

土壤自然干旱处理对钩藤生长与生理特征及主要药用成分积累的影响

张智仙, 王晓红, 李 雪, 张明生*

(贵州大学 生命科学院, 山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 贵阳 550025)

摘 要:以一年生钩藤实生苗为试材,通过连续土壤控水 12 d 盆栽试验,研究持续性土壤自然干旱对钩藤幼苗生长、抗逆生理指标及其主要药用成分含量的影响。结果表明:(1)随着干旱胁迫时间的延长,钩藤根和茎叶生物量以及叶片相对含水量(RWC)显著持续下降($P < 0.05$),而根冠比、叶片丙二醛(MDA)含量及相对电导率(REC)逐渐升高。(2)随着干旱胁迫时间的延长,钩藤叶片叶绿素 a、b 含量先增高后下降,叶片超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性先上升后下降,且 POD 活性最先达到峰值,CAT 活性增幅最大;叶片中脯氨酸(Pro)、可溶性糖(SS)和可溶性蛋白(SP)含量逐渐升高,且 Pro 表现出更强的渗透调节能力。(3)钩藤幼苗叶片、主茎和带钩茎枝中钩藤碱与异钩藤碱含量随着干旱胁迫时间的延长而呈先增高后下降的趋势,响应时间先后顺序依次为叶片、主茎、带钩茎枝,生物碱含量由高到低依次为带钩茎枝、叶片、主茎。研究发现,在土壤持续自然干旱条件下,钩藤幼苗生长受到一定影响,但植株能通过提高其抗氧化酶活性和积累渗透调节物质来提高吸水 and 保水能力,有效抵御干旱逆境;且土壤自然干旱胁迫 4~8 d 有利于主要药效成分钩藤碱与异钩藤碱的积累;土壤相对含水量在 42%~53%时,钩藤幼苗耐旱性较强且钩藤碱与异钩藤碱含量较高。

关键词:钩藤;土壤干旱;渗透调节物质;抗氧化酶;生物碱

中图分类号:Q945.79

文献标志码:A

Effect of Soil Natural Drought on Growth, Physiological Characteristics and Accumulation of Main Medicinal Components of *Uncaria rhynchophylla*

ZHANG Zhixian, WANG Xiaohong, LI Xue, ZHANG Mingsheng*

(School of Life Sciences, Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region [Ministry of Education], Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: We studied the effect of continuous soil natural drought on the growth, physiological indexes of stress tolerance and the contents of main medicinal components of *Uncaria rhynchophylla* seedlings by pot experiment of soil water control for 12 days. The results showed that: (1) with the extension of drought stress time, the biomass of roots, stems and leaves and the relative water content (RWC) of leaves decreased significantly ($P < 0.05$), while the content of MDA and the relative electrical conductivity (REC) increased gradually. (2) Along with the time of drought stress extended, the contents of chlorophyll a and chlorophyll b in leaves increased firstly and then decreased. The activities of superoxide dismutase (SOD),

收稿日期:2020-01-17;修改稿收到日期:2020-03-25

基金项目:国家重点研发计划课题(2016YFC0502604);贵州省科技计划重大专项课题(黔科合平台人才[2017]5411-06);国家喀斯特石漠化防治工程技术研究中心建设课题(2012FU125X13);贵州省科技创新人才团队建设专项资金(黔科合平台人才[2016]5624);贵州省教育厅创新群体重大研究项目(黔教合 KY 字[2016]023);贵州省高层次创新型人才培养计划(黔科合人才[2015]4031号);贵州省中药材现代产业技术体系建设项目(GZCYTX-02)

作者简介:张智仙(1994—),女,在读硕士研究生,主要研究方向为植物次生物质代谢。E-mail: 2013088606@qq.com

* 通信作者:张明生,教授,博士生导师,主要从事植物次生代谢研究。E-mail: mshzhang@163.com

peroxidase (POD) and catalase (CAT) increased firstly and then decreased. The activity of POD firstly reached the peak, and the increase of CAT activity was the largest. The contents of proline (Pro), soluble sugar (SS) and soluble protein (SP) in leaves increased gradually, and Pro showed stronger osmotic regulation ability. (3) The contents of rhynchophylline and isorhynchophylline in leaves, main stems and branches of *U. rhynchophylla* seedlings increased firstly and then decreased with the extension of drought stress time. The response time in order was leaves, main stems and branches with hooks. The alkaloid content in order was branches with hooks, leaves and main stems from high to low. It was found that the growth of *U. rhynchophylla* seedlings was affected by the continuous natural drought in the soil, but the plants could improve their water absorption and retention capacity by increasing their antioxidant enzyme activity and accumulation of osmoregulation substances to resist the drought stress effectively. In addition, the 4th—8th day of drought was beneficial to the accumulation of the main medicinal components, rhynchophylline and isorhynchophylline. Generally speaking, when the relative water content of soil was 42%—53%, *U. rhynchophylla* had stronger drought resistance and higher contents of rhynchophylline and isorhynchophylline.

Key words: *Uncaria rhynchophylla*; soil drought; osmotic adjustment substance; antioxidant enzyme; alkaloids

当今世界范围内已有 64% 的陆地遭受到干旱胁迫^[1],水分作为植物生存的必要环境因子,当其亏缺时会诱导植物产生渗透失衡、膜系统损伤、呼吸与光合效率降低等不良反应,不仅妨碍植物正常的生长发育,还影响体内次生代谢产物的积累^[2]。为抵御水分胁迫,植物会启动自身的干旱响应机制:一方面,形态结构发生改变,如根冠比增大^[3]等;另一方面,体内生理生化指标发生改变,如渗透调节物质脯氨酸、可溶性糖积累^[3],超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性增加^[4]等。在逆境胁迫下,植物体内次生代谢产物也会大量积累以应答环境,其中干旱胁迫是常见的诱发次生代谢产物积累的环境因子^[5],如李霞等研究表明干旱胁迫有利于植物生物碱的积累^[6]。

钩藤 [*Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil.] 为茜草科 (Rubiaceae) 钩藤属 (*Uncaria*) 常绿藤本植物,入药部位为干燥带钩茎枝,用于头痛眩晕、感冒夹惊、惊痫抽搐、妊娠子病、高血压等症^[7]。钩藤作为贵州重要道地药材,“剑河钩藤”已于 2011 年获国家地理标志产品保护^[8]。贵州省是中国西南喀斯特地区的中心,具有全国最大的石漠化土地面积^[9]。典型喀斯特生境由于土层浅薄,持水能力低以及岩石的渗透性强,普遍存在着干湿频繁交替巨变的胁迫^[10]。钩藤因其具有保水固土作用和良好的经济效益,有望成为石漠化治理的一个适宜树种。目前,国内外有关钩藤药理作用研究报道^[11-12]较多,而关于钩藤对于干旱胁迫的生理响应鲜见报道。因此,本研究以一年生钩藤实生苗为试材,采用盆栽控水的方法,考察自然干旱条件下其生长、抗逆生理及其体内主要次生代谢物钩藤碱与异钩藤碱积累的

变化,探索其对水分缺乏的适应能力,以期为喀斯特地区石漠化治理经济树种的选择提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料培养与处理

钩藤种子采自昌昊金煌中药有限公司,经温水浸泡 24 h,撒播于穴盘内,在智能光照培养箱内进行育苗(昼/夜温度为 25 °C/20 °C,昼/夜时间为 12 h/12 h,光照强度为 15~20 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,相对湿度为 65%)。待苗高约 10 cm 时,移入塑料防雨棚内花盆栽种,盆高 14 cm、上口径 23 cm,每盆装 2 000 g 壤土(pH 6.24、有机质 33.28 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、碱解氮 132.02 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、速效磷 6.45 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、速效钾 83.75 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),定植 1 株钩藤幼苗,其后定期除草浇水。4 个月,进行持续干旱试验,参照贾鑫等^[13]的试验设计并稍作改动。选择生长良好、长势一致的 84 盆钩藤苗,随机均分为 2 组,对照组正常水分管理,保持土壤相对含水量(RWC)在 60%~65%(参照野外钩藤生境设定);干旱处理组持续 12 d 不浇水,水分含量逐渐自然降低。试验期间,白天气温 23~27 °C,夜间平均气温 17~20 °C。在停止浇水的 0、2、4、6、8、10 和 12 d,每天早上 8:00 从对照组和干旱处理组中分别随机采集土样、根系及茎叶,选取中部枝条上的成熟叶片测定相关生理生化指标,每个指标取 3 个生物学重复。

1.2 测定指标及方法

1.2.1 土壤和叶片相对含水量 土壤和叶片相对含水量(RWC)均采用烘干法测定^[14-15]。

1.2.2 生物量 生物量测定分地上部茎叶和地下部根系两部分,先在 105 °C 杀青 20 min,再在 70 °C

烘干至恒重,分别称取地上和地下部干重,并计算根冠比(根生物量/茎叶生物量)。

1.2.3 相对电导率和丙二醛含量 叶片相对电导率(REC)测定采用电导仪法^[4],丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸法^[16]。

1.2.4 渗透物质和叶绿素含量 叶片可溶性糖(SS)含量采用蒽酮比色法测定^[16],游离脯氨酸(Pro)含量采用茚三酮显色法测定^[16],可溶性蛋白(SP)含量采用考马斯亮蓝法^[16]测定,叶绿素含量采用分光光度法^[16]测定。

1.2.5 抗氧化酶活性 称取 0.2 g 叶片于预冷研钵中,加入 1.6 mL 50 mmol · L⁻¹ 预冷的磷酸缓冲液(pH 7.8),冰浴上研磨成匀浆,转入 2 mL 离心管中 4 ℃ 下 12 000 r · min⁻¹ 离心 20 min,收集上清液用于 SOD、POD 及 CAT 活性的测定,具体测定均参照李合生^[16]的方法。

1.2.6 钩藤生物碱含量 (1)试剂:钩藤碱和异钩藤碱对照品(中国食品药品检定研究院);甲醇(美国 TEDIA);氨水(成都金山化学药品有限公司);娃哈哈纯净水。(2)色谱条件:Waterse2695 型 HPLC 仪;色谱柱为 Agilent Extend-C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm);流动相为甲醇:0.1%氨水=74:26;流速 1.0 mL · min⁻¹;进样体积 10 μL;柱温 30 ℃;检验波长为 245 nm。(3)供试品溶液的制备:精密称取钩藤待测部位粉末 1.0000 g,置于 50 mL 磨口具塞三角瓶中,加 73%甲醇 25 mL,超声提取 20 min,8 000 r · min⁻¹ 离心 5 min,重复 2 次,合并上清液,定容至 50 mL,用 0.22 微孔有机滤膜过滤 2 次,作为供试品溶液。(4)样品测定:将供试品溶液,按(2)项中色谱条件测定峰面积(mAU · s),代入钩藤碱标准曲线 y

$=2.31 \times 10^4 x + 2.8 \times 10^3$ ($r=0.999\ 9$) 与异钩藤碱标准曲线 $y=2.47 \times 10^4 x + 1.32 \times 10^3$ ($r=0.999\ 9$),计算钩藤碱与异钩藤碱含量,重复测定 3 次。

1.3 数据处理

采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析和 Duncan 法多重比较($P<0.05$),用 Excel 2007 软件绘图,数据以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 土壤和叶片相对含水量在自然干旱过程中的变化

在自然干旱胁迫期间,对照组土壤和钩藤叶片相对含水量(RWC)基本保持稳定,而干旱组随着干旱胁迫时间的延长均呈现逐渐降低的趋势(表 1)。其中,干旱组土壤 RWC 在干旱 2 d 时就开始较对照显著降低,其后于干旱 6~12 d 快速下降,干旱胁迫至 12 d(30.70%)时比同期对照显著降低 49.29%;干旱处理组钩藤叶片 RWC 在自然干旱 4 d 开始即比对照显著降低,其后干旱 4~6 d 迅速下降,干旱 8~10 d 缓慢下降,干旱胁迫至 12 d(52.32%)时比同期对照显著降低 42.62%。基于文献[17],将持续自然干旱 2~4 d 作为轻度干旱(土壤 RWC 为 50%~65%),6~10 d 作为中度干旱(土壤 RWC 为 35%~50%),12 d 作为重度干旱(土壤 RWC 低于 35%)。

2.2 土壤自然干旱对钩藤幼苗生物量的影响

植株生长量的变化能够直观反映干旱胁迫对植物的影响。由表 2 可以看出,土壤自然持续干旱过程中,对照组钩藤植株地上、地下部干重及根冠比均基本保持稳定,而干旱胁迫组地上、地下部干重随着土壤干旱时间延长而逐渐降低,而其根冠比逐渐增

表 1 自然干旱处理期间土壤和叶片相对含水量(RWC)

Table 1 The relative water content (RWC) of soil and leaves during natural drought period

干旱处理后天数 Days after drought/d	土壤相对含水量 Relative water content of soil/%		叶片相对含水量 Relative water content of leaves/%	
	对照 Control	干旱 Drought	对照 Control	干旱 Drought
0	60.40±2.02a	60.30±2.10a	94.42±3.73a	89.75±0.97a
2	62.08±0.14a	57.33±1.56a*	92.52±1.68a	81.39±2.74b
4	60.89±3.10a	52.93±2.38b*	91.35±1.98a	74.12±1.56c*
6	60.75±3.03a	49.54±1.78c*	89.90±2.86a	66.91±2.10d*
8	63.40±3.12a	42.21±1.82d*	89.85±0.65a	61.64±2.09de*
10	60.03±0.15a	36.29±1.81e*	89.17±0.67a	59.39±1.26e*
12	60.54±1.34a	30.70±2.09f*	91.08±0.24a	52.32±0.14f*

注:同列不同字母表示在 0.05 水平差异显著($P<0.05$),* 表示同时期对照与干旱处理间在 0.05 水平差异显著($P<0.05$),下同
Note: Different letters in the same column mean significant difference among stages at 0.05 level ($P<0.05$), * means significant difference between the control and drought treatment during the same time at 0.05 level ($P<0.05$); the same as below

加,且影响均达到显著水平($P<0.05$)。其中,地上茎叶干重与地下根干重分别在干旱 4 和 6 d 后开始显著下降,一直持续至 12 d 后,此时它们的干重比同期对照分别显著降低 54.37%和 25.17%;根冠比在干旱 4 d 后开始显著提高,之后各处理时期差异显著,并在干旱 12 d 达到最大值,此时为同期对照的 1.64 倍。可见,土壤干旱胁迫对钩藤生长具有抑制作用,不利于地上茎叶、地下根系干物质的积累,且随着干旱程度的加深,植株将更多干物质分配到根系。

2.3 土壤自然干旱对钩藤叶片相对电导率和丙二醛含量的影响

相对电导率(REC)和丙二醛(MDA)含量分别表征细胞膜透性与膜脂过氧化水平,是衡量细胞膜损伤程度的重要指标。土壤持续自然干旱期间,对照组钩藤叶片 REC 和 MDA 含量基本保持稳定,而干旱组则随着胁迫时间表现出逐渐增加趋势(图 1, A、B)。其中,干旱处理组叶片 REC 值在 0~2 d 内

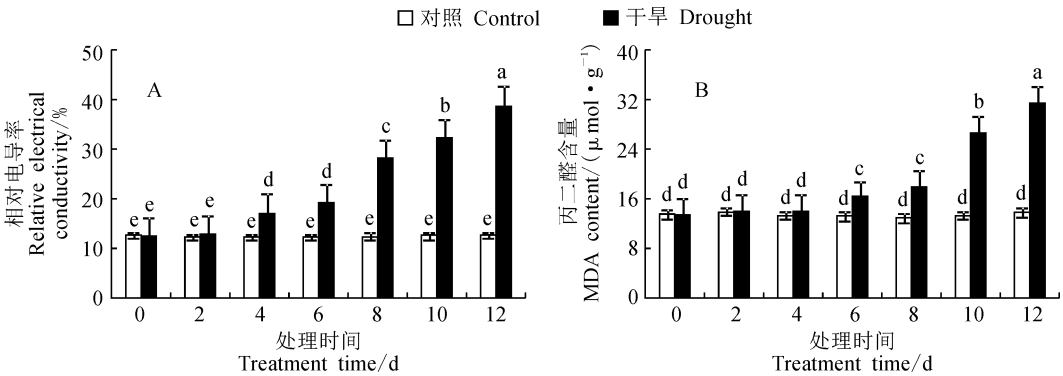
与对照无显著差异,在胁迫 4 d 时开始较对照显著升高,此后一直呈显著增加状态,在干旱 12 d 时比对照显著高出 2.10 倍;干旱组叶片 MDA 含量在干旱 6 d 时开始显著高于同期对照,并在 12 d 时达到峰值,此时为对照的 1.27 倍。可见,土壤持续干旱时间越长,钩藤叶片细胞膜透性越大,膜脂过氧化作用越强,叶片受干旱损伤程度越严重。

2.4 土壤自然干旱对钩藤叶片叶绿素含量的影响

叶绿素是吸收光能的主要物质,其含量与光合速率有直接关系,其数量变化也能反映植物对干旱胁迫的适应能力。由图 2, A、B 可知,随着土壤自然干旱时间的增加,钩藤叶片中叶绿素 a、叶绿素 b 含量在对照组均保持稳定,在干旱组均呈现先增加后下降的趋势,并均在干旱 6 d 出现最大值(分别为 1.81 和 0.72 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),此时较同期对照分别显著增加了 52.32%和 51.26%。其中,干旱组叶片叶绿素 a 含量在处理 6~8 d 显著高于对照,处理 12 d 时显著低于对照;其叶绿素 b 含量在持续干旱 6~10 d 显

表 2 土壤干旱胁迫过程中钩藤单株生物量的变化
Table 2 The biomass of *U. rhynchophylla* plant during soil drought stress

干旱处理后天数 Days after drought/d	地上干重 Dry weight aboveground/g		地下干重 Dry weight underground/g		根冠比 Root shoot ratio	
	对照 Control	干旱 Drought	对照 Control	干旱 Drought	对照 Control	干旱 Drought
0	9.90±0.10a	9.91±0.04a	5.17±0.10a	5.20±0.04a	0.52±0.02a	0.52±0.02f
2	9.92±0.06a	9.88±0.01a	5.21±0.10a	5.14±0.05a	0.53±0.01a	0.52±0.01f
4	10.00±0.04a	8.26±0.17b	5.23±0.09a	5.09±0.07a	0.52±0.01a	0.62±0.01e*
6	9.82±0.08a	7.18±0.14c*	5.20±0.06a	4.71±0.08b	0.53±0.02a	0.66±0.02d
8	9.91±0.03a	6.46±0.19d*	5.26±0.03a	4.43±0.06c	0.53±0.01a	0.69±0.01c*
10	9.91±0.10a	5.41±0.09e*	5.25±0.06a	4.15±0.14d*	0.53±0.02a	0.77±0.01b*
12	9.95±0.03a	4.54±0.06f*	5.25±0.05a	3.93±0.08e*	0.53±0.01a	0.87±0.03a*



不同小写字母表示处理及时期间在 0.05 水平差异显著($P<0.05$),下同

图 1 土壤干旱条件下钩藤叶片相对电导率及丙二醛的变化

Different normal letters mean significant difference among treatments and stages at 0.05 level ($P<0.05$), the same as below
Fig. 1 The relative electric conductivity and malondialdehyde content in leaves of *U. rhynchophylla* seedling during soil drought period

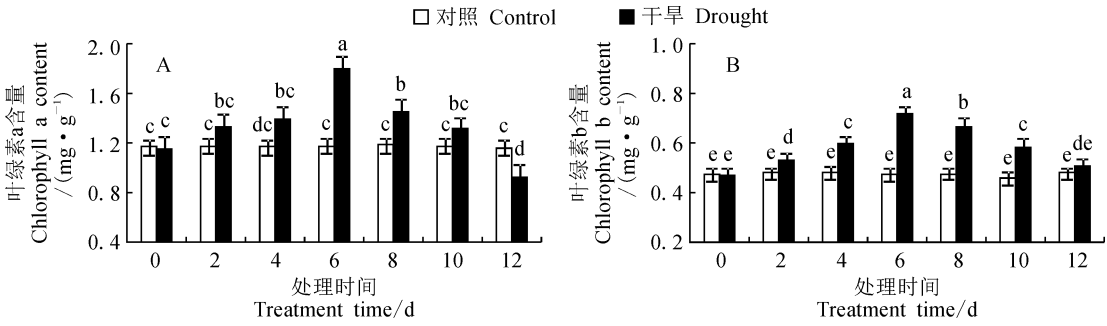


图 2 土壤干旱条件下钩藤叶片叶绿素 a 和叶绿素 b 含量的变化

Fig. 2 The contents of chlorophyll a and chlorophyll b in leaves of *U. rhynchophylla* seedling during soil drought period

著高于同期对照;两种叶绿素含量其余时期均与同期对照无显著差异。以上结果表明适当的土壤干旱有利于钩藤叶片叶绿素 a 和叶绿素 b 的积累。

2.5 土壤自然干旱对钩藤叶片抗氧化酶活性的影响

在整个土壤自然干旱期间,钩藤植株叶中 POD、SOD 和 CAT 活性均呈先升高后降低的变化趋势(图 3,A~C)。其中,在土壤自然干旱处理前期(0~4 d),钩藤叶片 POD 活性急剧增加,在干旱 2 d 时显著高于对照,在干旱 4 d 时达到峰值,此时较同期对照显著提高 25.96%;而叶片 SOD 与 CAT 活性在干旱 4 d 后才较对照显著增加。在土壤干旱处理中期(6~10 d),钩藤叶片 POD 活性迅速下降,至处理 10 d 时显著低于对照;而叶片 SOD 和 CAT 活性均在干旱处理 6 d 时达到最大值,此时比同期对照分别显著增加 25.27%与 33.29%,此后 SOD 和 CAT 活性逐渐下降,但 SOD 活性仍显著高于同期对照,而 CAT 活性在干旱处理 10 d 时下降到对照水平。在土壤干旱处理后期(12 d),钩藤叶片 POD、SOD 与 CAT 活性均降至最低,其中 POD 和 CAT 活性较同期对照分别显著下降 18.44%和 12.40%;SOD 活性仍高于相应对照,但差异不显著。以上结果表明,在土壤持续自然干旱过程中,钩藤叶片中 POD 和 CAT 分别在干旱前期和中期具有较强的活性氧清除作用,在后期干旱程度最严重时清除作用极弱;而叶片 SOD 在整个土壤干旱胁迫过程中始终维持较高活性,且在后期重度干旱时仍具有一定活性氧清除能力;钩藤叶片内 3 种保护酶能够协同作用,以适应一定程度的干旱胁迫环境。

2.6 土壤自然干旱对钩藤叶片渗透调节物质含量的影响

可溶性蛋白(SP)、可溶性糖(SS)和游离脯氨酸(Pro)是植物体内重要的渗透调节物质。随着土壤自然干旱程度的加剧,钩藤叶片中 Pro、SS 和 SP 含

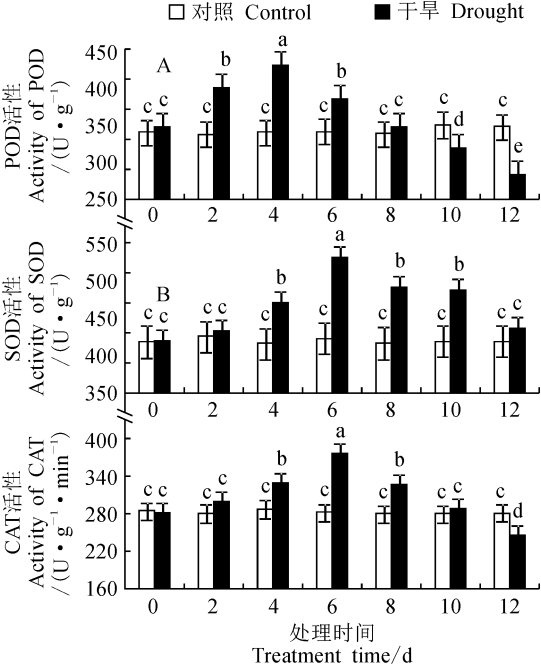


图 3 土壤自然干旱期间钩藤叶片 3 种抗氧化酶活性的变化

Fig. 3 The activities of three antioxidant enzymes in leaves of *U. rhynchophylla* plants during soil drought period

量均逐渐增加(图 4,A~C)。其中,叶片 Pro 含量从干旱 4 d 开始比同期对照显著增加,之后各处理时期差异显著,到处理 12 d 时比同期对照显著增加了 78.40%;叶片 SS 含量在干旱处理 2 d 时即比对照显著提高,并在处理 6~10 d 期间急剧增加,在处理 12 d 时比同期对照显著增加了 55.62%;叶片 SP 含量也在干旱处理 2 d 时就显著高于对照,随后迅速增加,且各处理时期差异显著,在处理 12 d 时较同期对照显著增加了 67.97%。可见,土壤干旱明显促进了钩藤叶片中可溶性蛋白、可溶性糖和游离脯氨酸含量显著增加,且增幅表现为游离脯氨酸>可溶性蛋白>可溶性糖,说明在钩藤抵御干旱逆境过程中游离脯氨酸可能发挥着更重要作用。

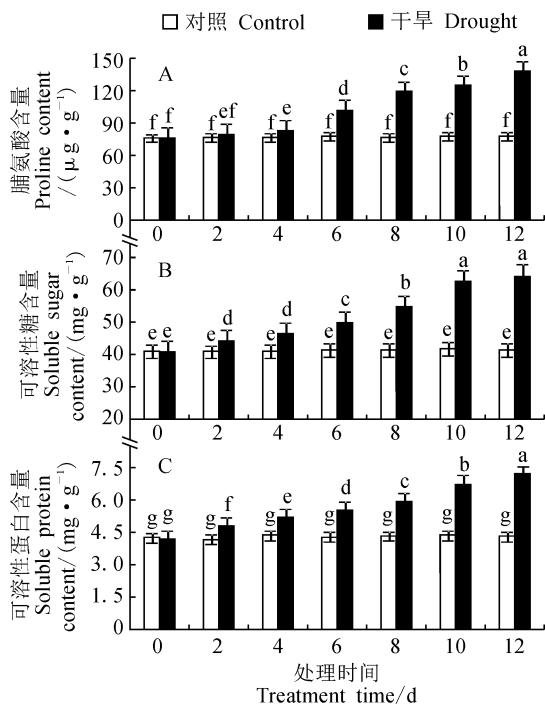


图4 土壤自然干旱期间钩藤叶片3种渗透调节物质含量的变化

Fig. 4 The contents of three osmotic adjustment substance in leaves of *U. rhynchophylla* plants during soil natural drought period

2.7 土壤自然干旱对钩藤各部位两种生物碱积累影响

钩藤幼苗叶片、茎枝和主茎中钩藤碱与异钩藤碱含量在土壤持续自然干旱过程中均表现出先升后降的变化趋势,而对照组始终保持稳定(图5,A~F)。首先,钩藤叶片钩藤碱和异钩藤碱含量分别在干旱处理2~10 d和4~10 d均比同期对照显著提高,在其余时期与对照无显著差异;叶中钩藤碱和异钩藤碱含量均在干旱处理4 d时达到最大值(分别为1 506.50和3 172.34 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$),分别比同期对照显著增加41.19%和31.48%(图5,A、B)。其次,钩藤带钩茎枝中钩藤碱和异钩藤碱含量在干旱处理2~12 d均显著高于同期对照,并均在干旱处理8 d时增至最大值(分别为1 977.50和3 620.64 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$),分别比同期对照显著增加57.51%和39.10%;干旱后期,带钩茎枝中钩藤碱和异钩藤碱含量虽然急剧下降,但在干旱处理12 d时仍显著高于对照,分别为对照的1.17和1.09倍(图5,C、D)。此外,钩藤主茎中钩藤碱和异钩藤碱含量分别在干旱处理4~12 d和2~12 d均显著高于同期对照,并均在干旱6 d时增至最大值(分别为1 217.64和3 017.50 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$),分别比同期对照显著增加97.77%和86.90%;

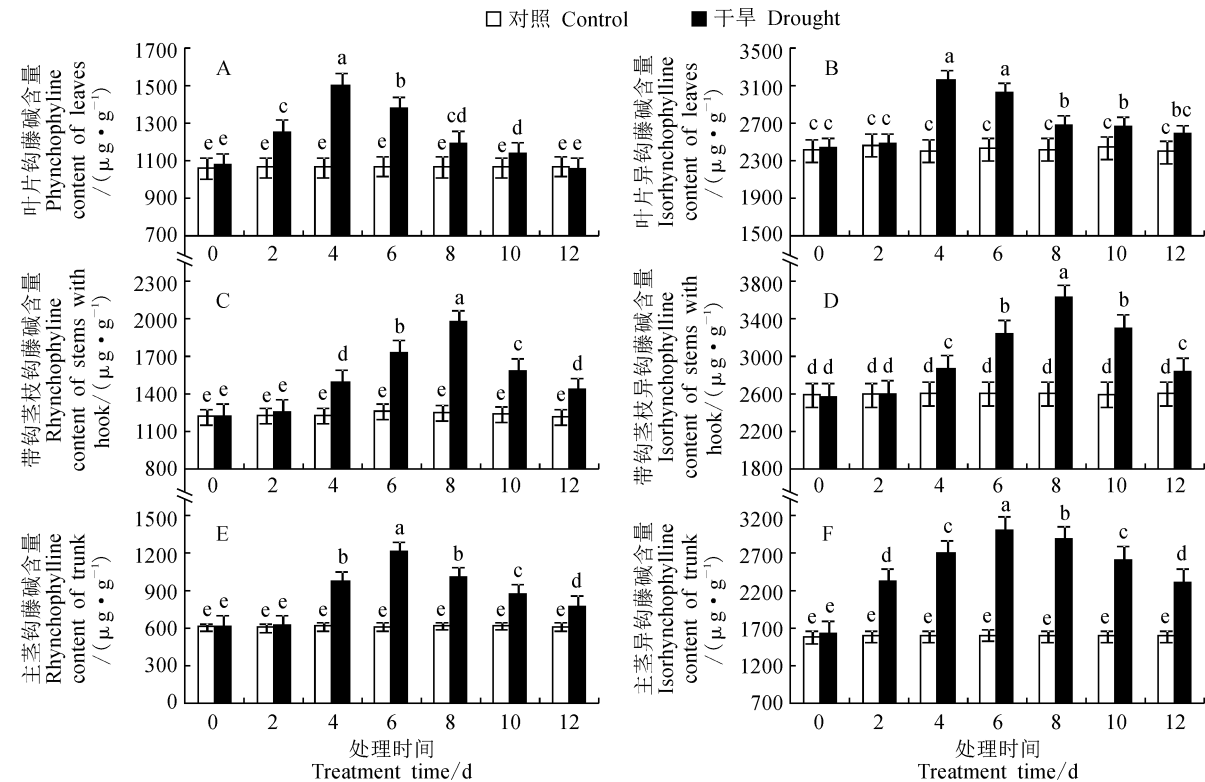


图5 土壤干旱条件下钩藤叶片、带钩茎枝和主茎中钩藤碱与异钩藤碱含量的变化

Fig. 5 The contents of rhynchophylline and isorhynchophylline in leaves, stems with hook and trunk of *U. rhynchophylla* plants during soil drought period

主茎中钩藤碱和异钩藤碱含量在干旱中后期虽然急剧降低,但仍显著高于同期对照,在干旱 12 d 时分别为对照的 1.26 和 1.45 倍(图 5,E、F)。以上结果表明,钩藤叶片、带钩茎枝与主茎中钩藤碱和异钩藤碱含量均随土壤持续自然干旱时间的增加而先增加后降低,说明适度的干旱均能够促进各部位中两种生物碱积累,但促进各部位两种生物碱含量增加的最适宜干旱程度并不一致;同时,各部位钩藤碱和异钩藤碱含量均表现为带钩茎枝明显高于叶片和主茎,叶片又稍高于主茎。

3 讨论

3.1 钩藤幼苗生长和叶片叶绿素含量对土壤干旱胁迫的响应

水分作为重要的载体,参与植物体内物质的合成、转化和运输等生命活动,缺水会导致植株营养生长减缓,生物量下降^[18]。本研究中,随着土壤自然干旱时间的延长,钩藤地上茎叶干重与地下根干重逐渐降低,钩藤生物量的积累受到干旱胁迫的显著抑制;而其根冠比在干旱 4 d 后开始显著提高,并在干旱 12 d 达到最大值,可知在干旱胁迫条件下,钩藤优先保证根系生长,增强其对土壤中水分的吸收能力来适应逆境。

叶绿素在光合作用中起着非常重要的作用,其参与光能的吸收、传递和转化过程^[19]。干旱胁迫会引发叶绿素含量发生改变,进而影响植物光合功能^[20]。以往研究表明:植物遭受干旱胁迫时,叶片叶绿素含量呈下降趋势,如大果榆(*Ulmus macrocarpa*)^[21]等。而在本研究中,土壤自然干旱处理前 6 d,钩藤叶片叶绿素 a 与叶绿素 b 含量却表现出增高的趋势。推测其原因在于此时期叶片相对含水量显著下降,每克叶干重、细胞数增加,导致叶绿素浓缩,含量相对升高^[22]。该现象可能是干旱胁迫下植株维持光合速率的一种生理响应机制。随后干旱处理 8~12 d,钩藤叶片叶绿素 a 与叶绿素 b 含量持续下降,且在干旱 12 d 时,叶绿素 a 含量显著低于对照,而叶绿素 b 含量与对照无显著差异,表明钩藤叶片叶绿素 a 较叶绿素 b 更容易在过度干旱胁迫下被分解破坏。

3.2 钩藤幼苗叶片抗逆性生理指标对土壤干旱胁迫的响应

干旱胁迫下,植物体内活性氧(ROS)的产生和清除平衡状态被破坏,导致过量 ROS 积累^[23]。SOD、POD 和 CAT 作为植物体内清除 ROS 的重要

保护酶,其活性与抗氧化能力呈正相关^[23]。本研究中,干旱处理 4 d 时,钩藤叶片 POD 活性较 SOD 和 CAT 优先达到峰值,发挥更多的 ROS 清除作用,表明钩藤 POD 对干旱胁迫较为敏感,证实了赵丽英等^[24]认为的 POD 在逆境初期表达的观点;随后干旱处理 6 d 时,叶片 SOD 与 CAT 活性同期达到峰值,且 CAT 活性的增幅大于 SOD,由于 CAT 可将 SOD 等产生的 H_2O_2 转化成 H_2O ^[25],则 CAT 与 SOD 协同作用抵抗中度干旱带来的氧化胁迫。

同时,植物在干旱胁迫下会主动积累渗透调节物质,以降低细胞水势和维持正常膨压,来增强植株保水能力,抵御干旱胁迫,其中 SP、Pro 与 SS 是主要的渗透调节物质^[14]。本研究中,干旱处理 6~12 d 期间,钩藤叶片中 Pro、SS 和 SP 含量均迅速增加,并在干旱 12 d 时三者含量均达到最大值,表明钩藤能通过增加渗透性物质含量,维持细胞膨压,来增强其对中度和重度干旱胁迫的抵御能力。相比较而言,在水分亏缺条件下,钩藤叶片 Pro 含量增幅最大,表现出更强的渗透调节能力,这与粗壮女贞(*Ligustrum robustum*)在较严重干旱胁迫时会产生大量 Pro 抵御干旱胁迫相似^[26]。

另外,植物细胞内过量的 ROS,不仅会氧化分解细胞膜中的不饱和脂肪酸,产生大量有机化合物,如 MDA^[25],还会破坏细胞膜双层结构,导致组织电解质的外渗,REC 增大^[15]。本研究中,干旱处理 0~6 d 期间,钩藤叶片 MDA 含量与 REC 呈缓慢增加的趋势,与此时抗氧化酶活性及渗透调节物含量显著增加有关;随后干旱处理 8~12 d 期间,叶片 MDA 含量与 REC 迅速增加,表明细胞质膜受到较严重程度的损伤,虽然此时 Pro、SS 和 SP 含量均较高,但因细胞膜透性的增大,三者的渗透调节能力会弱于正常浇灌环境。

由以上分析可知,钩藤对干旱胁迫的抗逆性生理过程表现为:在轻度干旱胁迫(干旱 0~4 d)时,钩藤叶片 SOD、POD、CAT 活性及 Pro、SS、SP 含量快速上升,其中 POD 活性达到峰值,可见抗氧化酶系统是钩藤抵御干旱胁迫的第一道防线;在中度干旱胁迫(干旱 6~10 d)时,SOD 与 CAT 活性同期达到峰值且 Pro、SS、SP 含量迅速增加,此时抗氧化酶系统和渗透调节物质共同作为钩藤抵御干旱胁迫的第二道保护系统;在重度干旱胁迫(干旱 12 d)时,钩藤 ROS 清除系统遭到破坏,细胞内 ROS 积累,MDA 含量与 REC 达到最大值,即使 Pro、SS、SP 含量升高也无法抵御过度干旱胁迫的伤害。

3.3 钩藤中药用活性成分钩藤碱和异钩藤碱含量对土壤干旱的响应

钩藤碱与异钩藤碱是钩藤降压作用的主要有效成分^[27]。本研究中,除药用部位钩茎外,钩藤叶片与主茎中均含有钩藤碱与异钩藤碱,这与黄瑞松等^[28]研究结果一致,且各部位生物碱含量由高到低依次为带钩茎枝、叶片、主茎。植物遭受逆境胁迫时,体内次生代谢产物积累,以帮助机体应答不良环境^[6]。例如:轻度干旱胁迫下长春花(*Catharanthus roseus*)中长春质碱、长春碱和长春新碱含量显著增加^[29];中度干旱胁迫促进菘蓝(*Isatis indigotica*)根部靛玉红含量积累^[30]。本研究中,中度干旱胁迫促进钩藤叶片、主茎及带钩茎枝中钩藤碱与异钩藤碱含量积累,推测可能是干旱胁迫下,钩藤体内 ABA 生物合成增加,促进两种生物碱合成途径中相关基因上调所致,且在长春花中,外源 ABA 处理下,其单萜吲哚生物碱生物合成基因 *CrTDC*、*CrNMT* 和 *CrD4H* 表达显著上升^[31]。同时,干旱处理组钩藤叶片、主茎与带钩茎枝中钩藤碱与异钩藤碱含量分

别在干旱 4、6 和 8 d 达到峰值,表明两种生物碱在应对干旱胁迫时含量变化具有组织特异性,且叶片对干旱胁迫更为敏感,这与益母草(*Leonurus heterophyllum*)^[32]的相关研究结果相一致。尽管,钩藤在干旱胁迫下地上茎叶生物量显著降低,但当叶片、主茎以及带钩茎枝中钩藤碱与异钩藤碱含量分别达到最大值时,增幅分别为 41.19%与 31.48%、97.77%与 86.90%、57.51与 39.10%,均高于同期地上茎叶生物量的降幅 17.36%、26.85%、34.86%,故从生物碱的总量来看,适度干旱胁迫的确可以促进钩藤不同部位两种生物碱总量的积累。

总之,钩藤苗在土壤持续自然干旱过程中,通过加大根冠比、调节抗氧化酶活性和增加渗透调节物质的含量来有效抵御干旱环境,维持正常生长;同时,持续干旱 4~8 d(土壤 RWC 为 42%~53%),有利于促进钩藤各部位次生代谢产物钩藤碱与异钩藤碱含量的积累,这将为后期探讨干旱环境下钩藤碱与异钩藤碱诱导合成的调控机制奠定基础。

参考文献:

[1] RABARA R C, TRIPATHI P, REESE R N, *et al.* Tobacco drought stress responses reveal new targets for Solanaceae crop improvement[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 484.

[2] GARG B, KATHJU S, BURMAN U. Influence of water stress on water relations, photosynthetic parameters and nitrogen metabolism of moth bean genotypes[J]. *Biologia Plantarum*, 2001, 44(2): 289-292.

[3] 赵丽丽,王普昶,陈超,等.持续干旱对金荞麦生长、生理生态特性的影响及抗旱性评价[J].草地学报,2016,24(4): 825-833. ZHAO L L, WANG P C, CHEN C, *et al.* Influence of long-term persistent drought stress on growth, physiological and ecological characteristics of *Fagopyrum dibotrys* and comprehensive evaluation of their drought resistance[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2016, 24(4): 825-833.

[4] 梁建萍,贾小云,刘亚令,等.干旱胁迫对蒙古黄芪生长及根部次生代谢物含量的影响[J].生态学报,2016,36(14): 4 415-4 422. LIANG J P, JIA X Y, LIU Y L, *et al.* Effects of drought stress on seedling growth and accumulation of secondary metabolites in the roots of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(14): 4 415-4 422.

[5] RAMACHANDRA RAO S, RAVISHANKAR G. Plant cell cultures; chemical factories of secondary metabolites[J]. *Biotechnology Advances*, 2002, 20(2): 101-153.

[6] 李霞,王洋,阎秀峰.水分胁迫对黄檗幼苗三种生物碱含量的影响[J].生态学报,2007,27(1): 58-64. LI X, WANG Y, YAN X F. Effects of water stress on berberine, jatrorrhizine and palmatine contents in *Phellodendron amurense* Rupr. seedlings[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(1): 58-64.

[7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015: 257.

[8] 张明生.贵州主要中药材规范化种植技术[M].北京:科学出版社,2013: 205.

[9] 戴全厚,严友进.西南喀斯特石漠化与水土流失研究进展[J].水土保持学报,2018,32(2): 1-10. DAI Q H, YAN Y J. Research progress of Karst rocky desertification and soil erosion in southwest China[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2018, 32(2): 1-10.

[10] 郭柯,刘长成,董鸣.我国西南喀斯特植物生态适应性及石漠化治理[J].植物生态学报,2011,35(10): 991-999. GUO K, LIU C C, DONG M. Ecological adaptation of plants and control of rocky-desertification on Karst region of Southwest China[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2011, 35(10): 991-999.

[11] 黄晏,周文霞,张永祥,等.钩藤碱及其同分异构体对神经系统作用的研究进展[J].药科学报,2018,53(7): 1 017-1 022. HUANG Y, ZHOU W X, ZHANG Y X, *et al.* Research progresses in pharmacological effects of rhynchophylline and its isomers on nervous system[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2018, 53(7): 1 017-1 022.

[12] 潘文慧,蒋海强,李运伦.钩藤提取液对自发性高血压大鼠尿液代谢组学的影响[J].中医杂志,2019,60(1): 62-66, 71. PAN W H, JIANG H Q, LI Y L. Effects of Guoteng(*Uncaria rhynchophylla*) extracting solution on urine metabolomics in spontaneously hypertensive rats[J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 60(1): 62-66, 71.

[13] 贾鑫,孙窗舒,李光跃,等.干旱胁迫对蒙古黄芪生长和生理生化指标及其黄芪甲苷积累的影响[J].西北植物学报,

- 2018, **38**(3): 501-509.
- JIA X, SUN C S, LI G Y, *et al.* Effect of drought stress on the growth and physiological characteristics and the accumulation of astragaloside IV secondary metabolites of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2018, **38**(3): 501-509.
- [14] 刘 艳, 陈贵林, 蔡贵芳, 等. 干旱胁迫对甘草幼苗生长和渗透调节物质含量的影响[J]. 西北植物学报, 2011, **31**(11): 2 259-2 264.
- LIU Y, CHEN G L, CAI G F, *et al.* Growth and osmoregulation substances accumulation of *Glycyrrhiza uralensis* seedling under drought stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2011, **31**(11): 2 259-2 264.
- [15] KOICHEVA K V, GEORGIEV G I, *et al.* An improvement of the diffusion model for assessment of drought stress in plant tissues[J]. *Physiologia Plantarum*, 2014, **150**(1): 88-94.
- [16] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 134-261.
- [17] 潘 昕, 邱 权, 李吉跃, 等. 干旱胁迫对青藏高原 6 种植物生理指标的影响[J]. 生态学报, 2014, **34**(13): 3 558-3 567.
- PAN X, QIU Q, LI J Y, *et al.* Physiological indexes of six plant species from the Tibetan Plateau under drought stress[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, **34**(13): 3 558-3 567.
- [18] 陈锦平, 王振夏, 曾成城, 等. 不同水分和植株密度处理对牛鞭草生长及形态的影响[J]. 草业学报, 2015, **24**(1): 39-46.
- CHEN J P, WANG Z X, ZENG C C, *et al.* Effects of different water levels and plant densities on the growth and morphology of *Hemarthria altissima* [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, **24**(1): 39-46.
- [19] 孙小玲, 许岳飞, 马鲁津, 等. 植株叶片的光合色素构成对遮阴的响应[J]. 植物生态学报, 2010, **34**(8): 989-999.
- SUN X L, XU Y F, MA L Y, *et al.* A review of acclimation of photosynthetic pigment composition in plant leaves to shade environment[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2010, **34**(8): 989-999.
- [20] 韩端宏, 卢欣石, 高桂娟, 等. 紫花苜蓿(*Medicago sativa*)对干旱胁迫的光合生理响应[J]. 生态学报, 2007, (12): 5 229-5 237.
- HAN R H, LU X S, GAO G J, *et al.* Photosynthetic physiological response of alfalfa (*Medicago sativa*) to drought stress[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, (12): 5 229-5 237.
- [21] 刘佳宁, 李春友, 贾长荣, 等. 大果榆苗期对不同水分胁迫的生长与生理响应[J]. 西北林学院学报, 2018, **33**(4): 24-29, 205.
- LIU J N, LI C Y, JIA C R, *et al.* Growth and physiological responses of *Ulmus macrocarpa* to different water stress at seedling stage[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2018, **33**(4): 24-29, 205.
- [22] 李芳兰, 包维楷, 吴 宁. 白刺花幼苗对不同强度干旱胁迫的形态与生理响应[J]. 生态学报, 2009, **29**(10): 5 406-5 416.
- LI F L, BAO W K, WU N. Morphological and physiological responses of current *Sophora davidii* seedlings to drought stress[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, **29**(10): 5 406-5 416.
- [23] 王宝山. 生物自由基与植物膜伤害[J]. 植物生理学通讯, 1988, **24**(2): 12-16.
- WANG B S. Biological free radicals and membrane damage of plants[J]. *Plant Physiology Communications*, 1988, **24**(2): 12-16.
- [24] 赵丽英, 邓西平, 山 仑. 活性氧清除系统对干旱胁迫的响应机制[J]. 西北植物学报, 2005, **25**(2): 413-418.
- ZHAO L Y, DENG X P, SHAN L. The response mechanism of active oxygen species removing system to drought stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2005, **25**(2): 413-418.
- [25] 刘红云, 梁宗锁, 刘淑明, 等. 持续干旱及复水对杜仲幼苗保护酶活性和渗透调节物质的影响[J]. 西北林学院学报, 2007, **22**(3): 55-59.
- LIU H Y, LIANG Z S, LIU S M, *et al.* Effect of progressive drying and rewatering on protective enzyme activities and osmoregulatory molecules in leaves of *Eucommia ulmoides* seedling[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2007, **22**(3): 55-59.
- [26] 吴丽丽, 王德炉, 李自玉. 粗壮女贞对持续性干旱及复水的生理响应[J]. 植物生理学报, 2018, **54**(5): 837-844.
- WU L L, WANG D L, LI Z Y. Physiological response of *Ligustrum robustum* to continuous drought and rewatering[J]. *Plant Physiology Journal*, 2018, **54**(5): 837-844.
- [27] 宋纯清, 樊 懿, 黄伟晖, 等. 钩藤中不同成分降压作用的差异[J]. 中草药, 2000, **31**(10): 762-764.
- SONG C Q, FAN Y, HUANG W H, *et al.* Different hypotensive effects of various active constituents isolated from *Uncaria rhynchophylla* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2000, **31**(10): 762-764.
- [28] 黄瑞松, 张 鹏, 覃冬杰, 等. 大叶钩藤植物不同部位中钩藤碱分析[J]. 中成药, 2012, **34**(4): 710-713.
- HUANG R S, ZHANG P, QIN D J, *et al.* Analysis of rhynchophylline content in different parts of *Uncaria macrophylla* Wall. [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2012, **34**(4): 710-713.
- [29] 张 楠, 温 泉, 冯 辉, 等. 干旱胁迫及施加氮素对长春花生物碱的调控[J]. 中国中药杂志, 2012, **37**(10): 1 346-1 352.
- ZHANG N, WEN Q, FENG H, *et al.* Effects of water stress and nitrogen nutrition on regulation of *Catharanthus roseus* alkaloids metabolism[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2012, **37**(10): 1 346-1 352.
- [30] 谭 勇, 梁宗锁, 董娟娥, 等. 水分胁迫对菘蓝生长发育和有效成分积累的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, (1): 19-22.
- TAN Y, LIANG Z S, DONG J E, *et al.* Effect of water stress on growth and accumulation of active components of *Isatis indigotica* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2008, (1): 19-22.
- [31] 张孟夏, 王燕燕, 于 放. 脱落酸调节长春花中单萜吡啶生物碱的生物合成[J]. 分子植物育种, 2019, **17**(10): 3 371-3 377.
- ZHANG M X, WANG Y Y, YU F. Regulation of Abscissic Acid on the biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, **17**(10): 3 371-3 377.
- [32] 李 林. 干旱胁迫对益母草总生物碱和黄酮含量的影响[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009.