

不同浓度 NaCl 处理对发芽玉米中类胡萝卜素富集的影响

汪雨茜¹, 何伟伟², 李大婧², 包怡红¹, 刘春泉², 宋江峰²

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

(2. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014)

摘要: 本文旨在研究不同浓度 NaCl 处理对发芽玉米籽粒中类胡萝卜素富集、抗氧化能力及其合成途径中关键酶基因表达量的影响。结果表明, NaCl 胁迫下, 发芽 3 d 玉米籽粒的发芽率和芽长显著下降, 呼吸强度显著增加。随 NaCl 浓度升高, 发芽玉米籽粒中类胡萝卜素含量及其合成途径中关键酶基因表达量先上升后下降, 300 mmol/L NaCl 处理下均达到最大值, 其中叶黄素和玉米黄质含量分别为对照的 1.19 和 1.30 倍。同时, 其超氧化物歧化酶、过氧化物酶活性及总抗氧化能力显著增加。NaCl 浓度大于 300 mmol/L 时, 关键酶基因相对表达量均下降, 类胡萝卜素的合成被抑制。NaCl 处理可提高类胡萝卜素合成相关酶基因表达量, 促进叶黄素、玉米黄质等类胡萝卜素富集, 同时其抗氧化能力有所提高。研究结果为玉米籽粒富集类胡萝卜素开创了新思路, 并为开发玉米籽粒保健功能食品提供理论依据和技术支撑。

关键词: NaCl 胁迫; 类胡萝卜素; 玉米籽粒; 发芽; 关键酶基因

文章编号: 1673-9078(2019)04-61-69

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.4.010

Effects of Different Concentrations of NaCl Treatment on Carotenoid Enrichment in Germinated Corn

WANG Yu-xi¹, HE Wei-wei², LI Da-jing², BAO Yi-hong¹, LIU Chun-quan², SONG Jiang-feng²

(1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

(2. Institute of Agro-product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In the present study, the effects of different concentrations of NaCl on the carotenoid content, antioxidant capacity and relative expression levels of key enzyme genes in germinated corn kernels were investigated. The results showed that NaCl stress significantly reduced the germination rate and sprout length of corn kernels and increased the respiratory intensity after 3 days of germination. With the increasing concentration of NaCl, the carotenoid content and the expression levels of key enzyme genes in the germinated corn kernels increased first, then decreased. The lutein and zeaxanthin contents reached maximum values in 300 mmol/L of NaCl treatment, which were 1.19 and 1.30 times of the control, respectively. Meanwhile, NaCl stress led to a significant increase in SOD, POD activities and total antioxidant capacity. However, the expression levels of key enzyme genes decreased and the synthesis of carotenoids were inhibited when NaCl concentration is greater than 300 mmol/L. The results suggest that NaCl treatment could increase the expression levels of related genes in germinated corn kernels and promote the enrichment of carotenoids such as lutein and zeaxanthin. Moreover, the antioxidant capacity also increased. The present study provides new methods for enriching carotenoids in yellow corn kernels, and provides theoretical basis and technical support for the development of health functional foods with germinated corn kernels.

Key words: NaCl stress; carotenoids; corn kernels; germination; key enzyme genes

收稿日期: 2018-12-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31771984); 江苏省自然科学基金项目 (BK20180305); 江苏省 333 工程培养资金资助项目 (013076511706)

作者简介: 汪雨茜 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品中功能成分的富集技术

通讯作者: 李大婧 (1976-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 果蔬加工与功能化利用; 共同通讯作者: 包怡红 (1970-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术 with 功能食品

玉米 (*Zea mays* L.) 是禾本科玉蜀黍植物, 其产量高、适应性强, 是我国主要粮食作物之一^[1]。玉米籽粒富含蛋白质、脂肪、维生素和类胡萝卜素等营养物质, 适用于三高人群, 是人们膳食粮谷的优质来源^[2]。类胡萝卜素(Carotenoids)是玉米籽粒中重要的营养物质, 其中叶黄素和玉米黄质是人眼视网膜中的主要色素, 具有强抗氧化作用, 可淬灭活性自由基和单线态氧, 有效降低眼部疾病风险^[3]。此外, 类胡萝卜素还可增强人体免疫力, 预防心血管疾病, 防癌抗癌、辅助治疗多种疾病等生理功能^[4]。玉米等谷物籽粒发芽后, 内源酶被激活, 其化学物质的组成结构及含量发生了改变, 提高了营养品质, 同时增加了人体对其的吸收利用率^[5]。

高等植物体内类胡萝卜素合成途径是由合成前体物质牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸通过八氢番茄红素合成酶(phytoene synthase, PSY)、八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS)和 ζ -胡萝卜素脱氢酶(ζ -carotene desaturase, ZDS)依次催化转化为番茄红素。再经番茄红素 β -环化酶(lycopene β -cyclase, LCYB)和番茄红素 ϵ -环化酶(lycopene ϵ -cyclase, LCYE)、胡萝卜素 ϵ 环羟化酶(cytochrome P450 hydroxylases CYP97C) 和 胡萝卜素 β 环羟化酶(carotene β -hydroxylase BCH1)催化最终合成叶黄素(lutein)和玉米黄质(zeaxanthin)^[6]。通常逆境胁迫, 如光照、温度和渗透压胁迫会对植物生长产生不利影响, 但能诱导类胡萝卜素和酚类物质等次生代谢物的富集, 有助于提高植物作物的营养价值, 并增强其抗氧化能力^[7]。荞麦种子在 50 mmol/L NaCl 胁迫下发芽 7 d, 其总类胡萝卜素含量是对照的 2 倍, DPPH 清除能力比对照增加了约 40%^[8]; Abdallah 等人^[9]将龙葵种子发芽后施加 100 mmol/L NaCl, 其叶黄素含量比对照增加了 35%; Aliu 等人^[10]研究 4 个不同品种玉米籽粒发芽后施加 100 mmol/L NaCl, 其类胡萝卜素含量分别比对照提高了 10%~48%。综上, NaCl 胁迫是植物籽粒发芽富集其植物营养素等活性物质的一种有效方式。

本试验以黄色玉米‘苏玉-29’籽粒为材料, 研究不同浓度 NaCl 溶液处理后, 发芽玉米籽粒的生长状况, 类胡萝卜素含量和抗氧化能力, 以及其合成途径中关键酶基因相对表达量的变化规律。旨在为探索利用 NaCl 胁迫处理对发芽玉米籽粒富集类胡萝卜素提供理论依据, 为以黄色玉米籽粒为原料富集类胡萝卜素开创新思路和方法, 同时玉米籽粒的营养价值和生物利用率的提高, 为生产富含类胡萝卜素的发芽玉米及其增值功能性食品开发提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试玉米品种为‘苏玉-29’(SY-29), 购于江苏省农业科学院六合动物科学试验基地, 选取大小均一、无病虫害、无损伤的成熟玉米籽粒为试验材料, 封装于密封袋中, 4℃保存备用。

类胡萝卜素标准品(纯度>90%), 购于美国 Sigma 公司; 色谱级甲醇、甲基叔丁基醚(methyl tert-butyl ether, MTBE), 购自美国 Tedia 公司; 黄嘌呤氧化酶, 购于南京建成生物研究所; 分析纯 6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Trolox), 购于梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 分析纯 2,2'-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐(2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride, AAPH), 购于阿拉丁(上海)有限公司; 分析纯正己烷、丙酮、甲苯、盐酸羟胺、愈创木酚、荧光素钠、无水乙醇、无水硫酸钠、氢氧化钾等, 购于国药集团化学试剂有限公司; Plant RNA Extraction Kit、RT-PCR Mater Mix Kit、SYBR Premix Ex Taq, 购于 Takara 公司。

1.2 仪器与设备

安捷伦 1200 高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; 微孔板分光光度计, BioTek Instruments; TriStar LB-941 型微孔板多功能分析仪, 德国 Berthold Technologies (伯托) 公司; 荧光定量 PCR 仪 Light Cycler 480 II, 德国 Roche 公司; BS224S 电子分析天平, 北京赛多利斯科学仪器公司; 紫外可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; FD-1A-50 型冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; RE52CS 旋转蒸发器和 B-220 恒温水浴锅, 上海亚荣生化仪器厂; SHZ-D (III) 循环水式真空泵, 上海东玺制冷仪器设备有限公司; D10 氮气吹扫仪, 杭州奥盛仪器有限公司; FW100 高速万能粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 发芽实验设计

经筛选、除杂后, 选取成熟饱满、大小均一的玉米籽粒。用 0.5% 的次氯酸钠溶液浸泡消毒 25 min 后, 去离子水冲洗数次至 pH 中性。常温下预处理浸泡 16 h (每浸泡 7 h 断水 1 h, 连续浸泡 2 次) 后, 用不同浓

度 NaCl 溶液浸泡玉米籽粒 8 h, 试验中 NaCl 溶液设定 5 个浓度水平, 分别为 0 (CK)、150、300、450、600 mmol/L。浸泡后将玉米籽粒表面洗净后, 放入垫有双层滤纸的培养皿 ($\Phi 15$ cm) 中, 每皿 30 g 左右, 于 25 °C 恒温培养箱内黑暗条件下发芽, 每隔 4 h 喷水一次保湿。发芽 3 d 后, 记录发芽数用于统计发芽率。用吸水纸吸干表面水分, 鲜样用于测定芽长、呼吸强度、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)和过氧化物酶(Peroxidase, POD)活性。冷冻干燥后的样品经研磨粉碎, 过 60 目筛后测定类胡萝卜素含量和总抗氧化能力指数 (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC)。

1.3.2 生长状况指标测定

发芽率: 参照国家标准 GB 3543-83《农作物种子检验规程》^[11]中试验方法, 以突破种皮的胚轴长度达 2 mm 为发芽标准, 记录发芽玉米种粒, 计算发芽率; 胚芽长: 随机取 10 粒发芽玉米籽粒, 用游标卡尺测定, 取平均值; 呼吸强度: 用小篮子法^[12]测定。

1.3.3 类胡萝卜素的提取

参考 Kao 等人^[13]的方法, 并略作改进。准确称取 3.0 g 发芽玉米籽粒粉末置于磨口锥形瓶中, 加入 30 mL 正己烷-乙醇-丙酮-甲苯 (10:6:7:7, V/V) 混合萃取液。静置 3~4 h 后, 加入 2 mL 40% KOH-甲醇溶液摇匀后置于暗处 25 °C 皂化 16 h。将皂化液转入 250 mL 分液漏斗, 加 40 mL 正己烷, 振荡摇匀, 再加入 48 mL 10% 硫酸钠溶液, 充分摇匀混合液体后, 静置, 弃去下层液体, 收集上层溶液。上述处理重复 2 次, 混合收集的上层溶液于 100 mL 圆底烧瓶中, 进行旋转蒸发, 待溶剂蒸发完全后, 用少量正己烷溶解后, 将溶液转移至试管中, 再用氮气将溶剂吹干。用 2 mL 色谱级甲醇复溶, 经 0.22 μ m 的有机膜过滤后转入棕色液相小瓶中, 待测定分析。

1.3.4 类胡萝卜素含量的测定

类胡萝卜素含量测定采用高效液相色谱(High performance liquid chromatography, HPLC)法, HPLC 条件参照 Li 等^[14]的方法。色谱柱为 YMC-C30 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m) 色谱柱, 柱温为 25 °C, 进样量为 20 μ L, 检测器为二极管阵列检测器(Diode array detector, DAD), 波长为 450 nm。流动相: A 相为水:MTBE:甲醇=5:25:75 (V:V:V), B 相为水:MTBE:甲醇=5:85:10 (V:V:V)。线性梯度洗脱, 流速为 0.6 mL/min, 梯度洗脱程序: 0 min: 95% A, 4.5 min: 80% A, 12.5 min: 50% A, 18 min: 25% A, 24~30 min: 5% A。

1.3.5 抗氧化活性测定

SOD 和 POD 酶提取液包括 50 mmol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液、0.1 mmol/L 乙二醇四乙酸、5 mmol/L 二硫苏糖醇和 1% 聚乙烯吡咯烷酮。将发芽玉米籽粒鲜样和酶提取液按质量体积比 1:5 于冰浴中研磨, 得到混合溶液于 10,000 r/min 离心 20 min, 上清液即为粗酶提取液。

SOD 活性测定参照徐东^[15]的方法并加以改进, 1 mL 66.7 mmol/L pH 7.8 磷酸缓冲液, 加入粗酶液 50 μ L, 依次加入 100 μ L 10 mmol/L 盐酸羟胺、200 μ L 7.5 mmol/L 黄嘌呤、200 μ L 0.2 mg/mL 黄嘌呤氧化酶、490 μ L 双蒸水, 混匀后于 37 °C 静置 30 min, 再加入 2 mL 0.33% 对氨基苯磺酸、2 mL 0.1% 甲萘胺, 室温放置 10 min, 在 550 nm 波长下测定 OD 值。酶活性单位 (U) 定义为 1 g 鲜样在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所需要的酶量。

POD 活性测定采用愈创木酚氧化法^[16], 取 2.9 mL 0.05 mol/L pH 6.5 磷酸缓冲液、1 mL 2% H₂O₂、1 mL 0.5 mol/L 愈创木酚, 加入 100 μ L 粗酶提取液启动反应, 每隔 30 s 记录 OD_{470 nm}, 共计 5 次。酶活性单位 (U) 为 1 g 鲜样 1 min 内 OD_{470 nm} 降低 0.01 单位所需要的酶量。

ORAC 值测定参照 Paula Becker Pertuzatti^[17]的方法并加以改进, 准确称取 1 g 发芽玉米籽粒粉末, 用 85% 甲醇 (含 0.5% 甲酸) 超声提取 3 次, 提取溶剂体积分别为 10、10、5 mL, 每次提取条件为室温下超声 20 min, 5000 r/min 离心 10 min, 合并 3 次提取上清液待测。用 85% 甲醇 (0.5% 甲酸) 将上清液稀释 400 倍, 取 100 μ L 稀释液加入 50 μ L 荧光素钠, 37 °C 反应 30 min 后, 加入 50 μ L AAPH 一起置于微量培养板上。将平板在自动酶标仪中于 37 °C 温育, 并使用荧光检测器每分钟读取一次, 共读取 100 min, 激发波长为 485 nm, 发射频率为 535 nm。使用 Trolox 绘制标准曲线, 结果表示为 Trolox/g DW。

1.3.6 基因表达

取发芽 3 d 的玉米籽粒, 参照 RNA 提取试剂盒 (Takara) 的说明书提取发芽玉米籽粒的总 RNA。

根据 NCBI 上公布的 cDNA 序列, 采用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计引物, 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, 如下表 1 所示。

荧光定量 PCR 采用 SYBR Premix Ex Taq (Takara) 试剂盒, 以玉米 ACTIN 基因作为内参基因, 并采用 20 μ L 反应体系。

表 1 玉米类胡萝卜素合成相关酶基因引物序列

Table 1 The primer sequence of carotenoids synthesis genes in corn kernels		
基因	引物序列(5'-3')	
	上游引物	下游引物
<i>PSY</i>	CATCTTCAAAGGGGTCGTCA	CAGGATCTGCCTGTACAACA
<i>PDS</i>	GAAATCATCGATGCAACTATGGAA	CTTCGATAGGTGACCTTTGGA
<i>ZDS</i>	GTGTGGTAAAGATCGGACAA	AGAGAGTTGCTCCTTCCAT
<i>LCYB</i>	CATCGTAAGGTTCTCGACA	ATGCCGAAGCAGAAGAAGCTC
<i>LCYE</i>	TTTACGTGCAAATGCAGTCAA	TGACTCTGAAGCTAGAGAAAG
<i>BCH1</i>	CCACGACCAGAACCTCCAGA	CATGGCACCAGACATCTCCA
<i>CYP97C</i>	GTTGACATTGGATGTGATTGG	AACCAACCTTCCAGTATGGC
<i>ACTIN</i>	CGATTGAGCATGGCATTGT	CCCCTAGCGTACAACGAA

表 2 不同浓度 NaCl 胁迫对发芽 3 d 的玉米籽粒生理指标的影响

Table 2 Effects of different concentrations of NaCl stress on physiological and biochemical indexes of germinated corn at 3 d

理化指标	NaCl 溶液浓度/(mmol/L)				
	0	150	300	450	600
发芽率/%	80.50±0.07 ^e	65.50±0.14 ^d	57.50±0.20 ^c	48.00±0.40 ^b	45.50±0.06 ^a
胚芽长度/cm	2.67±0.07 ^d	2.01±0.05 ^c	1.97±0.03 ^c	1.60±0.06 ^b	1.17±0.07 ^a
呼吸强度/(g CO ₂ /g/h FW)	0.59±0.10 ^a	0.99±0.12 ^b	1.26±0.11 ^c	1.11±0.08 ^{bc}	0.94±0.14 ^b

注：不同小写字母表示各处理组间理化指标差异显著 ($p<0.05$)。

1.4 数据统计及分析

试验设置 3 次生物学重复，各指标测定设置 3 次技术重复，试验数据用 SPSS 19.0 软件统计分析，单项方差分析法(ANOVA)进行多重比较，判断显著性差异的统计标准为 $p<0.05$ ，极显著差异的标准为 $p<0.01$ 。ORAC 值用 GraphPad. Prism. V6. 01 软件计算分析。图和表采用 OriginPro 8.5 软件绘制。

2 结果与讨论

2.1 NaCl 胁迫对玉米籽粒生长状况的影响

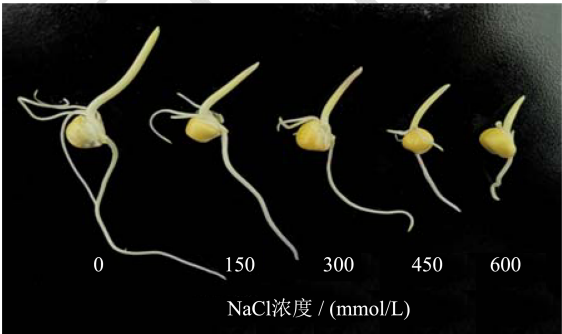


图 1 不同浓度 NaCl 处理下发芽玉米籽粒 3 d 的生长情况
Fig.1 Growth of germinated corn kernels treated with different concentrations of NaCl at 3 d

本试验采用不同浓度 NaCl 预处理玉米籽粒，发芽 3 d 的生长状态如图 1 所示。结果表明，在 0~600

mmol/L NaCl 胁迫下，随 NaCl 浓度增加，玉米籽粒的发芽率和芽长均呈下降趋势。

由表 2 可知，不同浓度 NaCl 处理下，玉米籽粒发芽率和芽长与对照相比较均有显著差异 ($p<0.05$)。当 NaCl 处理浓度为 600 mmol/L 时，玉米籽粒发芽率和芽长受到严重抑制，分别比对照降低了 43.47%和 56.18%，且其抑制程度与处理浓度呈显著正相关，相关系数分别为 0.923 和 0.944 ($p<0.01$)。NaCl 胁迫下，种粒外界渗透压高于内界，导致其吸水不足甚至失水，抑制种子吸收膨胀过程，不能突破种皮，从而抑制发芽^[18]。金正律^[19]等人研究发现盐胁迫抑制种子萌发对发芽的影响有 3 种可能性：阻止种子萌发，但不使其丧失活力；延迟但不阻止种子萌发；使种子永久失去活力。本试验结果表明，NaCl 胁迫对玉米籽粒的发芽有显著抑制作用。这与王永娟^[20]等人研究不同类型盐胁迫对玉米种子萌发特性的影响得到的结果相似。

呼吸强度反应植物的生长状态，由表 2 可知，不同浓度 NaCl 处理下，发芽玉米籽粒呼吸强度先升高再下降，但均高于对照且呈显著差异。当 NaCl 浓度为 300 mmol/L 时，其呼吸强度达到最大值，为 1.26 g CO₂/g/h，比对照提高 113.56%。450 mmol/L NaCl 胁迫下，其呼吸强度略低于 300 mmol/L NaCl 处理组，而比对照提高 88.13%。在 150 和 600 mmol/L NaCl 处理下，其呼吸强度无显著差异，分别比对照提高 67.79%和 59.32%。NaCl 胁迫下发芽玉米籽粒呼吸强

度增强的主要原因是逆境条件下植物体启动自身渗透调节功能,而合成渗透调节物质会消耗大量生物能量,需通过呼吸作用产生更多的 ATP 为其供能,因而供试发芽玉米籽粒的呼吸强度增大^[21]。

2.2 NaCl 胁迫对发芽玉米籽粒中类胡萝卜素含量的影响

本研究利用 C₃₀-HPLC-DAD 方法分析测定了发芽玉米籽粒中类胡萝卜素含量,图 2a 和 2b 分别是 6 种类胡萝卜素标准品和样品的高效液相色谱结果图。通过与类胡萝卜素标准品的保留时间比对,确定玉米籽粒样品中主要的 6 种类胡萝卜素分别为叶黄素、玉米黄质、 α -隐黄质、 β -隐黄质、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素。

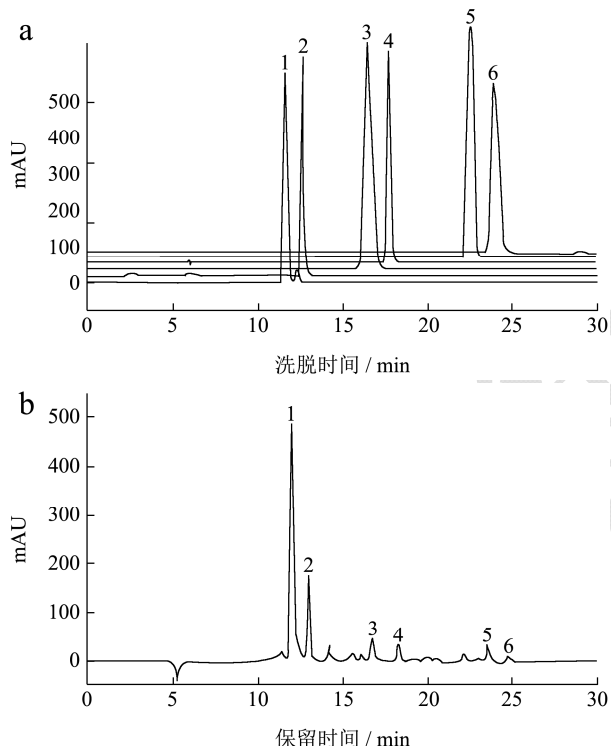


图 2 6 种类胡萝卜素标准品及发芽玉米籽粒中类胡萝卜素 HPLC 图

Fig.2 HPLC results of six kind of carotenoids standard and carotenoids in germinated corn kernels

注: 1.叶黄素; 2.玉米黄质; 3. α -隐黄质; 4. β -隐黄质; 5. α -胡萝卜素; 6. β -胡萝卜素。

不同浓度 NaCl 胁迫下,玉米籽粒发芽第 3 d, 6 种类胡萝卜素含量随 NaCl 浓度增加呈先升高后降低的趋势,单个含量从高到低依次为叶黄素>玉米黄质> α -隐黄质> β -胡萝卜素> β -隐黄质> α -胡萝卜素。叶黄素和玉米黄质约占 6 种类胡萝卜素总量的 84.42%, β -隐黄质、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素含量均小于 1

$\mu\text{g/g}$ 。150 mmol/L NaCl 处理下,6 种类胡萝卜素总量与对照组间无显著差异。当 NaCl 浓度为 300 mmol/L 时,6 种类胡萝卜素总量提高到 24.96 $\mu\text{g/g}$,比对照增加了 21.52% (如图 3 所示),其中叶黄素和玉米黄质含量显著增加($p<0.05$),达到最大值 13.18 $\mu\text{g/g}$ 和 7.89 $\mu\text{g/g}$,分别比对照提高 19.49%、29.56%,其富集效果显著。当 NaCl 浓度继续增加 450 和 600 mmol/L 时,叶黄素含量下降,分别比 300 mmol/L NaCl 处理减少了 18.74% 和 34.29%。

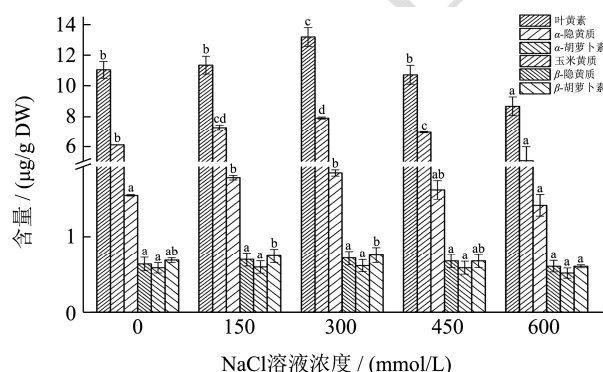


图 3 不同浓度 NaCl 胁迫下发芽玉米中类胡萝卜素含量

Fig.3 Carotenoid content of germinated corn kernels under different concentrations of NaCl

注: 不同小写字母表示各处理组间类胡萝卜素含量差异显著 ($p<0.05$)。

植物在高温、干旱和盐等非生物胁迫下会选择性地合成类胡萝卜素等萜类物质帮助其抵御胁迫^[22]。梁明华等人^[23]研究发现巴氏藻类在盐胁迫下可大量积累 β -胡萝卜素。烟草在盐胁迫下能通过提高类胡萝卜素含量以减少活性氧的积累,保护烟草避免受到氧化压力^[24]。由此可知,NaCl 胁迫处理可作为提高类胡萝卜素的有效手段。试验结果表明适宜浓度的 NaCl 处理玉米籽粒萌发可促进其类胡萝卜素的合成。但若 NaCl 处理浓度过大,胁迫程度过重,会导致发芽玉米生长受阻,也会抑制类胡萝卜素合成。史利平等^[25]人研究发现,不同浓度的 NaCl (0、100、200、400 mmol/L) 处理玉米幼苗后,其类胡萝卜素含量呈现先上升后下降的趋势。发芽玉米籽粒 NaCl 胁迫下类胡萝卜素含量的提高可能的原因是 NaCl 胁迫导致玉米籽粒膜脂过氧化,而类胡萝卜素被认为是保护种子免受氧化应激的抗氧化剂^[26],可维持细胞内的氧化还原势,在抵御 NaCl 胁迫时发挥重要作用,保障细胞正常生理活动。

2.3 NaCl 胁迫下发芽玉米籽粒中抗氧化活性的变化

2.3.1 SOD 和 POD 活性变化

发芽玉米籽粒在 0~300 mmol/L 的 NaCl 处理下,随着 NaCl 浓度增加,其 SOD 活性逐步提高。在 300 mmol/L NaCl 处理下, SOD 活性增加显著 ($p<0.05$),比对照提高了 30.79%。当 NaCl 浓度增加到 600 mmol/L 时, SOD 活力相比与 300 mmol/L 组略有下降,但无显著性差异 ($p>0.05$) (图 4a),表明 NaCl 处理对发芽玉米籽粒中 SOD 活性具有一定的促进作用。在 0~600 mmol/L 浓度范围内, NaCl 胁迫发芽玉米籽粒中 POD 活性变化随处理浓度的增加呈上升趋势。600 mmol/L NaCl 胁迫的发芽玉米籽粒中 POD 活性达到最大值 783.59 U/g,比对照组增加了 23.57% (图 4b)。上述结果与樊丽^[27]研究草莓叶片在 NaCl 胁迫条件下,其 SOD 和 POD 活性增加的结果类似。

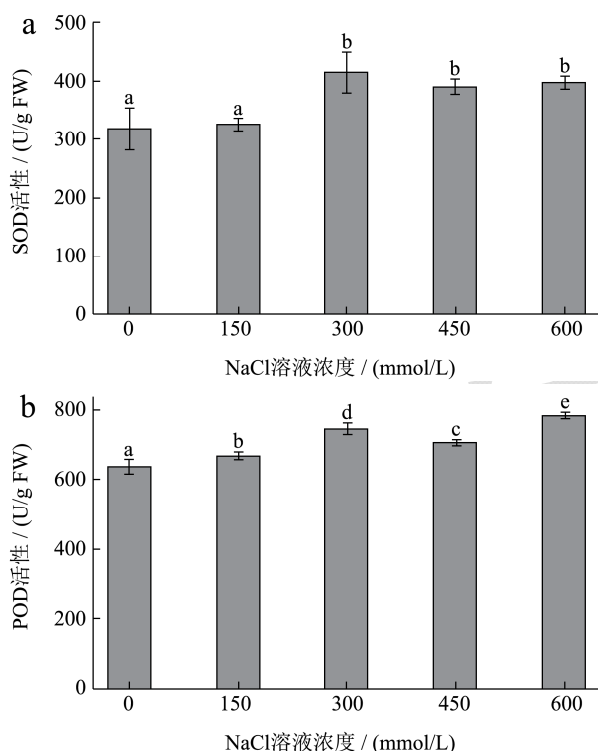


图 4 不同浓度 NaCl 胁迫下发芽玉米籽粒中 SOD 和 POD 活性
Fig.4 SOD and POD activity of germinated corn kernels under different concentrations of NaCl

注: 不同小写字母表示各处理组间差异显著 ($p<0.05$)。下同。

SOD 是植物自由基清除系统中重要的保护酶之一,可以消除超氧化物阴离子自由基生成 H_2O_2 ;而 POD 是植物清除过氧化物、降低活性氧伤害的另一种关键酶,可将 H_2O_2 分解成 H_2O 和 O_2 ,降低 H_2O_2 浓度从而降低毒害作用^[13]。发芽玉米籽粒在 NaCl 胁迫下产生活性氧,导致膜脂过氧化,此时植物组织启动其保护酶系统以降低或消除活性氧的伤害。根据试验结果可知 NaCl 胁迫下,发芽玉米籽粒中 SOD 和 POD

活性均增强,可有效清除膜脂过氧化物对其造成的生理伤害^[28],维持其健康生长和正常的生理功能。

2.3.2 抗氧化能力指数(ORAC)变化

发芽玉米籽粒 NaCl 胁迫对 ORAC 值具有显著的影响。随 NaCl 浓度增加,玉米籽粒发芽第 3 d 的 ORAC 值先上升后下降 (图 5),该趋势与盐胁迫下玉米籽粒中类胡萝卜素含量变化趋势类似。NaCl 浓度从 0 升高至 300 mmol/L 时, ORAC 值显著提高 ($p<0.05$),在 300 mmol/L 时达到最大值 (173.14 $\mu\text{mol Trolox/g}$),是对照的 4.74 倍。随后 NaCl 浓度升高, ORAC 值显著下降。用 NaCl 溶液处理草莓果实后发现,低浓度 NaCl 处理组的 ORAC 值是对照组的 1.11 倍,随着 NaCl 浓度上升,草莓果实中 ORAC 值呈现先升高后下降的趋势^[28]。

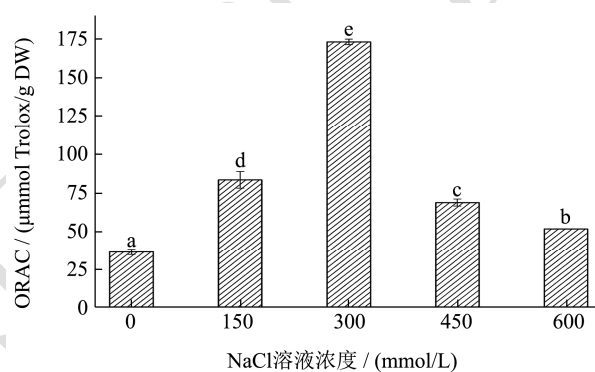


图 5 不同浓度 NaCl 胁迫下发芽玉米籽粒 ORAC 值

Fig.5 The ORAC values of germinated corn kernels under different concentrations of NaCl

NaCl 胁迫下发芽玉米籽粒中总抗氧化能力显著增强,为抵御 NaCl 胁迫对发芽玉米籽粒造成的活性氧损伤,机体一方面通过调节细胞内抗氧化酶 SOD 和 POD 活性来清除细胞内的活性氧,另一方面提高类胡萝卜素在玉米籽粒体内合成积累,从而清除 NaCl 胁迫产生的活性氧和有害自由基,这与本研究中 SOD、POD 活性、ORAC 值增加和类胡萝卜素含量升高的结果相对应。金兰^[29]等人研究发现,不同浓度 NaCl 胁迫下紫花苜蓿中 SOD 和 POD 活性随盐浓度增大而增强,但较高浓度下 SOD 活性减弱。NaCl 胁迫下玉米籽粒的总抗氧化能力增强,提高了其抗逆性,有利于芽苗生长及营养积累。

2.4 类胡萝卜素合成途径中关键酶基因的相对表达量变化

外源施加不同浓度的 NaCl 对类胡萝卜素合成途径中关键酶基因相对表达量的影响如图 6 所示。在 0~300 mmol/L NaCl 处理下, *PSY*、*PDS* 和 *ZDS* 基因

相对表达量均随 NaCl 浓度增大而增加 (图 6a、b、c), 当 NaCl 浓度为 300 mmol/L 时, 以上 3 种基因表达量显著提高, 分别是对照的 1.63、1.53 和 1.31 倍, 加快了类胡萝卜素合成速率。在 450 和 600 mmol/L NaCl 处理下, 3 种关键酶基因相对表达量均降低, 类胡萝卜素合成速率减慢。PSY 基因与高盐、干旱、高光等非生物胁迫有关, 可应答非生物胁迫并进行自身调节, 参与植物的抗逆反应^[30]。尤丽佳^[31]等人研究发现用 300 mmol/L NaCl 处理过表达 PSY 基因的拟南芥, 其类胡萝卜素含量是对照的 2.91 倍。但高浓度 NaCl 会抑制类胡萝卜素合成途径中关键酶的相对表达量, 从而降低类胡萝卜素含量。PSY 是类胡萝卜素合成途径中的第一个合成酶, 也是限速酶, 其活性和相对表达量直接影响合成效率。研究表明, 在土豆中过表达 PSY 基因可显著提高类胡萝卜素水平, 油菜种子过表达 PSY 基因可使其类胡萝卜素增加 50 倍^[32]。此外, PDS 和 ZDS 共同参与完成类胡萝卜素合成途径中的去饱和和反应生成番茄红素, 同是合成途径中的限速酶。

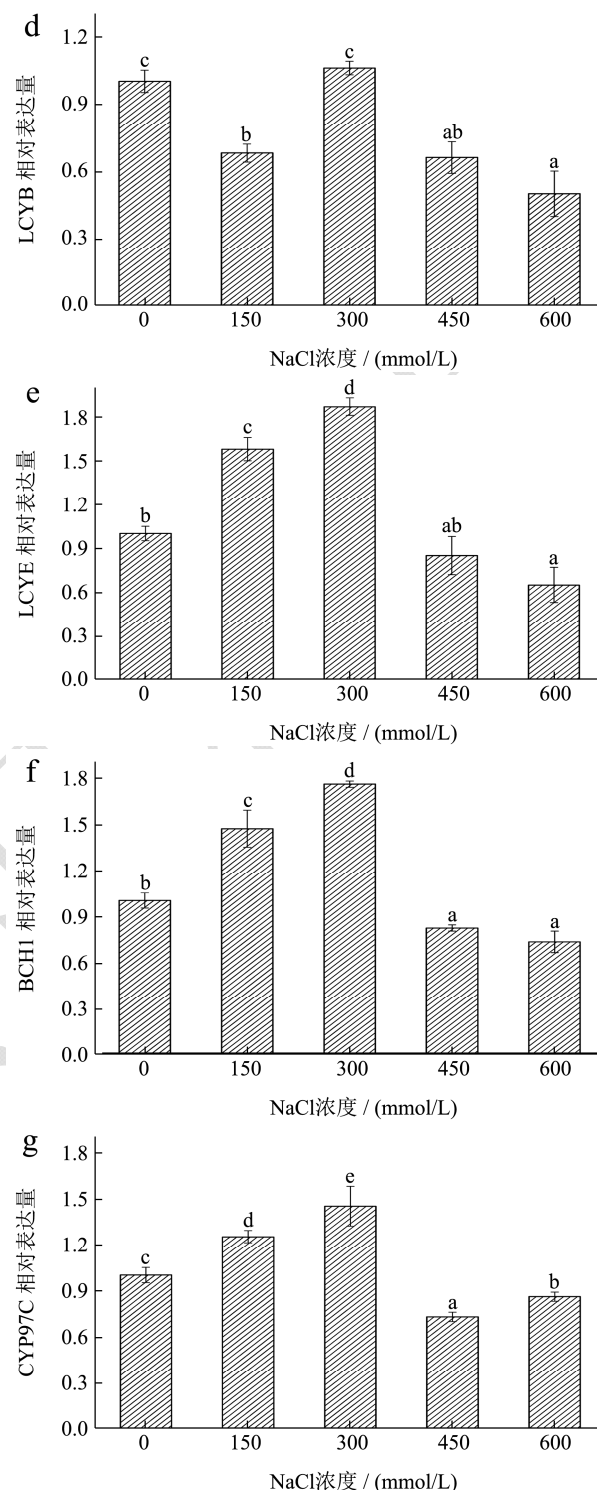
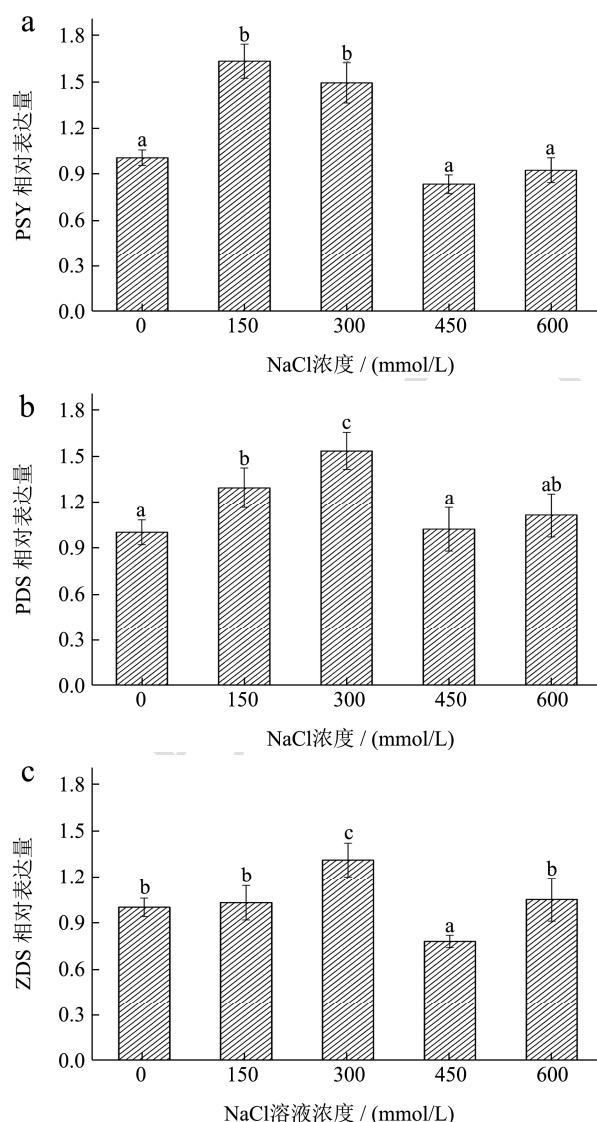


图6 NaCl 处理下发芽玉米籽粒中类胡萝卜素合成途径关键酶基因的相对表达量变化

Fig.6 Relative expression changes of key enzyme genes in carotenoid synthesis pathway in germinated corn kernels under NaCl treatment

如图 6d 所示, 在 300 mmol/L NaCl 处理下, LCYB 基因相对表达量与对照无显著变化, 随 NaCl 浓度增加, 其相对表达量显著下降, 分别比对照减少了 33.77%和 49.85%。NaCl 浓度在 0~600 mmol/L 范围内,

LCYE、*BCH1* 和 *CYP97C* 基因相对表达量均随浓度增加呈现先增高后降低的趋势, 且 NaCl 浓度为 300 mmol/L 时, 三者相对表达量显著增加, 分别为对照的 1.87、1.76 和 1.45 倍 (图 6e、f、g)。目前研究表明 *LCYB* 和 *LCYE* 酶将类胡萝卜素路径分为两个支路, 番茄红素经 *LCYB* 和 *LCYE* 共同催化生成 α -胡萝卜素, 再经 *BCH1* 和 *CYP97C* 催化最终生成叶黄素; 另一支路由 *LCYB* 催化生成 β -胡萝卜素, 再经胡萝卜素 *BCH1* 催化, 最终转化为玉米黄质^[6]。本研究结果显示, 300 mmol/L NaCl 处理下 *LCYB* 基因相对表达量无显著变化, 而 *LCYE* 基因相对表达量显著提高, 表明番茄红素流向 α -胡萝卜素分支途径。同时 *BCH1* 和 *CYP97C* 基因相对表达量也显著提高, 进一步促进 α -胡萝卜素合成叶黄素, 从而玉米籽粒中的叶黄素得到富集。同样在 *LCYE* 基因过量表达的拟南芥中, 检测到叶黄素的含量是野生型的 2 倍^[33]。此外, *BCH1* 相对表达量的增加也促进了玉米黄质的合成, 且 *LCYB* 基因表达量无显著增加, 番茄红素下游途径流向 α -胡萝卜素, 因此, 发芽玉米籽粒中玉米黄质含量低于叶黄素含量。在 Li^[34] 的研究中, 玉米籽粒中高 *LCYE* 相对表达量对应较高的类胡萝卜素 (尤其是叶黄素和玉米黄质组分) 的积累量, 随玉米籽粒发育 10~30 d, 其叶黄素和玉米黄质含量分别增加了 19.9 和 9.6 倍。当 NaCl 浓度继续增加时, 类胡萝卜素合成途径中关键酶基因相对表达量均显著下降, 表明 NaCl 浓度大于 300 mmol/L 时, 酶基因表达受到抑制, 降低类胡萝卜素合成速率, 从而类胡萝卜素含量下降。

3 结论

本研究探讨了 NaCl 胁迫发芽玉米籽粒富集类胡萝卜素的条件, 得出 300 mmol/L NaCl 胁迫下, 发芽玉米籽粒中限速酶 *PSY*、*PDS*、*ZDS* 基因表达量显著提高, 加快类胡萝卜素合成速率。叶黄素合成分支途径中关键酶 *LCYE*、*CYP97C* 基因相对表达量分别比对照提高了 1.87 和 1.45 倍, 促进了叶黄素的合成, 其含量最高达 $13.18 \mu\text{g/g}$, 其次玉米黄质含量为 $7.89 \mu\text{g/g}$, 二者分别为对照的 1.19 和 1.30 倍。此外, 玉米籽粒的 SOD、POD 及总抗氧化能力 ORAC 显著升高, 提高了发芽玉米籽粒的抗氧化活性。综上所述, 300 mmol/L NaCl 胁迫下发芽玉米籽粒可作为一种富含类胡萝卜素功能性食品的来源, 为玉米产品的深加工及综合利用提供科学依据和新思路。

参考文献

[1] REN T T, LI S G. Review on nutritive value and health

function of corn germ and its food development [J]. Grain Processing, 2012, 37(2): 65-69

[2] 良文.玉米营养价值的特色[J].江苏卫生保健:今日保健, 2015,1:38-38

LIANG Wen. Characteristics of nutritional value of corn [J]. Jiangsu Health Care: Today Health Care, 2015, 1: 38-38

[3] 李大婧,庞慧丽,刘春泉.叶黄素和玉米黄质对眼睛的保护作用研究进展[J].江苏农业科学,2013,41(9):1-4

LI Da-jing, PANG Hui-li, LIU Chun-quan. Research progress on the protective effect of lutein and zeaxanthin on eyes [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2013, 41(9): 1-4

[4] 刘晓涛.玉米的营养成分及其保健作用[J].中国食物与营养,2009,3:60-61

LIU Xiao-tao. Nutritional composition of maize and its health effects [J]. Food and Nutrition in China, 2009, 3: 60-61

[5] Hiran P, Kerdchoechuen O, Laohakunjit N. Combined effects of fermentation and germination on nutritional compositions, functional properties and volatiles of maize seeds [J]. Journal of Cereal Science, 2016, 71: 207-216

[6] Lado J, Zacarias L, Rodrigo M J. Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit development [M]. Carotenoids in Nature Springer International Publishing, 2016: 161-162

[7] Payyavula R S, Navarre D A, Kuhl J C, et al. Differential effects of environment on potato phenylpropanoid and carotenoid expression [J]. BMC Plant Biology, 2012, 12(1): 39-566

[8] Lim J H, Park K J, Kim B K, et al. Effect of salinity stress on phenolic compounds and carotenoids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) sprout [J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1065-1070

[9] Abdallah S B, Aung B, Amyot L, et al. Salt stress (NaCl) affects plant growth and branch pathways of carotenoid and flavonoid biosyntheses in *Solanum nigrum* [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2016, 38(3): 1-13

[10] Aliu S, Rusinovci I, Gashi B, et al. The effects of salt stress on seed germination of some maize (*Zea mays* L.) genotypes[C]// 50th Croatian and 10th International Symposium on Agriculture. Opatija, Croatia, 2015: 229-303

[11] 支巨振.新系列国标《农作物种子检验规程》介绍[J].中国标准导报,1997,5:24-35

ZHI Ju-zhen. Introduction of the new series of national standard "Inspection Procedures for Crop Seeds" [J]. China Standard Herald, 1997 5: 24-35

[12] Li H X, Xu J W, Cai M L, et al. Improved method for measuring respiratory rate of plant seeds using

- small-skep-method [J]. Journal of Biology, 2015, 1(32): 100-102
- [13] Kao T H, Chen C J, Chen B H. Carotenoid composition in *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz as determined by HPLC-MS and affected by freeze-drying and hot-air-drying [J]. Analyst, 2011, 136(15): 3194-3202
- [14] Li D J, Xiao Y D, Zhang Z Y, et al. Analysis of (all-E)- lutein and its (Z)-isomers during illumination in a model system [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 100: 33-39
- [15] 徐东,赵建,黄汉昌,等.改良的黄嘌呤氧化酶法测定动植物组织中 SOD 比活力[J].食品科学,2011,32(6):237-241
XU Dong, ZHAO Jian, HUANG Han-chang, et al. Determination of SOD specific activity in animal and plant tissues by improved xanthine oxidase method [J]. Food Science, 2011, 32(6): 237-241
- [16] Hammerschmidt R, Nuckles E M, Kué J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium* [J]. Physiological Plant Pathology, 1982, 20(1): 73-82
- [17] Pertuzatti P B, Barcia M T, Rodrigues D, et al. Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries [J]. Food Chemistry, 2014, 164(3): 81-88
- [18] Zhang Y F, Chen C Y. Response of NaCl and Na₂SO₄ stress on germination and starch conversion in germinating seeds of maize [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 33(29): 74-78
- [19] 金正律,周秋艳.盐胁迫对不同玉米品种种子发芽及幼苗生长的影响[J].湖北农业科学,2014,53(13):2989-2991
JIN Zheng-lyu, ZHOU Qiu-yan. Effects of salt stress on seed germination and seedling growth of different maize varieties [J]. Journal of Hubei Agricultural Sciences, 2014, 53(13): 2989-2991
- [20] 王永娟,周妍,金勇男,等.不同类型盐胁迫及外源钙离子对玉米和大豆种子萌发特性的影响[J].东北农业科学,2014, 39(4): 6-11
WANG Yong-juan, ZHOU Yan, JIN Yong-nan, et al. Effects of different types of salt stress and exogenous calcium on germination characteristics of maize and soybean seeds [J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 2014, 39(4): 6-11
- [21] 王鹏山,慈华聪,田晓明,等.不同钠盐胁迫对狼尾草种子萌发及幼苗生长的影响[J].安徽农业科学,2014,21:7007-7010
WANG Peng-shan, CI Hua-cong, TIAN Xiao-ming, et al. Effects of different sodium salt stress on seed germination and seedling growth of pennisetum [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 21: 7007-7010
- [22] Loreto F, Schnitzler J P, Dicke M, et al. Abiotic stresses and induced BVOCs [J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(3): 154-155
- [23] 梁明华.巴氏杜氏藻类胡萝卜素合成与降解相关基因的功能鉴定及盐胁迫响应机制研究[D].广州:华南理工大学, 2017
LIANG Ming-hua. Functional identification of genes involved in carotenoid synthesis and degradation of *Dunaliella salina* and salt stress response mechanism [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017
- [24] 李招娣.枸杞类胡萝卜素生物合成途径关键基因的克隆及功能表达[D].天津:天津大学,2015
LI Zhao-di. Cloning and functional expression of key genes in carotenoid biosynthesis pathway [D]. Tianjin: Tianjin University, 2015
- [25] 史利平,季静,王昱,等.盐胁迫条件下玉米萜类合成相关基因的表达式分析[J].中国生物工程杂志,2016,36(8):31-37
SHI Li-ping, JI Jing, WANG Gang, et al. Expression analysis of genes related to corn sputum synthesis under salt stress [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 36(8): 31-37
- [26] Smolikova G, Laman N, Boriskevich O V. Role of chlorophylls and carotenoids in seed tolerance to abiotic stressors [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2011, 58(6): 965-973
- [27] 樊丽.丛枝菌根真菌对草莓耐盐性及果实品质的影响[D].北京:中国农业科学院,2011
FAN Li. Effects of *Arbuscular Mycorrhizal Fungi* on salt tolerance and fruit quality of strawberry [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011
- [28] Khan A, Ungar I. Effects of thermoperiod on recovery of seed germination of halophytes from saline conditions [J]. American Journal of Botany, 1997, 84(2): 279
- [29] 金兰,罗桂花.盐胁迫对紫花苜蓿 SOD 丙二醛及 SOD 同工酶的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2004,5:15-16
JIN Lan, LUO Gui-hua. Effects of salt stress on sod malondialdehyde and sod isozyme of alfalfa [J]. Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2004, 5: 15-16
- [30] Li F, Vallabhaneni R, Wurtzel E T. PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis [J]. Plant Physiology, 2008, 146(3): 33-45

(下转第 95 页)