

## 冷锻炼和 ABA 诱导水稻幼苗提高抗冷性 期间膜保护系统的变化

曾韶西 王以柔 李美茹 刘鸿先

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

### 摘要

冷锻炼和 ABA 处理提高了水稻幼苗叶绿体 SOD 和 GR 活性及叶片抗氧化剂 AsA 和 GSH 的含量, 降低了膜电解质泄漏, 增强了幼苗的抗冷性。等电聚焦电泳分析表明, 冷锻炼和 ABA 处理苗叶绿体 SOD 三条同工酶带和 GR1、2、3 和 6 同工酶带都有不同程度的增强。低温胁迫后, 处理和未处理苗的 SOD、GR 活性和 AsA、GSH 含量均有所下降, 但处理苗的水平仍维持在未处理苗之上。亚胺环己酮可抑制因冷锻炼和 ABA 诱导增加的 SOD 和 GR 活性, 并使叶片电解质泄漏增大。本试验结果表明冷锻炼或 ABA 诱导水稻幼苗抗冷性提高时, 对防御活性氧的保护系统有类似的影响。

**关键词:** 水稻幼苗; 冷锻炼; ABA 处理; 膜保护系统

通过冷锻炼或常温下外源供应 ABA, 可提高植物的抗寒力已为实验所证实<sup>[7,10-12,15,21]</sup>。但有关其机理至今还不很清楚。纵观近年来兴起的自由基生物学研究发现, 各种逆境对作物生长发育的伤害大多与作物体内自由基代谢平衡的改变有关<sup>[1,4,9,13,16,18,20]</sup>。SOD 与植物多种抗逆性相联系<sup>[1,2,9,17]</sup>。为了探讨冷锻炼和 ABA 提高抗寒力机理, 本文研究了冷锻炼和 ABA 诱导水稻幼苗提高抗冷性时及低温胁迫后其膜保护系统的变化, 进一步阐明抗冷性变化与膜保护系统变化有关。

### 材料和方法

水稻 (*Oryza sativa*) 种子催芽后播于放有蛭石的培养皿中, 在 28°C、50  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  光强下生长 8 d。

**冷锻炼** 把生长 8 d 的幼苗转移到 15°C、75  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  光强下处理 3 d。

**外源 ABA 处理** 在原培养光、温条件下于测定前和低温胁迫前 48h 用  $1.5 \times 10^{-5} \text{mol/L}$  ABA 溶液对幼苗进行浸根处理。

以 28°C、50  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  下生长未加任何处理幼苗为对照。

**低温胁迫处理** 把分别经冷锻炼、ABA 处理及未处理 (对照) 苗同时置于 3°C、210  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  光强下 2d。

叶绿体提取、SOD 活性和电解质泄漏测定按前文的方法<sup>[2]</sup>。

**GR 活性测定** 按林植芳等的方法<sup>[5]</sup>。

国家自然科学基金资助项目。

缩写 SOD: 超氧化物歧化酶; GR: 谷胱甘肽还原酶; AsA: 抗坏血酸; GSH: 谷胱甘肽  
1993-08-16 收稿; 1993-10-07 修回

AsA 和 GSH 含量测定 按前文方法<sup>[6]</sup>。

等电聚焦凝胶电泳及 SOD 活性染色 参照武宝玟方法<sup>[6]</sup>稍加修改。10%凝胶浓度, 2.5%两性电解质 (pH3.5—10 和 pH3.5—5.5, 比例为 1:4。电泳缓冲液: 阴极为 0.02mol/L NaOH 溶液, 阳极为 0.01mol/L H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 溶液。电泳时先在 450V 下预聚焦 1h 后, 在 600V 下聚焦 3h。为便于比较不同处理间同工酶带的相对活性, 各处理均以等量蛋白质点样。

GR 酶活性染色 按 Guy 等方法<sup>[10]</sup>进行。

## 试验结果

### 一、冷锻炼和 ABA 诱导水稻幼苗提高抗冷性期间膜保护系统的变化

1. 保护酶 SOD 和 GR 的变化 从表 1 可见无论是冷锻炼或 ABA 诱导的水稻幼苗其叶绿体 SOD 和 GR 活性都高于未处理苗。冷锻炼苗的这两个酶活性分别比未处理苗高 18.42% 和 23.16%, ABA 处理苗分别高 11.63% 和 14.27%。表明水稻幼苗经冷锻炼和 ABA 预处理均可提高幼苗叶绿体 SOD 和 GR 的活性。

把冷锻炼、ABA 处理和未处理苗同时放在 3℃、210 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  光强下 2d, 三种不同处理的幼苗其 SOD 和 GR 活性均明显下降, 但冷锻炼和 ABA 处理苗的下降程度均小于未处理苗, 与低温胁迫前相比, 未处理、冷锻炼和 ABA 处理苗 SOD 活性分别下降了 34.09%、29.70% 和 24.71%。GR 活性分别下降了 40.11%、37.04% 和 37.57% (表 1), 表明冷锻炼和 ABA 处理的幼苗在低温胁迫下仍可保持较高的保护酶的活性。

冷锻炼和 ABA 诱导水稻幼苗抗冷性提高时也影响了 SOD 和 GR 的同工酶谱。等电聚焦电泳分析发现, 在本试验条件下, 三种不同处理的 SOD 同工酶均为三条谱带 (PI 在 4.6—5.6 之间)。GR 为 6 条同工酶谱带 (PI 在 5—6.8 之间)。水稻幼苗经冷锻炼和 ABA 处理后与未处理苗相比, SOD 3 条谱带均有不同程度的增强, 与表 1 活性测定结果一致。GR 酶谱带除第 4、5 酶带稍有减弱外, 1、2、3 和 6 酶带亦有明显的增强。冷锻炼和 ABA 处理之间各带增强的强度略有差异 (图 1)。

表 1 冷锻炼和 ABA 处理对水稻幼苗叶绿体 SOD 和 GR 活性的影响

Table 1 Effects of cold hardening and ABA treatment on the activities of SOD and GR of the chloroplast in rice seedlings

处 理 Treatment	SOD 活 性 SOD activity		GR 活 性 GR activity	
	Units mg <sup>-1</sup> protein	% change	$\mu\text{mol mg}^{-1}$ protein	% change
低温胁迫前 Before chilling stress	未 处 理 Untreated	10.15	7.08	
	冷 锻 炼 Cold hardened	12.02	8.72	
	ABA	11.33	8.09	
低温胁迫后 After chilling stress	未 处 理 Untreated	6.69	4.24	-40.11
	冷 锻 炼 Cold hardened	8.45	5.49	-37.04
	ABA	8.53	5.05	-37.57

GR: Glutathione reductase; SOD: Superoxide dismutase;

ABA: Abscisic acid

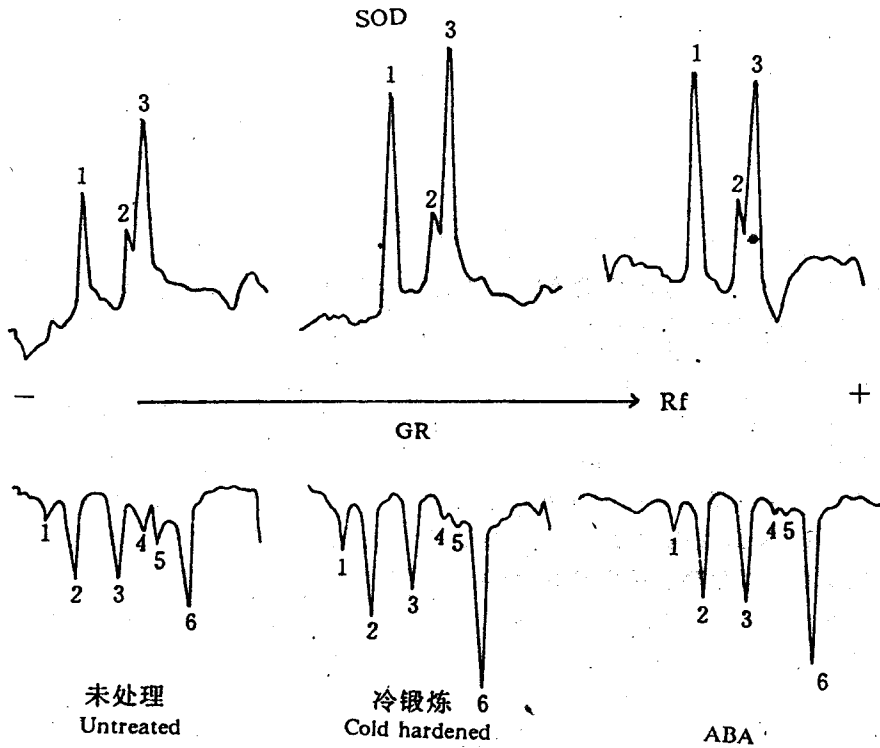


图 1 在冷锻炼和 ABA 诱导抗冷性提高期间水稻幼苗 SOD 和 GR 同工酶谱的变化

Fig. 1 Changes of zymograms of SOD and GR isozyme in rice seedlings during the enhancement of chilling resistance induced by cold hardening and ABA treatment

Abbreviations—see tab. 1

2. 抗氧化剂 AsA 和 GSH 含量的变化 水稻幼苗经冷锻炼和 ABA 处理,无论在处理后或低温胁迫后,叶片抗氧化剂 AsA 和 GSH 含量均高于未处理苗,其中 AsA 含量的变化尤为显著,冷锻炼和 ABA 处理后,两幼苗 AsA 含量分别比未处理苗提高了 57.30% 和 26.72%。低温胁迫后,三种处理幼苗叶片 AsA 和 GSH 含量都有所下降,但冷锻炼和 ABA 处理苗的下降程度小于未处理苗,其含量仍高于未处理苗(图 2),表明冷锻炼和 ABA 处理均可提高或维持幼苗的抗氧化剂水平。

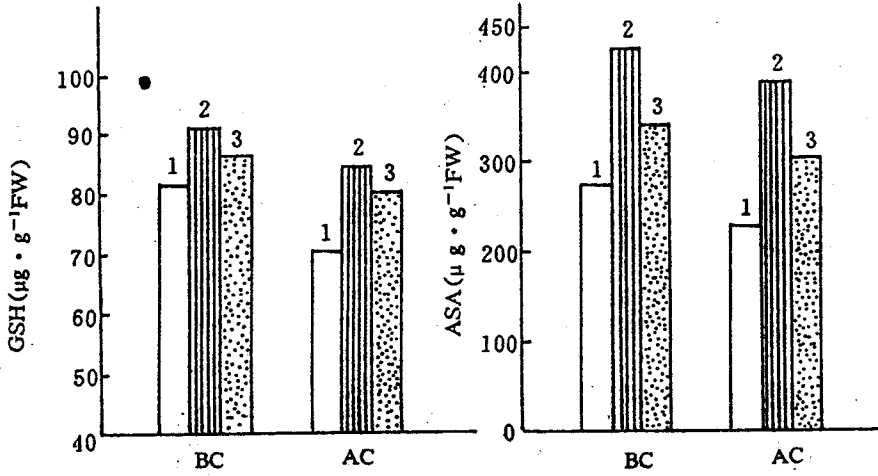


图 2 在冷锻炼和 ABA 处理诱导抗冷性提高期间和低温胁迫后水稻幼苗抗氧化剂 GSH 和 AsA 含量的变化

Fig. 2 Changes of antioxidant GSH and AsA contents in rice seedlings during the enhancement of

chilling resistance induced by cold hardening and ABA treatment and after chilling stress

BC; Before chilling stress; AC; After chilling stress; AsA; Ascorbic acid; GSH; Glutathione

1. Untreated; 2. Cold hardened; 3. ABA

## 二、亚胺环己酮 (CHM) 对冷锻炼和 ABA 处理苗 SOD 和 GR 活性的影响

幼苗在冷锻炼和 ABA 处理前 1d 加入 10 ppm 亚胺环己酮, 由冷锻炼和 ABA 诱导增加的 SOD 和 GR 活性受到明显的抑制 (图 3), 表明冷锻炼和 ABA 处理幼苗中 SOD 和 GR 活性水平的提高, 主要是由于 SOD 和 GR 蛋白新合成的增加, 而不是对已存在的酶蛋白的活化。

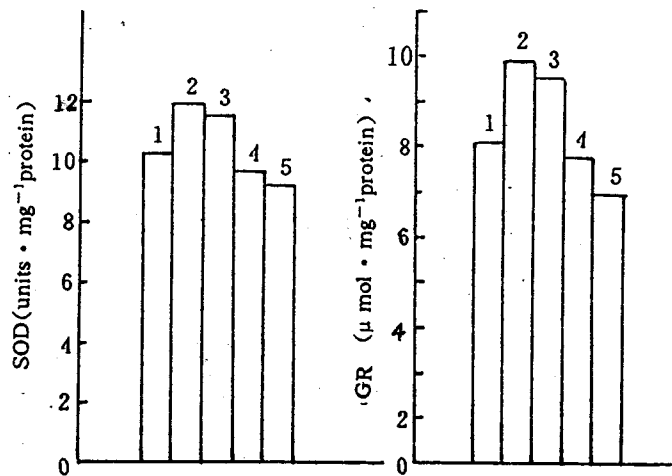


图 3 亚胺环己酮对冷锻炼和 ABA 处理的水稻幼苗 SOD 和 GR 活性的影响

Fig. 3 Effects of cycloheximide (CHM) on the activities of SOD and GR in cold hardened and ABA treated seedlings

1. Untreated; 2. Cold hardened; 3. ABA; 4. ABA + CHM; 5. Hardened + CHM

### 三、冷锻炼和 ABA 处理增强水稻幼苗细胞膜稳定性与 SOD 和 GR 活性的关系

冷锻炼、ABA 处理和未处理苗在低温胁迫 (1°C、2d) 后立即转移到 28°C 下恢复 1d, 两处理苗叶片电解质泄漏明显低于未处理苗。未处理苗电解质泄漏分别比冷锻炼和 ABA 处理苗高 76.48% 和 56.23%。说明冷锻炼和外源 ABA 处理明显增强了细胞膜的稳定性, 从而提高了幼苗的抗冷性。这与其他研究者的结果是一致的<sup>(7,10-12,15,21)</sup>。但当幼苗在冷锻炼和 ABA 处理前加入亚胺环己酮抑制 SOD 和 GR 等酶蛋白合成时, 水稻幼苗电解质泄漏显著加剧 (图 4), 表明冷锻炼和 ABA 处理能维持细胞膜结构与功能的稳定性, 提高幼苗的抗冷性是与膜保护酶活性的提高有关。

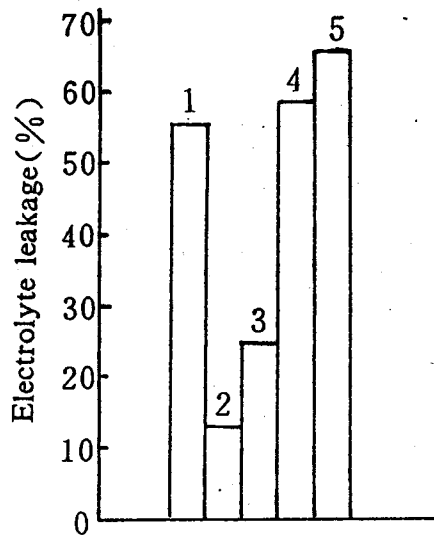


图 4 亚胺环己酮对冷锻炼和 ABA 处理水稻幼苗电解质泄漏的影响

Fig. 4 Effect of cycloheximide (CHM) on the electrolyte leakage in rice seedlings of cold hardening and ABA treatment

1. Untreated; 2. Cold hardened; 3. ABA; 4. Cold hardened + CHM; 5. ABA + CHM

## 讨 论

植物对逆境抵抗能力的变化与其各生理生化过程的一系列适应性变化有关。由于非伤害低温或 ABA 的作用, 使细胞代谢活动发生向有利于适应低温的方向改组。本研究中可以看到经冷锻炼和 ABA 处理, 使水稻幼苗与抗冷性发展有关的防御活性氧保护系统发生明显的适应性变化——显著增强了保护系统的能力, 不论低温胁迫前或后, 两处理苗叶片抗氧化剂 AsA 和 GSH 含量及 SOD 和 GR 活性都明显高于未处理苗 (图 2、表 1), 且抗冷性的增加 (电解质泄漏减少) 平行伴随着 SOD 和 GR 活性的增加 (图 3、4)。

每种酶系统的同工酶组成均是遗传单位——基因功能活性的产物。许多报道指出一级结构不同的同工酶可被低温促进或抑制<sup>(3)</sup>。我们用等电聚焦电泳分析表明, 冷锻炼和 ABA 处理的水稻幼苗叶绿体防御活性氧的保护酶 SOD 和 GR 同工酶, 除个别谱带稍有减弱外, 其余大部份谱带均比未处理苗显著增强 (图 1)。这就是说在低温和 ABA 的作用下, 使 SOD 和 GR 一

些同工酶受到促进或抑制,由于细胞内膜保护系统代谢的适应性变化,从而维持了细胞膜的稳定性,提高了幼苗的抗冷性。从以上结果可以看出。在诱导抗冷性提高期间,冷锻炼和 ABA 处理对细胞保护系统似乎有类似的影响,两者均通过提高防御活性氧的酶促和非酶促保护系统能力去增强幼苗的抗冷性,但两者的调节途径是否相关,抑或各具独立的控制机制,尚待进一步研究。

我们多年对低温伤害机理的研究认为,低温伤害原因之一是在低温胁迫下,细胞防御系统能力下降,自由基代谢平衡失调,使膜脂过氧化作用加剧造成的<sup>(2,9,9)</sup>。本研究结果又从另一个方面证实,细胞膜结构与功能的稳定性和植物抗冷性的高低与细胞防御自由基保护系统能力的高低有着密切的关系。

### 参 考 文 献

- 1 王建华,刘鸿先,徐同.超氧化物歧化酶(SOD)在植物逆境和衰老生理中的作用.植物生理学通讯,1989,(1):1—7
- 2 刘鸿先,曾韶西,王以柔等.低温对不同耐寒力的黄瓜子叶细胞器超氧化物歧化酶的影响.植物学报,1985;11(1):43—57
- 3 刘鸿先,曾韶西,李平.植物抗寒性与酶系统的多态性的关系.植物生理学通讯,1981;(6):6—11
- 4 刘愚,李振国,魏佩琦等.植物对二氧化硫的反应和抗性机理研究 IV. HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>对麦苗切断的伤害与乙烷产生的关系.植物生理学报,1980;6(3):307—314
- 5 林植芳,李双顺,林桂珠.ABA加速离体叶片衰老过程中一些内源活性氧清除剂的变化.中国科学院华南植物研究所集刊.北京:科学出版社,1989;4:161—187
- 6 武宝珩.野生种花生叶片内超氧化物歧化酶及其抗 Paraquat 特性.植物生理学报,1990;16(2):147—152
- 7 郭确,潘瑞炽.ABA对水稻幼苗抗冷性的影响.植物生理学报,1984;10(4):296—303
- 8 曾韶西,王以柔,刘鸿先.低温胁迫对水稻幼苗抗坏血酸含量的影响.植物生理学报,1987;13(4):365—370
- 9 曾韶西,王以柔.水稻幼苗的低温伤害与膜脂过氧化.植物学报,1987;29(5):506—512
- 10 Bornman H C, Janson E. *Nicotiana tabacum* callus studies X. ABA increases resistance to cold damage. *Physiol Plant*, 1980; 48: 491—493.
- 11 Chen H H, Li P H, Brenner M L. Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation. *Plant Physiol*, 1983; 71: 362—365.
- 12 Chen H H, Li P H. Potato cold acclimation. In Li P H, Sakai (eds); "Plant Cold Hardiness and Freezing stress". New York Academic Press, 1982; Vol 2, pp5—22
- 13 Dhindsa R, Matowe W. Drought tolerance in two mosses; correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. *J Exp Bot*, 1981; 32: 79—91
- 14 Guy C L, Carter J V. Characterization of partially purified glutathione reductase from cold hardened and nonhardened spinach leaf tissue. *Cryobiology*, 1984; 21: 454—464
- 15 Orr W, Keller W, Singh J. Induction of freezing tolerance in an embryonic cell suspension of *Drassica napus* by abscisic acid at room temperature. *J Plant Physiol*, 1986; 126: 23—32
- 16 Peiser G D, Lizada M C, Shang F Y. Sulfite induced lipid peroxidation in chloroplasts as determined by ethane Production. *Plant Physiol*, 1982; 70: 994—998
- 17 Rabinowitch H D, David S. Superoxide dismutase; a possible protective agent against sunscald in tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Planta*, 1980; 148: 162—167
- 18 Senaratne T, Mckersie B D, Stinson R H. Simulation of dehydration injury to membranes from soybean axes by free radicals. *Plant Physiol*, 1985; 77: 472—474
- 19 Schoer S, Krause G H. Protective systems against active oxygen species in spinach; response to cold acclimation in excess light. *Planta*, 1990; 180: 383—389

# CHANGE OF THE MEMBRANE PROTECTIVE SYSTEM DURING THE ENHANCEMENT OF CHILLING RESISTANCE INDUCED BY COLD HARDENING AND ABA TREATMENT IN RICE SEEDLINGS

Zeng Shaoxi Wang Yirou Li Meiru Liu Hongxian

(*South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650*)

## Abstract

The changes of the protective system against activated oxygen during the enhancement of the chilling resistance induced by the cold hardening and ABA treatment in rice seedlings were studied. The results indicated that in the treated seedlings, activities of SOD and GR of the chloroplast as well as the antioxidant AsA and GSH contents of the leaves increased while the electrolyte leakage decreased. Therefore, its chilling resistance was enhanced.

By using isoelectrofocusing gel electrophoresis analysis, the intensity of three isozyme bands of SOD and the isozyme bands 1, 2, 3 and 6 of GR, except 4, 5, were increased to a different degree in two treated seedlings.

After chilling stress, all the activities of SOD, GR and the contents of AsA, GSH were decreased in the treated and untreated seedlings, but the reduction of two enzyme activities and the antioxidant contents in the treated seedlings were less than those of the untreated seedlings.

The increase of SOD and GR activities induced by cold hardening and ABA treatment were inhibited by cycloheximide (CHM), at the same time the electrolyte leakage was increased. These results showed that there was a close correlation between the enhancement of chilling resistance and the increase of the protective system ability in the rice seedlings and that the effects of cold hardening and ABA treatment on the protective system against activated oxygen in rice seedlings were similar.

**Key words:** Rice seedlings; Cold hardening; ABA treatment; Protective system