

## 【研究简报】

微丝、微管抑制剂及周期性电脉冲  
对豌豆幼苗韧皮部运输的影响郭玉海<sup>①</sup> 花宝光<sup>②</sup> 于凤义<sup>③</sup> 冷强<sup>①</sup> 娄成后<sup>①</sup>(①中国农业大学植物生理实验室, 北京 100094; ②北京农学院植物生理生化  
实验室, 北京 102206; ③中国农业科学院原子能研究所, 北京 100094)

关键词 韧皮部运输 电脉冲 微丝 微管 豌豆

高等植物韧皮部运输是否只靠源库间的膨压差来推动, 其中有无原生质的参加, 一直是有争议的问题<sup>[1]</sup>. 60年代初, 阎隆飞等首先在烟草韧皮部鉴定出肌动球蛋白. 阎隆飞和刘国琴最近又在芹菜韧皮部鉴定出微管蛋白和类动蛋白(kinesin-like protein)<sup>[2]</sup>. 过去对韧皮部蛋白(P-蛋白)能否执行运输功能颇有争议, 最近也在其中找到了与运动有关的蛋白质, 这引起研究运输的生理学家的极大兴趣. 微丝、微管是高等植物细胞的基本组分. 在丝瓜卷须快速弯曲运动中, 接受刺激的部位与发生快速运动的部位之间需要有电波传递, 电波所到之处, 原生质发生收缩运动. 已经在丝瓜卷须中鉴定出肌动蛋白和肌球蛋白<sup>[3]</sup>. 用专一性抑制剂的研究也表明, 发生收缩运动的组分是微丝. 表明植物原生质的运动与动物类似, 受“神经-肌肉机制”的调控<sup>[4]</sup>. Wayne的研究表明, 细胞内的电波传递会干扰肌动蛋白和肌球蛋白相互作用, 使胞质环流停止<sup>[5]</sup>. 我们最近的研究结果表明, 周期性电脉冲减弱玉米苗韧皮部对<sup>14</sup>C-同化物的运输, 但并不影响<sup>32</sup>P在木质部的运输<sup>[6]</sup>, 提示电脉冲刺激很可能是作用于韧皮部的微丝、微管. 因此, 我们设想运输韧皮部(transport phloem)<sup>[7]</sup>筛管中微丝和微管的生理活动参与韧皮部运输. 本试验利用微丝、微管特异抑制剂和周期性电脉冲抑制微丝和微管的生理活动, 进而观察其对抑制韧皮部运输的效应.

正在萌发的豌豆幼苗, 适于用作细胞内含物再分配的研究. 营养源是养料储备丰富的子叶, 胚根维管束是物质运输的通道, 正在伸长生长的胚根是库, 构成理想的源、库、通道的物质运输系统. 在这个系统中, 胚根伸长生长所需的物质完全靠子叶细胞内含物的再分配, 这和蒜苔细胞内含物向新生珠蒜的再分配很相似. 蒜瓣表皮和蒜苔组织汁液的转移主要靠原生质的胞间运动<sup>[1]</sup>, 但韧皮部的汁液运输有无原生质的推动至今尚未阐明. 本试验以豌豆胚根的伸长生长和外源<sup>14</sup>C-蔗糖作为作韧皮部汁液运输的指标, 从两个角度考察微丝、微管在韧皮部运输中的作用: 即分别观察微丝、微管抑制剂和周期性电脉冲刺激对韧皮部运输的影响.

## 1 材料与方法

用玻璃板发芽法培养豌豆幼苗. 待豌豆初生胚根长度达2.0~3.0 cm时, 在距子叶节0.5 cm处环剥, 宽度0.5 cm, 深度到中柱, 去掉皮层, 暴露出中柱. 中柱内是韧皮部和木质部相间排列成三元结构的维管束. 这段维管束是子叶细胞内含物向胚根运输的必经之路. 处理这段维管束, 便于研究原生质对韧皮部运输的作用. 实施各种处理时把苗放入育苗容器内. 育苗器由内径11 mm的玻璃管制成, 底部装蒸馏水5 mL, 用滤纸条供应种子水分. 在黑暗, RH=

100% 的培养箱内,根悬在育苗容器中,不接触壁、滤纸和水. 胚根伸长生长所需的物质完全靠子叶供应,因此胚根伸长生长可以作为韧皮部物质运输的指标.

采用 CB(微丝抑制剂)、APM(微管抑制剂)和周期性电脉冲处理维管束. 处理过程中,韧皮部物质运输和胚根的伸长生长仍在进行,只是减缓了速度,清洗药剂或停止电脉冲刺激一段时间后,物质运输和伸长生长的速度仍能恢复,所以这些处理的作用都是可逆的. 电脉冲刺激的装置如图 1 所示. 电极连接方法是:用湿棉线包绕环剥的中柱一周,把 Ag/AgCl 电极分别连接在中柱和种子上. 首先作强度-期间试验,在能引发电波兴起的系列数据中,本着减少刺激时间、加大刺激强度的原则,选择刺激的“强度-期间”值为  $27\text{V} \times 1\text{s}$ . 根据 CB 和 APM 对胚根生长效应的预备试验,确定 CB 使用浓度为  $2\text{ mmol/L}$ , APM 使用浓度  $0.3\text{ mmol/L}$ .

电脉冲、微丝和微管抑制剂对根伸长的效应实验 电脉冲刺激的“强度-期间”值为  $27\text{V} \times 1\text{s}$ ,每天上午 8 点和下午 4 点各刺激一次. 对照则仅在装置中连接电极,但不加电脉冲刺激. 微丝抑制剂 CB 使用浓度为  $2\text{ mmol/L}$ ,微管抑制剂 APM 使用浓度  $0.3\text{ mmol/L}$ . 对照用稀释液,每株用量均为  $20\text{ }\mu\text{L}$ . 方法是用一细棉线包绕环剥的中柱一圈,用移液枪将溶液均匀注射在棉线靠中柱一侧,药液通过中柱进入维管束. 每处理重复 6 次. 实验在豌豆胚根长到  $2.0 \sim 3.0\text{ cm}$  时进行,3 d 后测定胚根长度增量. 用同一材料测定韧皮部面积后烘干测定胚根干重增量,计算比质量转移(SMT).

电脉冲、微丝和微管抑制剂对 $^{14}\text{C}$ -蔗糖运输的效应实验 用 1/4 Hoagland 营养液配制浓度为  $10\text{ mmol/L}$ ,  $\text{pH} = 6.5$  的 Mes 缓冲液,再用此缓冲液配制 $^{14}\text{C}$ -蔗糖溶液备用. 用手术刀在一片豌豆子叶上挖一个三角洞,用微量进样器向洞内注入  $5 \sim 15\text{ }\mu\text{L}$  的 $^{14}\text{C}$ -蔗糖溶液,每株的放射性活度  $1.2 \sim 2.4\text{ kBq}$ . 引入时间:a) 在电脉冲试验中,4 次电脉冲刺激后引入;b) 在 CB 和 APM 试验中,药剂处理胚根维管束 10 h 后引入. 电脉冲刺激的“强度-期间”值为  $27\text{V} \times 1\text{s}$ ,刺激时间间隔  $30\text{ min}$ . 对照则仅在装置中连接电极,但不加电脉冲刺激. 微丝抑制剂 CB 使用浓度为  $2\text{ mmol/L}$ ,微管抑制剂 APM 使用浓度  $0.3\text{ mmol/L}$ . 对照用稀释液,每株用量均为  $20\text{ }\mu\text{L}$ . 引入 $^{14}\text{C}$ -蔗糖 3h 后取样分析,样品用  $80^\circ\text{C}$  烘干至恒重. 制样用 BH1216 型低本底  $\alpha, \beta$  测定装置测定各部位 $^{14}\text{C}$  放射活度,并计算各部位 $^{14}\text{C}$  放射性活度占引入总放射性活度的百分比.

胚根中柱电刺激的表面电位测定方法同任海云和姜成后<sup>[8]</sup>.

## 2 结果

用胚根伸长生长速度,比质量转移(SMT)这两个指标观察电脉冲、CB、APM 处理对细胞内含物再分配过程中物质运输的作用. 结果表明:电脉冲处理使胚根生长速度降低 63%(表 1),CB 处理后胚根生长速度比对照降低 49%, APM 处理后胚根生长速度比对照降低 14%(表 2),与伸长生长变化相对应的是,3 种处理的 SMT 均比对照低(表 1,2).

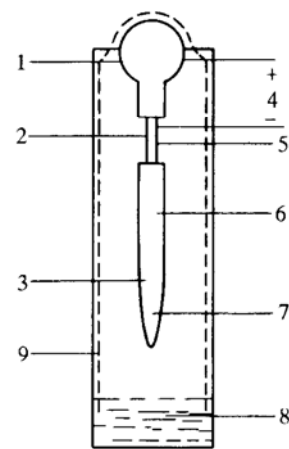


图 1 试验装置示意图

1——源,豌豆的子叶;2——通道,环剥皮层后暴露出的中柱,电刺激、CB、APM 处理均在此位置;3——库,胚根;4——电脉冲刺激器;5~6——测定电极;7——参比电极;8——蒸馏水;9——湿滤纸

表 1 电刺激豌豆维管束对胚根伸长生长和 SMT 的作用

|     | 0d 胚根长度/cm | 3d 胚根长度/cm | 胚根长度平均日增量/cm·d <sup>-1</sup> | SMT/g·m <sup>-2</sup> ·h <sup>-1</sup> |
|-----|------------|------------|------------------------------|----------------------------------------|
| 电刺激 | 2.20       | 3.50       | 0.43                         | 1.29                                   |
| 对照  | 2.21       | 5.73       | 1.17                         | 3.49                                   |

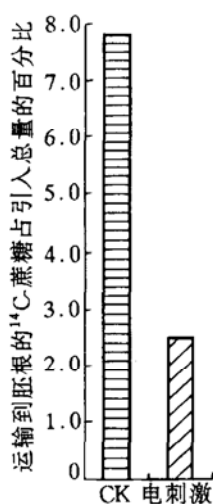
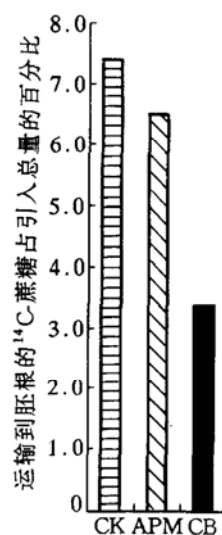
表 2 CB, APM 处理豌豆胚根维管束对胚根伸长生长和 SMT 作用

|     | 0d 胚根长度/cm | 3d 胚根长度/cm | 胚根长度平均日增量/cm·d <sup>-1</sup> | SMT/g·m <sup>-2</sup> ·h <sup>-1</sup> |
|-----|------------|------------|------------------------------|----------------------------------------|
| CB  | 2.60       | 3.94       | 0.67                         | 1.33                                   |
| APM | 2.54       | 4.75       | 1.12                         | 2.19                                   |
| 对照  | 2.72       | 5.35       | 1.31                         | 2.59                                   |

周期性电脉冲刺激维管束可测到电波兴起与局部电波传递,速度为  $2.6 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 距离在 3 cm 内. 显示电脉冲处理后维管束通道内受到刺激的影响.

电脉冲刺激胚根维管束,使<sup>14</sup>C-蔗糖从子叶运输到胚根的数量发生改变. 用胚根中<sup>14</sup>C 放射性活度占向子叶引入的总放射性活度的百分比表示<sup>14</sup>C-蔗糖从豌豆子叶运输到胚根的数量,结果表明:电脉冲处理后胚根的放射性活度比对照低 5.3 个百分点(图 2),即电脉冲处理后运输到胚根的<sup>14</sup>C-蔗糖比对照低 68%.

用 CB 和 APM 局部处理胚根维管束,子叶中<sup>14</sup>C-蔗糖向胚根的运输量发生改变. 以豌豆胚根中<sup>14</sup>C 放射活度占向子叶引入的总放射性活度的百分比表示<sup>14</sup>C-蔗糖从子叶运输到胚根的数量,结果表明:APM 和 CB 处理后胚根的放射性活度都比对照低,其中 CB 处理比对照低 54%(图 3).

图 2 周期性电脉冲对<sup>14</sup>C-蔗糖向豌豆胚根运输的影响图 3 CB, APM 对<sup>14</sup>C-蔗糖向胚根运输的影响

### 3 讨论

本实验的研究结果表明,微丝特异性抑制剂 CB、微管特异性抑制剂 APM 和周期性电脉

冲均能有效减弱豌豆幼苗韧皮部运输。微丝特异性抑制剂 CB、微管特异性抑制剂 APM 分别降低豌豆幼苗韧皮部运输量 54% 和 14%，说明正常情况下，韧皮部物质运输中有微丝和微管的参与。微丝在韧皮部运输中起的作用更大。这与丝瓜卷须快速弯曲运动中，原生质收缩主要靠微丝起作用的结果<sup>[4]</sup>一致。

同样地，周期性电脉冲也有效减弱豌豆幼苗韧皮部运输。本实验室已有的工作支持周期性电脉冲刺激抑制韧皮部运输可能是电波抑制微丝生理活动的结果这一假说。丝瓜卷须快速弯曲运动中，丝瓜卷须敏感尖端的电波传递作用于微丝，进而引起原生质收缩；用周期性电脉冲刺激玉米幼苗上胚轴，有效抑制同化物在韧皮部的运输，但不影响木质部的物质运输。此外，Fromm 的研究结果也显示，电脉冲刺激玉米叶片，在筛管引发的电波传递也抑制同化物在韧皮部的运输<sup>[9]</sup>。电波传递干扰肌动蛋白和肌球蛋白相互作用而导致 Chara 节间细胞内胞质环流暂时停止<sup>[5]</sup>。本实验结果显示，电脉冲刺激豌豆幼苗中柱引发电波传递，并有效抑制韧皮部物质运输。周期性电脉冲刺激和化学药剂处理对韧皮部运输的抑制效应都是可逆的，即除去处理因素，韧皮部运输最终能恢复正常。从图 2 图 3 的结果可以看出，电脉冲刺激比 CB 处理对韧皮部物质运输的抑制效应更强（分别为 63% 和 54%）。这些结果说明，电脉冲刺激引发的电波传递可能主要通过对微丝的作用遏抑了韧皮部物质运输。关于韧皮部运输的抑制机理仍在继续研究中。

**致谢** 本工作为国家自然科学基金(批准号:3947043)和国家“攀登”计划(批准号:92019)资助项目。

### 参 考 文 献

- 1 娄成后. 高等植物的命脉—维管束之谜. 见:余叔文主编. 植物生理与分子生物学. 北京:科学出版社, 1992. 500~513
- 2 阎隆飞, 刘国琴. 芹菜韧皮部中的微管蛋白和类动蛋白. 植物生理学报, 1995, 21(4): 393~395
- 3 Ma Yong-ze, Yen Lung-fei. Actin and myosin in pea tendrils. Plant Physiol, 1989, 89: 586~589
- 4 花宝光, 杨文定, 娄成后, 等. 丝瓜卷须快速弯曲中电化学波传递与原生质收缩. 科学通报, 1995, 40(16): 1 501~1 503
- 5 Wayne R. The excitability of plant cells. American Scientist, 1994, 81: 140~151
- 6 郭玉海, 于凤义, 张 萍, 等. 电脉冲刺激玉米上胚轴抑制韧皮部运输. 核农学通报. 1997, 18(3): 126~128
- 7 van Bel A J E. Interaction between sieve element and companion cell and the consequences for photoassimilate distribution: two structural hardware frames with associated physiological software packages in dicotyledon? J Exp Bot, 1996, 47: 1 129~1 140
- 8 任海云, 娄成后. 高等植物共质体区内与区间的电波传递. 植物生理学报, 1993, 19(3): 265~274
- 9 Fromm J, Bauer T. Action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation. J Exp Bot, 1994, 45(273): 463~469

(1997-02-25 收稿, 1997-06-10 收修改稿)