

PEG6000 对长春花幼苗期的胁迫效应 和生物碱含量的影响

刘 英 张衷华 李德文 赵冬梅

东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

摘要 在温室培养条件下, 研究不同体积分数聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 6000 处理下长春花幼苗期的胁迫效应以及对文多灵、长春质碱和长春碱等生物碱含量的影响。结果表明: 相同体积分数 PEG6000 处理下, 随着胁迫时间的延长, 叶片相对含水量呈先降低后上升的趋势, 脯氨酸含量呈缓升到急升的趋势。综合二因素的差异显著分析, 选择 35% (V/V) PEG6000 模拟干旱胁迫处理长春花, 与对照相比, 干旱胁迫的叶片中的过氧化物酶活性先增强后降低; 文多灵 (vindoline, VIN) 含量先升高后下降, 长春质碱 (catharanthine, CAT) 含量先下降后升高, 而长春碱 (vinblastine, VBL) 含量逐渐升高, 24 h 达到峰值为 $0.168 0 \pm 0.003 6$ mg/g (鲜质量)。

关键词 长春花; PEG6000 胁迫; 生物碱; 过氧化物酶; 文多灵; 长春质碱; 长春碱

中图分类号 Q 945.79; S 567.23⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)05-0040-05

植物为适应环境时其体内代谢会发生变化, 一些次生物质则成为适应这种代谢变化的物质基础, 相应的次生代谢产物缓解了环境的胁迫^[1-2]。研究发现, 在植物耐旱、抗寒和耐盐性的生长过程中, 次生代谢产物发挥了重要作用^[3]。药用植物长春花 (*Catharanthus roseus*) 忌湿、怕涝、喜光、耐盐渍、耐旱和瘠薄土壤^[4], 其体内含吲哚的生物碱是一类重要的次生物质, 目前已从植株的多个部位中分离出 100 多种生物碱, 其中长春碱 (vinblastine, VBL) 经临床验证具有明显的抗癌作用。在盐胁迫下, 长春花吲哚生物碱合成中过氧化物酶 (peroxidase, POD) 等方面的生理和调控机制的研究国外已有报道^[5], 在 NaCl 胁迫下, 促进长春花幼苗体内生物碱的代谢, 提高生物碱含量的研究^[6], 以及增加硝态氮浓度可显著提高叶绿素含量和叶片 SOD、POD 和 CAT 活性等生理方面的研究国内已有报道^[7]。虽然 NaCl 和等水势的聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 6000 都对种子萌发有抑制作用^[8-9], 但 PEG6000 的抑制作用大于 NaCl^[10], 表明非透过性的 PEG 胁迫和盐胁迫有不同的作用机制。因此, 笔者以长春花幼苗的叶片为材料, 通过测定相对含水量和脯氨酸含量的变化, 优化 PEG6000 体积分数模

拟干旱胁迫, 测定 POD 活性, 检测叶片中文多灵 (vindoline, VIN)、长春质碱 (catharanthine, CAT) 和长春碱含量的变化, 为进一步研究吲哚类生物碱在逆境胁迫下的代谢机制奠定基础, 同时为通过改变栽培条件来提高其长春碱含量提供理论指导。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1) 长春花的培养。长春花种子播种于东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室温室中, 自然光照, 待种子萌发后, 选取 30 d 的幼苗移栽到装有 1/2 Hoagland 营养液且上部有孔的塑料小桶中。

2) 长春花的处理。正常培养后, 选取长势一致的幼苗开始处理, 一组作为对照, 另一组分别用体积分数为 15%、20%、25%、30%、35%、40% 的 PEG6000 的 1/2 Hoagland 营养液进行处理 (胁迫水势相当于 -0.15 MPa), 分别胁迫处理 0、3、6、12、24、48 h 后称取各样品鲜叶。每处理最少 3 个重复。

1.2 试验方法

1) 长春花叶片脯氨酸 (Pro) 含量测定。参考文献^[11]茚三酮比色法。选取对照和不同体积分数的 PEG6000 处理下不同时间幼苗的叶片为材料, 用磺

收稿日期: 2012-10-10

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (DL11BA15, DL12BA05) 和国家自然科学基金青年基金项目 (31000133)

刘 英, 博士, 讲师。研究方向: 植物学。E-mail: arrive100@163.com

通讯作者: 李德文, 博士, 讲师。研究方向: 全球变化生态学与植物逆境生理生态学。E-mail: lidewen@126.com

基水杨酸提取叶片中脯氨酸,用甲苯萃取后,缩合物在波长 520 nm 处有一最大吸收峰。根据标准曲线的回归方程计算出 2 mL 测定液中脯氨酸的质量浓度 $X, \mu\text{g/mL}$,然后计算出样品中脯氨酸含量。单位鲜质量样品中的脯氨酸含量 ($\mu\text{g/g}$) 具体计算公式为 $(X \times 5/2)/(m \times 10^6)$; X 为提取液中脯氨酸的质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$), $5/2$ 为查标值, mL; m 为样品鲜质量, g。

2) 长春花叶片相对含水量 (relative water content, RWC) 的测定。参照文献 [12], 选取不同处理幼苗的叶片, 纯净水冲洗 3 次, 吸去水分后称取鲜质量 (m_t), 立即放入蒸馏水浸泡, 每隔 2 h 称质量至质量不再增加即为饱和质量 (m_s), $100 \sim 102 \text{ }^\circ\text{C}$ 杀青 15 min, $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘干 8 h 左右, 称质量至质量不再减少即为干质量 (m_d)。根据公式计算叶片组织的含水量。

$$\text{RWC} = (m_t - m_d) / (m_s - m_d) \times 100\%$$

3) 长春花叶片中过氧化物酶活性测定。采用愈创木酚法, 参照文献 [11] 进行测定。

4) 长春花叶片中生物碱含量测定。长春花幼苗叶片中文多灵、长春质碱和长春碱含量采用 HPLC 方法测定。分别于处理后进行取样, 叶片研磨后用甲醇提取, 以 3 种生物碱标准品 (Sigma, USA) 为对照进行 HPLC 检测。色谱柱为 Diamonsil TM C18 ODS ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$), 流动相为 $V_A : V_B = 64 : 36$, 其中 A 为水与二乙胺以 $V_{\text{水}} : V_{\text{二乙胺}} = 99 : 1$ 的混合物 (磷酸调 pH 值为 7.3), B 为甲醇; 流速, 1.5 mL/min ; 检测波长为 220 nm 。

5) 数据处理。数据采用 Excel 软件进行绘图, SPSS 软件进行方差分析, 运用 Duncan t 方法进行二因素有重复试验数据分析 ($P < 0.01$)。

2 结果与分析

2.1 不同体积分数 PEG6000 处理下长春花叶片中脯氨酸含量和相对含水量的变化

游离脯氨酸的积累与植物的抗旱性之间有着密切的关系。由图 1 可知, 15% PEG6000 模拟胁迫处理长春花, 在检测的 24 h 内脯氨酸 (Pro) 含量处于下降趋势。在 20% 和 25% PEG6000 渗透胁迫处理 3 h, Pro 含量逐渐降低, 然后 Pro 含量逐渐呈上升态势。在 30%、35% 与 40% PEG6000 胁迫下, 在 0~12 h 内 Pro 含量逐渐上升, 12 h 后直线上升, Pro 含量分别为对照的 5.64、4.80、6.64 倍, 说明在相同渗透胁迫强度之下, 随着处理时间的延长, 脯氨酸含量总体上表现为缓升到急升的上升趋势。

在干旱条件下分析叶片的相对含水量可以作为抗旱的重要指标。结果 (图 1) 表明, 在 15%、20% 和 25% PEG6000 渗透胁迫 3 h 后, RWC 变化不大, 与对照差异水平不显著, 说明长春花对短时间的水分胁迫有一定的适应能力; 在 30% PEG6000 胁迫下, 与对照相比, RWC 逐渐下降, RWC 在 6 h 时下降到峰值 (56%), 6 h 后 RWC 开始上升; 在 35% 和 40% PEG6000 胁迫下, 与对照相比, RWC 缓慢下降, 第 12 小时时降至 53.3% 和 54.2%, 12 h 后 RWC 开始上升, 说明 PEG6000 渗透胁迫下, RWC 总体上随着处理时间的延长呈降低到上升的趋势。

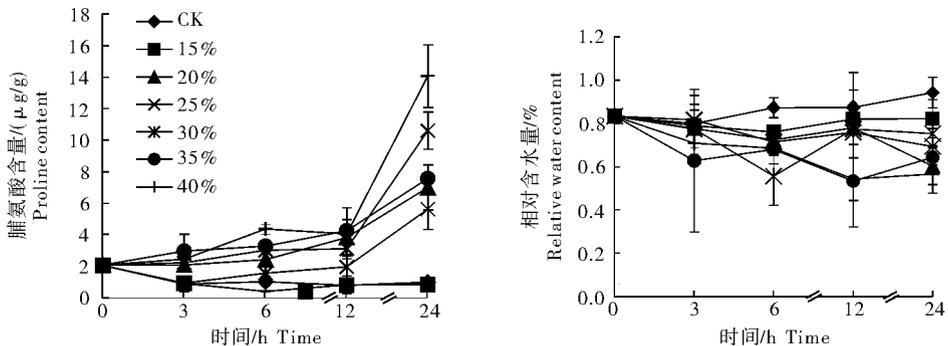


图 1 不同体积分数 PEG6000 处理对长春花叶片脯氨酸含量和相对含水量的影响

Fig. 1 The effect of proline content and relative water content in *C. roesus* leaves under different concentration of PEG6000 stresses

2.2 PEG6000 渗透胁迫下叶片中相对含水量和脯氨酸含量的差异

在不同体积分数 PEG6000 渗透胁迫条件下, 进

行二因素多重试验数据差异水平显著分析, 结果 (表 1) 表明, 在检测的 6 h 之内, 叶片相对含水量和脯氨酸含量与对照间差异水平不显著。由表 1 可

知,从胁迫 6 h 开始,30%~40% PEG6000 胁迫处理下,叶片 RWC 和 Pro 含量的变化与对照间差异水平极显著($P<0.01$);从胁迫 12 h 开始,6 种不同体积分数 PEG6000 胁迫处理下,叶片 RWC 和 Pro 含量的变化与对照间差异水平极显著($P<0.01$)。说明相同时间下,随着 PEG6000 体积分数增大,叶片 RWC 和 Pro 含量的变化差异越显著。按照胁迫动力学概念^[13],处理 12 h 时,在 35% 和 40%

PEG6000 胁迫下 RWC 形成特殊拐点,而在 30%、35% 和 40% PEG6000 处理下 Pro 含量形成特殊拐点。综上所述,长春花的抗旱性和耐旱性比较强,同时说明胁迫 0~12 h 使长春花受到损害,其分解代谢超过合成代谢,为胁迫下的预警阶段,胁迫处理 12~24 h 长春花植株各生理指标开始变化,为抗性阶段。因此,选择 35% PEG6000 模拟干旱胁迫。

表 1 不同体积分数 PEG6000 处理下长春花叶片相对含水量和脯氨酸含量的差异分析¹⁾

Table 1 The significant analysis of relative water content and proline content in *C. roseus* leaves under different concentration of PEG6000 stresses

PEG6000 含量/% PEG6000 content	相对含水量显著水平($P=0.01$) Significant of relative water content			脯氨酸含量显著水平($P=0.01$) Significant of proline content		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
	CK	A	A	A	A	A
15	A	B	AB	A	B	AB
20	A	B	B	A	B	AB
25	A	B	B	A	AB	B
30	B	B	B	AB	B	AB
35	AB	B	B	B	B	AB
40	AB	AB	B	B	B	B

1) 大写字母不同表示处理间差异达显著水平($P<0.01$)。Normals letters indicate significant difference at $P<0.01$.

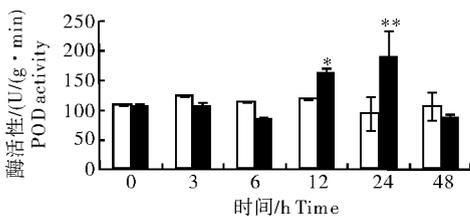
2.3 35% PEG6000 模拟干旱对长春花幼苗叶片中 POD 活性的影响

轻度干旱胁迫下,植物叶片过氧化物酶的活性低;严重的水分胁迫下,过氧化物酶活性表现出相反的顺序。在一定的水分胁迫范围内,过氧化物酶活性可用作植物耐旱性的鉴定指标,可以通过测定过氧化物酶活性来检测干旱胁迫程度。POD 已经被证明是参与阿玛碱向蛇根碱的转化及文多灵和长春质碱偶合为长春碱^[14]。由图 2 可知,干旱有利于 POD 活性的提高,随着胁迫时间的延长,POD 活性在 12、24 h 分别是对照的 1.4 和 2.0 倍,推测是适

度胁迫使植物体内产生的抗性影响次生物质的代谢。24 h 后 POD 活性下降,表明胁迫程度加重,影响细胞正常生理代谢。

2.4 35% PEG6000 模拟干旱对长春花幼苗叶片中 3 种生物碱含量的影响

利用 35% PEG6000 模拟干旱,再利用 HPLC 法对不同样品中的 3 种重要萜类吲哚生物碱:文多灵(VIN)、长春质碱(CAT)和长春碱(VBL)的含量进行测定。VIN 和 CAT 是重要抗癌活性成分 VBL 生物合成的直接前体化合物,它们的含量水平是长春花栽培的重要指标。结果(图 3)表明,对照长春花幼苗的叶片在观测阶段 VIN 的含量在 0~6 h 呈下降趋势后上升达到峰值,表现出先下降后上升的趋势,CAT 的含量在 0~3 h 上升后逐渐下降,VBL 含量没有明显的波动;在 PEG6000 干旱胁迫处理下,随着渗透胁迫时间的延长,VIN 含量逐渐升高,6 h 达到峰值,12.90±0.46 mg/g(鲜质量);CAT 含量先下降后逐渐升高,12 h 时明显高于对照,VBL 的含量逐渐的升高,12~24 h 明显高于对照($P<0.05$),在 24 h 时达到峰值,0.168 0±0.003 6 mg/g(鲜质量),是对照的 1.4 倍(图 3)。



□对照 Control ■PEG6000 胁迫 PEG6000 stress

* 表示差异显著, $P<0.05$ 。Significant difference $P<0.05$ are marked with symbol *; ** 表示差异极显著, $P<0.01$ 。Significant difference $P<0.01$ are marked with symbol **. 下同 The Same as below.

图 2 35% PEG6000 胁迫对长春花叶片中 POD 酶活性的影响

Fig. 2 The effects of 35% PEG6000 on POD activity in the leaves of *C. roseus* seedlings

3 讨论

水分状况是植物最重要的生理参数之一。相对

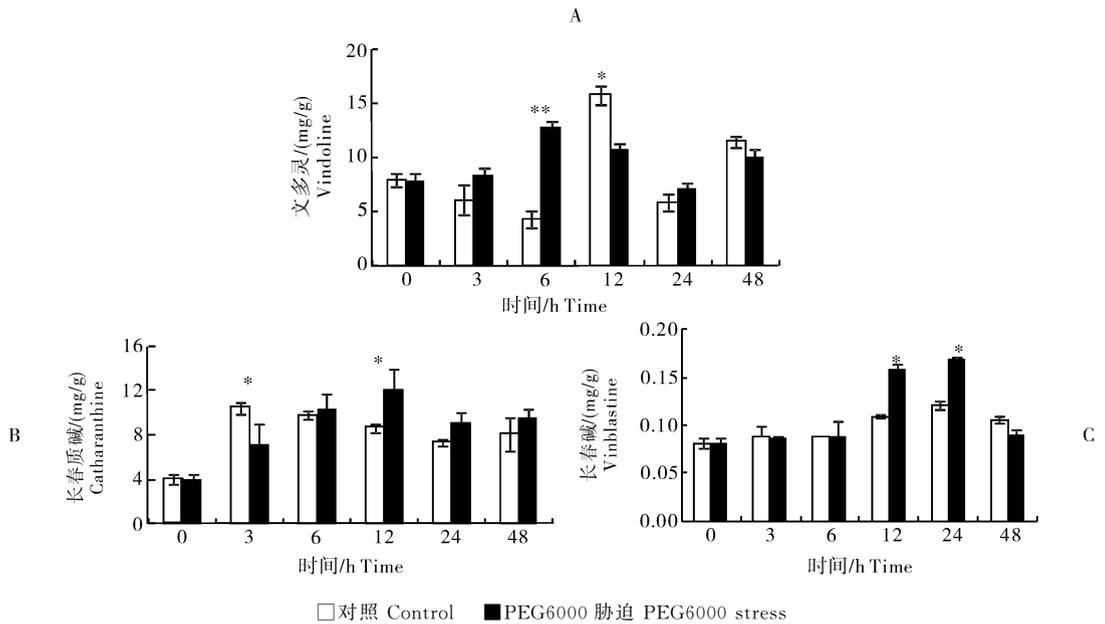


图 3 35% PEG6000 胁迫对长春花叶片中生物碱含量的影响

Fig. 3 Effects of 35% PEG6000 on alkaloids in the leaves of *C. roseus* seedlings

含水量可反映植物体内水分亏缺的程度,干旱对次生代谢产物含量的影响通常与缺水处理的程度、发生时间的长短有关。水分胁迫下产生的游离氨基酸具有维持细胞水势、消除物质毒害和储存氮素的功能。在干旱条件的刺激下,细胞内主动积累脯氨酸等渗透调节物,促使植物加强水分吸收,维持细胞一定的膨压,从而保持细胞生长、气孔开放以及光合作用等生理活动的正常进行。试验结果表明,在整个处理时间内,Pro 含量先缓慢上升后急速上升。在抗旱研究中,根据脯氨酸含量的增加量来判定植物细胞及膜的受害程度。40% PEG6000 胁迫下,Pro 含量急剧增加,表明在严重干旱胁迫下,叶片中的线粒体超微结构发生了变化,从而抑制了线粒体 Pro 的氧化;或是严重干旱胁迫解除了 Pro 的反馈抑制作用,使其合成受激^[15]。因此,选择 35% 的 PEG6000 模拟干旱胁迫。

逆境胁迫能够促进植物的次生代谢。生物碱(alkaloids)是植物天然次生代谢产物中数量最多的一类含氮碱性化合物。Flora 等^[16]研究发现,对长春花幼苗的机械损伤可以造成蛇根碱含量增加。同时,NaCl 胁迫亦能增加长春花体内阿玛碱、长春质碱及文多灵的含量^[6]。除了长春花外,一些植物也有这种特点,如喜树在短期干旱胁迫下叶内喜树碱的含量明显提高^[17]。在本研究中,35% PEG6000 干旱胁迫 12 h 后,长春花中的长春质碱和长春碱含量均高于对照,推测植物在防御干旱条件下免受伤害

的一种本能反应,诱导体内生物碱含量变化来防御外界不良环境。同时,随水分胁迫的加剧,长春花叶片中 Pro 含量增多,游离氨基酸等含氮化合物含量相对升高,而蛋白氮减少,因为蛋白氮转变为脯氨酸,改变长春花的 C/N,从而影响了次生代谢,因此可以推测,干旱胁迫下氮化合物的积累促进了含氮次生产物的合成和积累。

在长春花代谢途径中,文多灵(VIN)和长春质碱(CAT)是合成长春碱(VBL)的前体。VIN 和 CAT 都是单吲哚碱,在血红素类氧化酶等酶的催化下生成双吲哚碱长春碱。碱性 POD 是长春花生物碱代谢途径中的酶,参与 VIN 和 CAT 偶合为长春碱,因而,POD 对整个生物碱代谢途径具有相当的意义。研究表明,POD 活性越大,文多灵和长春质碱合成长春碱的转化率越高^[14]。本研究中,干旱胁迫下,POD 活性逐渐增强到阈值后下降,表明促进 VIN 和 CAT 向 VBL 转化率达到阈值,即 VIN 和 CAT 向 VBL 合成的代谢流增强了。因此,长春碱含量在 24 h 最高。

参 考 文 献

[1] 唐中华,于景华,杨逢建,等.植物生物碱代谢生物学研究进展[J].植物学通报,2003,20(6):696-702.
 [2] 黑倩,张辉,黄继斌,等.过量表达 AtNHXS1 新基因显著提高水稻的耐盐性[J].华中农业大学学报,2012,31(5):529-535.

- [3] STASOLLA C, VAN ZYL L, EGERTSDOTTER U. The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos[J]. *Plant Physiol*, 2003, 131(1):49-60.
- [4] 祖元刚, 王非, 马书荣, 等. 长春花生活史型研究[M]. 北京: 科学出版社, 2006:45-60.
- [5] JALEEL C A, MANIVANNAN P, KISHOREKUMAR A. Alterations in osmoregulation antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2007, 59(1):1150-1157.
- [6] 王景艳, 刘兆普, 刘玲, 等. 盐胁迫对长春花幼苗生长和生物碱含量的影响[J]. *应用生态学报*, 2008, 19(10):2143-2148.
- [7] 侯杰, 张建忠, 刘玲, 等. 硝态氮缓解长春花幼苗海水胁迫效应的研究[J]. *土壤学报*, 2009, 46(1):173-179.
- [8] 宋唯一. PEG6000 模拟干旱胁迫对黄瓜幼苗生长的影响[J]. *湖北农业科学*, 2011(12):2394-2397.
- [9] 高小宽, 白丽荣, 刘国杰. 干旱胁迫对大豆种子萌发及幼苗生长的影响[J]. *湖北农业科学*, 2012(24):5618-5620.
- [10] 李海云, 赵可犬, 王秀峰. 盐对盐生植物萌发的抑制作用[J]. *山东农业大学学报*, 2002, 33(2):170-173.
- [11] 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, 2000:164-165, 258-260.
- [12] 华东师范大学生物系植物生理教研室. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 人民教育出版社, 1980:15-60.
- [13] WALTER L. 植物生态生理学[M]. 瞿志席, 译. 北京: 中国农业大学出版社, 1997:246-247.
- [14] 周忆堂. 不同光强对长春花(*Catharanthus roseus*)光合作用及次生代谢的影响研究[D]. 重庆: 西南大学图书馆, 2008:32-48.
- [15] 魏琳. 卷柏抗旱生理基础及差异蛋白质研究[D]. 福州: 福建师范大学图书馆, 2006:2-6, 15-18.
- [16] FLORA F V, PECH M C, GARCIA Y M. Alkaloid metabolism in wounded *Catharanthus roseus* seedlings [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004, 42(7/8):623-628.
- [17] 冯建灿, 张玉洁, 张秋娟. 干旱胁迫与抗蒸腾剂对喜树几项生理指标及喜树碱含量的影响[J]. *河南农业大学学报*, 2002, 36(2):138-142.

Effects of PEG6000 stress on growth and alkaloid content of *Catharanthus roseus* seedlings

LIU Ying ZHANG Zhong-hua LI De-wen ZHAO Dong-mei

Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract The effects of PEG6000 on the growth and the contents of vindoline(VIN), catharanthine (CAT) and vinblastine(VBL) of *Catharanthus roseus* seedling were investigated using soil cultivation in the greenhouse. The results showed that the developing trend of the relative water content(RWC) was declining and rising. The developing trend of proline (Pro) content was increasing slowly and increasing quickly with the development of time under the same concentration PEG6000 stress. Combining and optimizing various conditions, 35% (V/V) PEG6000 stress on leaves of *C. roseus* was established. Contrasting with the control, the peroxidase activities increased gradually first and then decreased. Vindoline content decreased gradually then increased while catharanthine content increased gradually then decreased. Vinblastine content increased and reached the highest 0.1680 ± 0.0036 mg/g(FW) on the 24th hour. The results showed that peroxidase activities could regulate the transform from monomeric indole alkaloids to bis-indole alkaloids under the osmosis stress.

Key words *Catharanthus roseus*; polyethylene glycol 6000 stress; alkaloids; peroxidase; vindoline; catharanthine; vinblastine

(责任编辑:陆文昌)