

低温对香蕉叶片中蛋白质及脯氨酸的影响

陈杰忠 徐春香 梁立峰

(华南农业大学园艺系,广州,510642)

摘要 在人工气候室中,低温胁迫引起香蕉和大蕉叶片组织中可溶性蛋白质的组分发生明显变化.SDS-PAGE 图谱分析表明:当温度降至 1℃时,香蕉叶片中分子组成分别约为 1.13×10^5 和 6.45×10^4 的 2 种多肽含量明显增加,并新增加一种分子组成约为 1.20×10^5 的多肽.低温胁迫下大蕉的表现基本与香蕉的相似,只是分子组成约为 1.20×10^5 的多肽在 10℃时已隐约出现.推测该多肽可能与香蕉和大蕉的抗冷性有关.随着温度的降低,可溶性蛋白质、游离脯氨酸含量呈上升趋势;其中,抗冷性较弱的香蕉叶片中可溶性蛋白质和游离脯氨酸的含量高于抗冷性较强的大蕉,但大蕉的增加幅度高于香蕉.

关键词 香蕉;低温;蛋白质;游离脯氨酸

中图分类号 S 668.101

香蕉是世界上产销量最大的热带果树,在我国南方栽培常遭受低温冷害,造成严重的减产,甚至植株死亡,因此对香蕉的冷害及其抗冷机理进行研究显得尤其重要.前人曾对香蕉低温冷害的症状进行了观察,分析了碳水化合物、自由水/束缚水等物质与香蕉耐寒性的关系(刘星辉等,1990).近年来周碧燕等(1995)研究了香蕉冷害与酶促防御系统及激素的关系.低温胁迫会引起植物基因表达的改变,并有新的蛋白质合成.这已在柑桔(刘祖祺等,1993)、黄瓜(李晓萍等,1993)、苜蓿(Mohapatra et al,1988)等多种植物的冷驯化试验中得到验证.此外,植物组织中可溶性蛋白质和游离脯氨酸的含量也与植物的抗冷性之间密切相关.据此本研究测定了低温胁迫下香蕉蛋白质组分的变化情况及可溶性蛋白质、游离脯氨酸等物质含量的变化情况.希望能进一步丰富香蕉抗冷机理的研究,为香蕉抗冷育种提供理论依据和生理生化指标.

1 材料与方方法

1.1 试验材料与低温处理

本试验以抗冷性较强的大蕉和抗冷性较弱的香蕉为试材.选取高约 40 cm、生长健壮、长势一致的广东香蕉二号(*Musa* AAA Group cv. Guangdong Xiangjiao No.2)和中把大蕉(*Musa* ABB Group cv. Zhongba Dajiao)盆栽试管苗进行试验.采用随机区组设计,设香蕉和大蕉 2 个处理,每 3 株为一试验单元.每处理设 3 次重复,在人工气候室(Conviron PGC36)中进行,人工降温程序见表 1.配合这次降温的光照条件为:7:00~9:00 时, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;9:00~16:00 时, $140 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;16:00~18:00 时, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;18:00 至次日 7:00 时,黑暗.相对湿度为 85%~95%.分别在 13、10、7、4 和 1℃5 个温度点采样进行分析,取心叶下第 2~4 片叶中段近中脉鲜叶 5 g 左右.采样时间均为早上 7:00 点.同步做室温试验以供蛋白质组分测定,其余条件同上.

1.2 低温胁迫下香蕉和大蕉叶片中可溶性蛋白质组分的测定

样品液的提取参照 Mohapatra 等 (1988) 的方法进行。称取经过低温胁迫后的叶片鲜样约 1 g, 加入经 4 °C 低温预冷过的提取液 1 mL (含 25 mmol/L Tris - HCl, 10 mmol/L KCl, 20 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L MSH, pH 7.5), 冰浴研磨匀浆。4 °C 下 1.5×10^4 g 离心 30 min, 取上清液按一定比例加入 2 倍样品缓冲液混合, 沸水浴 2 ~ 3 min, 冷却后备用。

分子组成的测定: 采用 SDS-PAGE 凝胶电泳法 (张龙翔等, 1980)。 ρ (分离胶) = 125 g/L, ρ (浓缩胶) = 30 g/L。标准蛋白质由上海丽珠东风生物技术有限公司生产 (兔磷酸化酶 B 分子组成为 9.74×10^4 ; 牛血清白蛋白分子组成为 6.62×10^4 ; 兔肌动蛋白分子组成为 4.3×10^4 ; 牛碳酸酐酶分子组成为 3.1×10^4 ; 胰蛋白酶抑制剂分子组成为 2.01×10^4 ; 蛋清溶菌酶分子组成为 1.44×10^4)。胶板用 2.5 g/L 的考马斯亮蓝 R-250 染色。脱色后用岛津双波长扫描仪 CS-930 在 550/390 nm 处扫描。

1.3 可溶性蛋白质含量的测定

参照 Bradford (1976) 的考马斯亮蓝法进行测定, 用牛血清白蛋白作标准蛋白。每处理设 3 次重复, 每重复测定 3 次。

1.4 游离脯氨酸含量的测定

按照刘祖祺和张石城 (1995) 的方法进行。每处理设 3 次重复, 每重复测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 人工降温过程中的受害症状

在人工降温过程中, 当温度分别降至 13、10、7、4 °C 后, 香蕉和大蕉均未表现出明显的受害症状。当温度降至 2.5 °C 时, 抗冷性较弱的香蕉叶片开始出现轻微的萎焉状, 而抗冷性较强的大蕉则没有这种表现。当温度降至 1 °C 后, 香蕉叶片全部呈现明显的水渍状, 叶片萎焉; 此时, 大蕉叶片仅呈轻微失水状, 部分植株心叶叶尖和叶缘呈茶褐色水渍状。

2.2 低温对可溶性蛋白质组分的影响

经低温处理后, 从香蕉和大蕉叶片组织中可溶性蛋白质的 SDS-PAGE 电泳图谱 (图 1) 和扫描图 (图 2) 可以看出: 在人工降温过程中, 当温度分别降至 13、10、7、4 °C 后, 香蕉叶片中蛋白质组分未发生明显的变化; 温度降至 1 °C 后, 香蕉叶片中新增加一条分子组成约为 1.20×10^5 的谱带。此外, 分子组成分别约为 1.13×10^5 和 6.45×10^4 的两条谱带浓度明显增加。低温胁迫下, 抗冷性较强的大蕉叶片中蛋白质组分的变化与抗冷性较弱的香蕉蛋白组分的基本相似, 只是分子组成约为 1.20×10^5 的多肽, 在大蕉叶片中当温度降至 10 °C 时已隐约可见。

表 1 人工气候室的降温程序

处理日期 (日/月)	t/°C			
	01:00	07:00	11:00	19:00
12/9		20.0	22.0	18.0
13/9	15.0	15.0	19.0	16.0
14/9	13.0	13.0	17.0	14.0
15/9	11.5	11.5	15.5	12.5
16/9	10.0	10.0	14.0	11.0
17/9	8.5	8.5	12.5	9.5
18/9	7.0	7.0	11.0	8.0
19/9	5.5	5.5	9.5	6.5
20/9	4.0	4.0	8.0	5.0
21/9	2.5	2.5	6.5	3.5
22/9	1.0	1.0	3.0	3.0
23/9	1.0	1.0		

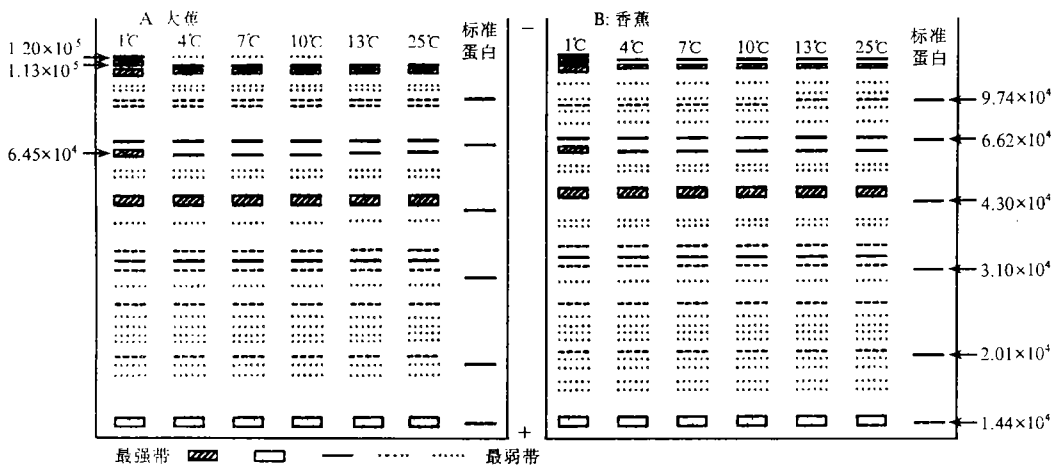
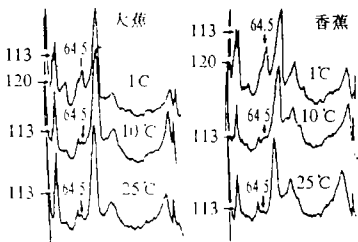


图1 冷驯化过程中香蕉和大蕉叶片中可溶性蛋白质的SD-PAGE电泳图

2.3 低温对可溶性蛋白质含量的影响

从图3可以看出:随着温度的降低,香蕉和大蕉叶片中可溶性蛋白质含量均呈上升趋势.香蕉以干质量计其可溶性蛋白质从13℃下的15.65 mg/g上升至1℃的19.05 mg/g,增长21.73%;大蕉可溶性蛋白质则从3.98 mg/g增至7.20 mg/g,增长80.91%.虽然抗冷性较强的大蕉叶片中可溶性蛋白质的含量没有抗冷性较弱的香蕉高,但其增幅比香蕉的大.



仅列出代表性扫描图(13.7和4℃的蛋白质扫描图与10℃时的相似)

图2 冷驯化过程中香蕉和大蕉叶片中可溶性蛋白质的SDS-PAGE光密度扫描图

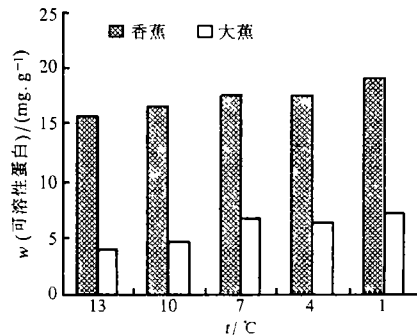


图3 冷驯化过程中香蕉和大蕉叶片中可溶性蛋白质含量的变化

2.4 低温对游离脯氨酸含量的影响

图4表明:无论是抗冷性较强的大蕉,还是抗冷性较弱的香蕉,其叶片中游离脯氨酸的含量均随着温度的下降而上升.香蕉以干质量计其游离脯氨酸从13℃下的194.26 μg/g上升至1℃的354.85 μg/g,绝对增加量为160.59 μg/g;大蕉游离脯氨酸则从146.23 μg/g增至284.45 μg/g,绝对增加量为138.22 μg/g.虽然在整个降温过程中,大蕉叶片中游离脯氨酸的绝对含量略低于香蕉,但大蕉的

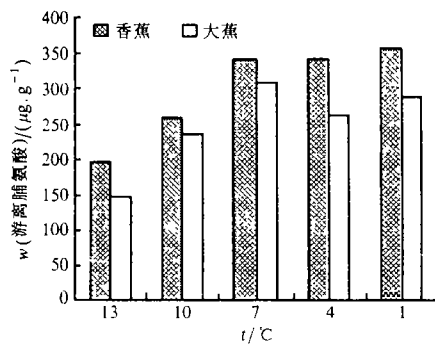


图4 冷驯化过程中香蕉和大蕉叶片中游离脯氨酸含量的变化

增幅高于香蕉的(分别为94.52%和82.67%),在人工降温的前期(13→7℃)显得尤为突出(分别为150.06%和74.32%)。人工降温的后期脯氨酸含量略有波动。

3 讨论

3.1 低温与蛋白质组分的关系

虽然抗寒特异蛋白质的产生与植物抗寒力发育的有关机制仍不十分清楚,但许多研究结果都表明:低温胁迫能引起植物的基因表达发生改变,并有新的蛋白质合成,它们参与抗寒性的发育过程(刘祖祺等,1993;Mohapatra et al,1988)。黄瓜幼苗经14℃/10℃(日/夜)低温处理后,诱导形成一种分子组成为 5.8×10^4 的多肽(李晓萍等,1993)。刘祖祺等(1993)的研究也表明:柑桔经低温锻炼后,基因表达发生了改变。低温处理7 d到21 d,新产生了分子组成为 3.2×10^4 、 2.5×10^4 两种可溶性特异蛋白及 1.04×10^5 、 8.70×10^4 、 3.0×10^4 三种膜特异蛋白,第14和21 d产生分子组成分别为 1.7×10^4 、 8.2×10^4 、 2.7×10^4 的三种膜特异蛋白。这些特异蛋白质的合成有利于提高柑桔的抗寒力。本试验也发现,当温度降至1℃时,香蕉叶片中蛋白质的组分发生明显变化,分子组成分别约为 6.45×10^4 和 1.13×10^5 的两条谱带浓度明显增加,并出现一条分子组成约为 1.20×10^5 的新谱带,该多肽在大蕉叶片中当温度降至10℃时已隐约出现。这说明抗冷性较强的大蕉能在相对较高的低温下开始接受低温的诱导,从而更能忍耐低温的胁迫,并说明该多肽可能参与了香蕉和大蕉的抗冷性发育过程。

3.2 低温与可溶性蛋白质含量的关系

可溶性蛋白质的亲水胶体性质强,能增强细胞持水力,因而在低温胁迫下,植物体内可溶性蛋白质含量的升高有利于抗冷性的提高。低温胁迫下可溶性蛋白质含量的升高,既可能是有新的蛋白质合成,也可能是从膜或其它结合形式降解释放,还可能是提取过程中发生的变化(Faw et al, 1976)。但彭艳华等(1992)用不同低温分别处理凤眼莲,发现可溶性蛋白质的含量远高于对照,且随着温度的降低而升高。他们认为:可溶性蛋白质含量的升高是因为有部分新的蛋白质合成,它们对植物的耐冷及对低温的敏感性起重要作用。本试验中,香蕉和大蕉叶片中可溶性蛋白质的含量均随着温度的下降呈上升趋势;抗冷性较强的大蕉叶片中可溶性蛋白质的绝对含量一直低于抗冷性较弱的香蕉,但增幅却比香蕉的大。这说明在植物的冷胁迫过程中,蛋白质的增加量可能比蛋白质的绝对含量起着更为重要的作用。

3.3 低温与游离脯氨酸含量的关系

一般情况下,植物体内游离脯氨酸并不多,经低温胁迫后,游离脯氨酸含量迅速提高(龚明等,1989)。本试验也发现,随着温度的降低,香蕉和大蕉叶片中游离脯氨酸含量均表现上升。游离脯氨酸具有水溶性和水势高、在细胞内积累无毒性等特点,因而在植物的低温胁迫过程中,能作为防脱水剂从而保护植物。游离脯氨酸还能诱导冷敏植物的耐冷性,把外源脯氨酸加入培养基中,可增加玉米愈伤组织对低温的忍耐能力(Duncan et al, 1987)。本试验中,抗冷性较弱的香蕉游离脯氨酸的含量和绝对增加量均高于抗冷性较强的大蕉,这一结果与龚明等(1989)对水稻抗冷性强和不抗冷2个品种的比较研究结果相似。

低温条件下,游离脯氨酸的积累既可能是由于蛋白质合成受阻,也有可能是由于其合成受激或氧化受阻(彭艳华等,1992),还可能是因为蛋白质降解的结果(龚明等,1989)。本试验中香蕉和大蕉叶片中可溶性蛋白质和游离脯氨酸含量均随着温度的降低而上升。可见,低温胁迫下植物体内游离脯氨酸和可溶性蛋白质含量之间并非呈简单的相互消长关系。脯氨酸对低温的反应常随着低温程度的不同而异:在较低的长期低温下,脯氨酸的增加是植物伤害的结果;

而在无严重冷害的锻炼温度下,脯氨酸的积累则是一种适应性反应(龚明等,1989).本试验中,人工降温的前期,香蕉和大蕉叶片中的游离脯氨酸含量稳步上升,这可能是一种适应性的表现;而人工降温的后期游离脯氨酸含量出现波动,则可能是因为较低的温度给植物造成伤害的结果.

参 考 文 献

- 李晓萍,郭俊彦. 1993. 黄瓜幼苗发育及冷锻炼过程子叶中的多肽变化. 植物学报, 35(10):766~771
- 刘星辉,王宏华,蔡建明,等. 1990. 香蕉叶片组织结构和生理特征与抗寒性的关系. 福建农学院学报, 19(2):181~185
- 刘祖祺,林定波. 1993. ABA/GAs 调控特异蛋白质与柑桔的抗寒性. 园艺学报, 20(4):335~340
- 刘祖祺,张石城. 1995. 植物抗性生理学. 北京:中国农业出版社, 369
- 张龙翔,张庭芳,李令媛. 1980. 生化实验方法和技术. 北京:高等教育出版社, 112~119
- 周碧燕,梁立峰,黄辉白,等. 1995. 低温和多效唑对香蕉及大蕉超氧化物歧化酶和脱落酸的影响. 园艺学报, 22(4):331~335
- 龚 明,刘友良,朱培仁. 1989. 低温下稻苗叶片中蛋白质及游离氨基酸的变化. 植物生理学通讯, 25(4):18~22
- 彭艳华,刘成运,卢大炎,等. 1992. 低温胁迫下凤眼莲叶片的适应. 武汉植物学研究, 10(2):123~127
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. Anal Biochem, 72: 248~254
- Duncan D R, Widholm J M. 1987. Proline accumulation and its implication in cold tolerance of maize callus. Plant Physiol, 83:703~708
- Faw W F, Shih S C, Jung C A. 1976. Extractant influence on the relationship between extractable proteins and cold tolerance of alfalfa. Plant Physiol, 57(5):720~723
- Mohapatra S S, Poole R J, Dhindsa R S. 1988. Alterations in membrane protein - profile during cold treatment of alfalfa. Plant Physiol, 86: 1 005~1 007

Effect of Low Temperature on Protein and Proline in Banana (*Musa* spp.) Leaves

Chen Jiezhong Xu Chunxiang Liang Lifeng

(Dept. of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract This study was mainly conducted in the phytotron. Low temperature stresses caused apparent physiological and biochemical changes in banana. SDS - PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) pattern showed that two polypeptides of about 1.13×10^5 and 6.45×10^4 were enhanced and a 1.20×10^5 polypeptide was induced in Xiangjiao(*Musa* AAA Group) leaves when the temperature was lowered to 1 °C. The response of Dajiao(*Musa* ABB Group) to the low temperature stress was similar to Xiangjiao except the 1.20×10^5 polypeptide had appeared indistinctly at 10 °C. It was inferred that it related the polypeptide probably to the chilling resistance of banana. As temperature decreasing, soluble proteins and free proline accumulated. There were more soluble protein and free proline in Xiangjiao leaves than in Dajiao leaves, but the rate of increasing in Dajiao was higher than that in Xiangjiao.

Key words banana; low temperature; protein; proline

【责任编辑 柴 焰】