

## 滞绿突变对大豆叶片蔗糖代谢相关基因表达的影响

王鹏<sup>1</sup> 侯思宇<sup>1,2</sup> 温宏伟<sup>1</sup> 李贵全<sup>1\*</sup>

(1. 山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801;

2. 山西农业大学 农业生物工程研究所, 山西 太谷 030801)

**摘要** 为研究大豆滞绿突变对叶片衰老过程中蔗糖代谢相关基因表达产生的影响,以晋大滞绿1号及其亲本晋大74号为试验材料,测定了大豆开花后至成熟期间叶片可溶性糖含量的变化趋势,并对比了不同基因型大豆品种叶片衰老过程中蔗糖代谢相关基因的表达差异。结果表明:1)花后至成熟期间,2个供试大豆品种可溶性总糖含量均呈波动升高然后降低的变化趋势。花后14至42天,晋大滞绿1号可溶性总糖含量高于晋大74号;2)花后29至42天,晋大滞绿1号蔗糖磷酸合成酶基因 *SPS4*, 转化酶基因 *CInv*、*CWInv2* 以及蔗糖合酶基因 *SS1*、*SS2-2* 表达水平显著高于非滞绿品种晋大74号;己糖激酶和果糖激酶基因 *Hxk* 和 *Frk* 表达量也高于非滞绿品种晋大74号;3)除 *SUT4-1* 外,其余6个蔗糖转运体基因 *SUTs* 的表达模式具有明显的品种特异性。花后29至42天,晋大滞绿1号叶片 *SUTs* 表达水平较高。综上,滞绿突变对于大豆蔗糖代谢相关基因的表达产生了明显的影响,特别是在鼓粒初期和中期等大豆籽粒形成的关键时期,滞绿品种晋大滞绿1号蔗糖代谢相关基因的表达更加活跃。

**关键词** 大豆; 滞绿; 蔗糖代谢; 基因表达

中图分类号 S565.1

文章编号 1007-4333(2021)11-0059-11

文献标志码 A

## Effects of stay-green mutation on the expression of sucrose metabolism-related genes in soybean leaves

WANG Peng<sup>1</sup>, HOU Siyu<sup>1,2</sup>, WEN Hongwei<sup>1</sup>, LI Guiquan<sup>1\*</sup>

(1. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

2. Institute of Agricultural Biotechnology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

**Abstract** To study the effect of a stay-green mutation on the expression of sucrose metabolism-related genes during leaf senescence, taking Zhilv No. 1 (Z1) and one of its parents Jinda No. 74 (JD74) as experimental materials, the change trend of soluble sugar content in soybean leaves from flowering to maturity was determined and the expression differences of sucrose metabolism-related genes were compared. The results indicated that: 1) The soluble sugar content of two soybean varieties fluctuated, increased and then decreased during the period from anthesis to maturity. From 14 to 42 days after flowering, the content of soluble sugar was much higher in Z1 than that in JD74. 2) From 29 to 42 days after anthesis, the expression levels of sucrose phosphate synthase gene *SPS4*, invertase iso-genes *CInv*, *CWInv2* and sucrose synthase iso-genes *SS1* and *SS2-2* in Z1 were significantly higher than those in JD74. The expression levels of hexokinase and fructokinase genes *Hxk* and *Frk* were also much higher than that in JD74. 3) Except for *SUT4-1*, sucrose transporter iso-genes *SUTs* showed obvious variety-specific expression patterns. From 29 to 42 days after anthesis, the expression levels of *SUTs* in Z1 were higher. In summary, the stay-green mutation in soybean had a significant impact on the expression of sucrose metabolism-related genes, especially in the key periods of soybean grain formation such as the early and middle stage of pod filling, the expression of source metabolism

收稿日期: 2021-03-14

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFE0111000); 欧盟 H2020 研究创新项目(727312); 山西农业大学青年创新项目(20142-03)

第一作者: 王鹏, 讲师, 主要从事大豆品质性状遗传研究和特异种质资源创新研究, E-mail: sxauwp@126.com

通讯作者: 李贵全, 教授, 主要从事大豆遗传育种研究和植物遗传改良及种质创新研究, E-mail: li-gui-quan@126.com

related genes in Z1 was more transcriptionally active.

**Keywords** soybean; stay green; sucrose metabolism; gene expression

高等植物的滞绿是指叶绿素降解缓慢或降解程度较低,叶片能够在生育末期长时间保持绿色,甚至完全不发生黄化的现象<sup>[1]</sup>。目前,已利用人工诱变手段在小麦、玉米、水稻、拟南芥和番茄等作物中获得了大量的滞绿突变体材料,各种滞绿突变体的成因及滞绿机理都存在一定的差异<sup>[2]</sup>。大豆中已鉴定出4个基因位点的突变会导致滞绿,其中 *cytG* 为细胞质遗传位点, *D1* 和 *D2* 双基因突变导致种子滞绿, *G* 与 *D1* 连锁,其突变会导致种皮发生滞绿<sup>[3]</sup>。

糖是植物体内重要的碳水化合物,由高等植物通过光合作用产生。蔗糖和己糖作为主要的可溶性糖类,均可以充当信号调节物质,参与细胞糖信号转导的过程,是植物生长发育和一些基因表达的重要调控因子<sup>[4]</sup>。蔗糖和己糖的代谢过程需要多种酶共同参与。其中,蔗糖磷酸合成酶(SPS)是蔗糖合成的限速酶<sup>[5]</sup>,催化尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)和6-磷酸果糖生成6-磷酸蔗糖和UDP,6-磷酸蔗糖再由蔗糖磷酸化酶(SPP)去磷酸化生成蔗糖。蔗糖需要通过水解为己糖才能被植物所吸收利用,而不能直接作为能源物质为植物提供能量<sup>[6]</sup>。转化酶(Inv)是蔗糖裂解的关键酶,催化蔗糖水解产生己糖(葡萄糖和果糖)。蔗糖合酶(SS)催化蔗糖分解与合成的可逆反应<sup>[7]</sup>,大豆叶片中SS分解方向的活性更大,主要参与蔗糖分解的调节作用<sup>[8]</sup>。己糖在己糖激酶的催化下发生磷酸化反应,进入糖酵解途径,进而为植物的生理活动提供能量和中间代谢产物<sup>[9]</sup>。广义的己糖激酶依据其底物特异性和功能的不同分为己糖激酶(Hxk)、葡萄糖激酶(Gxk)和果糖激酶(Frk)。有证据表明,己糖激酶能够直接或间接参与植物的糖感知和信号转导过程<sup>[10]</sup>,影响植物的生长发育<sup>[11]</sup>,以及调控植物激素信号的转导等<sup>[12]</sup>。植株生长发育后期,源叶中的碳水化合物以蔗糖的形式转移输送至籽粒中,以保证籽粒生长的需要。蔗糖转运体(Sucrose transporters, SUTs)是蔗糖的特异性感受器,SUTs可以特异性感受胞内蔗糖水平或蔗糖信号,并通过调节自身或其他一些相关基因的转录和翻译,对其作出应答反应<sup>[13]</sup>。

关于滞绿突变体的研究,多数集中于滞绿形成的分子机理以及滞绿基因的结构变异和功能解析<sup>[14]</sup>。在小麦和水稻等少数作物中,还探讨了滞绿

突变对植物碳氮代谢和抗氧化生理带来的影响<sup>[15]</sup>。然而,涉及大豆滞绿突变体生理生化特性及相关分子机制的研究还鲜有报道。Thomas和Howarth<sup>[2]</sup>将滞绿突变体划分为5种类型,并进一步归纳为功能型和非功能型两大类。研究表明,一些功能型滞绿突变体能够在阻止叶绿素降解的同时,相应地维持叶片光合能力的稳定,有效延长光合效率高值持续期<sup>[16]</sup>,并且相较于其野生型获得更好的产量表现<sup>[17]</sup>。大豆光合作用的主要产物是蔗糖<sup>[18]</sup>,并且蔗糖也是碳水化合物源库运输的主要形式。因此推测,滞绿突变可能会对大豆光合产物蔗糖的积累,蔗糖代谢转运相关酶活性以及相关基因的表达产生一定的影响。

本研究以晋大滞绿1号及其亲本晋大74号为试验材料,分析了大豆开花后至成熟期间叶片可溶性糖含量的变化趋势,对比了不同基因型大豆叶片衰老过程中蔗糖代谢相关酶基因的动态表达模式,旨在阐明滞绿突变对大豆叶片蔗糖代谢相关功能基因表达产生的影响,以期为进一步研究滞绿突变对大豆碳氮代谢调控的分子机制提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为晋大滞绿1号(Z1)大豆新品种,由山西农业大学大豆育种研究室自主选育,已通过陕西省品种审定委员会审定。该品种是以大豆自然滞绿突变体为父本,超高产品种晋大74号(JD74)为母本进行杂交,通过系谱法选育而来,具有典型的滞绿表型。以非滞绿亲本晋大74号作为对照。供试的2个大豆品种均为亚有限结荚习性,花期接近,晋大滞绿1号生育期为132 d,晋大74号生育期为129 d。

### 1.2 田间设计

田间试验于2017年在山西农业大学农学院试验基地进行。采用随机区组设计,每个品种种植3个重复小区,每小区6行,行长6 m,行距0.5 m。田间常规管理,及时中耕除草。开花期每个品种选择长势一致、同一天开花的植株挂牌标记(晋大滞绿1号为7月17日,晋大74号为7月15日),之后每隔7 d取样,如遇阴雨天顺延。样本选取标记植株全展的倒二功能叶,该叶位为新生叶片,能够反映植

株的光合效率和生理特征。每次选取 3 片复叶中的 1~2 片,迅速冷冻于液氮当中,然后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中备用,用于生理指标测定和相关基因表达分析。

### 1.3 可溶性糖含量测定

可溶性糖含量测定采用蒽酮硫酸法<sup>[19]</sup>。新鲜叶片烘干后,研磨至均匀粉末,称取 50 mg 粉末倒入具塞试管中,加 5 ml 80%乙醇,80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴浸提 30 min,期间不断搅拌。冷却到室温后,3 500 r 离心 10 min,取上清。沉淀加入 2 ml 80%乙醇,重复清洗 2 次,合并上清。加入 10 mg 活性炭,80 $^{\circ}\text{C}$ 脱色 30 min,用 80%乙醇定容至 10 ml。测定体系为:提取液 1 ml,蒸馏水 2 ml,蒽酮硫酸试剂 5 ml。100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中煮 10 min,冷却后测 620 nm 下吸光度值。

### 1.4 基因表达分析

大豆总 RNA 提取参照 Trizol kit(天根生化科技(北京)有限公司)操作说明,用紫外分光光度计测定 RNA 样品含量和纯度,利用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。提取的总 RNA 经 DNase I (TaKaRa)消化后去除基因组 DNA 污染,取 2  $\mu\text{g}$  用逆转录试剂盒(FastQuant RT Kit,天根生化科技(北京)有限公司)反转录合成 cDNA,冰上操作。采用 SYBR Green I PCR kit (TaKaRa)进行实时荧光定量 PCR,以 *HIS2* 作为内参基因,每个样本重复 3 次,采用 $2^{-\Delta\Delta}$ 法进行基因表达分析。荧光定量 PCR 引物通过 NCBI 在线设计,委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

### 1.5 数据处理

采用 Microsoft Excel 2010 对原始数据进行处理和图表绘制,利用 IBM SPSS 20.0 通过 Duncan's 多重比较( $\alpha=0.05$ )对同一时期不同品种基因表达差异进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 可溶性糖含量的变化

不同大豆品种在花后不同天数可溶性糖含量的变化见图 1。由图 1 可知,花后至成熟期间,2 个供试大豆品种叶片中可溶性糖含量均呈波动升高然后降低的变化趋势。开花期(花后 0 d),2 个品种中可溶性糖含量无显著差异;花后 14 至 42 d,滞绿品种 Z1 可溶性糖含量高于 JD74,且花后 14、21 和 42 d 达到显著水平。花后 36 和 42 d,JD74 和 Z1 可溶性

糖含量分别达到最大水平,之后逐渐降低。其中,JD74 降低速率小于滞绿品种 Z1,并于开花 55 d 后显著高于 Z1。

### 2.2 蔗糖合成基因表达的变化

图 2(a)表明,开花期(花后 0 d)2 个 SPS 同工酶基因在叶片中的表达量差距较大,其中滞绿品种 Z1 中的 *SPS4* 基因表达量显著低于 JD74,*SPS3* 基因表达量显著高于 JD74。花后至成熟期间,*SPS4* 和 *SPS3* 基因表达量在 2 个供试大豆品种中具有相似的变化趋势(图 2(b)和(c))。花后 0 至 7 d 维持在较高水平,花后 7 至 21 d 大幅下调,此后逐渐升高。开花 55 d 后,滞绿品种 Z1 中 2 个 SPS 同工酶基因表达量均迅速降低;JD74 中 *SPS4* 基因表达量迅速下降,而 *SPS3* 基因表达量则持续上调。鼓粒初期和中期(花后 29 至 42 d),除花后 36 d 外滞绿品种 Z1 中 *SPS4*、*SPS3* 基因表达量均显著高于 JD74。此外,因 *SPS3* 基因表达水平较低,推测其对大豆叶片蔗糖代谢的影响较小。

### 2.3 蔗糖裂解相关基因表达的变化

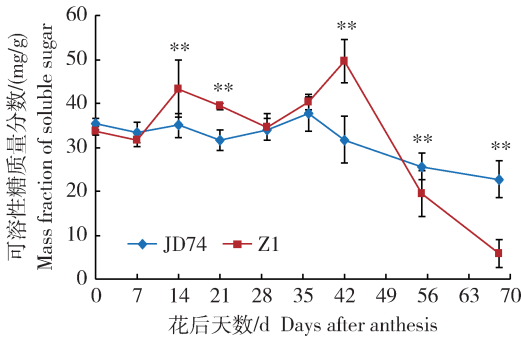
通过与拟南芥基因组进行同源比对,选择了 1 个大豆中性/碱性转化酶基因 *CInv* 以及 2 个酸性转化酶基因 *CWInv1* 和 *CWInv2* 进行基因表达检测。结果表明,开花期(花后 0 d)*CInv* 和 *CWInv2* 在叶片中具有较高的表达水平(图 3(a)),其中 JD74 表达量显著高于滞绿品种 Z1;*CWInv1* 表达量极低,且 2 个品种之间的差异不显著。花后至成熟期间,*CInv* 和 *CWInv2* 基因表达量在滞绿品种 Z1 中呈现出明显的“V”型变化曲线(图 3(b)和(d)),于花后 36 d 降至最低水平;在常规品种 JD74 中则表现为“W”型变化曲线,花后 29 至 42 d 经历较长时间的低水平表达期。2 个供试品种 *CWInv1* 基因在前期表达量极低(图 3(c)),后期大幅升高。其中,滞绿品种 Z1 上调时期早于 JD74,花后 36 至 55 d,*CWInv1* 基因表达量显著高于 JD74。

蔗糖合酶(SS)能够将蔗糖转化为 UDP-葡萄糖和果糖,并且根据植物的需要可逆性调节蔗糖与己糖之间的相互转化。由图 4(a)可知,开花期(花后 0 d)SS 同工基因在叶片中的表达量依次为  $SS2-2 > SS1 > SS2-1$ ,各基因表达水平在供试品种中无显著差异。开花 3 周内供试的 2 个品种 *SS1* 基因表达量均维持在较低的水平(图 4(b))。花后 29 至 42 d,滞绿品种 Z1 中 *SS1* 基因表达量大幅上升,且显著高于 JD74;开花 42 d 后,JD74 中 *SS1* 基因表达

表1 RT-qPCR引物序列信息

Table 1 Information of sequences of primers used for RT-qPCR

基因名称 Genes	基因 ID Locus ID	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	产物大小/bp Product length
<i>SPS4</i>	Glyma.06G323700	F: ACTGTGGCGGAGCATAACATC R: ATTCAGGCAAGTGAGGCCAA	90
<i>SPS3</i>	Glyma.08G308600	F: CTAGGCGTGGTGTCAACTGT R: TCAGGGCCATCTTCTTGACG	103
<i>CInv</i>	Glyma.08G143500	F: GAGGATGTCTGAAGCCCAACA R: CCTCAATAGAGTTGCGGCCA	112
<i>CWInv1</i>	Glyma.15G024600	F: TGTGGACATGGACCCTCTTC R: TAATCTTGACGGCGGCAGTT	182
<i>CWInv2</i>	Glyma.19G195400	F: AGCCACCATAGTCCCAGGTA R: TTTAGGTCTTCGGGTACGGC	102
<i>SS2-1</i>	Glyma.15G151000	F: ACCGCAACGAGTTCATCTCT R: CCTCGTACAGCAGGTCATGT	84
<i>SS2-2</i>	Glyma.03G216300	F: TGGCAATAGCAGTTCGTCCA R: TGCTTAATTGCTCCACGCTG	84
<i>SSI</i>	Glyma.09G073600	F: ATGCGTATTGAAGGACCGCA R: ACCACCAGGTTCCACCAACTC	132
<i>Hxk1</i>	Glyma.01G007200	F: GTGGCAGCAAGCTCAAGATG R: CACCTAAATGCACGGAAGG	126
<i>Hxk2</i>	Glyma.17G257800	F: ACTCAAACACGAGTGTGCCA R: CCAGCTCGCATGTCAGAAGA	78
<i>Frk1</i>	Glyma.01G109700	F: GCCTTTGTGGCATGATCGAC R: TTCAGTCCCACCACAGACC	103
<i>Frk2</i>	Glyma.01G062100	F: GCATCTAGTTCTGCTGGCCT R: GCCACTGTCATATCGTCTT	180
<i>SUT3</i>	Glyma.08G298500	F: CTTGTTGTCGATCCGCGTTC R: ATGTTGTTGTTGTTCCGGCGG	147
<i>SUT4-1</i>	Glyma.02G218600	F: TGGCATTGTGATAGCTGCGT R: TGATAACCCTTGCCGAGTC	127
<i>SUT4-2</i>	Glyma.04G089200	F: CCGCTGTTCTCATCATCGGT R: GGCCCTGAGTGACGTTGTTA	138
<i>SUT4-3</i>	Glyma.03G153700	F: TTCATGCAGCCCCTTATCGG R: TGATGTTGGCGGTGTAAGCA	133
<i>SUT1-1</i>	Glyma.04G088900	F: TGGAGCACTCCCTGTTGAAG R: TCTCGGCCATCCAATCAGT	189
<i>SUT8</i>	Glyma.02G075000	F: GCCATCGCCGTCTTCCTAAT R: CCACGAAGATTGCAACAGCC	103
<i>SUT1-2</i>	Glyma.10G217900	F: CTCCACAATCGCCTTGACCT R: GAACGCACCGAATAACTGCC	127



JD74 代表晋大 74 号, Z1 代表晋大滞绿 1 号; 误差线代表标准差; \* 代表在 0.05 水平上差异显著; \*\* 代表在 0.01 水平上差异显著。下同。

JD74 represents Jinda No. 74, Z1 represents Jinda Zhilv No. 1; The error bars indicate standard deviation; \*, indicates significant differences at 0.05 level; \*\*, indicates significant differences at 0.01 level. The same below.

图 1 不同大豆品种可溶性糖含量的变化

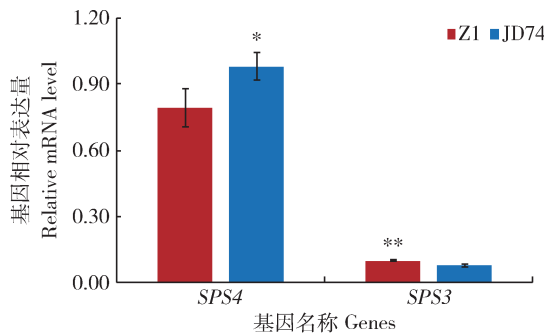
Fig. 1 The changes of soluble sugar in leaves of various soybean varieties

量大幅上升, 且在花后 55 至 68 d 显著大于 Z1。SS2-1 基因表达量先降低后升高(图 4(c)), 除花后 29 d 外, JD74 中 SS2-1 基因的表达量在多数时期都

显著高于滞绿品种 Z1 中的表达量。SS2-2 基因表达量表现为升-降-升的变化趋势(图 4(d)), 滞绿品种 Z1 于花后 36 d 降至最低水平, 随后迅速上调, 呈明显的“V”型曲线; 常规品种 JD74 低水平表达持续时间较长, 为花后 29 至 42 d, 呈“W”型曲线。结果表明, SS2-2 基因表达量在大豆叶片中的波动幅度较大, 说明其对内原糖水平的变化比较敏感。

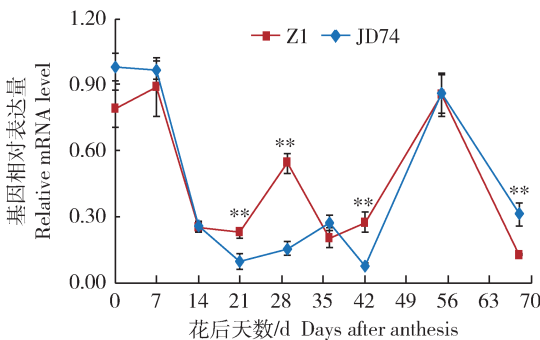
## 2.4 蔗糖转运蛋白基因 SUTs 表达的变化

如图 5(a)所示, 7 个 SUT 同工基因中, SUT4-1 表达量前期维持在极低的水平, 后期在各品种中均大幅升高。花后 29 至 55 d, 滞绿品种 Z1 中 SUT4-1 基因表达量高于 JD74, 且在花后 36 和 42 d 达到显著水平; 直到成熟末期(花后 68 d), JD74 中 SUT4-1 基因表达量才显著高于 Z1。其余 6 个 SUT 同工基因在不同品种中分别具有相似且典型的表达特征, 表现出明显的品种特异性(图 5(b)和(c))。其中, 滞绿品种 Z1 的表达仅在花后 36 d 明显降低, 此后迅速升高, 大致呈“V”型变化曲线; 而常规品种 JD74 在花后 29 至 42 d 均维持低水平表达, 呈明显的“W”型曲线。

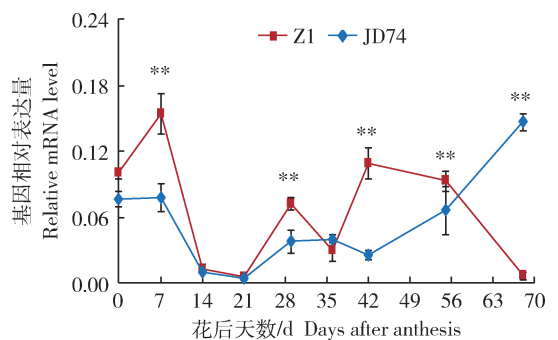


(a) 开花期 SPS 同工酶基因相对表达量

Relative mRNA level of SPS isozyme genes at anthesis



(b) SPS4 基因相对表达量  
Relative mRNA level of SPS4



(c) SPS3 基因相对表达量  
Relative mRNA level of SPS3

图 2 不同大豆品种叶片 SPS 同工酶基因表达的变化

Fig. 2 The changes of SPS isozyme genes expression in leaves of various soybean varieties

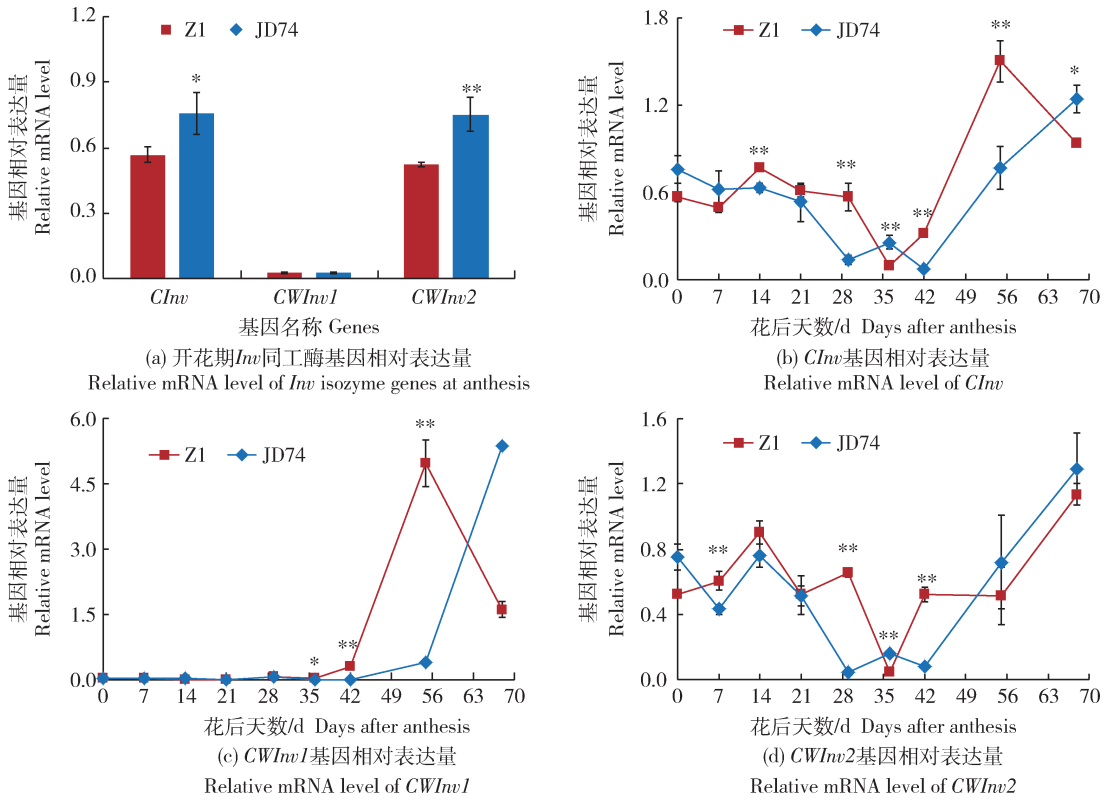


图3 不同大豆品种叶片 *Inv* 同工酶基因表达的变化

Fig. 3 The expression changes of *Inv* isozyme genes in leaves of various soybean varieties

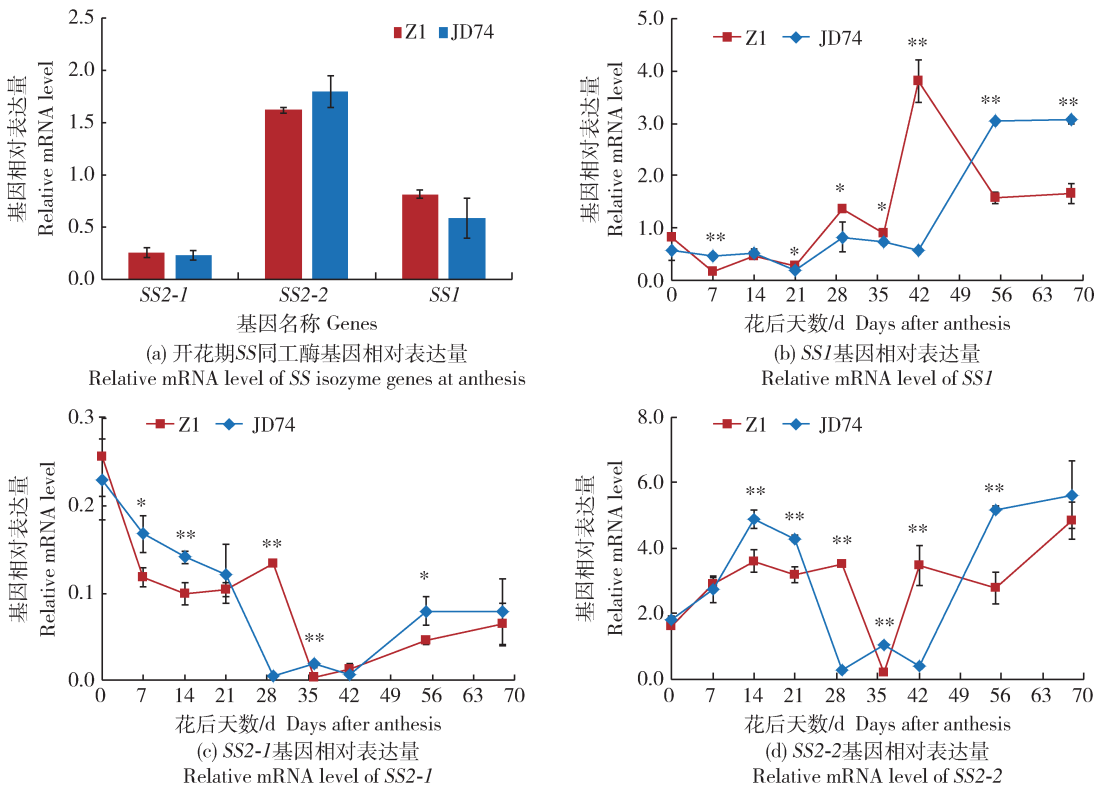


图4 不同大豆品种叶片 *SS* 同工酶基因表达的变化

Fig. 4 The expression changes of *SS* isozyme genes in leaves of various soybean varieties

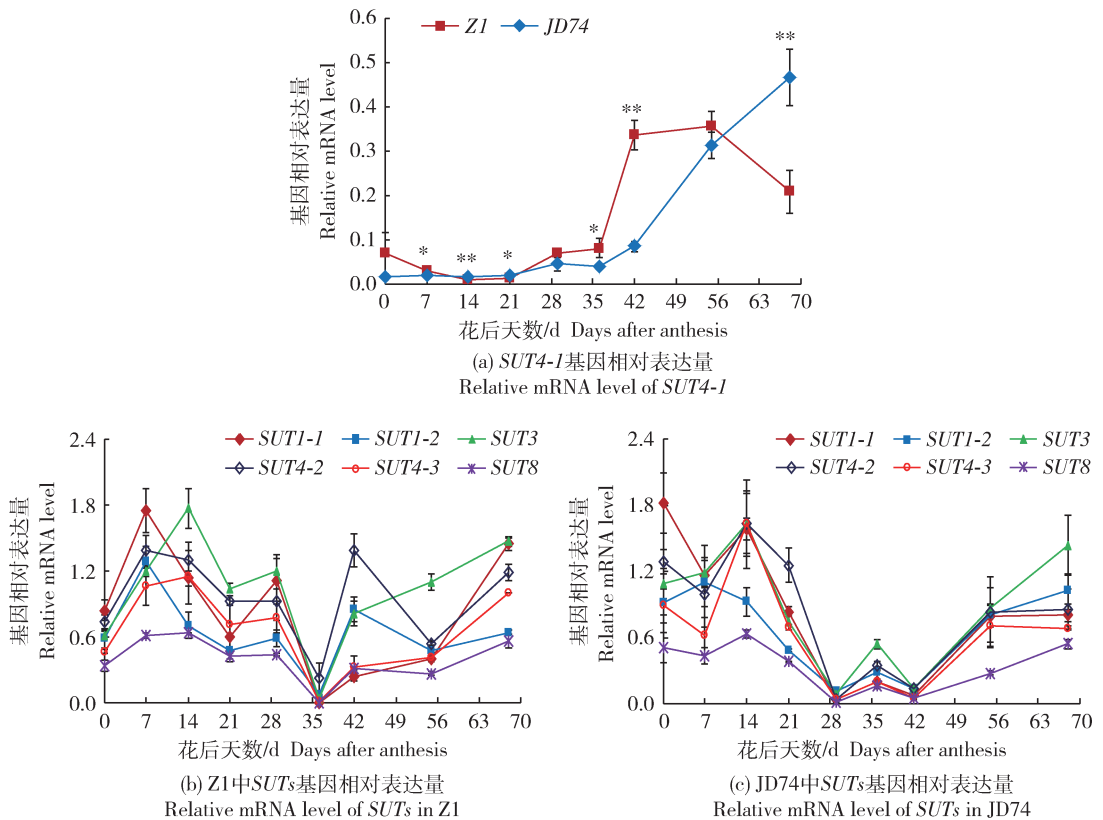


图 5 不同大豆品种叶片 *SUT* 同工酶基因表达的变化

Fig. 5 The expression changes of *SUT* isogenes in leaves of various soybean varieties

## 2.5 己糖激酶同工酶基因 *Hxks* 和 *Frks* 表达的变化

如图 6(a) 所示, 开花期 (花后 0 d) *Hxk2* 基因表达量高于 *Hxk1*, 且 JD74 中 *Hxk2* 基因的表达量显著高于 Z1。花后至成熟期间, *Hxk1* 基因在 2 个品种中的表达量变化趋势基本一致 (图 6(b)), 花后持续下降并长时期维持极低的表达水平, 后期表达量大幅上升且在花后 55 d 到达表达量峰值后迅速下降, 其中滞绿品种 Z1 中的表达量在花后 42 和 55 d 显著大于 JD74 中的表达量。各品种 *Hxk2* 基因表达量前期大幅升高后, 均经历一个迅速下降的过程 (图 6(c))。Z1 的表达水平于花后 36 d 降至最低, 之后迅速上升并基本保持稳定; JD74 的表达量则在花后 29 到 42 d 一直维持较低水平。

己糖激酶中还包括一类在果糖识别中起特异性作用的果糖激酶 (*Frk*), 植物体内通常含有多种编码 *Frk* 的基因。依据它们的蛋白质活性和氨基酸序列, 这些基因可以被划分为 *Frk1* 和 *Frk2* 两类。图 6(d) 结果表明, 开花期 (花后 0 d) *Frk1* 和 *Frk2* 基因表达水平差别不大, JD74 中的表达水平显著高于滞绿品种 Z1。花后至成熟阶段, 2 个品种中 *Frk1*

和 *Frk2* 的表达水平均呈现为升-降-升的变化趋势 (图 6(e) 和 (f))。结荚期 (花后 14 至 29 d), 除花后 21 d 外, 滞绿品种 Z1 中的表达水平均显著高于 JD74。鼓粒前期和中期 (花后 29 至 42 d), 除花后 36 d 外, JD74 中的表达水平均显著低于滞绿品种 Z1。

## 3 讨论

蔗糖是叶片光合作用的主要产物, 也是光合同化物源库运输的主要形式。植物体内蔗糖代谢的过程需要多种酶共同参与, 蔗糖代谢相关酶活性的变化会直接影响叶片的糖分积累<sup>[20]</sup>。其中, SPS 主要负责催化蔗糖的合成, 是蔗糖合成的限速酶。研究表明, SPS 可以调节小麦旗叶光合产物向蔗糖的转化<sup>[21]</sup>。SPS 家族基因的表达水平与蔗糖的积累呈明显的正相关<sup>[22]</sup>。抑制拟南芥 SPS 基因的表达, 会明显减少蔗糖的合成<sup>[23]</sup>。本研究结果表明, 2 个 SPS 同工基因在大豆叶片中具有相似的表达模式, 在鼓粒前中期 (花后 29 至 42 d), 除花后 36 d 外, 滞绿品种 Z1 中 SPS 基因的表达量显著高于 JD74, 表

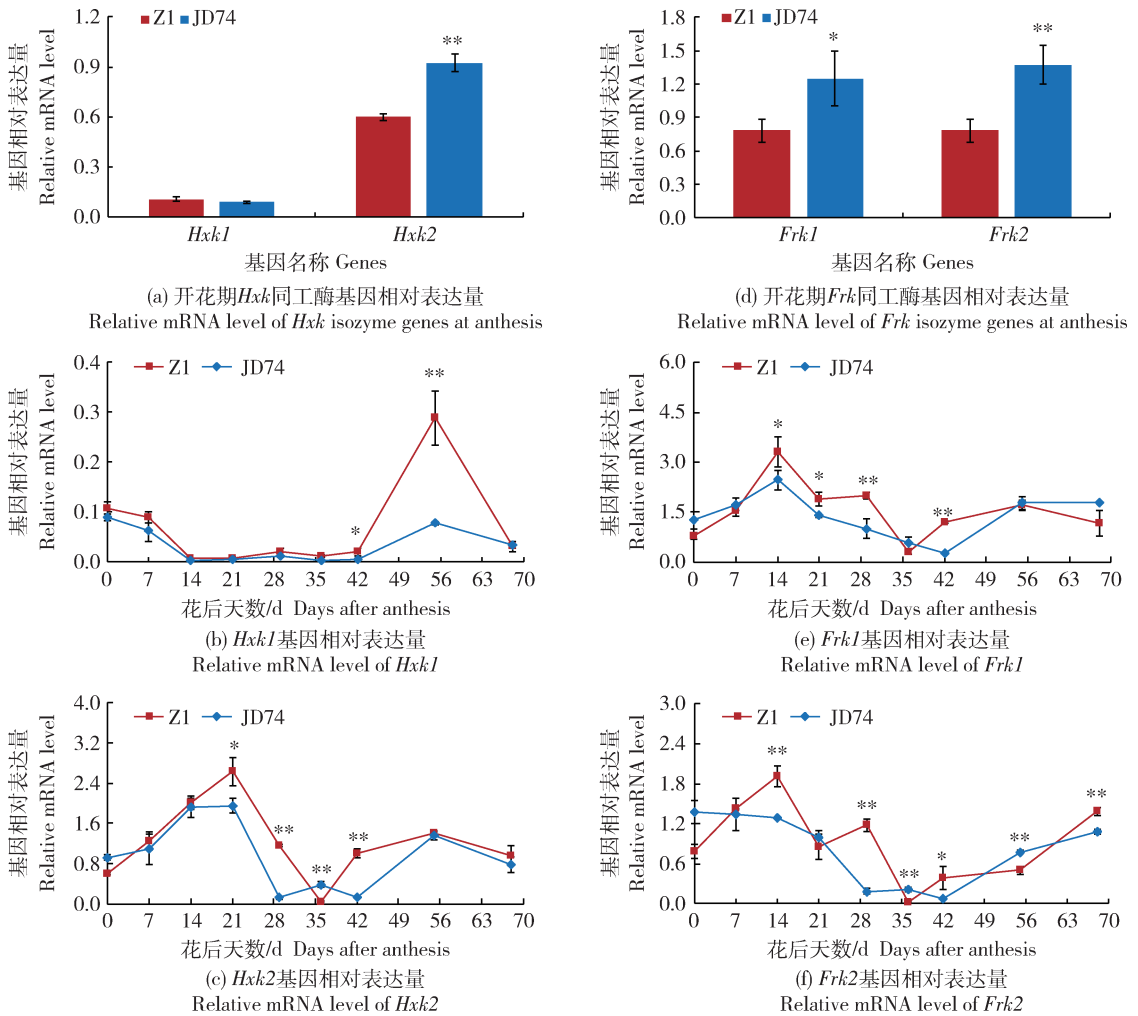


图6 不同大豆品种叶片 *Hxk* 和 *Frk* 同工酶基因表达的变化

Fig. 6 The expression changes of *Hxk* and *Frk* isozyme genes in leaves of various soybean varieties

明此阶段滞绿品种具有较强的蔗糖合成能力。但 Lunn 等<sup>[24]</sup>发现,转化集胞藻 *SPS* 基因至一些作物中,虽然使得 *SPS* 高水平表达,但没有明显提高转基因作物叶片 *SPS* 活性和碳的分配。Park 等<sup>[25]</sup>也发现,拟南芥 *SPS* 基因转化烟草后,*SPS* 转录丰度及酶活性在转基因植株茎和叶中均有所提高,但是蔗糖含量在茎中增加而在叶片中降低。本研究结果也证实,大豆叶片衰老后期 *SPS* 基因表达量上升的阶段(花后 42~55 d),糖水平反而下降,推测这种现象是由于鼓粒和成熟期蔗糖从叶片向茎秆和籽粒等库器官转运而造成的。

转化酶催化蔗糖裂解,产生己糖,转化酶基因的过表达能够造成己糖积累或叶片细胞渗透压升高,从而降低转基因植物叶片的光合速率<sup>[26]</sup>。*Inv* 的表达随蔗糖浓度的不同而发生变化,低糖时抑制效果

不明显,糖水平越高抑制作用越明显<sup>[27]</sup>。本研究表明,大豆开花后叶片可溶性糖含量逐渐升高,花后 29 至 42 d,叶片可溶性糖含量逐渐积累至最高水平,此时 *CInv* 和 *CWInv2* 基因表达量受到高糖水平的抑制降至最低水平。之后,随着光合速率的下降,光合产物积累减少,糖水平的降低逐渐解除这种抑制,*CInv* 和 *CWInv2* 表达量逐渐上调。*CWInv1* 前期表达水平一直很低,说明其对糖水平更加敏感,直到后期由于光合速率下降,蔗糖水平降低,才大幅上调表达。结果表明,*Inv* 同工酶基因在大豆叶片中的表达受糖水平的精确调控,*Inv* 在叶片衰老前期的表达可能受高水平糖的抑制。

己糖激酶除具有己糖磷酸化功能外,还广泛参与植物的糖感知和糖信号的转导<sup>[10]</sup>。先前研究表明,*Hxk1* 的表达随外源糖处理浓度的升高而逐渐



被抑制, *Hxk2* 则表现为低浓度诱导, 高浓度抑制。2 个 *Hxk* 同工酶基因对于外源糖的处理应对机制稍有不同, 但高浓度均抑制 *Hxk* 的表达<sup>[27]</sup>。本研究也表明, 大豆己糖激酶同工酶基因表达的变化趋势与叶片内源糖水平有着密切的联系, 受糖信号调控。*Hxk1* 和 *Hxk2* 低水平表达阶段正是 *SPS* 表达升高, 叶片通过光合作用产生碳水化合物能力最高的阶段(花后 29~42 d)。开花前期(0~21 d) *SPS* 表达降低, 光合速率下降, 叶片内包括蔗糖在内的各种糖类物质积累水平较低。同时, 由于 *SS* 和 *Inv* 等蔗糖裂解酶类同工酶基因和蔗糖转运蛋白 *SUTs* 基因都处在比较稳定的表达状态, 叶片内部糖水平没有发生较大变化, 使得 *Hxk2* 在低糖环境中逐渐升高其表达水平。花后 29~42 d, *SPS* 表达水平逐渐提高, 叶片光合速率也开始上升, 产生糖类碳水化合物的能力提高, 同时大多数 *SS*、*Inv* 和 *SUT* 等同工酶基因表达量降低, 造成蔗糖和己糖水平迅速提高, 从而抑制了 *Hxk2* 的表达。由此可见, 大豆源叶中存在复杂的碳水化合物转化代谢, 其中各个环节都受到糖水平的精确调控, 这种转化代谢对于叶片的衰老进程起着重要的作用。研究表明, 叶片衰老过程与己糖的积累有关<sup>[28]</sup>, 并且 *Hxk* 依赖性的糖信号起了重要的作用<sup>[24]</sup>。非滞绿品种 JD74 *Hxk* 和 *Frk* 表达量除个别时期外, 整体都低于滞绿品种 Z1, 并且期间会经历较长时间的低水平表达期(花后 29~42 d), 因此限制了体内己糖的磷酸化和进一步的代谢, 造成己糖出现一定程度的积累, 因此叶片衰老速度要大于滞绿品种。

综上所述, 滞绿突变确实对大豆叶片蔗糖代谢相关基因的表达产生了较大的影响, 特别是在鼓粒初期和中期(花后 29~42 d)。有研究表明, 在大豆开花期及随后的籽粒建成期, 叶片源活性的改变以及光合同化物的含量、形式和转运均会影响大豆籽粒数量和百粒重等重要的产量性状<sup>[29]</sup>。先前的研究结果也表明, 与亲本晋大 74 相比, 晋大滞绿 1 号在叶片衰老过程中, 叶绿素降解程度降低, 光合机构更加稳定, 光合效率高值持续期延长, 因此获得了更好的产量表现<sup>[30]</sup>。特别是单株粒数和单株粒重这两个重要的产量性状, 也都高于亲本晋大 74。结合本研究结果分析, 滞绿品种在产量表现及产量性状上的优势可能源于其叶片蔗糖代谢的变化。此外, 王文强<sup>[31]</sup>的研究结果表明, 小麦滞绿突变体灌浆期旗叶全氮含量、游离氨基酸含量以及氮素代谢相关

酶活性均高于其野生型。但是, 关于滞绿突变对大豆籽粒品质影响的研究还鲜有报道。因此, 滞绿大豆碳氮代谢及籽粒建成的相关生理及分子机制还有待进一步研究。

## 4 结 论

本研究结果表明, 滞绿突变对于大豆叶片蔗糖代谢相关基因表达产生的影响集中体现在鼓粒初期和中期(花后 29~42 d)。除花后 36 d 外, 滞绿品种 Z1 参与蔗糖合成和裂解的关键同工酶基因表达均较为活跃。己糖激酶和果糖激酶同工酶基因 *Hxk2*、*Frk1* 和 *Frk2* 的表达量也高于非滞绿品种 JD74。*SUT1-1*、*SUT1-2*、*SUT3*、*SUT4-2*、*SUT4-3* 和 *SUT8* 等 6 个蔗糖转运体同工酶基因的表达模式具有明显的品种特异性, 滞绿品种 Z1 叶片 *SUTs* 表达水平高于非滞绿品种 JD74。

## 参考文献 References

- [1] Kusaba M, Tanaka A, Tanaka R. Stay-green plants: What do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence [J]. *Photosynthesis Research*, 2013, 117: 221-234
- [2] Thomas H, Howarth C J. Five ways to stay green [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51(suppl\_1): 329-337
- [3] 任钧, 王晓磊, 高炯, 周强, 徐永平, 蒯本科. 国内大豆品种资源中滞绿(stay-green)性状的初步研究 [J]. *植物生理学报*, 2014, 50(9): 1336-1346  
Ren J, Wang X L, Gao J, Zhou Q, Xu Y P, Kuai B K. A preliminary study on the stay-green traits of soybean varieties [J]. *Plant Physiology Journal*, 2014, 50(9): 1336-1346 (in Chinese)
- [4] Qazi H A, Paranjpe S, Bhargava S. Stem sugar accumulation in sweet sorghum-Activity and expression of sucrose metabolizing enzymes and sucrose transporters [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169(6): 605-613
- [5] Huber S C, Huber J L. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1996, 47: 431-444
- [6] Ruan Y L, Jin Y, Yang Y J, Li G J, Boyer J S. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: Roles in development, yield potential, and response to drought and heat [J]. *Molecular Plant*, 2010, 3(6): 942-955

- [7] Stein O, Granot D. An overview of sucrose synthases in plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 95
- [8] 马春梅, 姚玉波, 郭海龙, 龚振平, 魏丹, 迟凤琴. 不同基因型大豆叶片蔗糖合成酶活性变化动态的研究[J]. 作物杂志, 2011(4): 32-37  
Ma C M, Yao Y B, Guo H L, Gong Z P, Wei D, Chi F Q. Dynamic changes of sucrose synthase in leaves among different soybean genotypes[J]. *Crops*, 2011(4): 32-37 (in Chinese)
- [9] 张超, 王彦杰, 付建新, 王晓庆, 王玮然, 董丽. 高等植物己糖激酶基因研究进展[J]. 生物技术通报, 2012(4): 19-26  
Zhang C, Wang Y J, Fu J X, Wang X Q, Wang W R, Dong L. Research advances in the hexokinase gene family in higher plant [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012 (4): 19-26 (in Chinese)
- [10] Cho J I, Ryoo N, Eom J S, Lee D W, Kim H B, Jeong S W, Lee Y H, Kwon Y K, Cho M H, Bhoo S H, Hahn T R, Park Y I, Hwang I, Sheen J, Jeon J S. Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as glucose sensors [J]. *Plant Physiology*, 2009, 149(2): 745-759
- [11] Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W H, Liu Y X, Hwang I, Jones T, Sheen J. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling[J]. *Science*, 2003, 300(5617): 332-336
- [12] Zhou L, Jang J C, Jones T L, Sheen J. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(17): 10294-10299
- [13] Barker L, Kühn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward J M, Frommer W B. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(7): 1153-1164
- [14] Fang C, Li C C, Li W Y, Wang Z, Zhou Z K, Shen Y T, Wu M, Wu Y S, Li G Q, Kong L A, Liu C M, Jackson S A, Tian Z X. Concerted evolution of D1 and D2 to regulate chlorophyll degradation in soybean[J]. *The Plant Journal*, 2014, 77(5): 700-712
- [15] Tian F X, Zhang M, Wang X, Chen Y H, Wang W. Antioxidative defence under drought stress in a wheat stay-green mutant[J]. *Biologia Plantarum*, 2015, 59(1): 123-130
- [16] Wang N, Zhang Y, Huang S N, Liu Z Y, Li C Y, Feng H. Defect in Brnym1, a magnesium-dechelate protein, causes a stay-green phenotype in an EMS-mutagenized Chinese cabbage (*Brassica campestris* L ssp *pekinensis*) line[J]. *Horticulture Research*, 2020, 7(1): 1-11
- [17] Zheng H J, Wu A Z, Zheng C C, Wang Y F, Cai R, Shen X F, Xu R R, Liu P, Kong L J, Dong S T. QTL mapping of maize (*Zea mays*) stay-green traits and their relationship to yield[J]. *Plant Breeding*, 2009, 128(1): 54-62
- [18] 马春梅, 郭海龙, 龚振平, 徐瑶, 魏丹, 迟凤琴. 大豆叶片可溶性糖代谢动态变化与相关酶活性的研究[J]. 作物杂志, 2012(5): 71-75  
Ma C M, Guo H L, Gong Z P, Xu Y, Wei D, Chi F Q. Study on dynamic change of soluble sugar metabolism and related enzyme activity in soybean leaf[J]. *Crops*, 2012(5): 71-75 (in Chinese)
- [19] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006  
Gao J F. *Experimental Guidance for Plant Physiology*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006 (in Chinese)
- [20] 陈忠良, 秦翠鲜, 桂意云, 廖芬, 汪淼, 王震, 龙明华, 黄东亮. 生长前期甘蔗叶片糖分含量及蔗糖磷酸合成酶基因表达分析[J]. 分子植物育种, 2020, 18(13): 4229-4235  
Chen Z L, Qin C X, Gui Y Y, Liao F, Wang M, Wang Z, Long M H, Huang D L. Characterization of sugar content and SPS expression pattern in leaves at the early growth stage of sugarcane[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2020, 18 (13): 4229-4235 (in Chinese)
- [21] 李永庚, 于振文, 姜东, 余松烈. 冬小麦旗叶蔗糖和籽粒淀粉合成动态及与其有关的酶活性的研究[J]. 作物学报, 2001, 27(5): 658-664  
Li Y G, Yu Z W, Jiang D, Yu S L. Studies on the dynamic changes of the synthesis of sucrose in the flag leaf and starch in the grain and related enzymes of high-yielding wheat[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2001, 27(5): 658-664 (in Chinese)
- [22] Grof C P L, Albertson P L, Bursle J, Perroux J M, Bonnett G D, Manners J M. Sucrose-phosphate synthase, a biochemical marker of high sucrose accumulation in sugarcane[J]. *Crop Science*, 2007, 47(4): 1530-1539
- [23] Strand A, Zrenner R, Trevanion S, Stitt M, Gustafsson P, Gardeström P. Decreased expression of two key enzymes in the sucrose biosynthesis pathway, cytosolic fructose-1, 6-bisphosphatase and sucrose phosphate synthase, has remarkably different consequences for photosynthetic carbon metabolism in transgenic Arabidopsis thaliana[J]. *The Plant Journal*, 2000, 23(6): 759-770

- [24] Lunn J E, Gillespie V J, Furbank R T. Expression of a cyanobacterial sucrose-phosphate synthase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in transgenic plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54(381): 223-237
- [25] Park J Y, Canam T, Kang K Y, Ellis D D, Mansfield S D. Over-expression of an arabidopsis family A sucrose phosphate synthase (SPS) gene alters plant growth and fibre development [J]. *Transgenic Research*, 2008, 17(2): 181-192
- [26] Büssis D, Heineke D, Sonnewald U, Willmitzer L, Raschke K, Heldt H W. Solute accumulation and decreased photosynthesis in leaves of potato plants expressing yeast-derived invertase either in the apoplast, vacuole or cytosol[J]. *Planta*, 1997, 202(1): 126-136
- [27] 李兆伟. 水稻叶片早衰突变体的糖代谢基因表达与抗氧化生理调控[D]. 杭州: 浙江大学, 2014
- Li Z W. The expression alteration of various genes related to sugar metabolism in senescing leaves and its antioxidation modulation for *esl* mutant [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014 (in Chinese)
- [28] Diaz C, Purdy S, Christ A, Morot-Gaudry J F, Wingler A, Masclaux-Daubresse C. Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in *Arabidopsis*. A metabolic profiling approach [J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(2): 898-908
- [29] Durand M, Mainson D, Porcheron B, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N. Carbon source-sink relationship in *Arabidopsis thaliana*: the role of sucrose transporters[J]. *Planta*, 2018, 247(3): 587-611
- [30] Wang P, Hou S Y, Wen H W, Wang Q Z, Li G Q. Chlorophyll retention caused by *STAY-GREEN* (*SGR*) gene mutation enhances photosynthetic efficiency and yield in soybean hybrid Z1[J]. *Photosynthetica*, 2021, 59 (1): 37-48
- [31] 王文强. 细胞分裂素代谢在小麦滞绿突变体 *tasgl* 中的作用及调控机制[D]. 泰安: 山东农业大学, 2018
- Wang W Q. The role and regulatory mechanism of cytokinins in wheat stay-green mutant *tasgl* [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2018 (in Chinese)

责任编辑: 董金波