

吴丽芳,魏晓梅,尹 辉,等. 干旱胁迫对白刺花根尖细胞有丝分裂的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(9):256-259.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.061

干旱胁迫对白刺花根尖细胞有丝分裂的影响

吴丽芳^{1,2}, 魏晓梅^{1,2}, 尹 辉¹, 颜岳辉¹, 李 通¹

(1. 曲靖师范学院生物资源与食品工程学院, 云南曲靖 655011;

2. 云南省高校云贵高原动植物多样性及生态适应性进化重点实验室, 云南曲靖 655011)

摘要:为探讨白刺花(*Sophora davidii*)种子萌发期对干旱的适应性,采用 PEG-6000 模拟干旱胁迫环境对白刺花根尖细胞有丝分裂、染色体畸变、微核变化等进行研究。结果表明,短时间(0~6 h)、低浓度(10%)胁迫对白刺花根尖细胞有丝分裂指数有促进作用,分裂指数由 8.78% 上升至 9.09%;中度处理及长时间、高浓度胁迫致使细胞分裂指数下降,抑制效应明显,尤其当浓度达到 50% 时,细胞分裂指数由 3.14% 下降至 1.96%。在染色体畸变类型中,出现类型最多是染色体断片,当 PEG-6000 浓度为 0~20% 时,白刺花根尖细胞染色体畸变率在 10% 以下;当浓度大于 30%,染色体畸变率均在 10% 以上。微核的观察随处理时间和胁迫浓度的变化而变化,当 PEG-6000 浓度小于 20% 时,微核率的大小在 10‰ 以下;当 PEG-6000 浓度高于 20% 后,微核率均大于 10‰;尤其当浓度达到 50% 时,处理 48 h 的微核率最高,达 15.76‰,且多以间期微核和单微核为主。

关键词:白刺花;干旱胁迫;根尖细胞有丝分裂;染色体畸变;微核

中图分类号: Q945.78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)09-0256-04

种子是有性繁殖植物的重要繁殖器官,种子能否顺利萌发及萌发初期长势直接影响到幼苗的建成、存活、竞争和个体未来的适合度。而植物种子萌发、生长发育有赖于细胞数目的增加和细胞体积的扩大,细胞数目的增加主要通过细胞分裂来实现,如果细胞分裂周期过程中遇到不利的逆境,将直接影响到植物整个生命周期活动,这一过程中,又以早期萌发生长期最具典型和敏感性。

白刺花(*Sophora davidii*)属豆科槐属落叶灌木,在我国主要分布在云南、四川、陕西、甘肃、山西、河北、河南、湖北、湖南、江苏、浙江等地,具深根性、抗旱强等特点,是集药用、食用、饲料、蜜源、水土保持、改良土壤、生态修复为一体的喀斯特山地优良野生植物。云贵高原属于典型的喀斯特地区,该区域石漠化现象日趋严重,且连年干旱的气候促使生态系统岌岌可危。云南自 2009—2012 年出现了史无前例的旱情,且今后干旱环境将一直存在,给生态治理提出了严峻地考验,从自然界中筛选抗旱植物,用于土壤、生态退化修复已收到了事半功倍的成效。干旱胁迫将导致植物一系列的连锁反应,从

对逆境的感知、传导、转录因子控制到生理反应和形态结构的改变,最终影响到植物的生长发育。目前已对白刺花抗旱性进行了多方面的研究,王慧慧等研究了干旱胁迫下白刺花种子大小与种子萌发的关系^[1];邵莉研究了白刺花干旱胁迫下生理相应机制及克隆了 *P5CS*、*DREB*、*DHN* 3 个与抗旱相关的基因^[2];王海珍等研究了白刺花适应干旱的生理机理^[3];王红梅等研究了干旱胁迫下白刺花幼苗的生理生化变化^[4];吴福忠等通过施用外源氮研究了干旱河谷白刺花幼苗生长、生物量及碳、氮、磷积累与分配的关系^[5];李芳兰等研究了干旱胁迫下白刺花的形态和生理变化^[6]。从现有资料来看,多数研究主要围绕干旱环境下白刺花种子萌发、幼苗生长过程的形态及生理生化变化以及在分子水平上相关抗旱基因的克隆,而对于从细胞分裂基础研究干旱胁迫下的遗传损伤少见报道。基于此,本试验在模拟干旱环境下,研究幼苗萌发过程中短期的干旱胁迫对白刺花根尖细胞染色体的分裂、结构变化,为进一步开展抗逆生境的基础研究提供更多的数据资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料于 2014 年 10 月在曲靖师范学院校园里采集,脱去外壳剔除有虫害的种子后,实验室自然风干保存于 4 ℃ 冰箱中备用。

收稿日期:2016-12-13

基金项目:国家级大学生创新创业训练项目(编号:201410684006);
云南省教育厅项目(编号:2014Y440)。

作者简介:吴丽芳(1980—),女,云南宣威人,硕士,副教授,主要从事植物资源评价与利用等研究。E-mail:wulifang0871@163.com。

arbuscular mycorrhiza on plant competition[J]. Journal of Ecology, 1997,85(4):541-545.

[33] Hart M M, Reader R J, Klironomos J N. Plant coexistence mediated by arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2003,18(8):418-423.

[34] van der Heijden M G, Horton T R. Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural

ecosystems[J]. Journal of Ecology, 2009,97(6):1139-1150.

[35] Grime J, Mackey J L, Hillier S H, et al. Floristic diversity in a model system using experimental microcosms[J]. Nature, 1987, 328(6129):420-427.

[36] 杨高文,刘 楠,杨 鑫,等. 丛枝菌根真菌与个体植物的关系及其对群落生产力和物种多样性的影响[J]. 草业学报,2015, 24(6):188-203.

1.2 萌发试验

将健康饱满的种子用刀片划破种皮后,用 10% 次氯酸钠消毒 20 min,无菌水冲洗 4 ~ 6 次后放入培养皿中发芽,发芽温度 27 ℃,黑暗培养。

1.3 干旱胁迫处理

待白刺花种子萌发至根尖长 1 ~ 2 cm 时,于 08:00 分别用 0%、10%、20%、30%、40%、50% 聚乙二醇 (PEG - 6000) 胁迫处理 6、12、24、48 h,每处理胁迫 50 颗小苗,胁迫完成后,迅速用蒸馏水涮洗根尖并将根尖取下,4 ℃ 冰箱低温预处理 24 h,放到卡诺固定液中固定 24 h,之后转入 70% 乙醇于 4 ℃ 冰箱中保存备用。

1.4 有丝分裂染色体制片

染色体制片参照李懋学的方法^[7]。将准备好的材料置于 0.1 mol/L HCl 中,60 ℃ 水浴解离 10 ~ 15 min 直至根尖软化,用蒸馏水漂洗 3 ~ 5 次后,吸水纸吸干,放在载玻片上,用刀片剔除根尖最顶端根冠后,截取少许根尖分生区,用解剖针将其捣碎并均匀地涂开,滴 1 ~ 2 滴卡宝品红染液,染色 2 ~ 3 min,盖上盖玻片,用铅笔轻敲并用吸水纸吸干水分,酒精灯火焰上轻轻烘烤,以利于细胞分散。

1.5 镜检及观察统计

将制备好的装片置于显微镜的载物台上,先在低倍镜 (10 × 10) 下找到分生组织区细胞分散均匀、分裂相比较多的区域,再到高倍镜 (10 × 40) 下观察。每处理的根尖至少观察 10 个装片,每个装片在高倍镜下观察和统计 10 个视野,记录每个视野中观察的总细胞数、分裂细胞数及各分裂相的比率。

1.6 干旱胁迫后观察根尖细胞有丝分裂、微核、染色体畸变指标

测定计算的指标参照周锦雯的方法^[8]。有丝分裂指数 = 处于分裂期的细胞数 / 总细胞数 × 100%; 有丝分裂指数下降速度 = - (有丝分裂指数_τ - 有丝分裂指数_t) / 有丝分裂指数_t × 100%; 染色体畸变率 = 染色体畸变细胞数 / 分裂细胞数 × 100%。其中,有丝分裂指数_τ 表示处理时的有丝分裂指数;有丝分裂指数_t 表示同一时间处理下对照组的有丝分裂指数。微核率 (micronucleus frequency, 简称 MNF) 是指 1 000 个细胞中微核细胞数所占的比例。

1.7 数据分析

试验数据用 Excel 和 DYES 软件进行处理,单因素随机区组试验进行方差分析,LSR 法检验各处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫对白刺花根尖细胞有丝分裂的影响

由表 1 可知,随着 PEG - 6000 浓度的增加和处理时间的延长,白刺花根尖细胞有丝分裂表现出不同的差异。低浓度 PEG - 6000 ≤ 10% 时,在处理 6 ~ 12 h 内,同一时间处理下与对照差异不显著;0 ~ 6 h 短期处理下,对白刺花根尖细胞有丝分裂有一定的促进作用,有丝分裂指数从 8.78% 上升至 9.09%。随着胁迫浓度的增加,其浓度 > 10% 后,有丝分裂细胞减少,表现出了一定的抑制效应。尤其当浓度达到 50% 时,胁迫 6 h 时的细胞分裂指数为 3.14%,而当胁迫 48 h 后,有丝分裂指数仅 1.96%,可以非常明显地观察到几乎所有细胞都已停止了分裂。结果表明,PEG - 6000 干旱胁迫对白刺花根尖细胞有丝分裂的影响不仅与处理时间有关,而且与处理浓度也有密切关系,是二者共同作用的结果。

表 1 干旱胁迫对白刺花根尖细胞有丝分裂指数的影响

PEG - 6000 胁迫浓度 (%)	有丝分裂指数 (%)			
	胁迫 6 h	胁迫 12 h	胁迫 24 h	胁迫 48 h
0	8.78 ± 0.81aA	8.74 ± 0.79aA	9.02 ± 0.96aA	9.04 ± 0.58aA
10	9.09 ± 0.82aA	8.61 ± 0.79aA	8.26 ± 0.97bA	7.65 ± 0.59bB
20	7.82 ± 0.85bB	7.34 ± 0.83bB	6.92 ± 1.01cB	6.89 ± 0.61cC
30	5.48 ± 0.87cC	5.50 ± 0.85cC	4.93 ± 1.03dC	4.53 ± 0.63dD
40	4.59 ± 0.89dD	4.21 ± 0.86dD	3.76 ± 1.05eD	3.21 ± 0.64eE
50	3.14 ± 0.91eE	3.02 ± 0.88eE	2.53 ± 1.07fE	1.96 ± 0.65fF

注:同列数据后不同小写字母、大写字母分别表示在 0.05、0.01 水平上差异显著、极显著。表 3、表 4 同。

植物根尖细胞分裂指数的大小反映了植物生长发育的状况,同时也反映出细胞分裂活性的高低。从表 2 中可以看出,随着处理时间的延长和处理浓度的增加,有丝分裂指数下降速率明显在上升。当处理时间为 6 h、处理浓度 10% 时,有丝分裂指数下降速率为 - 3.53%;当浓度增加至 50%,有丝分裂指数下降速率为 64.24%;当处理时间为 48 h、浓度为 50% 时,有丝分裂指数下降速率最大,为 78.32%。从整个变化趋势来看,细胞有丝分裂能力随处理时间的延长和浓度的升高不断降低。

2.2 干旱胁迫对白刺花染色体畸变的影响

由表 3 可知,染色体畸变率高低与处理浓度和处理时间呈正相关。当处理时间为 12 h、PEG - 6000 浓度 ≤ 10% 时,与对照处理差异显著;当处理时间超过 12 h,各浓度处理与对照差异极显著。当处理浓度 > 30% 时,白刺花根尖细胞染色体

表 2 干旱胁迫对白刺花根尖细胞有丝分裂指数下降速率的影响

PEG - 6000 胁迫浓度 (%)	有丝分裂指数下降速度 (%)			
	胁迫 6 h	胁迫 12 h	胁迫 24 h	胁迫 48 h
0	0	0	0	0
10	-3.53	1.49	8.43	15.38
20	10.93	16.02	23.28	23.78
30	37.59	37.07	45.34	49.89
40	44.72	51.83	58.31	64.49
50	64.24	65.67	71.95	78.32

畸变率均超过 10%,尤其当浓度为 50%、处理 48 h 时染色体畸变率高达 16.05%。结果表明,染色体畸变率与处理时间、处理浓度均有关系。

染色体畸变率往往通过多种类型而表现,在本试验中,可以观察到染色体断片、落后染色体、染色体桥、多极分裂、染色

表 3 干旱胁迫对白刺花根尖细胞染色体畸变率的影响

PEG -6000 胁迫浓度 (%)	染色体畸变率(%)			
	胁迫 6 h	胁迫 12 h	胁迫 24 h	胁迫 48 h
0	5.58 ± 1.12aA	6.33 ± 1.17aA	5.79 ± 1.59aA	5.55 ± 1.64aA
10	6.96 ± 1.13bB	7.36 ± 1.18bA	8.32 ± 1.60bB	9.08 ± 1.66bB
20	8.36 ± 1.18cC	9.08 ± 1.23cB	9.91 ± 1.67cB	10.94 ± 1.73cC
30	9.31 ± 1.21dCD	10.40 ± 1.26dC	12.03 ± 1.71dC	12.73 ± 1.77dD
40	10.39 ± 1.23eDE	11.67 ± 1.28eD	12.25 ± 1.74dC	14.14 ± 1.80eD
50	11.39 ± 1.26fE	13.57 ± 1.31fE	14.32 ± 1.78eD	16.05 ± 1.84fE

体浓缩等(图 1 至图 7)。通过研究观察,染色体断片是最常见的畸变类型,染色体断片通常是由于在理化因素的作用下 1 个染色体发生 1 处或多处断裂而不重接且无着丝粒的节段,如果染色体丢失片段比较大,或丢失片段上载有控制性状的主基因,将会不可逆地导致细胞或生物体死亡。染色体桥是染色体发生断裂,带着着丝粒的 2 条染色体再经重接,当 2 个染色单体后期向两极分开,二者两臂仍粘连在一起所形成

的。落后染色体的产生有 2 种,一种是细胞有丝分裂前中期,染色体不规则排列在赤道板上时,有个别染色体或染色体片断未能按时到达赤道板的位置;另一种是细胞有丝分裂后期,正常细胞的染色体都移向两极,而个别染色体或染色体片断滞留于两极之间,与染色体的主体部分移向两极的速度和进程不同而形成的。落后染色体经细胞分裂,可能随机趋向于细胞分裂的一极,也可能随细胞的分裂而丢失。

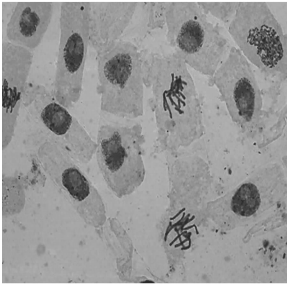


图1 正常分裂的细胞

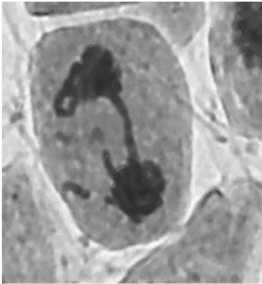


图2 染色体桥

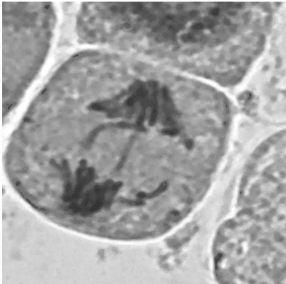


图3 染色体桥+落后染色体

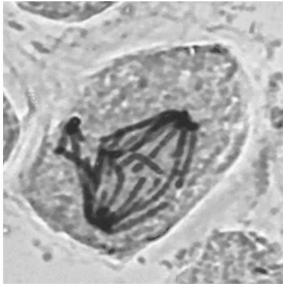


图4 染色体断片

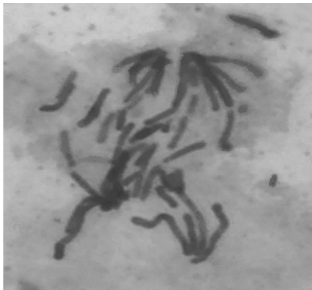


图5 染色体断片+多极分裂



图6 落后染色体

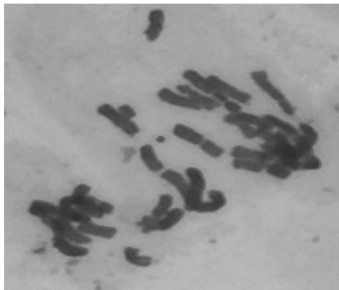


图7 染色体浓缩+染色体断片

2.3 干旱胁迫对白刺花根尖细胞微核的影响

微核也是染色体畸变的一种形式,早期微核技术主要用于水质的检测方面。微核位于细胞质中,直径是主核的 1/20 至 1/3,是完全与主核分开的圆形或椭圆形的小核。从表 4 可以看出,当 PEG -6000 浓度小于 20% 时,微核率在 10‰ 以下;当 PEG -6000 浓度高于 20% 后,微核率均大于 10‰,尤

其当浓度达到 50% 时,处理 48 h 的微核率最高,达 15.76‰。早期研究认为,微核仅出现在细胞分裂的间期,后来经过多年研究发现,细胞分裂的任何时期都能产生微核,且微核的大小与处理时间、处理浓度有关。本试验中也观察到不同分裂时期的微核(图 8 至图 11)。

表 4 干旱胁迫对白刺花根尖细胞微核的影响

PEG -6000 胁迫浓度 (%)	微核率(‰)			
	胁迫 6 h	胁迫 12 h	胁迫 24 h	胁迫 48 h
0	5.84 ± 1.11aA	5.66 ± 0.96aA	5.62 ± 0.79aA	5.67 ± 2.03aA
10	6.88 ± 1.12bA	8.18 ± 0.97bB	8.81 ± 0.80bB	9.27 ± 2.05bB
20	9.75 ± 1.17cB	10.72 ± 1.01cC	9.66 ± 0.83cC	9.89 ± 2.14bB
30	12.09 ± 1.20dC	11.87 ± 1.04dD	10.85 ± 0.85dD	12.38 ± 2.19cC
40	11.73 ± 1.22dC	12.57 ± 1.05dD	12.48 ± 0.86eE	15.29 ± 2.23dD
50	12.59 ± 1.25dC	12.45 ± 1.07dD	14.12 ± 0.88fF	15.76 ± 2.28dD

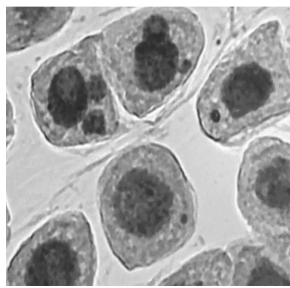


图8 间期微核

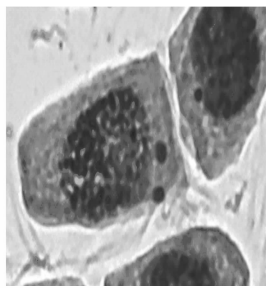


图9 前期双微核



图10 中期双微核

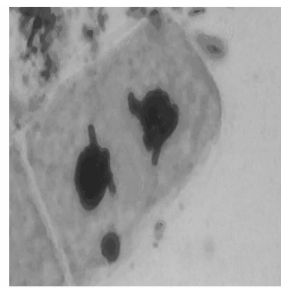


图11 末期微核

3 讨论

PEG-6000 作为一种渗透调节剂,它能模拟干旱逆境的原因是其可阻塞植物的输导组织。Kaufmann 等研究得出,PEG-6000 诱导水分逆境所取得的效果与土壤干旱是一样的,PEG-6000 诱导下引起植物内源激素如 ABA 积累,而植物根部对 ABA 的反应最为敏感,从而导致植物生长受到抑制^[9]。再者干旱胁迫下植物由于脱水使膜的构成或结构发生改变,导致质膜透性增加,细胞膜系统遭受破坏。在对小麦^[10-11]、柑橘^[12]、番茄^[13]等研究中发现干旱胁迫下植物细胞破裂、内容物溢出,多数叶绿体溶解散乱在基质中,细胞保护酶系统发生显著变化。在抑制植物生长方面,干旱胁迫可能降低与 DNA 合成有关的酶活性,致使 DNA 的合成速率减慢,细胞分裂的间期延长^[14]。本研究也观察到,白刺花根尖细胞有丝分裂指数随着 PEG-6000 处理浓度升高和处理时间延长明显下降。短期(6 h)低浓度(PEG-6000 浓度 10%)有一个上升趋势,这可能是植物短期内适应环境变化的应激反应,使相当一定时期内代谢增强,细胞周期加快导致,而当植物自身应激反应超过防御保护屏障后,植物的生长发育就会受到影响,甚至死亡,从而导致细胞分裂能力降低。

染色体畸变是植物细胞有丝分裂过程中受到理化因素的影响,DNA 或蛋白质的合成受到干扰,诸如纺锤体蛋白等与染色体运动有关的生物分子不能合成或合成量不足,或染色体损伤后不能及时正常修复而导致^[15],有染色体桥、染色体断片、细胞多极化等畸变类型。本研究中,PEG-6000 浓度 0~20%、处理 24 h 内时,白刺花根尖细胞染色体畸变率在 10% 以下,当浓度大于 30% 时,染色体畸变率均在 10% 以上。本试验中,观察到了染色体断片、染色体桥、染色体多极化、染色体浓缩等多种类型的畸变,其中染色体断片是主要的畸变类型。染色体浓缩可能是长时干旱胁迫致使细胞合成代谢受阻,抑制微管蛋白的组装,抑制调控细胞分裂的各种酶类的活性,使染色体被原位抑制而缩短变粗导致的。如在某些热击研究中,细胞在热激处理下合成热激蛋白,而热激也可能导致染色体的快速浓缩。

微核是染色体畸变的一种形式之一,可能是染色体发生断裂或部分落后染色体在细胞分裂的后期行动滞后,不能进入子细胞的主核而成^[16-17]。微核多出现于细胞分裂的间期,但在细胞分裂的前期、中期、后期均能看到,而末期微核数微乎其微。

参考文献:

- [1]王慧慧,王普昶,赵 钢,等. 干旱胁迫下白刺花种子大小与萌发对策[J]. 生态学报,2016,36(2):335-341.
- [2]邵 莉. 白刺花干旱和盐胁迫下生理相应机制及抗旱相关基因克隆[D]. 武汉:华中农业大学,2012.
- [3]王海珍,梁宗锁,郝文芳,等. 白刺花(*Sophora viciifolia*)适应土壤干旱的生理学机制[J]. 干旱地区农业研究,2005,23(1):106-110.
- [4]王红梅,包维楷,李芳兰. 不同干旱胁迫强度下白刺花幼苗叶片的生理生化反应[J]. 应用与环境生物学报,2008,14(6):757-762.
- [5]吴福忠,包维楷,吴 宁. 外源施 N 对干旱河谷白刺花(*Sophora davidii*)幼苗生长、生物量及 C、N、P 积累与分配的影响[J]. 生态学报,2008,28(8):3817-3825.
- [6]李芳兰,包维楷,吴 宁. 白刺花幼苗对不同强度干旱胁迫的形态与生理响应[J]. 生态学报,2009,29(10):5406-5416.
- [7]李懋学. 作物染色体及其研究技术[M]. 北京:中国农业出版社,1996.
- [8]周锦雯. 镉对蚕豆根尖细胞有丝分裂的影响[D]. 成都:四川师范大学,2006.
- [9]Kaufmann M R, Eckard A N. Evaluation of water stress control with polyethylene glycols by analysis of guttation[J]. Plant Physiology, 1971,47(4):453-456.
- [10]武玉叶,李德全. 土壤水分胁迫对冬小麦叶片渗透调节及叶绿体超微结构的影响[J]. 华北农学报,2001,16(2):87-93.
- [11]张永平,王志敏,吴永成,等. 不同供水条件下小麦不同绿色器官的气孔特性研究[J]. 作物学报,2006,32(1):70-75.
- [12]谢深喜,张秋明,熊兴耀,等. 水分胁迫对柑橘叶片和根系细胞超微结构的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2008,34(2):168-172.
- [13]齐红岩,刘 洋,刘海涛. 水分亏缺对番茄叶片气孔特性及叶绿体超微结构的影响[J]. 西北植物学报,2009,29(1):9-15.
- [14]段昌群,王焕校. 重金属对蚕豆的细胞遗传学毒理作用和对蚕豆根尖微核技术的探讨[J]. 植物学报,1995,37(1):14-24.
- [15]Qian X W. Mutagenic effects of Chromium trioxide on root tip cells of *Vicia faba*[J]. Journal of Zhejiang University Science, 2004,5(12):1570-1576.
- [16]曹 佳. 微核试验在中国的应用、发展与展望[J]. 遗传,2003,25(1):73-76.
- [17]陈宏伟. 微核及微核试验的应用与发展[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2004,25(10):1160-1164.