

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2013.01856

## 反义 *Trxs* 基因导入对弱筋小麦豫麦 18 淀粉积累及淀粉合成关键酶表达的影响

任江萍 王亚英 王新国 王娜 陈新 孟晓丹 李永春 尹钧\*

河南农业大学 / 国家小麦工程技术研究中心, 河南郑州 450002

**摘要:** 以转反义硫氧还蛋白基因小麦 TY18-99 和 TY18-100 及其相应未转基因对照为材料, 于 2007—2009 年通过盆栽试验系统研究了反义 *Trxs* 基因(*anti-Trxs*)导入对弱筋小麦豫麦 18 籽粒灌浆过程中淀粉积累、淀粉合成关键酶活性以及淀粉合成酶基因表达的影响。结果表明, 反义 *Trxs* 基因对小麦籽粒淀粉积累有一定的正效应。2 个转基因株系的总淀粉和支链淀粉的积累速率较对照显著提高; 在整个籽粒形成过程中, 反义 *Trxs* 基因导入显著提高了淀粉分支酶(SBE)活性。在籽粒灌浆中期和后期, 反义 *Trxs* 基因导入显著提高了腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(AGPase)和可溶性淀粉合酶(SSS)活性, 降低了颗粒束缚型淀粉合酶(GBSS)活性。实时荧光定量 RT-PCR 分析表明, 反义 *Trxs* 基因促进了 *AGPase*、*SBE I* 和 *SSS* (*SSS I*、*SSS II* 和 *SSS III*)基因的表达, 抑制了 *GBSS I* 基因的表达。上述结果说明, 反义 *Trxs* 基因导入后促进了 *AGPase*、*SBE I* 和 *SSS* 基因的转录, 从而使籽粒灌浆期间的淀粉积累速率发生了改变, 最终显著提高了总淀粉和支链淀粉的含量, 降低了直链淀粉含量, 进而提高了淀粉的支/直比, 这可能是转基因小麦淀粉品质改善和产量提高的主要原因。

**关键词:** 小麦; 反义 *Trxs* 基因; 淀粉合成酶

## Effects of Antisense Thioredoxin *s* on Starch Accumulation and Expressions of Enzymes Related to Starch Synthesis in Weak-gluten Wheat Cultivar Yumai 18

REN Jiang-Ping, WANG Ya-Ying, WANG Xin-Guo, WANG Na, CHEN Xin, MENG Xiao-Dan, LI Yong-Chun, and YIN Jun\*

Henan Agricultural University / National Engineering Research Centre for Wheat, Zhengzhou 450002, China

**Abstract:** To clarify the functional mechanisms of starch accumulation by the antisense-thioredoxin *s* (*anti-Trxs*) gene into wheat, we conducted a pot experiment using two transgenic wheat lines, TY18-99 and TY18-100, and their wild type “Yumai 18” from October 2007 to June 2009. The effects of the *anti-Trxs* on starch accumulation and key enzymes involved in starch synthesis were compared between the transgenic lines and the wild type. Results indicated that the rates of starch and amylopectin accumulations in grain were significantly higher in the transgenic lines than in the wild type. During the whole grain-filling period, activity of starch-branching enzyme (SBE) in the transgenic lines increased significantly by 49.2% compared with that in the wild type. At late grain-filling stage, activities of ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) and soluble starch synthase (SSS) in the transgenic lines increased by 45.8% and 16.0%, respectively. However, activity of granule-bound starch synthase (GBSS) in the transgenic lines had no significant variation. The real-time RT-PCR assay indicated that the introduction of *anti-Trxs* resulted in increased expressions of *SSS* (*SSS I*, *SSS II*, and *SSS III*), *SBE I*, and *AGPase* genes and reduction of *GBSS I* transcription. Therefore, the enhanced expressions of *AGPase*, *SBE I*, and *SSS* may be the main reason for increase in starch synthesis in *anti-Trxs* transgenic lines.

**Keywords:** Wheat; Anti-sense thioredoxin *s* gene; Starch synthesis enzymes

本研究由国家自然科学基金项目(30771332, 30971771)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 尹钧, E-mail: xmxxyj@126.com, Tel: 0371-63558203

第一作者联系方式: E-mail: xmxrjp@126.com, Tel: 0371-63558215

Received(收稿日期): 2013-01-04; Accepted(接受日期): 2013-05-25; Published online(网络出版日期): 2013-08-01.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20130801.1725.001.html>

硫氧还蛋白 h (thioredoxin h, Trxh) 是一类广泛存在于生物体内的多功能活性蛋白, 它能够通过氧化还原二硫键来参与生物体内的一系列生化反应<sup>[1]</sup>。在种子萌发期间, Trxh 通过还原小麦水解酶抑制蛋白的双硫键, 促进淀粉酶和蛋白质酶活性、增加贮藏蛋白的水溶性, 动员贮藏物质的水解, 从而促进种子萌发<sup>[2-3]</sup>。Ballicora 等<sup>[4]</sup>报道, Trxh 能还原 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶, 从而提高它与主要活化剂 3-磷酸甘油酸的亲和力, 促进淀粉的合成。Wong 等<sup>[5]</sup>发现花后 10 d 的小麦种子中, Trxh 对与淀粉和蛋白质等合成有关的酶及蛋白质有明显的促进作用。源于蓝色鹼草(*Phalaris coerulea*)的硫氧还蛋白 s (thioredoxin s, Trxs) 基因与 *Trxh* 基因同属于硫氧还蛋白基因家族, cDNA 序列有较高的同源性, 其蛋白质表达产物有相同的活性中心和相似的生物活性<sup>[6-7]</sup>。2003 年, 我们将 *Trxs* 基因的反义结构导入普通小麦豫麦 18 中<sup>[8-9]</sup>。与对照相比, 转基因小麦的抗穗发芽能力明显提高, 水解酶活性和硫基含量显著降低<sup>[10]</sup>, 而淀粉含量和产量却显著提高<sup>[11]</sup>。

淀粉是小麦籽粒的主要成分, 约占籽粒重量的 70%, 小麦籽粒的灌浆充实过程主要是胚乳中淀粉的合成与积累过程。因此胚乳中淀粉的生物合成及其积累直接关系到小麦的品质和产量。参与淀粉合成的酶主要有腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (adenosine diphosphate glucosepyrophorylase, AGPase)、可溶性淀粉合酶 (soluble starch synthase, SSS)、颗粒结合型淀粉合酶 (granule-bound starch synthase, GBSS) 和淀粉分支酶 (starch branching enzyme, SBE) 等, 它们由相应的淀粉合成酶基因, 即 *AGPase*、*SSS*、*GBSS I*、*SBE* 等所编码。因此, 为了揭示反义 *Trxs* 基因对小麦淀粉品质形成的调控作用及其机理, 本文对转基因和对照小麦籽粒灌浆期淀粉积累、淀粉合成关键酶活性及基因表达进行了分析, 旨在为抗穗发芽转基因小麦在生产上的进一步应用提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料及其种植

采用基因枪转化法将硫氧还蛋白基因的反义结构 (反义 *Trxs*) 导入其受体品种豫麦 18 中, 经过连续 3 代以上的自交, 并结合 PCR、RT-PCR 检测和表型选择, 筛选到目标基因稳定遗传且抗穗发芽的转基因纯合株系 TY18-99 和 TY18-100。将 2 个转基因株系

和未转基因对照品种于 2007—2009 年连续 2 个生长季节盆栽于河南农业大学科教示范园区。盆钵直径为 30 cm, 深 35 cm, 每盆装干土 15 kg。土壤为沙壤土, 取自大田 0~30 cm 耕层, 装土前过筛。每盆施纯 N 2.92 g, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 4.04 g, K<sub>2</sub>O 3.10 g。将盆埋于大田, 盆内土壤与盆外大田土齐平。每处理 20 盆, 随机区组排列, 3 次重复。10 月 21 日播种, 三叶期每盆定苗 15 株, 整个生育期管理一致。

### 1.2 取样方法

于开花期选择同一日开花、穗型大小一致的单穗挂牌标记, 于开花后第 10 天开始, 每隔 5 d 取一次样, 共取 5 次。选取标记穗第 4 至第 10 小穗基部的 2 个籽粒, 每次取 200 粒, 其中 100 粒在液氮中速冻 30 min, 置 -80℃ 冰箱保存, 用于酶活性及基因表达测定; 另 100 粒于烘箱中 105℃ 杀青 30 min, 70℃ 烘至恒重后用于淀粉含量的测定。

### 1.3 农艺性状调查

每年记录播种期、出苗期、抽穗期、开花期和成熟期。成熟后每处理取 5 盆, 分别考察株高、单株成穗数、每穗粒数、结实小穗数、不孕小穗数、千粒重和单株产量。

### 1.4 测定指标及方法

1.4.1 淀粉含量 采用何照范<sup>[12]</sup>的双波长比色法, 并作适当改进。其中直链淀粉含量测定的主波长用 620 nm, 参比波长用 430 nm; 支链淀粉含量测定的主波长用 540 nm, 参比波长用 720 nm; 总淀粉含量为直链淀粉和支链淀粉含量的总和。

1.4.2 AGPase、SSS、SBE 和 GBSS 活性 参考程方民等<sup>[13]</sup>的方法提取酶, 略有改动。取样品籽粒 15 粒, 称重后倒入研钵, 加 5 mL 提取液 [含 100 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 8 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol L<sup>-1</sup> EDTA, 12.5% (V/V) 甘油, 1% (W/V) 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP-40)], 研磨成匀浆, 10 000×g, 4℃ 离心 25 min, 分别收集上清液和沉淀, 上清液用于 AGPase、SSS、SBE 活性测定; 沉淀部分加入 5 mL 上述提取液, 悬浮后用于 GBSS 活性测定。

参照 Douglas 等<sup>[14]</sup>的方法测定 AGPase 活性, 参照 Nakamura 等<sup>[15]</sup>的方法测定 SSS 和 GBSS 活性, 参照赵法茂等<sup>[16]</sup>的方法测定 SBE 活性。所有酶活性测定均以等量煮沸的粗酶液为对照, 生化试剂均购自 Sigma 公司。

### 1.5 实时荧光定量 PCR 测定

取大小均匀一致的冻存籽粒 3~4 粒提取总 RNA<sup>[17]</sup>,

用琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的质量, 以 260 nm/280 nm 吸光值测定 RNA 浓度和纯度。

根据 GenBank 中小麦 *Trxh*、*AGPase*、*SSS*、*GBSS*、*SBE* 基因保守区域, 用 Primer Premier 5.0

软件设计特异引物(表 1), 由北京华大基因科技股份有限公司合成。以 *β-actin* 为内参对照。通过 NCBI 中 Blast 的同源比对功能, 评价设计的引物特异性。

表 1 用于分析目标基因表达的引物序列  
Table 1 Primer sequences for gene expression assay

基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank acc. number	引物序列 Primer sequence (5'-3')		预期片段大小 Theoretical size (bp)
		正向 Forward	反向 Reverse	
<i>Trxh</i>	AF438359	GCAGAAGCAAACAAGGATGGG	ACTGCCATCGCCAAGAGC	286
<i>GBSS I</i>	AF409085	AGACCGGGTTCCACATGG	CTCTCTTCAGGGAGCGGC	287
<i>AGPase</i>	AY727927, AF492644, AF244997	GACAGTGTAT(T/C)GGTGA(G/A)GG	ACAATGCCACTTTTGATGAA	323
<i>SSS I</i>	AF091803	GAGGCATGACGAAAGACCAT	TGTAAGTGTCTATCCACCCGA	304
<i>SSS II</i>	AF155217	GTTCATTGACGCTCCTCTCT	CAGATTTCATCCCCATAAG	157
<i>SSS III</i>	AF258608	CGGGTTGTATTTACCATCCA	TGTAATCCAACTTCTGCTGC	290
<i>SBE I</i>	AF286317, AF286318, AF076679	TTGA(T/C)GGCTTCCGATTTGAT	GCGATAGTCAAACCTACTCCA	251
<i>β-actin</i>	AB181991	GTTCCAATCTATGAGGGATACACGC	GAACCTCCACTGAGAACAACATTACC	422

采用 M-MLV Reverse Transcriptase 试剂盒 (Promega), 按操作指南合成第一链 cDNA。反应总体积为 20 μL, 包括 Oligo dT (50 μmol L<sup>-1</sup>) 1 μL、总 RNA (1 μg μL<sup>-1</sup>) 2 μL、dNTPs (10 mmol L<sup>-1</sup>) 4 μL、DEPC 处理过的 H<sub>2</sub>O 5.5 μL。

实时荧光 PCR 反应体系为 50 μL, 包括 10× buffer 5 μL、50 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 5 μL、10 mmol L<sup>-1</sup> dNTP 2 μL、*Taq* DNA 聚合酶(2.5 U μL<sup>-1</sup>) 1 μL、上下游引物(400 μmol L<sup>-1</sup>)各 0.2 μL、50×SYBR Green One 1 μL、cDNA 2 μL、H<sub>2</sub>O 33.6 μL。在 Eppendorf Realplex4 Mastercycler Eppgradient S 中进行 PCR 反应, 反应条件为 94℃ 5 min; 94℃ 15 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环。在 58℃ 反应步骤时收集荧光信号。每样品 3 个重复。根据扩增曲线确定每个基因相应的 C<sub>t</sub> 值, 以 *β-actin* 为内对照校正 PCR 模板的拷贝数。采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 方法<sup>[18]</sup>计算相对量。

1.6 数据处理和分析

用 SPSS10.0 软件进行方差分析和显著性检验。分析表明, 农艺性状与淀粉含量两年度的总体变化趋势一致, 且供试材料与年度间不存在交互作用, 故本文采用 2009 年的农艺性状、淀粉含量、淀粉酶活性和基因表达数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 反义 *Trxs* 基因在转基因株系中的表达特性分析

在灌浆过程中, 转基因株系与对照籽粒中 *Trxh*

基因表达量均呈单峰曲线变化, 均在花后 25 d 达到峰值(图 1)。在籽粒灌浆早期(花后 10 d 内), 2 个转基因株系 *Trxh* 表达量与未转基因对照差异较小, 但随着籽粒发育度增加转基因株系的表达量呈降低趋势, 花后 15~25 d 达显著差异( $P<0.05$ ), 说明外源 *Trxs* 基因能够在转基因小麦中正常表达, 并直接干扰或抑制内源基因的表达。

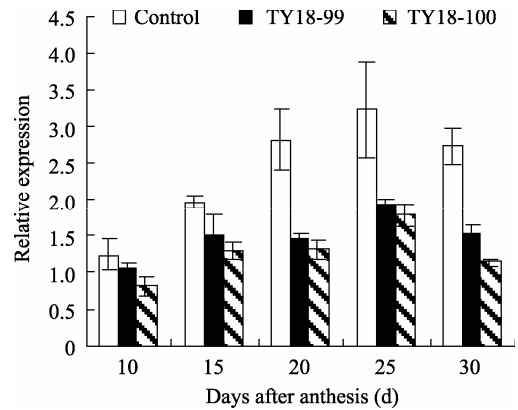


图 1 转反义 *Trxs* 基因小麦籽粒灌浆过程中 *Trxh* 基因表达  
Fig. 1 Expression of *Trxh* during grain filling in anti-*Trxs* transgenic wheat lines

2.2 反义 *Trxs* 基因导入对小麦农艺性状的影响

与未转基因对照相比, 2 个转基因株系的生育期、植株高度、单株成穗数和单株籽粒数均没有明显变化, 而千粒重和单株产量分别高 18.2%和 38.6%, 差异显著(表 2)。2 个转基因株系的产量水平存在差异, 单株产量分别较对照的增加 29.8% (TY18-99)和 47.4% (TY18-100)。

表 2 转基因株系与对照农艺性状比较  
Table 2 Comparison of agronomic traits between transgenic lines and their control

株系 Line	生育期 Growth duration (d)	株高 Plant height (cm)	单株成穗数 Spike number per plant	单株籽粒数 Grain number per plant	千粒重 1000-grain weight (g)	单株产量 Grain yield per plant (g)
对照 Control	215 a	66.33 a	3.40 a	119.07 a	33.12 a	3.69 a
TY18-99	216 a	66.60 a	3.64 a	136.93 a	37.49 b	4.79 b
TY18-100	216 a	67.07 a	3.85 a	141.38 a	40.79 b	5.44 b

均值后字母不同表示株系间差异显著( $P < 0.05$ )。  
Values followed by different letters are significantly different among lines ( $P < 0.05$ ).

2.3 反义 *Trxs* 基因导入对小麦籽粒淀粉积累的影响

在灌浆过程中, 小麦籽粒总淀粉与支链淀粉的积累速率呈相似变化规律(图 2), 即均随灌浆进程逐渐加快, 到灌浆中期(开花后 20~25 d)达峰值后逐渐下降, 且在开花后 15~30 d 显著或极显著高于对照。直链淀粉积累速率在灌浆期间也呈单峰曲线变化, 但峰值出现时间(开花后 15~20 d)比总淀粉和支链淀粉积累速率早, 且在花后 10~20 d 与对照无明显差

异, 但在 25 d 后较对照有所提高。表明, 反义 *Trxs* 基因导入有利于总淀粉与支链淀粉的合成与积累。

2.4 反义 *Trxs* 基因导入对灌浆期籽粒中 AGPase、SSS、GBSS 和 SBE 活性的影响

2.4.1 AGPase 活性 转基因株系和对照小麦籽粒中 AGPase 活性均随灌浆进程呈单峰曲线变化(图 3-A)。对照峰值出现在开花后 20 d, 而转基因株系的峰值出现在花后 25 d, 且在峰值出现后, 2 个转基因株系的 AGPase 活性分别比对照提高 45.3% (TY18-

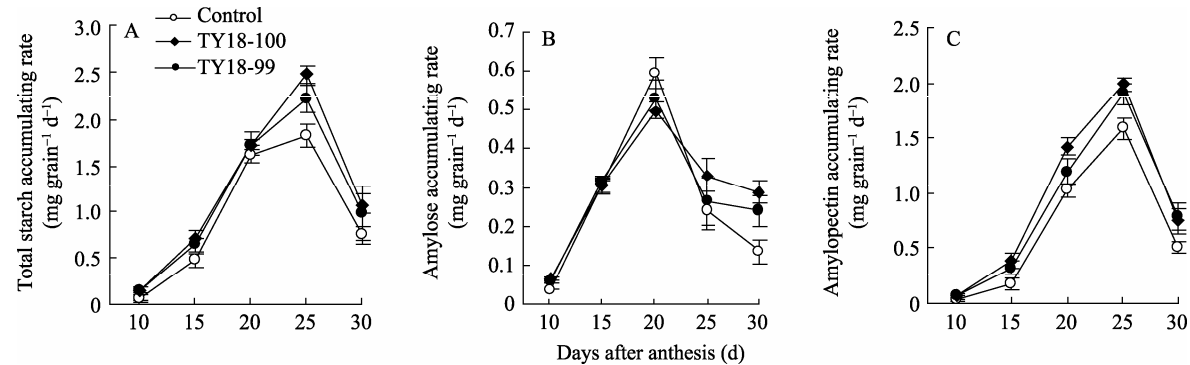


图 2 小麦籽粒灌浆过程中淀粉(A)、直链淀粉(B)和支链淀粉(C)积累速率的变化  
Fig. 2 Changes of starch (A), amylose (B), and amylopectin (C) accumulating rate during grain filling

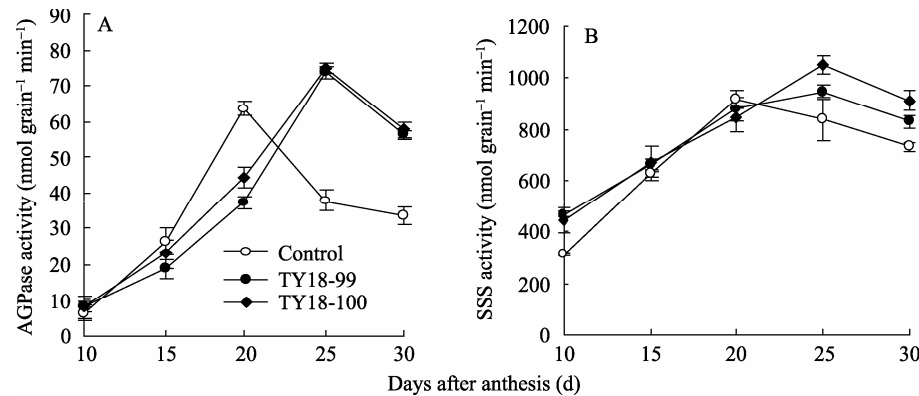


图 3 小麦籽粒灌浆过程中 AGPase (A)和 SSS (B)活性的变化  
Fig. 3 Changes of AGPase (A) and SSS (B) activities during grain filling

99)和 46.3% (TY18-100), 差异显著( $P<0.01$ )。说明反义 *Trxs* 基因导入对 AGPase 活性有一定的调控效应, 且主要发生在灌浆后期。

**2.4.2 SSS 活性** SSS 活性的变化趋势与 AGPase 相似, 在小麦籽粒灌浆期呈单峰曲线变化, 未转基因小麦的峰值出现在开花后 20 d, 而转基因株系的峰值较对照有所推迟, 出现在开花后 25 d (图 3-B)。与未转基因对照相比, 在灌浆前期(花后 10~15 d)和灌浆后期(花后 25~30 d), 2 个转基因株系 SSS 活性均显著高于对照, 平均分别比对照提高 24.6% (TY18-99)和 19.0% (TY18-100)。说明反义 *Trxs* 基因导入能够提高小麦籽粒灌浆前期和后期 SSS 活性, 有利于支链淀粉的合成与积累。

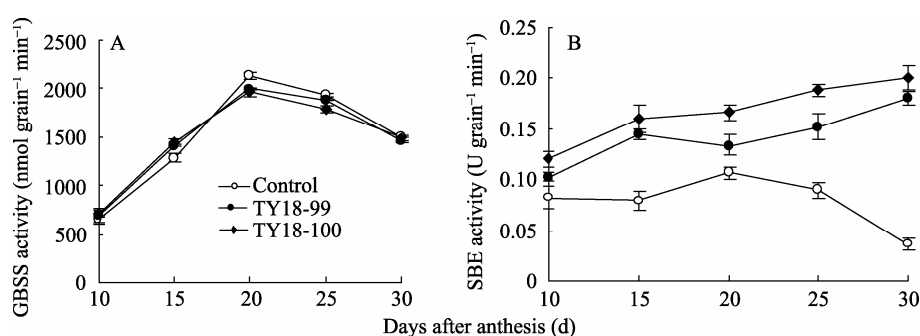


图 4 小麦籽粒灌浆过程中 GBSS (A)和 SBE (B)活性的变化  
Fig. 4 Changes of GBSS (A) and SBE (B) activities during grain filling

## 2.5 反义 *Trxs* 基因导入对灌浆期籽粒中 AGPase、SSS、GBSS 和 SBE 基因表达的影响

**2.5.1 AGPase 基因** 在灌浆过程中, 转基因株系与对照籽粒中 AGPase 的表达量均呈“降-升-降”的变化趋势(图 5-A)。在开花后 10~20 d, 转基因株系 AGPase 基因的表达量显著高于对照, 20 d 后 AGPase 的表达量较对照有所下降。说明反义 *Trxs* 基因的导入对受体小麦 AGPase 基因的表达有一定的调控作用且主要发生在籽粒灌浆前期和中期。

**2.5.2 SSS 基因** 小麦籽粒中 SSS I 基因的表达量随灌浆进程呈逐渐下降的变化趋势。在籽粒灌浆早期(花后 10 d 内), 转基因株系 SSS I 的表达量明显低于对照, 但随着籽粒成熟度的增加表达量显著高于对照(图 5-B)。

SSS II 在小麦籽粒灌浆过程中的表达趋势与 SSS I 基本一致, 即随灌浆进程呈逐渐下降的变化趋势(图 5-C)。与 SSS I 不同的是, 在整个灌浆过程中, 转基因株系 SSS II 的表达量均明显高于对照, 且在花后 10~20 d 差异显著( $P<0.01$ )。

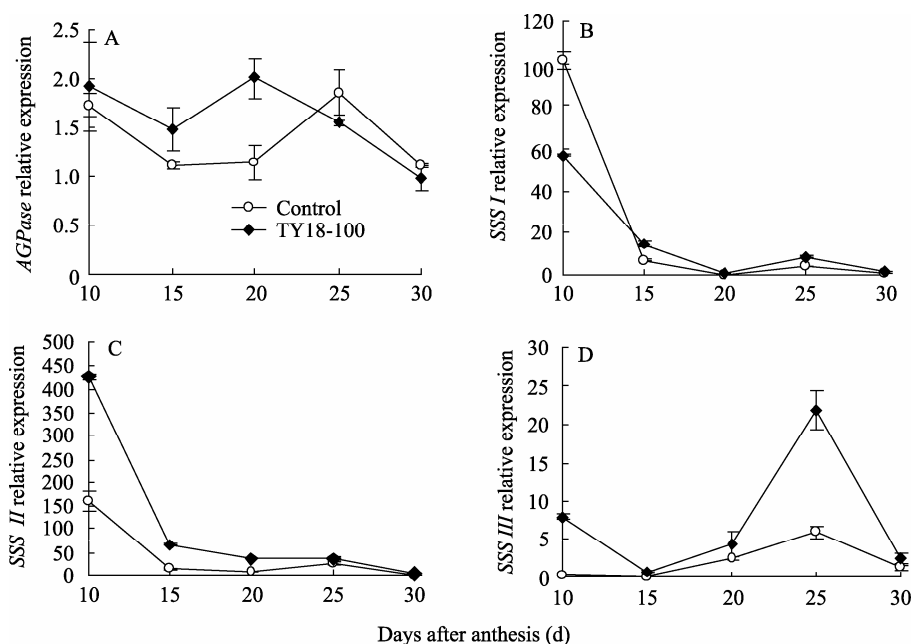
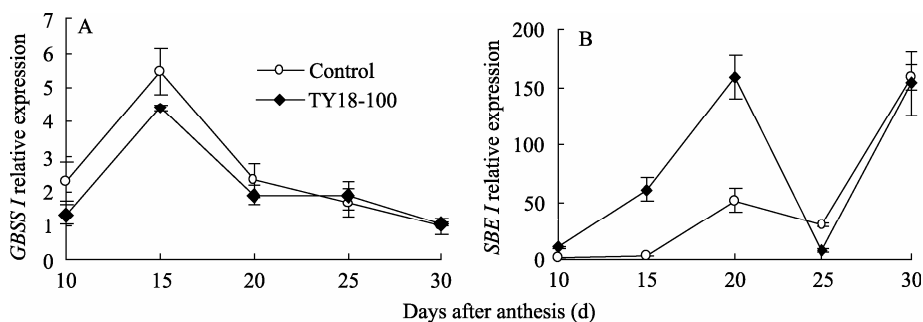
**2.4.3 GBSS 活性** GBSS 活性开始灌浆时较低, 随灌浆进程逐渐提高, 并于开花后 20 d 达峰值后迅速下降。在峰值出现之前, 2 个转基因株系的 GBSS 活性均高于对照, 达到峰值后, 2 个转基因株系的 GBSS 活性均较对照有所降低(图 4-A)。

**2.4.4 SBE 活性** 在小麦籽粒灌浆期间, 未转基因对照 SBE 活性呈单峰曲线变化, 其峰值出现在开花后 20 d, 而 2 个转基因株系的 SBE 活性表现为开始灌浆时较低, 以后随着灌浆进程呈逐渐增加的变化趋势(图 4-B)。与未转基因对照相比, 在整个灌浆过程中, 2 个转基因株系的 SBE 活性均高于对照, 分别提高 44.8% (TY18-99)和 52.8% (TY18-100), 且在花后 15~30 d 达显著差异( $P<0.01$ )。

与 SSS I 和 SSS II 不同, 在小麦籽粒灌浆过程中 SSS III 的表达呈谷峰曲线变化, 谷值出现在花后 15 d, 而峰值出现在花后 25 d。在整个灌浆过程中, 转基因株系的表达均明显高于对照(图 5-D)。在花后 10、15 和 25 d, 转基因株系 SSS III 的表达量分别为对照的 30.7、25.3 和 3.7 倍且均达显著差异( $P<0.01$ )。说明反义 *Trxs* 基因对 SSS III 的调控作用明显大于其他 2 个基因。

**2.5.3 GBSS I 基因** 小麦籽粒灌浆过程中 GBSS I 表达呈单峰曲线变化, 其峰值出现在花后 15 d。在花后 10~20 d, 转基因株系 GBSS I 的表达量显著低于对照, 此后随着灌浆进程, 转基因株系 GBSS I 的表达量虽较对照有所增加但差异未达显著水平(图 6-A)。说明反义 *Trxs* 基因的导入对受体小麦 GBSS I 的表达有一定的抑制作用且主要发生在籽粒灌浆前期和中期。

**2.5.4 SBE I 基因** 在灌浆期间, 小麦籽粒中 SBE I 表达呈“升-降-升”的变化趋势(图 6-B)。在花后 10~20 d, 转基因株系 SBE I 的表达量均显著高于对

图 5 小麦籽粒灌浆过程中 *AGPase* 和 *SSS* 表达结果Fig. 5 Results of *AGPase* and *SSS* expression during grain filling图 6 小麦籽粒灌浆过程中 *GBSS I* 和 *SBE I* 表达结果Fig. 6 Results of *GBSS I* and *SBE I* expression during grain filling

照, 此后随着籽粒的成熟, 转基因株系 *SBE I* 的表达量较对照有所降低。说明反义 *Trxs* 基因导入对受体小麦 *SBE I* 基因的表达调控主要在籽粒灌浆前期和中期。

### 3 讨论

二硫键是决定酶三维构象和生理活性的重要因素之一, 其氧化还原状态直接或间接地影响着许多酶的活性。研究表明, *Trxh* 在小麦种子发育过程中发挥着重要的调控作用, 它通过氧化还原二硫键参与营养物质从植株向种子的转移和储藏过程<sup>[19]</sup>, 而这一时期正是小麦籽粒储藏物质合成与积累的重要阶段, 直接影响小麦的产量及品质。本研究中将反义 *Trxs* 基因导入小麦后, 发现反义 *Trxs* 基因表达后使原品种的产量结构发生了较大变化, 2 个转基因株系

的单株产量均显著提高。进一步对其在种子发育过程中的淀粉积累速率研究表明, 在小麦籽粒灌浆的中期和后期, 转基因株系的总淀粉与支链淀粉的积累速率加快, 表明反义 *Trxs* 基因导入有利于籽粒中淀粉的积累, 从而使转基因小麦籽粒中储藏物质合成与积累量增加。该结果与课题组前期报道的抑制表达 *Trxs* 的转基因小麦淀粉含量升高的研究结果相一致<sup>[11]</sup>。

转基因小麦在籽粒灌浆中期和后期的淀粉积累速率较高与其 *AGPase*、*SSS*、*GBSS* 和 *SBE* 活性较高密切相关。已有研究表明, 在小麦籽粒淀粉合成过程中, 由 *AGPase* 催化合成淀粉直接前体腺苷二磷酸葡萄糖(ADPG), 在 *SSS* 的催化作用下参与合成支链淀粉, 在 *GBSS* 的催化作用下参与合成直链淀粉, *SBE* 催化分支糖链的产生<sup>[20-22]</sup>。*AGPase*、*SSS*

和SBE的活性与总淀粉和支链淀粉积累速率呈正相关,GBSS的活性与直链淀粉积累速率呈正相关<sup>[13,23]</sup>。本研究结果表明,反义 *Trxs* 基因导入可使小麦籽粒中SBE活性在整个籽粒形成过程中显著提高,AGPase和SSS活性在灌浆后期显著提高,但在开花后20~30 d,GBSS的活性低于对照,从而使籽粒灌浆期间的淀粉积累速率发生了改变,最终显著提高了总淀粉和支链淀粉含量,降低了直链淀粉含量,进而提高了淀粉的支/直比,改善了小麦淀粉品质。该结果与Trx能够促进淀粉的合成<sup>[4]</sup>和反义 *Trxs* 基因导入有利于小麦淀粉品质改善<sup>[11]</sup>的报道相吻合。

目前,对小麦淀粉合成关键酶基因已有一些研究。Reeves等<sup>[24]</sup>报道,AGPase基因在籽粒淀粉合成过程中主要通过转录水平来控制,小麦籽粒胚乳发育过程中AGPase基因的mRNA表达量与AGPase活性及淀粉积累速率呈正相关。Li等<sup>[25]</sup>研究发现,抑制表达GBSSI的转基因小麦籽粒胚乳中的GBSSI活性和直链淀粉含量明显下降。SSS和SBE基因发生突变或缺失,籽粒中支链淀粉的合成受阻<sup>[26-27]</sup>。本试验结果表明,反义 *Trxs* 基因对小麦籽粒中AGPase、SSS和GBSSI基因表达有一定的调控作用。在花后15~30 d,转基因显著提高了小麦籽粒中SSS I、SSS II和SSS III基因的mRNA相对表达量。在灌浆前期和中期,显著提高了AGPase和SBE I基因的转录水平,抑制了GBSSI基因的表达。在花后10~20 d,小麦籽粒中AGPase、SSS III、SBE I和GBSSI基因表达水平与籽粒中淀粉及其组分积累速率几乎呈线性相关趋势,且AGPase、SBE I和GBSSI基因的转录峰值较相应酶活性峰值出现时间有所提前,说明反义 *Trxs* 基因主要通过调控AGPase、SSS、SBE I和GBSSI基因的时空表达水平来调控籽粒淀粉的合成。从小麦籽粒中淀粉合成酶活性与淀粉合成酶基因表达水平来看,反义 *Trxs* 基因对SSS III基因调控主要发生在转录水平上,对AGPase、SSS I、SSS II、SBE I和GBSSI基因调控主要发生在转录后水平上。

关于Trxh的调控功能多集中于对种子萌发过程中的研究,而对种子发育过程中的功能研究较少。最近有研究发现,Trxh是一个质膜相关蛋白,它能够从原来表达的细胞迁移至另一个细胞来调控细胞间的氧化-还原动态平衡<sup>[28]</sup>。在前期研究中,我们发现抑制表达Trxh的转基因小麦籽粒中水解酶活性显著降低<sup>[10]</sup>。Guo等<sup>[29]</sup>对成熟期种子蛋白双向电泳分

析表明,反义 *Trxs* 基因可作用于转录因子WRKY和代谢调节蛋白14-3-3,调节小麦籽粒代谢。由此,我们推测,反义 *Trxs* 基因表达可能抑制小麦内源硫氧还蛋白基因的表达,影响小麦籽粒中原有的碳代谢平衡。反义 *Trxs* 基因在抑制碳代谢途径中参与分解代谢的部分酶活性的同时,也使得参与合成代谢的部分酶活性得以提高来维持细胞间的动态平衡,可能是转基因小麦中部分淀粉合成酶基因表达量增加和酶活性提高的主要原因,有关反义 *Trxs* 基因调控小麦籽粒中淀粉合成关键酶基因的内在机制有待进一步研究。

## 4 结论

反义 *Trxs* 基因表达后显著提高受体小麦总淀粉与支链淀粉的灌浆速率;提高籽粒中AGPase、SSS和SBE的活性,降低GBSS的活性;促进AGPase、SBE I、SSS (SSS I、SSS II和SSS III)基因的转录水平,抑制GBSSI的表达。反义 *Trxs* 基因对小麦籽粒灌浆的调控作用,可能与AGPase、SBE I和SSS表达增强有关。

## References

- [1] Joudrier P, Gautier M, Lamotte F D, Kobrehel K. The thioredoxin h system: potential applications. *Biotechnol Adv*, 2005, 23: 81–85
- [2] Kobrehel K, Yee B C, Buchanan B B. Role of the NADP/thioredoxin system in reduction of  $\alpha$ -amylase and trypsin inhibitor proteins. *J Biol Chem*, 1991, 266: 16135–16140
- [3] Kobrehel K, Wong J H, Balogh A, Kiss F, Yee B C, Buchanan B B. Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h. *Plant Physiol*, 1992, 99: 919–924
- [4] Ballicora M A, Frueauf J B, Fu Y, Schurmann P, Preiss J. Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphatase by thioredoxins. *J Biol Chem*, 1999, 275: 1315–1320
- [5] Wong J H, Cai N, Balmer Y, Tanaka C K, Vensel W H, Hurkman W J, Buchanan B B. Thioredoxin targets of developing wheat seeds identified by complementary proteomic approaches. *Phytochemistry*, 2004, 65: 1629–1640
- [6] Li X M, Nield J, Hayman D, Langredge P. Cloning a putative self-incompatibility gene from the pollen of the grass *Phalaris coerulescens*. *Plant Cell*, 1994, 6: 1923–1932
- [7] Li X M, Nield J, Hayman D, Langridge P. A self-fertile mutant of *Phalaris* produces an S protein with reduced thioredoxin activity. *Plant J*, 1996, 10: 505–513
- [8] Yin J(尹钧), Ren J-P(任江萍), Song L(宋丽), Li L(李磊), Shi X-Z(师学珍), Guo X-Y(郭向云). Regeneration culture from bombarded immature embryos of wheat and transgenic plant. *Acta Bot Boreali-Occident Sin* (西北植物学报), 2003, 23(9): 1565–1570 (in Chinese with English abstract)

- [9] Liu L(刘雷), Yin J(尹钧), Ren J-P(任江萍), Han J-F(韩锦峰). Effects of antisense *trxs* on germination of transgenic wheat seeds. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2004, 30(8): 801–805 (in Chinese with English abstract)
- [10] Li Y C, Ren J P, Cho M J, Zhou S M, Kim Y B, Guo H X, Wong J H, Niu H B, Kim H K, Morigasaki S, Lemaux P G, Frick O L, Yin J, Buchanan B B. The level of expression of thioredoxin is linked to fundamental properties and applications of wheat seeds. *Mol Plant*, 2009, 2: 430–441
- [11] Ren J-P(任江萍), Wang N(王娜), Wang X-G(王新国), Li Y-C(李永春), Niu H-B(牛洪斌), Wang X(王翔), Yin J(尹钧). Effects of anti-sense thioredoxin *s* on grain yield and quality properties in two wheat cultivars with different quality types. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2010, 36(11): 1877–1882 (in Chinese with English abstract)
- [12] He Z-F(何照范). Analysis Techniques for Grain Quality in Cereals and Oils (粮油籽粒品质及其分析技术). Beijing: China Agriculture Press, 1985. pp 131–133 (in Chinese)
- [13] Cheng F-M(程方民), Zhong L-J(钟连进), Sun Z-X(孙宗修). Effect of temperature at grain-filling stage on starch biosynthetic metabolism in developing rice grains of early-*indica*. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2003, 36(5): 492–501 (in Chinese with English abstract)
- [14] Douglas C D, Tsung M K, Frederick C F. Enzymes of sucrose and hexose metabolism in developing kernels of two inbreds of maize. *Plant Physiol*, 1988, 86: 1013–1019
- [15] Nakamura Y, Yuki K, Park S Y, Ohya T. Carbohydrate metabolism in the developing endosperm of rice grain. *Plant Cell Physiol*, 1989, 30: 833–839
- [16] Zhao F-M(赵法茂), Qi X(齐霞), Xiao J(肖军), Wang X-Z(王宪泽). Improved method for determining starch branching enzyme activity. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 2007, 43(6): 1167–1169 (in Chinese)
- [17] Ni Z F, Sun Q X, Wu L M, Xie C J. Differential gene expression between wheat hybrids and their parental inbreds in primary roots. *Acta Bot Sin*, 2002, 44: 457–462
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods*, 2001, 25: 402–408
- [19] Serrato A J, Cejudo F J. Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta*, 2003, 217: 392–399
- [20] Stark D M, Tinunerman K P, Barry G F, Preiss J, Kishpre G M. Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase. *Science*, 1992, 258: 287–292
- [21] Cresbie G B. Wheat quality trends in Western Australia . In: Proc 39th Cereal Chemistry Conference, Perth, 1989. pp 59–65
- [22] Kouich M, Koji K, Yuji A, Kawasaki T, Shimada H, Baba T. Starch branching enzymes from immature rice seeds . *J Biochem*, 1992, 112: 643–651
- [23] Wang Y-F(王月福), Yu Z-W(于振文), Li S-X(李尚霞), Yu S-L(余松烈) . Activity of enzymes related to starch synthesis and their effect during the filling of winter wheat . *Acta Agron Sin* (作物学报), 2003, 29(1): 75–81 (in Chinese with English abstract)
- [24] Reeves C D, Krishan H B, Okita T W. Gene expression in development wheat endosperm. *Plant Physiol*, 1986, 82: 34–40
- [25] Li J R, Zhao W, Li Q Z, Ye X G, An B Y, Li X, Zhang X S. RNA silencing of waxy gene results in low levels of amylose in the seeds of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Genet Sin*, 2005, 32: 846–854
- [26] Nishi A, Nakamura Y, Tanaka N, Satoh H. Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm. *Plant Physiol*, 2001, 127: 459–472
- [27] James M G, Robertson D S, Myers A M. Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell*, 1995, 7: 417–429
- [28] Meng L, Wong J H, Feldman L J, Lemaux P G, Buchanan B B. A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 3900–3905
- [29] Guo H X, Zhang H Z, Li Y C, Ren J P, Wang X, Niu H B, Yin J. Identification of changes in wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds proteome in response to anti-*trx s* gene. *PLoS ONE*, 2011, 6: e22255