

DOI: 10.5846/stxb201406081180

卞方圆, 苏建荣, 刘万德, 李帅锋, 郎学东. 云南红豆杉新采收种子的形态与离体胚的萌发特性. 生态学报, 2015, 35(24): - .

Bian F Y, Su J R, Liu W D, Li S F, Lang X D. Morphology of fresh seeds and germination of in vitro embryos for *Taxus yunnanensis*. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(24): - .

云南红豆杉新采收种子的形态与离体胚的萌发特性

卞方圆, 苏建荣*, 刘万德, 李帅锋, 郎学东

中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 昆明 650224

摘要: 通过云南红豆杉新采收种子形态观察、透水性测定、种子大小以及所带胚乳多少对离体胚萌发率的影响等试验, 探讨云南红豆杉种子的休眠与萌发机理。结果表明, 云南红豆杉种子呈倒卵形和三棱形; 胚酒瓶形, 白色; 胚乳淡黄色, 油质。种子千粒重为 72.934g; 种皮、种仁和种胚分别占种子鲜重的 50.56%、40.45% 和 8.99%; 胚与种子的体积比 (E:S) 为 0.074。胚的体积为 0.156—1.012mm³, 种子为 51.658—109.649mm³, 两者呈显著正相关 ($P<0.05$, $r=0.810$)。完整种子的吸水率明显低于破裂种皮、酸蚀 40min 和酸蚀 20min 的种子, 但差异随着浸泡时间延长而缩小; 种子含水量饱和时, 完整种子、破皮种子与酸蚀种子的吸水率无显著差异 (前者为 23.7%, 后两者约 28.0%)。不同大小种子离体胚的萌发率差异显著 ($P<0.05$), 特大、大、中、小和特小种子的离体胚的萌发率为 80%、77.8%、67.5%、62.0% 和 44.0%。胚乳抑制离体胚的萌发, 不带胚乳离体胚的萌发率为 41.3%, 显著高于带胚乳的萌发率 ($P<0.05$), 带部分胚乳的胚为 9.7%—13.3%, 带全胚乳的胚为 0。同时离体胚培养过程中所用种胚的新鲜程度也严重影响胚的萌发率。云南红豆杉种子休眠属于中度生理休眠类型, 种子中的抑制物质含量随时间的动态变化和胚乳中抑制物质含量的多少对胚萌发率的影响是以后云南红豆杉休眠研究的重点。

关键词: 云南红豆杉; 形态学; 离体胚培养; 种子萌发; 休眠类型

Morphology of fresh seeds and germination of in vitro embryos for *Taxus yunnanensis*

BIAN Fangyuan, SU Jianrong*, LIU Wande, LI Shuaifeng, LANG Xuedong

Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, China

Abstract: *Taxus yunnanensis* (*Taxus wallichiana* var. *wallichiana*) is an endangered species on China's national protection list. This plant is located mainly in Yunnan, Sichuan, Chongqing, and Tibet. In nature, the seeds of *T. yunnanensis* need about 2 years to eliminate dormant factors for germination. To shorten the time of seed germination and improve the germination rate, many studies of seeds on biology, physiological ecology, and cultivation have been conducted. However, there are no consistent views and conclusions about how to improve germination rates. Thus, clarification of the embryonal germination characteristics and the water permeability of seed coats form the basis for understanding causes of seed dormancy. In order to explore the mechanisms of *T. yunnanensis* seed dormancy and germination, fresh seeds were used for morphological observation, water permeability tests, and tests on the effects of different seed sizes and endosperm quantities on the germination rate for in vitro embryos. Our results showed that *T. yunnanensis* seeds were obovate three-sided prisms, embryos were white and bottle shaped, and the endosperm was pale yellow and oily. One thousand seeds weighed 72.934 g. The relative weights of seed coat, kernel, and embryo accounted for 50.56%, 40.45%, and 8.99% of total seed weight, respectively. The volume ratio of an embryo versus a seed (E:S) was 7.4%. The volume range for embryos and seeds was

基金项目: 林业局 948 项目 (2011-4-03); 云南省科技计划 (2011CI072) 的部分研究内容

收稿日期: 2014-06-08; 网络出版日期: 2015- -

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: jianrongsu@vip.sina.com

0.156—1.012 and 51.658—109.649 mm³, respectively. Mantel tests showed that there was a significant positive correlation between the volume of embryos and that of seeds ($P < 0.05$, $r = 0.810$). The water absorption rate of intact seeds was lower than that of cut seeds. However, the differences of water absorption rates for seeds corroded by acids for 40 and 20 min were reduced with the extension of soaking time. When the moisture content of a seed was saturated, there was no significant difference of water absorption rate among intact (23.7%), cut (28.7%), and acid-corroded (28.0%) seeds. The germination rate of in vitro embryos was markedly different for different seed sizes ($P < 0.05$). Specifically, the germination rate of in vitro embryos for superlarge seeds (98.051—109.649 mm³), large seeds (86.453—98.050 mm³), medium seeds (74.855—86.452 mm³), small seeds (63.257—74.854 mm³), and supersmall seeds (51.658—63.256 mm³) was 80%, 77.8%, 67.5%, 62.0%, and 44.0%, respectively. Moreover, the endosperm inhibits the germination of embryos, and the germination rate of embryos without endosperm (41.3%) was significantly higher than that for embryos with endosperm ($P < 0.05$). The respective germination rates for seeds with a portion of the endosperm and full endosperm was 9.7%—13.3%, and 0%. Finally, the freshness of in vitro embryos also affected their germination rates. In conclusion, the present study showed that sampling materials and their cultivation conditions should be consistent between studies. In addition, the seed dormancy of *T. yunnanensis* was moderate and caused by physiological dormancy. Many factors can contribute to physiological dormancy; this study confirmed that inhibitors within seeds are the most important causes of *T. yunnanensis* seed dormancy. Additional studies should focus on the changes in quantity of inhibitors over time and their effects on the germination rates for in vitro embryos.

Key Words: *Taxus yunnanensis*; morphology; in vitro embryo culture; seed germination; dormant type

云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)又名紫金杉、紫杉,被国际松杉类专家组(CSG)确定为3级渐危种,也是国家一级保护植物^[1]。云南红豆杉还是一种重要的药用植物,富含天然抗癌药物紫杉醇(Taxol)^[2],被广泛用于滇、川、渝、藏等地的药用原料林基地建设^[3-4]。红豆杉植物种子在自然条件下需两冬一夏才能萌发,萌发率很低^[5-7]。为缩短种子萌发时间,提高萌发率,规模化培育原料林和保育所需优质实生苗,国内外学者围绕红豆杉种子生物学、生理生态学、种苗培育方面开展了大量的研究,但在种皮透水性的强弱,是否为萌发的主要障碍^[7-11];胚乳对种胚萌发有抑制作用,还是促进作用^[12-13];新采收种子离体胚培养的萌发率是高(82%),还是低(8.5%)^[13-15]这三个关键问题上仍未形成一致观点和结论。

种子休眠(Seed Dormancy)是指在一定的时间内,具有活力的种子在任何正常的物理环境因子组合下不能萌发的现象^[16-17]。Baskin 和 Baskin^[16,18]依据物种的成熟新鲜种子是否在持续四周的最佳萌发条件下萌发与否作为划分种子休眠与否的时间界限,并结合种子的其它特性划分出生理休眠(Physiological Dormancy, PD)、形态休眠(Morphological Dormancy, MD)、形态生理休眠(Morphophysiological Dormancy, MPD)、物理休眠(Physical Dormancy, PY)和复合休眠(Combinational dormancy, PY+PD)5种类型。PD广泛存在于裸子植物和大多数被子植物的种子中,主要以离体胚能否正常生长,萌发是否需要释放休眠的预处理确定并划分亚类;MD型种子的胚已分化,但小、发育不完全,胚生长至足够体积后就能萌发;MPD的种子具有未发育完全和生理休眠的胚;PY则是由种皮或者果皮的不透水所引起;PY+PD的种皮(果皮)不透水,而且胚具有生理休眠^[19]。红豆杉种子的休眠机理迄今仍不清楚,快速解除休眠的技术也尚未发现^[7,20],而澄清种胚的萌发特性、种皮透水性等争议较大的问题是深入研究种子休眠类型与机理及开发休眠解除技术提高发芽率的重要基础。

本研究以新采收的云南红豆杉种子为对象,通过对种子的形态特征、种胚大小与萌发的关系、种皮透水性及离体胚萌发特性等方面的研究,探讨种皮的透水特性、胚乳对离体胚萌发的影响及离体胚培养萌发率变异巨大的成因,为揭示云南红豆杉的休眠机理及休眠解除机理累积基础数据,同时为推动种群恢复和实生苗的规模化培育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用云南红豆杉种子采自中国林业科学研究院资源昆虫研究所景东试验站栽培的同一种源。采样地海拔 1200m, 位于 E 100°18', N 23°52'。该区属亚热带季风气候, 年平均气温 $18.3 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 极端最高温 $37 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$, 极端最低温 $-2 \pm 1^{\circ}\text{C}$; 年平均降雨量 $1100 \pm 50\text{mm}$, 多集中于 7—8 月; 年平均日照天数 $205 \pm 5\text{d}$; 年均太阳辐射总量 $131.7 \pm 2.5\text{kcal}/\text{cm}^2$ 。2013 年 12 月 5 日采摘假种皮变红的种子用于试验。采种后带回实验室立即用水浸泡并搓洗除去假种皮, 将洗净的种子阴干后备用。经国家标准《林木种子检验规程》(GB 2772-1999)^[21] TTC 法测定, 种子生活力为 78%。

1.2 方法

1.2.1 试验种子抽样方法

各试验均采用《林木种子检验规程》(GB 2772-1999)^[21]四分法按所需用量从 2000 粒左右种子中随机抽取各项试验种子。

1.2.2 种子和种胚的形态与大小

观察种子与胚的形态, 测量种子大小、千粒重、胚大小, 称量种皮、种仁、胚重量。种子大小以长轴、横径和纵径表示, 随机抽取 30 粒种子, 3 次重复, 用精确到 0.01mm 的游标卡尺测量。云南红豆杉种子外观近似于椭球体, 因此根据椭球体的计算公式计算种子体积。胚形态用 VHX-1000 超景深三维显微镜观察与测量, 随机抽取 30 粒种子, 3 次重复。由于种胚形状呈酒瓶形, 上半部近似圆锥体, 下半部近似圆柱体, 采用圆锥和圆柱体积公式来计算种胚的体积。种子千粒重按《林木种子检验规程》(GB 2772-1999)^[21]测定。种皮、种仁、胚的重量为鲜重, 随机取 30 粒种子, 3 次重复, 用解剖刀将种子分离成种皮和种仁(包括胚乳、胚)两部分, 再分别用电子天平称量; 用解剖刀沿种仁中线切除部分胚乳后用解剖针挑出完整的种胚, 取 10 粒种胚用电子天平称量, 重复 20 次。

1.2.3 种子的含水量

由于红豆杉种子较坚硬, 所以先将种皮夹破, 再置于 $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的恒温干燥箱中烘 17h, 然后取出在干燥器中冷却至室温。每次取约 3g 种子, 3 次重复。用烘干前后的重量差值除以干重计算种子含水量^[22]。

1.2.4 种子透水性的测定

实验设完整种子、夹破种子、酸蚀 40min 种子、酸蚀 20min 种子 4 个处理, 其中夹破处理为切去约十分之一的种皮, 酸蚀所用试剂为 98% 的浓硫酸。取完整种子、夹破种子各 30 粒分别称质量, 然后放入烧杯中, 加蒸馏水浸泡, 在室温条件下吸胀。另取酸蚀 20min 种子和酸蚀 40min 种子各 30 粒分别称质量, 先流水冲洗 24h, 再继续浸泡水中。流水冲洗每 2h 称量 1 次, 24h 之后每 6h 称量 1 次, 36h 后每 12h 称量 1 次, 直至恒重^[23]。4 个处理, 每个处理 3 次重复, 以浸种前后的质量差除以浸种前质量计算种子吸水率。

1.2.5 不同大小种子的离体胚培养

随机抽取 150 粒种子, 用 0.01mm 的游标卡尺测量种子的长轴、横径和纵径, 计算体积。做频率分布图, 对种子大小进行分组。然后进行萌发试验, 每组随机取 40 颗, 重复 3 次, 去外种皮, 经 70% 酒精和 0.1% 升汞常规表面消毒后, 在无菌条件下切除种皮和部分胚乳后接种于 MS 基本培养基上。培养基的 pH 值为 5.8, 添加 3% 蔗糖、0.8% 琼脂。培养温度控制在 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 每天光照 16h, 光照度为 2000lx ^[13]。接种时间为 2013 年 12 月 19 日。离体胚萌发指具有子叶和胚轴的胚, 每天观察记录种子的萌发情况, 做动态曲线图。发芽率(G_p)为发芽总数除以培养总数, 发芽指数(G_i)为在时间 t 日的发芽数除以相应的发芽日数的总和。

1.2.6 带全胚乳和带部分胚乳胚的培养

用带全胚乳及带 1/3、1/2、2/3 胚乳和不带胚乳的胚进行离体培养, 每组处理 40 颗, 重复 3 次。去外种皮, 经 70% 酒精和 0.1% 升汞常规表面消毒后, 在无菌条件下切除种皮和 1/3、1/2、2/3 或全部胚乳。将 5 个处

理的种子分别接种于 MS 培养基上。培养方法同上,接种时间是 2013 年 12 月 24 日。按前述离体胚萌发标准,记录种子萌发日进程,绘制动态曲线。计算发芽率(G_p)和发芽指数(G_i)。

1.2.7 数据统计与分析

采用 SPSS 18.0 进行处理数据,计算种子与种胚各性状之间的相关系数;用单因素方差分析,检验不同的种皮处理对种子吸水的差异性和不同种胚大小的萌发率、发芽指数间的差异性,并进行 LSD 多重比较。采用 SigmaPlot 12.5 制图。

2 结果与分析

2.1 种胚的形态与大小

2.1.1 种胚的主要性状特征

云南红豆杉种子倒卵形,少数三棱形(图 1),种子有鲜红色杯状肉质假种皮包于种子下半部,顶端有小突尖,基部圆形。种子由种皮、胚及胚乳三部分组成(图 2)。种皮坚硬,褐色,平滑,在高倍显微镜下可见密布排列整齐的小椭圆形突起,包括外、中、内种皮。胚呈酒瓶形,白色,光滑(图 3)。胚乳淡黄色,油质。

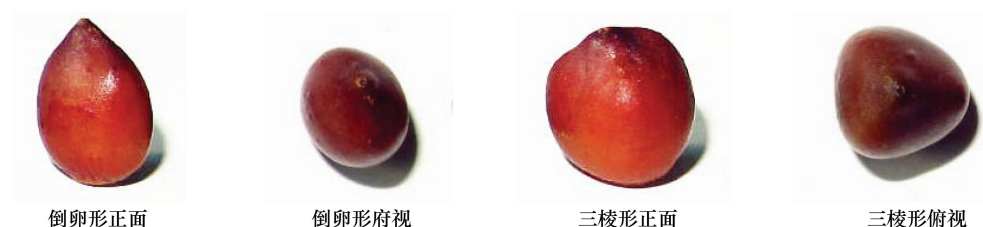
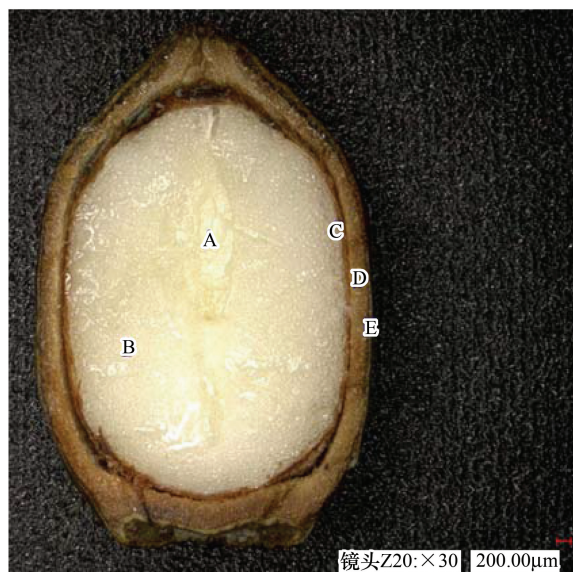


图 1 云南红豆杉种子形态

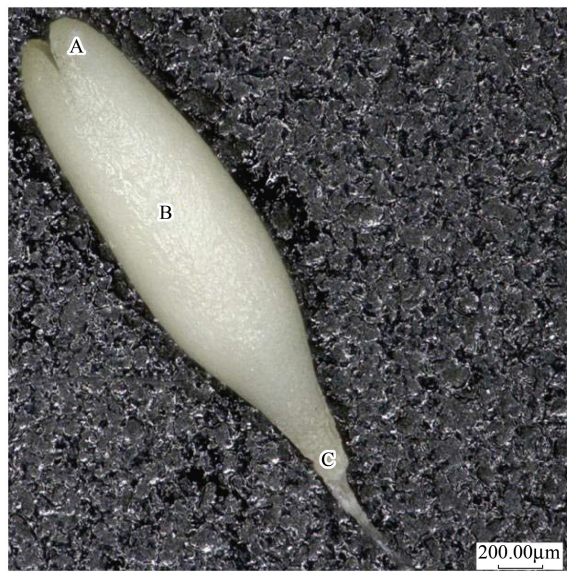
Fig. 1 Seed morphology of *Taxus yunnanensis*



A: 胚 B: 胚乳 C: 内种皮 D: 中种皮 E: 外种皮

图 2 南红豆杉种子纵切面

Fig. 2 Seeds longitudinal section of *Taxus yunnanensis*



A: 子叶 B: 胚轴 C: 胚根

图 3 云南红豆杉种胚形态

Fig. 3 Embryo morphology of *Taxus yunnanensis*

云南红豆杉种子特征数据见表 1。种子平均千粒重为 72.934g、平均含水率为 32%;种子的长轴长、横径长和纵径长分别是 6.905mm、4.876mm 和 4.403mm;平均每粒种子的种皮重、种仁重和种胚重为 0.045g、0.036g 和 0.0036g,分别占单粒种子重量的 50.56%、40.45%和 8.99%。

表 1 云南红豆杉种胚性状

Table 1 Embryo characters of *Taxus yunnanensis*

指标 Index	平均值±标准差 Mean±SD	最小值 Minimum	最大值 Maximum
千粒重 1000 seed weight/(g)	72.934±1.429	—	—
种皮重 Seed coat weight/(g)	0.045±0.008	0.026	0.057
种仁重 Seed kernel weight/(g)	0.036±0.006	0.024	0.049
种胚重 Embryo weight/(g)	0.008±0.002	0.005	0.011
种子长轴 Seed long axis/(mm)	6.905±0.436	6.02	7.92
种子横径 Seed transverse diameter/(mm)	4.876±0.240	4.27	5.46
种子纵径 Seed longitudinal diameter/(mm)	4.403±0.332	3.78	5.25
种胚长 Embryo length/(mm)	2.437±0.238	1.817	3.233
含水量 Seed moisture content/(%)	32.000±1.250	—	—

种皮、种仁为单个质量,种胚为每 10 个质量。

2.1.2 种胚性状的相关性分析

云南红豆杉种胚性状之间的相关分析(表 2)表明,种子的千粒重与种皮重、种胚长,种皮重与种仁重,种仁重与种子纵径长之间存在显著的相关性($P<0.05$);种子的长轴长分别与种子的横径长、种子纵径长和种胚长存在极显著正相关($P<0.01$);种子的横径长与种子纵径长和种胚长也呈极显著正相关($P<0.01$);种子纵径长与种胚长的相关性也达到极显著($P<0.01$)。

表 2 云南红豆杉种胚性状相关性分析

Table 2 Correlation analysis of embryo characters of *Taxus yunnanensis*

指标 Index	千粒重 1000 seed weight	种皮重 Seed coat weight	种仁重 Seed kernel weight	种胚重 Embryo weight	种子长轴 Seed long axis	种子横径 Seed transverse diameter	种子纵径 Seed longitudinal diameter	种胚长 Embryo length	含水量 Seed moisture content
千粒重 1000 seed weight	1.000								
种皮重 Seed coat weight	0.859 *	1.000							
种仁重 Seed kernel weight	0.709	0.236 *	1.000						
种胚重 Embryo weight	0.701	0.202	0.404	1.000					
种子长轴 Seed long axis	0.619	0.092	0.202	0.304	1.000				
种子横径 Seed transverse	0.150	0.168	0.114	0.174	0.631 **	1.000			
种子纵径 Seed longitudinal	0.645	0.279	0.296 *	0.190	0.773 **	0.681 **	1.000		
种胚长 Embryo length	0.769 *	0.085	0.262	0.174	0.865 **	0.546 **	0.725 **	1.000	
含水量 Seed moisture content	0.450	0.483	0.178	0.102	0.575	0.902	0.925	0.296	1.000

*, $P<0.05$; **, $P<0.01$

2.1.3 种胚的大小分布

云南红豆杉种子和种胚体积大小呈明显的正态分布(图 4)。

种子的体积大小在 51.658—109.649mm³之间,全距 57.991,以 11.598 为组距可将种子分成特小、小、中等、大、特大 5 个组,对应的体积范围分别为 51.658—63.256mm³、63.257—74.854mm³、74.855—86.452 mm³、86.453—98.050mm³和 98.051—109.649mm³。云南红豆杉种胚的体积分布范围为 0.156—1.012mm³,按体积大小可分为特小、小、中等、大、特大 5 个组,体积范围分别为 0.156—0.327 mm³、0.328—0.498 mm³、0.499—0.669 mm³、0.670—0.840 mm³和 0.841—1.012 mm³。

散点图(图 5)显示种子与种胚的体积之间存在明显的线性相关关系。进一步分析表明,云南红豆杉种胚的体积与种子的体积之间的回归方程为 $y = 0.0972 + 0.063x$ ($r^2 = 0.657$, $P < 0.001$)。种胚体积大小变异的 65.7%可用种子体积的大小来解释,因此生产上可用种子的大小来判断种胚的大小。云南红豆杉种胚与种子体积大小的比值(E:S)为 0.074。

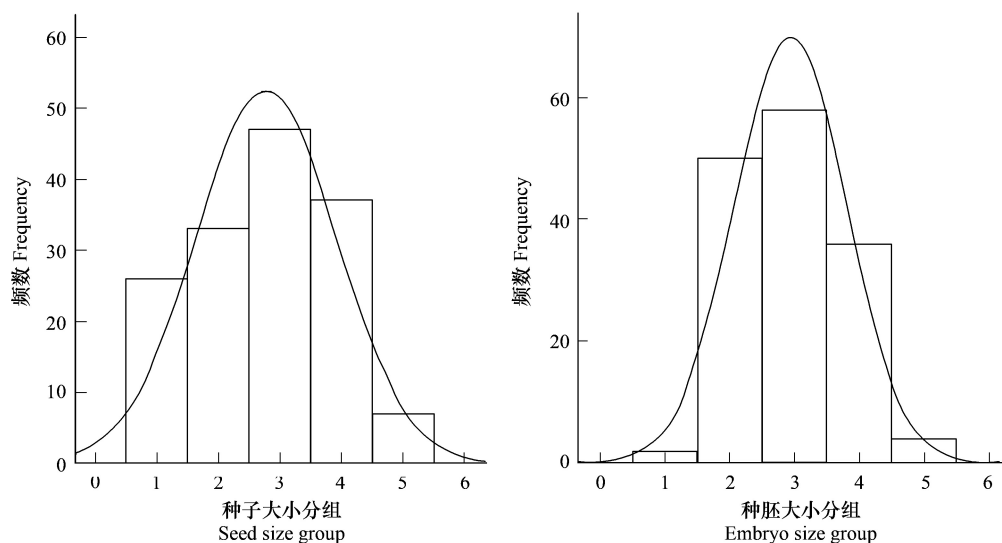


图4 种子与种胚大小的频数分布图

Fig. 4 Distribution of Seed and embryo size frequency

2.2 种皮透水性

在整个实验过程中,完整种子的吸水率明显低于破裂种皮、酸蚀 40min、酸蚀 20min 的处理种子的吸水率,但随着浸泡时间的增加吸水率的差异逐渐缩小(图 6)。

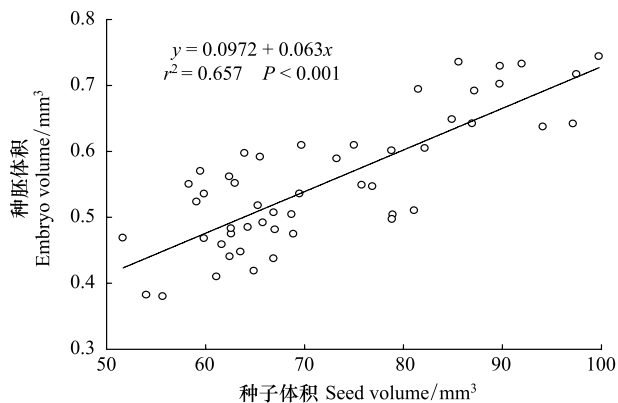


图5 种子—种胚体积散点图

Fig. 5 Scatter diagram of seed and embryo volume

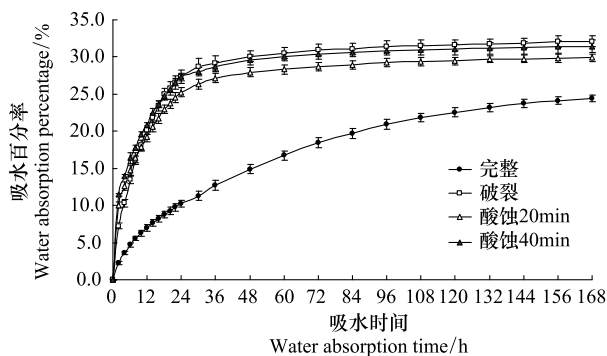


图6 不同处理云南红豆杉种子的吸水动态

Fig. 6 Water absorption dynamics of different processing *Taxus yunnanensis* seeds

从吸水速度看,完整种子的吸水速度最慢;而破裂种子与酸蚀种子吸水速度在 18h 内基本一致,快速吸水,18h 后酸蚀 20min 种子的吸水速度稍慢于破裂种子和酸蚀 40min 种子。酸蚀 40min 种子率先达到 20% 的吸水率,只需 10h,其次破裂种子需 12h,酸蚀 20min 种子需 14h,而完整种子最慢,达到 20% 吸水率需要 87h。到第 30h 时,破裂种子的吸水率为 28.7%,酸蚀 20min 为 26.3%,酸蚀 40min 为 28.0%,之后破皮种子与酸蚀种子的吸水量逐渐趋于饱和,而完整种子仍保持较快的吸水趋势。破皮种子与酸蚀种子在 48h 后达到饱和含水量,吸水率在 28% 左右;完整种子含水量达到饱和需要 144h,吸水率为 23.7%。

方差分析表明,不同的时间处理 ($P < 0.001$) 与种皮处理 ($P < 0.001$) 对云南红豆杉种子的吸水率都有极显著影响。对不同种皮处理间的 LSD 多重比较表明,完整种子的含水率与破皮种皮、酸蚀 40min、酸蚀 20min 处理种子的含水率差异达极显著水平 ($P < 0.001$);而后三者种子含水率的差异则不显著。所以,在培育实生苗过程中可采 98% 的浓硫酸处理种子 20 min,以增加种皮的透水性和种子含水量,提高种子萌发率。

2.3 种子大小对种胚萌发的影响

试验将不同大小的种子接种在 MS 培养上,培养 12d 左右可以明显观察到部分种胚生长出 2 片绿色子叶,同时胚轴伸长(图 7)。

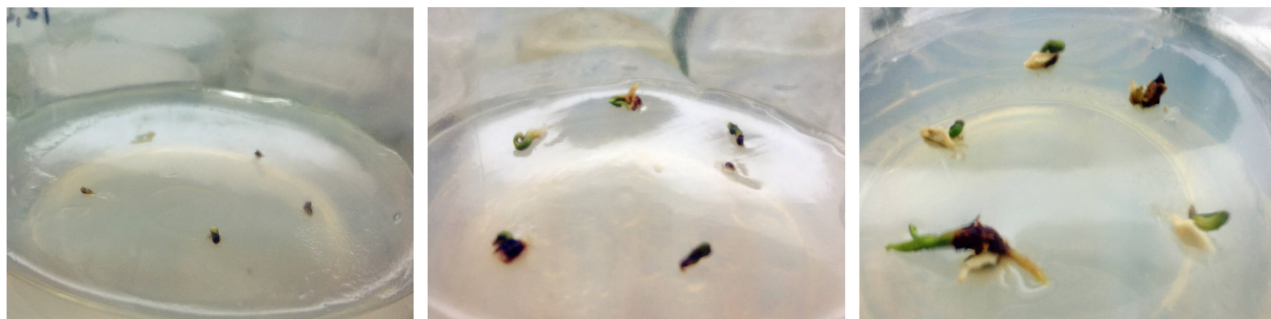


图 7 云南红豆杉种子的离体培养

Fig. 7 In vitro culture of *Taxus yunnanensis* seeds

云南红豆杉离体胚培养的萌发进程(图 8)表明,不同大小种子的萌发趋势较为一致,初期萌发率有随时间快速增长的特点。特大、大和中等大小种子的离体胚最先开始萌发,小种子和特小种子开始萌发的时间稍晚。离体培养到 12d—18d 左右,大量种胚同时萌发,萌发率较高,萌发率增长速度较快。随时间的推移,每天种胚的新增萌发量减少,萌发速度开始减慢。在接种之后的 23d 左右就观测不到种子萌发现象,种胚萌发基本停止,萌发率也不再增加。

云南红豆杉离体胚的平均萌发率和发芽指数随种子大小的增大而增加(图 8)。离体胚的萌发率在 44%—80%之间,特大种子的萌发率为 80%,大、中、小和特小种子的萌发率分别为 77.8%、67.5%、62.0%和 44.0%。方差分析表明,不同大小种子离体胚的萌发率(G_p)和发芽指数(G_i)的差异均达到显著水平($F_{G_p} = 4.194 > F_{0.05} = 3.480$; $F_{G_i} = 4.260 > F_{0.05} = 3.480$)。LSD 检验表明:特大种子的萌发率显著高于特小种子($P < 0.001$),显著高于小种子和中种子($P < 0.05$);大种子的萌发率显著高于特小种子($P < 0.05$);其余种子之间差异不显著。可见,在离体胚培养过程中,选择个大、饱满的种子,尤其是选用体积在 98 mm^3 以上的特大种子可显著提高胚的萌发率。该结果也说明,在实生苗培育的制种环节中应考虑对种子进行分级,以提高种子的萌发率,降低育苗成本。

2.4 胚乳对种胚萌发的影响

在云南红豆杉离体胚培养中,种胚所带胚乳的多少对胚萌发率的影响十分明显(图 10, 11),带全胚乳及带 1/3、1/2、2/3 胚乳和不带胚乳胚的萌发进程均不理想,每个处理的初始萌发时间差别很大,较早(不带胚乳)于 18d 开始萌发,较晚(全胚乳)甚至没有萌发的迹象,由于本研究仅观察到 35d,故不排除 35d 后仍有种子再萌发的情况。

在研究期限内,不带胚乳的胚的萌发率(41.3%)最高,带部分胚乳的萌发率在 9.7%—13.3%之间,全胚乳胚萌发率最低为 0。方差分析表明,离体胚培养过程中,胚带胚乳的多少对萌发率(G_p)和发芽指数(G_i)的影响达极显著水平($F_{G_p} = 16.629 > F_{0.01} = 5.99$, $P < 0.01$; $F_{G_i} = 32.397 > F_{0.01} = 5.99$, $P < 0.01$)。LSD 多重比较(图 11)进一步表明,不带胚乳胚的萌发率高于 1/3 胚乳胚、1/2 胚乳胚、2/3 胚乳胚和全胚乳胚,且萌发率和萌发指数的差异达极显著水平;1/3 胚乳胚显著高于全胚乳胚;其余种子之间差异不显著。

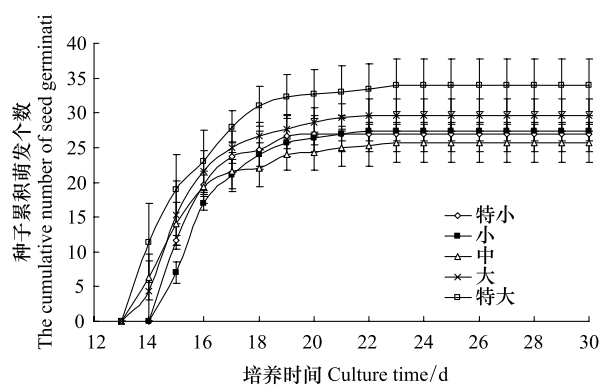


图 8 不同大小种子萌发动态

Fig. 8 Seed germination dynamic of different sizes

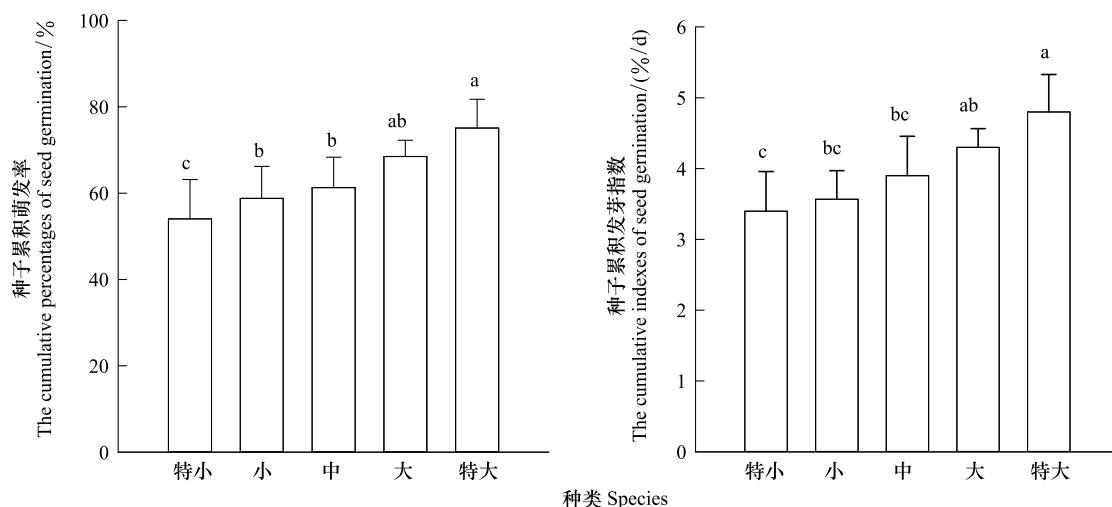


图9 不同大小种子萌发率与发芽指数

Fig. 9 Seed germination rate and germination index of different sizes

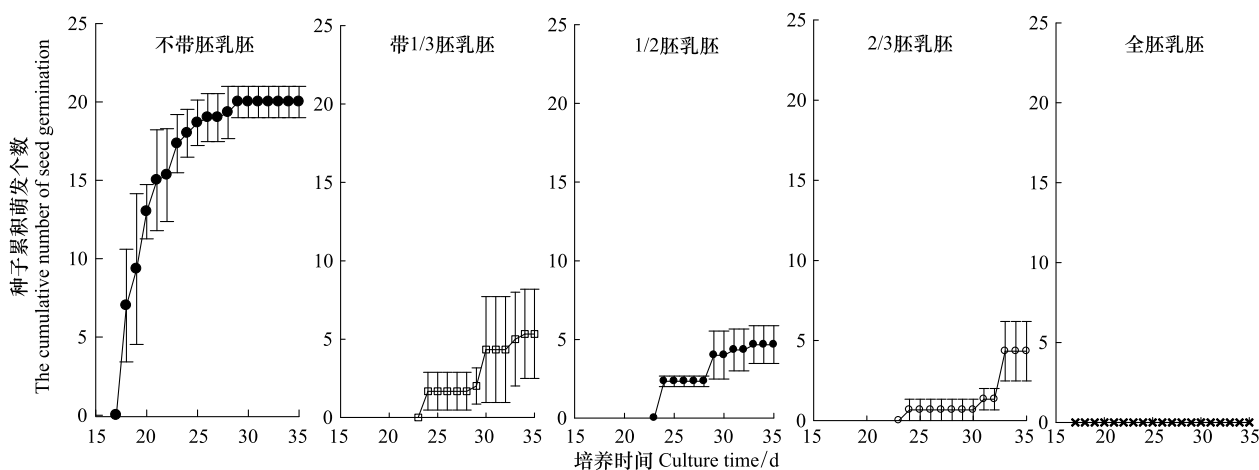


图10 种胚带不同大小胚乳萌发动态

Fig. 10 The germination dynamic of embryo with endosperm of different sizes

3 结论与讨论

3.1 云南红豆杉离体胚萌发率的影响因素

云南红豆杉的离体胚培养采用 MS 培养基时,种胚萌发率的差异很大,赵沛基等^[13]测定的萌发率高达 82%,王兵益等^[14]测定的萌发率为 70%,而杨玲等^[15]测定的萌发率仅有 8.5%。这些研究均以新鲜、成熟(以假种皮变红为标志)的种子为试验材料,培养方法基本一致。本研究表明,种子和胚的体积大小很可能是其离体胚培养萌发率差异较大的成因之一。云南红豆杉新采收种子和种胚的体积分别在 51.658—109.649mm³和 0.156—1.012mm³之间,变异幅度较大。种子大小对离体胚的萌发率影响显著,特大种子(体积 98.051—109.649 mm³)的萌发率高达 80%,而特小种子(体积 51.658—63.256 mm³)的萌发率仅有 44%。云南红豆杉种子的体积与种胚的体积之间存在显著的正相关(图 5),可以认为胚的大小也是影响离体胚萌发率的因素。以往的研究,忽视了种子、胚的大小对离体胚萌发率的影响,这可能是导致云南红豆杉离体胚培养种胚萌发率差异巨大的重要因素。在今后的研究中,应加强种子的大小对萌发率影响及其与种子成熟度关系的探索,并

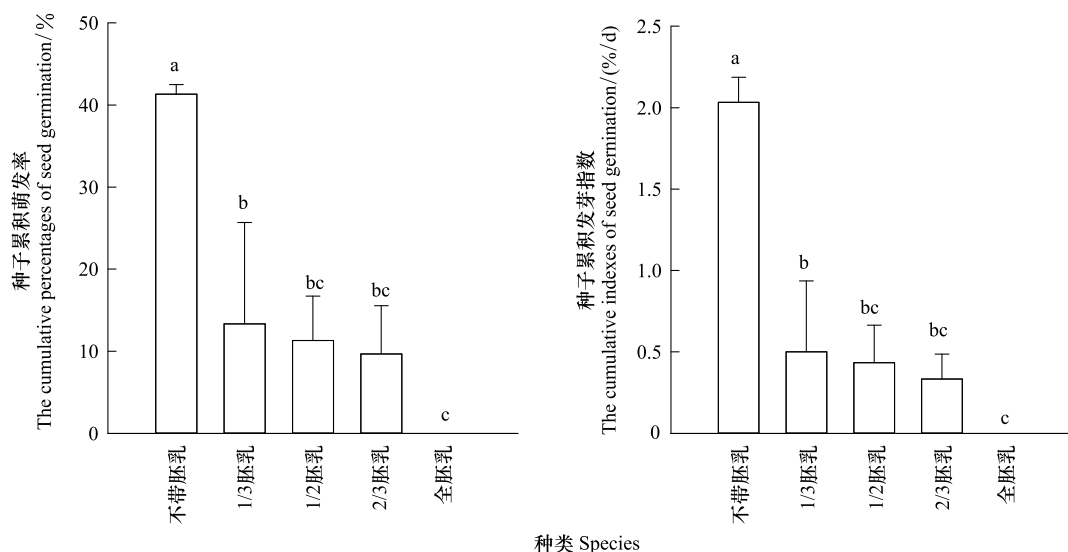


图 11 种胚带不同大小胚乳萌发率与发芽指数

Fig. 11 The germination rate and germination index of embryo with endosperm of different sizes

在实生苗木培育过程中对种子进行分级处理。

本研究所用云南红豆杉种子采于 2013 年 12 月 5 日,同月 19 日接种第一批离体胚,24 日接种第二批离体胚。第一批接种的带部分胚乳离体胚的萌发率为 44%—80%(图 9),而第二批带部分胚乳离体胚的萌发率仅为 9.7%—13.3%(图 11)。结果显示,用新采收云南红豆杉种子进行离体胚培养时,接种时间的早晚对种胚萌发率也有较大的影响,有研究报道鲜种在采后一周发芽率可达 90%^[10]。然而,先前的研究尚未认识到离体胚或种子的新鲜程度(种子采集后到接种或播种的时间长短)对种胚萌发率的影响。可见,种胚的新鲜程度也是导致云南红豆杉离体胚萌发率波动的重要因素。关于云南红豆杉的离体胚培养、种子萌发及休眠机理的研究,既要注意培育条件的相同,又要重视试验材料的一致性,深入探讨试验材料的差异性在揭示红豆杉休眠机理和突破红豆杉快速解除休眠技术方面具有重要的价值,应给予充分重视。

3.2 云南红豆杉的休眠类型及其成因

如前所述, Baskin 和 Baskin^[16,18] 将种子休眠分为生理休眠(PD)、形态休眠(MD)、形态生理休眠(MPD)、物理休眠(PY)和复合休眠(PY+PD)5 种类型。本研究中,带全胚乳的种胚在 35d 试验期的萌发率为 0,按照 Baskin 和 Baskin^[16,18] 的标准(四周不萌发),该物种具有休眠特性。解剖发现,试验用种都已分化完全,可明显观察到种皮、胚乳以及胚的胚根、胚轴、子叶等组织,且云南红豆杉新采收种子的离体胚在 12d—18d 左右能够正常生长(图 7),其它研究也未发现种子贮藏过程中胚结构的明显变化^[14],因此云南红豆杉种子的休眠不属于形态休眠类型。本研究显示,完整种子的吸水率虽然比破皮种子、酸蚀 40min、酸蚀 20min 处理种子的吸水率低,但浸泡 144h 后,前者的吸水率仅比后三类处理的仅低 5%左右。这与赵盛军^[11]认为云南红豆杉种皮透水性较好的结论一致,所以云南红豆杉种子的休眠也不属于物理休眠。对比有胚乳和没有胚乳的离体胚的萌发结果发现,胚乳是影响离体胚萌发的重要因素,由此可推断,云南红豆杉种子的休眠属于 Baskin 和 Baskin^[18] 休眠分类体系中的中度生理休眠类型。

导致生理休眠的原因很多,但是离体胚培养中种胚带胚乳的多少和种子的新鲜程度对云南红豆杉离体胚萌发的影响值得深入研究。本研究中,不带胚乳离体胚的萌发率显著高于带胚乳离体胚的萌发率,与赵沛基等^[13]的研究结论相反。产生这一矛盾的原因可能是试验用种新鲜程度的影响。以往研究都假定种子采集到接种的时间不影响种子的萌发率,均未注明种子的采集时间和胚的接种时间。但本研究结果表明,离体胚培养过程中所用种子的新鲜程度严重影响胚的萌发率。目前,普遍认为种子中的抑制物是导致红豆杉休眠的主要原因^[8,20,24-28]。通过研究云南红豆杉种子中抑制物含量与种子新鲜程度的关系,胚乳中抑制物含量对萌发

率的影响,可以解释产生上述矛盾的成因,这是今后云南红豆杉休眠研究的重点和方向。

参考文献(References):

- [1] 苏建荣, 张志钧, 邓疆, 李国松. 云南红豆杉的地理分布与气候关系. 林业科学研究, 2005, 18(5): 510-515.
- [2] Cragg G M, Schepartz S A, Suffness M, Grever M R. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. Journal of Natural Products, 1993, 56(10): 1657-1668.
- [3] 苏建荣, 张志钧, 邓疆. 不同树龄、不同地理种源云南红豆杉紫杉醇含量变化的研究. 林业科学研究, 2005, 18(4): 369-374.
- [4] 苏建荣, 缪迎春, 张志钧. 云南红豆杉紫杉醇含量变异及其相关的 RAPD 分子标记. 林业科学, 2009, 45(7): 26-28.
- [5] 美国农业部林务局. 美国木本植物种子手册. 李霆, 陈幼生, 译. 北京: 中国林业出版社, 1984.
- [6] 黄儒珠, 方兴添, 郭祥泉, 郑珂晖, 罗荔仙. 南方红豆杉种子的化学成分分析. 应用与环境生物学报, 2002, 8(4): 392-394.
- [7] 程广有, 唐晓杰, 高红兵, 沈熙环. 东北红豆杉种子休眠机理与解除技术探讨. 北京林业大学学报, 2004, 26(1): 5-9.
- [8] 张志权, 廖文波, 钟翎, 陈志明. 南方红豆杉种子萌发生物学研究. 林业科学研究, 2000, 13(3): 280-285.
- [9] 张艳杰, 申慧, 饶玮, 鲁顺保, 高捍东. 南方红豆杉种子生物学特性研究. 安徽农业科学, 2010, 38(1): 440-442.
- [10] 王卫斌, 王达明. 云南红豆杉. 昆明: 云南大学出版社, 2006.
- [11] 赵盛军. 云南红豆杉种子休眠原因的初步研究. 林业调查规划, 1996, (1): 44-46.
- [12] 臧新, 吕晓辉, 杨冬之, 黄象男. 2 种红豆杉的离体胚培养. 郑州大学学报: 理学版, 2006, 38(2): 107-112.
- [13] 赵沛基, 沈月毛, 彭丽萍, 甘烦远. 云南红豆杉离体胚的培养. 植物生理学通讯, 2003, 39(4): 327-329.
- [14] 王兵益, 苏建荣, 张志钧. 云南红豆杉种子贮藏过程中胚的变化. 林业科学研究, 2009, 22(1): 26-28.
- [15] 杨玲, 陈虎庚, 牛祖林, 石文雅. 浸种催芽对打破云南红豆杉种子休眠的初步研究. 湖北农业科学, 2011, 50(10): 2057-2059, 2063-2063.
- [16] Baskin J M, Baskin C C. A classification system for seed dormancy. Seed Science Research, 2004, 14(1): 1-16.
- [17] Finch-Savage W E, Leubner-Metzger G. Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist, 2006, 171(3): 501-523.
- [18] Baskin J M, Baskin C C. Some considerations for adoption of Nikolaeva's formula system into seed dormancy classification. Seed Science Research, 2008, 18(3): 131-137.
- [19] 付婷婷, 程红焱, 宋松泉. 种子休眠的研究进展. 植物学报, 2009, 44(5): 629-641.
- [20] 张雪梅, 龙雯虹, 荣剑. 红豆杉种子休眠机理及休眠解除研究进展. 西南林业大学学报, 2012, 32(5): 92-95.
- [21] 国家标准总局. GB 2772—1999, 林木种子检验规程. 北京: 中国标准出版社, 1999.
- [22] 宋松泉, 程红焱, 龙春林, 姜孝成. 种子生物学研究指南. 北京: 科学出版社. 2005.
- [23] 尚旭岚, 徐锡增, 方升佐. 青钱柳种子休眠机制. 林业科学, 2011, 47(3): 68-74.
- [24] Le Page Degivry M T. Non-acidic inhibitors and embryo dormancy in *Taxus baccata*. Physiologia Plantarum, 1977, 41(1): 85-88.
- [25] 高红兵, 吴榜华, 孙振良. 东北红豆杉种子层积过程中内源生长素和脱落酸含量的变化. 吉林林学院学报, 1998, 14(4): 187-189.
- [26] 朱念德, 刘蔚秋, 伍建军, 廖文波. 影响南方红豆杉种子萌发因素的研究. 中山大学学报: 自然科学版, 1999, 38(2): 75-79.
- [27] 黄儒珠, 郭祥泉, 方兴添, 李玉蕾. 变温层积处理对南方红豆杉种子生理生化特性的影响. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2006, 22(2): 95-98.
- [28] 张艳杰, 高捍东, 鲁顺保. 南方红豆杉种子中发芽抑制物的研究. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2007, 31(4): 51-56.