

贺安娜,伍贤进,李胜华,等. 虎耳草春叶和秋叶光合特性及有效成分含量比较[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):224-227.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.066

虎耳草春叶和秋叶光合特性及有效成分含量比较

贺安娜^{1,2}, 伍贤进^{1,2}, 李胜华^{1,2}, 杨 曦¹

(1. 怀化学院生命科学系, 湖南怀化 418008;

2. 民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室/湘西药用植物与民族植物学湖南省高校重点实验室, 湖南怀化 418008)

摘要:以虎耳草的春叶和秋叶为材料,比较两者光合作用与有效成分含量差异,为虎耳草采收利用提供依据。结果表明:春叶和秋叶的净光合速率及蒸腾速率日变量均呈双峰曲线,上午 10:00 达最高,13:00 出现“午休”,光合速率的降低受非气孔因子限制;春叶与秋叶光诱导的时间一致;高温对叶片净光合速率影响很大,秋叶在 30℃ 以上净光合速率降低更明显;秋叶的 F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 q_p 、 Φ_{PSII} 和 ETR 值都比春叶的显著或极显著升高, q_n 值显著降低。秋叶具有更强的光合能力,但秋叶岩白菜素和没食子酸含量极显著低于春叶。

关键词:虎耳草;叶龄;光合特性;有效成分

中图分类号: Q945.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0224-04

虎耳草为虎耳草科多年生草本植物,生于林缘、岩坡石隙,广泛分布于我国各地^[1],全草入药,可消炎、解毒,民间常用于治疗中耳炎等病症。由于株叶优美,叶似虎耳,现多作为绿化植物栽培。虎耳草中岩白菜素含量很高,该类成分已被《中国药典》收录,具有止咳、抗炎的功效^[2],近几年研究发现,虎耳草中所含的没食子酸有抑制前列腺癌的作用^[3],有关虎耳草有效成分及药理药效的研究逐步增多^[4-6]。

光合作用是植物的重要生理活动,它对环境的变化很敏感,单一环境因子及多因子综合作用对光合作用的影响,以及逆境条件下光合作用的变化已有大量的研究报道^[7-8],以往的研究也发现同种植物不同叶龄的光合速率存在较大差异^[9]。虎耳草属典型的阴生植物^[10],经过炎热强光的夏季,植株发生了很大变化。作者所在课题组在之前的研究发现,虎耳草在春季光合速率最高,有效成分含量则在冬季最高^[11],但相关性研究表明,虎耳草中岩白菜素和没食子酸含量在室温和强光下积累较多,光合速率与有效成分含量呈显著正相关^[12]。有研究表明,植物不同叶龄的有效成分含量存在较大差异^[13],基于以往研究,初步判断造成这种差异的原因是虎耳草叶龄的差异。本研究通过对虎耳草春叶和秋叶的光合特性及有效成分含量进行比较,旨在了解虎耳草光合作用及有效成分积累的特点,为虎耳草的采收和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

岩白菜素对照品和没食子酸对照品(中国药品生物制品鉴定所),经检查纯度为 98% 以上。甲醇为色谱纯,水为纯净

水,其余试剂为分析纯。

供试材料虎耳草为怀化学院生物园内栽培种,2012 年及 2013 年 3 月选长势良好的植株进行盆栽,每盆种植 3 株,共 15 盆。栽培用的塑料盆上口口径为 22 cm,底部直径 15 cm,高 20 cm。置于湖南怀化学院生物园阴棚内(前期试验证明覆盖 1 层遮阳网是最适光照^[14]),喷头常规洒水。分别于 2012 年、2013 年 4 月和 9 月对新长出的叶片进行挂牌标记。

1.2 气体交换日变化测定

2012 年、2013 年 10 月下旬选择风和日丽的天气,从 08:30 至 17:30 每隔 1.5 h 1 次,用 Li-6400 光合仪(美国 LI-COR 公司)进行测定,不同叶龄每个时间点测 10 张叶,取平均值。每个材料测定在 15 min 内完成。记录净光合速率(P_n)、蒸腾速率(T_r)、气孔导度(G_s)、胞间 CO_2 浓度(C_i)、气温(T_a)等。

1.3 光诱导时间测定

虎耳草叶片用锡箔纸包裹好,暗适应 1 晚,第 2 天上午 09:00 在室外测定,均采用室外生态因子。光诱导量子密度设为 500 $\mu mol/(m^2 \cdot s)$,由仪器配备的红蓝光源(6400-02B LED 光源)产生,每隔 5 min 计数 1 次,35 min 后停止计数。

1.4 净光合速率对不同温度的响应测定

选择晴朗的天气,上午 09:00 进行温度响应曲线测定,量子密度设置为 500 $\mu mol/(m^2 \cdot s)$,由仪器配备的红蓝光源(6400-02B LED 光源)产生,叶面温度设置为 10、15、20、25、30、35℃,由仪器自动控制。

1.5 叶绿素荧光参数的测定

用锡箔纸包裹好叶片,使叶片经 30 min 暗适应,测定原初荧光(F_o)及暗中最大荧光(F_m)。叶片经自然光照[量子密度约 500 $\mu mol/(m^2 \cdot s)$]诱导活化 30 min 后,测得稳态荧光产量(F_s)及光下最大荧光(F_m),在关闭活化光的瞬间,加上数秒远红外光,测定光下的最小荧光(F_o)。

1.6 岩白菜素和没食子酸含量测定

1.6.1 样品准备 2012 年、2013 年 10 月下旬采集虎耳草春

收稿日期:2014-12-19

基金项目:湖南省教育厅一般项目(编号:13C728);植物学湖南省重点实验室学科项目。

作者简介:贺安娜(1981—),女,湖南邵阳人,硕士,副教授,主要从事药用植物发育生物学研究。E-mail:anna99102@163.com。

叶及秋叶样品干燥至恒质量,粉碎并通过 120 目筛过滤。精确称取 1.0 g 虎耳草粉末,甲醇提取,料液比为 1 g : 25 mL,装入 50 mL 锥形瓶中,超声波提取 35 min,重复提取 1 次。所得滤液用旋转蒸发仪浓缩至约 5 mL,用甲醇定容至 25 mL 的容量瓶中。最后经 0.22 μm 针孔滤膜过滤,取 1 mL 于 EP 管中。

1.6.2 色谱条件 使用 LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津)进行测定,色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈(150 mm × 4.6 mm,5 μm)。流动相:甲醇-0.1% 磷酸溶液(73 : 29);流速:1.02 mL/min;检测波长 272 nm;柱温 25 ℃;进样量 20 μL。

1.6.3 标准曲线制备及回收率试验 准确称取岩白菜素标准品 20 mg 和没食子酸标准品 20 mg,以甲醇溶解制成浓度为 1.00 mg/mL 的溶液,再使用移液枪将其浓度分别稀释为 0.100 0、0.080 0、0.060 0、0.040 0、0.020 0 mg/mL,经 0.22 μm 针孔滤膜过滤,置于超声波洗净的离心管中。按色谱条件进样测定,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。回收率试验中精密称定已知含量的虎耳草约 0.50 g,分别加入适量的岩白菜素和没食子酸对照品,按供试品的制备的步骤提取。

1.6.4 虎耳草叶中岩白菜素及没食子酸含量的测定 取虎耳草叶片干样 1.0 g,按“1.6.3”节的方法准备,进样量 20 μL。按外标法以峰面积积分值计算岩白菜素和没食子酸的含量。

1.7 数据分析

所测定结果取平均值和标准误,利用 SPSS 及 Excel 统计

软件进行分析与绘图。春叶和秋叶的生理生态差异采用 *t* 测验进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 虎耳草春叶与秋叶的气体交换日变量

自然条件下,供试材料的净光合速率和蒸腾速率呈双峰曲线(图 1),上午 10:00 达最高,13:00 出现“午休”,下午 14:30 稍有回升,但仍低于上午。一天当中,春叶的净光合速率和蒸腾速率均略低于秋叶,春叶和秋叶日平均值差异显著(表 1),其中净光合速率值差异极显著。

气孔导度和胞间二氧化碳浓度则在上午 08:30 最高,随着时间的推移越来越低,在中午 13:00—14:30 降至最低点,午后又有所回升。春叶的气孔导度除了 14:30 外,都要低于秋叶。而一天中春叶的胞间二氧化碳浓度值除 14:30 外都略高于秋叶。秋叶的水分利用率、气孔导度日平均值都极显著高于春叶,春叶和秋叶胞间二氧化碳浓度差异不显著。

判断叶片光合速率降低的主要原因是气孔限制还是非气孔限制,一般只根据胞间二氧化碳浓度的变化方向便可作出正确判断,胞间二氧化碳浓度降低表明气孔导度降低是主要因素。10:00—13:00,虎耳草叶片气孔关闭,引起胞间二氧化碳浓度降低,从而导致净光合速率降低。但早上 08:30,气孔导度和胞间二氧化碳浓度都最高,净光合速率和蒸腾速率并未达最高,下午 14:30 以后净光合速率和蒸腾速率越来越低,气孔导度和胞间二氧化碳浓度却有所升高,说明影响虎耳草叶片光合速率的不尽是气孔因子。

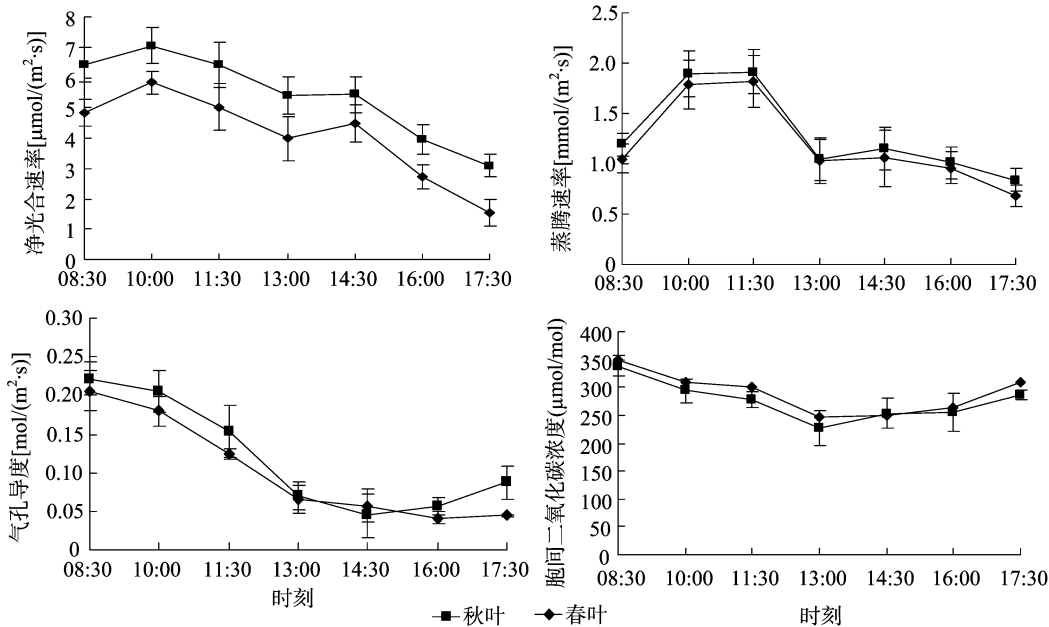


图1 虎耳草春叶和秋叶净光合速率、蒸腾速率、气孔导度、胞间二氧化碳浓度日变化

表 1 虎耳草春叶和秋叶的净光合速率、蒸腾速率、气孔导度、胞间二氧化碳浓度日平均比较 (n = 10)

叶龄	净光合速率 [μmol/(m ² · s)]	蒸腾速率 [mmol/(m ² · s)]	水分利用率 (μmol/mmole)	气孔导度 [mol/(m ² · s)]	胞间二氧化碳浓度 (μmol/mol)
春叶	4.06 ± 1.47	1.20 ± 0.434	3.38 ± 0.847	0.103 ± 0.068	289 ± 37.2
秋叶	5.39 ± 1.43	1.29 ± 0.431	4.18 ± 0.806	0.120 ± 0.073	276 ± 36.0
变化率(%)	24.7 **	6.96 *	20.3 **	14.2 **	4.50

注:“*”表示差异显著(P<0.05);“**”表示差异极显著(P<0.01)。表2、表4同。

2.2 春叶与秋叶光诱导时间的比较

植物光合作用对光的响应不是立即发生的,需要经过一个光诱导过程,不同的植物、同种植物不同的光处理,光合作用诱导期的长短差别很大^[15]。从图 2 可知,虎耳草春叶和秋叶净光合速率在 5 min 时差别不大,随着时间推移两者净光合速率逐步上升,至 25 min 后基本持平,两者光诱导所需的时间一致,秋叶净光合速率高于春叶。

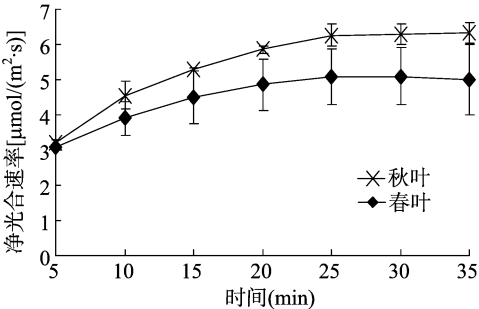


图2 虎耳草春叶和秋叶光诱导时间比较

2.3 春叶与秋叶光合速率对不同温度的响应

在控制光量子密度的条件下[500 μmol/(m²·s)],虎耳草叶片对温度的响应呈单峰曲线,短时的低温对净光合速率影响不大,秋叶整体高于春叶。当温度在 25℃ 左右时净光合速率最高(图 3),秋叶为 6.79 μmol/(m²·s),随着温度进一步升高,净光合速率有下降趋势,高温对秋叶的影响更明显。

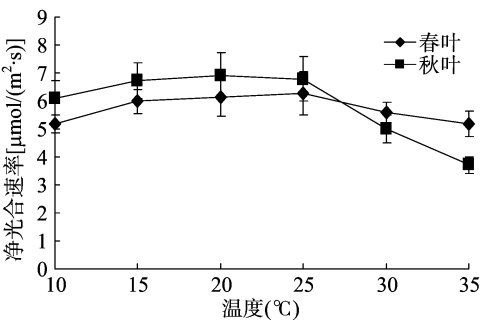


图3 不同温度下虎耳草叶片的净光合速率

2.4 春叶和秋叶叶绿素荧光参数比较

叶绿素荧光参数结果显示,春叶的 F_v/F_m 及 F_v/F_o 值都显著低于秋叶(表 2),其中 F_v/F_o 差异达极显著, F_v/F_o 的差异程度大于 F_v/F_m ,说明春叶的 PS II 传能效率的抑制比对其光能转化效率的抑制更显著。春叶的 q_p 值极显著低于秋叶,说明春叶 PS II 反应中心的开放比例降低, q_N 值与 q_p 值的变化相反,春叶激发能用于非光化学反应的耗散比例增大,这可以保护叶片 PS II 反应中心因吸收过多光能而引起的光氧化伤害。秋叶的 Φ_{PSII} 和 ETR 比春叶极显著升高,秋叶有更高的 PS II 光化学反应效率和更快的电子传递速率,更有利于光合作用。

表 2 虎耳草春叶和秋叶叶绿素荧光参数比较

叶龄	F_v/F_m	F_v/F_o	q_p	q_N	Φ_{PSII}	ETR[$\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]
春叶	0.773 ± 0.012	3.48 ± 0.275	0.292 ± 0.051	0.809 ± 0.011	0.290 ± 0.052	36.1 ± 6.42
秋叶	0.809 ± 0.004	4.65 ± 0.042	0.371 ± 0.032	0.778 ± 0.023	0.459 ± 0.053	58.7 ± 6.37
变化率(%)	4.45	25.2**	21.3**	-3.83	36.8**	38.5**

2.5 春叶和秋叶重要有效成分含量比较

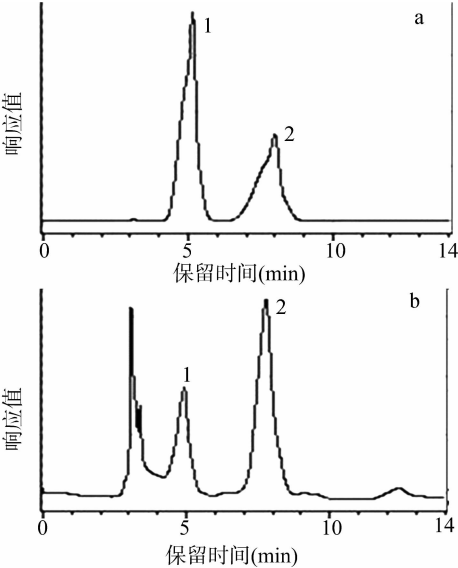
虎耳草中没食子酸和岩白菜素的保留时间分别为 5.15 min 和 7.99 min(图 4),理论板数均不低于 3 000。

岩白菜素和没食子酸的标准曲线结果见表 3,两者的相关系数均达 0.999 以上,回收率也可达 98% 以上。

虎耳草中重要有效成分含量测定发现,虎耳草叶中岩白菜素含量高于没食子酸(表 4),春叶的没食子酸和岩白菜素含量分别为 1.52、4.82 mg/g,均极显著高于秋叶。

3 讨论

植物因素如叶片气孔导度、气孔阻力等是植物长期适应多变的环境和土壤而形成的一类自身调节因素,主要通过环境因子和土壤水分状况而间接影响植物的光合生理变化^[16-19]。从本研究来看,虎耳草叶片的净光合速率和蒸腾速率呈双峰曲线,上午 10:00 达最高,13:00 出现“午休”,10:00 至 13:00 气孔导度也逐步降低,因此这段时间净光合速率主要受气孔因素影响;午后气孔导度有所回升,净光合速率却进一步下降,导致胞间二氧化碳浓度的缓慢升高,此时净光合速率受非气孔因子限制。通过光诱导曲线和温度响应曲线可发现,不同虎耳草叶龄光诱导所需的时间一致,说明不同叶龄对光的敏感程度是一致的;短时的低温对光合速率影响不大,此时光合速率有关的酶活性并没有受太多影响,这是虎耳草适



a—没食子酸及岩白菜素标样色谱; b—样品色谱;
1—没食子酸; 2—岩白菜素

图4 虎耳草 HPLC 图

应低温环境了一种表现;高温对光合速率有负面影响,其中新长出的秋叶受影响更明显。

PS II 是光合机构中对外界环境因子变化最敏感的部位,

表 3 岩白菜素和没食子酸的标准曲线及加样回收率

标准品	标准曲线	相关系数	线性范围 (mg/L)	回收率 (%)
岩白菜素	$y = 50\,000\,000x - 60\,366$	0.999 1	10.00 ~ 100.00	98.89
没食子酸	$y = 100\,000\,000x + 96\,303$	0.999 2	10.00 ~ 100.00	98.91

注：“x”表示含量(mg/L)，“y”表示峰面积。

表 4 虎耳草春叶和秋叶有效成分含量比较 (n=3)

叶龄	没食子酸		岩白菜素	
	含量 (mg/g)	RSD (%)	含量 (mg/g)	RSD (%)
春叶	1.52	2.01	4.82	3.48
秋叶	1.19	1.56	4.01	3.03
变化率 (%)	21.7 **		16.8 **	

以往研究发现,植物经逆境处理后, F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 q_P 、 Φ_{PSII} 都显著降低, q_N 呈上升趋势^[20]。本试验中,虎耳草秋叶的 F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 q_P 、 Φ_{PSII} 和 ETR 值都比春叶显著或极显著升高, q_N 值显著降低,说明秋叶 PS II 反应中心内禀光能转换效率和叶绿素 a/叶绿素 b 蛋白复合体 LHCP 到 PS II 的光能传递能力较高;叶绿体吸收的光能用于有效的光化学转换的比例增加,光合电子传递能力升高,叶绿体吸收的光能用于非光化学反应的耗散比例减少。这些叶片荧光参数的变化,表明了秋叶光合能力较高。

药用植物有效成分含量在不同的季节存在较大差异。苏春花等研究发现,阔叶箬竹冬季总黄酮含量最高,可溶性糖以春季最多^[21],这与次生代谢产物合成的途径不同有关。虎耳草光合速率与有效成分含量呈显著正相关^[12],但本研究发现光合速率高的秋叶,岩白菜素等有效成分含量显著低于光合速率低的春叶,这应该与岩白菜素、没食子酸代谢途径有关,叶龄长有利于此类次生代谢产物的积累。虎耳草春叶有较厚的表皮细胞和叶肉细胞,秋叶栅海比则高^[22],岩白菜素与没食子酸合成积累在叶片中的组织化学定位值得进一步研究。

虎耳草在春季和秋季均有旺盛生长期,夏季的高温 and 强光、冬季的低温可导致虎耳草半休眠。综合上述,种植虎耳草应抓紧春、秋两季的生长期,给予充足的肥水条件,采收则应在夏冬 2 季进行。

参考文献:

[1]中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第 34 卷:第 2 分册[M]. 北京:科学出版社,2005:75.

[2]覃容贵,龙庆德,范菊娣,等. 炮制对虎耳草中岩白菜素及其止咳抗炎作用的影响[J]. 中成药,2013,35(5):1027-1030.

[3]周欣,陈华国,黄志金,等. 虎耳草抗前列腺癌生物活性部位筛选研究[J]. 中国药理学通报,2013,29(6):867-870.

[4]Chen Z, Liu Y M, Yang S, et al. Studies on the chemical constituents and anticancer activity of *Saxifraga stolonifera* (L.) Meeb [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 16(3):1337-1344.

[5]周美,陈华国,先春,等. 虎耳草乙酸乙酯部位高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(7):1026-1029.

[6]周欣,陈华国,黄志金,等. 响应面法优选虎耳草抗前列腺癌活性部位提取工艺[J]. 中草药,2013,44(13):1768-1773.

[7]Ehleringer J R, Ceding T E, Helliker B R C. Photosynthesis atmospheric CO₂ and climate[J]. Oecologia, 1997, 112:285-299.

[8]戴宏芬,邱燕萍,袁沛元,等. 螺旋环剥对幼龄“桂味”荔枝果期光合和蒸腾作用的影响[J]. 园艺学报,2010,37(8):1241-1246.

[9]霍宏,王传宽. 冠层部位和叶龄对红松光合蒸腾特性的影响[J]. 应用生态学报,2007,18(6):1181-1186.

[10]贺安娜,袁雅威,梁云浩,等. 自然强光对阴生植物虎耳草光合特性的影响[J]. 安徽农业科学,2010,38(27):14940-14941.

[11]贺安娜,李胜华,谭晓利,等. 不同季节虎耳草的光合特性、岩白菜素及没食子酸含量比较[J]. 中药材,2013,36(2):202-205.

[12]贺安娜,欧立军,李胜华,等. 虎耳草不同光温条件下光合特性及有效成分含量的相关性分析[J]. 植物研究,2013,33(5):587-592.

[13]钱正强,周金江,杨明挚. 不同年龄香桂叶精油含量及成分差异分析[J]. 云南大学学报:自然科学版,2009,31(增刊):464-467.

[14]贺安娜,林文强,姚奕. 遮荫对虎耳草光合生理特性的影响[J]. 植物研究,2012,32(6):657-661.

[15]张小全,徐德应. 杉木中龄林针叶光合作用对光斑的响应[J]. 植物生态学报,2000,24(5):534-540.

[16]张力思,王洁,艾呈祥,等. 外源 NO 对于干旱胁迫下君迁子幼苗光合作用的影响[J]. 江苏农业学报,2014,30(3):623-628.

[17]云建英,杨甲定,赵哈林. 干旱和高温对植物光合作用的影响机制研究进展[J]. 西北植物学报,2006,26(3):641-648.

[18]冯海萍,曲继松,张丽娟,等. 典型旱作区不同田间持水量对塑料拱棚春茬番茄光合生理特性的影响[J]. 江苏农业学报,2014,30(2):381-387.

[19]于惠琳,史振声,丛玲,等. 干旱胁迫下甜高粱和粒用高粱光合及生理响应比较[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):72-75.

[20]冯强,胡聘,李娜. 典型城区与郊区环境大叶黄杨气体交换及叶绿素荧光特性比较[J]. 生态学报,2009,29(7):3477-3484.

[21]苏春花,刘国华,王福升,等. 箬竹叶片活性成分含量的季节变化[J]. 应用生态学报,2011,22(9):2471-2476.

[22]贺安娜,谭晓利. 虎耳草不同叶龄光合特性及叶片结构比较[J]. 中国农学通报,2011,27(16):122-125.