

周余华,唐义明,赵明明. 低温胁迫对克恩氏冬青超微结构及细胞内 Ca^{2+} 分布的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):166–168.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2015.03.053

低温胁迫对克恩氏冬青超微结构 及细胞内 Ca^{2+} 分布的影响

周余华^{1,2}, 唐义明³, 赵明明²

(1. 江苏农林职业技术学院,江苏镇江 212400; 2. 南京林业大学,江苏南京 210037; 3. 江苏省句容经济开发区,江苏句容 212400)

摘要:在低温胁迫条件下,分析克恩氏冬青细胞内的超微结构和 Ca^{2+} 分布与抗寒性的关系。结果表明:随着低温胁迫的增强,细胞内细胞器受损程度也增强,到 $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,细胞膜系统出现了严重的损伤,同时细胞内 Ca^{2+} 沉淀量随温度的降低而增加。

关键词:克恩氏冬青;低温胁迫;叶片细胞;超微结构; Ca^{2+} 分布

中图分类号: Q945.78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2015)03–0166–03

克恩氏冬青 (*Ilex × koehneana* ‘Emily Bruner’) 为冬青属常绿阔叶小乔木,是近期引进的欧洲冬青杂交品种。许多冬青属在低温胁迫条件下有较好的耐寒性,可以引种到北方地区^[1],一般来说,植物细胞内 Ca^{2+} 分布及超微结构会随着低温的变化而呈一定的相关性^[2], Ca^{2+} 作为胞内第二信使调节着植物体内的许多代谢和发育过程,因而起重要作用^[3–6]。为进一步研究克恩氏冬青的生态适应性及其栽培和推广的制约因素,于 2012 年对克恩氏冬青的耐寒性进行系统研究,解析不同温度条件下克恩氏冬青的解剖结构和低温胁迫的关系,从而深入研究克恩氏冬青的细胞学机制,为克恩氏冬青选育及栽培提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

2012 年 6 月将 6 种克恩氏冬青扦插于南京林业大学内,待生根后及时上盆,放置于树木园温室内存待。

1.2 方法

将样品在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下放置 1 周进行预冷,然后移至人工气候室 ($-40\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$),以 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为 1 个阶梯逐级降温,分别降到 0 、 -8 、 $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时各维持 48 h,及时采取低温处理好的植物顶端叶片迅速切成 $0.5\text{ mm}\times 0.5\text{ mm}$ 的组织块,并沉入到用 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 值 7.2) 配制的 2% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛混合液中,室温黑暗初固定 6 h;然后用含 2% 焦磷酸钾的缓冲液 (pH 值 7.6) 洗涤 3 次,每次约 0.5 h;再转移到含 2% 焦磷酸钾的缓冲液 (pH 值 7.6) 配制的 1% 锇酸中,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内固定过夜。将 2 次固定过的组织块用重蒸水洗涤 4 次后,再用 pH 值为 10.0 的重蒸水 (用 0.1 mol/L KOH 调节

pH 值) 洗涤 2 次,每次约 0.5 h。随后经系列冷乙醇脱水,环氧丙烷过渡, Epon812 (环氧树脂) 包埋, LKB–V 型超薄切片机切片,切片经 0.5% 醋酸双氧铀染色,在 H–600 型透射电子显微镜下观察照相。

2 结果与分析

2.1 不同低温胁迫下克恩氏冬青叶片细胞的超微结构

2.1.1 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下克恩氏冬青叶片细胞的超微结构 由图 1 可知,叶绿体仍然紧贴细胞壁排列,细胞核大部分较正常,少部分细胞核的核膜变得模糊,同样近一端分布,液泡中有少量高电子密度的嗜锇物质分布;叶绿体中嗜锇颗粒含量仍然较少且不含淀粉粒,其中叶绿体类囊体片层排列虽然规则、有序,但少部分清晰可见,大部分已模糊不清,线粒体略正常。

2.1.2 $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下克恩氏冬青叶片细胞的超微结构 由图 2 可知,叶绿体仍然紧贴细胞壁排列,细胞核较正常,仍然近一端分布,液泡中含少量高电子密度的嗜锇物质;叶绿体中嗜锇颗粒含量仍较多,同样不含淀粉粒,其中类囊体片层排列仍然规则、有序;同样,叶绿体大部分类囊体片层排列规则、有序且清晰可见,少部分叶绿体类囊体片层模糊,线粒体略正常。

2.1.3 $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下克恩氏冬青叶片细胞的超微结构 由图 3 可知,叶绿体已不贴细胞壁排列,叶绿体及其他细胞器散落在细胞中;细胞中含有很少量的高电子密度嗜锇物质,多数叶绿体被膜消失,所含嗜锇颗粒含量较多,不含淀粉粒,其中叶绿体的类囊体片层扩张并且不清晰,细胞核、线粒体受损 (图 3 中的箭头所指部位为受损部位)。

2.2 低温条件对克恩氏冬青叶片中 Ca^{2+} 分布的影响

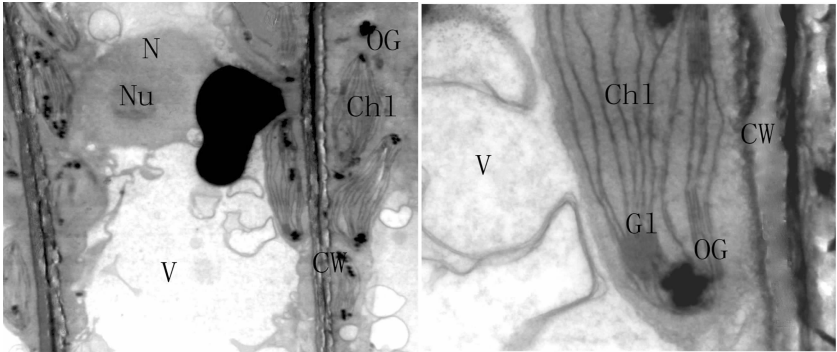
2.2.1 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下克恩氏冬青叶片中 Ca^{2+} 的分布情况 由图 4 可知,在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温下,克恩氏冬青叶片中的细胞间隙有 Ca^{2+} 沉淀,在细胞壁外侧、叶绿体膜和液泡膜上的 Ca^{2+} 沉积比细胞器上多,细胞核上有少量沉淀。

2.2.2 $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下克恩氏冬青叶片中 Ca^{2+} 的分布情况 由图 5 可知,在 $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温胁迫下,克恩氏冬青叶片的细胞壁外侧、细胞间隙上有 Ca^{2+} 沉积,大多情况下叶绿体、细胞壁、液泡上有少量沉积。

收稿日期:2014–04–14

基金项目:江苏省林业三新工程 (编号:LYSX[2012]15);江苏农林职业技术学院科研项目 [编号:2013(4)]。

作者简介:周余华 (1964—),男,江苏泰兴人,博士,副教授,主要从事园林植物的教学、生产及研究。Tel: (0511) 87290330; E-mail: uua16hot@126.com。



Chl—叶绿体；M—线粒体；Gl—基粒片层；OG—嗜饿颗粒；CW—细胞壁；
N—细胞核；CM—叶绿体被膜；Is—胞间隙；V—液泡；下同

图1 0℃ 低温胁迫下克恩氏冬青叶片细胞的超微结构

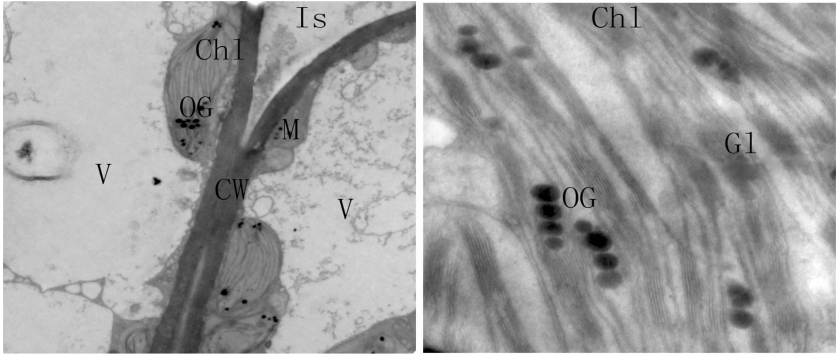
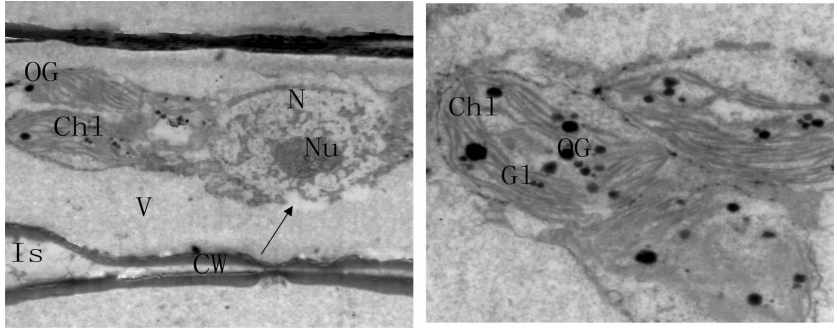


图2 -8℃ 条件下克恩氏冬青叶片细胞的超微结构



箭头所指的为受损部位

图3 -16℃ 条件下克恩氏冬青叶片超微结构

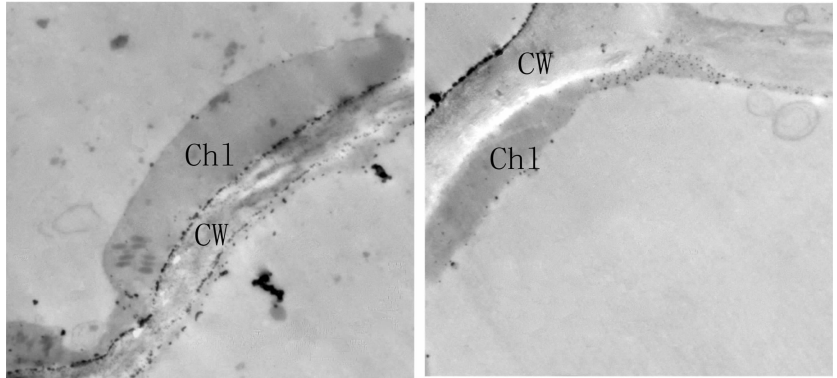
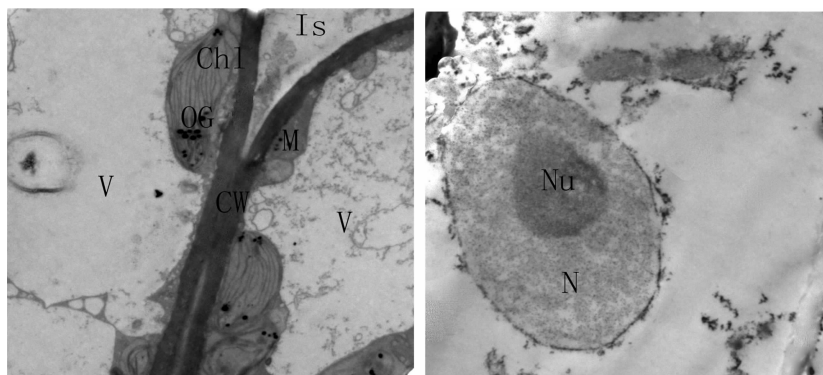
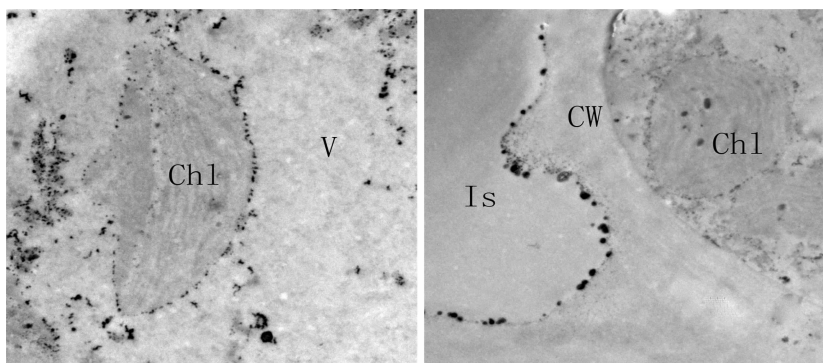


图4 0℃ 低温胁迫下克恩氏冬青叶片中 Ca²⁺ 的定位情况

2.2.3 -16℃ 条件下克恩氏冬青叶片中 Ca²⁺ 的分布情况
由图 5、图 6 可以看出,在 -16℃ 低温处理下,Ca²⁺ 沉淀明显多于 -8℃ 低温处理。类囊体片层或消失或模糊不清,叶绿

体游离到细胞内,不再紧贴细胞壁,且多数严重肿胀,细胞中液泡内、细胞质和叶绿体中、细胞壁上有少量 Ca²⁺ 沉积(图 6)。

图5 -8 °C 低温胁迫下克恩氏冬青叶片中 Ca^{2+} 的分布情况图6 -16 °C 低温胁迫下克恩氏冬青叶片中 Ca^{2+} 分布

3 结论与讨论

随着气温越来越低,克恩氏冬青叶肉细胞超微结构出现明显变化。在 0 °C 条件下,克恩氏冬青叶绿体呈长椭圆形且多数紧贴细胞壁分布,细胞核靠近一端,叶绿体片层清晰可见,液泡和叶绿体中有少量高电子密度的嗜锇物质分布,不含淀粉粒。总体来说,叶片细胞较正常,叶色较正常。在 -8 °C 条件下,细胞核结构正常,叶绿体稍有膨胀,片层弯曲,嗜锇颗粒增加,出现了较多的环状片层。在 -16 °C 条件下,叶片细胞结构遭到严重破坏,嗜锇颗粒增多且变大,细胞内大部分细胞器散乱于细胞内并变得模糊。可见,随着低温胁迫的增强,细胞核、叶绿体等细胞器受损程度也增强,细胞膜系统出现了严重的损伤,主要有叶绿体膜、细胞膜或解体或模糊不清。在 0、-8 °C 胁迫下,克恩氏冬青叶片的基本结构没有改变,能适应此低温;而到 -16 °C 时,细胞内线粒体受到破坏,说明此时植物体已发生冻害。克恩氏冬青细胞内的超微结构发生变化,说明与其抗寒性密切相关。试验中细胞内的线粒体、叶绿体同样是对低温比较敏感的 2 个细胞器,而质膜则是低温伤害的首要部位^[7],这说明植物与低温的适应性具有很重要的意义。

克恩氏冬青细胞内 Ca^{2+} 分布随温度的变化而变化。在 0 °C 低温胁迫下,细胞质中的 Ca^{2+} 浓度很低;到 -8 °C 低温条件时,细胞内 Ca^{2+} 浓度明显增加;到 -16 °C 时,克恩氏冬青细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,并沉淀成聚集状态分布,此时细胞内 Ca^{2+} 浓度已经超出植物的承受能力, Ca^{2+} 浓度平衡被打破,从而破坏和扰乱细胞正常的结构与功能。细胞质内 Ca^{2+} 变化

通过启动细胞内生理生化过程,导致植物的外部抗寒性反应,起着传递和放大信号的作用^[8]。此外, Ca^{2+} 浓度过度增加会扰乱以无机磷为基础的能量代谢系统^[9]。由 Ca^{2+} 信使诱发的这一系列变化致使植物发生低温伤害。

参考文献:

- [1] 张纪林,谢晓金,教忠意,等. 几种冬青属植物抗冻能力比较[J]. 园艺学报,2005,32(3):477-481.
- [2] 曾爱松,严继勇,宋立晓,等. 甘蓝幼苗叶片超微结构及细胞内 Ca^{2+} 分布对低温的响应[J]. 华北农学报,2011,26(6):129-135.
- [3] 杨凤娟,魏珉,苏秀荣,等. 不同浓度 NO_3^- 胁迫下黄瓜幼苗根系分生区细胞内 Ca^{2+} 分布为化的差异[J]. 园艺学报,2009,36(9):1291-1298.
- [4] 张银志,孙秀兰,刘兴华,等. 低温胁迫和变温处理对李子生理特性的影响[J]. 食品科学,2003,24(2):134-138.
- [5] Blancaflor E B, Masson P H. Plant gravitropism. Unraveling the ups and downs of a complex process[J]. Plant Physiology, 2003, 133(4):1677-1690.
- [6] 雷江丽,杜永臣,朱德蔚,等. 低温胁迫下不同耐冷性番茄品种幼叶细胞 Ca^{2+} 分布变化的差异[J]. 园艺学报,2000,27(4):269-275.
- [7] Kratsch H A, Wise R R. The ultrastructure of chilling stress[J]. Plant Cell and Environment, 2002, 23:337-350.
- [8] Bush D S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling[J]. Annu Rev plant Physiol Plant Mol Biol, 1995, 46:95-112.
- [9] Hepler P K, Wayne R O. Calcium and plant development[J]. Ann Rev Plant Physiol, 1985, 36:397-439.