

珍稀濒危植物珙桐种子休眠萌发 过程中内源激素的变化

雷泞菲^{1,2}, 彭书明^{1,2}, 牛蓓¹, 周嘉峪¹, 苏智先³, 陈放^{1*}

(1. 四川大学 生命科学学院, 成都 610041; 2. 成都理工大学 材料与化学
化工学院, 成都 610059; 3. 绵阳师范学院, 四川 绵阳 621000)

摘要: 珙桐是我国特有珍稀濒危植物, 休眠期长且具二次休眠现象。将处于休眠萌发过程中的珙桐种子依据胚根长度划分为4个阶段, 利用高效液相色谱(HPLC)测定各阶段种子及其内果皮中ABA(脱落酸)、GA(赤霉素)、KT(细胞分裂素)、IAA(3-吲哚乙酸)4种内源激素含量, 分析其比值动态变化, 并与幼苗阶段进行比较。结果显示: 未破壳种子的内果皮中内源激素含量以ABA最高, 其次是GA、IAA、KT, 随着种子破壳后四种激素含量显著降低。除ABA外, 种子中GA、IAA和KT含量随着胚根的伸长逐渐升高, 但仍低于幼苗阶段。此外, 随着胚根伸长, 种子中GA/ABA、IAA/ABA、KT/ABA比值逐渐增大, 其中以GA/ABA的变化最显著。因此, 珙桐种子的休眠和萌发可能主要受ABA和GA的平衡和拮抗来调控。

关键词: 珙桐; 内源激素; 休眠; 萌发

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2009)01-0066-04

Changes on the endogenous phytohormone content of the *Davidia involucrate* seed during dormancy and germination process

LEI Ning-Fei^{1,2}, PENG Shu-Ming^{1,2}, NIU Bei¹,
ZHOU Jia-Yu¹, SU Zhi-Xian³, CHEN Fang^{1*}

(1. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. College of Materials
and Chemistry & Chemical Engineering, Chengdu University of Technology, Chengdu
610059, China; 3. Mianyang Teachers College, Mianyang 621000, China)

Abstract: *Davidia involucrate* is an ornamental tree native to China and one of the very rare and endangered plants, which has double dormancy as well as a long dormant period. In the study, dormancy and germination process of *Davidia involucrate* seeds was divided into four stages according to radicle length. The changes of ABA(Abscissic acid), IAA(Indole-3-acetic acid), GA(Gibberellin) and KT(Kinetin) content in seeds and endocarp were determined by using HPLC among four stages. In addition, the dynamics on GA/ABA, IAA/ABA, KT/ABA and KT/IAA ratio were analysed among four stages. Finally, above-mentioned data were compared with those in seedlings stage. The results showed that: (1) the endogenous hormones content order is ABA>GA>IAA>KT in endocarp of uncracked seeds, the four endogenous hormones content decreased significantly after seeds were cracked; (2) except ABA, GA, IAA and KT contents in seeds increased gradually with radicle elongation. However, the GA, IAA and KT contents were less compared to those in seedlings; (3) in addition, GA/ABA, IAA/ABA and KT/ABA ratio in seed increased

收稿日期: 2007-06-05 修回日期: 2008-09-31

基金项目: 国家自然资源平台项目(2005DKA21403); 国家自然科学基金(30670209); 四川省青年基金(07ZQ026-039)[Supported by the National Infrastructure of Natural Resources for Science and Technology(2005DKA21403); the National Natural Science Foundation of China(30670209); the Youth Foundation of Sichuan Province(07ZQ026-039)]

作者简介: 雷泞菲(1974-), 女, 四川阆中人, 博士, 副教授, 研究方向为植物发育生物学, (E-mail)leiningfei@edut.cn.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: CFang@263.com)

gradually with radicle elongation. The change in GA/ABA ratio was greatest than the other two ones. So it is suggested that the trade-off between ABA and GA contents could control the dormancy and germination process in *Davidia involucrate* seed.

Key words: *Davidia involucrate*; phytohormones; dormancy; germination

珙桐 (*Davidia involucrate*) 属珙桐科 (Davidiaceae), 是我国特有的珍稀濒危植物。由于其种子休眠期长, 萌芽率低, 出苗不整齐, 导致繁殖非常困难。目前关于珙桐种子休眠机理方面做了较多工作, 如万朝琨 (1998) 认为透水、透气性差的坚硬内果皮是导致其种子休眠期长的主要原因; 陈坤荣等 (1988, 1992, 1998) 提出种胚形态后熟和生理后熟是其休眠期长的主要原因; 雷泞菲等 (2003) 的研究显示, 珙桐果实中存在大量萌发抑制物可能是引起种子休眠的一个重要原因。此外, 植物内源激素的变化和平衡可能是控制着种子休眠和萌发又一重要原因 (Nicolás, 1979)。陈坤荣等 (1992) 的研究显示, 休眠、萌发期间不仅珙桐种子中内源激素 GA、ABA 含量发生了显著变化, 而且种子萌发时 GA 含量变化与过氧化物酶活性具一定的相关性。李卓杰等 (1989) 认为珙桐种子的休眠和萌发过程中 GA 和 BA 促进酸性磷酸酶活性, 而 ABA 抑制其活性。近年来种子休眠、萌发与内源激素的关系, 已成为国内外研究者所关注的热点 (孙敬爽等, 2006)。本文将处于休眠萌发过程中的珙桐种子依据胚根长度划分为 4 个阶段, 利用高效液相色谱 (HPLC) 测定各阶段种子及其内果皮中 ABA (脱落酸)、GA (赤霉素)、KT (细胞分裂素)、IAA (3-吲哚乙酸) 4 种内源激素含量, 分析其比值动态变化, 并与幼苗阶段进行比较。旨在阐明和揭示内源激素在珙桐种子休眠、萌发过程的作用, 不仅有助于深化对珙桐种子休眠机理的认识, 还将为进一步开展珙桐种子休眠、萌发基因表达时空调控研究奠定基础。

1 研究方法

1.1 实验材料的准备

分别于 2004、2005 年在中国科学院华西亚高山植物园采集珙桐果实, 去除果肉后将部分新采收的果实保存于 -80 °C 低温冰箱待用, 其余用湿沙层积。2006 年 5 月选取未破壳种子及其内果皮、刚破壳种子及其内果皮、下胚轴长度小于 0.5 cm 种子及其内果皮、下胚轴长度大于 0.5 cm 种子及其内果皮、幼

苗 (高度约 10 cm)。

1.2 激素提取方法

参照谢君等 (2001) 的方法, 稍加改动, 准确称取 0.500 g 被研磨的各阶段种子和内果皮各 3 份, 80% 的冰冻甲醇 1:10 (W:V) 加入抗氧化剂、低温研磨, 4 °C 低温避光浸提 13 h, 抽滤, 残渣再用 80% 的冰冻甲醇 1:5 (W:V) 浸提 2 次, 每次 3 h, 4 °C 5 000 r/min 离心 10 min, 合并滤液, 30 °C 减压浓缩至原体积的 1/3, 石油醚 2:1 萃取 3 次, 弃去上层石油醚相, 水相用 0.1 mol/L NaOH 调 pH8.0, PVP 纯化, 抽滤, 3 次, 弃去 PVP, 水相用 HAc 调 pH3.0, 乙酸乙酯 2:1 萃取 3 次, 合并乙酸乙酯相。减压浓缩至干, 用流动相吸出定容, 用于 HPLC 分析。

1.3 激素测定方法

1.3.1 仪器与试剂 Waters 510 高效液相色谱仪, Waters 510 高压输液泵, 440 型紫外检测器 美国 Waters 公司, 色谱柱为 ODS-C18 反相色谱柱 (4.6 mm×25 cm, 5 μm), 保护柱 (4.6 mm×10 mm) 天津奥特塞恩斯仪器有限公司, 纯水系统 Labconco WaterPro-ultrafiltration, 美国 Jenco 公司, Buchi200R 型旋转蒸发器瑞士布奇公司, 电子天平 JA1604 型上海天平仪器厂。

激素标准品 (IAA、ABA、GA3 与 KT) 均为 sigma 产品; 用作流动相的乙腈与甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 实验用水为超纯水。

1.3.2 色谱条件的选择 色谱条件: 色谱柱 μBondapakC₁₈, ID4 mm×250 mm, 10 μm; 预柱为 ID4 mm×30 mm; 柱温 40 °C; 流动相为乙腈、甲醇与 0.6% 乙酸溶液比例为 5:50:45 (V/V/V), 0.8 mL/min 恒流洗脱; 检测波长 254 nm。柱温 28 °C。

1.3.3 计算方法 内源激素含量 (ng·g⁻¹ F. W.) = $\frac{V \cdot C \cdot S}{A \cdot W}$ (其中 V: 样品体积, C: 标样浓度, S: 样品峰面积, A: 标样峰面积, W: 植物样品鲜重 (g))。

2 结果与分析

2.1 不同胚根长度珙桐种子内果皮中内源激素含量的变化

从图 1 可以看出, 不同胚根长度珙桐种子的内

果皮中 GA 含量由高到低依次为:未破壳种子的内果皮>胚根长度大于 0.5 cm 种子的内果皮>胚根长度小于 0.5 cm 种子的内果皮>刚破壳种子的内果皮;IAA 含量由高到低依次为:未破壳种子的内果皮>刚破壳种子的内果皮>胚根长度大于 0.5 cm 胚根种子的内果皮>胚根长度小于 0.5 cm 种子的内果皮;ABA 含量由高到低依次为:未破壳种子的内果皮>刚破壳种子的内果皮>胚根长度小于

0.5 cm 种子的内果皮>胚根长度大于 0.5 cm 种子的内果皮;自种子破壳后内果皮中 KT 含量太低未能检测到。尽管未破壳种子的内果皮中 ABA 含量非常高,达 883.244 5 ng/g · FW,但其它生长激素如 GA、IAA 和 KT 的含量也是比较高的(图 1),这可能是由于珙桐种子刚从树上采集下来,除了与果实成熟相关的植物激素 ABA 外,还残留了大量的其它生长激素。

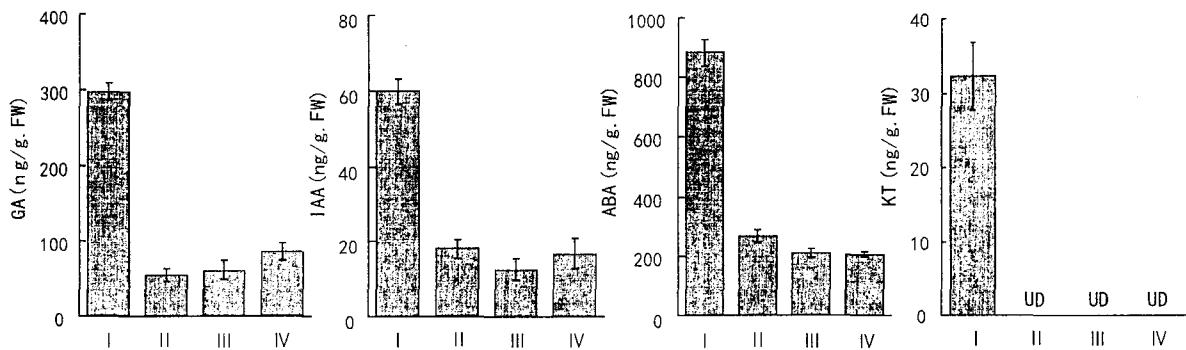


图 1 不同胚根长度珙桐种子的内果皮中内源激素含量

Fig. 1 The endogenesis phytohormones contents of endocarps in seeds with different radicle length

I. 未破壳种子的内果皮; II. 刚破壳种子的内果皮; III. 胚根长度小于 0.5 cm 种子的内果皮; IV. 胚根长度大于 0.5 cm 种子的内果皮; UD. 未检测出。

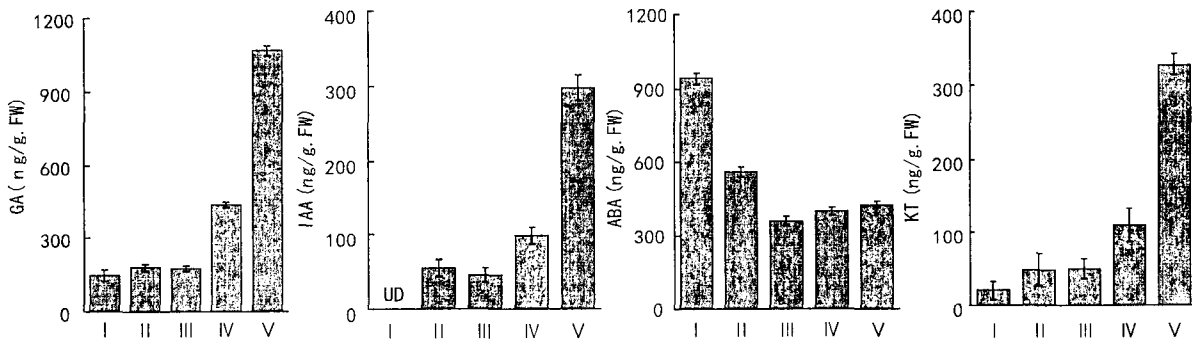


图 2 不同胚根长度珙桐种子中内源激素含量

Fig. 2 The endogenesis phytohormones contents in seeds with different radicle length

I. 未破壳种子; II. 刚破壳种子; III. 胚根长度小于 0.5 cm 种子; IV. 胚根长度大于 0.5 cm 种子; V. 幼苗; UD. 未检测出。下同。

2.2 不同胚根长度珙桐种子中内源激素含量的变化

从图 2 可以看出,尽管未破壳种子中 IAA 含量太低而未能检测到,然而珙桐种子中内源激素除 ABA 外,其余 3 种的含量均随着胚根的伸长而逐渐增加。4 种内源激素中变化幅度最大的是 GA,未破壳种子中 GA 只有 147.701 7 ng/g · FW,当胚根长度大于 0.5 cm 时含量达 437.8697 ng/g · FW,而当其萌发形成幼苗时竟高达 1067.336 ng/g · FW。此外,刚破壳种子中 GA 和 IAA 含量略高于胚根长

度小于 0.5 cm 的种子(图 2),原因可能是 GA 可以诱导半纤维素酶类酶解细胞壁,种子萌发时胚根要穿透坚硬的内果皮并突破厚厚的胚乳,较高的 GA 和 IAA 可促进胚乳细胞壁降解,从而有利于胚根的伸出(Nonogaki & Morohashi,1996)。

2.3 不同胚根长度珙桐种子中内源激素的比值动态

从图 3 可以看出,珙桐种子中 GA/ABA、KT/ABA、IAA/ABA 的比值随着胚根伸长而逐渐增大。其中 GA/ABA 比值变化最为明显,相比于未破壳

种子,在幼苗阶段 GA/ABA 比值增加了 15 倍多。除刚破壳种子略低外,KT/IAA 比值在其它几个阶段变化不大。

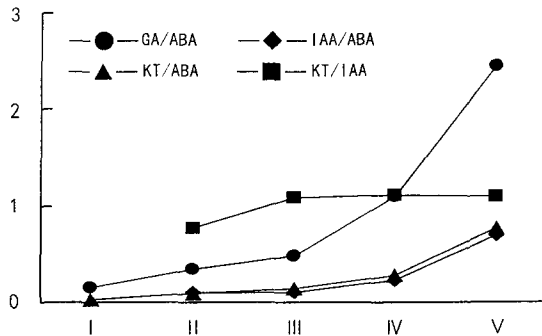


图 3 不同胚根长度珙桐种子中内源激素比值动态
Fig. 3 The ratios among endogenous phytohormones in seeds with different radicle length

3 讨论

随着胚根长度伸长,珙桐种子内果皮中 4 种内源激素含量逐渐降低(图 1),原因可能是内果皮自身不能合成激素,仅仅对种子起一保护作用。

ABA 在种子胚的发育、RNA 和蛋白质的合成上均起到了非常重要的作用,它可能降低胚的吸水能力和渗透势,从而阻碍了胚根的生长,因此 ABA 可能是控制种子休眠的主要因素(韩明玉等,2002)。然而通过 ABA 突变型与正常型正反交表明外源 ABA 只具有暂时休眠作用,只有内源 ABA 才能维持种子的持续休眠(LePage & Garelo,1998)。本研究中随着胚根的伸长,珙桐种子中 ABA 含量急剧下降(图 2),这显示 ABA 可能是种子萌发启动的信号,在参与诱发并维持其休眠上起到了关键作用。

GA 参与调控植物生长发育的各个阶段包括种子发芽、茎生长、叶片表皮、开花发育、花与果成熟等不同发育过程(Itoh 等,1999)。Bewley(1997)认为 GA 并不参与对休眠本身的调控,而是对促进和维持发芽起作用,拮抗 ABA,即作用于 ABA 的发芽抑制效应。这种拮抗和抑制可能通过特定 mRNA、蛋白质和酶来体现,如 GA 可能诱导使胚乳强度减弱的酶活性如 β -甘露聚糖酶(酶解细胞壁,有利于胚根伸出)活性增加(Nonogaki & Morohashi,1996; Toorop 等,1996; Bewley,1997)。而 ABA 能滞缓该酶的累积和胚乳的降解,抑制萌发(Lebuner 等,1995)。本研究中随着胚根的伸长,珙桐种子中 GA

绝对含量以及 ABA 比值均逐渐增大(图 2,3),这与 Nicolás(1979)和樊文梅等(2002)对欧洲山毛榉(*Fagus sylvatica*)和锁阳(*Cynomorium songaricum*)种子的研究结果相同。因此 GA 在打破种子休眠,维持种子萌发过程中起到重要作用,珙桐种子的休眠和萌发可能也是通过 ABA 和 GA 的平衡和拮抗来调节控制。

GA 常与 KT 联合作用被认为能排除种子对各种环境条件的要求,促进发芽和抵消 ABA 的抑制效应。IAA 尽管可能无促进发芽作用,但却是植物合成活性 GA 的必要条件(Bewley,1997)。本研究中珙桐种子中 IAA 和 KT 含量变化趋势与 GA 相似,而且 IAA/ABA 和 KT/ABA 比值也是随胚根伸长而逐渐增大(图 2,3),这显示 IAA 和 KT 可能参与了 GA 的合成、促进发芽和抵消 ABA 的作用。此外,刚破壳珙桐种子中 KT/IAA 比值要低于其它几个阶段(图 3),原因可能是 KT/IAA 比值低有利于下胚轴分化以及胚根的形成(符近,1998)。

由于珙桐种子具有二次休眠现象,往往层积 1 年后仅有少量发芽,大部分种子内果皮出现裂口或胚根伸出 0.1~0.3 cm,需再层积 1~2 年才能发芽(陈坤荣,1998)。因此,仅仅根据层积时间来取样可能导致不能充分揭示种子内源激素含量变化与其休眠萌发过程的相关性。本研究根据胚根长度来划分测定阶段,研究结果清楚显示珙桐种子中内源激素含量及比值变化显著影响着种子的休眠萌发过程,有助于深化对珙桐种子休眠机理的认识,对抢救和保护这一珍贵资源具有重要意义。

参考文献:

- Chen KR(陈坤荣). 1988. The dormancy of *Davidia involuocrata* seeds(珙桐种子休眠原因研究初报)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯),25(3):24-28
- Chen KR(陈坤荣),Li TS(李桐森),Tian GH(田广红),et al. 1998. The biological characteristics in Dovetree *Davidia involuocrata* propagation(珙桐繁殖的生物学特性)[J]. *J Southwest Fore Coll*(西南林学院学报),18(2):68-73
- Han MY(韩明玉),Zhang MR(张满让),Tian YM(田玉命),et al. 2002. Effect of plant hormones on seed dormancy and seedling growth of stone fruits(植物激素对几种核果类种子休眠破除和幼苗生长的效应研究)[J]. *Acta Bot Boreo-Occident Sin*(西北植物学报),22(6):1 348-1 354
- Lei NF(雷泞菲),Su ZX(苏智先),Chen JS(陈劲松),et al. 2003. Preliminary study on germination inhibitors from fruit of rare and endangered *Davidia involuocrata*(珍稀濒危植物珙桐果实中的萌发抑制物质)[J]. *Chin J Appl Envi Ron Biol*(应用与(下转第 131 页 Continue on page 131))

等; 还有些是近几年新入侵的种类, 在周边城市它们有的已成为恶性杂草, 有的开始大面积扩散, 但在西湖风景区内它们只是零星出现在一些景点, 尚未大面积发现, 应引起警惕的外来杂草, 如睫毛牛膝菊 (*Galinsoga ciliata*)、裸柱菊 (*Soliva anthemifolia*)、豚草 (*Ambrosia artemisiifolia*)、水盾草 (*Cabomba caroliniana*) 等。此外, 还应该引起注意的是黄秋英 (*Cosmos sulphureus*)、秋英 (*Cosmos bipinnata*)、万寿菊 (*Tagetes erecta*) 等在杭州市多有栽培, 而这些植物在我国西南地区已大面积归化(郭水良等, 1995; 强胜等, 2001); 毒莠苣、裂叶月见草等虽未入侵杭州, 但在邻近地区已发现。有关部门要严格采取生态安全保护措施, 并跟踪监测, 防止它们在本地区扩散、蔓延。

参考文献:

- 万方浩, 郑小波, 郭建英. 2005. 重要农林外来入侵物种的生物学与控制[M]. 北京: 科学出版社
李振宇, 解焱. 2002. 中国外来入侵种[M]. 北京: 中国林业出版社
杭州市地方志编辑委员会. 2003. 杭州年鉴[M]. 北京: 北京市

- 方志出版社出版: 1-32
杭州市统计局. 2003. 杭州统计年鉴[M]. 北京: 中国统计出版社出版: 1-40
金银根, 黄春华, 吴晓霞, 等. 2002. 关于植物杂草化的思考[J]. 杂草科学, 1: 10-13
郭水良, 李扬汉. 1995. 我国东南地区外来杂草研究初报[J]. 杂草科学, 2: 4-8
浙江植物志编辑委员会. 1993. 浙江植物志(1~7卷)[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社
Auld BA, Martin PM. 1975. The autoecology of *Eupatorium adenophorum* Spreng in Australia[J]. *Weed Res*, 15: 27-31
Guo SL(郭水良). 1995. Study on the origination spread and biological characteristics of exotic weeds(外域杂草的产生、传播及生物与生态学特性的分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), 15(1): 89-95
LI B(李博), Xu BS(徐炳声), Cheng JK(陈家宽). 2001. Perspectives on general trends of plant invasions with special reference to alien weed flora of Shanghai(从上海外来杂草区系剖析植物入侵的一般特征)[J]. *Biodiversity Sci*(生物多样性), 9(4): 446-457
Mack RN, Lonsdale WM. 2001. Humans as global plant dispersers: getting more than we bargained for[J]. *Bio Sci*, 51: 95-102
Qiang SB(强胜), Chao XZ(曹学章). 2001. Harmfulness of exotic weeds in China and for their management 外来杂草在我国的危害性及其管理对策[J]. *Biodiversity Sci*(生物多样性), 9(2): 188-195

(上接第 69 页 Continue from page 69)

- 环境生物学报), 9(6): 607-610
Li ZJ(李卓杰), Chen RZ(陈润政), Fu JR(傅家瑞), et al. 1989. Studies on acid phosphatase in *Davidia involucreta* seed dormancy and germination(珙桐种子休眠和萌发中酸性磷酸酶同工酶的研究)[J]. *J Southwest Fore Coll*(西南林学院学报), 9(1): 8-13
Sun JS(孙敬爽), Jia GX(贾桂霞). 2006. Germination characteristic and endogenous ABA, IAA content change in the seed of *Abies koreana* during stratifying(朝鲜冷杉种子层积过程中萌发特性和内源激素含量的变化)[J]. *Fore Res*(林业科学研究), 19(1): 117-120
Fan WM(樊文梅), Su GE(苏格尔). 2002. The comparison of the dynamic changes of endogenous hormones between *Cynomorium songaricum* and *Avena chinensis* during the germination of their seeds(锁阳与莜麦种子萌发过程中内源激素动态比较研究)[J]. *Acta Sci Nat Univ NeiMongol*(内蒙古大学学报), 33(3): 304-308
Fu J(符近), Ji WQ(奇文清), Gu ZH(顾增辉), et al. 1998. Seed dormancy and germination in *Cimicifuga nanchuanensis*(南川升麻种子休眠与萌发的研究)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 40(4): 303-308
Wan CK(万朝琨). 1998. Anatomy studies on *Davidia involucreta* dormancy seeds(珙桐种子休眠的解剖学研究)[J]. *J Central-South Fore Coll*(西南林学院学报), 8(1): 35-38
XIE J(谢君), Zhang YZ(张义正). 2001. Determination of Plant Intrinsic Hormones by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography(植物内源激素的反相高效液相色谱法测定)[J]. *J Instrumental Analysis*(分析测试学报), 20(1): 60-62
Bewley JD. 1997. Seed germination and dormancy[J]. *Plant cell*, 9: 1055-1066
Chen KR, Wen FD, Li ZJ, et al. 1992. Physiological studies on dormancy of dovetree (*Davidia involucreta*) seeds[M]//Fu JR, Khan AA (ed). *Advances in the Science and Technology of Seeds*. Beijing: Science Press, 231-238
Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Kawaide H, et al. (1999). The gene encoding tobacco gibberellin 3-hydroxylase is expressed at the site of GA action during stem elongation and flower development[J]. *Plant J*, 20: 15-24
LePage MT, Garello G. 1998. *In situ* abscisic acid synthesis. A requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus*[J]. *Plant Physiol*, 138: 1386-1390
Leubner G, Fründt C, Vogeli R, et al. 1995. Class I β -1, 3-glucanases in the endosperm of tobacco during germination[J]. *Plant Physiol*, 109: 751-759
Nicolás G, Aldasoro JJ. 1979. Activity of the pentose phosphate pathway and changes in nicotinamide nucleotide content during germination of seeds of *Cicer arietinum* [J]. *J Exp Bot*
Nonogaki H, Morohashi Y. 1996. An endo-p-mannanase develops exclusively in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence[J]. *Plant Physiol*, 110: 555-559
Toorop PE, Bewley JD, Hilhorst HWM. 1996. Endo-p-mannanase isoforms are present in the endosperm of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination[J]. *Plant*, 200: 153-158