

低温胁迫诱导灰木相思组培苗细胞凋亡

何文锦^{1,2}, 代容春², 连玲², 陈由强^{2,3}, 林思祖^{1*}

(1. 福建农林大学林学院, 福建 福州 350002; 2. 福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350007;
3. 福建农林大学农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点开放实验室, 福建 福州 350002)

摘要: 利用显微观察和 DNA 凝胶电泳等技术, 研究在低温胁迫诱导下灰木相思组培苗细胞的凋亡和对低温环境的耐受性。显微结构观察表明, 随着温度降低, 细胞核出现明显的凋亡特征, 证实低温胁迫可诱导灰木相思组培苗细胞凋亡, 同时灰木相思组培苗对低温的耐受性是有限的, 超过某一强度时, 细胞会死亡。

关键词: 低温胁迫; 灰木相思; 组培苗; 细胞凋亡

中图分类号: Q942.5

文献标识码: A

文章编号: 1671-5470(2007)01-0038-05

Apoptosis induced by cold stress in plantlets of *Acacia implexa*

HE Wen-jin^{1,2}, DAI Rong-chun², LIAN Ling², CHEN You-qiang², LIN Si-zu¹

(1. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 2. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China; 3. Key Lab of Eco-physiology & Genetic Improvement for Sugarcane, Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: Apoptosis and the tolerance of plantlets of *Acacia implexa* treated *in vitro* with cold stress were studied by microphotographs and total DNA agarose gel electrophoresis. It was found that the apoptosis characteristic of nucleus appeared while lowering the temperature. The results showed that cold stress caused apoptosis of the plantlets of *A. implexa in vitro* which had a limitation in the tolerance to cold stress.

Key words: cold stress; *Acacia implexa*; plantlet in tube; apoptosis

细胞凋亡(apoptosis, APO)或程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)是多细胞甚至单细胞生物体在内外因子的诱导下, 由基因控制的一种细胞主动死亡途径, 是细胞生命活动的基本特征之一^[1]。细胞凋亡是植物的一种重要抗逆反应, 对植物生长具有重要的生理意义。细胞生物学是研究这一问题极为有效的途径, 近年来细胞凋亡已成为植物细胞生物学的热点之一。

每年全球农林作物都受到自然界旱、涝、盐、碱以及高低温等逆境因子的严重影响。研究植物的抗逆性机制与调控, 不仅有重要的科学理论意义, 而且有重大的实际应用价值^[2]。低温胁迫会破坏植物细胞的正常生命活动, 使部分器官乃至植株整体的生长受到抑制。Koukalova et al^[3]发现低温胁迫能诱导体外培养的烟草细胞发生凋亡, 并且具有梯状 DNA 图谱、染色质和胞质浓缩等典型凋亡特征。这一发现启示我们, 植物体部分细胞的凋亡可能是植物整体抵抗低温胁迫的一种生理机制。

灰木相思(*Acacia implexa*)是含羞草亚科金合欢属热带多年生木本植物, 主要分布在澳大利亚, 南纬 24-36°^[4]。其生物量大, 耐瘠薄, 材质色泽很特别, 耐腐蚀, 具有良好的生态效益和经济效益。灰木相思是目前较具发展前途的相思类树种之一, 也是林业研究中一种优秀的种质资源。但相思类树种属热带植物, 抗寒能力有限, 若能提高抗寒能力, 则能扩大其在我国的种植面积。本试验旨在从细胞生物学角度来研究灰木相思的抗寒机制。

1 材料与方法

1.1 供试材料

灰木相思组培苗由福建师范大学生命科学学院植物细胞培养实验室提供。

收稿日期: 2006-10-30 修回日期: 2006-12-27

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(B0510009); 福建省林业厅种苗科技攻关项目(闽林综[2003]17号)。

作者简介: 何文锦(1972-), 女, 讲师。研究方向: 植物分子生物学。

* 通讯作者: 林思祖(1953-), 男, 教授, 博士生导师。研究方向: 森林培育。

1.2 溶液配置

1.2.1 卡诺固定液的配置 3份无水乙醇,加入1份冰醋酸(现配现用)。

1.2.2 解离液 1份体积分数为95%乙醇,加入1份 $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{HCl}$ 。

1.2.3 改良苯酚品红染色液的配置 (1)母液A:称取3g碱性品红,溶于100 mL 70%乙醇中(可于4℃冰箱中长期保存)。(2)母液B:取10 mL母液A,加入90 mL体积分数为5%苯酚水溶液(两周内使用)。

1.2.4 苯酚品红染色液 取45 mL母液B,加入6 mL冰醋酸和6 mL体积分数为37%的甲醛。

1.2.5 改良苯酚品红染色液 取10 mL苯酚品红染色液,加入90 mL体积分数为45%的乙酸和1.8 g山梨醇,放置两周后使用。

1.3 试验方法

1.3.1 低温诱导步骤 取灰木相思组培苗置于低温光照培养箱中进行低温锻炼,组培瓶瓶口换成灭菌过的纱布,利于内外空气流通,温度一致。培养温度的降温模式为:25℃ 1 d → 20℃ 1 d → 15℃ 1 d → 10℃ 1 d → 5℃ 1 d → 2℃ 1 d → -1℃ 1 d → -4℃ 1 d → -7℃ 1 d。分别取2、-1、-4、-7℃共4组低温诱导条件下处理的组培苗进行细胞凋亡实验,每组试验重复3次。

1.3.2 DNA提取和检测 在液氮中将0.4 g实验材料研磨成极细的粉末,根据UNIQ-10柱式植物基因组DNA抽提试剂盒使用说明,进行低温诱导后灰木相思组培苗的DNA提取。DNA纯度和质量浓度用紫外分光光度计检测,取10 μL基因组DNA加10 μL TE稀释后测定。DNA完整性用质量分数为1%的琼脂糖凝胶电泳检测,电泳缓冲液为 $1 \times \text{TAE}$,100 V下电泳45 min左右,运用凝胶成像系统进行摄像分析。

1.3.3 细胞核形态观察 (1)取材。取处理后的组培苗幼嫩部分置于卡诺固定液中固定24 h。若不能及时处理,则24 h后取出置于70%的乙醇中保存待用。(2)制片。将固定好的材料剪成小块,依次通过漂洗(3次)→解离(用解离液解离,待材料变软透明时即可,一般10 min左右)→漂洗(3次)→染色(用改良石炭酸品红染15 min)→压片将材料压散开制成临时装片^[5]。(3)镜检。将压好的片子置于光学显微镜下观察并记录结果,用荧光数字生物显微成像拍摄系统拍照。每种处理各选取5个视野,统计总细胞数和凋亡细胞数(以细胞核染色质出现明显的边缘化凝集为标志),计算凋亡率。凋亡率/% = (凋亡细胞数/总细胞数) × 100^[6]。以处理温度为X轴,凋亡率为Y轴作图。

1.4 仪器与试剂

人工气候低温培养箱(BOD481,美国);水平电泳仪[HE33(EPS301),瑞典];凝胶成像系统(GENE-GENIUS,英国);紫外分光光度计(Gene Quant pro,瑞典);荧光数字生物显微成像拍摄系统(OLMPUS BX51,日本);UNIQ-10柱式植物基因组DNA抽提试剂盒(上海生工);DNA ladder(MD110-01 D15000,天根生化科技有限公司);其余试剂均为国产分析纯产品。

2 结果与分析

2.1 DNA纯度及质量浓度检测

将提取的灰木相思DNA经全自动紫外分光光度计检测其纯度和质量浓度,每处理组检测3个重复样品。纯度检测结果见表1。从表1可见,各处理提取的灰木相思DNA D_{260}/D_{280} 值都在1.8~2.0之间,表明所提取的DNA纯度符合质量要求。

DNA质量浓度检测结果见图1。随着温度下降,DNA质量浓度也不断下降。当温度从2℃降到-1℃时,DNA

质量浓度下降了 $10.8\text{ }\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,降幅最大。这可能是由于温度跨越冰点0℃,植株细胞受到较大损害,为了适应低温环境,植株细胞凋亡数量增加。随着温度进一步下降,DNA质量浓度较稳定,说明植株正在逐

表1 灰木相思DNA的纯度检测

Table 1 DNA purity test of *A. implexa*

$t/^\circ\text{C}$	D_{260}	D_{280}	D_{260}/D_{280}
2	0.342	0.187	1.828
-1	0.234	0.123	1.902
-4	0.219	0.116	1.887
-7	0.142	0.078	1.821

渐适应低温环境。当温度从 -4°C 降到 -7°C , DNA 质量浓度又一次较大幅度下降,说明植株细胞死亡数量增加, DNA 发生断裂,这里包括受冻害死亡的细胞和主动程序性死亡的细胞。

2.2 细胞凋亡率的统计

从图 2 可见,细胞凋亡率随温度下降而上升。从图 1 与图 2 比较可知,细胞凋亡率与 DNA 质量浓度检测结果呈负相关,随着处理温度降低,细胞凋亡率越高, DNA 质量浓度越低。植株为了适应低温环境,一部分细胞主动发生细胞程序性死亡,随着胁迫程度加强,植株正常细胞因低温胁迫死亡和细胞凋亡的数量都显著增加, DNA 质量浓度大幅下降,说明组培苗植株对低温的耐受性是有限度的。

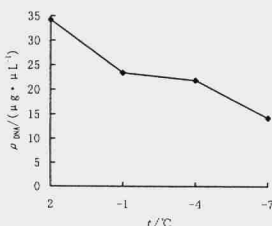


图 1 低温胁迫对灰木相思 DNA 质量浓度的影响

Fig. 1 Effect of cold stress on DNA mass concentration

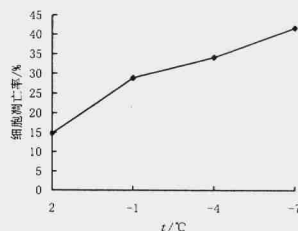


图 2 低温胁迫对细胞凋亡率的影响

Fig. 2 Effect of cold stress on apoptosis rate

2.3 DNA 电泳图谱分析

细胞凋亡的过程往往伴随染色质 DNA 的特异性断裂,形成 180–200 bp 或其整数倍的寡聚核苷酸片段。经琼脂糖凝胶电泳后,形成 DNA ladder^[7]。但也有报道认为,一些细胞凋亡时染色体 DNA 并不发生特异性断裂,如水稻和烟草并不随处理时间的延长而出现明显的 ladder 现象,带纹基本上是一条连续的弥散状拖带^[8]。

从图 3 也可看出,随着温度降低 DNA 发生断裂,质量浓度降低。从 2°C 到 -7°C 的泳道中都有出现弥散型拖尾,其中 -4°C 下 DNA 弥散型拖尾最长,对照组 DNA 电泳后为 1 条明显主带,相对分子质量较大,是较完整的基因组 DNA。当植物体中细胞凋亡与细胞坏死并存时,可能造成 DNA ladder 条带不十分清晰。而当受到外界极端刺激引起细胞坏死时,常由细胞损伤因子引起 DNA 无规律的断裂,在琼脂糖凝胶电泳上呈模糊的弥散状条带。

2.4 细胞核形态观察

一般认为在细胞凋亡过程中细胞核的变化最为明显和最重要,其主要特征表现为:细胞核凝集(condensation),染色质固缩、边缘化(margination),DNA 裂解(fragmentation),进而核膜破裂,凝聚的染色质散布到细胞浆内^[9–10]。本试验中灰木相思细胞核也随着温度降低出现了显著的凋亡形态(表 2)。

细胞显微观察结果与 DNA 质量浓度检测及细胞凋亡率的统计结果相一致。经 -7°C 处理后,可观察到细胞破裂程度严重,其中既有凋亡细胞也有由于胁迫温度过低致死的正常细胞。

以上凋亡细胞细胞核的各种变化从形态学上反映了细胞核在凋亡过程中的核心作用。而在凋亡过程中,不同细胞细胞核的形态学变化并不完全相同,其原因可能是凋亡细胞的功能状态不同以及所处的分化阶段不同。

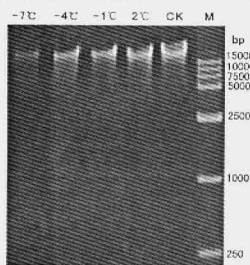


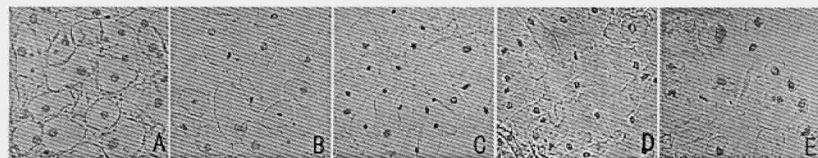
图 3 低温胁迫对 DNA 电泳图谱的影响

Fig. 3 Effect of cold stress on DNA electrophoresis

表2 不同温度处理的细胞凋亡形态学观察

Table 2 Morphological observation of apoptosis by different temperature treatments

t/℃	细胞凋亡形态学观察
25(CK)	染色质均匀分布于细胞核内,细胞核较大,呈圆球形,细胞质均匀透明,核膜与质膜均完整(图4A)。
2	成块的染色质发生迁移,靠近核膜并向核的一端集中,在核的一端形成新月形高度致密的团块,核缩小,细胞完整,在视野内还可见部分未凋亡细胞(图4B)。
-1	细胞核染色质明显浓缩致密,均质无结构,或染色质聚在核中央,整个核固缩成圆球状(图4C)。
-4	细胞核区边化,染色质固缩,呈颗粒、块状分布,呈现不规则团块,呈新月状、八字形、环形或黑洞状(图4D)。
-7	细胞壁、细胞膜及核膜有裂解现象,细胞内分布有不均匀的碎末状物质,胞内物质外溢,染色质松散,细胞间隙中出现许多从核内溢出的染色质,不能保持细胞的完整性(图4E)。



A. 25 °C 处理(CK); B. 2 °C 处理; C. -1 °C 处理; D. -4 °C 处理; E. -7 °C 处理(10×100)。

图4 低温胁迫对细胞核形态的影响

Fig. 4 Effects of cold stress on nucleus morphological changes

3 讨论

有研究者^[11]认为 DNA ladder 是细胞凋亡的特征之一,但也有研究者认为,一些植物虽在显微镜下可观察到明显的细胞核凋亡特征或经 TUNEL 检测呈阳性,但电泳实验中未出现 DNA ladder,如在洋葱鳞茎表皮细胞^[7]、水稻^[8]、烟草^[8]、蚕豆根细胞^[12]及玉米根尖细胞^[13]等实验中均未出现明显的 DNA ladder,所以提出一些植物细胞凋亡时染色体 DNA 并不发生断裂,细胞凋亡未必与 DNA 遗传损伤相关^[12]的观点。也有研究显示,DNA ladder 是在一些特定的处理时间或特定处理质量浓度时细胞核 DNA 断裂成 180~200 bp 左右的片段,如棉花悬浮细胞^[14-15]、胡萝卜悬浮细胞^[16]实验。本实验在镜检时细胞核出现明显的凋亡特征,但也未出现十分明显的 DNA ladder,只呈弥散状拖带,这有可能是因为在低温胁迫的逆境中细胞凋亡与细胞坏死并存,造成 DNA 条带不是十分明显。

植物组织细胞需经解离,使组织细胞尽量能分离成单层细胞才便于观察细胞核凋亡的形态变化^[17]。植物组织成熟细胞木质化程度或纤维化程度太高不易解离,所以要尽量选取幼嫩的组织器官作为实验材料,如根尖细胞、悬浮细胞、愈伤组织、幼嫩的组培苗等易解离的材料。

本实验得出,在一定范围内,随低温处理强度增加,细胞凋亡率大大提高。但如果继续延长处理时间或提高处理质量浓度,坏死细胞数目也会随之增加。植物体内的细胞凋亡有利于自身对逆境的适应,增强自身的抗逆能力,但植株对逆境的耐受性也是有限度的,超过此限度植株将受到不可逆转的伤害。

细胞凋亡在植物正常生长发育过程及对各种环境胁迫产生的反应中都有着重要作用。对植物细胞凋亡进行研究,将有助于进一步了解植物生长发育过程中正常的细胞死亡现象,对植物的抗病和抗逆境研究、提高农产品的品质和质量等具有重大意义。

参考文献

- [1] 潘瑞炽. 植物生理学[M]. 北京:高等教育出版社,2004:227~229.
- [2] DREW M C, HE C J, MORGAN P W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots[J]. Trends in Plant Science, 2000, 5(3):123~127.
- [3] KOUKALOVA B, KOVARIK A, FAJKUS J. Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress[J]. FEBS Lett, 1997, 414:289~292.
- [4] 潘志刚,游应天. 中国主要外来树种引种栽培[M]. 北京:科学技术出版社,1994:378~406.
- [5] 刘祖洞,江绍慧. 遗传学实验[M]. 北京:高等教育出版社,2004:208~212.

- [6] 王庆华,邓文君,李艳红. 细胞色素 C(Cyt C)诱导烟草悬浮细胞(BY-2)凋亡[J]. 植物生理学通讯,2004,40(6):666 - 668.
- [7] 李昊文,李鹏,印莉萍. 离子胁迫诱导洋葱鳞茎内表皮细胞凋亡[J]. 生物技术通报,2006(1):69 - 72.
- [8] 宁顺斌,宋运淳,王玲,等. 盐胁迫诱导的植物细胞凋亡——植物抗盐的可能生理机制[J]. 实验生物学报,2000,33(3): 245 - 253.
- [9] BLEECKER A B, PATTERSON S E. Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 1997,9:1169 - 1179.
- [10] ECKER J R. Ethylene signal transduction pathway in plants[J]. Science,1995,268(5):667 - 676.
- [11] 杨巍. 细胞凋亡特异核酸酶及其激活机制[D]. 北京:北京大学,2001.
- [12] 汪承润,闵莉,蒋继宏,等. 钛离子溶液诱导蚕豆根细胞凋亡的初步研究[J]. 中国稀土学报,2004,22(5):692 - 697.
- [13] 宁顺斌,宋运淳,王玲,等. 低温胁迫诱导玉米根尖细胞凋亡的形态和生化证据[J]. 植物生理学报,2000,26(3):189 - 194.
- [14] 夏启中,张献龙,聂以春,等. 在自然衰老和诱导条件下棉花悬浮细胞程序性死亡的发生[J]. 实验生物学报,2005,38(4):303 - 308.
- [15] 夏启中,张明菊,张献龙,等. 高浓度细胞分裂素诱导棉花悬浮细胞程序性死亡[J]. 华中农业大学学报,2005,24(4): 334 - 338.
- [16] LO SCHIAVO F, BALDAN B, COMPAGNIN D, et al. Spontaneous and induced apoptosis in embryogenic cell cultures of carrot (*Daucus carota* L.) in different physiological states[J]. Eur J Cell Biol, 2000,79:294 - 298.
- [17] 祁保民,黄小红,苏金为. 鸡马立克氏病发病过程中肝肾细胞凋亡的电镜观察[J]. 福建农林大学学报:自然科学版, 2003,32(1):113 - 116.

(责任编辑:陈幼玉)