

中国大麦地方品种的 α -淀粉酶酶活性研究

姜晓东^{1,2}, 张 京¹, 郭刚刚¹

(¹ 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ² 山西农业大学农学院, 太谷 030801)

摘要: 为了研究中国大麦地方品种种质资源 α -淀粉酶的遗传变异, 发掘具有高 α -淀粉酶酶活性的材料。本试验以 257 份中国地方品种为试验材料, 利用 3,5-二硝基水杨酸法 (DNS) 和降落数值法 (FN) 测定了 2010 年和 2011 年收获的发芽种子与干种子中的 α -淀粉酶活性。分析了不同年份间及发芽种子与干种子中的酶活性的相关性。结果表明, 中国大麦地方品种的 α -淀粉酶酶活性存在广泛的遗传变异, 酶活性最高的品种几乎是酶活性最低品种的 4 倍, 且多数品种的 α -淀粉酶活性在发芽后第 5 天或第 6 天达到最高。发芽种子的 α -淀粉酶酶活性在年份之间的相关性达到极显著水平, 说明发芽种子的 α -淀粉酶酶活性主要受遗传因素控制; 发芽种子与干种子的酶活性之间相关性不显著, 表明干种子测定的降落数值不能用来预测大麦品种的 α -淀粉酶活性。

关键词: 中国大麦; α -淀粉酶活性; 3,5-二硝基水杨酸法; 降落数值法

Study on the α -amylase Activity of the Chinese Barley Landrace

JIANG Xiao-dong^{1,2}, ZHANG Jing¹, GUO Gang-gang¹

(¹ Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

² Agronomy College, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801)

Abstract: This study was aimed to detect the extensive variation of α -amylase activity in Chinese barley landraces and explore the elite germplasms with high α -amylase activity. The α -amylase activity was tested in 257 Chinese barley landraces with the seeds harvested in two years by two methods. The method of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) was used for the enzyme activity test in germinated seed and the method of falling number (FN) was for the test of dry seeds. The results showed that there was extensive variation in α -amylase activity in Chinese barley landraces, with about four-fold difference between the highest and the lowest. Generally, enzyme activity reached the maximum in five to six days for most accessions. There was a strong correlation between 2010 and 2011 for α -amylase activity in germinated seed. But no correlation was found between germinated and dry barley seeds in the enzyme activity, suggesting that α -amylase activity in barley accessions came from dry seeds could not be tested by the method of falling number.

Key words: Chinese barley; α -amylase activity; 3,5-dinitrosalicylic acid; falling number

淀粉作为能源物质贮藏在植物的种子和块茎等组织中。在种子的胚乳中含有大量离散的、不溶性的淀粉颗粒。淀粉有 2 种存在形式, 一种是由 α -1, 4 糖苷键连接的线性葡萄糖聚合体, 即直链淀粉; 另一种是在 α -1, 4 糖苷键内部, 通过 α -1, 6 糖苷键连接的葡萄糖残基组成的支链淀粉。

α -淀粉酶作为一类典型的水解酶, 广泛地存在于微生物、植物和动物体中, 能够特异地切割淀粉中的 1,4-糖苷键。 α -淀粉酶在谷类作物中以多种形式存在, 在淀粉代谢及种子发芽过程中起着非常重要的作用, 其大量表达合成受植物激素如赤霉素的调节影响^[1-3]。一般来讲, 试验鉴定到的同功酶数

收稿日期: 2012-05-18 修回日期: 2012-06-12 网络出版日期: 2013-01-30

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130130.1620.016.html>

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (3-29); 国家现代农业产业技术体系 (CARS-05)

作者简介: 姜晓东, 博士, 研究方向为作物种质资源学。E-mail: caas08f2e1a@yahoo.cn

通信作者: 张京, 博士, 研究员, 研究方向为作物种质资源学。E-mail: zhangjing@caas.net.cn

量,不仅取决于试验研究的品种,而且与试验方法的灵敏度有关^[4-5]。基于物理化学及其免疫学特性,将谷物淀粉酶分为 2 类^[6]。I 类:等电点(pI)接近 5.8,属于钙不依赖型,种子萌芽早期当有赤霉素存在时很快地生成。II 类:等电点值(pI)接近 4.5,活性依赖钙离子的作用,发芽期间合成,需要赤霉素的诱导,能够代表 60% 的酶活性^[7-9]。在大麦、小麦和燕麦的成熟种子中可检测到 α -淀粉酶活性。R. D. Hill 等^[10] 对大麦、玉米、黑麦和燕麦种子发芽过程进行了广泛的研究,发现发芽期间 α -淀粉酶蛋白合成约占总蛋白的 30%。有研究表明:种子一旦发芽便具有 α -淀粉酶活性, α -淀粉酶活性在糊粉层细胞中的合成受到胚中分泌的植物激素-赤霉素(GA, gibberellic acid)的调节^[11]。

不论在自然萌发的种子中还是在人为控制工业流程(如麦芽制作和酿造工艺)中, α -淀粉酶对淀粉降解的初期起着非常重要的作用。 α -淀粉酶活性是影响啤酒大麦品质的重要因素之一,将高 α -淀粉酶活性性状作为啤酒大麦品种选育的重要目标之一。国外研究表明,大麦栽培品种中 α -淀粉酶活性存在广泛的遗传变异^[12],并受到位于第 1 和第 6 染色体上等位基因的影响^[13]。本文以分布于中国不同地区的大麦地方品种为材料,对其 α -淀粉酶活性进行研究,以鉴定筛选高 α -淀粉酶活性的优异种质,为啤酒大麦育种提供亲本材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料和田间试验

从国家大麦种质资源库中选取来自中国不同地区的大麦地方品种 257 份,分别于 2009 年和 2010 年 3 月初,在中国农业科学院作物科学研究所试验田春播种植,田间管理同一般大田。试验采用完全随机设计,每份材料重复 2 次。完熟期收获,经充分晾晒后脱粒,风干种子,4℃ 保存。

1.2 α -淀粉酶活性测定

1.2.1 3,5-二硝基水杨酸法(DNS,3,5-dinitro-salicylic acid) 取 100 粒当年收获保存于 4℃ 的大麦干种子,在 1% 次氯酸钠溶液中浸泡 15 min 进行表面消毒,然后用去离子水反复冲洗数次。15℃ 下蒸馏水中浸泡孵育 8 h 后,将种子平分到 3 个铺有湿润滤纸培养皿中,随机放进培养箱。为保持培养皿的相对湿度,定期向培养皿滴入蒸馏水。15℃ 暗培养 5 d 后,从每个培养皿中随机取 20 粒种子,去除根和芽,放置于冰预冷的研钵中,加入 5 mL 冰预

冷的蒸馏水和少量石英砂,迅速将种子研磨成匀浆。用冰水将匀浆倒入刻度容量瓶中,加入冰冷蒸馏水至 100 mL。将容量瓶在冰上放置 30 min,期间晃动几次。之后将匀浆转入 50 mL 离心管中,4℃ 下 8000 g 离心 10 min,取上清液作为 α -淀粉酶的粗提液。

将 4 mL 提取液倒入 10 mL 离心管中,70℃ 孵育 10 min,使 β -淀粉酶灭活。取 1 mL 该提取液移至另一试管,再加入 1 mL 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 5.6),然后加入 2 mL 1% 的可溶性淀粉(Sigma)混匀。从每支反应管中取 0.5 mL 溶液,加入到新的试管,并加入 1 mL 1% 的 3,5-二硝基水杨酸混匀,沸水煮沸 5 min,加入 8.5 mL 蒸馏水。测定 540 nm 的吸光度值(OD)作为 α -淀粉酶活性的测定值。对照加入 4 mL 0.4 mol/L NaOH 灭活 α -淀粉酶^[14-15]。

1.2.2 降落数值法 大麦面粉样品的准备。取当年收获的大麦种子 30 g,利用 Perten 公司生产的 3100 型微型磨面机磨粉后,经 0.8 mm 筛孔过筛。用近红外仪测定面粉的含水量。以含水量 14% 为标准,根据样品含水量的变化增加或减少面粉的含量,将加入的面粉量统一调整为 7 g。

降落数值的测定。采用 Perten 公司生产的 Falling Number 1700 型降落数值仪,进行降落数值测定。取经含水量测定的面粉(如含水量为 14%,取 7 g 面粉),放入试管,加 25 mL 蒸馏水,剧烈晃动 20 次,混匀。将粘度搅拌器连同试管放入沸水浴中,当降落数值仪中开始搅动样品时,淀粉开始糊化并且粘度增加。经过 60 s 的搅动,搅拌器将从试管的顶部开始下降。搅拌器的下降速度与其所对应的从顶部降落到底部的时间,取决于匀浆的粘度。拌器降落到底部的时间即降落数值,作为样品 α -淀粉酶活性的测定值。

1.3 统计分析

对 2 种方法测定 α -淀粉酶活性的结果,利用 Excel 数据分析模块进行描述统计分析,采用统计分析软件 SAS V8 进行方差和相关分析。

2 结果与分析

2.1 发芽种子的 α -淀粉酶活性

为明确测定 α -淀粉酶活性的最适时期,了解 α -淀粉酶活性在种子发芽过程中的变化趋势,采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS),对 5 个大麦品种在种子不同发芽时间的 α -淀粉酶活性进行了测定。结果显示(图 1), α -淀粉酶活性随发芽时间的增加,表现出不同的变化趋势;多数品种在发芽 132 h 时酶活

性达到高峰。但低活性品种如 WDM6113,在发芽 96 h 时酶活性达到最高,随后逐渐降低,到 240 h 即第 10 d 酶活性降到最低。而酶活性中等品种 ZDM3555 在发芽 132 h 达到最高,随后呈下降趋势。3 个高活性品种 ZDM8055、ZDM3381 和 ZDM3421,均在发芽 132 h 酶活性达到最高,但 ZDM8055 和

ZDM3381 在此后的发芽过程中,酶活性没有出现明显的下降。从图 1 可以看出,多数大麦品种在发芽后 120 ~ 132 h 内,即发芽第 5 ~ 6 天酶活性最高。因此本试验将发芽后第 6 天设定为酶活性的测定时间,并对全部 257 个大麦品种,进行了 α -淀粉酶活性测定。

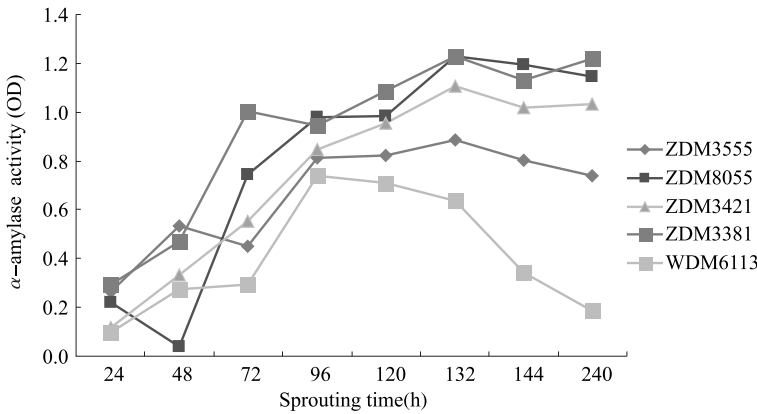
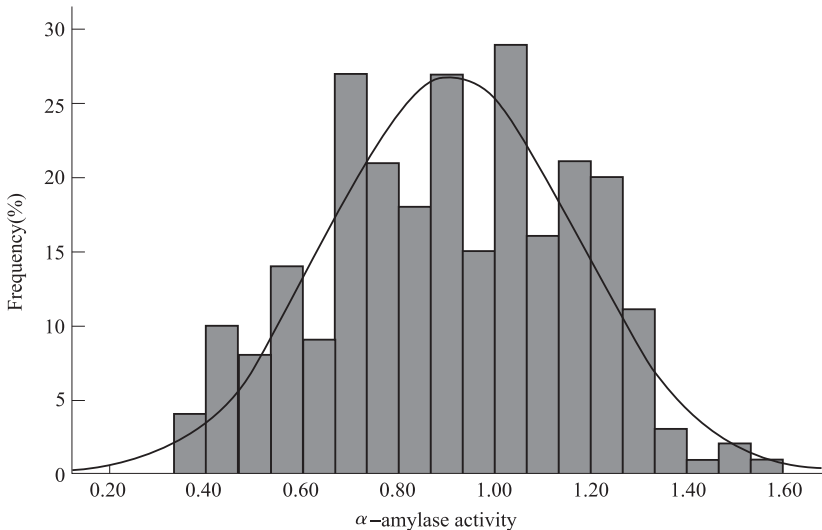


图 1 发芽过程中大麦 α -淀粉酶活性变化趋势
Fig. 1 The profile of α -amylase activity development in germinating seed of barley

关于大麦品种的 α -淀粉酶活性值,理论上只要通过麦芽糖标准曲线的标定,所测定的每一个品种的 OD 值均可对应转换成麦芽糖含量,然后根据单位时间内生成麦芽糖的量,转换为相应的活性值。然而,却并不能获得更多的生物学意义,并且降低了后续分析的精确性。因此,本研究直接利用测定的 OD 值,用于发芽种子中 α -淀粉酶的活性分析。

2.2 发芽种子 α -淀粉酶的活性分布

为明确其 α -淀粉酶活性在品种间的差异与分布,于 2010 - 2011 年测定了 257 份发芽大麦种子的 α -淀粉酶活性,基于每个品种 2 年的 α -淀粉酶活性平均值,对其进行了次数分布(图 2)。由图 2 可见,大麦品种间 α -淀粉酶活性存在较大变异,极差为 1.198,酶活性最高值约为最低值的 4 倍(1.585 和 0.387)。且品种间 α -淀粉酶活性的频次变化表现为连续正态分布。



横坐标代表 α -淀粉酶活性,纵坐标代表各活性值出现的频率
X-axis represents α -amylase activity and Y-axis represents the frequency of each α -amylase activity

图 2 大麦地方品种发芽种子中 α -淀粉酶活性的次数分布
Fig. 2 Frequency distribution of α -amylase activity from germinated seed for barley landraces

同时为了更加可靠地反映大麦品种间的 α -淀粉酶活性差异,利用公式: $LSD_{\alpha} = S_{y_1 - y_2} t_{\alpha}$ 对各个品种的酶活性进行了比较。式中 $S_{y_1 - y_2} = \sqrt{\frac{2MSe}{n}}$ 为样品品种间的酶活性差数的标准误。当 2 个品种的酶活性值(OD 值)的差 ≥ 0.44 或 0.58 时,分别表示 2 个

表 1 高 α -淀粉酶活性的品种

Table 1 Varieties with high α -amylase activity

品种编号 Variety No.	品种名称 Name of variety	α -淀粉酶活性 α -amylase activity	产地 Origin	棱型 Row type	皮裸性 Covered/naked	冬春性 Growth habit
ZDM7825	二棱大麦	1.585	甘肃	2	皮	春
ZDM54	80-229 大麦	1.474	河北	6	皮	冬
ZDM5371	如苏里	1.470	四川	6	皮	冬
ZDM3883	二轮谷老麦	1.418	贵州	2	皮	春
ZDM4922	藏青 1 号	1.398	西藏	6	裸	春
ZDM2960	临海无芒白大麦	1.341	浙江	6	皮	春
ZDM4589	索调噶木	1.340	西藏	6	裸	春
ZDM1464	天水县冬大麦	1.329	甘肃	6	皮	半冬
ZDM3901	千千大麦	1.324	贵州	6	皮	冬
ZDM29	沙河三月黄	1.320	河北	6	皮	冬
ZDM2057	六棱大麦	1.302	江苏	6	皮	半冬
ZDM1175	宁安皮 3 号	1.298	黑龙江	6	皮	春
ZDM1802	沙车白青稞	1.298	新疆	6	裸	春
ZDM797	火了芒大麦	1.296	河南	6	皮	春性
ZDM7892	白大麦	1.296	甘肃	6	皮	春
ZDM8270	泸麦 8 号	1.296	上海	2	皮	半冬
ZDM1367	宁城早熟芒	1.276	内蒙古	6	皮	春
ZDM3528	花垣大麦	1.269	湖南	6	皮	春

2.3 品种基因型与年份对发芽种子 α -淀粉酶活性的影响

从 2010 年和 2011 年收获的种子中,每个品种随机抽取 2 份进行发芽处理,采用 3,5-二硝基水杨酸法

品种的酶活性在 0.05 和 0.01 概率水平上,具有显著或极显著差异。比较结果表明,在检测的 257 个大麦品种中,138 个品种的 α -淀粉酶活性差异显著,42 个品种差异极显著。此外,为进一步培育具有高 α -淀粉酶活性的大麦品种提供种质材料,本文列举了 18 个 α -淀粉酶活性最高的大麦品种(表 1)。

(DNS 法),发芽第 6 天进行 α -淀粉酶活性测定,并对测定结果进行方差分析(表 2)。结果表明,品种间的酶活性差异极显著,而收获年份对酶活性没有影响,并且品种基因型与收获年份之间不存在互作效应。

表 2 2010 – 2011 年不同品种不同年份间 α -淀粉酶活性(DNS)的方差分析

Table 2 Variance analysis of α -amylase activity(DNS) between years and different varieties in 2010 – 2011

变异来源 Source of variation	自由度 DF	平方和 SS	均方 MS	F	Pr > F
品种(A) Variety	256	93.43	0.36495	3.56	<0.0001
年份(B) year	1	0.10	0.10373	1.01	0.3149
互作(A \times B)	256	29.92	0.11687	1.14	0.1087
Interaction effect between A and B					
误差 Error	514	52.68	0.10249		
总变异 Total variance	1027	176.13			

$Pr > F$ 即 P 值,当 $Pr > F$ 值小于 0.05,表明处理间差异显著;反之,若 $Pr > F$ 值或 P 值大于 0.05,则表明处理间差异不显著,下同
 $Pr > F$ means P value, when a probability($Pr > F(P)$) is less than a threshold(significance level), such as when $P < 0.05$ represents significant differences among treatments, in contrast, when $P > 0.05$ means there are no significant differences among treatments. The same as below

2.4 大麦干种子的 α -淀粉酶活性

从 2010 年和 2011 年收获的 257 个大麦品种的 514 份种子中,每个品种随机抽取 2 份,利用降落数值法进行了干种子的 α -淀粉酶活性(FN 值)测定。方

差分析表明,不仅品种或基因型间和不同年份之间的降落数值差异达到显著或极显著,而且基因型与年份的互作效应也达到显著水平(表 3)。可见大麦干种子的 α -淀粉酶活性容易受到环境条件的影响。

表 3 2010 – 2011 年不同品种不同年份间大麦干种子 α-淀粉酶活性(FN) 的方差分析

Table 3 Variance analysis of α-amylase activity(FN) in dry seeds of barley between years and varieties in 2010-2011

变异来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>Pr</i> > <i>F</i>
Source of variance	<i>SS</i>	<i>DF</i>	<i>MS</i>		
品种 (A) Variety	9276787. 48	256	36237. 5	27. 69922	<0. 0001
年份 (B) Year	284279. 21	1	284279. 0	35. 41825	<0. 0001
互作 (A × B)	2955296. 04	256	11544. 1	1. 45029	<0. 0001
Interaction effect between A and B					
误差 Error	1459693. 50	514	2839. 9		
总变异 Total variance	13976056. 23	1027			

为了全面了解中国地方大麦品种的 α-淀粉酶活性变异情况,根据田间记载和国家大麦种质资源数据库检索,按照品种的棱形、冬春性和皮裸性等,对 α-淀粉酶活性(DNS 法)进行了分类比较,结果见表 4。257 份大麦地方品种中,仅 28 个为二棱,大部分为六棱大麦,然而测定结果表明,二棱大麦 α-淀

粉酶平均活性(0. 925)略高于六棱大麦(0. 906),变异幅度也比六棱大麦高。150 个春性和 88 个冬性品种,虽然春性品种的 α-淀粉酶平均活性显著高于冬性大麦,但两者的酶活性变异幅度无显著差异。150 份皮大麦和 107 份裸大麦,皮大麦的 α-淀粉酶平均活性和变异幅度均高于裸大麦。

表 4 不同类型大麦中 α-淀粉酶的比较

Table 4 Comparison of α-amylase activity between barley accessions of different types

	皮大麦	裸大麦	二棱	六棱	春性	冬性
	Covered	Naked	Two-rowed	Six-rowed	Spring	Winter
品种数 No. of variety	150	107	28	228	150	88
平均数 ± 标准差	0. 92 ± 0. 26	0. 89 ± 0. 24	0. 925 ± 0. 29	0. 906 ± 0. 25	0. 915 ± 0. 25	0. 88 ± 0. 27
Mean ± SD						
最大值 Max.	1. 585	1. 398	1. 585	1. 474	1. 585	1. 474
最小值 Min.	0. 389	0. 387	0. 489	0. 387	0. 387	0. 398
极差 Range	1. 196	1. 011	1. 096	1. 087	1. 198	1. 076

通过对不同大麦种质类型中 α-淀粉酶活性的全面比较,尽管二棱大麦的平均酶活性高于六棱大麦,且最高酶活性材料也出自二棱大麦。但通过进一步的分析比较发现,试验中具有高 α-淀粉酶活性 18 个品种中 15 个为六棱大麦,而只有 3 个为二棱大麦(表 1)。这些品种将为该性状遗传改良提供有利用价值的育种材料,其中 3 个酶活性最高的品种 ZDM7825、ZDM54 和 ZDM5371,可在啤酒大麦育种中优先利用。

2.5 不同年份和不同测定方法对 α-淀粉酶活性的影响

为全面了解不同年份和不同测定方法是否影响大麦品种 α-淀粉酶活性的鉴定结果,对不同年份及不同测定方法的测定数据进行了相关分析(表 5)。由表 5 可见,2010 年与 2011 年 DNS 法测定的发芽种子 α-酶活性之间,存在极为显著的正相关关系($r=0. 84807$),表明 2 年测定的 α-酶活性具有高度的一致性,与前述方差分析中发芽种子的酶活性年

份间的交互效应不显著的结论完全相同。同样,2010 年与 2011 年 FN 法测定的干种子 α-淀粉酶活性之间,也具有一定相关性($r=0. 18590$),但相关程度较低。然而,在 DNS 法测定发芽种子与 FN 法测定干种子的 α-酶活性之间没有相关性(2010 年: $r=0. 07970$,2011 年: $r=0. 0477$),而且不同年份间也无相关性(2010/2011 年: $r=0. 0145$,2011/2010 年: $r=0. 0458$),表明大麦干种子的 α-酶活性并不代表发芽种子的 α-酶活性。

3 讨论

3.1 中国大麦的 α-淀粉酶活性

α-淀粉酶活性是啤酒大麦育种最重要的目标性状之一,然而由于测定比较困难,直到目前还没有对中国大麦种质资源的 α-淀粉酶活性开展大规模的表型鉴定,导致了实际育种工作中非常缺乏高 α-淀粉酶活性的育种材料,一定程度上减缓了我国啤酒

表 5 发芽种子中的 α -淀粉酶活性与干种子的降落数值的相关性

Table 5 Pearson correlation coefficient between α -amylase activity in germination seeds and falling number in dry seeds

α -淀粉酶活性 α -amylase activity	DNS		FN	
	发芽种子 2010 年	发芽种子 2011 年	干种子 2010 年	干种子 2011 年
发芽种子 2010 年	-			
发芽种子 2011 年	0.84807***	-		
干种子 2010 年	0.07970 ^{NS}	0.01452 ^{NS}	-	
干种子 2011 年	0.04508 ^{NS}	0.04770 ^{NS}	0.18590*	-

*** 表示在 0.001 水平上差异极显著; * 表示在 0.05 水平上差异显著; NS 表示变量间无相关性
*** represents significant difference at 0.001 level, * represents significant difference at 0.05 level, and NS represents non-significant difference

大麦育种的速度。本研究采用 DNS 法,对 257 份中国大麦地方品种的 α -淀粉酶活性进行了检测,结果发现 α -淀粉酶活性在我国大麦地方品种中具有广泛的遗传变异,存在大约 4 倍的差异。不仅为我国啤酒大麦育种鉴定出 α -淀粉酶活性高的优异种质,也为后续开展基于分子标记的全基因组关联分析储备了基础数据。同时研究还发现,中国二棱大麦地方品种的 α -淀粉酶活性略高于六棱大麦,与 J. S. Hough^[16]“六棱大麦的 α -淀粉酶活性高于二棱大麦”的研究结果刚好相反。这是否是中国大麦地方品种 α -淀粉酶活性的变异特点,还是由于本研究 257 份中国大麦地方品种中,二棱大麦材料相对较少(仅 28 份)所致,有待今后通过增加二棱大麦样本进一步验证。

3.2 影响 α -淀粉酶活性鉴定的因素

虽然基因型是 α -淀粉酶活性高低的决定因素,但种子样品的来源、样品处理、测定时间、测试方法、操作误差等,均会对鉴定结果造成影响。其中,鉴定品种的种子来源主要与其前代的生长环境有关。例如, A. M. Arends 等^[17]通过对生长在不同地区和不同年份的大麦品种,进行 α -淀粉酶的活性检测,发现生长环境对酶活性变异影响很大。目前,种子测试样品通过 2 种繁种途径取得:(1) 同地繁殖,即将所有的供试品种在同一地点繁种;(2) 异地繁殖,将供试品种按来源地进行繁种。尽管第 2 种途径中,供试品种生长在其最适宜的环境下,待测种子样品在最佳发育条件下得到,但第 1 种途径除田间试验管理简单方便之外,不仅降低了环境因素的影响,且可以避免由于长途运输引起的种子生理生化特性的改变对 α -淀粉酶活性造成的影响。所以,本研究采用了第 1 种繁种方式。至于测定方法, D. E. Briggs 等^[18]指出,糖化力测定方法本身出现的一些问题,会严重影响试验结果的可靠性。并且从本研究 DNS 法和 FN 法测试定结果的方差分析来看, DNS 法的品种基因型与收获年份之间互作效应不显著,

而 FN 法的基因型与年份互作效应显著。由此可见,采取适当的测试方法,可以有效降低环境因素对 α -淀粉酶活性鉴定结果的影响。当然,即使采取同一测定方法,除了上述种子来源之外,测试之前种子发芽处理条件、发芽和测试时间,以及试验中酶提取过程的量化等,都可能对鉴定结果造成影响。这需要在开始试验流程之前,应用生物统计的原理和方法,对整个试验加以精心设计,从而提高酶活性鉴定的精确性,保证鉴定结果的可靠性。

3.3 α -淀粉酶活性鉴定的适宜方法

在所有淀粉降解的酶类中, α -淀粉酶(1,4- α -D-葡聚糖水解酶, EC 3.2.1.1)是唯一能够通过水解,连接葡萄糖多聚体的 α -1,4 糖苷键,首先对天然淀粉颗粒发生作用的酶。之后的脱分支作用以及对麦芽糊精和可溶性聚合物的彻底降解,则分别由 β -淀粉酶、限制性糊精酶、 β -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶完成共同^[19]。在种子发芽过程中,高浓度的内源 α -淀粉酶抑制因子可能影响了高活性 α -淀粉酶基因的表达,造成发芽早期 α -淀粉酶的活性较低^[20]。从本试验对不同品种在不同发芽时间种子酶活性的测定结果来看,被测品种的 α -淀粉酶活性在发芽第 3 天后逐渐增加。可能是由于在种子萌发早期,未能合成大量的 α -淀粉酶,但随着种子发芽过程的延伸,胚中释放出的内源赤霉素不断增加,在赤霉素的调控下,糊粉层合成的 α -淀粉酶也越来越多^[21]。 R. Hooley^[22]的研究也表明,大麦发芽早期的酶活性较低,此后随着发芽时间的延长,大麦种子中的 α -淀粉酶活性逐渐增强。因此,本研究 DNS 和 FN 法的测定结果之间,无论同一年份还是不同年份,均不具有相关性,其根本原因就在于 DNS 法测定的是发芽种子,而 FN 法测定的是没有经过发芽的风干种子。并且,由于试验的种子发芽处理在人工控制下进行,所以 DNS 法的测定结果年份之间相关性极为密切,且与年份互作不显著,各基因型年份间表现非常一致。但 FN 法测定的干种子的酶活性,很大程度上

受到当年收获期间天气状况的影响,尽管年份间具有一定的相关性,但决定系数很低($R = 0.0345$),并且与年份的互作效应显著,受年份影响较大。P. Hucl^[23]的研究也认为,由于品种或基因型与年份间的互作,降落数值法测定结果的重复率较低。这与本研究结果基本一致。D. G. Humphreys 等^[24]发现,小麦种子的穗发芽程度,与降落数值具有高度的相关性。本研究同样注意到,一些本来 2010 年 DNS 法测定 α -淀粉酶活性较高的品种,由于 2011 年收获期间遇到几场大雨而发生穗发芽,其 FN 值大幅度降低。E. Johansson^[25]研究表明,淀粉质地是决定降落数值的主要因素。实际上,发芽种子的 α -淀粉酶活性更符合麦芽和啤酒工业的实际需要,而干种子的 α -淀粉酶活性更能反映种子的穗发芽程度。然而,从测试方法本身来看,DNS 法虽操作复杂,但更为直接、准确;FN 法尽管操作简单、快速,但由于受淀粉特性和其他大分子粘性物质,例如 β -葡聚糖含量的影响,准确性较差。

综上可知,在进行大麦品种或基因型的 α -淀粉酶活性鉴定中,只有采取适当测试方法,通过发芽种子的活性测定,才能真实反映基因型的本质差异。

3.4 α -淀粉酶活性鉴定的最佳时间

麦芽生产实际上是通过发芽将大麦种子加工成具有高淀粉酶活性的啤酒生产原料。其生产工艺即是通过调节发芽条件和发芽过程,使大麦种子的淀粉酶整体活性在最短的时间内达到最高且损失和能耗最低。其中,发芽时间是最为重要的控制因素之一。目前,麦芽企业采用的麦芽制作方法虽有所不同,但大多数根据 I. Schmalenbach 等^[26]的方法,采取 7 d 发芽。本试验对多个不同基因型的大麦同品种,在不同发芽时间对 α -淀粉酶活性进行连续测定,发现多数品种在发芽后第 6 天酶活性达到高峰。不仅为今后的大麦种质资源的 α -淀粉酶活性鉴定确定了最佳时间,而且为麦芽企业缩短制麦时间和提高麦芽产量,提供了试验参考。

参考文献

- [1] Chandler P M, Zucar J A, Jacobsen J V, et al. The effects of gibberellic acid and abscisic acid on α -amylase mRNA levels in barley aleurone layers studies using an α -amylase cDNA clone[J]. Plant Molecular Bio, 1984, 3: 407-418
- [2] Evins W H, Varner J E. Hormonal control of polyribosome formation in barley aleurone layers [J]. Plant Physiol, 1972, 49: 348-352
- [3] Gómez-Cadenas A, Zentella R, Walker-Simmons M K, et al. Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules[J]. Plant Cell, 2001, 13(3): 667-679
- [4] Fox G P, Panozzo J F, Li C D, et al. Molecular basis of barley quality[J]. Aust J Agri Res, 2003, 54(12): 1081-1101
- [5] Sekiguchi T, Takeda G, Kawaguchi K. Quality test for the breeding of malting barley in relation to alpha-amylase activity[J]. Jpn J Breed, 1984, 43: 263-272
- [6] Kruger J E, Marchylo B A. A comparison of the catalysis of starch components by isoenzymes from the two major groups of germinated wheat α -amylase[J]. Cereal Chem, 1985, 62(1): 11-18
- [7] Jacobsen J V, Scandalios J G, Varner J E. Multiple forms of amylase induced by gibberellic acid in isolated barley aleurone layers[J]. Plant Physiol, 1970, 45(4): 367-371
- [8] Bush D S. Effects of gibberellic acid and environmental factors on cytosolic calcium in wheat aleurone cells[J]. Planta, 1996, 199: 89-99
- [9] Chandler P M, Robertson M. Gibberellin dose-response curves and the characterization of dwarf mutants of barley[J]. Plant Physiol, 1999, 120: 623-632
- [10] Hill R D, Macgregor A W. Cereal α -amylases in grain research and technology[M]// Advances in Cereal science and technology. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, 1988: 217-261
- [11] Jacobsen J V, Chandler P M. Gibberellin and abscisic acid in germinating cereals[M]// Davies P J. Plant hormones and their role in plant growth and development. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht The Netherlands, 1988: 164-193
- [12] Hayter A M, Riggs T J. Environmental and varietal differences in diastatic power and four associated characteristics of spring barley[J]. J Agric Sci, 1973, 80: 297-302
- [13] Brown A H D, Jacobsen J V. Genetic basis and natural variation of α -amylase in barley isozymes in barley[J]. Genet Res, 1982, 40(3): 315-324
- [14] 史永旭, 姜涌明, 樊熹. 五种 α -淀粉酶测定方法的比较研究[J]. 微生物学通报, 1996, 23(6): 371-373
- [15] 缪可嘉, 张大龙, 马延和, 等. 利用随机突变探讨影响 α -淀粉酶催化活性的氨基酸位点[J]. 食品工业科技, 2007, 28(10): 63-69
- [16] Hough J S. The biotechnology of malting and brewing [M]. Cambridge: Press Syndicate of the University of Cambridge, 1985
- [17] Arends A M, Fox G P, Henry R J, et al. Genetic and environmental variation in the diastatic power of Australian barley[J]. J Cereal Sci, 1995, 21(1): 63-70
- [18] Briggs D E, Hough J S, Stevens R, et al. Malting and brewing science: malt and sweet wort[M]. London and New York: Chapman and Hall, 1981
- [19] Dunn G. A model for starch breakdown in higher plants[J]. Phytochemistry, 1974, 13(8): 1341-1346
- [20] Leah R, Mundy J. The bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor of barley: nucleotide sequence and patterns of seed-specific expression[J]. Plant Mol Bio, 1989, 12(6): 673-682
- [21] Paleg I G. Physiological effects of gibberellic acid. III. Observations on its mode of action on barley endosperm[J]. Plant Physiol, 1961, 36: 829-837
- [22] Hooley R. A role for G proteins in plant hormone signalling[J]. Plant Physiol Biochem, 1999, 37: 393-402
- [23] Hucl P. Repeatability of a simplified method for determining sprouting resistance in wheat[J]. Plant Var Seeds, 1994, 7: 79-84
- [24] Humphreys D G, Noll J. Methods for characterization of preharvest sprouting resistance in a wheat breeding program[J]. Euphytica, 2002, 126: 61-65
- [25] Johansson E. Effect of two wheat genotypes and Swedish environment on falling number, amylase activities, and protein concentration and composition[J]. Euphytica, 2002, 126(1): 143-149
- [26] Schmalenbach I, Pillen K. Detection and verification of malting quality QTLs using wild barley introgression lines[J]. Theor Appl Genet, 2009, 118(8): 1411-1427