

杨树越冬期间储藏蛋白质的动态变化规律

于彬¹, 郭彦青², 彭方仁³

(1. 中国林业科学研究院 热带林业研究所, 广东 广州 510520; 2. 广东省林业调查规划院, 广东 广州 510500; 3. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 为了探索营养储藏蛋白质在杨树体内的积累机制和生理功能, 采用凝胶电泳SDS-PAGE, 对1年生797杨 *Populus deltoids* × *P. euramericana* 越冬期间皮层和根部中的蛋白质质量分数及营养储藏蛋白质组分进行了测定分析。结果表明, 这些部位中的蛋白质在越冬期间质量分数逐渐增加; 皮层是杨树越冬期间储藏蛋白质的主要场所。越冬期间储藏蛋白质组分变化最明显的是36, 32, 22, 15 kD等蛋白; 落叶时蛋白谱带最清晰, 36和32 kD蛋白质是杨树营养储藏蛋白质的主要类型。图3 参11

关键词: 植物学; 杨树; 营养储藏蛋白质; 氮素利用

中图分类号: S718.4

文献标志码: A

营养储藏蛋白质(vegetative storage protein, VSPs)是许多落叶树种越冬期间储藏氮的主要形式。这种蛋白质通常在夏末秋初开始积累, 越冬期间维持较高的水平, 春季随着新梢的萌发, 被降解成氨基酸满足枝条生长的养分需求^[1]。有关木本植物VSPs的研究最早是在苹果 *Malus pumila* 和其他果树中进行的, 其后在许多落叶树种及部分常绿针叶树体内均发现一种结构上类似于许多双子叶植物种子的蛋白体的含高蛋白质的细胞器^[1-6]。利用半薄切片的光学显微镜及超薄切片的电子显微镜技术, 对蛋白质染色特性和胃脘酶消化特性的研究证实了柳树 *Salix* sp. 和杨树 *Populus* sp.^[5] 这种具膜的凝集物有蛋白质的特性, 利用SDS-PAGE 确定出了杨树木材提取物中一种32 kD的蛋白质组分^[7], 同时利用免疫金法成功地标记了液泡凝集物中的这种物质, 用白兔获得了该种蛋白质的抗体之后, 最后证实了其蛋白质的特性^[8]。目前对木本植物VSPs的类型、定位、功能、合成及降解机制、基因表达的调控等方面进行了大量的研究^[9, 10]。本文对1年生797杨 *Populus deltoides* × *P. euramericana* 越冬期间皮层、根系中的蛋白质质量分数及营养储藏蛋白质组分进行了测定分析, 以揭示杨树营养储藏蛋白质的形成和积累规律, 为指导合理施肥与管理, 选育高氮素利用率的优良品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试杨树无性系为1年生797杨。

收稿日期: 2006-11-27; 修回日期: 2007-07-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371154); “十五”南京林业大学人才基金资助项目

作者简介: 于彬, 助理工程师, 硕士, 从事土壤理化性质分析和植物营养诊断研究。E-mail: gyqyb@163.com。通

信作者: 郭彦青, 工程师, 硕士, 从事林业调查规划研究。E-mail: hanhb2008@163.com

1.2 样品采集与处理

2004 年10 月至2004 年12 月, 即由年生长后期至休眠期间, 每2 周采1 次样。皮层: 随机选树冠中上方靠近主干的当年生枝条, 截取10 cm, 混合均匀。样品采回后立即用含洗涤剂的水清洗一遍, 再用自来水冲洗, 最后用无离子水冲洗3 遍, 滤纸吸干, 医用手术刀小心剥取皮层(深达木质部)迅速放入液氮中3~5 min, 挂上标签后在-70℃冰箱内保存用于各项指标的测定; 根部: 挖土层深20 cm, 露出根部, 随机截取直径约2.5 cm 的侧根10 cm, 样品取回后处理同枝条, 混和均匀后测定。

1.3 样品分析

蛋白质质量分数测定采用考马斯亮蓝染色法^[2], 蛋白质组分分析采用SDS-PAGE 凝胶电泳^[3]。

2 结果与分析

2.1 不同部位总蛋白质质量分数的动态变化

对不同生长时期杨树的皮层、根部的蛋白质质量分数分析表明: 蛋白质的总体变化趋势基本一致, 呈上升趋势。两者的蛋白质质量分数同时在12 月底相对较高, 表明在杨树生长阶段后期, 树木体内开始积累营养物质(图1)。皮层的蛋白质质量分数明显高于根部, 这表明, 皮层是冬季蛋白质的主要储藏场所。这主要是由于叶片光合作用、根部活力及这些部位中蛋白酶活力随着冬季气温及土温的下降而下降, 再加上叶片中氮素营养物质回流, 一部分进一步转化为蛋白质, 另一部分以氨基酸本身作为储藏形式为下个生长周期的养分需求做准备, 或者合成与低温和短日照有关的一些内源激素, 进一步参与调节储藏蛋白质的积累。有人在越冬期间的银杏 *Ginkgo biloba* 枝条中也有类似发现^[4]。

2.2 杨树皮层蛋白质组分分析

营养储藏蛋白质是许多落叶树木越冬期间储藏氮素的主要形式^[1-3], 皮层是营养储藏蛋白质的主要储藏场所。对杨树皮层蛋白质的SDS-PAGE 凝胶电泳分析表明: 普遍存在的蛋白质包括: 95, 36, 32, 22, 19, 16, 15 kD 蛋白质(图2)。对不同时期蛋白质组分的SDS-PAGE 图谱分析发现皮层中的蛋白质发生了规律性的变化。图谱中发生变化最明显的是32, 22, 15 kD 蛋白质。从10 月到12 月这段时间, 其蛋白谱带颜色逐渐加深, 且越来越清晰。Wetzel 等^[5]通过SDS-PAGE 技术在欧美杨 *Populus × euramericana*, 加杨 *Populus × canadensis*, 意杨 *Populus euramericana* 等几个杨树无性系的皮层内也发现36 kD 和32 kD 2 种蛋白。图像扫描结果显示, 2 种蛋白占整个皮层总蛋白含量的30%左右。有人在苹果和接骨木 *Sambucus canadensis* 等树种中也有类似的发现^[6]。可见其明显的季节性变化规律和特殊的生理功能。

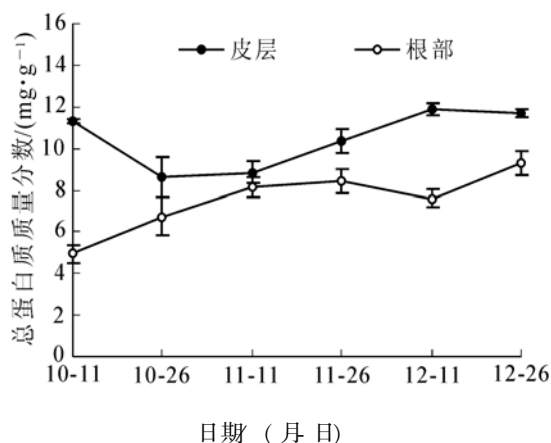


Figure 1 The changes of total contents of proteins in different organs

2.3 杨树根部蛋白质组分分析

杨树根部越冬期间蛋白质组分的单向电泳图谱如图3 所示。实验在根部中同样发现了32 kD 蛋白与36 kD 蛋白在越冬期间的积累。笔者认为, 36 kD 蛋白的表达受低温条件调控的可能性更大, 可能直接参与越冬期间根部对低温的适应性反应。32 kD 蛋白质可能直接参与树木的氮素代谢。图谱中一些短时期表达的蛋白质(如62 kD 蛋白质和53 kD 蛋白质)只作为临时储藏蛋白质, 它们并不存在于越冬期间的组织当中, 而是以小分子量的蛋白质形式与其他蛋白质一起作为树木翌年生长所需的养分储备。11 月底蛋白谱带上出现的16, 18, 19 kD 等3 种低分子蛋白质可能是合成下一生长季节树体内所需要的酶的前体物质, 也可能是一些高分子量蛋白质直接降解的产物^[7,8]。

3 结论与讨论

随着冬季气温的下降,杨树体内各器官内蛋白质质量分数均出现明显上升。这表明在越冬期间,杨树开始在体内储藏蛋白质。皮层的蛋白质质量分数明显高于根部,意味着皮层是杨树越冬期间储藏蛋白质的主要场所。

杨树不同器官储藏蛋白质组分存在明显的差异。皮层储藏蛋白质组分最为丰富,主要为95, 36, 32, 22, 19, 16, 15 kD 蛋白质,其中32, 22, 15 kD 在越冬期间谱带变化最明显。根部普遍存在的储藏蛋白质组分为53, 36, 32, 30 和 28 kD 蛋白质,其中36 和32 kD 蛋白在谱带中变化最明显。储藏蛋白质随着树木后期生长发育的发生明显变化。林木营养储藏蛋白质组分因树种不同存在明显的差别,大多数树木 VSP 的分子量为15~45 kD,研究最多的是杨树的32 kD 蛋白质。此外,确定分子量的还有杨树36 kD,落羽杉 *Taxodium distichum* 35 kD,欧洲落叶松 *Larix deciduas* 25, 27, 32 kD 蛋白质。松属 *Hnns* 树种的 VSP 主要是低分子量(15 kD)蛋白质,而橡胶树 *Hevea brasiliensis* 的 VSP 分子量明显较高(67 kD)^[9]。

越冬期间杨树体内营养储藏蛋白质有规律地积累。目前认为,主要受2种因素,即环境因子(包括低温、光周期、氮素供应量)和树体潜在的内源信号物质的影响,其中光周期影响蛋白质的积累主要是短日照。短日照处理可以诱导杨树皮层中32 kD 蛋白质的明显积累^[10]。低温诱导储藏蛋白质的机理现在多数学者意见不一,目前并没有足够的证据证明低温能诱导杨树储藏蛋白质的积累,只是在一些草本植物中发现某些低分子量蛋白质(17.3 kD)受低温调控的事实,但不能完全排除其他因素共同作用的可能。有的学者研究认为,外界因子影响蛋白质的积累归根结底是通过内源信号的传导来实现的^[11],包括一些内源激素变化。只是作某种意义上的猜测。

总的来说,杨树在越冬时期体内积累大量储藏蛋白质,本身就是对氮素等营养物质经济利用的直接体现。对养分元素的循环再利用功能是保持森林生态系统养分免遭损失的最重要的机制之一,也是树木主动适应外界环境变化的生态对策。杨树作为重要的速生用材树种,在维护生态平衡,改善生态环境,实现可持续发展具有不可替代的作用,能获得最大的投入产出比是目前经营林木的主要目的,提高树木氮素的再利用率是达到这一目的的重要途径。将来,基因工程的进一步发展为解决这一问题开辟了一条广阔的前景,无疑是今后林业工作者的努力方向。我们通过以上研究可以从不同角度、不同深度揭示杨树在年生长过程中氮素营养代谢规律,同时结合它的生长规律,能为建立合理的林木施肥制度提供一定的理论基础。

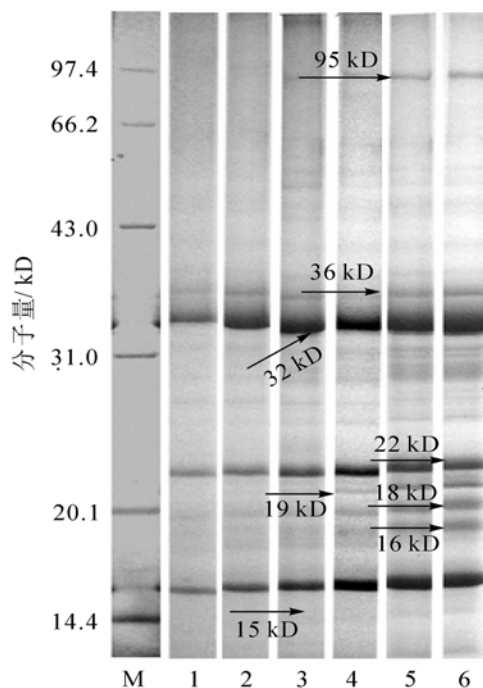


图2 杨树皮层营养储藏蛋白质电泳图
M. 标准蛋白;1~6 为10月11日、10月26日、11月11日、11月26日、12月11日、12月26日采集样品。

Figure 2 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of VSP of bark in poplar clone 797

M. marker; 1-6 samples of Oct. 11, Oct. 26, Nov. 11, Nov. 26, Dec. 11, Dec. 26.

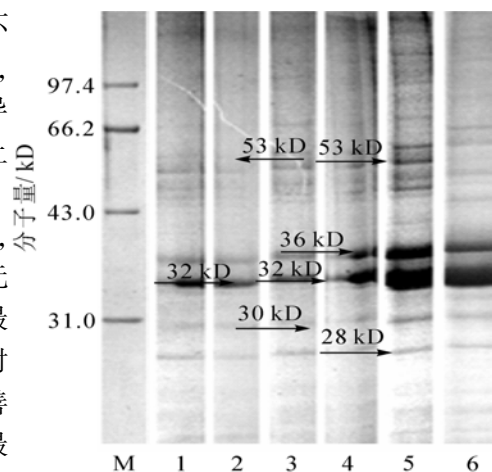


图3 杨树根部营养储藏蛋白质电泳图
M 标准蛋白;1~6 为10月11日、10月26日、11月11日、11月26日、12月11日、12月26日采集样品。

Figure 3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of VSP of root in poplar clone 797

M marker; 1-6 samples of Oct. 11, Oct. 26, Nov. 11, Nov. 26, Dec. 11, Dec. 26.

参考文献:

- [1] 彭方仁, 郭娟. 木本植物营养储藏蛋白质研究进展[J]. 植物学通报, 2001, **18** (4): 445 – 450.
- [2] HARMS U, SAUTER J J. Localization of a storage protein in the wood ray parenchyma cells of *Taxodium distichum* (L.), L. C. Rich, by immunogold labeling [J]. *Trees*, 1992, **6**: 37 – 40.
- [3] 彭方仁, 郭彦青, 朱小欢. 杨树新梢萌发过程储藏蛋白质的动态变化规律研究[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2006, **30** (6): 105 – 110.
- [4] 王改萍, 彭方仁, 李生平. 银杏叶片蛋白质含量动态变化的电泳分析[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2006, **30** (6): 116 – 118.
- [5] WEITZEL S, DEMMERS C, GREENWOOD J S. Seasonally fluctuating bark protein are a potential form of nitrogen storage in three temperate hardwoods [J]. *Horta*, 1989, **178**: 275 – 281.
- [6] NSIMBA-LUBAKI M, PEUMANS W J. Seasonal fluctuation of lectins in bark of elderberry and black locust [J]. *Hort Physiol*, 1986, **80**: 747 – 751.
- [7] STEPHEN V, SAUTER J J, MARIIN F. Vegetative storage proteins in woody plant [J]. *Hort Physiol Biochem*, 1994, **32**: 185 – 192.
- [8] SHIM K K, TITUS J S. Accumulation and mobilization of storage proteins in Ginkgo shoot bark [J]. *J Kor Hort*, 1985, **26**: 350 – 360.
- [9] 田维敏, 吴继林, 郝秉中, 等. 大叶桃花心木营养储藏蛋白的细胞学研究[J]. 热带作物学报, 1999, **20** (4): 25 – 31.
- [10] LANGHEINRICH U, TISCHNER R. Vegetative storage protein in poplar: induction and characterization of a 32 kD and a 36 kD polypeptide [J]. *Hort Physiol*, 1991, **97**: 1 017 – 1 025.
- [11] ROSSATO L. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle [J]. *J Exp Bot*, 2002, **53**: 265 – 275.

Dynamic change of vegetative storage proteins in one-year-old poplar during winter

YU Bin¹, GUO Yan-qing², PENG Fang-ren³

(1. Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, Guangdong, China;

2. Forestry Inventory & Planning Institute of Guangdong Province, Guangzhou 510500, Guangdong, China; 3.

College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: In order to study the accumulation mechanism and physiological functions of vegetative storage protein (VSPs) in poplar, the contents of proteins and the compound of vegetative storage proteins in the bark and roots during the course of live through winter of the one-year-old poplar clone 797 (*Populus deltoids* × *P. euramericana*) were measured and analyzed by SDS-PAGE. The results indicated that the content of proteins in the bark and root increased obviously during winter, and the vegetative storage proteins mainly stored in the bark. The proteins such as 36, 32, 22, 15 kD and etc. changed greatly during the course of through winter, of which these proteins could be detected clearly during the winter and most clear when defoliated. The proteins of 36 and 32 kD are the main types of vegetative storage proteins in poplar. [Ch, 3 fig. 11 ref.]

Key words: botany; poplar; vegetative storage proteins; nitrogen utilization