

干旱胁迫对黄檗幼苗生理及叶片中小檗碱含量的影响

覃炳醒 姚丽萍 周志强 张玉红

(东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室)

摘要:以黄檗幼苗为实验材料,采用3种浓度的聚乙二醇(PEG 8000)模拟干旱胁迫,研究黄檗幼苗的生理适应特征和叶中小檗碱含量的变化。结果表明:在5%、10%和20%的PEG胁迫下,丙二醛(MDA)含量变化各异。在5%PEG胁迫处理下,MDA含量不但没有增加,反而减少,而且在整个胁迫进程中一直低于胁迫前的水平($P < 0.05$),在10%PEG处理下,MDA的含量较处理前有所增加,但增加量也较少,只是在处理9 h时才有明显增加($P < 0.05$)。20%PEG胁迫处理下,MDA含量呈单峰曲线;质膜透性都随胁迫时间变化呈波动上升趋势,PEG浓度越大对膜伤害程度越大;脯氨酸含量都是先降低后上升,高浓度变化幅度较大;SOD活性都是先升高后降低,PEG浓度越高变化幅度越大,活性高峰出现的时间越早;叶片中小檗碱的含量随胁迫时间先升高后降低,高浓度含量高峰出现时间较早,低浓度含量高峰出现时间较晚,但含量最大值较高。

关键词: 黄檗; 干旱胁迫; 幼苗生理; 小檗碱含量

中图分类号: S718.43 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2012)03-0026-05

QIN Bing-xing; YAO Li-ping; ZHOU Zhi-qiang; ZHANG Yu-hong. **Influence of drought stress on plant physiology and berberine content of leaves in *Phellodendron amurense* seedlings.** *Journal of Beijing Forestry University* (2012) 34(3) 26-30 [Ch, 24 ref.] Key Laboratory of Forestry Plant Ecology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin, 150040, P. R. China.

The physiological tolerance adaptation characteristics and the changes of berberine content in leaves of *Phellodendron amurense* seedlings were investigated under the simulated condition of drought using three different concentrations of polyethylene glycol (PEG 8000). The results showed that the contents of MDA in *P. amurense* seedlings under 5%, 10% and 20% PEG were different. Under the 5% PEG stress, MDA content reduced, and in the entire stress process were lower than that before treatment ($P < 0.05$). Under the 10% PEG stress, MDA content increased a little and a significantly increase appeared at the 9th hour ($P < 0.05$). MDA content showed a single peak curve under the 20% PEG stress. Membrane electrolyte leakage in leaves showed a fluctuated upward trend with the stress time, and the higher concentration of PEG damaged membrane more seriously. The content of proline decreased firstly, and then increased. Under higher concentrations of PEG, the proline content varied greatly. The activity of SOD increased firstly, and then decreased. With the increase of PEG concentration, the SOD activity peaks came earlier. Berberine content in the leaves increased at the beginning, and then decreased gradually with the increase of duration. Under higher concentration of PEG, the berberine content reached its peak earlier, while under lower concentration of PEG, the berberine content peak came later but the maximum value was higher.

Key words *Phellodendron amurense*; drought stress; seedling physiology; berberine content

植物的生长不仅受到自身遗传物质的控制,还受到众多环境因子的影响,如光照、温度、水分和土壤中营养元素等在时空上的差异^[1]。在众多环境因素中,限制植物生长的最普遍因素之一是水分,

尤其在干旱的环境中^[2]。植物经常遭受干旱胁迫的危害,全世界干旱、半干旱地区的面积占总面积的43%,而中国更为严重,约占51.9%^[3]。干旱不仅引起土地沙化、草地退化、湿地萎缩、森林锐减、

收稿日期:2011-07-20

基金项目:林业公益性行业科研专项(201104066)、2010年黑龙江省博士后科研启动金、东北林业大学研究生论文资助项目(gram 09)。

第一作者:覃炳醒。主要研究方向:植物生理生态学。电话:0451-82191827 Email: qbx1987@163.com 地址:150040 哈尔滨市和兴路26号东北林业大学332信箱。

责任作者:张玉红,博士,副教授。主要研究方向:药用植物生理学。电话:0451-82192335 Email: pzhangyh@126.com 地址:同上。

本刊网址: <http://journal.bjfu.edu.cn>

生物多样性急剧下降等一系列的生态环境问题,并且已严重威胁到人类社会的可持续发展。干旱已成为影响植物正常生长发育、生理代谢和生理功能最主要的非生物胁迫因子之一^[4],因此弄清植物的抗旱机理,提高抗旱能力成为当前人们研究最多的非生物胁迫因子之一^[5-6]。

黄檗(*Phellodendron amurense*)又称黄波萝、黄柏,芸香科(Rutaceae)黄檗属植物,属第三纪孑遗植物,中国特有种,国家Ⅱ级重点保护的野生濒危植物^[7]。同时,黄檗材质优良,其根、皮、枝、叶等器官富含具有抗菌、抗病毒和防治心血管疾病作用的小檗碱、药根碱和掌叶防己碱,是我国经济价值较高的珍贵用材树种(东北3大硬阔之一)和3大木本药用植物之一^[8]。到目前为止,对黄檗的研究主要集中在其药用成分^[9-10]和组织培养^[11-13]等方面,对有关干旱胁迫条件下黄檗幼苗生理变化特性和小檗碱含量的系统性研究还未见报道。

本文通过模拟干旱环境研究黄檗幼苗在干旱胁迫条件下的生理变化和叶中小檗碱含量变化,旨在揭示黄檗干旱胁迫下生理变化之间的关系,了解黄檗的抗旱机制,为黄檗的高产栽培和推广提供光合生理生态方面的理论依据与参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本论文所用黄檗幼苗均为4个月龄的实生苗。黄檗种子来自黑龙江省牡丹江。在黄檗种子播种前3个月与湿沙相混,贮于4℃的冰箱里以打破休眠。播种后置于Conviron人工气候箱里进行培养,当黄檗种子萌发2片真叶后,移苗到珍珠岩基质里培养,第1个月2d浇灌1次Hoagland营养液,之后用营养液和水交替浇灌。培养到幼苗有6~8片真叶时进行处理。

1.2 研究方法

1.2.1 PEG 模拟干旱体系的建立

选用PEG 8000来模拟黄檗干旱处理。把PEG 8000用培养液配置成浓度为5%、10%、和20%的溶液。把黄檗幼苗的根系清理干净并用蒸馏水清洗,去除残留水分,放入盛有配制好的3种浓度的PEG溶液中,黄檗幼苗根系全部浸入在溶液中,放入培养箱。

按照下列时间取样:对照、处理0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、7.0、9.0 h分别取样,用重蒸水迅速冲洗干净,并用滤纸吸干表面水分后置入-80℃超低温冰箱保存备用。

1.2.2 丙二醛、脯氨酸含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性测定

参照文献[14]方法。

1.2.3 膜相对透性的测定

参照文献[15]方法。

1.2.4 小檗碱的提取及含量测定

利用超声波萃取法提取,高效液相色谱法(HPLC)^[16]检测小檗碱的含量。

1.3 数据处理

采用Excel和SPSS软件对所有试验数据进行分析、统计。

2 结果与分析

2.1 PEG 处理对黄檗叶片中丙二醛含量的影响

丙二醛作为在逆境条件下细胞膜脂过氧化的重要产物,可与细胞膜上的酶、蛋白质交联或结合使之失活,导致膜透性增大,从而引起生物膜的结构和功能的紊乱,导致细胞代谢出现紊乱而死亡,因此对丙二醛含量的研究能够反映出植物的抗逆程度。从图1可以看出,黄檗叶片在不同浓度PEG胁迫处理过程中MDA含量变化各异。5% PEG 胁迫处理下,MDA含量不但没有增加,反而减少,而且在整个胁迫进程中一直低于胁迫前的水平;在10% PEG 处理下,MDA 的含量较处理前有所增加,但增加量也较少,只是在处理9 h时才有明显增加,比对照增加了44%。说明较低浓度的PEG可能减弱膜脂的过氧化作用,对膜脂过氧化起到一定的防御作用^[17]。而20% PEG 胁迫处理下,随着处理时间的延长,MDA 的含量一直在增加,当处理到4 h,MDA的含量增加到最大,而后开始减小,但仍比处理前的要高。

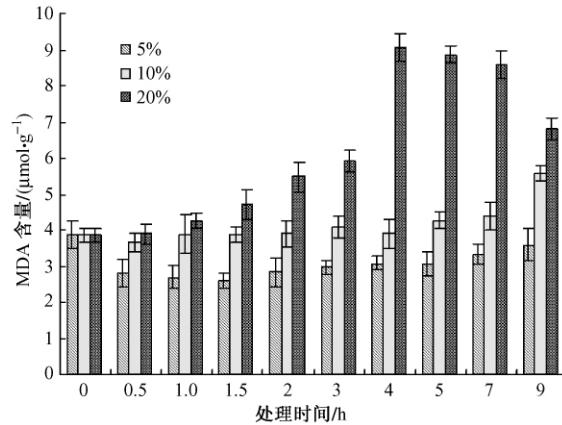


图1 不同浓度PEG处理下黄檗叶片中MDA含量的变化

Fig. 1 Variation of MDA content in leaves of *P. amurense*

seedlings under PEG stress with varied concentrations

2.2 PEG 处理对黄檗幼苗叶片质膜透性的影响

细胞膜是脂质双层结构,具有选择透性,是阻

挡细胞外各种胁迫因子的最重要的屏障,当植物遭受到外界逆境危害时,导致其结构和功能受到破坏,进而细胞膜透性增大,因此细胞膜的透性变化反映了外部不良环境对植物细胞的伤害程度,同时细胞膜在逆境下的稳定性也反映了植物抗逆性的高低^[18]。不同的PEG浓度胁迫处理对黄檗幼苗质膜透性的影响大致相似,只是对质膜伤害程度不同,不同浓度PEG胁迫下,黄檗幼苗叶片的质膜透性均随胁迫时间呈波动上升趋势。在胁迫处理1.5 h时出现高峰,2 h时稍微有下降,然后又上升,在胁迫处理到9 h时,除5%PEG处理外,其他2个处理几乎都达到100%。说明在前1.5 h,黄檗幼苗膜的伤害逐渐加重,但由于细胞内的自我修复系统的作用,胁迫时间在1.5~2 h期间,膜透性稍有下降,随后逐渐彻底崩溃。并且相同胁迫时间,PEG浓度越大,对质膜伤害也越大,当胁迫处理2 h时,质膜透性都超过50%,此后对膜的伤害程度不再与PEG浓度相关(图2),说明在膜受伤害的初期,高浓度PEG对质膜的影响较大,但当膜被伤害到一定程度后,增加相对较小的浓度就会加大对膜的伤害。

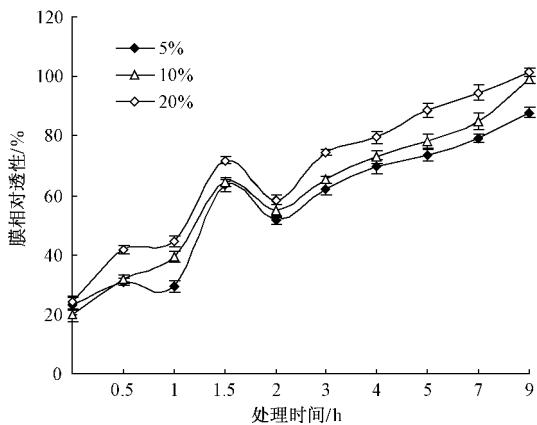


图2 不同浓度PEG处理对黄檗幼苗叶片膜相对透性的影响

Fig. 2 Effects of membrane electrolyte leakage of leaves of *P. amurense* seedlings under PEG stress with varied concentrations

2.3 PEG处理对黄檗叶片中脯氨酸含量的影响

自从20世纪50年代Kemble^[19]首先发现受旱的黑麦草(*Lolium perenne*)叶片中有游离的脯氨酸,随后在玉米(*Zea mays*)、小麦(*Triticum aestivum*)等多种农作物中也发现,但脯氨酸与抗旱性关系的研究大多是对草本植物和农作物进行,而对木本植物,特别是对药用植物的研究少有报道。为此对干旱条件下黄檗叶片内脯氨酸的含量变化进行了研究,测定结果如图3所示。

从图3中可以看出,不同浓度PEG处理下对黄檗细胞内脯氨酸含量都是先降低,后上升的。随着胁迫处理的时间延长,叶片中脯氨酸的含量逐渐提

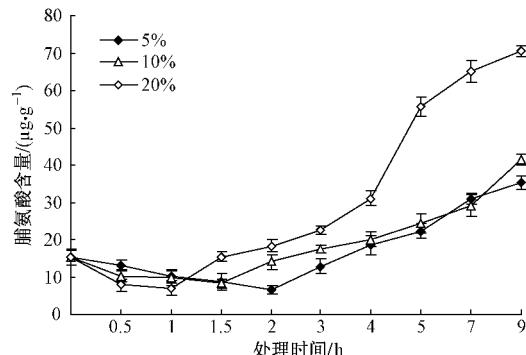


图3 不同浓度的PEG处理下黄檗叶中脯氨酸含量的变化

Fig. 3 Variation of proline content in leaves of *P. amurense* seedlings under PEG stress with varied concentrations

高。对于浓度为5%的PEG胁迫处理下,脯氨酸在3 h前低于对照,随后急速上升,到9 h时增加到对照的234%。在浓度为10%PEG胁迫下,脯氨酸的含量由15.17 μg/g增加到了41.42 μg/g,比对照增加了173%。而在20%PEG重度胁迫处理下,脯氨酸的含量比对照增加了365%。从脯氨酸的含量变化看出,对于浓度越大的PEG模拟胁迫处理,黄檗对干旱的敏感程度越大。

脯氨酸作为植物响应干旱逆境重要的渗透调节物质之一,它在细胞内累积为维持植物正常的生理功能起到了重要作用;因此干旱逆境下黄檗体内脯氨酸含量提高可以增加黄檗的抗旱性。但这种积累只有在适度的范围内,植物的抗旱力才能提高,否则会因消耗过多的碳水化合物而导致植物死亡。渗透调节物质的积累到什么程度才能更有利干增强植物的抗旱性,这将有待于我们的进一步的研究。

2.4 PEG处理对黄檗叶片中SOD活性的影响

SOD酶作为植物抵抗胁迫环境的第一道防线,能够与自由基O₂⁻反应生成H₂O₂,从而减少氧自由基对植物体的伤害。从图4中可以看出,在3种不同浓度PEG胁迫处理下,SOD酶活性都先升高后降低,呈单峰曲线。对于浓度相对较低的5%和10%的PEG处理下,都是在1.5 h时SOD酶活性达到最大值,而后开始下降,到第9 h时,5%PEG下的SOD酶活性仍稍高于对照,而10%PEG处理下的SOD酶活性与对照相当。而在20%PEG处理下,SOD酶则在胁迫的第1 h活性就达到了最大值,而后活性一直持续降低,到第9 h时,SOD活性明显低于对照,且比对照下降了28.4%。

从SOD活性的变化(图4)可以看出,较短时间胁迫处理,黄檗幼苗中的SOD活性明显增强,对胁迫过程中产生过剩的氧自由基能够及时有效地清除,减轻胁迫对植物体造成的伤害;但随持续的胁

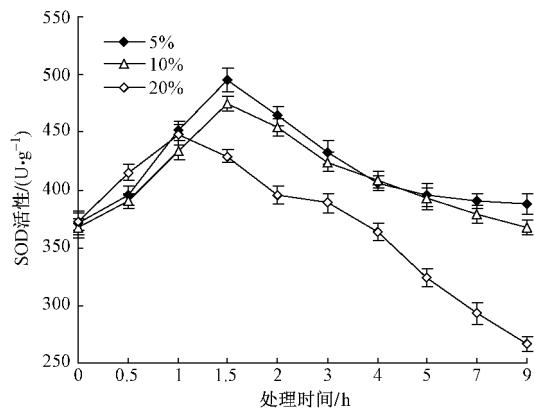


图4 不同浓度PEG处理下对黄檗幼苗叶片中SOD酶活性的影响

Fig. 4 Variation of SOD activity in leaves of *P. amurensis* seedlings under PEG stress with varied concentrations

迫处理,SOD酶的活性明显受到抑制。

2.5 PEG处理对黄檗叶片中小檗碱含量的影响

有关研究表明,水分胁迫有利于植物中生物碱的积累^[20]。但通过对黄檗幼苗用不同浓度的PEG模拟干旱处理的结果表明,在不同浓度的PEG胁迫条件下生长的黄檗,叶片中小檗碱的含量一直呈上升趋势,达到最大值后又下降,但胁迫处理9 h的黄檗幼苗叶片中小檗碱的含量均比对照含量高。

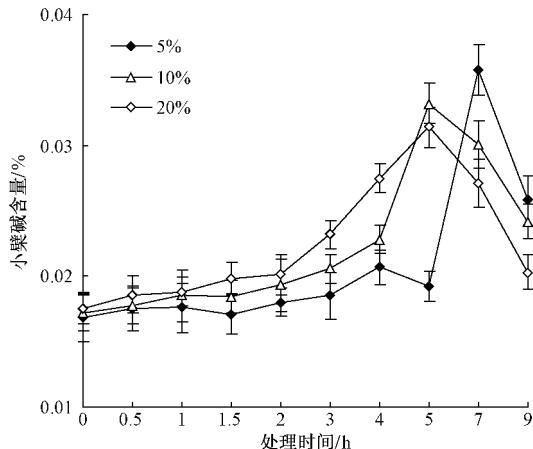


图5 不同浓度PEG胁迫处理下黄檗幼苗叶片中小檗碱含量变化

Fig. 5 Variation of berberine content in leaves of *P. amurensis* seedlings under PEG stress with varied concentrations

3 结论与讨论

近年来的研究表明,植物在逆境条件下,植物细胞膜质过氧化过程中O₂⁻产生率增高,细胞内的自由基代谢平衡被破坏,植物细胞内积累过剩的自由基加速了膜质的过氧化作用,导致丙二醛等过氧化产物的增多,表明叶膜细胞已被伤害,最终导致了膜的结构及生理完整性的破坏,这已被多数研究者所认可^[18-21]。黄檗在PEG模拟干旱胁迫下,叶片

细胞质膜透性增大,丙二醛生成增加,这与前人研究结果一致^[22]。脯氨酸作为植物抗逆反应的另一个重要指标已被研究者认同,黄檗在模拟干旱胁迫下脯氨酸含量先降低后升高,而且浓度越大的PEG处理,脯氨酸升高的越多。说明脯氨酸在植物体的累积有助于提高黄檗幼苗的抗旱性,其含量高低可以作为鉴定黄檗抗旱性的依据。

在正常的生长环境中,植物在长期进化过程中已经形成了活性氧自由基产生与及时清除的动态平衡状态^[22],而在干旱胁迫下,植物细胞内自由基的动态平衡被打破,清除能力降低,自由基在细胞内大量积累,引起植物体内的氧化胁迫,使生物膜膜脂受到损害而对植物造成伤害。与植物细胞对活性氧的清除能力也反映出植物抗旱的强弱^[18]。SOD作为清除植物细胞内活性氧自由基的一个关键酶,对植物的抗性研究意义较大。本文研究结果显示,黄檗幼苗在3种不同PEG浓度胁迫下,短时间内SOD酶活性都表现活跃;但随着持续胁迫处理,酶活性下降,而且PEG浓度越大,SOD酶活性下降出现的时间越早。说明植物细胞在对活性氧自由基清除能力存在着一个临界值,并且这个临界值随PEG浓度越大,出现的时间越早,超过了这个临界值,胁迫可能导致植物受到较大损伤。

在逆境胁迫下,植物中次生代谢产物含量的变化是一个新的研究热点。目前已有的研究表明,植物在逆境下其次生代谢产物含量会提高。Satoh等^[23]研究认为,干旱胁迫提高了欧洲赤松(*Pinus sylvestris*)和挪威云杉(*Picea abies*)中一些萜类化合物和树脂的含量;Zu等^[24]认为在从25到44℃梯度升温下对喜树(*Camptotheca acuminata*)进行热胁迫,喜树叶中的喜树碱含量在38℃下的最高,提高了50%,10-羟基喜树碱的含量在40℃下达到最高,其含量提高了5倍。在对黄檗幼苗在不同浓度PEG模拟胁迫下,小檗碱含量随胁迫时间延长而升高。5%的PEG下,胁迫7 h小檗碱含量达到最大,为原来的2.1倍,而后含量下降;10%和20%PEG下,胁迫5 h时小檗碱含量达到最大分别是对照时的1.93和1.79倍,而后含量都下降,到胁迫结束时的第9 h,小檗碱的含量都比对照时的含量要高,这为药用植物提高有效成分含量的研究提供了一个切实可行的思路和途径。

参 考 文 献

- [1] 肖春旺,周广胜,马风云. 施水量变化对毛乌素沙地优势植物形态与生长的影响[J]. 植物生态学报, 2002, 26(1): 69-76.
- [2] LANGE O L, KAPPEN L, SCHULZE E D. *Water and plant life: Problems and modern approaches* [M]. Berlin: Heidelberg Springer Verlag, 1976.

- [3] 何开跃,李晓储,黄利斌,等. 干旱胁迫对木兰科5树种生理生化指标的影响[J]. 植物资源与环境学报,2004,13(4):20-23.
- [4] 彭祚登,李吉跃,沈熙环. 林木抗旱性育种的现状与策略思考[J]. 北京林业大学学报,1998,20(4):98-103.
- [5] 谢志玉,张文辉,刘新成. 干旱胁迫对文冠果幼苗生长和生理生化特征的影响[J]. 西北植物学报,2010,30(5):948-954.
- [6] 周洁,黄璐琦,郭兰萍,等. 干旱胁迫下苍术幼苗生理特性变化研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(19):2163-2166.
- [7] 傅立国. 中国植物红皮书:稀有濒危植物:第1册[M]. 北京:科学出版社,1992:572.
- [8] 肖培根,李大鹏,杨世林. 新编中药志[M]. 北京:化学工业出版社,2002:664-669.
- [9] LEU C H, LI C Y, YAO X, et al. Constituents from the leaves of *Phellodendron amurense* and their antioxidant activity [J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 54(9): 1308-1311.
- [10] 秦彦杰,王洋,阎秀峰. 黄檗主要药用成分的分布规律[J]. 林产化学与工业,2007,27(2):62-66.
- [11] AZAD M A K, YOKOTA S, OHKUBO T, et al. In vitro regeneration of the medicinal woody plant *Phellodendron amurense* Rupr. through excised leaves [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2005, 80: 43-50.
- [12] 张玉红,曲伟娣. 培养条件对黄檗快速繁殖影响的研究[J]. 植物研究,2008,28(2):236-239,256.
- [13] 曲伟娣,张玉红. 不同因子对黄檗愈伤组织诱导的影响[J]. 经济林研究,2010,28(2):49-54.
- [14] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2003:172-173,192-280.
- [15] 张玉红. 黄檗干旱生理基础及差异蛋白质组学研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2004.
- [16] 秦彦杰,张玉红,王洋,等. 黄檗中生物碱含量的高效液相色谱分析[J]. 林产化学与工业,2004,24(增刊1):115-118.
- [17] 阎秀峰,李晶,祖元刚. 干旱胁迫对红松幼苗保护酶活性及脂质过氧化作用的影响[J]. 生态学报,1999,19(6):850-854.
- [18] CHERUTH A J, KSOURI R, RAGUPATHI G, et al. Antioxidant defense responses: Physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2009, 31: 427-436.
- [19] 罗音,孙明高. 干旱胁迫对5树种叶片中脯氨酸含量的影响[J]. 山东林业科技,1999(4):1-4.
- [20] G R 沃勒,E K 诺瓦茨基. 生物碱的生物学及其在植物学中的代谢作用[M]. 朱太平,译. 北京:科学出版社,1984:97-101.
- [21] 杨暹,关佩聪. 干旱胁迫与菜心叶片活性氧代谢的研究[J]. 华南农业大学学报,1998,19(2):81-85.
- [22] JUNG S S. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arahidopsis thaliana* subjected to droughts [J]. *Plant Science*, 2004, 166: 459-466.
- [23] SATU T, MANNINEN A M, RISTO R, et al. Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in scots pine and Norway spruce seedlings [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2003, 29(9): 1981-1995.
- [24] ZU Y G, TANG Z H, YU J H, et al. Different responses of camptothecin and 10-Hydroxycamptothecin to heat shock in camptotheca acuminata seedlings [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(7): 809-814.

(责任编辑 赵 勃)