

灰岩皱叶报春和滇北球花报春在热锻炼和热胁迫下叶肉细胞超微结构的差异

胡伟娟, 张启翔, 潘会堂, 董玲玲

(北京林业大学 园林学院, 北京, 100086)

摘要:为研究报春花属 *Primula* 植物对高温的响应机制,从超微结构的角度探讨热锻炼提高耐热性及不同品种耐热性差别的原因,利用透射电镜的方法,对耐热种灰岩皱叶报春 *P. forrestii* 和不耐热种滇北球花报春 *P. denticulate* ssp. *sinodenticulata* 进行了热锻炼(38 °C, 12 h)和热胁迫(42 °C)条件下细胞超微结构的观察.结果表明,热锻炼提高了核膜的热稳定性,延缓热胁迫对叶肉细胞超微结构的破坏,从而可提高细胞的耐热性.耐热种和不耐热种在热锻炼与热胁迫过程中的超微结构变化过程基本相同,只是被破坏的时间有差异;叶肉细胞中叶绿体比线粒体对高温敏感,在热胁迫过程中,存在线粒体数量增多的现象,推测是报春属植物对逆境的积极响应对策.

关键词:报春花属; 热锻炼; 热胁迫; 超微结构

中图分类号:S682.15; Q248

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2010)03-0043-04

Difference in Ultrastructure of Mesophyll Cell Between Two *Primula* Species with Different Thermotolerance Under Heat Acclimation and Heat Stress

HU Wei-juan, ZHANG Qi-xiang, PAN Hui-tang, DONG Ling-ling

(College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: To study the response mechanism of *Primula* to high temperature and find the reasons for the enhancement of heat resistance after heat acclimation and the difference in heat resistance between different species from the perspective of the ultrastructure, the ultrastructure of mesophyll cell in heat-resistant species (*Primula forrestii*) and non-heat-resistant species (*P. denticulate* ssp. *sinodenticulata*) were investigated under the heat acclimation (38 °C, 12 h) and heat stress (42 °C) using the method of transmission electron microscopy. The results showed that heat acclimation improved thermotolerance of cell and thermal stability of nuclear membrane, and delayed the ultrastructural destruction in heat stress. The ultrastructural changes between heat-resistant species and non-heat-resistant species under the heat acclimation and heat stress was basically same, but the difference lay in the time of destruction; mesophyll chloroplast was sensitive to heat than the mitochondria in the process of heat stress, the phenomenon of the number increase of mitochondria, suggesting that the genus *Primula* had a positive response to stress environment.

Key words: *Primula*; heat acclimation; heat stress; ultrastructure

由于近年来全球气温持续升高,使高温造成的生产损失越来越严重,因此对植物耐热性的研究已经引起人们的广泛重视.对于观赏植物而言,高温胁迫

不但影响其生长表现和观赏价值,更是制约高山观赏植物资源引种的一个重要因子.报春花属 *Primula* 植物是著名的高山花卉,以其丰富绚丽的花色、

收稿日期:2009-09-17

作者简介:胡伟娟(1980—),女,博士研究生;通信作者:张启翔(1956—),男,教授,博士,E-mail:ZQX@bjfu.edu.cn

基金项目:国家林业局重点项目(2003-008-L0);“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD01A18)

各具特色的花型而备受世界各地人们的喜爱,被外国尤其是欧美国家的花卉园艺者赞为“世界三大花园植物”之一^[1]。由于报春花大多分布在高山冷凉地区,温度是影响其引种利用的主要因子之一,所以研究报春花属植物的耐热性和对高温的响应机制是十分必要的。已有的研究证明,作物经过热锻炼后,其在热胁迫过程中的耐热性会得到明显提高,说明热锻炼能够提高组织的耐热性,而且,品种的耐热性差异只有经过热锻炼才能表现出来,即在锻炼前耐热性相近的不同品种经过热锻炼后获得的耐热性可能会有很大的差异^[2-4]。因此,研究不同品种在热锻炼过程中获得耐热性能力不同的原因,对于发掘耐热品种资源,培育耐热新品种,均有非常重要的意义。以往的研究多集中在热锻炼后热激蛋白的产生及对酶活性影响等生化指标方面^[5-7],而对超微结构变化与耐热性的关系的研究较少。本试验选择在北京温室中越夏时田间表现不同的2个报春种——灰岩皱叶报春(安全越夏)和滇北球花报春(难越夏),通过比较其在热锻炼和热胁迫过程中叶肉细胞超微结构的变化,说明热锻炼提高耐热性及不同品种耐热性差别的原因,探讨植物在高温胁迫时细胞的最初反应,为植物耐热性机制、耐热品种选育及从细胞学方面建立耐热性评价指标提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用生长习性相同、据田间表现认为抗热性有明显差异的2个报春种为材料,其中灰岩皱叶报春 *Primula forrestii* 为耐热种,滇北球花报春 *P. denticulate* ssp. *sinodenticulata* 为不耐热种。

材料在北京林业大学胖龙温室进行穴盘播种28 d后移栽至直径8 cm的营养钵,盆基质为V(草炭土):V(珍珠岩)=3:1,根据温室的条件进行常规的养护管理和病虫害防治,幼苗在处理前的生长条件为白天平均温度21℃,夜晚平均温度为16℃;每天光照时间约为10~12 h;水分充足。

1.2 方法

1.2.1 热锻炼和热胁迫处理 待2种报春花幼苗长出6~8片真叶时,将材料分为2组,每组30株,一组放于(38±0.5)℃的光照培养箱中12 h作为热锻炼处理,另一组放置于室温(22℃)下作为对照。随后将2组材料放入(42±0.5)℃培养箱中做热胁迫处理,间隔10、30、60、120和180 min分别取样,取样部位为相同部位的真叶,以不做热胁迫处理为对照,对照置于室温(22℃)下培养。

1.2.2 取样及透射电镜超微结构观察 将热胁迫处理过的材料取出,迅速冷却,随机取样。用锋利的双面刀片,在处理 and 对照的叶片中部切取长1 mm、宽1 mm的小片,快速投入到 w 为2.5% (pH7.2)的戊二醛固定液中,抽气机抽气5~10 min。更换戊二醛(w 为2.5%)固定液,固定2 h或更长时间。用0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH7.2)漂洗4次,每次20~30 min。 w 为1%锇酸固定3 h,0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH7.2)漂洗2次,每次15 min。用 φ 为30%、50%、70%、80%、90%、100%、100%、100%丙酮依次脱水,每级20 min。用V(丙酮):V(Spurr树脂)为1:1的混合液浸透24 h。纯Spurr树脂浸透24 h。包埋、干燥及聚合(70℃)。LKB-Y型超薄切片机切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色,JEM-100S透射电镜观察并照相。

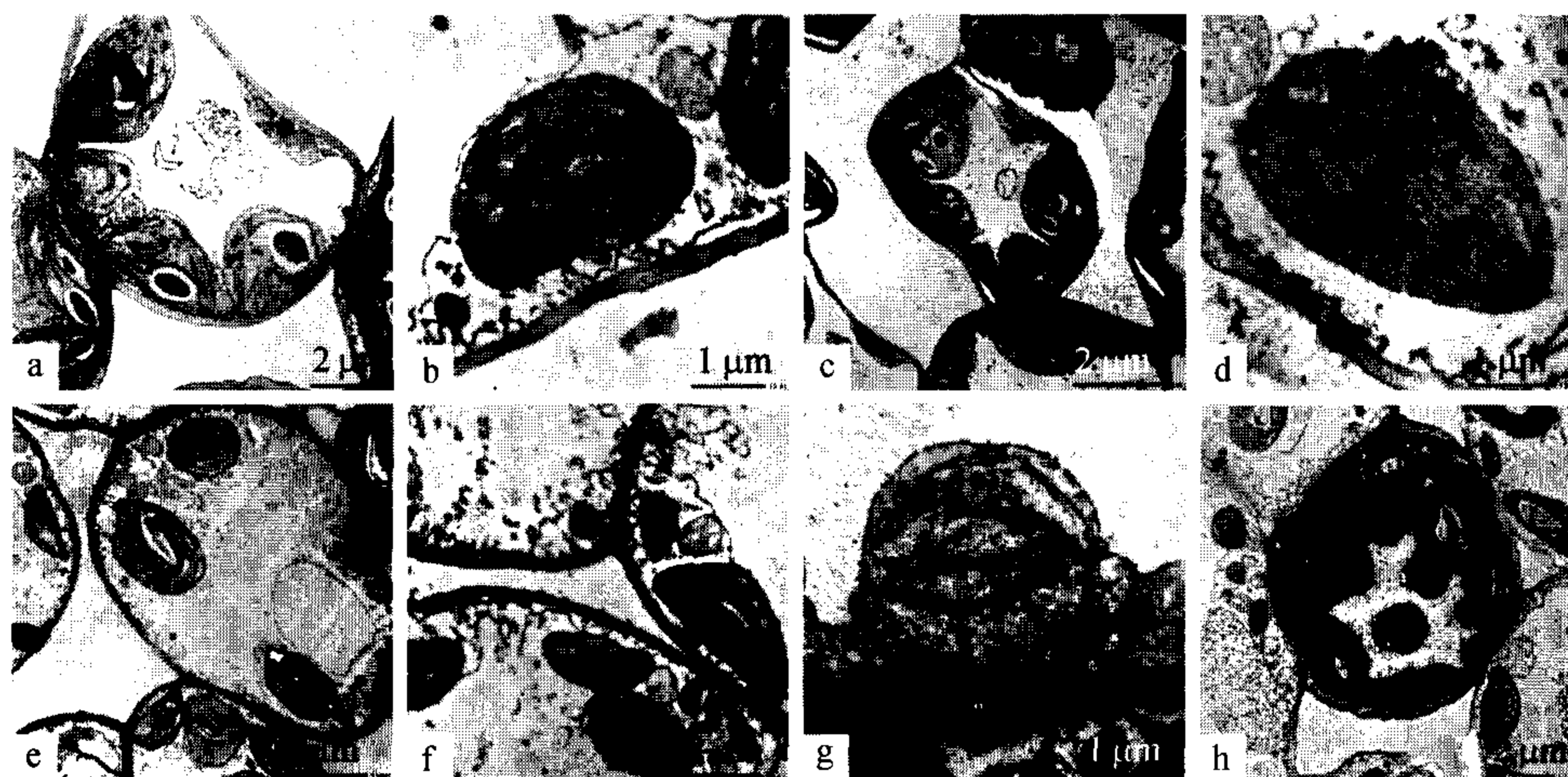
2 结果与分析

2.1 滇北球花报春在热锻炼和热胁迫过程中的超微结构变化

不耐热种(滇北球花报春)对照的叶肉细胞结构正常,各细胞器完好,质膜结构清晰。叶绿体是叶肉细胞中最明显的细胞器,数量较多,为梭形或长椭圆形,沿质膜分布,细胞中央为大液泡(图1a)。经热锻炼后,叶肉细胞部分部位发生质壁分离,质壁分离处的质膜外方出现膜被小泡,叶绿体内淀粉粒增多(图1b),其他结构无异常变化。

未经热锻炼的滇北球花报春在热胁迫10 min时叶肉细胞无明显变化,与对照基本相同。胁迫30 min后,叶肉细胞无质壁分离现象,叶绿体内淀粉粒不多,但发现有些细胞的液泡膜被破坏(图1c)。胁迫1 h后叶肉细胞发生了明显变化,质壁分离严重;叶绿体开始膨胀变圆,仍聚集在一起,沿质膜分布,叶绿体膜稍有解体,类囊体片层松散,结构紊乱;线粒体嵴和内膜逐渐解体(图1d)。胁迫2 h后,细胞内物质破化程度加剧(图1e)。

经过热锻炼的滇北球花报春在热胁迫10 min及30 min时,叶肉细胞的结构基本正常。而胁迫1 h时,出现质壁分离现象,部分细胞内少数叶绿体膜开始产生小泡,甚至破裂,叶绿体内片层随之松散,基质片层未出现明显变化;线粒体双层膜结构仍清晰可见(图1f)。胁迫2 h后,质壁分离严重,多数细胞叶绿体膜开始产生小泡,甚至破裂,内片层随之松散;液泡膜开始解体;线粒体外膜破裂(图1g);少数细胞结构遭到完全破坏。胁迫3 h后,细胞破坏严重(图1h),细胞严重收缩。



a: 未热锻炼, 热胁迫 0 min, 细胞结构正常, $\times 4\,000$; b: 热锻炼, 热胁迫 0 min, 质壁分离, $\times 12\,000$; c: 未热锻炼, 热胁迫 30 min, 无质壁分离, 淀粉粒不多, $\times 3\,000$; d: 未热锻炼, 热胁迫 1 h, 叶绿体膜破裂, $\times 12\,000$; e: 未热锻炼, 热胁迫 2 h, 细胞内物质有所破坏, $\times 4\,000$; f: 热锻炼, 热胁迫 1 h, 质壁分离, $\times 4\,000$; g: 热锻炼, 热胁迫 2 h, 线粒体外膜破裂, $\times 20\,000$; h: 热锻炼, 热胁迫 3 h, 细胞破坏加重, $\times 3\,000$.

图1 滇北球花报春的叶肉细胞观察

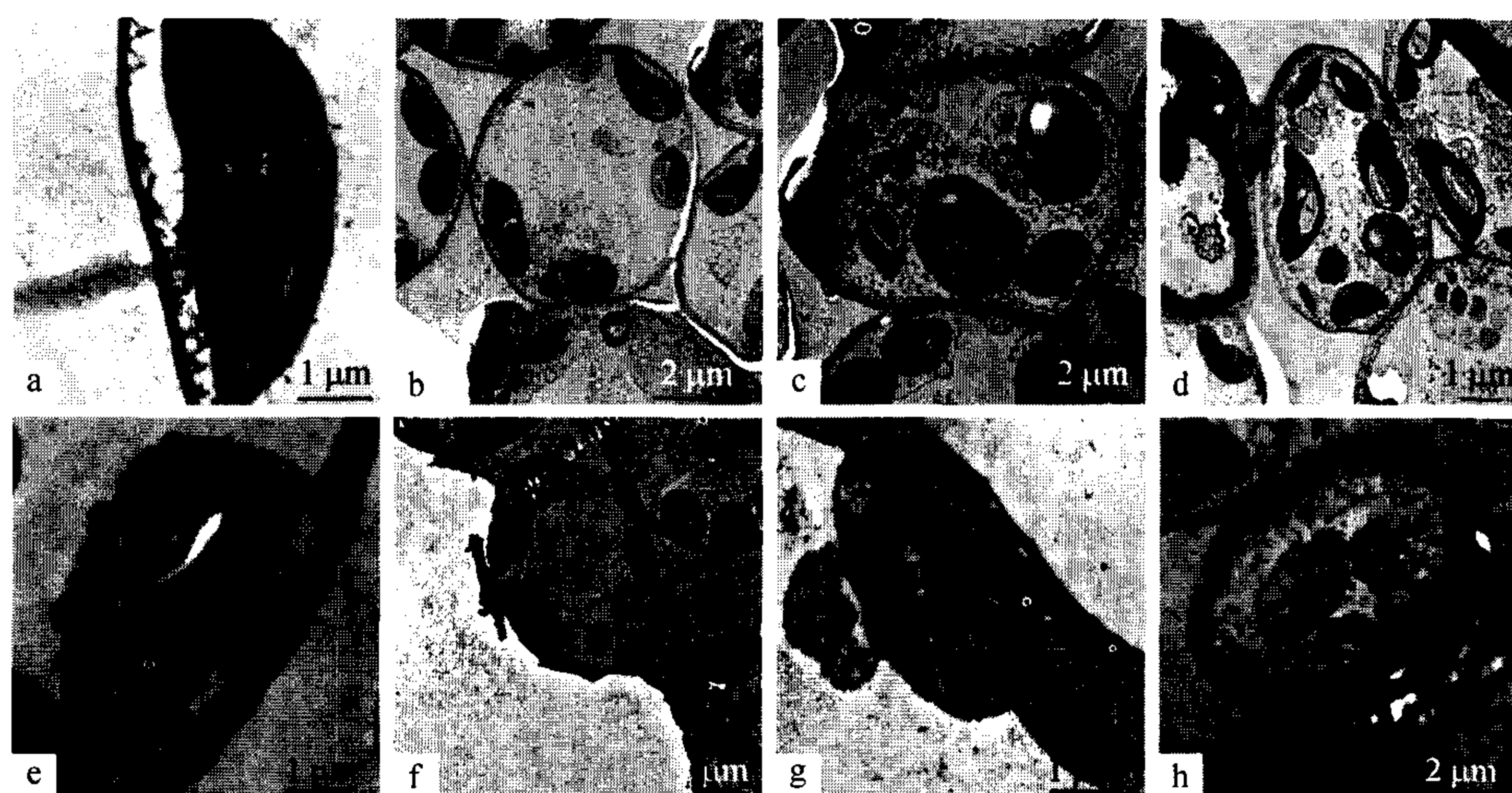
Fig. 1 Observation of the mesophyll cell in *Primula denticulate* ssp. *sinodenticulata*

2.2 灰岩皱叶报春在热锻炼和热胁迫过程中的超微结构变化

耐热种(灰岩皱叶报春)对照的叶肉细胞结构正常, 细胞器形态和分布与滇北球花报春基本相同. 经热锻炼后, 多数叶肉细胞发生质壁分离, 质膜内陷, 在质膜和细胞壁之间出现了多泡结构, 叶绿体内淀粉粒增多(图2a), 其他结构无异常变化.

未经热锻炼的灰岩皱叶报春在热胁迫 10 min 时, 叶肉细胞无明显变化, 与对照基本相同. 胁迫 30

min 后, 少量叶肉细胞存在质壁分离现象, 叶绿体内淀粉粒增多, 未发现细胞器膜的破坏(图2b). 胁迫 1 h 后多数叶肉细胞发生了质壁分离; 叶绿体膨胀变圆, 仍沿质膜分布; 液泡膜稍有破裂, 少数解体, 线粒体增多(图2c). 胁迫 2 h 后, 细胞多数部位发生质壁分离, 液泡膜破裂解体, 产生很多小泡; 叶绿体膜开始破裂, 内片层随之松散, 脂肪粒膨胀增大; 线粒体外膜破裂; 少数细胞破坏严重(图2d). 胁迫 3 h 后, 多数叶绿体外膜严重解体(图2e), 细胞严重收缩.



a: 热锻炼, 热胁迫 0 min, 质壁分离, 淀粉粒增多, $\times 12\,000$; b: 未热锻炼, 热胁迫 30 min, 出现质壁分离, 泡状物及脂质小球增多, $\times 3\,000$; c: 未热锻炼, 热胁迫 1 h, 线粒体增多, $\times 4\,000$; d: 未热锻炼, 热胁迫 2 h, 细胞遭到破坏, $\times 3\,000$; e: 未热锻炼, 热胁迫 3 h, 叶绿体外膜解体, 内容物模糊, $\times 12\,000$; f: 热锻炼, 热胁迫 1 h, 开始出现质壁分离, 细胞结构基本正常, $\times 3\,000$; g: 热锻炼, 热胁迫 2 h, 叶绿体膜开始破裂, 内片层随之松散, $\times 12\,000$; h: 热锻炼, 热胁迫 3 h, 解体的细胞器碎片排列在细胞中部, $\times 3\,000$.

图2 灰岩皱叶报春的叶肉细胞观察

Fig. 2 Observation of the mesophyll cell in *Primula forrestii*

经过热锻炼的灰岩皱叶报春在热胁迫 10 和 30 min 时, 叶肉细胞的结构基本正常. 胁迫 1 h 时开始出现质壁分离现象, 细胞器膜未受到破坏, 膜结构仍

清晰可见(图2f). 胁迫 2 h 后, 质壁分离严重, 少数细胞叶绿体膜开始破裂, 内片层随之松散(图2g); 液泡膜开始解体; 线粒体外膜破裂; 少数细胞结构遭

到完全破坏.胁迫3 h后,少数线粒体开始解体,细胞收缩,细胞壁模糊不清,解体的细胞器碎片排列在细胞中部(图2h).

3 讨论与结论

3.1 热锻炼提高耐热性及其原因探讨

从本试验结果可以看出,耐热种和不耐热种报春在经过热锻炼后,细胞超微结构都发生了适应性的变化.再进行热胁迫时,都推迟了细胞受伤害的时间,整个胁迫过程中,细胞受伤害的程度也低于未进行过热锻炼的对照,从细胞微观结构的变化上说明热锻炼能够提高报春属植物的耐热性.

热锻炼后叶肉细胞超微结构的变化与热锻炼前相比,耐热种和不耐热种报春未进行热胁迫时叶肉细胞均出现了部分质壁分离,在质壁分离处的质膜外方有膜被小泡或与细胞壁之间存在多泡结构,叶绿体内脂质小球或脂肪粒增多的现象.叶肉细胞在热锻炼过程中出现部分质壁分离可能对其在热胁迫下热致死时间的延长起重要作用^[8],因为叶片在蒸腾失水降低叶温的同时,也可使细胞液浓度增加,减少自由水比例,加大束缚水比例,增强植株的耐热性.另外,被膜小泡及多泡结构的生理意义可能在于增加质膜的表面积,能对高温起着一定的缓冲作用.而热锻炼后叶绿体内脂质小球增多现象可能是叶绿体对热胁迫环境的一种表现^[3].

3.2 不同种报春在热锻炼及热胁迫过程中叶肉细胞超微结构变化的差异

通过比较耐热种与不耐热种报春超微结构的变化可以看出,在热锻炼提高耐热性方面,2种报春基本没有差异,都可以通过热锻炼来提升耐热性能.但在热胁迫的过程中,2种报春表现出了不同的耐热性,试验显示,在相同的胁迫时间内,不耐热报春细胞所受的损伤较大,叶绿体、线粒体、液泡等都出现不同程度的破坏;不同耐热性品种的液泡、质膜、线粒体及叶绿体在热锻炼与热胁迫过程中的超微结构变化过程基本相同,只是被破坏的时间有差异,热胁迫使不耐热报春细胞中细胞壁周围,叶绿体,线粒体膜降解,说明了热胁迫容易使细胞内膜系统的结构稳定性降低,功能丧失,最终导致分解聚集.而耐热品种就可以抵抗热胁迫对膜、细胞壁和某些细胞器的伤害,说明耐热品种比不耐热品种膜的热稳定性高是其耐热的主要原因.但耐热品种的这种对热胁迫的热忍耐抵抗机制和原因还是一个极其复杂的过程,还需运用更加先进的方法,从形态、生理生化、生物物理、遗传、细胞生物学及分子水平上进一步探讨植物热反应机制.

3.3 叶绿体与线粒体在热锻炼与热胁迫过程中的变化

从试验结果可以看出,细胞中膜结构的破坏是

植物受高温胁迫的主要变化.而高温对细胞结构的影响程度取决于植物耐热性的强弱.植物各亚细胞结构中叶绿体是对高温比较敏感的细胞器,这与Ristic等^[9]发现玉米叶绿体结构受热刺激破坏较大相一致;而呼吸作用器官线粒体比叶绿体的耐热能力要强得多,因此植物受高温胁迫后会导致同化产物消耗占优势,使植物达到“饥饿”状态^[10].本试验所得结果进一步证明了线粒体比叶绿体更具有相对的热稳定性.另外,试验发现耐热报春在受到热胁迫时,产生了线粒体增多的现象,这在以往热胁迫对细胞超微结构影响的文献^[3,4,8]中未见报道,但在翠南报春*P. sieboldii*对低温的适应性变化^[11]中,发现了这一超微结构的变化,即在一定的低温范围内,翠南报春细胞会随着温度的降低而增加线粒体的数量.推测原因可能是报春属植物对逆境的一种积极响应对策.

参考文献:

- [1] RICHARDS J. Primula [M]. Poland, OR: Timber Press, 1993:3-4.
- [2] LI P H, DAVIS D W, SHEN Z Y. High-temperature-acclimation potential of the common bean: can it be used as a selection criterion for improving crop performance in high-temperature environments [J]. Field Crop Research, 1991, 27:241-256.
- [3] 王光耀, 刘俊梅, 张仪, 等. 热锻炼和热胁迫过程中菜豆叶肉细胞超微结构的变化 [J]. 农业生物技术学报, 1999, 7(2):151-156.
- [4] 苗琛, 利容千, 王建波. 甘蓝热胁迫叶片细胞的超微结构研究 [J]. 植物学报, 1994, 36(9):730-732.
- [5] VELAZQUEZ J M, LINDQUIST S. HSP70: Nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery [J]. Cell, 1984, 36:655-662.
- [6] BRODL M R. Regulation of the synthesis of normal cellular proteins during heat shock [J]. Physiologia Plantarum, 1989, 75:439-443.
- [7] WENG J, NGUYEN H T. Difference in the heat-shock response between thermotolerant and thermosusceptible cultivars of hexaploid wheat [J]. Theor Appl Genet, 1992, (84):941-946.
- [8] 马晓娣, 王丽, 汪矛, 等. 不同耐热性小麦品种在热锻炼和热胁迫下叶片相对电导率及超微结构的差异 [J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(5):4-8.
- [9] RISTIC Z K, DAVID D C. Chloroplast structure after water and high temperature stress in two lines of maize that differ in endogenous levels of abscisic acid [J]. Int J Plant Sci, 1992, 153:186-196.
- [10] THEBUD R K, SANTARIUS K A. Effects of high temperature stress on various biomembranes of leaf cell in situ and in vitro [J]. Plant Physiology, 1982, 70:200-205.
- [11] 周蕴薇. 翠南报春叶片细胞超微结构对低温的适应性变化 [J]. 园艺学报, 2006, 33(6):1361-1364.

【责任编辑 李晓卉】