

0.5 mm 的高,但从脱毒的角度考虑,还是以 0.5 mm 长的茎尖为宜,本实验结果与郭运玲等<sup>[14]</sup>在苕麻茎尖的实验结果一致。

3.2 植物生长调节剂对茎尖分化成苗的影响:培养基中的植物生长调节剂的种类和浓度是影响茎尖分生组织分化不定芽和不定根的主要因素<sup>[15]</sup>。在本试验中,以 MS 为基本培养基,通过 6-BA、KT 和 NAA 浓度及配比试验,结果表明,对于茎尖分化成不定芽,KT 与 NAA 组合的效果优于 6-BA 与 NAA 组合的效果;而对于不定芽生根,NAA 的效果优于 IBA,这与杨贤松等<sup>[15]</sup>在紫色甘薯茎尖培养中的实验结果不一致,可能是植物种类不同的缘故。

3.3 不同脱毒检测方法的评价:实验<sup>[14,15]</sup>表明,指示植物法和症状学法是病毒鉴定的传统方法,操作简便易行,成本低,无须贵重的设备和试剂,而且由于其结果观察的直观性和能准确地反映病毒的生物学特性,目前仍有广泛应用。但指示植物法和症状学法费工费时,检测周期长,重复性差。因此,这两种方法可以作为植物病毒病诊断的辅助方法。而 RT-PCR 病毒检测技术具有简单、快速、灵敏、特异性强、重复性好等优点,应用微量感病组织汁液即可灵敏地检测到病毒的存在。本研究首次将该方法成功地应用到黄独病毒的检测中,并对大田带毒株系以及脱毒苗进行了检测,从而为黄独脱毒苗的推广和开发奠定资源和技术基础。

#### 参考文献:

- [1] 王筱璐,杭悦宇,周义峰,等. 与黄独(*Dioscorea bulbifera*)性别相关的 RAPD-SCAR 标记研究[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(2): 1-5.
- [2] 林厚文,张 昱,赵宏斌,等. 黄药子的研究进展[J]. 中草药, 2002, 33(2): 175-177.
- [3] 陈 勇,夏启松,程 明,等. 应用基因表达谱芯片研究黄药子对小鼠肝脏的毒性机制(简报)[J]. 分子细胞生物学报, 2006, 39(6): 568-572.
- [4] Tang Z X, Zhou Y, Zeng Y K, et al. Capillary electrophoresis of the active ingredients of *Dioscorea bulbifera* L. and its medicinal preparations [J]. *Chromatographia*, 2006, 63: 617-622.
- [5] Komori T. Glycosides from *Dioscorea bulbifera* [J]. *Toxicol*, 1997, 35(10): 1531-1535.
- [6] 李建恒,潘 颖,于炳旗. 黄独不同溶剂提取物治疗恶性肿瘤临床疗效对比研究[J]. 河北职工医学院学报, 2002, 19(4): 1-2.
- [7] 郑玉红,夏 冰,杭悦宇,等. 黄独遗传多样性研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(10): 2011-2017.
- [8] 孙 伟,李 敬,马淑坤. 东北地区栽种黄独技术要点[J]. 特种经济动植物, 2007, 4: 41.
- [9] Narula A, Kumar S, Srivastava P S. Abiotic metal stress enhances diosgenin yield in *Dioscorea bulbifera* L. cultures [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 24(4): 250-254.
- [10] Chu E P, de C'assia R, Figueiredo L. Growth and carbohydrate changes in shoot cultures of *Dioscorea* species as influenced by photoperiod, exogenous sucrose and cytokinin concentrations [J]. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 2002, 70(3): 241-249.
- [11] 曾 军,兰志斌,张志勇,等. 闽西山药病毒种类的检测初报[J]. 武夷科学, 2003, 19(12): 176-178.
- [12] 徐 洁. 指示植物鉴定马铃薯病毒技术的研究与应用[J]. 中国马铃薯, 2002, 16(2): 73-75.
- [13] 吴志明,时 星,谢晓亮,等. 河北省马铃薯 Y 病毒株系分子鉴定及其 RT-PCR 检测[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(3): 54-59.
- [14] 郭运玲,郭安平,刘恩平,等. 苕麻茎尖的组织培养及其诱导植株的再生[J]. 热带作物学报, 2006, 27(1): 73-76.
- [15] 杨贤松,杨占苗,高 峰,等. 紫色甘薯的茎尖培养与脱毒[J]. 热带作物学报, 2007, 28(3): 68-73.

## 聚乙二醇对望江南种子萌发的影响

何家庆<sup>1</sup>,王 兴<sup>1,2</sup>,姚晴晴<sup>1\*</sup>

(1. 安徽大学生命科学学院,安徽省资源植物研究中心,安徽 合肥 230039;

2. 中国农业大学资源与环境学院,北京 100193)

**摘 要:**目的 以 PEG 6000 溶液处理望江南种子,研究 PEG 对望江南种子萌发的影响。方法 分别用 5% 和 10% PGE 6000 处理望江南种子,对种子发芽率、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)活性和脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的量进行测定。结果 与同期对照相比,5% PEG 6000 浸种 5 h,提高 SOD 活性和 POD 活性,降低脂质过氧化产物 MDA 的量,减少自由基积累,减轻浸种吸胀对膜系统的损伤。结论 5% PEG 浸种 5 h 提高望江南种子的发芽率。

**关键词:**聚乙二醇;望江南;种子;萌发

**中图分类号:**R282.2

**文献标识码:**A

**文章编号:**0253-2670(2009)09-1466-04

\* 收稿日期:2008-12-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30040027);安徽省星火计划资助项目(04053051)

作者简介:何家庆(1949—),男,安徽安庆人,教授,长期从事资源植物及植物分类学的教学、科研工作,已发表论文 40 余篇,出版专著 6 部,发明专利 4 项。Tel:(0551) 5106222 E-mail:hejq1949@126.com

Effects of polyethylene glycol on seed germination of *Cassia occidentalis*HE Jia-qing<sup>1</sup>, WANG Xing<sup>1,2</sup>, YAO Qing-qing<sup>1</sup>

(1. Research Center of Source Plant in Anhui Province, School of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, China;

2. College of Resources and Environmental Sciences, China Agriculture University, Beijing 100193, China)

**Abstract : Objective** To simulate the solution drought stress conditions with polyethylene glycol (PEG) 6000 for study on the seed germination of *Cassia occidentalis*. **Methods** The seed of *C. occidentalis* was treated with 5 % and 10 % PEG 6000, respectively, then the germination rate, the activity of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), and content of malondialdehyde (MDA) were measured.

**Results** Compared with the same period of the control, soaking with 5 % PEG 6000 for 5 h could increase the activity of SOD and POD, decrease the content of MDA. PEG Pretreatment could decrease free radical accumulation and make cell membrane system less damaged in the course of absorbing water in seed. **Conclusion** Soaking with 5 % PEG 6000 for 5 h could increase the seed germination rate of *C. occidentalis*

**Key words :** polyethylene glycol (PEG); *Cassia occidentalis* Linn.; seed; germination

望江南 *Cassia occidentalis* Linn., 别名金豆子、羊角豆等, 是豆科 (Leguminosae) 的一种药用植物, 性味苦、寒, 中医学上常用来肃肺、清肝、和胃、消肿解毒等。其叶、根、种子中含有挥发油, 对多种细菌有抑制作用, 其水提取物对某些真菌有抑制作用。《福建民间草药》记载, 望江南还具有杀虫解毒的功效, 常用来治疗虫、蛇咬伤<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明, 望江南种子含有大黄素、柯桉素及毒蛋白等, 对肿瘤细胞有直接破坏作用, 能轻度降低血压并有致泻解热作用<sup>[2]</sup>。聚乙二醇 (PEG) 作为一种渗透调节剂, 能促进种子萌发, 缩短发芽时间, 使发芽出苗齐一, 并在种子萌发阶段能起到抗寒作用<sup>[3,4]</sup>。目前 PEG 已在牧草、栉楼等种子萌发较为困难的植物中得到了应用<sup>[5,6]</sup>, 但尚未见 PEG 对望江南种子萌发影响的研究。为此, 本实验采用 PEG 6000 对望江南种子进行浸泡处理, 观察其发芽情况, 检测萌发过程中过氧化物酶 (POD)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 量的动态变化, 解析 PEG 对种子萌发的作用机制, 旨在探索望江南种子萌发技术, 以期解决种子萌发齐一, 提高发芽率, 促进望江南产业发展。

## 1 材料与方法

1.1 材料: 望江南种子采自安徽界首市栽培区, 并种植于安徽大学生命科学学院试验园, 采收当年成熟荚果, 自然晾干。

1.2 PEG 处理: 望江南种子先用 0.1 % HgCl<sub>2</sub> 消毒 10 min, 再用 70 % 酒精冲洗 3 次, 用无菌水清洗干净后分装。再用 5 % 和 10 % PEG 6000 浸种, 取出后用蒸馏水漂洗 4 ~ 5 次, 整齐排列在培养皿中, 置于 25 °C 恒温培养箱中避光培养萌发; 以蒸馏水浸种培养作为对照 (CK)。

1.3 发芽率测定: 按照公式发芽率 = 发芽的种子数 / 供试种子总数 × 100 % 计算发芽率。

1.4 POD 测定: 参照张立军的愈创木酚法测定 POD 活性<sup>[6]</sup>, 以 1 min 内 A<sub>470</sub> 变化 0.01 为 1 个酶活性单位 (U)。

1.5 SOD 测定: 采用氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 法测定<sup>[7]</sup>。

1.6 MDA 量测定: 参照张立军的硫代巴比妥酸 (TBA) 法测定 MDA 活性<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与分析

2.1 PEG 6000 处理对种子发芽率的影响: 取消毒过的望江南种子 50 粒以蒸馏水分别浸种 1、3、5、7、9 h 后整齐排列在培养皿中, 置于 25 °C 恒温培养箱中培养, 逐日观察发芽情况。结果以浸种 5 h 的望江南种子发芽整齐。取消毒过的望江南种子分别用 5 % 和 10 % PEG 6000 及蒸馏水浸种 5 h, 以上述同样方法培养, 试验结果表明浓度为 5 % PEG 6000 处理种子发芽率高, 为 67.58 % (图 1)。其发芽率明显高于同期对照, 达到显著水平 ( $P < 0.05$ ), 由此确立 PEG 6000 处理望江南种子时间 5 h, 处理浓度 5 %。

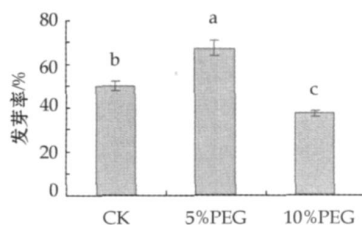


图1 PEG处理对望江南种子发芽率的影响

Fig. 1 Effect of EPG treatment on germination rate of *C. occidentalis* seeds

2.2 POD 活性的变化: 图 2 所示, 种子萌发的 0 d,

由于种子还在休眠期,种子中积累的活性氧较多,POD 的活性也较高。随着种子的逐渐萌发,植物细胞内各种生理生化反应逐渐活跃起来,活性氧量下降。在种子萌发的 0~1 d,POD 的活性呈下降趋势,此后,POD 的活性逐渐升高,第 3 天时到达峰值,然后降低。与对照相比,经 5% PEG 6000 处理后的望江南种子,其 POD 活性高于同期对照,在 1~4 d 达到显著水平 ( $P < 0.05$ ),由此可见 5% PEG 6000 处理可提高 POD 活性。

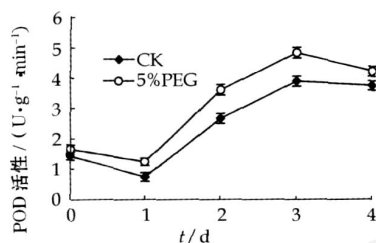


图 2 望江南种子萌发过程中 POD 活性的变化

Fig. 2 Activity of POD in *C. occidentalis* seeds during germination

2.3 SOD 活性的变化:图 3 所示,测定初始 5% PEG 6000 处理组与对照组 SOD 活性几乎在同一水平,以后随萌发时间的延长,SOD 活性逐渐升高,第 3 天达到最高水平,与对照相比较,处理组 SOD 活性在 1~4 d 显著 ( $P < 0.05$ ) 高于对照。

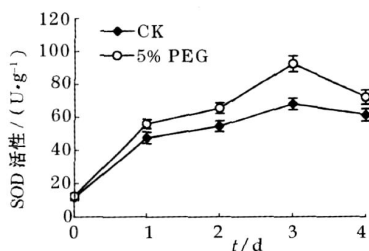


图 3 望江南种子萌发过程中 SOD 活性的变化

Fig. 3 Activity of SOD in *C. occidentalis* seeds during germination

2.4 MDA 量的变化:植物细胞膜系统的主要组成成分是脂质和蛋白质。脂质氧化产生的自由基可使膜质过氧化而造成细胞膜损伤。MDA 是脂质过氧化反应的产物,与自由基活性氧的量关系密切,其形成的速率在一定程度上反应机体内清除自由基能力的大小和活性氧代谢的水平<sup>[4]</sup>。结果表明:0 d 时种子中 MDA 的量比发芽的第 1 天高,萌发的第 1 天,细胞内的 MDA 的量比第 0 天下降很大,随着种子的逐渐发芽,自由氧量的增加,MDA 的量是逐渐升高的。用 PEG 处理望江南种子,可降低种子同期脂质过氧化反应(图 4)。

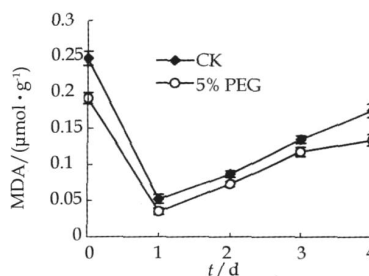


图 4 望江南种子萌发过程中 MDA 量的变化

Fig. 4 Content change of MDA in *C. occidentalis* seeds during germination

### 3 讨论

研究发现,在种子萌发过程中氧自由基会对质膜、酶系统、蛋白质合成造成一定的伤害作用,使种子发芽率降低<sup>[8]</sup>。种子引发是在控制条件下使种子缓慢吸水,为萌发提前进行生理准备的播前种子处理手段,能有效提高种子活力,加速种子萌发,提高种子萌发率,增强种子抗逆、抗老化<sup>[9]</sup>能力。本实验中,随着 PEG 浓度的增加,望江南的发芽率下降,这与梁国玲等<sup>[10]</sup>对羊茅的研究结果基本一致。可见,一定浓度的 PEG 胁迫能刺激望江南种子活性的提高,当超过植物种子对渗透胁迫的承受限度时,种子就不能萌发。目前,国内外对于种子引发的研究报道多集中于大田作物<sup>[11]</sup>、经济作物<sup>[12]</sup>等方面,在药用植物<sup>[13]</sup>方面的研究报道较少。已知对种子做渗透处理,有利于提高种子的活力。

近年来,随着自由基生物学的发展,逐步形成共识:抗氧化酶体系是植物体内重要的调节保护机制。植物 SOD 是一种典型的诱导酶,通过改变植物外部环境条件可影响 SOD 活性水平。在某种意义上,PEG 处理对种子萌发来说,起到一种水分胁迫的作用,如果这种胁迫是在植物体耐受范围之内,便会激活体内包括抗氧化酶在内的一系列保护机制的启动<sup>[5]</sup>,从而引起机体内抗氧化活动的增强,加速活性氧自由基的清除,减低对种子萌发过程中的不利因素,提高种子活力水平。PEG 是较为理想的渗透调节剂,PEG 处理的实质是限制水分进入种子的速率,可能减少了种子吸胀过程中膜系统的损伤,也有利于膜系统损伤的修复。PEG 的浓度对种子的萌发亦有影响。PEG 的浓度过高对种子的萌发有抑制作用。国外学者多采用低渗透势、长时间对种子进行处理,而国内研究人员则多倾向于高渗透势、短期的处理。本研究表明:5% PEG 6000 处理 5 h 后,望江南萌发过程中 SOD 等抗氧化酶活性的升高较对照更明显,在萌发的第 3 天是对照的

129.8%,MDA 的量也仅为对照的 83.2%,幼苗的发芽率比对照高出 2.7%。因此推断,PEG 处理抑制望江南种子萌发过程中活性氧引起的过氧化反应,有利于种子的萌发,也从减少种子萌发中自由基伤害的角度印证了 Dhindsa<sup>[8]</sup> 的研究。

#### 参考文献:

- [1] 阮小蕾,刘丽芳,何云蔚,等. 望江南中核糖体失活蛋白新基因 *Cassin* 的克隆及特征分析 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(2): 417-423.
- [2] 徐惠华. 重用望江南治疗顽固性头痛体会 [J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(6): 767-768.
- [3] 袁媛,李娜,邵爱娟,等. PEG 6000 处理对黄芩种子萌发和幼苗生长的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(2): 269-272.
- [4] 洪法水,赵海泉. 聚乙二醇和聚乙烯醇对黄瓜种子活力和抗寒性的影响 [J]. 园艺学报, 1997, 24(4): 395-396.
- [5] 刘杰. 聚乙二醇处理对羊草种子萌发及活性氧代谢的影响 [J]. 草业科学, 2002, 11(1): 59-64.
- [6] 何家庆,黄训端,黎承姬,等. 聚乙二醇对栝楼种子萌发的影响 [J]. 激光生物学报, 2005, 14(6): 416-419.
- [7] 张立军,樊金娟. 植物生理学实验教程 [M]. 北京:中国农业大学出版社, 2007.
- [8] Dhindsa R S. Enzymes of glutathione metabolism, oxidation injury, and protein synthesis turalis [J]. *Biophys*, 1978, 188: 210-213.
- [9] 朱世杨,洪德林. 杂交粳稻 86 优 8 号 F1 自然老化种子引发技术研究 [J]. 种子, 2007, 26(1): 38.
- [10] 梁国玲,周青平,颜红波. 聚乙二醇对羊茅属 4 种植物种子萌发特性的影响研究 [J]. 草业科学, 2007, 24(6): 50-54.
- [11] 廖祥儒,朱新产. 种子引发提高小麦抗渗透胁迫能力的效应 [J]. 植物学通报, 1997, 14(2): 36.
- [12] 林君,孙玉强,吕有军,等. 种子盐引发对转基因抗虫棉耐盐性的影响 [J]. 棉花学报, 2006, 18(6): 338.
- [13] 张贤秀,郭巧生,王艳茹. 种子引发对夏枯草种子活力影响的初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 33(5): 493-495.

## 枳实的高效液相色谱指纹图谱研究

黎阳<sup>1</sup>,刘素香<sup>2</sup>,张铁军<sup>2\*</sup>,陈常青<sup>2\*</sup>

(1. 天津中医药大学,天津 300193; 2. 天津药物研究院,天津 300193)

**摘要:**目的 建立枳实药材 HPLC 指纹图谱分析方法。方法 采用 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.01%磷酸二氢钠水溶液梯度洗脱,测定了 36 批枳实药材的指纹图谱。应用相似度分析、聚类分析和主成分分析,对枳实药材进行分类,建立枳实药材指纹图谱的共有模式,并应用主成分分析对共有模式进行研究。结果 在选定的色谱条件下,得到两类枳实药材 HPLC 指纹图谱;根据相似度分析、聚类分析和主成分分析的结果,将 36 批药材分为 2 类,分别建立指纹图谱。结论 应用本方法评价枳实药材的质量是可行的。

**关键词:** 枳实;高效液相色谱;指纹图谱

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)09-1469-06

### HPLC Fingerprint of *Fructus Aurantii Immaturus*

LI Yang<sup>1</sup>, LIU Su-xiang<sup>2</sup>, ZHANG Tie-jun<sup>2</sup>, CHEN Chang-qing<sup>2</sup>

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

**Abstract:** **Objective** To establish HPLC fingerprint for *Fructus Aurantii Immaturus*. **Methods** The HPLC method was used with Diamonsil-C<sub>18</sub> column (250 mm ×4.6 mm, 5 μm), and a mixture liquid of acetonitrile-0.01% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as mobile phase in a gradient elution. The HPLC fingerprint for 36 batches of *Fructus Aurantii Immaturus* was studied on their similarity, cluster, and principal components analyses. The common HPLC fingerprint of *Fructus Aurantii Immaturus* was established, which was studied with principal components analyses. **Results** Under the selected spectrum condition, the 36 batches of *Fructus Aurantii Immaturus* were classified into two groups based on the result of similarity, cluster, and principal components analyses. **Conclusion** This method is reasonable and reliable to the quality control of *Fructus Aurantii Immaturus*.

**Key words:** *Fructus Aurantii Immaturus*; HPLC; fingerprint

\* 收稿日期:2009-01-05

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAI06A01-02);2007 天津市科技创新专项项目

\*通讯作者 张铁军 Tel:(022)23006848 E-mail:tiejunzh2000@yahoo.com.cn