

# 扇脉杓兰种子发育过程中的生理生化变化

闫晓娜, 田敏\*, 王彩霞

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江省林木育种技术研究重点实验室, 浙江 杭州 311400)

**摘要:**为了解扇脉杓兰种子发育过程中的生理特性和变化规律,以浙江省天目山国家级自然保护区内的2个野生扇脉杓兰居群为材料,对其种子发育过程中的营养物质、内源激素含量和酶活性进行测定。结果表明:(1)可溶性蛋白质含量在扇脉杓兰授粉后20 d和85 d分别达到最高值 $774.03 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 和最低值 $373 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。淀粉含量从最初的2.65%急速增加到21.82%,授粉后60 d升至峰值,此后保持在20%左右。可溶性糖含量为1.72%~3.09%。淀粉和可溶性糖之间呈极显著正相关( $P < 0.01$ ),二者与可溶性蛋白质之间呈极显著负相关( $P < 0.01$ )。(2) $\text{GA}_3$ 、ZR、IAA峰值发生具有时间顺序性,扇脉杓兰授粉后20、30、40 d依次出现。3种激素极显著正相关( $P < 0.01$ )。ABA含量在授粉60 d后逐渐上升,授粉115 d时达到峰值,其含量与3种促进激素呈显著负相关( $P < 0.05$ )。( $\text{IAA} + \text{GA}_3 + \text{ZR}$ ) / ABA比值在授粉后20 d达到峰值,此后逐渐下降。(3)SOD活性在扇脉杓兰授粉后20 d迅速上升至峰值 $451.18 \text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,授粉后85 d降至最低,其变化趋势与可溶性蛋白质变化保持一致。POD活性和CAT活性呈单峰曲线变化。SOD、POD和CAT活性之间相关不显著( $P > 0.05$ ),但是三者与可溶性蛋白质之间呈显著正相关( $P < 0.05$ )。

**关键词:**扇脉杓兰;种子发育;生理生化变化

中图分类号:S718.43

文献标识码:A

## Physiological and Biochemical Changes During the Seed Development of *Cypripedium japonicum*

YAN Xiao-na, TIAN Min, WANG Cai-xia

(Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding of Zhejiang Province, Hangzhou 311400, Zhejiang, China)

**Abstract:** Two wild populations of *Cypripedium japonicum* from West Tianmu Mountain National Nature Reserve in Zhejiang Province were used to study the physiological characteristics and variation of *C. japonicum* during seed development. The content of nutrients, endogenous hormones and enzyme activity of developing seeds were measured. The results are as follows: 1) The soluble protein content peaked as  $774.03 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  twenty days after pollination (DAP). And the value was minimized as  $373 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  at 85 DAP. The starch content rose rapidly from the initial 2.65% to 21.82%, and peaked at 60 DAP. Thereafter the content maintained at about 20%. The soluble sugar content changed between 1.72% and 3.09%. There existed a highly significant positive correlation between starch and soluble sugar ( $P < 0.01$ ), and the starch and soluble sugar had highly significant negative correlation with soluble proteins ( $P < 0.01$ ). (2) The peak of  $\text{GA}_3$ , ZR and IAA occurred in a time sequence, as 20 DAP, 30 DAP and 40 DAP. There was highly a significant positive correlation among them ( $P < 0.01$ ). ABA content increased at 60 DAP and reached a peak at the time of 115 DAP. ABA contents were significantly negatively correlated with

收稿日期: 2015-04-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31370553);浙江省重大科技攻关项目(2010C02004-2)

作者简介: 闫晓娜(1989—),女,黑龙江齐齐哈尔人,在读硕士研究生,主要从事兰花生殖生物学研究。

\* 通讯作者: 副研究员,博士,硕士生导师,主要从事野生兰保护生物学研究。

three accelerative hormones ( $P < 0.05$ ). The ratio of (IAA + GA<sub>3</sub> + ZR) and ABA peaked at 20 DAP, then this ratio decreased. (3) The SOD activity rose rapidly to a peak as 451.18 U · g<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup> at 20 DAP, and then decreased until 85 DAP. The SOD activity and soluble protein trends kept consistent. Both POD activity and CAT activity showed a single peak curve. The SOD, POD and CAT had no significant correlation ( $P > 0.05$ ), but they showed a significant positive correlation with protein ( $P < 0.05$ ).

**Key words:** *Cypripedium japonicum*; seed development; physiological and biochemical changes

扇脉杓兰(*Cypripedium japonicum* Thunb.), 又名双叶兰、兰花双叶草, 隶属于兰科(Orchidaceae)杓兰亚科(Cypripedioideae)杓兰属(*Cypripedium* L.), 是多年生草本植物<sup>[1]</sup>。其双叶对生, 叶脉扇形, 叶型圆润, 单花顶生, 大而艳丽, 花型奇特, 因而具有较高的栽培观赏价值。扇脉杓兰根状茎细长、横走, 有活血调经、祛风镇痛之功效, 又具显著的药用价值。主要分布于中国、日本、韩国和缅甸等地, 产于我国湖北、四川、云南、安徽、浙江、台湾等省<sup>[2-3]</sup>。扇脉杓兰种子非常细小, 一个蒴果内含成千上万粒种子, 成熟种子胚纵横径分别只有 208.71 μm 和 106.19 μm, 种子结构简单, 不含胚乳组织<sup>[4]</sup>。自然状态下种子严重败育, 萌发率极低, 更新能力差, 主要依靠分株繁殖维持个体的存活<sup>[5]</sup>, 因此, 扇脉杓兰是一种易濒植物, 目前已被世界自然保护联盟(IUCN)濒危物种红色目录列为“濒危(Endangered)”物种<sup>[6]</sup>。

针对扇脉杓兰保护生物学的研究, 前人已从传粉生态学<sup>[7]</sup>、遗传多样性<sup>[8-10]</sup>、繁育系统和花果发育<sup>[4, 11]</sup>等方面开展了一些工作, 但是关于扇脉杓兰种子的研究罕有报道。大多数兰科植物在授粉后胚珠才开始发育, 种子发育过程与生长素和乙烯信号转导途径密切相关<sup>[12-13]</sup>。本试验通过研究扇脉杓兰种子发育过程中营养物质、内源激素及活性酶的动态变化, 旨在揭示种子发育过程中的生理特性和规律, 进一步掌握发育不同时期对养分的需求情况, 为提出扇脉杓兰种胚拯救的有效措施和研究物种保育提供生理学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

野生扇脉杓兰取自浙江省临安市境内天目山国家级自然保护区(119°23'47"~119°28'27" E, 30°18'30"~30°24'55" N)内的2个居群, 约120株。试验地属亚热带季风气候, 年均降水量1390~1870 mm, 空气相对湿度76%~81%<sup>[4]</sup>。土壤成分以有机质为主, 含氮、磷、钾等微量元素, 土壤pH值为4.

45~5.38<sup>[14]</sup>。

于2014年4月扇脉杓兰盛花期授粉后, 每10 d采集1次发育过程中的果实, 授粉70 d后, 每15 d采集1次果实, 每次取混合样品4~8个蒴果不等, 直至果实内种子完全成熟为止。将蒴果去除果皮和胎座部分, 剩余正在发育的种子部分做为样品用于生理生化指标的测定。激素测定样品置于-80℃下冷冻保存。

### 1.2 测定方法

1.2.1 可溶性蛋白质含量测定 准确称取样品0.3 g, 重复4次, 采用考马斯亮蓝测定法<sup>[15]</sup>。

1.2.2 可溶性糖的提取与含量测定 称取样品0.2 g, 采用蒽酮比色法测定<sup>[16]</sup>, 重复3次。

1.2.3 淀粉的提取和含量测定 淀粉样品为可溶性糖样品提取后的残渣, 也采用蒽酮法测定<sup>[17-18]</sup>。

1.2.4 激素含量的测定 精确称量低温保存的种子样品0.3 g, 3个重复, 采用酶联免疫法(ELISA), 由中国农业大学作物化学控制研究中心测定生长素(IAA)、细胞分裂素(ZR)、赤霉素(GA<sub>3</sub>)和脱落酸(ABA)的含量。

1.2.5 酶液的提取与酶活性测定 称取新鲜种子样品0.3 g于研钵中, 重复4次, 加入5 mL预冷的pH值7.8磷酸缓冲液(分2次加入), 用液氮低温下研磨提取, 然后4℃下10500 r · min<sup>-1</sup>离心15 min, 取上清液为酶液。超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮蓝四唑法<sup>[19]</sup>; 过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法; 过氧化氢酶(CAT)采用紫外吸收法<sup>[15]</sup>。

### 1.3 数据统计分析

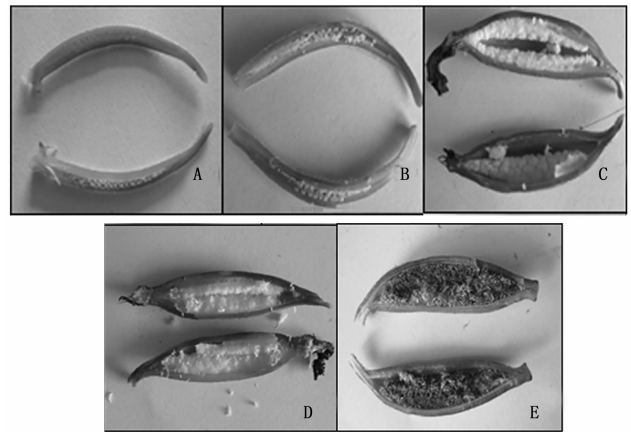
应用Excel 2007和SPSS 17.0软件对数据进行统计和比较分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 扇脉杓兰种子发育过程中营养物质含量的变化

2.1.1 可溶性蛋白质含量的变化 由图1可看出:

扇脉杓兰种子发育前期可溶性蛋白质含量升高,授粉后 20 d 含量达最大值  $774.03 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。授粉后 20 ~ 30 d(图 2 A、B),可溶性蛋白质含量迅速下降,此时正值大孢子发生时期,需要大量的营养物质供给<sup>[4]</sup>。随后可溶性蛋白质含量继续缓慢下降,授粉后 60 d(图 2 C)已基本完成受精作用,可溶性蛋白质积聚,其含量略有回升,后又继续下降。授粉后 85 d(图 2 D)可溶性蛋白质含量最低( $373 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ),这一时期球形胚逐渐形成,营养大量消耗。直至授粉后 115 d 种子完全成熟(图 2 E),球形胚不再进一步发育,可溶性蛋白质进入一个快速合成期,最终其含量提升 33.5%。



A:授粉 20 d;B:授粉 30 d;C:授粉 60 d;D:授粉 85 d;E:授粉 115 d  
图 2 扇脉杓兰果实纵切面

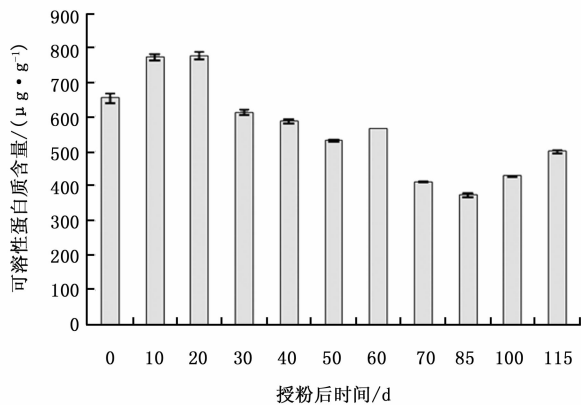


图 1 扇脉杓兰种子发育过程中可溶性蛋白质含量的变化

2.1.2 淀粉和可溶性糖含量的变化 在扇脉杓兰种子发育初期(图 2 A、B),淀粉和可溶性糖含量都呈上升趋势(图 3)。淀粉逐渐积累,在授粉后的 60 d 时间里,其含量迅速升高,由最初的 2.65% 急速增加到 21.82%。在种子超微结构观察中发现,随着种子发育成熟,淀粉粒在质体上逐渐堆积并填满整个质体空间,这与淀粉含量的测定结果相对应。授粉 60 d 后,淀粉含量有所下降,但变化不大,仍保持在 20% 左右(图 3)。

可溶性糖含量在授粉后 30 d 达到最大值(

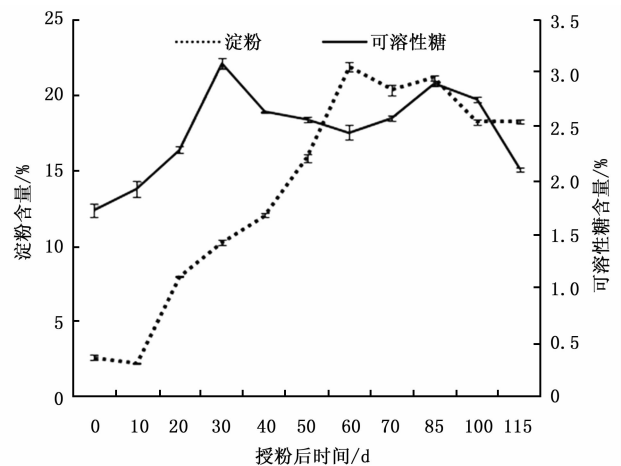


图 3 扇脉杓兰种子发育过程中淀粉和可溶性糖含量的变化

3.09%),而后有所下降,直至种子成熟可溶性糖含量都维持相对稳定的状态。在种子发育的整个过程中,可溶性糖含量为 1.72% ~ 3.09%,变化幅度较小(图 3)。

相关分析结果(表 1)显示:扇脉杓兰种子发育过程中,淀粉和可溶性糖之间相关系数为 0.618,二者呈极显著正相关( $P < 0.01$ ),并分别与可溶性蛋白质之间存在极显著负相关( $P < 0.01$ )。

表 1 扇脉杓兰种子发育过程中营养物质、内源激素和酶活性的相关性分析

项目	SOD	POD	CAT	可溶性蛋白质	可溶性糖	淀粉	IAA	GA <sub>3</sub>	ABA
POD	0.329								
CAT	-0.089	-0.131							
可溶性蛋白质	0.342 *	0.935 **	-0.122						
可溶性糖	0.149	-0.322	0.171	-0.545 **					
淀粉	-0.047	-0.827 **	0.337	-0.825 **	0.618 **				
IAA	0.314	0.811 **	-0.093	0.830 **	-0.382 *	-0.858 **			
GA <sub>3</sub>	0.406 *	0.791 **	-0.163	0.715 **	-0.230	-0.513 **	0.626 **		
ABA	-0.054	-0.657 **	-0.421 *	-0.556 **	0.012	0.295	-0.368 *	-0.403 *	
ZR	0.351 *	0.922 **	-0.010	0.916 **	-0.300	-0.805 **	0.917 **	0.619 **	-0.600 **

注: \* 表示在 0.05 水平上显著相关, \*\* 表示在 0.01 水平上显著相关。

## 2.2 扇脉杓兰种子发育过程中内源激素含量的变化

2.2.1 生长素(IAA)、赤霉素( $GA_3$ )和细胞分裂素(ZR)含量变化 如图4所示:IAA含量在扇脉杓兰种子发育初期处于较高水平,授粉后40 d达到峰值 $108.01 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ;此后 IAA 含量迅速下降,在授粉后85 d降至最低值( $48.86 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ),而后又缓慢上升,但上升幅度不大。

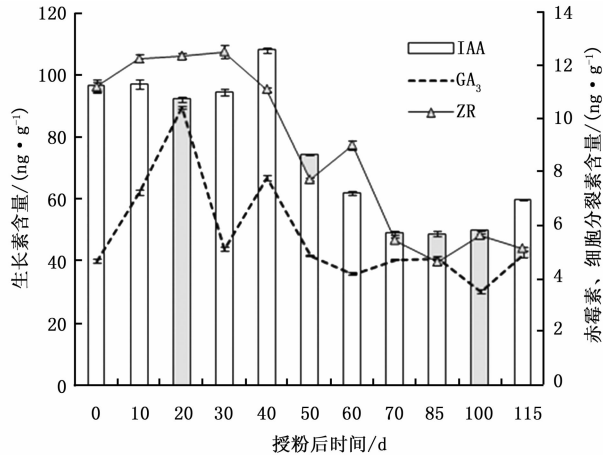


图4 扇脉杓兰种子发育过程中生长素(IAA)、赤霉素( $GA_3$ )和细胞分裂素(ZR)含量的变化

扇脉杓兰种子中  $GA_3$  含量变化呈波动曲线。在授粉后0~20 d内, $GA_3$ 含量呈直线上升趋势,并在授粉后20 d升至最高 $10.45 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ,但在授粉后20~30 d时发生骤降。在授粉后30~50 d内  $GA_3$  含量又发生小幅度的升降,此后随着种子成熟, $GA_3$ 含量趋于稳定。在整个发育过程中  $GA_3$  含量一直维持在较低水平。

ZR含量在授粉后缓慢升高,并在授粉后30 d达到峰值 $12.54 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。此后,其含量随着种子发育急速下降,授粉70 d之后变化趋于稳定且保持在 $5.2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 的较低水平,其峰值比最低值高出1.72倍。

这3种促进激素在扇脉杓兰种子发育过程中峰值依次出现,先后顺序为 $GA_3$ 、ZR、IAA。IAA与ZR、IAA与 $GA_3$ 、ZR与 $GA_3$ 之间呈极显著正相关( $P < 0.01$ ),相关系数分别为0.917、0.626和0.619(表1)。可见,在扇脉杓兰种子不同发育时期激素之间密切联系,而起关键作用的激素又存在一定的差异。

2.2.2 脱落酸(ABA)含量和 $(IAA + GA_3 + ZR) / ABA$ 的变化 ABA含量在扇脉杓兰授粉时就维持在较高水平,授粉后10~60 d内发生缓慢的波动,趋势为下降—上升—下降,授粉后20 d降至最低值

( $70.12 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )。授粉60 d以后,ABA含量逐渐上升,并在授粉115 d时达到最高值(图5)。在扇脉杓兰种子发育过程中,ABA含量与上述3种促进激素呈显著负相关( $P < 0.05$ )。

内源激素之间的平衡对种子正常发育至关重要。由图5可看出 $(IAA + GA_3 + ZR) / ABA$ 的比值在发育初期逐渐上升,授粉后20 d达到峰值,此时代谢旺盛,胚珠迅速发育。此后该比值呈逐渐下降的趋势,授粉70 d后稳定在0.6左右。

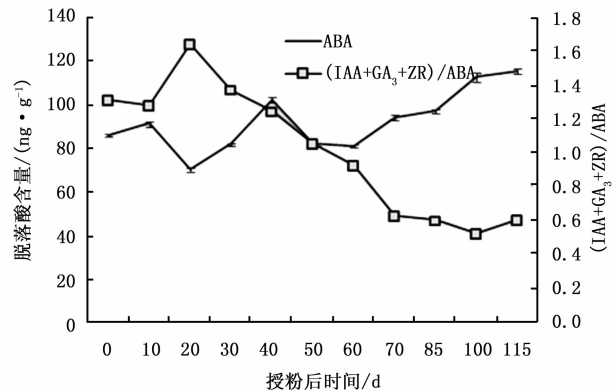


图5 扇脉杓兰种子发育过程中脱落酸(ABA)含量和 $(IAA + GA_3 + ZR) / ABA$ 的变化

## 2.3 扇脉杓兰种子发育过程中酶活性的变化

2.3.1 超氧化物歧化酶(SOD)活性变化 扇脉杓兰授粉后0~10 d,SOD活性缓慢升高。在授粉后10~20 d,SOD活性迅速上升至峰值( $451.18 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ),此阶段活性比授粉后10 d增加了72.4%。随后SOD活性有所下降,授粉后60 d出现小幅升高,而后迅速降低,直至授粉后85 d降至最低点,最后随着种子成熟又急速上升(图6)。SOD活性总体变化趋势与可溶性蛋白质含量基本保持一致(图1、6)。

2.3.2 过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性变化 由图7可知:POD活性和CAT活性都呈单峰曲线变化。POD活性峰值 $3155.84 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 出现在扇脉杓兰授粉后20 d,此后活性迅速下降,在授粉后85 d降至最低并趋于稳定。CAT活性在发育初期变化平缓,在授粉30 d后开始呈直线上升的趋势,并在授粉后60 d达到峰值( $1489.28 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )。随后CAT活性又直线下降,种子成熟时降至最低。

虽然SOD、POD和CAT活性之间无显著相关性( $P > 0.05$ ),但SOD、POD与可溶性蛋白质之间呈显著正相关( $P < 0.05$ ),其中,POD活性与可溶性蛋白

含量呈极显著正相关( $P < 0.01$ ),相关系数为0.935(表1)。

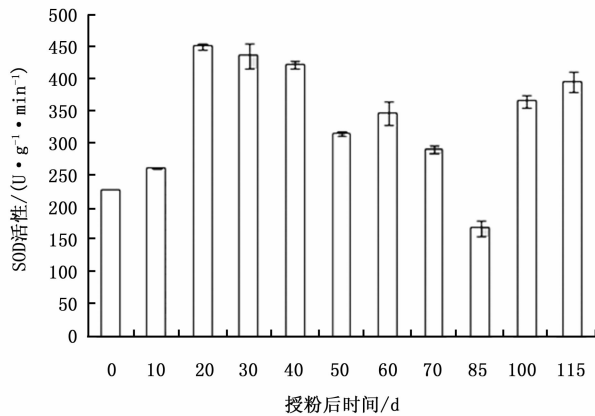


图6 扇脉杓兰种子发育过程中超氧化歧化酶(SOD)活性的变化

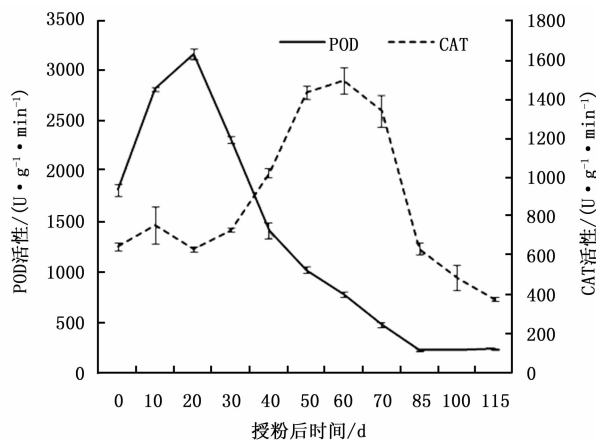


图7 扇脉杓兰种子发育过程中过氧化酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性的变化

### 3 结论与讨论

#### 3.1 营养物质的变化

种子中的营养物质既是组成细胞结构的重要组成部分,也是维持生命活动的养料和能源,不同植物种子中营养物质的变化趋势和类别有差异<sup>[20]</sup>。扇脉杓兰种子在整个发育过程中可溶性糖含量在3.1%以下,波动范围较小;在种子成熟时淀粉含量维持在20%左右,是主要的贮存物质;而经济树种水黄皮(*Pongamia pinnata* (L.) Pierre)种子发育过程中,可溶性糖含量水平较高,在18.49%~22.54%变动,淀粉含量则维持在5.5%~7.4%<sup>[21]</sup>。虽然在牧草作物老芒麦(*Elymus sibiricus* L.)、无芒雀麦(*Bromus inermis* L.)、结缕草(*Zoysia japonica* Steud.)和同德小花碱茅(*Puccinellia tenuiflora* (Griseb.) Scribn. et Merr. cv. Tongde)种子中淀粉也是主要贮藏物质,

但种子质量的增加和淀粉的积累都是可溶性糖转化的结果,可溶性糖和淀粉含量的变化趋势刚好相反<sup>[17-18,22-23]</sup>。在红花子莲(*Nelumbo nucifera* Gaer-en)胚中,可溶性糖的积累先于淀粉,早期胚中可溶性糖含量已相当高,并随着胚的分化而不断上升<sup>[24]</sup>。扇脉杓兰种子形成过程中淀粉与可溶性糖的积累是同步的,并呈极显著的正相关。可见,在不同植物种子中,营养物质含量差异较大,各成分的积累时间和变化趋势也大不相同。

扇脉杓兰种子发育过程中可溶性蛋白质含量在授粉20 d后开始下降,授粉85 d时降至最低,种子趋于成熟时可溶性蛋白质逐渐积累。这与经济植物南美椴(*Acca sellowiana* (O. Berg.) O. Berg.)胚胎发育过程中蛋白质含量变化趋势一致。蛋白质是胚胎发育的重要养料,它能够激活细胞代谢过程,促进胚胎的形态形成<sup>[25]</sup>,因此,在胚胎发生阶段需要大量供给。红花子莲的子叶胚积累大量的蛋白质、淀粉等营养物质,胚发育后期胚乳败育,子叶胚取代胚乳供给营养;而扇脉杓兰是单子叶植物,种子成熟时胚仍停留在球形胚时期,不能完全分化,不含胚乳<sup>[4]</sup>,种子中的营养物质有限,加之种子数量庞大,单粒种子能得到的营养成分少,所以形成的低质量型种子多败育,进而影响种子的萌发和生长进程。为保障扇脉杓兰种子在发育时有充足的营养供给,可采用种子离体培养法,在起始发育阶段补充大量的糖和充足的蛋白质,以促进胚拯救过程和种子萌发。

#### 3.2 内源激素的作用

内源激素是种子中的一类生理活性物质,其含量很低,但能调节种子的生理状态和生化变化,促使种子生命活动强度的升高或降低<sup>[20]</sup>。生长素、赤霉素和细胞分裂素都有促进细胞分裂和营养物质运输的作用,是种子发育的促进激素。赤霉素在许多植物中能够促进生长素的生物合成<sup>[26]</sup>。脱落酸对胚胎发育具有双重影响,一方面能促进胚胎发育的起始,另一方面又加速器官和组织的脱落<sup>[27-28]</sup>。

胚胎的正常发育受多种内源激素动态平衡和某一时期某一主导激素的调控<sup>[29]</sup>,而激素之间的平衡关系比单一激素对胚胎发育或败育的作用更重要,这是因为在植物发育过程中往往是几种激素协同作用。在扇脉杓兰种子发育过程中,4种植物激素含量存在明显的差异,IAA和ABA含量相对较高,GA<sub>3</sub>和ZR则相对较低。在种子发育早期IAA、ZR和

GA<sub>3</sub> 含量高于发育后期,随着种子发育成熟,ABA 含量不断升高,3 种促进激素含量逐渐下降,(IAA + GA<sub>3</sub> + ZR) / ABA 比值也随之下降,这种变化趋势符合种子的发育规律<sup>[30]</sup>。扇脉杓兰 4 种激素峰值发生具有明显的时间顺序性,这与结缕草和偃麦草 (*Elytrigia repens* (L.) Desr) 的研究结果一致<sup>[22,31]</sup>。GA<sub>3</sub>、ZR、IAA 和 ABA 在扇脉杓兰授粉后 20、30、40、115 d 依次出现。可见,在种子早期发育阶段,3 种促进激素起主导作用,而在种子成熟时,ABA 占优势地位。高水平的生长抑制物和低水平的生长促进物促使胚未完全分化的种子休眠,导致胚萌发困难且种子败育。

此外,内源激素对贮藏物质的含量也具有调控作用。在一种田菁 (*Sesbania virgata*) 植物中,ABA 通过抑制贮藏蛋白的分解和降低 α-半乳糖苷酶的活性控制贮藏物质的代谢<sup>[32]</sup>。内源激素的作用也与胚胎发育过程相互影响。在不经受精作用和败育的刺梨 (*Rosa roxburghii* Tratt.) 种子中,IAA 和 GA 含量相对较低,而正常发育型种子具有较高的促进激素水平<sup>[26]</sup>。乙烯在蝴蝶兰属 (*Phalaenopsis* Bl.) 和朵丽碟兰属 (*Doritaenopsis*) 植物授粉后能显著调节子房发育<sup>[12,33]</sup>。掌握种子不同发育时期对激素种类和含量的需求情况,对人为调节种胚发育过程具有指导意义。扇脉杓兰种子成熟时高水平的抑制激素致使内源激素平衡失调,这严重阻碍了种胚突破种皮的生长。为促进种子萌发,可在离体培养基中适度增加促进激素含量,维持细胞内激素的动态平衡,打破种子休眠,促进球形胚继续分化,从而降低种子败育率。

### 3.3 酶活性的影响

酶是种子发育过程中生理生化反应的有机催化剂,绝大多数酶的成分是蛋白质<sup>[20]</sup>,因此,酶的活性与蛋白质含量呈正相关。SOD、POD 和 CAT 是生命活动中具有协同作用的保护酶。种子的正常发育需要完整的膜系统,3 种保护酶对防止膜脂过氧化有重要作用<sup>[16]</sup>,其中,SOD 是清除氧自由基的重要酶之一;POD 能有效保护膜结构,且与呼吸作用和生长素水平有关;CAT 可消除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的胁迫作用,抵御低温等环境的影响<sup>[34-35]</sup>。

相比 POD 和 CAT,扇脉杓兰种子发育过程中 SOD 活性较低,其变化趋势随着可溶性蛋白质含量的消长而变化,这与周碧燕等<sup>[36]</sup>的研究结果相似。授粉 20 d 时正值发育早期,胚珠细胞代谢旺盛,SOD

和 POD 活性达到最高,这有利于清除体内的氧自由基,保护细胞膜结构完整。POD 在扇脉杓兰授粉后的 50 d 里一直保持活跃状态,它与呼吸作用密切相关,并能降解 IAA,其含量与可溶性蛋白质呈极显著正相关,该结果与百子莲品种 (*Agapanthus praecox* ssp. *Orientalis* 'Big Blue') 的研究结果一致<sup>[37]</sup>。POD 和 CAT 活性都呈现先升后降的变化,但 POD 活性变化的时间先于 CAT。授粉后 115 d,虽然 SOD 活性有所上升,但 POD 和 CAT 活性降至最低,SOD 在清除活性氧过程中积累过氧化氢,这在很大程度上抑制了 CAT 活性。种子完全成熟时保护酶活性低,细胞膜脂易发生过氧化作用,这可能直接导致细胞结构紊乱和种子败育。

种子的发育受内源激素含量及其平衡关系、营养物质组成、酶活性变化等多方面生理学因素的综合影响,各个因素内部和因素之间又发生复杂的相互作用。本试验对各个生理生化指标的变化规律进行了初步的探讨,而它们之间更为深入的相互作用机理尚待研究。

### 参考文献:

- [1] 林 泉. 浙江植物志[M]. 杭州:浙江科学技术出版社, 1993: 490.
- [2] 丁炳扬,李根有,傅承新,等. 天目山植物志[M]. 杭州:浙江大学出版社, 2010: 227.
- [3] 郎楷永. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社, 2006: 41-42.
- [4] 刘 芬,田 敏,王彩霞,等. 扇脉杓兰果实生长动态及胚胎发育过程观察[J]. 植物资源与环境学报, 2012, 21(1): 28-35.
- [5] 李桂强. 珍稀濒危植物扇脉杓兰保护生物学研究[D]. 重庆:西南大学, 2011: 24-26.
- [6] Rankou H. The IUCN red list of threatened species: *Cypripedium japonicum*[EB/OL]. [2014-03-01]. <http://www.iucnredlist.org>.
- [7] Sun H Q, Cheng J, Zhang F M, et al. Reproductive success of non-rewarding *Cypripedium japonicum* benefits from low spatial dispersion pattern and asynchronous flowering[J]. *Annals of Botany*, 2009, 103: 1227-1237.
- [8] Chung J M, Park K W, Park C S, et al. Contrasting levels of genetic diversity between the historically orchid *Cypripedium japonicum* and the historically common orchid *Cypripedium macranthos* in South Korea[J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2009, 160(2): 119-129.
- [9] Qian X, Li Q J, Liu F, et al. Conservation genetics of an endangered lady's slipper orchid: *Cypripedium japonicum* in China[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 11578-11596.
- [10] 李星霖. 东亚特有珍稀兰科植物扇脉杓兰的遗传多样性与谱系地理学研究[D]. 上海:华东师范大学, 2014: 21-30.
- [11] 刘 芬,李全健,王彩霞,等. 濒危植物扇脉杓兰的花部特征与繁育系统[J]. 林业科学, 2013, 49(1): 53-60.

- [12] Tsai W C, Hsiao Y Y, Pan Z J, *et al.* The role of ethylene in orchid ovule development[J]. *Plant Sci*, 2008, 175: 98 – 105.
- [13] Zhang X S, Sharman D O. Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination [J]. *The Plant Cell*, 1993, 5: 403 – 418.
- [14] 李全健, 王彩霞, 田敏, 等. 浙江扇脉杓兰野生居群的表型性状变异及其与地理-土壤养分因子的相关性[J]. *植物资源与环境学报*, 2012, 21(2): 45 – 52.
- [15] 李合生. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 164 – 167, 182 – 185.
- [16] 韩智龙. 华北驼绒藜种子败育生理机制的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008: 11 – 29.
- [17] 韩建国, 毛培胜, 牛忠联, 等. 老芒麦种子发育过程中的生理生化变化[J]. *草地学报*, 2000, 8(4): 237 – 244.
- [18] 毛培胜, 韩建国, 王培, 等. 无芒雀麦种子发育过程中的生理生化变化[J]. *中国草地*, 2001, 23(1): 26 – 31.
- [19] 汤章城. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 314 – 315.
- [20] 张红生, 胡晋. 种子学[M]. 北京: 科学出版社, 2010, 6 – 73.
- [21] Pavithra H R, Balakrishna G, Shivanna M B. Biochemical changes in the composition of developing seeds of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre. [J]. *Industrial Crops and Products*, 2014, 53: 199 – 208.
- [22] 马春晖, 韩建国, 孙洁峰, 等. 结缕草种子发育过程中生理生化变化的研究[J]. *草业学报*, 2009, 18(6): 174 – 179.
- [23] 史鹏. 同德小花碱茅幼穗分化的观察和种子发育过程中8个生理指标变化的研究[D]. 西宁: 青海大学, 2012: 20 – 26.
- [24] 覃章铮, 唐锡华, 张晓艳, 等. 莲胚发育与核酸、蛋白质含量的变化[J]. *植物生理学报*, 1989, 15(4): 333 – 339.
- [25] Cangahuala G C, Caprestano C A, Guerra M P. Dynamics of physiological and biochemical changes during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*[J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 2014, 50: 166 – 175.
- [26] Fan W G, An H M, Liu G Q, *et al.* Changes of endogenous hormone contents in fruit, seeds and their effects on the fruit development of *Rosa roxburghii*[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2003, 2(12): 1376 – 1381.
- [27] Gawronska H, Burza W, Bolesta E, *et al.* Zygotic and somatic embryos of cucumber (*Cucumis sativus* L.) substantially differ in their levels of abscisic acid[J]. *Plant Sci*, 2000, 157: 129 – 137.
- [28] Yin X, He D, Gupta R, *et al.* Physiological and proteomic analyses on artificially aged *Brassica napus* seed[J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 112.
- [29] Chen W, Lu L X. Endogenous hormones in relation to embryo development in litchi[J]. *Acta Hort*, 2001, 558: 247 – 250.
- [30] 何泽英, 许定发, 袁以苇. 种子萌发的生理生化[M]. 南京: 江苏科学出版社, 1987: 12 – 78.
- [31] 张艳红, 国振杰, 易津. 6种根茎禾草种子发育过程中内源激素变化规律的研究[J]. *种子*, 2007, 26(8): 8 – 12.
- [32] Tonini P P, Purgatto E, Buckeridge M S, *et al.* Effects of abscisic acid, ethylene and sugars on the mobilization of storage proteins and carbohydrates in seeds of the tropical tree *Sesbania virgata* (Leguminosae) [J]. *Annals of Botany*, 2010, 106: 607 – 616.
- [33] Zhang X S, Li Q Z, Zheng C C. Hormonal regulation of post pollination development of *Doritaenopsis* flowers by auxin and ethylene [J]. *Acta Phytophysiological Sinica*, 1999, 25(2): 178 – 186.
- [34] 冉景盛, 向邓云, 韩宗先. 杂交稻种子萌发酶活性的变化[J]. *重庆工商大学学报*, 2009, 26(4): 388 – 393.
- [35] 宋金凤, 李锋, 王亚军, 等. 低温胁迫下外源有机酸对长白落叶松幼苗生理生化特性的影响[J]. *林业科学*, 2012, 48(2): 89 – 95.
- [36] 周碧燕, 陈杰忠, 季作梁, 等. 香蕉越冬期间SOD活性和可溶性蛋白质含量的变化[J]. *果树科学*, 1999, 16(3): 192 – 196.
- [37] 孙颖, 卓丽环. 百子莲种子发育生理生化特性[J]. *东北林业大学学报*, 2010, 38(5): 57 – 59.