

文章编号: 1005-0906(2007)04-0086-03

高直链淀粉玉米和普通玉米子粒发育过程中与淀粉合成相关酶活性的比较

高珍妮, 王汉宁

(甘肃农业大学农学院, 兰州 730070)

摘要: 对高直链淀粉玉米和普通玉米子粒发育过程中与淀粉合成相关酶活性的变化动态进行了比较研究。结果表明, 高直链淀粉玉米子粒发育过程中, 束缚态淀粉合成酶(GBSS)活性高于普通玉米, 可溶性淀粉合成酶(SSS)和淀粉分支酶(SBE)活性低于普通玉米。高直链淀粉玉米总淀粉积累量少、直链淀粉比例大是 SSS、GBSS 和 SBE 综合作用的结果。

关键词: 高直链淀粉玉米; 子粒; 淀粉; 酶活性

中图分类号: S513.01

文献标识码: A

Comparison of Enzymes Activity Associated with Starch Synthesis in the Developing Grains Between High Amylose Corn and Normal Corn

GAO Zhen-ni, WANG Han-ning

(College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The study was carried out to compare the enzymes activities associated with starch synthesis in the developing grains between high amylose corn and normal corn. The results showed that the activity of granule-bound starch synthase(GBSS) was higher in high amylose corn than that of normal corn, but that of the soluble starch synthase(SSS), starch branching enzymes(SBE) were lower than that of normal corn. The decrease of total starch and the increase of amylose percent in total starch were resulted from the integrated action of SSS, GBSS and SBE.

Key words: High amylose corn; Grain; Starch; Enzyme activity

研究表明,在催化淀粉合成的众多酶当中,淀粉合成酶(starch synthase, SS)和淀粉分支酶(starch branching enzyme, SBE) 的活性对直链淀粉形成有较大影响。其中淀粉合成酶按其形态分为可溶性淀粉合成酶(soluble starch synthase, SSS)和束缚态淀粉合成酶(granule-bound starch synthase, GBSS)。目前,关于玉米子粒淀粉积累与基因型及其环境因素的关系已做了较深入的研究,但关于高直链淀粉玉米和普通玉米子粒发育过程中与淀粉合成相关酶活性动态变化的研究鲜见报道。本研究以高直链淀粉玉米和普通玉米为材料,研究两种玉米子粒中与直链淀粉合成

酶活性的动态变化,分析造成高直链淀粉玉米与普通玉米子粒品质差异的生化机制,为高直链淀粉玉米的品种选育和栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2006 年在甘肃农业大学教学基地进行。供试玉米为高直链淀粉玉米 ae1w64 (直链淀粉含量 46.12%)和普通玉米 137(直链淀粉含量 23%)。材料于 4 月中旬播种,按常规方法进行田间管理。开花期人工授粉,授粉后各材料每 10 d 取 1 次样,用液氮速冻后于 -70℃保存备用。

1.2 淀粉合成酶(SS)活性的测定

1.2.1 粗酶液的提取

参照程方民等的方法并略作改动。称取 1.0 g 样品子粒,加入 10 mL 的 Hepes-NaOH 缓冲液(pH 7.5),冰浴研磨。取 30 μ L 匀浆液,加 1.8 mL 的 Hepes-

收稿日期: 2007-03-07

基金项目: 国家“863”计划项目(2004AA207140)

作者简介: 高珍妮(1981-),甘肃平凉人,硕士研究生,从事玉米遗传育种研究工作。E-mail: gzn_1981@163.com

王汉宁为本文通讯作者。E-mail: wanghn@gsau.edu.cn

NaOH 缓冲液 (pH 7.5), 10 000 × g 冰冻离心 10 min, 沉淀, 经 pH 7.5 的 Hepes-NaOH 缓冲液悬浮后用于 GBSS 活性的测定, 其余匀浆 10 000 × g 冷冻离心 2 min, 上清液用来测定 SSS。

1.2.2 测定方法

取 20 μL 酶粗提液加入 36 μL 反应液 I [反应液终浓度为 Hepes-NaOH(pH 7.4) 50 mmol/L, ADPG 1.6 mmol/L, 支链淀粉 0.7 mg, DTT 15 mmol/L], 30℃ 反应 20 min 后, 沸水浴 30 s 终止反应, 冰浴中冷却; 加 20 μL 反应液 II [反应液终浓度为 Hepes-NaOH(pH 7.4) 50 mmol/L, PEP 4 mmol/L, KCl 200 mmol/L, MgCl₂ 10 mmol/L, 丙酮酸激酶 1.2 U], 30℃ 反应 20 min 后沸水浴 30 s 终止反应, 10 000 r/min 离心 10 min。取上清液 60 μL 与 43 μL 反应液 III [反应液终浓度为 Hepes-NaOH(pH 7.4) 50 mmol/L, 葡萄糖 10 mmol/L, Mg-Cl₂ 20 mmol/L, NADP 2 mmol/L, 己糖激酶 1.4 U, G-6-P-脱氢酶 0.35 U], 30℃ 反应 10 min 后测定 D_{340nm} 值的变化。

1.3 淀粉分支酶(SBE)活性的测定

参照沈鹏等的方法进行。取 0.3 g 子粒加入 6 mL 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 7.0), 冰浴研磨, 10 000 r/min 下离心 10 min。取上清粗酶液 1 mL, 加入 1 mL 0.2 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 7.0), 37℃ 水浴中加热 40 min, 加入 1 mL 浓度为 1 mol/L 的三氯乙酸终止反应, 加入碘液 1 mL, 定容至 50 mL, 于 660 nm 下比色。

2 结果与分析

2.1 子粒中 SSS 活性的变化

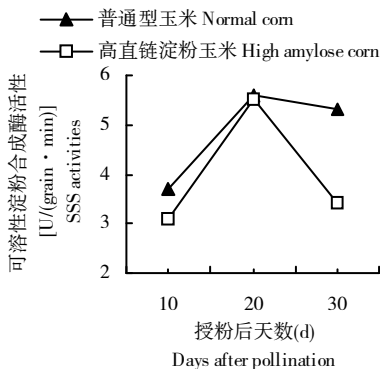


图 1 子粒灌浆过程中可溶性淀粉合成酶活性的动态变化
Fig.1 Changes of SSS activities of maize

SSS 以游离形态存在于玉米子粒的胚乳细胞中, 主要催化支链淀粉的合成。两种类型的玉米子粒中 SSS 活性的变化趋势一致, 均呈单峰曲线变化, 授

粉后 20 d 达到峰值, 此后逐渐下降(图 1)。在授粉后 10、20、30 d, 高直链淀粉玉米 SSS 活性分别是普通玉米的 83.78%、98.21%和 64.15%。灌浆过程中, 高直链淀粉玉米子粒 SSS 活性均低于普通玉米, 并且在授粉 20 d 后高直链淀粉玉米的 SSS 活性下降速率明显比普通玉米快。从试验结果可以看出, 较低的 SSS 活性在一定程度上减少了支链淀粉的积累, 从而使高直链淀粉玉米子粒中总淀粉含量降低。

2.2 子粒中 GBSS 活性的变化

GBSS 存在于胚乳细胞的淀粉体内部, 因其经缓冲液提取后仍保持在淀粉粒上, 被认为是与淀粉粒结合的, 称为束缚态淀粉合成酶。在子粒发育过程中, 两种类型玉米子粒的 GBSS 活性随着子粒的发育而逐渐增强(图 2)。授粉后 10、20、30 d, 高直链淀粉玉米子粒 GBSS 活性分别是普通玉米的 173.33%、118.51%和 161.11%。高直链淀粉玉米 GBSS 活性均高于普通玉米, 授粉 20 d 后高直链淀粉玉米的 GBSS 活性急剧上升, 授粉后 30 d 的 GBSS 活性比授粉后 20 d 又增长了 81.25%; 而普通玉米的 GBSS 活性仅增长了 33.33%。表明 GBSS 活性的变化不仅与直链淀粉的积累呈正相关关系, 而且在其灌浆中后期 GBSS 的急剧上升可能是高直链淀粉玉米子粒中直链淀粉含量高于普通玉米的主要原因之一。

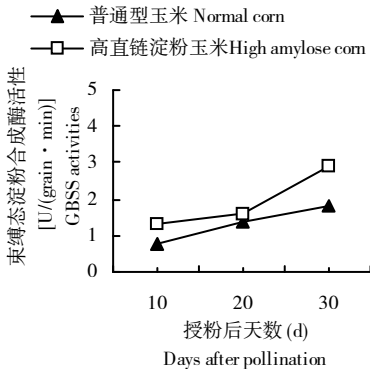


图 2 子粒灌浆过程中束缚态淀粉合成酶活性的动态变化
Fig.2 Changes of GBSS activities of maize

2.3 子粒中 SBE 活性的变化

淀粉分支酶对淀粉的合成具有两方面的意义: 第一, 使淀粉的 α-1,4-糖苷键连接的直链变为含有 α-1,6-糖苷键连接的支链, 葡聚糖的分子量不断增大, 以便让有限的细胞空间能容纳更多的具有能量的物质; 第二, α-1,6-糖苷键的导入使葡聚糖的非还原性末端增加, 有利于淀粉合成酶的催化反应, 使它们能在短时间内催化合成更多的淀粉。由图 3 可以看出, 授粉后 10、20、30 d, 高直链淀粉玉米子

粒的 SBE 活性分别是普通玉米的 68%、70.83% 和 50%。两种类型子粒的 SBE 活性均随着子粒的发育而逐渐减弱,高直链淀粉玉米的 SBE 活性始终低于普通玉米,这与高直链淀粉玉米子粒中支链淀粉含量和总淀粉含量低是一致的。

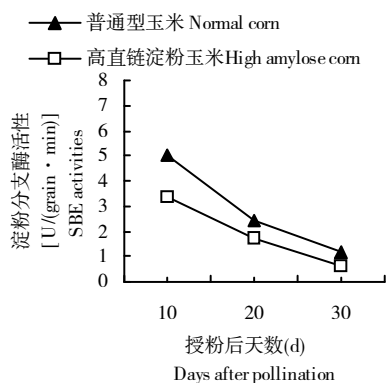


图3 子粒灌浆过程中淀粉分支酶活性的动态变化

Fig.3 Changes of SBE activities of maize

3 讨论

直链淀粉约含 200~2 000 个或更多的葡萄糖苷,以 1,4 方式结合形成直链状;支链淀粉的分子量更大,除了以 1,4 方式连接外,还在第 6 个碳位以 1,6 方式连接成葡萄糖苷分支。在淀粉合成过程中,SSS 主要催化支链淀粉的合成,GBSS 催化直链淀粉的形成,而 SBE 的变化则影响到支链淀粉的含量。

淀粉生物合成的途径相当复杂,每种酶都可能以多种形式存在。淀粉分支酶在多数植物中均含有两个以上同工酶,高直链淀粉玉米受 *ae* 基因的控制。李建生报道,*ae* 基因的剂量与一种分支酶的活性呈正相关,由此推测 *ae* 可能是与分支酶有关的结构基因。还有研究指出,*ae* 基因导致一个分支酶的缺失,因而提高了直链淀粉的含量。本研究发现,高直链淀粉玉米 *ae₁W₆₄* 子粒胚乳中 SBE 活性确实比普通玉米低,最低时的活性只有普通型玉米的 1/2;同时还发现高直链淀粉玉米的 SSS 活性也明显低于普通玉米,尤其是在授粉 20 d 以后,高直链淀粉玉米的 SSS 活性迅速下降,授粉后 30 d 其活性只占普通型玉米的 64.15%,下降率达到 38.18%。结合对 SSS、SBE 活性变化的分析可以看出,高直链淀粉玉米子粒中 SBE 的低活性造成直链淀粉积累量减少,而 SSS 的低活性造成支链淀粉积累减少,进一步造成其总淀粉含量的减少。

刘霞等人指出,子粒灌浆中后期的 GBSS 活性高低对直链淀粉终积累量的调节作用大于前期。

Denyer 曾报道 GBSS 必须在淀粉粒内部才能起催化作用,即必须在淀粉粒内部形成一定的晶体结构时才起作用。在本研究中,高直链淀粉玉米的 GBSS 活性明显高于普通型玉米,尤其在授粉 20 d 以后 GBSS 活性急剧上升,而此时其 SSS 活性已开始明显下降。授粉 30 d 后高直链淀粉玉米的 GBSS 活性比普通玉米高出 61.11%。说明在催化淀粉合成的反应中高直链淀粉玉米子粒中有更强的直链淀粉合成能力,子粒灌浆中后期的 GBSS 活性高低对直链淀粉终积累量的调节作用大于前期。

通过分析两种类型玉米子粒中 3 种酶活性的变化可以看出,高直链淀粉玉米子粒中积累较多的直链淀粉,总的淀粉含量变少是 SSS、GBSS 和 SBE 综合作用的结果。本研究是在选取了高直链淀粉玉米和普通玉米的两个代表品种的基础上进行的,其结果在高直链淀粉玉米中是否广泛适用还需进一步探讨。

参考文献:

- [1] 陈艳萍,袁建华,颜伟,等.高直链淀粉玉米研究进展[J].南京农专学报,2002,18(3):32-40.
- [2] 张瑛,徐晓红,朱玉芹,等.高直链淀粉玉米的选育概况与发展前景[J].玉米科学,2005,13(1):52-54,59.
- [3] 史振声,王志斌,李凤海,等.国内外高直链淀粉玉米的研究与利用[J].辽宁农业科学,2002(1):30-33.
- [4] 张宏伟,陈刚,陈海林.普通玉米淀粉及高直链玉米淀粉工业应用的进展[J].粮油食品科技,1999,17(1):6-9.
- [5] 刘鹏,胡昌浩,董树亭,等.甜质型与普通型玉米子粒发育过程中糖代谢相关酶活性的比较[J].中国农业科学,2005,38(1):52-58.
- [6] 盛婧,郭文善,胡宏,等.小麦淀粉合成关键酶活性及其与淀粉积累的关系[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2003,24(4):49-53.
- [7] Douglas C D, Tsung M K, Frederick C F. Enzymes of sucrose and hexose metabolism in developing kernels of two inbred of maize[J]. Plant Physiology, 1988, 86: 1013-1019.
- [8] Johningle B D, Hageman R H. Changes in composition during development and maturation of maize seed[J]. Plant Physiology, 1997, 116: 835-839.
- [9] 刘开昌,胡昌浩,董树亭,等.高油、高淀粉玉米子粒主要品质成分积累及其生理生化特性[J].作物学报,2002,28(4):492-498.
- [10] 高群英, Glover D V. 玉米子粒发育过程中胚乳核 DNA 含量的变化同子粒性状的关系[J].作物学报,1994,20:46-51.
- [11] 程方民,蒋德安,吴平,等.早籼稻子粒灌浆过程中淀粉合成酶的变化及其温度效应特征[J].作物学报,2001,27(2):201-206.
- [12] 沈鹏,金正勋,罗秋香,等.水稻灌浆过程中子粒淀粉合成关键酶活性与蒸煮食味品质的关系[J].中国水稻科学,2006,20(1):58-64.

(上接第 88 页)

[13] 王 忠 . 植物生理学[M]. 北京:中国农业出版社,2000 .

[14] Nakamura Y, Yuki K, Park S. Carbohydrate metabolism in the developing endosperm of rice grain[J]. Plant Cell Physiol, 1989, 30(6): 833-839.

[15] 彭吉松,郑志仁,刘 涤 . 淀粉的生物合成及其关键酶[J]. 植物生理学通讯,1997,33(4):297-303 .

[16] Tsai Mei, Qu-Lee, Setter T L. Effect of increased temperature in apical region of maize ears on starch-synthesis enzymes and accumulation of sugar and starch[J]. Plant Physiology, 1985, 79: 852-855.

[17] 徐军望,李旭刚,朱 楨 . 基因工程改良淀粉品质[J]. 生物技术

通报,2000(1):11-19 .

[18] 李建生 . 玉米淀粉品质遗传改良研究的进展[J]. 作物杂志,1998 (增刊):114-118 .

[19] 刘 霞,姜春明,郑泽荣,等 . 藁城 8901 和山农 1391 淀粉合成酶活性和淀粉组分积累特征的比较[J]. 中国农业科学,2005,38 (5):897-903 .

[20] Denyer K. Identification of multiple isoforms of soluble and granule-bound starch synthase in developing wheat endosperm[J]. Planta, 1995, 196: 256-265.

(责任编辑:张 英)