

# 不同因子对荞麦中草酸含量的影响

刘拥海\*, 俞乐\*, 彭新湘\*\*

(华南农业大学生命科学学院分子植物生理研究室, 广东广州 510642)

**摘要:**用不同化合物从根部喂养麦幼苗,测定其根叶中草酸含量的变化。结果表明:异柠檬酸、抗坏血酸及其前体物均可不同程度地降低荞麦根叶中草酸含量;而乙醇酸与乙醛酸则显著提高其草酸含量,表明荞麦叶片草酸合成主要来自乙醇酸途径,而非来自抗坏血酸等途径。水培条件下,以铵态氮或尿素等作唯一氮源时,荞麦中草酸含量远低于以硝态氮培养的;将谷氨酸或丝氨酸加到含硝态氮培养液中也能显著降低其草酸含量,不同氮素影响荞麦草酸含量可能与乙醇酸途径有关。

**关键词:**草酸;荞麦;乙醇酸;乙醛酸;氮源

中图分类号: Q946.815

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2004)05-0464-03

## Effect of Some Factors on Oxalate Content in Buckwheat Seedlings

LIU Yong-hai\*, YU Le\*, PENG Xin-xiang\*\*

(Lab of Molecular Plant Physiology, College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seedlings in Hoagland solution were fed with different substances, and oxalate contents in the roots and leaves were determined after 36 hours. The results showed that ascorbate and its precursors as well as isocitrate decreased to some extent the oxalate content in roots and leaves, whereas glycolate and glyoxylate significantly increased oxalate content, suggesting that oxalate in the leaves was synthesized mainly from glycolate pathway. Oxalate content in leaves of buckwheat seedlings cultured under hydroponic condition with ammonium nitrogen or urea as the only nitrogen source was much lower than that with nitrate nitrogen. The same result was observed under hydroponic condition with nitrate nitrogen in which glutamate or serine was added. It was shown that different nitrogen sources affecting oxalate accumulation in buckwheat leaves were closely related to glycolic acid metabolism.

**Key words:** Oxalate; Buckwheat; Glycolate; Glyoxylate; Nitrogen source

草酸是一种最简单的二元羧酸,普遍存在于植物中。在一些草酸积累型植物中,其含量可高达其干重的6%~10%<sup>[1]</sup>。环境条件影响着植物中草酸的积累,如在石灰性土壤中生长的生态适应性钙生植物群落,大多数植物的草酸含量比较高<sup>[2]</sup>。氮、磷、钾等营养条件也影响植物草酸的积累<sup>[2]</sup>。草酸虽然在植物生理及抗逆性中起重要作用,但它对人类食品质量可产生不利影响<sup>[1,2]</sup>,所以在时空上有效调控植物草酸形成与分泌具有非常重要的意义。本文以草酸积

累型植物荞麦为材料,初步研究几种不同因子对其草酸含量的影响,为进一步的代谢调控机制研究奠定基础。

### 1 材料和方法

**材料** 荞麦(*Fagopyrum esculentum* Moench, 品种为美国荞)由山西省太原市农业科学院提供。

**喂根处理** 种子用0.1% HgCl<sub>2</sub>消毒10 min,用自来水冲洗干净,浸种24 h后,将其点播于盛有

收稿日期:2003-10-08 接受日期:2004-02-17

基金项目:国家自然科学基金(30070453);广东省自然科学基金(010300)资助

\* 现工作单位:肇庆学院生物系

\*\* 通讯作者 Corresponding author

蛭石的瓦钵中。待子叶长出后移栽至盛有 1 L 的 1/5 强度 Hoagland 营养液(氮素为硝态氮, pH 6.0)的瓦钵中培养 8 d 至第一片真叶完全伸展, 然后将乙醇酸、乙醛酸、异柠檬酸、抗坏血酸及其前体物分别溶于培养液中, 从根部饲喂幼苗 36 h 后取样分析。

**不同氮源培养** 种子经消毒、浸种后, 将其点播于盛有蛭石的瓦钵中, 待子叶长出后移栽至盛有 1 L 的同样营养液中培养 3 d, 然后分成两部分: 一部分继续在同样条件下培养, 另一部分用铵态氮(硫酸铵或硝酸铵)、尿素等不同氮源取代硝态氮的 1/5 强度 Hoagland 溶液(pH 6.0), 培养 8 d 后取样分析。

**滴定法测草酸含量** 在 Baker<sup>[3]</sup>方法的基础上加以改进。称取第一片真叶和根 0.5 g, 加 3 ml 6 mol/L 盐酸和少量石英砂充分研磨后用 12 ml 蒸馏水分次洗入试管中, 沸水浴 15–20 min, 离心管中放置过夜。次日离心(10 000 ×g, 10 min), 上清液加入 5 ml 磷钨酸试剂, 室温下静置 5 h 后离心(10 000 ×g, 10 min), 上清液转入另一离心管中, 加入 5 ml 含钙醋酸缓冲液(pH 4.5)后用浓氨水调 pH 值至 4.5, 4–7℃下静置 16 h 后离心(10 000×g, 10 min), 收集沉淀, 加入 10 ml 饱和草酸钙淋洗液, 振荡均匀, 离心(10 000×g, 10 min), 向沉淀中加入 5 ml 10% 硫酸, 振荡均匀。在沸水浴中加热后, 立即滴定。

**高压液相色谱法测草酸含量** 在俞乐<sup>[4]</sup>方法基础上加以改进。称取第一片真叶和根 0.5 g, 加 2 ml 0.5 mol/L 盐酸和少量石英砂充分研磨成匀浆, 在沸水浴中加热 15–20 min, 冷却后再加入 2 ml 蒸馏水静置过夜。次日, 提取液先过滤, 再用 1 ml 蒸馏水洗试管及残留物过滤, 合并滤液并摇匀, 再定容到 5 ml, 进样前稀释适当倍数后取 1 ml 过 0.45 μm 微孔滤膜, 弃去前 0.5 ml, 收集后 0.5 ml, 再在 12 000 ×g 离心 10 min, 上清液作为待测样品。

## 2 结果

### 2.1 几种前体物对荞麦草酸含量的影响

表 1 结果显示: 异柠檬酸引起根叶中草酸含量下降; 抗坏血酸及几种与抗坏血酸合成相关的前体物如葡萄糖、半乳糖、半乳糖醛酸、半乳糖醛酸内酯等均导致根叶中草酸含量降低; 但乙醇酸、乙醛酸则显著提高荞麦根叶中的草酸含量。

### 2.2 氮素形态对荞麦草酸含量的影响

荞麦用不同氮素形态的 1/5 强度 Hoagland 营养液分别培养 8 d, 取生长年龄、叶位一致的叶片测定其草酸含量。由表 2 可见: 与硝态氮培养(对照)相比, 硫酸铵、尿素、硝酸铵培养后叶片草酸含量分别

表 1 可能的前体物质对荞麦中草酸含量的影响

Table 1 Effect of possible precursors on oxalate content in buckwheat

前体物 Precursors (mmol/L)	对照/处理含量 Control/Treatment content (mg g <sup>-1</sup> DW)	
	叶片 Leaves	根 Roots
乙醇酸 Glycolate 5	55.99±3.57/64.23±1.93	19.66±3.14/26.83±1.48
乙醛酸 Glyoxylate 5	49.52±2.14/65.09±3.53	14.53±3.20/31.53±4.66
异柠檬酸 Isocitrate 5	65.06±2.66/56.88±4.12	9.28±1.66/4.37±0.87
L-抗坏血酸 Ascorbate 5	64.03±4.79/60.25±6.31	28.99±2.02/27.81±1.85
葡萄糖 Glucose 10	61.77±5.12/54.65±1.47	23.17±3.63/15.59±1.42
果糖 Fructose 10	61.77±5.12/62.09±5.59	23.17±3.63/14.54±2.62
半乳糖 Galactose 5	40.07±5.18/34.93±3.79	19.66±3.13/9.47±2.20
半乳糖醛酸 Galacturonic acid 3	43.63±4.59/36.78±3.30	13.41±3.93/10.09±1.26
半乳糖醛酸内酯 Galactonolactone 3	43.63±4.59/37.66±3.24	13.41±3.93/11.71±2.30

下降了 84%、68%、62%。当在 Hoagland(硝态氮)的营养液中添加谷氨酸、丝氨酸时也引起草酸含量显著降低(表 2)。

## 3 讨论

前人曾用同位素示踪试验证明乙醇酸、乙醛酸是植物草酸合成的有效前体<sup>[5-7]</sup>。本文以乙醇酸与乙醛酸从根部饲喂荞麦幼苗时, 二者均明显促进其根

表 2 氮素对荞麦叶片草酸含量的影响

Table 2 Effect of different nutrition factors on oxalate content in buckwheat leaves

N 素形态 N forms (mmol/L)	对照/处理含量 (mg g <sup>-1</sup> DW)
	Control/Treatment content
硫酸铵 Ammonium sulfate 3	109.53±8.85/17.29±0.27
尿素 Urea 1.5	109.53±8.85/34.2±2.58
硝酸铵 Ammonium nitrate 1.5	109.53±8.85/41.15±0.24
丝氨酸 Serine 3	95.25±5.25/40.97±2.14
谷氨酸 Glutamate 3	95.25±5.25/46.19±1.97

叶中草酸积累(表 1),说明荞麦叶片中草酸合成可能来自光呼吸途径中的乙醛酸和乙醇酸。根自身能否合成草酸尚无结论,但已有的研究表明根中的草酸可能是在叶片中合成后转运而来<sup>[8,9]</sup>,荞麦根中草酸含量增加比叶片尤为明显(表 1),可能与其转运加强有关。分别以不同形态氮素培养荞麦后发现,硝态氮培养的叶片中的草酸含量是硫酸铵的 6.3 倍,是尿素的 3.2 倍、硝酸铵的 2.7 倍(表 2)。这与前人的结果基本一致<sup>[10,11]</sup>。前人的研究资料显示以不同氮素形态培养植物,其草酸含量的显著差异与硝酸盐可能作为草酸氧化酶的专一抑制剂<sup>[2,12]</sup>有关,也可能是由于铵态氮影响了草酸的前体乙醛酸的代谢<sup>[11]</sup>。但我们的系统研究表明不同氮素形态对荞麦草酸含量的影响可能与其光呼吸乙醇酸代谢有关,乙醇酸氧化酶和內源乙醛酸水平可能是其代谢的调控因子(数据另文发表)。将谷氨酸或丝氨酸加到含硝态氮培养液中时,叶片中草酸含量显著降低(表 2),这可能与乙醇酸氧化酶(glycolate oxidase)活性受到內源氨基酸抑制或者促进了乙醛酸到甘氨酸的转氨反应有关<sup>[13-16]</sup>。

异柠檬酸虽然可由异柠檬酸裂解酶催化生成乙醛酸,但乙醛酸循环主要存在于油料种子中。Millerd 等<sup>[17]</sup>曾报道植物绿色组织中乙醛酸除了可来自乙醇酸氧化外,也可来自异柠檬酸的裂解。但本文用异柠檬酸从根部喂幼苗并不增加荞麦草酸含量,说明荞麦中草酸可能并非来自异柠檬酸裂解产物乙醛酸。

已有研究表明抗坏血酸可能是部分植物草酸合成的有效前体<sup>[18-20]</sup>,但本文从根部饲喂荞麦幼苗抗坏血酸及其合成代谢相关的前体物如葡萄糖、半乳糖、半乳糖醛酸、半乳糖醛酸内酯等并未明显提高其草酸含量,反而有所降低(表 1),意味着荞麦叶片利用抗坏血酸形成草酸的可能性较小抑或抗坏血酸水平高低并不是草酸积累的限制因子。

### 参考文献

- [1] Peng X X(彭新湘), Li M Q(李明启). Oxalate and its metabolism [J]. *Plant Physiol Comm*(植物生理学通讯), 1992, 28(2):93-96. (in Chinese)
- [2] Libert B, Franceschi V R. Oxalate in crop plants [J]. *J Agri Food Chem*, 1987, 35:926-938.
- [3] Baker C J L. The determination of oxalate in fresh plant materials [J]. *Analytic*, 1954, 77:340-344.
- [4] Yu L(俞乐), Peng X X(彭新湘), Yang C(杨崇), et al. Determination of oxalic acid in plant tissue and root exudates by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2002, 30(9):1119-1122. (in Chinese)
- [5] Richardson K E, Tolbert N E. Oxidation of glyoxylic acid to oxalic acid by glycolic acid oxidase [J]. *J Biol Chem*, 1961, 235:1280-1284.
- [6] Chang C C, Beevers H. Biogenesis of glycolate in isolated leaf peroxisome [J]. *Plant Physiol*, 1968, 67:1003-1006.
- [7] Havir E A. Evidence for the presence in tobacco leaves of multiple enzymes for the oxidation of glycolate and glyoxylate [J]. *Plant Physiol*, 1983, 71:874-878.
- [8] Li B S(李宝盛), Peng X X(彭新湘), Li M Q(李明启). Relationship between oxalate accumulation and photorespiratory glycolate metabolism in plants [J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), 2000, 26(2):148-152. (in Chinese)
- [9] Liu X H(刘小琥), Peng X X(彭新湘). Formation of oxalate in tobacco leaves and the downward transport [J]. *J Trop Subtrop Bot*(热带亚热带植物学报), 2002, 10(2):183-184. (in Chinese)
- [10] Clark H E. Effect of ammonium and of nitrate nitrogen on the composition of the tomato plant [J]. *Plant Physiol*, 1936, 11:5-24.
- [11] Kpodar M P, Piquemal M, Calmes J, et al. Relations entre nutrition azotée et métabolisme photorespiratoire chez une plante à oxalate, *Fagopyrum esculentum* [J]. *Physiol Veg*, 1978, 16:117-130.
- [12] Meeuse J D, Campbell J M. An inhibitor of oxalic acid oxidase in beet extracts [J]. *Plant Physiol*, 1959, 34:583-586.
- [13] Fujii N, Watanabe M, Watanabe Y, et al. Relation between oxalate synthesis and glycolate cycle in spinach [J]. *J Jpn Soc Hort Sci*, 1994, 62:789-794.
- [14] Watanabe Y, Fujii N, Terayama H, et al. Comparison of enzyme activity in oxalate synthesis between *Spinacia oleracea* L. and *Brassica campestris* L. [J]. *Soil Sci Plant Nutr*, 1995, 41(1):89-94.
- [15] Yokota A, Kitaoka S, Miura K, et al. Reactivity of glyoxylate with hydrogen peroxide and simulation of the glycolate pathway of C<sub>3</sub> plants and *Euglena* [J]. *Planta*, 1985, 165:59-67.
- [16] Noguchi T, Hayashi S. Plant leaf alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, peroxisomal localization and identity with glutamate: glyoxylate aminotransferase [J]. *Biochem J*, 1981, 195:235-239.
- [17] Millerd A, Morton R K, Wells J R E. Role of isocitrate lyase in synthesis of oxalate acid in plants [J]. *Nature*, 1962, 196:955-956.
- [18] Yang J C, Loewus F A. Metabolic conversion of L-ascorbate to oxalic acid in oxalate-accumulating plants [J]. *Plant Physiol*, 1975, 56:283-285.
- [19] Horner H T, Kausch A P, Wagner B L. Ascorbic acid: a precursor of oxalate in crystal idioblasts of *Yucca torreyi* in liquid root culture [J]. *J Plant Sci*, 2000, 161(1):861-868.
- [20] Kostman T A, Tarlyn N M, Loewus F A, et al. Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125:634-640.