

层积过程中羌活种子种胚形态及生理生化变化

张娟^a, 其乐木格^a, 段海婧^{a,b}, 张金保^{a,b}, 晋玲^{a,b,c}, 陈红刚^{a,b,c,①}, 赵文龙^{a,b,c,①}

(甘肃中医药大学: a. 药学院, b. 西北中藏药省部共建协同创新中心,
c. 甘肃省珍稀中药资源评价与保护利用工程研究中心, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 对羌活 (*Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang) 种子进行层积处理, 观测层积过程中种子种胚形态及胚率, 研究种子中营养物质和內源激素含量以及呼吸途径关键酶活性的变化; 并对层积后的种子进行氟啶酮处理, 测定种子的发芽率和发芽势。结果显示: 与未层积(层积 0 d)相比, 层积后羌活种子种胚由球形发育为子叶型, 胚率增长至 67.30%, 发芽率增长至 50.67%; 种子的蛋白质、可溶性糖和淀粉含量显著降低; 赤霉素(GA₃)和吲哚乙酸(IAA)含量分别在 59.15~81.06 和 14.06~22.08 ng·g⁻¹ 范围内波动变化, 脱落酸(ABA)含量在层积 150 和 180 d 时显著降低, GA₃/ABA 比和 (GA₃+IAA)/ABA 比在层积 120~180 d 显著升高。在层积 0~60 d, 羌活种子的丙酮酸激酶(PK)活性呈先升高后降低的趋势, 琥珀酸脱氢酶(SDH)活性明显升高, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH)活性先降低后略有升高, 该时期以三羧酸循环途径(TCA)为主; 在层积 60~150 d, PK 活性呈波动升高的趋势, SDH 和 G-6-PDH 活性总体呈波动降低的趋势, 该期间以糖酵解途径(EMP)为主; 在层积 180 d 时, PK, SDH 和 G-6-PDH 活性均显著高于层积 120 d。相关性分析结果显示: ABA 含量分别与胚率和发芽率呈显著和极显著负相关, 相关系数分别为 -0.800 和 -0.875。综合研究结果表明: 羌活种子具有胚后熟特性, 层积处理结合氟啶酮处理可打破羌活种子休眠, 提高种子的发芽率; 营养物质含量的降低, 呼吸途径关键酶活性的波动变化, ABA 含量的降低以及 GA₃/ABA 比和 (GA₃+IAA)/ABA 比的升高对羌活种子休眠解除有重要影响。

关键词: 羌活; 种子休眠; 层积; 种胚形态; 生理生化特性

中图分类号: Q945.35; S567.23 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2023)01-0061-08

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2023.01.07

Embryo morphology and physiological and biochemical variations of *Notopterygium incisum* seeds during stratification ZHANG Juan^a, QI Lemuge^a, DUAN Haijing^{a,b}, ZHANG Jinbao^{a,b}, JIN Ling^{a,b,c}, CHEN Honggang^{a,b,c,①}, ZHAO Wenlong^{a,b,c,①} (Gansu University of Chinese Medicine: a. College of Pharmacy, b. Northwest Collaborative Innovation Center for Traditional Chinese Medicine Co-constructed by Gansu Province & MOE of PRC, c. Gansu Province Engineering Research Center for Evaluation, Protection and Utilization of Rare Traditional Chinese Medicine Resources, Lanzhou 730000, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2023, 32(1): 61-68

Abstract: Stratification treatment was conducted for *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang seeds, the embryo morphology and embryo rate of seeds during stratification were observed, and the variations of contents of nutrients and endogenous hormones and activities of key enzymes in respiratory pathway of seeds were studied; the seeds after stratification were treated with fluridone, and their germination rate and germination potential were measured. The results show that compared with no stratification (stratification for 0 d), the embryos of *N. incisum* seeds develop from spherical into cotyledon type after stratification, the embryo rate increases to 67.30%, and the germination rates increases to 50.67%;

收稿日期: 2022-06-21

基金项目: 中国工程院院地合作重大项目(GS2021ZDA06); 甘肃省高等学校青年博士基金项目(2022QB-093); 第四次全国中药资源普查甘肃省专项(GSZYPC2018Z17); 西北中藏药省部共建协同创新中心开放基金项目(Xbzzy-2022-03)

作者简介: 张娟(1997—), 女, 甘肃武威人, 硕士研究生, 主要从事中药资源保护、开发与可持续利用方面的研究。

①通信作者 E-mail: yiao1102@126.com; gszzy_zwl@163.com

引用格式: 张娟, 其乐木格, 段海婧, 等. 层积过程中羌活种子种胚形态及生理生化变化[J]. 植物资源与环境学报, 2023, 32(1): 61-68.

contents of protein, soluble sugar, and starch in seeds significantly decrease; contents of gibberellin (GA_3) and indoleacetic acid (IAA) fluctuate in the ranges of 59.15–81.06 and 14.06–22.08 $ng \cdot g^{-1}$ respectively, abscisic acid (ABA) content significantly decreases at stratification for 150 and 180 d, and GA_3/ABA and $(GA_3+IAA)/ABA$ ratios significantly increase during stratification for 120–180 d. During stratification for 0–60 d, pyruvate kinase (PK) activity of *N. incisum* seeds shows a tendency to first increase and then decrease, succinic dehydrogenase (SDH) activity evidently increases, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) activity first decreases and then slightly increases, and tricarboxylic acid cycle pathway (TCA) is dominant in this stage; during stratification for 60–150 d, PK activity shows a fluctuation increase tendency, activities of SDH and G-6-PDH show a fluctuation decrease tendency in general, and embden meyerhof pathway (EMP) is dominant in this stage; at stratification for 180 d, activities of PK, SDH, and G-6-PDH are all significantly higher than those at stratification for 120 d. The correlation analysis result shows that ABA content shows a significant and an extremely significant negative correlation with embryo rate and germination rate, and the coefficients of correlation are -0.800 and -0.875 respectively. The comprehensive study result shows that *N. incisum* seeds have the embryo post-maturation characteristics, and stratification treatment combined with fluridone treatment can break the dormancy of *N. incisum* seeds and increase germination rate of seeds; the decrease of nutrient content, fluctuation variations of activities of key enzymes in respiratory pathway, decrease of ABA content, and increases of GA_3/ABA and $(GA_3+IAA)/ABA$ ratios have important effects on the dormancy release of *N. incisum* seeds.

Key words: *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang; seed dormancy; stratification; embryo morphology; physiological and biochemical characteristics

羌活(*Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang)为中药羌活的来源之一。中药羌活别名有羌青、护羌使者、胡王使者、羌滑、退风使者和黑药等;性温,味辛、苦,入膀胱、肾经,具有解表散寒、祛风除湿、止痛的功效,用于风寒感冒、头痛项强、风湿痹痛、肩背酸痛,主产于甘肃、四川、青海等地,是中、藏、羌医药体系中的常用药^[1-2]。2013年,羌活在由中华人民共和国环境保护部和中国科学院联合编制的《中国生物多样性红色名录——高等植物卷》中被收录为近危(NT)物种。

据记载,羌活单味药及复方制剂涉及30多种剂型,260多个成方,约280个品种。近年来,随着中医药大健康产业的迅速发展,羌活的市场需求量急剧增加,野生羌活资源濒临枯竭。因羌活种子休眠严重^[3-4](自然状态下发芽率仅0.52%),目前只有部分地区试种成功,尚无法进行大规模人工种植。层积处理是常见的打破种子休眠的方法,可使种子种皮软化,增强种子内部代谢活动,还可促进种子完成一系列生理生化变化和后熟,变温层积处理是用高温与低温交替进行的层积方法,可以加速种子发芽^[5]。如大百合[*Cardiocrinum giganteum* (Wall.) Makino]^[6]和北五味子[*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.]^[7]种子经变温层积后,种胚完成形态后熟而萌发。变温层积过程中营养物质含量、呼吸途径关键酶活性以及内源激素含量的变化与种胚发育密不可分。如变温

层积过程中种子可溶性糖含量增加,淀粉和可溶性蛋白质含量降低^[8],葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH)活性升高^[9],脱落酸(ABA)含量降低,赤霉素(GA_3)和吲哚乙酸(IAA)含量升高^[10],均是种子休眠解除的原因之一。

羌活种子的休眠特性是其资源濒临枯竭的主要原因,与常温层积相比,变温(15℃~25℃/2℃~5℃)层积可缩短其解除休眠的时间^[4]。目前,对羌活种子层积过程中种胚形态及生理生化变化的相关研究较少,仅对羌活种子种胚后熟过程中内源激素含量变化有所研究^[11],对贮藏物质和呼吸途径关键酶并没有进行系统的研究,不利于羌活种子休眠解除机制的研究。鉴于此,本研究对层积过程中羌活种子种胚发育和生理生化指标的变化进行了研究,并分析了种胚发育与生理生化指标间的相关性,旨在明确羌活种子种胚发育和生理生化变化与种子休眠解除的内联联系,探究羌活种子萌发机制,建立种子休眠解除方法,为羌活野生资源保护、引种驯化、规模化种植提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试羌活种子于2020年9月采自甘肃省甘南藏

族自治州玛曲县欧拉秀玛乡(具体地理坐标为东经101°06'28.46"、北纬34°15'02.64",海拔3471 m),由甘肃中医药大学晋玲教授鉴定为羌活种子,采摘后去除杂质,先用质量分数0.2%次氯酸钠消毒5 min,再用蒸馏水冲洗3~5次,于室内通风处阴干,分装于10 cm×15 cm网袋(40目)中,共分装14袋,其中7袋每袋1 g,编号0-F至6-F,剩余7袋每袋3 g,编号0-J至6-J,备用。

河沙来源于兰州市黄河边(具体地理坐标为东经103°48'52.48"、北纬34°03'57.21"),用水洗去泥土及杂质,185℃烘干约3 h,过40目筛,高压灭菌锅121℃灭菌30 min,加入无菌水将沙子湿度保持在9%~11%,备用。

1.2 方法

1.2.1 变温层积处理 参考文献[9]中的方法进行变温层积处理。在容器(30 cm×40 cm聚丙烯盒)底部平铺厚度4 cm的沙子,将分装好的羌活种子平铺在其表面,再盖上一层沙子,用保鲜膜封住容器,用镊子打孔(12个)透气。先将容器置于室温(20℃~25℃)90 d,后移入3℃~5℃冰箱90 d。分别在层积0(即未层积处理,取出样品0-F和0-J)、30(取出样品1-F和1-J)、60(取出样品2-F和2-J)、90(取出样品3-F和3-J)、120(取出样品4-F和4-J)、150(取出样品5-F和5-J)和180 d(取出样品6-F和6-J)取样,取出后通风处阴干,将样品0-F至6-F置于4℃冰箱中保存,用于后续种胚形态及发芽指标的观测,样品0-J至6-J置于-80℃冰箱中保存,用于后续生理生化指标的测定。

1.2.2 种子种胚形态及胚率观测 样品0-F至6-F中,每份样品选取羌活种子30粒,蒸馏水浸泡12 h,先用OCT胶水进行常温包埋,然后置于-20℃条件下冷冻包埋5 min,采用Leica-CM1950型恒冷切片(德国Leica公司)切片(厚度0.12 mm),在Leica DM500显微镜(德国Leica公司)下观察种子形态结构,并随机取20粒种子用显微镜测量种子的胚长(种胚底端至顶端的长度)和胚乳长(胚乳底端至顶端的长度),取平均值计算种子的胚率,计算公式为胚率=(胚长/胚乳长)×100%^[10,12]。

1.2.3 种子生理生化指标测定 采用考马斯亮蓝法^[16-17]测定羌活种子蛋白质含量,采用蒽酮比色法^[16-17]测定可溶性糖和淀粉含量,采用丙酮酸激酶(PK)活性检测法^[17-18]测定PK活性,采用硫酸甲酯

吩嗪反应法^[17-18]测定琥珀酸脱氢酶(SDH)活性,这5个指标均使用购自南京建成生物工程研究所的试剂盒测定,试剂盒批号分别为20210622、20210422、20210429、20210329和202210329。采用酶联免疫法^[17-18]测定葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH)活性、赤霉素(GA₃)含量、吲哚乙酸(IAA)含量和脱落酸(ABA)含量,这4个指标均采用购自上海钦成生物科技有限公司的ELISA试剂盒测定,试剂盒批号均为202103,并据此计算GA₃/ABA比、IAA/ABA比和(GA₃+IAA)/ABA比。每个处理重复测定3次。

1.2.4 种子发芽指标测定 预实验结果显示:层积后的羌活种子(空白对照)的发芽率不足10%,而添加400 mg·L⁻¹氟啶酮处理的结果较好,故本试验选择400 mg·L⁻¹氟啶酮处理羌活种子。样品0-F至6-F中,每份样品随机选取羌活种子150粒,用400 mg·L⁻¹氟啶酮溶液(批号F809822、纯度99%,购于上海麦克林生化科技股份有限公司)浸泡24 h,蒸馏水冲洗3~5次,将种子上残留的氟啶酮溶液冲洗干净,播于沙床上,每培养皿(直径9 cm)播种50粒,3次重复。将培养皿置于光照度3000 lx、光照时间12 h·d⁻¹、温度20℃条件下培养,每日加入适量蒸馏水,记录萌发种子数(以胚根突破种皮为种子萌发标准),第12天统计发芽势,第25天计算发芽率,计算公式分别为发芽势=(第12天发芽种子数/供试种子数)×100%,发芽率=(发芽种子总数/供试种子数)×100%^[12-15]。

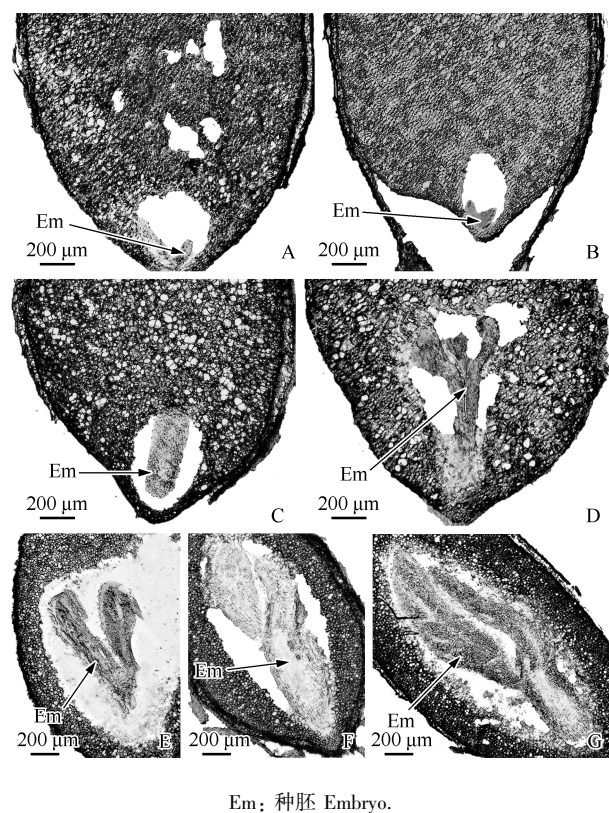
1.3 数据统计和分析

采用EXCEL 2013软件对获得的实验数据进行整理和分析,采用SPSS 28.0软件进行单因素方差分析、多重比较和Pearson相关性分析,采用Origin 2021软件制图。

2 结果和分析

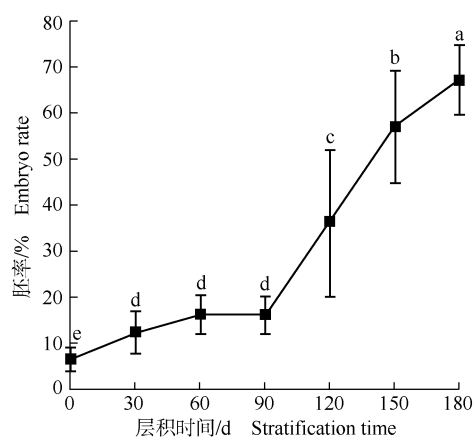
2.1 层积过程中羌活种子种胚生长发育动态

在整个层积过程中,羌活种子种胚不断发育,胚率总体持续升高,种胚形态变化见图1,胚率变化见图2。结果显示:未层积(层积0 d)时种胚为球形胚(图1-A),胚率为7.53%,种子仍处于休眠状态;层积30~90 d时,种胚发育缓慢(图1-B, C, D),胚率从13.33%升高至17.09%;层积120 d时,种胚发育为心形胚(图1-E),胚率显著升高至36.65%;层积150 d



A: 未层积(层积 0 d) No stratification (stratification for 0 d); B: 层积 30 d Stratification for 30 d; C: 层积 60 d Stratification for 60 d; D: 层积 90 d Stratification for 90 d; E: 层积 120 d Stratification for 120 d; F: 层积 150 d Stratification for 150 d; G: 层积 180 d Stratification for 180 d.

图 1 层积过程中羌活种子种胚形态的变化
Fig. 1 Change of embryo morphology of *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang seeds during stratification



不同小写字母表示不同层积时间处理在 0.05 水平差异显著 Different lowercases indicate the significant difference among different stratification time treatments at 0.05 level.

图 2 层积过程中羌活种子胚率的变化
Fig. 2 Changes of embryo rate of *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang seeds during stratification

时,种胚分化出完整的胚芽、胚轴和胚根(图 1-F),胚率显著升高至 57.35%;层积 180 d 时,种胚发育为子叶型胚(图 1-G),胚率显著升高至 67.30%,种胚后熟过程完成。

2.2 层积过程中羌活种子生理生化指标的变化

2.2.1 种子营养物质含量的变化

结果(表 1)显示:羌活种子的蛋白质含量在层积过程中总体呈降低的趋势,在层积 0~120 d 持续降低,在层积 150 d 时略升高,在层积 180 d 时降至最小值($22.39 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),层积 60~180 d 的种子蛋白质含量与层积 0 d(未层积)差异显著。可溶性糖含量在层积过程中波动较小,但在层积 0~60 d 呈降低的趋势,且在层积 60 d 时降至最小值($33.30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),此后波动升高,但均显著低于未层积处理。淀粉含量在层积过程中总体呈先降低后升高的趋势,在层积 0~60 d 呈降低的趋势,且层积 60 d 时降至最小值($12.93 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),之后波动升高,但均显著低于未层积处理。说明层积处理可显著降低羌活种子中营养物质的含量,为种子发育提供物质和能量。

2.2.2 种子呼吸途径关键酶活性的变化

结果(表 1)显示:羌活种子的丙酮酸激酶(PK)活性在层积 30 d 时较未层积处理显著升高,在层积 30~90 d 呈显著降低的趋势,且在层积 90 d 时降至最小值($79.25 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$),之后逐渐升高,在层积 180 d 时升至最大值($264.17 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)。琥珀酸脱氢酶(SDH)活性在层积 30 d 时较未层积处理无显著变化,在层积 60 d 时显著高于层积 0 和 30 d,在层积 60~150 d 呈波动降低的趋势,在层积 180 d 时升至最大值($39.70 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH)活性在层积 30 d 时较未层积处理显著降低,在层积 30~120 d 无显著变化,在层积 150 d 时降至最小值($10.06 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$),在层积 180 d 时升至最大值($20.35 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)。说明层积处理可使羌活种子内部代谢活动增强,有利于种胚发育。

2.2.3 种子内源激素含量的变化

结果(表 1)显示:羌活种子的赤霉素(GA_3)含量在层积过程中总体呈先升高后降低的趋势,在层积 0~120 d 呈上升趋势,在层积 150 d 时降至最小值($59.15 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$),显著低于未层积处理,在层积 180 d 时升至 $67.90 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。吲哚乙酸(IAA)含量在 $14.06 \sim 22.08 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 范围内小幅度波动,在层积 60 d 时达到最大值($22.08 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$),之后总体呈平缓降低的趋势。脱落酸

(ABA)含量在层积过程中总体呈先升高后降低的趋势,在层积 0~120 d 无显著变化,层积 150 和 180 d 的 ABA 含量显著低于层积 0~120 d,在层积 150 d 时降至最小值(82.39 ng · g⁻¹),在层积 180 d 时升至 91.11 ng · g⁻¹,但与层积 150 d 差异不显著。

结果(表 1)还显示:羌活种子的 GA₃/ABA 比、IAA/ABA 比和(GA₃+IAA)/ABA 比在层积 0~90 d 无显著变化,之后总体呈升高趋势;层积 120~180 d 的 GA₃/ABA 比和(GA₃+IAA)/ABA 比显著高于层积

0~90 d,但在层积 120~180 d 无显著变化。总体上看,在层积过程中,(GA₃+IAA)/ABA 比的变幅最大,GA₃/ABA 比的变幅次之,IAA/ABA 比的变幅较小。说明层积处理可使羌活种子内促进种子萌发的激素含量升高,抑制种子萌发的激素含量降低,有利于种子萌发。

2.3 层积过程中羌活种子发芽指标的变化

对层积过程中羌活种子发芽情况进行比较,结果见表 2。结果显示:层积过程中羌活种子的发芽率和

表 1 层积过程中羌活种子生理生化指标的变化($\bar{x}\pm SD$)¹⁾

Table 1 Changes of physiological and biochemical indexes of *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang seeds during stratification ($\bar{x}\pm SD$)¹⁾

层积时间/d Stratification time	蛋白质 含量/(mg · g ⁻¹) Protein content	可溶性糖 含量/(mg · g ⁻¹) Soluble sugar content	淀粉 含量/(mg · g ⁻¹) Starch content	PK/(U · g ⁻¹)	SDH/(U · g ⁻¹)	G-6-PDH/(U · g ⁻¹)
0	45.69±0.83a	50.44±0.89a	38.87±0.94a	148.89±6.79c	5.47±1.82d	18.50±1.66a
30	42.95±2.65a	40.57±0.61d	16.88±0.15e	225.74±0.00b	6.47±2.96d	12.45±1.33b
60	33.11±2.41c	33.30±0.96f	12.93±0.27f	112.87±3.40c	21.81±1.45b	14.44±0.99b
90	32.87±1.11c	45.05±1.52c	20.93±0.61c	79.25±3.40d	2.54±0.00e	11.68±0.56b
120	30.41±1.44c	37.19±1.23e	15.41±0.31d	124.88±0.00c	14.62±1.58c	13.80±0.91b
150	36.96±0.65b	47.55±0.97b	20.37±0.20d	136.89±3.40c	5.26±1.30d	10.06±0.37c
180	22.39±0.63d	42.89±0.12c	25.70±0.53b	264.17±0.00a	39.70±2.15a	20.35±2.04a

层积时间/d Stratification time	GA ₃ /(ng · g ⁻¹)	IAA/(ng · g ⁻¹)	ABA/(ng · g ⁻¹)	GA ₃ /ABA 比 GA ₃ /ABA ratio	IAA/ABA 比 IAA/ABA ratio	(GA ₃ +IAA)/ABA 比 (GA ₃ +IAA)/ABA ratio
0	61.98±0.67a	14.06±2.44b	112.84±9.06a	0.55±0.04b	0.12±0.01a	0.68±0.03b
30	68.08±2.16a	19.91±0.80b	128.31±5.89a	0.53±0.04b	0.16±0.00a	0.69±0.04b
60	74.44±1.07a	22.08±0.69a	147.57±20.62a	0.51±0.07b	0.15±0.02a	0.66±0.09b
90	75.32±6.99a	19.46±2.10b	139.67±7.65a	0.54±0.03b	0.14±0.02a	0.68±0.03b
120	81.06±10.61a	18.69±0.32b	115.97±8.30a	0.70±0.04a	0.16±0.01a	0.86±0.03a
150	59.15±1.10b	14.31±1.41b	82.39±8.89b	0.72±0.09a	0.18±0.03a	0.90±0.12a
180	67.90±10.45a	15.91±2.93b	91.11±3.24b	0.74±0.09a	0.18±0.04a	0.92±0.05a

¹⁾ PK: 丙酮酸激酶活性 Pyruvate kinase activity; SDH: 琥珀酸脱氢酶活性 Succinic dehydrogenase activity; G-6-PDH: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性 Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity; GA₃: 赤霉素含量 Gibberellin content; IAA: 吲哚乙酸含量 Indoleacetic acid content; ABA: 脱落酸含量 Abscisic acid content. 同列中不同小写字母表示不同层积时间处理在 0.05 水平差异显著 Different lowercases in the same column indicate the significant difference among different stratification time treatments at 0.05 level.

表 2 层积过程中羌活种子发芽指标的变化($\bar{x}\pm SD$)¹⁾

Table 2 Changes of germination indexes of *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang seeds during stratification ($\bar{x}\pm SD$)¹⁾

层积时间/d Stratification time	发芽率/% Germination rate	发芽势/% Germination potential
0	0.00±0.00c	0.00±0.00c
30	0.00±0.00c	0.00±0.00c
60	0.67±0.58c	0.00±0.00c
90	1.33±0.58c	0.00±0.00c
120	13.33±1.53b	5.33±0.03b
150	46.67±5.69a	28.00±0.17a
180	50.67±1.53a	35.33±0.04a

¹⁾ 同列中不同小写字母表示不同层积时间处理在 0.05 水平差异显著 Different lowercases in the same column indicate the significant difference among different stratification time treatments at 0.05 level.

发芽势总体呈升高趋势,层积 0~90 d 的发芽率和发芽势较低,且均无显著变化,层积 120~180 d 的发芽率和发芽势显著高于层积 0~90 d,发芽率和发芽势在层积 180 d 时升至最大值,分别为 50.67%和 35.33%。

2.4 各指标间的相关性分析

对羌活种子的胚率和发芽率与各生理生化指标进行相关性分析,结果见表 3。结果显示:种子胚率与脱落酸(ABA)含量呈显著负相关,相关系数为-0.800,与其余指标相关性不显著;发芽率与 ABA 含量呈极显著负相关,相关系数为-0.875,与其余指标相关性不显著。

表3 羌活种子胚率和发芽率与各生理生化指标间的相关系数

Table 3 Correlation coefficient of embryo rate and germination rate of *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang seeds with each physiological and biochemical index

指标 Index	相关系数 ¹⁾ Correlation coefficient ¹⁾								
	蛋白含量 Protein content	可溶性糖含量 Soluble sugar content	淀粉含量 Starch content	PK	SDH	G-6-PDH	GA ₃	IAA	ABA
胚率 Embryo rate	-0.695	0.068	-0.091	0.419	0.584	0.142	-0.196	-0.437	-0.800 *
发芽率 Germination rate	-0.562	0.234	0.053	0.451	0.511	0.157	-0.399	-0.572	-0.875 **

¹⁾ PK: 丙酮酸激酶活性 Pyruvate kinase activity; SDH: 琥珀酸脱氢酶活性 Succinic dehydrogenase activity; G-6-PDH: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性 Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity; GA₃: 赤霉素含量 Gibberellin content; IAA: 吲哚乙酸含量 Indoleacetic acid content; ABA: 脱落酸含量 Abscisic acid content. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

3 讨论和结论

3.1 羌活种子后熟与种胚形态的关系

因胚的发育程度造成的种子休眠可分为3种情况,即胚的形态休眠、生理休眠以及2种方式同时存在所引起的综合休眠^[19]。综合休眠的种子在后熟阶段需要经历球形胚、心形胚、鱼雷型胚才能发育完全,这在柴胡(*Bupleurum chinense* DC.)^[20]、滇重楼[*Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mzt.]^[16]、刺楸[*Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz.]^[21]等植物中已得到证实。本研究中,羌活种子先在室温(20℃~25℃)下层积90d,后在低温(3℃~5℃)下继续层积90d,观测发现羌活种子种胚发育具有胚后熟特性,且层积处理可有效促进种胚的发育,胚率总体持续升高,尤其是层积后期(低温层积)的胚率显著提高。张恩和等^[4]的研究结果表明:羌活种子胚率仅6%,需经过一段时间的后熟,才可发育为具有胚根、胚轴和子叶的完整胚,且层积过程中低温可提高种胚的无氧呼吸作用,减少种胚的需氧量,从而克服包被组织造成的萌发障碍。由此推断,层积处理可打破羌活种子形态休眠,且低温对种胚形态休眠的解除至关重要。

3.2 羌活种子后熟与营养物质含量的关系

种子萌发过程中需要消耗能量,为了给种胚的生长发育提供原料和能量,种子中贮藏的淀粉、蛋白质和脂肪等大分子物质在相关酶的作用下会转化成种胚易于吸收的可溶性糖等小分子物质,这些小分子物质可为种胚的生长发育提供营养和能量^[22-24]。黄精(*Polygonatum sibiricum* Delar. ex Redoute)^[25]和百蕊草(*Thesium chinense* Turcz.)^[26]种子在层积过程中,其淀粉含量逐渐降低,可溶性糖和蛋白质含量升高,大

分子物质转化为小分子物质,为种胚的分化发育提供能量,促进了萌发。说明种子内贮藏物质的积累与消耗,可反应种子内部代谢活动的强弱^[27]。本研究结果显示:在层积过程中羌活种子的蛋白质、可溶性糖和淀粉含量总体呈降低趋势。其中,蛋白质含量在层积0~120d逐渐降低,在层积150d时显著升高,在层积180d时又显著降低,可能是因为在种子发育过程中蛋白质水解为氨基酸等其他小分子化合物,而后又和其他有机物质合成新的蛋白质,说明种子内部代谢活动增强^[27]。可溶性糖和淀粉含量在层积0~60d逐渐降低,为种胚伸长生长提供能量,在层积90~180d波动升高,可能是为后期种子的萌发储存能量。

3.3 羌活种子后熟与呼吸途径关键酶活性的关系

糖酵解途径(EMP)、三羧酸循环途径(TCA)和磷酸戊糖途径(PPP)是植物体内常规的呼吸代谢途径,种子休眠和萌发与呼吸代谢途径密切相关,丙酮酸激酶(PK)、琥珀酸脱氢酶(SDH)和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH)分别作为EMP途径、TCA途径和PPP途径的关键限速酶,一定程度上反映着相应呼吸途径的活化水平,通过对关键酶活性的测定,可以进一步了解种子休眠的历程^[28-30]。如华重楼[*Paris polyphylla* var. *chinensis* (Franch.) Hara]^[31]种子在层积过程中G-6-PDH活性显著升高,其呼吸代谢途径从以TCA途径为主转为以PPP途径为主,通过调控种子呼吸代谢途径,促进种子解除休眠。本研究结果显示:在层积0~60d,PK活性呈先升高后降低的趋势,TCA途径SDH活性呈明显升高的趋势,G-6-PDH活性先降低后略有升高,说明层积0~60d期间以TCA途径为主。层积60~150d,PK活性呈波动升高的趋势,SDH和G-6-PDH活性总体呈波动降低的趋势,说明层积60~150d期间以EMP途径为主。在层积180d时,PK、SDH和G-6-PDH活性均

显著高于层积120 d,且层积150~180 d的羌活发芽率以及胚率均显著高于层积120 d,说明层积150~180 d的羌活种子内部代谢活动显著加强,利于种子休眠的解除。

3.4 羌活种子后熟与内源激素含量的关系

植物激素对种子萌发有至关重要的调控作用,脱落酸(ABA)可以促进种子休眠,抑制种子萌发。而赤霉素(GA_3)可以解除种子休眠,促进种子萌发^[32-33]。金银花(*Lonicera japonica* Thunb.)^[34]和桃儿七(*Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying)^[35]种子通过低温层积可使种子内部的 GA_3 和IAA含量升高,ABA含量降低,降低了抑制种子萌发的内源激素含量,进而解除种子休眠。本研究结果表明:羌活种子的 GA_3 和ABA含量在层积0~120 d内无显著差异,在层积150 d时显著降低,在层积180 d时又有所升高,而吲哚乙酸(IAA)含量在层积过程中变化不大。影响种子休眠和萌发的因子不仅与植物内源激素的绝对含量有关,还可能与种子内源激素的协调有关,尤其是与促进种子萌发和抑制种子萌发的激素有关^[36],如高水平的 GA_3/ABA 比、 IAA/ABA 比和 $(GA_3+IAA)/ABA$ 比有助于打破种子休眠^[37-38]。本研究结果表明:羌活种子的 GA_3/ABA 比和 $(GA_3+IAA)/ABA$ 比在层积过程中总体呈升高趋势,且层积120~180 d的 GA_3/ABA 比和 $(GA_3+IAA)/ABA$ 比显著高于层积0~90 d,而 IAA/ABA 比在层积过程中无显著变化。相关性分析结果表明:种子胚率与ABA含量呈显著负相关,发芽率与ABA含量呈极显著负相关。说明层积处理可使种子内促进种子萌发的激素含量升高,抑制种子萌发的激素含量降低,提高种子的发芽率;且促进种子萌发与抑制种子萌发的激素比值显著升高对羌活种子休眠解除具有重要作用。

3.5 层积处理与羌活种子发芽情况的关系

种子的发芽情况可通过发芽率和发芽势等指标进行评价,发芽率和发芽势是检测种子质量的重要指标。氟啶酮为脱落酸(ABA)生物合成抑制剂,具有促进种子萌发的作用^[39]。本研究结果表明:层积处理可促进种子萌发,将层积处理后的种子用氟啶酮处理,发芽势达到35.33%,种子发芽率达到50.67%。说明层积处理结合氟啶酮处理是打破羌活种子休眠的有效方法。

综上所述,羌活种子具有胚后熟特性,层积处理可打破羌活种子形态休眠,结合氟啶酮处理可提高种

子发芽率;营养物质含量的降低,呼吸途径关键酶活性的波动变化,ABA含量的降低以及内源激素含量间的比值变化对羌活种子休眠解除有重要影响。该结果将为羌活引种驯化和规模化种植提供科学依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 190-191.
- [2] 徐顺连, 张占林, 曾中兰, 等. 羌活的研究进展[J]. 青海草业, 2020, 29(3): 20-23.
- [3] 尹青岗, 熊超, 王晓蓉, 等. 羌活无公害规范化栽培体系研究[J]. 中药材, 2019, 42(3): 698-703.
- [4] 张恩和, 陈小莉, 方子森, 等. 野生羌活种子休眠机理及破除休眠技术研究[J]. 草地学报, 2007, 15(6): 509-514.
- [5] 田义新. 药用植物栽培学[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2011: 92.
- [6] 蔡薇, 李叶芳, 刘春雪, 等. 变温层积下激素对大百合种胚后熟的影响[J]. 中国农学通报, 2017, 33(34): 103-110.
- [7] 李阳, 于锡宏, 蒋欣梅, 等. 不同温度层积处理对北五味子种子休眠过程中种胚后熟的影响[J]. 北方园艺, 2017(20): 140-144.
- [8] 张鸽香, 胡靖. 流苏树种子变温层积过程中贮藏物质及酶活性变化[J]. 林业科技开发, 2015, 29(6): 24-27.
- [9] 徐宠然, 葛慧, 贾袭伟, 等. 淫羊藿种子变温层积过程中胚形态及生理生化变化[J]. 草地学报, 2022, 30(8): 2075-2081.
- [10] 杨凯, 杨景煌, 刘绍伟, 等. 三七种子后熟过程种胚发育和6种内源激素的动态变化[J]. 中药材, 2018, 41(3): 519-523.
- [11] 史静, 马小军, 蒋舜媛, 等. 羌活种胚后熟过程中内源激素的动态变化[J]. 中草药, 2006, 37(2): 273-276.
- [12] 史静. 羌活种子解除休眠与检验规程及质量标准的研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2005: 22.
- [13] 陈红刚, 久西加, 赵文龙, 等. 不同产地红花绿绒蒿种子品质及内源激素含量的比较[J]. 植物资源与环境学报, 2021, 30(6): 67-69.
- [14] 李丹丹, 李晓花, 刘杰, 等. 赤霉素和干旱胁迫单一处理对珍稀濒危植物小溪洞杜鹃种子萌发的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2022, 31(4): 57-64.
- [15] 陈红刚, 赵文龙, 晋玲, 等. 红花绿绒蒿种子休眠及破除方法研究[J]. 草地学报, 2021, 29(2): 402-406.
- [16] 陈伟, 杨奕, 马绍宾, 等. 滇重楼种子休眠类型的研究[J]. 西南农业学报, 2015, 28(2): 783-786.
- [17] 杨朝霞. 厚朴种子解除休眠及萌发生理的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2008: 60.
- [18] 苏海兰, 周先治, 李希, 等. 七叶一枝花种子萌发不同阶段生理生化变化研究[J]. 中草药, 2017, 48(22): 4755-4763.
- [19] BASKIN J M, BASKIN C C. A classification system for seed dormancy[J]. Seed Science Research, 2004, 14: 1-16.
- [20] 曹海禄, 魏建和, 于婧, 等. 3种柴胡种质的种胚发育特性

- 研究[J]. 中国现代中药, 2008, 10(10): 11-12, 17.
- [21] 何利平. 刺楸种子休眠原因及解除休眠的研究[J]. 山西林业科技, 2003(4): 22-24.
- [22] 李富恒, 张宏发, 张永芳, 等. 种子成熟度差异对老山芹种子层积效果的影响[J]. 东北农业大学学报, 2022, 53(4): 17-29.
- [23] 梁艳, 高美玲, 刘敏, 等. 红松种胚发育过程中营养物质的动态变化[J]. 种子, 2018, 37(10): 16-20.
- [24] 孙海燕, 李强, 朱铭玮, 等. 油用牡丹‘凤丹’种子层积过程中营养物质的代谢变化研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2021, 45(1): 70-78.
- [25] 薛晨阳, 杨世海. 低温层积处理对黄精种子生理变化的影响[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(3): 724-726.
- [26] 张成才, 谭显锐, 张子璇, 等. 百蕊草种子层积过程中酶活性及其生理变化研究[J]. 中药材, 2021, 44(4): 802-805.
- [27] 孙瑞敏, 王蕾, 王佳琪, 等. 裕民贝母破除种子生理休眠营养物质的变化[J]. 分子植物育种, 2021, 19(15): 5143-5149.
- [28] 高云鹏. 紫荆种子休眠解除过程中生理生化变化及分子机理研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2020: 19.
- [29] 黄鹏云, 罗丽娟. 丙酮酸激酶在高等植物中的作用[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(20): 9352-9354.
- [30] 方志荣, 苏智先, 胡进耀, 等. 珙桐种子几种呼吸代谢酶活性及果实不同组织总酚含量测定[J]. 绵阳师范学院学报, 2008, 27(5): 70-73.
- [31] 李昭玲, 童凯, 闫燊, 等. 变温层积过程中中华重楼种胚后熟生理生化的变化[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(4): 629-633.
- [32] 于敏, 徐恒, 张华, 等. 植物激素在种子休眠与萌发中的调控机制[J]. 植物生理学报, 2016, 52(5): 599-606.
- [33] 张雁明, 卜海燕, 赵迪, 等. 矮金莲花种子吸胀过程中内源激素含量的变化[J]. 植物资源与环境学报, 2018, 27(4): 104-106.
- [34] 王书云, 袁王俊, 刘亚芳, 等. 金银花种子休眠机制及快速解除休眠方法研究[J]. 中药材, 2020, 43(7): 1566-1569.
- [35] 久西加, 杜毅, 陈红刚, 等. 桃儿七种子低温层积过程中胚形态及生理生化物质变化[J]. 西北植物学报, 2021, 41(12): 2096-2103.
- [36] CHEN M, MACGREGOR D R, DAVE A, et al. Maternal temperature history activates Flowering Locus T in fruits to control progeny dormancy according to time of year[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(52): 18787-18792.
- [37] 何超, 彭健, 韩博, 等. 低温层积对纳罗克非洲狗尾草种子内源激素的影响[J]. 草业与畜牧, 2016(3): 5-12.
- [38] 陈怡, 杨赋祺, 陈松树, 等. 多花黄精种子萌发过程的内源激素含量变化研究[J]. 中药材, 2020, 43(3): 523-527.
- [39] 苏贺, 王月, 杨阳, 等. 氟啶酮、赤霉素和发芽温度对巫山淫羊藿种子休眠解除的影响[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(14): 2625-2632.

(责任编辑: 郭严冬)

《植物资源与环境学报》2022 年审稿专家名单

《植物资源与环境学报》2022 年审稿专家名单如下(按姓氏的汉语拼音排序):

毕润成 蔡磊 曹建国 陈炳华 陈功锡 陈剑 陈军文 陈儒钢 陈世品 陈云明 陈之端 程虎印
 崔大方 戴传超 邓涛 邓衍明 邓云飞 丁小余 董彩霞 董胜君 董仕勇 段爱国 段成国 方升佐
 方炎明 冯守千 洪香香 高露双 高源 葛之葳 耿文娟 郭泉水 郭伟 郭晓思 郝成元 郝文芳
 贺俊英 胡绵好 华建峰 黄新元 惠红 贾晓东 姜会钰 江玉梅 金华 金孝锋 靳红梅 旷远文
 李恒 李宏博 李建宏 李朗 李林芳 李伟 李先琨 李亚 李葵 梁呈元 梁明祥 梁珺硕
 廖文波 林晗 刘金福 刘启新 刘世彪 刘晓静 刘艺平 刘玉凤 刘志雄 隆小华 陆长梅 吕运舟
 马永鹏 买买提明·苏来曼 毛礼米 潘健 彭斌 彭涛 强胜 乔玉山 秦民坚 仇硕 单宇
 邵剑文 孙小芹 唐晓清 田代科 田敏 万平 汪庆 汪仁 王长林 王长庭 王广东 王金彦
 王明奎 王奇志 王树力 王祥荣 王忠 韦继光 闻志彬 翁庆北 吴承祯 谢寅峰 徐炳成 徐晟
 徐曙 徐迎春 徐增莱 许岳飞 闫淑珍 杨劲峰 杨志玲 易绮斐 殷云龙 於虹 余坤勇 余小芳
 于晓南 俞筱押 俞元春 郁万文 袁干军 翟俊文 曾波 张春红 张大勇 张飞 张光富 张国防
 张计育 张力 张敕 张钦弟 张石宝 张艳梅 张重义 赵德英 赵宏波 郑健 郑玉红 钟全林
 周志春 朱灿灿 朱艳蕾 庄萍 邹小兴

本刊对各位审稿专家的支持表示诚挚的感谢!