

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

马晓娣^{1,3} 王丽¹ 汪矛¹ 彭惠茹²

(1. 中国农业大学 生物学院,北京 100094; 2. 中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100094;

3. 邯郸农业高等专科学校,河北 永年 057150)

摘要 以不同耐热性的2个小麦品种叶片为试材,研究在热锻炼(34,48 h)和热胁迫(49)条件下,叶片相对电导率及超微结构变化与耐热性的关系。结果表明:热锻炼提高了核膜的热稳定性,降低了叶片相对电导率,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。叶肉细胞中液泡膜对高温最敏感,其次为线粒体和叶绿体。线粒体的嵴和内膜比外膜对高温更敏感;叶绿体中,类囊体膜在热胁迫下首先出现排列紊乱,但解体时间却比叶绿体被膜晚。此外比较了2个小麦品种叶肉细胞超微结构在热锻炼和热胁迫下反应的差异,讨论了这些超微结构变化与耐热性的关系及热胁迫下叶肉细胞的死亡类型。

关键词 小麦;热锻炼;热胁迫;相对电导率;超微结构

中图分类号 Q 942.4; S512.1

文章编号 1007-4333(2003)05-0004-05

文献标识码 A

Difference in relative conductivity and ultrastructure of leaf between two wheat cultivars with different thermotolerance under heat acclimation and heat stress

Ma Xiaodi^{1,3}, Wang Li¹, Wang Mao¹, Peng Huiru²

(1. College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

3. Handan Agricultural College, Hebei Yongnian 057150, China)

Abstract The relations between relative conductivity of leaf and ultrastructural changes of mesophyll cell and thermotolerance, under the condition of heat acclimation (34, 48 h) and heat stress (49) of two wheat cultivars with different thermotolerance, were investigated. The results showed that heat acclimation reduced improved thermotolerance of cell and thermal stability of nuclear membrane, thus reducing relative conductivity of leaf and delayed the ultrastructural destruction induced by heat stress. In mesophyll cell, vacuolar membrane was the most susceptible one to high temperature, and mitochondrion was more susceptible than chloroplast. In mitochondria, mitochondrial crista and inner membrane was more susceptible than outer membrane. In chloroplasts, though the arrangement of thylakoid membrane appeared disturbance firstly, the disintegration of thylakoid membrane appeared later than chloroplast envelope. The difference of reaction ultrastructure of two wheat cultivars with different thermotolerance to heat acclimation and heat stress was compared, the relationship of ultrastructure's changes with thermotolerance was discussed, and the type of mesophyll cell death under heat stress also studied.

Key words wheat; heat acclimation; heat stress; relative conductivity; ultrastructure

近年来,由于“温室效应”,全球气温持续升高,尤其在小麦灌浆期经常出现“干热风”,严重影响小麦的产量和品质,因此对小麦耐热性研究已成为近年来抗性研究的热点之一^[1~3]。

已有的研究证明,作物经过热锻炼(heat acclimation, HA)后,其在热胁迫(heat stress, HS)过程中的耐热性明显提高,而且,品种的耐热性差异只有经过

热锻炼才能表现出来^[4~6]。因此,研究品种在热锻炼过程中获得耐热性的能力不同的原因,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击蛋白(heat shock protein, HSP)的产生及对酶活性影响等生化指标方面^[9~11],而对超微结构变化与耐热性的关系的研究较少,尤其对短期高温热胁迫下的细胞死亡类

收稿日期:2003-08-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000106)

作者简介:马晓娣,硕士研究生;王丽,副教授,联系作者,主要从事发育植物学研究, E-mail: zzzhang@cau.edu.cn

型极少涉及^[5~6]。本试验通过比较不同耐热性的小麦品种在热锻炼和热胁迫过程中的叶片相对电导率及叶肉细胞超微结构变化,从生理学及细胞学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,为耐热品种选育及从生理学及细胞学方面建立耐热性评价指标提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

选用生长习性相同、田间表现耐热性有明显差异的2个小麦品种为材料:TAM200为耐热品种,中国春为不耐热(或热敏性)品种,实验用小麦品种籽粒由中国农业大学农学与生物技术学院提供。

1.2 方法

1.2.1 热处理 将饱满、胚无损伤的小麦籽粒(各500粒)均匀摆放在底部平铺湿润滤纸的培养皿中,每培养皿约60粒,人工气候培养箱内培养,光/暗周期为14/10 h,昼夜温度20/15℃,相对湿度60%。

当小麦幼苗株高约10 cm时,分成二组,一组转入34℃恒温培养,作为热锻炼处理,光/暗周期为14/10 h;另一组仍在原培养环境中生长,作为对照。48 h后,随即剪取热锻炼和未锻炼幼苗的第一真叶各6片,设4个重复,去掉叶片顶端1~1.5 cm,切取一段2 cm长的叶片放入试管,立即用去离子水冲洗3次,再加入10 mL去离子水浸没叶片,将试管口用锡箔纸封住,放入(49±1)℃的恒温水浴中作0 min~2 h热胁迫处理,间隔10 min取样。

1.2.2 相对电导率测定 将处理的材料取出冷却至室温,静置20 h,用Cole-Parmer 1481-55型电导仪测定对照及热胁迫处理材料的电导率 T_1 ,之后将材料在125 kPa(约0.14 MPa)高压锅中处理15 min,取出冷却至室温后测定电导率 T_2 。相对电导率= $T_1/T_2 \times 100\%$ 。

1.2.3 电镜制片 将处理材料迅速冷却,在各叶片中部切取3 mm长、2 mm宽的小片,戊二醛-锇酸双固定,磷酸缓冲液漂洗,梯度丙酮脱水,Spurr树脂浸透、包埋,JB-4型超薄切片机切片,醋酸双氧钨和柠檬酸铅双染,JEOL-100S透射电镜观察并照相。

2 结果

2.1 不耐热品种在热锻炼和热胁迫过程中叶肉细胞超微结构变化

不耐热品种(中国春)对照的叶肉细胞结构正常(图1-1);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,叶绿体内脂质小球增多,核仁内出现核仁液泡(图1-2,3),其他结构无异常变化。

未经热锻炼的中国春在热胁迫初期(10 min)叶肉细胞无质壁分离现象,叶绿体内脂质小球不多(图1-4)。但发现有些细胞的液泡膜被破坏;线粒体嵴和内膜逐渐解体;核质凝集,核膜破裂;叶绿体内类囊体片层松散,结构紊乱。(图1-5,6)。热胁迫20 min时,叶肉细胞质壁分离严重;叶绿体被膜解体破裂;细胞结构完全遭到破坏(图1-7)。

经过热锻炼的中国春在热胁迫10及20 min时,叶肉细胞的结构基本正常;而40 min时,线粒体内部结构开始解体,出现空洞;叶绿体内脂质小球增多,类囊体片层松散,结构紊乱,叶绿体被膜解体破裂;核质凝集程度高,但核膜完整(图1-8)。热胁迫50 min时,细胞收缩严重,细胞间隙扩大,细胞质中被膜小泡增多;细胞结构完全遭到破坏(图1-9)。

2.2 耐热品种在热锻炼和热胁迫过程中叶肉细胞超微结构变化

耐热品种(TAM200)对照的叶肉细胞结构正常(图1-10)。经热锻炼后叶肉细胞稍有质壁分离,其它结构正常(图1-11)。

未经热锻炼的TAM200在热胁迫10 min时,叶肉细胞结构基本正常;而20 min时,线粒体内部结构开始解体,叶绿体片层结构紊乱,核质出现凝集,但无质壁分离现象,细胞结构仍然完整(图1-12)。热胁迫30 min时细胞结构完全遭到破坏(图1-13)。

经热锻炼的TAM200在热胁迫10及20 min时,叶肉细胞的结构基本正常;30 min时,叶肉细胞稍有质壁分离,线粒体嵴开始模糊,叶绿体内脂质小球增多,细胞结构仍然完整(图1-14)。随时间延长,首先线粒体嵴和内膜逐渐解体,随后叶绿体的类囊体片层松散,结构紊乱;直至热胁迫80 min时叶绿体被膜解体,细胞收缩,细胞间隙扩大,细胞壁破裂,细胞内容物外泄,细胞结构完全遭到破坏(图1-15)。

2.3 耐热与不耐热品种在不同热胁迫时间处理下叶片的相对电导率

生理学上用电导率测定表示植物组织受伤害的程度,相对电导率达50%时植物组织就已死亡,而将此时的热胁迫时间称为热致死时间(heat killing time)^[5]。本实验测定了中国春和TAM200在不同热胁迫时间处理下的相对电导率(图2),结果显示:中国春和TAM200未经热锻炼的热致死时间分别为17.5 min和27.0 min,而经热锻炼后的热致死时间

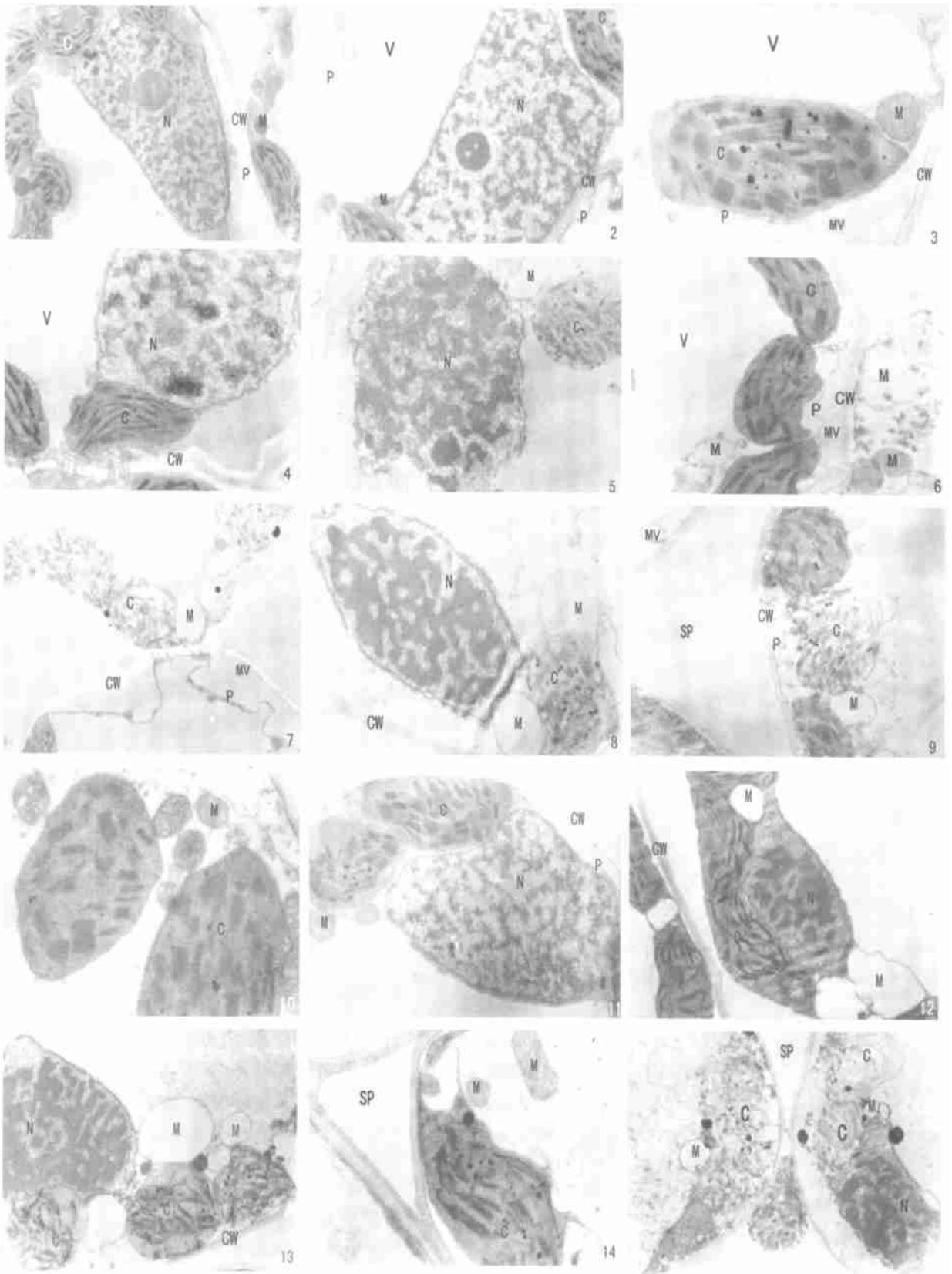


图1 不同耐热性小麦品种在热锻炼和热胁迫过程中叶肉细胞超微结构的变化

Fig. 1 Ultrastructural changes of mesophyll cell in two wheat cultivars with different thermostability under heat acclimation and heat stress

N 细胞核; CW 细胞壁; C 叶绿体; M 线粒体; P 质膜; MV 膜被小泡; V 液泡; SP 细胞间隙

不耐热品种中国春的叶肉细胞观察:

1. HA 0 h, HS 0 min, 细胞结构正常, $\times 4\ 200$;
- 2~3. HA 48 h, HS 0 min:
 2. 出现核仁液泡, $\times 7\ 300$;
 3. 出现质壁分离、泡状物及脂质小球增多, $\times 14\ 300$;
- 4~6. HA 0 h, HS 10 min (超微结构变化顺序):
 4. 无质壁分离, 核质稍凝集, $\times 7\ 300$;
 5. 超微结构破坏顺序: 线粒体—细胞核—叶绿体, 脂质小球增多, $\times 7\ 300$;
 6. 质壁分离, 线粒体破坏过程, $\times 7\ 300$;
7. HA 0 h, HS 20 min, 质膜破裂, 细胞结构完全破坏, $\times 4\ 200$;
8. HA 48 h, HS 40 min, 超微结构破坏顺序: 液泡—线粒体—叶绿体—细胞核, 核质凝集严重, $\times 7\ 300$;
9. HA 48 h, HS 50 min, 质膜破裂, 细胞结构完全破坏, $\times 7\ 300$;

耐热品种 TAM200 的叶肉细胞观察:

10. HA 0 h, HS 0 min, 细胞结构正常, $\times 14\ 300$;
11. HA 0 h, HS 20 min, 无质壁分离, 脂质小球增多, 超微结构破坏顺序: 液泡—线粒体—叶绿体—细胞核, $\times 7\ 300$;
12. HA 0 h, HS 30 min, 质膜破裂, 细胞结构完全破坏, $\times 5\ 600$;
13. HA 48 h, HS 0 min, 热锻炼后稍有质壁分离, 其他结构正常, $\times 5\ 600$;
14. HA 48 h, HS 30 min, 脂质小球增多, 线粒体开始出现破坏, $\times 10\ 000$;
15. HA 48 h, HS 80 min, 质膜破裂, 细胞结构完全破坏, 破坏顺序: 液泡—线粒体—叶绿体—细胞核, $\times 4\ 200$ 。

分别为 48.0 min 和 71.0 min, 这与细胞超微结构完全破坏的时间基本一致(图 1-7, 9, 12, 15), 说明植物组织在热致死时间细胞已经死亡, 叶片相对电导率测定所得结果与细胞学观察所得的结论是一致的。

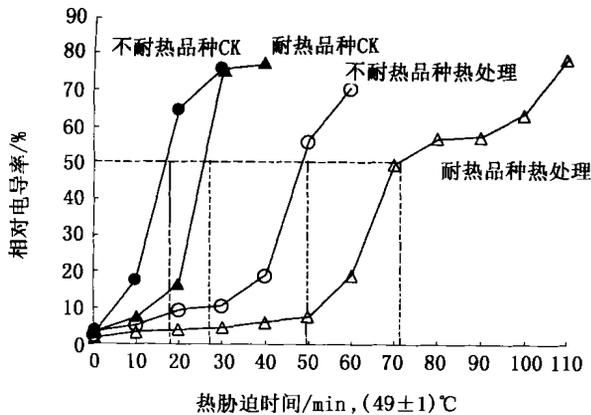


图 2 小麦叶片在不同热胁迫处理时间下的相对电导率(示热致死时间)

Fig. 2 Relative conductivity of wheat leaf under different heat stress time (show heat killing time)

3 讨论

3.1 热锻炼可提高作物耐热性的原因探讨

本实验从叶片相对电导率及叶肉细胞超微结构变化证实, 热锻炼前耐热与不耐热品种在热致死时间上稍有差异, 经热锻炼后 2 品种均延长了热致死时间, 且二者之间差异明显。从细胞学与生理学角度进一步验证了热锻炼可提高植物耐热性, 不同品种的耐热性差异经过热锻炼后才能表现出来的研究结论^[4~6]。说明热锻炼后进行热胁迫, 叶片相对电导率和叶肉细胞超微结构的变化可以分别作为耐热

性评价的生理学指标^[8]和细胞学指标。

热锻炼后叶肉细胞超微结构的变化与热锻炼前相比, 不耐热与耐热品种经热锻炼后而未进行热胁迫时叶肉细胞核仁内出现核仁液泡; 发生部分质壁分离, 在质壁分离处的质膜外方有膜被小泡及叶绿体内脂质小球增多等现象(图 1-2, 3, 11)。

核仁对高温下蛋白质的合成起重要作用, 热锻炼过程中核仁的变化可能与热击蛋白 HSP70 的产生有关^[9]。研究发现^[10], HSP 提高植物的耐热性与它的亚细胞定位有关, HSP 可能与细胞核、细胞膜、细胞骨架相结合, 当高温胁迫时, 它们起到阻止或延缓高温对细胞结构破坏的功能。热锻炼还可提高超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性及蛋白质的稳定性, 从而使膜的稳定性增加, 延缓热胁迫对细胞结构的破坏^[7]。所以核仁在热锻炼过程中出现的超微结构及生理生化变化说明核仁在细胞受到热胁迫时对保护细胞起着重要作用。

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, 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, 增强植株的抗逆性。另外, 质壁分离可以使质膜接触细胞壁的面积变小, 其中的空隙可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击环境的一种表现^[5]。

3.2 不同耐热性小麦品种在热锻炼与热胁迫过程中叶肉细胞超微结构变化的差异与耐热性的关系

不耐热小麦品种未经热锻炼而热胁迫时, 超微结构(尤其膜结构)遭到破坏的顺序为: 液泡膜—线粒体嵴、内膜—核膜—叶绿体被膜—质膜(图 1-5); 经热锻

炼后,顺序为:液泡膜-线粒体嵴、内膜-叶绿体被膜-质膜-核膜(图 1-8)。可以看出,热锻炼后细胞核(尤其是核膜)的热稳定性明显提高。而耐热小麦品种无论热锻炼与否,在热胁迫过程中超微结构遭到破坏的顺序均为:液泡膜-线粒体嵴、内膜-叶绿体被膜-质膜-核膜(图 1-12~15),即耐热品中核膜的热稳定性最高。由此可见,细胞核的热稳定性直接影响细胞结构的稳定性,而且与品种的耐热性明显相关。

另外,本实验观察到在叶肉细胞中,液泡膜对高温最敏感,质膜较为耐热,但线粒体遭到破坏的时间始终早于叶绿体和细胞核,这与线粒体比叶绿体对高温忍耐性强的研究结论不同^[5,6];且在线粒体中,嵴和内膜比外膜对高温更敏感;所以线粒体可能是热胁迫刺激诱导逆境反应的最初作用目标之一。在叶绿体中,虽然类囊体膜在热胁迫下首先出现排列紊乱,但其解体时间却比叶绿体被膜晚。实验显示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,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。

3.3 热胁迫下小麦叶肉细胞的死亡类型

细胞死亡是生物体的一种常见现象。细胞死亡一般分为细胞坏死(necrosis)和细胞程序化死亡(programmed cell death, PCD) 2 种类型。细胞坏死是细胞在遭受极度刺激时引起的细胞死亡,以原生质膜的破裂为特征,造成细胞内含物的炎性泄露,是一种非正常死亡。而细胞程序化死亡是一种主动的、生理性的细胞死亡过程^[12]。研究表明:逆境(如病虫害、高温、低温、盐分、水以及干旱等)胁迫可引起植物细胞程序化死亡^[13]。2 种常见的细胞程序化死亡的早期超微结构特征为:染色质浓缩在核边缘(细胞凋亡)或细胞质中形成大量自噬泡(细胞质的细胞死亡)^[14]。本实验中的小麦叶肉细胞在热胁迫下一直未出现染色质浓缩在核边缘及细胞质中形成大量自噬泡的现象。而是随着热胁迫时间的延长,叶肉细胞内只出现核质凝集现象;线粒体嵴和内膜逐渐解体;叶绿体的类囊体片层松散,结构紊乱;直至叶绿体被膜、核膜及质膜破裂;电解质渗出增加,在较短时间内(热胁迫 20~80 min)出现叶片相对电导率升高,叶肉细胞超微结构遭到彻底破坏的结果。由此分析本实验中小麦叶肉细胞在热胁迫下的细胞死亡类型不属于细胞程序化死亡,而可能属于细胞坏死,推断这种死亡类型可能与小麦叶片在离体的状

态下遭受短期的高温逆境(49 ,10~80 min)胁迫有关,相关研究还有待进一步深入。

参 考 文 献

- [1] He Zhonghu, Rajaram S. Differential responses of bread wheat characters to high temperature [J]. *Euphytica*, 1994, 72:197~203
- [2] Blumenthal C S, Batey I L, Bekes F, et al. Seasonal changes in wheat-grain quality associated with high temperatures during grain filling [J]. *Aust J Agric Res*, 1991, 42:21~30
- [3] 徐如强,孙其信,张树榛. 小麦耐热性研究现状与展望(综述) [J]. *中国农业大学学报*, 1998, 3(3):33~40
- [4] 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
- [5] 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
- [6] 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
- [7] 周人纲,樊志和,李晓芝,等. 热锻炼对小麦叶片细胞膜及有关酶活性的影响 [J]. *作物学报*, 1995, 21(5): 568~572
- [8] Reynolds M P, Nagarajan S, Razaque M A, et al. Application of Physiology in Wheat Breeding (Chapter10, Heat Tolerance) [M]. *CIMMYT Wheat Program*, 2001, 124~135
- [9] Velazquez J M, Lindquist S. HSP70: Nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery [J]. *Cell*, 1984, 36: 655~662
- [10] Brodl M R. Regulation of the synthesis of normal cellular proteins during heat shock [J]. *Physiologia Plantarum*, 1989, 75:439~443
- [11] Weng J, Nguyen H T. Difference in the heat-shock response between thermotolerant and thermosusceptible cultivars of hexaploid wheat [J]. *Theor Appt Genet*, 1992, (84):941~946
- [12] Chae H S, Lee W S. Ethylene and enzyme-mediated superoxide production and cell death in carrot cells grown under carbon starvation [J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20: 256~261
- [13] 刘文娜,汪矛,孔令安,等. TMV 侵染番茄引起的细胞结构变化及细胞程序化死亡 [J]. *中国农业大学学报*, 2003, 8(3): 19~23
- [14] Gunawardena A H L A N, Pearce D M, Jackson M B, et al. Characterisation of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.) [J]. *Planta*, 2001, 212:205~214