

# 水分胁迫对黄芩内源激素与有效成分相关性的影响

秦双双<sup>1,2</sup>, 陈顺钦<sup>1</sup>, 黄璐琦<sup>2</sup>, 杨兆春<sup>2</sup>, 袁媛<sup>2\*</sup>, 陈新<sup>1</sup>, 林淑芳<sup>2</sup>

(1. 武汉工业学院, 武汉 430023; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究水分胁迫条件对黄芩内源激素与有效成分积累相关性的影响。方法: 利用 ELISA 法测定黄芩根中内源激素(indole-3-acetic acid, IAA; abscisic acid, ABA; gibberellin, GAs; zeatin riboside, ZR) 的含量; 利用 HPLC 法测定黄芩苷、黄芩素含量。结果: 水分胁迫处理 70 d, 黄芩素含量显著高于对照, ZR 与黄芩素含量呈正相关。水分胁迫条件下, GAs/IAA, GAs/ABA 和 GAs/ZR 比值均呈上升趋势, 与黄芩素含量变化显著相关。结论: GAs 在水分胁迫影响了黄芩有效成份积累的过程中可能发挥了重要的作用。

[关键词] 水分胁迫; 黄芩; 内源激素; 黄芩素

[中图分类号] R282.2 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0099-03

黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 为唇形科黄芩属植物, 黄酮类化合物是黄芩体内重要的有效成分, 主要包括黄芩苷、黄芩素等。在我国北方大部分地区黄芩生长均会遇到不同程度的水分胁迫。水分胁迫可以改变内源激素的水平, 在水分胁迫条件下植物为了生存, 必然会通过各种方式来应对和适应水分胁迫, 植物激素在这一过程中起着非常重要的作用<sup>[1-2]</sup>。内源激素在调控类黄酮的合成代谢中起到重要作用, 如内源激素促进类黄酮合成大多数是通过提高酶活性或促进成熟来完成的<sup>[3]</sup>。研究激素调控植物对环境适应的机制对中药质量的控制具有重要的现实意义。本实验拟在水分胁迫条件下对黄芩内源激素与有效成分含量进行研究, 以了解水分胁迫对黄芩内源激素与有效成分积累的相关性影响, 为合理使用植物生长调节剂生产优质药材提供理论和技术基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及培养条件 采用室内人工气候箱栽培

的方法, 将收集于甘肃陇西的黄芩种子撒播于花盆(800 cm<sup>3</sup>) 混合土中, 土壤烘干后质量为 500 g, 泥炭: 岩沙(2:1), 设置 6 根日光灯(光照强度 100 μm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), 光周期设置为光照 16 h/黑暗 8 h, 温度控制在 25 ℃, 湿度为 60% 左右。在栽培 3 个月后, 从 30 盆盆栽黄芩中筛选大小基本一致的 18 盆, 随机分成 2 组, 每组 9 盆(3 个重复), 每盆黄芩植株为 10 株。每日 14:00 采用称重法控制土壤含水量水分胁迫组(土壤含水量为 12%)、对照组(土壤含水量为 16%)<sup>[4]</sup>。分别在处理后的 30, 50, 70 d 的上午 9:00 统一取样, 每盆混合取黄芩全根, 将样品保存于 -80 ℃ 冰箱中, 用于内源激素及化学成分分析。

**1.2 内源激素的测定** 取黄芩根 0.1 g, 液氮研磨后用 80% 甲醇(含有 0.02% 2,6-二叔丁基对甲酚)提取, 内源 IAA(indole-3-acetic acid), GAs(gibberellin), ZR(zeatin riboside), ABA(abscisic acid) 的测定均采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)<sup>[5]</sup>, 重复测 3 次。激素测定试剂盒由中国农业大学王保民博士提供, 按照 ELISA 说明书, 用酶联免疫检测仪(华东电子管厂生产 DG-3022A 型)进行测定。

**1.3 黄芩苷、黄芩素含量的测定** 取黄芩根组织粉末 0.05 g 精密加入甲醇 1 mL, 超声频率为 40 kHz, 提取 30 min, 离心, 取上清, 重复提取 3 次, 最后定容 10 mL, 取 1 mL, 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。采用李晓明等<sup>[6]</sup> HPLC 法测定样品中黄芩苷、黄芩素含量。色谱柱 Agilent TC-C<sub>18</sub>, (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相乙腈-水-甲酸(23:77:1.0)(A); 乙腈-水-甲

[收稿日期] 2010-02-02

[基金项目] 北京市科技新星项目(2008B82), 国家中医药管理局项目(06-07ZP51), 中国中医科学院自主选题(ZZ2008062)

[第一作者] 秦双双, 硕士研究生, 主要从事药用植物分子生物学研究; Tel: 15810385394; E-mail: qin\_double@126.com

[通讯作者] \* 袁媛, 助研, 主要从事药用植物分子生物学研究; Tel: (010) 64014411-2956; E-mail: yyuan0732@gmail.com

酸(80 20 1.0) (B); 梯度洗脱, 梯度洗脱程序为: 0 ~15 min, 100% (A); 15 ~25 min, 100% ~87% (A); 25 ~40 min, 87% ~52% (A); 40 ~60 min, 52% ~0% (A)。检测波长 280 nm; 分析时间 60 min; 柱温 30 。

**1.4 数据分析** 采用 SPSS, Excel 软件对相关数据进行相关性分析和显著性分析。

## 2 结果与分析

**2.1 黄芩苷含量动态变化** 对照条件下, 黄芩苷含量在第 30 天为  $47.26 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 随着时间呈逐渐上升趋势, 在第 70 天含量最高, 达到  $68.66 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 与第 30 天相比升幅达到 45.28%; 水分胁迫条件下, 黄芩苷含量随时间没有显著变化, 在第 70 天时黄芩苷含量显著低于对照 ( $P < 0.05$ ) 见图 1。

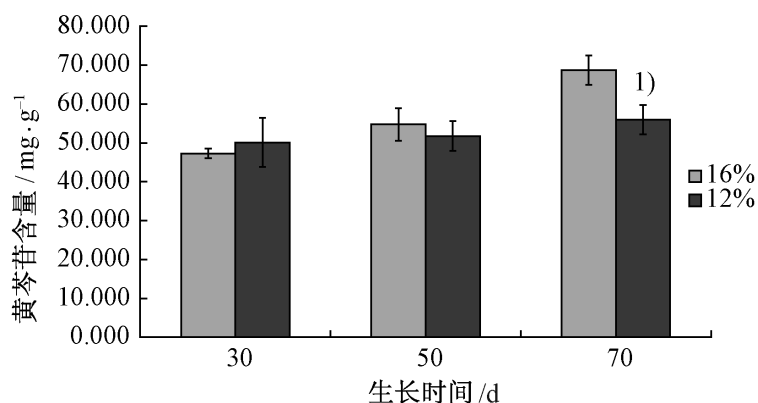


图 1 黄芩中黄芩苷含量的动态变化

相同处理时间土壤含水量 16% 和 12% 比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$  (图 2 同)

**2.2 黄芩素含量动态变化** 对照条件下, 黄芩素含量随着时间为逐渐上升的趋势, 在第 70 天含量最高, 达到  $18.80 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 水分胁迫条件下, 黄芩素含量在第 50 天显著增高, 达到  $23.57 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。在第 30, 50 天时, 胁迫条件下黄芩素含量显著高于对照条件下黄芩素的含量  $P < 0.05$ , 见图 2。

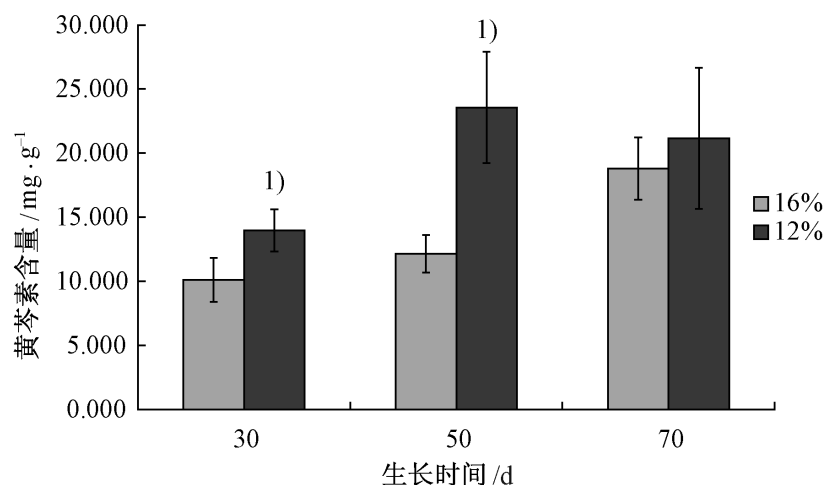


图 2 黄芩中黄芩素含量的动态变化

**2.3 水分胁迫对黄芩内源激素含量的影响** 对照条件下, 黄芩中 GAs 含量随时间变化呈下降趋势, 而在水分胁迫条件下, 黄芩中 IAA 的含量随时间总体呈下降趋势。在 30 d 时, 胁迫条件下 IAA 和 ZR

的含量明显高于对照 ( $P < 0.05$ ), 胁迫条件下 GAs 的含量明显低于对照 ( $P < 0.05$ )。另外, ABA 在胁迫条件下与对照相比波动较大, 见表 1。

表 1 黄芩中内源激素含量的变化 ( $\bar{x} \pm s$ ) ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ , 鲜重)

处理	IAA	GAs	ZR	ABA
16% 30 ds	69.78 ±5.73	30.40 ±1.73	19.82 ±0.27	71.89 ±3.02
50 ds	73.24 ±5.66	29.01 ±1.02	16.77 ±0.40	61.40 ±2.00
70 ds	89.86 ±11.33	25.19 ±0.97	16.51 ±0.49	63.69 ±2.55
12% 30 ds	108.28 ±5.90 <sup>1)</sup>	24.80 ±0.71 <sup>1)</sup>	23.15 ±0.34 <sup>1)</sup>	70.10 ±2.00
50 ds	75.97 ±6.65	28.25 ±1.02	15.16 ±1.25	59.60 ±0.94
70 ds	88.03 ±7.86	26.28 ±2.22	17.69 ±0.16	65.15 ±2.31

注: 相同时间土壤含水量 16% 和 12% 比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$

## 2.4 内源激素与黄芩苷、黄芩素含量的相关性分析

利用 SPSS 软件对内源激素与黄芩苷、黄芩素的相关性 (Pearson Correlation) 进行了分析, 从表 2 中可以看出在含水量 16% 的对照条件下, IAA 与黄芩素含量呈显著正相关, GAs 与黄芩素含量显著负相关, 而在水分胁迫含水量 12% 的条件下 ZR 与黄芩素含量显著负相关, 相关系数见表 2。

表 2 水分胁迫对黄芩内源激素与黄芩苷、黄芩素相关性的影响

处理	16%		12%	
	黄芩苷	黄芩素	黄芩苷	黄芩素
IAA	0.982	0.998 <sup>1)</sup>	-0.409	-0.991
GAs	-0.996	-0.999 <sup>1)</sup>	0.193	0.935
ZR	-0.812	-0.732	-0.466	-0.997 <sup>1)</sup>
ABA	-0.619	-0.515	-0.241	-0.951

注: 与内源激素处理显著相关<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , (表 3 同)。

**2.5 水分胁迫对黄芩内源激素相关性的影响** 利用 SPSS 软件对内源激素的相关性 (Pearson Correlation) 进行了分析, 从表 3 可以看出除 GAs-IAA 在对照和胁迫条件下都是负相关外, 其他激素在对照与胁迫条件之间的相关性都是相反的。并且在胁迫的条件下, 各个激素的相关性较对照都有较大幅度的升高, 其中 ZR-IAA, GAs-ABA 之间的含量显著相关。

表 3 水分胁迫对黄芩内源激素相关性的影响

内源激素	对照	胁迫
ZR-GAs	0.754	-0.958
ZR-IAA	-0.686	0.998 <sup>1)</sup>
ZR-ABA	-0.961	0.971
GAs-ABA	0.544	-0.999 <sup>1)</sup>
GAs-IAA	-0.995	-0.974
IAA-ABA	-0.459	0.984

**2.6 内源激素平衡与黄芩苷、黄芩素含量的相关性分析** 为进一步阐明内源激素平衡与黄芩苷、黄芩素含量之间的关系,我们利用 SPSS 软件对内源激素平衡与黄芩苷、黄芩素含量间做了相关性分析。在对照下, IAA/GAs ( $r=0.983$ ), IAA/ZR ( $r=0.995$ ), IAA/ABA ( $r=0.984$ ) 间的激素平衡比值变化与黄芩苷含量变化显著相关。在胁迫条件下, GAs/IAA ( $r=0.956$ ), GAs/ZR ( $r=0.968$ ), GAs/ABA ( $r=0.928$ ), ZR/ABA ( $r=-1.000$ ), IAA/ABA ( $r=-0.999$ ) 间的激素平衡比值变化与黄芩素含量变化显著相关。

### 3 讨论

研究表明,在对照条件下,随着 IAA 含量的升高,黄芩素含量也随之升高,两者的变化曲线呈显著相关 ( $r=0.998$ )。查尔酮合成酶 (CHS) 是类黄酮的生物合成过程中最关键的酶,且 CHS 受高含量的 IAA 刺激<sup>[7]</sup>。基因活化学说认为,生长素能在转录和翻译水平上促进核酸和蛋白质的合成,本研究结果提示 IAA 可能促进与黄芩素积累有关的功能基因或者是催化黄芩素生物合成酶基因的转录。

本研究表明,在水分胁迫条件下,随着 GAs 含量的升高,黄芩素含量也随之升高。水分胁迫条件下, GAs/IAA, GAs/ABA 和 GAs/ZR 比值均呈上升趋势,说明黄芩在水分胁迫下 GAs 发挥了重要作用。

本研究结果显示对照条件下, IAA/GAs ( $r=0.983$ ), IAA/ZR ( $r=0.995$ ), IAA/ABA ( $r=0.984$ ), GAs/IAA ( $r=-0.994$ ), ZR/IAA ( $r=-0.974$ ) 间的激素平衡比值变化与黄芩苷含量变化显著相关,即相对较高的 IAA 含量和相对较低的 GAs 和 ZR 含量有利于黄芩苷的积累。在水分胁迫条件下, GAs/IAA ( $r=0.956$ ), GAs/ZR ( $r=0.968$ ), GAs/ABA ( $r=0.928$ ), ZR/ABA ( $r=-1.000$ ), IAA/ABA ( $r=-0.999$ ) 间的激素平衡比值变化与黄芩素含量变化显

著相关,即相对较高的 GAs 含量有利于黄芩素的积累。

综上,黄芩是一种常用中药材,不同产地的黄芩其有效成分差异较大,水分胁迫是其中非常重要的影响因素之一。本研究表明,水分胁迫条件下,黄芩有效成分的积累受到多种内源激素含量变化的调节,其中对 GAs、IAA 含量的变化最为显著,这些内源激素相互影响可以促进黄芩素的积累。这为研究通过内源激素间的协同作用进行黄芩质量控制及生产优质药材提供理论依据。

### [参考文献]

- [1] 刁枷连,何钟佩,于连华,等. 生命科学研究进展 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1996: 219.
- [2] Van Rooijen G J H, R W Wilen, L A Holbrook, et al. In: Karssen C M (eds), Progress at Plant Growth Regulation [M]. Netherlands, 1992: 354.
- [3] Max C S. External control of anthocyanin formation in apple [J]. Scientia Horticulturae, 1990, 42: 181.
- [4] Theodore C. Hsiao. Plant Responses to Water Stress [J]. Plant Physiol, 1973, 24: 519.
- [5] Wu S R, Chen W S, Zhou X. The Determination Method of Enzyme-linked Immunosorbent Assays Application on the Endogenous Hormone Content [J]. Plant Physiol Comm, 1988, 5: 53.
- [6] 李晓明, 罗毓健, 袁媛, 等. 高效液相色谱法测定黄芩愈伤组织中黄芩苷、黄芩素含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(8): 1.
- [7] Carolyn E L, Jane E L, John R L. Developmental changes in enzymes of flavonoid biosynthesis in the skins of red and green apple cultivators [J]. Sei Food Agric, 1996, 71: 313.

[责任编辑 顾雪竹]