

人工干燥和冷层积过程中的花楸树种子中内源激素含量变化

杨玲, 沈海龙*, 梁立东, 刘春苹

东北林业大学林学院, 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

摘要:用高效液相色谱技术检测人工干燥和冷层积中花楸树种子中内源激素含量和平衡变化的结果表明:在人工干燥过程中种皮和胚内的 GA_3/ABA 比值显著增高;2~5 冷层积过程中的种皮内ABA含量显著下降,种皮和胚内各种促进生长类物质的相对含量(尤其是 GA_3/ABA 比值)明显增加。

关键词:花楸树;种子休眠;冷层积;内源激素

Changes in Endogenous Hormone Content in Seeds of *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. during Artificial Drying and Cold Stratification

YANG Ling, SHEN Hai-Long*, LIANG Li-Dong, LIU Chun-Ping

School of Forestry, Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Endogenous hormone content and ratio in mature seeds of *Sorbus pohuashanensis* during artificial drying and cold stratification were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) technique. The results showed that the GA_3/ABA ratio in seed coat and embryo increased significantly after artificial drying, the ABA content in seed coat decreased significantly during 2~5 cold stratification, and the relative content of growth promotion substances (especially GA_3/ABA ratio) in seed coat and embryo increased evidently.

Key words: *Sorbus pohuashanensis*; seed dormancy; cold stratification; endogenous hormones

花楸树主要以种子繁殖,其种子的深休眠特性给育苗生产增加了难度,也阻碍了其推广利用。因此,研究花楸树种子休眠和萌发机制,建立实用、快速、有效的催芽方法对于育苗生产实践有重要意义。冷层积是打破种子生理休眠的有效方法(李秉真等 1998; 金飏等 2005; Rascio 等 1998; Cavieres 和 Arroyo 2000)。冷、湿处理是打破花楸属树种种子休眠的必需条件(Stein 2008; Taylor 和 Gerrie 1985; Lenartowicz 1988)。一般来说,花楸树种子休眠解除需要 0~5 冷层积 3 个月以外,外源药剂结合冷层积处理也可以促进花楸树种子萌发(沈海龙等 2006; 腾范例和赵辉 2006)。此外,有研究表明,内源脱落酸和赤霉素是通过调控糊粉层中 α -淀粉酶合成方向并向胚乳中分泌而调节种子休眠和萌发的(Gubler 等 2002; Ogawa 等 2003; 江玲等 2005)。但关于冷层积条件下花楸属树种种子中内源激素含量变化对种子休眠与萌发影响的报道尚很少见。本文用高效液相色谱(HPLC)技术检测了人工干燥和冷层积处理过程中花楸树种子中内源激素含量的变化,以揭示内源激素在花楸树种子休眠解

除和萌发中的作用,为改善和建立有效的种子催芽处理技术提供参考。

材料与方法

花楸树[*Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl.]种子分别于 2003 和 2005 年 9 月下旬采自黑龙江省伊春市五营国家森林公园内。(1)陈种子:采集并人工干燥后在 2~5 下密封保存 2 年;(2)新种子:采集经人工干燥后直接用于试验。种子人工干燥参照沈海龙等(2006)文中的方法,种子含水量在 9%~10%。

上述两批种子分别冷层积。将种子在水中浸泡 5 d 至其充分吸胀后,用 70% 酒精消毒 30 s,再用 3% 的 NaClO 消毒 5 min,混湿沙(种子和沙的体积比为 1:3,含水量约 80%)后置于 2~5 下冷层积。定期通气 and 补充水分,保持种沙湿润。分别

收稿 2008-04-22 修订 2008-06-26

资助 国家“十一五”科技支撑项目子课题(2006BAD03A0405)

* 通讯作者(E-mail: shenhl-cf@nefu.edu.cn; Tel/Fax: 0451-82191044)。

于冷层积 0、7、15、30、45、60、75、90、105、120 和 135 d 时取种样。种样表面砂粒洗去后用滤纸吸干表面水分, 立即用液氮冷冻, 在冰块上分离种皮和种胚。然后再次用液氮分别冷冻, 随后真空冷冻干燥 20 h, 密封保存于 -80 °C 冰箱中。

激素的提取与纯化参照刘华英(2003)文中的方法。进样量为 10 μL, 紫外分光光度检测波长为 254 nm。根据保留时间定性, 外标峰面积法定量。标准样品为 3- 吲哚乙酸(IAA)、赤霉素(GA₃)、脱落酸(ABA)、玉米素(ZT)、玉米素核苷(ZR)均为 Sigma 公司产品。所有激素均用甲醇溶解, 各配 25 mL 浓度为 0.06 g·L⁻¹ 的溶液, 用棕色瓶保存在 5~6 °C 下备用。甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂为国产分析纯。

Ailent1100 高效液相色谱仪。条件: 色谱柱 Spherisorb C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 0.5 μm), 柱温 35 °C。流动相: 甲醇、水和 2% 乙酸, 恒流 1 mL·min⁻¹, 梯度洗脱条件参照刘华英(2003)文中介绍的方法。

结果与讨论

1 人工干燥后种子中内源激素含量变化

人工干燥后种皮内 5 种激素含量变化趋势一致, 均高于人工干燥前, 其中 GA₃ 含量提高比较显著。胚中 GA₃ 和 IAA 含量也有提高, 而 ABA、ZT 和 ZR 含量则下降(图 1)。人工干燥后种皮内 GA₃/ABA、ZR/ABA 和 IAA/ABA 值均高于人工干燥前, ZT/ABA 值下降; 胚内 GA₃/ABA、ZT/ABA、ZR/ABA 和 IAA/ABA 值均比人工干燥制前有提高(图 2)。

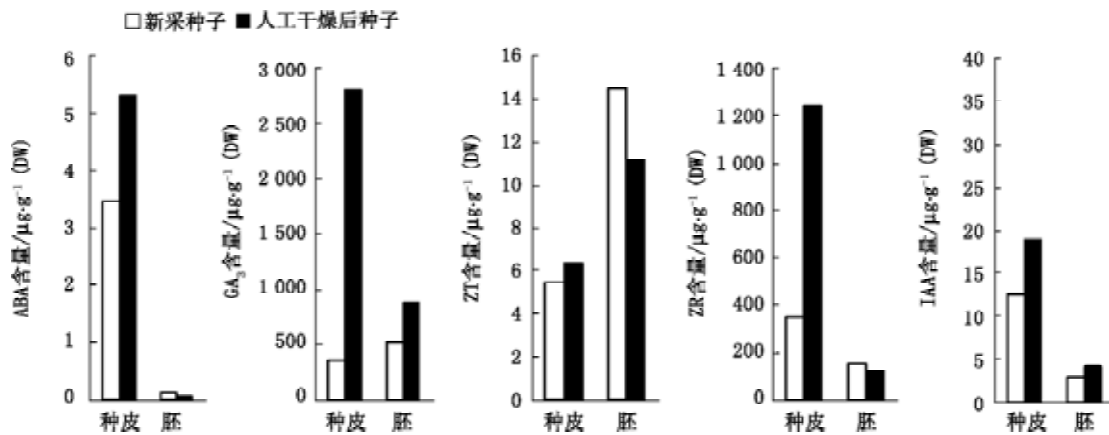


图1 人工干燥对花楸树种子中内源激素含量的影响

Fig.1 Effect of artificial drying on endogenous hormone content in *S. pohuashanensis* seeds

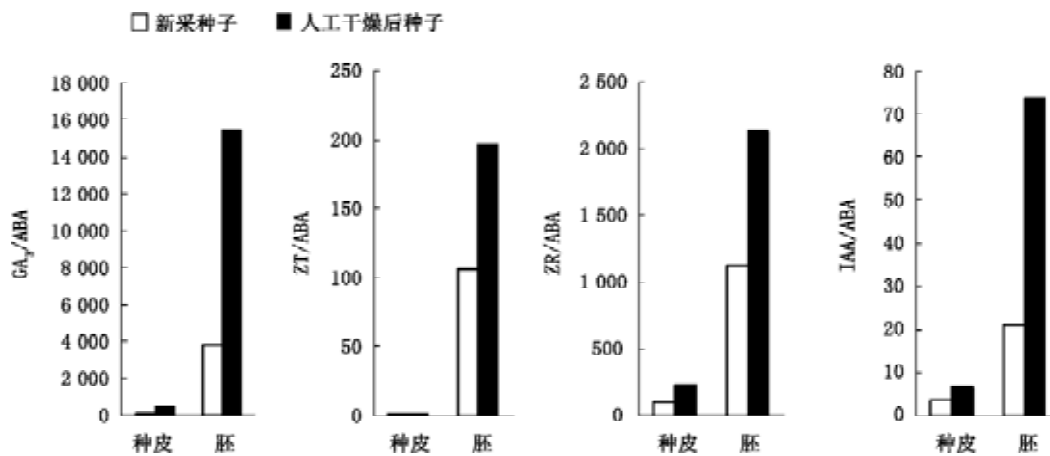


图2 人工干燥对花楸树种子中内源激素间比值的影响

Fig.2 Effect of artificial drying on ratio of different endogenous hormones in *S. pohuashanensis* seeds

2 冷层积过程中种子中的内源激素含量变化

图3~7显示, (1)冷层积前新种子吸胀后的种皮内ABA含量显著下降, 冷层积过程中的ABA含量随着层积时间延长而下降, 层积75 d以后接近零(低于有效检测的最低下限 $0.10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (图3)。冷层积前吸胀的胚中ABA含量增加, 层积7 d时下降, 此后在层积30和60 d时出现高峰(高于层积前), 层积60 d以后再次下降, 层积120 d时最低。冷层积前陈种子吸胀后的种皮和胚中ABA含量提高, 层积过程中种皮中ABA含量随着层积时间的延长而下降, 层积75 d时降至最低, 而后开始上升, 层积105 d时达到高峰, 此后再次下降。冷层积过程中陈种子胚内ABA含量变化与新种子胚的相似, 但变化节奏不同。层积15 d的陈种子胚中ABA含量下降, 此后在层积30和90 d时分别增高, 层积90 d

以后逐渐降低, 层积120 d时最低。这个结果与美国黑核桃种子(斐东等2002)和拟南芥种子(Ali-Rachedi等2004)中的结果相似。

(2)冷层积前新种子吸胀后的种皮和胚内 GA_3 含量下降, 种皮的下降比例较大(图4)。层积7 d的种皮中 GA_3 含量略有提高, 此后逐渐下降, 层积45和105 d时出现高峰, 层积120 d再次下降。层积前30 d胚内的 GA_3 含量持续下降, 但在层积45和75 d时出现高峰, 随后下降, 层积120 d时略有恢复, 但低于层积前水平。冷层积前陈种子吸胀后的种皮内 GA_3 含量显著下降, 此后, 随着层积时间延长而增高, 层积105 d时达到高峰, 此后略有下降。冷层积前吸胀的陈种子胚内 GA_3 含量略有提高。冷层积过程中的陈种子胚中 GA_3 含量变化趋势与新种子相似。层积前45 d内的胚中 GA_3 含量

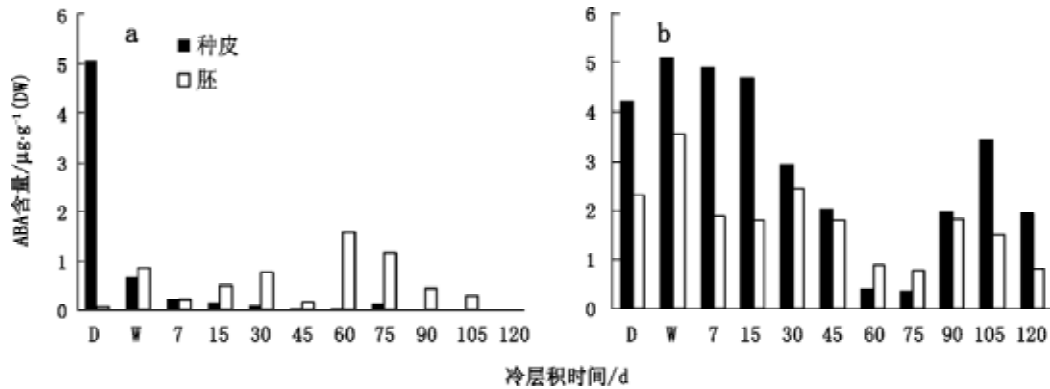


图3 冷层积过程中花楸树种皮和胚内的ABA含量变化

Fig.3 Changes in ABA content in seed coat and embryo of *S. pohuanshanensis* during cold stratification

a: 新采集并经过人工干燥的种子; b: 人工干燥后低温贮藏2年的陈种子; D: 未浸泡的干种子; W: 浸泡吸胀后冷层积前的湿种子。图4~7 同此。

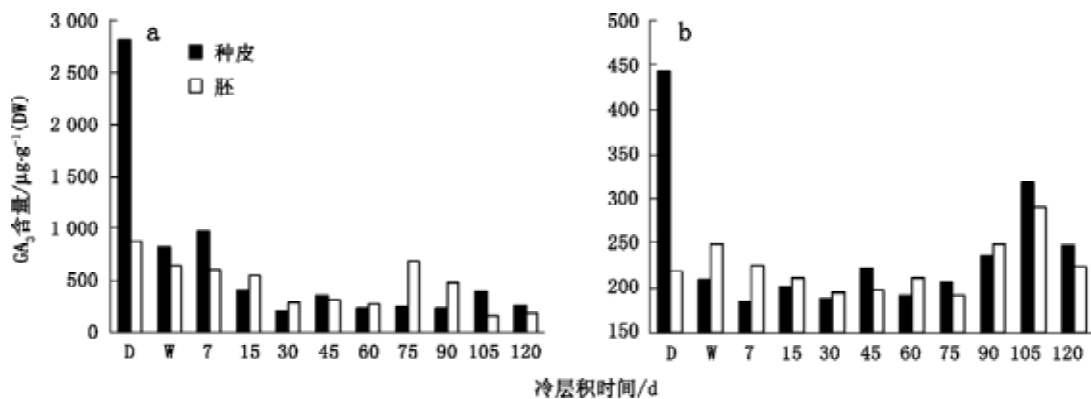


图4 冷层积过程中花楸树种皮和胚内的 GA_3 含量变化

Fig.4 Changes in GA_3 content in seed coat and embryo of *S. pohuanshanensis* during cold stratification

持续下降, 层积 60 和 105 d 时出现高峰, 层积 105 d 的最高, 随后下降。

(3)冷层积前新种子吸胀后的种皮中 ZT 含量显著提高, 冷层积过程中则下降(图 5)。层积 45 和 75 d 时略有恢复(仍低于层积前水平), 随后下降, 层积 120 d 时降至最低。冷层积前新种子吸胀后的胚内 ZT 含量下降, 层积前 7 d 的略有恢复, 随后持续下降, 层积 45 d 的最低, 层积 60 和 75 d 的略有恢复, 90 d 时再次下降, 随后略有增高, 但仍低于层积前水平。此外, 冷层积前吸胀的陈种子种皮和胚内的 ZT 含量显著下降。层积过程中的种皮内 ZT 含量呈增加趋势, 层积 45 和 105 d 时显著高于层积前, 层积 105 d 时显著高于干燥种子。层积前 15 d 的胚内 ZT 含量持续下降, 随后提高, 层积 75 d 时达到最高点(显著高于干种子), 此后再次下降, 层积 120 d 时显著低于层积前水平。

(4)冷层积前新种子吸胀后的种皮中 ZR 含量显著下降(图 6)。冷层积过程中的种皮内 ZR 含量呈下降趋势, 层积 75 和 105 d 时略有恢复(低于层积前水平), 随后再次下降。层积前新种子吸胀后的胚内 ZR 含量增高, 随后下降, 层积 60 d 时最低, 此后略有增高, 但随着层积时间延长增高并不显著。冷层积前陈种子吸胀后的种皮内 ZR 含量显著增加, 层积前 7 d 的略有提高, 随后下降, 层积 45 d 时略有恢复(低于层积前水平), 层积 60 d 以后持续增加, 层积 90 d 时达到高峰(高于层积前水平), 此后持续下降。冷层积前新种子吸胀后的胚中 ZR 含量略有提高, 层积过程中总体呈增加趋势, 层积 30 和 105 d 分别达到高峰, 层积 120 d 时下降, 但仍高于层积前水平。

(5)冷层积前新种子吸胀后的种皮内 IAA 含量显著下降, 层积中的呈平缓下降趋势, 但变化不显

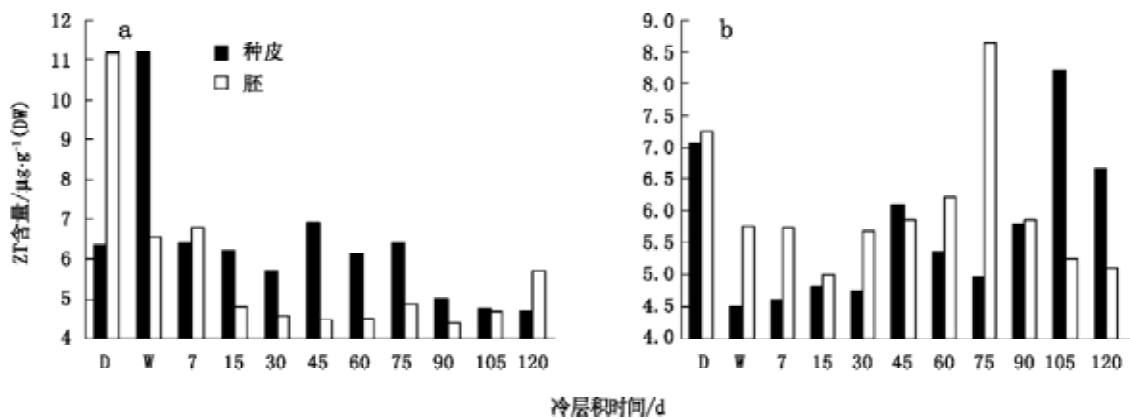


图 5 冷层积过程中花楸树种皮和胚内的 ZT 含量变化

Fig.5 Changes in ZT content in seed coat and embryo of *S. pohuashanensis* during cold stratification

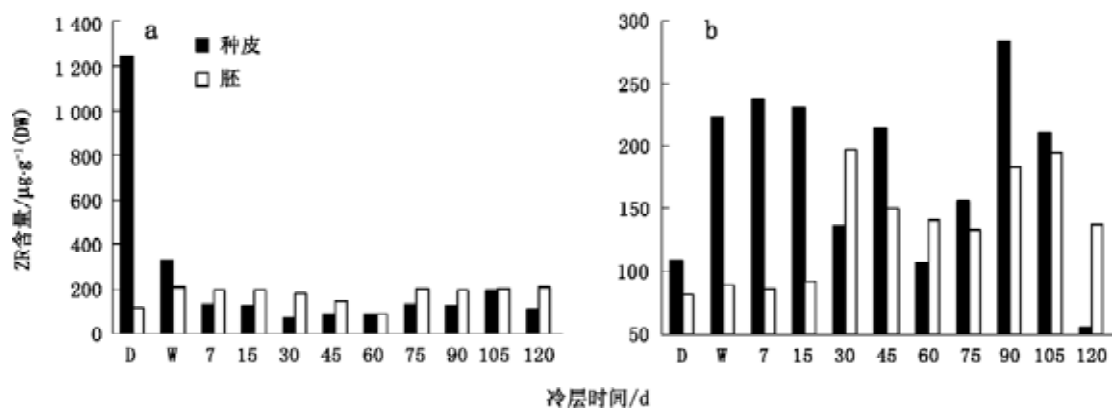


图 6 冷层积过程中花楸种皮和胚内的 ZR 含量变化

Fig.6 Changes in ZR content in seed coat and embryo of *S. pohuashanensis* during cold stratification

著。层积 60 d 以后有所恢复, 但仍低于层积前水平(图7)。冷层积前吸胀后的胚内源 IAA 含量提高, 层积前 15 d 内的下降, 层积 30 和 60 d 时略有增加, 其中层积 60 d 时的增高比例较大, 随后略有下降, 层积 120 d 时再次增高。此外, 冷层积前吸胀的陈种子种皮内 IAA 含量显著下降。冷层积过程中的

陈种子种皮中的总体变化趋势与新种子相似, 层积前 7 d 的下降, 层积 15 和 45 d 有所恢复, 层积 60 d 时下降, 此后持续增加, 层积 120 d 时最高, 高于层积前。而冷层积前吸胀的陈种子胚内 IAA 含量显著增加, 冷层积过程中总体呈下降趋势, 层积前 30 d 的下降比例较大, 随后变化不显著, 层积 120 d 时

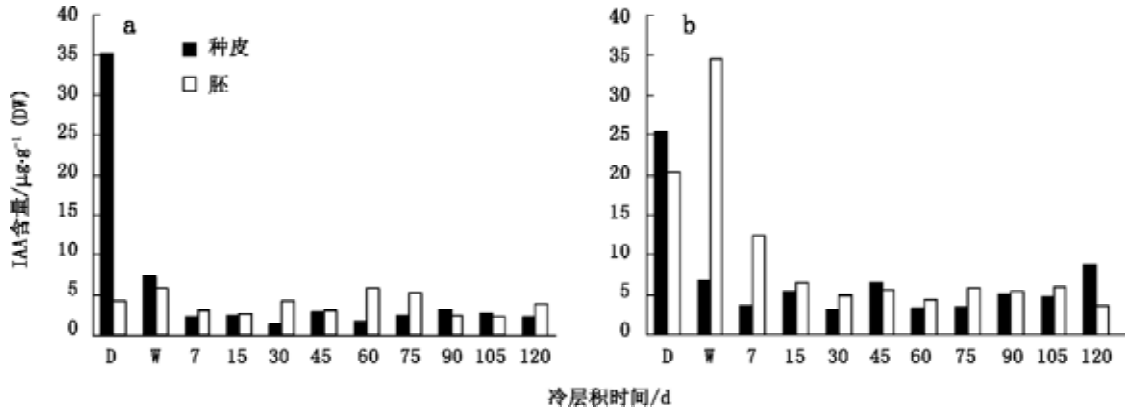


图7 冷层积过程中花楸种皮和胚内的 IAA 含量变化

Fig.7 Changes in IAA content in seed coat and embryo of *S. pohuashanensis* during cold stratification

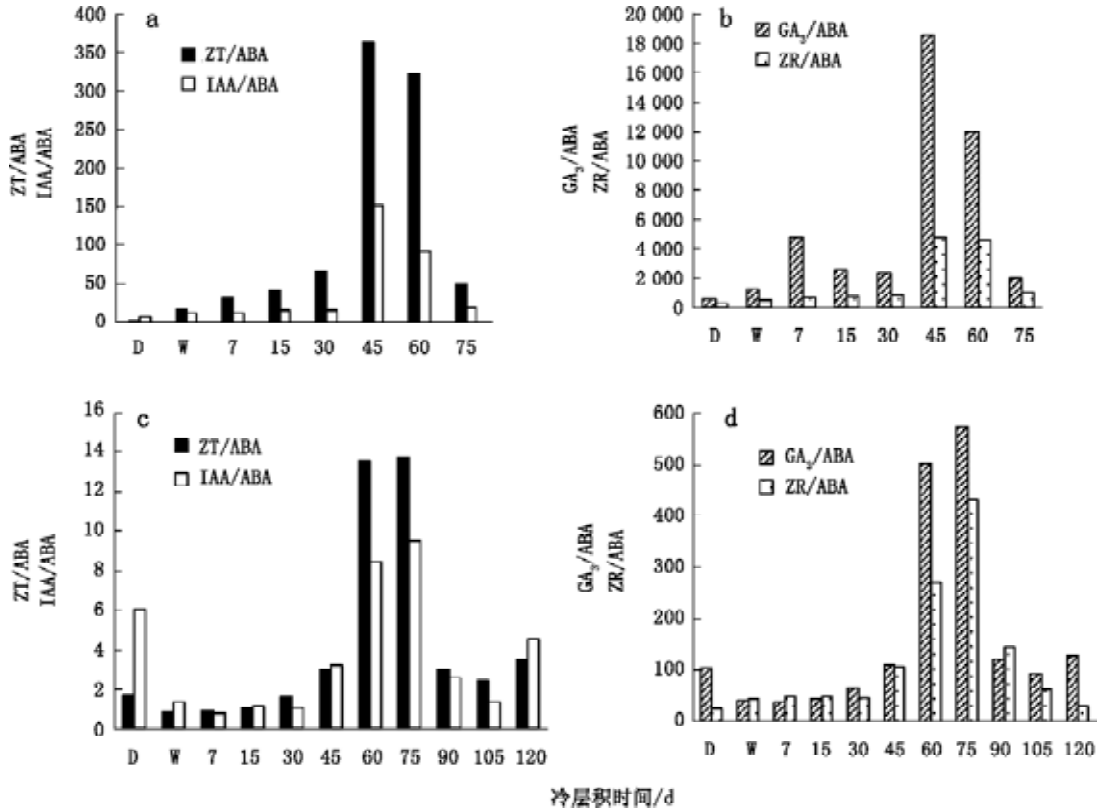


图8 冷层积过程中花楸种皮中不同内源激素间比值的变化

Fig.8 Changes in ratio of different endogenous hormones in seed coat of *S. pohuashanensis* during cold stratification

a、b: 新种子的种皮; c、d: 陈种子的种皮。

降为最低。

3 冷层积过程中种子中内源激素之间的平衡

冷层积前新种子吸胀后的种皮内 GA_3/ABA 、 IAA/ABA 、 ZT/ABA 和 ZR/ABA 的比值增加(图8-a、b), 而陈种子种皮内只有 ZR/ABA 的比值增加, 其余各激素与 ABA 的比值下降(图 8-c、d)。冷层积过程中, 2 种批种子的种皮内各种激素比值均呈增加后下降趋势(图8): 新种子种皮内各激素之间比值在层积 45 d 时达到最大, 层积 75 d 时下降, 但仍高于层积前水平(由于层积 75 d 以后新种子种皮内 ABA 含量低于有效检测的最低下限 $0.10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 故此后的各激素比值未作分析) (图 8-a、b); 陈种子种皮内各激素之间比值在层积 75 d 时达到最大, 此后表现为持续降低, 层积 120 d 时, ZR/ABA 值低于层积前水平, 而 GA_3/ABA 、 IAA/ABA 和 ZT/ABA 比值则仍高于层积前水平(图 8-c、d)。

冷层积前新种子吸胀后的胚中 GA_3/ABA 、 IAA/ABA 、 ZT/ABA 和 ZR/ABA 比值下降(图 9-a、b), 陈种子胚中 GA_3/ABA 、 ZT/ABA 和 ZR/ABA 比值下降的同时 IAA/ABA 比值增高(图 9-c、d)。冷

层积过程中的新种子胚中各激素之间比值增加, 层积 7 和 45 d 时出现高峰, 层积 60 d 时略有下降, 此后至层积 105 d 胚中各激素之间比值持续增加, 略高于层积前水平(图 9-a、b); 陈种子胚中 GA_3/ABA 、 ZT/ABA 和 ZR/ABA 比值总体上呈增加趋势, 层积 75 d 时达到高峰(高于层积前水平), 层积 90 d 时降低, 此后再次增加, 层积 120 d 时, GA_3/ABA 、 ZT/ABA 和 ZR/ABA 比值均高于层积前水平, 而 IAA/ABA 比值在层积前 30 d 持续下降, 层积 30 d 以后有所恢复, 层积 75 d 时达到高峰(但低于层积前水平), 层积 90 d 时下降, 此后再次增加, 但直至层积 120 d 仍低于层积前水平(图 9-c、d)。

综上所述, 冷层积解除花楸树种子休眠过程中, 花楸树种皮内 ABA 含量显著下降, 种皮和胚内各种促进生长类物质的相对含量(尤其是 GA_3/ABA 比值)显著增加。因此推测种皮和胚内较高的 ABA 含量是抑制花楸树种子萌发的主要原因。Feurtado 等(2007)的研究表明, ABA 抑制剂(fluridone)和赤霉素综合处理可以打破 ABA 的内部平衡并代替冷层积处理解除美国五针松种子的休眠, 加强 ABA 及其代

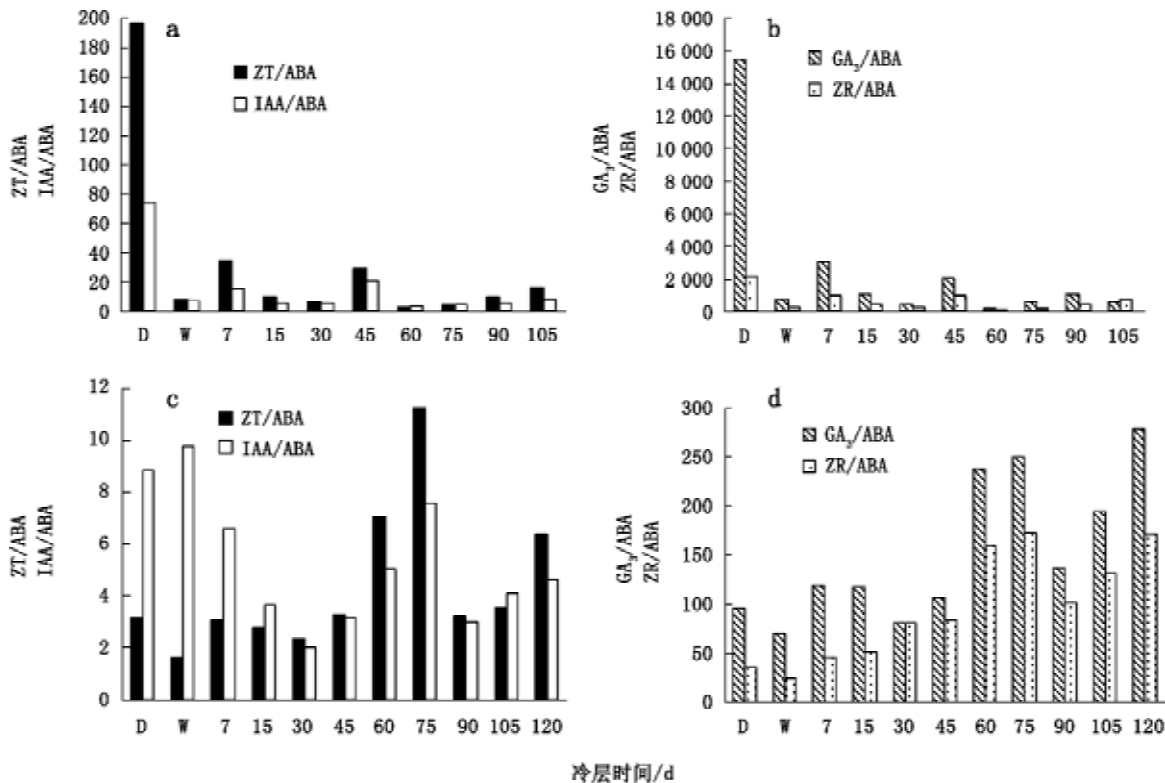


图9 冷层积过程中花楸种胚中不同内源激素间比值的变化

Fig.9 Changes in ratio of different endogenous hormones in embryo of *S. pohuashanensis* during cold stratification
a、b: 新种子的胚; c、d: 陈种子的胚。

谢产物的分解和(或)运输,可以补偿ABA含量的降低。这提示我们,如何通过加强或阻止ABA及其代谢产物的分解和(或)运输以调控花楸树种子的休眠和萌发很值得研究。

参考文献

- 江玲, 侯名语, 刘世家, 陈亮明, 刘喜, 翟虎渠, 万建民(2005). 水稻种子低温萌发生理机制的初步研究. 中国农业科学, 38 (3): 480~485
- 金颢, 陈宇, 王莉, 丁玲, 周武忠(2005). 影响琼花种子休眠的因素. 植物生理学通讯, 41 (5): 610~612
- 李秉真, 乌云, 田瑞华, 索兰弟, 李雄(1998). 山楂种子休眠与后熟期间内源激素的变化. 植物生理学通讯, 34 (4): 254~256
- 刘华英(2003). 柑橘体细胞胚发生的细胞学及生理生化特性研究 [博士论文]. 长沙: 湖南农业大学
- 裴东, 张俊佩, 石永森, 徐虎智(2002). 层积催芽对美国黑核桃种子发芽和苗木生长的影响. 林业科学, 38 (5): 73~77
- 沈海龙, 杨玲, 张建瑛, 冯丹丹, 范少辉(2006). 花楸树种子休眠影响因素与萌发特性研究. 林业科学, 42 (10): 133~138
- 滕范例, 赵辉(2006). 花楸种子不同处理方法发芽率的比较. 中国林副特产, (4): 31
- Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner MH, Bonnet M, Sotta B, Grappin P, Jullien M (2004). Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 219: 479~488
- Cavieres LA, Arroyo MTK (2000). Seed germination response to cold stratification period and thermal regime in *Phacelia secunda* (Hydrophyllaceae). *Plant Ecol*, 149: 1~8
- Feurtado JA, Yang J, Ambrose SJ, Cutler AJ, Abrams SR, Kermode AR (2007). Disrupting abscisic acid homeostasis in western white pine (*Pinus monticola* Dougl. Ex D. Don) seeds induces dormancy termination and changes in abscisic acid catabolites. *J Plant Growth Regul*, 26: 46~54
- Gubler F, Chandler PM, White RG, Lewellyn DJ, Jacobsen JV (2002). Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiol*, 129: 191~200
- Lenartowicz A (1988). Warm-followed-by-cold stratification of mountain-ash (*Sorbus aucuparia* L.) seeds. *Acta Horticult*, 226: 231~238
- Ogawa M, Hanada A, Yamaguchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S (2003). Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell*, 15: 1591~1604
- Rascio N, Mariani P, Vecchia FD, Rocca NL, Profumo P, Gastaldo P (1998). Effects of seed chilling or GA₃ supply on dormancy breaking and plantlet growth in *Cercis siliquastrum* L.. *Plant Growth Regul*, 25 (1): 53~61
- Stein WI (2008). *Sorbus* L.. In: Bonner FT, Karrfalt RP (eds). *Woody Plant Seed Manual*. USDA FS Agriculture Handbook 727, 1059~1064
- Taylor CW, Gerrie WA (1985). Effects of temperature on seed germination and seed dormancy in *Sorbus glabrescens* Cardot. *Acta Horticult*, 215: 185~192