

外源 H₂O₂ 预处理对垂盆草抗寒性及药材产量和品质的影响

赖秋洁, 崔运启, 朱再标*, 晏梦恬, 成琳, 韩佳沛

南京农业大学 中药材研究所, 江苏 南京 210095

摘要: 目的 探索外源过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 预处理对垂盆草 *Sedum sarmentosum* 抗逆性及药材产量和品质的影响, 为逆境信号物质诱导药材高产优质的栽培模式提供依据。方法 垂盆草叶面喷施不同浓度 (0、1、10、100 mmol/L) H₂O₂ 后经历自然低温, 收获时测定生长指标、生物量、多种黄酮类成分含量及多种体外抗氧化能力。结果 在低温条件下, 喷施 H₂O₂ 均显著提高垂盆草最大分枝长、叶片层数、分枝数、生物量、多种黄酮类成分含量以及体外抗氧化能力。随外源 H₂O₂ 浓度提高, 垂盆草叶片层数、分枝数、新生芽数、生物量及过氧化物酶 (peroxidase, POD) 酶活性呈下降趋势, 而超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 酶活性及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量呈上升趋势。1、10 mmol/L H₂O₂ 处理的生物量分别比对照提高 209.38% 和 87.50%。总黄酮、总酚酸含量以及槲皮素、山柰酚、异鼠李素含量均以 10 mmol/L H₂O₂ 处理最高, 比对照提高 16.67%~37.84%, 1 mmol/L H₂O₂ 处理次之。1 mmol/L H₂O₂ 处理垂盆草 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 和 2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid), ABTS] 自由基清除能力最强, 而羟基自由基清除能力和抗脂质过氧化能力以 10 mmol/L H₂O₂ 处理最强。结论 在低温条件下 H₂O₂ 预处理有利于提高垂盆草抗寒性及药材产量和品质; 综合比较生物量及活性成分含量, 1 或 10 mmol/L H₂O₂ 预处理利于提高垂盆草抗寒性, 高产优质兼得。

关键词: 垂盆草; 诱导抗性; 抗氧化; 低温胁迫; 逆境; 过氧化物酶; 超氧化物歧化酶; 过氧化氢酶; 丙二醛

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)21-6874-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.21.026

Exogenous H₂O₂ pretreatment improve cold resistance, yield and quality of *Sedum sarmentosum*

LAI Qiu-jie, CUI Yun-qi, ZHU Zai-biao, YAN Meng-tian, CHENG Lin, HAN Jia-pe

Institute of Chinese Medicinal Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Objective To explore the effects of exogenous hydrogen peroxide (H₂O₂) pretreatment on the adversity resistance and the yield and quality of *Sedum sarmentosum*, and to provide a basis for the high-yield and high-quality cultivation model of *S. sarmentosum* induced by stress signal substances. **Methods** After foliage-spraying with different concentrations of H₂O₂ (0, 1, 10, 100 mmol/L) on *S. sarmentosum*, it experienced natural low temperature, and the growth index, biomass, content of various flavonoids and various *in vitro* antioxidant capacity were measured at harvest. **Results** Under low temperature conditions, spraying H₂O₂ significantly increased the maximum branch length, leaf layers, number of branches, biomass, content of various flavonoids, and *in vitro* antioxidant capacity. With the increase of the concentration of exogenous H₂O₂, the number of leaf layers, branches, number of new buds, biomass and peroxidase (POD) enzyme activity showed a downward trend, while enzyme activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) as well as malondialdehyde (MDA) content showed an upward trend. The biomass of 1 mmol/L H₂O₂ and 10 mmol/L H₂O₂ treatments increased by 209.38% and 87.50%, respectively compared with control. The content of total flavonoids, total phenolic acids, quercetin, kaempferol, and isorhamnetin were the highest when treated with 10 mmol/L H₂O₂, which was 16.67%~37.84% higher than the control, followed by treatment with 1 mmol/L H₂O₂. The *S. sarmentosum* treated with 1 mmol/L H₂O₂ showed have the strongest free radical scavenging ability with 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) methods, while the hydroxyl radical scavenging ability and anti-lipid peroxidation ability are the strongest when treated with 10 mmol/L H₂O₂. **Conclusion** H₂O₂ pretreatment under low temperature conditions is beneficial to increase the cold resistance, yield and quality of *S. sarmentosum*; And 1 or 10 mmol/L H₂O₂ pretreatment is suitable treatments after comprehensive evaluation.

Key words: *Sedum sarmentosum* Bunge; induced resistance; anti-oxidation; cold stress; stress; POD; SOD; CAT; MDA

收稿日期: 2022-02-03

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (KYZZ201912)

作者简介: 赖秋洁 (1996—), 女, 重庆北碚人, 硕士研究生, 主要研究方向为中药材规范化生产。

*通信作者: 朱再标, 教授, 研究方向为中药材。Tel: (025)84395980 E-mail: zhuzaibiao@njau.edu.cn

过氧化氢 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 是植物在正常有氧代谢过程中产生的一种相对稳定的活性氧。它一方面是引起细胞氧化损伤破坏的毒性分子, 另一方面是一种重要的信号分子, 参与植物防御系统对逆境的响应调控, 缓解逆境对植物的胁迫^[1-2]。它在增强植物应激耐受性方面发挥重要作用, 如外施 H_2O_2 能提高裸燕麦对于干旱胁迫的耐性^[3], 增强柑橘叶片对低温的抗性^[4]。另一方面, H_2O_2 也可调节植物的次生代谢, 如提高黄芩植株苷元类成分含量, 提高其药材质量^[5]。药用植物中许多活性成分的生态功能之一即是应对逆境导致的氧化胁迫, 因此, 将外源 H_2O_2 应用于药用植物生产, 在诱导提高药用植物抗逆性的同时提高其药用品质, 减少生产损失, 同时实现高产优质, 对于药材生产具有较高的应用价值。但目前外源 H_2O_2 应用于药用植物抗逆性的研究鲜见报道。

垂盆草 *Sedum sarmentosum* Bunge 为景天科景天属多年生草本植物。具有利湿退黄、清热解毒功效, 用于湿热黄疸、小便不利、痈肿疮疡^[6], 可用于治疗肝炎、咽喉肿痛、疖痈、湿热黄疸等。垂盆草含有黄酮、三萜、氰苷类等成分, 在观赏、环保、医药和食用方面均具潜在价值^[7]。目前, 对垂盆草的研究多集中在化学成分、药理作用和应用开发等方面^[8-12], 栽培方面^[13-14]也有一些研究, 鲜见外源信号物质如 H_2O_2 对垂盆草药材品质及抗氧化活性影响的报道。

冷害是一类对植物具有重大影响的非生物胁迫因子, 它不仅影响植物的生长、导致植物产量降低, 严重时甚至会造成植物死亡。低温胁迫下许多植物 (包括垂盆草) 叶片变黄、萎蔫, 生长受到抑制, 最终制约药材产量和品质。槲皮素、山柰素、异鼠李素 3 种黄酮类物质是《中国药典》2020 年版垂盆草药材指标性成分, 均具有较强的抗氧化作用, 其含量在干旱条件下显著提高^[14]。因此, 基于 H_2O_2 的生物学功能及槲皮素等 3 种黄酮类物质的抗氧化作用, 本研究提出假设: 通过外源 H_2O_2 预处理, 可提高垂盆草的抗寒性并提高其槲皮素、山柰素、异鼠李素等黄酮类成分的含量。本研究通过盆栽试验, 比较不同浓度外源 H_2O_2 预处理对低温条件下垂盆草生长发育和药材品质的影响, 以期通过外源 H_2O_2 喷施减轻低温对垂盆草生长和产量的不利影响, 并提高其药材质量, 为建立逆境信号物质诱导药材高产优质栽培模式提供依据。

1 材料

试验材料栽培于南京农业大学中药材研究所试验大棚, 经郭巧生教授鉴定为景天科景天属植物垂盆草 *S. sarmentosum* Bunge。

2 方法

2.1 样品的处理

2020 年 6 月, 选取健康、长势均一的垂盆草茎段 (4 个茎节), 去侧芽和顶芽, 种植于试验大棚塑料花盆 (直径 15.0 cm, 高 12.1 cm, 底径 10.6 cm) 中, 每盆 5 株。试验用土为营养土-园土 1:3 (体积比), 前期统一养护的光照强度控制在 60% 左右, 适宜水分控制在田间持水量的 75% 左右。于 10 月 18 日开始处理, 4 个处理 [对照 (CK)、T1、T10、T100] 分别喷施 0、1、10、100 mmol/L H_2O_2 , 然后经历自然低温。每个处理 7 盆。实验期间 10、11、12 月平均气温分别为 17、12.5、4.5 °C, 日最高温和最低温变化见图 1。每隔 7 d 喷施 1 次相应浓度的 H_2O_2 , 对照处理为喷施相同体积的纯净水。各处理喷施量相同, 以叶片滴水为度。随机排列, 试验过程中每周随机变换位置。于 2021 年 1 月 3 日收获并测定各项指标。

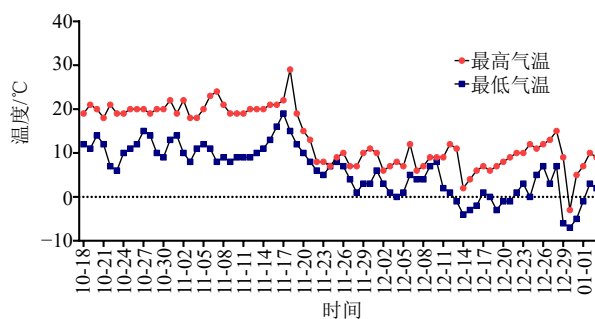


图 1 实验期间日最高温和最低温变化

Fig. 1 Change of daily minimum and maximum air temperature during experiment

2.2 生长指标测定

收获时每处理组中选取具有代表性的 18 株垂盆草进行标记, 记录分枝数、新生芽数、叶片层数, 直尺和游标卡尺测其最大分枝长、叶长、叶宽。

2.3 生物量测定

收获时每处理随机挑选 18 株, 测定鲜质量。将植株样品于 105 °C 杀青后, 将植株样品于 60 °C 烘干至恒定质量, 称取干质量, 之后粉碎过 3 号筛备用。

根冠比=地下干质量/地上干质量

折干率=干质量/鲜质量

2.4 抗氧化酶活性和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量测定

分别从各处理组中随机选取长势相似代表性植株, 选取植株中成熟饱满叶片测定其生理指标。参考高俊山等^[15]的方法, 取 0.5 g 垂盆草相同部位的成熟叶片至预冷研钵, 加入 8 mL 预冷的 0.05 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.8), 冰浴研磨后离心 (4 °C, 8500 r/min, 10 min), 上清液即为酶提液。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性采用氮蓝四唑法, 过氧化物酶 (peroxidase, POD) 活性采用愈创木酚法, 过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性采用紫外分光光度法^[16], MDA 采用硫代巴比妥酸法。每个处理测定 3 次。

2.5 化学成分指标测定

总黄酮含量测定时取垂盆草粉末适量, 按料液比 1:25 加入 50%乙醇, 60 °C 超声提取 40 min, 过滤, 加 50%乙醇定容至 10 mL, 以芦丁为对照品, 510 nm 波长处吸光度, 采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法^[17]测定。总酚含量测定时取垂盆草粉末适量加蒸馏水回流提取 2 h, 滤液经旋转蒸发仪浓缩, 用蒸馏水定容至 10 mL, 以没食子酸为对照品, 采用 Folin-Ciocalteu 法^[18]测定。槲皮素、山柰素、异鼠李素含量参照《中国药典》2020 年版^[6]HPLC 法测定。

2.6 体外抗氧化能力测定

将垂盆草粉末加蒸馏水回流提取 2 h, 滤液经旋转蒸发仪浓缩, 用蒸馏水定容至 10 mL, 置 4 °C 冰箱保存, 测定抗氧化活性时稀释至 500 μg/mL。采用 DPPH、ABTS 等方法, 进行垂盆草抗氧化能力评价^[19], 以维生素 C (Vc) 为对照。

2.6.1 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 (DPPH·) 清除率的测定 精密称取 DPPH 试剂 0.024 0 g, 无水乙醇溶解定容至 100 mL, 得 DPPH 溶液, 避光保存。试管 1 (A_1) 中加去离子水、DPPH 溶液各 4 mL; 试管 2 (A_2) 中加垂盆草提取液 (500 μg/mL)、DPPH 溶液各 4 mL; 试管 3 (A_3) 中加垂盆草提取液 (500 μg/mL) 与去离子水各 2 mL。静置 30 min 后于 517 nm 处测定试管 1、2、3 的吸光度值, 分别为 A_1 、 A_2 、 A_3 值。计算垂盆草清除 DPPH· 的清除率 (SA)。

$$SA = [A_1 - (A_2 - A_3)] / A_1$$

2.6.2 2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS⁺) 自由基清除率 (I) 的测定 首先配制 7 mmol/L 的 ABTS 溶液, 140 mmol/L 的过硫酸钾溶液, 按 10:1 混合成 ABTS 混合液, 静置过夜。用无水乙醇将混合液稀释至在 734 nm 处的 A 值为 (0.700±0.05), 备用。在试管中加入 1 mL 提取液 (空白溶液、样品溶液、样品溶液本底溶液), 再加入 4 mL 的 ABTS 工作液, 混合, 静置 6 min, 在 405 nm 处测定 A 值, 实验平行测 3 次。计算 I 值。

$$I = A_0 - (A_x - A_y) / A_0$$

A_0 为空白对照的 A 值; A_x 为加入样品溶液后的 A 值; A_y 为不加 H_2O_2 的样品溶液本底的 A 值

2.6.3 羟基自由基的清除率的测定 取 2 mmol/L 的硫酸亚铁溶液 1 mL, 6 mmol/L H_2O_2 1 mL, 6 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 1 mL, 加入垂盆草提取液 (500 μg/mL) 1 mL, 放置 30 min, 在 510 nm 处测定 A 值, 计算羟基自由基 $OH·$ ($\cdot OH$) 的清除率。实验平行测 3 次。根据公式计算 I 值。

2.6.4 硫氰酸铁 (FTC) 法检测抗脂质过氧化能力 参照 Kim 等^[18]方法, 取不同处理的垂盆草黄酮溶液各 4 mL, 分别放入加塞试管中, 加入 4.1 mL 2.5%亚油酸 (乙醇配制)、8 mL 磷酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH7.0) 和 3.9 mL 去离子水, 密封, 并放置 40 °C 恒温箱中保存。24 h 后, 取 40 °C 恒温箱中的培养液各 0.1 mL, 分别加入 9.7 mL 75%乙醇溶液、0.1 mL 30%硫氰酸铵溶液, 然后再加入 0.1 mL 0.02 mol/L 氯化亚铁溶液 (3.5% HCl 配制), 准确反应 3 min, 于 500 nm 下测定 A 值。

2.7 数据分析

数据采用 Excel 2019 和 SPSS21.0 进行统计与分析, 不同处理相同指标进行 LSD 法进行多重比较。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

3 结果与分析

3.1 低温条件下外源 H_2O_2 喷施对垂盆草生长指标的影响

外源 H_2O_2 喷施处理对垂盆草的叶宽、叶长影响不显著 (表 1)。在低温条件下, 喷施 H_2O_2 的垂盆草最大分枝长、叶片层数、分枝数均显著高于 CK。随外源喷施 H_2O_2 浓度升高, 垂盆草最大分枝长、叶片层数、分枝数、新生芽数呈下降趋势。其中 T1 处理生长优势明显, 最大分枝长、叶片层数、分枝数、新生芽数最高, 分别比 T100 处理增加 35.53%、27.83%、25.36%和 27.89%, T10 处理

表 1 外源 H₂O₂ 喷施处理对垂盆草植株形态的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

Table 1 Effects of foliage-applied exogenous H₂O₂ on growth indexes of *S. sarmentosum* ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

处理	最大分枝长/cm	叶长/cm	叶宽/cm	叶片层数	新生芽数/个	分枝数/个
CK	9.33 ± 1.51 ^c	0.92 ± 0.10 ^a	0.52 ± 0.12 ^a	7.50 ± 0.84 ^c	9.83 ± 1.47 ^b	4.33 ± 1.21 ^c
T1	14.00 ± 2.61 ^a	1.12 ± 0.15 ^a	0.62 ± 0.08 ^a	13.00 ± 1.79 ^a	15.67 ± 2.73 ^a	9.17 ± 0.75 ^a
T10	12.17 ± 1.72 ^{ab}	1.05 ± 0.14 ^a	0.60 ± 0.06 ^a	10.67 ± 1.51 ^b	13.17 ± 2.14 ^{ab}	7.33 ± 1.37 ^b
T100	10.33 ± 1.03 ^{bc}	0.92 ± 0.17 ^a	0.55 ± 0.08 ^a	10.17 ± 0.75 ^b	12.50 ± 2.74 ^{ab}	7.17 ± 0.98 ^b

同列不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$; CK 代表对照, T1、T10、T100 分别代表不同浓度 (1、10、100 mmol/L) H₂O₂, 下同

Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$). CK means control, and T1, T10 and T100 mean H₂O₂ of different concentrations (1, 10 and 100 mmol/L), same as below

居中。在低温条件下, 喷施 H₂O₂ 有利于提高垂盆草抗寒性, 减轻低温对垂盆草生长的抑制作用, 其中 T1、T10 处理优势更明显。

3.2 低温条件下外源 H₂O₂ 喷施对垂盆草生物量的影响

在低温条件下, 喷施 H₂O₂ 的垂盆草单株鲜质量、干质量显著高于 CK, 折干率没有显著差异 (表 2)。随着 H₂O₂ 浓度升高, 垂盆草单株鲜质量、干质量呈下降趋势, 根冠比呈上升趋势。单株干质量以 T1 处理最高, T10 处理次之, 分别比 CK 提高 209.38% 和 87.50%。T1 的根冠比显著低于其他处理。在低温条件下喷施 H₂O₂, 尤其较低浓度 H₂O₂, 有利于垂盆草生物量积累。

3.3 低温条件下外源 H₂O₂ 喷施对垂盆草抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响

低温条件下各外源 H₂O₂ 喷施处理均显著提高 SOD 和 CAT 活性, 降低 MDA 含量。T1 处理的 POD 活性显著高于 CK, 而 T10 和 T100 处理显著

低于 CK (表 3)。3 个 H₂O₂ 浓度处理中, T1 处理的 SOD 和 CAT 活性最低, 而 T100 处理最高。T100 的 SOD 和 CAT 活性分别比 T1 提高了 14.77% 和 15.90%。而 POD 活性的变化趋势与之相反。

各外源 H₂O₂ 喷施处理均显著降低 MDA 含量。随着 H₂O₂ 浓度升高, MDA 含量呈升高趋势, 且各处理间差异达到显著水平, 其中 T1 处理的 MDA 含量仅为 CK 的 51.03%, 分别是 T10 和 T100 处理的 68.48% 和 63.95%。

3.4 低温条件下外源 H₂O₂ 喷施对垂盆草品质的影响

低温条件下外源 H₂O₂ 喷施处理对垂盆草总黄酮、总酚含量影响显著, 均显著高于对照处理 (CK)。总黄酮、总酚酸含量随 H₂O₂ 量提高呈先升后降趋势, 最高值均出现在 T10 处理 (分别为 1.49、6.01 mg/g), 比 CK 分别提高 20.16%、37.84%。T1 和 T10 处理的总黄酮含量差异不显著 (图 2)。

低温条件下喷施 H₂O₂ 有利于垂盆草槲皮素、山柰酚和异鼠李素积累, 随外源 H₂O₂ 量提高, 槲皮素、山

表 2 外源 H₂O₂ 喷施处理对垂盆草生物量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

Table 2 Effects of foliage-applied exogenous H₂O₂ on biomass of *S. sarmentosum* ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

处理	单株鲜质量/g	单株干质量/g	根冠比	折干率/%
CK	2.39 ± 0.99 ^c	0.32 ± 0.16 ^b	0.51 ± 0.28 ^{ab}	12.94 ± 1.68 ^a
T1	6.25 ± 1.99 ^a	0.99 ± 0.46 ^a	0.16 ± 0.04 ^c	15.85 ± 3.53 ^a
T10	4.83 ± 1.58 ^{ab}	0.60 ± 0.21 ^b	0.23 ± 0.09 ^{bc}	12.37 ± 2.35 ^a
T100	3.83 ± 1.01 ^{bc}	0.54 ± 0.15 ^b	0.68 ± 0.31 ^a	14.03 ± 1.85 ^a

表 3 外源 H₂O₂ 处理对垂盆草抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

Table 3 Effects of exogenous H₂O₂ on antioxidant system of *S. sarmentosum* and MDA content ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

处理	SOD/(U·g ⁻¹ ·min ⁻¹)	POD/(U·g ⁻¹ ·min ⁻¹)	CAT/(mg·g ⁻¹ ·min ⁻¹)	MDA/(μmol·g ⁻¹)
CK	411.56 ± 14.36 ^d	220.15 ± 4.60 ^b	107.29 ± 6.36 ^b	38.41 ± 2.01 ^a
T1	486.16 ± 9.97 ^c	352.23 ± 17.21 ^a	214.21 ± 22.34 ^a	19.60 ± 1.10 ^c
T10	528.22 ± 2.82 ^b	174.06 ± 2.73 ^c	235.29 ± 1.82 ^a	28.62 ± 2.38 ^b
T100	557.97 ± 3.51 ^a	139.20 ± 7.86 ^d	248.28 ± 31.17 ^a	30.65 ± 3.26 ^b

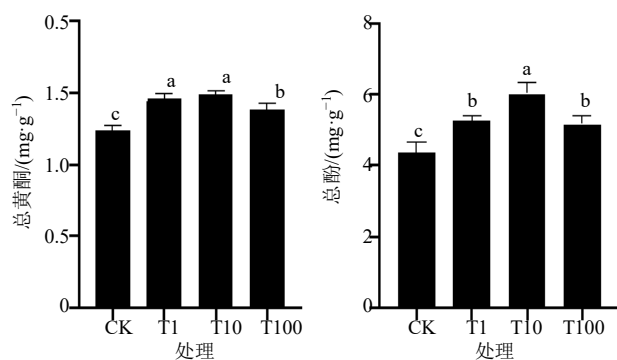


图 2 外源 H_2O_2 处理对垂盆草水提物总黄酮和总酚含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effects of foliage-applied exogenous H_2O_2 on total flavonoids and total phenolic concentration of *S. sarmentosum* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 4 外源 H_2O_2 处理对垂盆草黄酮类成分含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effects of foliage-applied exogenous H_2O_2 on the content of flavonoids of *S. sarmentosum* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

处理	槲皮素/%	山柰酚/%	异鼠李素/%	总含量/%
CK	0.063 ± 0.000^c	0.012 ± 0.001^c	0.020 ± 0.002^c	0.094 ± 0.002^d
T1	0.068 ± 0.000^b	0.014 ± 0.000^b	0.024 ± 0.000^b	0.106 ± 0.002^b
T10	0.085 ± 0.000^a	0.014 ± 0.000^b	0.027 ± 0.000^a	0.126 ± 0.000^a
T100	0.060 ± 0.000^d	0.018 ± 0.000^a	0.023 ± 0.000^b	0.101 ± 0.001^c

表 5 外源 H_2O_2 处理对垂盆草水提物体外抗氧化活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effects of foliage-applied exogenous H_2O_2 on antioxidant activities of *S. sarmentosum* aqueous extracts methods ($\bar{x} \pm s, n=3$)

处理	DPPH·清除率/%	ABTS ⁺ 清除率/%	FTC 法吸光度	·OH 清除率/%
CK	33.05 ± 1.19^e	57.66 ± 0.69^e	0.26 ± 0.01^{bc}	66.74 ± 0.56^e
T1	41.60 ± 1.01^c	62.31 ± 0.68^e	0.24 ± 0.01^d	76.45 ± 0.83^b
T10	46.06 ± 0.71^b	63.73 ± 0.67^b	0.25 ± 0.00^{cd}	70.38 ± 0.32^c
T100	37.54 ± 0.74^d	59.13 ± 0.71^d	0.27 ± 0.01^b	69.51 ± 1.29^c
Vc	96.81 ± 0.08^a	97.92 ± 0.18^a	0.69 ± 0.00^a	99.43 ± 0.09^a

除能力一致。各处理的·OH 清除率差异均达到显著水平。以 T1 处理最高，为 76.45%，T2 次之，CK 最低。·OH 清除率高低顺序为 T1 处理>T10 处理>T100 处理>CK 处理。4 组 H_2O_2 处理的·OH 清除作用均弱于 Vc 组。

FTC 法测得 T1 处理的吸光度低于其他处理，表明 T1 处理抗脂质过氧化能力强于其他处理，但和 T10 处理差异不显著。CK 的吸光度最高，显著高于 H_2O_2 处理。

4 讨论

4.1 低温条件下外源 H_2O_2 对垂盆草抗寒性的影响

H_2O_2 在植物受到低温胁迫时具有重要信号调

控功能^[20]；在对低温胁迫的响应中，低浓度 H_2O_2 可作为信号分子诱发防御反应，提高油菜种子的低温耐受能力^[21]，增强水稻幼苗的抗寒性^[22]。

3.5 低温条件下外源 H_2O_2 喷施对垂盆草体外抗氧化能力的影响

生长过程中经过不同浓度外源 H_2O_2 喷施处理的垂盆草，干燥后其水提物的体外抗氧化能力见表 5。不同处理的 DPPH·清除率具有较大差异，以 T10 处理最高，为 46.06%，显著高于其他浓度 H_2O_2 处理，比 CK 高 13.01%；T1 次之，为 41.60%。4 组处理的 DPPH·清除作用均弱于 Vc 组。ABTS⁺法测得的自由基清除能力在各处理中的变化与 DPPH·清

奈酚和异鼠李素含量整体呈先升后降趋势（表 4）。槲皮素、山柰酚和异鼠李素量最高值均出现在 T10 处理（喷施 10 mmol/L H_2O_2 ），分别比对照提高了 34.92%、16.67%、35.00%，其中槲皮素和异鼠李素均显著高于其他处理，而 T10 和 T1 处理的山柰酚量差异不显著。

本研究结果表明，外源 H_2O_2 喷施处理垂盆草新生芽数、枝条、叶片层数、干质量、鲜质量等指标显著优于对照处理组。试验中施加低浓度即 T1、T10 处理（浓度分别为 1、10 mmol/L） H_2O_2 处理不同程度提高垂盆草的生物量、新生芽数、枝条、叶片层数、最长分枝长。与蒋景龙等^[23]在大红柑上的研究结果相似。表明外源 H_2O_2 能够缓解低温胁迫对垂盆草的生长抑制，尤其较低浓度 H_2O_2 。 H_2O_2 对低温条件下垂盆草的促进作用可能

是因为在低浓度下, H_2O_2 对植物的同化、光合作用、呼吸、气孔导度、渗透压的积累、ABA 水平的调节和酶的抗氧化活性的增强起着重要的调节作用[24]。

万林等[25]研究表明外源 H_2O_2 处理可通过诱导抗氧化物质积累, 激活抗氧化酶活性等途径增强油菜幼苗的抗寒性。本研究发现低温条件下各外源 H_2O_2 喷施处理均显著提高 SOD 和 CAT 活性, 降低 MDA 含量。随着 H_2O_2 浓度升高, MDA 量呈升高趋势, 且各处理间差异达到显著水平, 这与油菜[25]、柑橘[4]的相关研究结果类似。表明外源 H_2O_2 可以提高垂盆草 SOD 和 CAT 活性, 降低细胞膜质过氧化程度, 减轻低温胁迫的伤害, 从而增强垂盆草的抗寒性。

4.2 低温条件下外源 H_2O_2 对垂盆草品质的影响

H_2O_2 除了具有潜在的催化作用外, 还在苯丙烷途径中充当重要的信号分子, 激活苯丙氨酸解氨酶、肉桂酸-4-羟化酶和 4-香豆酰-辅酶 A 连接酶的活性, 从而促进木质素的生物合成[26]。 H_2O_2 可以显著提高大叶榕[27]的抗氧化活性, 促进黄芩苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanineammonialyase, PAL) 和 β -葡萄糖苷酸酶基因表达, 提高了 PAL 活性, 促进了黄酮类成分的生物合成和苷元类成分的转化[5]。

本研究结果显示, 低温条件下外源 H_2O_2 喷施处理对垂盆草总黄酮、总酚含量影响显著, 均显著高于对照处理 CK。总黄酮、总酚含量随 H_2O_2 浓度的提高, 整体呈先升后降趋势, 最高值均出现在 T10 处理 (10 mmol/L H_2O_2)。随 H_2O_2 浓度的提高, 槲皮素、山柰素和异鼠李素含量整体呈先升后降趋势, 最高值均出现在 10 mmol/L H_2O_2 处理。说明低温条件下喷施 H_2O_2 有利于垂盆草黄酮类成分积累, 其中 10 mmol/L H_2O_2 处理促进效果最佳。在组培或非逆境环境下前人有关类似研究结果, 如低浓度 H_2O_2 提高了远志愈伤组织次生代谢产物总酚、总黄酮含量[28], 增强黄芩 PAL 基因表达和活性, 促进黄酮类成分积累, 尤其是苷元类成分, 提高了黄芩药材的质量[5], 提高了五味子抗氧化酶活性并促进五味子木脂素类成分的生物合成[29]。

药用植物中黄酮类化合物不仅作为药效成分治疗人类疾病, 还保护植物机体本身。黄酮类化合物具有广泛功能, 如抗氧化活性、紫外线防护、抵抗植物病原体等[30]。槲皮素和异鼠李素等垂盆草活

性成分具有较强的抗氧化性, 可能是植物细胞内抵御环境胁迫的抗氧化体系的组成部分。因此, 逆境或人为添加的逆境信号物质可诱导这类成分合成积累。

孟祥才等[31]提出了道地药材质量形成活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 机制的假说: 生态胁迫通过 ROS 的作用导致植物次生代谢发生改变, ROS 是道地药材质量形成的本质因素之一。在较适宜的环境条件下, 在采收前的适宜时间内, 可通过增施一定量 ROS 进行人为干扰来达到药材优质高产的目的。研究表明, 在逆境条件下对垂盆草预处理 H_2O_2 还可提高其抗逆性。因此, 在逆境下施用 H_2O_2 可能是提高药用植物抗逆性同时提高其产量和品质的有效途径。 H_2O_2 安全性强, 最终分解为水和氧气, 是法定的食品添加剂, 因此 H_2O_2 作为一种促进药用植物增产提质的外源添加物质, 具有广泛的应用前景。

体外抗氧化能力与黄酮类、酚酸类成分含量关系密切[32-33]。本研究发现, 垂盆草 ABTS、DPPH 自由基清除能力与总酚酸、槲皮素含量的趋势一致, 最高值均出现在 10 mmol/L H_2O_2 处理。羟自由基清除率, 以 T1 处理最大, 为 76.45%, 随 H_2O_2 浓度的提高, 呈下降趋势。表明说明低温条件下喷施较低浓度 H_2O_2 (1 或 10 mmol/L) 有利于增强垂盆草体外抗氧化能力。

综上所述, 在低温条件下喷施 H_2O_2 有利于减轻低温对垂盆草生长的不利影响, 促进黄酮类次生代谢产物积累, 从而提高垂盆草药材质量。综合比较各处理生长生理指标、生物量、化学成分含量及抗氧化能力, 在低温条件下喷施 1 或 10 mmol/L H_2O_2 时, 垂盆草药材高产和优质可兼得, 同时具有较高的抗氧化活性。外源 H_2O_2 对于具有较强抗氧化活性化学成分的积累是否具有普遍效果, 有待于进一步研究。笔者前期研究发现外源 H_2O_2 可提高垂盆草的保肝活性, 本研究涉及处理的药理作用研究尚在进行中。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hossain M A, Bhattacharjee S, Armin S M, et al. Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: Insights from ROS detoxification and scavenging [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 420.
- [2] 刘建新, 欧晓彬, 王金成, 等. 镉胁迫下裸燕麦幼苗对

- 外源 H_2O_2 的生理响应 [J]. 草业学报, 2020, 29(1): 125-134.
- [3] 刘建新, 欧晓彬, 王金成. 外源 H_2O_2 对干旱胁迫下裸燕麦幼苗叶片生理特性的影响 [J]. 干旱地区农业研究, 2019, 37(4): 146-153.
- [4] 蒋景龙. 外源 H_2O_2 对低温胁迫下柑橘叶片抗寒性的影响 [J]. 西北植物学报, 2016, 36(3): 499-505.
- [5] 付晓莹, 郭慧敏, 丛薇, 等. 外源 H_2O_2 对黄芩次生代谢调控及道地质量形成机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(2): 281-287.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 126.
- [7] 宋玉华, 李春雨, 郑艳. 垂盆草的研究进展 [J]. 中药材, 2010, 33(12): 1973-1976.
- [8] 兰扬, 姜红, 张仕瑾, 等. 不同产地垂盆草中有效成分对比研究 [J]. 亚太传统医药, 2020, 16(5): 50-52.
- [9] 姚晓敏, 陈磊, 孙梦贤, 等. 垂盆草对四环素所致非酒精性脂肪性肝病的保护作用 [J]. 药学研究, 2018, 37(8): 439-442.
- [10] Bai Y H, Lu H, Zhang G, *et al.* *Sedum sarmentosum* Bunge extract exerts renal anti-fibrotic effects *in vivo* and *in vitro* [J]. *Life Sci*, 2014, 105(1/2): 22-30.
- [11] 潘金火, 潘萍. 垂盆草总黄酮的保肝降酶作用及其化学成分的鉴别研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(8): 1930-1934.
- [12] 蒋志涛, 王雪, 王建春, 等. 垂盆草总黄酮及异鼠李素对乙酰氨基酚诱导的 L02 细胞损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(6): 121-125.
- [13] 朱再标, 杨金凤, 郭巧生, 等. 不同光强对垂盆草生长和药材品质及抗氧化活性的影响 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(22): 4404-4409.
- [14] 杨金凤, 郭巧生, 朱再标, 等. 不同水分梯度下垂盆草生长发育、品质及抗氧化活性关系研究 [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3382-3388.
- [15] 高俊山, 蔡永萍. 植物生理学实验指导 [M]. 第 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2018: 53.
- [16] 高俊凤. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 23.
- [17] Chen Y J, Wang J, Wan D R. Determination of total flavonoids in three *Sedum* crude drugs by UV-Vis spectrophotometry [J]. *Pharmacogn Mag*, 2010, 6(24): 259-263.
- [18] Kim C Y, Lee M Y, Park I S. Antioxidant activities of fractions from *Sedum sarmentosum* [J]. *Prev Nutr Food Sci*, 2006, 11(1): 6-9.
- [19] 唐赞. 药学专业实验教程 [M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2010: 263.
- [20] 刘零怡, 赵丹莹, 郑杨, 等. 植物在低温胁迫下的过氧化氢代谢及信号转导 [J]. 园艺学报, 2009, 36(11): 1701-1708.
- [21] 张曼, 戴蓉, 张顺凯, 等. H_2O_2 浸种对油菜种子低温萌发的缓解效应 [J]. 南京农业大学学报, 2017, 40(6): 963-970.
- [22] 韩娜, 冯汉青, 李燕鸿, 等. 外源 H_2O_2 对水稻幼苗抗寒性的调节作用 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(6): 1214-1219.
- [23] 蒋景龙, 沈季雪, 徐卫平, 等. 外源 H_2O_2 对低温胁迫下大红柑生长及叶片生理指标的影响 [J]. 浙江农业学报, 2016, 28(7): 1164-1170.
- [24] Iqbal H, Yaning C, Waqas M, *et al.* Hydrogen peroxide application improves quinoa performance by affecting physiological and biochemical mechanisms under water-deficit conditions [J]. *J Agro Crop Sci*, 2018, 204(6): 541-553.
- [25] 万林, 张曼, 钟飞燕, 等. H_2O_2 浸种处理对晚直播油菜苗期耐寒性的影响 [J]. 中国油料作物学报, 2015, 37(6): 811-819.
- [26] Li D, Limwachiranon J, Li L, *et al.* Hydrogen peroxide accelerated the lignification process of bamboo shoots by activating the phenylpropanoid pathway and programmed cell death in postharvest storage [J]. *Postharvest Biol Technol*, 2019, 153: 79-86.
- [27] Nurnaeimah N, Mat N, Suryati Mohd K, *et al.* The effects of hydrogen peroxide on plant growth, mineral accumulation, as well as biological and chemical properties of *Ficus deltoidea* [J]. *Agronomy*, 2020, 10(4): 599.
- [28] 曹福麟, 胡本祥, 彭亮, 等. H_2O_2 对远志愈伤组织中总酚总黄酮含量及相关酶活性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(20): 153-159.
- [29] 丛薇, 郭慧敏, 付晓莹, 等. H_2O_2 对五味子鲜果次生代谢影响及机制研究 [J]. 中药材, 2018, 41(3): 535-539.
- [30] 许永华, 卫宝瑞, 佐月, 等. 低温影响药用植物次生代谢产物积累研究进展 [J]. 分子植物育种, 2022, 20(5): 1708-1715.
- [31] 孟祥才, 王喜军. 活性氧促进道地药材质量形成的假说及其探讨 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 799-804.
- [32] Wojdyło A, Oszmiański J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs [J]. *Food Chem*, 2007, 105(3): 940-949.
- [33] 袁亚男, 陈承瑜, 杨滨, 等. 31 种黄酮、酚酸类化合物和 10 种中药清除 DPPH 能力考察 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(13): 1695-1700.

[责任编辑 时圣明]