

逆境胁迫对菘蓝幼苗靛玉红含量的影响

段 飞, 杨建雄, 周西坤, 马天利, 俞嘉宁

(陕西师范大学生命科学学院, 陕西 西安 710062)

摘 要: 培养 30 d 的菘蓝无菌幼苗经 250 mmol/L NaCl、自然干旱、20 mmol/L ABA、4℃低温等不同方式逆境处理, 不同时间内取样, 用高效液相色谱法对其中靛玉红的含量进行测定。结果表明: 盐、干旱、ABA 处理 12 h 内能提高菘蓝幼苗中靛玉红含量 59.05%~161.67%, 低温胁迫处理 24 h 也能提高靛玉红含量 141.4%, 说明适当逆境胁迫处理能有效提高菘蓝幼苗体内靛玉红的累积量, 其中 250 mmol/L NaCl 胁迫处理效果最为显著。

关键词: 菘蓝; 靛玉红; 逆境胁迫; HPLC

中图分类号: R745.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2006)03-0111-04

菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.) 是十字花科大青属的一种常用的二年生药用植物, 我国南北各地广为栽培, 根和叶均可入药, 中药称菘蓝的根为板蓝根, 叶为大青叶。菘蓝整株含有靛玉红(indirubin), 为吲哚类衍生物, 是板蓝根和大青叶的有效成分^[1,2]。

植物在遭受外界不良因素, 如生物、非生物入侵、创伤等胁迫时, 植物细胞往往趋于向次生产物合成的方向转变^[3]。如许桢灿等^[4]应用薄层扫描法测定同一产地不同采收期的板蓝根中靛玉红含量, 发现 12 月份靛玉红含量最高, 认为北方产板蓝根宜在 11~12 月份之间采收。说明靛玉红的含量可能受环境胁迫的影响。我们用盐、低温、干旱、脱落酸(ABA)等不同胁迫方式处理培养 30 d 的菘蓝无菌幼苗, 通过高效液相色谱法测量其中的靛玉红含量, 期望找出能提高靛玉红含量的较佳胁迫方式。

1 材料与方法

1.1 无菌苗的栽培

菘蓝种子(购于西安市万寿路中药材批发市场, 并经本院田先华副教授鉴定) 去掉果皮^[5], 清水洗净后用浓度为 75% 的乙醇浸泡 30 s, 无菌水清洗一遍, 浸泡于 0.1% 的 HgCl₂ 溶液中 10 min, 无菌水冲洗 3~5 次置于 MS 固体培养基中, 27℃ 黑暗条件萌发^[6], 3 d 后转入光照培养室, 25℃, 每天 14 h 光照培养, 光照强度 2 500 lx, 选择生长 30 d 长势基本一致的菘蓝无菌苗为实验材料。

1.2 盐和 ABA 胁迫处理

将菘蓝幼苗小心从培养基中取出, 洗净其上的残留培养基, 吸干水分, 取 120 株等分成 2 份分别放

入 250 mmol/L 的 NaCl 和 20 mmol/L 的 ABA 溶液中, 光照培养箱内 25℃, 光照强度 2500 lx 进行处理, 0, 1.5, 3.0, 6.0, 9.0, 12.0 h 分别取样, 迅速将幼苗擦干后投入盛有液氮^[7]的研钵中进行研磨, 加入无水乙醇, 待乙醇挥发净尽后于 40℃ 烘至干燥得样品干燥粗粉待用(每处理设三个重复)。

1.3 干旱胁迫处理

将菘蓝幼苗小心从培养基中取出, 洗净其上的残留培养基, 吸干水分, 取 60 株于光照培养箱中 25℃ 光照自然干旱处理^[8], 0, 1.5, 3.0, 6.0, 9.0, 12.0 h 分别取样, 按 1.2 中的方法制得粗粉待用。

1.4 冷胁迫处理

将原先置于光照培养室生长 30 d 菘蓝幼苗的培养瓶放置在光照培养箱中, 4±0.2℃ 光照培养, 分别于 0, 6, 9, 12, 24, 36 h 将幼苗小心从瓶内培养基中取出, 清水洗净苗上残留培养基, 按 1.2 中的方法制得粗粉待用。

1.5 靛玉红含量测定

靛玉红含量测定采用日本岛津公司 SHIMADZU LC-2010A 高效液相色谱系统。靛玉红对照品为中国药品生物制品检定所 717-200204 样品。

2 结果与分析

2.1 对照品溶液和样品供试液

对照品溶液的制备: 准确称取靛玉红对照品 10 mg 置 250 ml 容量瓶中, 用 100 ml 氯仿溶解, 加入甲醇稀释至刻度定容, 充分混匀后精密量取 25 ml 该溶液置 50 ml 容量瓶中, 用甲醇精确定容至刻度

收稿日期: 2005-11-21

基金项目: 2004~2006 校级重点基金

作者简介: 段 飞(1980-), 男, 陕西西安人, 硕士研究生, 主要从事植物抗性生理生化研究。

通讯作者: 俞嘉宁, E-mail: jnyu@snnu.edu.cn

线,摇匀,制成 0.02 mg/ml 的靛玉红对照品溶液,备用。

样品供试液的制备^[9]:准确称取经各胁迫处理制得的粗粉 0.15 g,置索氏提取器中,加氯仿 60 ml,回流提取 6 h,提取液置蒸发皿中,放置于通风橱内 40℃ 水浴挥干,用适量甲醇:氯仿(80:20)混合液分四次溶洗定容至 10 ml 容量瓶中,0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液即为供试品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱:Shim-pack VP-ODS 色谱柱(150

mm×4.6 mm);流动相:甲醇:水=70:30;检测波长:290 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:室温。

2.3 标准曲线的制作

制得的 0.02 mg/ml 的靛玉红对照品溶液分别设定 1, 3, 5, 7, 9, 11 μl 仪器自动进样,记录色谱图(如图 1),以对照品进样量对峰面积作图,得回归方程如下:

$Y = 1.00 \times 10^{-4} X + 3.47 \times 10^{-2}$, $r = 0.99998$,表明靛玉红在 0.02~0.22 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

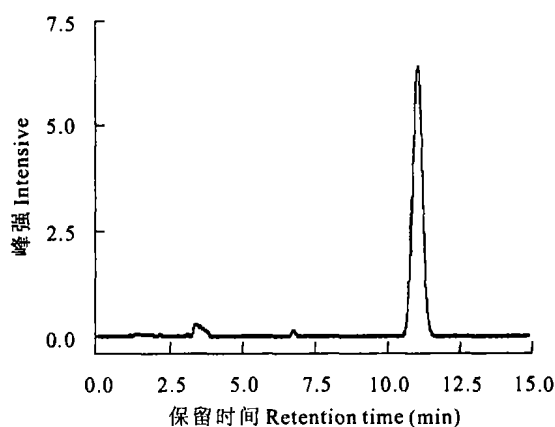
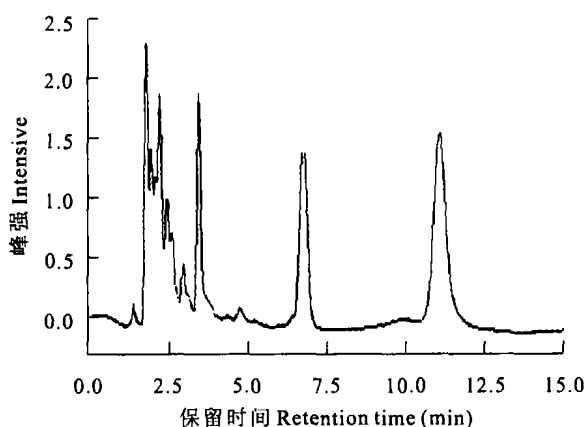


图 1 靛玉红标准品及供试品的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC graph of standard indirubin and trial sample

A. 供试品; B. 靛玉红标准品 A. sample; B. standard indirubin

2.4 精密度试验

以 5 μl 连续对靛玉红对照品自动进样 5 次,测得峰面积分别为:1385546, 1385094, 1382907, 1380884, 1383106, RSD=0.14%,表明精密度良好。

2.5 稳定性试验

对照品溶液的稳定性:取浓度为 0.02 mg/ml 的靛玉红对照品溶液 5 μl 间隔 1 h 连续自动进样 8 次,所得峰面积分别为:117307.0, 124535.2, 120331.7, 119806.9, 118637.5, 118518.5, 119779.0, 119226.3, RSD=2.33%,表明对照品溶液在 8 h 内稳定。

供试样品溶液的稳定性:取供试样品溶液 5 μl 间隔 1 h 连续自动进样 8 次,所测的峰面积分别为:69132.1, 67254.1, 65221.4, 66144.4, 65208.8, 66592.2, 66572.1, 66612.2, RSD=2.48%,表明供试样品溶液在 8 h 内稳定。

2.6 加样回收率

准确称取已知靛玉红含量为 133.26 μg/g 未经任何处理的菘蓝幼苗粗粉 0.15 g,加入 0.02 mg/ml 靛玉红标准品溶液 1 ml,依照样品供试液的制备和

样品含量的测定方式处理 5 份,计算平均回收率为:96.31%, RSD=0.86%。

2.7 靛玉红含量

将仪器自动进样量数值设定为 20 μl,分别对已制备的样品供试液进行进样测定,结果如图 2 所示,用 250 mmol/L NaCl 溶液处理菘蓝幼苗时,靛玉红含量随着胁迫时间的延长不断增加,至 12 h 达到最大值 348.69 μg/g,高出对照 161.67%;干旱处理的结果与盐处理结果类似,但在 9 h 含量达到最大值 211.94 μg/g 后至 12 h 的靛玉红含量基本保持不变。20 mmol/L 的 ABA 溶液处理的菘蓝幼苗,靛玉红含量在处理 6 h 后达到最大 227.49 μg/g,高出对照 70.72%,之后开始下降,但处理 12 h 的含量又有所上升,且明显高于对照。

4℃低温胁迫处理的菘蓝幼苗靛玉红含量表现出先上升后下降,再又上升的趋势。即 0 到 9 h 逐渐增加至 317.92 μg/g, 12 h 含量减至 232.70 μg/g, 24 h 上升且达到最大值 321.68 μg/g,高出对照 141.4%,至 36 h 又略有下降。

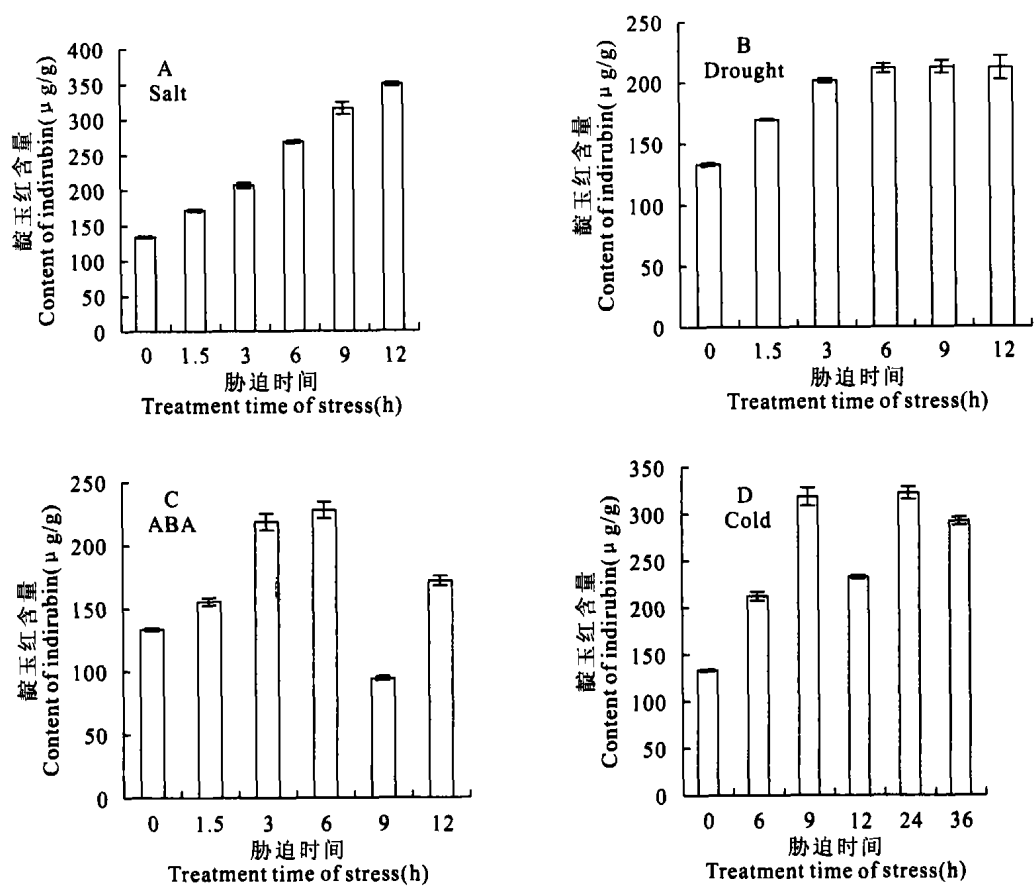


图 2 盐、干旱、冷、ABA 胁迫处理菘蓝靛玉红含量 ($n=3$)
Fig. 2 Content of indirubin in salt, drought, cold and ABA stress treated *Isatis indigotica* Fort
A 250mmol/L NaCl; B 自然干旱; C 20mmol/L ABA; D 冷处理
A 250mmol/L NaCl; B drought; C 20mmol/L ABA; D cold

3 讨论

植物的次生代谢是植物体内的另一种重要的生理代谢,对绝大多数植物而言,次生代谢产物的合成与积累往往与所处的生长环境密切相关。植物根据所处的环境条件及其变化来决定合成次生代谢产物的种类及数量,即只有在一定的生长环境条件下才合成某些特定的次生代谢产物,或者显著的增加某些特定的次生代谢产物在体内的含量。与植物的初生代谢需要有良好的生长环境不同,植物的次生代谢往往会在植物遭遇如低温、干旱、高盐碱等胁迫性环境时变得旺盛^[10]。当环境适宜时,植物通过初生代谢合成自身生长所需的蛋白质、糖类、核酸等物质,次生代谢只产生少量的代谢物质以维持日常生长所需,当适宜的生境恶化时植物光合与呼吸作用受到抑制,而次生代谢活动加强,产生大量的次生代谢物质以提高植物自身的抗逆性^[11, 12]。

靛玉红是菘蓝的次生代谢物质,属于吲哚类生物碱,本实验结果表明,经 250 mmol/L NaCl 溶液胁迫处理过的菘蓝幼苗从 0 到 12 h 靛玉红含量逐渐增加,干旱处理的菘蓝幼苗中靛玉红的含量从 0 到 9 h 逐渐增加,达最大值,且在 12 h 含量基本保持恒定,这一现象可能是因为菘蓝幼苗在受到盐胁迫和干旱胁迫处理后体内代谢方式出现相应的调整,从初生代谢为主转向以次生代谢为主,产生大量的具有抗逆作用的次生代谢物质以维持自身的生存。

ABA 作为一种“胁迫激素”在调节植物抗逆性方面起着一定的作用^[13, 14],外源 ABA 的处理能够诱导植物某些耐逆基因的表达^[15, 16],实验室和大田实验也证明气孔的开放程度会随着所用 ABA 浓度的提高而下降^[17~19],本试验使用 20mmol/L ABA 溶液处理菘蓝幼苗表现出和盐胁迫处理、干旱胁迫处理类似现象,即随 ABA 处理时间的延长,靛玉红含量表现出逐渐增加的趋势,表明 ABA 可能也具有诱导菘蓝中靛玉红合成相关基因表达的作用。但 ABA 处理 9 h 后,靛玉红含量表现出较明显下降,

其原因可能是因为最初胁迫阶段(0 到 6 h)ABA 诱导促使菘蓝体内合成大量靛玉红,同时叶片气孔的缩小或者关闭导致菘蓝幼苗光合与呼吸作用的减弱,以至使处理 9 h 后菘蓝幼苗各种正常代谢活动可能进一步减弱之故,当继续延长 ABA 胁迫处理时间,靛玉红含量又有所上升,其原因有待深入研究。

将正常生长的菘蓝幼苗置于 4℃ 低温环境后,菘蓝幼苗从外观上看并没有像上述几种处理出现明显的变化,因此我们进行了较长时间的低温处理。结果所有处理时间点的靛玉红含量均高于对照,表明冷胁迫可诱导幼苗中靛玉红的累积。0 到 9 h 菘蓝幼苗中靛玉红含量随低温胁迫时间的增加而增加,但处理 12、36 h 时,靛玉红含量下降,推测可能与植物体自身的昼夜节律有关^[20],其详细机制有待进一步研究。

菘蓝是中药板蓝根和大青叶的主要来源,而靛玉红是板蓝根和大青叶的主要有效活性成分。从每年初春播种到当年 7 月和 10 月分别收获大青叶和板蓝根,这一周期长达 4 到 6 个月^[21],文献报道^[9,22~24],板蓝根中靛玉红的含量为 7.5~24.2 $\mu\text{g/g}$,大青叶中靛玉红的含量为 153.6~1117.7 $\mu\text{g/g}$,而本实验选用生长 30 d 的菘蓝幼苗进行适当的逆境处理,有效提高菘蓝体内靛玉红的含量且可高达 348.7 $\mu\text{g/g}$,因而如果以菘蓝为原料提取靛玉红可以将生长 1 个月左右无土栽培或盆栽的菘蓝幼苗进行适当的逆境胁迫或 ABA 处理,这样获得菘蓝植株来提取靛玉红,操作简单,不受时空条件制约,节约耕地,产量高,具有较好的经济和社会效益。

参考文献:

- [1] 彭菲,王凤翔. 菘蓝子叶和下胚轴组织培养再生植株的研究[J]. 湖南农学院学报,1994,20(5):450—456.
- [2] 崔树玉,薛原,杨建莉. 板蓝根研究进展[J]. 中草药,2001,32(7):670—671.
- [3] 李俊,彭正松. 刺激剂对植物细胞悬浮培养的影响[J]. 广西植物,2005,25(4):341—348.
- [4] 许桢灿. 板蓝根中靛蓝与靛玉红含量分析[J]. 中成药研究,1987,(2):8—9.
- [5] 傅翔,张汉明,丁如贤,等. 激素对菘蓝器官分化的影响[J]. 中草药,1997,28(10):618—620.
- [6] 曾建军,孙敏,肖璇,等. 4 种抗生素对菘蓝外植体生长的影响[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2003,28(6):

987—990.

- [7] 买合木提·卡热,吾甫尔·巴拉提,侯江涛,等. NaCl 胁迫对扁桃砧木可溶性蛋白质和脯氨酸含量的影响[J]. 新疆农业大学学报,2005,28(1):1—5.
- [8] Ried J L, Walker-Simmons M K. Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Physiol*, 1993, 102: 125—131.
- [9] 徐德然,刘学华. HPLC 测定板蓝根中靛玉红含量的方法[J]. 中国野生植物资源,2004,23(2):53—55.
- [10] 苏文华,张光飞,李秀华,等. 植物药材次生代谢产物的积累与环境的关系[J]. 中草药,2005,36(9):1415—1418.
- [11] 杜丽娜,张存莉,朱玮,等. 植物次生代谢合成途径及生物学意义[J]. 西北林学院学报,2005,20(3):150—155.
- [12] 段传人,王伯初,徐世荣. 环境应力对植物次生代谢产物形成的作用[J]. 重庆大学学报,2003,26(10):67—71.
- [13] 沈波,李云荫. 渗透胁迫和脱落酸对小麦叶片蛋白质的影响[J]. 作物学报,1996,22(3):288—294.
- [14] Pruvot G, Massimino J, Peltier G, et al. Effects of low temperature, high salinity and exogenous ABA on the synthesis of two chloroplastic drought-induced protein in solanum tuberosum [J]. *Plant Physiol*, 1996, 97: 123—131.
- [15] Bray E A. Molecular responses to water deficit [J]. *Plant Physiology*, 1993, 103: 1035—1040.
- [16] Shinozaki K, Yamaguchi-shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115: 327—334.
- [17] Tardien F, Davies W J. Stomatal response to abscisic acid is a function of current plant water status [J]. *Plant Physiol*, 1992, 98: 540—545.
- [18] Zhang J, Davies W J. Sequential response of whole plant water relations to prolonged soil drying and the involvement of xylem sap ABA in the regulation of stomatal behavior of sunflower plants [J]. *New Phytol*, 1989, 113: 167—174.
- [19] Khalil A M, Grace J. Carbohydrates and water status in wheat plant under water stress [J]. *New Phytology*, 1993, 125: 609—614.
- [20] 徐张红,赵晓刚,何奕昆. 拟南芥生物钟分子机制研究进展 [J]. 植物学通报,2005,22(3):341—349.
- [21] 刘怀德,张忠鹏,冯京华. 菘蓝特性及栽培措施的研究 [J]. 生物学通报,1995,30(6):45—47.
- [22] 王邦林,王强. 板蓝根、大青叶中靛玉红、靛蓝的高效液相色谱分析 [J]. 天津药学,1994,6(3):30—33.
- [23] 杨军,王京霞. 反相高效液相色谱法测定板蓝根、大青叶中靛蓝、靛玉红的含量 [J]. 中药新药与临床药理,1996,7(2):43—44.
- [24] 孙立新,唐虹,尹萍,等. RP-HPLC 测定板蓝根、大青叶中靛蓝、靛玉红的含量 [J]. 沈阳药科大学学报,2000,17(3):191—193.

(英文摘要下转第 120 页)

The evaluation on the spatial difference of sustainable
land resource use in Gansu Province

MAO Xiao-wen

(College of Tourism, North West Normal University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: Based on establishing an indicator system for evaluating the spatial differences of the sustainable land resource use, which include 23 evaluation indicators about resources, environment, economy and society, the paper evaluated quantitatively the spatial differences of the sustainable land resource use in Gansu province. The results show that the spatial difference level of the sustainable land resource use in Gansu province is remarkable, and that the effective measures should be taken to harmonize the relationship of resource exploitation, economy development, society improvement and environment protection.

Keywords: land resource; sustainable use; spatial difference evaluation; Gansu province

(上接第 114 页)

Effects of stress on the indirubin content of Isatis indigotica Fort. seedlings

DUAN Fei, YANG Jian-xiong, ZHOU Xi-kun, MA Tian-li, YU Jia-ning

(College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: The seedlings of Isatis indigotica Fort. cultivated for 30 days in aseptic environment were treated with 250 mmol/L NaCl, natural drought method, 20 mmol/L ABA, 4℃ low temperature, respectively. The content of indirubin was extracted from Isatis indigotica Fort. seedlings at the indicated times and analyzed using HPLC method, the results showed that the content of indirubin could increased up to 59.05%~161.67% in salt, drought and ABA treatment during 12 h. The content of indirubin increased up to 141.4% under low temperature stress for 24 h. These implied that the content of indirubin in the Isatis indigotica Fort. seedlings could accumulate by appropriate stress and ABA treatment efficiently. The 250 mmol/L NaCl stress treatment had the most effect.

Keywords: Isatis indigotica Fort. ; indirubin; stress; HPLC