

抗旱性不同的春小麦品种籽粒萌发期 α -淀粉酶活性及其同工酶分析

赵会君^{1,2}, 张怀刚¹, 王海庆¹

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 为了解春小麦萌发期生理生化变化对干旱胁迫的响应及为早期抗旱筛选鉴定提供科学依据, 选用抗旱性不同的 9 个春小麦品种为材料, 在 20% 聚乙二醇 (PEG6000) 干旱胁迫下和非干旱胁迫下进行萌发试验, 研究了 α -淀粉酶活性及其同工酶的表达。结果表明: 1) 在两种胁迫处理下, α -淀粉酶活性在品种间都存在着差异, 但干旱胁迫下抗旱品种 α -淀粉酶活性显著高于干旱敏感品种; 2) α -淀粉酶活性与胚芽鞘长度之间呈显著正相关; 3) 在 20% PEG6000 胁迫下, 抗旱品种 α -淀粉酶同工酶受抑制较小, 条带较多, 胚芽鞘长度与主胚根长度受抑制较小。因此认为, 抗旱品种在干旱胁迫下有着较高的萌发势, 可能与具有表达 α -淀粉酶同工酶的强势基因型有关; 干旱胁迫下 α -淀粉酶活性和 α -淀粉酶同工酶可以作为春小麦抗旱性筛选和鉴定的指标。

关键词: 小麦; 抗旱性; α -淀粉酶; 活性; 同工酶

中图分类号: S512.1⁺2; S312

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2008)04-0633-05

Study on α -amylase Activity and Its Isoenzyme Expression in Nine Spring Wheat Cultivars at Germination Stage

ZHAO Hui-jun^{1,2}, ZHANG Hui-gang¹, WANG Hai-qing¹

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810001, China;

2. Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In order to understand response of physiological and biochemical changes at the germination stage to drought stress and to provide theoretic basis for screening of drought resistance at early development stage of spring wheat seedlings, nine cultivars with different drought resistance were chosen for germination tests under 20% PEG6000 drought-stressed and non-stressed conditions to study α -amylase activities and its iso-enzyme expression. After 3 days dark culture at 28 °C, samples were taken for measuring coleoptile length, numbers of radicles and length of primary radicles. At the same time, α -amylase activities were measured with reduced sugar assay of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) and α -amylase iso-enzymes were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. The main results are as follows: 1) There was significant difference in α -amylase activity among the cultivars under the two conditions. Under the drought-stressed condition, α -amylase activities of the drought-resistant cultivars were significantly higher than those of the drought-sensitive cultivars. 2) There was a significant positive relationship between α -amylase activity and coleoptile length. 3) α -amylase iso-enzyme expression, coleoptile length and length of primary radicles in the drought-resistant cultivars were restrained less than in the drought-sensitive cultivars. The drought-resistant cultivars had more bands of α -amylase

收稿日期: 2008-01-21 修回日期: 2008-03-20

基金项目: 中国科学院知识创新工程重大项目 (KSCX1-YW-03); 中国科学院知识创新工程方向性项目 (KSCX2-YW-N-052); 青海省重点科技攻关项目 (2006-N-137)。

作者简介: 赵会君 (1980-), 女, 硕士研究生, 主要从事小麦抗旱生理研究。

通讯作者: 张怀刚 (1962-), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事小麦遗传育种研究。hgzhang@nwipb.ac.cn

iso-enzymes than the drought-sensitive cultivars. The higher germination potential of the drought-resistant cultivars might be caused by the existence of some genotypes with higher expression of α -amylase iso-enzymes. α -amylase activities and α -amylase iso-enzymes could be used as selective indicators for drought resistance in wheat breeding.

Key words: Wheat; Drought resistance; α -amylase; Activity; Isoenzyme

春小麦为中国西北干旱半干旱地区的主要粮食作物,而西北地区春季干旱少雨,蒸发量大,春旱现象较为严重,影响了出苗率和植株形态建成,给小麦生产造成一定损失。一些抗旱性强的品种的应用^[1,2],减轻了干旱对产量的影响。干旱抑制春小麦的萌发,主要表现在对胚芽鞘生长的抑制,而抗旱性不同的品种受抑制程度不同。国内外就早期抗旱筛选已有较多报道,在萌发期形态方面,Morgan^[3]、王玮等^[4,5]、Ashraf等^[6]、Liu等^[7]认为小麦胚芽鞘的长度是预测小麦抗旱性和抗旱性鉴定的可靠指标,干旱条件下胚芽鞘的生长与后期产量形成有重要关系。Umenura等^[8]对水稻和 Georg-kraemer等^[9]对大麦种子萌发阶段 α -淀粉酶活性大小变化趋势研究显示,随着种子萌发的进行, α -淀粉酶活性迅速增强,淀粉水解速率加快,之后随着底物的减少而迅速下降。Francisco等^[10]通过 Northern-blot 和原位杂交技术检测到萌发期小麦种子中 α -淀粉酶基因的表达部位和酶蛋白合成及变化规律;赵玉锦等^[11]通过对萌发速率不同的水稻品种 α -淀粉酶同工酶分析表明,萌发速率较快的品种, α -淀粉酶同工酶条带多于速率较慢品种。近年的研究指出, α -淀粉酶活性大小可能是胚芽鞘生长研究的重要突破口^[12]。虽然对萌发阶段 α -淀粉酶活性的变化已有研究,但关于干旱胁迫对抗旱性不同的小麦品种 α -淀粉酶同工酶表达的影响以及同工酶与胚芽鞘生长的关系少有研究报道。笔者选用甘肃、青海两省育成的主要春小麦抗旱品种和农家抗旱品种为主要材料,以干旱敏感品种为参照,研究干旱胁迫与非胁迫下不同抗旱性品种萌发阶段的主要形态指标、 α -淀粉酶活性及其同工酶表达,探讨干旱胁迫对 α -淀粉酶活性及其同工酶的影响,以为小麦抗旱机理研究、抗旱性鉴定及育种提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验选用了9个春小麦品种,其中5个品

种抗旱性较强,4个品种为干旱敏感的材料。抗旱品种包括中国科学院西北高原生物研究所培育的“高原671”^[11]和“高原602”^[12]、甘肃省定西地区旱作农业研究中心培育的“定西24”以及农家品种“和尚头”和“老芒麦”,干旱敏感品种包括中国科学院西北高原生物研究所培育的“高原205”、“高原448”和“高原V028”及从国际玉米小麦研究中心引进种植的“波他姆”。品种在干旱条件下的产量是鉴定抗旱品种的重要指标之一^[13],这5个抗旱品种在甘肃和青海干旱地区多年种植,产量稳定,抗旱效果明显,这4个干旱敏感品种适宜水地种植,旱地种植大幅度减产。

1.2 方法

1.2.1 萌发处理 每个品种筛选籽粒饱满完整的种子,10%的次氯酸(HClO)消毒10 min后蒸馏水冲洗,各品种分别设立干旱和对照两个处理,每个处理重复3个培养皿,每个培养皿中摆100粒于双层滤纸上,28℃暗培养。干旱胁迫处理(T)的每天添加6 mL 20%聚乙二醇(PEG 6000);对照(CK)即非胁迫处理的每天添加6 mL蒸馏水。

1.2.2 胚芽鞘形态指标和 α -淀粉酶活性测定 于暗培养的第3天分别取各品种处理(T)和对照(CK)的种子各20粒,测定胚芽鞘长度、胚根数和主胚根长度,计算抑制率。部分样品用3,5-二硝基水杨酸测定 α -淀粉酶活性^[14],重复3次。

抑制率(*I*)按下式计算: $I(\%) = [(CK - T) / CK] \times 100\%$

1.2.3 α -淀粉酶同工酶分析 于暗培养的第3天取28℃培养下各品种1.0 g,按1:10(w/v)加入样品提取液(11.98 g蔗糖和0.606 g Tris定容至100 mL),在冰浴中匀浆,4℃12 000转冷冻离心20 min,上清液于-20℃保存备用。点样前置70℃水浴中10 min钝化 α -淀粉酶。

用非变性聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳分析 α -淀粉酶同工酶^[15]。电泳分离胶浓度10%,浓缩胶浓度5%,上样量6 μ L,电压80 V,电泳4 h。

电泳毕,将胶板置于1.5%的可溶性淀粉溶液(0.2 mol/L乙酸配制)中37℃保温3 h,然后用

0.2 mol/L 乙酸冲洗胶面, F KI 显色液染色 20 min, 拍照记录条带数并计算相对迁移率 (R_f), 迁移率为 5 次电泳结果的平均值。

$R_f(\%) = (X_2 / X_1) \times 100\%$, X_2 代表固定染色后凝胶中酶蛋白区带的迁移距离, X_1 代表固定染色前凝胶中指示剂的迁移距离^[15]。

1.3 统计方法

试验数据用 SPSS 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫条件下小麦品种的 -淀粉酶活性
暗培养第 3 天各品种 -淀粉酶活性测定结果

(表 1) 表明, 干旱和非干旱胁迫处理下品种间 -淀粉酶活性都存在着差异, 但非干旱胁迫下抗旱品种与干旱敏感品种间表现的规律不明显, 而干旱胁迫下抗旱品种的 -淀粉酶活性显著高于干旱敏感品种。说明干旱胁迫明显抑制了 -淀粉酶活性, 但不同品种受抑制的程度不同, 抗旱品种受抑制程度低, 干旱敏感品种受抑制程度大。如抗旱品种“老芒麦”和“定西 24”受抑制小, 在两种处理下 -淀粉酶活性差异不显著, 而其他抗旱性相对弱的品种和干旱敏感品种 -淀粉酶活性在干旱胁迫下显著降低。

表 1 干旱胁迫和非干旱胁迫下各品种 -淀粉酶活性的差异性分析

Table 1 Difference analysis of -amylase activities of cultivars under drought and non-drought stresses

品种 Cultivars	非干旱胁迫 Non-drought stress (U/g)	干旱胁迫 Drought stress (U/g)	二者差值 Difference C(U/g)	抑制效应 Stress effect		
				抑制率 Stressed index I (%)	F 值 F value	P
高原 671 Gaoyuan 671	12.71aAB	11.41bB	1.29	10.16	78.12	0.001
高原 602 Gaoyuan 602	12.14bBC	10.39cC	1.75	14.42	173.57	0.000
定西 24 Dingxi 24	11.41cCD	11.19bB	0.22	1.93	2.21	0.212
和尚头 Heshangtou	11.11cD	9.33dD	1.78	16.02	74.33	0.001
老芒麦 Laomangmai	13.13aA	12.28aA	0.85	6.47	6.05	0.070
高原 205 Gaoyuan 205	11.69bcCD	4.54hG	7.15	61.16	1 253.5	0.000
高原 448 Gaoyuan 448	10.39dE	5.81gF	4.59	44.18	478.55	0.000
高原 V028 Gaoyuan V028	11.56cCD	6.86fE	4.70	40.66	497.73	0.000
波他姆 Potam	9.41eF	7.36eE	2.05	21.79	63.07	0.001

同一列数字后的小写字母表示在 5% 水平上差异显著, 大写字母表示在 1% 水平上差异显著。

Small and capital letters indicate difference significant at the 0.05 and 0.01 levels, respectively.

表 2 干旱和非干旱胁迫下各小麦品种萌发期的形态指标

Table 2 Morphological characteristics of the cultivars at germination stage under drought and non-drought stresses

品种 Cultivar		胚芽鞘长度 (cm) Coleoptile length	胚根数 No. of radicles	主胚根长度 (cm) Main radicle length
高原 671 Gaoyuan 671	CK	5.27 ± 0.083	4.62 ± 0.106	8.06 ± 0.731
	T	4.53 ± 0.177	4.53 ± 0.183	6.55 ± 0.783
	I (%)	14.0	0.19	18.70
高原 602 Gaoyuan 602	CK	4.31 ± 0.063	3.25 ± 0.621	6.41 ± 0.661
	T	3.84 ± 0.146	3.00 ± 0.288	6.10 ± 0.188
	I (%)	10.9	8.30	4.80
定西 24 Dingxi 24	CK	4.89 ± 0.123	4.16 ± 0.112	8.15 ± 1.041
	T	3.42 ± 0.172	4.84 ± 0.760	6.31 ± 0.656
	I (%)	30.0	3/16.3	21.20
和尚头 Heshangtou	CK	4.60 ± 0.132	4.92 ± 0.176	6.42 ± 0.221
	T	3.63 ± 0.171	4.46 ± 0.227	5.82 ± 0.382
	I (%)	21.0	9.30	9.30
老芒麦 Laomangmai	CK	5.58 ± 0.085	3.00 ± 0.000	6.73 ± 0.771
	T	4.83 ± 0.171	3.07 ± 0.177	6.41 ± 0.235
	I (%)	13.4	3/2.30	4.75
高原 205 Gaoyuan 205	CK	3.40 ± 0.141	3.07 ± 0.177	5.16 ± 0.980
	T	1.26 ± 0.243	3 ± 0.000	3.17 ± 0.648
	I (%)	62.9	2.30	38.5
高原 448 Gaoyuan 448	CK	3.10 ± 0.118	3.15 ± 0.376	6.71 ± 0.690
	T	1.52 ± 0.055	4.00 ± 0.577	4.23 ± 0.908
	I (%)	50.9	3/26.9	36.90
波他姆 Potam	CK	3.40 ± 0.142	3.15 ± 0.376	5.83 ± 0.879
	T	1.78 ± 0.091	3.46 ± 0.177	4.3 ± 0.681
	I (%)	47.6	3/9.80	26.20
高原 V028 Gaoyuan V028	CK	3.40 ± 0.241	3.10 ± 0.118	7.14 ± 0.674
	T	1.21 ± 0.158	3.16 ± 0.077	4.3 ± 0.881
	I (%)	64.4	3/1.90	39.70

T: 干旱胁迫处理; I: 抑制率。 T: drought stress treatment; I: stress index.

2.2 干旱胁迫条件下不同品种萌发期形态指标的变化

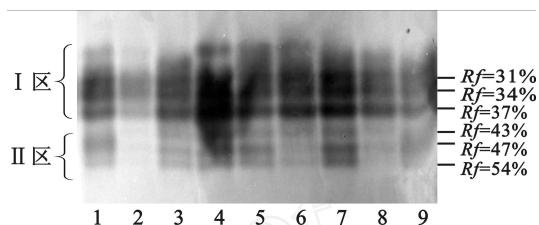
由表 2 可见,在 20% PEG6000 胁迫下,各品种胚芽鞘和胚根生长均受到抑制,但对胚根数影响并不明显。胚根数的多少不能很好地显示品种的抗旱性强弱。相对于非干旱胁迫情况而言,干旱胁迫下,各品种主胚根长度受抑制的程度依次为高原 V028 > 高原 448 > 高原 205 > 波他姆 > 定西 24 > 高原 671 > 和尚头 > 高原 602 > 老芒麦,抗旱品种主胚根生长受抑制较小,而干旱敏感品种受抑制明显,但在品种内个体间差异较大,所以在抗旱筛选中以主胚根生长受抑制程度作为指标的可靠性较差。各品种胚芽鞘长度受到干旱胁迫的抑制程度依次为高原 V028 > 高原 205 > 高原 448 > 波他姆 > 定西 24 > 和尚头 > 老芒麦 > 高原 671 > 高原 602,干旱敏感品种受抑制程度远远大于抗旱品种,并且品种内个体间芽鞘长度差异不显著。由此可见,胚芽鞘长度能很好地显示品种间抗旱性的强弱,可作为品种抗旱性鉴定的形态指标。

相关性分析显示,在非干旱胁迫下 α -淀粉酶活性与胚芽鞘长度之间相关系数为 0.696,在干旱胁迫下相关系数为 0.841,相关达极显著水平 ($P < 0.01$)。这进一步说明,干旱胁迫下小麦品种胚芽鞘长度与萌发生长关系密切。

2.3 干旱和非干旱胁迫下不同小麦品种 α -淀粉酶的同工酶表现

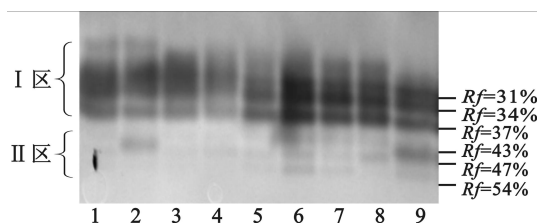
在非干旱胁迫下, α -淀粉酶同工酶表达没有受到抑制,酶带条数增多,各品种间差异不太明显,几乎所有品种在同工酶 II 区都出现了 R_f 值分别为 43%、47% 和 54% 的条带,但相对于同工酶 I 区 R_f 值为 31%、34% 和 37% 的条带而言亮度较小,初步推测可能是表达产生新的同工酶。其中易穗发芽的高原 205(第 4 泳道)酶带的亮度强、面积较大(图 1)。在干旱胁迫条件下,抗旱性强的品种(和尚头、老芒麦、定西 24、高原 602 和高原 671)的 α -淀粉酶同工酶条带数明显多于干旱敏感品种,高原 602 和老芒麦等在同工酶 II 区也出现 R_f 值为 43%、47% 和 54% 的条带,并且同工酶 I 区酶带面积较大、亮度较强(图 2),说明该酶蛋白量较高、活性较强;而干旱敏感品种(高原 V028、波他姆、高原 448、高原 205)在同工酶 I 区酶带面积较小、亮度弱,说明该区酶蛋白含量较少,并且在同工酶 II 区几乎没有条带产生。这与

所测定的 α -淀粉酶活性表现一致。结合表 1 分析,干旱胁迫下萌发期 α -淀粉酶同工酶基因受到了抑制,但不同品种受抑制程度不同,抗旱品种受抑制较小,导致品种间同工酶蛋白含量上的差异,从而综合表现在 α -淀粉酶活性强弱不同和水解淀粉能力上的差异。



1、2、3、4、5、6、7、8 和 9 分别代表高原 V028、波他姆、高原 448、高原 205、和尚头、老芒麦、定西 24、高原 602 和高原 671
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9 represent Gaoyuan V028, Potam, Gaoyuan 448, Gaoyuan 205, Heshangtou, Laomangmai, Dingxi 24, Gaoyuan 602 and Gaoyuan 671, respectively.

图 1 非干旱胁迫下各品种 α -淀粉酶同工酶表现(反相图)
Fig. 1 α -amylase isoenzyme of cultivars under non-drought stressed



1、2、3、4、5、6、7、8 和 9 分别代表高原 V028、波他姆、高原 448、高原 205、和尚头、老芒麦、定西 24、高原 602 和高原 671
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9 represent Gaoyuan V028, Potam, Gaoyuan 448, Gaoyuan 205, Heshangtou, Laomangmai, Dingxi 24, Gaoyuan 602 and Gaoyuan 671, respectively.

图 2 干旱胁迫下各品种 α -淀粉酶同工酶表现(反相图)
Fig. 2 α -amylase isoenzyme of cultivars under drought stress

3 讨论

3.1 α -淀粉酶活性可作为春小麦抗旱选择的辅助指标

α -淀粉酶是淀粉型种子萌发初期最重要的水解酶,盾片和糊粉层产生的 α -淀粉酶将胚乳中的淀粉迅速水解为可溶性糖供给胚芽鞘生长。对盐胁迫下的胚芽鞘萌发阶段胚乳活性研究证实,抗盐性品种在逆境胁迫下胚乳活化较快,发芽率高,

淀粉酶活性强^[16~18],对水稻萌发阶段同工酶表达的研究已表明高的-淀粉酶活性是导致种子快速萌发的主要原因^[8,10]。本研究表明,在干旱胁迫下,参试春小麦品种的-淀粉酶活性都降低,但抗旱品种的-淀粉酶活性显著高于干旱敏感品种,这种品种间的差异可能是抗旱春小麦品种萌发期胚芽鞘与胚根生长受抑制较小的一个重要原因。本研究还发现,干旱胁迫下胚芽鞘长度能很好地显示品种的抗旱性,而胚根数的多少与抗旱性关系不明显,这与Morgan^[3]和王玮等^[4,5]的研究结果一致,所以认为胚芽鞘长度作为抗旱筛选指标是可靠的。相关分析显示,-淀粉酶活性大小与胚芽鞘长度极显著相关,在干旱胁迫下-淀粉酶活性大小与品种的抗旱性高度一致,因此可以作为春小麦抗旱的一个辅助选择指标。

3.2 -淀粉酶同工酶可作为春小麦抗旱鉴定的生理指标

前人在对盐胁迫下的胚芽鞘萌发阶段胚乳活性研究后认为,淀粉酶同工酶可以作为抗盐性筛选的分子标记^[15]。本试验通过对青海、甘肃等西北地区春小麦抗旱品种与干旱敏感品种在萌发阶段进行干旱模拟研究表明,20% PEG6000 胁迫影响-淀粉酶同工酶表达,但抗旱品种-淀粉酶同工酶表达受抑制较小,从而能保持较高的-淀粉酶活性,而干旱敏感品种-淀粉酶同工酶受抑制较为明显、活性低,其原因可能是有些同工酶基因对胁迫环境敏感,表达受到明显抑制。据此,本研究认为-淀粉酶同工酶可以用作春小麦抗旱鉴定的生理指标。

参考文献:

[1]张怀刚,程大志. 抗旱优质春小麦新品种—高原671[J]. 麦类作物学报,2003,23(4):143.
[2]陈集贤,赵绪兰主编. 丰产抗旱春小麦高原602研究与应用[M]. 兰州:兰州大学出版社,1995.

[3]Morgan J M. The use of coleoptile responses to water stress to differentiate wheat genotypes for osmoregulation, growth and yield[J]. Annals of Botany, 1988,62(2):193-198.
[4]王玮,邹琦. 胚芽鞘长度作为冬小麦抗旱性鉴定指标的研究[J]. 作物学报,1997,23(4):458-467.
[5]王玮,邹琦. 水分胁迫下冬小麦芽鞘长度与抗旱性的关系及其遗传特性的研究[J]. 西北植物学报,1997,17(4):493-498.
[6]Ashraf C M, shakra S. Wheat seed germination under low temperature and moisture stress [J]. Agronomy Journal, 1978, 70(1):135-179.
[7]Liu H P, Zhu Z X, Lu T X, et al. Effect of osmotic stress on the kinds, forms and levels of polyamines in wheat coleoptiles [J]. Journal of Physiology and Molecular Biology, 2006, 32(3):293-299.
[8]Umenura T, Perata P, fulsuhara Y, et al. Sugar sensing and alpha-amylase gene repression in rice embryos [J]. Planta, 1998, 204: 420-428.
[9]Georg-kraemer J E, Mundstock, E C, Cavalli-Molina, S. Developmental expression of amylase during barley malting[J]. Journal of Cereal Science, 2001, 33(3):279-288.
[10]Francisco J, Maria T, David C. Amylase expression during wheat seed germination [J]. Plant Science,1995,106(2):207-213.
[11]赵玉锦,王台. 水稻种子萌发过程中-淀粉酶与萌发速率关系的分析[J]. 植物学通报,2001,18(2):226-230.
[12]陈爱国,陈进红. 胚芽鞘的伸长机理和生理生态响应[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2002,33(4):438-441.
[13]张木清,陈如凯. 作物抗旱分子生理与遗传改良[M]. 北京:科学出版社,2005:378.
[14]李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:169-172.
[15]何忠效,张树政. 电泳(第二版)[M]. 北京:科学出版社,1999:298-300.
[16]张华,孙永刚,张帆,等. 外源一氧化氮供体对渗透胁迫下小麦种子萌发和水解酶活性的影响[J]. 植物生理与分子生物学学报,2005,31(3):241-246.
[17]王翠亭,黄占景,何聪芬. 小麦耐盐突变体生化标记的研究[J]. 麦类作物学报,2002,22(1):10-13.
[18]赵可夫. 植物抗盐生理[M]. 北京:中国科技出版社,1993.