

发育,或提高寄主植物的抗性<sup>[13,14]</sup>等。但对于菌根真菌 AR-15 和 AR-18 促进福建金线莲生长的机制仍有待深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 福建省中医药研究院. 福建药物志 [M]. 第二册. 福州:福建科技出版社, 1982.
- [2] 蔡文燕, 肖华山, 范秀珍. 金线莲研究进展 [J]. 亚热带植物科学, 2003, 32(3): 68-72.
- [3] 黄慧莲, 刘贤旺, 吴祥松, 等. 金线莲试管苗移栽试验研究 [J]. 江西科学, 2001, 19(1): 52-54.
- [4] 郭顺星, 陈晓梅, 于雪梅, 等. 金线莲菌根真菌的分离及其生物活性研究 [J]. 中国药学杂志, 2000, 35(7): 443-445.
- [5] 于雪梅, 郭顺星. 金线莲与内生真菌共生培养体系的建立 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(2): 81-83.
- [6] 张勤, 张启能. 生物统计学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.
- [7] Smith S E. Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition [J]. *New Phytol*, 1966, 65(4): 488-499.
- [8] 庄锦华, 李年. 兰苗于共生下之生长生理 [J]. 中国园艺, 1985, 31(4): 189-200.
- [9] Smercin E A, Currah R S. Symbiotic germination of seed of terrestrial orchids of north America and Europe [J]. *Lindleyana*, 1989, 1: 6-15.
- [10] Andersson S, Jensen P, Soderstrom B. Effects on mycorrhizal colonization by *Paxillus involutus* on uptake of Ca and P by *Picea abies* and *Betula pendula* Grown in unlimed and limed peat [J]. *New Phytol*, 1996, 133(4): 695-704.
- [11] Smith S E, Read D J. *Mycorrhizal symbiosis* [M]. California: Academic Press, 1997.
- [12] 郭秀珍, 毕国昌. 林木菌根及应用技术 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1989.
- [13] Gianinazzi-Pearson V, Dumas-Gaudot E, Gollotte A, et al. Cellular and molecular defence-related root response to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi [J]. *New Phytol*, 1996, 133(1): 45-57.
- [14] Subramanian K S, Charest C. Acquisition of N by external hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus and its impact on physiological responses in Maize under drought-stressed and well-watered conditions [J]. *Mycorrhiza*, 1999, 9(2): 69-75.

## 芍药种子内源抑制物质活性的研究

张荣荣, 王康才\*

(南京农业大学中药材研究所, 江苏 南京 210095)

**摘要:**目的 通过对芍药种子内源抑制物质的研究,探讨芍药种子休眠的原因。方法 采用生物测定和离体培养的方法对芍药种子种皮、胚乳中抑制物的活性进行研究。结果 证实了芍药种子胚乳、种皮中含有一定活性的抑制物质,且两者对白菜幼根生长的抑制活性均高于对白菜种子萌发的抑制活性;胚乳乙醚萃取液纸色谱 Rf 值为 0.5 区段对白菜幼根生长抑制活性最强(根长相对百分率 36.36%);接种在不同的培养基上的离体胚均能生根,但未加 GA<sub>3</sub>培养基上的胚上胚轴不能伸长生长,说明离体胚也存在上胚轴休眠现象,或存在抑制物质。结论 芍药种子中的内源抑制物质是导致其休眠的主要原因。

**关键词:**芍药种子; 抑制物质; 胚离体培养

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)12-1880-04

### Activity of intrinsic inhibitor in seed of *Paeonia lactiflora*

ZHANG Rong-rong, WANG Kang-cai

(Institute of Chinese Medicinal Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract: Objective** To investigate the dormancy reason of the seeds by studying on intrinsic inhibitor in the seed of *Paeonia lactiflora*. **Methods** Biological methods and embryo culture were carried out to study the activity of intrinsic inhibitor in the testa and endosperm of the *P. lactiflora* seeds. **Results** The Activity of intrinsic inhibitor exists in the testa and endosperm, and both of the intrinsic inhibitors showed stronger inhibitory effect on the growth of younger roots of *Brassica pekinensis* than that on their seed germination. The Rf 0.5 section of the ether extract of endosperm showed the strongest inhibition on the growth of younger roots of *B. pekinensis* (relative rate: 36.36%). All embryos that inoculated on different culture medium could root, but the epicotyls of embryos that inoculated on culture medium without GA<sub>3</sub> could not elongate, which showed that the embryo *in vitro* also exists the dormancy of

收稿日期:2008-04-16

基金项目:江苏省资源开发局项目支持(IAIL3-2007-KJ-02)

作者简介:张荣荣(1983—),女,在读硕士研究生,河南洛阳人,研究方向为药用植物栽培与生理。

E-mail: 2006104121@njau.edu.cn

\*通讯作者 王康才 Tel: (025) 84396125 E-mail: Wangkc@njau.edu.cn

epicotyl, or embryo with inhibitor. **Conclusion** Intrinsic inhibitor in the seed of *P. lactiflora* is the main factor that results in its dormancy.

**Key words:** the seed of *Paeonia lactiflora* Pall.; inhibitor; embryo culture *in vitro*

芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 为毛茛科多年生草本植物,以根入药,传统中医认为白芍性微寒,味苦酸,有平肝止痛、养血调经、敛阴止汗等功效<sup>[1]</sup>。主产于安徽、浙江、四川等省,栽培历史悠久,长达 3 000 多年。生产中发现,芍药种子存在发芽缓慢、发芽率低、发芽不整齐等特性,但关于芍药种子具有休眠特性的研究不多。陶新宇等<sup>[2]</sup>认为芍药种子具有休眠特性是由于种皮机械障碍及外胚乳的约束力所造成,通过对种子进行机械破皮处理,发芽率可由 35% 提高到 66.7%;金飏等<sup>[3]</sup>研究得出露地播种芍药种子休眠萌发过程中,下胚轴开始伸长时脱落酸(ABA)的量迅速下降,GA<sub>1-3</sub>的量在上胚轴生长前最高,上胚轴生长后下降,而 5℃ 低温贮藏种子无萌发,ABA 的量未降低。基于此方面的原因,本实验对芍药种子中的内源抑制物质活性、存在部位进行了研究,以期进一步研究芍药种子休眠机制、确定种子预处理方法提供理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 材料:供试芍药种子系 2007 年 8 月份从连云港市天源中药材种植有限公司门河镇药材种植基地采集的种子,湿沙层积于室内阴凉处备用。

### 1.2 方法

1.2.1 种子形态与结构观察:采用清水选种法,选出饱满种粒,观察种子的形态,测定种子的大小、千粒质量。将种子浸水 24 h 后剥去种皮,剖开胚乳,徒手切片,于解剖镜下,分别观察种皮、胚乳结构和幼胚形态。

1.2.2 种子胚乳、种皮抑制物质粗提物制备:将芍药种子的胚乳、种皮分别加入研钵中研碎,加入 10 倍量的水置于 56℃ 下浸提 24 h,滤过,残渣再浸提 2 次,合并 3 次滤液,56℃ 下浓缩成一定体积,定容后,换算成每毫升粗提液相当于实验材料质量数,即为 0.1 g/mL。

1.2.3 种子胚乳、种皮粗提物的抑制活性生物测定:向 60 mm 铺有滤纸的培养皿中,分别注入总体积 2 mL 的适量水和粗提物,使培养皿中胚乳、种皮粗提物系列质量浓度分别为:0(对照)、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 g/mL。每个培养皿中放入 25 粒饱满均匀的白菜 *Brassica pekinensis* Rupr. 种子,于 (25±1)℃ 条件下黑暗中培养,24 h 测白菜种子发

芽率,48 h 测定幼根长度,试验重复 3 次。

1.2.4 粗提物对小麦种子萌发及幼苗生长的影响:取 5 g 种子加 30 mL 蒸馏水,在 45℃ 恒温下密闭浸提 1 d,另取一份去种皮后磨碎加 30 mL 蒸馏水于室温浸提 1 d 后滤过,滤液用作生物测定。在 150 mm 培养皿中加滤液 8 mL,再放入饱满均匀小麦 *Triticum aestivum* L. 种子 100 粒,用蒸馏水作为对照,于 (25±1)℃ 培养箱中 72 h 后测定小麦发芽率、芽鞘长和幼根长度,重复 3 次。

1.2.5 胚乳、种皮乙醚提取液制备及纸色谱、分段生物测定:参考赵敏等<sup>[4]</sup>的方法,将芍药种子胚乳、种皮粗提物分别用 10 mL 乙醚分两次萃取,得到胚乳、种皮乙醚提取液与胚乳、种皮乙醚萃取残余液,再分别定容至 50 mL,将 4 种提取液进行纸色谱,展开剂为正丁醇-水-氨水(80:15:5),用毛细管沿色谱纸点样线点样,每张色谱纸点样量相同,分 3 次进行,每次点液柱高 2 cm,待干燥后,再点下 1 次,色谱纸宽 6 cm,长 18 cm,当展开剂前沿距点样线 15 cm 时结束层析,晾干滤纸,将色谱纸按 Rf 值不同剪成 10 段(每段 1.5 cm),每段对折后再剪成 3 cm 两段,放入 60 mm 小培养皿中,25 粒白菜种子,注入 2 mL 蒸馏水进行生物测定,对照用展开剂推动过的滤纸,试验重复 3 次。

1.2.6 种胚离体培养:用流水将种子表皮冲洗干净,剥开种皮,于洁净工作台上,将去皮种子先用 70% 乙醇浸泡 30 s,无菌水冲洗 2 次,再用 0.1% 升汞消毒 10 min,无菌水冲洗 4~5 次。切开胚乳,用解剖针取出种胚,分别接入不加任何激素的 MS 固体培养基与 MS+GA<sub>3</sub> 固体培养基上。培养温度 (25±1)℃,光照时间 12 h/d,光照度 1 500~2 000 lx。

## 2 结果与分析

2.1 芍药种子的形态特征:芍药果实为蓇葖果,当呈蟹黄色时,种子成熟,种皮红棕色或黑褐色,形状一般为椭圆形、倒卵形,成熟种子的大小差异较大,长为 6.5~9.4 mm,宽为 6.0~8.2 mm。胚乳乳白色,遇空气,易氧化变褐;种胚比较小,仅 1~2 mm,包埋于胚乳中间,胚根圆锥形,子叶 2 枚。千粒质量为 217.35 g。

2.2 内源抑制物质活性与粗提物浓度的关系:芍药种子的胚乳、种皮中均存在着活性较高的抑制物质,

当胚乳粗提物质量浓度为 0.04 g/mL 时,抑制白菜种子萌发作用最强,发芽百分率为 22.24%,而种皮为 61.11%。但当质量浓度高于 0.04 g/mL 时,胚乳、种皮抑制作用减弱,可能与粗提物质量浓度的变化引起某些萌发促进物质的量(活性)与抑制物质的量(活性)比值增大,导致抑制萌发向促进萌发方向转变。胚乳中内源抑制物质活性高于种皮,两者对白菜幼根生长的抑制活性均高于对白菜种子萌发的抑制活性,且抑制活性随着粗提物质量浓度增大而增强的趋势明显,见表 1。

表 1 芍药种子粗提物对白菜种子萌发及对幼根生长的影响

Table 1 Effect of crude extract of *P. lactiflora* seeds on seed germination and growth of young root of *B. pekinensis*

粗提物	质量浓度/(g·mL <sup>-1</sup> )	发芽率/%	幼根生长率/%
胚乳	0.01	88.89 a	55.12 a
	0.02	72.22 b	34.11 b
	0.03	61.11 c	17.50 c
	0.04	22.24 e	13.29 d
	0.05	33.34 d	11.60 e
种皮	0.01	122.22 a	158.38 a
	0.02	72.22 c	97.20 b
	0.03	61.11 d	36.70 c
	0.04	61.11 d	26.38 d
	0.05	83.33 b	22.90 e

不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下表同

Values with different little letters are of significant difference ( $P < 0.05$ ), following tables are same

2.3 粗提物对小麦种子萌发和幼苗生长的影响:芍药的完整种子、磨碎种子的粗提物均对小麦种子萌发没有抑制作用,而完整种子粗提物基本上对小麦的生长无抑制作用;但磨碎种子粗提物对小麦幼苗的芽鞘与幼根生长的抑制作用较明显,尤对小麦的幼根生长抑制活性最强,见表 2。

表 2 芍药种子粗提物对小麦种子萌发及幼苗生长的影响

Table 2 Effect of crude extract of *P. lactiflora* seeds on seed germination and growth of young root of *T. aestivum*

处理方式	小麦种子	小麦幼苗	小麦幼苗
	发芽率:对照/%	芽鞘长度:对照/%	幼根长度:对照/%
完整种子 (45℃ 温水)	101.02	108.37	115.82
磨碎种子 (25℃ 室温)	100.00	77.27	70.59

2.4 乙醚提取液及乙醚萃取液色谱各区段活性比较:芍药种子乙醚萃取液纸色谱的不同色谱段,对种子萌发和幼苗生长的影响不同。胚乳乙醚萃取液纸色谱在 Rf 值 0.6、1.0 区段对白菜种子萌发抑制活性最强(相对发芽率为 75%),在 Rf 值 0.5 区段对白菜幼根生长抑制活性最强(根长相对百分率为

36.36%);而种皮乙醚萃取液纸色谱在 Rf 值 0.8 区段对白菜种子萌发抑制活性最强,发芽率为对照的百分率仅为 31.58%,在 Rf 值 0.5 区段对白菜幼根生长抑制活性最强,达到 61.56%,见表 3。

表 3 芍药种子胚乳、种皮乙醚萃取液色谱各区段对白菜种子萌发及幼根生长的影响

Table 3 Effect of ether extract of *P. lactiflora* endosperm and testa in different sections of paper chromatography on seed germination and growth of young root of *B. pekinensis*

Rf 值	胚乳乙醚萃取液		种皮乙醚萃取液	
	发芽率为对照的百分率/%	幼根生长为对照的百分率/%	发芽率为对照的百分率/%	幼根生长为对照的百分率/%
0.1	81.25 e	42.60 f	84.21 b	69.30 d
0.2	106.25 a	84.04 a	73.68 d	66.42 e
0.3	93.75 b	41.50 g	84.21 b	54.95 g
0.4	87.50 d	44.61 d	57.89 f	62.06 f
0.5	89.70 c	36.36 i	57.89 f	38.44 i
0.6	75.00 f	80.00 b	63.16 e	76.36 c
0.7	87.50 d	43.64 e	78.95 c	62.46 f
0.8	93.75 b	65.45 c	31.58 g	48.00 h
0.9	87.50 d	65.00 c	73.68 d	90.39 b
1.0	75.00 f	38.30 h	89.47 a	105.86 a

芍药种子萃取液中的极性物质经纸色谱展开后,不同区段对种子萌发和幼苗生长的影响也不同。胚乳乙醚萃取液纸色谱在 Rf 值 0.9 区段对白菜种子萌发抑制活性最强(相对发芽率为 64.29%),在 Rf 值 0.9 区段也对白菜幼根生长抑制活性最强(根长相对百分率 30.77%);而种皮乙醚萃取液纸色谱在 Rf 值 0.7 区段对白菜种子萌发抑制活性最强,发芽率为对照的百分率仅为 37.50%,在 Rf 值 1.0 区段对白菜幼根生长抑制活性最强,达到 65.93%。见表 4。

从总体上看,芍药种子粗提物中可能存在着两大类内源抑制物质,水溶性物质与脂溶性物质,在一定程度上都对白菜生长起到抑制作用。其中,种皮中含有的内源抑制物质对白菜种子萌发抑制活性高于胚乳,而胚乳对幼根生长抑制活性较高。

2.5 种胚离体培养:去除胚乳的胚,接种在 MS 培养基上,15 d 后子叶展开,胚根伸长约 3~4 cm,60 d 后,胚根不断伸长并生长侧根,但胚芽始终未见生长(图 1-A);而 MS+GA<sub>3</sub> 培养基上的胚,培养 10 d 后,子叶膨大明显,15 d 后,顶芽开始萌动生长,胚根稍有露出,约 1 cm 左右,30 d 后,叶柄伸长,2 枚小叶片展开(图 1-B)。根据观察结果,推测接种在未加激素的 MS 培养基上的胚,上胚轴处于生理休眠期,可能是离体胚中存在一定抑制活性物质,抑制胚芽生长;

表 4 芍药种子胚乳、种皮乙醚萃取液液相色谱各区段对白菜种子萌发的影响

Table 4 Effect of residue in ether extract of *P. lactiflora* endosperm and testa in different sections of paper chromatography on seed germination and growth of young root of *B. pekinensis*

Rf 值	胚乳乙醚萃取液		种皮乙醚萃取液	
	发芽率为对照的百分率/%	幼根生长为对照的百分率/%	发芽率为对照的百分率/%	幼根生长为对照的百分率/%
0.1	85.71 c	60.26 d	68.75 d	43.18 e
0.2	71.43 e	79.27 a	75.00 c	45.45 d
0.3	114.29 a	77.27 b	50.00 f	50.30 c
0.4	71.43 e	46.28 f	87.50 b	59.09 a
0.5	78.57 d	35.24 g	56.25 e	53.51 b
0.6	85.71 c	59.86 d	93.75 a	59.80 a
0.7	78.57 d	32.73 h	37.50 g	34.75 h
0.8	78.57 d	58.64 e	56.25 e	40.61 f
0.9	64.29 f	30.77 i	87.50 b	35.91 g
1.0	107.14 b	73.18 c	87.50 b	34.07 h

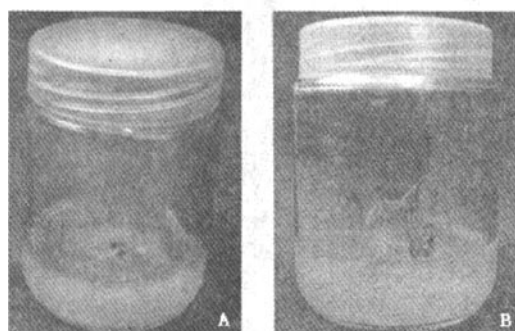


图 1 MS (A) 和 MS+GA<sub>3</sub>(B) 培养基中的胚

Fig. 1 Embryo grown on MS (A) and MS+GA<sub>3</sub> (B) culture medium

而附加 GA<sub>3</sub> 的培养基, 可以打破胚芽的休眠。

### 3 讨论

在长期的系统演化过程中, 芍药种子形成了较为特殊的休眠萌发特性, 主要表现为秋季降温时下胚轴伸长, 长出胚根, 经过冬季低温后上胚轴休眠被破除, 春季升温后胚芽出土萌发<sup>[5]</sup>。GA<sub>3</sub> 可以代替低温打破芍药种子上胚轴休眠, 说明芍药种子的激素休眠占主导地位。许多研究也指出, 种子休眠的原因复杂, 一般都是综合性的<sup>[6]</sup>。

本研究认为芍药种子胚乳乙醚萃取液在 Rf 值 0.5 区段对幼根生长抑制活性最强, 对种子的萌发抑制作用较弱, 与胚离体培养试验结果一致; 去胚乳的胚在 10 d 左右就能长出胚根, 而适当浓度的 GA<sub>3</sub> 在一定程度上能够代替低温打破上胚轴的休眠, 说明在子叶或胚中存在抑制上胚轴生长的内源抑制物质。芍药种子胚乳中存在抑制胚根生长的物质, 当胚根休眠打破后, 子叶或胚中抑制胚芽萌动的激素占主导, 各部位抑制作用大小为: 胚乳>胚(子叶)>种皮。

### 参考文献:

- [1] 方前波. 中国芍药属芍药组的分类、分布与药用 [J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(3): 28-30.
- [2] 陶新宇, 杨海兰, 李莉. 芍药种子萌发特性的研究 [J]. 赤峰学院学报, 2005, 21(6): 13-19.
- [3] 金鹰, 丁玲, 何小弟, 等. 芍药种子露地播种和低温贮藏过程中内源激素含量的变化 [J]. 南京林业大学学报, 2006, 29(6): 45-48.
- [4] 赵敏, 王炎, 张伟. 北五味子种子内源抑制物质特性的初步研究 [J]. 东北林业大学学报, 1999, 27(5): 62-64.
- [5] 李嘉珏. 中国牡丹与芍药 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1999.
- [6] 唐安军, 龙春林, 刀志灵. 种子休眠机理研究进展 [J]. 云南植物研究, 2004, 26(3): 241-251.

## 关木通 HPLC-DAD-ESI/MS 指纹图谱研究

樊夏雷<sup>1,2</sup>, 丁一冰<sup>3</sup>, 冯有龙<sup>2</sup>, 尚 姝<sup>2</sup>, 刘文英<sup>1\*</sup>

(1. 中国药科大学, 江苏 南京 210009; 2. 江苏省药品检验所, 江苏 南京 210008; 3. 南京大学医学院, 江苏 南京 210008)

**摘要:**目的 建立关木通 HPLC-DAD-ESI/MS 指纹图谱分析方法, 可用于关木通质量的评价, 为进一步开展关木通的肾毒性代谢研究提供药材质量依据。方法 用 75% 甲醇对不同产地的关木通样品进行提取, 经 HPLC-DAD-ESI/MS 联用技术分析, 建立指纹图谱, 确定共有指纹峰, 并选用两种相似度计算方法进行比较。结果 关木通中含有 30 个特征指标成分, 初步建立了 30 个共有峰为特征指纹信息的 HPLC-DAD-ESI/MS 指纹图谱。24 批被测样品的指纹图谱整体相似度在 0.871~0.998, 各产地关木通之间相似性良好。结论 方法准确可靠, 重现性好, 可应用于关木通的品质评价和质量控制。

收稿日期: 2008-06-10

作者简介: 樊夏雷(1965—), 男, 浙江绍兴人, 在读博士, 主要研究方向为色谱分析、质量标准与质量控制方法研究。

E-mail: fanxialei@sohu.com Tel: 13805165256 (025)83313672

\* 通讯作者 刘文英 Tel: (025)83271251 E-mail: lwcpu@126.com