

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201510018

杨凯,李磊,龙光强,等. 顽拗性三七种子后熟过程超微结构和抗氧化酶变化 [J]. 广西植物, 2016, 36(12):1519-1525
YANG K, LI L, LONG GQ, et al. Changes of antioxidant enzyme and ultrastructure in recalcitrant seeds of *Panax notoginseng* during after-ripening process [J]. Guihaia, 2016, 36(12):1519-1525

顽拗性三七种子后熟过程超微结构和抗氧化酶变化

杨凯^{1,2}, 李磊^{1,2}, 龙光强¹, 孟珍贵¹, 李龙根¹, 陈军文^{1,2*}

(1. 云南农业大学 云南省优势中药材规范化种植工程研究中心, 昆明 650201;
2. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 昆明 650201)

摘要: 该研究以3年生三七成熟种子为材料,通过对三七种子种胚切片观察、抗氧化酶活性测定及相关基因表达量的变化分析,从生理、形态及转录组3个层面了解顽拗性三七种子的内在机理。结果表明:三七种子后熟0~40 d,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和谷胱甘肽还原酶(GR)的活性先升高后降低,过氧化物酶(POD)的活性升高。后熟40 d时SOD、POD、CAT、APX相关差异表达基因的FPKM值分别为28、13、356、105,皆处于较高水平,此时观察到完整的细胞结构,种胚完成形态成熟,丙二醛(MDA)含量达到了最高值,说明三七种子内部抗氧化系统抵御氧化伤害最激烈,对水分胁迫造成的氧化伤害最为敏感。伴随后熟时间的延长,膜脂过氧化作用加剧造成细胞膜的降解,导致细胞功能丧失和畸形死亡,抗氧化系统酶活性降低不能有效抵御氧化伤害可能是导致顽拗性三七种子脱水敏感的重要原因之一。

关键词: 三七, 后熟作用, 脱水敏感性, 超微结构, 抗氧化系统

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2016)12-1519-07

Changes of antioxidant enzyme and ultrastructure in recalcitrant seeds of *Panax notoginseng* during after-ripening process

YANG Kai^{1,2}, LI Lei^{1,2}, LONG Guang-Qiang¹, MENG Zhen-Gui¹,
LI Long-Gen¹, CHEN Jun-Wen^{1,2*}

(1. Yunnan Provincial Research Center on Good Agricultural Practice for Dominant Chinese Medicinal Materials, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The changes in ultrastructure, activity of antioxidant enzyme and expression of antioxidant enzyme were examined in 3-year-old *Panax notoginseng* seeds during the after-ripening process. The objective of the present study was to analyze the desiccation sensitivity in recalcitrant seeds of *P. notoginseng* at the physiological, ultrastructural and transcriptomic levels. The results showed that during after-ripening process of 40 d, the activity of SOD, CAT, APX and GR in seeds increased at first and then reduced, and POD activity gradually increased. At the end of after-ripening period of 40 d, FPKM values of gene related to antioxidant enzymes (SOD, POD, CAT and APX) were 28, 13, 356 and 105, respectively, and all at a high. At the same time, intact cell structure was observed, and mature embryo was morphologi-

收稿日期: 2015-10-15 修回日期: 2016-01-18

基金项目: 国家自然科学基金(81360609); 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项目(2014HB011) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (81360609); the Project of Young and Middle-aged Talent of Yunnan Province (2014HB011)].

作者简介: 杨凯(1993-),女(彝族),云南普洱人,硕士研究生,主要研究方向为种子生理学,(E-mail) flove102@163.com.

*通讯作者: 陈军文,博士,教授,主要研究方向为药用植物生理生态,(E-mail) cjlw31412@163.com.

cally completed. However, the amount of MDA reached a peak value. Summarily, the peroxidations of membrane lipid caused cell membrane degradation and led to cell function loss and even cell death; meanwhile, antioxidant enzymes could not effectively resist the oxidative injury with the prolonged time of after-ripening, which may be the vital reasons for desiccation sensitivity in recalcitrant seeds of *P. notoginseng*.

Key words: *Panax notoginseng*, after-ripening, desiccation sensitivity, ultrastructure, antioxidant system

三七(*Panax notoginseng*)为五加科(Araliaceae)人参属多年生草本植物,是我国特有的名贵中药材,有“南国神草”的美誉。三七主产地和地道产区为云南省文山州,种植面积和产量均占全国的比重在90%以上。三七含有多种皂苷、氨基酸、多糖和黄酮等生理活性物质(张铭,2003),其根、茎、花均可入药,具有散瘀止血、消肿止痛、降脂、降血糖、提高机体免疫力和抗心肌缺血等功效(付建华等,2006)。三七作为具有确切的预防、医疗和保健功能的天然药物,在药品、保健品、功能食品领域具有巨大的开发潜力和市场前景。

顽拗性种子是指在成熟过程中不发生脱水行为,种子在成熟脱落时仍然保持着较高的含水量(Smith & Berjak, 1995),在整个生长发育过程对脱水和低温敏感(Pammenter & Berjak, 1999)。目前国内对种子休眠及种子脱水耐性的分子机理尚不十分明确(李晓琳等,2011),研究表明种子超微结构及其代谢活性变化与种子在生长发育过程中脱水耐性的获得有着密切的联系(Farrant et al, 1997)。顽拗性种子在脱水过程中,种子内部发生水介导的氧化伤害,即种子含水量处于中等水平时,其内部将会发生一种不受控制的氧化反应,可对种子造成脱水伤害(Leprince et al, 1996)。种子内部存在的抗氧化防御系统,可以对抗种子劣变过程中所产生的超氧阴离子自由基,酶促防御系统和非酶促防御系统共同构成抗氧化系统,前者包括SOD(超氧化物歧化酶)、POD(过氧化物酶)及CAT(过氧化氢酶)等(Cakmak et al, 1993)。当抗氧化系统酶活性下降时,种子就会发生氧化胁迫伤害。因此,在脱水过程中酶促防御系统未能对膜脂过氧化事件进行有效的抵御也可能是顽拗性种子脱水敏感性的主要原因。三七种子在成熟采收后保持着较高的含水量,在后熟过程中伴随着一定程度水分的丧失。

种子繁殖是三七农业生产上应用最为广泛的繁殖方式,然而三七种子为典型的顽拗性种子,对脱水和低温高度敏感(李磊等,2014),种子在完成形态成熟时含水量约为67.3%,此时种胚尚未完全分化,

需经过60~100 d的后熟期才能开始萌发,属生理休眠类型(安娜,2006)。由于三七种子的典型顽拗性,严重阻碍着三七种子的贮藏保存。本文在前人研究的基础上,对后熟不同时期的三七种子进行种胚切片观察、抗氧化系统酶活性及相关基因表达量的变化分析,试图从解剖学、生理学和分子生物学层面探讨三七种子脱水敏感性的原因。

1 材料与方法

1.1 供试材料

三七(*Panax notoginseng*)种子采自于云南省文山州的文山市苗乡三七实业有限公司苗乡三七科技公司的试验基地。试验基地位于文山州砚山县盘龙乡。

1.2 实验设计

选择成熟、饱满的3年生植株的种子,人工搓去果皮,用5% CuSO₄浸泡消毒,将种子冲洗干净,用滤纸吸干表面水分后与经高温消毒后的湿沙按1:5层积保存。自2014年11月19日,以每10 d的间隔进行取样,分别进行种子超微结构观察及抗氧化系统酶生理指标的测定;部分种子液氮冻存,备用转录组测序。

1.3 实验方法

1.3.1 超微结构观察 超微结构观察实验前期样品处理方法参照(Wen et al, 2009)的方法,并稍作修改。将处于不同后熟阶段的种子去掉种皮,切去种胚生长部位1 cm³左右样品,放入含2.5%戊二醛的0.2 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH7.2)中,4℃下固定24 h后经2%的锇酸固定3 h,用50%、70%、80%、90%乙醇梯度脱水各15 min,再用100%乙醇脱水3次,每次30 min, Epon812 环氧树脂包埋。用LKB-v型超薄切片机切片,切片经醋酸铀和柠檬酸铅染色后,在透射电子显微镜下观察拍照。选取不同后熟期最清晰的电镜图,使用标尺计算细胞器的大小。

1.3.2 抗氧化系统酶活性测定及丙二醛(MDA)和超氧阴离子的测定 选取不同后熟期的三七种子测定

抗氧化酶活性以及丙二醛和超氧阴离子含量, 实验设定三次重复。种子超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮蓝四唑(NBT)法(王学奎, 2006), 并以每分钟每克植物组织的反应体系对 NBT 光还原的抑制为 50% 为一个活性单位。过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法(张志良和瞿伟菁, 2003), 以每分钟每克植物组织 OD 值变化 0.01 为 1 个酶活性单位。过氧化氢酶(CAT)的活性测定采用高锰酸钾滴定法(李合生, 2006), 酶活性用每克鲜重样品 1 min 内分解 H_2O_2 的毫克数表示。抗坏血酸氧化酶(APX)活性的测定参考(Arakawa et al, 1981)的方法。谷胱甘肽还原酶(GR)活性的测定参考 Chen et al(2011)的方法。还原型谷胱甘肽(GSH)的含量测定参考 Doulis et al(1997)的方法。MDA 含量测定参考 Hodges et al(1999)的方法。超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)的含量测定参考 Elstner & Heupel(1976)的方法。

1.3.3 与抗氧化系统相关差异表达基因筛选 通过 Illumina HiSeq™2500 测序技术获得三七种子 4 个后熟时期(0、20、40、60 d)的转录本信息, 并筛选出与抗氧化系统酶相关的基因, 用 FPKM (每百万 fragments 中来自某一基因每千碱基长度的 fragments 数目)来估算不同后熟期的基因表达水平(Trapnell et al, 2010)。

1.4 数据统计分析

不同后熟时期抗氧化酶活性及氧化产物含量和抗氧化酶相关基因的 FPKM 值使用 SPSS 17.0 单因素方差分析和 Duncan 多重比较方法进行显著性差异分析, P 值 ≤ 0.05 时视为差异显著。试验独立重复 3 次($n=3$)。

2 结果与分析

2.1 超微结构观察

三七种子后熟过程中, 经透射电子显微镜观察后所得到的超微结构的变化情况如图 1 所示。刚成熟的三七种子细胞整齐饱满, 中央大液泡发达, 细胞壁内侧紧密排列着大量形状大小相对统一的椭圆形黑色脂质体, 脂质体长轴的长度一般约为 0.1 nm (图 1:a)。层积保存 20 d 时, 细胞壁明显增厚, 厚度约为初始时期的 2 倍, 脂质体排列间隔变大, 颜色变为半透明(图 1:b)。层积保存 30 d 时观察到了明显的液泡, 脂质体大小不一分散在细胞内, 并且首

次观察到了淀粉体, 淀粉体长约 2.3 μm , 宽约 1.36 μm (图 1:c)。层积保存 40 d, 可以观察到典型的椭圆形细胞核结构, 核内有核仁直径约 0.15 nm, 细胞内出现了大量的液泡, 脂质体颜色逐渐变深, 在细胞壁内侧不断积累(图 1:d-e)。层积保存 50 d 时, 细胞核较之前变小, 核仁直径约为 0.09 nm, 细胞内的脂质体又重新聚集在细胞壁的内侧(图 1:f-g); 层积保存 60 d 时, 可观察到细胞壁逐渐向内凹陷, 细胞形状畸形, 细胞间隙变大, 液泡消失, 出现了大量的形状大小规则的淀粉粒, 长约 0.89 μm , 宽约 0.64 μm , 脂质体分散排列在细胞壁内侧(图 1:h)。

2.2 抗氧化系统酶活性及氧化产物生成量测定

三七种子后熟过程中 SOD、POD、CAT、APX、GR 酶活性及 GSH 含量的变化趋势各不相同。SOD 和 POD 酶活性变化见图 2:a, b, SOD 酶活性呈现升降交替的变化趋势, 20 d 时达到整个过程最大值 29.8 $U \cdot g^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 到 40 d 时下降到最低值 3.63 $U \cdot g^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; POD 酶活性在后熟期 40 d 时达到整个后熟过程的最高值(5.40 $U \cdot g^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), 显著高于其他后熟时期($P < 0.05$), 随后呈现逐渐降低的趋势。抗氧化酶 CAT、APX 酶活性变化如图 2:c, d 所示, CAT 酶活性整体呈现出逐渐上升的变化趋势, 在后熟期 60 d 时达到最大值(4.29 $U \cdot g^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), 随后逐渐下降。APX 酶活性整体呈现出上下交替的变化趋势, 在后熟期 60 d 时, 酶活达到最小值(2.55 $U \cdot g^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), 而 70 d 时上升至最大值(4.16 $U \cdot g^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)。GR 酶活性和 GSH 含量变化见图 2:e, f, GR 酶活性在后熟期初期呈现上升趋势, 30d 时达到整个后熟过程最大值(0.58 $U \cdot g^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), 随后呈现逐渐缓慢下降趋势。GSH 含量在整个后熟过程呈现出升降交替的变化趋势, 其中在 20 d 时达到最大值(1.18 $\text{mmol} \cdot g^{-1}$), 随后直线下降至 40 d 时出现最小值(0.56 $\text{mmol} \cdot g^{-1}$)。

三七种子后熟过程中, 氧化产物(丙二醛、超氧阴离子)含量的变化情况见图 3 所示。其中, MDA 含量整体呈现上下交替的变化趋势, 在后熟期 40 d 时达到最大值 1.10 $\mu\text{mol} \cdot g^{-1}$ 。 $O_2^{\cdot-}$ 含量在后熟期 20 d 时达到整个过程最小值 29.2 $\text{nmol} \cdot g^{-1}$ Fw, 30~50 d 变化较为平缓, 后呈现直线下降的变化趋势。

2.3 与抗氧化系统相关差异表达基因的筛选与分析

为明确三七种子后熟期抗氧化系统功能的分子机理, 在所得的三七种子转录组数据库中, 筛选出后熟过程中与抗氧化系统有关酶的差异表达基因共

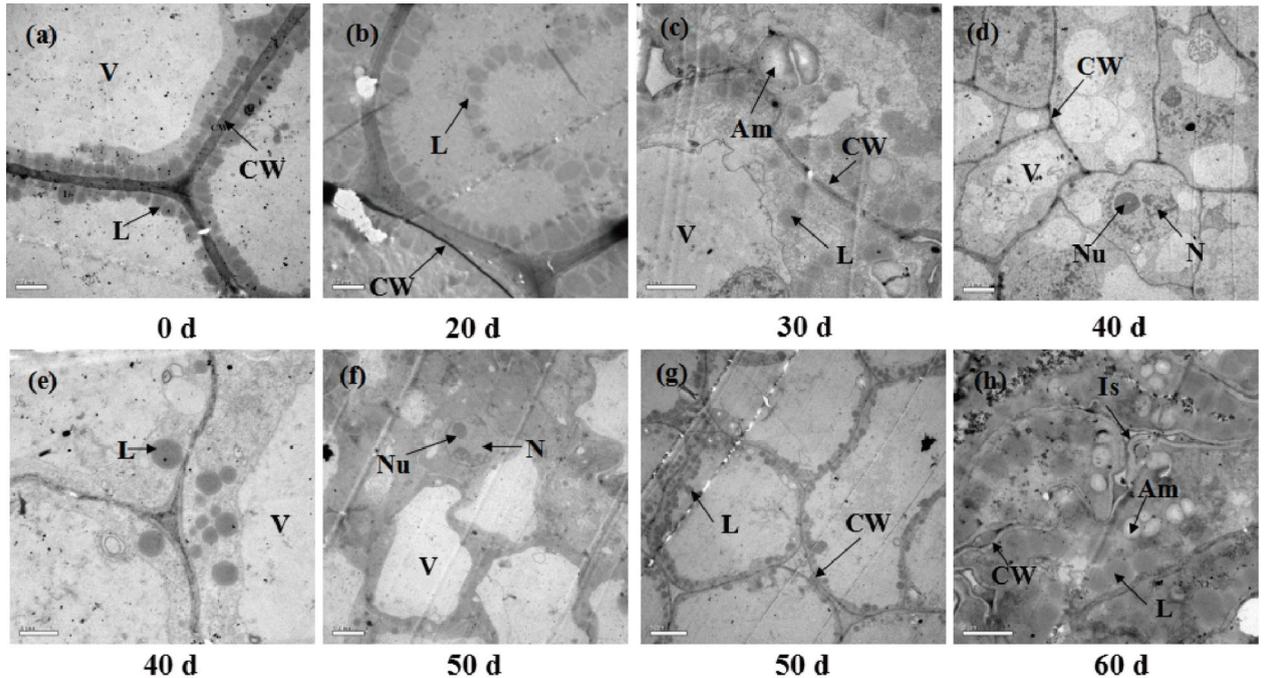


图 1 三七种子后熟过程各时期的超微结构 CW. 细胞壁; L. 脂质体; V. 液泡; Am. 淀粉体; Nu. 核仁; N. 细胞核; Is. 细胞间隙。标尺 a, b, d, f=0.2 nm; 标尺 c, h=2 μm ; 标尺 e=1 μm ; 标尺 g=5 μm 。

Fig. 1 Electron micrographs of sections from the seed of *Panax notoginseng* during after-ripening process of embryo growth CW. Cell wall; L. Lipid; V. Vacuole; Am. Amyloplast; Nu. Nucleolus; N. Nucleus; Is. Intercellular space. Scale bars: a, b, d, f=0.2 nm; c, h = 2 μm ; e = 1 μm ; g = 5 μm .

87 条,其中与 SOD、POD、CAT、APX、GR 和 GSH 合成酶相关差异表达基因分别有 25、32、17、4、7、2 条。SOD 家族相关基因表达量呈现先降后升的趋势(图 4:a),后熟 20 d 时 FPKM 值最小为 19.39,随后开始不断升高,后熟 40 d 时为 28.45,到后熟 60 d 时达到最大值为 29.59。POD 类基因表达量 FPKM 值总体呈现升高趋势(图 4:b),后熟 0 d 为最小值 6.28,后熟 40 d 为 12.96,后熟 60 d 时达到最大值 18.55。

CAT 类是所有抗氧化系统相关酶基因中差异表达量最高的,FPKM 值的变化规律为先升后降(图 4:c),后熟 0 d 的 FPKM 值最低为 189.54,后熟 20 d 达到最大值 335.16,随后出现缓慢下降趋势,后熟 40 d 时为 356.44。APX 类基因表达量在整个后熟过程中持续升高(图 4:d),后熟 0 d FPKM 值为 61.32,后熟 20 d 和 40 d 增幅较平缓,40 d 时为 104.77,到后熟 60 d 升至最大值 120.66。GR 类基因表达量表现出先降后升(图 4:e),FPKM 值在后熟 0 d 为最大值(23.87),随后出现缓慢下降趋势,在后熟 40 d 出现最低值(19.81)。GSH 相关基因表达量 FPKM 值在整个后熟过程中表现为升降交替

变化(图 4:f),于 20 d 达到最大值(12.83),随后开始下降至后熟 40 d 为最低值(7.61)。

3 讨论

种子的顽拗性是以活跃的组织代谢为特征表现的,如顽拗性长叶罗汉松(*Podocarpus henkelii*)的种子成熟时保持着高含水量,其种胚细胞含有大量的线粒体且所有细胞器代谢活跃,对正常性玉米种子胚根细胞的研究,发现种子萌发伴随着大量的线粒体退化,液泡减少,而淀粉粒、质粒和蛋白体不断积累。三七种子在后熟脱水过程中,种胚形态超微结构的发育也是伴随着生理生化的变化进行的(段承俐等,2010)。本研究结果显示胞超微结构在后熟 20、40、60 d 发生了很明显的变化,同时这也是几个重要的抗氧化酶变化的转折点,三七种子在后熟初期,细胞代谢旺盛,中央大液泡规则饱满,种子具有较高含水量。随着时间的推进,液泡逐渐缩小,种子含水量下降,油脂体颜色变浅并逐渐分散,可观察到一些淀粉体,推测此时贮藏物质可能由油脂向淀粉

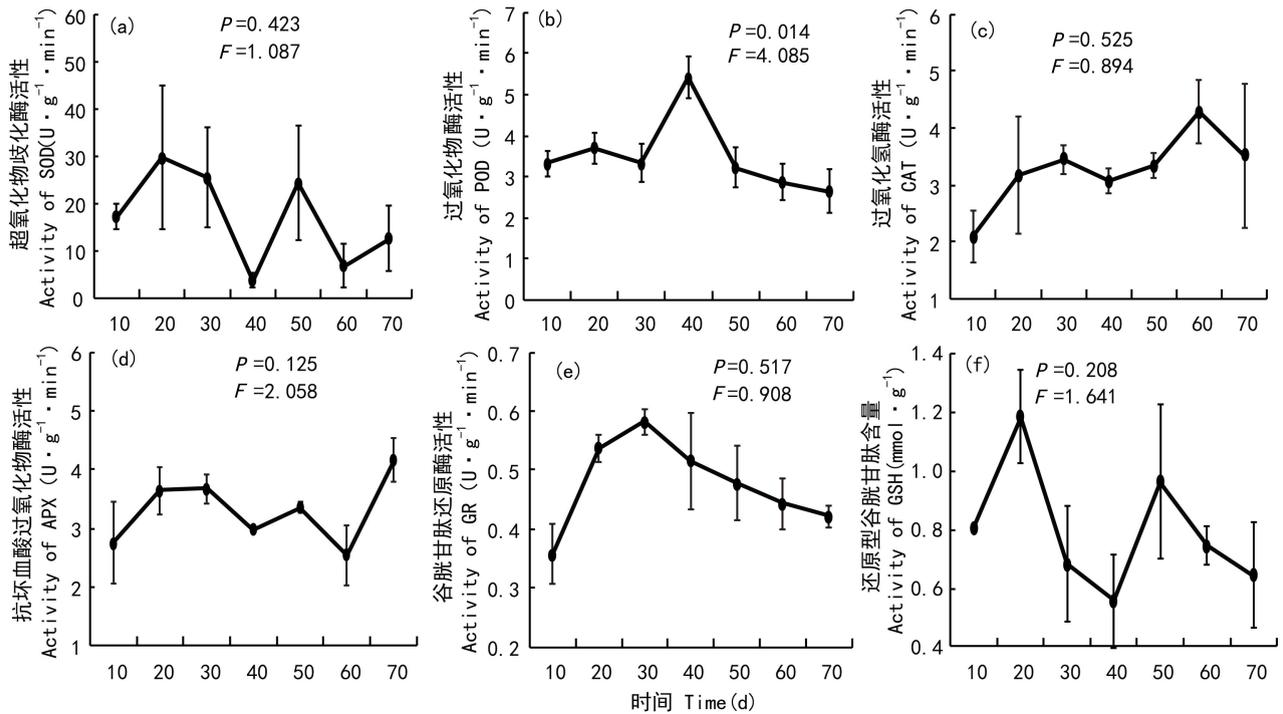


图2 三七种子后熟过程中超氧化物歧化酶(SOD, a)、过氧化物酶(POD, b)、过氧化氢酶(CAT, c)、抗坏血酸过氧化物酶(APX, d)和谷胱甘肽还原酶(GR, e)活性及还原型谷胱甘肽(GSH, f)含量的变化 数据是平均值 \pm 标准误($n=3$)。下同。

Fig. 2 Changes in activities of SOD (a), POD (b), CAT (c), APX (d), GR (e) in the process of embryo growth after-ripening of *Panax notoginseng* seed and content of GSH (f) Values for each point were $\bar{x} \pm s_x$ ($n=3$). The same below.

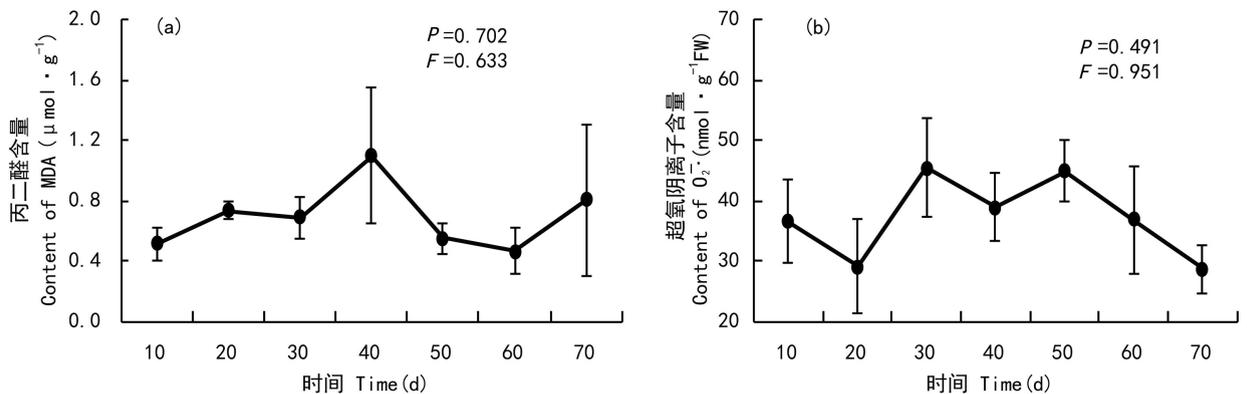


图3 三七种子后熟过程中脂质过氧化物丙二醛(MDA, a)、超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$, b)含量的变化

Fig. 3 Changes in content of MDA (a) and $O_2^{\cdot-}$ (b) in the process of embryo growth after-ripening of *Panax notoginseng* seed

转化。在后熟层积 40 d 时,细胞高度分化,贮藏物质减少,三七种子所受氧化伤害最为严重,此时为三七种子种胚完成形态成熟的时间,随后,细胞开始退化,细胞器代谢活性下降。

ROS 清除酶的失效以及抗氧化循环系统的裂解,导致氧化伤害以及种子活力的丧失 (Varghese et al, 2011)。本研究结果表明后熟层积过程的前 30 d, SOD 对于 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的氧化伤害起到了一定的抵

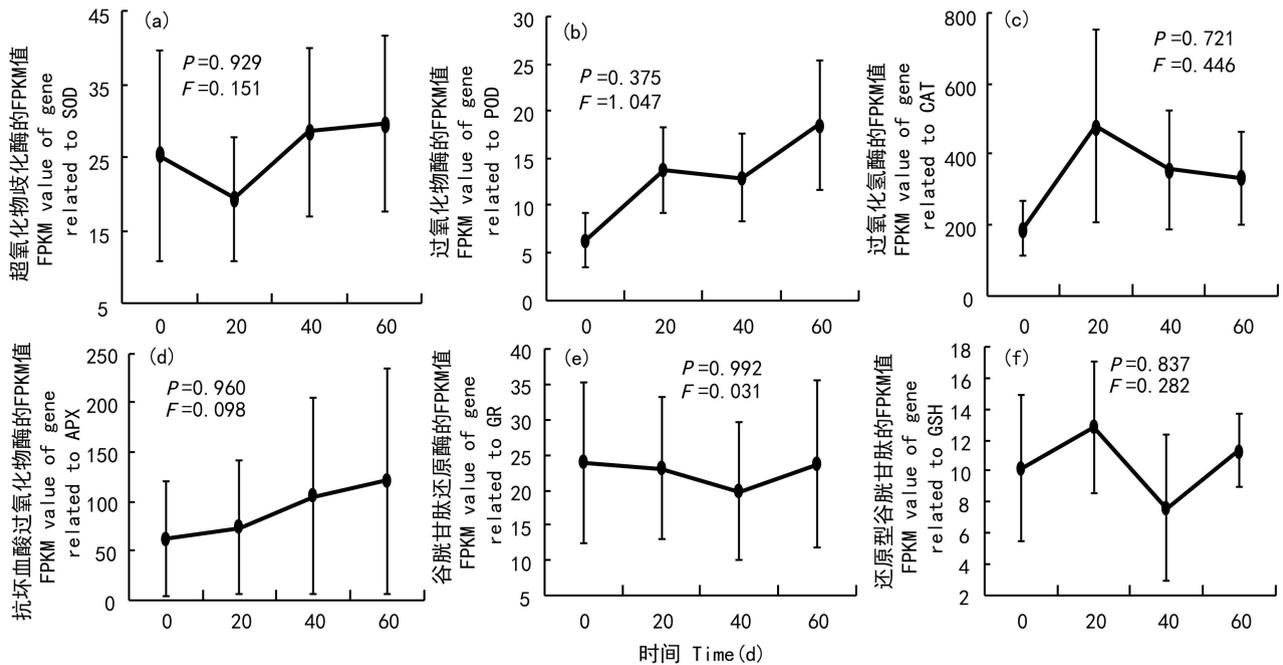


图4 三七种子后熟过程中超氧化物歧化酶(SOD, **a**)和过氧化物酶(POD, **b**)过氧化氢酶(CAT, **c**)、抗坏血酸过氧化物酶(APX, **d**)和谷胱甘肽还原酶(GR, **e**)及还原型谷胱甘肽(GSH, **f**)相关基因的FPKM值

Fig. 4 FRKM related to SOD (**a**), POD (**b**), CAT (**c**), APX (**d**), GR (**e**) and GSH (**f**) of *Panax notoginseng* seed at different after-ripening stages

御作用,但30 d之后,随着 $O_2\cdot$ 自由基的不断积累,其产生的氧化伤害逐渐大于SOD的清除能力,SOD酶活性出现下降趋势;40 d后SOD酶活性逐渐增强,两者相互制约,因此出现升降交替的变化趋势。APX和GR是植物抗坏血酸—谷胱甘肽循环中的关键酶,GR活性与细胞GSH库的水平有关,GSH含量及GR活性作为机体抗氧化状态的重要标志;三七种子在后熟层积前30 d内,GR酶活性呈现上升的趋势,被还原生成的GSH含量随之增高;30 d以后,随着GR酶活性的下降,GSH含量逐渐降低到相对较低的水平。因此,推测抗坏血酸—谷胱甘肽循环系统在种子后熟30 d前起到了一定的抗氧化作用。植物细胞内的MDA含量直接反应了受氧化伤害的程度(陆定志等,1997),三七种子后熟40d时SOD、CAT、APX和GR酶活性均呈现下降趋势,MDA达到了最高值,此时的三七种子内部受到的脂质过氧化伤害最为严重,虽然POD活性在此时达到最大值,但依靠单一抗氧化酶并不能有效抵御ROS的氧化伤害作用。

在组织中,当编码酶促抗氧化剂的基因增量表达时,由氧化事件引起的细胞毒素产物的清除对于

提高脱水胁迫耐性具有重要意义(Ingram & Bartels, 1996)。三七种子后熟过程中,SOD相关基因在种子种胚形态生长期少量表达,说明此时种子内部受到的氧化胁迫较小,而在种子后熟40 d时表达量明显增加,这也验证了此时种子内部所受氧化伤害程度严重的结果。POD相关基因在后熟期差异表达总体上呈现持续升高,说明在整个后熟过程中POD起到了抵御氧化伤害的作用。CAT相关基因差异表达量最高,可见该基因对三七种子所受氧化伤害较为敏感。APX相关基因表达量在整个后熟期持续升高,而酶活性在后熟40 d和60 d时较低,推测后熟60 d时种子内所受到由 H_2O_2 引起的氧化伤害程度最为严重。GSH受谷胱甘肽合成酶基因调控,其差异表达量在各时期相对较小,后熟期20 d时表达量最高,推测种子在后熟20 d时GR和GSH发挥着重要的ROS清除功能。可见,三七种子后熟过程中每种抗氧化酶基因的表达模式都是独特而又复杂的。

总的来看,三七种子后熟过程中,SOD、POD、CAT、APX相关差异表达基因的FPKM值总体呈现升高趋势。后熟前20 d,SOD、APX、GR活性升高,

对氧化伤害起到抵御作用;后熟 40 d 时,细胞代谢活性最强,种胚完成形态成熟,SOD、POD、CAT、GR 活性下降,MDA 大量积累,此时种子对氧化伤害最为敏感;后熟 60 d 时膜脂过氧化加剧,抗氧化系统酶活性降低,导致细胞功能的丧失和畸形死亡。由此可见,抗氧化酶系统不能有效抵御氧化伤害可能是导致三七种子脱水敏感性的重要原因之一。

参考文献:

- AN N, 2006. Studies on fruit development and seed after-ripening characteristics of *Panax notoginseng* [D]. Kunming: Yunnan Agriculture University: 42-46. [安娜, 2006. 三七果实发育和种子后熟特性研究 [D]. 昆明: 云南农业大学: 42-46.]
- ARAKAWA N, TSUTSUMI K, SANCEDA NG, et al, 1981. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4, 7-diphenyl-1, 10-phenanthroline [J]. Agric Biol Chem Tokyo, 45(5): 1289-1290.
- CAKMAK I, STRBAC D, MARSCHNER H, 1993. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds [J]. J Exp Bot, 44(1): 127-132.
- CHEN X, LI W, LU Q, et al, 2011. The xanthophyll cycle and antioxidative defense system are enhanced in the wheat hybrid subjected to high light stress [J]. J Plant Physiol, 168(15): 1828-1836.
- DODD MC, VAN STADEN J, SMITH MT, 1989b. Seed germination in *Podocarpus henkelii*: an ultrastructural and biochemical study [J]. Ann Bot, 64(5): 569-579.
- DOULIS A, DEBIAN N, KINGSTON-SMITH AH, et al, 1997. Characterization of chilling sensitivity in maize. I. Differential localization of antioxidants in maize leaves [J]. Plant Physiol, 114: 1031-1037.
- DUAM CL, LI ZT, DING JL, et al, 2010. Physiologic characteristics of *Panax notoginseng* seeds during after-ripening process [J]. Chin J Chin Mater Med, 35(20): 2652-2656. [段承俐, 李章田, 丁金玲, 等, 2010. 三七种子的后熟生理特性研究 [J]. 中国中药杂志, 35(20): 2652-2656.]
- ELSTNER EF, HEUPEL A, 1976. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium chloride: a simple assay for superoxide dismutase [J]. Anal Biochem, 70(2): 616-620.
- FARRANT JM, PAMMENTER NW, BERJAK P, et al, 1997. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance [J]. Seed Sci Res, 7(2): 135-144.
- FU JH, LI XZ, SHANG XH, et al, 2006. Protective effects of saponines of stem and leaf of *Panax notoginseng* on acute myocardial ischemia in anaesthetic dogs [J]. Chin J Chin Mat Med, 31(1): 62-65. [付建华, 李欣志, 尚晓泓, 等, 2006. 三七茎叶皂苷对麻醉犬急性心肌缺血的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 31(1): 62-65.]
- HODGES DM, DELONG JM, FORNEY CF, et al, 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds [J]. Planta, 207(4): 604-611.
- INGRAM J, BARTELS D, 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants [J]. Ann Rev Plant Biol, 47(1): 377-403.
- LI XL, SHAO AJ, CHEN M, et al, 2011. Advances in study of seed of *Panax notoginseng* [J]. Seed, 30(7): 63-65. [李晓琳, 邵爱娟, 陈敏, 等, 1996. 三七种子研究进展 [J]. 种子, 30(7): 63-65.]
- LEPRINCE O, HENDRY GAF, ATHERTON NM, et al, 1996. Free radicals and metabolism associated with acquisition and loss of desiccation tolerance in developing seeds [J]. Biochem Soc Trans, 24: 451-455.
- LI L, SUN XT, ZHANG GH, et al, 2014. Effect of drying rates on the desiccation sensitivity and antioxidant enzyme activities of recalcitrant *Panax notoginseng* seeds [J]. Seed, 33(12): 1-5. [李磊, 孙雪婷, 张广辉, 等, 2014. 脱水速率对顽拗性三七种子脱水敏感性和抗氧化酶活性的影响 [J]. 种子, 33(12): 1-5.]
- LI HX, 2000. Principles and techniques of plant physiological and biochemical experiment [M]. Beijing: Higher Education Press: 166-167. [李合生, 2000. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社: 166-167.]
- LU DZ, FU JR, SONG SQ, 1997. Plant senescence and regulation [M]. Beijing: China Agriculture Press: 33-34. [陆定志, 傅家瑞, 宋松泉, 1997. 植物衰老及其调控 [M]. 北京: 中国农业出版社: 33-34.]
- PAMMENTER NW, BERJAK P, 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms [J]. Seed Sci Res, 9(01): 13-37.
- SMITH MT, BERJAK P, 1995. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds [M]// KIGEL J, GALILI G (eds). Seed development and germination. New York: Marcel Dekker Inc: 701-746.
- TRAPNELL C, WILLIAMS BA, PERTEA G, et al, 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during celldifferentiation [J]. Nat Biotechnol, 28(5): 511-515.
- VARGHESE B, BERJAK P, VARGHESE D, et al, 2011. Differential drying rates of recalcitrant *Trichilia dregeana* embryonic axes: a study of survival and oxidative stress metabolism [J]. Physiol Plant, 142(4): 326-338.
- WANG XK, 2006. Principles and techniques of plant physiological and biochemical experiment [M]. Beijing: Higher Education Press: 172-173. [王学奎, 2006. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社: 172-173.]
- WEN B, WANG R, SONG S, 2009. Cytological and physiological changes related to cryotolerance in orthodox maize embryos during seed development [J]. Protoplasma, 236(1-4): 29-37.
- ZHANG M, 2003. Internationalization of *Panax notoginseng* produced in Wenshan [J]. Chin Ecol Week, (21): 1-4. [张铭, 2003. 神奇仙草生南国文山三七走向世界 [J]. 中国经济快讯, (21): 1-4.]
- ZHANG ZL, QU WJ, 2003. Experimental manual of plant physiology [M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press: 123-124. [张志良, 瞿伟菁, 2003. 植物生理学实验指导(第三版) [M]. 北京: 高等教育出版社: 123-124.]