

提高黄瓜幼苗抗冷性研究

刘明池

(北京市农林科学院蔬菜中心, 100081)

摘 要 研究低温、干旱锻炼和外喷 ABA 对黄瓜幼苗的生理影响, 初步探讨交叉适应现象的机理。结果表明, 三种处理均提高了黄瓜幼苗的抗冷性和脱落酸(ABA)含量, 体内 ABA 含量与幼苗抗冷力呈极显著正相关。低温锻炼不仅提高了过氧化物酶的活性, 而且出现了一条新的同工酶带。这条酶带是在处理前细胞内已存在的 mRNA 上翻译而来。在锻炼过程中喷施 SFU 和 DDTC 均降低了幼苗处理的效果。低温、干旱锻炼不但影响了体内激素的平衡, 提高了细胞内渗透调节物质的含量, 而且也使控制代谢的酶系统发生了相应改变。

关键词 黄瓜 幼苗 抗冷性

植物本身对环境的适应能力是有限的。许多年来人们注意到, 低温锻炼^[6]、干旱锻炼^[9]等都可使植物的抗冷性提高。Boussiba^[8]等人还发现在盐渍、矿质缺乏、缺氧及低温等环境下, 烟草内源 ABA 含量都增加。在 ABA 含量下降至正常水平之前转入其他胁迫环境, 抗逆性仍较强。即植物在一种胁迫环境下生长, 不仅具有抵抗这种胁迫的能力, 而且也具有抵抗其他胁迫的能力。Levitt^[7]把这种现象称为交叉适应现象。郭确等^[3]1986 年发现干旱预处理或盐预处理都可提高水稻幼苗的抗冷性, 低温预处理也能提高水稻幼苗的抗旱性, 并认为内源 ABA 在这种交叉适应现象中具有重要调节作用。

本文研究了黄瓜幼苗的低温、干旱锻炼和外喷 ABA 对幼苗的生理影响, 并初步探讨了交叉适应现象的机理。

1 材料和方法

1.1 试验设计

供试黄瓜品种为津研 4 号, 采用蛭石营养液培育幼苗。采用完全随机试验设计, 重复 3 次, 并经邓肯氏新复极差测验法进行差异显著性测定。

1.1.1 低温锻炼 将一叶一心期的幼苗在 18:00 时放到 $6 \pm 1^\circ\text{C}$ 的植物生长实验箱内, 早 7:00 时放回最高温度不超过 25°C 的温室内反复处理 5 天。这一处理又分为三个子处理:

①低温—ck: 分别于锻炼的 0, 1, 3 天喷清水; ②低温—F: 分别于锻炼的 0, 1, 3 天喷 100×10^{-6} 的 5-氟尿嘧啶, 以抑制新 RNA 的合成; ③低温—D: 分别于锻炼的 3, 4, 5 天

喷 10mmol 的 DDTc(二乙基二硫氨基甲酸钠)以抑制细胞内 SOD 酶的活性。

1.1.2 干旱锻炼 在长出第一片真叶后，每次浇水时控制每盆的浇水量均为对照的 1 / 3。也有三个子处理：干旱—ck、干旱—F、干旱—D。处理方法同 1.1.1。

1.1.3 对照 对照也有三个子处理：ck—ck、ck—F、ck—D。处理方法同 1.1.1。

1.1.4 ABA 处理 于测定的前两天分别喷 10^{-4} mol 的 ABA。

所有处理均在测定的前一天彻底浇水一次，使植物体内水分恢复正常。

1.2 测定项目及方法

1.2.1 超氧化物歧化酶（SOD）活性测定 取待测叶片 1g 加入 5mlpH7.8 磷酸缓冲液，冰浴上研磨，提取 1h 后，在 4℃、11000×g 下离心 15min。上清液则为酶粗提液，用于 SOD 酶活性和蛋白质含量的测定。SOD 酶活性的测定按 Giannopolitics CN, Ries SK^[4]的方法测定，以抑制光化还原 NBT 的 50%为一个酶活单位。

1.2.2 过氧化物酶活性及同工酶测定 活性测定按胡军等^[2]提供的方法进行，同工酶的测定依文献[1]提供的方法进行，采用抗坏血酸—联苯胺染色液染色。

1.2.3 丙二醛（MDA）含量测定 按 Heath 等^[5]提供的方法进行。

1.2.4 可溶性糖、脯氨酸含量的测定 参照西北农大主编《基础生物化学实验指导》测定。ABA 含量委托南开大学生物系测定。

2 结果与分析

将一叶一心期黄瓜幼苗进行各种处理后，放于 $1\pm1^{\circ}\text{C}$ 下 12h，测定各种生理指标。

2.1. 幼苗处理后相对电导率和 ABA 含量的变化

从表 1 看出，经低温、干旱锻炼和外喷 ABA 处理后的幼苗在低温下其叶片相对电导率分别为对照的 72.5%、67.9%、53.5%，说明三种幼苗处理均明显地提高了幼苗的抗冷性，尤其外喷 ABA 的效果最明显。干旱预处理也能提高幼苗的抗冷性，说明黄瓜幼苗也具有交叉适应能力。

表 1 幼苗处理后相对电导率和 ABA 含量的变化

处 理	低温锻炼	干旱锻炼	外喷 ABA	对照
相对电导率(%)	0.3252	0.3012	0.2413	0.4486
ABA(ng / gFW)	82.97 A	56.23 B	484.10 C	30.20 D

注:经邓肯氏新复极差测验,大写字母为极显著;小写字母为显著;字母相同为差异不显著;字母不同为差异显著;以下表格同。

从表 1 还可看出，低温、干旱和外喷 ABA 都极显著地提高了幼苗体内 ABA 的含量，经统计分析，植物体内 ABA 含量与幼苗相对电导率呈负相关，相关系数 $r=-0.8253$ ；即 ABA 含量与幼苗抗冷力呈正相关。

2.2 幼苗处理对叶片中过氧化物酶和 SOD 的影响

不同处理的幼苗经过 12h 低温后，叶片中 SOD 活性和过氧化物酶的活性及同工酶的变化见表 2 和图 1。

表 2 幼苗处理对过氧化物酶和 SOD 的影响

处 理	低温锻炼	干旱锻炼	外喷 ABA	对照
过氧化物酶活性(Gu / gFW)	413.9 A	62.3 Bb	86.6 Bb	61.2 Bb
过氧化物酶同工酶条带数	1+4	4	4	4
SOD 酶活性(单位 / gFW)	345.7 a	349.9 a	267.5 b	358.1 a

从表 2 和图 1 可以看出, 经过低温锻炼的幼苗, 其叶片中过氧化物酶活性极显著地增强了, 增大将近 7 倍, 且出现了迁移慢的一条区带 ($R_f=0.072$), 而干旱处理和外喷 ABA 处理过氧化物酶活性与对照并无显著差异, 也未出现新的同工酶带。说明过氧化物酶在低温锻炼提高幼苗抗冷性的过程中起着重要作用。

幼苗的低温、干旱锻炼虽然提高了幼苗的抗冷性, 但并没有提高叶片组织中 SOD 的活性, 这表明幼苗锻炼提高抗冷性并不是通过提高 SOD 的活性, 从而防止膜系统的过早破坏这一途径实现的。

2.3 幼苗处理后可溶性组分的变化

幼苗处理后测定其叶片中可溶性糖、脯氨酸和可溶性蛋白的含量, 结果列于表 3。由表 3 看

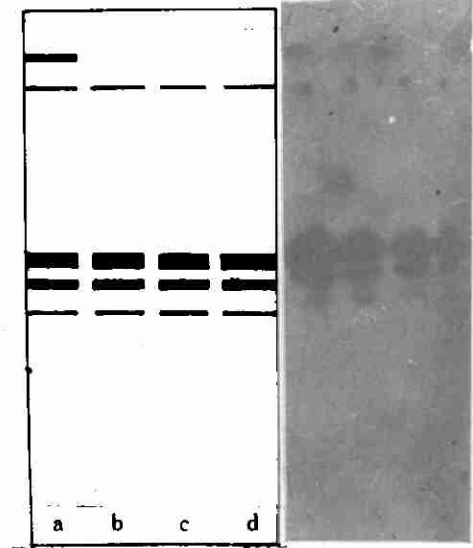


图 1 幼苗不同处理后过氧化物酶同工酶电泳
a. 低温处理; b. 干旱处理; c. 对照; d. 喷 ABA

表 3 幼苗处理后可溶性糖、脯氨酸和蛋白含量的变化

处 理	低温锻炼	干旱锻炼	外喷 ABA	对照
可溶性糖(mg / gFW)	3.729	4.193	2.154	3.546
脯氨酸(μ g / gFW)	7.947	8.501	3.244	7.210
可溶性蛋白(mg / gFW)	79.550	63.700	38.720	54.080

出, 经过低温、干旱锻炼后明显提高了幼苗可溶性蛋白、可溶性糖及脯氨酸的含量。这三种可溶性物质均具有保护植物免受逆境伤害的作用。低温锻炼提高可溶性蛋白的效果更明显些, 而干旱锻炼对可溶性糖、脯氨酸的作用更明显。值得注意的是, 虽然低温、干旱锻炼提高了幼苗体内 ABA 含量, 但外喷 ABA 并未使这三种可溶性物质的含量提高。

2.4 5-氟尿嘧啶 (5FU) 对相对电导率及过氧化物酶的影响

以上实验证明, 在幼苗锻炼过程中有新的蛋白质合成。为研究蛋白质在幼苗锻炼中所起的作用, 及新的蛋白是如何形成的, 我们在幼苗锻炼的 0, 1, 3 天分别喷 100×10^{-6} 的 5-氟尿嘧啶 (RNA 合成阻抑剂), 研究其对幼苗锻炼效果的影响。将不同处理的幼苗放于

表 4 幼苗处理后相对电导率和过氧化物酶活性的变化

处 理		相对电导率	为喷水 %	过氧化物酶活性	同工酶
低温锻炼	喷水	0.3252	100	413.91	1+4
	喷 5FU	0.4073	125.2	439.35	1+4
干旱锻炼	喷水	0.3012	100	62.27	4
	喷 5FU	0.3703	122.9	87.74	4
对 照	喷水	0.4486	100	61.19	4
	喷 5FU	0.4675	104.2	49.55	4

1±1℃下 12h, 测其叶片的相对电导率和过氧化物酶活性及同工酶, 结果见表 4 和图 2。

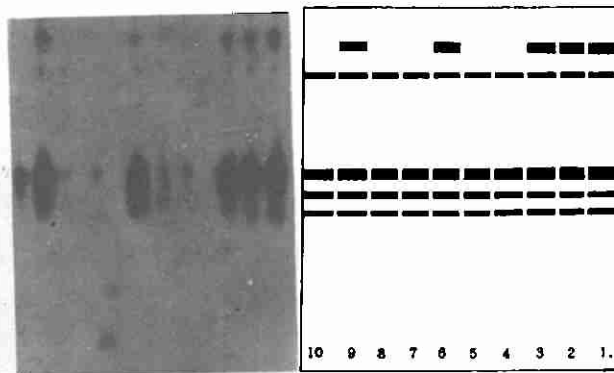


图 2 幼苗不同处理后过氧化物酶同工酶图谱

1.低温喷水; 2.低温喷 5FU; 3.低温喷 DDTC; 4.干旱喷水; 5.干旱喷 5FU;
6.干旱喷 DDTC; 7.对照喷水; 8.对照喷 5FU; 9.对照喷 DDTC; 10.喷 ABA;

在低温、干旱锻炼过程中喷施 5-氟尿嘧啶, 明显抑制了幼苗锻炼的效果。其相对电导率为喷水的 125.2%和 121.9%,而对照喷 5-氟尿嘧啶后仅为喷水的 104.2%,证明在幼苗低温、干旱锻炼过程中有新的 RNA 合成, 并由此合成新的蛋白质, 以提高植物对逆境的抗性。

在低温锻炼过程中喷 RNA 合成抑制剂后, 未能阻止过氧化物酶新酶带的出现, 也未使酶活性降低, 说明新增加的过氧化物酶的同工酶酶带, 是由在低温锻炼前细胞内已存在的 mRNA 上翻译修饰而来。

2.5 SOD 活性抑制剂 DDTC 对幼苗锻炼的影响

为研究 SOD 在抗逆性中的作用, 在幼苗锻炼的 3、4、5 天分别喷施 10mol 的 DDTC。

2.5.1 幼苗处理后 SOD 活性、丙二醛 (MDA) 的变化及与抗冷性的关系 不同处理的幼苗在 12h 低温后, 其叶片的相对电导率、SOD 活性、MDA 含量列于表 5。

表 5 幼苗处理后相对电导率 SOD 和 MDA 含量变化

处 理		相对电导率	为喷水%	SOD 活性(U / mg 蛋白)	MDA(μmol / gFW)
低温锻炼	喷 水	0.3252	100	19.21A	0.226
	喷 DDTC	0.3796	116.7	14.93B	0.660
干旱锻炼	喷 水	0.3012	100	27.47C	0.231
	喷 DDTC	0.3436	114.1	16.76D	0.542
对 照	喷 水	0.4486	100	33.12E	0.217
	喷 DDTC	0.4792	106.8	26.60C	0.367

喷施 SOD 抑制剂 DDTC 后, 低温、干旱锻炼、对照幼苗叶片在低温下的相对电导率分别为喷水的 116.7%、114.1%、106.8%, 这不仅降低了幼苗锻炼的效果, 而且也降低了幼苗本身(对照)的抗冷性, 验证了 SOD 在植物对逆境适应中的保护作用。喷 DDTC 后

SOD 活性降低, 差异达极显著水平, 膜脂氧化的产物 MDA 含量也成倍增加, 分别为喷水的 291.4%、235.2%、161.9%, 证明在植物处于逆境时 SOD 能清除体内活性氧自由基, 防止细胞膜的膜脂被氧化。

2.5.2 喷 DDTC 对过氧化物酶的影响 不同处理的幼苗经过 12h 低温后, 测其过氧化物酶活及同工酶 (表 6 和图 2)。

表 6 喷 DDTC 对过氧化物酶的影响

处 理		过氧化物酶活 (Gμ / gFW)	为喷水 %	同工酶区带数
低温锻炼	喷水	413.91 A	100	1+4
	喷 DDTC	584.45 B	141.2	1+4
干旱锻炼	喷水	62.27 C	100	4
	喷 DDTC	338.04 D	542.9	1+4
对 照	喷水	61.19 C	100	4
	喷 DDTC	435.77 A	712.2	1+4

无论何种处理, 喷 DDTC 后极显著地抑制了 SOD 的活性, 却使过氧化物酶活性极显著地增强, 并出现了新的同工酶带。干旱锻炼、对照喷 DDTC 后过氧化物酶活分别为喷水的 542.9%、712.2%。尤其是低温锻炼的幼苗虽然低温锻炼已使过氧化物酶活极显著地提高, 喷 DDTC 后, 使过氧化物酶再度极显著地提高, 由 413.91 增到 584.45。表明 SOD 被抑制后, 使得植物在低温下代谢变得紊乱, 酶系统失去了平衡, 从而加速了对植物的伤害。说明 SOD 和过氧化物酶在植物对逆境的适应中有着一定的联系。

3 讨论

低温锻炼、干旱锻炼都使幼苗的可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸的含量提高, 也使幼苗 ABA 含量显著提高, 从而提高幼苗抗冷性, 这是两者提高抗冷性的相同点。二种锻炼的差异在于低温锻炼极显著地提高过氧化物酶的活性, 且出现新的区带, 而干旱锻炼对过氧化物酶影响不大, 说明过氧化物酶是低温锻炼提高幼苗抗冷性的关键因素之一。

经过低温, 黄瓜幼苗叶片含水量降低, 束缚水含量增加, 在 100% 相对湿度下锻炼的植株, 其抗冷性并未得到提高^[10]。在低温锻炼过程中, 含水量降低, 束缚水含量提高可能对锻炼效果有重要作用, 可以认为低温锻炼也包含着干旱锻炼这样一个过程。本实验证明, 低温和干旱锻炼对幼苗的影响是深刻的, 多方面的, 两种处理不仅影响体内激素的平衡, 提高细胞内渗透调节物质的含量, 也使控制代谢的酶系统发生相应改变。所有这些共同的变化, 都是植物具有抗性交叉适应的基础, 并非 ABA 单方面的作用。

ABA 处理的幼苗在经过 12h 低温后, 其叶片中过氧化物酶、SOD 活性要比对照分别高 41.5% 和 4.3%, 似乎外喷 ABA 可能在低温下对酶起一种保护作用。外喷 ABA 并不像低温、干旱锻炼使可溶性组分含量提高, 而是使可溶性蛋白、糖和脯氨酸含量分别降低 28.5%, 39.5%, 55%, 即外喷 ABA 可能抑制植物代谢的强度。因此, 外喷 ABA 人为改变了体内生长物质和抑制物质的平衡, 使植物生长势减弱、休眠势增强, 从而使得植物对逆境相对不敏感。在生产上, 定植前对苗子进行低温锻炼及蹲苗对提高幼苗的低温适应性具有重

要作用, 但蹲苗不能过狠, 否则会使幼苗内生长抑制物质积累过多, 影响定植后缓苗速度和生长发育。

鸣谢 本研究得到朱桓、解淑贞二位先生的指教, 谨表谢意。

参 考 文 献

- 1 吴少伯. 植物组织中蛋白质及同工酶的聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳. 植物生理学通讯, 1979 (1): 30~33
- 2 胡军, 李曙轩. 瓜类植物过氧化物酶活力测定及影响测定的条件. 中国蔬菜, 1981 (创刊号): 41~44
- 3 郭确, 潘瑞炽. 不同胁迫预处理对水稻幼苗抗冷性和抗旱性的影响. 植物生理学报, 1986, 12 (4): 396~401
- 4 Giannopolitis CN, Ries SK. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedling. Plant Physiol, 1977, 59: 315~318
- 5 Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Arch Biochem Biophys, 1968, 125: 189~198
- 6 Levitt J. Responses of Plants to Environmental Stress. New York: Academic Press, 1972
- 7 Levitt J. Responses of Plants to Environmental Stress. 2nd edition, Vol II. New York: Academic Press, 1980, 533~568
- 8 Boussiba S, Rikin A. The role of abscisic acid in cross-adaptation of tobacco plants. Plant Physiol, 1975, 56: 337~339
- 9 Wesley, Cox. Interrelations between environmental factors and freezing resistance of cabbage leaves. Plant Physiol, 1976, 57: 553~555
- 10 Wilson JM. The mechanism of chill-hardening and drought-hardening of phaseolus vulgaris leaves. New Phytol, 1976, 76: 257~270

Studies on Improving Cucumber Chilling Resistance by Seedling Hardening

Liu Mingchi

(Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences,

Beijing 100081)

Abstract The physiological effects of cold hardening, drought hardening and abscisic acid (ABA) spraying on cucumber seedlings were studied, and the mechanism of plant cross-adaptation in stress was investigated. Three seedling treatments all improved the chilling resistance of cucumber seedlings and ABA content. The ABA content was significantly correlated with the chilling resistance. The peroxidase activity was significantly enhanced by cold hardening, and a new band of isoenzyme was found. The new band resulted from the translation of the mRNA which already existed in cells before hardening. Spraying 5-fluorouracil (5-FU) and DDTC during the hardening process reduced the effects of seedling hardening. Cold hardening and drought hardening of cucumber seedlings affected the balance of endogenous hormones in the plant, increased the content of osmosis-regulating substances and changed the enzyme system.

Key words: Cucumber; Seedling hardening; Chilling resistance