

大豆应答逆境胁迫的蛋白质组学研究进展

牛 宁,李占军,金素娟,赵 璇,赵春华,王玉岭

(石家庄市农林科学研究院,河北 石家庄 050041)

摘 要:文章对近年来国内外科研人员应用蛋白质组学技术研究大豆应答逆境胁迫的相关成果进行总结归纳,综述了大豆抗逆蛋白质组学研究的最新进展,并对大豆抗逆蛋白质组学研究今后的发展方向进行了展望,以期为进一步开展大豆抗逆蛋白质组学研究提供参考与借鉴。
关键词:大豆;蛋白质组学;逆境胁迫
中图分类号:S565. 1 **文献标识码:**A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2016. 02. 0337

Advances on Proteomics of Soybean under Stress

NIU Ning, LI Zhan-jun, JIN Su-juan, ZHAO Xuan, ZHAO Chun-hua, WANG Yu-ling

(Shijiazhuang Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050041, China)

Abstract: Based on recent achievements of proteomics application in soybean under stress at home and abroad, this paper reviewed advances on proteomics in soybean under stress and provided a new perspective of future development of soybean proteomics in future. The main aim was to supply useful information so as to promote the development of soybean proteomics under stress in China.
Keywords: Soybean; Proteomics; Stress

大豆原产于我国,种植历史悠久,是世界上最重要的油料作物之一。近年来,全球气候异常、极端天气的频发造成水资源分布不均衡、温度变化异常等现象成为常态,加上人类自身不当的生产生活造成的土壤退化、盐碱化以及重金属污染等问题,形成了多种不利于作物生长发育的逆境,这也严重影响了大豆产业的发展。在这样的大背景下,研究作物逆境相关生理与分子机制,明确逆境下其分子调控网络,进而发现重要的抗逆基因与蛋白的工作也就迫在眉睫,而蛋白质组学作为能够联系植物表型与基因型之间的一个有效工具,在植物抗逆研究中发挥了越来越重要的作用。本文通过对近年来国内外科研人员应用蛋白质组学技术研究大豆应答逆境胁迫的相关成果进行总结归纳,综述了大豆抗逆方面蛋白质组学研究的最新进展,并对大豆抗逆蛋白质组学研究今后的发展方向进行了展望,以期为进一步开展大豆抗逆蛋白质组学研究提供参考与借鉴。

1 非生物胁迫的蛋白质组学研究进展

1.1 淹水胁迫

淹水胁迫是严重影响大豆生长发育的环境胁迫之一,危害严重时造成大豆减产、甚至绝收。Yin

等^[1]利用磷酸化蛋白质组学技术对淹水胁迫处理的大豆幼苗根尖的蛋白表达进行了分析。共成功鉴定 114 个磷酸化蛋白,其中胁迫 3 h 后 34 个蛋白在磷酸化位点上发生显著变化,其中真核翻译起始因子(eukaryotic translation initiation factors)发挥去磷酸化的作用,而一些与蛋白合成相关蛋白则发生磷酸化反应。进一步研究发现蔗糖磷酸合成酶 1F(sucrose phosphate synthase 1F)和真核翻译起始因子 4G(eukaryotic translation initiation factor 4G)的 mRNA 水平是下调的,而尿苷二磷酸-葡萄糖 6-脱氢酶(UDP-glucose 6-dehydrogenase)的 mRNA 水平在正常生长中是上调的,在胁迫下为下调表达。通过对淹水反应蛋白进行生物信息学的蛋白互作分析发现真核翻译起始因子 4G 是位于淹水胁迫反应网络中心的,并且在乙烯信号途径中发挥作用。以上研究结果表明乙烯信号途径通过蛋白磷酸化作用在大豆淹水胁迫早期阶段根尖抗性机制中发挥重要作用。Mustafa 等^[2]则通过糖蛋白质组学技术对淹水胁迫大豆幼苗根系的蛋白表达进行了比较分析,分别在胁迫处理和正常生长的材料中鉴定了 69 和 111 个糖蛋白。功能分类发现淹水胁迫下蛋白降解、细胞壁以及糖酵解作用相关蛋白的积累水平是增加的,而胁迫相关蛋白则是降低的。另

收稿日期:2015-08-17
基金项目:河北省自然科学基金(C2015106059)。
第一作者简介:牛宁(1980-),男,博士,助理研究员,主要从事大豆遗传育种与蛋白质组学研究。E-mail: niuning1980@163. com。
通讯作者:王玉岭(1957-),男,研究员,主要从事大豆遗传育种与栽培研究。E-mail: wangyuling0313@163. com。

外,在对照与胁迫处理中共有的 23 个糖蛋白中,淹水胁迫后只有过氧化物酶(peroxidases)和糖基水解酶(glycosylhydrolases)的水平是下降的。同时发现胁迫处理样品内质网中蛋白和 N-糖基化相关蛋白的表达也是下调的。研究结果表明淹水胁迫可能影响蛋白的 N-糖基化过程和蛋白降解过程,而糖酵解作用相关糖蛋白则相应得到激活。

除了淹水胁迫影响蛋白修饰的研究外,对外源物质调节淹水胁迫大豆材料蛋白表达的研究也有报道。Oh 等^[3]利用蛋白质组学技术对外源钙影响淹水胁迫大豆的蛋白表达情况进行了分析。结果发现胁迫导致蛋白降解/合成/翻译后修饰、激素/细胞壁代谢以及 DNA 合成相关蛋白下调表达,而外源钙处理则缓解了这种趋势。淹水胁迫下钙的施用也提高了大豆根中发育、脂肪代谢和信号转导相关蛋白的积累水平。此外,尿素酶(urease)和铜伴侣蛋白(copper chaperone proteins)在正常生长和外源钙处理胁迫的大豆中表现相似的趋势。以上研究结果表明外源钙可能影响淹水胁迫大豆根中细胞壁/激素代谢、蛋白降解/合成以及 DNA 合成相关蛋白的表达。Oh 等^[4]还利用无标记蛋白质组学技术对赤霉素(GA₃)影响淹水胁迫大豆蛋白的表达进行了研究。分别在正常生长、淹水胁迫以及 GA₃处理的淹水胁迫材料中鉴定得到 307,324,250 个蛋白,其中淹水胁迫材料中次生代谢、细胞相关蛋白以及蛋白降解和合成相关的蛋白下调表达,然后在外源 GA₃处理的淹水胁迫材料中,以上蛋白的表达水平得到了恢复。而 GA₃处理并没有影响发酵以及细胞壁相关蛋白的表达水平。研究结果表明 GA₃能够影响淹水胁迫大豆中涉及次生代谢、细胞周期以及蛋白降解与合成相关蛋白表达丰度的变化。

此外,Yin 等^[5]通过使用两种不同的蛋白质组学技术(基于凝胶和非凝胶)分析了淹水胁迫条件下大豆根尖蛋白的胁迫早期的表达变化,共鉴定出 115 个蛋白,其中有 9 个蛋白通过两种方法均能鉴定。随后对通过非凝胶蛋白质组学方法鉴定的 71 个蛋白的胁迫诱导水平进行聚类分析,将其聚为 5 个类群。关联分析表明属于类群 I 的 10 个蛋白构成了蛋白反应网络的核心部分。这 10 个蛋白的 mRNA 表达分析显示其中的柠檬酸裂解酶(citrate lyase)和热激蛋白 70(heat shock protein 70)是下调表达的。结果表明淹水胁迫诱导大豆内钙相关的信号转导途径可能在淹水胁迫发生初期发挥重要的作用。为了研究淹水胁迫如何影响核蛋白的表达,Oh 等^[6]运用无标记数量蛋白质组学技术分析了淹水胁迫下大豆根尖细胞核蛋白的丰度变化情况,

发现淹水处理导致 94 个核蛋白的丰度发生差异性变化,其中 19 个上调,75 个下调。功能分类发现 8 个上调蛋白涉及蛋白合成、翻译后修饰以及蛋白降解,34 个下调蛋白则涉及转录、RNA 加工、DNA 合成以及染色质结构稳定。差异蛋白中丰度变化 10 倍以上的蛋白包括 2 个多聚 ADP 核糖合成酶(poly ADP-ribose polymerases)和 1 个 G 结构域蛋白(G-domain-containing protein),这 3 个蛋白涉及 RNA 结合。结果表明蛋白多聚 ADP-核糖化作用的加速和 RNA 代谢的受抑制可能发生在淹水胁迫处理的大豆根尖中。

除此之外,蛋白质组学技术还被用于其他方面,如分析通过抗涝指数筛选出的抗涝、中等抗涝以及不抗涝的大豆品种根系蛋白的表达差异以阐明抗涝性的分子机制^[7]、结合代谢组学技术研究淹水胁迫的大豆根尖中蛋白与代谢物质的变化情况^[8]、淹水胁迫下大豆不同器官(根^[9-19]、叶^[17]、下胚轴^[17-19]、子叶^[15])以及组织中不同细胞器(内质网^[20]、线粒体^[21])的蛋白表达的特异性反应等方面,并取得了一定的进展,限于篇幅,在此不再细述。

1.2 干旱胁迫

干旱胁迫也是导致大豆产量下降的主要环境限制因素,但近年来关于大豆干旱胁迫相关的蛋白质组学研究相对较少。Mohammadi 等^[22]运用蛋白质组学方法研究干旱胁迫和 PEG 渗透胁迫处理的大豆蛋白表达的变化。结果发现干旱、PEG 及两者同时处理后大豆根中分别有 32,13,12 个蛋白表达发生变化。在 PEG 处理和干旱处理的幼苗叶片中,代谢相关蛋白表达上调,能量和蛋白质合成相关蛋白下调表达。进一步研究干旱胁迫下根、叶和下胚轴中都存在表达变化的 3 个蛋白,分别是上调的热激蛋白 70(heat shock protein 70)和肌动蛋白异构体 B(actin isoform B)以及下调的蛋氨酸合成酶(methionine synthase)后,发现它们的 mRNA 也是差异调控的,干旱胁迫的 3 个器官中蛋氨酸合成酶的 mRNA 与蛋白水平均为下调,而在其他处理中没有此反应,表明蛋氨酸合成酶是一种干旱反应蛋白,干旱胁迫下其下调表达抑制了大豆幼苗的正常生长。Gil-Quintana 等^[23]则对干旱胁迫抑制大豆共生固氮的调控机制进行了研究。水分限制的根系统中氮固定是降低的,而固氮酶(nitrogenase)活性在灌溉的另一半根中保持在对照的水平。蛋白质组学分析表明碳代谢、蛋白合成、氨基酸代谢与细胞生长这些过程相关蛋白在干旱胁迫下大豆根瘤中发生了相应的变化。

1.3 盐胁迫

由于人类生产生活的影响,土壤尤其农田的盐渍化现象日益严重。盐胁迫是干旱和半干旱地区导致作物减产的主要环境限制因素之一,其中大豆生产也受到了极大的影响。而目前筛选大豆耐盐种质直接用于生产或用于耐盐育种是主要的技术手段,蛋白质组学研究则被用来分析盐胁迫下大豆耐盐种质的蛋白反应网络,从而发现耐盐种质中控制相应蛋白合成的调控基因以及它们在耐盐机制中所发挥的作用。Hakeem 等^[24]对水培生长的 10 个大豆基因型的幼苗进行不同浓度氯化钠处理,评估其耐盐性。结果发现盐胁迫后 Pusa-24 的株高、鲜重、干重等生长指标急剧下降,并且发生了高水平的脂质过氧化作用,而 Pusa-37 的抗氧化酶活性中相比对照分别有不同程度的提高。以上结果表明 Pusa-24 和 Pusa-37 分别为盐敏感型与耐盐大豆基因型。进一步分析了 Pusa-37 在高盐胁迫下的蛋白反应,鉴定得到 173 个蛋白,其中 40 个是与盐胁迫相关的。Ma 等^[25]选用大豆盐敏感品种 Jackson 和耐盐品种 Lee 68 的幼苗进行氯化钠处理,分析其叶片的蛋白质表达。结果发现在 800 个蛋白点中 91 个是差异表达的,其中 78 个蛋白得到鉴定,涉及 14 个代谢途径和细胞进程,包括活性氧的产生和清除、蛋白水解加速和蛋白合成减少之间的平衡,光合作用的修复,能量的供应以及乙烯生物合成增加等。分析发现耐盐的 Lee 68 比盐敏感的 Jackson 在同时遭受盐胁迫时会表现出更强的自由基清除能力、能量补充能力、乙烯产生能力和光合能力,这些可能是其耐盐的主要原因。Ma 等^[26]随后又对盐胁迫处理后以上两个品种幼苗的根系蛋白进行了分析。68 个差异表达的蛋白得到了成功鉴定,并且将它们划归成 13 个代谢途径和细胞进程。分析发现盐胁迫下 Lee 68 中与油菜素内酯和赤霉素信号转导相关蛋白显著上调表达,同时 ABA 的含量水平与 Lee 68 也呈现正相关关系。 Ca^{2+} 信号途径相关蛋白在 Lee 68 幼苗根中比 Jackson 明显上调。此外,在盐胁迫下 Lee 68 还有比 Jackson 更强的活性氧清除能力和细胞 K^+/Na^+ 平衡的稳定能力。综上所述 Lee 68 中存在的以上的差异可能跟其耐盐性有一定的联系。

1.4 不适温度胁迫

1.4.1 高温胁迫 大豆正常的生产发育需要适宜的温度,过高或者过低的温度都会引起相应的危害,在生产上造成不可估量的损失。近年来,极端高温天气发生频繁,而此时又恰逢部分主产区的大豆生长发育的关键时期,因此对大豆生产造成了一定的影响。Ahsan 等^[27]利用比较蛋白组学技术研

究了高温胁迫下大豆幼苗组织特异性蛋白表达模式。在高温胁迫处理的叶、茎、根中分别鉴定了 54, 35, 61 个差异表达的蛋白。其中热激蛋白和涉及抗氧化的蛋白基本上都是上调表达的,而与光合作用、次生代谢、氨基酸代谢和蛋白合成有关的蛋白为下调表达。进一步分析发现 *HSP70*、*CPN-60* 和 *ChsHSP* 的表达具有组织特异性,此结果通过免疫杂交实验得到了验证。以上结果表明大豆幼苗应对高温胁迫会启动组织特异性防御与适应机制,在 3 种器官中进行一套与热激蛋白产生相关的共同防御机制。除此之外,几种组织特异性蛋白可能还在各器官的各自防御高温胁迫危害的机制中发挥相应的作用。

高温发生的同时,往往伴随着高湿。高温与高湿的共同胁迫往往会导致田间大豆种子在收获前发生变质,从而严重影响种子的商品性。Wang 等^[28]运用蛋白质组学技术比较了易变质的大豆种子分别在高温高湿处理的不同时间与正常种子的蛋白表达情况。结果发现共有 42 个差异表达的蛋白点,通过质谱鉴定成功匹配上 31 种不同的蛋白质。这些蛋白涉及细胞反应和代谢过程,其中代谢过程包括糖代谢、信号转导、蛋白生物合成、光合作用、蛋白折叠与组装、能量途径、细胞复苏与防御、细胞周期、氮代谢、脂类代谢、氨基酸代谢、翻译调控以及次生代谢。依据这些蛋白的功能以及所涉及的途径,结合物理化学的超微结构和代谢数据,他们提出了收获前种子变质的相应机制。该机制有助于进一步了解发生在高温高湿环境下发育种子中细胞反应以及可能调控方式。

1.4.2 低温胁迫 早春低温严重影响中国南方春大豆的生长发育。在蛋白质水平揭示幼苗对低温的反应机制有助于培育抗低温的春大豆品种。Tian 等^[29]对低温反应有差异的两个大豆品种的叶片蛋白表达进行比较,发现 57 个差异表达的蛋白,涉及光合作用、蛋白折叠与组配、细胞防御、细胞骨架蛋白、转录与翻译调控、氨基酸与氮代谢、蛋白降解、贮藏蛋白、信号转导、碳水化合物代谢、脂肪代谢、能量代谢等途径。进一步分析低温影响两个品种的蛋白表达结果发现骨粒青比南农 513 更抗寒的原因在于它有更强的蛋白、脂肪、多胺生物合成代谢,更有效的含硫代谢循环,更高的光合速率以及较低的蛋白酶解和能量损耗。以上结果为揭示春大豆遭受低温胁迫的反应机制以及进一步阐明抗低温的机理提供了有益的参考。

种子萌发是一个极其复杂的过程,与包括温度与水分等在内的环境因素关系密切。萌发的大豆种子对不良的环境条件尤其敏感,可能导致抑制萌

发。Swigonska 等^[30]分析了低温与渗透胁迫对大豆萌发种子根蛋白表达的影响。大豆种子分别在低温、渗透胁迫及低温与渗透胁迫叠加的条件下萌发,从中提取根蛋白进行比较分析。结果发现 59 个在处理与对照中均出现且存在显著差异的蛋白点通过 LC/nanoESI-MS 得到鉴定。这些蛋白通过功能分类,发现 9 个蛋白涉及植物防御,8 个与植物贮藏有关,10 个涉及碳水化合物代谢的不同分支。其他蛋白还涉及电子传递、代谢途径、次生代谢、细胞运输等。

1.5 重金属胁迫

1.5.1 镉胁迫 镉是一种剧毒的重金属元素,随着现代工业的发展,造成镉在环境中不断累积,对生长在镉过量环境下的大豆生长造成严重的伤害。Hossain 等^[31]以对镉积累有明显差异的两个大豆品种(高积累型与低积累型)以及它们的重组自交系 CDH-80(高镉积累型)的幼苗为材料揭示镉胁迫下大豆反应的蛋白网络。结果发现不同材料根的生长都受到了抑制,进而对根蛋白表达的品种差异进行了评估。其中 NADP 依赖型链烯双键还原酶 P1(NADP dependent alkenal double bond reductase P1)在低镉积累型品种中的表达更高。而叶片蛋白质组学分析表明差异表达的蛋白主要涉及代谢与能量产生。以上结果表明高镉积累型与低镉积累型品种以及 CDH-80 在应对镉胁迫的防御机制上存在某些共性。涉及糖酵解和 TCA 循环的高丰度蛋白酶可能有助于镉刺激细胞产生更多的能量来满足高能的需求。此外,光合作用相关蛋白的上调表达则说明能量产生中光合同化物的快速消耗。同时,谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase)表达量增加可能与植物整合肽调控镉离子的去除有关系。除此以外,抗氧化酶(SOD、APX、CAT)的表达量的增加能够保证在镉胁迫下减少活性氧造成的危害。在高镉积累品种中分子伴侣的上调表达可能也是一个防止蛋白再折叠或者错误折叠从而维持蛋白质结构与功能稳定,进而维持细胞内环境平衡的重要防御途径。

为了能够减少镉胁迫对植物的危害,一些化学物质被用于缓解过量镉的影响, β -氨基丁酸(BABA)就是其中之一。Hossain 等^[32]利用蛋白质组学技术对 BABA 缓解大豆镉胁迫的相应机理进行了研究。结果发现镉胁迫下总共有 66 个蛋白丰度发生差异变化。BABA 处理与未处理的胁迫叶片中都存在的有 17 个蛋白。光合放氧增强蛋白 1(oxygen-evolving enhancer protein 1)和核酮糖二磷酸羧化酶小链 1(ribulose biphosphate carboxylase small chain 1)在两组叶片中均为上调表达。在 15 个下调

表达的蛋白中,热激蛋白 70(heat shock protein 70)、碳酸酐酶(carbonic anhydrase)、蛋氨酸合成酶(methionine synthase)和甘氨酸脱氢酶(glycine dehydrogenase)在 BABA 处理后相对表达水平都有部分恢复。此外,BABA 处理显著地增加了过氧化物酶和糖酵解酶在镉胁迫下的表达丰度。同时应用生物光子技术对植株生理状态进行监控,发现 BABA 处理镉胁迫的叶片呈现相对较低的生物光子的释放,表明它们比未处理的植株发生了较少的氧化伤害。综合以上研究结果,BABA 处理通过活化细胞脱毒系统来调节植物防御机制保护细胞少受镉胁迫引起的氧化损伤从而应对镉胁迫。

1.5.2 铝胁迫 酸性土壤中的铝离子毒性是中国南方大豆生产的关键问题。通过筛选耐铝的大豆品种可有效的克服这一问题。但耐铝品种的分子机制还不是非常清楚。Duressa 等^[33]通过 2D-DIGE 结合质谱技术对铝胁迫下耐铝基因型 PI416937 和铝敏感基因型 Young 的根蛋白的表达进行了分析。结果表明铝胁迫诱导 PI416937 中耐铝相关蛋白的表达,而在 Young 中则导致一般胁迫反应相关蛋白的表达。其中铝胁迫下 PI416937 中苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase)、烯醇酶(enolase)、苹果酸氧化还原酶(malate oxidoreductase)和丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase)是上调表达的,而在 Young 中则无此现象。这些酶有助于脱铝毒机制中一种关键物质柠檬酸的合成。

1.6 其它非生物胁迫

1.6.1 磷缺乏 大豆根瘤的共生固氮作用是一个高磷需求的过程。Chen 等^[34]对磷缺乏条件下大豆根瘤中差异表达的蛋白进行了鉴定,然后又利用 qRT-PCR 分析了差异蛋白编码基因的表达模式。共从大豆根瘤中鉴定出 44 个磷缺乏反应蛋白,其中 14 个植物蛋白与 3 个根瘤菌蛋白为上调表达,13 个植物蛋白与 14 个根瘤菌蛋白下调表达。随后的 qRT-PCR 分析验证了基因表达与 14 个上调表达蛋白中的 11 个一致,而 13 个下调蛋白中仅有 4 个蛋白与相应基因的表达相一致。结果表明大部分上调蛋白的表达可能在转录水平受到调控,而下调蛋白则为转录后调控。进一步分析发现根瘤中一些基因表现出与根中不同的反应,这也表明根与根瘤在磷缺乏胁迫下可能存在不同反应机制。

1.6.2 臭氧胁迫 环境中臭氧近年来呈现增长的趋势,严重影响农业生产,而大豆又为对臭氧高度敏感的作物之一。Galant 等^[35]为了理解臭氧作用大豆的分子反应机制,对设施环境下的大豆施加 3 种浓度的臭氧处理后进行全蛋白质组和氧化还原蛋白质组分析。结果发现在高浓度臭氧处理的叶

片中,35 个蛋白在表达丰度上增加 5 倍,22 个蛋白在氧化反应上也有 5 倍的提高,还有 22 个蛋白在表达丰度和氧化反应都上调。这些差异变化涉及碳代谢、光合作用、氨基酸合成、类黄酮和类异戊二烯合成、信号和激素以及抗氧化途径。结果表明对大豆施加季节性臭氧改变了氧化还原相关蛋白的表达丰度和氧化性质,进而影响一系列的代谢过程,在一些情况下也有助于缓解氧化胁迫作用。

2 生物胁迫的蛋白质组学研究进展

2.1 病害胁迫

随着自然环境以及人类耕作制度的改变,导致生物胁迫发生的规模与频次越来越显著,对农业生产的影响也越来越大。大豆花叶病毒(SMV)是众多大豆病害中影响最大、发生地域最广的病毒病害之一,我国大豆主产区均有 SMV 的危害,其严重影响大豆的产量与外观品质。Yang 等^[36]通过蛋白质组学技术分析了接种 SMV 的大豆叶片的蛋白表达并发现了 28 个差异表达的蛋白,其中 SMV 感染样品中有 16 个蛋白上调表达,12 个蛋白下调表达。通过质谱成功鉴定其中 16 个蛋白,分别涉及蛋白降解、防御信号传递、活性氧清除、细胞壁强化、能量以及代谢调控等途径。进一步利用 qRT-PCR 分析了 13 个基因的表达发现代谢与光合作用相关基因在所有时间点都是下调表达的,其余基因在 SMV 感染后也在转录水平有不同的变化。该结果有助于在分子水平更好的理解大豆受到 SMV 感染后的应答反应。

大豆锈病是大豆产区普遍存在的严重的叶类病害,在分子尤其是蛋白水平明确寄主的反应、鉴定抗性蛋白则有助于控制此类病害的发生。Wang 等^[37]对接种大豆锈菌的抗锈病大豆品种的叶片进行了蛋白质组学分析。接种后 12 和 24 h 的处理与对照的叶片中总共有 41 个蛋白得到成功鉴定,并划归为 7 个功能分类。具体结果为:接种后 12 h 有 20 个蛋白上调表达、4 个蛋白下调表达,24 h 时有 18 个蛋白上调表达、8 个蛋白下调表达;与光合作用相关的蛋白是下调表达的,而病害与防御反应、蛋白折叠与组装、碳水化合物代谢以及能量合成相关蛋白则为上调表达。

此外,Zhang 等^[38]还对引起大豆根腐与茎腐的疫霉菌感染不同抗性大豆品种下胚轴后的蛋白表达进行了研究,抗性品种豫豆 25 接种后有 26 个蛋白差异表达,而敏感品种 NG6255 则有 20 个差异表达的蛋白。差异蛋白主要与能量调控、防御反应、代谢以及蛋白合成等有关。

2.2 虫害胁迫

近年来,各种虫害的频繁发生也成为大豆生产中面临的严重的问题,而这方面的研究则较为缺乏。Timbo 等^[39]通过氧化还原代谢和蛋白质组学分析对抗褐臭蝽的大豆 IAC-100 和易感品种 BRS Sylvania RR 受到虫食后叶片的生化反应进行了分析。在易感品种中伤害引起脂氧合酶 3 (lipoxygenase-3) 和愈创木酚过氧化物酶 (guaiacol peroxidase) 的活性增加,抗坏血酸过氧化物酶没有变化,过氧化氢酶的活性下降。而在抗虫品种中伤害并没有引起以上酶活性的任何变化。运用蛋白质组学技术分析了两者伤害发生后 24 h 的蛋白表达,结果发现在两个品种中差异表达蛋白的比例均在 4% ~ 5%。质谱鉴定发现易感品种的差异蛋白与胁迫反应、植物防御和真菌侵染相关,而抗虫品种则与卡尔文循环相关。当易感品种在氧化还原代谢和胁迫反应蛋白表达上发生变化时,抗虫品种则表现出防御反应来避免生物胁迫的伤害。

大豆胞囊线虫(SCN)近年来已经成为威胁我国大豆生产安全的重要植物病原线虫,而实践中发现黑豆一般对胞囊线虫有较强的抗性。Liu 等^[40]就利用比较蛋白质组学技术以抗病的黑豆与易感的辽豆 15 杂交的 F₄ 分离群体作为试验材料分离鉴定 SCN 感染后差异表达的蛋白。结果显示抗病样品有 367 个蛋白点,而易感样品则为 372 个。在这些蛋白点中,来自抗病样品中的 23 个蛋白点和易感样品中的 4 个蛋白点是差异表达的,质谱鉴定出其中 16 个蛋白。功能分析表明这 16 个鉴定蛋白中的大部分涉及防御、能量与代谢过程,说明以上途径的相关蛋白可能与大豆抗 SCN 有关。

除此之外,Fan 等^[41]对斜纹夜蛾饲喂大豆叶片后诱导大豆防御反应相关蛋白表达进行了分析,共鉴定出 11 个蛋白,其中大部分蛋白的表达是上调的,主要涉及活性氧清除、防御信号传导以及代谢调控等途径。Zhang 等^[41]还对引起大豆根腐与茎腐的疫霉菌感染不同抗性大豆品种下胚轴后的蛋白表达进行了研究,抗性品种豫豆 25 接种后有 26 个蛋白差异表达,而敏感品种 NG6255 则有 20 个差异表达的蛋白。差异蛋白主要与能量调控、防御反应、代谢以及蛋白合成等有关。

3 总结与展望

植物在生产发育过程容易遭受各种各样的逆境胁迫的影响,在应答胁迫的过程中,体内也发生着复杂的变化,蛋白表达的变化就是其中一个重要方面。蛋白质是生命现象的表现形式,是生理功能的执行者和生命活动的直接体现者。利用蛋白质

组学技术对逆境胁迫后大豆材料表达变化的蛋白进行定性与定量分析,既可以掌握不同逆境胁迫与相应蛋白表达的关系,确定抗逆相关蛋白,又可以在蛋白水平揭示大豆应答逆境胁迫的机制,从而有助于全面而深入了解植物抗逆的分子机制。通过对近年来应用蛋白质组学技术研究大豆应答逆境胁迫的研究结果进行总结分析,发现虽然不同的逆境胁迫会导致数量众多的蛋白表达发生变化,但在其中还是存在一些共性的地方。首先,虽然逆境不

同,但有一些差异蛋白却是普遍存在的,诸如热激蛋白、抗氧化酶以及与能量和代谢相关的一些酶类等,它们在大豆遭受逆境胁迫后相应的表达都会上调。其次,将表达差异蛋白按功能分类,发现受到影响的生物途径与过程也是相通的,像植物防御反应、能量与代谢途径会受到相应的促进,而光合作用会受到明显抑制。根据以上研究结果,绘制了一张大豆应答逆境胁迫的模式图(图1)以供参考。

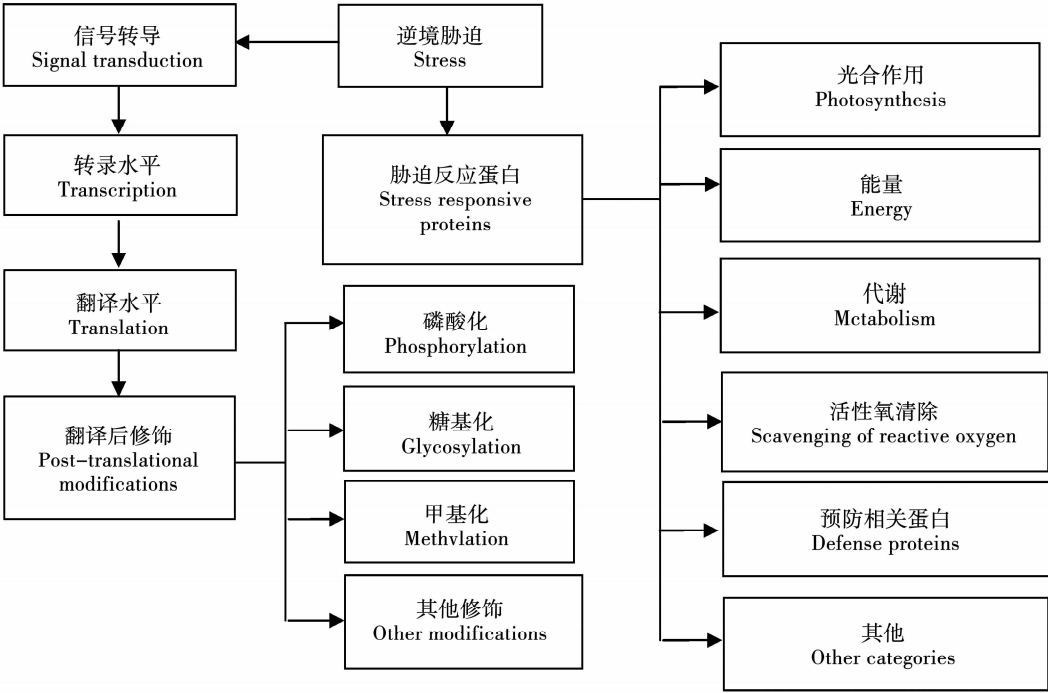


图1 大豆应答逆境胁迫的模式简图

Fig. 1 The simple model of the stress responses in soybean

目前,尽管在大豆应答逆境胁迫的蛋白质组学研究上已经进行了有益的探索,并取得了较大的进展,但相比模式植物拟南芥、水稻上抗逆的蛋白质组学研究的整体水平,大豆的类似研究相对缺乏。并且在大豆抗逆蛋白质组学研究的各个种类中,研究的深度与水平也不尽相同,研究较好的为淹水胁迫,深度与层次较高,其它各方面与之均有一定的差距。因此大豆淹水胁迫研究可以作为大豆抗逆蛋白组学研究发展的标杆,为其它方面逆境胁迫研究提供参考与借鉴。首先是对蛋白翻译后修饰作用的重视。蛋白质存在翻译后的修饰作用,如磷酸化、糖基化等。而这种翻译后的修饰作用对于许多蛋白的功能调控至关重要。因此应加强磷酸化、糖基化等修饰的蛋白质组学研究的应用。其次,外源物质对不同胁迫下大豆蛋白表达的影响。通过对施用外源物质缓解相应胁迫的大豆差异蛋白表达的了解,结合不同抗性材料对逆境胁迫的反应,共同构建大豆响应逆境胁迫的分子调控网络。第三,

尽管之前的研究中发现了许多大豆响应逆境胁迫的重要相关蛋白,但是仍然缺乏对其内在作用机制的理解。只有进一步结合生理生化研究以及基因功能验证才能对相应蛋白的功能进行明确,从而更清楚的了解相应蛋白的作用机制。

随着新一代高通量测序技术的日益成熟,加大大豆基因组序列测定的完成^[42],加快了功能基因和蛋白的发现步伐,给大豆应答逆境胁迫的蛋白质组学研究带来了新的机遇。抗逆蛋白的差异表达通常是相应基因表达变化的结果。对蛋白质组学研究发现抗逆蛋白的相应编码基因进行研究,通过转基因技术研究其表达调控,已在模式植物拟南芥^[43]、水稻^[44]、烟草^[45]等得到应用,在转基因植株中过表达相应基因后,对盐、低温胁迫等的抗性明显提高。但该类研究在大豆中的应用目前还较少。因此,利用蛋白质组学技术挖掘抗逆相关蛋白,对其进行功能的验证与结构的解析,对相应的基因进行克隆,通过转基因手段阐明相关基因(蛋白)的表

达调控机制,将能更深刻地揭示大豆响应逆境胁迫的分子调控网络,为大豆抗胁迫品种的培育和遗传改良工作提供技术与资源的保证,使其在生产实践中得到更好的应用。

参考文献

- [1] Yin X J, Sakata K, Komatsu S. Phosphoproteomics reveals the effect of ethylene in soybean root under flooding stress [J]. *Journal of Proteome Research*, 2014, 13(12): 5618-5634.
- [2] Mustafa G, Komatsu S. Quantitative proteomics reveals the effect of protein glycosylation in soybean root under flooding stress [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 627.
- [3] Oh M W, Nanjo Y, Komatsu S. Gel-free proteomic analysis of soybean root proteins affected by calcium under flooding stress [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 559.
- [4] Oh M W, Nanjo Y, Komatsu S. Analysis of soybean root proteins affected by gibberellic acid treatment under flooding stress [J]. *Protein and Peptide Letters*, 2014, 21(9): 911-947.
- [5] Yin X J, Sakata K, Nanjo Y, et al. Analysis of initial changes in the proteins of soybean root tip under flooding stress using gel-free and gel-based proteomic techniques [J]. *Journal of Proteomics*, 2014, 106: 1-16.
- [6] Oh M W, Nanjo Y, Komatsu S. Identification of nuclear proteins in soybean under flooding stress using proteomic technique [J]. *Protein and Peptide Letters*, 2014, 21(5): 458-467.
- [7] Nanjo Y, Jang H Y, Kim H S, et al. Analyses of flooding tolerance of soybean varieties at emergence and varietal differences in their proteomes [J]. *Phytochemistry*, 2014, 106: 25-36.
- [8] Komatsu S, Nakamura T, Sugimoto Y, et al. Proteomic and metabolomic analyses of soybean root tips under flooding stress [J]. *Protein and Peptide Letters*, 2014, 21(9): 865-884.
- [9] Komatsu S, Han C, Nanjo Y, et al. Label-free quantitative proteomic analysis of abscisic acid effect in early-stage soybean under flooding[J]. *Journal of Proteome Research*, 2013, 12 (11): 4769-4784.
- [10] Komatsu S, Nanjo Y, Nishimura M. Proteomic analysis of the flooding tolerance mechanism in mutant soybean[J]. *Journal of Proteomics*, 2013, 79: 231-250.
- [11] Nanjo Y, Nakamura T, Komatsu S. Identification of indicator proteins associated with flooding injury in soybean seedlings using label-free quantitative proteomics [J]. *Journal of Proteome Research*, 2013, 12 (11): 4785-4798.
- [12] Khatoon A, Rehman S, Oh W M, et al. Analysis of response mechanism in soybean under low oxygen and flooding stresses using gel-base proteomics technique [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39:10581-10594.
- [13] Salavati A, Khatoon A, Nanjo Y, et al. Analysis of proteomic changes in roots of soybean seedlings during recovery after flooding [J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75: 878-893.
- [14] Khatoon A, Rehman S, Hiraga S, et al. Organ-specific proteomics analysis for identification of response mechanism in soybean seedlings under flooding stress[J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75: 5706-5723.
- [15] Komatsu S, Makino T, Yasue H. Proteomic and biochemical analyses of the cotyledon and root of flooding-stressed soybean plants [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65301.
- [16] Nanjo Y, Skultety L, Uváčková L, et al. Mass spectrometry-based analysis of proteomic changes in the root tips of flooded soybean seedlings[J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(1): 372-385.
- [17] Khatoon A, Rehman S, Salavati A, et al. A comparative proteomics analysis in roots of soybean to compatible symbiotic bacteria under flooding stress [J]. *Amino Acids*, 2012, 43: 2513-2525.
- [18] Alam I, Sharmin S A, Kim K H, et al. Comparative proteomic approach to identify proteins involved in flooding combined with salinity stress in soybean[J]. *Plant Soil*, 2011, 346:45-62.
- [19] Komatsu S, Thibaut D, Hiraga S, et al. Characterization of a novel flooding stress-responsive alcohol dehydrogenase expressed in soybean roots[J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, 77:309-322.
- [20] Komatsu S, Kuji R, Nanjo Y, et al. Comprehensive analysis of endoplasmic reticulum-enriched fraction in root tips of soybean under flooding stress using proteomics techniques [J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 77: 531-560.
- [21] Komatsu S, Yamamoto A, Nakamura T, et al. Comprehensive analysis of mitochondria in roots and hypocotyls of soybean under flooding stress using proteomics and metabolomics techniques[J]. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10: 3993-4004.
- [22] Mohammadi P P, Moieni A, Hiraga S, et al. Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings[J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75: 1906-1923.
- [23] Gil-Quintana E, Larrainzar E, Seminario A, et al. Local inhibition of nitrogen fixation and nodule metabolism in drought-stressed soybean[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64 (8): 2171-2182,
- [24] Hakeem K R, Khan F, Chandna R, et al. Genotypic variability among soybean genotypes under NaCl stress and proteome analysis of salt-tolerant genotype[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 168: 2309-2329.
- [25] Ma H Y, Song L R, Shu Y J, et al. Comparative proteomic analysis of seedling leaves of different salt tolerant soybean genotypes [J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75: 1529-1546.
- [26] Ma H Y, Song L R, Huang Z G, et al. Comparative proteomic analysis reveals molecular mechanism of seedling roots of different salt tolerant soybean genotypes in responses to salinity stress [J]. *EuPA Open Proteomics*, 2014, 4: 40-57.
- [27] Ahsan N, Donnart T, Nouri M Z, et al. Tissue-specific defense and thermo-adaptive mechanisms of soybean seedlings under heat stress revealed by proteomic approach [J]. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(8): 4189-4204.
- [28] Wang L Q, Ma H, Song L R, et al. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress[J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75: 2109-2127.
- [29] Tian X, Liu Y, Huang Z G, et al. Comparative proteomic analysis of seedling leaves of cold-tolerant and -sensitive spring soybean cultivars [J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 42 (3): 581-601.
- [30] Swigonska S, Weidner S. Proteomic analysis of response to long-term continuous stress in roots of germinating soybean seeds[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170: 470-479.
- [31] Hossain Z, Hajika M, Komatsu S. Comparative proteome analysis

of high and low cadmium accumulating soybeans under cadmium stress[J]. *Amino Acids*, 2012, 43: 2393-2416.

[32] Hossain Z, Makino T, Komatsu S. Proteomic study of β -aminobutyric acid-mediated cadmium stress alleviation in soybean[J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(13): 4151-4164.

[33] Duressa D, Soliman K, Taylor R, et al. Proteomic analysis of soybean roots under aluminum stress[J]. *International Journal of Plant Genomics*, 2011, 282531.

[34] Chen Z J, Cui Q Q, Liang C Y, et al. Identification of differentially expressed proteins in soybean nodules under phosphorus deficiency through proteomic analysis[J]. *Proteomics*, 2011, 11: 4648-4659.

[35] Galant A, Koester R P, Ainsworth E A, et al. From climate change to molecular response: Redox proteomics of ozone-induced responses in soybean[J]. *New Phytologist*, 2012, 194: 220-229.

[36] Yang H, Huang Y P, Zhi H J, et al. Proteomics-based analysis of novel genes involved in response toward soybean mosaic virus infection[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38:511-521.

[37] Wang Y, Yuan X Z, Hu H, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in resistant soybean leaves after *Phakopsora pachyrhizi* infection[J]. *Journal of Phytopathol*, 2012, 160: 554-560.

[38] Zhang Y M, Zhao J M, Xiang Y, et al. Proteomics study of changes in soybean lines resistant and sensitive to *Phytophthora sojae* [J]. *Proteome Science*, 2011, 9:52.

[39] Timbo R V, Hermes-Lima M, Silva L P, et al. Biochemical aspects of the soybean response to herbivory injury by the brown stink bug *Euschistus heros* (*Hemiptera: Pentatomidae*) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109735.

[40] Liu D W, Chen L J, Duan Y X. Differential proteomic analysis of the resistant soybean infected by soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* Race 3[J]. *Journal of Agricultural Science*, 2011, 3(4): 160-167.

[41] Fan R, Wang H, Wang Y L, et al. Proteomic analysis of soybean defense response induced by cotton worm (*prodenia litura*, *fab-ricius*) feeding[J]. *Proteome Science*, 2012, 10:16.

[42] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean[J]. *Nature*, 2010, 463: 178-183.

[43] Yu S, Zhang X, Guan Q, et al. Expression of a carbonic anhydrase gene is induced by environmental stresses in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29: 89-94.

[44] Feng L L, Han Y J, Liu G, et al. Overexpression of sedoheptulose-1,7-bisphosphatase enhances photosynthesis and growth under salt stress in transgenic rice plants[J]. *Functional Plant Biology*, 2007, 34: 822-834.

[45] Gupta A S, Webb R P, Holaday A S, et al. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress (induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants) [J]. *Plant Physiology*, 1993, 103: 1067-1073.

特写：豆类唱主角——联合国宣布 2016 年为“国际豆类年”

新华网罗马 11 月 11 日电（记者罗娜）联合国粮农组织总干事若泽·格拉齐亚诺·达席尔瓦 10 日在意大利首都罗马亲手把蚕豆栽种到花盆中，为以“提供丰富营养，促进可持续发展”为口号的“2016 国际豆类年”预热。

从地中海的胡姆斯豆酱，到传统的英式早餐烤豆，再到印度豆菜，在世界各地的美味佳肴中都有豆类的身影。小小的豆子为何会进入人们的视野，通过联合国大会决议成为国际年主角的呢？

豆类是人类消除饥饿的核心力量。在粮农组织的定义中，豆类指仅作为干燥种子而收获的豆科作物，如芸豆、菜豆、棉豆、蚕豆、鹰嘴豆、豇豆、黑眼豆和木豆等等，不包括被分类为蔬菜的青收作物（如豌豆、青豆），以及用来榨油（如大豆和花生）和专门用于播种目的的豆科作物（如三叶草和紫花苜蓿种子）。“豆类是确保众多人口粮食安全的重要农作物。特别是在拉丁美洲、非洲和亚洲等发展中国家，豆类是传统饮食的一部分，也是小规模农业种植的主要作物，”格拉齐亚诺说。豆类富含多种营养素和大量蛋白质，在那些因物资匮乏无法获得肉奶制品的地区，价格低廉的豆类蛋白质是人们营养的理想来源。因此，豆类不仅是世界许多贫困地区改善饮食的主要食物，同时也在联合国世界粮食计划署粮食援助战略中的“食品篮”中占有一席之地。

豆类是摆脱贫困的重要支柱。对于农民来说，豆类是重要的作物，因为它们既可以用来出售，也可以作为家庭的主要食物。数据显示，豆类价格通常高于谷类价格 2~3 倍，因此无论选择食用或出售，农民都可维持家庭的粮食安全并确保经济的稳定。在不断变化的气候条件下，豆类因其遗传多样性，能够保证农民有机会选择新的品种进行农业生产维持生计。与此同时，在发展中国家，许多家庭特别是妇女从事与豆类相关的生产和加工，促进全球豆类消费还有助于增加收入，帮助他们摆脱贫困。不仅如此，豆类还可以降低全球粮食系统对小麦、玉米、大米等几种主要粮食作物的过度依赖所带来的风险，创造新的投资机会。

豆类对于人类健康不可或缺。“数百年来，豆类一直是人类饮食的重要组成部分”，格拉齐亚诺说，“然而，其营养价值却未能得到普遍认识，甚至经常被低估”。豆类虽小，但其所富含的蛋白质分别是小麦和大米蛋白质含量的 2 和 3 倍，还富含微量元素、氨基酸和 B 族维生素。豆类的脂肪含量低，但富含营养和可溶性纤维，被认为是控制胆固醇和维护消化系统健康的极佳食物，其所含的大量铁和锌能够有效防治妇女和儿童贫血症。豆类不含麸质，因此也适合于乳糖患者食用。此外，豆类还是健康饮食中的主要成分，有助于应对肥胖症和防治糖尿病、冠心病和癌症等慢性疾病。

豆类是生态环境的有益助手。专家表示，豆类作物的非食用部分可以用作动物饲料和农业肥料。它含氮量高，不仅能够改善动物的健康状况、促进其生长，还可以提高土壤肥力、增加农作物产量，消除农作物对化肥的依赖，从而减少合成饲料、肥料的消耗，间接降低温室气体的排放。通过改善土壤总体健康状况，豆类为各种微生物营造了适宜的环境，可以有力地促进地下生物多样性。同时，将豆类与其他作物间作或轮作，可减少土壤侵蚀、帮助防治病虫害。值得一提的是，豆类还是一种节水的蛋白质来源。与其他蛋白质来源相比，豆类消耗的水仅为其他蛋白质来源的 10%~50%。

转自新华网