

文章编号:1000-8551(2020)02-0409-09

甘肃贝母种子水提取液对小白菜的化感效应

许美玲¹ 郭凤霞^{1,*} 陈垣^{1,2,*} 武睿¹

(¹甘肃农业大学,生命科学技术学院,农学院/甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室/甘肃省中药材规范化生产技术创新重点实验室/甘肃省药用植物栽培育种工程研究中心/甘肃省干旱生境作物学重点实验室,甘肃 兰州 730070;

² 甘肃省特色药用植物资源保护与利用工程实验室/甘肃省特色药材规范化可追溯栽培工程技术研究中心/

甘肃中天药业有限责任公司,甘肃 定西 748100)

摘要:为进一步探明甘肃贝母种子后熟休眠机理,本研究对其种子不同后熟阶段水提取液不同质量浓度下小白菜种子的生物活性进行测定。结果表明,甘肃贝母种子水提取液对小白菜种子萌发及生长具有明显影响,影响程度随其所处后熟阶段的不同而异。在形态后熟阶段,与对照相比,水提取液浓度为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,对小白菜种子发芽率和发芽势均有促进作用,但随着水提取液浓度的提高,小白菜种子萌发和幼苗生长均表现明显的化感抑制效应,化感效应指数 RI 值逐渐降低,当水提取液浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,化感抑制效应达到显著水平 ($P < 0.05$)。在生理后熟阶段表现出不同的化感效应,各处理组小白菜种子的发芽率均低于对照,但随着水提取液浓度的提高,化感效应呈现先增大后减小的趋势,当水提取液浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,小白菜苗高、根直径与单苗鲜重均较对照显著提高 ($P < 0.05$)。综上所述,甘肃贝母种子内源化感抑制物质在后熟不同阶段具有明显差异,从形态后熟转入生理后熟后,种子内源化感抑制物明显减少。本研究结果为进一步探究甘肃贝母种子中内源抑制物质的种类特性及生产实践中打破其种子休眠提供了科学依据和理论支撑。

关键词:甘肃贝母;小白菜;水提取液;化感抑制

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2020.02.0409

甘肃贝母(*Fritillaria przewalskii* Maxim.)系被子植物百合科贝母属多年生草本药用植物,是药材川贝母的主要基原植物之一,也是我国名贵的野生药材,干燥鳞茎入药,俗称“岷贝”,具有清热润肺、化痰止咳、散结消痈等多种功效,主治肺热燥咳、干咳少痰、阴虚劳嗽等症^[1-3]。甘肃贝母是贝母属中药用价值最高的一个类群,现已被广泛应用于多种复方中成药和注射针剂^[4],但由于甘肃贝母野生种群自然更新速度缓慢,生长期4年,产量很低,加之过度采挖、环境恶化等,药材蕴藏量锐减,人工栽培难度又较大,已处于濒危状态,被《中国珍稀濒危植物名录》列为国家三级保护植物^[5-7]。

甘肃贝母种子繁殖系数高,具有不伤害药用部位的特点,是生产上快速解决甘肃贝母供应困难的有效

途径^[8]。然而,甘肃贝母种子是具有后熟特性的原胚型种子,蒴果充分成熟后种子尚无完整的胚结构,仅具胚乳状的内含物,需要经过完全的后熟过程才能吸胀发芽,属于形态生理双重休眠类型^[9-10]。种子打破休眠对植物生长发育至关重要,由种子萌发内源抑制物即化感物质引起的休眠是最常见的种子休眠类型之一^[11-14]。因此,进一步探究甘肃贝母种子的后熟休眠机理及打破休眠促进萌发的途径,对其规范化生产具有重要意义。

植物化感作用(allelopathy)包括自毒、自促、化感偏害和互惠作用,是自然界中普遍存在的现象^[15]。马令法等^[16]研究表明,不同浓度青稞秸秆水浸提液对甘肃贝母种子发芽具有影响,适当把握秸秆还田量,可以

收稿日期:2018-10-29 接受日期:2019-02-24

基金项目:国家自然科学基金地区基金(31660158,31360316),甘肃省现代农业中药材产业体系首席专家(GARS-ZYC-1),甘肃省中药材产业科技攻关(GYC12-06)

作者简介:许美玲,女,主要从事药用植物生态生理研究。E-mail: 2352486618@qq.com

*** 通讯作者:**郭凤霞,女,研究员,主要从事药用植物生态生理研究与教学。E-mail: guofx@gsau.edu.cn;

陈垣,男,教授,主要从事药用植物资源与利用研究。E-mail: cygex1963@163.com。同为通讯作者。

降低化感作用对甘肃贝母发芽的抑制。李志亮等^[17]采用伊贝母种子浸液对小麦生长化感效应研究,证实其种子内存在某类抑制物质,且对其本身后熟过程和萌发存在抑制作用,并提出种子处理的方法。化感物质是化感作用的媒介,主要是植物的次生代谢物质通过抑制种胚生长、破坏种子亚细胞结构、植物激素及活性氧的代谢平衡,从而对种子萌发产生影响^[18]。

甘肃贝母等川贝母种子具有严格的后熟和休眠特性,郭凤霞等^[19]研究揭示了甘肃贝母种子的灌浆特性,常彦莉等^[9]研究了经后熟的甘肃贝母种子的吸水发芽特性,这些研究解决了野生甘肃贝母抚育和驯化栽培的关键技术,但至今对甘肃贝母种子后熟过程中是否存在内源萌发抑制物质及其活性的消长规律等鲜见相关报道。因此,本试验通过对甘肃贝母种子不同后熟阶段内源化感抑制物质的提取和生物活性测定,旨在揭示其种子内是否存在此类物质以及抑制活性的强弱,从而确定种子休眠的主要原因,为进一步探明甘肃贝母种子中内源抑制物质的种类特性及后熟脱休眠机理奠定基础,为生产实践中打破其种子休眠提供理论支撑,促进濒危药用植物甘肃贝母种质资源的可持续化利用。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试甘肃贝母种子于 2017 年 7 月采集于野生甘肃贝母,采集地点为甘肃省漳县金钟镇大庄村,经甘肃农业大学药用植物资源与鉴定实验室鉴定。将甘肃贝母植株采摘后带回实验室,将种子从果实中搓揉下来,25℃ 蒸馏水清洗之后,用多菌灵 1 000 倍液消毒,再用无菌水洗净,参考常彦莉等^[9]的方法进行后熟处理。

受体材料为小白菜品种北京 60,其种子纯度 ≥ 96.0%、净度 ≥ 98.0%、发芽率 ≥ 85%、含水量 ≤ 7.0%,购自兰州蔬菜种子供应站。

1.2 不同后熟阶段甘肃贝母种子水提取液的制备

在甘肃贝母后熟过程中,取形态和生理后熟两个阶段甘肃贝母种子,洗去表面沙粒后用滤纸吸干表面水分,备用。水提取液的制备参考郑景瑶等^[20]的方法。称取 10.0 g 种子于研钵中,经液氮冷冻后研磨,置于 500 mL 烧杯中,按 1:25 (m/v) 的比例用蒸馏水提取,40 Hz 超声提取 30 min 后,用保鲜膜封口并在室温 (20~25℃) 下静置浸泡 24 h。粗提液进行二重过滤后,获得 40 mg·mL⁻¹ 的母液,储存于 4℃ 低温冰箱中,用于小白菜种子发芽试验。使用前参考郑景瑶等^[20]的方

法,进行提取液浓度梯度的稀释准备。在上述甘肃贝母种子提取液母液基础上,分别吸取部分母液加蒸馏水依次稀释成 0、2.5、5.0、10.0、20.0 和 40.0 mg·mL⁻¹ 5 个质量浓度的水提取液用于小白菜种子发芽试验。

1.3 化感作用的生物活性测定

参照郭凤霞等^[21]的方法。选取颗粒饱满、大小一致的小白菜种子 900 粒,分成 6 组,每组 150 粒,3 次重复,每重复 50 粒。采用培养皿 (直径 9 cm) 双层滤纸法,各处理以 6.0 mL 对应质量浓度的上述甘肃贝母种子提取液浸湿进行发芽试验,对照组 (CK) 加等量蒸馏水浸湿。发芽试验采用完全随机区组设计,在 25℃ GTOP-260Y 型恒温培养箱 (浙江托普仪器有限公司) 中进行,每天定时更换 3.0 mL 对应提取液,从第 2 天开始每天记录小白菜种子的萌发情况,直至发芽结束 (连续 3 d 不再发芽)。按照公式计算发芽率 (germination ratio, GR)、发芽势 (germination energy, GE)、发芽指数 (germination index, GI)、发芽活力指数 (vigor index, VI)^[9,22]:

$$GR = (\text{正常发芽的种子数} / \text{供试种子数}) \times 100\% \quad (1)$$

$$GE = (\text{第 2 天发芽种子数} / \text{供试种子数}) \times 100\% \quad (2)$$

$$GI = \sum (G_t / D_t) \quad (3)$$

$$VI = \text{发芽指数} \times \text{胚根长} \quad (4)$$

式中, G_t 为第 t 天的发芽种子数, D_t 为相应发芽天数,发芽种子的判定标准为小白菜胚根突破种皮,且伸长长度达到种子直径的 1/2 为标准。

发芽结束,从各处理培养皿中随机抽样 10 株小白菜幼苗,用吸水纸吸干表面水分,用游标卡尺 (0.01 mm) 测定苗高、幼根长、幼根直径,用电子天平 (0.000 1 g) 称量单苗鲜重。

采用 DDS-11A 型电导率仪 (上海雷磁仪器厂) 测定电导率。取各浓度水提取液处理下生长一致的小白菜幼苗,去离子水冲洗干净,用滤纸吸干表面残留水分后,置于试管中,加入 4 mL 去离子水,真空抽气 20 min 后,立即测定初始电导率 d_1 ,然后将试管加盖放入沸水浴中加热 20 min,放至室温后再测定浸出液电导率 d_2 ^[23]。按照公式计算相对电导率 (d_3):

$$d_3 = d_1 / d_2 \times 100\% \quad (5)$$

采用化感效应指数 (response index, RI) 度量化感作用的类型和强度^[24]。综合化感效应指数 (comprehensive response index) 是指同一处理下供体植物对同一受体植物各测试项目 RI 的算术平均值,能反映化感效应的强弱^[25]。按照公式计算 RI:

$RI = 1 - C/T \ (T \geq C); RI = T/C - 1 \ (T < C)$ (6)

式中,C 为各指标对照值,T 为各指标处理值。RI >0 为促进作用,RI <0 为抑制作用,设定对照的 RI 值为 0,绝对值的大小与化感作用强度一致。

1.4 数据处理

采用 Microsoft Office Excel 2010 制图,SPSS 19.0 统计软件进行方差分析,试验数据均以平均值±标准差表示。处理间多重比较采用 Duncan 法。

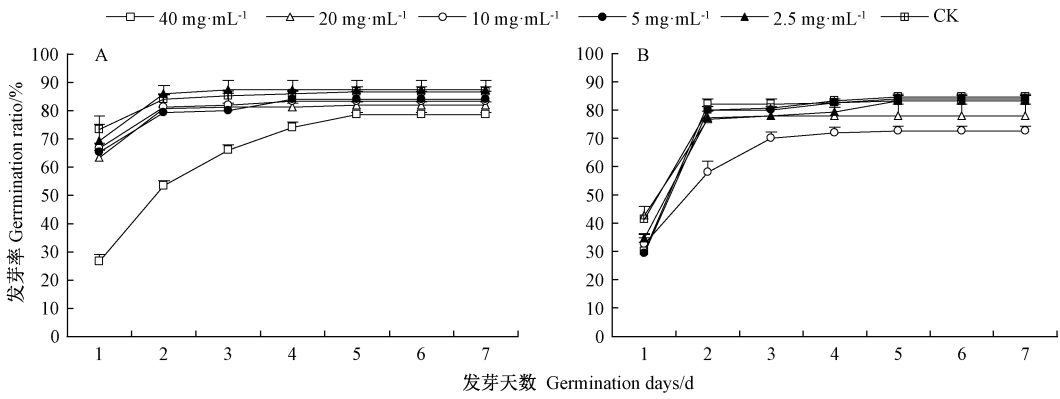
2 结果与分析

2.1 不同阶段甘肃贝母种子水提取液对小白菜种子萌发进程的影响

由图 1 可知,不同后熟阶段甘肃贝母种子不同浓度水提取液对小白菜种子萌发进程和终发芽率均具有显著影响($P < 0.05$),其影响趋势在不同阶段表现不一致。在不同浓度甘肃贝母种子水提取液条件下,小白菜种子均从着床后第 2 天开始萌发,第 8 天发芽全部结束,发芽持续 7 d。发芽初期(第 1~第 4 天),一定浓度的水提取液对小白菜种子萌发有影响,而从第 5 天开始,各处理种子发芽率达到平衡,并持续到发芽终期,其中,形态

后熟阶段 $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和生理后熟阶段 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的处理对小白菜种子终发芽率具有显著影响($P < 0.05$)。

形态后熟阶段甘肃贝母种子水提取液中,CK、2.5、5、10、20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 各处理组种子的发芽率在发芽第 1 天分别达到 73.3%、69.3%、65.3%、66.7%、63.3%,当水提取液浓度达到 $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,小白菜种子的萌发进程较 CK 明显后延(图 1-A)。小白菜种子的发芽速率随着甘肃贝母水提取液浓度的升高而呈现逐渐减缓的趋势,且水提取液浓度越高对萌发速度的影响越大。而生理后熟阶段各浓度水提取液处理对小白菜种子萌发的影响未表现出通常化感作用所具有的促进或抑制作用规律,而是单一的促进作用,0~5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 是一个作用区间,10~40 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 是另一个作用区间,当水提取液浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,小白菜种子发芽率在整个萌发过程中持续低于 CK(图 1-B)。在发芽第 2 天,CK、2.5、5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理组种子的发芽率分别达到 80%、77.3%、80%,浓度效应不明显,而 10、20、40 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理组种子的发芽率分别达到 58%、76.7%、82%,其中以 $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理的促进作用更明显,表明此阶段水提取液中含有能够促进小白菜种子萌发的物质,并且需要水提取液浓度大于 $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,才可产生正向的生理效应。



注:A:形态后熟;B:生理后熟。
Note: A: Morphologic after-ripening. B: Physiological after-ripening.
图 1 不同后熟阶段甘肃贝母种子水提取液对小白菜种子萌发进程的影响

Fig.1 Effects of aqueous extracts from different after-ripening stages of *F. przewalskii* on seeds germination process of *B. chinensis*

2.2 不同阶段甘肃贝母种子水提取液对小白菜种子发芽特性的影响

由表 1 可知,形态后熟与生理后熟阶段甘肃贝母种子水提取液对小白菜种子发芽的作用有所差异,在两个阶段中其变化趋势不同,对发芽活力指数影响最明显。在形态后熟阶段,小白菜种子的发芽率和发芽势均随着甘肃贝母种子水提取液浓度的增大呈现低浓

度促进高浓度抑制的双重作用,但对其发芽指数和发芽活力指数均表现单一的抑制作用。当水提取液浓度为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,种子发芽率和发芽势均达到最大值,较 CK 分别提高了 0.76%、2.38%,对应 RI 值分别为 0.008、0.023,显著高于 $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理组($P < 0.05$)。当水提取液浓度大于 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,对小白菜种子萌发开始表现出抑制作用($RI < 0$),其发芽率和

发芽势均随着水提取液浓度增大而逐渐降低,与 CK 相比,5、10、20、40 mg·mL⁻¹处理组小白菜种子发芽率分别降低 3.08%、3.85%、5.39%、9.23%,发芽势分别降低 5.56%、3.18%、3.96%、36.51%,抑制作用与其浓度呈正比。不同浓度甘肃贝母种子水提取液对小白菜种子发芽指数及活力指数均表现为抑制作用(RI<0),且各处理的发芽活力指数与 CK 之间均达到差异显著水平($P<0.05$)。当水提取液浓度升至 40 mg·mL⁻¹时,小白菜种子的化感抑制作用最强,发芽率、发芽势、发芽指数以及发芽活力指数均较 CK 显著降低 9.23%、36.51%、40.60%、85.96% ($P<0.05$),RI 值分别为-0.102、-0.575、-0.684、-6.124。

在生理后熟阶段中,小白菜种子的发芽特性均异于形态后熟阶段。不同浓度水提取液处理对小白菜种子发芽率和发芽指数均表现出抑制作用(RI<0),发芽率从高到低依次为 CK>5 mg·mL⁻¹>40 mg·mL⁻¹>2.5 mg·mL⁻¹>20 mg·mL⁻¹>10 mg·mL⁻¹,发芽指数为 CK>20 mg·mL⁻¹>2.5 mg·mL⁻¹>40 mg·mL⁻¹>5 mg·mL⁻¹>10 mg·mL⁻¹,但随着水提取液浓度的增大,处于 0~5 mg·mL⁻¹阶段时,对小白菜种子发芽率和发芽指数均表现为抑制作用,在 10 mg·mL⁻¹时,对其各发芽指标抑制作用均达到最强,10~40 mg·mL⁻¹时,各项发芽指标的抑制作用逐渐减弱。水提取液浓度为 5 mg·mL⁻¹时,小白菜种子发芽活力指数为 117.04,高于 CK,RI 值为 0.084,当水提取液浓度增加至 10 mg·mL⁻¹时,对

小白菜种子发芽率、发芽势、发芽指数和发芽活力指数的抑制作用均达到最大,与 CK 相比分别降低 19.69%、27.50%、19.18%、12.01%,其 RI 值分别为-0.245、-0.379、-0.237、-0.137。生理后熟阶段水提取液对小白菜种子发芽率虽均表现为抑制作用(RI<0),但水提取液浓度超过 10 mg·mL⁻¹后浓度梯度效应表现明显,种子发芽率和发芽势均随着水提取液浓度增大而逐渐升高,不同浓度水提取液处理的小白菜种子发芽率与 CK 之间差距逐渐缩小,分别为 19.69%、7.88%、1.58%;当水提液浓度为 20 mg·mL⁻¹时,虽然对小白菜种子发芽率、发芽势和发芽指数均有抑制,但是显著提高了其发芽活力指数。同时,除 10 mg·mL⁻¹处理组的发芽率、发芽势和发芽指数以及 20 mg·mL⁻¹和 40 mg·mL⁻¹处理组的发芽活力指数与 CK 相比达到差异显著水平($P<0.05$)外,其余指标与 CK 均无显著差异。

由各指标的 RI 值可知,不同萌发指标对甘肃贝母化感效应的影响大小不同。形态后熟阶段,每个处理 RI 值均为发芽指数>发芽活力指数,由此可见,发芽活力指数对此阶段甘肃贝母水提取液的化感效应最敏感,发芽指数次之。生理后熟阶段,当水提液浓度低于 10 mg·mL⁻¹时,发芽指数表现最敏感;水提液浓度为 10 mg·mL⁻¹时,发芽势敏感作用最强;水提液浓度为 10~40 mg·mL⁻¹时,发芽活力指数对化感作用最敏感,说明水提液浓度大于 10 mg·mL⁻¹,主要影响小白菜种子的生长量。

表 1 不同后熟阶段甘肃贝母种子水提取液对小白菜种子萌发的影响

Table 1 Effects of aqueous extracts from different after-ripening stages of <i>F. przewalskii</i> on seeds germination of <i>B. chinensis</i>									
后熟阶段 After-ripening stages	浓度 Concentration /(mg·mL ⁻¹)	发芽率 GR/%	RI	发芽势 GE/%	RI	发芽指数 GI	RI	发芽活力 指数VI	RI
形态后熟 Morphologic after-ripening	CK	86.67±3.06a	0	84.00±3.46a	0	39.70±1.92a	0	176.53±8.55a	0
	2.5	87.33±5.77a	0.008	86.00±5.29a	0.023	39.05±3.86a	-0.017	100.22±9.90b	-0.761
	5.0	84.00±0.00ab	-0.032	79.33±3.06a	-0.059	36.78±2.18a	-0.079	77.71±4.62c	-1.272
	10.0	83.33±6.11ab	-0.040	81.33±7.57a	-0.033	37.28±2.45a	-0.065	82.50±5.42c	-1.140
	20.0	82.00±2.00ab	-0.057	80.67±1.15a	-0.041	36.18±1.49a	-0.097	66.53±2.73d	-1.653
	40.0	78.67±1.15b	-0.102	53.33±3.06b	-0.575	23.58±1.38b	-0.684	24.78±1.45e	-6.124
生理后熟 Physiological after-ripening	CK	84.67±4.16a	0	80.00±4.00a	0	30.91±1.24a	0	107.17±4.30cd	0
	2.5	80.00±8.00a	-0.058	77.33±7.02a	-0.035	28.68±1.62ab	-0.078	114.86±6.49bc	0.067
	5.0	84.00±2.00a	-0.008	80.00±2.00a	0.000	27.80±2.49ab	-0.112	117.04±10.49abc	0.084
	10.0	68.00±9.17b	-0.245	58.00±6.93b	-0.379	24.98±0.57b	-0.237	94.29±2.16d	-0.137
	20.0	78.00±7.21ab	-0.086	76.67±8.33a	-0.043	30.05±2.66a	-0.029	133.90±11.84a	0.200
	40.0	83.33±3.06a	-0.016	82.00±3.46a	0.024	28.15±3.50ab	-0.098	132.19±16.41ab	0.189

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。
Notes: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level. The same as following.

2.3 不同阶段甘肃贝母种子水提取液对小白菜幼苗生长发育的影响

不同阶段甘肃贝母种子水提取液对小白菜幼苗生长发育也具有不同影响,影响趋势在两个阶段中表现不一致。由表 2 可知,发芽结束后,不同阶段甘肃贝母种子的水提取液对小白菜幼苗生长发育具有不同程度的影响。其中,形态后熟阶段水提取液对小白菜幼苗生长有明显的影响,整体表现为抑制作用($RI<0$)。水提取液浓度为 $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对小白菜幼苗根直径的抑制作用未达到显著水平,而在其他浓度水提取液处理下,幼苗(10 株)平均苗高、根长、根直径和单苗鲜重与 CK 相比均达到差异显著水平($P<0.05$),且随着水提取液浓度的增高,对小白菜幼苗生长发育各项指标的抑制作用逐渐增强, $40\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 水提取液对小白菜种子抑制作用均达到最大($P<0.05$),平均苗高、根长、根直径和单苗鲜重分别较 CK 显著降低 46.27%、76.40%、36.92%、20.48%,对应的 RI 值分别为

-0.861、-3.238、-0.585、-0.258。生理后熟阶段不同浓度水提取液对小白菜幼苗生长总体表现为促进作用($RI>0$),但对根长影响不显著($P>0.05$)。当水提取液浓度为 $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对小白菜幼苗苗高、根长、单苗鲜重影响不显著,但对其根直径有显著的促进作用($P<0.05$);当浓度为 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对幼苗苗高、根直径、单苗鲜重的促进作用均达到显著水平($P<0.05$),各生长指标较 CK 分别增加 22.84%、35.14%、48.50%;而当水提取液浓度为 $40\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对幼苗根直径和单苗鲜重的促进作用最大,较 CK 分别显著增加了 70.27%、83.08%($P<0.05$)。

由各指标的 RI 值可知,不同生长指标受甘肃贝母化感效应的影响程度不同。形态后熟阶段根长受影响最大,对甘肃贝母化感作用更敏感。而生理后熟阶段,当水提取液浓度高于 $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,单苗鲜重对化感作用最敏感。

表 2 不同后熟阶段甘肃贝母种子水提取液对小白菜幼苗生长的影响
Table 2 Effects of aqueous extracts from different after-ripening stages of *F. przewalskii* on plant growth of *B. chinensis*

后熟阶段 After-ripening stages	浓度 Concentration /($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	苗高 Plant height /mm	RI	根长 Root length /mm	RI	根直径 Root diameter /mm	RI	单苗鲜重 Fresh weight per plant/mg	RI
形态后熟 Morphologic after-ripening	CK	14.89±1.93a	0	4.45±2.22a	0	0.65±0.08a	0	11.18±0.21a	0
	2.5	13.57±1.86b	-0.097	2.57±1.53b	-0.732	0.60±0.08ab	-0.083	10.25±0.15b	-0.091
	5.0	12.06±1.95c	-0.235	2.11±1.92b	-1.109	0.60±0.07b	-0.083	10.39±0.01b	-0.076
	10.0	11.14±1.91c	-0.337	2.21±1.87b	-1.014	0.52±0.09c	-0.250	10.01±0.01c	-0.117
	20.0	9.56±2.36d	-0.558	1.84±1.53bc	-1.418	0.45±0.11d	-0.444	9.55±0.01d	-0.171
	40.0	8.00±1.62e	-0.861	1.05±1.09c	-3.238	0.41±0.14d	-0.585	8.89±0.02e	-0.258
生理后熟 Physiological after-ripening	CK	15.94±2.13cd	0	3.47±2.01a	0	0.37±0.11c	0	5.32±0.49d	0
	2.5	15.40±2.89d	-0.035	4.01±3.97a	0.135	0.52±0.16b	0.288	6.12±0.58d	0.131
	5.0	19.58±1.98ab	0.186	4.21±3.32a	0.176	0.50±0.14b	0.260	7.90±0.66c	0.327
	10.0	18.53±2.53b	0.140	3.77±3.39a	0.080	0.44±0.18bc	0.159	8.78±0.17b	0.394
	20.0	20.17±2.81a	0.210	4.46±2.29a	0.222	0.45±0.13bc	0.178	9.57±0.15ab	0.444
	40.0	17.03±3.79c	0.064	4.70±3.49a	0.262	0.63±0.19a	0.413	9.74±0.40a	0.454

2.4 甘肃贝母种子不同阶段水提取液对小白菜幼苗电导率的影响

电导率可以很好地反映植物细胞的稳定程度。由表 3 可知,不同阶段各浓度的甘肃贝母种子水提取液对小白菜幼苗的电导率表现出差异性。形态后熟阶段,随着甘肃贝母种子水提取液浓度的增大,小白菜幼苗浸出液电导率(d_2)呈升高趋势,与 CK 相比,2.5、5、10、20、40 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理组 d_2 分别增加 8.80%、

2.56%、3.86%、11.58%、25.27%,且水提取液浓度为 $40\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时与 CK 间差异达到显著水平($P<0.05$),而初始电导率(d_1)和相对电导率(d_3)并无明显的变化规律性。而生理后熟阶段,不同浓度甘肃贝母种子水提取液处理小白菜幼苗后,其初始电导率、浸出液电导率及相对电导率与 CK 相比均未达到显著水平($P>0.05$)。

表 3 不同后熟阶段甘肃贝母种子水提取液对小白菜幼苗电导率的影响

Table 3 Effects of aqueous extracts from different after-ripening stages of <i>F. przewalskii</i> on the conductivity of <i>B. chinensis</i>					
后熟阶段 After-ripening stages	浓度 Concentration /(mg·mL ⁻¹)	电导率 Conductivity			RI
		d ₁ /(us·cm ⁻¹)	d ₂ /(us·cm ⁻¹)	d ₃ /%	
形态后熟 Morphologic after-ripening	CK	6.97±0.37bcd	61.33±5.31b	11.42±1.06ab	0
	2.5	8.68±0.58a	66.73±5.08b	13.07±1.50a	0.126
	5.0	6.11±0.05cd	62.90±5.60b	9.76±0.84bc	-0.170
	10.0	7.58±1.08ab	63.70±2.40b	11.92±1.79ab	0.042
	20.0	7.18±0.74bc	68.43±5.08ab	10.48±0.60b	-0.090
	40.0	5.83±0.73d	76.83±6.00a	7.63±1.20c	-0.497
生理后熟 Physiological after-ripening	CK	14.30±4.95a	97.63±6.00a	14.50±4.15a	0
	2.5	15.33±6.91a	109.87±15.75a	13.58±4.03a	-0.068
	5.0	11.40±1.65a	103.53±2.81a	11.00±1.46a	-0.318
	10.0	11.80±2.43a	103.57±11.30a	11.34±1.35a	-0.279
	20.0	13.30±0.56a	95.60±10.05a	14.06±2.12a	-0.031
	40.0	14.60±4.95a	108.07±5.15a	13.42±3.98a	-0.080

2.5 综合化感效应分析

由表 4 可知,不同阶段甘肃贝母种子水提取液对小白菜萌发特性、幼苗形态与电导率指标的综合化感效应表现不同,影响程度因阶段不同而异。形态后熟阶段,不同浓度水提取液对小白菜发芽大体表现为抑制作用,且其抑制作用随着水提取液浓度的增大而逐渐增强。水提取液对小白菜种子发芽率、发芽势、发芽指数及发芽活力指数的抑制效应强度分别为 0.045、0.135、0.188、2.190,即对发芽活力指数的化感抑制效应最大,表明此阶段中化感物质对小白菜种子萌发率的影响较小,而对种子萌发速度和生长量的影响较大。幼苗形态中根长对此阶段水提取液的综合化感效应响应表现得最为敏感,综合化感效应指数为-1.502,其次为苗高、根直径和单株鲜重。相对电导率的综合化感效应指数为-0.118,其敏感程度最低。生理后熟阶段,不同浓度水提取液对小白菜种子的终发芽率虽有抑制作用(RI<0),但当水提取液浓度>10 mg·mL⁻¹时,其对发芽率和发芽势的抑制作用强度随着水提取液浓度的增大不断降低。小白菜种子萌发特性各指标不同浓度的综合化感效应指数为-0.050,幼苗形态与电导率指标的综合化感效应指数为 0.148,而在形态后熟阶段,其综合化感效应指数分别为-0.640、-0.494。总体来看,水提液浓度为 2.5、5、10、20、40 mg·mL⁻¹的形态后熟阶段水提取液化感抑制作用强度均大于同等浓度的生理后熟阶段水提取液。

3 讨论

种子打破休眠进而萌发是一个非常复杂的过程,由许多内部和外部因素自发地进行调节,共同控制^[26]。其中导致种子萌发率低的原因有很多,如机械障碍^[27]、激素平衡以及种子后熟特性^[28]、内源抑制物^[29]等。诸多研究发现,种子内源抑制物即化感物质是导致种子休眠的主要原因,化感物质可促进或抑制不同物种种子的萌发,对植物的生长发育有着重要的影响^[30-31]。药用植物普遍存在化感作用,如中药材种子滇重楼^[32]、蒙古黄芪^[21]、玉铃花^[33]等均是由于种子内存在内源化感抑制物质,从而导致其难以萌发。研究发现,化感作用存在浓度梯度效应,一般表现为低促高抑,即当提取液浓度达到一定“阈值”时才表现出抑制作用,浓度越大,抑制作用越明显^[34-35]。本研究结果表明,药用植物甘肃贝母种子中的内源化感抑制物质,在不同后熟阶段表现出不同程度的化感效应,两个阶段甘肃贝母种子不同浓度水提取液对小白菜种子萌发进程、萌发特性的综合化感敏感程度表现为形态后熟>生理后熟,其中在形态后熟阶段,抑制效应随着水提取液浓度增大,呈现先减弱后增强的趋势,而生理后熟阶段水提取液虽然抑制了小白菜种子的萌发,但当水提取液浓度为 10 mg·mL⁻¹时达到最低,超过 10 mg·mL⁻¹时,对发芽率和发芽势的抑制作用逐渐降低。说明不同后熟阶段,其种子所含的抑制物质含量不同,对小白菜种子呈现的抑制效果有所差异,有些抑制物质

表 4 不同后熟阶段甘肃贝母种子水提取液对小白菜种子萌发与幼苗生长的化感效应

Table 4 Allelopathic effects of aqueous extracts from different after-ripening stages of *F. przewalskii* on seeds germination and seedling growth of *B. chinensis*

后熟阶段 After-ripening stages	指标 Indexes	浓度 Concentrations/(mg·mL ⁻¹)					综合化感效应指数 Comprehensive response index
		2.5	5	10	20	40	
形态后熟 Morphologic after-ripening	发芽率 GR	0.008	-0.032	-0.040	-0.057	-0.102	-0.045
	发芽势 GE	0.023	-0.059	-0.033	-0.041	-0.575	-0.135
	发芽指数 GI	-0.017	-0.079	-0.065	-0.097	-0.684	-0.188
	发芽活力指数 VI	-0.761	-1.272	-1.140	-1.653	-6.124	-2.190
	综合化感效应指数 Comprehensive response index	-0.187	-0.360	-0.319	-0.462	-1.871	-0.640
	苗高 Plant height	-0.097	-0.235	-0.337	-0.558	-0.861	-0.417
	根长 Root length	-0.732	-1.109	-1.014	-1.418	-3.238	-1.502
	根直径 Root diameter	-0.083	-0.083	-0.250	-0.444	-0.585	-0.289
	单苗鲜重 Fresh weight per plant	-0.091	-0.076	-0.117	-0.171	-0.258	-0.142
	相对电导率 Conductivity	0.126	-0.170	0.042	-0.090	-0.497	-0.118
生理后熟 Physiological after-ripening	综合化感效应指数 Comprehensive response index	-0.175	-0.335	-0.335	-0.536	-1.088	-0.494
	发芽率 GR	-0.058	-0.008	-0.245	-0.086	-0.016	-0.083
	发芽势 GE	-0.035	0.001	-0.379	-0.043	0.024	-0.086
	发芽指数 GI	-0.078	-0.112	-0.237	-0.029	-0.098	-0.111
	发芽活力指数 VI	0.067	0.084	-0.137	0.200	0.189	0.081
	综合化感效应指数 Comprehensive response index	-0.026	-0.009	-0.250	0.011	0.025	-0.050
	苗高 Plant height	-0.035	0.186	0.140	0.210	0.064	0.113
	根长 Root length	0.135	0.176	0.080	0.222	0.262	0.175
	根直径 Root diameter	0.288	0.260	0.159	0.178	0.413	0.260
	单苗鲜重 Fresh weight per plant	0.131	0.327	0.394	0.444	0.454	0.350
	相对电导率 Conductivity	-0.068	-0.318	-0.279	-0.031	-0.080	-0.155
	综合化感效应指数 Comprehensive response index	0.090	0.126	0.099	0.204	0.222	0.148

在浓度较低时反而会出现促进作用。一般认为生理后熟的过程即是萌发促进物质含量与抑制物质含量比值增大的过程^[36]。

植物化感抑制物质对种子的影响不仅表现在萌发特性上,对种子生长发育表现更为突出^[37]。郭凤霞等^[21]研究发现,蒙古黄芪种子不同时间水浸提液对党参种子幼苗生长均具有极显著影响,且影响趋势在 2 个党参种中表现基本一致,即随着浸提时间延长,对不同党参萌发及幼根促进作用逐渐减弱而抑制作用逐渐增强。李彩琴等^[38]通过不同温度宽叶羌活种子水浸提液对白菜种子萌发和幼苗生长的研究,证明宽叶羌活种子中含有较强的内源抑制物质,且随着温度升高,其浸提液中内源抑制物质活性越强。本研究结果表明,不同阶段不同浓度甘肃贝母种子水提取液对小白菜种子的生长指标也具有显著作用,且对小白菜种子

幼苗生长的影响要强于其萌发特性,不同阶段对小白菜的化感效应存在较大差异。形态后熟阶段,对小白菜苗高、幼根长、幼根直径及单苗鲜重等各项生长指标均表现为单一的抑制作用,且除当水提取液浓度为 2.5 mg·mL⁻¹时对小白菜幼苗根直径的抑制作用不显著,其他均与对照相比达到统计差异显著水平,化感敏感程度总体表现为根长>苗高>幼根直径>单苗鲜重(个别浓度除外),说明小白菜幼苗对此阶段贝母种子内部化感物质的敏感部位主要集中在根部。生理后熟阶段,虽然规律性不明显,但是其在水提取液浓度为 2.5 mg·mL⁻¹时,已经开始表现出对小白菜幼根直径明显的促进作用。

电导率代表种子中的化感物质对质膜的损伤程度,水提取液中的化感物质可在一定程度上破坏细胞膜系统或改变细胞膜功能,从而影响植物对矿质元素

和水分的吸收以及蛋白质的合成,抑制受体植物幼苗的生长^[39]。本试验中,形态后熟阶段低浓度水提取液(2.5~10.0 mg·mL⁻¹)处理的小白菜幼苗浸出液电导率显著低于高浓度(40 mg·mL⁻¹)处理,表明小白菜幼苗在较低浓度下,细胞膜稳态性较强,这与邹丽娜等^[40]的研究结果一致。生理后熟阶段,各处理之间无显著差异。综合分析表明,生理后熟阶段水提取液处理对小白菜幼苗细胞的伤害最低,甘肃贝母种子后熟过程中,形态后熟阶段水提取液对小白菜幼苗的抑制作用高于生理后熟阶段。

4 结论

本研究结果表明,甘肃贝母种子中含有一定活性的内源化感抑制物质,且与种子休眠有关系。在种子不同后熟阶段,其内源化感抑制物质的含量变化有显著差别,形态后熟阶段对小白菜种子幼根生长的抑制活性高于对其种子萌发的抑制活性,生理后熟阶段正好相反。本研究对内源化感抑制物质与甘肃贝母种子休眠之间的关系以及对其后熟处理过程中内源抑制物质的活性消长规律有了初步探讨,为进一步详细研究甘肃贝母种子萌发的抑制机理提供了科学依据,进而为甘肃贝母的引种驯化提供了重要参考。

参考文献:

- [1] State Pharmacopoeia Commission. People's Republic of China Pharmacopoeia (one) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 36-38
- [2] 王天志, 杜蕾蕾, 王曙. 川贝母的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2001, 16(3): 200-203
- [3] 陈梅花, 王慧春, 朱艳媚, 陈志. 贝母的药理研究[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(1): 103-105
- [4] 王鹤娉. 甘肃贝母组培快繁技术对其总生物碱积累影响的研究[D]. 甘肃: 甘肃农业大学, 2008: 17-18
- [5] 王丽芝. 药材川贝母的品质研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2013: 1-2
- [6] 周宜, 丁红, 阎博华, 李继书, 刘松山, 李明权, 王帅, 丰芬, 黄晓燕. 不同基原川贝母镇咳、祛痰功效差异性实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(6): 612-616
- [7] 傅立国. 中国珍稀濒危植物名录[M]. 北京: 科学出版社, 1987
- [8] 常彦莉. 甘肃贝母种子发育及发芽特性研究[D]. 甘肃: 甘肃农业大学, 2010: 2-7
- [9] 常彦莉, 陈垣, 郭凤霞, 林玉红, 黎天. 甘肃贝母种子吸水及发芽特性研究[J]. 草业学报, 2010, 19(4): 41-46
- [10] 潘宣. 百合川贝母平贝母伊贝母[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2004: 169-171
- [11] Barrero J M, Downie A B, Xu Q, Gubler F. A role for barley

- CRYPTOCHROME1 in light regulation of grain dormancy and germination[J]. The Plant Cell, 2014, 26(3): 1094-1104
- [12] Ishibashi Y, Koda Y, Zheng S H, Yuasa T, Mari Iwaya-Inoue. Regulation of soybean seed germination through ethylene production in response to reactive oxygen species[J]. Annals of Botany, 2012, 111(1): 95-102
- [13] 李康, 李丹青, 张佳平, 夏宜平. 鸢尾属植物种子休眠研究进展[J]. 植物科学学报, 2016, 34(4): 662-668
- [14] Amirreza T, Ali S, Majid S. Seed germination of medicinal plant, fennel(*Foeniculum vulgare* Mill), as affected by different priming techniques[J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2016, 180(1): 26-40
- [15] 王建华, 陈婷, 林文熊. 植物化感作用类型及其在农业中的应用[J]. 中国生态农业学报, 2013, 21(10): 1173-1183
- [16] 马令法, 王改花, 吉哈利, 王雪花, 李全才, 马金玉, 马仲华. 不同浓度青稞秸秆水浸提液对甘肃贝母发芽的影响[J]. 广东农业科学, 2013, 40(20): 28-30
- [17] 李志亮, 潘映红, 李凤. 贝母种子浸液抑制性测定[J]. 中国中药杂志, 1989, 14(5): 15-16
- [18] 陈锋, 孟永杰, 帅海威, 罗晓峰, 周文冠, 刘建伟, 杨文钰, 舒凯. 植物化感物质对种子萌发的影响及其生态学意义[J]. 中国生态农业学报, 2017, 25(1): 36-46
- [19] 郭凤霞, 常彦莉, 林玉红, 王三喜, 朱君, 陈垣. 甘肃贝母种子灌浆特性研究[J]. 草业学报, 2010, 19(2): 97-102
- [20] 郑景瑶, 岳中辉, 田宇, 刘宝林, 郭立波. 间荆水浸液对小麦种子萌发及幼苗生长的化感效应初探[J]. 草业学报, 2014, 23(3): 191-196
- [21] 郭凤霞, 武志江, 陈垣, 席倬霞, 张小虎, 姚立荣, 陈翔. 蒙古黄芪种子水浸液对不同种党参种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(22): 3375-3380
- [22] 金彦博, 郭凤霞, 陈垣, 郭一青. 三种作物根际土壤水浸液对当归的化感效应[J]. 核农学报, 2018, 32(11): 2248-2257
- [23] 李玲, 李娘辉, 蒋素梅, 冷佳奕, 王小倩. 植物生理学模块实验指导[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 78-80
- [24] Bruce W G, Richardson D. Bioassays for allelopathy: Measuring treatment responses with independent controls [J]. Journal of Chemical Ecology, 1988, 14(1): 181-187
- [25] Dong Q, Yang S Y, Wang Y, Shen H M. Allelopathy of aqueous extracts from *Oxytropis ochrocephala* on four receptor plants [J]. Human Agricultural Sciences, 2010(9): 7-10
- [26] 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
- [27] 李晓琳, 展晓日. 红豆杉种子休眠机制的研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2018, 32(4): 78-81
- [28] 杨凯, 杨景煌, 刘绍伟, 孟珍贵, 谢世清, 陈军文. 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): 527-531
- [29] 闫芳. 黄瑞香种子休眠机理研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016: 5-6
- [30] 童凯, 李昭玲, 闫桑, 唐勇斌, 邓孟胜, 姜美杰, 田孟良. 变温层积过程中中华重楼种子的化感作用变化[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(7): 1724-1726

- [31] 王跃华, 田孟良, 蒋婷, 周杰, 张珏, 李文光. 华重楼种子外种皮的化感作用研究[J]. 西南农业学报, 2012, 25(1):340-342
- [32] 魏玉兰, 毛美琴, 赵燕, 马明东. 滇重楼种子水浸液对三种植物种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 植物科学学报, 2018, 36(1):94-102
- [33] 司倩倩, 臧德奎, 刘丹, 褚泽龙. 玉铃花种子休眠原因及其内源激素含量变化[J]. 北方园艺, 2017(6):91-95
- [34] Pramanik M H R, Asao T, Yamamoto T, Matsui Y. Sensitive bioassay to evaluate toxicity of aromatic acids to cucumber seedlings [J]. Allelopathy Journal, 2001, 8(2):161-170
- [35] 崔宏亮, 姚庆, 李利民, 苗昊翠. PEG 模拟干旱胁迫下花生品种萌发特性与抗旱性评价[J]. 核农学报, 2017, 31(7):1412-1418
- [36] 赵敏. 防风种子中内源抑制物质活性的研究[J]. 中草药, 2004, 35(4):441-444
- [37] Kato-Noguchi H, Ino T. Possible involvement of momilactone B in rice allelopathy[J]. Journal of Plant Physiology, 2005, 162(6):718-721
- [38] 李彩琴, 陈垣, 郭凤霞. 宽叶羌活种子浸提液对白菜种子萌发和幼苗生长的抑制活性[J]. 甘肃农业大学学报, 2008, 43(5):84-86
- [39] 王芳林, 刘世增, 尉秋实, 魏小红, 柴成武, 李爱德, 张莹花, 王昱淇, 王飞, 张锦春. 骆驼蓬 (*Peganum harmala*) 茎叶水浸液对黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum*) 种子萌发与幼苗生长的化感作用[J]. 中国沙漠, 2017, 37(3):469-474
- [40] 邹丽娜, 周志宇, 颜淑云, 秦彧. 盐胁迫对紫穗槐幼苗生理生化特性的影响[J]. 草业学报, 2011, 20(3):84-90

Allelopathic Effect of Aqueous Extracts of *Fritillaria przewalskii* Maxim. Seeds on *Brassica chinensis*

XU Meiling GUO Fengxia^{1,*} CHEN Yuan^{1,2,*} WU Rui¹

(¹ College of Life Science and Technology, College of Agronomy, Gansu Agricultural University/Gansu Key Lab of Crop Genetic & Germplasm Enhancement/Gansu Provincial Key Lab of Good Agricultural Production for Traditional Chinese Medicines/Gansu Provincial Engineering Research Centre for Medical Plant Cultivation and Breeding/Gansu Provincial Key Lab of Aridland Crop Science, Lanzhou, Gansu 730070; ²Gansu Engineering Lab of Resource Reservation and Utilization for Characteristic Medical Plants/Gansu Cultivated Engineering and Technology Research Center of Standardization and Traceability for Characteristic Chinese Medicine/Gansu Zhongtian Pharmaceutical Co., Ltd, Dingxi, Gansu 748100)

Abstract: In order to further explore the mechanism of after-ripening dormancy-release of *Fritillaria przewalskii* Maxim. seeds, the biological activity of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* seeds was determined at different concentrations of the aqueous extracts and different after-ripening stages of *F. przewalskii*. The results showed that the aqueous extracts of *F. przewalskii* had obvious effects on the seed germination and growth of *B. chinensis*, and some differences were found between the two stages. At the morphologic after-ripening stage, compared with the control, the germination ratio and germination energy of *B. chinensis* were promoted when the concentration of aqueous extracts was 2.5 mg·mL⁻¹. However, with the increase of concentration of aqueous extracts, the *B. chinensis* seeds showed significant allelopathic inhibition effect on germination and seedling growth, and the response index (RI value) decreased gradually. When the concentration was 40 mg·mL⁻¹, the allelopathic inhibition effect reached a significant level ($P < 0.05$). In the stage of physiological after-ripening, the opposite allelopathic effect was observed. Although the germination ratio of *B. chinensis* seeds in each treatment was lower than that of the control, the allelopathic effect increased first and then decreased with the increase of the concentration of aqueous extracts. And when the concentration was 5 mg·mL⁻¹, the seedling height, root diameter and fresh weight per plant of the *B. chinensis* were significantly higher than the control ($P < 0.05$). In summary, the endogenous allelopathic inhibitors of *F. przewalskii* seeds showed significant differences in different stages of after-ripening, which decreased significantly from morphological after-ripening to physiological after-ripening. The results of this study provide a scientific basis and theoretical support for further exploration of the species characteristics of endogenous inhibitors in *F. przewalskii* seedlings and the breaking of seed dormancy in production practice.

Keywords: *Fritillaria przewalskii*, *Brassica chinensis*, aqueous extract, allelopathic inhibition