

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.01.016

丁兰,张丽,李静,等. 8-甲氧基二氢血根碱化感潜能的评估[J]. 广西植物,2014,34(1):84–88

Ding L,Zhang L,Li J,et al. Allelopathic potential of 8-methoxy dihydrosanguinarine[J]. *Guihaia*,2014,34(1):84–88

8-甲氧基二氢血根碱化感潜能的评估

丁兰^{1*}, 张丽¹, 李静², 杨玲¹, 令利军¹, 杨宁¹, 刘国安¹

(1. 西北师范大学 生命科学学院, 兰州 730070; 2. 武威市第八中学, 甘肃 武威 733000)

摘要:以莴苣幼苗为材料,检测了分离自细果角茴香的生物碱对莴苣幼苗根生长及根毛发育的影响。结果表明:50~200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内,8-甲氧基二氢血根碱对莴苣幼苗根长显著抑制;10、20和30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8-甲氧基二氢血根碱对莴苣幼苗根毛的长度和数量有显著的抑制作用,且抑制作用均表现了浓度依赖性。通过对莴苣根尖细胞有丝分裂研究发现,50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的8-甲氧基二氢血根碱能显著抑制根尖细胞的有丝分裂,而且莴苣幼苗净增值率与根尖细胞的有丝分裂之间呈正相关,证明8-甲氧基二氢血根碱主要通过抑制根尖细胞有丝分裂对莴苣根的生长产生影响。

关键词: 8-甲氧基二氢血根碱; 莴苣; 生物碱; 化感作用

中图分类号: Q945.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)01-0084-05

Allelopathic potential of 8-methoxy dihydrosanguinarine

DING Lan^{1*}, ZHANG Li¹, LI Jing², YANG Ling¹,LING Li-Jun¹, YANG Ning¹, LIU Guo-An¹(1. *College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China;**2. Wuwai No. 8 Senior High School, Wuwei 733000, China*)

Abstract: Effects of 8-methoxy dihydrosanguinarine isolated from *Hypecoum leptocarpum* on the root growth and root hair development of *Lactuca sativa* seedlings were studied. The results showed that the root growth was significantly inhibited by 8-methoxy dihydrosanguinarine at the concentration of 50–200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; the inhibitory effect on root hairs increased with concentration ranging from 10 to 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The inhibitory effects of tested compound on the length and number of root hairs showed a dose-dependent manner. Moreover, the mitosis of apical cells could be inhibited by 8-methoxy dihydrosanguinarine at the concentrations above 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and revealed a positive linear regression with root NGR. Thus, the effect of 8-methoxy dihydrosanguinarine on *Lactuca sativa* seedlings mainly explored on the inhibition of the mitotic activity.

Key words: 8-methoxy dihydrosanguinarine; *Lactuca sativa*; alkaloids; allelopathy

化感作用是指植物在生长过程中分解产生的次级代谢产物对自身或邻近植物(包括微生物)的生长发育产生直接或间接、有利或有害的影响。植物具有大量的次生代谢产物,如酚类、萜类及生物碱类等。这些物质通过雨水淋溶、挥发、根分泌和植株分

解等途径释放到环境中,并对其生境中的生物产生影响(Weir *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2012),它们是生态环境的参与者和构建者(Ma *et al.*, 2008)。化感物质依其结构可分为14类(Rice, 1984),生物碱就是其中最为重要的一种。

收稿日期: 2013-08-29 修回日期: 2013-10-04

基金项目: 西北师范大学知识与科技创新工程项目(NWNU-KJXG-03-65); 国家自然科学基金(30960464); 生物学省级重点学科项目。

作者简介: 丁兰(1964-), 女, 四川德阳人, 博士, 教授, 主要研究方向为植物细胞工程和分子药理学, (E-mail)dinglan@nwnu.edu.cn。

*通讯作者

细果角茴香(*Hypocoum leptocarpum*)为罂粟科角茴香属一年生草本植物,主要分布于四川、西藏、青海及华北地区。该属植物含有丰富的生物碱和糖苷类,目前有 20 余种生物碱(隐品碱、原阿片碱和茴香碱等)从该属植物中分离得到(中华本草编委会,1999)。生物碱是重要的化感物质之一,但有关角茴香中生物碱的化感潜能的评估目前鲜有文献报道(Ding *et al.*,2011),该类化合物的生态学贡献还不清楚。本研究以青海细果角茴香中的 8-甲氧基二氢血根碱为测试化合物,以经典化感测试植物——莴苣为受试对象,研究 8-甲氧基二氢血根碱对莴苣幼苗根及根毛生长发育的影响,评估其化感潜能。

1 材料与方 法

1.1 研究材料

莴苣(*Lactuca sativa*);8-甲氧基二氢血根碱分离于青海西宁产细果角茴香(*Hypocoum leptocarpum*),并通过现代波谱学方法对其分子结构进行了鉴定,纯度达 99.8%。二甲基亚砜(DMSO)和乙醇等均为分析纯。

1.2 研究方法

1.2.1 莴苣幼苗培养及药物处理 莴苣种子经流水冲洗 10 min,无菌水冲洗 3~4 次后均匀排列在铺有 3 层经水浸润的滤纸的培养皿中,每皿 40 粒种子。置于(20±2)℃,昼/夜周期 16h/8h 条件下培养 48 h 后,将生长整齐一致的幼苗转入不同浓度的 8-甲氧基二氢血根碱处理液当中,继续培养 48 h,统计数据。8-甲氧基二氢血根碱用 DMSO 溶解,配制 200 mmol·L⁻¹母液,置冰箱内保存,使用时按量加入培养皿中。两个实验组的处理液中 8-甲氧基二氢血根碱浓度分别为 0、10、20、30 μmol·L⁻¹和 0、50、100、150 和 200 μmol·L⁻¹。对照组和处理组中的 DMSO 含量均一致,其终浓度不超过 0.2%,预实验结果表明,该浓度对莴苣幼苗根的生长发育没有显著性影响。

1.2.2 根长、苗高净增值率的测定 莴苣幼苗经 8-甲氧基二氢血根碱处理 48 h 后,参照 Pan *et al.*(2001)的方法测定其根和苗的净增值率 NGR(Net growth rate)。各处理组均设 3 个平行,每个平行组测定 18 株幼苗的根长和下胚轴长度,用下胚轴长度的变化反映苗高的变化,并进行 3 次独立重复实验。

苗净增值率计算公式为 Seedling NGR=(处理后下胚轴长-处理前下胚轴长)/处理前苗高×100%;根的净增值率公式为 Root NGR=(处理后根长-处理前根长)/处理前根长×100%。

1.2.3 根毛的观察测定 距根尖 0.5 cm 处切取约 1 cm 长的根段,于 75%的乙醇中固定备用。压片后在光学显微镜(Nikon Eclipse E400)上用目镜测微尺观察,测定幼苗根毛 1 300 μm 根段内的根毛密度和平均长度。取测量根段的两端和中间的值的平均值,每处理组随机选取 18 株幼苗。

1.2.4 有丝分裂指数测定 根据 Akinboro *et al.*(2007)的根尖压片法(略有修改)测定莴苣幼苗根尖细胞的有丝分裂指数。莴苣幼苗经一定浓度的 8-甲氧基二氢血根碱处理 48 h 后,切取根尖(长约 1 cm),用卡诺固定液(冰醋酸:乙醇=1:3,V/V)固定 24 h 后将材料转入 70%的乙醇中备用;取固定后的根尖在 1.0 mol/L HCl 中 60℃水解 8 min,小心切取幼苗根尖(长约 1 mm),用刀片小心挑至滴有改良石碳酸品红染液的载玻片上,染色 8 min,常规压片后置于光学显微镜(Nikon Eclipse E400)下观察、拍照(Canon XIUS 80 IS 数码相机),并统计有丝分裂指数(即每 1 000 个细胞中分裂期细胞所占比率)。

1.3 数据统计与分析

对照组和实验组差异采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析($P<0.05$ 表示显著性差异, $P<0.01$ 表示极显著性差异)。各药物处理后数据之间的相关性用统计学软件进行线性回归分析,并评价其显著性(P)和决定系数(R^2)。所有实验数据均以平均值±标准差的形式表示。

2 结果与分析

2.1 8-甲氧基二氢血根碱对莴苣幼苗生长的抑制作用

莴苣幼苗经 8-甲氧基二氢血根碱处理 48 h 后,根生长表现出被抑制现象(图 1),但苗高不受影响。实验表明,8-甲氧基二氢血根碱对莴苣幼苗根生长具有显著性的抑制作用($P<0.01$),并与药物浓度呈正相关,幼苗经 50、100、150 和 200 μmol·L⁻¹该化合物处理 48 h 后,幼苗根的平均 NGR 均低于对照组(135.93%),分别为 108.79%、92.7%、83%和 77.34%(图 2:A);幼苗经以上 4 种浓度 8-甲氧基二氢血根碱处理 48h 后,胚上部分的平均 NGR 分别

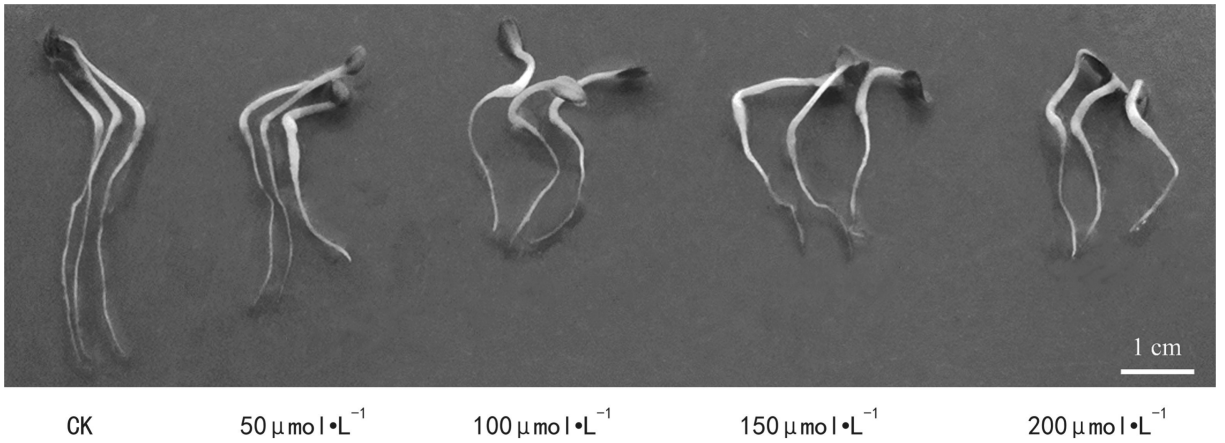


图 1 8-甲氧基二氢血根碱对莴苣幼苗根长、苗高的影响

Fig. 1 Effects of 8-methoxy dihydrosanguinarine on the root and hypocotyls growth of *Lactuca sativa* seedlings

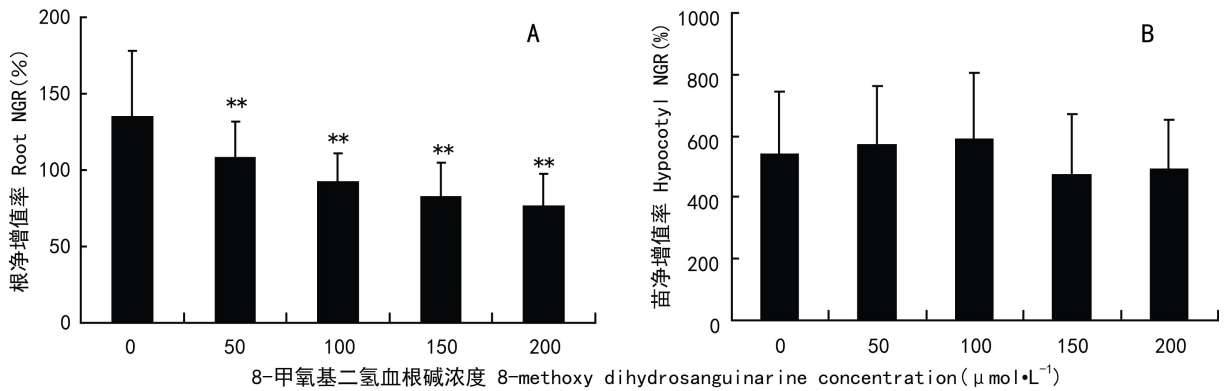


图 2 8-甲氧基二氢血根碱对莴苣幼苗生长的抑制作用 A. 对莴苣幼苗根净增值率的影响; B. 对莴苣幼苗胚上部分净增值率的影响。* 和 ** 分别表示处理组和对照组在 0.05、0.01 水平差异显著,下同。

Fig. 2 Inhibition of 8-methoxy dihydrosanguinarine on the seedling growth of *Lactuca sativa* A. Effects on net growth rate (NGR) of *L. sativa* seedlings; B. Effects on hypocotyls net growth rate(NGR) of *Lactuca sativa* seedlings; * and ** respectively indicate significant differences between treatments and control at 0.05 and 0.01 level, the same below.

为 570.97%、590.32%、477.72% 和 495.16%, 与对照组(543.55%)无显著性差异($P > 0.05$) (图 2; B), 即上述浓度的 8-甲氧基二氢血根碱并未对莴苣幼苗胚上部分的生长发育产生影响。

2.2 8-甲氧基二氢血根碱对莴苣幼苗根毛生长的抑制作用

图 3 显示, 分别用 10、20 和 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8-甲氧基二氢血根碱处理莴苣幼苗 48 h 后, 其根毛发育受到了明显的抑制, 在 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下, 幼苗有少量极短根毛, 说明抑制作用与药物浓度呈正相关。图 3 结果显示, 在 10、20 和 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 8-甲氧基二氢血根碱浓度下, 处理组根毛平均长度分别为 187.3、100.61 和 63.84 μm , 与对照组 190.87 μm 相比呈明显的下降趋势, 其中 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

平均根毛长度与对照组相比无显著性差异($P > 0.05$); 20 和 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8-甲氧基二氢血根碱均能不同程度地抑制根毛的生长, 具有显著性水平($P < 0.01$)且呈浓度依赖性(图 4; A); 相同浓度梯度下, 处理组根毛密度分别为 90.3、48 和 23 个, 相对对照组的 97.9 个, 差异显著(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $P < 0.05$; 20 和 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $P < 0.01$) (图 4; B)。

2.3 8-甲氧基二氢血根碱对莴苣幼苗根尖分生区细胞有丝分裂的抑制作用

应用根尖压片技术观察有丝分裂不同时期染色体的形态特征(图 5), 并以该特征为标准, 统计实验组根尖细胞的有丝分裂指数, 以此评估受试化合物对莴苣幼苗根尖分生区细胞有丝分裂活力的影响, 阐释该化合物对莴苣幼苗根生长的影响。如图 6 所

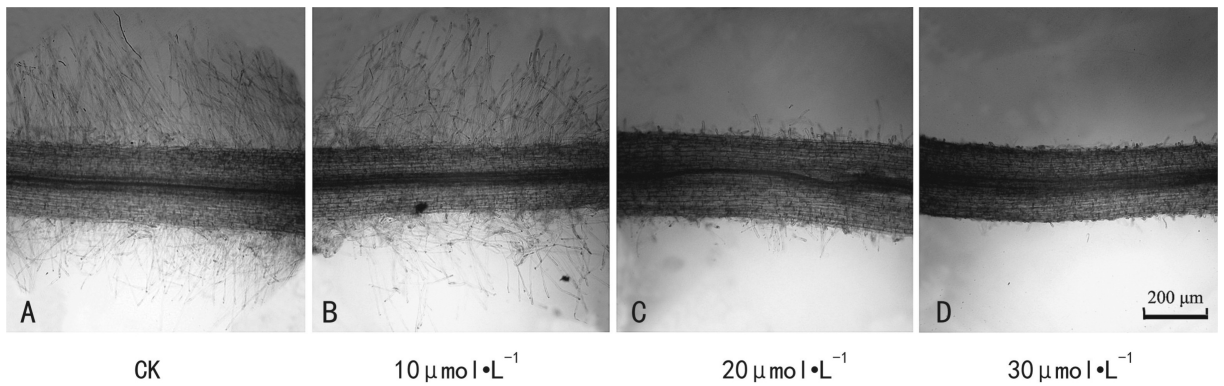


图 3 8-甲氧基二氢血根碱处理莴苣幼苗 48 h 后对根毛发育抑制作用的光学显微图 A. 对照组; B-D. 分别表示经 10, 20, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8-甲氧基二氢血根碱处理后的莴苣幼苗根毛图片。

Fig. 3 Light micrographs showing the inhibition of 8-methoxy dihydrosanguinarine on root hair development of *Lactuca sativa* seedlings after treatment for 48 h A. Control; B-D. Seedlings of lettuce were treated with 8-methoxy dihydrosanguinarine (10, 20, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively).

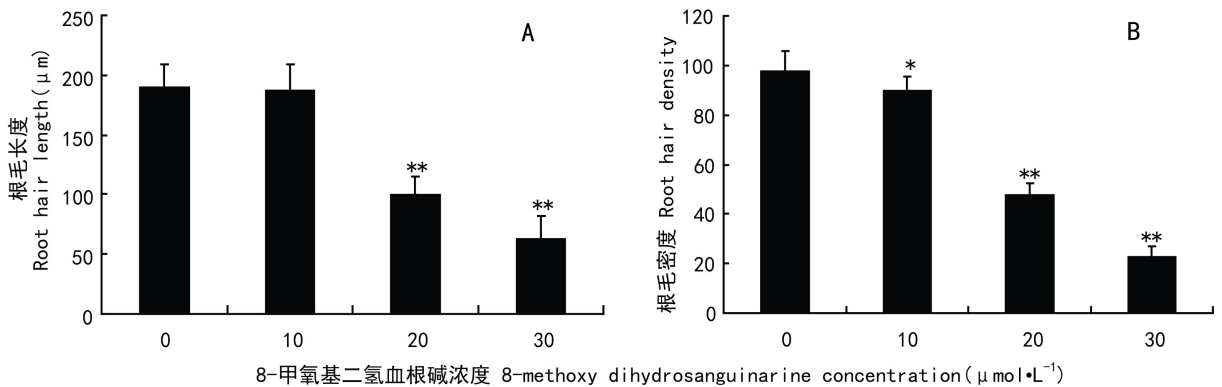


图 4 8-甲氧基二氢血根碱处理莴苣幼苗 48 h 后对根毛发育的影响 根毛密度表示为每 1 300 μm 根段内观察到的根毛数目
Fig. 4 Effects of 8-methoxy dihydrosanguinarine on the root hair development of *Lactuca sativa* seedlings after treatment for 48 h The density of root hair was root hair number within per 1300 μm root segment.

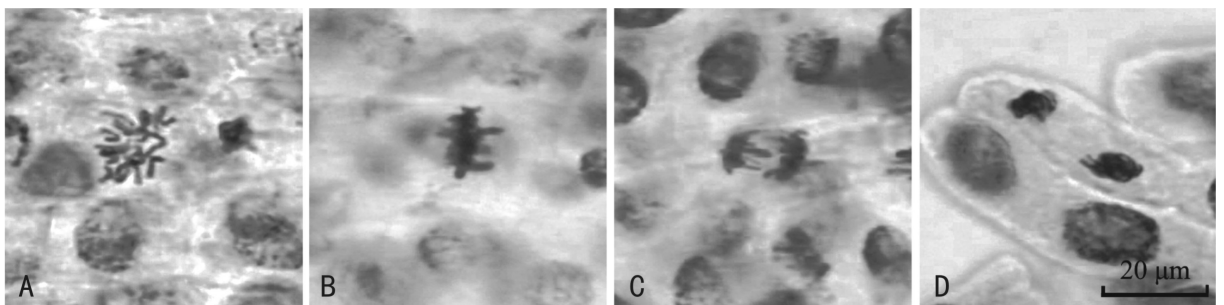


图 5 有丝分裂期的不同时期 A. 前期; B. 中期; C. 后期; D. 末期。

Fig. 5 Different phases of mitosis A. Prophase; B. Metaphase; C. Anaphase; D. Telophase.

示, 莴苣幼苗生长 48 h 后, 对照组根尖细胞有丝分裂指数为 77.1%, 而 50、100、150 和 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 8-甲氧基二氢血根碱处理组根尖细胞的有丝分裂指数分别为 64.4、49.4、47.1 和 42.4%, 与对照组相比

呈极显著差异 ($P < 0.01$)。表明 8-甲氧基二氢血根碱在处理浓度下能显著抑制莴苣幼苗根尖细胞的有丝分裂, 且抑制作用随浓度的升高而增强。

莴苣幼苗根净增值率与根尖分生区细胞有丝分

裂指数经线性回归分析结果表明存在显著的正相关关系($r=0.99, P=0.001$)(图7)。这表明在50~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内,8-甲氧基二氢血根碱可以通过降低根尖细胞有丝分裂活性对莴苣幼苗根的生长产生抑制。

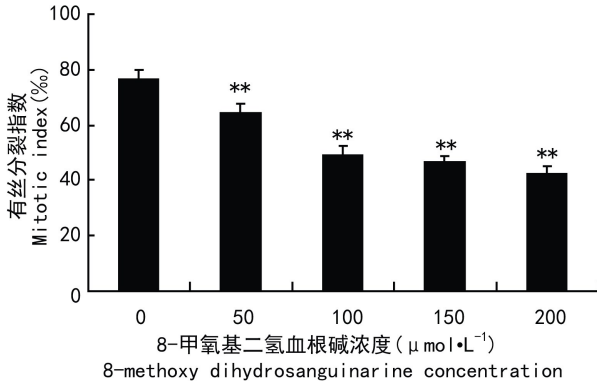


图6 8-甲氧基二氢血根碱对莴苣幼苗根尖细胞有丝分裂的抑制作用

Fig. 6 Inhibition of 8-methoxy dihydrosanguinarine on the mitotic of apical cells of *Lactuca sativa* seedlings

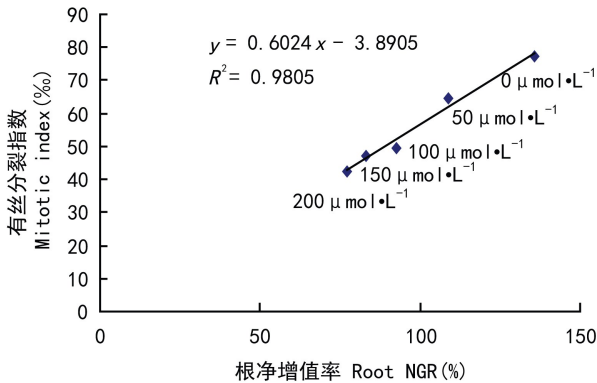


图7 莴苣幼苗经8-甲氧基二氢血根碱处理后根NGR和根尖细胞有丝分裂指数间的回归直线图

Fig. 7 Regression line between root NGR and mitotic index of lettuce seedlings after treatment for 48 h with 8-methoxy dihydrosanguinarine.

3 结论与讨论

植物根是化感物质作用的重要靶器官,由于根的生长主要源于根尖伸长区细胞的伸长生长和分生区的细胞分裂(Wolters *et al.*, 2009),同时根毛的生长发育对外界环境的变化也很敏感,因此,在实验室条件下对植物次生代谢产物的化感作用潜能的评估主要选取根及根毛为研究对象。生物碱是一类化感

作用较强的次生代谢产物,本研究显示,50~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 8-甲氧基二氢血根碱能明显地抑制莴苣幼苗根的生长,这与其显著抑制根尖分生区细胞有丝分裂活力密切相关。

植物次生代谢产物不仅可通过抑制纺锤丝的形成而抑制细胞分裂,还能通过抑制植物细胞壁多糖类物质的合成而抑制细胞伸长,使根直径加粗(Liamson *et al.*, 1988)。丁兰等(2011)使用高浓度二氢血根碱处理莴苣幼苗根尖后发现根分生区细胞DNA有明显的损伤,认为根尖细胞有丝分裂活力的下降与细胞DNA受损有关。Cools *et al.* (2008)认为当植物根尖DNA被损伤时植物细胞运行周期阻滞和DNA损伤修复机制是为了保持基因组的完整性。8-甲氧基二氢血根碱导致莴苣幼苗根尖细胞有丝分裂指数显著下降是有丝分裂过程中纺锤体组装受到了影响,还是根尖细胞的DNA被损伤而引起周期阻滞使分裂细胞数目减少所致,尚需进一步研究求证。

植物根毛的主要功能是增大根对水分、营养物质的有效吸收面积以及可利用的土壤体积(Wang *et al.*, 2004; 李扬汉, 1984; Bibikova *et al.*, 2002)。丁兰等(2008)研究表明,对映-贝壳杉烷型二萜化合物Leukamenin E对莴苣幼苗根毛生长发育的抑制很可能是通过拮抗乙烯信号途径发挥作用的, Franck *et al.* (2003)研究发现,刺桐碱可通过诱导桉树根毛的细胞骨架重建使根毛生长停止和变形。那么8-甲氧基二氢血根碱抑制莴苣幼苗根毛发育是否是通过乙烯信号通路或细胞骨架的改变而施加影响,还需进一步深入研究。

综上所述,细果角茴香中的8-甲氧基二氢血根碱对经典化感测试植物莴苣幼苗的根和根毛的生长发育均表现出显著的抑制效应,显示了一定的化感潜能,但该化合物是否在其生态环境中发挥了生态作用还需要进一步深入研究。

参考文献:

- 《中华本草》编委会. 1999. 中华本草(第3册)[M]. 上海:上海科学技术出版社:654—655
- 李扬汉. 1984. 植物学[M]. 上海:上海科技出版社:417
- Akinboro A, Bakare AA. 2007. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn [J]. *J Ethnopharmacol*, **112**:470—475
- Bibikova T, Gilroy S. 2002. Root hair development[J]. *J Plant Growth Regul*, **21**:383—415

(下转第115页 Continue on page 115)