

不同核桃品种的耐寒性及其渗透调节机制

杨 惠, 翟梅枝*, 李 丽, 许 静, 王 丹, 王振元, 肖志娟

(西北农林科技大学 核桃研究中心, 陕西杨陵 712100)

摘 要:以‘香玲’、‘鲁 W06-1’、‘西洛 3 号’3 个核桃品种(优系)为材料, 对低温胁迫各材料的耐受情况及相应渗透调节物质含量和总蛋白质表达的变化情况进行分析, 以揭示低温胁迫下不同核桃品种(优系)的渗透调节机制和蛋白质组分差异。结果显示: (1) 3 个核桃品种(优系)休眠枝条解剖结构分析表明, ‘鲁 W06-1’ 一年生休眠枝条的木质部比率最大, ‘西洛 3 号’ 的韧皮部厚度显著大于其他两个品种(优系)。 (2) 随胁迫温度降低和胁迫时间的延长, 枝条相对电导率(REC)逐渐升高, 且‘西洛 3 号’ 的相对电导率均大于‘鲁 W06-1’ 和‘香玲’。 (3) 核桃枝条可溶性糖、可溶性蛋白和游离脯氨酸含量均随温度降低先增加后减小, 但各品种(优系)增至最大值的温度不同, 其中‘鲁 W06-1’ 枝条积累可溶性蛋白的速度和幅度较大, 且各低温胁迫处理后的枝条可溶性糖和游离脯氨酸的含量也更高; 3 种渗透调节物质含量之间均呈极显著正相关关系, 可溶性糖与游离脯氨酸含量的相关系数达 0.844, 表明二者对低温胁迫的应答反应密切相关。 (4) 在不同胁迫温度和胁迫时间处理后, 核桃枝条的蛋白质表达谱带总体相似, 但检测出 6 条表达量明显增加的差异条带, 它们的分子量范围为 38.9~87.9 kD。研究表明, 3 个核桃品种(优系)的耐寒性强弱为‘鲁 W06-1’ > ‘香玲’ > ‘西洛 3 号’; 低温胁迫下, 核桃枝条迅速积累可溶性蛋白, 然后积累可溶性糖和游离脯氨酸, 并以耐寒性较强品种(优系)积累速度更快、积累量更大, 且耐寒性较强的品种(优系)枝条蛋白谱带出现较多表达量增加的条带。

关键词: 核桃; 耐寒性; 渗透调节; 蛋白质表达

中图分类号: Q945.78; Q789 **文献标志码:** A

Cold-tolerance and Osmoregulation Mechanism of Walnut Cultivars

YANG Hui, ZHAI Meizhi*, LI Li, XU Jing, WANG Dan, WANG Zhenyuan, XIAO zhijuan

(Walnut Research Center, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Three walnut cultivars (superior line), ‘Xiangling’, ‘Lu W06-1’ and ‘Xiluo 3’, were used as experimental materials to study their cold-tolerance and the effect of different low temperatures and times on walnut’s osmolytes content and protein expression. Results showed that: (1) The ratio of xylem of ‘Lu W06-1’s 1-year-old twigs was the largest, and thickness of phloem of ‘Xiluo 3’ was significant larger than that of others. (2) With the temperature decreasing, relative electric conductivity (REC) increased gradually, and the REC of ‘Xiluo 3’ was almost larger than that of other two walnut cultivars (superior line) under every treatment. (3) The contents of soluble sugar (SS), free proline (FP) and soluble protein (SP) increasing firstly and then decreasing. However, the temperatures that increased to maximum value were still different. The SP contents of ‘Lu W06-1’ increased faster and larger, and its SS and FP contents were always larger than that of others under treatments. There were significant positive correlations between any two osmolytes of the three osmolytes, especially the correlation coefficient between SS and FP, which was 0.844. These indicated that their respond to cold stress were linked by a close relationship. (4) Electro-

收稿日期: 2013-06-24; 修改稿收到日期: 2013-09-03

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(201004027); 陕西省科技统筹创新工程计划(2012KTZB02-01)

作者简介: 杨 惠(1988—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物抗寒生理生态方面的研究。E-mail: hui295@126.com

* 通信作者: 翟梅枝, 教授, 硕士生导师, 主要从事植物病害生物防治、植物资源开发利用等方面的教学与研究。E-mail: plum-zhai@163.com

phoretic protein patterns showed similar among different treatments, but there were significant accumulation existed in 6 protein bands of walnut branches when exposed to low temperature, which was from 38.9 kD to 87.9 kD. The cold tolerance abilities were ranked in the following order: 'Lu W06-1' > 'Xiangling' > 'Xiluo 3'. When exposed to low temperature, SP content of walnut branches accumulated rapidly, then SS and FP increased. In addition, more accumulated protein bands were detected in walnut branch which was more cold-tolerant.

Key words: *Juglans regia* L.; cold-tolerance; osmoregulation; protein expression

核桃(*Juglans regia* L.)又名胡桃,为世界四大干果之一,是中国重要的经济林树种。由于核桃喜温和早春开花的习性,极端低温和无霜期等环境因素对其生长影响较大^[1]。近年来,中国北方地区冬季以及早春气温偏低,并且常出现倒春寒和晚霜,造成核桃产量下降甚至绝收。因此,深入研究核桃耐寒性和耐寒机理十分必要。

植物对低温胁迫的应答是一个复杂的过程,其中渗透调节物质发挥着重要作用。细胞有机渗透调节物质包括可溶性糖、游离脯氨酸、可溶性蛋白等,其含量的增加可减少细胞失水,维持细胞所需渗透压,抑制质外体结冰,减少低温对植物细胞的机械损伤和进一步破坏,提高植物对低温的适应性^[2]。李小琴等^[3]研究表明核桃耐寒性与离体叶片的可溶性糖含量呈正相关;相昆等^[4]报道 6 个核桃品种(系)枝条的脯氨酸含量和可溶性蛋白含量随处理温度的降低而增加。但迄今对核桃枝条中渗透调节物质的系统研究鲜有报道。此外,低温胁迫下的蛋白质组分分析已经在小麦、杨树、水稻等植物中有较多研究^[5-8],但在核桃中也尚未见报道。

本研究以陕西主栽核桃品种'香玲'、耐寒性较强的鲜食核桃优系'鲁 W06-1'以及晚实核桃品种'西洛 3 号'为试验材料,考察其一年生休眠枝条的解剖结构以及在不同胁迫温度和时间下的枝条相对电导率、可溶性糖含量、可溶性蛋白含量以及游离脯氨酸含量变化,并提取蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),以期探索低温胁迫下不同核桃品种(优系)的渗透调节机制和蛋白质组分差异,为筛选耐寒性较强的核桃品种和采取适宜措施提高核桃耐寒性提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

2011 年 12 月中旬在西北农林科技大学山阳核桃试验示范站随机选择 5 年生、长势一致的'鲁 W06-1'、'香玲'、'西洛 3 号'核桃品种(优系)各 5 株,剪取朝向和生长部位相对一致、无病虫害的当年

生休眠枝条。用修枝剪剪成约 20 cm 长小段,自来水洗掉尘土,再经蒸馏水冲洗 3 遍,滤纸吸干水分,剪口封蜡,置于密封袋中备用。

1.2 胁迫处理

胁迫温度设置 -10 °C、-15 °C、-20 °C、-25 °C 及 -30 °C 等 5 个梯度水平,以未经低温处理材料为对照。各品种(优系)随机取 30 段枝条,按照每处理 5 段放入数控冰箱内进行低温胁迫。处理时以 4 °C·h⁻¹ 匀速降温,达到处理温度后保持 12 h,然后控制相同速率匀速升温,至实验室温度(10 °C)时取出,静置 4 h 后用于测定分析。胁迫时间的处理为匀速降至 -20 °C 后分别保持 12、24、36 h,之后同温度梯度处理,以未经低温处理的材料为对照。

1.3 枝条解剖结构观察测定

随机选取各品种(优系)枝条的中部枝段 5 段,剪成 1.0 cm 小段放入 FAA 固定液中,抽真空固定保存。先用 25% 甘油浸泡软化,然后用冷冻切片机切片,切片厚度为 20~30 μm,经过甲苯胺蓝 O 染色,每个材料重复 5 次。在显微镜下观察,并测量枝条半径、韧皮部厚度、木质部厚度和髓半径,各测 5 个部位。

1.4 生理指标测定

相对电导率的测定参考 Poirier 等^[9]的方法,计算方法参考 Zhang 等^[10]的方法。游离脯氨酸和可溶性糖含量的测定均参考高俊凤^[11]的方法。采用丙酮沉降法提取总可溶性蛋白,参考谷瑞升等^[12]、曾广娟等^[13]方法,并略有改动。采用考马斯亮蓝染色法(G-250)^[14]测定蛋白质含量。各指标测定均重复 3 次。试验数据采用 Microsoft Excel 和 SPSS 16.0 软件进行制图和统计分析。

1.5 SDS-PAGE 凝胶电泳

经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离鉴定低温诱导蛋白。采用北京市六一仪器厂 DYY-6C 型三恒电泳仪进行不连续垂直板 SDS-PAGE 凝胶电泳。分离胶浓度为 12%(pH 8.8),浓缩胶浓度为 5%(pH 6.8)。样品上样量为 20 μL,开始电流为 15 mA,进入分离胶后为 25 mA,当指示剂移动至离边缘约 1

cm 时停止电泳。考马斯亮蓝 R-250 染色,每个处理重复 2 次。脱色后凝胶用 BIO-RAD Molecular Imager 凝胶成像系统扫描,使用 Image Lab 4.0 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同品种(优系)核桃枝条解剖结构的比较

3 个核桃品种(优系)的休眠枝条解剖结构指标及方差分析结果表明(表 1),韧皮部厚度以‘西洛 3 号’最大,并显著大于‘鲁 W06-1’和‘香玲’($P < 0.05$);木质部厚度和木质部比率(木质部/枝条半径)均以‘鲁 W06-1’的最大,并均显著大于‘西洛 3 号’;而它们的髓半径和枝条半径差异不显著。因此,3 个品种(优系)中‘鲁 W06-1’枝条的木质化程度最高,耐寒性最强,随后依次为‘香玲’和‘西洛 3 号’,这与田间观察结果相同。

2.2 低温胁迫对核桃枝条相对电导率的影响

低温胁迫影响细胞膜的稳定性和流动性,导致细胞内含物外渗、代谢紊乱甚至植物死亡。由图 1, A 可看出,3 个核桃品种(优系)枝条的相对电导率随胁迫温度的降低均逐渐升高,呈“S”型变化趋势。

在相同温度胁迫下,‘西洛 3 号’的相对电导率大于‘香玲’和‘鲁 W06-1’,说明‘香玲’和‘鲁 W06-1’的耐寒性强于‘西洛 3 号’,这与上述枝条解剖结构的结果一致。另外,‘香玲’和‘鲁 W06-1’枝条在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理后的相对电导率约为 50%,‘西洛 3 号’在 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理后的相对电导率即达到 50.11%。由此推测,‘香玲’和‘鲁 W06-1’的半致死温度约为 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,‘西洛 3 号’的半致死温度约为 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$,这也进一步证实了各核桃品种(系)耐寒性强弱表现。因此,选择 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作为研究低温胁迫时间对 3 个核桃品种(优系)影响的处理温度。

由图 1, B 可见,在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下处理相同时间,‘鲁 W06-1’的相对电导率均小于其他两个品种,说明‘鲁 W06-1’膜系统受到的低温破坏比其他两个品种小,耐寒性强。‘香玲’和‘西洛 3 号’在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 36 h 的相对电导率,以及在 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 12 h 后两者的相对电导率均达到 70% 左右(图 1, A),由此可见,低温胁迫对核桃枝条细胞膜的破坏程度受到胁迫时间和时间的双重影响。

另外,在本实验条件下,‘香玲’的相对电导率在不同胁迫温度下的变异系数为 34.8%,明显大于不

表 1 不同核桃品种(优系)的休眠枝条解剖结构的比较

Table 1 Comparison of the anatomical structure of annual branches among different walnut cultivars (superior line)

品种(优系) Cultivar (superior line)	韧皮部厚度 Thickness of phloem/ μm	木质部厚度 Thickness of xylem/ μm	髓半径 Radius of pith/ μm	枝条半径 Radius of branch/ μm	木质部比率 The ratio of xylem/%
鲁 W06-1 Lu W06-1	375.87 \pm 32.82b	1 839.55 \pm 53.17a	1 196.23 \pm 60.36a	3 597.35 \pm 85.75a	51.14 \pm 0.01a
香玲 Xiangling	370.89 \pm 52.66b	1 806.54 \pm 64.62ab	1 226.72 \pm 84.85a	3 632.88 \pm 96.16a	49.73 \pm 0.01ab
西洛 3 号 Xiluo 3	446.66 \pm 27.14a	1 758.95 \pm 86.42b	1 192.79 \pm 121.44a	3 604.09 \pm 98.30a	48.81 \pm 0.02b

注:同列不同字母表示品系间在 0.05 水平存在显著性差异。
Note: The different normal letters indicate significant difference among cultivars at 0.05 level.

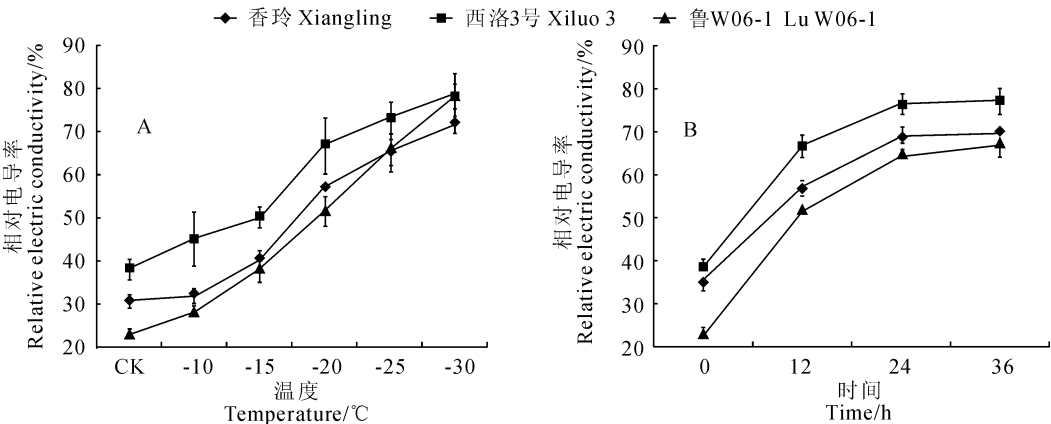


图 1 低温胁迫下各核桃品种枝条相对电导率的变化

Fig. 1 The changes of relative electric conductivity in annual branches of different walnut cultivars under low temperature

同胁迫时间下的变异系数(29.3%),说明温度对其相对电导率的影响大于 -20°C 下处理时间造成的影响。‘鲁 W06-1’和‘西洛 3 号’也有类似的结果。由此推测,极端低温对核桃枝条细胞膜的破坏程度可能比半致死温度下处理较长时间的更大。

2.3 低温胁迫对核桃枝条渗透调节物质含量的影响

2.3.1 可溶性糖含量

由图 2, A 可知,随胁迫温度的降低,‘香玲’、‘西洛 3 号’和‘鲁 W06-1’的枝条可溶性糖含量均呈先增加后降低的趋势,且均在 -20°C 时达到最大,分别比胁迫前显著提高26.16%、46.7%和27.48%。除 -25°C 外,‘鲁 W06-1’在其他各温度处理后的可溶性糖含量均最大,说明其枝

条在低温处理后能积累较多可溶性糖,耐寒性较强。此外,‘西洛 3 号’未经处理时的可溶性糖含量较低,但是低温处理后的含量均大于‘香玲’,可见‘西洛 3 号’的枝条可溶性糖积累反应强于‘香玲’。如图 2, B 所示,在 -20°C 处理 12 h 时,3 个核桃品种(优系)枝条的可溶性糖含量均显著增加;处理 24 h 时,‘西洛 3 号’和‘鲁 W06-1’的可溶性糖含量相对降低,‘香玲’却继续增加;而在处理 36 h 时,前二者的含量又上升,‘香玲’却降低。这可能是它们对低温胁迫表现出的不同适应性响应。

2.3.2 游离脯氨酸含量

在 -20°C 胁迫下,‘鲁 W06-1’和‘西洛 3 号’枝条的游离脯氨酸含量分别为对照的 2.08 倍和 2.94 倍,增加幅度较大;当温度

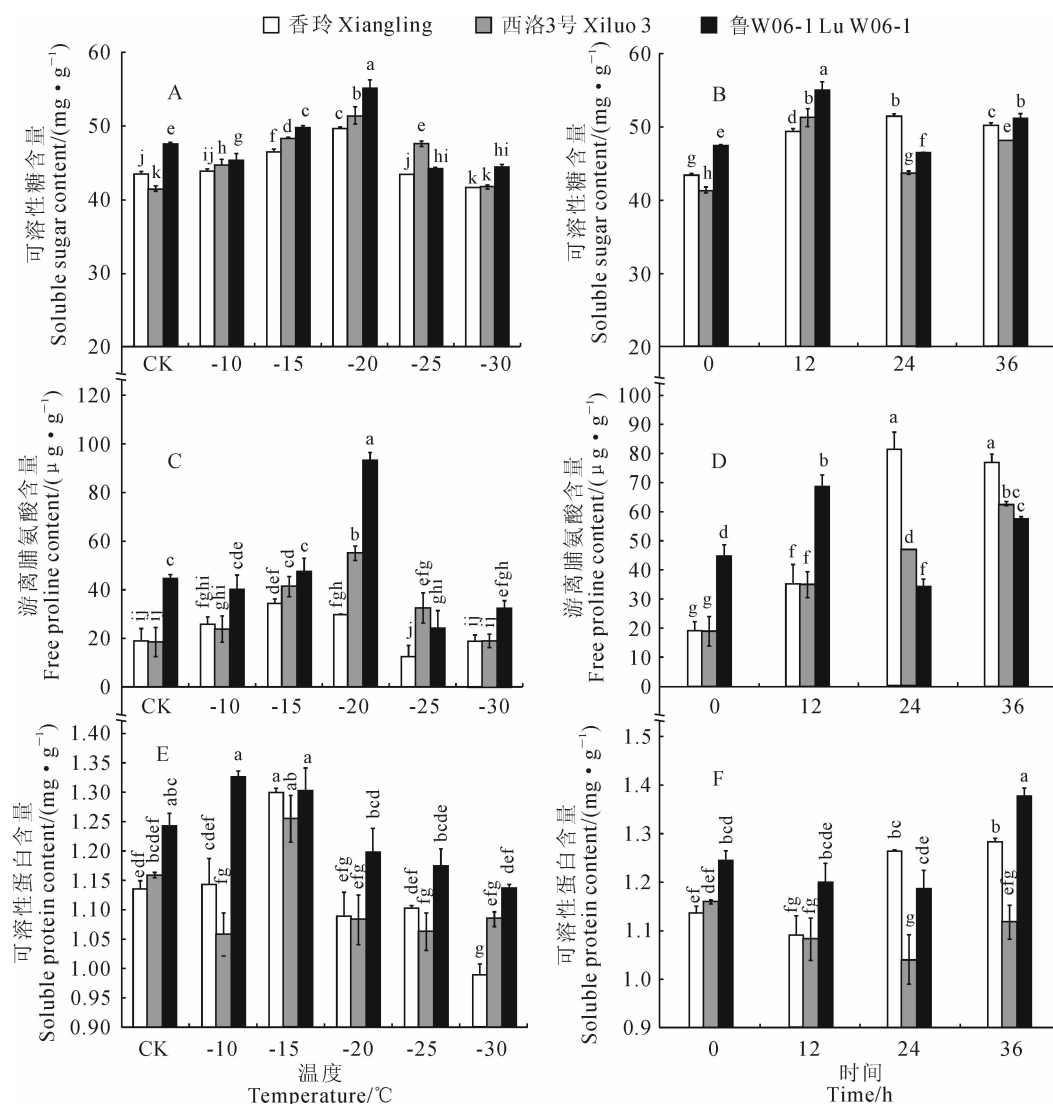


图 2 低温胁迫下各核桃品种枝条渗透调节物质含量的变化

不同字母表示处理间在 0.05 水平存在显著性差异

Fig. 2 The content of osmolytes in branches of different walnut cultivars under low temperature

The different normal letters indicate significant difference among treatments at 0.05 level

继续降低时,3个品种(优系)的游离脯氨酸含量均迅速减小(图2,C)。另外,‘西洛3号’枝条的游离脯氨酸含量随低温胁迫时间的延长持续增加且差异显著($P < 0.05$),在处理36 h时增加至对照的3.31倍;‘香玲’在 -20°C 处理24 h时游离脯氨酸含量急剧增加,为对照的4.22倍,显著大于其他两个品种(优系),并且处理36 h时仍然保持显著高于其他品系的较高水平;‘鲁W06-1’的脯氨酸含量随处理时间表现出升-降-升的趋势,并在处理12 h时显著高于其他品系,其后均显著低于其余品系(图2,D)。由此推测,‘西洛3号’和‘香玲’的游离脯氨酸代谢在 -20°C 处理24~36 h时保持稳定,而在低于 -20°C 的环境中处理12 h即受到破坏,游离脯氨酸含量迅速降低。

2.3.3 可溶性蛋白含量 在各梯度温度胁迫下(图2,E),‘鲁W06-1’枝条的可溶性蛋白含量均高于其他品种。在 -10°C 处理时,‘鲁W06-1’的可溶性蛋白含量达到最大,而在 -15°C 处理时‘香玲’和‘西洛3号’的可溶性蛋白含量才达到各自的最大值;由此推测低温胁迫时,‘鲁W06-1’体内快速产生可溶性蛋白以抵御低温伤害,这可能是‘鲁W06-1’的耐寒性优于‘香玲’和‘西洛3号’的原因之一。当胁迫温度降低至 -30°C 时,3个品种(优系)的可溶性蛋白含量均显著低于对照水平,原因可能是其合成酶活性在低温环境中降低,或者蛋白质结构被破坏。同时,图2,F显示,随着处理时间的延长,各品种(优系)枝条的可溶性蛋白含量表现出先降再升的趋势,‘鲁W06-1’和‘香玲’最大值均出现在胁迫36 h,而‘西洛3号’则出现在处理前(0 h),这也可能是‘西洛3号’耐寒性较弱的原因之一。另外,比较图2,A、C、E可知,各核桃品种(优系)枝条的可溶性糖和游离脯氨酸含量均在 -20°C 时达到最大,而它们的可溶性蛋白含量最大值出现在 -10°C 或 -15°C ,说明核桃受到低温胁迫后可溶性蛋白系统的应答反应比其他两种渗透调节物质更迅速。

经进一步分析发现,核桃枝条中3种可溶性渗透调节物质的含量之间均具有极显著的正相关性,尤其是可溶性糖和游离脯氨酸含量的相关系数达到0.844。再依据图2的变化趋势可推测,核桃枝条受到低温胁迫后,可溶性糖和游离脯氨酸的应答反应密切相关,同时它们与可溶性蛋白的应答反应具有一定的协同作用。不同耐寒性核桃品种的枝条渗透调节物质的含量变化趋势相似:随胁迫温度的降低先上升后降低;可溶性糖和游离脯氨酸含量随胁迫

时间的延长先上升后下降再回升,可溶性蛋白先下降后上升。但是,耐寒性较强的核桃品种(优系),其枝条积累可溶性蛋白的速度和幅度较大,并且各低温胁迫处理后的枝条可溶性糖和游离脯氨酸的含量也比耐寒性较弱的品种(优系)高。

2.4 低温胁迫下核桃枝条蛋白质的SDS-PAGE电泳分析

不同胁迫温度下核桃枝条蛋白质的SDS-PAGE电泳结果如图3所示。在未经处理时(CK),3个品种(优系)在蛋白表达量上存在差异,其中的‘鲁W06-1’最高,这与图2,E所反映的结果一致。各品种(优系)间蛋白质电泳谱带总体相似,但耐寒性较强的‘鲁W06-1’的62.5~47.5 kD、25.6 kD、18.2~16.7 kD区间的条带明显亮于耐寒性较弱的‘西洛3号’,由此推测,这3个区间条带的表达量的差异导致了低温胁迫下不同耐寒性核桃品种枝条蛋白含量的差异。

低温胁迫后,3个品种(优系)的38.9 kD和83.3 kD的条带表达量均增加,其中的‘鲁W06-1’在 -10°C 胁迫时其表达量明显增加,而‘香玲’和‘西洛3号’在 -15°C 胁迫时才明显增加。此外,‘鲁W06-1’在 -30°C 胁迫下,可诱导产生56.6 kD

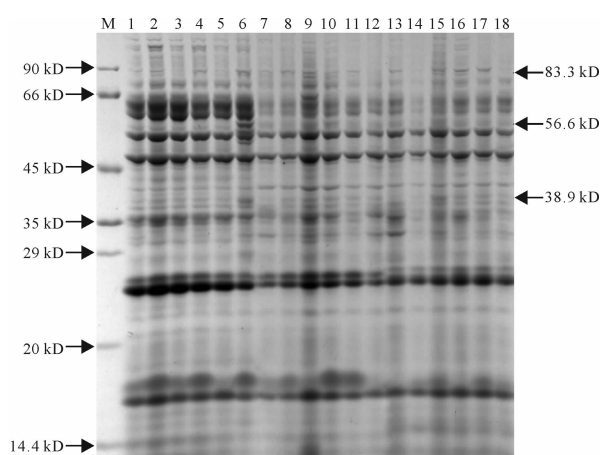


图3 不同低温胁迫下核桃枝条蛋白质电泳图谱
除标准蛋白(M)外,第1~6泳道为‘鲁W06-1’,7~12泳道为‘香玲’,
13~18泳道为‘西洛3号’,每品种按照由左至右的顺序分别为
CK、 -10°C 、 -15°C 、 -20°C 、 -25°C 和 -30°C 胁迫处理

Fig. 3 SDS-PAGE patterns of proteins in walnut branches under different low temperature treatments
The 1st to 6th line is ‘Lu W06-1’, 7th to 12th line is ‘Xiangling’,
13th to 18th line is ‘Xiluo 3’, except Marker(M). For each walnut cultivars (superior line), there are proteins of branches under CK, -10°C , -15°C , -20°C , -25°C and -30°C treatment from the left to the right, respectively

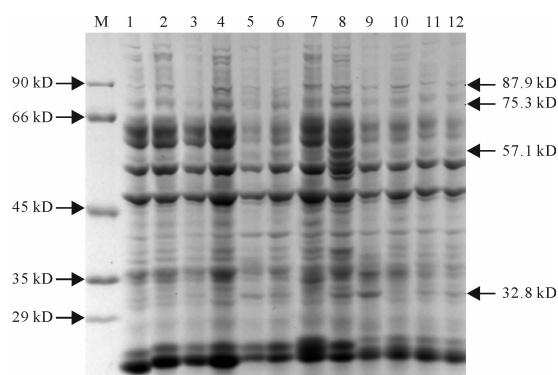


图4 不同胁迫时间下核桃枝条蛋白电泳图谱
除标准蛋白(M)泳道外,第1~4泳道为‘鲁 W06-1’,第5~8
泳道为‘香玲’,第9~12泳道为‘西洛3号’,且每品种
由左至右分别为 CK、12 h、24 h、36 h 处理

Fig. 4 SDS-PAGE patterns of proteins in walnut branches under -20°C with different time treatments
The 1st to 4th line is ‘Lu W06-1’, 5th to 8th line is ‘Xiangling’,
9th to 12th line is ‘Xiluo 3’, except Marker. For each walnut cultivars (superior line), there are proteins of branches under CK, 12 h, 24 h and 36 h treatment from the left to the right, respectively
的新条带,且表达量相对较高,推测该蛋白条带为低温诱导蛋白。

由图4可知,在 -20°C 下胁迫不同时间后,3个核桃品种(优系)枝条蛋白电泳谱带存在差异。其中,‘西洛3号’各时间处理后的电泳谱带总体相似,总可溶性蛋白表达量差异不显著,但32.8 kD条带随胁迫时间的增加而降低,说明该蛋白条带对低温较敏感。随胁迫时间的增加,‘香玲’枝条中57.1 kD蛋白表达量显著增强,与图3中‘鲁 W06-1’在 -30°C 胁迫下诱导产生56.6 kD新蛋白条带的分子量相似,推测它们均为核桃枝条的低温诱导蛋白。此外,‘鲁 W06-1’和‘香玲’枝条中的87.9 kD和75.3 kD条带表达量增加,且在胁迫36 h时达到最大,推测这两个条带表达量增加可能与提高核桃细胞的耐寒性有关。

3 讨论

3.1 核桃枝条在低温胁迫下的渗透调节应答

许多植物在受到温度、水分和高盐等胁迫时均积累游离脯氨酸,且在低温环境中常积累可溶性糖和可溶性蛋白^[2,15-16]。植物通过积累可溶性糖、可溶性蛋白和游离脯氨酸等渗透调节物质,平衡细胞渗透压,降低细胞水势和冰点,避免或减轻伤害^[17]。

Jacobsen等^[18]对藜麦的研究结果表明,在 4°C 处理10 d后,叶片可溶性糖含量增加了10倍,游离脯氨酸含量增加了约4.3倍,并提出游离脯氨酸和

可溶性糖含量可以作为耐冻性强弱的指标。冬油菜在处理14~21 d时的可溶性糖含量为对照的3.8~10倍,游离脯氨酸含量逐渐增加并在处理21 d时达到对照的5.4倍^[19]。对法国中南部的核桃栽培品种的研究显示,核桃枝条冬季的可溶性糖含量显著高于春季和秋季,且春季最低,说明可溶性糖含量的增加与核桃耐寒性的增强有关^[9]。本研究显示,在低温胁迫下,‘鲁 W06-1’、‘香玲’和‘西洛3号’枝条的可溶性糖和游离脯氨酸含量均显著增加,其中3个品种(优系)的游离脯氨酸含量最大值均增加至对照的2倍以上,增加幅度最大,推测核桃的渗透调节应答以游离脯氨酸含量的变化为主,而其他物种(如藜麦和冬油菜)主要表现为可溶性糖含量的增加。由此说明,不同的物种中由低温胁迫诱导的各渗透调节物质含量的变化幅度不同。

研究表明,植物在适应低温环境的过程中常积累可溶性蛋白,如冬小麦和卷心菜^[21]。将冬小麦和春小麦幼苗置于 4°C 下处理14 d,其可溶性蛋白含量均有显著增加,且冬小麦积累可溶性蛋白的速度快于春小麦,推测耐寒性较强的品种积累可溶性蛋白速度较快^[7]。本研究表明,耐寒性强优系‘鲁 W06-1’枝条的可溶性蛋白含量在 -10°C 胁迫时显著增加,而其他两个品种在 -15°C 才显著增加,且在大部分低温胁迫处理后‘鲁 W06-1’的可溶性糖和游离脯氨酸含量均较高,相对电导率较低。由此可见,在冬季遭遇低温胁迫时,耐寒性较强的核桃品种能快速积累可溶性蛋白,大量积累可溶性糖和游离脯氨酸,从而维持细胞所需的渗透压、减少细胞内含物外渗,相对电导率较低,进而维护细胞的结构和功能稳定。

3.2 低温胁迫诱导核桃枝条蛋白表达的变化

本研究表明,各核桃品种(优系)枝条分别在不同胁迫时间和不同胁迫温度的 SDS-PAGE 蛋白谱带存在差异。Karimzadeh等^[7,22]报道,在小麦早期低温胁迫时出现3条(166、180和200 kD)差异蛋白条带,在黑麦中出现分子量为310 kD的差异蛋白条带。Renaut等^[8]将杨树幼苗置于 4°C 下处理,鉴定出26个差异蛋白,其分子量范围为8.5~85 kD。本研究也未检测到明显的高分子低温诱导蛋白(56.6 kD、57.1 kD),推测草本和木本植物在低温胁迫下诱导产生的主要差异蛋白有较大区别。

前人研究^[5,8]表明,低温诱导产生的差异蛋白点中三分之一为分子伴侣类蛋白(例如热激蛋白和分子伴侣),部分类似脱水蛋白。这些蛋白点各自具

有重要的功能,有的涉及信号转导过程,有的与细胞能量代谢有关,有的参与蛋白质结构的折叠、细胞生长以及细胞死亡等过程。本研究中,核桃枝条经低温胁迫处理后检测出 6 条表达量明显增加的差异蛋白条带,其分子量分别为 38.9、56.6、57.1、75.3、83.3、87.9 kD,其中‘西洛 3 号’中仅出现 2 条差异

条带(38.9 kD 和 83.3 kD),‘香玲’和‘鲁 W06-1’均分别出现了 5 条差异条带,这可能是‘西洛 3 号’耐寒性较差的原因之一。关于这些差异条带的进一步分析鉴定和功能预测的研究,有待通过双向电泳、质谱分析等手段进行深入研究。

参考文献:

- [1] 郝荣庭,张毅萍. 中国果树志(核桃卷)[M]. 北京:中国林业出版社,1996:36.
- [2] HARE P D, CRESS W A, VAN S J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress[J]. *Plant Cell Environ*, 1998, **21**(6):79—102.
- [3] LI X Q(李小琴), PENG M J(彭明俊), DUAN A A(段安安), *et al.* Effects of low temperature stress on physiological indices of eight clod resistance *Juglans sigillata* clones[J]. *Journal of Northwest Forestry University* (西北林学院学报), 2012, **27**(6):12—15(in Chinese).
- [4] XIANG K(相 昆), ZHANG M Y(张美勇), XU Y(徐 颖), *et al.* Cold-tolerance of walnut cultivars: A comprehensive evaluation[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2011, **22**(9):2 325—2 330(in Chinese).
- [5] HAO Q(郝 强), ZHANG R P(张瑞鹏), LENG P SH(冷平生), *et al.* Proteomic analysis of cold stress responses in *Euonymus japonicus* leaves[J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2011, **38**(11):2 169—2 179(in Chinese).
- [6] CUI S, HUANG F, WANG J. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings[J]. *Proteomics*, 2005, **5**:3 162—3 172.
- [7] KARIMZADEH G, SHARIFI-SIRCHI G R, JALALI-JAVARAN M, *et al.* Soluble protein induced by low temperature treatment in the leaves of spring and winter wheat cultivars[J]. *Pak. J. Bot.*, 2006, **38**(4):1 015—1 026.
- [8] RENAUT J, LUTTS S, HOFFMANN L, *et al.* Responses of poplar to chilling temperatures: proteomic and physiological aspects[J]. *Plant Biology*, 2004, (6):81—90.
- [9] POIRIER M, BODET C, PLOQUIN S, *et al.* Walnut cultivar performance of cold resistance in south central france[J]. *Acta Hort*, 2006, 705:281—285.
- [10] ZHANG M I N, WILLISON J H M. An improved conductivity method for measurement of frost hardiness[J]. *Can. J. Bot.*, 1987, **65**:710—715.
- [11] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 2006:210—231.
- [12] GU R SH(谷瑞升), LIU Q L(刘群录), CHEN X M(陈雪梅), *et al.* Comparison and optimization of the methods on protein extraction and SDS-PAGE in woody plants[J]. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), 1999, **16**(2):171—177(in Chinese).
- [13] ZENG G J(曾广娟), LI CH M(李春敏), ZHANG X ZH(张新忠), *et al.* Leaf protein extraction methods suitable for SDS-PAGE analysis in apple[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* (华北农学报), 2009, **24**(2):75—78(in Chinese).
- [14] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**:248—254.
- [15] TABAEI-AGHDAEI S R, PEARCE R S, HARRISON P. Sugars regulate cold-induced gene expression and freezing-tolerance in barley cell cultures[J]. *J. Exp. Bot.*, 2003, **54**:1 565—1 575.
- [16] WU H(武 辉), ZHANG J S(张巨松), SHI J Y(石俊毅), *et al.* Physiological responses of cotton seedlings under low temperature stress [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2013, **33**(1):74—82(in Chinese).
- [17] AARON J P, SUZANNE M C, JEFFREY J V, *et al.* Differences in freeze tolerance of zoysiagrasses: II. carbohydrate and proline accumulation[J]. *Crop Science*, 2007, **47**:2 170—2 181.
- [18] JACOBSEN S E, MONTEROS C, CORCUERA L J, *et al.* Frost resistance mechanisms in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)[J]. *Eur. J. Agron*, 2007, **26**:471—475.
- [19] BURBULIS N, JONYTIENĖ V, KUPIENĖ R, *et al.* Changes in proline and soluble sugars content during cold acclimation of winter rapeseed shoots *in vitro*[J]. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 2011, **9**(2):371—374.
- [20] ATICI Ö, DEMIR Y, KOCAÇALIŞKAN İ. Effects of low temperature on winter wheat and cabbage leaves[J]. *Biol. Plant*, 2003, **46**:603—606.
- [21] KARIMZADEH G, FRANCIS D, DAVIES M S. Low temperature-induced accumulation of protein is sustained both in root meristems and in callus in winter wheat but not in spring wheat[J]. *Annals of Botany*, 2000, **85**:769—777.