

干旱处理对华北绣线菊和毛果绣线菊光合作用及相关蛋白表达的影响

刘计璇¹, 胡冰², 仇茜¹, 苏青¹, 张娇¹, 刘慧民^{1,*}

(¹东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030; ²大庆市花圃, 黑龙江大庆 163000)

摘要: 以抗旱力弱的毛果绣线菊与抗旱力强的华北绣线菊为试验材料, 采用不同程度干旱处理, 在测定其光合作用变化的基础上, 采用蛋白质组学技术研究两种绣线菊光合作用相关蛋白表达的变化。结果表明: 干旱胁迫两种绣线菊光合能力降低, 光补偿点和光饱和点降低, 说明利用弱光能力提高, 华北绣线菊适应弱光环境的能力强于毛果绣线菊。不同水平干旱处理分别鉴定出涉及能量代谢与运输的相关蛋白 20 种。干旱胁迫下毛果绣线菊中卡尔文循环途径相关酶、光系统 II 中多数放氧复合蛋白和捕光色素复合蛋白、参与光合磷酸化的酶发生显著上调和下调表达; 华北绣线菊中参与卡尔文循环代谢相关酶、PS I 中反应中心蛋白和参与光合电子传递的蛋白、PS II 中捕光色素复合蛋白、参与光合磷酸化与氧化磷酸化的蛋白发生明显的上调和下调表达。干旱胁迫使抗旱力不同的毛果绣线菊和华北绣线菊光合作用相关蛋白均受到影响, 毛果绣线菊中多是能量代谢相关蛋白发生显著变化, 华北绣线菊中多是能量运输相关蛋白发生显著变化。

关键词: 绣线菊; 干旱处理; 光合作用; 光合作用相关蛋白; 光合能力

中图分类号: S 685

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 05-0917-13

Effects of Drought Stress Treatments on Photosynthesis and Proteins Related to Photosynthesis of *Spiraea fritschiana* and *S. thichocarpa*

LIU Ji-xuan¹, HU Bing², ZHANG Qian¹, SU Qing¹, ZHANG Jiao¹, and LIU Hui-min^{1,*}

(¹College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; ²Daqing Flower Nursery, Daqing, Heilongjiang 163000, China)

Abstract: *Spiraea thichocarpa* Nakai with poor drought resistance and *S. fritschiana* Schneid with strong drought resistance were used as experimental materials under different levels of drought treatments. Proteomics technology was used for studying the changes of expressions of proteins related to photosynthesis of two *Spiraea* species which was on the basic of measuring the changes of photosynthesis. The results show that the photosynthetic capacities of two *Spiraea* species decreased under drought stress, light compensation point (LCP) and light saturation point (LSP) decreased, but their capacity of using weak light increased, *S. fritschiana* Schneid with stronger drought resistance showed a better ability of adapting weak light than that of *S. thichocarpa* Nakai. Twenty kinds of proteins related to photosynthesis involved

收稿日期: 2015-01-20; 修回日期: 2015-04-17

基金项目: 中国博士后基金面上项目 (415152); 黑龙江省博士后基金项目 (LBH-Z09288); 东北农业大学博士启动项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: liuhm0423@163.com)

in energy metabolism and transport were identified separately under different levels of drought treatments. In *S. thichocarpa* Nakai, the expressions included the enzymes in Calvin Cycle and photophosphorylation, the most oxygen-evolving complex proteins and the chlorophyll a/b binding proteins of photosystem II showed obvious up and down regulation under drought stress. While in *S. fritschiana* Schneid, the expressions included the enzymes in Calvin Cycle, the reaction center proteins and electron transport proteins of photosystem I, the chlorophyll a/b binding proteins of photosystem II, the proteins involved in photophosphorylation and oxidative phosphorylation also showed obvious up and down regulation under drought stress. The proteins related to photosynthesis of two *Spiraea* species were effected under drought stress. In *S. thichocarpa* Nakai, it was the proteins related to energy metabolism changed significantly. In *S. fritschiana* Schneid, it was the proteins related to energy transport changed significantly.

Key words: *Spiraea*; drought stress; photosynthesis; proteins related to photosynthesis; photosynthetic capacity

大量研究证明干旱胁迫对植物光合作用影响显著, 研究干旱胁迫下光合生理指标的变化成为揭示植物抗性机制的重点(付士磊等, 2006)。近年的研究认为干旱胁迫诱导蛋白的产生是植物对干旱环境的一种适应, 可提高植物的抗旱能力(颜华等, 2002)。干旱胁迫可引起蛋白种类和其表达量的变化, 分析这些蛋白在代谢途径中表达量的变化可一定程度说明植物的适应机制(Salekdeh et al., 2002)。许多研究发现干旱能诱导光合机构蛋白的变化, 进而使植物光合能力发生适应性变化(陆许可等, 2013)。Hajheidari等(2005)在甜菜叶片中鉴定了12个干旱胁迫蛋白, 这些蛋白主要参与光合作用、氧化还原调节、氧化胁迫和信号转导等, 并通过这些蛋白的表达量变化探讨了甜菜对干旱胁迫的响应机制。Xiao等(2009)对青杨(*Populus cathayana*)干旱胁迫45 d后鉴定了40个干旱胁迫蛋白, 这些蛋白参与光合作用、次生代谢、氧化还原调节和防御反应等代谢过程。Giuseppe等(2009)鉴定了21个小麦干旱胁迫蛋白, 这些蛋白涉及光合作用、碳水化合物和氨基酸生物合成、能量代谢和活性氧清除过程, 其中参与能量代谢的主要调节酶类, 如磷酸丙酮酸水合酶、磷酸丙糖异构酶和磷酸甘油酸激酶等表达量显著下调, 间接导致小麦光合作用下降, 而参与光合作用的Rubisco酶、ATP合酶 α 亚基和磷酸核酮糖激酶表达量均下调, 最终导致小麦光合能力下降。Tanja等(2013)研究菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)干旱胁迫蛋白质组学发现, 干旱胁迫下菜豆体内的能量代谢蛋白, 光合作用蛋白, ATP能量转换蛋白等相继发生不同的变化, 其中Rubisco酶在抗旱与非抗旱菜豆中均发生降解并且其大亚基、小亚基表达量分别下调; 磷酸核酮糖激酶、ATP合酶CF1 α 亚基表达量下调; 碳酸酐酶在抗旱与非抗旱菜豆中均上调表达, 氧化增强子蛋白、叶绿素a/b结合蛋白在抗旱性强的种类中上调表达; 发现干旱胁迫不仅影响蛋白表达的种类与丰度, 还促使植物合成新蛋白。Hajheidari等(2005)、Gazanchian等(2007)和Lehtimaki等(2010)的研究结果均表明干旱胁迫使植物表达诱导蛋白。

中国东北地处半干旱地区, 且园林绿化资源匮乏。绣线菊属(*Spiraea*)为蔷薇科(*Rosaceae*)植物, 种类丰富, 适应性强, 观赏价值高, 对绣线菊资源抗旱能力研究是其在干旱半干旱地区应用的关键。据张超(2008)报道华北绣线菊(抗旱生理指标隶属函数值为0.5672)抗旱能力强于毛果绣线菊(隶属函数值为0.4561)。本试验中以两种抗旱力不同的绣线菊为材料, 测定其在不同程度干旱胁迫下光合生理指标的变化, 并利用蛋白质组学技术研究光合机构蛋白的变化, 从蛋白质水平探讨抗旱机制, 为筛选抗旱绣线菊品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及干旱处理

以抗旱能力强的华北绣线菊 (*Spiraea fritschiana* Schneid) 和抗旱能力弱的毛果绣线菊 (*Spiraea trichocarpa* Nakai) 2 年生扦插苗为试验材料, 用普通园土钵 (13 cm × 13 cm) 栽于温室内, 常规栽培管理。当绣线菊钵苗生长高度达 15 ~ 20 cm、分枝数量达 3 ~ 5 条、叶片数达 20 ~ 30 枚以上时, 每种材料各取 200 钵, 随机分成 4 组, 每组 50 钵, 分别用于 4 个试验处理。

处理前对材料浇透水, 1 ~ 2 d 后, 利用 Delta-T 探针和 HH2 土壤湿度计 (英国) 测定土壤容积含水量, 当土壤容积含水量达到饱和水分状态的 40% ~ 50% 时, 将其中 1 组材料作为对照, 另 3 组材料进行控水干旱处理。当试验土壤容积含水量达到 30% ~ 35% (轻度干旱)、20% ~ 25% (中度干旱) 和 10% ~ 15% (重度干旱) 时, 分别保持 1 ~ 2 d (期间空气相对湿度 60% ~ 80%, 气温 22 ~ 33 °C) 后取材。达到每级干旱水平的试验材料分别取材后, 持续干旱处理直到达到下级干旱水平。控水干旱处理于 2012 年 5 月末—6 月间在东北农业大学园艺设施中心温室内进行, 持续 30 ~ 33 d。

1.2 取材及测定方法

从处理的每组 50 钵试验材料中随机选取 30 个单株, 按照对角线法随机采集位于中上部的当年生枝条上第 2 ~ 9 片生长最佳的叶片 6 ~ 9 g, 用液氮处理后保存于 -80 °C 冰箱待用; 同时按照对角线法随机选取 20 个植株测定中上部叶片的光合生理指标。每个处理均进行 3 次重复随机取样、平行样测定, 取平均值。

于晴朗微风天 9:00—11:30, 采用 LI-6400 便携式光合分析仪测定叶片净光合速率 (P_n), 叶室温度 20 ~ 29 °C, 相对湿度 60% ~ 69%, CO_2 浓度 360 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 。测定时采用光合仪的人工光源, 依次设定光合有效辐射 (PAR) 为 0、30、50、100、300、500、800、1 000、1 200、1 400、1 600、1 800、2 000 和 2 200 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 的光照梯度, 每处理重复测定 3 次。利用 Origin7.02 软件拟合绘制光响应曲线, 根据公式求得光饱和点 (LSP)、光补偿点 (LCP) 与净光合速率等。光响应曲线利用非线性方程进行拟合 (Murray, 1977)。

叶片蛋白质的提取、双向凝胶电泳、凝胶固定与染色、胶内酶解、MALDI-TOF-MS 质谱鉴定参照夏其昌和曾嵘 (2004)、Wu 等 (2013) 和 Liu 等 (2014) 的方法。

采用图像分析软件 ImageMaster2DELite 对蛋白图谱进行斑点检测、匹配, 查询和检索质谱数据库 NCBI nr 鉴定蛋白质。首先将同种绣线菊不同干旱处理的图谱与本种对照的图谱比较, 排除与干旱诱导无关的假阳性蛋白点的干扰, 再确定显著的差异点, 其次将相同干旱处理的两种绣线菊的蛋白质差异点再做比较, 确定与干旱处理相关的蛋白点。

2 结果与分析

2.1 干旱处理绣线菊光合生理指标变化

由图 1 分析, 干旱处理使 2 种绣线菊的最大光合速率、光饱和点、光补偿点均显著下降, 但下降幅度各不相同。轻度、中度和重度干旱处理的华北绣线菊光合速率下降幅度分别为 42.5%、55.1% 和 70.4%, 光补偿点降幅为 34.2%、47% 和 60.4%, 光饱和点降幅为 19.5%、46.6% 和 50.2%; 毛果

绣线菊光合速率下降幅度分别为 15.5%、22.8%和 64.8%，光补偿点降幅为 12.7%、23.3%和 28.8%，光饱和点降幅为 12.2%、26.3%和 33.7%。2 种绣线菊光合速率下降，说明光合能力降低；光补偿点下降，说明可在较低光强下保持一定光合能力，有助于维系正常生理功能（Falk et al., 1996）；光饱和点下降，说明利用弱光能力提高，在弱光下提高有机物积累满足正常代谢活动（张成军，2003；柯世省和金则新，2007）。华北绣线菊光合速率降幅显著大于毛果绣线菊，干旱处理对华北绣线菊光合能力影响显著。华北绣线菊光补偿点降幅显著大于毛果绣线菊，降至重度胁迫时已显著低于毛果绣线菊该水平的光补偿点，说明华北绣线菊低光强下光合能力强于毛果绣线菊。华北绣线菊光饱和点降幅显著大于毛果绣线菊，其中重度胁迫的光饱和点低于毛果绣线菊该水平的光饱和点，说明华北绣线菊低光强下的光合能力强于毛果绣线菊。东北干旱时节多发生在温度适中，光照不强的春秋季节，上述光合生理指标的分析说明，华北绣线菊更适应干旱弱光环境，华北绣线菊适应干旱弱光环境的能力强于毛果绣线菊。

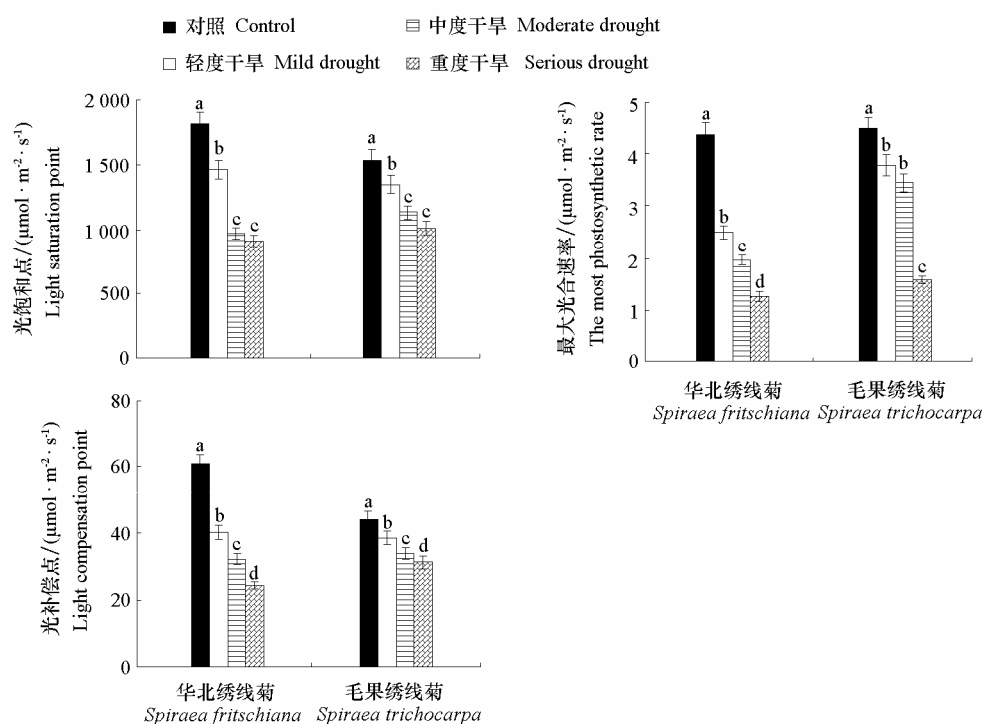


图 1 两种绣线菊不同干旱处理光合生理指标的变化

Fig. 1 The change of photosynthetic physiological indexes of two species of *Spiraea* Linn. with different drought stress treatments

2.2 干旱处理绣线菊光合作用相关蛋白电泳图谱变化

干旱胁迫 2 种绣线菊双向电泳图谱（图 2）表明：在华北绣线菊不同干旱水平的双向电泳图谱中，平均检测到 635 个蛋白点，在毛果绣线菊中平均检测到 573 个蛋白点，其中干旱胁迫表达量显著差异的蛋白点 66 个。在 66 个差异点中鉴定出光合作用相关蛋白 20 种，其中上调表达的蛋白点 8 个，新增 10 个蛋白点，下调表达的蛋白点 9 个。

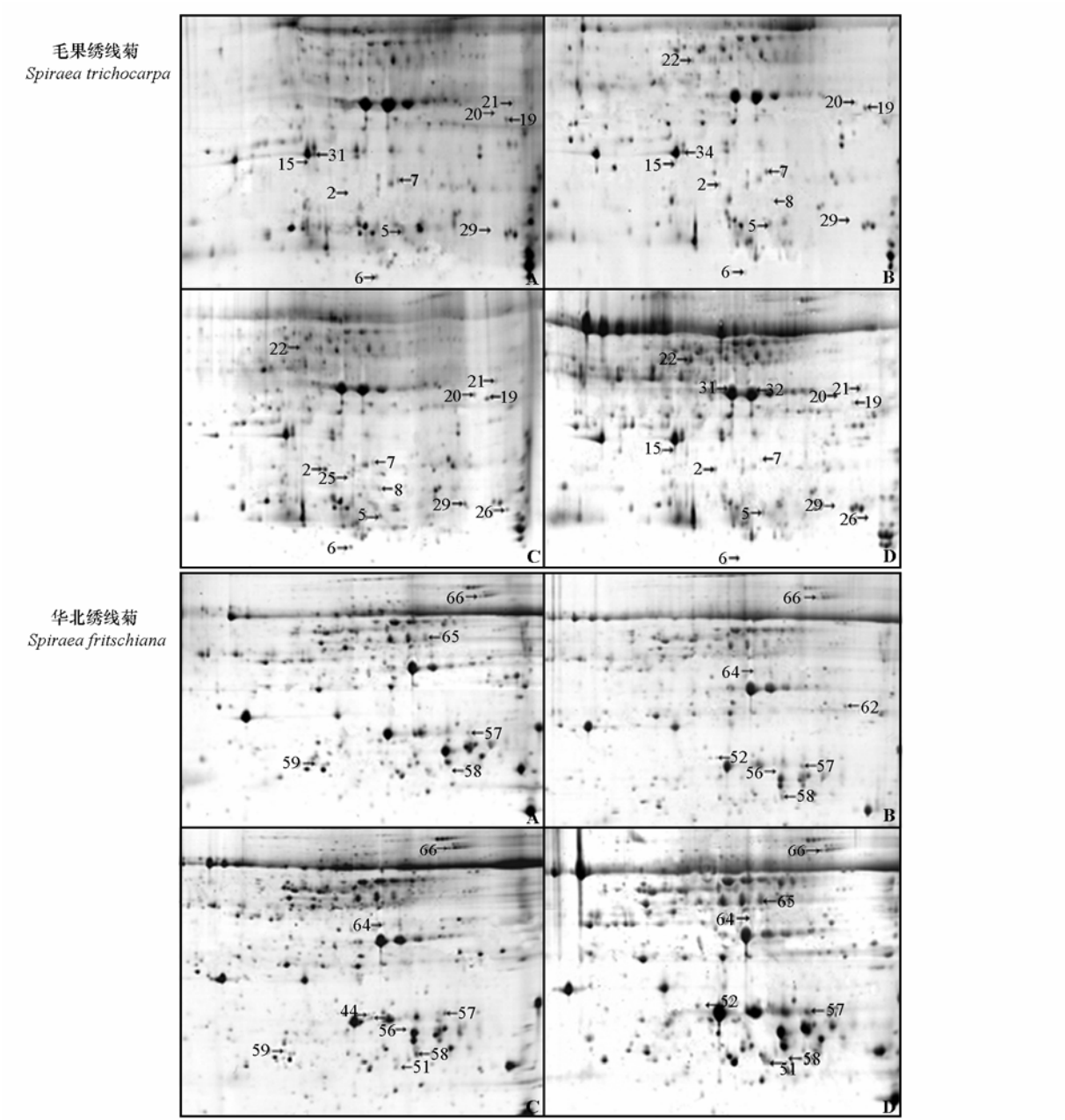


图 2 轻度 (A)、中度 (B)、重度 (C) 干旱处理和对照处理 (D) 后毛果绣线菊和华北绣线菊叶片差异蛋白表达图谱
Fig. 2 The patterns of proteins with different expressions of *Spiraea trichocarpa* and *S. fritschiana* under mild (A), moderate (B), serious (C) and control (D) stress treatments

2.3 干旱处理绣线菊光合作用相关蛋白鉴定结果

取不同干旱水平 2 种绣线菊双向电泳凝胶上 66 个表达差异的蛋白点, 经过胶内酶解后进行 MALDI - TOF - MS 分析, 得到肽质量指纹图谱, 经过 MASCOT 数据库搜索, Protein Score 大于 64 分可以确定蛋白质种类, 结合蛋白得分, 在给出的候选蛋白中选择最接近绣线菊物种的蛋白作为鉴定结果, 成功鉴定 59 种蛋白, 鉴定率为 89.4%, 其中涉及能量代谢与运输的光合机构蛋白 20 种。表 1 概括了被鉴定的 20 种蛋白的名称、等电点、分子量、登录号、蛋白得分与来源物种等。

与能量代谢相关的 14 种蛋白质主要包括：核酮糖 - 1,5 - 二磷酸羧化酶 - 加氧酶 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase, 点 2)、核酮糖 - 1,5 - 二磷酸羧化酶 - 加氧酶大亚基(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, 点 5、6、52、66)、核酮糖二磷酸羧化酶大链(Ribulose bisphosphate carboxylase large chain, 点 59)、核酮糖二磷酸羧化酶(ribulose bisphosphate carboxylase, 点 26、29、51)、叶绿体核酮糖 - 1,5 - 二磷酸羧化酶(chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, 点 22)、叶绿体核酮糖 - 1,5 - 二磷酸羧化酶 - 加氧酶小蛋白活化酶(chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase small protein, 点 65)、23 kD 放氧复合蛋白 (23 kD OEC protein, 点 34)、放氧复合 33 kD 光系统 II 蛋白 (oxygen evolving complex 33 kD photosystem II protein, 点 32)、氧化复合蛋白 1 (oxygen-evolving complex protein 1, 点 21)、PSI-D1 前体 (PSI-D1 precursor, 点 7)、氧化增强子 1、2(oxygen-evolving enhancer protein 1、2, 点 15、31)、叶绿体锰稳定蛋白 - II (chloroplast manganese stabilizing protein - II, 点 25)、二磷酸果糖酶 NPALDP1 (plastidic aldolase NPALDP1, 点 64)。还包括 6 种与能量运输有关的蛋白：ATP 合酶亚基 (ATP synthase epsilon subunit, 点 8)、ATP 合酶 CF1 亚基 (ATP synthase CF1 epsilon subunit, 点 58)、叶绿素 a/b 结合蛋白 (chlorophyll a/b binding protein, 点 19、20、62)、NADPH 脱氢酶 M 亚基 [NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit M, 点 56] 和细胞色素 C 氧化酶亚基 II PS17 (putative cytochrome oxidase subunit II PS17, 点 44)、光系统 I 反应中心亚基 II (photosystem I reaction center subunit II, 点 57)，它们在光合能量运输中执行重要功能。

表 1 两种绣线菊不同水平干旱处理鉴定的光合作用相关蛋白

Table 1 Proteins related to photosynthesis in two species of *Spiraea* L. indentified by MALDI-TOF-MS under different drought stress treatments

| 功能 Function | 蛋白质名称 Protein name | 蛋白质点 Spot No. | 登录号 Accession No. | 序列覆 盖率/% Sequence coverage | 物种 Species | 分子量/等电点 Mw/pI | MALDI-TOF-MS | |
|-----------------------------|---|------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--|--|-------------------|------------------------------|
| | | | | | | | 得分 Score | 匹配肽段数 Matched peptides |
| 能量代谢 Energy metabolic | 核酮糖 - 1,5 - 二磷酸羧化酶 - 加氧酶 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase | 2 | CAJ44392 | 10 | 糙隐子草 <i>Gnidia squarrosa</i> | 50530/5.82 | 320 | 6 |
| | 核酮糖 - 1,5 - 二磷酸羧化酶 - 加氧酶大亚基 | 5, | AAY16714 | 10 | 茜草 <i>Tannodia cordifolia</i> | 51617 /6.09 | 399 | 7 |
| | Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit | 6, 52, | CAA99696 ABE99712 | 4 18 | 桂叶黄梅 <i>Ochna serrulata</i> 牻牛儿苗 <i>Erodium stephanianum</i> | 51476 /6.13 51804/6.46 | 106 428 | 3 11 |
| | | 66 | AAA20538 | 14 | 翼枝长序榆 <i>Ulmus alata</i> | 52668/6.05 | 393 | 12 |
| | 核酮糖二磷酸羧化酶大链 Ribulose bisphosphate carboxylase large chain | 59 | P28426 | 10 | 钝齿冬青 <i>Ilex crenata</i> | 51518/6.10 | 322 | 8 |
| | 核酮糖二磷酸羧化酶 Ribulose bisphosphate carboxylase | 26, 29, 51 | CAA42618 CAA42618 CAA42618 | 16 16 12 | 菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> 菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> 菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> | 20127/9.16 20127/9.16 20127/9.16 | 203 181 159 | 7 7 5 |
| | 叶绿体核酮糖 - 1,5 - 二磷酸羧 化酶 Chloroplast ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase | 22 | ABI94075 | 29 | 红花槭 <i>Acer rubrum</i> | 47681/6.85 | 803 | 17 |
| | 叶绿体核酮糖 - 1,5 - 二磷酸羧 化酶 - 加氧酶小蛋白活化酶 Chloroplast ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase activase small protein | 65 | ABI94075 | 33 | 红花槭 <i>Acer rubrum</i> | 47681/6.85 | 798 | 18 |
| | 23 kD 放氧复合蛋白 23 kD OEC protein | 34 | ABQ85433 | 27 | 盐角草 <i>Salicornia veneta</i> | 21544/5.94 | 250 | 7 |

续表 1

| 功能 Function | 蛋白质名称 Protein name | 蛋白质点 编号 Spot No. | 登录号 Accession No. | 序列覆盖 率/% Sequence coverage | 物种 Species | 分子量/等电点 Mw /pI | MALDI-TOF-MS | |
|-----------------------------|---|------------------------|----------------------------|-------------------------------------|---|--|-------------------|------------------------------|
| | | | | | | | 得分 Score | 匹配肽段数 Matched peptides |
| 能量代谢 Energy metabolic | 放氧复合 33 kD 光系统 II 蛋白 Oxygen evolving complex 33 kD photosystem II protein | 32 | AAP03871 | 28 | 烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> | 35177/5.63 | 678 | 13 |
| | 氧化复合蛋白 1 Oxygen-evolving complex protein 1 | 21 | 2002393A | 3 | 稻 <i>Oryza sativa</i> | 26489/5.13 | 555 | 13 |
| | PS I -D1 前体 PS I -D1 precursor | 7 | BAA02871 | 17 | 美花烟草 <i>Nicotiana sylvestris</i> | 23441/9.84 | 163 | 6 |
| | 氧化增强子 2 Oxygen-evolving enhancer protein 2 | 31 | P85189 | 9 | 向日葵 <i>Helianthus annuus</i> | 28117/8.67 | 150 | 4 |
| | 氧化增强子 1 Oxygen-evolving enhancer protein 1 | 15 | XP_0025223 | 29 | 蓖麻 <i>Ricinus communis</i> | 35226/5.58 | 797 | 14 |
| | 叶绿体锰稳定蛋白 - II Chloroplast manganese stabilizing protein- II | 25 | ACS34663 | 23 | 马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i> | 31214/6.45 | 266 | 9 |
| | 二磷酸果糖酶 NPALDP1 Plastidic aldolase NPALDP1 | 64 | BAA77604 | 19 | 烟草 <i>Nicotiana paniculata</i> | 42547/6.92 | 437 | 11 |
| | ATP 合酶亚基 ATP synthase epsilon subunit | 8 | CAD23926 | 46 | 美国假轮叶 <i>Theophrasta americana</i> | 14467/5.43 | 344 | 8 |
| | ATP 合酶 CF1 亚基 ATP synthase CF1 epsilon subunit | 58 | YP_0040216 | 42 | 桃 <i>Prunus persica</i> | 14607/4.99 | 199 | 7 |
| | 叶绿素 a/b 结合蛋白 Chlorophyll a/b binding protein | 19, 20, 62 | P09756 P09756 P09756 | 11 11 18 | 大豆 <i>Glycine max</i> 大豆 <i>Glycine max</i> 大豆 <i>Glycine max</i> | 27844/5.46 27844/5.46 27844/5.46 | 148 210 221 | 6 6 7 |
| 能量运输 Energy transport | NADPH 脱氢酶 M 亚基 NADPH-quinone oxidoreductase subunit M | 56 | A9PJQ8 | 12 | 杂交杨 <i>Populus × jackii</i> | 23523/5.10 | 112 | 2 |
| | 细胞色素 C 氧化酶亚基 II PS17 Putative cytochrome C oxidase subunit II PS17 | 44 | P84733 | 100 | 北美乔松 <i>Pinus strobus</i> | 1707/9.62 | 63 | 2 |
| | 光系统 I 反应中心亚基 II Photosystem I reaction center subunit II | 57 | P32869 | 21 | 黄瓜 <i>Cucumis sativus</i> | 22707/9.54 | 250 | 6 |
| | | | | | | | | |

2.4 干旱处理 2 种绣线菊光合作用相关蛋白表达量变化

干旱处理使光合作用蛋白的表达量显著变化（图 3，图 4）。经过轻度干旱至重度干旱处理，与对照处理相比，毛果绣线菊中表达量下降幅度小于 60% 的差异蛋白有 23 kD 放氧复合蛋白（点 34）；下降幅度在 60% ~ 100% 的差异蛋白有核酮糖 - 1,5 - 二磷酸羧化酶 - 加氧酶大亚基（点 6）、叶绿体核酮糖 - 1,5 - 二磷酸羧化酶（点 22）；表达量上升幅度小于 40% 的差异蛋白有放氧复合 33 kD 光系统 II 蛋白（点 32）、氧化增强子 2（点 31）；表达量上升幅度为 100% 的差异蛋白有氧化增强子 1（点 15）、叶绿体锰稳定蛋白 - II（点 25）、核酮糖二磷酸羧化酶（点 29）；表达量上升幅度大于 100% 的差异蛋白有 ATP 合酶亚基（点 8）、叶绿素 a/b 结合蛋白（点 20）、核酮糖 - 1,5 - 二磷酸羧化酶 - 加氧酶（点 2）。由轻度干旱逐渐至重度干旱处理，华北绣线菊中表达量下降幅度在 40% ~ 100% 之间的差异蛋白有核酮糖 - 1,5 - 二磷酸羧化酶 - 加氧酶大亚基（点 66）、光系统 I 反应中心亚基 II（点 57）、叶绿体核酮糖 - 1,5 - 二磷酸羧化酶 - 加氧酶小蛋白活化酶（点 65）；表达量上升幅度在 70% ~

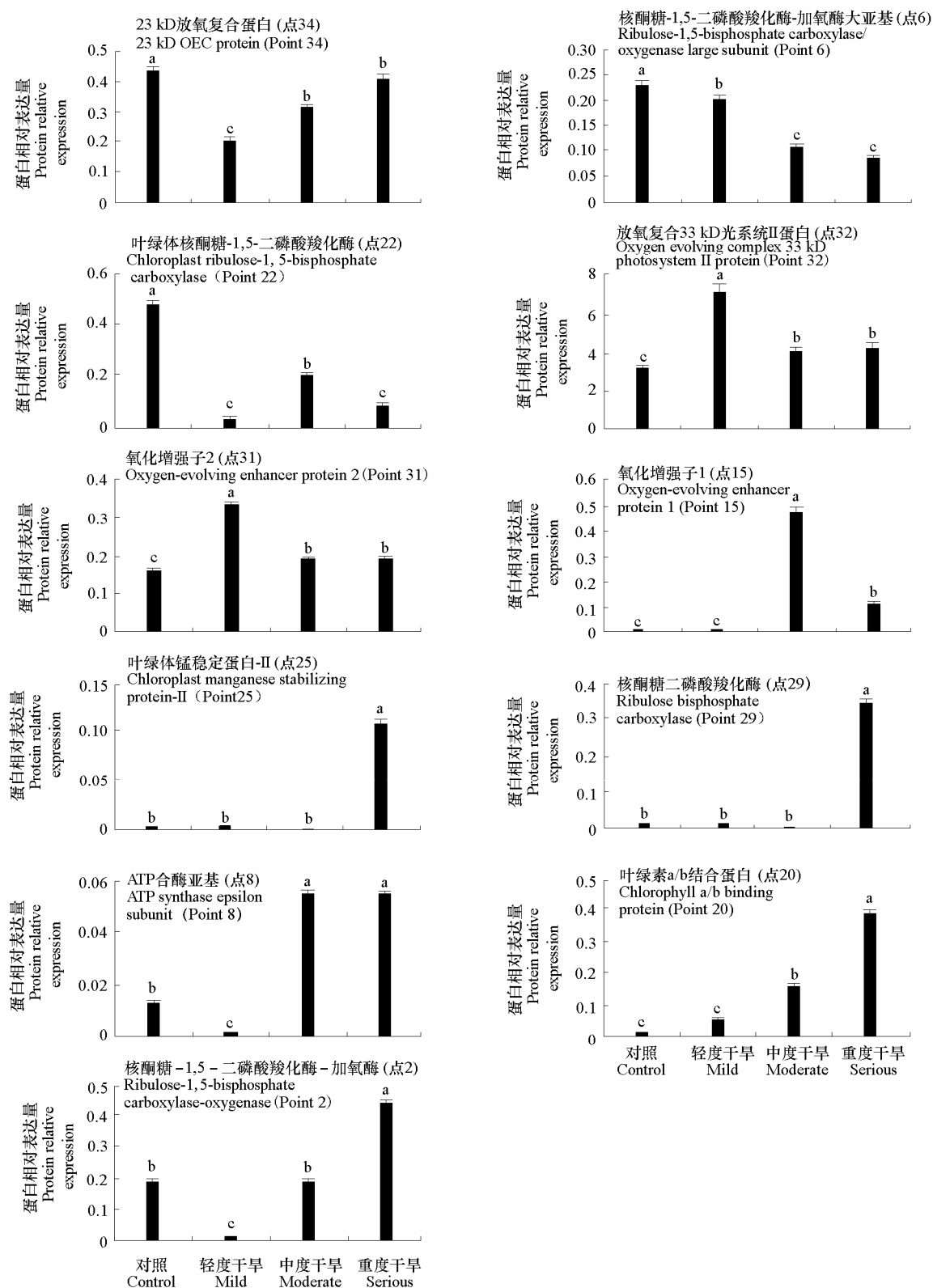


图3 毛果绣线菊不同干旱处理蛋白变化的定量分析

Fig. 3 The quantitative analysis of different proteins of *Spiraea thichocarpa* under different drought stress treatments

100%的差异蛋白有核酮糖二磷酸羧化酶（点 51）、叶绿素 a-b 结合蛋白（点 62）；上升幅度为 100% 的差异蛋白有 ATP 合酶 CF1 亚基（点 58）、NADPH 脱氢酶 M 亚基（点 56）、细胞色素 C 氧化酶亚基 II PS17（点 44），上升幅度大于 100% 的差异蛋白有二磷酸果糖酶 NPALDP1（点 64）。毛果绣线菊中多是能量代谢蛋白发生显著变化，华北绣线菊中多是能量运输蛋白发生显著变化，干旱胁迫使毛果绣线菊中光合作用相关蛋白的表达量变化更为显著。

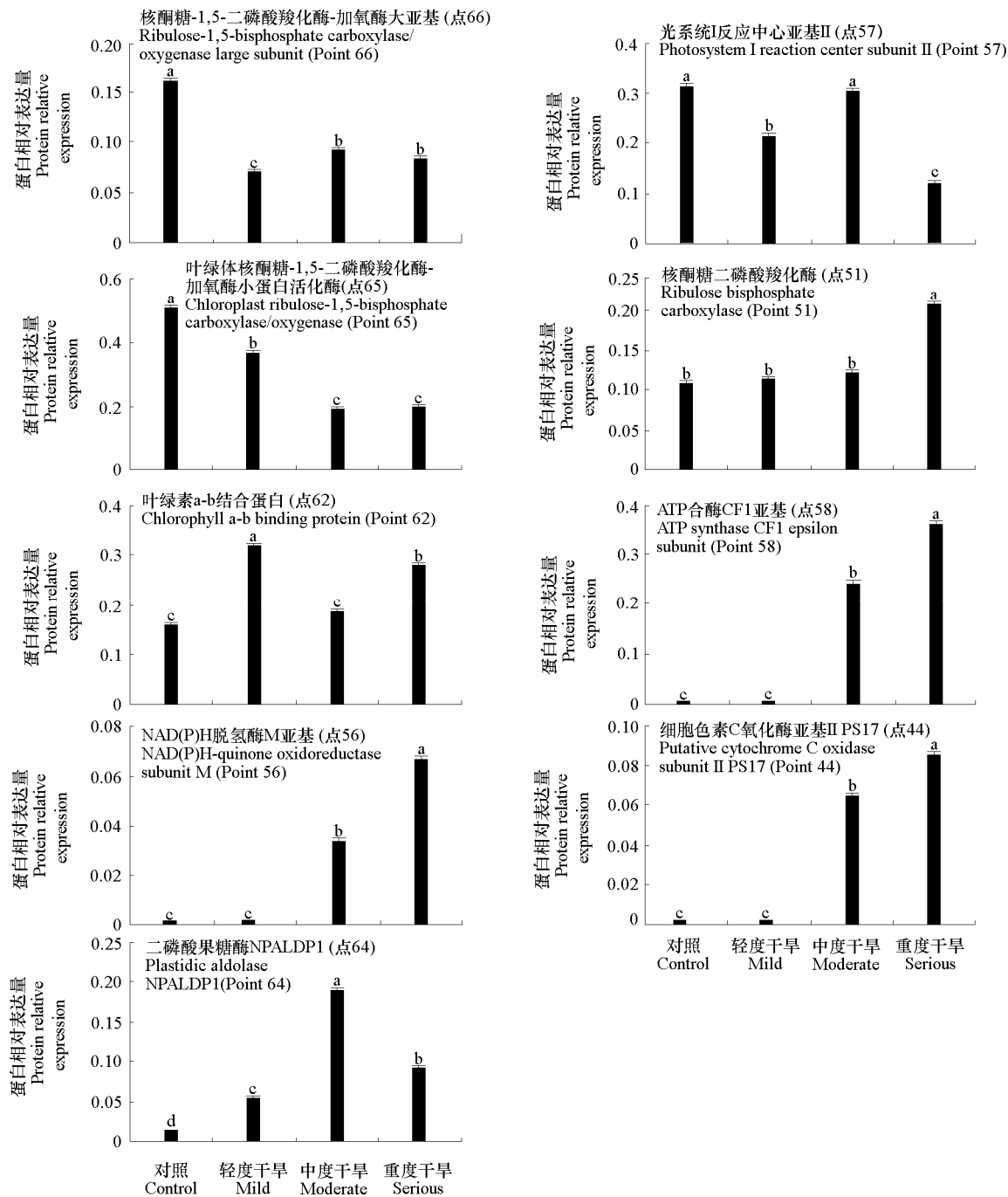


图 4 华北绣线菊不同干旱处理蛋白变化的定量分析

Fig. 4 The quantitative analysis of different proteins of *Spiraea frutschiana* under different drought stress treatments

3 讨论

3.1 干旱处理 2 种绣线菊能量代谢相关蛋白的表达与绣线菊的抗旱能力

通过干旱处理鉴定出 20 种与光合能量代谢相关的差异蛋白(表 1),它们在光合作用三羧酸循环和卡尔文循环中执行重要作用,并间接参与能量代谢的糖酵解和糖异生等途径。其中核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶-加氧酶是植物体内含量最丰富的酶,在卡尔文循环阶段催化第一个主要的碳固定反应。毛果绣线菊与华北绣线菊中的核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶-加氧酶大亚基(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit)在持续干旱胁迫时表达量都明显下调,直接影响了 2 种绣线菊对二氧化碳的固定,进而影响其对光能的吸收、传递和转换,最终可导致其光合能力下降,与本试验中对光合生理指标的研究结果一致;并间接影响光合产物可溶性糖生成,使抗旱保护物质减少。核酮糖二磷酸羧化酶(ribulose bisphosphate carboxylase)是卡尔文循环中起催化作用的酶,毛果绣线菊与华北绣线菊干旱胁迫时其表达量都明显上调,这不仅能增强光合能力,增加抗旱保护物质的合成,并产生更多能量用于各种抗性反应,以提高对干旱的抵抗能力。Hurry 等(1995)的研究表明干旱胁迫时卡尔文循环中执行催化作用的蛋白酶类也发生上调表达,且 Strand 等(1999)发现拟南芥干旱胁迫时也发生了同样的变化。干旱一方面会对植物代谢活动产生破坏作用,另一方面植物也会积极调节并主动适应干旱环境(Kwang-Hyun & Daniel, 2006)。植物对干旱胁迫的响应是一个复杂的网络调控反应(Goulas et al., 2006),所以干旱胁迫可引起参与能量代谢的多种蛋白的表达量发生下调或上调变化(范海延 等, 2009)。

在叶绿体核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶的催化下,核酮糖-1,5-二磷酸(RuBP)与 CO₂ 结合,最终产生葡萄糖,并消耗能量(赵妍, 2011)。干旱胁迫下毛果绣线菊中的叶绿体核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, 点 22)下调表达,说明毛果绣线菊固定 CO₂ 能力降低,导致光合能力降低,生成的葡萄糖减少,抗旱保护物质减少的同时降低了其抗旱能力。

果糖-1,6-二磷酸醛缩酶在植物适应逆境胁迫应答反应中起一定作用,其在卡尔文循环中第一个催化由 3C 化合物转化为 6C 化合物,细胞质中的果糖磷酸醛缩酶(质体醛缩酶)主要参与糖异生过程中蔗糖的生物合成(陈帅, 2010)。干旱胁迫时华北绣线菊中二磷酸果糖酶 NPALDP1(plastidic aldolase NPALDP1, 点 64)上调表达,说明干旱逆境中华北绣线菊通过增强其合成糖类物质的能力,进而增加抗旱保护物质以适应干旱胁迫。

研究发现,23 kD 放氧复合蛋白对锰簇复合体起到保护作用(刘慧民 等, 2010),而 33 kD 蛋白与氧释放关系最为密切,特别具有稳定锰簇结构的作用(于勇 等, 2001)。干旱胁迫使毛果绣线菊中叶绿体锰稳定蛋白-II(chloroplast manganese stabilizing protein-II)、放氧复合 33 kD 光系统 II 蛋白(oxygen evolving complex 33 kD photosystem II protein)显著上调表达,说明毛果绣线菊在干旱胁迫时为避免光合作用受到影响,或者光合作用已受到影响时,通过稳定锰簇和提高 PSII 的锰簇复合体的表达量以保护其光合能力,以维系正常的光合作用;干旱胁迫还使毛果绣线菊中 23 kD 放氧复合蛋白(23 kD OEC protein)下调表达,使其对锰簇复合体的保护能力下降,锰簇复合体稳定性受到影响,导致毛果绣线菊光合能力下降,与前述毛果绣线菊光合生理指标的变化分析一致。放氧增强蛋白因子是与光合作用相关蛋白的降解产物(Yang et al., 2003)。干旱胁迫时毛果绣线菊增强表达氧化增强子 1 和 2,说明干旱胁迫使其部分光合蛋白降解,导致其光合能力严重下降,推测是其抗旱能力弱于华北绣线菊的原因之一。干旱胁迫时一方面毛果绣线菊部分光合作用蛋白表达量

上调, 积极维系和提高其光合能力, 另一方面其部分光合作用蛋白表达量下调, 导致其光合能力下降, 研究表明干旱胁迫时抗旱力弱的种类, 其多个生理代谢途径往往产生明显或剧烈变化, 这些变化是为适应逆境环境而做出的各种理化调节; 抗旱力强的种类其代谢多表现平稳或不受影响 (Cao et al., 2013), 据试验中毛果绣线菊光合作用蛋白的复杂变化, 推测是其对干旱胁迫做出的调节或适应性反应。

本节分析表明, 干旱胁迫主要使毛果绣线菊中参与卡尔文循环途径相关的酶和光系统 II 中多数放氧复合蛋白的表达量发生显著变化, 导致其光合能力发生变化, 影响光合产物糖类的合成。而干旱胁迫主要使华北绣线菊中参与卡尔文循环代谢相关的酶表达量发生显著变化, 导致其光合能力发生变化的同时并影响光合产物糖类合成。

3.2 干旱处理 2 种绣线菊能量运输相关蛋白的表达与绣线菊的抗旱能力

2 种绣线菊中的 ATP 合酶亚基 (ATP synthase epsilon subunit, 点 8) 和 ATP 合酶 CF1 亚基 (ATP synthase CF1 epsilon subunit, 点 58) 在干旱处理时上调表达, 使光合磷酸化过程产生更多的 ATP, 并增强卡尔文循环, 使抗旱保护物质可溶性糖生成增加, 增强了 2 种绣线菊的抗旱力。

干旱胁迫时两种绣线菊中叶绿素 a/b 结合蛋白 (chlorophyll a/b binding protein) 均上调表达, 说明绣线菊能通过提高色素蛋白复合体的表达量以调节 2 个光系统间平衡利用光能, 最终维持其正常的光合作用适应干旱影响。

研究表明, 位于叶绿体类囊体上的 NADPH 脱氢酶参与光呼吸作用, 偶联光合磷酸化作用促进 ATP 合成, 同时减少活性氧产生 (Bukhov et al., 2000)。干旱胁迫时华北绣线菊中 NADPH 脱氢酶 M 亚基 (NADPH-quinone oxidoreductase subunit M) 上调表达, 说明逆境中华北绣线菊仍可增加体内 ATP 产生, 以增强抗旱能力, 推测这是华北绣线菊抗旱力强的原因之一。

干旱胁迫时华北绣线菊中的光系统 I 反应中心亚基 II (photosystem I reaction center subunit II, 点 57) 下调表达, 生成光合能量的能力被降低, 间接导致其后续光合产物葡萄糖的合成量减少, 抗旱保护物质减少的同时也降低了其抗旱能力。

细胞色素 C 氧化酶催化电子从细胞色素 C 转移到氧分子, 产生的质子电化学梯度能合成 ATP。该酶重要的金属中心分别存在于其亚基 I 和亚基 II 中, 并构成了该酶的活性位点 (覃芳, 2011)。干旱胁迫时华北绣线菊中细胞色素 C 氧化酶亚基 II PS17 (putative cytochrome C oxidase subunit II PS17, 点 44) 上调表达, 说明逆境中华北绣线菊通过提高其合成 ATP 的能力, 为各种代谢活动提供所需的能量, 进而适应干旱胁迫。

分析表明, 干旱胁迫主要使毛果绣线菊光系统 II 中捕光色素复合蛋白和参与光合磷酸化的酶发生显著变化, 进而影响其光合电子传递能力与光合同化力形成, 导致其光合能量合成受到影响。而干旱胁迫主要使华北绣线菊 PS I 中反应中心蛋白和参与光合电子传递的蛋白、PS II 中捕光色素复合蛋白、参与光合磷酸化与氧化磷酸化的蛋白表达量发生显著变化, 影响其光合电子传递能力与光合同化力形成的同时也导致其光合能量合成受到影响。

4 结论

干旱胁迫使两种绣线菊的光合速率、光补偿点、光饱和点均显著降低, 但下降幅度各不相同; 干旱胁迫两种绣线菊光合能力均下降, 但其利用弱光能力增强, 抗旱力强的华北绣线菊适应弱光环境的能力强于抗旱力弱的毛果绣线菊。

干旱胁迫使抗旱力不同的毛果和河北绣线菊光合作用相关蛋白均受到影响, 毛果绣线菊中卡尔文循环途径相关的酶、光系统 II 中多数放氧复合蛋白和捕光色素复合蛋白、参与光合磷酸化的酶发生显著变化, 河北绣线菊中参与卡尔文循环代谢相关的酶、PS I 中反应中心蛋白和参与光合电子传递的蛋白、PS II 中捕光色素复合蛋白、参与光合磷酸化与氧化磷酸化的蛋白发生明显变化。毛果绣线菊中多是能量代谢相关蛋白发生显著变化, 河北绣线菊中多是能量运输相关蛋白发生显著变化。

References

- Bukhov N G, Samson G, Carpentier R. 2000. Nonphotosynthetic reduction of the intersystem electron transport chain of chloroplasts following heat stress steadystate rate. *Photochemistry and Photobiology*, 72 (3): 351 – 357.
- Cao M J, Liu X, Zhang Y, Xue X Q, Zhou X E, Melcher K, Gao P, Wang F X, Zeng L, Zhao Y, Deng P, Zhong D F, Zhu J K, Xu H E, Xu Y. 2013. An ABA-mimicking ligand that reduces water loss and promotes drought resistance in plants. *Cell Research*, 23 (8): 1043 – 1054.
- Chen Shuai. 2010. Screening, cloning and analysis of related genes induced by PVY in tobacco (*Nicotiana tabacum*) [M. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. (in Chinese)
- 陈 帅. 2010. 烟草受 PVY 诱导相关基因的筛选、克隆与分析[硕士论文]. 北京: 中国农业科学院.
- Falk S, Maxwell D P, Laudenbach D E. 1996. Photosynthetic adjustment to temperature. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers: 367 – 385.
- Fan Hai-yan, Cui Na, Shao Mei-ni, Xu Yu-feng. 2009. Advances on proteomics of plants under stresses. *Biotechnology Bulletin*, (10): 15 – 19. (in Chinese)
- 范海延, 崔 娜, 邵美妮, 许玉凤. 2009. 植物应答逆境胁迫的蛋白质组学研究进展. *生物技术通报*, (10): 15 – 19.
- Fu Shi-lei, Zhou Yong-bin, He Xing-yuan, Chen Wei. 2006. Effects of drought stress on photosynthesis physiology of *Populus pseudo-simonii*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 17 (11): 2016 – 2019. (in Chinese)
- 付士磊, 周永斌, 何兴元, 陈 玮. 2006. 干旱胁迫对杨树光合生理指标的影响. *应用生态学报*, 17 (11): 2016 – 2019.
- Gazanchian A, Hajheidari M, Sima N K, Salekdeh G H. 2007. Proteome response of *Elymus elongatum* to severe water stress and recovery. *Soc Experiment Biol*, 58 (2): 291 – 300.
- Giuseppe C, Chiara C, Patrizia F, Riccardo G, Roberto S, Aldo L. 2009. Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant Science*, 177 (6): 570 – 576.
- Goulas E, Schubert M, Kieselbach T, Kleczowski L A, Gardestrom P, Schoder W, Hurry V. 2006. The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show differential sensitivity to short and long term exposure to low temperature. *The Plant Journal*, 47 (5): 720 – 734.
- Hajheidari M, Abdollahian N M, Askari H, Heidari M, Sadeghian S Y, Ober E S, Salekdeh G H. 2005. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics*, 5 (4): 950 – 960.
- Hurry V M, Strand A, Tobiaeson M, Ardestrom P, Oquist G. 1995. Cold hardening of spring and winter wheat and rape results in differential effects on growth, carbon metabolism, and carbohydrate content. *Plant Physiol*, 109: 697 – 706.
- Ke Shi-xing, Jin Ze-xin. 2007. Effect of drought stress and water recovering on physiological characteristics of *Sinocalycanthus chinensis* seedlings. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 13 (6): 1166 – 1172. (in Chinese)
- 柯世省, 金则新. 2007. 干旱胁迫和复水对夏蜡梅幼苗光合生理特性的影响. *植物营养与肥料学报*, 13 (6): 1166 – 1172.
- Kwang-Hyun B, Daniel Z S. 2006. Differential expression of manganese superoxide dismutase sequence variants in near isogenic lines of wheat during cold acclimation. *Plant Cell Reports*, 25 (3): 223 – 230.
- Lehtimäki N, Lintala M, Allahverdiyeva Y, Aro E M, Mulo P. 2010. Drought stress induced upregulation of components involved in ferredoxin-dependent cyclic electron transfer. *Journal of Plant Physiology*, 167 (12): 1018 – 1022.
- Liu H M, Fang L, Che Y S, Wu F Z, Yang C P. 2014. Protein expression patterns in two *Spiraea* species in response to cold treatment. *Molecular Biology Reports*, 41 (7): 4533 – 4547.
- Liu Hui-min, Che Yan-shuang, Che Dai-di, Yan Yong-qing, Wu Feng-zhi. 2010. Effects of drought stress on photosynthesis capability of *Spiraea fritschiana* and *Spiraea bunmalba* ‘Goldmound’. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 21 (8): 2004 – 2009. (in Chinese)

- 刘慧民, 车艳双, 车代弟, 闫永庆, 吴凤芝. 2010. 干旱胁迫对华北绣线菊和金山绣线菊光合能力的影响. 应用生态学报, 21 (8): 2004 - 2009.
- Lu Xu-ke, Zhang De-chao, Yin Zu-jun, Wang De-long, Wang Jun-juan, Fan Wei-li, Wang Shuai, Ye Wu-wei. 2013. Comparative analysis of proteomics in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves with different drought resistance levels under drought stress. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 33 (12): 2401 - 2409. (in Chinese)
- 陆许可, 张德超, 阴祖军, 王德龙, 王俊娟, 樊伟丽, 王 帅, 叶武威. 2013. 干旱胁迫下不同抗旱水平陆地棉的叶片蛋白质组学比较研究. 西北植物学报, 33 (12): 2401 - 2409.
- Murray J D. 1997. Nonlinear different equation models in biology. Oxford: Clarendon Press.
- Qin Fang. 2011. Expression, purification and measuring the activity of cytochrome oxidase C from *A. ferrooxidans* [M. D. Dissertation]. Hunan: Hunan University. (in Chinese)
- 覃 芳. 2011. 细胞色素 C 氧化酶的表达、纯化及其活性鉴定 [硕士论文]. 湖南: 湖南大学.
- Salekdeh G H, Siopongco J, Wade L J, Ghareyazie B, Bennett J. 2002. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. Proteomics, 2 (9): 1131 - 1145.
- Strand A, Hurry V, Henkes S, Huner N, Gustafsson P, Gardestrom P, Stitt M. 1999. Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. Plant Physiology, 119: 1387 - 1397.
- Tanja Z, Kristin H, Wolfgang E J, Vladimir M, Jelka S V. 2013. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Proteomics, 78 (14): 254 - 272.
- Wu F Z, Wang B C, Yang C P. 2013. Proteomic analysis of chloroplast RNA-binding proteins in birch (*Betula platyphylla* Suk.). Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 29: 144 - 150.
- Xia Qi-chang, Zeng Rong. 2004. Protein chemistry and proteomic. Beijing: Science Press: 275 - 279. (in Chinese)
- 夏其昌, 曾 嵘. 2004. 蛋白质化学与蛋白质组学. 北京: 科学出版社: 275 - 279.
- Xiao X W, Yang F, Zhang S, Korpelainen H, Li C Y. 2009. Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. Physiologia Plantarum, 136 (2): 150 - 168.
- Yan Hua, Jia Liang-hui, Wang Gen-xuan. 2002. Research on proteins under water stress treatment in plants. Chemistry of Life, 22 (2): 165 - 168. (in Chinese)
- 颜 华, 贾良辉, 王根轩. 2002. 植物水分胁迫诱导蛋白的研究进展. 生命的化学, 22 (2): 165 - 168.
- Yang E J, Oh Y A, Lee E S, Park A R, Cho S K, Yoo Y J, Park O K. 2003. Oxygen-evolving enhancer protein 2 is phosphorylated by glycine-rich protein 3/wall-associated kinase 1 in *Arabidopsis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 305 (4): 862 - 868.
- Yu Yong, Weng Jun, Xu Chun-he. 2001. Research progress of the structure and function of plant photosystem II oxygen complex peripheral proteins. Journal of Plant Physiology, 27 (6): 441 - 450. (in Chinese)
- 于 勇, 翁 俊, 徐春和. 2001. 植物光系统 II 放氧复合体外周蛋白结构和功能的研究进展. 植物生理学报, 27 (6): 441 - 450.
- Zhang Chao. 2008. Research on the drought stress adaptability of six species of *Spiraea* L. [M. D. Dissertation]. Harbin: Northeast Agricultural University. (in Chinese)
- 张 超. 2008. 6 种绣线菊的干旱适应性研究 [硕士论文]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- Zhang Cheng-jun. 2003. Ecophysiological responses to soil drought in four woody species seedling in *Quercus Liaotungensis* forest [Ph. D. Dissertation]. Harbin: Northeast Forestry University. (in Chinese)
- 张成军. 2003. 辽东栎林中四种木本植物幼苗对土壤干旱的生理生态响应 [博士论文]. 哈尔滨: 东北林业大学.
- Zhao Yan. 2011. Study of drought responsive proteins and metabolites in bermudagrass [Ph. D. Dissertation]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University. (in Chinese)
- 赵 妍. 2011. 狗牙根干旱相关蛋白及代谢产物研究 [博士论文]. 上海: 上海交通大学.