

王海波,李璐,苏新国,等. *MaCaM* 和 *MaCAMTA3* 基因在热处理诱导香蕉抗冷性中的作用[J]. 江苏农业科学,2018,46(5):40-42.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.05.010

# *MaCaM* 和 *MaCAMTA3* 基因在热处理诱导香蕉抗冷性中的作用

王海波<sup>1</sup>, 李璐<sup>2</sup>, 苏新国<sup>1</sup>, 张昭其<sup>3</sup>, 庞学群<sup>2</sup>

(1. 广东食品药品职业学院, 广东广州 510520; 2. 华南农业大学生命科学学院, 广东广州 510642;

3. 华南农业大学园艺学院, 广东广州 510642)

**摘要:**为了探讨 *MaCaM* 和 *MaCAMTA3* 基因在热处理诱导香蕉抗冷性中的作用,将香蕉经 52 ℃ 热水处理 3 min 后于 7 ℃ 贮藏 5 d,测定脯氨酸含量,利用实时荧光定量 PCR 分析 *MaCaM* 和 *MaCAMTA3* 基因在香蕉热处理和低温贮藏中的表达情况。结果表明,香蕉果实经热激处理后在 7 ℃ 贮藏时,其脯氨酸含量一直明显高于对照处理。7 ℃ 低温诱导香蕉果实的 *MaCaM* 基因表达在 1 h 迅速升高至最大值,之后又在 4 h 迅速下降,后期维持在一个较低的水平。而经热激处理后在 7 ℃ 贮藏的香蕉果实,其 *MaCaM* 基因表达高峰推迟出现在 4 h,除 7 ℃ 贮藏 1、4 h 外,热激处理的 *MaCaM* 基因表达均高于对照。热处理能诱导香蕉果实 *MaCAMTA3* 基因表达在处理 3 h 内迅速增强,7 ℃ 贮藏下 *MaCAMTA3* 基因表达呈现先下降后上升再下降的趋势,而经过热激处理后在 7 ℃ 贮藏的香蕉果实,除 7 ℃ 贮藏 1、4 h 外,其 *MaCAMTA3* 基因表达均高于对照。*MaCaM* 和 *MaCAMTA3* 基因表达增强可能参与了热处理诱导香蕉果实产生的抗冷性。

**关键词:**香蕉; *MaCaM*; *MaCAMTA3*; 热处理; 脯氨酸; 抗冷性

**中图分类号:** TS255.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)05-0040-03

香蕉果实在贮藏温度低于 12 ℃ 时即发生冷害,难以采用较低的温度来延长贮运期<sup>[1-2]</sup>。热处理是提高果蔬抗冷性的最有效的采后处理措施之一<sup>[3]</sup>,但热处理诱导的抗冷机制目前尚不明确。钙调素(calmodulin, CaM)是植物中重要的第二信使, CAMTA(calmodulin-binding transcription activator)/SR(signal responsive transcription activator)是一类广泛存在于真核生物中的含有 CaM 结合位点的转录因子家族。CaM 和 CAMTA 在植物响应逆境中起调节作用,对香蕉 CaM 和 CAMTA 的深入研究,有助于进一步了解香蕉钙信号系统调节的分子机制,有助于揭示热处理提高香蕉果实抗冷性的作用

机理。CaM 参与了植物对高温、低温胁迫等的响应,并且在植物细胞对胁迫的适应过程中起重要调节作用<sup>[4-5]</sup>。热、冷、干旱等多种胁迫都能诱导 CAMTA 基因上调表达<sup>[6-7]</sup>。拟南芥 CAMTA3 能同 CBF2(C-repeat binding transcription factor)启动子区域 CM2 序列(CCGCGT)结合,激活 CBF2 等基因的表达,从而提高拟南芥的抗冷性<sup>[8]</sup>。笔者所在课题组的前期研究结果表明,采用 52 ℃ 热水处理香蕉果实 3 min,能有效减轻香蕉果实的冷害症状<sup>[9-10]</sup>,但有关 CaM 和 CAMTA 在热水处理诱导香蕉抗冷性中的作用目前还不明确。分析 CaM 和 CAMTA 基因在香蕉热处理和低温贮藏中的表达情况,探讨这 2 个基因在热处理诱导香蕉抗冷性中的作用,为有效延长香蕉贮运期提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及处理

香蕉品种为巴西(*Musa* spp. AAA Group cv. cavendish),采自广东省广州市番禺香蕉园,及时运回广东省果蔬保鲜重点实验室。挑选七成饱满、大小均匀、无病虫害及机械损伤的单个香蕉,先后用 0.1% 漂白粉和 0.05% 咪鲜胺锰盐可湿性

收稿日期:2017-06-13

基金项目:国家自然科学基金(编号:31301584);广东省自然科学基金(编号:S2013010013987);广东省高校优秀青年教师项目(2014);广东省科技计划(编号:2012A020100007);广东省广州市科技计划(编号:20180401491)。

作者简介:王海波(1981—),男,湖南祁阳人,博士,教授,主要从事果蔬保鲜技术研究。Tel:(020)29164658;E-mail:haibovip@126.com。  
通信作者:庞学群,博士,教授,主要从事果蔬保鲜技术研究。Tel:(020)85280195;E-mail:xqpang@scau.edu.cn。

[11] Dai M, Ziesman S, Ratcliffe T, et al. Visualization of protoplast fusion and quantitation of recombination in fused protoplasts of auxotrophic strains of *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2005, 7(1): 45-52.

[12] 周明明, 李晓雁, 陈悦, 等. 鞘氨醇单胞菌 TP-3 原生质体制备与再生的研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 22: 184-188.

[13] 周东坡, 平文祥. 微生物原生质体融合与基因重排[M]. 北京:

中国科学技术出版社, 2010: 1-421.

[14] 余波, 吕向云, 董凤晴, 等. 凝结芽孢杆菌原生质体的制备、再生及灭活[J]. *食品科技*, 2017, 42(4): 2-7.

[15] 李森, 曾柏全, 冯金儒. 高产纤维素酶菌株原生质体制备及再生条件[J]. *中南林业科技大学学报*, 2013, 33(12): 174-180.

[16] 周颀. 基于基因组重排技术筛选角蛋白酶高产菌株及发酵动力学研究[D]. 成都: 四川大学, 2016.

粉剂各浸泡 5 min, 晾干后备用。

热水及低温贮藏处理: 将香蕉果实浸入热水处理机(体积 400 L)中, 温度 52 ℃, 时间 3 min。热水处理后将香蕉果实放入 20 ℃ 恒温箱中贮藏 3 h, 然后置于 7 ℃ 下贮藏 5 d; 对照处理的香蕉在 20 ℃ 恒温箱中贮藏 3 h, 然后置于 7 ℃ 下贮藏 5 d。每个处理 100 个香蕉, 定期取样备用。取样时间点为: 20 ℃ 下 0、0.5、1.5、3.0 h; 7 ℃ 下 1.0、4.0、8.0、24.0、48.0、120.0 h。

## 1.2 试验方法

1.2.1 脯氨酸含量测定 参照 Demiral 等的试验方法<sup>[11]</sup>, 略有改动。取香蕉果皮 0.5 g, 用 5 mL 3% 磺基水杨酸提取, 沸水浴 10 min, 冷却。5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液待测。测定: 取 2 mL 上清液, 加 2 mL 水、2 mL 3% 磺基水杨酸、2 mL 冰乙酸和 4 mL 2.5% 茚三酮, 沸水浴显色 30 ~ 60 min, 冷却。加 4 mL 甲苯萃取, 静置后取甲苯相测定 520 nm 下的吸光度(以甲苯为空白对照)。根据下式计算脯氨酸含量: 单位鲜质量样品中脯氨酸含量(μg/g) = 2.5C/W, 式中: C 为样品脯氨酸浓度, μg/mL; W 为样品质量, g; 2.5 表示溶液体积为 2.5 mL。

1.2.2 实时定量引物设计 根据已经克隆得到的 *MaCaM* 和 *MaCAMTA3* 基因序列, 设计实时定量引物, 验证后备用。引物序列为 *MaCaM* (5' - ACCGAAGCTGAGCTACAG - 3'、5' - ATCCTTCATCTTGGCAGC - 3') 和 *MaCAMTA3* (5' - GCAAATGCTCACAAAGGC - 3'、5' - GAGAAGCATTCGGAACAG - 3')。

1.2.3 实时荧光定量 PCR (qRT - PCR) 采用 TOYOBO THUNDERBIRD SYBR® qPCR Mix 进行 qRT - PCR 扩增。反应体系为 20.0 μL, 即 SYBR - Green PCR Master Mix 10.0 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.25 μL, 稀释的 cDNA 2.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 7.5 μL。扩增程序: 95 ℃ 3 min; 95 ℃ 10 s, 59 ℃ 10 s, 72 ℃ 20 s, 40 个循环。为了确认产物的质量和引物的特异性, 在溶解曲线中分析产物的 *T<sub>m</sub>* (分析溶解温度为 65 ~ 95 ℃)。所有 qRT - PCR 结果根据内参基因 *Actin1* 进行 *C<sub>t</sub>* 值校准, 再利用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算目的基因的相对表达量, 重复 3 次。

## 1.3 数据处理

采用 Sigmaplot 12.5 制作折线图。

## 2 结果与分析

### 2.1 热激处理及热激后低温贮藏对脯氨酸含量的影响

前期研究表明, 7 ℃ (冷害温度) 下, 香蕉果实在处理后 5 d 已经出现明显的冷害症状, 利用 52 ℃ 热水处理(HWD) 3 min 能有效提高香蕉果实在 7 ℃ 低温贮藏中的抗冷性<sup>[9-11]</sup>。从图 1 可知, 对照香蕉果实的脯氨酸含量在 7 ℃ 下呈现缓慢上升的趋势。热激处理后在 20 ℃ 贮藏期间, 香蕉果实的脯氨酸含量小幅度逐渐增加, 且脯氨酸含量略高于对照。当热激后的香蕉果实转入 7 ℃ 下 1 h 时, 脯氨酸含量迅速增加至 20 ℃ 贮藏时的 3 倍左右, 之后呈现出下降上升再下降的趋势, 在整个 7 ℃ 低温贮藏期间, 热激处理的香蕉果实其脯氨酸含量一直明显高于对照。

### 2.2 热激处理及热激后低温贮藏对 *MaCaM* 表达的影响

从图 2 可知, 对照处理的 *MaCaM* 基因表达在 7 ℃ 下 1 h

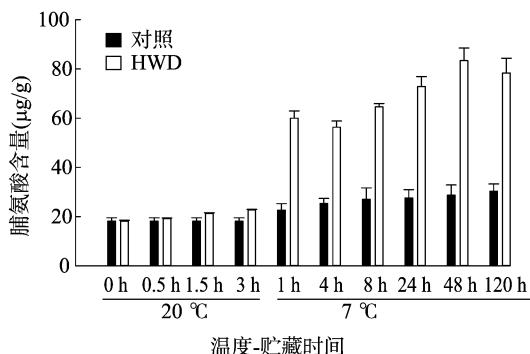


图1 热水处理和低温贮藏对脯氨酸含量的影响

迅速升高至最大值, 之后又在 7 ℃ 4 h 迅速下降, 后期持续在同一个水平, 但表达量仍高于 20 ℃ 下的表达量。香蕉果实经过 HWD 处理后, *MaCaM* 基因表达呈现快速升高的趋势, 在 20 ℃ 下 3 h 达到一个高峰, *MaCaM* 基因表达量约为对照的 2 倍。当热激后的香蕉果实转入 7 ℃ 低温贮藏 1 h 时, *MaCaM* 基因表达量迅速下降至 0 d 的水平, 这与对照的表现相反。7 ℃ 低温 4 ~ 8 h 时, *MaCaM* 基因表达量迅速增强至最高峰, 之后逐渐下降。除 7 ℃ 贮藏 1、4 h 外, 热激处理的 *MaCaM* 基因表达量均高于对照。

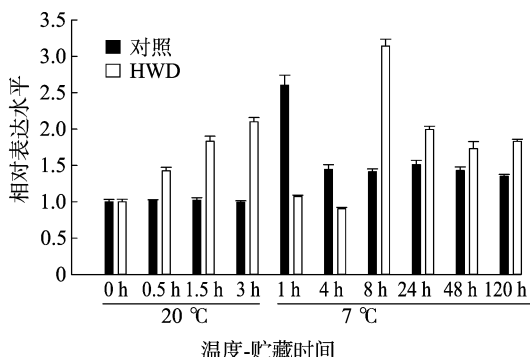


图2 热水处理和低温贮藏对 *MaCaM* 基因表达的影响

### 2.3 热激处理及热激后低温贮藏对 *MaCAMTA3* 表达的影响

从图 3 可知, 对照处理的 *MaCAMTA3* 基因在 7 ℃ 贮藏下 1 ~ 8 h 呈现逐渐下降趋势, 7 ℃ 贮藏 8 ~ 24 h *MaCAMTA3* 基因表达又增强至 20 ℃ 贮藏时的水平, 之后又开始逐渐下降。香蕉经 HWD 处理后 3 h, *MaCAMTA3* 基因表达逐渐升高至最大值, 约是对照处理的 1.4 倍, 然而当果实转入 7 ℃ 后 1 h, *MaCAMTA3* 基因表达量出现短暂而迅速的下降, 且低于对照。之后其表达量逐渐上升, 在 7 ℃ 8 ~ 24 h 达到一个高峰, 之后又开始逐渐下降。除 7 ℃ 贮藏 1、4 h 外, HWD 处理的 *MaCAMTA3* 基因表达均高于对照。

## 3 结论与讨论

脯氨酸含量的积累与果实抗冷性的提高密切相关<sup>[12]</sup>。桃果实中较高的脯氨酸含量明显提高了桃果实的抗冷性, 而且用外源 5 mmol/L 脯氨酸处理桃果实, 能明显降低桃果实冷害指数, 缓解其冷害症状的发生<sup>[13]</sup>。10 mmol/L 甜菜碱处理可提高黄瓜果实中脯氨酸含量, 从而减轻黄瓜果实贮藏期间的冷害<sup>[14]</sup>。外源 NO 处理能够通过促进香蕉果实脯氨酸积累和增强体系的抗氧化性, 进而减轻香蕉冷害<sup>[15]</sup>。本研究也

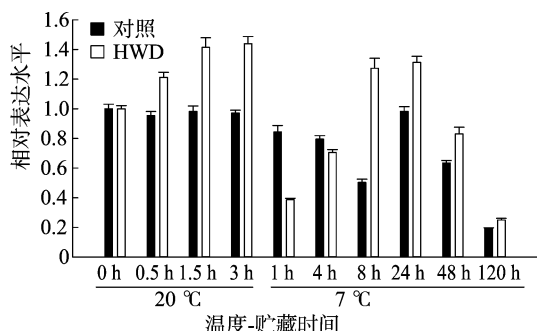


图3 热水处理和低温贮藏对香蕉 *MaCAMTA3* 基因表达的影响

发现,热激能在处理后 3 h 内轻微增加香蕉果实脯氨酸的含量,而当果实经热激处理后在 7 °C 低温贮藏时,其脯氨酸含量一直明显高于对照处理,说明热激诱导的脯氨酸大量积累与香蕉果实的抗冷性密切相关。

热激处理能在短时间内迅速激活 *CaM* 的表达。例如,拟南芥幼苗经过 37 °C 热激后,其 *AtCaM3* 基因表达水平在 20 min 内迅速增加并达到最大值,在 30 min 后逐渐下降<sup>[16]</sup>。37 °C 处理玉米幼苗后,其 *CaM1-2* 的表达在 10 min 后开始迅速增强<sup>[4]</sup>,本研究也发现,香蕉果实经过热激处理后, *MaCaM* 基因表达呈现快速升高的趋势,在处理 3 h 达到一个高峰。*CaM* 也参与了植物的低温胁迫反应。例如,茶树在 4 °C 低温胁迫下, *CsCaM1* 与 *CsCaM2* 基因的表达量从 3 h 开始逐渐上升,于 24 h 达到最大值<sup>[17]</sup>。4 °C 低温能诱导小麦幼苗 *TaCaM5* 的表达量在 1 h 后迅速升高,3 h 达到最高峰,之后又迅速下降至处理前的水平<sup>[18]</sup>。本研究结果与之类似,7 °C 低温诱导香蕉果实的 *MaCaM* 基因表达在 1 h 迅速升高至最大值,之后又在 4 h 迅速下降,后期维持在一个较低的水平。而经热激处理后在 7 °C 低温贮藏的香蕉果实, *MaCaM* 基因表达高峰推迟出现在 4 h,除低温贮藏 1.4 h 外,热激处理的 *MaCaM* 基因表达均高于对照。以上结果说明, *MaCaM* 可能参与了热激处理诱导香蕉果实抗冷性的过程。

热处理和低温都能诱导 *CAMTA* 基因的表达。42 °C 热处理能诱导拟南芥幼苗的 *AtCAMTA1*、*AtCAMTA2*、*AtCAMTA3*、*AtCAMTA5*、*AtCAMTA6* 这 5 个基因在 15 min 开始上调表达,尤其是 *AtCAMTA1*、*AtCAMTA5*、*AtCAMTA6* 这 3 个基因在热处理 4 h 内均维持较高的表达水平。类似地,4 °C 低温也能诱导拟南芥幼苗 *AtCAMTA1*、*AtCAMTA2*、*AtCAMTA3*、*AtCAMTA5*、*AtCAMTA6* 这 5 个基因的上调表达,尤其是 *AtCAMTA1*、*AtCAMTA3*、*AtCAMTA5*、*AtCAMTA6* 这 4 个基因在低温处理 4 h 内均保持较高的表达水平<sup>[6]</sup>。本研究也发现,热处理能诱导香蕉果实 *MaCAMTA3* 基因表达在处理 3 h 内迅速增强,7 °C 低温贮藏下 *MaCAMTA3* 基因表达呈现先下降后上升再下降的趋势,而经过热激处理后在 7 °C 低温贮藏的香蕉果实,除低温贮藏 1.4 h 外, *MaCAMTA3* 基因表达均高于对照。说明热激处理诱导 *MaCAMTA3* 基因较高的表达水平,可能参与了热激处理诱导香蕉果实产生的抗冷性。

热处理能诱导香蕉果实在低温贮藏中的脯氨酸含量升高,从而提高果实抗冷性。 *MaCaM* 和 *MaCAMTA3* 基因可能

参与了热激处理诱导香蕉果实产生的抗冷性。

## 参考文献:

- [1] 陆旺金,张昭其,季作梁. 热带亚热带果蔬低温贮藏冷害及御冷技术[J]. 植物生理学通讯,1999,35(2):158-163.
- [2] 张昭其,庞学群. 南方水果贮藏保鲜技术[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2008:26.
- [3] 王海波,张昭其,邓鸿铃,等. 热处理提高采后果蔬抗冷性的机理分析[J]. 广东农业科学,2015,42(15):57-64.
- [4] Liu H T, Li B, Shang Z L, et al. Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat[J]. Plant Physiology, 2003, 132(3): 1186-1195.
- [5] Yang N, Peng C, Cheng D, et al. The over-expression of calmodulin from antarctic notothenioid fish increases cold tolerance in tobacco[J]. Gene, 2013, 521(1):32-37.
- [6] Yang T, Poovaiah B W. A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(47):45049-45058.
- [7] Pandey N, Ranjan A, Pant P, et al. CAMTA1 regulates drought responses in *Arabidopsis thaliana*[J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 216.
- [8] Doherty C J, van Buskirk H A, Myers S J, et al. Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance[J]. Plant Cell, 2009, 21(3):972-984.
- [9] 王海波,庞学群,黄雪梅,等. 活性氧在热处理诱导香蕉耐冷性中的作用[J]. 中国农业科学, 2012, 45(5):936-942.
- [10] Wang H, Zhang Z, Xu L, et al. The effect of delay between heat treatment and cold storage on alleviation of chilling injury in banana fruit[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(13):2624-2629.
- [11] Demiral T, Türkan I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance[J]. Environmental and Experimental Botany, 2005, 53(3):247-257.
- [12] 刘彤彤,蒋欣梅,于锡宏,等. 间歇降温对黄瓜幼苗耐冷相关指标的影响[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(12):195-196, 271.
- [13] 陈智智. 脯氨酸对减轻桃果实冷害的作用及其机理研究[D]. 南京:南京农业大学, 2012.
- [14] 张海英,王有年,韩涛,等. 外源甜菜碱对黄瓜果实冷藏期间延缓冷害的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(8):2407-2412.
- [15] Wang Y, Luo Z, Du R, et al. Effect of nitric oxide on antioxidative response and proline metabolism in banana during cold storage[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(37):8880-8887.
- [16] Zhang W, Zhou R G, Gao Y J, et al. Molecular and genetic evidence for the key role of *AtCaM3* in Heat-Shock signal transduction in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2009, 149(4):1773-1784.
- [17] 黄玉婷,钱文俊,王玉春,等. 茶树钙调素基因 *CsCaMs* 的克隆及其低温胁迫下的表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(5):906-913.
- [18] 刘新颖,王晓杰,薛杰,等. 小麦钙调素新亚型 *TaCaM5* 的克隆及表达分析[J]. 作物学报, 2010, 36(6):953-960.