

# 鹿蹄草在自然越冬过程中内源激素的变化研究

陈 忠, 董延龙, 李 岩

(黑龙江省农业科学院 园艺分院, 黑龙江 哈尔滨 150069)

**摘 要:**以采自黑龙江省尚志市帽儿山地区和五大连池老黑山地区的鹿蹄草为试材,分析测定了自然越冬过程中鹿蹄草内源激素含量的变化。结果表明:在自然越冬过程中,鹿蹄草叶片中的脱落酸(ABA)呈先上升后下降的趋势,最高值出现在12月份或1月份;吲哚乙酸(IAA)呈现小幅度下降趋势,整体变化趋势并不明显,因此与鹿蹄草抗寒性无显著相关性;赤霉素(GA)则一直呈现均匀的梯度下降趋势;ABA/GA比值也呈先上升后下降趋势,但上升幅度远远大于降低幅度,与鹿蹄草的抗寒性呈正相关。

**关键词:**鹿蹄草;自然越冬;内源激素;变化

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)13-0181-05

鹿蹄草(*Pyrola rotundifolia* ssp. *chinensis*)属鹿蹄草科鹿蹄草属多年生草本植物。鹿蹄草属植物全世界约有30余种,主要分布于北半球的温带和寒温带地区,我国是其主要分布区,并且种类繁多,共有27种3个变种,主要集中分布在西南部的四川省、云南省、贵州省、西藏和东北地区的黑龙江大兴安岭、小兴安岭,吉林长白山等地区。在我国鹿蹄草属植物的分布广泛且丰富。鹿蹄草是我国重要的药用资源,我国对鹿蹄草的研究已有悠久的历史,在我国民间鹿蹄草作为一种中草药有极其广泛的应用,并且在苗药、藏药中也有非常重要的地位。鹿蹄草在医药领域的应用最为广泛,在抗菌、抗肿瘤、消炎等方面疗效显著,鹿蹄草的水煎剂以及提取分离出来的化学成分具有广谱抗菌作用,对消化道、上呼吸道、泌尿道、创伤感染等常见多发病有较好的抗菌消炎疗效。鹿蹄草是抗逆性较强的植物,在-50℃也能生存,而且在越冬期几乎可以保持“绿体”越冬。因此鹿蹄草在园林、绿化、观赏领域的应用潜力较大,鹿蹄草的特殊耐寒机制尤其值得学者们研究。

鹿蹄草是一种抗逆性较强的植物,因此研究鹿蹄草的抗寒生理变化对其引种栽培及药物资源的开发均有极其重要的意义。一般认为植物激素是抗寒基因表达的启动因子,环境条件变化或发育的内生节奏会改变植物体内内源激素平衡状况,因此,激素平衡关系的改变可能是植物抗寒锻炼的推动力之一<sup>[1]</sup>。现从生理角度分析测定了与鹿蹄草抗寒相关的内源激素含量的变化,

以期对鹿蹄草冬季引种驯化、鹿蹄草中药资源的开发及大批量种植、抗寒品种的挖掘和在食品、化工等方面的应用提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 采样地概况

1.1.1 黑龙江省尚志市帽儿山地区 帽儿山位于黑龙江省南部的尚志市帽儿山镇,境内山峦绵延,丘陵起伏。地理坐标为北纬45°20′~45°25′,东经127°30′~127°34′,境内最高海拔805 m,最低海拔260 m,平均海拔300 m,坡度平均在10~15。根据采集样品实际测量结果显示,在2009~2010年度越冬期,帽儿山地区最高气温出现在2009年10月中旬,达13℃,随后气温大幅度下降,到12月份左右气温达到最低值,-29℃,翌年3月份气温回升到-9℃,越冬期的6个月平均气温为-16.2℃。在2010~2011年越冬期间,帽儿山地区气温最高为9℃,最低气温出现在2011年1月份为-29℃。越冬期的6个月平均气温为-15.3℃(图1)。

1.1.2 黑龙江省五大连池市老黑山地区 五大连池市是我国第二大火山堰塞湖。地理坐标为北纬48°34′~48°43′,东经126°00′~126°26′。位于黑龙江省哈尔滨市以北385 km,黑河市以南251 km,松嫩平原的丘陵地区。该地属寒温带大陆性季风气候,冬季严寒漫长,夏季凉爽短促。年平均气温-0.5℃,无霜期为121 d。老黑山地区气温较帽儿山气温偏低,最高气温在2009年10月份,为4℃,最低气温在2010年1月份,为-42℃,2010年2~3月气温属于回升状态,3月份气温回升到-18℃,越冬期平均气温为-23.8℃。在老黑山地区,最高气温为2011年10月份,为8℃,最低气温为-40℃,越冬期平均气温为-22.7℃,整体气温较帽儿山地区偏低(图1)。

**第一作者简介:**陈忠(1968-),男,研究员,现主要从事园林植物与观赏园艺等研究工作。E-mail:cz0451@163.com.

**基金项目:**黑龙江省自然科学基金资助项目(C200805)。

**收稿日期:**2013-03-05

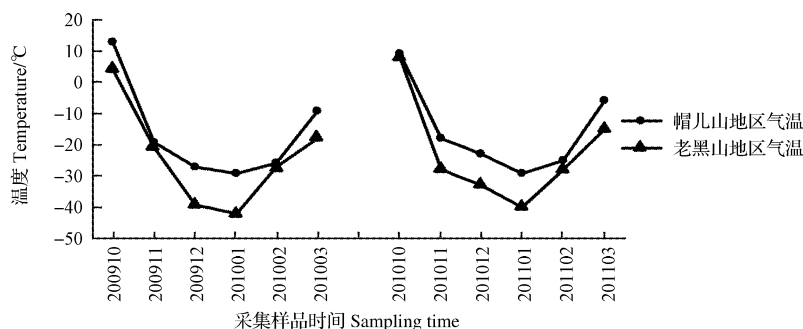


图1 2个采样地各采样时期气温变化特点

Fig. 1 The changing characteristic of temperature at each sampling date form two plots

## 1.2 试验材料

供试鹿蹄草采自黑龙江省尚志市帽儿山地区和五大连池老黑山地区。采样时间分别为2009年10月15日、11月15日、12月15日,2010年1月15日、2月15日、3月15日、10月15日、11月15日、12月15日,2011年1月15日、2月15日、3月15日。

## 1.3 试验方法

1.3.1 材料处理 挑选生长在帽儿山和老黑山地区的长势强壮的鹿蹄草植株进行采集,将采集好的样品在采集区用干冰保存,带回实验室。将鹿蹄草用去离子水洗2次后,吸干表面的水分,剪成面积大小相同的小叶片,称取0.5 g鹿蹄草小叶片用锡纸包裹好,置于液氮迅速冷冻后,将同一时期、同一地点的样品做好标记,贮藏于-80℃冰箱备用。

1.3.2 内源激素(ABA、IAA、GA)含量测定 鹿蹄草的内源激素采取酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定。称取0.5~1.0 g新鲜植物材料(若取样后材料不能马上测定,用液氮速冻0.5 h后,保存在-20℃的冰箱中),加2.0 mL样品提取液,在冰浴下研磨成匀浆,转入10 mL试管,再用2.0 mL提取液分次将研钵冲洗干净,一并转入试管中,摇匀后放置在4℃冰箱中。4℃下提取4 h,3 500 r/min离心8 min,取上清液。沉淀中加1.0 mL提取液,搅匀,置4℃下再提取1 h,离心,合并上清液并记录体积,弃去残渣。上清液过C-18固相萃取柱。将系列标准样加入96孔酶标板的前2行,每个浓度加2孔,每孔50 μL,其余孔加待测样,每个样品重复2孔,每孔50 μL。再加抗体:在5.0 mL样品稀释液中加入一定量的抗体(最适稀释倍数见试剂盒标签,如稀释倍数是1:2 000,就要加2.5 μL的抗体),混匀后每孔加50 μL,然后将酶标板加入湿盒内开始竞争。竞争条件37℃左右0.5 h。洗板:将反应液甩干并在报纸上拍净。第1次加入洗涤液后要立即甩掉。然后再接着加第2次。共洗涤4次。加二抗:将适当的酶标二抗,加入10 mL样品稀释液中(比如稀释倍数1:1 000就加10 μL),混匀后,在酶标板每孔加100 μL,然后将其放入湿盒内,置

37℃下,温育0.5 h。洗板:方法同竞争之后的洗板。加底物显色:称取10~20 mg邻苯二胺(OPD)溶于10 mL底物缓冲液中(小心勿用手接触OPD),完全溶解后加4 μL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。混匀,在每孔中加100 μL,然后放入湿盒内,当显色适当后(肉眼能看出标准曲线有颜色梯度,且100 ng/mL孔颜色还较浅),每孔加入2.0 mol/L硫酸50 μL终止反应。比色:在酶联免疫分光光度计上依次测定标准物各浓度和各样品490 nm处的OD值。最后将所得结果带入公式:

$$\text{Logit}(B/B_0) = \ln \frac{B}{B_0 - B}$$

式中,B<sub>0</sub>代表0 ng/mL孔的显色值,B代表其它浓度的显色值。

待测样品可根据其显色值的Logit值从图上查出其所含激素浓度(ng/mL)的自然对数,再经过反对数即可知其激素的浓度(ng/mL)。求得样品中激素的浓度后,再计算样品中激素的含量(ng/gFW)。

## 2 结果与分析

### 2.1 2个样地不同采集时期鹿蹄草脱落酸(ABA)含量的变化

由图2可知,在2009~2010年度帽儿山地区与老黑山地区的鹿蹄草叶片中内源激素ABA含量均呈现先增后减的变化趋势,帽儿山地区在2009年10月至2010年1月,ABA含量不断增加,从1 420 ng/gFW增加至4 920 ng/gFW,随后在2~3月下降至3 960 ng/gFW;老黑山地区的鹿蹄草叶片ABA含量从2009年10月份的1 391 ng/gFW上升至2010年1月的4 540 ng/gFW。在2010~2011年度越冬期间ABA含量变化趋势同样是先增后减。帽儿山地区由最低含量1 267 ng/gFW增加到最高含量4 849 ng/gFW,随后ABA含量小幅度下降至4 001 ng/gFW,最高含量比最低含量增加了226%;该年度老黑山地区的鹿蹄草叶片中内源激素ABA含量同样由最低含量1 038 ng/gFW增加到最高含量5 342 ng/gFW,最高含量出现在2011年1月份,ABA最高含量比最低含量增加了414%,增幅偏大。进入2011年3月,ABA

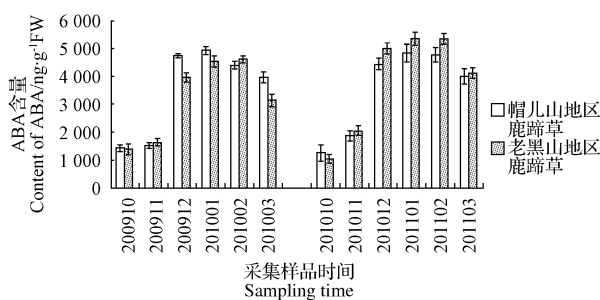


图2 2个样地不同采集时期鹿蹄草叶片 ABA 含量的变化

Fig. 2 The changes of ABA content in leaves of *Pyrola* at different collecting periods from two plots

含量稍微降低至 4 120 ng/gFW。

在 2 个越冬期间,从相同地区的鹿蹄草叶片中 ABA 含量来看,其变化趋势基本一致。帽儿山地区的鹿蹄草叶片中 ABA 的最高值和最低值在 2 个越冬年度基本保持相当水平。老黑山地区鹿蹄草叶片的 ABA 含量在 2 个越冬年度变化趋势也基本一致,只是在 2010~2011 年度越冬期其各月 ABA 较 2009~2010 年度含量稍高。

## 2.2 2 个样地不同采集时期鹿蹄草吲哚乙酸(IAA)含量的变化

由图 3 可知,在 2009~2010 年度帽儿山地区与老黑山地区的鹿蹄草叶片中内源激素 IAA 含量呈现递减的变化趋势,但变化不显著。帽儿山地区在 2009 年 10 月至 2010 年 1 月,IAA 含量降低,从 80 ng/gFW 降低至 78 ng/gFW,随后在 2~3 月下降至 63 ng/gFW;老黑山地区的鹿蹄草叶片 IAA 含量从 2009 年 10 月份的 97 ng/gFW 降至 2010 年 1 月的 78 ng/gFW。在 2010~2011 年度越冬期间 IAA 含量没有明显的变化趋势。帽儿山地区由最低含量 62 ng/gFW,最高含量 65 ng/gFW;该年度老黑山地区的鹿蹄草叶片中内源激素 IAA 含量没有含量变化。

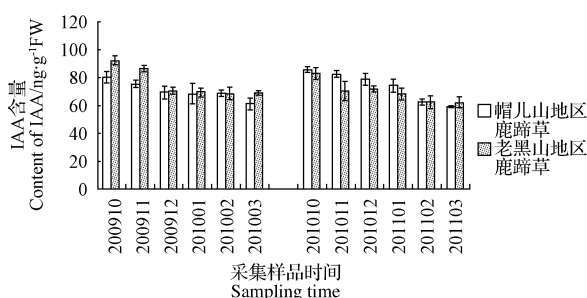


图3 2个样地不同采集时期蹄草叶片 IAA 含量的变化

Fig. 3 The changes of IAA content in leaves of *Pyrola* at different collecting periods from two plots

在 2 个越冬期,无论是相同地区的鹿蹄草叶片的 IAA 含量,还是同年度的鹿蹄草叶片其 IAA 含量均未呈现较为明显的变化,只是随着越冬期的推进而略有降低。

## 2.3 2 个样地不同采集时期鹿蹄草赤霉素(GA)含量的变化

GA 是最早被认为与抗寒性有关的植物激素。一般认为抗寒性强的植物 GA 含量低于抗寒性弱的植物<sup>[2]</sup>。GA 是一类能显著促进生长的植物激素,被认为与抗寒性有关,但其作用没有 ABA 显著。多数研究结果认为植物体内 GA 含量高的抗寒性较弱<sup>[3]</sup>。

由图 4 可知,在 2009~2010 年度,帽儿山地区和老黑山地区的鹿蹄草叶片 GA 含量与 ABA 含量变化趋势有很大相同,呈现一直下降的趋势。帽儿山地区的鹿蹄草叶片由 10 月份最高含量 513 ng/gFW 一直下降到翌年 3 月份的 354 ng/gFW,下降了 31%,下降幅度最大的月份是由 10 月到 11 月,GA 含量下降了 14%,其余月份均下降幅度较小。老黑山地区鹿蹄草叶片 GA 含量由 10 月份最高量 494 ng/gFW 降到翌年 3 月份的 332 ng/gFW,下降了 33%。并且各月份下降幅度较为平均,在 5%~9%之间;在 2010~2011 年度,帽儿山地区鹿蹄草 GA 含量由 2010 年 10 月份最高值 479 ng/gFW 降低到翌年 3 月份最低值 297 ng/gFW,下降了 40%。下降幅度最大在 10 月到 11 月期间,GA 含量下降了 22%。其它各月期间下降幅度较小,且下降幅度较为平均。老黑山地区的鹿蹄草叶片 GA 含量由 10 月份最高值 540 ng/gFW 降至翌年 3 月份的最低值 341 ng/gFW,下降了 36.8%。下降幅度最大是在 1~2 月和 2~3 月间,下降幅度均为 11%。

在 2009~2010 和 2010~2011 年度的 2 个越冬期间,从相同地区的鹿蹄草叶片的 GA 含量来看,其变化趋势基本一致,均处于一直下降趋势。只是在个别月份下降幅度有所不同,但整体差异不大。

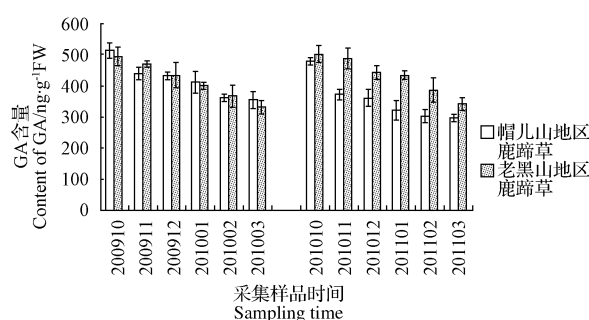


图4 2个样地不同采集时期蹄草叶片 GA 含量的变化

Fig. 4 The changes of GA content in leaves of *Pyrola* at different collecting periods from two plots

## 2.4 2 个样地不同采集时期鹿蹄草 ABA/GA 比值的变化

很多研究表明,对植物抗寒性起作用的并非某一类激素,更有可能是不同激素起着协同作用,Waldman 等<sup>[4]</sup>认为 ABA/GA 值增加与植物抗寒性增强密切相

关,较高的 ABA 水平和较低的 GA 水平以及较高的 ABA/GA 值是植物抗寒性增强的内在原因。由图 5 可知,无论是相同年份不同地区的鹿蹄草叶片 ABA/GA,还是不同年份相同地区的鹿蹄草叶片 ABA/GA,均呈不

断上升的趋势,且最大值均出现在 11~12 月份,一直到翌年 2 月比值才略有下降。这种幅度变化相对于气温的大幅度变化有些滞后。

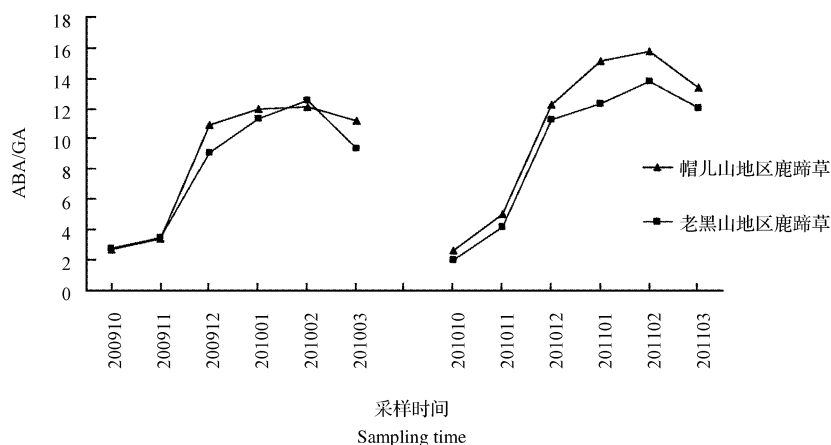


图 5 2 个样地不同采集时期蹄草叶片 ABA/GA 含量变化

Fig. 5 The changes of ABA/GA content in leaves of *Pyrola* at different collecting periods from two plots

### 3 结论与讨论

该研究结果表明,在自然越冬过程中,鹿蹄草叶片中的 ABA 呈现先上升后下降的变化趋势,最高值出现在 12 月或 1 月。IAA 呈现小幅度下降趋势,整体变化趋势并不明显,因此与鹿蹄草抗寒无显著相关性。GA 则一直呈现均匀的梯度下降趋势。ABA/GA 在降温过程中呈不断上升的趋势,这与多数前人的研究结论相一致,当 ABA/GA 比值越大,其抗寒力越强。

植物激素在植物体内作为执行细胞通讯的化学信息在代谢、生长、形态建成等植物生理活动的各个方面均起着十分重要的作用。随着秋季气温的降低,植物生长活力下降,其内源激素发生明显变化,主要表现为 ABA 大量增多,IAA 和 GA 减少。一般认为抗寒性强的品种 ABA 含量高于抗寒性弱的品种。一般在干旱、盐渍、冷、热条件下都诱导植物 ABA 的合成。有关 ABA 与植物抗寒性关系的研究已有较多报道<sup>[5-9]</sup>。在该研究中,帽儿山地区和老黑山地区的鹿蹄草的叶片 ABA 含量均随着越冬期时间的积累而不断增高。但 2 个地区并没有在由 10 月份进入 11 月份温度迅速降低的过程而明显提高,而是在每年的 12 月份至翌年 1 月份出现最高峰,这可能是在鹿蹄草体内 ABA 激素对低温的感应具有滞后性。

自然降温过程中,鹿蹄草的 ABA 含量大致呈现出先升高后降低的变化规律,与鹿蹄草的抗寒性呈正相关。ABA 在越冬期影响鹿蹄草的生理生化变化主要原因可能是 ABA 影响膜的透性和 SOD、POD 酶的活性,同时还可以影响气孔关闭,从而调节水分,最后 ABA 可以

启动抗寒基因表达。

IAA 是最早用来控制植物抗寒性的植物生长调节剂,现在人们认为生长素代谢也是植物抗寒性调控系统的一部分。许多证据表明外源生长素是降低植物抗寒性的因素<sup>[19]</sup>,但内源生长素与抗寒性关系的研究很少。该试验发现鹿蹄草叶片的 IAA 含量随气温的下降而略呈现下降趋势,并且下降幅度并不明显。其主要原因可能是鹿蹄草在整体越冬过程中处于较低的温度环境,其生长缓慢或代谢基本处于停止状态,还有报道认为 POD 对 IAA 有一定降解作用。但整体来说,IAA 含量变化不大,可认为 IAA 与鹿蹄草在冬季抗寒无显著关系。

### 参考文献

- [1] 罗正荣. 植物激素与抗寒力的关系[J]. 植物生理学通讯, 1989(3): 1-5.
- [2] 罗文谦, 王浩东, 刘存海. 对鹿蹄草化学成分的研究[J]. 安康师专学报, 2002, 14(1): 56.
- [3] 徐文方, 李孝常, 董杰德, 等. 鹿蹄草素的体内外药效学研究[J]. 山东医科大学学报, 1996, 34(3): 252-254.
- [4] Waldman M, Binin A, Dovrat A, et al. Hormonal regulation of morphogenesis and cold-resistance[J]. J Exp Bot, 1975, 26(2): 175-183.
- [5] 段泾云, 肩文瑰. 鹿蹄草的抗炎作用[J]. 陕西中医, 1992, 13(9): 424-425.
- [6] 周天寒. 鹿衔草的临床应用[J]. 四川中医, 1987(2): 51.
- [7] 张涛, 王伽荣, 李增莉, 等. 鹿蹄草制剂治疗椎动脉型颈椎病 65 例临床观察[J]. 中国中医骨伤科杂志, 1989, 5(4): 30.
- [8] 艾启俊, 陈静, 李强. 鹿蹄草用于低盐酱菜保藏的研究[J]. 北京农学院学报, 1996(6): 77-82.
- [9] 艾启俊. 苹果贮藏中鹿蹄草浸提物抗真菌研究初探[J]. 西北园艺(果树), 2003(6): 9-11.