

多因素处理对云南重楼及其多芽品系种子萌发的影响

张绍山¹, 刘璇¹, 王景富¹, 余孟杰¹, 黄钟杰¹, 刘圆^{2*}, 张浩^{3*}

1. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

2. 西南民族大学民族医药研究院, 四川 成都 610041

3. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041

摘要:目的 探讨温度、内源激素、授粉方式等条件对云南重楼及其多芽品系种子萌发和出苗的影响进行研究, 建立促进云南重楼种子萌发技术体系, 为重楼种子育苗提供科学指导, 缓解目前重楼优质种源严重不足、商品药材严重供不应求、市场价格高居不下的瓶颈问题。**方法** 采用湿沙培养各条件下处理过的云南重楼种子, 测定发芽率和平均发芽时间, 并将催芽后的种子播种于大田, 考察出苗率、平均出苗时间。**结果** 经 4~18 ℃变温湿沙培养处理的重楼种子获得了较高的发芽率和出苗率; 赤霉素处理能促进云南重楼种子的萌发, 缩短平均发芽时间, 100、200 mg/L 赤霉素处理效果较好; 人工授粉的种子发芽率和出苗率显著高于自然授粉的种子 ($P < 0.05$); 云南重楼及其多芽品系间发芽率和出苗率无明显差别。**结论** 将除去外种皮的人工授粉的种子用 100 mg/L 赤霉素处理, 经 4~18 ℃变温湿沙培养至萌芽, 萌芽种子播种于大田, 可缩短云南重楼种子的出苗周期 1 年, 获得高达 80% 以上的出苗率。

关键词: 云南重楼; 多芽品系; 温度; 赤霉素; 授粉方式; 出苗率

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)10-2111-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.10.029

Effect of multiple factors on seeds germination of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and polygerm varieties

ZHANG Shao-shan¹, LIU Xuan¹, WANG Jing-fu¹, YU Meng-jie¹, HUANG Zhong-jie¹, LIU Yuan², ZHANG Hao³

1. School of Pharmacy, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

2. Ethnic Medicine Institute, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

3. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, 610041, China

Abstract: Objective To explore the impacts of temperature, endogenous hormone, and pollination methods on the seeds germination and emergence of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and polygerm varieties, and establish the technical system to promote the germination of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* seeds and provide scientific guidance for the cultivation of *Paris* L., To ease the bottleneck problem of current serious shortage of high quality source of seeding material and commercial herbal products of *Paris* L., and highest market price. **Methods** Using wet sand cultured *P. polyphylla* var. *yunnanensis* seeds under different conditions and determined the rate of germination and the mean germination time, the cultivated seeds were planted in the field to investigate the rate of seedling emergence and the average time of emergence. **Results** The higher germination rate and emergence rate were obtained at the temperature of 4—18 ℃; Gibberellin (GA₃) treatment could promote the seed germination, and reduce the mean germination time, especially in 100 and 200 mg/L; The germination rate and emergence rate of artificial pollination were significantly higher than natural pollination ($P < 0.05$); There is no difference between *P. polyphylla* var. *yunnanensis* and polygerm varieties seeds. **Conclusion** The peeled seeds are treated by 100 mg/L gibberellin, and cultured to sprout by wet sand at the temperature of 4—18 ℃, then sown in the field. It can shorten the seed emergence period one year and up to more than 80% of emergence rate.

Key words: *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz.; polygerm varieties; temperature; gibberellin; pollination mode; emergence rate

收稿日期: 2016-12-22

基金项目: 四川省科技支撑计划 (2016FZ0045); 四川省重点技术创新项目计划 (2014XM041); 阿坝州应用技术与开发资金 (2015)

作者简介: 张绍山 (1990—), 男, 云南腾冲人, 硕士研究生, 主要从事民族药物研究。Tel: 13880684249 E-mail: 1007354550@qq.com

*通信作者 刘圆, 博士, 教授, 博士生导师, 从事少数民族药物的研究和教学。Tel: 13808091609 E-mail: 499769896@qq.com

张浩, 硕士, 教授, 博士生导师, 从事药植物的研究和教学。Tel: 13709055858 E-mail: zhanghxx@vip.sina.com

云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 为历版《中国药典》2015 年收载的重楼药材的基源植物之一^[1]。云南重楼可采用根茎或种子进行繁殖，根茎繁殖技术虽简单成熟，但需消耗大量种源，难以满足市场需求，种子繁殖具有繁殖系数大、生产成本低等优点，但其存在二次休眠，在自然情况下需要两冬一夏才能出土成苗，15 个月的出苗率仅为 46.2%^[2]。2005 年以来重楼价格一路攀升，不同行业的企业家、农民等，纷纷投资于重楼栽培，但人工种植目前尚无优质、稳定的种源供给市场，已经成为制约重楼制药产业可持续发展的瓶颈^[3]。多芽品系是一类具有典型的云南重楼植物学特征的新品系，如花瓣上部狭匙形，药隔凸出明显等^[4]，但其具有众多丛生芽，每个芽可作为栽培材料，因此，可快速繁殖和显著增产。

已有研究成果^[5-7]说明云南重楼种子的萌发受到多种激素、温度等的调控，揭示了激素、温度调节等促进其萌发过程中的作用；徐文娟等^[8]深层次研究了各激素的控制基因在种子萌发过程中的表达水平。破除其休眠虽有较多文献报道，但没有成体系地应用到云南重楼的种植生产环节，因此建立一套系统的种子萌发技术才是目前解决重楼种源的有效途径。课题组从事长达 20 年的重楼资源调查和规模化种植重楼的过程中发现，不同的授粉方式对果实的饱满程度和果实产量具有明显影响，而果实的饱满程度又显著影响种子的萌发，因此本研究首次对人工授粉和自然授粉的云南重楼种子萌发力进行对比研究；对近年来新发现的云南重楼（多芽品系）与普通云南重楼的种子萌发力进行对比研究，以期对云南重楼及其多芽品系重楼的种苗繁育提供科学指导，缓解目前重楼优质种源严重不足，商品药材严重供不应求，市场价格高居不下的瓶颈问题。

1 材料和方法

1.1 仪器和材料

智能人工气候箱 RTOP-2689（浙江托普仪器有限公司）；容声冰箱 BCD-563WY-C（海信科龙电器股份有限公司）。

云南重楼及其多芽品系成熟果实 2015 年采自云南省丽江市华坪县和腾冲市重楼种植基地，经西南民族大学刘圆教授和四川大学张浩教授鉴定为百合科 (Liliaceae) 云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 的果实，分别为

人工授粉的云南重楼及其多芽品系果实、自然授粉的云南重楼及其多芽品系果实。

1.2 云南重楼及其多芽品系种子的萌发

1.2.1 种子处理 将种子分别按大果 ($m \geq 20$ g)、中果 ($10 \text{ g} < m < 20 \text{ g}$)、小果 ($m \leq 10 \text{ g}$) 划分等级（每个等级 10 个鲜果），计算平均单果种子粒数、千粒种子均质量、千粒去皮种子均质量，并按照国标农作物种子检验规程中“水分测定 (GB/T 3543.6-1995)”和“净度分析 (GB/T 3534.3-1995)”项下测定种子水分和净度。

1.2.2 变温培养、种子萌发及种子播种处理 目前，云南重楼（多芽品系）成为重楼种植的首选材料，但对其种子萌发研究尚未报道，此外，为避免授粉方式等因素对实验结果的影响，若不特殊说明，实验均采用人工授粉的云南重楼（多芽品系）种子。将云南重楼（多芽品系，人工授粉）种子除去外种皮，于 100 mg/L 赤霉素 (GA_3) 中浸泡 24 h，晾干水分。放入盛有灭菌湿沙的发芽盒中，每隔 2 cm 湿沙放一层种子，50 粒种子/层，4 层/盒，每个发芽盒均按此操作。

4~18 °C 变温培养操作如下：将发芽盒中云南重楼种子先于 4 °C 冰箱中培养 60 d，转入 18 °C 气候箱中培养，每隔 5 d 用灭菌的镊子翻动一次，保持细沙潮湿，设置 3 组重复。

每隔 2 d 记录 1 次发芽情况，当胚根长度约为种子直径的一半时视为种子发芽。

发芽率 = 萌发的种子总数 / 200

平均发芽时间 = $\sum(t_i \times n_i) / \sum n_i$

t_i 表示从实验开始的天数， n_i 表示每天发芽的种子数

将培养后的种子直接播种于长 5 m，宽 1.2 m，高 25 cm 的墒面上，覆盖一层 0.5 cm 厚的腐叶土，并搭建遮阳网 (75%)，手工拔除杂草，注意防止积水、干旱以及病虫害。每隔 2 d 统计 1 次出苗情况，连续记录 140 d。

出苗率 = 出苗的种子总数 / 200

平均出苗时间 = $\sum(t_i \times n_i) / \sum n_i$

t_i 表示从播种开始的天数， n_i 表示每天出苗的种子数

1.2.3 温度对种子萌发的影响 根据文献研究发现重楼种子在自然环境中低温休眠和 20 °C 左右发育程度最高^[6]，再结合自然状态下重楼种子经两冬一夏萌发的规律，考察 4、18、4~18 °C 3 种温度对云南重楼种子萌发的影响。将去皮云南重楼（多芽品系，人工授粉）种子分为 3 组，4 °C 和 18 °C 组

分别置于冰箱中和气候箱中培养 130 d, 4~18 ℃ 组按“1.2.2”项下变温培养条件处理。其余均按“1.2.2”项下操作。

1.2.4 GA₃ 质量浓度对种子萌发的影响 设置 0、100、200、500 mg/L 4 种 GA₃ 质量浓度, 将去皮的云南重楼(多芽品系, 人工授粉)种子在相应质量浓度的 GA₃ 溶液中浸泡 24 h。其余均按“1.2.2”项下操作。

1.2.5 授粉方式对种子萌发的影响 将人工授粉和自然授粉的云南重楼(多芽品系)种子分别按照

“1.2.2”项下的步骤操作。

1.2.6 云南重楼及多芽品系种子萌发对比 将人工授粉的云南重楼及其多芽品系种子按照“1.2.2”项下的步骤操作。

1.3 数据分析

除种子参数计算外, 所有数据均采用 SPSS 统计软件进行单因数方差和独立样本 *t* 检验。

2 结果和分析

2.1 种子各参数对比

云南重楼及多芽品系种子各参数计算结果见表 1。

表 1 种子各参数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Comparison of seeds indexes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

来源	大果:中果:小果	10 个鲜果 均质量/g	平均单果 种子粒数	种子千粒 均质量/g	去皮种子千粒 均质量/g	种子水分/%	种子净度/%
云南重楼(多芽品系, 自然授粉)	1:4:6	105.9	98.0	74.9	41.4	67.6	98.5
云南重楼(多芽品系, 人工授粉)	3:7:1	119.6	118.4	94.5	54.1	65.9	99.2
云南重楼(自然授粉)	1:4:5	102.4	92.6	78.5	43.8	70.3	96.2
云南重楼(人工授粉)	2:8:1	110.4	106.0	93.6	51.6	69.4	97.9

云南重楼及多芽品系种子间各参数并无明显的差异。人工授粉果实较自然授粉果实主要有以下区别:(1)与自然授粉比较, 人工授粉果实更加均匀, 大果和中果的比例显著增加;(2)人工授粉单果质量、种子数、种子千粒质量明显高于自然授粉, 水分低于自然授粉。

2.2 温度处理对种子萌发的影响

云南重楼(多芽品系, 人工授粉)种子各温度条件下培养的结果见表 2。种子在 4 ℃ 培养 130 d 均无萌发, 播种后 140 d 均无出苗, 因其发芽率和出苗率均为 0, 故 4 ℃ 温度培养结果不做统计学分析。18 ℃ 培养 52 d 后种子开始萌发, 播种后 90 d 种子开始出苗, 开始出苗后的 30 d 内为出苗高峰期。

经 4 ℃ 培养 60 d, 再转入 18 ℃ 培养 40 d 后种子开始萌发, 播种后 85 d 种子开始出苗, 出苗高峰期也是开始出苗后的 30 d 内。

温度处理对云南重楼(多芽品系)种子的萌发有极显著的作用 ($P < 0.001$), 18 ℃ 处理的发芽率为 40.50%, 而 4~18 ℃ 变温处理的发芽率高达 91.50%; 对种子的平均发芽时间也有极显著的影响 ($P < 0.001$), 4~18 ℃ 变温处理的平均发芽时间(112.33 d)显著高于 18 ℃ 处理的(60.67 d) ($P < 0.001$)。温度处理对云南重楼(多芽品系)种子出苗率有显著的影响 ($P < 0.001$), 4~18 ℃ 变温处理的出苗率(83.26%)显著高于 18 ℃ 处理的(32.40%); 对种子平均出苗时间的影响没有达到显著差异水平。

表 2 温度对种子萌发的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of temperature on seed germination ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

温度/℃	状态	发芽率/%	平均发芽时间/d	出苗率/%	平均出苗时间/d
18	恒温	40.50 ± 2.65*	60.67 ± 3.01*	32.40 ± 2.96*	116.07 ± 1.39
4~18	变温	91.50 ± 1.36	112.33 ± 1.82	83.26 ± 1.94	109.67 ± 2.00

*18 ℃ 恒温与 4~18 ℃ 变温相比: $P < 0.05$

*indicates the comparison between 18 ℃ and 4—18℃, $P < 0.05$

2.3 授粉方式对种子萌发的影响

云南重楼(多芽品系)人工授粉与自然授粉种子的培养结果见表 3 和图 1。授粉方式对种子发芽率有显著的影响 ($P = 0.001$), 人工授粉的种子发芽率(92.50%)显著高于自然授粉的(70.50%); 对种子平

均发芽时间的影响没有达到显著性水平。授粉方式对种子的出苗率有极显著的影响 ($P < 0.001$), 人工授粉的种子出苗率(84.88%)显著高于自然授粉的(62.04%); 对种子的平均出苗时间无明显影响。此外, 人工授粉的发芽种子胚根明显长于自然授粉的。

表 3 不同授粉方式种子萌发结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Seed germination results of different pollination methods ($\bar{x} \pm s, n=3$)

授粉方式	发芽率/%	平均发芽时间/d	出苗率/%	平均出苗时间/d
自然授粉	70.50±2.04*	118.00±1.36	62.04±1.71*	110.50±1.41
人工授粉	90.50±1.24	112.00±2.44	84.88±1.45	108.67±2.57

*自然授粉与人工授粉相比: $P<0.05$ * indicates that the comparison between natural pollination and artificial pollination, $P<0.05$ 

人工授粉

自然授粉

图 1 云南重楼 (多芽品系) 幼苗图

Fig. 1 Seedling of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* (polygerm varieties)

2.4 GA₃ 质量浓度对种子萌发的影响

GA₃ 处理对云南重楼 (多芽品系, 人工授粉) 种子的发芽率有极显著的促进作用 ($P=0.001$), 随

GA₃ 质量浓度的升高发芽率先升后降, 空白组的发芽率最低 (79.84%), 200 mg/L GA₃ 组获得了最高发芽率 (93.50%), 显著高于空白组 ($P<0.001$) 和 500 mg/L GA₃ 组 ($P<0.05$), 但与 100 mg/L GA₃ 组的差异没有达到显著性水平; 对种子的平均发芽时间也有显著影响 ($P<0.05$), 随 GA₃ 质量浓度的升高平均发芽时间缩短, 但空白组、100 mg/L 和 200 mg/L GA₃ 组间的差异并没有达到显著性水平。GA₃ 处理对种子的出苗率有显著影响 ($P<0.05$), 影响趋势与对发芽率的影响相一致; 对种子的平均出苗时间无明显影响。结果见表 4。

2.5 比较云南重楼及其多芽品系种子萌发

人工授粉的云南重楼及多芽品系种子的培养结果见表 5。二者的种子发芽率、平均发芽时间、出苗率和平均出苗时间均无显著差异。

表 4 GA₃ 质量浓度对种子萌发的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Effect of GA₃ on seed germination ($\bar{x} \pm s, n=3$)

GA ₃ /(mg·L ⁻¹)	发芽率/%	平均发芽时间/d	出苗率/%	平均出苗时间/d
空白组	79.84±1.16 a	114.00±1.82 a	72.65±1.27 a	109.33±2.46
100	91.50±1.52 b	110.67±2.43 a	83.18±1.97 b	112.00±2.06
200	93.50±0.78 b	109.33±2.68 a	84.15±2.34 b	108.00±0.80
500	85.50±1.98 a	102.00±0.70 b	75.24±2.98 a	114.67±1.41

不同的字母表示用 LSD 检验在检验水准 $\alpha=0.05$ 上存在显著性差异Different letters indicates that there is a significant difference at $\alpha=0.05$, according to LSD test表 5 云南重楼及其多芽品系种子萌发对比 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 Comparison on seed germination between *P. polyphylla* var. *yunnanensis* and polygerm varieties ($\bar{x} \pm s, n=3$)

品种	发芽率/%	平均发芽时间/d	出苗率/%	平均出苗时间/d
云南重楼	90.73±1.24	112.33±1.76	84.42±1.58	108.50±2.49
云南重楼 (多芽品系)	89.94±1.34	109.32±2.56	82.14±1.07	111.51±2.06

3 讨论

陈疏影等^[5]和孟凡蕴等^[9]研究表明云南重楼种子在 18~20 ℃ 培养最快 43 d 就可萌发, 云南重楼种子发育过程中胚的变化与 GA₃ 量正相关。本实验在云南重楼及其多芽品系也得出基本一致的结论: GA₃ 处理的种子在 18 ℃ 培养 52 d 后开始萌发。因

为种子萌发初期, GA₃ 促进胚乳的贮藏, 物质转为可利用状态, 供给胚用于细胞分裂和伸长^[10], 而高温培养有助于胚中 GA₃ 的合成。但经 4~18 ℃ 变温培养可获得高达 91.50% 的发芽率和 83.26% 的出苗率, 可能是因为重楼的生长环境长期低温, 特别是种子成熟后就进入严寒的冬季, 因此短期的低温培

养为种胚的发育提供了过渡期。

外种皮在维持种子休眠中起着重要作用^[11], 新鲜的云南重楼及其多芽品系的种子有红色多汁的假种皮, 里面可能含有抑制物质或阻止了种子内萌发抑制物质的溢出。人工授粉的云南重楼及其多芽品系的果实比自然授粉的更加饱满, 单果种子数较多, 在有限的子房空间里彼此较拥挤, 以致假种皮较薄, 因此假种皮里可能含有的抑制物较少且有利于种子内萌发抑制物的渗出; 人工授粉的种子水分低于自然授粉的, 说明人工授粉的种子种胚比重较高, 发育可能更加成熟。上述因素可能是导致人工授粉的云南重楼及其多芽品系的种子发芽率和出苗率显著高于自然授粉的原因。云南重楼与其多芽品系的种子萌发和出苗结果并无显著差异, 二者的种子各参数亦无明显差别, 这说明二者间除外观形态有差异外, 可能并不存在内在的特征差异。

结合本研究结果和生产成本, 云南重楼及其多芽品系花粉成熟后, 采用人工授粉, 种子成熟后搓去外种皮, 用 100 mg/L GA₃ 溶液浸泡 24 h, 先于 4 °C 下培养 60 d, 转入 18~20 °C 培养至发芽, 培养过程注意沙子湿度和空气流通, 发芽种子播种于苗床, 覆盖一层 0.5 cm 厚的腐叶土, 第 2 年可实现 80% 以上的出苗。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 张旺凡, 沈素贞, 梁文斌, 等. 七叶一枝花种子萌发

特性研究 [J]. 中国野生植物资源, 2013, 32(5): 16-20.

- [3] 李 恒, 苏 豹, 张兆云, 等. 中国重楼资源现状评价及其种植业的发展对策 [J]. 西部林业科学, 2015, 44(3): 1-7.
- [4] 李 恒. 重楼属植物 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1998.
- [5] 陈疏影, 尹品训, 杨艳琼, 等. 变温培养对解除滇重楼种子休眠及其内源激素变化的研究 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 793-795.
- [6] 黄 玮, 孟繁蕴, 张文生, 等. 滇重楼种子休眠机理研究 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(12): 242-246.
- [7] 李海峰, 赵 昱, 袁朗白, 等. 滇重楼种子休眠破除及植株形态发生的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 161-164.
- [8] 徐文娟, 李先恩, 孙 鹏, 等. 滇重楼种子培养后脱落酸和赤霉素相关基因表达水平的研究 [J]. 中草药, 2013, 44(3): 338-343.
- [9] 孟繁蕴, 汪丽娅, 张文生, 等. 滇重楼种胚休眠和发育过程中内源激素变化的研究 [J]. 中医药学报, 2006, 34(4): 36-38.
- [10] Beaudoin N, Serizet C, Gosti F, *et al.* Interaction between abscisic acid and ethylene signaling cascades [J]. *Plant Cell*, 2000, 12(7): 1103-1115.
- [11] Zhou L, Wu J, Wang S. Low-temperature stratification strategies and growth regulators for rapid induction of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* seed germination [J]. *Plant Growth Regul*, 2003, 41(2): 179-183.