

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  $\text{Ca}^{2+}$  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 $\text{Ca}^{2+}$ 分布的影响

周余华<sup>1,2</sup>, 唐义明<sup>3</sup>, 赵明明<sup>2</sup>

(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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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; $\text{Ca}^{2+}$  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<sup>[1]</sup>,一般来说,植物细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  分布及超微结构会随着低温的变化而呈一定的相关性<sup>[2]</sup>,  $\text{Ca}^{2+}$  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<sup>[3-6]</sup>。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  $0.2\text{ mol/L}$  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  $0.1\text{ mol/L}$  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 $\text{Ca}^{2+}$ 分布的影响

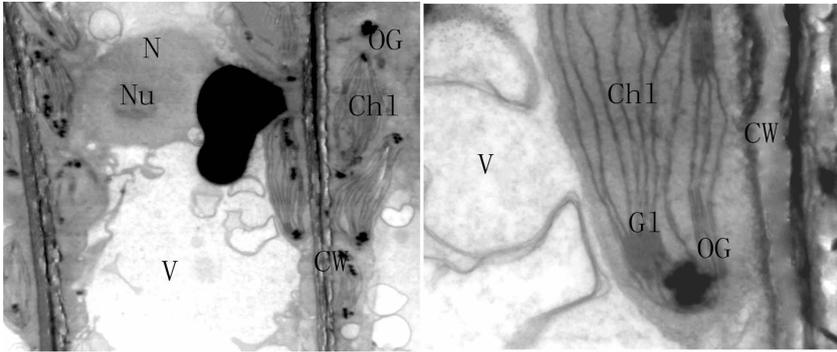
**2.2.1  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下克恩氏冬青叶片中  $\text{Ca}^{2+}$  的分布情况** 由图 4 可知,在  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  低温下,克恩氏冬青叶片中的细胞间隙有  $\text{Ca}^{2+}$  沉淀,在细胞壁外侧、叶绿体膜和液泡膜上的  $\text{Ca}^{2+}$  沉积比细胞器上多,细胞核上有少量沉淀。

**2.2.2  $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下克恩氏冬青叶片中  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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:uual6hot@126.com。



Chl—叶绿体；M—线粒体；Gl—基粒片层；OG—嗜银颗粒；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

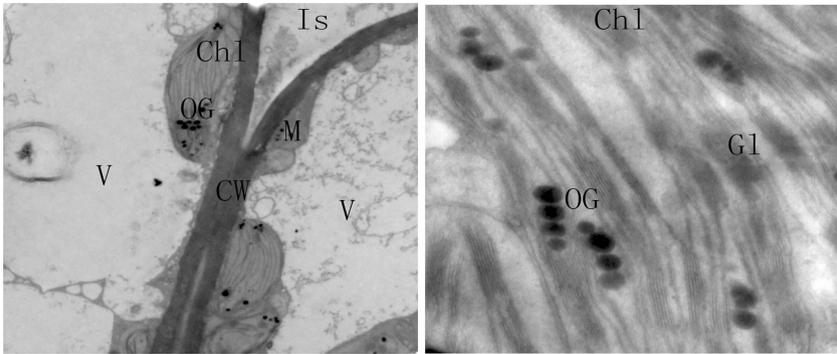
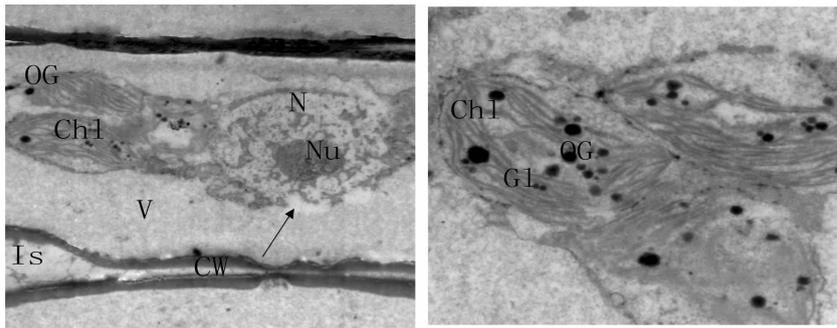


图2 -8℃条件下克恩氏冬青叶片细胞的超微结构



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

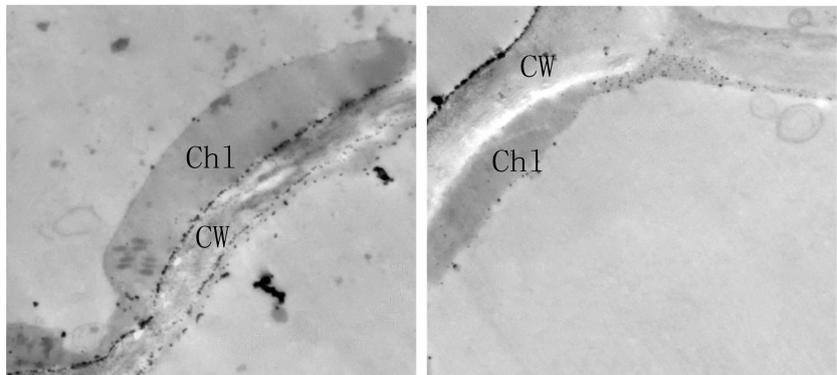
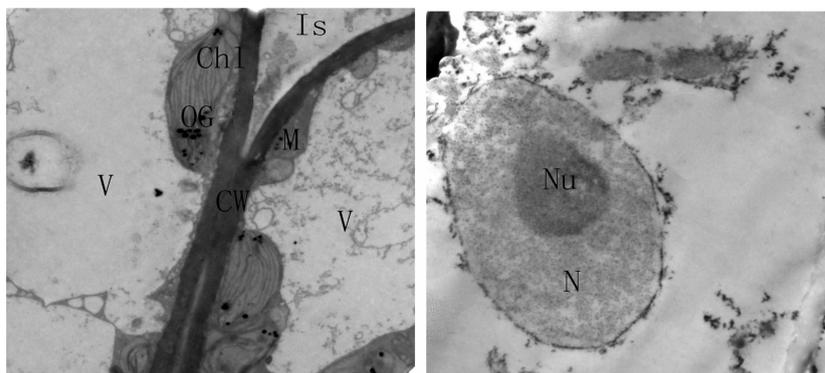
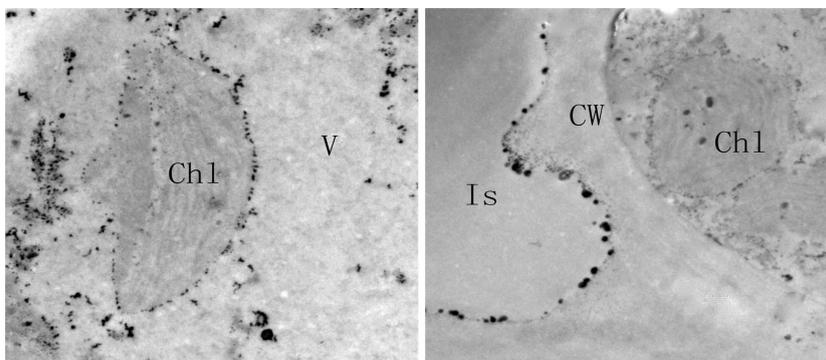


图4 0℃低温胁迫下克恩氏冬青叶片中Ca<sup>2+</sup>的定位情况

2.2.3 -16℃条件下克恩氏冬青叶片中Ca<sup>2+</sup>的分布情况  
由图5、图6可以看出,在-16℃低温处理下, Ca<sup>2+</sup> 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Ca<sup>2+</sup>沉积(图6)。

图5 -8℃低温胁迫下克恩氏冬青叶片中Ca<sup>2+</sup>的分布情况图6 -16℃低温胁迫下克恩氏冬青叶片中Ca<sup>2+</sup>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℃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铁物质分布,不含淀粉粒。总体来说,叶片细胞较正常,叶色较正常。在-8℃条件下,细胞核结构正常,叶绿体稍有膨胀,片层弯曲,嗜铁颗粒增加,出现了较多的环状片层。在-16℃条件下,叶片细胞结构遭到严重破坏,嗜铁颗粒增多且变大,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℃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℃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<sup>[7]</sup>,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<sup>2+</sup>分布随温度的变化而变化。在0℃低温胁迫下,细胞质中的Ca<sup>2+</sup>浓度很低;到-8℃低温条件时,细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度明显增加;到-16℃时,克恩氏冬青细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度增加,并沉淀成聚集状态分布,此时细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度已经超出植物的承受能力,Ca<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup>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<sup>[8]</sup>。此外,Ca<sup>2+</sup>浓度过度增加会扰乱以无机磷为基础的能量代谢系统<sup>[9]</sup>。由Ca<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup>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<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫下黄瓜幼苗根系分生区细胞内Ca<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup>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.