

冬小麦抗冻蛋白的周转规律及功能

Protein Changes and Functions of Winter Wheat During Cold Acclimation

赵 玉 田 赵 军

(中国农业科学院品种资源研究所)

提 要 对抗寒锻炼与脱锻炼过程中冬小麦叶片组织可溶性蛋白和膜蛋白的分析结果表明, 抗寒锻炼期间, 抗寒小麦京冬1号有9种, 弱抗寒小麦肖农12有13种可溶性蛋白的含量明显增加。其中分子量为1000 d, 7000 d(较高PI), 18000 d(2种)和21000 d的5种蛋白的含量在两个品种中都与抗冻性的发育呈正相关。京冬1号、农大139两个小麦品种新合成分子量为34500 d, 24000 d和两种特异膜蛋白, 肖农12新合成24000 d特异膜蛋白, 它们在叶片组织中的含量与抗冻性的发育呈正相关。结果表明, 寒胁迫过程中, 伴随着抗冻性的提高, 控制这些蛋白合成的基因, 在表达机制上发生了根本的变化。

关键词 寒胁迫 可溶性蛋白 膜蛋白 双向电泳 抗冻性鉴定

近年来, 人们研究小麦寒胁迫蛋白的产生与变化, 作为基因表达改变的一个侧面, 推测某些新合成或合成增强的特异蛋白提高植物的抗冻性。迄今人们正在进行冬小麦、小黑麦(Cloutier, 1983)、菠菜抗寒(Guy, 1987)、苜蓿抗寒(Mohapatra, 1988)的研究。结果表明, 寒胁迫蛋白与提高植物的抗冻性呈正相关, 也与基因表达的改变有关。

1 材料与方法

实验材料选用不同抗冻性的小麦品种16种: 京冬1号、晋农160、农大139、肖农12、9饲2/AH1599、原冬8165、原冬834、宝丰7227、徐州21、86-005、品007、9饲5/WOH59、9品1/AH1059、9品9/WOH45、9饲9/H1890、原冬8756。

抗寒锻炼与脱锻炼是将20℃下生长的幼苗分两组, 一组置温度5—15℃下生长作对照, 另一组放人工生物气候箱中抗寒锻炼42 d(昼2—4℃, 12 h; 夜0—2℃, 12 h)。再将锻炼的部分幼苗转回5—20℃下脱锻炼处理10 d。各种处理保持幼苗的大小基本一致。抗冻性鉴定是对抗寒锻炼、未锻炼和脱锻炼的材料进行冰冻处理(赵玉田, 1987)。对抗寒锻炼、未锻炼和脱锻炼的冬小麦叶片组织的可溶性蛋白和膜蛋白提取的方法, 可参照(Guy, 1987; Cloutier, 1983)方法。应用超薄层等电聚焦/SDS-指数孔梯度PAGE

水平双向电泳技术分离蛋白质^①(Guy, 1987)。

2 结果与分析

2.1 抗冻性鉴定结果

抗寒锻炼的(CH)、未锻炼的(NH)和脱锻炼的(DH)小麦材料在人工气候箱中经-7和-8℃冰冻处理下存活率见表 1、照片 1 和 2。从中可以看出, 冬小麦抗寒锻炼与各自

表 1 不同条件下生长的小麦材料经过冰冻处理后的存活率

品种名称	存活率 (SR)					
	-7℃			-8℃		
	NH	CH	DH	NH	CH	DH
京冬 1 号	15.7	90.2	19.8	0	88.5	23.3
肖农 12	0	76	16.1	0	74	5.2
晋农 160	43.5	88.5	51.3	0	89.7	7
农大 139	42.3	86				
86-005	53.3	85.4		0	80	
原冬 8615	57.1	93.3		47	82.4	
原冬 834	42.9	95.7				
9 品 1 / AH1095	68.4	93.7		0	90.9	
9 饲 5 / WOH59	0	85.7		0	80.4	
9 饲 2 / AH1599	22	77.7		19.4	72.7	
9 饲 9 / H1890				23.9	67.8	
9 品 9 / WOH45				7.7	87.5	
品 007				0	78	

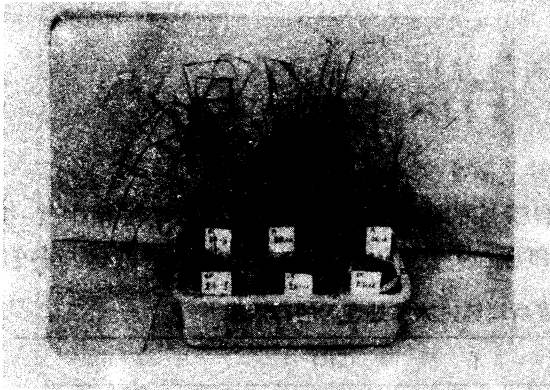
注: NH 为未锻炼材料; CH 为抗寒锻炼的材料; DH 为脱锻炼材料, 即 CA 材料。

对照, 其存活率都有大幅度提高, 表明抗寒锻炼可以提高冬小麦的抗冻性。如将京冬 1 号、肖农 12、晋农 160 等品种的锻炼材料转回到 5—20℃ 下脱锻炼, 再经-7 和-8℃ 冰冻处理, 其存活率又大幅度下降, 表明这些品种脱锻炼后抗冻性明显降低。

2.2 寒胁迫下可溶性蛋白质的变化及作用

京冬 1 号、肖农 12 两个品种的 NH 和 CH 叶片组织中可溶性蛋白的变化见表 2 所示。从表 2 看到, 京冬 1 号 CH 叶片组织中的可溶性蛋白与 NH 组织相比, 至少有 9 种蛋白含量明显增加, 其分子量分别为 43 000 d, 41 000 d, 18 000 d(2 种), 24 000 d, 21 000 d, 7 000 d(2 种, 各具有较高和低 PI)和 1 000 d。在肖农 12 中至少有 13 种可溶性蛋白含量明显增加。其中有 9 种与在京冬 1 号观察到的结果相同, 另有 4 种分子量均

^①赵军, 1990, 硕士研究生毕业论文。



照片 1 抗寒锻炼 42 d 的麦苗及其对照经-8℃处理后, 在 20℃下恢复一周时的状态



照片 2 抗寒锻炼 42 d 的麦苗及其对照经-8℃处理后, 在 20℃下恢复、生长 30 d 的状态

为 42 000 d。研究表明, 抗寒锻炼过程中伴随着抗冻性的提高, 一些可溶性蛋白合成能力加强, 表明抗寒锻炼期间控制这些蛋白合成的基因, 在表达机制上发生了改变。

脱锻炼下可溶性蛋白的变化与作用。归纳表 2 发现, 寒胁迫过程中, 京冬 1 号含量明显增加的 9 种蛋白(肖农 12 中的 13 种), 在脱锻炼下发生了如下变化。

(1) 京冬 1 号中分子量分别为 43 000 d, 41 000 d, 24 000 d 的 3 种蛋白的含量进一步增加, 分子量 7 000 d(较高 PI)蛋白没变化。肖农 12 中分子量为 42 000 d(4 种), 41 000 d, 43 000 d, 24 000 d 和 7 000 d(较高 PI)共 8 种蛋白的含量进一步增加。比较

表 2 抗寒锻炼过程中含量增加的可溶性蛋白在 NH₁, CH, DH, NH₂ 四种叶片组织中的变化

蛋白编号	分子量(d)	变 化									
		京冬 1 号					肖农 12				
		NH ₁	CH	DH	NH ₂	RS	NH ₁	CH	DH	NH ₂	RS
1	43 000	+	↑	↑	↑	●	+	↑	↑	↑	●
2	42 000(4 种)	-	-	+	+	●	+	↑	↑	↑	●
3	41 000	+	↑	↑	↑	●	+	↑	↑	↑	●
4	24 000	+	↑	↑	↑	●	+	↑	↑	↑	●
5	18 000(2 种)	+	↑	↓	不变	▲	+	↑	↓	不变	▲
6	7 000(高 PI)	+	↑	不变	消失	●	+	↑	↑	↑	●
7	7 000(低 PI)	+	↑	↓*	不变	▲	+	↑	↓*	↑	△
8	1 000	+	↑	消失	不变	▲	+	↑	消失	不变	▲
9	21 000	+	↑	↓*	消失	△	+	↑	↓	不变	▲

注: ↑为蛋白含量增加; ↓为蛋白含量降低; ↓*为蛋白含量趋于消失; RS为蛋白与抗冻性的关系; ●为蛋白虽与抗冻性存在一定的关系, 但关系不密切, 其含量主要受发育控制; ▲为蛋白与抗冻性发育呈正相关, 其含量不受发育控制; △为蛋白与抗冻性发育呈正相关, 同时其含量也受发育控制; +为蛋白存在; -为蛋白不存在。

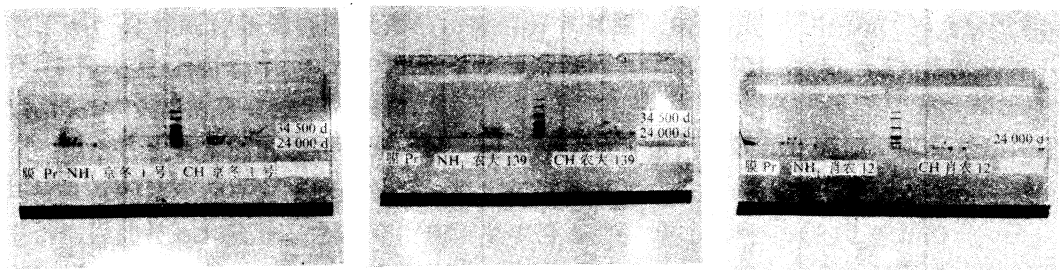
NH_1 、 NH_2 两种叶片组织可溶性蛋白的变化时发现, 京冬 1 号在 NH_2 叶片组织中, 除 7 000 d 完全消失外, 其余 3 种蛋白含量也有增加; 肖农 12 中有 8 种蛋白的含量也明显增加。表明这些蛋白在叶片组织中的含量既受温度的影响, 也与抗冻性存在着一定的关系, 但关系并不密切, 其含量主要受发育的控制。

(2) 京冬 1 号分子量 7 000 d(较低 PI 一种)趋于消失, 18 000 d(2 种)蛋白含量下降, 1 000 d 蛋白完全消失。肖农 12 中 1 000 d 的蛋白完全消失, 21 000 d, 18 000 d(2 种)蛋白含量下降。观察 NH_1 、 NH_2 两种叶片组织的可溶性蛋白变化时发现, 京冬 1 号, 肖农 12 各有 4 种蛋白在 NH_2 叶片组织中的含量没有变化。表明这些蛋白在叶片组织中的含量与抗冻性的形成呈正相关, 而且仅受温度的影响, 而不受发育的控制, 表明是由特异抗寒基因调控表达的, 直接参与抗冻性提高的必须的蛋白。

(3) 京冬 1 号分子量为 21 000 d, 肖农 12 7 000 d 蛋白(较低 PI), 在脱锻炼过程中都趋于消失。观察 NH_1 、 NH_2 两种叶片组织可溶性蛋白变化时发现, 京冬 1 号 21 000 d 蛋白在 NH_2 叶片组织中消失, 而肖农 12 7 000 d 蛋白的含量却增加。表明它们各自具有双重作用, 既与提高组织的抗冻性呈正相关, 也在个体发育中起着一定的作用。这些研究结果表明, CH 叶片组织在脱锻炼过程中, 为适应正常温度下发育的需要, 对其基因表达机制做了较大的调整。说明抗寒锻炼过程中基因表达的机制发生了根本的改变。

2.3 抗寒锻炼和脱锻炼下膜蛋白的变化及作用

(1) 低温锻炼下膜蛋白的变化与功能 由京冬 1 号、农大 139、肖农 12 三个品种 NH、CH 叶片组织中提取膜蛋白获得的电泳图谱见照片 3 和表 3。由此看出, 京冬 1 号经过 42 d 抗寒锻炼后, 叶片组织中合成了两种 NH_1 叶片组织中所没有的特异膜蛋白, 其分子量分别为 34 500 d 和 24 000 d。比较 CH 和 NH_1 叶片组织的膜蛋白变化时发现, 有 6 种膜蛋白的含量明显提高, 其分子量分别为 34 000 d(3 种), 15 000 d, 7 500 d, 26 000 d。至少有 13 种膜蛋白含量显著下降, 分子量分别为 305 000 d、10 000 d(2 种)、9 000 d(4 种)、10 500 d(2 种)、42 000 d、37 000 d、28 000 d、22 500 d。其中分子量为 10 000 d 蛋白中的 1 种、9 000 d 蛋白中的 2 种, 10 500 d 蛋白中的 1 种以及 30 500 d, 42 000 d, 37 000 d, 28 000 d 的蛋白趋于消失。从照片 3、表 3 看到, 抗寒



照片 3 膜蛋白双向电泳银染图谱

CH, NH_1 的意义与表 2 相同; → 为特异膜蛋白

表 3 抗寒锻炼过程中含量发生变化的膜蛋白在 NH₁, CH, DH 和 NH₂ 四种叶片组织中的变化

蛋 白 分 类	蛋白编号	分子 量 (d)	变 化												备 注
			京 冬 1 号				肖 农 12								
			NH ₁	CH	DH	NH ₂	NH ₁	CH	DH	NH ₂	NH ₁	CH	DH	NH ₂	
抗寒锻炼过程中产生的特异膜蛋白	1	34 500	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	蛋白编号 3; 在京冬 1 号中 3 种, 肖农 12 中 PI 较高的 2 种
	2	24 000	-	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
	3	34 000	+	↑	-	-	-	-	+	↑	↑	↑	↑	↑	
	4	15 000	+	↑	-	-	-	-	+	↑	↑	↑	↑	↑	
抗寒锻炼过程中含量增加的膜蛋白	5	7 500							+	↑	↑	↓*	↓*	↓*	具有较低 PI
	6	7 500	+	↑	↓*	-	-	-	+	↑	↑	-	↓*	↓*	具有较高 PI
	7	26 000	+	↑	-	-	-	-							
	8	8 000							+	↑	↑	↓*	↓*	↓*	2 种
抗寒锻炼过程中含量降低的膜蛋白	9	35 000	+	↓*	↑	↓*	↓*	↓*							
	10	10 000	+	↓*	↑	↓*	↓*	↓*	+	↓*	↑	↑	↓	↓	2 种
	11	9 000	+	↓*	↑	↓*	↓*	↓*	+	↓*	↑	↑	↓	↓	4 种
	12	10 500	+	↓*	↑	↓*	↓*	↓*	+	↓*	↑	↑	↑	↑	具有较高 PI
	13	10 500	+	↓*	↑	↑	↑	↑	+	↓*					具有较低 PI
	14	42 000	+	↓*	↑	↓	↓	↓							
	15	37 000	+	↓*	↑	↑	↑	↑							
	16	28 000	+	↓*	↑	↑	↑	↑							
	17	22 500	+	↓*	↑	↑	↑	↑							

注: + 为此蛋白存在且含量较高; ++ 为此蛋白存在且含量增加; - 为不存在或消失; ↑ 为含量增加; ↓ 为含量降低;
↓* 为含量显著降低。

锻炼过程中农大 139 叶片组织膜蛋白的变化与京冬 1 号相似, 肖农 12 抗寒锻炼期间叶片组织中也合成了一种分子量为 24 000 d 的特异膜蛋白, 另有 7 种膜蛋白与 NH_1 组织中的相应蛋白含量比较均有提高, 其分子量分别为 75 000 d(2 种), 8 000 d(2 种), 34 000 d(2 种)、15 000 d; 至少有 7 种膜蛋白含量显著下降, 其分子量为 10 000 d(2 种), 9 000 d(4 种)和 10 500 d。以上结果表明, 抗寒锻炼过程中冬小麦叶片组织中膜蛋白组成发生了动态变化, 一些正常的基因关闭, 而一些与适应中有关的基因启动表达, 表现出正常的蛋白合成受阻, 逆境蛋白被诱导合成, 证明抗寒锻炼过程中控制这些膜蛋白合成的基因在表达机制上发生了根本的改变。

(2) 脱锻炼下膜蛋白的变化与功能 表 3 看出, 抗寒锻炼过程中, 京冬 1 号叶片组织新合成的分子量为 24 000 d 和 34 500 d 两种特异膜蛋白及肖农 12 中的 24 000 d 特异蛋白, 在脱锻炼下完全消失。这 3 种特异膜蛋白的合成或阻碍与抗冻性的提高或下降存在着密切的相关关系。它们是发育抗冻性必须的特异膜蛋白。在抗寒锻炼下, 京冬 1 号叶片组织含量下降或趋于消失的 13 种膜蛋白, 肖农 12 含量下降的 7 种膜蛋白, 在脱锻炼后其含量增加, 表明这些膜蛋白在组织中的含量与抗冻性呈负相关。

在寒胁迫下, 京冬 1 号含量明显增加的 6 种膜蛋白, 脱锻炼后分子量为 7 500 d 的膜蛋白含量明显下降, 其余 5 种膜蛋白消失; 肖农 12 增加的 7 种膜蛋白, 脱锻炼下其分子量为 8 000 d(2 种)和 7 500 d(2 种)的膜蛋白的含量明显下降, 其余 4 种膜蛋白消失。比较表 3 中 NH_1 , NH_2 两种叶片组织的膜蛋白变化时发现, 京冬 1 号中有 6 种膜蛋白在 NH_2 叶片中消失, 肖农 12 分子量为 8 000 d(2 种), 7 500 d(2 种)的膜蛋白含量明显下降, 其余 3 种膜蛋白消失。证明京冬 1 号中这 6 种膜蛋白和肖农 12 中的 7 种膜蛋白, 在叶片组织中的含量变化, 既受温度的影响, 也与抗冻力的形成呈正相关, 同时也受发育的控制。

3 讨论与结论

冬小麦抗寒锻炼过程中, 抗冻性的提高与基因表达改变有关。这一研究结果与国外的有关报道相同(Guy, 1987; Mohapatra, 1988; Cloutier, 1983; Mork, 1988)。本研究发现低温锻炼下, 京冬 1 号中的 9 种可溶蛋白(肖农 12 中 13 种)含量明显提高。其研究结果与 Cloutier (1983)的实验结果相似。对膜蛋白的分析中发现, 京冬 1 号在抗寒锻炼中, 不仅合成两种新的特异膜蛋白, 而且有 6 种膜蛋白(肖农 12 中为 7 种)含量增加, 有 13 种膜蛋白(肖农 12 中为 7 种)含量明显降低, 其中有的趋于消失。这一观察结果与 Yoshida (1984)的研究结果相似。

蛋白是抗寒基因的表达最终产物。研究寒胁迫下蛋白质的变化规律, 将会发现它们与抗冻性的发育存在着不同的关系, 对揭示这些蛋白在抗寒锻炼过程中生理功能的研究提供细致的技术和理论。本研究发现京冬 1 号在寒胁迫过程中合成的 2 种新的特异膜蛋白(肖农 12 中为 24 000 d), 由于它们在抗寒锻炼和脱锻炼过程中的合成与阻碍同这两个过程中抗冻性的提高与下降呈正相关, 又由于分子量 24 000 d 的膜蛋白, 在强抗冻京

冬 1 号叶片中含量比弱抗肖农 12 中的含量高, 而分子量 34 500 d 的膜蛋白在肖农 12 中根本不合成。由此认为, 这些特异膜蛋白是冬小麦在低温逆境下产生的抗冻基因蛋白。这种膜蛋白对植物低温下维持膜的流动性, 使蛋白质不因结冰脱水而变构, 以抵抗结冰伤害造成的机械效应, 是提高植物抗冻性必须直接的、特异的抗冻膜蛋白, 为基因工程提供了关键资料。

综上所述, 可以获得如下结论:

(1) 冬小麦抗寒锻炼其抗冻性与对照相比明显提高。(2) 抗寒锻炼期间, 京冬 1 号小麦叶片组织中有 9 种可溶性蛋白, 肖农 12 有 13 种可溶性蛋白含量明显增加。其分子量为 1 000 d, 7 000 d(1 种), 21 000 d, 18 000 d(2 种)的 5 种蛋白的含量在两个品种中都与抗冻性呈正相关。(3) 抗寒锻炼期间, 京冬 1 号、农大 139 两个品种叶片组织中, 检测到两种分子量为 34 500 d, 24 000 d 的特异膜蛋白, 肖农 12 为 24 000 d 的特异膜蛋白, 它们与抗冻性呈正相关。京冬 1 号中 6 种, 肖农 12 中有 7 种膜蛋白含量增加, 它与抗冻性呈正相关。在京冬 1 号中至少 12 种(肖农 12 有 7 种)膜蛋白的含量显著下降, 它们与抗冻性呈负相关。(4) 植物的抗冻能力为其基因表达所控制, 这种基因的转录和翻译的最终产物——蛋白质。进行逆境膜蛋白与抗冻性关系研究, 对阐明高等植物个体发育过程中基因表达调控机制, 揭示抗冻性的本质, 筛选抗逆“源”以至最终利用基因工程和常规育种方法结合, 培育抗逆新品种具有重要的意义。

参 考 文 献

- 赵玉田, 1987. 冬小麦抗冻性鉴定方法指标及筛选. 中国农业科学, 20(6):74—80
- Cloutier Y, 1983. Changes in electrophoretic patterns of the soluble proteins of winter wheat and rye following cold acclimation and desiccation stress. *Plant Physiol.*, (71): 400—403
- Guy C Y, 1987. Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. *Plant Physiol.*, (84): 872—878
- Mohapatra S S, 1988. Changes in protein patterns and translatable messenger RNA populations during cold acclimations of alfalfa. *Plant Physiol.*, (84):1 172—1 176
- Mork A, 1988. Analysis of mRNAs that accumulate in response of low temperature identifies a thiol protease. Gene in tomato. *Plant Physiol.*, (87): 43—436
- Yoshida S, 1984. Involvement of plasma membrane during acclimation of winter rye seedling. *Plant Physiol.*, (75): 818—826