

大豆热激蛋白与内源激素变化的研究^{*}

路子显 曲建波^{**} 傅鸿仪 邓向东
朱保葛 陈建南

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

摘 要

对 6 个华北生态型大豆品种热激蛋白与内源激素变化研究表明:在开花结荚期,高温促进大豆 HSP₂₋₇₃的合成,内源 IAA 和 ABA 也随之发生变化。不同大豆品种 HSP₂₋₇₃ IAA 和 ABA 的变化有显著差异,抗倒伏,抗脱落的品种表现较强的 HSP₂₋₇₃合成能力。

关键词 大豆;热激蛋白;内源激素

大豆热激蛋白 (Heat Shock Protein, HSP)的研究始于 1982 年^[1],经高温处理 (43-45℃)后,大豆胚中出现某些热激 mRNA,在种子中出现 15-16KDa, 21KDa, 75KDa 热激蛋白^[2]。HSP 是在生物细胞受热或其它理化因素 (如乙醇、病毒感染、氨基酸类似物、DNA 损伤、缺氧、重金属离子等)应激后发生热激反应启动一些基因合成的一类蛋白质^[3]。HSP 通常与具有不同功能的多种蛋白质细胞中形成天然复合物,并通过其形成和解离而参与有关蛋白新生肽的拆叠、亚基组装、细胞内运输以及蛋白质降解等过程,以调节靶蛋白的活性和功能,并应付外界环境的胁迫影响^[4]。

吲哚乙酸 (IAA)和脱落酸 (ABA)是植物的重要内源激素。IAA 能调节植物组织器官的生长、分化、物质运输、诱导发根和结实等^[5]。ABA 能够调节气孔开闭、抑制种子休眠、控制胚胎种子发育与成熟,还有抗逆作用,如对脱水、干旱、盐胁迫、低温、病虫害和机械创伤等环境因子的应答^[6]。

虽然人们对大豆的 HSP IAA 和 ABA 的研究已有不少报道,但大多数都是单独研究某一个因素的变化。本文试图通过研究三者之间的动态变化,并初步探索它们对大豆抗逆性状的影响,为进一步探明大豆抗高温、抗花荚脱落的分子机理打下基础。

* “八五”国家科技攻关加强项目

** 北京市福瑞生物工程公司。

收稿日期 1998-01-19 This paper was received on Jan. 19, 1998.

材料与方法

1 植物材料

选用华北生态型 6 个大豆品种,分别是早熟 17号 (Prematurity No. 17, PM 17) 诱处 4号 (Mutagenic Treatment No. 4, M T4), 诱变 31号 (Mutagenesis No. 31, M U31), 耐阴黑豆 (Dark-resistant Black Soybean, DBS), 科丰 6号和 34号 (Scientific Bumper Harvest No. 6& No. 34, SBH6& SBH34), 各品种的基本特点见表 1

表 1 不同品种的特征特性^[7 8 9]

Table 1 Characteristic of various varieties

品种 Varieties	基本特征特性 General characteristic
早熟 17号 (PM17)	株高 70cm,平均分枝 3- 4个,抗倒伏,亚有限结荚,光温反应不敏感
诱处 4号 (MT4)	株高 100cm,平均分枝 2- 6个,高光效,亚有限结荚
诱变 31号 (MU31)	株高 70- 80cm,平均分枝 3个,抗倒伏,无限结荚,光温反应不敏感
耐阴黑豆 (DBS)	株高 80cm,平均分枝 4个,抗逆境,耐阴,抗炸荚
科丰 6号 (SBH6)	株高 100cm,平均分枝 1- 3个,无限结荚,抗病性强,光温反应不敏感
科丰 34号 (SBH34)	株高 85cm,平均分枝 2个,抗倒伏,无限或亚有限结荚

2 高温处理

大豆开花结荚阶段,高温处理前搭塑料大棚,塑料拱棚体积为 $2 \times 3 \times 3\text{m}^3$,白天上午 10时开始罩住试验大豆品种,棚内逐渐升温,处理 4h,最高温度达 45°C 。为使试验大豆接近自然栽培大豆,试验在田间生长条件下进行,分不同时期盖棚加温,棚外温度一般 $30-33^{\circ}\text{C}$,棚内温度一般 $43-45^{\circ}\text{C}$ 。

3 样品采集

在高温胁迫后,每品种摘取 3株大豆主茎第 3片展开叶,称其三出复叶前端小叶鲜重 3g,立即放入液 N_2 冷冻,然后转入 -70°C 冰箱保存备用。

4 样品处理

在 3g 样品中加 3ml 提取液 [80% 甲醇,内含 1mM/L BHT(二叔丁基对甲苯酚)] 研磨,再加 3ml 提取液磨细,分 3次每次 3ml 提取液冲洗样品于离心管中,放入 4°C 冰箱 4h,离心 15min (4000rpm),收集上清液,再加 3ml 提取液于沉淀中,振荡 15min ,放入 4°C 冰箱 1h,离心 15min (4000rpm),收集上清液并与第 1次上清液合并,放入 4°C 冰箱保存。

将 5ml 上清液转入 5ml 塑料离心管中,用 N_2 吹干,除去提取液中的甲醇,用样品稀释液 (100ml PBS <磷酸缓冲液> + 0.1 ml Tween20, 0.1g 白明胶) 定容, 10000rpm 冷冻离心 10min 除去沉淀,用于 ELISA(酶联免疫吸附分析法) 测定

5 样品测定

本试验采用 Maldiney R 等建立的生长素测定方法^[10],测定大豆顶部第三展开叶内源游离态 IAA 含量,根据标准曲线计算 IAA 含量 (ng /g. fw)

根据 Walker-Simmons M (1987) 采用的 ABA ELISA,用间接法测定 ABA 含量^[11]。

根据 Logit 曲线计算 ABA 的含量 (ng/g. fw)

抗大豆热激蛋白 (HSP₇₂₋₇₃) 单克隆抗体的碘标记采用 Hunter & Greenwood 法^[12], 先制备大豆叶片可溶性蛋白提取液, 再用 Sephadex G50 柱分离标记物, 0.01M 磷酸缓冲液洗脱, 收集蛋白峰, -20℃ 贮存, 最后标记测定 HSP₇₂₋₇₃ 含量。试验步骤如下:

表 2 试验操作步骤^[13 14]

Table 2 Steps of experiment operation

反应物	T管	O管	样品管
聚乙烯板条	1孔	1孔	1孔
HSP ₇₂₋₇₃ 样品	100 μ L
缓冲液 (pH8.0 PBS)	200 μ L	100 μ L
4℃ 16小时后弃反应液			蒸馏水洗 4次
1% BAS / PBS pH7.4	250 μ L	250 μ L
室温 1小时后弃反应液			蒸馏水洗 4次
¹²⁵ I- HSP ₇₂₋₇₃ 抗体	200 μ L	200 μ L	200 μ L
	37℃	1. 5小时温浴	

弃反应液, 用蒸馏水洗 4次, 依次测定各管 CPM 数

¹²⁵I- HSP₇₂₋₇₃ 抗体蛋白质峰与游离峰分离良好, 收集 ¹²⁵I- HSP₇₂₋₇₃ 抗体蛋白质峰分装冻存, -20℃ 下保存至少可用 5周。 ¹²⁵I 利用率为 73.4%, 标记物比活度 0.675KBq/ μ g (25 μ ci/ μ g), 放化强度大于 90%, 样品之间的比较用样品的 CPM 与总 T 的比值进行比较, 值越高, 样品中 HSP₇₂₋₇₃ 含量越高

结果与分析

1 高温诱导初花期大豆叶片 HSP₇₂₋₇₃ 含量变化

在大豆初花期, 第一天盖棚 4小时, 温度逐渐上升至 43-45℃, 6个大豆品种叶片 HSP₇₂₋₇₃ 测定结果表明: 其 HSP₇₂₋₇₃ 含量均比对照 (30-33℃) 提高, 其中诱处 4号, 科丰 34号, 耐阴黑豆和科丰 6号提高幅度较大, 达 50% 以上 (表 3)

表 3 高温诱导大豆叶片 HSP₇₂₋₇₃ 合成

Table 3 High temperature induced HSP₇₂₋₇₃ synthesis of soybean leaves

品种 Varieties	高温 (43-45℃) High temperature		对照 (30-33℃) Control		总 T Total T (CPM)
	CPM	S/T	CPM	S/T	
早熟 17号 (PM17)	343	0.0020	312	0.0018	174648
诱处 4号 (MT4)	413	0.0024	244	0.0013	174648
诱变 31号 (MU31)	275	0.0016	261	0.0015	174648
科丰 34号 (SBH34)	381	0.0022	215	0.0012	174648
耐阴黑豆 (DBS)	333	0.0019	206	0.0012	174648
科丰 6号 (SBH6)	427	0.0024	246	0.0014	174648

2 高温诱导初花期大豆内源 IAA 含量变化

在高温 (43-45℃) 处理之后, 处理第一天各品种叶片内源 IAA 含量比对照 (30-

33℃)显著增加,早熟 17号,诱处 4号,诱变 31号,科丰 34号,耐阴黑豆和科丰 6号的内源 IAA 含量比对照分别增加 2.6 3.4 3.7 4.7 9.9和 10.6倍(图 1)。

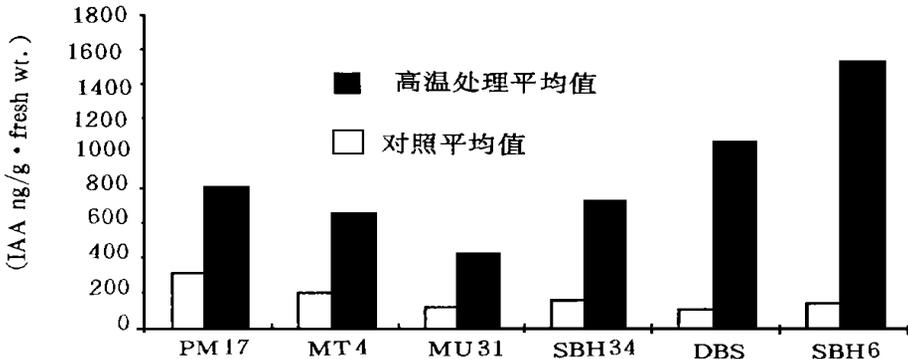


图 1 初花期大豆叶片内源 IAA 含量在高温处理第一天的变化, SE < 10% 平均值

Fig. 1 At the early blooming, IAA levels in soybean leaves varied after the first day heat stress. SE was less than 10% of the mean for all points

在连续 2天处理 (43- 45℃, 4h /d)后,内源 IAA明显降低,大多数情况下,它们也比对照更低。除科丰 34号和耐阴黑豆的 IAA 水平高于对照外,其余 4个品种 IAA 含量均低于对照(图 2)。

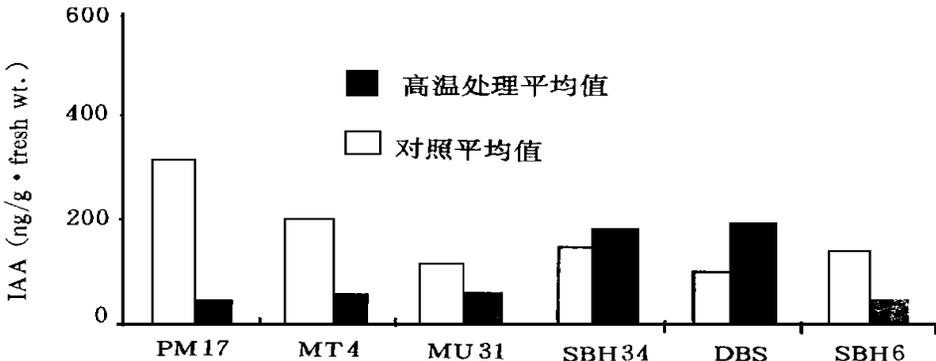


图 2 初花期大豆叶片内源 IAA 含量在连续高温处理二天的变化, SE < 10% 平均值

Fig. 2 At the early blooming, IAA levels in soybean leaves varied after two consecutive days heat stress. SE was less than 10% of the mean for all points

3 高温诱导初花期大豆的内源 ABA 含量变化

初花期大豆在高温处理后,第一天盖棚 4小时,温度上升至 43- 45℃,各品种叶片内源 ABA 含量分别比对照增加 2.4 5.3 1.4 2.4 3.1和 7.4倍(图 3)

在连续二天高温处理后内源 ABA 含量一般比第一天降低,而且早熟 17号,科丰 34号和耐阴黑豆比对照更低(图 4)。虽然科丰 34号和耐阴黑豆在高温处理第二天后 ABA 含量比对照低,但它们的 IAA 含量却比对照高(图 2)。这与它们的品种特性有关,较低的 ABA 含量和较高的 IAA 含量有利于抑制花荚脱落。

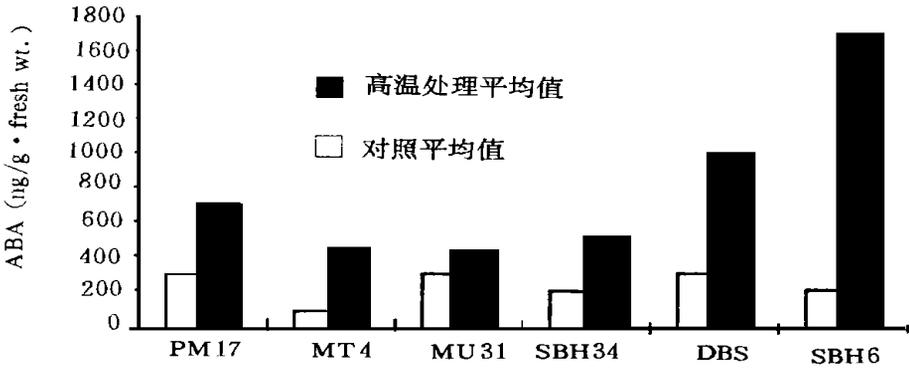


图 3 初花期大豆叶片内源 ABA 含量在高温处理第一天的变化, SE < 10% 平均值

Fig. 3 At the early blooming, ABA levels in soybean leaves varied

after the first day heat stress. SE was less than 10% of the mean for all points

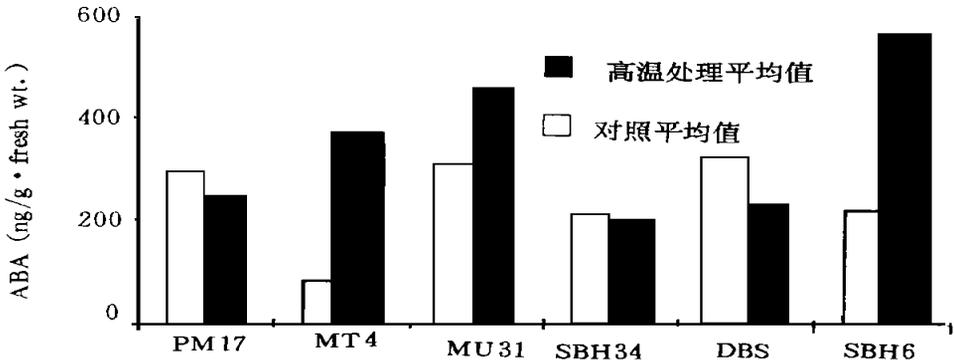


图 4 初花期大豆叶片内源 ABA 含量在连续 2 天高温处理后的变化, SE < 10% 平均值

Fig. 4. At the early blooming, ABA levels in soybean leaves varied after two

consecutive days heat stress. SE was less than 10% of the mean for all points

4 高温诱导结荚期大豆叶片 HSP₇₂₋₇₃含量的变化

在结荚期,第一天盖棚 4 小时,温度上升至 45°C,测定 5 个大豆品种叶片的 HSP₇₂₋₇₃,结果表明,诱处 4 号,耐阴黑豆,科丰 6 号叶片中 HSP₇₂₋₇₃明显高于对照(表 4)。

表 4 高温诱导大豆叶片 HSP₇₂₋₇₃合成

Table 4 High temperature induced HSP₇₂₋₇₃ synthesis of soybean leaves

品种 Varieties	高温 (43- 45°C) High temperature		对照 (30- 33°C) Control		总 T Total T (CPM)
	CPM	S/T	CPM	S/T	
	早熟 17号 (PM 17)	727. 0	0. 0042		
诱处 4号 (MT4)	1489. 0	0. 0085	1007. 0	0. 0058	174648
科丰 34号 (SBH34)	811. 0	0. 0046			174648
耐阴黑豆 (DBS)	1008. 0	0. 0058	871. 0	0. 0050	174648
科丰 6号 (SBH6)	1570. 0	0. 0090	860. 0	0. 0050	174648

5 高温诱导结荚期大豆叶片内源 IAA 的变化

在结荚期,高温 (45°C , 4h)处理后,大豆叶片内源 IAA 水平比对照增加 2.4–12.9 倍,早熟 17号 > 诱处 4号 > 耐阴黑豆 > 科丰 6号 > 科丰 34号 (图 5).

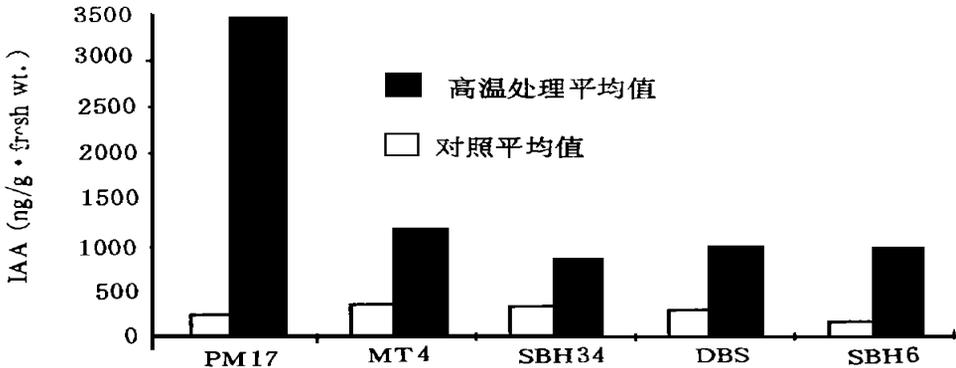


图 5 结荚期大豆叶片内源 IAA 含量在高温处理后的变化, SE < 10% 平均值

Fig. 5 At the pod stage, IAA levels in soybean levels varied after heat stress. SE was less than 10% of the mean for all points

6 高温诱导结荚期大豆叶片内源 ABA 的变化

在结荚期,高温 (45°C , 4h)处理后,大豆叶片内源 ABA 水平比对照增加 1.8–25.5 倍,早熟 17号 > 诱处 4号 > 耐阴黑豆 > 科丰 6号 > 科丰 34号 (图 6).

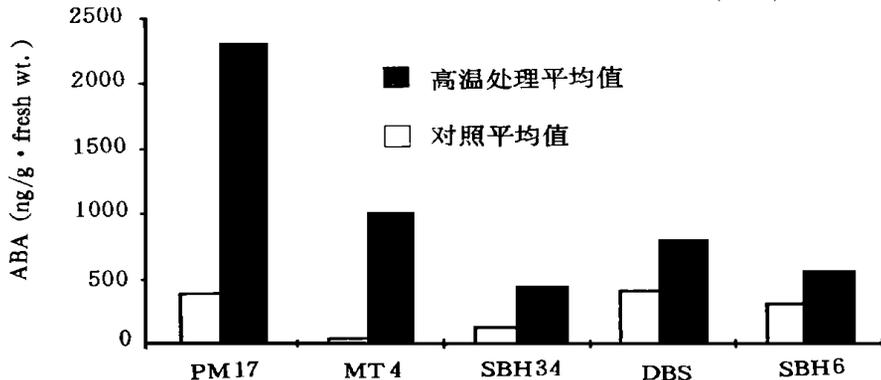


图 6 结荚期大豆叶片内源 ABA 含量在高温处理后的变化, SE < 10% 平均值

Fig. 6 At the pod stage, ABA levels in soybean levels varied after heat stress. SE was less than 10% of the mean for all points

讨 论

1 对大豆 HSP 的研究

本研究表明,在 6 个华北夏大豆中,在初花期高温处理 4 小时,温度从 $30-33^{\circ}\text{C}$ 逐渐上升至 $43-45^{\circ}\text{C}$,它们的 HSP_{72-73} 含量均有增加。其中超高产大豆诱处 4 号、优质抗倒伏大豆科丰 34 号、抗炸荚大豆耐阴黑豆和高抗大豆花叶病毒病 (SMV) 以及抗大豆灰斑病的大豆科丰 6 号的 HSP_{72-73} 增幅较大,比各自对照提高 50% 以上。这一结果表明,

HSP₇₂₋₇₃的大量积累与大豆抗逆性有明显的正相关。在结荚期,对5个华北夏大豆高温处理4小时,最高温度为45℃,诱处4号,耐阴黑豆,科丰6号均表现出HSP₇₂₋₇₃含量增加。

2 对大豆内源 IAA 和 ABA 的研究

研究表明,在初花期大豆热激之后,第一天内源 IAA 均表现比对照提高;但第二天继续热激后,仅有抗倒伏品种科丰34和抗炸荚品种耐阴黑豆比对照 IAA 含量高,其余品种 IAA 含量低于对照。内源 ABA 含量变化在热激第一天表现和 IAA 含量变化一致,但第二天继续热激后,抗倒伏品种科丰34号,抗炸荚品种耐阴黑豆和早熟品种早熟17号的 ABA 含量比对照低,其余品种的 ABA 含量高于对照,这表明抗倒伏和抗炸荚品种在连续热激两天条件下表现出较高的 IAA 含量和较低的 ABA 含量,说明 IAA 和 ABA 对大豆抗高温的影响是不同的。

在结荚期高温处理后,5个品种内源 IAA 和 ABA 含量均高于对照,但抗倒伏大豆科丰34号,抗炸荚大豆耐阴黑豆和抗病大豆科丰6号含有较低的内源 IAA 和 ABA,表现出对热激诱导不十分敏感。

综上所述,大豆内源激素 IAA、ABA 以及 HSP₇₂₋₇₃共同调节大豆的抗逆性,在热激诱导条件下表现出不同的变化,通过它们的相互作用,影响大豆的丰产性,倒伏性,成熟期,抗病性以及抗落花落荚能力。深入研究它们之间的相互关系将为进一步揭开大豆落花落荚的分子机理及筛选出抗逆、抗脱荚大豆新品种提出理论依据。

参 考 文 献

- [1] Altschuler M. et al., 1982, *Plant Mol Biol.* 1: 103- 105
- [2] Altschuler M. et al., 1985, *Plant Mol Biol.* 5: 291- 297
- [3] Subieck JR 1986, *Am. J. Physiol.* 250: 1
- [4] Ballinger D. G., 1983, *Cell.* 33: 103
- [5] Tam YY, et al., Slovin, Jerry D. Cohen. 1995. Selection and Characterization of a Methyltryptophan-Resistant Lines of *Lemna gibba* Showing a Rapid Rate of Indole- 3- Acetic Acid Turnover. *Plant Physiol.* 107: 77- 85
- [6] 彭艳华, 黄永秀, 齐义鹏, 1996, 脱落酸应答基因的结构、表达调控及信号转导, *植物生理学通讯*, 32(2): 155 - 158
- [7] 林建兴主编, 1995, 作物育种与育种新技术, 科学出版社, P265- 273
- [8] 张性坦等, 1997, 超高产大豆(诱处4号)的某些特性研究, *作物学报*, 1997, 23(3): 296- 300
- [9] 张性坦等, 1996, 夏大豆诱处4号公顷产4500kg生理指标的研究, *中国农业科学*, 29(6): 46- 54
- [10] Maldiney R, et al., 1986, A biotin- avidin- based enzyme immunoassay to quantify three phytohormones auxin, abscisic and zeatinriboside. *J. Immunol Methods.* 90: 151- 158
- [11] Walker- Simmons M 1987, ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiol* 84: 61- 66
- [12] Hunter MW, Greenwood FC, 1962, Preparation of iodine- 131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194: 495- 496
- [13] Dennis J. Shale and Jennifer A. faux, 1995, The Evaluation of a Quantitative Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Anti- *Aspergillus Fumigatus* IgG. *Journal of Immunological Methods.* 77: 197- 205

[14] 蒋成淦著《酶免疫测定法》, 人民出版社, P102- 132

STUDY ON VARIATIONS OF HEAT SHOCK PROTEIN AND ENDOGENOUS HORMONE

Lu Zixian Qu Jianbo Fu Hongyi Deng Xiangdong Zhu Baoge Chen Jiannan

(*Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing, 100101*)

Abstract

Six cultivars, which are the ecotypes of North China, were used in this experiment. When blooming began and at the stage of pod formation, high temperature improved synthesis of HSP₂₋₇₃ and varied remarkably IAA and ABA content. Variations of HSP₂₋₇₃, IAA and ABA were very different in various varieties. The lodging-resistant and anti-shattering varieties showed high synthesis of HSP₂₋₇₃.

Key words Soybean; Heat shock protein; Endogenous hormone