

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.01093

灌浆期遮光对不同粒色小麦籽粒花青素积累与相关酶活性的影响

王海伟 王振林 王 平 王树刚 黄 玮 武玉国 孙兰珍 尹燕枰*

作物生物学国家重点实验室 / 山东省作物生物学重点实验室 / 山东农业大学农学院, 山东泰安 271018

摘 要: 为探讨光照条件对不同粒色小麦籽粒花青素合成与积累的影响, 以红粒小麦品种(系) D4 红、红 5、黑小麦 76, 黑粒小麦品系 D4 黑、昌邑黑麦, 以及普通小麦济麦 19 (白粒)为材料, 研究穗部遮光对不同粒色小麦籽粒发育过程中花青素积累及相关酶活性的影响。全灌浆期穗部遮光或后期遮光对籽粒花青素含量的影响显著大于前期遮光, 说明籽粒灌浆后期是花青素合成的关键时期。穗部遮光对 D4 红、红 5 及黑小麦 76 籽粒花青素含量的影响显著大于黑粒小麦昌邑黑麦与 D4 黑。3 个红粒品种(系)全灌浆期遮光后籽粒花青素含量不足 1 U g^{-1} , 与白粒品种类似, 而前期遮光后期恢复光照后籽粒花青素迅速合成。与未遮光的对照比较, 遮光对 2 个黑粒小麦品系花青素含量影响虽达显著水平, 但遮光后黑粒品系花青素含量仍在 2 U g^{-1} 以上。说明黑粒与红粒小麦籽粒花青素的合成途径不同。红粒小麦的花青素合成可能是一种依赖光的合成途径, 而黑粒小麦中可能是依光型和非依光型两种合成途径, 且后者是其主要途径。有色小麦籽粒的苯丙氨酸解氨酶(PAL)和查尔酮异构酶(CHI)活性变化趋势是灌浆前期低, 中后期高, 而多酚氧化酶(PPO)活性则呈前期高, 中后期低的变化趋势。未遮光处理的有色小麦, 其不同时期籽粒花青素含量与 PAL 和 CHI 活性变化趋于一致, 且呈显著正相关, 表明 CHI 与 PAL 是有色小麦籽粒花青素合成的关键酶。黑粒小麦的花青素含量与 PPO 活性呈显著负相关, 而红粒的相关性不显著。遮光后籽粒的花青素含量变化与酶活性变化趋势不一致, 说明光照条件对籽粒花青素合成的影响并非直接通过 3 种酶活性的变化而起作用。

关键词: 花青素; 苯丙氨酸解氨酶; 查尔酮异构酶; 多酚氧化酶; 遮光

Effect of Shading Post Anthesis on Anthocyanin Accumulation and Activities of Related Enzymes in Colored-grain Wheat

WANG Hai-Wei, WANG Zhen-Lin, WANG Ping, WANG Shu-Gang, HUANG Wei, WU Yu-Guo, SUN Lan-Zhen, and YIN Yan-Ping*

State Key Laboratory of Crop Biology / Shandong Provincial Key Laboratory of Crop Biology / Agronomy College of Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

Abstract: To understand the pathway of anthocyanin accumulation during grain filling of wheat (*Triticum aestivum* L.) and its response to light, we used three red-grain, two black-grain, and one white-grain (control) varieties (lines) to investigate the dynamic changes of anthocyanin accumulation and activities of related enzymes during grain filling. Shading treatments were conducted during the whole filling stage (14–34 days post anthesis, treatment T1) and at early (14–24 d post anthesis, treatment T2) or late filling stage (24–34 days post anthesis, treatment T3), and natural light condition without shading was used as the control. The effects of treatments T1 and T3 on anthocyanin content were larger than that of treatment T2, indicating that late grain filling period is critical for anthocyanin biosynthesis. The changing degree of anthocyanin content induced by shading varied across varieties with larger changes in D4 Hong (red grain), Hong 5 (red grain), and Heixiaomai 76 (purple red grain). In the treatment T1, the grains of three red-grain varieties with anthocyanin content less than 1 U g^{-1} were colorless, similar to the white-grain control “Jimai 19”. In the treatment T2, the anthocyanin began to be synthesised after the shading was removed in late grain filling period. The anthocyanin contents of black-grain wheat varieties Changyi Heimai and D4 Hei were significantly reduced in shading treatments, but the absolute content was higher than 2 U g^{-1} in the treatment T1. This result suggested different pathways of anthocyanin biosynthesis probably light-dependent in red-grain wheat. While both light-dependent and non-light-dependent

本研究由国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08002-004B), 国家自然科学基金项目(30871477)和国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2009CB118602)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 尹燕枰, E-mail: ypyinsdau@sina.com, Tel: 0538-8242458

第一作者联系方式: E-mail: wanghaiwei200803@163.com

Received(收稿日期): 2010-10-15; Accepted(接受日期): 2011-03-08.

pathways in black-grain wheat, of which the latter was the main pathway. In colored-grain wheat, the activities of phenylalanine ammonialyase (PAL) and chalcone isomerase (CHI) were low in early grain-filling period, and increased to a higher level in middle to late filling period. However, the activity of polyphenol oxidase (PPO) varied from a high level in early filling period to a low level in middle to late filling period. In the control treatment without shading, the activities of PAL and CHI were positively associated with anthocyanin content at a significant level, indicating that CHI and PAL are the key enzymes in anthocyanin biosynthesis. The PPO activity was negatively correlated with anthocyanin content in black-grain wheat rather than red-grain wheat. Under the shading conditions, the activities of PAL, CHI, and PPO were not closely associated with the anthocyanin content. Therefore, it is inferred that the effect of light on anthocyanin biosynthesis is not based on the direct regulations of PAL, CHI, and PPO activities.

Keywords: Anthocyanin; PAL; CHI; PPO; Shading

花色苷是植物体内非常重要的水溶性色素, 分布极为广泛。迄今为止, 已在除藻类植物之外的其他各门高等植物体内发现花色苷的合成^[1]。近年育成的有色小麦品种, 其籽粒富含天然花色素, 且钙、铁、锌、硒等营养元素含量明显高于普通粒色小麦, 因其有特殊的调节和保健功能而日益受到消费者的青睐^[2-3]。小麦籽粒由胚和胚乳以及胚乳外覆盖的果皮、种皮等部分组成, 果皮、种皮或糊粉层中沉积色素的不同导致粒色的差异, 以红粒和白粒最为常见, 亦有少量紫、蓝或黑色^[4-5]。在一定遗传背景下, 籽粒粒色深浅有别, 如蓝粒可分为浅蓝、中蓝和深蓝等^[4,6]。细胞内花色苷的合成主要集中在液泡周围的细胞质, 经由苯基丙酸类合成途径(phenylpropanoid pathway)和类黄酮生物合成途径(flavonoid biosynthetic pathway)完成。花色苷的生物合成途径包括约 20 步生物化学过程, 大约涉及 15 个结构基因和两类(Myb 和 Myc 型)调节基因。结构基因直接编码花色苷生物合成的酶类, 调节基因控制结构基因的表达强度和表达方式^[1]。花色苷的生物合成除受植物体内部因子(如本身发育程序、激素水平等)的影响外, 环境因子对其具有明显的调节作用, 其中光照是重要的调节因子之一。持续白光有助于离体培养花瓣的着色, 并且光下着色能被光合作用抑制剂所抑制^[1]。杨文雄和介晓磊^[4]研究了紫粒小麦种子发育进程与光照条件的关系, 提出在籽粒发育后期延长光照时间有利于籽粒花色素和黑色素的积累。本课题组 2008 年试验发现, 穗部遮光后红粒小麦籽粒表现不呈现红色, 而黑粒小麦粒色则不受影响^[7], 然而对其机制了解甚少。红粒与黑粒小麦粒色对光反应的差异是否与结构基因直接编码花色苷代谢生物合成的酶类有关? 针对这个问题, 本试验以红、黑粒 5 个小麦品种(系)和一个白粒小麦品种为材料, 研究了有色小麦籽粒花青素的积累过程, 遮光对其积累及相关酶活性的影响, 以期探明有色小麦籽粒花色苷的合成途径和光照条件对色素合成的调节效应, 为促进

有色小麦功能性食品和天然色素的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料及遮光处理

以花粉管通道法将外源红高粱(*Sorghum bicolor* L. Moench)总 DNA 导入白粒小麦(*Triticum aestivum* L.)品种济核 916 中, 获得黑粒稳定品系 D4 黑和红粒稳定品系 D4 红、红 5^[7]。以这些品种(系)及已推广的昌邑黑麦(黑粒)、黑小麦 76(紫红粒)品种为试验材料, 并以白粒小麦品种济麦 19 作对照(图 1), 2008 年 10 月至 2010 年 6 月连续 2 个生长季在山东农业大学农学试验站田间种植。采用随机区组设计, 小区面积 6 m², 3 次重复。栽培管理同一般高产田。

图 1 供试小麦品种(系)及其粒色

Fig. 1 Varieties and lines used and their grain colors
红粒品种(系): 红 5(No. 1), D4 红(No. 2)和黑小麦 76(No. 3); 黑粒品种(系): D4 黑(No. 4)和昌邑黑麦(No. 5); 白粒品种: 济麦 19 (No. 6), 对照。
Red-grain varieties (lines): Hong 5 (No. 1), D4 Hong (No. 2), and Heixiaomai 76 (No. 3); Black-grain varieties (lines): D4 Hei (No. 4) and Changyi Heimai (No. 5); White-grain variety: Jimai 19 (No. 6), control.

2009 年 5 月小麦开花后, 选择发育正常的麦穗, 用铝箔包裹麦穗进行遮光处理, 设未遮光的对照(control)、花后 14~34 d 全灌浆期遮光(T1)、花后 14~24 d 灌浆前期遮光(T2)和花后 24~34 d 灌浆后期遮光(T3) 4 种处理。收获时分别取样测定籽粒的花青素含量。2010 年 5 月改用纯黑卡纸纸袋套住麦穗进行遮光处理, 未套袋的麦穗作对照。花后每隔 4~5 d

取样一次, 样品用液氮固定后 -40℃ 保存鲜样备用; 收获期取样干燥后贮藏。测定前每处理取 7 穗, 去掉顶部 2 个小穗, 每小穗剥出 1、2 粒籽粒混合后作为样品, 随机称取 0.5 g, 3 次重复。

1.2 籽粒中花青素含量测定方法

将 0.5 g 样品用 96% 乙醇去除叶绿素, 沉淀残渣用 50% 酸化乙醇提取液 (pH 1.0) 10 mL 提取花青素, 60℃ 水浴提取 3 h 后, 5 600×g 离心 10 min^[5], 取上清液测定 600 nm 与 530 nm 下的吸光值, 以 $\Delta_{A530-A600}=0.1$ 作为花青素单位^[4,8]。

1.3 籽粒中酶活性测定方法

参照王慧聪等^[9]的方法提取苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 和查尔酮异构酶 (CHI)。取 0.5 g 籽粒加入 5 mL 提取液 (含 0.05 mol L⁻¹ Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.0, 0.05 mol L⁻¹ 抗坏血酸, 0.018 mol L⁻¹ 巯基乙醇), 冰浴匀浆 4℃ 下 12 000×g 离心 20 min, 上清液为酶粗提液, 参照 Lister 等^[10]的方法测定 PAL 和 CHI 酶活性。

参照晏本菊和李焕秀的方法^[11], 稍作改动测定多酚氧化酶 (PPO) 活性。称 0.5 g 籽粒, 加 5 mL 磷酸缓冲液 (0.05 mol L⁻¹, pH 5.5), 冰浴研磨, 低温下提取 30 min 后, 0~4℃ 下 12 000×g 离心 15 min, 3 次重复。取 0.5 mL 上清液, 加入磷酸缓冲液 2 mL 和 0.1 mol L⁻¹ 邻苯二酚 1 mL, 混匀后将反应液置恒温水浴 35℃ 保温 15 min, 然后于 325 nm 下测定吸光值。以每 15 min 光密度变化 0.01 为一个酶活力单位^[12]。

1.4 数据处理

采用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS 17.0 软件处理数据, 采用 LSD 法进行处理间差异显著性比较。

2 结果与分析

2.1 籽粒中花青素含量变化

用铝箔做遮光处理, 灌浆全程遮光后 4 个有色小麦品种 (系) 籽粒中花青素含量都较对照显著降低, 红 5 与 D4 红籽粒中的花青素含量不足 1 U g⁻¹, 而昌邑黑麦与 D4 黑籽粒中的花青素含量都在 3 U g⁻¹ 以上。灌浆前期遮光后红粒小麦 D4 红、红 5 的花青素含量较对照显著降低, 黑粒小麦昌邑黑麦、D4 黑籽粒中花青素含量也显著低于对照, 但降低幅度远低于红粒品种。各有色小麦品种 (系) 灌浆后期遮光处理的籽粒中花青素含量均低于前期遮光处理的含量, 且黑粒小麦较对照的差异幅度远小于红粒小麦 (图 2)。说明遮光对红粒小麦籽粒花青素积累影响显著大于对黑粒籽粒色素积累的影响。

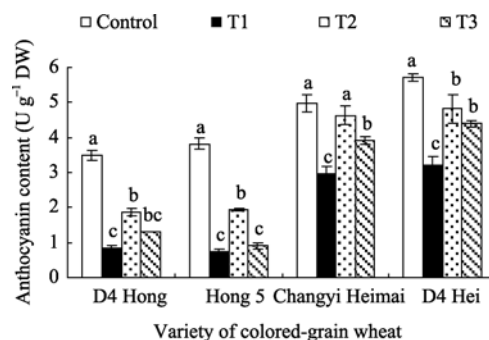


图 2 不同遮光处理小麦成熟期籽粒花青素含量 (2009 年)
Fig. 2 Anthocyanin contents in wheat grains at maturity under different shading treatments in 2009

数据为 3 次重复的平均值±标准差; 处理间达显著差异 ($P < 0.05$) 用不同字母表示。Control: 未遮光处理; T1: 全灌浆期 (花后 14~34 d) 遮光; T2: 灌浆前期 (花后 14~24 d) 遮光; T3: 灌浆后期 (花后 24~34 d) 遮光。

Data are shown in means±SD of 3 replicates. Treatments with significant differences ($P < 0.05$) are marked with different letters. Control: Normal condition without shading; T1: Shading during the whole grain-filling stage (from 14 to 34 days post anthesis); T2: Shading at early filling stage (from 14 to 24 days post anthesis); T3: Shading at late filling stage (from 24 to 34 days post anthesis).

用黑纸袋遮光处理, 灌浆期全程遮光后 3 个红粒品种 (系) 不同时期籽粒花青素含量都较对照极显著降低, 花后 34 d 籽粒的花青素含量和白粒品种济麦 19 中的测定结果相近 (图 3), 说明红粒小麦遮光后籽粒中几乎无花青素合成。灌浆前期遮光处理的 3 个取样时期内, 红粒小麦花青素含量变化较小, 说明花青素基本不能合成, 而去袋后花青素则迅速积累。到花后 34 d, 前期遮光处理的黑小麦 76 籽粒中花青素含量与对照无显著差异, D4 红显著低于对照, 但红 5 花青素含量显著高于对照 (图 3 和图 4)。灌浆后期遮光中, 3 个红粒小麦籽粒中花青素从遮光之日起几乎不见积累, 红 5 和黑小麦 76 籽粒中花青素含量各时期变化较小, 而 D4 红前期合成的花青素在后期遮光后则降至全程遮光处理的花青素含量水平, 这可能是 D4 红灌浆后期有一部分的花青素被降解所致。黑粒小麦 D4 黑前 4 个取样时期遮光处理与未遮光对照的花青素含量无明显差异, 而花后 34 d 时 3 种遮光处理的花青素含量都显著低于对照, 但比济麦 19 的含量高 2 倍以上 (图 3 和图 4), 说明籽粒中还是有大量花青素积累。昌邑黑麦灌浆全程遮光中后 3 个取样时期的花青素含量都显著低于对照, 且其籽粒花青素积累量最少; 花后 29 d 后期遮光处理的花青素含量显著低于对照, 在花后 34 d 时灌浆前期遮光与后期遮光处理的籽粒花青素含量无明显差异 (图 3 和图 4)。白粒小麦济麦 19 遮光处理的与未遮光的花青

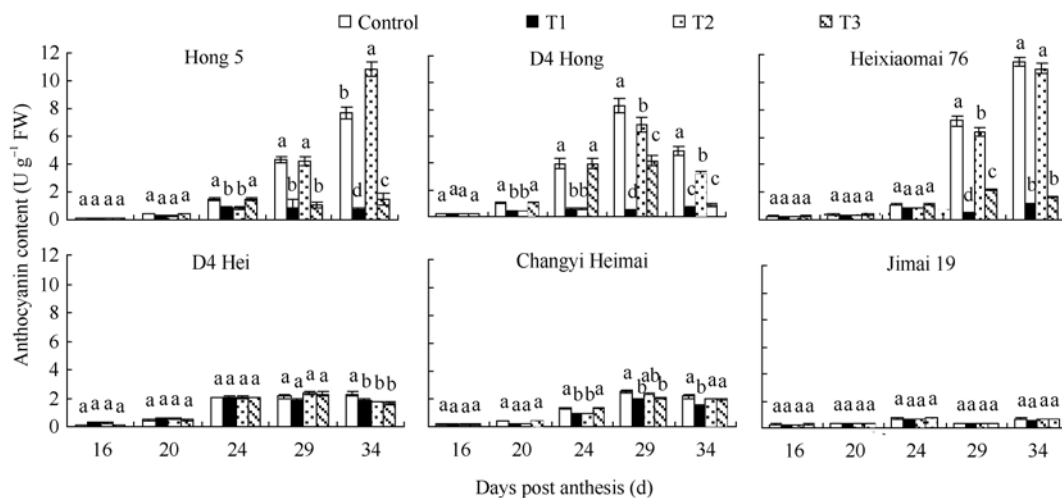


图 3 不同粒色小麦品种(系)灌浆期籽粒花青素含量变化(2010 年)

Fig. 3 Anthocyanin contents in grains of different colored-grain varieties (lines) during grain filling in 2010

数据为 3 次重复的平均值±标准差, 处理间达显著差异($P < 0.05$)用不同字母表示。

Control: 未遮光处理; T1: 全灌浆期(花后 14~34 d)遮光; T2: 灌浆前期(花后 14~24 d)遮光; T3: 灌浆后期(花后 24~34 d)遮光。

Data are shown in means±SD of 3 replicates. Treatments with significant differences ($P < 0.05$) are marked with different letters.

Control: Normal condition without shading; T1: Shading during the whole grain-filling stage (from 14 to 34 days post anthesis); T2: Shading at early filling stage (from 14 to 24 days post anthesis); T3: Shading at late filling stage (from 24 to 34 days post anthesis).

图 4 不同遮光处理花后 29 d 时红、黑粒小麦籽粒颜色变化(2010 年)

Fig. 4 Changes in grain colors of red and black wheat varieties (lines) at the 29th day post anthesis under different shading treatments in 2010

Control: 未遮光处理; T1: 全灌浆期(花后 14~34 d)遮光; T2: 灌浆前期(花后 14~24 d)遮光; T3: 灌浆后期(花后 24~34 d)遮光。

Control: Normal condition without shading; T1: Shading during the whole grain-filling stage (from 14 to 34 days post anthesis); T2: Shading at early filling stage (from 14 to 24 days post anthesis); T3: Shading at late filling stage (from 24 to 34 days post anthesis).

素含量无明显差异, 且其含量都在 1 U g^{-1} 以下。

2.2 籽粒中 PAL、CHI 和 PPO 的活性变化

2.2.1 PAL 活性变化 在灌浆全程遮光处理中, 除红 5 外, 其他 4 个有色小麦品种(系)籽粒的 PAL 活性与对照相比变化趋势是前期显著高于对照, 后期显著低于对照; 而济麦 19 籽粒 PAL 活性变化是先较对照显著降低, 而后显著高于对照; 到花后 34 d 时, 昌邑黑麦和济麦 19 的 PAL 活性与对照无明显差异。前期遮光处理去袋后红 5 与 D4 黑的 PAL 活性迅速增加, 红 5 的后 2 个取样时期的酶活性都显著高于对照, 这可能是红 5 籽粒花青素含量高于未遮光对照的原因之一; D4 黑在花后 34 d 时的酶活性显著低于对照, 其他 4 个品种去袋后的 PAL 活性稍低于对照或者无明显差异。灌浆后期遮光处理中, 红 5 与

黑小麦 76 两个取样时期籽粒的 PAL 活性都显著低于未遮光对照, D4 红花后 29 d 时籽粒的 PAL 活性显著低于对照, 在花后 34 d 时与对照无明显差异; 而 D4 黑与济麦 19 花后 29 d 时遮光处理的 PAL 活性显著高于对照, 在花后 34 d 时与未遮光处理的无明显差异, 而昌邑黑麦花后 34 d 籽粒的 PAL 活性显著高于未遮光处理(图 5)。

2.2.2 CHI 活性变化 全程遮光处理中, 除昌邑黑麦外, 其他各小麦籽粒中的 CHI 活性先显著高于对照, 而后降低至对照的酶活性水平以下, 花后 34 d 时 5 个小麦品种(系)籽粒的 CHI 活性都低于对照; 而昌邑黑麦花后 29 d 时的 CHI 活性显著低于对照, 34 d 时又显著高于对照, 其他各时期与对照无显著差异。灌浆后期遮光处理中, D4 红、D4 黑、黑小麦 76

与济麦 19 花后 29 d 时的 CHI 活性显著低于对照, 红 5 与昌邑黑麦与对照无显著差异; 到花后 34 d 时 D4 红的 CHI 活性显著高于对照, 而黑小麦 76 与 D4 黑显著低于对照, 其他小麦籽粒的 CHI 活性与对照无明显差异。前期遮光处理中, 红 5 去袋后的 CHI 活

性较对照显著增加, 在后两取样时期籽粒的 CHI 活性都显著高于对照, 黑小麦 76 花后 29 d 时显著低于对照, 而 D4 红、D4 黑的 CHI 活性在花后 34 d 时显著低于对照, 其他 3 个小麦品种去袋后籽粒中 CHI 活性较未遮光处理的没有明显差异(图 6)。

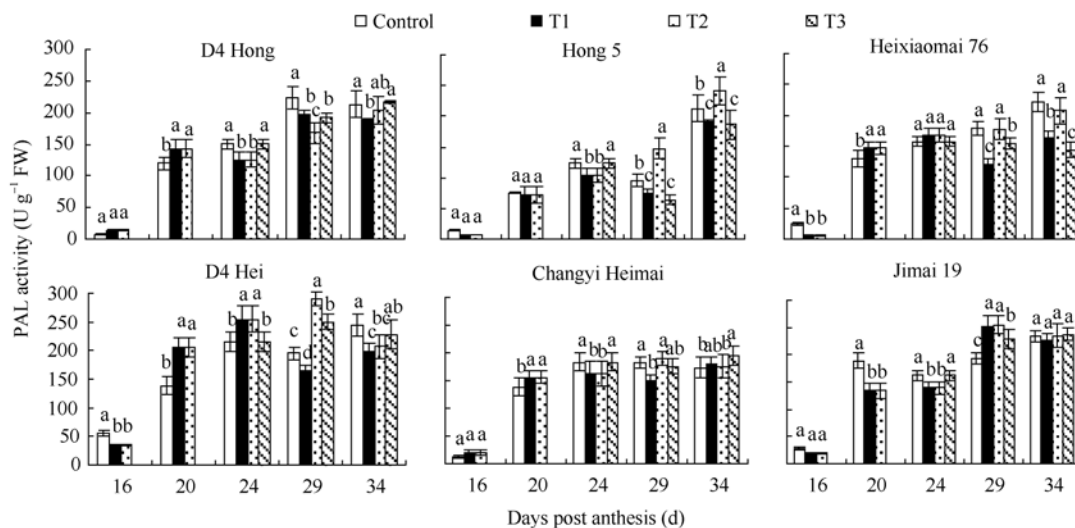


图 5 不同粒色小麦灌浆期籽粒 PAL 活性变化

Fig. 5 PAL activities in colored-grain wheat varieties (lines) during grain filling

数据为 3 次重复的平均值±标准差, 处理间达显著差异($P<0.05$)用不同字母表示。Control: 未遮光处理; T1: 全灌浆期(花后 14~34 d)遮光; T2: 灌浆前期(花后 14~24 d)遮光; T3: 灌浆后期(花后 24~34 d)遮光。

Data are shown in means±SD of 3 replicates. Treatments with significant differences ($P<0.05$) are marked with different letters. Control: Normal condition without shading; T1: Shading during the whole grain-filling stage (from 14 to 34 days post anthesis); T2: Shading at early filling stage (from 14 to 24 days post anthesis); T3: Shading at late filling stage (from 24 to 34 days post anthesis).

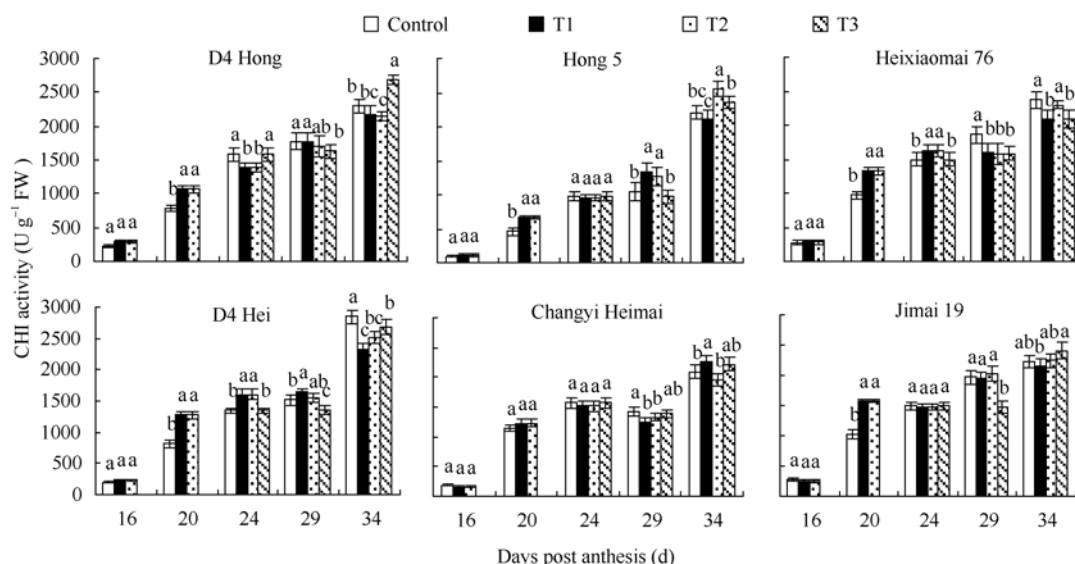


图 6 不同粒色小麦灌浆期籽粒查尔酮异构酶活性变化

Fig. 6 CHI activities in colored-grain of wheat varieties (lines) during grain filling

数据为 3 次重复的平均值±标准差, 处理间达显著差异($P<0.05$)用不同字母表示。Control: 未遮光处理; T1: 全灌浆期(花后 14~34 d)遮光; T2: 灌浆前期(花后 14~24 d)遮光; T3: 灌浆后期(花后 24~34 d)遮光。

Data are shown in means±SD of 3 replicates. Treatments with significant differences ($P<0.05$) are marked with different letters. Control: Normal condition without shading; T1: Shading during the whole grain-filling stage (from 14 to 34 days post anthesis); T2: Shading at early filling stage (from 14 to 24 days post anthesis); T3: Shading at late filling stage (from 24 to 34 days post anthesis).

2.2.3 PPO 活性变化 在花后 24 d 的前 3 个取样时期小麦遮光处理后籽粒中 PPO 活性都低于或显著低于对照。在后两个时期, 灌浆全程遮光处理的黑小麦 76 与昌邑黑麦的 PPO 活性花后 29 d 时都较对照显著升高, 在花后 34 d 时又都较对照显著降低, D4 红则显著高于对照, 红 5、D4 黑和济麦 19 遮光处理与未遮光的 PPO 活性无显著差异。前期遮光处理去袋后济麦 19、D4 红、D4 黑、红 5 在花后 34 d 时籽粒中 PPO 活性显著高于对照, 昌邑黑麦与黑小麦 76 籽粒中 PPO 活性与对照的无明显差异。灌浆后期遮光中, D4 红在花后 34 d 时 PPO 活性极显著高于对照, 而红 5、黑小麦 76、昌邑黑麦都是显著低于对照, D4 黑与济麦 19 籽粒中 PPO 活性较对照变化

不明显(图 7)。

2.3 花青素与 PAL、CHI、PPO 的相关性

相关分析结果表明(表 1), 不同时期红粒小麦对照的籽粒花青素含量与 CHI 和 PAL 活性呈极显著正相关, 而与 PPO 活性相关性不显著; 黑粒小麦对照组籽粒的花青素含量与 CHI、PAL 活性呈极显著正相关, 而与 PPO 酶活性呈极显著负相关。这说明 CHI 和 PAL 都是有色小麦籽粒花青素合成的关键酶, 且 2 种颜色小麦籽粒的花青素含量与 CHI 活性的相关性更高些。穗部遮光后红、黑粒小麦不同时期籽粒花青素含量与 PAL 和 CHI 相关系数都较对照小, 但也可达显著正相关; 黑粒小麦花青素含量与 PPO 活性相关系数较对照降低, 呈显著负相关, 而红粒小

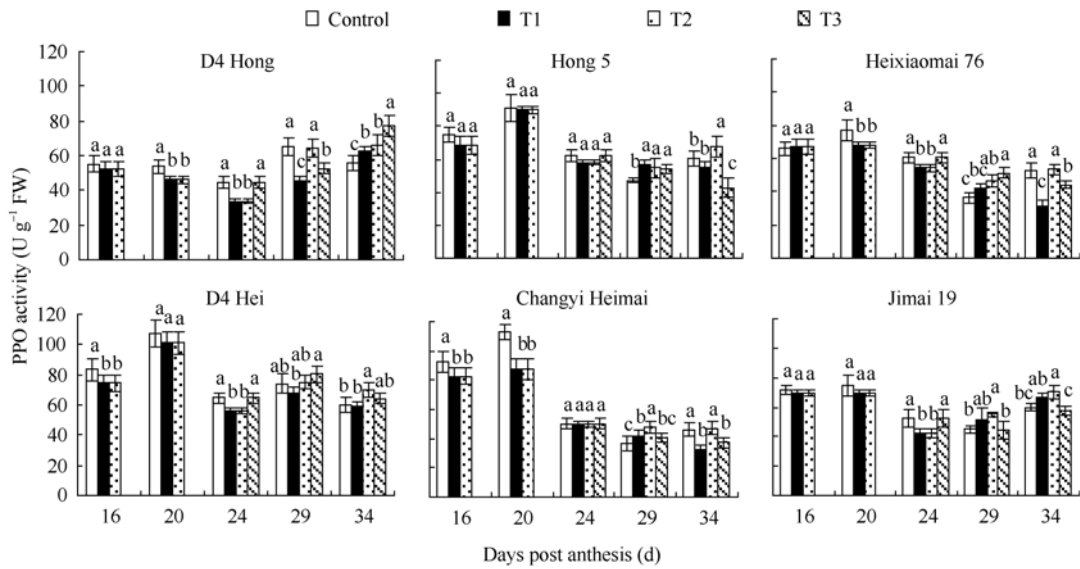


图 7 不同粒色小麦灌浆期籽粒多酚氧化酶活性变化

Fig. 7 PPO activities in colored-grain of wheat varieties (lines) during grain filling

数据为 3 次重复的平均值±标准差, 处理间达显著差异($P<0.05$)用不同字母表示。Control: 未遮光处理; T1: 全灌浆期(花后 14~34 d)遮光; T2: 灌浆前期(花后 14~24 d)遮光; T3: 灌浆后期(花后 24~34 d)遮光。

Data are shown in means±SD of 3 replicates. Treatments with significant differences ($P<0.05$) are marked with different letters. Control: Normal condition without shading; T1: Shading during the whole grain-filling stage (from 14 to 34 days post anthesis); T2: Shading at early filling stage (from 14 to 24 days post anthesis); T3: Shading at late filling stage (from 24 to 34 days post anthesis).

表 1 红、黑粒小麦籽粒花青素含量与 PAL、CHI 和 PPO 活性的相关系数

Table 1 Correlation coefficients between anthocyanin content and activities of PAL, CHI, and PPO in grains of red and black wheats

花青素含量 Anthocyanin content	PAL				CHI				PPO			
	对照	Control	遮光	Shading	对照	Control	遮光	Shading	对照	Control	遮光	Shading
红粒小麦 Red-grain wheat		0.802**		0.516**		0.853**		0.436*		-0.469		0.058
黑粒小麦 Black-grain wheat		0.834**		0.713**		0.848**		0.552*		-0.801**		-0.524*

* $P<0.05$, ** $P<0.01$. $N_{\text{红, CK}}=15$, $N_{\text{黑, CK}}=10$, $N_{\text{红, 遮}}=27$, $N_{\text{黑, 遮}}=18$

未遮光处理中, 红、黑粒小麦的自由度分别为 15 和 10; 遮光处理中, 红黑粒小麦的自由度分别为 27 和 18。

Under the natural condition without shading, the degrees of freedom (df) were 15 for red-grain wheat and 10 for black-grain wheat. In the shading treatments, the df values were 27 for red-grain wheat and 18 for black-grain wheat.

麦的花青素含量与 PPO 活性几乎不相关。

3 讨论

3.1 不同粒色小麦籽粒中花青素合成途径的探讨

红、黑粒小麦籽粒中花青素合成都受光的影响,但就受光的影响差异幅度看,与未遮光相比较,遮光对红粒小麦籽粒花青素含量的影响远大于黑粒小麦。黑粒小麦穗部遮光后花青素含量变化较小,但与对照相比仍达到显著差异水平,籽粒中仍有大量的花青素合成;而红粒小麦遮光后花青素与济麦 19 的花青素含量无明显差异,前期遮光处理去袋后花青素迅速合成,说明二者的花青素主要合成途径是不完全相同的。3 个红粒小麦品种(系)籽粒花青素的合成推断应是一种受光诱导的合成途径;可能其受光诱导的转录调控因子(Myb 或 bHLH 等)表达进而调控籽粒花青素的合成^[1,13]。而黑粒小麦籽粒花青素合成推断其应至少存在两条途径,一条是非依赖光的花青素合成途径,另一条是依赖光的花青素合成途径。遮光后籽粒花青素减少的部分可能是受光诱导的途径被阻止,而其他不受光诱导的合成途径继续合成花青素,且非依赖光的合成途径为黑粒小麦主要的花青素合成途径。目前对不依赖光的合成途径有两种假设解释,一是植物中有不依赖光的基因表达,这种基因即使在黑暗条件下也能启动花色素生物合成^[8];二是在自我调节机制下产生了基因产物,使其花青素能继续合成^[8,14]。关于光对红、黑粒小麦籽粒花青素含量影响的机制有待进一步深入研究。

3.2 遮光对不同粒色小麦籽粒中酶活性影响的探讨

PAL 是合成花色苷也是合成其他多种化合物(类黄酮、木质素等)的起始酶,其活性已备受关注^[1]。Arakawa^[15]认为,受光调节的 PAL 才是花青素合成的关键酶。但周爱琴等^[16]发现,随着苹果果皮中花色苷含量的增加,果实中 PAL 活性也随着增加,但二者并非呈简单的正相关关系,可能还受其他代谢反应的影响, PAL 可能不是控制花青素合成的唯一关键酶,有可能存在更直接的酶。冯守千等^[17]也认为 PAL 不是砂梨果皮花青素合成的关键酶,因为砂梨果皮中 PAL 酶活性与花青素变化趋势不一致。本试验结果表明,红粒和黑粒小麦对照组籽粒中花青素含量与 PAL 活性呈显著正相关,说明 PAL 是有色小麦花青素合成的相关酶;遮光后相关系数降低,但仍达到显著水平,说明受光的影响籽粒花青素的含量变化与 PAL 酶活性变化关系不密切。CHI 作为

花青苷合成的一个关键酶,在黄酮类化合物的转化中起重要作用,在荔枝^[9]、苹果^[16]、沙梨^[17]等中已有报道,但在有色小麦中鲜有报道。两种粒色小麦对照组籽粒中花青素含量与 CHI 酶活性呈极显著正相关,且大于与 PAL 的相关系数,说明花青素含量的变化与 CHI 酶的关系更密切些;遮光后红粒型的花青素含量与 CHI 的相关系数降低较大,这也说明受光的影响有色小麦籽粒花青素的合成变化与 CHI 酶活性变化关系不密切,推断其遮光后主要是阻断了光信号转导途径而影响花青素的合成,并非是影响 CHI 酶活性而影响花青素的合成。PPO 是广泛存在于植物、真菌和昆虫质体中的金属蛋白酶,它能分别催化单羟基酚和二羟基酚氧化为醌,从而引起褐化^[18-19]。但是,植物体内大多数 PPO 活性都是潜在的,这是因为正常组织内细胞中的酚类物质和多酚氧化酶呈区域性分布^[19-20]。PPO 对花色苷的作用较为复杂,PPO 可将查尔酮(chalcone)作为特异性底物,催化类黄酮奥啉(aurone)的形成,而后者是花色及果实等黄色形成的主要原因之一^[21];另外,PPO 还与花色苷的降解有关,当有绿原酸或咖啡酸等酚类存在时,多酚氧化酶促进多酚生成 *O*-醌类化合物,该中间产物进一步与花色苷快速反应生成花色苷-*O*-醌的缩合物,然后进一步降解^[22]。本研究表明,黑粒小麦对照组籽粒的花青素合成与 PPO 活性呈显著负相关,说明其可能与花青素的降解有关。而 PPO 与红粒小麦的相关性不显著;遮光后其相关系数都降低,说明光对红粒小麦花青素含量和 PPO 活性的影响不是密切相关的,其 PPO 活性可能主要与小麦的一些其他性状密切相关,如抗病性^[23]和植物组织褐化^[20]。

3.3 红、黑粒小麦籽粒干鲜样花青素含量的差异

从本试验两年结果看,红粒与黑粒小麦籽粒干、鲜样花青素含量结果不一致,即红粒小麦籽粒花青素含量是鲜样大于干样,而黑粒小麦籽粒花青素含量是干样大于鲜样。分析其原因认为,可能是红粒小麦在种子脱水干燥过程中籽粒的花青素自身降解一部分或者转化为其他物质^[22],致使籽粒干样中花青素含量低于鲜样。而黑粒小麦样品脱水后,其中的花青素未发生变化,但会使单位重量样品中花青素含量增加。关于红、黑粒小麦籽粒干鲜样花青素含量的差异机制,尚待进一步研究。

4 结论

利用大田种植正常成熟的红、黑种粒 5 个品种

(系)小麦中观察到其籽粒花青素合成途径存在差异,红粒小麦的花青素合成可能是一种依赖光的合成途径,并且光对籽粒花青素含量的影响主要在籽粒灌浆后期,此时正是花青素合成的关键时期;而在黑粒小麦中,可能至少存在两条花青素合成途径,一种是依光型合成途径,另一种是非依光型合成途径,且后者是其主要合成途径。PAL 和 CHI 是有色小麦花青素合成的关键酶,CHI 与花青素合成的关系更密切;PPO 与花青素合成关系不密切。灌浆期不同遮光处理红、黑粒小麦的籽粒花青素含量变化与 PAL、CHI 和 PPO 酶活性的变化趋势不尽一致,说明光照条件对籽粒花青素合成的影响并非直接通过这 3 种酶活性的变化而起作用。

References

- [1] Ling W-H(凌文华), Guo H-H(郭红辉). Anthocyanin of Plant (植物花色苷). Beijing: China Science and Technology Press, 2002. pp 9–45 (in Chinese)
- [2] Li X-P(李杏普), Hou H-J(侯红军), Liu Y-P(刘玉平), Lan S-Q(兰素缺), Zhu Y-Y(祝玉英). Studies of grain nutritional quality on wheat with blue or purple kernels. *Acta Agric Boreali-Sin* (华北农学报), 2002, 17(1): 21–24 (in Chinese with English abstract)
- [3] Tang X-Z(唐晓珍), Wang Z(王征), Zhang X-S(张宪省), Wang X-D(王晓东), Sun L-Z(孙兰珍), Yin Y-P(尹燕桦). Red and black Tai'an wheat lines: nutritional quality evaluation. *J Chin Cereals Oils Assoc* (中国粮油学报), 2009, 24(4): 28–31 (in Chinese with English abstract)
- [4] Yang W-X(杨文雄), Jie X-L(介晓磊). Sunlight effect on pigment content of purple wheat. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2007, 27(6): 1101–1105 (in Chinese with English abstract)
- [5] Tang X-Z(唐晓珍), Liu B(刘宾), Jiang Y(姜媛), Sun L-Z(孙兰珍), Yin Y-P(尹燕桦). Technological conditions for extraction of pigment from purple wheat bran by acidified alcohol. *J Chin Cereals Oils Assoc* (中国粮油学报), 2008, 23(5): 24–27 (in Chinese with English abstract)
- [6] Lan S-Q(兰素缺), Li X-P(李杏普), Liu Y-P(刘玉平). Genetic of seed pigment of blue kernel wheat. *Acta Agric Boreali-Sin* (华北农学报), 2008, 23(suppl-1): 12–14 (in Chinese with English abstract)
- [7] Ma D(马东). Study on the Quality Characteristic and Accumulating of Pigment of Color Wheat. Master Thesis of Shandong Agricultural University, 2008. pp 39–41 (in Chinese with English abstract)
- [8] Han L(韩磊), Wang X-D(汪旭东), Wu X-J(吴先军). The application of multivariate linear regression model in the analysis of anthocyanidin and its correlative factors in purple rice. *Weifang Higher Vocational Education* (潍坊高等职业教育), 2009, 3(5): 55–58 (in Chinese with English abstract)
- [9] Wang H-C(王惠聪), Huang X-M(黄旭明), Hu G-B(胡桂兵), Huang H-B(黄辉白). Studies on the relationship between anthocyanin biosynthesis and related enzymes in *Litchi pericarp*. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2004, 37(12): 2028–2032 (in Chinese with English abstract)
- [10] Lister C E, Lancaster J E. Developmental changes in enzymes of flavonoid biosynthesis in the skins of red and green apple cultivars. *J Sci Food Agric*, 1996, 71: 313–320
- [11] Yan B-J(晏本菊), Li H-X(李焕秀). The relationship between browning ratio in vitro PPO and phenols of pear explants. *J Sichuan Agric Univ* (四川农业大学学报), 1998, 16(3): 310–313 (in Chinese with English abstract)
- [12] Wang S-F(王淑芬). Synthesis of Pigments in Chinese Radish (*Raphanus sativus* L.) with Red Pulp and the Cloning of Anthocyanin Regulator Gene. PhD Dissertation of Shandong Agricultural University, 2006. p 37 (in Chinese with English abstract)
- [13] Zhou B, Li Y H, Xu Z R, Yan H F, Homma S, Kawabata S. Ultra-violet A-specific induction of anthocyanin biosynthesis in the swollen hypocotyls of turnip (*Brassica rapa*). *J Exp Bot*, 2007, 58: 1771–1781
- [14] Dooner H K, Ralston E. Light requirement for anthocyanin pigment of C aleurones. *Maize Genet Coop Newsl*, 1994, 66: 74–75
- [15] Arakawa O. Photoregulation of anthocyanin synthesis in apple fruit under UV-B and red light. *Plant Cell Physiol*, 1988, 29: 1385–1389
- [16] Zhou A-Q(周爱琴), Zhu J(祝军), Sheng J-P(生吉萍), Shen L(申琳), Sheng Z-J(生兆江). The relationship of anthocyanidin formation, PAL activity and protein content during apple colouring. *J China Agric Univ* (中国农业大学学报), 1997, 2(3): 97–99 (in Chinese with English abstract)
- [17] Feng S-Q(冯守千), Chen X-S(陈学森), Zhang C-Y(张春雨), Liu X-J(刘晓静), Liu Z-C(刘遵春), Wang H-B(王海波), Wang Y-L(王延玲), Zhou C-H(周朝华). A study of the relationship between anthocyanin biosynthesis and related enzymes activity in *Pyrus pyrifolia* 'Mantianhong' and its bud sports 'Aoguan'. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2008, 41(10): 3184–3190 (in Chinese with English abstract)
- [18] Zhao Y-P(赵云鹏), Chen F-D(陈发棣), Guo W-M(郭维明). Advances in genetic engineering of flower color of ornamental plants. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2003, 20(1): 51–58 (in Chinese with English abstract)
- [19] Wagner H, Obermeier G, Chari V M. Flavonoid-C-glycosides from *Triticum aestivum* L. *J Nat Prod*, 1980, 43: 583–587
- [20] He L-H(贺立红), Bin J-H(宾金华). Polyphenol oxidase in higher plants. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 2001, 37(4): 340–346 (in Chinese)
- [21] Nakayama T, Yonekura-Sakakibara K, Sato T, Kikuchi S. Aureusidin synthase: a poly phenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *Science*, 2000, 290: 1163–1166
- [22] Kader F, Irmouli M, Nicolas J P, Metche M. Proposed mechanism for the degradation of pelargonidin 3-glucoside by caffeic acid O-quinone. *Food Chem*, 2001, 75: 139–144
- [23] Li X-P(李杏普), Lan S-Q(兰素缺), Liu Y-P(刘玉平). Studies on pigment and its related physio-biochemical properties of blue or purple grain wheat. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2003, 29(1): 157–158 (in Chinese with English abstract)