

开花前后的光周期处理对大豆叶片 蛋白质组分的影响*

韩天富 王金陵

(东北农业大学农学系, 哈尔滨, 150030)

谭克辉 徐继

(中国科学院植物研究所, 北京, 100044)

摘 要

采用 SDS——聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 分析不同时期光周期处理后大豆品种丹豆 5 号叶片蛋白质组分的变化。结果表明不论开花前或开花后, 不同光周期处理均会使大豆叶片蛋白质组分发生变化。作者认为, 大豆开花前后的光周期反应都与某些特定基因的表达有关。

关键词 大豆; 叶片; SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳; 蛋白质组分; 开花; 成熟

前 言

光周期是诱导大豆开花的主要环境因子(Garner 和 Allard, 1920), 并对初花(R_1)至成熟阶段的发育进程有重要的调控作用(韩天富等, 1994)。近年来, 在小麦等作物的研究中发现, 春化处理诱导开花的机制与特定基因的表达有关(谭克辉, 1992), 并发现光周期可在转录和翻译水平上对水稻育性的表达进行调节(曹以诚等, 1987; 王台等, 1990)。在光周期调控大豆开花结实的分子机制方面, 作者尚未见到任何报道。本文从分析叶片蛋白质组分入手, 研究光周期在开花前后对大豆发育的调控是否涉及基因的表达, 比较光周期在大

* 本文于 1994 年 6 月 30 日收到。

This paper was received on June 30, 1994.

豆开花前后对大豆发育的影响,探索光周期在大豆花前及花后作用机理的异同。

材料和方法

本试验于 1993 年在北京中国科学院植物研究所进行。

一、试验材料

供试品种丹豆 5 号,原产辽宁凤城($40^{\circ}48'N$),属当地中晚熟品种,有限结荚习性,光周期反应明显。

二、光照处理方法

1. 初花(R_1)前大豆植株的光周期处理

出苗后置北京自然光照下,待第 1 三出复叶展开起进行两种光照处理:a:短日照(12h);b:长日照(15h)。短日处理的暗期在人工培养箱中,光期在室外,同期长日处理亦移至室外接受自然光照。长日处理光期的延长部分(3h)通过人工培养箱(日本医化器械制作所产 LH-200-RDCT 型)的日光灯补充。培养箱恒温 $23^{\circ}C$ 。

2. 初花(R_1)后大豆植株的光周期处理

将在北京自然光照下开花的植株自初花(R_1)起分置两种光照条件下:a:短日照(10h);b:长日照(24h)。处理方法同开花前。两组培养箱均恒温 $25^{\circ}C$ 。

3. 发育时期的记载

按 Fehr 等(1977)的大豆发育时期分期标准进行。

4. 叶片蛋白质组分的分析

(1)取样

自处理开始时起,每隔一定日数取样。供分析的叶片为植株自顶及基第 2 完全展开的三出复叶。叶片剪下后迅速称重并速冻于液氮中保存备用。

(2)叶片全蛋白样品的制备

取预先称重并保存于液氮的大豆叶片 4g,在液氮中研磨(加 0.4g PVP-AT)成粉,向粉末中加 36ml 预冷的含 10%TCA(三氯乙酸)的丙酮, $-20^{\circ}C$ 下放置 45min 后在低温($4^{\circ}C$)下离心 15min(约 $20,000\times g$),取沉淀。再加 36ml 含 0.07% β -巯基乙醇的冷丙酮在 $-20^{\circ}C$ 下静置 1h,按上述方法离心。取沉淀后再加 36ml 含 β -巯基乙醇的冷丙酮浸提、离心 1 次。沉淀在常温下抽气干燥,干粉密闭保存于 $-20^{\circ}C$ 冰箱中备用。

(3)蛋白样品的电泳分析

a. 样品的制备

准确称取丙酮浸提后的干粉 35mg,加样品缓冲液[0.0625M Tris-HCl (pH 6.8), 2%SDS, 5% β -巯基乙醇, 10%甘油, 0.002%溴酚兰]0.35ml,混匀,加少量(40 μ l 左右) 28.57% Tris 调 pH 至样品呈淡蓝色(碱性)。沸水浴 5min 使蛋白质变性。待样品恢复到室温后离心 5min($12,000\times g$)。离心后将上清液保存于 $-20^{\circ}C$ 冰箱中。上样前测定上清液的蛋白质含量,每样孔上样量为 65 μ g 蛋白。

b. 电泳

采用 SDS——聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS—PAGE),垂直板不连续系统。分离胶浓度为 12%,缓冲液为 1.5M Tris—HCl 系统(pH8.8);浓缩胶浓度为 3.9%,缓冲液为 0.5M Tris—HCl 系统(pH6.8),电极液为 Tris 甘氨酸系统(pH8.3)。采用 Bio—Rad 的标准分子量蛋白,溴酚兰为前沿指示剂。考马斯亮蓝 R250 为凝胶染色剂,凝胶染色后在岛津 CS—910 型薄层光密度扫描仪上进行扫描,波长为 595nm。

结果与分析

一、不同时期光周期处理对大豆发育进程的影响

试验结果(表 1)表明,开花前后的光周期均明显改变供试大豆品种的发育进程。短日处理使初花期大大提前,开花后的发育加快。开花后置 24h 长光照下,已有花萼败育脱落,表现出强烈的长日抑制作用,而短日处理在初花(R_1)10 天后即在到结荚初期(R_3)。

表 1 不同时期光周期处理对大豆品种丹豆 5 号发育进程的影响(北京,1993)

Table 1 The effects of photoperiodic treatments at different stages

on the development of soybean cv. Dandou 5

日数(days)

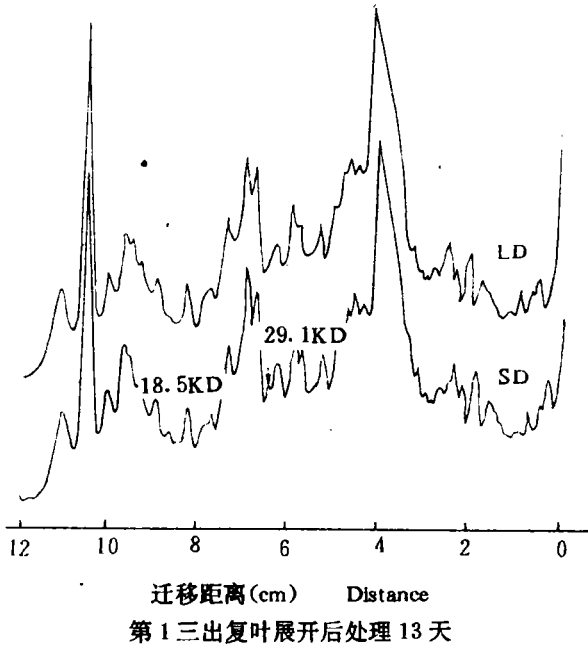
光照处理时期 Stage of photoperiodic treatments	出苗期 Date of emergence (M/D)	出苗至初花日数 Days from emergence to R_1		初花至结荚初期日数 (R_1-R_3)			
		短日照 (SD)		长日照 (LD)		短日照 (SD)	
		(12h)	(15h)	(10h)	(24h)		
第 1 三出复叶 展开至初花(R_1) From the unrolling of 1st trif leaf to R_1	5 月 25 日	36.0	47.3	—	—		
初花以后 After R_1	5 月 25 日	39.3	10.0	花朵败育脱落 Flowers aborted			

二、光周期处理对叶片蛋白质组分的影响

SDS——聚丙烯酰胺凝胶电泳分析的结果表明,无论开花前或开花后,不同光照处理均会引起大豆叶片蛋白质组分的变化。第 1 三出复叶展开后进行 7 天的光周期处理,两处理蛋白质组分有明显不同(未列出),至 13 天时,差异更大,短日处理至少比长日处理多出两种(组)蛋白质,分子量分别为 18.5KD 和 29.1KD(图 1)。处理开始后第 19 天也发现处理间的差异(未列出)。

初花(R_1)后对大豆进行不同光周期处理,叶片蛋白质组分也发生明显变化。处理开始后第 4 天,两处理至少在 3 条谱带上有差异(图 2a),长日处理出现两种分子量分别约为 17.2KD 和 79.1KD 的蛋白质,短日处理则出现分子量约为 39.7KD 的一种蛋白质。处理开始后 12 天时,两处理差异仍很大,短日处理比长日处理多出分子量约为 22.7、33.3 和 41.7KD 的三种蛋白质(图 2b)。

可以看出,开花前后的光周期处理均会诱导大豆叶片蛋白质组分的变化。至于这些由光周期诱导产生的谱带哪些与发育有直接关系尚待研究。



Treated for 13 days after the unrolling of 1st trifoliate leaf

图1 光周期对大豆叶片蛋白质电泳(SDS-PAGE)图谱的影响(一)

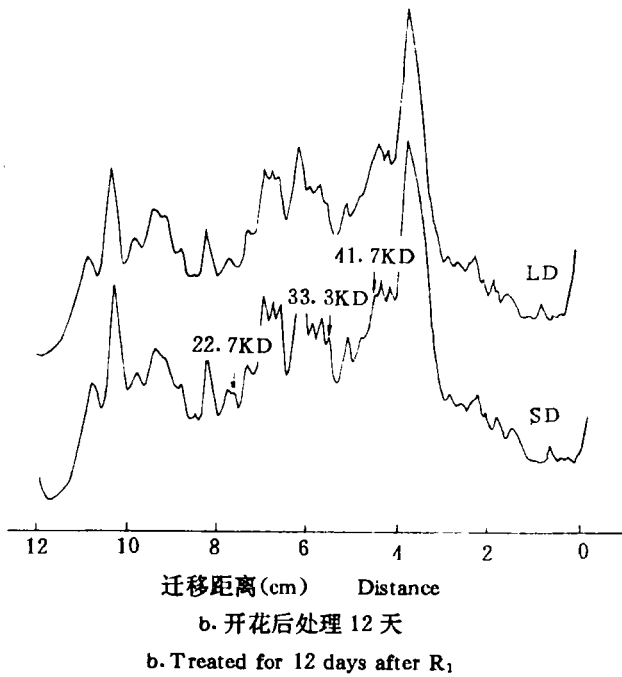
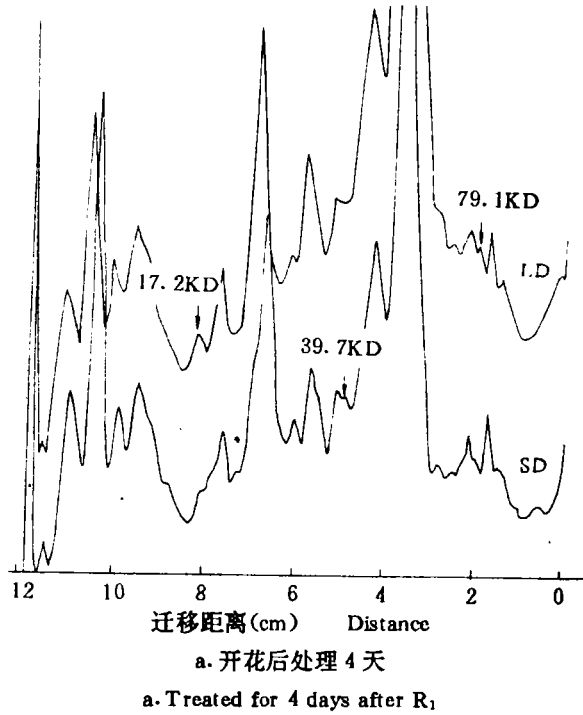
Fig. 1 The effects of photoperiod on SDS-PAGE patterns of protein in soybean leaves (1)

讨 论

本文的试验结果进一步证明,光周期不仅影响大豆的花芽分化和开花,而且调控开花后的发育进程(韩天富等,1994)。短光照可加速大豆的发育进程,而长光照则有相反的作用。开花后的长日照甚至可导致已有花荚的败育和脱落。可以看出,光周期对大豆发育进程的调控是短日促进作用和长日抑制作用共同作用的结果。

韩天富等(1994)发现,光周期在大豆开花前后均可影响叶片过氧化物酶活力及同工酶谱,这两项指标的变化在开花前后有相同的趋势。本试验结果表明,光周期也可在开花前后引起大豆叶片蛋白质组分发生变化。虽然目前尚不能确定何种蛋白与发育有直接关系,但这一结果说明,光周期调控大豆发育进程的作用与某些蛋白质的合成有关,涉及特异基因的时空表达。从光周期在开花前后的作用都与基因表达有关这一点来说,大豆开花前后的光周期反应有一定的相似性。

目前,有关大豆光周期反应分子机制的研究尚处于起步阶段。今后应通过深入的研究工作确定控制发育的特异蛋白和RNA,明确相关基因的结构与功能,进而克隆和转移这些基因,以便阐明大豆光周期反应的机制和能动地改良大豆品种的光周期反应特性。



图·2 光周期对大豆叶片蛋白质电泳(SDS—PAGE)图谱的影响(二)

Fig. 2 The effects of photoperiod on SDS—PAGE patterns of protein in soybean leaves(Ⅱ)

参考文献

- [1] 王台、肖翊华、刘文芳,1990,光周期诱导 HPGMR 叶蛋白质变化的研究,华中农业大学学报. 9(4):369—374
- [2] 曹以诚、付彬英、王明全、朱英国,1987,光敏感核不育水稻蛋白质双向电泳的初步研究,武汉大学学报,湖北光周期敏感核不育水稻专利,73—80
- [3] 韩天富,1994,不同生态类型大豆品种开花后光周期反应的研究,东北农业大学博士论文(导师:王金陵),东北农业大学图书馆
- [4] 谭克辉,1992,春化过程中特异蛋白质的合成,植物学集刊,6,13—16
- [5] Fehr W. R. and C. E. Caviness, 1977, Stages of soybean development. Agric and Home Economics Exp. Stn. Spec. Rep. 80, Iowa State Univ., Ames, IA, USA.
- [6] Garner W. W. and H. A. Allard, 1920, Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. J. Agric. Res., 18(2):553—606

THE EFFECTS OF PRE—AND POST—FLOWERING PHOTOPERIODIC TREATMENTS ON THE PROTEIN COMPONENTS OF SOYBEAN LEAVES

Han Tianfu Wang Jinling

(Dept. of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin, 150030)

Tan Kehui Xu Ji

(Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100044)

Abstract

SDS—PAGE was used to study the changes of protein components in the leaves of soybean CV. Dandou 5 after the photoperiodic treatments at different developmental stages. The results showed that the protein components in soybean leaves were changed by the photoperiodic treatments, no matter the treatments were conducted before or after the flowering (R_1). It was proposed that both pre— and post—flowering photoperiodic responses in soybeans were related to the expression of certain genes.

Key words Soybean; Leaf; SDS—PAGE; Protein component; Flowering; Maturity