刘广娜,杨祥波,胡善凯. 混合盐胁迫对水飞蓟种子萌发期耐盐性及水飞蓟宾含量的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(20):144 - 146.
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2017.20.034

混合盐胁迫对水飞蓟种子萌发期耐盐性及水飞蓟宾含量的影响

刘广娜[1], 杨祥波[2], 胡善凯[1]
(1. 吉林农业科技学院中药学院,吉林吉林 132101; 2. 吉林农业科技学院生物工程学院,吉林吉林 132101)

摘要:以水飞蓟为试验材料,采用浓度为 0.1、0.2、0.3 mol/L 的混合盐($NaCl$、Na_2CO_3、$NaHCO_3$、Na_2SO_4 等物质量混合)溶液分别对水飞蓟种子进行处理,计算发芽率、发芽势和相对盐害率;选择大田中长势相近的水飞蓟植株进行不同浓度混合盐溶液的胁迫处理,测定水飞蓟素和水飞蓟宾的含量。结果显示,相对盐害率随着处理混合盐溶液浓度的增大而增加,0.1 mol/L 混合盐溶液处理下,种子相对盐害率为 0;发芽率、发芽势在 0.1 mol/L 混合盐溶液处理下最高,且高于对照组;水飞蓟素和水飞蓟宾的含量均随着混合盐溶液浓度的增高呈现出先增高后降低的趋势,以 0.2 mol/L 混合盐溶液的促进作用最好。

关键词:混合盐;胁迫;水飞蓟;耐盐性;相对盐害率;水飞蓟素;水飞蓟宾
中图分类号: S567.01　**文献标志码:** A　**文章编号:**1002 - 1302(2017)20 - 0144 - 03

中药水飞蓟为菊科(Asteracea)水飞蓟属植物水飞蓟[*Silybum marianum* (L.) Gaertn]的干燥成熟果实,是一味常用的清热解毒、疏肝利胆的药物[1]。其主要成分是水飞蓟素,具有抗自由基活性、抗脂质过氧化作用、抗脂氧酶等作用[2]。水飞蓟素中以水飞蓟宾为主,还含有异水飞蓟宾和水飞蓟宁[3]。

季平等研究在不同类型盐碱胁迫下,耐盐碱大豆品种的各器官生物量、荚数、粒数、产量和生长性状均显著高于盐碱敏感品种[4]。随着全球工业化的发展,环境污染的加剧,二氧化碳排放量的增加,逐渐形成温室效应,造成全球气温升高,海平面不断上升,由此引起土壤盐渍化现象日趋严重[5]。当前全世界有 9.55 亿 hm^2 盐碱地,我国约有 2 600 万 hm^2 盐碱地,其中约 660 万 hm^2 盐碱耕地。因此,开发利用盐碱地,提高盐碱地的利用率,具有十分重要的意义。本试验主要研究不同浓度混合盐溶液对水飞蓟种子发芽率、发芽势、相对盐害率、水飞蓟素和水飞蓟宾含量的影响,选出适宜浓度的混合盐溶液,以期为探究水飞蓟栽培新技术提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用水飞蓟种子购自安徽亳州明雨中药材销售有限公司,种于吉林农业科技学院中药学院九站药用植物园。

1.2 萌发期耐盐性比较

选取大小相同、饱满的水飞蓟种子,用 1% NaClO 溶液浸泡 15 min 后,无菌水反复冲洗,用 0.1、0.2、0.3 mol/L 混合盐($NaCl$、Na_2CO_3、$NaHCO_3$、Na_2SO_4 等物质量混合)溶液分别浸泡种子 4 h,再将种子均匀地置于铺有 2 层滤纸、直径为 10 cm 的培养皿中,各加入 8 mL 相应的混合盐处理溶液,温度设定为 25 ℃,放在光照培养箱中进行培养,每个处理 50 粒种子,重复 3 次,为了保证混合盐溶液的浓度,每隔 2 d 换 1 次处理液及滤纸。每天记录发芽种子数,以胚根突破种皮记为种子萌发,计算发芽率、发芽势和相对盐害率[6]。计算公式如下:

发芽率 =(9 d 累积发芽的种子数/供检测的种子总数)×100%;

发芽势 =(4 d 累积发芽的种子数/供检测的种子总数)×100%;

相对盐害率 =(对照发芽率 - 处理发芽率)/对照发芽率 ×100%。

当处理发芽率大于对照发芽率时相对盐害率记为 0,视为无盐害。

1.3 混合盐胁迫水飞蓟植株

选择大田中长势相近、生长旺盛、无病虫害的水飞蓟植株进行混合盐胁迫处理。试验采用单因素随机区组设计,设置对照组(CK)和处理组。混合盐处理组设 0.1、0.2、0.3 mol/L 等 3 个浓度水平,每个处理 3 次重复,每个处理浇灌量为 300 mL,对照组浇灌等量自来水。每 10 d 浇灌 1 次,连续浇灌 3 次。

1.4 测定项目及方法

1.4.1 水飞蓟素含量的测定　称取 2 mg 水飞蓟宾标准品,用 80% 乙醇溶液溶解并定容到 10 mL 容量瓶中,配成水飞蓟宾对照品母液,分别吸取水飞蓟宾对照品母液 0、0.5、1.0、2.0、3.0 mL,将母液稀释成不同浓度,用 80% 乙醇溶液定容至 10 mL,于紫外分光光度计上测定 288 nm 处的吸光度($D_{288\ nm}$),根据测定的结果,以水飞蓟宾对照品母液的浓度为 x 轴,$D_{288\ nm}$ 为 y 轴,得到线性相关方程为 $y = 0.790\ 7x + 0.000\ 1$,$r^2 = 0.999\ 5$,并绘制标准曲线。

收稿日期:2016 - 07 - 06
基金项目:吉林农业科技学院青年基金(编号:吉农院合字[2014]第 227 号)。
作者简介:刘广娜(1982—),女,吉林吉林人,硕士,讲师,主要从事生物技术在中草药中的应用研究。E - mail:95471607@qq.com。

取 2 g 水飞蓟种子粉于提取烧瓶中，置于超声波水箱中，每次用 12 mL 乙酸乙酯溶液在 50 ℃下浸提 4 h，共计 2 次，将浸提液合并，经旋转蒸发回收乙酸乙酯，经过真空干燥得到黄色粉末状提取物，称取 2 mg 水飞蓟提取物，然后加入 80% 乙醇溶液，用超声波辅助溶解，过滤，定容至 10 mL，即为提取物母液，于紫外分光光度计上测定 288 nm 处的吸光度（$D_{288\ nm}$），最后再根据标准曲线计算出提取物中水飞蓟宾的含量[7]。

1.4.2　水飞蓟宾含量的测定　色谱条件的选择：色谱柱为 Shimadzu C_{18}（150 mm×4.6 mm），流动相为甲醇－水－冰醋酸（体积比为 48∶52∶1），流速 1.0 mL/min，进样量 1 mL，检测波长为 288 nm。

标准品溶液的制备：分别精密称取水飞蓟宾 A、B 标准品各 1 mg，各加入 1 mL 的色谱纯甲醇溶解，用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，滤液即为高效液相法（HPLC）测定用的标准品溶液。

水飞蓟宾标准曲线：分别取 HPLC 测定用水飞蓟宾 A、B 标准品溶液各 1、2、3、4、5 μL，按设定好的色谱条件进样分析。以峰面积为纵坐标，标准品溶液浓度为横坐标，分别得到水飞蓟宾 A、B 的标准曲线如图 1、图 2 所示。

供试品溶液的制备：精密称取 1 g 干燥种子粉，用 50 mL 的石油醚在 70 ℃回流 3 h。等待提取完成后，将溶液过滤，残渣用滤纸包裹再用温风吹干。精密加入 150 mL 乙酸乙酯溶液，78 ℃水浴回流 3 h，过滤，然后用 20 mL 乙酸乙酯溶液分成 2 次洗涤烧瓶和滤纸。将滤液和洗涤液合并在一起浓缩至干，再用甲醇溶解并定容至 10 mL 容量瓶中，即为高效液相测定用的供试溶液。

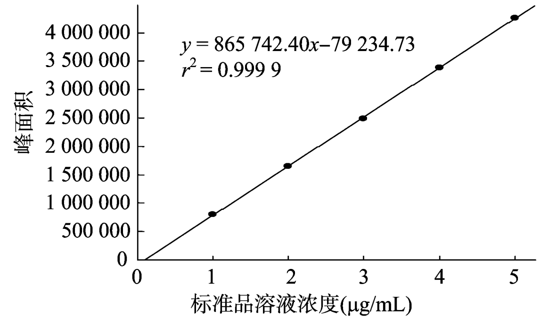

图1　水飞蓟宾 A 的标准曲线

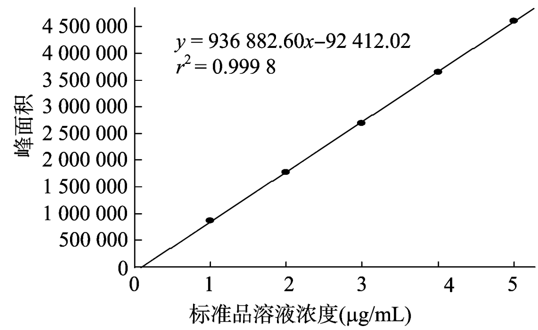

图2　水飞蓟宾 B 的标准曲线

2　结果与分析

2.1　不同浓度混合盐胁迫对水飞蓟种子萌发期耐盐性的影响

2.1.1　不同浓度混合盐胁迫对种子发芽率的影响　由图 3 可知，在 0.1 mol/L 混合盐溶液处理下，水飞蓟种子发芽率高于对照组，对种子发芽有促进作用。但随着混合盐溶液浓度的增大，发芽率逐渐降低，且低于对照组。

2.1.2　不同浓度混合盐胁迫对种子发芽势的影响　由图 4 可知，在 0.1 mol/L 混合盐溶液处理下，水飞蓟种子的发芽势高于对照组，但随着混合盐溶液浓度的增大，发芽势先降低后上升，但均低于对照组。

2.1.3　不同浓度混合盐胁迫对种子相对盐害率的影响　由图 5 可知，0.1 mol/L 混合盐溶液对水飞蓟种子没有盐害，且相对盐害率随着混合盐溶液浓度的增大而升高。

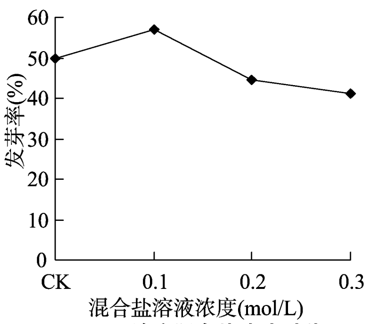

图3　不同浓度混合盐胁迫对种子发芽率的影响

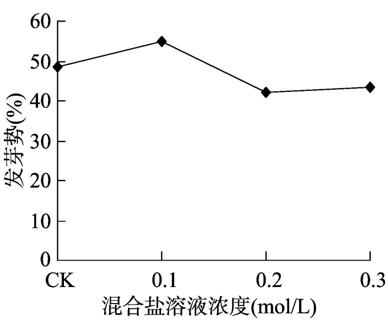

图4　不同浓度混合盐胁迫对种子发芽势的影响

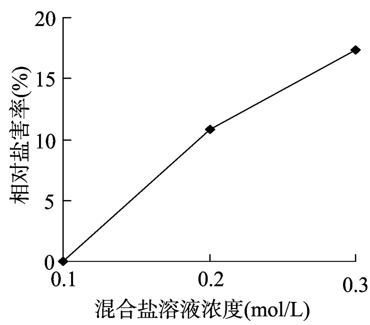

图5　不同浓度混合盐胁迫对种子相对盐害率的影响

2.2　不同浓度混合盐胁迫对水飞蓟素含量的影响

由图 6 可知，水飞蓟素的含量随着混合盐溶液浓度的升高呈现先上升后下降的趋势，当混合盐溶液浓度为 0.2 mol/L 时水飞蓟素的含量最高，比对照组高 19%。

2.3　不同浓度混合盐胁迫对水飞蓟中水飞蓟宾含量的影响

2.3.1　对照组植株中水飞蓟宾含量的测定结果　由图 7 可知，对照组植株提取物中含有水飞蓟宾 A 和水飞蓟宾 B，通过水飞蓟宾 A 和水飞蓟宾 B 的标准曲线可以计算出水飞蓟宾 A 含量为 2.518 04 μg/mL，水飞蓟宾 B 含量为 3.586 13 μg/mL。

2.3.2　0.1 mol/L 混合盐溶液胁迫下植株中水飞蓟宾含量的测定结果　由图 8 可知，0.1 mol/L 混合盐溶液处理组含有水飞蓟宾 A 和水飞蓟宾 B，通过水飞蓟宾 A 和水飞蓟宾 B 的标准曲线可以计算出水飞蓟宾 A 含量为 12.929 61 μg/mL，水飞蓟宾 B 含量为 19.239 21 μg/mL，且水飞蓟宾 A、B 的含量均远高于对照组中的含量，说明 0.1 mol/L 混合盐处理对水飞蓟宾合成具有较好的促进作用。

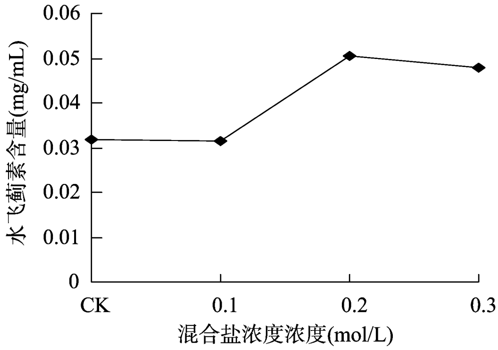

图6　不同浓度混合盐胁迫对水飞蓟素含量的影响

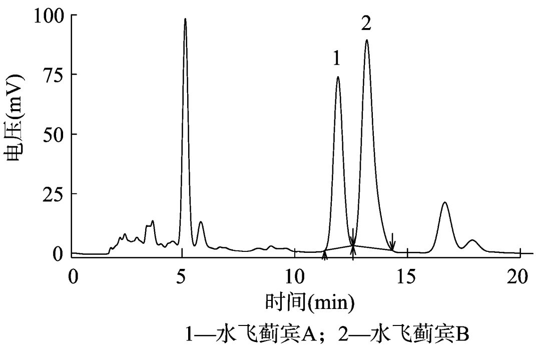

图7　对照组植株中水飞蓟宾含量的色谱测定结果

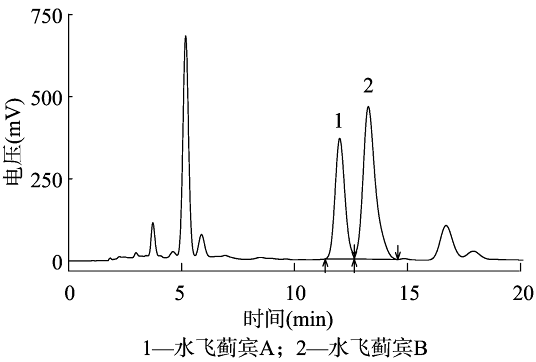

图8　0.1 mol/L 混合盐溶液处理组植株中水飞蓟宾含量的色谱测定结果

2.3.3　0.2 mol/L 混合盐溶液胁迫下植株中水飞蓟宾含量测定结果　由图 9 可知，0.2 mol/L 混合盐溶液处理组中含有水飞蓟宾 A 和水飞蓟宾 B，通过水飞蓟宾 A 和水飞蓟宾 B 的标准曲线可以计算出水飞蓟宾 A 含量为 17.245 62 μg/mL，水飞蓟宾 B 含量为 25.627 50 μg/mL，且水飞蓟宾 A、B 的含量均高于对照组和 0.1 mol/L 混合盐溶液处理组中的含量，说明 0.2 mol/L 混合盐处理对水飞蓟宾合成具有极好的促进作用。

由图 10 可知，0.3 mol/L 混合盐溶液处理组含有水飞蓟宾 A 和水飞蓟宾 B，通过水飞蓟宾 A 和水飞蓟宾 B 的标准曲线可以计算出水飞蓟宾 A 含量为 5.013 48 μg/mL，水飞蓟宾 B 含量为 7.472 92 μg/mL，且水飞蓟宾 A、B 的含量均高于对照组中的含量，但低于 0.1、0.2 mol/L 混合盐溶液处理组中的含量，说明 0.3 mol/L 混合盐溶液处理对水飞蓟宾合成具有促进作用，但随着混合盐浓度的升高，水飞蓟宾的含量呈现出先增加后降低的趋势。

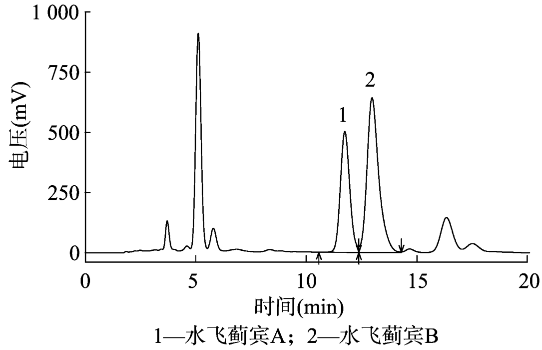

图9　0.2 mol/L 混合盐处理组植株中水飞蓟宾含量的色谱测定结果

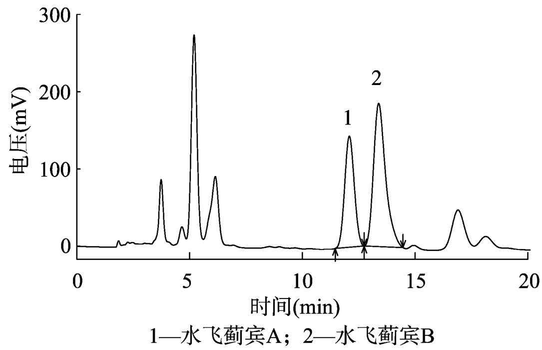

图10　0.3 mol/L 混合盐处理组植株中水飞蓟宾含量的色谱测定结果

3　讨论

在本试验所采用的 3 种浓度混合盐溶液的胁迫下，0.1 mol/L 混合盐溶液处理下的发芽率、发芽势均明显高于对照组，且对种子萌发的相对盐害率为 0；水飞蓟素和水飞蓟宾的含量均随着混合盐溶液处理浓度的升高呈现出先增高后降低的趋势，以 0.2 mol/L 混合盐溶液的促进效果最好。

通过本试验的研究，可以初步确定适量浓度的盐碱地可以有助于水飞蓟素及水飞蓟宾含量的增加。期望本研究的结果可为研究盐碱胁迫对水飞蓟中有效成分含量的影响提供参考。

参考文献：

[1]张春晓，陈　华，刘友彬，等. 从水飞蓟粕及水飞蓟壳中提取水飞蓟素及水飞蓟宾的比较研究[J]. 中成药，2013，35(10)：2137－2141.

[2]孙铁民，李　铣. 水飞蓟素药理研究进展[J]. 中草药，2000，31(3)：229－231，附2.

[3]任冰如，赵友谊，徐柏衡，等. 水飞蓟素提取和水飞蓟宾纯化的研究[J]. 时珍国医国药，2012，23(3)：655－656.

[4]季　平，张　鹏，徐克章，等. 不同类型盐碱胁迫对大豆植株生长性状和产量的影响[J]. 大豆科学，2013，32(4)：477－481.

[5]李玉明. 混合盐碱胁迫对高粱的影响[D]. 长春：东北师范大学，2002.

[6]张晓倩，王康才，张彦南，等. 水飞蓟萌发期和苗期对盐胁迫的生长生理响应[J]. 西北植物学报，2013，33(10)：2050－2056.

[7]史劲松，孙达峰，顾龚平，等. 水飞蓟素提取工艺的改进和探讨[J]. 中国野生植物资源，2006，25(6)：52－54.