

不同杂交水稻籽粒灌浆期叶片蛋白的差异表达分析*

黄锦文¹ 李忠¹ 陈军¹ 张志兴¹ 李奇松¹ 郑家团² 林文雄^{1**}

(1. 福建农林大学农业生态研究所 福州 350002; 2. 福建省农业科学院水稻研究所 福州 350018)

摘要 为明确超级杂交水稻高产形成的分子机理, 以超级杂交水稻“Ⅱ优航2号”为试验材料, 杂交水稻“汕优63”为对照, 运用双向电泳结合质谱技术, 比较分析了籽粒灌浆过程中两种不同“源”类型杂交水稻叶片蛋白的差异表达情况。结果显示, 两种不同类型水稻叶片蛋白中共有22个蛋白点出现显著差异表达, 其中有20个蛋白功能得到鉴定。通过对差异蛋白功能及表达丰度的分析, 相对于“汕优63”, “Ⅱ优航2号”在灌浆期光合代谢、抗逆反应、基因转录表达、细胞生长、能量代谢等生理活动过程中表现出较大优势, 是其叶片在籽粒灌浆期“源”优势的主要体现。本研究从差异蛋白水平明确了航天超级杂交稻高产形成的“源”特征, 丰富了籽粒灌浆的“源、库、流”理论, 为超级杂交水稻育种提供理论依据。

关键词 超级杂交水稻 “源”特征 穗粒灌浆期 叶片 蛋白组学 表达丰度 差异表达

中图分类号: S343.2 文献标识码: A 文章编号: 1671-3990(2011)01-0075-07

Analysis of differential expression of leaf proteins in different hybrid rice during grain-filling

HUANG Jin-Wen¹, LI Zhong¹, CHEN Jun¹, ZHANG Zhi-Xing¹, LI Qi-Song¹,
ZHENG Jia-Tuan², LIN Wen-Xiong¹

(1. Institute of Agricultural Ecology, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
2. Rice Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350018, China)

Abstract To further clarify molecular metabolism of high yield super-hybrid rice, this paper studied differential expression patterns of leaf proteins in super-hybrid combinations “Ⅱ Youhang No. 2” and hybrid combinations “Shanyou 63” during grain-filling. The proteomic approach, which was based on two-dimensional electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry (MS) was used in the study. A total of 22 differentially expressed proteins (at a significant level) were noted, and 20 of which were eventually identified. Further analysis of relative functions and expression abundances showed advantages of “Ⅱ Youhang No. 2” in photosynthetic metabolism, defense, gene-transcript regulation, cell growth, energy metabolism, compared with “Xianyou 63”. The advantages maybe the internal agents of “source” property of “Ⅱ Youhang No. 2” leaf in grain-filling stage. The study revealed the source properties of high yield super-hybrid “Ⅱ Youhang No. 2” at differential proteomic levels. This, to some extent, enriched the source-sink-flow theory and provided a theoretical basis for super-hybrid rice breeding.

Key words Super-hybrid rice, Source property, Grain-filling stage, Leaf, Proteomic, Expression abundance, Differential expression
(Received Oct. 11, 2010; accepted Nov. 25, 2010)

近年来大量的大穗型以及超大穗型的杂交水稻组合被选育出来, 这些组合都表现出较大的产量优势, 如福建省农业科学院水稻研究所利用航天育种

技术育成的超级杂交稻新组合“Ⅱ优航2号”, 该组合经各地试验、试种, 均表现出根系发达、群体形态结构整齐、丰产稳产性好、适应性广、穗大粒

* 国家自然科学基金项目(30871494)、教育部博士点基金项目(200803890006)、福建省自然科学基金项目(2007J0304, 2008J0042)和福建省科技重大专项(2008NZ0201)资助

** 通讯作者: 林文雄(1957~), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为植物生理与分子生态学。E-mail: wenxiong181@163.com
黄锦文(1967~), 女, 博士, 教授, 主要从事作物生理生态及分子生态学研究。E-mail: huangjw1126@sohu.com

收稿日期: 2010-10-11 接受日期: 2010-11-25

多等特点。“Ⅱ优航2号”2004年、2005年参加福建省中稻区域试验,平均产量8 796.6 kg·hm⁻²,比“汕优63”增产9.28%^[1]。可见,航天育种创造的“Ⅱ优航2号”在产量上已经具有明显优势。作者所在的福建农林大学农业生态研究所对“Ⅱ优航2号”的“源、库、流”生理特性进行分析,结果显示,相对于杂交水稻“汕优63”,“Ⅱ优航2号”灌浆中后期叶片的光合速率、叶绿素含量和叶绿素荧光动力等特征均表现出显著优势。在水稻籽粒灌浆的中后期,茎鞘中储藏的同化物质已经转移到籽粒上,而该时期又是弱势籽粒灌浆的重要时期,因此该时期作为主要“源”器官的叶片,其同化物质输出量的大小,对弱势籽粒的灌浆具有重要作用^[2-3]。“Ⅱ优航2号”在灌浆期叶片的特性是决定其具有高产潜力的重要因素,目前关于超级杂交稻“源”特征的分子机理还鲜见报到。

蛋白质是基因表达的最终产物,也是基因功能的执行者。水稻基因组学研究的重大进展也推动着水稻蛋白质组学进入了“功能基因组学”时代^[4]。应用蛋白质组学技术对植物生育后期叶片的研究已成为热点,Schiltz等^[5]研究了豌豆种子充实时期的叶片蛋白表达差异,鉴定了80个差异蛋白,这些蛋白参与了种子的充实、能量代谢、抗逆等生理过程。福建农林大学农业生态研究所李兆伟等^[6]采用双向电泳和质谱技术研究大穗型水稻“金恢809”灌浆期旗叶的蛋白质表达模式,共发现17个蛋白质发生差异表达,分别参与叶片的物质合成与降解、碳水化合物运输和组织成熟等生理反应。Zhang等^[7]应用比较蛋白质组学研究水稻灌浆期水稻叶片衰老机制中碳代谢调控,鉴定了170个差异表达蛋白,通过这些蛋白推测了相应代谢网络图。目前,水稻灌浆期叶片蛋白质组学研究主要针对单一组合(品种)在生长发育不同时期的蛋白质表达差异,从而揭示其发育代谢机理。本研究应用差异蛋白质组学研究方法,以两组“源”特性相异的杂交水稻为研究对象,探讨超级杂交稻籽粒灌浆过程中叶片的蛋白质代谢模式,并探索其与传统杂交稻的蛋白表达差异,旨在揭示超级杂交水稻叶片“源”优势形成的分子机理,从而丰富“源、库、流”理论,以期为超级杂交水稻的选育及其超高产优质栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试水稻组合与取样方法

试验于2009年5月在福建农林大学闽侯白沙科研基地进行。供试水稻为超级杂交水稻“Ⅱ优航2号”,其平均株高129.9 cm,穗长25.8 cm,每穗总

粒数159.7粒,结实率79.0%,千粒重28.5 g;以杂交水稻“汕优63”作为对照。田间种植试验小区面积为30 m²,采用随机区组排列,3次重复,每个组合插植3个区,每区插植规格为20 cm×20 cm。每区施纯氮12.5 kg·666.7 m⁻²,氮肥运筹为基肥 糜肥 穗肥 粒肥=4 3 2 1;施P₂O₅10 kg·666.7 m⁻²,K₂O 10 kg·666.7 m⁻²,分别以过磷酸钙和氯化钾的形式施入,磷肥全部用作基肥,钾肥作分蘖肥和穗肥两次施用,各占一半。其他管理措施与高产栽培模式一致。抽穗期,定株并标记100株秧龄相同、长势相似的水稻供随机取样。在自然条件下,分别于籽粒灌浆7 d、14 d、21 d、28 d取同一叶位的功能叶并分别收藏于-80℃冰箱中备用。

1.2 叶片蛋白质样品制备

按王经源等^[8]的TCA-丙酮沉淀法进行叶片蛋白质样品制备。按Garrels^[9]的方法测定蛋白质含量后,用作电泳样品。

1.3 二维聚丙烯酰胺凝胶电泳(2-DE)

参照王经源等^[8]的方法。第1向等电聚焦(IEF)采用18 cm自制管状胶条,上样量为150 μg。在28℃下,依次按200 V、300 V、400 V、500 V、600 V、800 V各30 min,1 000 V 18 h,1 100 V 30 min的电压梯度进行电泳。第2向聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)的凝胶规格为180 mm×180 mm×1.5 mm,分离胶浓度为10%,浓缩胶浓度为5%。电泳结束后,用硝酸银染色。Umax powerlook III扫描仪扫描凝胶图像,构建蛋白质表达图谱;借助Image Master 5.0软件进行分析。

1.4 蛋白质点胶内酶解

参照Peng等^[10]的方法略作修改进行。挖取差异蛋白质点,在1:1的0.03 mol·L⁻¹铁氰化钾和0.1 mol·L⁻¹硫代硫酸钠混合液中脱色;57℃条件下0.01 mol·L⁻¹DTT溶液中还原1 h,0.055 mol·L⁻¹碘乙酰胺溶液烷基化1 h;用12.5 ng·μL⁻¹胰岛素酶缓冲液4℃下水化30 min,并在37℃下,0.05 mol·L⁻¹碳酸氢铵溶液中酶切14 h。分别用0.02 mol·L⁻¹碳酸氢铵溶液、含5%TFA的50%乙腈、100%乙腈萃取酶切产物。

1.5 MALDI-TOF/MS(基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱)分析

MALDI-TOF/MS分析使用德国BRUKER公司的ReFlexTMIII MALDI-TOF质谱仪。采用反射模式,离子源加速电压1为20 kV,加速电压2为23 kV,N₂激光波长337 nm,脉冲宽度为3 ns,离子延迟提取2 000 ns,真空度1.9×10⁻⁵ Pa,质谱信号单次扫描累加50次,并用标准Mark峰作为外标校正质谱峰,正

离子谱检测。基质为 HCCA(*a*-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid)饱和液, 基质溶解液为 40% 乙腈和 60% 溶解有 0.1% TFA 的双蒸水。用 2 μ L 0.5% TFA 溶液溶解肽段, 按 1:1 将样品溶液和基质溶液混合后点样, 自然干燥后进行质谱分析, 获得肽指纹图谱(PMF), 用 MASCOT 软件检索查询。

2 结果与分析

2.1 叶片蛋白组图谱构建与比较分析

为探讨“Ⅱ优航 2 号”在籽粒灌浆期叶片“源”优势形成的分子机理, 本研究选取籽粒灌浆期 4 个不同时段(7 d、14 d、21 d、28 d)“Ⅱ优航 2 号”和“汕优 63”叶片共 8 个样品, 经双向电泳后得 8 张叶片 2D 图谱。在等电点 3~10 和分子量 14~116 kD 范围内, 通过软件 Image Master5.0 分析, 去除假点, 每张 2D 图谱大概有 600 个点左右。当点与点之间差异达到 1.5 倍, 即认为表达量有显著差异, 共检测到 22 个在两个不同组合间出现差异表达的蛋白, 分别标记为 1~22(图 1)。挖取差异蛋白质点, 进行 MALDI-TOF/MS 鉴定分析。

2.2 差异点质谱鉴定

分别根据 22 个差异蛋白质的肽质量指纹图谱(图 2)所得数据, 去除杂质峰值后, 通过 Matrix Science (London, UK)网站(<http://www.matrixscience.com>)提供的 MASCOT 软件进行查询。共有 20 个蛋白质得到鉴定(表 1), 另外 2 个蛋白质(Spot 2, 19)在蛋白数据库中没有明显的同源匹配蛋白, 未能鉴定。

2.3 蛋白功能鉴定以及丰度变化分析

对所鉴定的蛋白质通过数据库检索以及相关

的文献查询, 一共鉴定到 20 个蛋白, 其中 5 个蛋白(Spot 3, 6, 9, 11, 16)鉴定为假想蛋白, 蛋白功能有待继续深入研究, 这里暂不对上述 5 个蛋白进行探讨, 其余 15 个蛋白依据其功能分为 5 大类, 蛋白丰度的变化趋势见图 3。

(1) 光合作用相关蛋白(3 个): 核酮糖二磷酸羧化酶大亚基前体(Spot 10)、核酮糖二磷酸羧化酶大亚基(Spot 18)和 Fe-NADP 还原酶(Spot 13), 这 3 个蛋白在两个水稻组合中丰度变化趋势都有所下降, 特别是开花后 14 d 出现显著下调, 但这 3 个蛋白在“Ⅱ优航 2 号”中下调的趋势较“汕优 63”缓慢。

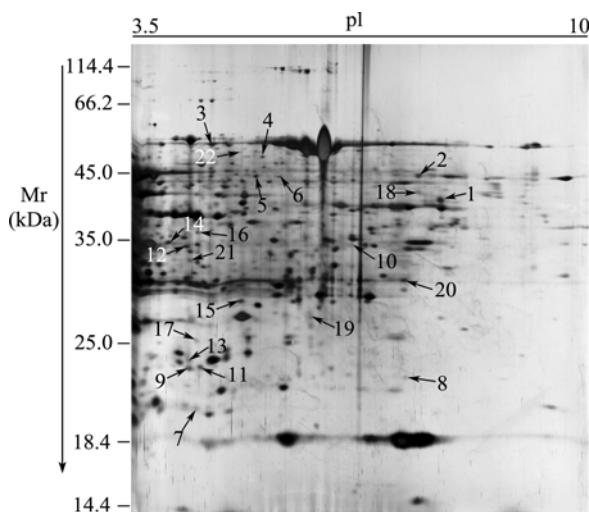


图 1 粒灌浆 21 d 时超级杂交稻“Ⅱ优航 2 号”叶片的双向凝胶电泳图谱

Fig. 1 2-DE gel electrophoretogram in leaf of “Ⅱ Youhang No. 2” at 21 days after grain filling

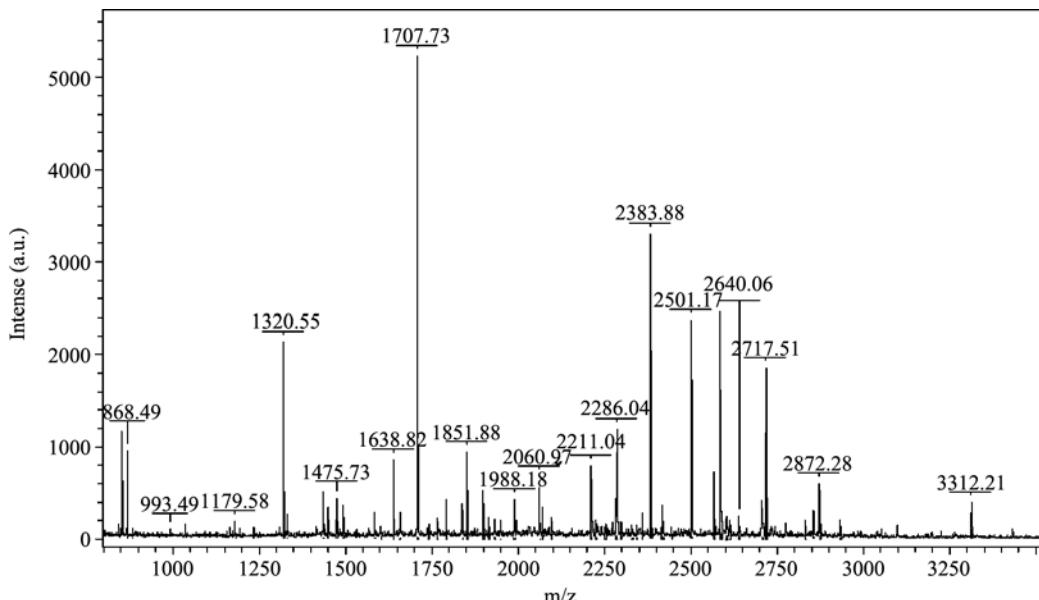


图 2 粒灌浆 21 d 时超级杂交稻“Ⅱ优航 2 号”叶片的蛋白肽指纹图谱

Fig. 2 Peptide mass fingerprinting (PMF) of protein in leaf of “Ⅱ Youhang No. 2” at 21 days after grain filling

表 1 叶片差异蛋白点 MALDI-TOF/MS 质谱鉴定结果
Tab. 1 MALDI-TOF/MS results of differentially expressed proteins in leaf

序号 No.	蛋白质名称 Protein name	登录号 Accession No.	理论等电点/分子量 Theo. PI/MW (kD)	试验等电点/分子量 Exp. PI/MW (kD)	覆盖率 Sequence coverage (%)	匹配肽段数 Matched peptides
1	果糖 1,6-二磷酸醛缩酶 Fructose-bisphosphate aldolase	Gi 115468886	7.57/37.959	7.90/41	23	9
3	假想蛋白 Hypothetical protein OsJ_30424	Gi 222642143	6.42/53.437	6.03/51	21	12
4	糖基转移酶 Glycosyltransferases	Gi 115475672	6.48/52.199	6.51/49	34	12
5	翻译延伸因子 Tu 蛋白 Elongation factor Tu	Gi 115456623	6.04/48.564	6.42/45	37	17
6	假想蛋白 Hypothetical protein OsJ_31958	Gi 125575203	5.22/44.299	6.61/45	32	11
7	CCHC 锌指结构域蛋白 Zn-finger, CCHC type domain containing protein	Gi 115472477	8.60/133.651	6.02/21	17	18
8	莽草酸激酶 2 Shikimate kinase 2	Gi 56805579	9.47/32.897	7.31/21	28	8
9	假想蛋白 Hypothetical protein OsI_12090	Gi 218193065	5.32/20.630	5.64/23	48	8
10	核酮糖二磷酸羧化酶大亚基前体 Ribulose bisphosphate carboxylase large chain precursor	Gi 110288945	8.51/40.763	7.32/41	20	9
11	假想蛋白 Hypothetical protein	Gi 115477166	6.58/25.552	5.91/23	34	7
12	逆转录转座子 Retrotransposon protein, putative	Gi 78708033	8.98/205.982	5.62/35	15	25
13	Fe-NADP 还原酶 Ferredoxin-nadp reductase, leaf isozyme	Gi 149392465	6.59/21.769	5.71/23	45	10
14	推定解旋酶 SKI2W Putative Helicase SKI2W	Gi 125538171	5.63/145.057	5.51/35	14	19
15	微管结合蛋白 Microtubule-binding protein	Gi 115446007	11.93/45.523	6.52/29	21	5
16	假想蛋白 Hypothetical protein OsI_13117	Gi 125545347	10.46/42.719	6.03/36	34	7
17	推定泛素羧基端水解酶 7 Putative ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	Gi 14209584	5.42/129.696	6.14/26	18	17
18	核酮糖二磷酸羧化酶大亚基 Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	Gi 57283874	6.23/53.331	7.53/35	28	14
20	腺苷激酶类蛋白 Adenosine kinase-like protein	Gi 29367547	5.57/40.606	7.25/32	28	5
21	ATP 合成酶 CF1 β 亚基 ATP synthase CF1 beta subunit	Gi 11466794	5.47/54.037	5.6/34	23	9
22	真核生物肽链释放因子亚基 1 Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	Gi 115454823	5.38/49.138	6.3/48	29	9

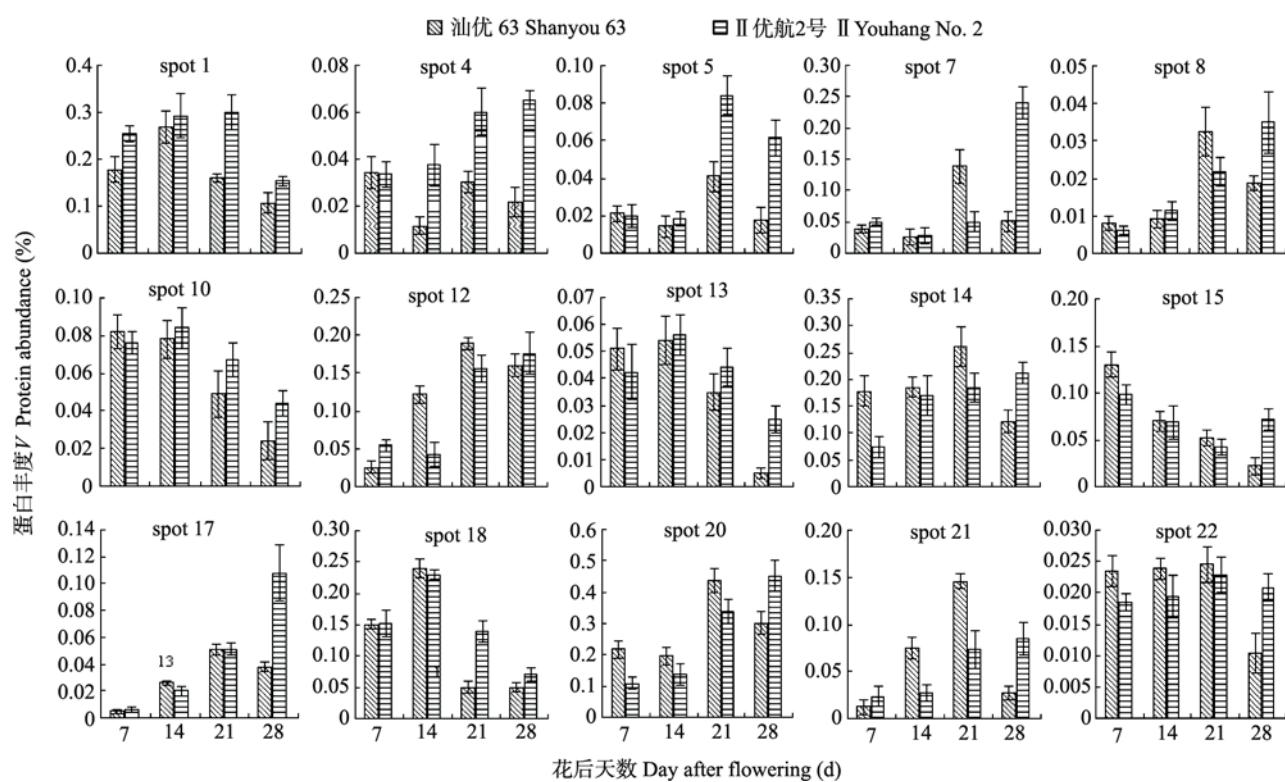


图 3 两种杂交水稻组合叶片差异蛋白点的丰度变化

Fig. 3 Changes in expression abundance of leaf protein spots between two combinations of hybrid rice

(2)抗逆相关蛋白(2个): 翻译延伸因子 Tu 蛋白(Spot 5)在两个水稻组合中灌浆前期丰度都比较低, 到后期出现上调表达, 但该蛋白在“Ⅱ优航2号”中上调表达的幅度较大。莽草酸激酶2(Spot 8)在两个水稻组合灌浆前中期(花后7~14 d)的表达量相对较低, 后期(花后21~28 d)表达量升高, 最大值在“汕优63”和“Ⅱ优航2号”中分别出现在花后21 d和28 d。

(3)蛋白代谢相关蛋白(4个): 糖基转移酶(Spot 4)在“汕优63”的花后7 d和21 d出现两次表达峰, 在“Ⅱ优航2号”花后4个时期都表现出逐步上调。推定解旋酶SKI2W(Spot 14)在“汕优63”中表达峰值出现在开花后21 d, 后期下调明显, 而该蛋白在“Ⅱ优航2号”中一直保持上调趋势。推定泛素羧基端水解酶7(Spot 17)在花后7~21 d都出现上调表达现象, 但在“汕优63”中花后28 d开始出现下调表达现象, 而在“Ⅱ优航2号”中花后28 d依旧呈现上调表达现象。真核生物肽链释放因子亚基1(Spot 22)花后21 d之前在“汕优63”中表达量相对稳定, 28 d时出现显著下调, 而在“Ⅱ优航2号”的整个灌浆期都稳定表达。

(4)基因转录调节及细胞生长相关蛋白(4个): CCHC锌指结构域蛋白(Spot 7)在花后7 d、14 d时的表达量较低, 21 d明显上调, 28 d又明显下调。“汕优63”表达峰值出现在花后21 d, 而“Ⅱ优航2号”表达峰值出现在花后28 d。逆转录转座子(Spot 12)在两杂交水稻叶片中的表达量均上调, “汕优63”中花后7~14 d时增量较大, 而“Ⅱ优航2号”中花后14~21 d时出现大幅上调。微管结合蛋白(Spot 15)在“汕优63”中表达量持续下降, 在“Ⅱ优航2号”中前3个时期同样下调, 但在花后28 d时出现上调表达现象。腺苷激酶类蛋白(Spot 20)在两种杂交水稻中灌浆前中期(7~14 d)表达量相对较低, 在后期表达量升高, “汕优63”中花后21 d时最高, “Ⅱ优航2号”中花后28 d时最高。

(5)能量代谢相关蛋白(2个): 果糖1,6-二磷酸醛缩酶(Spot 1)在“汕优63”中表达量在花后14 d时最高, 中后期逐渐下调, 而在“Ⅱ优航2号”灌浆的前期和中期(花后7~21 d)表达量较为稳定, 略有上升趋势, 花后28 d开始下调。ATP合成酶CF1 β 亚基(Spot 21)在“汕优63”中灌浆初期表达量较低, 随后增加, 到灌浆后期又减少, 表达量峰值出现在花后第21 d, 而在“Ⅱ优航2号”中的表达丰度持续上升, 花后28 d时最大。

3 讨论

3.1 光合作用相关蛋白的差异表达

在籽粒灌浆期基于对照组合“汕优63”, “Ⅱ优航2号”叶片差异表达蛋白中, 鉴定到光合作用相关的差异蛋白有3个, 分别是核酮糖二磷酸羧化酶大亚基、Fe-NADP还原酶和核酮糖二磷酸羧化酶大亚基前体。核酮糖二磷酸羧化酶大亚基以及核酮糖二磷酸羧化酶大亚基前体都参与1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)的构成。Rubisco是植物光合作用中CO₂固定的关键酶, 决定光合作用的净效率, 许多研究结果表明水稻Rubisco含量与光合速率显著相关^[11~12]。Fe-NADP还原酶组成光系统Ⅱ, 是光合电子传递中关键的酶, 在光合电子传递的最后一步, FNR利用Fd从PSI中获得的电子还原NADP⁺, 生成还原力NADPH与ATP^[13]。本研究中上述3个蛋白在两个不同水稻组合中丰度变化趋势大致相同, 随着灌浆的进行丰度都显著降低, 说明随着灌浆的进行水稻叶片对光能的吸收和转化能力下降, 产生的NADPH与ATP也随之减少, 不能为叶片卡尔文循环提供足够的还原力, Rubisco相应开始大量分解, 对CO₂固定能力减弱, 光合速率也随之降低, 而对于大穗型水稻来说, 灌浆后期往往是弱势籽粒灌浆的重要时期, 此时光合同化能力的大小对弱势籽粒灌浆的完成情况具有重要作用。本试验中“Ⅱ优航2号”水稻后期与Rubisco合成相关蛋白的丰度降低趋势相对缓慢, 表明“Ⅱ优航2号”叶片在灌浆后期能够保持较高的同化能力, 在籽粒灌浆期的“源”供给能力较大, 促进了弱势籽粒的灌浆, 这可能也是“Ⅱ优航2号”具有较大高产潜力的一个重要因素。

3.2 抗逆相关蛋白的差异表达

本研究中, 在籽粒灌浆后期出现差异表达的蛋白中有2个与叶片抗逆相关, 分别是莽草酸激酶2、翻译延伸因子Tu蛋白。莽草酸激酶2是莽草酸循环中的关键酶, 莽草酸途径在植物次生代谢中起中心作用, 许多次生代谢物和芳香族氨基酸前体均来自莽草酸代谢途径所合成的芳香族氨基酸及其中间代谢产物^[14], 其中包括许多有关植物抗病、抗逆物质, 常见的有木质素、酚类化合物、水杨酸等物质^[15]。翻译延伸因子Tu蛋白的主要生物功能是蛋白质合成中肽链的延伸^[16], 同时翻译延伸因子Tu蛋白被证实存在于叶绿体和细菌中, 与植物的耐热性有关, 在热胁迫下, 该蛋白表达量增加, 能与热激蛋白发生强烈的反应^[17], 起到分子伴侣的功能, 保护叶绿体内蛋白不发生热聚合和失活^[18]。在本研究中, 随

着叶片的衰老, 叶片对外界的胁迫表现更加敏感, 有害物资的积累诱发抗逆相关物质合成代谢, 莽草酸激酶和翻译延伸因子 Tu 在两种水稻灌浆后期都相应提高, 但在“Ⅱ优航 2 号”中的表达量更高, 而在“汕优 63”的灌浆末期出现下调, 说明“Ⅱ优航 2 号”在灌浆末期的抗逆性更强, 可能是“Ⅱ优航 2 号”在灌浆后期能够保持较高的同化能力的原因之一。

3.3 蛋白质代谢相关蛋白的差异表达

植物的一切生命活动都离不开蛋白质的参与和调控, 本研究发现与蛋白代谢相关的蛋白有推定解旋酶 SKI2W、真核生物肽链释放因子亚基 1 和推定泛素羧基端水解酶 7。推定解旋酶是 DNA 转录和复制过程的关键酶; 真核生物肽链释放因子亚基 1 位于核糖体上, 具有肽链延伸和释放的功能。随着叶片的衰老, 为维持细胞的正常生理过程, 叶片细胞内进行水解受损蛋白与合成新蛋白的替换过程, 本研究发现的这 2 个蛋白质合成相关的蛋白在花后 14 d 和 21 d 表达量较高, 随着灌浆的进行, 到灌浆后期花后 28 d, 这 2 个蛋白在“Ⅱ优航 2 号”叶片中的丰度高于“汕优 63”, 表明在籽粒灌浆后期“Ⅱ优航 2 号”叶片蛋白的合成水平比“汕优 63”高, 有利于维持灌浆后期叶片正常生理功能。推定泛素羧基端水解酶 7 是调控细胞内蛋白活性的一个重要酶类, 其调控对象主要是细胞内结构受损或需要及时清除的功能蛋白。泛素相关蛋白在灌浆中后期构成降解短周期寿命蛋白的泛素系统, 通过对蛋白进行泛素化, 调节细胞内多种蛋白的周转, 保证生命活动中新旧蛋白更替的复杂有序^[19]。本研究鉴定到的推定泛素羧基端水解酶 7 在 2 种杂交水稻的灌浆初期表达量低, 在灌浆后期表达量上调, “汕优 63”中泛素羧基端水解酶 7 在花后 21 d 达到峰值, 随后下降, 而在“Ⅱ优航 2 号”中其表达量持续上升, 表明“Ⅱ优航 2 号”在灌浆末期对结构受损或需要及时清除的蛋白具有更强的降解能力。相对“汕优 63”而言, 在灌浆后期“Ⅱ优航 2 号”叶片的蛋白质合成代谢更为活跃, 同时受损蛋白的降解更迅速, 该生理活动可能与水稻叶片延缓衰老有关。

蛋白质的翻译后修饰在生物体的生命活动中起重要的调节作用。糖基转移酶是植物体内关键的糖基化蛋白, 在生物体内催化活化的糖连接到不同的受体分子, 如蛋白、核酸、寡糖、脂和小分子上, 糖蛋白是许多生物过程的基本物质。本试验中, “Ⅱ优航 2 号”在整个灌浆期该蛋白在叶片中的表达量较“汕优 63”高, 说明“Ⅱ优航 2 号”叶片在灌浆期糖基化水平较高, 能够合成较多的糖蛋白用于维持叶片正常的生理代谢活动。

3.4 基因转录调节及细胞生长相关蛋白的差异表达

鉴定到的腺苷激酶类蛋白和逆转录转座子与水稻叶片中的核酸代谢水平相关, 粒籽灌浆期这两个蛋白在“Ⅱ优航 2 号”叶片中都有较大的表达丰度, 暗示着“Ⅱ优航 2 号”的核酸代谢水平较高。核酸是生物细胞中最重要的物质, 是产生能量与合成蛋白质的基础, 它能修复受损细胞, 使各器官功能恢复正常, 粒籽灌浆期“Ⅱ优航 2 号”叶片较高的核酸代谢水平是籽粒灌浆顺利完成的保证。

CCHC 锌指结构域蛋白以及微管结合蛋白都与叶片中细胞生长相关。锌指蛋白在真核生物体内主要通过与 DNA 特异结合, 来调节基因的表达, 并可参与细胞内的信号转导。微管结合蛋白参与了微管的组装并增加微管的稳定性, 而微管在细胞中起着信号传导、物资运输、维持细胞和参与细胞分裂中细胞壁的形成的作用^[20]。本研究发现, 这 2 个蛋白在 2 个水稻组合叶片中出现差异表达的情况都是在花后 28 d, 并且在“Ⅱ优航 2 号”中的表达量较大, 由此可见, 在籽粒灌浆后期, “Ⅱ优航 2 号”叶片还保持着较活跃的细胞活动, 这有利于大穗型水稻的后期弱势籽粒的灌浆。

3.5 能量代谢相关蛋白的差异表达

本研究中鉴定到 2 个与能量和物质代谢相关蛋白。果糖 1,6-二磷酸醛缩酶是糖酵解过程中的关键酶, 前人研究认为, 在逆境胁迫下, 果糖 1,6-二磷酸醛缩酶表达量增加, 通过糖酵解途径为适应逆境提供 ATP^[21]。同时果糖 1,6-二磷酸醛缩酶是叶片细胞中合成蔗糖的关键酶, 光合作用中产生的磷酸丙糖进入细胞质用于合成蔗糖并向库细胞输送, 若果糖 1,6-二磷酸醛缩酶不足, 光合作用形成的磷酸丙糖滞留在叶绿体内用于合成淀粉, 并通过某种(些)机理反馈抑制光合作用^[22], 因此增加果糖 1,6-二磷酸醛缩酶的表达量有利于光合作用和蔗糖的运输。本研究发现, 在灌浆前期该蛋白在两个水稻叶片中的表达量较高, 在后期减少, 但“Ⅱ优航 2 号”在 4 个时期该蛋白表达丰度均大于“汕优 63”, 灌浆后期二者差异更为明显。说明“Ⅱ优航 2 号”在灌浆前中期能够更迅速地将光合产物合成蔗糖并转运出去, 减少叶绿体内淀粉的积累, 避免抑制光合作用, 在灌浆末期, 具有更强的糖酵解能力和抗逆能力, 也暗示着“Ⅱ优航 2 号”具有“源”足、流畅的优势。

ATP 合成酶 CF1 β 亚基是 ATP 合成酶的组成成分, ATP 合成酶是 ATP 合成和水解的关键酶。前人研究认为, 水稻籽粒灌浆期间叶片高 ATPase 活性是物质大量合成和迅速转运的保证^[23], 叶片中的 ATP 结合蛋白与碳同化物的输出呈极显著正相关^[24], 对

叶片中的物质运输和能量代谢起着重要作用^[25]。本研究发现,在籽粒灌浆前期和中期(花后0~21 d),ATP合成酶CF1 β 亚基在两个水稻叶片中的表达量都上调表达,在“汕优63”叶片中的表达丰度大于“Ⅱ优航2号”,但在后期,该蛋白在“汕优63”中的表达丰度下降明显,而在“Ⅱ优航2号”中保持上调,说明在灌浆前期“汕优63”的叶片物质转移速率较高,但“Ⅱ优航2号”在籽粒灌浆后期物质的合成以及转运的优势明显,这对弱势籽粒的灌浆更加有利。

4 结论

前期对超级稻“Ⅱ优航2号”的“源、库、流”生理特性分析发现,“Ⅱ优航2号”在灌浆期叶片的光合速率、叶绿素含量和叶绿素荧光动力学特征相对“汕优63”均表现出显著优势^[2-3]。本试验进一步从蛋白表达水平深入探讨了其灌浆期水稻叶片“源”优势的内因,结果表明,相对于“汕优63”,灌浆期“Ⅱ优航2号”在光合代谢、抗逆反应、基因转录表达、细胞生长、能量代谢等生理活动过程中表现出较大优势。籽粒灌浆期叶片的代谢情况对水稻产量的形成有重要作用,“Ⅱ优航2号”叶片的上述生理以及分子特征或许是其高产的重要原因。本研究不仅丰富了籽粒灌浆的“源、库、流”理论,同时对遗传育种具有非常重要的指导和实践意义,为分子改良水稻组合提供依据。

参考文献

- [1] 林琼,罗维禄.超级稻新组合Ⅱ优航2号产量结构及增产途径分析[J].农艺学报,2007,23(9):244-246
- [2] 曹树青,赵永强,温家立,等.高产小麦旗叶光合作用及与籽粒灌浆进程关系的研究[J].中国农业科学,2000,33(6):19-25
- [3] 翟虎渠,曹树青,张荣锐,等.超高产杂交稻灌浆期光合功能与产量的关系[J].中国科学,2002,45(6):25-32
- [4] Rakwal R, Agrawal G K, Kubo A, et al. Defense/stress responses elicited in rice seedling exposed to the gaseous air pollutant sulfur dioxide[J]. Environmental and Experimental Botany, 2003, 49(3): 223-235
- [5] Schiltz S, Gallardo K, Huart M, et al. Proteome reference maps of vegetative tissues in pea: An investigation of nitrogen mobilization from leaves during seed filling[J]. Plant Physiol, 2004, 135: 2241-2260
- [6] 李兆伟,熊君,齐晓辉,等.水稻灌浆期叶片蛋白质差异表达及其作用机理分析[J].作物学报,2009,35(1):132-139
- [7] Zhang A, Lu Q, Yin Y, et al. Comparative proteomic analysis provides new insight into the regulation of carbon metabolism during leaf senescence of rice grown under field conditions[J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167(16): 1380-1389
- [8] 王经源,陈舒奕,梁义元,等. ISO-DALT双向电泳方法的优化与改进[J].福建农林大学学报,2006,35(2):187-190
- [9] Garrels J I. Quantitative two-dimensional gel electrophoresis of proteins[J]. Methods Enzymol, 1983, 100: 411-423
- [10] Peng X X, Ye X T, Wang S Y. Identification of novel immunogenic proteins of *Shigella flexneri* 2a by proteomic methodologies[J]. Vaccine, 2004, 22: 2750-2756
- [11] Makino A, Mac T, Chira K. Variations in the contents and kinetic properties of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylases among rice species[J]. Plant Cell Physiol, 1987, 28: 199-204
- [12] Suzuki Y, Miyamoto T, Yoshizawa R, et al. Rubisco content and photosynthesis of leaves at different positions in transgenic rice with an overexpression of RBCS[J]. Plant, Cell & Environment, 2009, 32: 417-427
- [13] Carrillo N, Ceccarelli E A. Open questions in ferredoxin-NADP⁺ reductase catalytic mechanism[J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270: 1900-1915
- [14] 何水林,郑金贵,王晓峰,等.植物次生代谢:功能、调控及其基因工程[J].应用与环境生物学报,2002,8(5):558-563
- [15] 陈晓梅,郭顺星.植物抗病性物质的研究进展[J].植物学通报,1999,16(6):658-664
- [16] 安凤秋,吴云锋,孙秀芹,等.小麦蓝矮病植原体延伸因子(EF-Tu)tuf基因序列的同源性分析[J].中国农业科学,2006,39(1):74-80
- [17] BShailendra K B, Thomas E E, Jeffrey E H, et al. Heat-stress induced synthesis of chloroplast protein synthesis elongation factor (EF-Tu) in a heat-tolerant maize line[J]. Planta, 2001, 212: 359-366
- [18] Damodara R, Ivana M, Satoru K, et al. Chaperone activity of recombinant maize chloroplast protein synthesis elongation factor, EF-Tu Eur[J]. Biochem, 2004, 271: 3684-3692
- [19] 王丽华,谭学林,张峰,等.水稻灌浆期种子贮藏物相关基因表达谱的微阵列分析[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2003,29(4):392-398
- [20] 黄聪聪.植物微管结合蛋白的研究进展[J].植物学通报,2008,25(3):354-362
- [21] Fida M A, Setsuko K. A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath[J]. Proteomics, 2004, 4: 2072-2081
- [22] Csaba C, Norman F W, Bob B B, et al. A special fructose bisphosphate functions as a cytoplasmic regulatory metabolite in green leaves[J]. Proc Natl Acad Sci, 1982, 79: 4322-4326
- [23] 黄琪玉,吴志强.稻穗ATP酶活性与籽粒灌浆的关系[J].福建农学院学报,1989,18(4):487-493
- [24] 蒋德安,温晓燕,洪健,等.低钾营养条件下水稻源叶碳同化物输出的障碍[J].植物生理学报,1994,20(2):137-144
- [25] 韦存虚,兰盛银,徐珍秀.水稻胚乳发育中ATP酶的超微细胞化学定位和功能分析[J].中国农业科学,2003,36(3):259-262