

文章编号: 0529-6579 (1999) 02-0075-05

影响南方红豆杉种子萌发因素的研究^{*}

朱念德, 刘蔚秋, 伍建军, 廖文波

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 研究了南方红豆杉种胚的发育状况、外种皮的结构以及种子各部分抑制物质相对活性。结果表明种子形态成熟时, 种胚基本成熟, 离体培养可以生长成苗; 外种皮的不透气性和胚乳中的某些抑制物质可能是抑制南方红豆杉种子萌发的因素, 但 ABA 不是萌发的抑制因素。

关键词: 南方红豆杉 (*Taxus mairei*); 种胚; ABA; 萌发

中图分类号: Q 945 **文献标识码:** A

南方红豆杉 (*Taxus mairei*) 是我国珍贵的观赏及用材树种, 其树皮所含的抗癌物质紫杉醇较高。由于遭到极大的人为破坏, 加上南方红豆杉自然繁殖力低, 因此, 目前该种已处于濒危状态。

南方红豆杉种子休眠期长、发芽缓慢不齐, 是造林、引种、繁殖和育种的重要障碍。目前, 对于南方红豆杉种子难于萌发的原因研究不多^[1~3], 本文对影响南方红豆杉种子萌发的因素进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材 料

供试种子分 2 批分别于 1996 年 11 月和 1997 年 11 月采于广东省连县大东山雷神堂。1 000 粒种子质量为 84.4 g。1996 年采的种子, 在 4 °C 冰箱中贮藏 1 a (称 A 种子), 1997 年采的种子于 4 °C 冰箱中 1 个月后再在室温保存 1 个月, 然后进行实验 (称 B 种子)。种子在贮藏过程中, 以氯化三苯四氮唑 (TTC) 检查其生活力, 结果表明都有生活力。

1.2 方 法

1.2.1 脱落酸的提取和测定 提取和测定的方法参见文献 [4, 5]。

1.2.2 提取物生物活性的生物鉴定 鉴定材料为油菜 (*Brassica campestris* L.) 种子。在小培养皿中, 放入相当于一定鲜质量种皮或胚乳的提取物质, 然后加入 2 mL 的蒸馏水, 使每 mL 水中所含提取物相当的外种皮或胚乳的鲜质量分别为 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 g,

^{*} 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (950091); 华南科学与技术研究中心基金; 林业部保护司 GEF 小型科研基金资助项目

收稿日期: 1998-09-21 作者简介: 朱念德, 男, 1941 年生, 副教授。

再加入一小块圆形滤纸，其上放 50 粒油菜种子，于 27℃下培养 48 h 测发芽率，56 h 测根长。对照组只加 2 mL 蒸馏水。

用同样的方法，在小培养皿中分别加入 2 mL 0.002, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μg/L 的 ABA 溶液，测定 ABA 溶液对油菜种子的萌发和根生长的影响。

1.2.3 外种皮透水性测定 取 25 粒南方红豆杉种子放入水中，每天取样，用滤纸擦干表面水分，称量，直至其质量不再增加为止。每次记录含水量，作吸水曲线。

1.2.4 种皮和种胚结构观察 材料用 FAA 固定，常规石蜡制片，Olympus BH2 显微镜观察并照相。

1.2.5 离体胚培养 A、B 种子剥去外种皮后，用 φ=70%乙醇和 w=0.2%次氯酸钠表面消毒，将离体胚在培养基上培养。培养基为 1/2 MS 加 w=0.5%活性炭和 w=3%蔗糖，并用 w=0.8%琼脂固化，加入 2 mg/L 的 BA 或不加任何外源激素。

2 结 果

2.1 种子中脱落酸（ABA）定性定量分析结果

根据液相色谱法分析结果，计算出每 g 鲜质量的种子外种皮及胚乳（包括内种皮和胚）中 *m* (ABA) 为：1996 年采收种子（A 种子）0.275 μg, 0.130 μg；1997 年采收种子（B 种子）0.053 μg, 0.043 μg。

2.2 南方红豆杉种子各部位抑制物质活性相对比较

南方红豆杉种子外种皮及胚乳的提取物以及 ABA 溶液对油菜种子萌发及幼根生长的抑制作用见表 1, 2。

表 1 南方红豆杉种子提取物对油菜种子萌发及幼根生长的影响

Tab 1 Inhibitory effect of extraction to the germination of <i>Brassica campestris</i> seeds and growth of young roots								
时间	种子外种皮				种子胚乳			
	<i>m</i> ¹⁾ /g	<i>c</i> (ABA) (μg·mL ⁻¹)	萌发率 ²⁾ %	<i>l</i> ³⁾ cm	<i>m</i> /g	<i>c</i> (ABA) (μg·mL ⁻¹)	萌发率 %	<i>l</i> cm
1996	0.05	0.013 7	34.6	0.447	0.05	0.006 5	32.0	0.300
	0.10	0.027 5	40.0	0.355	0.10	0.013 0	9.0	0.246
	0.25	0.068 8	21.0	0.200	0.25	0.032 5	6.0	0.140
	0.50	0.137 5	7.0	0.150	0.50	0.065 0	5.0	0.100
	1.00	0.275 0	0	0.120	1.00	0.130 0	0	0.050
	0.05	0.002 7	31.3	0.42	0.05	0.002 2	34.0	0.440
1997	0.10	0.005 3	26.7	0.27	0.10	0.004 3	17.0	0.260
	0.25	0.013 3	12.0	0.15	0.25	0.010 8	19.0	0.230
	0.50	0.026 5	6.0	0.12	0.50	0.021 5	6.6	0.200
	1.00	0.053 0	0	0.08	1.00	0.043 0	0	0.100
	对照	0	48.0	0.550				

1) 每 mL 提取物溶液相当的鲜质量；2) 48 h 后的萌发率；3) 56 h 后的平均根长

由表 1 可见，随着外种皮及胚乳提取物质量浓度的提高，油菜种子的发芽率及平均根长均明显下降。低温贮藏的种子的外种皮提取物对油菜种子的萌发和幼根生长的抑制作用相对较小，但当每 mL 溶液中提取物相当的鲜质量达到 1 g 时，油菜种子的萌发和幼根生

长在 4 种提取物溶液中都完全受到抑制，此时 A、B 种子的外种皮和胚乳提取物溶液中 ABA 的质量浓度分别为：0.275，0.130，0.053，0.043 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 2 ABA 溶液对油菜种子萌发及幼根生长的影响

Tah 2 Inhibitory effect of ABA solution to the germination of *Brassica campestris* seeds and growth of young roots

$c(\text{ABA})/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	对照	0.002	0.005	0.010	0.050	0.100	0.200	0.500	1.000	2.000	4.000
48 h 时萌发率/%	35.0	39.0	32.0	22.0	25.0	20.0	18.0	12.0	2.0	2.0	0
56 h 时平均根长/cm	0.36	0.36	0.40	0.27	0.24	0.30	0.41	0.19	0.08	0.02	0

由表 2 可知，当 $c(\text{ABA})$ 为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 时，ABA 溶液对油菜种子的萌发及幼根生长的抑制作用是比较微弱的，即使在 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 ABA 溶液中，油菜种子的萌发率仍然达到 12.0%，根长达 0.19 cm。因此南方红豆杉种子提取物中抑制种子萌发的物质可能有 ABA 的影响，但很可能还有别的物质起作用，这需要进一步的研究确定。

2.3 外种皮透水性测定结果

切破外种皮的种子和对照（完整）种子的吸水量见图 1。切破外种皮的种子第 1 天吸水量迅速增加至 29%，而对照组（完整）种子的吸水量则呈缓慢增长，第 1 天吸水量仅为 15%，但最终两者都能达到充分吸水状态。

2.4 南方红豆杉离体胚培养结果

采后 2 个月的南方红豆杉种子（B 种子）以及低温贮藏的种子（A 种子）的完全剥离胚乳的离体胚或带少量胚乳的离体胚在 1/2 MS 培养基中培养 40 d 后，两种离体胚均有不同程度的生长和萌发（图 2a，表 3）。从培养结果可见，A 种子和 B 种子的离体胚均可萌发和生长，其中 B 种子完全剥离胚乳的离体胚的萌发率比带少量胚乳的离体胚高，A 种子则相反，而在含有 BA 的培养基上的离体胚的萌发均好于在不含外源激素的培养基上的离体胚。

表 3 南方红豆杉离体胚培养萌发率/%

Tah 3 Germination rate of embryos cultured *in vitro*

材料		BA	
		未加 BA	含 2 mg/mL
A 种子	无胚乳	—	35.0
	带胚乳	—	50.0
B 种子	无胚乳	50.0	72.5
	带胚乳	0	60.7

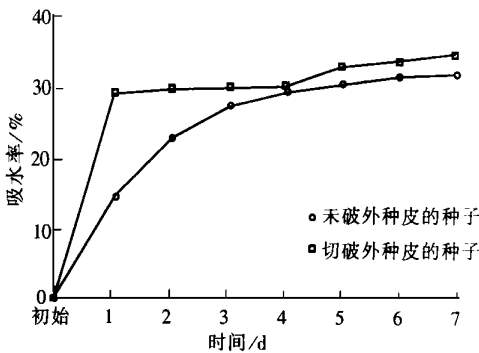


图 1 南方红豆杉种子的吸水曲线

Fig 1 Water absorbing curve of *Taxus mairei* seeds

2.5 种子发育状况观察结果

种胚显微结构显示，胚体各部分基本分化完善（图 2b ~d），顶端分生组织明显向上突起，原形成层出现，但发育程度较差，维管系统尚未分化。表明种胚虽未完全长大，但基本上已成熟。南方红豆杉种子的外种皮由 3 层构成（图 2e），最外 1 层细胞外壁强烈增

厚,具角质和蜡质层,形成不透水结构;第2层由2~4层栓化的厚壁细胞组成,细胞排列极为紧密;第3层由约28层的石细胞组成(图2f).外种皮这种结构成为种子气体和水分交换的主要障碍.顶端分生组织明显向上突起,原形成层出现,但发育和度较差,维管系统尚未分化.表明种胚虽未完全长大,但基本上已成熟.

南方红豆杉种子的外种皮由3层构成(图2e),最外1层细胞外壁强烈增厚,具角质层和蜡质层,形成不透水结构;第2层由2~4层栓化的厚壁细胞组成,细胞排列极为紧密;第3层由约28层的石细胞组成(图2f).外种皮这种结构成为种子气体和水分交换的主要障碍.

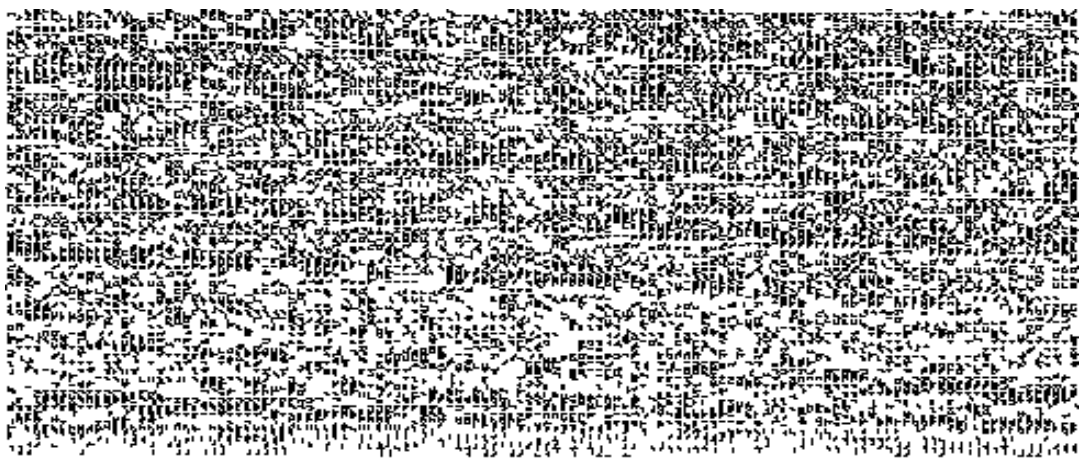


图2 南方红豆杉种子离体胚萌发及种胚和外种皮的显微结构

Fig. 2 Gemination of embryos of *Taxus mairei* seeds cultured *in vitro* and the microscopic structure of seed embryo and outer seed coat

a 离体胚萌发; b 种胚显微结构; c 种胚的顶端分生组织; d 种胚中尚未分化的维管系统;
e 种子外种皮的结构; f 外种皮中的石细胞

3 讨论

从分析结果可以看出,南方红豆杉种子中各部分都含有ABA,经冷层积后的种子,其 $c(ABA)$ 不仅没有下降反而有所上升.油菜种子萌发试验结果显示,经冷层积后的外种皮提取物抑制活性有所下降,但胚乳提取物的抑制活性反而增加.目前对于层积过程中 $c(ABA)$ 的下降是种子解除休眠的原因已受到普遍怀疑^[6],本研究认为南方红豆杉种子中存在的抑制萌发的物质很可能并不仅仅是ABA,应该还有别的物质起作用,但这种物质是什么尚需进一步研究.

解剖观察和离体培养结果说明,南方红豆杉种胚基本成熟,经离体无菌培养可以生长成苗,说明南方红豆杉种胚本身没有休眠期,不必经过后熟即可萌发.离体胚培养的结果还表明,胚乳中的某些抑制物质可能与南方红豆杉种子的休眠有关,但BA的作用可以减弱这种抑制作用.冷层积的种子在含2 mg/L BA的培养基上培养时,带胚乳的离体胚的萌发率反而升高,可能是由于BA抵消了胚乳中的抑制物的作用,而胚乳可提供胚萌发所需的某些营养物质.

种皮解剖观察指出, 南方红豆杉种子有多层厚壁细胞组成的坚硬外种皮, 形成高度不透水层, 但完整种子与破皮种子的最大吸水率近似, 只是破皮种子第 1 天的吸水率较大一些, 说明完整种子具有通畅的种孔, 能够充分吸收水分, 坚硬外种皮不是种子吸水的障碍. 坚硬外种皮的蜡质和栓质层则可能是氧气进入种子的主要障碍. 谭一凡曾报道, 南方红豆杉存在完整种皮时, 种子处于明显的无氧呼吸状态^[2], 而高度缺氧条件下, 可导致种子内抑制物的形成^[7], 从而影响种子的生理后熟和萌发.

因此, 影响南方红豆杉种子萌发的因素可能与胚乳和外种皮存在的抑制物质以及外种皮的不透气性有关.

参考文献:

- [1] 吴啸峰. 红豆杉种子抑制物质的初步研究 [J] . 植物生理学通讯, 1985, 4: 23 ~ 26.
- [2] 谭一凡. 南方红豆杉种子后熟生理的研究 [J] . 中南林学院学报, 1991, 11 (2): 201 ~ 206.
- [3] 史忠礼, 周菊华, 王子卿. 南方红豆杉种子休眠的研究 [J] . 浙江林业科技, 1991, 11 (5): 1 ~ 6.
- [4] 丁静, 沈镇德, 方亦雄. 植物内源激素的提取、分离和生物鉴定 [J] . 植物生理学通讯, 1979 (2): 27 ~ 39.
- [5] SAUNDERS P F. Isolation of plant growth substances [M] . HILLMAN J R ed New York,: Cambridge University Press, 1978. 97 ~ 115.
- [6] BERRIE A M. Germination and dormancy [M] . In: WILKINS M B ed. Advanced plant physiology. London: Pitman Press, 1984. 452 ~ 456.
- [7] 傅家瑞编. 种子生理 [M] . 北京: 科学出版社, 1985. 259 ~ 261.

Study on Factors Affecting the Germination of *Taxus mairei* Seeds

*
ZHU Nian-de , LIU Wei-qiu, WU Jian-jun, LIAO Wen-bo

Abstract: Developmental state of seed embryo, structure of outer seed coat and relative activity of inhibitory substances of different parts of *Taxus mairei* seeds were studied. The results showed that when seeds matured morphologically, their embryos matured too, for embryos cultured *in vitro* could germinate and develop into shoots. The results also showed that the impermeability of oxygen through the seed coat and some inhibitory substances (but not ABA) in seed coat and endosperm might be the factors that affect the germination of *Taxus mairei* seeds.

Keywords: *Taxus mairei*; embryo, ABA, germinate

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China