

低温胁迫下凤眼莲叶片的适应

——脱落酸和可溶性蛋白质含量升高

彭艳华 刘成运 卢大炎 叶婉成

(中国科学院武汉植物研究所, 武汉 430074)

提 要 本文报道低温胁迫下凤眼莲叶片脱落酸 (ABA)、可溶性蛋白质和水势的测定结果。低温胁迫时脱落酸和可溶性蛋白质含量远高于对照, (前者含量最高可达对照的4倍, 后者可达到对照的2.75倍), 而且脱落酸和蛋白质含量随温度降低而升高。蛋白质的生物合成抑制剂亚胺环己酮证明, 可溶性蛋白质含量升高, 原因是有一部分是新合成的。在各种低温处理下获得了几乎相同于对照的叶片水势。我们推测: 低温胁迫下, 脱落酸水平的相应变化不是由于低温诱导水分胁迫所致, 而是低温胁迫本身诱导。

关键词 凤眼莲; 低温胁迫; 脱落酸; 水势; 可溶性蛋白质

在调节植物生长发育的物质中, ABA是一重要激素, 它参与植物生理过程的许多方面^[10]。在几种胁迫条件下, ABA水平增高, 从而增强植物对其胁迫的适应能力。在整体水平和离体培养中 ABA能提高耐寒力, 其物质基础是新蛋白质^[8]。寒冷条件下, ABA含量的增值到底由于低温本身引起, 还是水势变化所致? 目前尚不清楚^[5,7]。

凤眼莲 (*Eichhornia crassipes* Mart. Solms) 是高等水生植物, 可被用作净化污水, 但低温季节生物产量太低, 而高温季节生物产量又过高, 影响其实际应用。我们研究了凤眼莲的一些生理生化特性, 以便有效地调节其生长。本项研究的目的在于弄明低温胁迫下水势、脱落酸、可溶性蛋白质三者的关系。

材 料 和 方 法

取样前凤眼莲生长在我所水生区, 白天25—28℃, 夜间15—18℃。选择具有12片叶子的植株为实验对象。把它们转移到装有一定量培养液的容器里并置于培养间 (白天光照8小时, 4000lx, 恒温24—26℃) 2天, 除对照 (仍置培养间) 外其它植株分别置于2, 4, 8℃下恒温光照 (4000lx) 48小时, 同时在部分对照及处理植株培养液中分别加入10, 100, 200μm ABA和亚胺环己酮 (7×10^{-5} mol/L), 分别在0, 4, 24, 48小时取不同叶龄的叶片。

ABA提取、分离、初纯化按丁静等人方法^[11], 分析在本所技术室完成。分析方法

参考 Lung Ming Tsang 方法^[6], ABA 标准品为 Fluka 公司生产。标准样浓度 $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。高压液相色谱仪为 HITACHI 635A, 检测器为: SPD-1 可变波长紫外检测器。测定条件为: 柱材料 Zorbax ODS, 流动相是冰醋酸-甲醇-水溶液(1:78:22), 流速 $0.6\text{ml}/\text{min}$, 压力 $80\text{kg}/\text{cm}^2$, 检测波长 254nm , 灵敏度范围 16×10^{-2} 。

蛋白质分析取材量 5 克, 分析方法参照 Robert F. Schleif 等^[9]描述的 Lowry 法, 牛血清蛋白为标准蛋白质, 721 分光光度计 560nm 处测定各样品 OD 值, 以上实验重复两次。

叶片水势用毛细管法测定^[2]。

结果和讨论

1. 低温胁迫下凤眼莲叶片脱落酸含量的变化

高压液相色谱测定凤眼莲叶片脱落酸含量的图谱如下, ABA 出峰时间 4.3 分。

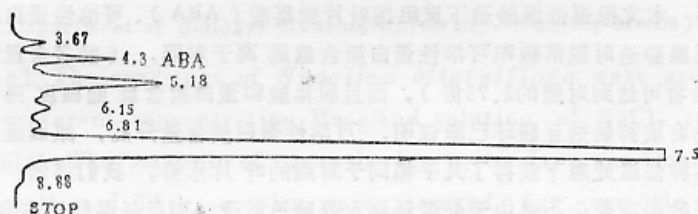


图 1 ABA 的液相色谱

Fig 1 ABA High-pressure Liquid Chromatogram

图 1 展示了 ABA 的测定结果, 与对照($24-26^{\circ}\text{C}$)相比, 低温处理($2, 4$ 和 8°C)的 ABA 含量高, 同是低温处理, 又以 2°C 处理后 ABA 含量最高, 4°C 次之。在同一低温处理下, $0-24$ 小时内 ABA 含量有明显上升趋势, 但随后含量下降。详细情况见表 1。

表 1 不同温度 and 不同时间条件下凤眼莲叶片 ABA 含量

Table 1 ABA content of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* Mart. Solms) leaves after exposure to different temperatures

时间(小时) Time(h)	ABA 含量($\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{FW}$) ABA content($\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{FW}$)			
	$24-26^{\circ}\text{C}$	2°C	4°C	8°C
0	4.00	4.02	4.01	4.02
4	4.01	10.55	9.50	8.85
24	4.02	16.05	13.25	12.14
48	4.03	14.31	12.12	11.52
72	4.01	12.32	10.32	8.55

2. 低温胁迫下凤眼莲叶片可溶性蛋白质水平的变化

低温胁迫下凤眼莲叶片可溶性蛋白质水平的变化与脱落酸水平变化具有相似性。低

温处理的含量均高于对照, 在低温处理中 2°C 时可溶性蛋白质含量最高, 达到对照的 2.75 倍。同一温度处理时不同时间的蛋白质含量变化也与 ABA 水平变化一致 (表 2)。

表 2 不同温度条件下凤眼莲叶片可溶性蛋白质的变化

Table 2 Changes of soluble protein contents in water hyacinth after exposure to different temperatures

时间(小时) Time(h)	可溶性蛋白质含量 (mg/g·FW) Soluble protein contents(mg/g·FW)			
	24—26 $^{\circ}\text{C}$	2 $^{\circ}\text{C}$	4 $^{\circ}\text{C}$	8 $^{\circ}\text{C}$
0	2.1 $\pm$ 0.01a	2.1 $\pm$ 0.02a	2.1 $\pm$ 0.01a	2.1 $\pm$ 0.02a
4	2.1 $\pm$ 0.01a	3.35 $\pm$ 0.02b	2.8 $\pm$ 0.01b	2.61 $\pm$ 0.02b
24	2.1 $\pm$ 0.02a	5.78 $\pm$ 0.02c	4.2 $\pm$ 0.02c	3.78 $\pm$ 0.01c
48	2.1 $\pm$ 0.01a	4.31 $\pm$ 0.01d	3.23 $\pm$ 0.02d	2.95 $\pm$ 0.01d
72	2.1 $\pm$ 0.02a	3.35 $\pm$ 0.02b	2.85 $\pm$ 0.02b	2.65 $\pm$ 0.01b

同一栏中, 字母相同的数据 (平均数 $\pm$ 误差) 间无显著性差异 ($P < 0.05$)。

Data(mean $\pm$ SE) sharing the same letter in the same column are not significantly different ($P < 0.05$)

3. 低温胁迫下凤眼莲叶片的水势

我们用 B. 斯拉维克所描述的毛细管法 (误差在 $\pm 1\text{bar}$ 范围内) 测定水势, 在不同温度、不同时间里所测得的水势并无显著差异 (表 3)。

表 3 不同温度、不同时间条件下凤眼莲叶片的水势

Table 3 Water potential of water hyacinth leaves after exposure to different temperature

时间(小时) Time(h)	水势 (bar) Water potential(bar)			
	24—26 $^{\circ}\text{C}$	2 $^{\circ}\text{C}$	4 $^{\circ}\text{C}$	8 $^{\circ}\text{C}$
0	-15.9 $\pm$ 0.04	-15.9 $\pm$ 0.04	-15.9 $\pm$ 0.04	-15.9 $\pm$ 0.04
4	-16.4 $\pm$ 0.05	-15.9 $\pm$ 0.04	-16.4 $\pm$ 0.05	-15.9 $\pm$ 0.05
24	-15.9 $\pm$ 0.04	-15.9 $\pm$ 0.04	-16.4 $\pm$ 0.04	-16.4 $\pm$ 0.04
48	-16.4 $\pm$ 0.05	-16.4 $\pm$ 0.05	-15.9 $\pm$ 0.04	-15.9 $\pm$ 0.04
72	-15.9 $\pm$ 0.05	-15.9 $\pm$ 0.05	-15.9 $\pm$ 0.04	-16.4 $\pm$ 0.05

4. 低温胁迫下亚胺环己酮对凤眼莲叶片可溶性蛋白质含量的影响

低温胁迫处理的同时, 在培养液中加入 $7 \times 10^{-5}\text{M}$ 亚胺环己酮, 结果发现, 对照样品和 2°C 低温处理的样品其蛋白质含量均比未加亚胺环己酮时低 (表 4), 而且从蛋白质合成抑制率看, 低温处理显著地高于对照 ($24-26^{\circ}\text{C}$)。

表 4 低温胁迫下(2℃)亚胺环己酮对凤眼莲叶片可溶性蛋白质含量的影响
Table 4 Effect of cycloheximide on protein content of water hyacinth leaves after exposure to different temperature

时间(小时) Time(h)	蛋白质含量(mg/g·FW)				蛋白质合成的抑制率(%)	
	Protein content(mg/g·FW)				Inhibition of protein synthesis(%)	
	24—26℃		2℃		NCHX-CHX ^①	SCHX*-CHX* ^②
	NCHX (control)	CHX	NCHX* (control)	CHX*	CHX (%)	CHX* (%)
0	2.1	2.1	2.1	2.10	0	0
4	2.1	1.95	3.35	3.01	7.10	10.10
24	1.97	5.78	3.98	3.98	10.45	31.20
48	2.2	1.99	4.32	3.65	5.20	15.50
72	2.1	2.12	3.35	3.10	3.64	7.50

NCHX和NCHX*表示培养液中未加亚胺环己酮, CHX和CHX*表示培养液中有亚胺环己酮。①和②两组数据间有显著差异(P>0.05)。

NCHX and NCHX*: Culture liquid without cycloheximide.

CHX and CHX*: Culture liquid with cycloheximide.

There is significant difference between data group ① and ②.

5. 讨论

在低温胁迫下, 蕃茄^[5]、玉米、柑等植物^[4]的内源 ABA 水平有大幅度升高。对这一现象的解释有两个不同的观点。有人认为, 低温本身导致 ABA 含量增加, 有的则认为低温造成水分胁迫, 再导致 ABA 水平变化。我们的结果与 Wightman, Jaleh Daie 等人^[11]研究结果相似, 在低温胁迫下凤眼莲叶片内源 ABA 含量增高, 但各温度处理下的叶片水势几乎相同, 因此我们认为低温胁迫本身诱导内源 ABA 水平升高。

实验结果还显示, ABA 和可溶性蛋白质水平变化规律具有相似性。在对照和低温(2℃)处理时分别加入亚胺环己酮, 蛋白质含量均有所下降, 而且 2℃时蛋白质合成的抑制率显著高于对照(24—26℃)。Robert 等人^[8]曾经提出, 在低胁迫环境中植物为了适应合成了新的蛋白质。我们推测: 低温胁迫下可溶性蛋白质含量高, 原因是有了新的蛋白质合成(表 4), 而这种合成受到高水平的内源 ABA 刺激(图 1), 这些新合成的蛋白质在凤眼莲的耐寒冷和对低温的敏感性上起重要作用。

参 考 文 献

- 1 丁静等. 植物生理学通讯, 1979(2): 27—39
- 2 B. 斯拉维克. 植物与水分关系研究法, 科学出版社, 1986: 39—40
- 3 Chen S C H et al. *Plant Physiology*, 1983; 73: 71—75
- 4 Chen THH, GUSTA L V. *Plant Physiology*, 1983; 73: 11—13
- 5 Danj, Campbell WG. *Plant Physiology*, 1981; 67: 26
- 6 Lung Ming Tsang et al. *Journal of Chromatography*, 1984; 287: 121—127
- 7 Luo Zheng-rong, *Plant Physiology Communications*, 1989; 3: 1—5
- 8 Robert, A Creelman. *Annual Review of Plant Physiology*, 1980; 39: 439—473
- 9 Robert F, Schleig et al. *Practical Methods in Molecular Biology* Springer-Verlag, Berlin, 1981; 74—75
- 10 Walton D C. *Annual Review of Plant Physiology*, 1980; 30: 453—459
- 11 Wightman R et al(ed). *Plant Regulation and World Agriculture* Plenum, 1977: 327

RESPONSE OF WATER HYACINTH LEAVES TO LOW TEMPERATURE STRESS

—INCREASE IN ABSCISIC ACID AND SOLUBLE PROTEIN CONCENTRATIONS

Peng Yanhua, Liu Chengyun, Lu Dayan, Ye Wancheng

(Wuhan Institute of Botany, Academia Sinica, Wuhan 430074)

Abstract To investigate the abscisic acid(ABA) production, soluble protein level and water potential of water hyacinth *Eichhornia crassipes* (Mart. Solms) leaves in response to diurnal low temperature stress, plants with 12 pieces of leaves were exposed to constant temperatures of 2, 4 and 8°C for 72 hours and leaves were sampled at 0, 4, 24, 48 and 72 hours. ABA quantities were measured by using HPLC techniques. Lowry method was used to measure soluble and capillary method was used to measure water potential. Various low temperatures significantly increased ABA and soluble protein levels compared with control temperature (24—26°C), ABA and soluble protein increased with temperature decreasing. Cycloheximide was found to inhibit protein synthesis in the leaves at 2°C more than at 24—26°C. Since normal water potentials were obtained in plants of all temperatures, the observed ABA response was not due to temperature-induced water stress. Temperature stress induced the plant to produce high level of ABA.

Key words *Eichhornia crassipes*; Low temperature stress; Abscisic acid(ABA); Water potential, Soluble protein