

七叶一枝花种子萌发过程中内源抑制物种类与含量的变化分析

孟艳艳¹, 刘祖懿¹, 吕昕芮¹, 范雅萱¹, 宋发军^{1*}, 胡光灿²

(1 中南民族大学 a. 生命科学学院; b. 生物技术国家民委重点实验室; c. 武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 武汉 430074; 2 宜昌市农业科学研究院 湖北 宜昌 443004)

摘要 为探索七叶一枝花种子萌发期间内源抑制物的种类、含量变化及其对休眠解除的影响. 以不同萌发阶段的七叶一枝花种子为研究对象, 利用系统溶剂萃取法获得种子内源抑制物并进行定性和定量分析, 共鉴定出17种对种子萌发具有抑制作用的化合物; 为进一步确认关键内源抑制物, 选取白菜、小麦、绿豆种子作为模型, 测试了对苯二酚标准品的半抑制浓度(IC_{50}), 结果显示: 对白菜、小麦、绿豆种子的半抑制浓度分别为182.81、845.28、1510.08 mg/L; 此外, 测定了对苯二酚在七叶一枝花种子萌发过程中的绝对含量变化, 结果表明种子萌发过程中对苯二酚含量持续降低, 并在培养至萌发关键节点(20 d)时显著下降. 本研究揭示了七叶一枝花种子中存在多种内源抑制物, 并从中筛选出对种子萌发起关键作用的内源抑制物——对苯二酚, 首次明确了对苯二酚含量的降低与七叶一枝花种子的休眠解除有关. 研究不仅系统地描绘了七叶一枝花种子萌发期间内源抑制物的变化图谱, 还明确了对苯二酚在七叶一枝花种子萌发过程中的关键作用, 为未来针对性地开发种子休眠破除技术及提高七叶一枝花种子繁殖效率奠定了坚实的理论基础.

关键词 七叶一枝花; 种子休眠; 内源抑制物; 气相色谱质谱联用仪; 高效液相色谱

中图分类号 Q945 **文献标志码** A **文章编号** 1672-4321(2025)06-0790-12

doi: 10.20056/j.cnki.ZNMDZK.20250605

Variety and content changes of endogenous inhibitors during seed germination of *Paris polyphylla* var. *Chinensis*

MENG Yanyan¹, LIU Zuyi¹, LYU Xinrui¹, FAN Yaxuan¹, SONG Fajun^{1*}, HU Guangcan²

(1 South-Central Minzu University, a. College of Life Sciences; b. Key Laboratory for Biotechnology of National Ethnic Affairs Commission; c. Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plant Germplasm in Wuling Area of China, Wuhan 430074, China; 2 Yichang Academy of Agricultural Sciences, Yichang 443004, Hubei China)

Abstract This study aimed to investigate the diversity and dynamics of endogenous inhibitors during the germination of *Paris polyphylla* var. *Chinensis* seeds. Employing seeds at various germination stages, systematic solvent extraction was utilized to isolate endogenous inhibitors, followed by their qualitative and quantitative analysis. This approach led to the identification of 17 compounds exhibiting inhibitory effects on seed germination. To further ascertain the pivotal endogenous inhibitors, cabbage, wheat, and mung bean seeds were employed as models to assess the half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) of hydroquinone. The IC_{50} values for hydroquinone were determined as 182.81, 845.28, and 1510.08 mg/L, respectively. Additionally, the absolute content variation of hydroquinone were monitored throughout the germination course of *Paris polyphylla* var. *Chinensis* seeds. The results revealed a consistent decline in hydroquinone levels, with a pronounced decrease observed at a critical germination juncture (day 20). The findings illuminate the

收稿日期 2024-04-29 * **通信作者** 宋发军, 研究方向: 应用生物化学, E-mail: songfajun@mail.scuec.edu.cn

作者简介 孟艳艳(1981-), 女, 讲师, 博士, 研究方向: 药物植物分子育种, E-mail: 2014084@mail.scuec.edu.cn

基金项目 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(CZY22007); 国家留学基金资助

presence of multiple endogenous inhibitors within *Paris polyphylla* var. *Chinensis* seeds and single out hydroquinone as a crucial determinant of germination initiation. Notably, this work is the first to establish a direct correlation between decreased hydroquinone levels and the alleviation of seed dormancy in *Paris polyphylla* var. *Chinensis*. Collectively, this research not only provides a comprehensive profile of endogenous inhibitor dynamics during seed germination but also elucidates the pivotal role of hydroquinone in this process, thereby laying a robust foundation for the targeted development of dormancy-breaking techniques and enhancing the propagation efficiency of *Paris polyphylla* var. *Chinensis* seeds.

Keywords *Paris polyphylla* var. *chinensis*; seed dormancy; endogenous inhibitor; GC-MS; HPLC

七叶一枝花(*Paris polyphylla* var. *Chinensis*)为百合科(Liliaceae Juss.)重楼属(*Paris* L.)多年生珍稀药用植物。目前,七叶一枝花的野生植物资源濒临枯竭^[1],同时人工繁殖依赖于种子繁育,但因为种子休眠水平高、萌发周期长、发芽率低等因素,限制了人工繁殖的规模和速度^[2]。因此,了解七叶一枝花种子萌发过程中内源抑制物的种类和含量变化,以及解析其中关键的内源抑制物,对破除种子休眠、实现快速繁育和保护野生种质资源具有重要意义。

种子休眠是植物尤其是多年生植物进化过程中形成的一个重要适应性性状^[3-4],不同植物的种子休眠原因各不相同,其中内源抑制物的作用是造成许多植物种子休眠的主要原因之一^[5]。KHAN^[6]在1975年就发现内源抑制物在植物种子萌发中的关键作用,此后越来越多的内源抑制物在植物种子中被发现。当前,植物种子中被鉴定到的与萌发相关的内源抑制物主要为ABA和酚类化合物^[7]。此外,不同类型的药用植物种子内还含有各自特殊的内源抑制物质,诸如香豆素类、有机酸、芥子油、生物碱、芳香油及不饱和内酯类等^[8]。药用植物种子的休眠与萌发与内源抑制物的存在密不可分^[9-10]。

重楼属植物种子中存在内源抑制物,且对种子的萌发造成了显著的影响,如带有外种皮的滇重楼(*Paris polyphylla* var. *yunnanensis*)种子存在发芽滞后现象,并且外种皮和胚乳中存在的萌发抑制物是影响种胚形态后熟的重要因素^[11]。此外,古今等^[12]发现滇重楼种子中抑制物质的活性比种皮中的更明显,暗示种子是滇重楼内源抑制物质的主要存在部位。李昭玲^[13]在七叶一枝花种子中也发现了内源抑制物质,指出种子的生理后熟现象可能与抑制物质有关。赵燕^[14]从滇重楼的种皮浸提液中鉴定出19种化合物,从胚乳浸提液中鉴定出22种化合物;并认为乙酸、辛酸、丁酸、苯甲酸和苯酚对滇重楼种子休眠有重要意义。种种迹象表明,种子当中存在内

源抑制物是重楼属植物种子休眠的主要原因之一。

目前关于重楼种子内源抑制物的研究大多聚焦在内源抑制物的提取及其生物活性检测等方面,而对抑制物的定性和定量分析鲜见报道^[15],这对探索重楼属植物种子的休眠与萌发机制不利。因此,在前期实验基础上,以处于不同萌发时间段的七叶一枝花种子为研究对象,利用GC-MS对内源抑制物组份进行定性和定量分析,并筛选出了种子萌发过程中的候选关键内源抑制物——对苯二酚;而后用对苯二酚标准品加至三种不同类型的种子(白菜-脂肪类种子代表、小麦-淀粉类种子代表、绿豆-蛋白类种子代表)当中,确定了对苯二酚对植物种子萌发具有抑制效用,并测定了其半抑制浓度;同时借助HPLC测定了对苯二酚在七叶一枝花种子萌发过程中的绝对含量,发现对苯二酚含量变化与七叶一枝花种子的萌发密切相关。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

在湖北省恩施州巴东县重楼药材种植基地,从果实成熟的七叶一枝花植株采集种子为供试材料。生物活性测定的材料白菜(*Brassica pekinensis*)、小麦(*Triticum aestivum*)、绿豆(*Vigna radiata*)种子购自山东寿禾种业有限公司。色谱甲醇购于美国Honeywell公司。对苯二酚标准品(色谱纯)、冰乙酸(色谱纯)(上海麦克林),纯净水(杭州娃哈哈)。甲醇、乙醇、石油醚(60~90℃)、乙醚、乙酸乙酯和无水硫酸钠(中国医药)。气相色谱-质谱联用仪(Trace1300-ISQ7000)、TG-WaxMS毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)(美国赛默飞)。高效液相色谱仪(1260型,美国安捷伦),色谱柱Outstand C18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm,天津博纳艾杰尔公司)。旋转蒸发仪(上海亚荣)。玻璃砂芯过滤装置、0.22 μm有机及水系

微孔滤膜(50 mm)、0.22 μm 尼龙滤膜(13 mm)均购自天津津腾。

1.2 实验方法

1.2.1 种子培养及内源抑制物提取

新鲜采收的七叶一枝花种子经过预处理之后用湿沙层积的方式分别在4 $^{\circ}\text{C}$ (种子储藏温度)和22 $^{\circ}\text{C}$ (最适培养温度)下恒温培养。按照培养时间和外部形态将22 $^{\circ}\text{C}$ 种子分为六类,分别为第0天、培养至第20天的未萌发种子和胚根长度为1 mm、3 mm、8 mm、15 mm的已萌发种子。前期研究结果表明,七叶一枝花种子的80%甲醇浸提液的甲醇分离相,对不同受体种子的萌发抑制效果最强。因此,本研究对上述六组种子研磨处理后,用系统溶剂萃取法获得六种不同时期种子内源抑制物的甲醇相提取物。将分离出的甲醇相溶液进行浓缩蒸发,得到褐色浓缩干物质。随后加入3 mL色谱甲醇溶解浓稠干样,摇匀后即制成了甲醇相提取液浓缩样品。取各时期浓缩样品1.5 mL于EP管中,加入0.1 g无水硫酸钠,摇匀后在-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中静置。隔夜取出,过0.22 μm 滤膜,待测。

1.2.2 不同时期提取物的GC-MS鉴定

色谱条件参考赵燕^[14-16]的方法并稍作改动,设定如下: TG-WaxMS毛细管柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm);柱温:程序升温,起始温度60 $^{\circ}\text{C}$,以10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至160 $^{\circ}\text{C}$,再以5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至250 $^{\circ}\text{C}$,保持9 min;进样口温度250 $^{\circ}\text{C}$;载气为氦气;流速1 mL/min;分流比15:1。质谱条件:电离源EI,源温230 $^{\circ}\text{C}$,电离电压70 eV;扫描范围:50~550 amu;直接进样;进样量1 μL ;第3.5 min开始采样。

1.2.3 不同时期提取物的相对含量测定

采用面积归一化法测定各化合物的相对含量,以鉴定图谱中单个峰面积与总峰面积的比值代表该化合物的相对含量。

1.2.4 对苯二酚的 IC_{50} 测定

通过质谱法检验关键内源抑制物的样品图谱与标品图谱之间的相似度,选取RSI(相似系数)大于800的化合物(RSI大于800即认定两者为相同物质,RSI最高值为1000)^[17]。并结合GC-MS鉴定结果,观察萌发过程中相对含量占比较多且变化规律的化合物。综合以上条件筛选出对七叶一枝花种子萌发可能有影响的内源抑制物——对苯二酚。

将对苯二酚标准品用蒸馏水配制成浓度为1、10、100、1000、10000 mg/L的标准溶液,取不同梯度

的标准溶液各5 mL加入有两层滤纸的培养皿中,以蒸馏水为空白对照,每处理组设三个重复;将白菜、小麦、绿豆种子消毒并催芽后放入培养皿中,每皿30粒种子;22 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养,定期补水。3 d后测量种子的胚根长,并拍照记录。对苯二酚标准品对白菜、小麦、绿豆种子的抑制率通过以下公式计算:

$$\text{抑制率} = (A_0 - A_1)/A_0 \times 100,$$

式中: A_0 为对照组种子的平均胚根长度(mm); A_1 为处理组种子的平均胚根长度(mm)。

IC_{50} 是指胚根生长的抑制率达到50%时标准品的浓度。将标准品的浓度改写为以10为底的对数,作为X轴;以标准品对种子胚根生长的抑制率作为Y轴。SPSS软件拟合回归方程,求解方程后获得 LgIC_{50} 值,并经反对数求出 IC_{50} 。

1.2.5 对苯二酚的绝对含量测定

对苯二酚含量测定采用标准曲线法。50%甲醇溶液(色谱级)溶解对苯二酚标准品,并配制成浓度分别为25、50、100、150、200 mg/L的标准溶液;待HPLC检测后,以上述质量浓度为横坐标,对应的峰面积为纵坐标,拟合线性回归方程,得到标准曲线。将80%甲醇浸提液置于旋转蒸发仪中,60 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至干,加入50%甲醇溶液(色谱级)充分溶解后定容至5 mL,过0.22 μm 滤膜。色谱柱为Outstand C18反向柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);柱温25 $^{\circ}\text{C}$;流动相为甲醇:0.5%乙酸水(体积比为45:55),等度洗脱;流速0.5 mL/min;紫外检测波长为293 nm;进样量10 μL 。以样品峰和标品峰的保留时间确定关键抑制物的名称,以样品峰面积和线性回归方程计算关键抑制物的含量(mg/L)。使用SPSS对数据进行统计学分析;使用Origin 9.0绘制峰图和标准曲线。

1.2.6 萌发前期的种子浸提液抑制活性检测

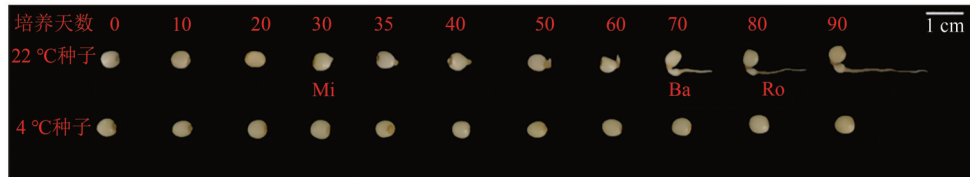
为进一步明确对苯二酚变化趋势是否与七叶一枝花种子萌发有关,又探究了不同培养期的七叶一枝花种子浸提液对受体种子萌发率的影响。取22 $^{\circ}\text{C}$ 培养条件下层积第0天、20天和胚根1 mm的七叶一枝花种子制备浸提液,在旋转蒸发仪中浓缩浸提液,随后用蒸馏水将浓缩液定容至25 mL,并依次稀释至0.02、0.04、0.06、0.08 g/mL。取不同浓度浸提液各5 mL,加入有两层滤纸的培养皿中,每皿50粒小麦种子,22 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下进行小麦籽粒萌发实验。以蒸馏水作为对照,每组设置3个重复。

2 结果与分析

2.1 七叶一枝花种子外部形态及发芽率

由图 1 可知, 22 °C 层积培养的种子在培养至 30

d 时胚根突破种皮, 之后随着培养时间的增长, 胚根逐渐伸长并分化, 形成胚轴. 而 4 °C 条件下培养的种子, 在整个培养周期中种子外部形态均无明显变化.



Mi: 珠孔端; Ba: 胚轴基部; Ro: 根系.

图 1 七叶一枝花种子萌发过程中的外部形态

Fig. 1 External morphology during seed germination of *Paris polyphylla* var. *chinensis*

种子发芽率统计结果表明(表 1), 22 °C 层积培养过程中, 发芽率自种子露白(第 30 天)开始呈上升趋势; 其中第 30 天种子的发芽率为 10.4%, 30~40 d 期间发芽率增长最快, 第 40 天有近一半的种子萌发; 此后发芽率持续增长, 第 60 天达到 81.1%; 而 60~80 d 期间无明显变化, 第 90 天增长至最高值(89.9%). 4 °C 条件下培养的种子, 在整个培养期内未有明显的萌发迹象. 从表 2 可知, 22 °C 层积条件

培养下, 种子培养至 30 d 时首次观测到胚根突破种皮, 平均胚根长度为 0.7 mm; 之后随着培养时间的增加, 胚根逐渐伸长. 其中 30~60 d 期间种胚长度缓慢增加(平均胚根长度由 0.7 mm 增加至 2.4 mm); 而培养 60~90 d 期间种胚长度急剧增加(平均胚根长度由 2.4 mm 增加至 25.9 mm), 并在 90 d 时达到最大值. 与此同时, 4 °C 条件下培养的种子在整个周期都未观测到露白, 整个周期种子胚根长度为 0 mm.

表 1 七叶一枝花种子发芽率

Tab. 1 Germination rate of *Paris polyphylla* var. *chinensis* seeds

培养天数(d)	0	10	20	30	35	40	50	60	70	80	90
22 °C 种子 萌发率(%)	0e	0e	0e	10.4±3.0d	32.4±5.2c	49.2±7.5b	73.8±10.8a	81.1±8.1a	81.0±11.8a	79.6±8.9a	89.9±4.2a
4 °C 种子 萌发率(%)	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a

注: 不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著.

表 2 七叶一枝花种子胚根长度

Tab. 2 Radicle length of *Paris polyphylla* var. *chinensis* seeds

培养天数(d)	0	10	20	30	35	40	50	60	70	80	90
22 °C 种子 胚根长(mm)	0f	0f	0f	0.7±0.2e	0.9±0.3e	1.1±0.2de	1.4±0.4de	2.4±0.9d	8.0±1.4c	18.8±2.6b	25.9±3.6a
4 °C 种子 胚根长(mm)	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a

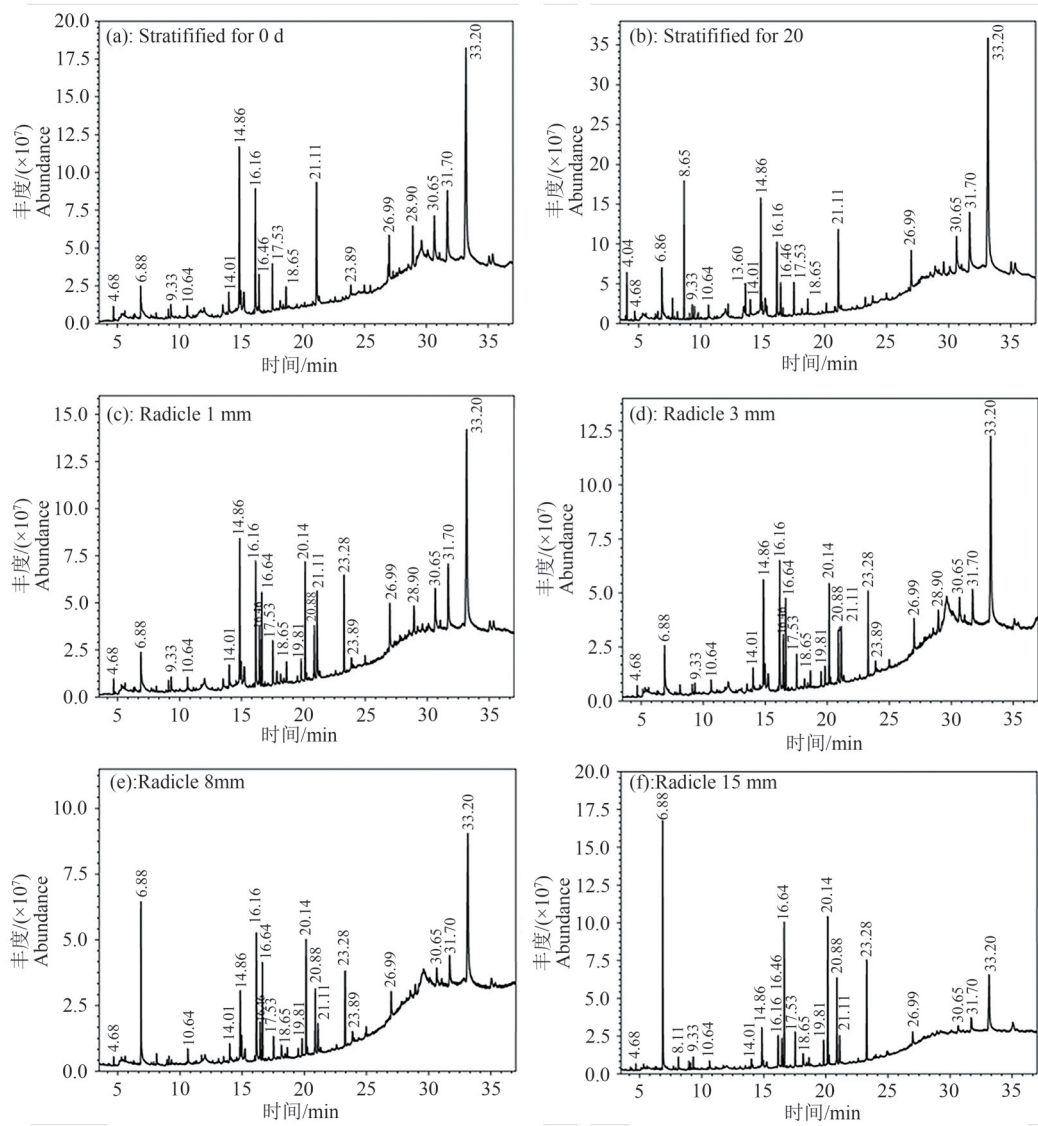
注: 不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著.

2.2 不同时期内源抑制物的 GC-MS 鉴定

利用 GC-MS 技术, 鉴定 22 °C 各时期的七叶一枝花种子内源抑制物, 其总离子图(total ion chromatogram, TIC) 如图 2 所示, 所有检测得到的有机化合物的种类和相对含量列于表 3.

由图 2(a) 可知, 未经层积培养的七叶一枝花种子(第 0 天)的甲醇组分以醇类、有机酸类、醛类和糖

类物质为主. 其中, 峰面积与相似度较高的几种化合物有丙烯醇(6.55%)、5-羟甲基糠醛(6.98%)、对苯二酚(2.95%)、棕榈酸(3.29%)、十八烷酸(3.92%)、亚麻酸 C18:2(5.27%)、2-氨基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖(8.55%)和蔗糖(18.31%), 上述几种化合物的峰面积之和占总峰面积的 55.82%, 相似系数(RSI)均在 800 以上.



(a)层积0天组;(b)层积20天组;(c)胚根长1 mm组;(d)胚根长3 mm组;(e)胚根长8 mm组;(f)胚根长15 mm组
图2 七叶一枝花不同时期种子提取物总离子流色谱图

Fig. 2 Total ion current chromatogram of seed extract of *Paris polyphylla* var. *chinensis* at different stages

表3 七叶一枝花种子萌发过程中提取的有机化合物种类及相对含量

Tab. 3 Types and relative contents of organic compounds extracted during seed germination of *Paris polyphylla* var. *chinensis*

类别	时间/min	化合物	英文名	匹配度 RSI	相对含量/%					
					0 d	20 d	1 mm	3 mm	8 mm	15 mm
醇类 lcohols	9.32	糠醇	Furfuryl alcohol	892	0.81	0.78	0.66	0.53	0.28	0.68
	16.15	*丙烯醇	Allyl alcohol	928	6.55	4.29	5.99	6.94	6.86	2.51
	18.17	甘油	Glycerol	902	0.74	0.56	0.63	0.71	1.04	1.19
吡嗪类	22.23	2,5-呋喃二甲醇	2,5-Furandimethanol	834	0.23	0.22	0.15	0.22	0.22	0.19
	4.68	*2-甲基吡嗪	2-Methylpyrazine	932	0.42	0.42	0.39	0.32	0.29	0.25
	5.31	*2,5-二甲基吡嗪	2,5-Dimethyl pyrazine	890	0.12	0.24	0.16	0.14	0.12	0.20
	5.60	2,3-二甲基吡嗪	2,3-Dimethylpyrazine	900	0.15	0.12	0.17	0.16	0.20	0.13
	6.28	2-乙基-3-甲基吡嗪	2-Ethyl-3-methylpyrazine	901	0.13	0.07	0.14	0.13	0.15	0
有机酸类	4.80	2-亚异丙基胺氧基丙酸	2-[(Isopropylideneamino)oxy]propanoic acid	883	0.19	0.10	0.14	0.11	0.10	0.08

续表

类别	时间/min	化合物	英文名	匹配度 RSI	相对含量/%					
					0 d	20 d	1 mm	3 mm	8 mm	15 mm
	6.88	*乙酸	Acetic acid	986	1.79	2.92	2.11	2.43	6.47	12.73
	23.50	2-(1 <i>H</i> -吡咯-1-基)丙酸	2-(1 <i>H</i> -Pyrrol-1-yl)propanoic acid	874	0.26	0.18	0.13	0.12	0.16	0.08
	26.99	*棕榈酸	Palmitic acid	882	3.29	2.52	2.77	1.84	1.82	1.27
	30.65	*十八烷酸	<i>cis</i> -Vaccenic acid	867	3.92	3.19	2.71	1.84	1.68	0.93
	31.70	*亚麻酸 C18:2	Linoleic acid	941	5.27	4.61	4.14	2.83	2.46	1.57
	35.38	二十烯酸	<i>icos</i> -13-enoic acid	806	1.13	1.08	0.89	0.40	0.53	0.32
	9.12	γ -丁内酯	Gamma Butyrolactone	973	0.39	0.29	0.40	0.40	0.37	0.42
	16.64	*棕榈酸甲酯	Methyl palmitate	935	0	0.40	3.28	3.48	3.98	7.75
	19.81	*硬酯酸甲酯	Methyl stearate	842	0	0.16	0.93	0.91	0.82	1.66
酯类	20.14	*油酸甲酯	Methyl Oleate	918	0.24	0.52	4.56	4.22	5.11	9.02
	20.88	*亚油酸甲酯	Methyl linoleate	900	0	0.24	2.31	2.55	3.18	5.46
	22.61	(+/-)- β -羟基- γ -丁内酯	(+/-)-3-hydroxy-gamma-butyrolactone	964	0.36	0.23	0.32	0.32	0.34	0.45
	23.28	顺-11-二十烯酸甲酯	Methyl (11 <i>Z</i>)-11-icosenoate	932	0	0.53	4.10	3.82	3.68	6.80
	10.64	1,2-环戊二酮	cyclooctane-1,2-dione	927	0.70	0.83	0.67	0.79	0.81	0.67
	11.33	3-甲基环戊烷-1,2-二酮	3-Methyl-1,2-cyclopentanedione	802	0.12	0.19	0.14	0.10	0.15	0.11
酮类	13.53	2 <i>H</i> -吡喃-2,6(3 <i>H</i>)-二酮	2 <i>H</i> -Pyran-2,6(3 <i>H</i>)-dione	939	0.87	0.51	0.76	0.70	0.39	0.22
	14.01	呋喃酮	Furaneol	872	1.14	1.02	1.04	1.12	1.03	0.65
	17.53	2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4(<i>H</i>)-吡喃-4-酮	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(<i>H</i>)-pyran-4-one	932	2.24	1.71	1.83	1.65	1.23	2.30
	11.74	*愈创木酚	Guaiacol	888	0.23	0.11	0.13	0.17	0.30	0.21
酚类	13.09	甲基麦芽酚	3-Hydroxy-2-methyl-4 <i>H</i> -pyran-4-one	874	0.24	0.10	0.22	0.28	0.33	0.25
	16.46	*4-乙烯基-2-甲氧基苯酚 ^[110]	4-Hydroxy-3-methoxystyrene	945	1.71	1.65	2.31	2.36	1.80	1.80
	28.90	*对苯二酚	Hydroquinone	907	2.95	1.21	1.86	1.58	1.15	0.42
	14.86	2-氨基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖	2-Amino-2-deoxyhexopyranose	825	8.55	6.90	6.53	5.47	3.80	3.01
糖类	33.20	蔗糖	Sucrose	804	18.31	21.99	14.72	15.00	12.92	6.69
	35.08	1,6-脱水- β -D-葡萄糖	1,6-Anhydro- β -D-glucose	887	0.92	1.22	0.96	0.84	0.92	1.40
	21.11	5-羟甲基糠醛	5-Hydroxymethylfurfural	906	6.98	4.74	4.20	3.43	1.91	2.18
醛类	27.30	4-羟基苯丙醛	4-Hydroxydihydrocinnamaldehyde	837	0.47	0.12	0.20	0.15	0.07	0.01
	4.04	*桉叶油醇	1,8-Cineole	944	0	1.31	0	0	0	0
其他物质	6.38	*二氧化丁二烯	1,2,3,4-diepoxybutane	872	0.44	0.41	0.30	0.21	0.12	0
	8.65	* β -石竹烯	β -Caryophyllene	936	0	4.11	0	0	0	0
合计					71.86	71.80	72.95	68.27	66.79	73.61

注:“*”表示被报道有抑制作用的化合物。

第20天种子[图2(b)]中新分离出六种化合物,分别为桉叶油醇(1.31%)、 β -石竹烯(4.11%)、棕榈酸甲酯(0.4%)、硬酯酸甲酯(0.16%)、亚油酸甲酯(0.24%)和顺-11-二十烯酸甲酯(0.53%)。该时期的甲醇组分主要包括醇类、有机酸类、醛类、烯炔类和糖类物质。峰面积较大的几种物质,如丙烯醇(4.29%)、5-羟甲基糠醛(4.74%)、对苯二酚(1.21%)、

棕榈酸(2.52%)、十八烷酸(3.19%)、亚麻酸 C18:2 (4.61%)和2-氨基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖(6.9%)的相对含量与前一时期相比有所下降(表3)。

对胚根长为1 mm的七叶一枝花种子甲醇相提取物进行GC-MS鉴定,得到其总离子流(图2(c))。共分离出37个峰,其甲醇组分主要含有醇类、有机酸类、酯类、醛类和糖类物质(表3),其中含量较高、

相似度较大的几种化合物为丙烯醇(5.99%)、5-羟甲基糠醛(4.2%)、棕榈酸甲酯(3.28%)、油酸甲酯(4.56%)、顺-11-二十烯酸甲酯(4.1%)、亚麻酸C18:2(4.14%)、2-氨基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖(6.53%)和蔗糖(14.72%)。此外,酯类物质的总含量与前一时期相比明显升高,由2.37%升高至15.9%(表3),提示酯类化合物可能与促进种子萌发有关;糖类物质的总含量明显下降,表明糖类可能作为营养物质在种子萌发时被分解消耗。

GC-MS鉴定结果表明,胚根长为3 mm的七叶一枝花种子甲醇相的提取物中,总离子流图共分离出37个峰[图2(d)]。随着种子萌发时间的增加,化合物的相对含量发生明显变化。与第0天和第20天仍处于休眠期的种子相比,部分有机物的含量明显降低,如棕榈酸由原来的3.29%下降至1.84%,十八烷酸由原来的3.92%下降至1.84%,亚麻酸C18:2由原来的5.27%下降至2.83%,对苯二酚由原来的2.95%下降至1.58%,5-羟甲基糠醛由原来的6.98%下降至3.43%(表3)。因此,推测上述物质可能与七叶一枝花种子的休眠解除有关。此外,酯类、酮类和糖类物质的含量与上一时期相比未有明显变化。

胚根长为8 mm的七叶一枝花种子甲醇相提取物进行GC-MS鉴定时(图2(e)),得到总离子流图中共分离出37个峰由质谱系统检测和计算机分析系统处理后得到样品图谱,经与标准图谱比对获得该时期含量较高的几种化合物为:丙烯醇(6.86%)、乙酸(6.47%)、亚麻酸C18:2(2.46%)、棕榈酸甲酯(3.98%)、油酸甲酯(5.11%)、亚油酸甲酯(3.18%)、顺-11-二十烯酸甲酯(3.68%)、蔗糖(12.92%)和2-氨基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖(3.8%),上述物质的含量之和为总峰面积的48.46%(表3)。由表3可以看出,该时期乙酸的相对含量明显上升,由上一时期的2.43%升高至6.47%;酯类物质和糖类物质为该时期的主要成分,其相对含量分别为17.48%和17.64%。

胚根长为15 mm的七叶一枝花种子的甲醇相提取物的总离子流图共分离出35个峰[图2(f)]。该时期酯类物质的总相对含量高于其他类物质,为总峰面积的31.56%;其中棕榈酸甲酯(7.75%)、油酸甲酯(9.02%)和顺-11-二十烯酸甲酯(6.8%)为酯类物质的主要成分。而乙酸的相对含量继续上升,与上一时期相比升高了6.26%。此外,该时期化合物的种类有所减少,二氧化丁二烯和2-乙基-3-甲基吡嗪分别由上一时期的0.12%和0.15%减少为0;而桉叶油醇和 β -石竹烯仅为第20天种子所含有(表3)。

综上所述,本研究从七叶一枝花种子的甲醇相组分中共鉴定出39种化合物,其中有17种已被证实对植物种子萌发或幼苗生长有抑制作用,分别为丙烯醇、2-甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、乙酸、棕榈酸、十八烷酸、亚麻酸C18:2、棕榈酸甲酯、硬酯酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯、愈创木酚、4-乙基-2-甲氧基苯酚、对苯二酚、桉叶油醇、二氧化丁二烯和 β -石竹烯。在种子培养过程中,内源物质的种类与含量均发生了变化,内源物质的种类变化呈现先增加后减少的趋势,并且在第20天组中检测到的内源物质种类最多(39种)。其中被报道具有抑制作用的内源物质其种类变化规律同样呈现先增加后减少的趋势,由于桉叶油醇和 β -石竹烯仅在第20天组中检测到,因此第20天中检测到被报道具有抑制作用的内源物质种类最多(17种)。另一方面,内源抑制物含量的变化情况大致分为三种:首先是先升高后降低的类型,如桉叶油醇、 β -石竹烯;其次,棕榈酸、十八烷酸、亚麻酸C18:2、对苯二酚、2-甲基吡嗪和二氧化丁二烯的含量呈下降趋势;最后,乙酸、棕榈酸甲酯、硬酯酸甲酯、油酸甲酯和亚油酸甲酯的含量呈上升趋势。结合前人的研究与抑制物含量的变化情况,本研究认为对苯二酚^[18]、2-甲基吡嗪^[19]、棕榈酸^[20]、十八烷酸^[21]、亚麻酸C18:2^[22]、桉叶油醇^[23]、二氧化丁二烯^[24]和 β -石竹烯^[25]为七叶一枝花种子的关键内源抑制物质,5-羟甲基糠醛和4-羟基苯丙醛可能与调控七叶一枝花种子休眠有关。其中,在种子萌发的整个过程中均能检测到对苯二酚的存在,其相对含量占比较高(除15 mm组外均高于1%),同时对苯二酚含量的变化存在明显下降的趋势,并且在第20天(萌发关键节点)显著降低。因此,本研究选择对苯二酚作为候选的关键内源抑制物质,对其进行了进一步的分析和研究。

2.3 对苯二酚半抑制浓度测定

由质谱检测结果可知,在七叶一枝花种子的甲醇相鉴定图谱中,第28.9 min出峰的化合物的质谱图-图3(a)与对苯二酚的标准质谱图-图3(b)匹配情况良好,匹配度为907。

同时,为了进一步明确对苯二酚对植物种子萌发存在抑制活性,采用不同浓度的对苯二酚标准品溶液处理了不同类型的种子:白菜(脂肪类种子)、小麦(淀粉类种子)、绿豆(蛋白类种子)。经不同浓度的对苯二酚标准品处理后,白菜、小麦、绿豆种子的萌发情况见图4。随着施加对苯二酚标准品浓度的增加,观察到三种受体种子的萌发率和露白长度

均受到抑制,当施加对苯二酚浓度达到 10000 mg/L 时,几乎观察不到萌发的种子。

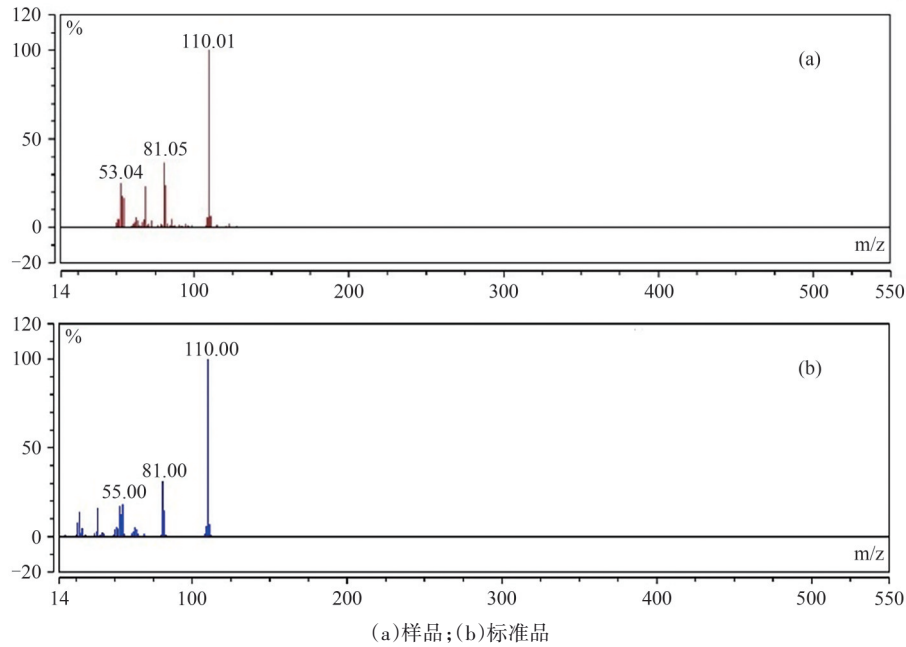
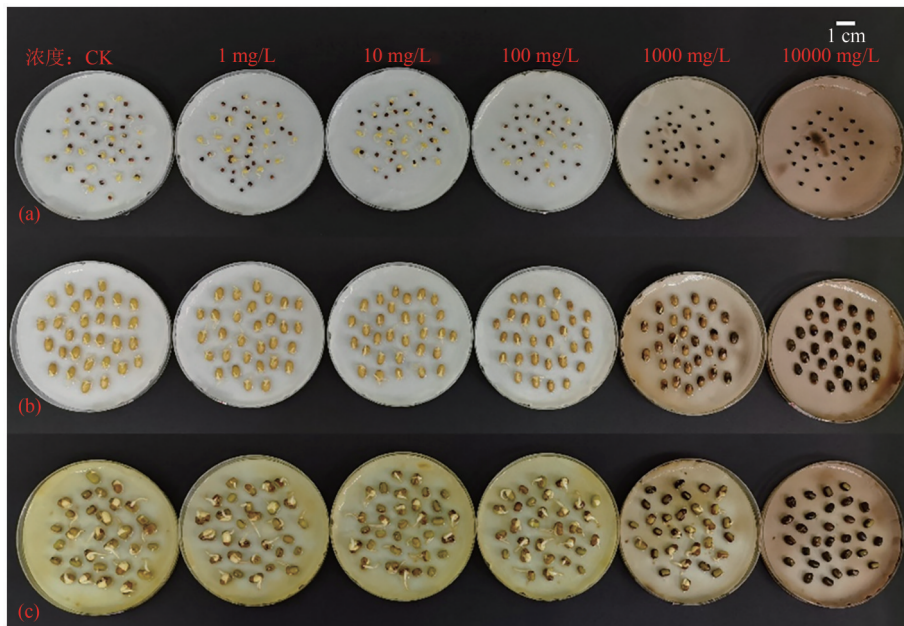


图3 甲醇相分离物与数据库对苯二酚质谱图比对

Fig. 3 MS comparison between the inhibitor of the extraction and hydroquinone



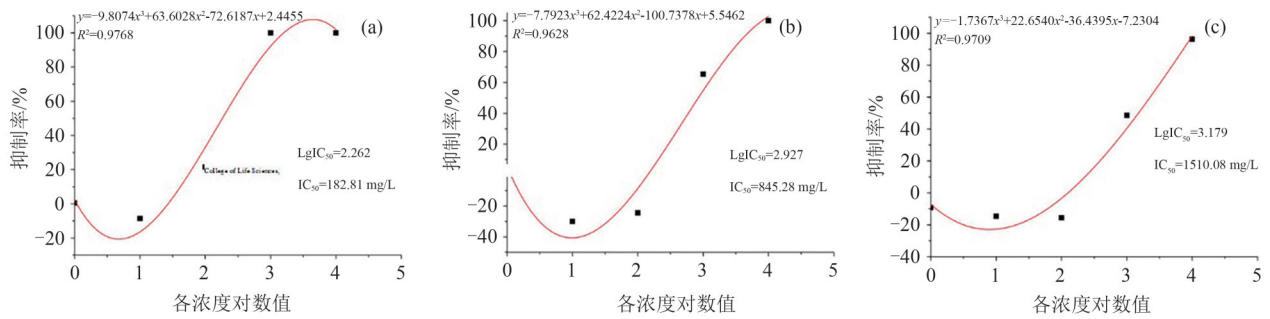
(a)白菜种子;(b)小麦种子;(c)绿豆种子

图4 不同浓度对苯二酚对受体种子萌发

Fig. 4 Inhibitory effect of hydroquinone at different concentrations on germination of receptors

利用不同浓度对苯二酚标准品对白菜、小麦、绿豆种子处理后,进行生物活性测定,并获得拟合曲线(图5)。不同浓度对苯二酚标准品对白菜(图5(a))、小麦(图5(b))、绿豆(图5(c))种子抑制活性的拟合回归方程分别为 $y=-9.8074x^3+63.6028x^2-72.6187x+2.4455$ 、 $y=-7.7923x^3+62.4224x^2-100.7378x+5.5462$ 以及 $y=-1.7367x^3+22.6540x^2-36.4395x-7.2304$ 。

由图5可知,不同浓度对苯二酚对三种不同类型种子的胚根生长均具有不同的作用效果,且抑制率随浓度变化的趋势相同,均表现为高浓度产生抑制效果、低浓度时产生促进效果。带入上述方程分别计算出对苯二酚标准品对不同受体种子的半抑制浓度分别为182.81 mg/L(白菜)、845.28 mg/L(小麦)、1510.08 mg/L(绿豆)。



(a)白菜种子;(b)小麦种子;(c)绿豆种子

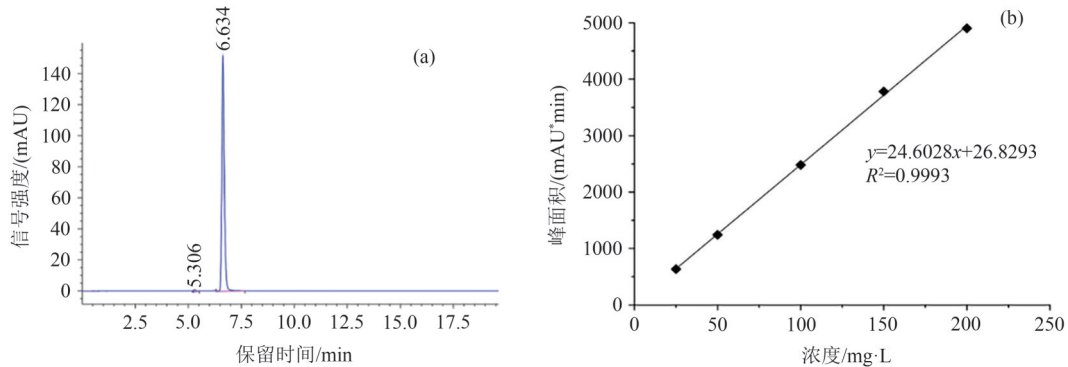
图5 不同浓度对苯二酚对受体种子胚根生长的抑制作用

Fig. 5 Inhibitory effect of hydroquinone at different concentrations on radicle growth of receptors

2.4 对苯二酚标准品检测

利用 HPLC 检测后发现,对苯二酚标准品的保留时间为 6.63 min(图 6(a)). 随后将对苯二酚分别稀释成 25、50、100、150、200 mg/L,以不同浓度梯度

作为 X 轴,以对应的峰面积作为 Y 轴,进行线性回归,并得到标准曲线(图 6(b)). 结果显示,本研究色谱条件下,对苯二酚标准溶液的浓度与峰面积呈良好的线性关系,相关系数在 0.99 以上.



(a)对苯二酚标准品色谱图;(b)对苯二酚标准品标准曲线

图6 对苯二酚标准品的峰图及标准曲线

Fig. 6 Chromatogram and standard curve of hydroquinone standard

2.5 对苯二酚含量分析

根据 22 °C 条件下种子生长的对应时期(露白 1 mm 对应 40 d、露白 3 mm 对应 60 d、露白 8 mm 对应 70 d 以及露白 15 mm 对应 80 d),选取培养相同天数的 4 °C 种子作为对照,比较适宜萌发(22 °C)与不适宜萌发(4 °C)的温度条件下种子中的对苯二酚含量的变化.

HPLC 检测结果显示,在 4 °C 条件下种子层积过程中,对苯二酚的含量略有下降和波动,但水平一直较高(表 4). 第 0 天种子的含量最高,为 932.56 mg/L;第 20 天种子的含量有所下降,但从整体上来看,各时期种子之间对苯二酚的含量都维持较高的水平.

表4 4 °C 培养条件下七叶一枝花种子中对苯二酚的含量

Tab. 4 Hydroquinone content in *Paris polyphylla* var. *chinensis* seeds at 4 °C

培养天数/d	0	20	40	60	70	80
对苯二酚质量浓度/(mg/L)	932.56±26.28a	729.67±28.34c	760.58±25.60bc	886.09±46.63ab	758.03±21.25bc	809.42±24.55b

注:不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著.

在 22 °C 条件下种子层积过程中,对苯二酚的含量呈显著下降趋势(表 5). 第 0 天种子的含量最高,第 20 天种子的含量与第 0 天种子相比下降了 37.9%,下降幅度明显;种子露白初期(胚根 1 mm)与第 20 天的含量变化不明显. 随着种子萌发进程的推

进,对苯二酚的含量迅速下降,胚根长度为 15 mm 时含量最低,较 0 d 种子下降了 87.1%.

由以上结果可知,在 22 °C 培养条件下,休眠的七叶一枝花种子内对苯二酚含量较高,且高于小麦种子的 IC_{50} (845.28 mg/L);随着层积时间的增加,其

表5 22℃培养条件下七叶一枝花种子中对苯二酚的含量
Tab. 5 Hydroquinone content in *Paris polyphylla* var. *chinensis* seeds at 22℃

分组	第0天	第20天	胚根1 mm	胚根3 mm	胚根8 mm	胚根15 mm
对苯二酚质量浓度/(mg/L)	932.56±26.28a	578.82±24.76b	518.53±34.90b	374.25±18.87c	252.14±26.15d	120.67±20.54e

注:不同字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著.

含量逐渐降低,第20天后降至小麦种子的 IC_{50} 以下;而4℃培养条件下,对苯二酚的含量一直处于较高水平,且整个培养期内未有种子萌发.因此,本研究认为对苯二酚可能是七叶一枝花种子的一种关键内源抑制物,其含量的持续降低与七叶一枝花种子的休眠解除有关.

2.6 对苯二酚含量变化与受体种子萌发之间的关系

考虑到七叶一枝花和小麦种子同属于淀粉类种子,因此着重分析了对苯二酚含量变化规律与小麦种子发芽率之间的关系.由表6可知,在不同浓度的0 d七叶一枝花种子浸提液处理下,小麦种子的发芽率均显著低于对照组;22℃层积的20 d,浓度为0.04、0.06、0.08 g/mL的种子浸提液处理的小麦籽的发芽率均显著增加,较0 d种子处理分别增加了27.27%、33.37%、39.71%,其中0.06 g/mL和0.08 g/mL处理组显著低于对照组;种子露出胚根(22℃层积40 d)后,不同浓度浸提液处理的小麦籽的发芽率较20 d种子处理有小幅增加,此时0.08 g/mL处理组显著低于对照组.结果表明,在七叶一枝花种子从休眠到萌发过程中,0 d、20 d、40 d(胚根1 mm)三组种子浸提液的抑制活性逐渐降低.因此,本研究推测种子的内源抑制物在休眠解除过程中存在降解的现象.此外,第20天时浸提液的抑制活性显著下降,而萌发前后活性变化不明显,这与22℃条件下对苯二酚含量的变化情况一致(表5).

3 讨论

引起种子休眠的抑制物质多种多样.本课题组前期研究表明,七叶一枝花种子浸提液对多种植物种子的萌发产生了抑制作用,且80%甲醇浸提液的甲醇分离相为抑制活性最强的分离相,推测可能与组分中含有较多种类的抑制物有关.

本研究鉴定得到的17种被报道具有抑制活性的化合物,在七叶一枝花种子萌发过程中抑制物的种类和含量均发生了明显变化.种类变化表现为先增加后减少的趋势.含量的变化情况大致分为三种.首先是先升高后降低的类型,如桉叶油醇、 β -

表6 七叶一枝花种子萌发前期浸提液对小麦籽发芽的影响

Tab. 6 Effect of seed extract of *Paris polyphylla* var. *chinensis* at early germination stage on wheat seed germination

	浸提液浓度/(g/mL)	相对发芽率/%	抑制率/%
第0 d	0(CK)	100.00±0.00a	0.00
	0.02	75.56±7.76b	24.44
	0.04	55.56±4.31c	44.44
	0.06	40.96±5.32cd	59.04
	0.08	26.46±7.34d	73.54
第20 d	0.02	94.36±2.40a	5.64
	0.04	82.83±4.45ab	17.17
	0.06	74.33±1.37b	25.67
	0.08	66.17±6.82b	33.83
胚根1 mm	0.02	99.28±2.39a	0.72
	0.04	85.23±1.50ab	14.77
	0.06	80.00±9.37ab	20.00
	0.08	71.56±8.76b	28.44

注:不同字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著.

石竹烯,这一结果与李昭玲^[13]的研究结果一致,这暗示着重楼种子中的抑制物在种子层积过程中可能存在先合成后降解的现象.其次,棕榈酸、十八烷酸、亚麻酸C18:2、对苯二酚、2-甲基吡嗪和二氧化丁二烯的含量呈下降趋势,这与高云鹏^[25]在紫荆种子中的研究结果一致.这表明一方面这些化合物中的某些物质可能是七叶一枝花种子的内源抑制物,随着种子培养时间的增加,抑制物质逐渐降解,种子受到的抑制作用减弱,从而产生萌发;另一方面这些化合物中的某些物质也可能是作为七叶一枝花种子的营养物质,随着种子培养时间的增加,逐渐消耗为种子萌发提供能量,从而产生萌发.最后,乙酸、棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯和亚油酸甲酯的含量呈上升趋势,预示着,这些物质可能参与七叶一枝花种子功能性脂肪酸合成与代谢途径,是一类具有重要功能的生物分子,在种子萌发的过程中逐渐积累,共同服务于种子的生长发育^[26].另外,本研究中甲醇相提取液中分离出的抑制物质的种类较多,但各抑制物质的相对含量较低.这一方面可能是由于GC-MS检测到的糖类物质的相对含量较高,使得内源抑制物的检测信息被弱化;另一方面,可能是由于内源抑制物在植物种子中本身含量较低,在代谢

过程中可能通过信号的级联放大作用调控休眠^[27]。因此,需要对关键内源抑制物进一步做绝对定量检测,以便深入解析抑制物在种子休眠中的作用。

在诸多内源抑制物中,对苯二酚对白菜、小麦和绿豆种子的萌发都表现出了抑制作用。GC-MS鉴定结果表明,在22℃培养条件下,休眠七叶一枝花种子(0 d)中的对苯二酚相对含量较高,随着层积时间的增加,其含量逐渐降低,并在种子休眠解除时(胚根长1 mm)显著降低;此外,种子浸提液的抑制活性检测结果显示,随着种子的萌发其前期的浸提液的抑制活性呈降低趋势,与对苯二酚含量的变化趋势一致,这些结果表明对苯二酚可能是七叶一枝花种子的关键内源抑制物,其含量的降低与七叶一枝花种子的休眠解除有关,并且很可能是因为对苯二酚含量的降低,减弱了种子萌发受到的抑制效果,从而实现种子萌发。

研究种子内源抑制物质的抑制活性时,多以对受体植物种子萌发的半数抑制浓度为标准。对苯二酚对油脂类(白菜)、淀粉类(小麦)和蛋白类(绿豆)种子萌发的抑制活性实验表明对苯二酚标准溶液对上述种子的萌发均表现为双重作用,在较低浓度时(≤ 10 mg/L)表现为促进作用,而在较高浓度时(≥ 1000 mg/L)表现为抑制作用,这与KAMRAN等^[17]的研究结果相符合,即对苯二酚在低浓度促进种子萌发,高浓度抑制种子生长。此外,4℃和22℃培养条件下的种子均含有对苯二酚,在4℃种子层积过程中,对苯二酚的含量一直维持在较高水平范围内波动;而在22℃种子层积过程中,休眠种子(0 d)中的对苯二酚含量很高,而后随着层积时间的延长,其含量呈迅速降低趋势,并在第20天时降至小麦种子的 IC_{50} 以下,随后在第30天观察到种子萌发。上述情况可能是因为七叶一枝花种皮在层积过程中吸水变软,使部分抑制物透过种皮而渗出。此外,当种子层积至第20天时,22℃种子的对苯二酚含量比4℃种子下降更明显,从而推测暖温条件可能更有利于七叶一枝花种皮的软化,使透性增加,从而加速抑制物的溢出。

遗憾的是,由于时间关系以及材料不足等条件的限制,本研究未能进行对苯二酚对七叶一枝花种子的半抑制浓度测定,以及不同时期七叶一枝花种子浸提液对自身种子的生物活性检测,后期将进一步考察对苯二酚对七叶一枝花种子萌发率的影响。

参 考 文 献

- [1] 宋发军,吕昕芮,刘祖懿,等.七叶一枝花中两个尿苷二磷酸糖基转移酶基因的克隆和原核表达[J].中南民族大学学报(自然科学版),2022,41(3):277-284.
- [2] 刘贺贺,梁玖华,阮成江,等.中药重楼种子繁殖技术研究进展[J].种子科技,2019,37(13):18-19,21.
- [3] OSBORNE D J. Dormancy as a survival stratagem [J]. *Annals of Applied Biology*, 1981, 98(3): 525-531.
- [4] FINCH-SAVAGE W E, LEUBNER-METZGER G. Seed dormancy and the control of germination [J]. *The New Phytologist*, 2006, 171(3): 501-523.
- [5] KERMODE A R. Role of abscisic acid in seed dormancy [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2005, 24(4): 319-344.
- [6] KHAN A A. Primary, preventive and permissive roles of hormones in plant systems [J]. *The Botanical Review*, 1975, 41(4): 391-420.
- [7] BLAKE P S, TAYLOR J M, FINCH-SAVAGE W E. Identification of abscisic acid, indole-3-acetic acid, jasmonic acid, indole-3-acetonitrile, methyl jasmonate and gibberellins in developing, dormant and stratified seeds of ash (*Fraxinus excelsior*) [J]. *Plant Growth Regulation*, 2002, 37(2): 119-125.
- [8] 傅家瑞. 种子生理[M]. 北京: 农业出版社, 1992.
- [9] 齐永平,顾蔚,罗成,等.秦岭华中五味子种子内源抑制物活性研究[J].种子,2009,28(8):1-3,8.
- [10] 孙玉琴,杨莉,陈中坚,等.屏边三七种子后熟生理研究Ⅱ.层积后的种子内源抑制物粗提取及生物活性测定[J].西南农业学报,2019,32(1):75-80.
- [11] 陈伟,杨奕,马绍宾,等.滇重楼种子休眠类型的研究[J].西南农业学报,2015,28(2):783-786.
- [12] 古今,吴梅,李文春,等.滇重楼种子中萌发抑制物质活性的研究[J].现代中药研究与实践,2013,27(1):10-12.
- [13] 李昭玲,童凯,闫燊,等.变温层积过程中重楼种胚后熟生理生化的变化[J].中国中药杂志,2015,40(4):629-633.
- [14] 赵燕,魏玉兰,毛美琴,等.滇重楼种子内源抑制物质的活性研究[J].西北植物学报,2017,37(10):2025-2032.
- [15] 陈诗,陈盛虎,王云龙,等.基于“辨状论质”木瓜性状与主要成分含量的相关性研究[J].中南民族大学学报(自然科学版),2024,43(3):332-337.
- [16] 宋发军,黄珍,罗忠,等.代谢组学及其在药用植物研究中的应用[J].中南民族大学学报(自然科学版),2016,35(2):36-41.
- [17] 北京计算机技术及应用研究所.一种基于质谱数据的化合物相似度检测方法:CN202011412426.X[P].

- 2021-03-09.
- [18] KAMRAN M, KHAN A L, ALI L, et al. Hydroquinone: A novel bioactive compound from plant-derived smoke can cue seed germination of lettuce [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2017, 5: 30.
- [19] ZOHAR M, MATZRAFI M, ABU-NASSAR J, et al. Subcritical water extraction as a circular economy approach to recover energy and agrochemicals from sewage sludge [J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 285: 112-114.
- [20] 高云鹏. 紫荆种子休眠解除过程中生理生化变化及分子机理研究[D]. 南京:南京林业大学, 2020.
- [21] 孙佳, 郭江帆, 魏朔南. 植物种子萌发抑制物研究概述[J]. *种子*, 2012, 31(4): 5.
- [22] BELLALLOUI N, SMITH J R, MENGISTU A, et al. Evaluation of exotically-derived soybean breeding lines for seed yield, germination, damage, and composition under dryland production in the midsouthern USA [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 176.
- [23] IBANEZ M D, BLAZQUEZ M A. Phytotoxicity of essential oils on selected weeds: Potential hazard on food crops [J]. *Plants*, 2018, 7(4): 79.
- [24] EMERY G. Biological effects of a chemical mutagen, diepoxybutane, on tomato [J]. *Science*, 1960, 131(3415): 1732-1733.
- [25] SANCHEZ-MUNOZ B A, AGUILAR M I, KING-DIAZ B, et al. The sesquiterpenes β -caryophyllene and caryophyllene oxide isolated from *Senecio salignus* act as phyto-growth and photosynthesis inhibitors [J]. *Molecules*, 2012, 17(2): 1437-1447.
- [26] 张慧, 曾玲力, 王晓文, 等. 阿育魏种子中脂肪酸含量的测定[J]. *新疆医科大学学报*, 2003, (5): 488.
- [27] 傅强, 杨期和, 叶万辉. 种子休眠的解除方法[J]. *基因组学与应用生物学*, 2003, 3(3): 230-234.

(责编&校对 姚春娜)