

匙叶翼首花种子低温层积过程中内源抑制物及激素变化研究

孟瑾瑾¹, 刘东¹, 陈红刚^{1,2}, 杜骏^{1,2*}

(1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 西北中藏药协同创新中心, 甘肃 兰州 730000)

摘要:【目的】探究低温层积过程中匙叶翼首花(*Pterocephalus hookeri*)种子生理生化变化与休眠解除的内在联系。【方法】通过低温层积处理(60 d)解除匙叶翼首花种子休眠, 观测不同层积时间种子发芽率、内源抑制物及赤霉素(GA)、吲哚乙酸(IAA)和脱落酸(ABA)的活性变化。【结果】在低温层积过程中, 匙叶翼首花种子发芽率在层积后期(45~60 d)显著提高($P < 0.05$); 在层积后, GA含量显著升高($P < 0.05$), 萌发促进物和抑制物比例(GA/ABA、IAA/ABA、GA+IAA/ABA)也呈升高趋势; 种子发芽率与GA显著正相关($P < 0.05$)。【结论】匙叶翼首花种子内部存在内源抑制物; 匙叶翼首花种子浸提液随着层积时间的延长, 对种子发芽率、根长和胚轴长的抑制先增强后减弱; 内源激素比例平衡及GA含量的上升也是匙叶翼首花种子解除休眠的关键因素。

关键词:匙叶翼首花; 种子; 低温层积; 休眠; 内源激素

中图分类号:S567 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2024)05-0228-06

DOI:10.13817/j.cnki.cyycp.2024.05.027



匙叶翼首花(*Pterocephalus hookeri*)是川续断科(Dipsacaceae)匙叶翼首草的干燥全草, 是藏族习用药材, 藏名“榜孜毒乌”^[1], 主要分布于云南、四川、西藏东部、青海南部和甘肃南部, 不丹、锡金、印度也有分布, 生于海拔1 800~4 800 m的山野草地、高山草甸^[2]。具有解毒除瘟、清热止痢、祛风通痹的功效, 被喻为地上“七种仙草”之一^[3]。但是由于匙叶翼首花种子所具有的休眠特性及市场需求的进一步增加, 导致其野生资源匮乏^[4]。

种子休眠是种子在长期系统发育过程中获得的一种对不适宜环境的适应策略, 而在农业生产上, 种子的休眠严重限制了种子的扩繁和应用。层积过程中内源抑制物及内源激素的变化是种子解除休眠的

重要原因。李强等^[5]在“风丹”种子中证实了低温层积有助于内源抑制物分解, 从而解除休眠; 在细木楠, 圆齿野鸦椿等多种植物种子上, 相关研究同样印证了低温层积可解除种子休眠^[6-8]; 韩月乔等^[9]发现白藜种子中存在内源抑制物阻碍种子代谢进而抑制萌发, 另外, 植物内源激素的绝对含量与各类激素之间的平衡, 是破除休眠的主要原因^[10]。吲哚乙酸(IAA)、赤霉素(GA)和脱落酸(ABA)是3种常见的植物内源激素。IAA通过调控GA与ABA的合成和传导影响种子的休眠及萌发^[11], 研究表明桃儿七^[12]种子在低温层积过程中IAA含量的显著上升是解除桃儿七休眠的关键。GA₃促进 α -淀粉酶、核酸酶、蛋白水解酶、ATP酶等的表达, 解除种子休眠, 促进萌发^[13-14], 经GA₃处理后的单叶蔓荆果皮^[15]粗提物能显著促进白菜种子萌发和生长。ABA促进种子贮藏蛋白和脂肪的合成, 促进种子脱水耐性和种子休眠的获得, 抑制种胚萌发。

目前对匙叶翼首花的研究主要集中在全草提取物的化学成分^[16]和药理作用^[17]等方面, 对其种子休眠的研究主要集中在温度、光照和水分等条件对匙叶翼

收稿日期:2023-06-13;修回日期:2023-09-02

基金资助:国家中药材产业技术体系建设专项资金(CARS-21)

作者简介:孟瑾瑾(1997-),女,河南商丘人,硕士研究生。

E-mail:2968764974@qq.com

*通信作者。E-mail:gslzdt@163.com

首花种子萌发特性的影响。研究发现^[18-19]匙叶翼首花种子浸提液对青稞种子萌发有一定程度的抑制作用,虽然将匙叶翼首花种子水浴一段时间或低温层积均能一定程度上解除匙叶翼首花种子休眠,但关于匙叶翼首花种子休眠与其种子内源激素的联系鲜有报道。本研究以匙叶翼首花种子为试验材料,对匙叶翼首花种子进行低温层积,通过观测不同层积阶段种子内源抑制物、激素等的变化,探究匙叶翼首花种子休眠解除与内源抑制物及激素之间的内在关系,为揭示匙叶翼首花休眠机理提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

匙叶翼首花种子于2021年9月采收于甘肃中医药大学和政药用植物园,经甘肃中医药大学杜弢教授鉴定为匙叶翼首花种子。园内海拔2 430 m,年均降水量660 mm,无霜期110 d,年均气温5.1℃,年最高气温29.0℃,年最低气温-20.4℃。土壤为黑垆土,属典型高寒阴湿区。

1.2 试验方法

1.2.1 种子基本特征及千粒重 随机选取规则种子用种子测微尺测量其长、宽等。用放大镜或解剖镜观察干种子的外部形态。参照GB/T3543法,随机选取1 000粒种子,用万分之一天平称重,重复3次。

1.2.2 种子低温层积处理 将洗净的河沙过40目筛,灭菌锅灭菌(121℃,30 min),烘箱烘干(120℃)。在容器底部铺细沙5~7 cm,翼首草种子装入纱网袋平铺于河沙之上,再覆盖河沙5~7 cm,并保证种子处于容器中央。控制沙子湿度在8%~11%,用保鲜膜封住容器口,适量打孔透气,置于4℃恒温冰箱。每隔15 d取样1次,共计5次,取一部分用作发芽和浸提试验,剩余部分置于-80℃冰箱保存备用。将-4℃下保存的种子作为对照。

1.2.3 发芽率和发芽势测定 随机选取各层积阶段种子160粒,用1%次氯酸钠消毒15分钟,再用蒸馏水冲洗5次,播于铺有两层滤纸的培养皿中,每皿40粒,4次重复,恒温25℃,半光照下培养,每天加水1 mL,记录萌发时间并计算发芽率;从处理第2天开始,每天检查记录发芽种子数,到种子连续3天不再萌发为止,以有胚根且芽长等于种子长的1/2作为发芽标准。取

种子发芽第5天统计发芽势。计算公式如下:

$$\text{发芽率} = \frac{\text{发芽种子总数}}{\text{供试种子数}} \times 100\%$$

$$\text{发芽势} = \frac{\text{第5天种子发芽数}}{\text{供试种子数}} \times 100\%$$

1.2.4 抑制物浸提及生物活性测验 不同层积阶段种子随机称取2份,每份3 g,分别置于研钵中加液氮研碎,置于两个磨口锥形瓶内。参照陈红刚^[20]等方法,取其中一份加入30 mL蒸馏水,置4℃冰箱浸提24 h,3 500 r/min离心20 min,重复浸提3次,合并3次浸提液。利用旋转蒸发仪(56℃)旋蒸至干,加水定容,使种子水浸提液浓度为0.05 g/mL;再取第2份种子加入80%乙醇,同方法制得醇浸提液。取各层级阶段种子浸提液加入铺有两层滤纸的培养皿内,以加入蒸馏水的发芽床作为对照(CK),发芽床挥干后每皿加入蒸馏水2 mL,以小白菜种子为生物活性测验材料,每皿50粒,3次重复,在恒温25℃条件下培养,及时补充水分,24 h测定发芽率,48 h测定根长,72 h测定胚轴长度^[21]。

1.2.5 生理生化测定 不同层积阶段种子GA、IAA、ABA等均采用ELISA酶联免疫法试剂盒(上海钦诚)测定。

1.3 数据分析

使用Excel 2019、SPSS 25.0、Origin 2018等软件进行数据处理及作图。

2 结果与分析

2.1 种子基本特征

匙叶翼首花种子为瘦果,长5~9 mm,倒卵形,淡棕色,具8条纵棱,疏生贴伏毛,具棕褐色宿存萼刺20条,刺长约10 mm,被白色羽毛状绒毛。去皮后种子长4.77 mm,宽1.85 mm,千粒重8.35 g(图1)。

2.2 低温层积过程中匙叶翼首花种子发芽率和发芽势变化特征

低温层积可以提高匙叶翼首花种子的发芽率和发芽势,发芽率和发芽势随层积时间的延长呈上升→下降→上升的趋势。在层积60 d时发芽率最高,达79%,显著高于其他处理。层积时间长短不同,种子萌发时滞存在差异,层积0 d的种子萌发周期为25 d,层积30 d的种子萌发周期为16 d,而层积60 d的种子发芽最快,萌发周期只有7 d(表1)。

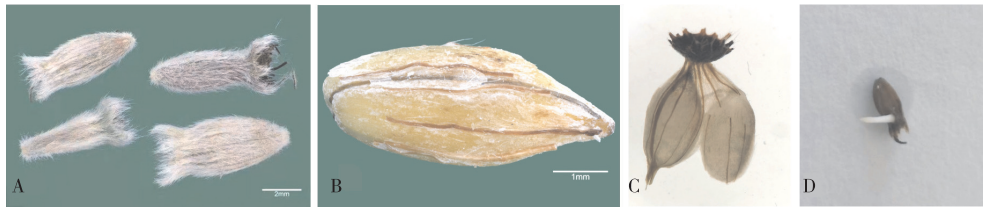


图1 匙叶翼首花种子形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of the seeds of the *Pteroccephalus hookeri*

注:A 匙叶翼首花种子外观形态,B 去掉种皮后种子,C 4X体视显微镜下种子外种皮,D 种子发芽照片。

表1 低温层积对匙叶翼首花种子发芽率和发芽势及发芽周期的影响

Table 1 Effects of low temperature stratification on seed germination rate and germination potential and germination cycle of the seeds of *Pterygoides pterygoides*.

层积时间/ d	发芽率/%	发芽势/%	发芽周期/ d
0	36.88±7.47	7.00±4.33	25
15	51.25±8.54	12.30±5.96	21
30	64.38±3.15	26.50±1.25	10
45	46.88±8.26	17.00±2.04	9
60	71.25±8.54	37.50±2.39	7

2.3 低温层积过程中内源抑制物变化特征

随着匙叶翼首花种子层积时间的延长,水浸提液对小白菜种子生物活性抑制性呈先增强后减弱的趋势。层积0~45 d种子水浸提液处理小白菜种子,小白菜种子发芽率分别为33%(层积0 d)、37%(层积15 d)、35%(层积30 d)、44%(层积45 d)、59%(层积60 d),对照(CK)的发芽率为98%;上述阶段表现为随着层积时间的延长,水浸提液对小白菜种子生物活性抑制性逐渐增强;种子层积至60 d,水浸提液对小白菜种子生物活性抑制性与层积45 d相比明显减弱,此时小白菜种子发芽率为59%(图2-A)。

各层积阶段的匙叶翼首花种子用80%乙醇浸提,用浸提液开展小白菜种子萌发试验,结果表现为乙醇浸提液对小白菜种子生物活性抑制性呈现先增强后减弱的趋势。层积0~60 d乙醇浸提液处理小白菜种子,其发芽率表现为:7%(层积0 d)、25%(层积15 d)、33%(层积30 d)、47%(层积45 d)、53.5%(层积60 d),对照(CK)的发芽率为86%(图2-A)。

各层积阶段种子水和80%乙醇浸提液作用于小白菜种子,对小白菜种子萌发均有抑制作用,其幼苗的根和胚轴伸长生长也受到抑制,具体表现为抑制性先

增强后减弱,层积0~30 d种子浸提液对幼苗根和胚轴伸长抑制性均随层积时间的增加而增强,30~60 d是随层积时间的增加而减弱。在整个层积过程(0~60 d)中,匙叶翼首花种子水和80%乙醇浸提液处理的小白菜种子,其幼苗的根长和胚轴长始终小于CK。

2.4 低温层积过程中匙叶翼首花种子内源激素含量变化特征

不同层积阶段匙叶翼首花种子中含有的GA、IAA和ABA含量不同,并且GA/ABA、(GA+IAA)/ABA、IAA/ABA等比例也不相同(图3)。GA含量在层积0~45 d内呈上升趋势,45 d GA含量最高为193.33 ng/g,45~60 d略有下降。ABA含量在整个层积过程中波动较大,呈下降—上升—下降的变化趋势,含量变化为134.28 ng/g~168.79 ng/g。IAA含量在整个层积过程中,呈上升趋势,含量变化为81.13~110.03 ng/g。

GA/ABA和(GA+IAA)/ABA比值呈上升—下降—上升—下降的趋势,前者比值变化是1.02~1.41,后者比值变化是1.51~2.20,并且相互间差异显著。IAA/ABA比值呈上升—下降—上升的趋势,比值变化是0.48~0.82,相互间变化差异显著($P<0.05$)。

2.5 匙叶翼首花种子各指标间相关性分析

将不同层积阶段种子发芽率与GA、IAA、ABA、GA/ABA、(GA+IAA)/ABA、IAA/ABA等进行相关性分析,结果表明,匙叶翼首花种子层积过程中,种子发芽率与GA含量呈显著正相关($r=0.997$),与GA/ABA、IAA/ABA、(GA+IAA)/ABA相关性均不显著(表2)。

3 讨论

3.1 种子形态

本研究通过对匙叶翼首花种子长宽、千粒重和外部形态的观测,发现它具有两层种皮,外种皮疏松贴

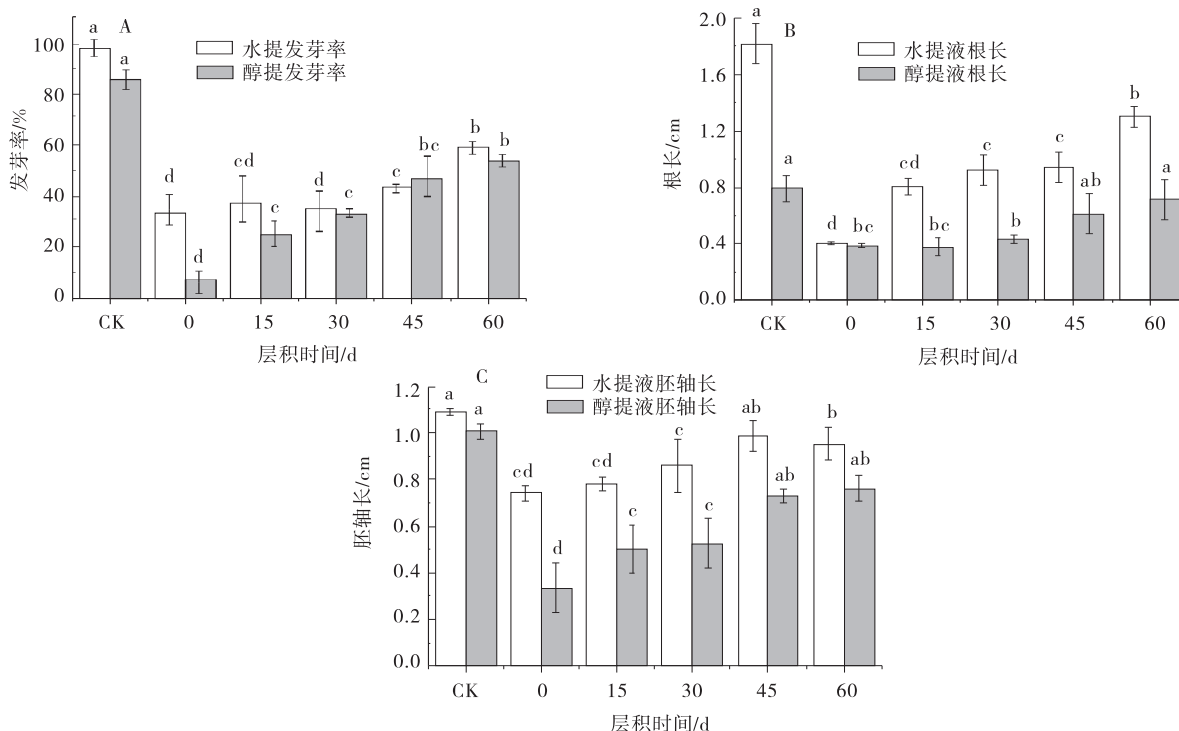


图 2 匙叶翼首花种子内源抑制物对白菜种子的影响

Fig. 2 Effects of endogenous seed of *Pterocephalus hookeri* inhibitors on *Brassica chinensis* L.

注:A匙叶翼首花种子浸提液对白菜种子发芽率的影响;B匙叶翼首花种子浸提液对白菜种子根长的影响;C匙叶翼首花种子浸提液对白菜种子胚根长的影响。不同小写字母表示处理之间在0.05水平差异显著(P<0.05)。

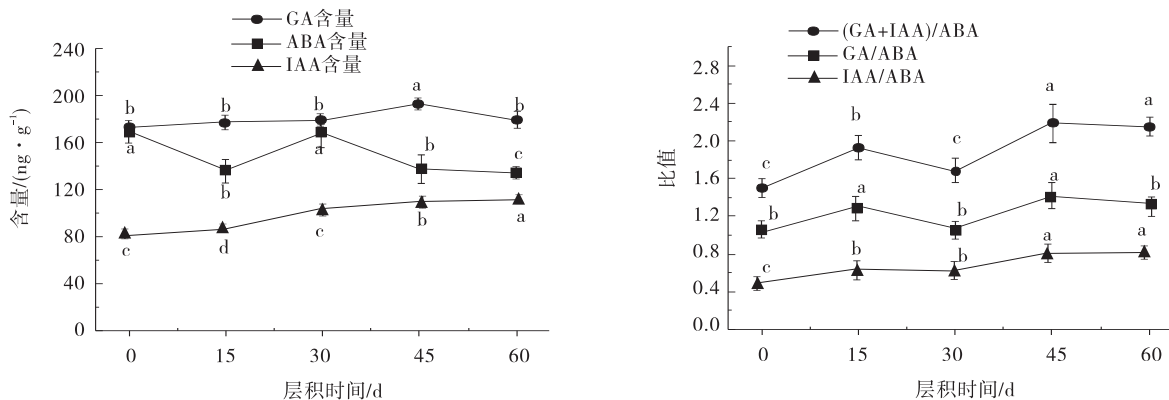


图 3 匙叶翼首花种子内源激素含量变化特征

Fig. 3 Characteristics of endogenous hormone content changes in seeds of *Pterocephalus hookeri*

注:不同小写字母表示处理之间在0.05水平差异显著(P<0.05)。

表 2 匙叶翼首花种子各指标间相关性分析

Table 2 Correlation analysis between indexes of *Pterocephalus hookeri* seeds

不同层积时期各指标间的相关性分析						
指标	GA	IAA	ABA	GA/ABA	IAA/ABA	(GA+IAA)/ABA
发芽率	0.997*	-0.4162	0.4517	-0.2102	-0.3209	-0.2509

注:不同小写字母表示处理之间在0.05水平差异显著(P<0.05)。

伏毛,具棕褐色宿存萼刺,被白色羽毛状绒毛,并且残存的宿存萼较坚硬,种子萌发时难以突破。

3.2 种子休眠与内源抑制物的关系

内源抑制物在休眠性种子中普遍存在,种类繁多

多,且存在于种子的不同部位,从而影响种子萌发。本研究以匙叶翼首花种子为材料进行生物活性测验,结果表明,各层积阶段用水和80%乙醇浸提液处理匙叶翼首花种子,种子发芽率均显著低于CK,表明种子内部存在水溶性和醇溶性内源抑制物,并且,随着层积时间的延长,水和80%乙醇浸提液对匙叶翼首花种子发芽率、根长和胚轴长的抑制效果逐渐减弱,这可能是在低温层积初期,种子中内源抑制物含量较高,萌发抑制性较强,随着层积时间的延长,内源抑制物由种皮(果皮)大量溢出,被层积的沙土吸收,种子中的内源抑制物含量逐渐降低,抑制作用减弱。同时,匙叶翼首花种子的发芽率逐步升高,说明匙叶翼首花种子中内源抑制物的减少可能是其休眠解除的关键。

3.3 种子休眠与内源激素的关系

植物内源激素在植物的整个生长发育阶段起着重要作用,GA、ABA、IAA是常见的植物激素^[22],有研究表明GA和ABA在多个层面对种子的休眠和萌发具有重要的调节作用,GA促进种子萌发,而ABA则与GA拮抗,抑制种子萌发^[23],在本研究中随着层积时间的延长,GA呈上升趋势,并在层积60d时达到最高,这与陈媛媛等^[24]研究结论一致。未进行层积的匙叶翼首花种子ABA含量高于其他层积阶段,随着层积时间的延长,ABA含量呈波浪状降低,并在层积60d时含量达到最低。IAA通过调控GA与ABA的合成和传导影响种子的休眠及萌发^[25],斯琴巴特尔等^[26]研究表明,低浓度的IAA对蒙古文扁桃种子萌发有促进作用,高浓度IAA则会对种子萌发产生抑制作用。本研究结果也符合此变化规律,植物激素对种子解除休眠的调控是各种激素协同作用的结果^[27]。萌发促进物与抑制物的比值被认为是调节种子萌发的一个重要因素,本研究中随着层积时间的增加,萌发促进物与抑制物的比例(GA/ABA、IAA/ABA、(GA+IAA)/ABA)及GA含量逐渐上升是解除休眠的关键,此结论在低温层积解除桃儿七种子休眠的研究中已得到验证。本试验仅对匙叶翼首花的休眠特性和解除休眠措施进行了研究,发现了匙叶翼首花种子具有休眠抑制物,但没有进一步分析抑制物所在具体部位及抑制物的成分,下一步应通过分离、纯化与鉴定确定萌发抑制物的成分。

4 结论

低温层积可有效促进匙叶翼首花种子萌发,提高种子发芽率。匙叶翼首花种子中内源抑制物的减弱、萌发促进物与萌发抑制物(GA/ABA、IAA/ABA、GA+IAA/ABA)的比例及GA含量的升高是影响匙叶翼首花种子解除休眠的关键因素。

参考文献:

- [1] 青海省藏医药研究所. 中国藏药(第一卷)[M]. 上海:上海科技出版社,1996:101-105
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(73卷第一分册)[M]. 北京:科学出版社,1996:12-71
- [3] 庞伟. 藏药翼首草的研究与应用[J]. 中国民族医药杂志,2007,13(5):63-65
- [4] 杨敬军,马令法,何淑玲,等. 匙叶翼首草种子特性及萌发最适条件的研究[J]. 西南农业学报,2013,26(6):2489-2492.
- [5] 李强,孙海燕,朱铭玮,等. '凤丹'种子层积过程中内源抑制物含量变化规律[J]. 经济林研究,2022,40(4):81-89.
- [6] 张心艺,闫旭,李铁华,等. 细叶楠种子休眠与萌发对低温层积的生理响应[J]. 植物科学学报,2022,40(3):398-407.
- [7] 张莉梅,张子晗,刘源,等. 低温层积过程中圆齿野鸦椿种子的生理生化变化[J]. 种子,2015,34(7):37-40.
- [8] 何超,彭健,韩博,等. 低温层积对纳罗克非洲狗尾草种子内源激素的影响[J]. 草业与畜牧,2016,226(3):5-12.
- [9] 韩月乔,于营,王志清,等. 白藜种子休眠原因及解除方法研究[J]. 河北农业大学学报,2015,38(2):43-47.
- [10] Khan A A. Primary, Preventive and Permissive Roles of Hormones in Plant Systems[J]. Botanical Review, 1975, 41(4):391-420.
- [11] 宋松泉,刘军,唐翠芳,等. 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,2020,65(34):3924-3943.
- [12] 久西加,杜翌,陈红刚,等. 桃儿七种子低温层积过程中胚形态及生理生化物质变化[J]. 西北植物学报,2021,41(12):2096-2103.
- [13] 赵永华,杨世林,刘惠卿,等. 西洋参种子休眠解除与磷酸戊糖途径关系的研究[J]. 中草药,2001(3):69-71.
- [14] 田小霞,孟庆沂,毛培春,等. 外源赤霉素GA₃对偃麦草属植物种子萌发特性的影响[J]. 草原与草坪,2022,42(6):95-100.
- [15] 尹德洁,布凤琴,徐艳芳,等. 单叶蔓荆种子休眠特性与

- 解除方法[J]. 林业科学, 2020, 56(12): 157-165.
- [16] 黄美玲, 周静, 伍城颖, 等. 基于UPLC-QTOF-MS/MS的藏药翼首草不同提取物化学成分比较研究[J]. 中国野生植物资源, 2022, 41(6): 31-40.
- [17] 王芸, 吴宇, 蒋庆锋, 等. 翼首草鲨烯合酶(PhSQS2)全长克隆、表达特性分析及蛋白功能验证[J]. 中草药, 2022, 53(21): 6840-6847.
- [18] 杨敬军, 马令法, 何淑玲, 等. 匙叶翼首草种子浸提液对青稞种子化感作用的研究[J]. 中国种业, 2013, 225(12): 56-58.
- [19] 杨敬军, 马令法, 何淑玲, 等. 匙叶翼首草种子特性及萌发最适条件的研究[J]. 西南农业学报, 2013, 26(6): 2489-2492.
- [20] 陈红刚, 赵文龙, 晋玲, 等. 红花绿绒蒿种子休眠及破除方法研究[J]. 草地学报, 2021, 29(2): 402-406.
- [21] 徐任生. 天然产物化学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 424-425.
- [22] 徐海宁, 甘然, 吴巧花, 等. 3种樟科植物果皮内源激素定量分析[J]. 南方林业科学, 2020, 48(6): 1-3+39.
- [23] 刘开业, 陆肇伦, 杨烈. 不同外源激素处理对狗牙根种子发芽的影响[J]. 草原与草坪, 2011, 31(5): 26-29.
- [24] 陈媛媛, 刘秀岩, 刘福顺, 等. 龙葵种子萌发过程中生理生化变化研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(4): 952-956.
- [25] Gazzarrini S, Tsai A Y L. Hormone cross-talk during seed germination [J]. Essays biochemistry, 2015, 58: 151-64.
- [26] 斯琴巴特尔, 秀敏. 蒙古扁桃种子萌发的生理生化特性[J]. 中国草地学报, 2006, 28(2): 39-43.
- [27] Moles A T, Ackerly D D, Webb C O, *et al.* A brief history of seed size [J]. Science, 2005, 307 (5709): 576-580.

Study on endogenous inhibitors and hormonal changes during low-temperature accumulation of *Pterocephalus hookeri* seeds

MENG Jin-jin¹, LIU Dong¹, CHEN Hong-gang^{1,2}, DU Tao^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Northwest Collaborative Innovation Center for Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Abstract: [Objective] The study was carried out in order to explore the internal relationship between seed physiological and biochemical changes of *Pterocephalus hookeri* and dormancy removal during the process of low temperature stratification. [Method] The seed dormancy was relieved by low temperature stratification treatment (60 d). The germination rate, endogenous inhibitors and the activities of gibberellin (GA), indoleacetic acid (IAA) and abscisic acid (ABA) were observed at different stratification time. [Result] The results showed that during the low temperature stratification process, the germination rate of the seed was significantly increased at the late stage of stratification (45~60 d) ($P < 0.05$). After stratification, GA content was significantly increased ($P < 0.05$), and the ratio of germination promoters to inhibitors (GA/ABA, IAA/ABA, GA+IAA/ABA) also showed an increasing trend. There was a significant positive correlation between seed germination rate and GA ($P < 0.05$). [Conclusion] It was found that there were endogenous inhibitors in the seeds of *Pterocephalus hookeri*. With the extension of the stratification time, the inhibition of the seed extract on the germination rate, root length and cotyl length of *P. hookeri* seeds first increased and then decreased. The increase of GA content was also the key factors for the release of dormancy of the seeds.

Key words: *Pterocephalus hookeri*; seed; low-temperature layering; dormancy; endogenous hormones

(责任编辑 康宇坤)