

温湿度胁迫对 Bt 棉叶片氨基酸组分及 Bt 蛋白含量的影响

王永慧^{1,2} 陈建平² 张祥¹ 陈源¹ 陈德华¹

(1. 扬州大学 农学院 江苏省作物遗传生理重点开放实验室 江苏 扬州 225009; 2. 江苏沿海地区农业科学研究所, 农业部沿海盐碱地农业科学观测试验站 江苏 盐城 224401)

摘要:以泗抗 1 号(常规品种)和泗杂 3 号(杂交种)为材料,于盛铃期用高温低湿度和低温低湿度 2 个处理胁迫棉株 48 h,研究叶片氨基酸组分的变化及其与 Bt 蛋白含量的关系。结果表明,温湿度胁迫大幅度增加了叶片中天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸及精氨酸含量,对丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸含量无明显影响,亮氨酸、异亮氨酸含量小幅下降。低温低湿度胁迫 12 h 后叶片 Bt 蛋白含量发生显著下降,而高温低湿度处理胁迫 24 h 后下降幅度较大;整个胁迫过程中,低温低湿度下叶片 Bt 蛋白含量一直低于高温低湿度处理。温湿度胁迫还降低叶片 GPT 和 GS 酶活性,但提高了蛋白酶的活性。相关性分析表明,温湿度胁迫叶片中 Bt 蛋白主要氨基酸组分总量与 Bt 蛋白含量呈显著负相关关系。说明盛铃期湿度胁迫叶片 Bt 蛋白含量的下降与 Bt 蛋白合成能力下降、分解能力增强相关。

关键词:温湿度胁迫;氨基酸;Bt 蛋白;Bt 棉

中图分类号: S562.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)06-0102-05

Effect of Combination Stress of Temperature and Humidity on Amino Acids and Bt Protein Content in Leave of Bt Cotton

WANG Yong-hui^{1,2}, CHEN Jian-ping², ZHANG Xiang¹, CHEN Yuan¹, CHEN De-hua¹

(1. Agricultural College of Yangzhou University, Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology of Jiangsu Province, Yangzhou 225009, China; 2. Institute of Agricultural Sciences of Jiangsu Costal Area, Observation and Experimental Station of Saline Land of Costal Area, Ministry of Agriculture, Yancheng 224001, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate how high temperature with low humidity stress and low temperature-humidity stress for 48 hours on leaf amino acids content and the relationship between Bt protein content and amino acids content using two Bt cotton cultivars in plant growth chamber, one was conventional (Sikang 1), other was hybrid (Siza 3). The results showed that combination stress of temperature and humidity stress increased sharply the content of Asp, Glu, Ala and Arg, but decreased the content of Leu and Ile, and had no significantly effect on the content of Ser, Thr and Val. The combination stress of temperature and humidity stress had significantly effect on the leaf Bt protein content in peak boll period. Leaf Bt protein content was decreased under low temperature-humidity stress after 12 hours significantly, while that of high temperature with low humidity stress dropped sharply after 24 hours. Leaf Bt protein content of low temperature-humidity treatment was lower than that of high temperature with low humidity treatment during stress time. The combination stress of temperature and humidity significantly decreased activity of the GPT and GS, but increased protease activity. There existed significantly negative correlation between total content of main amino acids of Bt protein and Bt protein content. These results suggested that the decrease of leaf Bt content under combination stress of temperature and humidity was closely associated with the decrease of Bt protein synthesis ability and the increase of Bt protein decomposition.

收稿日期: 2012-08-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971727; 31171479); 国家转基因生物新品种培育重大专项(2012ZX0813007-003); 江苏省高校自然科学基金研究重大项目(10KJA210057)

作者简介: 王永慧(1983-), 男, 江苏盐城人, 助理研究员, 博士, 主要从事棉花栽培及生理研究。

通讯作者: 陈德华(1964-), 男, 江苏盐城人, 教授, 博士生导师, 主要从事棉花栽培及生理研究。

Key words: Combination stress of temperature and humidity; Amino acids; Bt protein; Bt cotton

转基因棉花因棉株体内融合了 Bt 杀虫基因,能够稳定地合成 Bt 杀虫蛋白,有效地减轻棉铃虫等相关害虫的危害,降低农药用量。这既节省了植棉用工成本,又减轻了农药对环境的污染,具有良好的经济效益和生态效益^[1-2]。但到现在为止,国内外一致认为,转 Bt 基因棉花的抗虫性表现不稳定,除认为 Bt 棉遗传本身在生育过程中不同生育阶段的抗虫性表达差异较大外^[3-4],还认为气象因子对抗虫性表达具有较大的影响。目前,相关研究主要集中在干旱、水分及高温等对 Bt 棉抗虫性的影响,认为高温胁迫后,棉叶的氮代谢受到影响,生理活性下降,Bt 蛋白表达量明显降低^[5-7];同时,前人用生测试验也证明了低温环境下棉叶抗虫性明显偏低,棉铃幼虫存活率提高^[8-10]。但上述研究基本以单个因子进行,而棉花生育过程是受自然环境条件特别是温度和湿度等因子的综合影响,如在棉花生育后期往往易发生高温干旱、低温寡照等极端性气候,对棉花抗虫能力的表达产生不良影响。因此,单个因子往往不能完全反映自然温湿度互作条件下对 Bt 蛋白表达量的影响。此外,氨基酸作为蛋白质的基本单元,其组分的构成和比例是蛋白类型和功能的重要影响因素,Bt 蛋白作为蛋白质的一种,其氨基酸构成及比例是固定的,如果发生变化,可能会影响 Bt 蛋白的形成。因此,本研究通过人工模拟高温低湿度和低温低湿度 2 种不同的温湿度互作逆境,观察盛铃期温湿度逆境下 Bt 棉氨基酸组分的变化及对 Bt 蛋白表达量的影响,试图进一步明确逆境下 Bt 抗虫棉生理生化代谢特征,以期为 Bt 棉安全生产应用提供生理基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验于 2008 - 2009 年在扬州大学江苏省栽培生理重点实验室人工气候室进行,采用盆栽方法。供试土壤为沙壤土,含有机质 1.88%,水解氮 134.7 mg/kg,速效磷 22.5 mg/kg,速效钾 81.3 mg/kg。试验所用盆钵直径 30 cm,高 27 cm,每盆装土 11 kg,土壤自然风干、过筛去杂后装盆,用水沉实。供试棉花品种为泗抗 1 号(常规品种)、泗杂 3 号(杂交种)。营养钵育苗,2 年均是在 4 月 5 日播种,36 d 后移栽棉苗于盆中。管理措施与一般大田生产一致。

1.2 试验设计

于 8 月 15 日(盛铃期),用人工气候箱对棉株进行温湿度胁迫。本试验采用 2 个处理,分别为高温低湿度(HD)和低温低湿度(DD),其中大气相对湿度设定为 50%,温度分别设高温(37℃)和低温(18℃) 2 个水平,胁迫持续时间为 48 h。以上温度控制误差 $\pm 1^\circ\text{C}$,湿度控制误差 $\pm 5\%$,光量子通量密度为 $800 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,用称重法控制土壤含水量,待胁迫前调节土壤相对含水量,使之维持在 $(70 \pm 5)\%$ 。

1.3 取样方法及测定内容

在温湿度胁迫 12, 24, 36, 48 h 后取样。2 个处理均选择生长均匀一致的棉花 3 株,取棉株倒 4 叶片,混合后叶片分成两部分,一部分液氮速冻后供叶片 Bt 蛋白含量及酶活性的测定;另一部分先 105℃ 杀青,再在 80℃ 下烘干后待测。

叶片 Bt 蛋白含量的测定,用酶联免疫法(ELISA),参见文献[11]进行。

叶片氨基酸含量的测定,样品衍生后用氨基酸 AccQ·Tag 方法测定。

叶片 GPT、GS 酶活性的测定,参见文献[12]进行。

1.4 数据分析

用 SPSS 13.0 软件进行统计分析数据,用 Duncan's 进行处理间差异性检验($P = 0.05$),用 Sigma-plot 绘制图表。

2 结果与分析

2.1 盛铃期温湿度胁迫对叶片氨基酸组分的影响

叶片中氨基酸共有 17 种,根据性质将其分为酸性、碱性和中性氨基酸 3 类。表 1 表明,盛铃期温湿度胁迫后叶片天冬氨酸(Aspartic acid)、谷氨酸(Glutamic acid)都呈快速上升的趋势。处理间相比,HD 处理前期变化较小,后期增幅较大;与之相反,DD 处理在胁迫前期酸性氨基酸含量上升较快,而后期增幅较小。胁迫 12 h,HD 和 DD 处理下泗杂 3 号叶片酸性氨基酸含量分别比对照增加了 4.3% 和 18.1%;胁迫 48 h 后泗抗 1 号 HD 处理天冬氨酸、谷氨酸溶度分别比对照增加了 58.9% 和 139.1%,而 DD 处理天冬氨酸、谷氨酸溶度分别比对照增加了 38.2% 和 125.4%。温湿度处理还促进了精氨酸(Arginine)和碱性氨基酸总量的增加,对赖氨酸(Lysine)含量无明显影响。

表 1 盛铃期温湿度胁迫下叶片酸性和碱性氨基酸浓度
Tab. 1 Concentrations of acidic and alkali amino acids in leaves under combination stress of temperature and humidity during peak boll period

品种 Cultivars	处理 Treatment	胁迫时间/h Stress time	酸性氨基酸 Acidic amino acids			碱性氨基酸 Alkali amino acids			总量 Total	
			天冬氨酸 Asp	谷氨酸 Glu	总量 Total	组氨酸 His	精氨酸 Arg	赖氨酸 Lys		
			μmol/g							
泗抗 1 号 Sikang1	高温低湿度	0	653. 2d	783. 3d	1 436. 5d	350. 4c	103. 0c	342. 8a	796. 2d	
		12	698. 1d	777. 7d	1 475. 8d	362. 0c	98. 2c	356. 9a	817. 1d	
		24	785. 9c	1 216. 5c	2 002. 4c	360. 8c	122. 7b	351. 8a	855. 3c	
		36	970. 2b	1 775. 1b	2 745. 3b	388. 9b	166. 4a	347. 1a	902. 4b	
	低温低湿度	0	1 038. 4a	2 073. 6a	3 112. 0a	432. 2a	154. 7a	350. 5a	937. 4a	
		12	653. 2d	783. 3e	1 436. 5e	350. 4a	103. 0a	342. 8a	796. 2c	
		24	710. 7c	904. 9d	1 615. 6d	364. 1a	106. 5a	332. 1a	802. 7c	
		36	780. 2b	1 011. 1c	1 791. 3c	349. 9a	109. 0a	335. 9a	794. 8c	
	泗杂 3 号 Siza3	高温低湿度	0	879. 9a	1 639. 0b	2 518. 9b	340. 8ab	148. 6a	350. 7a	840. 1b
			12	903. 2a	2 037. 7a	2 940. 9a	330. 4b	190. 1a	342. 0a	872. 5a
			24	737. 0d	1 516. 3c	2 269. 0c	339. 5a	148. 2b	347. 4a	835. 1a
			36	708. 8d	1 040. 8d	1 749. 6d	384. 6c	106. 8b	332. 7a	824. 1c
低温低湿度		0	737. 0b	950. 7e	1 687. 7e	347. 5a	98. 0c	349. 1a	794. 6b	
		12	191. 3a	2 238. 1a	3 429. 4a	471. 6b	180. 1a	347. 5a	999. 2a	
		24	720. 8b	1 273. 1d	1 993. 9d	344. 9a	90. 7c	330. 0a	765. 6c	
		36	752. 7b	1 516. 3c	2 269. 0c	339. 5a	94. 8c	355. 3a	789. 6b	
48		940. 9a	1 849. 6a	2 790. 5a	335. 8a	172. 0a	342. 0a	849. 8a		

注: 同一栏不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。表 2 同。

Notes: Means followed by the same letters with each column are significantly different at the 0.05 probability level. The same as Tab. 2.

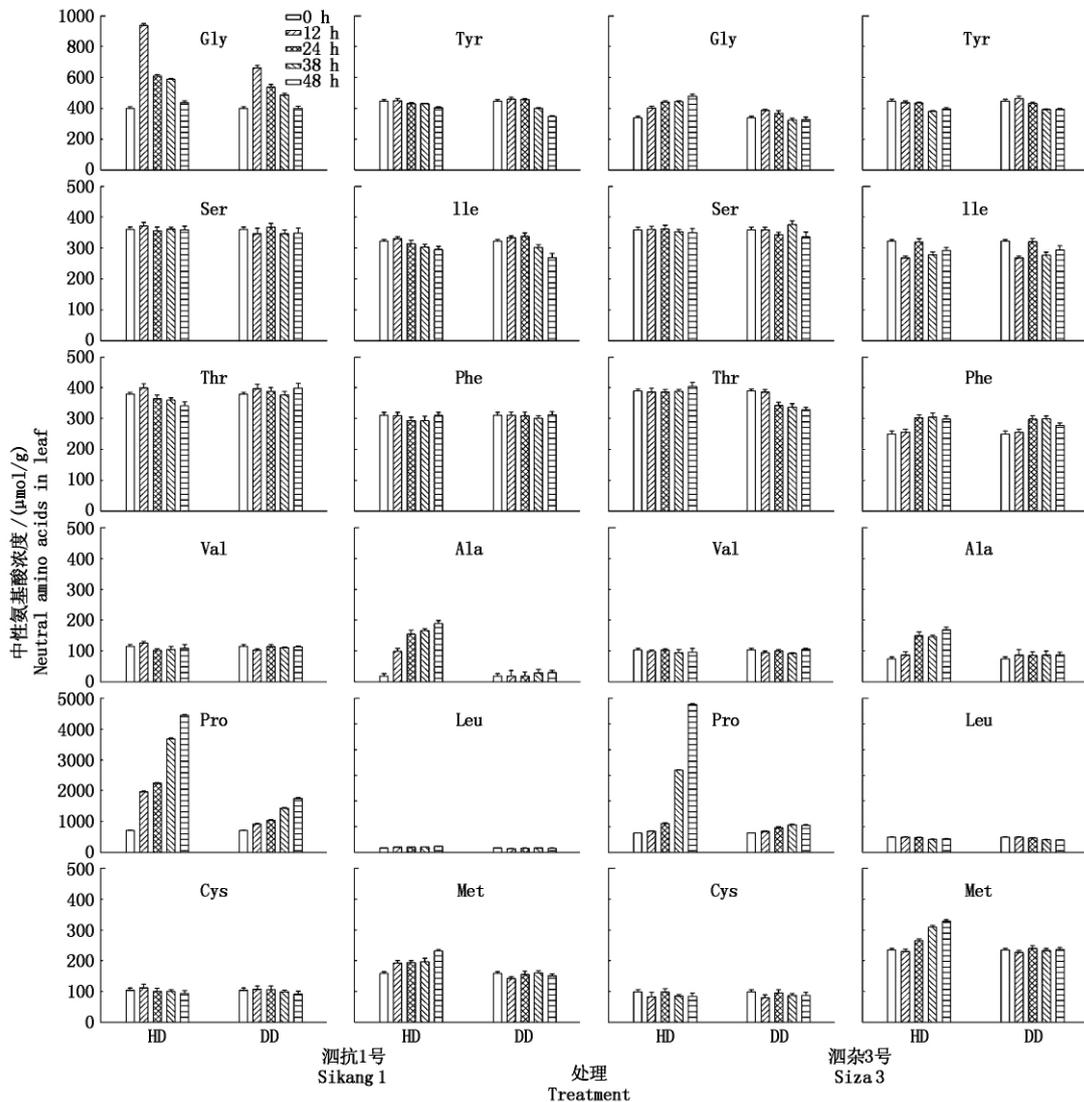


图 1 盛铃期温湿度胁迫下叶片中性氨基酸浓度

Fig. 1 Concentrations of neutral amino acids in leaves under combination stress of temperature and humidity during peak boll period

盛铃期温湿度胁迫对叶片中性氨基酸含量影响表明(图1),HD和DD胁迫后叶片氨基酸组分中亮氨酸(Leucine)、异亮氨酸(Isoleucine)溶度呈小幅下降的趋势,丝氨酸(Serine)、苏氨酸(Threonine)、缬氨酸(Valine)溶度无显著变化,丙氨酸(Alanine)和脯氨酸(Proline)溶度大幅度提高。低湿度下,高温处理和低温处理不同品种丙氨酸溶度分别比对照提高了3.8~9.6倍和3.1~8.5倍。HD处理还促进了甘氨酸(Glycine)、蛋氨酸(Methionine)、苯丙氨酸(Phenylalanine)等含量的增加。

Bt蛋白由248个氨基酸组成,其中,Bt蛋白主

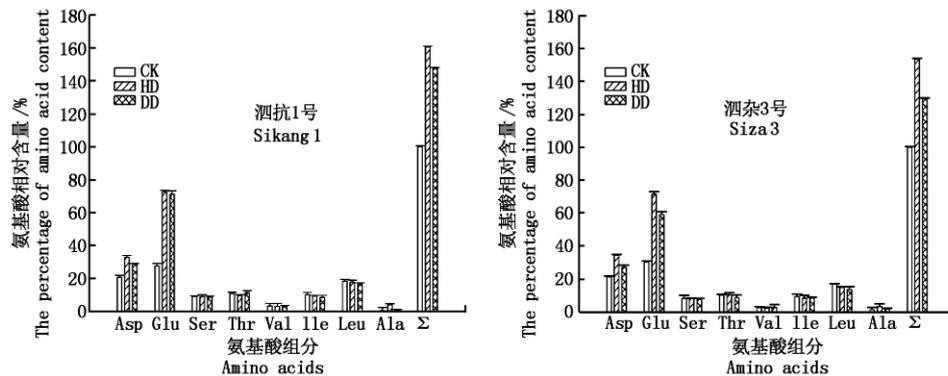


图2 盛铃期温湿度胁迫48 h后叶片中Bt蛋白主要氨基酸组分相对含量的变化

Fig. 2 Contents of main amino acids of Bt protein in leaves under combination stress of temperature and humidity for 48 hours during peak boll period

2.2 盛铃期温湿度胁迫对叶片Bt蛋白含量的影响

表2表明,盛铃期温湿度胁迫对不同基因型品种叶片Bt蛋白含量有明显的影响,胁迫后Bt蛋白含量出现大幅下降的特点,但不同处理对Bt蛋白含量影响程度不一样。与HD处理相比,DD处理12 h后2个叶片中Bt蛋白含量就发生显著性下降,胁迫12 h后DD处理泗抗1号和泗杂3号叶片Bt蛋白含量分别比对照下降了20.6%和23.1%。随着胁迫时间的延长,HD下叶片Bt蛋白含量降幅较大,但仍表现为DD下叶片Bt蛋白含量较低,胁迫48 h

要氨基酸组分由天冬酰胺(测定过程中,已酸解成天冬氨酸)、酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)、中性氨基酸(缬氨酸、苏氨酸、丙氨酸、亮氨酸、丝氨酸、异亮氨酸)8种氨基酸组成,其含量占叶片氨基酸总含量的74.58%^[13]。图2表明,不同类型Bt棉品种叶片Bt蛋白主要氨基酸组分含量都是以酸性氨基酸和亮氨酸最多,占到总组分含量45%~52%,苏氨酸、异亮氨酸和丝氨酸次之,缬氨酸和丙氨酸含量最低。胁迫48 h后,HD和DD均促进了Bt蛋白主要氨基酸总量的提高,泗抗1号分别比对照提高了58.1%和48.9%,泗杂3号分别比对照提高了53.3%和29%。

表2 盛铃期温湿度胁迫下叶片Bt蛋白含量的变化

品种 Cultivar	处理 Treatment	胁迫时间/h Stress time				
		0	12	24	36	48
泗抗1号 Sikang 1	高温低湿度 HD	465.2b	441.8b	444.0a	356.9a	314.4b
		465.2b	369.3c	335.5c	263.4d	235.7d
泗杂3号 Siza 3	低温低湿度 DD	513.6a	510.6a	463.2a	368.8b	359.7a
		513.6a	395.2c	366.8b	321.2c	280.0c

3 结论与讨论

3.1 铃期温湿度胁迫改变了叶片氨基酸组分含量,可能与Bt蛋白的降解密切相关

本试验研究结果表明,构成Bt蛋白主要氨基酸

后,HD和DD处理下泗抗1号分别比对照下降了32.4%和49.6%。这说明了盛铃期在低湿度下,低温比高温更容易引起Bt棉抗虫性的下降。

品种间,HD处理下抗虫棉杂交种下降幅度较大,而DD处理则与之相反。这可能与杂交种叶面积较大、高温胁迫导致蒸腾速率变大、受到水分胁迫的危害较重有关。相关性分析表明,盛铃期高温低湿度和低温低湿度叶片中酸性氨基酸含量、丙氨酸含量及Bt蛋白主要氨基酸组分总量与Bt蛋白含量呈显著或极显著负相关关系($r = -0.6125^* \sim -0.8537^{**}$)。

组分含量中均是以天冬氨酸、谷氨酸和亮氨酸最多,苏氨酸、异亮氨酸和丝氨酸次之,缬氨酸和丙氨酸含量最低。与对照相比,8个氨基酸在温湿度胁迫下其组分并没有改变,但不同氨基酸的相对含量发生了变化,不同时期都表现为亮氨酸和异亮氨酸含量

小幅下降,丝氨酸、苏氨酸和缬氨酸含量保持稳定,而酸性氨基酸、丙氨酸含量上升的特征。其中,酸性氨基酸溶度和相对含量在温湿度胁迫下变化幅度最大。由此可见,组成 Bt 蛋白的主要成分酸性氨基酸含量发生了明显的变化。

谷氨酸在氨基酸代谢中处于中心位置,是很多氨基酸合成的前体。天冬氨酸是由草酰乙酸接受由谷氨酸转来的氨基形成,丙氨酸是丙酮酸与谷氨酸

在谷-丙转氨酶(GPT)的作用下形成的,而谷氨酸在谷氨酰胺合成酶(GS)催化下合成谷氨酰胺。本研究同时发现,温湿度胁迫 48 h 后 GPT 和 GS 这两种酶活性明显降低,而蛋白酶活性增强(图 3)。说明以上氨基酸组分含量的增加可能是由于蛋白质分解而导致的。Bt 主要氨基酸组分总量与 Bt 蛋白含量呈极显著负相关,也进一步说明盛铃期温湿度胁迫下叶片 Bt 蛋白分解加强,从而导致抗性下降。

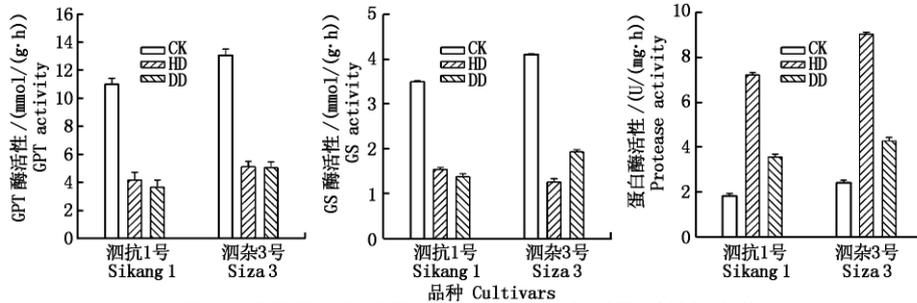


图 3 盛铃期温湿度胁迫 48 h 叶片中相关酶活性的变化

Fig. 3 Different enzyme activity in leaves under combination stress of temperature and humidity for 48 hours during peak boll period

3.2 盛铃期温湿度胁迫引起 Bt 棉抗性下降对棉铃虫及相关害虫防治的意义

棉花生产是一个开发的生态系统,棉花的生长季节也是各种灾害性气候频繁发生的季节,其中,高温、低温、干旱是生产中比较常见的,且是对棉花的生长发育和产量品质影响较大的环境因子。陈德华等^[7]发现,在结铃盛期高温胁迫叶片蛋白酶和肽酶增加,而 Bt 蛋白含量显著下降。周冬生等^[8]研究认为,低温下抗性明显偏低,随温度升高,转 Bt 基因棉对低龄棉铃虫的抗性增强,但随处理时间的推进,高温下抗性和低温相差无几。本试验研究了在低湿度(RH 50%)条件下,高温(37℃)和低温(18℃)处理对抗虫棉 Bt 蛋白含量的影响。结果表明,高温低湿度在胁迫 24 h 内对叶片 Bt 蛋白含量影响较小;而低温低湿度胁迫至 12 h 就出现大幅度下降;24 h 后随着胁迫时间的延长,高温低湿度胁迫下 Bt 蛋白含量的下降幅度也同时增大,而同阶段低温低湿度处理下 Bt 蛋白含量降幅变缓,至 48 h 高温低湿度处理 Bt 蛋白含量低于低温低湿度处理。此外,不同基因型品种对温湿度胁迫响应存在差异,抗虫棉杂交种对高温低湿度环境较敏感,Bt 蛋白含量降幅较常规种大,但含量的绝对值仍显著高于常规品种;而低温低湿度下不同品种 Bt 蛋白含量变化与之相反,杂交种 Bt 蛋白含量降幅较小。总之,在以上 2 种逆境下叶片的抗性下降了 30%~50%。因此,生产上在盛铃期要注意极端性气候对抗虫性的影响,根据抗虫性的下降程度及时调整棉铃虫等相关

害虫的防治策略,为 Bt 棉的安全应用提供保障。

参考文献:

- [1] 郭香墨, 刘海涛, 张永山, 等. 我国转 Bt 棉育种技术与成就[J]. 中国棉花, 1999, 26(7): 2-5.
- [2] Gasser C S, Fraley R T. Genetically engineering plants for crop improvement [J]. Science, 1989 (244): 1293-1299.
- [3] 崔金杰, 夏敬源. 转 Bt 基因棉对棉铃虫抗性的时空动态[J]. 棉花学报, 1999, 11(3): 141-146.
- [4] 束春娥, 孙洪武, 孙以文, 等. 转基因棉 Bt 毒性表达的时空动态及对棉铃虫生存、繁殖的影响[J]. 棉花学报, 1998, 10(30): 131-135.
- [5] 夏兰芹, 郭三堆. 高温对转基因抗虫棉中 Bt 杀虫基因表达的影响[J]. 中国农业科学, 2004, 37(11): 1733-1737.
- [6] 孟凤霞, 沈晋良, 褚妹频. Bt 棉叶对棉铃虫抗性的时空变化及气象因素的影响[J]. 昆虫学报, 2003, 46(3): 299-304.
- [7] 陈德华, 杨长琴, 陈源, 等. 高温胁迫对 Bt 棉叶片杀虫蛋白表达量和氮代谢影响的研究[J]. 棉花学报, 2003, 15(5): 288-292.
- [8] 周冬生, 吴振廷, 王学林, 等. 施肥量和环境温度对转 Bt 基因棉抗虫性的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2000, 27(4): 352-357.
- [9] Rod Mahon, Jean Karen O et al. Environmental stress and the efficacy of Bt cotton [J]. The Australian Cottongrower, 2002, 23(2): 18.
- [10] Fitt G P, Mares C L, Llewellyn D J. Field evaluation and protectional ecological impact of transgenic cotton (*Gossypium hirsutum*) in Australia [J]. Biocontrol Science and Technology, 1994, 4(4): 535-548.
- [11] 何钟佩. 农作物化学控制实验指导 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993: 60-68.
- [12] 中国上海科学院上海植物生理研究所. 现代植物生理学实验指南 [M]. 上海: 上海科学出版社, 1999.
- [13] 董志强. Bt 棉氮素代谢特征与丰产性抗性协同表达的化学调控 [D]. 北京: 中国农业大学, 2000: 24.