

促芽肥对水稻再生芽萌发生长过程蛋白质表达的影响*

陈鸿飞 张志兴 林文雄**

(福建农林大学生命科学学院/福建农林大学农业生态研究所 福州 350002)

摘要 采用比较蛋白质组学的方法和技术,并结合相关生理指标测定,探讨了促芽肥对水稻再生芽萌发生长过程中蛋白质表达及相应生理特性的影响。共获得了20个在不同促芽肥下再生芽萌发生长过程出现差异表达的蛋白质点,涉及再生芽萌发生长过程的能量代谢、生长调控和抗逆响应等。在其他栽培措施一致的情况下,施用促芽肥能有效地降低再生芽萌发生长过程中能量代谢相关蛋白的下调幅度,提高光合相关蛋白的表达,从而使再生芽具有相对较强的能量合成能力和光合自养能力,更好地满足再生芽分化生长对能量和物质的需求;还能相对降低抑制再生芽萌发生长相关蛋白的表达,提高促进再生芽分化过程细胞分裂和伸长相关蛋白及抗性相关蛋白的表达,促进再生芽的萌发生长,增强再生芽抵御外界生物和非生物胁迫的能力,提高对各种不良环境的适应性,因而其倒2至倒5各节位再生芽的活芽率和芽长极显著高于未施用促芽肥处理,从而显著提高了再生季的单位面积有效穗数、结实率和产量,实现了再生季的高产增产。

关键词 水稻 再生芽 促芽肥 蛋白质表达 产量

中图分类号: S511.01 文献标识码: A 文章编号: 1671-3990(2014)12-1405-09

Effects of nitrogen application for bud development on protein expression of ratooning buds of rice

CHEN Hongfei, ZHANG Zhixing, LIN Wenxiong

(School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University/Institute of Agricultural Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract Ratooning rice, with significant improvement in potential yield, has become a major farming system to raise multiple crop index. Ratooning rice yield is directly related to the rate of ratooning bud germinating into spikes, and thereby enhancing ratooning bud germination is a key element for ratooning rice high yield. Numerous studies on rice eco-physiology have shown that nitrogen application enhances bud development also strongly promotes ratooning bud germination. However, the molecular mechanism of nitrogen application for bud development to promote ratooning bud germination has remained unclear. This paper studied the effects of nitrogen application for bud development on protein expression of ratooning buds of rice and the corresponding physiological characteristics by using comparative proteomics and relative physiological indicators. A total of 20 differentially expressed proteins were detected in different treatments in 2-DE maps of ratooning bud proteome. The proteins involved in energy metabolism, growth regulation, defense response to stress, etc. The results indicated that the expression abundance of nucleoside diphosphate kinase protein involved in energy metabolism was down-regulated and the proteins involved in photosynthesis (probable photosystem oxygen-evolving complex protein and cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit) were up-regulated during ratooning bud germination. Furthermore, protein expressions were higher under nitrogen application treatment than non-fertilization treatment on 7 d and 14 d after nitrogen application for bud development. It suggested that nitrogen application for ratooning bud development significantly slowed the down-regulation of proteins involved in energy metabolism, and promoted the up-regulation of proteins involved in photosynthesis. Thus ratooning buds mediated by fertilization treatment had relatively stronger energy synthesis and photoautotroph capabilities, which better met the needs of energy and material for ratooning bud germination and differentiation. Six protein spots involved in cellular growth and five protein spots involved in resistance were detected and identified in the study. Among them, two protein spots (translationally-controlled tumor protein homolog and actin-depolymerizing factor) were

* 福建省生态学重点学科项目(6112C0600)、福建省自然科学基金项目(2009J01060、2012J01075)资助

** 通讯作者: 林文雄, 主要从事植物生理与分子生态学研究。E-mail: wenxiong181@163.com

陈鸿飞, 研究方向为植物生理与分子生态学。E-mail: hongfeichen2006@163.com

收稿日期: 2014-08-10 接受日期: 2014-10-30

down-regulated and nine protein spots (e.g., germin-like protein, ABA/WDS-induced protein, putative quinone-oxidoreductase QR2, Cu-Zn superoxide dismutase and dirigent-like protein) were up-regulated during the ratooning bud germination. Furthermore, expression abundance of proteins (e.g., ABA/WDS-induced protein and actin-depolymerizing factor on the 7th and 14th day, germin-like protein on the 7th day of fertilization) was lower under nitrogen application treatment than non-fertilization treatment. Proteins (e.g., translationally-controlled tumor protein homolog, putative quinone-oxidoreductase QR2, Cu-Zn superoxide dismutase and dirigent-like protein on the 7th and 14th day, germin-like protein on the 14th day) had higher expressions under fertilization treatment than non-fertilization treatment. It indicated that nitrogen application for ratooning bud development relatively cut down the expression abundance of proteins that inhibited ratooning bud germination. Meanwhile, it increased the expression abundance of proteins related to cell division, elongation and resistance, which promoted the germination of ratooning bud and enhanced the ability to resist adverse conditions. Therefore compared with those under non-fertilization treatment, living bud rate and length of the 2nd to the 5th ratooning bud were significantly higher in nitrogen application treatment. As a result, nitrogen application for bud development significantly improved effective panicle number, seed setting rate and grain yield of ratooning rice, which was aimed at getting high yield and significant improvement in ratooning rice production.

Keywords Rice; Ratooning bud; Nitrogen application for bud development; Protein expression; Grain yield

(Received Aug. 10, 2014; accepted Oct. 30, 2014)

再生稻有较大的增产潜力, 再生芽发苗、成穗多少直接影响再生稻单产的高低, 因而提高再生芽萌发成苗是培育高产再生稻的关键^[1-3]。现在研究认为水稻再生力是个复杂的数量遗传性状, 其萌发生长过程是遗传和环境共同作用的结果^[4]。众多研究表明再生芽的萌发生长与生态环境有密切关系, 其中促芽肥能强烈地调控再生芽的萌发生长, 并对促芽肥调控再生芽萌发生长进行了生理生态特性研究^[5-6], 但对再生芽萌发生长过程以及外界环境调控再生芽萌发生长的分子机制仍有待进一步研究。因此, 为进一步提高再生稻产量, 需要加强再生芽萌发生长调控过程的机理研究。本研究应用差异蛋白质组学的方法和技术, 并借助生物信息学技术, 研究再生季不同促芽肥水平调控再生芽萌发生长的蛋白质差异表达特性, 为实现再生稻高产稳产、促进再生稻的大面积推广提供理论依据和实践指导。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验于 2011 年 4—10 月在福建农林大学教学农田进行, 供试材料为福建省三明市农业科学研究所选育的杂交稻组合‘ 优 1273’。试验地土壤为沙壤土, 含全氮 2.36 g·kg⁻¹、速效氮 173.6 mg·kg⁻¹、全磷 1.18 g·kg⁻¹、有效磷 118.6 mg·kg⁻¹、全钾 1.12 g·kg⁻¹、速效钾 328.9 mg·kg⁻¹, pH 5.6。试验设两种处理(FT, NT), FT 处理: 头季齐穗后 18 d 施促芽肥尿素 300 kg·hm⁻², 割后 3 d 施壮苗肥尿素 75 kg·hm⁻²; NT 处理: 头季齐穗后 18 d 不施促芽肥, 割后 3 d 施壮苗肥尿素 75 kg·hm⁻²。每个处理设 3 个小区, 每个小区面积 16 m², 3 月 25 日播种, 5 月 3 日移栽, 插植规格为 16.5 cm×19.8 cm, 7 月 8 日齐穗, 8 月 13 日成熟。再生季稻 9 月 16 日

齐穗, 10 月 15 日成熟。两个处理头季稻农事操作相同, 各处理小区周边以砖块砌成水泥田埂, 防止肥、水流失及相互渗漏。

1.2 取样

于头季齐穗后 18 d 促芽肥施用当天、促芽肥施后 7 d、促芽肥施后 14 d 每处理分别取倒 3 节再生芽, 置于液氮中保存, 用于蛋白质的提取。

1.3 产量及其构成调查

再生季成熟时每小区调查 50 丛穗数, 并取 5 丛稻株考种。

1.4 再生芽芽长和活芽率

于头季收刈时每处理取 10 株稻株, 按节位分解为倒 2 芽、倒 3 芽、倒 4 芽、倒 5 芽, 用软尺分别测量各节位再生芽芽长并计算各节位活芽率。

1.5 蛋白质样品的制备

取 1 g 水稻再生芽样品, 液氮研磨成粉, 加入预冷的 10%三氯乙酸(TCA)抽提液(10%TCA, 90%丙酮, 0.07%巯基乙醇), 重悬沉淀, -20 °C 沉淀过夜。4 °C 下 18 000 r·min⁻¹ 离心 25 min, 弃上清, 沉淀用预冷的丙酮(含 0.07%巯基乙醇)重悬, 于 -20 °C 静置 2 h; 重复该步骤 2~3 次, 直至上清液澄清。4 °C 下 18 000 r·min⁻¹ 离心 25 min, 弃上清, 真空干燥, 所得的蛋白干粉于 -20 °C 保存待用。取 50 mg 蛋白干粉加入 500 μL 蛋白裂解液(含 7 mol·L⁻¹ 尿素, 2 mol·L⁻¹ 硫脲, 5%CHAPS, 2%巯基乙醇, 5% pH3.5~10 两性电解质), 于超声波清洗器中 25 °C 超声处理 30 min。4 °C 下 15 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清, 用于蛋白定量以及后续的双向电泳试验。蛋白定量采用 Bradford 方法^[7]进行。

1.6 双向电泳(2-DE)

双向电泳采取自制的管胶技术进行^[8]。一向聚焦

采用 18 cm 自制管状胶条, 蛋白上样总量为 150 μg 。聚焦程序如下: 200 V、300 V、400 V、500 V、600 V、800 V 各 30 min, 1 000 V 16 h, 1 100 V 6 h。聚焦温度 28 $^{\circ}\text{C}$ 。一向聚焦完成后, 取出胶条加入平衡液(60 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCL pH 6.8, 2% SDS, 5% 巯基乙醇, 10% 甘油, 0.05% 溴酚蓝)平衡 30 min, 立即进行第 2 向 SDS-PAGE。凝胶规格为 180 $\text{mm}\times 180\text{ mm}\times 1.5\text{ mm}$, 分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 5%。采用 20 mA/每板胶恒流电泳, 温度 15 $^{\circ}\text{C}$, 待溴酚蓝距底部 1 cm 即可停止电泳。凝胶染色采用硝酸银染色法。

1.7 蛋白质图谱分析及差异点的确定

染色后采用 Umax powerlook 扫描仪进行扫描, 构建蛋白表达图谱。图谱分析采用 ImageMaster 5.0 软件进行, 人工去除杂点后进行蛋白点的匹配分析, 当蛋白质点间表达丰度值差异大于 1.5 倍时, 认为该蛋白点具有显著性差异。

1.8 质谱分析

挖取差异蛋白点, 送复旦大学蛋白质组学研究中心进行串联质谱(ESI-Q MS/MS)分析。

2 结果与分析

2.1 再生芽萌发生长过程蛋白质表达图谱的构建与比较分析

经双向电泳得到施促芽肥 FT 处理和未施促芽肥 NT 处理的再生芽蛋白质表达 2D 图谱, 通过 Imagemaster 2D Elite 5.0 图像分析软件对 FT 处理和 NT 处理施用促芽肥后 0 d、7 d 和 14 d 的再生芽电泳图谱(图 1)进行分析, 共得到 20 个既在再生芽萌发生长不同时期发生变化又在 2 个不同促芽肥水平下出现差异表达的蛋白质点, 分别标号为 1 到 20(图 1)。

2.2 再生芽差异表达蛋白质的质谱鉴定及功能分析

将 20 个差异蛋白点从 2D 胶上切取, 酶解, 进行 MALDI-TOF/MS 鉴定分析, 共有 14 个差异蛋白质点得到鉴定, 质谱分析所得数据通过 Matrix Science (Matrix Science, London, UK)网站(<http://www.matrixscience.com>)提供的 MASCOT 软件(http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)进行查询, 结果见表 1。依据功能可将 14 个蛋白质划分为以下几个类群: 能量代谢相关差异蛋白点 3 个, 分别为核苷二磷酸激酶(spot3)、推定的光系统放氧复合蛋白(spot8)和细胞色素 b6/f 复合体铁硫蛋白(spot20); 生长相关差异蛋白点 6 个, 分别为翻译调控肿瘤蛋白(spot 2)、肌动蛋白解聚因子(spot 4)、类萌发素蛋白(spot 5、6、7)和脱落酸/干旱诱导蛋白(spot9); 抗性相关差异蛋白点 5 个, 分别为推定的苯醌氧化还原酶(spot 10、11)、铜-锌超氧化物歧化酶

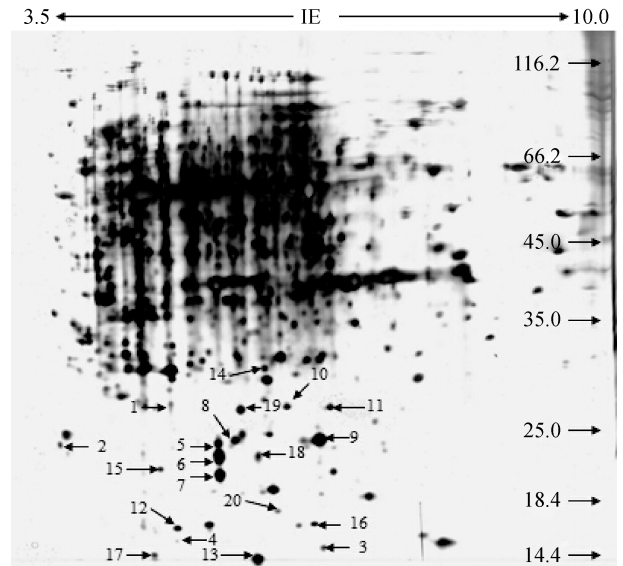


图 1 施与未施促芽肥处理下水稻再生芽萌发生长过程中蛋白表达图谱

Fig. 1 2-DE map of protein expression of rice ratooning buds during differentiation and growth with and without nitrogen fertilization for bud development

箭头标注的 1~20 为既在再生芽萌发生长不同时期又在 2 个不同促芽肥水平下出现差异表达的蛋白质点。Differentially regulated protein spots in response to different phases and different fertilization treatments during ratooning bud germination are indicated with arrows numbered with 1 to 20.

(spot 12)和植物病原应答诱导蛋白(spot 13、17)。

2.3 促芽肥对不同节位再生芽芽长和活芽率的影响

再生芽发苗、成穗的多少, 直接影响再生稻产量的高低。表 2 显示, 至头季成熟期, 再生季施用促芽肥 FT 处理的倒 2 至倒 5 芽再生芽芽长比未施用促芽肥 NT 处理的倒 2 至倒 5 五芽长 58.21%、21.93%、81.83%、160.25%, 再生芽活芽率高 15.43%、13.61%、51.49%、136.53%, 各节位芽长和活芽率差异达极显著水平; 表明促芽肥能够显著提高倒 2 至倒 5 各节位再生芽的活芽率, 尤其是倒 4 芽和倒 5 芽的活芽率, 并能极显著促进倒 2 芽至倒 5 芽的生长。

2.4 促芽肥对再生季稻产量及其构成因素的影响

由表 3 可知, 施用促芽肥处理的再生季水稻产量为 7 938.09 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$, 比未施用促芽肥处理的再生季水稻产量(4 021.95 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$)高 97.37%, 差异达极显著水平。进一步分析还可看出, 在再生季稻产量构成因子中, FT 处理的千粒重和每穗粒数与 NT 处理的基本相近, 两者的差异未达显著水平; FT 处理的单位面积有效穗和结实率为 552.9 穗 $\cdot\text{m}^{-2}$ 和 89.67%, 比 NT 处理(291.5 穗 $\cdot\text{m}^{-2}$ 、86.37%)高 89.67%和 3.82%, 差异达极显著和显著水平。可见, 促芽肥对再生稻产量有显著影响, 主要是因为施促芽肥显著提高了单位面积有效穗数和结实率, 实现穗多粒饱, 其中单位面积有效穗的增加对增产的贡献最大。

表 1 再生季不同促芽肥处理下水稻再生芽生长过程中差异表达蛋白质点的质谱鉴定结果

Table 1 Identification of differential expressed protein spots in rice ratooning buds by ESI-Q MS/MS and database searching under different fertilization treatments during bud development

| 编号 Spot No. | 登陆号 Accession No. | 鉴定的蛋白质名称 Protein identification | 分子量 Molecular weight (D) | 等电点 Isoelectric point | 得分 Score | 蛋白质分数 Protein score (%) |
|-------------------|-------------------------|--|--------------------------------|-----------------------------|-------------|-------------------------------|
| 2 | P35681 | 翻译调控肿瘤蛋白 Translationally-controlled tumor protein homolog | 18 934.4 | 4.51 | 294 | 100.00 |
| 3 | Q7XC37 | 核苷二磷酸激酶 Nucleoside diphosphate kinase | 16 768.8 | 6.85 | 94 | 100.00 |
| 4 | Q84TB3 | 肌动蛋白解聚因子 Actin-depolymerizing factor | 15 936.0 | 5.72 | 182 | 100.00 |
| 5 | Q9SAZ9 | 类萌发素蛋白 Germin-like protein | 21 846.2 | 6.01 | 138 | 100.00 |
| 6 | Q9SAZ9 | 类萌发素蛋白 Germin-like protein | 21 846.2 | 6.01 | 126 | 100.00 |
| 7 | Q9SAZ9 | 类萌发素蛋白 Germin-like protein | 21 846.2 | 6.01 | 154 | 100.00 |
| 8 | Q8GTK4 | 推定的光系统 放氧复合蛋白 Probable photosystem oxygen- evolving complex protein | 26 922.7 | 8.66 | 214 | 100.00 |
| 9 | Q53JF7 | 脱落酸/干旱诱导蛋白 ABA/WDS induced protein | 15 455.5 | 6.20 | 179 | 100.00 |
| 10 | Q8LQN2 | 推定的苯醌氧化还原酶 Putative quinone-oxidoreductase QR2 | 21 690.8 | 6.06 | 96 | 99.99 |
| 11 | Q8LQN2 | 推定的苯醌氧化还原酶 Putative quinone-oxidoreductase QR2 | 21 690.8 | 6.06 | 104 | 100.00 |
| 12 | P93407 | 铜-锌超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase [Cu-Zn] | 21 287.9 | 5.79 | 399 | 100.00 |
| 13 | Q2R011 | 植物病原应答诱导蛋白 Dirigent-like- protein | 16 592.5 | 5.82 | 201 | 100.00 |
| 17 | Q2R0H3 | 植物病原应答诱导蛋白 Dirigent-like- protein | 17 454.0 | 5.37 | 154 | 100.00 |
| 20 | Q69S39 | 细胞色素 b6/f 复合体铁硫蛋白 Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit | 23 869.2 | 8.54 | 82 | 99.96 |

编号为图 1 中箭头标注的编号。Spot No. is the number indicated with arrow in the figure 1.

表 2 水稻再生季不同促芽肥水平对再生芽成活与生长的影响

Table 2 Effects of different treatments of fertilization for bud development on living bud rate and growth of ratooning buds of rice

| 再生芽 Ratooning bud | 再生芽芽长 Length of ratooning buds (cm) | | 活芽率 Living rationing bud rate (%) | |
|------------------------|-------------------------------------|--------------|-----------------------------------|--------------|
| | FT | NT | FT | NT |
| 倒 2 芽 2nd bud from top | 22.53±1.03Aa | 14.24±0.87Bb | 96.97±0.58Aa | 84.01±0.36Bb |
| 倒 3 芽 3rd bud from top | 13.01±0.43Aa | 10.67±0.41Bb | 81.82±0.32Aa | 72.02±0.39Bb |
| 倒 4 芽 4th bud from top | 9.26±0.57Aa | 5.09±0.38Bb | 78.79±1.38Aa | 52.01±1.67Bb |
| 倒 5 芽 5th bud from top | 14.34±1.79Aa | 5.51±0.49Bb | 75.76±1.43Aa | 32.03±1.27Bb |

FT: 施促芽肥; NT: 未施促芽肥; 下同。FT: nitrogen fertilization for ratooning bud development; NT: non-fertilization for ratooning bud development. The same below.

表 3 不同促芽肥水平下再生季稻产量及其构成因素

Table 3 Grain yield and its components of ratooning rice under different treatments of fertilization for bud development

| 处理 Treatment | 单位面积穗数 Spikes per unit area (spike·m ⁻²) | 每穗粒数 Grains per spike | 结实率 Seed setting rate (%) | 千粒重 1000-grain weight (g) | 产量 Yield (kg·hm ⁻²) |
|-----------------|---|--------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| FT | 552.90±60.30Aa | 61.70±8.00Aa | 89.67±1.00Aa | 25.95±0.67Aa | 7 938.09Aa |
| NT | 291.50±30.30Bb | 61.30±9.00Aa | 86.37±1.13Ab | 26.06±0.58Aa | 4 021.95Bb |

2.5 促芽肥对不同时期再生芽差异蛋白质点表达丰度的影响

施用促芽肥引起的再生芽伸长速度和萌发成穗率的变化或产生的影响是通过生命功能的执行者——蛋白质来体现的,其表达量的变化与其参与特定生理和生态条件下组织的细胞功能、代谢活动直接相关。

2.5.1 能量代谢相关蛋白

再生芽的萌发生长过程是一个细胞不断分裂、生长、分化的过程,这个过程需要能量的参与。本研究中共鉴定到 3 个参与能量代谢的蛋白质(图 2),其中核苷二磷酸激酶(spot3)蛋白表达量随着再生芽的分化生长呈下降趋势,但 FT 处理的再生芽中核苷

二磷酸激酶蛋白表达量较同时期 NT 处理的下降幅度较小;光系统 放氧复合体(spot8)和细胞色素 b6/f 复合体蛋白(spot20)表达量均随着再生芽的萌发生长呈上升趋势,FT 处理的光系统 放氧复合体(图 3)和细胞色素 b6/f 复合体蛋白表达量上调幅度明显高于 NT 处理。

2.5.2 生长相关蛋白

再生稻是由头季稻母茎上的休眠芽在条件适宜的情况下萌发生长而成的,这个过程是一个抑制休眠和解除休眠相互作用的复杂生长过程。本研究鉴定到的 14 个差异蛋白点中,有 6 个是与生长相关的蛋白(图 4),可见促芽肥调控对再生芽的萌发生长影

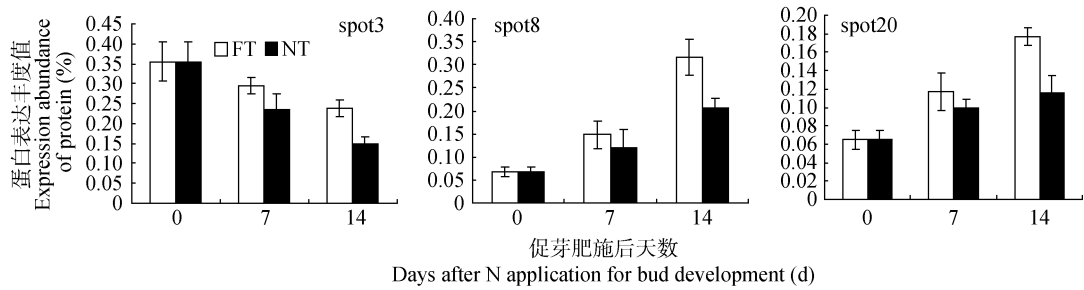


图 2 不同促芽肥处理下水稻再生芽能量代谢相关差异蛋白表达丰度

Fig. 2 Expression of proteins involving energy metabolism in rice rationing buds under different treatments of fertilization for bud development

spot3: 核苷二磷酸激酶; spot8: 光系统 放氧复合体; spot20: 细胞色素b6/f复合体蛋白。spot3: nucleoside diphosphate kinase; spot8: probable photosystem oxygen-evolving complex protein; spot20: cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit.

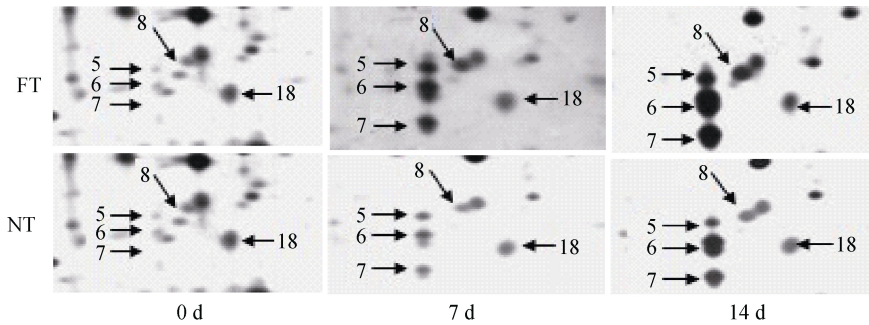


图 3 不同促芽处理下水稻再生芽相关蛋白表达变化图

Fig. 3 Expression maps of some proteins in rice rationing buds under different treatments of fertilization for bud development

响较大。其中翻译调控肿瘤蛋白(spot 2)在再生芽萌发生长过程中表现为前期较高,而后随着再生芽的萌发生长而逐渐下调, FT 处理的下调幅度明显小于 NT 处理;肌动蛋白解聚因子蛋白(spot4)表达量 FT 处理下再生芽萌发生长过程中呈下降趋势, NT 处理则呈先略增加而后下降的变化趋势;类萌发素蛋白(spot5、6、7)(图 3, 图 4)表达量在再生芽萌发生长

过程中呈上升趋势,但 FT 处理和 NT 处理在不同时期的上调幅度不同,施用促芽肥后 7 d, FT 处理的小于 NT 处理,施用促芽肥后 14 d, FT 处理的大于 NT 处理的;脱落酸诱导蛋白(spot 9)表达量在再生芽分化生长期间表现为前期较低,而后随着再生芽的萌发生长而逐渐上调,但 FT 处理的上调幅度明显小于 NT 处理。

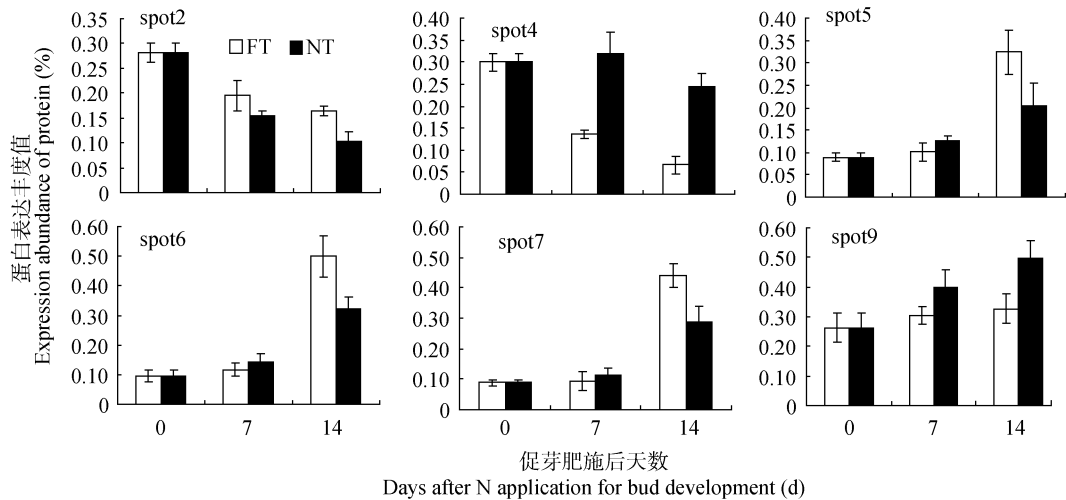


图 4 不同促芽肥处理下水稻再生芽生长相关差异蛋白表达丰度

Fig. 4 Expression of proteins involving cellular growth in rice rationing bud under different treatments of fertilization for bud development

Spot2: 翻译调控肿瘤蛋白; spot4: 肌动蛋白解聚因子; spot5、6、7: 类萌发素蛋白; spot 9: 脱落酸诱导蛋白。Spot2: translationally-controlled tumor protein homolog; spot4: actin-depolymerizing factor; spot5, 6, 7: germin-like protein; spot 9: ABA/WDS induced protein.

2.5.3 抗性相关蛋白

再生芽萌发生长处于头季稻后期衰老阶段, 本研究中鉴定到 5 个与抗性相关的蛋白。由图 5 可知, 在再生芽分化生长期, 苯醌氧化还原酶(spot10、11)、铜-锌超氧化物歧化酶蛋白(spot12)表达量均表现为前期较低, 而后随着再生芽的萌发生长而逐渐

上调; 植物病原应答诱导蛋白(spot13、17)在施用促芽肥后 0 d、7 d 时未表达, 在施用促芽肥后 14 d 时才表达。同一时期不同施肥处理再生芽 5 个蛋白表达量上升幅度不同, 同一时期 FT 处理的苯醌氧化还原酶、铜-锌超氧化物歧化酶、植物病原应答诱导蛋白表达量上升幅度均大于 NT 处理。

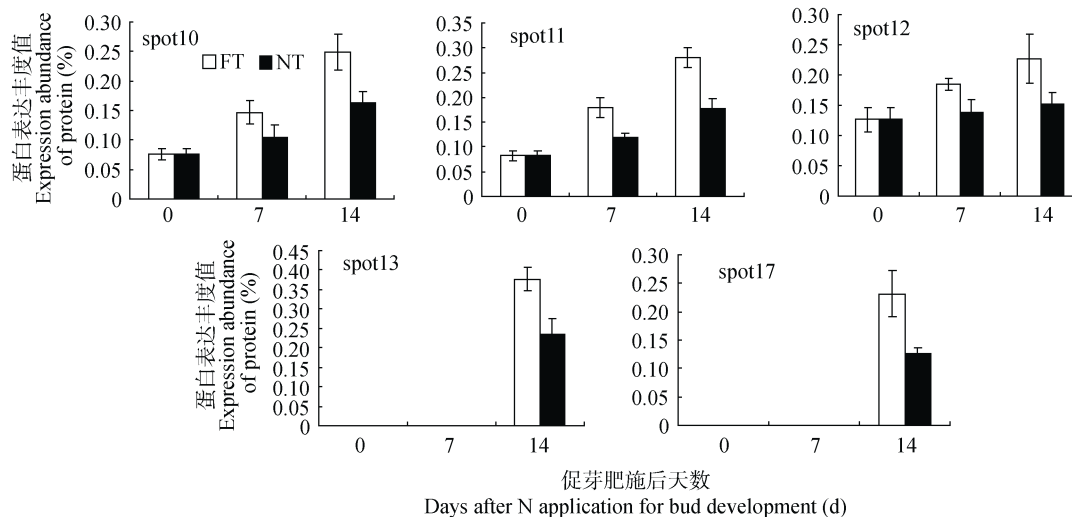


图 5 不同促芽肥处理下再生芽抗性相关差异蛋白表达丰度

Fig. 5 Expression of proteins involving resistance in rice regrowth bud under different treatments of fertilization for bud development
Spot10、11: 苯醌氧化还原酶; spot12: 铜-锌超氧化物歧化酶蛋白; spot13、17: 植物病原应答诱导蛋白。Spot10、11: putative quinone-oxidoreductase QR2; spot12: superoxide dismutase [Cu-Zn]; spot13、17: dirigent-like-protein.

3 结论与讨论

再生稻是利用水稻的再生特性, 采用一定的栽培管理措施, 在头季稻收割后利用稻桩上的休眠芽萌发生长成穗而收割的一季水稻。再生芽的萌发生长过程首先是一个抑制休眠和解除休眠相互作用的复杂生长过程, 内源激素在再生芽解除休眠萌发生长过程中起着重要作用。脱落酸是一种具有倍半萜结构的植物激素, 具有促进脱落、抑制生长、促进休眠、引起气孔关闭等生理功能, 在腋芽生长分化后期, ABA 和腋芽的生长速度有很强的负相关性^[9-11]。脱落酸诱导蛋白是受脱落酸诱导产生的蛋白, 其表达量与植物体内的脱落酸含量有着密切的关系, 本试验中发现脱落酸诱导蛋白(spot9)表达量随着再生芽萌发生长呈上升趋势, 这可能与头季稻植株随着灌浆进程的进行而加速衰老有关; 但施用促芽肥处理的上调幅度明显小于未施用促芽肥处理。说明施用促芽肥能减少脱落酸含量, 从而减少脱落酸诱导蛋白的表达量, 解除休眠, 促进再生芽的萌发生长。

解除休眠后的再生芽生长是一个细胞不断分裂、生长、分化的过程。凌启鸿等^[12]研究认为前季稻抽穗到成熟期, 母茎秆上的潜伏芽已处于幼穗分化, 可见, 解除休眠后的再生芽是个营养生长与生

殖生长并行的阶段, 植物的生长和新器官组织的形成需要大量的能量和新物质的合成。核苷二磷酸激酶(spot3)参与植物体内能量 ATP 的合成运转^[13-15], 同时在细胞核苷酸合成、相关蛋白生物合成、脂质合成及多聚糖合成方面也有重要的作用。随着再生芽生长分化的进行, 该蛋白在再生芽中的表达量也逐渐下调, 这与再生芽的生长过程是一致的, 前期细胞需要不断的生长分化形成新的器官组织, 需要较多的能量和新物质, 新器官组织形成后其对能量和物质的需求也相对的减少; 但 FT 处理的再生芽中核苷二磷酸激酶蛋白表达量较同时期 NT 处理的下降幅度较小, 说明施用促芽肥能相对提高再生芽核苷二磷酸激酶表达量, 从而使其具有相对较强的能量合成能力, 可以更好地满足再生芽分化生长对能量的需求。放氧复合体和细胞色素 b6/f 复合体主要存在于类囊体膜上, 分别参与光化学反应中的水氧化放氧和循环电子传递, 是光化学反应的组成成员, 该反应可将光能转化为化学能。本研究鉴定到的光系统 放氧复合体(spot8)和细胞色素 b6/f 复合体蛋白(spot20)表达量均随着再生芽的生长呈上升趋势, 说明随着再生芽的萌发生长其自身逐渐具备了光合能力, 由异养逐步转向自养, 施用促芽肥处理的这 2 个蛋白表达量的上调幅度明显高于未施促

芽肥处理,说明施用促芽肥可以提高光系统Ⅱ-放氧复合体和细胞色素 b6/f 复合体蛋白表达量,促进再生芽内光合系统的分化形成,从而使其较未施用促芽肥处理的具有更强的光合自养能力,在再生芽生长露出母茎叶鞘后更有利于形成大量的光合能量用于碳同化,为再生芽的分化生长提供物质和能量基础,促进其萌发生长成穗。

细胞的分裂分化是植物体形态和结构建成的基础,翻译调节肿瘤蛋白(spot2)是一个在物种间高度保守、广谱表达和多功能的蛋白质,参与细胞内许多重要的生理过程,不仅具有调节细胞骨架的动态变化和调节细胞的生长与增殖的作用;还具有组胺释放、抗凋亡、调节细胞周期、干细胞分化和微管结合以及抗疟疾等功能^[16]。随着再生芽生长分化的进行,该蛋白在再生芽中的表达量逐渐下调,但施用促芽肥处理的下调幅度明显小于未施用促芽肥处理,说明施用促芽肥能促进再生芽生长过程细胞的分裂和分化。肌动蛋白是真核生物细胞中普遍存在的一种重要的蛋白质,构成细胞骨架中的微丝系统。肌动蛋白骨架对植物高度特异化的细胞如花粉管、根毛、叶毛和气孔保卫细胞的形态发生和功能起着重要作用,同时在高等植物形态发生的细胞分裂和伸长过程中起着关键的调节作用^[17]。肌动蛋白行使其生物学功能需要一系列肌动蛋白结合蛋白维持其正常生理状态^[18-19],而肌动蛋白生理活动本身又受肌动蛋白解聚因子在内的众多结合蛋白调控^[20]。肌动蛋白解聚因子解聚和切割肌动蛋白,肌动蛋白解聚因子的过表达会破坏肌动蛋白的动态平衡,从而影响植物正常生长。本试验中鉴定到的肌动蛋白解聚因子(spot4)表达量随着再生芽的生长呈下调趋势,但施用促芽肥处理的下调幅度明显大于未施用促芽肥处理,说明施用促芽肥能明显降低肌动蛋白解聚因子蛋白表达量,提高再生芽内肌动蛋白含量,促进再生芽分化过程的细胞分裂和伸长。类萌发素蛋白(spot5、6、7)是植物中普遍存在的一类与小麦萌发素序列高度相似、位于胞外基质的可溶性糖蛋白,具有草酸氧化酶(OxO)活性, OxO 降解草酸产生 H₂O₂ 和 CO₂, 同时引起 Ca²⁺的释放^[21], 这些小而快速扩散的分子在低浓度时可作为信号或第二信使;高浓度时,可调节细胞壁聚合体的交联。此外,由于 OxO 可以被病原菌^[22-23]、盐胁迫^[24]、重金属离子^[25]等因子所诱导,因此,它不仅调节了植物特定的生长发育过程,而且也参与了植物对生物及非生物胁迫的抗性反应,具有促进细胞壁的形成和加固、抵御生物和非生物环境胁迫的作用。在再生芽萌发生

长过程中该蛋白表达量呈上升趋势,但 FT 处理和 NT 处理在不同时期的上调幅度不同,施用促芽肥后 7 d, FT 处理的小于 NT 处理,施用促芽肥后 14 d, FT 处理的大于 NT 处理。说明施用促芽肥能降低再生芽分化生长前期类萌发素蛋白表达量,抑制细胞壁的形成和加固,促进再生芽的萌发伸长,至再生芽萌发生长后期又能提高再生芽类萌发素蛋白表达量,促进细胞壁的形成和加固,提高再生芽抵御生物和非生物环境的胁迫,从而有利于再生芽的萌发成苗。

再生芽萌发生长处于头季稻后期,稻株机能开始加速衰老,体内活性氧清除能力下降,导致氧化代谢失调,积累了过量的活性氧,而活性氧伤害是导致再生芽死亡的主要原因^[26]。铜-锌超氧化物歧化酶属于植物抗氧化系统蛋白,是生物防御活性氧毒害的关键保护酶,具有清除自由基的作用,对于维持细胞膜的结构和功能具有重要的作用^[27];苯醌氧化还原酶能清除细胞有毒物质醌,减少活性氧的产生,保护细胞免受氧化胁迫的损伤^[28];植物病原应答蛋白参与木质素的形成,与植物体的病菌防御有关,植物病原应答诱导蛋白的表达量与植物病原应答蛋白含量有密切关系。本试验鉴定到的苯醌氧化还原酶(spot10、11)、铜-锌超氧化物歧化酶(spot12)蛋白表达量在再生芽分化生长期间呈上升趋势,植物病原应答诱导蛋白(spot13、17)在施用促芽肥后 0 d、7 d 时未表达,在施用促芽肥后 14 d 时才表达;不同施肥处理下不同时期 3 个蛋白表达量上升幅度不同,同一时期 FT 处理的 3 个蛋白表达量上升幅度大于 NT 处理。说明施用促芽肥能相对提高再生芽中抗性相关蛋白的表达,清除灌浆后期随着植株衰老体内显著增加的活性氧,增强再生芽抵御外界生物和非生物胁迫的能力,提高对各种不良环境的适应性,从而有利于再生芽的早生快发。

综上所述,水稻再生芽的萌发生长是一个复杂的涉及众多代谢途径的综合过程,是众多参与生理功能蛋白质发生质或量的变化共同作用的结果。关于促芽肥对再生芽萌发生长的影响,前人较多的从生理生态(如干物质积累分配、根系活力、光合相关生理指标、保护酶系相关指标等)进行了研究,但由于无法深入涉及水稻再生芽生长分化的代谢途径而无法深入揭示促芽肥调控再生芽萌发生长的机理。本研究应用蛋白质组学技术,对促芽肥调控下水稻再生芽蛋白质表达特性进行分析,检测到 20 个蛋白点出现差异表达,其中 14 个蛋白点得到鉴定,涉及再生芽萌发生长过程的能量代谢、生长调控和抗逆响应等,在其他栽培措施一致的情况下,

施用促芽肥能有效地降低再生芽萌发生长过程中能量代谢相关蛋白的下调幅度,提高光合相关蛋白的表达,从而使再生芽具有相对较强的能量合成能力和较强光合自养能力,更好地满足再生芽分化生长对能量和物质的需求;还能相对降低抑制再生芽萌发生长相关蛋白的表达,促进再生芽分化过程细胞分裂和伸长相关蛋白和抗性相关蛋白的表达,促进再生芽的萌发生长,增强再生芽抵御外界生物和非生物胁迫的能力,提高对各种不良环境的适应性,显著提高了其倒 2 芽至倒 5 芽各节位再生芽的活芽率和芽长,尤其是低节位的倒 4 芽和倒 5 芽,从而显著提高了再生季的单位面积有效穗数和产量,实现了再生季的高产增产。本研究结果在一定程度上丰富了促芽肥调控水稻再生芽生长分化的研究内容,从蛋白质组学层面揭示了促芽肥调控水稻再生芽生长分化的机理,可为进一步的相关研究提供理论依据。

参考文献

- [1] 刘保国,王光明,陈静,等. 促芽肥影响水稻再生芽萌发的生理系列化基础[J]. 西南农业学报, 1998, 11(水稻栽培专辑): 41-47
- [2] 任天举,头季后期营养器官碳水化合物含量对再生稻的影响[J]. 西南农业学报, 1993, 6(2): 32-37
- [3] 李经勇,任天举,唐永群. 赤霉素、植物细胞分裂素对再生稻的增产效应[J]. 西南农业学报, 1997, 10(2): 26-31
- [4] HilleRisLambers D. Varietal improvement for rice ratooning: Traits, procedures, collaboration in rice ratooning[C/OL]. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1988. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PH8911379>
- [5] 姜照伟,林文雄,李义珍,等. 不同氮肥施用量对再生稻干物质积累运转的影响[J]. 福建农业学报, 2004, 19(2): 103-107
- [6] 黄育民,李义珍,蔡亚港,等. 再生稻丰产技术研究. 再生稻株对促芽肥的吸收积累[J]. 福建稻麦科技, 1995, 13(3): 45-47
- [7] 夏其昌,曾嵘. 蛋白质化学与蛋白质组学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 278
- [8] 王经源,陈舒奕,林文雄,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] Klee H, Estele M. Molecular genetic approaches to plant hormone biology[J]. Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1991, 42: 529-551
- [10] Medford J I, Horgan R, El-Sawi Z, et al. Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene[J]. Plant Cell, 1989, 1(4): 403-413
- [11] Romano C P, Cooper M L, Klee H J. Uncoupling auxin and ethylene effects in transgenic tobacco and *Abidopsis* plants[J]. Plant Cell, 1993, 5(2): 181-189
- [12] 凌启鸿,苏祖芳,侯康平,等. 水稻潜伏芽生长和穗分化形成规律及其应用研究[J]. 中国农业科学, 1989, 22(1): 35-43
- [13] Hasunuma K, Yabe N, Yoshida Y, et al. Putative functions of nucleoside diphosphate kinase in plants and fungi[J]. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2003, 35(1): 57-65
- [14] Kimura N. Nucleoside diphosphate kinases: Genes and protein functions[J]. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2003, 35(1): 3-4
- [15] Lascu I, Gonin P. The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases[J]. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2000, 32(3): 237-246
- [16] Leung K C, Li H Y, Mishra G, et al. ACBP4 and ACBP5, novel *Arabidopsis* acyl-CoA-binding proteins with kelch motifs that bind oleoyl-CoA[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 55(2): 297-309
- [17] Kost B, Lemiche E, Chua N H. Cytoskeleton in plant development[J]. Current Opinion in Plant Biology, 1999, 2(6): 462-470
- [18] Ayscough K R. In vivo functions of actin-binding proteins[J]. Current Opinion in Cell Biology, 1998, 10(1): 102-111
- [19] McCurdy D W, Kovar D R, Staiger C J. Actin and actin binding proteins in higher plants[J]. Protoplasma, 2001, 215(1/4): 89-104
- [20] Chen C Y, Wong E I, Vidali L, et al. The regulation of actin organization by actin depolymerizing factor in elongating pollen tubes[J]. Plant Cell, 2002, 14(9): 2175-2190
- [21] Lane B G, Dunwell J M, Ray J A, et al. Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(17): 12239-12242

- [22] Zhang Z, Collinge D B, Thordal-Christensen H. Germin-like oxalate oxidase, a H_2O_2 -producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus[J]. *The Plant Journal*, 1995, 8(1): 139–145
- [23] Hurkman W J, Tanaka C K. Germin gene expression is induced in wheat leaves by powdery mildew infection[J]. *Plant Physiology*, 1996, 111(3): 735–739
- [24] Singh S, Thakur M, Malik V, et al. Influence of NaCl stress on oxalate oxidase activity in germinating seeds of forage sorghum hybrid[J]. *Indian Journal of Plant Physiology*, 1998, 3(4): 317–319
- [25] Berna A, Bernier F. Regulated by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H_2O_2 -producing enzyme[J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 39(3): 539–549
- [26] 张志刚, 王光明, 刘保国, 等. 活性氧代谢与再生芽萌发的关系[J]. *西南农业大学学报*, 2000, 22(1): 14–16
- Zhang Z G, Wang G M, Liu B G, et al. Relationship between activated oxygen metabolism and germination of ratooning buds in rice[J]. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2000, 22(1): 14–16
- [27] 王彦荣, 华泽田, 陈温福, 等. 粳稻根系与叶片早衰的关系及其对籽粒灌浆的影响[J]. *作物学报*, 2003, 29(6): 892–898
- Wang Y R, Hua Z T, Chen W F, et al. Relation between root and leaf senescence and their effects on grain-filling in Japonica rice[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2003, 29(6): 892–898
- [28] Laskowski M J, Dreher K A, Gehring M A, et al. FQR1, a novel primary auxin-response gene, encodes a flavin mononucleotide-binding quinone reductase[J]. *Plant Physiology*, 2002, 128(2): 578–590