

人工老化对青川产北柴胡种子生理生化特性的影响

姚入宇¹, 陈兴福^{1*}, 谌琴琴¹, 屈晓霞¹, 王菲¹, 杨兴旺²

1. 四川农业大学农学院 农业部西南作物生理生态与耕作重点实验室, 四川 温江 611130

2. 四川德培源中药科技开发有限公司, 四川 绵阳 621000

摘要: 目的 探究青川产北柴胡种子的劣变机制, 揭示其不耐贮藏的原因。方法 采用人工老化的方法处理柴胡种子, 并分析老化过程中种子的抗氧化酶活性、电导率和营养物质质量变化。结果 随老化时间延长, 老化种子的过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、抗氧化酶(CAT)活性持续下降; 可溶性糖和可溶性蛋白的量降低, 老化3 d后均处于低量水平; 种子浸出液电导率下降; 经老化处理1 d的种子即已丧失萌发能力。结论 青川产北柴胡种子劣变机制包含氧化损伤、膜损伤和营养物质过度消耗3条途径, 种子不宜长期贮藏, 且贮藏要避免高温、高湿环境。

关键词: 北柴胡; 种子; 人工老化; 劣变; 贮藏

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)06-0844-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.06.020

Effects of artificial aging on physiological and biochemical characteristics of *Bupleurum chinense* seeds from Qingchuan county

YAO Ru-yu¹, CHEN Xing-fu¹, SHEN Qin-qin¹, QU Xiao-xia¹, WANG Fei¹, YANG Xing-wang²

1. Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Farming System in Southwest China, Ministry of Agriculture, College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China

2. Sichuan Depeiyuan Traditional Chinese Medicine Technology Development Co., Ltd., Mianyang 621000, China

Abstract: Objective To investigate the deterioration mechanism of *Bupleurum chinense* seeds from Qingchuan county, thus to study the seeds harvesting and storage characteristics, and to reveal the deterioration mechanism. **Methods** Artificial aging method is used to study the seeds deterioration and to observe the changes of nutrient substance, anti-oxidase activities, and conductivity of seeds. **Results** While the seeds deteriorated, their activities of anti-oxidase (POD, SOD, and CAT) decreased, and the content of soluble sugar and soluble protein reduced also as the aging time prolonged. After 3 d treatment, SOD, POD, and CAT activities decreased to a low level. Moreover, the conductivity of seeds leachate decreased. The germination ability of *B. chinense* seeds lost after 1 d aging treatment. **Conclusion** The seeds deterioration mechanisms include the heavy oxidative injury, over consumption of nutrients, and membrane damage. The seeds long-time storage is inappropriate and the seeds storage should avoid from high temperature and humid environment.

Key words: *Bupleurum chinense* DC.; seed; artificial aging; deterioration; storage

柴胡 *Bupleuri Radix* 已有上千年药用历史, 含皂苷类、黄酮类、挥发油类和多糖类等多种生物活性物质^[1], 是一种世界性的植物药。现代药理研究表明其具有抗菌、解热、镇静、保肝和免疫调节等多种功效^[2-6], 极具药用价值和开发潜力。正品柴胡药材来源于北柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 和狭

叶柴胡 *B. scorzonifolium* Willd. 的干燥根^[7], 因市场需求量大, 柴胡野生资源供不应求, 目前药材主要来自于各地人工栽培。笔者通过调查发现, 生长于四川省青川县马公乡的北柴胡具有良好的品质性状, 但其种子不耐贮藏。北柴胡种子常见隔年生活力丧失^[8], 限制其规范化种植。学者考察了不同贮

收稿日期: 2013-05-27

基金项目: 国家星火计划项目(2010GA810056); 四川省科技富民强县专项计划项目“青川县柴胡现代化科技产业基地建设”; 四川省“十二五”育种攻关项目(2011NZ098-12-11)

作者简介: 姚入宇(1988—), 男, 在读硕士研究生, 药用植物学专业, 主要研究方向为药用植物生理生态与栽培。E-mail: yry0255@126.com

*通信作者 陈兴福, 教授, 博士生导师。Tel: (028)86290970 E-mail: chenxf64@sohu.com

藏温度^[9]、不同贮藏年限^[10]和不同种子含水量^[11]贮藏后北柴胡种子的质量差异,然而对其劣变机制无系统研究。青川产北柴胡种子具有典型的不耐贮藏的特点,可作为柴胡种子劣变研究的理想材料,探究柴胡种子劣变的一般规律,既可为该地方种质资源的种子高效贮藏技术提供依据,也可为研究其他柴胡种子劣变提供方法学参考,弥补柴胡种子劣变生理的理论空缺。

1 材料

供试北柴胡种子于2011年12月采自于四川省广元市青川县马公乡朝阳村,由中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所魏建和研究员鉴定为北柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的群体中采集得到。随机选取座果植株,待顶花序果实颜色变黑后割去地上部分并脱粒,使种子总量不低于100 g,采收的种子置于室内通风处阴干,净选备用。

2 方法

2.1 种子的人工老化处理与取样

将净选种子置于温度40℃、相对湿度100%的环境下进行人工老化处理^[12],每天取样,取至第7天,以室内环境贮藏的种子为对照,取样重复3次。

2.2 抗氧化酶(CAT)活性测定

参照王学奎的方法^[13],称取种子或种苗0.500 g加入pH 7.8的磷酸缓冲液进行研磨,于4 000 r/min下离心15 min提取粗酶液成1 mL,4℃低温下保存使用。取3支试管分别(S_0 、 S_1 、 S_2)均加入0.1 mL酶液、1.5 mL pH为7.8磷酸缓冲液、1.0 mL蒸馏水。将 S_0 在沸水浴煮1 min以杀死酶液,冷却。然后将所有试管在25℃下预热后,逐管加入0.3 mL 0.1 mol/L的 H_2O_2 ,每加完1管立即记时,并迅速在240 nm波长下测定吸光度(A),每隔1 min测1次,共测5 min,待3管全部测完后计算CAT酶活性,以每分钟内 A_{240} 变化0.1酶量为1个酶活性单位(U)。

$$CAT \text{ 活性} = (\Delta A_{240} \times V_T) / (0.1 \times V_S \times t \times W)$$

式中: $\Delta A_{240} = A_{S_0} - (A_{S_1} + A_{S_2}) / 2$, A_{S_0} 为加入杀死酶液的对照管的吸光度; A_{S_1} 、 A_{S_2} 为样品测定管的吸光度; V_T 为提取酶液总体积(mL); V_S 为测定时所用酶液体积(mL); W 为样品鲜质量(g); t 为从加 H_2O_2 开始到最后一次读数的时间(min); 0.1为 A_{240} 下降0.1时的1个酶活性单位(U)

2.3 过氧化物酶(POD)的测定

参照王学奎的方法^[13],称取种子0.500 g加入pH 7.8的磷酸缓冲液进行研磨,于3 000 r/min下离

心10 min提取粗酶液成1 mL,4℃低温下保存使用。分别取0.05 mol/L磷酸缓冲液2.9 mL,1% H_2O_2 1.0 mL。0.05 mol/L愈创木酚1.0 mL和0.05 mL酶液,用加热煮沸5 min的酶液为对照。反应体系加入酶液后,立即于37℃水浴中保温15 min,然后迅速转入冰浴中,并加入20%三氯乙酸2.0 mL终止反应,然后滤过,在470 nm波长下测定 A 值,每隔1 min测1次,共测5 min,计算POD酶活性,以每分钟内 A_{470} 变化0.01酶量为1个酶活性单位。

$$POD \text{ 活性} = (\Delta A_{470} \times V_T) / (0.01 \times V_S \times t \times W)$$

式中: ΔA_{470} 为反应时间内吸光度的变化, W 为样品质量(g), t 为反应时间(min), V_T 为酶液总体积(mL), V_S 为测定时取用酶液体积(mL)

2.4 超氧化物歧化酶(SOD)的测定

参照王学奎的方法^[13],称取种子0.500 g加入pH 7.8的磷酸缓冲液进行研磨,于3 000 r/min下离心10 min提取上清粗酶液成1 mL。取4支试管(2支为测定管,2支为对照管)分别都加入0.05 mol/L磷酸缓冲液1.5 mL、130 mmol/L蛋氨酸(Met)溶液0.3 mL、750 μ mol/L氮蓝四唑(NBT)溶液0.3 mL、100 μ mol/L EDTA- Na_2 液0.3 mL、20 μ mol/L核黄素0.3 mL、蒸馏水0.25 mL、酶液0.05 mL(2支对照管以缓冲液代替酶液),总体积3.0 mL。混匀后将1支对照管置暗处,其他各管于4 000 lx日光灯下反应20 min。反应结束后,以不照光的对照管作空白,分别在560 nm波长下测各管吸光度。计算SOD活性,活性单位以抑制NBT光化还原的50%为1个酶活性单位。

$$SOD \text{ 活性} = [(A_{CK}) - (A_E) \times V] / (0.5 \times A_{CK} \times W \times V_T)$$

式中: A_{CK} 为照光对照管的吸光度, A_E 为样品管的吸光度, V 为样品总体积(mL), V_T 为测定时样品用量(mL), W 为样品鲜质量(g)

2.5 种子浸出液的电导率测定

称取种子0.500 g依次用自来水、去离子水冲洗数次,用洁净滤纸吸干水分,置烧杯中,再冲洗2~3次,各加20 mL无离子水放入注射器抽气,之后将其倒入烧杯中,在室温下浸提2 h^[14]。用无离子水进行电导仪校正后,测定材料浸出液的电导率,重复3次。

2.6 可溶性糖和可溶性蛋白测定

称取净选种子0.100 g,分别用蒽酮-浓硫酸比色法和考马斯亮蓝-G250法^[14]测定种子可溶性糖和可溶性蛋白量,重复3次。

2.7 种子萌发试验

准确净选种子 50 粒各 3 份, 用 40 ℃ 清水浸种 24 h, 多菌灵 1 000 倍液浸泡消毒 30 min 置于双层滤纸-培养皿中, 20 ℃ 光照 12 h/20 ℃ 黑暗 12 h 光照培养箱中培养, 每天补水, 观察种子萌发情况, 统计萌发率, 重复 3 次。

2.8 数据处理

实验数据在 Excel 2007 和 SAS 9.2 数据处理系统中分析。

3 结果与分析

3.1 人工老化对青川产北柴胡种子主要抗氧化酶活性的影响

CAT 具有催化 H_2O_2 分解的活性, 以此减少 H_2O_2 对机体的氧化损伤。具有生活力的柴胡种子中 CAT 活性可通过其催化 H_2O_2 分解的速率测定。POD 广泛存在于植物组织中, 也是植物抗氧化酶系统的重要成员, 其催化过氧化物分解的活性可减少组织的氧化损伤。SOD 在植物组织中普遍存在, 具有催化清除机体内超氧根离子的活性, 从而减少超氧化物对机体的氧化损伤。青川产北柴胡种子的 CAT、POD、SOD 活性随老化时间的变化情况见表 1。

3.1.1 CAT 的活性变化 由表 1 可知, 老化处理使柴胡种子 CAT 活性急剧下降, 随着老化时间的增加, 其活性下降显著。未老化种子 CAT 活性可达 144.8 U/(g·min), 经过 1 d 老化后降至 62.4 U/(g·min), 降幅高达 56.9%, 方差分析表明, 两者差异极显著,

表 1 不同老化时间青川产北柴胡种子的 CAT、POD、SOD 的活性变化

Table 1 Changes of CAT, POD, and SOD activities of *B. chinense* seeds in Qing chuan county during different artificial aging periods

老化时间 / d	CAT / (U·g ⁻¹ ·min ⁻¹)	POD / (U·g ⁻¹ ·min ⁻¹)	SOD / (U·g ⁻¹)
0	144.8±9.1 a	658.0± 9.3 a	15.9±1.2 a
1	62.4±3.8 b	380.0±10.1 b	9.8±0.8 b
2	50.4±6.0 c	269.3± 4.2 c	3.3±0.8 c
3	18.4±1.1 d	123.3± 7.1 d	2.1±0.4 d
4	11.2±4.1 de	11.3± 1.5 e	1.8±0.3 d
5	4.8±0.9 e	5.3± 0.5 e	1.2±0.3 d
6	5.6±1.6 e	2.0± 1.0 e	1.4±0.2 d

不同字母代表在 5% 水平上差异显著, 下同

Different letters mean significant differences at 5% level, same as below

可见仅老化 1 d 即大大降低种子的 CAT 活性。老化 3 d 的种子 CAT 活性水平已低至 18.4 U/(g·min), 老化 4、5、6 d 的种子 CAT 活性在较低水平缓慢下降。可见, 老化前 3 d CAT 活性迅速下降, 经过 3 d 老化的种子 CAT 活性已经达较低水平, 之后在此水平下缓慢下降, 下降变化不显著。

3.1.2 POD 的活性变化 老化处理使种子的 POD 活性迅速下降。如表 1 所示, 经过 1 d 老化处理的柴胡种子 POD 活性从 658.0 U/(g·min) 降到 380.0 U/(g·min), 较未老化种子的 POD 活性下降 42.3%。此后 POD 活性随种子老化时间的增长而持续下降, 经过 4 d 老化的种子 POD 活性仅有 11.3 U/(g·min), 只有未老化种子活性的 1.7%, 可认为老化 4 d 的种子 POD 基本失活。由此可知, 老化的种子 POD 活性随老化时间迅速下降, 到老化 4 d 后处于活性极低。

3.1.3 SOD 的活性变化 由表 1 可知, 未经老化的柴胡种子 SOD 活性为 15.9 U/g, 经 1 d 老化, 其活性骤降至 9.8 U/g, 降幅达 38.5%, 经 2 d 老化的种子 SOD 活性仅为 2.1 U/g, 处在低酶活水平, 此后 SOD 酶活维持在较低水平。种子老化可显著降低其 SOD 活性, 并随老化时间增加其活性降幅增大, 老化 2 d 后, 种子 SOD 活性降至较低水平。

3.2 人工老化对青川产北柴胡种子的膜损伤效应

植物组织的膜损伤也是植物组织劣变的重要原因之一。通过测定不同老化程度的青川产北柴胡种子的电导率, 可以反映老化对种子的膜损伤情况。老化过程中青川产北柴胡种子的电导率变化见图 1。由图 1 可知, 随着老化时间的增加, 柴胡种子电导率持续下降, 到老化 3 d 和 4 d 稳定, 随后又继续下降到 200 μ S/cm; 而未经老化的青川产北柴

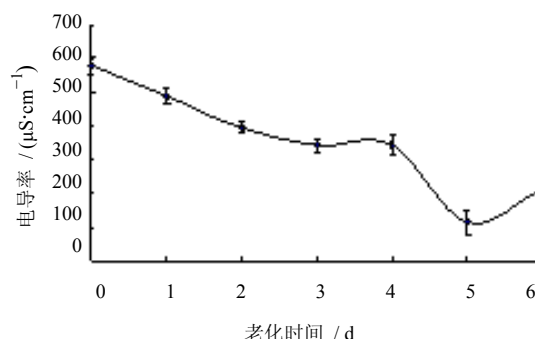


图 1 人工老化过程中青川产北柴胡种子的电导率变化
Fig. 1 Conductivity changes of *B. chinense* seeds in Qing chuan county during artificial aging period

胡种子电导率保持在 600 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 左右。因老化导致膜损伤,并使细胞内电解质浸出,一般作物种子在老化后电导率会上升。而老化的北柴胡种子电导率下降,这可能是因为北柴胡种子细小,老化所致的膜损伤导致其细胞质大量外流,从而浸提液中电解质质量较低。

3.3 人工老化对青川产北柴胡种子的可溶性糖和可溶性蛋白量的影响

可溶性糖和可溶性蛋白是影响种子生理活性的溶解态营养物质,与机体代谢强度紧密相关。不同人工老化时间的青川产北柴胡可溶性糖和可溶性蛋白的影响见表 2。

表 2 不同老化时间青川产北柴胡种子的可溶性糖和可溶性蛋白量变化

Table 2 Changes of soluble sugar and protein contents of *B. chinense* seeds in Qing chuan county during different artificial aging periods

老化时间 / d	可溶性糖 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	可溶性蛋白 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
0	87.00 $\pm$ 2.52 a	86.13 $\pm$ 4.99 a
1	75.80 $\pm$ 4.50 b	76.04 $\pm$ 3.75 b
2	59.40 $\pm$ 2.69 c	64.38 $\pm$ 0.76 c
3	40.80 $\pm$ 3.14 d	50.88 $\pm$ 1.44 cd
4	39.50 $\pm$ 1.39 de	59.00 $\pm$ 3.25 de
5	45.80 $\pm$ 3.01 ef	53.96 $\pm$ 1.37 e
6	34.70 $\pm$ 2.55 f	48.25 $\pm$ 5.26 e

由表 2 可见,老化种子的可溶性糖和可溶性蛋白含量均下降,并在老化 3 d 时达到较低量水平。老化处理前 3 d 随着老化时间的增加,可溶性糖和可溶性蛋白显著迅速,其中可溶性糖由 87.00 mg/g 降到 40.80 mg/g ,可溶性蛋白从 86.13 mg/g 降至 50.88 mg/g ,3 d 以后两者含量均在低水平内波动,稳中有降,变化较小。由此可知,种子老化伴随其溶解态营养物质的消耗,老化 3 d 可使其量降到较低水平。

3.4 人工老化对青川产北柴胡种子萌发的影响

将不同老化阶段的青川产北柴胡种子置于 20 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中做萌发试验,结果表明,未经老化的种子第 15 天开始萌发,萌发率 10.7%,然而,经过 1 d 老化的种子即已丧失萌发能力,其他老化时间更长的种子也未见萌发。由此可知,此老化方法能够导致青川产北柴胡种子的严重劣变,经老化的北柴

胡种子丧失萌发能力。

4 讨论

人工老化促使青川产北柴胡种子质量产生劣变,老化种子的 POD、SOD、CAT 3 种主要抗氧化酶活性下降、可溶性糖和可溶性蛋白量减少、浸出液电导率降低;北柴胡种子易发生劣变,经老化的种子丧失萌发能力。北柴胡种子劣变机制包含抗氧化酶系统失活所致氧化损伤、质膜损伤所致细胞质流失和溶解态营养物质质量的下降等 3 大因素。

作物种子所处的条件不能满足正常贮藏需求时,引起其内部生理生化的异常,这种异常变化累积到一定程度即致种子劣变。本实验揭示了北柴胡种子劣变的生理生化改变机制,抗氧化酶系统的破坏可致其产生氧化损伤,营养物质的过度消耗引起种子代谢异常,而膜损伤可致其细胞质外流而使机体结构发生破坏。已有研究表明,北柴胡种子属于短命种子,不耐贮藏^[8];同时,北柴胡种子的含水量也能影响其贮藏效果^[9];外界环境条件如温度和贮藏时间对种子的贮藏效果影响大^[10-11,15],这些都可能是引起上述生理生化异常的原因。因此,北柴胡种子贮藏应控制种子自身状态和外界环境,避免不利因素引起其生理生化的改变而致品质劣变。同时,检测贮藏种子的生理生化指标也有利于监控种子质量。试验还发现,老化 1 d 的种子即不能萌发,印证了北柴胡种子不耐贮藏,可能是其隔年生活力丧失^[10]的原因。青川产北柴胡种子的劣变机制为氧化损伤、质膜系统破坏和营养物质消耗,生产上宜当年采收次年播种,忌隔年贮藏,贮藏期间还应避免高温、高湿等环境对种子的不利影响。

致谢: 本实验抗氧化酶活性测试得到曾建威、陈艾萌帮助。

参考文献

- [1] Ashour M L, Wink M. Genus *Bupleurum*: a review of its phytochemistry, pharmacology and modes of action [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2011, 63(3): 305-321.
- [2] Su J K, Young J L, Byeong M K, et al. Effect of *Bupleuri radix* extracts on the toxicity of 5-fluorouracil in HepG2 hepatoma cells and normal human lymphocytes [J]. *Basic Clin Pharmacol*, 2008, 103(4): 305-313.

- [3] Wang Z, Li H, Xu H, *et al.* Beneficial effect of *Bupleurum* polysaccharides on autoimmune disease induced by *Campylobacter jejuni* in BALB/c mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124(3): 481-487.
- [4] Zhao R Z, Yuan D, Liu S J, *et al.* Liver targeting effect of vinegar-baked *Radix Bupleuri* on rhein in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 132(2): 421-428.
- [5] Su W, Xu H F, Huang H. *In vitro* anti-influenza A H1N1 effect of extract of *Bupleuri Radix* [J]. *Immunopharm Immunot*, 2011, 33(3): 433-437.
- [6] Yang C M, Zhao Y K, Wei J H, *et al.* Factors affecting embryogenic callus production and plant regeneration in anther culture of *Bupleurum chinense* [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(3): 214-220.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [8] 姚入宇, 陈兴福, 邹元锋, 等. 北柴胡种子生物学研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(17): 2429-2432.
- [9] 朴 锦, 邵天玉, 吕龙石. 不同贮藏法和处理法对长白山区柴胡种子发芽率的影响 [J]. 延边大学农学学报, 2007, 29(1): 27-29.
- [10] 潘安中, 谢树莲, 秦雪梅. 不同年份柴胡种子 SOD、POD 活性与发芽率的测定 [J]. 天津中医药, 2008, 25(3): 243-245.
- [11] 杨艳芳, 付 尧, 魏建和, 等. 不同含水量对柴胡种子生活力的影响 [J]. 种子, 2009, 28(4): 41-44.
- [12] 吴聚兰, 周小梅, 范玲娟, 等. 人工老化对大豆种子活力和生理生化特性的影响 [J]. 中国油料作物学报, 2011, 33(6): 582-587.
- [13] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [14] 熊庆娥. 植物生理实验教程 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2010.
- [15] 马英姿, 张 慧, 宋 荣, 等. 高温胁迫对蛇足石杉生理特性的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 224-228.