

芸苔属几种蔬菜种子的劣变及其荧光泄漏物质

II. 荧光泄漏物质的鉴定和种子活力 与泄漏液芥子碱含量的相关性

黄学林 李燕红 傅家瑞

(中山大学生物学系, 广州 510275)

摘要 用纸层析结合显色反应初步鉴定了芥蓝, 白菜, 菜心劣变种子中的荧光泄漏物质, 发现它们均含有 R_f 值、显色反应与芥子碱相同的化合物. 根据芥子碱在 $\text{pH} > 10$ 时转变为黄色, 最大吸收波长为 388nm 的特征, 利用光密度测定法检验该类种子活力, 并计算两者之间的相关系数, 其 r 分别为 -0.92 , -0.81 和 -0.81 . 实验表明, 用光密度(388nm)测定法检测这些种子活力是可行的, 并且比荧光观测法灵敏, 快速, 准确.

关键词 芸苔属种子, 芥子碱, 活力测定

分类号 Q945.65

一些十字花科种子吸水时可泄漏荧光物质, 而且该物质泄漏与种子劣变程度相关^[1~5], 其中主要的荧光物质证明为芥子碱^[6~7], 该化合物在紫外光下显荧光, 在 $\text{pH} > 10$ 时变为黄色, 水解产物为芥子酸和胆碱^[8]. 我们以前的研究也证明南风芥菜种子的荧光泄漏物主要为芥子碱^[9]. 本文报导芥蓝、白菜、菜心劣变种子荧光泄漏物的纸层析鉴定和评价光密度法(388nm)测定泄漏液的芥子碱作为检验这些种子活力的方法.

1 材料和方法

1.1 材料及其处理 种子萌发、人工劣变处理按前述方法^[3,4]. 种子由广州市蔬菜研究所提供.

1.2 种子荧光泄漏物的纸层析鉴定 烘干用于种子萌发的滤纸, 将有荧光的斑点剪下, 用 95% 乙醇洗脱, 洗脱液浓缩至 1~2ml, 用于点样展层; 同时也将芥子碱(美国康乃尔大学 Dr. Taylor A G 惠赠)、芥子酸(购于美国 Aldrich Chemical Co.) 标准样品点样对照. 层析纸用新华滤纸 3 号, 展开剂分别为 BAW(正丁醇: 乙酸: 水 = 4: 1: 5), 6% 乙酸和重蒸馏水, 展开距离约 23cm. 展层后将滤纸风干, 于紫外光(253.7nm)下检查, 画出荧光斑点, 计算 R_f 值, 并进行显色试验, 包括氨气熏和喷 Drogendroff 试剂等^[9].

收稿日期: 1993-03-23

1.3 种子浸出液光密度测定 种子浸出液按芥子碱在碱性条件最大吸收波长及其测定条件^[3]进行光密度测定.取不同活力种子 1g 加入 10ml 重蒸馏水,浸泡 8h,过滤,取滤液 1ml,加入 3.5ml 重蒸馏水稀释,然后加入 0.5ml 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(pH10),摇匀,用 721 型分光光度计在波长 388nm 下测定光密度.

2 结果与讨论

2.1 荧光物质的鉴定结果 鉴定采用纸层析 Rf 值和显色反应.在部分层析谱上发现 2 个荧光斑,在 BAW 展开剂中其 Rf 值分别为 0.86 和 0.57(表 1).层析谱分析结果表明,各种活力的不同种子浸泡液,在 3 个展开剂系统层析 R_f 值与芥子碱标准品具有十分相似的 Rf 值和相同的显色反应(表 1);另外在层析滤纸上还有与芥子酸标准品 Rf 值相近的斑点 and 显色反应.芥子酸的斑点荧光极弱,显色反应不明显,其来源可能有两个,一是种子本身含有的,这已被许多研究所证实^[1,6~8];另外可能是实验操作过程中的次生产物,即由芥子碱水解产生的.但种子泄漏的荧光物质主要可能是芥子碱,另外也可能含有其它酸性物质,如芥子酸等.

表 1 芸苔属 3 种蔬菜劣变种子浸出液荧光物质的纸层析鉴定

Tab. 1 Identification of the fluorescent leakage in aging seeds of 3 species of Brassica by paper Chromatography

种 类	处 理	Rf 值			显色反应		
		BAW	6%乙酸	双蒸水	UV	+NH ₃	Dragendorff
佛山芥蓝	HK*	0.57	0.71	0.14	亮蓝	黄	橙红
	老化 5d	0.55	0.70	0.12	亮蓝	黄	橙红
		0.86	-	-	蓝色	无色	无色
春心奶 白菜	HK*	0.57	0.72	0.10	亮蓝	黄	橙红
	老化 5d	0.57	0.70	0.10	亮蓝	黄	橙红
60d 菜心	HK*	0.57	0.71	0.10	亮蓝	黄	橙红
	老化 5d	0.55	0.70	0.11	亮蓝	黄	橙红
		0.86	-	-	蓝色	无色	无色
芥子碱 标准品	-	0.56	0.75	0.13	亮蓝	黄	橙红
芥子酸 标准品	-	0.86	0.39	0.62	蓝色	无色	无色

* 热压(121℃)杀死的种子

2.2 芥子碱含量测定及其与种子活力的相关性 不同活力的种子浸出液都显示出芥子碱的特征反应,如紫外光下(253.7nm)发生蓝色荧光,而在碱性条件下在 388nm 有最大吸收峰,因此,可用光密度法测定各种活力种子浸出液中的芥子碱含量,考察光密度变化与种子活力相关系数,来评价其用于种子检验的有效性.结果如表 2 所示:光密度随着老化天数的增加而增加,热压杀死的种子 O.D 最大.不同种子的 O.D 增加幅度是不一样的,这

正反映了种子的差异性.从表 2 可知它们的相关系数 $|r|$ 接近 1,呈负相关,即 O. D 越大,说明种子活力越差.它们之间的相关性较好.研究表明,当芥子碱浓度低于 4mg/L 时,在紫外光下肉眼观察不出的荧光,用测定芥子碱含量的光密度法,则可提高其灵敏度约 20 倍^[3].已被证明,用光密度法检测卷心菜种子活力,远比电导法和荧光法检测灵敏准确^[10].因此,通过测定种子浸出液中的芥子碱的 O. D(388)值来测定种子活力是可行的.

表 2 芸苔属 3 种不同活力种子浸出液 388nm 下光密度变化

Tab. 2 Relationship between O. D. (388nm) of the seed leakage and the seed vigor in 3 species of Brassica

种 类	老化处理 t/d	萌发率/%	活力*	O. D 388nm	相关系数 r
佛山芥蓝	0	77.8	2.93	0.303	-0.92
	2	53.0	1.35	0.414	
	3	45.2	1.23	0.617	
	4	34.5	0.83	0.625	
	5	13.7	0.25	0.717	
	HK**	0	0	1.57	
春心奶白菜	0	78.0	3.96	0.146	-0.81
	2	61.9	2.62	0.302	
	4	39.3	1.22	0.419	
	5	17.3	0.34	0.492	
	8	5.4	0.01	0.722	
	HK	0	0	1.09	
迟菜心 29 号	0	73.6	3.22	0.133	-0.81
	2	70.8	2.64	0.157	
	5	58.9	2.17	0.323	
	9	38.1	0.90	0.361	
	12	12.5	0.24	0.564	
	HK	0	0	0.907	

* 活力=萌发率×胚根平均长度(cm); ** HK,热压(121℃处理 15min)杀死的种子

参 考 文 献

- 1 Taylor A G, Huang X L, Hill H J. Sinapine leakage from Non-viable Cabbage Seeds, Jour Exp Bot, 1988, 39:1433~1438
- 2 郑光华,阎庆山.用荧光法快速测定种子生活力的试验,植物生理学通讯,1964,3:21~25
- 3 Huang X L et al, The Degree of seed Deterioration in *Brassica juncea* (L.) Coss var. *foliosa* and Its Fluorescent Leakage, Chinese J Bot, 1991, 3(2):139~144
- 4 Taylor A G et al. Determining Seed viability. United state patten, 1990, 4: 957, 364
- 5 Austin F L Wolff, Sinapine and related ester in seed meal of *crambe abyssinica*, J Agri food chem, 1968, 16:132~135
- 6 Schults O E, Gmelin R. Papierchromatographie der senfolglucosid - drogen. Zeitschrift für Natur-

forschung, Tb, 1952. 500~508

- 7 Blair R, Reichert R D. Carbohydrate and phenolic constituents in a comprehensive range of rapeseed and canola fractions; nutritional significance for animals, J Su Food Agri, 1984, 35; 29~35
- 8 Tzagolff A. Metabolism of sinapine in mustard plants. I. Degradation of sinapine into sinapic acid and choline. Plant Physiology, 1963, 38, 202~206
- 9 Raffauf R F. A simple field test for alkaloid containing plants. Economic Botany, 1962, 16; 171~172
- 10 Hill H J, Talor A G, Huang X L. Seed Viability Determinations in Cabbage Utilizing Sinapine Leakage and Electrical Conductivity Measurements. Jour Exp Bot, 1988, 39; 1439~1447

Seed Deterioration in Several Brassica Vegetative Species and Their Fluorescent Leakage

I. Identification of the fluorescent leakage by paper chromatography and the seed vigor test by sinapine leakage determination

Huang Xuelin* Li Yanhong Fu Jiarui

Abstract The fluorescent leakage from *Brassica alboglabra* Bailey, *B. chinensis* Linn. and *B. parachinensis* bailey was identified by paper chromatography. The leakage was found to contain a compound, the R_f value and color reaction of which were similar to that of sinapine. The concentration of the sinapine determined by using the specific absorbance of the compound at 388nm in basic solution ($\text{pH} > 10$) was closely associated with the seed vigor. Their relative coefficient were respectively -0.92, -0.81 and -0.81. Thus, the seed vigor test in these species utilizing sinapine determination is practical, sensitive and better than method of observation of the fluorescent leakage under UV light.

Keywords Brassica seed, fluorescent leakage, seed vigor test

* Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275