

植物生理 生化进展

第五期



北京植物生理学会 编辑

科学出版社

植物生理生化进展

第五期

北京植物生理学会 编辑

科学出版社

1988.7

内 容 简 介

《植物生理生化进展》是北京植物生理学会编辑的不定期刊物。该刊主要介绍国内外植物生理学和植物生物化学的研究发展动态及其重要成就。

本期共选编了12篇综述评论,其中3篇是有关植物抗性生理;2篇是关于植物组织培养;其他几篇是关于植物的光合作用及代谢生理等方面的综述;书中还选编了有关基因表达的综述文章。

本书可供农业科学工作者、植物生理学工作者及大专院校生物系师生和农林院校师生参考。

主编: 吴相钰 副主编: 黄宗甄
委员: 何笃修 李杰芬 祝宗喙 赵微平
施福海 郝通斌 梁淑文

植 物 生 理 生 化 进 展

第 五 期

北京植物生理学会 编辑

责任编辑 梁淑文

科学出版社 出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1987年6月第一版 开本: 787×1092 1/16
1987年6月第一次印刷 印张: 10 1/4 插页: 2
印数: 0001—2,300 字数: 236,000

统一书号: 13031·3526

本社书号: 5208·13—10

定价: 2.65 元

目 录

植物冻害和抗冻性的细胞生物学研究·····	简令成(1)
植物寒冷驯化的机理·····	何若韞 王光洁(17)
试论“比较逆境生理”·····	刘友良(30)
植物原生质体培养和细胞杂交研究的进展·····	夏镇澳(36)
组织培养中不定根的分化·····	奚 惕(54)
植物过氧化物酶体及其代谢·····	梁 峥(65)
叶绿素的生物合成·····	朱亮基(86)
光形态建成·····	童 哲(98)
除草剂在植物体中的代谢和选择性·····	陈永正(113)
凝集素在高等植物体内的生物合成、分布及其可能的生理功能·····	繆国华(133)
植物血红蛋白及其基因表达·····	荆玉祥(141)
甘薯抗氰呼吸的诱导·····	李合生(155)

植物冻害和抗冻性的细胞生物学研究

简 令 成

(中国科学院植物研究所细胞室)

冻害是农业生产中一种严重的自然灾害,涉及的面很广,包括粮食作物、蔬菜、果树及其他许多经济作物,在我国,从北到南均有发生。全世界每年因此种灾害造成的损失十分巨大。加之近代人类人口的急剧增加及环境生态平衡的破坏,不正常气候向人们的挑战日益严重,致使这一问题变得更为突出。对于植物冻害和抗冻性的研究已有长期历史。据统计,在1960年以前发表的论文共约5000篇;1960—1970,每年平均增加60—80篇^[2]。近十余年来,每年平均在100篇以上。这说明,对于植物寒害和抗寒性的研究愈来愈得到重视和加强。研究的内容涉及到植物的生长发育特性、形态、生理、生物化学、生物物理、生态以及细胞与遗传学等多学科的综合研究。近代的研究表明,生物膜与植物的冻害和抗冻性具有密切关系^[1,65,70,89]。从某种意义上说,细胞的基本结构是一个生物膜体系,各种细胞器都是由生物膜分隔和包围的小区,许多生命活动和生理功能均在生物膜上进行,或与之密切相关。因此很显然,细胞生物学在植物冻害和抗冻性的研究具有重要意义。

我们自1959年起,对植物在寒害和抗寒锻炼过程中细胞的显微和超显微结构的变化,以及糖类、蛋白质、核酸及酶活性的细胞化学动态,膜与细胞器结构的稳定性同植物寒害和抗寒性的关系等进行了一些实验观察。本文试图在我们自己工作结果的基础上,结合国内外有关的文献资料,对植物冻害和抗冻性的细胞生物学研究作一个简要的综述。

一、冻害中细胞结构与功能的变化

简令成等(1965)报道,不抗寒或抗寒性弱的小麦品种的幼苗在冬季寒冷到来时,其细胞核和叶绿体的结构均发生明显的破坏,结果导致植株的伤害和死亡;并观测到抗寒品种的细胞结构的稳定性随着抗寒锻炼而增强,指出细胞结构的稳定性与植物的抗寒力成正相关。

近年来,我们进一步用电子显微镜观察了不同抗寒小麦品种的幼苗在人工冰冻处理后细胞超显微结构的变化^[19];并用小麦分离原生质体在冰冻-化冻后的存活率,测试质膜的稳定性与植物寒害和抗寒性的关系^[9]。这些试验结果进一步证明,膜与细胞器结构的稳定性同植物抗寒性的密切联系(表1);并观察到细胞结构的伤害变化与植株冻害程度的相关性。例如抗寒强的冬小麦品种的麦苗在-9℃冰冻2天后,叶片细胞的精细结构仍然保持冰冻前的正常状态,这与化冻后植株立即恢复正常状态是一致的。抗寒性中等的麦苗在同样冰冻处理后,其叶片细胞的超微结构表现明显的变化,叶绿体与线粒体发生明显的膨胀,叶绿体从梭形和长椭圆形向圆形方面变化,片层排列的方向也发生改变,一些类囊体变成小的空泡;许多内质网和高尔基体表现出明显的空泡化;液泡膜向内反卷,并由此

在液泡内产生小的囊泡状结构;细胞核的染色质发生凝集,形成比较粗的染色质块。这类麦苗在化冻后表现轻度的萎蔫,但在3—4小时后,仍然恢复到正常状态,说明以上变化是可逆的。不抗寒的春小麦幼苗在-9℃冰冻2天后,其叶片细胞的精细结构遭到严重破坏,一些叶绿体变成圆形,严重改变了片层结构的排列方向与分布,类囊体严重空泡化;一些叶绿体的外周被膜破裂,片层结构分散到细胞质中;线粒体的内嵴遭到破坏;细胞质内呈现大量空泡;细胞核的染色质及其他物质严重凝集,核内形成空泡。这类植株在化冻后立即萎蔫,随即死亡,表明上述超显微结构的变化是致死的不可逆性的变化。

以上结果表明,冻害引起各类细胞器结构的变化及其破坏程度,决定于植物品种的抗寒性,即抗寒性强的品种,其细胞器和膜结构的稳定性高;相反,不抗寒或抗寒性弱的品种的细胞器和膜结构的稳定性低,以致它们在冻害中遭到破坏,从而引起植株的伤害和死亡。

表1 小麦分离原生质体膜稳定性的冰冻测定——冰冻后的存活率与品种抗寒性的关系*

品种	抗寒力	麦苗生长条件	原生质体数/ml		存活率(%)
			冰冻前	化冻后	
农科一号	抗寒力强	(1) 种苗,冰箱内2℃,9天	8.9×10^5	7.5×10^5	84.3
		(2) 早春室外盆栽	6.0×10^5	4.6×10^5	76.7
		(3) 实验地秋播麦苗	6.2×10^5	6.0×10^5	96.0
郑州741	中等抗寒	同上(1)	9.7×10^5	3.9×10^5	40.2
		同上(2)	9.4×10^5	3.6×10^5	38.4
		同上(3)	6.8×10^5	3.6×10^5	51.8
京红8号	不抗寒	同上(1)	8.5×10^5	0.85×10^5	10.0
		同上(2)	7.7×10^5	0.52×10^5	6.7
		同上(3)	6.0×10^5	0.12×10^5	2.0

* 分离原生质体悬浮液在-5℃处理2小时。

Heber (1968)通过菠菜分离叶绿体的冰冻试验指出,冻害首先是破坏叶绿体的膜结构,然后才导致光合磷酸化(ATP酶)的失活。Steponkus及其同事(1977)对菠菜叶绿体的冻害作了进一步的研究,结果观测到,冻害使叶绿体膜发生三种破坏:(1)使偶联因子(CF_1)从类囊体的外表面解离下来,从而破坏了光诱发质子的吸收;(2)使叶绿素从膜上解离;(3)破坏了膜的半透性。有报道指出,叶绿体膜对低温很敏感,将番茄幼苗置于5℃下2小时,子叶细胞内的叶绿体被膜和类囊体膜即发生断裂^[49]。偃伏柞木(*Cornus stolonifera*)的愈伤组织在0℃处理6小时,前质体即发生变化,电子密度增加,形态上伸长;到24小时,前质体的膜结构遭到严重破坏^[68]。苇状羊茅(*Festuca arundinacea*)幼苗遭受-8℃冻害时,叶绿体发生膨胀,部分膜被破坏^[73]。Kimball和Salisbury(1973)对几种不同抗寒性牧草的低温实验结果也证实,叶绿体膜结构的稳定性与植物种类的抗寒性成正相关:不耐寒的雀麦草(*Paspalum notatum*,热带植物)和狗牙根草(*Cynodon dactylon*,亚热带植物)的叶绿体在环境温度降到10℃时就发生聚集,形态上变圆;在0℃,即表现明显的膨胀状态,进一步变圆,片层膜的排列方向发生改变;到-5℃,二者的叶绿体膜发生严重的折

叠与破坏。然而抗寒性较强的黑麦 (*Secale cereale*, 温带植物) 的叶绿体到 -5°C 才发生聚集和轻度膨胀。

线粒体曾被认为是低温损伤较为敏感的细胞器。Lyons (1970) 根据不同耐寒植物的分离线粒体在不同测试温度下呼吸速率的变化, 提出膜的物相变化是引起寒害原因的著名观点。在电子显微镜下观察到, 无论是冷害或冻害, 都使线粒体发生膨胀, 严重时内嵴遭到破坏^[19,23,64,73,75]。Ilker 等(1979)对番茄幼苗寒害的超微结构研究指出, 线粒体对低温伤害开始很敏感, 但在寒害继续发展时, 却表现相对稳定, 而其他细胞器则继续变化。偃株伏木的愈伤组织遭受寒害时, 线粒体明显地表现出相对稳定, 在 0°C 处理 24 小时后, 前质体、高尔基体、内质网及液泡膜等都发生严重破坏时, 大多数线粒体仍保持正常状态^[68]。在雀麦草、狗牙根草以及小麦的寒害中, 线粒体也比叶绿体表现出明显的相对稳定: 当叶绿体的片层排列方向严重改变, 类囊体产生明显空泡化时, 线粒体尚保持正常, 或只表现轻度膨胀; 当叶绿体解体时, 线粒体内嵴虽遭破坏, 但仍维持个体性^[19,77]。Singh (1977) 甚至观测到, 当黑麦幼苗细胞冻害致死时, 其线粒体仍保持很高的呼吸活性。

质膜是细胞与生活环境相联系的关键性结构, 它不仅调控一切营养物质的进出, 而且是细胞反应外界不利因子的最先的重要屏障。不少实验观察结果表明, 质膜是冻害最敏感的部位^[17,70,71]。冻害损伤的一个最普遍的直感现象是离子和水分的外流, 丧失膨压, 植物体表现萎蔫。因此, 人们很早就认为, 冻害可能首先损伤质膜的半透性。马克西莫夫早在 1912 年就指出, 不能渗入细胞内的冰冻保护剂(如蔗糖)能对原生质体起到保护作用, 表明冻害必然是发生在细胞表面的质膜上。四十年代初, Scarth, Levitt 和 Siminovitch 的实验揭示, 无论是细胞内结冰或细胞外结冰, 都会导致质膜的破坏^[87]。Steponkus 等(1978)通过分离原生质体的冰冻-化冻实验, 认为冰冻脱水时的收缩及化冻时的吸水膨胀造成质膜的破裂。简令成等(1980)通过小麦分离原生质体在冰冻-化冻后存活率的测定, 指出质膜的稳定性与小麦品种的抗寒性成正相关^[3]。Palta 与 Li (1978) 通过洋葱鳞茎和马铃薯叶片的冻害试验, 证实质膜是冻害的最先受害者。他们还利用氘化水, 脲与甲脲的吸收试验, 进一步揭示冻害的最初损伤并未破坏膜的半透性, 而只是破坏了质膜上的主动运输体系。新近, Gordon-Kamm 和 Steponkus (1984)报道, 分离原生质体在高渗溶液中产生脱水收缩时, 质膜发生部分栅割, 在细胞质中形成小泡, 从而缩小了质膜的整个面积。在冰冻脱水时也产生此种现象。因此作者们认为, 当化冻吸水膨胀时, 未等原生质体恢复到原来的体积时, 质膜就有发生破裂的危险。

Mohr 及 Stein (1969) 对番茄果实进行冰冻替代和冰冻蚀刻的研究指出, 液泡膜对低温的伤害比质膜更敏感。然而较多的观察结果是, 在冻害过程中, 液泡膜的变化常常是在质体、线粒体、内质网、高尔基体及质膜的改变之后, 它开始是产生反卷与内陷, 然后是膜结构的破坏^[19,68,76,97]。经生活力的测定和再培养的试验结果表明, 液泡膜的反卷与内陷是可逆的非致死性的损伤; 而液泡膜的破裂则导致死亡。因此认为, 液泡膜的破坏是寒害致死的临界线。植物液泡是一种溶酶体, 液泡膜破坏后, 水解酶被释放, 结果引起细胞自溶。Ziegler 等认为, 由于液泡膜的破裂, 造成液泡内有毒物质的释放, 结果引起蛋白质的中毒变性^[99]。

二、冻害中 ATP 酶活性的变化

关于低温寒害可能首先是损伤细胞的膜结构的观点,已为许多实验观察结果所证实。然而,寒害究竟首先损伤膜的何种性质,迄今,不同研究者的实验结果和看法尚不一致。Levitt 指出,寒害主要是损伤膜蛋白质。他认为,低温可将蛋白质分子拆开成亚单位,并使蛋白质分子中的 $-SH$ 基氧化,形成二硫键($-S-S-$),造成蛋白质变性;同时,冰冻脱水引起细胞收缩塌陷时的张力作用,可使膜的双层脂滑动分离,结果使膜内蛋白质脱出与释放,导致功能蛋白质(酶)失活^[59]。Lyons 等认为,寒害可能是由于膜的物相变化,即从液晶相转变成凝胶状态^[60]。Yoshida (吉田)的实验结果揭示,冰冻首先改变了膜束缚的磷脂D酶的调节性质,增强了磷脂D酶的活性反应,结果使膜脂发生降解和释放^[59]。Palta 和 Li 提出,亚致死性的冰冻伤害的最初部位可能是细胞膜的主动运输体系^[70]。Steponkus 和 Wiest 基于分离原生质体的冰冻试验,认为冻害是由于冰冻脱水时引起原生质体的收缩以及化冻吸水时引起原生质体的膨胀,破坏了细胞膜分子间的结合力。因此,植物的抗寒力是决定于膜分子间结合力的牢固性和原生质体的膨胀系数^[85]。

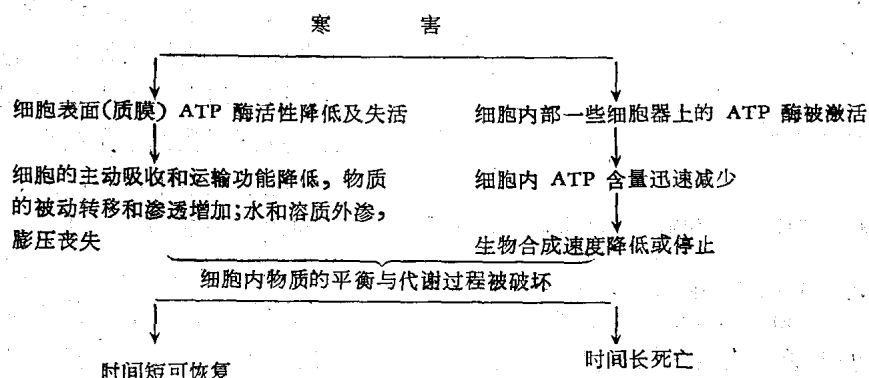
我们鉴于 ATP 酶是膜束缚的一种功能性蛋白质,它同膜和细胞器有着广泛的联系;同时,它在能量代谢、物质的吸收与运输等生理功能上具有重要作用。因此,我们借助酶细胞化学方法,研究了番茄和黄瓜幼苗在冷害中以及小麦幼苗在冻害中 ATP 酶活性的变化^[6,8,11,17]。结果指出,当番茄和黄瓜幼苗遭受 5°C , 12 小时冷处理时,其子叶细胞的质膜、细胞壁及细胞间隙内的 ATP 酶活性开始明显降低,但细胞核和叶绿体片层膜上的 ATP 酶仍保持较高的活性反应。在冷处理 24 小时后,质膜和细胞壁上的 ATP 酶活性几乎完全丧失,而细胞核和叶绿体片层膜上的 ATP 酶活性刚开始明显减弱(图版 I, 图 1—3)。这种情况表明,细胞各部位上的 ATP 酶活性,以细胞表面(质膜和细胞壁)的 ATP 酶活性对低温伤害最敏感。小麦幼苗在冻害过程中 ATP 酶活性的变化同番茄和黄瓜在冷害中的上述结果基本上一致。当小麦幼苗遭受到亚致死性的冰冻伤害时(-8°C , 12 小时),其细胞各部位上的 ATP 酶活性,首先是质膜 ATP 酶活性明显降低,直至完全失活。但与此同时,细胞质内的一些细胞器(如高尔基体、内质网及液泡等)的 ATP 酶被激活,产生高的活性反应;叶绿体片层膜上的 ATP 酶也转变成水解 ATP 的高活性(图版 II 图 4—7)。

总之,我们的实验结果揭示,无论是冻害或冷害,细胞各部位上的 ATP 酶活性,首先是细胞表面(质膜)的 ATP 酶活性发生降低或完全失活;而细胞内部的一些细胞器上的 ATP 酶则被激活或保持水解 ATP 的高活性。

三、冻害机理

关于冻害机理已有多种假说^[9],如细胞内结冰致死学说,蛋白质沉淀学说,盐分毒害学说,冰冻脱水引起的次生干旱学说,以及如上所述的寒害引起膜结构变化的各种不同观点。我们综合分析了以往的各种假说,根据我们自己工作中的结果,对于植物的寒害机理提出以下的分析与设想:寒害首先是损伤细胞的膜结构,可能最初是改变膜上的功能性

蛋白质,如 ATP 酶活性发生变化,然后引起生理生化过程的破坏。我们认为,寒害可能是从两个方面导致植物的伤害和死亡,即低温一方面引起细胞表面(质膜) Mg^{2+} -ATP 酶活性的降低和失活,从而使细胞对物质的主动吸收和运输功能降低,物质的被动转移和渗透增加,细胞内的溶质外渗,水分失散,丧失膨压,其结果是使细胞及植物有机体同周围环境的物质交换的平衡关系遭到破坏。另一方面,寒害激活细胞内部的一些细胞器上的 ATP 酶的水解活性。起初,这可能是有机体对外界损伤因子的一种保护性反应,即通过提高能量的释放来抵御寒冷的侵袭。这表明植物和动物在对损伤因子的反应上仍保持共同性。但因此引起细胞内 ATP 含量的急剧减少。由于 ATP 的缺乏,则导致生物合成速度的降低和停止,结果使整个生理生化过程遭到破坏。若寒害时间较短,伤害是可逆的;若寒害持续的时间长,则随着破坏过程的发展而导致死亡。这一损伤过程的设想,可简要归纳成如下图解。



四、抗冻基因表达(抗寒锻炼)与细胞生命活动强度的关系

抗冻性是植物对零下低温长期适应的一种遗传特性。但因抗冻基因是一种诱发性基因,只有在一定条件(主要是低温和短日照)的作用下才能表达为抗寒力,在抗寒基因表达之前,抗寒性强的植物也是不耐寒的,所以,抗寒的遗传性仅是一种潜能,一种基础,只有当它表达后,才能发展为抗寒力。抗寒性(基因)表达为抗寒力的过程,即抗寒力提高的过程,称之为抗寒锻炼。使植物进入抗寒锻炼,即诱发抗寒基因表达,不仅决定于外界的诱发条件——低温与短日照,而且与植物体的内因,如细胞的生理活动强度,细胞的分裂和生长活动等密切相关。植物的生长活动与抗寒基因的表达是矛盾的,生长越旺,抗寒力越低,降低生长活动是提高抗寒力的前提条件^[2,15]。越冬植物必须在秋季低温和短日照条件下逐渐停止生长活动,抗寒基因才能启动,表达为抗寒力。木本植物的秋梢的抗寒力弱,其原因就在于秋梢停止生长活动比春梢晚,阻碍了抗寒基因的表达。不同抗寒性小麦品种在秋播后生长锥细胞的有丝分裂动态表现明显的差别(图 1)^[2,15]。抗冻性强的品种比抗冻性弱的品种生长活动缓慢,细胞分裂的频率在秋季低温下逐渐降低,直至停止,从而使细胞的代谢活动转入抗寒锻炼的适应性变化,抗寒基因被表达,抗寒力得到提高。相反,抗冻性弱的品种由于生长活动旺盛,使细胞的代谢活动不能转变到抗寒锻炼的适应性

变化,以致不能发展抗寒力。

冬小麦在越冬过程中,核仁的状态发生明显的变化^[2,19]。在活跃生长的分蘖盛期,

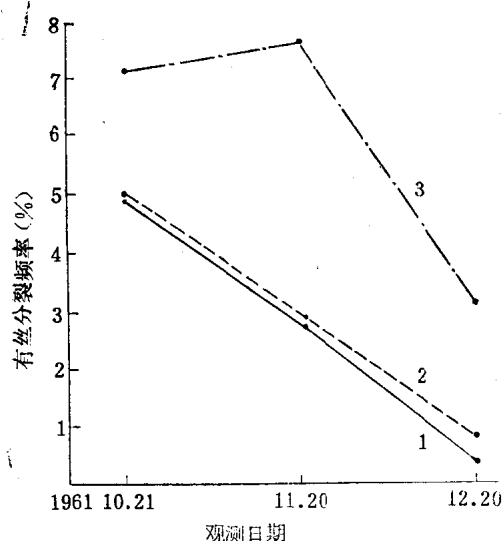


图1 抗寒锻炼中不同抗寒性小麦品种生长锥细胞有丝分裂动态

1. 农大 183, 抗寒性强, 2. 碧蚂一号, 抗寒性较弱, 3. 南大 2419, 抗寒性弱。

们仍处于活跃的生理状态,与其细胞的高分裂频率是一致的^[2]。这也进一步说明,活跃的生理活动阻碍了抗寒锻炼。

简令成等(1973)报道冬小麦在进入寒冬过程中,核膜孔的动态与细胞生理活动强度和抗寒力提高的关系。在植株活跃生长的分蘖盛期,核膜上表现较大的孔或开口。并观察到核内物质特别是核仁物质通过核膜孔从核转移到细胞质,表明这时的核质交换关系频繁。而随着温度的降低逐步进入寒冬过程中,抗寒性强的冬小麦的核膜孔就相应地逐渐缩小,最后几乎完全关闭。但是,不抗寒品种的核膜孔在冬季寒冷到来时仍然张开着。作者认为,核膜孔的这种动态,可能对细胞的生长活动和抗寒基因的表达起着重要的调控作用。即随着温度的降低,核膜孔逐渐关闭,使核与质的物质交换活动逐渐停止。从而逐渐停止细胞的分裂和生长活动,使细胞代谢转入抗寒锻炼途径,抗寒基因得到启动和表达。发展了抗寒力。反之,不抗寒和抗寒性弱的品种在温度降低后,核膜孔不关闭,核质交换和生长活动不能停止,不能或不能很好地转变到抗寒锻炼途径,致使在越冬中遭受到伤害和死亡。

本世纪的四十——五十年代,苏联学者金杰里(Генкель)等曾报道许多草本和木本植物在冬季休眠时期产生细胞的质壁分离现象^[101];然而不少研究者否定这一现象的真实性^[59,100]。六十年代初,我们用多种固定液对几种不同抗寒性小麦品种在进入寒冬过程中的原生质体状态进行过细致的对比观察。结果表明,寒冬时期原生质体的收缩孤立现象与品种的抗寒性密切相关。当寒冬降临时,抗寒性强的品种产生明显的质壁分离;抗寒性弱的品种不发生;抗寒性中等的品种则居于前二者之间^[2,19]。近年来,我们在对高度抗寒性的新冬一号小麦的超微结构研究中,也在寒冬时期观察到明显的质壁分离现象。由此看来,寒冬中原生质体的收缩孤立现象可能还是真实存在的。它的作用可能在于,原生质

核仁体积大,其在光学显微镜下表现的核仁周围的透明区(亮环)也显著的大。随着秋季温度的降低和细胞分裂生长活动的逐渐停止,核仁的体积及其周围的亮环也明显地变小。到初春,当温度升高,锻炼被解除,抗寒力降低时,核仁的体积和亮环又明显地增大。核仁状态的这种变化,揭示它与生理活动强度的密切关系。大的核仁体积和亮环反映细胞(包括核仁本身)处于旺盛生长和代谢活动中;反之,小的核仁体积和亮环则反映核仁处于低的生理活性状态,植株停止生长或处于休眠状态中。这进一步证明我们早先在小麦壮苗和黄弱苗的细胞学观察中所指出的,核仁体积和亮环的大小是细胞生理活动强度的一个形态学指标^[9]。在秋末,抗寒性弱的小麦品种的核仁比抗寒性强的品种明显的大,显示它

体孤立后,使胞间连丝中断,破坏了共质体的连续性,从而使植株停止生长,并进入休眠,使植物体避免越冬过程中气温波动的影响,维持稳定的抗寒力。

五、抗寒锻炼中细胞结构的适应性变化

迄今的研究结果表明,在抗寒锻炼过程中,即抗冻性(基因)表达为抗寒力的过程中,细胞的结构和代谢上的各种生理生化性质发生一系列明显的变化,这些变化虽然尚不能说明抗冻基因表达和调控的根本,但对抗寒力的形成显然具有重要意义。

1. 细胞结构稳定性的提高

近代的研究结果表明,细胞器和膜结构稳定性的提高是抗寒力发展的关键性变化和重要条件。这里所说的稳定性包括诸如膜的相变,膜分子间的结合力,膜分子的构型变化、膜与细胞器的破裂,膜脂降解以及膜蛋白的脱离等方面。简令成等(1965)报道小麦细胞器和膜结构的稳定性同植株的抗寒力成正相关,抗寒性强的品种的细胞器结构的稳定性比不耐寒品种高;同时在抗寒锻炼中这种稳定性与抗寒力的增长平行相关^[2,17]。1978—1980年,我们通过小麦叶片组织超薄切片的电镜观察和分离原生质体在冰冻-化冻后存活率的测定,进一步揭示叶绿体膜、液泡膜、细胞核以及质膜的稳定性与小麦品种和器官组织的抗寒力成正相关^[5,19]。Steponkus等(1977)证实抗寒锻炼可以提高叶绿体片层膜上偶联因子(CF₁)的稳定性,使之不易遭到冰冻解离。Senser和Beck(1977)也报道云杉叶绿体膜的稳定性在抗寒锻炼后得到提高。Kimball等(1973)和杨福愉等(1981,1982)的研究结果也指出,抗寒性强的种和品种的叶绿体及线粒体膜的稳定性比抗寒性弱的大。

我们新近的研究指出,冬小麦细胞的周质微管(细胞骨架)在低温下的稳定性也与植株的抗寒力密切相关^[18]。生长于25℃未经抗寒锻炼的冬小麦幼叶细胞的周质微管在1—0℃处理4小时,和通常报道的一样发生解聚;然而当冬小麦幼苗在2—3℃经过15—20天抗寒锻炼后,不但保持着微管,而且在0℃低温处理4小时后也不遭到破坏(图版III图8—11)。此种情况说明,在抗寒锻炼过程中,微管对低温的稳定性(抗低温性能)也得到提高。

2. 叶绿体结构功能的适应性变化

在低温锻炼期间,冬小麦叶绿体的光合效率与其品种的抗寒性成正相关。在此过程中,抗寒性强的冬小麦叶绿体内的淀粉粒消失,拟脂颗粒增加,叶绿体膜转变成波浪形;而抗寒性不强的品种在同样条件下不产生这些变化^[59]。不同抗寒性的马铃薯品种在抗寒锻炼过程中也表现类似情况^[37]。木本植物云杉的叶绿体膜在抗寒锻炼过程中提高了稳定性,但光合效率降低^[79]。Steponkus等(1977)通过冰冻蚀刻的电镜观察指出,在抗寒锻炼后,菠菜叶绿体的类囊体的内断裂面上的颗粒密度比未经锻炼的减少一半,并从两种大小的颗粒(100Å及165Å)转变成一种大小的颗粒(140Å)^[42,84]。

关于木本植物叶绿体在秋季低温锻炼及越冬过程中的形态学变化,存在两种不同的报道。一种报道说,叶绿体在秋季低温锻炼中发生聚集,在寒冬中被膜和类囊体消失,或被

此粘合,丧失个体的完整性,到翌年春天再恢复^[66,102]。另一种报道则指出,叶绿体在秋冬低温的作用下发生聚集,其中的淀粉粒逐渐消失,拟脂颗粒增加,基粒片层显著减少,但仍保持个体的完整性^[2,4,104]。Parker 等(1963)曾报道,白皮松针叶细胞的叶绿体在冬季里产生轻度的嵌合现象。我们也观察到冬小麦幼叶细胞中的叶绿体在进入寒冬时期相互聚集,形成嵌合和拉链;不耐寒品种的叶绿体不表现此种现象^[4]。这说明,叶绿体的嵌合拉链与抗寒性存在内在联系。

3. 线粒体结构功能的适应性变化

简令成等(1965,1973)曾报道冬小麦在秋末冬初的抗寒锻炼过程中,幼叶及分蘖节细胞内线粒体的数量增加,体积增大,内嵴增多^[2,4]。新近,我们在不同抗寒性柑桔种类中也观察到,抗寒性较强的温州蜜柑在抗寒力发展到最高峰的寒冬时期,叶片细胞内的线粒体数量明显地增加;而抗寒性较弱的冰糖橙不表现这种变化^[4]。此种情况表明,线粒体数量的增加同植物的抗寒性及抗寒锻炼存在密切联系。刺槐树在秋季低温锻炼期间,枝条的次生韧皮薄壁细胞中的线粒体数量也增加^[74]。松树茎形成层细胞内的线粒体在寒冬时期变得很丰富^[28]。Хохлова 等在冬小麦的抗寒锻炼中也观察到线粒体数量的增加,但体积缩小,ATP 酶活性降低^[105]。线粒体数量的增加被认为是对单位线粒体活性功能降低的补偿,从而保证抗寒锻炼过程中能量的供应。Реценникова (1976)报道,在寒冬时期,抗寒性强的冬小麦线粒体的高能磷(ATP)含量比抗寒性较弱的品种高。这一例证进一步证实了线粒体的能量供应与植物抗寒性的密切关系。

4. 液泡的适应性变化

成熟的植物细胞具有中央大液泡,它是一种水溶液体系,细胞内的绝大部分水集中于液泡中,因此,它是结冰冻害最危险的地方。在抗寒锻炼中,液泡必须发生深刻的适应性变化,才能避免冰冻伤害。迄今的研究结果表明,越冬植物在秋冬低温的抗寒锻炼中,液泡产生多方面的明显变化:(1)液泡内的可溶性糖、氨基酸及其他溶质的浓度显著增加^[99]。(2)由于细胞质浓度的增加,大液泡被分隔成许多小液泡^[2,12,74]。(3)近年来,我们先后在冬小麦和柑桔的自然抗寒锻炼中观察到,液泡膜在低温锻炼中产生反卷内陷活动,形成吞噬泡,将细胞质物质转移到液泡内,大大增加液泡内大分子物质的成分。抗寒性强的种类或品种的液泡的吞噬活动比抗寒性弱的高^[12,14]。此种情况说明,液泡的吞噬活动与植物的抗寒性和抗寒锻炼有密切相关。(4)在抗寒锻炼过程中液泡膜产生 ATP 酶的高活性^[10,11,16]。这可能同在此过程中液泡吞噬细胞质活动以及液泡对泡外溶质的主动吸收和积累有关。

5. 质膜的适应性变化

如前面所述,质膜可能是冻害损伤的最初部位。为了抵抗低温伤害,质膜在抗寒锻炼中必然要产生抗冻性的适应性变化。Levitt 和 Scarth (1936)的观测指出,质膜的透水性随着抗寒力的提高而增加,具有高渗透性的抗寒细胞能使水迅速流到细胞外的冰核地方,防止细胞内结冰^[59]。McKenzie 等(1974)和 Kasperska-Palacz 等(1977)也先后观察到此种现象^[59]。Steponkus 和 Wiest (1978)用分离原生质体的实验指出,经过抗寒锻

炼的原生质膜具有较大的膨胀系数，因而在化冻吸水膨胀时不易遭到渗透冲击的破坏。Pomeroy 和 Siminovitch (1971) 发现刺槐枝条皮层细胞的质膜在秋季低温锻炼中及寒冬时期发生内陷，呈现波浪状。然而 Niki 和 Sakai (1981) 在对桑树枝条皮层细胞的超微结构研究中，虽然也在秋季低温锻炼时期观察到质膜的内陷弯曲，但在寒冬时期却未表现此现象。因此他们认为，质膜内陷弯曲与植物抗寒力无关。近年来，我们连续多年在高度抗寒性的冬小麦——新冬一号的越冬过程中(无论是秋末冬初的低温锻炼或仲冬时期)均观察到质膜的内陷弯曲现象。因此我们认为，越冬中质膜的内陷弯曲活动是真实存在的，是高度抗寒植物的一个特征。特别值得注意的是，质膜内陷深入到细胞质内与液泡相连接(如图版 IV 图 12—15)。如此看来，质膜的内陷弯曲活动在防止冰冻伤害上可能具有两个主要作用：(1)缓冲和减少原生质体在冰冻脱水收缩和化冻吸收膨胀时张力的破坏作用。(2)增加水的渗透面积，特别是质膜内陷与液泡相连接，好似给液泡内水的外流开辟了一条渠道，如图 2,3 所示。在一般情况下，液泡内的水流向细胞外时，要经过一段距离的细胞质。水经过细胞质时，遇到的阻力较大，如温度降低过快，水在流至细胞质的中途即有结冰的危险；而当质膜内陷与液泡连接后，水就可通过这种渠道(排水渠)直接排到细胞外。这样，就在很大程度上排除了细胞内结冰的危险。

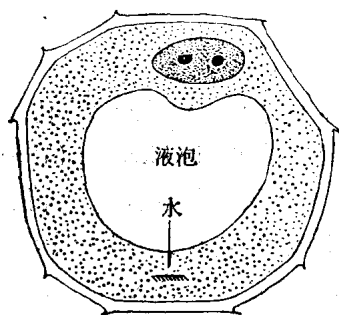


图2 锻炼前的细胞，水在途经细胞质时即可能发生结冰。

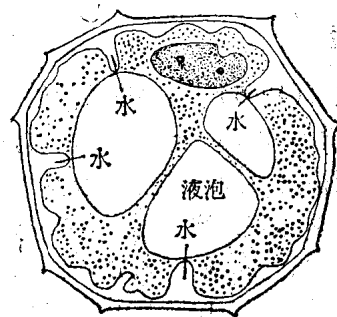


图3 锻炼后的细胞，水通过质膜内陷形成的“排水渠”，直接排到细胞外。

六、抗寒锻炼过程中细胞内各类物质及酶活性的适应性变化

1. 糖类的变化

抗寒锻炼中可溶性糖的积累及其对冻害的保护作用已有许多研究^[59]。通常，越冬植物在秋季低温锻炼过程中，细胞内的含糖量增加，到春天则下降。细胞的含糖量与植物抗寒性之间，多数植物成正相关；也有些不相关。例如甘蔗茎及白薯的块根，其细胞内的含糖量很高，但并不抗寒。相反，某些很抗寒植物细胞的含糖量却相当低，一些常绿植物在低温锻炼过程中，含糖量很少增加或不增加^[59]。

我们对不同抗寒性小麦品种的测试指出，在秋末冬初低温锻炼过程中，可溶性糖含量的增加与品种抗寒性成正相关。在锻炼初期，细胞内的多糖(淀粉粒)也发生积累，当冬季寒冷降临后逐渐分解，到仲冬时期全部消失，到初春(返青前)又发生积累^[3]。新近，我们在柑桔叶片细胞超微结构的研究中观察到，抗寒性较强的种类(温州蜜柑)叶绿体中的淀

粉粒在寒冬中水解消失,而抗寒性较弱的甜橙未发生明显变化^[44]。这说明,淀粉粒的消长动态也与植物抗寒性有一定关系。

2. 氨基酸与蛋白质的含量

当越冬植物进入寒冬过程中,细胞内的氨基酸含量增加,到仲冬达到高峰;但到春天恢复生长,抗寒力降低时,又出现第二次高峰。这说明,氨基酸的含量不仅依赖于温度,而且与生长有关。关于脯氨酸与植物抗寒性和抗寒锻炼的关系也存在不一致的报道,看来,很难成为抗寒性的鉴定指标^[59]。

细胞内可溶性蛋白质含量和抗冻性之间平行增长的关系,在刺槐和红松皮层细胞的观测中清楚地被证实^[60,80]。在茶树中,可溶性蛋白质含量与抗寒力之间表现更为明显的正相关:一方面,蛋白质含量随着低温锻炼中抗寒力的提高而提高;另一方面,抗冻性强的品种具有更多的可溶性蛋白质^[86]。在红花三叶草和冬油菜的抗寒锻炼中也测得可溶性蛋白的增加^[51,53]。我们通过细胞化学的研究指出,冬小麦在秋末冬初的低温锻炼过程中,细胞内的全蛋白和核内的碱性蛋白均增加;并观察到蛋白质的增加是在糖类增加之后^[3]。然而在有些植物中,可溶性蛋白含量与抗寒性之间没有明显联系^[59]。

3. 核酸含量

简令成等(1965)^[3]通过核酸的细胞化学研究指出,冬小麦在秋末冬初的低温锻炼过程中,细胞质内 RNA 含量明显增加,但 DNA 保持恒定。Siminovitch 等(1968)用生化方法测定刺槐皮层细胞在抗寒锻炼和越冬过程中的结果同我们在冬小麦上所获结果是一致的。在秋季低温锻炼过程中, RNA 和蛋白质含量随着抗寒力的提高而提高,在寒冬时期保持稳定,到春季下降, DNA 在各个时期均保持不变。山茱萸的核酸在越冬过程中表现出同样动态^[60]。Li 和 Weist (1969)对一年生苹果枝条的测试指出,在抗寒力迅速增加前一个星期, RNA 含量开始增加。在一个星期内, sRNA 增加 38%;在两个星期内, rRNA 增加 41%。Devay 和 Paldi (1977)报道冬小麦幼苗在人工控制的低温锻炼过程中, rRNA 含量增加二倍;但不抗寒的春小麦幼苗在同样条件下没有增加。

4. 拟脂的变化

通常,当越冬植物进入寒冬过程中淀粉粒逐渐被水解,而拟脂颗粒增加^[59]。然而,特别引起研究家们注意的是膜脂与抗寒性的关系。迄今的研究主要集中在两个方面:一是膜脂的不饱和脂肪酸含量与抗寒性的关系;二是膜磷脂含量与抗寒性的关系。1964年 Lyons 等报道几种植物的线粒体膜脂的不饱和度与抗冷性之间的相关性,提出膜脂脂肪酸不饱和程度与膜的物相变化的相关性的见解^[62]。尔后的一些年间,几乎所有的这类研究都指出,在抗寒锻炼中,膜脂脂肪酸的不饱和度均增加。例如苜蓿,无论在田间或室内控制的锻炼条件下,根细胞及叶绿体膜脂的不饱和度都明显地增加;同时膜脂的不饱和度与品种的抗寒性也成正相关^[45,87]。美国五针松经秋季低温锻炼后,叶绿体膜脂的不饱和脂肪酸含量增加到很高的程度^[40]。王洪春等报道,水稻种子的干胚及芽鞘线粒体膜脂的不饱和脂肪酸指数均与品种的抗冷性成正相关^[20,21]。杨福愉等也报道水稻幼苗线粒体膜脂的不饱和度及膜的流动性与水稻品种的抗冷性成正相关^[25,26]。葡萄种子的膜脂以及在秋季

取样的茎、叶片及叶绿体膜脂肪酸的不饱和度也随品种抗寒性的增加而增加^[22]。然而近些年来,相反的实验结果也在逐渐积累。例如 De La Roche 等报道,四个不同抗寒性小麦品种在低温锻炼过程中,线粒体膜脂的不饱和度的增加相似^[38]。Willemot 等^[91]对二个不同抗寒性小麦品种的观测,也证实了以上结果。油菜幼苗在低温锻炼过程中,亚油酸不仅在抗寒力提高的叶细胞中增加,也同时在抗寒力不提高的根细胞中增加^[83]。白杨和黑刺槐的皮层组织经秋季低温锻炼后获得最大的抗冻性,但脂肪酸的不饱和度却没有增加^[81,96]。这些资料表明,关于膜脂的不饱和度在抗寒力形成中的作用,目前尚难于判断。

关于膜磷脂含量与抗寒性的密切联系已为不少观测结果所证实。杨树和刺槐皮层细胞的膜磷脂在秋季和初冬的抗寒锻炼中与抗寒力的提高成平行性的增加^[80,81,96]。在柑桔的测试中也获得类似的结果,并发现抗寒性强的品种的膜磷脂含量比不抗寒品种高^[59]。在冬小麦等禾谷类及苜蓿的抗寒锻炼中也观察到磷脂总量的增加^[92]。通过用 ³²P 培养冬小麦幼苗的试验,表明抗寒锻炼能促进细胞内膜磷脂的生物合成,而且抗寒品种的生物合成显著高于不抗寒品种;但磷脂生物合成的增加是在抗寒力开始提高以后。这说明,低温锻炼中磷脂的生物合成与抗寒性有关,但不是抗寒力发展的前提条件,可能对发展高水平的抗寒力起作用。

新近, Yoshida 和 Uemura (吉田和植村, 1984)用鸭茅草和冬黑麦幼苗的分离纯化的质膜研究膜的蛋白质和拟脂成分与抗寒性的关系。他们的测试结果指出,在抗寒锻炼中,质膜的总甾醇/磷脂比率以及不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸比率的变化甚小,但磷脂/蛋白质比率明显增加。看来,进一步研究膜脂和膜蛋白相互关系的动态,将对植物抗冻机理的探讨起重要作用。

5. 酶活性的适应性变化

在抗寒锻炼过程中, RNA 酶活性降低^[32,46]。这被认为是与抗寒锻炼过程中 RNA 的积累有关。低温提高淀粉酶的活性,使淀粉粒迅速分解,增加细胞液中可溶性糖的浓度^[37,43]。在冬小麦和冬黑麦的低温锻炼中,也观测到蛋白酶水解活性的增强^[56]。Roberts (1968)研究了过氧化物酶的同工酶与小麦品种抗寒性的关系,指出生长在 6℃ 下的小麦叶片中的阴离子同工酶活性显著高于生长在 20℃ 下的活性。Kovacs 等(1978)发现冬小麦幼苗在低温锻炼期间,不仅过氧化物酶的复合酶活性提高,而且产生新的活性带。还有报道指出,冬小麦幼苗在低温锻炼中产生新的吲哚乙酸氧化酶^[30]。

我们通过电镜酶细胞化学的观测指出^[7,10,11,16,17],冬小麦幼苗细胞的质膜 ATP 酶在抗寒锻炼过程中获得耐低温的特性,以致在适于锻炼的低温(3℃)下能保持高的活性反应;同时,液泡膜在锻炼过程中形成高的 ATP 酶活性。春小麦幼苗在低温锻炼中不能提高抗寒力,其质膜 ATP 酶在锻炼过程中也不能发展抗寒性能,因而在 3℃ 低温培育下不表现明显的活性,同时液泡膜也不产生 ATP 酶活性。Kacperska-Palacz 等(1974)和 Kovacs 等(1978)也分别测试到,在低温(4—5℃)培育反应条件下,经抗寒锻炼的冬油菜和冬小麦幼苗的过氧化物酶活性比没有锻炼的显著高。这些结果表明,在抗寒锻炼中,冬小麦质膜 ATP 酶耐低温特性的形成,以及液泡膜上产生高的 ATP 酶活性,是与植株抗寒力的提高有密切关系的重要特性。

七、抗寒力发展的激素调节

激素被认为是抗寒基因表达的启动因子^[41,50]。Kacperska-Palacz (1978)认为抗寒锻炼的开始是由于环境因素改变了植物体内激素的平衡关系,从而导致生长的停止和代谢途径的变化。Waldman 等(1975)实验观测指出,苜蓿幼苗体内赤霉素和脱落酸(ABA/GA)平衡关系的变动调控着抗寒锻炼。在冬油菜的抗寒锻炼中,叶片细胞内的类GA物质减少,一种抑制剂(可能是ABA)增加(Kacperska-Palacz 等,1977)。当小麦、番茄、马铃薯等植物处于低温下时,也观测到内源ABA含量的增加^[36,50]。近些年来,一些研究者应用外源ABA对一些植物(烟草、马铃薯、棉花、黄瓜及苜蓿等)进行处理,结果也引起内源ABA含量的增加,同时提高了植物的抗寒力^[31,33,77]。我们较长时间以来试验矮壮素(CCC)对小麦抗寒力的效应,并在近些年研究了ABA对提高小麦抗寒力的作用。经过多年的重复试验结果表明,在北京地区秋播条件下,CCC对不同抗寒性品种有着不同的效应:对抗寒性弱的品种具有相当明显的提高抗寒力的作用;对抗寒性中等或较强的品种,作用效率较低;对冬性和抗寒性很强的品种,一般无明显作用,或作用甚微(见表2)。通过对生长发育状态的观察结果指出,CCC提高小麦抗寒力的机理可能是通过抑制生长发育起作用。因此,当冬前麦苗旺长时,喷施CCC会起到抑制生长提高抗寒力的作用。CCC提高抗寒力的作用也在其他一些植物(冬油菜、白菜、番茄、苹果树、桃树等)上得到证实^[48,59]。

表2 CCC对提高小麦抗寒力的作用——1966—1967麦苗越冬存活率(%)³⁾

品 种 \ 处 理	对 照	苗期喷施二次 ¹⁾	浸种+苗期喷施一次 ²⁾
南大 2419 (抗寒性弱)	4.3	19.0	54.3
碧玛一号(抗寒性中等)	75.2	84.5	89.1
农大 183 (抗寒性强)	91.9	93.1	95.9

1) 1966年9月24日播种,10月20日和11月5日用0.2%CCC喷施麦苗。2)用0.3%CCC浸种24小时,10月20日用0.2%CCC喷施麦苗。3)返青后,各处理挖取200株麦苗观测存活率。

ABA的试验是在精确控制的试管培养或培养皿内进行的。即将ABA配于试管培养基中,然后将种子播于其上,全部操作程序均在无菌条件下进行。多次重复试验结果表明,ABA的使用浓度适当能显著提高小麦的抗寒力;浓度过低不起作用;浓度过高,严重抑制生长,并降低抗寒力(见表3)。与CCC相反,ABA对抗寒性强的品种的效应比抗寒性弱的品种显著,在我们的试验条件下,对前者能提高抗寒力约7℃,对后者约4℃。这一结果似可证明,ABA的作用确实可能与抗寒基因的启动有关。ABA提高小麦抗寒力的作用还有另外两个特点:(1)与CCC不同,是在不抑制生长的情况下提高抗寒力;(2)能在暖和温度下诱发抗寒力的提高。通常,植物抗寒力只有在低温锻炼下才能得到发展。ABA的这些作用特点,不仅对探讨抗寒基因的表达与调控具有重要意义,而且有可能为防止越冬作物的倒春寒冻害带来希望。

Chen 和 Li (1982)在研究马铃薯的抗寒锻炼中发现,细胞内含糖量、渗透浓度、

ABA 及可溶性蛋白质含量以及植株的抗寒力表现出顺序性的提高。他们用蛋白质合成抑制剂(放线菌酮)的处理证明,抑制锻炼中蛋白质的合成,低温或外源 ABA 都不能诱发抗寒力的增加。他们基于这些结果,对低温锻炼中抗寒基因的表达提出了一个假设:低温促使细胞内可溶性糖的积累,从而引起细胞渗透浓度的提高,高的渗透浓度引起 ABA 含量的增加,ABA 诱导蛋白质的生物合成,然后,抗寒基因表达,抗寒力提高。在这个假设中,新合成的蛋白质是否是一种新蛋白质,是何种蛋白质,它如何去诱发或启动抗寒基因的表达?目前还不了解。

表 3 ABA 处理对提高小麦抗寒力的作用——冰冻后的存活率(%)¹⁾

ABA 浓度 (mol/L)		对照	10^{-7}	2.5×10^{-7}	5×10^{-7}	10^{-5}	5×10^{-5}
农大 183 (抗寒性强)	-6	62	80	100	98	100	0
	-10	4	32	40	100	100	—
	-13	0	12	14	58	60	—
杨麦(抗寒性弱)	-6	44	56	96	94	—	—
	-10	0	6	12	52	—	—

1) 播种后, 26°C 萌发生长 5 天, 转到 20°C/5—6°C 12 天, 各种冰冻处理均为 8 小时, 2—3°C 下化冻。

八、摘要与结论

1. 由于生物膜与植物的冻害和抗冻性具有密切关系, 而细胞的基本结构就是一个生物膜体系, 因此, 细胞生物学在植物冻害和抗冻性的研究具有重要意义。以往的研究已经为这一问题的探讨提供了许多重要信息。

2. 冻害引起细胞各种膜结构(质体、线粒体、高尔基体、内质网、液泡膜及质膜等)的破坏, 质膜可能是这种破坏中的最初部位。

3. 膜组分中的功能性蛋白质(如 ATP 酶)对低温伤害的反应可能比膜脂更敏感。由于寒害一方面引起质膜 ATP 酶活性的降低和失活, 从而破坏了细胞对物质的主动吸收及运输过程, 并造成细胞内的溶质外渗, 水分失散, 结果使细胞及植物有机体同周围环境的物质交换的平衡关系遭到破坏; 另一方面, 寒害激活了细胞内部一些细胞器上 ATP 酶的水解活性, 引起细胞内 ATP 的含量急剧减少, 从而导致生物合成速度的降低和停止, 结果使整个生理生化过程遭到破坏, 造成植株的伤害或死亡。

4. 抗寒基因是一种诱发性基因, 它的表达不仅决定于外界的诱发条件——低温和短日照, 而且与植物体的内因密切相关。降低和停止细胞的分裂和生长活动, 是使植物进入抗寒锻炼, 使抗寒基因得以表达为抗寒力的前提条件。而在低温的作用下, 核膜孔的逐渐关闭, 可能是使细胞停止分裂和生长活动的重要调节者。原生质体孤立的形成, 则可能是使植物进入深度休眠, 避免越冬过程中气温波动的影响, 维持稳定抗寒力的一个重要的适应特性。

5. 在植物抗寒锻炼中, 迄今所揭示的细胞的膜结构及各种生理生化过程的一系列适应性变化, 大多属于与抗寒力发展相平行的一些因素与特征; 关于抗寒基因本身的结构,