

水稻种子花色苷形成及其对稻谷储藏特性的影响

张丽丽¹, 刘斌美¹, 许 学^{1,2}, 章忠贵^{1,2}, 吴跃进¹

(¹中国科学院离子束生物工程学重点实验室, 合肥 230031; ²安徽农业大学农学院, 合肥 230036)

摘要: 花色苷是有色稻种皮和颖壳里呈现颜色的主要物质, 属于类黄酮类物质, 具有抗氧化性。本研究围绕水稻种子形成过程中花色苷含量的变化以及其对稻谷储藏特性变化的影响, 探讨花色苷在稻谷储藏中延长种子寿命的作用。结果显示: 选取的 3 个品种中, 水稻种子的花色苷形成主要在发育初期, 随着颖果体积的增大, 颖果花色苷的含量会逐渐降低, 而颖壳的花色苷含量变化不显著, 将种子进行人工老化后, 仍只有颖果的花色苷含量出现下降的趋势, 表明种子在老化过程中颖壳的花色苷不参与抗老化的各项代谢反应。老化种子 SOD 活性分析显示, 花色苷含量低的中粳 9311 可能是通过 SOD 酶活性增加, 削减高温高湿胁迫对种子衰老的影响; 由稻谷感染霉菌情况显示在 3 个水稻品种中, 花色苷含量高的品种的抗霉菌能力要稍优于花色苷含量低的品种。但综合来看, 花色苷含量高低并不是决定种子寿命的主要因素。

关键词: 花色苷; 稻谷; 耐储藏; 人工老化; 抗霉菌

Formation of Anthocyanin in Rice (*Oryza sativa* L.) and Influence of Anthocyanin Content to Storage

ZHANG Li-li¹, LIU Bin-mei¹, XU Xue^{1,2}, ZHANG Zhong-gui^{1,2}, WU Yue-jin¹

(¹Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031;

²School of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Anthocyanin, mainly existing in glume and episperm of colored rice, is a group of compounds formed from anthocyanidin and glucoside. Because of the structure of flavonoid, anthocyanin has the ability of antioxidation. The paper reported the changes of rice anthocyanin in growing and ageing processes and the function of rice anthocyanin to extend seed longevity in seed storage. The results indicated that rice anthocyanin had been accumulated in the early stage. With the increase of the seed's size, anthocyanin content gradually decreased in carpopsis; meanwhile, the anthocyanin content did not change significantly in glume. After artificial ageing, the anthocyanin content notably decreased, contrary to the result in glume. It might indicate that the anthocyanin in glume doesn't get involved in antioxidant response. The analyses of mycotic infection of ageing seeds suggested that, in the three varieties, the anti-mycete ability of the ones with higher content of anthocyanin was better than that with lower content of anthocyanin. Considering the results, anthocyanin was not the crucial factor in seed storage.

Key words: Anthocyanin; Rice; Storage; Artificial ageing; Anti-mycete

稻谷是亚洲最主要的粮食之一, 也是我国最主要的储备粮。但稻谷在长时间储藏之后, 品质下降, 发芽率也会急剧降低^[1]。为确保储备粮的品质, 每

年国家投入大量的人力物力和资金用于更换储备粮。所以, 储藏长寿命的种子可以极大地减少人力物力的浪费。种子寿命长短是由多种因素共同调控

收稿日期: 2011-09-01 修回日期: 2011-11-24

基金项目: 中科院方向性项目 (KJCX2-YW-N34, KJCX2-EW-N05); 国家自然科学基金 (10975153); 安徽省科技计划项目 (11010301008); 安徽省自然科学基金 (11040606Q58)

作者简介: 张丽丽, 博士研究生。研究方向: 离子束生物技术。E-mail: lilyshengwu@yahoo.com.cn

通信作者: 吴跃进, 博士, 研究员。研究方向: 离子束生物技术。E-mail: yjwu@ipp.ac.cn

的,如耐储藏基因表达、种子含水量^[2]、脂肪氧化酶^[3-4]等。原始的野生稻多为有色稻,在野外环境中,野生稻种子自然成熟后脱落,在土壤中能够保持活力数月或者1~2年,该过程中种子花色苷发挥重要作用。

花色苷是一类水溶性的类黄酮类物质,是由多种花色素和糖形成的糖苷,也是有色稻颖壳和种皮显色的主要成分。它们赋予了植物各种各样的颜色,被广泛用作食品色素,它的保健作用也越来越受到人们的广泛关注。但花色苷的生物产量并不高,尤其在生长过程中受外界因素的影响非常大^[5-6]。

近年来具有生物活性的物质开始成为瞩目的焦点,由于花色苷的抗氧化性^[7-9]、抗炎性、抗癌性和抗细胞毒性^[10-12]的特质,也成为研究的热点。目前对于花色苷的研究大多数集中于对哺乳动物或其细胞的功效上^[13-15],花色苷在水稻种子中的形成过程和对储藏中种子活力的影响鲜见报道。

本研究选取3种花色苷含量不同的水稻品种,对它们发育和老化阶段的花色苷含量进行了检测。分析颖果、颖壳花色苷含量的变化规律,还分析了陈化稻谷的SOD活性和种子储藏过程中陈化变质、霉变情况,旨在进一步探讨花色苷含量在稻谷储藏中的作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

实验选用的3个水稻品种(组合)为农丰优1671、中粳9311和冲腿。农丰优1671(农丰A/YR1671)是由本实验室和安徽荃银种业共同选育的杂交中粳组合,它的颖壳为浅红色、种皮白色;中粳9311颖壳为浅黄色、种皮白色;冲腿是云南地方品种,颖壳为深黄色、种皮红色(图1)。



图1 试验材料

Fig. 1 Experimental materials

从左至右为农丰优1671、中粳9311和冲腿

From left to right are Nongfengyou1671, Zhongxian9311 and Chongtui

3个水稻品种于2008年正季种植在中科院离子束生物工程学重点实验室合肥试验田中,分别在上述品种开花后2、3、4和5周取样。样品保存于-20℃冰箱。

1.2 花色苷检测

无水乙醇,Na₂HPO₃·12H₂O,NaH₂PO₃·2H₂O和安替福民(次氯酸钠溶液)购于国药集团化学试剂有限公司,盐酸和丙三醇购于上海苏懿化学试剂有限公司,均为分析纯。抗坏血酸和还原型GSH(Bio Basic Inc.分装)以及PVPK购于上海生工生物工程有限公司。

1.2.1 花色苷的提取 花色苷的提取方法根据张名位^[16]的黑米色素提取技术稍做修改。样品用液氮或粉碎机研磨成粉状,准确称取0.5g,加入5ml提取液(95%乙醇与1.5mol/L盐酸,V/V=85/15),60℃水浴5h,重复3次。

1.2.2 花色苷含量的测定 样品水浴后避光静置一段时间,吸出上清液测量535nm处的吸光度(紫外可见光分光光度计,TU-1901,北京普析通用仪器公司)。定义的535OD吸光度为一个单位(U),花色苷的含量(U/g)=OD×10/W,W为样品的质量。

1.3 稻谷人工老化方法

按照何成芳等^[17]的方法稍做修改,模拟稻谷储藏中的高温高湿的环境。具体做法是将稻谷装入纱网袋,悬挂在智能人工气候培养箱(ZRX-300D,杭州钱江仪器设备有限公司)内,设置温度为42℃,湿度50%,老化期间每隔1d将种子翻动1遍。

1.4 发芽率测定

按照GB/T3543.4-1995的方法,采用纸上发芽法定期测定发芽率。

1.5 SOD的提取和检测

称取2.5g糙米,研磨成粉状,加入3ml提取液(50mmol/L的pH7.0磷酸缓冲液,20%甘油,1mmol/L还原型GSH,2mmol/L抗坏血酸,1%PVPK)继续研磨成匀浆,8000r/min 4℃冷冻离心15min,吸取上清液,为粗酶液。使用SOD可见光试剂盒(南京建成生物研究所)进行检测。

1.6 霉菌感染情况鉴定方法

种子发芽6d后,用肉眼能看到有霉菌菌丝包围的种子即被感染种子。

1.7 数据分析

数据分析采用Excel和Origin软件。

2 结果与分析

2.1 花色苷在稻谷中的含量分布

将成熟稻谷分为颖壳、果皮和种皮、胚乳、胚 4 个部分分别检测,结果显示:颖果的花色苷主要分布于表层(果皮和种皮),胚乳基本不含花色苷,颖壳的花色苷含量稍低。胚部分不仅体积极小,其花色苷含量也非常少(图 2)。表明种子的花色苷主要分布在颖果表层和颖壳。

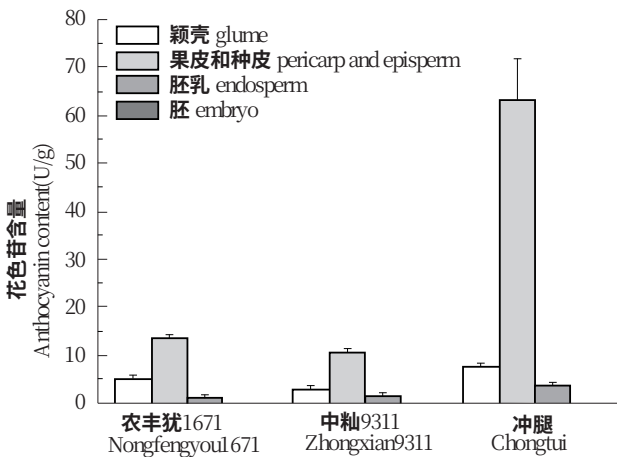


图 2 花色苷在稻谷中的含量分布

Fig.2 Distribution of anthocyanin content in rice

2.2 稻谷发育阶段花色苷含量的变化

根据生长期颖果的大小,种子分为 I-IV 4 个阶段(灌浆期、乳熟期、蜡熟期和完熟期),相应的颖壳也分成 4 个阶段(图 3)。分别检测颖果和颖壳,可以看到颖果中的花色苷含量随着稻谷的成熟是减少的(图 4)。I 期颖果的花色苷含量最高,是 IV 期颖果花色苷含量的几倍,甚至是十几倍。农丰优 1671 I 期颖果的花色苷含量高达 33.92U/g,而中粳 9311 和冲腿的 I 期颖果花色苷含量也分别达到了 14.35U/g 和 16.76U/g。有色稻品种冲腿,从 II 期开始花色苷的含量就趋于稳定,而农丰优 1671 和中粳 9311 的花色苷含量仍在继续减少。

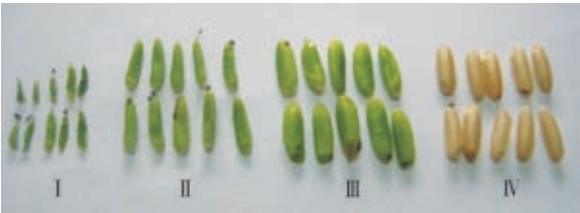


图 3 不同发育时期的水稻颖果

Fig.3 Rice caryopsis at different growing stage

I 灌浆期; II 乳熟期; III 蜡熟期; IV 完熟期

I Grain filling period, II Milk stage, III Waxy ripe stage,

IV Full ripe stage

相对于颖果,颖壳的花色苷含量变化较不显著, 3 个品种中只有中粳 9311 的颖壳到第 IV 期时含量出现了显著性的下降,其余 2 个品种的颖壳花色苷在发育过程中均没有发生显著性的变化(图 5)。在试验所选的 3 个品种中,有色稻冲腿的花色苷含量在颖果和颖壳部分都是最高的,而中粳 9311 在这两个部分都是最低的。

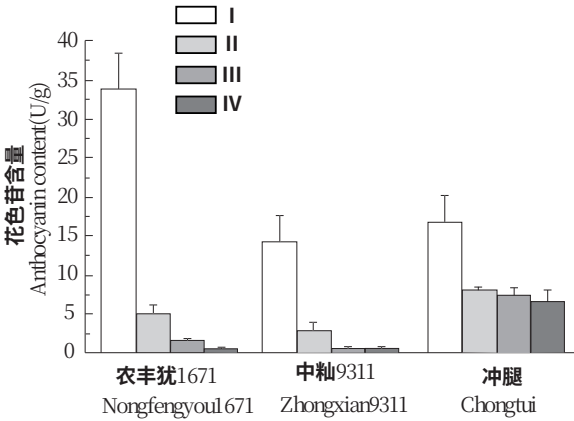


图 4 不同品种的稻谷在发育阶段颖果花色苷含量的变化

Fig.4 The changes of anthocyanin content in rice caryopsis of different varieties of rice at growing stage

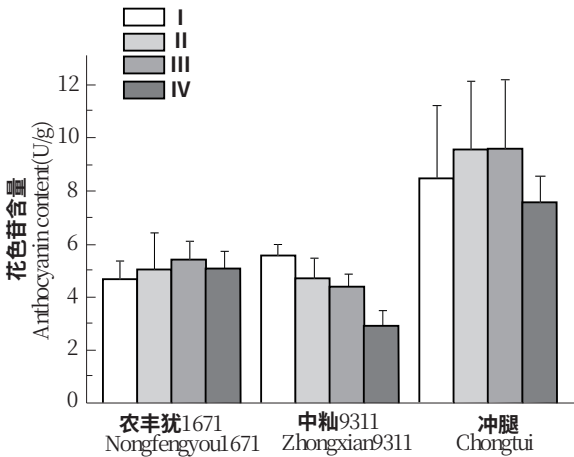


图 5 不同品种的稻谷在发育阶段颖壳花色苷含量的变化

Fig.5 The changes of anthocyanin content in glume of different varieties of rice at growing stage

2.3 稻谷人工老化过程花色苷含量的变化

将上述 3 个品种的成熟稻谷装入纱网袋中置于智能人工气候培养箱中进行人工老化(42℃, 湿度 50%)。经过 0d、10d、15d、20d 和 25d 分别取出一部分种子进行检测。随着老化时间的增加,颖果中的花色苷含量出现较显著的减少,而颖壳花色苷含量相对稳定,变化较小(图 6)。老化 15d 后,花色苷的

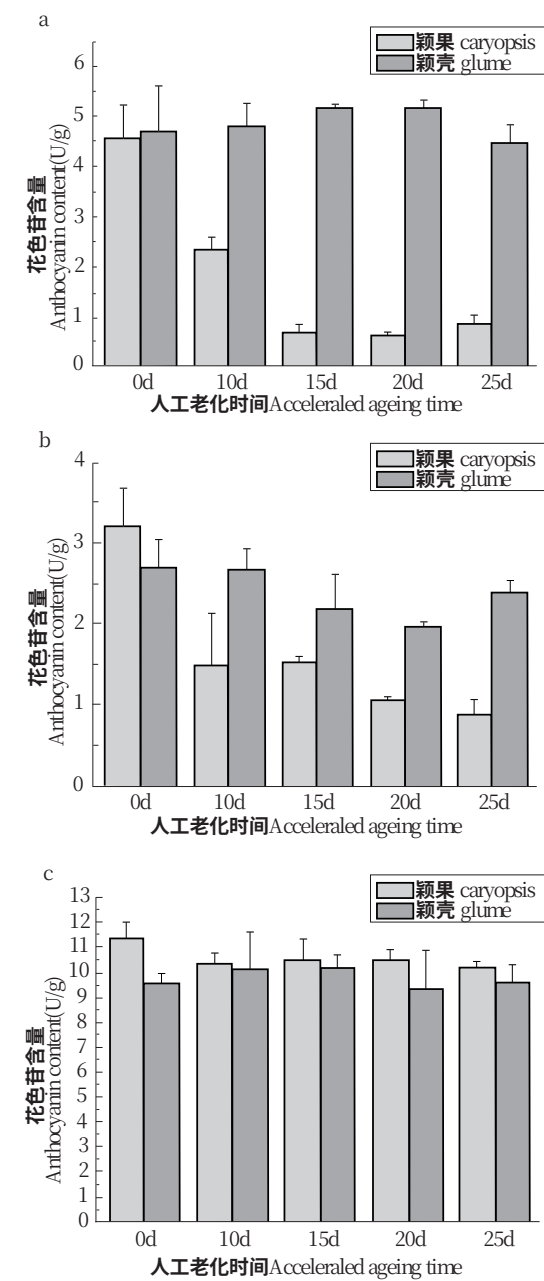


图 6 3 种稻谷中花色苷含量在老化过程中的变化

Fig.6 The changes of anthocyanin content of 3 varieties of rice

a: 农丰优 1671; b: 中粳; c: 冲腿

a: 1671 Nongfengyou1671, b: 9311 Zhongxian9311, c: Chongtui

含量降低的速度变缓慢。农丰优 1671 和中粳 9311 经过老化 25d 后,颖果的花色苷含量分别下降了 81% 和 72%。冲腿在老化过程中花色苷含量变化不明显,各时间段之间没有显著性差异。

2.4 老化过程中稻谷 SOD 活性的变化

SOD 是生物体内重要的抗氧化酶,广泛分布于各种生物体内,具有特殊的生理活性,是生物体内清除自由基的首要物质,所以 SOD 在生物体内的水平

高低可以认为是衰老与死亡的直观指标。试验中也分别测量了 3 种稻谷不同老化时期的 SOD 活性,期望它能够反应出稻谷在高温高湿环境下的品质变化(图 7)。从图 7 中可以看出,农丰优 1671 和冲腿的 SOD 活性本底较低,但冲腿老化后花色苷含量由 19.04U/g 下降为 8.39U/g,减少了近 50% 的活性,农丰优 1671 的 SOD 活性虽然有一些波动,但各阶段之间没有显著性差异。中粳 9311 的 SOD 活性最高,且老化 25d 后开始出现上升的趋势。

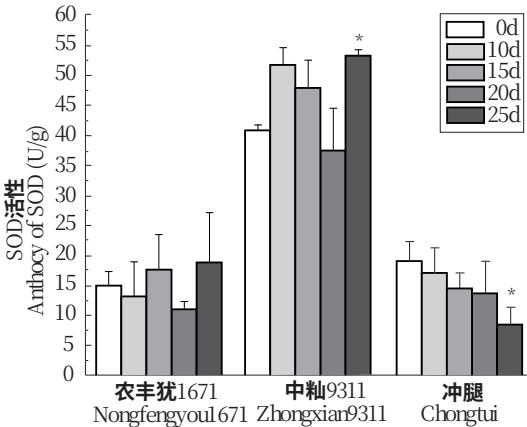


图 7 老化过程中稻谷 SOD 活性的变化

Fig.7 The changes of SOD activity of rice in accelerated ageing time

* 表示 $P < 0.05$ * means significance of $P < 0.05$

2.5 花色苷含量与抗霉菌的相关性

将经过 1 次老化的种子进行 2 次老化(42℃,湿度 90%)。由于第 2 次老化的湿度很大,适宜霉菌的生长,老化完成后将种子用 10% 安替福民表面消毒后统计发芽率,同时统计感染霉菌稻谷的个数(图 8)。由图 8 可以看出,在同一老化条件下,花色

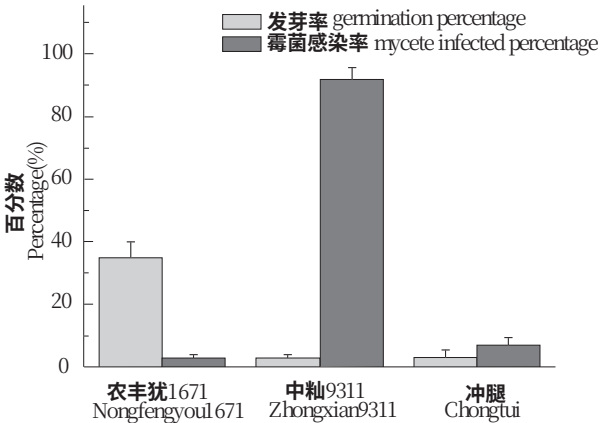


图 8 3 种稻谷经人工老化后的发芽率及霉菌感染率

Fig.8 Germination percentage and mycete infected percentage of ageing seeds

苷含量最低的中粳 9311 感染霉菌的种子个数最多,约是其他两种稻谷的 10 倍。农丰优 1671 的发芽率最高,也约是其他两种稻谷的 10 倍。由此可见,花色苷含量可能会影响到种子储藏中对霉菌的抗性,但并不是唯一决定种子耐储藏特性的要素。

3 讨论

花色苷作为类黄酮类物质,具有清除自由基的作用。现有关于花色苷的研究主要侧重于它的药用价值,大量的流行病学研究证明食物中的花色苷和植物多酚对人类许多疾病有预防和治疗作用。而对于发育和老化中植物种子的花色苷含量变化以及作用却很少有研究。水稻花色苷含量受自身的遗传因素控制,各种研究表明,花色苷含量属于数量性状,至少受到 1 对以上基因控制并且独立遗传^[18-19],同时也受到生态环境的影响^[20]。在生长过程中,叶鞘部位花色素、原花色素和黄酮随着生长发育过程含量变化呈 S 型曲线^[21]。

本试验的水稻种子选取了 3 个不同花色苷含量的品种,检测了它们在发育以及老化过程中花色苷的含量,初探花色苷在植物种子内的变化规律,以及对抵抗植物衰老是否起到一定的积极作用。在试验中发现同种稻谷颖壳与颖果的花色苷含量是有差异的,而且在发育过程中颖壳与颖果的花色苷含量变化的规律也不尽相同。颖果中的花色苷含量会随着发育阶段的前进而不断减少,颖壳的花色苷含量变化则不显著。推测是由于在种子发育过程中,颖果和颖壳不同的生长速率所导致。因为花色苷主要分布在颖果的表层上,在稻谷生长过程中,颖果的体积显著增大,但颖壳的体积变化较小,如果花色苷是在发育早期积累形成,那么随体积的增大,比表面积会不断减小,导致生长期间花色苷含量的减少。冲腿颖果的体积最小,在后期体积变化小于农优 1671 和中粳 9311,这可能是造成冲腿花色苷含量减少速度变缓的原因。

为探索花色苷在本研究选取的 3 个品种稻谷老化过程中是否起到积极的作用,将它们的成熟种子进行人工老化后检测花色苷含量变化,并测定其 SOD 活性、2 次老化后发芽率和霉菌感染率。结果显示,在这 3 个品种中,只有农丰优 1671 和中粳 9311 的颖果花色苷含量随着老化时间的增长而降低,冲腿则无变化。推测可能是由于冲腿是有色稻品种,花色苷绝对含量最高,参与抗氧化过程的花色苷含量相对于总量来说较少所造成。而成熟后的种子颖壳是非生命体,仅起到对颖果的物理保护作用,

不能参与呼吸代谢等生理过程,所以老化后颖壳花色苷的含量并不会发生改变。

SOD 活性是反应种子清除自由基能力的重要指标,试验发现老化过程中 3 个品种的 SOD 活性完全不同。从 3 种稻谷的 SOD 活性变化趋势推测,冲腿正在进入品质衰败的过程,酶活力的降低会更加速其老化的进程。而中粳 9311 正处于老化的初期阶段,SOD 活性被激发,开始发挥清除因老化产生的自由基作用,削减因高温高湿胁迫对种子的影响。农丰优 1671 虽然经历了同样的人工老化,但外部的恶劣环境没有过多地影响到它内部的代谢环境等,所以才导致 SOD 活性变化不显著。

以上结果结合老化后发芽率及霉菌感染率表明,在本研究所选取的 3 个品种中花色苷含量的高低与种子的耐储藏性之间无直接相关性,但花色苷含量高的品种感染霉菌的数量相对较少,它可能在抑制霉菌的生长上会起到一定的作用。虽然花色苷的抗氧化性可能会弥补某些酶活性的不足,但由于材料所限,试验所选 3 个品种的稻谷遗传背景不同,其内在环境及各物质含量的差别,不能完全显示出花色苷含量高的种子在储藏中所占的优势。且除花色苷之外,还有一些活性物质(如 β -胡萝卜素,抗坏血酸等)在种子储藏过程中也起到协同作用。所以,要进一步探索花色苷在稻谷储藏过程中的作用,应当构建不同花色苷含量的近等位基因系材料,并同时补充花色苷抗霉菌的体外试验。

参考文献

- [1] 周显青,张玉荣. 储藏稻谷品质指标的变化及其差异性[J]. 农业工程学报, 2008(12): 238-242
- [2] Ellis R H, Hong T D. Desiccation tolerance and potential longevity of developing seeds of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Ann Bot, 1994, 73(5): 501-506
- [3] Zhang Y, Yu Z L, Lu Y X, et al. Effect of the absence of lipoxygenase isoenzymes on the storage characteristics of rice grains [J]. J Stored Prod Res, 2007, 43(1): 87-91
- [4] Li J K, Zhang Y, Yu Z L, et al. Superior storage stability in low lipoxygenase maize varieties [J]. J Stored Prod Res, 2007, 43(4): 530-534
- [5] Ben-Tal Y, King R W. Environmental factors involved in colouration of flowers of Kangaroo Paw [J]. Sci Hort, 1997, 72: 35-48
- [6] Kuo T H, Deng G C, Yi T H, et al. Absciseic acid-induced hydrogen peroxide is required for anthocyanin accumulation in leaves of rice seedlings [J]. J Plant Physiol, 2007, 165: 1280-1287
- [7] Chung H S, Shin J C. Characterization of antioxidant alkaloids and phenolic acids from anthocyanin-pigmented rice (*Oryza sativa* cv. *Heuginjubyee*) [J]. Food Chem, 2007, 104: 1670-1677
- [8] 张瑞芬,徐金瑞,张名位,等. 黑大豆种皮花色苷提取物抗兔动脉粥样硬化作用[J]. 营养学报, 2007, 29(5): 479-484

(下转第 983 页)