

苦楝贮藏蛋白的初步研究

孟春晓, 高政权

(山东理工大学 生命科学院 山东 淄博 255049)

摘要:以不同季节的苦楝枝条为研究对象,利用光学显微技术和 SDS—PAGE 技术研究其枝条中贮藏蛋白在休眠期和生长期的分布情况。经汞—溴酚蓝染色后的石蜡切片显微观察表明,休眠期枝条细胞的液泡中存在大量蓝色近椭圆状蛋白颗粒,而在生长期枝条细胞的液泡中则未发现这种蛋白颗粒的存在。SDS—PAGE 结果表明:休眠期枝条中的蛋白条带数目明显多于生长期枝条且浓度高,有 12、30、32、38、40、53kD 6 条蛋白带在休眠期枝条细胞中大量特异表达。

关键词:苦楝;贮藏蛋白;显微观察;SDS—PAGE

中图分类号:Q 945.13 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2009)09—0060—03

营养贮藏蛋白质(Vegetative storage protein, 简称 VSPs)是许多落叶树种越冬期间贮藏氮的主要形式。VSPs 通常在夏末秋初开始积累,整个越冬期内含量较高,春季随着新梢的萌发,被降解成氨基酸以满足枝条生长的营养需求,VSPs 为树木在新季节的生长发育提供了营养基础^[1,2]。据有关的研究表明^[3,9],VSPs 主要分布在枝条和树干的树皮组织,尤其是次生韧皮部中。田维敏^[5]等人采用光镜和电镜技术检查了 VSPs 在 18 科 54 属 70 种热带树木中的分布。除热带树木外,田维敏

等^[10]还利用光学显微镜技术和组织化学方法研究了 15 科 29 种 2 变种温带树木中的 VSPs,结果表明,VSPs 在热带树木中的分布模式与温带树木非常相似。

苦楝(*Melia azedarach* L.)别名楝树,楝科楝属,落叶乔木,喜温暖气候,对土壤适应性强,抗污染,生长速度快。主要分布在我国华北南部至华南、西南,一般用作庭荫树、行道树、防护林树种。现以生长期和休眠期苦楝枝条为材料,利用光学显微技术和 SDS—PAGE 技术初步研究了其中 VSPs 含量的动态变化。

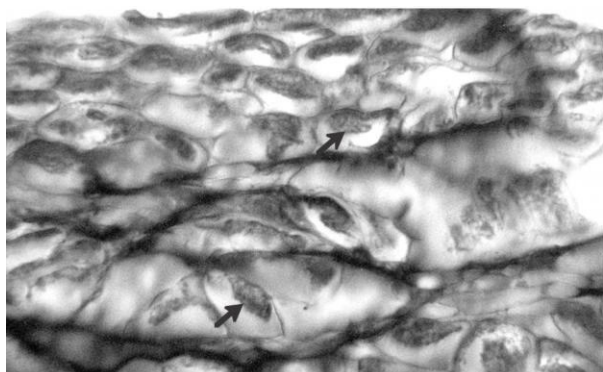


图 1 3 月初的苦楝枝条树皮经汞溴酚蓝染色后的显微图谱
注:箭头所指为贮藏蛋白颗粒。放大倍数 400×。

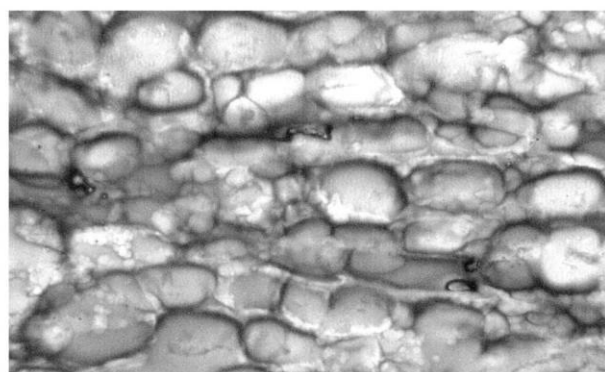


图 2 7 月初的苦楝枝条树皮经汞溴酚蓝染色后的显微图谱
注:没有观察到贮藏蛋白颗粒。放大倍数 400×。

第一作者简介:孟春晓(1977-),女,博士,副教授,现从事藻类及植物分子生物学方向研究工作。E-mail: mengchunxiao@126.com。

通讯作者:高政权(1972-),男,博士,副教授,现主要从事植物生理与藻类生物技术研究工作。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30671126);山东理工大学博士启动基金资助项目(4041-405017;4041-405016);山东理工大学自然科学基金资助项目(4040-306017)。

收稿日期:2009—04—15

1 材料与方法

研究对象苦楝采集于山东理工大学校园,收集生长期和休眠期贴上标签后储存于-70℃冰箱中备用。石蜡切片的制作方法主要参照^[11-12],石蜡经汞—溴酚蓝染色后利用 XPS-16A 普通光学显微镜进行显微观察。枝条中的总可溶性蛋白提取方法参照文献^[11-12],采用 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳^[13],分离胶 T=12%,将蛋白电泳样品煮沸 5 min 后点样 40 μL,120 V 恒压电泳约 8 h,

考马斯亮蓝 R-250 染色, 每个样品重复多次。

2 结果与分析

经汞-溴酚蓝染色后的石蜡切片显微观察表明, 休眠期苦楝枝条与生长期苦楝枝条中确实存在 VSPs 的变化。休眠期苦楝枝条中的 VSPs 大多分布在次生韧皮部 其细胞液泡中含有大量蓝色椭圆状蛋白颗粒(图 1, 箭头所指即为 VSPs 颗粒); 而在生长期苦楝枝条细胞的液泡中鲜有此类蛋白颗粒的存在(图 2)。结果表明, 休眠期苦楝枝条中存在大量 VSPs, 而生长期苦楝枝条中基本没有 VSPs 或 VSPs 很少。

根据休眠期和生长期苦楝枝条总可溶性蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱可以看出, 休眠期苦楝枝条中的蛋白条带比 7 月苦楝枝条蛋白条带的数目多且颜色深, 其中有分子量分别为 12.30、32、38.40、53kD 6 条蛋白带在休眠期枝条中特异表达(如图 3)。

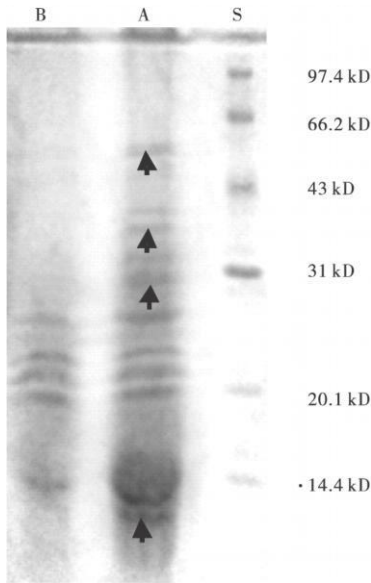


图 3 休眠期和生长期苦楝电泳图谱

注: S 为标准蛋白 A、B 分别为生长期和休眠期苦楝电泳图谱。箭头所指为休眠期中特异表达的 31 kD 和 45 kD 蛋白。

3 讨论

近年来, 对树木营养贮藏组织内各种贮藏化合物的季节性动态变化做了大量研究, 尤其是温带落叶阔叶树^[10]。许多阔叶树的枝条韧皮薄壁细胞、木薄壁细胞, 甚至形成层细胞在秋天以蛋白体或 VSPs 液泡形式积累蛋白质, 以满足第 2 年春季树木光合作用未恢复前的新梢生长的需要。虽然不同温带树种中蛋白质含量差异很大, 但其周期性季节波动很明显。该研究通过光学显

微和 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳技术初步探讨了苦楝两个季节(休眠期和生长期)的枝条中 VSPs 的含量变化, 发现休眠期枝条细胞的液泡中含有大量 VSPs 颗粒, 而在生长期枝条细胞液泡中则基本没有蛋白颗粒或含量较少; 且休眠期枝条中的蛋白条带显著多于生长期枝条, 且颜色较深(浓度高), 6 条在休眠期枝条中特异表达的 6 种蛋白的都有可能是 VSPs, 但具体哪些是, 还需要进一步研究证明。这说明苦楝枝条中的 VSPs 确实存在季节性的变化, 这与其它树种中的研究报道结果一致^[3-4 10 12]。这一结论为上述树木在入冬后开始积累 VSPs, 直到次年为新梢的生长和开花结果所消耗的观点提供了重要依据。由于时间的关系, 该试验只比较研究了休眠期和生长期两个典型季节的枝条材料, 并不知何时才是苦楝枝条中 VSPs 的最佳积累时期, 也不了解枝条中的 VSPs 是从何时开始积累的, 缺乏对这个树种枝条中 VSPs 动态变化的了解。该研究是对现有温带树木 VSPs 研究的一个补充, 也为下一步深入研究苦楝枝条中 VSPs 的动态变化提供了一定基础。

参考文献

[1] 彭方仁, 郭娟, 徐柏森. 木本植物营养贮藏蛋白质研究进展[J]. 植物学通报, 2001, 18(4): 445-450.

[2] 彭方仁, 王改萍, 郭娟. 银杏营养贮藏蛋白质的细胞学及生物化学分析[J]. 南京林业大学学报, 2006(4): 109-113.

[3] 田维敏, 吴继林, 郝秉中. 大叶桃花心木营养贮藏蛋白质的细胞学研究[J]. 热带作物学报, 1999(4): 27-29.

[4] 田维敏, 高政权, 孟春晓, 等. VSPs 在热带树木中分布的细胞学研究[J]. 热带作物学报, 2001(4): 1-6.

[5] Hao B Z, Wu J L. Vacuole Proteins in parenchyma cells of secondary phloem and xylem of Dalbergia odorifera [J]. Trees, 1993, 8: 104-109.

[6] Greenwood, Wetzel S. Seasonally dependent formation of protein-storage vacuoles in the inner bark tissues of Salix microstycha[J]. Canada Journal of Botany, 1990, 68: 1747-1752.

[7] Wu J L, Hao B Z. Vacuole protein in secondary phloem parenchyma cells of the Meliaceae species[J]. IAWA Bull, 1991, 12: 51-56.

[8] Wetzel S, Demmers C, Greenwood J S. Spherical organelles: analogous to seed protein bodies, fluctuate seasonally in parenchymatous cells of hardwoods[J]. Canada Journal of Botany, 1989, 67: 3439-3445.

[9] Tian W M, Han Y Q, Wu J L, et al. Characteristics of protein-storing cells associated with a 67 kDa protein in Hevea brasiliensis[J]. Trees, 1998, 12: 153-159.

[10] 田维敏, 吴继林, 郝秉中, 等. 15 科温带树木营养贮藏蛋白质的细胞学研究[J]. 西北植物学报, 2000, 20(5): 838-841.

[11] 田维敏. 树木营养贮藏蛋白质的细胞学、生物化学和生物学功能的研究[D]. 西安: 西北大学博士学位论文, 2002.

[12] 潘瑞英. 荔枝营养贮藏蛋白质的分离鉴定及其与开花结实的关系[D]. 儋州: 华南热带农业大学硕士学位论文, 2004.

[13] 李合生. 植物生理生化实验原理技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 178-185.

木霉菌 REMI 转化体诱导番茄植株产生防御酶系的研究

刘 限¹, 赵 岩¹, 高增贵², 庄敬华², 郭培磊¹

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110164; 2. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 对不同木霉菌 REMI 转化体诱导番茄产生的 PAL、POD、CAT 和 SOD 防御酶系进行了研究。结果表明: Ttm55 处理番茄植株产生的酶活性与其它菌株有所不同, PAL、POD 和 CAT 的变化趋势明显不同于其它菌株; SOD 与其它菌株的变化趋势一致, 但 SOD 酶活性高于其它菌株。Ttm31 处理番茄植株产生的各种防御酶系的变化趋势与其它菌株的基本一致, 但 CAT、PAL 活性高于其它菌株; 而 SOD、POD 活性稍低。Ttm34 处理番茄植株产生的防御酶系中 POD、PAL 活性稍高; 而其它酶活性稍低。

关键词: 木霉菌转化体; 番茄; 防御酶

中图分类号: S 641.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)09-0062-03

木霉菌(*Trichoderma* spp.)作为重要的植物病害生防菌已引起人们的普遍关注, 目前关于木霉菌生防机制的研究大多集中于对病原菌的重寄生作用、拮抗作用和营养竞争方面^[1-4]。De Meyer 等利用哈茨木霉 T39 接种根部或叶子, 控制了灰葡萄孢引起的病害, 认为诱导抗性是重要机制之一^[5]。Yedidia 等也证实了哈茨木霉菌株 T203 穿透到黄瓜根部产生了一种类似的诱导抗

性^[6]。为了研究木霉菌与植物抗病代谢活动的关系, 现利用限制性内切酶介导整合(Restriction Enzyme-Mediation Integration, REMI)技术对木霉菌 T21 进行了改造, 获得了对番茄灰霉病防效不同的木霉菌转化体, 利用这些木霉菌转化体处理番茄幼苗后, 对叶片几种主要防御酶活性进行了初步研究, 为进一步深入研究木霉菌的多重生防机理和 REMI 技术在木霉菌上的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 番茄品种和供试菌株

品种为 L1402, 菌株为木霉菌初发菌株 T21, REMI 变异株 Ttm31、Ttm34 和 Ttm55。

1.2 接种及取样

将番茄 L1402 育苗后, 移栽到花盆中, 于沈阳农业大学植物免疫研究所温室, 待长至 5~6 叶期, 采用毛笔

第一作者简介: 刘限(1970-), 男, 河北唐山人, 博士, 副教授, 现主要从事设施蔬菜病害生物防治研究工作。E-mail: benz117309@sina.com.cn。

基金项目: 辽宁省博士启动资助项目(20051051); 辽宁省教育厅资助项目(20040323)。

收稿日期: 2009-03-20

Study of Vegetative Storage Protein in *Melia azedarach* L.

MENG Chun-xiao, GAO Zheng-quan

(College of Life Sciences, Shandong University of Technology, Zibo, Shandong 255049, China)

Abstract: Vegetative storage proteins(VSPs)in the *Melia azedarach* L. were identified by using optical microscopy and SDS-PAGE. Under optical microscope, deep blue masses in a granular appearance were observed in the secondary xylem parenchyma cells of the dormancy season barks after stained with mercury-bromophenol blue. However, there was no granular protein in the development season barks. Compared with SDS-PAGE results of the development season barks, there were six 12, 30, 32, 38, 40, 53 kD major proteins expressed in the dormancy season barks, which was probably the vegetative storage protein of *Melia azedarach* L.

Key words: *Melia azedarach* L.; Vegetative storage proteins; Microscopy; SDS-PAGE