

## 云南蓝果树种子休眠与萌发特性

袁瑞玲, 向振勇, 杨文忠\*, 张珊珊

(国家林业局云南珍稀濒危特森林植物保护和繁育实验室, 云南 昆明 650201)

关键词: 云南蓝果树; 极度濒危; 种子休眠; 萌发特性

中图分类号: S723.1

文献标识码: A

### Seed Dormancy and Germination Traits of *Nyssa Yunnanensis*

YUAN Rui-ling, XIANG Zhen-yong, YANG Wen-zhong, ZHANG Shan-shan

(Key Laboratory of Rare and Endangered Forest Plants of State Forestry Administration, Kunming 650201, Yunnan, China)

**Abstract:** Understanding the seed dormancy and germination traits of *Nyssa yunnanensis* is a base to protect this extremely endangered tree species. *N. yunnanensis* is one of the national protected plants in China. The results of investigations show that three of eight existing trees bear rich fruit but have no regenerated seedlings in natural forests. The study on seed dormancy and germination attempts to unveil key factors causing regeneration failure of *N. yunnanensis*. It shows that the germination inhibitors existed in different parts of the fruit, particular in seed embryo and pannexterna, are the main factor impacting seed germination. Low water absorption of the seed resulted from obstacle of story endocarp is one of the factors causing seed dormancy. To promote seed germination, the temperature, illumination, and gibberellin acid ( $GA_3$ ) gradient tests were carried out. The results unveil that the optimal temperature for seed germination is 25 °C. Light is conducive to seed germination because germination rate from light treatment ( $12\text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ ) is higher than that from dark treatment. Seed germination percentage, germination vigor and germination index can increase by soaking with  $100 \sim 500\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $GA_3$ , and the best concentration is  $200\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**Key words:** *Nyssa yunnanensis*; critically endangered; seed dormancy; germination characteristics

云南蓝果树(*Nyssa yunnanensis* W. C. Yin)又名毛叶紫树,为蓝果树科蓝果树属落叶大乔木,主要生长于热带北缘季雨林,阳光较充足的溪边沟谷地段,为中国热带北缘的特有种<sup>[1]</sup>,是国家一级保护植物<sup>[2]</sup>,IUCN 极度濒危种<sup>[3]</sup>,目前仅在云南省西双版纳州景洪市普文镇发现2个天然种群(共8株)和1个人工种群(18株)<sup>[4]</sup>。野外考察发现,云南蓝果树天然种群植株生长良好,现存8株中的3株挂果丰硕,但林下无幼苗和幼树,自然繁殖更新能力严重衰退,种子散落后不能萌发是导致云南蓝果树天然更新困难的关键因素。

种子是植物有性繁殖和维持种群稳定的重要环节,植物种群周期中以种子形式出现的阶段称为潜在种群,种子萌发是从潜在种群转变为现实种群的关键<sup>[5]</sup>。多数濒危植物天然更新困难,都与其种子休眠和萌发特征有关<sup>[6-7]</sup>。濒危植物种子难以萌发和发芽率低的一个重要原因是种子存在休眠过程,种子休眠的主要原因大致有:(1)发芽抑制物质的存在;(2)种皮效应;(3)对温度的要求;(4)对光的要求<sup>[8]</sup>。在导致种子休眠的诸多原因中,抑制物被认为是最重要的原因之一<sup>[9]</sup>。党海山等<sup>[7]</sup>发现,毛柄小勾儿茶(*Berchemiella wilsonii* var. *pupipetiolata*)

收稿日期: 2012-11-15

基金项目: 国家林业局珍稀濒危物种野外救护与繁育项目(2012YB1001); 云南省创新人才培养项目(2009CI098)

作者简介: 袁瑞玲(1982—),女,助理研究员,硕士,现主要从事珍稀濒危特森林植物保护和繁育研究。

\* 通讯作者:男,副研究员,博士。E-mail: wzyang2004@126.com

种子的不同部位存在萌发抑制物;Sari 等<sup>[10]</sup>的研究认为,月桂(*Laurus nobilis*)的果皮和种皮中含有抑制物质;尚旭岚等<sup>[11]</sup>发现,青钱柳(*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk)果皮和种皮中含有一些活性较强的抑制萌发和生长的内源抑制物质是限制种子萌发的重要因素。研究发现沙葱(*Allium mongolicum* Regel)<sup>[12]</sup>和紫荆(*Cercis chinensis* Bunge)<sup>[13]</sup>等种子的种皮障碍是引起种子休眠的原因之一。那么,云南蓝果树果实中是否含有抑制种子萌发的物质?是否存在种皮障碍?至今未见报道。针对云南蓝果树种子萌发困难这一限制该物种更新的关键问题,目前仅有孙宝玲等<sup>[14]</sup>从萌发基质、光照、人工破坏内果皮和碱液处理几个角度对云南蓝果树种子的萌发条件做了初步的探索,其休眠机制仍不完全清楚。因此,以云南蓝果树种子为试验材料,针对是否存在发芽抑制物质及种皮障碍,其适宜萌发温度及对光的要求如何,以及如何打破种子休眠促进种子萌发等问题,研究其休眠和萌发特性,进一步探讨云南蓝果树种子难以萌发的原因,以期找出其生殖环节中的限制因素,为科学保护云南蓝果树提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试的云南蓝果树种子于2011年8月采自云南省西双版纳州普文镇。果实属核果,未成熟时为黄绿色,成熟时为紫红色。果实采回后,用水浸泡24 h,搓洗去除肉质外果皮,洗净含有坚硬内果皮的种子,用水选法除去浮在水面的瘪粒,自然阴干备用。培养箱为LRH-250-G II光照培养箱。

### 1.2 方法

1.2.1 种子内源萌发抑制物的提取和生物鉴定 参照王成霖<sup>[15]</sup>的方法并有改动。首先将剥取下的新鲜外果皮、腐烂外果皮(种子落在地上时间久了,肉质外果皮腐烂,但仍黏在坚硬内果皮上)和洗净的含有坚硬内果皮的种子放入烘箱内,70℃烘24 h,分离内果皮和种仁(含胚乳、胚和种皮)。取研碎后的种仁、内果皮和新鲜外果皮、腐烂外果皮,各加入相当于重量20倍的蒸馏水,置于50℃恒温箱内浸提48 h,过滤。90 mm培养皿中加5 mL浸提液,播大白菜种子50粒,置于25℃的恒温箱内培养,24 h后测发芽率,48 h后测定胚根长和苗高,计算简易活力指数。实验重复3次,以蒸馏水为对照。

1.2.2 种子吸水性能测定 采用称质量法测定种子的透水性。取自然阴干的云南蓝果树种子,称质量后,放入小烧杯中,加蒸馏水浸泡,室温吸胀,于不同时间取出种子,用滤纸吸干种子表面的水分,电子天平迅速称质量,记录,然后再把种子放回小烧杯中继续吸水,直至种子吸水至恒定质量。实验重复3次,每重复25粒种子。计算种子吸水率,绘制吸水曲线。

种子吸水率 = (浸种后质量 - 浸种前质量) / 浸种前重量 × 100%

1.2.3 温度、光照对种子萌发的影响 发芽温度设25、28、30、35℃,每天光照12 h,2 000 lx条件下,恒温进行发芽测定,种子播种于90 mm培养皿中,以双层滤纸作为发芽床。在最适温度条件下设每天12 h光照和连续黑暗2种处理进行对比试验,黑暗处理为将培养皿用4层报纸包裹,放入厚纸盒中遮光,进行萌发。各处理种子均先用质量分数为30%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>消毒5~8 min,然后蒸馏水冲洗4遍,每处理3次重复,每重复20粒种子,最长培养50 d,统计发芽率。

1.2.4 赤霉素(GA<sub>3</sub>)对种子萌发的影响 分别用100、200、300、500 mg·L<sup>-1</sup>的赤霉素溶液浸泡种子24 h后,倾去浸泡液,用蒸馏水冲洗3次,置于以蒸馏水湿润的培养皿内双层滤纸上,28℃恒温箱内进行萌发实验。每处理3次重复,每重复40粒种子。萌发过程中每24 h观察1次,最长培养50 d,计算发芽指数、发芽势,统计发芽率。

1.2.5 数据处理与统计分析 种子萌发以胚根突破种皮为标准。种子萌发指标的统计参考顾增辉等<sup>[16]</sup>的方法。

发芽率 = 发芽种子数 / 供试种子数 × 100%

发芽指数(GI) =  $\sum (G_t / D_t)$

式中:G<sub>t</sub>为第t天发芽的种子数;D<sub>t</sub>为相应的发芽天数。

发芽势 = 种子发芽数达到高峰时的正常发芽种子数 / 供试种子数 × 100%

简易活力指数 = 发芽率 × 生长势(胚根长 + 苗长)

采用SPSS17.0统计软件进行方差分析,对各处理间方差进行齐性Levene检验,各组方差齐时(P > 0.05),用LSD法进行多重比较,方差不齐时(P < 0.05),采用Tamhane法进行多重比较<sup>[17]</sup>,结果以平均数 ± 标准差(Mean ± SD)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 种子发芽抑制物的生物鉴定

云南蓝果树种子各部位浸提液对白菜种子萌发的检测结果见表1。表1显示:云南蓝果树种子的不同部位都存在抑制种子发芽的物质。

云南蓝果树种子浸提液对白菜种子发芽率影响的方差分析结果表明,除内果皮浸提液处理与对照呈显著差异( $P < 0.05$ )外,其他处理与对照相比差异均达极显著水平( $P < 0.01$ );各处理间相比,对白菜种子发芽率抑制作用最强的是种仁浸提液,最弱的是内果皮浸提液,两处理间差异显著,其他处理间没有显著差异;即种子各部位浸提液对白菜种子发芽率影响的强弱顺序依次为:种仁 > 外果皮(鲜) = 外果皮(腐) ≥ 内果皮。

对白菜种子胚根生长和苗高生长的抑制作用:

各处理与对照相比,各处理间均达极显著差异( $P < 0.01$ ),其中,外果皮(鲜)浸提液的抑制作用最强,完全抑制了白菜种子的胚根和苗高生长,至实验结束,白菜种子萌发维持在胚根突破种皮的状态;腐烂外果皮的抑制作用比新鲜外果皮稍弱一点,但仅有6%的白菜种子出现胚根和苗高的生长,且根长和苗高分别仅为对照的20.7%、16.7%;其次是种仁浸提液,在实验中观察到白菜幼苗的胚根全部褐化,胚根无根毛,根茎处还出现一定程度的膨大现象,这些都是畸形苗和异状苗的表现形式;抑制作用最弱的是内果皮。种子各部位的浸提液对白菜种子胚根和苗高生长的抑制作用强度依次为:外果皮(鲜) > 外果皮(腐) > 种仁 > 内果皮(表1)。简易活力指数的变化趋势与胚根长及苗高的一致。说明萌发抑制物的存在是云南蓝果树种子难以萌发和发芽率极低的重要原因。

表1 云南蓝果树种子浸提液对白菜种子萌发的影响

| 浸提部位   | 发芽率/%            | 胚根长/cm        | 苗高/cm         | 简易活力指数          |
|--------|------------------|---------------|---------------|-----------------|
| 种仁     | 72.00 ± 2.67 Bc  | 0.43 ± 0.19 C | 0.34 ± 0.12 C | 0.547 ± 0.200 C |
| 内果皮    | 76.78 ± 2.01 ABb | 0.87 ± 0.39 B | 0.64 ± 0.31 B | 1.158 ± 0.390 B |
| 外果皮(鲜) | 75.22 ± 0.69 Bbc | -             | -             | -               |
| 外果皮(腐) | 75.45 ± 2.91 Bbc | 0.29 ± 0.08 D | 0.14 ± 0.05 D | 0.330 ± 0.088 D |
| 对照     | 83.22 ± 3.34 Aa  | 1.40 ± 0.51 A | 0.84 ± 0.34 A | 1.865 ± 0.553 A |

注:表中数据同一列中不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ ),下同。

### 2.2 种子吸水性能

云南蓝果树种子吸水后的吸水曲线见图1,种子在开始吸水的0.5 h内,吸水速率较快,呈直线上升,实验过程中观察到0.5 h内,种子表面产生大量细小气泡,也说明种子正快速吸水,0.5 h吸水量达总吸水量的41.16%;之后吸水速率减缓,相对平缓上升,24 h吸水量达总吸水量的89%,24 h后吸水速率减慢,直至达到饱和,从36~72 h,吸水率一直保持在17.8%左右,说明36 h种子达到吸水饱和。由此表明:云南蓝果树种子能透水,但吸水饱和时吸水率不到20%,说明存在一定的透水障碍<sup>[18]</sup>。种皮的机械障碍作用会影响种子的吸水、透气性,最终影响种子萌发<sup>[19]</sup>,因此,云南蓝果树种子的吸水情况对种子萌发有一定的影响,种子存在一定程度的机械休眠。

### 2.3 温度、光照对云南蓝果树种子萌发的影响

在实验所设25~35℃范围内,云南蓝果树种子均能萌发,萌发温度越高,种子的发芽率越低,25℃发芽率显著( $P < 0.05$ )高于其他3种温度,其他3

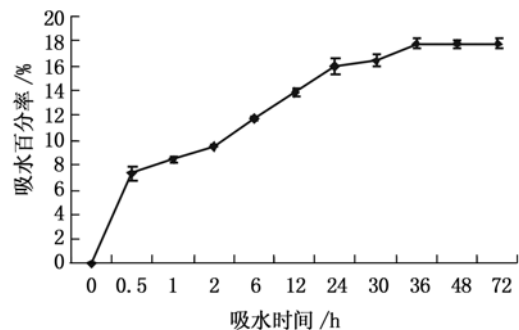


图1 云南蓝果树种子吸水率随浸泡时间的变化

种温度间差异不明显(图2)。实验过程中发现,当温度≥30℃时,种子极少萌发,种子内果皮变色,由淡黄色变成黄棕色;50 d发芽期后,25℃处理下没有发霉但仍未萌发的种子,剥开发芽瓣观察,种仁仍是白色,对剥开发芽瓣的种子继续培养,发现仍能正常发芽,但温度超过30℃后,剥开种子发芽瓣发现种仁变成棕褐色,继续培养很快腐烂。因此,在实验所设温度范围内,25℃是云南蓝果树种子的最适发芽温度。

在种子最适发芽温度 25 ℃ 条件下,光照和连续黑暗处理对比实验(图 2)发现:种子的发芽率差异明显,光照处理的发芽率达 68.3%,而黑暗处理的

发芽率只有 20%,说明种子在黑暗条件下也能萌发,但光照利于种子萌发。

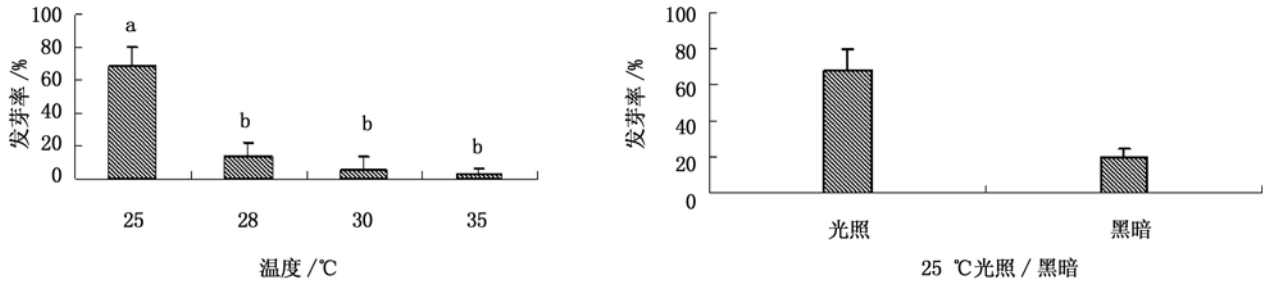


图 2 温度和光照对云南蓝果树种子发芽率的影响

#### 2.4 赤霉素 (GA<sub>3</sub>) 处理对种子萌发的影响

不同浓度的 GA<sub>3</sub> 溶液可以不同程度的促进云南蓝果树种子的萌发,提高发芽率、发芽指数和发芽势(表 2);随着 GA<sub>3</sub> 浓度的增大,种子的发芽率和发芽指数先升高后降低,其中,经 200 mg · L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 处理的种子的发芽率和发芽指数最高,显著 ( $P < 0.05$ ) 高于清水对照,是对照的 2.25 倍,发芽指数比

对照高出 129%。虽然不同 GA<sub>3</sub> 浓度处理间种子的发芽率、发芽指数及发芽势没有显著差异,GA<sub>3</sub> 浸种后开始发芽的时间和萌发高峰期也没有明显提前,但结合各处理与对照间发芽率和发芽指数的方差分析结果还是可以看出:200 mg · L<sup>-1</sup> 是促进云南蓝果树种子萌发的最适 GA<sub>3</sub> 浓度,GA<sub>3</sub> 浓度太低或太高效果都不理想。

表 2 赤霉素对云南蓝果树种子萌发的影响

| GA <sub>3</sub> 浓度/(mg · L <sup>-1</sup> ) | 开始发芽天数/d | 萌发高峰期/d | 发芽势/%         | 发芽指数           | 发芽率/%            |
|--|----------|---------|---------------|----------------|------------------|
| 100  | 13       | 18      | 10.00 ± 2.50  | 0.39 ± 0.12 ab | 19.17 ± 6.29 ab  |
| 200  | 14       | 18      | 18.33 ± 3.81  | 0.64 ± 0.08 a  | 30.00 ± 4.33 a   |
| 300  | 11       | 18      | 20.00 ± 6.61  | 0.63 ± 0.15 a  | 25.83 ± 5.20 ab  |
| 500  | 11       | 18      | 16.67 ± 10.10 | 0.53 ± 0.26 ab | 21.67 ± 10.41 ab |
| 0(CK)                                      | 13       | 18      | 8.33 ± 6.29   | 0.28 ± 0.20 b  | 13.33 ± 8.78 b   |

### 3 结论与讨论

云南蓝果树种子的不同部位存在水溶性萌发抑制物,尤其是外果皮和种仁中的抑制物可能是影响云南蓝果树种子萌发的重要因素。外果皮和种仁的水浸提液不仅对白菜种子的发芽率有极显著的抑制作用,外果皮水浸提液还几乎完全抑制了胚根和苗高的生长,种仁水浸提液则造成幼苗出现畸形生长等情况;所以云南蓝果树种子含有抑制萌发的水溶性内源抑制物质,这可能是导致该物种濒危的重要原因。种子各部位内含物的抑制作用有着很大的差异,说明种子各部位所含抑制物的种类、含量不同,种子中内源抑制物的种类、含量与云南蓝果树种子休眠的关系,还有待于进一步研究。

云南蓝果树坚硬的内果皮是影响种子萌发的另

一原因。在种子吸水萌发阶段,当吸水率达到种子自身质量的 35% ~ 37% 时,种子便能正常萌发,按照卡恩<sup>[18]</sup>的理论,种子吸水率达到 40% 就达到种子萌发的生理需求。云南蓝果树种子在吸水达到饱和时吸水率不足 20%,表明在水分充足且浸种时间足够长的条件下,内果皮的吸水障碍导致种子吸水难以满足其萌发生理需求。云南蓝果树天然种群林下灌草密集,种子散落后难以接触土壤水分,限制了种子萌发更新的进程,同时,坚硬致密的种皮对胚的机械限制会阻碍种子萌发<sup>[20]</sup>。在 GA<sub>3</sub> 对云南蓝果树种子萌发影响试验中,至实验结束时仍有一部分种子没有萌动,人工去除内果皮尖端一侧的三角形萌发瓣<sup>[21]</sup>后继续培养,这些种子能正常发芽生长,与人工破坏内果皮能提高云南蓝果树种子发芽率<sup>[14]</sup>的研究结果相符,说明云南蓝果树内果皮对种

子萌发有一定的机械限制。

适宜的温度和光照是云南蓝果树种子萌发的必要条件。基于在萌发温度为 19 ~ 24 °C 条件下,云南蓝果树种子的萌发率为 60.53%<sup>[14]</sup>,本研究所设 25 ~ 35 °C 温度范围内,25 °C 时云南蓝果树种子的萌发率为 68.3%,可以看出,云南蓝果树种子的适宜萌发温度为 25 °C;同时,光照试验结果表明:光照利于种子萌发;然而,云南蓝果树天然种群林下灌草密集、光照不足,阻碍了种子萌发和自然更新。

用赤霉素 GA<sub>3</sub> 处理是打破云南蓝果树种子休眠的有效措施。GA<sub>3</sub> 处理能促进种子内部的生理生化变化,使细胞分裂分化而促进种子发芽,打破种子的休眠<sup>[22]</sup>,采用 GA<sub>3</sub> 处理的云南蓝果树种子,以 200 mg · L<sup>-1</sup> 效果最好,发芽率比清水对照高出 125%,表明用 GA<sub>3</sub> 处理比人工破坏内果皮(发芽率提高 7.4%)<sup>[14]</sup>更为有效。针对种皮含有抑制物、存在机械障碍及透性障碍的种子,生产上可采用一种<sup>[23-26]</sup>或多种方法来解除其休眠<sup>[13,27]</sup>,对极度濒危的云南蓝果树,应在更加深入研究的基础上,探寻更多解除其种子休眠的办法,为保护和繁育云南蓝果树提供配套技术措施。

#### 参考文献:

- [1] 傅立国. 中国珍稀濒危植物[M]. 上海:上海教育出版社,1989
- [2] 于永福. 中国野生植物保护工作的里程碑—《国家重点保护野生植物名录(第一批)》出台[J]. 植物杂志,1999, 151(5): 3-11
- [3] 李玉媛,司马永康,方波,等. 云南省国家重点保护野生植物资源的现状与评价[J]. 云南植物研究,2003, 25(2): 181-191
- [4] 陈伟,史富强,杨文忠,等. 云南蓝果树的种群状况及生态习性[J]. 东北林业大学学报,2011, 39(9): 7-19, 61
- [5] 李鸣光,张炜银,王伯逊,等. 微甘菊种子萌发特性的初步研究[J]. 中山大学学报,2002, 4(6): 57-59
- [6] 陈发菊,梁宏伟,王旭,等. 濒危植物巴东木莲种子休眠与萌发特性的研究[J]. 生物多样性,2007, 15(5): 492-499
- [7] 党海山,张燕君,江明喜,等. 濒危植物毛柄小勾儿茶种子休眠与萌发生理的初步研究[J]. 武汉植物学研究,2005, 23(4): 327-331
- [8] 傅家瑞. 种子生理[M]. 北京:科学出版社,1985:207
- [9] Bewley J D, Black M. Seeds: Physiology of Development and Germination[M]. New York: Plenum Press, 1994: 199-257
- [10] Sari A O, Oguz B, Bilgic A. Breaking seed dormancy of laurel (*Laurus nobilis* L.) [J]. New Forests, 2006, 31(3): 403-408
- [11] 尚旭岚,徐锡增,方升佐. 青钱柳种子休眠机制[J]. 林业科学, 2011, 47(3): 68-74
- [12] 王晓娟,张凤兰,杨忠仁,等. 沙葱种皮特性、种胚及种子浸提液与种子休眠的关系[J]. 植物生理学报, 2011, 47(6): 589-594
- [13] 孙秀琴,安蒲媛,李庆梅. 紫荆种子休眠解除及促进萌发的研究[J]. 林业科学研究, 1998, 11(4): 407-411
- [14] 孙宝玲,张长芹,周凤林,等. 极度濒危植物:云南蓝果树的种子形态和不同处理条件对种子萌发的影响[J]. 云南植物研究, 2007, 29(3): 351-354
- [15] 王成霖. 江南桫欏木种子休眠和萌发的初步研究[J]. 植物生理学通讯, 1986, 22(5): 31-34
- [16] 顾增辉,徐本美,邓光华. 测定种子活力方法之探讨(II)发芽的生理测定法[J]. 种子, 1982(3): 11-17
- [17] 苏金明,傅荣华,周建斌,等. 统计软件 SPSS for Windows 实用指南[M]. 北京:电子工业出版社, 2000: 1-417
- [18] 卡恩 A A. 种子休眠和萌发的生理生化[M]. 北京:农业出版社, 1989: 37-40
- [19] 王友凤,马祥庆. 林木种子萌发的生理生态学机理研究进展[J]. 世界林业研究, 2007, 20(4): 19-23
- [20] 李蓉,叶勇. 种子休眠与破眠机理研究进展[J]. 西北植物学报, 2005, 25(11): 2350-2355
- [21] Edye R H. Morphological and paleobotanical studies of the *Nyssaceae* I: A survey of the modern species and their fruits [J]. Journal of the Arnold Arboretum, 1963, 44: 1-59
- [22] 孙艳,崔鸿文,李文平. 几种化学物质浸种对辣椒种子发芽率的影响[J]. 种子, 1995(5): 17-19
- [23] 沈琼桃. 濒危植物白桂木种子萌发生理研究[J]. 西北林学院学报, 2011, 26(2): 111-113
- [24] 陈伟,杨楼,马绍宾. 濒危药用植物桃儿七种子的萌发特性初探[J]. 种子, 2008, 27(4): 49-51
- [25] 周元. 滇青冈种子的萌发[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(4): 325-326
- [26] Sadeghi S, Ashrafi Z Y, Tabatabai M F, et al. Study methods of dormancy breaking and germination of common madder (*Rubiatinctorum* L.) seed in laboratory conditions [J]. Botany Research International, 2009, 2(1): 7-10
- [27] 李淑娴,刘菁菁,田树霞,等. 乌柏种子休眠原因及解除方法研究[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2011, 35(5): 1-4