

## 华中五味子种子的发育和3种内源激素含量的变化

齐永平<sup>1</sup>, 顾蔚<sup>1,2,3,\*</sup>, 罗成<sup>1</sup>, 王喆之<sup>1,2,3</sup>

陕西师范大学<sup>1</sup>生命科学学院, <sup>2</sup>药用植物资源与天然药物化学教育部重点实验室, <sup>3</sup>西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 西安710062

### Development and Changes of Three Endogenous Hormones Contents of Seed in *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils.

QI Yong-Ping<sup>1</sup>, GU Wei<sup>1,2,3,\*</sup>, LUO Cheng<sup>1</sup>, WANG Zhe-Zhi<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, <sup>2</sup>Key Laboratory of the Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, <sup>3</sup>National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Crude Drugs in Northwest of China, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

**摘要:** 研究秦岭地区野生华中五味子种子的发育及其不同发育时期种子中内源激素 GA<sub>3</sub>、IAA 和 ABA 含量变化的结果表明: 盛花期后 80 d 华中五味子种子形态发育已完善, 相对含水量降至 28.8%, 盛花期后 60 d 和 80 d 的可溶性糖和可溶性蛋白含量分别达到最大, GA<sub>3</sub> 和 IAA 含量以及 ABA 含量分别在盛花期后 30 d 和 70 d 达到最大。

**关键词:** 华中五味子; 种子; 发育; 内源激素

植物种胚发育状况与种子的休眠和萌发密切相关。植物激素作为植物体内的痕量信号分子, 对植物种子的形成、休眠和萌发有调节作用(江玲和万建民 2007; 陈娟等 2006)。各种激素之间及其与种子发育之间的关系复杂(曹帮华和蔡春菊 2006; 樊卫国等 2004; Brady 和 McCourt 2003; Berti 和 Johnson 2008)。长期以来, 种子发育过程中各种生理生化指标和内源激素含量变化的关系, 以及种子的休眠和萌发机制一直是人们关注的问题(杨玲等 2008; Brady 和 McCourt 2003; Ekpong 2009)。华中五味子种子休眠期长, 萌发率低(陈瑛等 1984), 其在发育期间的生理生化变化的研究尚未见报道。本文研究秦岭地区野生华中五味子种子不同发育时期种子形态、相对含水量、可溶性糖和可溶性蛋白含量以及赤霉素(GA<sub>3</sub>)、生长素(IAA)和脱落酸(ABA)含量的变化, 以期深入探讨华中五味子种子休眠原因以及它的人工栽培和野生抚育的研究提供参考。

### 材料与amp;方法

2008年5~8月, 从位于秦岭南坡陕西省柞水县凤凰镇华中五味子(*Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils.)野生抚育基地采样, 在同一居群内选取 20 株生长状况良好、性状均一、雌雄花数量适中的华中五味子, 标记后于盛花期后每隔 10 d 取样 1 次,

样品迅速置于冰盒内带回实验室, 除去外果皮和中果皮后贮于 -20℃ 冰箱中待测。

观察种子形态时, 将种子置于体视显微镜下, 观察种子的形状、种皮颜色, 并测量种子的长度、宽度和厚度, 以“种子长度×种子宽度×种子厚度”表示种子大小(刘长江等 2004; 林祁等 2007)。

测定种子含水量时, 取适量种子切开打碎, 精确称重( $W_1$ )后, 于 80℃ 恒温干燥箱内预烘 2~3 h, 然后于 (105±2)℃ 中烘至恒重, 冷却后称重( $W_2$ ), 则种子含水量计算公式如下: 相对含水量(RWC)=( $W_1 - W_2$ )/ $W_1$ 。

可溶性糖和可溶性蛋白含量测定分别采用蒽酮比色法和考马斯亮蓝法(王学奎 2006)。

内源激素含量测定用高效液相色谱(HPLC)(方能虎等 1998; 谢君和张义正 2001)。GA<sub>3</sub>、IAA 和 ABA 提取参照谢君和张义正(2001)以及赵永华等(2001)文中的方法, 略有改进。精确称取 2.00 g 种子, 切碎后用 20 mL 甲醇(色谱纯)置于 4℃ 中分 2 次冷浸提取 24 h, 过滤, 样品均置于冰浴中研磨成

收稿 2009-04-02 修定 2009-05-07

资助 国家“十一五”科技支撑计划(2006BA106A13-06)和陕西师范大学研究生培养创新基金(2008CXS040)。

\* 通讯作者(E-mail: weigu@snnu.edu.cn; Tel: 029-85310266)。

匀浆, 再加入体积分数为 80% 甲醇 100 mL 置于 4 °C 分 2 次冷浸提取 24 h。合并全部提取液, 在 36~38 °C 下, 干燥蒸发至原体积的一半, 再用等体积石油醚萃取脱色 3 次, 弃掉石油醚层, 继续减压蒸发除去甲醇; 加入 20 mL 三蒸水溶解残渣, 1 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸调 pH 至 2.5~2.8, 用等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 弃水相; 将乙酸乙酯溶液挥发至干, 用流动相溶液定容至 10.0 mL, 再经 0.5 μm 超滤膜(天津市津腾实验设备有限公司)过滤, 作为试液。

测定用的高效液相色谱仪为 LC-2010 型(日本 SHIMADZU 公司), 试验用水均为超纯水, 甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。GA<sub>3</sub>、IAA 和 ABA 标准品均为 Sigma 公司产品, 色谱柱为日本 SHIMADZU 公司岛津 C18 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)。

GA<sub>3</sub> 检测流动相为  $V_{\text{超纯水}}:V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙腈}}=60:20:20$ , 检测波长 206 nm, 流速 0.7 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。IAA 和 ABA 检测流动相为  $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙腈}}:V_{0.6\%(\varphi)\text{乙酸}}=45:5:50$ , 检测波长 254 nm, 流速 0.7 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL。

各发育时期种子的长度、宽度、厚度的测定均取 20 个样品, 取平均值。测定种子含水量、可溶性糖、可溶性蛋白、GA<sub>3</sub>、IAA 和 ABA 含量均重复 3 次。采用外标法对华中五味子种子内源激素含量分析, 建立的回归方程线性关系良好, 拟合度高。以 GA<sub>3</sub>、IAA 和 ABA 标准品进行的精密度试验结果表明, 仪器的精密度高, 完全达到痕量分析要求。稳定性试验和重现性试验结果显示, 华中五味子种子内源激素待测样品在 16 h 内的稳定性良好, 多次分析的重现性好。GA<sub>3</sub>、IAA 和 ABA 的回收率分别为 88.3%、92.1% 和 89.6%。

## 结果与讨论

### 1 不同发育时期的华中五味子种子的形态变化

不同发育时期的华中五味子种子的长度、宽度、厚度与种皮颜色都发生显著变化(表 1)。盛花期后 50~60 d 种子长度达到最大值; 种子的宽度和厚度随着种子发育不断增加, 盛花期后 80 d 达到最大值。种皮颜色随着种子的发育由乳白色变为褐色, 种子形状相对较稳定, 变化不大。盛花期后 20~30 d, 种子迅速变大(图 1), 说明这一时期是华中五味子种子形态建成的关键时期。

### 2 不同发育时期的华中五味子种子中可溶性糖和可溶性蛋白含量变化

图 2 显示, 随着华中五味子种子的发育成熟, 在盛花期后 10~60 d 种子中可溶性糖含量呈逐渐升高趋势, 60 d 左右达到最高峰, 60~80 d 下降。种子中可溶性蛋白含量(图 3)在种子发育早期与可溶性糖含量(图 2)的变化类似, 盛花期后 10~60 d 可溶性蛋白含量逐渐升高, 60~80 d 继续缓慢上升, 但增幅减小, 盛花期后 80 d 达到最大值。华中五味子早期发育过程中可溶性糖和可溶性蛋白的积累, 主要在种子发育前期。

### 3 不同发育时期的华中五味子种子含水量变化

盛花期后 10 d 的华中五味子种子相对含水量高达 88.7%, 整个种子发育过程中的相对含水量呈逐渐下降趋势, 盛花期后 70 d 基本上稳定在 30% 左右(图 4)。

### 4 不同发育时期的华中五味子种子中 GA<sub>3</sub>、IAA 和 ABA 含量变化

(1) 不同发育时期华中五味子种子的内源 GA<sub>3</sub> 含量变化在整体上呈现先升后降的趋势(图 5)。种

表 1 不同发育时期华中五味子种子的形态变化

盛花期后发育 时间/d	种子形态				
	种子长度/mm	种子宽度/mm	种子厚度/mm	种皮颜色	种子形状
10	1.79±0.14	2.04±0.10	1.10±0.05	乳白	近圆形
20	2.32±0.19	2.64±0.10	1.27±0.04	乳黄	肾形
30	3.29±0.11	3.65±0.16	2.28±0.11	浅黄	肾形
40	3.43±0.04	3.75±0.08	2.35±0.06	黄	肾形
50	3.85±0.05	4.05±0.11	2.39±0.06	黄	肾形
60	3.93±0.03	4.27±0.04	2.63±0.09	浅褐	肾形
70	3.90±0.07	4.47±0.16	2.68±0.04	褐	肾形
80	3.91±0.04	4.60±0.06	2.72±0.05	褐	肾形

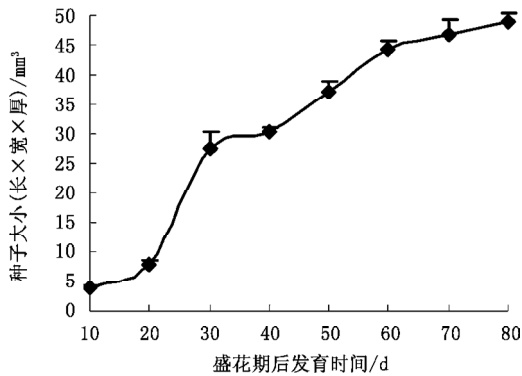


图1 不同发育时期华中五味子种子的大小变化

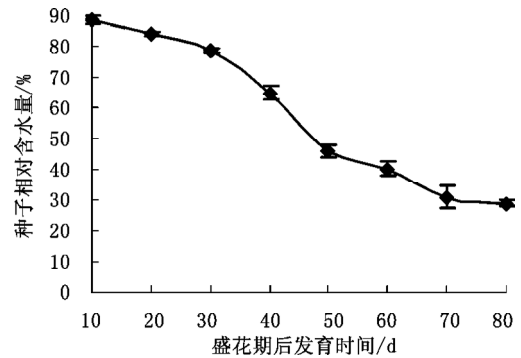


图4 不同发育时期华中五味子种子的相对含水量变化

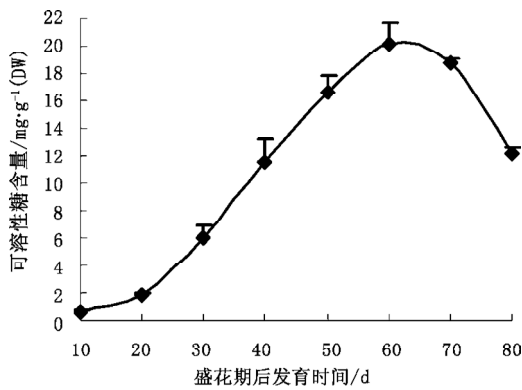


图2 不同发育时期华中五味子种子中可溶性糖含量变化

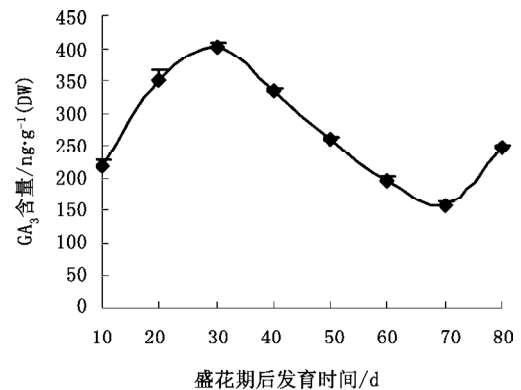


图5 不同发育时期华中五味子种子中 GA₃ 含量变化

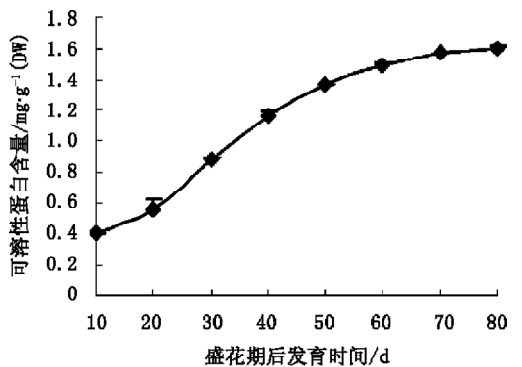


图3 不同发育时期华中五味子种子中可溶性蛋白含量变化

子发育早期, GA<sub>3</sub> 含量迅速增加, 盛花期后 30 d 左右达到最大值, 30~70 d 逐渐下降, 70~80 d 略有回升(图 5)。结合图 1 华中五味子种子大小指数的变化趋势, 可以认为 GA<sub>3</sub> 含量变化与种子大小的变化比较一致, 表明盛花期后 20~30 d 是华中五味子种子形态建成的重要时期, 种子内 GA<sub>3</sub> 可促进细胞伸长, 因而种子的长度、宽度和厚度在短时间内迅速增加。

(2)华中五味子种子发育过程中, IAA 含量波动较大(图 6), 盛花期后 10~30 d 种子中 IAA 含量急剧增加, 30 d 达到顶峰, 这一时期的 IAA 变化趋势与 GA<sub>3</sub> 变化趋势相似。盛花期后 30 d IAA 含量开始下降, 50~60 d 略有回升, 之后又逐渐下降。众所周知, 一般植物种子发育的早期主要是种子形态建成和胚乳的生长发育, 华中五味子盛花期后 20~30 d 是种子大小变化最为活跃的时期, 这一时

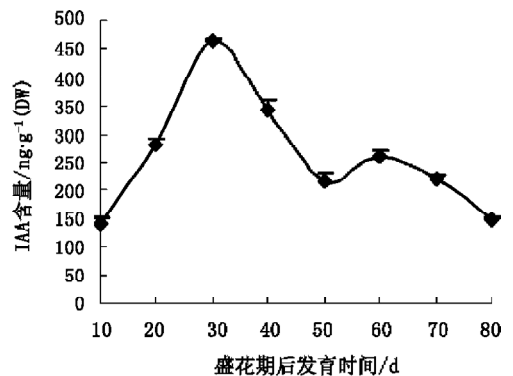


图6 不同发育时期华中五味子种子中 IAA 含量变化

期 IAA 含量增加对细胞的快速分裂和迅速伸长无疑是有利的。

(3)盛花期后 10~30 d 和 50~70 d 华中五味子种子发育过程中的内源 ABA 含量迅速上升并在 70 d 达到最大值, 随后下降, 但仍维持在相对较高的水平上(图 7)。

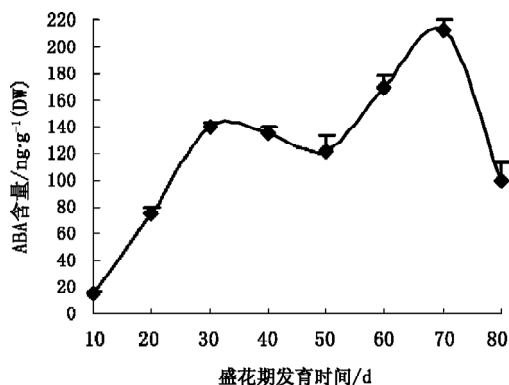


图 7 不同发育时期华中五味子种子中 ABA 含量变化

### 参考文献

曹帮华, 蔡春菊(2006). 银杏种子后熟生理与内源激素变化的研究. 林业科学, 42 (2): 32~37  
 陈娟, 潘开文, 辜彬(2006). 逆境胁迫下植物体内脱落酸的生理功能和作用机制. 植物生理学通讯, 42 (6): 1176~1182

陈瑛, 孙昌高, 孙国栋, 李瑛(1984). 药用植物种子休眠的类型及特性. 药学学报, 19 (1): 69~76  
 樊卫国, 安华明, 刘国琴, 何嵩涛, 刘进平(2004). 刺梨果实与种子内源激素含量变化及其与果实发育的关系. 中国农业科学, 37 (5): 728~733  
 方能虎, 侯树泉, 邵学广, 何友昭, 赵贵文(1998). 植物激素的反相高效液相色谱法分离和测定. 色谱, 16 (5): 417~420  
 江玲, 万建民(2007). 植物激素 ABA 和 GA 调控种子休眠和萌发的研究进展. 江苏农业学报, 23 (4): 360~365  
 林祁, 李超, 刘长江, 杨志荣(2007). 八角属(八角科)植物的种子形态. 植物研究, 27 (2): 145~150  
 刘长江, 林祁, 贺建秀(2004). 中国植物种子形态学研究方法和术语. 西北植物学报, 24 (1): 178~188  
 王学奎(2006). 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 105~106, 202~204, 190~192  
 谢君, 张义正(2001). 植物内源激素的反相高效液相色谱法测定. 分析测试学报, 20 (1): 60~62  
 杨玲, 沈海龙, 梁立东, 刘春萍(2008). 人工干燥和冷层积过程中的花椒树种子中内源激素含量变化. 植物生理学通讯, 44 (4): 682~688  
 赵永华, 杨世林, 刘惠卿, 刘铁城(2001). 西洋参种胚形态后熟过程中种子内源激素变化动态及其对种胚发育的调节. 中草药, 32 (2): 159~162  
 Berti MT, Johnson BL (2008). Physiological changes during seed development of cuphea. Field Crop Res, 106: 163~170  
 Brady SM, McCourt P (2003). Hormone cross-talk in seed dormancy. J Plant Growth Regul, 22: 25~31  
 Ekpong B (2009). Effects of seed maturity, seed storage and pre-germination treatments on seed germination of cleome (*Cleome gynandra* L.). Sci Horticult, 119: 236~240