

羧甲基壳聚糖对玉米的生理调节功能初探^①

师素云^② 薛启汉 陈游 王学臣
(江苏省农科院) (北京农业大学生物学院)
陈洁
(无锡轻工业学院食品科学与工程系)

摘要 以不同浓度的羧甲基壳聚糖(NCMC)处理玉米种子,其种子发芽势、发芽率、幼苗株高及幼苗叶片的叶绿素含量均有不同程度提高;用 NCMC 处理玉米种子及幼苗,萌发种子胚乳中 α -淀粉酶、幼苗茎叶中硝酸还原酶活性分别提高 45%和 60%,但幼苗蛋白水解酶活性降低 40%,NCMC 处理开花期玉米果穗和花丝,收获的种子中贮藏蛋白含量平均提高 20%左右,其中主要组分醇溶蛋白(zein)含量提高近 50%。这一初步结果表明,羧甲基壳聚糖对玉米的碳、氮代谢具有一定生物调节功能,作为一种天然生物调节剂,NCMC 有可能在很多作物,特别是那些蛋白质含量较低的作物中具有广泛应用前景。

关键词 玉米; 羧甲基壳聚糖; α -淀粉酶; 硝酸还原酶; 蛋白水解酶; 贮藏蛋白
中图分类号 Q539; S143-8

Primary Study on Physiological Regulation Function of N-Carboxmethylchitosan in Maize

Shi Suyun Xue Qihan Chen You

(Institute of Agrobiological Genetics and Physiology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014)

Wang Xuechen

(College of Biology)

Chen Jie

(Dept. of Food Sciences and Engineering, Wuxi Institute of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract Corn seeds were treated with different concentration of N-carboxmethylchitosan (NCMC) to increase seeds germinating energy, germination percentage, seedling height and chlorophyll content of seedling leaves on some extent. At flowering stage, corn ears and silk were also treated with NCMC to increase seeds storage protein content by 20% on average. Among the main fractions of corn storage protein, zein was increased nearly by 50%. Enzymatical analysis indicated that α -amylase activity in

收稿日期: 1995-06-28

修回日期: 1997-02-26

①本研究为国家攀登计划项目“主要农作物高产高效及抗逆性生理基础研究”及江苏省科委应用基础部分资助项目

②师素云,江苏省南京市孝陵卫 50 号,江苏省农科院,210014

germinated endosperm and nitratase activity in seedling under NCMC treatment was increased up to 45% and 60% respectively. However, protease activity in NCMC treated seedling was decreased nearly by 40% than that of control. This primary results demonstrated that N-carboxymethylchitosan presents certain bioregulating effects on carbohydrate and nitrogen metabolism of maize which might have great potential to be used as a natural bioregulator widely applied in many crops particularly in protein deficiency species.

Key words corn; N-carboxymethylchitosan; α -Amylase; nitratase; protease; storage protein

迄今为止,在农业生产中应用的生物调节剂多为人工合成,并主要通过促进作物生长与发育提高作物产量。羧甲基壳聚糖(N-carboxymethylchitosan,简称 NCMC)是天然几丁质(chitin)的衍生物^[1,2],无生物毒性^[3,4],在医药、食品、生物化工等多种工业中具有广泛应用^[5]。几丁质衍生物具有抗真菌、诱导植物几丁质酶活性的作用^[6]。并对作物生长和营养代谢具有调节功能^[7]。但国内尚未见该方面的研究报道。本文以玉米为材料,就羧甲基壳聚糖对某些生理作用的影响及其调节的研究做一初步报道。

1 材料与方法

1.1 材料

羧甲基壳聚糖由无锡轻工业学院食品科学与工程系提供,分子量 10 000 以下。供试玉米材料为“苏玉 5 号”、“丹玉 13 号”F₁ 杂交种,分别由江苏农科院粮食所和安徽怀远农业局提供。

1.2 试验方法

1.2.1 种子处理 取刚收获未经后熟、籽粒饱满的“苏玉 5 号”玉米种子,分别以 0.05%, 0.10%, 0.20% 和 0.30% 的 NCMC 溶液浸种 4 h,播种在蛭石中,恒温(30℃)发芽。每日以相应浓度的 NCMC 喷洒 100 mL,种子出苗后进行自然光照。播种后第 5 天测定胚乳中 α -淀粉酶活性,第 7 天测定叶片中叶绿素含量。设蒸馏水处理为对照。试验重复两次。

“丹玉 13 号”玉米种子,用 0.20% NCMC 浸种 2 h 后恒温(30℃)下发芽生长,每日以 0.20% NCMC 喷洒一次,设蒸馏水处理为对照,取萌发第 3~9 天的幼苗地上部测定硝酸还原酶活性。取整株测定蛋白水解酶活性。试验重复三次。

1.2.2 植株处理 选生长在田间,开花期一致、发育均匀的“丹玉 13”玉米植株授粉后 1~2 d,每果穗分别注射 0.05%, 0.10%, 0.20% 和 0.30% 的 NCMC 溶液 2 mL,并用 5 mL 相应浓度的 NCMC 喷洒花丝,次日重复处理一次,设蒸馏水处理为对照。玉米成熟后,每处理收获大小均匀的果穗 10 枚,干燥脱粒,用于蛋白质组分分析。

1.3 蛋白质组分分析

基本上参照董牛^[8]方法,依次用 0.1 mol·L⁻¹氯化钠、蒸馏水、75%乙醇、0.1 mol·L⁻¹盐酸和 0.1 mol·L⁻¹氢氧化钠提取各组分。用 Folin-phenol^[9]法测定各组分的含量。

1.4 酶活性测定

1.4.1 α -淀粉酶活性测定 参照 Bornfeld^[10]和黎锡扬^[11]方法。

1.4.2 硝酸还原酶活性测定 参照陈薇等^[12]方法。

1.4.3 蛋白水解酶活性测定 参照吴光南等^[13]方法进行。

1.4.4 叶绿素含量测定 参照 Wintermans^[14]方法。

2 结果与分析

2.1 羧甲基壳聚糖处理玉米种子对其萌发及幼苗生长的影响

2.1.1 发芽势、发芽率及幼苗株高 以不同浓度的 NCMC 浸种,其发芽势、发芽率和幼苗株高都明显高于对照(图 1),且浓度效应明显,0.05%~0.20%浓度处理,种子发芽势和发芽率比对照提高 50%以上。但 NCMC 浓度增加至 0.30%时,种子发芽势、发芽率和幼苗株高的增幅都有下降,但株高增长仍很明显。

2.1.2 α -淀粉酶活性 谷物种子主要贮存物质是淀粉, α -淀粉酶是玉米种子中主要的淀粉水解酶之一。NCMC 处理种子,其胚乳中 α -淀粉酶活性显著高于对照(图 2),普遍提高 30%以上。NCMC 的这一效果,从种子萌发过程中胚乳 α -淀粉酶活性的消长动态也可看出(图 3)。种子萌发后第 3 天到第 5 天,处理与对照样品胚乳中 α -淀粉酶活性均逐日增强,但 NCMC 处理的样品酶活性普遍高于对照。第 6 天后活性均逐渐下降,但 NCMC 处理的样品酶活性下降幅度明显低于对照,表明 NCMC 不仅提高种子萌发过程中 α -淀粉酶的活性,还能使其活性稳定较长时间,保证淀粉充分水解,为种子苗的生长提供充足的营养。这可能是 NCMC 处理之所以能提高玉米种子发芽势、发芽率及种子苗株高的内在原因之一。

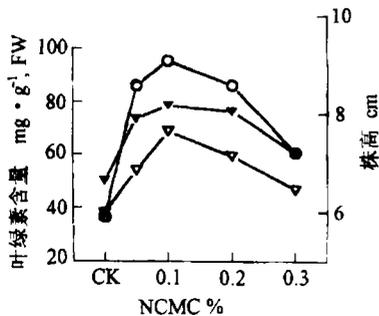


图 1 NCMC 处理对玉米种子发芽势、发芽率及幼苗株高的影响

○ 株高 ▲ 发芽率 △ 发芽势

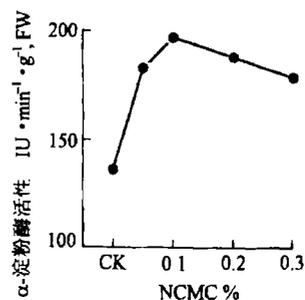


图 2 不同浓度的 NCMC 处理玉米种子与胚乳中 α -淀粉酶活性的关系

2.1.3 叶绿素含量 NCMC 不仅能促进玉米种子的萌发和幼苗的生长,而且也明显提高幼苗叶片中叶绿素的含量(图 4),叶绿素含量的提高,使种子苗光合产物积累较早较多,也有利于幼苗早发与生长。

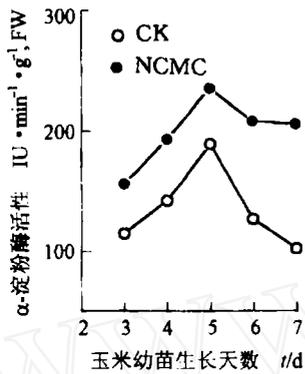


图3 用 NCMC 处理玉米种子,在萌发过程中 α -淀粉酶活性的变化

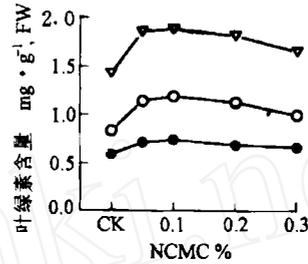


图4 NCMC 处理对玉米种子苗叶片中叶绿素含量的影响

○ 叶绿素 a ● 叶绿素 b △ 叶绿素 a+b

2.2 NCMC 处理植株对玉米种子贮藏蛋白含量及组分的影响

NCMC 处理授粉后的玉米果穗和花丝,种子贮藏蛋白总量均有不同程度的提高。NCMC 的浓度在 0.10%~0.30% 范围内蛋白总量提高 10%~30%, 平均提高 19.59%(表 1)就不同组分而言,盐溶球蛋白(globulin)含量变化不大,水溶白蛋白(albumin)有所下降,主要组分醇溶蛋白(zein)和谷蛋白(glutelin)增加极为显著,分别平均提高 48.92% 和 12.17%。

表 1 NCMC 处理花期玉米对种子贮藏蛋白含量及组分的影响

蛋白组分	种子贮藏蛋白的含量(mg · g ⁻¹ 籽粒干粉)					平均蛋白含量	对照(±%)
	NCMC 浓度 (%)						
	0.00 CK	0.05	0.10	0.20	0.30		
球蛋白	19.90	19.00	19.20	20.20	19.70	19.53	-1.96
白蛋白	3.20	2.40	2.30	2.10	2.20	2.25	-29.68
醇溶蛋白	27.80	36.00	39.60	48.00	42.00	41.40	+48.92
谷蛋白	30.96	32.70	34.70	36.20	35.30	34.73	+12.17
总蛋白	81.86	90.10	95.80	106.50	99.20	97.90	+19.59
比对照±%	—	+10.07	+17.03	+30.10	+21.18	+19.59	—

2.3 NCMC 处理种子对玉米幼苗硝酸还原酶和蛋白水解酶的影响

2.3.1 硝酸还原酶 大多数陆生植物主要的氮源是硝酸盐。硝酸盐被植物吸收后经硝酸还原酶的催化作用,还原成亚硝酸盐,再经亚硝酸还原酶作用还原成氨后,才能进一步转化成有机含氮化合物,因此硝酸还原酶活性的增强,将有利于硝酸盐的同化,对植物生长发育、产量形成和蛋白质含量起着重要作用^[15]。玉米种子从萌发第 3 天起,地上部的硝酸还原酶

活性不断上升,第 7 天达最高值,随后活性逐渐下降。NCMC 处理的样品,硝酸还原酶活性的消长动态与对照趋势一致,但与同期苗相比,处理苗比对照苗酶活性高 30%~60%,第 7 天后,对照苗酶活性迅速下降,而经 NCMC 处理的苗酶活性下降缓慢(图 5)。

2.3.2 蛋白水解酶 玉米种子萌发第 2 天至第 5 天,幼苗中蛋白水解酶活性不断上升,第 6 天开始下降,经 NCMC 处理的幼苗与同期对照苗相比,蛋白水解酶活性明显偏低,低幅达 34.7%,随苗龄增加,二者酶活性差距减少,但第 5 天酶活性达最大值时,处理苗酶活性比对照仍低 15%(图 6)。

NCMC 处理种子及幼苗提高了硝酸还原酶活性,降低了蛋白水解酶活性,这一试验结果说明 NCMC 对玉米幼苗氮代谢具有一定的生理调节作用。但这是否与种子贮藏蛋白的提高有直接关系,还需进一步深入研究。

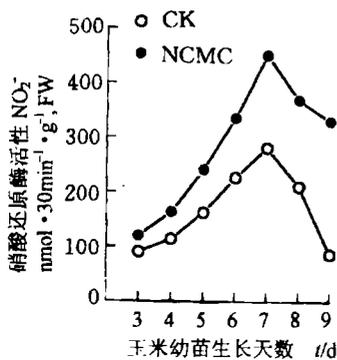


图 5 NCMC 处理对玉米种子苗硝酸还原酶活性的影响

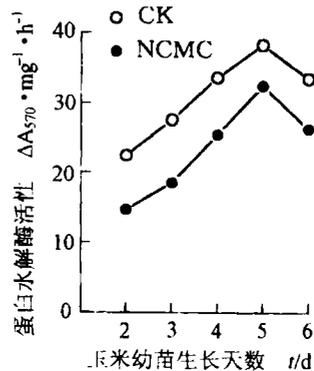


图 6 NCMC 处理对玉米种子苗蛋白水解酶活性的影响

3 讨论

Cuero 1991 年首次报道利用壳聚糖 (chitosan) 处理种子提高番茄植株叶绿素含量^[1]。本文利用壳聚糖衍生物 NCMC 处理玉米种子亦能提高玉米幼苗叶片叶绿素含量,表明二者有类似的作用。由于后者有更好的水溶性,实际应用更为方便。NCMC 处理后熟期的玉米种子以促进种子萌发和种子苗生长尚属首次报道。表明 NCMC 对作物碳代谢有一定的调节功能。但尚需进一步系统研究,特别是 NCMC 对作物光合产量的影响须倍加关注。

Osuji 等 1992 年报道^[7],利用 NCMC 处理果穗可以提高玉米贮藏蛋白中醇溶蛋白 (zein) 含量近一倍,但未进行其他组分的详细分析,本研究取得类似结果,但醇溶蛋白含量提高幅度远不及 Osuji 的结果,特别是水溶白蛋白含量有较大幅度的下降。这一结果的差异可能是由于彼此制备的 NCMC 分子量不同(目前国内外市场尚无 NCMC 商品出售),不同分子量的 NCMC 的生物活性可能存在较大差异,这是今后有待进一步深入研究的内容。

另外,作物一生中参与氮代谢的酶很多,本文仅以硝酸还原酶和蛋白水解酶为例,以说明 NCMC 对玉米氮代谢的生理调节作用。NCMC 对其他作物和一些氮代谢关键酶,如谷氨

酰胺合成酶(GS)、谷氨酸脱氢酶(GDH)和谷氨酸合酶(GOGAT)的影响以及与提高贮藏蛋白含量的关系等将做下一步研究。

参 考 文 献

- 1 Cuero R G, et al. N-Carboxymethylchitosan: uptake and effects on chlorophyll production, water potential and biomass in tomato plants. *Food Biotechnology*, 1991, 5:95~103
- 2 Osuji G O, Cuero R G. Regulation of ammonium ion salvage and enhancement of the storage protein contents of corn, sweet potato, and yam tuber by N-(carboxymethyl) chitosan application. *J Agric Food Chem*, 1992, 40:724~734
- 3 Arai K. et al. Toxicity of chitosan. *Bull Tokai Reg Fish Res Lab*, 1968, 56:89~95
- 4 Hirano S, et al. Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds. *J Agric Food Chem*, 1990, 38:1214~1217
- 5 夏文水,陈洁. 甲壳素和壳聚糖的化学改性及其应用. *无锡轻工业学院学报*,1994,13(2):162~171
- 6 Hirano S, et al. Chitinase activity of some seeds during their Germination Process, and its induction by treating with chitosan and derivatives. In: Skjark Brack G, et al. eds. *Proceedings, 4th International Conference on Chitin and Chitosan, USA*. 1988, 743~774
- 7 Osuji G O, Cuero R G. N-Carboxymethylchitosan enhancement of the storage protein contents of maize seeds. *Food Biotechnology*, 1992, 6(2): 105~126
- 8 董牛等. 高赖氨酸的高单系列玉米种子蛋白分析. *植物生理学报*,1988,14 (1):29~34
- 9 Lowry O H, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193:265~275
- 10 Bornfeld P. Amylase α and β . In: Colowick S P, Kaplan N O eds. *Methods in Enzymology: I*. New York: Academic Press, 1955, 149
- 11 黎锡扬等. 天门冬酰胺对赤霉菌促进枯草杆菌 A¹⁷ α -淀粉酶形成的阻抑作用. *生物化学与生物物理学报*,1978,10:103~108
- 12 陈薇,张德颐. 植物组织中硝酸还原酶的提纯、测定和纯化. *植物生理学通讯*,1980,(4):45~49
- 13 吴光南等. 水稻叶片蛋白质水解酶的某些理化特性及其与衰老的关系. *江苏农业学报*,1985, 1(1):1~10
- 14 Wintermans J F G M, de Mots A. Spectrophotometric Characteristics of chlorophyll a and b pheophytins in ethanol. *Biochem Biophys Acta*, 1965, 109:448~453
- 15 李文才等. 硝酸还原酶的研究: V. 棉花硝酸还原酶活力与硝态氮含量的关系. *作物学报*,1983,9(2): 93~97