

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2020.04.028

# 低温胁迫下油菜素内酯对高山 离子芥悬浮细胞膜系统的影响

刘亚洁<sup>1</sup>, 安黎哲<sup>2</sup>

(1. 兰州大学草地农业生态系统国家重点实验室, 兰州大学农业农村部草牧业创新重点实验室, 兰州大学草地农业教育部工程研究中心, 兰州大学草地农业科技学院, 兰州 730020; 2. 兰州大学生命科学学院, 兰州 730000)

**摘 要:** 为研究低温胁迫下油菜素内酯(brassinosteroids, BRs)对植物细胞膜系统的影响,使用 24-表油菜素内酯(24-epibrassinolide, EBR)在 4 ℃ 处理高山离子芥(*Chorispora bungeana*)悬浮细胞. 结果显示,低温胁迫下高山离子芥悬浮细胞的离子渗漏率和丙二醛(MDA)含量明显升高,而 EBR 处理显著降低了细胞的离子渗漏率和 MDA 含量. 此外,低温胁迫下,EBR 处理在一定程度上提高了膜脂脂肪酸不饱和程度并明显增强了细胞质膜 H<sup>+</sup>-ATPase, K<sup>+</sup>-ATPase, Ca<sup>2+</sup>-ATPase 以及 Mg<sup>2+</sup>-ATPase 的活性. 另外,低温诱导 *CbCOR15* 基因大量表达. 而在低温胁迫初期,EBR 处理细胞的 *CbCOR15* 基因表达水平更高. 以上实验结果表明,EBR 在稳定低温胁迫下高山离子芥悬浮细胞膜系统的结构与功能方面发挥积极作用,从而保证细胞生理代谢的正常进行,以提高其抗寒能力.

**关键词:** 油菜素内酯; 高山离子芥; 低温胁迫; 膜系统; 抗寒性

**中图分类号:** Q945      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0490-6756(2020)04-0797-07

## Effect of brassinosteroids on the membrane system of *Chorispora bungeana* suspension-cultured cells under chilling stress

LIU Ya-Jie<sup>1</sup>, AN Li-Zhe<sup>2</sup>

(1. State Key Laboratory of Grassland Agro-ecosystems, Key Laboratory of Grassland Livestock Industry Innovation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Engineering Research Center of Grassland Industry, Ministry of Education, College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China;

2. School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** In order to explore the effect of brassinosteroids (BRs) in plant cell membrane systems subjected to chilling stress, suspension-cultured cells of *Chorispora bungeana* were treated with 24-epibrassinolide (EBR) at 4 ℃. The results showed that under chilling stress, ion leakage and malondialdehyde (MDA) content were increased obviously in the cultured cells, but they were significantly decreased by EBR treatment. Besides, under chilling conditions, treatment with EBR obviously increased the unsaturation of membrane fatty acids and remarkably enhanced the activities of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, K<sup>+</sup>-ATPase, Ca<sup>2+</sup>-ATPase and Mg<sup>2+</sup>-ATPase. Furthermore, the expression of *CbCOR15* was highly responsive to low temperature. The *CbCOR15* was expressed at a much higher level in EBR-treated cells at the early stage of chilling stress. All the results indicated that EBR could play a positive role

收稿日期: 2019-07-31  
基金项目: 国家杰出青年基金(30625008)  
作者简介: 刘亚洁(1981—), 女, 甘肃镇原县人, 实验师, 研究方向为植物环境生理学. E-mail: liuyajie@lzu.edu.cn  
通讯作者: 安黎哲. E-mail: 498240060@qq.com

in stabilizing the structure and function of cell membranes under low temperature conditions, thereby ensuring the normal physiological metabolism of cells to improve its chilling tolerance.

**Keywords:** Brassinosteroids; *Chorispora bungeana*; Chilling stress; Membrane system; Chilling tolerance

# 1 引言

生物膜是细胞与外界环境联系的接口,各种逆境对细胞的伤害多始于细胞膜.大量研究表明,低温胁迫下植物细胞膜系统是最先受到伤害的部位,造成大量电解质向组织外渗漏,使组织浸泡液的离子渗漏率增高<sup>[1]</sup>.在低温胁迫下,细胞内产生大量的活性氧自由基(ROS),自由基的增加首先攻击膜系统,膜脂脂肪酸的不饱和键被过氧化,产生膜脂过氧化作用,造成丙二醛(MDA)含量的增加<sup>[2]</sup>.低温对膜脂的直接影响是改变膜脂成分的含量及其脂肪酸组成,膜的流动性和稳定性主要由膜脂脂肪酸的不饱和程度来决定<sup>[3]</sup>,大量研究表明膜脂脂肪酸不饱和程度高,可增强光和有机体对冷、低温和盐胁迫的耐性<sup>[4-5]</sup>.

质膜 ATPase 是一类功能性蛋白,对维持细胞内外环境的代谢平衡具有十分重要的作用,它同各种膜体系和细胞器有着广泛的联系,对能量代谢、物质的吸收和运输等许多生理过程具有重要作用<sup>[6]</sup>.质膜 H<sup>+</sup>-ATPase 被形象地称为植物生命活动的“主宰酶”,它通过泵出质子建立跨膜的电化学梯度,驱动次级离子或溶质的跨膜运输<sup>[7]</sup>.研究表明 H<sup>+</sup>-ATPase 对低温引起的氧化胁迫十分敏感<sup>[8]</sup>.K<sup>+</sup>-ATPase 存在于细胞质膜中,该酶在细胞质膜中的唯一功能是水解 ATP 进行 K<sup>+</sup>的逆浓度梯度运输<sup>[9]</sup>.低温胁迫能引起胞质 Ca<sup>2+</sup>水平升高<sup>[10-11]</sup>,胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度过高或维持高浓度时间过长会干扰细胞能量代谢系统和许多生理功能.因此,要维持细胞生理代谢和 Ca<sup>2+</sup>第二信使功能的正常进行,必须把受刺激升高的胞质 Ca<sup>2+</sup>浓度在其完成信息传递后迅速回落到静息态即低稳态水平.这种动态调节行为主要依赖于细胞质膜和细胞器外膜上的 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 和 Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>逆向运输两种方式<sup>[12]</sup>.细胞膜上 Mg<sup>2+</sup>-ATPase 对有生命的细胞维持内外环境生理代谢的平衡具有极其重要的作用<sup>[13]</sup>.总之,研究低温环境条件下质膜各类 ATPase 活性的变化对进一步阐明植物的抗寒机理具有重要意义.此外,低温胁迫诱导了一些基因的启动和大量表达,这些基因称之为冷诱导基因或

冷调节基因(COR),它们在提高植物耐低温能力方面发挥重要作用.

油菜素内酯(brassinosteroids, BRs)是以甾醇为基本结构的具有生物活性的化合物,广泛存在于植物体内,对茎和花粉管伸长、叶片弯曲和偏上性生长、乙烯合成、质子泵活化、木质部分化、光形态建成、衰老和基因表达等具有广泛的调节作用<sup>[14-15]</sup>.在农业生产中,BRs 可以提高作物对高温、干旱、冷害、除草剂、盐害等逆境的抗性,特别是在提高植物耐冷性方面表现出了良好的效果<sup>[16]</sup>.BRs 可以提高植物对低温胁迫的抗性,但是其深层次的机理在很大程度上尚未探究.细胞膜是植物遭受冷害损伤的原初部位,本文以高山离子芥(*Chorispora bungeana*)悬浮细胞为材料,通过研究在低温胁迫下 BRs 对其离子渗漏率,膜脂过氧化程度,膜脂脂肪酸不饱和程度,质膜上执行重要生理功能的 ATPase 活性,以及冷调节基因 *CbCOR15* 表达水平的影响来探讨在低温胁迫下 BRs 对细胞膜系统的影响,从而阐明 BRs 提高植物抗寒性的原初生理机制.

# 2 材料与方法

## 2.1 材料

高山离子芥取材于新疆天山乌鲁木齐河源区,悬浮细胞的培养参照 Guo *et al.* 的方法<sup>[17]</sup>.

## 2.2 方法

2.2.1 悬浮细胞的处理 将悬浮培养好的处于指数生长期的同一批材料转接于加入 0.05 mg/L 油菜素内酯(24-epibrassinolide, EBR)的 MS 液体培养基中,常温处理 3 d 后,立即置于 4 ℃ 低温光照培养箱中摇床培养处理 1~5 d,摇床转速为 120 r/min,每天取样一次,以不加 EBR 的细胞为对照.研究 BRs 对 *CbCOR15* 基因表达的影响时取样时间为低温处理 1 h、3 h、6 h、9 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 和 120 h,以不加 EBR 的细胞为对照.除处理时间外,其它环境条件均一致.处理结束后,按照 Ishikawa 等提供的方法用 400 目双层筛网过滤细胞<sup>[18]</sup>,蒸馏水清洗 3 遍,用滤纸吸干表面水分,鲜样称重,测定以下各指标.

2.2.2 生理指标测定 离子渗漏率的测定参照 Rapacz 的方法<sup>[19]</sup>. 膜脂过氧化程度用 MDA 含量表示,其测定参照李合生的方法<sup>[20]</sup>. 膜脂脂肪酸的双链指数(Double bond index, DBI)是反映膜脂脂肪酸不饱和程度的综合指标. 膜脂的提取,脂肪酸含量的测定,DBI 的计算均参照李合生的方法<sup>[20]</sup>. 质膜的提取纯化和质膜 H<sup>+</sup>-ATPase 活性的测定参照张志良等人的方法<sup>[21]</sup>. 质膜 K<sup>+</sup>-ATPase 活性的测定参照乙引等人的方法<sup>[9]</sup>. 质膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性的测定参照李新民等人的方法<sup>[22]</sup>. 质膜 Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性的测定参照王精明等人的方法<sup>[13]</sup>.

2.2.3 *CbCOR15* 基因的表达分析 采用 Trizol 法提取总 RNA,以总 RNA 为模板,用引物 oligdT 进行反转录得到相应的 cDNA. 根据高山离子芥 *CbCOR15* 基因(基因登记号:EF208112)设计特异引物:上游引物:5'-CGCAAGAAGTCGTCGTT-3',下游引物:5'-GTGGCATCCTTAGCATCT-3'. 同时根据已知的高山离子芥 *Actin* 基因(基因登记号:AY825363)设计特异引物作为内参,来调节每个样品中的 RNA 含量. 上游引物:5'-AT-ACGCTCTTCCACACGCTATTTC-3',下游引物:5'-TCACGATTTTCACGCTCTGCT-3'. 按 SYBR Premix Ex Taq(TaKaRa)操作手册的要求在 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)上进行实时荧光定量 PCR 检测. 高山离子芥 *CbCOR15* 基因的扩增程序为 95 °C 预变性 10 s,95 °C 变性 15 s,55 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 20 s,共进行 40 个循环. 高山离子芥 *Actin* 基因的扩增程序为 95 °C 预变性 10 s,95 °C 变性 5 s,59 °C 退火及延伸 20 s,共进行 45 个循环. 以梯度稀释的 cDNA 为模板,进行与样本条件相同的实时荧光定量 PCR 反应,电脑会通过软件自动绘制标准曲线.

2.2.4 数据分析 所有实验至少重复三次,用 SPSS19.0 对数据进行统计和方差分析,用 Origin9.0 绘制数据图.

### 3 实验结果

#### 3.1 低温胁迫下,EBR 对离子渗漏率的影响

离子渗漏率是直接反映细胞膜透性的指标,如图 1 所示,低温处理导致没有经过 EBR 处理的细胞内电解质大量外渗,在前 2 d,其离子渗漏率明显提高,在第 3~5 d 又略微有所下降,但均高于常温(0 d). 而 EBR 处理的细胞离子渗漏率明显低于对

照,其变化趋势维持在一个比较稳定的状态.

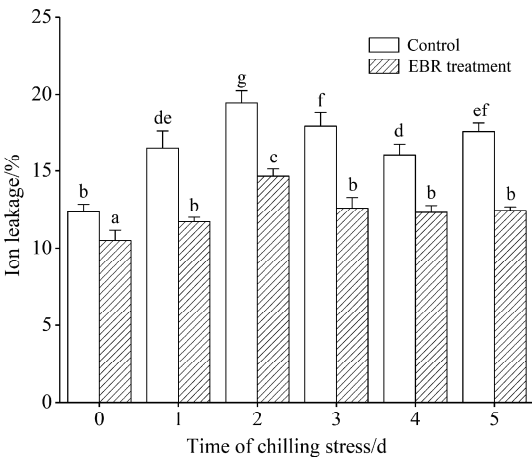


图 1 4 °C 低温胁迫下 EBR 对高山离子芥悬浮细胞离子渗漏率的影响

图中数据为平均数±标准差(SD). 柱上不同字母表示经 Duncan 法检验在  $P<0.05$  水平差异显著(下同)

Fig. 1 Effect of EBR on ion leakage of suspension cultured cells of *Chorispora bungeana* under 4 °C stress. Each value represents mean ± standard deviation (SD). Different letters on the bars indicate significant difference at  $P<0.05$  level by Duncan test.

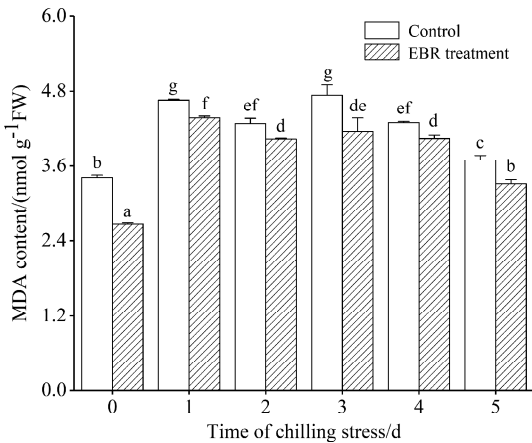


图 2 4 °C 低温胁迫下 EBR 对高山离子芥悬浮细胞 MDA 含量的影响

Fig. 2 Effect of EBR on MDA content in suspension cultured cells of *Chorispora bungeana* under 4 °C stress

#### 3.2 低温胁迫下,EBR 对膜脂过氧化程度的影响

MDA 的含量反映了膜脂过氧化程度,如图 2 所示,低温胁迫下,没有经过 EBR 处理的细胞其 MDA 含量在前 3 d 呈明显上升趋势,然后又缓慢下降,而 EBR 处理可以抑制 MDA 含量的增加,降低膜脂过氧化程度.

#### 3.3 低温胁迫下,EBR 对膜脂脂肪酸不饱和程度的影响

经过气相色谱分析,高山离子芥悬浮细胞中膜脂脂肪酸的主要组分为棕榈酸(C16:0),棕榈油

酸(C16 : 1),油酸(C18 : 1),亚油酸(C18 : 2)和亚麻酸(C18 : 3). 图 3 显示了 4 ℃胁迫下,EBR 对细胞膜脂脂肪酸 DBI 的影响. 对照中 DBI 在胁迫处理前 3 d 略微升高,随后又呈缓慢下降趋势,而在 EBR 处理在一定程度上提高了膜脂脂肪酸 DBI,在低温胁迫第 2、3、5 d 时,EBR 处理细胞的 DBI 值比对照分别提高了 10. 9%、8. 9%、15. 6%.

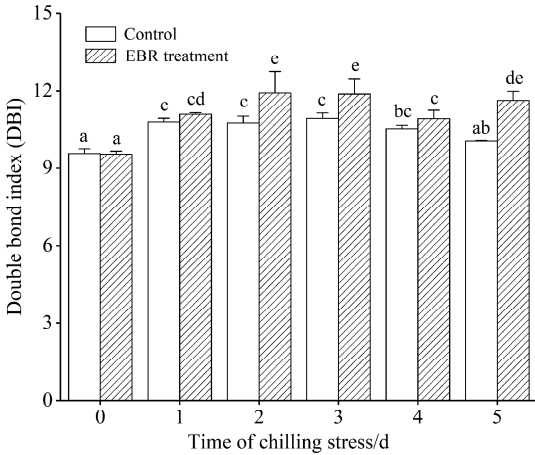


图 3 4 ℃低温胁迫下 EBR 对高山离子芥悬浮细胞膜脂脂肪酸 DBI 的影响

Fig. 3 Effect of EBR on DBI of membrane fatty acids in suspension cultured cells of *Chorispora bungeana* under 4 ℃ stress

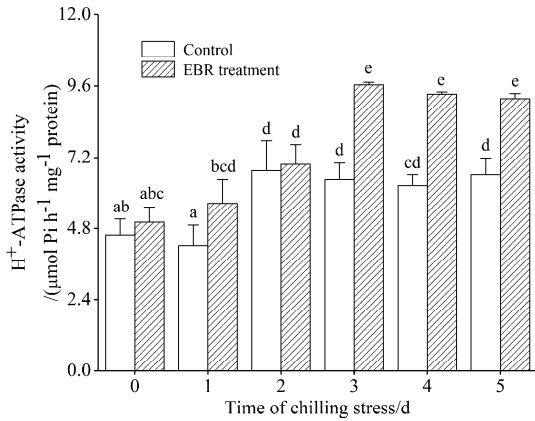


图 4 4 ℃低温胁迫下 EBR 对高山离子芥悬浮细胞质膜 H<sup>+</sup>-ATPase 活性的影响

Fig. 4 Effect of EBR on the activity of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in suspension cultured cells of *Chorispora bungeana* under 4 ℃ stress

3. 4 低温胁迫下 EBR 对质膜 ATPase 活性的影响

3. 4. 1 对质膜 H<sup>+</sup>-ATPase 活性的影响 图 4 反映了低温胁迫下,EBR 处理对质膜 H<sup>+</sup>-ATPase 活性的影响. 在低温处理第 1 d,对照中 H<sup>+</sup>-ATPase 活性略微有所下降,随后呈上升趋势,在第 2 d 以后呈比较平稳的状态. 而 EBR 处理可以显著提高 H<sup>+</sup>-ATPase 活性,尤其在低温胁迫第 3~5 d 时表

现得更为明显,比对照分别提高了 49. 3%、49. 3%、38. 7%.

3. 4. 2 对质膜 K<sup>+</sup>-ATPase 活性的影响 如图 5 所示,低温胁迫下,对照细胞 K<sup>+</sup>-ATPase 活性在处理第 1 d 没有变化,在第 2 d 达到最大,随后又呈明显下降趋势. 而 EBR 处理的细胞表现出更高的 K<sup>+</sup>-ATPase 活性,在前 4 d,经 EBR 处理的细胞 K<sup>+</sup>-ATPase 活性呈上升趋势,只有在第 5 d 有所下降,但比对照提高了 121. 9%.

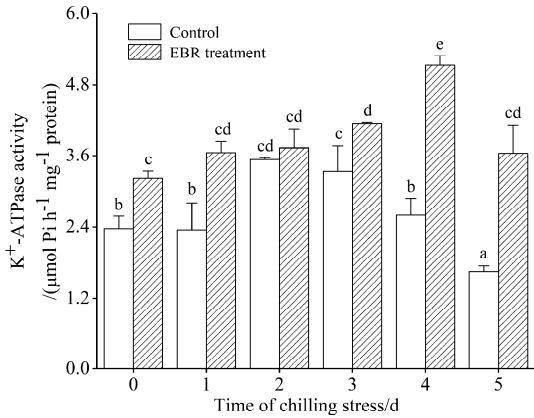


图 5 4 ℃低温胁迫下 EBR 对高山离子芥悬浮细胞质膜 K<sup>+</sup>-ATPase 活性的影响

Fig. 5 Effect of EBR on the activity of plasma membrane K<sup>+</sup>-ATPase in suspension cultured cells of *Chorispora bungeana* under 4 ℃ stress

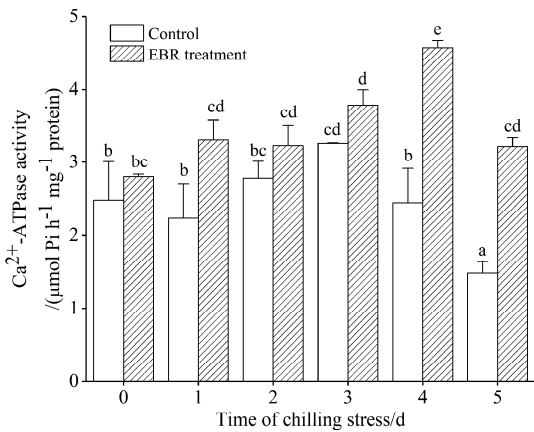


图 6 4 ℃低温胁迫下 EBR 对高山离子芥悬浮细胞质膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性的影响

Fig. 6 Effect of EBR on the activity of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase in suspension cultured cells of *Chorispora bungeana* under 4 ℃ stress

3. 4. 3 对质膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性的影响 图 6 显示了低温胁迫下,EBR 处理可以明显提高细胞 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性. 在处理前 3 d,对照 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性缓慢上升,而第 3 d 后又明显下降. EBR 处理的细胞其 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性在前 4 d 呈上升

趋势,在第 5 d 时又有所下降,在第 4 d 和第 5 d,其  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性要比对照分别提高 86.8% 和 118.1%.

3.4.4 对质膜  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性的影响 图 7 显示了低温胁迫下,EBR 处理对质膜  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性的影响. 低温胁迫下,经 EBR 处理的细胞其  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性变化趋势与  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性的变化趋势相似,与对照相比,其活性明显升高,尤其是在处理后期即第 4 d 和第 5 d,这种促进效应更为明显,比对照要提高 75.6% 和 89%.

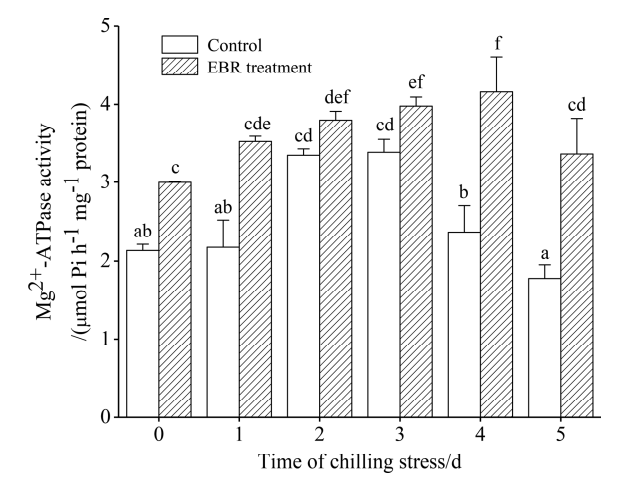


图 7 4 °C 低温胁迫下 EBR 对高山离子芥悬浮细胞质膜  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性的影响

Fig. 7 Effect of EBR on the activity of plasma membrane  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase in suspension cultured cells of *Chorispora bungeana* under 4 °C stress

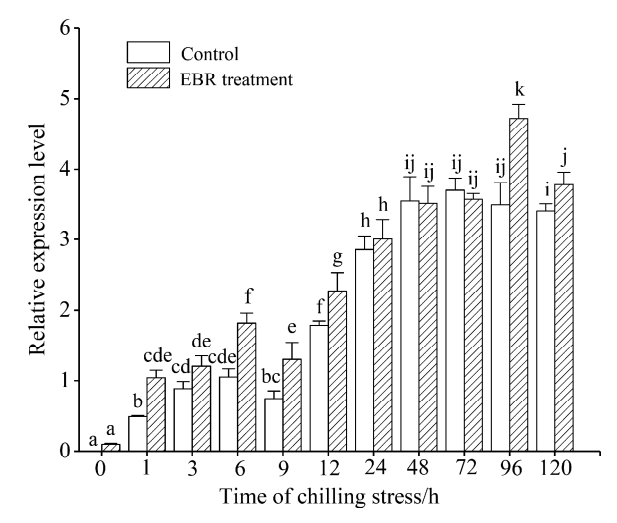


图 8 4 °C 低温胁迫下 EBR 对高山离子芥悬浮细胞 *CbCOR15* 基因表达的影响

Fig. 8 Effect of EBR on expression of *CbCOR15* in suspension cultured cells of *Chorispora bungeana* under 4 °C stress.

### 3.5 低温胁迫下 EBR 对高山离子芥 *CbCOR15* 基因表达的影响

低温胁迫诱导了对照细胞 *CbCOR15* 基因大量表达,在低温胁迫处理初期(1~48 h),*CbCOR15* 表达量迅速增加,随后呈相对稳定的状态(图 8). 在胁迫 1~12 h 时,EBR 处理可以明显提高 *CbCOR15* 基因的表达量,在 24~72 h 时,EBR 的处理效果并不明显,对照和 EBR 处理细胞的 *CbCOR15* 表达量没有显著差异,但在低温胁迫后期(96~120 h),EBR 处理细胞中 *CbCOR15* 表达量又明显高于对照.

## 4 讨 论

本研究通过对细胞离子渗漏率的测定后发现,在持续低温胁迫下,EBR 处理的细胞其离子渗漏率明显低于对照,变化趋势比较平稳(图 1),EBR 在很大程度上抑制了低温胁迫所造成的细胞内电解质大量外渗,从而使细胞内外的离子浓度维持在一个较平衡的状态,保护细胞膜的稳定性. 低温胁迫会诱导高山离子芥悬浮细胞积累较多的 MDA,而 EBR 处理在一定程度上降低了细胞内 MDA 含量(图 2),从而减轻低温所造成的膜脂过氧化程度,有利于维持细胞膜正常的结构与功能. 总之,EBR 处理可以缓解低温胁迫对细胞膜造成的损伤,这也最直观地表明 EBR 可以提高高山离子芥悬浮细胞的抗寒能力.

研究表明增加膜脂不饱和脂肪酸含量,可以使细胞膜在低温胁迫下维持一定的流动性和稳定性,这对提高植物对低温的耐受性是有利的<sup>[4-5]</sup>. 在低温胁迫下,EBR 可以在一定程度上提高高山离子芥悬浮细胞的膜脂脂肪酸不饱和程度(图 3),这说明 EBR 处理可以增加膜脂不饱和脂肪酸的含量,有利于细胞膜保持一定的流动性,这对维持细胞膜正常生理代谢,提高植物的抗寒性具有积极意义. 推测 EBR 提高膜脂脂肪酸不饱和程度可能通过 2 条途径,一是 EBR 的应用可以维持低温下与脂肪酸代谢相关的酶特别是去饱和酶的活性,可能是 EBR 刺激了编码这些酶的基因的表达;二是直接改善膜脂的物理状态,防止其低温下发生相变.

植物在冷害或冻害中质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase 较其它膜上的 ATPase 更敏感,它们会首先发生活性的降低或丧失<sup>[23-24]</sup>. 在本实验中,与对照相比,EBR 可以提高冷胁迫下细胞质膜  $\text{H}^{+}$ -ATPase 活性(图 4),这说明 EBR 可以保护质膜上的  $\text{H}^{+}$ -ATPase,

使之维持正常的生理功能. EBR 提高  $H^+$ -ATPase 的活性可能是通过 EBR 促进  $H^+$ -ATPase 基因的表达或酶蛋白的修饰来执行的.

植物在低温胁迫下, 质膜失去半透性, 膜功能发生变化使得膜上与  $K^+$  运输的酶系统失活, 胞内  $K^+$  大量向胞外渗漏. 在本研究中, EBR 可以在低温下提高  $K^+$ -ATPase 的活性, 而且这种促进效应随着胁迫时间的延长表现得越为明显(图 5), 可见 EBR 可以保护质膜  $K^+$ -ATPase, 维持其正常的  $K^+$  运输能力, 从而使细胞质中的  $K^+$  浓度处于一个正常水平.

许多研究证明质膜上  $Ca^{2+}$ -ATPase 的活性与植物的抗寒力有密切的关系. Jian *et al.* 报道在低温下不抗寒植物的质膜和核膜中  $Ca^{2+}$ -ATPase 失活, 胞质内和核内  $Ca^{2+}$  的增加不能被泵回胞外或胞内钙库, 造成细胞死亡<sup>[25]</sup>. 冷预处理诱导水稻幼苗抗寒性的提高, 可能与其能较强的维持或激活质膜和液泡膜上的  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性有关<sup>[26]</sup>. 从本实验结果可以看出, 低温下 EBR 处理的细胞  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性显著高于没有经过 EBR 处理的细胞(图 6). EBR 处理能较好地维持或激活悬浮细胞质膜  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性, 使细胞能更有效地把因冷胁迫刺激所升高的过量胞质  $Ca^{2+}$  及时地运到胞外或运入胞内钙库储藏起来, 从而使胞质  $Ca^{2+}$  浓度迅速降低到静息态水平, 以维持细胞生理代谢和  $Ca^{2+}$  信使功能的正常进行. 质膜  $H^+$ -ATPase 的活性受蛋白激酶调控, 蛋白激酶活性又受到胞质  $Ca^{2+}$  含量的影响, 低温胁迫下 EBR 处理可以增强  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性, 从而维持细胞内正常的  $Ca^{2+}$  浓度, 这对于间接提高  $H^+$ -ATPase 的活性也是有利的.

王精明等人采用冷胁迫和低温锻炼两种方式处理水稻幼苗, 研究低温对根质膜和液泡膜  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性的影响<sup>[13]</sup>. 结果表明, 冷胁迫可降低质膜和液泡膜  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性. 然而, 低温锻炼可增加其冷稳定性. 冷害可能首先是通过影响植物细胞膜  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性, 使之降低或完全失活, 从而破坏植物的生命力. 本实验中, EBR 处理可以明显提高冷胁迫下高山离子芥悬浮细胞质膜  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性, 而且这种效应随着胁迫时间的延长表现的越为明显(图 7), 这说明 EBR 提高细胞抗寒能力与质膜  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性的增强有关.

低温胁迫可以诱导 COR 基因的大量表达, 如

图 8 所示, 在 4 °C 胁迫初期, 离子芥悬浮细胞 *Cb-COR15* 基因的表达量大幅度上升. 已有研究证明拟南芥 *AtCOR15a* 编码的多肽具有两亲性的  $\alpha$ -螺旋结构域, 可能通过影响膜磷脂层内部的弯曲性来减少膜遇冷时所产生的由脂双层向六角形  $H_H$  相位转变的发生率, 从而保护膜结构的稳定性, 缓解低温对植物细胞膜造成的损伤<sup>[27]</sup>. 高山离子芥 *CbCOR15* 基因编码的亲水性多肽也具有类似的功能<sup>[28]</sup>. 而 EBR 处理可以明显提高低温胁迫最初期 *CbCOR15* 基因的表达水平, 从而有利于在一开始就防止细胞膜六角形  $H_H$  相位的产生, 这对于稳定细胞膜的结构和功能, 从分子水平上提高植物的抗寒性具有重要意义.

综上所述, EBR 处理可以抑制低温胁迫所引起的高山离子芥悬浮细胞离子渗漏率和 MDA 含量的升高, 提高膜脂脂肪酸不饱和程度, 增强质膜  $H^+$ -ATPase,  $K^+$ -ATPase,  $Ca^{2+}$ -ATPase 以及  $Mg^{2+}$ -ATPase 的活性, 并在胁迫最初期诱导 *Cb-COR15* 基因大量表达, 从而稳定高山离子芥悬浮细胞膜系统的结构与功能, 保证细胞生理代谢的正常进行, 以提高其抗寒能力.

## 参考文献:

- [1] 薛爽, 饶丽莎, 左丹丹, 等. 植物低温胁迫响应机理的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2016, 44: 17.
- [2] Prasad T K, Anderson M D, Martin B A. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide [J]. The Plant Cell, 1994, 6: 65.
- [3] Murata N, Siegenthaler P A. Lipids in photosynthesis: an overview [M]//Siegenthaler P A, Murata N. Lipids in photosynthesis: structure, function and genetics. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998: 1.
- [4] Gombos Z, Kanervo E, Tsvetkova T, *et al.* Genetic enhancement of the ability to tolerate photoinhibition by introduction of unsaturated bonds into membrane glycerolipids [J]. Plant Physiol, 1997, 115: 551.
- [5] Allakhverdiev S I, Nishiyama Y, Suzuki I, *et al.* Genetic engineering of the unsaturation of fatty acids in membrane lipids alters the tolerance of *Synechocystis* to salt stress [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 5862.
- [6] Serrano R. Structure and function of plasma membrane ATPase [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1989, 40: 61.

- [7] 杨颖丽,杨宁,安黎哲,等. 物质膜  $H^+$ -ATPase 的研究进展[J]. 西北植物学报, 2006, 26: 2388.
- [8] 李美茹,刘鸿先,王以柔. 植物细胞膜 ATP 酶及其与植物低温生理过程的关系[J]. 热带亚热带植物学报, 1997, 5: 74.
- [9] 乙引,汤章城. 经渗透胁迫高粱根的质膜囊泡  $K^+$ -ATP 酶及其运输特征[J]. 植物生理学报, 1996, 22: 231.
- [10] Jian L C, Sun L H, Li J H, *et al.*  $Ca^{2+}$ -homeostasis differs between plant species with different cold-tolerance at 4°C chilling [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42: 358.
- [11] Wang L J, Huang W D, Li J Y, *et al.* Peroxidation of membrane lipid and  $Ca^{2+}$  homeostasis in grape mesophyll cells during the process of cross-adaptation to temperature stresses [J]. *Plant Sci*, 2004, 167: 71.
- [12] Puhakainen T, Pihakaski-Maunsbach K, Widell S, *et al.* Cold acclimation enhances the activity of plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase in winter rye leaves [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1999, 37: 231.
- [13] 王精明,李美茹. 低温对水稻幼苗根细胞质膜、液泡膜  $Mg^{2+}$ -ATP 酶活性的影响[J]. 湖北农学院学报, 2000, 20: 295.
- [14] Müssig C, Fischer S, Altamann T. Brassinosteroid-regulated gene expression [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1241.
- [15] 李钱峰,鲁军,余佳雯,等. 油菜素内酯与脱落酸互作调控植物生长与抗逆的分子机制研究进展[J]. 植物生理学报, 2018, 54: 370.
- [16] 靳开川,何金环. 油菜素内酯在植物抗逆中的作用及信号传导机制综述[J]. 江苏农业科学, 2017, 45: 4.
- [17] Guo F X, Zhang M X, Chen Y, *et al.* Relation of several antioxidant enzymes to rapid freezing resistance in suspension cultured cells from alpine *Chorispora bungeana* [J]. *Cryobiology*, 2006, 52: 241.
- [18] Ishikawa M, Robertson A J, Gusta L V. Comparison of viability tests for assessing cross-adaptation to freezing, heat and salt stresses induced by abscisic acid in bromegrass (*Bromus inermis* Leyss) suspension cultured cells [J]. *Plant Sci*, 1995, 107: 83.
- [19] Rapacz M. Frost resistance and cold acclimation abilities of spring-type oilseed rape [J]. *Plant Sci*, 1999, 147: 55.
- [20] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 227.
- [21] 张志良,翟伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 260.
- [22] 李新民,倪嘉缙,王平原,等. 稀土对肌质网  $Ca^{2+}$ -ATP 酶活性的影响[J]. 生物化学杂志, 1995, 11: 281.
- [23] 简令成,董合铸,孙龙华. 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[J]. 植物学报, 1981, 23: 257.
- [24] Arora R, Palta J P. A loss in the plasma membrane ATPase activity and its recovery coincides with incipient freeze-thaw injury and postthaw recovery in onion bulb scale tissue [J]. *Plant Physiol*, 1991, 95: 846.
- [25] Jian L C, Li J H, Chen W P, *et al.* Cytochemical localization of calcium and  $Ca^{2+}$ -ATPase activity in plant cells under chilling stress: a comparative study between the chilling-sensitive maize and the chilling-insensitive winter wheat [J]. *Plant Cell Physiol*, 1999, 40: 1061.
- [26] 曾韶西,李美茹. 冷和盐预处理提高水稻幼苗抗寒性期间细胞  $Ca^{2+}$ -ATP 酶活性的变化[J]. 植物学报, 1999, 41: 156.
- [27] Steponkus P L, Uemura M, Joseph R A, *et al.* Mode of action of the *COR15a* gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 14570.
- [28] Si J, Wang J H, Zhang L J, *et al.* *CbCOR15*, a cold-regulated gene from alpine *Chorispora bungeana*, confers cold tolerance in transgenic tobacco [J]. *J Plant Biol*, 2009, 52: 593.

#### 引用本文格式:

中文: 刘亚洁, 安黎哲. 低温胁迫下油菜素内酯对高山离子芥悬浮细胞膜系统的影响[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2020, 57: 797.

英文: Liu Y J, An L Z. Effect of brassinosteroids on the membrane system of *Chorispora bungeana* suspension cultured cells under chilling stress [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2020, 57: 797.