

· 中药农业 ·

蛇足石杉不同天然居群的土壤酶活性研究[△]王德立^{1*}, 齐耀东²

1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所 海南分所, 海南 海口 570311;

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

[摘要] 目的: 了解可能促进蛇足石杉孢子萌发及植株生长的土壤酶种类及其活性情况。方法: 分别采集重庆黄水镇蛇足石杉分布区中5年、10年、15年生柳杉林地土壤, 海南霸王岭东五样地和东二样地土壤。采用酶联免疫法测定土壤中蛋白酶、过氧化氢酶、多酚氧化酶、脲酶、蔗糖酶、纤维素酶和磷酸酶7种酶活性。结果: 重庆15年林地、海南东五等有蛇足石杉分布的样地中重庆15年林地样地的蛋白酶、过氧化氢酶及多酚氧化酶活性较高, 而海南样地脲酶、蔗糖酶活性较高; 重庆15年林地土壤蛋白酶、过氧化氢酶及磷酸酶活性高于5年和10年林地, 而多酚氧化酶、脲酶、蔗糖酶活性低于二者; 5年林地土壤纤维素酶活性较高; 海南东五样地土壤蛋白酶、蔗糖酶、纤维素酶及磷酸酶活性低于东二样地, 两样地在过氧化氢酶、多酚氧化酶及脲酶活性方面差异不显著。结论: 蛋白酶、过氧化氢酶和多酚氧化酶可能有利于蛇足石杉孢子萌发; 较高的脲酶、蔗糖酶、纤维素酶和磷酸酶活性可能更有利于蛇足石杉植株生长。

[关键词] 蛇足石杉; 土壤酶; 孢子萌发; 天然居群; 样地

[中图分类号] R282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)10-1407-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190227006

Studies on Enzymes of Soil from Different Natural Populations of *Huperzia serrata*WANG De-li^{1*}, QI Yao-dong²

1. Hainan-branch Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Haikou 570311, China;

2. Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China

[Abstract] **Objective:** To find the soil enzymes which promote spores germination and growth of *Huperzia serrata*. **Methods:** The soil was collected from the following 6 plots: 5 years old, 10 years old and 15 years old Cryptomeria woods in Huangshui town, Chongqing province; the plots of Donger and Dongwu in Ba Wangling Natural reserve, Hainan province. The level of seven soil enzymes activity was detected by ELISA, and those were protease, catalase, polyphenol oxidase enzyme (PPO), urease, invertase, cellulase and phosphatase. **Results:** In natural populations of *H. serrata*, the enzyme activity of soil protease, catalase and PPO from 15 years old woods plot were higher, but the activity of urease and invertase was lower than Hainan Dongwu plot. In three Chongqing plots, the activity of protease, catalase and phosphatase of 15 years old woods plot was higher than that of 5 years and 10 years woods plots, but the activity of PPO, urease and invertase was lower. The cellulase activity of 15 years old woods was higher than that of other two plots. In Hainan plots, the activity of protease, invertase, cellulose and phosphatase of Dongwu was higher than Donger. The activity difference of catalase, PPO and urease was not significant between Dongwu and Donger plots. **Conclusion:** Protease, catalase and PPO maybe accelerated spores of *H. serrata* germination. The plants will grow well in the surrounding with higher activity of urease, invertase, cellulase and phosphatase.

[Keywords] *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trevis; soil enzymes; spore germination; natural population; plot

[△] [基金项目] 中央本级重大增减支项目(2060302); 国家自然科学基金项目(81303159)

* [通信作者] 王德立, 硕士生导师, 研究方向: 药用植物栽培; E-mail: redai101@163.com

蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trevis, 又名千层塔, 隶属石杉科石杉属, 为一种拟蕨类植物, 多年生草本, 高 20 ~ 30 cm, 生长于潮湿、富含腐殖质的林下。在我国主要分布在长江以南各省, 尤以江西、安徽、湖南、重庆等地较多。该植物为我国一种传统中药材, 以茎叶入药, 常用于治疗瘀血肿痛、挫伤等^[1]。现代研究表明, 蛇足石杉植物体含石杉碱甲, 对治疗早发性痴呆效果较好, 且毒副作用最小^[2]。该物种也因此引起全世界人们的关注, 对其原料需求量剧增。但该植物生长较为缓慢, 年生长高度 2 ~ 3 cm^[3], 大量无序采集造成资源储量迅速减少, 野生资源分布范围迅速萎缩, 加上环境不断变化, 尤其是干旱气候影响, 导致部分地区的蛇足石杉储量锐减甚至绝迹。

当前蛇足石杉资源储量远不能满足市场需求, 要解决原料短缺问题最为有效的措施是开展规模化种植, 而目前迅速扩繁技术尚未成熟, 致使规模化生产难以实施。蛇足石杉的主要繁殖方式为孢子繁殖和芽胞繁殖^[4]。尽管由芽胞萌发生长至成熟孢子体的周期较短, 但芽胞数量较少, 不足以实施产业化。孢子繁殖是实施产业化的潜在方式, 成株可每年产生几个至几十个孢子囊, 每个孢子囊内含上万个孢子。但在人工可控环境中如何促进大量孢子快速萌发是当前亟待解决的难题。在野外, 成熟的孢子散落在富含腐殖质、潮湿的土壤中, 于适宜条件下萌发, 经过配子体世代形成孢子体。而在人工控制条件下孢子却难以萌发, 调查发现孢子休眠时间较长, 几年甚至十几年, 但休眠原因及打破休眠的方法尚不清楚。野生环境中可能存在促进孢子萌发的微生物和多种酶类。土壤中的酶类主要有: 过氧化氢酶、多酚氧化酶、腺酶、蛋白酶、磷酸酶、脱氢酶和蔗糖酶等^[5-6], 这些酶是土壤生化过程中重要参与者, 在物质和能量交换过程中起重要作用^[7]。

蛇足石杉适宜生长在多年生林地土壤中, 土壤含有丰富的酶类, 这些酶可能对蛇足石杉的孢子萌发和植株生长起到直接或间接的促进作用。蛇足石杉内生菌以及微生物促进孢子萌发已有研究^[8-9], 目前尚未找到能够促进孢子萌发的关键微生物, 也未见关于土壤酶对蛇足石杉孢子萌发影响的报道。本研究拟通过分析以孢子繁殖为代表的重庆市黄水镇蛇足石杉天然居群及以芽胞繁殖为代表的海南昌江

霸王岭自然保护区蛇足石杉天然居群的土壤酶活性差异, 找出可能促进孢子萌发和植物生长的土壤酶。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 采样位置 土壤材料采集地点为重庆石柱县黄水镇, 海拔 1300 m 左右, 地理坐标: N27°29', E108°39'; 海南省霸王岭自然保护区石峰, 海拔 1300 m 左右, 地理坐标: N18°50', E109°05'。

1.1.2 样地类型及采样方法

1.1.2.1 重庆黄水镇样地(CQ) 该样地蛇足石杉居群主要分布在生长 10 年以上的柳杉林下, 居群大小视柳杉林地面积而定。分别采集生长 5 年、10 年和 15 年的柳杉林内地表 20 cm 的土壤, 其中 10 年和 15 年柳杉林地有蛇足石杉分布, 10 年林地内仅有幼苗和幼株, 15 年林地既有成株又有幼苗和幼株。每个居群采集 6 份土样, 每份土样按 X 取样法采集 5 份土样混合而成。

1.1.2.2 海南霸王岭样地(HN) 该样地包括东五样地和东二样地, 其中东五样地海拔 1300 m 左右, 有蛇足石杉分布, 居群面积约 1200 m², 该居群繁殖方式以芽胞繁殖为主, 80% 的幼苗来自芽胞, 95% 以上的成株均产生芽胞; 东二样地无蛇足石杉部分, 海拔 800 m 左右。两样地均采用 S 取样法在该居群中采集距地表 20 cm 左右的土壤。每个样地、每种林地类型分别采集土样 6 份。

1.2 测定方法

采用酶联免疫法测定蛋白酶(活性单位为 U·L⁻¹)、过氧化氢酶(活性单位为 IU·L⁻¹)、多酚氧化酶(活性单位 IU·L⁻¹)、脲酶(活性单位 IU·L⁻¹)、蔗糖酶(活性单位 U·L⁻¹)、磷酸酶(活性单位为 U·L⁻¹)、纤维素酶(活性单位 U·L⁻¹)。

经测定标准溶液, 得出 7 种酶活性的标准曲线方程: 蛋白酶: $Y = 25.1134X + 0.1783 (r = 0.9984)$; 过氧化氢酶: $Y = 69.787X + 3.4549 (r = 0.9983)$; 多酚氧化酶: $Y = 207.2347X + 8.8582 (r = 0.9983)$; 脲酶: $Y = 503.9279X + 8.2345 (r = 0.9983)$; 蔗糖酶: $Y = 425.5288X + 15.0660 (r = 0.9987)$; 磷酸酶: $Y = 413.7709X + 1.3758 (r = 0.9985)$; 纤维素酶:

$Y = 82.5285X + 2.24 (r = 0.9987)$ 。

1.3 数据处理

数据用 SPSS17.0 进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 两个蛇足石杉居群的土壤酶活性比较

土壤酶活性比较见表 1。蛋白酶活性、过氧化氢酶活性和多酚氧化酶活性：重庆 15 年林地 > 海南东五样地；脲酶活性和蔗糖酶活性：重庆 15 年林地 < 海南东五样地；纤维素酶活性、磷酸酶活性：两样地无显著性差异。

酶类型	样地土壤酶活性	
	CQ(15 年林地)	HN(东五)
蛋白酶	61.31 ± 3.49 a	34.87 ± 5.49 b
过氧化氢酶	142.25 ± 17.55 a	119.51 ± 10.92 b
多酚氧化酶	361.37 ± 57.44 a	195.41 ± 33.62 b
脲酶	802.91 ± 145.2 b	1 249.72 ± 141.89 a
蔗糖酶	588.09 ± 119.04 b	711.5 ± 34.46 a
纤维素酶	96.76 ± 24.73	98.06 ± 18.18
磷酸酶	676.87 ± 43.37	605.5 ± 104.77

注：不同字母表示差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；下同。

2.2 重庆不同株龄林地土壤酶活性比较

重庆黄水镇不同株龄的柳杉林中土壤酶活性比较见表 2。15 年株龄的柳杉林地蛋白酶活性、过氧化氢酶活性及磷酸酶活性较高；5 年和 10 年株龄柳杉林地多酚氧化酶、脲酶、蔗糖酶活性较高；5 年株龄林地活性较低的土壤酶有蛋白酶、过氧化氢酶、磷酸酶。

2.3 海南霸王岭两样地土壤酶活性比较

海南霸王岭样东五样地和东二样地土壤酶活性结果见表 3。东二样地蛋白酶活性、蔗糖酶活性、纤维素酶活性及磷酸酶活性均高于东五样地，而过氧化氢酶、多酚氧化酶、脲酶等酶活性无显著差异。

3 讨论

土壤酶包括胞内酶和胞外酶，主要来源于土壤微生物、植物根系分泌物和动植物残体，是生态系统的物质循环和能量流动等生态过程中最为活跃的生物活性物质^[7,10-11]。土壤酶种类和活性反映了土壤肥力状况，影响根系对养分、水分的吸收，从而影响植物生长发育^[12]。目前尚未实现蛇足石杉规模化种植，仅有小面积栽培，且种苗全部来自于野生，因此原生境对孢子萌发极其重要，原生境中的土壤酶可能对孢子萌发有促进作用，也会影响蛇足石杉生长发育。

表 2 重庆黄水镇不同株龄柳杉林地土壤酶活性($\bar{x} \pm s, n = 6$)			
酶类型	柳杉林地年限土壤酶活性		
	5 年	10 年	15 年
蛋白酶	31.55 ± 4.46 c	42.43 ± 6.47 b	61.31 ± 3.49 a
过氧化氢酶	82 ± 16.00 b	130.97 ± 13.32 a	142.25 ± 17.55 a
多酚氧化酶	338.58 ± 33.11 b	437.01 ± 60.47 a	361.37 ± 57.44 b
脲酶	1 077.97 ± 125.53 a	1 241.74 ± 165.51 a	802.91 ± 145.20 b
蔗糖酶	811.14 ± 97.59 a	713.98 ± 25.69 a	588.09 ± 119.04 b
纤维素酶	157.07 ± 19.78 a	115 ± 14.94 b	96.76 ± 24.73 b
磷酸酶	561.71 ± 69.35 b	596.19 ± 101.54 ab	676.87 ± 43.37 a

注：不同字母表示差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表3 海南霸王岭东五样地和东二样地
土壤酶活性($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

酶类型	样地土壤酶活性	
	东五	东二
蛋白酶	34.87 $\pm$ 5.5 b	60.38 $\pm$ 4.18 a
过氧化氢酶	119.51 $\pm$ 10.92	105.09 $\pm$ 14.16
多酚氧化酶	195.41 $\pm$ 33.62	424.75 $\pm$ 41.11
脲酶	1 249.72 $\pm$ 141.89	1 212.77 $\pm$ 142.15
蔗糖酶	711.5 $\pm$ 34.46 b	1 068.94 $\pm$ 121.29 a
纤维素酶	98.06 $\pm$ 18.18 b	193.18 $\pm$ 6.17 a
磷酸酶	605.5 $\pm$ 104.77 b	899.97 $\pm$ 72.67 a

重庆黄水镇15年柳杉林样地和海南霸王岭样地均有蛇足石杉成株和大量幼苗,前者以孢子幼苗为主,后者以芽孢幼苗^[4](芽孢为蛇足石杉无性繁殖体,从母株脱落后直接萌发成幼苗)为主。这表明重庆15年林地环境更适宜孢子繁育与植株生长。从两个样地的土壤酶活性来看(表1),蛋白酶活性、过氧化氢酶活性和多酚氧化酶活性:重庆15年林地样地>海南东五样地,这表明这3种酶可能更有利于孢子萌发和植株生长。其中蛋白酶可促进孢子壁的溶解和相关蛋白质的转化,以打破孢子休眠,促进孢子萌发;过氧化氢酶可有效保护孢子内原生质体中的多种物质,避免被氧化而失去活性;多酚氧化酶活性可有效避免在孢子萌发过程中受到病菌或其他有害物质的侵害,因此较高的多酚氧化酶活性更有利于孢子萌发。而海南东五样地由于土壤蛋白酶、过氧化氢酶和多酚氧化酶活性偏低,可能缺少孢子萌发的必要条件,因此孢子幼苗极少,而芽孢幼苗较多。脲酶、蔗糖酶、磷酸酶均分解土壤中的营养物质,其活力大小均反应了土壤肥力水平,这些酶活力高低直接影响植物长势。这3种酶活性:海南东五显著高于重庆15年林地样地,这也进一步验证了海南蛇足石杉生长速率高于重庆样地的现象^[3]。两样地的纤维素酶活性差异不显著,这可能与两样地均为多年生次生林,地表均积累了丰富的枯枝、落叶有关。

由表2知重庆样地不同生长年限的柳杉林土壤酶活性差异明显。蛋白酶活性:15年>10年>5年,这说明随着乔木生长年限增加,蛋白酶活性不断增强,而5年林地没有蛇足石杉分布,10年林地偶尔有分布,15年林地有大量分布,由此推测蛋白酶可能影响蛇足石杉孢子萌发。过氧化氢酶活性:15年=

10年>5年,即10年之后林地土壤过氧化氢酶活性变化不大,该酶也可能对孢子萌发起促进作用。多酚氧化酶在不同年限林地间无规律的变化趋势,而脲酶、蔗糖酶的纤维素酶的活性5年株龄林地最高,15年株龄林地较低,这说明林地早期阶段为待分解的营养较多,也是物质快速转化阶段。磷酸酶活性随着林地年限的增加呈增强趋势,这表明土壤中可被直接吸收的磷元素减少,磷酸酶活性增加可将土壤中难溶性磷转化为可溶性磷,为植物提供可直接吸收的磷元素。

海南蛇足石杉居群的主要繁殖方式为芽孢繁殖,该繁殖方式与孢子繁殖不同,不需要经过孢子萌发形成配子体即没有配子体世代。该样地有蛇足石杉分布的居群土壤蛋白酶、蔗糖酶、纤维素酶和磷酸酶均低于无蛇足石杉分布的居群,过氧化氢酶、多酚氧化酶及脲酶差异无统计学意义(表3)。这种差异可能源自环境温度不同,有蛇足石杉的样地海拔1300 m左右,而无蛇足石杉的样地海拔800 m左右。由此可以看出温度对蛇足石杉的芽孢萌发和植株生长影响较大,虽然养分条件较好,但较高的温度也不适宜蛇足石杉生长,这与蛇足石杉喜温凉、耐严寒、怕高温的生物学特性有关。

由此推测,蛇足石杉孢子萌发及植株生长可能与多种土壤酶活性息息相关。蛋白酶、过氧化氢酶、多酚氧化酶可能对孢子萌发有重要影响,脲酶、蔗糖酶、纤维素酶和磷酸酶可能和植株生长有关。因此在孢子培养过程中可适当加入相应的酶以促进孢子萌发和幼苗生长。

参考文献

- [1] 福建省中医药研究院. 福建药物志(修订本)[M]. 福州: 福建科学技术出版社. 1994:26-27.
- [2] MA X Q, TAN C, ZHU D, et al. Huperzine A from *Huperzia* species-an ethnopharmacological review[J]. J Ethnopharmacol, 2007, 113(1):15-34.
- [3] 齐耀东, 王德立. 蛇足石杉的种群结构和致危因素[J]. 中国现代中药, 2017, 19(1):96-102.
- [4] WANG D L, QI Y D, FENG J D, et al. An efficient regeneration pattern via Gemmae for *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev. in Hainan Province, China[J]. AM FERN J, 2011, 101(3):182-192.
- [5] 杨万勤, 王开运. 森林土壤酶的研究进展[J]. 林业科学, 2004, 40(2):152-159.

(下转第1414页)

3 讨论

3.1 流动相选择

在选择流动相过程中,因为桑椹中化合物的极性范围分布较广,且化合物种类繁多,在色谱分离时不易得到理想的峰形,参考相关文献^[6],考察了0.1%甲酸水-乙腈、0.1%甲酸水-0.1%甲酸乙腈、0.1%磷酸水-乙腈、0.1%磷酸水-甲醇、0.1%磷酸水-甲醇乙腈(1:1:1)和0.2%甲酸水-乙腈等流动相组成,发现水相为磷酸水的效果要优于甲酸水,峰形较好,且分离度良好,同时整体的色谱分离检测时间稍短。有机相乙腈的效果好于甲醇-乙腈(1:1)、甲醇,其中加了甲酸的乙腈的色谱图基线较不加甲酸的更加平稳,但无明显影响,因此选择了0.2%甲酸水-乙腈为流动相。

3.2 提取条件的选择

采用饮片粉碎后用超声波提取,该方法具有简便、安全、有效等特点。在单因素提取条件下,以提取效果为指标,提取时间结果为:40 min > 20 min > 30 min > 10 min;溶剂浓度:60% > 80% > 100% > 40%;料液比:1:20 > 1:15 > 1:10 > 1:5。运用正交优化试验法,选取甲醇浓度、提取时间、料液比3个因素,每个因素为3水平,以桑椹中新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷和槲皮素7种成分的总含量为指标,选用 $L_9(3^4)$ 正交设计,对桑椹中7种成分最佳超声提取条件的优化,发现甲醇浓度是最关键的影响因素,其次为料液比

和提取时间;确定最佳提取条件为0.50 g桑椹粉末采用10 mL 80%甲醇溶液超声提取40 min。

4 结论

本研究建立了一种稳定、可靠的桑椹中7种黄酮类成分(新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷和槲皮素)含量同时测定的高效液相色谱(HPLC)方法,经方法学验证,符合分析要求,并对不同地区、不同批次的桑椹饮片中7种成分的含量进行测定,结果表明,芦丁为平均含量最高成分,而异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素平均含量较低,国内不同地区所用桑椹饮片质量存在较大差异,需要对其生产产地、加工方法、质量评价指标进行深入研究,确保其临床有效性。

参考文献

- [1] 黄勇,张林,赵卫国,等.桑椹的化学成分及药理作用研究进展[J].广西蚕业,2006,43(3):15-19.
- [2] 耿旦,马雯芳,甄汉深,等.RP-HPLC测定桑椹中芦丁的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(14):63-65.
- [3] 赵金娟,戴雪梅,曲永胜,等.绿原酸药效学研究进展[J].中国野生植物资源,2013,32(4):1-5.
- [4] ARAMWIT P, BANG N, SRICHANA T. The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits [J]. Food Research International, 2010, 43(4):1093-1097.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:300.
- [6] 游元元,万德光,杨文宇,等.桑椹药材 HPLC 图谱研究[J].食品科学,2010,31(2):141-144.

(收稿日期:2019-03-02 编辑:王笑辉)

(上接第1410页)

- [6] 关松荫,张德生,张志明.土壤酶及其研究法[M].北京:农业出版社,1986:1-339.
- [7] 孟立君,吴凤芝.土壤酶研究进展[J].东北农业大学学报,2004,35(5):622-626.
- [8] 闵长莉,汪学军.蛇足石杉产石杉碱甲内生真菌的分离鉴定[J].天然产物研究与开发,2013,25:590-593.
- [9] 马英姿,刘江海,许欢,等.蛇足石杉的离体培养[J].植

物生理学报,2015,51(4):465-470.

- [10] 孟立君,吴凤芝.土壤酶研究进展[J].东北农业大学学报,2004,35(5):622-626.
- [11] HERIBER I. Development in soil microbiology since the mid1960s[J]. Geoderma, 2001, 100(3):389-402.
- [12] 张焱华,吴敏,何鹏,等.土壤酶活性与土壤肥力关系的研究进展[J].安徽农业科学,2007,35(34):11139-11142.

(收稿日期:2019-02-27 编辑:王笑辉)