

香草酸对青钱柳离体胚萌发过程中生理生化指标的影响及各指标的相关性分析

尚旭岚, 徐锡增, 方升佐^①

(南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 采用离体胚培养法,研究了在培养基中添加 $81.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (半抑制浓度, IC_{50}) 香草酸的条件,青钱柳 [*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk.] 离体胚萌发过程中部分生理生化指标的变化,并对各指标间的相关性进行了分析。结果表明:随培养时间的延长,处理组(培养基中添加 $81.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 香草酸)及对照组离体胚的粗脂肪和蛋白质含量均呈逐渐降低的趋势,淀粉和可溶性糖含量均呈先降低后升高的趋势,异柠檬酸裂合酶(ICL)、酸性磷酸酶(AP)、碱性磷酸酶(ALP)和过氧化物酶(POD)活性以及葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH)和6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-PGDH)联合活性均高于培养初期,且 ICL、POD、AP 和 ALP 活性不断提高;但处理组的粗脂肪和蛋白质含量均高于对照组且变化幅度相对较小,淀粉含量在培养前期高于对照、在培养后期低于对照,可溶性糖含量总体上高于对照,ICL、AP 和 ALP 活性及 G-6-PDH 和 6-PGDH 联合活性的提高幅度整体上小于对照,培养后期 POD 活性显著高于对照。相关性分析结果表明:青钱柳离体胚萌发过程中粗脂肪和蛋白质含量与各种酶活性间均呈显著或极显著的负相关。研究结果显示:香草酸对青钱柳离体胚萌发过程中各种酶的活化产生抑制作用,导致主要贮藏物质的转化受阻,从而影响胚的萌发。

关键词: 香草酸; 青钱柳; 离体胚; 半抑制浓度(IC_{50}); 生理生化指标; 相关性分析

中图分类号: Q945.35; S792.12 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2012)04-0076-06

Effect of vanillic acid on physiological-biochemical indexes of embryos *in vitro* of *Cyclocarya paliurus* during germination process and correlation analysis of these indexes SHANG Xu-lan, XU Xi-zeng, FANG Sheng-zuo^① (College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2012, 21(4): 76-81

Abstract: By embryo *in vitro* culture method, change of some physiological-biochemical indexes and correlation among these indexes during germination process of embryos *in vitro* of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk. were analyzed under the condition of adding $81.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (hemi-inhibitory concentration, IC_{50}) vanillic acid (VA) in medium. The results show that with prolonging of culture time, contents of crude fat and protein in embryos *in vitro* of treatment group (adding $81.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ VA in medium) and the control group all appear the trend of decreasing gradually, while contents of starch and soluble sugar all appear the trend of decreasing at first and then increasing, activities of isocitrate lyase (ICL), acid phosphatase (AP), alkaline phosphatase (ALP) and peroxidase (POD), combined activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH) all are higher than those at start culture stage, and activities of ICL, POD, AP and ALP all increase continuously. But contents of crude fat and protein in embryos *in vitro* of treatment group are both higher than those of the control group and their change ranges are relatively smaller, starch content is higher at prophase but lower at anaphase than that of the control, soluble sugar content is generally higher than that of the control, enhancement extent of activities of ICL, AP and ALP, combined activity of G-6-PDH and 6-PGDH are generally lower than those of the control, POD activity is significantly higher than that of the control at anaphase. The correlation analysis result shows that there are significant

收稿日期: 2012-02-10

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(200904046); 江苏省高等学校创新团队科研计划(苏教科[2009]10号)

作者简介: 尚旭岚(1978—),女,四川乐山人,博士,讲师,主要从事林木种苗方面的研究。

^①通信作者 E-mail: fangsz@njfu.edu.cn

or extremely significant negative correlations among contents of crude fat and protein with activities of above-mentioned enzymes. It is considered that VA has an inhibition to activations of enzymes during germination process of embryos *in vitro* of *C. paliurus* and leads to hinder from the transformation of main storage substances, so as to inhibit germination of embryos.

Key words: vanillic acid; *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk.; embryo *in vitro*; hemi-inhibitory concentration (IC_{50}); physiological-biochemical index; correlation analysis

酚酸是指带有酚类基团的有机酸,是植物在生命活动过程中产生的一类重要次生代谢产物,也是植物体中化感活性较强的一类成分。香草酸(vanillic acid)是植物体中常见的酚酸类成分之一。很多学者从植物的茎、叶、根等器官^[1-3]或含有植物残体的土壤^[4-6]中分离出香草酸并对其进行了化感作用方面的研究,也有学者从植物种子中分离出香草酸并对其进行了种子萌发抑制作用方面的研究^[7-10],但有关香草酸抑制植物生长及种子萌发的作用机制方面的研究报道尚不多见^[10]。

青钱柳(*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk.)又称摇钱树、麻柳,为胡桃科(Juglandaceae)青钱柳属(*Cyclocarya* Iljinsk.)植物,是中国特有的单属植物,也是国家重点保护野生植物之一。青钱柳具有较高的药用、保健、材用和观赏等价值,是极具开发利用前景的珍贵树种。但由于青钱柳种子发育差并具有深休眠特性,因此天然更新困难,大量人工栽培也受到严重阻碍^[11]。

前期研究结果表明:青钱柳种皮中含有的一些内源抑制物质可能是导致青钱柳种子休眠和幼苗生长受阻的原因之一^[12]。采用系统溶剂法对抑制活性最强的青钱柳种皮甲醇提取液进行分离,其乙醚相的抑制活性最强,在乙醚相中香草酸的相对含量最高,达到35.09%,生物测定结果显示香草酸对不结球白菜(*Brassica campestris* subsp. *chinensis* Makino)种子幼根生长有较强的抑制作用^[13];香草酸对青钱柳离体胚萌发和胚根伸长生长都有较强的抑制作用,其对青钱柳种子萌发的半抑制浓度为 $81.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[14]。但香草酸对青钱柳种子萌发的抑制作用机制并不清楚,也未见相关的研究报道。

作者将青钱柳离体胚接种到添加半抑制浓度($81.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)香草酸的培养基中进行培养,并定期取样,对青钱柳离体胚萌发过程中相关生理生化指标的变化以及各生理生化指标间的相关性进行了分析,以期更深入地了解香草酸对青钱柳离体胚萌发的

抑制作用机制,为打破青钱柳种子休眠技术的研发提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

于2006年11月在云南昆明植物园内采集成熟的青钱柳种子,千粒质量为108.45 g,饱满率63%。种子去翅后采用体积分数40%乙醇进行分选,选取下沉种子并晾干,使其饱满率达到90%。种子晾干后用透气的塑料篮子盛装,保存于室内阴凉、避光处待用。实验于2006年12月进行。

1.2 方法

1.2.1 离体胚的处理及培养方法 首先采用过滤灭菌法对香草酸母液(质量浓度 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,用体积分数95%乙醇配制)进行灭菌处理,向已灭菌并冷却至约 $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的空白培养基(仅含 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂,pH 5.95~pH 6.00)中添加一定体积的香草酸母液,配制成含 $81.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (半抑制浓度, IC_{50})香草酸的培养基,对照则加入等体积的体积分数95%乙醇,逐管分装。

青钱柳种子用体积分数70%乙醇处理1 min后,用质量体积分数0.2% HgCl_2 浸泡20 min,无菌水冲洗5~6次,然后用无菌水浸泡96 h后再进行常规消毒;先用体积分数70%乙醇处理1 min,再用质量体积分数0.1% HgCl_2 浸泡6.5 h。从已消毒种子中剥取较完整的离体胚分别接种到香草酸处理组和对照组培养基上。每管接种1个离体胚,每处理200管,各重复3次,每处理共计600管。置于温度(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、光照时间 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、光照度 $1500 \sim 2000 \text{ lx}$ 的条件下分别培养0、3、6、9和12 d后取样测定各项生理生化指标。将离体胚从试管中取出后用蒸馏水洗净并吸干表面水分(培养0 d的离体胚直接从种子中剥取),根据测定指标样品量的要求准确称量后分装并置于液氮内速冻1 min,然后置于 $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱保存、备用、待测。

1.2.2 生理生化指标的测定方法 测定指标分别为粗脂肪、可溶性糖、淀粉和蛋白质含量;异柠檬酸裂合酶(ICL)、过氧化物酶(POD)、酸性磷酸酶(AP)和碱性磷酸酶(ALP)活性;葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH)和6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-PGDH)联合活性。采用索氏提取法^[15]¹⁸⁴⁻¹⁸⁵测定粗脂肪含量(以质量分数计);将提取粗脂肪后的样品烘干,采用蒽酮比色法^[16]¹⁹⁵⁻¹⁹⁷测定可溶性糖和淀粉含量;采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[16]¹⁸⁴⁻¹⁸⁵测定蛋白质含量;参照宋松泉等^[17]⁸⁰⁻⁸²和邢更妹等^[18]的方法测定 ICL 活性;参照文献^[19]的方法测定 G-6-PDH 和 6-PGDH 联合活性;采用愈创木酚法^[16]¹⁶⁴⁻¹⁶⁵测定 POD 活性;参照宋松泉等^[17]⁷⁹⁻⁸⁰的方法测定 AP 活性;参照文献^[20]的方法测定 ALP 活性。

1.3 数据处理

采用 SPSS 13.0 统计分析软件对实验数据进行方差分析、差异显著性分析和相关性分析。将香草酸处理组和对照组所有同时段同一指标的测定数据合并后进行生理生化指标的相关性分析。

2 结果和分析

2.1 香草酸对青钱柳离体胚萌发过程中部分生理生化指标的影响

2.1.1 对贮藏物质含量的影响 在添加了半抑制浓度($81.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)香草酸的培养基上,青钱柳离体胚萌发过程中粗脂肪、蛋白质、淀粉和可溶性糖 4 种主要贮藏物质含量的变化见表 1。

表 1 香草酸对青钱柳离体胚萌发过程中贮藏物质含量的影响¹⁾

Table 1 Effect of vanillic acid on content of storage substances in embryos *in vitro* of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Hjnisk. during germination process¹⁾

时间/d Time	粗脂肪含量/% ²⁾ Crude fat content ²⁾		蛋白质含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Protein content		淀粉含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Starch content		可溶性糖含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Soluble sugar content	
	VA	CK	VA	CK	VA	CK	VA	CK
0	47.50±0.24a	47.50±0.24a	39.82±0.74a	39.82±0.74a	10.03±0.71c	10.03±0.71c	18.35±0.03c	18.35±0.03c
3	46.59±0.11b	44.92±0.07b	34.94±2.42b	28.72±0.48b*	8.50±0.62d	7.42±0.72c	16.60±0.06d	13.93±0.12d*
6	45.39±0.01c	43.06±0.75b	30.25±1.06c	23.04±1.54c*	10.26±0.67c	9.81±0.69c	9.51±1.84e	8.23±1.34e
9	44.90±0.49c	22.71±0.73c*	26.51±0.58d	12.99±1.43d*	17.74±0.55b	18.42±1.44b	34.03±0.11b	30.68±3.64b
12	21.62±0.28d	8.23±1.69d*	19.20±1.10d	13.26±1.16d*	25.08±1.64a	28.32±0.47a*	41.11±0.46a	34.88±1.73a*

1) 同列中不同的小写字母表示差异显著($P < 0.05$) Different small letters in the same column indicate the significant difference ($P < 0.05$); *: 表示处理组与对照组间差异显著($P < 0.05$) Indicating significant difference between treatment group and the control group ($P < 0.05$). VA: 处理组, 培养基中添加半抑制浓度($81.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)香草酸 Treatment group, vanillic acid with hemi-inhibitory concentration ($81.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) added in the medium; CK: 对照组 The control group.

2) 质量分数 Mass ratio.

由表 1 可见:随培养时间的延长,青钱柳离体胚的粗脂肪和蛋白质含量基本上呈不断下降的趋势,香草酸处理组的粗脂肪和蛋白质含量变幅比对照组小且在各培养时间都高于对照组。在培养前 6 天内,对照组及处理组的粗脂肪含量均小幅下降;培养第 9 天时对照组的粗脂肪含量迅速下降,至第 12 天粗脂肪含量仅为 8.23%;而培养第 9 天处理组的粗脂肪含量仅略有降低,培养第 12 天处理组的粗脂肪含量虽然明显降低但仍高达 21.62%,且培养第 9 天和第 12 天处理组离体胚的粗脂肪含量均显著高于对照组。培养第 3 天对照组离体胚的蛋白质含量比接种初期降低了 27.9%,培养第 9 天时较初期降低了 67.4%,培养第 12 天时则较第 9 天略有增加;而处理组的蛋白质含量则不断降低,且与同期对照组的蛋白质含量均

有显著差异($P < 0.05$)。

由表 1 还可见:随着培养时间的延长,香草酸处理组和对照组青钱柳离体胚的淀粉和可溶性糖含量均呈先降低后升高的变化趋势。在培养前 6 天内,处理组和对照组的淀粉含量均较初期略有降低但二者的差异基本不显著;而培养第 9 天和第 12 天处理组和对照组的淀粉含量均显著提高,至培养结束时二者的淀粉含量均达到最高,且处理组的淀粉含量显著低于对照组。在培养前 6 天内,处理组和对照组离体胚的可溶性糖含量急剧降低,均在第 6 天降至最低,其中第 3 天时处理组的可溶性糖含量显著高于对照组($P < 0.05$);随后可溶性糖含量不断增加,至培养结束时二者的可溶性糖含量均达到最高,且处理组的可溶性糖含量显著高于对照组($P < 0.05$)。

差异显著性分析结果表明:培养 12 d 时,香草酸处理组和对照组青钱柳离体胚的粗脂肪和蛋白质含量均显著低于接种初期,而淀粉和可溶性糖含量则显著高于接种初期;在培养 3~12 d 内,香草酸处理组和对照组离体胚中前述 4 种贮藏物质的含量大多与接种初期有显著差异。

2.1.2 对一些酶活性的影响 在添加了半抑制浓度 ($81.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 香草酸的培养基上,青钱柳离体胚萌发过程中一些酶活性的变化见表 2 和表 3。

由表 2 可见:随着培养时间的延长,香草酸处理组和对照组离体胚的异柠檬酸裂合酶 (ICL) 活性均呈逐渐增强的趋势,但整体上看,同一时段对照组离体胚的 ICL 活性显著高于处理组 ($P < 0.05$)。在培养第 6 天,对照组离体胚的 ICL 活性开始大幅度提高,且与处理组间的差异达显著水平,在培养第 12 天,对照组离体胚的 ICL 活性为培养初期的 56.5 倍;而处理组

离体胚的 ICL 活性在培养第 9 天才大幅度提高,至培养第 12 天时其 ICL 活性仍小于对照组,并且也小于培养第 6 天对照组的 ICL 活性水平。

由表 2 还可见:在培养前 6 天,对照组青钱柳离体胚的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G-6-PDH) 和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (6-PGDH) 联合活性变化不明显,在培养第 9 天时达到最高且与处理组间差异显著 ($P < 0.05$),在培养第 12 天有所降低。处理组离体胚的 G-6-PDH 和 6-PGDH 联合活性则从培养第 6 天开始一直上升,到第 12 天时达到最高,其活性水平与培养第 9 天时对照组的活性相近,这可能与处理组离体胚萌发受阻导致 PPP 途径活化推迟有关。

表 2 和表 3 的数据还表明:随着培养时间的延长,对照组和处理组青钱柳离体胚的过氧化物酶 (POD)、酸性磷酸酶 (AP) 和碱性磷酸酶 (ALP) 活性均呈逐渐提高的趋势;在培养第 12 天,处理组青钱柳

表 2 香草酸对青钱柳离体胚萌发过程中一些酶活性的影响¹⁾

Table 2 Effect of vanillic acid on some enzyme activities of embryos *in vitro* of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk. during germination process¹⁾

时间/d Time	ICL/ $\mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$		DH/ $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$		POD/ $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	
	VA	CK	VA	CK	VA	CK
0	1.63±0.18d	1.63±0.18d	2.77±0.20c	2.77±0.20c	0.90±0.01d	0.90±0.01e
3	7.33±0.15c	8.91±0.95c	2.08±0.32c	3.52±0.24c*	0.11±0.01d	53.60±18.13d*
6	8.37±1.57c	34.64±2.58b*	3.03±0.11c	3.56±1.05c	180.24±9.01c	183.30±29.47c
9	24.95±1.57b	39.05±2.14b*	8.76±1.26b	12.23±1.55a*	359.68±14.14b	244.66±2.14b*
12	30.26±1.16a	92.05±5.08a*	12.84±2.54a	8.83±1.71b	729.45±19.22a	466.06±16.16a*

¹⁾ 同列中不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different small letters in the same column indicate the significant difference ($P < 0.05$); *: 表示处理组与对照组间差异显著 ($P < 0.05$) Indicating significant difference between treatment group and the control group ($P < 0.05$). ICL: 异柠檬酸裂合酶活性 Isocitrate lyase activity; DH: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶联合活性 Combined activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase; POD: 过氧化物酶活性 Peroxidase activity. VA: 处理组,培养基中添加半抑制浓度 ($81.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 香草酸 Treatment group, vanillic acid with hemi-inhibitory concentration ($81.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) added in the medium; CK: 对照组 The control group.

表 3 香草酸对青钱柳离体胚萌发过程中 2 种磷酸酶活性的影响¹⁾

Table 3 Effect of vanillic acid on two phosphatase activities of embryos *in vitro* of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk. during germination process¹⁾

时间/d Time	酸性磷酸酶活性/ $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ Acid phosphatase activity		碱性磷酸酶活性/ $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ Alkaline phosphatase activity	
	VA	CK	VA	CK
0	9.17±0.10c	9.17±0.10e	5.36±0.24d	5.36±0.24d
3	11.01±0.38c	19.46±0.66d*	6.86±0.09d	7.64±0.51d
6	36.99±0.81b	49.90±2.82c	12.98±0.16c	20.92±0.91c*
9	43.95±5.72b	72.37±0.73b	41.22±1.73b	67.40±0.51b*
12	64.88±2.83a	116.41±1.05a*	64.59±1.22a	86.68±1.99a*

¹⁾ 同列中不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different small letters in the same column indicate the significant difference ($P < 0.05$); *: 表示处理组与对照组间差异显著 ($P < 0.05$) Indicating significant difference between treatment group and the control group ($P < 0.05$). VA: 处理组,培养基中添加半抑制浓度 ($81.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 香草酸 Treatment group, vanillic acid with hemi-inhibitory concentration ($81.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) added in the medium; CK: 对照组 The control group.

离体胚的 POD 活性显著高于对照 ($P < 0.05$), 而其 AP 和 ALP 活性则显著低于对照。同一培养时段, 对照组离体胚的 AP 和 ALP 活性大于处理组且增幅更大。在培养的第 6 天和第 9 天, 处理组离体胚的 ALP 活性均显著低于对照组。

差异显著性分析结果表明: 在培养的第 12 天, 香草酸处理组和对照组青钱柳离体胚的 ICL、POD、AP 和 ALP 活性以及香草酸处理组青钱柳离体胚的 G-6-PDH 和 6-PGDH 联合活性均显著高于接种初期 ($P < 0.05$)。

2.2 青钱柳离体胚萌发过程中部分生理生化指标的相关性分析

青钱柳离体胚萌发过程中粗脂肪、蛋白质、淀粉和可溶性糖含量及 ICL、POD、AP 和 ALP 活性以及 G-6-PDH 和 6-PGDH 联合活性间的相关性分析结果见

表 4。

由表 4 可见: 青钱柳离体胚萌发过程中粗脂肪含量和蛋白质含量与 5 个酶活性指标间均呈显著或极显著负相关, 粗脂肪含量还与蛋白质含量和淀粉含量分别呈极显著正相关和显著负相关, 蛋白质含量还与淀粉含量和可溶性糖含量呈极显著负相关; 淀粉含量与可溶性糖含量、ICL 活性、G-6-PDH 和 6-PGDH 联合活性、POD 活性和 ALP 活性均呈显著或极显著正相关; 可溶性糖含量与 ICL 活性以及 G-6-PDH 和 6-PGDH 联合活性呈极显著正相关; ICL 活性与 G-6-PDH 和 6-PGDH 联合活性、POD 活性、AP 活性及 ALP 活性均呈显著或极显著正相关; G-6-PDH 和 6-PGDH 联合活性与 POD 活性呈极显著正相关; POD 活性与 AP 活性及 ALP 活性均呈极显著正相关; AP 活性与 ALP 活性也呈极显著正相关。

表 4 青钱柳离体胚萌发过程中部分生理生化指标的相关性分析¹⁾

Table 4 Correlation analysis among some physiological-biochemical indexes of embryos *in vitro* of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk. during germination process¹⁾

指标 Index	相关系数 Correlation coefficient								
	CF	Pr	St	SS	ICL	DH	POD	AP	ALP
CF	1.000								
Pr	0.575 **	1.000							
St	-0.480 *	-0.757 **	1.000						
SS	0.051	-0.567 **	0.880 **	1.000					
ICL	-0.531 *	-0.828 **	0.809 **	0.537 **	1.000				
DH	-0.449 *	-0.784 **	0.836 **	0.846 **	0.564 **	1.000			
POD	-0.743 **	-0.811 **	0.769 **	0.304	0.720 **	0.717 **	1.000		
AP	-0.925 **	-0.519 *	0.316	-0.232	0.455 *	0.256	0.750 **	1.000	
ALP	-0.947 **	-0.684 **	0.473 *	-0.152	0.658 **	0.432	0.824 **	0.940 **	1.000

¹⁾ CF: 粗脂肪含量 Crude fat content; Pr: 蛋白质含量 Protein content; St: 淀粉含量 Starch content; SS: 可溶性糖含量 Soluble sugar content; ICL: 异柠檬酸裂合酶活性 Isocitrate lyase activity; DH: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶联合活性 Combined activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase; POD: 过氧化物酶活性 Peroxidase activity; AP: 酸性磷酸酶活性 Acid phosphatase activity; ALP: 碱性磷酸酶活性 Alkaline phosphatase activity. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

3 讨论和结论

酚酸是一类重要的抑制植物种子萌发的成分, 能够抑制自身和其他植物种子的萌发和生长, 进而产生自毒效应和他感作用。相关研究表明: 酚酸类成分主要通过阻碍气体交换、水分吸收、蛋白质合成^[9]和酶活化^[4-5]等生理活动对植物种子萌发产生抑制作用。

在种胚萌发过程中, 随着细胞含水量的增加, 各种受阻抑的代谢过程逐步恢复, 细胞内部发生一系列生理生化变化, 呼吸作用增强、各类贮藏物质被分解

并转化为可利用的物质后运转到生长部位, 作为幼胚生长的营养物质和能量来源。脂肪是青钱柳种子中最主要的贮藏物质, 含量约 50%^[21]。本研究结果表明: 受香草酸抑制作用的影响, 在萌发过程中香草酸处理组青钱柳离体胚的粗脂肪含量均高于对照组, 说明处理组的离体胚中脂肪降解较少, 而对照组离体胚中的脂肪则能顺利降解。

Baleroni 等^[22]的研究结果显示: 阿魏酸和香豆酸能降低脂肪代谢活性, 阻止油菜 (*Brassica napus* L.) 种子萌发; Muscolo 等^[5]认为: 脂肪是南欧黑松 (*Pinus laricio* Poir.) 种子中的主要贮藏物质, 酚酸类物质可抑

制脂肪代谢途径中异柠檬酸裂合酶(ICL)的活性从而影响种子的萌发。本研究也得到类似的实验结果。本研究表明:对照组和香草酸处理组的青钱柳离体胚中粗脂肪含量不断降低,与此相对应的是离体胚的ICL活性从培养第6天开始迅速提高,且对照组的ICL活性显著高于处理组,说明培养基中添加的香草酸抑制了青钱柳离体胚中ICL的活化从而使脂肪不能顺利降解,影响离体胚的萌发。

相关性分析结果表明:在青钱柳离体胚的萌发过程中,粗脂肪含量和蛋白质含量除与ICL活性有显著或极显著的负相关关系外,还与G-6-PDH和6-PGDH联合活性以及POD活性、酸性磷酸酶活性和碱性磷酸酶活性有显著或极显著的负相关关系,说明青钱柳离体胚萌发过程中贮藏物质的转化与酶的活化紧密相关。

综上所述,在培养基中添加半抑制浓度($81.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)香草酸能够抑制青钱柳离体胚萌发过程中各种酶的活化,导致主要贮藏物质的转化受阻,从而影响胚的萌发。

参考文献:

[1] SAMPIETRO D A, VATTUONE M A, ISLA M I. Plant growth inhibitors isolated from sugarcane (*Saccharum officinarum*) straw [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2006, 163(8): 837-846.

[2] 邬彩霞. 几种豆科牧草化感作用的比较研究[D]. 南京:南京农业大学动物科技学院, 2007.

[3] 甄文超, 王晓燕, 孔俊英, 等. 草莓根系分泌物和腐解物中的酚酸类物质及其化感作用[J]. *河北农业大学学报*, 2004, 27(4): 74-78.

[4] MUSCOLO A, PANUCCIO M R, SIDARI M. Glyoxylate cycle in germination of *Pinus laricio* seeds: effects of phenolic compounds extracted from different forest soils [J]. *Plant Growth Regulation*, 2002, 37(1): 1-5.

[5] MUSCOLO A, PANUCCIO M R, SIDARI M. The effect of phenols on respiratory enzymes in seed germination. Respiratory enzyme activities during germination of *Pinus laricio* seeds treated with phenols extracted from different forest soils [J]. *Plant Growth Regulation*, 2001, 35(1): 31-35.

[6] ISHIKURA Y, KOJIMA Y, TERAZAWA M. Effects of phenolic compounds on seed germination of shirakamba birch *Betula platyphylla* var. *japonica* [J]. *Eurasian Journal Forest Research*, 2001, 2: 17-25.

[7] GALLAGHER R S, ANANTH R, GRANGER K. Phenolic and short-chained aliphatic organic acid constituents of wild oat (*Avena fatua* L.) seeds [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(1): 218-225.

[8] GATFORD K T, EASTWOOD R F, HALLORAN G M. Germination inhibitors in bracts surrounding the grain of *Triticum tauschii* [J]. *Functional Plant Biology*, 2002, 29(7): 881-890.

[9] SIDDIQUI Z S, KHAN M A. The role of seed coat phenols on water uptake and early protein synthesis during germination of dimorphic seeds of *Halopyrum mucronatum* (L.) Staph [J]. *Pakistan Journal of Botany*, 2010, 42(1): 227-238.

[10] NAQVI H H, HANSON G P. Germination and growth inhibitors in guayule (*Parthenium argentatum* Gray) chaff and their possible influence in seed dormancy [J]. *American Journal of Botany*, 1982, 69(6): 985-989.

[11] 方升佐, 狄香香. 青钱柳资源培育与开发利用的研究进展 [J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2007, 31(1): 95-100.

[12] 杨万霞, 方升佐. 青钱柳种皮甲醇浸提液的生物测定 [J]. *植物资源与环境学报*, 2005, 14(4): 11-14.

[13] 尚旭岚, 徐锡增, 方升佐. 青钱柳种子休眠机制 [J]. *林业科学*, 2011, 47(3): 68-74.

[14] SHANG X L, XU X Z, FANG S Z. Identification and quantitative analysis of germination inhibitors in the pericarp of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskata [J]. *Propagation of Ornamental Plants*, 2012, 12(4): 195-201.

[15] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.

[16] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.

[17] 宋松泉, 程红焱, 龙春林, 等. 种子生物学研究指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2005.

[18] 邢更妹, 薛荣, 王仓山. 红芪组织培养中次生代谢产物的研究 I. 红芪愈伤组织异柠檬酸裂解酶活性的变化 [J]. *兰州大学学报: 自然科学版*, 1999, 35(2): 119-123.

[19] 浦心春, 韩建国, 李敏. 结缕草种子打破休眠过程中的代谢调控 [J]. *中国草地学报*, 1994, 16(3): 20-24.

[20] 董建华, 杨华庚, 王秉忠. 橡胶种子不同萌发期几种酶及可溶性蛋白质的变化 [J]. *热带作物学报*, 1998, 19(3): 1-7.

[21] FANG S Z, WANG J Y. Changes in the biochemical composition and enzyme activity during dormancy release of *Cyclocarya paliurus* seeds [J]. *Forestry Studies in China*, 2007, 9(1): 7-13.

[22] BALERONI C R S, FERRARESE M L L, SOUZA N E, et al. Lipid accumulation during canola seed germination in response to cinnamic acid derivatives [J]. *Biologia Plantarum*, 2000, 43(2): 313-316.

(责任编辑: 佟金凤)