

# 常春藤质膜透性和内源激素与抗寒性关系初探

沈 漫

(北京农学院植物科学技术系, 北京 102206)

**摘 要:** 以栽培在露地和温室的常春藤 (*Hedera nepalensis* var. *sinensis*) 为材料, 测定了其叶片低温半致死温度以及在越冬过程中内源激素的变化。结果表明, 不同栽培条件下的常春藤抗寒能力和耐受低温极限有所不同。露地栽培的常春藤具有较强的抗寒性, 其脱落酸水平显著高于温室栽培的常春藤, 赤霉素水平则低于温室栽培的常春藤。越冬过程中常春藤叶片内源激素的变化尤其是激素间的平衡与抗寒能力关系密切。

**关键词:** 常春藤; 细胞膜伤害率; 半致死温度; 内源激素; 抗寒性

**中图分类号:** S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 01-0141-04

## Preliminary Study on the Relations between Membrane Permeability, Endogenous Hormones and Cold Resistance of Ivy

Shen Man

(Department of Plant Science and Technology, Beijing Agriculture College, Beijing 102206, China)

**Abstract:** The ivy (*Hedera nepalensis* var. *sinensis*) plants growing in open field or greenhouse were used as the experimental materials. The changes of the semilethal temperature and the endogenous hormones in the leaves through the winter period were determined by electric conductivity and ELISA methods. The results showed that the cold resistance and the limit of endurance to the low temperature were different for the ivy plants growing under different cultivate conditions. For the plants growing in open field, it possessed more stronger cold resistance, and its levels of endogenous hormones changed more obviously than that growing in greenhouse, such as the increase of the content of abscisic acid and the decrease of gibberellic acid. During the winter period, the changes of the contents of ABA and GA, especially the ABA/GA were associated closely with the cold resistance of ivy growing in open field.

**Key words:** *Hedera nepalensis*; Membrane injury percentage; Semilethal temperature; Endogenous hormones; Cold resistance

### 1 目的、材料和方法

在植物抗寒性研究中发现, 细胞膜系统可能是冻害发生的首要位置; 低温下植物细胞膜透性加大,  $K^+$  和葡萄糖等电解质外渗增加<sup>[1]</sup>。Rajashekar等<sup>[2]</sup>把低温对植物细胞膜伤害的过程用 Logistic 曲线表示, 并用该曲线急剧上升区的中点所对应的温度作为致死温度。朱根海等<sup>[3]</sup>证实此方法在多种植物上应用可取得比较准确的结果。朱月林等<sup>[4]</sup>用消除自身电导后的电解质透出率来拟合 Logistic 方程, 发现能准确反映植物的抗寒能力和所能忍受的低温极限。脱落酸 (ABA) 被认为是植物对不同逆境产生响应的信号因子之一<sup>[5]</sup>。植物激素可能通过某种平衡状态启动抗寒基因表达以及对维持细胞膜结构功能起作用<sup>[6]</sup>。本研究以栽培在露地和温室的常春藤为材料, 通过测定离体叶片在低温下的细胞膜伤害率的改变, 研究细胞膜相对透性的变化与低温半致死温度的关系, 并通过对叶片内源激素含量的检测, 分析常春藤内源激素与抗寒性的关系, 试图为阐述植物抗寒机理提供参考依据。

收稿日期: 2004 - 04 - 11; 修回日期: 2004 - 07 - 01

基金项目: 北京市科委 “科技新星计划” 资助项目 (9558101600)

供试植物材料为北京林业大学花卉研究所露天试验地和温室内栽植的 2 年生常春藤 (*Hedera nepalensis* var *sinensis*), 露地栽培为背风疏荫的近墙处, 常规水肥管理, 植株攀援于墙面或匍匐于地面生长。分别在 1998 年 11 月中旬 (冬前, 平均气温 7 )、1999 年 1 月中旬 (冬季, 平均气温 - 10 ) 和 1999 年 3 月中旬 (初春, 平均气温 5 ) 采样, 测定常春藤内源激素含量; 其中 1999 年 1 月中旬采样同时用于测定膜相对透性。温室的常春藤 (平均温度 20 ) 管理措施、采样时间等同露地栽植。采集当年生茎中部茎段上成熟度较为一致的叶片, 除部分叶片立即测定低温半致死温度外, 其余叶片液氮速冻, 置 - 40 低温冰箱保存备用, 供植物激素含量的测定。

测定细胞膜透性和确定半致死温度参照刘祖琪等<sup>[7]</sup>方法。取 1999 年 1 月中旬采集的新鲜叶片制成 0.5 cm<sup>2</sup> 圆片, 每个温度梯度处理取 0.3 g 叶片, 3 次重复。叶圆片置试管中, 插入低温浴槽。按 - 2 间隔递减, - 4 ~ - 22 设定 10 个温度梯度, 低温处理期间温度波动约  $\pm 0.5$ , 各温度处理 1.5 h。取出后 25 温浴 0.5 h, 加去离子水 5 mL, 真空浸提 15 min, 25 水浴振荡 2 h, 静置, 测第 1 次电导率 (Rt)。然后置沸水浴中 15 min, 冷却至室温, 测第 2 次电导率 (K)。以未经低温处理的电导率作为本底 (C), 计算细胞膜伤害率  $MP = (Rt - C) / (K - C) \times 100\%$ 。将处理温度与 MP 值进行非线性回归分析, 按 Logistic 方程  $Y = K / (1 + ae^{-bx})$  方程进行拟合<sup>[3,7,8]</sup>, 求出曲线拐点所对应的温度, 作为低温半致死温度 ( $LT_{50}$ )。Logistic 曲线方程式中 K 值表示最大胁变, 参数 a 值表示曲线对于原点的相对位置, b 值则为初始胁强下的胁变增长率<sup>[8]</sup>。

植物内源激素的提取在 Xu 等<sup>[9]</sup>的方法上加以改进。称取 1.0 g 叶片, 加入 3 mL 80% 内含 1 mmol/L BHT (二叔丁基对甲苯酚) 的甲醇水溶液和 100 mg PVP (聚乙烯吡咯烷酮), 弱光冰浴研磨, 匀浆转入 10 mL 试管, 摇匀后置 4 下提取 4 h。2000  $\times g$  离心 15 min, 取上清液, 过 Sep-PakC<sub>18</sub> 柱纯化两次。滤出液定容至 1.5 mL。样品叶片中的生长素 (IA)、赤霉素 (GA<sub>3</sub>)、细胞分裂素类 (Z + ZR) 和脱落酸 (ABA) 的含量采用酶联免疫法 (ELISA) 测定, 3 次重复。

## 2 结果分析与讨论

### 2.1 不同栽培条件下生长的常春藤叶片膜透性的比较

不同栽培条件下的常春藤离体叶片经零下梯度低温处理后, 测定的 MP 值与处理温度进行非线性回归,  $R^2$  均较高, 表明方程具有较好的拟合度 (表 1、图 1)。

表 1 露地及温室条件下的常春藤叶片细胞膜伤害率变化和非线性方程

Table 1 Changes of MP and nonlinear regression equation of leaves from ivy plants growing in open field or greenhouse

栽培条件 Growing condition	细胞膜伤害率 MP (%)										Logistic 方程 Logistic equation	拟合度 Fitness ( $R^2$ )	$LT_{50}$ ( )
	- 4	- 6	- 8	- 10	- 12	- 14	- 16	- 18	- 20	- 22			
露地 Open field	8.27 $\pm 0.74$	8.30 $\pm 0.17$	17.04 $\pm 0.78$	23.27 $\pm 1.48$	23.49 $\pm 0.06$	25.68 $\pm 2.25$	46.19 $\pm 0.51$	82.22 $\pm 1.50$	86.49 $\pm 0.83$	92.91 $\pm 1.38$	$Y = \frac{131.73}{1 + 78.11e^{-0.2464X}}$	0.950 <sup>**</sup>	- 17.69
温室 Greenhouse	6.13 $\pm 0.18$	11.49 $\pm 1.96$	18.06 $\pm 2.03$	46.81 $\pm 0.54$	72.78 $\pm 1.50$	85.48 $\pm 0.27$	86.44 $\pm 0.35$	89.85 $\pm 1.79$	91.04 $\pm 0.74$	95.95 $\pm 0.91$	$Y = \frac{92.20}{1 + 373.25e^{-0.5945X}}$	0.994 <sup>**</sup>	- 9.96

注: 表中数据为 3 次重复的均值  $\pm$  标准差, <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ 。下同。

Note: The values in Table 1 are  $\bar{X} \pm s$  of three repetitions, <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ . The same below.

在一系列冷冻低温处理后, 常春藤离体叶片组织细胞膜伤害率与处理温度之间呈急剧或缓慢上升的“S”形曲线。不同栽培条件下常春藤的拐点温度存在差异, 露地栽培的为 - 17.69, 温室的为 - 9.96。拐点处单位胁强变化引起的胁变变化最大, 此点具有可比性且与植物抗性有关<sup>[8]</sup>。根据这一性质推测<sup>[3]</sup>, 处于拐点温度附近, 降温对细胞膜的破坏效应最大。拐点温度上表现出的差异可以用于衡量其耐受低温的能力, 且这种差异表现为拐点温度与抗寒力之间呈负相关趋势,  $LT_{50}$  越低, 抗寒性越强, 即露地栽培的常春藤的抗寒性大于温室栽培的。

从不同栽培条件下的常春藤离体叶片在低温处理下的细胞膜伤害率曲线可见, 拐点以前, 曲线斜

率不断增加,表明降温对细胞膜伤害率的递增效应不断增大,到拐点时最大;之后,曲线斜率逐渐下降,降温对细胞膜伤害率的递增效应减小。比较露地和温室栽培的 MIP 曲线 (图 1), MIP 值都随零下低温的递降而上升,但不同栽培条件下获得不同抗寒性的植株, MIP 上升的速率具有明显的差异。

比较拟合方程中参数  $b$ , 发现温室中常春藤的  $b$  值为 0.5945; 而露地栽培的由于经过 11 月深秋自然降温的低温锻炼, 其  $b$  值仅为 0.2464。MIP 值由 20% 升至 80% 的降温幅度, 温室栽培的常春藤是 4 ( - 8 ~ - 12 ), 而露地栽培的常春藤则为 10 ( - 8 ~ - 18 ); 且露地栽培的拐点温度也

比温室栽培低 7~8 (表 1, 图 1)。这说明, 栽培在不同温度下的常春藤具有不同的抗寒性。露地栽培下具有较强抗寒性的常春藤对胁迫引起的不良胁迫的增长率相对较缓慢, 不同抗寒性的常春藤在低温下膜的稳定性具有较大的差异。

## 2.2 不同栽培条件下生长的常春藤叶片内源激素的变化

越冬期间不同栽培条件下生长的常春藤叶片内源激素含量的变化综合列于表 2。

表 2 越冬期间露地及温室条件下的常春藤叶片内源激素含量的变化

Table 2 Changes of endogenous hormone contents from ivy plants growing in open field or greenhouse through winter period

处理 Treat- ment	LT <sub>50</sub> ( )	采样时间 Sampling time	内源激素含量 Endogenous hormone content (ng/g FM)				内源激素平衡 Balance of endogenous hormones		
			ABA	GA <sub>3</sub>	Z + ZR	IAA	ABA / GA <sub>3</sub>	ABA / (Z + ZR)	ABA / IAA
露地 Open field	- 17.69	冬前 Before winter	628.83 ± 3.87	6601.01 ± 6.75	1956.79 ± 3.34	706.38 ± 6.22	0.0953 ± 0.0007	0.3214 ± 0.0015	0.8902 ± 0.0060
		冬季 Winter	1176.48 ± 6.81	3904.57 ± 5.28	1208.33 ± 14.53	988.87 ± 14.72	0.3013 ± 0.0016	0.9736 ± 0.0338	1.1897 ± 0.0180
		初春 First spring	457.05 ± 5.39	3754.89 ± 5.00	1556.71 ± 3.66	754.47 ± 8.75	0.1217 ± 0.0015	0.2936 ± 0.0039	0.6058 ± 0.0132
温室 Green- house	- 9.96	冬前 Before winter	310.31 ± 8.00	6601.01 ± 8.73	1965.97 ± 3.19	1706.38 ± 4.94	0.047 ± 0.0012	0.1578 ± 0.0043	0.1819 ± 0.0044
		冬季 Winter	389.03 ± 8.95	6546.85 ± 7.29	1919.74 ± 12.72	2086.10 ± 6.71	0.059 ± 0.0014	0.2026 ± 0.0050	0.1865 ± 0.0037
		初春 First spring	227.16 ± 3.87	7239.25 ± 9.59	1390.04 ± 8.37	2159.23 ± 4.20	0.031 ± 0.0006	0.1634 ± 0.0018	0.1052 ± 0.0019

露地栽培的常春藤内源激素变化较大, 从冬前到冬季, ABA 增加了 87%, IAA 增加了 40%, GA<sub>3</sub> 和细胞分裂素类 (Z + ZR) 分别下降了 41% 和 38%; 到初春, Z + ZR 增加了 22%, IAA 和 GA<sub>3</sub> 略有下降, 而 ABA 下降了 157%。温室栽培的常春藤叶片中 ABA 含量持续较低, 在冬前到冬季, 从 310 ng/g FM 升至 389 ng/g FM, 到初春, 又降至 227 ng/g FM, 在整个冬季, 其内源激素的变化幅度也较小 (表 2)。

由表 2 可见, 露地栽培的常春藤 ABA / GA<sub>3</sub>、ABA / IAA、ABA / (Z + ZR) 都随温度下降而增大, 其中 ABA / GA<sub>3</sub> 的变幅最大, 其变化与温度呈极显著负相关 ( $R = - 0.9999$ ), ABA / IAA 和 ABA / (Z + ZR) 也与温度显著负相关 ( $R$  分别为  $- 0.9897$  和  $- 0.8139$ )。而温室栽培的常春藤 ABA / GA<sub>3</sub> 与温度的相关性则相对不明显 ( $R = - 0.7559$ ), ABA / (Z + ZR) 与温度呈显著负相关 ( $R = - 0.9999$ ), ABA / IAA 比值与温度的相关性不显著 ( $R = - 0.4495$ )。

以上结果表明, 常春藤抗寒性与内源 ABA 含量相关; ABA 与其他激素的比值更能清楚描述常春藤在适应低温过程中的作用。这说明对低温适应起作用的并非某一类激素, 而是不同激素间的平衡。另外, 温室栽培的常春藤叶片内源激素之间平衡的改变幅度均小于露地栽培, 其原因可能有两个: 一是不同抗寒性的常春藤之间存在着差异; 二是抗寒性强的常春藤对低温逆境的适应能力较强, 从而表现出相对的代谢调控的稳定性, 以维持正常的生长。

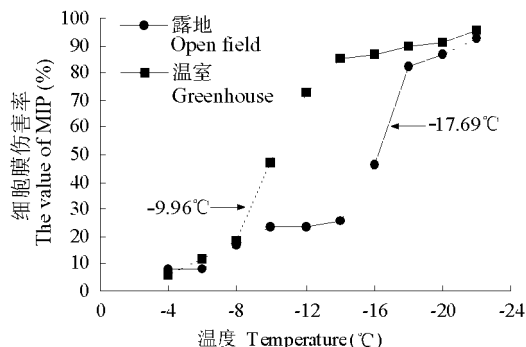


图 1 露地及温室条件下常春藤叶片细胞膜伤害率的比较

Fig 1 Comparison of MIP of leaves of ivy plants growing in open field or greenhouse

植物激素对植物抗寒力的调控起着重要作用<sup>[6]</sup>。特别是 ABA, 低温等胁迫首先引发植物体内渗透调节的改变<sup>[10,11]</sup>, 进而引起植物 ABA 的瞬间或持续性积累, 最终导致基因表达的改变以及植物抗寒性的提高<sup>[12]</sup>。对马铃薯<sup>[2]</sup>、柑桔<sup>[13]</sup>、小麦<sup>[5,14]</sup>、栀子<sup>[15]</sup>等的研究表明, 在低温锻炼中, 伴随着耐寒性的提高, 植物内源 ABA 含量也上升, 抗寒性强植物的 ABA 含量高于抗寒性弱的<sup>[6]</sup>。本研究结果表明, 抗寒性强的露地常春藤 ABA 含量高于抗寒性弱的温室常春藤, 内源 ABA 及其与其它激素之间的平衡, 与常春藤抗寒性相关, 这与马铃薯<sup>[9]</sup>、柑桔<sup>[13]</sup>的规律类似。

赤霉素  $GA_3$  是最早被认为与抗寒力有关的植物激素, 但作用不似 ABA 显著<sup>[6,9]</sup>。据报道抗寒性强的植物  $GA_3$  含量一般低于抗寒性弱的植物<sup>[6,15]</sup>。相对于 ABA 和  $GA_3$  的含量, ABA/ $GA_3$  的比值更能体现与抗寒力的关系。ABA/ $GA_3$  的平衡可以影响不同品种接受低温锻炼的能力; 不同品种或同种植物处于不同生境下, ABA 和  $GA_3$  的对植物抗寒性的影响是不同的<sup>[13,15]</sup>。

植物抗寒能力受众多生理因素影响, 因此需要综合分析多项生理指标的测定结果来判别植物种间、品种间的抗寒性差异, 提供阐述抗寒机制多方面的认识和依据。

### 参考文献:

- 王洪春. 植物对温度逆境的适应. 见: 余叔文主编. 植物生理分子生物学. 北京: 科学出版社, 1992 395  
Wang H C. The adaptability of plants to the temperature adversity. In: Yu S W ed. Plant physiology molecular biology. Beijing: Science Press, 1992 395 (in Chinese)
- Rajashekar C, Gusta L V, Burke M J. Membrane structural transition: probable relation to frost damage in hardy herbaceous species. In: Lysons J M, Graham D, Raison J K eds. Low temperature stress in crop plants the role of membrane. New York: Academic Press, 1979. 255 ~ 274
- 朱根海, 刘祖祺, 朱培仁. 应用 Logistic 方程确定植物组织低温半致死温度的研究. 南京农业大学学报, 1986, 3 (3): 11 ~ 16  
Zhu G H, Liu Z Q, Zhu P R. A study on determination of lethal temperature with logistic equation. Journal of Nanjing Agricultural University, 1986, 3 (3): 11 ~ 16 (in Chinese)
- 朱月林, 曹寿椿, 刘祖祺. 致死温度确定法的改进与在不结球白菜的验证. 园艺学报, 1988, 15 (1): 51 ~ 56  
Zhu Y L, Cao S C, Liu Z Q. Improve of lethal temperature confirmed means and its validation on no-calluses sphere cabbage. Acta Horticulturae Sinica, 1988, 15 (1): 51 ~ 56 (in Chinese)
- Holappa L D, Walker-Simmons M K. The wheat abscisic acid-responsive protein kinase mRNA, PKABA1, is up-regulated by dehydration, cold temperature, and osmotic stress. Plant Physiology, 1995, 108: 1203 ~ 1210
- 罗正荣. 植物激素与抗寒力的关系. 植物生理学通讯, 1989, (3): 1 ~ 5  
Luo Z R. Relationship between plant hormones and cold resistance. Plant Physiology Communication, 1989, (3): 1 ~ 5 (in Chinese)
- 刘祖祺, 张石城. 植物抗性生理学. 北京: 中国农业出版社, 1994. 382 ~ 383  
Liu Z Q, Zhang S C. Plant resistant physiology. Beijing: China Agricultural Press, 1994. 382 ~ 383 (in Chinese)
- 苏维埃, 宓容钦, 王文英, 王洪春. 植物抗性指标的数量化研究. 见: 刘祖祺, 王洪春主编. 植物耐寒性及防寒技术. 北京: 学术书刊出版社, 1990. 204 ~ 212  
Su W A, Mi R Q, Wang W Y, Wang H C. The quantitative studies on the indexes of plant resistance. In: Liu Z Q, Wang H C eds. Plant cold hardiness and low temperature resistance techniques. Beijing: Academic Books and Periodicals Press, 1990. 204 ~ 212 (in Chinese)
- Xu X, Lammeren A M, Vemeer E, Vreugdenhil D. The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation in vitro. Plant Physiology, 1993, 72: 249 ~ 254
- Thomas H, James A R. Freezing tolerance and solute changes in contrast genotypes of *Lolium perenne* L. acclimated to cold and drought. Physiology Plant, 1993, 72: 249 ~ 254
- Skriver K, Mundy J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. Plant Cell, 1990, 2: 503 ~ 512
- Gusta L V. Stress tolerance induction: the role of ABA and heat stable proteins. Horticultural Science, 1994, 29: 571
- 刘祖祺, 林定波. ABA/ $GA_3$  调控特异蛋白质与柑桔的抗寒性. 园艺学报, 1993, 20 (4): 335 ~ 340  
Liu Z Q, Lin D B. The regulation of ABA/ $GA_3$  to the differential protein and cold resistance of citrus. Acta Horticulturae Sinica, 1993, 20 (4): 335 ~ 340 (in Chinese)
- 朱根海, 朱培仁. 小麦抗冻性的季节变化以及温度对脱锻炼的效应. 南京农学院学报, 1984, 2 (2): 9 ~ 16  
Zhu G H, Zhu P R. Seasonal variations of cold hardiness in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) and its relation to temperature. Journal of Nanjing Agricultural College, 1984, 2 (2): 9 ~ 16 (in Chinese)
- 严寒静, 谈 锋. 自然降温过程中栀子叶片脱落酸, 赤霉素与低温半致死温度的关系. 西南师范大学学报 (自然科学版), 2001, 26 (2): 195 ~ 199  
Yan H J, Tan F. The relation between abscisic acid, gibberellic acid and semilethal temperature of *Gardenia jasminoides* Ellis leaves as temperature fell. Journal of Southwest China Normal University (Natural Science), 2001, 26 (2): 195 ~ 199 (in Chinese)