

泡桐丛枝病发生与叶片蛋白质和 氨基酸变化关系的研究*

范国强 蒋建平

摘要 本文分别对楸叶泡桐、兰考泡桐、鄂川泡桐和台湾泡桐的同品种、同方位和同高度的同一病株病叶、病健叶和健株叶片的蛋白质进行了 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳及其水解产物进行了分析研究。结果表明, 4 种感病泡桐植株的叶片内都出现了一条健康植株叶片内没有的、分子量为 12 KD 的蛋白质谱带, 并且同一病株病叶内该蛋白质的量较病健叶的量多。此外, 楸叶泡桐和台湾泡桐病株病叶、病健叶和健株叶片蛋白质的氨基酸组成也存在着明显差异。随叶片感病程度的加深, 胱氨酸含量逐渐增多, 而苯丙氨酸则逐渐减少。泡桐叶片内的这些变化可能与丛枝病的发生有一定联系。

关键词 泡桐 丛枝病 蛋白质 氨基酸

泡桐丛枝病严重影响泡桐生长甚至存活, 是林业生产中急需解决的问题之一。以前人们从生理生化角度分析了泡桐感病过程中激素及其它指标的变化^[1, 2]。近年来, 林木兰等人^[3, 4]借助于分子生物学手段研究了植物菌原体(phytoplasmas)的一些特性。然而, 目前该病的发病机理及其防治方法都没有较大进展。为了解决泡桐丛枝病的发病机理, 本文研究了不同种泡桐病株病叶、病健叶和健株叶片基因表达最终产物——蛋白质及其组成基本单位——氨基酸的差异, 为进一步研究泡桐丛枝病提供基础数据。

1 材料与方 法

1.1 材料及处理

试验材料分别为 1995 年 5 月 5 日采于河南农业大学林业试验站(郑州北郊)的楸叶泡桐(*Paulownia catalpifolia* Gong Tong)、兰考泡桐(*P. elongata* S. Y. Hu)、鄂川泡桐(*P. albipholoea* Z. H. Zhu)和台湾泡桐(*P. kawakunii* Ito)的同品种、同方位、同高度的同一病株病叶(病叶)和病株健叶(病健叶)及健株的叶片(健叶)。称取采集后贮于液氮的 4 种泡桐的不同叶片 10 g, 迅速放入盛有液氮的 4 个研钵内研磨成粉末(必要时加入液氮以防止组织融化), 并转移到 4 个 250 mL 的离心管内, 分别加入 100 mL 冷(-40℃)的 10% 三氯醋酸(丙酮配制, 内含 0.07% 的巯基乙醇)振荡混匀, 在 -40℃ 条件下静置 1 h 后, -4℃ 10 000 g 离心 30 min, 倒去上清液, 沉淀用 100 mL 冷(-40℃)丙酮(内含 0.07% 巯基乙醇)悬浮; 然后, 分别将其放入 -40℃ 冰箱内静置 30 min 后, 如上条件进行离心, 沉淀真空干燥后用于提取蛋白质。

1.2 试验方法

1996—06—15 收稿。

范国强教授, 蒋建平(河南农业大学泡桐研究所 郑州 450002)。

* 1996~1998 年河南省杰出青年基金资助项目。

1.2.1 蛋白质提取 分别称取 100 mg 上面处理的叶片干粉于 1.5 mL 离心管内, 分别加 1 mL UKS 溶液($9.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_2\text{CO}_3$, 1.25% SDS, 0.5% 二硫苏糖醇, 2% 两性载体电解质(pH3.5~10), 5% Triton X-100) 混匀, 在 60°C 水浴中温育 10 min, 然后, 室温 1 万 g 离心 30 min, 离心后的上清液即为电泳分析的蛋白质样品。

1.2.2 电泳 参照 Laemilli 和范国强^[5,6]法。浓缩胶和分离胶浓度分别为 4% 和 13% , 电流强度为 30 mA/板 , 上样量为 $10 \mu\text{g}$ 蛋白质样品。电泳结束后, 凝胶用染色液(0.025% 考马斯亮蓝 R_{250} , 45% 甲醇, 10% 冰醋酸) 染色和脱色液(10% 甲醇, 7% 冰醋酸) 脱色, 脱色好的凝胶用于照相。

1.2.3 氨基酸的测定 将在林业试验站采集的泡桐叶片在 80°C 条件下烘干, 研成粉末, 在 6 N HCl 真空密封条件下进行酸水解^[7], 然后在日立 835-50 型氨基酸分析仪上进行氨基酸含量的测定。每一数据测定 3 次, 取其平均值。

2 结果与分析

2.1 不同感病程度泡桐叶片蛋白质 SDS-PAGE

由楸叶泡桐、兰考泡桐、鄂川泡桐和台湾泡桐的病株病叶、病健叶、健株叶片蛋白质的 SDS-PAGE 结果(如图 1) 可以看出, 4 种泡桐叶片内蛋白质在大分子量(43 KD 以上) 区域内各种泡桐有一定的差异, 即楸叶泡桐分别比兰考泡桐、鄂川泡桐和台湾泡桐多一条 A、B、C 带。这说明 4 种泡桐基因组方面存在着一定的差异。分别比较 4 种泡桐健株叶片、病株病叶和病健叶蛋白质的电泳结果发现, 感病植株叶片蛋白质较健康植株多一条分子量 12 KD 的谱带 D, 但该蛋白质在病株病叶中的含量较病健叶内的高。这意味着该蛋白质含量的高低与其叶片的感病程度有一定的关系。

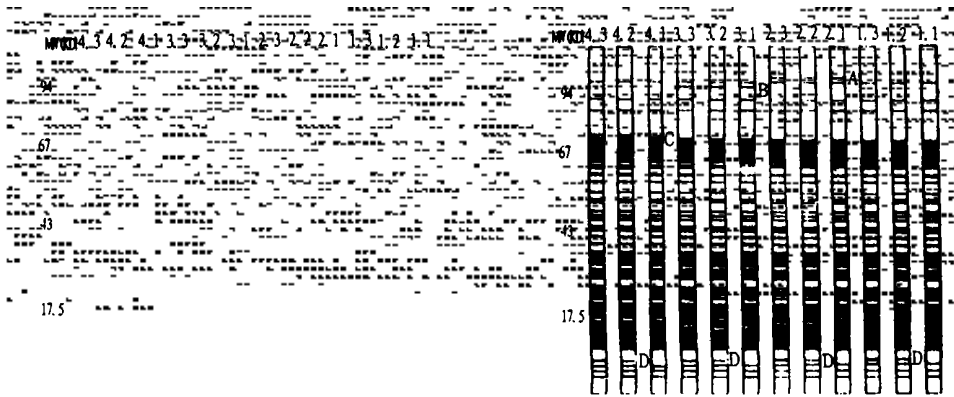


图 1 不同感病程度泡桐叶片蛋白质 SDS-PAGE

1. 1, 1. 2, 1. 3 楸叶泡桐健叶, 病健叶, 病株病叶 2. 1, 2. 2, 2. 3 兰考泡桐健叶, 病健叶, 病株病叶
3. 1, 3. 2, 3. 3 鄂川泡桐健叶, 病健叶, 病株病叶 4. 1, 4. 2, 4. 3 台湾泡桐健叶, 病健叶, 病株病叶

2.2 不同种泡桐病健株叶片氨基酸的含量

由楸叶泡桐和台湾泡桐病株病叶、病健叶和健株叶片氨基酸分析结果(见下页表 1) 可以看出, 同一种泡桐感病程度不同, 叶片的氨基酸含量存在一定的差异。这意味着楸叶泡桐和兰考泡桐感病后叶片蛋白质的组成发生了变化。对台湾泡桐和楸叶泡桐来说, 在所分析的氨基酸

中,只有胱氨酸和苯丙氨酸表现出随叶片感病程度的加深,呈现出的变化趋势相同,即胱氨酸的含量随叶片感病程度的加深逐渐增多,而苯丙氨酸的含量则逐渐减少,其它氨基酸变化则没有一定的规律。苯丙氨酸含量的减少可能与叶片发生病变有一定的关系。比较楸叶泡桐和台湾泡桐叶片碱性氨基酸(赖氨酸+组氨酸+精氨酸)的变化结果可以看出,病叶内的碱性氨基酸含量最低,病健叶内的较低,而健叶内的较高。这种变化也许与叶片DNA的活动有关,最终使叶片表现出病症。

表1 不同泡桐病健株叶片的氨基酸含量

(单位:mg/g)

氨基酸种类	楸叶桐健	楸叶桐病	楸叶桐病健	台湾桐健	台湾桐病	台湾桐病健
天冬氨酸(Asp.)	14.67	23.94	20.77	26.32	24.46	23.12
苏氨酸(Thr.)	5.69	8.79	7.74	9.87	7.95	8.10
丝氨酸(Ser.)	8.98	16.66	25.00	24.01	18.35	24.00
谷氨酸(Glu.)	3.59	21.52	19.01	14.80	12.84	16.82
脯氨酸(Pro.)	16.76	24.85	25.35	28.94	24.46	22.52
甘氨酸(Gly.)	5.69	1.51	8.80	6.25	8.56	2.70
丙氨酸(Ala.)	2.99	1.21	4.58	3.62	1.56	3.30
胱氨酸(Cys.)	1.20	2.73	2.46	1.64	4.59	3.90
缬氨酸(Val.)	1.80	3.94	3.87	3.62	2.47	2.40
蛋氨酸(Met.)	1.80	1.82	1.27	4.60	3.98	2.20
异亮氨酸(Ile.)	2.69	2.76	5.28	3.32	3.32	2.70
苯丙氨酸(Phe.)	6.36	3.89	5.63	7.56	1.50	5.81
赖氨酸(Lyr.)	7.89	4.79	5.98	8.22	3.90	7.34
组氨酸(His.)	2.42	1.50	1.76	2.63	1.90	2.14
精氨酸(Arg.)	7.58	4.79	6.69	8.55	8.71	7.34

3 讨 论

蛋白质是基因表达的最终产物。植物体内任何一种蛋白质都有基因与其相对应。当外界环境条件发生变化时,植物体内的代谢活动也随之发生改变,这种改变也将引起其体内基因表达活动的变化。对泡桐来说,当植物菌原体侵入树体后,必然引起各种生理生化反应的变化,虽然研究这些反应有利于阐明泡桐丛枝病发生与这些反应的关系,但很难弄清该病的发生机理。众所周知,氨基酸是合成蛋白质的基本单位,蛋白质又是基因表达的最终产物。因此,研究蛋白质与泡桐丛枝病发生的关系,对于阐明泡桐丛枝病的发生机理具有重要的意义。Saho用乙醇和盐酸提取白花泡桐叶片发现,感病和健康植株叶片的氨基酸含量没有差异,但盐酸提取出病枝上小叶的氨基酸比正常叶片的低 $1/5^{[8]}$ 。本实验结果与其有一定的差异,这可能主要是由于所测氨基酸不同的缘故(Saho所测氨基酸为乙醇和盐酸提取出来的,而本文的结果则是叶片全蛋白质的水解产物)。本试验通过电泳技术找出了蛋白质与泡桐丛枝病发生的关系,这点从楸叶泡桐和台湾泡桐病株病叶、病株健叶和健株叶片蛋白质的水解产物的不同得到了进一步证实。这些实验结果为以后了解泡桐丛枝病的发病机理提供了基础数据。有关该(类)蛋白质在发病过程中的作用有待于进行深入的研究。

参 考 文 献

- 1 王 蕤. 激素对泡桐丛枝病发生的影响. 见: 中国林学会泡桐文集. 北京: 中国林业出版社, 1980. 40 ~ 45.
- 2 蒋建平, 武禄光, 刘廷志, 等. 泡桐丛枝病与过氧化物酶含量关系研究初报. 河南农业大学学报, 1993, 26(1): 301 ~ 304.
- 3 张春立, 林木兰, 胡勤学, 等. 泡桐丛枝病类菌原体的分子克隆与序列分析. 植物学报, 1994, 36(4): 278 ~ 282.
- 4 林木兰, 张春立. 泡桐丛枝病类菌原体单克隆抗体的研制及初步应用. 植物学报, 1993, 35(9): 710 ~ 715.
- 5 范国强, 蒋建平. 泡桐叶片蛋白质提取方法的研究. 植物学通报, 1997, 12(2): 56 ~ 58.
- 6 Laemill U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of basleriophage T4. Nature, 1997, 227(3): 680 ~ 685.
- 7 Richter G. Physiology and biochemistry of primary metabolism. Florida: CRC Press, 1978, 377 ~ 387.
- 8 Saho H. On the amino acids of *Paulownia tomentosa* (Thumb) Staud affected by witches broom Part I The amino acids of leaves and twigs. J. Jap. For. Soc., 1957, 39(1): 447 ~ 451.

Study on the Relation between Witches Broom, Protein and Amino Acid Change in *Paulownia* Leaves

Fan Guoqiang Jiang Jianping

Abstract This paper dealt with the SDS polyacryamide gel electrophoresis of proteins and analysis of the amino acids in the diseased and healthy leaves, at the same side and same height, of the same strain of *Paulownia catalpifolia*, *P. elongata*, *P. albiphloea* and *P. kawakamii* respectively. The results indicated that the leaves of 4 species of *Paulownia* trees with witches broom had one protein band, of which molecular weight was 12 KD, which did not appear in the healthy leaves free of phytoplasmas. Moreover, the protein quantity in the affected leaves was more than that in the healthy leaves free of phytoplasmas. Moreover, the protein quantity in the affected leaves was more than that in the healthy leaves free of phytoplasmas. At the same time, there was significant difference on the amino acids between the healthy and diseased leaves of *P. catalpifolia* and *P. kawakamii*. The amount of cystine in the affected leaves was higher than that in the healthy leaves, but the change of amount of phenylalanine in the affected and healthy leaves was contrary. These changes of proteins and amino acids in the leaves might be related to the witches broom of the *Paulownia* trees.

Key words *Paulownia* witches broom protein amino acid