

不同层积处理滇重楼种子内源激素变化的研究^{*}

赵俊凌¹, 罗承彬², 李 戈^{1△}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所云南分所, 云南景洪 666100;

2. 西双版纳州农机学校, 云南 景洪 666100)

摘要: 目的 研究滇重楼种子在萌发过程中内源激素变化, 为滇重楼种苗繁育提供理论依据。方法 以室外与室内两种不同处理的滇重楼种子为材料, 采用高效液相法测定滇重楼种子内源激素含量。结果 经层积处理 120d 后, 滇重楼种子开始萌发; 整个萌发过程中, 滇重楼种子内源激素 GA 显著升高, ABA 显著降低, IAA 含量变化不明显; 室外处理的滇重楼种子萌发整体水平优于室内处理。结论 在滇重楼种子育苗过程中, 内源激素 ABA 和 GA 起着重要的作用。

关键词: 滇重楼; 种子; 层积处理; 内源激素

中图分类号: R282.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2014)03-0028-02

重楼 (*Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis*) 是云南白药的主要原料, 也是宫血宁、夺命丹、总皂苷片、季德胜蛇药片、热毒清等 65 个重要中成药的主要组方原料^[1]。重楼药材多年来完全依赖野生采挖, 连年的乱采滥挖使我国野生资源日趋枯竭, 据云南白药集团调查, 全国年需求量在 3 000 以上, 国产野生重楼已开发 90%。

滇重楼种子具有“二次休眠”现象^[1-2], 且出苗率很低, 仅为 46.2%^[2]。种子繁殖一直未能在生产上应用, 成为制约重楼依靠种子繁育种苗速度的一个重要瓶颈。本文以滇重楼种子胚率与内源激素为指标, 研究不同层积条件对重楼种子发育的影响, 为重楼种苗繁育提供理论依据。

1 材料与方法^[3-6]

1.1 材料

白药种子于 2012 年 12 月 20 日采自云南白药集团云南省楚雄市武定栽培基地。

1.2 种子处理

将新鲜的重楼种子去皮后, 清水冲洗, 分别放置于室内环境(恒温 20℃)与室外环境(药用植物研究所云南分所内试验田)中进行沙藏保存, 保持湿润条件, 分别于 20d, 40d, 60d, 80d, 100d, 120d,

140d, 160d, 180d 取样, 样品经液氮冷冻后贮藏于低温冰箱中(-80℃)保存, 以备测试。

1.3 胚率测定

分别取不同时间段的 20 粒种子, 沿种胚中央将胚乳切成两半, 利用体式显微镜和游标卡尺分别测量胚长与胚乳长, 并计算胚率。(胚率=胚长/胚乳长)

1.4 内源激素提取

精密称取样品 3 份, 每份 1.00g, 加入液氮磨碎, 加 8 倍 80% 冰冻甲醇 4℃ 低温避光浸提 12 h, 离心取上清液; 将残渣再用 80% 的冰冻甲醇(1:5)浸提 2 次, 每次 2 h, 离心, 合并上清液, 40℃ 下氮气吹干, 加水定容至 5mL, 作为供试液 1 备用; 用 10 mL 80% 甲醇平衡 C18 小柱→取 1mL 供试液 1 至 C18 小柱→10 mL 甲醇淋洗 C18 小柱→收集洗脱液, 将洗脱液用氮气吹干, 甲醇定容至 1mL, 过 0.45μm 有机膜, 作为供试液 2 备用。

1.5 激素含量测定

1.5.1 仪器与试剂

Waters 高压液相色谱系统 (600-2707-2998, on-line degasses AF Empower station); 色谱柱: Waters XTerra C18 柱(250×4.6, 5.0μm,);

^{*} 基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务专项(YZYN 2012-02), 中央级公益性科研院所基本科研业务专项(YZYN 2013-01)

收稿日期: 2014-03-04

作者简介: 赵俊凌(1981-), 男, 四川三台人, 助理研究员, 主要从事药用植物化学成分分析。

△通信作者: 李戈, E-mail: lige@163.com

甲醇(Fisher,美国)、乙腈(Fisher,美国)为色谱纯,磷酸为分析纯,(赤霉素,SIGMA)、IAA(吲哚乙酸,ALORICH)、ABA(脱落酸,SIGMA)

1.5.2 色谱条件

流动相:A泵:甲醇,B泵:乙腈,C泵:0.05%磷酸缓冲液,D泵:去离子水;梯度洗脱,程序如表1所示;检测波长:210nm;流速:1mL/min;柱温:35℃。

表1 梯度洗脱程序表

T/min	A/%	B/%	C/%	D/%	Curve
0.00	0	25.00	75.00	0	
10.00	0	40.00	60.00	0	6
25.00	0	25.00	75.00	6	6
30.00	0	25.00	75.00	0	6

2 结果与分析

2.1 滇重楼种子层积过程中胚率变化

种胚生长速率与层积时间有密切关系,胚率随着时间推移而增大,见图1。在80d后,室外条件下胚率显著增加,说明室外条件更有利于重楼种子萌发。

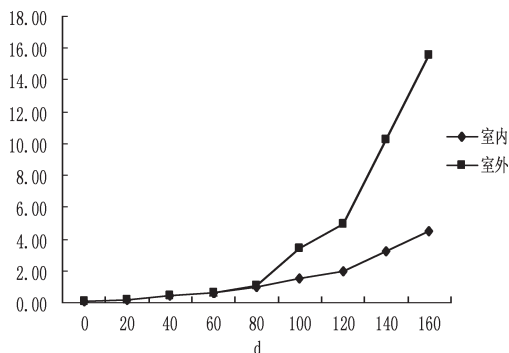
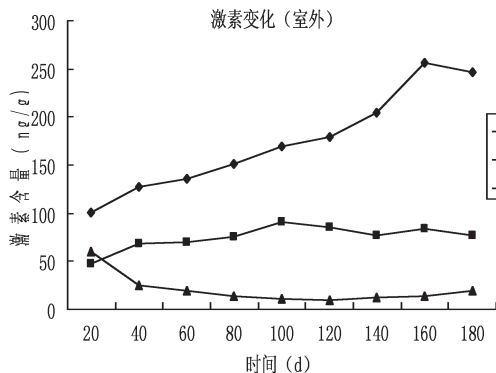


图1 滇重楼种子萌发过程中胚率变化

2.2 重楼种子层积过程中内源激素动态变化

由图2可知,在滇重楼种子萌发过程内源ABA



与GA变化显著,而内源IAA含量总体变化趋势明显,表明ABA与GA是影响滇重楼种子发育的重要因素。

随着时间的延续,层积40d后滇重楼种子内源ABA含量明显下降,120d后含量最低,表明较高ABA含量可能是种子休眠的重要原因;滇重楼种子内源GA含量随着层积时间的延续逐渐升高,在160d时达到最高值,然后呈现降低趋势;滇重楼种子内源IAA含量没有显著变化。

3 讨论

种子萌发受环境因素影响(光照、水分及温度等),环境改变引发种子各内源激素量发生变化而最终导致种子萌发。由于滇重楼种子存在二次休眠的现象中,多采用变温层积处理缩短种子发芽时间,提高出苗率。滇重楼种子最适合温度为18~20℃,本试验选择室内(20℃恒温)及室外(大田)两种处理方法。结果表明,滇重楼种子处理时间120d后,室外条件下的胚率明显高于室内恒温条件,说明室外处理促进了种子的萌发,提前解除滇重楼种子的休眠期,提高了种子的利用度。

文献报道ABA是控制种子休眠的主要因素,而GA可通过对ABA的拮抗作用来打破种子休眠,促进种子胚的发育及种子的萌发。实验结果显示,在萌发过程中,随着时间推移,滇重楼种子内源ABA含量持续降低,而GA量逐渐增加,IAA量上下波动不明显。结果表明,ABA及GA是控制滇重楼种子萌发的主要内源激素,因此,增加环境中GA/ABA值将可能缩短滇重楼种子萌发时间,增加种子的出苗率。从图2的变化趋势分析,室外条件下滇重楼种子内源激素的变化总体水平明显高于室内恒温条件,说明室外处理比室内处理更有利于种子的萌发。

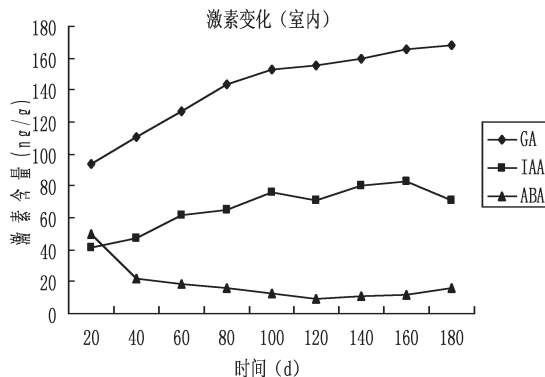


图2 重楼种子萌发过程中内源激素的动态变化

(下转第41页)