

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202310013

康亮, 卢覃培, 王德宝, 等, 2024. 七叶一枝花种子萌发过程中内源激素含量及酶活性变化研究 [J]. 广西植物, 44(6): 1118–1128.

KANG L, LU QP, WANG DB, et al., 2024. Changes of endogenous hormone content and enzyme activities during seed germination of *Paris polyphylla* [J]. *Guihaia*, 44(6): 1118–1128.

## 七叶一枝花种子萌发过程中内源激素含量及酶活性变化研究

康亮<sup>1</sup>, 卢覃培<sup>1</sup>, 王德宝<sup>3</sup>, 朱丹<sup>1</sup>, 朱凯铭<sup>1</sup>, 黄雪静<sup>1</sup>, 郭宏伟<sup>1,2\*</sup>

(1. 广西生物活性分子研究与评价重点实验室/广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 长寿与老年相关疾病教育部重点实验室/广西医科大学转化医学研究中心, 南宁 530021; 3. 广西柏朗健康产业发展有限公司, 南宁 530000)

**摘要:** 为探究七叶一枝花的种子萌发生理机制, 该文从种胚形态上对七叶一枝花种子萌发过程的时期进行了划分, 并分析了不同时期种子内源激素含量及相关酶活性的变化规律。结果表明: (1) 根据种胚形态可将种子萌发过程细分为 8 个时期, 即种胚未萌动时期 (S1 期)、心形胚时期 (S2 期)、种胚膨大时期 (S3 期)、胚根未突破种皮时期 (S4 期)、子叶柄伸长和胚根突破种皮时期 (S5 期)、下胚轴突破种皮时期 (S6 期)、上胚轴伸长时期 (S7 期)、胚根伸长时期 (S8 期)。(2) 不同萌发时期种子的  $\alpha$ -淀粉酶活性均明显高于  $\beta$ -淀粉酶。(3) 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性在 S5 期最高, S1 期最低; 过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性随种子萌发进程总体呈上升趋势, 可溶性蛋白含量随种子萌发进程先下降后升高。(4) 吲哚乙酸 (IAA)、赤霉素 ( $GA_3$ )、脱落酸 (ABA) 和水杨酸 (SA) 含量随种子萌发进程整体呈下降趋势; 1-氨基环丙烷羧酸 (ACC)、茉莉酸 (JA)、油菜素内酯 (BRs) 随种子萌发进程整体呈上升趋势; 细胞分裂素类 (CTKs) 含量无显著变化; IAA/ABA 和  $GA_3$ /ABA 随种子萌发进程呈先下降后上升趋势, 而 CTKs/ABA 则不断升高。(5) ABA、IAA、 $GA_3$  含量与胚率呈负相关, 而 ACC、JA、BRs、POD、CAT、 $\beta$ -淀粉酶活性与胚率呈正相关。综上所述, 七叶一枝花在不同时期种子内源激素含量及相关酶活性各不相同, 其中  $\alpha$ -淀粉酶活性、POD 活性可能与种胚胚根伸长有关,  $GA_3$  可能影响种胚形成, 而 ABA 则可能抑制种胚的生长发育。

**关键词:** 七叶一枝花, 萌发阶段, 内源激素, 抗氧化酶, 淀粉酶

中图分类号: Q945.34 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2024)06-1118-11

## Changes of endogenous hormone content and enzyme activities during seed germination of *Paris polyphylla*

KANG Liang<sup>1</sup>, LU Qinpei<sup>1</sup>, WANG Debao<sup>3</sup>, ZHU Dan<sup>1</sup>, ZHU Kaiming<sup>1</sup>, HUANG Xuejing<sup>1</sup>, GUO Hongwei<sup>1,2\*</sup>

收稿日期: 2024-04-02 接受日期: 2024-05-21

基金项目: 广西重点研发计划项目 (桂科 AB20238004); 中央引导地方科技发展资金专项 (防科 ZY20221502); 广西壮族自治区大学生创新创业训练计划项目 (202110598260); 国家青年岐黄学者培养项目; 广西医科大学高水平创新团队及杏湖学者计划项目。

第一作者: 康亮 (1986—), 博士, 讲师, 研究方向为药用植物栽培学, (E-mail) 55752628@qq.com。

\*通信作者: 郭宏伟, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为中药民族药物物质基础与作用机制研究, (E-mail) hongweigu@gxmu.edu.cn。

( 1. Guangxi Key Laboratory of Bioactive Molecules Research and Evaluation/Pharmaceutical College, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Key Laboratory of Longevity and Aging-Diseases of Chinese Ministry of Education /Center for Translational Medicine, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3. Guangxi Bolang Health Industry Development Co., Ltd., Nanning 530000, China )

**Abstract:** To investigate the germination physiological mechanism of *Paris polyphylla* seeds, different stages of the germination process were divided based on the seed embryo morphology and the changing rules in endogenous hormone content and related enzyme activities were analyzed at different stages. The results were as follows: (1) The germination process of the seeds could be divided into eight stages based on seed embryo morphology: non-germinating embryo stage (S1), heart-shaped embryo stage (S2), embryo swelling stage (S3), radicle not breaking through seed coat stage (S4), cotyledon petiole elongation and radicle breaking through seed coat stages (S5), lower hypocotyl breaking through seed coat stage (S6), upper hypocotyl elongation stage (S7), and radicle elongation stage (S8). (2) The  $\alpha$ -amylase activity in the seeds was significantly higher than  $\beta$ -amylase activity at all germination stages. (3) Superoxide dismutase (SOD) activity was the highest at stage S5 and the lowest at stage S1; peroxidase (POD) and catalase (CAT) activities generally increased with seed germination progress; soluble protein content initially decreased and then increased with seed germination progress. (4) The contents of hormones such as indoleacetic acid (IAA), gibberellin ( $GA_3$ ), abscisic acid (ABA), and salicylic acid (SA) decreased overall, while 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), jasmonic acid (JA), brassinolides (BRs) increased overall during seed germination. Cytokinins (CTKs) content showed no significant change. The ratios of IAA/ABA and  $GA_3$ /ABA decreased initially and then increased, while CTKs/ABA continuously increased with seed germination progress. (5) The contents of ABA, IAA,  $GA_3$  were negatively correlated with embryo rate, while ACC, JA, BRs, POD, CAT, and  $\beta$ -amylase activity were positively correlated with embryo rate. In conclusion, the germination process of the seeds can be subdivided into eight stages based on seed embryo morphology, with varying endogenous hormone content and related enzyme activities at different stages. The activities of  $\alpha$ -amylase and POD may be related to radicle elongation, while  $GA_3$  may affect the embryo formation, and ABA may inhibit the growth and development of the embryo.

**Key words:** *Paris polyphylla*, germination stage, endogenous hormone, antioxidant enzymes, amylase

七叶一枝花(*Paris polyphylla*)是百合科重楼属植物,为《中华人民共和国药典》收录的重楼药材基原植物,具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊的功效(国家药典委员会,2020),是云南白药、宫血宁胶囊、楼莲胶囊等80多种中成药产品的主要原料。当前,我国七叶一枝花每年的消耗量远远超出了其自然生长量,使其野生药用资源面临枯竭的威胁,而人工繁育七叶一枝花是缓解上述矛盾和促进其可持续发展的有效途径。因此,开展七叶一枝花人工繁育技术研究,指导高产优质人工栽培,对保护野生七叶一枝花资源、满足临床需求具有重要意义。

七叶一枝花的繁殖包括根茎切块繁殖、组织培养和种子繁殖3种方式,其中种子繁殖因其繁殖系数大、资源消耗少而更有利于规模化种植(马传江等,2016)。然而,目前七叶一枝花的种子繁殖研究仍处于低级阶段,种子萌发过程中生理生化指标方面的研究还较少报道。在种子萌发过程中,淀粉、蛋白质等物质通过相关酶的作用发生转

化,进而为种子发芽提供营养和能量。淀粉酶主要由 $\alpha$ -淀粉酶和 $\beta$ -淀粉酶组成,催化种子内淀粉降解。随着种子的萌发,抗氧化酶开始清除种子休眠期积累的有害物质活性氧(Bailly et al., 2008),抗氧化酶系统中主要以超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)通过清除细胞内的活性氧,从而维持正常的细胞代谢功能。另外,种子萌发由遗传和环境因素共同决定,其萌发的激素调控可能是种子植物中一种高度保守的机制。有研究表明,吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)、脱落酸(abscisic acid, ABA)、赤霉素(gibberellic acid, GA)等(宋松泉等, 2020a, b, c)对种子萌发起着重要的生理作用。

七叶一枝花的种子萌发难,在自然条件下需要经过2年才能萌发成苗。本团队在前期研究发现,七叶一枝花种子在(20±1)℃下干燥保存4个月可促进七叶一枝花种子萌发,但其在萌发过程

中所参与的多种酶、激素等因子的变化规律及其与种胚发育的相关性研究鲜有报道。因此,本研究以(20±1)℃下干燥保存4个月的七叶一枝花种子为材料,采用显微法观察不同萌发阶段七叶一枝花种子的显微结构,并采取生理生化法测定淀粉酶及抗氧化酶,同时采用质谱法测定8种植物内源激素的含量,分析萌发过程中胚率与酶活及内源激素之间的相关性,以期探索七叶一枝花种子萌发的生理机制,为七叶一枝花人工繁育栽培提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

所用材料于2021年11月中旬采自广西壮族自治区百色市罗城县且兴村上且屯,经广西药用植物园余丽莹研究员鉴定为七叶一枝花(*Paris polyphylla*)的种子。

### 1.2 试验方法

1.2.1 种子萌发处理 七叶一枝花种子采收后,立即洗去红色假种皮,阴干7 d,随后在(20±1)℃下干燥保存120 d。于2022年4月开始育苗,育苗采用蛭石+育苗盆法,育苗盆大小为22 cm × 15 cm × 8 cm,盆内有小格,育苗时每小格放置1粒种子,每盆40粒,育苗20盆。育苗时,先润洗蛭石,蛭石以手握不出水为宜,在育苗盆底部铺垫(2±0.5) cm厚蛭石,放置种子(种子先用自来水浸泡24 h,再用500 mg · L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>浸泡24 h),上面覆盖约0.3 cm厚的蛭石。育苗盆置于(20±1)℃的种子发芽箱中培养110 d,期间不定期补水,补水以保持蛭石表面湿润为宜。

根据七叶一枝花种子的种胚形态和不同发育阶段,将种子萌发过程划分为8个时期,即育苗1 d的种子标记为S1期,育苗15 d的种子标记为S2期,育苗29 d的种子标记为S3期,育苗44 d的种子标记为S4期,育苗58 d的种子标记为S5期,育苗72 d的种子标记为S6期,育苗96 d的种子标记为S7期,育苗110 d的种子标记为S8期。在58 d与72 d时,统计种子萌发率,以胚根突破种皮且发芽的种子为萌发种子,萌发率(%)=(每个取样时期的发芽种子粒数/取样的总种子粒数)×100。

1.2.2 种子显微结构观察及形态测定 于S1-S6期随机取10粒大小一致的种子,将种子从中间纵

切,使用FAA固定液固定,随后采用番红固绿染色法制成永久玻片。将玻片放在OLYMPUS正置荧光显微镜BX53下观察、拍照,利用CellSens Dimension软件测量种子胚乳横径、胚乳纵径及胚纵径,并计算胚率(普甜等,2023),胚率(%)=(胚纵径/胚乳纵径)×100。S7-S8期由于胚根过长,因此改在根系扫描仪EPSON 2000上进行图像采集,之后利用WinRHIZO软件分析胚乳横径、胚乳纵径和胚纵径。

1.2.3 酶活测定 取1.0 g种子3份,先加入1 mL蒸馏水和少量石英砂,磨成匀浆后转入离心管中,再加入4 mL蒸馏水浸提15 min,期间摇动数次。于1 200×g下离心10 min,取上清液定容至10 mL,即为α-淀粉酶、β-淀粉酶待测酶液。另取0.5 g种子3份,分别加入5 mL的磷酸钠缓冲液(pH 7.8),研磨成匀浆后于8 000×g下离心20 min,取上清液用于测定超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和可溶性蛋白。α-淀粉酶和β-淀粉酶活性参考李小方和张志良(2016)的方法,SOD、POD、CAT、可溶性蛋白测定参考张志良等(2009)的方法。

1.2.4 内源激素的提取和测定 取大小一致的种子5粒,置于液氮研磨后称量100 mg,分别加入1 170 μL乙腈-水-甲酸溶液(80:19:1, V/V),10 μL ISMix-A(混合内标A),20 μL ISMix-B(混合内标B),涡旋60 s,低温避光超声25 min,-20℃静置过夜,在4℃14 000×g下离心20 min,先取上清液900 μL至96孔去磷脂板中正压过滤,再加入200 μL乙腈-水-甲酸溶液(80:19:1, V/V)洗脱1次,液氮吹干滤液,-80℃保存备用。测定时用200 μL甲醇:水(1:1, V/V)进行复溶。采用Waters I-Class LC超高效液相色谱系统进行分离。流动相:A液为0.05%甲酸-水溶液,B液为0.05%甲酸-乙腈。样品置于4℃自动进样器中,柱温45℃,流速为400 μL · min<sup>-1</sup>;进样量为2 μL。洗脱梯度:0~10.0 min,2%~98%B;10.0~10.1 min,98%~2%B;11.1~13.0 min,2%B。采用5500 QTRAP质谱仪(AB SCIEX)在正/负离子模式下进行质谱分析。5500 QTRAP ESI源条件:离子源温度(Source Temperature)500℃,雾化气压(Ion Source Gas 1)45 psi,辅助气压(Ion Source Gas 2)45 psi,气帘气压(Curtain gas)30 psi,喷雾气压(IonSapary Voltage Floating)4 500 V;采用MRM模式检测待测离子对。

1.2.5 数据处理 利用 IBM SPSS Statistics 22.0 和 Excel 2019 软件进行数据处理及制图,分析不同阶段的差异显著性;采用 Duncan 法进行多重比较,差异显著水平为 0.05 ( $P < 0.05$ );采用 Pearson 法进行相关分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同时期七叶一枝花种子的形态解剖特征

由图 1 可知,S1 期种子未萌发,视野处无种胚,为种胚未萌动时期(图 1: B, C);S2 期可见幼胚心形,为心形胚时期(图 1: D, E);S3 期幼胚进一步生长,幼胚细胞核清晰,细胞质浓,隐约可见子叶、胚根分化,为种胚膨大时期(图 1: F, G);S4 期种胚可见子叶、胚芽、胚根的分化,种子珠孔处膨大,胚根未突破珠孔,为胚根未突破种皮时期(图 1: H, I);S5 期子叶柄伸长,胚根突破珠孔,下胚轴进一步伸长,子叶呈卷曲状,为子叶柄伸长、胚根突破种皮时期(图 1: J, K);S6 期种子胚轴突破珠孔,并加粗膨大呈柱形,子叶仍留在种皮内,呈圆柱形,胚根进一步伸长且在与胚轴连接处缩窄,为下胚轴突破种皮时期(图 1: L, M);S7 期种子上胚轴伸长,胚根长为 0.3~1 cm,为上胚轴伸长时期(图 1: A);S8 期胚轴膨大呈纺锤形,胚根长大于 1.0 cm,为胚根伸长时期(图 1: A)。

根据种子的解剖特征,参考苏海兰等(2017a)的分类方法,将 8 个时期的种子归类为 3 个不同萌发阶段,分别为打破种胚休眠即将萌动阶段,含 S1 期;种胚生长发育至上胚轴休眠阶段,含 S2 期至 S6 期;上胚轴休眠结束至即将破土出苗阶段,含 S7 期、S8 期。

不同时期七叶一枝花种子胚乳横径、胚乳纵径及胚纵径测量结果(表 1)表明,在 S1 期至 S4 期胚乳纵径持续增长,43 d 内增长率为 48.67%,而胚乳横径则表现为缩窄,缩窄率为 9.75%;在 S5 期至 S7 期胚乳横径、胚乳纵径无明显差异,但胚纵径均显著增长;S8 期种子胚根进一步伸长,胚纵径、胚乳纵径显著高于其他时期。由七叶一枝花萌发过程可知,S1 期未观察到种胚;S2 期种胚初分化,胚率为 1.78%;S3 期、S4 期种胚持续增长、胚率持续增长;S5 期、S6 期下胚轴突破珠孔且持续增长膨大,胚率分别为 71.57%、87.09%;S7 期、S8 期,下胚轴增长减缓,而胚根则迅速增长,胚率

分别为 139.43%、318.53%。七叶一枝花种子在育苗 58 d 和 72 d 的萌发率分别为 61.20%、80.40%。

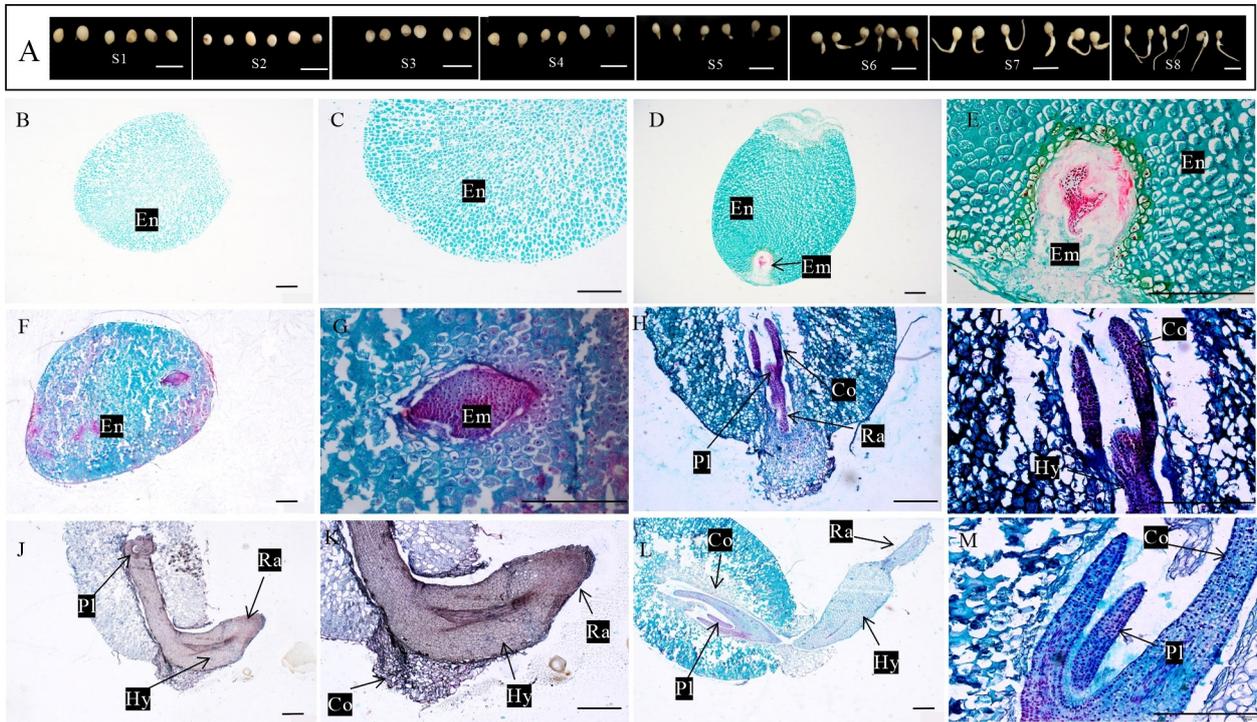
### 2.2 不同时期七叶一枝花种子淀粉酶和抗氧化酶活性的变化

2.2.1 淀粉酶活性变化 由图 2: A 可知,七叶一枝花种子的  $\alpha$ -淀粉酶活性随萌发进程在 S4 期出现小高峰,达  $440.7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{min}^{-1}$ ,较 S1 期升高 2.67 倍,并在 S6 期下降至最小值,之后于 S8 期达到最大值  $502.83 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{min}^{-1}$ ,表明  $\alpha$ -淀粉酶可诱导子叶和胚芽的发育以及胚根细胞的分化。由图 2: B 可知,七叶一枝花种子  $\beta$ -淀粉酶活性随萌发进程先下降后上升。S1 期时  $\beta$ -淀粉酶活性较高,在 S2 期时该酶活性快速下降至  $10.11 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{min}^{-1}$ ,在 S3-S7 期呈现出波动性上升的趋势,并在 S8 期时其活性显著增加。七叶一枝花种子在不同萌发时期  $\alpha$ -淀粉酶活性均明显高于  $\beta$ -淀粉酶,说明七叶一枝花的种子主要以  $\alpha$ -淀粉酶水解淀粉和糖原,并提供碳水化合物和能量,从而促进种子的萌发。

2.2.2 抗氧化酶活性变化 在七叶一枝花种子萌发的不同时期 SOD 活性总体趋势变化不大,其中 S1 期和 S6 期显著低于其他时期(图 3: A)。POD 活性在 S1 期至 S7 期的变化波动较大,但在 S8 期时活性显著增强,达  $11388.23 \text{U} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{min}^{-1}$ (图 3: B),表明 POD 可能参与调控七叶一枝花的种胚细胞生长,并促进种子萌发胚根伸长。CAT 活性随萌发进程总体呈上升趋势,并且其活性在 S7 期、S8 期时显著高于其他时期(图 3: C),表明 CAT 可能参与调控胚乳分解且促进了下胚轴膨大和胚根伸长。可溶性蛋白含量随萌发进程先下降后升高,S1 期至 S5 期的结果表明七叶一枝花种子内部的代谢活动增强,为种子的休眠解除提供物质和能量(图 3: D)。

### 2.3 七叶一枝花种子内源激素含量和比例的变化

2.3.1 种子内源激素含量变化 不同萌发时期七叶一枝花种子各激素含量的变化较大。IAA、 $\text{GA}_3$ 、ABA 和 SA 含量呈逐渐下降趋势,并在 S2 期时含量最高,在 S4 期至 S8 期时含量显著下降(图 4: A-C, G)。IAA 含量在 S6 期时下降至  $5.5 \text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ (图 4: A); $\text{GA}_3$  含量在 S4 期时下降至  $11.06 \text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ (图 4: B);ABA 含量在 S8 期时最低,仅为 S2 期的 15.32%(图 4: C)。水杨酸(salicylic acid, SA)含量在 S4 期至 S8 期时显著下降(图 4: G)。细胞分裂



A. S1-S8 期七叶一枝花种子外观; B, C. S1 期种子纵切面; D, E. S2 期种子纵切面; F, G. S3 期种子纵切面; H, I. S4 期种子纵切面; J, K. S5 期种子纵切面; L, M. S6 期种子纵切面; En. 胚乳; Em. 胚; Pl. 胚芽; Hy. 下胚轴; Ra. 胚根; Co. 子叶。标尺: A=1 cm; B-M=500  $\mu\text{m}$ 。

A. Seed appearance of *Paris polyphylla* from S1 to S8 stage; B, C. Longitudinal section of S1; D, E. Longitudinal section of S2; F, G. Longitudinal section of S3; H, I. Longitudinal section of S4; J, K. Longitudinal section of S5; L, M. Longitudinal section of S6; En. Endosperm; Em. Embryo; Pl. Plumule; Hy. Hypocotyl; Ra. Radicle; Co. Cotyledon. Scale bars: A=1 cm; B-M=500  $\mu\text{m}$ 。

图 1 七叶一枝花种子不同萌发时期的显微形态

Fig. 1 Micro-morphology of *Paris polyphylla* seed during different germination stages

素类 (cytokinins, CTKs) 含量在不同时期无显著性差异 (图 4: D)。1-氨基环丙烷羧酸 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC) 是乙烯的合成前体, 而乙烯可促进种子休眠解除。ACC 含量随七叶一枝花种子萌发进程呈现出先下降后上升的趋势, 并在 S4 期时最低 (60.59  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ ), 在 S8 期时最高, 达 162.51  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$  (图 4: E)。茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 含量在 S2 期、S4 期、S6 期时无显著性差异, 而在 S8 期则显著上升, 为 S4 期的 10.01 倍 (图 4: F)。油菜素内酯 (brassinolides, BRs) 含量随种子萌发进程呈现出逐渐上升的趋势, 在 S8 期高达 6 572.19  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$  (图 4: H)。

2.3.2 种子内源激素比例变化 由图 5 可知, IAA/ABA、 $\text{GA}_3/\text{ABA}$  变化趋势基本相似, 即先降后升, 但 IAA/ABA 在 S6 期降至最低, 而  $\text{GA}_3/\text{ABA}$  在 S4 期时降至最低, 表明 IAA、 $\text{GA}_3$  在种子萌发作用上

具有协同效应。CTKs/ABA 随种子萌发进程不断升高。

#### 2.4 七叶一枝花的种子酶活性、内源激素含量与种子胚率的相关性

由表 2 可知, 在七叶一枝花种子萌发过程中, ABA、IAA、 $\text{GA}_3$  含量与胚率呈显著负相关, 而 ACC、JA、BRs 含量与胚率则呈显著正相关, 并且 POD、CAT、 $\beta$ -淀粉酶与胚率呈极显著正相关。通过比较激素含量之间的相关系数, 结果为  $R_{\text{ABA}} > R_{\text{BRs}} > R_{\text{ACC}} > R_{\text{JA}} > R_{\text{IAA}} > R_{\text{GA}_3} > R_{\text{SA}} > R_{\text{CTKs}}$ 。

### 3 讨论与结论

#### 3.1 七叶一枝花的种胚生长阶段划分和种子育苗管理

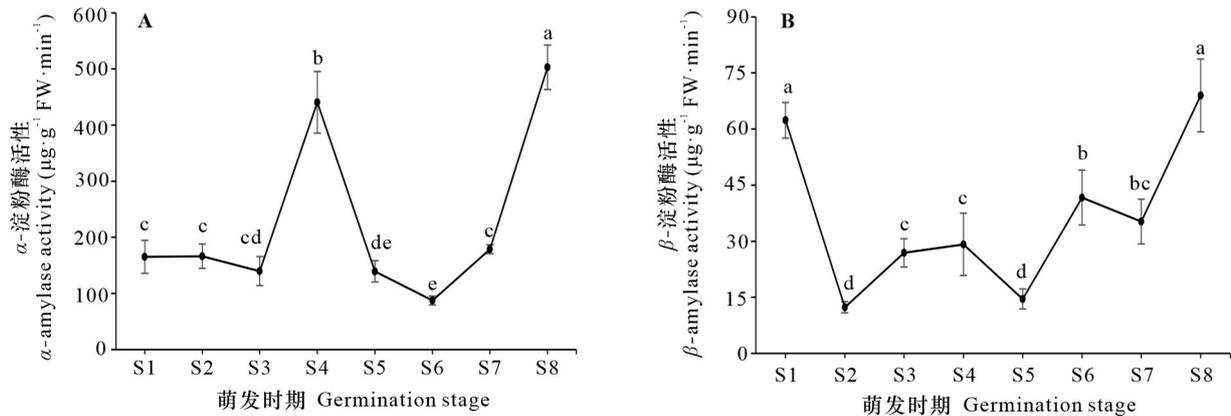
苏海兰等 (2017a) 将七叶一枝花种子萌发分

表 1 七叶一枝花种子不同萌发时期的形态指标 ( $n=10$ )Table 1 Morphology indexes of *Paris polyphylla* seed during different germination stages ( $n=10$ )

时期 Stage	时间 Time (d)	胚乳横径 Width of endosperm (mm)	胚乳纵径 Length of endosperm (mm)	胚纵径 Length of embryo (mm)	胚率 Rate of embryo (%)	萌发率 Germination rate (%)
S1	1	3.69±0.14a	3.76±0.10e	—	—	—
S2	15	3.43±0.06bc	4.21±0.08d	0.08±0.01g	1.78±0.27g	—
S3	29	3.51±0.10abc	4.99±0.08c	0.46±0.02f	9.17±0.25f	—
S4	44	3.33±0.14c	5.59±0.23b	1.98±0.08e	35.44±1.78e	—
S5	58	3.50±0.11abc	5.62±0.08b	4.02±0.05d	71.57±1.63d	61.20±2.96b
S6	72	3.50±0.13abc	5.76±0.06b	5.01±0.25c	87.09±5.07c	80.40±2.37a
S7	96	3.58±0.05ab	5.76±0.17b	8.02±0.05b	139.43±4.45b	—
S8	110	3.63±0.07ab	6.07±0.17a	19.35±0.82a	318.53±7.93a	—

注: 数值为平均值±标准差; 同列不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ); 同列相同小写字母表示差异不显著 ( $P>0.05$ )。

Note: Values are  $\bar{x}\pm s$  deviation; different lowercase letters in the same column indicate significant differences ( $P<0.05$ ); the same lowercase letter in the same column indicates no significant differences ( $P>0.05$ ).



不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。下同。

Different letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ). The same below.

图 2 七叶一枝花种子不同萌发时期  $\alpha$ -淀粉酶活性 (A) 和  $\beta$ -淀粉酶活性 (B) 的变化 (均值±标准差,  $n=3$ )Fig. 2 Changes of the  $\alpha$ -amylase (A) and  $\beta$ -amylase (B) activities in *Paris polyphylla* seed during different germination stages ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

为 3 个阶段, 即未萌发、未解除休眠阶段 (第一阶段); 萌发后上胚轴并不伸长, 当年不出苗, 处于上胚轴休眠阶段 (第二阶段); 上胚轴伸长, 子叶发育完全, 即将破土出苗阶段 (第三阶段)。本研究与苏海兰等 (2017a) 的划分方法略有不同, 在第二阶段的上胚轴休眠阶段中, 可细分为 5 个时期, 即心形胚时期 (S2 期)、种胚膨大时期 (S3 期)、胚根未突破种皮时期 (S4 期)、子叶柄伸长和胚根突破种

皮时期 (S5 期)、下胚轴突破种皮时期 (S6 期)。本研究在七叶一枝花种子萌发进程中, 露白、胚根伸长和上胚轴萌发是种子萌发进程的重要标志: 种子在进入 S5 期时, 种子开始露白, 此时取出种子播种, 可提高种子田间存活率; 而在种子进入 S6 期后, 种子的胚轴突破种皮, 种胚仅靠子叶柄与种壳相连, 若此时取出种子播种, 就容易造成子叶柄断裂, 从而导致种胚死亡。

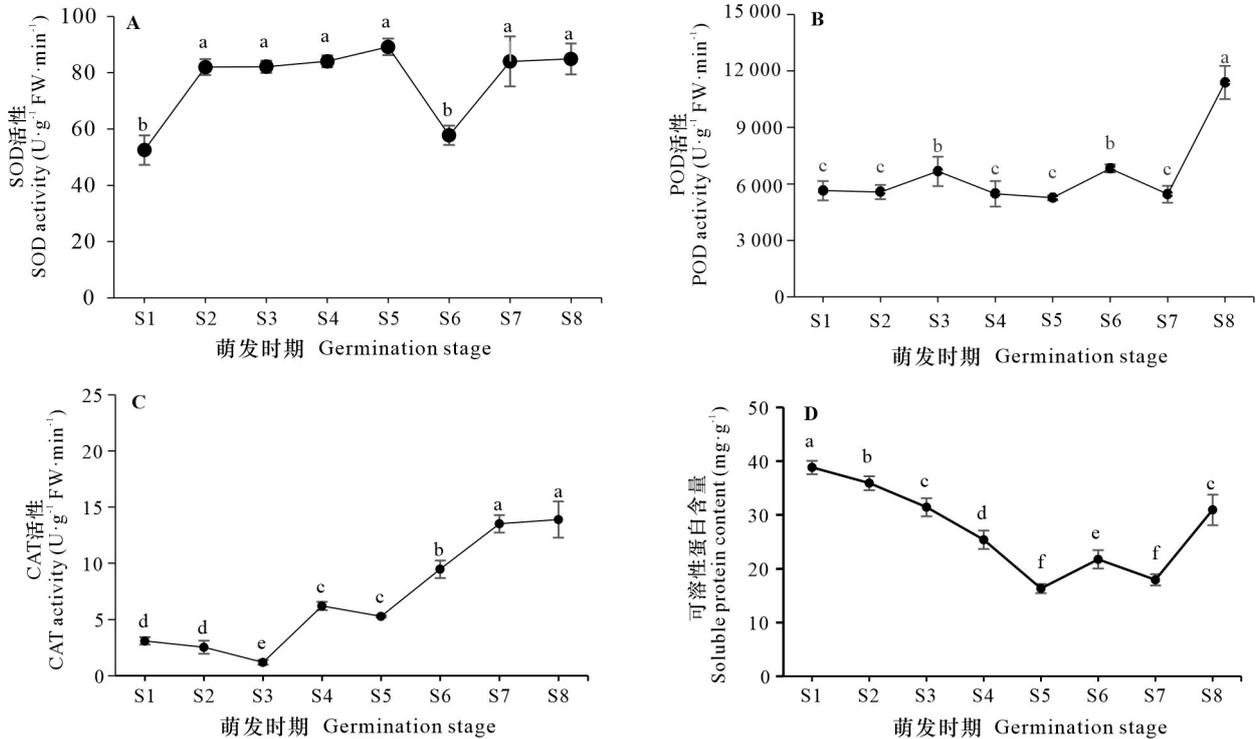


图 3 七叶一枝花种子不同萌发时期抗氧化相关酶活性和可溶性蛋白含量的变化 (均值±标准差,  $n=3$ )

Fig. 3 Changes of related enzyme activities and soluble protein content in *Paris polyphylla* seed during different germination stages ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

### 3.2 种子酶活性变化对七叶一枝花种子萌发的影响

种子通过各种酶的作用,促进蛋白质、淀粉、脂质等物质转化,进而促进种胚发育、胚根分化和出苗等活动。本研究结果表明,七叶一枝花种子的 $\alpha$ -淀粉酶活性在种子休眠未解除时较低,珠孔膨大时上升,与苏海兰等(2017b)的研究结果一致,但随后酶活性下降,至S8期时再度上升,与苏海兰等(2017b)的研究结果不同,这可能与本研究中七叶一枝花种子的胚根伸长发生时期较后有关, $\alpha$ -淀粉酶分解淀粉所释放的能量作用于胚根的伸长,从而导致 $\alpha$ -淀粉酶活性升高(王凤凤等,2017)。

本研究中,七叶一枝花从种子休眠期向萌动期过渡,并伴随着体内抗氧化酶活性的变化,SOD活性在S2-S5、S7-S8期均呈高值,此类时期均伴有种胚细胞增多的特征,而在S1、S6期SOD活性较低。这与浙贝母(许美玲,2019)、滇重楼(李戈等,2015;苏海兰等,2018)、华重楼(李昭玲等,2015)萌发时SOD的变化无规律略有不同。但一

般认为,种子维持较高的SOD活性则有利于对活性氧以及过氧化氢的清除,为种子萌发创造了良好条件(Buetler, et al., 2004; Liskay et al., 2004)。本研究中,POD活性在胚根伸长时期较其他时期显著提高,这与七叶一枝花(苏海兰等,2017a)、天山郁金香(张伟,2020)的研究结果一致,POD活性参与植物细胞壁的形成和脂肪酸的氧化,在S8期时该酶活性增加可为胚根伸长提供能量。

### 3.3 IAA、GA及ABA与七叶一枝花种子萌发的关系

植物激素对种子萌发有至关重要的调控作用,七叶一枝花随着种子的萌发进程,种子内源激素含量呈现出不同的变化趋势,从而参与调控种子。本研究中,七叶一枝花种子IAA含量高峰出现在S2期,该高峰的出现可能与种子的种胚形成有关,本研究结果与多花黄精(张武君等,2022)、紫花苜蓿(李浩天等,2023)的研究结果相似,但与苏海兰等(2017a)与李晓冬(2018)的研究结果却

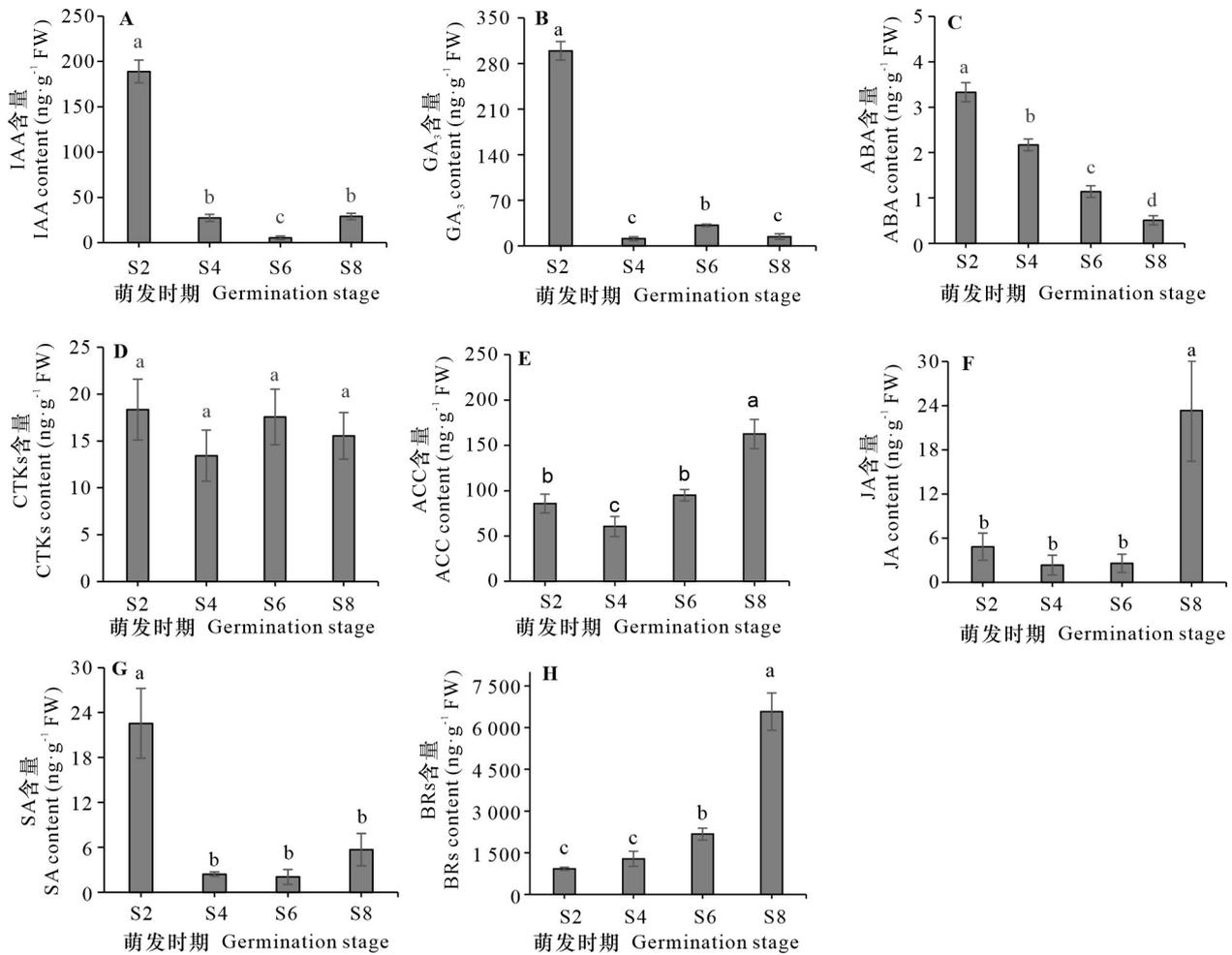


图 4 七叶一枝花种子不同萌发时期内源激素含量的变化 (均值±标准差,  $n=3$ )

Fig. 4 Change of endogenous hormone contents in *Paris polyphylla* seed during different germination stages ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

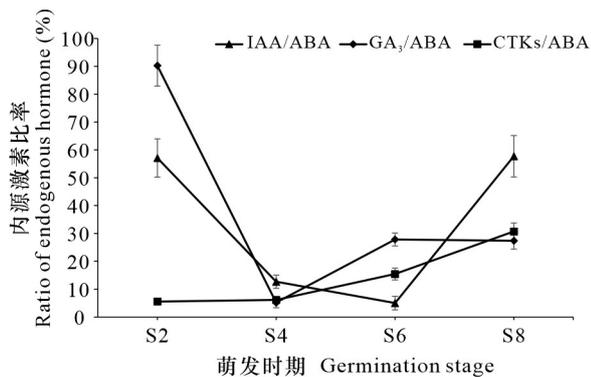


图 5 七叶一枝花种子不同萌发时期内源激素含量的比率 (均值±标准差,  $n=3$ )

Fig. 5 Ratio of endogenous hormone contents in the *Paris polyphylla* seed during different germination stages ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

不同。Liu 等(2013)的研究发现,IAA 在拟南芥种子的休眠过程中起正向调控作用,是第二类促进种子休眠的激素;而本研究发现,IAA 含量在心形胚时期最高,可能与种子刚结束休眠有关。本研究结果显示,IAA 含量与胚纵茎、胚率呈显著负相关,与七叶一枝花(苏海兰等,2017a)、滇重楼(浦梅等,2016)的研究结果不同,这可能与不同的萌发阶段需要不同浓度的 IAA 刺激有关。成京晋等(2018)的研究发现,多花黄精种子在层积过程中 IAA 含量无明显变化规律;李浩天等(2023)的研究发现,紫花苜蓿种子 IAA 含量随萌发进程递减,这与本研究的结果相似。

本研究中,七叶一枝花的种子 ABA 含量随萌发进程降低,这与滇重楼(浦梅等,2016)、棉花(夏

表 2 七叶一枝花种子不同萌发时期酶活性、内源激素含量与种子胚率的相关性 ( $df=10$ )Table 2 Correlation among enzymatic activities, endogenous hormone contents and embryo rate in *Paris polyphylla* seed during different germination stages ( $df=10$ )

指标 Index	ABA	IAA	GA <sub>3</sub>	CTK <sub>s</sub>	ACC	JA	SA	BRs	SOD	POD	CAT	$\alpha$ -淀粉酶 $\alpha$ -amy-lase	$\beta$ -淀粉酶 $\beta$ -amy-lase	可溶性蛋白 Soluble protein
胚纵径 Length of embryo	-0.947**	-0.628*	-0.625*	-0.041	0.843**	0.748**	-0.509	0.914**	-0.169	0.874**	0.962**	0.342	0.930**	-0.243
胚率 Rate of embryo	-0.953**	-0.643*	-0.634*	-0.047	0.835**	0.727**	-0.525	0.901**	-0.198	0.887**	0.960**	0.317	0.929**	-0.263

注: \* 表示显著相关 ( $P<0.05$ ); \*\* 表示极显著相关 ( $P<0.01$ )。Note: \* indicates significant correlation ( $P<0.05$ ); \*\* indicates extremely significant correlation ( $P<0.01$ ).

军等,2019)的种子萌发现象相似,而与苏海兰等(2017a)对七叶一枝花的种子萌发现象不同。ABA正向调控种子的休眠诱导和维持(宋松泉等,2020b),并且在吸胀的休眠种子中其萌发的抑制是在吸胀过程中维持较高水平的ABA积累(Iwasakiet al.,2022)。但是,Schmitz等(2002)的研究认为,种子之所以萌发是因为胚对ABA敏感性下降,与ABA含量降低关系不大。

GA<sub>3</sub>含量在S2期大量积累,此时形成心形胚,表明GA<sub>3</sub>参与调控七叶一枝花种子的种胚形成和发育,可能作为上游信号调控七叶一枝花种子整个萌发进程的开始,这与苏海兰等(2017a)的研究结果不同。种子萌发与否取决于胚生长的机械力和胚乳的限制力,前期较高的GA<sub>3</sub>含量既可以弱化种胚覆盖层的机械阻力(宋松泉等,2020c),也可以诱导 $\alpha$ -淀粉酶进而动员贮藏物的降解(Hauvermale, et al.,2012)。本研究发现GA<sub>3</sub>对七叶一枝花种子的萌发有显著促进作用,而GA<sub>3</sub>含量在S4期和S8期较低,推测GA<sub>3</sub>可能与胚根伸长关系不大。在拟南芥种子萌发过程中,GA生物合成的时空表达模式显示,GA<sub>4</sub>仅在胚根伸出前积累(Urbanova & Leubner-Metzger,2016),随后含量下降,本研究结果与之相似。

种子萌发不仅受内源激素各自含量的影响,还与各类激素之间的平衡有关,特别是促进生长激素与抑制生长激素之间的比例和平衡,而ABA与GA之间的动态平衡是种子打破休眠与萌发的关键(佐月和许永华,2021)。本研究结果显示,七叶一枝花种子在S2期GA<sub>3</sub>/ABA比值较高,可能与该时期接近S1期有关,ABA和GA的比值是植

物种子休眠状态的主要调节器(佐月和许永华,2021),S1期是七叶一枝花种子打破休眠开始萌发的始点,往往含有较高GA<sub>3</sub>/ABA比值,而往后GA<sub>3</sub>/ABA比值降低。IAA与ABA对种子萌发具有协同作用,Shuai等(2017)研究表明IAA可促进ABA的生物合成且降低ABA分解,并可增强ABA信号转导(Shu et al.,2016)。本研究中,七叶一枝花的IAA/ABA值从S2-S6期逐渐降低,而在S8期因IAA促进胚根生长(Casanova-Sáez & Voß,2019)而进一步升高。

综上所述,根据种胚形态可将七叶一枝花种子萌发过程细分为8个时期,在不同时期种子内源激素含量及相关酶活性各不相同,其中 $\alpha$ -淀粉酶活性、POD活性可能与种胚胚根伸长有关,GA<sub>3</sub>可能影响七叶一枝花种胚形成,而ABA则可能抑制种胚的生长发育。

## 参考文献:

- BAILLY C, EL-MAAROUF-BOUTEAU H, CORBINEAU F, 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology [J]. *C R Biol*, 331(10): 806-814.
- BUETLER TM, KRAUSKOPF A, RUEGG UT, 2004. Role of superoxide as a signaling molecule [J]. *Physiology*, 19(3): 120-123.
- CASANOVA-SÁEZ R, VOß U, 2019. Auxin metabolism controls developmental decisions in land plants [J]. *Trends Plant Sci*, 24(8): 741-754.
- CHENG JJ, DABUXILATU, LIU J, et al., Physiological research on the after-ripening process of the *Polygonatum*

- cyrtonea* Hua seed [J]. Seed, 37(10): 31–35. [成京晋, 达布希拉图, 刘佳, 等, 2018. 多花黄精种子后熟过程生理研究 [J]. 种子, 37(10): 31–35.]
- Chinese Pharmacopoeia Commission, 2020. Chinese Pharmacopoeia: 2020 ed. Part 2 [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press. [国家药典委员会, 2020. 中华人民共和国药典: 2020 年版. 二部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社.]
- HAUVERMALEE AL, ARIIZUMI T, STEBER CM, 2012. Gibberellin signaling: a theme and variations on DELLA repression [J]. Plant Physiol, 160(1): 83–92.
- IWASAKE M, PENFIELD S, LOPEZ-MOLINA L, 2022. Parental and environmental control of seed dormancy in *Arabidopsis thaliana* [J]. Ann Rev Plant Biol, 73(1): 355–378.
- LI G, TANG L, WANG YF, et al., 2015. Effect of different stratification treatment on physiological characteristics of *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* seed [J]. Chin Agric Sci Bull, 31(7): 149–153. [李戈, 唐玲, 王艳芳, 等, 2015. 不同层积条件下滇重楼种子的生理变化 [J]. 中国农学通报, 31(7): 149–153.]
- LI HT, SUI XQ, YANG J, et al. 2023. Dynamics of endogenous hormones during seed germination in *Medicago sativa* [J]. Grassl Turf, 43(4): 72–80. [李浩天, 隋晓青, 杨静, 等, 2023. 紫花苜蓿种子萌发过程中内源激素含量的动态变化 [J]. 草原与草坪, 43(4): 72–80.]
- LI XD, 2018. Study on rapid germination of *Paris polyphylla* var. *chinensis* seeds [D]. Yangling: Northwest A & F University. [李晓冬, 2018. 华重楼种子快速萌发研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学.]
- LI XF, ZHANG ZL, 2016. Experimental supervision of plant physiology [M]. 5th ed. Beijing: Higher Education Press. [李小方, 张志良, 2016. 植物生理学实验指导 [M]. 5 版. 北京: 高等教育出版社.]
- LI ZL, TONG K, YAN S, et al., 2015. Physiological and biochemical change of *Paris* seed in after-ripening during variable temperature stratification [J]. Chin J Chin Mat Med, 40(4): 629–633. [李昭玲, 童凯, 闫燊, 等, 2015. 变温层积过程中华重楼种胚后熟生理生化的变化 [J]. 中国中药杂志, 40(4): 629–633.]
- LISZKAY A, VAN DER ZALM E, SCHOPFER P, 2004. Production of reactive oxygen intermediates ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , and  $\cdot OH$ ) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth [J]. Plant Physiol, 136(2): 3114–3123.
- LIU XD, ZHANG H, ZHAO Y, et al. 2013. Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated *ABI3* activation in *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci, 110(38): 15485–15490.
- MA CJ, LU S, CAO GS, et al. 2016. Breeding Technology of *Paris polyphylla* var. *chinensis* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 22(18): 192–196. [马传江, 逯双, 曹广尚, 等, 2016. 七叶一枝花繁育技术研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 22(18): 192–196.]
- PU M, SUN YY, GAO CJ, et al., 2016. Relationship between endogenous hormone content and embryo growth and the seed germination of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. For Res, 29(2): 268–273. [浦梅, 孙永玉, 高成杰, 等, 2016. 滇重楼种子内源激素含量与种胚长度和萌发的关系 [J]. 林业科学研究, 29(2): 268–273.]
- PU T, LI HL, WANG J, et al., 2023. Seed germination characteristics and seedling types of *Malaria oleifera*, a rare and endangered plant [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 43(2): 242–254. [普甜, 栗宏林, 王娟, 等, 2023. 珍稀濒危植物蒜头果种子萌发特征与幼苗类型的研究 [J]. 西北植物学报, 43(2): 242–254.]
- SCHMITZ N, ABRAMS SR, KERMODE AR, 2002. Changes in ABA turnover and sensitivity that accompany dormancy termination of yellow-cedar (*Chamaecyparis nootkatensis*) seeds [J]. J Exp Bot, 53(366): 89–101.
- SHU K, LIU XD, XIE Q, et al., 2016. Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination [J]. Mol Plant, 9(1): 34–45.
- SHUAI HW, MENG YJ, LUO XF, et al., 2017. Exogenous auxin represses soybean seed germination through decreasing the gibberellin/abscisic acid (GA/ABA) ratio [J]. Sci Rep, 7(1): 1–11.
- SONG SQ, LIU J, TANG CF, et al., 2020a. Metabolism and signaling of auxins and their roles in regulating seed dormancy and germination [J]. Chin Sci Bull, 65: 3924–3943. [宋松泉, 刘军, 唐翠芳, 等, 2020a. 生长素代谢与信号转导及其调控种子休眠与萌发的分子机制 [J]. 科学通报, 65: 3924–3943.]
- SONG SQ, LIU J, XU HH, et al., 2020b. ABA metabolism and signaling and their molecular mechanism regulating seed dormancy and germination [J]. Sci Agric Sin, 53(5): 857–873. [宋松泉, 刘军, 徐恒恒, 等, 2020b. 脱落酸代谢与信号传递及其调控种子休眠与萌发的分子机制 [J]. 中国农业科学, 53(5): 857–873.]
- SONG SQ, LIU J, HUANG H, et al., 2020c. Gibberellin metabolism and signaling and its molecular mechanism in regulating seed germination and dormancy [J]. Sci Sin Vit, 50(6): 599–615. [宋松泉, 刘军, 黄荟, 等, 2020c. 赤霉素代谢与信号转导及其调控种子萌发与休眠的分子机制 [J]. 中国科学: 生命科学, 50(6): 599–615.]

- SU HL, ZHOU XZ, LI X, et al., 2017a. Physicochemical changes of *Paris polyphylla* var. *chinensis* seed during different stages of germination [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 48(22): 4755–4763. [苏海兰, 周先治, 李希, 等, 2017a. 七叶一枝花种子萌发不同阶段生理生化变化研究 [J]. *中草药*, 48(22): 4755–4763.]
- SU HL, ZHOU XZ, LI X, et al., 2017b. Carbohydrate content and amylase activity in germinating seeds of *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* [J]. *Fujian J Agric Sci*, 32(10): 1145–1149. [苏海兰, 周先治, 李希, 等, 2017b. 七叶一枝花种子萌发不同阶段贮藏物质及淀粉酶活性变化 [J]. *福建农业学报*, 32(10): 1145–1149.]
- SU HL, ZHOU XZ, LI X, et al., 2018. Dynamic changes of enzyme and endogenous of *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* seed during different stages of germination [J]. *J Nucl Agric Sci*, 32(1): 141–149 [苏海兰, 周先治, 李希, 等, 2018. 云南重楼种子萌发过程内源激素含量及酶活性变化研究 [J]. *核农学报*, 32(1): 141–149.]
- URBANOVA T, LEUBNER-METZGER G, 2016. Gibberellins and seed germination [M]. Manhattan: Johnwiley & Sons. Ltd.
- WANG FF, LIU WG, LU HY, et al., 2017. Spatiotemporal variation of  $\alpha$ -amylase in germinating corn grains [J]. *Barley Cereal Sci*, 34(4): 16–19. [王凤凤, 刘卫国, 陆海燕, 等, 2017. 萌动玉米籽粒中  $\alpha$ -淀粉酶的时空变化 [J]. *大麦与谷类科学*, 34(4): 16–19.]
- XIA J, SHI XJ, HAO XZ, et al., 2019. Effects of low temperature on enzyme activity and hormone content in germination of different genotypes of cotton seeds [J]. *Plant Physiol J*, 55(9): 1291–1305. [夏军, 时晓娟, 郝先哲, 等, 2019. 低温对不同基因型棉种萌发过程中酶活性及激素含量的影响 [J]. *植物生理学报*, 55(9): 1291–1305.]
- XU ML, 2019. Studies on seed dormancy and germination characteristics of *Fritillaria przewalskii* Maxim [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University. [许美玲, 2019. 甘肃贝母种子休眠及萌发特性研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学.]
- ZHANG W, 2020. Study on dormancy releasing mechanism of *Tulipa thianschanica* regel seeds [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University. [张伟, 2020. 天山郁金香种子休眠解除机制研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学.]
- ZHANG WJ, ZHAO YQ, LIU BC, et al., 2022. Physiological changes of *Polygonatum cyrtoneuma* Hua seeds during stratification [J]. *Fujian J Agric Sci*, 37(8): 995–1007. [张武君, 赵云青, 刘保财, 等, 2022. 多花黄精种子层积过程生理变化研究 [J]. *福建农业学报*, 37(8): 995–1007.]
- ZHANG ZL, QU WJ, LI XF, et al. 2009. Experimental supervision of plant physiology [M]. Beijing: Higher Education Press. [张志良, 瞿伟菁, 李小方, 等, 2009. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社.]
- ZUO Y, XU YH, 2021. Research progress on the mechanism of GA and ABA during seed germination [J]. *Mol Plant Breed*, 19(18): 6221–6226. [佐月, 许永华, 2021. 种子萌发过程中 GA 与 ABA 的作用机制研究进展 [J]. *分子植物育种*, 19(18): 6221–6226.]

(责任编辑 蒋巧媛 王登惠)