

外源 H₂O₂ 对不同水分条件下垂盆草线粒体稳态、生长及品质的调控作用

崔运启, 赖秋洁, 朱再标*, 郭巧生, 刘雅琦, 江汇瀛, 刘秋钰

南京农业大学 中药材研究所, 江苏 南京 210095

摘要: 目的 为揭示外源 H₂O₂ 叶面预处理对不同水分条件下垂盆草 *Sedum sarmentosum* 线粒体稳态、生长和黄酮类成分积累的调控作用。方法 设置 4 个处理即适宜水分、适宜水分+1 mmol/L H₂O₂、干旱、干旱+1 mmol/L H₂O₂ 处理, 测定不同处理垂盆草叶肉细胞超微结构及其线粒体抗氧化系统、垂盆草生长指标、生物量、指标性成分含量及多种体外抗氧化能力。结果 在干旱胁迫条件下外源喷施 1 mmol/L H₂O₂ 可以显著提高垂盆草线粒体超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶 (peroxidase, POD) 和抗坏血酸过氧化物酶 (ascorbate peroxidase, APX) 活性, 显著降低线粒体超氧阴离子产生速率及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量, 减轻线粒体膜结构破坏。在干旱条件下叶片喷施 H₂O₂ 处理的垂盆草鲜质量和干质量分别比干旱处理提高 51.53% 和 38.78%, 总黄酮、总酚含量分别提高 13.37% 和 6.50%, 但槲皮素和异鼠李素含量显著低于其他处理。适宜水分条件下喷施 H₂O₂ 处理有利于提高生物量和异鼠李素含量。垂盆草 ABTS、DPPH、OH· 自由基清除能力与抗脂质过氧化能力均以适宜水分+喷施 H₂O₂ 处理最高, 干旱+喷施 H₂O₂ 处理次之。结论 喷施 1 mmol/L H₂O₂ 可以缓解干旱胁迫对垂盆草的氧化伤害, 维持线粒体稳态, 提高垂盆草药材产量和品质, 从而协调干旱逆境下垂盆草产量和品质之间的矛盾; 适宜水分条件下喷施 H₂O₂ 亦有助于提升垂盆草产量和品质。

关键词: 垂盆草; 过氧化氢; 干旱胁迫; 诱导抗性; 交叉抗性; 超氧化物歧化酶; 过氧化物酶; 抗坏血酸过氧化物酶; 丙二醛

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)23-7823-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.23.025

Regulation of exogenous H₂O₂ on mitochondrial homeostasis, growth and quality of *Sedum sarmentosum* under different water conditions

CUI Yun-qi, LAI Qiu-jie, ZHU Zai-bao, GUO Qiao-sheng, LIU Ya-qi, JIANG Hui-ying, LIU Qiu-yu

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

Abstract: Objective To reveal the regulatory effects of exogenous H₂O₂ leaf pretreatment on mitochondrial homeostasis, growth and flavonoids accumulation in *Sedum sarmentosum* under different water conditions. **Methods** Four treatments were conducted, namely, suitable moisture, suitable moisture + 1 mmol/L H₂O₂, drought, drought + 1 mmol/L H₂O₂. The ultrastructure of mesophyll cells and mitochondrial antioxidant system of *S. sarmentosum* under different treatments, as well as the growth index, biomass, contents of quality-related components and four *in vitro* antioxidant capacities of *S. sarmentosum* were determined. **Results** Exogenous spraying of 1 mmol/L H₂O₂ under drought stress could significantly increase the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and ascorbate peroxidase (APX) in mitochondria of *S. sarmentosum*, significantly reduce the mitochondrial O₂⁻ production rate and malondialdehyde (MDA) content, and reduce the damage of mitochondrial membrane structure. Under drought conditions, the fresh weight and dry weight of leaves which sprayed with H₂O₂ increased by 51.53% and 38.78%, and the contents of total flavonoids and total phenols increased by 13.37% and 6.50%, respectively, compared with those under drought conditions, but the contents of quercetin and isorhamnetin were significantly lower than those under other treatments. Spraying H₂O₂ under suitable water condition was conducive to improving biomass and isorhamnetin content. ABTS, DPPH, OH· radical scavenging ability and anti-lipid peroxidation ability of *S. sarmentosum* were the highest under suitable moisture + spraying H₂O₂ treatment, followed by drought + spraying H₂O₂ treatment. **Conclusion** Foliar spraying 1 mmol/L H₂O₂ could alleviate the oxidative damage of drought stress on *S. sarmentosum*, maintain mitochondrial homeostasis, and improve the yield and quality of *S. sarmentosum*, thereby coordinating the contradiction between yield and quality of *S. sarmentosum* under drought stress. Spraying H₂O₂ under suitable moisture conditions can also help to improve the yield and quality of *S. sarmentosum*.

Key words: *Sedum sarmentosum* Bunge; hydrogen peroxide; drought stress; induced resistance; cross resistance; superoxide dismutase; peroxidase; ascorbate peroxidase; malondialdehyde

收稿日期: 2023-05-06

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (KYZZ2021005)

作者简介: 崔运启, 硕士研究生, 主要从事药用植物 (动) 物种种植 (养殖) 理论与技术研究。E-mail: 2019104124@njau.edu.cn

*通信作者: 朱再标, 教授, 主要从事药用植物 (动) 物种种植 (养殖) 理论与技术研究。Tel: (025)84395980 E-mail: zhuzhaibiao@njau.edu.cn

干旱是影响植物生长的重要生态因子,会导致植物产生过量活性氧(reactive oxygen species, ROS),加速膜脂质过氧化,破坏酶和核酸结构,影响蛋白质合成,从而对细胞造成损害并影响植物生长^[1]。干旱作为自然界中对药用植物危害最大的非生物胁迫之一,对药用植物生长发育和品质均有重要影响^[2-3]。

作为 ROS 成员, H₂O₂ 在低浓度条件下是一种信号分子,在植物应对逆境过程中起到关键调节作用,调控细胞氧化还原稳态,提高耐逆性^[4-5]。已有研究表明,外源施用 H₂O₂ 可诱导植物产生交叉抗性^[6],从而促进多种大田作物在干旱^[7]、盐碱^[8-9]、低温^[10]等逆境条件下的生长,并提高其品质。

植物次生代谢产物是植物适应环境的产物,其中黄酮类等化合物能有效清除 ROS,抑制氧化应激,因此植物中黄酮类等物质的合成积累可能是为了对抗逆境 ROS 积累的防御反应^[11]。有研究表明外源 H₂O₂ 作为逆境因子可以提高大麦等大田作物^[12]以及三角榕^[13]等药用植物的产量和总酚酸等次生物质含量。但目前鲜见 H₂O₂ 预处理调控逆境条件下药用植物抗逆反应及其对产量和品质影响的报道。

垂盆草 *Sedum sarmentosum* Bunge 为景天科景天属多年生草本植物,其干燥全草为药材垂盆草,富含黄酮类、三萜类、生物碱类、氰苷类等成分,性凉、味甘淡、微酸,有清热利湿、解毒消肿的功效^[14]。黄酮类成分槲皮素、山柰酚、异鼠李素为《中国药典》2020 年版垂盆草药材的指标性成分。杨金凤等^[15]研究表明干旱胁迫有助于提高垂盆草槲皮素、山柰酚、异鼠李素含量,但严重抑制垂盆草生物量。

因此本研究拟通过研究不同水分处理条件下低浓度外源 H₂O₂ 叶面喷施对垂盆草叶肉细胞超微结构及线粒体氧化还原稳态、生长指标、黄酮类成分含量及体外抗氧化能力的影响,以期探讨外源 H₂O₂ 对垂盆草叶肉细胞线粒体稳态、生长和黄酮类成分积累的调控作用,为逆境信号物质 H₂O₂ 应用于垂盆草等药用植物逆境栽培提供依据。

1 材料与仪器

1.1 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,经朱再标教授鉴定为景天科景天属植物垂盆草 *S. sarmentosum* Bunge。

无水乙醇、福林酚、蒽酮、盐酸、氢氧化钠、

碳酸钠等均为国产分析纯;色谱级甲醇(美国 TEDIA 公司);对照品异鼠李素(批号 P17S9F68615,质量分数 ≥98%)、山柰酚(批号 G11A11L110978,质量分数 ≥98%)、槲皮素(批号 C09S8Y43412,质量分数 ≥98%)、没食子酸(批号 C13O9C72105,质量分数 ≥98%)均购于上海源叶生物科技有限公司。

1.2 仪器

HT7700 型透射电子显微镜(日本 HITACHI 公司), Leica UC7 型超薄切片机(德国 Leica 公司), Agilent1290 型高效液相色谱仪、RE-2000A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)、5810R 型台式高速冷冻离心机(eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 样品的处理

2020 年 8 月 11 日,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 21.5 cm×16.5 cm×7.5 cm 的塑料花盆中,每盆 5 株,试验用土营养土-原土 1:3(体积比)。2020 年 10 月 11 日,将垂盆草随机分为 4 组,每组 6 盆,开始进行处理。S 组一直保持适宜水分(田间持水量的 75%~80%);S+H₂O₂ 组喷施 1 mmol/L H₂O₂ 并保持适宜水分(同 S 组);D 组采用控水法模拟干旱(逐渐降至并维持在田间持水量的 5%~10%);D+H₂O₂ 组喷施 1 mmol/L H₂O₂ 并采用控水法模拟干旱(同 D 组)。H₂O₂ 喷施处理组每隔 7 d 处理 1 次,每次每盆 10 mL,其他组喷施相同体积的蒸馏水,以叶片滴水为度,共喷施 4 次。选取 1 mmol/L H₂O₂ 喷施处理垂盆草是由于课题组前期研究发现该浓度喷施处理有利于垂盆草生长及品质形成。2020 年 11 月 1 日根据需要进行叶片取样观测微观结构等检测指标,最后收获全株进行成分及体外抗氧化能力的测定。每处理进行 3 次生物学重复。

2.2 生长指标和生物量测定

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,测定鲜质量,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。将植株样品于 105 °C 杀青后,60 °C 烘至恒重,称取干质量后粉碎过 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

2.3 叶片含水量测定

称取 2 g 垂盆草叶片测鲜质量,然后放于 60 °C

烘箱中烘干, 按照公式测定干质量。

叶片含水量=(鲜质量-干质量)/鲜质量

2.4 线粒体提取及微观结构观察

参考杨培芳等^[16]方法进行垂盆草叶肉细胞线粒体的提取及微观结构观察。

2.5 线粒体抗氧化酶活性、超氧阴离子产生速率、H₂O₂ 及 MDA 含量的测定

超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、过氧化物酶 (peroxidase, POD) 活性、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性分别参照李合生^[17]、施特尔马赫和钱嘉渊^[18]、高俊凤^[19]的方法进行测定。抗坏血酸过氧化物酶 (ascorbate peroxidase, APX) 活性、线粒体超氧阴离子产生速率、H₂O₂ 含量及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量测定均采用高俊山等^[20]的方法。

2.6 化学成分指标及体外抗氧化能力的测定

总黄酮、总酚含量及体外抗氧化能力测定时参照杨金凤等^[15]方法进行样品供试液的提取, 其中总黄酮含量采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法^[21]测定, 且以芦丁为对照品。总酚含量测定时, 以没食子酸作为对照品, 参照 Folin-Ciocalteu 法^[22]进行。槲皮素、山柰酚及异鼠李素含量采用《中国药典》2020 年版^[14]HPLC 法测定。体外抗氧化活性测定时首先将提取的供试液稀释至 500 mg/L, 采用 DPPH、ABTS 等方法, 进行垂盆草体外抗氧化能力评价。其中 DPPH、ABTS、羟基自由基清除率的测定参照唐赞^[23]的方法硫氰酸铁 (ferric

thiocyanate, FTC) 法参照 Kim 等^[22]方法进行, 各测定方法均以维生素 C 为对照。

2.7 数据分析

采用 Excel 2010 和 SPSS 21.0 软件进行统计与分析, 不同处理相同指标采用 Duncan 法进行多重比较。

3 结果与分析

3.1 干旱或适宜水分条件下外源 H₂O₂ 喷施对垂盆草生长的影响

不同处理对垂盆草叶长、叶宽、叶片层数影响不显著 (表 1)。D 组 (干旱处理) 垂盆草新生芽数和分枝数均显著低于 S 组 (适宜水分处理), 降幅分别为 67.62%、22.06%。D+H₂O₂ 组最大分枝长、分枝数比 D 组分别提高 11.88%、20.00%, 其中分枝数达到显著水平, 表明在干旱条件下喷施低浓度 H₂O₂ 有利于缓解干旱对垂盆草生长的抑制。S+H₂O₂ 处理生长优势明显, 最大分枝长和分枝数达到最高, 分别比 S 处理提高 13.05% 和 20.81%。

D 组鲜质量和干质量比 S 组分别降低 108.50% 和 44.90% (表 2), 但 D+H₂O₂ 组比 D 组鲜质量和干质量分别提高 51.53% 和 38.78%。垂盆草根冠比和折干率均以 D 组最高, D+H₂O₂ 组次之, S 组与 S+H₂O₂ 组较低且差异不显著。此外, S+H₂O₂ 处理单株鲜质量、干质量虽在 4 个处理中最高, 但与 S 组差异并不显著。

与 S 处理相比, 其他处理叶片含水量显著下降。

表 1 干旱或适宜水分条件下外源 H₂O₂ 喷施对垂盆草植株形态的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of spraying exogenous H₂O₂ on morphology of *S. sarmentosum* under drought or suitable water conditions ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

处理	最大分枝长/cm	叶长/cm	叶宽/cm	叶片层数/层	新生芽数/个	分枝数/个
S	17.40±0.92b	1.38±0.34a	0.683±0.230a	14.17±3.37a	11.83±1.60a	12.83±1.72b
S+H ₂ O ₂	19.67±1.40a	1.62±0.20a	0.750±0.150a	14.00±3.16a	11.33±2.66a	15.50±1.04a
D+H ₂ O ₂	17.90±1.43ab	1.56±0.27a	0.833±0.150a	11.33±1.37a	5.67±1.37b	12.00±1.41b
D	16.00±1.58b	1.52±0.18a	0.850±0.160a	12.33±0.82a	3.83±1.17b	10.00±1.27c

同列不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$, 下同

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences, $P < 0.05$, same as below

表 2 干旱或适宜水分条件下外源 H₂O₂ 对垂盆草生物量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of spraying exogenous H₂O₂ on biomass of *S. sarmentosum* under drought or suitable water conditions ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

处理	单株鲜质量/g	单株干质量/g	根冠比	折干率/%
S	14.97±2.72a	0.71±0.19a	0.05±0.01b	4.70±0.56b
S+H ₂ O ₂	15.90±2.13a	0.79±0.14a	0.05±0.00b	4.95±0.48b
D+H ₂ O ₂	10.88±2.53b	0.68±0.11ab	0.06±0.01a	6.38±1.25a
D	7.18±1.37c	0.49±0.10b	0.07±0.01a	6.85±1.26a

其中 D+H₂O₂ 处理的叶片相对含水量虽比 D 处理高，但差异不显著（图 1）。

3.2 外源 H₂O₂ 对垂盆草叶片线粒体抗氧化酶活性的影响

4 个处理的垂盆草线粒体 SOD、POD 和 APX 活性变化趋势类似（图 2）。上述 3 种抗氧化酶活性均以适宜水分处理最高，而干旱处理或适宜水分+H₂O₂ 处理导致抗氧化酶活性下降，其中 POD 和 APX 活性降幅达到显著水平。与干旱处理相比，干旱+H₂O₂ 处理均可提高垂盆草线粒体上述 3 种抗氧化酶活性，增幅分别达到 150.95%、24.78% 和 5.72%。CAT 活性以 S+H₂O₂ 处理最高，但和 S 处理相比差异不显著。与 S 处理相比，D 处理导致线粒体 CAT 活性下降，而 D+H₂O₂ 处理导致 CAT 活性进一步下降，且差异达到显著水平。

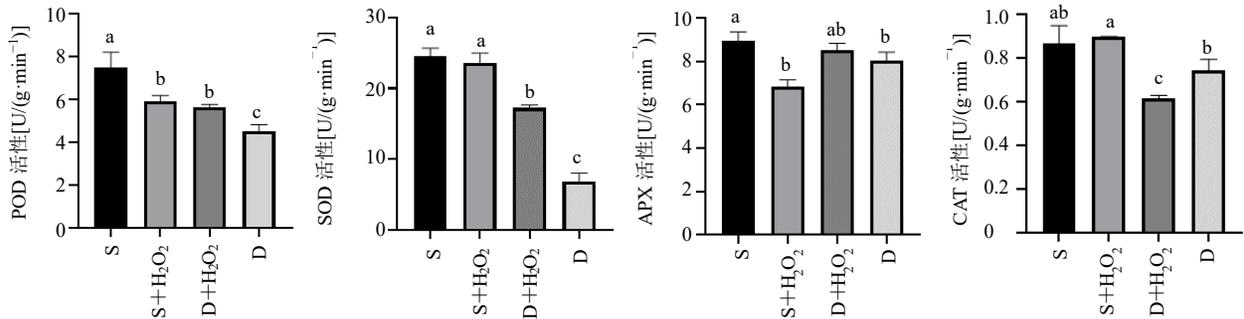
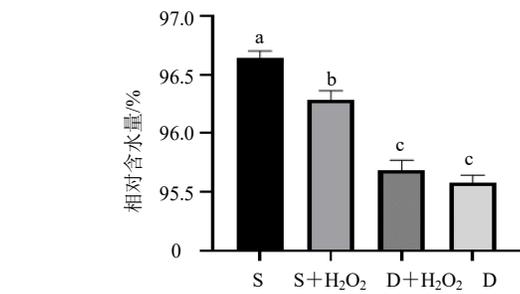


图 2 外源 H₂O₂ 对不同水分处理下垂盆草叶片线粒体 POD、SOD、APX 和 CAT 活性的影响

Fig. 2 Effects of exogenous H₂O₂ on activities of CAT, POD, SOD and APX in *S. sarmentosum* leaves mitochondria under different moisture treatments

3.3 外源 H₂O₂ 对垂盆草叶片线粒体超氧阴离子产生速率、H₂O₂ 和 MDA 含量的影响

不同处理间垂盆草叶片线粒体超氧阴离子产生速率以及 MDA 含量均差异显著，且变化趋势



不同小写字母表示差异显著 $P < 0.05$ ，下同

Different lowercase letters indicate significant differences, $P < 0.05$, same as below

图 1 干旱或适宜水分条件下外源 H₂O₂ 对垂盆草叶片含水量的影响

Fig. 1 Effects of exogenous H₂O₂ on leaf water content of *S. sarmentosum* under drought or suitable water conditions

类似（图 3）。与适宜水分处理相比，其他 3 个处理的超氧阴离子产生速率以及 MDA 含量均显著提高，其中干旱处理增幅最高，分别提高 181.61% 和 24.54%。

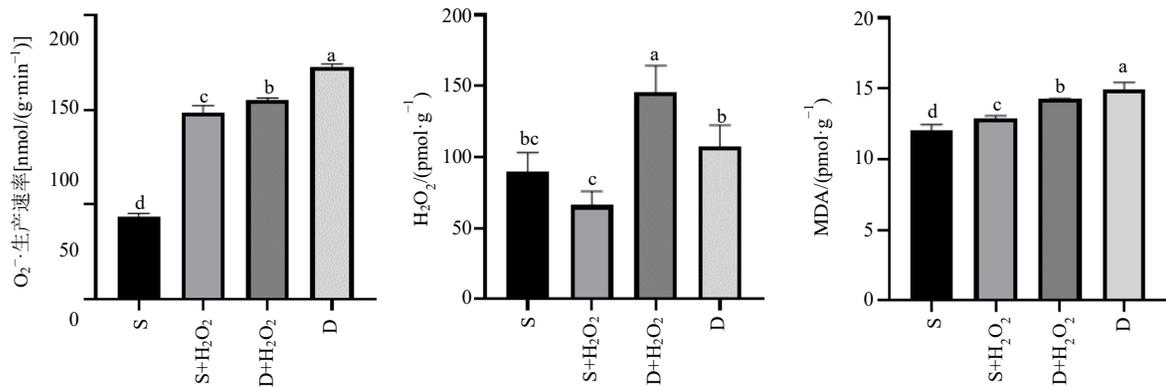


图 3 外源 H₂O₂ 对不同处理下垂盆草叶片线粒体超氧阴离子产生速率、H₂O₂ 和 MDA 含量的影响

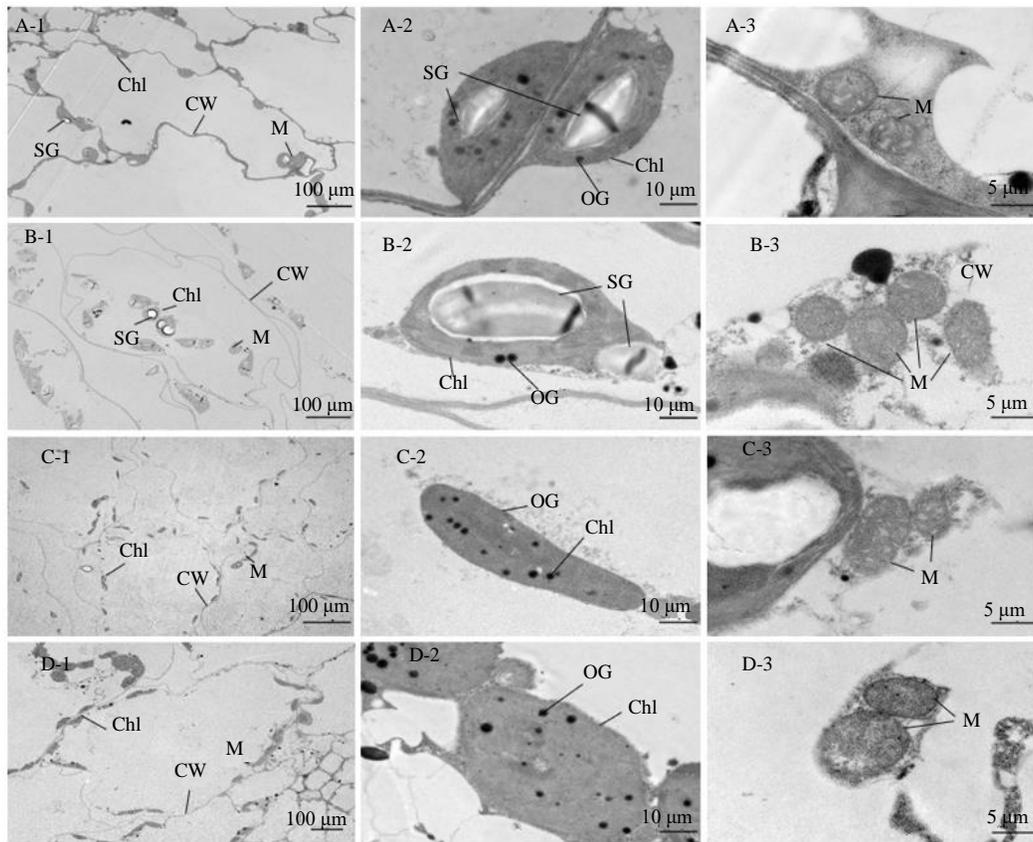
Fig. 3 Effects of exogenous H₂O₂ on MDA contents in *S. sarmentosum* leaves mitochondria under different moisture treatments

与干旱处理相比,在干旱条件下进行 H₂O₂ 喷施处理可显著降低超氧阴离子产生速率以及 MDA 含量。垂盆草叶片线粒体 H₂O₂ 含量以 D+H₂O₂ 处理最高,显著高于其他处理,S 处理与 S+H₂O₂ 和 D 处理均没有显著差异。由此可知,与适宜水分处理相比,单独的外源 H₂O₂ 喷施或干旱胁迫对垂盆草叶片内源 H₂O₂ 含量没有显著影响;而在干旱条件下喷施外源 H₂O₂ 会显著增加内源 H₂O₂ 积累。

3.4 外源 H₂O₂ 对垂盆草叶片细胞微观结构的影响

4 组细胞微观结构图中,S 组细胞形态最为完好,胞壁清晰,质壁结合紧密;叶绿体结构清晰完整,多呈梭形,紧贴细胞边缘分布;内部淀粉粒及嗜锇颗粒较多;线粒体多呈较规则的圆形分布在细胞壁周围,结构完整,外膜清晰可见,内部电子密度较高,内嵴比较丰富。D 组细胞形态破坏最为严重,细胞呈现一定的空泡化,胞壁界限模糊,叶绿

体团聚现象明显,一些叶绿体发生降解,细胞中分布着零碎降解物;淀粉粒降解、嗜锇颗粒明显增多;部分线粒体明显肿胀变形,轮廓模糊不清,内部嵴断裂、减少,出现空腔,有自融倾向。S+H₂O₂ 组细胞形态虽没有 S 组细胞形态完好,但明显优于 D 组细胞,其细胞虽着色较浅,但细胞膜结构基本完整,叶绿体向细胞中间移动,少数发生变形,嗜锇颗粒减少;线粒体外膜边缘较清晰,内部变化不明显。表明喷施 H₂O₂ 和干旱处理对垂盆草叶肉细胞形态都有一定损伤,其中干旱对细胞损伤最为严重。D+H₂O₂ 组虽然没有 S 组及 S+H₂O₂ 组细胞结构完整,且多数淀粉粒降解,嗜锇颗粒增多,内部嵴减少,但相较于 D 组细胞结构仍然较完整,叶绿体及线粒体外膜轮廓清晰,类囊体片层结构完整,具体结果见图 4。由此可见,在干旱条件下喷施外源 H₂O₂ 对垂盆草叶肉细胞结构有一定的保护作用。



叶肉细胞

叶绿体

线粒体

A-1~A-3-适宜水分 B-1~B-3-H₂O₂+适宜水分 C-1~C-3-干旱 D-1~D-3-H₂O₂+干旱 Chl-叶绿体 SG-淀粉粒 OG-嗜锇颗粒 M-线粒体
A-1~A-3-Adequate moisture B-1~B-3-H₂O₂+adequate moisture C-1~C-3-drought D-1~D-3-H₂O₂+drought Chl-chloroplast SG-starch granule OG-osmiophilic granule M-mitochondria

图 4 外源 H₂O₂ 对不同水分处理下垂盆草叶片细胞微观结构的影响

Fig. 4 Effects of exogenous H₂O₂ on microstructure of mesophyll cells in *S. sarmentosum* leaves under different moisture treatments

3.5 外源 H₂O₂ 喷施对垂盆草品质的影响

S 处理的垂盆草总黄酮和总酚含量高于 D 处理, 但差异不显著 (图 5)。D+H₂O₂ 处理的总黄酮、总酚含量比 D 处理分别提高 13.37%, 6.50%, 表明在干旱条件下喷施低浓度 H₂O₂ 有利于垂盆草总黄酮、总酚积累。S+H₂O₂ 组总黄酮含量低于 S 组, 但总酚酸含量高于 S 组, 且是 4 处理中最高, 表明在适宜水分情况下的垂盆草喷施低浓度 H₂O₂ 有利于总酚含量积累。与适宜水分处理相比, 干旱有利于垂盆草槲皮素、山柰酚积累 (表 3)。D 处理比 S 处理分别提高 1.54%、2.86%, 槲皮素、山柰酚含量最高值均出现在 D 处理组, 而异鼠李素含量差异不显著。D+H₂O₂ 组的槲皮素、异鼠李素含量显著低于其他处理。异鼠李素含量最高值出现在 S+H₂O₂ 处理, 显著高于 S 处理。

3.6 外源 H₂O₂ 喷施对垂盆草体外抗氧化能力的影响

DPPH 自由基、羟自由基和 FTC 法测得的 4 个处理垂盆草水提物的抗氧化能力变化趋势类似 (表 4)。与 S 处理相比, D 处理显著提高上述 3 种方法测得的抗氧化能力。在适宜水分或干旱条件下外源喷施 H₂O₂ 均可显著提高上述 3 种抗氧化能力, 其

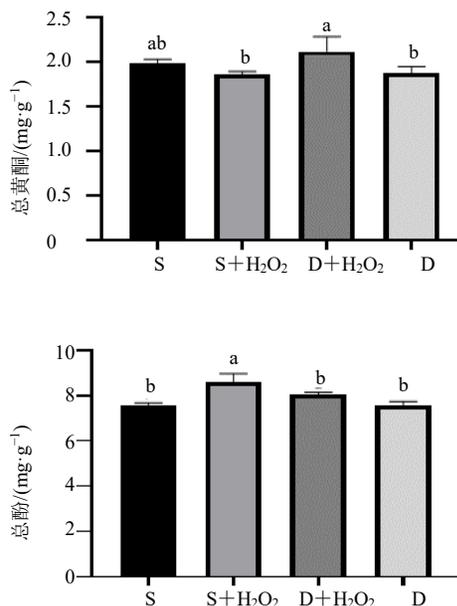


图 5 干旱或适宜水分条件下外源 H₂O₂ 对垂盆草总黄酮和总酚含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effects of exogenous H₂O₂ on total flavonoids and total phenols contents of *S. sarmentosum* under drought or suitable water conditions ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 3 干旱或适宜水分条件下外源 H₂O₂ 对垂盆草黄酮类成分含量差异 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of exogenous H₂O₂ on the content of flavonoids of *S. sarmentosum* under drought or suitable water conditions ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

处理	槲皮素/%	山柰酚/%	异鼠李素/%	总量/%
S	0.065 ± 0.001b	0.035 ± 0.000b	0.049 ± 0.001b	0.149 ± 0.002b
S+H ₂ O ₂	0.064 ± 0.000b	0.034 ± 0.000c	0.051 ± 0.000a	0.149 ± 0.001b
D+H ₂ O ₂	0.062 ± 0.000c	0.036 ± 0.000a	0.043 ± 0.000c	0.141 ± 0.000c
D	0.066 ± 0.001a	0.036 ± 0.000a	0.049 ± 0.000b	0.152 ± 0.001a

表 4 干旱或适宜水分条件下外源 H₂O₂ 对垂盆草水提物体外抗氧化活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effects of exogenous H₂O₂ on *in vitro* antioxidant activities of *S. sarmentosum* aqueous extracts under drought or suitable water conditions ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

处理	DPPH 自由基抑制率/%	ABTS 自由基清除率/%	FTC 法吸光度	羟自由基清除率/%
S	35.78 ± 0.58e	45.75 ± 2.43d	0.29 ± 0.02b	53.01 ± 1.19e
S+H ₂ O ₂	69.09 ± 1.43b	63.64 ± 1.00b	0.23 ± 0.01cd	70.82 ± 0.38b
D+H ₂ O ₂	50.59 ± 0.25c	54.34 ± 2.47c	0.22 ± 0.01d	64.54 ± 0.28c
D	42.93 ± 0.11d	35.87 ± 0.13e	0.26 ± 0.01c	57.55 ± 0.94d
VC	97.71 ± 0.13a	99.48 ± 0.34a	0.40 ± 0.02a	99.42 ± 0.02a

中 DPPH 自由基抑制率分别提高 93.10%和 17.84%, 羟自由基清除率分别提高 33.60%和 12.15%, 而 FTC

吸光度值分别下降 20.69%和 15.38%。与 S 处理相比, D 处理的 ABTS 自由基清除率下降, 在适宜水分或干

旱条件下外源喷施 H_2O_2 均可显著提高 ABTS 自由基清除率, 增幅分别达到 39.10% 和 51.49%。

4 讨论

线粒体是植物细胞中产生 ROS 的主要部位之一, 线粒体稳态失衡会诱发大量 ROS 产生, 进而损伤机体^[24-25]。线粒体作为能量中心, 在能量代谢、生物合成及细胞凋亡或程序性坏死等过程中起关键调控作用, 其结构的完整性与抗氧化系统的有序性可以判断线粒体及细胞稳态是否正常^[26-29], 其稳态变化还可反映植物的受逆状况及对逆境的适应能力^[30-32]。 H_2O_2 作为信号分子可参与调控植物对逆境响应的防御体系, 增强植株对环境胁迫的适应能力。本实验中, D 组和 S+ H_2O_2 组相较于 S 组细胞形态都受到了不同程度的损伤, 说明 H_2O_2 和干旱虽然都会破坏垂盆草叶肉细胞超微结构, 但干旱对细胞的损伤明显比 H_2O_2 对细胞的损伤严重。D+ H_2O_2 组较 S 组细胞结构虽然也遭到了破坏, 但比 D 组细胞结构的受损程度较轻, 叶绿体、线粒体轮廓仍清晰, 整体结构比较完整。由此可见, 喷施外源 H_2O_2 可在一定程度上改善垂盆草叶肉细胞结构于干旱胁迫下的受损程度。

为了维持体内 ROS 代谢平衡, 植物为此进化形成了酶类和非酶类抗氧化系统, 其中 POD、SOD、CAT 和 APX 是 ROS 清除过程中比较重要的抗氧化酶, 其酶活性的大小是衡量植物抗氧化能力强弱的重要指标^[33]。此外, H_2O_2 作为信号分子可参与调节胁迫反应等特定生理过程, 有效提高抗氧化酶活性等, 进而缓解植物因胁迫造成的氧化应激损伤^[34-35]。在本研究中, D+ H_2O_2 组垂盆草线粒体 SOD、POD 和 APX 活性比 D 组显著提高, 且与线粒体 MDA 含量和超氧负离子产生速率呈负相关, 表明外源 H_2O_2 预处理能通过 SOD、POD 和 APX 协同作用降低干旱胁迫下积累的超氧负离子含量, 从而减轻 $O_2^{\cdot-}$ 等自由基对线粒体膜造成的伤害, 维持垂盆草线粒体氧化还原稳态。

研究表明外施 H_2O_2 能够提高植物对多种逆境的交叉抗性, 有效改善植株水分状况, 调控光合和呼吸等过程, 增强抗氧化防御体系和渗透调节能力^[36], 减轻干旱胁迫对植物的生长抑制。本研究结果显示干旱胁迫严重抑制垂盆草生长, 使叶片层数、新生芽数、分枝数、干鲜质量都低于适宜水分组。但在干旱条件下喷施外源 H_2O_2 处理组的垂盆草最大分枝长、分枝数、新生芽数、干鲜质量均

高于干旱处理组, 有利于缓解干旱对垂盆草生长的抑制。在适宜水分条件下喷施外源 H_2O_2 处理组较其他组生长优势明显, 最大分枝长、分枝数最高, 表明在适宜水分情况下喷施低浓度 H_2O_2 有利于垂盆草生长, 这与武术杰等^[37]在非洲紫罗兰上的研究结果相似。

有研究发现植物对逆境的响应可以有效促进中药活性成分产生, 更加有利于道地药材形成。如 Liu 等^[38]研究发现中度干旱有利于黄芩活性成分合成, 但黄芩苷含量随胁迫程度增加呈下降趋势。杨金凤等^[15]等研究表明干旱胁迫有助于垂盆草槲皮素、山柰酚、异鼠李素含量的积累。但逆境往往抑制植物生长, 由此造成药材产量和品质提升之间的矛盾。而植物生物调节剂 (plant bioregulators, PBRs) 如 H_2O_2 等低成本化学物质, 可以加强植物防御, 尤其在逆境条件下, 近十年来已较多用于诱导植物适应逆境^[5, 39]。

植物次生代谢产物种类繁多, 功能多样, 功能包括跨物种交流、酶活性调节、信号和防御等^[11]。因此, 针对某类特定功能 (如防御氧化胁迫) 的次生代谢产物, 通过 H_2O_2 等植物生物调节剂同步调节初生代谢和次生代谢, 同步提高产量和品质, 从而解决产量和品质之间的矛盾是可行的。如 50 mmol/L H_2O_2 可显著提高大麦总酚酸含量、苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 活性以及 ABTS 抗氧化活性, 而 100 和 150 mmol/L H_2O_2 处理可以促进其生长^[12]。16、30 mmol/L H_2O_2 提高三角榕抗氧化能力、总酚酸和总黄酮含量以及牡荆素和异牡荆素含量, 同时也提高了株高、叶面积、光合色素含量、净光合速率和光量子产量等^[13]。因此, 在非逆境条件下, 外源 H_2O_2 可以作为逆境因子诱导药用植物逆境反应, 从而提高药用植物品质。

本研究结果显示, 干旱降低垂盆草总黄酮和总酚酸含量, 这与丹参等药用植物在干旱胁迫下的研究结果相似。但 D+ H_2O_2 组比 D 组总黄酮、总酚含量提高 13.37%、6.50%, 说明干旱条件下喷施低浓度 H_2O_2 有利于垂盆草黄酮类成分积累。另外, 适宜水分条件下喷施低浓度 H_2O_2 使总酚酸含量显著提高。对于《中国药典》2020 年版垂盆草药材评价指标槲皮素、山柰酚和异鼠李素而言, 本研究中干旱处理提高了槲皮素、山柰酚含量, 与杨金凤等^[15]关于不同水分梯度下垂盆草品质研究结果相似。适宜水分条件下喷施低浓度 H_2O_2 促进异

鼠李素积累, 但干旱条件下外源喷施 H_2O_2 处理导致槲皮素、异鼠李素含量降低, 这可能与垂盆草含有多种黄酮类成分有关, 干旱条件下喷施低浓度 H_2O_2 促进积累的垂盆草黄酮类成分中以其他成分为主, 也可能与 H_2O_2 喷施的次数和时间有关。本研究还发现, 垂盆草 ABTS、DPPH、 $OH\cdot$ 自由基清除能力与总酚酸含量的趋势基本一致, 最高值均出现在 S+ H_2O_2 组, D+ H_2O_2 次之, 由此可见干旱和适宜水分条件下喷施低浓度 H_2O_2 均有利于增强垂盆草体外抗氧化能力。

综上所述, 在干旱条件下喷施 1 mmol/L H_2O_2 有利于减轻干旱对垂盆草生长的不利影响, 改善干旱导致的线粒体稳态失衡, 进而维持线粒体结构与功能正常, 提升垂盆草抗氧化应激能力, 并提高总黄酮和总酚含量及体外抗氧化能力, 从而协调干旱逆境下垂盆草产量和品质之间的矛盾。而在适宜水分条件下 H_2O_2 也具有较弱的促进垂盆草生长并提高其品质的作用。因此低浓度 H_2O_2 喷施在垂盆草生产中具有较高的应用价值, 并可为其他药用植物的逆境栽培提供参考。外源 H_2O_2 调控垂盆草线粒体稳态的内在机制及其与黄酮类成分合成积累之间的机理有待于进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gharibi S, Tabatabaei B E S, Saeidi G, et al. Effect of drought stress on total phenolic, lipid peroxidation, and antioxidant activity of *Achillea* species [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 178(4): 796-809.
- [2] Khaitov B, Urmonova M, Karimov A, et al. Licorice (*Glycyrrhiza glabra*)—Growth and phytochemical compound secretion in degraded lands under drought stress [J]. *Sustainability*, 2021, 13(5): 2923.
- [3] 于浩滢, 徐志超, 闵伟红, 等. 干旱胁迫影响药用植物品质的分子机制研究 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2018, 20(9): 1650-1658.
- [4] Slesak I, Libik M, Karpinska B, et al. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses [J]. *Acta Biochim Pol*, 2007, 54(1): 39-50.
- [5] Jira-Anunkul W, Pattanagul W. Seed priming with hydrogen peroxide alleviates the effects of drought stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings [J]. *Not Bot Horti Agrobo*, 2020, 48(1): 273-283.
- [6] Sáenz-de la O D, Morales L O, Strid Å, et al. Ultraviolet-B exposure and exogenous hydrogen peroxide application lead to cross-tolerance toward drought in *Nicotiana tabacum* L. [J]. *Physiol Plant*, 2021, 173(3): 666-679.
- [7] 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.
- [8] 蒋景龙, 沈季雪, 李丽. 外源 H_2O_2 对盐胁迫下黄瓜幼苗氧化胁迫及抗氧化系统的影响 [J]. *西北农业学报*, 2019, 28(6): 998-1007.
- [9] Abdel Latef A, Kordrostami M, Zakir A, et al. Eustress with H_2O_2 facilitates plant growth by improving tolerance to salt stress in two wheat cultivars [J]. *Plants*, 2019, 8(9): 303.
- [10] Han N, Feng H Q, Li Y H, et al. Regulation of exogenous H_2O_2 on rice seedlings chilling tolerance [J]. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 2009, 29(6): 1214-1219.
- [11] Yadav B, Jogawat A, Rahman M S, et al. Secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: A review [J]. *Gene Rep*, 2021, 23: 101040.
- [12] Delis-Hechavarría E A, Guevara-González R G, Ocampo-Velázquez R V, et al. Pre-germination treatment with hydrogen peroxide as a controlled elicitation strategy to improve chemical properties of hydroponic barley fodder [J]. *Crop Pasture Sci*, 2021, 72(10): 815-822.
- [13] 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.
- [14] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 223.
- [15] 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.
- [16] 赖秋洁, 崔运启, 朱再标, 等. 外源 H_2O_2 预处理对垂盆草抗寒性及药材产量和品质的影响 [J]. *中草药*, 2022, 53(21): 6874-6880.
- [17] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 167.
- [18] 德·施特马赫著. 钱嘉渊译. 酶的测定方法 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 274.
- [19] 高俊凤. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 214.
- [20] 高俊山, 蔡永萍. 植物生理学实验指导 [M]. 2 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2018: 93-94, 110, 118-121.
- [21] Wan D R, Chen Y J, Wang J. Determination of total flavonoids in three *Sedum* crude drugs by UV-Vis spectrophotometry [J]. *Phcog Mag*, 2010, 6(24): 259.
- [22] 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.
- [23] 唐赟. 药学专业实验教程 [M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2010: 184.
- [24] Neill S J, Desikan R, Clarke A, *et al.* Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants [J]. *J Exp Bot*, 2002, 53(372): 1237-1247.
- [25] 罗银玲, 宋松泉. 植物线粒体、活性氧与信号转导 [J]. 西北植物学报, 2004, 24(4): 737-747.
- [26] Smeitink J A, Zeviani M, Turnbull D M, *et al.* Mitochondrial medicine: A metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders [J]. *Cell Metab*, 2006, 3(1): 9-13.
- [27] Foyer C H, Noctor G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria [J]. *Physiol Plant*, 2003, 119(3): 355-364.
- [28] Møller I M, Jensen P E, Hansson A. Oxidative modifications to cellular components in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2007, 58: 459-481.
- [29] 孙海平, 汪晓峰. 植物线粒体中活性氧的产生与抗氧化系统 [J]. 现代农业科技, 2009(8): 239-240.
- [30] 陆晓民, 孙锦, 郭世荣, 等. 油菜素内酯对低氧胁迫黄瓜幼苗根系线粒体抗氧化系统及其细胞超微结构的影响 [J]. 园艺学报, 2012, 39(5): 888-896.
- [31] 曾德永, 崔杰, 张萌, 等. 植物线粒体抗氧化应激效应影响的研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(21): 31-37.
- [32] 闻志彬, 莱孜提·库里库, 张明理. 干旱胁迫对 3 种不同光合类型荒漠植物叶绿体和线粒体超微结构的影响 [J]. 西北植物学报, 2016, 36(6): 1155-1162.
- [33] 赵曼, 陈仕勇, 李亚萍, 等. 外源 GABA 对盐胁迫下金花菜种子萌发及幼苗抗氧化能力的影响 [J]. 江苏农业学报, 2021, 37(2): 310-316.
- [34] Baxter A, Mittler R, Suzuki N. ROS as key players in plant stress signalling [J]. *J Exp Bot*, 2014, 65(5): 1229-1240.
- [35] Sofo A, Scopa A, Nuzzaci M, *et al.* Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 13561-13578.
- [36] Rahman M A, Alam I, Sharmin S A, *et al.* Physiological and proteomic analyses reveal the protective roles of exogenous hydrogen peroxide in alleviating drought stress in soybean plants [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2021, 15(6): 805-818.
- [37] 武术杰, 张凤瑾, 刘骞, 等. 干旱胁迫下外源 ABA 和 H₂O₂ 对非洲紫罗兰抗旱性影响 [J]. 东北林业大学学报, 2019, 47(10): 36-39.
- [38] Liu J J, Zhang Y Q, Li J, *et al.* Influence of water stress on the physiological and biochemical characteristics of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *Agric Sci Technol Hunan*, 2010, 11: 22-25.
- [39] Sáenz-de la O D, Morales L O, Strid Å, *et al.* Ultraviolet-B exposure and exogenous hydrogen peroxide application lead to cross-tolerance toward drought in *Nicotiana tabacum* L. [J]. *Physiol Plant*, 2021, 173(3): 666-679.

[责任编辑 时圣明]