

3种冬青属植物种子解休眠过程中的生理变化

张蕊¹, 王秀花¹, 章建红², 周志春¹

(1. 中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 浙江省宁波市农业科学研究院, 浙江 宁波 315040)

摘要: 选择具有长期休眠特性的3种冬青属 *Ilex* 树种铁冬青 *Ilex rotunda*, 冬青 *Ilex chinensis* 和全缘冬青 *Ilex integra* 种子, 以无休眠的小果冬青 *Ilex micrococca* 种子为对照, 开展低温层积过程中种子内含物质量分数、酶活性和内源激素质量分数等生理变化研究, 以揭示冬青属种子休眠的可能生理机制。测定结果表明, 铁冬青、冬青和全缘冬青种子在低温层积过程中代谢活跃, 脂肪质量分数不断下降, 淀粉和还原糖质量分数明显增加; 过氧化物酶(POD)活性显著增强, 而过氧化氢酶(CAT)活性明显降低; 脱落酸(ABA)质量分数大幅降低, 赤霉素(GA₃), 生长素(IAA)和玉米素核苷(ZR)质量分数及与 ABA 的比值均呈现出不同程度的增长趋势。低温层积前后的比较发现, 铁冬青、冬青和全缘冬青种子 ABA 质量分数由层积前高于到层积后低于小果冬青, 而 GA₃/ABA 比值从层积前低于到层积后高于小果冬青, 这可能是解除其种子休眠的原因之一。测定结果还发现铁冬青和冬青种子在解休眠过程中生理变化较为一致, 而与全缘冬青则有一定差异, 这与铁冬青和冬青两者亲缘关系较近有关。图 1 表 2 参 13

关键词: 森林生物学; 铁冬青; 冬青; 全缘冬青; 种子; 解除休眠; 生理机制

中图分类号: S718.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2010)04-0524-05

Physiological seed changes in three *Ilex* species during seed dormancy-breaking

ZHANG Rui¹, WANG Xiu-hua¹, ZHANG Jian-hong², ZHOU Zhi-chun¹

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, The Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China; 2. Ningbo Agriculture Academy, Ningbo 315040, Zhejiang, China)

Abstract: Three *Ilex* species: *Ilex rotunda*, *I. chinensis*, and *I. integra*, were compared with *I. micrococca* (a control which did not have deep dormancy), for physiological responses to seed dormancy-breaking. The medicinal components, hormones, and enzyme activities were measured during stratification. Results showed that compared to the control there was an active metabolism in seeds of the three *Ilex* plants with lipid content decreasing, while starches and reduced sugars increased. Catalase (CAT) activity decreased; peroxidase(POD) activity increased; and abscisic acid (ABA) content decreased. Ratios of gibberellic acid (GA₃)/ABA, indole-acetic acid (IAA)/ABA, and zeatin-riboside (ZR)/ABA increased. Before stratification ABA in *I. rotunda*, *I. chinensis*, and *I. integra* was higher than *I. micrococca*, but after stratification it was lower. Also, before stratification GA₃/ABA in *I. rotunda*, *I. chinensis*, and *I. integra* was lower than the control but higher after stratification. Additionally, compared to *I. micrococca*, *I. rotunda* and *I. chinensis* had similar characteristics. [Ch, 1 fig. 2 tab. 13 ref.]

Key words: forest biology; *Ilex rotunda*; *Ilex chinensis*; *Ilex integra*; seed; dormancy-breaking; physiological mechanism

冬青属 *Ilex* 植物隶属于冬青科 Aquifoliaceae, 多为常绿树种, 具有适应性强, 观赏性好, 耐修剪

收稿日期: 2009-07-10; 修回日期: 2009-09-21

基金项目: 浙江省宁波市科技局资助项目(2006C100003)

作者简介: 张蕊, 助理研究员, 硕士, 从事珍贵用材树种的育种和栽培技术研究。E-mail: nurui0218@126.com

等优良特点, 是一类极具潜力的乡土观果木本植物而日益受到人们的重视, 但是多数冬青属植物的种子具有休眠特性而影响其快速繁育。其休眠期长短因种而异, 如大叶冬青 *Ilex latifolia* 种子的休眠期长达 3 a, 小果冬青 *I. micrococca* 和榕叶冬青 *I. ficoidea* 种子的休眠期则较短, 秋季采集的种子于翌年春播种即可正常发芽^[1]。现在, 多数学者认为冬青科植物种子属于综合性休眠^[2-4], 但相关机理研究还较少。如 Anita 等^[5]研究证实了一些冬青属植物的果实成熟时种胚尚未发育完全, 推断种胚形态发育不完全而需生理后熟是引起一些冬青属植物种子休眠的主要原因。王宁等^[6]认为大叶冬青和短梗冬青 *I. buergeri* 种子的休眠是因其种皮坚硬, 表面覆盖蜡质, 种子透气透水性差之故。笔者选择铁冬青 *I. rotunda*, 冬青 *I. chinensis* 和全缘冬青 *I. integra* 3 种具有长期休眠(2 ~ 3 a)特性的冬青属植物种子, 并以具短期休眠特性的小果冬青种子为对照, 研究其在长期低温层积处理时的解休眠过程中储藏物质(脂肪、可溶性糖、淀粉)、酶类物质[过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)]活性变化及生长素(IAA), 赤霉素(GA₃), 脱落酸(ABA)和玉米素核苷(ZR)等激素的变化, 以揭示铁冬青、冬青和全缘冬青种子休眠的生理机制, 为打破其种子休眠提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 试验种子采集和处理

铁冬青、冬青和全缘冬青的试验种子于 2006 年秋天采集自浙江省宁波市。采集的核果用水浸渍 2 ~ 3 d, 待果肉充分软熟后搓擦, 淘洗, 除去杂质后每果实可得到种子 4 ~ 6 粒。种子阴干后及时于 0~5 °C 下进行低温层积。从低温层积后的第 5 个月开始, 隔 5 个月 1 次, 共 4 次测试种子储藏物质和激素质量分数及酶类物质的活性。小果冬青种子则于 2007 年秋天采集以作为参照, 于发芽前(低温层积后第 5 个月)进行 1 次测试分析。重复测试 3 次·次⁻¹。铁冬青、冬青、全缘冬青和小果冬青种子的长宽比分别为 3.28, 3.63, 2.27, 1.83, 千粒质量分别为 3.27, 6.99, 19.38 和 0.40 g。

1.2 种子储藏物质和激素质量分数及酶活性测定方法

解休眠过程中, 冬青种子脂肪质量分数用索氏抽提法测定, 淀粉和还原糖质量分数用蒽酮法测定^[7]; 种子 POD 活性用愈创木酚比色法测定^[8], CAT 活性参照比色法^[9]测定并略作调整, 分别以 470 nm 和 240 nm 波长下, 1 min 变化 0.01 个吸光度值为 1 个酶活性单位, 用 U·g⁻¹ 表示, 再根据 1 U = 16.67 nkat, 对酶活性进行换算。冬青种子中 IAA, GA₃, ABA 和 ZR 等激素质量分数委托中国农业大学作物化学控制研究中心采用酶联免疫法测定。

2 结果与分析

2.1 解休眠过程中冬青种子脂肪、淀粉等储藏物质质量分数变化

从表 1 可以看出, 3 种具休眠特性的冬青种子在解休眠过程中脂肪质量分数不断下降, 其中以前 15 个月降幅较大, 第 15 ~ 20 个月降幅趋缓。冬青和全缘冬青种子脂肪质量分数分别降低了 24.07% 和 35.15%, 而铁冬青降低幅度较小, 为 17.39%。铁冬青和冬青种子在低温层积后第 5 个月的脂肪质量分数分别为 185.7 和 230.6 mg·g⁻¹, 均高于对照小果冬青测定值(176.6 mg·g⁻¹), 而全缘冬青测定值略低, 为 147.8 mg·g⁻¹。随着解休眠时间的推移, 种子脂肪质量分数逐渐下降, 第 15 个月时铁冬青种子脂肪降至 156.2 mg·g⁻¹, 至第 20 个月时铁冬青、冬青和全缘冬青种子的脂肪质量分数均低于小果冬青, 分别为 153.4, 175.1 和 95.8 mg·g⁻¹。

铁冬青和冬青种子在解休眠过程中淀粉质量分数呈现先增长, 后下降, 再增长的趋势, 而全缘冬青则表现为持续增长。比较发现, 冬青和全缘冬青种子淀粉质量分数增幅较大, 分别为 58.26% 和 75.53%, 铁冬青增幅相对小, 为 37.05%, 但三者的淀粉质量分数均显著地高于小果冬青(40.5 mg·g⁻¹)。与小果冬青比较, 铁冬青种子中还原糖质量分数平均值(21.0 mg·g⁻¹)较高, 冬青和全缘冬青种子中还原糖(17.5 和 11.8 mg·g⁻¹)较低。然而, 试验却发现 3 种冬青种子中还原糖皆呈现随低温层积时间的增长而增加的趋势。在低温层积后第 5 个月时 3 种具休眠特性的冬青种子其还原糖质量分数均低于小果冬青测定值或与其相近, 铁冬青、冬青种子还原糖在第 10 ~ 15 个月时显著增加, 到 15 个月时分别

表1 解休眠过程中冬青属植物种子主要储藏物质变化

Table 1 Contents of main storage material in the three *Ilex* species' seeds during stratification

低温层积 时间/月	铁冬青/(mg·g ⁻¹)			冬青/(mg·g ⁻¹)			全缘冬青/(mg·g ⁻¹)			小果冬青/(mg·g ⁻¹)		
	脂肪	淀粉	还原糖	脂肪	淀粉	还原糖	脂肪	淀粉	还原糖	脂肪	淀粉	还原糖
5	185.7	65.4	18.7	230.6	58.1	15.2	147.8	54.0	11.1	176.6	40.5	18.6
10	181.4	81.9	19.8	203.3	77.7	15.9	130.5	65.8	11.3	—	—	—
15	156.2	61.5	22.5	187.2	56.8	19.5	91.1	75.9	11.6	—	—	—
20	153.4	89.7	23.0	175.1	92.0	19.6	95.8	94.8	13.1	—	—	—
平均	169.2	74.6	21.0	199.1	71.2	17.5	116.5	72.6	11.8	176.6	40.5	18.6

增长了20.3%和28.3%，之后增长平缓；全缘冬青种子还原糖从5个月开始到第15个月，增长缓慢，在15个月以后则明显增长。从上推测，3种具休眠特性冬青属植物种子在解休眠过程中，能量代谢上的变化在一定程度上说明休眠的种子开始并不具备萌发所必需的能量，经过了一定时期的低温层积，种子各储藏物质成分发生了变化，最终形成种子萌发所必需的能量体系。

2.2 解休眠过程中冬青属植物种子 POD 和 CAT 活性变化

4种冬青属种子 POD 活性差异很大，其中冬青种子 POD 活性最强，平均为 6 759.94 nkat·g⁻¹，铁冬青次之，平均为 974.70 nkat·g⁻¹，全缘冬青和小果冬青种子 POD 活性很低，平均分别为 19.21 nkat·g⁻¹ 和 36.34 nkat·g⁻¹。然而试验却发现，3种具休眠特性冬青种子其 POD 活性在解休眠过程中皆呈现大幅增长趋势，其中铁冬青种子 POD 活性增加了 579.18%，全缘冬青和冬青种子 POD 活性分别增加了 47.37%和 21.41%。与 POD 活性不同的是，铁冬青、冬青和全缘冬青种子的 CAT 活性不仅较高，而且其在解休眠过程中均呈降低的趋势，降幅分别为 26.74%，36.99%和 36.12%。

表2 解休眠过程中冬青属植物种子过氧化物酶和过氧化氢酶活性变化

Table 2 Activity of POD and CAT in the three *Ilex* species seeds' during stratification

低温层积时间/月	铁冬青/(nkat·g ⁻¹)		冬青/(nkat·g ⁻¹)		全缘冬青/(nkat·g ⁻¹)		小果冬青/(nkat·g ⁻¹)	
	POD	CAT	POD	CAT	POD	CAT	POD	CAT
5	245.05	2 795.73	6 151.23	7 732.55	15.84	1 640.33	36.34	3 795.93
10	691.97	2 514.84	6 475.96	6 861.37	18.17	1 390.28	—	—
15	1 297.43	2 400.48	6 944.39	6 310.76	19.50	1 178.07	—	—
20	1 664.33	2 048.08	7 468.16	4 872.47	23.34	1 047.88	—	—
平均	974.70	2 439.78	6 759.94	6 444.29	19.21	1 314.14	36.34	3 795.93

2.3 解休眠过程中冬青属植物种子内源激素质量分数和比例的变化

测试结果表明(图1)，3种冬青属种子解休眠过程中 ABA 质量分数明显降低，而 GA₃、IAA 和 ZR 等3种激素质量分数均呈现出不同程度的增长趋势，这可能是冬青属种子解休眠的一个主要原因。在低温层积至5个月时铁冬青、冬青和全缘冬青种子 ABA 质量分数分别为 78.43，83.13 和 77.64 ng·g⁻¹，均高于没有长期休眠特性的小果冬青(76.33 ng·g⁻¹)，但至20个月时3种种子的 ABA 分别降低了 23.49%，9.53%和 18.84%，分别降至 60.00，75.21 和 63.01 ng·g⁻¹，皆已低于没有长期休眠特性的小果冬青。铁冬青、冬青和全缘冬青种子从低温层积5个月至第20个月时其 GA₃ 质量分数分别增长了 18.02%，32.65%和 11.03%，IAA 质量分数分别增长了 22.69%，86.55%和 30.27%，ZR 质量分数分别增长了 32.82%，75.77%和 53.39%。从3种激素质量分数的增幅来看，以 ZR 变化幅度最大，GA₃ 变化幅度最小。此外，铁冬青、冬青和全缘冬青种子中低温层积解休眠过程中其 GA₃/ABA，IAA/ABA 和 ZR/ABA 也均呈现不同程度的增长趋势。

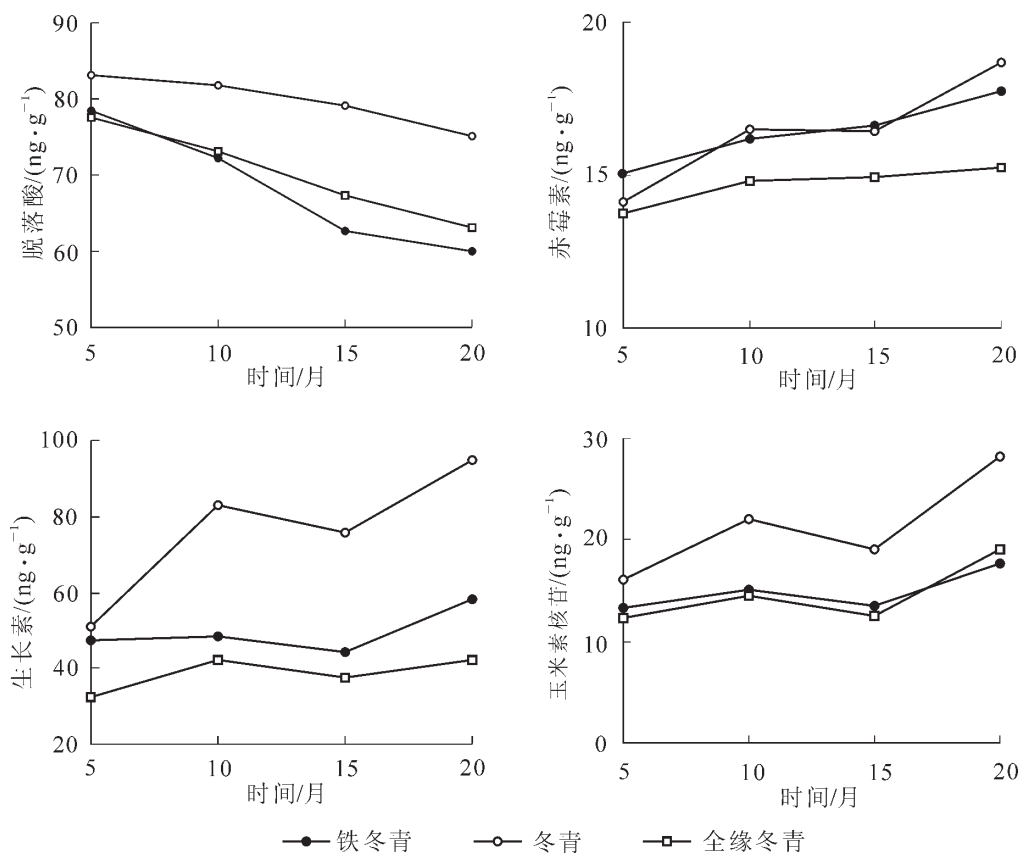


图 1 3 种冬青种子解休眠过程中脱落酸、赤霉素、生长素和玉米素核苷的变化

Figure 1 Change of ABA, GA₃, IAA, ZR contents in the three *Ilex* species' seeds during stratification

3 结论与讨论

已有研究认为, 冬青属植物种子坚硬致密的种皮透气性较差, 存在机械障碍和种皮中具有抑制萌发物质等是冬青属种子休眠的主要因素^[3-4,6], 但这些研究较少涉及冬青属植物种子解休眠过程的生理变化。本研究结果表明, 在解休眠过程中冬青属种子的主要内含物质量分数变化总体上较为一致, 均表现出脂肪减少, 淀粉增加, 还原糖增长的趋势。由此初步可见, 在冬青属种子解休眠过程中, 脂肪代谢一部分转化为淀粉, 同时淀粉分解为还原糖, 提供种子萌发所必需的能量。通过比较发现, 铁冬青和冬青种子的主要内含物质量分数变化趋势比较一致, 而与全缘冬青则有较大差异。在解休眠过程中全缘冬青种子淀粉质量分数增长较快, 但还原糖增长却较慢, 说明脂肪和淀粉并没有大量的转化为糖类, 而可能在相应酶的作用下转化合成为其他物质参与胚的生长。

冬青属种子在低温层积过程中, 其过氧化物酶(POD)活性逐渐提高, 加速了戊糖磷酸途径的运转, 使铁冬青、冬青和全缘冬青种子逐渐由休眠转向萌发, 这类似于郭明军等^[10]的研究结果。4 种冬青属种子 POD 活性的大小依次为冬青>铁冬青>小果冬青>全缘冬青, 其增加的幅度以铁冬青最大, 全缘冬青次之, 而冬青最小。过氧化氢酶(CAT)在植物体内主要催化过氧化氢分解为水和氧, 避免它对植物体的毒害作用。冬青属植物种子中 CAT 活性大小依次为冬青>小果冬青>铁冬青>全缘冬青, 变化幅度则与 POD 酶活性相反, 冬青最大, 全缘冬青次之, 铁冬青最小。与几乎无休眠过程的小果冬青比较, 全缘冬青种子在解休眠过程中代谢相对缓慢, 而铁冬青和冬青种子则较为活跃。因此单从酶活性角度来说, 其大小和变化并不是解除冬青属种子休眠的直接原因, 可能与其他因素相联系来解除种子的休眠。

种子休眠和萌发的调控不仅与内源激素的绝对含量有关, 而且与激素间的相互消涨也密切相关。试验结果表明, 在解休眠过程中冬青属种子 ABA 质量分数呈显著下降趋势, 而 GA₃ 质量分数及 GA₃/ABA 比值则呈显著增长趋势。在试验的 3 种冬青属植物种子中, 虽然全缘冬青的种子发芽较铁冬青

和冬青提早半个月左右,但其 GA_3/ABA 比值的增加量却相对较小,而铁冬青和冬青种子的 GA_3/ABA 比值却增加了 1.47 倍和 1.27 倍,这说明 ABA, GA_3 和 ABA 的交互作用是抑制冬青属种子发芽的主要原因,这与 Schmitz 等^[11]和 Sonia 等^[12]的研究一致。冬青属种子 IAA 质量分数、 IAA/GA_3 比值也都有增长的趋势,原因可能在于 GA_3 对 IAA 合成有调控作用, GA_3 可以降低 IAA 氧化酶活性,促进蛋白质水解以增加 IAA 合成前体(色氨酸),同时促进束缚态 IAA 转化为游离态 IAA。所以 GA_3 调控可增加种胚中 IAA 含量,从而促进胚细胞分化和伸长。在低温层积过程中 3 种冬青属种子内源激素间比值的变化存在同步性,4 类激素间比值出现明显的规律性变化,说明内源激素的变化与种子解休眠存在密切的关系。

研究还发现,小果冬青种子中淀粉,POD,ZR,ZR/ABA 的值和其他 3 种冬青属种子相比较低,如果按照其他 3 种冬青属种子的情况,则也应处于不萌发状态,但实际上它几乎没有休眠期,第 2 年春季直接播种就能萌发,这可能与种子小,种皮薄有关。铁冬青和冬青种子在解休眠过程中的生理变化趋势都较一致,而与全缘冬青差异较大。毛志滨等^[13]从 7 种冬青属植物耐低温比较研究中也发现了同样趋势,这从另一角度说明了铁冬青和冬青间亲缘关系较近,全缘冬青则属于另一分支。

参考文献:

- [1] 王良衍. 小果冬青栽培技术[J]. 林业实用技术, 2004 (12): 15 - 16.
WANG Liangyan. The cultivation technique of *Ilex micrococca* Maxim [J]. *Prat For Technol*, 2004 (12): 15 - 16.
- [2] 徐本美. 论木本植物种子休眠与萌发的研究方法[J]. 种子, 1995 (4): 56 - 58.
XU Benmei. The research method of seeds dormancy and germination in woody plants [J]. *Seed*, 1995 (4): 56 - 58.
- [3] 徐本美, 史晓华, 孙运涛, 等. 大果冬青种子的休眠与萌发初探[J]. 种子, 2002 (3): 1 - 2.
XU Benmei, SHI Xiaohua, SUN Yuntao, *et al.* Seeds dormancy and germination of *Ilex macrocarpa* [J]. *Seed*, 2002 (3): 1 - 2.
- [4] 何彦峰. 狭叶冬青种子休眠与萌发的研究[J]. 浙江林业科技, 2008, 28 (3): 63 - 65.
HE Yanfeng. Study on dormancy and germination of *Ilex fargesii* seed [J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 2008, 28 (3): 63 - 65.
- [5] ANITA C W T, RICHARD T C. Reproductive biology of the *Ilex* species (Aquifoliaceae) in Hong Kong, China [J]. *Can J Bot Ottawa*, 2005, 83 (12): 1645 - 1654.
- [6] 王宁, 吴军, 张桂菊, 等. 冬青种壳种皮透水性及种皮浸提液的生物鉴定[J]. 河南科学, 2006, 24 (4): 528 - 531.
WANG Ning, WU Jun, ZHANG Guiju, *et al.* Water absorption of holly seeds coats shell and the biotic measurement of seeds coats [J]. *Henan Sci*, 2006, 24 (4): 528 - 531.
- [7] 中国林业科学研究院分析中心. 现代实用仪器分析方法[M]. 北京: 中国林业出版社, 1993: 443 - 446.
- [8] 李合生. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 119 - 185.
- [9] JABLONSKY P P, ANDERSON J W. Light dependent reduction of dehydroascorbate by ruptured pea chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 1981, 67: 1239 - 1244.
- [10] 郭明军, 杨晓玲, 张培玉, 等. 山楂种子休眠与萌发生理研究()山楂种子 POD 活性及其同工酶的变化与休眠的关系[J]. 河北农业技术师范学院学报, 1997, 11 (3): 25 - 28.
GUO Mingjun, YANG Xiaoling, ZHANG Peiyu, *et al.* Study on dormancy and germination physiology of Hawthorn seed (). The relation among dormancy and POD activity and its isozyme in Hawthorn seeds [J]. *J Hebei Agrotech Teach Coll*, 1997, 11 (3): 25 - 28.
- [11] SCHMITZ N, ABRAMS S R, KEMOODE A R. Changes in ABA turnover and sensitivity that accompany dormancy termination of yellow-cedar (*Charaecyparis nootkatensis*) seeds [J]. *J Exp Bot*, 2002, 53 (366): 89 - 101.
- [12] SONIA A R, DENISE B, MARIE-HÉLÈNE W, *et al.* Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Planta*, 2004, 219 (6): 479 - 488.
- [13] 毛志滨, 谢晓金, 汤庚国. 7 种冬青树种耐低温能力比较[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2006, 30 (1): 33 - 36.
MAO Zhibin, XIE Xiaojin, TANG Gengguo. The comparison of low temperature tolerance ability of seven species of *Ilex* trees [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2006, 30 (1): 33 - 36.