

不同来源黄芩种子抗旱特征比较

吴志刚, 杨兆春, 袁媛*, 马文军, 李娜
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 以 20% PEG6000 溶液模拟干旱胁迫条件, 对不同来源黄芩种子的抗旱特征进行研究。方法: 用 20% PEG6000 溶液分别处理 8 种来源的黄芩种子 8 h 以上, 对种子的萌发率、萌发指数、各器官的长度进行测定。利用 SPSS 13.0 for Windows 统计分析软件进行不同来源种子抗旱性的分级。选择抗旱性差异较大的黄芩种子进行 PEG 处理, 对其保护酶(过氧化氢酶、过氧化物酶、抗坏血酸过氧化物酶、超氧化物歧化酶)活性进行分析。结果: 模拟干旱条件下, 不同来源黄芩种子的萌发状态、生长状况存在差异; 聚类分析结果表明甘肃陇西来源黄芩种子的抗旱性最强, 而陕西渭南来源黄芩种子的抗旱性最弱, 且其过氧化氢酶活性显著提高, 是对照的 2.73 倍。结论: 不同来源黄芩种子抗旱特征存在差异。

[关键词] 黄芩; 种子; 干旱胁迫

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0126-04

Characteristic Drought-resistant between Different Regions of *Scutellaria baicalensis*

WU Zhi-gang, YANG Zhao-chun, YUAN Yuan*, MA Wen-jun, LI Na

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objection:** To simulate solution drought stress conditions with 20% PEG (6000) to research characteristic drought-resistant of *Scutellaria baicalensis* seeds from different regions in response to drought stress. **Method:** The seeds of *S. baicalensis* from different regions was treated with 20% PEG respectively. Germination rate, germination index, the fresh weight of seedlings and the length of the organs. The seeds were classified by software SPSS13.0 for Windows. And we analyzed the activities of protective enzymes of two seeds, which have significant difference. **Result:** PEG treatments had different influence on the germination rate and the growth of the seedlings of *S. baicalensis* from different regions. Clustering results showed the seeds from longxi, were drought-resistant. But the seeds from weinan were weak in drought-resistant and their CAT activity was significant increased after stress. **Conclusion:** The characteristic drought-resistant between different regions of *Scutellaria baicalensis* could be different.

[Key words] *Scutellaria baicalensis*; seed; drought dress

黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 为唇形科多年生草本植物。以根入药, 为常用中药, 需要量较大^[1]。黄芩野生资源在我国各地都有分布, 近年开

始家种生产, 河北、陕西、山东等地栽培较多, 且多在旱地种植。黄芩播种时由于缺水易发生出苗不齐的现象。PEG6000 是一种常用模拟干旱条件的化学试剂, Gergeley^[2] 用 PEG 诱导水份胁迫与对土壤控水的结果差不多, 并认为 110 g 的 PEG4000 培养液相当于土壤田间持水量为 75% 的水份状况。20% PEG 处理 8 h 以上可作为黄芩种子干旱模拟条件^[3]。本研究采用该模拟条件对不同来源黄芩种子的萌发状态、生长状况以及保护酶水平等指标进行测定, 比较

[收稿日期] 2011-05-09

[基金项目] 中国博士后科学基金特别资助项目(201003228)

[第一作者] 吴志刚, 助理研究员, Tel: 010-64014411-2955, E-mail: wuzhigang168@sohu.com

[通讯作者] * 袁媛, 副研究员, Tel: 010-64014411-2956, E-mail: yuuan0732@gmail.com

其抗旱特征,旨在为黄芩抗旱机制研究提供参考,为抗旱黄芩品种的选育研究打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 黄芩种子来源:陕西渭南(编号1)、陇县(编号2)、北京延庆县(编号3)、河北承德市(编号4)、甘肃陇西(编号5)、山东济南市(编号6)、莒县(编号7)和蒙阴县(编号8),用0.1% HgCl₂消毒5 min后,清水冲洗3遍。用20%的PEG6000处理种子8 h后,进行标准萌发试验,每天浇蒸馏水2 mL^[3]。每个处理50粒种子,重复3次。放置于光照培养箱中,培养温度为25℃,24 h光照,生长10 d后取萌发的幼苗备用。以未进行处理的种子作为对照,对萌发幼苗的形态进行观察,并测量其鲜重、各器官的长度等指标^[4]。

相对初生根长度 = PEG处理的初生根长度/对照

相对鲜重 = PEG处理的鲜重/对照

根/子叶叶柄 = 初生根长度/子叶叶柄长度

1.2 种子萌发率、萌发指数的测定^[5-6] 每天记录种子的萌发状态,计算萌发率和萌发指数。

萌发率(%) = 萌发的种子数 × 100/供试种子数

萌发指数(GI) = $\sum(Gt/Dt)$; Gt为不同萌发时间的萌发率;Dt为不同的萌发试验天数

相对萌发率 = PEG处理的萌发率/对照

相对萌发指数 = PEG处理的萌发率/对照

1.3 保护酶活性的测定

1.3.1 蛋白质含量的测定 随机挑选10个刚露芽的种子,重复3次。用1 mL蛋白提取缓冲液(50 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液,0.1 mmol·L⁻¹ EDTA,0.1 mmol·L⁻¹ Tris-HCl)研磨,过夜后12 000 × g离心20 min,取上清备用。以上步骤均在4℃条件下完成。利用紫外分光光度计测定提取物的A₂₆₀和A₂₈₀,按公式计算蛋白质含量(g·L⁻¹) = 1.55A₂₈₀ - 0.76A₂₆₀^[6]。

1.3.2 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定 SOD活性测定用氮蓝四唑(NBT)光还原法^[7]。测定反应体系含13 mmol·L⁻¹的Met,75 μmol·L⁻¹的NBT,10 μmol·L⁻¹的EDTA-Na₂,2 μmol·L⁻¹的核黄素和50 mmol·L⁻¹ pH 7.0的磷酸缓冲液,25℃,4 000 Lx的光照,20 min后测定560 nm处的吸光度(A)。用缓冲液代替酶液的处理作空白对照,以抑制NBT光化还原50%的酶液量为1个酶活性单位。

SOD活性 = 2(A₅₆₀空白 - A₅₆₀处理) × 稀释倍数/A₅₆₀空白

1.3.3 过氧化氢酶(CAT)活性的测定 CAT活性

测定用分光光度法^[8]进行。反应液中加入3 mL 50 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液,1 mL 0.3% H₂O₂和0.1 mL酶液,在240 nm下测定其A。以每分钟A的降低表示活性。

1.3.4 过氧化物酶(POD)活性的测定 POD活性测定用愈伤木酚法^[9]。以愈伤木酚为反应底物,反应体系包括2.8 mL pH 6.8的磷酸缓冲液,1 mL 0.1%邻甲氧基苯酚,0.01 mL酶液和0.2 mL 0.3% H₂O₂溶液(对照用无菌水),于60 min时在470 nm测A。以每分钟A₄₇₀变化0.01为1个酶活性单位。

1.3.5 抗坏血酸过氧化物酶(ApX-POD)活性的测定 ApX-POD活性测定用分光光度法^[10]进行。反应液中加入50 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液,0.3 mmol·L⁻¹ AsA,0.06 mmol·L⁻¹ H₂O₂和0.1 mL酶液,在240 nm下测定A。以每分钟A的降低表示活性。

2 结果与分析

2.1 PEG干旱胁迫对不同来源黄芩种子萌发的影响 本研究收集的不同来源黄芩种子活力差异较大,其萌发率最高为70.67%,最低为4.67%;萌发指数最高11.16,最低1.98。PEG处理后的黄芩种子,其萌发率均显著高于对照,但只有2号种子的萌发指数显著高于对照它材料均无显著变化。相对萌发率最高为5号种子,其它材料差异不大(表1,2)。

表1 PEG干旱胁迫对不同来源黄芩种子萌发率的影响($\bar{x} \pm s$)

编号	萌发率/%		相对萌发率
	处理	对照	
1	37.64 ± 0.44 ¹⁾	23.33 ± 2.91	1.61
2	73.33 ± 5.52 ¹⁾	40.67 ± 0.67	1.80
3	80.19 ± 0.19 ¹⁾	47.67 ± 11.87	1.68
4	89.49 ± 3.84 ¹⁾	70.67 ± 6.36	1.27
5	20.67 ± 2.33 ¹⁾	4.67 ± 2.67	4.43
6	79.73 ± 2.16 ¹⁾	48.67 ± 7.06	1.64
7	65.56 ± 6.05 ¹⁾	41.33 ± 6.57	1.59
8	73.61 ± 1.80 ¹⁾	42.00 ± 6.11	1.75

注:与对照组比较¹⁾P < 0.05(表2,3,5同)。

2.2 PEG干旱胁迫对不同来源黄芩幼苗生长的影响 除5号种子外,不同来源黄芩幼苗的初生根生长状况差异不大,且均无茎的生长。PEG处理的种子所长成的幼苗,其初生根差异不大,但子叶叶柄和茎的生长存在差异,主要表现为1,5号种子的子叶叶柄显著长于其他材料,分别为11.72 mm,11.01 mm。且1,3,5号种子均观察有茎的生长,其长度分别为13.25,7.73,9.11 mm(表3)。与对照比较,

**表 2 PEG 干旱胁迫对不同来源黄芩种子
萌发指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)**

编号	萌发指数		相对 萌发指数
	处理	对照	
1	4.63 ± 0.11	3.52 ± 0.63	1.32
2	7.83 ± 0.13 ¹⁾	3.86 ± 0.54	2.03
3	9.07 ± 0.43	8.76 ± 2.27	1.04
4	11.17 ± 0.98	11.16 ± 1.79	1.00
5	2.24 ± 0.96	1.98 ± 0.41	1.13
6	9.72 ± 0.64	10.01 ± 1.18	0.97
7	7.83 ± 0.43	8.72 ± 1.15	0.90
8	8.86 ± 0.26	8.35 ± 1.05	1.06

所有材料的子叶叶柄长度均高于对照,但只有种子 1,5,6 号的初生根长度显著高于对照。5 号种子的相对初生根长度最长,为 2.42 mm;相对鲜重较高的 1,3,5 号分别为 2.03,2.39,2.45 mm;而根/子叶叶柄较低的为 1 和 5 号,分别为 2.03 和 2.40 mm。

2.3 不同来源黄芩种子抗旱特征的综合评价 本研究选择可代表各来源黄芩种子抗旱性强弱的指标进行分析,以其相对值作为被分析的变量,由此构成聚类分析的原始数据矩阵。利用 SPSS 13.0 for Windows 统计分析软件进行种子抗旱性的分级,聚

表 3 PEG 干旱胁迫对不同来源黄芩幼苗生长的影响

编号	处理/mm			对照/mm			相对初生 根长度	相对鲜重	根/子叶 叶柄
	初生根	子叶叶柄	茎	初生根	子叶叶柄	茎			
1	26.94 ¹⁾	11.72 ¹⁾	13.25	19.64	4.49	-	1.37	2.03	2.30
2	26.99	5.58 ¹⁾	-	24.54	3.91	-	1.10	1.47	4.84
3	28.12	5.58 ¹⁾	7.73	24.53	3.33	-	1.15	2.39	5.04
4	26.12	4.91 ¹⁾	-	23.00	4.16	-	1.14	1.43	5.32
5	26.44 ¹⁾	11.01 ¹⁾	9.11	10.90	4.43	-	2.42	2.45	2.40
6	22.82 ¹⁾	5.41 ¹⁾	-	27.08	4.05	-	0.84	1.36	4.22
7	25.03	5.27 ¹⁾	-	26.71	4.43	-	0.94	1.39	4.75
8	27.51	5.49 ¹⁾	-	25.66	4.53	-	1.07	1.29	5.01

类分析结果显示,其第 2 类的类中心有变化,第 1、3 类的类中心无变化(表 4),且 5 号种子的抗旱性最强,而 1 号材料的抗旱性最弱。

2.4 PEG 干旱胁迫对不同来源黄芩种子保护酶水平的影响 不同来源黄芩种子保护酶水平差异较大,选择抗旱性差异较大的 1 和 5 号进行 PEG 处理,对其 CAT,POD,AsA-POD,SOD 活性进行分析,结果表明 1 号 CAT 活性显著提高,是对照的 2.73 倍(表 5)。

表 4 K 均数分类初始及最终类中心

指数	初始类中心			最终类中心		
	1	2	3	1	2	3
相对初生根长度	1.37	1.07	2.42	1.37	1.04	2.42
相对鲜重	2.03	1.29	2.45	2.03	1.56	2.45
根/子叶叶柄	2.30	5.01	2.40	2.30	4.86	2.40
相对萌发率	1.61	1.75	4.43	1.61	1.62	4.43
相对萌发指数	1.32	1.06	1.13	1.32	1.17	1.13

表 5 PEG 干旱胁迫对不同来源黄芩种子保护酶水平的影响

组别	编号	蛋白质含量	CAT 活性	POD 活性	AsA-POD 活性	SOD 活性
		/g·L ⁻¹	/U·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	/U·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	/μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹	/U·min ⁻¹ ·mg ⁻¹
处理	1	1.47	6.68 ¹⁾	0.86	15.25	2.40
	5	1.57	7.33	0.56	22.90	2.84
对照	1	1.80	2.45	1.42	21.17	1.77
	5	1.92	9.59	1.90	11.66	2.08
处理/对照	1	0.82	2.73	0.61	0.72	1.36
	5	0.82	0.76	0.29	1.96	1.37

3 讨论

由于大多数药用植物的种子多为自然采收,其萌发率很难保证一致性,而萌发率在种子抗旱指标中具有重要的地位,因此本实验采用复水法对黄芩种子进行处理,使评价结果较为全面。评价结果表明,在供试的材料中采集自陕西渭南(1号)的黄芩种子的抗旱性最强,而采集自甘肃陇西(5号)的黄芩种子抗旱性最弱。

干旱是对植物组织的一种重要胁迫因子,它能干扰植物细胞中活性氧产生与清除之间的平衡,导致植物细胞受到氧化胁迫。正常情况下,植物细胞中产生的活性氧与其清除系统保持平衡,而当环境胁迫长期作用于植株时,产生的活性氧超出了活性氧清除系统的能力时,就会引起活性氧累积产生氧化伤害^[11]。SOD, POD, CAT 是植物体内的重要保护酶,在清除自由基中起重要作用^[12],通过对 PEG 模拟干旱处理种子中的保护酶水平进行分析,结果表明抗旱性较弱黄芩种子中的 CAT 活性变化较大,说明这种酶可能对干旱胁迫比较敏感,在干旱条件下被迅速大量诱导表达,来消除干旱胁迫所产生的活性氧对植物细胞的伤害。而抗旱性较强的黄芩种子 CAT 活性变化较小,意味着干旱对植物细胞影响较小,这些材料能更好的适应同样的干旱条件,不需要大量合成 CAT 来清除植物细胞内的活性氧。

[参考文献]

- [1] 徐国钧,何宏贤,徐璐珊,等. 中国药材学[M]. 北京:中国医药科技出版社,1996:398.
- [2] 袁媛,李娜,邵爱娟,等. PEG 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.

- [3] 刘守华. 不同类型玉米苗期抗旱性探讨[J]. 中国牧业通讯,2006,4:66.
- [4] 种子工作手册编写组. 种子[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979:425.
- [5] International Seed Testing Association. International rules for seed testing [J]. Seed Sci & Technol, 1999, 27 (Suppl): 27.
- [6] 刘春菊,孟宪军,宣景宏. 树莓超氧化物歧化酶的分 离纯化和部分性质研究[J]. 西北农业学报,2006, 3:142.
- [7] Giannopolite C N, Ries S K. Superoxide dismutase. I Occurrence in higher plants [J]. Plant Physiol, 1977, 59:309.
- [8] Change B, Maehly A C. Assay of catalases and peroxidase [J]. Meth Enzymol, 1955,2:764.
- [9] Scebba F, Sebastiani L, Vitagliano C. Protective enzymes against activated oxygen species in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling: response to cold acclimation [J]. J Plant Physiol, 1999,155:762.
- [10] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. Plant Cell Physiol, 1981,22: 867.
- [11] Jiang M Y. Generation of hydroxyl radicals and its relation to cellular oxidative damage in plants subjected to water stress [J]. Acta Botanica Sinica,1999,41(3): 229.
- [12] 汪耀富,韩锦峰,林学梧. 烤烟生长前期对干旱胁迫的生理生化响应研究 [J]. 作物学报,1996, 22 (1):117.

[责任编辑 何伟]