

· 中药农业 ·

须根水提液对白花丹参种子萌发幼苗 光合作用及次生代谢的影响[△]

史国玉¹, 周冰谦², 刘伟^{2*}, 王晓², 耿岩玲², 张琳³, 赵珂⁴, 李奉胜⁴

1. 山东医学高等专科学校, 山东 济南 250002;

2. 齐鲁工业大学/山东省科学院 山东省分析测试中心, 山东 济南 250014;

3. 山东第一医科大学 第二附属医院, 山东 泰安 271000;

4. 莱芜紫光生态园有限公司, 山东 济南 271100

[摘要] **目的:** 研究不同浓度白花丹参须根水提液对种子萌发、幼苗光合作用及次生代谢物质积累的影响, 以为白花丹参连作障碍的消减提供参考。**方法:** 设置不同浓度白花丹参须根水提液处理组, 测定不同处理组种子萌发率、幼苗多酚氧化酶活性、可溶性糖及可溶性蛋白含量; 利用高效液相色谱法(HPLC)测定幼苗中水溶性及脂溶性有效物质含量。**结果:** 白花丹参须根水提液低浓度对种子萌发有促进作用, 高浓度有抑制作用; 与对照组相比, 处理组幼苗净光合速率、蒸腾速率、气孔导度均有不同程度下降; 对照组多酚氧化酶活性及可溶性蛋白、可溶性糖总量分别比白花丹参须根水提液处理后低 7.86%、8.47%、14.33%, 但处理后幼苗水溶性有效成分(丹酚酸 B、迷迭香酸)及脂溶性有效成分(二氢丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A、隐丹参酮)含量积累量均高于对照组。**结论:** 白花丹参须根水提液通过影响种子的萌发率、抑制幼苗的光合作用、促进次生代谢产物积累影响丹参的产量及品质。

[关键词] 白花丹参; 水提液; 种子萌发; 生理活性; 次生代谢

[中图分类号] S567 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2021)03-0491-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190929003

Effects of Water Extract of Fibrous Root on Seed Germination, Photosynthesis and Secondary Metabolism of *Salvia miltiorrhiza*

SHI Guo-yu¹, ZHOU Bing-qian², LIU Wei^{2*}, WANG Xiao², GENG Yan-ling²,
ZHANG Lin³, ZHAO Ke⁴, LI Feng-sheng⁴

1. Shandong Medical College; Jinan 250002, China;

2. Qilu University of Technology/Shandong Analysis and Test Center, Shandong Academy of Sciences,
Jinan 250014, China;

3. The Second Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Tai'an 271000, China;

4. Laiwu Ziguang Ecological Co., Ltd., Jinan 271100, China

[Abstract] **Objective:** In order to provide basic data for reducing the continuous cropping obstacle of *Salvia miltiorrhiza* Bge. *F. alba*, the effects of different concentrations of fibrous root water extract on seed germination, seedling photosynthesis and secondary metabolite accumulation were studied. **Methods:** Germination rate of seeds, polyphenol oxidase activity, soluble sugar and protein content were measured in different treatment groups, and also the content of water-soluble and lipid soluble effective substances in *S. miltiorrhiza* seedlings were determined by HPLC. **Results:** Compared with the control group, the net photosynthetic rate (P_n), transpiration rate (T_r) and stomatal conductance (G_s) of the treated group are decreased. The PPO activity, the content of soluble protein and total soluble sugar in the control group were 7.86%, 8.47% and 14.33% lower than those in the fibrous root water extract group, respectively, but the accumulation of water-

[△] **[基金项目]** 中央本级重大增减支项目(2060302); 山东省高等学校科技计划项目(J17KA261); 山东省中医药科技发展计划项目(2019-0314); 山东省重点研发计划项目(2017CXGC1304)

* **[通信作者]** 刘伟, 研究员, 研究方向: 中药资源与质量控制; Tel: (0531)68606191, E-mail: liuwei0074@163.com

soluble (salvianolic acid B, rosmarinic acid) and lipid soluble effective substance (dihydrotanshinone, tanshinone I, tanshinone II_A, cryptotanshinone) in the treated seedlings were higher than that in the control group. **Conclusion:** The water extract of fibrous root affected the germination rate of seeds, inhibited photosynthesis of seedlings, promoted the accumulation of secondary metabolites, and affected the yield and quality of *S. miltiorrhiza*.

[**Keywords**] *Salvia miltiorrhiza* Bge. F. alba; water extract; seed germination; physiological activity; secondary metabolism

白花丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. F. alba 为唇形科鼠尾草属植物, 具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦之功效^[1]。研究表明, 白花丹参是治疗高血压、心脑血管疾病的理想药物, 且在治疗血栓闭塞性脉管炎方面有独特疗效^[2]。其野生种主要分布在山东泰沂山脉^[3]。有研究表明, 白花丹参中丹参酮 II_A、丹参酮 I 及总丹参酮的体外抗菌活性优于紫花丹参^[4]。

随着近年来丹参需求量的上升, 其种植面积及复种指数逐年增加, 引发连作障碍。这一问题已成为限制丹参种植产业发展的瓶颈^[5]。研究表明, 丹参连作会引起须根脱落, 主根粗糙、褐变、腐烂, 造成减产甚至绝产; 而丹参脱落的须根产生大量的化感物质^[6], 引起自毒作用, 继而影响植物生长代谢, 有可能对第二年的种苗产生影响, 继而在后期产生连作障碍^[7]。因此, 本研究以白花丹参须根水提液为研究材料, 明确其对种子萌发过程、幼苗光合作用及次生代谢产物积累的影响, 以期对丹参连作障碍的消减提供理论参考。

1 材料

1.1 样品

样品采集于山东莱芜紫光生态园白花丹参种植基地, 经山东中医药大学李佳教授鉴定为白花丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. F. alba 的种子。

1.2 仪器

722E 型可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); SB-3200DT 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); RXZ-280A 型人工智能气候箱(宁波江南仪器厂); LI-6400XT 型便携式光合测定仪(北京力高泰科技有限公司); 5424 型离心机(Eppendorf 公司); 1200 型高效液相色谱仪(包括 DAD 检测器、Agilent Chemstation 工作站, 美国安捷伦公司); SHZ-D(III) 型台式真空泵(巩义市科瑞仪器有限公司)。

1.3 试剂

牛血清蛋白(纯度 ≥ 98%, 美国 Sigma 公司); 蒽酮(纯度 ≥ 99%, 批号: 20160324)、蔗糖(纯度 ≥ 99%, 批号: 20150722)、甘油(纯度 ≥ 99%, 批号: 20150212)、三氯乙酸(纯度 ≥ 99%, 批号: 20140711)、硫代巴比妥酸(纯度 ≥ 98%, 批号: 20190521)、乙二醇四乙酸二钠(纯度 ≥ 99%, 批号: 20140324)、L-甲硫氨酸(纯度 ≥ 99%, 批号: 20190807)、核黄素(纯度 ≥ 99%, 批号: F20110615)、考马斯亮蓝 G250(纯度 ≥ 99%, 批号: 20190312)、巯基乙醇(批号: 20200605)均购于国药集团化学试剂有限公司; 硼酸(纯度 ≥ 99%, 天津市广成化学试剂有限公司); 无水乙醇(分析纯, 批号: 20191105)、乙腈(分析纯, 批号: 20191025)、甲醇(分析纯, 批号: 20181201)均购于天津市富宇精细化工有限公司。

二氢丹参酮(纯度 ≥ 98%, 批号: B20357)、隐丹参酮(纯度 ≥ 98%, 批号: 35825-57-1)、丹参酮 I(纯度 ≥ 98%, 批号: 568-73-0)、丹参酮 II_A(纯度 ≥ 98%, 批号: 568-72-9)、丹酚酸 B 对照品(纯度 ≥ 98%, 批号: 115939-25-8)均购于上海源叶生物科技有限公司; 迷迭香酸(纯度 ≥ 98%, 批号: MUST 12020702, 成都曼思特生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 白花丹参须根水提液的制备

根据前期实验方法^[6], 白花丹参收获后收集残留在大田中的须根, 自然阴干后粉碎, 过 60 目筛。称取过筛后样品 20 g, 蒸馏水 200 mL 浸泡 24 h, 超声提取 0.5 h, 滤过, 滤渣加蒸馏水 200 mL 重复提取 2 次, 合并滤液, 台式真空泵过水膜抽滤, 得滤液后加蒸馏水定容至 800 mL, 作为白花丹参须根提取液母液。

2.2 实验设计

种子萌发实验共设 4 个处理: 蒸馏水对照组

(CK)、须根水提液母液处理组(A)、须根水提液1倍稀释液处理组(B)、须根水提液2倍稀释液处理组(C),分别测定不同浓度白花丹须根水提液对白花丹参种子萌发的影响。测定种子萌发后CK及C组白花丹参幼苗光合作用、生理活性及有效成分含量的影响。

2.2.1 种子萌发实验 将白花丹参种子用5%氯化汞浸泡3 min,蒸馏水彻底清洗干净后,将种子置于垫有双层滤纸的培养皿中。采用上述4种处理溶液浸湿滤纸,光照($280 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)14 h,恒温25 ℃。实验过程中保持滤纸湿润。观察并记录每日的发芽数量^[8]。每个处理取白花丹参种子50粒,4个重复。每天统计发芽情况,第四天统计发芽势(GP),第七天统计发芽率(GR)。

$$GP = [\sum(G_4)/N] \times 100\% \quad (1)$$

$$GR = [\sum(G_7)/N] \times 100\% \quad (2)$$

式中, G_4 为第四天的发芽数; G_7 为第七天的发芽数; N 为供试种子数。

2.2.2 丹参幼苗培养及光合作用的测定 将白花丹参种子用5%氯化汞浸泡3 min,蒸馏水彻底清洗干净后置于湿润滤纸上,放入人工智能气候箱中萌发4~5 d。种子萌发后(以胚根突破种皮为准),用消毒的镊子将其挑出,进行沙培^[9]。在每盘培养皿(直径15 cm)中放入洗净的石英沙50 g及已萌发种子15粒,放入人工智能气候箱中培养30 d后开始分别处理,CK加入蒸馏水5 mL继续培养,C组加入白花丹参须根提取液2倍稀释液5 mL培养,每个处理设置4个重复。每隔1 d各补充相应处理液2 mL,处理7 d后进行丹参幼苗光合作用的测定。

选择生长健康的丹参功能叶片(茎尖往下第四片叶),使用便携式光合测定仪在自然光下对丹参幼苗叶片净光合速率(P_n)、蒸腾速率(T_r)、气孔导度(G_s)、胞间 CO_2 体积浓度进行不离体测定。

2.3 丹参幼苗生理活性的测定

2.3.1 酶液提取 分别称取丹参幼苗地上部分及地下部分0.5 g,放入预冷的研钵中,分次加入预冷的磷酸盐缓冲液($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.8)4 mL,在冰浴中充分匀浆。将匀浆液置于预冷离心机中 $10\,000 \times g$ 离心20 min,上清液即酶提取液^[10]。

2.3.2 测定方法及指标 多酚氧化酶(PPO)的活性测定参照Mishra等^[11]的方法;可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝G-250法^[12];可溶性糖含量测定采

用蒽酮法^[13]。

2.4 丹参幼苗有效成分含量测定

根据参考文献[14]方法测定丹参幼苗丹酚酸B、迷迭香酸、二氢丹参酮、丹参酮I、丹参酮II_A、隐丹参酮的含量。

2.5 数据分析

采用SPSS 17.0软件进行处理组间差异显著性分析,用Excel软件处理数据并获得标准差。

3 结果

3.1 不同浓度须根水提液对丹参种子发芽率的影响

不同浓度须根水提液对丹参种子发芽率的影响见表1。结果显示,处理组C的GP(第四天)与GR(第七天)最高为62.25%、80.36%,较CK分别高出6.85% ($P > 0.05$)、3.65% ($P > 0.05$)。处理组A的丹参种子发芽势及发芽率均为最低,分别为25.38%、71.90%,较处理组C分别低59.23% ($P < 0.05$)、10.53% ($P > 0.05$)。

表1 不同浓度须根水提液对丹参种子发芽率影响($\bar{x} \pm s$, $n=50$)

处理	处理时间/d			
	4	5	6	7
CK	58.26 ± 6.41a	72.31 ± 3.72a	77.48 ± 5.47a	77.53 ± 8.22a
A	25.38 ± 3.09c	51.04 ± 2.77b	66.72 ± 9.25a	71.90 ± 1.03a
B	49.13 ± 2.66b	68.55 ± 2.41a	71.29 ± 5.28a	73.44 ± 8.23a
C	62.25 ± 7.34a	74.89 ± 5.98a	74.03 ± 6.92a	80.36 ± 9.55a

注:同列不同小写字母表示 $P < 0.05$;下同。

3.2 丹参须根水提液对丹参幼苗光合作用的影响

CK中 P_n 、 T_r 、 G_s 分别为 $0.86 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $0.03 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 和 $447.82 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,较C组分别高6.80%、8.06%、22.45%,而C组胞间 CO_2 体积浓度较对照组CK高2.17%。

3.3 丹参须根水提液对丹参幼苗PPO、可溶性糖及可溶性蛋白的影响

分别对丹参幼苗地上及地下部分进行PPO活性和可溶性糖、可溶性蛋白含量进行分析(表2)。结果显示,CK中PPO活性和可溶性蛋白、可溶性糖总量分别较C组低7.86% ($P > 0.05$)、8.47% ($P < 0.05$)、14.33% ($P > 0.05$)。其中,PPO活性和可溶性蛋白、可溶性糖总量在2个组中均表现为地上

部分高于地下部分。

表2 须根提取液对丹参幼苗 PPO 活性和可溶性糖、可溶性蛋白质质量分数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

处理	PPO/ $U \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$	可溶性蛋白/ $mg \cdot g^{-1}$	可溶性糖/ $mg \cdot g^{-1}$
地上 CK	20.10 ± 1.69a	150.13 ± 7.01a	3.32 ± 0.19a
C	21.53 ± 1.28a	117.38 ± 4.69b	3.88 ± 0.46a
地下 CK	11.42 ± 1.06a	103.62 ± 7.67b	17.90 ± 2.25a
C	12.69 ± 1.78a	159.84 ± 16.26a	20.89 ± 1.80a
总量 CK	31.52 ± 1.20a	253.75 ± 11.48a	21.22 ± 2.23a
C	34.21 ± 0.74a	277.23 ± 17.22a	24.77 ± 1.58a

3.4 丹参须根水提液对丹参幼苗有效物质含量的影响

表3显示,处理组C中丹参幼苗的丹酚酸B及迷迭香酸总含量较CK分别高出46.84% ($P < 0.05$)、9.77% ($P < 0.05$);地下部分丹酚酸B及迷迭香酸含量CK分别较处理C低33.83%、21.00%。丹参须根水提液对丹参幼苗脂溶性成分含量的影响见图1。由图1可以看出,处理组C中丹参幼苗含量高于CK,二氢丹参酮、隐丹参酮、丹参酮I及丹参酮II_A分别较对照组高出249.87% ($P < 0.01$)、289.32% ($P < 0.01$)、40.21% ($P < 0.05$)及17.22% ($P > 0.05$)。

表3 丹参幼苗水溶性成分质量分数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$) %

处理	丹酚酸B	迷迭香酸
地上 CK	8.67 ± 0.62a	38.62 ± 2.49a
C	7.83 ± 1.39a	34.68 ± 2.13b
地下 CK	121.25 ± 13.42b	46.11 ± 4.60b
C	183.25 ± 9.00a	58.37 ± 8.04a
总量 CK	130.13 ± 13.20b	84.77 ± 5.33b
C	191.08 ± 10.24a	93.05 ± 9.27a

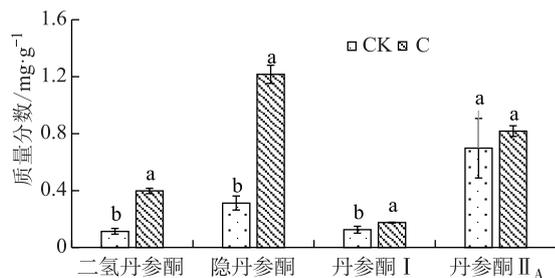


图1 丹参须根水提液2倍稀释液对丹参幼苗脂溶性成分质量分数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

4 讨论

植物根系有吸收水分和营养的功能,同时也分泌各种化学物质产生自毒作用^[15],即植物自身的分泌物,如茎、叶的淋溶及残体分解物、根系分泌物等所产生的有毒物质抑制植物生长的现象^[16],酚类化合物作为化感物质中最为常见的分泌物,对植物的种子萌发有着明显的抑制作用。而种子萌发是植物生活史的重要阶段之一,是决定着药材产量和质量的第一关键因素^[17],因此研究化感物质对种子萌发及幼苗生长的影响具有重要的作用。

研究报道表明,多种植物提取液中含有阿魏酸、香豆素等酚酸类物质,如小麦、黑胡桃、燕麦及黄花茅等,这些植物中含有的化感物质能对牵牛花、杂草种子的萌发有明显的抑制作用^[18-21]。而丹参须根提取液中含有的酚酸类物质对丹参产量及质量的形成也有着不同程度的影响^[6-7]。本研究中以不同浓度的丹参须根水提液对其种子萌发、幼苗光合作用、生理活性及有效成分含量的影响进行研究,发现不同浓度的参须根水提液对其种子萌发的影响呈现出显著的“剂量效应”,即高浓度抑制种子萌发,低浓度促进种子萌发的现象,这可能与化感物质影响种子中相关酶合成及活性有关,如硝酸还原酶、淀粉酶、磷酸化酶等,同时抑制细胞分裂及伸长等生理过程,影响蛋白的合成及基因表达改变激素水平从而使得种子萌发所需要的能量及物质得不到有效供给,因此造成了种子的活力降低,萌发率下降等^[17,22]。同时,须根水提液对种皮的渗透压也有一定影响,造成吸水力作用的紊乱,这些物质同时也能滋生病原微生物的生长,造成种子腐烂,抑制种子萌发^[23-24]。

另外,PPO可将植物体内的酚类物质氧化成对病原菌有毒的醌类物质,并具有清除H₂O₂的作用,其活性与植物抗逆密切相关^[25]。因此,本研究中丹参在重茬逆境下启动其自身防御机制,使得体内PPO酶活性升高。同时,PPO参与有机物中芳香族化合物的转化,这可能与须根提取液中所含的酚酸类物质的积聚导致底物诱导相应功能酶的活性有关^[26]。

参考文献

- [1] 刘伟,张琳,章云云,等.不同连作年限对白花丹参生长及其活性成分含量的影响[J].中国中药杂志,2013,38

- (24):4252-4256.
- [2] 朱海林,张大伟,孙隆儒,等. 白花丹参总丹参酮抗血栓闭塞性脉管炎的实验研究[J]. 中药材,2012,35(5):780-783.
- [3] 王峰祥,闫永亮,毛淑敏,等. 白花丹参野生资源濒危保护和开发利用研究[J]. 中国现代中药,2009,11(8):17-18.
- [4] 李允尧,赵华英,陈沪宁,等. 山东省白花丹参的植物资源[J]. 中药材,2000,23(2):69-70.
- [5] 刘伟,魏莹莹,刘大会,等. 白花丹参抗连作品系植物学及物候期特性研究[J]. 中药材,2015,38(1):5-7.
- [6] 刘伟,魏莹莹,孙鹏,等. 须根自然腐解对白花丹参生长及其活性成分含量的影响[J]. 中国中药杂志,2015,40(13):2548-2552.
- [7] 刘伟,魏莹莹,吕海花,等. 须根腐解对丹参根际土壤化感物质的影响[J]. 中药材,2016,39(10):2203-2206.
- [8] 陶嘉龄,郑光华. 种子活力[M]. 北京:科学出版社,1991:4.
- [9] 李志华,沈益新. 不同品种紫花苜蓿根水浸提液化感作用效应的研究[J]. 中国草地,2005,27(4):39-46.
- [10] 米海莉,许兴,李树华,等. 干旱胁迫下牛心朴子幼苗相对含水量、质膜透性及保护酶活性变化[J]. 西北植物学报,2003,23(11):1870-1875.
- [11] MISHRA B B, GAUTAM S, SHARMA A. Free phenolics and polyphenol oxidase(PPO):The factors affecting post-cut browning in eggplant (*Solanum melongena*) [J]. Food Chem,2013,139(1/4):105-114.
- [12] 张志良,瞿伟菁,李小方. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2009:69.
- [13] 张自坤,刘世琦,王忠全,等. 低温胁迫对不同砧木黄瓜嫁接苗生理生化指标的影响[J]. 山东农业科学,2009(5):36-40.
- [14] 周冰谦,吕海花,杨帆,等. 变温干制对白花丹参有效成分的二次提升研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(10):1883-1893.
- [15] 周艳丽,王艳,李金英,等. 大蒜根系分泌物的化感作用[J]. 应用生态学报,2011,22(5):1368-1372.
- [16] 郭俊霞,李青苗,杨玉霞,等. 丹参连作土壤水提液对其幼苗生长的影响[J]. 甘肃中医学院学报,2013,30(3):76-79.
- [17] 杨期和,叶万辉,廖富林,等. 植物化感物质对种子萌发的影响[J]. 生态学杂志,2005,24(12):1459-1465.
- [18] GUENZI W D, MCCALLA T M. Phenolic acids in oats, wheat, sorghum, and corn residues and their phytotoxicity[J]. Agron J,1966,58(3):303-304.
- [19] COCHRAN V L, ELLIOTT L F, PAPENDICK R I. The production of phytotoxins from surface crop residues[J]. Soil Sci Soc Am J,1977,41(5):903-908.
- [20] HISASHI K N. Isolation and identification of an allelopathic substance in *Pisum sativum*[J]. Phytochemistry, 2003,62(7):1141-1144.
- [21] TSUCHIYA K, LEE J W, HOSHINA T. Allelopathic potential of red pepper (*Capsicum annum* L.) [J]. Jpn Agr Res Q,1994,28:1-11.
- [22] 王进闯,潘开文,吴宁,等. 花椒品种间化感效应的差异[J]. 生态学报,2005,25(7):1591-1598.
- [23] 马茂华,于凤兰,孔令韶. 油蒿的化感作用研究[J]. 生态学报,1999,19(5):670-676.
- [24] 何泽瑛. 种子萌发的生理生化[M]. 南京:江苏科学技术出版社,1979:92-93.
- [25] 曹光球,杨梅,林思祖,等. 邻羟基苯甲酸对不同化感型杉木无性系抗氧化酶活性的化感效应[J]. 中国生态农业学报,2010,18(6):1267-1271.
- [26] 廖海兵,李云霞,邵晶晶,等. 连作对浙贝母生长及土壤性质的影响[J]. 生态学杂志,2011,30(10):2203-2208.

(收稿日期:2019-09-29 编辑:戴玮)