

## 棉苗抗冷性与低温诱导蛋白关系的研究

李生泉, 李 锐, 范月仙

(山西农业大学, 太谷 030801)

**摘要:**以具有显著抗冷性差异的早熟和晚熟两种陆地棉品种为材料,以昼夜不同形式的低温处理其幼苗后,测定其可溶性蛋白含量;并采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)对蛋白质进行分离,发现抗冷性强的新 S29 品种的幼苗经适当的低温处理后有一条分子量约 123 kd 的低温诱导蛋白(即抗冻蛋白)谱带产生,而抗冷性弱的晋棉 6 号则没有。较详细地分析了不同温度处理对棉苗中可溶性蛋白质含量和种类的变化情况及其与品种抗冷性间的关系,并从理论上探讨了与其相关的可能机理。

**关键词:**棉苗;抗冷性;低温诱导蛋白;抗冻蛋白

**中图分类号:**S562.01 **文献标识码:**A

**文章编号:**1002-7807(2006)01-0043-04

## Study on the Relation between Chilling Resistance and Low-temperature-induced Proteins in Cotton Seeding

LI Sheng-quan, LI Rui, FAN Yue-xian

(Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

**Abstract:** Two varieties of upland cotton belonging to different chilling-resistant levels, i. e. early and late maturity were determined for the amount of soluble proteins in cotton seedlings which have been treated at different low temperature day and night, and the soluble proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (*abbr. to* SDS-PAGE). Results showed that a low-temperature-induced protein (namely antifreeze protein, about 123 kd) band appeared in the variety Xin S29 that has obviously chilling resistance, but the band wasn't seen in the variety Jinmian 6 that has less chilling resistance. The relations between the chilling resistance of cotton varieties and the amount of soluble proteins and kinds in cotton seedlings which have been treated at different low temperature day and night were analyzed in this paper. Moreover, the possible relevant mechanisms were discussed.

**Key words:** cotton seeding; chilling resistance; low-temperature-induced proteins; antifreeze protein

植物低温诱导蛋白是植物在低温作用下由于基因表达的改变而诱发合成的蛋白质<sup>[1]</sup>。自 1970 年<sup>[2]</sup>提出低温诱导能调节基因表达而合成新蛋白质的观点以来,有关植物的抗冷(冻)性与低温诱导蛋白(或抗冻蛋白)方面的研究非常活跃<sup>[3]</sup>。所涉及的植物材料种类繁多,品种多样<sup>[3]</sup>,但从国内外目前的研究进展看,尚未见到在棉苗中发现低温诱导蛋白及其与品种抗冷性关系的报道。鉴于棉花苗期的抗冷性在棉花育种和生产上

的重要意义,为此本文在研究棉花苗期抗冷性与多种和抗冷性密切相关的重要生理生化指标间关系<sup>[4-10]</sup>的基础上,对分属早熟和晚熟两种不同抗冷级别的 2 个棉花品种的幼苗,经不同温度培育,分别进行不同的低温处理,测定其可溶性蛋白含量,并采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)对蛋白质进行分离,发现抗冷性强的新 S29 品种的幼苗经适当的低温处理后有一条明显的(分子量约为 123 kd)低温诱导蛋白(即抗冻蛋

白)谱带产生,而抗冷性弱的晋棉6号则没有,这说明抗冻蛋白可能是抗冷生理过程中的重要物质,对提高幼苗的抗冷性具有明显的作用。

## 1 材料和方法

实验于2004年在山西农大进行。选用抗冷性强的新S29和抗冷性弱的晋棉6号两个陆地棉品种(由山西省农科院棉花研究所品种资源组提供)为实验材料,在植物生理专用培养箱完成。实验方法:(1)幼苗的培养方法。把所需的棉种放在沸水浴中煮沸1 min后,立即放于冷水中冷却,在37℃的条件下放置4~5 h,分成3批播于待用的河沙中,在光照培养箱中控制日平均温度为28℃、23.2℃、18.4℃的不同条件培养。待棉苗长出子叶后,在昼/夜温度为(15±1)℃/(8±1)℃;(15±1)℃/(4±1)℃;(15±1)℃/(2±1)℃的不同条件下进行低温处理,光周期为12 h/12 h。(2)可溶性蛋白含量的测定。称取0.5 g的棉花幼苗于研钵中,加5.0 mL pH 7.8磷酸缓冲液(0.05 mol·L<sup>-1</sup>)和少量石英砂于冰浴中研磨成匀浆,离心(10000 r·min<sup>-1</sup>) 20 min,收集上清液,作为蛋白质含量的测定。用考马斯亮蓝G-250法<sup>[11]</sup>测定可溶性蛋白含量。(3)棉苗中低温诱导蛋白质的提取、分离及分子量测定。参考Michel Perras等<sup>[12]</sup>的方法。取待测的棉苗0.5 g,用0℃灭菌水洗涤3次,洗净后放入预冷的研钵中,加入5.0 mL冰预冷的研磨缓

冲液(0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 0.01 mol·L<sup>-1</sup> tris-HCl pH 8.0, 0.001 mol·L<sup>-1</sup> EDTA pH 8.0, 100 mg·L<sup>-1</sup> PMSF)进行研磨(冰上操作),研磨成匀浆后,倒入烧杯,在4℃条件下离心(10000 r·min<sup>-1</sup>) 10 min,上清液即为抗冻蛋白的粗提液。取0.3 ml该上清液立即加入4倍体积的冰预冷丙酮,在-30℃条件下放置24 h,有固体析出。取固体溶于样品溶解液(60 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 6.8, 10%甘油, 2%(W/V)SDS, 5%2-巯基乙醇)中,然后进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

## 2 结果与分析

### 2.1 育苗温度和低温处理对棉苗体内可溶性蛋白含量的影响

采用不同温度培育的棉苗进行不同的低温处理。处理后每24 h测定一次幼苗体内可溶性蛋白含量(表1)。从表1可以看出:(1)在试验的所有培育温度和低温处理条件下,参试的2个棉花品种其幼苗中的可溶性蛋白质含量都随着低温处理时间的延长而增加;当处理时间延续到第5 d时,可溶性蛋白质含量达到最高值;低温处理时间继续延长,可溶性蛋白质含量反而下降。(2)在相同育苗温度下培育的同一品种的幼苗经不同的低温处理后,可溶性蛋白质含量不同,以15℃/4℃处理条件下的最高。(3)在相同低温处理条件下,同一品种在不同培育温度下培育的幼苗,其可溶

表1 在冷处理条件下育苗温度对棉花幼苗体内可溶性蛋白质含量的变化

Table 1 Variation of soluble protein in cotton seeding cultivate in different temperatures during cold acclimation

品种	昼夜冷处理 /℃	育苗温度 /℃	不同低温处理时间可溶性蛋白质含量/(mg·g <sup>-1</sup> )							
			0 d	2 d	%*	3 d	4 d	5 d	6 d	
新 S29	15/8	28.0	3.78	3.93	4.0	4.23	4.47	4.81	4.54	
		23.2	3.92	4.47	14.0	5.14	5.67	5.97	5.31	
		18.4	4.12	4.93	19.7	5.32	5.78	6.21	5.47	
	15/4	28.0	3.78	4.43	17.2	4.65	4.87	5.32	5.15	
		23.2	3.92	4.87	24.2	5.27	5.96	6.27	6.09	
		18.4	4.12	5.13	24.5	5.63	6.07	6.32	6.17	
	15/2	28.0	3.78	4.17	10.3	4.45	4.63	4.95	4.62	
		23.2	3.92	4.59	17.1	5.32	5.83	5.14	5.92	
		18.4	4.12	5.07	23.1	5.45	5.92	6.23	6.06	
	晋棉 6 号	15/8	28.0	3.76	3.80	1.1	3.93	4.05	4.13	3.90
			23.2	3.83	3.91	2.1	4.08	4.19	4.32	4.12
			18.4	4.07	4.18	2.7	4.25	4.45	4.82	4.32
15/4		28.0	3.76	3.82	1.6	3.96	4.14	4.36	4.05	
		23.2	3.83	3.97	3.7	4.17	4.32	4.76	4.47	
		18.4	4.07	4.23	3.9	4.47	4.69	5.23	4.54	
15/2		28.0	3.76	3.82	1.6	3.97	4.12	4.25	4.03	
		23.2	3.83	3.95	3.1	4.13	4.26	4.52	4.17	
		18.4	4.07	4.21	3.4	4.27	4.32	4.76	4.21	

注:表中的所有测定值均为3次平行测定的平均值;\*为低温处理2 d后的可溶性蛋白质增加百分率。

性蛋白质含量也不同,即在较低温度下培育的幼苗,其可溶性蛋白质含量较高。(4)未经低温处理(0 d)时,参试的两个品种的幼苗,其可溶性蛋白质含量无明显不同,但经低温处理后,两个品种的可溶性蛋白质含量的增加率表现显著性的差异,即抗冷性强的品种新 S29 的可溶性蛋白质含量的增加率大大高于抗冷性弱的品种晋棉 6 号的。如新 S29 在 18.4℃ 培育的条件下,用 15℃/4℃ 低温处理 2 d 后,幼苗体内总的可溶性蛋白质就从低温处理前的 4.12 mg · g<sup>-1</sup> 增加到了 5.13 mg · g<sup>-1</sup>,增加率为 24.5%,而同样条件下,晋棉 6 号的可溶性蛋白质含量仅比处理前增加了 3.9%。

## 2.2 育苗温度和低温处理对棉苗体内可溶性蛋白电泳图谱的影响

采用不同温度培育的棉花幼苗进行不同的低

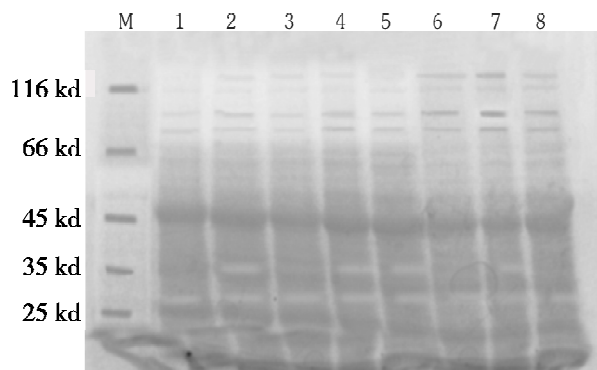


图 1 不同温度培育的新 S29 在低温处理下的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 The electrophoretograms of SDS-PAGE for the variety Xin S29

注: M 为标准蛋白, 1 为 28℃ 的幼苗, 2、6 为 15℃/8℃ 处理的幼苗, 3、7 为 15℃/4℃ 处理的幼苗, 4、8 为 15℃/2℃ 处理的幼苗, 5 为 18.4℃ 的幼苗。

## 3 讨论

### 3.1 可溶性蛋白质与棉苗抗冷性的关系

不少研究者已发现,多种植物在低温锻炼期间,细胞内可溶性蛋白质和抗(冷)冻性之间表现出明显的正相关,即可溶性蛋白质含量随低温锻炼过程抗(冷)冻性的提高而增加<sup>[13-14]</sup>,但也有研究指出,可溶性蛋白质含量在低温锻炼中并没有实质性的改变,或者可溶性蛋白质含量的增加与植物抗寒冻性的增加并不存在因果关系<sup>[15]</sup>。本实验的测定结果表明,在不同低温锻炼期间,棉苗中的可溶性蛋白质含量的增加和品种的抗冷性表现出明显的正相关。这可能是由于可溶性蛋白质的亲水胶体性质,其含量的增加有助于加强细胞

温处理。处理 5 d 后取幼苗进行抗冻蛋白的提取,在冷的丙酮中过夜后进行 SDS-PAGE(10%)电泳(图 1、2)。从图 1、2 可以看出,不同温度培育的棉苗在冷处理 5 d 后其体内的可溶性蛋白的含量和种类都有明显变化:(1)抗冷性强的新 S29 品种的幼苗经低温处理后在分子量处有一条明显的新肽(约 123 kD)产生(图 1),抗冷性弱的晋棉 6 号则没有(图 2)。(2)新 S29 在低温处理过程中,有 4 条蛋白带含量增加,它们分别是 110, 91, 77, 20 kD;有 2 条蛋白带含量降低,它们分别是 52, 30 kD,有 1 条蛋白带(46 kD)在冷锻炼过程中几乎完全消失。在晋棉 6 号中也有 4 条蛋白带含量增加,它们分别是 120, 110, 43, 33 kD;有 2 条蛋白带含量减少,它们分别是 65, 49 kD。

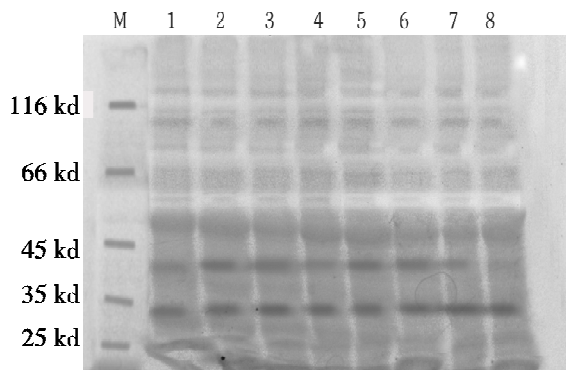


图 2 不同温度培育的晋棉 6 号在低温处理下的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 Jinmian 6 cotton seedlings cultivated in different temperature during cold acclimation

的保水力,从而增大细胞内束缚水的比例,降低冰点,并可能导致细胞液过冷的形成,对提高抗冷性具有重要作用。

### 3.2 抗冻蛋白与棉苗抗冷性的关系

细胞膜和细胞骨架是寒冻损伤的关键部位,一些抗冷性强的植物,特别是受冷锻炼的植物,其细胞膜和细胞骨架对这种冰晶伤害有耐受性,甚至在一些植物体内有胞外冰核剂存在<sup>[16]</sup>。强抗冷性植物为了防止胞内结冰,一方面先由胞外结冰引起细胞质浓缩,导致冰点降低,另一方面细胞内积累了许多抗冷性物质,它们的作用是大幅度地降低细胞质的熔点和冰点。抗冻蛋白能显著改善植物的抗冷性。植物经过低温锻炼后,能获得一定的抗冷能力。这些抗冷能力的获得,和蛋白

质的代谢密切相关<sup>[17]</sup>,即从一些低温诱导蛋白质的积累和植物的抗冷性呈平行关系来推断。本实验结果表明,在抗冷性强的新 S29 中,有一条新蛋白带(123 kd)出现,而且在低温培育的幼苗再经过适当的低温锻炼表现明显,与植物的抗冷性呈显著的正相关,这说明这个低温诱导的蛋白在增加棉花的抗冷性方面是需要的和发展的。另一方面,在新 S29 和晋棉 6 号中都有蛋白强度增加,但与抗冷程度无关,说明这些蛋白可能是属于 TQ 蛋白家族(在低温下调整植物平衡生长),这些蛋白可能是保证细胞在低温条件下生存,而不是增加它们的抗冷能力。

综合本文及相关文献所述的实验结果,可以充分说明棉苗在低温逆境中,为了生存,其体内必须进行一系列错综复杂的生理生化反应的综合调控,以抵御寒冷的侵害。

#### 参考文献:

- [1] KACAOKA T, Deda K. Heat-elable COR(cold-Heg-ulated) proteins associated with freezing tolerance in epinacb[J]. *Plant Cell Physiol*, 1992, 33(8): 1107-1114.
- [2] WEISER C J. Cold resistance and injury in woody plants [J]. *Science*, 1970, 169: 1269-1278.
- [3] 林善枝, 张志毅, 林元震. 植物抗冻蛋白及抗冻分子改良[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2004, 30(3): 251-260.
- [4] 范月仙, 潘登奎, 冀满祥, 等. 棉花苗期细胞色素氧化酶活力与抗冷性关系[J]. *中国棉花*, 1989, 16(6): 11-13.
- [5] 郭定成, 范月仙, 潘登奎, 等. 过氧化物酶同功酶与棉花抗寒性[J]. *中国棉花*, 1991, 18(2): 11-13.
- [6] 范月仙, 李生泉, 冯文新, 等. 棉苗抗冷性与可溶性糖含量变化关系的研究[J]. *棉花学报*, 1995, 7(2): 126-127.
- [7] 范月仙, 张述义, 李生泉. 棉苗抗冷性与 POD 活性变化关系的研究[J]. *棉花学报*, 1995, 7(3): 172-174.
- [8] 李生泉, 张金桐, 范月仙. 棉花苗期抗冷性与非蛋白氮含量增加关系的研究[J]. *中国棉花*, 1996, 23(12): 11-12.
- [9] 李生泉, 侯燕平, 范月仙. 不同抗冷级别的棉苗在低温处理后叶片细胞超微结构的变化[J]. *电子显微学报*, 1998, 17(3): 231-236.
- [10] 李生泉, 李 锐, 范月仙. 棉花抗冷性与硝酸还原酶活性变化的研究[J]. *中国棉花*, 2004, 31(10): 14-16.
- [11] 刘志国. 新编生物化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 335-337.
- [12] MICHEL P, Fathey S. Synthesis of Freezing Tolerance Proteins in wheat during Cold Acclimation [J]. *Plant Physiol*, 1989, 89: 577-585.
- [13] 刘鸿先, 王以柔, 李晓萍, 等. 低温诱导植物基因表达的改变与耐寒性[J]. *中科院华南植物所集刊*, 1991, 7: 54-61.
- [14] 陈杰忠, 徐春香, 梁立峰. 低温对香蕉叶片中蛋白质及脯氨酸的影响[J]. *华南农业大学学报*, 1999, 2(3): 54-58.
- [15] 李美茹, 刘鸿先, 王以柔. 植物细胞中的抗寒物质及其与植物抗冷性的关系[J]. *植物生理学通讯*, 1995, (5): 328-334.
- [16] 简令成. 生物膜与植物抗寒害和抗寒性的关系[J]. *植物学通报*, 1983, 1(1): 17-23.
- [17] 江 勇, 贾士荣, 费云标, 等. 抗冻蛋白质及其在植物抗冻生理中的作用[J]. *植物学报*, 1999, 41: 677-685. ●