

中波紫外线对三叶青酚类物质质量分数、抗氧化能力及基因表达的影响

夏敬青^{1,2}, 刘海荣³, 顾依雯^{1,2}, 王子玥^{1,2}, 邢巧月^{1,2}, 张宇翔^{1,2}, 李 姍^{1,2}, 白 岩^{1,2}

(1. 浙江农林大学 浙江省中药资源保护与创新重点实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 食品与健康学院, 浙江 杭州 311300; 3. 中国储备粮管理集团有限公司浙江分公司, 浙江 杭州 311500)

摘要: 【目的】探究短时间中波紫外线 (UV-B) 辐射对三叶青 *Tetrastigma hemsleyanum* 酚类成分、抗氧化能力及相关基因表达的影响。【方法】将 3 年生三叶青苗经 UV-B 持续辐射 12.0 h, 在 0、0.5、1.0、3.0、6.0 和 12.0 h 观察表型; 另取三叶青辐射 1.0 和 3.0 h (记为 T₁ 和 T₃) 并补充暗处理至 24.0 h (记为 T₁₊₂₃ 和 T₃₊₂₁), 以未经处理为对照 (ck), 进行酚类物质 (总酚和总黄酮) 质量分数、抗氧化能力和叶片中抗逆酶活性、丙二醛 (MDA) 质量摩尔浓度测定以及转录组分析。【结果】持续 UV-B 辐射对三叶青表型有影响, 3.0 h 组叶片局部发黄, 6.0 和 12.0 h 组叶片明显发黄和略微卷曲。叶片和块根的总酚 (2.65 和 2.63 mg·g⁻¹) 和总黄酮 (7.16 和 7.30 mg·g⁻¹)、块根中的抗氧化能力 (86.56%) 均在 T₁₊₂₃ 组达到最大值。同时, UV-B 辐射后施以黑暗处理可促进过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的大幅提升, 且在 T₁₊₂₃ 组达到最大, MDA 质量摩尔浓度在 T₃₊₂₁ 组达到最高 (7.21 mmol·g⁻¹)。UV-B 辐射和黑暗处理下调了黄酮合成通路基因 (*ThF3H*、*ThANS*、*ThCHS*、*ThANR* 等) 和上调了氧化相关调节因子 (*CAT* 和 *SOD*) 的表达。【结论】UV-B 辐射后增加黑暗处理可提高三叶青酚类物质质量分数、抗氧化能力及抗逆酶活性, 且在 T₁₊₂₃ 组达最大值, 同时下调黄酮合成酶基因表达, 上调氧化应激相关基因的表达。图 7 表 2 参 52

关键词: 三叶青; 中波紫外线胁迫; 多酚类物质; 抗氧化能力; 差异表达

中图分类号: S949.95; R284.1 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2024)02-0223-11

Effect of UV-B radiation on mass fraction of phenolic substances, antioxidant capacity and genes expression in *Tetrastigma hemsleyanum*

XIA Jingqing^{1,2}, LIU Hairong³, GU Yiwen^{1,2}, WANG Ziyue^{1,2}, XING Qiaoyue^{1,2},
ZHANG Yuxiang^{1,2}, LI Shan^{1,2}, BAI Yan^{1,2}

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Resources Protection and Innovation of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. College of Food and Health, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 3. China Grain Reserve Management Group Ltd. Company Zhejiang Branch, Hangzhou 311500, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] This study aims to investigate the effects of UV-B radiation on phenolic components, antioxidant capacity and relation genes expression in *Tetrastigma hemsleyanum*. [Method] Three-year-old *T. hemsleyanum* seedlings were subjected to continuous UV-B radiation for 12.0 h and their phenotypes were observed at 0, 0.5, 1.0, 3.0, 6.0, and 12.0 h. With those untreated as control (ck), some other *T. hemsleyanum* were irradiated for 1.0 and 3.0 h (T₁ and T₃), and supplemented with dark treatment for 24.0 h (T₁₊₂₃ and T₃₊₂₁). Mass fractions of phenolic substances (total phenols and total flavonoids), antioxidant capacity, anti-stress

收稿日期: 2023-06-30; 修回日期: 2023-11-06

基金项目: 浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划项目 (2023C02054); 浙江农林大学发展基金资助项目 (2022LFR111)

作者简介: 夏敬青 (ORCID: 0009-0009-1465-5909), 从事药用植物次生代谢调控研究。E-mail: xiajingqing@stu.zafu.edu.cn. 通信作者: 白岩 (ORCID: 0000-0002-0068-2174), 副教授, 从事林下药材品质调控和中药资源挖掘整理研究。E-mail: hzbaian@zafu.edu.cn

enzyme activity, malondialdehyde (MDA) mass molar concentration in leaves were determined and transcriptome analysis was made. [Result] Continuous UV-B radiation had an effect on the phenotype of *T. hemsleyanum*. The leaves of 3-h group were partially yellowed, while the leaves of 6-h and 12-h groups were significantly yellowed and slightly curled. The mass fractions of total phenols (2.65 and $2.63 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) and total flavonoids (7.16 and $7.30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) in leaves and root tubers, as well as the antioxidant capacity (86.56%) in root tubers reached the maximum in T_{1+23} group. Meanwhile, dark treatment after UV-B radiation promoted a significant increase in activities of catalase (CAT), peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD), which reached the maximum in T_{1+23} group. The MDA mass molar concentration was the highest in T_{3+21} group ($7.21 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$). UV-B radiation and dark treatment down-regulated the expression of flavonoid synthesis pathway genes (*ThF3H*, *ThANS*, *ThCHS*, *ThANR*, etc.) and up-regulated the expression of oxidation-related regulators (*CAT* and *SOD*). [Conclusion] Darkness treatment after UV-B radiation increases the mass fraction of phenolic substances, antioxidant capacity and anti-stress enzymes activity of *T. hemsleyanum*, reaching the maximum in T_{1+23} group. The expression of flavonoid synthase genes is down-regulated and the expression of oxidative stress-related genes is up-regulated. [Ch, 7 fig. 2 tab. 52 ref.]

Key words: *Tetrastigma hemsleyanum*; UV-B stress; phenolic substances; antioxidant capacity; differential expression

三叶青 *Tetrastigma hemsleyanum* 为葡萄科 Vitaceae 崖爬藤属 *Tetrastigma* 三叶崖爬藤, 全株均具有药用价值^[1], 多以块根入药, 味微苦, 性平, 具有清热解毒、消肿止痛、化痰散结等功效^[2-4]。三叶青中的主要活性成分为酚类和黄酮类物质, 在植物中不仅表现出各种生理和药理活性, 包括抗氧化^[5]、抗炎^[6]和公认的抗癌活性^[7-8], 并且具有防御功能, 可以保护植物免受紫外线的伤害^[9]。

高剂量的紫外线辐射会诱导产生活性氧 (ROS), 进而损害多种细胞器和大分子物质 (如 DNA 和光合蛋白), 破坏光合功能, 导致生长减缓^[10-11]。但近年来的研究显示: 紫外辐射可以诱导植物加速次生代谢物的合成进程^[12-14], 例如, 紫外线促进铁线莲 *Clematis terniflora*^[15]、黄花蒿 *Artemisia annua*^[16]、黄连 *Coptis chinensis*^[17] 等植物合成酚类和黄酮类化合物, 从而降低紫外辐射的伤害。类黄酮质量分数与中波紫外线 (UV-B) 的持续辐射时间有关^[18], 例如, BAI 等^[19] 研究发现: 适当的 UV-B 和短波紫外线 (UV-C) 辐射 30~180 min 可提高三叶青中黄酮类成分质量分数, 黄酮类物质的种类和质量分数差异还与辐射时间有关。同时, UV-B 辐射也有利于植物抗逆能力的增加, 如 GAO 等^[20] 研究发现: 低剂量 UV-B 辐射能提高植物抗逆酶活性, LÜ 等^[21] 发现: 经 UV-B 处理后类黄酮生物合成酶基因 (*PAL*、*C4H*、*4CL*、*CHS1* 和 *DTX41*) 和抗逆性基因 (*MYB*、*WRKY*、*APX3* 和 *EX2*) 表达水平均上调。此外, 适当的黑暗处理并施加 UV-B 辐射对植物有积极影响, 如处理后的茶树 *Camellia sinensis*^[22] 可显著增加叶片中游离氨基酸质量分数, 降低可溶性蛋白质质量分数, 处理后的苹果 *Malus pumila*^[23] 可增加体内有效成分质量分数。但是, UV-B 辐射及黑暗处理对三叶青次生代谢的调控和有效成分影响还不清晰。

本研究探究 UV-B 辐射及黑暗补充处理对三叶青总酚和总黄酮类物质质量分数、抗氧化能力、抗逆酶活性及相关基因表达的影响, 以期有效利用环境因素提高三叶青药用价值提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

选取 3 年生三叶青成苗 (购自浙江省丽水市遂昌县种植基地) 作为研究材料, 经浙江农林大学周爱存博士鉴定为三叶青。使用盆栽 (直径为 20 cm) 方式种植于浙江省中药资源保护与创新重点实验室试验基地 ($30^{\circ}15'30.39''\text{N}$, $119^{\circ}43'26.92''\text{E}$)。单株种植, 种植所用土壤购自杭州锦海农业有限公司, 隔 1 d 浇水 1 次, 浇水量为 400 mL, 缓苗 2 个月于 2022 年 5—10 月进行取样。

选取生长健壮、无病虫害、苗高大小近似的三叶青苗, 随机分为 6 组, 分别移入置物架中, 由不透光黑布完全覆盖, 置物架中配置 40 W 的 UV-B (280~320 nm) 灯管 (南京华强电子有限公司), UV-B 辐射强度为 $10 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ 。持续辐射 12 h 并分别选取 0、0.5、1.0、3.0、6.0 和 12.0 h 共 6 个时间节点观察表

型。另取三叶青苗 5 组，以未经过 UV-B 辐射的植株作为对照 (ck)，分为 2 种处理 (UV-B 处理和 UV-B+暗处理) 进行，即经过 UV-B 辐射 1.0、3.0 h 后，一部分立即取样 (处理代号分别为 T_1 和 T_3)，另一部分转移进行暗处理至完整处理时间为 24.0 h (代号分别为 T_{1+23} 和 T_{3+21})。处理结束后取样，放入密封袋，立即液氮中冷冻并超低温冰箱保存 ($-80\text{ }^\circ\text{C}$)，备用。

1.2 总酚及总黄酮质量分数测定

精密称取新鲜三叶青块根和叶片各 1 g，参考韩敏琪^[24]的方法制备提取液；参考 AL-KHAYRI 等^[25]的方法测定总酚质量分数；参考 BAI 等^[19]的方法测定总黄酮质量分数。

1.3 抗氧化能力测定

取 1.2 中提取液，参考刘希达等^[26]的方法测定三叶青叶片及块根中 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 清除率，计算抗氧化能力。

1.4 抗逆酶活性及 MDA 质量摩尔浓度测定

参考李世玉等^[27]的方法测定过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及丙二醛 (MDA) 质量摩尔浓度。

1.5 转录组测序

收集 ck、 T_1 、 T_{1+23} 、 T_3 和 T_{3+21} 处理叶片样本在液氮中速冻。样品在 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 的冰箱中保存，24 h 后送至南京派森诺基因技术有限公司进行 RNA 提取和转录组测序。通过 Oligo (dT) 富集 mRNA，通过 Agilent 2100 Bioanalyzer 对文库进行质检。样品经过 RNA 抽提、纯化、建库之后，采用第 2 代测序技术 (next-generation sequencing, NGS)，基于 Illumina 测序平台，进行双末端 (paired-end, PE) 测序。对原始下机数据中带接头、低质量的读长 (reads) 进行过滤，以获得去除接头和低质量 reads 后的数据 (clean reads)，并组装成非冗余序列 (unigene)，计算每个样品的 unigene 表达水平。对于多个样品，根据要求检测样品间的差异表达基因，并对差异表达基因进行深入的聚类和功能富集分析 ($|\log_2 C_F| \geq 2$, $P < 0.05$ 。 C_F 为差异倍数)。

1.6 数据分析

利用 Origin 2021 和 SPSS 27 计算平均值 \pm 标准差，运用单因素方差分析法 (one-way ANOVA) 和最小显著性差异法 (LSD) 进行方差分析和多重比较，用 Origin 2021 进行皮尔逊相关性分析，利用 TB tools 进行热图分析。

2 结果与分析

2.1 UV-B 持续辐射导致三叶青表型产生变化

UV-B 持续辐射下，三叶青苗的生长情况是反映其对胁迫响应最直观的指标。与对照组相比，辐射时长为 0.5 和 1.0 h 的三叶青苗并没有明显的外观差异，辐射 3.0 h 的叶片有局部发黄，辐射 6.0 和 12.0 h 的三叶青叶片有明显发黄和略微卷曲 (图 1)。因此本研究选用紫外光 UV-B 辐射 1.0 和 3.0 h 及补充黑暗处理至 24.0 h 的三叶青进行酚类化合物质量分数及抗氧化能力变化测定。

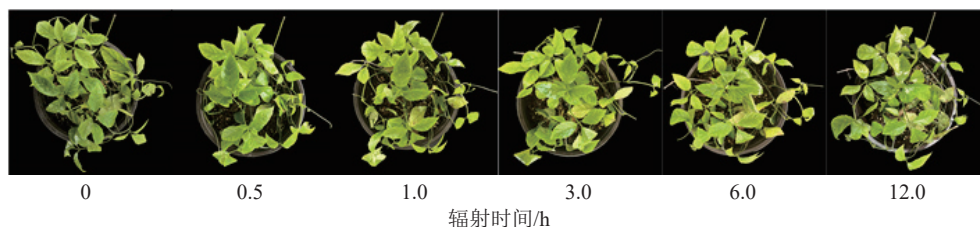


图 1 12.0 h 内 UV-B 胁迫处理下三叶青苗的生长情况

Figure 1 Growth of *T. hemsleyanum* under UV-B stress

2.2 UV-B 处理对酚类化合物的影响

2.2.1 UV-B 辐射对三叶青总酚质量分数的影响 除 T_1 处理外，三叶青总酚质量分数在叶片 (图 2A) 和块根 (图 2B) 中的变化趋势基本一致。在叶片中， T_1 处理的总酚质量分数是 T_3 处理的 1.84 倍，分别为 2.30、1.25 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ；在块根中， T_3 处理的总酚质量分数是 T_1 处理的 1.56 倍，分别为 1.45、0.93 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

说明块根和叶片对于 UV-B 辐射的响应是不同步的。UV-B 辐射后经过黑暗处理,总酚质量分数都有明显提升。 T_{1+23} 处理的叶片和块根中的总酚质量分数都达到了最大值,分别为 ck 的 2.23 和 1.87 倍,差异极显著 ($P < 0.001$)。

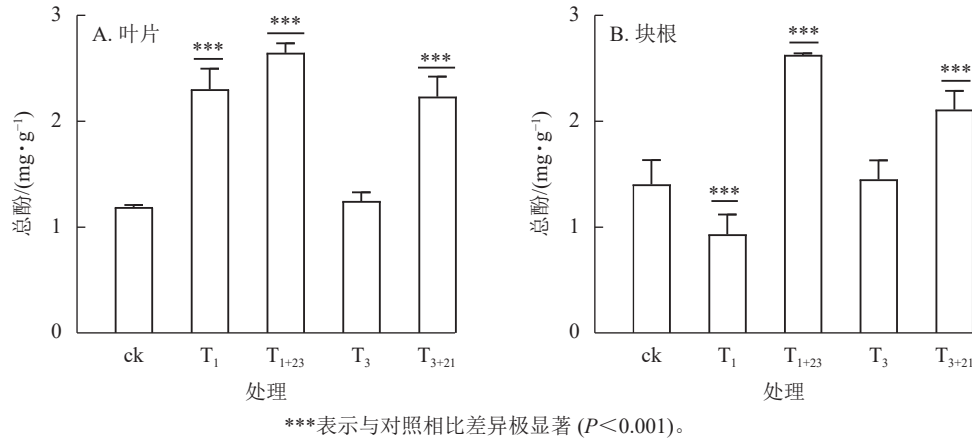


图 2 UV-B 处理对总酚质量分数的影响
Figure 2 Effects of UV-B treatment on total phenols mass fraction

2.2.2 UV-B 处理对三叶青总黄酮质量分数的影响 经 T_1 处理后,叶片中总黄酮质量分数比 ck 增加,为 $5.40 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (图 3A),块根中黄酮质量分数比 ck 减少,为 $2.42 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (图 3B),分别是 ck 的 1.16 和 0.56 倍,且均差异显著 ($P < 0.05$)。 T_{1+23} 处理的叶片和块根中的总黄酮质量分数都达到了最大值,叶片中的总黄酮质量分数为 $7.16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,是 T_1 处理的 1.33 倍;块根中的总黄酮质量分数为 $7.30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,是 T_1 处理的 3.02 倍。在 T_3 处理及后续的 T_{3+21} 处理中,叶片和块根中的总黄酮质量分数均低于 ck。

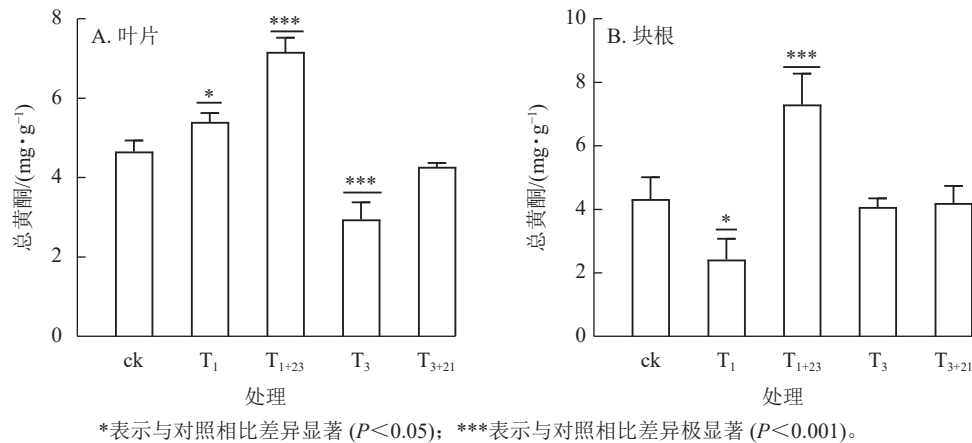


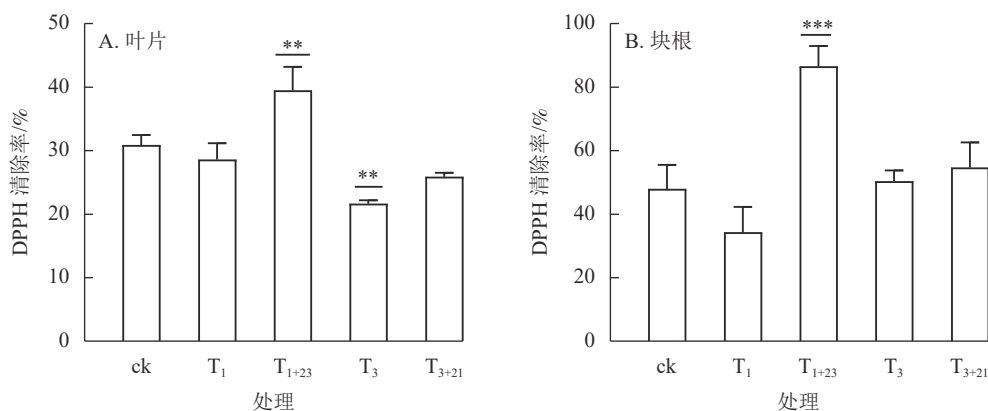
图 3 UV-B 处理对三叶青总黄酮质量分数的影响
Figure 3 Effects of UV-B treatment on total flavonoids mass fraction

2.3 UV-B 处理对三叶青抗氧化能力影响

如图 4 所示:在 ck 及各处理组中,三叶青块根的抗氧化能力较高,约为叶片相应处理组的 1.20~2.33 倍。仅使用 UV-B 辐射对叶片和块根的抗氧化能力提升作用并不明显,而增加黑暗处理后抗氧化能力得到明显改善,尤其是块根的 T_{1+23} 处理呈极显著差异 ($P < 0.001$)。 T_{1+23} 处理的叶片和块根中 DPPH 清除率均达到了最大值,分别比 T_1 处理增加 39.48% 和 86.56%,是 ck 的 1.28 和 1.80 倍。

2.4 UV-B 处理对三叶青抗逆酶积累影响

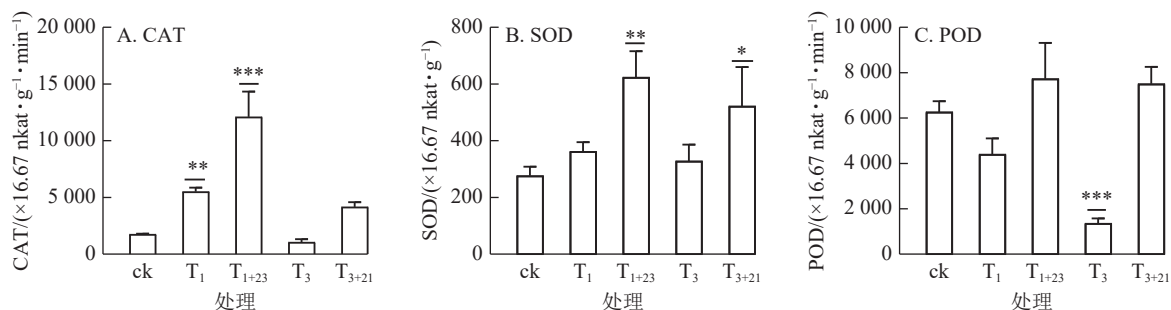
如图 5 所示: T_1 处理的 CAT 活性和 SOD 活性提高,分别是 ck 的 3.15 和 1.31 倍,其中 CAT 差异显著 ($P < 0.01$);而 T_3 处理的 CAT 活性和 POD 酶活性降低,分别是 ck 的 0.60 和 0.22 倍,其中 POD 酶活性差异极显著 ($P < 0.001$)。在紫外辐射后加上黑暗处理,3 种抗逆酶活性都有了大幅度的提升,其中 T_{1+23} 处理后, CAT、SOD 和 POD 活性均达到最大值,分别为 $725.66 \times 16.67 \text{ nkat} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 、



表示与对照相比差异显著 ($P < 0.01$); *表示与对照相比差异极显著 ($P < 0.001$)。

图 4 UV-B 处理对抗氧化能力的影响

Figure 4 Effects of UV-B treatment on antioxidant capacity



*表示与对照相比差异显著 ($P < 0.05$); **表示与对照相比差异显著 ($P < 0.01$); ***表示与对照相比差异极显著 ($P < 0.001$)。

图 5 UV-B 处理对三叶青抗逆酶活性的影响

Figure 5 Effects of UV-B treatment on defense enzymes activity

37.40×16.67 nkat·g⁻¹和 463.94×16.67 nkat·g⁻¹·min⁻¹, 分别是 ck 的 6.89、2.26 和 1.23 倍。

2.5 UV-B 处理对三叶青 MDA 质量摩尔浓度影响

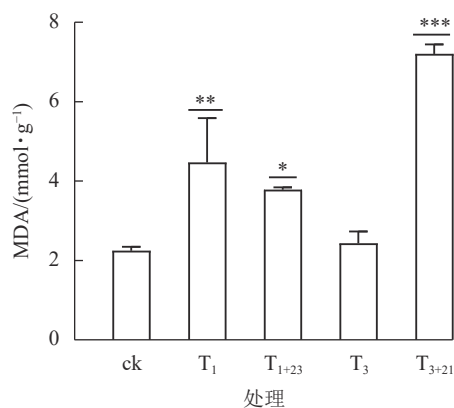
UV-B 辐射增加了各组三叶青叶片中的 MDA 质量摩尔浓度 (图 6)。T₃₊₂₁ 处理后, 三叶青叶片中的 MDA 质量摩尔浓度与 ck 相比差异极显著 ($P < 0.001$), 且高于其他处理, 达 7.21 mmol·g⁻¹, 分别是 ck 的 3.21 倍、T₃ 处理的 2.97 倍。

2.6 相关性分析及热图

如图 7 所示: 总酚、总黄酮、CAT、SOD、POD 和 MDA 均与 DPPH 呈正相关, 其中总黄酮质量分数、CAT 酶活性与三叶青抗氧化能力 (DPPH 清除率) 呈现显著正相关 ($P < 0.05$); CAT 活性与总黄酮质量分数呈显著正相关 ($P < 0.05$)。对三叶青上述成分进行热图聚类分析发现: 总酚、总黄酮质量分数, POD、CAT、SOD 活性和 DPPH 清除率均在 T₁₊₂₃ 处理达到最高, 说明黑暗处理对这些指标具有促进作用, MDA 质量摩尔浓度在 T₃₊₂₁ 处理达到最高。

2.7 转录组分析

对 UV-B 胁迫处理后的三叶青叶片做转录组差异表达 unigene 的京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 黄酮代谢通路中的差异基因如表 1 所示。12 个结构基因中, ck-T₁ 组的 *ThHCT* (DN17271) 和 *ThCYP98A3* (DN156339)、ck-T₁₊₂₃ 组的 *ThF3H* (DN10838) 和 *ThF3H* (DN7985)、ck-T₃₊₂₁ 组



*表示与对照相比差异显著 ($P < 0.05$); **表示与对照相比差异显著 ($P < 0.01$); ***表示与对照相比差异极显著 ($P < 0.001$)。

图 6 UV-B 处理对丙二醛质量摩尔浓度的影响

Figure 6 Effects of UV-B treatment on MDA mass molar concentration

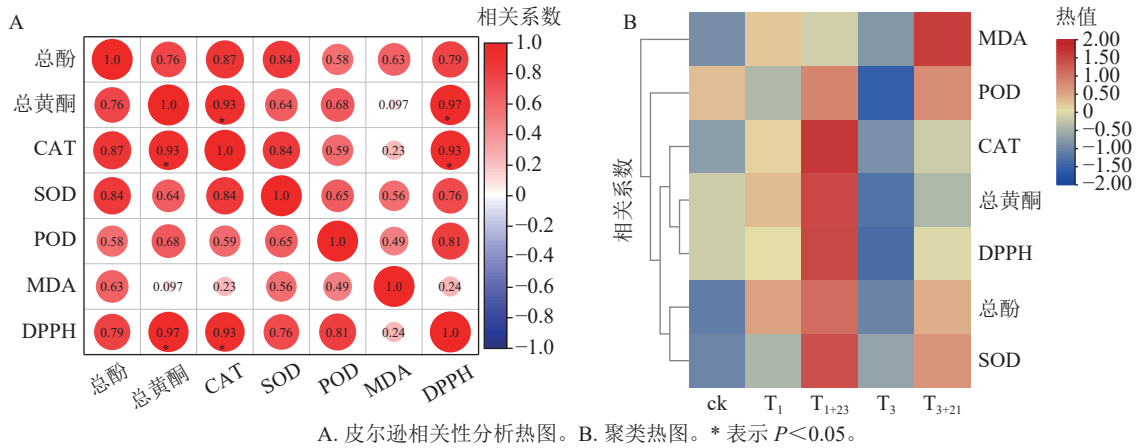


图7 热图分析

Figure 7 Heat map analysis

的 *ThANS* (DN12973)、*ThF3H* (DN7985) 和 *ThF3H* (DN10838) 以及 T_3 - T_{3+21} 组的 *ThF3H* (DN7985)、*ThCHS* (DN734)、*ThANR*(DN145313)、*ThFLS* (DN10864) 和 *ThCYP75B1* (DN1106) 基因的表达量均下降了 2 倍以上 ($\log_2 C_F$ 为 $-2.08 \sim -3.71$)，*ThCHS* (DN734) 和 *ThANR* (DN145313) 基因的表达量下降了 4 倍以上，差异极显著 ($|\log_2 C_F| > 4$)。

表1 黄酮代谢通路中的差异基因

Table 1 Differential genes in the flavonoid metabolic pathway

组别	基因编码	基因注释	$\log_2 C_F$	调节
ck- T_1	TRINITY_DN17271_c0_g1	羟基肉桂酰基转移酶(HCT)	-2.59	下调
ck- T_1	TRINITY_DN156339_c0_g1	5-O-(4-香豆酰基)-D-奎啉酸酯 3'-单加氧酶(CYP98A3)	-2.08	下调
ck- T_3	TRINITY_DN10864_c0_g1	黄酮醇合酶(FLS)	3.28	上调
ck- T_{1+23}	TRINITY_DN10838_c0_g1	黄酮醇3-羟化酶(F3H)	-2.60	下调
ck- T_{1+23}	TRINITY_DN7985_c0_g1	黄酮醇3-羟化酶(F3H)	-2.56	下调
ck- T_{3+21}	TRINITY_DN12973_c0_g1	花青素合酶(ANS)	-3.71	下调
ck- T_{3+21}	TRINITY_DN7985_c0_g1	黄酮醇3-羟化酶(F3H)	-2.14	下调
ck- T_{3+21}	TRINITY_DN10838_c0_g1	黄酮醇3-羟化酶(F3H)	-2.73	下调
T_3 - T_{3+21}	TRINITY_DN7985_c0_g1	黄酮醇3-羟化酶(F3H)	-2.38	下调
T_3 - T_{3+21}	TRINITY_DN734_c0_g1	查耳酮合酶(CHS)	-4.74	下调
T_3 - T_{3+21}	TRINITY_DN145313_c0_g1	花青素还原酶(ANR)	-6.33	下调
T_3 - T_{3+21}	TRINITY_DN10864_c0_g1	黄酮醇合酶(FLS)	-3.21	下调

此外，KEGG 富集分析中 T_1 - T_{1+23} 组和 T_3 - T_{3+21} 组的过氧化物酶体 (peroxisome) 通路差异基因如表 2 所示。其中 T_1 - T_{1+23} 组结果显示：抗氧化系统的 *ThCAT* (DN105637) 基因上调了 2.97 倍； T_3 - T_{3+21} 组结果显示：*ThXMP2* (DN16875)、*ThSOD* (DN4487)、*ThICDH* (DN19733) 和 FMN 依赖型 α -羟基酸脱氢酶基因均上调。

3 讨论

长时间的紫外光照射对于生长在林下的三叶青属于致胁迫因素。本研究对三叶青持续 UV-B 辐射发现：3.0 h 后三叶青表型发生变化，叶片开始略微发黄，初步判断此时三叶青已受到轻度胁迫。这与小麦 *Triticum aestivum*^[28]、苦荞 *Fagopyrum tataricum*^[29]、黄瓜 *Cucumis sativus*^[30] 等植物受到胁迫后的表型变化趋势相似。此外，多种植物在表型产生胁迫变化的同时，会在体内做出一系列适应紫外胁迫的生理生化反应。例如，鸡毛菜 *Brassica rapa* 显著提高了多种类黄酮代谢通路上游合成酶的活性^[13]，榛子 *Corylus avellana* 增加了花粉中多酚和黄酮类次生代谢产物的质量分数^[31]，三叶青改变了黄酮类化合物

表 2 过氧化物酶体通路中的差异基因

Table 2 Differential genes in the peroxisome pathway				
组别	基因编码	基因注释	log ₂ C _F	调节
T ₁ -T ₁₊₂₃	TRINITY_DN105637_c0_g1	过氧化氢酶(CAT)	2.97	上调
T ₃ -T ₃₊₂₁	TRINITY_DN16875_c0_g1	过氧化物酶体膜蛋白2(XMP2)	1.65	上调
T ₃ -T ₃₊₂₁	TRINITY_DN4487_c0_g1	超氧化物歧化酶(SOD)	1.07	上调
T ₃ -T ₃₊₂₁	TRINITY_DN19733_c0_g2	异柠檬酸脱氢酶(ICDH)	1.46	上调
T ₃ -T ₃₊₂₁	TRINITY_DN48302_c0_g1	FMN依赖型α-羟基酸脱氢酶	2.10	上调

量分数及相关合成酶、抗逆酶活性^[19]等。在本研究中,经 UV-B 辐射 1.0 h 后,叶片中总酚和总黄酮质量分数均升高,这是因为黄酮类物质对紫外光极其敏感^[32],可减少紫外线对植物组织的穿透作用,保护叶片免受伤害^[33]。经 UV-B 辐射 3.0 h 后,三叶青总酚和总黄酮质量分数均较 UV-B 辐射 1.0 h 下降,分析认为可能是植物光合作用受到影响,合成速率降低,光合产物减少,导致黄酮类化合物合成减少。与 GAO 等^[20]的研究结果一致,即较低水平的 UV-B 辐射比高水平的 UV-B 辐射更能促进植物黄酮类化合物的合成和积累。而在块根中,UV-B 辐射 1.0 h 的总酚和总黄酮质量分数均小于 ck,参考 SURJADINATA 等^[34]和 ÁLVAREZ-GÓMEZ 等^[35]的研究发现:刚开始遭受 UV-B 胁迫,块根中还原糖质量分数降低以供运输到叶片进行酚类物质合成,导致块根中合成酚类的前体物质减少,最终直接影响酚类化合物的积累。此外,在多种药用植物研究中发现:UV-B 辐射后施以黑暗处理,铁线莲 *Clematis terniflora* 会通过增加黄酮类物质^[36]、桑树 *Morus alba* 积累桑黄素 N 和黑木耳素^[37]、长春花 *Catharanthus roseus* 积累生物碱^[38]来提高耐胁迫能力。本研究结果与以上研究相似。单纯的紫外处理并未显著增加三叶青中的次生代谢产物,UV-B 辐射后给予黑暗处理可大幅度增加总酚和总黄酮质量分数,并显著提升其抗氧化能力。相关性分析结果也表明:总酚和总黄酮质量分数与三叶青抗氧化能力有显著正相关性。

对多种植物的研究结果均显示:光照和生物钟会影响植物对 UV-B 胁迫的敏感性,并且一些基因(如 *ELIP1*、*CHS/PRR9* 和 *ELF4* 等)在不同环境中对 UV-B 的敏感度是不同的^[39],例如,适当的紫外光照射会提高彩色马铃薯 *Solanum tuberosum* 的抗氧化能力,从而增加花青素结构基因(*F3'5'H*、*F3'H*、*DFR* 和 *ANS* 等)的表达^[40];UV-B 加黑暗处理对拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 叶片光合相关基因(*CAB*)的表达、叶绿素质量分数和光合效率的影响较大^[41];黑暗处理对茶树不同基因的影响存在差异,经黑暗处理后的 *CsPAL*、*CsCHS*、*CsACL*、*CsLAR*、*CsANR* 和 *CsANS* 基因表达下调,而 *CsFLS* 基因表达上调,表达结果较为复杂^[42]。本研究的转录组结果进一步表明:与 ck 组相比,经 UV-B 和黑暗处理后多数黄酮合成酶基因,如 *ThF3H*、*ThANS* 和 *ThCHS* 等均下调。分析认为:这与植物在黑暗处理时会快速且大量合成次生代谢产物从而形成反馈抑制有关,并进一步下调了相关合成酶基因表达^[42]。孟凡来等^[43]对紫甘薯 *Ipomoea batatas* 叶片的转录组分析发现:UV-B 辐射增强类黄酮合成通路中的各关键酶(如查尔酮合成酶、花青素合成酶、4-香豆酸-CoA 连接酶 6、类花青素 3-O-葡萄糖基转移酶 7)基因主要以下调表达为主,与本研究结果一致。而 *ThFLS* 基因经 UV-B 辐射 3.0 h 后上调,表明其在 UV-B 辐射增强中起关键的正向调控作用^[44]。

当植物(如黄芩 *Scutellaria baicalensis*^[45]、葡萄 *Vitis vinifera*^[46]等)遭受紫外光照射时,抗逆酶系统启动,逐步清除体内的游离氧离子、自由基及一些有害物质,对叶片起到较好的保护作用。SOD 处于抵御活性氧伤害的第 1 道防线,主要清除对植物毒性较大的超氧阴离子(O₂⁻),将其转化成为毒性较小的 H₂O₂、CAT 和 POD, H₂O₂ 进一步转化为无毒的 H₂O 和 O₂^[47]。本研究中,三叶青在遭受 UV-B 辐射 1.0 h 后 CAT 和 SOD 活性增加,并且 CAT 活性较 SOD 和 POD 活性大幅提升,说明三叶青中各种酶的作用机理不同,进而在细胞内的活性变化趋势略有不同。而在 UV-B 辐射 1.0 h 加黑暗处理后,酶活性达到最大,表明了一定时间的黑暗处理可提高 H₂O₂ 清除能力,对三叶青有修复功能^[48]。当辐射时间达 3.0 h 时,胁迫进一步加重,3 种酶活性下降,分析认为可能是保护酶系统受损。进一步转录组分析显示:UV-B 辐射并增加黑暗处理能提高三叶青中一些氧化应激反应相关基因(如 *CAT* 和 *SOD*)表达上调,与褚润等^[49]对香蒲 *Typha orientalis* 的研究结果一致。MDA 作为膜质过氧化分解的重要产物,可以对受胁迫

细胞再次造成伤害,在一定程度上其质量摩尔浓度的高低可以表示细胞的膜质过氧化水平和细胞受损程度^[50]。本研究中,经UV-B辐射1.0 h后MDA质量摩尔浓度升高,这与先前的研究结果相同^[51];增加黑暗处理后,MDA质量摩尔浓度小幅降低,提示黑暗有利于膜的修复。UV-B辐射3.0 h时MDA质量摩尔浓度较UV-B辐射1.0 h呈下降趋势,表明UV-B辐射3.0 h内三叶青中抗氧化系统产生应激反应, O_2^- 被迅速清除,缓解了膜受损程度。而UV-B辐射3.0 h加黑暗处理后,MDA质量摩尔浓度达到最高,可能的原因是MDA的影响相对于抗逆酶系统有滞后效应,这也与GONCHARUK等^[52]的研究结果相同,即此时抗逆酶系统虽在缓慢修复,但 O_2^- 仍超出了植物自身防御系统的清除能力,此时,即使给予黑暗处理,MDA质量摩尔浓度也会显著升高。

4 结论

UV-B辐射1.0 h加23.0 h黑暗处理能更好地增加三叶青中次生代谢物质及其抗氧化能力,同时下调黄酮合成酶和上调氧化相关调节因子的基因表达,并且使各物质达到最大值,既能增加次生代谢产物,又能将紫外胁迫的伤害控制在一定范围内,保证植物正常生长。同时,暗处理对紫外照射后的三叶青是极其重要的,其影响机理仍未探明,今后的研究将予以持续关注。

5 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志委员会. 中国植物志: 第48卷第2分册[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 122.
Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Science. *Flora of China: Vol 48, Issue 2* [M]. Beijing: Science Press, 2004: 122.
- [2] JI Tao, JI Weiwei, WANG Juan, *et al.* A comprehensive review on traditional uses, chemical compositions, pharmacology properties and toxicology of *Tetrastigma hemsleyanum* [J/OL]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, **264**: 113247[2023-05-30]. doi: 10.1016/j.jep.2020.113247.
- [3] HU Wangying, ZHENG Yujie, XIA Pengguo, *et al.* The research progresses and future prospects of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg: a valuable Chinese herbal medicine [J/OL]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, **271**: 113836[2023-05-30]. doi: 10.1016/j.jep.2021.113836.
- [4] 徐硕, 金鹏飞, 徐文峰, 等. 民间中药三叶青的研究进展[J]. 中南药学, 2016, **14**(12): 1336 – 1341.
XU Shuo, JIN Pengfei, XU Wenfeng, *et al.* Research advances in Chinese herbal medicine *Tetrastigmae hemsleyanum* [J]. *Central South Pharmacy*, 2016, **14**(12): 1336 – 1341.
- [5] LAI Chengchun, PAN Hong, ZHANG Jing, *et al.* Light quality modulates growth, triggers differential accumulation of phenolic compounds, and changes the total antioxidant capacity in the red callus of *Vitis davidii* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, **70**(41): 13264 – 13278.
- [6] GARCÍA-LAFUENTE A, GUILLAMÓN E, VILLARES A, *et al.* Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease [J]. *Inflammation Research*, 2009, **58**(9): 537 – 552.
- [7] LI Yongli, FENG Xinyu, ZHANG Yiru, *et al.* Dietary flavone from the *Tetrastigma hemsleyanum* vine triggers human lung adenocarcinoma apoptosis via autophagy [J]. *Food & Function*, 2020, **11**(11): 9776 – 9788.
- [8] 范适, 胡春梅, 李有清, 等. 三叶青的研究进展[J]. 湖南生态科学学报, 2018, **5**(2): 46 – 51.
FAN Shi, HU Chunmei, LI Youqing, *et al.* Advances in *Tetrastigma hemsleyanum* [J]. *Journal of Hunan Ecological Science*, 2018, **5**(2): 46 – 51.
- [9] PAOLETTI E. UV-B and Mediterranean forest species: direct effects and ecological consequences [J]. *Environmental Pollution*, 2005, **137**(3): 372 – 379.
- [10] FROHNMEYER H. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection [J]. *Plant Physiology*, 2003, **133**(4): 1420 – 1428.
- [11] HOLLÓSY F. Effects of ultraviolet radiation on plant cells [J]. *Micron*, 2002, **33**(2): 179 – 197.
- [12] SONG Yan, MA Bin, GUO Qingxun, *et al.* UV-B induces the expression of flavonoid biosynthetic pathways in blueberry (*Vaccinium corymbosum*) calli [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, **13**: 1079087[2023-05-30]. doi: 10.3389/fpls.2022.1079087.

- [13] HAO Juan, LOU Panpan, HAN Yidie, *et al.* Ultraviolet-B irradiation increases antioxidant capacity of pakchoi (*Brassica rapa* L.) by inducing flavonoid biosynthesis [J/OL]. *Plants*, 2022, **11**(6): 766 [2023-05-30]. doi: 10.3390/plants11060766.
- [14] LIU Yang, LIU Jia, ABOZEID A, *et al.* UV-B radiation largely promoted the transformation of primary metabolites to phenols in *Astragalus mongholicus* seedlings [J/OL]. *Biomolecules*, 2020, **10**(4): 504 [2023-05-30]. doi: 10.3390/biom10040504.
- [15] TAO Minglei, ZHU Wei, HAN Haote, *et al.* Mitochondrial proteomic analysis reveals the regulation of energy metabolism and reactive oxygen species production in *Clematis terniflora* DC. leaves under high-level UV-B radiation followed by dark treatment [J/OL]. *Journal of Proteomics*, 2022, **254**: 104410 [2023-05-30]. doi: 10.1016/j.jprot.2021.104410.
- [16] PANDEY N, PANDEY-RAI S. Short term UV-B radiation-mediated transcriptional responses and altered secondary metabolism of in vitro propagated plantlets of *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2014, **116**(3): 371 – 385.
- [17] 温泉, 张楠, 曹瑞霞, 等. 增强UV-B对黄连代谢及小檗碱含量的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, **36**(22): 3063 – 3069.
WEN Quan, ZHANG Nan, CAO Ruixia, *et al.* Effect of enhanced UV-B radiation on metabolism and berberine content of *Coptis chinensis* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2011, **36**(22): 3063 – 3069.
- [18] NEUGART S, BUMKE-VOGT C. Flavonoid glycosides in *Brassica* species respond to UV-B depending on exposure time and adaptation time [J/OL]. *Molecules*, 2021, **26**(2): 494 [2023-05-30]. doi: 10.3390/molecules26020494.
- [19] BAI Yan, GU Yiwen, LIU Shouzan, *et al.* Flavonoids metabolism and physiological response to ultraviolet treatments in *Tetragium hemsleyanum* Diels et Gilg [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, **13**: 926197 [2023-05-30]. doi: 10.3389/fpls.2022.926197.
- [20] GAO Limei, LIU Ying, WANG Xiaofei, *et al.* Lower levels of UV-B light trigger the adaptive responses by inducing plant antioxidant metabolism and flavonoid biosynthesis in *Medicago sativa* seedlings [J]. *Functional Plant Biology*, 2019, **46**(10): 896 – 906.
- [21] LÜ Min, SU Hongyan, LI Meiling, *et al.* Effect of UV-B radiation on growth, flavonoid and podophyllotoxin accumulation, and related gene expression in *Sinopodophyllum hexandrum* [J]. *Plant Biology*, 2021, **23**: 202 – 209.
- [22] CHEN Yiyong, FU Xiumin, MEI Xin, *et al.* Proteolysis of chloroplast proteins is responsible for accumulation of free amino acids in dark-treated tea (*Camellia sinensis*) leaves [J]. *Journal of Proteomics*, 2017, **157**: 10 – 17.
- [23] LI Ke, TIAN Huiyue, MAO Jiangping, *et al.* Effect of darkness treatment on the morphology, hormone status and gene expression of developing adventitious root in apple rootstock [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2021, **148**(2): 331 – 346.
- [24] 韩敏琪. 短波长光质对三叶青生理生化及黄酮含量的影响[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2019.
HAN Minqi. *Effects of Short-wavelength Light Quality on Physiology, Biochemistry and Flavonoid Content Tetragium hemsleyanum* Diels et Gilg [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2019.
- [25] AL-KHAYRI J M, UPADHYA V, PAI S R, *et al.* Comparative quantification of the phenolic compounds, piperine content, and total polyphenols along with the antioxidant activities in the *Piper trichostachyon* and *P. nigrum* [J/OL]. *Molecules*, 2022, **27**(18): 5965 [2023-05-30]. doi: 10.3390/molecules27185965.
- [26] 刘希达, 韩娜, 刘志惠, 等. 覆盆子抗氧化和 α -葡萄糖苷酶抑制活性成分研究[J]. 中草药, 2021, **52**(17): 5226 – 5232.
LIU Xida, HAN Na, LIU Zhihui, *et al.* Active components of antioxidation and α -glucosidase inhibitory from *Rubi Fructus* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, **52**(17): 5226 – 5232.
- [27] 李世玉, 程登虎, 闫星, 等. 外源SNP对盐胁迫下甜瓜幼苗生长及抗氧化酶活性的影响[J]. 西北植物学报, 2022, **42**(6): 994 – 1002.
LI Shiyu, CHENG Denghu, YAN Xing, *et al.* Effect of exogenous SNP on the growth and antioxidant enzyme activities in melon seedlings under salt stress [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, **42**(6): 994 – 1002.
- [28] 王晓宇, 张艳娥, 张林生. 4种非生物胁迫下小麦幼苗表型及可溶性蛋白含量的变化[J]. 干旱地区农业研究, 2018, **36**(2): 113 – 117.
WANG Xiaoyu, ZHANG Yan'e, ZHANG Linsheng. Changes of phenotype and soluble protein content in wheat seedlings under four kinds of abiotic stress [J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2018, **36**(2): 113 – 117.
- [29] 朱智慧, 温东, 张栋, 等. 紫外光促进苦荞中黄酮类化合物积累的分子机制探究[J]. 中草药, 2021, **52**(5): 1448 – 1453.

- ZHU Zhihui, WEN Dong, ZHANG Dong, *et al.* Molecular mechanisms of UVB-induced flavonoid accumulation in *Fagopyrum tataricum* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, **52**(5): 1448 – 1453.
- [30] QIAN Minjie, ROSENQVIST E, PRINSEN E, *et al.* Downsizing in plants-UV light induces pronounced morphological changes in the absence of stress [J]. *Plant Physiology*, 2021, **187**(1): 378 – 395.
- [31] ÇETINBAŞ-GENÇ A, TOKSÖZ O, PICCINI C, *et al.* Effects of UV-B radiation on the performance, antioxidant response and protective compounds of hazelnut pollen [J/OL]. *Plants*, 2022, **11**(19): 2574[2023-05-30]. doi: 10.3390/plants11192574.
- [32] DU Zhaokui, LIN Weida, YU Binbin, *et al.* Integrated metabolomic and transcriptomic analysis of the flavonoid accumulation in the leaves of *Cyclocarya paliurus* at different altitudes [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, **12**: 794137[2023-05-30]. doi: 10.3389/fpls.2021.794137.
- [33] JULKUNEN-TIITTO R, HÄGGMAN H, APHALO P, *et al.* Growth and defense in deciduous trees and shrubs under UV-B [J]. *Environmental Pollution*, 2005, **137**(3): 404 – 414.
- [34] SURJADINATA B B, JACOBO-VELÁZQUEZ D A, CISNEROS-ZEVALLOS L. UVA, UVB and UVC light enhances the biosynthesis of phenolic antioxidants in fresh-cut carrot through a synergistic effect with wounding [J/OL]. *Molecules*, 2017, **22**(4): 668[2023-05-30]. doi: 10.3390/molecules22040668.
- [35] ÁLVAREZ-GÓMEZ F, KORBEE N, FIGUEROA F. Effects of UV radiation on photosynthesis, antioxidant capacity and the accumulation of bioactive compounds in *Gracilaria longissima*, *Hydropuntia cornea* and *Halopithys incurva* (Rhodophyta) [J]. *Journal of Phycology*, 2019, **55**(6): 1258 – 1273.
- [36] YANG Bingxian, GUAN Qijie, TIAN Jinghui, *et al.* Transcriptomic and proteomic analyses of leaves from *Clematis terniflora* DC. under high level of ultraviolet-B irradiation followed by dark treatment [J]. *Journal of Proteomics*, 2017, **150**: 323 – 340.
- [37] LI Yaohan, LIU Shengzhi, SHAWKY E, *et al.* SWATH-based quantitative proteomic analysis of *Morus alba* L. leaves after exposure to ultraviolet-B radiation and incubation in the dark [J/OL]. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 2022, **230**: 112443[2023-05-30]. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2022.112443.
- [38] ZHU Wei, YANG Bingxian, KOMATSU S, *et al.* Binary stress induces an increase in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, **6**: 582[2023-05-30]. doi: 10.3389/fpls.2015.00582.
- [39] TAKEUCHI T, NEWTON L, BURKHARDT A, *et al.* Light and the circadian clock mediate time-specific changes in sensitivity to UV-B stress under light/dark cycles [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, **65**(20): 6003 – 6012.
- [40] WU Xiaojie, CHEN Bicong, XIAO Jiping, *et al.* Different doses of UV-B radiation affect pigmented potatoes' growth and quality during the whole growth period [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, **14**: 1101172[2023-05-30]. doi: 10.3389/fpls.2023.1101172.
- [41] SZTATELMAN O, GRZYB J, GABRYŚ H, *et al.* The effect of UV-B on *Arabidopsis* leaves depends on light conditions after treatment [J/OL]. *BMC Plant Biology*, 2015, **15**: 281[2023-05-30]. doi: 10.1186/s12870-015-0667-2.
- [42] SHI Jing, ZHANG Xue, ZHANG Yuanyuan, *et al.* Integrated metabolomic and transcriptomic strategies to understand the effects of dark stress on tea callus flavonoid biosynthesis [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, **155**: 549 – 559.
- [43] 孟凡来, 白磊, 郭华春, 等. 紫甘薯叶片响应UV-B辐射增强的转录组分析[J]. 华北农学报, 2021, **36**(5): 135 – 142.
- MENG Fanlai, BAI Lei, GUO Huachun, *et al.* Transcriptome analysis of purple sweet potato leaf in response to enhanced UV-B radiation [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2021, **36**(5): 135 – 142.
- [44] MARIZ-PONTE N, MENDES R, SARIO S, *et al.* Tomato plants use non-enzymatic antioxidant pathways to cope with moderate UV-A/B irradiation: a contribution to the use of UV-A/B in horticulture [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2018, **221**: 32 – 42.
- [45] WANG Hui, KANG Yunyan, YANG Ni, *et al.* Inhibition of UV-B stress in lettuce through enzyme-like *Scutellaria baicalensis* carbon dots [J/OL]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, **246**: 114177[2023-05-30]. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114177.
- [46] 吴业飞, 吴鲁阳, 张振文. 紫外线-B辐射增强对葡萄叶片抗氧化系统的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, **36**(12): 161 – 166.
- WU Yefei, WU Luyang, ZHANG Zhenwen. Effect of enhanced ultraviolet-B radiation on antioxidant systems in grapevine

- seedling leaves [J]. *Journal of Northwest A&F University (Nature Science Edition)*, 2008, **36**(12): 161 – 166.
- [47] FAIZE M, BURGOS L, FAIZE L, *et al.* Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, **62**(8): 2599 – 2613.
- [48] POÓR P, TAKÁCS Z, BELA K, *et al.* Prolonged dark period modulates the oxidative burst and enzymatic antioxidant systems in the leaves of salicylic acid-treated tomato [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2017, **213**: 216 – 226.
- [49] 褚润, 陈年来, 韩国君, 等. 三种UV-B辐射强度下香蒲的生长和抗氧化状况[J]. *湿地科学*, 2020, **18**(1): 32 – 39.
CHU Run, CHEN Nianlai, HAN Guojun, *et al.* Growth and antioxidant status of *Typha orientalis* under 3 kinds of UV-B radiation intensities [J]. *Wetland Science*, 2020, **18**(1): 32 – 39.
- [50] AYALA A, MUÑOZ M, ARGÜELLES S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal [J/OL]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, **2014**: 360438 [2023-05-30]. doi: 10.1155/2014/360438.
- [51] 梁晨, 安美玲, 杨锡洪, 等. 紫外辐射(UVB)胁迫下南极硅藻*Phaeodactylum tricornutum* ICE-H的生理生化与抗氧化活性响应[J]. *海洋科学进展*, 2023, **41**(2): 283 – 294.
LIANG Chen, AN Meiling, YANG Xihong, *et al.* Physiological, biochemical and antioxidant activity response of Antarctic diatom *Phaeodactylum tricornutum* ICE-H under ultraviolet radiation (UVB) stress [J]. *Advances in Marine Science*, 2023, **41**(2): 283 – 294.
- [52] GONCHARUK E, ZUBOVA M, NECHAEVA T, *et al.* Effects of hydrogen peroxide on In vitro cultures of tea (*Camellia sinensis* L.) grown in the dark and in the light: morphology, content of malondialdehyde, and accumulation of various polyphenols [J/OL]. *Molecules*, 2022, **27**(19): 6674 [2023-05-30]. doi: 10.3390/molecules27196674.