

山东省不同时期主推小麦品种的籽粒淀粉合成比较

郭骞欢¹, 谢彦庆¹, 程敦公², 周连杰¹, 戴双³, 李豪圣², 赵世杰^{1,*}, 宋健民^{2,*}

¹山东农业大学生命科学学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安271018; ²山东省农业科学院作物研究所, 小麦玉米国家工程实验室, 农业部黄淮北部小麦生物学与遗传育种重点实验室, 济南250100; ³山东省农业科学院农作物资源中心, 济南250100

摘要: 籽粒淀粉含量对小麦产量和加工品质有重要影响, 本实验对1949年以来山东省不同时期8个主要小麦推广品种籽粒灌浆过程中淀粉含量、淀粉合成关键酶活性和酶基因表达的动态变化进行了比较, 以期小麦遗传改良提供理论依据。结果表明, 8个小麦品种籽粒总淀粉含量和直、支链淀粉含量随着育成时间的推移表现明显的上升趋势, 与籽粒产量的变化一致。籽粒灌浆过程中, 淀粉合成关键酶ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(AGPase)、淀粉粒束缚淀粉合酶(GBSS)和淀粉分支酶(SBE)活性及其编码基因相对表达量呈单峰模式, 在花后20 d达到顶峰; 可溶性淀粉合酶(SSS)花后10 d以后呈缓慢下降的趋势。AGPase和SSS活性及其编码基因相对表达量随着品种育成年代的推移呈上升的趋势, 近年选育的‘济南17’和‘济麦22’显著高于其他品种, 而GBSS和SBE酶活性及其编码基因表达量变化趋势不明显。相关分析结果表明, AGPase和SSS酶活性及其编码基因表达水平与成熟期籽粒淀粉含量的相关性高于GBSS和SBE酶, 说明胚乳淀粉合成在提高小麦籽粒产量方面具有重要作用, AGPase和SSS对淀粉含量的影响可能超过GBSS和SBE。

关键词: 冬小麦; 淀粉合成酶; 基因表达; 遗传改良

Comparison in Grain Starch Biosynthesis of the Leading Wheat Cultivars of Different Eras Released in Shandong Province

GUO Qian-Huan¹, XIE Yan-Qing¹, CHENG Dun-Gong², ZHOU Lian-Jie¹, DAI Shuang³, LI Hao-Sheng², ZHAO Shi-Jie^{1,*}, SONG Jian-Min^{2,*}

¹State Key Laboratory of Crop Biology, College of Life Science, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; ²Key Laboratory of Wheat Biology and Genetic Improvement on North Yellow and Huai River Valley, Ministry of Agriculture, National Engineering Laboratory for Wheat and Maize, Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; ³Shandong Center of Crop Germplasm Resources, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China

Abstract: Grain starch plays a very important role in determining wheat yield and quality. Eight leading wheat cultivars widely planted in Shandong province during different decades since 1949 were investigated in this study. The dynamic change of starch content, starch biosynthesis of historical wheat cultivars during grain filling released in Shandong province were compared in order to extend the current view and provide the theoretical basis for wheat breeding. A comprehensive analysis of the starch biosynthesis in developing endosperm and the activities of starch biosynthetic enzymes and the transcript levels of the encoding genes were investigated. The results revealed that the content of amylose, amylopectin and total starch content in mature endosperm increased significantly with the released time of eight wheat cultivars, in accordance with changes in the grain yield. During the grain filling, the activities of starch biosynthetic enzymes and relative expressions of their encoding genes showed unimodal patterns peaking around 20 days after anthesis (DAA), such as ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), granule-bound starch synthase (GBSS), and starch branching enzyme (SBE). Whereas, the activity of soluble starch synthase (SSS) and their transcript levels declined gradually after 10 DAA. The activities and relative expressions of AGPase and SSS genes increased pronounced with the cultivar

收稿 2013-06-09 修订 2013-06-30

资助 国家重点基础研究发展计划(2009CB118505)、国家自然科学基金(31171551和31271635)、现代农业产业体系建设专项(CARS-03-1-8)、转基因生物新品种培育科技重大专项(2011ZX08002-003)和作物生物学国家重点实验室开放课题。

* 通讯作者(E-mail: sjzhao@sdau.edu.cn, Tel: 0538-8249767; E-mail: song_jianmin@163.com, Tel: 0531-83179561)。

evolution, especially for the newest cultivars such as ‘Jinan17’ and ‘Jimai22’ with the highest activities and expression levels. However, the expression levels of GBSS and SBE varied insignificantly with the released time. The activities and gene expression levels of AGPase and SSS were more related to the starch content in mature seeds compared to that of GBSS and SBE, suggesting their more important roles in starch biosynthesis. Therefore, grain yield could be improved in future breeding program by modification in starch physicochemical properties through screening of key enzyme activities and expressions involved in starch biosynthesis during developing endosperm.

Key words: winter wheat; starch synthetic enzymes; gene expression; genetic improvement

小麦是我国最重要的三大粮食作物之一, 据预测未来20年如果要保障粮食安全, 小麦产量需在现有基础上每年递增1.4%, 而目前主产麦区产量潜力年均增长率仅为0.8% (何中虎等2011), 我国56%的小麦产区产量徘徊不前 (Ray等2012)。从目前的需求和市场来看, 我国必须保持小麦持续增产。淀粉占小麦籽粒干重的60%~70%, 与籽粒产量关系密切 (Tetlow 2011; Zeeman等2010)。Hucl和Chibbar (1996)对加拿大春小麦的研究表明, 淀粉含量与籽粒产量呈正相关。因此, 改良淀粉合成能力对提高小麦产量非常重要。淀粉分为直链淀粉和支链淀粉, 其合成受一系列淀粉相关酶和基因表达的调控 (Geigenberger 2011; Stitt和Zeeman 2012; Tetlow 2011; Zeeman等2010), 其中ADP-葡萄糖焦磷酸化酶 (AGPase, EC 2.7.7.27) 催化合成ADP-葡萄糖 (ADPG), 作为淀粉合成的直接底物, 对淀粉生物合成起着重要的枢纽作用; 淀粉合酶 (SS, EC 2.4.1.21) 催化淀粉的形成, 分为两类: 淀粉粒结合淀粉合酶 (GBSS, 又称Wx蛋白) 和可溶性淀粉合酶 (SSS); 淀粉分支酶 (SBE, EC 2.4.1.18) 形成淀粉的分支。小麦胚乳发育过程中, 淀粉合成非常容易受到环境胁迫如高温、干旱等异常气候的影响, 从而影响籽粒产量, 主要原因就是淀粉合成关键酶对逆境相对敏感 (石慧清等2011; Geigenberger 2011; Cossani和Reynolds 2012)。近年来全球气候呈现变暖的趋势, 气温的持续升高势必对小麦育种和生产产生重要影响 (Lobell和Gourdji 2012)。山东是我国小麦生产的高产区和主产区, 小麦面积和产量分别占全国总数14%左右和18%以上; 而且山东省在不同时期推出了很多栽培品种。因此探讨不同时期 (气候条件下) 推广小麦品种淀粉合成特性及其与籽粒产量的关系对理解高产机制和推动山东乃至全国小麦育种都具有重要

的意义。本研究选用建国以来不同时期山东省8个主要推广小麦品种为材料, 比较其籽粒灌浆过程中淀粉组分含量、淀粉合成关键酶活性及其基因表达的动态变化, 旨在探讨影响产量提高的关键淀粉合成酶及基因, 为今后的小麦品种遗传改良提供理论基础。

材料与方 法

1 试验材料和试验设计

选用山东省1949年以来不同时期种植面积最大的小麦 (*Triticum aestivum* L.) 8个主推品种为试验材料 (彭芹等2012; 庄巧生2003) (表1)。试验于2010~2012年在山东省泰安市农业科学院实验基地进行。试验田0~20 cm土层含全氮 $0.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、水解氮 $91.9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、有效磷 $35.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、速效钾 $70.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、有效硫 $43.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。随机区组排列, 3次重复, 小区面积 $4 \text{ m}\times 1.5 \text{ m}$, 6行区, 行距25 cm。田间管理同高产田, 幼苗返青后及时架尼龙网防止倒伏。

2 测定方法

小麦开花期选取生长健壮、发育一致的植株挂牌, 标记同一天开花的穗子中上部小穗。于花后10、20、30 d取样 [测定淀粉含量时再于成熟期 (花后40 d) 取样], 每个品种取样时期严格按照其开花时间的先后顺序, 每个小区取10穗, 剥取穗子中部小穗发育较好的籽粒, 在液氮中速冻30 min后, 迅速转移到 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的超低温冰箱中, 保存备用。成熟时收获全部籽粒。

2.1 籽粒淀粉含量的测定

籽粒淀粉含量的测定采用WZZ-2B(A)自动旋光仪 (上海易测仪器设备有限公司) 测定; 直链淀粉含量的测定采用Amylose/Amylopectin Kit (Megazyme International Ireland Ltd, Co. Wicklow, Ire-

表1 山东省1949年以来不同时期8个小麦主推品种情况
Table 1 Eight historical leading wheat cultivars released in Shandong province since 1949

序号	品种名称	杂交组合(母本/父本)	推广年份	年最大面积/万亩	最大面积年份
1	‘碧蚂1号’	‘蚂蚱麦’/‘碧玉麦’	1949	1 800	1959
2	‘济南2号’	‘碧蚂4号’/‘早洋麦’	1959	2 100	1967
3	‘济南9号’	‘辛石3号’/‘早洋麦’	1965	1 000	1972
4	‘泰山1号’	‘碧蚂4号’/‘早熟1号’/‘欧柔’	1971	2 990	1978
5	‘济南13’	‘欧柔白’/‘辉县红’/‘阿勃’	1982	1 446	1985
6	‘鲁麦14’	‘C149’/‘F4530’	1990	1 478	1994
7	‘济南17’	‘临汾5064’/‘鲁麦13’	1999	1 049	2000
8	‘济麦22’	‘济麦935024’/‘济麦935106’	2006	2 758	2011

1亩=666.7 m²。父本或母本中双斜杠前后品种名为上代杂交组合。

land)的操作方法(Yasui等2009)。

2.2 淀粉合成酶液的提取和酶活性测定

粗酶液的提取参考程方民等(2001)的方法。AGPase活性测定参考Nakamura等(1996)、张振清和夏淑芳(1982)的方法; GBSS和SSS活性测定参考Nakamura等(1996)的方法; SBE活性测定参考赵法茂等(2007)的方法。

2.3 淀粉合成酶基因表达检测

参照全式金基因提取试剂(Trizol plant)操作方法, 提取小麦籽粒胚乳总RNA。采用宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)的反转录试剂盒[RNA LA PCRTM Kit (AMV) Ver.1.1], 按说明书进行反转录, 反转录后的cDNA贮存于-80 °C冰箱备用。

荧光定量PCR引物设计利用Beacon Designer 7软件(表2), 目的基因序列来自NCBI中小麦EST数

据库, 引物设计扩增区段通过NCBI中Blast的同源比对功能选择, 对设计的引物特异性进行评价, 委托上海生物工程有限公司合成引物。

定量PCR反应采用Fermentas试剂盒Fluorescein qPCR Master Mix (SYBR Green), 每个反应重复5次, 反应体系20 μL, 含cDNA模板1.6 μL, Fluorescein qPCR Master Mix 10 μL, 正向引物0.6 μL, 反向引物0.6 μL, ddH₂O 7.2 μL。在CF96荧光定量PCR仪(Bio-Rad Laboratories, Inc.)上完成测定。扩增程序50 °C温育2 min, 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40个循环。并计算基因的相对表达量。

3 数据分析

采用SPSS16.0统计分析系统对试验数据进行统计与分析。

表2 用于分析目标基因表达的引物序列
Table 2 Primer sequences for analysis of target genes expression

目标基因	NCBI登录号	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	目标片段长度/bp
<i>Actin</i>	DN551593	aagcccaatcatagaaaagtg	ccgagaggaagtacagtgtc	131
<i>SSUI</i>	EF405961	gccaataccgatttcagtttc	acacatccctaccaataaac	123
<i>LSUI</i>	DQ839506	cttcctgcatttgattga	ctcgctgccacttcttac	142
<i>SSUII</i>	EU586278	gtcccaatttacacaacc	atagtagtccgacccattag	192
<i>LSUII</i>	EF378944	tgattactggaagataattgg	catagatggtgtaggtttc	139
<i>GBSSI</i>	AY050174	gacactatcgtggaaggcaag	ftgacatctcatggtacgc	152
<i>GBSSII</i>	AF109395	cacagaatgccagagcatag	gaacagatgggaatcactcca	151
<i>SSSI</i>	AJ292521	gagagtagatgacggctgtg	caatcgctaaggctaaagagtc	190
<i>SSSII</i>	AB201445	cgttctttgctctgctcttcc	gactgtgtgtgctctcttcc	169
<i>SSSIII</i>	AF258608	ttatccacattgccgttgag	gtaaatccttgacactgctttg	159
<i>SBEI</i>	AF286317	caacaaccgccaactcattc	ccagaagtgcctcaccatc	189
<i>SBEIIa</i>	Y11282	agaactggctgtgtatgc	acctatccatctgctcctctg	191
<i>SBEIIb</i>	AY740401	cgatatcggaaacatgagga	tccgagtctaagacccttg	150

AGPase包括4种亚基编码基因: 胞质型小亚基(*SSUI*)、质体型小亚基(*SSUII*)、胞质型大亚基(*LSUI*)和质体型大亚基(*LSUII*); 两种GBSS基因分别是*GBSSI*和*GBSSII*; 三种SSS基因分别是*SSSI*、*SSSII*和*SSSIII*; 三种SBE基因分别是*SBEI*、*SBEIIa*和*SBEIIb*。

实验结果

1 籽粒灌浆过程中淀粉含量的变化

随着育成年代的推迟, 山东不同时期小麦主推品种籽粒产量呈明显增长的趋势(图1-A), 1949年推广的‘碧蚂1号’籽粒产量只有 $4.39 \text{ t}\cdot\text{hm}^{-2}$, 而2006年育成的‘济麦22’产量达到了 $7.78 \text{ t}\cdot\text{hm}^{-2}$, 增长了77%。

不同时期主推品种籽粒灌浆期总淀粉、直链淀粉、支链淀粉含量总体上呈不断升高的趋势(图1-B~D)。在成熟期, 最近育成的‘济麦22’籽粒总淀粉含量、直链淀粉和支链淀粉含量分别为69.8%、23.4%和46.5%, 比1949年代主推的‘碧蚂1号’分别提高9、3和6个百分点。

2 籽粒灌浆过程中淀粉合成关键酶活性的变化

籽粒灌浆过程中4种最主要的淀粉合成关键酶活性的变化见图2。由图2-A可以看出, 籽粒灌

浆过程中AGPase活性呈单峰变化, 约在花后20 d达到峰值。从AGPase活性峰值(花后20 d)的情况看, 酶活性的高低基本与品种育成推广的时期一致, 近年代育成的‘济南17’、‘济麦22’酶活性最高, 而早期育成推广的小麦品种酶活性较低, 说明随着品种更新淀粉合成能力在不断提高。

籽粒灌浆过程中, GBSS活性也呈现单峰变化(图2-B), 约在花后20 d达到峰值, 但与AGPase活性的变化相比, 其峰值相对不明显。从总体上看, 不同小麦品种GBSS活性差异相对较小, 品种间变化规律也不明显, 但最近育成的‘济麦22’酶活性在整个籽粒灌浆期相对较高。

籽粒灌浆过程中, SSS活性花后呈不断下降的趋势(图2-C), 不同年代育成推广的小麦品种SSS活性随着年代的更替呈上升的趋势, ‘济麦22’、‘济南17’等最近育成的品种酶活性较高, 而‘碧蚂1

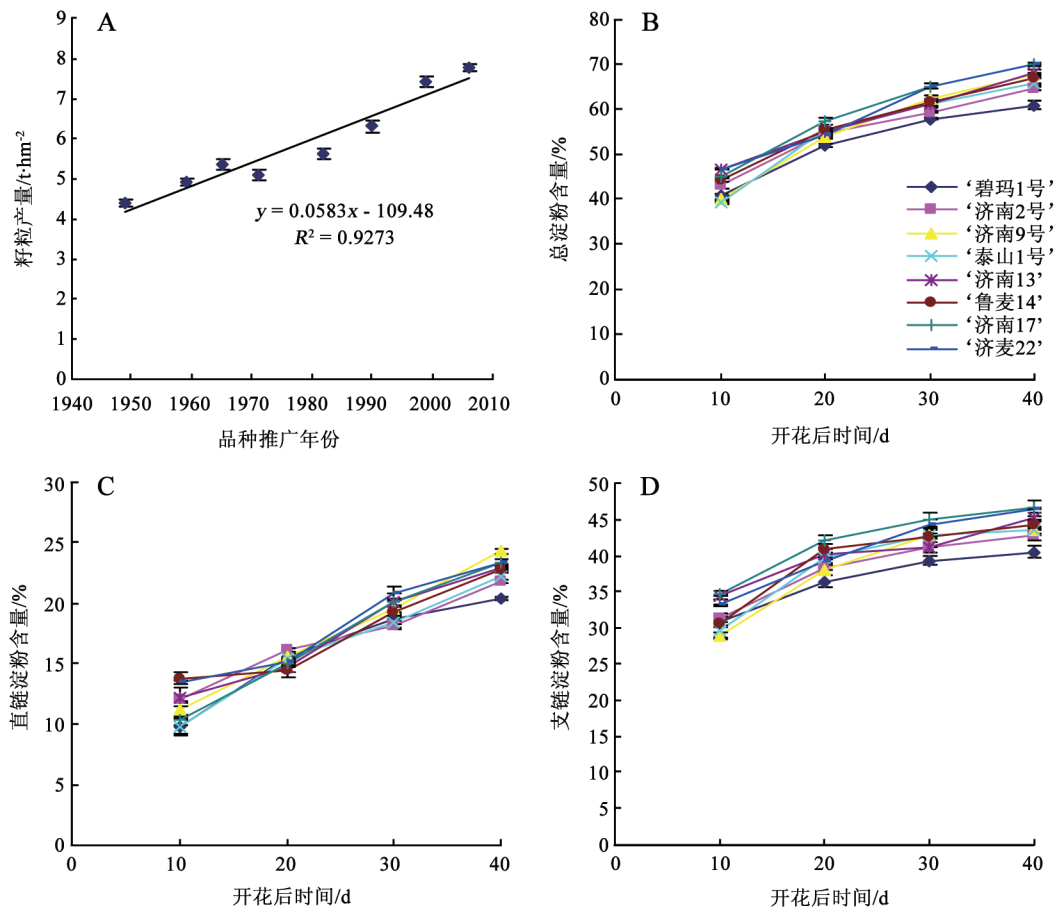


图1 山东省不同时期主推小麦品种籽粒产量及灌浆过程中淀粉含量的变化

Fig.1 Changes in grain yield and starch content in filling grains of leading wheat cultivars in Shandong province at different ears

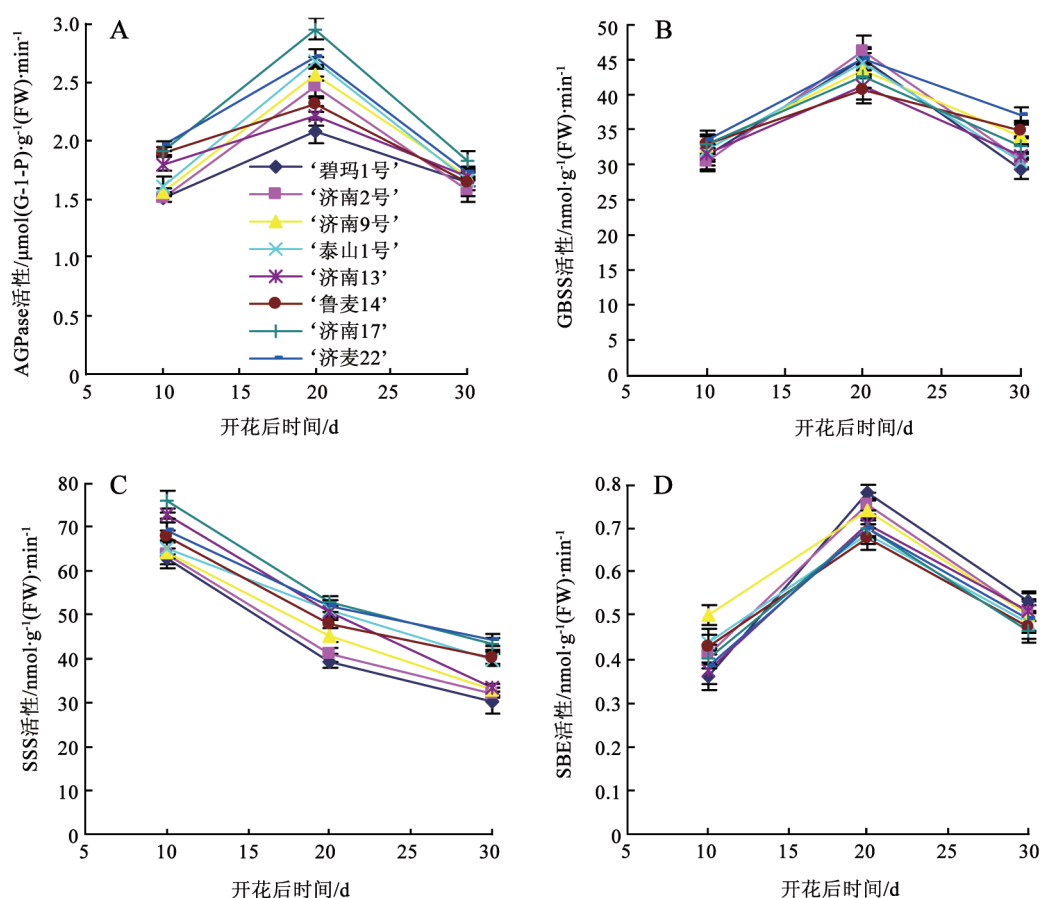


图2 山东省不同时期主推小麦品种籽粒灌浆过程中淀粉合成关键酶活性的变化

Fig.2 Changes of starch biosynthetic enzymes activity in filling grain from leading wheat cultivars released in Shandong province at different ears

号’、‘济南2号’等较早育成的品种酶活性较低。

籽粒灌浆过程中, SBE活性的变化趋势与AG-Pase和GBSS相似, 均呈单峰变化模式, 约在花后20 d时达到峰值(图2-D), 但与AGPase和GBSS相比, SBE活性到达峰值前上升的速度明显较快, 而峰值以后下降的速度相对较慢。与GBSS相似, 不同年代育成小麦品种的SBE活性差异相对较小, 品种更替过程中变化规律不明显。

3 籽粒灌浆过程中淀粉合成关键酶基因表达的变化

采用qRT-PCR方法对籽粒灌浆过程中淀粉合成关键酶的12个基因进行了表达分析(图3), 籽粒灌浆过程中4种AGPase基因(图3-A~D)相对表达量均呈单峰变化模式, 约在花后20 d表达量达到峰值, 但不同品种又存在明显的差异, 如‘济南2号’整体表达水平较低, 峰值相对不明显; ‘济麦22’的

*LSUI*花后20 d达到峰值, 但峰值并不明显, 到达峰值后的下降速度也比其他品种慢; ‘济南17’的*LSUI*花后10 d即达到相当高的表达水平, 到达峰值以后的下降速度也相对较快; 而‘济南13’的*LSUI*基因表达水平到达峰值前和到达峰值后的下降速度基本一致。不同品种基因表达水平差异非常明显, 如花后20 d *LSUI*基因表达水平达到极显著差异 ($P < 0.01$)。从4个基因的整体情况看, 近年来推广的品种‘济麦22’和‘济南17’基因表达水平较高, 尤其是‘济南17’明显高于其他品种, 而较早年代推广的小麦品种, 如‘济南2号’、‘碧玛1号’等品种表达水平相对较低。

两种*GBSS*基因的表达, 均呈单峰变化(图3-E~F), 在花后20 d达到高峰, 但8个品种*GBSS*基因的表达明显不同, 有的品种峰值非常明显, 有的品种峰值不明显, 个别品种甚至呈下降的趋势。8个

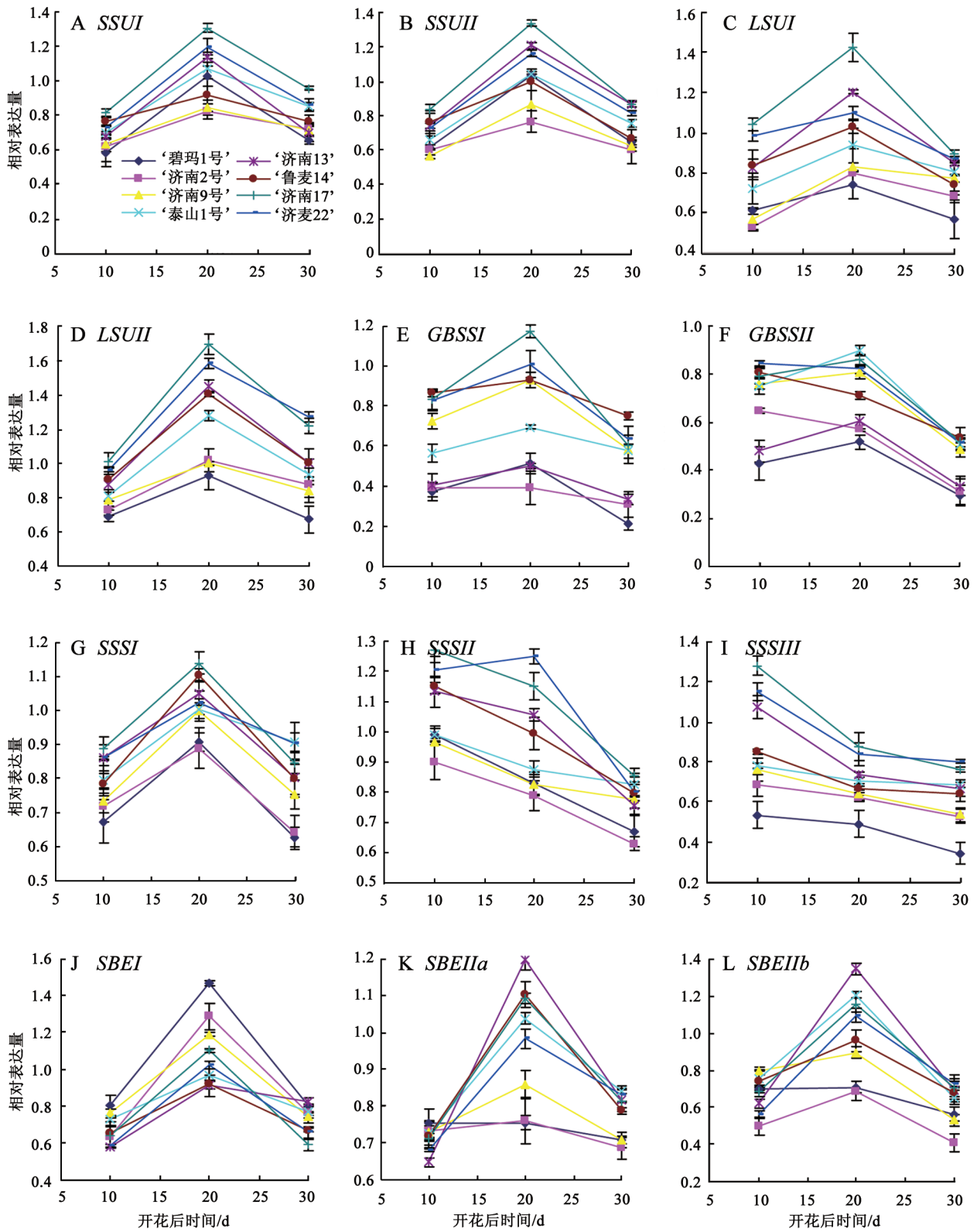


图3 山东省不同时期小麦品种籽粒灌浆过程中淀粉合成酶基因表达量的变化

Fig.3 Changes of the relative expression of genes encoding starch biosynthetic enzymes in filling grains from leading wheat cultivars released in Shandong province at different ears

品种*GBSSI*基因表达差异显著,花后20 d相对表达量达到1%的差异显著性,其中在花后20 d‘碧蚂1号’和‘济南2号’表达量最低,‘济麦22’和‘济南17’表达量较高,在其他灌浆期小麦品种没有明显的年代更替趋势规律。8个品种*GBSSII*基因整体表达水平差异较小,但花后20 d相对表达量也达到5%的差异显著性,其中‘碧蚂1号’和‘济南2号’表达量最低。

从整体情况看3种*SSS*基因相对表达量比较接近(图3-G~I),并表现出比较明显的时代变化趋势,即随着推广时间的推移,相对表达量呈上升的趋势,但籽粒灌浆过程中的变化趋势明显不同。*SSSI*基因呈单峰变化,约在花后20 d达到峰值;而*SSSII*和*SSSIII*基因在籽粒灌浆过程中呈下降的趋势,只有‘济麦22’*SSSII*基因在花后20 d出现一个较小的峰。8个品种比较,*SSSI*和*SSSII*基因表达量差异相对较小,而*SSSIII*差异相对较大,尤其在花后10 d的籽粒灌浆初期。

三种*SBE*基因(*SBEI*、*SBEIIa*、*SBEIIb*)在籽粒

灌浆过程中均呈单峰变化趋势(图3-J~L),并在花后20 d达到峰值,与酶活性的变化趋势一致。8个品种3种*SBE*基因相对表达量差异明显,尤其是花后20 d达到峰值时,但与品种推广年代之间没有明显的变化规律。

4 淀粉合成相关酶活性及基因表达水平与淀粉含量的相关性分析

对淀粉合成关键酶活性及其编码基因相对表达量与成熟期籽粒淀粉含量进行了相关分析(表3、4)。由表3可知,籽粒灌浆过程中*AGPase*平均活性与总淀粉和支链淀粉含量呈极显著正相关,表明*AGPase*在小麦籽粒淀粉积累过程中具有重要作用。籽粒灌浆过程中*SSS*平均活性与支链淀粉和总淀粉含量呈极显著性正相关,说明其在支链淀粉合成中具有重要作用,进而影响总淀粉的合成。*SBE*活性与支链淀粉含量显著负相关,说明*SBE*也是通过影响支链淀粉的合成进而影响总淀粉含量。*GBSS*平均活性与淀粉含量相关不显著,但花后10 d和30 d *GBSS*活性与直链淀粉和总淀粉

表3 淀粉合成关键酶活性与籽粒淀粉含量的相关性分析

Table 3 Relationship between activities of starch biosynthetic enzymes in filling grains and starch content in mature seeds

淀粉合成关键酶	总淀粉含量	直链淀粉含量	支链淀粉含量
<i>AGPase</i>	0.85**	0.65	0.89**
<i>GBSS</i>	0.50	0.50	0.44
<i>SSS</i>	0.85**	0.58	0.92**
<i>SBE</i>	-0.49	-0.10	-0.67*

*和**分别表示显著($P<0.05$)和极显著相关($P<0.01$),酶活性数据源自籽粒灌浆期3次测定结果的平均值。下表同。

表4 淀粉合成关键酶基因相对表达量与籽粒淀粉含量的相关性分析

Table 4 Relationship between relative expression of genes encoding starch biosynthetic enzymes in filling grains and starch content in mature seeds

淀粉合成关键酶基因	总淀粉含量	直链淀粉含量	支链淀粉含量
<i>SSUI</i>	0.66	0.35	0.79*
<i>SSUII</i>	0.61	0.28	0.74*
<i>LSUI</i>	0.84**	0.55	0.93**
<i>LSUII</i>	0.86**	0.56	0.95**
<i>GBSSI</i>	0.72*	0.70*	0.66
<i>GBSSII</i>	0.69*	0.69*	0.62
<i>SSSI</i>	0.86**	0.66	0.89**
<i>SSSII</i>	0.80*	0.53	0.88**
<i>SSSIII</i>	0.92**	0.66	0.99**
<i>SBEI</i>	-0.84**	-0.63	-0.88**
<i>SBEIIa</i>	0.64	0.43	0.70*
<i>SBEIIb</i>	0.60	0.49	0.61

含量显著相关(数据未给出)。

由表4可以看出, AGPase大亚基*LSUI*和*LSUII*在整个灌浆期的相对表达量与支链淀粉和总淀粉含量呈极显著相关, 而*SSUI*和*SSUII*相对表达量仅与支链淀粉含量显著相关。*GBSSI*和*GBSSII*的平均表达水平与直链淀粉和总淀粉含量显著相关。籽粒灌浆过程中3种SSS基因相对表达量与支链淀粉和总淀粉含量显著或极显著相关。3种SBE基因中, *SBEI*相对表达量与支链淀粉和总淀粉含量均极显著负相关, *SBEIIa*与支链淀粉含量显著正相关, 而*SBEIIb*与淀粉含量相关不显著。

讨 论

前人研究表明, 小麦品种的遗传改良对籽粒产量提高起着重要的作用(田中伟等2012; 庄巧生2003), 但近年来品种的遗传改良进度明显减缓(彭芹等2012; Fischer和Edmeade 2010; Graybosch和Peterson 2010)。光合性能的改善是品种更替过程中籽粒产量提高的重要基础(彭芹等2012; 田中伟等2012), 但Borras等(2004)和Zhang等(2010)证明灌浆期籽粒库容对产量的限制性很大。小麦籽粒中淀粉含量达70% (Tetlow 2011; Zeeman等2010), 因此本研究从淀粉合成关键酶及基因表达方面探讨了籽粒淀粉合成能力对小麦产量的影响。结果发现, 山东省不同时期8个小麦主推品种成熟期籽粒总淀粉和直、支链淀粉含量随着推广时间的推移表现明显的上升趋势; AGPase和SSS活性及其编码基因表达水平随着年代更替而升高, 与籽粒产量的变化一致, 尤其是1999年之后推广的‘济麦22’和‘济南17’的籽粒产量以及AGPase和SSS酶活性及其基因表达水平要明显高于1999年之前推广的小麦品种, 相关分析也表明二者与淀粉含量的关系更密切。这说明, 淀粉合成在决定籽粒产量形成方面具有重要作用, 而AGPase和SSS对淀粉合成数量的影响明显超过GBSS和SBE, 这也是与其在淀粉合成中的不同功能相一致的。

小麦籽粒淀粉合成过程中, AGPase、SSS、GBSS和SBE是控制小麦籽粒淀粉合成代谢的几种关键酶(Jeon等2010), 并且目前国内外在小麦、玉米、水稻、马铃薯等植物中已发现了AGPase、SSS、GBSS和SBE的多种同工酶或同工型(钟连进

等2012; Kawagoe等2005)。AGPase是谷类作物淀粉积累的限制因子, 甘薯过表达AGPase基因后, 淀粉含量增加了35%; 玉米、水稻和小麦过表达AGPase基因后, 粒重和单株产量也明显提高(Smidansky等2002); 反义抑制AGPase活性后, 淀粉含量显著下降(Müller-Röber等1992)。AGPase由两种功能不同的亚基组成, LSU负责调节功能, 而SSU主要负责催化功能, 这两种亚基与AGPase活性密切相关, 两者共同调节AGPase活性大小。本研究发现, AGPase活性及其基因的表达量与籽粒产量的变化趋势一致。因此, 促进淀粉合成和提高籽粒产量需要调节AGPase基因的表达, 提高其酶活性。遗传研究表明, GBSS、SSS和SBE在决定淀粉复合体结构方面具有重要作用(Geigenberger 2011; Stitt和Zeeman 2012; Tetlow 2011; Zeeman等2010)。GBSS负责直链淀粉的合成, 其编码基因突变或缺失, 直链淀粉含量下降或形成糯性胚乳(Stitt和Zeeman 2012; Tetlow 2011; Zeeman等2010)。SSSI、SSSII和SSSIII分别延长短链、中链和长链; 与SBEII相比, SBEI更倾向于转移长链(Stitt和Zeeman 2012; Tetlow 2011; Zeeman等2010)。SSS和SBE在不同器官中的表达水平不同, 因而形成不同的淀粉结构, 如马铃薯块根中SSSIII活性占SSS总活性的80%, 大豆胚中SSSII占60%, 玉米胚乳中SSSI占60% (Tetlow 2011; Zeeman等2010)。水稻缺失*SSSIIa*、*SBEI*和*SBEIIb*后胚乳淀粉粒表型改变(Sato等2003)。粳稻和籼稻淀粉理化特性的差异也是由其不同的淀粉合成的基因表达水平不同造成的(Jeon等2010)。明确不同酶基因的表达水平及其功能, 就可以采取不同的策略对小麦淀粉含量进行遗传改良, 从而优化淀粉结构, 改善淀粉理化特性, 提高其营养和加工品质。

从本研究结果看, 山东省不同时期育成小麦品种籽粒灌浆过程中12种淀粉合成关键酶编码基因的相对表达量表现出十分明显的差异, 而4种淀粉合成关键酶活性差异明显变小, 尽管AGPase和SSS活性差异显著, 但淀粉含量的差异较小。说明籽粒淀粉的合成是一个非常复杂的过程, 从基因的表达达到蛋白的翻译再到最终产物的合成都可能受到复杂精细的调控。如AGPase除受蔗糖、无机

磷、硝酸盐等信号转录水平的调节外, 还受变构调节、氧化还原等转录后修饰、蛋白磷酸化、形成多酶复合体等多层次的调节(Geigenberger 2011), 因此转录水平的变化通常不能完全从相应酶蛋白水平和活性的变化反映出来(Gibon等2004)。Ohdan等(2005)也发现*SBEII*转录水平与酶活性并不完全一致。因此, 在小麦育种中除注重调节淀粉合成关键酶及基因的表达活性外, 还应对整个过程开展系统调控, 进而提高淀粉合成能力, 最终提高籽粒产量。

以上结果表明, 山东省不同时期8个小麦品种籽粒总淀粉和直、支链淀粉含量随着育成推广时间的推移表现明显的上升趋势。小麦品种更替过程中, AGPase和SSS活性及其编码基因相对表达量随着年代的更替而升高, GBSS和SBE活性及其编码基因相对表达量随着年代更替变化规律不明显。相关分析结果表明AGPase和SSS活性与成熟期籽粒淀粉含量的相关性更密切, 说明AGPase和SSS在淀粉合成过程的作用可能更重要。因此今后我们可以通过调节酶活性及基因表达进行遗传改良, 进而选育高产优质的小麦新品种。

参考文献

- 程方民, 蒋德安, 吴平, 石春海(2001). 早籼稻籽粒灌浆过程中淀粉合成酶的变化及温度效应特征. 作物学报, 27: 201~206
- 何中虎, 夏先春, 陈新民, 庄巧生(2011). 中国小麦育种进展与展望. 作物学报, 37: 202~215
- 彭芹, 郭骞欢, 张西斌, 程敦公, 戴双, 李豪圣, 赵世杰, 宋健民(2012). 山东小麦品种更替过程中光合特性的演变. 中国农业科学, 45: 3883~3891
- 石慧清, 龚月桦, 张东武(2011). 花后高温对持绿型小麦叶片衰老及籽粒淀粉合成相关酶的影响. 植物生态学报, 35: 769~778
- 田中伟, 王方瑞, 戴廷波, 蔡剑, 姜东, 曹卫星(2012). 小麦品种改良过程中物质积累转运特性与产量的关系. 中国农业科学, 45: 801~808
- 张振清, 夏淑芳(1982). 无机磷对叶片蔗糖和淀粉积累的影响. 植物生理学报, 8: 385~391
- 赵法茂, 齐霞, 肖军, 王宪泽(2007). 测定淀粉分支酶活性方法的改进. 植物生理学通讯, 43: 1167~1169
- 钟连进, 董虎, 蔡小波, 封言柠, 任凭, 程方民(2012). 控制水稻胚乳淀粉合成代谢若干关键酶基因对花后高温的响应表达. 应用生态学报, 23 (3): 745~750
- 庄巧生(2003). 中国小麦品种改良及系谱分析. 北京: 中国农业出版社
- Borras L, Slafer GA, Otegui ME (2004). Seed dry weight response to source-sink manipulations in wheat, maize and soybean: a quantitative reappraisal. Field Crop Res, 86: 131~146
- Cossani CM, Reynolds MP (2012). Physiological traits for improving heat tolerance in wheat. Plant Physiol, 160: 1710~1718
- Fischer RA, Edmeade GO (2010). Breeding and cereal yield progress. Crop Sci, 50: 85~98
- Geigenberger P (2011). Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. Plant Physiol, 155: 1566~1577
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Höhne M, Hendriks JHM, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M (2004). A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. Plant Cell, 16: 3304~3325
- Graybosch RA, Peterson CJ (2010). Genetic improvement in winter wheat yields in the great plains of North American, 1959~2008. Crop Sci, 50: 1882~1890
- Hucl P, Chibbar RN (1996). Variation for starch concentration in spring wheat and its repeatability relative to protein concentration. Cereal Chem, 73: 756~758
- Jeon JS, Ryoo N, Hahn TR, Walia H, Nakamura Y (2010). Starch biosynthesis in cereal endosperm. Plant Physiol Biochem, 48: 383~392
- Kawagoe Y, Kubo A, Satoh H, Takaiwa F, Nakamura Y (2005). Roles of isoamylase and ADP-glucose pyrophosphorylase in starch granule synthesis in rice endosperm. Plant J, 42: 164~174
- Lobell DB, Gourdji SM (2012). The influence of climate change on global crop productivity. Plant Physiol, 160: 1686~1697
- Müller-Röber B, Sonnewald U, Willmitzer L (1992). Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. EMBO J, 11: 1229~1238
- Nakamura Y, Umemoto T, Ogata N, Kuboki Y, Yamo M, Sasaki T (1996). Starch debranching enzyme (R-enzyme or pullulanase) from developing rice endosperm: purification, cDNA and chromosomal localization of the gene. Planta, 199: 209~218
- Ohdan T, Francisco PB, Sawada T, Hirose T, Terao T, Satoh H, Nakamura Y (2005). Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. J Exp Bot, 56: 3229~3244
- Ray DK, Ramankutty N, Mueller ND, West PC, Foley JA (2012). Recent patterns of crop yield growth and stagnation. Nat Commun, 3: 1293
- Satoh H, Nishi A, Fujita N, Kubo A, Nakamura Y, Kawasaki T, Okita TW (2003). Isolation and characterization of starch mutants in rice. J Appl Glycosci, 50: 225~230
- Smidansky ED, Clancy M, Meyer FD, Lanning SP, Blake NK, Talbert LE, Giroux MJ (2002). Enhanced ADP-glucose pyrophosphorylase activity in wheat endosperm increases seed

- yield. Proc Natl Acad Sci USA, 99: 1724~1729
- Stitt M, Zeeman SC (2012). Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. Curr Opin Plant Biol, 15: 282~292
- Tetlow IJ (2011). Starch biosynthesis in developing seeds. Seed Sci Res, 21: 5~32
- Yasui T, Ashida K, Sasaki T (2009). Chain-length distribution profiles of amylopectin isolated from endosperm starch of waxy and low-amylose bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with common genetic background. Starch-Stärke, 61 (12): 677~686
- Zeeman SC, Kossmann J, Smith AM (2010). Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. Annu Rev Plant Biol, 61: 209~234
- Zhang H, Turner NC, Poole ML (2010). Source-sink balance and manipulating sink-source relations of wheat indicate that the yield potential of wheat is sink-limited in high-rainfall zones. Crop Pasture Sci, 61: 852~861