

李 洁. 干旱胁迫对青稞幼苗可溶性蛋白的影响[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(12): 124–126.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2015.12.038

干旱胁迫对青稞幼苗可溶性蛋白的影响

李 洁

(青海省农林科学院/青海省青稞遗传育种重点实验室/青海省高原作物种质资源创新与利用国家重点实验室培育基地, 青海西宁 810016)

摘要:采用液体培养法,研究了不同浓度聚乙二醇(PEG)模拟干旱处理对青稞幼苗叶片可溶性蛋白含量的影响,并利用 SDS–PAGE 电泳检测干旱对供试青稞品种叶片可溶性蛋白的变化及其与干旱胁迫的关系。结果表明:在短时间干旱胁迫下,旱地紫青稞、大麻青稞叶片可溶性蛋白含量均随着干旱胁迫增强呈先降低、后升高的趋势;但在长时间干旱胁迫下,2 份材料的可溶性蛋白含量随着干旱胁迫增强逐渐降低;对于干旱胁迫 4 d 的可溶性蛋白进行 SDS–PAGE 分析,发现在 55 ku 处有 1 个蛋白或 1 组蛋白为干旱诱导蛋白。

关键词:干旱; 青稞; 可溶性蛋白; 干旱诱导蛋白

中图分类号: Q945.78; S512.301 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2015)12–0124–03

干旱作为一种自然灾害,严重影响着农业生产,对农作物造成的损失仅次于病虫害,在所有非生物胁迫中占首位,每年因干旱导致作物减产达 50 % 以上^[1]。在干旱环境下,植物会产生与之相适应的一系列生理生化反应,例如植物内部微器官形态的变化,同时还会破坏正常的生理代谢,诱导相关转录因子转录及蛋白含量发生变化等,持续干旱甚至会导致植株死亡^[2–3]。在缺水条件下,植物蛋白含量和种类会发生变化,部分蛋白的表达量出现上调或下调^[4]。表达量下调是因为部分蛋白质在干旱胁迫的影响下,合成受到抑制,合成速率下降,而与此同时为了维持其生理代谢需要又合成一些新的蛋白质,这就是干旱诱导蛋白。干旱诱导蛋白在植物对干旱的适应过程中起重要的保护作用,能够提高植物对干旱的耐胁迫能力^[5]。

青稞(*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.) 属于禾本科大麦属,在植物学上属于栽培大麦的变种,因其籽粒内外稃与颖果分离,籽粒裸露,故称裸大麦^[6],在青藏高原地区被

称为青稞,是藏区农牧民不可替代的主粮。青稞是青藏高原最具特色的农作物,是青藏高原极端环境条件下植物适应性进化的典型代表^[7],主要种植在高寒缺氧、环境恶劣的地区,具有耐寒、耐旱、耐瘠薄等优异种性,是一种基因资源十分丰富的种质资源^[8]。目前对小麦^[9–11]、苜蓿^[12]、棉花^[13]等植物的干旱胁迫研究较多,关于青稞抗旱胁迫的研究相对较少,但青稞独具的耐旱、耐盐碱等多重抗性却是其他作物不可比的。本研究用之前从国内 28 个青稞品种中筛选出的对水分胁迫敏感与不敏感的品种各 1 个^[14],利用不同浓度聚乙二醇(PEG)溶液模拟干旱胁迫环境,分析这 2 个品种在各种干旱胁迫下蛋白质含量的变化,旨在了解干旱胁迫对青稞幼苗叶片蛋白含量的改变及蛋白表达差异的影响,为耐旱青稞新品种选育与栽培,以及新品种推广等提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

供试青稞品种为旱地紫青稞(水分胁迫不敏感材料)、大麻青稞(水分胁迫敏感材料)。试剂:聚乙二醇(PEG)6000、考马斯亮蓝 G₂₅₀等试剂均为国产分析纯。

1.2 水分胁迫

精选 2 个供试品种的青稞种子,用清水浸泡 1 h,用 5%

收稿日期:2015–05–29

基金项目:青海省科技厅应用基础研究项目(编号:2013–Z–723)。

作者简介:李 洁(1982–),女,青海西宁市人,硕士,助理研究员,主要从事青稞育种研究。Tel: (0971) 5311197; E–mail: lij_28257@163.com。

不易倒伏打下了基础^[2–3]。目前我国农用机械已向适合地小分散的小型化、高质量、大功率并能一次性完成起垄、施肥、播种、合墒、镇压作业以及后期喷药、收获等多用途方向发展,采用起垄免中耕种植方式,再配以使用除草剂、缓释肥,免去机械难以操作的中耕除草及追施固态肥过程,是山区杂交玉米实现机械化种植的适宜耕作模式。本试验中采用追液态尿素,原因包括以下几方面:一是液态肥比固态肥扩散半径大,肥带宽而深,减少固态肥施入土表后的挥发损失,给根系吸肥创造了良好的空间环境,有利于提高肥料利用率;二是操作简单易行;三是有利于机械操作,可采用 3SYF–2.8B 型施液态肥多用机来实施^[4]。另外,采用缓释肥还能免去追肥作业,提高经济效益。

参考文献:

- [1] 徐成忠,孔晓民,王 超,等. 垄作栽培对夏玉米根系和叶片生长发育及产量性状的影响研究[J]. 玉米科学, 2008, 16(1): 101–103.
- [2] 丛艳君,黄瑞冬,许文娟,等. 中耕方式对土壤理化特性及玉米生长发育影响研究. I. 中耕方式对玉米生长发育的影响[J]. 玉米科学, 2006, 13(3): 94–97.
- [3] 丛艳君,黄瑞冬,许文娟,等. 中耕方式对土壤理化特性及玉米生长发育影响研究. II. 中耕方式对土壤理化特性的影响[J]. 玉米科学, 2006, 14(3): 112–115.
- [4] 付尚云,任秀坤,徐艳秋,等. 追施液态氮(N)素化肥的方法研究[J]. 农机化研究, 2004(1): 189–190.

H₂O₂ 消毒 30 min,之后用清水洗净,将种子浸入蒸馏水中置于 4 ℃ 冰箱中 1 d。将每 25 粒种子播种于铺有 3 层滤纸、直径 10 cm 的培养皿内。在 25 ℃ 黑暗条件下萌发 1 d,然后将萌发的种子置于 12 h/12 h(光照/黑暗)、光照度为 2 000 lx 的培养箱中培养,定期浇等量的水,当幼苗培养至 2 叶 1 心时,分别用质量浓度 10%、20%、30%、40% 的 PEG-6000 溶液进行胁迫处理,每个处理 3 次重复,隔天更换处理液,以清水培养的植株为对照。每隔 2 d 剪取叶片,用液氮迅速冷冻后保存于 -80 ℃ 冰箱。

1.3 蛋白质的提取

蛋白质的提取参照任东涛等的方法^[15]并加以改进。提取液为 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7),每个处理称取 0.5 g 叶片,用液氮预冷的研钵加入液氮研磨,加入 1 mL 提取液,冰浴研磨,14 000 r/min 离心 20 min,取上清液备用,每个处理重复 3 次。

1.4 蛋白质的测定

干旱可溶性蛋白质的定量采用 G-250 法^[16]。取上清液,用 Eppendorf 核酸蛋白测定仪测定,以水为对照,以牛血清蛋白做标准曲线,计算每个样品可溶性蛋白含量。可溶性蛋白的检测采用 SDS-PAGE 法。浓缩胶 80 V,30 min;分离胶 120 V,90 min,稳压电泳,G-250 法染色。

1.5 数据分析

对试验数据采用 Excel 2003 软件绘制图表,SPSS 18.0 软件进行方差分析和多重比较分析。

2 结果与分析

从图 1 可以看出,在整个干旱胁迫过程中(0~8 d),旱地紫青稞在 2~6 d PEG 处理下,叶片可溶性蛋白含量随着 PEG 处理浓度的升高,呈现出明显先降低、后升高的趋势;但在胁迫 8 d 时,随着 PEG 处理浓度的逐渐升高,其蛋白含量逐渐降低。在胁迫 2 d 时,蛋白含量最低点为 PEG 胁迫浓度为 20% 时,为对照的 61.16% ($P < 0.01$),但在胁迫浓度为 40% 时,其蛋白含量能够达到对照的 83.03% ($P < 0.01$);在 4、6 d PEG 处理下,蛋白含量最低点为 PEG 浓度为 30% 时,分别为对照的 74.8% ($P < 0.01$)、64.84% ($P < 0.01$),在 PEG 浓度为 40% 时,其蛋白含量有所增加,分别为对照的 80.32%、78.80%;在 8 d 时,其叶片可溶性蛋白含量均随着 PEG 浓度逐渐增高而呈现逐步降低的趋势,在 PEG 浓度达到 40% 时,其蛋白含量仅为对照的 62.69% ($P < 0.01$)。

从图 2 可以看出,大麻青稞在干旱胁迫 2~4 d 时,随着 PEG 处理浓度的升高,叶片可溶性蛋白含量基本上呈先降低、后升高的趋势,但在胁迫 8 d 时,随着 PEG 处理浓度的升高,可溶性蛋白含量出现先升高、后降低的趋势。在胁迫 2 d 时,蛋白含量最低点为 PEG 浓度为 20% 时,为对照的 67.02% ($P < 0.01$),但在胁迫浓度 40% 时,其蛋白含量能够达到对照的 74.45% ($P < 0.01$);在胁迫 4 d 时,蛋白含量最低点为 PEG 浓度为 20% 时,为对照的 83.18% ($P < 0.01$),当 PEG 浓度达到 40% 时,其蛋白含量有所增加,为对照的 92.68%;在胁迫 8 d 时,PEG 浓度达到 40% 时,其蛋白含量仅为对照的 74.59% ($P < 0.01$)。

综上所述,在短时间干旱胁迫下,不论是水分胁迫敏感材料还

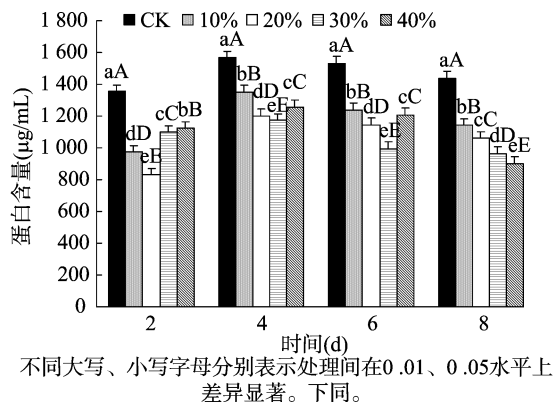


图1 不同干旱胁迫下旱地紫青稞叶片可溶性蛋白质含量变化

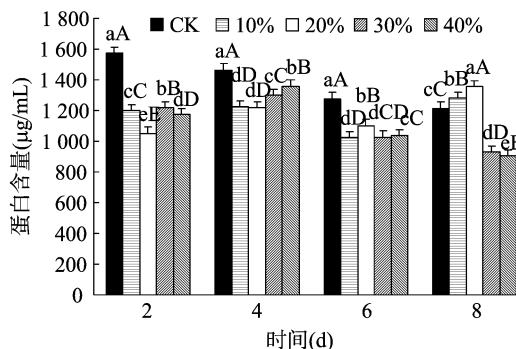
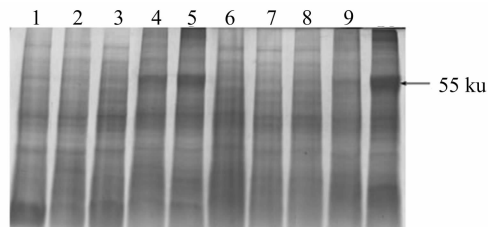


图2 不同干旱胁迫下大麻青稞叶片可溶性蛋白质含量变化

是水分胁迫不敏感材料,其叶片可溶性蛋白含量都会随着干旱胁迫逐渐增强呈现先降低、后升高的趋势;但在长时间干旱胁迫下,2 份材料的可溶性蛋白含量都会随着干旱胁迫逐渐增强逐渐降低。

从图 3 可以看出,对于干旱胁迫 4 d 的可溶性蛋白进行 SDS-PAGE 分析,旱地紫青稞在干旱处理 4 d 时,第 4、5 泳道的蛋白带分布与第 1、2、3 泳道明显不同,在 PEG 处理浓度为 30% 时 55 ku 处的蛋白带逐渐变浓,表示蛋白含量增加,PEG 处理浓度为 40% 时蛋白含量上升;大麻青稞在干旱处理 4 d 时,只有 40% PEG 处理的 55 ku 蛋白带突然变浓。在 PEG 浓度为 30% 时,旱地紫青稞在 55 ku 的蛋白含量比大麻青稞高,在 30% PEG 处理下旱地紫青稞的蛋白开始大量表达,用来应对干旱胁迫,相对于大麻青稞,更能快速响应干旱胁迫,说明该品种对干旱胁迫反应较为敏感,这可能是旱地紫青稞抗旱性优于大麻青稞的部分原因。



泳道1~5均为旱地紫青稞处理,分别为CK、10%PEG处理、20%PEG处理、30%PEG处理、40%PEG处理;泳道6~10均为大麻青稞处理,分别为CK、10%PEG处理、20%PEG处理、30%PEG处理、40%PEG处理。

图3 不同浓度 PEG 胁迫4 d 旱地紫青稞与大麻青稞叶片可溶性蛋白质电泳图谱

3 结论与讨论

3.1 叶片可溶性蛋白含量对干旱的响应

植物在遭受干旱胁迫时,除了表观的叶片萎蔫、发黄等一系列变化外,其叶片中总蛋白质的合成速率也会发生变化^[17],而可溶性蛋白含量变化可以反映细胞内蛋白质合成、变性及降解等多方面信息^[18]。本研究表明,在短时间干旱胁迫下,旱地紫青稞、大麻青稞叶片可溶性蛋白含量都会随着胁迫程度的逐渐增强呈先降低、后升高的趋势;但在长时间干旱胁迫下,2 份材料的可溶性蛋白含量会随着胁迫程度的逐渐增强逐渐降低。这与谭晓荣等^[8]、韩蕊莲等^[19]、康俊梅等^[12]的研究结果一致,其原因可能是在低浓度 PEG 胁迫初期,植物体尚未适应外界环境变化,水分缺失导致了植物体内蛋白质降解,随后植物机体自我防御功能开启,诱导基因转录翻译出干旱胁迫蛋白,导致可溶性蛋白含量逐渐升高,这是机体对干旱环境逐步适应的表现,但在干旱胁迫达到一定阈值时,植物机体自身防御系统已经无法承受干旱胁迫带来的伤害时,植物可溶性蛋白含量开始下降。

3.2 PEG 胁迫对青稞叶片可溶性蛋白组分的影响

通常在逆境环境下植物会诱导出一些特异蛋白,这些特异蛋白可以帮助植物在短期逆境环境下维持生命,可以提高植物的耐胁迫能力^[18]。Salekdeh 等对水稻在受到干旱胁迫后的研究表明,其叶片中出现显著变化的蛋白,主要是与氧化胁迫、细胞骨架、光合作用、能量代谢相关^[20]。林秀琴等对干旱胁迫 10、15 d 橡胶树叶片的研究表明,与对照相比,干旱胁迫的橡胶树叶片蛋白中出现差异表达蛋白即为干旱诱导蛋白,主要参与光合作用、胁迫应激响应、信号转导、能量代谢等生物学过程^[21]。本研究表明,供试 2 个青稞品种中,干旱胁迫所诱导大量表达的分子量在 55 ku 左右的蛋白是 1 个或 1 组干旱诱导蛋白,目前其功能还不得而知,还须进行后续蛋白质谱分析。

综上所述,干旱胁迫下植物为维持正常的生命活动,会产生一系列复杂的形态、生理生化及生物物理等方面的变化^[22-24],而干旱对植物生理过程的影响是通过蛋白的合成与降解调控作用来实现的。在干旱胁迫下可诱导相关基因的表达,产生新的水分胁迫蛋白,不仅可以调节植物细胞的渗透势,还可以以功能蛋白的方式帮助植物抵御干旱胁迫对机体带来的伤害。本研究中,无论是水分胁迫敏感材料与不敏感材料,可溶性蛋白含量与其抗旱性并无直接相关性。这与王俊刚等对芦苇水分胁迫的研究结论^[25]一致。也有研究发现,在同样干旱条件下,抗旱品种可能产生更多的蛋白质,或者细胞内一些不溶性蛋白转变为可溶性蛋白以抵抗缺水对植物的威胁^[26]。总之,植物对干旱胁迫的响应是一种复杂的调控方式,须要对其进行更加深入研究。

参考文献:

- [1] 唐益苗,赵昌平,高世庆,等. 植物抗旱相关基因研究进展[J]. 麦类作物学报,2009,29(1):166-173.
- [2] Liu H S, Li F M, Xu H. Deficiency of water can enhance root respiration rate of drought-sensitive but not drought-tolerant spring wheat [J]. Agricultural Water Management, 2004, 64(1):41-48.

- [3] 李 洁. 植物干旱胁迫适应机制研究进展[J]. 广东农业科学, 2014(19):154-159.
- [4] Demirevska K, Zasheva D, Dimitrov R, et al. Drought stress effects on rubisco in wheat: changes in the rubisco large subunit [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2009, 31(6):1129-1138.
- [5] 李 磊,贾志清,朱雅娟,等. 我国干旱区植物抗旱机理研究进展[J]. 中国沙漠,2010,30(5):1053-1059.
- [6] 郭本兆. 青海经济植物志[M]. 西宁:青海人民出版社,1987:701.
- [7] 臧靖巍,阚建全,陈宗道,等. 青稞的成分研究及其应用现状[J]. 中国食品添加剂,2004(4):43-46.
- [8] 谭晓荣,胡韬纲,戴 媛,等. 不同干旱方式对小麦幼苗可溶性蛋白含量及总抗氧化力的影响[J]. 河南工业大学学报:自然科学版,2008,29(1):42-47.
- [9] 吴昆仑. 青稞种质资源的 SSR 标记遗传多样性分析[J]. 麦类作物学报,2011,31(6):1030-1034.
- [10] 张小丰,孔海燕,李朴芳,等. 小麦干旱诱导蛋白及相关基因研究进展[J]. 生态学报,2011,31(9):2641-2653.
- [11] 杨好伟. 干旱胁迫对不同生育时期冬小麦叶片蛋白质及核酸含量的影响[J]. 安徽农业科学,2008,36(16):6640-6641.
- [12] 康俊梅,杨青川,樊育成. 干旱对苜蓿叶片可溶性蛋白的影响[J]. 草地学报,2005,13(3):199-202.
- [13] 张德超. 棉花叶片干旱胁迫蛋白的表达分析与鉴定[D]. 北京:中国农业科学院,2013.
- [14] 姚晓华,吴昆仑. PEG 预处理对青稞种子萌发和幼苗生理特性的影响[J]. 西北植物学报,2012,32(7):1403-1411.
- [15] 任东涛,赵松岭. 水分胁迫对半干旱区春小麦旗叶蛋白质代谢的影响[J]. 作物学报,1997,23(4):468-473.
- [16] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 北京:世界图书出版社,2000:137-138.
- [17] 颜 华,贾良辉,王根轩. 植物水分胁迫诱导蛋白的研究进展[J]. 生命的化学,2002,22(2):165-168.
- [18] 邵世光,阎斌伦,许云华,等. Cd²⁺ 对条斑紫菜的胁迫作用[J]. 河南师范大学学报:自然科学版,2006,34(2):113-116.
- [19] 韩蕊莲,李丽霞,梁宗锁. 干旱胁迫下沙棘叶片细胞膜透性与渗透调节物质研究[J]. 西北植物学报,2003,23(1):23-27.
- [20] Salekdeh G H, Siopongco J, Wade L J, et al. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery [J]. Proteomics, 2002, 2(9):1131-1145.
- [21] 林秀琴,邓 军,袁 坤,等. 巴西橡胶树叶片蛋白样品的制备及质谱初步分析[J]. 热带农业科学,2009,30(4):1-6.
- [22] 韩金龙,王同燕,徐子利,等. 玉米抗旱机理及抗旱性鉴定指标研究进展[J]. 中国农学通报,2010,26(21):142-146.
- [23] 李 光,龚 宁. 干旱胁迫对金线兰 POD 活性及同工酶酶谱的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):208-209.
- [24] 张小娟,宋 涛,甄晓辉,等. 模拟干旱胁迫对转 c4 双基因水稻幼苗光合功能及部分抗氧化酶活性的影响[J]. 江苏农业学报,2014,30(4):709-715.
- [25] 王俊刚,陈国仓,张承烈. 水分胁迫对 2 种生态型芦苇的可溶性蛋白含量、SOD、POD、MDA、CAT 活性的影响[J]. 西北植物学报,2002,22(3):561-565.
- [26] Skriver K, Mundy J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress[J]. Plant Cell, 1990, 2(6):503-512.