

持续水分胁迫对丹参茎叶酚酸含量 及其抗氧化活性的影响

周正¹, 白玲¹, 余燕¹, 杨在君¹, 吴一超^{1,2*}, 彭正松^{1,3}

(1 西华师范大学 生命科学学院, 四川南充 637009; 2 西华师范大学组织修复材料工程技术协同创新中心, 四川南充 637002; 3 西昌学院, 四川西昌 615000)

摘要: 丹参种植中产生大量废弃茎叶, 造成巨大的资源浪费, 干旱显著影响药用植物活性成分的产生和积累。该研究以‘川丹参 1 号’为材料, 采用土壤水分胁迫法, 探讨长期水分胁迫对丹参茎叶的总酚酸 (TPA)、8 种主要酚酸含量和乙醇提取物抗氧化活性的影响, 以初步明确丹参茎叶中酚酸及其抗氧化能力对土壤水分胁迫的响应特征, 为丹参茎叶的开发利用提供理论依据。结果表明: (1) 丹参茎叶 TPA 对土壤水分响应敏感, 8、9、10 月份样品 (SL-8、SL-9 和 SL-10) 的 TPA 含量随着土壤相对含水量 (SRWC) 降低而增加, 且不同月份间差异显著; 在相同 SRWC 下, SL-9 的 TPA 含量最低, 仅为 SL-8 的 41.4%~91.1% 和 SL-10 的 24.0%~79.9%。(2) 长期土壤水分胁迫下, 丹参茎叶中迷迭香酸、丹酚酸 B、咖啡酸和原儿茶醛明显积累; 干旱增加了 TPA 和单一酚酸的含量, 但严重缺水 (SRWC 为 35%) 会降低酚酸含量。(3) 丹参茎叶乙醇提取物具有很强的抗氧化活性, 其 DPPH· 和 ABTS·⁺ 清除活性随着 SRWC 的降低而增强, 与 TPA 含量变化趋势一致。研究发现, 适度干旱胁迫能显著增加丹参茎叶酚酸含量及抗氧化活性, 在丹参种植中可以通过科学灌溉技术来增加茎叶中酚酸含量, 促进丹参的综合利用。

关键词: 丹参; 干旱胁迫; HPLC; 酚酸; 抗氧化活性

中图分类号: Q945.78; R282.2 **文献标志码:** A

Effect of Continuous Water Stress on Phenolic Acids Content and Antioxidant Activity in Stems and Leaves of *Salvia miltiorrhiza* Bge.

ZHOU Zheng¹, BAI Ling¹, YU Yan¹, YANG Zaijun¹, WU Yichao^{1,2*}, PENG Zhengsong^{1,3}

(1 College of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong, Sichuan 637002, China; 2 Collaborative Innovation Center of Tissue Repair Material Engineering Technology, China West Normal University, Nanchong, Sichuan 637002, China; 3 Xichang University, Xichang, Sichuan 615000, China)

Abstract: The planting scale of *Salvia miltiorrhiza* continues to expand, producing many stems and leaves, resulting in a huge waste of resources. Drought significantly affects the production and accumulation of active components in medicinal plants. This study used ‘Chuan Danshen 1’ (CDS-1) as the material and used the soil water stress method to study the effects of long-term water stress on the total phenolic acids (TPA), the contents of 8 major phenolic acids and the antioxidant activity of the stem and leaf ethanol extracts. This study preliminarily clarified the response behavior and antioxidant capacity of phenolic acids in *S. miltiorrhiza* stems and leaves to soil water stress, and provided scientific theoretical guidance for the

收稿日期: 2021-09-06; 修改稿收到日期: 2022-01-12

基金项目: 西华师范大学创新团队项目 (CXTD2018-6, CXTD2020-2); 西华师范大学博士启动基金 (19E045); 国家级一般培育项目 (20A004)

作者简介: 周正 (1996—), 男, 硕士研究生, 主要从事中药资源评价及利用研究。E-mail: 2497949883@qq.com

* 通信作者: 吴一超, 博士, 讲师, 主要从事中药资源评价及利用, 天然产物绿色开发研究。E-mail: chaoyue-wu@qq.com

development and utilization of *S. miltiorrhiza* stems and leaves. The results showed that: (1) TPA of CDS-1 stems and leaves was sensitive to soil moisture. The TPA content of August, September and October samples (SL-8, SL-9 and SL-10) increased as the soil relative water content (SRWC) decreased, but there are significant differences between different months. Under the same SRWC, SL-9 has the lowest TPA content, only 41.4%—91.1% of SL-8 and 24.0%—79.9% of SL-10. (2) Under long-term soil water stress, the rosmarinic acid, salvianolic acid B, caffeic acid and protocatechuic aldehyde were significantly accumulated in the stems and leaves of CDS-1. Drought stress increases the contents of TPA and single phenolic acid, but severe water shortage (SRWC is 35%) will reduce the content of phenolic acid. (3) Ethanol extracts of the CDS-1 stems and leaves had strong antioxidant activity, and their DPPH · and ABTS ·⁺ scavenging activities increased with the decrease of SRWC, which was consistent with the change trend of TPA content. It was found that moderate drought stress significantly increased the phenolic acid content and antioxidant activity of the CDS-1 stems and leaves. Scientific irrigation technology can be used to increase the phenolic acid content of the stems and leaves in the cultivation of *S. miltiorrhiza* to promote the comprehensive utilization of *S. miltiorrhiza*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge.; drought stress; HPLC; phenolic acid; antioxidant activity

丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 为唇形科 (Labiateae) 鼠尾草属 (*Salvia*) 多年生草本植物, 其根肥厚、肉质, 表皮朱红色、内白色^[1], 其酚酸类成分主要为单酚酸(原儿茶醛、咖啡酸、丹参素)和多酚酸(迷迭香酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B)^[2], 具有显著的抗氧化、抗肝损伤、抗肿瘤和保护脑组织^[3-6]等作用。‘川丹参 1 号’(CDS-1)(川审药 2011002)是经审定的第一个川丹参品种, 有效成分含量高, 生育期长, 株高 60~75 cm, 根粗短、肥厚, 易折断, 在一定的区域内抗逆性以及适应性较强^[7-8]。

全球气候变化不断加剧, 干旱成为抑制植物生长最严重的非生物胁迫^[9]。干旱会引发药用植物一系列形态、生理、生化和分子水平的变化, 对药用植物的生长和次生代谢物的积累造成严重影响^[10]。药用植物对干旱等逆境的响应可以有效促进次生代谢产物的产生和积累, 影响品质的形成。有研究发现干旱胁迫早期黄芩苷含量在黄芩茎叶中不断上升, 而根系中则随胁迫加重持续增加^[11]; 七叶一枝花根茎中总皂苷含量随土壤水分含量的降低先增加后减少^[12]; 干旱胁迫会使丹参植株矮化, 生物量降低, 但促使叶片中酚酸含量增加^[13]; 轻度干旱可提高丹参生物量, 对丹参酮和丹酚酸 B 积累有促进作用^[14]。对大多数药用植物而言, 适度干旱胁迫可增加次生代谢产物的积累, 提高药用植物的品质, 川丹参道地产区四川中江等地每年干旱频发, 春旱和伏旱尤甚, 对丹参的产量和品质有显著影响。

川丹参是川产大宗中药材, 近年来市场需求不断增加, 种植规模不断扩大, 产生大量非传统药用部位物质(茎、叶), 未得到利用, 造成巨大的资源浪费。

丹参地上部分占全株生物量的 60%~70%, 总酚酸含量可达干重 5%~8%, 川丹参冬季不倒苗, 地上部分具有较高的开发价值。因此, 本研究以 CDS-1 为材料, 采用土壤水分胁迫法, 研究丹参在持续水分胁迫下, 不同月份茎叶酚酸含量和抗氧化活性的变化规律, 初步明确丹参茎叶中酚酸及其抗氧化能力对土壤水分胁迫的响应行为, 为丹参茎叶的开发利用提供科学的理论指导, 也为后续进一步开展丹参抗旱性和生态种植技术研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和处理

材料为四川农业大学张利教授课题组提供的‘川丹参 1 号’(CDS-1), 采用土壤水分胁迫法对丹参进行长期水分胁迫。将土壤和营养土按体积比 4:1 拌匀, 装盆(直径 28 cm, 高 20 cm), 每盆 8 kg 左右。采用烘干法测定土壤绝对含水量, 本次试验土壤最大持水量为 22.9%, 以此为基础设定每个水分胁迫处理组的土壤相对含水量(SRWC)。

于 2020 年 3 月 10 日, 选择粗细均匀的 CDS-1 种根, 种植于花盆中, 统一管理, 种植过程中定量施肥 2 次。丹参植株 30% 以上开始长出花序时(2020 年 6 月 17 日), 选取长势一致的 25 盆, 随机分为 5 个处理组, 开始水分胁迫, 至 12 月底收获。以田间最大持水量记为 100%, 设置土壤相对含水量 75% (偏湿)、65% (适宜)、55% (轻度干旱)、45% (中度干旱) 和 35% (重度干旱) 5 个水分胁迫处理组, 计算每一盆对应水分胁迫处理的总质量, 每天下午 6:00 补足失水质量。分别于 9 月 1 日、10 月 1 日和 11 月 1

日每组随机取样 3 株茎叶进行酚酸含量测定和抗氧化活性评价。

1.2 试剂与仪器

BR 级 1 mol/L 福林酚购自源叶生物;96% DP-PH 和 98% ABTS 购自 Macklin;98.38% 丹参素 (Batch No. 19060920)、99.52%(+)-儿茶素 (Batch No. 19080110)、99.88% 原儿茶醛 (Batch No. 19071608)、99.48% 咖啡酸 (Batch No. 19032003)、99.02% 迷迭香酸 (Batch No. 19053107)、98.95% 丹酚酸 A (Batch No. 19072411) 和 99.79% 丹酚酸 B (Batch No. 19062808) 标准品均购买于成都曼斯特生物科技有限公司。主要仪器包括 22331 Hamburg 离心机 (Eppendorf AG)、酶标仪 (Gene Company Limited)、Agilent 1200-LC 高效液相色谱仪 (Agilent Technologies Inc.)、Dura12FV 实验室超纯水机 (泽拉布仪器科技上海有限公司)、PS-60A 超声波清洗机 (东莞市浩康超声波设备有限公司)。

1.3 丹参茎叶酚酸提取

分别于 2020 年 9 月 1 日、10 月 1 日及 11 月 1 日,采集各胁迫处理的丹参茎叶,分别记为 SL-8、SL-9、SL-10,−80℃ 保存。精密称取丹参茎叶 1.00 g,用均质器磨碎,置三角瓶中,加入 80% 乙醇 100 mL,室温超声提取 30 min,静置。取上清液,0.22 μm 的微孔滤头滤过,取续滤液用于 HPLC 分析,另取 1 mL 提取液稀释 30 倍,作为总酚酸 (TPA) 含量测定和抗氧化活性评价供试品溶液。

1.4 丹参茎叶 TPA 含量的测定

采用福林酚法参考 Wang 等^[15]的方法优化后测定 SL-8、SL-9、SL-10 的 TPA 含量。取 0.3 mL 样品溶液,加入 0.25 mol·L^{−1} 的福林酚溶液 0.3 mL 混匀,静置 3 min 后加入 15% Na₂CO₃ 0.6 mL

混匀静置 30 min,4 000 r·min^{−1} 离心 5 min,取上清液,加入 96 孔板,每孔 300 μL,以 15% Na₂CO₃ 作空白对照,在 760 nm 波长下测定吸光度。每个样品重复测定 3 次,每次 3 孔,以丹酚酸 B 当量计算 TPA 含量,结果取平均值。

1.5 丹参茎叶主要酚酸成分含量的 HPLC 测定

丹参茎叶 8 种酚酸成分含量采用 HPLC 同时测定,使用 Agilent 1200-LC 高效液相色谱仪在岛津 ODS-3(5 μm,4.6×250 mm)色谱柱上完成。流动相为 0.1% 磷酸-水 (A)—乙腈 (B),流速 1 mL/min,柱温 40℃,进样量 10 μL,检测波长 280 nm。梯度洗脱程序:0~10 min,15%~20% B;10~11 min,20%~25% B;11~20 min,25%~50% B;20~21 min,50%~90% B;后运行 6 min。

标准曲线绘制:分别取没食子酸、丹参素、(+)-儿茶素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 标准品适量,分别制得浓度为 0.092 0、0.123 0、0.093 3、0.095 0、0.084 0、0.095 0、0.079 8 和 0.038 5 mg/mL 的混标溶液,并稀释为一系列浓度梯度。取不同浓度混标进样,按上述色谱方法进行 HPLC 分析,以浓度 (X,mg/mL) 为横坐标,峰面积 (Y) 为纵坐标,拟合标准曲线 (表 1)。另取 1.3 中样品溶液在相同条件下进行 HPLC 分析,采用标准曲线法计算各样品中酚酸含量,平行测定 3 次,结果取平均值。

1.6 丹参茎叶抗氧化活性评价

1.6.1 DPPH·清除率的测定 将 Wu 等的方法^[16]改进,测定 DPPH·清除率。在 96 孔板中加入 0.1 mg·mL^{−1} 的 DPPH-乙醇溶液 200 μL,然后依次加入 1.3 节稀释 30 倍的样品溶液 0、10、20、30、40、50、60 和 70 μL,用 80% 乙醇补足 300 μL,室温

表 1 8 种酚酸标准曲线
Table 1 Standard curves of 8 phenolic acids

酚酸 Phenolic acid	标准曲线 Standard curve	线性范围 Linear range/(mg·mL ^{−1})
没食子酸 Gallic acid	Y=35592X+74.698,R ² =0.9995	0.004 6~0.046 0
丹参素 Danshensu	Y=4167.4X+6.9467,R ² =0.9952	0.005 6~0.123 0
(+)-儿茶素 Cianidanol	Y=7355.9X−0.2841,R ² =0.9999	0.006 2~0.062 2
原儿茶醛 Protocatechualdehyde	Y=66490X−9.8413,R ² =0.9999	0.003 9~0.077 0
咖啡酸 Caffeic acid	Y=35918X+0.3993,R ² =1	0.004 2~0.063 0
迷迭香酸 Rosmarinic acid	Y=22984X+0.2813,R ² =1	0.003 9~0.077 0
丹酚酸 B Salvianolic acid B	Y=11184X+1.349,R ² =0.9999	0.008 0~0.079 8
丹酚酸 A Salvianolic acid A	Y=28223X+1.1983,R ² =1	0.003 9~0.038 5

避光反应 30 min,并在 517 nm 处测定溶液吸光度。VC 作阳性对照,所有试验重复测定 3 次。按下式计算 DPPH · 清除率:

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中, A_1 为样品 + DPPH · 溶液的吸光度; A_2 为样品 + 80%乙醇的吸光度; A_0 为 80%乙醇 + DPPH · 溶液的吸光度。

1.6.2 ABTS · ⁺清除率 将 Wu 等的方法^[16]改进后进行 ABTS · ⁺清除率测定。在 96 孔板中加入 ABTS · ⁺工作液(734 nm 处吸光度 A_{734} 在 0.700 左右)200 μL ,然后依次加入 1.3 节稀释 30 倍的样品溶液 0、10、20、30、40、50、60 和 70 μL ,用 80%乙醇补足 300 μL ,避光室温静置 10 min,在 734 nm 处测定吸光度。以 VC 作阳性对照,所有试验重复测定 3 次。按下式计算 ABTS · ⁺清除率:

$$\text{ABTS} \cdot \text{清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中, A_1 为样品 + ABTS · ⁺的吸光度; A_2 为样品 + 80%乙醇的吸光度; A_0 为 80%乙醇 + ABTS · ⁺的吸光度。

1.7 数据处理

使用 Excel 2016 对原始数据进行汇总、整理,采用 SPSS statistics 20 进行单因素方差分析(Duncan’s multiple range tests, $P < 0.05$)、计算抗氧化的 IC50 值和进行相关性分析,所有数据为平均值 $\pm$ SD($n = 3$)。

2 结果与分析

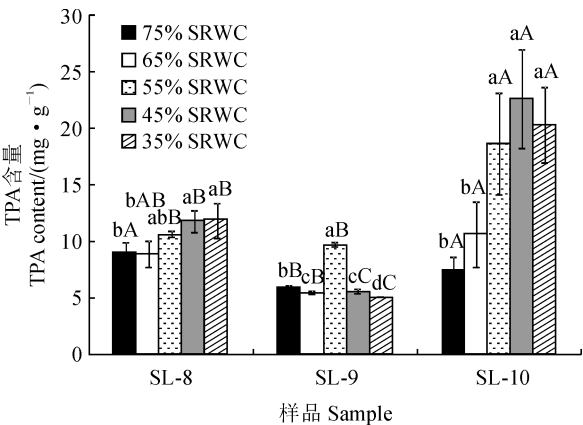
2.1 持续水分胁迫对丹参茎叶 TPA 含量的影响

从图 1 可知,在持续水分胁迫条件下,丹参 8 月份茎叶(SL-8)中总酚酸(TPA)的含量随着土壤相对含水量(SRWC)降低而逐渐增加,在 SRWC 为 35%时(重度干旱)达到最高(11.86 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),并显著高于 SRWC 为 75%(偏湿)和 65%(适宜)水分胁迫处理,而与 SRWC 为 55%(轻度干旱)和 45%(中度干旱)时无显著差异。丹参 9 月份茎叶(SL-9)TPA 含量则随着 SRWC 降低先升后降,并在轻度干旱时达到最高(9.59 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),此时显著高于其他 4 个水分处理组。丹参 10 月份茎叶(SL-10)的 TPA 含量随着 SRWC 的降低呈增加的趋势,并在中度干旱时达到最高(22.64 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),但与轻度和重度干旱处理均无显著差异,而轻度到重度干旱胁迫处理均显著高于偏湿和适宜水分处理组。

同时,在相同水分处理条件下,各月份丹参茎叶样品 TPA 含量均以 SL-9 最低,仅为 SL-8 的 41.4%~91.1%和 SL-10 的 24.0%~79.9%;在偏湿处理组以 SL-8 最高,而在适宜水分和干旱胁迫下(SRWC 为 35%~65%时)均以 SL-10 最高。以上结果表明,丹参茎叶 TPA 含量对土壤水分响应敏感,不同月份样品 TPA 含量随着 SRWC 降低总体呈相似的增加趋势,但不同月份间差异显著,均以 10 月份样品含量较高。

2.2 持续水分胁迫对丹参茎叶主要酚酸含量的影响

土壤水分胁迫处理丹参茎叶样品中 8 种酚酸的含量测定结果(图 2、表 2)显示,迷迭香酸、丹酚酸 B、咖啡酸和原儿茶醛在各月份和各处理组均有显著积累,而丹参素和丹酚酸 A 主要在 SL-9 的适宜水分和重度干旱处理组积累,(+)-儿茶素仅在 SL-9 的偏湿处理组有检出(0.005 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),没食子酸在所有样品中均未检出。同时,通过不同月份样品对比发现,迷迭香酸、丹参素在 SL-9 中积累显著高于 SL-8 和 SL-10,原儿茶醛在 SL-8 中积累较多,丹酚酸 B 在所有月份样品中均有积累。另外,随着 SRWC 降低,丹参茎叶迷迭香酸含量呈现 V 形变化,而丹参素含量却显著增加。



SL-8、SL-9 和 SL-10 分别表示 8、9、10 月份的样品;小写字母表示相同月份内水分处理组间在 0.05 水平差异显著($P < 0.05$);大写字母表示相同处理组内不同月份在 0.05 水平差异显著($P < 0.05$)

图 1 8—10 月份持续水分胁迫下丹参茎叶中 TPA 含量

SL-8,SL-9 and SL-10 stand for the sample collected in August, September and October, respectively; Different normal letters within same month means significant differences among different treatments at 0.05 level ($P < 0.05$); Capital letters indicate significant differences at the 0.05 level between different months in the same treatment ($P < 0.05$)

Fig. 1 TPA content in CDS-1 stems and leaves under continuous water stress in August, September and October

表 2 不同月份水分胁迫对 8 种酚酸含量影响
Table 2 Effects of water stress in different months on the contents of 8 phenolic acids/(mg · g⁻¹)

SRWC	样品 Sample	没食子酸 Gallic acid	丹参素 Danshensu	(+)-儿茶素 Cianidanol	原儿茶醛 Protocatechualdehyde	咖啡酸 Caffeic acid	迷迭香酸 Rosmarinic acid	丹酚酸 B Salvianolic acid B	丹酚酸 A Salvianolic acid A
75%	SL-8	—	—	—	0.022±0.002b	—	1.061±0.138e	0.069±0.008d	—
	SL-9	—	0.063±0.027cd	0.005±0.002a	—	—	3.772±0.155a	0.120±0.049c	0.017±0.009d
	SL-10	—	—	—	0.007±0.004d	0.032±0.014efg	1.237±0.159de	0.030±0.015e	—
65%	SL-8	—	0.157±0.013a	—	0.019±0.004b	—	1.128±0.165e	0.059±0.019de	—
	SL-9	—	0.053±0.015de	—	0.006±0.003d	0.090±0.004a	3.605±0.164a	0.068±0.012de	0.094±0.011b
	SL-10	—	—	—	0.007±0.004d	0.035±0.011def	1.234±0.253de	0.048±0.010de	—
55%	SL-8	—	—	—	0.021±0.004b	—	1.152±0.132e	0.226±0.023a	—
	SL-9	—	0.036±0.013e	—	0.006±0.001cd	0.053±0.004bc	2.773±0.144b	0.227±0.035a	0.041±0.003c
	SL-10	—	—	—	0.005±0.001cd	0.026±0.008fg	1.585±0.178d	0.138±0.017bc	0.016±0.002d
45%	SL-8	—	0.088±0.011b	—	0.028±0.006a	—	1.959±0.273c	0.166±0.011b	—
	SL-9	—	0.080±0.024bc	—	0.006±0.001cd	0.047±0.011cd	3.591±0.184a	0.115±0.024c	0.017±0.003d
	SL-10	—	—	—	0.007±0.002cd	0.020±0.008g	3.435±0.275a	0.030±0.008e	—
35%	SL-8	—	—	—	0.021±0.006b	0.045±0.005cde	1.222±0.062e	0.133±0.007b	—
	SL-9	—	0.100±0.027b	—	0.006±0.002cd	0.065±0.013b	3.496±0.164a	0.106±0.017c	0.028±0.005cd
	SL-10	—	—	—	0.011±0.004c	—	2.974±0.306b	0.070±0.017d	0.123±0.013a

注:SRWC,土壤相对含水量;同列数值后不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著
Note: SRWC, Soil relative water content; Different letters in the same column indicate significant differences between treatments at 0.05 level

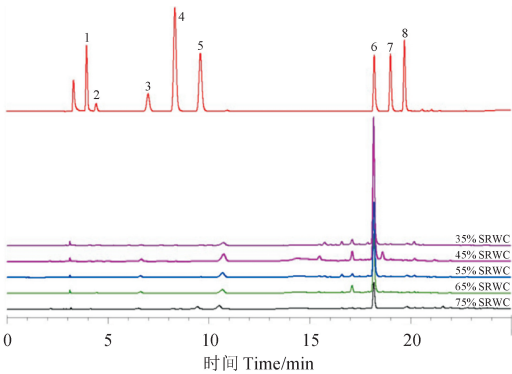


图 2 SL-10 不同土壤相对含水量胁迫样品酚酸 HPLC 图
1. Gallic acid; 2. Danshensu; 3. Cianidanol; 4. Protocatechualdehyde;
5. Caffeic acid; 6. Rosmarinic acid; 7. Salvianolic acid B;
8. Salvianolic acid A

Fig. 2 HPLC chromatograms of phenolic acid determination of SL-10 samples under water stress in different SRWC

2.3 持续水分胁迫对丹参茎叶抗氧化活性的影响

图 3 显示,不同 SRWC 处理下各月份丹参茎叶提取物都具有较强的抗氧化活性,且其 DPPH · 和 ABTS · ⁺清除率具有显著的浓度依耐性。其中,SL-8 的抗氧化活性从强到弱的依次是 SRWC 为 45%、55%、65%、75%、35%水分处理组,表明 SL-8 在轻度和中度干旱胁迫下抗氧化活性最强,但在重度干旱胁迫下抗氧化活性最弱;不同 SRWC 处理的 SL-9 的 ABTS · ⁺、DPPH · 清除能力差异不大,SL-9 样品在偏湿或者适宜水分下的抗氧化活性强于干旱胁迫;SL-10 的 ABTS · ⁺清除率随 SRWC 的降低逐渐增强,而对 DPPH · 的清除率从强到弱依次是 SRWC 为 45%、35%、65%、55%、75%水分处理组,表明在 10 月份丹参茎叶酚酸在中度和重度干旱下具有更强的抗氧化活性。

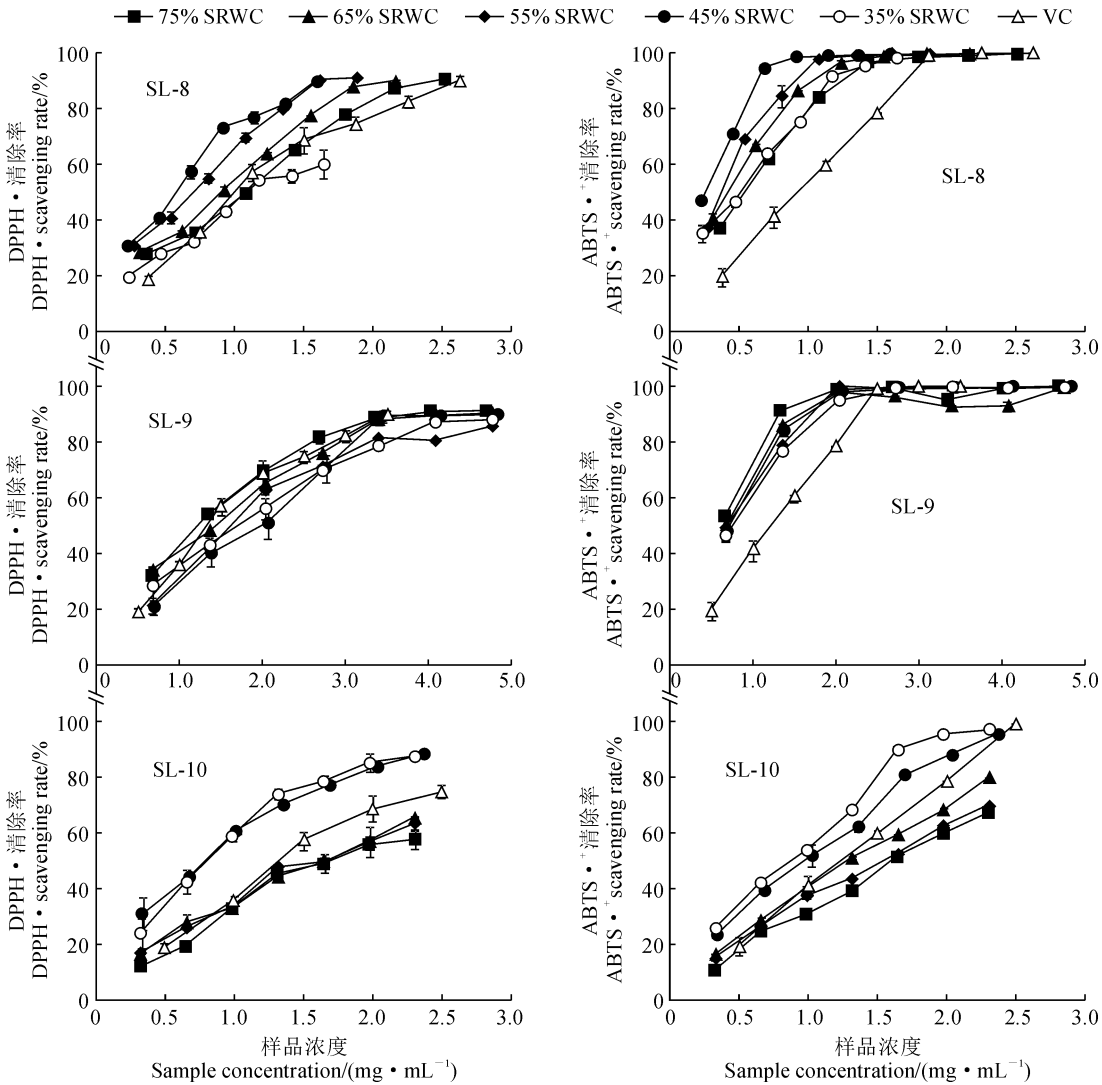


图 3 不同月份水分胁迫样品的 DPPH · 和 ABTS · ⁺清除率

Fig. 3 DPPH · and ABTS · ⁺ scavenging rates of different month samples under water stress

3 讨 论

3.1 持续水分胁迫与丹参茎叶酚酸含量的关系

干旱胁迫会在植物中诱导氧化应激反应,会产生过量活性氧(ROS)^[17-18]。酚类(酚酸)是植物中适应性最强、分布最广泛的次级代谢产物之一,参与植物抵御外部环境压力,能够清除多余 ROS^[19]。酚酸在植物体内的生物合成通常是由逆境胁迫所引起,其中最重要的是干旱(水分)胁迫,干旱胁迫下卡琪花蒂玛(*Labisia pumila*)^[20]、撒尔维亚(*Salvia officinalis*)^[21]和锡那罗亚鼠尾草(*Salvia sinaloensis*)^[22]中酚类化合物的生物合成有所增加。丹参的酚酸类化合物主要由苯丙烷类代谢途径产生,除丹参素和咖啡酸可由氨基酸直接氧化脱氨基生成外,其余均可看作二者的衍生物^[23]。苯丙氨酸解氨酶(PAL)是苯丙烷类途径的关键限速酶,催化 L-苯丙氨酸转化为酚酸合成主要中间体反式肉桂酸^[24]。酚酸类化合物的积累可能与水分胁迫下 PAL 的活化有关, PAL 的活性增加了对胁迫的反应,通过增加酚酸的含量来增强抗氧化能力,在植物对非生物胁迫的耐受性方面发挥重要作用^[25-26]。

本研究结果表明丹参对干旱的耐受性可能与叶片中丰富的酚酸有关,当土壤的相对含水量降低到一定程度达到干旱水平时,丹参会启动酚酸相关代谢途径关键酶系统,激活其中的关键酶,从而影响酚酸类物质的合成与积累^[27]。可能是由于适当干旱胁迫提高了酚酸合成相关酶的活性,而偏湿或适宜水分下的酶活性不如中、重度干旱时的酶活性;但是严重干旱反而会降低酶活性,不利于酚酸的合成与积累^[28]。干旱下丹参通过增加具有抗氧化活性的酚酸类物质含量而适应环境变化^[29]。

3.2 持续水分胁迫与丹参茎叶抗氧化活性的关系

干旱会在植物中诱导氧化应激反应,产生大量 ROS,打破植物体内氧化还原平衡,影响植物正常生长,酚酸类化合物能够有效清除 ROS,对植物起到保护作用^[26]。本研究通过不同程度持续水分胁迫下丹参茎叶酚酸的抗氧化活性分析发现,它们都具有较强清除 DPPH· 和 ABTS·⁺ 的能力,与 VC 活性接近。其中,SL-8 中度干旱处理组的 DPPH· 清除活性较偏湿处理组显著提高 40.5%,ABTS·⁺ 清除活性提高了 39.3%;SL-10 中度干旱处理组的 DPPH· 和 ABTS·⁺ 的清除活性较偏湿处理组分别显著提高了 58.7%和 53.8%。在轻、中度干旱胁迫下,丹参茎叶酚酸的抗氧化活性大于偏湿或重度

干旱处理,表明适度干旱有利于提高丹参茎叶抗氧化活性,但过度干旱或偏湿反而会降低抗氧化活性。

同时,在持续水分胁迫下,丹参茎叶总酚酸(TPA)含量变化的趋势与其抗氧化活性变化的趋势一致,酚酸积累多的丹参处理组其抗氧化活性也较高。李晶等^[30]研究发现南丹参的抗氧化活性是其多个化学成分共同作用的结果,其研究结果表明丹酚酸 B、原儿茶醛、丹参素、咖啡酸等与抗氧化活性的相关性较大,且均与抗氧化活性呈正相关。由此可见持续水分胁迫对丹参茎叶抗氧化活性的影响可能表现在水分胁迫影响了丹参茎叶酚酸的含量的积累,从而影响其抗氧化活性能力。

此外,本研究结果还发现 SL-8 和 SL-10 的中度和重度干旱胁迫更利于丹参茎叶 TPA 的积累和抗氧化活性的提高,而 SL-9 中轻度干旱胁迫更利于 TPA 的积累和抗氧化活性的提高。对于相同土壤相对含水量处理组,丹参茎叶 TPA 含量和抗氧化活性时空(月份间)变化显著。就抗氧化活性而言,除重度干旱处理组外,其他处理组整体趋势为 SL-8 抗氧化活性最强,SL-9 次之,SL-10 最弱。引起相同处理的不同月份样品之间差异的原因可能是由于 8 月、9 月、10 月 3 个月的气候变化,可能是由于高温和低温胁迫与水分胁迫共同导致。有研究表明,温度的逐渐降低、日照时间减少等可能会影响到丹参植株的生长、酶的活性、代谢物的积累等^[31]。后续还需要进一步研究温度等气候因子对丹参茎叶酚酸含量的影响,以期能充分利用丹参植物资源,促进产业发展。

4 结 论

研究表明,持续水分胁迫对丹参茎叶酚酸含量和抗氧化活性有显著影响。但水分胁迫压力程度和时间段(8 月、9 月和 10 月)的不同,丹参茎叶总酚酸、主要酚酸含量及其抗氧化能力都存在差异。中度和重度干旱胁迫下丹参茎叶酚酸含量最高,10 月份茎叶总酚酸含量最高,8 月份茎叶的总体抗氧化活性最强。土壤相对含水量为 45%时(中度干旱)8 月份和 9 月份茎叶中主要酚酸含量最高,在 9 月份茎叶中不同处理组差异不大。本研究丹参茎叶酚酸含量的增加与文献中其他植物和丹参品种的数据基本一致,表明这可能是丹参对干旱诱导产生的 ROS 的一种应激反应。这些结果还表明,干旱可以成功地用于增强丹参茎叶中酚酸等抗氧化物质的合成和积累,并可以通过科学的灌溉技术来增加丹参茎叶中酚酸的含量,促进丹参的综合利用。

参考文献：

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京：科学出版社，1990：145.

[2] 张 利. 川丹参及其近缘物种资源植物研究[M]. 北京：科学出版社，2016：4-5.

[3] ZHANG H, LIU Y Y, JIANG Q, *et al.* Salvianolic acid A protects RPE cells against oxidative stress through activation of Nrf2/HO-1 signaling[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, **69**: 219-228.

[4] 孙宁远, 朱雪林, 陈 君. 丹参化学成分抗纤维化药理作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, **26**(22): 201-208.

SUN N Y, ZHU X L, CHEN J. Research progress of anti-fibrosis pharmacological effect and mechanisms of chemical components in *Salviae miltiorrhizae* Radix et Rhizoma[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2020, **26**(22): 201-208.

[5] 梁文仪, 陈文静, 杨光辉, 等. 丹参酚酸类成分研究进展[J]. 中国中药杂志, 2016, **41**(5): 806-812.

LIANG W Y, CHEN W J, YANG G H, *et al.* Research progress on salvianolic acids of *Salviae miltiorrhizae*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2016, **41**(5): 806-812.

[6] 万新焕, 王瑜亮, 周长征, 等. 丹参化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 2020, **51**(3): 788-798.

WAN X H, WANG Y L, ZHOU C Z, *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2020, **51**(3): 788-798.

[7] 邓婉月, 冷秋彦, 杨在君, 等. 干旱胁迫对盆栽‘川丹参 1 号’生理指标及主要活性成分含量的影响[J]. 作物杂志, 2021, (1): 74-81.

DENG W Y, LENG Q Y, YANG Z J, *et al.* Effects of simulated drought stress on the physiological indexes and contents of active components of potted ‘Chuan Danshen 1’ [J]. *Crops*, 2021, (1): 74-81.

[8] 王 萌, 张力文, 谢显莉, 等. 丹参新品种‘川丹参 1 号’[J]. 园艺学报, 2012, **39**(11): 2 333-2 334.

WANG M, ZHANG L W, XIE X L, *et al.* A new *Salvia miltiorrhiza* cultivar ‘Chuan Danshen 1’ [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, **39**(11): 2 333-2 334.

[9] 周广生, 王 晶, 蒯 婕, 等. 专辑导读：加强大田经济作物栽培措施与环境/资源配置的互作研究、推动产业高效优质发展[J]. 作物学报, 2021, **47**(9): 1 633-1 638.

ZHOU G S, WANG J, KUAI J, *et al.* Editorial: strengthening the research on the interaction between cultivated measures and environment/resource allocation of field economic crops to promote the development of industry with high efficiency and high quality [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2021, **47**(9): 1 633-1 638.

[10] CASER M, D'ANGIOLILLO F, CHITARRA W, *et al.* Ecophysiological and phytochemical responses of *Salvia sinaloensis* Fern. to drought stress[J]. *Plant Growth Regulation*, 2018, **84**(2): 383-394.

[11] LIU J H, ZHANG Y Q, LI J, *et al.* Influence of water stress on the physiological and biochemical characteristics of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *Agricultural Science and Technology*, 2010, **11**(6): 22-25.

[12] 梁 娟, 郭泽宇, 叶 漪. 不同土壤水分条件对七叶一枝花光合特性及有效成分皂苷含量的影响[J]. 植物生理学报, 2014, **50**(1): 56-60.

LIANG J, GUO Z Y, YE Y. Effects of different soil moisture conditions on photosynthetic characteristics and effective content of saponin of *Paris polyphylla* [J]. *Plant Physiology Journal*, 2014, **50**(1): 56-60.

[13] 刘景玲, 齐志鸿, 郝文芳, 等. UV-B 辐射和干旱对丹参生长和叶片中酚酸类成分的影响[J]. 生态学报, 2015, **35**(14): 4 642-4 650.

LIU J L, QI Z H, HAO W F, *et al.* The effects of drought and UV-B radiation on the growth and the phenolic compounds of the *Salvia miltiorrhiza* Bunge leaf[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, **35**(14): 4 642-4 650.

[14] 刘大会, 郭兰萍, 黄璐琦, 等. 土壤水分含量对丹参幼苗生长及有效成分的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, **36**(3): 321-325.

LIU D H, GUO L P, HUANG L Q, *et al.* Effects of soil water content on seedlings growth and active ingredients of *Salvia miltiorrhiza*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2011, **36**(3): 321-325.

[15] WANG J, VANGA S K, RAGHAVAN V. High-intensity ultrasound processing of kiwifruit juice: Effects on the ascorbic acid, total phenolics, flavonoids and antioxidant capacity [J]. *LWT*. 2019, **107**: 299-307.

[16] WU Y C, JIANG Y Y, ZHANG L, *et al.* Chemical profiling and antioxidant evaluation of *Paeonia lactiflora* Pall. ‘Zhongjiang’ by HPLC-ESI-MS combined with DPPH assay [J]. *Journal of Chromatographic Science*, 2021, **59**(9): 795-805.

[17] MUNNÉ-BOSCH S, PENUELAS J. Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants [J]. *Planta*, 2003, **217**(5): 758-766.

[18] 张明聪, 何松榆, 秦 彬, 等. 外源褪黑素对干旱胁迫下春大豆品种绥农 26 形态、光合生理及产量的影响[J]. 作物学报, 2021, **47**(9): 1 791-1 805.

ZHANG M C, HE S Y, QIN B, *et al.* Effects of exogenous melatonin on morphology, photosynthetic physiology, and yield of spring soybean variety Suinong 26 under drought stress[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2021,**47**(9): 1 791-1 805.

[19] DI FERDINANDO M, BRUNETTI C, AGATI G, *et al.* Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2014,**103**: 107-116.

[20] JAAFAR H Z E, IBRAHIM M H, MOHAMAD FAKRI N F M. Impact of soil field water capacity on secondary metabolites, phenylalanine ammonia-lyase (PAL), malondialdehyde (MDA) and photosynthetic responses of Malaysian Kacip Fatimah (*Labisia pumila* Benth) [J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2012,**17**(6): 7 305-7 322.

[21] RADWAN A, KLEINWÄCHTER M, SELMAR D. Impact of drought stress on specialised metabolism: Biosynthesis and the expression of monoterpene synthases in sage (*Salvia officinalis*)[J]. *Phytochemistry*, 2017,**141**: 20-26.

[22] CASER M, D'ANGIOLILLO F, CHITARRA W, *et al.* Ecophysiological and phytochemical responses of *Salvia sinaloensis* Fern. to drought stress[J]. *Plant Growth Regulation*, 2018,**84**(2): 383-394.

[23] 刘晓蕾. 干旱下丹参酚酸类化合物积累机制及其抗旱性研究[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2011: 7-8, 31-32.

[24] KACPERSKA A. Water Potential Alterations—A Prerequisite or a Triggering Stimulus for the Development of Freezing Tolerance in Overwintering Herbaceous Plants[M]. Advances in Plant Cold Hardiness. Boca Raton: CRC Press, 2018: 73-91.

[25] GIORGI A, MINGOZZI M, MADEO M, *et al.* Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rechb)[J]. *Food Chemistry*, 2009,**114**(1): 204-211.

[26] BETTAIEB I, HAMROUNI-SELLAMI I, BOURGOU S *et al.* Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011,**33**: 1 103-1 111.

[27] 金丽萍, 崔世茂, 杜金伟, 等. 干旱胁迫对不同生态条件下蒙古扁桃叶片 PAL 和 C₄H 活性的影响[J]. 华北农学报, 2009,**24**(5): 118-122.

JIN L P, CUI S M, DU J W, *et al.* Effects of drought stress in different ecological conditions of the *Prunus mongolica* maxim almond leaves in PAL and C₄H activity [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2009,**24**(5): 118-122.

[28] 王 微. 土壤水分条件对丹参生长和化学成分含量的影响、机制及其应用基础[D]. 上海: 复旦大学, 2014: 84-85.

[29] CASER M, CHITARRA W, D'ANGIOLILLO F, *et al.* Drought stress adaptation modulates plant secondary metabolite production in *Salvia dolomitica* Codd[J]. *Industrial Crops and Products*, 2019,**129**: 85-96.

[30] 李 晶, 沈震亚, 陈 超, 等. 南丹参中酚酸类成分抗氧化活性谱效关系研究[J]. 时珍国医国药, 2017,**28**(12): 2 895-2 897.

LI J, SHEN Z Y, CHEN C, *et al.* The spectral efficiency relationship research on the antioxidant activity in phenolic compounds in *Salvia bowleyana* Dunn[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2017,**28**(12): 2 895-2 897.

[31] 谭友莉, 马云桐, 文 静, 等. 气候变暖对药用植物次生代谢产物的影响[J]. 中药与临床, 2014,**5**(5): 1-4+28.

TAN Y L, MA Y T, WEN J, *et al.* Influence of climate warming on the medicinal plant of secondary metabolism[J]. *Pharmacy and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2014,**5**(5): 1-4.

(编辑:裴阿卫)