

苏铁种子的脱水敏感性及温湿条件对种子后熟的影响

田美华, 赵正武, 唐安军*

重庆师范大学生命科学学院植物环境适应分子生物学重庆市重点实验室, 重庆401331

摘要: 本文分析了贮藏温度和介质水分对苏铁种子后熟的影响及种子的脱水耐性。结果表明, 种子是透水的, 新成熟的苏铁种子的胚很小(3.45 mm), 胚的长度/种子长度之比值(E:S)约是0.089。在适宜的条件下, 胚能继续发育和生长, 其子叶胚在萌发时的临界长度约16.38 mm。由此得知, 苏铁种子是形态休眠的。另外, 苏铁种子对于干燥脱水十分敏感, 是顽拗性的, 一旦严重失水就会劣变, 甚至死亡。在冷层积(4°C)时, 75%的介质含水量比50%和25%的介质含水量更有利于胚的后熟。而且, 在室温下, 长时间的干藏和水藏都容易导致种子死亡。所以, 保持湿润是保存苏铁种子的关键。此外, 施用GA₃溶液(500 mg·L⁻¹)处理可以加速冷层积种子的胚的发育, 缩短解除休眠的时间。

关键词: 种子繁殖; 层积; 未成熟胚; 形态休眠; 顽拗性种子; 苏铁

苏铁俗称铁树, 隶属裸子植物苏铁科(Cycadaceae), 具有优良的观赏价值、重要的生态价值以及科研价值, 是现存于地球上最原始的种子植物之一。由于野生苏铁(广义的苏铁类植物)分布狭窄, 资源量极少, 且遭受着多重因素的致危作用, 因此, 被称之为“活化石”的野生苏铁类植物被列为国家一级重点保护植物(http://www.gov.cn/gongbao/content/2000/content_60072.htm), 拯救和保护极度濒危的苏铁已刻不容缓。

在野外, 种子发育时的环境条件能深刻地影响种子特性, 而且, 传播后的环境对种子内在的生理生化变化和命运(死亡或萌发成幼苗)也起着至关重要的作用(Shimono和Washitani 2004; Baskin和Baskin 2014)。当种子脱落后, 非休眠的种子或在适宜的环境中萌发, 或因逆境作用(如高温)而诱发次级休眠, 或由于环境胁迫而劣变, 甚至死亡; 同样, 成熟脱落的休眠的种子或进入土壤种子库, 逐渐解除休眠, 然后在适宜的时空下萌发; 抑或被动物取食; 或在环境胁迫中逐渐劣变而失去活力(Haper 1977; Gutterman 2000)。大量的研究已经证明, 种子采集后的贮藏环境对种子性能的维持或改变有着极大的正(或负)作用(Roberts 1973; Hong和Ellis 1996; Baskin和Baskin 2014)。譬如, 低温层积(0~10°C)可以促进许多具有形态生理休眠的种子的胚的发育(后熟)(Vandlook等2007; Baskin和Baskin 2004)。然而, 在低温或干燥条件下, 许多顽拗性种子由于低温伤害或干燥脱水而死亡(Berjak和Pammenter 2008; 傅家瑞和宋松泉2004)。所以, 探究由温度和介质水分等因素构成的贮藏环境对采后种子性状的影响, 不仅可以发现重要的理论

规律, 提高种质资源保存的效率, 也能为实生苗的繁育提供依据, 提高物种保护的有效性。

迄今, 尽管已有一些关于苏铁种子解剖结构(潘爱芳2012a, b; Dehgan和Yuen 1983)和播种育苗(揭建勤和苏文兴1989)等方面的研究, 明确了苏铁种子的形态和解剖结构, 发现种子萌发需要较长的时间(6~7个月, 甚至9个月)。但是, 目前缺少关于采后贮藏环境对苏铁种子的作用效应、种子的脱水耐性及其萌发行为的相关研究报道。在连续多年的观察中, 我们发现, 栽培的苏铁虽然结实量较大, 但在母株周边极难见到种子萌发及其幼苗, 其植株数量的扩展极度依赖于分孽繁殖。基于已有的知识和调查数据, 我们提出了如下假设: 苏铁的种子休眠在自然条件下很难被打破, 因而限制了其有性更新。本文以苏铁种子为材料, 研究温度对种子发育(后熟)的影响、贮藏介质的含水量对胚发育的作用效应以及干燥脱水对苏铁种子活力的影响。通过上述3方面的研究, 旨在阐述苏铁种子的胚的后熟动态及萌发行为, 从而更好地理解苏铁种子的本质, 促进该资源的可持续利用。

材料与方法

1 种子材料的获得

2013年11月12日和16日, 在重庆师范大学虎

收稿 2015-09-21 修定 2016-01-26

资助 重庆市科委科技项目(cstc2013jcyjA00002)、重庆市教委科技项目(KJ1400504)和重庆师范大学校级科技项目(2011SLX34)。

* 通讯作者(E-mail: tanganjun@mail.kib.ac.cn)。

溪校区、重庆大学虎溪校区和重庆医科大学缙云校区,从栽培的苏铁(*Cycas revoluta* Thunb.)植株上采集了大量的当年成熟的种子。在采集时,种子的外种皮呈红色,个别种子的肉质外种皮已略显皱缩。将采集的种子分为2组:第一组保留红色肉质的外种皮,用于田间播种试验;第二组去掉红色肉质的外种皮,通过浮选法去除空瘪的种子(健壮的种子沉水),将选择好的种子清洗干净,平铺于实验台上晾干,然后将其装入塑料袋,保存于恒温箱(15°C,相对湿度约45%)。

2 种子基本特征值的测量与活力评价

2.1 种子基本特征值的测量

随机取新采集的50粒种子,用游标卡尺(精度0.1 mm)测量种子的长度和宽度,以及胚的纵向长度,各取平均值;随机取10粒种子,用电子天平(精度为0.1 mg)称其重量,4次重复,以平均值表示种子的单粒重(g)。

2.2 种子活力评价

参考国际种子检验规则(ISTA 2003),用氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC)染色法检测苏铁新鲜种子或干燥脱水种子的活力。在剥离胚之前,先在室温下的蒸馏水中浸泡种子96 h,然后去除硬质的中种皮(mesotesta或sclerotesta),无损伤地剥取胚。将分离的60个胚均分为3组,然后将每一组分别放入一个玻璃缸中,用1%的TTC溶液将完全胚淹没,盖上玻璃盖,静置于30°C的黑暗的萌发箱,24 h后观察胚的着色情况。观察前,先用蒸馏水冲洗3次,然后评价。如果整个胚被染成红色,则被视为是高活力的;胚仅有一小部分被染成红色或完全呈白色,被视为活力低下或已死亡。

3 种皮透水性能的评价

首先,随机取去除外种皮而中种皮完整的种子60粒,均分为3组,分别称重(W_0 , g)。将这3组种子分别放进容量为500 mL的烧杯中,并加入蒸馏水完全淹没种子。分别在2、4、8、12、24、48、72、96、120、144、168、192、216和240 h后,将浸泡的3组种子分别称重(W_t , t表示称重时的浸泡时间),称重时用吸水纸吸干种子表面水分,依据种子质量的增加率(%) (平均值)评价骨质的中种皮膜质内种皮的透水性能。按下述公式计算种子

质量增加率(%): 种子的质量增加率(%)= $[(W_t - W_0) / W_0] \times 100\%$ 。

其次,随机取去除了外种皮的种子60粒,然后用解剖针将骨质中种皮的中部刺穿(种皮穿孔),但不损伤内部的胚乳组织。其他的操作(称重、浸泡时间、计算种子质量的增加率)如上所述。

4 种子的干燥脱水处理

4.1 快速脱水处理

在种子采集后的第9天,在带盖的玻璃干燥器底部放一层硅胶(厚约5 cm),然后将种子平铺于硅胶上,然后倒入硅胶(厚约4 cm),又在硅胶上平铺一层种子,依此重复以上的操作,共计放置4层种子;3个重复。在第12、24、48、96、120和144 h时取样,分别进行含水量测定和活力评价(TTC法);以未脱水的种子作为对照组。

在进行含水量测定时,每一次用15粒种子,将其等分3组,用电子天平(精度为0.1 mg)称重(W_0 , g),然后置于(103±1)°C的烘箱中,烘17 h后取出再称重(g),以鲜重为基础计算种子的含水量(%)。

4.2 慢速脱水处理

在种子采集后的第9天,将种子平铺于室内的桌面上任其自然风干(室温),取样时间分别为7、28、60、80和90 d。每次取样75粒种子,分别进行含水量的测定(15粒)(操作程序如上所述)和活力评价(60粒)(TTC法)。

5 层积温度对胚生长的影响

首先将种子浸泡于蒸馏水中,48 h后转移至装有湿润珍珠岩(含水量约60%)的塑料盒(45 cm×35 cm×20 cm),充分混匀,进行层积处理。层积温度分别是恒温4和20°C。在每个温度下层积420粒种子,放置于黑暗之下。在第3个月、第4个月和第6个月,分别取样100粒,其中20粒用于胚的长度测定,余下的80粒进行萌发检测,萌发温度为变温28°C/20°C。这一萌发温度是基于相关研究而设定的(Dehgan和Schutzman 1989)。在光照下(光周期为12 h·d⁻¹,光照强度约40 μmol·m⁻²·s⁻¹)进行萌发时,将种子放入直径为15 cm的玻璃培养皿中,培养皿中盛有灭菌的珍珠岩,并加入蒸馏水使其充分湿润。将种子平放且埋入珍珠岩中。在观测过程中,及时喷洒无菌水以确保介质湿润。当胚根突破种皮并生长至2 mm,则认为种子已萌发。萌发实验持续30 d。

6 层积介质含水量对胚生长的影响

首先, 配置不同含水量的介质。在2013年12月1日, 用称重法将紫外线杀菌的珍珠岩配置成含水量不同的层积介质。珍珠岩的含水量(W/W)分别设定为25%、50%或75%。此外, 用2%的次氯酸钠溶液消毒10 min。盛有同一含水量介质的塑料盒有2个, 每一个塑料盒中含有100粒种子; 在将苏铁种子和介质充分混匀后加盖(V/V , 种子/珍珠岩=1:3), 且用2层铝箔纸包裹塑料盒(遮光和防止介水分散失), 将其保存于4°C。8个月后, 将种子取出, 统计种子的发芽率和霉烂率; 解剖20粒种子, 测量未萌发种子的胚的长度(mm)。其余的种子用于萌发检测, 其萌发温度为28°C/20°C, 周期性光照(12 h·d⁻¹); 持续时间为30 d。

7 种子的干藏、水藏和干湿交替保存

7.1 干藏处理

用牛皮纸袋装120粒种子, 将其存放于室温下(实验室的月平均温度介于8.3~24.7°C之间), 24周后, 解剖20粒种子, 查看胚和胚乳与种皮(中种皮和内种皮)的离合情况, 并测量胚的长度。其余的100粒用于萌发检测, 萌发温度是28°C/20°C, 周期性光照(12 h·d⁻¹), 以胚根突破种皮并长至2 mm为萌发的标准; 持续时间为30 d。

7.2 水藏处理

在室温下的2个玻璃缸(35 cm×18 cm×12 cm)中放入120粒完整的种子, 然后加入蒸馏水将其淹没(水面至最上部的种子约3 cm)。同时, 加入1% (W/V)的百菌清以防止霉变。每7 d换水一次。在换水时, 观察种皮的颜色变化及腐烂情况; 24周后, 将种子取出, 其中20粒用于解剖, 查看种仁与种皮的离合情况, 并测量胚的长度; 其余的100粒种子用于萌发检测(萌发的条件和标准如上所述)。

7.3 干湿交替保存处理

在室温下的玻璃缸(35 cm×18 cm×12 cm)中放入120粒种子, 然后加入蒸馏水将其淹没(水面至种子的距离约3 cm); 同时, 加入1% (W/V)的百菌清。每14 d换水一次, 在换水时, 将种子取出并平铺于塑料板上; 48 h后又将这些种子放入水中保存。在24周后, 随机解剖20粒种子, 查看种仁与种皮的离合情况, 并测量胚的长度; 其余的100粒种子用于萌发检测(萌发的条件与标准如上所述)。

8 GA₃溶液对种子发育的影响

在4°C且黑暗的环境下层积300粒种子, 层积介质珍珠岩的含水量为75%。在第16周后, 将种子取出, 其中30粒用于测量胚的长度(mm)。将余下的270粒种子均分为3组, 分别用蒸馏水(对照组)、200和500 mg·L⁻¹的GA₃溶液将其浸泡96 h。之后, 取出种子, 用1%的次氯酸钠溶液灭菌10 min。在用蒸馏水冲洗3次后进行低温(4°C)层积处理。在8周后, 分别测量20粒种子的胚的长度和检测其余70粒种子的萌发率, 2个重复, 每个重复35粒, 萌发温度为变温28°C/20°C, 持续时间为30 d; 其他的萌发条件和评价标准如上所述。

在实验结束时, 解剖所有的种子, 测量胚的长度(mm), 以评价外源GA₃的效应。而且, 对刚萌发的种子, 先切除种皮外的胚根, 然后纵向地从种子的中央切开, 用游标卡尺测量胚的长度, 以此确定种子萌发时的胚的临界长度。

9 数据统计分析

种子萌发率、种子活力、种子含水量和胚的长度以平均数±标准偏差(SD)表示。用软件SPSS 16.0分析相关处理后的胚长度的最小显著差异(least significant difference, LSD)。

实验结果

1 苏铁种子的基本特征

当年成熟的苏铁种子呈倒卵形或卵圆形, 略扁, 暗红色或橙红色。种子的平均大小(长×宽×厚)为39.5 mm×31.4 mm×22.7 mm, 单粒重21.45 g。种脐端有1个突起的种阜(图1-A)。种子由种皮和种仁组成, 种皮可分为肉质化的外种皮(sarcotesta)、骨质的中种皮[亦称之为硬质种皮(mesotesta或sclerotesta)和褐色膜质的内种皮(endotesta, 亦称之为膜质层(membranous jacket)](图1-B)。外种皮肉质化, 与中种皮结合紧密; 中种皮比较坚硬, 透水性差; 内种皮棕(褐)色, 膜质化。

苏铁的种仁由胚(位于劲卵器之中)和胚乳组成。在胚孔端, 有2个胚孔(图1-A); 沿中轴线纵切, 还能见到包藏于胚乳之中的2个劲卵器(图1-C); 胚不明显, 位于劲卵器内, 在适宜的环境中能逐渐发育完善。胚乳实为雌配子体组织(female gametophyte tissue), 乳白色。幼胚的长度(3.45 mm)与种子的长度之比值(E:S)约是0.089。

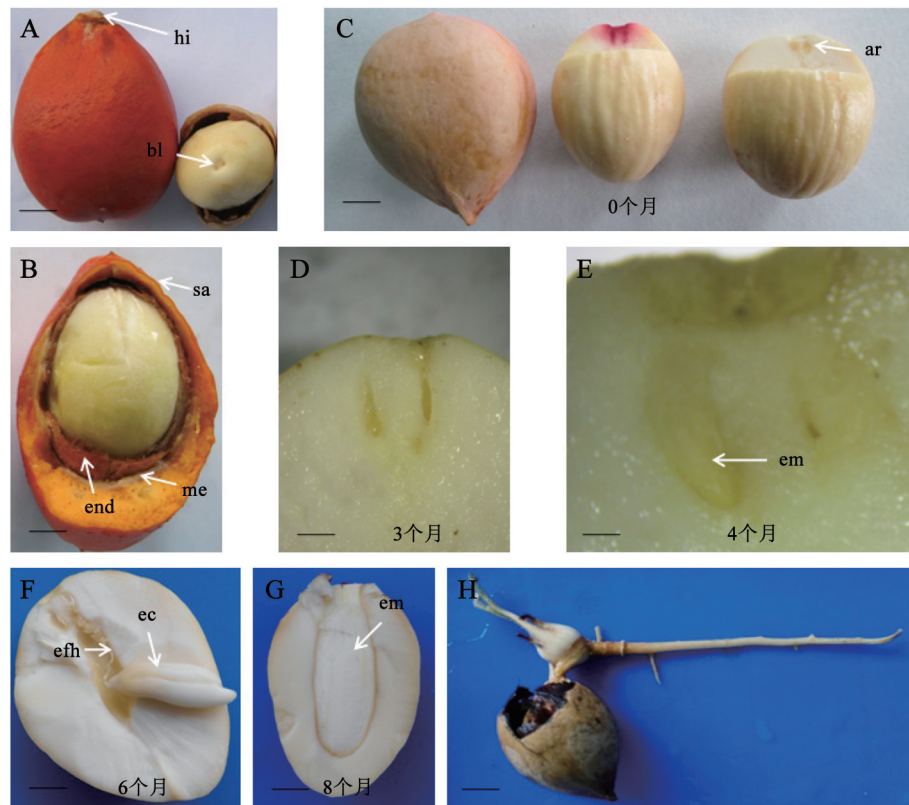


图1 苏铁种子及其胚的发育变化

Fig.1 The seed of *C. revoluta* and changes in embryo development

A: 种子和胚乳, 比例尺8 mm; B: 种皮结构, 比例尺6.4 mm; C: 去除了外种皮的种子及胚乳端的劲卵器, 比例尺4.8 mm; D-E: 暖层积下的胚或局部的纵面观(纵切), 比例尺分别是2和1.1 mm; F: 发育完全的胚, 比例尺4.8 mm; G: 暖层积下已萌发的种子的胚(纵切), 比例尺4.8 mm; H: 已充分发育的幼苗, 比例尺8 mm. ar: 劲卵器; bl: 胚乳; ec: 具子叶的胚; em: 胚; end: 内种皮; efh: 伸长的丝状吸器; me: 中种皮; sa: 外种皮。

去除红色肉质的外种皮后, 单粒苏铁种子重约12.32 g; 种子的平均大小(长×宽×厚)约为36.1 mm×24.2 mm×19.6 mm。

2 苏铁种子的吸水动态

在前24 h内, 中种皮完好的种子因吸水而增加的质量很少, 仅有3.84% (相当于0.51 g水); 在96 h时, 中种皮完好的种子质量增加率为25.28%, 中种皮穿孔的种子质量增加率为28.26%, 两种类型的种子的质量增加率无显著性差异(图2)。在240 h时, 中种皮完好的种子和中种皮穿孔的种子的质量增加率分别为29.57%和30.21%。由此可知, 苏铁种子能较好地吸水, 这也暗示坚硬的中种皮不能阻碍种仁吸收水分。

3 苏铁种子的活力及脱水耐性

经TTC染色后, 58个胚被染成深红色, 这说明新采集的苏铁种子有很高的活力。新采集的苏铁

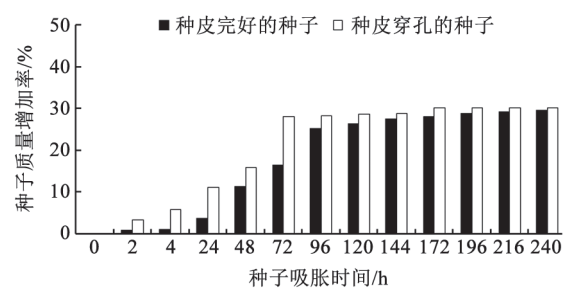


图2 没有肉质外种皮的苏铁种子的吸水动态

Fig.2 The water absorption of *C. revoluta* seeds without fleshy sarcotesta

种子的初始含水量为53.9%。硅胶脱水(快速脱水)能使种子含水量快速下降。当用硅胶干燥处理12 h后, 种子含水量下降至48.4%, 其活力减至78.3%; 干燥48 h后, 种子的含水量下降至30.2%, 种子活力为56.7%。当种子脱水120 h后, 含水量下降到

21.8%时, 种子已完全失活(图3)。在室温自然风干(慢速脱水)过程中, 种子的活力亦随种子含水量的减少而显著降低(图4)。在第28天, 种子的含水量

和活力分别是37.5%和53.3%。在第60天时, 种子含水量为35.3%, 种子活力下降到25%; 在第90天时, 种子含水量为27.4%, 种子活力降低至10%。

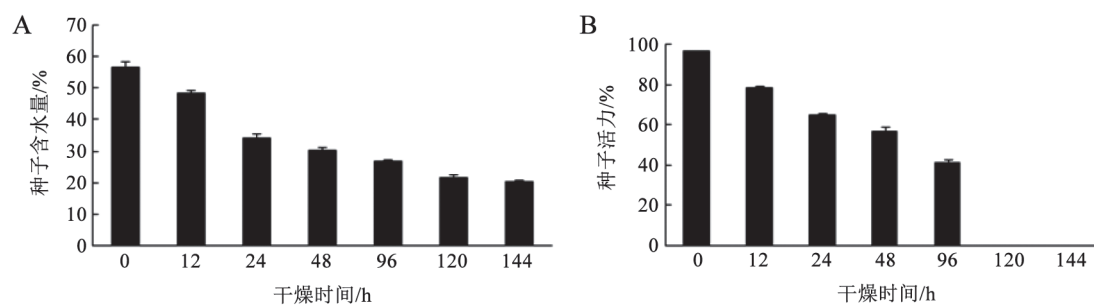


图3 硅胶干燥对苏铁种子含水量及种子活力的影响

Fig.3 Effect of drying in silica gel on seed moisture content and seed viability of *C. revoluta*

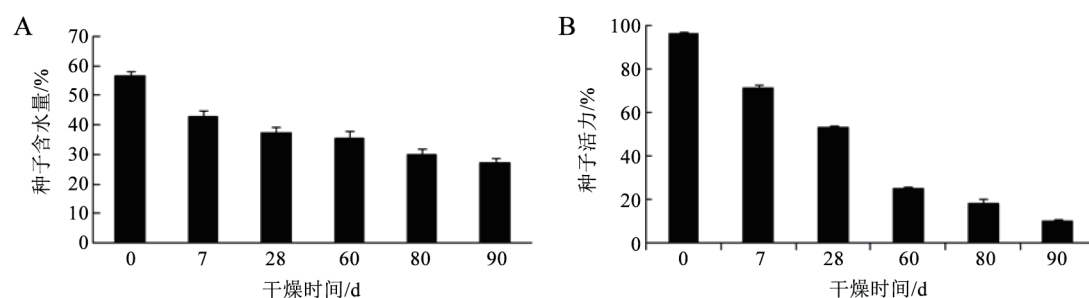


图4 室温自然干燥对苏铁种子含水量及种子活力的影响

Fig.4 Effect of natural drying at room temperature on the moisture content and seed viability of *C. revoluta*

4 温度对苏铁胚生长及萌发力的影响

在4°C下, 胚的生长较慢, 但比较整齐; 在20°C下, 胚生长较快, 但个体差异较大(表1)。在4和20°C层积6个月的种子E:S值分别为0.44和0.59; 在28°C/20°C且光照处理30 d后, 种子的萌发率分别是0和86.3%。在萌发2周后, 胚的长度是19.76 mm, E:S值为0.77 (图1-G)。之后萌发的种子发育成幼苗(图1-H)。

5 介质含水量对苏铁胚生长及萌发力的影响

在冷层积(4°C)且含水量不同的介质处理8个月后, 种子存活率、胚的发育(以胚的长度表示)和种子萌发率均表现出显著差异($P < 0.05$)。在介质含水量为75%时, 种子的存活率是100%, 胚的长度达到15.13 mm; 当介质含水量为25%时, 其种子存活率仅有31%, 而且胚发育非常缓慢(表2)。可见, 在冷层积中, 介质的含水量显著地影响胚的发育、种子活力及萌发力。

表1 不同积层下苏铁的胚长度及种子萌发率的变化

Table 1 Changes in embryo length and germination percentages of *C. revoluta* seeds under different stratification

时间/月	低温层积(4°C)		暖层积(20°C)	
	胚的长度/mm	种子萌发率/%	胚的长度/mm	种子萌发率/%
0	3.45±0.39	0	3.45±0.39	0
3	5.91±0.67	0	8.67±1.83	0
4	7.73±0.61	0	11.62±2.47	0
6	12.18±0.86	0	15.50±1.91	86.3±1.5

表2 冷层积下介质含水量对苏铁种子的影响

Table 2 Effects of the moisture content of substrate on *C. revoluta* seeds under cold stratification

介质含水量/%	种子存活率/%	胚的长度/mm	种子的萌发率/%
25	31 ^c	5.42±0.67 ^c	0 ^c
50	77 ^b	11.08±1.02 ^b	63.3 ^b
75	100 ^a	15.13±0.91 ^a	96.3 ^a

同一列中的不同小写字母表示数据间差异显著。下表同此。

6 干藏、水藏和干湿交替保存对种子活力的影响

在干藏8个月后,种子的存活率为23%,胚的长度为5.57 mm,种子的发芽率22%;当摇动死亡的种子时,能听到种仁撞击种皮的响声,这表明种仁已大量失水而与种皮分离。在水中保存8个月后,所有种子的胚已腐烂。然而,通过干湿交替的方式保存8个月后,种子存活率是100%,胚的长度是15.06 mm,而且,在28°C/20°C能顺利萌发(96.3%)。可见,干湿交替保存的效果最好,显著优于其他两种方式($P<0.05$)。

7 GA₃对种子发育的作用

GA₃溶液处理能促进冷层积16周的种子的胚的生长,且具有明显的浓度依赖性(表3)。在冷层积16周后,用500 mg·L⁻¹ GA₃溶液处理96 h,种子的胚长度从(7.91±0.61) mm增加至(16.38±1.42) mm。这表明种子萌发时胚的临界长度约是16.38 mm。

表3 GA₃处理对冷层积种子的胚生长及种子萌发率的影响Table 3 Effects of GA₃ on embryo length and germination percentages of cold stratified seeds

GA ₃ 浓度/mg·L ⁻¹	胚的长度/mm	种子萌发率/%
0	12.02±0.91 ^b	0
200	13.87±0.56 ^b	0
500	16.38±1.42 ^a	66.7±3.4

讨 论

苏铁种子的种皮由外种皮、中种皮和内种皮组成。去除红色肉质外种皮后,苏铁种子的单粒重约是12.32 g,其平均大小(长×宽)约为36.1 mm×24.2 mm。由此推算,无外种皮的苏铁种子的千粒重可达12 320 g。Chin等(1984)指出,顽拗性种子的千粒重常超过500 g,比正常性种子重。Hong和Ellis (1996)认为种子千粒重超过1 300 g的种子极

可能是顽拗性的。类似地,Daws等(2006)指出,热带植物所产生的顽拗性种子的平均千粒重约为3 383 g。就种子大小而言,顽拗性种子的二维尺度多数介于6 mm×5 mm(如黄兰*Michelia champaca*)和43 mm×42 mm之间(如鳄梨*Persea americana*) (傅家瑞和宋松泉2004)。比较而言,苏铁种子极可能是顽拗性的。

现在,以种子的脱水耐性评价种子的贮藏生理行为已被广大种子生物学家认可(Hong和Ellis 1996; Berjak和Pammenter 2008)。顽拗性种子不耐脱水,因而称之为脱水敏感性种子(Roberts 1973),其安全含水量因物种而异,如可可(*Theobroma cacao*)种子的安全含水量是23% (Hor等1984),海榄雌(*Avicennia marina*) (Farrant等1986)种子的安全含水量为61.5%。研究发现,正常性种子可大量失水,甚至可脱水至5%而不发生明显的伤害,中间性种子可脱水至7%~12%,顽拗性种子不能经受严重的脱水,这与正常性种子和中间性种子截然不同(Kermode和Finch-Savage 2002; 唐安军2014)。苏铁种子的中种皮虽然坚硬,但是透水的(图2),其初始含水量约为56.7%,无论是快速脱水(硅胶脱水),还是慢速脱水(自然风干),水分丧失直接导致种子活力下降(图3和4)。这充分说明干燥脱水直接导致苏铁种子劣变而降低了活力;同时,也表明慢速脱水能使苏铁种子在较高含水量水平致死。鉴于此,我们认为脱水敏感的苏铁种子是顽拗性的。

除了对脱水敏感外,顽拗性种子通常易受低温伤害,不同用常规方法加以保存。大多数顽拗性种子对零上低温是敏感的,易受伤害,如橡胶(*Hevea brasiliensis*)和红毛丹(*Nephelium lappaceum*) (Chin 1975)。可可(*T. cacao*)种子在15°C时也受到伤害(Hor等1984)。此外,栎属(*Quercus* spp.)等温带性植物所产生的顽拗性种子在2°C下冷藏8个月后仍能萌发(傅家瑞和宋松泉2004)。就苏铁种子而言,在4°C中层积6个月或24周后依然能保持很高的活力,这说明苏铁种子有较强的耐受零上低温的能力。这一特性为保存苏铁种子提供了便利。

在贮藏或层积过程中,种子休眠程度的变化是一定的环境信号启动内在的生理生化变化后的结果(Finch-Savage和Leubner-Metzger 2006; Footitt

等2011; Obrouchea 2012)。许多植物种子休眠状态的变化直接与胚的形态结构及其生理变化有关。例如, Vandellook等(2007)发现低温层积(5°C)比暖层积(23°C)能更有效地促进*Angelica sylvestris* (Apiaceae)形态生理休眠种子的胚的发育, 而且单一的冷层积不如先暖层积然后冷层积的“复合层积”的效果。类似地, Nagano等(2008)发现紫芭蕉(*Musa velutina*)的胚是未成熟的, 其休眠解除的前提是胚发育成熟; 在25°C和20°C, 紫芭蕉的胚发育较迅速, 而在10°C/15°C以及20°C/10°C和30°C/20°C下胚发育十分缓慢。不仅如此, Baskin和Baskin (2003)通过“移步”实验(move-along experiments), 既揭示了温度对*Viburnum formosanum* (Caprifoliaceae)的幼胚发育的促进作用, 又明确了温度作用的时序性(与季节性温度变化相似)。当然, “幼胚现象”也存在于在其他苏铁类种子。譬如, 骆文华等(2013)发现濒危植物德保苏铁(*Cycas debaoensis*)的胚在种子成熟时也是未发育完全的, 种子尚未真正成熟; 低温层积(5°C)能促进胚的发育(亦称之为后熟), 临界发芽种子的E:S值为0.53。就苏铁而言, 本文发现暖层积(20°C)中的胚发育比较迅速。在20°C下经过6个月后, 苏铁种子的胚已真正成熟, 充分具备了发芽能力(图1)。但是, 在低温层积(4°C)下, 苏铁种子的胚发育较缓慢, 尽管比较整齐(表1)。基于胚的形态结构阶段性变化特性, 我们清楚地发现, 在当年成熟时, 苏铁种子的胚是幼小的, 未发育完全, 在脱落后还须继续发育才能真正成熟(图1、表1和2)。因此, 我们认为苏铁种子是形态休眠的, 胚的后熟过程需要较长的时间, 而且其成熟过程是温度、水分和时间等因素的复合函数。在自然条件下, 如果水热条件不适宜, 种子后熟则会中断, 甚至被胁迫致死。即使苏铁种子处于安全的环境中, 长时间的后熟过程也会延迟种子萌发, 使其错过最佳的萌发窗口。由此推知, 胚的未完全发育(即“幼胚现象”)可能是苏铁种子难以自然转化为幼苗的关键原因。

事实上, 贮藏环境或种子传播后的“落脚点”是一个由多因子组成的系统, 其中的任意一个因子的变化都会影响种子的发育或萌发。在分析层积介质水分状态对苏铁种子的胚的发育时, 我们发现介质的水分状况对胚发育的影响非常明显。

尽管苏铁种子的骨质化中种皮对种仁有一定的保护作用, 但不能阻断种子的吸水过程(图2)。Baskin和Baskin (2004)认为种子的物理休眠是由于种皮不透水引起的。由此可知, 苏铁种子没有物理休眠, 在育苗时, 无需人为磨破或划破种皮。在吸胀过程中, 水分抵达种子的胚与胚乳部分, 就能激活内在的生理机制, 如脱落酸的合成与分解、赤霉素的合成, 从而刺激胚的分化与生长(Bewley 1997; Ali-Rachedi等2004; Obroucheva 2012)。在实验中, 苏铁种子在低温(4°C)下层积16周后, 赤霉素(GA₃)溶液处理能加速胚的生长(表3), 这说明外源GA₃能促进胚的发育; 同时, 这种现象也暗示在层积的后期, 苏铁种子的胚生长加速可能与激素的变化有关。不仅如此, 介质含水量为75%时能有效地促进苏铁的胚的发育(表1)。在含水量为50%或25%时, 胚发育不但受阻, 而且种子的死亡率也很高。这可能与介质含水量低而导致种子失水劣变有关。就介质的水分状况而言, 含水量为75%的介质(珍珠岩)是比较适宜于苏铁种子层积的。此外, 干藏8个月后, 苏铁种子的存活率仅有23%, 这与干藏诱导种子失水劣变有关, 因为这些种子的种仁已皱缩, 与种皮已完全分离。水藏8个月后, 种子已全部死亡, 这可能是种子长期处于无氧呼吸状态进而诱发细胞衰亡的产物。相反, 干湿交替能收到非常好的效果, 种子的存活率为100%, 且胚也能充分发育。所以, 长时间干燥贮藏或水淹都不利于苏铁的胚发育, 也不能有效地维持种子活力。

本文实验用种采自于重庆市西部城区3所大学校园的栽培苏铁。重庆市位于长江上游, 其气候属亚热带湿润季风气候, 夏热冬暖, 雨热同季且丰富; 在1960~2005年间, 年平均温度约17.5°C; 年降雨量约1 140.1 mm, 主要集中在5~9月(占全年总雨量的70%~80%) (周浩等2008)。调查发现, 在重庆主城区, 苏铁种子成熟于少雨的秋季(9月~11月)。秋季成熟的种子能在大孢子叶柄上留存时间可超过1年。从所获得的实验数据看, 尽管苏铁种子对于干燥脱水十分敏感, 但是其肉质的外种皮和骨质的中种皮能起到良好的屏障作用, 使种子不至于因自然风干而在短时间内死亡。也就是说, 挂树的苏铁种子有可能完成后熟过程。这一推测可以从潘爱芳(2012b)的研究中得到有力的佐证。

潘爱芳(2012b)研究了次年挂树苏铁种子(采自福州城区,种子在树上留存了大约1年时间)的胚与胚乳结构,结果发现有的种子具有子叶胚,胚与胚乳的长度比值可达1/3至2/3,甚至个别种子已萌发。这就证实了福州城区某种微环境下的水热条件能满足苏铁种子后熟及其萌发的需要。然而,地区间的气候与环境是不同的,甚至差异极大。所以,只有具体分析苏铁种群所处的生境特点与气候格局,才能客观地揭示不同苏铁种群有性更新受阻的真正原因。诚然,尚有诸多方面需要进一步的研究,譬如,温度和水分对种子后熟的综合效应;在贮藏(层积)过程中,胚的生理调控机制;苏铁种子在野外的季节性萌发模式;气候变暖对苏铁有性繁殖的影响等等。阐释这些问题对于全面理解苏铁种子的本质及其变化趋势是非常重要的。

综上所述,当年成熟的苏铁种子的胚是幼小的,未真正发育成熟,在适宜的(贮藏)环境中可继续发育成熟;严重失水会导致种子活力急剧降低或丧失。换言之,苏铁种子是形态休眠的,且是顽拗性的。在层积过程中,温度和介质的含水量强烈地影响胚的后熟过程。当温度适宜时,保持种子湿润是贮藏苏铁种子的关键,也是胚后熟的基础。此外,施加GA₃溶液处理能加速胚的发育,提高苏铁种子转化为幼苗的效率。毋庸置疑,这些信息对研究苏铁类植物的种子保存、有性更新过程及物种保护是非常有价值的。

参考文献

- Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner M, 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
- Baskin CC, Baskin JM (2003). When breaking seed dormancy is a problem try a move-along experiment. *NPI*, 4: 17–21
- Baskin CC, Baskin JM (2014). *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination* (second edition). London: Academic Press/Elsevier
- Baskin JM, Baskin CC (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Sci Res*, 14: 1–16
- Berjak P, Pammenter NW (2008). From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. *Ann Bot*, 101: 231–228
- Bewley JD (1997). Seed dormancy and germination. *Plant Cell*, 9: 1055–1066
- Chin FH (1975). Germination and storage of rambutan (*Nephelium lappaceum*) seeds. *Malay Agric Res*, 4: 173–180
- Chin FH, Hor YL, Lassim MBM (1984). Identification of recalcitrant seeds. *Seed Sci Technol*, 12: 429–436
- Daws MI, Garwood NC, Pritchard HW (2006). Prediction of desiccation sensitivity in seeds of woody species: a probabilistic model based on two seed traits and 104 species. *Ann Bot*, 97: 667–674
- Dehgan B, Schutzman B (1989). Embryo development and germination of *Cycas* seeds. *J Amer Soc Hort Sci*, 114 (1): 125–129
- Dehgan B, Yuen CKKH (1983). Seed morphology in relation to dispersal, evolution, and propagation of *Cycas* L.. *Bot Gaz*, 144 (3): 412–418
- Farrant JM, Pammenter NW, Berjak P (1986). The increasing desiccation sensitivity of recalcitrant *Avicennia marina* seeds with storage time. *Physiol Plant*, 67: 291–298
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol*, 171: 521–523
- Footitt S, Douterelo-Soler, Clay H, Finch-Savage WE (2011). Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108 (50): 20236–20241
- Fu JR, Song SQ (2004). *Recalcitrant Seed Biology*. Beijing: China Science and Culture Press (in Chinese) [傅家瑞, 宋松泉(2004). 顽拗性种子生物学. 北京: 中国科学文化出版社]
- Gutterman Y (2000). Maternal effects on seeds during development. In: Fenner M (ed). *Seeds: the Ecology of Regeneration in Plant Communities*. Wallingford: CAB International, 59–84
- Harper JL (1977). *Population Biology of Plants*. New York: Academic Press
- Hong TD, Ellis RH (1996). A protocol to determine seed storage behavior. In: Engels JMM, Toll J (eds). *IPGRI Technical Bulletin No. 1*. Rome: International Plant Genetic Resources Institute
- Hor YL, Chin HF, Mohamed ZK (1984). The effect of seed moisture and storage temperature on the storability of cacao (*Theobroma cacao*) seeds. *Seed Sci Technol*, 12: 415–420
- ISTA (International Seed Testing Association) (2003). *International Rules for Seed Testing*. Edition 2003. Switzerland: Brassersdorf
- Jie JQ, Su WX (1989). Preliminary study on seed storage and breeding seedlings by seeds. *Jiangxi For Sci Technol*, 6: 26 (in Chinese) [揭建勤, 苏文兴(1989). 苏铁种子贮藏与育苗试验初报. 江西林业科技, 6: 26]
- Kermode AR, Finch-Savage WE (2002). Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: Black M, Pritchard HW (eds). *Desiccation and Survival in plants: drying without dying*. Oxford: CAB International, 149–184
- Luo WH, Deng T, Zhao B, Huang SX, Tang WX (2013). Seed dormancy and germination of endangered species *Cycas devaoensis*. *Seed*, 32 (1): 72–74 (in Chinese with English abstract) [骆文华, 邓涛, 赵博, 黄仕训, 唐文秀(2013). 濒危植物德保苏铁种子休眠与萌发. 种子, 32 (1): 72–74]
- Nagano S, Mori G, Oda M (2008). Effects of temperature and moisture content of the substrate during storage on embryo development and germination in seeds of *Musa velutina* Wendl. & Drude. *J Hort Sci Biotechnol*, 83 (1): 33–36
- Obrouchea NV (2012). Transition from hormonal to nonhormonal regulation as exemplified by seed dormancy release and germination triggering. *Russ J Plant Physiol*, 59 (4): 591–600

- Pan AF (2012). Seed coat structure traits of *Cycas revoluta* Thunb. *Plant Sci J*, 30 (5): 618–623 (in Chinese with English abstract) [潘爱芳(2012). 苏铁种子的种皮结构特征研究. *植物科学学报*, 30 (5): 437–442]
- Pan AF (2012). Embryo and endosperm structures of *Cycas revoluta* Thunb. seeds. *Plant Sci J*, 30 (6): 618–623 (in Chinese with English abstract) [潘爱芳(2012). 苏铁(*Cycas revoluta* Thunb.)种子的胚与胚乳解剖结构研究. *植物科学学报*, 30 (6): 618–623]
- Roberts EH (1973). Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci Technol*, 1: 499–514
- Shimono A, Washitani I (2004). Seedling emergence patterns and dormancy/germination physiology of *Primula modesta* in a sub-alpine region. *Ecol Res*, 19: 541–551
- Tang AJ (2014). Seed dormancy and storage behavior of *Magnolia sargentiana* endemic to China. *Plant Physiol J*, 50 (1): 105–110 (in Chinese with English abstract) [唐安军(2014). 中国特有植物凹叶木兰种子的休眠与贮藏行为. *植物生理学报*, 50 (1): 105–110]
- Tang AJ, Long CL, DAO ZL (2004). Molecular mechanisms and storage technologies of recalcitrant seeds. *Acta Bot Boreal Occident Sin*, 24 (11): 2170–2176 (in Chinese with English abstract) [唐安军, 龙春林, 刀志灵(2004). 种子顽拗性的形成机理及其保存技术. *西北植物学报*, 24 (11): 2170–2176]
- Vandlook F, Bolle N, Van Assche JA (2007). Multiple environmental signals required for embryo growth and germination of seeds of *Selinum carvifolia* (L.) L. and *Angelica sylvestris* L. (Apiaceae). *Seed Sci Res*, 17: 283–291
- Zhou H, Yang BG, Cheng BY (2008). Analysis of characteristics of climate change over last 46 years in Chongqing. *Chin J Agrometeorol*, 29 (1): 23–27 (in Chinese with English abstract) [周浩, 杨宝钢, 程炳岩(2008). 重庆近46年气候变化特征分析. *中国农业气象*, 29 (1): 23–27]

Desiccation sensitivity and effects of temperature and moisture content of the substrate during storage on after-ripening in seeds of *Cycas revoluta*

TIAN Mei-Hua, ZHAO Zheng-Wu, TANG An-Jun*

Chongqing Key Laboratory of Molecular Biology of Plant Environmental Adaptations, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China

Abstract: This article fully compared effects of both temperature and moisture content of substrate during storage on the embryo development in seeds of *Cycas revoluta* as well as desiccation tolerance. The results showed that the seed with the mesotesta (or sclerotesta) and endotesta was water permeable, and the embryo was highly small and immature (*ca.* 3.45 mm) with the low ratio of the embryo length to the seed length (E:S), namely, E:S=0.089. The seeds must continue developing and growing to a proper size prior to germination. And the critical length of embryo with cotyledon was near 16.38 mm for germination. Thus, the data confirmed that there existed morphological dormancy in the seeds of *C. revoluta*. Also, the seeds were sensitive to drying because serious water loss induced sharp decrease in seed vigor, even resulted in total death. So the seeds of this species should be considered recalcitrant. In addition, 75% of the moisture content of the substrate was better than 50% and 25% for embryo after-ripening. Moreover, both long-term dry storage in air and wet storage in water were destructive. Therefore, we thought that keeping seeds moist enough not wet was the key to effectively conserve seeds *ex situ*. Notably, application of GA₃ solutions (500 mg·L⁻¹) could accelerate the embryo development of cold stratified seeds.

Key words: regeneration from seed; stratification; immature embryo; morphological dormancy; recalcitrant seeds; *Cycas revoluta*

Received 2015-09-21 Accepted 2016-01-26

This work was supported by Chongqing Science and Technology Committee (Grant No. cstc2013jcyjA00002), Chongqing Educational Committee (Grant No. KJ1400504), and Chongqing Normal University (Grant No. 2011SLX34).

*Corresponding author (E-mail: an_20070710@163.com).