

张凤军,叶景秀,师理,等.干旱胁迫下不同抗旱水平马铃薯叶片蛋白质组学分析[J].江苏农业科学,2018,46(9):23-28.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.005

干旱胁迫下不同抗旱水平马铃薯叶片蛋白质组学分析

张凤军^{1,2,3,4,5},叶景秀^{1,2},师理^{1,2,3,4,5},阮建平^{1,2,3,4,5},王舰^{1,2,3,4,5}

(1. 青海大学农林科学院,青海西宁 810016; 2. 青海省农林科学院,青海西宁 810016;

3. 青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室,青海西宁 810016;

4. 青藏高原生物技术教育部重点实验室,青海西宁 810016; 5. 青海省马铃薯育种重点实验室,青海西宁 810016)

摘要:运用双向电泳和质谱技术,以耐旱品种青薯 9 号和干旱敏感品种费乌瑞它为试验材料,分析干旱胁迫下耐旱性不同的马铃薯品种在盛花期叶片蛋白质的差异变化。结果表明:2 个品种盛花期叶片中共鉴定出 81 个差异蛋白,其中 78 个有明确生理功能。耐旱性强的品种青薯 9 号共鉴定出 45 个差异蛋白,干旱敏感品种费乌瑞它共鉴定出 33 个差异蛋白,对其进行初步功能分类,这些差异蛋白涉及光合作用、物质能量代谢、抗逆、信号传导和生长发育等相关生理生化过程,这些蛋白可能与马铃薯的抗旱性密切相关。

关键词:马铃薯;干旱胁迫;双向电泳;蛋白质组学

中图分类号: S532.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)09-0023-05

我国是传统农业大国,干旱是影响农业生产的重要因素之一,是造成我国农业生产不稳定的主要原因^[1-2]。在我国尤其是干旱和半干旱地区,缺水问题一直是限制农业生产的最主要因子之一,即使是降水较多的地区也普遍存在季节性和非周期性干旱问题^[3]。马铃薯是重要的粮、菜、饲兼用作物,栽培范围遍布全球,常年播种面积稳定在 2 000 万 hm^2 左右。近年来我国马铃薯的种植面积得到迅速发展,种植面积达到 500 多万 hm^2 ,占全球种植面积的 20% 以上^[4]。马铃薯是对水分亏缺较为敏感的作物,受干旱影响较大,而我国马铃薯的主要种植省区都或多或少存在干旱问题^[5],干旱使这些地区马铃薯产量的损失超过了其总产量的 30%^[6]。

植物在逆境胁迫条件下,基因表达发生改变,一些正常基因被关闭,而一些与适应逆境有关的基因则被启动,表现出正常蛋白合成受阻,而诱导合成特异蛋白即逆境蛋白^[7-8]。已经发现许多逆境因子如干旱、盐碱、低温、高温等,都会引起植物基因表达的变化,诱导产生逆境蛋白。植物感受这些逆境信号后通过信号转导过程调节细胞内抗逆相关蛋白的表达,进而调整自身的生理状态或形态的改变来适应不利环境。因此,寻找与抗逆相关蛋白(或基因)对了解植物抗逆机制以及提高植物抗逆性能有着十分重要意义。

本试验探究不同抗旱性马铃薯品种(耐旱品种青薯 9 号^[9],干旱敏感品种费乌瑞它)在干旱胁迫下盛花期蛋白水平的响应,发掘与马铃薯抵御干旱胁迫相关的蛋白,为后续的抗旱基因克隆和分子育种工作提供有力支持。

收稿日期:2017-11-28

基金项目:青海省应用基础研究项目(编号:2015-ZJ-708);国家现代农业产业技术体系专项(编号:CARS-09);青海省高原作物种质资源创新与利用重点实验室开放基金(编号:2014-2)。

作者简介:张凤军(1977—),男,山东临沂人,副研究员,主要从事马铃薯遗传育种研究。E-mail:sdzhangfengjun@163.com。

通信作者:王舰,研究员,主要从事马铃薯遗传育种研究。E-mail:wangjian2197@sohu.com。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试验处理

试验材料为耐旱品种青薯 9 号和干旱敏感品种费乌瑞它,均由青海省农林科学院生物技术研究所提供。试验于 2015 年 4—9 月在青海省农林科学院试验地简易干旱棚中进行,试验设盛花期干旱胁迫处理和全生育期正常供水对照处理。达到处理时间要求的最后 1 天 09:00 取 3 株顶叶下完全展开叶第 4 片复叶,去掉叶柄,混合放入封口袋,置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用^[10]。

1.2 蛋白质提取

采用 TCA-丙酮法^[11-12]提取马铃薯叶片总蛋白,蛋白浓度参考 Bradford 法^[13]测定。

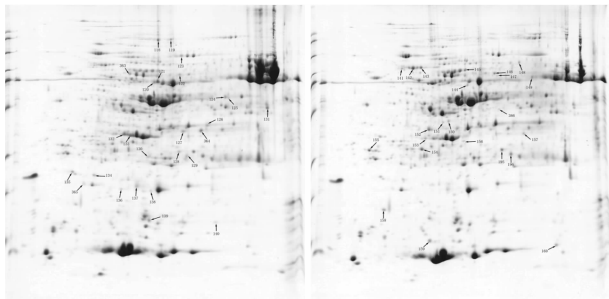
1.3 双向电泳、图谱分析及质谱鉴定

双向电泳操作参考叶景秀等^[11]、章玉婷等^[12]的方法进行(第一向 IEF-PAGE, pH 值为 4~7 的非线性 IPG 干胶条;第二向 SDS-PAGE 电泳,浓度 12% 的聚丙烯酰胺凝胶)进行分离,经考马斯亮蓝染色后,获得了分辨率和重复性较好的双向电泳图谱。使用 PDQuest 8.0.1 分析软件对双向电泳图谱进行分析,对找出的差异蛋白点,将差异表达的目标蛋白质点经过处理后进行串联质谱(MALDI-TOF-MS)分析,通过 Mascot、Peptident 等数据库,对其序列进行同源性比对,鉴定耐旱的特异蛋白。

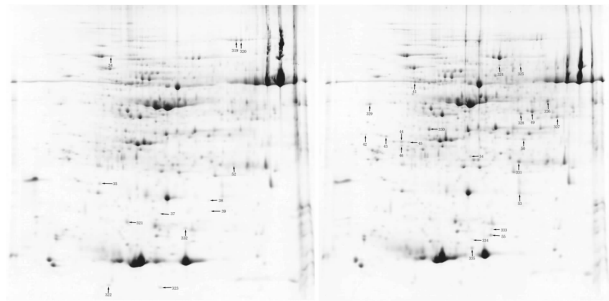
2 结果与分析

2.1 不同抗旱水平马铃薯盛花期叶片蛋白质组图谱比较

青薯 9 号盛花期胁迫与对照相比,表达量超过对照 1.5 倍的蛋白质点有 26 个;对照表达量超过胁迫 1.5 倍的蛋白质点有 21 个,新产生蛋白 1 个(图 1)。费乌瑞它盛花期胁迫与对照相比,表达量超过对照 1.5 倍的蛋白质点有 8 个,新产生蛋白 4 个;对照表达量超过胁迫 1.5 倍的蛋白质点有 21 个,新产生蛋白 1 个(图 2)。



胁迫 对照
图1 青薯9号叶片蛋白质的双向电泳图谱



胁迫 对照
图2 费乌瑞它叶片蛋白质的双向电泳图谱

2.2 不同抗旱水平马铃薯盛花期叶片差异蛋白的鉴定

青薯9号共鉴定出47个差异蛋白(表1、表2),可将它们

分为5类(图3),分别为:(1)光合作用相关蛋白14个(占29.79%),其中胁迫处理鉴定出的有8个,对照处理鉴定出6个;(2)物质和能量代谢相关蛋白15个(占31.91%),其中胁迫处理鉴定出的有9个,对照处理鉴定出6个;(3)抗氧化和防御相关蛋白8个(占17.02%),其中胁迫处理鉴定出的有5个,对照处理鉴定出3个;(4)信号传导和生长发育相关蛋白8个(占17.02%),其中胁迫处理鉴定出的有3个,对照处理鉴定出5个;(5)未知功能蛋白2个(占4.26%),其中胁迫处理的有1个,对照处理鉴定出1个。

由图3和表1、表2可见,胁迫处理下的青薯9号在盛花期除光合作用差异蛋白质点表达数量大于对照处理外,其他几类功能蛋白差异不大,可见由于青薯9号本身抗旱性强,胁迫和对照处理下均能建立起强大的抗旱系统,抵御外界环境的变化。

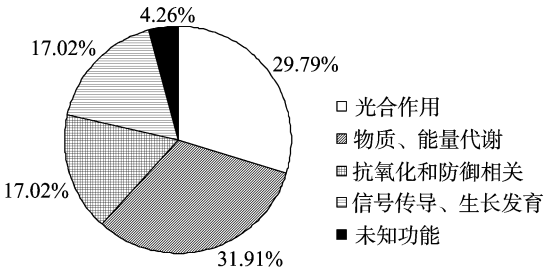


图3 青薯9号差异表达蛋白功能分类

表1 胁迫下青薯9号叶片差异蛋白的质谱鉴定结果

蛋白类型	蛋白编号	登录号	蛋白名称	物种	分子量/ 等电点	序列覆 盖率(%)	得分
光合作用相关蛋白 (8个)	121	gi 377549265	核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基	<i>Chloraea prodigiosa</i>	48.940/6.46	13	400
	123	gi 460406209	转酮醇酶	番茄	80.268/5.97	9	320
	126	gi 1781348	质体醛缩同源酶	马铃薯	38.632/5.89	15	283
	127	gi 3913651	铁氧还蛋白-NADP还原酶	烟草	40.705/8.37	25	462
	129	gi 387157286	碳酸酐酶	马铃薯	34.919/6.40	27	381
	136	gi 565402325	放氧增强蛋白2	马铃薯	24.208/5.54	9	123
	137	gi 565402325	放氧增强蛋白2	马铃薯	24.208/5.54	21	227
	364	gi 3913651	铁氧还蛋白-NADP还原酶	烟草	40.705/8.37	23	332
物质、能量代谢 相关蛋白(9个)	120	gi 114558	ATP合酶亚基β	烟草属	53.608/5.04	20	441
	122	gi 565348342	烯醇异构体X1	马铃薯	48.101/5.58	17	292
	124	gi 327198779	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	马铃薯	48.538/7.06	16	428
	125	gi 565362287	精氨酸酶1	马铃薯	36.928/5.89	19	277
	131	gi 565386971	甘油醛-3-磷酸脱氢酶A.	马铃薯	42.966/8.46	24	603
	132	gi 239911810	叶绿体锰稳定蛋白	马铃薯	31.442/6.45	40	467
	133	gi 313586398	叶绿体锰稳定蛋白	马铃薯	34.332/6.73	36	387
	139	gi 82754633	ATP合酶CF1ε链	马铃薯	14.631/5.43	46	299
	363	gi 28261702	ATP合酶CF1α亚基	颠茄	55.476/5.26	22	638
	128	gi 565401266	L-抗坏血酸过氧化物酶1	马铃薯	27.685/5.78	33	438
抗氧化和防御相关 蛋白(5个)	134	gi 565397058	发病相关蛋白R	马铃薯	25.905/5.31	41	391
	138	gi 53830841	渗透蛋白	马铃薯	24.816/6.52	24	267
	140	gi 297793529	热休克蛋白18	琴叶拟南芥	18.064/7.93	9	95
	365	gi 407907615	硫氧还蛋白过氧化物酶	烟草	29.972/8.25	20	221
	118	gi 565365826	富含甘氨酸的RNA结合蛋白	马铃薯	15.607/7.79	45	421
信号传导、生长发育 相关蛋白(3个)	119	gi 565351116	上游元件结合蛋白2	马铃薯	67.351/5.56	3	67
	130	gi 568215184	harpin结合蛋白1	马铃薯	30.301/8.31	41	519
功能未知蛋白(1个)	135	gi 413968614	假定蛋白质	马铃薯	16.088/4.72	34	227

表 2 对照青薯 9 号叶片差异蛋白的质谱鉴定结果

蛋白类型	蛋白编号	登录号	蛋白名称	物种	分子量/ 等电点	序列覆 盖率(%)	得分
光合作用相关蛋白 (6 个)	142	gi 565346319	Rubisco 大亚基结合蛋白亚基 α	马铃薯	61.974/5.37	21	495
	145	gi 460366131	Rubisco 大亚基结合蛋白亚基 β	番茄	63.238/5.72	18	787
	148	gi 2150029	胞质 NADP - 苹果酸酶	番茄	64.629/5.71	13	419
	149	gi 169563	核酮糖二磷酸羧化酶	马铃薯	53.371/6.19	10	349
	154	gi 460368501	核糖 - 5 - 磷酸异构酶	番茄	31.185/6.00	23	193
	196	gi 387157286	碳酸酐酶	马铃薯	34.919/6.40	32	445
物质、能量代谢 相关蛋白(6 个)	144	gi 21599	UTP - 葡萄糖 - 1 - 磷酸尿苷酰转移酶	马铃薯	52.026/5.39	27	469
	146	gi 565348342	烯醇异构体 X1	马铃薯	48.101/5.58	25	422
	152	gi 565388645	硫胺素噻唑合酶 1	马铃薯	37.946/5.40	22	392
	153	gi 239911810	叶绿体锰稳定蛋白	马铃薯	31.442/6.45	22	277
	157	gi 15240972	吡哆醛生物合成蛋白 PDX1.3	鼠耳芥	33.480/5.79	19	398
	160	gi 565362500	核苷二磷酸激酶	马铃薯	16.212/6.32	47	449
抗氧化和防御相关 蛋白(3 个)	141	gi 971544504	蛋白质二硫键异构酶	马铃薯	56.388/4.87	13	310
	147	gi 54288757	S - 腺苷 - L - 高半胱氨酸水解酶	烟草	53.656/5.51	14	267
	156	gi 460412473	乳酰谷胱甘肽裂合酶	番茄	40.465/7.05	16	210
信号传导、生长发 育相关蛋白(5 个)	150	gi 568214633	60S 酸性核糖体蛋白 P0	马铃薯	33.974/5.12	18	197
	151	gi 111133837	丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 PP2A - 5 催化亚基	烟草	36.301/4.93	14	81
	155	gi 429345851	NAC 转录因子	欧洲山杨	16.547/10.08	5	49
	158	gi 76160921	P23 肿瘤蛋白	马铃薯	15.882/4.70	31	295
	159	gi 799015	富含甘氨酸的 RNA 结合蛋白	马铃薯	17.650/5.60	41	316
功能未知蛋白(1 个)	143	gi 1021037765	假定蛋白 DCAR_018790	黄胡萝卜	56.851/5.04	13	351

费乌瑞它共鉴定出 34 个差异蛋白(表 3、表 4),可将它们分为 5 类(图 4),分别为:(1)光合作用相关蛋白 7 个(占 20.59%),其中胁迫处理鉴定出的有 3 个,对照处理鉴定出 4 个;(2)物质和能量代谢相关蛋白 9 个(占 26.47%),其中胁迫处理鉴定出的有 4 个,对照处理鉴定出 5 个;(3)抗氧化和

防御相关蛋白 8 个(占 23.53%),其中胁迫处理鉴定出的有 4 个,对照处理鉴定出 4 个;(4)信号传导和生长发育 9 个(占 26.47%),其中胁迫处理没有鉴定出,对照处理鉴定出 9 个;(5)未知功能蛋白 1 个(占 2.94%),其中胁迫处理的有 1 个,对照处理没有鉴定出。

表 3 胁迫下费乌瑞它叶片差异蛋白的质谱鉴定结果

蛋白类型	蛋白编号	登录号	蛋白名称	物种	分子量/ 等电点	序列覆 盖率(%)	得分
光合作用相关蛋白 (3 个)	39	gi 295091	核酮糖 1,5 - 二磷酸羧化酶	变豆菜属	52.907/5.85	2	69
	52	gi 350537679	碳酸酐酶异构体 1	番茄	34.845/6.67	14	127
	321	gi 568214334	细胞色素 b6 - f 复合铁硫亚基	马铃薯	24.593/8.20	20	175
物质、能量代谢相关 蛋白(4 个)	319	gi 970045975	甘氨酸脱氢酶	潘那利番茄	114.077/6.69	11	556
	320	gi 970045975	甘氨酸脱氢酶	潘那利番茄	114.077/6.69	11	506
	323	gi 568215010	蛋白酶抑制剂前体	马铃薯	17.693/6.12	10	126
	332	gi 82754633	ATP 合酶 CF1 ϵ 链	马铃薯	14.631/5.43	41	230
抗氧化和防御相关蛋白 (4 个)	34	gi 565391329	基质 70 ku 热休克相关蛋白	马铃薯	74.965/5.26	12	302
	35	gi 565397058	发病相关蛋白 R	马铃薯	25.905/5.31	26	233
	37	gi 565367364	22.7 ku IV 类热休克蛋白	马铃薯	22.456/5.41	31	188
	38	gi 565405245	渗透蛋白 OSML13	马铃薯	24.796/7.90	25	95
信号传导、生长发育相 关蛋白(0 个)							
功能未知蛋白(1 个)	322	gi 823166292	未被表征的蛋白质 LOC105797727	美洲棉	29.001/5.95	2	48

由表 3、表 4 和图 4 可知,费乌瑞它在胁迫处理下其差异蛋白质点的表达数量少于对照处理,干旱胁迫使相关酶降解,从而使费乌瑞它抗旱性降低。

3 讨论

3.1 光合作用相关蛋白

光合作用是绿色植物吸收阳光的能量,同化 CO₂ 和

H₂O,制造有机物质并释放氧气的过程,是地球上最重要的化学反应,又是一个极为复杂的,包括一系列光化学步骤和物质转变过程,包括羧化阶段、还原阶段和更新阶段^[14]。

核酮糖 - 1,5 - 二磷酸羧化/加氧酶(ribulose - 1,5 - biphosphate carboxylase/oxygenase)是植物进行光合作用羧化阶段固定 CO₂ 的关键酶,广泛存在于叶绿体中,肩负着光反

应 CO₂ 固定和暗反应 CO₂ 释放的双重功能,对光合作用的效

表 4 对照费乌瑞它叶片差异蛋白的质谱鉴定结果

蛋白类型	蛋白编号	登录号	蛋白名称	物种	分子量/ 等电点	序列覆 盖率(%)	得分
光合作用相关蛋白 (4 个)	41	gi 151302073	核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基	红豆杉	47.336/6.56	18	407
	325	gi 2150029	胞质 NADP-苹果酸酶	番茄	64.629/5.71	17	443
	326	gi 327198779	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	马铃薯	48.538/7.06	22	539
	327	gi 22094840	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	马铃薯	36.795/6.34	21	433
物质、能量代谢 相关蛋白(5 个)	50	gi 15240972	吡哆醛生物合成蛋白 PDX1.3	鼠耳芥	33.480/5.79	14	252
	324	gi 565347175	琥珀酸脱氢酶黄素蛋白亚基 1	马铃薯	69.917/6.07	20	418
	328	gi 460404529	苹果酸脱氢酶	番茄	35.703/5.91	32	328
	330	gi 565388645	硫胺噻唑合酶 1	马铃薯	37.946/5.40	22	349
	331	gi 972780640	丙糖磷酸异构酶	马铃薯	27.223/5.73	50	421
抗氧化和防御 相关蛋白(4 个)	49	gi 565365980	41 ku 叶绿体茎环结合蛋白	马铃薯	43.399/6.52	18	222
	54	gi 565402978	双功能单硫醇谷氧还蛋白-S16	马铃薯	32.795/6.61	25	216
	333	gi 565350050	硫氧还蛋白 H 型 1	马铃薯	13.748/5.56	23	167
	334	gi 460405609	硫氧还蛋白 M 型	番茄	20.335/9.27	19	161
信号传导、生长 发育相关蛋白 (9 个)	42	gi 565363449	33 ku 核糖核蛋白	马铃薯	35.862/4.71	13	150
	43	gi 565400239	延伸因子	马铃薯	25.340/4.52	11	252
	44	gi 565396089	29 ku 核糖核蛋白 B	马铃薯	32.651/4.91	34	335
	45	gi 565396089	29 ku 核糖核蛋白 B	马铃薯	32.651/4.91	27	347
	46	gi 565396089	29 ku 核糖核蛋白 B	马铃薯	32.651/4.91	31	387
	53	gi 565351960	生长素结合蛋白 ABP19a	马铃薯	21.620/5.83	17	148
	55	gi 565365826	富含甘氨酸的 RNA 结合蛋白	马铃薯	15.607/7.79	38	327
	329	gi 565365360	锚蛋白重复结构域蛋白 2B	马铃薯	37.557/4.45	25	377
	335	gi 568214415	线粒体加工肽酶亚基 α	马铃薯	54.871/5.71	13	373
功能未知蛋白(0 个)							



图4 费乌瑞它差异表达蛋白功能分类

率有着非常重要的意义^[15-16]；叶绿体转酮醇酶(transketolase, TK)是植物光合作用卡尔文循环中的关键酶,参与光合作用中碳的固定,是植物最大光合速率的限制因子^[12,17]；碳酸酐酶也与光合作用密切相关,能催化细胞质中的碳酸氢盐转换为 CO₂,增加细胞内 CO₂ 浓度,进而提高 Rubisco 的固碳效率^[16,18]；氧不断变化的增强蛋白 2 (OEE2)属于光系统 II (PS II)放氧簇复合物,催化水裂解而放出氧气,对维持光系统 II 的稳定性和放氧能力起重要作用^[16,19]；铁氧还蛋白-NADP 还原酶参与光系统的循环电子传递,催化电子从还原态的铁氧还蛋白传递给 NADP⁺,生成的还原力 NADPH 主要用于卡尔文循环中的 CO₂ 固定和叶绿体的其他代谢过程^[20-21]；细胞色素 b6-f 复合体是类囊体膜上可分离的多亚基膜蛋白,它的主要功能是参与光系统 I (PS I)和光系统 II (PS II)之间的电子传递,其组成成分细胞色素 b6-f 复合物铁硫亚单位是光合自养生物所必需的蛋白^[22]。

本试验中青薯 9 号在干旱胁迫条件下鉴定出与光合作用相关的蛋白质 9 个,对照组鉴定出 6 个,主要包括核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶、转酮醇酶、质体醛缩酶、碳酸酐酶、铁氧还蛋白-NADP 还原酶、氧不断变化的增强蛋白 2

(OEE2)、NADP-苹果酸酶和核糖-5-磷酸异构酶等在光系统和碳同化中起重要作用的键蛋白。费乌瑞它在干旱胁迫条件下鉴定出与光合作用相关的蛋白质 3 个,对照组鉴定出 4 个,主要包括核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶、碳酸酐酶、NADP-苹果酸酶和细胞色素 b6-f 复合体铁硫亚基等在光系统和碳同化中起重要作用的蛋白质。青薯 9 号无论在胁迫条件下和对照条件下鉴定出的蛋白质均比费乌瑞它多,青薯 9 号在胁迫条件下鉴定出的蛋白蛋白质比对照还多,可见其应对干旱胁迫的能力较费乌瑞它强,青薯 9 号通过提高一些光合作用关键酶的表达,促进光合作用,从而提高青薯 9 号的抗旱性。

3.2 物质能量代谢相关蛋白

本试验中,青薯 9 号在干旱胁迫条件下鉴定出与能量物质代谢相关的蛋白质 7 个,对照组鉴定出 6 个,主要包括甘油醛-3-磷酸脱氢酶、ATP 合成酶 β 亚基、ATP 合成酶 CF1α 亚基、ATP 合成酶 CF1ε 链、烯醇化酶同工酶 X1、叶绿体锰稳定蛋白、硫胺噻唑合酶、吡哆醛生物合成蛋白 PDX1.3、核苷二磷酸激酶等蛋白质。费乌瑞它在干旱胁迫条件下鉴定出与能量物质代谢相关的蛋白质 4 个,对照组鉴定出 5 个,主要包括甘氨酸脱氢酶、ATP 合成酶 CF1ε 链、琥珀酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、吡哆醛生物合成蛋白 PDX1.3、磷酸丙糖异构酶等蛋白质。

干旱胁迫下植物体内的各种物质能量代谢平衡被打破,为了维持正常的生理活动,各种代谢过程需要调节来抵御、响应干旱胁迫。ATP 合成酶广泛存在于线粒体、叶绿体、细胞核中,是生物体能量代谢的关键酶,在细胞物质运输、信号传导、物质合成与分解等代谢活动中起决定作用^[16]；青薯 9 号在胁

迫条件下鉴定出 3 个与 ATP 合成酶相关的蛋白,为干旱条件下各类代谢活动提供动力。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDHs)在细胞的碳代谢中起着核心作用,是维持生命活动能量形成的最基本酶之一^[23]。

3.3 抗氧化和防御相关蛋白质

青薯 9 号在干旱胁迫条件下鉴定出与抗氧化和防御相关的蛋白质 5 个,对照组鉴定出 3 个,主要包括渗调蛋白、热休克蛋白 18、L-抗坏血酸过氧化物酶、病原相关蛋白、硫氧还蛋白过氧化物酶、蛋白质二硫键异构酶、乳腺谷胱甘肽裂合酶等蛋白质。费乌瑞它在干旱胁迫条件下鉴定出与抗氧化和防御相关的蛋白质 4 个,对照组鉴定出 4 个,主要包括渗调蛋白、70 ku 热休克蛋白、病原相关蛋白、22.7 ku 热休克蛋白、谷氧还蛋白、硫氧还蛋白、41 ku 叶绿体茎-环结合蛋白等蛋白质。相关研究表明,提高植物体内抗氧化酶类代谢的水平是增强植物抗逆性的途径之一^[24]。渗调蛋白^[25]、热休克蛋白^[16,26]、病程相关蛋白^[16]等干旱胁迫响应蛋白在胁迫条件下的表达量增加,对提高植物的抗逆性具有重要意义。干旱胁迫下植物体内氧化还原平衡状态会被打破,积累对植物有毒害作用的活性氧,植物可通过抗氧化酶系统等保护机制来清除活性氧,其中硫氧还蛋白^[27]、L-抗坏血酸过氧化物酶^[26]、谷氧还蛋白^[26]等的增量表达,对植物本身稳固过氧化物酶体、清除活性氧,积极应对干旱胁迫有重要意义。

3.4 信号传导、生长发育相关蛋白质

青薯 9 号在干旱胁迫条件下鉴定出与信号传导、生长发育相关的蛋白质 3 个,对照组鉴定出 5 个,主要包括上游元件结合蛋白、Harpin 结合蛋白、富含甘氨酸 RNA 结合蛋白、60S 酸性核糖体蛋白 P0、丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 PP2A-5 催化亚基、NAC 转录因子等蛋白质。费乌瑞它在干旱胁迫条件下鉴定出与信号传导、生长发育相关的蛋白质 0 个,对照组鉴定出 9 个,主要包括 33 ku 核糖核蛋白、29 ku 核糖核蛋白 B、富含甘氨酸 RNA 结合蛋白、线粒体加工肽酶 α 亚基、延伸因子等蛋白质。

富含甘氨酸 RNA 结合蛋白是植物中的一种高丰度蛋白质,参与干旱等逆境的反应调节^[28];NAC 转录因子是一种重要的调控因子,参与植物生长发育、多种防御反应以及激素信号转导等各种生理活动,受干旱等胁迫的诱导表达,参与植物的胁迫应答^[28],在植物抗旱、高盐等非生物逆境胁迫中起重要作用,一些 NAC 基因可正向或负向调控植物对干旱、高盐胁迫的耐受能力^[29]。

综上所述,2 个品种盛花期叶片中共鉴定出 81 个差异蛋白质,其中 78 个有明确生理功能。耐旱性强的品种“青薯 9 号”共鉴定出 45 个差异蛋白质,包括光合作用相关蛋白(15 个)、物质能量代谢相关蛋白(14 个)、抗氧化和防御相关蛋白(8 个)和信号传导、生长发育相关蛋白(8 个)等;耐旱性弱的品种费乌瑞它共鉴定出 33 个差异蛋白质,包括光合作用相关蛋白(7 个)、物质能量代谢相关蛋白(9 个)、抗氧化和防御相关蛋白(8 个)和信号传导、生长发育相关蛋白(9 个)等;由此可见,干旱胁迫对耐旱性弱的马铃薯品种影响更大,2 个品种对干旱胁迫的响应调控途径不同。植物对干旱胁迫的响应存在着非常复杂的生理生化过程,表现在多路径和水平的调

控上,本试验只对盛花期马铃薯叶片在干旱胁迫下蛋白质组的响应情况作了初步研究,一些干旱胁迫相关蛋白的具体功能还不十分清楚,因此,还需要借助一些新的技术和手段对马铃薯的抗旱机制进行进一步研究,寻找关键抗逆基因,解析马铃薯应答干旱胁迫等逆境的分子机制。

参考文献:

- [1] Wu L, Liu M, Rui L. Preparation and properties of a double-coated slow-release NPK compound fertilizer with superabsorbent and water-retention. [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(3): 547-554.
- [2] 任永峰, 赵 举, 路战远, 等. 马铃薯种子播前抗旱处理技术研究[J]. 北方农业学报, 2013(4): 25-27.
- [3] 杨俊兴, 张 彤, 吴冬秀. 磷素营养对植物抗旱性的影响[J]. 广东微量元素科学, 2003, 10(12): 13-19.
- [4] 屈冬玉, 谢开云. 加速马铃薯脱毒种薯三代繁育体系建设促进产业全面升级和农民脱贫致富[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2009: 1-6.
- [5] 屈冬玉, 谢开云. 加速综合配套抗旱技术研究促进我国马铃薯产业健康发展[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2012: 3-10.
- [6] Schafleitner R. Growing more potatoes with less water[J]. Tropical Plant Biology, 2009, 2(3/4): 111-121.
- [7] Didierjean L, Frendo P, Nasser W, et al. Heavy-metal-responsive genes in maize: identification and comparison of their expression upon various forms of abiotic stress[J]. Planta, 1996, 199(1): 1-8.
- [8] Yun H K, Yi S Y, Yu S H, et al. Cloning of a pathogenesis-related protein-1 gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its salicylic acid-independent induction by copper and β -aminobutyric acid[J]. Journal of Plant Physiology, 1999, 154(3): 327-333.
- [9] 王 芳. 密度和基质对马铃薯青薯 9 号脱毒微型薯产量的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 84-85.
- [10] 抗艳红, 龚学臣, 赵海超, 等. 不同生育时期干旱胁迫对马铃薯生理生化指标的影响[J]. 中国农学通报, 2011, 27(15): 97-101.
- [11] 叶景秀, 陈蕊红, 张改生, 等. 杀雄剂 SQ-1 诱导小麦雄性不育花药蛋白质组分分析[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(5): 858-864.
- [12] 章玉婷, 周德群, 苏 源, 等. 干旱胁迫条件下马铃薯耐旱品种宁蒍 182 叶片蛋白质组学分析[J]. 遗传, 2013, 35(5): 666-672.
- [13] Marion M, Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [14] 潘瑞炽. 植物生理学[M]. 7 版. 北京: 高等教育出版社, 2012: 69-103.
- [15] 魏军亚, 刘德兵, 陈业渊, 等. 香蕉 1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶小亚基克隆与生物信息学分析[J]. 中国园艺文摘, 2015(1): 16-26.
- [16] 陆许可, 张德超, 阴祖军, 等. 干旱胁迫下不同抗旱水平陆地棉的叶片蛋白质组学比较研究[J]. 西北植物学报, 2013, 33(12): 2401-2409.
- [17] 靳静晨, 马东媛, 靳永胜, 等. 烟草转酮醇酶基因(*NtTK*)的克隆与表达[J]. 河南农业大学学报, 2008, 42(5): 479-482.

丁泽红,付莉莉,吴春来,等. 木薯 *MeTPSI* 基因克隆、表达及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(9):28-33.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.006

木薯 *MeTPSI* 基因克隆、表达及生物信息学分析

丁泽红,付莉莉,吴春来,胡伟

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所,海南海口 571101)

摘要:海藻糖-6-磷酸合成酶(trehalose-6-phosphate synthase,简称TPS)是海藻糖生物合成途径中的关键酶,提高TPS基因的表达量可以增强植物在干旱、低温等非生物胁迫条件下的抗逆性。木薯是重要的热带经济作物和粮食作物,在严重干旱、低温或密植(遮阴)条件下,木薯块根产量会显著减少。为了研究TPS基因在木薯抗逆中的功能,通过同源基因克隆的方法,从木薯叶片中克隆了1个TPS基因*MeTPSI*,该基因含有1个2 781 bp的开放阅读框,编码926个氨基酸,含有TPS家族保守结构域。系统进化树分析表明,*MeTPSI*与杨树、杞柳中同源基因的亲缘关系较近,序列相似性分别达到88.1%、89.4%。启动子元件分析表明,*MeTPSI*含有干旱诱导元件(MBS)、热胁迫响应元件(HSE)、防御和胁迫响应元件(TC-rich repeats)以及光响应元件(ACE、Box 1、Box 4)等。实时荧光定量PCR分析表明,*MeTPSI*在叶片中的表达量最高,在须根和储藏根中表达量最低,并且*MeTPSI*基因的表达能被干旱、低温和遮阴处理显著诱导,但对ABA处理无明显响应。这些结果表明,*MeTPSI*在转录水平参与木薯干旱、低温和遮阴胁迫的响应,可将其作为候选基因进一步研究其在木薯抗逆中的功能。

关键词:海藻糖合成酶;*MeTPSI*;干旱;低温;遮阴;ABA;表达分析

中图分类号:S533.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)09-0028-06

海藻糖是由2个葡萄糖分子通过 $\alpha-1,1$ 糖苷键结合而成的非还原性双糖^[1]。海藻糖具有生物抗逆性,其含量在干旱、低温、氧化和热胁迫等条件下被大量积累^[2],可以在非生物胁迫下保护核酸、蛋白质、细胞膜等生物大分子物质,从而增强植物的抗逆性^[3-4]。海藻糖-6-磷酸合成酶(trehalose-6-phosphate synthase,简称TPS)是海藻糖生物合成途径中的一个关键酶,即尿苷二磷酸葡萄糖和6-磷酸葡萄糖在TPS催

化作用下生成6-磷酸海藻糖,之后在海藻糖-6-磷酸酯酶的水解作用下生成海藻糖^[5]。在大多数植物中,海藻糖的含量非常低(鲜质量含量<10 $\mu\text{mol/g}$),但是通过调节TPS基因的表达可以提高海藻糖的含量并且不影响植株生长^[6]。将拟南芥*AtTPSI*基因转入烟草后,转基因植株体内海藻糖含量显著增加,其耐受盐胁迫的能力显著增强^[4]。在干旱、低温和高盐条件下,水稻*OsTPSI*转基因植株抗性明显增强,与对照相比,转基因植株体内海藻糖含量约增加了2倍^[3,7]。TPS基因的表达受到干旱、低温、遮阴等非生物胁迫的调控。在低温胁迫条件下,茶树*CsTPS*、辣椒*CaTPS*、小麦*TaTPS*的表达量显著增加^[8-10];在干旱胁迫条件下,棉花*GhTPS*和海带*SjTPS*的表达量显著增加^[11-13];在遮阴胁迫条件下,玉米TPS基因的表达量也发生了显著变化^[14]。此外,TPS基因的表达量在植物的不同组织中也不尽相同,呈现出差异表达的特点^[8-9]。这些研究充分表明,TPS是一个重要的抵御干旱、低

收稿日期:2017-08-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:31600198);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(编号:1630052016012)。

作者简介:丁泽红(1982—),男,湖南岳阳人,博士,副研究员,主要从事植物分子生物学研究。Tel:(0898)66989380;E-mail:dingzehong@itbb.org.cn。

通信作者:胡伟,博士,副研究员,主要从事植物分子生物学研究。Tel:(0898)66890587;E-mail:huwei2010916@126.com。

[18]孙勇,王丹,全征,等. 香蕉幼苗叶片响应低温胁迫的比较蛋白质组学研究[J]. 中国农学通报,2015,31(34):216-228.

[19]韩平安,禄晓萍,米福贵,等. 基于蛋白质组学的高丹草苗期杂种优势分析[J]. 作物学报,2016,42(5):696-705.

[20]杨超,胡红涛,吴平,等. 高等植物铁氧还蛋白-NADP⁺氧化还原酶研究进展[J]. 植物生理学报,2014,50(9):1353-1366.

[21]安飞飞,凡杰,李庚虎,等. 华南8号木薯及其四倍体诱导株系叶片蛋白质组及叶绿素荧光差异分析[J]. 中国农业科学,2013,46(19):3978-3987.

[22]梁潘霞,李杨瑞. 甘蔗细胞色素b6-f复合体铁硫亚基(*SoCYT*)基因的克隆和表达分析[J]. 西南农业学报,2016,29(5):1032-1037.

[23]卢倩,弭晓菊,崔继哲. 植物甘油醛-3-磷酸脱氢酶作用机

制的研究进展[J]. 生物技术通报,2013(8):1-6.

[24]夏民旋,王维,袁瑞,等. 超氧化物歧化酶与植物抗逆性[J]. 分子植物育种,2015,13(11):2633-2646.

[25]徐平,凌建群,李德葆. 一种新的与渗透蛋白基因启动子结合的蛋白基因的分离[J]. 中国科学(C辑),1999,29(1):68-74.

[26]李国龙,吴海霞,孙亚卿,等. 甜菜叶片应答干旱胁迫的差异蛋白质组学分析[J]. 作物杂志,2015(5):63-68.

[27]付晨熙,肖自华,高飞,等. 干旱胁迫下蒙古沙冬青叶片蛋白质组学研究[J]. 生物技术通报,2017,33(6):69-80.

[28]肖振,赵琪,张川芳,等. 蛋白质组学研究揭示的甘蓝型油菜非生物胁迫应答机制[J]. 植物科学学报,2016,34(6):949-961.

[29]孙利军,李大勇,张慧娟,等. NAC转录因子在植物抗病和抗非生物胁迫反应中的作用[J]. 遗传,2012,34(8):993-1002.