

文章编号:1000-8551(2016)01-0028-07

甘草种子水浸液对其种子萌发 及 *GusQS1* 和 *GubAS* 基因表达的影响

张豆豆 梁新华 王 俊

(宁夏大学生命科学院,宁夏 银川 750021)

摘要:为探讨甘草种子是否存在化感自毒作用,以甘草种子为试验材料,采用常规萌发试验和实时荧光定量 PCR 方法,研究 $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的甘草种子水浸液对其种子萌发率、*GusQS1* 基因和 *GubAS* 基因表达的影响。结果表明:甘草种子具有较强的化感自毒作用。 $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘草种子水浸液处理下甘草种子的萌发率为 62%,极显著低于对照处理(76%);该处理极显著抑制了 *GubAS* 基因的表达,但对 *GusQS1* 基因的表达却具有显著促进作用。该研究结果可为人工调控栽培甘草质量提供一定参考。

关键词:甘草种子;水浸液;萌发;基因表达;实时荧光 PCR;化感;自毒作用

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2016.01.0028

甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)是中国传统大宗药材之一。甘草含甘草酸、甘草黄酮、甘草多糖及生物碱类物质^[1-3],其中甘草酸的含量是评价甘草药材及成药质量的最主要依据^[4]。甘草酸的合成途径为甲羟戊酸途径^[5],位于合成途径中的 2 种酶——鲨烯合成酶(squalene synthase, SQS1)与 β -香树脂醇合成酶(β -amyrin, β -AS)是甘草酸合成代谢的 2 种关键酶^[6],它们一定程度上决定着甘草酸在植物体内含量的高低。目前,这 2 种关键酶基因的表达与相关影响因子的研究已成为甘草酸生物合成研究领域的热点。

植物化感作用一直是相关领域科研工作者研究的热点,近年来以根及根状茎入药的药用植物化感作用的研究越来越多^[7-12]。化感作用既包括不同物种间的化感作用,也包括植物作用于同物种或者其自身的化感作用。随着人工甘草种植年限的延长,虽然其有效药用成分含量提高,但病虫害发生严重,推测可能与甘草也存在化感自毒作用有关^[13]。因此,本研究以一定浓度甘草种子水浸液处理甘草种子,研究其对自身种子萌发及萌发期种子中 2 种甘草酸生物合成关键酶基因 *GusQS1* 和 *GubAS* 表达的影响,旨在为深入研究甘草是否存在自毒作用及甘草人工栽培种植提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 供试材料

乌拉尔甘草种子,购自宁夏盐池县科学技术局。

1.2 甘草种子水浸液的制备

挑选颗粒饱满、大小均匀的甘草种子,准确称取 5.000g,蒸馏水冲洗除尘,75% 的乙醇浸泡消毒 3~5min,去离子水洗至无乙醇气味,加入 500mL 去离子水,封口膜封口后置于 4℃ 冰箱,静置 48h 后取出,滤液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,得试验用浓度的甘草种子水浸液($10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),4℃ 冰箱保存备用。

1.3 甘草种子发芽试验

挑选 400 粒颗粒饱满、大小基本均匀一致的甘草种子,蒸馏水冲洗除尘,加入适量 75% 乙醇浸泡消毒 3~5min,去离子水洗至无乙醇气味,浓硫酸烧种破除甘草种皮对其种子萌发的抑制作用,具体方法如下:用量筒小心量取 30mL 浓硫酸(98%),加入盛有 400 粒甘草种子的烧杯中,玻璃棒搅拌,使所有甘草种子能够均匀接触浓硫酸,待甘草种子表面出现数量较多且分布较为均一的黑色小点,将其倾倒入盛有大量蒸馏水的干净容器中,冲洗 4~5 次后,加入去离子水,室温浸泡

收稿日期:2015-05-08 接受日期:2015-08-02

基金项目:国家自然科学基金项目(81260637)

作者简介:张豆豆,女,主要从事代谢植物学研究。E-mail:329399146@qq.com

通讯作者:梁新华,女,教授,主要从事植物生理学教学及药用植物生理与分子生物学科学研究工作。E-mail:lxh@nxu.edu.cn

8h 至甘草种子充分吸胀。

甘草种子萌发试验:将上述 400 粒充分吸胀的甘草种子按每皿 50 粒,随机分至 8 个经高温高压灭菌的铺有双层滤纸的培养皿中,其中 4 皿为蒸馏水处理(CK),4 皿为甘草种子水浸液($10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)处理(处理组),将所有培养皿置于 25°C 的恒温培养箱(HH. D11 型,上海市跃进医疗器械一厂)中培养。每天定时给各培养皿添加相应蒸馏水和甘草种子水浸液各 2mL。逐天统计各皿的萌发数量,并随机取样,保存于 -80°C 冰箱中,用于实时荧光定量 PCR 的 RNA 的提取。萌发 7d 后计算各处理的萌发率和萌发速度。

1.4 化感效应指数的计算

生物测定结果参照 Williamson 等^[14]的方法计算化感作用效应指数 RI :

$$RI = \begin{cases} 1 - C/T, T \geq C \\ T/C - 1, T < C \end{cases}$$

式中, C 为对照值, T 为处理值。 RI 为化感作用效应指数, $RI > 0$ 表示促进作用, $RI < 0$ 表示抑制作用,绝对值的大小与作用强度一致。萌发率的 RI 值根据所统计的种子萌发数求得;而萌发速度的 RI 值根据 Leather 等^[15]的发芽速度指数(I)求得,种子萌发速度用发芽速度指数(I)来表示: $I = 2 \times (10 \times X1 + 9 \times X2 + \dots + 3 \times X8 + 2 \times X9 + X10)$ 。 X 表示每隔 24 h 的发芽数, $X1 = 24$ h 时记录的发芽数, $X2 = 48$ h 记录的发芽数,其余依次类推。

1.5 综合化感效应评价

为综合比较供体材料间的化感作用强度,参照马瑞君等^[16]的方法,用综合化感效应指数(M)表示,即对萌发率和萌发速度的 RI 值采取相加平均法进行再处理, $M > 0$ 为促进, $M < 0$ 为抑制,绝对值的大小与作用强度一致。

1.6 甘草种子 RNA 的提取、反转录以及实时荧光定量 PCR

1.6.1 RNA 的提取——试剂盒法 所用试剂盒为大连宝生物公司出品的 MiniBEST Nucleic Acid Isolation Kits,货号 9769。具体步骤参照说明书进行。

1.6.2 反转录 在无 RNase 的已冷却处理过的 0.5mL 无菌离心管中依次加入模板 RNA 2.0 μL , Oligo d(T) 3.0 μL , ddH₂O 3.0 μL ,轻轻混匀该体系, 70°C ,保温 10min;迅速转入冰浴,3min。再依次向离心管中加入下列试剂:5 \times RT Buffer 4.0 μL , dNTP 1.0 μL ,反转录酶 0.8 μL , Rasin (RRI) 0.5 μL , ddH₂O 13.7 μL ,至终体积 20.0 μL 。轻轻混匀该体系, 42°C ,保温 60min;然

后再放置于 70°C ,保温 15min,将离心管置于冰浴上终止反应, -20°C 保存备用。

1.6.3 引物的设计与合成 于 NCBI 查找 *GuSQS1* 基因(GenBank 登录号为: AM182329)、*GubAS* 基因(GenBank 登录号为: AB037203.1)及 *Guactin* 基因(GenBank 登录号为: EU190972),BioXM2.6 及 Primer Premier 5.0 软件设计特异引物。其中 *Actin* 基因引物序列为:*GuactinF*: 5' - CCTCTCTCTTTATGCCAGTG - 3',*GuactinR*: 5' - GCTTCTCCTTTATGTCACCG - 3'。扩增片段长度: 229bp。角鲨烯合成酶基因引物序列为:*GuSQS1F*: 5' - GGTCACTAATGCTTTGTTGC - 3',*GuSQS1R*: 5' - TAACTACACCTCCGAAGACT - 3'。扩增片段长度: 157bp; β -香树脂醇合成酶引物序列为:*GubASF*: 5' - ACAGAGAGAGGATGGTGGAT - 3',*GubASR*: 5' - GCCAATCACCTCTTCCAAT - 3'。扩增片段长度: 209bp。以上各引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.6.4 实时荧光定量 PCR

反应体系为:

SYBR Premix: 10.0 μL , 5' Primer: 0.8 μL , 3' Primer: 0.8 μL , 模板 cDNA: 1.0 μL , ddH₂O: 7.4 μL , 总计: 20.0 μL

制备好的检测样本同时上机,反应程序如下:

GuSQS1 基因: 94°C 预变性 3min; 94°C 变性 30s, 54°C 退火 30s, 72°C 延伸 30s, 共 32 个循环;最后 72°C 延伸 5min。

GubAS 基因: 94°C 预变性 3min; 94°C 变性 30s, 55°C 退火 30s, 72°C 延伸 30s, 共 32 个循环;最后 72°C 延伸 5min。

GuActin 基因: 94°C 预变性 3min; 94°C 变性 30s, 54°C 退火 30s, 72°C 延伸 30s, 共 26 个循环;最后 72°C 延伸 5min。

实时荧光定量 PCR 扩增曲线图和熔解曲线图

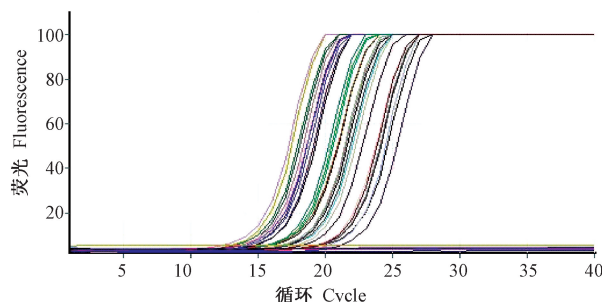
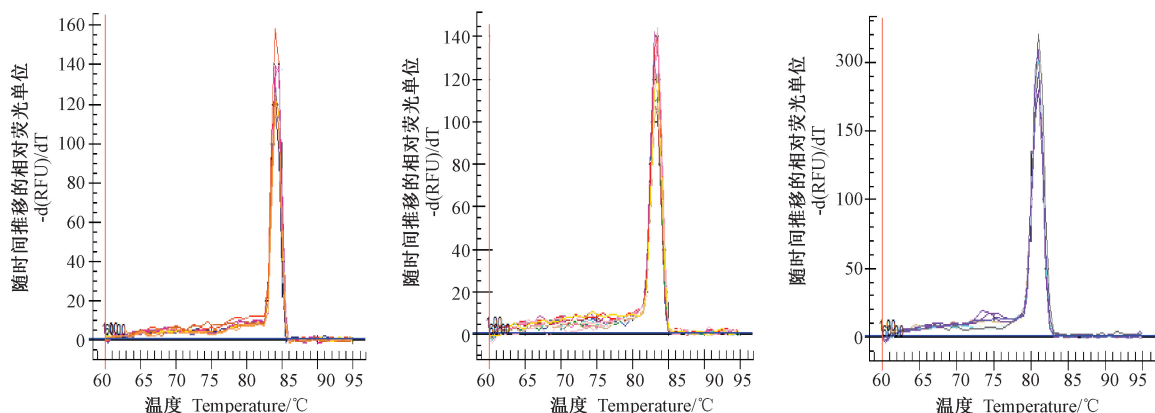


图 1 实时荧光定量 PCR 扩增曲线图

Fig. 1 The amplification curve by realtime fluroscent PCR



注:从左到右依次为 *Guactin*, *GubAS*, *GuSQS1*。

Note: From left to right: *Guactin*, *GubAS*, *GuSQS1*。

图2 熔解曲线图

Fig. 2 Melting curve by realtime fluroscent PCR

1.7 数据分析与处理

所有试验数据利用 Excel 和 DPS 8.01 软件对其进行处理分析。

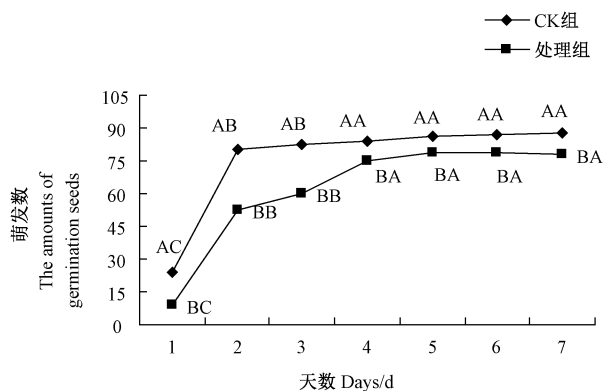
2 结果与分析

2.1 甘草种子水浸液对甘草种子萌发的影响

由图3可知,蒸馏水对照组与水浸液处理组的甘草种子萌发数在处理间差异达到极显著水平($P < 0.01$), $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘草种子水浸液处理的甘草种子萌发数极显著低于CK组,说明甘草种子自身水浸液对其种子的萌发存在一定程度的抑制作用。

不同萌发天数间的统计结果表明,萌发第4天、第5天、第6天及第7天时无论是CK组还是处理组,甘草种子萌发数都极显著高于相应培养处理条件下萌发第2天和第3天的,而2个不同条件下萌发第2天和第3天的甘草种子萌发数又极显著高于萌发第1天的。说明,随着萌发天数的延长,甘草种子萌发数会快速增多,尤以第2天为一个转折期,第2天后,无论是处理组还是CK组,甘草种子的萌发数都有极显著的上升,至第4天后,维持在一平稳水平。虽然处理组甘草种子的萌发数一直略低于CK组,但至萌发第4天时,其萌发数量也上升至较高水平,说明 $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 水浸液对甘草种子萌发的抑制作用主要体现在萌发初期,随萌发天数延长,其抑制作用减弱。

进一步对甘草种子水浸液化感效应指数进行分析,发现甘草种子水浸液能够抑制其自身种子的萌发



注:图中各天的萌发数以同一处理3次重复的算术平均数表示;不同大写字母表示在0.01水平差异极显著。下同。

Note: The data is the arithmetical average of the three replicates in the same treatment, different capital letters indicate significant difference at 0.01 level between different treatments and different days of germination. The same as following.

图3 甘草种子水浸液对甘草种子萌发的影响

Fig. 3 Effect of aqueous extracts from *Glycyrrhizia uralensis* Fisch. seeds on its seeds germination

($RI < 0$),具体表现在对种子萌发速率(RI_{GI})的抑制作用强于对种子萌发数量(RI_{GR})的抑制。由综合化感效应指数(M)可知,甘草种子水浸液能够抑制甘草种子的萌发($M < 0$)(表2)。

2.2 甘草种子水浸液对 *GuSQS1* 基因表达的影响

由图4可知,处理组甘草种子中 *GuSQS1* 基因的相对表达量在处理初期明显高于相应时段CK组,尤其在处理第1天和第3天出现2个相对表达量高峰分

表 2 甘草种子水浸液对甘草种子萌发的影响

Table 2 Effect of aqueous extracts from *Glycyrrhizia uralensis* Fisch. seeds on its germination

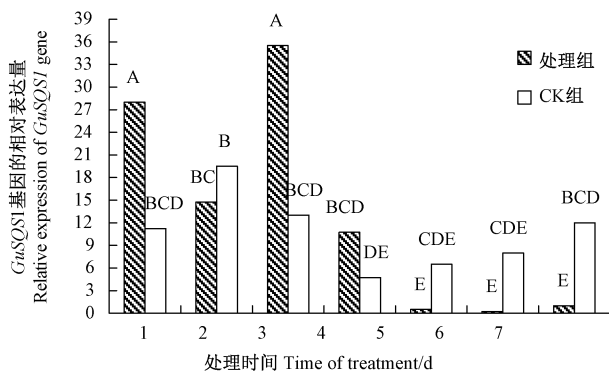
指标 Index	CK 组 Control group	处理组 Treatment group
GR/%	76 ± 22a	62 ± 24b
RI_{GR}	-	-0.052
RI_{GI}	-	-0.22
M	-	-0.14

注: M 以萌发率和萌发速度指数的 RI 值的相加平均数表示。小写英文字母表示不同处理间的差异显著性。对对照组和对照组数据相比用“-”表示,无实际意义。

Note: M is the average sum of germination rate and germination speed index RI . Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level between different treatments. ‘-’: The control group and the control group were compared with their own data, no meaning.

别为 27.92 和 35.42, 是相应时间 CK 组的 150.85% 和 170.59%), 第 4 天时 *GuSQS1* 基因的相对表达量 (10.75) 也高于 CK 组 (4.64), 是 CK 的 131.68%, 但从萌发第 5 天起处理组甘草种子 *GuSQS1* 基因的相对表达量持续处于极低水平, 低于 CK 组。

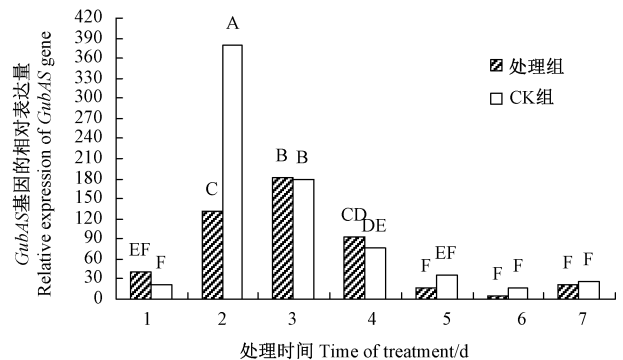
统计分析结果表明, 与 CK 相比, 处理组能够显著提高甘草种子自身 *GuSQS1* 基因的表达; 就处理天数而言, *GuSQS1* 基因在甘草种子萌发过程中的表达高峰期处于萌发第 1~3 天; 就互作效应而言, 处理组第 3 天的甘草种子 *GuSQS1* 基因的相对表达量极显著高于其他, 初步说明 $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甘草种子水浸液这一浓度适宜的处理时间为 3d, 此浓度持续作用 3d 时, 可以大幅提高甘草种子中与甘草酸合成相关的 *GuSQS1* 基因的表达。

图 4 甘草种子水浸液对 *GuSQS1* 基因表达的影响Fig. 4 Effect of aqueous extracts from *Glycyrrhizia uralensis* Fisch. seeds on relative expression of *GuSQS1* gene

2.3 甘草种子水浸液对 *GubAS* 基因表达的影响

由图 5 可知, 处理组甘草种子中 *GubAS* 基因的表达与相同处理条件下 *GuSQS1* 基因的表达情况不同。

首先, 在整个种子萌发期中, 无论是处理组还是 CK 组, *GubAS* 基因的相对表达量均表现为萌发第 2 天升高, 第 4 天下降, 之后一直维持在低水平表达。其次, 只有第 4 天时, 处理组的甘草种子中 *GubAS* 基因的相对表达量 (92.41) 高于同时段 CK 组 (76.46), 增加了 20.86% (图 5)。

图 5 甘草种子水浸液对于 *GubAS* 基因表达的影响Fig. 5 Effect of aqueous extracts from *Glycyrrhizia uralensis* Fisch. seeds on relative expression of *GubAS* gene

统计分析结果表明, 处理组 *GubAS* 基因的相对表达量极显著低于 CK, 说明这一浓度甘草种子水浸液能够抑制其自身种子中与甘草酸生物合成的 *GubAS* 基因的表达; 就处理天数而言, 处理第 3 天时的 *GubAS* 基因的相对表达量极显著高于第 2 天、第 4 天及第 1 天、第 5 天、第 6 天和第 7 天, 说明 *GubAS* 基因在甘草种子萌发过程中的表达高峰期可能处于萌发第 2~4 天, 特别是萌发第 2 天; 就处理与处理时间的互作效应而言, CK 组萌发第 2 的 *GubAS* 基因的相对表达量极显著高于其他各组合, 初步说明浓度为 $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘草种子自身水浸液对甘草酸生物合成途径中相对于 *GuSQS1* 基因处于其下游的 *GubAS* 基因的表达呈现出明显的抑制作用。

3 讨论

化感自毒作用在植物界广泛存在, 如常见农作物花生^[17-18]、大豆^[19]、棉花^[20-22]、大蒜^[23]、马铃薯^[24]、

辣椒^[25]等,根茎类药用植物如人参^[26-27]、丹参^[28]、地黄^[29]、当归^[30-31]、贝母^[32]和三七^[33]等均具有明显的化感自毒作用,生产实践中将这种作用及其后果统称为连作障碍。目前,化感效应评价以测定种子萌发及生长、生物量积累及根部形态和生理生化指标等为主,其中测定种子萌发情况的报道较多^[34-35]。本研究结果也表明,10g·L⁻¹甘草种子水浸液对其自身的萌发具有较强的抑制作用。

甘草种子水浸液能极显著抑制甘草种子的萌发,属典型的化感自毒现象。化感物质对植物的作用具有浓度效应。已有研究证实三七鲜根水浸液对小麦幼苗及一些品种玉米生长有明显的抑制作用,随水浸液浓度增加,抑制作用增强^[33]。另有研究报道,玉米秸秆腐解液对盆栽玉米的土壤相关酶活性有一定促进作用,但随处理天数延长,促进作用逐渐减弱,该腐解液对玉米幼苗根系活力的影响随腐解液浓度升高呈现先升后降的变化趋势,而且随玉米苗龄的不断增大其促进作用逐渐减弱^[36]。这些研究结果为开展不同浓度甘草种子、甘草植株各部分的水浸液对其自身植株或其他后茬粮食作物如小麦、玉米化感作用的研究提供了新的研究思路。

甘草中最主要的药用成分为甘草酸。笔者在甘草种子化感自毒作用的萌发实验的基础上,初步研究了10g·L⁻¹甘草种子水浸液对甘草酸生物合成途径中2种关键酶基因(*GuSQS1* 基因和 *GubAS* 基因)表达的影响,证实了这一浓度甘草种子水浸液能极显著抑制甘草种子萌发过程中 *GubAS* 基因的表达,显著促进 *GuSQS1* 基因的表达。在甘草酸生物合成代谢途径中,角鲨烯(squalene)处在β-香树脂醇(β-Amyrin)的上游^[5],10g·L⁻¹的甘草种子水浸液显著促进 *GuSQS1* 基因表达量的增加,说明在此处理条件下,能促进角鲨烯大量合成,进而保证下游各种以角鲨烯为底物的次生代谢产物的合成,但 *GubAS* 基因在10g·L⁻¹的甘草种子水浸液的处理下相对表达量减少则意味着在此浓度处理条件下β-香树脂醇类物质减少,最终将会影响甘草酸的生物合成。一定浓度的Zn、Mn、Mo对甘草幼苗根中 *GuSQS1* 基因和 *GubAS* 基因的表达具有显著的促进作用^[37],10⁻⁴ mol·L⁻¹ MeJA 和 ABA 外源处理可以迅速显著地提高甘草幼苗根中 *GuSQS1* 基因和 *GubAS* 基因的表达^[38]。但本试验中10g·L⁻¹的甘草种子水浸液处理却表现出了与上述研究结果不同的一面,研究对象同为乌拉尔甘草,但不同物质对甘草酸生物合成关键酶的调控作用表现不同,说明它

们的作用机制不同,因此在提高人工栽培甘草质量的研究中,借助现代分子生物学技术手段,有选择地、有针对性的对甘草酸生物合成途径中的关键酶基因尤其是处在下游的一些关键酶基因进行人为定向调控,应是提高栽培甘草中甘草酸含量的更直接、更科学有效的手段之一。

4 结论

本研究发现,浓度为10g·L⁻¹的甘草种子水浸液对其自身种子的萌发具有较强的抑制作用,能极显著抑制 *GubAS* 基因的表达,但却显著促进了 *GuSQS1* 基因的表达。说明甘草种子存在一定程度的化感自毒作用。但10g·L⁻¹浓度甘草种子水浸液对2种甘草酸生物合成关键酶基因表达的影响不尽相同,推测可能与这一浓度水浸液及水浸液中化感物质的种类和含量有一定关系,其作用机制还需进一步深入研究探索。

参考文献:

- [1] 冯薇,王文全,赵平然. 栽培年限和采收期对甘草总皂苷、总黄酮含量的影响[J]. 中药材,2008,31(2):184-186
- [2] 李晓冰,何小鹏,刘彪,徐荔,鞠大宏,姜森,吕爱平. 甘草多糖对H22荷瘤小鼠的免疫调节作用[J]. 中西医结合学报,2010,8(4):363-367
- [3] 张继,姚健,杨永利,王一峰,古丽萍,王永军. 甘草生物碱成分的分析及含量测定[J]. 西北植物学报,2001,21(6):1259-1262
- [4] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 二部. 北京:化学工业出版社,2010:80-81
- [5] 罗永明,刘爱华,李琴. 植物萜类化合物的生物合成途径及其关键酶的研究进展[J]. 江西中医学院学报,2003,15(1):45-51
- [6] 梁新华. 微量元素对甘草中甘草酸形成与积累影响的研究[D]. 北京:北京林业大学,2010:3-5
- [7] 李振方,杨燕秋,谢东风,朱兰芳,张自冠,黄木极,刘宗泉,张重义,林文雄. 连作条件下地黄药用品质及土壤微生态特性分析[J]. 中国生态农业学报,2012,20(2):217-224
- [8] 郭利川,刘常宏,左广胜,薛雅蓉,双惊雷. 地黄连作障碍机制分析[J]. 中国农学通报,2012,28(31):227-231
- [9] 王英,凯撒·苏来曼,李进,朱国强,宋铁珊,刘力. 不同苗龄伊贝母根系分泌物GC-MS分析[J]. 西北植物学报,2009,29(2):384-389
- [10] 张子龙,侯俊玲,王文全,张志信,张仕秀. 三七水浸液对不同玉米品种的化感作用[J]. 中国中药杂志,2014,39(4):600-605
- [11] 王庆玲,董涛,张子龙. 三七对小麦的化感作用[J]. 生态学杂志,2015,34(2):431-438
- [12] 张子龙,王文全,张志信,张仕秀. 三七对不同玉米品种的化感作用[C]//中国第六届植物化感作用学术研讨会论文摘要集.

- 成都:中国植物保护学会植物化感作用专业委员会,2013:54
- [13] 蒋齐,王英华,李明,杨彩霞. 甘草研究[M]. 银川:宁夏人民出版社,2009:65-93
- [14] Williamson G B, Richardson D. Bioassays for allelopathy: Measuring treatment responses with independent controls [J]. *Journal of Chemical Ecology*,1988,14(1):181-187
- [15] Leather G R, Einhel F A. Bioassays in the study of allelopathy [M]//Putnam A R, Tang C S. *The Science of Allelopathy*. New York: John Wiley and Sons, 1986: 133-145
- [16] 马瑞君,王明理,赵坤,郭守军,赵庆芳,孙坤. 高寒草场优势杂草黄帚橐吾水浸液对牧草的化感作用[J]. *应用生态学报*,2006,17(5):845-850
- [17] 李培栋,王兴祥,李奕林,王宏伟,梁飞燕,戴传超. 连作花生土壤中酚酸类物质的检测及其对花生的化感作用[J]. *生态学报*,2010,30(8):2128-2135
- [18] 刘苹,赵海军,万书波,任海霞,李瑾,杨力,于淑芳. 连作对花生根系分泌物化感作用的影响[J]. *中国生态农业学报*,2011,19(3):639-645
- [19] 谷岩,邱强,王振民,陈喜凤,吴春胜. 连作大豆根际微生物群落结构及土壤酶活性[J]. *中国农业科学*,2012,45(19):3955-3965
- [20] 刘小龙,马建江,管吉钊,罗静静,罗明,麦迪尼也提·买买提. 连作对棉田土壤枯、黄萎病菌数量及细菌群落的影响[J]. *棉花学报*,2015,27(1):62-70
- [21] 李锐,刘瑜,褚贵新,高慧. 棉花连作对北疆土壤酶活性、致病菌及拮抗菌多样性的影响[J]. *中国生态农业学报*,2015,23(4):432-440
- [22] 王翌,刘连涛,孙红春,张永江,李存东. 连作对棉株干物质积累、分配及功能叶片生理特征的影响[J]. *河北农业大学学报*,2013,36(5):6-11
- [23] 周艳丽,王艳,李金英,薛艳杰. 大蒜根系分泌物的化感作用[J]. *应用生态学报*,2011,22(5):1368-1373
- [24] 谭雪莲,郭晓冬,马明生,刘高远,张平良,吕军峰,郭天文. 连作对马铃薯土壤微生物区系和产量的影响[J]. *核农学报*,2012,26(9):1322-1325
- [25] 马彦霞,郁继华,张国斌,李雯琳,曹刚. 谷胱甘肽对自毒作用下辣椒叶片光合特性的影响[J]. *核农学报*,2012,26(2):396-402
- [26] 雷峰杰. 人参根系分泌物化感作用的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2011:10-12
- [27] 赵东岳. 人参自毒物质降解菌的筛选及其降解特性研究[D]. 北京:北京协和医学院,2013:8-10
- [28] 张辰露,孙群,叶青. 连作对丹参生长的障碍效应[J]. *西北植物学报* 2005,25(5):1029-1034
- [29] 李静军,李静云,王军,贾国伦. 地黄块根水浸液对地黄种子萌发及幼苗生长的影响[J]. *河南师范大学学报:自然科学版*,2014,42(1):101-105
- [30] 朱慧,马瑞君,吴双桃,林金哲,廖宜英. 当归根际土对其种子萌发和幼苗生长的影响[J]. *生态学杂志*,2009,28(5):833-838
- [31] 王田涛,王琦,王惠珍,张恩和. 当归自毒作用及其对不同作物的化感效应[J]. *草业学报*,2012,20(6):1132-1138
- [32] 廖海兵,李云霞,邵晶晶,方芳,郭卫东,陈文荣. 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
- [33] 拱健婷,张子龙,王雄飞,刘凤波,赵志刚. 三七自毒与化感作用初步研究[J]. *广西植物*,2014,34(3):362-369
- [34] 丁国昌,曹光球,林思祖. 2种杉木化感物质对杉木种子萌发的化感效应[J]. *福建农林大学学报*,2007,36(2):134-137.
- [35] 黄小芳,李勇,丁万隆. 人参根系分泌物对种子萌发的自毒效应[J]. *种子*,2009,28(10):4-7
- [36] 乔天长,赵先龙,张丽芳,焦健,魏混,顾万荣,李晶. 玉米秸秆腐解液对苗期根际土壤酶活性及根系活力的影响[J]. *核农学报*,2015,29(2):383-390
- [37] 梁新华,栾维江,梁军,张凤侠. 硼等4种元素对甘草酸生物合成关键酶基因表达的 RT-PCR 分析[J]. *时珍国医国药*,2011,22(10):2351-2353
- [38] 张凤侠. 外源因子对甘草酸生物合成关键酶基因表达的调控[D]. 银川:宁夏大学,2011:30-31

Effect of Aqueous Extracts From *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. Seeds on Its Seed Germination and Genes Relative Expression of *GuSQS1* and *GubAS*

ZHANG Doudou LIANG Xinhua WANG Jun

(College of Biological Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: To characterize the autointoxication potential of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., the influences of Aqueous extract from seeds of *G. uralensis* at a concentration of $10\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ on germination and relative expression of *GuSQS1* and *GubAS* were studied. The results indicated that the germination rate of *G. uralensis* seeds in the aqueous extract was 62%, which is significantly lower than the germination rate of 76% in the pure water treatment. The aqueous extract treatment also significantly inhibited the *GubAS* gene expression. In contrast, the aqueous extract promoted the relative expression of the *GuSQS1* gene. Therefore, it was concluded that the seed aqueous extract of *G. uralensis* can inhibit its seed germination and have significant but distinct effects on the expression of two key genes involved in the bio-synthesis pathway of glycyrrhizic acid. The findings of high autointoxication of *G. uralensis* seeds should be valuable for agronomic production of the species.

Keywords: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., aqueous extracts, germination, gene expression, real-time PCR, allelopathy, auto toxicity