

不同浓度脱落酸对冬小麦 干旱诱导蛋白的影响*

沈 波** 李云荫

(河北师范大学生物系, 石家庄 050016)

摘 要 应用双相电泳技术对冬小麦干旱诱导蛋白研究结果表明, 10×10^{-6} 脱落酸 (ABA) 对于抗旱性强的冬小麦太原 633 和抗旱性弱的 C609 干旱诱导蛋白的形成没有作用, 100×10^{-6} ABA 可以使太原 633 产生分子量为 17.5~20KD, PI4.7~5.5 的一些新蛋白; 50×10^{-6} 和 100×10^{-6} ABA 能诱导 C609 形成 15~17.5KD, PI5.2~5.7 的几个新蛋白和一个 26KD、PI5.8 的新蛋白。而在干旱胁迫下, 太原 633 产生的一些诱导蛋白为 17.5~20KD, PI4.7~5.5, C609 仅产生 26KD、PI5.8 的新蛋白。由此表明, 不同浓度的 ABA 对冬小麦干旱诱导蛋白的效应是不同的, 且与抗旱性有关; ABA 和干旱胁迫对干旱诱导蛋白的形成有一定的差异性。

关键词 冬小麦 干旱胁迫 脱落酸 干旱诱导蛋白 双相电泳

许多研究表明, 在干旱胁迫条件下发生蛋白质代谢的变化及新蛋白和多肽的产生, 是外界干旱胁迫信号导致了植物体内基因表达的改变, 从而对蛋白质的合成产生一定的影响, 这些干旱诱导蛋白可能导致植物抗旱性的增强并适应干旱环境^[1,2,11]。近年研究表明, ABA 与干旱胁迫诱导的蛋白质变化确实存在着某种联系, 在一些以蕃茄、玉米、水稻等为材料的实验中, 均发现在干旱诱导 ABA 积累的同时, 有一些蛋白质和体外转译产物的合成, 而且 ABA 也能诱导出它们^[4,6,8,9]。进一步的研究证实, 由于干旱胁迫所引起的一些基因的表达, 其中只有部分基因的表达可被 ABA 诱导, 而其它基因的表达似乎与 ABA 无关, 说明 ABA 和干旱胁迫对植物基因表达调控的差异性和复杂性^[4,10]。我们试图以不同浓度的 ABA 处理方式来观察和研究对不同抗旱性冬小麦品种蛋白质变化的影响及与干旱诱导蛋白的关系。

1 材料和方法

1.1 材料的处理

本试验以两种抗旱性不同的冬小麦 (*Triticum aestivum*) 太原 633 和 C609 为材料, 前者为强抗旱性品种, 后者为弱抗旱性品种。种子由河北师范大学生物系植物生理教研室和河北省农林科学院粮油作物所提供。

精选均匀饱满的种子, 经 10% 安替福民消毒 15min, 冲洗、浸泡、萌发到根长 1cm, 播

1993--10--21 收稿。

* 河北省自然科学基金资助项目

** 现工作单位: 中国水稻研究所, 杭州, 310006

于纱网上,光下水培,温度 $18\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$,光照强度 8000lx ,每天照光 14h ,水培6天后换Hoagland完全培养液^[5]继续培养到16天,将此16龄幼苗用以下溶液进行浸根处理:

- (1) Hoagland 营养液
 - (2) 用Hoagland 溶液配制的 10×10^{-6} 、 50×10^{-6} 、 100×10^{-6} ABA 溶液。
 - (3) 用聚乙二醇(PEG—6000)配制的 -1.75MPa 渗透液模拟干旱胁迫。
- 处理时间为 24h ,处理期间全照光,然后剪取小麦叶片速冻待用。

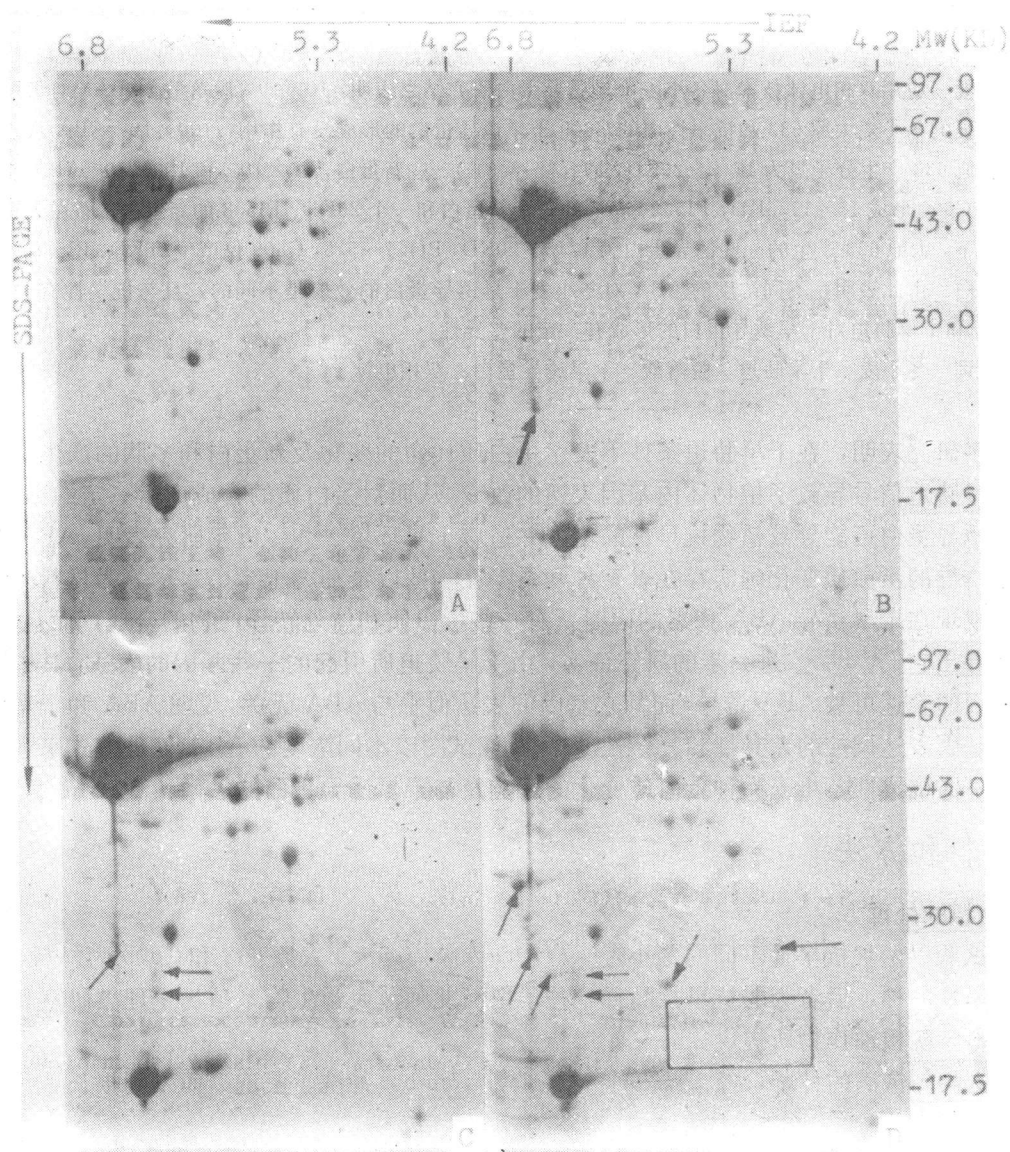


图1 不同浓度 ABA 处理后太原 633 叶片蛋白质电泳图谱

A 太原 633 蛋白质(对照)的双相电泳图谱。 B 太原 633 经 10×10^{-6} ABA 处理后的蛋白质双相电泳图谱。 C 太原 633 经 50×10^{-6} ABA 处理后的蛋白质双相电泳图谱。 D 太原 633 经 100×10^{-6} ABA 处理后的蛋白质双相电泳图谱。箭头示强度增大的蛋白质,方框示诱导的蛋白质。

1.2 测定方法

1.2.1 蛋白质提取 根据 Damerval 等^[7]的方法略加改进。称取 2g 小麦叶片在液氮中研磨成粉末, 加入含 10% 三氯乙酸、0.07% 巯基乙醇的丙酮 (-20°C) 40ml, -20°C 下放置 60min, 4°C 下离心 15min, 15 000r/min; 弃上清液, 沉淀悬浮于 -20°C 含 0.07% 巯基乙醇的丙酮中, 沉淀 1h, 再次离心, 弃上清液, 沉淀真空干燥, -30°C 短期存放。

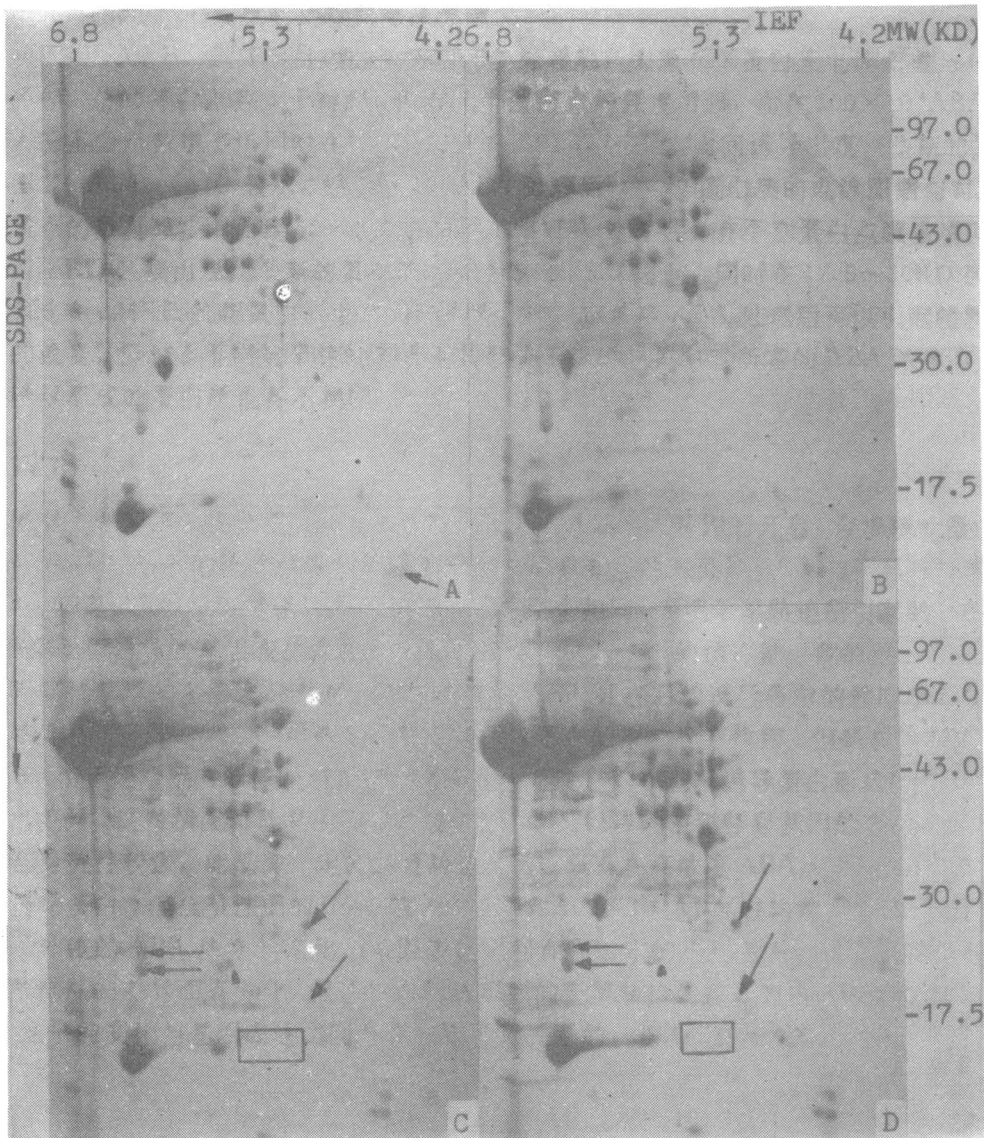


图2 不同浓度 ABA 处理后 C609 叶片蛋白质电泳图谱

A C609 蛋白质双相电泳图谱, 箭头示 C609 特有的蛋白质。B C609 经 10×10^{-6} ABA 处理后的蛋白质双相电泳图谱。C C609 经 50×10^{-6} ABA 处理后的双相电泳图谱。D C609 经 100×10^{-6} ABA 处理后的双相电泳图谱, 箭头示强度增大的蛋白质, 方框和三角形示诱导的新蛋白。

1.2.2 蛋白质的双相凝胶电泳 根据李立武^[3]、O' Farrell^[12]等方法改进。第一相等电聚焦玻管长130mm, 内径2.5mm, 上样量60 μ l。10ml 凝胶混合液中含: 5.5g 尿素、2ml Triton X-100、1.33ml 30%的丙烯酰胺溶液(28.38%的丙烯酰胺和1.62%的甲叉双丙烯酰胺)、1.97ml 重蒸水、0.4ml 两性电解质 pH5~7, 0.2ml 两性电解质 pH3~10。第一相电泳结束凝胶柱4℃下在平衡缓冲液中平衡15 min, 即可用于第二相电泳。第二相电泳在BIO-RAD PROTEAN™ I 型电泳仪上进行, 分离胶浓度13%, 浓缩胶浓度4.5%, 胶长11cm, 胶厚1mm。电泳后凝胶在染色液(0.25%考马斯兰 R-250、40%乙醇、10%醋酸)中染色, 用脱色液(40%乙醇、10%醋酸)脱色至底色退去, 然后制作干胶板长期保存。

2 结果与分析

2.1 正常条件下的双相电泳图谱

在正常供水条件下, 双相电泳图谱反映出抗旱品种太原633和弱抗品种C609在蛋白质点的总体分布上趋向一致(图1-A, 图2-A), 但在点的大小及深浅程度上有明显区别, 并且C609有一个12KD、PI 4.4的蛋白点, 而太原633没有。在以后的各种处理中, 这个蛋白质都不会消失, 变化的只是强度的减弱或增强, 表明抗旱性不同的两个品种, 其自身的蛋白质类型及基因表达有差异。

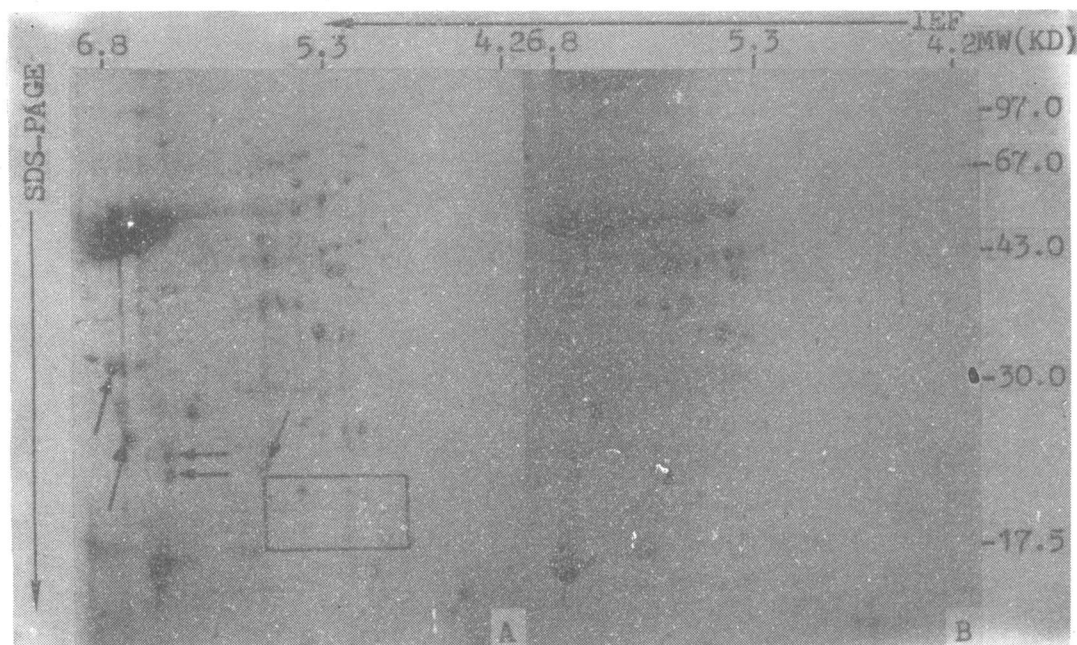


图3 经渗透胁迫后太原633和C609叶片蛋白质电泳图谱

A 太原633经渗透胁迫后蛋白质双相电泳图谱, 箭头示强度增大的蛋白质, 方框示诱导的新蛋白。B C609经渗透胁迫后蛋白质双相电泳图谱, 三角形示诱导的新蛋白。

2.2 干旱胁迫下的双相电泳图谱

从图 3-A、B 可以看出胁迫 24 h 后, 与对照相比, 蛋白质点的大小和数量受到不同程度地抑制, 表明干旱胁迫对蛋白质合成产生一定的影响。同时, 有一部分蛋白点的强度增大, 而且太原 633 在 17.5~20 KD、PI 4.7~5.5 之间出现了一些新的蛋白点, 但 C609 仅出现一个 26KD、PI 5.8 的新蛋白点。从中可以看出, 干旱胁迫能够影响蛋白质的合成与代谢, 并可诱导出一些新的蛋白质, 且抗旱品种的诱导效果好于弱抗旱品种。

2.3 不同浓度 ABA 处理后的双相电泳图谱

从图 1—A、B、C、D 可以看出, 经 ABA 处理后, 太原 633 蛋白质电泳图谱与对照相比明显不同, 总的蛋白点数少于对照, 但有几个蛋白点的强度增强, 而在 100×10^{-6} ABA 时, 强度增大的蛋白点数增多, 同时在 17.5~20KD, PI 4.7~5.5 之间诱导出现一些新的蛋白点。

图 2—A、B、C、D 显示, 经 10×10^{-6} ABA 处理后, C609 蛋白质的电泳图谱与对照相比, 蛋白质点的数量减少, 而经 50×10^{-6} , 100×10^{-6} ABA 处理后, 有个别蛋白点强度增强, 并在 15~17.5KD 区段出现几个新的蛋白质, PI 为 5.2~5.7 之间, 同时在 17.5~30KD 区段出现一个 PI 5.8、26KD 的新蛋白。由此可以表明, 经一定浓度 ABA 处理后可以引起植物蛋白质合成的改变, 但对于不同抗旱性的冬小麦其形成干旱诱导蛋白时所需的 ABA 浓度有所不同, 而且诱导形成的蛋白质也各不相同。

3 讨论

通过本试验进一步证明了 ABA 处理确实可以诱导有关基因的开启, 合成新的蛋白质。同时看到, ABA 与干旱胁迫对蛋白质代谢的影响是有差异的, 虽然 ABA 与干旱一样能诱导胁迫蛋白, 但是 ABA 与干旱诱导的合成部位并非完全相同, 表明干旱胁迫所引起的一些基因表达与 ABA 所诱导的基因表达存在一定的差异性, 这与他人的结论是一致的^[10]。

不同抗旱性的冬小麦品种对于不同浓度的 ABA 处理后的诱导蛋白的效应是不同的。虽然低浓度 ABA (10×10^{-6}) 对两个品种干旱诱导蛋白的形成没有作用, 但是在较高浓度 ABA 条件下, 由于两个品种自身抗性的遗传差异, 从而使它们在干旱诱导蛋白形成的 ABA 浓度上表现出差异。这种情况可能是由于低浓度 ABA 不足以启动植物特异基因的表达, 而太原 633 由于自身抗性较强, 能抵御一定的逆境胁迫, 所以只有在高浓度 ABA (100×10^{-6}) 时才形成干旱诱导蛋白, 但抗旱性弱的 C609 在 50×10^{-6} 和 100×10^{-6} ABA 时均能产生诱导蛋白。这也说明了外施的 ABA 浓度的变化与基因表达之间存在一定的平行关系, 尽管这种平行关系会因品种抗性的差异而有变化, 但这与人们认识到的干旱胁迫导致细胞内 ABA 水平的升高, 且 ABA 水平的变化与基因表达之间存在一定平行关系的认识^[4,9]是一致的。

参 考 文 献

- 1 王洪春. 干旱诱导蛋白的研究进展. 华北农学报, 1990, 5 (增刊): 8~12
- 2 李云荫, 李霞, 曹敏等. 干旱对植物蛋白质组分的影响及诱导产生特异蛋白的研究概况, 见: 赵可夫主编. 植物抗性生理研究. 济南: 山东科学技术出版社, 1992, 1~5
- 3 李立武. 植物叶片蛋白质的双向电泳分析. 植物学通报, 1989, 6 (4): 248~250
- 4 梁建生. ABA 对高等植物基因表达的调节作用. 植物生理学通讯, 1991, 27 (3): 230~233

- 5 薛应龙. 植物生理学实验. 北京: 高等教育出版社, 1985. 43~44
- 6 Cook RM, Neill SJ. Abstracts 14th international conference on plant growth substances, 1991. 112
- 7 Damerval C, Vienne D et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins. *Electrophoresis*. 1986. 7: 52~54
- 8 Elizabeth A Bray. Drought-and ABA-induced changes in poly-peptide and mRNA accumulation in Tomato leaves. *Plant Physiol*. 1988. 88: 1210~1214
- 9 Gomez J et al. A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. *Nature*. 1988. 334: 262~264
- 10 Guerrero FD, Mullet JE. Reduction of turgor induces rapid changes in leaf translatable RNA. *Plant Physiol*. 1988. 88 (2): 401~408
- 11 Martin M Sachs, Tuan-Hua David Ho. Alteration of gene expression during environmental stress in plants. *Ann Rev Plant Physiol*. 1986. 37: 363~376
- 12 O' Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975. 250: 4007~4021

Effect of Different Concentration of ABA on Drought-induced Proteins in Winter Wheat

Shen Bo Li Yunyin

(Department of Biology, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016)

Abstract The results of study conducted by use of two-dimensional gel electrophoresis show that 10×10^{-6} ABA has no effect on induction of drought-induced proteins in drought-resistant winter wheat Taiyuan633 and drought-sensitive winter wheat C609. A group of new proteins with 17.5—20 KD and PI values of 4.7—5.5 can be induced with treatments of 100×10^{-6} ABA in Taiyuan 633, and several new proteins with 15--17.5 KD and PI values of 5.2—5.7, and a 26 KD protein with PI value of 5.8 can be induced with treatment of 50×10^{-6} or 100×10^{-6} ABA in C609. But under drought stress a group of new proteins with 17.5-20KD (PI 4.7—5.5) can be induced in Taiyuan633, only a 26KD protein (PI 5.8) in C609. This shows that effects of different concentration of ABA on drought-induced proteins in winter wheat are different, moreover, related to plant drought resistance. Meanwhile, there are differences in induction of drought-induced proteins between ABA and drought stress.

Key words: Winter wheat; Drought stress; Absciscic acid; Drought-induced protein; Two-dimensional gel electrophoresis