

夏卜贤,安云蓉,高建明,等.甜高粱的糖分积累与蔗糖合成酶基因表达规律的相关性[J].江苏农业科学,2016,44(2):133-135,140.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.037

甜高粱的糖分积累 与蔗糖合成酶基因表达规律的相关性

夏卜贤³,安云蓉²,高建明¹,罗峰¹,陈晓木¹,李欧静¹,王飞扬¹,石东峰¹,关小楠¹,吴宏玉¹,裴忠有¹

(1. 天津农学院农学与资源环境学院,天津 300380;2. 天津广播电视大学,天津 300000;

3. 安徽省马鞍山市横望山农业科技有限公司,安徽马鞍山 243131)

摘要:以甜高粱品种罗马和 W452 与普通高粱品种忻梁 52 不同生育时期的叶片和茎秆为材料,对总糖、蔗糖含量以及蔗糖合成酶(sucrose synthase,SS)基因表达规律进行研究。结果表明:在叶片和茎秆的整个生育期,蔗糖为总糖的主要组成成分,其含量与总糖含量的变化趋势一致;在叶片中,总糖和蔗糖含量从拔节期开始逐渐升高,在灌浆期达到最高,随后又下降,同时通过对 SS 基因表达规律研究发现,SS 基因表达量先于蔗糖含量在开花期达到最高;在茎秆中,蔗糖含量占总糖含量的 60%,甜高粱的糖分含量明显高于普通高粱,完熟期时糖分含量达到最高,而 SS 基因表达规律与在叶片中表达相似,开花期达到最高,随后有所下降。因此,通过研究糖分含量变化趋势与 SS 基因表达规律为甜高粱分子育种创造了条件。

关键词:甜高粱;qRT-PCR;糖分积累;蔗糖合成酶;基因表达;生育期

中图分类号:S514.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)02-0133-03

随着化石能源的日趋枯竭和环境的日益恶化,发展生物能源成为未来解决能源危机的主要途径。甜高粱作为普通高粱的一个变种,因其茎秆糖分、汁液含量高,是目前被公认最有发展前景的能源作物之一,而其总糖、蔗糖含量以及蔗糖合成酶(sucrose synthase,SS)基因调节蔗糖合成代谢已成为研究热点。谢凤周对甜高粱品种丽欧的总糖含量变化趋势进行了研究,发现在整个生育时期呈逐渐增加的趋势,在完熟期达到最高^[1];杨相坤等对蔗糖含量在整个生育时期的变化进行了研究,发现从孕穗期到蜡熟期呈逐渐升高、在蜡熟期达到最高值后又略有下降趋势^[2-3]。通过对甜高粱茎秆汁液化学成分的分析发现,蔗糖是其主要成分,占 55% 左右^[4]。而蔗糖受作为调节植物蔗糖代谢的关键酶之一 SS 的调节,该酶在小麦胚芽中被首次发现^[5-7],它参与淀粉、纤维素和 ATP 等的合成,调动蔗糖进入各种代谢途径,且可逆合成和分解蔗糖,进而调节植物的生长过程等^[8];该酶在番茄中控制蔗糖的合成及运转,保持相对较强的活性^[9];该酶在甘蔗中有利于运输过程中将库器官的蔗糖卸出^[10],在多数植物中存在 2 种同工酶 SS1 和 SS2,其中 SS1 主要分解蔗糖,SS2 主要合成蔗糖^[11],并且利用酶联免疫法(ELISA)验证了蔗糖合成酶表达量与蔗糖含量具有显著的相关性^[12]。本研究测定了普通高粱及甜高粱的叶片和茎秆中糖分含量,分析了 SS 基因的表达量,这对进一步了解叶片、茎秆中的糖分积累与 SS 基因表达

之间的关系具有非常重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料种植及取样

本试验所用甜高粱品种为罗马和 W452,普通高粱品种为忻梁 52,均由天津农学院高粱育种课题组提供。试验分别于 2011 年和 2012 年在天津农学院作物标本园进行,试验地前茬为玉米,土壤肥力偏低。5 月 1 日播种,设 3 次重复,每个小区面积 30 m²,行长 4 m,行距 0.5 m,株距 0.2 m;播种时每个小区施底肥硫酸钾和复合肥各 0.075 kg;中耕除草 3 次。分别在拔节期、孕穗期、抽穗期、开花期、灌浆期和完熟期等 6 个生育时期随机重复 3 次取样,取材部位为植株中部茎秆和完全展开的叶片,一部分用于测定样品的各种糖分含量,另一部分用液氮速冻后置于 -80 ℃ 冰箱内保存,用于研究叶片及茎秆中蔗糖合成酶基因的表达规律。

1.2 试剂

测量总糖含量所用试剂包括酒石酸钾钠(C₄H₄O₆KNa·4H₂O)、硫酸铜(CuSO₄·5H₂O)、无水葡萄糖(C₆H₁₂O₆)、氢氧化钠(NaOH)、亚铁氰化钾[K₄F₄(CN)₆·3H₂O]、次甲基蓝(C₁₆H₁₈ClN₃S·3H₂O)、盐酸(HCl),均购自天津北方天医化学试剂厂。测量蔗糖含量所用试剂包括色谱纯乙腈、果糖标准品、葡萄糖标准品、蔗糖标准品,均购于中国药品生物制品检定所。RNA 提取试剂盒购自北京百泰克(Biotake)公司。反转录试剂盒购于北京康为世纪公司,定量反应中的内参基因 β -actin 及 SS 基因引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 蔗糖和总糖含量的测定

高粱茎秆和叶片通过榨汁处理后分成 2 份,分别用于总糖和蔗糖含量的测定,简单步骤为:向 10 mL 样品中加入

收稿日期:2015-01-05

基金项目:天津市中青年骨干创新人才培养计划;天津市科技支撑计划(编号:12ZCZDNC00100);天津市高校优秀青年教师资助。

作者简介:夏卜贤(1989—),男,安徽马鞍山人,硕士研究生,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:beifanglang12689@126.com。

通信作者:裴忠有(1967—),男,辽宁大连人,博士,研究员,主要从事甜高粱育种研究。E-mail:zhongyoupei@tjau.edu.cn。

1 mL 浓硫酸,混匀,68 ℃ 水解 10 min,随后使用 SGD-IV 型全自动还原糖测定仪测定汁液中的总糖含量,采用高效液相色谱仪(安捷伦 CP-3800)测定样品中的蔗糖含量,每个样品重复测定 3 次。

1.4 总 RNA 的提取与分析

根据百泰克公司 RNA 提取试剂盒的说明提取高粱叶片和茎秆的总 RNA。将提取的 RNA 溶于溶解液(TE Buffer)后,使用微量核酸测定仪检测其纯度和浓度,并取 1 μL 的 RNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳,以确定所提取 RNA 的完整性。

1.5 利用 qRT-PCR 分析蔗糖合成酶基因的表达

本试验应用 Primer 5、Oligo 6 等软件在甜高粱 SS 基因 *Susy2*(FJ1513325)跨内含子区设计正向引物 5'-GTCCCT-CAAGACACTCCCT-3'和反向引物 5'-ATTGGATT-GGGCAAAGTAG-3';高粱 β -actin 基因引物,其正向序列为 5'-ACGGCCTGGATGGCGACGTACATG-3',反向序列为 5'-GCAGAAGGACGCCTACGTTGTGTAC-3'。按北京康为世纪公司反转录试剂盒的说明将 RNA 样品反转成 cDNAs。cDNAs 合成后,将 cDNA 以 10 倍梯度稀释成 5 个浓度,使用 ABI 公司的 7 500 fast 荧光定量 PCR 仪分别扩增靶基因 SS 和内参基因 β -actin,根据 2 个基因的循环数与初始模板浓度制备 2 个基因的标准曲线,并进行扩增效率的检测。扩增体系如下:cDNAs 2 μL,依次加入 12.5 μL 的 2 × Ultra SYBR Mixture,10 μmol/L 上下游引物各 1 μL,最后加入 RNase-Free 的水补至 25 μL。实时荧光定量 PCR 的扩增程序如下:预变性 95 ℃ 10 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,40 个循环。溶解曲线程序:95 ℃ 15 s;60 ℃ 1 min;95 ℃ 15 s;60 ℃ 15 s。每个样本进行 3 次重复,同时设置无模板阴性作对照。在反应结束后仪器会自动生成熔解曲线图及样品的循环数(C_T)。

2 结果与分析

2.1 不同生育时期叶片中总糖和蔗糖含量的变化

为了解作为糖分合成部位——叶片中糖分的变化情况,本试验对甜高粱品种罗马和 W452 与普通高粱品种忻梁 52 不同生育时期总糖和蔗糖含量进行测定。由图 1、图 2 可以看出,3 个品种糖分含量都呈现出从拔节期至灌浆期一直上升而到完熟期又有所下降的趋势,3 个品种叶片中的糖分含量在开花期和灌浆期比较接近;从整个生育时期来看,3 个品种的糖分含量在灌浆期都有 1 个突然升高的过程,可能这一时期是糖分合成的活跃期,等到完熟期时,大量糖分被运输至茎秆或穗子中,所以此时又呈下降趋势。

2.2 不同生育时期茎秆中总糖和蔗糖含量的变化

甜高粱为普通高粱的一个变种,它的茎秆已经成为糖分储存的库,而普通高粱的茎秆只是作为糖分转移的流。从图 3、图 4 可以看出,W452 和忻梁 52 总糖和蔗糖含量从拔节期开始逐渐升高,灌浆期时达到最高值,随后在完熟期又有所下降;而罗马的总糖和蔗糖含量则在完熟期达到最高值,这种变化趋势与叶片中的糖分积累规律基本一致,同样甜高粱茎秆中的糖分在灌浆期也有 1 个突然升高的过程,但忻梁 52 茎秆中的总糖和蔗糖含量与甜高粱相比在各个时期都较低,这可能是因为在灌浆期时叶片中大量合成的蔗糖流向库器官——

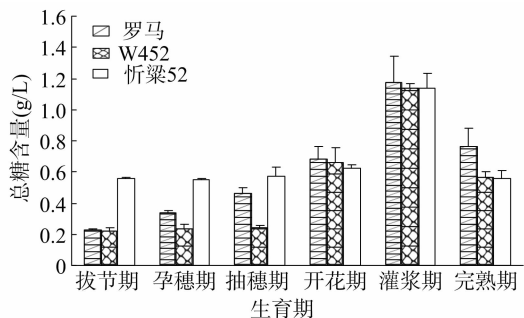


图1 不同生育时期罗马、W452 和忻梁 52 叶片中的总糖含量

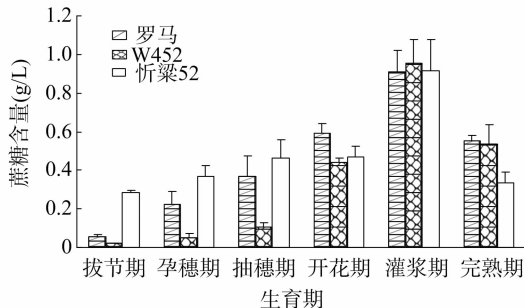


图2 不同生育时期罗马、W452 和忻梁 52 叶片中的蔗糖含量

穗,很少在茎秆中储存,导致茎秆中的糖分含量比较低,而甜高粱的库器官除了穗以外还有茎秆,因此甜高粱茎秆中总糖和蔗糖含量明显高于普通高粱茎秆;同时本试验还在 3 个品种中进行蔗糖和总糖含量的相关性分析,结果表明,不同高粱品种茎秆内的蔗糖和总糖含量都呈现出极显著相关($r>0.98, P<0.01$),蔗糖含量约占总糖含量的 60%。

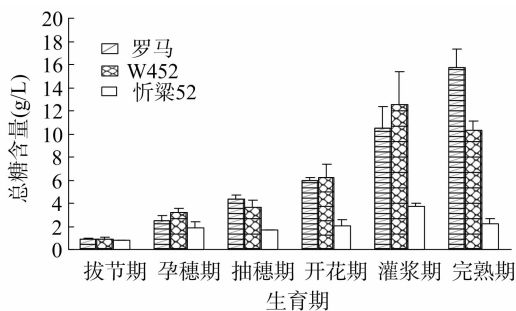


图3 不同生育时期罗马、W452 和忻梁 52 茎秆中的总糖含量

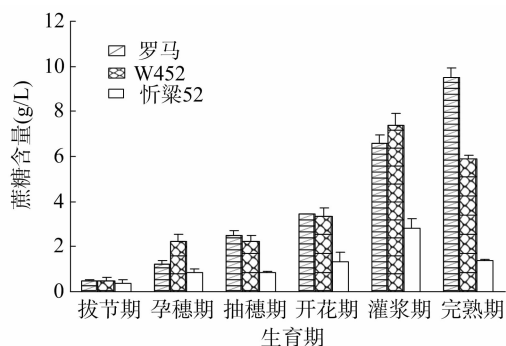


图4 不同生育时期罗马、W452 和忻梁 52 茎秆中蔗糖的含量

2.3 不同生育时期叶片中 SS 基因表达分析

SS 基因是植物蔗糖合成重要的调节基因,本试验利用 qRT-PCR 方法对 3 个高粱品种罗马、W452 与忻梁 52 的不同生育时期叶片中的 SS 基因表达进行分析。从图 5 可以看

出,以拔节期的表达量作为参照,SS 基因在不同高粱品种中的表达量均呈现先升后降的趋势,开花期达到最高,此时罗马、W452 和忻梁 52 的表达量分别是拔节期的 7.8、10.5、1.8 倍,可见 2 个甜高粱品种变化幅度较忻梁 52 明显,忻梁 52 叶片中 SS 基因在不同生育时期的表达量变化差异不大。

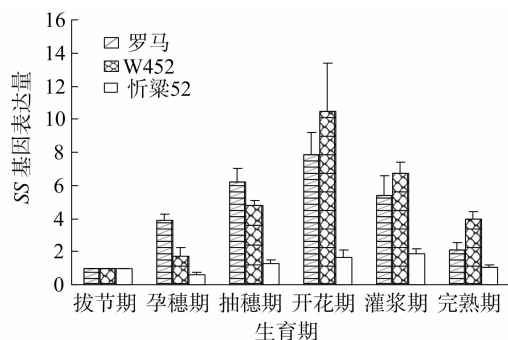


图5 不同生育时期高粱叶片中 SS 基因的定量表达分析

2.4 不同生育时期茎秆中 SS 基因表达分析

茎秆为甜高粱糖分的主要储藏器官,了解茎秆中 SS 基因的表达与甜高粱中蔗糖积累的关系具有非常重要的意义。本试验对罗马、W452 和忻梁 52 的各个时期茎秆中 SS 基因的表达量进行分析(图 6)。在整个生育时期,SS 基因在 3 个品种内的表达量均呈现先升后降的趋势,至开花期表达量最高,此时罗马、W452 和忻梁 52 的表达量分别为拔节期的 5.0、5.1、1.7 倍,说明 SS 基因在甜高粱品种中的表达量明显比普通高粱高,而且 SS 基因在忻梁 52 各个生育期中的表达量变化差异不大,该结果与叶片中 SS 基因的表达量变化趋势一致,但是表达量明显比叶片中的少。

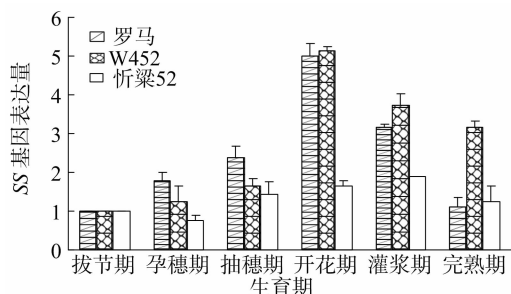


图6 不同生育时期高粱茎秆中 SS 基因的定量表达分析

2.5 高粱 SS 基因表达与蔗糖含量的相关性分析

通过以上蔗糖和 SS 基因在叶片和茎秆整个生育时期的变化趋势可以看出,SS 基因的变化趋势与蔗糖含量的变化趋势基本表现一致,但 SS 基因表达量的最高峰是在开花期,蔗糖含量最高峰出现在灌浆期,主要因为开花期蔗糖合成活跃,但开花这一生理过程会消耗植物大量的能量^[13],以致流向库器官中的蔗糖少,所以在灌浆期之前蔗糖积累缓慢;到了灌浆期,虽然 SS 基因的表达量有所下降,但高粱生长发育的几大耗能过程已结束,此时合成的蔗糖开始积累,导致叶片和茎秆中的蔗糖含量在灌浆期有 1 个短暂快速的积累过程。因此,总的来说 SS 基因的表达与蔗糖积累具有一定的相关关系。

3 结论与讨论

高粱为重要的能源和饲料作物,已为世界各国所认

同^[14]。甜高粱茎秆无论是用来生产燃料乙醇还是用作青贮饲料,了解其糖分组成及决定因素对提高糖分含量具有重要意义。结果表明,蔗糖是甜高粱糖分的主要成分,而先前对蔗糖含量的相关性研究大都基于酶活性的测定,酶活性分析容易受提取过程和外界因素的影响,不一定能完全反映两者之间的关系^[15]。本试验通过对不同高粱品种叶片和茎秆中糖分含量的测定与 SS 基因表达量的比较,获得更直接的与糖分积累相关的数据。

从生理上来说,叶片是高粱的源器官,蔗糖在叶片中合成后经长距离运输到库器官。本研究结果表明,叶片中总糖和蔗糖含量的变化呈“山峰”的变化趋势,灌浆期时糖分含量达到最高值,但是通过对 SS 基因表达规律的研究发现,SS 基因表达量先于蔗糖含量在开花期达到最高,即糖分含量的积累具有一定的延后性。

普通高粱的穗是其唯一的“库”,而甜高粱作为普通高粱的变种具有 2 个库器官——穗和茎秆。相较于普通高粱而言,甜高粱茎秆中总糖和蔗糖的积累明显提高,完熟期时糖分含量达到最高值,而 SS 基因的表达规律与在叶片中相似,开花期表达量达到最高值,随后有所下降。甜高粱茎秆在开花期之前蔗糖含量普遍较低,并且不同品种的差异并不大,从灌浆期开始,蔗糖大量积累,到完熟期时甜高粱茎秆中蔗糖含量高于普通高粱忻梁 52 将近 6 倍,这与陈维维等的研究结论^[16-17]相似。但从 2 个甜高粱品种整个生育时期茎秆中糖分含量的变化来看,W452 从拔节期到开花期呈上升趋势,灌浆期达到最大值后略有下降,这一结果与张华文等的研究结论^[18]一致,而罗马直到完熟期时才达到最大值,其结果与丽欧品种的特性^[1]相似,这可能是因为罗马(生育期为 190 d)的生育期比 W452(132 d)长的原因,测定罗马完熟期糖分时已是深秋,低温条件降低了细胞的呼吸强度,使得糖分一直处于不断积累的过程。

从拔节期开始,SS 基因的表达量一直呈缓慢上升的趋势,到开花期突然增高,此时合成的大量蔗糖主要供给开花过程^[13],随着这一耗能过程的结束,光合产物开始往储藏器官中运输。虽然随后 SS 基因的表达量有所下降,但此时甜高粱茎秆中的蔗糖含量积累速度仍然大于消耗速度,这也正是在生长后期糖分不断积累的原因。本试验结果表明,SS 基因很可能是影响糖分差异的主要基因,说明在以后育种上可以根据 SS 基因的表达量为指标筛选获得优质的甜高粱品种。

参考文献:

- [1] 谢凤周. 糖高粱茎秆糖分积累规律初步研究[J]. 辽宁农业科学, 1989(5): 50-51.
- [2] 杨相昆, 田海燕, 陈树宾, 等. 不同种植密度对甜高粱糖分积累的影响[J]. 西南农业学报, 2009, 22(1): 60-63.
- [3] Lingle S E. Sucrose metabolism in the primary culm of sweet sorghum during development[J]. Crop Science, 1987, 27(6): 1214-1219.
- [4] Billa E, Koullas D P, Monties B, et al. Structure and composition of sweet sorghum stalk components[J]. Industrial Crops and Products, 1997, 6(3/4): 297-302.
- [5] 黄东亮, 李双喜, 廖青, 等. 植物蔗糖磷酸合成酶研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(6): 109-119.

(下转第 140 页)

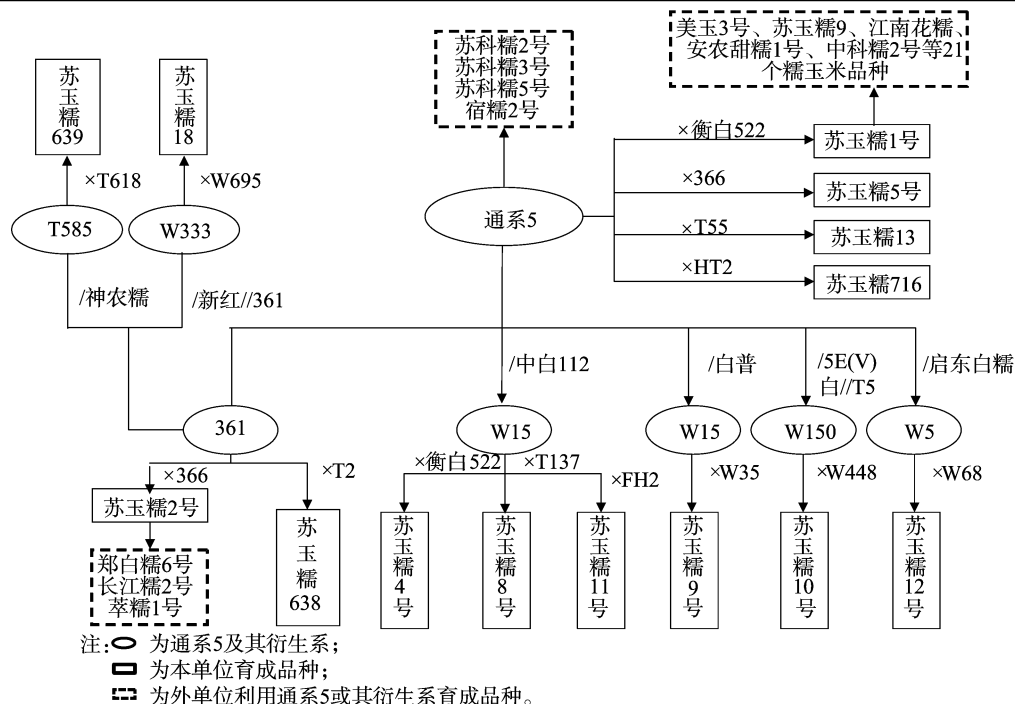


图2 通系5及其衍生系种质利用系谱

参考文献:

- [1] 谢孝颐. 玉米良种苏玉糯1号选育及加工利用[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1996: 1-5.
- [2] 谢孝颐, 薛林, 石明亮, 等. 高产优质多抗糯玉米杂交种苏玉(糯)1号选育报告[J]. 玉米科学, 1997, 5(3): 11-15.
- [3] 谢孝颐, 蔡志飞, 印志同, 等. 糯玉米育种概论[J]. 玉米科学, 2003(增刊2): 58-67.
- [4] 陈国清, 陆虎华, 薛林, 等. 早熟优质糯玉米杂交种苏玉糯2号的选育及应用[J]. 金陵科技学院学报, 2006, 14(1): 71-74.
- [5] 陆虎华, 陈国清, 薛林, 等. 优质高产糯玉米单交种苏玉糯5号

的选育[J]. 玉米科学, 2006, 14(5): 61-63.

- [6] 陆虎华, 胡加如, 薛林, 等. 9个糯玉米自交系主要品质性状的配合力效应及遗传参数分析[J]. 天津农学院学报, 2011, 18(3): 1-4.
- [7] 陆虎华, 薛林, 等. 鲜食糯玉米品种(品系)对粗缩病的田间抗性评价[J]. 中国农学通报, 2014, 30(24): 277-282.
- [8] 赫忠友, 赫晋. 美玉(加甜糯)3号鲜食专用玉米的选育[J]. 长江蔬菜, 2005(12): 43-44.
- [9] 赫忠友, 赫晋. 美玉(加甜糯)8号鲜食专用玉米杂交种的选育[J]. 作物杂志, 2005(5): 68-69.
- [10] 袁建华, 颜伟, 陈艳萍, 等. 糯玉米杂交新组合——江南花糯[J]. 江苏农业学报, 2002, 18(4): 240.

(上接第135页)

- [6] Sturm A, Šebková V, Lorenz K, et al. Development - and organ - specific expression of the genes for sucrose synthase and three isoenzymes of acid β - fructofuranosidase in carrot [J]. Planta, 1995, 195(4): 601-610.
- [7] Cardini C E, Leloir L F, Chiriboga J. The biosynthesis of sucrose[J]. J Biol Chem, 1955, 214: 149-155.
- [8] 卢合全, 沈法富, 刘凌霄, 等. 植物蔗糖合成酶功能与分子生物学研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(7): 34-37, 57.
- [9] 齐红岩, 李天来, 刘海涛, 等. 番茄不同部位中糖含量和相关酶活性的研究[J]. 园艺学报, 2005, 32(2): 239-243.
- [10] Martin T, Frommer W B, Salanoubat M, et al. Expression of an arabidopsis sucrose synthase gene indicates a role in metabolism of sucrose both during phloem loading and in sink organs [J]. The Plant Journal for Cell and Molecular Biology, 1993, 4(2): 367-377.
- [11] Komatsu A, Moriguchi T, Koyama K, et al. Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(366): 61-

71.

- [12] 杨明, 刘丽娟, 李莉云, 等. 甜高粱蔗糖合酶表达与蔗糖积累的相关分析[J]. 作物学报, 2009, 35(1): 185-189.
- [13] Kawano S, Nagai Y. The productive and reproductive biology of flowering plants[J]. Journal of Plant Research, 1975, 88(4): 281-318.
- [14] 詹秋文. 高粱与苏丹草的遗传及其杂种优势利用的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007: 1-2.
- [15] 刘鹏, 胡昌浩, 董树亭, 等. 甜质型与普通型玉米籽粒发育过程中糖代谢相关酶活性的比较[J]. 中国农业科学, 2005, 38(1): 52-58.
- [16] 陈维维, 再吐尼古丽·库尔班, 涂振东, 等. 不同种植密度对甜高粱糖分积累及 SS、SPS 活性的影响[J]. 作物学报, 2013, 39(8): 1507-1513.
- [17] 聂元冬, 钟海丽, 顿宝庆, 等. 甜高粱 SAI 基因的表达与茎秆糖分积累的相关性分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(21): 4506-4514.
- [18] 张华文, 秦岭, 王海莲, 等. 甜高粱茎秆糖分含量的变化分析[J]. 华北农学报, 2009, 24(增刊2): 69-71.