

# 国外农业科技资料

(35)

——植物抗寒生理

沈阳农学院科技情报室编译

1982·3

# 说 明

这本译文集是结合我院植物生理教研室的科研课题——《植物抗寒生理研究》而组织编译的。译文由生理和生化教研室供稿，何若韞同志负责业务选题并对全文进行了整理，现汇集成册，供作参考。

由于水平所限及时间仓促，难免有不足和错误，请予批评指正。

沈阳农学院

科技情报室

植物生理教研室

# 目 录

- 一、受冷害的愈伤组织中细胞膜的透性和呼吸活性…………… (1)
- 二、低温下根中有机物质的移动和流失…………… (4)
- 三、大豆吸胀和渗漏的温度效应…………… (9)
- 四、被离子激活的某些植物膜上 ATP 酶对温度的敏感性… (12)
- 五、温度对冷敏感植物和抗冷植物 PEP 羧化酶的影响…………… (18)
- 六、脱落酸防止棉花的冷害…………… (23)
- 七、水稻幼苗在低温下叶色及叶绿体结构变化的研究…………… (27)
- 八、三个高粱品种对低温的反应…………… (32)
- 九、研究植物冷害的新方法——叶绿体的应用…………… (38)
- 十、转录和翻译的专一抑制剂对黄瓜幼苗抗冷和抗热锻炼的影响…………… (44)
- 十一、冰冻对离体植物线粒体的作用…………… (49)
- 十二、水分胁迫对冬小麦抗寒性的影响…………… (54)
- 十三、草本植物抗冻锻炼期间脂类的化学修饰…………… (58)
- 十四、脂类参与莴苣种子避免细胞内结冰的机制…………… (62)

# 受冷害的愈伤组织中 细胞膜的透性和呼吸活性

Shizuo Yoshida, Turuo Niki

为了增进对冷敏感愈伤组织(杞柳山茱萸)冷害机理的了解,我们研究了细胞透性和呼吸活性的早期变化。在 $0^{\circ}\text{C}$ 下受冷的晚期(48小时),当大多数愈伤组织遭受严重损伤时,其特征是氨基酸出现部分渗漏,外加的多巴胺的透性和氧化突然加强。然而在受冷的早期(24小时内),观察到细胞透性很少变化或没有变化,这时细胞仍保持其生长活性,即当移至温暖条件下还可生长。这些结果暗示出,细胞膜本身的变化绝非细胞损伤的最初步骤。于受冷12小时后马上测定,呼吸活性表现暂时降低,但寒冷持续至24小时,其活性又恢复到原来水平。呼吸系统不可逆的机能失调是在延长寒冷至48小时才出现的。这就暗示了线粒体功能的不可逆损伤可能并不是在细胞损伤的早期。本文讨论了受冷害细胞中这些观察到的变化与超微结构变化之间的可能关系。

起源于热带或亚热带的许多植物的种,对 $0^{\circ}\text{C}$ 左右到 $15^{\circ}\text{C}$ 之间的低温敏感,以至遭受严重伤害。细胞膜半透性的突然丧失和呼吸活性的变更,是冷害过程中细胞受损伤的两个主要症状。在许多冷敏感植物的种中,也观察到受冷害后促进了钾、碳水化合物和氨基酸的丢失。许多研究工作者曾报导,冷敏感的植物组织在受冷期间或受冷以后,出现与冷害有关的异常呼吸行为。

如早先报导,从杞柳山茱萸(*Cornus stolonifera*)衍生的愈伤组织对冷温非常敏感,短期暴露于 $10^{\circ}\text{C}$ 以下的温度时,就会遭受严重伤害。还曾报导,受冷害的细胞继后在超微结构上,也对低温作出反应而发生变化。

在本项研究中,重点放在冷敏感的愈伤组织在受冷期间细胞透性的变化,特别是多巴胺的渗透及其氧化,还有呼吸活性

的变化等方面。这些变化与观察到的细胞受冷后在超微结构上作出的反应,即内质网空泡化和液泡膜的损伤成正相关。

## 材料与方法

### 材料

试材为从杞柳山茱萸衍生的愈伤组织,是在 $26^{\circ}\text{C}$ 下暗中继代培养的。培养基为Murashige和Skoog基本琼脂培养基但略加修改,即补加了NAA(5 ml/升)。瓶中盛有培养了10天的愈伤组织,于 $0^{\circ}\text{C}$ 下冷冻不同时间。细胞活力用以前报导的方法估算。

### 粗线粒体组分的制备

收取经低温处理的愈伤组织,每10克组织加入10毫升研磨介质,4克洗净的海砂和1.5克Polyclar AT,于研钵中研磨。研磨介质含有100mM Tris-HCl缓冲液,PH7.8,0.5M山梨醇,5mM EGTA,

5 mM  $MgCl_2$ 、10 mM  $KCl$ 、0.5% 牛血清蛋白 (BSA) 和 20 mM 半胱氨酸-HCl。混合物在  $0^\circ C$  下研磨 100 秒钟。糊浆用二层纱布和一层 Miracloth 过滤。滤后的无细胞抽提物依次以 300, 1000 和  $14000 \times g$  分别离心 5、10 和 15 分钟。经  $14000 \times g$  离心获得的小丸再用反应介质清洗。

### 离体和活体内呼吸活性的测定

离体线粒体的氧化活性是用氧电极测定氧的吸收来表示。反应介质含有 0.5 M 甘露醇, 20 mM 磷酸钾缓冲液, pH 7.2, 1 mM  $MgCl_2$  和 0.1% 牛血清蛋白。底物 (20 mM 琥珀酸盐) 的氧化速率以 2 毫升反应混合物中存在 (3 态) 或缺少 (4 态)  $115 \mu M$  ADP/1.1—1.2 mg 线粒体蛋白时测是。活体的呼吸活性乃用氧电极在 3 毫升未加小量有机成分的液体培养基中测定。所加入的多巴胺的氧化, 也用氧电极测定其增强的吸氧量。

### 氨基酸渗漏测定

收取经不同低温处理的愈伤组织 500 毫克浸入蒸馏水中; 于  $26^\circ C$  下保温 1 小时。之后通过离心除去细胞。其上清液用 10% TCA (三氯醋酸) 去蛋白质。离心后, 氨基酸存在上清液中, 用水合茚三酮法测是。从受冷细胞中渗漏的氨基酸量, 以细胞中总氨基酸的 % 表示。

蛋白质的测定乃以 10% TCA 沉淀后, 用 Lowry 等 (1951) 的方法测定。BSA 用作标准样。

## 结 果

### 受冷期间细胞透性的变化

如前文报导, 愈伤组织在  $0^\circ C$  下受冷 12 小时以内时, 不遭损伤, 但如果细胞受冷 24 小时和 48 小时, 则受到严重损伤的细胞分别约达 40% 和 80%。如图 1 所示, 愈

伤组织受冷 48 小时以上时, 也只有部分氨基酸被释放出来, 而如果受冷时间在 24 小时以内时, 则没有或很少渗漏。

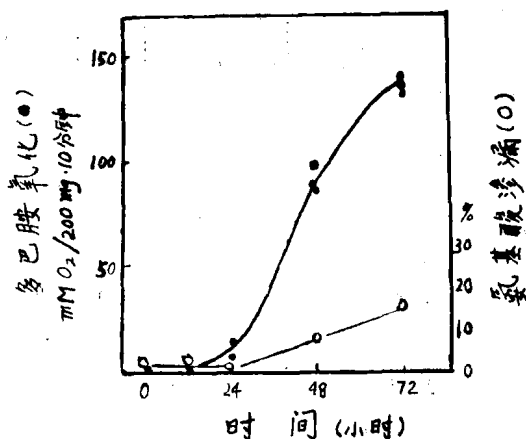


图 1 受冷细胞中氨基酸渗漏和外加的多巴胺的氧化。受冷细胞于  $26^\circ C$  下在蒸馏水中浸提 1 小时之后测定渗漏的氨基酸。氨基酸渗漏量以细胞总氨基酸的 % 表示。受冷细胞对外加多巴胺的渗透和氧化在  $26^\circ C$  下用氧电极测定。

然而, 活体对外加多巴胺的渗透和氧化, 在受冷 48 小时以上的愈伤组织中出现激增 (图 1)。愈伤组织对外加多巴

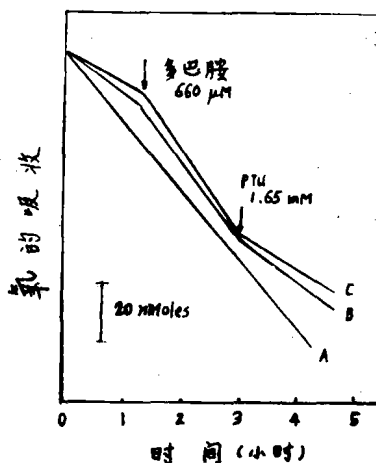


图 2 对照和受冷细胞在加入多巴胺和不加的情况下吸收  $O_2$  的典型图。多巴胺 (660 微克分子) 和 PTU (1.65 毫克分子) 于指定的时间加入。反应在  $26^\circ C$  下完成。A、未受冷细胞; B, C, 分别受冷 48 小时和 72 小时。

胺的氧化,因加入苯硫脲(PTU)而被强烈抑制(图2),苯硫脲是多酚氧化酶的有效抑制剂。从未受冷的愈伤组织制备的原生质体,于25℃下在2 mM多巴胺中预温20分钟后洗净,发现保温期间很少吸收或不吸收底物(资料未发表)。而且就是受冷72小时的愈伤组织,虽然大多数细胞已失去活性,但细胞外侧的可溶性酶也很少渗漏或不渗漏(资料未发表)。

活体的呼吸活性在受冷的第12小时稍微下降(图3)。当在0℃下延长至24小时,呼吸活性明显地差不多恢复到原来的水平。尔后,呼吸活性随着受冷时间的延长而进一步降低。活体由于加入解联剂(1  $\mu$ M FCCP,为p-三氟甲氧基苯胺基氰化物)所促进的呼吸,也在第12小时呈可逆性减弱。从经过不同时间冷处理的愈伤组织分离的粗线粒体,也得到近乎相同的结果(图3B)。受冷12小时后,呼吸控制率(RCR)也暂时降低了;当受冷时间

延至24小时,又几乎恢复到正常水平。尔后,观察到呼吸控制明显减弱,表明呼吸控制系统不可逆的机能失调。因此,观察到的活体呼吸活性在受冷过程中所发生的变化,可能是由于线粒体活性可逆或不可逆变更之故。

## 讨 论

在本项研究中,我们未能精确地追究受冷期间愈伤组织对电解质透性的变化。然而,与早先对一些冷敏感植物的研究结果不同,我们注意到受冷48小时后,大多数细胞已遭受严重损伤,但氨基酸仅部分地渗漏出来。

观察到受冷48小时的愈伤组织,其活体对外加的多巴胺突然增强其渗透性和氧化作用。这表明受冷约48小时以后,细胞膜发生了某种变更,以至底物可透入细胞。愈伤组织在受冷期间,多酚氧化酶的总活性很少变化或无变化。

在新近应用冰冻-撕裂电子显微技术的研究中,我们证明了在受冷48小时以后,细胞膜P面(靠原生质一面——译者)上的内膜颗粒大大地聚集,而受冷12小时以内者,颗粒的分布很少变化或无变化。

根据这些观察,我们可以阐明,细胞于受冷晚期遭到严重损伤之前,一直保持膜的正常功能。可见,细胞膜本身的损伤并不是导致冷害的最初事态。

已有大量实验指出,受冷期间线粒体的氧化活性损坏或减弱。在甘薯根中,线粒体功能的减弱是对寒冷的反应,它是与膜中蛋白质和类脂之间疏水性关系的改变相伴发生的。在我们的冷敏愈伤组织中,观察到在受冷的第12小时,线粒体的功能暂时降低。一种解联剂(FCCP)对活体呼吸活性的刺激效应以及离体线粒体的呼

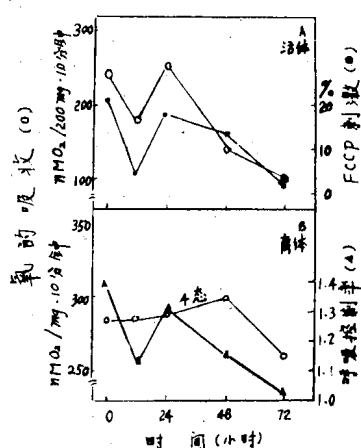


图3 受冷后活体(A)和离体(B)呼吸活性的变化。如文中所述,粗线粒体组分是从0℃下受冷一定时间的愈伤组织制备的。活体和离体二者对O<sub>2</sub>的吸收均用氧电极在26℃下测定;离体条件下3态呼吸的测定,底物用22mM琥珀酸,ADP为115  $\mu$ M,加入的FCCP,使其最终浓度为1  $\mu$ M。

# 低温下根中有机物质的移动和流失

M. N. Christiansen

从根中释放出来的物质通常称为渗泌物，它们是被动或主动地转移至根围的物质。根的渗泌物包括糖、氨基酸、蛋白质和其他许多通常存在于植物根细胞的物质。已知多种逆境，诸如水分亏缺、厌氧生活、低pH、降低光强度和极端的温度条件，都会增加根中有机物和无机物的流失。也有报导，把渗泌物化学性质的变更作为逆境作用的结果。物质流失至根围，关系到继后根发病率的增高，因而植物病理学家对此也甚感兴趣。对毗邻植物或后继作物的植物毒素抑制效应或不利条件的形成，可能吸控制率相伴降低，这一数据表明氧化磷酸化能力降低。然而，当受冷时间延长至24小时，降低了的线粒体功能又明显地恢复到接近正常水平。受冷12小时的细胞，在26℃下回暖后，仍能存活而不受伤害。可见，线粒体活性对寒冷的早期反应显然是可逆的。受冷24小时以后，线粒体活性才出现不可逆的机能损伤。正如较早的研究中所注意到的一样，受冷时间在24小时以内时，未观察到线粒体超微结构的改变。之后，细胞突然变质，液泡膜崩溃，很少再看到正常结构。

在我们新近应用冰冻-撕裂电子显微技术的研究中，发现培养的细胞在0℃下受冷12小时后的早期进程中，液泡膜的内膜结构发生变更，即内膜颗粒聚集。这就暗示着膜上发生了某种可逆的变更，这种变更大概引起盐分和质子等在细胞内的分区化作用发生紊乱。这些细胞在同一受冷

也是由于渗泌物的作用。Knudson(1920)最早报导了根渗泌物的性质。Roveria(1965, 1969)对这一主题曾发表过几篇评论。我们对这一课题发生兴趣，是由于确信逆境引起的渗泌是膜机能失调的结果，并且渗泌是一种易于测定的活体水平的指标，可用以表明逆境引起的伤害。

逆境导致渗泌增大的客观事实，证明其机理直接和膜的物理性质或者和维持着膜的功能与完整性的代谢事态有关。从这一概念出发，就可以推论：极端温度影响着细胞内对有机物和无机物的保持、分室期中，也发生了粗内质网的并发空泡化。在瓣鳞花属(Frankeniania)的盐腺细胞中，粗内质网的囊泡化和空泡化是与盐分积累的功能相关的。如果栽培植物的细胞也是这种状况，那么我们可以推测，内质网或多或少具有盐腺细胞类似的功能，它对细胞质内盐分和质子等的浓度的紊乱具有平衡作用，至少在受冷的早期如此。因此，在受冷早期所观察到的呼吸作用的可逆变化，可能是由于胞液环境的可逆紊乱，即盐浓度和pH等发生变化引起，推测这又是由液泡膜透性的可逆变化引起。

要确定这一看法，显然还需要进一步的试验。我们实验室正在研究冷敏感愈伤组织的完整液泡。

译自 Plant and Cell Physiol.  
20(7):1237—1242(1979)

译者 何若韞

隔离和运输的控制系统。

已确定,大多数存在于植物根细胞的有机物质,也在渗泌物中出现。另外也已证明,顶部使用的非内源化学物质,也能转移至植物体内,并且从根中渗出。正如所料,从形成了液泡的细胞所渗泌的物质,与那些未长出液泡的细胞的渗泌物是有差别的。Garrad 等(1967)指出,玉米的盾片组织在不同条件下渗泌的糖类在质上出现变化。

有大量证据表明,在低温逆境下膜失去其代谢屏障的作用。杰出的例子是香蕉,只需短暂的寒冷就能引起果实明显变色。颜色变化是由于原来结合在膜上的多酚氧化酶被释放下来,使酚类物质氧化的结果。另外的例子是叶和根的渗泌作用,它表明膜的迅速变更和降低其对细胞内含物的控制。因此,渗泌现象提供了极端温度使膜发生变更的活体水平上的证据。

由冷温引起渗泌所提出的问题之一是:这究竟是由于维持膜完整性所必需的代谢系统受到低温抑制呢,还是由于膜的类脂双层单纯的生物物理混乱?这一问题可能通过对反应时间的观察做出部分回答。如果冷温迅速引起渗漏,则能很好地证明膜发物理性的“沟渠化”变更,而反应如果需要几小时甚至几天,则可能是由于代谢受阻、能量平衡破坏或毒素积累造成的结果。

由低温引起的呼吸抑制,与化学抑制剂或缺氧引起的呼吸抑制完全一样,而且呼吸受到抑制时,也能相当快地导致物质渗泌。这就有点使以反应时间的长短作为划分对膜产生的是物理效应还是代谢效应,并据此将逆境的作用分类的论点无效了。迅速降温引起叶或根的渗泌反应(图1)与水果或块茎等肉质器官相比是不同的,这可能是由于后者是大组织块和散热

不同引起。如甘薯在 $10^{\circ}\text{C}$ 下只有当时间延长到2—4周以后,才发展为渗漏和组织褐变。苹果的内部褐变也存在同样情况。

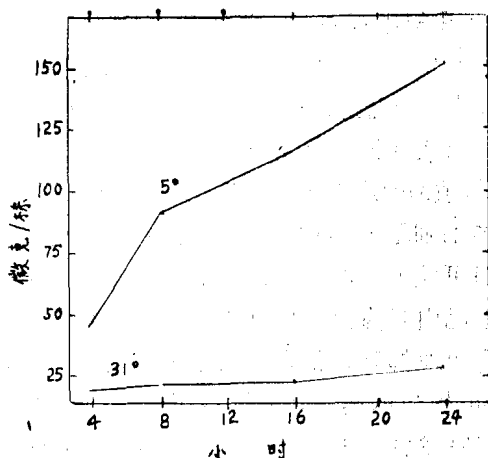


图1 于 $31^{\circ}\text{C}$ 下发芽一天的棉花种苗,在 $31^{\circ}\text{C}$ 和 $5^{\circ}\text{C}$ 下胚根中碳水化合物流失的累加量。

二价阳离子,如钙或镁,在低温引起的渗泌过程中参与作用的事实,证明这一过程属物理性质。已知钙能迅速稳定根细胞膜的功能。许多已发表的有关钙和膜的报告虽然没有论及低温逆境,但都涉及了钙在膜对离子的识别和吸收中的中介作用。Sorokin等(1940)注意到正常根的形成和功能的执行需要钙。钙的存在能全面加强离子的吸收,这通常称为“Viets”效应(Viets, 1944),这是钙对膜透性产生的效应。钙在膜上作用的方式,是重要的争论点。Dodds等(1966)认为,与膜结合的ATP酶被钙激活。用螯合剂(EDTA)除去钙,则降低呼吸和导致根中核苷酸的流失。这就再一次证明呼吸作用是维持膜的完整性的重要因子。也已确定,钙参与膜对细胞有机内含物的控制。Garrad等(1967)曾指出,钙或镁可防止玉米盾片组织中蔗糖的渗漏,特别是在低温下如此。他们推理说, Ca 与膜结构

的阴离子基团相结合而在膜的结构成分之间形成跨桥, 从而通过孔半径或表面电荷维持选择透性。另一些有关钙的研究指出, Ca 分布在根细胞的表面, 因而提出 Ca 在根中起着维持质膜膜结构的作用。

Christansen 等 (1972) 注意到, Ca 对低温逆境引起的渗泌有着明显的作用 (表 I)。寒冷或缺氧导致的渗泌可被 Ca 或 Mg 所阻止; 而低 pH (3.0) 引起的渗泌则不能因加入 Ca 而被控制。渗泌作用可被 Ca 的预处理 (表 I, 处理 F) 或者已引起渗泌之后加入 Ca (处理 E) 而有效地抑制。正在发展中的渗泌过程能被 Ca 相当迅速 (几分钟之内) 地阻抑住, 这显然表明 Ca 是与膜结构发生生物物理的结合, 而不是对 ATP 酶作用的刺激或其他代谢过程的效应。这也表明, 由寒冷引起的渗泌, 是由于膜发生直接的物理变

更, 而不是与膜有关的代谢受到冲击。

我们曾经做过有关冷温潜在效应的试验。这些研究的目的是为了测得引起渗泌所需要的冷量; 为了发展化学的改良技术; 以及为了用化学抑制剂来测定, 如果代谢参与了恢复或“修补屏障”的话。通常, 棉花根在 4 °C 下经过 4 天就不能恢复。我们没有找到改良的化学方法, 但发现许多“代谢抑制剂”能减慢恢复, 并且也引起根的渗泌。一般说, 呼吸抑制剂使渗泌增加; 蛋白质合成抑制剂很少有作用, 而解联剂如 DNP 则引起渗泌和阻碍受冷的恢复 (表 II、表 III)。

人们了解到, “专一”的代谢抑制剂经常是不灵敏的研究工具, 这首先是由于它们对代谢的作用场所并不专一; 其次是因为很难测定它们移至代谢场所的速率。在这些资料中, 最有趣的是 EDTA, 虽然它向组织内移动以极其缓慢而著称, 但它

表 I 棉花胚根在低温、N<sub>2</sub> 气或低 pH 时的渗泌作用

| 处 理                                                            | 渗泌碳水化合物<br>微克/株苗/小时 |
|----------------------------------------------------------------|---------------------|
| A. 对照, 31°C                                                    | 4.5                 |
| B. 对照, 5°C                                                     | 14.5                |
| C. 对照 + CaSO <sub>4</sub><br>(10 <sup>-6</sup> M)              | 2.0                 |
| D. 5°C + CaSO <sub>4</sub><br>(10 <sup>-6</sup> M)             | 4.4                 |
| E. 5°C 2 小时 → 5°C<br>CaSO <sub>4</sub> (10 <sup>-6</sup> M)    | 2.1                 |
| F. 31°C + CaSO <sub>4</sub><br>(10 <sup>-6</sup> M) → 5°C, 水   | 4.4                 |
| G. N <sub>2</sub>                                              | 22.0                |
| H. N <sub>2</sub> + CaSO <sub>4</sub><br>(10 <sup>-6</sup> M)  | 1.7                 |
| I. pH <sub>3</sub> —31°C                                       | 121.0               |
| J. pH <sub>3</sub> + CaSO <sub>4</sub><br>(10 <sup>-6</sup> M) | 106.0               |
| K. EDTA<br>(2 × 10 <sup>-3</sup> M)                            | 109.0               |

表 II 化学试剂对棉花胚根渗泌的诱导作用

| 处 理                              | 渗 泌 的<br>碳水化合物<br>微克/株苗/小时 | 抑制功能 <sup>a</sup> |
|----------------------------------|----------------------------|-------------------|
| 叠氮化钠<br>3.5 × 10 <sup>-5</sup> M | 50                         | 呼吸作用              |
| 碘 乙 酸<br>10 <sup>-5</sup> M      | 48                         | 呼吸糖酵解             |
| 氟 化 钠<br>10 <sup>-5</sup> M      | 24                         | 呼吸稀醇化酶            |
| 氟柠檬酸盐<br>10 <sup>-5</sup> M      | 20                         | 三羧酸循环             |
| 2,4-DNP<br>10 <sup>-4</sup> M    | 66                         | 氧化磷酸化作用           |
| 砷 酸 钠<br>10 <sup>-5</sup> M      | 5                          | 呼吸作用              |
| 氯 霉 素<br>10 <sup>-4</sup> M      | 20                         | 蛋白质合成             |
| 对 照                              | 4.5                        |                   |

a Davenport's 定律: “一种抑制剂专一性的宽窄, 与对它搞清楚的程度成反比。”

较之碘乙酸、氟化物或氟柠檬酸具有更大的诱导效应。人们可以推知, EDTA 可能是通过去除 Ca 或其他稳定的阳离子而

作用于膜表面, 而不是对代谢产生效应。呼吸抑制剂却必须透入线粒体才能影响呼吸作用。

表Ⅱ 代谢抑制剂、钙和ATP对冷处理后的棉花种苗碳水化合物渗泌的影响

| 处                                                       | 理 | 31℃下处理的时数        |     |     |     |
|---------------------------------------------------------|---|------------------|-----|-----|-----|
|                                                         |   | 1                | 2   | 3   | 4   |
|                                                         |   | 微克/小时/株苗         |     |     |     |
| 对照, 水, 5℃ 3天                                            |   | 73               | 27  | 20  | 14  |
| CaSO <sub>4</sub> (10 <sup>-5</sup> M)                  |   | 65               | 31  | 22  | 14  |
| 叠氮化钠 (35×10 <sup>-4</sup> M)                            |   | 67               | 77  | 91  | 73  |
| D N P (10 <sup>-3</sup> M)                              |   | 53               | 126 | 143 | 110 |
| 氯霉素 (10 <sup>-4</sup> M)                                |   | 38               | 18  | 10  | 9   |
| 环已酰胺* (10 <sup>-4</sup> M)                              |   | 53               | 37  | 27  | 27  |
| D N P (10 <sup>-3</sup> M) + A T P (10 <sup>-4</sup> M) |   | 60               | 133 | 131 | 117 |
| 叠氮化钠 (10 <sup>-4</sup> M) + A T P (10 <sup>-4</sup> M)  |   | 38               | 29  | 24  | 37  |
|                                                         |   | 冷处理 4 天后在31℃下的时数 |     |     |     |
|                                                         |   | 1                | 2   | 3   | 4   |
| 对照, 31℃, 水                                              |   | 81               | 37  | 36  | 26  |
| CaSO <sub>4</sub> (10 <sup>-5</sup> M)                  |   | 71               | 34  | 23  | 16  |
| 叠氮化钠 (35×10 <sup>-4</sup> M)                            |   | 65               | 70  | 59  | 48  |
| D N P (10 <sup>-3</sup> M)                              |   | 100              | 124 | 141 | 105 |
| 氮霉素 (10 <sup>-4</sup> M)                                |   | 63               | 25  | 23  | 20  |
| 环已酰胺* (10 <sup>-4</sup> M)                              |   | 60               | 35  | 32  | 32  |
| D N P (10 <sup>-3</sup> M) + A T P (10 <sup>-4</sup> M) |   | 50               | 98  | 138 | 114 |
| 叠氮化钠 (10 <sup>-4</sup> M) + A T P (10 <sup>-4</sup> M)  |   | 32               | 19  | 29  | 30  |
| 对照——未受冷                                                 |   | 20               | 12  | 9   | 6   |
| 叠氮化钠 (10 <sup>-4</sup> M)——未受冷                          |   | 38               | 49  | 49  | 52  |

\*原文为Cyclohexamide, 可能为Cycloheximide (环己亚胺) 之误——译者。

## 体内溶质的移动和根的渗泌

为了测定种苗组织内有机物质的移动, 以及冷温对这些过程的影响, 采用了一种局部应用标记C<sup>14</sup>—甘氨酸的方法, 即将标记物质定量地混入0.5%的琼脂中, 应用于种苗子叶的切面上。种苗先在

31℃下发芽30小时 (胚根一致长2cm), 将其垂直放在支架上, 使胚根顶端的1cm浸入蒸馏水。经过5℃处理4天的种苗, 局部应用的甘氨酸自根中流失的量乃以常速增长 (图2)。这一反应堪与以前有关糖与氨基酸自根中渗泌的报导相匹配。这些结果表明冷温对完整种苗膜的影响, 或

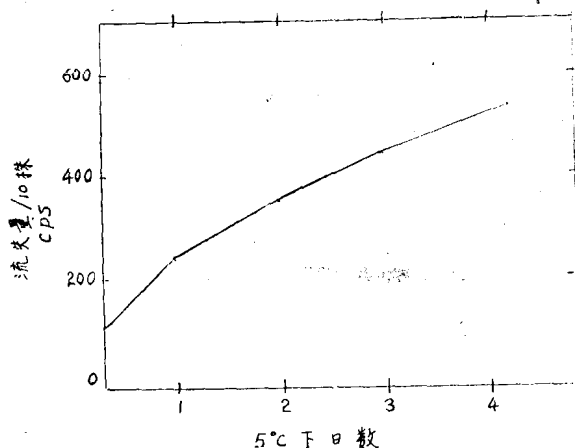


图2 棉花种苗  
经5℃冷处理后，在  
30℃温度下C<sup>14</sup>—甘  
氨酸的流失

多或少与对根细胞质膜的影响相等。可以想像，在子叶应用的C<sup>14</sup>—甘氨酸，要经过子叶叶肉细胞，主轴和根的韧皮部细胞，根的皮肤细胞而至根围，或者说，经过有机养分的运输途径而自子叶到达根。

我们还在局部应用的琼脂—C<sup>14</sup>—甘氨酸混合剂中加入CaSO<sub>4</sub>，以期进一步探明Ca的作用。在30℃下，钙对其移动没有影响。将种苗自30℃移至5℃，也很少

有作用。只有在5℃下处理6小时以上，甘氨酸经过种苗主轴的移动以及自根流失的量才降低了1/3至1/2（表Ⅳ）。钙在种苗中的作用部位未曾测定。它有可能局限在子叶的应用部位附近，在该处起着较大的限制影响；或者它能够扩散而遍及全苗。通常钙在组织中不大移动是由于它在植物体内发生了反应。问题的回答有待于我们将要进行的Ca<sup>45</sup>示踪试验。

表Ⅳ 钙对受冷和未受冷的棉花种苗局部应用的  
C<sup>14</sup>—甘氨酸自胚根流失的效应

| 温 度 安 排 方 式  | 10株种苗每小时流失的甘氨酸<br>每秒钟计数 |     |        |     |
|--------------|-------------------------|-----|--------|-----|
|              | 3 小时读数                  |     | 6 小时读数 |     |
|              | Ca                      | 无Ca | Ca     | 无Ca |
| 30℃，对照       | 10                      | 8   | 11     | 10  |
| 30℃，8小时后置5℃下 | 47                      | 35  | 63     | 50  |
| 5℃，8小时后置30℃下 | 144                     | 350 | 48     | 108 |
| 持续5℃下        | 102                     | 166 | 44     | 102 |

这篇报告表明，对冷敏感的棉花种苗遭受了遍及全株的膜变更，这种膜变更能够影响溶质和水的移动。从引起根的迅速渗泌这一现象来看，可认为膜的变更是物理性的；从可被钙逆转以及EDTA的作用来看，也同样可认为这是结构的变更而非

代谢事态。

译自《Low Temperature Stress  
In Crop plants》  
Academic Press, 1979.  
P 115—122.

译者 何若韞

# 大豆吸胀和渗漏的温度效应

A. CARL LEDPOLD

为了对种子冷害本质进行分析,我们测定了大豆子叶在各种温度下水分吸收和溶质渗漏的最初线性速率。活子叶和死子叶两者吸水的Arrhenius图均近似直线,其斜率(和活化能)活细胞不显著高于死细胞,表明膜对水分进入来说,很少有屏障作用。在溶质渗漏速率方面,图中表明活组织比死组织低10倍;温度低于15℃时,Arrhenius图中斜率倒转反映了渗漏速率增加,说明在发生冷害的温度下,膜的改组受到一定程度的破坏。

已有事实证明,种子吸胀期间的冷害可能是由于水分进入干种子时膜的改组被破坏所致。利用大豆子叶吸水和溶质渗漏的最初线性速率,以及通过Arrhenius图对它们分析,定量测定了膜的屏障力。

水分最初进入干子叶的时间进程表现出一个迅速的非线性的时期,持续5—10分钟,接着便是线性的时期,持续30分钟或更长时间。溶质从正在吸胀的子叶中渗出的最初时间进程也表现出有一个非线性的迅速时期,接着大约在水分进入变为线性的同时,渗漏也开始了线性阶段。上述情况已暗示出:最初的迅速阶段代表细胞膜被相对瓦解的时期,线性阶段代表通过膜的改组达到稳定状态的进程。假如这种解释是正确的,那么水分进入和溶质渗漏的线性速率将分别反映出膜对水分和溶质通过的阻力。

本文报导的试验是测定多种温度下水分进入子叶和溶质渗出子叶的线性速率,可用来建立Arrhenius图和估算由重新组成的细胞膜提供的屏障能。

## 材料和方法

选大小相同(6.8—8mm)的大豆种

子,取下子叶用来测定水分和溶质渗漏。一部分子叶于测定前一天晚上用100℃温度热杀死。吸胀前将全部子叶置于饱和湿度环境下24小时,使其水分含量约提高至湿重的20%。

水分进入的时间进程,是测定沉浸在5ml水中的5片子叶的鲜重变化,即每隔10分钟吸干子叶表面水分后,称取一次重量。将吸胀系统沉浸在水浴中保持1—40℃之间的恒温。

溶质渗漏的时间进程是测定浸有10片子叶的25ml水的电导度的升高程度,用Markson电导仪每隔5分钟测定一次电导度。

速率是从10—40分钟的时间内的斜率用线性回归计算出来的。由这些斜率值的对数绘成Arrhenius图,然后用Stein方程计算出活化能:

$$2.3 \log \frac{k'}{k''} = \frac{Ad}{R} \left( \frac{1}{T''} - \frac{1}{T'} \right)$$

Ad为活化能,  $k'$ 和 $k''$ 是40°和5℃(分别为 $T'$ 和 $T''$ )的速率的对数值, R是气体常数。

## 结 果

大豆子叶吸水 and 溶质渗漏的时间进程曲线表明于图 1。在吸胀开始几分钟以后，水分吸收和溶质渗漏二者的速率都是常数。还可看出，死子叶渗漏溶质的速率比活子叶要高得多。

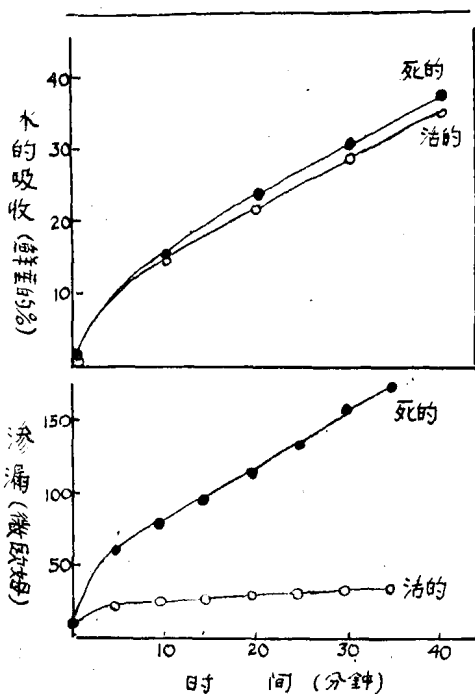


图 1 活的和死的大豆子叶吸水 (上图) 和溶质渗漏 (下图) 的时间进程曲线。水分吸收以累积的鲜重计；渗漏以溶液层的电导度累积值计；23℃。

水分吸收速率的对数对逆温度顺序作图，得图 2 中的 Arrhenius 图。在整个试验温度范围内，死子叶呈现出近似线性的斜率 (-1.1)，在同样温度范围内活子叶表现出稍陡一些的斜率 (-1.4)，但进行  $t$  试验未表明差异显著。在较低的温度范围内，水分进入死子叶的速率略高于活子叶。

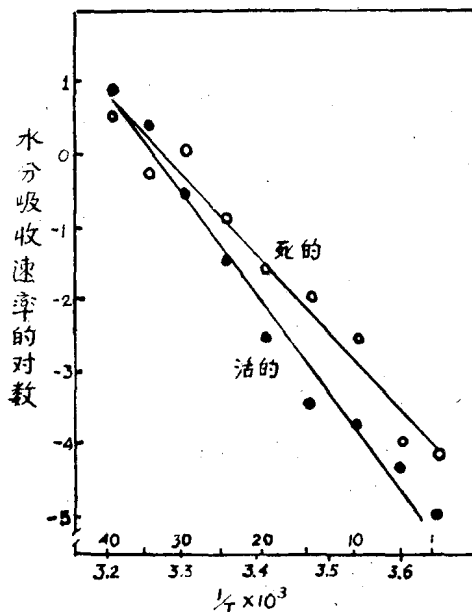


图 2 活子叶和死子叶吸水速率 ( $\log\%/分钟$ ) 的 Arrhenius 图。经  $t$  试验，两个斜率没有显著差异。

图 3 示出同一温度范围内溶质渗漏速率的 Arrhenius 图，在整个温度范围内死子叶呈现出近似线性的图象 (斜率 = -1.6)，而活子叶在图中表现出断折，20℃ 以上的线性区域的斜率为 -1.7，20℃ 以下的斜率完全不同，为 +1.8。虽然在 20℃ 以上时，死子叶和活子叶的图象表明斜率大致相似，但是死子叶的渗漏速率，依次地都比那些活子叶要快。

从这些 Arrhenius 图可计算出水分吸收和溶质渗漏的表观活化能。水分进入死子叶和活子叶的表观活化能在 4—5 千卡/M 范围内 (表 1)，这些能量是水分和其他小分子物质自由扩散所必需的。死的和活的子叶溶质渗漏的活化能，在温度为 20—40℃ 时大至为 7 千卡/M。在 1—20℃ 的温度范围内，渗漏的活化能是负数，这表明，在这个温度范围内，溶质从组织中渗漏的难度随温度增高而增加。

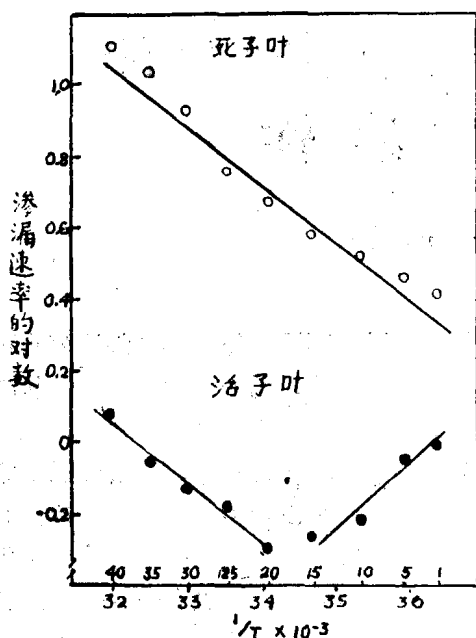


图3 活子叶和死子叶溶质渗漏速率 ( $\log \mu \Omega/\text{分钟}$ ) 的 Arrhenius 图。

表1 大豆子叶水分吸收和溶质渗漏的活化能计算值

| 组 织 | 活 化 能 |                              |
|-----|-------|------------------------------|
|     | 水分吸收  | 溶质渗漏                         |
|     | 千卡/M  |                              |
| 死子叶 | 4.7   | 7.3                          |
| 活子叶 | 5.8   | 7.6(20-40°C)<br>-8.0(1-20°C) |

## 讨 论

水分通过和溶质进入及渗出子叶的动力学分析已被用来推断冷害的实质。利用水分进入最初的线性速率以及活子叶和死子叶溶质渗漏的线性速率,可以比较细胞膜在能够改组和不能改组的条件下物质进出组织的通道。水分进入的 Arrhenius 图(图2)表明,活组织的斜率比热杀死组织稍陡一些,这种现象表明膜对水分

进入组织的过程稍有阻碍。造成冷害的温度(16°C和16°C以下)并不能引起水分进入的 Arrhenius 图发生显著的变化。相反,溶质渗漏的 Arrhenius 图(图3)表明活组织渗漏溶质的速率比死组织约低10倍。这是和利用渗漏速率作为组织中膜屏障力的指示者的观念是一致的。在25°C以下渗漏速率的斜率倒转有力地证明了:在这种较低的温度条件下,膜以不完善的方式改组并降低其屏障力。

水分进入干燥的组织导致膜改组,以及低温干扰膜改组的概念首先是由 Herrera 等人根据酵母重新水合而提出的。在最初的吸胀期间低温能损伤许多类种子的事实已被 Pollock 和 Toole 所注意。Simon 认为冷害是由于干扰了磷脂从干燥态的六面体结构转变为多水态的片状结构的过程而造成的。Van Steveninck 等根据 Arrhenius 图提出,寒冷对重新水合的酵母细胞造成损害可能和相变有关,这种相变使类脂在低温条件下的组建受到干扰。本文报导的资料表明:活子叶在温暖和寒冷两种温度下渗漏速率的 Arrhenius 图的斜率具有很大的差异,并且在这两个温度范围内表观活化能变化显著,这就用测得的数据支持了下面的观点:寒冷的温度干扰了吸水期间膜的正常改组。

水分进入脱水组织,例如干燥种子,必定引起细胞组成,特别是膜进行广泛的改组。Brown 的早期工作指出,吸水速率的增加和温度是指数关系,虽然 Shull 断言温度的效应远比 Brown 描述的要复杂。Waggoner 等曾指出,豌豆活种子和死种子吸水速率相似。水分进入几种类型种子所需活化能约在6—7千卡/M之间。由于水分进入大豆活子叶和死子叶组织的 Arrhenius 图都没有表现出显著的差异,而只是活组织较死组织活化能稍高,因

# 被离子激活的某些植物膜上ATP酶 对温度的敏感性

Edward J. McMurchie

## 引 言

冷害的初始过程是改变膜脂分子排列的假说,首次用分离的植物线粒体得到了结果。这些研究曾指出,从冷敏感植物分离出的线粒体膜呼吸酶在某种临界温度下会经历一种表观活化能( $E_a$ )的变化。而从抗冷植物分离出的膜,则观察不到这种 $E_a$ 的变化。用自旋标记或荧光探针技术检测出膜结合酶的 $E_a$ 变化,与膜脂的排列或流体性有关。然而这些技术并未能确切解释担负着酶 $E_a$ 变化的膜脂分子改变的性质。虽然,在临界的寒冷温度中,观察到了膜脂分子排列的变化,然而它与类脂相变过程的关系,或者与涉及到冷害现象的初始变化——类脂相分离的关系却并不清楚。

除了冷敏感植物和抗冷植物线粒体膜

此似乎有理由推断,水分进入种子不被重新组成的膜所明显限制。水分进入的速率可被认为主要是由水分扩散作用和组织中的高分子电解质的水合作用所决定的。

温度低于20℃时溶质从吸胀的种子中渗漏出来的量增大。Bramlage等人确定对萌发和生长速度产生冷害的吸胀温度,会使大豆胚中溶质渗漏增加,并且渗漏速率的 $Q_{10}$ 下降,其值比发生冷害的温度范围中的值更小。活的大豆子叶渗漏速率比

的热变化过程不同之外,其它细胞膜也可能经受到同样性质的变化。在这方面,从冷敏感植物分离的,具有光合活性的某些叶绿体膜的 $E_a$ 变化曾有过报导。虽然已观察到某些植物组织在零上低温时离子透性有变化,但冷敏感植物和抗冷植物的原生质膜热变化过程的差异却没有报导过。这种离子透性的变化,可能反映出受离子激活的质膜ATP酶温度敏感性的变化,而这些ATP酶涉及着离子的运转过程。因此,温度诱导质膜和与之相结合的酶发生变化,可能在寒冷敏感性上起着作用。

在本项研究中,利用从冷敏感的蕃茄和黄瓜,以及从抗冷的花椰菜组织分离出来,并去除了线粒体膜的制备物,检测受离子激活的ATP酶对温度的敏感性。观察到受离子激活的ATP酶 $E_a$ 的变化,这种变化可以说明质膜所遭受的变化,质膜的变化与观察到的线粒体膜的变化是一样

死的低10倍(图3)。可能是细胞膜对溶质渗漏极度限制的结果。温度低于20℃时,Arrhenius图中的渗漏速率增高。这可被解释为连续降温对正在改组的膜造成的损伤增加之故,当温度降至10℃时,活组织的渗漏速率接近死组织渗漏的程度。

自译: Plant physiol. Vol. 65,

(1980), 1096—1098

译者: 郝建军

校者: 何若韞

的。对于膜中可能存在着与酶  $E_a$  变化有联系的相变,作为一种方法,对膜和膜脂的提取物用差示扫描量热法进行检测。

## 材料和方法

### A、膜的分离

蕃茄的绿色果实 (*Lycopersicon esculentum* Var Red china)、花椰菜的小花 (*Brassica oleraceae*) 和黄瓜果实 (*Cucumis Sativas*) 都取自商品。蕃茄和黄瓜只利用其果皮组织。组织在市售的汁液抽取器中匀浆,用冰冷却的介质,内含: 300mM 蔗糖、0.5% (w/v) 聚乙烯吡咯烷酮、1 mg/ml 牛血清蛋白、3mM EGTA、25mM Tris、2mM 1(2-羟乙基)-1-哌嗪乙基磺酸 (HEPES)、4mM 二硫苏糖醇,全部均用 HCl 调至 pH7.4,所用溶液与组织之比为 2:1 (v/w)。抽提时,匀浆用 NaOH 保持在 pH7.2。匀浆用 4 层纱布过滤,并用 13,000g 离心 15 分钟,然后将上清液通过 4 层纱布滤出,用 135,000g 离心 30 分钟。球状物在 TM 缓冲液中 (25mM Tris HCl、1.5mM  $MgSO_4$  pH7.5) 洗两次,每次重新悬浮,并于 135,000g 离心 30 分钟。最终的球状物重新悬浮在 TM 缓冲液中,使浓度为每毫升 3—6 mg 蛋白质。该材料立即用于 ATP 酶的分析。

### B、分析:

1、测量 ATP 酶活性是在 1.0ml 最终体积内含有 25mM Tris HCl、1.5mM  $MgSO_4$  pH8.0 ( $Mg^{2+}$  ATP 酶) 的缓冲液或在校正到 pH8.0 的含有 40mM KCl (受  $K^+$  激活的  $Mg^{2+}$  ATP 酶) 相同的缓冲液中进行。反应液含有 300—600  $\mu$ g 膜蛋白。反应在加入 Tris ATP 使最终浓度为 3.0mM 时开始。任何一批分析物选定的反应时间都应该使其在分析进程中底物

转化为无机磷的量不超过 20%。加入 50  $\mu$ l 70% (v/v) 过氯酸终止反应,应用 Rosenthal 和 Matheson 方法测定无机磷。 $Mg^{2+}$  ATP 酶和受  $K^+$  激活的  $Mg^{2+}$  ATP 酶对温度敏感性的测定,是采用一种能够维持 14 个温度梯度的摇动铝板来进行,试验期间能控制  $\pm 0.2^\circ C$  的精确度。两种酶的活性用成对分析同时测定。分析物来自同一膜制备物,含有相同的膜蛋白量。ATP 酶活性的最终速度用温度效应的空白值和无酶的 ATP 水解速度校正过。

2、用 Lowry 等人的方法测定膜蛋白。

### C、类脂提取

将悬浮在 TM 缓冲液中的膜制备物,用 21 倍容积含有 1 mg 丁基羟甲苯作为抗氧化剂的三氯甲烷: 甲醇 (2:1) 抽提过夜。然后将抽提物逆分配于 0.2 倍容积的 0.73% (w/v) 的 NaCl 中,除去水层。类脂抽提物干燥后,置入三氯甲烷中,于  $-20^\circ C$  下储存。

### D、电子显微镜检查

将 TM 缓冲液中的膜制备物离心 (135,000g, 30 分钟), 并重新悬浮于含有 4% (v/v) 戊二醛的 50mM pH7.5 的磷酸钾缓冲液中。30 分钟后,将膜如上法离心,用标准程序制备样品切片。

### E、差示扫描量热法

差示扫描量热法是用 Perkin Elmer DSC—2 量热仪来完成的。将 TM 缓冲液中的膜制备物于 135,000g 离心 30 分钟,并将球状制品装入一个 20  $\mu$ l 的小金皿中,然后密封。将三氯甲烷中的膜脂样品干燥,然后用涡旋的办法,并随之用为时 2 分钟的音震使其悬浮于 pH8.0, 25mM 的 Tris-HCl、10mM 的 EDTA 中。类脂悬浮液按上述膜样品那样装皿,进行离心和试验,完毕后测定样品的干重。用一个操

作灵敏度为 0.2毫卡/秒的仪表在10℃/分钟的速率下进行扫描。从吸热和放热波峰的面积来测定相变热函，标准为钢。

## 结 果

### A、被离子激活的ATP酶的活力

用分离膜的程序，能使所有三种组织的膜制备物都产生膜囊。这些膜制备物中含有依赖于 $Mg^{2+}$ 的ATP酶活性，此活性能进一步被一价的阳离子激活。ATP酶的活性几乎能全部被 $Ag^+$ 离子抑制，用二硫苏糖醇可保护不受这种抑制。所有这些性质都与已知的，质膜ATP酶的性质是一致的。和含有原生质膜一样，膜制备物也含有来自液胞和 内质网 碎片。作为 线粒体ATP酶水平的一种测量，膜制备物的ATP酶总活力，当有50  $\mu g/ml$ 寡霉素存在时，受到的抑制不超过15%（结果未列出）。

蕃茄的  $Mg^{2+}$ ATP酶和受  $K^+$ 激活的  $Mg^{2+}$ ATP酶活性的 Arrhenius图示于图1中。两个图都是在大约20℃时表现出不连续性，在20℃以下不呈直线关系。然而两个图都未能清晰地表明10℃左右的临界温度，这一温度与观察到的蕃茄线粒体的呼吸活性的临界温度一致。

黄瓜  $Mg^{2+}$ ATP酶与受  $K^+$ 激活的  $Mg^{2+}$ ATP酶活力的 Arrhenius图，都是在大约10℃时表现出不连续性（图2）。这个温度与在黄瓜线粒体中观察到的，与膜有联系的呼吸活性变化温度是一致的。在受 $K^+$ 激活的ATP酶的 Arrhenius图中，这种不连续性不太明显，这可能说明当分析过程中有 $K^+$ 存在时，此酶对低温的敏感性较低。

以前曾谈到过，从抗冷植物分离的线粒体，与其膜有联系的呼吸活性，在从0°到25℃的温度范围内， $E_a$ 不会产生突然的变化。但是，从抗冷的花椰菜分离的，

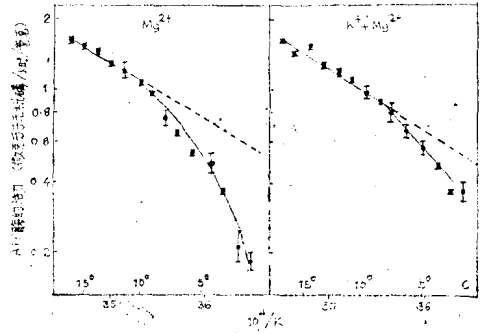


图1 从蕃茄的绿色果实分离出的与膜结合的 $Mg^{2+}$ ATP酶活力和受 $K^+$ 激活的 $Mg^{2+}$ ATP酶活力的 Arrhenius图

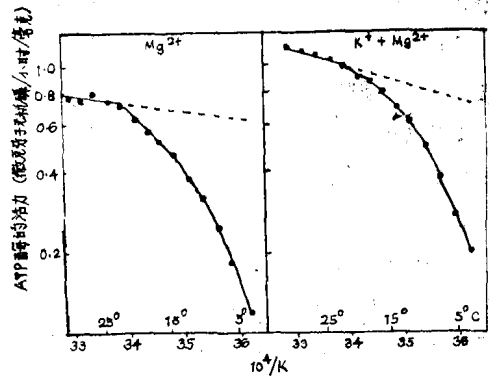


图2 与黄瓜分离的膜相联系的  $Mg^{2+}$ ATP酶和受  $K^+$ 激活的  $Mg^{2+}$ ATP酶活性的Arrhenius图

（误差线表示用成对分析ATP酶所得的界限）

受离子激活的膜ATP酶，当在3℃至28℃的范围分析时，其活性就呈现出线性的Arrhenius动力学，也就是不呈现恒定的 $E_a$ (图3)。 $Mg^{2+}$ ATP酶的 Arrhenius图是三相的，在8℃和15℃发生了断折。与之相对比，受 $K^+$ 激活的 $Mg^{2+}$ ATP酶的活力，只在15℃左右观察到一个断折。在所有的温度下，被 $K^+$ 激活的 $Mg^{2+}$ ATP酶的敏感性都远远地超过了在蕃茄和黄瓜中观察到的ATP酶的敏感性。此外，在低