

三十烷醇在原生质体冰冻和化冻中对质膜的保护作用

何若天 莫家让

(广西农学院)

摘要 在合适浓度范围的三十烷醇存在下, 经冰冻处理的烟草叶肉原生质体化冻后质膜完整率均高于对照, 以0.1, 0.5和1.0p.p.m 三十烷醇对原生质体膜的保护效果较佳。三十烷醇对甘蔗叶肉原生质体的抗冰冻力有类似效果, 使用浓度亦相近。作者认为三十烷醇可能与质膜结合, 在维护质膜正常相和生理活性的完整性与稳定性中起一定作用。

关键词 三十烷醇; 原生质体的质膜; 抗冰冻和化冻为害

新鲜分离的植物原生质体很适用于研究植物细胞耐冻性和伤害中质膜之变化。它不仅便于在原位上用膜探测物对质膜进行标志, 还可用表面膜对冷冻的敏感度来评价胞壁在冷冻中是否有机械效应^[1]。因此, 无壁的原生质体是研究细胞抗寒机理的一种较好的材料。不少研究者曾用游离原生质体研究过它们在冰冻和化冻中的表现^[2, 10, 12, 13]。考虑到三十烷醇在某种程度上能增强甘蔗组织的抗寒性^[1], 可能与细胞膜正常结构的维持有关。为此, 我们研究了三十烷醇对游离原生质体在冰冻和化冻过程中对质膜的保护效应。本文报道三十烷醇保护烟草和甘蔗等叶肉原生质体抗冰冻和化冻为害的初步研究结果。

材料与方 法

一、植物材料 所用试验材料为盆栽烟草 (*Nicotiana tabacum* L.), 在自然条件下长至具7—8片叶时, 切取上部刚充分伸展的叶片供用。田间栽培的甘蔗 (*Saccharum sinensis* Roxb. 品种为台糖134) 长至高约1米时切取健康植株的稍部幼叶供用。

二、叶肉原生质体的分离 分离原生质体所用酶液由0.5—1.0% EA3—867 纤维素酶, 0.3M (甘蔗用) 或0.4M (烟草用) 甘露醇和5 mM 磷酸盐缓冲液 (pH5.6) 等组成。把烟草叶片下表撕去并切成小碎片, 置酶混合液内。甘蔗稍部幼叶亦横切成小碎条置酶混合液内。于30℃中保温1.5小时 (甘蔗) 和4小时 (烟草)。保温结束后, 经250目不锈钢丝网过滤, 80~100r.p.m 转速下离心3分钟, 弃上清液。用0.3M (甘蔗) 和0.4M (烟草) 甘露醇溶液洗涤三遍。最后一次分别改用0.3M和0.4M 蔗糖溶液把原生质体再悬浮, 混匀后各分成五等份, 分别低速离心5分钟, 弃上清液, 保留底部原生质体丸供用。

三、三十烷醇的处理与原生质体的冰冻和化冻过程 分别以0.3M (甘蔗) 和0.4M (烟草) 蔗糖溶液为介质, 配制含0.00, 0.05, 0.1, 0.5和1.0p.p.m 三十烷醇 (广西师大化学系产品, 纯度近100%) 溶液 (均含有微量吐温80) 调pH为5.6~5.8。在五份含有原生质体的离心管内分别加入0.3毫升上述三十烷醇溶液, 使再悬浮后置25℃中保温30分钟, 然后在8℃下放置一小时, 再转至-8℃下令其冷冻结冰。冻结30分钟后置8~10℃冷水中缓慢解冻。

四、原生质体完好率的测定 在冷冻处理前后分别从各管中吸取1小滴原生质体悬浮液

置载玻片上镜检, 统计完好原生质体数。以可见的质膜和内部结构完整者为存活或完好的原生质体。每份计数50~60个视野, 取平均值。计算冰冻和化冻后完好原生质体百分率。

试验结果

一、三十烷醇处理对烟草叶肉原生质体抗冰冻和化冻的效应 经不同浓度三十烷醇处理的烟草叶肉原生质体经冰冻和化冻后完好率均不同程度地高于对照。多次试验结果颇为一致(表1)。这显示三十烷醇对烟草叶肉原生质体在冰冻和化冻情况下对质膜有保护效应。经统计分析可见, 0.05p.p.m的处理不显著, 而0.1, 0.5和1.0p.p.m处理的达极显著水准。

表1 三十烷醇对烟草叶肉原生质体遭冰冻和化冻处理的保护效应
Table 1 The protective effect of triacontanol on tobacco mesophyll protoplast subjected to freezing and thaw

处 理	冰冻和化冻后完好原生质体%						与对照的差值
	I	II	III	IV	V	平均值	
0.00p.p.m (Control)	5.05	12.50	21.20	13.60	31.20	16.71	
0.05p.p.m	23.08	15.60	41.70	16.30	23.20	23.98	7.27
0.10p.p.m	25.75	25.40	66.50	22.40	41.90	36.39	19.68**
0.50p.p.m	39.20	33.50	66.30	27.00	37.60	40.72	24.01**
1.00p.p.m	26.90	49.80	55.40	28.30	60.80	44.24	27.53**

LSD_{0.05} = 11.719

LSD_{0.01} = 16.147

二、三十烷醇处理对甘蔗叶肉原生质体抗冰冻和化冻影响的效应 三十烷醇对增强甘蔗叶肉原生质体抗冰冻和化冻为害亦有显著作用(表2)。经统计分析, 0.5和1.0p.p.m处理者达极显著水准。

表2 三十烷醇对甘蔗叶肉原生质体遭冰冻和化冻处理的保护效应

Table 2 The protective effect of triacontanol on sugarcane mesophyll protoplast subjected to freezing and thaw

处 理	冰冻和化冻后完好原生质体%			
	I	II	平均值	与对照的差值
0.00p.p.m (control)	20.3	20.7	20.50	
0.05p.p.m	28.4	23.7	26.05	5.55
0.10p.p.m	29.3	31.2	30.25	9.75*
0.50p.p.m	34.4	41.4	37.90	17.40**
1.00p.p.m	33.3	40.1	36.70	16.20**

LSD_{0.05} = 9.572

LSD_{0.01} = 15.874

讨 论

近十余年, 经生化测定与电镜观察结合, 证实了细胞膜系与植物寒害及抗寒性有密切关系, 其中质膜又是细胞各结构成分中对寒害最敏感的部位^[5], 膜是植物寒害和抗寒的关键结构^[2]。Steponkus和Wiest(1978)认为游离原生质体在冰冻和化冻期间, 冰冻脱水时的收缩和化冻时的吸水膨胀会造成质膜破裂^[5]。Palta和Li(1978)对洋葱鳞茎与马铃薯叶片的冻害试验表明质膜是冻害的最先受害者^[8]。Levitt(1972)认为寒害主要是损伤膜蛋白质, 低温可将蛋白质分子拆开成亚单位, 并氧化蛋白质分子中的SH基成-S-S-键, 造成蛋白质变性; 同时, 冰冻脱水引起细胞收缩塌陷时发生的张力作用可使膜的双脂层滑动分离, 导致膜内嵌入蛋白脱离, 从而功能性蛋白质(酶)失活^[7]。Lyons(1973)认为寒害可能是由于膜的物相变化, 即从液晶态转变为凝胶态^[5]。简令成等(1981, 1983)进一步揭示寒害主要是损伤质膜组分中的ATP酶活性。无论冷害或冻害, 细胞表面(质膜)的ATP酶活性最先降低或完全失活, 而细胞内部一些细胞器上的ATP酶活性则被激活^[3-5]。因而增强和维持生物膜各组分结构的稳定性和生理活性是防止寒害的重要因素。莫家让和叶燕萍(1981)观察到三十烷醇对保持甘蔗叶组织的透性不致受低温为害有一定作用^[1]。本试验结果进一步表明三十烷醇在保护植物细胞抗冰冻和化冻为害中有明显效果。有人用³H标记的三十烷醇处理植物细胞后, 进行密度梯度离心分析, 发现三十烷醇能与质膜结合, 从而产生一系列生理生化效应^[6]。因此, 三十烷醇所以能增强细胞抗冰冻和化冻之为害, 很可能是三十烷醇在维护膜系正常物相和生理活性的完整性与稳定性中起重要作用。其机理尚有待阐明。但此种保护效应与三十烷醇使用浓度有关, 在合适浓度(0.5~1.0p.p.m)处理下, 效果才好; 浓度过高(10p.p.m), 原生质体完好率显著下降(资料未列出), 原因不明。

Hall和Cocking(1974)观察到游离原生质体置于含吲哚乙酸(IAA)的渗透压稳定剂中保温时, 会引起广泛液泡化导致原生质体迅速膨胀而破裂^[9], 我们的试验却显示适合浓度的三十烷醇对质膜有明显保护效应, 这表明三十烷醇对膜系的作用可能与IAA不同, 其原因亦有待进一步研究。

参 考 文 献

- (1) 莫家让等, 1981: 低温对蔗叶透性的破坏和三十烷醇效应的初步研究。广西植物, 1: 15—19。
- (2) 简令成, 1980: 小麦原生质体在冰冻—化冻中的稳定性与其品种抗寒力的关系。植物学报, 22: 17—21。
- (3) 简令成等, 1981: 番茄子叶细胞内三磷酸腺苷酶活性的超微结构定位及其在冷害中的变化。植物学报, 23: 257—261。
- (4) 简令成等, 1983: 冬小麦幼叶细胞内ATP酶活性的超微结构定位及其在抗寒锻炼和冻害中的变化。植物学集刊, P. 183—189。
- (5) 简令成, 1983: 生物膜与植物寒害和抗寒性的关系。植物学通报, 1(1): 17—23。
- (6) 陈善坤, 1984: 三十烷醇专题考察报告。植物生理学通讯, (1): 73—75。
- (7) Levitt, J. 1972: Responses of plants to environmental stresses, Vol. I, Academic Press, New York.
- (8) Palta, J. P. & Li, P. H. 1978: Cell membrane properties in relation to freezing

- injury, In: *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress*. Academic Press, New York, P.93—115.
- [9] Power, J. B. 1977: The physiology of isolated plant protoplasts, In: H. Simth ed. *The Molecular Biology of Plant Cells*. Blackwell Scientific Publications, P. 418—428.
- [10] Singh, J. 1977: Freezing tolerance of the rye protoplasts. *Plant Physiol.* 59(6) (suppl.): 4.
- [11] Singh, J. 1979: Freezing of protoplasts isolated from Cold-Hardened and non-hardened Winter Rye. *Plant Sci. Lett.* 16: 195—201.
- [12] Wiest, S. C. & Steponkus, P. L. 1977: Freezing-thaw induced Lysis of spinach protoplast. *Plant Physiol.* 59(6)(suppl.): 4.
- [13] Wiest, S. C. 1977: Lysis of spinach protoplasts by osmotic shock and its relevance to freezthaw injury. *Plant Physiol.* 59(6)(suppl.): 4.

THE PROTECTIVE EFFECT OF TRIACONTANOL ON PROTOPLAST PLASMALEMMA SUBJECTED TO FREEZING AND THAW

He Rao-tian and Mo Jia-rang
(Guangxi College of Agriculture)

Abstract Through freezing and thaw of the mesophyll protoplast of tobacco (*Nicotiana tabacum*) and sugarcane (*Saccharum sinensis*) which were disposed of triacontanel in suitable concentration, the percentage of intact protoplast plasmalemma is higher than that of the control. The results indicated that the triacontannol have some protective effect in protoplast plasmalemma subjecting to freezing and thaw. The experiments showed that the concentration of 0.1, 0.5 and 1.0 p.p.m. of triacontanol for tobacco protoplast and 0.5 and 1.0 p.p.m. for sugarcane are the better treatments. The authors consider that the triacontanol probably integrate with the plasmalemma and play a specified function in protecting the integrality and stability of normal constitutions and physiological activities in plasmalemma.

Key words triacontanol; protoplast plasmalemma; resist the harm of freezing and thaw