

# 水分胁迫使刺槐实生苗核糖核酸酶活力增加原因的探讨\*

叶金山 陆宪辉

(南京林业大学)

**摘要** 水分胁迫能促使刺槐(*Robinia pseudoacacia*)实生苗核糖核酸酶(RNase)活力增加。与此同时,水分胁迫的刺槐实生苗叶片中Al、Cd、Co、Cr、Fe、Li、Mn、Na、Ti和V含量( $\times 10^{-6}$ (ppm))比对照增加,Ba、Ca、Ni、P和Sr含量比对照稍减少,而K、Cu、Mg、Pb和Zn含量不变。亚胺环己酮(CHM)前处理对充分供水和水分胁迫的刺槐实生苗RNase活力增加均有强烈的抑制作用。水分胁迫可导致 $^3\text{H}$ -亮氨酸参入刺槐实生苗RNase能力明显减小,而胁迫实生苗的RNase活力则比充分供水的对照高13%,从而证明水分胁迫时刺槐实生苗RNase活力增加主要是由于RNase重新合成所致。

**关键词** 刺槐实生苗 水分胁迫 核糖核酸酶

水分胁迫对RNase影响的许多研究,多数认为水分胁迫可促使植物RNase活力明显增加,但某些小麦品种并不因为水分胁迫而引起叶片中RNase总活力增加,或者基本不变<sup>[1]</sup>。对水分胁迫引起RNase活力增加的解释有多种:①水分胁迫促进了RNase的重新合成<sup>[2]</sup>;②RNase活力增加是由于原存的酶活化的结果<sup>[3]</sup>;③水分胁迫时抑制剂如金属离子的消失或减少<sup>[4]</sup>;④水分胁迫引起膜结构破坏,促使RNase从细胞器的区隔中释放出来而增加酶活力<sup>[5]</sup>;⑤因水分胁迫而使RNase解聚成为两个亚单位而提高其活力<sup>[6]</sup>。

Brandle(1977)研究刺槐实生苗在脱水—复水循环时多核糖体的蛋白质合成活性证明,在水分胁迫时,刺槐实生苗多核糖体仅减少20%,但是它能有效地使 $^3\text{H}$ -亮氨酸参入肽链。水分胁迫时RNase活力增加,复水后RNase活力便降低。从而得出这样的结论:刺槐实生苗对水分胁迫的主要反应之一是RNase释放、活化或合成<sup>[7]</sup>。总之,对水分胁迫使RNase活力增加的原因看法不一。本文试以刺槐实生苗为材料,研究探讨水分胁迫对RNase活力影响的原因,并为林业生产实践提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 种子处理

将刺槐种子浸泡在80℃温水中20 min以软化坚硬的种皮,然后用冷水冲洗,转移到27℃黑暗的恒温箱中发芽,每天早晚各换水一次,按研究需要在规定的时间取样制备RNase制剂。

### 1.2 酶液的制备

1991—11—11收稿。

\*本文蒙周国璋副研究员审改,深致谢意。

取发芽整齐、大小一致的实生苗放在玻璃研钵中,加适量0.05 M醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.8)研磨。匀浆液在4000 rpm下离心20 min,取上清液定容作为粗酶液。所有的提取步骤均在冰浴中进行。

### 1.3 RNase 活力测定

RNase活力测定参考文献[8]。

### 1.4 水势测定

水势按宋廷生和余叔文描述的细流法测定<sup>[9]</sup>。

### 1.5 水分胁迫处理

将实生苗放入培养皿于27 °C恒温箱中进行脱水,对照充分供水。盆栽苗采用停止灌水来造成水分胁迫。

### 1.6 亚胺环己酮(CHM)前处理

将实生苗先培养在CHM溶液(30 ppm)中,24 h后用水充分清洗。然后,把经CHM前处理的和未经CHM前处理的实生苗分别进行充分供水(对照)和脱水。

### 1.7 <sup>3</sup>H-亮氨酸参入

实生苗(25 g)经胁迫20 h后,放入<sup>3</sup>H-亮氨酸溶液(浓度4  $\mu$ ci/ml,比度105 ci/mM)中培养8 h。对照幼苗在标记之前充分供水。所有实生苗都用蒸馏水充分洗涤后再匀浆。匀浆液用Beckman超速离心机在20 000 rpm下离心20 min。

### 1.8 <sup>3</sup>H-亮氨酸标记的RNase的部分提纯

1.8.1 Sephadex G-100柱层析 <sup>3</sup>H-亮氨酸参入的RNase粗提液通过预先用0.05 M醋酸-醋酸钠缓冲液(pH4.8)平衡的Sephadex G-100柱,用同样缓冲液淋洗,流速25 ml/h,每组分收集5 ml,合并有活力的高峰组分。

1.8.2 CM-纤维柱层析 合并有活力的高峰组分通入预先用0.05 M醋酸-醋酸钠缓冲液(pH4.8)平衡的CM-纤维素柱,用含有0.25~0.75 M KCl的0.05 M醋酸-醋酸钠缓冲液(pH4.8)进行梯度洗脱,流速60 ml/h,每组分收集5 ml,将有RNase活力的高峰组分进行放射性测定。

### 1.9 RNase 放射性测定

取CM-纤维素柱的RNase活力高峰组分50  $\mu$ l滴在滤纸片中,待干后,放入Beckman LS-5801型液闪谱仪中测定RNase中<sup>3</sup>H-亮氨酸的DPM值。

### 1.10 叶片金属离子含量测定

实生苗叶片干粉的金属离子含量用Beckman电感耦合等离子直读光谱仪(ICP)测定。

### 1.11 蛋白质测定

按M. M. Bradford(1976)描述的Coomassie亮蓝G<sub>250</sub>染色法测定<sup>[10]</sup>。

所有试验均在水分胁迫前取鲜重25 g生长一致的实生苗两份,一份正常供水,另一份进行胁迫处理。胁迫后不因失水而增加幼苗重量,一律按胁迫前取样的25 g鲜重计算。

## 2 结果与讨论

### 2.1 水分胁迫下刺槐实生苗RNase活力的变化

刺槐实生苗对水分胁迫的反应非常敏感,轻度的水分胁迫就能引起RNase活力的明显提

表1 水分胁迫对刺槐实生苗RNase活力的影响

实验	处 理	水 势 (bar)	RNase活力 (Units /g·F·W)	相 对 活 力 (%)
I	对 照	-1.57	131	100
	胁迫10 h	-2.20	181	138
	胁迫20 h	-4.91	186	142
	胁迫30 h	-7.62	190	145
II	对 照	-1.52	132	100
	胁迫10 h	-2.18	136	103
	胁迫20 h	-4.84	146	111
	胁迫30 h	-7.56	160	121
III	对 照	-1.58	117	100
	胁迫20 h	-4.89	132	113
IV	对 照	-2.96	52	100
	胁迫288 h	-4.94	153	294

注：1. 在实验 I 和 II 中，种子分别在 27℃ 恒温箱中培养 76 h 和 136 h，幼苗平均长 25、70 mm 时进行胁迫处理。

2. 实验 III 中，种子在 27℃ 恒温箱中培养 72 h，幼苗平均长 25 mm 时开始胁迫 20 h，然后供水 8 h 测定 RNase 活力。

3. 实验 IV 中，盆栽幼苗自播种之日起生长 50 d，停止供水 12 d，而对照始终充分供水。盆栽土取自苗圃地，加入 1/3 体积黄沙，增加通透性。

制<sup>[14]</sup>。但是，也有报道，10 mM Zn<sup>2+</sup>和 Cu<sup>2+</sup>对小麦可溶性 RNase 和颗粒 RNase 均无抑制效应<sup>[1]</sup>。但是，在本研究中，水分胁迫引起刺槐实生苗叶片 RNase 活力显著提高的同时，所测定的离子无明显减少，尤其是 Co<sup>2+</sup>含量不但不减少，反而有增加，而 Cu<sup>2+</sup>和 Zn<sup>2+</sup>含量则不变(表 2)。我们的研究结果与前人的不一致。因此，刺槐实生苗在水分胁迫时 RNase 活力增加

高。RNase 活力可随水势不断减小而增加，直至永久萎蔫为止(表 1)。水分胁迫能促使刺槐实生苗 RNase 活力显著提高，与多数情况下水分胁迫促使草本植物 RNase 活力明显增加相一致<sup>[11,12]</sup>。

## 2.2 水分胁迫下刺槐实生苗叶片 RNase 活力与金属离子含量

表 2 数据表明，水分胁迫显著提高了实生苗叶片的 RNase 活力，同时也引起叶片中金属离子含量的改变。在测定的离子中，水分胁迫实生苗叶子的 Al、Cd、Co、Cr、Fe、Li、Mn、Na、Ti 和 V 含量比对照增加；Ba、Ca、Ni、P 和 Sr 含量稍有减少；而 K、Cu、Mg、Pb 和 Zn 含量基本不变。

Engelberg (1962) 发现，Zn<sup>2+</sup>对 2 周苹果叶子 RNase 活力的抑制效应比对 4 或 8 周叶子 RNase 大得多<sup>[13]</sup>。Bozhenkov (1968) 认为水分紧张时向日葵 RNase 活力增加是由于抑制剂(如 Zn<sup>2+</sup>和 Co<sup>2+</sup>)减少的缘故<sup>[4]</sup>。Greay (1974) 报道，细胞质可溶性 RNase 通常能被加入反应混合物中的 Zn<sup>2+</sup>和 Cu<sup>2+</sup>抑制，而细胞器微粒体 RNase 则不被抑

表2 水分胁迫对刺槐实生苗叶片的RNase活力和金属离子含量的影响

处 理	金 属 离 子										
	Al	Ba	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	K	Li	Mg
充分供水	140	40.5	3.3	0.11	0.30	0.88	8.98	235	2.0	0.35	0.56
水分胁迫	290	37.5	3.1	0.17	0.40	1.10	9.60	399	2.0	0.46	0.57
占供水(%)	207	93	94	155	133	125	107	170	100	131	102

  

处 理	金 属 离 子									RNase活力 (Units /g·F·W)	水 势 (bar)
	Mn	Na	Ni	P	Pb	Sr	Ti	V	Zn		
充分供水	60.3	217	2.89	0.32	2.98	114	6.90	0.67	59.6	52	-2.96
水分胁迫	72.4	358	2.86	0.26	3.10	106	18.3	1.23	61.5	153	-4.94
占供水(%)	120	165	99	81	104	93	265	184	403	294	167

注：表中Ca、K、Mg、P的含量单位为%，其余金属离子含量单位为ppm。

不是由于金属离子含量减少的缘故。

### 2.3 亚胺环己酮(CHM)前处理对水分胁迫时刺槐实生苗RNase活力的影响

用30 ppmCHM前处理刺槐实生苗24 h,不但强烈地抑制水分胁迫实生苗RNase活力的提高,而且也明显抑制对照(充分供水)实生苗RNase活力的增加(表3)。

表3 H<sub>2</sub>O和CHM前处理在水分胁迫状态下对刺槐实生苗RNase活力的影响

处 理	时间 (h)	H <sub>2</sub> O			CHM			前 处理 时间 (h)	CHM 浓 度 (ppm)
		水 势 (bar)	RNase活力 (Units /g·F·W)	占前处理开始 (%)	水 势 (bar)	RNase活力 (Units /g·F·W)	占前处理开始 (%)		
前处理开始	0	-1.54	114	100	-1.54	114	100		
前处理结束	24	-1.57	131	115	-1.58	108	95	24	30
对 照	10	-1.53	188	165	-1.55	107	94	24	30
水分胁迫		-2.20	181	159	-2.22	101	89		
对 照	20	-1.50	184	161	-1.60	101	89	24	30
水分胁迫		-4.91	186	163	-4.92	70	61		
对 照	30	-1.56	153	134	-1.59	87	76	24	30
水分胁迫		-7.62	164	144	-7.70	35	31		

注:种子在27℃恒温箱内培养52 h,幼苗平均长17 mm时取样25 g进行CHM前处理。

CHM是蛋白质合成的抑制剂,它对水分胁迫实生苗和对照实生苗RNase活力的增加都有明显抑制作用,表明水分胁迫时刺槐实生苗RNase活力增加与蛋白质(包括RNase)合成有密切关系。我们的结果与王万里(1986)和TBopyc(1970)报道的资料类似<sup>[11,16]</sup>。

### 2.4 水分胁迫对<sup>3</sup>H-亮氨酸参入刺槐实生苗RNase的效应

水分胁迫实生苗和对照实生苗标记RNase的部分提纯揭示,胁迫导致<sup>3</sup>H-亮氨酸参入刺槐实生苗RNase的能力急剧减少,而胁迫实生苗RNase活力则比充分供水的对照高13%(表4)。这表示水分胁迫主要能导致细胞重新合成RNase,因为部分提纯的RNase高峰组分经聚丙烯酰胺凝胶电泳显示,高峰组分主要是RNase。

表4 水分胁迫对<sup>3</sup>H-亮氨酸参入刺槐实生苗RNase的效应

处 理	水 势 (bar)	RNase活力 (Units/g·F·W)	占对照 (%)	<sup>3</sup> H-亮氨酸标记的RNase的放射性			
				DPM/RNase活力单位	占对照(%)	DPM/mg蛋白质	占对照(%)
对 照	-1.58	117	100	211	100	13118	100
水分胁迫	-4.89	132	113	145	69	7011	53

注:种子在27℃下培养72 h,幼苗平均25 mm时开始进行<sup>3</sup>H-亮氨酸参入RNase的处理。

水分胁迫导致刺槐实生苗RNase活力的增加是由于RNase重新合成所致,因为本研究中的RNase是经过部分提纯的,大部分杂蛋白通过Sephadex G-100柱和CM-纤维素柱层析已被除去<sup>[16]</sup>,放射性主要是来自参入RNase的<sup>3</sup>H-亮氨酸,而来自杂蛋白的很少,否则对照和水分胁迫RNase之间的DPM不会相差近一倍(表4)。这与Brandle J. R. (1977)研究刺槐实生苗在脱水—复水循环时RNase活力的变化趋势相一致<sup>[7]</sup>。

RNase活力增加将有害于刺槐实生苗的正常生长和代谢过程,而RNase活力可以作为水

分胁迫早期效应的有用生化指标<sup>[17]</sup>。因此, 本试验结果可为干旱和半干旱地区刺槐育苗提供参考。

### 参 考 文 献

- 1 Yi C, Todd G W. Change in ribonuclease activity of wheat plants during water stress. *Physiol. Plant*, 1979, 46: 13~18.
- 2 Sacher, J A, Morgan E J, de La Rose D. Paradoxical effect of actinomycin D. Regulation of synthesis of wound RNase at translation in turnip tissue. *Plant Physiol.*, 1975, 56: 442~449.
- 3 Pitt, D. Activation and de novo Synthesis of RNase following mechanical damage to leaves of solanum tuberosum. L., *Ibid*, 1974, 117: 43~55.
- 4 Bozhenkov, V P. Effects of Al and Co on nucleic acid content and RNase activity in the growing points of sunflower plant under water deficit conditions. *Sov. Plant Physiol.* (Engl. translation), 1968, 15: 94~99.
- 5 Kessler B. Nucleic acid as factors in drought resistance of higher plants. In: *Recent Advances in Botany*. University of Toronto Press, 1961, 2: 1153~1159.
- 6 Блехман Г И, Творус К К. Огиства Цитоплазматиче ского белка с рибонуклеазной активностью из листьев проростков чшеницы и изменение его четвертичной структуом под действием на растения засухи. *физиол. Раст.*, 1976, 23: 98~106.
- 7 Brandle J R, Hinckley T M Brown G N. The effects of dehydration-rehydration cycles on protein synthesis of Black Locust seedlings, *Physiol. Plant*, 1977, 40: 1~5.
- 8 陆宪辉. 赤霉素对刺槐实生苗中核糖核酸酶活力的影响. *林业科学研究*, 1990, 3(1): 34~49.
- 9 宋廷生, 余叔文. 关于测定植物组织吸水力和细胞液渗透压的细流法. *植物生理学通讯*, 1960, (3): 52.
- 10 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248~254.
- 11 王万里, 章秀英, 林芝萍. 水分胁迫对高粱等作物叶片中核糖核酸酶活力的影响. *植物生理学报*, 1986, 12(1): 16~25.
- 12 王万里. 植物对水分胁迫的反应. *植物生理学通讯*, 1981, (5): 55~64.
- 13 Kessler B, Engelberg N. RNA and RNase activity in developing leaves. *Biochim. Biophys. acta*, 1962, 55: 70~82.
- 14 Greay J C. The inhibition of RNase activity and the isolation of polysomes from leaves of the french bean, *phaseolus vulgaris*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1974, 163: 343~348.
- 15 Творус, Е К. Влияние засухи и повышенной температуры на активность рибонуклеазы в растениях. *физиол. раст.*, 1970, 17: 787~794.
- 16 苑兆和, 陆宪辉. 刺槐幼苗中核糖核酸酶的提纯和特性. *南京林业大学学报*, 1991, 15(4): 31~37.
- 17 Dove L A. Ribonuclease activity of stress tomato leaflets. *-Ibid*, 1967, 42: 1176~1178.

*The Research on RNase Activity Increasing Reason in  
Black Locust Seedling Results from Water Stress*

Ye Jingshan Lu Xianhui

(*Nanjing Forestry University*)

**Abstract** RNase activity in the seedling of Black Locust increased remarkably under water stress. The while, Al, Cd, Co, Cr, Fe, Li, Mn, Na, Ti and V ions contents in water-stressed leaves of Black Locust seedling rose as compared with the control, Ba, Ca, Ni and Sr contents slightly decreased, and there were no changes in K, Cu, Mg, Pb and Zn contents. Pretreatment of the Black Locust seedlings with cycloheximid (30 ppm) for 24 h. before dehydration completely prevented the increase of RNase activity due to water stress. Partly purification of <sup>3</sup>H-leucine-labelled RNase from control and water-stressed Black Locust seedlings revealed that incorporation of <sup>3</sup>H-leucine into the RNase of water-stressed seedlings was markedly decreased, and activity of RNase from water-stressed seedlings was enhanced by 13 % as compared to with the control. It implies that an increase in activity of RNase from water-stressed seedlings was mainly due to its fresh synthesis.

**Key words** Black Locust seedling    water stress    ribonuclease