

# 日光紫外线 B 辐射对甜荞苯丙烷代谢的影响

姚银安<sup>a</sup>, 杨爱华<sup>a</sup>, 徐 刚<sup>b\*</sup>

(贵州大学, a. 农学院; b. 绿色农药与农业生物工程教育部重点实验室, 贵阳 550025)

**摘要:**对甜荞(*Fagopyrum esculentum* Moench)苯丙烷次生代谢受紫外线 B 辐射的响应进行了研究。结果表明:不仅卢丁、槲皮素等黄酮类化合物含量在紫外线 B 辐射下显著升高,而且叶片苯丙烷单环酚类化合物,如阿魏酸含量等也大幅度升高,两类化合物的应激提高对甜荞的 UV-B 胁迫提供了重要的保护作用。

**关键词:**甜荞; 紫外线 B; 次生代谢; 卢丁

中图分类号: Q945.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)02-0152-04

## Influence of Ultraviolet B Radiation on the Phenylpropanoid Metabolism in Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench)

YAO Yin-an<sup>a</sup>, YANG Ai-hua<sup>a</sup>, XU Gang<sup>b\*</sup>

(a. College of Agriculture; b. China Key Laboratory of Green Pesticide and Agricultural Bioengineering, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

**Abstract:** The effects of ultraviolet B (UV-B) radiation on the phenylpropanoid compounds in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) herb were studied by HPLC method. The results showed that not only the contents of flavonoid compounds, such as rutin and quercetin, were significantly increased, but also those of phenolic compounds, eg. ferulic acid and *P*-coumaric acid, were markedly enhanced. The enhancements of two kinds of compounds provided important protection against UV-B injury in buckwheat herbs.

**Key words:** *Fagopyrum esculentum*; Ultraviolet B; Secondary metabolism; Rutin

甜荞(*Fagopyrum esculentum* Moench)是我国主要的杂粮作物和填闲作物,其籽粒和叶片中的高含量卢丁是人体最重要的黄酮来源<sup>[1]</sup>。卢丁及其配基槲皮素含量还是衡量甜荞药用和食用品质的主要指标。研究表明,甜荞叶片中包括卢丁在内的苯丙烷次生代谢物受到多种环境条件的调控<sup>[2]</sup>。有研究发现日光中的紫外线 B(UV-B)辐射对苯丙烷次生代谢有着重要的影响;Umek 等报道随海拔梯度的升高,贯叶连翘(*Hypericum perforatum*)中卢丁含量逐渐升高<sup>[3]</sup>;Ohsawa 和 Tsutsumi 报道初夏的甜荞叶片卢丁含量远高于深秋的<sup>[4]</sup>;这些差异可能是日光紫外辐射强度不同所致,尤其是紫外线 B (UV-B)的影响。然而,紫外线 B 辐射对甜荞苯丙烷代谢

的影响仍不清楚。本文探讨日光 UV-B 辐射对甜荞中包括卢丁在内的苯丙烷次生代谢产物的影响,为甜荞产区规划及合理栽培以提高甜荞品质提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料及处理方法

实验材料为当地甜荞(*Fagopyrum esculentum* Moench)品种巧家甜荞,2005 年 3 月播种,按每盆(直径 25 cm)10 株密度播种后放置在温室内,参照 Yao 等<sup>[5]</sup>的方法在盆上部悬挂中波紫外灯(280 ~ 320 nm)进行增强 UV-B 辐照处理,该波长与太阳光中 UV-B 的辐射波长大体一致,辐射剂量分别为 0、

收稿日期:2008-05-07 接受日期:2008-09-09

基金项目:国家自然科学基金项目(30800127);贵州省 2008 年度公关农业项目(黔科合 NY 字 20083022)及贵州省自然科学基金项目(20072056)资助

\* 通讯作者 Corresponding author

5、10  $\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$ , 每处理设3重复, 每重复3盆; 其中0  $\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$  为对照, 对照悬挂的中波紫外灯管表面覆盖0.13 mm 聚酯膜以去处315 nm 以下的UV-B辐射<sup>[6]</sup>。甜荞盛花期(播种后55 d)采集主茎倒数第4~5片叶(共约1.5 g),  $-70^{\circ}$  超低温保存, 用于叶片苯丙烷次生代谢产物分析。

## 1.2 苯丙烷代谢产物及多酚氧化酶分析

将叶片在液氮中磨成粉末后称取0.1 g 置于离心管中, 加入5.0 ml 甲醇: 水: 乙酸 = 89: 10: 1 (v/v) 提取液于温水浴中震荡提取5 h, 于5 000  $\times$  g 离心5 min, 取上清液加入2 ml 石油醚去除油脂后, 即用于HPLC测定黄酮类含量(主要是芦丁、槲皮素、桑色素)。离心管沉淀部分加入1 mol/L NaOH溶液,  $80^{\circ}\text{C}$  提取3 h, 冷却后用1 mol/L 盐酸中和, 最后用乙酸乙酯萃取出酚类物质, 即用于HPLC分析苯丙烷单环酚类化合物(主要是阿魏酸、*P*-香豆酰等单体)。

HPLC分析采用Waters HPLC系统, 色谱柱采用Waters Spherisorb ODS-1柱, Waters 二极管阵列检测器, 流动相流速为1  $\text{ml min}^{-1}$ 。

黄酮类化合物含量的测定参照Hofmann等<sup>[7]</sup>的方法: 线形梯度洗脱液如下: A液为乙酸-乙腈-磷酸-水(20: 24: 1.5: 54.5, v/v), B液为1.5%磷酸; 100% A液7 min 线形梯度洗脱至90%, 再3 min 洗脱至67%, 最后再经过15 min 梯度洗脱至20%, B液由0% 逐渐升至80%; 下一个样品分析前用A液平衡10 min。

单环酚类化合物含量的测定参照Ruhland<sup>[8]</sup>的方法: 线形梯度洗脱液如下: A液为1%磷酸, B液为甲醇: 四氢呋喃 = 45: 56 (v/v); 84% 的A液15 min 线形梯度洗脱至66%, 同时B液经15 min 由16% 升高到34%, 进入下一个样品分析前用A液平衡10 min。

标准品芦丁、槲皮素、阿魏酸、*P*-香豆酰标样从成都中药站购买, 桑色素由Sigma公司提供。叶片化合物含量按外标法由峰面积计算而得, 各黄酮化合物含量用 $\text{mg g}^{-1} \text{DW}$ 表示, 各单环酚类化合物含量用 $\text{mg g}^{-1} \text{FW}$ 表示。

多酚氧化酶(PPO)活性测定参照Agarwal<sup>[9]</sup>的方法测定, 以525 nm 光吸收值1 min 变化0.01 为1个活力单位(U)。

## 1.3 数据分析

统计分析采用SPSS 11.0 统计软件, 对不同处理采用Tukey's *t*-test (HSD) 进行两两分析。

## 2 结果

### 2.1 紫外线B辐射对黄酮类化合物的影响

我们的研究表明, 紫外线B辐射显著影响芦丁和槲皮素含量(图1)。随着紫外线B辐射剂量的增加, 叶片中槲皮素和芦丁含量逐渐升高, 在10  $\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$  的UV-B辐射下, 槲皮素和芦丁含量比对照分别提高21.4%和35.43% ( $P < 0.05$ )。本实验中甜荞叶片桑色素含量很低, 我们没有检测出。

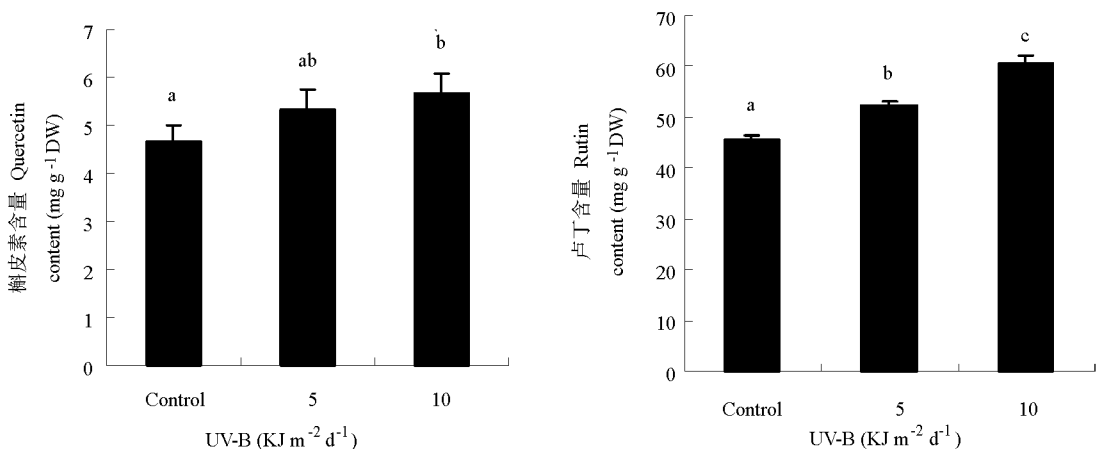


图1 UV-B辐射对甜荞叶片黄酮类化合物含量的影响

Fig. 1 Effects of UV-B radiation on contents of flavonoid compounds in leaves of common buckwheat

柱形上不同字母表示处理间差异达到显著水平( $P < 0.05$ ) (HSD 检验)。Different letters above the columns indicate significant difference among treatments at 0.05 level by Tukey's HSD test. 下图同。The same for following figure.

## 2.2 紫外线 B 辐射对苯丙烷单环酚类化合物的影响

随着 UV-B 辐射剂量的升高,阿魏酸含量逐步提高,分别较对照升高 53.7% 和 97.6%。而 *P*-香豆酰化合物在 5 和 10  $\text{kJ m}^{-2}\text{d}^{-1}$  的强度下,含量均比对照提高了 22.7% (图 2)。UV-B 辐射胁迫下多酚氧

化酶大幅度升高,在 5 和 10  $\text{kJ m}^{-2}$  UV-B 辐射下其活性分别升高了 0.63 和 1.58 倍(图 2),且叶片颜色在高强度的 UV-B(10  $\text{kJ m}^{-2}$ )辐射下变深,叶片更硬。

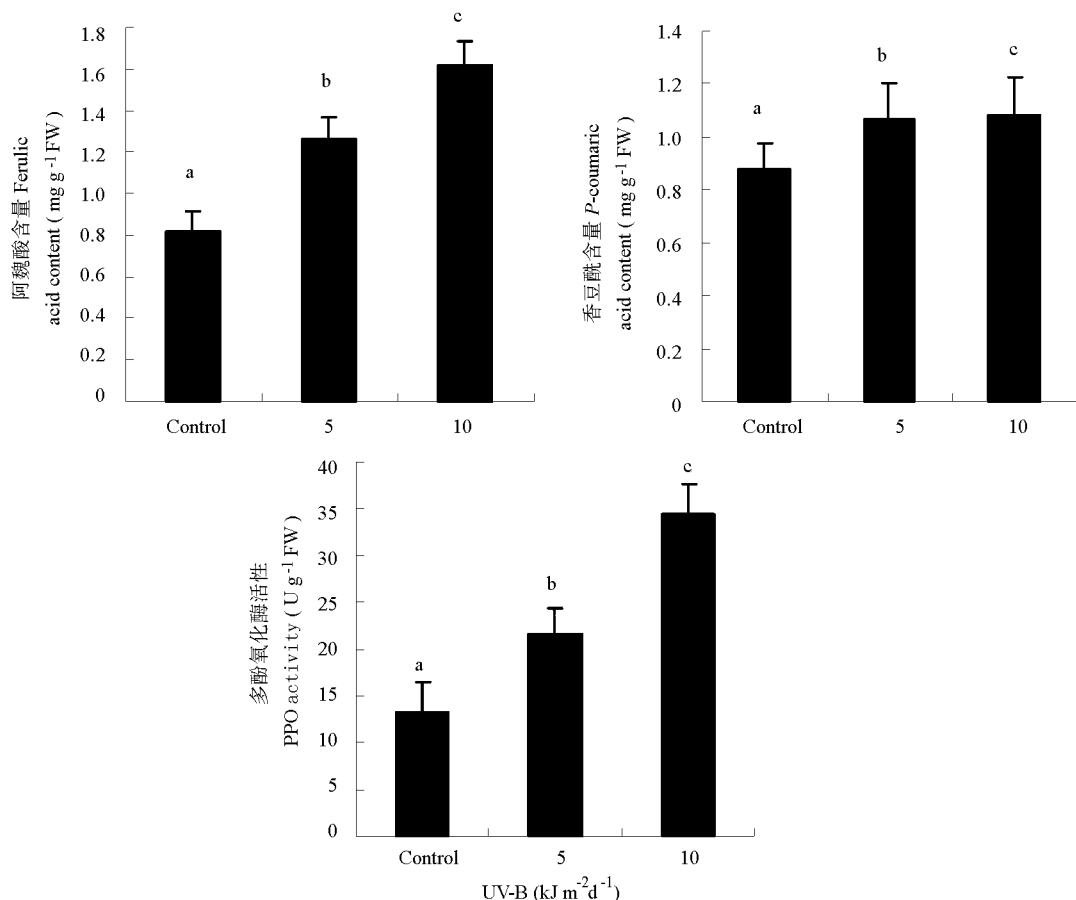


图 2 UV-B 辐射对甜荞叶片单环酚类化合物含量和多酚氧化酶活性的影响

Fig. 2 Effects of UV-B radiation on content of hydroxycinnarnates and activity of in leaves of common buckwheat

## 3 讨论

甜荞叶片的苯丙烷次生代谢产物主要由黄酮类化合物和单环酚类化合物构成。本研究表明黄酮类化合物卢丁及其皂甙基团槲皮素受紫外线辐射诱导升高,这与前人对其他植物的研究结果一致<sup>[10]</sup>。对玉米 (*Zea mays*)、拟南芥 (*Aradidopsis thaliana*)、欧芹 (*Petroselinum crispum*) 等植物进行紫外辐射胁迫处理,结果 UV-B 辐射提高了苯丙烷代谢关键酶如苯丙氨酸解氨酶 (PAL), *CHS* (查儿酮合成酶) 和 *CHI* (查儿酮异构酶) 的蛋白质表达和相关基因表达<sup>[11]</sup>; Hartmann 等<sup>[12]</sup> 对拟南芥 *CHS* 基因受 UV-B、UV-A/蓝光诱导的启动子进行了深入的研究,发现共有 1 970 bp 属 UV-B、UV-A/蓝光应答区

域。人们认为黄酮类化合物的大幅度升高是植物应对紫外辐射的有效保护机制;黄酮类化合物主要分布在植物叶片表皮和液泡中,且其吸收峰处于紫外线范围内,因此黄酮类化合物能够过滤掉紫外线 B 并有效地保护叶片内部组织免受 UV-B 伤害<sup>[13]</sup>。而缺失黄酮的水稻和拟南芥突变体对紫外线 B 辐射敏感性大幅度升高。此外,对芸薹 (*Beassica campestris*)、白三叶草 (*Trifolium repens*) 和矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 等试验表明:UV-B 辐射下槲皮素苷化合物升高幅度较其他黄酮类化合物 (如山奈黄素等) 大得多<sup>[10]</sup>; Olsson 等认为由于槲皮素、卢丁等黄酮基团含有邻位双羟基结构<sup>[14]</sup>,在植物组织中可能存在抗氧化功能,虽然人们采用体外实验证明了荞麦卢丁和槲皮素具有清除自由基功能,但目前

对该类化合物在植物体内的抗氧化功能还缺乏更有力的证据。

很长时间以来,单环酚类化合物对 UV-B 辐射的保护作用没有得到重视, Landry 等<sup>[15]</sup>采用缺失阿魏酸羟基酶(fah1)的拟南芥突变体进行研究,发现苯丙烷类单环化合物在 UV-B 辐射保护中也起着重要作用。在本研究中,我们发现阿魏酸和 *P*-香豆酰化合物等单环酚类化合物在 UV-B 辐射下也有了显著升高。阿魏酸是构成木质素单体、芥子酯等的重要前体物质,而 *P*-香豆酰化合物是构成所有单环化合物的重要中间体。我们的研究中未作叶片不溶性和可溶性香豆酰类化合物(后者以单体形式存在)的区分;但考虑到前者在叶片中占绝大多数,且以香豆酰类化合物为底物的多酚氧化酶大幅度升高,叶片颜色在高强度的 UV-B (10 kJ m<sup>-2</sup>)辐射下变深,叶片更硬;这表明荞麦叶片细胞壁中木质素、儿茶素等有了较大程度的升高,叶片的木质化有利于屏蔽 UV-B 辐射。Ruhland 等也发现 UV-B 辐射降刺激了不溶性的香豆酰化合物(尤其是表皮细胞壁香豆酰化合物)的升高<sup>[8]</sup>。Ruhland 等认为 UV-B 辐射下叶片变小主要是由于香豆酰单体在植物细胞壁中形成交联,限制了叶片生长所致,本试验叶片变硬也证明了这一点。

总之,通过对甜荞叶片酚类苯丙烷次生代谢的 UV-B 辐射响应研究,表明两类代谢产物,即黄酮类化合物(主要是芦丁和槲皮素)和单环酚类化合物的应激升高对 UV-B 胁迫提供了重要的保护作用;另一方面,本研究中 UV-B 辐射剂量与叶片芦丁含量的正相关关系也提示我们:在优质甜荞种植区域的选择上还应该考虑到日光 UV-B 强度这一环境因子。

## 参考文献

- [1] Kreft S, Strukelj B, Gaberscik A, et al. Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation level: Comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method [J]. J Exp Bot, 2002, 53: 1801-1804.
- [2] Gaberscik A, Voncina M, Trost T, et al. Growth and production of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) treated with reduced, ambient, and enhanced UV-B radiation [J]. J Photochem Photobiol B: Biol, 2002, 66: 30-36.
- [3] Umek A, Kreft S, Kartnig T, et al. Quantitative phytochemical analysis of six *Hypericum* species growing in Slovenia [J]. Planta Med, 1999, 65: 388-390.
- [4] Ohsawa R, Tsutsumi T. Inter-varietal variations of rutin content in common buckwheat flour (*Fagopyrum esculentum* Moench) [J]. Euphytica, 1995, 86: 183-189.
- [5] Yao Y, Li Y, He Y M, et al. Effect of ultraviolet-B on crop growth, development, yield and leaf pigment concentration of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) under field conditions [J]. Eurp J Agron, 2006, 25: 215-222.
- [6] Sullivan J H, Teramura A H. Field study of the interaction between solar ultraviolet-B radiation and drought on photosynthesis and growth in soybean [J]. Plant Physiol, 1990, 92: 141-146.
- [7] Hofmann R W, Swinny E E, Bloor S J, et al. Responses of nine *Trifolium repens* L. populations to ultraviolet-B radiation: differential flavonol glycoside accumulation and biomass production [J]. Ann Bot, 2000, 86: 527-537.
- [8] Ruhland C T, Xiong F S, Clark W D, et al. The influence of ultraviolet-B radiation on growth, hydroxycinnamic acids and flavonoids of *Deschampsia antarctica* during spring time ozone depletion in Antarctica [J]. Photochem Photobiol, 2005, 81: 1086-1093.
- [9] Agarwal S. Increased antioxidant activity in *Cassia* seedlings under UV-B radiation [J]. Biol Plant, 2007, 51: 157-160.
- [10] Yao Y A(姚银安), Zu Y Q(祖艳群), Li Y(李元). Ultraviolet B radiation and the secondary metabolism of phenol in plants [J]. Plant Physiol Commun(植物生理学通讯), 2003, 39: 179-184.(in Chinese)
- [11] Casati P, Zhang X, Burlingame A L, Walbot V. Analysis of leaf proteome after UV-B irradiation in maize lines differing in sensitivity [J]. Mol Cell Proteomics, 2005, 4: 1673-1685.
- [12] Hartmann Y, Valentin W J, Christie J M. The identification of UV/Blue light-response elements in the *Arabidopsis* *CHS* promoter using a homologous transient expression system [J]. Plant Mol Biol, 1998, 36: 741-754.
- [13] Lin Z F(林植芳), Lin G Z(林桂珠), Peng C L(彭长连), et al. The accumulation of UV-B absorbing compounds in leaves of subtropical plants [J]. Acta Ecol Sin(生态学报), 1998, 18(1): 90-95.(in Chinese)
- [14] Olsson L G, Veit M, Weissenböck G. Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus* [J]. Phytochemistry, 1998, 49: 1021-1028.
- [15] Landry L G, Chapple C C S, Last R L. *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage [J]. Plant Physiol, 1995, 109: 1159-1166.