

镧对 UV-B 胁迫下大豆幼苗类黄酮影响: II 类黄酮成分影响

彭 祺¹, 彭 倩¹, 周 青^{1,2}

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学环境与土木工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要:采用液相色谱法研究了 La(III)对紫外辐射(UV-B: 0.15 W·cm⁻², 0.45 W·cm⁻²)胁迫下大豆(*Glycine max*)幼苗类黄酮成分变化的影响。结果表明, 20 mg·L⁻¹La 能明显提高大豆幼苗的类黄酮含量但不改变其成分; UV-B 处理下大豆幼苗类黄酮含量增加但机理与 La(III)不同, 低剂量 UV-B(0.15 W·cm⁻²)下大豆幼苗类黄酮成分无变化, 而高剂量(0.45 W·cm⁻²)下其成分产生调整, 合成更多种类的黄酮类物质; La(III)UV-B 处理组类黄酮含量同对应的 UV-B 处理组近似, 惟在各自对应时段的增幅前者大于后者。表明 La(III)具有提高大豆幼苗类黄酮含量、缓解 UV-B 辐射伤害的作用。

关键词:La(III); UV-B 辐射; 大豆幼苗; 类黄酮

中图分类号:Q945.78 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)02-0462-05

Effect of Lanthanum on the Flavonoids in the Soybean Seeding Under Ultraviolet-B Stress: II Effect on Content of Flavonoids

PENG Qi¹, PENG Qian¹, ZHOU Qing^{1,2}

(1. The Key Lab. of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Environmental and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Effect of La(III) on the composition of flavonoid in the soybean seedlings under elevated ultraviolet-B radiation (UV-B, 280~320 nm) was studied by liquid chromatography. The purpose was to explain the mechanism of alleviating damage of UV-B radiation stress to soybean seedling by flavonoid and La(III). UV-B radiation doses of 0.15 W·cm⁻² and 0.45 W·cm⁻² were used. The results showed that La(III) (20 mg·L⁻¹) could increase the content of flavonoid in soybean seedlings, but could not change flavonoid composition. UV-B radiation could also increase the content of flavonoid, but the mechanism differed from La(III) treatment. The flavonoid content in soybean seedlings did not change at low dose of UV-B (0.15 W·cm⁻²), but its composition was modified at high dose (0.45 W·cm⁻²) and more types of flavonoid were synthesized. The flavonoid content in La+UV-B treatment group was similar with the corresponding UV-B group, but increased more than the latter in the corresponding periods. Therefore, La(III) could increase the flavonoid content in soybean seedlings, and then alleviate the damage of UV-B to soybean seedling. However, the flavonoid content could not represent completely the plant ability of resistance to UV-B radiation, the composition of flavonoid also played an important role in the plant resistance to UV-B radiation.

Keywords: lanthanum; ultraviolet-B radiation; soybean seedling; flavonoid

地球上空臭氧层衰减导致地表 UV-B 辐射增强, 由此对植物生长发育、形态建成和生理生化代谢产生诸多影响。研究证明, 作为作物次生代谢产物的

类黄酮有抵御 UV-B 辐射伤害植物的作用^[1]; 而适宜与适量的 RE 也有增强作物代谢、缓解逆境伤害作物的作用^[2,3]。前文工作中^[4], 发现稀土 La(III)能提高大豆幼苗类黄酮含量, 减轻 UV-B 辐射胁迫对其造成的伤害, 并结合 La(III)与 UV-B 辐射对大豆 Chl 含量的反向作用推断, 两者提高类黄酮含量、诱导酶活性的机制不同。鉴于此, 本文采用 HPLC 方法进一步研究了 La(III)对 UV-B 辐射胁迫下大豆幼苗体内类黄酮成分

收稿日期: 2007-07-08

基金项目: 国家发改委稀土专项基金(IFZ20051210)

作者简介: 彭 祺(1980—), 男, 宁夏吴忠人, 博士, 研究方向为环境生态学。

通讯作者: 周 青 E-mail: zhouqeco@yahoo.com.cn

变化影响,试图从防御物质“量-质”关系角度诠释类黄酮减轻 UV-B 辐射伤害植物与 La (Ⅲ) 减轻 UV-B 伤害植物的内在原因。探讨 UV-B 辐射胁迫下 RE 对作物生长的影响,既可为 RE 农用技术拓展提供基础实验依据,也可为 UV-B 辐射伤害作物的生态防御研究提供新的思考方向。

1 材料和方法

1.1 试材培养

大豆(*Glycine max*)“垦农 18”的种子用 5% HgCl_2 消毒 5 min,去离子水冲洗 4 次,放入铺有 3 层纱布的培养皿中,于恒温培养箱(25℃)中萌发。待胚根长至 1 cm 移入塑杯($\Phi=8$ cm)中去离子水培养,每杯 3 株,每天换水 1 次。当第 2 枚真叶出现时,改用 1/2 Hoagland 营养液、室温(30℃/25℃)下培养,每天光照 12 h,光强 8 klx,早晚通气各 1 次,并用去离子水维持溶液体积,每 3 d 换 1 次营养液,至第 3 片真叶展开后进行 La(Ⅲ)和 UV-B 辐射处理。

1.2 试材处理

以前期实验筛选的最适浓度 LaCl_3 (20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 溶液处理大豆植株,喷雾器均匀喷布大豆叶片,滴液为限(约为 30 $\text{mL}\cdot\text{株}^{-1}$),CK 喷等量蒸馏水,处理与对照(CK)均 15 杯。48 h 后,进行 UV-B 辐射胁迫。于植株上方悬挂 UV-B 灯管(40 W, $\lambda=280\sim 320$ nm,南京紫光电器厂),调整高度使其强度达到 T1(0.15 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$)、T2(0.45 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$),以双通道辐照计(北京师范大学光电仪器厂)校正。每天处理 6 h(10:00—16:00),连续处理 5 d,之后可见光处理。从 1 d UV-B 胁迫结束后开始,每 48 h 取样一次,共取样 6 次。处理与 CK 均 3 次重复,差异显著性分析采用 LSD 方法。

1.3 测定方法

取同向、第 3 枚大豆幼苗叶片存于-70℃冰箱中直至分析。取冷冻叶片用液氮研磨成粉末并进行冷冻干燥。取冷冻干燥样品粉末 50 mg 用 1 mL CH_3OH 室温下提取 2 h,4℃下 10 000 g 离心 15 min。上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后直接进行 HPLC 分析。

HPLC 分析:Agilent HP1100 高效液相色谱仪, VWD 检测器;色谱柱:4.6×150 mm I.D. 5 μm Agilent ZORBAX SB-C18;柱温:室温(25℃)。检测波长:254 nm。运行时间:40 min。进样量:10 μL ;流动相 A:0.5% 乙酸溶液,流动相 B:乙腈,溶剂梯度为 0~40 min 内流动相 B 由 10%增至 80%。以芦丁为标样,通过进样量与峰面积求回归方程,类黄酮总量以芦丁计^[5]。

UV-B 吸收物测定按 Mirecki^[6]方法并略做修改,取冷冻的大豆叶片粉末 20 mg,加入 1 mL 酸化甲醇($\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}=79:1:20,\text{V/V}$) 室温提取 2 h,4 000 转,离心 30 min,取上清液,定量稀释,用紫外分光光度计测其在 300 nm 下的吸光值,以 OD_{300} 表示其含量。类黄酮含量测定见文献^[4]。

2 结果与分析

2.1 La(Ⅲ)对 UV-B 胁迫下大豆幼苗 UV-B 吸收物的即时影响

UV-B 吸收物主要是次生代谢产生的一些非光合色素(主要是类黄酮),富含 UV-B 吸收物的叶表皮是防护叶肉细胞免受 UV-B 损伤的屏障。从图 1 可知,La(Ⅲ)组大豆植株,UV-B 吸收物含量较 CK 提高 29.3%,这无疑有益于屏蔽 UV-B 辐射对大豆植株的伤害;UV-B 辐射胁迫下,UV-B 吸收物含量急增,增幅达 66.7%和 127.4%;La(Ⅲ)+UV-B 组 UV-B 吸收物的增幅分别为 108.5%[La(Ⅲ)+T1]和 144.9%[La(Ⅲ)+T2],均大于对应的 UV-B 处理组,且 La(Ⅲ)对 T1 效果优于 T2。

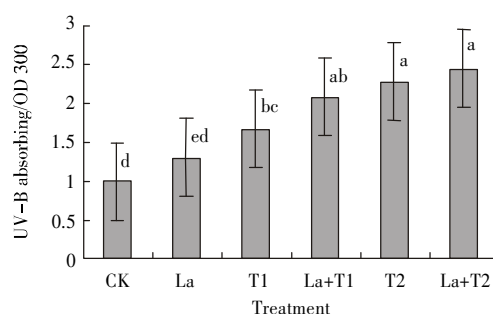


图 1 UV-B 胁迫 5 d 后大豆幼苗 UV-B 吸收物含量变化

Figure 1 Effects of the content of UV-B absorbing in soybean seedlings under UV-B stress in 5 d

进一步分析发现,UV-B 吸收物含量变化与类黄酮含量变化不对应,暗示与大豆类黄酮成分变化有关。从图 4 可知,CK 组大豆幼苗主要含 3 种类黄酮,而高剂量 UV-B 胁迫下则生成更多类黄酮。图 3 为 UV-B 胁迫 5 d 后 T2 组大豆幼苗类黄酮的 HPLC 图谱及各主要成分的 UV 吸收光谱,由于各类黄酮响应 UV 光谱的吸收波段不同,导致 UV-B 吸收物含量高低差异。

2.2 La(Ⅲ)对 UV-B 胁迫下大豆幼苗类黄酮总量的变化

图 2 展现的是 6 组处理大豆类黄酮含量连续 11

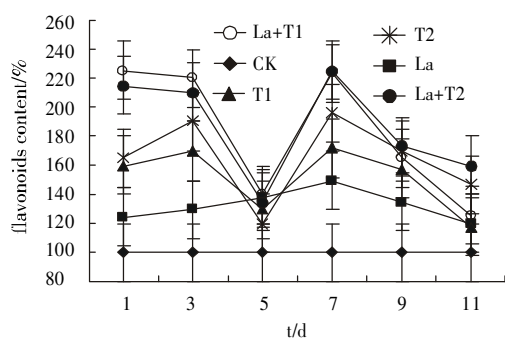


图 2 La(III)对 UV-B 胁迫下大豆幼苗类黄酮的动态变化

Figure 2 Dynamic effects of La(III) on the content of flavonoids in soybean seedlings under UV-B stress

d的动态变化规律。从图 2 增幅与走势看,La(III)组类黄酮含量整个实验时段(胁迫和恢复两阶段)皆高于CK,至 11 d 仍高于 CK 12.1%,表明稀土具有提高类黄酮含量的稳定效果,且时效不小于 13 d(喷施 La 2 d 后才开始处理)。UV-B 与 La(III)+UV-B 组类黄酮含量也均大于 CK,且在胁迫期(1~5 d)和恢复期(6~11 d)均历经先升后降这一过程;这是因为,胁迫后期由于持续的 UV-B 辐射破坏叶绿体的基粒与基质片层,阻碍 Chl 合成,加速其分解^[7],导致植物光合作用下降,同化产物积累减少,从而改变了有机合成中碳素的流向与流量,使植物次生代谢生物合成系统效率降低^[8];而在恢复期由于对大豆幼苗已停止 UV-B 胁迫,光致修复作用加强,Chl 含量回升^[8],同时大豆幼苗还未从 UV-B 胁迫中完全恢复,为类黄酮大量合成提供了条件,后期大豆幼苗胁迫伤害逐渐减弱,类

黄酮含量随之降低。UV-B 与 La(III)+UV-B 组类黄酮含量仅在各自对应时段的增幅上存异,即前者增幅<后者,La(III)+T2 增幅<La(III)+T1;说明 La(III)通过提高大豆幼苗类黄酮含量方式增强植株对 UV-B 辐射伤害的抗御能力,且 La(III)对 T1 的防护效果优于 T2。

进一步分析发现,UV-B 吸收物含量变化与类黄酮含量变化不对应,暗示与大豆类黄酮成分变化有关。从图 4 可知,CK 组大豆幼苗主要含 3 种类黄酮,而高剂量 UV-B 胁迫下则生成更多种类黄酮。图 3 为 UV-B 胁迫 5 d 后 T2 组大豆幼苗类黄酮的 HPLC 图谱及各主要成分的 UV 吸收光谱,由于各类黄酮响应 UV 光谱的吸收波段不同,导致 UV-B 吸收物含量高低差异。

2.3 La(III)对 UV-B 胁迫下大豆幼苗类黄酮的 HPLC 分析

图 4 为各处理组大豆幼苗在 1、5、9 d 时的 HPLC 图谱。由图的峰数与峰强及前期实验知^[4],La(III)与 UV-B 辐射均能促进大豆类黄酮合成,且 La(III)+T1(T2)组与 T1(T2)组峰数近同,仅峰强略高于后者,根据 La(III)与 UV-B 辐射对大豆 Chl 含量的反向作用推断,两者提高类黄酮含量的机制不同^[4]。因此,La(III)+T1(T2)组提高类黄酮量不等于它们的叠加。类黄酮是苯丙氨酸经苯丙酸盐途径形成查尔酮后进入各种不同的类黄酮合成途径产生。La(III)组与 CK 组相比,峰强增大,峰数基本稳定,表明类黄酮含量虽增,但成分没变,说明 La(III)对类黄酮合成途径中的酶无特异

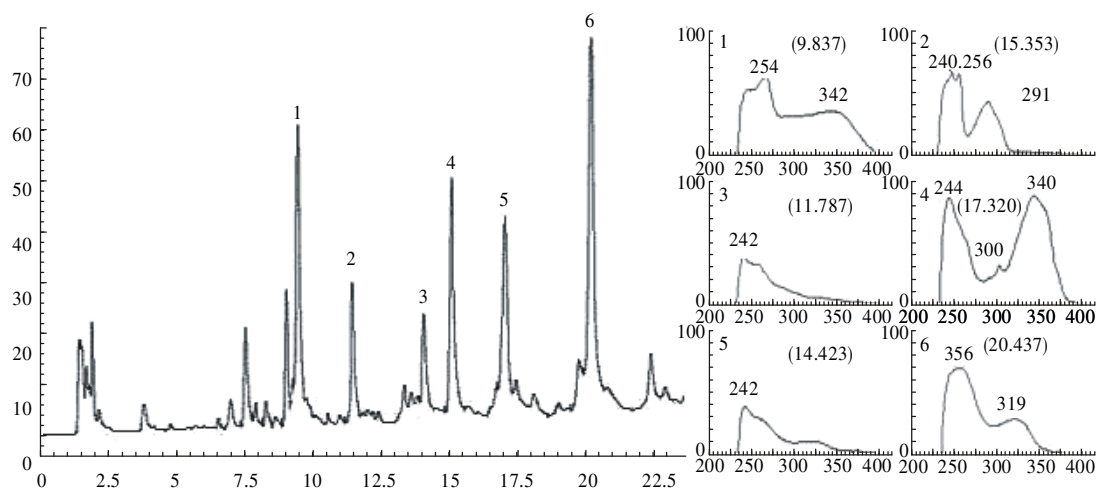


图 3 UV-B 胁迫 5 d 后 T2 组大豆幼苗类黄酮的 HPLC 图谱及成分 UV 光谱

Figure 3 HPLC chromatogram and UV spectrum of flavonoids in soybean seedlings under UV-B stress in 5d

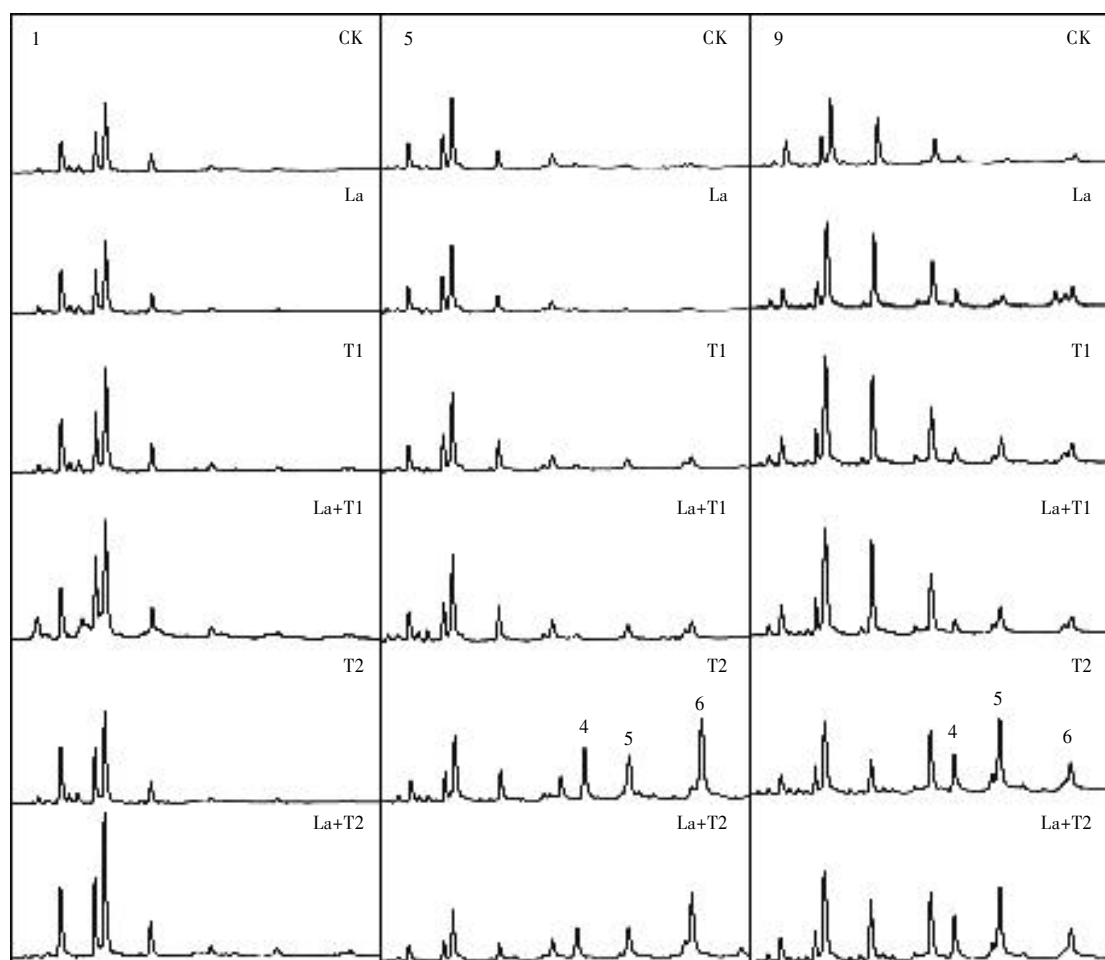
性;UV-B 胁迫时,T1 组虽与 La(Ⅲ)相似,但 T2 组经 5d UV-B 辐射后,新增 4、5、6 峰,峰 6 成主峰,峰 1 略降,新生成的类黄酮含量较高,其它类黄酮相应减少;UV-B 胁迫结束后(9 d),虽保持上述峰形,但峰 6 已大为降低,新生成类黄酮含量回落,其他类黄酮上升。已有研究指出^[9],某些植物在 UV-B 胁迫下,类黄酮总量不变,通过生成清除自由基功效更高的特异性类黄酮^[9]来实现避害目标。由此推测,UV-B 可诱导大豆类黄酮合成途径中关键酶,或植物通过改变类黄酮合成方向来应对环境变化。T1 与 T2 组差异可能是植物应对 UV-B 辐射机制不同,即低剂量 UV-B 辐射(T1)下,植物只需在叶片中积累大量类黄酮就可过滤消减进入叶肉细胞的 UV-B 净通量;高剂量 UV-B 辐射(T2)胁迫时,植物体内的 UV-B 通量依然很高,引起细胞及 DNA 损伤,次时植物通过合成特异性黄酮来清除自由基^[10],减弱 UV-B 伤害。

3 结论

(1)La(Ⅲ)能提高大豆幼苗 UV-B 吸收物和类黄酮含量,从而减轻 UV-B 辐射对其造成的伤害,且 La(Ⅲ)对低剂量 UV-B(T1)的防护效果优于高剂量(T2);

(2)La(Ⅲ)与 UV-B 提高大豆类黄酮含量的不同机制在于,La(Ⅲ)以促进苯丙酸盐(类黄酮前体物质)合成为主,不改变类黄酮合成流向;而 UV-B 胁迫还可对类黄酮合成途径中各种酶进行诱导,通过改变类黄酮合成流向来提高自身防护能力;

(3)从 UV-B 吸收物与类黄酮含量差异变化知,类黄酮含量不能完全代表植物耐 UV-B 辐射能力,其组分在抵抗 UV-B 胁迫中的作用不可小觑。低剂量 UV-B 辐射胁迫下,植物是以急剧提高类黄酮总量来应对外在胁迫(以量为先),高剂量 UV-B 辐射胁迫下,植物以明显改变其类黄酮成分来适应外在胁迫(以质



1.DAIDZIN 大豆甙 2.MGD 丙二酰大豆甙 3.MGG 丙二酰染料木甙 4.DAIDZEIN 大豆甙元 5.GENISTIN 染料木甙 6.GLYCITIN 甲氧基大豆甙

图 4 各处理下大豆幼苗类黄酮的 HPLC 图谱

Figure 4 HPLC chromatogram of flavonoids in soybean seedlings under UV-B stress

取胜)。

参考文献:

- [1] Hanns Frohnmeyer, Dorothee Staiger. Ultraviolet-B Radiation-Mediated Responses in Plants. Balancing Damage and Protection [J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(4):1420-1428.
- [2] Huang X H, Zhou Q, Zhang G S. Advances on rare earth application in pollution ecology [J]. *Journal of Rare Earths*, 2005, 23(1):5-11.
- [3] 邵红建,常 江,张自立,等. 稀土在植物抗逆中的生理作用[J].中国稀土学报,2003,22(5): 487-490.
GAO Hong-jian, CHANG Jiang, ZHANG Zi-li, et al. Physiological Effects of Rare Earth Elements on Stress Resistance in Plant[J]. *Journal of the Chinese Rare Earth Society*,2003,22(5):487-490.
- [4] 梁 滨,季平扬,唐宋辉,等. 镧对 UV-B 胁迫下大豆幼苗类黄酮含量影响: I 对类黄酮总量影响[J]. 农业环境科学学报,2006,25(3): 584-586.
LIANG Bin, JI Ping-yang, TANG Song-hui, et al. Effect of Lanthanum on the Content of Flavonoids in Soybean Seedling Under Ultraviolet-B Stress: I Effect of Lanthanum on Total Flavonoids[J]. *Journal of Agro-Environment Science*,2006,25(3): 584-586.
- [5] Rainer W Hofmann, Ewald E.Swinny, Stephen J Bloor, et al. Responses of Nine *Trifolium repens* L. Populations to Ultraviolet-B Radiation: Differential Flavonol Glycoside Accumulation and Biomass Production [J]. *Annals of Botany*, 2000, 86:527-537.
- [6] Mirecki R M, Teramura A H, Effects of ultraviolet-B irradiance on soybean V The dependence of plant sensitivity on the photosynthetic photon flux density during and after leaf expansion [J] . *Plant Physiol*,1984, 74:475-480.
- [7] Zhao D, et al.Growth and physiological responses of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) to elevated carbon dioxide and ultraviolet-B radiation under controlled environment conditions[J]. *Plant Cell Environ*,2003,771-782.
- [8] Liang Chanjuan, Huang Xiaohua, Zhou Qing. Effect of Rare Earths on Plant under Supplementary Ultraviolet-B Radiation: I Effect of Cerium on Growth and Photosynthesis in Rape Seedlings Exposed to Supplementary Ultraviolet-B Radiation [J]. *Journal of Rare Earths*, 2005,23(5): 569-575.
- [9] Ken G Rayan, Ewald E Swinny, Kenneth R Markham, et al. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves [J].*Phytochemistry*, 2002, 59: 23-32.
- [10] Holger A Scheidt, et al. Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1663: 97-107.