

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¹, 李璐², 苏新国¹, 张昭其³, 庞学群²

(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 °C 热水处理 3 min 后于 7 °C 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 °C 贮藏时,其脯氨酸含量一直明显高于对照处理。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 贮藏的香蕉果实,其 *MaCaM* 基因表达高峰推迟出现在 4 h,除 7 °C 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 °C 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 贮藏的香蕉果实,除 7 °C 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

香蕉果实贮藏温度低于 12 °C 时即发生冷害,难以采用较低的温度来延长贮运期^[1-2]。热处理是提高果蔬抗冷性的最有效的采后处理措施之一^[3],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^[4-5]。热、冷、干旱等多种胁迫都能诱导 CAMTA 基因上调表达^[6-7]。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^[8]。笔者所在课题组的前期研究表明,采用 52 °C 热水处理香蕉果实 3 min,能有效减轻香蕉果实的冷害症状^[9-10],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。

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。

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

[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] 周颺. 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 °C, 时间 3 min。热水处理后将香蕉果实放入 20 °C 恒温箱中贮藏 3 h, 然后置于 7 °C 下贮藏 5 d; 对照处理的香蕉在 20 °C 恒温箱中贮藏 3 h, 然后置于 7 °C 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 °C 下 0、0.5、1.5、3.0 h; 7 °C 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^[11], 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($\mu\text{g/g}$) = $2.5C/W$, 式中: C 为样品脯氨酸浓度, $\mu\text{g/mL}$; 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' - GCAAATGTCACAAAGGC - 3'、5' - GAGAAGCATTCCGAACAG - 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 $\mu\text{mol/L}$)各 0.25 μL , 稀释的 cDNA 2.0 μL , ddH₂O 7.5 μL 。扩增程序: 95 °C 3 min; 95 °C 10 s, 59 °C 10 s, 72 °C 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_m (分析溶解温度为 65 ~ 95 °C)。所有 qRT - PCR 结果根据内参基因 *Actin1* 进行 C_t 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 °C (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 °C 热水处理(HWD) 3 min 能有效提高香蕉果实在 7 °C 低温贮藏中的抗冷性^[9-11]。从图 1 可知, 对照香蕉果实的脯氨酸含量在 7 °C 下呈现缓慢上升的趋势。热激处理后在 20 °C 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 °C 下 1 h 时, 脯氨酸含量迅速增加至 20 °C 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 °C 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 °C 下 1 h

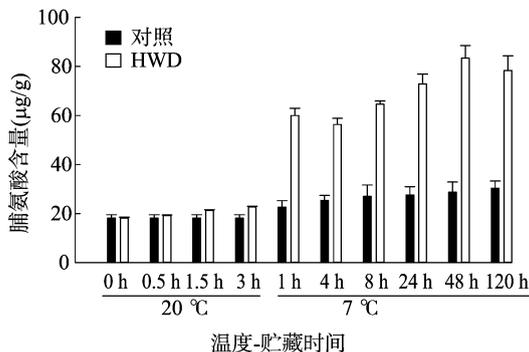


图1 热水处理和低温贮藏对脯氨酸含量的影响

迅速升高至最大值, 之后又在 7 °C 4 h 迅速下降, 后期持续在同一个水平, 但表达量仍高于 20 °C 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 °C 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中转入 7 °C 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 °C 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 °C 贮藏 1、4 h 外, 热激处理的 *MaCaM* 基因表达量均高于对照。

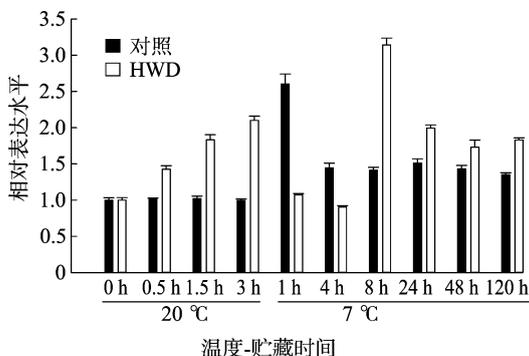


图2 热水处理和低温贮藏对 *MaCaM* 基因表达的影响

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 °C 贮藏下 1 ~ 8 h 呈现逐渐下降趋势, 7 °C 贮藏 8 ~ 24 h *MaCAMTA3* 基因表达又增强至 20 °C 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 °C 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 °C 8 ~ 24 h 达到一个高峰, 之后又开始逐渐下降。除 7 °C 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^[12]。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^[13]。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^[14]。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^[15]。本研究也

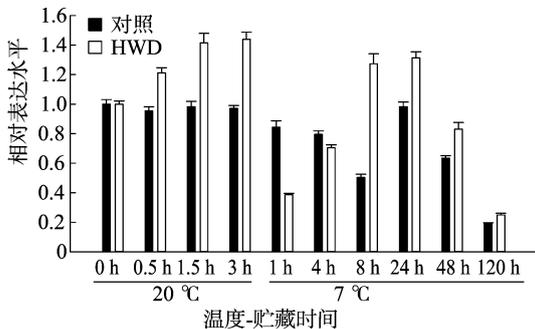


图3 热水处理和低温贮藏对香蕉 *MaCAMTA3* 基因表达的影响

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^[16]。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^[4],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^[17]。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^[18]。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^[6]。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.