

CPPU 对干旱胁迫下小麦幼苗叶片的蛋白 响应及生育期差异的影响

赵 芳 姚占军 苏集华

(河北农业大学 农学院 河北 保定 071001)

摘要:采用叶面喷施调吡脞(*N*-(2-chloro-4-pyridyl)-*N'*-phenylurea, CPPU) 处理,分析干旱胁迫下 CPPU 对小麦幼苗叶片蛋白质及各种生理生化指标的影响,以探讨 CPPU 提高小麦抗旱性的分子机制。以小麦品种河农 822 为材料,用聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE) 研究喷施 CPPU 后幼苗叶片中蛋白质组变化情况;用常规方法检测过氧化物酶(POD) 活性、可溶性蛋白、可溶性糖、脯氨酸和丙二醛(MDA) 含量的变化。结果表明,经 SDS-PAGE 电泳技术发现,与对照相比,干旱胁迫下喷施 CPPU 后出现分子量为 125.80, 55.40, 35.33, 25 kDa 等 7 条特异性条带,消失了 30 kDa 的电泳条带。与干旱对照相比,喷施 CPPU 后叶片中蛋白条带中多了 40 kDa 特异性条带,消失了 30 kDa 的电泳条带;并且在干旱胁迫下,喷施 100 mg CPPU 后使幼苗体内的 POD 活性提高 37.06%,可溶性蛋白含量增加 63.50%,可溶性糖含量增加 87.51%,脯氨酸含量增加 109.57%,MDA 含量降低 46.06%。与干旱对照相比,喷施 CPPU 的幼苗叶片中出现了一条特异性条带,消失了一条特异性条带,且在 70 kDa 和大约 20 kDa 处的蛋白含量明显高于 2 个对照,在 32 kDa 和大约 25 kDa 处的蛋白含量下降。100 mg CPPU 可促进干旱胁迫下幼苗体内的可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸含量显著增加,POD 活性显著提高,MDA 含量降低。说明叶面喷施 CPPU 能够增强幼苗对干旱胁迫的适应性。

关键词:CPPU; 小麦; 干旱胁迫; SDS-PAGE

中图分类号:S512.01 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)02-0180-05

Effects of CPPU on Protein Response of Wheat Seedlings Leaves and Different Growth Stage under Drought Stress

ZHAO Fang, YAO Zhan-jun, SU Ji-hua

(College of Agronomy, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

Abstract: This experimentation focused on the effects of CPPU on wheat seedlings proteins and physiology-biochemistry indexes under drought stress to explore the molecular mechanisms of CPPU treatment on improving drought resistance of wheat by foliage spraying with CPPU (*N*-(2-chloro-4-pyridyl)-*N'*-phenylurea). With Henong 822 as materials, SDS-PAGE was used to study changes of proteomics in seedlings leaves, and routine methods were used to test changes of peroxidase (POD) activity, the contents of soluble sugar and protein, proline and malondialdehyde (MDA) contents. The result of SDS-PAGE showed that seven specific electrophoresis bands were obtained after CPPU treatment compared with the control under drought stress, their molecular weight was 125.80, 55.40, 35.33 and 25 kDa respectively, but one of 30 kDa was disappeared. In compared with the drought control, 40 kDa specific band was found in protein bands of leaves with CPPU treatment, but 30 kDa strip was disappeared. The protein contents of 70 kDa and about 20 kDa were higher than two contrast groups, while the protein contents of 32 kDa and about 25 kDa were decreased. After spraying 100 mg CPPU, POD activity was increased by 37.06%, the contents of soluble protein and sugar were improved by 63.50% and 87.51%, proline content was improved by 109.57%, but MDA content was decreased by 46.06% in wheat seedlings under drought stress. It illustrated spraying CPPU on leaves could strengthen adaptability of wheat under drought stress. In compared with the drought control,

收稿日期:2011-12-28

基金项目:河北省应用基础研究计划重点基础研究项目(11960145D);河北省人力资源和社会保障厅科研资助项目(2009);河北省自然科学基金(2007000470)

作者简介:赵芳(1987-),女,河北阳原人,硕士,主要从事小麦分子遗传育种研究。

通讯作者:姚占军(1965-),男,河北平泉人,教授,博士,主要从事小麦遗传育种研究。

one specific protein band was found in seedlings leaves of treatment with CPPU, one was disappeared and the protein contents of 70 kDa and about 25 kDa were higher than two contrast groups, while the protein contents of 32 kDa and about 25 kDa were decreased. 100 mg of CPPU could improve the contents of soluble sugar, protein and proline as well as POD activity significantly, but decrease MDA content in wheat seedlings under drought stress. It illustrated spraying CPPU on leaves could strengthen adaptability of seedlings under drought stress.

Key words: CPPU; Wheat; Drought stress; SDS-PAGE

细胞分裂素作为一种重要的植物激素,主要以 2 种形式存在:一种是苯基脲型细胞分裂素,如 N-苯基-N-(2-氯-4-吡啶基)脲(CPPU)、N-(4-吡啶基)N-苯基脲(4PU)等;另一种是嘌呤型细胞分裂素,如 6-苄基腺嘌呤(6-BA)、6-咪喃甲基腺嘌呤(KT)等^[1]。CPPU 是一种重要吡啶取代脲类细胞分裂素,具有诱导愈伤组织生长,促进芽的发育、种子萌发、保绿和延缓衰老等显著的生理活性^[2]。Kapchina 等^[3]发现,在培养基中添加 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 CPPU,可增加满天星中干物质的积累并促进叶绿体的合成,提高叶绿素含量。Kim^[4]研究表明,在猕猴桃落花后第 10 天喷施 5~10 mg/L 的 CPPU 可使果实明显增大,单果质量增至对照的 2 倍。罗黄颖等^[5]研究发现,外源喷施 CPPU 能够通过提高番茄幼苗抗氧化酶活性来缓解盐胁迫下其对细胞膜的伤害和光合作用的抑制。

蛋白质组(Proteome)一词由澳大利亚科学家提出,源于蛋白质(Protein)和基因组(Genome)2 个词的组合,意指“一种基因组所表达的全套蛋白质”^[6]。蛋白质组学为在蛋白质水平上研究生物体、细胞、器官和组织,以及分析比较不同生理条件下的蛋白质表达等提供了一套有力的工具和方法。蛋白质组学技术已有效地应用于分析非生物因子胁迫下植物的蛋白响应过程,包括热害、冷害、干旱胁迫、氧化胁迫、盐害和重金属毒害等^[7]。

小麦是世界性的重要粮食作物,而干旱胁迫是影响小麦生长发育并最终导致其减产的重要环境因子之一。本试验研究干旱胁迫下 CPPU 对小麦幼苗蛋白质组、过氧化物酶(POD)活性、可溶性蛋白、可溶性糖、脯氨酸和丙二醛(MDA)等的影响,以探讨 CPPU 提高小麦耐旱性的可能生化生理机制。

1 材料和方法

1.1 材料

试验在河北农业大学农学院试验温室进行,供试小麦(*Triticum aestivum* L.)品种为河农 822;CPPU 购置于上海易利生物科技有限公司。供试基质为蛭石,采用高和直径均为 12 cm 的塑料营养钵进行育

苗栽培,营养钵用 75% 酒精擦洗消毒。

选用籽粒饱满、无病虫害、外形一致的种子,用 75% 的酒精对种子进行消毒处理。将消毒后的种子种植 40 盆,用 Hongland 营养液浇灌培养,待幼苗达到四叶一心时,选整齐一致的幼苗移出培养钵,其根部用蒸馏水冲洗干净放入装有 50 mL 10% 聚乙二醇(PEG6000)的三角瓶中进行干旱胁迫处理,对照组放入清水中,在叶片表面喷施 CPPU,进行 5 个处理:CK. 对照;0. 干旱处理;1. 干旱 + 10 mg/L CPPU 处理;2. 干旱 + 50 mg/L CPPU 处理;3. 干旱 + 100 mg/L CPPU,每个处理设 5 个重复,生物学重复 3 次,处理 24 h 后完全随机区组采样。

1.2 测定方法

称取小麦组织 0.1 g,放入研钵内,加 1 mL 去离子水,于冰水浴中研成匀浆,然后以 1 mL ddH₂O 洗入离心管。在高速离心机上以 8 000 r/min 离心 10 min,吸取 750 μL 上清液至 1.5 mL 离心管中,加 750 μL 40% 蔗糖混和, - 20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。SDS-PAGE 聚丙烯酰胺参考生工商品目录配制,电泳结束后进行银染。

POD 活性按照李合生^[8]的愈创木酚氧化法进行;可溶性蛋白含量采用李合生^[8]考马斯亮蓝 G-250 法;脯氨酸含量采用李合生^[8]的茚三酮比色法;MDA 含量和可溶性糖含量采用李合生^[8]的硫代巴比妥酸法。

1.3 数据分析

采用 Excel 和 SPSS 软件进行数据处理和分析。

2 结果与分析

2.1 CPPU 对干旱胁迫下小麦幼苗中蛋白质种类变化的影响

为阐明小麦的干旱伤害和 CPPU 的抗旱机制,利用不同浓度的 CPPU 处理幼苗,进行蛋白质组学分析。如图 1 电泳图谱显示,与对照相比,在干旱胁迫下叶片组织中产生了分子量为 125, 80, 55, 35, 33, 25 kDa 等 6 条特异性蛋白质条带;而喷施 CPPU 后产生了分子量为 125, 80, 55, 40, 35, 33, 25 kDa 等 7 条特异性条带,消失了 30 kDa 的电泳条带。与干

旱对照相比,多了 40 kDa 特异性条带并消失了 30 kDa 的电泳条带,在 70 kDa 和大约 20 kDa 处的蛋白含量明显高于 2 个对照,而在 32 kDa 和大约 25 kDa 处的蛋白含量降低。

2.2 CPPU 对干旱胁迫下小麦幼苗中 POD 活性的影响

由图 2-A 可知,与对照相比,在干旱胁迫下喷施 CPPU 可以显著提高叶片中 POD 活性,在 10、50、100 mg/L CPPU 分别比对照提高 272.27%、236.43%、303.27%;与干旱对照相比,分别提高 11.23%、14.35%、37.06%。说明喷施 CPPU 可以提高叶片中 POD 活性,从而增强幼苗对活性氧的清除能力,提高幼苗对干旱胁迫的抗性。

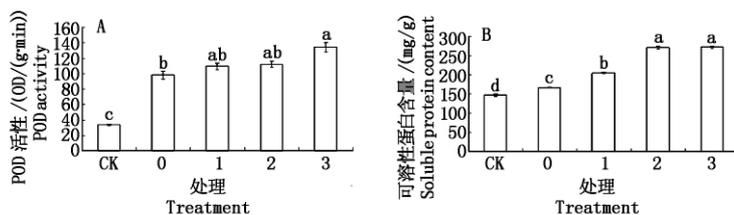


图 2 CPPU 对干旱胁迫下小麦苗期 POD 活性和可溶性蛋白含量的影响

Fig. 2 Effect of exogenous CPPU on the activity of POD and soluble protein content in leaves of wheat seedlings under drought stress

2.3 CPPU 对干旱胁迫下小麦幼苗中可溶性蛋白含量的影响

图 2-B 表明,与对照相比,在干旱胁迫下喷施 CPPU 可以显著提高叶片中可溶性蛋白的含量,喷施 10、50、100 mg/L CPPU 分别比对照提高 39.16%、83.73%、84.77%;而与干旱对照相比,分别提高 23.14%、62.58%、63.50%。表明喷施 CPPU 能提高干旱胁迫下叶片中可溶性蛋白含量,从而提高幼苗中酶活力,增强幼苗对干旱胁迫的适应性。

2.4 CPPU 对干旱胁迫下小麦幼苗中可溶性糖含量的影响

从图 3-A 可以看出,与对照相比,随着喷施 CPPU 浓度的增大,叶片中可溶性糖含量逐渐增大,且干旱胁迫后幼苗中糖含量明显高于对照。在干旱胁迫下喷施 CPPU 可以显著提高叶片的可溶性糖的含

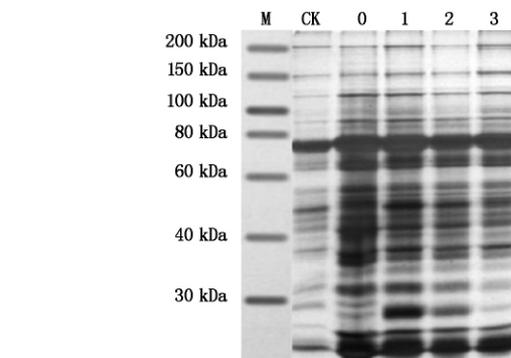


图 1 CPPU 对干旱胁迫下小麦苗期的可溶性蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of exogenous CPPU on soluble protein expression in leaves of wheat seedlings under drought stress

量,与对照相比,喷施 10、50、100 mg/L CPPU 分别提高 135.13%、173.91%、299.93%;与干旱对照相比,分别提高 10.25%、28.43%、87.51%。表明喷施 CPPU 可以提高小麦叶片中可溶性糖含量,从而提高幼苗的渗透调节能力,增强幼苗对干旱胁迫的抗性。

2.5 CPPU 对干旱胁迫下小麦幼苗中脯氨酸含量的影响

如图 3-B 所示,与对照相比,随着喷施 CPPU 浓度的增加,叶片中脯氨酸含量逐渐增大,与对照相比,喷施 10、50、100 mg/L CPPU 分别提高 47.74%、77.97%、118.07%;与干旱对照相比,分别提高 41.99%、71.03%、109.57%,表明经 100 mg/L CPPU 处理能有效增加小麦抗旱能力。

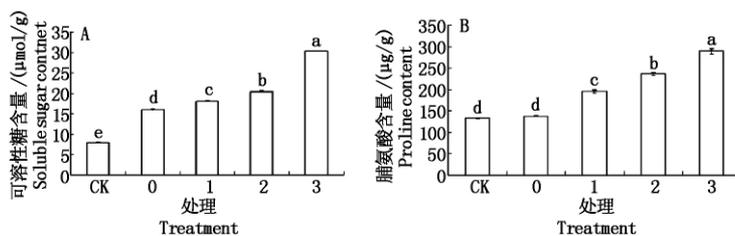


图 3 CPPU 对干旱胁迫下小麦幼苗中可溶性糖和脯氨酸含量的影响

Fig. 3 Effect of exogenous CPPU on soluble sugar and proline content in leaves of wheat seedlings under drought stress

2.6 CPPU 对干旱胁迫下小麦幼苗中 MDA 含量的影响

由图 4 可知,对照和干旱对照的叶片中 MDA 含量差异显著,干旱胁迫下幼苗叶片中 MDA 含量显著上升。经 10, 50, 100 mg/L 的 CPPU 处理后与对照相比,MDA 含量分别上升了 93.36%, 36.97%, 26.54%; 而与干旱处理相比,分别下降了 17.58%, 41.61%, 46.06%。表明干旱胁迫增加了幼苗体内 MDA 含量,从而导致幼苗膜脂过氧化,而喷施 CPPU 可以降低叶片 MDA 含量,进而减轻膜脂过氧化作用对植物细胞的伤害。

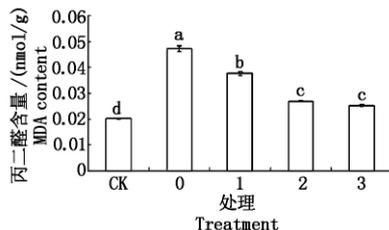


图 4 CPPU 对干旱胁迫下小麦苗期叶绿素和 MDA 含量的影响

Fig. 4 Effect of exogenous CPPU on MDA content in leaves of wheat seedlings under drought stress

3 结论与讨论

植物在干旱胁迫下产生的干旱诱导蛋白因品种、组织器官、干旱胁迫强度不同及生长发育时期不同等而表现出不同的变化规律,并发挥着不同的作用^[9-11]。Moham madkhani 等^[12]利用 SDS-PAGE 电泳分离技术报道,干旱胁迫对 2 个玉米品种可溶性蛋白质组成和种类的影响,指出玉米叶片中的 15, 17, 20, 27, 30, 37, 54, 59 kDa 蛋白在干旱胁迫中表达量增加,干旱胁迫诱导产生 22 kDa 的叶片蛋白。Beltranol 等^[13]报道,小麦水分胁迫下新产生了 108.5, 88.4, 63 kDa 的蛋白。前人研究表明,干旱诱导产生的新蛋白及发生蛋白表达量增减改变的主要是一些小分子蛋白。本研究采用 SDS-PAGE 凝胶电泳发现在 PEG6000 胁迫处理 24 h 后,与对照相比,在干旱胁迫下幼苗叶片组织中产生分子量为 125, 80, 55, 35, 33, 25 kDa 6 条特异性蛋白质条带;而喷施 CPPU 后出现分子量为 125, 80, 55, 40, 35, 33, 25 kDa 7 条特异性条带,其中,消失了 30 kDa 电泳条带。与干旱对照相比,喷施 CPPU 后叶片组织中多了 40 kDa 特异性蛋白条带,消失了 30 kDa 的电泳条带;并且在 70 kDa 和大约 20 kDa 处的蛋白含量明显高于 2 个对照,在 32 kDa 和大约 25 kDa 处的蛋白含量下降。这与前人的研究相一致,具体的分子机制有待于进一步研究。

在干旱胁迫下,植物细胞内自由基产生和清除的平衡遭到破坏,产生过量的 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 等活性氧,自由基积累可引发或加剧细胞的膜脂过氧化,并进一步导致细胞膜结构和功能的损伤,严重时导致细胞死亡^[14]。罗黄颖等^[5]研究发现,盐胁迫下,在营养液中添加 CPPU 处理后,根系和叶片 POD 活性都明显提高。本研究发现在干旱胁迫下喷施 CPPU 能显著提高幼苗叶片中 POD 活性,从而减轻膜脂过氧化的伤害。干旱胁迫会使质膜的结构和功能受到伤害,导致细胞膜透性增大。可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸是植物体内的重要渗透调节物质。在盐胁迫下,丛枝菌根真菌(AMF)可以促进番茄体内可溶性蛋白积累,提高细胞液浓度,维持细胞膨压,防止原生质体过度脱水,从而提高番茄的耐盐性^[15]。据杨淑慎等^[16]报道,甜菜碱可作为外援渗透调节剂提高 PEG 模拟干旱胁迫下小麦幼苗中游离脯氨酸和可溶性糖含量。本研究表明,干旱胁迫下,小麦幼苗体内可溶性蛋白、脯氨酸和可溶性糖含量会主动积累,喷施 CPPU 后,在其作为大分子调节渗透调节物质的协同作用下会诱导这 3 种物质积累的进一步增加,从而提高小麦幼苗的抗旱性。MDA 是细胞膜质中不饱和脂肪酸发生过氧化反应的最终产物之一,可以抑制蛋白质的合成,从而使酶丧失活性甚至成为一种催化错误代谢的分子^[17]。其含量的多少在一定程度上代表了细胞膜的损伤程度和植物对逆境反应的强弱^[18]。据聂磊等^[19]报道,抗旱性强弱与 MDA 含量呈显著负相关,CPPU 处理可以减少柚树细胞内 MDA 积累,降低叶片膜脂过氧化水平,从而提高柚树苗的抗旱性。本研究表明,干旱胁迫下幼苗体内 MDA 含量会显著上升,而经 CPPU 处理后,幼苗体内的 MDA 含量显著下降。这与前人的研究结果相一致。以上结果说明,在干旱胁迫下喷施 100 mg/L CPPU 可以使幼苗体内的 POD 活性、可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸含量显著提高,MDA 含量下降。说明叶面喷施 CPPU 能增强小麦对干旱胁迫的适应性。

参考文献:

- [1] 王三根. 细胞分裂素在植物抗逆和延缓中的作用[J]. 植物学通报, 2000, 17(2): 121-126.
- [2] 高金山, 边庆华, 张永忠, 等. 细胞分裂素 CPPU 的研究进展[J]. 农药, 2006, 3(45): 151-154.
- [3] Kapchina Toteva V, Stoyanova D. Effect of cytokinins and cytokinin antagonist on in vitro cultured *Gyposiphila paniculata* L[J]. *Biologia Plantarum*, 2003, 46(3): 337-341.

- [4] Kim J G ,Takami Y ,Mizugami T *et al.* CPPU application on size and quality of hardy kiwifruit [J]. *Scientia Horticulturae* 2006 ,110(2) : 219 - 222.
- [5] 罗黄颖 ,高洪波 ,高志奎 ,等. CPPU 和 6-BA 对盐胁迫下番茄活性氧代谢及叶绿素荧光的影响 [J]. *西北植物学报* 2010 ,30(9) : 1852 - 1858.
- [6] Wilkins M R ,Williams K L ,Appel R D *et al.* Proteome research ,new frontiers in functional genomics [M]. Berlin: Springer - Verlag ,1997: 304 - 331.
- [7] 周伟辉 ,薛大伟 ,张国平. 高温胁迫下水稻叶片的蛋白响应及其基因型和生育期差异 [J]. 2011 ,37(5) : 820 - 831
- [8] 李合生. 植物生理生化实验原理与技术 [M]. 北京: 高等教育出版社 2001
- [9] Pandey D M ,Wu R Z ,Hane E J *et al.* Drought effect on electrophoretic protein pattern of *Anoectochilus* for mosanus [J]. *Scientia Horticulturae* 2005 ,168: 161 - 166.
- [10] Lobato A K S ,Oliveira-neto C F ,Costa R C L *et al.* Biochemical and physiological behavior of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. under water stress during the vegetative phase [J]. *Asian J Plant Sci* 2008(7) : 44 - 49.
- [11] Oosthuizen I B ,Snyman H A ,Pretorius J C. Protein concentration in response to water stress in *Themeda triandra* Forsk [J]. *South African Journal of Plant and Soil* 2006 , 23(1) : 43 - 48.
- [12] Mohammadkhani N ,Heidar R. Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties [J]. *Turk J Biol* 2008 ,32: 23 - 30.
- [13] Beltrano J ,Ronco M ,Arango M C. Soil drying and rewetting applied at three grain developmental stages affect differentially growth and grain protein deposition in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Braz J Plant Physiol* , 2006 ,18: 341 - 350.
- [14] 高雁 ,李春 ,姜恺. 甜菜碱对干旱胁迫下棉花幼苗生理特性的影响 [J]. *植物营养与肥料学报* , 2011. 17(3) : 513 - 516.
- [15] Huang Z ,He C X ,He Z Q *et al.* The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxyradical scavenging system of tomato under salt tolerance [J]. *Agricultural Sciences in China* 2010 9(8) : 1150 - 1159.
- [16] 杨淑慎 ,翁明阳 ,戴明 ,等. 甜菜碱不同预处理时间下小麦幼苗对 PEG-6000 模拟干旱的响应 [J]. *水土保持研究* 2008 ,15(6) : 241 - 244.
- [17] 曹锡清. 膜脂过氧化对细胞与机体的作用 [J]. *生物化学与生物物理进展* ,1986(2) : 17 - 21.
- [18] 冯焯 ,于贤昌 ,郭恒俊 ,等. 低温胁迫对黄瓜嫁接苗和自根苗保护酶活性的影响 [J]. *山东农业大学学报: 自然科学版* 2002 ,33(3) : 302 - 304.
- [19] 聂磊 ,刘鸿先 ,彭少麟. CPPU 提高柚树苗抗旱性的研究 [J]. *植物学通报* 2001 ,18(1) : 90 - 95.