

镧对 UV-B 胁迫下大豆幼苗类黄酮含量与抗氧化能力影响

彭祺¹, 周青^{1,2*}

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

摘要:为进一步认识 La(Ⅲ)提高类黄酮含量及减轻 UV-B 辐射伤害植物机制,以大豆幼苗为材料,采用水培实验的方法研究了 La(Ⅲ)对 UV-B 辐射胁迫下大豆幼苗类黄酮抗氧化能力的动态影响。结果表明,UV-B 辐射($T_1: 0.15 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ 和 $T_2: 0.45 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$)胁迫下,大豆幼苗类黄酮含量在胁迫期和恢复期均先升后降,质膜透性、MDA 含量先升(1~5 d)后降(6~11 d),类黄酮对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 的清除率与其含量变化趋势近同。各处理组类黄酮含量 $\text{La(Ⅲ)} + \text{UV-B} > \text{UV-B} > \text{La(Ⅲ)} > \text{CK}$, $\text{La(Ⅲ)} + T_1 > \text{La(Ⅲ)} + T_2$; 质膜透性、MDA 含量 $\text{UV-B} > \text{La(Ⅲ)} + \text{UV-B} > \text{CK} > \text{La(Ⅲ)}$, $\text{La(Ⅲ)} + T_2 > \text{La(Ⅲ)} + T_1$; 类黄酮对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 清除率 $\text{La(Ⅲ)} + \text{UV-B} > \text{UV-B} > \text{La(Ⅲ)} > \text{CK}$, $\text{La(Ⅲ)} + T_1 > \text{La(Ⅲ)} + T_2$, 表明 La(Ⅲ)对类黄酮的调控作用,提高了清除活性氧自由基的运行效率,降低了 MDA 浓度,维持了质膜正常透性,且对低剂量(T_1)的防护效果优于高剂量(T_2),进而在防御系统层面实现了 La(Ⅲ)对 UV-B 辐射伤害大豆幼苗的防护效应。

关键词: La(Ⅲ); UV-B 辐射; 大豆幼苗; 类黄酮; 自由基; 抗氧化

中图分类号: X173 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2008)07-2024-04

Effect of Lanthanum on the Flavonoids Contents and Antioxidant Capacity in Soybean Seedling Under Ultraviolet-B Stress

PENG Qi¹, ZHOU Qing^{1,2}

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

Abstract: Dynamic state of antioxidant capacity of flavonoids was investigated for a further demonstration of alleviating the damage of the UV-B radiation in the La-treated soybean seedlings under UV-B stress. Using hydroponics culture, the effects of lanthanum on the contents of flavonoids and its ability of antioxidant under elevated ultraviolet-B radiation (280-320 nm) was studied in this paper. The results showed flavonoids contents in Soybean seedlings during the stress and convalescent period increase firstly and then reduce. Membrane permeability and MDA contents increase firstly (1st-5th day) and then fall (6th to 11th day). A similar change of flavonoids contents and clearance of flavonoids scavenging $\text{O}_2^{\cdot-}$ and $\cdot\text{OH}$ in soybean seedlings occur: the flavonoids contents $\text{La(Ⅲ)} + \text{UV-B} > \text{UV-B} > \text{La(Ⅲ)} > \text{CK}$, $\text{La(Ⅲ)} + T_1 > \text{La(Ⅲ)} + T_2$. Plasma membrane permeability and MAD contents $\text{UV-B} > \text{La(Ⅲ)} + \text{UV-B} > \text{CK} > \text{La(Ⅲ)}$, $\text{La(Ⅲ)} + T_2 > \text{La(Ⅲ)} + T_1$. The ability of Scavenging activities of free radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$) $\text{La(Ⅲ)} + \text{UV-B} > \text{UV-B} > \text{La(Ⅲ)} > \text{CK}$. It suggested that the regulative effect of La(Ⅲ) on flavonoids, improved the metabolism of ROS, diminished the concentration of MDA and maintained normal Plasma membrane permeability, and that its protective effect against low UV-B radiation was superior to that of high UV-B radiation. To conclude, the defensive effect of La(Ⅲ) on soybean seedlings under UV-B stress was carried out on the layer of defense system.

Key words: La(Ⅲ); ultraviolet-B radiation; soybean seedlings; flavonoids; free radical; antioxidative

紫外辐射(UV-B, 280~320 nm)增强诱发陆地生态系统振荡,引起国内外科学家广泛关注。大量研究显示^[1~3],植物应对 UV-B 辐射胁迫的途径之一是提升体内类黄酮含量,增强吸收屏蔽 UV-B 辐射,减少进入植物细胞内的 UV-B 辐射净通量,在一定程度上实现对 UV-B 辐射的生态适应。然而有关类黄酮减轻 UV-B 辐射伤害植物的机制是否仅限于对后者的吸收屏蔽,还是具有诸如动物系统中的直接淬灭自由基(ROS)的抗氧化作用等尚不明晰^[2,3]。前期研究中发现,RE 能够明显提高植物体内类黄酮含量,减轻 UV-B 辐射胁迫对植物伤害,但对类黄酮减灾

的认识尚局限于其吸收屏蔽效应。对此,本研究进一步探讨镧[La(Ⅲ)]对 UV-B 辐射胁迫下大豆幼苗类黄酮总量、质膜透性、丙二醛、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 含量的影响,以期为进一步认识类黄酮对植物的保护机制及 La(Ⅲ)减轻 UV-B 伤害植物的机制提供参考。

收稿日期:2007-06-26; 修订日期:2007-09-20

基金项目:国家发改委稀土专项基金项目(GFZ040628); 国家自然科学基金项目(30570323)

作者简介:彭祺(1980~),男,博士研究生,主要研究方向为环境生态学。

* 通讯联系人, E-mail: zhouqeco@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 试材培养

大豆(*Glycine max*)“垦农 18”种子用 0.1% HgCl_2 消毒 5 min, 去离子水冲洗 5 次, 置有 3 层纱布的培养皿中, 于恒温箱(25℃)中萌发. 待胚根长至 1 cm 移入塑杯($\phi = 8\text{ cm}$)中去离子水培养, 每杯 3 株, 每天换水 1 次. 当第 2 枚三出复叶展开后, 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, 待第 3 枚三出复叶展开后进行 $\text{La}(\text{III})$ 和 UV-B 辐射处理.

1.2 试材处理

以 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LaCl_3 溶液处理大豆植株^[2], 喷雾器均匀喷布叶片, 滴液为限, 对照(CK)喷等量蒸馏水, 处理与 CK 均 18 杯. $\text{La}(\text{III})$ 预处理 48 h 后, 放置于特定剂量的紫外灯下进行胁迫处理. 于植株上方悬挂 UV-B 灯管(40 W, λ 为 280 ~ 320 nm, 南京紫光电器厂), 调整高度使其强度达到 T_1 ($0.15\text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$)、 T_2 ($0.45\text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$), 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, CK 为可见光. 每天同一时间取样测定, 处理与 CK 均 3 次重复. 不断调整灯管与植株顶端之间的距离以保证植物接受恒定剂量的 UV-B 辐射, 同时每天调换同一处理组中植株的位置以保证同一处理组内植株接受的紫外辐射较为均匀. 于紫外辐射第 1 d 开始, 每隔 24 h 测定 1 次, 连续测定 6 次.

1.3 指标测定

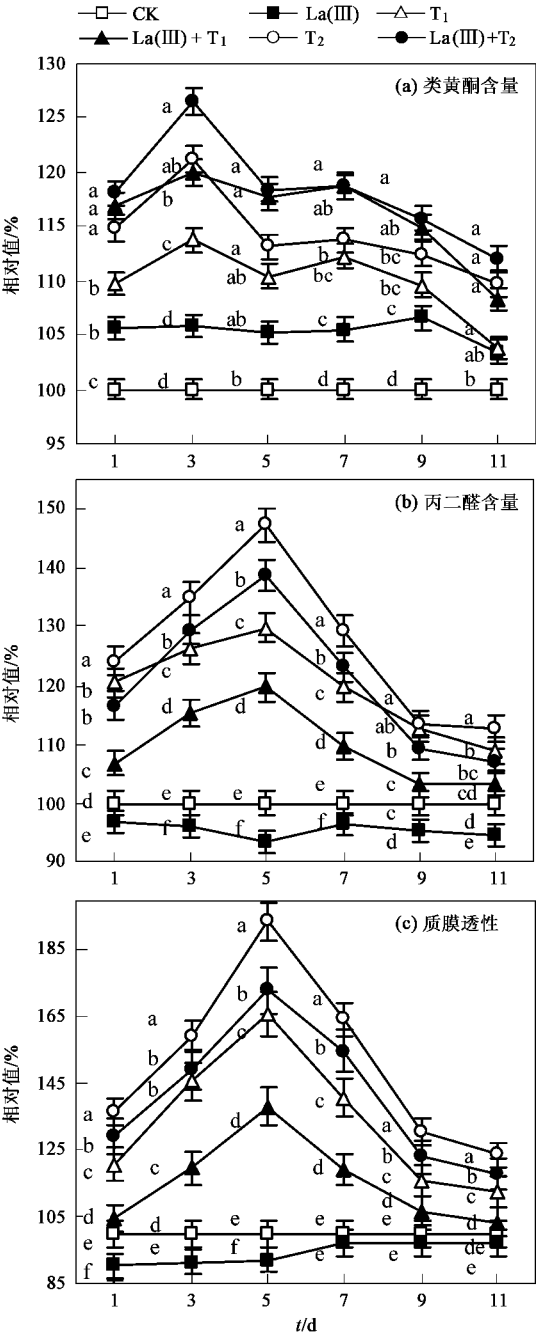
取同向、同叶位大豆幼苗叶片测定类黄酮、质膜透性、丙二醛(MDA)、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 及 $\cdot\text{OH}$ 清除率. 类黄酮测定参照文献[3]方法, 质膜透性测定参照文献[4]方法, MDA 含量采用硫代巴比妥酸法测定^[5], 类黄酮对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 及 $\cdot\text{OH}$ 的清除率分别参照文献[6, 7]方法, 将空白对照组使用缓冲液, 测定其在 420 nm 处 ABS.

2 结果与分析

2.1 $\text{La}(\text{III})$ 对 UV-B 胁迫下大豆幼苗类黄酮总量影响

图 1(a) 是大豆幼苗类黄酮含量连续 11 d 动态变化. 从类黄酮增加幅度与走势看: $\text{La}(\text{III})$ 组在胁迫(t 为 1 ~ 5 d)和恢复(t 为 6 ~ 11 d)整个实验时段皆高于 CK, 至 11 d 仍高于 CK 12.1%, 表明 $\text{La}(\text{III})$ 有提高大豆幼苗类黄酮含量的稳定效果; UV-B 与

$\text{La}(\text{III}) + \text{UV-B}$ 组也大于 CK, 且在胁迫与恢复期均历经先升后降过程, 区别是各自类黄酮含量在对应时段的增幅上存异, 即前者增幅 < 后者; $\text{La}(\text{III}) + T_2$ 增幅 < $\text{La}(\text{III}) + T_1$; 说明 $\text{La}(\text{III})$ 通过提高大豆幼苗类黄酮含量适应 UV-B 辐射对植株伤害, 且 $\text{La}(\text{III})$ 对 T_1 的防护效果优于 T_2 .



图中相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著($\alpha = 0.05$), 下同

图 1 $\text{La}(\text{III})$ 对 UV-B 胁迫下大豆幼苗类黄酮、质膜透性与 MDA 的影响

Fig.1 Dynamics of relative value of flavonoids contents, plasma membrane permeability and MAD contents in the La-treated soybean seedlings under UV-B stress

2.2 La(Ⅲ)对 UV-B 胁迫下大豆幼苗质膜透性与MDA 影响

图 1(c)为大豆幼苗质膜透性的动态变化趋势. La(Ⅲ)组质膜透性低于 CK, 证明La(Ⅲ)有改善质膜结构、提高质膜稳定性效果^[8]. UV-B 与 La(Ⅲ) + UV-B组质膜透性呈先升(1~5 d)后降(6~11 d)态势, 仅在各自对应时段的增幅与恢复速度上存异, 即前者增幅>后者, La(Ⅲ) + T₂ > La(Ⅲ) + T₁; 恢复速度恰好逆转. UV-B辐射胁迫下大豆幼苗 MDA 含量动态变化反映在图 1(b)中. La(Ⅲ)组 MDA 变化趋势与质膜透性近同; UV-B与 La(Ⅲ) + UV-B组 MDA 变化也与质膜透性相似. 比较而言, T₂ 组的伤害效应>T₁ 组, 符合剂量-效应规律; La(Ⅲ) + UV-B组曲线走势同UV-B组近同, 只是曲线位置低于UV-B组(更接近 CK), 且La(Ⅲ) + T₁ 组增幅<La(Ⅲ) + T₂, 表明在整个实验时段La(Ⅲ)均可降低 ROS 对细胞

膜系统中不饱和脂肪酸的攻击, 抑制膜系统自氧化链式反应发生, La(Ⅲ)缓解低剂量UV-B辐射胁迫的效果优于高剂量UV-B辐射.

2.3 La(Ⅲ)对 UV-B 胁迫下大豆幼苗抗氧化能力影响

图 2 为大豆幼苗类黄酮清除 O₂⁻ 和·OH的动态变化趋势. La(Ⅲ)组类黄酮对 O₂⁻ 和·OH的清除率在整个实验时段均高于 CK, 且与其含量变化[图 1(a)]相似; T₁ 组类黄酮对 O₂⁻ 和·OH的清除率同样与其含量变化[图 1(a)]近同, 清除能力与类黄酮含量变化对应; T₂ 组类黄酮对 O₂⁻ 和·OH的清除率与其含量变化[图 1(a)]略有不同, 即UV-B胁迫第 5 d, 类黄酮含量下降, 对 O₂⁻ 和·OH清除率不降反升, 之后虽略有降低, 但仍然保持较高水平. 至于La(Ⅲ) + UV-B组大豆幼苗清除 O₂⁻ 和·OH能力均强于UV-B组, 推测同La(Ⅲ)促进了类黄酮合成相关.

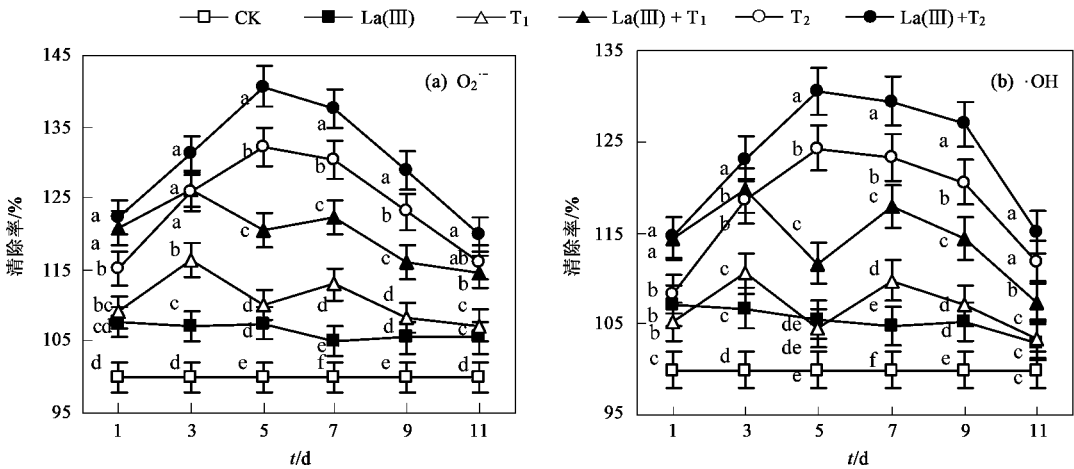


图 2 La(Ⅲ)对UV-B胁迫下大豆幼苗类黄酮清除 O₂⁻ 与·OH 的影响

Fig.2 Dynamics of relative value of restraining the free radical in the La-treated soybean seedlings under UV-B stress

3 讨论

同位素示踪实验证明, 类黄酮分子中的 A 环是由 3 个乙酸分子头尾衔接而成, B 环与 C 环上的碳原子则来自莽草酸途径合成的苯丙氨酸(Phe). Phe 经苯丙氨酸解氨酶(PAL)催化转入苯丙酸盐途径形成查尔酮, 后者进入类黄酮化合物合成途径生成种类丰富的类黄酮. Phe 是类黄酮合成的起始物质, PAL 是启动类黄酮合成途径的第一个关键酶, 苯丙氨酸含量与 PAL 活性高低直接影响植物应激合成类黄酮. La(Ⅲ)通过提高大豆幼 Phe 含量及苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性促进类黄酮合成, 减轻UV-B辐射伤害的效果^[2]. 在本实验中, UV-B辐射胁迫期(1

~5 d)和恢复期(6~11 d), 大豆幼苗类黄酮含量均经历了“先升后降”的变化[且La(Ⅲ) + UV-B组大于UV-B组], 但原因不尽相同. 胁迫期类黄酮含量上升是La(Ⅲ)促进类黄酮合成与大豆幼苗面对胁迫产生应激保护反应的双重作用, 此后下降是因为胁迫后期UV-B辐射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^[9], La(Ⅲ)虽可缓解类黄酮降势却无法逆转; 恢复期UV-B胁迫停止使大豆幼苗光致修复作用发生^[10], 因植株尚未从UV-B胁迫中恢复, 为类黄酮的大量合成提供了条件, 导致类黄酮含量上升. 其后随大豆幼苗伤害修复增强, 类黄酮含量随之降低. 同理, 由于La(Ⅲ)促进

类黄酮合成,所以整个恢复期La(Ⅲ)+UV-B组的类黄酮含量大于UV-B组。

需氧生物代谢过程中不可避免地产生 ROS (O_2^- 和 $\cdot OH$),UV-B辐射无疑加速了这一过程。ROS 几乎可以同所有细胞成分尤其是细胞质膜中不饱和脂肪酸发生反应,启动膜脂过氧化的自由基链式效应。脂质过氧化产物丙二醛(MDA)对细胞质膜和细胞中的许多生物功能分子有很强的破坏作用。它能与膜蛋白和氨基酸残基反应,降低膜稳定性,加大膜透性,促进膜渗漏,使细胞器膜结构、功能紊乱^[13],细胞物质与能量代谢异常,诱发细胞衰老、死亡和机体病变^[14]。La(Ⅲ)不仅能直接清除植物体内过量的 O_2^- ^[15],还能促进类黄酮合成[图 1(a)],提高大豆幼苗对 O_2^- 和 $\cdot OH$ 的清除率(图 2),遏制细胞膜脂过氧化反应产物 MDA 的形成[图 1(b)],维持细胞质膜透性[图 1(c)],提高植物在UV-B辐射胁迫下的自我保护能力。实验中出现的 T_2 组类黄酮含量在UV-B胁迫第 5 d 下降[图 1(a)],对 O_2^- 和 $\cdot OH$ 的清除率却不降反升(图 2),说明类黄酮与 ROS 清除率间不是简单的线性关系。植物类黄酮化合物合成响应UV-B辐照胁迫的比率和速度不尽一致^[16],植物通常采取增加部分目标产物,或改变黄酮类化合物种类的措施适应胁迫。当UV-B胁迫发生时,具有更多 B 环羟基数目的类黄酮优先合成,且清除 ROS 效率与 B 环羟基数目呈正相关^[17]。这是由于化合物清除 ROS 能力,既取决于它对 ROS 反应活性,也受反应中形成的“抗氧化自由基”稳定性制约。黄酮类化合物芳氧基具有进行广泛电子离域的分子结构,形成的多重内消旋结构是稳定自由基的基础。对黄酮类芳氧基衰变速率常数的研究显示,所有稳定的芳氧基均具有 3',4'-邻二酚羟基 B 环取代结构,其它种类的酚类化合物则形成稳定性较低的芳氧基^[18]。类黄酮抗氧化机制是通过酚羟基与自由基反应生成较稳定的半醌式自由基,终止其链式反应。植物在UV-B持续胁迫下,合成的同化产物降低,难以持续大量转化为次生代谢产物,转而采取生成有邻羟基 B 环黄酮的对策,此类黄酮所占比例越大,抗氧化能力越强^[9]。

4 结论

(1)La(Ⅲ)能增加大豆幼苗体内类黄酮含量,提高类黄酮对 O_2^- 和 $\cdot OH$ 的清除率,降低 MDA 与细胞质膜透性,减轻UV-B辐射胁迫对植株的伤害。

(2)La(Ⅲ)缓解低剂量UV-B胁迫(T_1)伤害大豆幼苗效果好于高剂量(T_2)。

(3)La(Ⅲ)调控大豆幼苗类黄酮合成并促使参与 ROS 清除,可能是La(Ⅲ)减轻UV-B辐射胁迫伤害植物的又一机制。

参考文献:

- [1] Frohnmeyer H, Staiger D. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection [J]. *Plant Physiology*, 2003, **133**: 1420-1428.
- [2] Liang B, Huang X, Zhang G S, *et al.* Effect of Lanthanum on Plants under Supplementary Ultraviolet-B Radiation [J]. *Journal of Rare Earths*, 2006, **24**(4): 613-616.
- [3] 朱宏波,腾冰,高凤兰,等.不同抗性大豆品种感染 SMV1 后若干生化变化[J]. *西北农业学报*, 2001, **10**(3): 38-40.
- [4] 邹琦.植物生理学实验指导[M].北京:中国农业出版社, 2000. 131-135.
- [5] 张志良,瞿伟菁.植物生理学实验指导[M].(第三版).北京:高等教育出版社, 2004. 67-70.
- [6] 韩强,林惠芬,朱玲莉.一些天然提取物对超氧自由基和羟基自由基的清除活性[J]. *日用化学工业*, 2000, **30**(3): 14-17.
- [7] 郭亚力,李聪,欧灵澄,等.3 种分光光度法对天然抗氧化物质抗自由基性能的分析检测[J]. *分析实验室*, 2004, **23**(10): 43-48.
- [8] 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.
- [9] Zhao D. 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, **26**(5): 771-782.
- [10] Liang C J, Huang X H, Zhou Q. 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.
- [11] 宁加贵.稀土对作物增产因子研究[J]. *稀土*, 1994, **15**(1): 63.
- [12] Pourcel L, Routaboul J M, Cheynier V, *et al.* Flavonoid oxidation in plants from biochemical properties to physiological functions [J]. *Trends in Plant Science*, 2007, **12**(1): 29-36.
- [13] 余淑文,汤章成.植物生理与分子生物学[M].北京:科学出版社, 1998. 336-389.
- [14] Salin M L. Toxic oxygen species and protective system of the chloroplast [J]. *Physiol Plant*, 1987, **72**: 681-689.
- [15] 谢祖彬,朱建国,褚海燕.分根法研究镧对水稻生长及其生理参数的影响[J]. *中国稀土学报*, 2003, **21**(1): 71-76.
- [16] 刘杰,王伯初,彭亮,等.黄酮类抗氧化剂的构-效关系[J]. *重庆大学学报*, 2004, **27**(2): 120-124.
- [17] 王龙,孙建设.类黄酮的化学结构及其生物学功能[J]. *河北农业大学学报*, 2003, **26**: 144-147.
- [18] Bors W, Hellers W, Michel C, *et al.* Methods in Enzymology [M]. New York: Academic Press, 1990. 343-355.