

Exogenous Ethephon and Zinc Synergistically Increased Vinblastine Levels in *Catharanthus roseus* Leaves

Ling Jin, Meijiao Gao, Qi Chen, Xiaorui Guo*

The Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin
Email: *xruiquo@nefu.edu.cn

Received: Nov. 22nd, 2013; revised: Dec. 20th, 2013; accepted: Dec. 28th, 2013

Copyright © 2014 Ling Jin et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. In accordance of the Creative Commons Attribution License all Copyrights © 2014 are reserved for Hans and the owner of the intellectual property Ling Jin et al. All Copyright © 2014 are guarded by law and by Hans as a guardian.

Abstract: Under Zinc (Zn) stress conditions, the production of vinblastine was increased in the medicinal plant *Catharanthus roseus* leaves. The combinational treatment with Zn and ethephon further promoted vinblastine accumulation in *C. roseus* leaves compared with Zn-stressed plants. This elevation of vinblastine induced by ethephon was dependent on the dose of exogenous ethephon. Besides, the dry biomass accumulation of leaves and ethylene release were also increased significantly in *Catharanthus roseus* seedlings affected by the combined treatment with exogenous Zn and ethephon.

Keywords: *Catharanthus roseus*; Zinc Stress; Ethephon; Vinblastine

外源乙烯利、锌协同促进长春花叶片中长春碱的含量

金 玲, 高媚娇, 陈 琪, 郭晓瑞*

东北林业大学, 森林植物生态学教育部重点实验室, 哈尔滨
Email: *xruiquo@nefu.edu.cn

收稿日期: 2013年11月22日; 修回日期: 2013年12月20日; 录用日期: 2013年12月28日

摘 要: 药用植物长春花叶片中含有的长春碱在外源锌胁迫条件下其含量有一定程度上的增加。而在此基础上加入外源乙烯利后的协同作用下, 更加促进了长春碱含量的增加, 并且随着处理浓度的增加使之呈现出规律性变化。在外源锌和乙烯利的协同作用条件下, 长春花叶片的干物质积累以及乙烯气体释放量等参数也有显著提高。

关键词: 长春花; 锌胁迫; 乙烯利; 长春碱

1. 引言

药用植物长春花(*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), 夹竹桃科(Apocynaceae), 长春花属(*Catharanthus*)^[1]。不同生境下的长春花植株在生活史过程中表现出较强的可塑性和耐受性, 因而是研究植物生理生态学较好的材料之一。其体内的生物碱例如长春碱、文多灵等药用成分对人类防治癌症有非常高的利用价值。

*通讯作者。

植物次生代谢产物(plant secondary metabolite), 是指植物体内一大类并非植物生长发育所必需的小分子有机化合物, 主要可分为酚类化合物、萜类化合物以及含氮有机碱三大类。它们不仅对于植物自身在复杂环境中的生存和发展起重要作用, 还具有重要的生理活性及药理作用^[2]。然而, 药用植物中次生代谢产物含量往往较低, 且天然药用植物资源有限, 影响了其活性成分的开发和利用。于是人们开始探索各种

提高次生代谢产物含量的途径,即次生代谢工程。

锌(Zn)不但是一种常见的有毒重金属元素,同时也是植物正常生长所必须的微量元素,但过量的锌是有害的^[3]。并且锌作为一种过量的重金属涉及到一部分有机体的生物代谢流程^[4],如锌胁迫条件下可以在一定程度上促进植物的次生代谢。乙烯作为植物的成熟激素是植物体内目前已知的五大类激素之一,对植物的生命活动有重大的调节作用,乙烯利被植物吸收后能增加乙烯释放量。不但可以促进长春花幼苗的次生代谢,还可以在在一定程度上缓解锌胁迫对幼苗的伤害作用。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

本实验选取的药用植物长春花种子来自于浙江富阳长春花种植基地,为保证长春花生长环境的统一性从播种到处理都在东北林业大学森林生态学教育部重点实验室人工气候箱(ZPW-400, China)内培养,培养条件为光照 6 级(day)/光照 0 级(night),光照时间为 6:00~18:00,湿度 80%,温度 28℃(day)/25℃(night)。幼苗均在长春花发芽后移栽于装有珍珠岩、下部有孔的黑色营养杯中,定期对幼苗浇灌 1/2 浓度的 Hoagland's 营养液^[5],并用空调调节室内温度,使之最适宜长春花生长。

2.2. 试验方法

本文主要研究营养液培养条件下长春花幼苗响应外源 Zn、ET 胁迫条件下植株生长及叶片中次生代谢物长春碱含量的变化规律。该营养液培养条件为 1/2 Hoagland's 营养液,营养液中 Zn 本底含量为 $6.66 \times 10^{-4} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,含量很少,相对于处理浓度可以忽略不计。

处理幼苗时在 1/2 Hoagland's 营养液的基础上加入 ZnCl_2 (分析纯),乙烯利(Ethephon)来处理长春花幼苗,通过预实验筛选 Zn 的浓度选择 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,而 ET 浓度定为 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $70 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,另外还有对照 CK,共计 13 种处理。试验期间,处理液每 3 d 浇一次,每次 1L 浇于托盘中。处理 7 d 后植株取样,根部用去离子水冲洗干净,去掉多余水分后称重。并将叶、茎、根分开 70℃ 烘干至恒重(3 d)。取烘干的长春花各组织部位

样品分析天平精密称量(精确至 0.0001 g),再用研钵研磨成粉末,取叶、根的粉末用分析天平精密称量 0.1 g,置于 10 mL 离心管中,加入 5 mL 甲醇,超声提取 20 min, 8000 rpm 离心 10 min 后提取上清液。再将沉淀残渣依次加入 3 mL、2 mL 甲醇重复提取 2 次,合并上清液,在 40℃ 条件下负压空化强化提取至干^[6]。样品以 1 mL 甲醇复溶,超声 20 min 使挂壁的提取物充分溶解,溶液转入 2.5 mL 离心管中,12,000 rpm 离心 10 min 后提取上清液,再经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后供 HPLC 检测。

2.3. 色谱条件:

色谱柱: Waters 5C₁₈-AR-II (4.6 × 150 mm);

流动相: A 相, 甲醇; B 相, 磷酸二乙胺: 990 mL 超纯水 + 10 mL 二乙胺(磷酸调 pH 至 7.3~7.5); A:B = 68:32;

流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 220 nm; 柱温: 25℃; 进样量: 20 μL 。

3. 结果与分析

3.1. Zn 胁迫条件下加入 ET 促进长春碱的含量

由图 1 可以看出叶片中长春碱的含量随着外源 Zn 处理浓度的增加而呈现出逐渐递增的趋势;而在加入外源 ET 后,在 $\text{Zn}50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + \text{ET}50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理浓度条件下对长春碱含量的提高最为显著,相当于 CK 的 1.78 倍, $\text{Zn}10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + \text{ET}50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理浓度条件下 1.56 倍。

3.2. 外源 Zn、ET 协同作用下对长春花干物质积累的影响

由图 2 可见,外源 Zn 胁迫条件下长春花叶片干物质重相对于 CK 略有增加但不显著,加入外源 ET 后,叶片的干物质重在 $\text{Zn}80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + \text{ET}50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理浓度下增加显著,相当于 $\text{Zn}80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 1.23 倍;而 $\text{Zn}50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + \text{ET}50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理浓度条件下则为 $\text{Zn}50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 1.1 倍。

3.3. 外源 ET 作用下长春花乙烯气体释放的影响

由图 3 可以看出外源 ET 处理长春花幼苗,随着处理浓度和处理时间的增加植株乙烯气体释放量也

随之增加, 并大体呈现出递增的变化趋势, 随着时间的增加递增趋势更加显著。

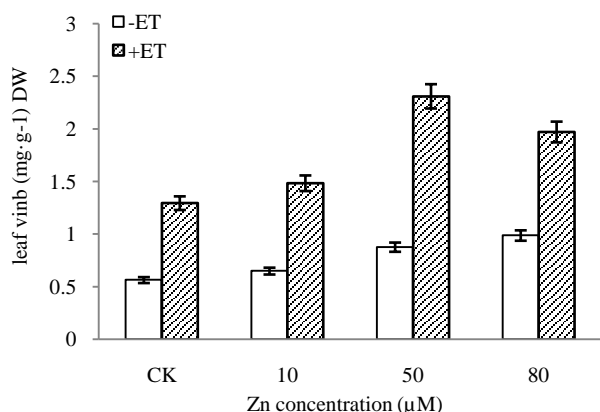


Figure 1. With the increase of the contents of Vinblastine by ET in Zn stress

图 1. Zn 胁迫条件下加入 ET 促进长春碱的含量的增加

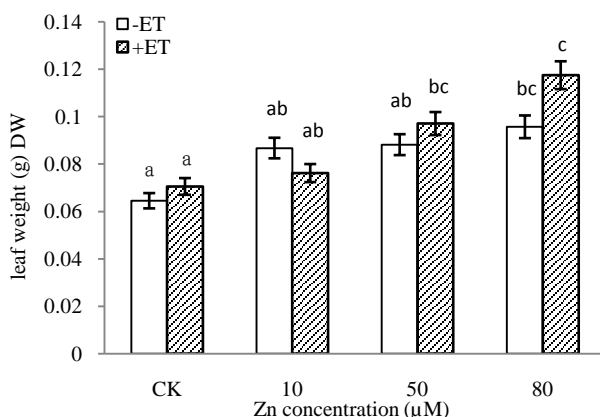


Figure 2. The changes of dry matter accumulation of *Catharanthus roseus* leaves in synergistic effect of exogenous ET and Zn

图 2. 外源 ET、Zn 协同作用下长春花叶片干物质积累的变化

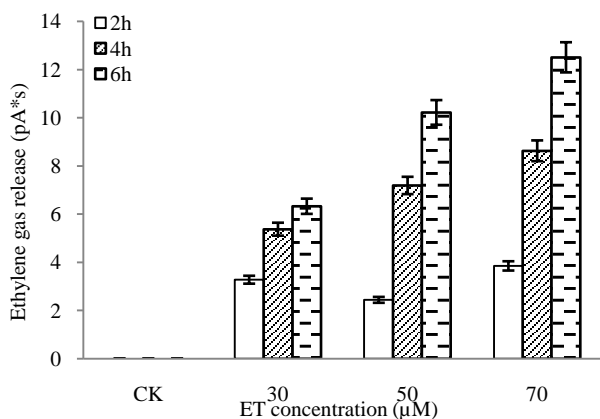


Figure 3. The changes of *Catharanthus roseus* ethylene gas emissions over time by exogenous ET

图 3. 外源 ET 作用下长春花乙烯气体释放量随时间的变化

3.4. 外源 Zn、ET 协同作用下对长春花生物碱含量的影响

在外源 ET 基础上加入 Zn50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 在 ET、Zn 协同作用下长春花幼苗叶片中长春碱含量在 ET50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + Zn50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理条件下达到最大值(见图4), 相当于 CK 的 2.18 倍。由此可见在 ET50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + Zn50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理条件下对长春花叶片中长春碱含量促进最为显著。

4. 结论

在以往的研究中, 锌缺乏和锌过量在顶部的叶片和叶片边缘表现出萎黄病, 并且整株植物生长都弱于锌充足的条件下。这一研究结果与 Yang^[7]和 Gupta^[8]等人一致。据报道, 分别在锌缺乏和锌过量的条件下葡萄和黑豆也得出类似的结果。而在青蒿^[9]和菜豆^[10]报道中表明 Zn 胁迫条件下减少叶片的生长。

综合本文上述实验数据分析得出, 锌和乙烯利对药用植物长春花的生长虽然有一定的胁迫作用, 但是相应的也提高了叶片中长春碱含量和叶片干物质积累量。并且在乙烯利与锌的协同作用下不但更加显著的提高了长春碱的含量, 而且乙烯利在一定程度上缓解了锌胁迫对长春花植株的伤害。通过实验观察, 处理浓度在 ET50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + Zn50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对长春碱含量的提高最为显著, 相比较单一锌胁迫 Zn50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下也有大幅度提高。单一锌胁迫条件下和锌、乙烯利协同作用下对长春花幼苗叶片的干物质积累都有显著的增加, 而且后者增加效果更为明显。

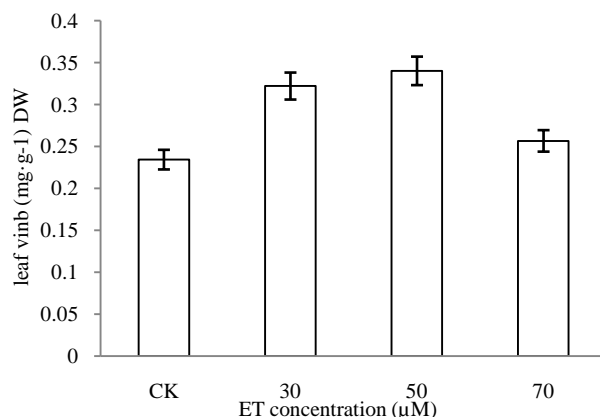


Figure 4. The changes of Vinblastine of *Catharanthus roseus* leaves in synergistic effect of exogenous ET and Zn

图 4. 外源 ET、Zn 协同作用下长春花长春碱积累的变化

通过观测长春花叶片乙烯气体释放量的参数可以看出在 4h 和 6h 的取样时间点乙烯气体释放量随着 Zn 处理浓度的增加而呈现出梯度的增加。总之,外源 Zn、ET 作用下的药用植物长春花幼苗其叶片干物质重、长春碱含量以及乙烯气体释放量都有显著的增加。

参考文献 (References)

- [1] 祖元刚, 王非, 马书荣, 唐中华, 郭晓瑞 (2006) 长春花生活史型研究. 科学出版社, 北京.
- [2] 生书晶, 赵炜, 赵树进 (2012) 药用植物次生代谢工程研究概况. *生命的化学*, **6**, 968-971.
- [3] PrabhuInbaraj, M. and Muthuchelian, K. (2011) The effect of zinc stress combined with high irradiance stress on membrane damage and antioxidative response in bean seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, **74**, 171-177.
- [4] Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I. and Lux, A. (2007) Zinc in plants. *New Phytologist*, **173**, 677-702.
- [5] Hoagland, D.R. and Arnon, D.I. (1950) The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station, Circular*, **347**, 4-32.
- [6] 杨磊, 张琳, 田浩, 牛卉颖, 祖元刚 (2008) 负压空化强化提取长春花中生物碱的工艺参数优化. *化工进展*, **11**, 1841-1845.
- [7] Yang, Y., Sun, C., Yao, Y., Zhang, Y. and Achal, V. (2011) Growth and physiological responses of grape (*Vitisvinifera* "Comber") to excess zinc. *Acta Physiologiae Plantarum*, **33**, 1483-1491.
- [8] Gupta, B., Pathak, G.C. and Pandey, N. (2011) Induction of oxidative stress and antioxidant responses in vignamungo by zinc stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, **58**, 85-91.
- [9] Khudsar, T., Mahmooduzzafar, Iqbal, M. and Sairam, R.K. (2004) Zinc-induced changes in morpho-physiological and biochemical parameters in *Artemisia annua*. *Biologia Plantarum*, **48**, 255-260.
- [10] Polson, D.E. and Adams, M.W. (1970) Differential response of heavy beans (*Phaseolusvulgaris* L.) to zinc I. Differential growth and elemental composition at excess Zn levels. *European Journal of Agronomy*, **62**, 557-560.