

荆彦平,刘大同,郝亚芳,等. 胚乳淀粉体分离的简易方法[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):73-74.

胚乳淀粉体分离的简易方法

荆彦平, 刘大同, 郝亚芳, 王 萍, 李金萍, 顾蕴洁, 王 忠

(扬州大学江苏省作物遗传生理重点实验室/农业部长江中下游作物生理生态与栽培重点开放实验室, 江苏扬州 225009)

摘要:以小麦、玉米为材料分离胚乳淀粉体,采用切割胚乳、低速离心法从胚乳中分离出淀粉体,利用 0.5% I_2 - KI 溶液对淀粉体进行染色,结果表明,小麦胚乳淀粉体呈近圆球形或椭球形,玉米胚乳淀粉体呈圆球形。玉米胚乳淀粉体形状较规则,淀粉体长、短轴差异较小,圆度较高。小麦胚乳淀粉体形状变化比较大,淀粉体长、短轴值差异较大,圆度较低。

关键词:小麦;玉米;胚乳;淀粉体;低速离心

中图分类号: S512.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0073-02

胚乳是由 3 倍体胚乳原核经反复分裂发育而来的营养组织,是谷物籽粒的重要组成部分。胚乳重量约占谷物重量的 80% 以上,胚乳富含淀粉、蛋白质、脂质、矿质元素等物质,其中淀粉约占谷物籽粒干重的 65% ~ 70%。淀粉体的发育状况及内部淀粉的积累量影响谷物的产量及品质^[1-2]。近年来,学者们从形态结构、生理生化、分子遗传等方面对淀粉体进行了广泛研究,利用电子显微技术观察并确定了淀粉体的结构。简易方便的淀粉体分离技术对深入研究淀粉体尤为重要。Echeverria 等先从玉米胚乳组织中诱导培养出前质体,然后从前质体中分离出了淀粉体^[3]。Tetlow 等利用低速离心法从小麦胚乳组织中分离出了完整的淀粉体^[4]。本研究对淀粉体分离过程进行了简化,从小麦、玉米胚乳中分离出了淀粉体,并对其进行了显微拍照,旨在为分离胚乳淀粉体提供依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 材料 以郑麦 9023、农乐 988 花后 12 d 的颖果为材料。

收稿日期:2013-08-07

基金项目:国家自然科学基金(编号:3107134、31270228);高等学校博士学科点专项科研基金(编号:2009320004)。

作者简介:荆彦平(1989—),男,硕士研究生,从事谷物胚乳发育研究。E-mail: jingyanping1989@163.com。

通信作者:王 忠,教授,从事植物生理学研究。E-mail: wangzhong@yzu.edu.cn。

1.1.2 仪器 2 mL 吸管、镊子、解剖针、双面刀片、培养皿、400 目尼龙纱布、漏斗、5 mL 离心管、烧杯、量筒、200 μ L 移液枪、1 000 mL 容量瓶、分析天平、冷冻台式离心机、普通光学显微镜、偏振光显微镜。

1.2 试剂

1.2.1 淀粉体分离液 以蒸馏水为作为溶剂,每升溶液含有 50 mmol Tris、0.8 mol 蔗糖、1 mmol EDTA 二钠、1 mmol KCl、2 mmol $MgCl_2$,利用 1 mol/L HCl 调节溶液 pH 值至 7.5。将新配制的溶液置于 4 $^{\circ}C$ 避光条件下(最多 1 周),分离淀粉体时,向溶液中滴加 1 g 牛血清蛋白(BSA)及 2 mmol 巯基乙醇。

1.2.2 淀粉体染液 0.5% I_2 - KI 溶液(取 1 g KI 溶于 5 ~ 10 mL 蒸馏水中,加 0.5 g I_2 至完全溶解,加蒸馏水至 300 mL)。

1.3 方法

1.3.1 取材 分别取小麦与玉米颖果 10 ~ 20 粒,剥除果皮、种皮、胚,将胚乳放在培养皿中,滴加 5 mL 分离液,冰浴中预冷 30 ~ 60 min。

1.3.2 提取 倒掉分离液,用双面刀片将胚乳切割成细小颗粒,重新滴加 2 mL 分离液,冰浴静置 1 h,用吸管吸取胚乳周围的匀浆,用 400 目纱布过滤后置于 5 mL 离心管中。向胚乳颗粒中重新滴加 1 mL 分离液,重复上述步骤 2 ~ 3 次。

1.3.3 离心 将滤液在 100 g 4 $^{\circ}C$ 下离心 10 min,倒掉上清液,滴加 5 mL 分离液,缓慢翻转离心管,使沉淀悬浮,重新离心 1 ~ 2 次。离心后,所得沉淀即为淀粉体,在沉淀中滴加 2 mL 分离液使其悬浮。

1.3.4 染色 吸取 2 ~ 3 滴淀粉体悬浮液于指形管中,滴加

cidation of the genetic factors appearance quality[J]. Agron Hort, 2012,87(6):525-535.

[16] Mitsui T. Research on appearance quality and eating quality of rice: (19) strategy to develop high-temperature rice starch metabolism enzymes (from the perspective of cellular and molecular biology) [J]. Agron Hort, 2012,87(6):627-633.

[17] Takeuchi Y, Hori K, Suzuki K, et al. Major QTLs for eating quality of an elite Japanese rice cultivar, Koshihikari, on the short arm of chromosome 3[J]. Breeding Science, 2008,58:437-445.

[12] Fukuoka S, Saka N, Koga H, et al. Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice[J]. Science, 2009,325(5943):998-1001.

[13] Yano M, Yamamoto S. Selection of DNA markers in rice[J]. Agric For Fish Res Mag, 2009,33:5-11.

[14] Kobayashi A, Sugimoto K, Yano M, et al. Import high temperature of QTL gene from Hanaeichizen to maturing varieties of brown rice appearance quality[J]. Breed Res, 2011,13:153.

[15] Kobayashi A. Research on appearance quality and eating quality of rice: (18) high temperature resistant rice varieties bred and the elu-

1 滴 0.5% I₂ - KI 溶液,染色 5 min。

1.3.5 拍照 分别吸取 1 滴未染色与染色的淀粉体悬浮液涂布于载玻片上,加盖玻片,置于光学显微镜与偏振光显微镜下观察并拍照。

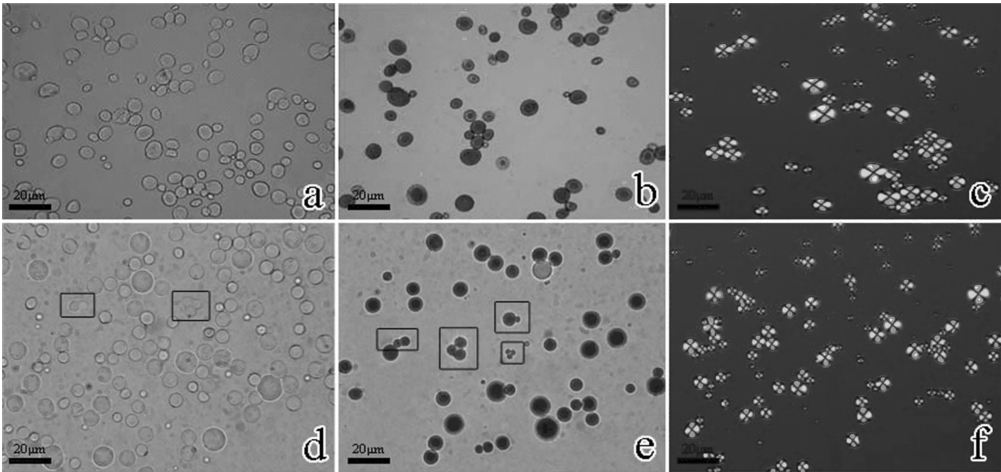
1.4 数据分析

利用 ImageJ 软件分析显微图片中淀粉体的表面几何特性,用 Excel 软件分析数据。

2 结果与分析

小麦、玉米胚乳淀粉体均为单粒淀粉体,即 1 个淀粉体内

只含有 1 个淀粉粒(图 1)。2 种作物淀粉体被 I₂ - KI 溶液染色后呈深蓝色,说明淀粉体内淀粉主要以直链淀粉为主。淀粉体在偏振光显微镜下呈“十”字构型,淀粉体内的淀粉具有球晶结构特性。玉米胚乳淀粉体可通过“出芽”(淀粉被膜外凸形成小淀粉体)及“分裂”(淀粉体内部形成隔板并分裂成几个单体)的方式进行增殖。小麦胚乳淀粉体呈近圆球形或椭圆形,玉米胚乳淀粉体呈圆球形(图 1)。玉米胚乳淀粉体形状较规则,淀粉体长、短轴差异较小,圆度较高。小麦胚乳淀粉体形状变化比较大,淀粉体长、短轴值差异较大,圆度较低(表 1)。



a—小麦胚乳淀粉体普通光镜显微镜图; b—小麦胚乳淀粉体经 I₂-KI 溶液染色后淀粉体普通光镜图; c—小麦胚乳淀粉体偏振光显微镜图; d—玉米胚乳淀粉体普通光镜显微镜图; e—玉米胚乳淀粉体经 I₂-KI 染色后淀粉体普通光镜图; f—玉米胚乳淀粉体偏振光显微镜图。图中方框部分为正在增殖的淀粉体; 标尺为 20 μm

图1 小麦、玉米淀粉体形态

作物	长度(μm)		圆度	费雷特直径(μm)
	长轴	短轴		
小麦	12.64 ± 0.89	11.59 ± 0.65	0.75 ± 0.04	12.58 ± 0.98
玉米	11.83 ± 1.20	11.43 ± 0.85	0.90 ± 0.06	11.60 ± 1.18

3 结论与讨论

本研究从小麦、玉米颖果中分离出淀粉体,淀粉体内富含密度较大的淀粉粒,淀粉体在分离过程中容易破裂。因此在分离过程中应注意以下事项:利用切割法代替研磨法使胚乳释放出淀粉体。分离叶绿体时通常采用研磨方式粉碎植物组织,释放叶绿体^[5]。淀粉体分离过程中采用研磨方式容易使淀粉体破裂;分离过程中动作应当缓慢,避免损伤淀粉体;离心之前先用 400 目尼龙纱布过滤匀浆,去除胚乳组织碎片、完整的细胞以及体积较大的细胞器,淀粉体及小的细胞器可以通过;低速离心,提高淀粉体的纯度。淀粉体密度较大,低速离心时优先沉降,其他小细胞器、蛋白质等不发生沉降,残留在上清液中,多次离心后可去除杂质,提高纯度。利用切片技术观察淀粉体的结构,实际观察结果为淀粉体的横切面,切片制作过程复杂耗时。利用分离技术将淀粉体从胚乳组织中分离,可以直接观察淀粉体的完整形态,操作简便省时。

利用 I₂ - KI 溶液染色及显微观察可以对淀粉体的分离

进行定性鉴定,如果要在分离的基础上继续对淀粉体的代谢机理及遗传表达展开研究,首先要对分离结果进行定量测定。测量指标有分离纯度、完整度及产量。测定分离产物中磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶、乙醇脱氢酶、延胡索酸酶、柠檬酸合成酶等酶的活性来验证细胞质、线粒体、内质网以及过氧化物酶体等小型细胞器的残余量,用以检测淀粉体分离纯度。测定淀粉体内的标志性酶如腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶、碱性磷酸酶的活性与含量来检测淀粉体的完整性与产量。

参考文献:

[1] Sabelli P A, Larkins B A. The development of endosperm in grasses [J]. Plant Physiology, 2009, 149: 14 - 26.

[2] 蔡瑞国, 尹燕彬, 赵发茂, 等. 强筋小麦胚乳淀粉粒度分布特征及其对弱光的响应[J]. 中国农业科学, 2008, 41(5): 1308 - 1316.

[3] Echeverria E, Boyer C, Liu K C, et al. Isolation of amyloplasts from developing maize endosperm [J]. Plant Physiology, 1985, 77(3): 513 - 519.

[4] Tetlow I J, Blissett K J, Emes M J. A rapid method for the isolation of purified amyloplasts from wheat endosperm [J]. Planta, 1993, 189(4): 597 - 600.

[5] 孔祥生, 易现峰. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008: 83 - 84.