

乙烯处理对玉米胚乳发育过程中淀粉合成的影响

刘晓庆, 王 萍, 詹延廷, 王 月, 杨 阳, 李 昊, 董学会

(中国农业大学农学院, 北京 100193)

摘 要: 以玉米自交系 B73 为试验材料, 研究施用外源乙烯之后对胚乳内淀粉合成的影响。结果表明, 在玉米 10 展叶时期施用 400 mg/L 的乙烯利水溶液显著降低玉米百粒重和淀粉含量。淀粉合成相关酶活性测定结果表明, 处理组中 ADP 葡萄糖焦磷酸化酶、可溶性淀粉合成酶、淀粉分支酶、蔗糖合成酶的活性均显著下降。淀粉合成相关基因表达量分析结果表明, 处理组中 ADP 葡萄糖焦磷酸化酶基因 *ZmSH2*、可溶性淀粉合成酶基因 *ZmSS1*、蔗糖合成酶的基因 *ZmSH1* 表达量低于对照组。由此推测, 外源乙烯通过调控淀粉合成相关基因的表达与酶的活性影响玉米胚乳内淀粉的合成。

关键词: 玉米; 胚乳; 乙烯; 淀粉合成酶

中图分类号: S513.01

文献标识码: A

Effect of Ethylene on Starch Biosynthesis During Endosperm Development in Maize

LIU Xiao-qing, WANG Ping, ZHAN Yan-ting, WANG Yue, YANG Yang, LI Hao, DONG Xue-hui

(College of Agronomy, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: To explore the ethylene effect during starch biosynthesis, maize inbred line B73 was used and sprayed with 400 mg/L ethephon at 10-leaf stage. The results suggested that both 100-kernel weight and starch content decreased significantly after the maize was treated by ethephon solution. Also, the activities of many enzymes that related to starch biosynthesis all decreased significantly, which involved ADP-glucose pyrophosphorylase, soluble starch synthase(SSS), starch branching enzyme(SBE), sucrose synthase(SS), etc. Additionally, we used qRT-PCR to analyze the expression patterns of endogenous genes relevant to starch synthesis. The relative expressions of *ZmSH2*, *ZmSS1* and *ZmSH1* were all decreased at certain seed development period after exogenous ethylene spraying. These data revealed that ethylene affected starch biosynthesis through influencing enzymes activities and genes expression levels involved in starch synthesis.

Key words: Maize; Ethylene; Endosperm; Starch synthase enzyme

玉米是三大粮食作物之一, 种植面积呈逐年扩大的趋势。在我国华北及东北地区, 夏玉米容易遭受暴风雨的袭击造成倒伏进而导致减产。乙烯利的有效成分是 2-氯乙基膦酸, 酸性条件下可释放乙烯, 由于乙烯是重要的植物生长调节剂, 因此乙烯利

常被用于研究外源乙烯对植物生长发育的影响。相关研究表明, 乙烯利能够降低作物如小麦(*Triticum aestivum* L.)、玉米(*Zea mays* L.)、大麦(*Hordeum vulgare* L.)等株高, 进而降低倒伏率, 从而抑制倒伏造成的减产^[1-3], 同时乙烯利在降低玉米、小麦倒伏的过程中会导致产量降低和穗粒数下降。有研究表明, 低浓度的乙烯利能够提高水分胁迫及高密度条件下玉米的产量^[4]。鉴于乙烯利的抗倒伏优势及其对玉米产量造成的不利影响, 研究乙烯利导致玉米产量降低的原因是非常必要的。

乙烯对玉米子粒发育具有显著影响, 敲除乙烯信号通路中的 ACS6(ACC synthase)基因后, 干旱胁迫条件下玉米植株内源乙烯合成量降低 53%, 且表现

录用日期: 2018-04-11

基金项目: 国家重点研发计划项目子课题(2016YFD0300304)

作者简介: 刘晓庆(1986-), 女, 河北人, 在读博士, 主要从事调节剂调控玉米子粒发育的研究。

E-mail: liuxiaoqing2011@cau.edu.cn

董学会为本文通讯作者。

E-mail: xuehuidong@cau.edu.cn

出产量高于正常水分条件下的玉米^[5]。在玉米中超表达 *ARGOS8* 基因,降低植株对乙烯的敏感性,转基因植株在干旱和良好水肥条件下的产量都有提高^[6]。由此可见,降低内源乙烯含量可以促进玉米产量的提高。玉米在早前期用外源乙烯处理可以显著降低株高,在4叶期用乙烯的前体 ACC(1-氨基环丙烷-1-羧酸)进行处理,玉米部分中部节间、叶鞘、叶耳明显缩短。

淀粉有直链淀粉和支链淀粉两种,在玉米淀粉中,支链淀粉约占淀粉含量的70%~80%^[7]。淀粉合成主要在玉米胚乳细胞的造粉体中进行。参与淀粉合成过程的第一个限速酶为ADP葡萄糖焦磷酸化酶(AGPase),该酶功能是把光合作用产生的葡萄糖-1-磷酸(G-1-P)转变成ADP葡萄糖(ADP-Glc),而ADP-Glc是淀粉合成的直接底物。研究表明,该酶活性的变化会直接影响玉米淀粉含量^[8]。淀粉合成酶(SS)以寡聚糖为前体,ADP-Glc作底物,把ADP-Glc上的Glc通过 α -1,4键连接到寡聚糖上,形成直链淀粉或分支淀粉的延长链。淀粉合成酶可分为可溶性淀粉合成酶(SSS)及结合型淀粉合成酶(GBSS)^[9]。淀粉分支酶(SBE)主要负责切开 α -1,4糖苷键连接的葡聚糖,并连接 α -1,6糖苷键,是影响子粒中淀粉组成和结构的关键酶。淀粉去分支酶(DBE)可专一性裂解支链淀粉的 α -1,6糖苷键。Zhu等研究表明,乙烯利喷施水稻之后,淀粉合成相关酶如AGPase、SSS等的活性显著下降,且抑制酶的基因转录水平的表达^[10]。本研究通过在玉米发育早期进行乙烯利处理,对玉米子粒胚乳发育过程中淀粉的合成情况进行测定,探究乙烯影响子粒发育的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用植物材料为玉米自交系B73,试验地点为中国农业大学上庄试验站。

1.2 试验方法

处理组于10展叶时期全株喷施400 mg/L 乙烯利(ETH400)水溶液,喷药量为480 kg/hm²,对照组喷施同等量的蒸馏水。自花授粉,分别于授粉后6、10、15、20、25、30、35 d选取植株长势一致、穗长发育情况一致的玉米雌穗,取样部位位于雌穗下部约三分之一处,去掉子粒的种皮和胚,用胚乳进行试验。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 淀粉含量及淀粉合成相关酶活性的测定

参照GB/T-5514-2008方法进行,直链淀粉与支链淀粉的测定采用双波长比色法。

酶液提取:参照Nakamura等的方法^[11],略有改动。5个子粒鲜样加入5 mL提取液:50 mmol/L Hepes-NaOH(pH值7.4)、8 mmol/L MgCl₂、5 mmol/L DTT、2 mmol/L EDTA、12.5(V/V)甘油、5%(W/V)PVP-30,冰浴研磨成匀浆,10 000 r/min 4℃离心10 min,收集上清液用于AGPase、SSS、SBE、DBE和SS活性测定。沉淀用5 mL提取液悬浮后1 000 r/min 4℃微离心3 min用于GBSS活性测定。所有步骤除注明温度之外,均在0~4℃进行。

SSS和GBSS活性的测定:每个酶活性单位为每个子粒每分钟产生NADPH的量。0.05 mL酶提取液加入0.35 mL反应液:50 mmol/L Hepes-NaOH(pH值7.4)、1.6 mmol/L ADPG、15 mmol/L DTT、0.7 mg支链淀粉。30℃水浴反应20 min,沸水浴1 min终止反应,冷却。10 000 r/min离心5 min。取上清液,加入0.20 mL反应液:50 mmol/L Hepes-NaOH(pH值7.4)、4 mmol/L PEP、200 mmol/L KCl、10 mmol/L MgCl₂、1.2 U丙酮酸激酶,30℃水浴反应30 min,沸水浴中终止反应1 min,冷却。再加入0.40 mL反应液:50 mmol/L Hepes-NaOH(pH值7.4)、10 mmol/L Glucose、20 mmol/L MgCl₂、2 mmol/L NADP充分混匀之后加入1.4 U HK、0.35 U G-6-PDH,30℃水浴反应10 min,340 nm比色。

SBE活性测定:每个酶活性单位为每个子粒每分钟增加0.01个碘蓝值。0.2 mL提取液中加入50 mmol/L Hepes-NaOH(pH值7.4)、5 mmol/L G-1-P、1.25 mmol/L AMP、54 U磷酸化酶,30℃水浴反应20 min。加入0.05 mL HCl(1 mol/L)终止反应,加入0.5 mL二甲基亚砷混合均匀后加入0.7 mL I₂/KI(0.1% I₂,1% KI),540 nm比色。

DBE活性测定:每个酶活性单位为每个子粒每分钟形成葡萄糖的量。0.05 mL酶提取液中加入0.20 mL支链淀粉(0.4%)、30℃水浴反应20 min,沸水浴中终止反应1 min,冷却。DNS法测定生成的葡萄糖的量。

AGPase测定:每个酶活性单位为每个子粒每分钟产生NADPH的量。0.04 mL酶提取液中加入0.20 mL反应液:50 mmol/L Hepes-NaOH(pH值7.4)、1.2 mmol/L ADPG、3 mmol/L PPi、5 mmol/L MgCl₂、4 mmol/L DTT,30℃水浴反应20 min,沸水浴中终止反应1 min,冷却。加入0.01 mL反应液:7.5 mmol/L NADP、0.08 U PGM、0.07 U G-6-PDH,30℃水浴反应10 min,340 nm比色。

SS活性测定(降解方向):参照Douglas等的方法^[12]。每个酶活性单位为每个子粒每分钟形成果糖

的量。0.05 mL酶提取液中加入0.20 mL反应液：50 mmol/LHepes–NaOH (pH值7.4)、100 mmol/L蔗糖、10 mmol/L UDP, 30℃水浴反应20 min,沸水浴中终止反应1 min,冷却。DNS法测定生成的果糖的量。

1.3.2 玉米胚乳RNA提取及实时荧光定量PCR

RNA提取采用Invitrogen TRIZOL Reagent的RNA提取试剂盒进行提取,3次生物学重复。用RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas)进

行反转录。cDNA进行4倍稀释后作为模板,用SYBR Premix Ex Taq™ II(TAKALA)进行扩增,并在7 500 fast Real–Time PCR仪(ABI)进行PCR扩增。用ABI 7500 Fast Real–Time PCR System进行荧光信号数据采集,对实时定量PCR的数据进行分析。*ZmACT1*为内参基因。反应体系20 μL: ddH₂O 5.6 μL、SYBR Premix 10 μL、正向引物(5 μmol/L) 1.2 μL、反向引物(5 μmol/L)1.2 μL、cDNA 2 μL。

表1 实时荧光定量PCR的基因和引物序列
Table 1 Genes and primers used for qRT–PCR

基因编码蛋白 Gene encoding protein	基因名 Genename	基因编号 Gene ID	引物序列 Primer sequence(5' to 3')	
蔗糖合成酶	<i>ZmSH1</i>	GRMZM2G089713	F	tgtttcacgcgaattcgca
			R	agacaggtgaacgagcaggc
淀粉分支酶	<i>ZmSBEIIb</i>	GRMZM2G032628	F	cgaagcctggggtgtat
			R	cactggagcatagacacacat
结合型淀粉合成酶	<i>ZmGBSSI</i>	GRMZM2G024993	F	gtcgaaggcgaggagatc
			R	cgcctattaggtgtgcca
AGP焦磷酸化酶	<i>ZmBT2</i>	GRMZM2G068506	F	cgcggagtgtecatctegatg
			R	caccacctccagaatgattcc
AGP焦磷酸化酶	<i>ZmSH2</i>	GRMZM2G429899	F	tgggagcggacacctatg
			R	tcaccacgattccagacctt
淀粉合成酶	<i>ZmSSI</i>	GRMZM2G129451	F	gtctgctttggctgccttg
			R	aggacaacaacacaggtataatc
淀粉合成酶	<i>ZmSU2</i>	GRMZM2G348551	F	atcgtgggtggctgctgaatg
			R	gttcactctaggtcctgtctctgc
淀粉去分支酶	<i>ZmSU1</i>	GRMZM2G138060	F	cgggtggttgttgggcttc
			R	cgcaatacaaggatgatggag
肌动蛋白	<i>ZmACT1</i>	GRMZM2G126010	F	cgattgagcatggcattgtc
			R	cgaaaaacagcctggatagc

1.3.3 产量构成因子的测定

收获20株玉米,3次生物学重复。

1.4 数据处理与分析

数据采用SPSS19.0及Excel 2010软件进行方差分析与作图,采用Duncan法进行显著性检验($p<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 乙烯处理降低百粒重以及穗粒数

由表2可知,乙烯处理之后玉米的百粒重及单穗粒重显著降低,百粒重下降约15.7%,单穗粒重下降20.7%。乙烯处理对行粒数及穗粒数也有显著影响,处理组中行粒数及穗粒数与对照组相比分别下降约15.7%和15.4%。外源乙烯处理对玉米的秃尖

长、穗长及穗粗的影响均不显著。乙烯处理降低玉米百粒重、穗粒数、单穗粒重和行粒数,没有影响玉米穗长、秃尖长、穗粗。

2.2 乙烯处理降低子粒总淀粉含量与支链淀粉含量

由表3可知,随着授粉后天数的增加,子粒总淀粉含量、直链淀粉及支链淀粉含量不断提高,支链淀粉/直链淀粉比例也不断提高,且在处理组和对照组中差异显著。在DAP35,处理组中总淀粉含量与对照组相比下降约8.5%,支链淀粉含量下降约12.5%,说明总淀粉含量下降主要由于支链淀粉含量下降造成。

2.3 乙烯处理影响淀粉合成相关酶的活性

由图1可知,在DAP10、15、20中,对照组中的AGPase活性显著高于处理组。在DAP15,乙烯处理

之后 AGPase 酶活性与对照组相比酶活性下降约 19%。在授粉后 10~20 d,此段时间是淀粉积累的关键时期,这段时间内乙烯处理之后 AGPase 活性的降低可能是造成处理组总淀粉含量低于对照组总淀粉含量的主要原因。

表2 乙烯处理对B73产量构成因子的影响
Table 2 Yield components of B73 under ethylene treatment

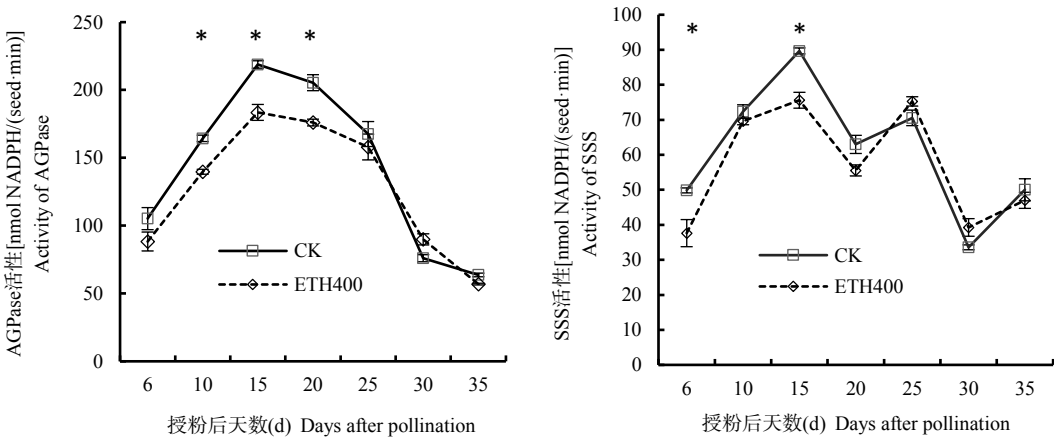
处 理 Treatment	穗 长 (cm) Ear length	秃尖长 (cm) Bare tip length	行粒数(粒) Kernel number per row	穗 粗 (cm) Ear diameter	单穗粒重 (g) Grain weight per ear	穗粒数(粒) Kernel number per ear	百粒重 (g) 100-kernel weight
ETH400	10.65±0.31 a	1.57±0.17 a	17.47±1.25 b	34.77±0.68 a	23.75±0.84 b	235±8.84 b	10.79±0.22 b
CK	11.04±0.27 a	1.33±0.17 a	20.73±1.16 a	35.74±0.55 a	29.96±3.93 a	278±12.26 a	12.81±0.93 a

注:同一列中不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。本数据为2016年测定结果,与2015年测定结果无显著差异。
Note: Different letters in a column indicate significant difference among treatments at $P<0.05$. These data represent the results in 2016 which had no significant difference with the results of 2015.

表3 乙烯对胚乳发育过程中淀粉含量的影响
Table 3 Effect on the starch content during endosperm development under ethylene treatment

处 理 Treatment	总淀粉含量(%) Total starch content	直链淀粉含量(%) Amylose content	支链淀粉含量(%) Amylopectin content	支/直链淀粉 Amylose content / amylopectin
C15	37.52±0.35 a	45.61±0.31 b	54.38±0.41 a	1.19 b
E15	32.25±0.22 b	49.98±0.15 a	50.01±0.25 b	1.00 b
C20	55.26±0.14 a	42.64±0.17 b	57.35±0.32 a	1.34 a
E20	51.25±0.19 b	47.17±0.54 a	52.82±0.14 b	1.12 b
C25	68.35±0.33 a	38.39±0.32 b	61.80±0.14 a	1.60 a
E25	60.24±0.02 b	43.66±0.12 b	56.33±0.12 b	1.29 b
C30	75.51±0.41 a	34.19±0.21 b	65.80±0.14 a	1.92 a
E30	70.25±0.34 b	41.21±0.25 a	58.78±0.21 b	1.43 b
C35	75.54±0.24 a	30.10±0.23 b	69.90±0.36 a	2.32 a
E35	70.59±0.12 b	38.88±0.17 a	61.11±0.25 b	1.57 b

注:同一列中不同字母表示授粉后某时间的处理间差异显著($P<0.05$)。C表示 CK,E表示 ETH400。
Note: Different letters within a column indicate significant difference at $P<0.05$. The data were collected at certain time after pollination.



注:“*”表示处理组与对照组在 $p<0.05$ 水平下差异显著。下图同。
Note: *indicated significant difference at the 0.05 level. The same as below.

图1 乙烯对胚乳发育过程中AGPase和SSS活性变化的影响

Fig.1 The effects of ethylene on the catalytic activities of AGPase and soluble starch synthase(SSS) during endosperm development

在授粉后的第6天和第15天,对照组 SSS 活性显著高于处理组(图1)。SSS 活性在整个玉米胚乳发育时期均较高,与 Ma 等通过 iTRAQ 对子粒发育时期进行蛋白质组研究得到的 SSSII 的蛋白含量变化类似^[13]。本研究中,在子粒发育后期淀粉合成酶含量在处理组和对对照组均有显著下降。AGPase 与 SSS 在子粒发育时期酶活性的变化基本一致,两者共同促进淀粉在胚乳细胞中的积累。

由于 GBSS 与直链淀粉合成相关,因此 GBSS 活性的高低与直链淀粉的含量具有直接的关系。由图2可知,在 DAP20 和 DAP25 处理组中 GBSS 活性

与对照组差异显著,说明乙烯处理降低 GBSS 在灌浆中期的酶活性。处理组在授粉后 15 d GBSS 的活性最高,与对照组在授粉后 20 d 具有最高活性不同,推测这与处理组的淀粉含量低于对照组有直接的关系。本研究中,SBE 在整个灌浆过程中活性均比较高,特别是在灌浆前、中期,在 DAP15、DAP20 时 SBE 活性表现为对照组显著高于处理组。由于 SBE 可引入 α -1,6 糖苷键,因而其活性直接关系到支链淀粉含量,本研究中支链淀粉含量在乙烯处理之后显著下降,这可能与 SBE 酶活性的下降有直接关系。

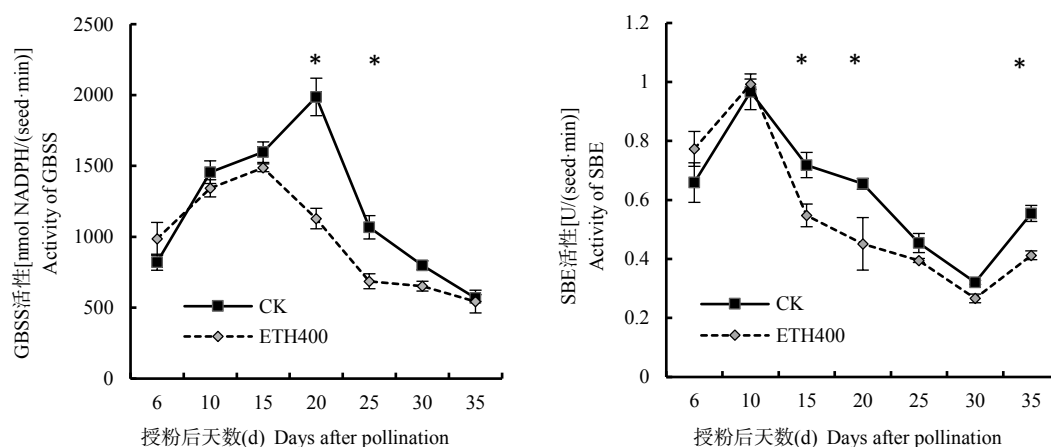


图2 乙烯对胚乳发育过程中GBSS和SBE活性变化的影响

Fig.2 The effects of ethylene on the activities of granule-bound starch synthase(GBSS) and starch branching enzyme(SBE) during endosperm development

乙烯处理并没有影响 DBE 活性,且在子粒灌浆的前中期均有较高活性(图3)。推测乙烯处理后, DBE 活性未受到明显影响可能是多种因素共同调节的结果。SUS 将从光合器官运送过来的蔗糖水解为果糖和尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG),是决定库强度的关键酶。由图3可知,乙烯处理后 SUS 活性与对

照组相比显著下降,特别是在灌浆前中期。由于 SUS 活性的强弱直接关系到库的强度,进而对蔗糖的转运以及淀粉的合成产生显著的影响。认为 SUS 活性的降低是造成淀粉含量降低的原因之一。因此,提高灌浆后期蔗糖合成酶的活性可能是降低乙烯对子粒淀粉含量影响的一个突破口。

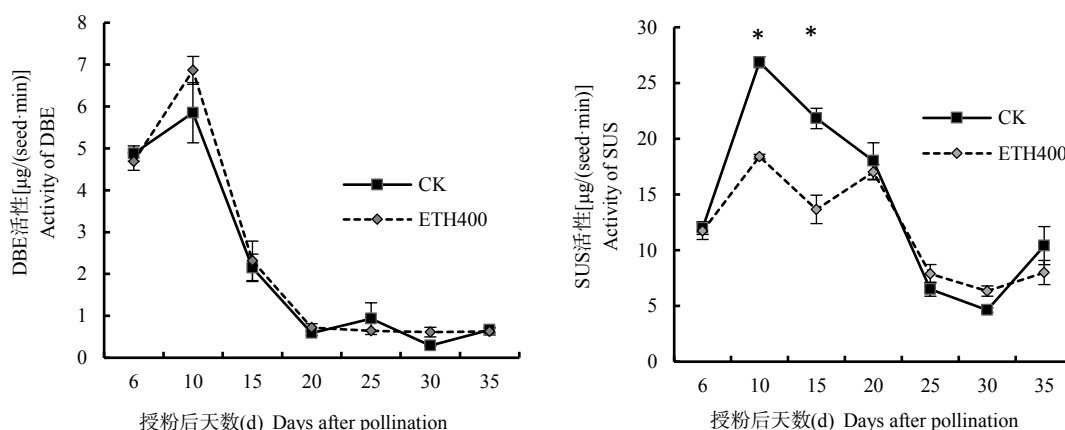


图3 乙烯对胚乳发育过程中DBE和SUS活性变化的影响

Fig.3 Effects of ethylene on the activities of starch debranching enzyme (DBE) and SUS during endosperms development

2.4 乙烯处理影响淀粉合成相关酶的基因表达量

玉米中 AGPase 由两个亚基组成,大亚基由 *ZmSH2* 基因编码,小亚基由 *ZmBT2* 基因编码^[14, 15]。本研究分别对这两个基因表达量进行检测,结果表明,这两个基因的表达量在子粒灌浆的前中期表达量非常高,在灌浆后期表达量下降很快,特别是在授

粉后 35 d。 *ZmBT2* 的基因表达量仅在 DAP20 表现出对照组与处理组的差异显著性,在其他时间表现为差异不显著。 *ZmSH2* 基因表达量在 DAP10、DAP15 均表现出差异显著,对照组中 *ZmSH2* 的相对表达量显著高于处理组(图 4)。

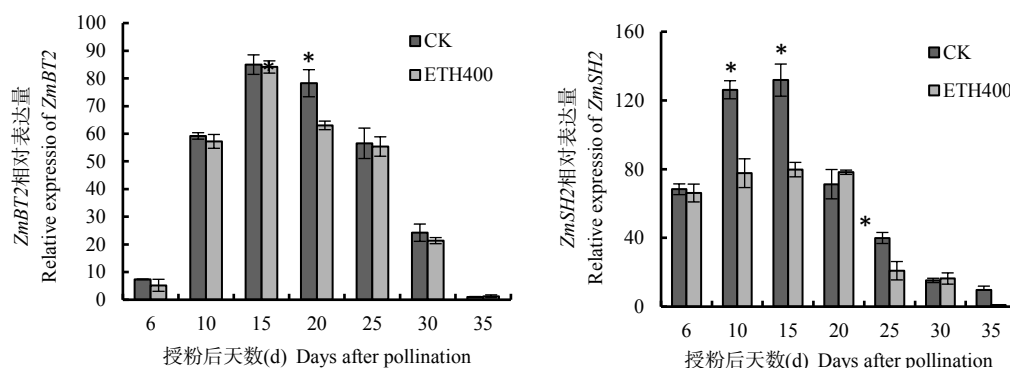


图 4 乙烯处理对胚乳发育过程中 *ZmBT2* 与 *ZmSH2* 表达量的影响

Fig.4 Effect of ethylene on the relative expression levels of *ZmBT2* and *ZmSH2* during endosperm development

SSSI 和 SSSIa 为同源蛋白,均属于 SSS 家族成员^[16]。 *ZmSSI* 基因编码 SSSI 蛋白。在 DAP15, *ZmSSI* 基因的表达量在对照组中较高,且具有差异显著性;在 DAP25,对照组中 *ZmSSI* 基因的表达量显著低于处理组(图 5)。 *ZmSU2* 基因编码 SSSIa 蛋白, *ZmSU2* 基因相对表达量在授粉后前中期均表现出处理组和

对照组差异不显著,仅在 DAP30 表现为对照组的表达量高于处理组。由于 SSS 在乙烯处理后表现出活性降低,而编码 SSSIa 的基因 *ZmSU2* 表达量在灌浆前中期没有表现出显著差异,可能由于其他同源蛋白基因的表达量的变化导致的 SSS 酶活性的下降。

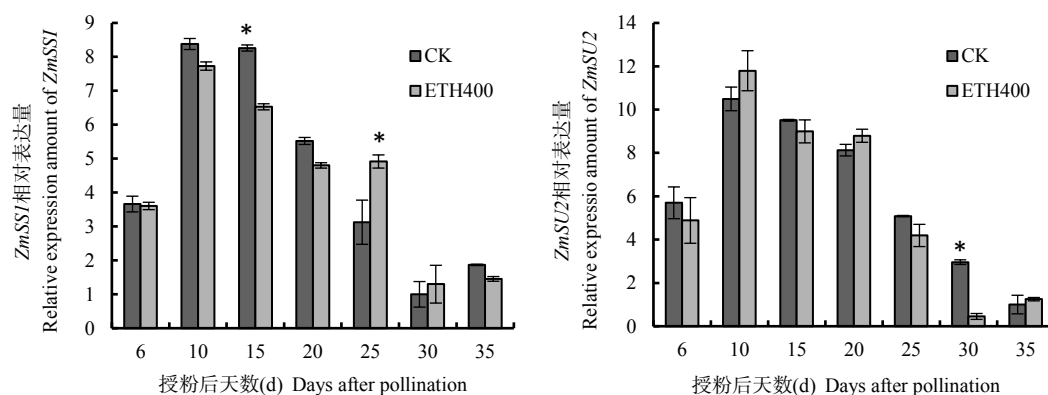


图 5 乙烯处理对胚乳发育过程中 *ZmSSI* 与 *ZmSU2* 表达量

Fig.5 Effect of ethylene on the relative expression levels of *ZmSSI* and *ZmSU2* during endosperm development

ZmGBSSI 编码 GBSS 蛋白, *ZmGBSSI* 表达水平在整个灌浆过程中均较高,仅在 DAP10 表现为乙烯处理组的 *ZmGBSSI* 表达量显著低于对照组,在其他时期均表现为对照组与处理组差异不显著。淀粉分支酶 SBEIIb 是 SBE 蛋白家族成员,由 *ZmSBEIIb* 基因编码,在玉米中主要存在于胚乳细胞中^[17, 18]。由图 6 可知,乙烯处理之后 *ZmSBEIIb* 基因表达量在灌浆中期低于对照组,在灌浆后期无差异。此时淀粉分支

酶活性在处理组与对照组表现出显著差异,说明基因的表达量与酶活性的变化具有一致性。

淀粉去分支酶 DBE 的编码基因在玉米中有两个: *ZmZpu1* 和 *ZmSU1*,其中后者在胚乳细胞中表达量较高^[19]。由图 7 可知, *ZmSU1* 在灌浆中期 DAP20 表现出较高表达量,且在整个灌浆过程中表现出对照组与处理组差异不显著,这种情况与淀粉去分支酶的活性在整个过程中表现基本一致,乙烯并没有

影响淀粉分支酶的活性及其编码基因的表达量。蔗糖合成酶SUS的基因在玉米中由 *ZmSH1*、*ZmSUS1*、*ZmSUS3* 基因编码, 前两者缺失后子粒内部淀粉含量下降 99.5%, 缺失 *ZmSH1* 之后淀粉含量下降约 90%^[20]。本研究对 *ZmSH1* 基因的表达量进行检测 (图 7), 灌浆的整个过程中该基因表达量均较高, 且

仅在 DAP10 表现为处理组的 *ZmSH1* 基因表达量显著低于对照组, 说明该基因在淀粉合成过程中起着非常重要的作用, 该基因表达量变化与 SUS 活性的变化基本一致, 表明乙烯在淀粉合成过程中影响 SUS 活性及基因表达量。

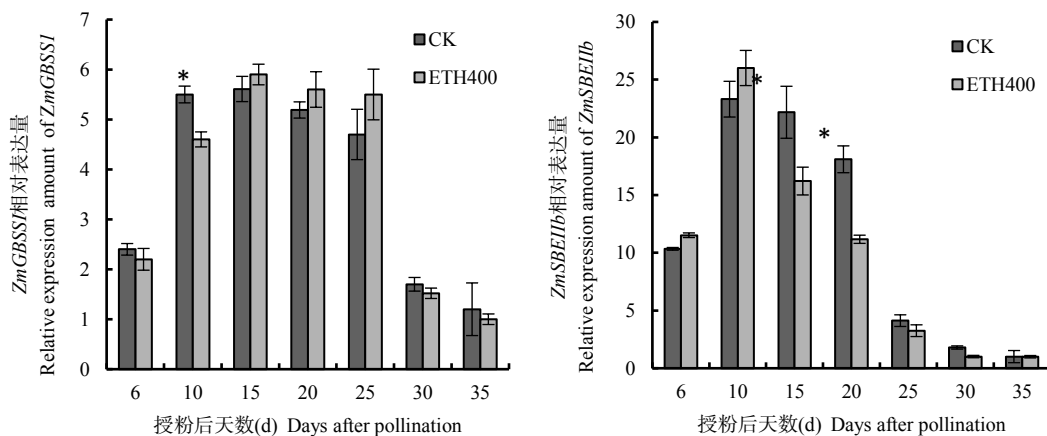


图6 乙烯处理对胚乳发育过程中 *ZmGBSSI* 与 *ZmSBEIIb* 表达量的影响

Fig.6 Effect of ethylene on the relative expression levels of *ZmGBSSI* and *ZmSBEIIb* during endosperm development

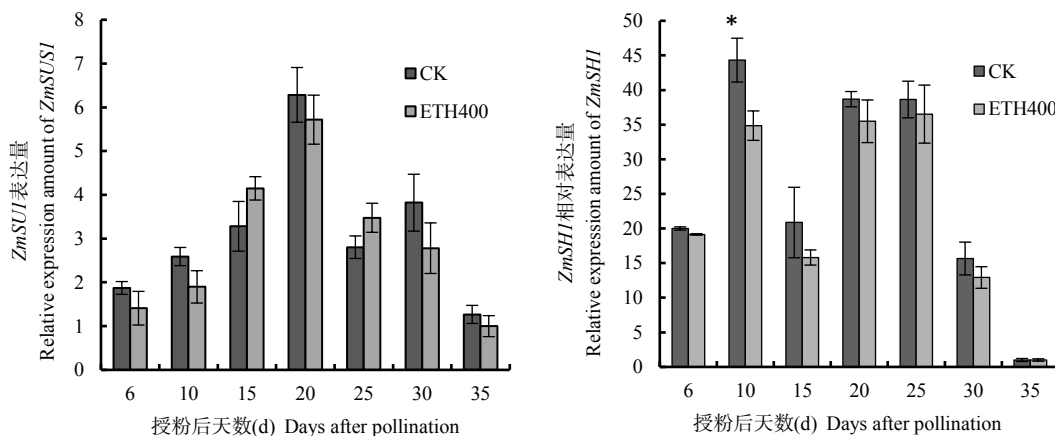


图7 乙烯处理对胚乳发育过程中 *ZmSUS1* 与 *ZmSH1* 表达量的影响

Fig.7 Effect of ethylene on the relative expression levels of *ZmSUS1* and *ZmSH1* during endosperm development

3 结论与讨论

本研究以玉米 B73 为试材, 探讨在玉米 10 展叶期用外源乙烯处理整株材料对子粒中淀粉合成的影响。研究发现, 外源乙烯处理后子粒百粒重、穗粒数下降显著, 淀粉含量下降约 8.5%, 支链淀粉含量下降约 12.5%。通过对淀粉合成相关酶活性测定发现, 外源乙烯处理之后, 在子粒灌浆的过程中主要是灌浆前中期, 酶活性显著下降, 特别是 ADP 葡萄糖焦磷酸化酶在 DAP10 至 DAP20 均表现出酶活性下降显著, 可溶性淀粉合成酶、淀粉分支酶、蔗糖合成酶等有不同程度下降。另外, 相关基因表达量分析

表明, 外源乙烯处理之后 *ZmSH2* 在 DAP10 ~ DAP15 时表现出表达量下降, *ZmSSI* 有一定程度下降, *ZmSBEIIb* 基因在 DAP15 至 DAP20 时下降显著, 而 *ZmSH1* 仅在 DAP10 时下降显著。

关于乙烯对玉米子粒发育的研究, 相关报道涉及乙烯信号通路的改变。本研究主要利用乙烯的释放剂乙烯利, 通过增加乙烯含量研究了乙烯对子粒发育的影响, 特别是对胚乳细胞中淀粉的积累量进行研究。本研究表明, 外源乙烯处理显著降低穗粒数及百粒重。相关研究显示, *ACS6* 的 RNAi 转基因玉米中单穗粒数有明显下降, 推测原因可能是内源乙烯含量的降低缩短了雄穗散粉与雌穗吐丝之间的

时间间隔,这样授粉时间延长,导致转基因植株中穗粒数的增多。本研究中,由于进行自花授粉,表现出行粒数减少,说明可能存在其他机制造成单穗粒数的减少。本研究表明,乙烯处理之后支链淀粉含量显著下降。有研究表明,高温条件下水稻灌浆时间由 32 d 缩短到 26 d,淀粉含量下降显著,特别是直链淀粉的含量下降极为显著^[21]。因此可推测直链淀粉与支链淀粉的合成过程可能涉及不同的代谢调控网络。

AGPase 酶活性在乙烯处理之后表现出较明显降低,编码基因 *ZmSH2* 表达量也表现出一定程度下降。Sakulsingharoj 等表明,通过提高 AGPase 酶活性可提高淀粉的含量及产量^[22]。说明 AGPase 酶活性直接影响淀粉含量。Panda 等发现,AGPase 活性降低伴随着淀粉积累总量及支链淀粉比例的下降,同时 SSS 活性、SBE 活性也有一定程度的降低^[23]。玉米高温条件下 AGPase 酶活性下降约 87%,而 SSS 活性下降 57%^[24]。因此乙烯可能作为一种逆境胁迫信号通过一系列信号转导途径影响淀粉合成相关酶,AGPase、SSS 等酶活性进而导致淀粉含量的下降特别是支链淀粉含量下降。

淀粉合成相关酶类基因的表达量变化进一步表明乙烯对淀粉合成的影响。与淀粉合成相关酶类的转录因子有很多,opaque2(O2)及 prolamine-box binding factor(PBF),均对淀粉合成酶以及淀粉分支酶的基因表达量有显著影响,对于淀粉含量也有明显影响^[25]。DNA binding with one finger 3(*ZmDof3*)是胚乳特异的转录因子,可直接调节蔗糖合成酶基因 *SH1* 和 *SUS1* 基因的表达,进而影响淀粉含量^[26]。以上胚乳特异相关转录因子研究表明,转录因子可调控淀粉合成的过程。本研究推测乙烯可能通过调控转录因子进而影响淀粉合成相关酶的活性。

参考文献:

- [1] YE D L, Zhang Y S, Alkaisi M M, et al. Ethephon improved stalk strength associated with summer maize adaptations to environments differing in nitrogen availability in the North China Plain[J]. J. Agr. Sci., 2016, 154: 960–977.
- [2] Tripathi S C, Sayre K D, Kaul J N, et al. Lodging behavior and yield potential of spring wheat(*Triticum aestivum* L.): effects of ethephon and genotypes[J]. Field Crops Research, 2004, 87: 207–220.
- [3] Ramburan S, Greenfield P L. Use of ethephon and chlormequat chloride to manage plant height and lodging of irrigated barley(cv. Puma) when high rates of N-fertiliser are applied[J]. South African Journal of Plant & Soil, 2007, 24: 181–187.
- [4] Shekoofa A, Emam Y. Plant growth regulator(Ethephon) alters maize (*Zea mays* L.) growth, water use and grain yield under water stress [J]. Journal of Agronomy, 2008, 7: 160–174.
- [5] Habben J E, Bao X, Bate N J, et al. Transgenic alteration of ethylene biosynthesis increases grain yield in maize under field drought-stress conditions[J]. Plant Biotechnol J., 2014, 12: 685–693.
- [6] Shi J, Habben J E, Archibald R L, et al. Overexpression of ARGOS genes modifies plant sensitivity to ethylene, leading to improved drought tolerance in both arabidopsis and maize[J]. Plant physiology 2015, 169: 266–282.
- [7] Perez S, Bertoft E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review[J]. Starch-Starke 2010, 62:389–420.
- [8] Saripalli G. AGPase: its role in crop productivity with emphasis on heat tolerance in cereals[J]. Theor Appl Genet, 2015, 18: 1893–1916.
- [9] Jeon J S. Starch biosynthesis in cereal endosperm[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48: 383–392.
- [10] Zhu G, Ye N, Yang J, et al. Regulation of expression of starch synthesis genes by ethylene and ABA in relation to the development of rice inferior and superior spikelets[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62: 3907–3916.
- [11] Nakamura Y, Yuki K, Park S Y, et al. Carbohydrate-Metabolism in the developing endosperm of rice grains[J]. Plant and Cell Physiology, 1989, 30: 833–839.
- [12] Doehlert D C, Kuo T M, Felker F C. Enzymes of sucrose and hexose metabolism in developing kernels of two inbreds of maize[J]. Plant Physiology, 1988, 86: 1013–1019.
- [13] Ma C, Zhou J, Chen G, et al. iTRAQ-based quantitative proteome and phosphoprotein characterization reveals the central metabolism changes involved in wheat grain development[J]. BMC Genomics, 2014, 15: 1029.
- [14] Hannah L C, Jr OEN. Characterization of ADP-glucose pyrophosphorylase from shrunken-2 and brittle-2 mutants of maize[J]. Biochem Genet 1976, 14: 547.
- [15] Greene T W, Hannah L C. Maize endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase SHRUNKEN2 and BRITTLE2 subunit interactions [J]. The Plant Cell, 1998, 10: 1295–1306.
- [16] Zhang X L, Colleoni C, Ratushna V, et al. Molecular characterization demonstrates that the *Zea mays* gene sugary2 codes for the starch synthase isoform SSIIa[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 54: 865–879.
- [17] Blauth S L, Kim K N, Klucinec J, et al. Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 1(sbe1) in *Zea mays* L[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48: 287–297.
- [18] Gao M, Fisher D K, Kim K N, et al. Evolutionary conservation and expression patterns of maize starch branching enzyme I and IIb genes suggests isoform specialization[J]. Plant Molecular Biology, 1996, 30: 1223–1232.
- [19] James M G, Robertson D S, Myers A M. Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernels [J]. The Plant Cell, 1995, 7: 47–429.
- [20] Carlson S J, Chourey P S, Helentjaris T, et al. Gene expression studies on developing kernels of maize sucrose synthase(SuSy) mutants show evidence for a third SuSy gene[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 49: 15–29.

(下转第 68 页)

- 研究[J]. 玉米科学, 2005, 13(1): 72-76.
- Yang Q, Liu Y H. Research on growing and physiologic index of sweet maize seedling and glutinous maize seedling under drought [J]. Journal of Maize Sciences, 2005, 13(1): 72-76. (in Chinese)
- [8] 蔡庆红, 陶优生, 唐云鹏, 等. 南方玉米高产栽培技术研究进展[J]. 作物研究, 2012, 26(3): 282-287.
- Cai Q H, Tao Y S, Tang Y P, et al. Research progress of high yield cultivation technology in southern corn[J]. Crop Research, 2012, 26(3): 282-287. (in Chinese)
- [9] 曾珊珊. 淹水胁迫对不同基因型玉米生长发育影响及其机理研究[D]. 河南农业大学, 2012.
- [10] 王 强, 石伟勇. 海藻肥对番茄生长的影响及其机理研究[J]. 浙江农业科学, 2003(2): 67-70.
- Wang Q, Shi W Y. Effects of seaweed fertilizer on tomato growth and its mechanism[J]. Zhejiang Agricultural Science, 2003(2): 67-70. (in Chinese)
- [11] 温延臣, 袁 亮, 林治安, 等. 海藻液对玉米苗期生长的影响[J]. 中国农学通报, 2012, 28(30): 36-39.
- Wen Y C, Yuan L, Lin Z A, et al. Effects of seaweed extract in maize seedling stage[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(30): 36-39. (in Chinese)
- [12] 黄清梅, 肖植文, 管俊娇, 等. 海藻肥对玉米产量及农艺性状的影响[J]. 西南农业学报, 2015, 28(3): 1166-1170.
- Huang Q M, Xiao Z W, Guan J J, et al. Effects of seaweed fertilizer on yield and agronomic characteristics of maize[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2015, 28(3): 1166-1170. (in Chinese)
- [13] 王智威, 牟思维, 闫丽丽, 等. 水分胁迫对春播玉米苗期生长及其生理生化特性的影响[J]. 西北植物学报, 2013, 33(2): 343-351.
- Wang Z W, Mu S W, Yan L L, et al. Effects of physiological and biochemical characteristics and growth under water stress in seedling of spring maize[J]. Journal of Northwestern Plants, 2013, 33(2): 343-351. (in Chinese)
- [14] 李晓旭, 李家政. 优化蒽酮比色法测定甜玉米中可溶性糖的含量[J]. 保鲜与加工, 2013, 13(4): 24-27.
- Li X X, Li J Z. Determination of the content of soluble sugar in sweet corn with optimized an throne colorimetric method[J]. Storage and Process, 2013, 13(4): 24-27. (in Chinese)
- [15] 王伟玲, 王 展, 王晶英. 植物过氧化物酶活性测定方法优化[J]. 实验室研究与探索, 2010, 29(4): 21-23.
- Wang W L, Wang Z, Wang J Y. Optimization of determination method of peroxidase activity in plant[J]. Research and Exploration in Laboratory, 2010, 29(4): 21-23. (in Chinese)
- [16] Greenway, Hank. Conditions leading to high CO₂ sub (2) (>5 kPa) in waterlogged-flooded soils and possible effects on root growth and metabolism[J]. Annals of Botany, 2006, 98(1): 9-32.
- [17] 姬静华, 霍治国, 胡 飞, 等. 鲜食玉米形态特征、生理特性及产量对淹水的响应[J]. 玉米科学, 2016, 24(3): 85-91.
- Ji J H, Huo Z G, Hu F, et al. Waterlogging effects on the morphological, physiological characteristics and yield of fresh eating maize[J]. Journal of Maize Sciences, 2016, 24(3): 85-91. (in Chinese)
- [18] Bansal R, Srivastara J P. Antioxidative defense system in pigeon pea roots under waterlogging stress[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2012, 34(2): 515-522.
- [19] 韩玉军, 陶 波. 壳聚糖对玉米幼苗生长及生理生化活性的影响[J]. 玉米科学, 2012, 20(3): 73-76.
- Han Y J, Tao B. Effects of chitosan on the seedlings growth and the physiochemical activity of maize[J]. Journal of Maize Sciences, 2012, 20(3): 73-76. (in Chinese)

(责任编辑:姜媛媛)

(上接第63页)

- [21] Ahmed N, Tetlow I J, Nawaz S, et al. Effect of high temperature on grain filling period, yield, amylose content and activity of starch biosynthesis enzymes in endosperm of basmati rice[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2014, 95: 2237.
- [22] Sakulsingharoj C, Choi S B, Hwang S K, et al. Engineering starch biosynthesis for increasing rice seed weight: the role of the cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase[J]. Plant Sci., 2004, 167: 1323-1333.
- [23] Panda B B, Badoghar A K, Sekhar S, et al. Biochemical and molecular characterisation of salt-induced poor grain filling in a rice cultivar[J]. Funct Plant Biol, 2016, 43: 266-277.
- [24] Singletary G, Banisadr R, Keeling P. Heat stress during grain filling in maize: effects on carbohydrate storage and metabolism[J]. Funct Plant Biol, 1994, 21: 829-841.
- [25] Zhang Z Y, Zheng X X, Yang J, et al. Maize endosperm-specific transcription factors O2 and PBF network the regulation of protein and starch synthesis[J]. P. Natl Acad Sci. USA, 2016, 113: 10842-10847.
- [26] Qi X, Li S, Zhu Y, et al. ZmDof3, a maize endosperm-specific Dof protein gene, regulates starch accumulation and aleurone development in maize endosperm[J]. Plant Molecular Biology, 2017, 93: 7-20.

(责任编辑:姜媛媛)