

• 现代科技 •

# 植物耐寒性及防寒技术

PLANT COLD HARDINESS  
AND  
LOW TEMPERATURE RESISTANCE TECHNIQUES

刘祖祺 王洪春 主 编

学 术 书 刊 出 版 社

· 现代科技 ·

# 植物耐寒性及防寒技术

刘祖祺 王洪春 主编

学术书刊出版社

### 内 容 提 要

本书包括38篇学术论文,由国内外80余名植物抗寒防冻专家撰写,内容包括植物抗寒生理生化方面研究的最新进展,植物抗低温能力及伤害机理;植物抗寒生理指标;植物防寒原理及防寒技术等4个方面。内容丰富,立论新颖,理论联系实际,是在植物耐寒性及防寒技术上一部难得的好书。对于从事本专业的科研人员、大专院校师生以及有关科技人员,有重要参考价值。

·现代科技·

### 植物耐寒性及防寒技术

刘祖祺 王洪春主编

·

学术书刊出版社出版(北京海淀区学院南路86号)

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

北京燕山印刷厂印刷

·

开本: 787×1092 毫米 1/16 印张, 19 字数: 470 千字

1990年1月第1版 1990年1月第1次印刷

印数: 1—1150册 定价: 14.00元

ISBN 7-80045-533-5/S·71

## 序

植物的寒害冻害，是世界作物生产上的一大威胁。不论是一年生的稻、麦、棉、油、蔬菜，或是多年生的柑桔、苹果、香蕉、甘蔗、橡胶、林木等都遭受不同程度的寒冻损失，限制了栽培的区域。历年来，水稻的烂秧，小麦、油菜的霜冻，以及柑桔、香蕉、橡胶的冻害，造成巨大的损失。美国Florida州1983~1985年3年大冻，每年损失柑桔果实达500万吨，许多橙汁厂因缺乏原料供应而倒闭。1954、1977年我国南方大冻，柑桔、香蕉、橡胶损失几百万株树，使雷州半岛的橡胶树全遭毁灭。

一个世纪以来，植物的冻害受到世界各国学者的重视。Muller-Thurgau (1886)、Molisch (1897)、Maximov (1913)、Mez (1925)、Chandler (1926)、Levitt (1962、1980) 等人，先后研究发表过植物冻害的成因，植物对寒冻的反应，低温锻炼的效应和防冻的措施等问题，使植物冻害的研究，逐渐深化发展。

第3届国际植物抗冻学术讨论会1986年9月在上海植物生理研究所召开，由美国的Minnesota大学园艺系植物抗冻实验室主任李本湘博士和上海植物生理研究所植物抗性研究室主任王洪春研究员主持。

本书编译的38篇学术论文，内容包括植物抗寒的生理生化研究；植物抗低温能力及伤害机理；植物抗寒生理指标；以及植物防寒原理与防寒技术等四个方面，由中外的植物抗寒防冻专家80余人撰写学术论文，内容丰富，立论新颖，理论联系实际，是当今在植物抗寒生理上一部难得的汇编。可供高等院校、科研单位及生产部门广大读者参考学习。实深庆幸，并志祝贺。

章文才

华中农业大学柑桔研究室

1989年4月2日

## 前 言

第三次国际植物抗冻学术讨论会于1986年9月4~7日在上海植物生理研究所召开。

这次会议是由美国明尼苏达大学园艺系植物抗冻实验室主任李本湘博士和中国上海植物生理研究所植物抗性研究室主任王洪春研究员共同主持的。会议的宗旨是使科研与教学工作者们汇聚一堂，共同研讨有关抗冻基本理论的研究状况。例如：抗冻机理、冷锻炼、低温胁迫下植物的反应，防寒的基本原理等。

本书选编了会议主要的论文及补充了有关论文。读者可以系统地从中得知自第二次抗冻会议以来在这一领域的最新进展。这对我们进一步研究有关植物耐寒性及防寒技术是有很大的帮助的。

在这里要感谢上海植生所所长沈允钢对会议的支持，同时感谢实验室内研究生和其他工作人员在会议组织过程中所给予的帮助。

本书出版由刘祖祺、王洪春主持，全面负责编、译、审等工作。主要参加编译的有朱月林、汪良驹、殷毅中等老师，并请王洪春、何若韞、简令成、周恩、陶大立、刘友良等教授进行终审。

顾苏同志为本书照目、绘图，在此一并致谢。

本书出版资金，承蒙王洪春、刘祖祺、陶大立、简令成、周恩、何若韞、郝士琴等单位课题组以及学术书刊出版社的支持，特此致谢。

主编 刘祖祺、王洪春  
一九八九年十月七日于南京

# 目 录

## 第一部分 植物抗寒的生理生化研究

1. 抗寒性诱导中核酸和蛋白质合成的变化  
Menq-Jian Tseng and Paul H. Li ..... 3
2. 25℃下ABA诱导悬浮培养油菜的耐冻性: 蛋白质和RNA变化的研究  
A.M. Johnson-Flanagan and J. Singh ..... 16
3. 低温下冬小麦抗冻性与蛋白质合成  
T.I. Trunova ..... 20
4. 抗冻和非抗冻小麦细胞表面的糖蛋白  
简令成 孙龙华 孙德兰 ..... 28
5. 光合作用——植物对低温反应的关键过程: 在低温锻炼时的变化和冻融初期的伤害  
Kenneth L. Steffen and Jiwan P. Palta ..... 33
6. 椭圆小球藻脂肪酸合成酶系统和抗冻性的关系  
Shoji Hatano H. Akashi Y. Nogata and M. Yoshimoto ..... 49
7. 用放射免疫法分析柑桔抗寒锻炼中游离和结合态脱落酸的变化  
刘祖祺 张连华 朱培仁 ..... 57
8. 桉树的抗冻性有植物生长调节物质参与吗?  
Dugald M. Paton ..... 65
9. 巨桉抗霜性——一种可能的分子机制  
Matthew L. Bolte Wilfrid D. Crow and Dugald M. Paton ..... 71

## 第二部分 植物抗低温能力及其伤害机理

10. 热带高山植物避冻和耐冻的机理  
E. Beck R. Scheibe Scheibe and Jens Hansen ..... 79
11. 日本北海道萨哈林冷杉抗冻性的地区差异  
S. Eiga and A. Sakai ..... 86
12. 冬季太阳辐射诱发的红松苗不可逆伤害  
陶大立 靳月华 杜英君 ..... 94
13. 红松苗冬季伤害机理  
靳月华 陶大立 杜英君 ..... 99
14. 夏霜和冬旱对针叶树苗的危害

|                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| L.Christersson H.von Fircks and Yang Sihe .....                                                           | 103 |
| 15. 冷锻炼和未锻炼的苏格兰松树针叶纯化质膜的冰冻伤害——<br>结合有离子促进型ATP酶的质膜是冻害的最初部位吗？<br>J.Hellergren S.Widell and T.Lundborg ..... | 108 |
| 16. 麦叶细胞原生质体和液泡的耐冻性差异<br>王洪春 李锦树 .....                                                                    | 114 |
| 17. 复合介质中无机电解质对结冰过程中类囊体膜伤害和保护作用的比较<br>K. A. Santarius .....                                               | 118 |
| 18. 冷锻炼和冰冻伤害对植物组织电阻抗的影响<br>D. G. Stout .....                                                              | 127 |
| 19. 冷害对高等植物生物电学特性的影响与低温胁迫<br>金 戈 王洪春 .....                                                                | 136 |
| 20. 生长锥发育对冬小麦抗寒性的生理效应<br>刘友良 丁念诚 .....                                                                    | 144 |
| 21. 黑穗醋栗冻害的研究<br>张永和 桂明珠 高庆玉 周 恩 .....                                                                    | 148 |
| 22. 大白菜叶中游离脯氨酸含量的变化及其与耐冻性的关系<br>何若樨 张晓松 玄英淑 .....                                                         | 157 |
| 23. 低温和干旱锻炼对杂交梗稻无性系抗寒性的生理效应<br>龚 明 刘友良 <u>朱培仁</u> .....                                                   | 162 |
| 24. 草莓在寒冷驯化中游离脯氨酸含量的变化与耐冻性的发育<br>何若樨 王光洁 张晓松 .....                                                        | 169 |
| 25. 云南桉树冻害及抗冻性研究<br>陈炳林 杨俊陶 .....                                                                         | 176 |
| 26. 苹果幼树越冬后抽条原因的探讨<br>郝士琴 阮圣冬 .....                                                                       | 184 |

### 第三部分 植物抗寒生理指标的研究

|                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 27. 细胞膜特性与冻害的关系<br>J. P. Palta P. H. Li .....                                         | 191 |
| 28. 应用Logistic方程确定植物组织低温半致死温度的研究<br>朱根海 刘祖祺 .....                                     | 199 |
| 29. 植物抗性指标的数量化研究<br>——胁迫、时间与胁迫三者植物抗冻性中的数量关系<br>苏维埃 宓容钦 王文英 王洪春 .....                  | 204 |
| 30. 致死低温确定法的改进及其在不结球白菜上的验证<br>朱月林 曹寿椿 刘祖祺 .....                                       | 213 |
| 31. 用叶片组织中水质子核磁共振弛驰时间的热滞后测定植物组织的冷害<br>M. Iwaya-Inoue Y. Konagamitsu and S. Kaku ..... | 219 |

#### 第四部分 植物防寒原理及其防寒技术

|                                                       |     |
|-------------------------------------------------------|-----|
| 32. 柑桔抗寒生理与其防寒技术                                      |     |
| 刘祖祺 .....                                             | 231 |
| 33. 柑桔生长与抗冻化学生物调节                                     |     |
| G.Yelenosky C.S.Mank M.G.Bausher and M.M.Kushad ..... | 250 |
| 34. 甘蔗愈伤组织的超低温保存                                      |     |
| 简令成 孙德兰 孙龙华 .....                                     | 260 |
| 35. 将野生和栽培二倍体马铃薯的抗冻性导入普通四倍体马铃薯                        |     |
| Nelson Estrada Ramos .....                            | 267 |
| 36. 中国东部抗寒的常绿阔叶树种的引种和筛选                               |     |
| 顾 英 孙醉君 毕绘蟾 黄树芝 蔡剑华 耿晓美 贺善委 .....                     | 273 |
| 37. 柑桔抗寒生理因素的季节变化                                     |     |
| G.Yelenosky C.L.Guy .....                             | 279 |
| 38. 日本柑桔的冻害和防冻措施                                      |     |
| I.Ikeda .....                                         | 286 |



# 第 一 部 分

## 植物抗寒的生理生化研究



# 抗寒性诱导中核酸和蛋白质合成的变化

Menq-Jian Tseng and Paul H. Li

## 引 言

植物抗寒性的研究可分成两大领域：(1) 抗冻或冻害的性质与机制；(2) 冷锻炼的性质和机制。这是一个表示植物在冰冻温度下存活能力的过程 (Huner, 1985)。这两大领域的研究已在许多综述和书籍中得到广泛评述 (Alder和Hermann, 1971; Larcher和Bäuer, 1981; Burkner等, 1976; Lyons等, 1979; Graham和Patterson, 1982; Levitt, 1980; Li和Sakai, 1978, 1982; Steponkus, 1984; Li, 1984, 1985; Carter和Brenner, 1985; Yelenosky, 1985)。关于抗寒锻炼的研究, 有许多注重于水分平衡, 碳水化合物水平, 核酸、蛋白质含量, 氨基酸, 脂质饱和作用, 细胞壁特性, 原生质膜的变化和膜的稳定性, 生长调节剂的作用, 以及细胞结构的完整性, 等等。上述大多数观察结果或多或少都与抗寒性的增加有关, 但迄今还没有直接论证这些现象与抗寒性增加具有因果关系。

近几年来, 研究工作又注重于蛋白质的变化。因为这种变化可能与冷锻炼期间调节基因的表达有关, 并导致耐冻性的增加。也有人提出诱导抗冻性可能受激素平衡改变, 尤其是ABA的变化所调节 (Chen等, 1983)。为了弄清冷锻炼的机制, 我们致力于ABA在冷锻炼中调节基因表达潜力的研究, 着重研究冷锻炼和如何使用ABA使之在体内、体外两种情况下改变野生马铃薯 (*Solanum commersonii*) 茎 培试管苗的蛋白质合成类型。马铃薯茎培小植株是一个生理生化上已充分了解的系统, 利用它可以获得冷锻炼 (5/5℃) 或 ABA (20/15℃) 处理增加抗寒性的信息。因而它成为研究抗寒性产生过程中分子变化的理想系统。

本文回顾了过去几十年所取得的能证明抗寒性诱导过程涉及到的“抗寒蛋白”和 (或) 遗传成分方面的试验证据; 也强调众所周知的冷锻炼中与基因表达有关的蛋白质、酶和核酸的改变和 (或) 积累; 同时, 还总结了我们在马铃薯茎培小植株上的近期工作, 认为它们是支持冷锻炼和ABA处理改变基因的表达, 并导致耐冻性的增加这一观点的。

## 植物抗寒性与蛋白质变化的关系

在许多植物上, 可溶性蛋白质的增加与抗寒性的产生有相关性 (Siminovitch和Briggs, 1949, 1953; Siminovitch, 1963; Gerloff等1970; Lebedev和Komarnitskii, 1971; Lashén和Chaplin, 1971; Kacperska-Palacz等, 1972, 1977a; Brown和Bixby, 1973b, 1975; Rochat和Therrien, 1975a; Trumova和Zvereva, 1977; Chen和Li, 1980b)。

有些报道指出, 可溶性蛋白质在抗寒锻炼中没有实质性的改变 (Young, 1969; To-

man和Mitchell, 1968), 或者可溶性蛋白质的增加与抗寒性的增强没有关系(Pieninzek和Holubowicz, 1973; Ghazaleh和Hendershott, 1967)。抗寒锻炼中可溶性蛋白质的增加可能是由于合成的加强, 或降解速率下降, 或仅仅反映了锻炼中普遍发生的水分含量的下降。Rochat和Therrien (1975b) 用 $^{35}\text{S}$ 以及Pomeroy等 (1970) 用 $^{14}\text{C}$ -亮氨酸分别标记锻炼过的冬小麦和红松, 观察到这些同位素掺入可溶性蛋白质中的量有增加的现象。这暗示了在抗寒性产生过程中, 抗寒性的增加需要重新合成蛋白质。而且, 用蛋白质合成专一抑制剂的研究表明, 诱导过程不仅需要蛋白质合成, 而且是在细胞质核糖体上合成(Hatano等, 1976; Trunova和Zvereva, 1977)。从锻炼过的含羞草上胚轴(Brown, 1972) 或马铃薯叶片(Vigue等, 1974) 中分离得到的多聚核糖体, 在抗寒锻炼中始终保持完整。Bixby和Brown (1975) 发现低温锻炼过的黑槐幼苗中至少有17种核糖体蛋白质发生了改变, 提出低温下核糖体的功能发生改变从而产生了不同的蛋白质。在低温锻炼过程中, 蛋白质合成机制似乎发生了某种改变, 这与抗寒性的产生有关。

早在1949年, Briggs和Siminovitch就从水溶性蛋白质的5条电泳谱带中分辨出2~3条的含量发生了相当大的变化。在黑槐树皮组织中, 这些蛋白质的合成依赖于一种未知因子的预先积累(Siminovitch和Briggs, 1953)。Coleman等 (1966) 发现锻炼过的苜蓿根中多出一条高电荷低分子量的蛋白质带。Gerloff等 (1967) 认为检测出抗性不同的苜蓿品种间在谱带上的任何变化, 尚不足以用来估计其抗寒能力。Morton (1969) 用白菜叶, Faw和Jung (1972) 以及Faw等 (1976) 用苜蓿根颈和根均未发现新的多肽, 也未发现锻炼过程中电泳带类型的显著改变。在柑桔中也未发现与抗寒性有关的蛋白质成分。但是, Yelonosky和Guy (1982) 发现, 冻害后未锻炼的华兰西亚甜橙叶片蛋白质变性比锻炼过的严重。然而, 在抗寒性发生改变的时候, 苹果树皮和侧柏叶片(Carker等, 1969) 以及百慕大草的根状茎(Davis和Gilbert, 1970) 中已经观察到蛋白质发生了质的变化, 这一点可以由特异电泳带的出现或消失而得到证实。

根据这些蛋白质的特性, 已推测出新合成蛋白质在冻害不断严重时的作用。Chou和Levitt (1972) 发现抗性弱的三种植物(玉米、小米和高粱) 籽粒中疏水氨基酸含量较高, 而三种较抗寒的植物(小麦、黑麦和大麦) 籽粒中的含量较低。他们提出, 抗性弱的植物在冻融循环中, 由于疏水氨基酸含量高, 可溶性蛋白质活性部位的疏水性强, 可能导致蛋白质的解体 and 变性。从抗寒的山菜蕒中已分离出3个分子量约为20~40KD的糖蛋白。Williams (1973, 1972) 认为, 这些多聚体在结冰时可能增加对细胞水的束缚, 从而减少脱水胁迫。经冷锻炼的黑槐树皮中也发现了一种糖蛋白复合物(Brown和Bixby, 1973b, 1975)。

Heber研究小组在抗冻的菠菜和白菜叶中分离出两套“冰冻保护性叶蛋白”, 其分子量在10~20KD (Heber和Kempfle, 1970)。这些蛋白质在体外条件下能十分有效地防止结冰时离体类囊体膜的光合磷酸化失活。它们含有很多极性氨基酸, 并对热稳定(Volger和Heber, 1975)。对耐寒和寒敏感的小麦所进行的脉冲标记研究表明, 冷锻炼出现了两种高亲水性蛋白质(分子量240, 115KD) (Rochat和Therrin, 1975b)。Makinen和Stegermann (1981) 未发现锻炼后的冬小麦叶片中有任何新的蛋白质, 只是看到锻炼过的叶片在SDS-PAGE上出现某种较强的带。Kacperska-Palacz等 (1977a, b) 在冬油菜叶片经冷处理时确认了两种可溶性蛋白质增加, 其分子量约为25.5~30KD。这些蛋白质缺乏磷

氨酸和蛋氨酸残基,并存在于细胞质中。Cloutier (1983)发现,经冷锻炼或脱水胁迫诱导冬小麦和黑麦的耐冻性后,两种可溶性多肽增加了两倍。后来,他利用双向凝胶电泳技术证实了经锻炼的黑麦原生质体中存在一种46KD的蛋白质(Cloutier, 1984)。

这些矛盾的结果反映了蛋白质合成与抗寒性的复杂关系。抗寒性是不稳定的,随时间、温度、日长、含水量、成熟期、营养状况、物种、品种以及生理年龄的不同而改变。因此,解释蛋白质合成的改变时要特别小心。不同的结果可能是试验设计不合理造成的。细胞中许多蛋白质的质和量是不同的。为了揭示冷锻炼中微妙而又可能极为重要的蛋白质合成的改变,需要高度灵敏的技术。在冷锻炼期间,可溶性蛋白质中出现具有高度亲水的糖蛋白,由于它们具有独特的氨基酸组成及高度的水合能力,这种高效水分束缚能力的蛋白质被认为是冰冻时抑制胞内结冰的一个重要因素。

最近,一些研究者对参与抗寒性诱导过程中的蛋白质改变及其分子机制进行了研究。以冷锻炼和未锻炼的菠菜叶为材料,标记分析体内蛋白质合成类型。结果表明,在冷锻炼组织内出现82KD的多肽,并与离体翻译产物相一致(Guy等, 1985)。以0℃处理2天的冬油菜幼苗试验也表明,处理抑制了特异基因的活动和诱导蛋白质水平的改变(Meza-Basso等, 1986)。Johnson-Flanagan (1987)报道了锻炼的冬油菜悬浮培养细胞在体内、体外均可诱导一种20KD多肽,而且这种多肽与富含ER部分有关。这个领域的工作刚刚开始,尽管许多问题尚待解决,还有许多问题超出了现有技术所能及的范围,但可以看出一些新的苗头和灿烂的前景。在今后几年内,这个领域的研究将会得到巨大发展。

在冷锻炼中,对膜蛋白质变化的数量存在着分歧(Brown和Bixby, 1975; Gusta和Weiser, 1972; Kacperska-Palacz, 1977b)。尽管美洲黑麦在冷锻炼时,叶绿体可溶性蛋白质在数量上变化明显(Huner和Macdowall, 1976),但在冬小麦(Rochat和Therrien, 1975a; Huner和Macdowall, 1976)、大麦(Havaux等, 1985)或黑麦(Griffith等, 1982)中,冷锻炼对叶绿体膜上的多肽电泳类型没有影响。有人提出,冷锻炼期间叶绿体膜特异蛋白发生了构象的改变(Griffith等, 1982, 1986)。

Khokhlova等(1976)观察到,冬小麦在冷锻炼期间,其线粒体蛋白质复合体发生了质和量的变化。分析冷锻炼植株中提取的质膜蛋白质表明,锻炼改变了凝胶电泳的蛋白质类型(Uemura和Yoshida, 1984; Yoshida, 1984; Yoshida和Uemura, 1984)。在这些研究中,质膜蛋白质均由双向电泳技术分离,结果发现,冷锻炼过程中出现了一些新的多肽,而另一些多肽则消失或在数量上明显减少。

最近,围绕这个领域中的膜蛋白进行了大量的研究。现在应该研究锻炼信号感受时的细胞质蛋白和蛋白质合成变化,并确定锻炼的产物。这些信息还不可能从膜蛋白质的研究中得到,因为膜蛋白的改变很可能受细胞质蛋白的变化所调节。

## 抗寒锻炼中有关酶的变化

业已对冷锻炼中酶的活性、动力学、结构和功能的改变进行了一系列的研究。这里只列举几个例子来说明锻炼时酶类变化的复杂性。

1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(RuBPCase)可能是研究得最广泛的酶之一(Huner, 1985)。冷锻炼诱导白菜中RuBPCase的改变,酶的两个亚基形成两个截然不同的峰(Sh-

mer-Ilan 和 Waisel, 1975)。当美洲黑麦进行冷锻炼时, RuBPCase 的结构、功能、反应动力学、与底物结合过程以及净电荷都会发生变化 (Huner 和 Macdowall, 1976a,b; Huner 和 Macdowall, 1978, 1979a,b)。由于体内 SH 基团的构象改变, 增加了 RuBP 羧化酶对冰冻的稳定性 (Huner 和 Carter, 1982; Huner 和 Hayden, 1982)。

植物石竹 (*Dianthus*) 经冷锻炼后, 酸性磷酸酶同工酶的组成、淀粉酶和乳酸脱氢酶的活性均发生了改变, 并有新的过氧化物酶同工酶合成 (McCown 等, 1969a)。有四个属的植物在冷锻炼中过氧化物酶活性较高, 同时有新的同工酶出现 (McCown 等, 1969b)。冬小麦经冷锻炼后不同分子量的转化酶的相对含量及酶动力学发生了变化 (Roberts, 1967, 1975, 1982)。铁氧还蛋白-NADP<sup>+</sup>还原酶活性随抗寒性的增加而增加 (Riov 和 Brown, 1976, 1978)。用低温处理苜蓿不仅会出现新的异柠檬酸、乳酸、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的同工酶 (Krawnuk 等, 1976a, b), 而且还导致一些脱氢酶数量的增加。

锻炼过的冬小麦 (Boldue, 1970) 和苜蓿 (Krasnuk 等, 1975) 的吲哚乙酸氧化酶活性增加, 表明冷锻炼期间激素平衡发生了变化。冬小麦幼苗 (Jian 等, 1982) 和苏格兰松实生苗 (Hellergrén, 1983; Bervaes 和 Kylin, 1972) 在锻炼期间膜结合 ATPase 活性发生了适应性的变化。Kok 和 Osterhuis (1983) 以及 Guy 和 Carter (1984) 论证了经锻炼和未锻炼的菠菜中谷胱甘肽还原酶的活性与底物的亲和性、反应动力学、电泳移动性和冻害稳定性发生了改变。Calderon 和 Pontis (1985) 也报道了锻炼中的小麦叶片蔗糖合成酶活性增加。

在抗寒性诱导期间, 含羞草上胚轴与下胚轴 (Brown 和 Bixby, 1973a) 和朝鲜黄杨木叶片 (Gusta 和 Weiser, 1972) 的核糖核酸酶活性降低。冬小麦的热稳定性发生了改变 (Sasaki K 和 Sasaki S, 1976)。这一证据说明, RNA 代谢及蛋白质合成的调节可能具有某种程度的特异性。相反, Oslunt 等 (1971) 发现, 无论经过或未经过锻炼的马铃薯叶片, 在低温下的核糖核酸酶活性都下降。在春小麦和冬小麦中也得到类似的结果 (Sarhan 和 Chevier, 1985)。这表明, 低温导致非特异性的抑制, 而不是有选择的基因反应。而且, Sarhan 和 Chevier (1985) 发现锻炼中的冬小麦 RNA 多聚酶 I 和 II 活性加强。经锻炼的冬小麦的 RNA 多聚酶 I 和 II 的比例较未锻炼的高。总而言之, 冷锻炼过程中发生了一系列复杂的代谢变化。这些变化是否与抗寒性有关, 抑或仅仅是低温下的一个生长生理反应, 总是抗寒性研究中有争议的问题。

### 抗寒锻炼中有关核酸的变化

Jung 及其同事进行了一系列分析, 试图通过叶部使用嘌呤碱和嘧啶碱, 增加苜蓿的耐寒性 (Jung, 1962; Jung 等, 1965, 1967, 1974; Shih 和 Jung, 1970)。许多植物, 诸如马铃薯 (Chen 和 Li, 1980a; Vigue 等, 1974)、苹果嫩枝 (Li 和 Weiser, 1969)、黑槐 (Siminovitch, 1963, 1968)、山茱萸 (Li 和 Weiser, 1976)、朝鲜黄杨木 (Gusta 和 Weiser, 1972) 和苜蓿 (Jung, 1967) 在抗寒锻炼中保持 DNA 水平稳定, 而总的 RNA 和 rRNA 含量增加。相反, 未能发现含羞草幼苗的抗寒性与 RNA 含量有关 (Brown 和 Sasaki, 1972)。锻炼期间冬小麦的 rRNA 含量增加与 RNA 多聚酶 I 的活性增加有关, 这涉及到重新合成 (Sarhan 和 Chevier, 1985), 而不是全部 rRNA 基因的增加 (Devay 和 Paldi,

1970)。

冷锻炼中的苹果嫩枝 (Li和Weiser, 1972)、含羞草上胚轴组织 (Brown和Sasaki) 以及冬小麦 (Sarhan和D'Aoust, 1975) 的可溶性RNA含量增加。冬小麦和苜蓿植株经锻炼后可溶性RNA的碱基比 ( $G + C/A + u + \Psi$ ) 增加 (Sarhan和D'Aoust, 1975; Jung等, 1974), tRNA的浓度也增加 (Sarhan和D'Aoust, 1975)。不过, 其它一些研究表明, tRNA浓度在冷锻炼中是相对稳定的 (Brown和Sasaki, 1972; Gusta和Weiser, 1972)。最近有人论证了几种植物在冷锻炼过程中能翻译的mRNA发生了变化 (Guy等, 1985; Meza-Basso等, 1986; Johnson-Flangan, 1987)。

看来相当清楚, 核酸代谢包括在冷锻炼过程之中发生了改变。有几种假说认为这些变化与抗寒性有关, 但这仅仅是猜测。研究基因表达的调节作用与抗寒性的关系刚刚开始, 要理解植物体内基因表达的机制以及基因怎样调节以增加抗寒性, 需要走一段漫长的道路。

## 冷锻炼和ABA处理对马铃薯块茎苗在抗寒性 诱导期间蛋白质在体内、外合成的影响

过去十多年中, 我们植物抗性实验室积累了大量的有关马铃薯对冷锻炼的生理生化反应以及耐冻性方面的资料。尽管抗寒机制还不清楚, 但抗寒诱导期间的代谢变化类型却相当一致。就马铃薯在冷锻炼中代谢变化的序列而言, 我们的主要工作是对水分平衡、膜特性、糖改变、可溶性蛋白和核酸的改变以及ABA的作用进行了研究。这些观察结果已在其它地方相继得以报道 (Li和Fennel, 1985; Li, 1984, 1985; Chen和Li, 1982)。

我们研究了马铃薯茎培小植株, 期望了解冷锻炼和ABA处理是怎样改变基因的表达而增强抗寒性的。采用这种材料对ABA处理和体内标记是容易掌握的, 它避免了样本被微生物污染, 避免了由于吸收放射性氨基酸而造成的组织损伤。茎培马铃薯小株在MS培养基上进行离体培养可长出枝芽, 通过改变培养基, 能够诱导不同的叶片, 得到类似自然条件下正常生长的马铃薯。利用这个很具特征的马铃薯茎培系统, 能够在分子水平上研究不同器官的抗寒性。结果表明, 马铃薯茎培小株经14天冷锻炼 (5/5℃) 后的抗寒性可从 -3.5℃ 提高到 -8.6℃ (Tseng和Li, 1987a)。在20/15℃下用15mg/L的ABA处理也可使抗寒性达到类似的水平, 处理第7天时抗寒性达最大值。

### (一) 冷锻炼和ABA诱导的蛋白质合成体内标记模型的变化

我们在双向凝胶电泳分析中观察到, 低温下把小株培养在含<sup>35</sup>S-蛋氨酸培养基上至少12小时, 蛋白质能得到充分的标记。马铃薯脱锻炼过程是相当迅速的 (Chen和Li, 1980b)。为了揭示冷锻炼过程中蛋白质合成的性质, 在低温下标记锻炼组织是十分必要的, 而且, 标记物的比活要高, 尤其是在比较锻炼和未锻炼组织的标记多肽类型时更要如此。我们通过双向凝胶电泳技术分析比较了马铃薯茎培小株在冷锻炼 (5/5℃) 和ABA处理 (20/15℃) 下体内多肽合成的类型 (Tseng和Li, 1987a), 可以看出, 锻炼、未锻炼以及ABA处理的样本在标记多肽类型上存在差异。荧光光谱分析表明, 锻炼14天或ABA处理 (15mg/L) 的组织所合成并积累的多肽链与未锻炼的组织不同。冷锻炼或ABA处理的第

一天,两者都能诱导分子量为21、22和31KD的多肽。至少在14天内,这些蛋白质一直持续出现,而在脱锻炼后一天就会下降。锻炼第七天才能诱导三种具有不同等电点(pI)、分子量为83KD的多肽,然而这些多肽在ABA处理时出现要早得多。整个处理期间也合成一些短命多肽。诱导的多肽中有ABA特效的、冷锻炼特效的及两种处理共同诱导的三种类型。研究表明:(1)冷锻炼或ABA处理均不能诱导“超量”的多肽,而是诱导一些特异多肽的起始合成;(2)ABA处理和冷处理诱导的新多肽都具有稳定性和动力学特性;(3)冷锻炼和ABA处理共同诱导的新的多肽与马铃薯茎培小株的抗寒性增加是一致的。在研究冷锻炼机制时应考虑到锻炼过程中蛋白质合成发生了连续性变化。尽管仍不清楚抗寒性诱导过程中所合成的多肽的作用,但我们相信,对这些合成调节作用的研究将有助于了解低温和激素是怎样控制高等植物的基因表达的。

## (二) 冷锻炼和ABA诱导的蛋白质合成体外标记模型的变化

我们已经提纯了冷锻炼,ABA处理或两者兼有之下1、3、5、7、10和14天以及随之脱锻炼1天的茎培马铃薯小植株组织中的Poly(A<sup>+</sup>)RNA。Poly(A<sup>+</sup>)RNA用<sup>35</sup>S-蛋氨酸作为标记,能在兔子网织红细胞翻译系统中进行翻译。诱导抗寒性14天处理与未处理的翻译产物经双向凝胶电泳图分析表明,在冷锻炼和ABA处理一天后,就能看到翻译产物类型的一些改变。8种mRNA能被冷锻炼和ABA处理所共同诱导,并在14天中基本保持在一个比较稳定的水平。除一种mRNA外,其它均在脱锻炼一天后消失。翻译产物中最主要的是2~3对分子量为26、27KD,具有不同等电点的蛋白质。分析总RNA的翻译产物时也可检测到它们。锻炼可以诱导特异的mRNA,ABA处理也可诱导其特异的mRNA。在锻炼加ABA处理的组织中,这些mRNA全部出现。一种编码分子量为195KD的翻译产物,仅能在总RNA群体中找到,而不存在于Poly(A<sup>+</sup>)RNA中(Tseng和Li, 1987b)。但是在所有3种处理一天后均能测到这种RNA。锻炼5天或ABA处理10天或锻炼与ABA共同处理14天,这种RNA一直存在。

任何非细胞蛋白质合成系统都有点人工性质,它可以翻译特殊的RNA,只是效率有高有低。因此,我们可以利用第二非细胞系统即小麦胚芽非细胞系统来评价冷锻炼和ABA处理对能翻译的Poly(A<sup>+</sup>)RNA的影响。一般来说,兔子网织红细胞非细胞系统有利于合成高分子量的蛋白质,且具有很高的翻译活性;而小麦胚芽非细胞系统有利于合成分子量低的蛋白质,且效率较低(Manted等, 1985; Clemens, 1984)。而且,小麦胚芽系统有过早终止合成的趋势,经常产生不完全产物,并释放多肽-tRNA复合物,因此产生了“背景”多肽。利用小麦胚芽非细胞系统产生的Poly(A<sup>+</sup>)RNA翻译产物的典型双向电泳模式表明,放射活性点在双向凝胶电泳图的下部比上部更强烈。就大部分来说,由小麦胚芽系统得到的翻译产物类型与由兔网织红细胞系统所得到的差异悬殊。尽管“背景”多肽给结果进行恰当的比较带来困难,但仍可在两系统上看到一些斑点在相似的相对位置上。分子量26、27KD的翻译产物也可在小麦胚芽系统中找到。这两对翻译产物(PI为6.0, 6.3)在锻炼一天后就能出现,并在整个锻炼的14天内一直存在,但脱锻炼一天后即可消失。ABA处理和冷锻炼外加ABA处理也得到相似的结果。

因此,这些真正能编码分子量为26、27KD翻译产物的mRNA能在两种离体蛋白质合成系统中得到证实。这表明,这些mRNA能在体内相应地合成分子量为21和22KD的新的多肽,而它们都能被冷锻炼和ABA处理共同诱导(Tseng和Li, 1987a, b)。尽管在离体下



合成的多肽分子量为26、27KD,比成熟的多肽大5KD,这5KD理应为信号多肽,因此,分子量为21、22KD的多肽确实可能被合成。这表明分子量为21、22KD的多肽是分泌性蛋白质或者是完整的膜蛋白(Bloel和Dobberstein, 1975)。

由于没有一种新合成的蛋白质大量积累(凝胶不易被银染或考马斯法染色)(Tseng和Li, 1987a),因此这些多肽不可能起到阻碍细胞间结冰的作用,也不可能 在冰冻期间束缚大量的细胞水而避免脱水损伤。我们推测合成的分子量为21和22KD的多肽是分泌性蛋白质。它们转移到细胞的特殊部位,以诱导一系列代谢改变,或插入膜中增加抗寒性。我们仍然不能排除这些多肽是体内某些高分子量多肽功能蛋白质的亚基的可能性。在这些新多肽的细胞合成部位及它们的特性得以阐明之前,任何关于这些多肽在抗寒中的作用的设想都会受到限制。

## 结 论

在一般情况下,真核生物染色体组所含有的DNA比实质编码产生大量蛋白质所需要的DNA来得多。在高等植物中,仅需要5~10%的DNA专门控制特异染色体功能的已知序列(Sorenson, 1984)。在高等植物中,大多数DNA可能都具有调节功能,并对各种环境条件的强度发生反应(Adams和Rinne, 1982)。过去几十年中,关于冷锻炼对特异酶或蛋白质以及核酸的影响方面的研究提供了大量的证据表明,在冷锻炼中调节基因表达可能在提高抗寒性方面起重要作用。

可以想象,从生理生化反应来考虑,植物冷锻炼是一个复杂的过程。我们相信,基因表达的改变可能最终调节生理生化方面的变化,从而增加植物的抗寒性。我们已提出证据证明,冷锻炼和ABA处理改变马铃薯茎培小株RNA和蛋白质合成的类型,ABA处理和冷锻炼共同诱导一些多肽和mRNA。它们表明,如果从增加抗寒性和诱导一些共同的蛋白质来看,ABA的作用方式与冷锻炼相类似,也就是说,在自然条件下,ABA对启动抗寒锻炼过程起着关键作用。下面的工作自然是确定体内新合成的蛋白质及其mRNA,特别是编码分子量为26和27KD翻译产物的mRNA和分子量为21和22的多肽。关于抗寒锻炼的性质还有许多问题需要研究。更加深入的研究将有助于我们更好地解决植物的冻害问题。

(汪良驹 刘昆舟 译 刘祖祺 王洪春 校)

## 主要参考文献

- Adams C, Rinne RW(1982). Stress protein formation, gene expression and environmental interaction with evolutionary significance. Intern Rev Cytology 79:305~315.
- Alden J, Hermann RK(1971). Aspects of the cold-hardiness mechanism in Plants. Bot Rev 37:37~142.
- Bervaeke JCAM, Kylin A (1972). Long and short term development of frost hardiness in *Pinus silvestris*, and heavy particle adenosine triphosphatase. Physiol Plant 27:178~181.
- Bixby JA, Brown GM(1975). Ribosomal changes during induction of cold hardiness in black locust seedling. plant physiol 58:617~621.
- Bloel G, Dobberstein B(1975). Transfer of proteins across membranes I. presence of proteolytically