

文章编号: 1000-5692(2007)02-0173-06

低温引发处理过程中三尖杉种子 生理变化及产地差异

焦月玲, 周志春, 金国庆, 李因刚

(中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要: 选用对低温引发处理反应差异显著的贵州黎平、福建明溪和四川盐源 3 个产地的三尖杉 *Cephalotaxus fortunei* 种子, 设置不同的低温引发处理, 研究它们在低温引发处理过程中的生理变化及产地差异。结果表明, 经低温引发处理后上述 3 个产地种子发芽率差异巨大, 分别为 30.86%, 9.90% 和 1.91%, 而在不同处理中则以 10 d 冷藏引发处理的种子发芽率较高。三尖杉种子在低温引发处理过程中代谢活跃, 脂肪和淀粉质量分数不断下降, 氨基酸质量分数大量增加, 过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性显著增强。低温引发处理效果较好的福建明溪产地种子, 其胚乳脱落酸(ABA)质量分数在处理前较高, 处理后则显著降低, 赤霉素(GA₃)/ABA 变化较小或略有提高, 这可能是解除该产地种子休眠的原因之一。四川盐源三尖杉种子在低温引发处理前胚乳 ABA 质量分数很低, GA₃/ABA 较高, 但不能发芽, 而在低温引发处理后种子胚乳 ABA 质量分数保持不变或有较大幅度的升高, 说明另有原因控制其种子的休眠。四川盐源三尖杉种子对低温引发处理反应较小, 应与它长期适应冬暖气候有关。此外, 福建明溪三尖杉种子直接沙藏种子发芽率较低似与种子胚乳 ABA 水平较高有关。表 5 参 8

关键词: 植物学; 三尖杉; 种子; 产地; 解除休眠; 低温引发处理; 生理机制

中图分类号: S718.43 **文献标志码:** A

三尖杉 *Cephalotaxus fortunei* 是我国特有珍稀濒危树种和重要的木本药用植物。我国首创的三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱抗癌药物, 就来源于三尖杉及同属的其他植物, 主要用于治疗急性白血病和恶性淋巴瘤, 同时还用于治疗黑素瘤、肺癌、乳腺癌和脑肿瘤等, 与阿霉素药联用治疗乳腺癌有效率达 94%^[1]。由于我国三尖杉天然资源稀少, 人工种植是解决三尖杉酯碱类提取原料短缺的主要途径。然而, 因三尖杉种子休眠时间长而难以打破, 影响其药用林的培育。三尖杉属植物种子兼具生理休眠和器质休眠的特性。易恩荣等^[2]认为, 种子内存在脱落酸(ABA)是造成籐子三尖杉 *C. olivar* 种子休眠的主要原因, 低温处理可促进种子提早萌发。李玉华等^[3]试验和生产实践证实, 三尖杉种子采收后即时低温引发处理和沙藏层积可显著提高种子的发芽率, 但对不同产地种子的解除休眠效果存在较大差异, 如在生产中低温引发处理难以打破四川盐源产地三尖杉种子的休眠。鉴于此, 作者选用福建明溪、贵州黎平和四川盐源 3 个产地的三尖杉种子, 研究低温引发处理过程中种子的生理变化, 揭示三

收稿日期: 2006-08-07; 修回日期: 2006-10-31

基金项目: 浙江省科学技术攻关项目(2005C32035)

作者简介: 焦月玲, 硕士, 从事林木种苗技术研究。E-mail: xiaoyudian421@163.com。通信作者: 周志春, 研究员, 博士, 博士生导师, 从事亚热带重要针阔叶用材树种育种和栽培技术等研究。E-mail: zezhou@fy.hz.zj.cn

尖杉种子解除休眠可能的生理机制及产地差异。

1 材料和方法

1.1 试验种子采集

三尖杉试验种子分别于2005年10月下旬采自福建明溪、贵州黎平和四川盐源3个产地的天然林分。种子采集后即在当地搓去紫黑色假种皮,清洗干净并阴干,随后用布袋快件寄至浙江省富阳市中国林业科学研究院亚热带林业研究所。3个三尖杉产地的种子大小和千粒质量等性状见表1。

1.2 种子解休眠引发试验处理

将来自各产地的种子设置3个低温引发试验处理,即将水洗阴干后的种子用干净塑料袋密封包装,放在5℃冰

箱中分别低温冷藏10、20和30 d,不同处理结束后立即转入沙藏层积。试验以直接沙藏层积的种子为对照,每个处理的种子数量均为0.50 kg。3个低温处理和对照处理在2005年11月6日同时进行。于室内在底部打有小孔的塑料桶(上端内径21.0 cm,下端内径15.5 cm,高22.5 cm)中沙藏层积,上覆盖稻草。沙藏层积过程中须注意浇水保湿。

1.3 解除休眠中种子主要内含物和内源激素质量分数等测定

于2005年11月5日、2006年1月3日(引发处理50 d)和2006年2月11日(引发处理86 d)测定低温处理前和解除休眠过程中种子脂肪、淀粉和氨基酸等内含物质量分数,过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性,及种子胚和胚乳内源激素吲哚乙酸(IAA),赤霉素(GA₃),脱落酸(ABA),玉米素核苷(ZR)质量分数的变化。其中种子胚和胚乳内源激素质量分数仅选用福建明溪和四川盐源2个产地的种子,于2005年11月5日和2006年2月11日测定2次。每次测定时各产地不同处理的种子均按四分法随机选取,取样数量超过30粒。种子脂肪质量分数用索氏抽提法测定^[4],淀粉质量分数用蒽酮法测定^[4],种子过氧化物酶活性用比色法测定^[5],过氧化氢酶活性参照Mishra等法^[6]测定,分别以470 nm和240 nm波长下光密度值下降0.01个·min⁻¹为1个酶活性单位。种子胚和胚乳内源激素质量分数由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。于2006年3月上旬开始,每隔1周计数一次发芽种子数,于4月22日结束,并于当日对未发芽种子进行清点,计算各产地不同试验处理的种子发芽率。

2 结果与分析

2.1 低温引发处理的三尖杉种子发芽率产地差异

不同产地的三尖杉种子经低温冷藏和沙藏引发处理后的发芽率列于表2。从表2可以看出,不同产地三尖杉种子发芽率差异巨大,贵州黎平的种子平均发芽率高达30.86%,福建明溪9.90%,仅为贵州黎平的1/3左右,而四川盐源的种子平均发芽率非常低,只有1.91%,意味着低温引发处理难以解除四川盐源三尖杉种子的休眠。在前2年的研究和生产中也发现四川盐源种子具有难以解除休眠的特性,这可能与其产地的气候条件有关。四川盐源地处我国西南高原区,因冬季上空盛行从西南亚来的干暖偏西气流,而形成冬暖的特殊气候。长期适应冬暖气候可能致使该产地三尖杉种子对低温引发处理反应很不敏感。

通过比较不同低温引发处理试验结果,发现贵州黎平产地种子经低温冷藏10 d引发处理的发芽率最高,达33.96%,冷藏20 d和30 d引发处理的发芽率稍低,分别为30.60%和30.38%,而直接沙藏处理的发芽率也达到了28.50%;对于福建明溪产地种子,冷藏10 d和30 d引发处理的发芽率较高,分别为11.60%和11.76%,而直接沙藏和冷藏20 d引发处理的发芽率较低,分别为9.44%和

表1 3个三尖杉产地的种子性状

Table 1 Seed characters from three provenances of *Cephalotaxus fortunei*

产地	种子长/cm	种子宽/cm	种子厚/cm	千粒质量/g
福建明溪	2.11	1.04	0.78	780.5
贵州黎平	1.72	0.96	0.75	521.6
四川盐源	1.67	0.93	0.80	583.1

6.78%; 对于四川盐源产地种子, 冷藏 10 d 引发处理的发芽率最高, 达 4.19%, 其他处理的种子发芽率为 0.74%~1.93%。

表 2 低温引发处理下 3 个三尖杉产地的种子发芽率

Table 2 Seed germination rate of three *Cephalotaxus fortunei* provenances under low temperature priming

产地	三尖杉种子发芽率/%				平均
	直接沙藏	冷藏 10 d 后沙藏	冷藏 20 d 后沙藏	冷藏 30 d 后沙藏	
福建明溪	9.44	11.60	6.78	11.76	9.90
贵州黎平	28.50	33.96	30.60	30.38	30.86
四川盐源	1.93	4.19	0.79	0.74	1.91

2.2 低温引发处理过程中种子主要内含物质量分数变化

三尖杉种子脂肪质量分数很高, 依产地不同变化, 为 $510.3 \sim 547.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 属油脂类种子(表 3)。在低温冷藏和沙藏引发处理解除种子休眠过程中, 不同产地种子的脂肪质量分数都呈显著降低的规律, 其中以贵州黎平产地降幅最大。引发处理 50 d 时, 种子脂肪质量分数降低幅度较大: 为 $446.7 \sim 496.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 引发处理 86 d 时, 种子脂肪质量分数又降低, 达 $426.3 \sim 450.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。比较分析表明, 随着冷藏引发处理的加强, 三尖杉种子在解除休眠过程中的脂肪质量分数降幅增大, 不因产地不同而有较大差异。类似于脂肪质量分数, 低温引发处理解除休眠过程中种子淀粉因不断分解, 其质量分数也显著降低, 引发处理 50 d 和 86 d 时, 种子淀粉质量分数分别下降了 $134.8 \sim 180.0$ 和 $215.3 \sim 264.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 其中以冷藏 10 d 和 30 d 的引发处理降幅最大。

种子在解休眠过程中需要消耗脂肪、淀粉和蛋白质等储藏物质合成必须的氨基酸等以满足种子萌发需求, 所以种子氨基酸质量分数在解除休眠过程中是不断增加的。引发处理 50 d 时, 福建明溪、贵州黎平和四川盐源种子氨基酸质量分数分别提高了 111.0 , 74.9 和 $221.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 引发处理 86 d 时分别提高了 399.2 , 303.8 和 $441.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 其中以四川盐源产地增幅最大。随着低温引发处理的加强, 解除休眠过程中种子氨基酸质量分数有增加的趋势。

表 3 低温引发处理过程中种子主要内含物质量分数变化

Table 3 Main constituent content change of seeds from three *Cephalotaxus fortunei* provenances during low temperature priming

引发处理时间	处理	福建明溪			贵州黎平			四川盐源		
		脂肪/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	淀粉/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	氨基酸/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	脂肪/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	淀粉/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	氨基酸/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	脂肪/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	淀粉/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	氨基酸/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
处理前		547.7	61.93	31.83	542.7	59.27	32.75	510.3	63.27	31.65
	直接沙藏	508.5	52.61	34.12	507.0	56.61	33.39	448.9	55.28	33.57
引发处理	冷藏 10 d 后沙藏	539.1	47.95	33.39	473.3	47.28	33.94	488.9	49.95	35.32
	冷藏 20 d 后沙藏	490.4	53.94	35.59	448.7	53.28	35.59	445.0	56.61	37.24
50 d	冷藏 30 d 后沙藏	446.7	48.62	38.34	392.1	47.95	37.88	404.0	48.62	48.52
	平均	496.2	50.78	35.36	455.3	51.28	35.20	446.7	52.62	38.66
	直接沙藏	444.7	47.61	73.57	460.3	50.89	77.51	437.0	51.41	78.52
引发处理	冷藏 10 d 后沙藏	461.9	41.04	79.02	471.6	44.32	76.00	451.6	46.26	78.69
	冷藏 20 d 后沙藏	462.1	49.25	80.20	438.5	51.41	76.50	430.3	51.41	78.94
86 d	冷藏 30 d 后沙藏	431.7	44.33	78.94	384.9	39.41	75.58	386.1	42.84	79.19
	平均	450.1	45.56	77.93	438.8	46.51	76.40	426.3	47.98	78.83

2.3 低温引发处理过程中种子 POD 和 CAT 活性变化

过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)都是与种子发芽力有关的酶, 在种子解除休眠过程中和萌发时对动员和利用贮藏物质起着重要的作用。如表 4 所示, 低温冷藏和沙藏引发处理过程中 3 个产地

种子的POD和CAT活性不断增强,引发处理50 d时,三尖杉种子POD和CAT活性分别较处理前提高了16.0%~33.6%和6.9%~16.1%;引发处理86 d时即种子萌发前POD和CAT活性维持在较高水平,分别较处理前提高了22.3%~38.2%和15.8%~21.5%。在不同引发处理中,以冷藏30 d处理的种子POD和CAT活性最强。

表4 低温引发处理过程中种子过氧化物酶和过氧化氢酶活性变化

Table 4 POD and CAT change of seeds from three *Cephalotaxus fortunei* provenances during low temperature priming

引发处理时间	处理	福建明溪		贵州黎平		四川盐源	
		POD/ ($\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$)	CAT/ ($\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$)	POD/ ($\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$)	CAT/ ($\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$)	POD/ ($\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$)	CAT/ ($\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$)
处理前		2.20	2.51	2.07	2.24	2.24	2.37
引发处理 50 d	直接沙藏	2.45	2.56	2.66	2.56	2.64	2.63
	冷藏 10 d 后沙藏	2.35	2.74	2.65	2.57	2.68	2.64
	冷藏 20 d 后沙藏	2.56	2.67	2.73	2.61	2.59	2.82
	冷藏 30 d 后沙藏	2.84	2.77	3.05	2.68	2.84	2.80
	平均	2.55	2.69	2.77	2.61	2.69	2.72
引发处理 86 d	直接沙藏	2.69	2.75	2.64	2.54	2.84	2.77
	冷藏 10 d 后沙藏	2.49	2.92	2.83	2.68	2.78	2.83
	冷藏 20 d 后沙藏	2.70	2.93	2.84	2.84	2.77	2.95
	冷藏 30 d 后沙藏	2.88	3.03	3.15	2.77	2.88	2.87
	平均	2.69	2.91	2.86	2.71	2.82	2.86

2.4 低温引发处理过程中种子胚和胚乳内源激素变化

表5给出了2个对低温引发处理反应差异较大的三尖杉产地种子在解除休眠过程中胚和胚乳内源激素质量分数的测定值。测定分析发现,低温冷藏和沙藏引发处理86 d时,福建明溪和四川盐源两产地种胚GA₃和ZR质量分数明显下降,ABA质量分数显著提高,IAA质量分数因产地不同而有增有减,从种胚内源激素质量分数变化难以说明引发处理后两产地种子发芽率的差异。

表5 低温引发处理过程中种子胚和胚乳内源激素质量分数测定值

Table 5 Changes of endogenous hormones in embryo and endosperm of seeds from three *Cephalotaxus fortunei* seed sources during low temperature priming

产地	种子部位	引发处理时间	处理	IAA/ ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)	GA ₃ / ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)	ABA/ ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)	ZR/ ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)	
福建明溪	胚	处理前		75.635 9	125.201 0	197.058 7	124.642 4	
		引发处理 86 d	直接沙藏	25.848 7	68.195 6	239.856 3	22.688 7	
			冷藏 10 d 后沙藏	38.651 1	114.877 2	391.092 6	25.632 1	
	胚乳	处理前		162.876 6	210.566 8	475.345 4	43.606 8	
		引发处理 86 d	直接沙藏	144.684 8	128.222 9	323.891 5	151.566 0	
			冷藏 10 d 后沙藏	74.447 1	117.566 8	185.459 2	92.567 1	
四川盐源	胚	处理前		63.862 4	143.982 9	243.832 7	81.729 7	
		引发处理 86 d	直接沙藏	115.020 4	108.469 7	374.494 8	34.727 3	
			冷藏 10 d 后沙藏	107.045 2	74.303 4	603.676 0	50.944 6	
	胚乳	处理前		66.122 2	119.371 3	351.636 0	45.487 2	
		引发处理 86 d	处理前		132.869 0	126.131 3	156.750 6	25.522 4
			直接沙藏	248.351 4	169.827 8	249.571 3	39.813 9	
引发处理 86 d	冷藏 10 d 后沙藏	454.882 9	197.193 2	513.339 1	109.568 7			
	冷藏 30 d 后沙藏	88.645 4	69.312 2	153.863 5	39.742 1			

三尖杉种子休眠的原因可能与胚乳存在 ABA 抑制性内源激素有关。福建明溪种子胚乳在处理前 ABA 质量分数高达 $475.3454 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, 引发处理 86 d 时显著降低, 直接沙藏、冷藏 10 d 后沙藏和冷藏 30 d 后沙藏 3 种引发处理分别降低了 31.86%, 60.98% 和 52.58%, GA_3/ABA 比值变化较小或略有提高, 这或许是低温引发处理解除福建明溪三尖杉种子休眠的一个主要原因。福建明溪种子直接沙藏时种子发芽率较低似与胚乳 ABA 质量分数较高有关。与福建明溪产地不同, 四川盐源产地的三尖杉种子在处理前胚乳 ABA 质量分数就很低 ($156.7506 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$), GA_3/ABA 比值较高, 但却不能发芽, 这说明控制四川盐源三尖杉种子休眠可能另有原因。四川盐源三尖杉种子长期适应冬暖气候, 低温冷藏和沙藏引发处理对其是一种胁迫处理, 这可解释经过低温冷藏和沙藏引发处理后四川盐源三尖杉种子胚乳 ABA 质量分数为什么保持不变或有较大幅度的升高。

3 结果与讨论

种子休眠是植物在复杂的自然环境中, 经过长期系统发育而形成的一种适应性, 具有重要的生态学意义^[7]。种子休眠和萌发一直都是人们研究的重点问题, 虽然相关研究已取得了重要进展^[8], 但对于全面阐明休眠和萌发机理还差得很远。打破种子休眠提早发芽在生产上意义重大。三尖杉种子在当年采收后需湿沙层积, 并经过当年和翌年冬季低温才能发芽, 解除三尖杉种子休眠对于其药用林培育至关重要。

作者选用 3 个代表性产地的三尖杉种子, 开展低温引发处理解除种子休眠过程中的生理变化研究, 以期揭示低温引发处理解除三尖杉种子休眠的可能机制。结果表明, 低温引发处理过程中三尖杉种子代谢非常活跃, 脂肪和淀粉质量分数不断下降, 氨基酸质量分数大量增加, POD 和 CAT 活性显著增强, 不同低温引发处理下各产地的种子都基本遵循这一相似的生理变化规律。三尖杉种子主要内含物质量分数 POD 和 CAT 活性这一变化其实是解除休眠的结果而非解除休眠的原因。

来自不同产地的三尖杉种子对低温引发处理反应差异很大, 在参试的 3 个产地中, 低温引发处理后贵州黎平种子发芽率最高, 平均达 30.86%, 福建明溪种子发芽率次之, 平均为 9.90%, 四川盐源种子发芽率最低, 仅为 1.91%。造成种子发芽率产地差异的原因较多, 但种子内源激素质量分数变化可能是主要原因之一。研究发现, 福建明溪种子胚乳在处理前 ABA 质量分数很高, 低温引发处理后显著降低, GA_3/ABA 比值变化较小或略有提高, 这可能是低温引发处理解除福建明溪三尖杉种子休眠的可能原因。四川盐源地处我国冬暖气候的西南高原, 长期适应冬暖气候的结果致使三尖杉种子对低温引发处理反应较小。四川盐源产地三尖杉种子在处理前胚乳 ABA 质量分数就很低, GA_3/ABA 比值较高, 但发芽率却很低, 控制其种子休眠可能另有原因, 需进一步深入研究。与福建明溪和贵州黎平产地不同, 低温引发处理对四川盐源三尖杉种子其实是一种胁迫, 胁迫处理的结果促进种子胚乳 ABA 质量分数提高或保持不变。

参考文献:

- [1] 浙江省三尖杉研究协作组. 三尖杉植物生物碱的临床研究[J]. 浙江肿瘤通讯, 1976 (2): 14.
- [2] 易思荣, 黄娅. 篦子三尖杉种子繁殖技术[J]. 林业科技通讯, 2001 (7): 38.
- [3] 吕玉华, 沙衍. 三尖杉的育苗技术[J]. 云南林业科技, 2000 (2): 12-14.
- [4] 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: 445-446.
- [5] 张志良. 植物生理学试验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1987: 154-155.
- [6] MISHRA N O, MISHRA R K, SINGHAL G S. Changes in the activities of anti-oxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors [J]. *Plant Physio*, 1993, **102**: 903-910.
- [7] 尹华军, 刘庆. 种子休眠与萌发的分子生物学的研究进展[J]. 植物学通报, 2004, **21** (2): 156-163.
- [8] 颜育民. 种子休眠综述[J]. 种子, 1995 (4): 30-34, 43.

Cephalotaxus fortunei seed-physiological changes and differences among three seed sources during low temperature priming

JIAO Yue-ling, ZHOU Zhi-chun, JIN Guo-qing, LI Yin-gang

(Research Institute of Subtropical Forestry, the Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: *Cephalotaxus fortunei* seeds from three seed sources, namely Liping, Guizhou Province; Mingxi, Fujian Province; and Yanyuan, Sichuan Province, were used to determine physiological changes during low temperature priming (direct sand storage in 5 °C for 10 days, 20 days or 30 days) as well as variation among seed sources by measuring fattiness, amylose, amino acid, POD (peroxidase), CAT (catalase), IAA (indoleacetic acid), GA₃ (gibberellin), ABA (abscisic acid) and ZR (zealin) concentrations in seeds. Results after low temperature priming indicated that the average germination rate of Liping seeds (30.9%) was greater than Mingxi seeds (9.9%) and Yanyuan seeds (1.9%). Of the different treatments, the 10 days low temperature priming had the highest seed germination rate. In addition, during low temperature priming, active metabolism, decreased levels of fat and starch, increased amino acids, and enhanced POD/CAT activity were detected. In the endosperm, seeds from Mingxi possessed lower levels of ABA after low temperature treatment with no obvious change or little increase of GA₃/ABA ratio. This might be one reason for seed dormancy-breaking. In spite of a low ABA content and a high GA₃/ABA ratio in the endosperm of Yanyuan seeds before low temperature priming, germination did not occur; ABA in the seed endosperm increased mostly after low temperature priming. This indicated that with Yanyuan seeds some unknown factors controlled seed dormancy; also, the lack of germination with low temperature priming might be the result of a long adaptation to warmer winters in Sichuan. Moreover, the low germination rate of seeds from Mingxi with direct sand storage seemed to be related to high ABA content in the endosperm. [Ch, 5 tab. 8 ref.]

Key words: botany; *Cephalotaxus fortunei*; seed; seed source; dormancy-breaking; low temperature priming; physiological mechanism