

# 遮光对长春花叶片长春碱含量 和相关合成基因表达的影响\*

刘英 赵冬梅 祖元刚\*\* 张衷华

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** 分别在红色滤光膜遮光处理和正常日光灯照条件下, 研究长春花 (*Catharanthus roseus*) 无菌幼苗叶片中叶绿素含量和生物碱含量以及生物碱合成相关基因的表达变化。结果表明: 与对照相比, 叶片中叶绿素含量在前 30 d 先升高, 然后明显降低 ( $P < 0.05$ ), 叶绿素 a/b 比率低于对照; 文多灵 (vindoline, VIN) 和长春质碱 (catharanthine, CAT) 的含量稍高于对照后下降, VIN 和 CAT 耦合的重要抗癌产物长春碱 (vinblastine, VBL) 的含量逐渐高于对照, 在处理第 15 天达到最高为  $(0.028 0 \pm 0.005 1) \text{ mg/g}$ ; 遮光处理有利于 VBL 合成路径相关基因 (*Tdc*、*Str*、*Dat* 和 *D4h*) 的表达, 表明植物在适应遮光胁迫过程中发挥着积极的调控作用。

**关键词** 红色滤光膜; 长春碱; 基因表达; 长春花

**中图分类号** Q 945.79, Q 786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)05-0634-05

长春花 (*Catharanthus roseus*) 为夹竹桃科 (Apocynaceae) 长春花属 (*Catharanthus*) 多年生草本植物。长春花全草可以入药, 含有一百多种具有重要药用价值的生物碱, 其中, 叶片中的萜类吲哚生物碱 (terpenoid indole alkaloids, TIAs)——长春碱 (vinblastine, VBL) 和长春新碱 (vincristine, VCR) 具有抗癌作用。长春碱合成由 Kutney<sup>[1]</sup> 提出, 是文多灵 (vindoline, VIN) 和长春质碱 (catharanthine, CAT) 耦合成的产物。据报道长春碱在长春花中的含量比较低, 尽管研究人员做了很多努力, 但长春碱的产量并没有得到有效的提高<sup>[2]</sup>。

长春花 TIAs 的生物合成由提供色氨酸生物合成的莽草酸途径 (shikimate pathway) 和提供异戊烯焦磷酸生物合成的甲基磷酸赤藓糖途径 (2-C methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway, MEP) 组成, 其合成路径前期的 2 个重要基因色氨酸脱羧酶 (tryptophan decarboxylase, *Tdc*) 和异胡豆苷合成酶 (strictosidine synthase, *Str*) 及后期的 2 个重要基因脱乙酰文多灵-4-羟化酶 (desacetoxyvindoline-4-hydroxylase, *D4h*) 和脱乙酰文多灵-4-O-乙酰转移酶 (deacetylvindoline-4-O-acetyl transferase, *Dat*) 的表达已被广泛报道, 并且过量表达有利于生

物碱的合成<sup>[3]</sup>。长春花 TIAs 的生物合成可以被植物生长激素和光调节, 生长激素不仅影响培养物生长而且从各个方面抑制生物碱的合成<sup>[4]</sup>; 光不仅影响叶绿素的积累<sup>[5]</sup>, 而且还调节长春碱合成路径相关基因表达进而影响其生物碱合成与积累<sup>[3]</sup>。尽管 Ramani 等<sup>[6]</sup> 报道在紫外光下长春花的细胞悬浮培养能增加文多灵和长春质碱含量, 但在同样条件下却不能合成长春碱。

在本研究中, 排除生长激素的干扰, 进行长春花无菌苗的培养, 分别对红色滤光膜下和日光灯 (对照) 下的叶片中生物碱含量进行测定, 考察生物碱积累与相关合成基因表达的关系; 通过半定量 RT-PCR 分析 *Tdc*、*Str*、*Dat* 和 *D4h* 基因表达变化, 探讨基因表达变化如何反应长春花生物碱的积累。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

1) 长春花的培养。长春花种子在 MS 培养基上萌发后, 形成的无菌苗置于 200 mL 1/2 MS 培养基的锥形瓶中进行再培养, 日光灯照 (40 W) 时间 06:00—18:00, 培养温度为 28 °C。培养 40 d 后, 一部分长春花无菌苗开始进行红色滤光膜 (编号: 104)

收稿日期: 2010-02-26; 修回日期: 2010-06-21

\* 国家自然科学基金 (30770338) 资助

\*\* 通讯作者。E-mail: zygorl@public.hr.hl.cn

刘英, 女, 1978 年生, 博士研究生, 讲师。研究方向: 植物学。E-mail: arrive100@163.com

遮盖处理,另一部分日光灯下的长春花无菌苗设置为对照。

2)长春花的处理。在培养45 d后,利用便携式光谱辐射仪(AvaSpec-2048-2-USB2, Holand)对光谱不同区域的辐射能量进行扫描测定,每个处理测定3~5次。对不同条件下无菌苗的叶片进行取样,分别对生物碱和叶绿素的含量进行测定(3次重复),对生物碱合成路径的基因表达进行分析。

## 1.2 试验方法

1)长春花叶片中生物碱含量的测定。长春花无菌苗叶片中文朵灵、长春质碱和长春碱含量采用HPLC方法测定。分别于处理后的第0、3、7、15、30天进行取样,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 TMC18 ODS(4.6 mm×250 mm),流动相为 $V_A : V_B = 64 : 36$ ,其中A为水与二乙胺以 $V_{水} : V_{二乙胺} = 990 : 10$ 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。

2)长春花叶片中叶绿素含量的测定。分别于处理后的第0、3、7、15、30天摘取叶片,叶绿素的提取参照文献[7]的方法进行,用岛津UV-160分光光度计测定波长在649 nm和665 nm的光密度,即 $D_{649}$ 、 $D_{665}$ ,计算叶绿素的含量(Chla+Chlb)。计算公式为:Chla(mg/g) =  $(12.19 \times D_{665} - 3.45 \times D_{649}) \times V / (1000 \times S)$ ; Chlb(mg/g) =  $(21.99 \times D_{649} - 5.32 \times D_{665}) \times V / (1000 \times S)$ ;公式中Chla表示叶绿素a,Chlb表示叶绿素b,V表示提取液的体积,mL;S为鲜样质量,g。

3)总RNA的抽提和半定量RT-PCR。用TRIzol(Invitrogen, USA)方法分别提取2组叶片的总RNA。取不同样品的不等量总RNA,按MMLV第一链cDNA合成试剂盒(MBI, Canada)说明合成第一链cDNA。半定量RT-PCR方法参照文献[8]和文献[9]的方法进行。根据已知长春花的基因序列设计特异性引物:

*Tdc*: 5'-ACACCACTAGCGAGTCCATT-3'

5'-CCAACAGCCAGTCTTAGCAT-3'

(GenBank Acc. No. X67662)

*-Str*: 5'-CCTTCCTATGCTCCGAATGC-3'

5'-CCATCGTGCTCTTGAATCTG-3'

(GenBank Acc. No. X61932)

*-D4h*: 5'-ACTATCAGAAGCTTTGGGGC-3'

5'-GGGGTACCTCTAATGTTACCG-3'

(GenBank Acc. No. U71604)

*-Dat*: 5'-GAAGTTCGAATTTCGTTGCCG-3'

5'-GCTCTAGAAGTAGCTGTTCGTTTC-3'

(GenBank Acc. No. AF053307)

*-Actin*: 5'-GGCTGGATTTGCTGGAGATGAT-3'

5'-TAGATCCTCCGATCCAGACACTG-3'

(GenBank Acc. No. AK322149)

PCR反应条件为:94℃预变性3 min, *Actin*基因作为内参基因,采用28个扩增循环,其他基因采用32个扩增循环(94℃变性30 s, 45~50℃退火30 s, 72℃延伸50 s), 72℃继续延伸10 min。反应完成后用1%琼脂糖凝胶电泳检测,采用Quantity One软件对电泳结果进行分析。

4)数据处理。采用SPSS 15.0软件对上述所有数据进行处理与统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 红色滤光膜下的波长和辐射能量

光是植物生命活动中重要的环境因子之一,人们通常从光强和光质2个方面分析光照对植物的生理代谢过程的影响规律。采用红色滤光膜遮光来获得特殊的光照环境,与日光灯相比(300~1100 nm),红色滤光膜诱导了一个低光和低紫外光的环境(如表1),即红色滤光膜下紫外辐射能量占对照紫外辐射的6%,同时,在日光灯下的总辐射能量8.31 W/m<sup>2</sup>高于红色滤光膜下的总辐射能量0.769 W/m<sup>2</sup>。

### 2.2 生物碱含量

试验选取的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。如图1所示,对照长春花无菌苗叶片中VIN和CAT的含量均呈逐渐上升趋势,而它们的耦合衍生物VBL含量前3 d升高,然后逐渐下降;而经红色滤光膜遮盖处理后,长春花无菌苗叶片中VIN和CAT含量水平分别在观测期间的前3 d上升到最高,为(0.32±0.07) mg/g和(0.63±0.18) mg/g,之后逐渐下降,而VBL含量逐渐增加,在处理15 d时,高达对照的1倍左右,为(0.028 0±0.005 1) mg/g结果表明,红色滤光膜遮盖处理的一定时间内,促进了长春花叶片中VIN和CAT生物合成VBL。

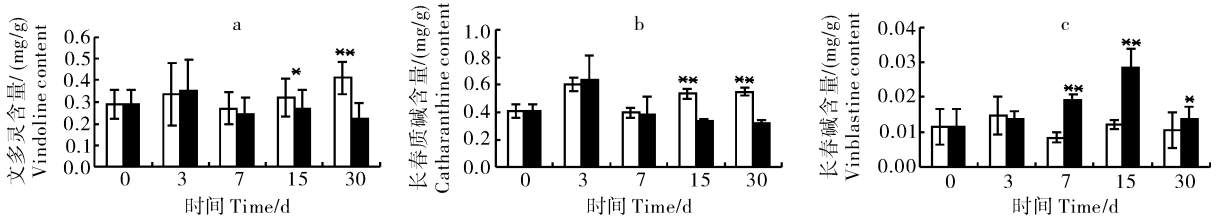
表 1 红色滤光膜下的光谱和辐射能量<sup>1)</sup>

Table 1 Spectra and radiant energy of red plastic films

W/m<sup>2</sup>

处理 Treatment	紫外光 Ultraviolet 300~400 nm	蓝光 Blue 400~510 nm	绿光 Green 510~610 nm	红光 Red 610~720 nm	近红光 Ear infrared 720~1 100 nm	总辐射光 Total radiant energy 300~1 100 nm
对照 Control	0.288 0 a	2.914 0 a	3.405 a	1.106 a	0.596 a	8.31 a
红色滤光膜 Red plastic films	0.017 3 b	0.048 3 c	0.101 c	0.432 b	0.203 c	0.769 d
比例* Percents/%	6.00	1.66	2.97	39.60	34.10	9.30

1) \* 代表不同光区辐射能量占对照各个光区的总辐射能量的百分数 The percents of radiant energy of different light wave bands in overall radiant energy; 同一列内不同字母表示在 0.05 水平上差异显著 Different letters within the same column mean significant difference at 0.05 level.



□对照 Control; ■红色滤光膜 Red plastic films; 带“\*\*\*”标注表示差异显著 ( $P < 0.01$ ), 下同 Significantly difference  $P < 0.01$  are marked with symbol ‘\*\*\*’, the same as below.

图 1 红色滤光膜及对照条件下长春花无菌苗叶片中文多灵(a)、长春质碱(b)、长春碱(c)的含量

Fig. 1 The contents of vindoline, catharanthine, and vinblastine in the leaves of *C. roseus* aseptic seedlings under control and red plastic films significantly

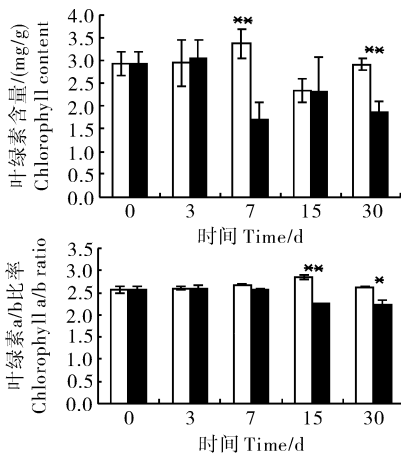
## 2.3 叶绿素含量

如图 2 所示,日光灯照射条件下,长春花无菌苗叶片中叶绿素含量第 7 天以后呈现下降趋势,而叶绿素 a/b 的比率在第 15 天前是逐渐上升。红色滤光膜遮盖处理下,叶片中叶绿素的含量下降,在第 7 天显著低于对照( $1.71 \pm 0.37$  mg/g),红色滤光膜遮盖处理后叶绿素 a/b 比率一直低于对照,第 15 和

30 天差异显著 ( $P < 0.05$ )。因此,可以看出,在红色滤光膜遮盖处理的前期,长春花无菌苗叶片叶绿素含量和叶绿素 a/b 比率差异不明显,而处理后后期差异显著,其叶绿素含量和叶绿素 a/b 比率都明显低于对照。

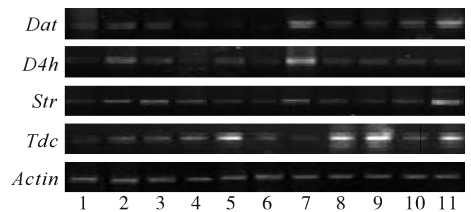
## 2.4 基因表达分析

通过半定量 RT-PCR 法对长春花生物碱合成路径相关基因的表达进行分析,结果如图 3,4 所示,在红色滤光膜处理下,叶片中 *Tdc* 在 3 h 和 6 h 表



□对照 Control; ■红色滤光膜 Red plastic film

图 2 红色滤光膜及对照条件下长春花无菌苗叶片叶绿素含量和叶绿素 a/b 比率的变化

Fig. 2 Changes of chlorophyll content and chlorophyll a/b ratio in the leaves of *C. roseus* aseptic seedlings under control and red plastic films

1~6. 对照, 分别表示电泳时间为 0、3、6、12、24、72 h; 1-6 lanes controls, and electrophoresis time was 0, 3, 6, 12, 24, 72 h; 7~11. 红膜处理, 分别表示电泳时间为 3、6、12、24、72 h 7-11 red plastic films treatment, and electrophoresis time was 3, 6, 12, 24, 72 h.

图 3 红色滤光膜及对照条件下长春花无菌苗叶片中 *Tdc*, *Str*, *D4h* 和 *Dat* 基因表达的电泳结果, *Actin* 基因作为内参Fig. 3 The gel results of *Tdc*, *Str*, *D4h* and *Dat* genes expression in the leaves of *C. roseus* aseptic seedlings under control and red plastic films, *Actin* gene was used as an internal control

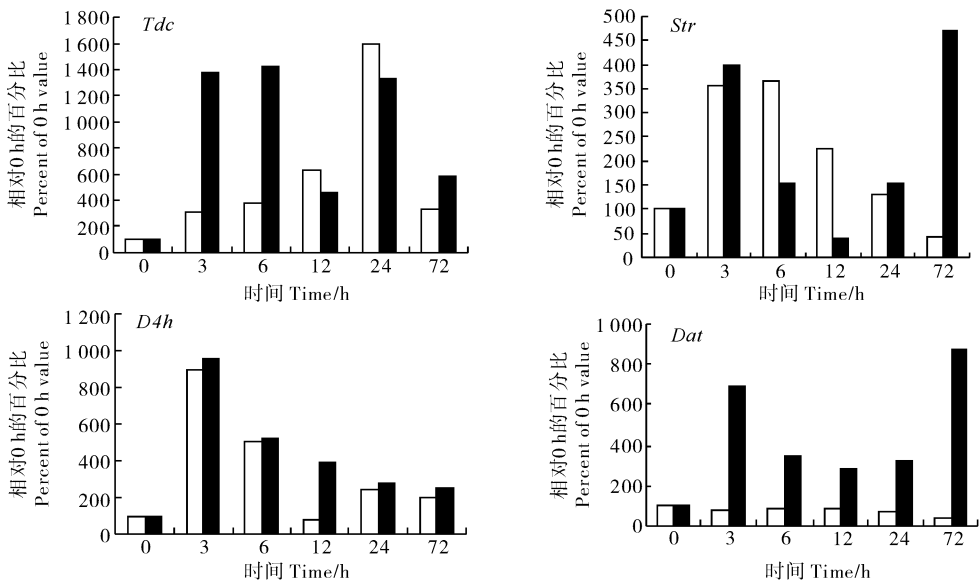


图 4 *Tdc*, *Str*, *D4h* 和 *Dat* 基因表达的 Quantify One 软件分析结果 (*Actin* 基因作为内参)

Fig. 4 Signals linear results of genes expression in their intensities were quantified by Quantify One software (*Actin* gene was used as an internal control)

达明显上调, *Str* 在 3 h 和 72 h 表达明显上调;而在红色滤光膜处理下, *D4h* 和 *Dat* 的表达水平高于对照,并且处理后的 *Dat* 的转录水平积累很明显。

### 3 讨 论

光照条件对植物的生长发育和生理代谢都具有重要影响。有关遮光膜对植物影响的报道主要集中在喜树碱及其代谢合成<sup>[10]</sup>,而对于长春花在遮光条件下的代谢和相关基因表达特点研究较少。因此本文主要从生理和基因表达方面研究和探讨遮光条件对长春花代谢产物的影响,以揭示长春碱积累与合成路径基因表达的关系。

紫外辐射直接影响植物的生理生化过程,间接延缓植物生长<sup>[5]</sup>;长春花在近紫外光作用下随着 VIN 和 CAT 含量下降,二聚碱含量增加<sup>[11]</sup>。在本研究中,与对照相比,红色滤光膜遮盖排除有害紫光的影响,有利于植物生长,因而促进在红色滤光膜下 VBL 积累;另一方面,红色滤光膜作为遮盖材料,改善长春花无菌苗培养的温度和湿度,激活 VIN 和 CAT 偶联连成 VBL 的合成机制, VBL 含量逐渐上升高于对照,这说明滤光膜造成的光质环境有利于促进长春碱在无菌苗叶片中积累。光不仅影响植物叶绿素的生长,而且影响叶绿素发育过程中许多有关生物碱的重要前体的合成<sup>[12]</sup>。叶绿素比率下降类似于有关报道关于在红色滤光膜下草莓植物的叶

绿素变化<sup>[5]</sup>,这可能是由于叶绿素的降解增加或者叶绿素的合成减少,即影响叶绿素的生长进而影响重要前体的合成,因此伴随着 VIN 和 CAT 含量下降,而 VBL 在一定时间含量上升(图 1-c)。

Vázquez-Flota 等<sup>[13]</sup>报道光影响 *D4h* 基因的表达和 VIN 积累,同时 *D4h* 和 *Dat* 基因的高转录水平与 VIN 含量的积累存在正相关性<sup>[14]</sup>;在低紫外光下 *Tdc* 和 *Str* 基因表达影响 CAT 含量的积累<sup>[15]</sup>。在笔者的试验中,红色滤光膜遮盖不仅促进 *Tdc* 和 *Str*, *D4h* 和 *Dat* 基因表达高于对照,而且诱导遮盖早期长春花无菌苗叶片中 CAT 和 VIN 的积累,有利于提供足够多的前体合成 VBL,使 VBL 含量在处理的第 15 天达到最高(图 1-c)。这说明在一定时间内, TIA 合成路径的 4 个基因 (*Tdc*, *Str*, *D4h* and *Dat*) 表达变化和长春花叶片中的二聚碱积累存在一定的相关性,因此长春花在适应红色滤光膜遮盖过程中,不仅在生理代谢方面上表现出较强的可塑性,而且在相关基因表达方面上也呈现出显著变化。可以通过分析 TIA 合成路径的基因表达变化和生理变化,快速推断长春花生物碱的累积情况,对大规模培育长春花目的产物的生产实践起到指导作用。

### 参 考 文 献

[1] KUTNEY J P. Biosynthesis and synthesis of indole and bisindole alkaloids in plant cell cultures: a personal overview[J].

- Nat Prod Rep, 1990, 7: 85-103.
- [2] ZHAO J, ZHU W H, HU Q, et al. Improvement of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures by osmotic shock[J]. Biotechnol Lett, 2000, 22: 1227-1231.
- [3] EL-SAYED M, VERPOORTE R. *Catharanthus* terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation[J]. Phytochem Rev, 2007, 6: 277-305.
- [4] ZHAO J, VERPOORTE R. Manipulating indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering[J]. Phytochem Rev, 2007, 6: 435-457.
- [5] QIN Y H, ZHANG S L, SYED A, et al. Regeneration mechanism of Toyonoka strawberry under different color plastic films[J]. Plant Sci, 2008, 168: 1425-1431.
- [6] RAMANI S, JAYABASKARAN C. Enhanced catharanthine and vindoline production in suspension cultures of *Catharanthus roseus* by ultraviolet-B light[J]. J Mol Signal, 2008(3): 9-15.
- [7] ARNON D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*[J]. Plant Physiol, 1949, 24(1): 1-15.
- [8] 李凤娥, 熊远著, 雷明刚, 等. 猪 ESR mRNA 在不同组织表达的定量研究[J]. 华中农业大学学报, 2004, 23(5): 492-494.
- [9] 陈名红, 陈毅坚, 叶艳青, 等. 用半定量 RT-PCR 法分析基因表达水平的影响因素[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(8): 28-30.
- [10] 戴绍军, 王洋, 阎秀峰, 等. 滤光膜对喜树幼苗叶片生长和喜树碱含量的影响[J]. 生态学报, 2004, 24(5): 869-875.
- [11] HIRATA K, ASADA M, YATANI E, et al. Effect of near ultraviolet light on alkaloid production in *Catharanthus roseus* plants [J]. Planta Med, 1993, 59: 46-50.
- [12] ZHAO J, ZHU W H, HU Q. Effects of light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindoline and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus cultures[J]. Plant Growth Regul, 2001, 33: 43-49.
- [13] VAZQUEZ-FLOTA F, ST-PIERRE B, DE LUCA V. Light activation of vindoline biosynthesis does not require cytomorphogenesis in *Catharanthus roseus* seedlings[J]. Phytochemistry, 2000, 55: 531-536.
- [14] DUTTA A, BATRA J, PANDEY-RAI S, et al. Expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic pathway genes corresponds to accumulation of related alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don [J]. Planta, 2005, 220: 376-383.
- [15] RAMANI S, CHELLIAH J. UV-B-induced signaling events leading to enhanced-production of catharanthine in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures [J]. BMC Plant Biol, 2007, 7: 61-78.

## Effects of Shading Light on Alkaloids and Related Genes Expression in Leaves of *Catharanthus roseus*

LIU Ying ZHAO Dong-mei ZU Yuan-gang ZHANG Zhong-hua  
Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education,  
Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract** Effects of red plastic films and fluorescent light (as control) on the contents of chlorophyll, alkaloids and the expression of biosynthesis pathway genes in the leaves of *Catharanthus roseus* aseptic seedlings were studied. The results showed that chlorophyll content in leaves was higher under red films than that under fluorescent light on the first 30 d, and the chlorophyll content under red films decreased significantly after 3 d ( $P < 0.05$ ). The ratio of chlorophyll a/b was lower than control. The content of vindoline (VIN) and catharanthine (CAT) firstly increased a little and then decreased compared with control. The content of vinblastine (VBL), as a coupling product of VIN and CAT increased gradually and reached the highest on the 15th day ( $0.0280 \pm 0.0051$ ) mg/g in shade culture. The plastic films induced the high expression of alkaloids biosynthesis pathway genes (*Tdc*, *Str*, *Dat* and *D4h*). The results indicated that plants under shade treatment with red films were positively regulated by physiological metabolisms.

**Key words** red plastic films; alkaloids; genes expression; *Catharanthus roseus*