DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.02030

不同品质类型小麦籽粒贮藏蛋白组分含量及相关酶活性

石 玉¹ 谷淑波¹ 于振文^{1,*} 许振柱²

¹ 山东农业大学农业部作物生理生态与栽培重点开放实验室, 山东泰安 271018; ² 中国科学院植物研究所植被与环境变化国家重点实验室, 北京 100093

摘 要: 以小麦品种藁城 8901、9411、济南 17、烟农 19、泰山 23 和鲁麦 21 为材料, 采用反相高效液相色谱法研究了不同小麦品种籽粒贮藏蛋白各组分含量积累动态及相关酶活性的差异。依据国家标准 GB/T17892-1999, 将 6 个品种分为一等强筋(I)、二等强筋(II)和中筋(III) 3 组。I 组和 II 组比较, 籽粒贮藏蛋白和总蛋白含量无显著差异, I 组籽粒谷蛋白含量高于 II 组, 醇溶蛋白含量与谷蛋白含量的比值(醇/谷比值)低于 II 组。花后 20~36 d, 籽粒醇溶蛋白含量为 II 组>I 组>III 组; 花后 20 d, 谷蛋白含量为 I 组显著高于 II 组和 III 组, 醇/谷比值为 II 组显著高于 I 组和 III 组; 花后 28 d 和 36 d, 谷蛋白含量为 I 组>II 组>III 组, 醇/谷比值为 II 组>III 组>I 组, 表明灌浆中后期谷蛋白和醇溶蛋白积累速率的不一致性, 导致不同品种醇/谷比值的差异。花后 12 d, I 组的高分子量谷蛋白亚基含量显著高于 II 组和 III 组; 花后 20 d 至成熟期, 为 I 组>II 组>III 组。不同组间低分子量谷蛋白亚基含量积累动态的差异与谷蛋白一致。花后 12 d 和 20 d, 旗叶谷氨酰胺合成酶活性与籽粒谷蛋白含量、高分子量谷蛋白亚基与低分子量谷蛋白亚基含量的比值(HMW/LMW)呈极显著或显著正相关, 而花后 20 d, 其活性与醇/谷比值呈显著负相关; 花后 20 d 和 28 d, 内肽酶活性与谷蛋白含量、HMW/LMW 呈极显著正相关, 与醇溶蛋白含量呈显著正相关, 说明在籽粒灌浆前中期旗叶谷氨酰胺合成酶活性高, 中后期内肽酶活性高, 则籽粒谷蛋白、醇溶蛋白含量及 HMW/LMW 高, 醇/谷比值低, 利于形成一等强筋小麦的蛋白质品质。

关键词: 小麦; 品质类型; 蛋白质组分; 变化动态; 酶活性

Contents of Protein Components Stored in Grains and Activities of Related Enzymes in Wheat Cultivars in Different Quality Types

SHI Yu¹, GU Shu-Bo¹, YU Zhen-Wen^{1,*}, and XU Zhen-Zhu²

¹ Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Cultivation, Ministry of Agriculture, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; ² State Key Laboratory of Vegetation and Environmental Change, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract: Stored protein content and its components are determinative factors of wheat processing quality. The activities of enzymes involved in nitrogen metabolism impact the accumulations of protein components. However, the effect of enzyme activities on stored protein content in grain is not clearly understood. In this study, we used six wheat cultivars grouped into type-I (GC8901 and 9411, first-class strong gluten), type-II (Jinan 17 and Yannong 19, second-class strong gluten), and type-III (Taishan 23, and Lumai 21, medium gluten) to observe the dynamic accumulations of stored protein components in grains and the activities of related enzymes in leaves during grain filling. The contents of total protein and stored protein were not significantly different between type-I and type-II, but type-I had higher glutenin content and lower ratio of Gli-to-Glu than type-II. Gliadin contents were presented with the order of type-II > type-I > type-III from 20 d after anthesis (DAA) to 36 DAA. Type-II had the highest ratio of Gli-to-Glu from 20 to 36 DAA, and type-III ranked the second and without significant difference with type-I at 20 DAA. Glutenin contents were presented with the order of type-I > type-II > type-III from 28 to 36 DAA. The accumulation rates of glutenin and gliadin contents at the medium-late filling stage were different among cultivars, which resulted in the difference of ratio of Gli-to-Glu. The HMW-GS content was higher in type-I than in type-II and type-III at 12 DAA, whereas showed the order of type-II > type-III > type-I from 20 DAA to maturity. The glutamine synthetase activity in flag leaf had positive correlations with

本研究由农业部现代小麦产业技术体系项目(nycytx-03)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 于振文, E-mail: yuzw@sdaa.edu.cn, Tel: 0538-8241484

第一作者联系方式: E-mail: shiyu@sdaa.edu.cn

Received(收稿日期): 2011-04-07; Accepted(接受日期): 2011-07-15; Published online(网络出版日期): 2011-09-06.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20110906.1106.025.html>

glutenin content ($P < 0.01$) and ratio of HMW/LMW ($P < 0.05$) at 12 DAA and 20 DAA, but a negative correlation with the ratio of Gli-to-Glu at 20 DAA ($P < 0.05$). The endopeptidase activity in flag leaf had positive correlations with glutenin content ($P < 0.01$), ratio of HMW/LMW ($P < 0.01$), and gliadin content ($P < 0.05$) at 20 DAA and 28 DAA. High GS activity at the early-medium filling stage and high EP activity at the medium-late filling stage resulted in high contents of glutenin and gliadin, high ratio of HMW/LMW, and low ratio of Gli-to-Glu, which is favorable for high processing quality of the first-class strong-gluten wheat.

Keywords: Wheat cultivar; Quality type; Protein component; Dynamic change; Enzyme activity

小麦籽粒蛋白质组分中, 醇溶蛋白和谷蛋白构成贮藏蛋白, 二者共同决定面团的黏弹性, 对小麦的加工品质具有重要作用^[1-3], 籽粒中具有较高的贮藏蛋白含量和 HMW/LMW 及较低的醇/谷比值, 有利于提高强筋小麦的加工品质^[4]。低醇/谷比值增加面团形成时间、揉面峰值阻力、最大抗延阻力和面包体积^[5-6], 而且谷蛋白含量、醇溶蛋白含量与面团形成时间、稳定时间和延伸性均呈极显著正相关^[7-8]。目前, 关于氮代谢相关酶活性与籽粒蛋白质组分含量关系的报道不多, 且结论不一致。有报道认为小麦旗叶谷氨酰胺合成酶活性与花后吸收氮量呈显著正相关^[8], 而与籽粒蛋白质含量相关不显著^[9-10], 但也有研究指出, 蛋白质含量与旗叶谷氨酰胺合成酶活性呈显著正相关^[11-12]。前人的研究主要侧重于不同小麦品种籽粒蛋白质组分含量差异及与加工品质的关系, 关于不同品质类型小麦籽粒贮藏蛋白各组分含量变化动态和相关酶活性的差异及相互关系报道甚少。本试验采用反相高效液相色谱法, 研究强筋和中筋小麦籽粒中醇溶蛋白、谷蛋白、高分子量谷蛋白亚基、低分子量谷蛋白亚基含量及醇/谷比值的变化动态和相关酶活性的差异, 以期为通过栽培措施调节不同品质类型小麦氮代谢相关酶活性、蛋白质组分含量, 改善籽粒加工品质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试品种与试验设计

2004—2006 连续两年度在山东农业大学实验农场进行田间试验。小麦播种前 0~20 cm 土层的土壤含有机质 1.21%、全氮 0.09%、碱解氮 76.5 mg kg⁻¹、速效磷 28.3 mg kg⁻¹ 和速效钾 82.0 mg kg⁻¹。2004—2005 年度供试品种为藁城 8901、9411、济南 17、烟农 19、泰山 23、鲁麦 21; 根据 2004—2005 年度测定结果按 GB/T17892-1999 标准将 6 个品种分为一等强筋(I 组)、二等强筋(II 组)和中筋(III 组)小麦, 2005—2006 年度从上一年的每一组品种中选 1 个, 即藁城 8901、济南 17 和泰山 23 进行重复试验。小区面积 1.5 m × 4.0 m = 6.0 m², 随机区组排列, 3 次重复。播种前每公顷底施纯氮 120 kg、P₂O₅ 135 kg 和 K₂O

105 kg, 拔节期结合浇水开沟追施纯氮 120 kg hm⁻²。2004 年 10 月 8 日播种, 2005 年 6 月 12 日收获; 2005 年 10 月 7 日播种, 2006 年 6 月 10 日收获, 基本苗为 150 株 m⁻²。其余管理措施同一般高产田。

在开花期选择和标记同日开花、长相一致的穗子。于花后 4、12、20、28、36 d 的 9:00~11:00 取标记单茎的旗叶, 置液氮中速冻, 立即贮于 -40℃ 冰箱备用。同时取籽粒置 70℃ 烘箱烘至恒重以测蛋白质组分含量。

1.2 籽粒蛋白质含量及其组分含量测定方法

按 GB2905-1982“谷类、豆类作物种子粗蛋白质测定法(半微量凯氏法)”测定籽粒氮素含量, 含氮量乘以指数 5.7 为蛋白质含量^[13]。

参照 Wieser 等的方法^[14]测定籽粒清蛋白+球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白含量。谷蛋白含量测定时可分离出高分子量谷蛋白亚基和低分子量谷蛋白亚基。色谱系统为 Waters 474 色谱仪+Waters 996 检测器(Waters, 美国), 样品环体积为 1.2 mL, 工作站软件为 Millium32。色谱柱为 Nucleosil 300-5 C8 柱(4 mm×240 mm)。试剂包括 A 液(0.4 mol L⁻¹ NaCl, 0.067 mol L⁻¹ HKNaPO₄, pH 7.6)、B 液(60%乙醇)和 C 液(50% 1-PrOH, 2 mol L⁻¹ 尿素, 0.05 mol L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.5, 氮气条件下 1% DTE)。

称取全麦粉 100 mg, 置 2 mL 离心管中, 加入 1.0 mL A 液, 漩涡振荡 2 min, 在 20℃ 条件下用 TMC5355 型恒温混合器(Eppendorf, 德国)振荡 10 min, 8 900×g 离心 1 min, 连续提取 2 次, 收集上清液(清蛋白和球蛋白), 并用提取液定容至 2 mL。残余物中加入 0.5 mL B 液, 漩涡振荡 2 min, 在 20℃ 条件下用 TMC5355 型恒温混合器振荡 10 min, 8 900×g 离心 20 min, 连续提取 3 次, 收集上清液(醇溶蛋白), 并用提取液定容至 1.5 mL。残余物在氮气条件下加入 1.0 mL C 液, 漩涡振荡 2 min, 在 60℃ 条件下再次振荡 20 min, 悬浮液在 20℃ 恒温下 8 900×g 离心 20 min, 连续提取 2 次, 收集上清液(谷蛋白), 并用提取液定容至 2 mL。样品测定前过 0.45 μm 滤膜, 在进样前后分别注入 0.1% (V/V)三氟乙酸 500 μL, 清

蛋白+球蛋白、醇溶蛋白、谷蛋白进样体积分别为200、80和100 μL 。

1.3 籽粒品质测定方法

用 Brabender 880101 小型实验磨 (德国)制粉, 出粉率为60%。用 Brabender 810106002 型粉质仪(德国)测定面团形成时间和面团稳定时间; 用BAU-A型沉降值仪(中国农业大学, 北京), 按 GB/T15685-1995 方法测定沉降值。

1.4 谷氨酰胺合成酶活性的测定方法

取4~5片旗叶, 去中脉及首尾部分, 剪碎后称取0.5 g, 加入50 mmol L^{-1} 咪唑(pH 8.0) 6 mL, 于HCl缓冲提取液(含2 mmol L^{-1} MgSO_4 , 0.5 mmol L^{-1} EDTA, 10 mmol L^{-1} β -巯基乙醇)中冰浴研磨, 4℃下15 000 $\times g$ 离心20 min, 上清液即为酶液。

参照 Oneal 的方法^[15], 取2份上述酶液各700 μL , 分别加入1.6 mL 反应混合液A (50 mmol L^{-1} 咪唑-HCl 缓冲液, pH 7.8, 含20 mmol L^{-1} MgSO_4 , 0.5 mmol L^{-1} EDTA, 60 mmol L^{-1} 谷氨酸和10 mmol L^{-1} ATP)和1.6 mL 反应混合液B (反应混合液A中加入10 mmol L^{-1} 盐酸羟胺), 混合均匀后, 于30℃水浴反应30 min, 然后加入1 mL 显色剂(0.2 mol L^{-1} TCA、0.37 mol L^{-1} FeCl_3 和0.6 mol L^{-1} HCl 混合液), 摇匀后放置片刻, 于5 000 $\times g$ 下离心10 min, 取上清液测定540 nm下的吸光值。用 γ -谷氨酰基羟氨酸做标准曲线, 以加入反应液B和反应液A的吸光值之差,

根据标准曲线查得酶活性。

1.5 内肽酶活性测定方法

1 g 旗叶加50 mmol L^{-1} Tris (pH 7.5) 5 mL 和少量石英沙冰浴研磨, HCl 缓冲液含4 mmol L^{-1} DTT、1 mmol L^{-1} EDTA和1% PVP, 然后15 000 $\times g$ 离心30 min, 上清液用于酶活性测定。

酶反应体系含100 mol L^{-1} 醋酸缓冲液(pH 4.8) 0.4 mL、溶解于醋酸缓冲液(pH 4.8)的0.05 mol L^{-1} 牛血红蛋白0.2 mL, 以及酶液0.4 mL。参照 Vernon 的方法^[16], 混合反应液于38℃保温1 h, 然后加10%三氯乙酸1 mL 终止反应(对照在反应前加入三氯乙酸), 4℃静置30 min, 4 000 $\times g$ 离心10 min, 上清液用于茚三酮反应。

用 Bechman UV-640 核酸-蛋白酶动力学分析仪(美国)测吸光值。

1.6 统计分析

用 Microsoft Excel 2003 软件计算数据和绘图。用 DPS 统计软件进行差异显著性检验(LSD 法)。

2 结果与分析

2.1 不同小麦品种籽粒蛋白质组分含量和加工品质的差异

按 GB/T17892-1999 标准将6个品种分为3组(表1), 其中藁城 8901 和 9411 属于一等强筋小麦(I 组); 济南 17 和烟农 19 属于二等强筋小麦(II 组); 泰山 23

表1 不同小麦品种籽粒蛋白质组分含量和加工品质性状的差异(2004–2005)
Table 1 Difference of grain protein component content and processing quality of different wheat cultivars in 2004–2005

品种 Cultivar	蛋白质组分含量 Content of protein component					加工品质 Processing quality			
	Alb+Glo (%)	Glu (%)	Gli (%)	GP (%)	Gli/Glu	TP (%)	DT (min)	ST (min)	WGC (%)
I 组 Type-I									
藁城 8901 GC 8901	2.91	3.63	5.65	9.28	1.56	14.13	7.2	20.6	36.4
9411	2.87	3.93	5.97	9.90	1.52	14.45	7.0	22.4	36.9
平均 Average	2.89 a	3.78 a	5.81 b	9.59 a	1.54 c	14.29 a	7.1 a	21.5 a	36.7 a
II 组 Type-II									
济南 17 Jinan 17	2.97	3.38	5.93	9.31	1.75	14.15	4.5	9.9	33.8
烟农 19 Yannong 19	3.06	3.31	6.29	9.60	1.90	14.30	4.7	9.5	34.3
平均 Average	3.02 a	3.35 b	6.11 a	9.46 a	1.82 a	14.23 a	4.6 b	9.7 b	34.1 b
III 组 Type-III									
泰山 23 Taishan 23	2.88	2.93	4.99	7.92	1.70	13.64	2.9	3.5	31.7
鲁麦 21 Lumai 21	2.86	2.70	4.31	7.01	1.60	11.42	3.0	2.8	28.6
平均 Average	2.87 a	2.82 c	4.65 c	7.47 b	1.65 b	12.53 b	3.0 c	3.2 c	30.2 c

Alb+Glo: 清蛋白+球蛋白; Glu: 谷蛋白; Gli: 醇溶蛋白; GP: 贮藏蛋白; Gli/Glu: 醇/谷比; TP: 总蛋白; DT: 形成时间; ST: 稳定时间; WGC: 湿面筋含量。各组平均值后的不同小写字母表示组间差异达0.05显著水平。

Alb+Glo: albumin + globulin; Glu: glutenin; Gli: gliadin; GP: gluten protein; Gli/Glu: ratio of Gli-to-Glu; TP: total protein; DT: development time; ST: stability time; WGC: wet gluten content. Different letters after averages indicate significant difference among cultivar types at $P < 0.05$.

鲁麦 21 介于强筋小麦和弱筋小麦之间, 属于中筋小麦(III 组)。

谷蛋白含量、面团形成时间、面团稳定时间和湿面筋含量由 I 组至 III 组显著降低, 表明一等强筋小麦品种的上述指标值高, 二等强筋小麦居中, 中筋小麦低; I 组和 II 组的贮藏蛋白与总蛋白含量显著高于 III 组, 说明强筋小麦具有较高的贮藏蛋白含量和总蛋白质含量; 醇溶蛋白含量为 II 组>I 组>III 组。I 组和 II 组比较, 贮藏蛋白和总蛋白含量无显著差异, I 组具有较高的谷蛋白含量和较低的醇/谷比值及高面团稳定时间和沉降值, 表明在总蛋白质含量和贮藏蛋白含量无显著差异的条件下, 具有较高的谷蛋白含量和较低的醇/谷比值是形成一等强筋小麦品质的基础。第 2 年重复试验结果与第 1 年一致(表 2)。

2.2 不同小麦品种籽粒成熟期谷蛋白各组分含量

参照 RP-HPLC 分析方法, 将谷蛋白洗脱为 3 部分, 未发生重叠, 包括 ω b-醇溶蛋白(8.0~17.5 min)、高分子量谷蛋白亚基(17.5~27.5 min)和低分子量谷蛋白亚基(27.5~53.0 min), 各品种低分子量谷蛋白亚基含量最高, 高分子量谷蛋白亚基次之, ω b-醇溶蛋白含量最低。不同品种的谷蛋白分离峰面积明显不同, 9411 的谷蛋白含量、高分子量谷蛋白亚基和低分子量谷蛋白亚基含量最高, 烟农 19 次之, 鲁麦 21 最低(图 1)。

2.3 不同小麦品种籽粒谷蛋白和醇溶蛋白含量的变化动态

各组品种谷蛋白含量随灌浆进程不断增加(表 3)。花后 12 d, 组间谷蛋白含量无显著差异; 花后 20 d, 为 I 组>II 组、III 组, 表明此时一等强筋小麦籽粒谷蛋白积累能力显著高于 II 组和 III 组; 花后 28 d 和 36 d, 谷蛋白含量为 I 组>II 组>III 组, 表明灌浆中后期是导致不同品质类型小麦籽粒谷蛋白含量显著差异的重要时期。

随灌浆进程各组醇溶蛋白含量不断增加(表 3)。

花后 12 d, I 组和 II 组的醇溶蛋白含量显著高于 III 组, 表明强筋小麦的醇溶蛋白在灌浆前期积累能力高于中筋小麦; 开花 20 d 至成熟, 醇溶蛋白含量为 II 组>I 组>III 组, 表明醇溶蛋白含量高的二等强筋小麦在开花 20 d 以后保持强的醇溶蛋白合成能力。

2.4 不同小麦品种籽粒醇/谷比值的变化动态

在小麦籽粒灌浆过程中, 各组品种籽粒醇/谷比值变化趋势相同, 均为先增加后下降, 在花后 28 d 达峰值(表 4), 说明虽然谷蛋白和醇溶蛋白均为贮藏蛋白, 但二者的积累速率并非一致。花后 12 d, 3 组间醇/谷比值无显著差异; 花后 20 d, II 组显著高于 I 组和 III 组; 花后 28 d 和 36 d, 为 II 组>III 组>I 组, 说明灌浆中后期组间醇溶蛋白和谷蛋白积累速率的差异, 造成不同品种醇溶蛋白和谷蛋白比值的不同, 灌浆中后期是影响不同品质类型小麦醇/谷比值产生显著差异的重要时期。

2.5 不同小麦品种籽粒高分子量谷蛋白亚基和低分子量谷蛋白亚基含量的变化动态

各组品种高分子量谷蛋白亚基含量随灌浆进程不断增加(表 5)。开花后 12 d, I 组的高分子量谷蛋白亚基含量显著高于 II 组和 III 组, II 组和 III 组无显著差异, 表明在灌浆前期 I 组品种的高分子量谷蛋白亚基合成能力显著高于 II 组和 III 组; 开花 20 d 至成熟期, 为 I 组>II 组>III 组, 说明在开花 12 d 后, 不同品质类型小麦籽粒的高分子量谷蛋白亚基积累能力出现显著差异, 导致成熟期籽粒的高分子量谷蛋白亚基含量不同。

各组品种低分子量谷蛋白亚基含量随灌浆进程不断增加(表 5)。组间比较, 花后 12 d, 3 组的低分子量谷蛋白亚基含量无显著差异; 花后 20 d, 为 I 组显著高于 II 组和 III 组, 说明此时一等强筋小麦的低分子量谷蛋白亚基合成能力显著高于二等强筋和中筋小麦; 花后 28 d 和 36 d, 为 I 组>II 组>III 组, 与谷

表 2 不同小麦品种籽粒蛋白质组分含量和加工品质性状的差异(2005–2006)
Table 2 Difference of grain protein component content and processing quality of different wheat cultivars in 2005–2006

品种 Cultivar	蛋白质组分含量 Content of protein component					加工品质 Processing quality			
	Alb+Glo (%)	Glu (%)	Gli (%)	GP (%)	Gli/Glu	TP (%)	DT (min)	ST (min)	WGC (%)
藁城 8901 GC 8901	2.96 a	3.58 a	5.61 b	9.19 a	1.57 c	14.09 a	6.8 a	18.8 a	35.2 a
济南 17 Jinan 17	3.02 a	3.30 b	5.94 a	9.24 a	1.80 a	14.10 a	4.1 b	8.7 b	32.9 b
泰山 23 Taishan 23	2.93 a	2.89 c	4.90 c	7.79 b	1.70 b	13.52 b	3.0 c	3.2 c	31.0 c

Alb+Glo: 清蛋白+球蛋白; Glu: 谷蛋白; Gli: 醇溶蛋白; GP: 贮藏蛋白; Gli/Glu: 醇/谷比; TP: 总蛋白; DT: 形成时间; ST: 稳定时间; WGC: 湿面筋含量。数据后不同小写字母表示品种间差异达 0.05 显著水平。

Alb+Glo: albumin + globulin; Glu: glutenin; Gli: gliadin; GP: gluten protein; Gli/Glu: ratio of Gli-to-Glu; TP: total protein; DT: development time; ST: stability time; WGC: wet gluten content. Values within a column followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$.

图 1 不同小麦品种籽粒谷蛋白分离图谱(2004–2005)
Fig. 1 Elution profiles of grain glutenins of different wheat cultivars by RP-HPLC in 2004–2005

蛋白含量趋势相同,说明籽粒灌浆中后期是导致不同品质类型小麦低分子量谷蛋白亚基含量显著差异的重要时期。

2.6 不同小麦品种旗叶谷氨酰胺合成酶和内肽酶活性的变化动态

各组品种小麦旗叶谷氨酰胺合成酶活性变化均呈慢-快-慢的降低趋势(表 6)。花后 4 d, 谷氨酰胺合成酶活性为 I 组和 II 组显著大于 III 组,表明此时 I 组和 II 组品种的旗叶谷氨酰胺合成酶活性高,氮的同化效率高;花后 12 d 和 20 d, 为 I 组>II 组>III 组;花后 28 d 和 36 d, 各组间无显著差异。

在营养器官的衰老过程中,旗叶内肽酶活性可反映旗叶中蛋白质降解能力。在籽粒灌浆过程中,旗叶内肽酶活性逐渐升高,开花后 20 d 达最高水平,之后迅速下降。组间比较,花后 4 d 和 12 d, 3 组内肽酶活性无显著差异;花后 20 d 和 28 d, I 组>II 组>III 组,表明这一时期由 I 组至 III 组旗叶蛋白质水解能力显著降低,旗叶蛋白质向籽粒蛋白质转化减少;至花后 36 d, 3 组的内肽酶活性无显著差异(表 6)。

2.7 旗叶氮代谢相关酶活性与籽粒蛋白质组分含量的关系

开花后 4 d, 旗叶谷氨酰胺合成酶活性与籽粒总蛋白质、谷蛋白、醇溶蛋白含量呈显著或极显著正相关(表 7),表明小麦籽粒灌浆前期旗叶谷氨酰胺合成酶活性高,有利于籽粒中总蛋白质、谷蛋白、醇

表 3 不同小麦品种籽粒谷蛋白和醇溶蛋白含量的变化动态(2004–2005)
Table 3 Dynamic changes in gluten and gliadin contents in kernel of different wheat cultivars in 2004–2005

品种 Cultivar	谷蛋白含量 Glutenin content (%)				醇溶蛋白含量 Gliadin content (%)			
	12 DAA	20 DAA	28 DAA	36 DAA	12 DAA	20 DAA	28 DAA	36 DAA
I 组 Type-I								
藁城 8901 GC8901	0.65	1.14	2.10	3.63	0.94	1.71	3.40	5.65
9411	0.78	1.22	2.30	3.93	1.13	1.82	3.84	5.97
平均 Average	0.72 a	1.18 a	2.20 a	3.78 a	1.04 a	1.77 b	3.62 b	5.81 b
II 组 Type-II								
济南 17 Jinan 17	0.72	1.03	1.95	3.38	1.07	1.90	3.80	5.93
烟农 19 Yannong 19	0.70	1.09	2.03	3.31	1.00	1.80	4.00	6.29
平均 Average	0.71 a	1.06 b	1.99 b	3.35 b	1.04 a	1.85 a	3.90 a	6.11 a
III 组 Type-III								
泰山 23 Taishan 23	0.72	1.10	1.82	2.93	0.98	1.80	3.30	4.99
鲁麦 21 Lumai 21	0.61	0.99	1.76	2.7	0.90	1.49	3.18	4.31
平均 Average	0.67 a	1.05 b	1.79 c	2.82 c	0.94 b	1.65 c	3.24 c	4.65 c

DAA: 开花后天数。各组平均值后的不同小写字母表示组间差异达 0.05 显著水平。
DAA: days after anthesis. Values followed by different letters are significantly different among cultivar types at $P < 0.05$.

表 4 不同小麦品种籽粒醇/谷比值的变化动态(2004–2005)

Table 4 Dynamic changes in Glu/Gli in kernel of different wheat cultivars in 2004–2005

品种 Cultivar	12 DAA	20 DAA	28 DAA	36 DAA
I 组 Type-I				
藁城 8901 GC8901	1.45	1.50	1.62	1.56
9411	1.45	1.49	1.67	1.52
平均 Average	1.45 a	1.50 b	1.64 c	1.54 c
II 组 Type-II				
济南 17 Jinan 17	1.49	1.84	1.95	1.75
烟农 19 Yannong 19	1.43	1.65	1.97	1.90
平均 Average	1.46 a	1.75 a	1.96 a	1.83 a
III 组 Type-III				
泰山 23 Taishan 23	1.36	1.64	1.81	1.70
鲁麦 21 Lumai 21	1.48	1.51	1.81	1.60
平均 Average	1.42 a	1.57 b	1.81 b	1.65 b

DAA: 开花后天数。各组平均值后的不同小写字母表示组间差异达 0.05 显著水平。

DAA: days after anthesis. Values followed by different letters are significantly different among cultivar types at $P < 0.05$.

表 5 不同小麦品种籽粒高分子量和低分子量谷蛋白亚基含量的变化动态(2004–2005)

Table 5 Dynamic changes in HMW-GS and LMW-GS contents in kernel of different wheat cultivars in 2004–2005

品种 Cultivar	HMW-GS content (%)				LMW-GS content (%)			
	12 DAA	20 DAA	28 DAA	36 DAA	12 DAA	20 DAA	28 DAA	36 DAA
I 组 Type-I								
藁城 8901 GC8901	0.14	0.30	0.58	1.13	0.50	0.83	1.51	2.46
9411	0.19	0.31	0.65	1.21	0.57	0.90	1.63	2.69
平均 Average	0.17 a	0.31 a	0.62 a	1.17 a	0.54 a	0.87 a	1.57 a	2.58 a
II 组 Type-II								
济南 17 Jinan 17	0.13	0.25	0.51	0.90	0.57	0.78	1.43	2.41
烟农 19 Yannong 19	0.12	0.27	0.43	0.89	0.55	0.81	1.56	2.35
平均 Average	0.13 b	0.26 b	0.47 b	0.90 b	0.56 a	0.80 b	1.50 b	2.38 b
III 组 Type-III								
泰山 23 Taishan 23	0.12	0.25	0.38	0.71	0.60	0.85	1.43	2.17
鲁麦 21 Lumai 21	0.10	0.18	0.31	0.71	0.51	0.77	1.44	1.96
平均 Average	0.11 b	0.21 c	0.35 c	0.71 c	0.56 a	0.81 b	1.44 c	2.07 c

DAA: 开花后天数。各组平均值后的不同小写字母表示组间差异达 0.05 显著水平。

DAA: days after anthesis. Values followed by different letters are significantly different among cultivar types at $P < 0.05$.

表 6 不同小麦品种旗叶谷氨酰胺合成酶和内肽酶活性的变化动态(2004–2005)

Table 6 Dynamic changes in GS and EP activities in flag leaf of different wheat cultivars in 2004–2005

品种 Cultivar	GS activity ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$)					EP activity ($\mu\text{mol } \alpha\text{-NH}_2 \text{g}^{-1} \text{FW h}^{-1}$)				
	4 DAA	12 DAA	20 DAA	28 DAA	36 DAA	4 DAA	12 DAA	20 DAA	28 DAA	36 DAA
I 组 Type-I										
藁城 8901 GC8901	31.00	29.50	15.10	8.00	3.10	0.87	0.98	1.50	0.53	0.08
9411	32.20	31.00	16.40	8.70	4.30	0.81	0.80	1.59	0.56	0.13
平均 Average	31.60 a	30.25 a	15.75 a	8.35 a	3.70 a	0.84 a	0.89 a	1.55 a	0.55 a	0.11 a
II 组 Type-II										
济南 17 Jinan 17	32.10	29.70	13.20	7.60	4.00	0.75	0.89	1.23	0.42	0.10
烟农 19 Yannong 19	31.40	27.60	12.60	8.60	2.40	0.83	0.84	1.34	0.47	0.08
平均 Average	31.75 a	28.65 b	12.90 b	8.10 a	3.20 a	0.79 a	0.87 a	1.29 b	0.45 b	0.09 a
III 组 Type-III										
泰山 23 Taishan 23	29.70	27.60	11.10	8.90	4.20	0.80	0.87	1.07	0.36	0.12
鲁麦 21 Lumai 21	28.60	26.70	11.40	7.70	3.60	0.79	0.80	0.90	0.35	0.07
平均 Average	29.15 b	27.15 c	11.25 c	8.30 a	3.90 a	0.80 a	0.84 a	0.99 c	0.36 c	0.10 a

DAA: 开花后天数。各组平均值后的不同小写字母表示组间差异达 0.05 显著水平。

DAA: days after anthesis. Values followed by different letters are significantly different among cultivar types at $P < 0.05$.

表 7 旗叶谷氨酰胺合成酶和内肽酶活性与籽粒蛋白质各组分含量的相关关系(2004–2005)

Table 7 Correlation coefficients between GS and EP activities in flag leaves and protein components contents in grain in 2004–2005

开花后天数 Days after anthesis (d)	总蛋白质 Total protein	谷蛋白 Glutenin	醇溶蛋白 Gliadin	醇/谷比 Ratio of Gli-to-Glu	HMW/LMW
谷氨酰胺合成酶活性 GS activity					
4	0.8841*	0.8722**	0.9334**	0.1303	0.5480
12	0.5524	0.8283**	0.4318	−0.5684	0.8952**
20	0.1106	0.6388*	0.0323	−0.8879**	0.8306**
28	0.4310	0.1945	0.2415	0.1189	0.0066
36	−0.0545	−0.1544	−0.3821	−0.3458	−0.3221
内肽酶活性 EP activity					
4	0.2477	0.3438	0.1895	−0.2002	0.5895
12	0.3744	0.2370	0.2109	−0.0404	0.2684
20	0.8207**	0.9770**	0.7963*	−0.2205	0.8730**
28	0.7152*	0.9621**	0.7517*	−0.2661	0.9031**
36	0.4974	0.4223	0.2379	−0.2437	0.1014

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

溶蛋白合成; 花后 12 d 和 20 d, 旗叶谷氨酰胺合成酶活性与籽粒谷蛋白含量和 HMW/LMW 呈极显著或显著正相关, 表明灌浆中期旗叶的谷氨酰胺合成酶是与谷蛋白合成有关的酶类; 花后 20 d, 旗叶谷氨酰胺合成酶活性与醇/谷比值呈显著负相关, 说明此时旗叶中谷氨酰胺合成酶活性高, 籽粒谷蛋白合成速率的增加幅度高于醇溶蛋白。

花后 20 d 和 28 d, 旗叶内肽酶活性与总蛋白含量呈极显著或显著正相关, 与谷蛋白含量和 HMW/LMW 均呈极显著正相关, 与醇溶蛋白含量呈显著正相关, 表明在籽粒蛋白质积累中后期维持较高的旗叶内肽酶活性, 有利于获得较高的谷蛋白和蛋白质含量。

3 讨论

关于小麦籽粒谷蛋白和醇溶蛋白含量变化的研究, 有报道指出随籽粒灌浆进程, 谷蛋白和醇溶蛋白含量不断上升^[17], 另有研究表明, 醇溶蛋白含量变化呈“高—低—高”的趋势, 谷蛋白含量随籽粒发育而逐渐升高, 且始终高于醇溶蛋白含量^[18]。不同小麦品种籽粒贮藏蛋白各组分含量积累动态特性的比较, 特别是分析其与相关酶活性的关系的研究报道甚少。本试验表明, 谷蛋白和醇溶蛋白含量均随籽粒发育进程不断增加, 高分子量谷蛋白亚基和低分子量谷蛋白亚基含量变化与谷蛋白含量变化一致。

朱云集等^[19]指出, 不同品种谷蛋白积累量在花后 15 d 以前无显著差异, 开花 20 d 后差异显著。朱新开等^[18]发现, 在籽粒形成期强筋小麦谷蛋白含量

较高, 弱筋小麦醇溶蛋白含量较高; 籽粒乳熟期, 弱筋小麦的谷蛋白和醇溶蛋白含量显著低于中筋和强筋小麦; 至成熟期, 醇溶蛋白和谷蛋白的含量均为强筋小麦>中筋小麦>弱筋小麦。本研究表明, 醇溶蛋白含量高的二等强筋小麦在开花 20 d 后即保持较强的醇溶蛋白合成能力。各品种籽粒谷蛋白含量花后 12 d 无显著差异, 花后 20 d, 一等强筋显著高于二等强筋和中筋小麦, 花后 28 d 和 36 d, 一等强筋显著高于二等强筋, 二等强筋显著高于中筋小麦, 表明籽粒灌浆中后期是导致不同品质类型小麦谷蛋白含量显著差异的重要时期。

醇/谷比值是影响面包烘焙品质和馒头品质的一项重要指标^[20]。前人关于籽粒成熟期醇/谷比值与加工品质的关系进行了诸多研究^[4,20-22]。Weegels 等^[21]指出适当的醇/谷比值可获得较高的面包比容和面包评分; Wieser 等^[6]和 Scanlon 等^[22]研究表明, 低醇/谷比值增加面团形成时间、揉面峰值阻力、最大抗延阻力和面包体积。而关于不同品质类型小麦的醇/谷比值积累动态差异研究尚少。本试验表明, 在籽粒灌浆期, 醇/谷比值的变化曲线呈先增加后降低的趋势, 花后 28 d 达到峰值, 花后 20 d, 醇/谷比值为 II 组显著高于 I 组和 III 组, 花后 28 d 和 36 d, 为 II 组>III 组>I 组, 说明灌浆中后期组间谷蛋白和醇溶蛋白积累能力的差异, 造成醇溶蛋白和谷蛋白含量比值的不同, 从而形成不同品质类型小麦的加工品质。

谷氨酰胺合成酶在高等植物含氮有机物的合成中作为氮的供体, 为籽粒蛋白质合成提供氨基酸源^[23-24]。旗叶中谷氨酰胺合成酶活性高, 则叶片中无机态氮转

化成有机态氮的效率^[25]。内肽酶是蛋白质水解的关键酶。有报道指出, 小麦籽粒蛋白质含量与旗叶谷氨酰胺合成酶活性呈显著正相关^[10-11], 亦有研究表明, 灌浆前中期具有较高的旗叶谷氨酰胺合成酶活性和灌浆中后期具有较高的旗叶内肽酶活性, 是籽粒具有较高谷蛋白大聚合体含量的生理基础^[25]。本试验表明, 灌浆前中期旗叶谷氨酰胺合成酶活性高, 利于籽粒谷蛋白和醇溶蛋白的合成, 且获得低的醇/谷比值; 花后 20 d 和 28 d, 内肽酶活性与谷蛋白和醇溶蛋白含量分别呈极显著和显著正相关。说明籽粒灌浆前中期旗叶谷氨酰胺合成酶活性高, 旗叶氮素吸收同化能力强, 灌浆中后期旗叶内肽酶活性高, 利于蛋白质降解, 则籽粒谷蛋白、醇溶蛋白含量高, 醇/谷比值低, 利于形成一等强筋小麦的蛋白质品质。本试验选用 6 个品种进行试验, 还需要选用更多的品种进一步研究, 并探讨通过调节有关酶活性来改善小麦蛋白质加工品质的生理机制。

4 结论

籽粒灌浆中后期是导致不同品质类型小麦谷蛋白含量、醇溶蛋白含量显著差异的重要时期。花后 12 d, I 组的高分子量谷蛋白亚基含量显著高于 II 组和 III 组; 花后 20 d 至成熟期, 为 I 组>II 组>III 组; 不同品质类型小麦低分子量谷蛋白亚基含量在灌浆中后期差异显著。在籽粒灌浆期, 醇/谷比值的变化曲线呈先增加后降低的趋势, 花后 28 d 达到峰值, 花后 20 d, II 组显著高于 I 组和 III 组, 花后 28 d 和 36 d, 为 II 组>III 组>I 组。花后 12 d 和 20 d, 旗叶谷氨酰胺合成酶活性与籽粒谷蛋白含量、HMW/LMW 呈极显著或显著正相关, 花后 20 d, 其活性与醇/谷比值呈显著负相关; 花后 20 d 和 28 d, 内肽酶活性与谷蛋白含量、HMW/LMW 比值均呈极显著正相关, 与醇溶蛋白含量呈显著正相关。

References

- [1] D'Ovidio R, Masci S. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *J Cereal Sci*, 2004, 39: 321-339
- [2] Liu L(刘丽), Zhou Y(周阳), He Z-H(何中虎), Wang D-S(王德森), Zhang Y(张艳), Peña R J. Effect of allelic variation in HMW and LMW glutenin subunits on the processing quality in common wheat. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2004, 37(1): 8-14 (in Chinese with English abstract)
- [3] Zhang P P, He Z H, Zhang Y, Xia X C, Chen D S, Zhang Y. Association between SDS-unextractable polymeric protein (%UPP) and end use quality in Chinese bread wheat cultivars. *Cereal Chem*, 2008, 85: 696-700
- [4] Shi Y(石玉), Zhang Y-L(张永丽), Yu Z-W(于振文). Contents of grain protein components and their relationships to processing quality in wheat. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2009, 35(7): 1306-1312 (in Chinese with English abstract)
- [5] Zhang P P, He Z H, Zhang Y, Xia X C, Liu J J, Yan J, Zhang Y. Pan bread and Chinese white salted noodle qualities of Chinese winter wheat cultivars and their relationship with gluten protein fractions. *Cereal Chem*, 2007, 84: 370-378
- [6] Wieser H, Kieffer R. Correlations of the amount of gluten protein types to the technological properties of wheat flours determined on a micro-scale. *J Cereal Sci*, 2001, 34: 19-27
- [7] Tang J-W(唐建卫), Liu J-J(刘建军), Zhang P-P(张平平), Zhang Y(张艳), Li H-S(李豪圣), Zhao Z-D(赵振东), Qu Y-Y(曲延英), He Z-H(何中虎). Dough properties and loaf quality stability in wheat cultivar Jimai 20 and their relationship with protein fractions. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2007, 33(11): 1788-1793 (in Chinese with English abstract)
- [8] Tang J-W(唐建卫), Liu J-J(刘建军), Zhang P-P(张平平), Zhang Y(张艳), Xiao Y-G(肖永贵), Qu Y-Y(曲延英), Zhang Y(张勇), He Z-H(何中虎). Effects of gluten protein fractions on dough property and products quality in common wheat. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2008, 41(10): 2937-2946 (in Chinese with English abstract)
- [9] Wang Y-F(王月福), Yu Z-W(于振文), Li S-X(李尚霞), Yu S-L(余松烈). Effect of nitrogen nutrition on the change of key enzyme activity during the nitrogen metabolism and kernel protein content in winter wheat. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2002, 28(6): 743-748 (in Chinese with English abstract)
- [10] Sun M(孙敏), Guo P-Y(郭平毅), Gao Z-Q(高志强), Wang P(王鹏), Shi J(时静), Miao G-Y(苗果园). Protein accumulation in grains of wheat cultivars differing in drought tolerance and its regulation by nitrogen application amount under irrigated and dryland conditions. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2010, 36(3): 486-495 (in Chinese with English abstract)
- [11] Ma X-M(马新明), Li L(李琳), Zhao P(赵鹏), Xiong S-P(熊淑萍), Guo F(郭飞). Effects of water control on activities of nitrogen assimilation enzymes and grain quality in winter wheat. *Acta Phytoecol Sin* (植物生态学报), 2005, 29(1): 48-53 (in Chinese with English abstract)
- [12] Wang X-C(王小纯), Xiong S-P(熊淑萍), Ma X-M(马新明), Zhang J-J(张娟娟), Wang Z-Q(王志强). Effects of different nitrogen forms on key enzyme activity involved in nitrogen metabolism and grain protein content in speciality wheat cultivar. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 2005, 25(4): 802-807 (in Chinese with English abstract)
- [13] He Z-F(何照范). Analytical Techniques for Grain Quality of Cereals and Oils (粮油籽粒品质及分析技术). Beijing: Agriculture Press, 1985. pp 37-41 (in Chinese)
- [14] Wieser H, Antes S, Seilmeier W. Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem*, 1998, 75:

- 644–650
- [15] Oneal D, Joy K W. Glutamine synthetase of pea leaves-divalent cation effects, substrate specificity, and other properties. *Plant Physiol*, 1974, 54: 773–779
- [16] Vernon A W. Ribulose biphosphate carboxylase and protenlytic activity in wheat leafs from anthesis through senescence. *Plant Physiol*, 1979, 64: 884–887
- [17] Zhang J(张晶), Wang J-A(王姣爱), Dang J-Y(党建友), Zhang D-Y(张定一). Effect of nitrogen application rate on dynamic changes of grain protein and composition content in wheat. *Acta Agric Boreali-Occident Sin* (西北农业学报), 2010, 19(4): 58–61 (in Chinese with English abstract)
- [18] Zhu X-K(朱新开), Zhou J-L(周君良), Feng C-N(封超年), Gou W-S(郭文善), Peng Y-X(彭永欣). Differences of protein and its component accumulation in wheat for different end uses. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(3): 342–347 (in Chinese with English abstract)
- [19] Zhu Y-J(朱云集), Ma D-Y(马冬云), Li X-Y(李向阳), Guo T-C(郭天财), Wang C-Y(王晨阳). Accumulation dynamics of protein and starch components in grain of two winter wheat cultivars with different canopy temperature characteristics during the filling stage. *J Plant Ecol* (植物生态学报), 2006, 30(2): 352–358 (in Chinese with English abstract)
- [20] Zhang P P, He Z H, Chen D S, Zhang Y, Larroque O R, Xia X C. Contribution of common wheat protein fractions to dough properties and quality of northern-style Chinese steamed bread. *J Cereal Sci*, 2007, 46: 1–10
- [21] Weegels P L, Hamer R J, Schofield J D. Functional properties of wheat glutenin. *J Cereal Sci*, 1996, 23: 1–18
- [22] Scanlon M G, Ng P K W, Lawless D E, Bushuk W. Suitability of reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of wheat proteins for long-term statistical assessment of bread making quality. *Cereal Chem*, 1990, 67: 395–399
- [23] Paula M M, Ligia M L, Isabel M S. Expression of the plastid-located glutamine synthase of *Medicago truncatula*: accumulation of the precursor in root nodules reveals an in vivo control at the level of protein import into plastids. *Plant Physiol*, 2003, 132: 390–399
- [24] Dai T-B(戴廷波), Cao W-X(曹卫星), Sun C-F(孙传范), Jiang D(姜东), Jing Q(荆奇). Effect of enhanced ammonium nutrition on photosynthesis and nitrate reductase and glutamine synthetase activities of winter wheat. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 2003, 14(9): 1529–1532 (in Chinese with English abstract)
- [25] Wang X-Y(王小燕), Yu Z-W(于振文). Differences in characteristics of quality and related enzymes activity of different wheat cultivars. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2005, 38(10): 1980–1988 (in Chinese with English abstract)