

小麦子粒 α -淀粉酶活性测定方法的改进

赵远玲

(黑龙江省农业科学院 生物技术研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: α -淀粉酶活性是与小麦穗发芽有关的重要生理指标。对测定 α -淀粉酶活性的 3,5-二硝基水杨酸法进行了常量法和微量法试验。通过对比研究,提出了改进的微量测定方法,并对其利用进行了讨论。

关键词: 小麦; 穗发芽; α -淀粉酶活性; 3,5-二硝基水杨酸法

中图分类号: S512

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2010)04-0040-03

小麦收获前的穗发芽(Pre-harvest sprouting)是世界性的自然灾害,严重影响小麦的产量和品质。小麦籽粒储藏的主要物质是淀粉,当籽粒萌发时,由于淀粉酶的活动,使储藏的淀粉糖化,造成产量和加工品质降低。研究表明, α -淀粉酶活性高,是小麦发生穗发芽最根本的生化原因^[1-2],可以将 α -淀粉酶活性作为选择指标,应用于抗穗发芽育种中^[3]。

测定 α -淀粉酶活性的方法有分光光度法、凝胶扩散法、3,5-二硝基水杨酸法、粘度计法和降落值法等^[4]。目前,3,5-二硝基水杨酸法是最常用的方法。在许多试验手册中提供了常规用量的一般方法和步骤,然而试剂用量较大,且操作不够简便,不便将其应用于穗发芽抗性选择^[5-6]。该研究通过对比分析常量和微量 2 种方法获得的试验结果,旨在提供一种能够替代常量测定的经济有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 试验材料的准备 从 Frontana(抗穗发芽品种)/Inia66(感穗发芽品种)的重组自交家系群体(F_8)中选取发芽指数分别为高、中、低的 3 个小麦品系,群体号分别是 1、2、48。在田间随机排列种植,3 次重复。收获后,按照籽粒的萌发试验要求对其进行发芽试验,3 d 后备用。

1.1.2 试剂 (1) α -淀粉酶提取缓冲液(pH 5.5): 20 mmol \cdot L⁻¹ NaAc(2.721 6 g \cdot L⁻¹), 1 mmol \cdot L⁻¹ CaCl₂(0.110 99 g \cdot L⁻¹), 加入 HAc

调节 pH;(2)柠檬酸缓冲液(pH5.60):由 A 液和 B 液组成。A 液:柠檬酸 20.01 g,溶解定容至 1 L,B 液:柠檬酸钠 29.41 g,溶解定容至 1 L,再将 A 液 13.70 mL 与 B 液 26.30 mL 混匀备用;(3)0.4 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠溶液:称取 16.00 g 氢氧化钠,加蒸馏水定容至 1 L;(4)1% 淀粉溶液:称取 1.00 g 淀粉,加少量蒸馏水搅拌成悬浊液,用滴管吸取向沸水中边加边搅拌;(5)1.0 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠溶液:称取 4.00 g 氢氧化钠,加蒸馏水定容至 100 mL;(6)3,5-二硝基水杨酸(DNS):1.00 g 3,5-二硝基水杨酸溶于 20 mL 1.0 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠溶液中,加入 50 mL 预热的蒸馏水,再加入 30.00 g 酒石酸钾钠,溶解定容至 100 mL,盖紧瓶塞,防止 CO₂ 进入;(7)标准麦芽糖溶液(1 mg \cdot L⁻¹):称取 0.10 g 麦芽糖,溶解定容至 100 mL。

1.2 方法

1.2.1 提取酶液 取萌发 3 d 的种子,用滤纸吸去表面的水分,称取 1 g,加 1 mL 提取缓冲液,少量石英砂,研磨至匀浆,4 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min。取上清液,定容至 25 mL。

1.2.2 酶促反应 每一个样品取 4 支试管,一个做对照,其它用于测定样品(3 个平行样);每管加入酶液 1 mL,70 \pm 0.5 $^{\circ}$ C 水浴准确加热 15 min,钝化 β -淀粉酶,取出后迅速用流水冷却;向各管中加入柠檬酸缓冲液(pH5.60),然后再向对照管中加入 0.4 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠溶液,以终止其中的酶促反应,各管均是 40 $^{\circ}$ C 水浴 15 min;分别向各试管中加入 40 \pm 0.5 $^{\circ}$ C 下预热的 1% 淀粉溶液,摇匀,立即放回水浴中,准确保温 5 min;向各测定管中迅速加入 0.4 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠溶液,以终止酶促反应。每一步加入试剂的用量见表 1。

收稿日期:2010-02-01

作者简介:赵远玲(1977-),女,黑龙江省哈尔滨市人,硕士,研究实习员,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:lizixin418@sina.com。

表1

常量和微量酶促反应的试剂用量对比

mL

处理		酶液	0.4 mol·L ⁻¹ NaOH	柠檬酸 缓冲液	1%淀粉 溶液	0.4 mol·L ⁻¹ NaOH
常量	对照	1.000	4.000	1.000	2.000	0
	待测样	1.000	0	1.000	2.000	4.000
微量	对照	0.125	0.500	0.125	0.250	0
	待测样	0.125	0	0.125	0.250	0.500

1.2.3 显色反应 待测样:取上述酶促反应液于刻度试管中,加入3,5-二硝基水杨酸,沸水浴5 min。取出冷却,蒸馏水稀释。利用紫外分光光度计测定520 nm下的吸光度。其中,常量试验中,酶促反应液和DNS各2.0 mL,稀释至25 mL;微量试验中,2种试液分别加入0.48 mL,稀释至6 mL;标准液:取7支试管,分别加入麦芽糖标准液(1mg·L⁻¹)。再向各管中加水定容。然后加入3,5-二硝基水杨酸,沸水浴5 min。取出冷却,蒸馏水稀释。利用分光光度计测定

表2

标准样常量和微量显色反应的试剂用量对比

项目	常量							微量						
编号	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
麦芽糖/mL	0	0.2	0.6	1.0	1.4	1.8	2.0	0	0.048	0.144	0.240	0.336	0.432	0.480
H ₂ O/mL	2.0	1.8	1.4	1.0	0.6	0.2	0	0.480	0.432	0.336	0.240	0.144	0.048	0
DNS/mL	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	0.480	0.480	0.480	0.480	0.480	0.480	0.480
沸水浴5 min,冷却稀释至25 mL							沸水浴5 min,冷却稀释至6 mL							

520 nm下的吸光度(见表2)。

1.2.4 求算样品中麦芽糖含量 以标准样中麦芽糖含量为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程。将待测样的吸光度代入方程,求得待测样的麦芽糖含量,折算成1 g鲜种子中麦芽糖的含量及酶活力。

α-淀粉酶活力=浓度×体积×稀释倍数/样品鲜重×时间

其中,浓度单位为mg·mL⁻¹,体积单位

为mL,样品鲜重单位为g,酶活力单位为mg·g⁻¹·min⁻¹。

2 结果与分析

2.1 标准曲线在常量和微量方法中的对比

标准曲线试验方法规定,r²相关系数达到0.99的回归方程才可用。从表3可以看出,采用常量和微量试验方法建立的标准曲线,其相关系数均在0.99以上。说明采用微量法获得的标准曲线是可以利用的。

表3

标准曲线的常量和微量对比

编号	1	2	3	4	5	6	7	回归方程	r ² 相关系数
常量1	-0.037	0.018	0.143	0.288	0.439	0.582	0.658	y=0.682x-0.037	0.994
微量1	-0.030	0.017	0.158	0.302	0.443	0.571	0.651	y=0.671x-0.030	0.996
常量2	-0.021	0.034	0.174	0.314	0.469	0.590	0.670	y=0.685x-0.021	0.997
微量2	-0.008	0.002	0.057	0.118	0.157	0.204	0.212	y=0.230x-0.008	0.990
常量3	-0.041	0.005	0.144	0.248	0.398	0.541	0.625	y=0.642x-0.041	0.990
微量3	-0.023	0.018	0.131	0.233	0.345	0.448	0.528	y=0.532x-0.023	0.995

2.2 采用常量法和微量法测量待测样品结果对比

常量标准曲线回归方程:

y=0.620x-0.015(r²相关系数0.998)

微量标准曲线回归方程:

y=0.608x-0.023(r²相关系数0.997)

以每一个品种田间种植的3次重复为样品,对其进行淀粉酶活性测定。将每个样品的3个平行样的试验结果列于表4和表5。

表 4 待测样消光值在微量试验中的数据分析

编号	品系	重复	消光值					麦芽糖浓度 /mg · L ⁻¹	酶活力 /mg · g ⁻¹ · min ⁻¹
			对照	平行样 1	平行样 2	平行样 3	平均值—对照		
1	1	3	0.080	0.113	0.079	0.093	0.015	0.063	31.5
2		2	0.083	0.112	0.085	0.103	0.017	0.066	33.0
3		1	0.060	0.091	0.082	0.197	0.057	0.132	66.0
4	48	3	0.094	0.101	0.098	0.105	0.007	0.049	24.5
5		2	0.113	0.172	0.150	0.184	0.056	0.130	65.0
6		1	0.120	0.185	0.252	0.181	0.086	0.179	89.5
7	2	2	0.126	0.221	0.221	0.215	0.093	0.191	95.5
8		3	0.120	0.239	0.211	0.207	0.099	0.201	100.5
9		1	0.109	0.231	0.214	0.224	0.114	0.225	112.5

表 5 待测样常量数据分析

编号	品系	重复	消光值					麦芽糖浓度 /mg · L ⁻¹	酶活力 /mg · g ⁻¹ · min ⁻¹
			对照	平行样 1	平行样 2	平行样 3	平均值—对照		
1	1	3	0.088	0.090	0.081	0.086	-0.002	0.021	10.5
2		2	0.084	0.093	0.087	0.083	0.004	0.031	15.5
3		1	0.083	0.095	0.086	0.087	0.006	0.034	17.0
4	48	3	0.086	0.145	0.147	0.145	0.060	0.121	60.5
5		2	0.103	0.238	0.233	0.230	0.131	0.235	117.5
6		1	0.121	0.258	0.268	0.276	0.146	0.260	130.0
7	2	2	0.122	0.301	0.348	0.299	0.194	0.337	168.5
8		3	0.118	0.424	0.447	0.461	0.326	0.550	275.0
9		1	0.128	0.482	0.499	0.550	0.382	0.640	320.0

结果表明,除个别情况,无论常量还是微量试验,重复性都比较好;通过除去 3 个数据中一个相对差距大的数据,保留两个接近数据进行平均,能够获得更加准确的测量值。常量法和微量法获得的淀粉酶活性值的相关系数达到 0.776*^{*}。值得注意的是,同一品种因生长环境不同,α-淀粉酶活力不同,说明种植 3 次重复是非常必要的。

将 2 种测定方法得到的每个品种的 3 次重复取平均值,相关系数为 0.994*^{*}。印证了用微量方法代替常量方法进行 α-淀粉酶活力测定的可行性。

3 讨论

从结果可知,微量试验和常量试验的重复性都比较好。虽然 2 种试验方法获得的结果不能完全吻合,但是两者之间具有相同的变化趋势。将微量法用于抗穗发芽品种的筛选时,具有经济有效、操作简便的特点,并且提高了工作效率。因为该试验的步骤较多,反应温度、反应时间要求严格,微量试验中试剂用量少,受环境影响大,操作熟练是保证试验结果可靠性的关键。目前,尚未见到用微量法测定 α-淀粉酶活力的报道。

在测定籽粒中 α-淀粉酶活性的试验中,有人用干种子研磨成粉。肖世和等^[7]指出,浸润前后及由浸润导致的 α-淀粉酶活性增量,品种间存在极显著差异。α-淀粉酶活性低的品种抗穗发芽,反之则易穗发芽。浸润使某些不抗穗发芽的品种 α-淀粉酶活性有较大增加,而发芽率较低的品种增加较小。未浸润子粒的 α-淀粉酶活性与发芽率相关不显著。该研究将种子先进行发芽,3 d 后用于试验。增强了抗、感穗发芽品种的区分度。

参考文献:

[1] 张海峰,卢荣禾.小麦穗发芽抗性机理与遗传研究[J].作物学报,1993,19(3):523-530.

[2] 吴颖,胡汉桥,王罡,等.春小麦 α-淀粉酶活性及其与穗发芽抗性的关系[J].吉林农业大学学报,2002,24(4):22-25.

[3] 王凤宝,董立峰,付金锋.小麦抗穗发芽酶反应生化标记选择法[J].农业生物技术学报,2007,15(3):482-488.

[4] 刘小丽,宋保军,侯睿林.测定 α-淀粉酶活性的 2 种方法的比较研究[J].农业科技与信息,2006(9):36-38.

[5] 刘泽军.淀粉酶测定进展[J].国外医学临床生物化学与检验学分册,1992,13(1):15-16.

[6] 潘仁瑞.在同一份植物样品中测定 α 和 β-淀粉酶活力方法的改进[J].生物学杂志,1987(2):20-23.

[7] 肖世和,闫长生,张海萍,等.小麦穗发芽研究[M].北京:中国农业科学技术出版社,2004.

几种马铃薯栽培模式对马铃薯产量的影响

顾 鑫,丁俊杰

(黑龙江省农业科学院 佳木斯分院,黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:为提高黑龙江省马铃薯的产量,对几种马铃薯栽培模式进行了对比研究,结果表明,80 cm 大垄距与小整薯播种技术相结合的处理增产效果显著。增产达到 25.83%。

关键词:大垄栽培;整薯播种;马铃薯

中图分类号:S532 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2010)04-0043-02

马铃薯已经成为继大豆、玉米、水稻之后黑龙江省的第四大作物。占黑龙江省粮食播种面积的 4.0%。马铃薯产业在黑龙江省农业结构调整和促进农民增收中发挥着日益重要的作用。黑龙江省是全国重要的种薯和商品薯基地之一,播种面积仅次于大豆、玉米和水稻。自 2001 年突破 40.0 万 hm^2 后,总产量和单产水平各年变化较大,2004 年总产量达 515.0 万 t,单产 15.2 $\text{t} \cdot \text{hm}^{-2}$,分别居于全国第 6 位和第 16 位。从近几年看,黑龙江省马铃薯种植面积和总产量在全国占有较大比重,但单产水平一直不高^[1]。马铃薯栽培技术停滞不前阻碍了马铃薯产量的提升,栽培技术是继优良品种之后夺取高产的又一手段,但长期以来,对马铃薯栽培技术重视不够,

科研和推广工作薄弱,技术培训欠缺等现象较普遍,田间管理简单粗放,影响了马铃薯产量的提高^[2]。采用高产、优质、高效栽培技术是提高黑龙江省马铃薯产量有效而必要的措施。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料采用由黑龙江省农业科学院克山分院提供的克新 13 脱毒种薯。脱毒种薯按芽眼切块,每块 30 g 左右;同时还采用健康的克新 13 脱毒小整薯每个 50 g 左右。

1.2 试验设计

试验于 2009 年在黑龙江省农业科学院佳木斯分院内进行,土质为黑土,前茬为大豆,肥力中等,地力均匀,喷灌方便。采用随机区组排列,每处理 3 次重复,小区面积 13.5 m^2 。处理 1 采用 80 cm 宽大垄,整薯播种栽培技术;处理 2 采用 80 cm 垄距,切块播种;处理 3 采用 65 cm 常规垄距,用整薯播种栽培技术;对照为 65 cm 常规垄距,切块播种。其它栽培措施按照常规进行。

收稿日期:2010-01-13
第一作者简介:顾鑫(1980-),男,四川省铜梁县人,硕士,研究实习生,从事植保研究。E-mail:Guxin1111@163.com。
通讯作者:丁俊杰(1974-),男,黑龙江省桦南县人,博士,副研究员,从事大豆病理研究。E-mail:me999@126.com。

Improvement of Determination method on α -Amylase Activity in Wheat Grain

ZHAO Yuan-ling

(Biotechnology Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: α -Amylase activity is physiological index related to pre-harvest sprouting of wheat. The test normal and micro dosage of 3,5-Dinitrosalicylic acid was contrasted, and get a improved measure method based on micro-dosage.

Key words: wheat; pre-harvest sprouting; α -Amylase activity; 3,5-Dinitrosalicylic acid