

肉果秤锤树核果甲醇提取液发芽抑制物质研究

伏秦超¹, 刘超¹, 王颖¹, 李超豪², 胡强²

(1. 乐山师范学院 生命科学学院, 四川 乐山 614000; 2 乐山市产品质量监督检验所, 四川 乐山 614000)

摘要:以肉果秤锤树核果为试材, 以白菜籽为研究对象, 运用系统溶剂法提取分离肉果秤锤树(*Sinojackia sarcocarpa* L. Q. Luo)核果甲醇浸提液, 得到石油醚相、乙醚相、乙酸乙酯相、甲醇相 4 个分离组分, 进行发芽抑制物质生物测定, 并对各个萃取液组分进行鉴定和相对含量测定, 进一步研究了肉果秤锤树核果内源抑制物与种子休眠的关系。结果表明:乙醚相、乙酸乙酯相、甲醇相中含有抑制种子萌发和幼苗生长的物质, 且含有的抑制物活性依次为:甲醇相>乙酸乙酯相>乙醚相。通过气相色谱-质谱联用仪进一步分离与鉴定, 确定发芽抑制物的种类与相对含量, 发现肉果秤锤树核果中包含辛酸、十七烷酸、油酸等发芽抑制物。

关键词:肉果秤锤树; 核果; 气相色谱-质谱联用; 抑制物质

中图分类号:Q 946.91 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)02-0006-04

肉果秤锤树(*Sinojackia sarcocarpa* L. Q. Luo)属安息香科秤锤树属, 亦名野茉莉科, 是罗利群^[1]于 1992 年在四川乐山地区发现的一个新种, 因果实肉质汁多且明显区别于其它种, 故命名为肉果秤锤树。但由于种群个体数量非常少以及分布面积太小, 已被列入国家重点保护的二级濒危树种。其花雪白, 果实为核果, 棕色, 呈卵形, 形似秤锤, 果序下垂, 随风摆动, 具有很高的观赏价值^[1], 可引种为园林树种, 肉果秤锤树野生资源分布极为稀少, 处于濒危状态。其种子具有深休眠习性, 在自然条件下一般要经过 2~3 年才能萌发, 且发芽率极低^[2], 人工繁育极其困难, 已经严重影响到对该物种的资源保护与开发利用等研究工作。

研究表明, 植物的核果(有文献称为种子^[3-4])有别于植物学所定义的种子, 核果将外果皮、中果皮、内果皮统称为种皮, 种仁为胚和胚乳)中含有的一些化学成分影响了种子的后熟和萌发, 从而导致种子休眠^[5]。姚青菊等^[3]和贾书果等^[4]分别对秤锤树属另一种秤锤树(*Sinojackia xylocarpa*)种子中发芽抑制物进行了研究, 发现存在酯溶性发芽抑制物质。刘超等^[6]对肉果秤锤树核果萌发抑制物质的初步研究表明, 在肉果秤锤树核果中也含有酯溶性抑制物, 但目前对于抑制物质的分离鉴定和含量测定尚鲜见报道。为此, 该试验将采

用系统分离法对肉果秤锤树核果甲醇提取液进行分离, 对各萃取液进行生物测定, 并采用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)对各个萃取液组分进行鉴定和相对含量测定, 进一步研究肉果秤锤树核果内源抑制物与种子休眠的关系, 探讨种子的休眠机理, 以期打破种子休眠提高发芽率提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试肉果秤锤树核果采集于乐山师范学院植物苗圃, 收集后清洗除杂, 待自然风干。供试生物活性测定白菜籽(*Brassica pekinensis*)“早熟 5 号”为市场购买, 纯度 97%, 净度 98%, 含水量约 8%, 发芽率 95%以上。

1.2 试验方法

1.2.1 发芽抑制物质的分离 称取 5 g 风干且饱满的肉果秤锤树核果, 高速粉碎机粉碎, -20℃预冷的 80% 甲醇在 4℃密闭环境中充分浸提, 24 h 后过滤, 重复 2 次。合并浸提液, 离心, 取上层清液, 抽滤后减压蒸馏浓缩至 5 mL(浓度为 1 g/mL)^[7]。参照韩宝瑞等^[8]方法, 使用石油醚、乙醚、乙酸乙酯、甲醇相进行发芽抑制物质的系统分离(图 1)。

1.2.2 发芽抑制物质的生物测定 分别取 1.2.1 中分离得到的石油醚相、乙醚相、乙酸乙酯相、甲醇相 3 mL 于直径为 9 cm 的铺有滤纸的培养皿中, 待有机溶剂挥发干后加入 3 mL 的蒸馏水, 相同体积的蒸馏水作为对照。每皿中上部均匀放入 30 粒白菜籽(白菜籽预先在 40℃水浴中温浸 20 min), 25℃培养, 放置培养皿时应倾斜 45°(利用地心引力使培根直立生长, 便于测量)^[9-10]。

第一作者简介:伏秦超(1984-), 男, 陕西渭南人, 硕士, 实验师, 现主要从事珍稀植物保护利用等研究工作。E-mail: fuqch@126.com.

基金项目:四川省乐山市科技局科技计划资助项目(12NZD088)。

收稿日期:2014-09-04

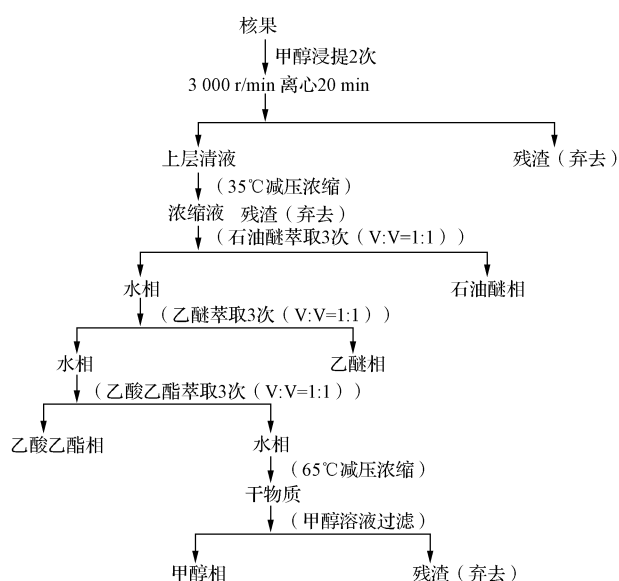


图1 发芽抑制物质初步分离流程

Fig. 1 The progress flow for the primary separation of germination inhibitors

36 h后统计白菜籽的发芽率(以胚根长于白菜籽直径为发芽标准),72 h后测量胚根长,每处理3次重复^[11]。

1.3 项目测定

1.3.1 肉果秤锤树核果甲醇浸提液中发芽抑制物质的鉴定 将1.2.1中分离得到的乙醚相、乙酸乙酯相、甲醇相减压浓缩后,送往乐山市产品质量检测所进行GC-MS分析,GC-MS气相色谱质谱联用仪型号为TSQ-8000, Thermo Fisher。气相方法为:TR-5MS 30 m×0.25 mm×0.25 μm毛细管色谱柱,柱温箱的起始温度为50℃,以20℃/min升高至220℃,保持1 min,再以10℃/min的速率升高到290℃,保持40 min,进样温度为280℃。载气为氦气,0.8 mL/min。质谱方法为:界面温度为250℃,离子源为EI,源温为200℃,发射电流为150 μA,电离电压350 V,扫描速度0.7 s,质量范围29~800 amu,进样量2 μL,4 min时开始采样。由计算机控制的库存信号检查各个成分的质谱图并与数据库进行核对^[11]。

1.3.2 肉果秤锤树核果甲醇浸提液中物质的相对含量测定 以离子流程图中每个峰面积与全部检出峰面积的比值代表该成分在肉果秤锤树核果甲醇浸提液中相对含量。

1.4 数据分析

采用DPS 9.50软件对试验数据进行单向分组资料的方差分析。

2 结果与分析

2.1 肉果秤锤树核果中发芽抑制物质对白菜种子发芽率和胚根长的抑制作用

由表1可知,在石油醚相萃取液培养条件下白菜种

子的发芽率为88.89%,与对照组的92.22%接近;而白菜种子在乙醚相、乙酸乙酯相、甲醇相萃取液培养条件下的发芽率分别为50.00%、28.89%、11.11%,均明显小于对照组。4种萃取液对白菜种子胚根长的影响也呈现相似的生长趋势,其中在石油醚相中培养的白菜种子胚根长最长,为2.89 cm,乙醚相、乙酸乙酯相次之,最短的是甲醇相,为0.82 cm。由方差结果可知,与对照组相比,石油醚相对白菜种子发芽抑制率及胚根长差异不显著($P<0.01$),而其它3相萃取液均降低了白菜种子的发芽率和胚根长,达到差异极显著水平($P<0.01$)。表明石油醚相萃取液中未发现有发芽抑制物,而乙醚相、乙酸乙酯相、甲醇相中含有抑制种子萌发和幼苗生长的抑制物质,且含有的抑制物质活性大小为:甲醇相>乙酸乙酯相>乙醚相。

表1 萃取液对白菜种子发芽率和胚根长的抑制作用

Table 1 The inhibition of extract on the percentage germination rate and root growth of cabbage seeds

处理 Treatment	发芽率 Germination rate/%	发芽率与对照比较 Compared with CK/%	LSR 0.01	胚根长 Radicle length/cm	胚根长与对照比较 Compared with CK/%	LSR 0.01
对照 CK	92.22	100.00	A	2.90	100.00	A
石油醚相 Petroleum ether	88.89	96.39	A	2.89	99.66	A
乙醚相 Diethyl ether	50.00	54.22	B	1.75	60.34	B
乙酸乙酯相 Ethyl acetate	28.89	31.33	C	0.84	28.97	C
甲醇相 Methanol	11.11	12.05	C	0.82	28.28	C

2.2 肉果秤锤树核果甲醇提取液中物质的GC-MS分析测定

2.2.1 肉果秤锤树核果乙醚相萃取液中有机化合物的种类及相对含量 采用GC-MS对肉果秤锤树核果乙醚相萃取液进行分析鉴定,共分离出19个峰,经质谱扫描后的质谱图,通过质谱计算机数据系统检索并与标准图谱进行核对,选择离子流程图中峰面积及相似度较大的有机化合物有10种。由表2可以看出,其中可能具有抑制物作用的物质为2,4-二叔丁基苯酚^[12],其它化合物主要为烷烃类,如二十三烷、正二十四烷、正三十烷等,这些物质是否存在发芽抑制活性,目前尚未被证实。

2.2.2 肉果秤锤树核果乙酸乙酯相萃取液中有机化合物的种类及相对含量 采用GC-MS对肉果秤锤树核果乙酸乙酯相萃取液进行分析鉴定,共分离出19个峰,经质谱扫描后的质谱图,通过质谱计算机数据系统检索并与标准图谱进行核对,选择离子流程图中峰面积及相似度较大的有机化合物有13种(表3),其中已确定有机酸类物质辛酸^[13]具有抑制作用。其它有机化合物是否具

有抑制种子萌发的作用,目前尚未被证实。分别是有机酸类:3,7-二甲基-6-辛烯酸、十七烷酸、邻丙氧基苯甲酸;苯类:乙基苯、丙基苯、2,6-二异丙基苯、茚;酯类:亚麻酸甲酯、1-亚油酸单甘油酯;醛类:2,5-二辛氧基对苯二甲醛;酚类:2,6-二叔丁基对甲酚。

表2 肉果秤锤树核果乙醚相萃取液中
有机化合物的种类及相对含量

Table 2 Organic compound kinds and their relative content in
extract diethyl ether of *Sinojackia sarcocarpa* L. Q. Luo drupe

时间 Time/min	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight	中文名 Chinese name	相对含量 Relative content/%
4.54	C ₈ H ₁₀	106	1,2-二甲苯	2.74
11.40	C ₁₇ H ₃₆	240	正十七烷	1.61
13.46	C ₁₄ H ₂₂ O	206	2,4-二叔丁基苯酚	2.77
21.27	C ₂₃ H ₄₈	324	二十三烷	3.03
22.66	C ₂₄ H ₅₀	338	正二十四烷	4.05
26.92	C ₃₀ H ₆₂	422	正三十烷	7.91
28.31	C ₂₈ H ₅₈	394	正二十八烷	10.16
32.32	C ₃₄ H ₇₀	478	三十四烷	8.64
33.75	C ₃₆ H ₇₄	506	正三十六烷	9.30
35.45	C ₃₃ H ₆₈	464	三十三烷	4.99

表3 肉果秤锤树核果乙酸乙酯相萃取液中
有机化合物的种类及相对含量

Table 3 Organic compound kinds and their relative content in
extract ethyl acetate of *Sinojackia sarcocarpa* L. Q. Luo drupe

时间 Time/min	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight	中文名 Chinese name	相对含量 Relative content/%
4.20	C ₈ H ₁₀	106	乙基苯	6.97
5.37	C ₉ H ₁₂	120	丙基苯	0.91
5.78	C ₈ H ₁₆ O ₂	144	辛酸	0.68
9.89	C ₁₀ H ₈	128	茚	0.14
10.89	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	3,7-二甲基-6-辛烯酸	0.35
13.43	C ₁₅ H ₂₄ O	220	2,6-二叔丁基对甲酚	3.63
13.99	C ₁₀ H ₁₈ O ₃	186	10-羟基-2-癸烯酸	1.32
16.30	C ₁₆ H ₂₀	212	2,6-二异丙基苯	0.65
17.54	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	十七烷酸	9.57
17.79	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	180	邻丙氧基苯甲酸	6.12
20.39	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292	亚麻酸甲酯	5.84
27.49	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390	2,5-二辛氧基对苯二甲醛	1.22
30.15	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	354	1-亚油酸单甘油酯	6.53

2.2.3 肉果秤锤树核果甲醇相萃取液中有机化合物的种类及相对含量 采用GC-MS对肉果秤锤树核果甲醇相萃取液进行分析鉴定,共分离出52个峰,由离子流程图可知,经质谱扫描后的质谱图,通过质谱计算机数据系统检索并与标准图谱进行核对,选择离子流程图中峰面积及相似度较大的有机化合物有20种(表4),其中已确定有机酸类物质油酸^[14]具有抑制作用。其它有机化合物是否具有抑制种子萌发的作用,目前尚未被证实。分别为有机酸类:乙氧基乙酸、2-呋喃甲酸、3-氧代-1-环戊烷羧酸等;胺类:2-甲基对苯二胺、2-甲基丙烯酰胺、十二烷基二甲基叔胺等;酯类:亚麻酸甲酯、十七酸甲酯、花生酸甲酯等;醇类:硫代乙二醇。

表4 肉果秤锤树核果甲醇相萃取液中
有机化合物的种类及相对含量

Table 4 Organic compound kinds and their relative content in
extract methanol of *Sinojackia sarcocarpa* L. Q. Luo drupe

时间 Time/min	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight	中文名 Chinese name	相对含量 Relative content/%
4.22	C ₂ H ₅ NO	59	乙酰胺	0.22
5.17	C ₂ H ₆ OS	78	硫代乙二醇	0.08
6.61	C ₄ H ₈ O ₃	104	乙氧基乙酸	0.28
6.75	C ₇ H ₁₀ N ₂	122	2-甲基对苯二胺	0.25
7.23	C ₆ H ₄ O ₃	112	2-呋喃甲酸	0.31
7.79	C ₆ H ₈ O ₃	128	3-氧代-1-环戊烷羧酸	0.56
8.36	C ₇ H ₈ O ₂	124	2,5-环己二烯-1-甲酸	0.42
9.08	C ₄ H ₇ NO	85	2-甲基丙烯酰胺	0.30
9.34	C ₆ H ₈ O ₄	144	衣庚酸	0.20
9.94	C ₆ H ₆ O ₂	110	1,2-苯二酚	0.20
10.44	C ₅ H ₆ N ₂	94	3-氨基吡啶	0.71
10.92	C ₆ H ₁₀ O ₄	146	己二酸	0.86
12.24	C ₁₄ H ₃₁ N	213	十二烷基二甲基叔胺	0.27
14.62	C ₁₆ H ₃₅ N	241	二甲基十四烷基胺	1.31
17.57	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	十七烷酸	0.40
18.71	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	油酸	0.57
18.76	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	十七酸甲酯	0.84
20.42	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292	亚麻酸甲酯	3.82
22.83	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	326	花生酸甲酯	0.42
23.19	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	312	蓖麻油酸甲酯	1.00

3 结论与讨论

研究证明内源性生理抑制物质的存在是导致种子休眠的一个主要因素^[15-17]。自1959年Hoffmann首次从欧洲花楸(*Sorbus aucuparia*)核果中分离出一种具有很强抑制作用的物质花楸酸(Parasorbic acid),发芽抑制物的研究就成为种子休眠机理研究的重点^[18]。刘超等^[6]对肉果秤锤树核果萌发抑制物质进行了初步研究,结果表明在肉果秤锤树核果中含有酯溶性抑制物,但没有对浸提液进行系统分离与鉴定,该试验进一步运用系统溶剂法提取分离肉果秤锤树核果甲醇浸提液,得到石油醚相、乙醚相、乙酸乙酯相、甲醇相4个萃取组分,通过4个萃取液对白菜籽的发芽及胚根生长情况进行的研究表明,乙醚相、乙酸乙酯相、甲醇相溶液处理的白菜籽发芽率分别降低了42.22%、63.33%、81.11%,胚根长分别减少了1.15、2.06、2.08 cm,发芽率和胚根长均明显降低,均达到差异极显著水平($P<0.01$),说明肉果秤锤树核果中含有抑制种子萌发和幼苗生长的物质,且含有的抑制物活性依次为甲醇相>乙酸乙酯相>乙醚相。进一步采用GC-MS联用仪对发芽抑制物质进行分析鉴定,分离鉴定出多种化合物,主要是烷烃类、有机酸类、酯类、苯类、酚类、酮类等,其中辛酸、十七烷酸、油酸3种物质已经被证实具有抑制发芽作用^[13-14],郭廷翹等^[14]对水曲柳种子发芽抑制物进行鉴定及生物化学研究,认为油酸参与调控种子休眠,推想其参与膜组分的代谢、对

膜的性质产生影响,从而抑制种子发芽与生长。孙佳等^[19]认为从种子中分离出的有机酸、不饱和酯类、酚类等有机化合物可能具有抑制作用,因此该试验分离鉴定出的其它化合物是否对种子的萌发具有抑制作用,需要采用标准品进行证实,并进一步研究其与种子休眠的关系,在更深层面上揭示其种子休眠机理,为快速打破肉果秤锤树种子的休眠提供理论依据。

参考文献

- [1] 罗利群. 极危树种-肉果秤锤树的生态特性[J]. 生态学报, 2005(3): 575-580.
- [2] 罗利群, 王维德. 濒危植物肉果秤锤树人工繁殖成功[J]. 植物杂志, 2000(5): 9.
- [3] 姚青菊, 汪琼, 王贞, 等. 秤锤树种子中发芽抑制物初步研究[J]. 江苏林业科技, 2008, 35(5): 24-26.
- [4] 贾书果, 沈元宝, 吴薇, 等. 秤锤树种子甲醇浸提液的生物测定[J]. 林业科技开发, 2007, 34(1): 104-107.
- [5] Kentzer T. Gibberellin like substance and growth inhibitors in relation to the dormancy and after ripening of ash seeds[J]. Acta Soc Bot Pol, 1966, 35: 575-600.
- [6] 刘超, 伏秦超, 罗正敏, 等. 肉果秤锤树核果中萌发抑制物质的初步研究[J]. 北方园艺, 2013(4): 20-24.
- [7] 李庆梅, 刘艳, 刘广全, 等. 栎属 7 种植物种子的发芽抑制物质研究[J]. 生态学报, 2013, 33(7): 2104-2112.
- [8] 韩宝瑞, 徐凌志. 西洋参果实中发芽抑制物质研究[J]. 安徽农业科学, 2010(14): 7302-7304.
- [9] 黄耀阁, 崔树玉, 李向高, 等. 西洋参种子抑制物质的初步研究[J]. 吉林农业大学学报, 1994(2): 9-14.
- [10] 尚旭岚, 孙容, 徐锡增, 等. 青钱柳种子不同部位发芽抑制物质的测定[J]. 农业科技开发, 2011(5): 29-32.
- [11] 张艳杰, 高捍东, 鲁顺保. 南方红豆杉种子中发芽抑制物的研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2007(4): 51-56.
- [12] 张新慧, 张恩和, 何庆祥, 等. 2,4-二叔丁基苯酚对啤酒花幼苗生长与光合特性的影响[J]. 草业学报, 2008(6): 47-51.
- [13] 尚旭岚, 孙容, 徐锡增, 等. 青钱柳种子不同部位发芽抑制物质的测定[J]. 农业科技开发, 2011(5): 29-32.
- [14] 郭廷翹, 郭维明, 聂虹, 等. 水曲柳种子主要天然发芽抑制物的鉴定及生物化学研究[J]. 东北林业大学学报, 1991(S1): 358-366.
- [15] Briggs C L, Morris. Seed-coat dormancy in *Grevillea linearifolia*: little change in permeability to an apoplastic tracer after treatment with smoke and heat[J]. Annals of Botany, 2008, 101(5): 623-632.
- [16] Vandeloos F, Bolle N, Van Assche. Seed dormancy and germination of the European *Chaerophyllum temulum* (Apiaceae), a member of a trans-Atlantic genus[J]. Annals of Botany, 2007, 100: 233-239.
- [17] Vandeloos F, Van Assche J A. Temperature requirements for seed germination and seedling development determine timing of seedling emergence of three monocotyledonous temperate forest spring geophytes[J]. Annals of Botany, 2008, 102(5): 865-875.
- [18] 曹珊珊. 黄山花楸种子休眠特性研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2009.
- [19] 孙佳, 郭江帆, 魏朔南. 植物种子萌发抑制物研究概述[J]. 种子, 2012(4): 57-61.

Study on Germination Inhibitors of *Sinojackia sarcocarpa* L. Q. Luo Drupe Methanol Extract

FU Qin-chao¹, LIU Chao¹, WANG Ying¹, LI Chao-hao², HU Qiang²

(1. College of Life Sciences, Leshan Normal University, Leshan, Sichuan 614000; 2. Leshan Product Quality Supervision and Testing Institute, Leshan, Sichuan 614000)

Abstract: Taking *Sinojackia sarcocarpa* L. Q. Luo drupe as materials, and seeds of Chinese cabbage as research object, by the use of systematic solvent extraction method, four kinds of organic phase were got from the *Sinojackia sarcocarpa* L. Q. Luo drupe methanol extract, which were petroleum ether phase, ether phase, ethyl acetate phase and methanol phase. Biological test of germination inhibitor was conducted, component identification and relative content of each organic phase were determined. The results showed that inhibition of seeds germination and seedling growth substances exist in ether phase, ethyl acetate phase and methanol phase, and the inhibitory viabilities among them were as follows. Ether phase < ethyl acetate phase < methanol phase. The germination inhibitors were studied by GC-MS, and the results showed that caprylic acid, heptadecanoic acid and oleic acid existed in the *Sinojackia sarcocarpa* L. Q. Luo drupe, and these inhibitors were one of the factors which lead to the delay of the germination.

Keywords: *Sinojackia sarcocarpa* L. Q. Luo; drupe; GC-MS; germination inhibitor