

大豆 SMV 病源相关蛋白的诱导与抗病性获得

刘丽君

陈怡

高明杰

崔喜恒

(黑龙江省农业科学院大豆所)

(木兰县建国乡)

提 要

本研究利用 SDS-PAGE 技术,研究了不同抗病性品种(系)接种 SMV 1 号株系后,病源相关蛋白的表达变化。结果表明:大豆接种 SMV 后,感病品种蛋白亚基增加数目较多,同时也伴随着一些正常表达的蛋白亚基的降解。而高抗 SMV 1 号病毒的大豆株系,接种 SMV 病毒后,蛋白亚基增加 1—2 条,其正常工作的蛋白组分均没有消失,蛋白亚基消失与表达的变化与品种的抗病性获得相一致。这一结果,目前尚未见报道,深入研究病源相关蛋白的性质、表达和消失,对研究大豆感染 SMV 和抗病性的分子鉴定具有一定的意义。

关键词 SMV;诱导;病源相关蛋白;蛋白亚基

大豆 SMV 病源相关蛋白(Soybean SMV pathogenesis-related proteins)是大豆被 SMV 病毒诱导后新产生(或累积)的一种或多种蛋白。目前,有关植物病源相关蛋白的存在,诱导的研究已在烟草、黄瓜、番茄中加以证实^[1,2,3,4]。研究表明:不同植物中出现的病源相关蛋白的数目不同,它们很可能是植物对病源感染或相关诱导的基本反应之一,并参与组织抗性,而有关大豆方面的研究至今尚未报导。大豆感染 SMV 后减产非常严重,深入研究大豆对 SMV 的感病机理,不仅在理论上,而且在生产上有非常重要的意义。本实验旨在通过对感染和没感染 SMV 大豆病源相关蛋白的分析,从生理生化水平上探讨大

* 自然科学基金资助项目。

本文于 1993 年 12 月 16 日收到。

This paper was received on Dec. 16, 1993.

豆抗病和感病的内在机理。

材料和方法

本实验供试的大豆品种:抗病品种:哈 88-7704、哈 88-2501、;感病品种:合丰 25, 黑农 34;^[6]哈 88-2499(中抗),上述品种种于防虫网室。于真叶期接种 SMV1 号株系,接种后的两周进行采样测定。

样品提取:取大豆叶片 1g,洗净吸干水份,剪碎,加 5ml 样品提取液(50mM Tris, pH6.8, 8.2%(W/V)SDS, 5%(v/v)巯基乙醇, 10%(V/V)甘油、0.1%溴酚蓝),研磨,4℃ 放置 1 小时,8 层纱布过滤,10,000xg 离心 10 分钟,在 70℃ 的恒温水浴中保温 10 分钟。

电泳:采用不连续双垂直板电泳,用 SDS(5M 尿素)-PAG 电泳技术,分离胶为含 0.1%SDS 的 10%的聚丙烯酰胺凝胶。浓缩胶浓度为 4.5%,电极缓冲液:0.25M Tris-HCL, 0.1%SDS、0.025Mβ-巯基乙醇、0.1%BPB、0.5M 尿素。每孔点样 60μl。上槽为负极、下槽为正极,18mA 稳流。到 BPB 浓缩胶层出现前定电压 100V,溴酚兰为指示剂。

染色与脱色:0.1%考马斯亮兰 R₂₅₀, 40%甲醇、10%醋酸,从泳动槽中取出凝胶,用染色液染色 30 分钟,再用 10%醋酸脱色。

标准分子量计算:

标准蛋白的分子量分别为:94KD、67KD、43KD、30KD、17.5KD。

标准蛋白的预处理:取 6ml 标准蛋白原液放到 Ependorf 管内,加 120μl 样品提取液,70℃ 水浴加热 10 分钟,电泳点样量为 60μl。分子量的计算:按 Weber. K.^[5]所采用的公式: $\log M \cdot W = \log K - b R_m$ 计算分子量。式中:logK 为截距,b 为斜率,R_m 为电泳带的迁移率。

结果与讨论

大豆不同品种叶肉细胞内的蛋白组分经 SDS-PAG 技术分析后可显示 22 条谱带,它们的分子量在 18.8KD-93.0KD 之间(图 1)。人工接种 SMV1 号株系后,叶片内蛋白亚基分析表明:感病品种比抗病品种蛋白组分增加数目较多,同时也伴随着一些正常表达的蛋白亚基的降解。如合丰 25,幼苗接种 SMV1 号后,叶肉细胞内蛋白亚基增加了三个,其分子量分别为 93KD、58KD、47KD,但也有一条正常表达和工作的蛋白组分一分子量为 72KD,在接种条件下,没有表达。而高抗 SMV 病毒的大豆株系,接种 SMV1 号病毒后,蛋白亚基增加 1-2 条,如哈 88-7704,增加了一条分子量为 76KD 的谱带;哈 88-2501 增加了二条分子量为 54.5KD、44.5KD 的谱带。所参试的抗病品种,其正常工作的蛋白组分均没有消失(图 2)。由于叶肉细胞内蛋白亚基的变化,反应了品种的感病程度,所以这些与病源有相关联系的蛋白亚基的表达与消失,与大豆抗 SMV 病毒有着密切的关系。抗病品种在病毒浸染条件下,能够产生许多新的蛋白质,用于增强对病毒的抗性,同时又保持原有基因表达的不改变,使植株在 SMV 病毒侵染下能够正常生长。感病品种,虽然产生了许多新蛋白,用于克服病源菌的侵染,但由于 SMV 病毒的作用,使其正常工作的蛋白

亚基的转录,表达等过程受到影响,而使其合成减少,或者不能完全表达,因而表现出症状。

表 1 大豆叶片 SMV 病源相关蛋白各多肽蛋白的分子量

Table 1 Molecular weight of each pobtypeptide protein of SMV pathogenesis—related proteins in leaf of soybean		
编号 No.	相对迁移率 Relative migration rate	分子量 Moleculorr weight
1	0.18	93.000
2	0.29	81.500
3	0.31	79.500
4	0.34	76.000
5	0.38	72.000
6	0.42	67.500
7	0.44	65.000
8	0.46	63.000
9	0.48	61.000
10	0.51	58.000
11	0.54	54.500
12	0.61	47.000
13	0.63	44.500
14	0.65	42.500
15	0.69	38.000
16	0.70	37.000
17	0.73	34.000
18	0.78	28.000
19	0.79	27.000
20	0.81	25.000
21	0.85	21.000
22	0.87	18.800

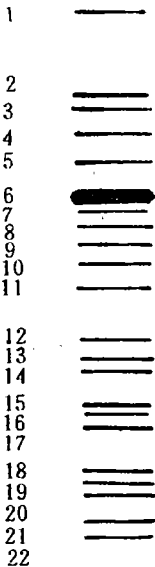


图 1 大豆叶片 SMV 病源相关蛋白电泳图
Fig. 1 Electrophoretic atlas of SMV pathogenesis—related proteins in left of soybean

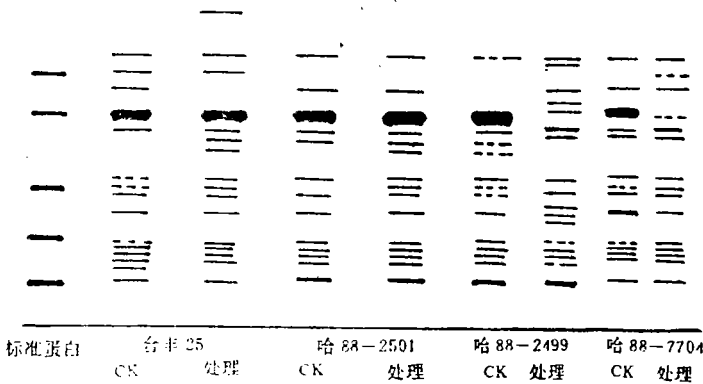


图 2 SMV 诱导大豆病源相关蛋白表达的示意图
Fig. 2 Changes of phathogenesis—related soybean proteins after inoculating SMV

目前,人们对 SMV 侵染后的抗性问题的了解甚少。然而 SMV 一直成为危害大豆生产的主要病源,南方尤甚。因此,急待解决这些问题,SMV 对大豆诱导后的病源相关蛋白的表达与消失的进一步研究,可能有助于这些问题的解决,对研究大豆感染 SMV 的机理和抗病性的分子鉴定具有一定的意义。

参考文献

- [1] Van Loon L. C. 1985. *Plant Mol. Biol* 4;111
- [2] Nasser W. et al. 1988 *Plant Mol. Biol* 11;529
- [3] Molano J. et al. 1979. *J. Biol Chem* 254;4901
- [4] Roberts Wk. 1986. *Selitrechnikoff cp. Biochim Biophys Acta.* 880;161
- [5] Weber. K. et al. 1971. *J. Biol. Chem.* 246;4505
- [6] 陈怡等 1993,病毒病抗性不同的大豆品种及其 F₁ 代过氧化物酶、酯酶同工酶分析《大豆科学》12(1)30—36

INDNETION OF SOYBEAN SMV PATHOGENESIS—RELATED PROTEIN AND ACQUISTION OF FOLERANCE

Liu Lijun^{*} Chen Yi Gao Minjie

(The Soybean Reseatrch Institute, Heilong jiang Academy of Agricultural Science)

Chui Xiheng

(Mulan County, Jianguo)

Abstract

The changes of pathogenesis—related protein (PR—Protein) of different soybean cultivars (Lines) with different degree of resistame by inoculating with mosaic virus (SMV) trains were studied with SDS—PAG. After inocnlating with "SMV", The Protein subunit of susceptible varieties of soybean were more than that of resistant one, mean while some normal protein subunits were degraded. One or two protein subunits of the soybean lines resistant to SMV No. 1 increased in comparison with that of ck, but normal express protein subunits didn't reduce.

The change of degradation and appearance of the protein subunits was in accordance with the disease resistance of the cultivars. So far, there is on report related about this result. A thorough research on the characteristics appearance, and degradation of the PR—protein is very improtant for the undstanding of molecular festing technique for susceptibility and resistance of soybean to SMV.

Key words SMV;Inocnlating; Pathogenesis—related protein;Protein subunit