

He-Ne激光辐照对大豆幼苗异黄酮含量的影响*

金丽虹¹, 申炳俊¹, 姚丙波¹, 施健美¹, 鞠殿民², 田 坚^{1**}

1. 长春理工大学生命科学技术学院, 长春 130022 ; 2. 长春理工大学光电信息工程学院, 长春 130022

摘要: 用波长为 632.8 nm的He-Ne激光辐照大豆种子胚, 研究辐照时间对发芽率、幼苗株高及幼苗子叶、叶和茎中大豆异黄酮含量的影响。结果表明: 大豆种子胚经 3.6 mW/mm²激光辐照 1~7 min后, 其发芽率、幼苗株高、幼苗苯丙氨酸转氨酶(PAL)活性、游离苯丙氨酸(Phe)和大豆异黄酮含量均高于对照组(ck)。其中以幼苗叶辐照 5 min后和子叶辐照 7 min后, 大豆异黄酮含量的提高最为明显, 分别为 42.6%和 36.7%。本研究还从大豆异黄酮合成代谢起始酶PAL活性、合成前体Phe含量两方面探讨了激光辐照大豆种子胚提高其幼苗大豆异黄酮含量的机理。

关键词: 大豆种子; 激光辐照; 大豆异黄酮; Phe含量; PAL活性

中图分类号: S565.103.52

文献标识码: A

文章编号: 1000-5684 (2011)

DOI:

网络出版地址:

The Influence to the Content of Soy Isoflavone in Its Seedling after Being Exposed in He-Ne Laser Illumination

JIN Li-hong¹, SHEN Bing-jun¹, YAO Bing-bo¹, SHI Jian-mei¹, JU Dian-min², TIAN Jian¹

1. School of Life Science and Technology, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022, China; 2. College of Optical and Electronic Information, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022, China

Abstract: After soybean germs were exposed in a He-Ne laser ($\lambda=632.8$ nm) illumination, its effects on germination, height of seedlings and content of soy isoflaronone in seedling cotyledon, leaves and stems with exposure time were studied. The results showed that germination, height of seedlings, activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL), free amino acids and content of soy isoflaronone were higher than thoset before its germ being exposed for 1, 3, 5 and 7 minutes. The optimum increasememmts of soy isoflavone happened in seedling leaves (42.6%) after 5 minutes and in cotyledon (36.7%) after 7 minutes exposure, respectively. Moreover, a possible mechanism for the increase of the content of soy isoflaronone was also discussed with initial enzyme activity of anabolism of soy isoflaronone(PAL) and synthetic precursor Phe content.

Key words: soybean seed; exposure in laser illumination; soy isoflavone; Phe level; PAL activity

近年来,大豆异黄酮(soy isoflavones, SIF)的突出生理活性引起了国内外研究人员的广泛关注。研究表明,大豆异黄酮具有抗氧化、消除自由基、抗癌、预防心血管疾病、预防骨质疏松和改善妇女更年期综合症等生理功能^[1-4]。自然界中的大豆异黄酮资源十分有限,仅存在于豆科蝶形花亚科的极少数植物中,大豆是唯一含有异黄酮且其含量在营养学上具有特殊意义的食物资源。因此,如何培育出高异黄酮含量的大豆具有重要的现实意义。

激光作为诱变手段,已经成功地应用于早熟、抗逆性强、高产、高蛋白质和高脂肪大豆选育中^[5],但

有关激光选育高异黄酮大豆的报道较少。赵新乐等人研究表明,15mW/mm² Nd: YAG倍频激光辐照 5 min可使大豆幼苗异黄酮含量得到提高^[6]。本研究利用激光育种中使用率较高的He-Ne激光^[7]预处理大豆种子胚,研究其对幼苗子叶、叶片和茎中异黄酮含量的影响,并进一步研究异黄酮类物质的合成前体苯丙氨酸(Phe)含量及苯丙烷类代谢途径的关键酶和限速酶——苯丙氨酸转氨酶(PAL, EC 4.3.1.5)活性。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

* 基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20090541), 吉林省教育厅项目(200828), 国家级大学生创新性试验计划项目(2009A0831)

作者简介: 金丽虹, 女, 博士研究生. 主要从事激光与生物质相互作用研究。

收稿日期: 2011-04-16

网络出版时间:

** 通讯作者

选取子粒饱满,大小均匀的大豆种子(“吉科豆1号”吉林省冠华农业科技有限公司),用0.1%的氯化汞消毒处理,置于40℃温水0.5h。

He-Ne激光波长632.8nm(长春中吉光电设备有限公司,光斑直径1.5mm),激光处理组大豆种子胚,距离10cm。激光功率密度3.6mW/mm²,处理时间分别为1,3,5,7min,同时设立对照组(ck)。将大豆种子随机分为5组,其中4组处理,1组对照;每组预处理种子100粒,重复3次。培育方法参照文献[6]。

1.2 测定项目与方法

1.2.1 种子发芽率的统计和幼苗株高测定 种子培养7d后,统计各组发芽数并计算发芽率;10d时,测量大豆幼苗平均株高。

1.2.2 PAL活性测定 取大豆幼苗子叶、叶和茎各0.5g,分别加入2.5mL 0.1mmol/L pH 8.8 硼酸缓冲液和0.05g PVP及少量的石英砂,在预冷的研钵中研磨成匀浆,1万r/min、4℃离心15min,取上清液。5mL反应体系中,含80μL酶液,3.92mL PAL样品提取液和1mL 0.02mol/L 苯丙氨酸,测定时对照不加酶液而用80μL PAL样品提取液代替。反应体系于40℃水浴中保温60min后,立即加入0.2mL 6mol/L HCl终止反应,用日立U-2800紫外分光光度计测定OD₂₉₀值,以OD值变化0.01为1个酶活性单位 [U/(g·min)]^[8]。

1.2.3 游离Phe的提取和含量测定 将大豆幼苗子叶、叶和茎分别粉碎,各取1.0g,分别加入15mL体积分数为80%乙醇中,在70℃条件下回流30min,将提取液过滤、蒸干乙醇,得粗氨基酸溶液;粗提物加入到732阳离子交换柱中,静置10min,用蒸馏水洗脱至流出液为无色,再用1.4mol/L的氨水洗脱,直到用茚三酮检测为无色;将洗脱液蒸干即为纯的氨基酸混合物^[9]。用5mL的0.1mol/L的HCl溶液溶解氨基酸,HPLC(美国,Agilent1200)在210nm处测定苯丙氨酸的含量^[10]。

1.2.4 大豆异黄酮的提取 大豆幼苗子叶、叶和茎在60℃条件下烘干并粉碎。每组样品各取3g,其大豆异黄酮提取、测定方法参照周建芹^[11]方法。在乙醇-水体系中,体积分数为80%乙醇,V(乙醇):V(原料)=24:1,50℃条件下提取大豆异黄酮;采用日立U-2800紫外分光光度计在260nm测定大豆异黄酮含量。

2 结果与分析

2.1 激光预处理对大豆种子萌发的影响

波长为632.8nm的激光处理时间对大豆种子发芽率的影响结果见图1。由图1可以看出,632.8nm激

光处理时间为1,3min时,发芽率随激光处理时间增加而增加;当激光处理时间为3~7min时,发芽率随激光处理时间增加而减少。其中,ck发芽率约为94.7%,3min激光处理组发芽率为98.5%,其增幅最大,但仅高于ck约3.8% (“*”表示P<0.05,差异显著,下同);7min处理组发芽率与ck相同,说明激光处理时间过长不利于提高大豆种子发芽率。

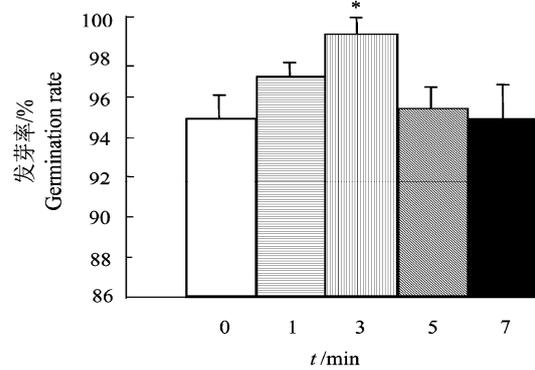


图1 He-Ne激光处理对大豆发芽率的影响

Fig.1 The effect of the pullulation ratio after irradiating by the He-Ne laser

波长为632.8nm激光处理时间对大豆幼苗平均株高的影响结果(图2)。除3min预处理组低于ck外,其他3个处理组株高均大于ck。其中,ck大豆幼苗株高为14.6cm,1,5min预处理组株高为16.0cm,较ck高1.4cm (“**”表示P<0.01,差异极显著,下同);3min预处理组株高为13.6cm,低于ck 1.0cm (P<0.05);而激光预处理大豆种子胚7min对其幼苗株高影响不明显。因此,632.8nm激光处理大豆种子3min在一定程度上降低株高。

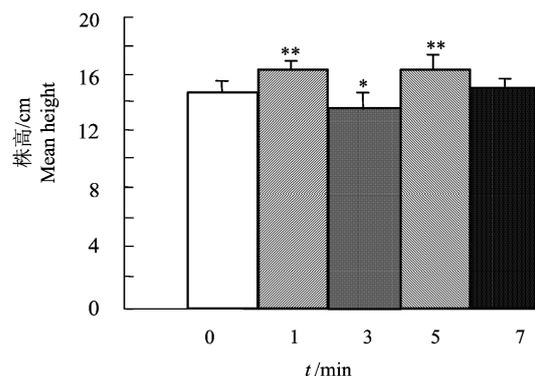


图2 He-Ne激光处理对大豆幼苗平均株高的影响

Fig.2 The effect of He-Ne laser irradiation on the average height of soybean seedling

2.2 激光预处理对大豆幼苗中PAL活性的影响

波长为632.8nm激光处理影响了大豆幼苗子叶、叶和茎中PAL活性(图3)。其中,ck大豆幼苗子叶和叶中PAL活性分别为22.22U/(g·min)和18.20U/(g·min),7min激光处理组子叶和叶中PAL活性分

别高于 ck 6.28 U/(g·min)和 8.10 U/(g·min)($P < 0.01$); ck 大豆幼苗茎 PAL 活性为 12.61 U/(g·min), 激光预处理 5 min 时 PAL 活性高于 ck 0.58 U/(g·min) ($P < 0.05$)。大豆幼苗 3 个部位中 PAL 活性与激光处理时间关系存在差别; 子叶和叶中 PAL 活性随处理时间增加而增大, 激光处理 7 min 的子叶和叶中 PAL 活性达到最大; 而激光处理对茎中 PAL 活性影响不大。

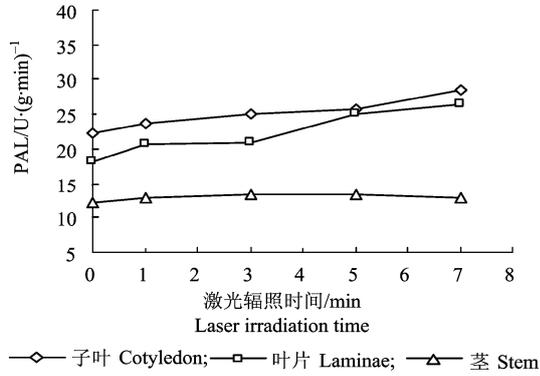


图 3. He-Ne激光对大豆幼苗PAL活性的影响

Fig.3. The effect of He-Ne laser irradiation on the activity of PAL of the soybean seedling

2.3 激光预处理对大豆幼苗游离 Phe 含量的影响

波长为 632.8nm 的激光处理对大豆幼苗子叶、叶和茎中游离 Phe 含量的影响程度有所不同, 激光处理使大豆幼苗子叶和叶中 Phe 含量得到显著提高, 而对茎中 Phe 含量影响则与 PAL 活性影响相似 (图 4)。其中, ck 子叶中 Phe 含量为 34.11 $\mu\text{g/g}$, 5 min 预处理组子叶中 Phe 含量高于 ck 22.31 $\mu\text{g/g}$ ($P < 0.01$); ck 叶中 Phe 含量为 20.28 $\mu\text{g/g}$, 激光处理 3 min 叶中 Phe 含量比 ck 多 13.55 $\mu\text{g/g}$ ($P < 0.01$); ck 大豆幼苗茎中 Phe 含量为 25.94 $\mu\text{g/g}$, 5 min 预处理组茎中 Phe 含量比 ck 多 2.46 $\mu\text{g/g}$ ($P < 0.05$)。

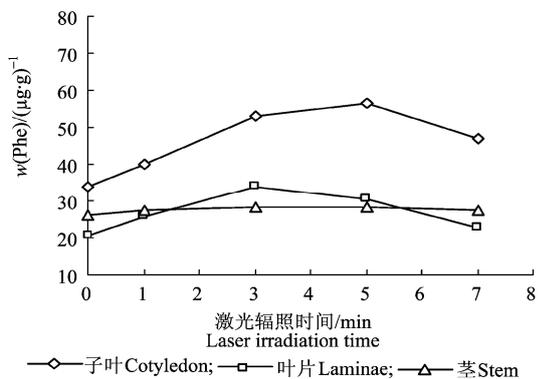


图 4. He-Ne激光对大豆幼苗游离Phe含量的影响

Fig.4 The effect of He-Ne laser irradiation on the dissociated content of Phe of the soybean seedling

试验结果表明: 大豆幼苗子叶和叶片中 Phe 含量达到最大值所需激光处理时间不同, 激光处理 5 min 大豆幼苗子叶 Phe 含量达到最大值, 3 min 时叶片中

Phe 含量达到最大值; 而激光处理对大豆茎中 Phe 含量影响不大。

2.4 激光预处理对大豆幼苗异黄酮含量的影响

激光预处理对大豆幼苗异黄酮含量的影响结果 (图 5), 其中, ck 大豆幼苗子叶异黄酮含量为 6.56 mg/g , 7 min 预处理组子叶中大豆异黄酮含量高于 ck 2.41 $\mu\text{g/g}$, 其增幅为 36.7% ($P < 0.01$); ck 叶和茎中大豆异黄酮含量分别为 6.64 和 6.17 $\mu\text{g/g}$, 激光处理 5 min 叶和茎中大豆异黄酮含量比 ck 多 2.83 $\mu\text{g/g}$ ($P < 0.01$) 和 0.20 $\mu\text{g/g}$ ($P < 0.05$), 其增幅分别为 42.6% 和 3.2%。大豆幼苗子叶中异黄酮含量随激光处理时间增加而增大, 激光处理 7 min 的子叶中大豆异黄酮含量达到最大值; 而叶中大豆异黄酮含量在激光处理时间为 1~5min 时, 其含量随处理时间增加而增大, 5~7min 大豆异黄酮含量随处理时间增加而下降, 激光处理 5 min 其值达到最大; 激光处理对茎中大豆异黄酮含量影响不大。

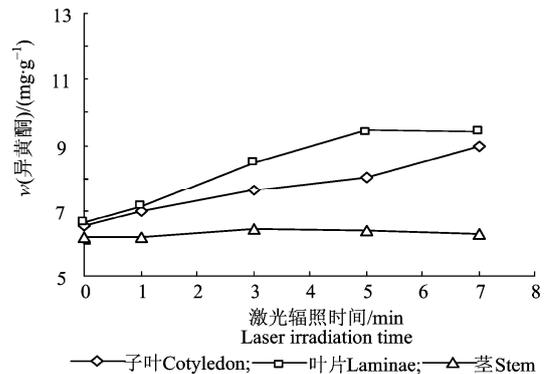


图 5. He-Ne激光对大豆幼苗异黄酮含量的影响

Tab.5 The effect of He-Ne laser irradiation on the content of isoflavone of the soybean seedling

3 讨论

波长为 632.8 nm 的激光处理大豆种子胚对种子发芽率、株高和幼苗 (子叶、叶和茎) 中 PAL 活性、Phe 含量、大豆异黄酮含量均产生影响。其中, 辐照 3 min 为提高种子萌发的最佳激光处理时间, 其种子发芽率和幼苗株高增幅分别约为 4.0% 和 6.8%; 诱发大豆幼苗叶和茎中的异黄酮含量增加的最佳激光处理时间为 5min, 可使幼苗两部位大豆异黄酮含量分别提高 42.6% 和 3.2%; 激光处理 7 min 为提高大豆幼苗子叶异黄酮含量的最佳处理时间, 其增幅为 36.7%。试验结果表明, 大豆幼苗中 PAL 活性和 Phe 含量的变化是影响大豆异黄酮含量变化的因素, 且 PAL 活性是主要因素。

从试验结果来看, 波长为 632.8 nm 激光处理 3 min 可提高发芽率和降低幼苗株高, 其幅度分别约为 4.0% 和 6.8%, 原因是大豆种子经 0.5 h 浸泡后进行激光处

理,此时其正处于种子萌发的活化阶段^[12];因此,波长为632.8nm激光处理过程满足了大豆种子活化阶段的热量需要。而且ATP对种子活性影响有积极意义,而大豆种子经He-Ne激光处理后ATP含量明显高于对照组^[13]。因此,采用适量的波长和合理辐照时间有利于大豆种子胚发芽。He-Ne激光波长为632.8 nm虽远离DNA的主共振波长209 nm和260 nm,但仍能进行非线性共振吸收而引起DNA构象变化^[14],文献中激光处理3 min使大豆幼苗矮化也间接地证明上述观点。

1~7 min激光处理组的PAL活性均高于ck,其原因在于激光的电磁场效应使被照射的植物细胞线粒体膜表面形成环形感应电场提高了ATP含量,而ATP的含量对种子的活性有积极意义。因此,ATP加速了种子的萌发,提高了酶的活性^[13,15-17]。另外,大豆异黄酮合成途径中PAL的活性和含量可以受到光照的调节^[18]。因此,波长为632.8nm激光处理大豆种子胚影响了PAL活性。由于激光属电磁波,有着与电离辐射类似的作用时间表^[19]。其时间表可分为物理阶段(<10⁻¹² s)、化学阶段(数分钟内)和生物学阶段(数小时到数十天)。本研究激光处理时间为1~7min,在此阶段光受体吸收激光后或直接参与生化反应,或作用于信使分子,发生光信号的传导与放大(光子只是作为一种触发信号)。另外,激光电磁效应可加速大豆生长阶段光合作用,有利于初生代谢产物淀粉的积累^[6]。试验中大豆被培养在无氮源环境中,其大豆幼苗中游离Phe主要来于淀粉代谢。因此,波长为632.8nm激光处理大豆种子胚1~7min可促进大豆幼苗子叶、叶和茎中游离Phe含量提高,表现出激光的刺激作用。

大豆异黄酮是植物体中苯丙氨酸的代谢产物,其合成前体是Phe和丙二酰辅酶A;PAL是异黄酮合成途径中的3个关键酶之一^[20]。因此,Phe含量和PAL活性的改变势必会影响大豆异黄酮的合成(图3~5)。本研究结果表明:激光处理组大豆幼苗子叶中异黄酮含量随激光处理时间的变化趋势与PAL活性相同,但有别于Phe含量变化;大豆叶片中异黄酮含量随激光处理时间的变化趋势与Phe含量的变化趋势相同,但其下降幅度较Phe的下降幅度小。因此,PAL活性、Phe含量是异黄酮积累的因素,PAL活性升高是大豆幼苗子叶和叶中异黄酮含量增加的主要原因^[20]。另外,大豆幼苗茎中Phe含量、PAL活性和异黄酮含量变化趋势与子叶相同,同样说明大豆幼苗叶中PAL活性、Phe含量是大豆异黄酮的积累因素。进一步研究发现,激光处理组

幼苗叶中的PAL活性、Phe含量低于子叶,而大豆异黄酮含量却高于子叶,此现象说明激光效应对大豆异黄酮含量的影响随大豆的生长逐渐增加^[6],且激光处理影响了叶中合成大豆异黄酮的其他物质。

参考文献:

- [1] Suzanne Hendrich. Bioavailability of isoflavones[J]. Journal of Chromatography B, 2003, 777(1): 203-210.
- [2] Li Hsunchang, Ya chuancheng, Chieh MingChang. Extracting and purifying isoflavones from defatted soybean flakes using superheated water at elevated pressures[J]. Food chemistry, 2004, 84(2): 279-285.
- [3] Fritz KL, Seppanen CM, Kurzer MS, et al. The in vivo antioxidant activity of soybean isoflavones in human subjects[J]. Nutrition Research, 2004, 23(4): 479-487.
- [4] Rostagno Mauricio A, Palma Miguel, Barroso Carmelo G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1012(2): 119-128.
- [5] 韩亚萍, 草岩, 陈炳. 大豆激光诱变育种发展趋势研究[J]. 大豆科学, 2008, 27(3): 532-535.
- [6] 赵新乐, 金丽虹, 申炳俊, 等. Nd:YAG 倍频激光对大豆幼苗异黄酮的影响[J]. 中国激光, 2009, 36(10): 2728-2733.
- [7] 张中卫, 陈瑞品. 激光生物诱变育种及辐照参数控制的机理分析[J]. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 2007, 30(4): 512-514.
- [8] 刘亚光, 李海英, 杨庆凯. 大豆品种的抗病性与叶片内苯丙氨酸解氨酶活性关系的研究[J]. 大豆科学, 2002, 21(3): 195-198.
- [9] 刘荣森, 杨虹琦, 黄郁维, 等. 植物中游离氨基酸的提取、纯化及分析方法[J]. 河南科技大学学报: 自然科学版, 2007, 28(3): 76-79.
- [10] 王丽, 宋志峰, 纪锋, 等. 高效液相色谱法测定大豆中游离氨基酸含量[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(1): 180-183.
- [11] 周建芹. 大豆异黄酮提取工艺优化及其活性研究[J]. 大豆科学, 2007, 26(2): 276-279.
- [12] 周培疆, 胡云楚, 凌杏元, 等. 种子萌发生长的微量热及非平衡热力学研究[J]. 物理化学学报, 1999, 15(3): 274-278.
- [13] 郭金华, 尹若春, 徐剑, 等. 激光预处理种子提高大豆幼苗抗冷害的机理探讨[J]. 激光技术, 2003, 27(6): 506-509.
- [14] 余碧玉, 李余慰, 封国林, 等. 激光与 DNA 作用系统非线性共振实验初探[J]. 激光技术, 2000, 9(1): 30-31.
- [15] 张建东, 陈怡平, 王勋陵, 等. CO₂激光处理对大豆种子萌发及生理的影响[J]. 西北植物学报, 2004, 24(2): 221-225.
- [16] 蔡素文, 齐智, 马小来, 等. He-Ne 激光对玉米幼苗可溶性蛋白合成的影响[J]. 中国激光, 2000, 27(3): 284-288.
- [17] 张娟, 韩榕. He-Ne激光和UV-B辐射对小麦幼苗核酸酶的影响[J]. 中国激光, 2009, 36(10): 2619-2624.
- [18] Kreuzaler F, Ragg H, Fauiz E, et al. UV induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of petroselinum bortense[C]. Proceeding of National Academy of Science USA, 1983, 84: 7428-7432.
- [19] 杨在富, 杨景庚, 高光煌, 等. 低强度激光生物效应机理研究[J]. 激光生物学报, 2002, 11(5): 388-392.
- [20] 马君兰, 李成, 魏颖, 等. 异黄酮的生物合成途径及其调控[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(5): 692-693.