



干旱胁迫对紫花苜蓿黄酮类化合物含量及其合成途径关键酶活性的影响

李丹丹^{1,3}, 梁宗锁², 普布卓玛^{3,4}, 杨宗岐², 韩蕊莲^{1,3*}, 徐学选³

(1 浙江理工大学 建筑工程学院, 杭州 310018; 2 浙江理工大学 生命科学与医药学院, 浙江省植物次生代谢调控重点实验室, 杭州 310018; 3 西北农林科技大学 草业与草原学院, 陕西杨陵 712100; 4 西藏自治区农科院 草业科学研究所, 拉萨 850000)

摘要:以3个紫花苜蓿(*Medicago sativa*)品种为试验材料,利用不同浓度(0、5%、10%、15%、20%、25%)的PEG-6000溶液模拟干旱胁迫,探究干旱胁迫对不同品种紫花苜蓿黄酮类化合物合成上游3个关键酶活性以及黄酮类化合物含量的影响。结果表明:(1)随着PEG-6000胁迫浓度的增加,3种紫花苜蓿叶片中PAL(苯丙氨酸解氨酶)、C4H(肉桂酸-4-羟基化酶)和4CL(4-香豆酸辅酶A连接酶)活性均呈先升高后降低的趋势,但不同酶类之间响应存在差异,即PAL活性在10%PEG-6000胁迫浓度下最高,C4H和4CL活性则在15%PEG-6000胁迫浓度下最高,且均显著高于相应对照。(2)3种紫花苜蓿植株地上部总黄酮含量和8种黄酮类化合物含量均随着PEG-6000胁迫浓度的增加呈先上升后下降的趋势,且均在10%~15%PEG-6000胁迫浓度时达到最高值,并显著高于相应对照。(3)各品种紫花苜蓿叶片黄酮类化合物含量与其关键酶活性呈不同程度的相关性,即紫花苜蓿黄酮类化合物合成途径上游3个关键酶活性与其地上部黄酮类化合物含量存在密切的关系。研究认为,不同程度的干旱胁迫可以通过促进黄酮类化合物合成途径上游关键酶活性的变化来调节紫花苜蓿植株中黄酮类化合物的合成,且适度干旱胁迫能显著促进相关酶活性增强和黄酮类化合物含量增加。

关键词:紫花苜蓿;干旱胁迫;黄酮合成酶;黄酮类化合物

中图分类号:Q945.78

文献标志码:A

Flavonoids Contents and Flavonoids Synthetic Key Enzyme Activities in Alfalfa under Drought Stress

LI Dandan^{1,3}, LIANG Zongsuo², PUBU Zhuoma^{3,4},
YANG Zongqi², HAN Ruilian^{1,3*}, XU Xuexuan³

(1 School of Civil Engineering and Architecture, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2 Key Laboratory of Plant Secondary Metabolism and Regulation of Zhejiang Province, School of Life Science and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 3 College of Grassland Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 4 Tibet Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Lasa, Tibet 850000, China)

Abstract: Drought stress was simulated with different concentrations (0, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%) of PEG-6000 solution. We used three cultivars of alfalfa (*Medicago sativa*) to clarify the effects of drought stress on the activities of three key enzymes as well as the accumulation of flavonoids. Results revealed that: (1) with the increase of PEG-6000 simulated drought stress concentration, the activities of PAL

收稿日期:2020-05-27;修改稿收到日期:2020-07-30

基金项目:国家自然科学基金(31570370);浙江理工大学科研启动基金(17052059-Y)

作者简介:李丹丹(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向为植物逆境生物学。E-mail:1398596371@qq.com

* 通信作者:韩蕊莲,教授,硕士生导师,主要从事植物逆境方向研究。E-mail:hanrl@nwsuaf.edu.cn

(phenylalanine ammonia lyase), C4H (cinnamic acid-4-hydroxylase) and 4CL (4-coumaric acid coenzyme A ligase) in the three alfalfa cultivar leaves increased first and then decreased but there were differences among different enzymes. PAL reached the maximum under 10% PEG stress, whereas, C4H and 4CL reached the maximum under 15% PEG stress and significantly higher than the corresponding control. (2) Compared with the control, with the increase of PEG-6000 simulated drought stress concentration, the content of flavonoids in three cultivars of alfalfa increased first and then decreased, and the content of flavonoids was the highest under the stress of 10% to 15% PEG-6000 and significantly higher than the corresponding control. (3) The activities of three key enzymes in the upstream synthesis of flavonoids in alfalfa leaves are closely related to the content of flavonoids and the content of flavonoids in the leaves of three alfalfa cultivars are related to their key enzyme activities to varying degrees. The results showed that different degrees of drought stress can increase the synthesis of flavonoids in alfalfa plants by promoting the accumulation of key enzyme activities upstream of flavonoids in alfalfa and moderate drought stress can significantly increase the related enzyme activities to promote the content of flavonoids.

Key words: alfalfa; drought stress; flavone synthase; flavonoids

黄酮类化合物是植物主要的次生代谢产物之一,其生物合成途径为苯丙烷代谢途径。首先以丙二酰辅酶 A 和 4-香豆酰-辅酶 A 为底物经查尔酮合酶(CHS)催化合成查尔酮(chalcone),然后再通过查尔酮异构酶(CHI)、查尔酮还原酶(CHR)和异黄酮合成酶(IFS)等酶催化的酶促反应合成黄酮(flavone)、黄烷酮(flavanone)、黄酮醇(flavonol)、异黄酮(isoflavone)、二氢异黄酮(isoflavanone)以及花青素(anthocyanin)等不同类型的化合物^[1-2]。有研究表明,黄酮类化合物的生物合成受到苯丙氨酸解氨酶(PAL)、CHS、CHI、黄烷酮醇还原酶(DFR)和花青素合成酶(ANS)等系列酶的调控,而这些酶的活性及其分子合成水平又受到光照、温度、水分和养分等环境因子的影响^[3]。孙坤等^[4]研究发现随干旱胁迫程度的增强,肋果沙棘(*Hippophae neurocarpa* Linn.)试管苗叶片黄酮类化合物含量表现为先下降后上升的趋势。

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)为多年生豆科牧草,原产于伊朗,生产潜力大,适口性好,营养价值和经济价值高,素有“牧草之王”和“饲料皇后”的美称^[5-6]。紫花苜蓿中含有大量黄酮类化合物。研究发现紫花苜蓿中黄酮类化合物主要有杀菌、抗氧化、延缓衰老、抗肿瘤、类雌激素、增强机体免疫力等生物活性功能^[7-9]。早在 2007 年徐文燕^[10]研究温度对不同品种紫花苜蓿黄酮含量影响时发现,同一紫花苜蓿品种不同温度处理组的总黄酮和黄酮单体含量差异显著。目前,干旱胁迫对紫花苜蓿次生代谢物质合成机制的研究相对较少,而水分胁迫是限制苜蓿生长的主要因素之一,干旱胁迫条件下紫花苜蓿黄酮类化合物含量也会发生显著的变化,这些变

化对保护紫花苜蓿免受干旱伤害有重要意义,对其质量的维持也有显著的影响。因此,本试验以抗旱性不同的 3 个紫花苜蓿品种‘保定苜蓿’、‘农牧 806’和‘雷达克之星’为实验材料,以不同浓度的 PEG-6000 模拟干旱胁迫处理,通过测定黄酮代谢途径上 3 个关键酶活性以及黄酮类化合物的含量,拟探讨干旱胁迫对不同品种紫花苜蓿黄酮合成途径关键酶活性以及黄酮类化合物含量的影响,为紫花苜蓿品种改良、药用成分的开发利用提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 材料培养与处理

紫花苜蓿种子购买自北京克劳沃草业有限公司,根据不同浓度的 PEG-6000 模拟干旱试验,选择抗旱性不同的紫花苜蓿品种‘保定苜蓿’、‘农牧 806’和‘雷达克之星’。将 3 品种紫花苜蓿种子先用 0.5%高锰酸钾溶液消毒 20 min,再用蒸馏水冲洗干净,分别撒播在育苗盘上,表面覆土,定时浇水,当幼苗培养至 3 叶期后,移苗至盛有混匀介质(泥炭土:珍珠岩:蛭石=3:1:1)的营养盆(口径 12 cm×高 13 cm)中,定时浇水,每周灌溉 1 次 1/2 Hogland 营养液。光照室内温度控制在 26℃左右,光照周期 14 h·d⁻¹。5 个月后,挑选生长一致的紫花苜蓿苗,开始干旱胁迫实验处理。用不同浓度的 PEG-6000(0、5%、10%、15%、20%、25%)分别处理紫花苜蓿幼苗(每盆浇灌 100 mL),于干旱胁迫的第 7 天分别取叶片样品测定 PAL、C4H 和 4CL 活性,并收取各品种紫花苜蓿地上部分,用水洗净,于 50℃烘箱内干燥,粉碎,过 40 目筛,混合均匀后用于测定黄酮类化合物含量。

表 1 紫花苜蓿 8 种指标成分对照品标准曲线

Table 1 Standard curve of 8 reference components of alfalfa

成分 Ingredient	线性回归方程 Linear regression equation	线性范围 Linear range/ μg	R^2
虎杖苷 Polydatin	$y = 4\,215\,296\,x + 11890$	0.05~5	0.9979
山奈酚 3-O-芸香糖苷 Kaempferol 3-rutinoside	$y = 1\,038\,700\,x + 15655$	0.05~5	0.9165
甘草素 Liquiritigenin	$y = 991\,045\,x + 12919$	0.05~5	0.9832
木犀草素 Luteolin	$y = 3\,902\,762\,x - 73074$	0.05~5	0.9970
7'-二羟基黄酮 7'-dihydroxyflavone	$y = 1\,627\,784\,x + 8780$	0.05~5	0.9968
染料木素 Genistein	$y = 998\,247\,x - 101681$	0.05~5	0.9978
芹菜素 Apigenin	$y = 2\,832\,547\,x + 13550$	0.05~5	0.9981
苜蓿素 Tricin	$y = 2\,372\,132\,x - 66255$	0.05~5	0.9989

1.2 测定指标及方法

1.2.1 PAL、C4H、4CL 活性 PAL(苯丙氨酸解氨酶)活性的测定参照徐友^[11]的方法;C4H(肉桂酸-4-羟基化酶)活性的测定参照 Lamb C J 等^[12]的方法;4CL(4-香豆酸辅酶 A 连接酶)活性的测定参照 Karl-Heinz K 等^[13]的方法。

1.2.2 黄酮类化合物含量 参考并改进臧清波^[14]、徐文燕^[10] HPLC 测定紫花苜蓿黄酮类化合物含量的方法,对 3 个品种紫花苜蓿地上部黄酮类化合物含量进行测定。

(1)色谱条件 色谱柱为 Sunfire C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为 A(乙腈)-B(0.05% 磷酸水),梯度洗脱(0~5 min, 5% A; 5~10 min, 5%~10% A; 10~25 min, 10%~19% A; 25~60 min, 19%~20%; 60~100 min, 20%~32%; 100~115 min, 32%~5%);柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$;流速: 1 mL · min⁻¹;检测波长: 340 nm;进样量 30 μL 。

(2)对照品溶液的制备 分别精密称取虎杖苷标准品、山奈酚-3-O 芸香糖苷标准品、甘草素标准品、木犀草素标准品、7'-二羟基黄酮标准品、染料木素标准品、芹菜素标准品及苜蓿素标准品,加甲醇配制成 1 mg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。标准品均购自上海源叶生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$ 。分别将已配制好的混合对照品溶液稀释 10 倍,进样量设定为 20 μL 、15 μL 、5 μL 和 2 μL ;稀释 100 倍,进样量设定为 10 μL 和 2 μL ,制定如表 1 所示各指标成分对照品标准曲线。

(3)供试品溶液的制备 精确称取 0.100 g 紫花苜蓿地上部分样品,加入 5 mL 70% 乙醇,超声提取 15 min,取出后 5 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,取上清液,前后提取共 2 次,合并 2 次上清液得紫花苜蓿提取液。取各品种紫花苜蓿提取液 5 mL 于旋转蒸发

瓶中,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 下旋转蒸发,然后用 1 mL 70% 甲醇将提取物超声溶解,10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取上清液于 0.22 μm 滤膜上过滤,滤液作为供试品溶液。

1.2.3 总黄酮含量 参考并改进许英一等^[15] 超声波辅助乙醇提取法,准确称取 0.1 g 经过处理的紫花苜蓿地上部分粉末置于 10 mL 试管中,加入 5 mL 70% 的乙醇,在温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 、超声功率为 180 W 的条件下超声提取 30 min,收集浸提液,滤渣重复浸提 1 次,合并 2 次的浸提液。依次加入 5% NaNO₂ 溶液 0.3 mL,摇匀静置 5 min,加 10% Al(NO₃)₃,摇匀静置 5 min,再分别加入 1 mol · L⁻¹ NaOH 溶液 10 mL,定容至刻度,摇匀,静置 15 min,在 510 nm 下测定反应溶液的吸光值(A)。根据标准曲线计算总黄酮含量。每个样品设置 3 个重复。

1.3 数据处理

所有试验数据均重复测定 3 次,取平均值,并采用 SPSS18.0 进行方差分析,且利用 LSD 进行差异显著性检验和 Duncan's 法进行多重比较测验,各处理间的显著性差异检验水平为 $\alpha = 0.05$,图表由 Graphpad Prism 6 软件绘制。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫对不同品种紫花苜蓿叶片 PAL、4CL 和 C4H 活性的影响

2.1.1 PAL 活性 从图 1, A 可知, 3 个紫花苜蓿品种叶片中 PAL 活性在干旱胁迫后均比对照(正常水分处理, 未添加 PEG-6000)不同程度增加, 且大多达到显著水平, 但品种间叶片 PAL 活性对于干旱胁迫的响应程度不同, 基本表现为‘保定苜蓿’ < ‘农牧 806’ < ‘雷达克之星’; 同时, 3 个紫花苜蓿品种叶片中 PAL 活性随着 PEG-6000 浓度的增加均呈先增加后降低的趋势, 且均在 10% PEG-6000 模拟干旱

胁迫下达到最高值,此时‘保定苜蓿’、‘农牧 806’、‘雷达克之星’叶片中 PAL 活性分别是对照的 1.15、1.37 和 1.74 倍 ($P < 0.05$),‘雷达克之星’叶片中 PAL 活性增加的幅度显著高于其他 2 个品种,‘农牧 806’又显著高于‘保定苜蓿’。

2.1.2 4CL 活性 图 1, B 显示,在不同的 PEG-6000 模拟干旱胁迫条件下,紫花苜蓿 3 个品种叶片中 4CL 活性均表现出先升高后降低的趋势,且各干旱胁迫处理均显著高于对照,并以‘农牧 806’叶片中 4CL 活性的变化幅度较大;3 个品种紫花苜蓿叶片中 4CL 活性均在 15% PEG-6000 模拟干旱胁迫下

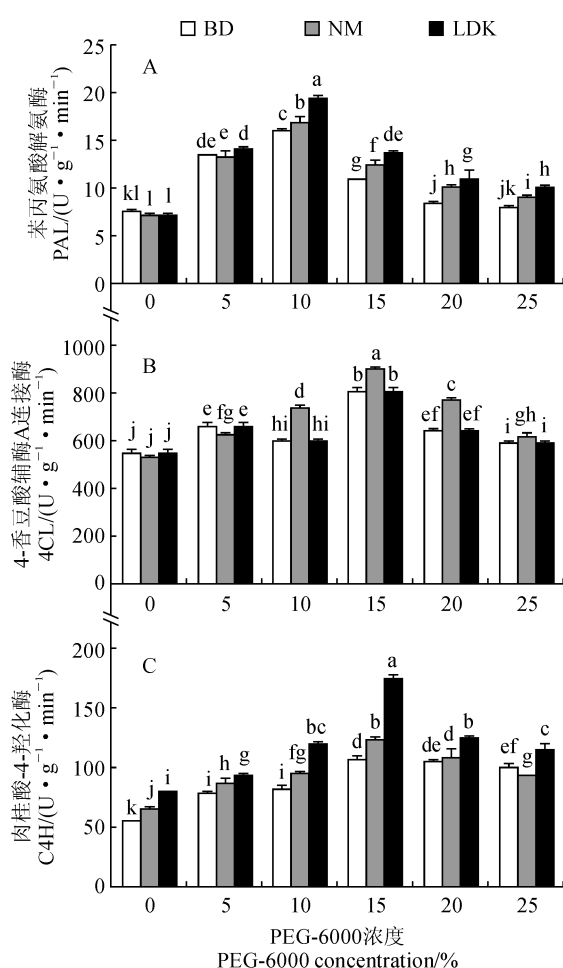
最高,分别比相应对照显著增加了 48.02%、68.68%和 48.02% ($P < 0.05$);当 PEG-6000 浓度增加至 20%时,3 个品种紫花苜蓿叶片中 4CL 活性均显著降低,并于 25% PEG-6000 模拟干旱胁迫下降至最低。

2.1.3 C4H 活性 由图 1, C 来看,随着 PEG-6000 浓度的增加,3 个紫花苜蓿品种叶片中 C4H 活性也均表现出先增加后降低的趋势,但各干旱胁迫处理均显著高于对照,其中以‘雷达克之星’叶片 C4H 活性的变化幅度显著高于其他两个紫花苜蓿品种;3 个紫花苜蓿品种叶片中 4CL 活性也均在 15% PEG-6000 模拟干旱胁迫下达到最高,‘保定苜蓿’、‘农牧 806’、‘雷达克之星’与对照相比分别显著增加了 97.44%、83.35%和 121.05% ($P < 0.05$);当 PEG-6000 浓度增加至 25%时,3 个品种紫花苜蓿叶片中 4CL 活性均显著降低。

以上结果说明,不同程度干旱胁迫均能诱导 3 个紫花苜蓿品种叶片黄酮代谢通路上 3 个关键酶 PAL、4CL 和 C4H 活性显著升高,但各品种响应幅度不同,PAL 和 C4H 活性均以‘雷达克之星’品种变幅较大,4CL 活性则以‘农牧 806’品种变幅较大;3 个紫花苜蓿品种各关键酶活性均随着干旱胁迫程度增强而先升高后降低,各品种叶片 PAL 活性均在 10% PEG-6000 处理下达到最大值,而它们 4CL 和 C4H 活性均在 15% PEG-6000 处理下达到峰值。

2.2 干旱胁迫对不同品种紫花苜蓿植株内黄酮化合物含量的影响

2.2.1 总黄酮含量 由图 2 可知,在对照条件下,3 个品种紫花苜蓿植株内总黄酮含量有差异但不显著 ($P > 0.05$),具体表现为‘雷达克之星’>‘保定苜蓿’



BD. 保定苜蓿; NM. 农牧 806; LDK. 雷达克之星; 不同小写字母表示各处理和品种间在 0.05 水平存在显著性差异; 下同
图 1 不同浓度 PEG-6000 胁迫下 3 个品种紫花苜蓿叶片 PAL、4CL 和 C4H 活性的变化

BD. Baoding; NM. Nongmu806; LDK. Radarke⁺;
Different lowercase letters indicate that there is a significant difference between the treatments and cultivars at the 0.05 level; the same as below

Fig. 1 The PAL, 4CL and C4H activities in leaves of three alfalfa cultivars under different PEG concentrations

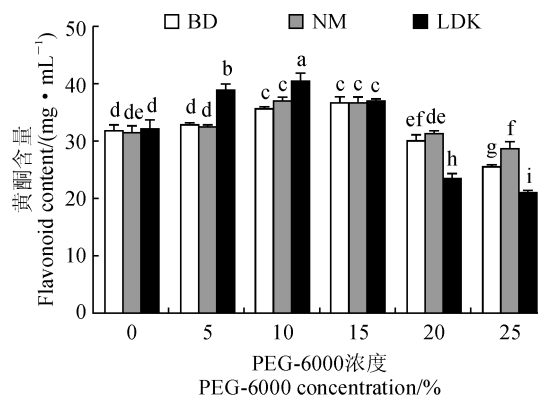


图 2 PEG-6000 模拟干旱胁迫下紫花苜蓿 3 个品种植株总黄酮含量的变化

Fig. 2 The total flavonoid content in plants of three alfalfa cultivars under different PEG concentrations

>‘农牧 806’。随着干旱胁迫的增加,紫花苜蓿 3 个品种植株内总黄酮含量呈先增加后降低的趋势。其中,‘保定苜蓿’植株内总黄酮含量在 PEG-6000 浓度为 15% 时最高,与对照相比显著增加了 15.52% ($P<0.05$);而‘农牧 806’和‘雷达克之星’植株内总黄酮含量则在 10% PEG-6000 模拟干旱胁迫下达到最大值,比相应对照分别显著增加了 17.29% 和 25.96%。3 个紫花苜蓿品种植株内总黄酮含量在 PEG-6000 浓度增加至 20% 时显著降低,并在 25% PEG-6000 浓度下降至最低。

2.2.2 虎杖苷和山奈酚-3-O-芸香糖苷含量 如图 3,A 所示,在干旱胁迫条件下,3 个品种紫花苜蓿植株内虎杖苷含量均显著高于相应对照;随着 PEG-6000 浓度增加,3 个品种紫花苜蓿植株内虎杖苷含量均呈现出先升高后降低的趋势,且均在 10% PEG-6000 模拟干旱胁迫下达到最高值,此时‘保定苜蓿’、‘农牧 806’、‘雷达克之星’的地上部分虎杖苷

含量分别是相应对照的 6.71 倍、4.47 倍和 7.03 倍 ($P<0.05$)。此后,随着干旱胁迫程度的继续增加,紫花苜蓿 3 个品种植株内虎杖苷含量随之显著降低,且品种‘农牧 806’和‘雷达克之星’呈线性降低。同时,由图 3,B 可知,随着干旱胁迫程度的增加,3 种紫花苜蓿地上部分山奈酚-3-O-芸香糖苷含量的变化趋势与虎杖苷含量相似,只是各品种达到最大值的 PEG-6000 浓度稍高,比对照的增幅稍低,即‘保定苜蓿’、‘农牧 806’和‘雷达克之星’地上部分的山奈酚-3-O-芸香糖苷含量均在 PEG-6000 浓度增加至 15% 时达到最高,分别比相应对照显著增加了 3.08 倍、3.61 倍和 3.68 倍 ($P<0.05$)。

2.2.3 甘草素和 7'-二羟基黄酮含量 图 4,A 显示,紫花苜蓿 3 个品种地上部分甘草素含量在各干旱胁迫处理下与对照相比均显著增加 ($P<0.05$),但各品种对不同浓度的干旱胁迫响应不同。随着 PEG-6000 浓度的增加,‘保定苜蓿’、‘农牧 806’和‘雷

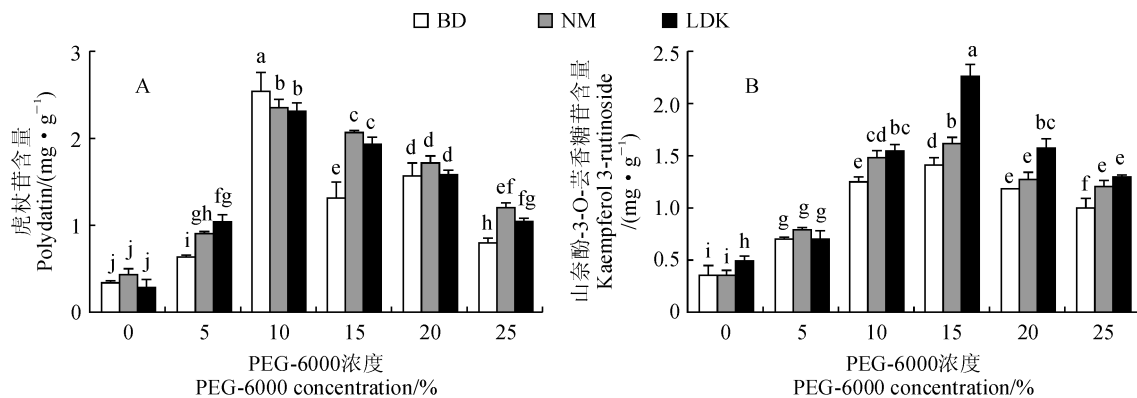


图 3 模拟干旱胁迫下紫花苜蓿 3 个品种植株虎杖苷和山奈酚-3-O-芸香糖苷含量的变化

Fig. 3 The contents of polydatin and kaempferol 3-rutinoside in plants of three alfalfa cultivars under different PEG concentrations

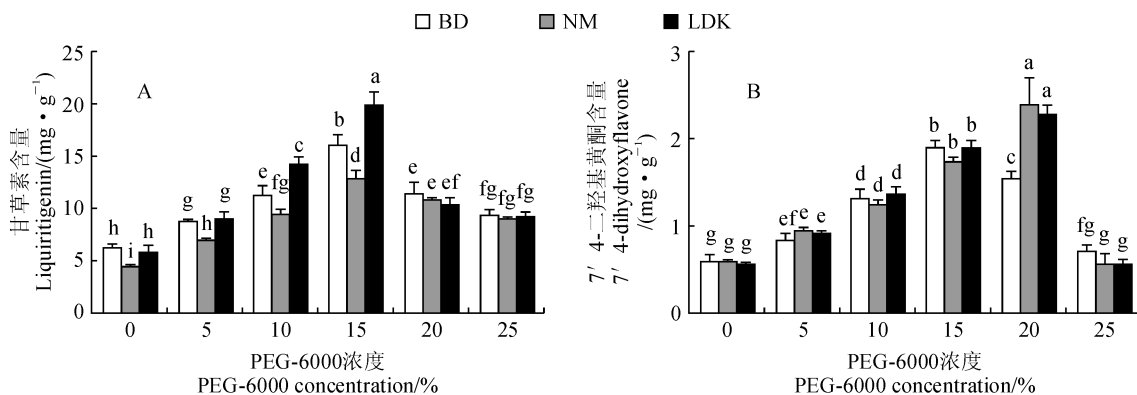


图 4 模拟干旱胁迫下紫花苜蓿 3 个品种植株甘草素和 7'-二羟基黄酮含量的变化

Fig. 4 The contents of liquiritigenin and 7'-4-dihydroxyflavone in plants of three alfalfa cultivars under different PEG concentrations

达克之星’地上部分甘草素含量表现出先升高后降低的变化趋势,且均当 PEG-6000 浓度为 15% 时达到最高值,此时分别是相应对照的 1.59 倍、1.91 倍和 2.50 倍。在相同处理下,当 PEG 胁迫浓度为 0~15% 时,植株中甘草素含量表现为‘农牧 806’显著低于‘保定苜蓿’和‘雷达克之星’;当 PEG 胁迫浓度为 20%~25% 时,品种间差异不显著。

同时,由图 4, B 可知,在对照条件下,3 个品种紫花苜蓿地上部分 7'-二羟基黄酮含量相差不显著 ($P>0.05$)。在受到模拟干旱胁迫后,3 个紫花苜蓿品种内 7'-二羟基黄酮的含量发生不同程度的变化。与对照相比,紫花苜蓿 3 个品种内的 7'-二羟基黄酮含量在 5%~20% PEG-6000 浓度时均显著提高,而在 25% PEG-6000 浓度时变化不显著;随着干旱胁迫程度的增加,各品种地上部分 7'-二羟基黄酮含量均呈现出先升高后降低的趋势,‘保定苜蓿’于 15% PEG-6000 浓度下增至最高,与其对照相比显著增加了 2.21 倍,而‘农牧 806’和‘雷达克之星’则在 PEG-6000 浓度为 20% 时增至最大,与相应对照相比分别显著增加了 3.04 倍和 3.16 倍。品种间相比较,仅当 PEG-6000 浓度为 20% 时,‘农牧 806’和‘雷达克之星’内 7'-二羟基黄酮含量显著高于‘保定苜蓿’ ($P<0.05$),其余处理浓度下品种间差异均不显著。

2.2.4 木犀草素和染料木素含量 如图 5, A 所示,在对照条件下,3 个紫花苜蓿品种地上部分木犀草素含量无显著差异。在干旱胁迫条件下,3 个紫花苜蓿品种内木犀草素含量变化幅度不同,‘雷达克之星’显著高于‘保定苜蓿’和‘农牧 806’;随着 PEG-6000 模拟干旱胁迫浓度的增加,紫花苜蓿 3 个品种内木犀草素含量均表现出先升高后降低的趋

势。其中,‘保定苜蓿’和‘农牧 806’植株中木犀草素含量于 10% PEG-6000 浓度下增至最大值,与相应对照相比分别显著增加了 40.16% 和 47.01% ($P<0.05$),而‘雷达克之星’则在 15% PEG-6000 处理下增至最高值,木犀草素含量是对照的 2.02 倍。

同时,图 5, B 显示,在对照条件下,3 个品种紫花苜蓿地上部染料木素含量差异显著 ($P<0.05$),并以‘农牧 806’的染料木素含量最高,是‘雷达克之星’的 2 倍。在模拟干旱胁迫下,3 个紫花苜蓿品种内染料木素含量随干旱胁迫浓度的增加表现出先升高后降低的变化趋势,并均在 10% PEG-6000 浓度下增至最高值,分别比相应对照显著增加了 1.20 倍、1.94 倍和 5.97 倍 ($P<0.05$)。与对照相比,各品种紫花苜蓿地上部染料木素含量除 25% PEG-6000 浓度处理外均显著增加。

2.2.5 芹菜素和苜蓿素含量 在对照条件下,3 个品种紫花苜蓿植株内芹菜素和苜蓿素含量均无显著差异(图 6)。从图 6, A 可知,在干旱胁迫条件下,3 个品种紫花苜蓿植株内芹菜素含量大多显著高于相应对照,且均随着 PEG-6000 浓度的增加呈现出先升高后降低的趋势,其中的‘保定苜蓿’芹菜素含量在 10% PEG-6000 浓度下增至最高值(为对照的 2.72 倍),而‘农牧 806’和‘雷达克之星’植株则在 15% PEG-6000 浓度下增至最高值,分别比对照显著增加了 7.17 倍和 9.75 倍 ($P<0.05$)。在干旱胁迫下,‘农牧 806’和‘雷达克之星’植株内芹菜素含量变化幅度高于‘保定苜蓿’。

同时,如图 6, B 所示,在对照条件下,紫花苜蓿 3 个品种内苜蓿素含量差异不显著 ($P>0.05$)。在干旱胁迫条件下,3 个品种紫花苜蓿内苜蓿素含量除 25% PEG-6000 浓度处理外大多显著高于相应对照;

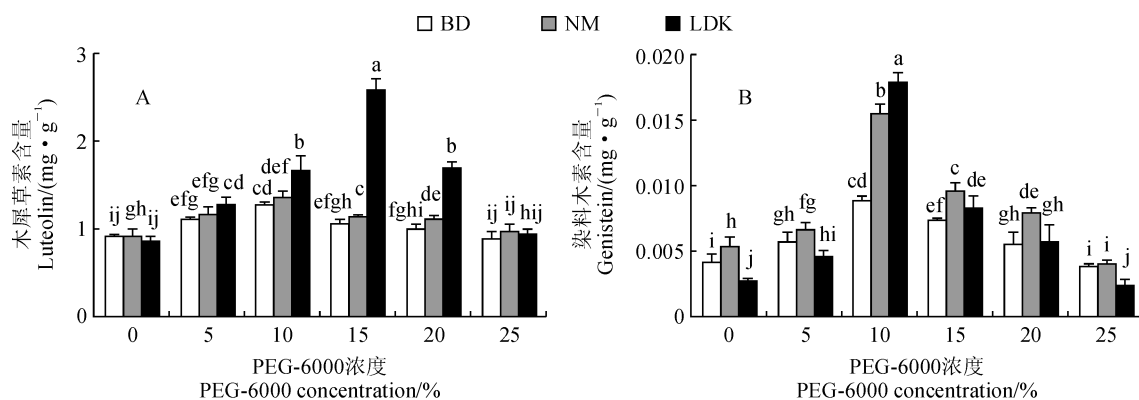


图 5 PEG-6000 模拟干旱胁迫对紫花苜蓿 3 个品种木犀草素和染料木素含量的影响

Fig. 5 Effects of different PEG concentrations on contents of luteolin and genistein of three alfalfa cultivars

随着 PEG-6000 浓度的增加,‘保定苜蓿’、‘农牧 806’和‘雷达克之星’地上部苜蓿素含量均呈现出先增加后降低的趋势,并均在 15% PEG-6000 浓度下增至最高值,其苜蓿素含量分别是同一品种对照的 0.67 倍、2.08 倍和 1.55 倍($P<0.05$)。在各 PEG-6000 浓度胁迫下,‘农牧 806’和‘雷达克之星’植株内苜蓿素含量变化幅度高于‘保定苜蓿’。

2.3 紫花苜蓿黄酮类化合物含量与其合成关键酶活性的相关性分析

由表 2 可知,在干旱胁迫条件下,紫花苜蓿叶片黄酮类化合物含量与其合成关键酶活性呈不同程度的相关性。其中,对于‘保定苜蓿’品种而言,叶片 PAL 活性与其总黄酮、虎杖苷、木犀草素、染料木素以及芹菜素含量呈极显著正相关($P<0.01$);叶片 4CL 活性与其总黄酮、山奈酚-3-O-芸香糖苷、甘草

素、7′4-二羟基黄酮以及苜蓿素含量呈极显著正相关($P<0.01$);C4H 活性与其山奈酚-3-O-芸香糖苷、甘草素以及 7′4-二羟基黄酮含量呈极显著正相关($P<0.01$),与苜蓿素含量显著相关($P<0.05$)。对于‘农牧 806’品种而言,叶片 PAL 活性与其总黄酮、虎杖苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、染料木素以及苜蓿素含量呈极显著正相关($P<0.01$),与木犀草素含量显著相关($P<0.05$);叶片 4CL 活性与其总黄酮、虎杖苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、甘草素、7′4-二羟基黄酮、木犀草素、芹菜素以及苜蓿素含量呈极显著正相关($P<0.01$),与染料木素含量显著相关($P<0.05$);叶片 C4H 活性与其虎杖苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、甘草素、7′4-二羟基黄酮、芹菜素以及苜蓿素含量呈极显著正相关($P<0.01$)。对于‘雷达克之星’而言,叶片 PAL 活性与其总黄酮、虎杖苷、染料

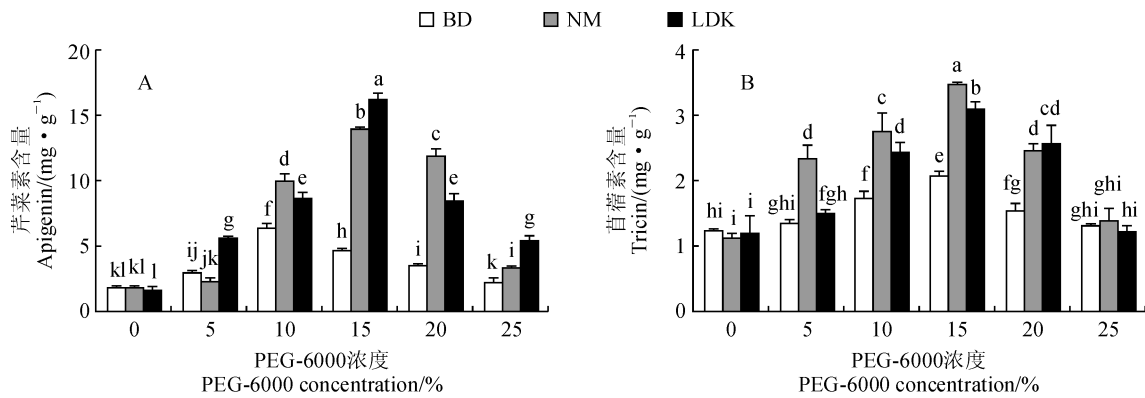


图 6 PEG-6000 模拟干旱胁迫对紫花苜蓿 3 个品种芹菜素和苜蓿素含量的影响

Fig. 6 Effects of different PEG concentrations on contents of apigenin and tricin of three alfalfa cultivars

表 2 紫花苜蓿黄酮类化合物含量与其关键酶活性的相关性分析

Table 2 Correlation analysis between the flavonoids content and its key enzyme activities of alfalfa

品种 Cultivar	关键酶 活性 Key enzyme activity	黄酮类化合物含量 Flavonoids content								
		总黄酮 Total flavonoid	虎杖苷 Polydatin	山奈酚-3-O- 芸香糖苷 Kaempferol 3-rutinoside	甘草素 Liquiriti- genin	7′4-二羟 基黄酮 7′4-dihydroxy- flavone	木犀草素 Luteolin	染料木素 Genistein	芹菜素 Apigenin	苜蓿素 Tricin
保定苜蓿 Baoding	PAL	0.632**	0.614**	0.311	0.268	0.244	0.903**	0.802**	0.778**	0.376
	4CL	0.544**	0.145	0.628**	0.849**	0.744**	0.258	0.456	0.366	0.794**
	C4H	-0.144	0.357	0.828**	0.761**	0.675**	0.045	0.177	0.283	0.564*
农牧 806 Nongmu 806	PAL	0.739**	0.722**	0.576**	0.375	0.239	0.478*	0.854**	0.428	0.691**
	4CL	0.648**	0.846**	0.855**	0.926**	0.774**	0.838**	0.545*	0.953**	0.917**
	C4H	0.427	0.771**	0.886**	0.965**	0.715**	0.712**	0.327	0.866**	0.821**
雷达克之星 Radarke	PAL	0.648**	0.827**	0.443	0.576*	0.206	0.418	0.877**	0.452	0.448
	4CL	0.21	0.929**	0.960**	0.933**	0.726**	0.903**	0.699**	0.912**	0.928**
	C4H	0.065	0.725**	0.965**	0.937**	0.763**	0.982**	0.345	0.985**	0.925**

注: * 和 ** 分别表示在 0.05 和 0.01 水平显著相关(双尾)

Note: * and ** stand for the significant correlation at 0.01 and 0.05 levels, respectively (two tails)

木素含量呈极显著正相关($P < 0.01$),与甘草素含量显著相关($P < 0.05$);叶片 4CL 活性与其虎杖苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、甘草素、7'-二羟基黄酮、木犀草素、芹菜素以及苜蓿素含量呈极显著正相关($P < 0.01$);叶片 C4H 活性与其虎杖苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、甘草素、7'-二羟基黄酮、木犀草素以及苜蓿素含量呈极显著正相关($P < 0.01$)。

3 讨 论

生物与非生物因子的变化不会直接影响植物次生代谢产物的合成,而是通过影响次生代谢中关键基因的表达和关键酶活性等合成前体来影响次生代谢物的合成^[16]。PAL、C4H 和 4CL 是苯丙氨酸代谢途径中的关键酶,这些酶的活性受光、温度和水分等环境因素的影响^[17]。王彤彤等^[18]研究发现轻度至中度干旱胁迫能够促进半夏氮代谢关键酶活性的增高,从而促进半夏内次生代谢产物的合成与积累。本研究发现,随着 PEG-6000 浓度的升高,紫花苜蓿 3 个品种叶片中 PAL、4CL 和 C4H 的活性均呈先升高后降低的变化趋势,但各个酶活性对不同程度干旱胁迫的响应不同,PAL 在 10% PEG-6000 时具有最高的活性,而 4CL 和 C4H 在 15% PEG-6000 时活性最高。这与 Lin 等^[19]发现适度干旱胁迫可以通过刺激黄芩苷生物合成的关键酶活性及表达量来促进黄芩苷的积累的研究结果一致。

品种是影响植物中黄酮类化合物积累的重要因素。臧清波^[14]发现 233 份紫花苜蓿黄酮类化合物含量存在差异。本研究发现,在对照(无干旱胁迫处理)条件下,3 个紫花苜蓿品种间地上部分总黄酮含量以及 8 个黄酮类化合物含量存在差异,这与早期微微等^[20]的相关研究结果相似。由于黄酮本身具有很强的抗氧化作用,大量研究表明,干旱、温度等胁迫使得植物组织中黄酮类化合物积累从而增强

其对极端温度和干旱的耐受性^[21-23]。本研究也发现,随着干旱胁迫的增加 3 个紫花苜蓿品种内黄酮类化合物含量的积累呈先增加后降低的变化趋势,且在 10%~20% PEG 胁迫条件下,‘保定苜蓿’、‘农牧 806’和‘雷达克之星’植株中黄酮类化合物含量显著增加。但当 PEG 胁迫浓度为 25%时,3 种紫花苜蓿内黄酮类化合物含量开始降低,表明干旱胁迫浓度增加到一定程度时,黄酮类化合物的增加幅度会降低。研究也发现,3 种紫花苜蓿内黄酮类化合物含量随着 PEG 胁迫浓度的增加呈先升高后降低的变化趋势,这与叶片 PAL、4CL 和 C4H 活性的变化趋势相一致,且 3 种紫花苜蓿内黄酮类化合物含量与其代谢通路上 3 个关键酶活性呈不同程度的相关性,这一现象说明干旱胁迫可以通过影响紫花苜蓿黄酮合成途径上游关键酶活性来改变其地上部黄酮类化合物含量,且适度的干旱胁迫可以刺激增强黄酮代谢通路上相关酶活性,从而促进黄酮类化合物的合成积累。这与阎君等^[24]发现轻度干旱(10% PEG-6000 处理)能够通过提高黄酮合成途径上游关键酶的活性来促进芹菜黄酮类化合物的积累相似。

4 结 论

本研究发现,不同浓度的 PEG-6000 模拟干旱胁迫下,3 个紫花苜蓿品种叶片中 PAL、4CL、C4H 活性随着胁迫程度呈先增加后降低的趋势,且在 10%~15% PEG 干旱胁迫下增至最大值。10%~15%的干旱胁迫还显著促进 3 个紫花苜蓿品种地上部分总黄酮含量和 8 个黄酮类化合物(虎杖苷、木犀草素、染料木素、山奈酚-3-O-芸香糖苷、苜蓿素、甘草素、芹菜素、7'-二羟基黄酮)含量,但随着干旱胁迫程度的继续增强,3 个品种紫花苜蓿关键酶活性以及黄酮类化合物含量随之明显降低。

参考文献:

- [1] JUSTYNA M, KAMIL K, ANNA K. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment[J]. *Molecules*, 2014, **19**(10): 16 240-16 265.
- [2] 诸 姮,胡宏友,卢昌义,等. 植物体内的黄酮类化合物代谢及其调控研究进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2007, **46**(S1): 136-143.
ZHU H, HU H Y, LU C Y, *et al.* Progresses on flavonoid metabolism in plants and its regulation [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2007, **46**(S1): 136-143.
- [3] 汪贵斌,郭旭琴,常 丽,等. 温度和土壤水分对银杏叶黄酮类化合物积累的影响[J]. 应用生态学报, 2013, **24**(11): 3 077-3 083.
WANG G B, GUO X Q, CHANG L, *et al.* Effects of air temperature and soil moisture on accumulation of flavonoids in *Ginkgo biloba* leaves[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, **24**(11): 3 077-3 083.
- [4] 孙 坤,张宏涛,陈 纹,等. 干旱胁迫对肋果沙棘(*Hippophae neurocarpa*)试管苗叶片黄酮类化合物代谢的影响[J].

- 西北师范大学学报(自然科学版),2015,**51**(3): 72-78.
- SUN K, ZHANG H T, CHEN W, *et al.* Effects of drought stress on the metabolism of flavonoids in leaves of test tube seedlings of *Hippophae neurocarpa* [J]. *Journal of Northwest Normal University (Natural Science)*, 2015, **51** (3): 72-78.
- [5] MAGHSOODI M, RAZMJOOA J, GHEYSARI M. Application of biochemical markers for the assessment of drought tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars[J]. *Grassland Science*, 2017, **63**(1): 3-14.
- [6] 李莎莎, 张志强, 王亚芳, 等. 根瘤菌共生对低温胁迫下紫花苜蓿抗寒生理变化的影响[J]. 草地学报, 2016, **24**(2): 377-383.
- LI S S, ZHANG Z Q, WANG Y F, *et al.* Effect of symbiotic rhizobium in alfalfa on physiological change under cold stress [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2016, **24**(2): 377-383.
- [7] 卢成, 曾昭海, 张涛, 等. 紫花苜蓿生物活性成分研究进展[J]. 草业科学, 2005, (9): 28-32.
- LU C, ZENG Z H, ZHANG T, *et al.* Research progress of alfalfa bioactive ingredients[J]. *Pratacultural Science*, 2005, (9): 28-32.
- [8] 吴健全, 金宏, 许志勤, 等. 染料木黄酮对 γ -射线损伤小鼠免疫功能的影响[J]. 解放军预防医学杂志, 2005, (4): 245-247.
- WU J Q, JIN H, XU Z Q, *et al.* The effect of genistein on the immune function of mice injured by γ -rays[J]. *Journal of Preventive Medicine of Chinese People's Liberation Army*, 2005, (4): 245-247.
- [9] 李苗苗, 靳思玉, 牛志力, 等. 苜蓿黄酮的生物活性功能及其在反刍动物中的应用[J]. 中国饲料, 2019, (13): 4-8.
- LI M M, JIN S Y, NIU Z L, *et al.* The bioactive function of alfalfa flavonoids and its application in ruminants[J]. *China Feed*, 2019, (13): 4-8.
- [10] 徐文燕. 紫花苜蓿化学成分及其黄酮成分影响因子的研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007.
- [11] 徐友. 温度和光强对银杏生长和次生代谢产物合成的影响[D]. 南京: 南京林业大学, 2016.
- [12] LAMB C J, RUBERY P H. A spectrophotometric assay for trans-cinnamic acid 4-hydroxylase activity[J]. *Analytical Biochemistry*, 1975, **68**(2): 554-561.
- [13] KARL-HEINZ K, KLAUS H. 4-Coumarate: CoA ligase from cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* Hoffm [J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 1977, **184**(1): 237-248.
- [14] 臧清波. 233 份紫花苜蓿黄酮类化合物及饲用品质评价[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2019.
- [15] 许英一, 王宇, 杨伟光. 紫花苜蓿叶总黄酮提取及抗氧化性[J]. 草地学报, 2018, **26**(3): 757-763.
- XU Y Y, WANG Y, YANG W G. Extraction of total flavonoids from alfalfa leaves and their antioxidant activity[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2018, **26**(3): 757-763.
- [16] HARVAUX M, KLOPPSTECHE K. The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and *tt* mutants[J]. *Planta*, 2001, **213**(6): 953-966.
- [17] DUPONT N, AKSNES D L. Simulation of optically conditioned retention and mass occurrences of *Periphylla periphylla* [J]. *Journal of Plankton Research*, 2010, **32** (6): 773-783.
- [18] 王彤彤, 何志贵, 韩蕊莲, 等. 干旱胁迫对半夏氮代谢相关酶活性的影响[J]. 浙江农业科学, 2018, **59**(7): 138-141.
- WANG T T, HE Z G, HAN R L, *et al.* Effects of drought stress on enzyme activities related to nitrogen metabolism of *Pinellia ternate* [J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2018, **59**(7): 138-141.
- [19] LIN C, MEI H, LI M Y, *et al.* Changes in the physiological characteristics and baicalin biosynthesis metabolism of *Scutellaria baicalensis* Georgi under drought stress[J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, **122**: 473-482.
- [20] 高微微. 苜蓿生物活性及影响其黄酮和皂苷成分因素的研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2004.
- [21] BIAZZI E, MARIA C, TAVA A, *et al.* Cyp72a67 catalyzes a key oxidative step in *Medicago truncatula* hemolytic saponin biosynthesis[J]. *Molecular Plant*, 2015, **8**(10): 1493-1506.
- [22] 岳凯, 刘文瑜, 魏小红. 干旱胁迫对不同品系藜麦内黄酮和抗氧化性的影响[J]. 分子植物育种, 2019, **17**(3): 956-962.
- YUE K, LIU W Y, WEI X H. Effect of drought stress on flavonoids and antioxidant in different strains of quinoa [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, **17**(3): 956-962.
- [23] 李光跃, 罗晓雅, 孙窗舒, 等. 干旱胁迫对黄芪植株生长中黄酮类成分积累的影响[J]. 西北植物学报, 2017, **37**(1): 138-143.
- LI G Y, LUO X Y, SUN C S, *et al.* Effect of drought stress on accumulation of flavonoids in astragalus plant growth [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2017, **37**(1): 138-143.
- [24] 阎君, 于力, 王颖, 等. 芹菜生长及黄酮类物质积累对 PEG6000 胁迫的响应[J]. 中国农学通报, 2018, **34** (25): 45-51.
- YAN J, YU L, WANG Y, *et al.* Response of celery growth and flavonoid accumulation to PEG6000 stress [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2018, **34**(25): 45-51.

(编辑: 裴阿卫)