

文章编号: 1001-1498(2000) 03-0280-06

南方红豆杉种子萌发生物学研究

张志权¹, 廖文波¹, 钟翎¹, 陈志明²

(1. 中山大学生命科学学院, 广东广州 510275; 2. 广东省南岭国家级自然保护区大东山管理站, 广东连州 513400)

摘要: 对南方红豆杉种子的萌发生物学特性进行研究, 主要结果表明: (1) 种子在自然条件下有很深的休眠特性, 但种皮透性不是休眠的原因; (2) 对新鲜种子进行“暖温(25℃)层积—低温(5℃)层积”; 以“36周—12周”的模式效果最好, 能促进胚纵向生长和打破种子休眠, 发芽率达 64.0% ~ 82.2%。

关键词: 南方红豆杉; 种子萌发; 暖温层积; 低温层积

中图分类号: S791.490.1 **文献标识码:** A

红豆杉属 (*Taxus*) 植物因含有抗肿瘤特效药紫杉醇 (taxol) 成分而引起不同科学家的兴趣^[1-4]。该属重要价值使它在某些地区遭遇到极大劫难^[5], 从而也使有关国家制定了相应的保护、恢复和再生的政策。据报道, 美国 BMS 公司于 1991 年已种植 400 万株红豆杉, 1992 和 1993 年又各种植了 1 000 万株, 计划在 2~3 a 长高至 0.6~0.9 m 时则用于提取紫杉醇^[6]。因此, 有关红豆杉属的繁殖生物学研究又再度引起人们的注意^[7-9]。而利用种子繁殖早期有对欧洲紫杉 (*T. baccata* Linn.) 和东北红豆杉 (*T. cuspidata* Sieb. et Zucc.) 的研究^[10, 11]。早期报道认为, 红豆杉属植物种子的胚很小, 具有深休眠, 天然萌发的大多是经过鸟类消化道的种子, 因此建议用暖层积 (室温或 16℃) 后加上低温层积 (2~5℃) 可以打破种子的休眠, 一般是暖层积 3 个月, 而低温层积 4 个月至 1 a。其中, 欧洲紫杉经这样处理后, 平均发芽率为 67% (萌发率范围在 47%~70%)^[10]。作者在 1996 年依据该方法处理南方红豆杉 (*Taxus mairei* (Lemee & Levl.) S. Y. Hu ex Liu) 种子, 并按该手册的方法进行发芽测定 (将处理后的种子播于沙床中发芽 28 d), 但是, 却没有得到预期的结果, 所处理的样品中没有一个是发芽。显然, 红豆杉属不同种对变温层积具有不同的反应, 也许在各温度时段长短上有不同的要求。因此, 有必要对南方红豆杉种子萌发生物学进行具体研究, 以丰富红豆杉属植物的繁殖生物学资料, 并预期应用于生产。

1 材料与方法

1.1 种子及其处理方式

试验用种子采自粤北连州市谭岭镇大东山自然保护区附近的雷神堂村旁 (风水林), 选定同一母株, 其胸径为 110 cm, 树龄估计有百年。该地区为次生常绿阔叶林, 并生长有较多毛竹, 在约 1 100 m² 的范围内有高 12~15 m 的南方红豆杉大树 5 株, 幼树、小苗约 18 株。参考早期

收稿日期: 1999-02-01

基金项目: 广东省自然科学基金(950091)、华南科学与技术研究中心基金和林业部保护司 GEF 小型科研基金资助

作者简介: 张志权(1942-), 男, 广东花县人, 副教授。

的研究, 探讨在变温层积中不同温度时段的长短调节控制, 并增加激素预处理因素(如表 1)。

表 1 种子处理及萌发方法

种子预处理	代号	先于 25 中层积	然后转入 5 中层积
A. 将种子放入 $1\ 000\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 赤霉素加 $100\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 吲哚乙酸混合液中浸种 24 h, 然后用湿沙相混合	A ₁	12 周	36 周
	A ₂	24 周	24 周
	A ₃	36 周	12 周
B. 将种子放入蒸馏水中浸种 24 h, 然后用湿沙(含水量约 10%)相混合	B ₁	12 周	36 周
	B ₂	24 周	24 周
	B ₃	36 周	12 周
C. 将种子放入蒸馏水中浸种 24 h, 然后播于沙床中, 放在 25 培养箱中作发芽试验, 作为对照	C	不作层积处理	不作层积处理

1.2 测定项目和方法

1.2.1 种子千粒质量 在雷神堂村南方红豆杉种子采收现场, 称取鲜果 3 份各 500 g 计数鲜果数, 测定鲜果千粒质量。种子(果实)洗去肉质假种皮, 洗净于通风阴凉处晾干 24 h 和 1 周后, 分别取 4 份各 50 粒测定种子的含水量、千粒质量和干种子千粒质量(去外种皮后)。

1.2.2 吸水率 吸水率测定是将晾干 1 周后的种子, 取称量过鲜质量后的 100 粒种子放于垫有双层滤纸的培养皿中, 给予蒸馏水并放于 25 的培养箱中, 然后定期用吸水纸吸干种子表面水分后, 称量种子湿质量, 再放回培养皿中继续吸水, 如此重复定期测定种子湿质量, 直至两次测定数值较接近为止(本试验为 10 d), 计算出每个时间间隔中种子吸水的绝对质量, 然后将种子于 100 中烘干称量, 再换算成约当 100 g 干种子的吸水量(吸水率%)^[12], 重复 3 份。

1.2.3 发芽率 变温层积结束后, 每一处理取出部分种子, 用沙床方法于 25 中进行发芽试验, 28 d 后检查发芽数及统计发芽率^[10], 每一试样 50 粒种子, 作 3 份重复。

1.2.4 胚的大小 在试验开始前及变温层积结束后, 测定胚大小, 每一处理测定 20 个胚。

1.2.5 种子中发芽抑制物 在试验开始前及变温层积结束后, 测定南方红豆杉种子中发芽抑制物活性。方法是称取一定量的种子(去假种皮后的鲜种子), 用蒸馏水研磨成匀浆, 过滤定容得种子水提取液。同时称取部分种子测定含水量, 根据种子含水量、研磨种子鲜质量及水提取液定容量, 而计算出每毫升水提取液中约当含有的种子干物质量($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。用菜苔(*Brassica parachinensis* L. H. Bailey)种子作抑制物活性检测, 将菜苔种子(每份 100 粒)置于垫有滤纸的培养皿中, 将水提取液稀释成含有不同种子干物质量的浓度系列(C_i), 加入到菜苔种子中, 每一浓度作 3 份重复, 检测菜苔种子发芽率, 另外以蒸馏水代替水提取液作对照。依下式计算每一浓度水提取液 C_i 对菜苔种子的发芽抑制率 R_i :

$$R_i = \frac{G_0 - G_i}{G_0} \times 100\%$$

式中 R_i 为某一水提取液浓度 C_i 对菜苔种子的发芽抑制率, G_0 为对照组(蒸馏水)菜苔种子发芽率, G_i 为某一浓度水提取液 C_i 菜苔种子的发芽率。在获得各浓度系列的发芽抑制率后, 对每一层积处理的种子水提取液的 $R_i - C_i$ 进行回归分析, 根据 $R_i - C_i$ 的回归方程, 求出当 $C_i = 100\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时的发芽抑制率(R_{100}), 我们称这个发芽抑制率(R_{100})为“比较发芽抑制率”。比较发芽抑制率越大, 说明抑制物对发芽的抑制程度越大。这样就可根据各层积处理 R_{100} 的大小来比较南方红豆杉种子中发芽抑制物活性的大小消长情况。

2 结 果

2.1 南方红豆杉种子的基本参数

种子千粒质量、含水量测定结果如表 2 所示。此外,连州市高山镇茶田围村的风水林中一棵胸径为 186 cm 的母株上,采摘成熟果实,洗净后称取 8 份各 50 粒于 100 ℃ 中烘干,测定以干质量为基础的种子千粒质量,结果为 58.335 ± 0.647 g,经 t 检验,它与雷神堂母株上所采收种子的千粒质量差异达极显著。事实上,红豆杉属植物分布广泛,常形成变种或地理种等,有报道认为欧洲紫杉就有 40 多个变种^[6]。在本试验中,连州市境内的高山镇、谭岭镇两地的南方红豆杉个体间,至少在种子大小上就存在着极为显著的差异。

表 2 南方红豆杉种子基本参数

项 目	样品数	结 果
成熟鲜果千粒质量/g	3	479.5 ± 14.2
洗去果肉通风晾干 24 h 后种子含水量/%	4	26.93 ± 0.27
洗去果肉通风晾干 1 周后种子含水量/%	4	12.52 ± 1.58
洗去果肉晾干 24 h 后种子千粒质量(鲜)/g	8	93.97 ± 1.64
洗去果肉 100 ℃ 烘干后种子千粒质量(干)/g	8	73.785 ± 1.249

2.2 种子吸水率

南方红豆杉种子在通风阴凉处晾干 1 周后,种子含水量从 26.93% 降至 12.52% (表 2),即种子内的水分在 1 周内丢失超过 50%,失水很快。当环境中充足的水分和合适的温度条件时,南方红豆杉种子吸水速度也很快(图 1),经 240 h 后种子含水量已达到 44.39%,与吸水试验开始时相比,种子含水量增加近 3 倍,已远远超过了刚采收的新鲜种子的含水量(表 2)。从种子的失水和吸水情况来看,南方红豆杉种子的种皮透水性是相当好的。

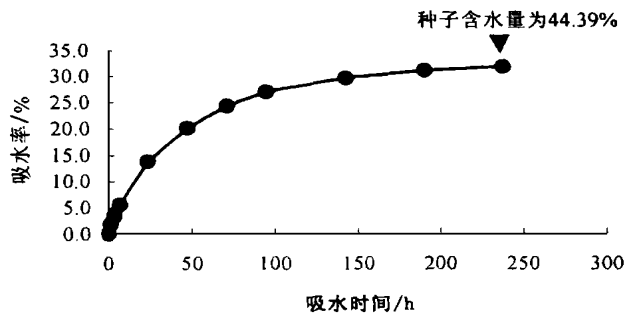


图 1 南方红豆杉种子的吸水率

2.3 发芽抑制物的消长

实验开始时的新鲜种子,以及各层积处理在结束后作发芽试验之前,所测定种子中发芽抑制物的比较发芽抑制率(R_{100})的大小,如表 3 所示。结果表明,南方红豆杉种子中存在对发芽具有抑制作用的物质。在新鲜种子中,这种抑制物对菜苔种子的发芽具有极为强烈的抑制作用,其比较发芽抑制率达 64.52%。变温层积处理可有效地消除这种抑制物,变温层积结束后,比较发芽抑制率降至 4% ~ 19%。另一方面,无论是 A 还是 B 变温层积中,虽然总的层积时间相同,温度变化顺序相同,但只要是所处的温度时段长短有所差异,抑制物的消长就表现出明显的差异。而且,在两个系列中都表现出相同的趋势,在暖层积(25 ℃)中的时间越长(A_3 和 B_3)种子中水提取液对发芽的抑制作用就越少。此外,单就抑制物的消长而言,利用激素对种子

表3 新鲜种子和变温层积结束后种子内抑制物活性测定和比较发芽抑制率(R_{100})

处 理	$R_i(y) - C_i(x)$ 的回归方程	n	r^2	$R_{100}/\%$
新鲜种子 C(对照)	$y = 0.006 7x^2 + 0.002 3x - 2.707 8$	7	0.971 6	64.52
变温层积 A ₁	$y = -0.000 2x^2 + 0.218 2x - 0.196 1$	7	0.990 9	19.60
变温层积 A ₂	$y = 0.000 6x^2 + 0.015 2x + 2.218 6$	7	0.897 5	9.74
变温层积 A ₃	$y = 0.000 5x^2 - 0.006 3x + 0.952 9$	7	0.930 1	5.32
变温层积 B ₁	$y = 0.000 6x^2 + 0.008 6x + 1.254 0$	7	0.967 7	8.11
变温层积 B ₂	$y = 0.000 2x^2 + 0.053 6x + 1.461 7$	7	0.926 0	8.82
变温层积 B ₃	$y = 0.000 2x^2 + 0.071 5x - 1.151 9$	7	0.941 7	4.02

作预处理(A系列)的作用不优于B系列, 即其作用并不明显。

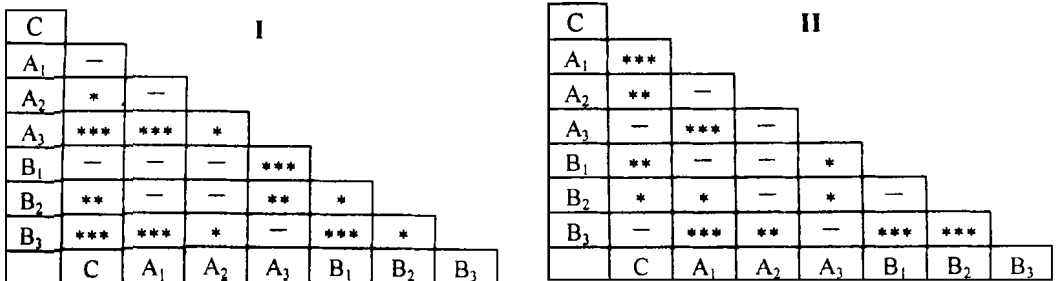
2.4 胚的大小

实验开始时的新鲜种子, 以及各变温层积结束后作发芽试验之前, 对剥离的胚进行观察。在刚采收的种子中, 胚呈纺锤形或披针形; 而在变温层积后, 大多数胚的形状呈披针形或长披针形。用测微尺测定, 以其在显微镜下的投影长度和最宽处的宽度作为胚的大小的指标, 结果如表4所示。此外, 为掌握在处理过程中胚是否有实质的生长以及比较不同层积处理间的效果, 对各处理间胚的大小, 进行差异性检验, 结果如图2所示。

表4 新鲜种子C(对照)和A、B变温层积结束后各剥离20个胚的大小比较

mm

处 理	C	A ₁	A ₂	A ₃	B ₁	B ₂	B ₃	
胚 长	最大值	3.28	3.20	3.56	3.44	3.24	3.44	3.36
	最小值	2.00	2.04	2.04	2.60	2.08	2.44	2.80
	平均值	2.66 ± 0.37	2.69 ± 0.32	2.84 ± 0.38	3.03 ± 0.21	2.70 ± 0.34	2.86 ± 0.26	3.00 ± 0.16
胚 宽	最大值	1.04	0.88	0.92	0.92	0.84	0.84	0.88
	最小值	0.64	0.48	0.64	0.72	0.64	0.68	0.72
	平均值	0.86 ± 0.13	0.74 ± 0.09	0.78 ± 0.08	0.81 ± 0.05	0.77 ± 0.07	0.78 ± 0.05	0.82 ± 0.05



“-”表示 $P > 0.05$ (差异不显著), “*”表示 $P < 0.05$ (差异显著),

“**”表示 $P < 0.01$ 和 “***”表示 $P < 0.001$ (差异极显著)

图2 实验开始C(对照)和两个变温层积系列层积结束时各处理间胚的长度()和宽度()的差异比较(t检验)

结果表明, 与刚采收的种子相比, 两个变温层积系列种子的胚都有生长的表现。其中, 胚的纵轴方向都在伸长, 但A₁和B₁的胚长与C的差异并不显著, 而A₂、B₂、A₃和B₃则分别有显著和极显著伸长。在胚的横向生长上, 胚的宽度都有变窄趋势, 其中A₁、B₁、A₂和B₂宽度收窄都为显著或极显著, 而A₃和B₃胚的宽度则没有显著收窄, 说明该处理的种子在经历胚纵向的强

烈伸长后,也开始横向生长。但所在变温时段相同的层积处理间(A_1 与 B_1 , A_2 与 B_2 , A_3 与 B_3)无论是在胚长还是宽度上都没有显著差异,说明用激素对种子预处理的作用不大。

2.5 发芽率

刚采收的种子在保持合适的湿润和 25 的条件下,经过 52 周后,仍没有发芽。而在变温层积处理后的种子,则打破休眠,在保持合适湿润(湿沙床)和 25 的条件下开始发芽,4 周后累计发芽率如表 5。在对照、 A_1 和 B_1 处理中,大部分种子只是开裂或露出种仁,但没有发芽。随着种子在暖层积(25)中的时间越长(A_3 与 B_3)发芽率就越高,分别达到 49.8%和 74.9%。

表 5 刚采收的新鲜种子和经变温层积的种子发芽率

处 理	C	A_1	A_2	A_3	B_1	B_2	B_3
发芽率/%	0	0	11.3±2.3	49.8±5.7	0	27.6±2.5	74.9±9.5
发芽率范围/%	0	0	10.0~14.0	44.0~55.3	0	25.0~30.0	64.0~82.2

3 小 结

(1) 不经任何处理的南方红豆杉种子,具有很深的休眠特性,即使在合适的水分和温度条件下,经历 1 a 仍不发芽。由于种子失水和吸水的速度都很快,说明其种皮透水性很好,不可能成为种子萌发的障碍和休眠的原因。(2) 新鲜种子内含有对发芽具抑制作用的物质,其水提取液对菜苔种子的发芽具有极显著的抑制作用,其比较发芽抑制率(R_{100})达 64.52%。因此,种子内存在发芽抑制物质是种子休眠的成因之一。(3) 利用“25 - 5 ”这种“暖温层积—低温层积”处理种子,可以显著地消除种子内的发芽抑制物质,促进胚的纵向生长,打破休眠促进萌发。在总的层积时间相同的情况下,在暖温(25)中层积较长时间,比在低温(5)中层积较长时间的处理更为有效。即在暖温中层积 36 周再在低温中层积 12 周的效果最好。在这一处理中,种子水提取液比较发芽抑制率(R_{100})从 64.52%降至 4.03%,胚长从 2.66±0.36 mm 增至 3.00±0.16 mm,种子的平均发芽率达 74.9%。但是,在层积前用激素对种子作预处理则效果不显著。

参考文献:

- [1] Busing R T, Halpern C B, Spies T A. Ecology of pacific yew (*Taxus brevifolia*) in western Oregon and Washington [J]. *Cons Biol*, 1995, 9(5): 1199~1207.
- [2] El-Kassaby Y A, Yanchuk A D. Genetic diversity, differentiation, and inbreeding in Pacific yew from British Columbia [J]. *J Hered*, 1994, 85(2): 112~117.
- [3] Nicolaou K C, Yang Z, Liu J J, et al. Total synthesis of taxol [J]. *Nature*, 1994, 367(6464): 630~634.
- [4] Wickremesinhe E R M, Artega R N. *Taxus* cell suspension cultures: Optimizing growth and production of taxol [J]. *J Plant Physiol*, 1994, 144(2): 183~188.
- [5] 张晋文. 云南红豆杉大劫难[N]. 羊城晚报, 1996-08-22.
- [6] 胡润生. 国外医药·植物药分册[J]. 1993, 8(2): 54.
- [7] 张志权, 廖文波, 陈志明, 等. 南方红豆杉嫩枝扦插生根性研究[J]. 林业科学研究, 1999, 12(5): 539~543.
- [8] 马小军, 丁万隆, 陈震. 东北红豆杉扦插繁殖的研究[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(6): 337~338.
- [9] 谭一凡. 南方红豆杉种子后熟生理的研究[J]. 中南林学院学报, 1991, 11(2): 200~206.
- [10] 美国农业部林业局. 红豆杉属 *Taxus*[A]. 李霆, 陈幼生等译. 见: 美国种子植物手册[M]. 北京: 中国林业出版社,

1984. 565 ~ 570.

- [11] Hartmann H T, Kester D E. 植物繁殖原理和技术[M]. 郑开文等译. 北京: 中国林业出版社, 1988, 712 ~ 713.
- [12] 张志权, 蓝崇钰. 铅锌矿尾矿场植被重建的生态学研究 . 尾矿对种子萌发的影响[J]. 应用生态学报, 1994, 5(1): 52 ~ 56.

Biological Study on Seed Germination of *Taxus mairei*

ZHANG Zhi-quan¹, LIAO Wen-bo¹, ZHONG Ling¹, CHEN Zhi-ming²

(1. School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, Guangdong, China;

2. Dadongshan Station, Nanling National Nature Reserve, Lianzhou 513400, Guangdong, China)

Abstract: Seed germination biology of *Taxus mairei* from Lianzhou, north Guangdong Province was studied. The main results showed: (1) The weight of per thousand freshly harvested mature fruits was 479.5 ± 14.2 g, the dry weight of per thousand seeds was 73.785 ± 1.249 g, and the average size of embryo was 2.66 ± 0.36 mm in length and 0.86 ± 0.13 mm in breadth. (2) The germination experiment revealed that the freshly harvested seeds was shown deep dormancy characteristics because they seriously delay their germination under moisture and at 25 °C conditions and only appeared little rupture of seed coat through 52 weeks. (3) The seeds were easy to loss water and to imbibe water. The water contents of washed seeds respectively came down to 26.93% and 12.52% under shady condition for 24 h and a week, but the absorbing water of seeds can went up 44.39% at 25 °C for 24 h. It seemed that the seed coat was quite permeable. (4) The water extract from seeds could inhibit the germination of *Brassica parachinensis*. Comparison with germination in distilled water, the reduction of germination percentage of *B. parachinensis* by commensurate extract with 100 mg dry weight of seeds of per milliliter was called “relative germination inhibiting rate (R_{100})” in present study. The R_{100} of water extract of freshly harvested seeds of *T. mairei* was 64.52%. (5) The seeds were exposed in “warm temperature (25 °C) stratification—low temperature (5 °C) stratification” for different corresponding duration: 12—36 weeks, 24—24 weeks, and 36—12 weeks, respectively. The results showed that 36—12 weeks was most effective to break the dormancy of seeds of *T. mairei*. Ending off this stratification, the germination rate counted up to 74.9% (range from 64.0% to 82.2%) in 28 days. But (6) if above seeds were imbibed for 24 h in (A) mixed solution of $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ gibberellin (GA) and $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ indoleacetic acid (IAA) and (B) distilled water, the significant difference about seed germination still weren't observed between seeds by pretreatment of mixed solution and by distilled water.

Key words: *Taxus mairei*; seed germination; warm temperature stratification; low temperature stratification