

高温对长春花生活史型形成和生理代谢的影响

唐中华,焦琰,张学科,祖元刚*,高杨,孙艳斐,杨蕾,赵晓菊

(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:长春花(*Catharanthus roseus*)是重要的药用植物,广泛栽植于热带和亚热带地区。高温(40℃)是其生活史过程中常见的胁迫因子之一。为了研究高温对植物能量在营养和繁殖上分配格局和生理代谢的影响,运用生活史型理论与方法研究高温和对照温度条件下长春花生活史型和生理代谢动态特点。主成分分析法(Principal component analysis, PCA)对营养生长(Vegetative growth, V)、有性生殖(Sexual reproduction, S)和无性繁殖(Clone reproduction, C)等3类15种性状进行统计,发现4周后高温与对照温度条件下长春花生活史型划分结果分别为 $V_{0.480} S_{0.487} C_{0.032}$ 和 $V_{0.604} S_{0.385} C_{0.010}$ 。对高温处理过程中可溶性糖、生物碱和抗氧化剂的代谢规律研究发现,蔗糖含量在第4周增加了约7倍,达到了(1.41±0.23) mg/g;文朵灵、长春质碱和长春碱等3种生物碱在第2周增加了2倍,峰值分别达到(6.0±0.63) mg/g、(3.8±0.63) mg/g 和(35.6±2.8) μg/g;还原性谷胱甘肽(glutathione, GSH)从(153.3±11.8) nmol/g 升高到(348.7±19.9) nmol/g, 氧化型谷胱甘肽(GSSG)由(54.5±9.27) nmol/g 增加至(149.2±10.1) nmol/g, 均增加了1倍以上,GSH/GSSG比值则呈持续下降趋势。结果表明,高温使长春花能量固定总量增加了1倍以上,促进了有性繁殖和无性繁殖的投入,降低了营养生长方面的投入比例,这种能量分配格局的变化伴随着显著的生理代谢变化。

关键词:长春花;生活史型;主成分分析;生理代谢

文章编号:1000-0933(2006)11-3641-06 中图分类号:Q142,Q948.1 文献标识码:A

Effect of high temperature on life cycle forms and physiological metabolisms of *Catharanthus roseus*

TANG Zhong-Hua, JIAO Yan, ZHANG Xue-Ke, ZU Yuan-Gang*, GAO Yang, SUN Yan-Fei, YANGLEI, ZHAO Xiao-Ju (Key Laboratory of Forest Plant Ecology, the Ministry of Education of China, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China). Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(11): 3641~3646.

Abstract: *Catharanthus roseus* has been widely cultivated around subtropic and the tropics, due to the pharmaceutical application in cancer cure. High temperature (40℃) is the commonest stress factor during growth and development of *C. roseus*, exerting marked influences on allocating patterns of energy in vegetative growth and reproduction process and physiological metabolisms. In this paper, life cycle forms and physiological metabolism dynamics under different temperature were determined. Investigation of principal component analysis (PCA) on 15 kinds of phenotypic characteristics, separately being related to vegetative growth, sexual and clone reproduction, was conducted. The results showed that the life cycle forms of *C. roseus* under high and control temperature were $V_{0.480} S_{0.487} C_{0.032}$ and $V_{0.604} S_{0.385} C_{0.010}$.

The investigations on some physiological metabolites, including soluble sugar, alkaloids and antioxidants affected by high temperature revealed that at the fourth week of treatment, there was about 7-fold elevation of sucrose content, arriving at (1.41±0.23) mg/g. The concentrations of vindoline, catharanthine and vinblastine increased to peak values of (6.0±0.63) mg/g、(3.8±0.63) mg/g and (35.6±2.8) μg/g, 2-fold higher than the original values. The content of Glutathione (GSH) and its oxidative

基金项目:国家教育部重点资助项目(104191)

收稿日期:2006-01-18;修订日期:2006-09-20

作者简介:唐中华(1977~),男,江苏丹阳人,博士,主要从事植物生理生态学研究。

*通讯作者 Corresponding author. E-mail: zygorl@vip.hf.cn

Foundation item: The project was financially supported by the Key Project of Chinese Ministry of Education (No. 104191)

Received date: 2006-01-18; Accepted date: 2006-09-20

Biography: TANG Zhong-Hua, Ph.D., mainly engaged in plant physiological ecology.

form GSSG were observed to be enhanced about more than 1-fold by high temperature, respectively from (153.3 ±11.8) nmol/g to (348.7 ±19.9) nmol/g, from (54.5 ±9.27) nmol/g to (149.2 ±10.1) nmol/g. While the ratio of GSH/GSSG decreased step by step during this course. These results indicated that high temperature promoted assimilation and accumulation of resources and energy allocations into sexual and clone reproductions, with repressed distributions of resources to vegetative growth. The changes of life cycle forms, at the same time, was followed with coordinated variations of primary and secondary metabolisms affected by high temperature.

Key words: *Catharanthus roseus*; life cycle form; principal component analysis; physiological metabolism

在环境的影响下,植物在整个生活史过程中将可用资源按不同比例分配到营养生长和生殖生长(有性生殖和无性繁殖)上,在形态学(性状)、生理和分子等不同层次上形成显著差异,以适应环境变化获得最大的生存和繁殖效益^[1,2]。海三棱草在由低到高的不同高度光滩上生长,球茎、根状茎的生物分配比例逐渐下降,而花序的比例则逐渐上升,表明植物在生活史过程中,由无性繁殖向有性繁殖转变,这种转变可能有助于种群的扩散和生存^[3]。将植物性状划分为营养生长(Vegetative growth form, V)、有性生殖(Sexual reproduction form, S)和无性繁殖(Clone reproduction form, C)三类,运用主成分分析法(Principal component analysis, PCA)统计出资源在它们之间的分配比例,形成不同的生活史型,以公式 $V_xS_yC_z$ ($x + y + z = 1$) 表示^[4,5]。该方法将多种相关的性状进行分类和降维,最后进行对比,可以更全面地反映植物在不同生境条件下的能量分配格局。

植物除了在性状上响应环境变化,在生理代谢也有明显的变化^[5]。增加UV-B辐射使植物的核酸和可溶性蛋白质含量降低,降低叶绿素含量,还能降低IAA含量提高ABA含量^[6]。在高温胁迫条件下,叶片中可溶性糖含量持续增加,提高了植物的保水能力^[7]。植物对环境胁迫的忍耐与植物体内谷胱甘肽的氧化还原水平有关,它的合成能力的增强可能是植物对环境胁迫的内在响应之一^[8]。生物碱作为植物次生代谢物质也积极响应外界环境的变化^[9]。

长春花(*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)是重要的药用植物,由于含有的100多种生物碱多数具有抗癌活性,如长春碱和长春新碱,目前在世界上有广泛的栽培^[10]。长春花大都分布在热带和亚热带地区,高温(40℃)是其生长过程中常见的胁迫因子,对长春花栽培具有重要意义。为了认识高温对长春花能量分配格局及生理代谢的影响,本文从营养生长、有性生殖和无性繁殖等性状,以及可溶性糖、抗氧化剂和生物碱等生理代谢物质的含量水平出发,研究高温调控长春花生活史型形成和生理代谢的特点,为长春花高产栽培提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

萌发30d左右的长春花幼苗被移栽到12cm×12cm培养盒中,共100株苗转移到设在东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室温室内人工气候箱内,培养条件为温度28℃,光照强度400~500 μmol·m⁻²·s⁻¹,照射时间6:00~18:00,模拟自然光照情况设4个光照强度梯度,湿度50%~60%。培养30d后,将50株苗转移到温度为40℃的培养箱中,模拟高温处理,其它条件同上。处理时间为4周,每周固定时间取样,共取4次,分别测定生理指标参数。同时对4周后的生命史型各性状参数进行定量分析。

1.2 实验方法

1.2.1 长春花生活史型的定量分析 将长春花形态指标划分为3类,即营养生长、有性生殖和无性繁殖,各选择5个相关指标表征各类型性状。营养生长(X1-X5):株高、基径、叶柄长、分枝数、基部分枝到地面的距离;有性生殖(X6-X10):花数、单株花枝率、果实数、花盘直径、产蓄数;无性繁殖(X11-X15):节间长、基径、叶柄长、茎基部分枝数、基部分枝到地面的距离。采用SPSS11.0中主成分分析法对上述3类15个指标进行数据处理与分析,对不同条件下长春花的生活史型进行定量划分^[5]。

1.2.2 生理代谢特点测定与分析 对不同温度条件下长春花叶片中可溶性糖(蔗糖、葡萄糖和果糖)、生物

碱(文朵灵、长春质碱和长春碱)、激素(ABA)、谷胱甘肽和花青素等生理指标每周进行测定,重复5次。

(1) 可溶性糖测定

称取样品0.2g,加入1ml 80%的乙醇,超声20min,13000r/min离心,取上清。上清液经氮气吹干,加80%乙醇复溶,HPLC同时检测葡萄糖、果糖和蔗糖含量^[11]。

(2) 生物碱测定

取长春花叶片,50℃烘干后研磨,取0.3g,5ml甲醇超声提取20min,离心,取上清,重复一次,合并上清,浓缩至干,1ml甲醇定量复溶,HPLC同时检测文朵灵、长春质碱和长春碱的含量^[12]。

(3) 氧化还原型谷胱甘肽含量的测定

谷胱甘肽及其氧化型含量测定采用试剂盒(Dojindo Laboratorie, Japan)进行检测,取长春花叶片0.3g,液氮研磨后加入5-Sulfosalicylic Acid(SSA),超声15min,18000m/s离心10min,取上清液待用,分别测定还原型和氧化型谷胱甘肽含量^[13]。

2 结果

2.1 高温对长春花生活史型的影响

对营养生长、有性繁殖和无性生殖的15个性状参数分别进行标准化处理,消除量纲,得到各个参数的平均数和标准差,见表1。对数据初步分析发现,高温对长春花的营养生长、有性生殖和无性繁殖均具有明显的促进作用,显著高于对照温度条件。

表1 不同温度培养四周长春花形态性状参数

Table 1 Morphological characteristic of Catharanthus roseus cultured in different temperature

项目 Item	变量 Var.	性状 Morphological characteristics	40		28	
			平均数 Mean	标准差 St.D.	平均数 Mean	标准差 St.D.
营养生长参数	X1	株高 Individual high(cm)	32.167	1.795	13.367	2.065
Vegetative growth	X2	基径 Diameter(mm)	0.518	0.071	0.362	0.433
	X3	叶柄长 Leaf stalk length(cm)	1.733	0.252	0.867	0.057
	X4	分枝数 Branch quantity(个)	3.000	1.000	2.667	0.577
	X5	基部分枝到地面的距离 Distance from basal branch to ground(cm)	0.67	0.115	0.567	0.528
有性生长参数	X6	花数 Flower quantity(个)	4.667	2.082	2.667	1.528
Sexual reproduction	X7	单株花枝率 Flower branch ratio(%)	1.733	0.208	0.900	0.100
	X8	果实数 Fecundity ratio(个)	8.667	3.055	1.667	1.000
	X9	花盘直径 Discus diameter(cm)	2.833	0.693	2.113	0.252
	X10	产蕾数 Bud quantity(个)	5.667	1.154	5.000	3.055
无性生长参数	X11	节间长 Internodal length(cm)	1.733	0.252	1.167	0.379
Clonal reproduction	X12	基径 Diameter(mm)	0.518	0.115	0.362	0.043
	X13	叶柄长 Leaf stalk length(cm)	1.733	0.577	0.867	0.058
	X14	茎基部分枝数 Stem branch quantity(个)	0.333	0.603	1.333	0.153
	X15	基部分枝到地面的距离 Distance from basal branch to ground(cm)	0.67	0.071	0.567	0.577

对营养生长V、有性繁殖S和无性生殖C等3类样本进行主成分分析,根据各样本相关矩阵的特征根、贡献率,计算出各样本的主分量得分系数矩阵,见表2。从表2可以看出,各有1个主成分被提取。

根据主分量得分系数,分别计算出不同类型长春花在营养生长、有性生殖和无性生殖的主成分得分,结果见表3。对V、S和C的主成分得分进行归一化处理,得到对照和高温条件下长春花生活史型分别为 $V_{0.606}$ $S_{0.383}$ $C_{0.010}$ 和 $V_{0.480}$ $S_{0.487}$ $C_{0.032}$ 。从得分结果看,高温条件下总量为对照的2倍多,说明高温促进了植物能量的积累。从V、S和C的得分比例看,对照条件下营养生长比例占总量的60.6%,是有性生殖所占比例的2倍,无性繁殖比例很低,仅为1%左右;高温条件下,营养生长和有性生殖所占比例各为48.7%和48.7%,无性繁殖比例升高至3.2%。所以高温提高了能量在有性生殖上的投入,使植物在营养生长上的能量投入减少。

表2 长春花在不同生活史阶段主分量得分系数矩阵

Table 2 The coefficient matrix of principal components in different periods of life histories of different *Catharanthus roseus*

营养生长 Vegetative growth	变量 Var.	X1	X2	X3	X4	X5
	系数 Coef.	0.273	0.257	0.245	0.080	- 0.259
有性生殖 Sexual reproduction	变量 Var.	X6	X7	X8	X9	X10
	系数 Coef.	0.284	0.303	0.281	- 0.265	- 0.061
无性生殖 Clonal reproduction	变量 Var.	X11	X12	X13	X14	X15
	系数 Coef.	0.226	0.215	0.199	- 0.221	- 0.209

2.2 高温对生理代谢的影响

对温度处理不同时间的长春花叶片可溶性糖含量进行检测,结果显示葡萄糖(glucose, Gc)、果糖(fructose, Fru)及蔗糖(sucrose, Suc)含量在处理期间有明显的变化,见图1。不同温度处理对果糖影响不大,虽然在处理过程中,果糖有一定的变化,但处理结束时基本与起始含量持平。葡萄糖含量在高温条件下则有先降后增的趋势,由起始的(1.58 ± 0.09) mg/g 增加到最终的(3.49 ± 0.38) mg/g,增加了1倍多。蔗糖在处理和对照温度下均呈现持续升高的规律,特别是高温条件下,蔗糖含量增长速度更快,第4周期间其含量增加了约7倍,达到了(1.41 ± 0.23) mg/g。

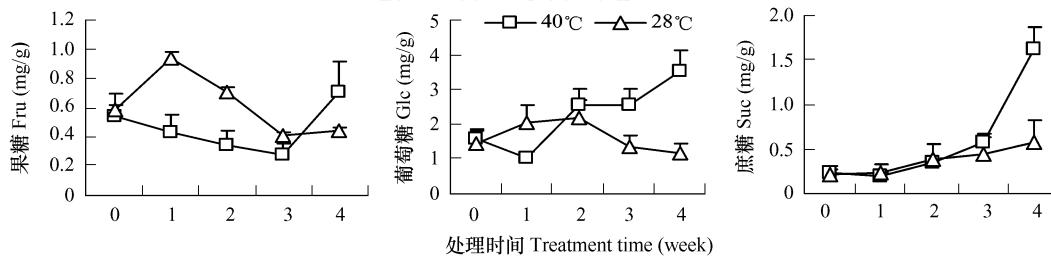


图1 高温对长春花可溶性糖含量的影响

Fig. 1 Effects of high temperature on soluble sugar contents in *C. roseus*

长春碱是长春花对文多灵(vindoline, Vin)、长春质碱(catharanthine, Cat)和长春碱(vinblastine, Vlb)含量测定结果见图2。结果显示,3种生物碱在高温条件下均呈现先增后降的规律,峰值分别达到(6.0 ± 0.63) mg/g、(3.8 ± 0.63) mg/g 和(35.6 ± 2.8) μg/g,均增加了2倍左右。对照温度条件下3种生物碱也出现同样的变化特点,只是峰值出现推后1周。到了第4周,不温度条件下的长春花内3种生物碱均降低到起始水平,说明生物碱对温度的响应是一个应激过程,这与以前的研究结果一致。

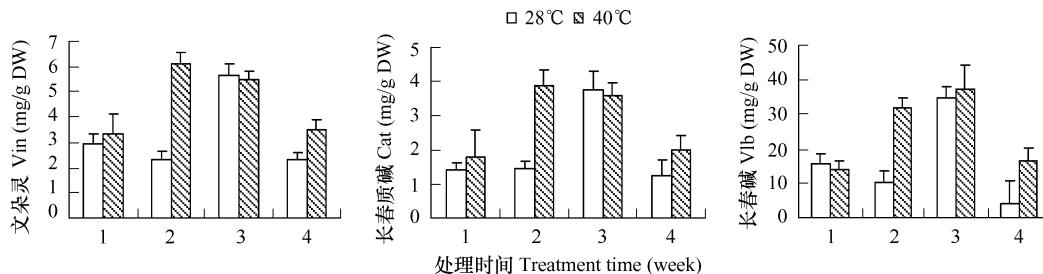


图2 高温对长春花生物碱含量的影响

Fig. 2 Effects of high temperature on alkaloid contents in *C. roseus*

谷胱甘肽是植物体内重要的非酶性抗氧化剂,其还原型和氧化型的含量及其比值反映了植物的氧化还原状态^[13]。为了检测高温对植物体内氧化还原状态,测定了还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)和氧化谷胱甘肽(GSSG)的含量及其比值,结果见图3。从图3可以看出,高温导致了GSH和GSSG的含量的持续增长,GSH从(153.3 ± 11.8) nmol/g 升高到(348.7 ± 19.9) nmol/g, GSSG由(54.5 ± 9.27) nmol/g 增加至(149.2 ± 10.1) nmol/g,均增加了1倍以上,而在对照温度条件下两者均无显著变化。GSH/GSSG的比值却是相反,高温导致了比值的持续下降,对照温度保持了长春花体内比值的平稳,表明高温激发了一定程度的氧化胁迫,植物氧化还原调节库能力较弱,而对照温度氧化胁迫和抗氧化能力都没有显著变化。

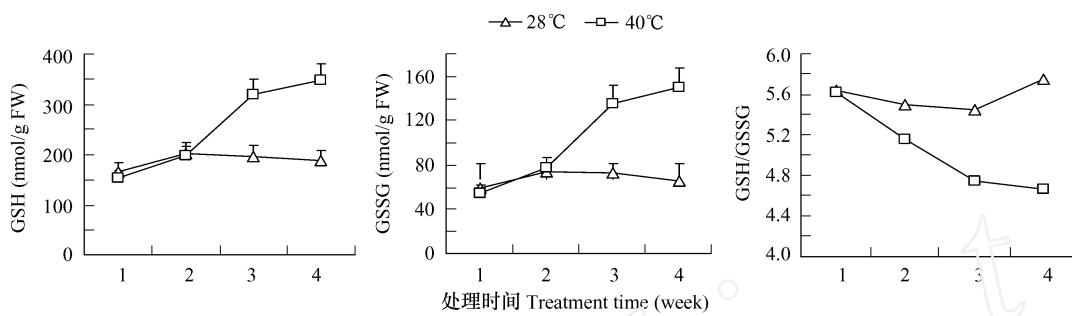


图3 高温对长春花还原型和氧化型谷胱甘肽含量的影响

Fig. 3 Effects of high temperature on the contents of GSH and GSSG in *C. roseus*

3 结论

3.1 高温对长春花生活史型的影响

运用主成分分析法计算出高温和对照温度条件下长春花生活史型结果分别为 $V_{0.480} S_{0.487} C_{0.0323}$ 和 $V_{0.604} S_{0.385} C_{0.010}$ 。观察不同温度条件下长春花形态学可以发现高温促进了株高、茎基、叶片面积、开花数量等指标有促进作用,与运用主成分分析法计算的结果类似。从主成分结果还可以看出,能量在V、S和C投入的比值在不同温度条件下也发生了改变,高温提高了生殖生长的比例,而降低了营养生长的比值,该结果与前人研究一致^[14],同时这一结果是定性分析不能直接观察到的,体现了主成分分析法的合理性。高温胁迫虽然增加了能量固定,但有性生殖比例过度增加到48.7%,改变了植物内的能量最优分配格局,造成了内部代谢紊乱等不良影响。

3.2 高温对长春花生理代谢的影响

高温对植物的碳代谢具有重要调控作用,能导致气孔关闭、可溶性糖积累^[15]。可溶性糖,包括蔗糖、葡萄糖和果糖,在叶片中大量积累可能与提高保水能力、增加抗性有关,同时还能作为能量供应物质和信号分子促进有性繁殖^[16]。本研究中,高温促进了蔗糖和己糖的积累,特别是在处理的第4周,高温培养的长春花蔗糖含量突然增加,与此时长春花开始大量开花、从V型向S型转变有关,与已有研究结论一致^[16,17]。从生活史型角度看,高温促进了生殖生长过程,形成VS生活史型,与增高的蔗糖含量水平有关,而在对照温度条件下,形成V生活史型,可溶性糖代谢变化不大。

氧化胁迫是植物和环境相互作用过程中最常见的一种生理胁迫,如干旱、机械损伤等都能引起间接的氧化还原状态变化,谷胱甘肽是植物中最重要的抗氧化剂之一^[13]。本研究中,对照温度条件下,长春花GSH和GSSG含量水平变化不显著,表明长春花在此温度下生长生理代谢正常,而高温条件则造成了显著的氧化胁迫,是生活史型形成的重要生理机制之一,与生活史型理论假设一致^[4]。

生物碱是植物一类重要的防御性次生代谢产物,在胁迫条件下植物常能积累较高含量的生物碱以应对环境变化^[10]。研究发现高温条件下长春花3种生物碱含量均在第2周出现峰值,而在2周之后两温度下的文多灵与长春质碱含量逐渐趋于同一水平,说明次生代谢能够随环境的改变而应激性地产生瞬时变化,而在适应之后就趋于平衡的状态^[18]。可以利用生物碱代谢的积累特点,通过调控环境促进生物碱的积累,为高产栽培

提供理论指导。

References:

- [1] Zhang D Y. Life History Evolution and Reproductive Ecology in Plants. Beijing: Science Press, 2004.
- [2] Sun R Y. Life cycle strategy. Chinese bulletin of botany, 1997, 32 (5) : 2 ~ 4.
- [3] Sun S C, Cai Y L, Liu H. Biomass allocation of *Scirpus mariquerter* along an elevated gradient in a salt marsh of the Yangtse River Estuary. Acta Botanica Sinica, 2001, 43 (2) : 178 ~ 185.
- [4] Zu Y G, Wang W J, Yang F J, et al. Dynamic analysis and diversity of plant life cycle forms. Acta Ecologica Sinica, 2002, 22(11) : 1811 ~ 1818.
- [5] Zu Y G, Zhao Z H, Yang F J, et al. Classification and reciprocal transformation of plant life cycle forms. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(9) : 2347 ~ 2353.
- [6] Liu Y, Luo N S, Zhong Z C, et al. Effects of enhanced ultraviolet-B (UV-B) radiation on diurnal variations of photosynthesis and water use efficiency in *Trichosanthes kirilowii* maxim. Journal of Southwest Agricultural University, 2003, 25 (5) : 377 ~ 380.
- [7] Pan Q M, Han X G, Bai Y F, et al. Advances in physiology and ecology studies on stored non ~ structure carbohydrates in plants. Chinese Bulletin of Botany, 2002, 19(1) : 30 ~ 38.
- [8] Alschner R G. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. Physiol. Plant, 1989, 77: 457 ~ 464.
- [9] Waller G R and Nowacki E K. Alkaloid biology and metabolism in plants. New York: Plenum Press, 1978.
- [10] Tang Z H, Yu J H, Yang F J, et al. Metabolic biology of plant alkaloids. Chinese Bulletine of Botany, 2003, 20(6) : 696 ~ 702.
- [11] Maria E B L, Maria-Cruz G G, et al. Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. The Plant Cell, 2004, 16: 1276 ~ 1287.
- [12] Luo M, Fu Y J, Zu Y G, et al. Rapid determination of 4 vinca alkaloids by reversed phase high performance liquid chromatography. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2005, 33(1) : 87 ~ 89.
- [13] Doulis AG, Hausladen A, Mondy B, et al. Antioxidant response and winter hardiness in red spruce (*Picea rubens* Sarg.). New Phytol., 1993, 123: 365 ~ 74.
- [14] Zhang Q F, Xu S, Li J L. A study on variations of physiological and biochemical indices of high temperature stress in *Festuca arundinacea* cv. Barlexas. Pratacultural Science, 2006, 23(4) : 26 ~ 28.
- [15] Wang L J, Huang W D. Heat stress and its signal transduction. Chinese Bulletine of Botany, 2000.
- [16] Masaaki O and Kiyoshi O. Effects of sugar on Vegetative Development and Floral Transition in Arabidopsis. Plant Physiol, 2001, 127: 252 ~ 261.
- [17] Bernier G, Havelange A, et al. Physiological signals that induce flowering. The Plant Cell, 1993, 5: 1147 ~ 1155.
- [18] Kutchan T M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. Plant Physiol, 2001, 125: 58 ~ 60.

参考文献:

- [1] 张大勇. 植物生活史进化与繁殖生态学. 北京: 科学出版社, 2004.
- [2] 孙儒泳. 生活史对策. 生物学通报, 1997, 32(5) : 2 ~ 4.
- [3] 孙书存, 蔡永立, 刘红. 长江口盐沼海三棱草在高程梯度上的生物量分配. 植物学报, 2001, 43 (2) : 178 ~ 185.
- [4] 祖元刚, 王文杰, 杨逢建, 等. 植物生活史型多样性及动态分析. 生态学报, 2002, 22(11) : 1811 ~ 1818.
- [5] 祖元刚, 赵则海, 杨逢建, 等. 植物生活史型的划分及其相互转化. 生态学报, 2005, 25(9) : 2347 ~ 2353.
- [6] 刘芸, 罗南书, 钟章成, 等. 增加 UV-B 辐射对栝楼光合及蒸腾日变化的影响. 西南农业大学学报, 2003, 25 (5) : 377 ~ 380.
- [7] 潘庆民, 韩兴国, 白永飞, 等. 植物非结构性贮藏碳水化合物的生理生态学研究进展. 植物学通报, 2002, 19(1) : 30 ~ 38.
- [10] 唐中华, 于景华, 杨逢建, 等. 植物生物碱代谢生物学研究进展. 植物学通报, 2003, 20(6) : 696 ~ 702.
- [12] 罗猛, 付玉杰, 祖元刚, 等. 反相高效液相色谱法快速测定长春花中 4 种生物碱. 分析化学, 2005, 33(1) : 87 ~ 89.
- [14] 张庆峰, 徐胜, 李建龙. 高温胁迫下高羊茅生理性状研究. 草业科学, 2006, 23(4) : 26 ~ 28.
- [15] 王利军, 黄卫东. 高温胁迫及其信号转导. 植物学通报, 2000, 17(2) : 114 ~ 120.