

增强紫外线 B 辐射对小麦根尖细胞微管骨架的影响

郭爱华 高丽美 李永锋 翟菁如 韩 榕*

(山西师范大学生命科学学院细胞工程研究所, 临汾 041004)

摘要 以小麦幼苗根尖为材料, 采用间接免疫荧光标记技术并结合激光共聚焦扫描显微系统, 研究了增强紫外线 B (ultraviolet-B, UV-B) 辐射 ($10.08 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$) 对小麦根尖细胞微管骨架的影响, 为进一步研究微管骨架与“分束分裂”的关系打下基础。研究表明, 小麦根尖分裂过程中微管骨架排列呈现一定的周期性, 对照组中微管周期结构明显清晰, 荧光较强。而增强 UV-B 辐射处理的小麦根尖细胞中, 其微管结构紊乱, 周质微管骨架定向发生改变, 或解聚呈片段和点状分布; 出现两条早前期带的异常结构, 纺锤体微管聚集, 末期成膜体弥散或缺失。

关键词 微管骨架; 增强 UV-B 辐射; 小麦; 激光共聚焦扫描显微镜; 分束分裂

大气平流层中臭氧层的破坏, 导致到达地球表面紫外线 B (ultraviolet-B, UV-B) 辐射增强, 并有持续增强的趋势^[1,2]。UV-B (280~320 nm) 辐射的增加, 对地球上的动物、植物以至人类本身都构成严重威胁^[3~5]。由于植物具有不可躲避性, 在接受有效光合辐照的同时不可避免的遭受 UV-B 辐射的损伤。已有研究表明, 增强的 UV-B 辐射使小麦形态发生变化而影响其光合作用和呼吸作用; 使植株体内活性酶系统和非酶系统物质发生改变而影响其生理代谢^[6,7]; 使细胞中 DNA 产生环丁烷嘧啶二聚体而改变细胞的遗传学方向^[4]。植物的根、茎、叶作为一个统一体, 在受到增强 UV-B 辐射的胁迫后, 通过体内各个系统, 及时反馈给整个植株, 致使其受到不同程度的影响。微管(microtubule, MT)是植物细胞骨架的重要组成部分之一, 它与细胞分裂关系密切, 在细胞生长和发育过程中起着重要的作用, 同时还参与维持细胞形态、染色体迁移、细胞有丝分裂、细胞壁构建和信号转导等生理过程^[8], 能对外界环境产生灵敏反应。关于增强 UV-B 辐射对微管骨架有何影响尚未见报道。韩榕等^[9]研究发现, 增强 UV-B 辐射会使小麦根尖体细胞产生一种特殊的分裂方式——“分束分裂”, 其细胞中的染色体“束”主要呈两极分布, 每极上“束”的数和量不同, 已发现有三束分裂, 四束分裂和六束分裂, 从各束染色体数量看, 每一束所含的染色体数均少于正常体细胞。这些异常分裂的机制是什么? 是否与微管骨架有关值得进一步研究。

本文以小麦为材料, 采用间接免疫荧光定位技术并结合激光共聚焦扫描显微系统, 研究增强 UV-B 辐射对微管骨架的影响, 旨在为进一步探明微管骨架与

“分束分裂”产生的关系, 同时为研究异常有丝分裂发生的机制及 UV-B 辐射的生物学效应打下基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

冬小麦晋麦 8 号(*Triticum aestivum*, cv. Jinmai 8), 由山西省农科院小麦研究所提供。

1.2 材料培养

选取籽粒饱满、大小均一的种子, 经 0.1% 氯化汞表面消毒后, 浸泡于玻璃器皿中, 待种子露白后培养于铺有两层湿纱布的培养皿内, 每盘 30 粒, 25 °C 培养, 待处理。

1.3 处理设置

试验设置有对照组(CK 组)和增强 UV-B 处理组(UV-B 组), 处理时间如表 1, UV-B 组将小麦置于紫外培养箱(紫外灯: 秦牌, 宝鸡制造, 30 W, 297 nm), 通过调整 UV-B 灯与植物培养皿之间的距离来控制 UV-B 辐射的强度, 剂量选择 $10.08 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$, 处理 2~3 日后开始后续试验。

1.4 免疫荧光标记

剪取 2 mm 长的根尖在 4% 多聚甲醛(50 mmol/L PIPES 配制, pH 6.8)中固定 1 h, PEM 缓冲液(50 mmol/L PIPES, 2 mmol/L MgSO_4 , 5 mmol/L EGTA, pH 6.9)洗涤 3 次, 每次 10 min。1% 纤维素酶 R-10 (cellulase R-10,

收稿日期: 2010-01-05 接受日期: 2010-03-24

国家自然科学基金(No.30671061)和山西省自然科学基金(No.2008011059-1, No.20041101)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0357-2051050, E-mail: hanrong@dns.sxnu.edu.cn

Table 1 Establishment and treatment procedure of different groups

Treatment	Light (h/d)	UV-B radiation (h/d)	Dark culture (h/d)
CK	8	—	16
UV-B	8 *	8	16

* with UV-B is at the same time.

Japan)和1% 果胶酶(pectinase, Fluka)酶液(PEM 配制)酶解 1 h, 洗涤 3 次。0.2% Triton X-100 (PEM 配制)抽提 40 min, PEM 缓冲液洗涤 3 次, PBS (0.1 mol/L, pH 7.4)洗涤 1 次。1% BSA 和 0.2% NaN₃ 封闭 15~20 min。单克隆抗微管蛋白(小鼠)的一抗(Sigma 产品), 以稀释度 1:20 在 37 ℃温育 40 min, PBS 缓冲液洗涤 1 次, 然后用 Texas Red- 羊抗鼠 IgG (Invitrogen)以稀释度 1:20 在 37 ℃温育 40 min。压片, 50% 甘油封片, 透明指甲油封边^[10]。

1.5 图像的观察与采集

所有制片均采用 Nikon TE-2000 激光共聚焦扫描显微系统进行观察和扫描, 以 He-Ne 激光为激发光源, 激发光为 543 nm, 物镜镜头使用 100 倍油镜, 图像采集使用 512×512 像素。

1.6 异常微管结构的统计与数据分析

每次观察 10 个根尖, 每个根尖至少观察 1 000 个细胞, 重复 3 次。统计各类异常微管结构, 用 *t* 检验检验 UV-B 处理组与对照组之间的显著性差异。

2 结果

2.1 小麦根尖细胞的微管周期变化

用间接免疫荧光标记技术定位小麦根尖细胞的微管骨架, 发现在细胞周期中微管周期(microtubule cycle), 主要包括间期的周质微管(cortical microtubule)、前期的早前期带和纺锤体微管(preprophase band and spindle microtubules)的初步形成、中期及后期的纺锤体微管及成膜体微管(phragmoplast microtubules)、末期胞质分裂的成膜体微管。现对其结构形式及分布特点分别描述。

在小麦根尖细胞的间期, 微管主要分布在细胞的周围细胞质中。它们与细胞纵轴垂直, 围绕在细胞表面, 从外观上观察是均匀平行排列, 围绕整个细胞(图 1-1)。

细胞分裂前期, 微管周期变化主要涉及早前期带(preprophase band, PPB)的形成和早前期带向纺锤体微管发展初期这两个主要方面。早前期带微管最早形成的标志是均匀平行分布的周质微管开始向细胞

中腰部位集中, 此时的周质微管排列仍均匀, 但在细胞中部有一个较宽和较密微管区域, 它们平行的微管束还可以区分, 并保持和细胞长轴垂直(图 1-2)。早前期带微管进一步发展继续向细胞中部集中(图 1-3), 其发育最为成熟时, PPB 在细胞中形成一条极明亮的荧光带(图 1-4)。随着 PPB 的发育成熟, 核区的荧光亮度逐渐加强, 紧密的在核区外围形成圆环, 向细胞质辐射出短的微管(图 1-5)。以后, PPB 荧光逐渐变弱, 几乎看不见, 只有在一定焦面才能看到细胞两侧 PPB 的明亮痕迹(图 1-6)。此时从细胞的两极开始逐渐产生纺锤体(图 1-7)。

细胞发展到中期时, 染色体排列在赤道板上, 微管从两个相对的纺锤体极向细胞的赤道板辐射, 形成两个半纺锤体(图 1-8)。有丝分裂后期, 随着染色体向两极移动, 动粒微管逐渐缩短并拉向两极, 使极区的微管荧光加强, 而极性微管在赤道区无荧光的背景下显得较为明显(图 1-9)。

细胞分裂末期, 染色体被迁移至两极, 有丝分裂过渡到胞质分裂, 此期间微管骨架集中平行排列在与赤道板相垂直的区域, 即为成膜体微管(图 1-10)。成膜体微管最初形成时在两群子染色体之间沿极丝中央分布, 纤丝较长, 以后逐渐缩短(图 1-11)。成膜体微管在赤道面出现一个无荧光的狭缝为最早沉积的细胞板(图 1-12)。

2.2 增强 UV-B 辐射对小麦细胞微管骨架的影响

在 UV-B 处理组中微管骨架也呈现有周期性, 但其微管结构遭到一定程度的破坏, 同时出现部分异常微管排列。与对照组相比, 经过增强 UV-B 辐射处理后, 小麦根尖细胞间期原本应相互平行排列的周质微管排列紊乱, 在细胞中定向发生改变, 交错成网络状(图 2-1), 有的细胞中平行微管骨架发生解聚而断裂(图 2-2), 损伤程度严重的甚至完全解聚, 在图像中是点状荧光(图 2-3)。在细胞分裂的早期, 经过 UV-B 处理的细胞不是像对照组一样出现一条明亮的早前期带, 而是有两条早前期带这种异常现象(图 2-4), 这将直接影响细胞的胞质分裂, 可能会最后导致子细胞发生异变。细胞分裂中期, 纺锤体微管看不出明显的半

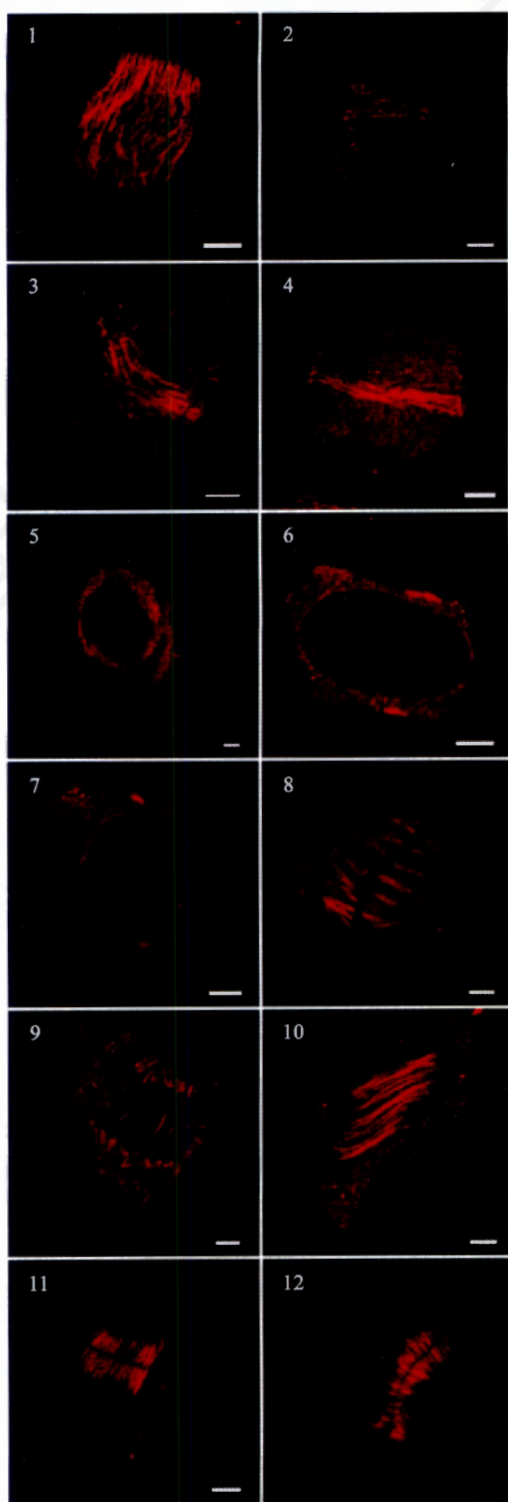


Fig.1 Microtubule arrangements of control group cells

1: cortical microtubules; 2-4: the dynamic of PPB; 5: perinuclear microtubules; 6: PPB in both sides of cell; 7: primary formation of spindles; 8: spindle in metaphase; 9: spindles and polar microtubules in anaphase; 10, 11: changes of phragmoplast; 12: deposition of cell plate. Bar=5 μ m

纺锤体, 结构比较紊乱, 部分微管结构聚集而出现棒状纺锤丝(图 2-5)。UV-B 组末期细胞的成膜体与对

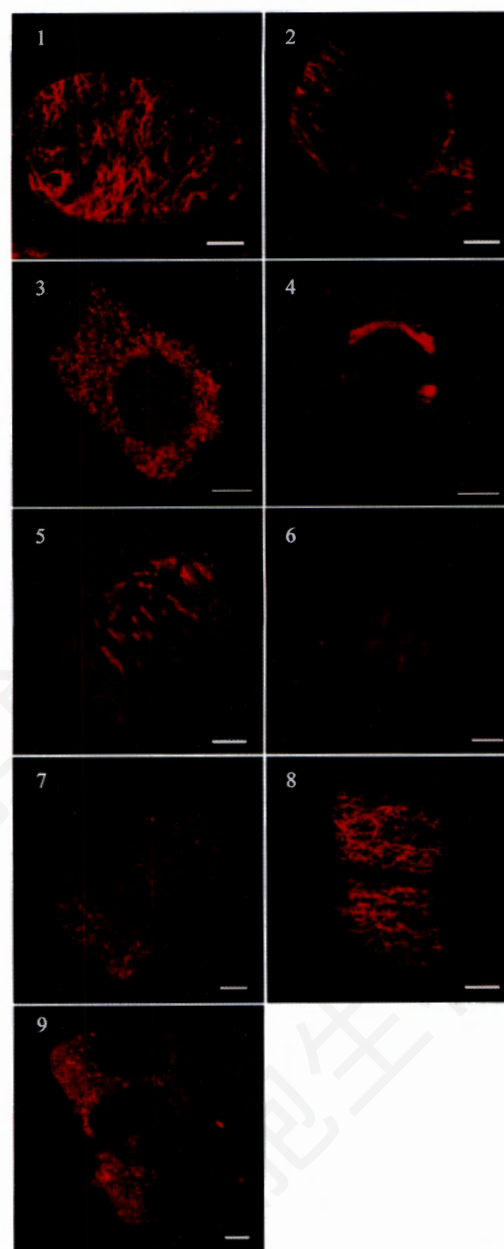


Fig.2 Microtubule arrangements of UV-B group cells

1: network of cortical microtubules; 2: fragment of MTs in cells; 3: interphase cell showing punctuate MTs; 4: double PPB in a cell; 5: metaphase cell showing disorder spindle; 6: dispersivity of phragmoplast; 7: disappeared of phragmoplast in division telophase; 8: network of MTs in daughter cells after cytokinesis; 9: coenocyte in telophase. Bar=5 μ m.

照组相比, 微管纤丝较弥散, 微管束没有区分开来, 荧光较弱(图 2-6), 有的成膜体发生解聚几乎看不清其结构(图 2-7)。胞质分裂结束后在子细胞中出现的周质微管同样是交错的网络状而非均匀平行(图 2-8)。图 2-9 是增强 UV-B 辐射处理的小麦根尖细胞分裂末期, 在同一个细胞中却有四个细胞核, 说明增强 UV-B 辐射使细胞分裂发生异常, 而导致多核现象, 其细胞

Table 2 The statistics of aberrant microtubule arrangements

Aberration MTs types	Control			UV-B treated		
	Total of aberration	Arithmetic mean±range	Percentage (%)	Total of aberration	Arithmetic mean±range	Percentage (%)
Cortical MTs aberration	10	3.33±0.57	55.56	273	91.00±4.36	48.66
Double PPB	0	0	0	8	2.67±0.58	1.43
Spindle aberration	2	0.67±0.58	11.11	113	37.67±7.02	20.14
Phragmoplast aberration	5	1.33±1.15	27.78	146	48.68±6.66	26.03
Coenocyte	1	0.33±0.58	5.56	21	7.00±2.65	3.74
Summation	18	5.66±2.88	100	561	187.02±21.27	100

中微管荧光分布模糊, 没有明显的结构, 也未见有成膜体形成。

2.3 异常微管结构的统计分析

对实验过程中出现的各类异常微管结构进行统计, 如表 2, 在所有异常结构中, 出现频率最多的是周质微管结构紊乱和解聚, 在对照组和 UV-B 处理组中分别占各自总异常结构的 55.56% 和 48.66%; 其次是成膜体微管结构弥散或缺失, CK 组与 UV-B 组分别占其各自异常总数的 27.78% 和 26.03%。对 CK 组和 UV-B 组各类微管异常结构数目进行 *t* 检验, 结果表明 $|T_{CK,UV-B}|=2.25$, $P<0.05$, 两者差异显著。说明增强 UV-B 辐射会造成微管结构异常, 且影响结果较明显。

3 讨论

微管自发现以来已成为生命科学领域研究的热点^[11], 本研究通过间接免疫荧光定位技术和激光共聚焦扫描显微系统, 显示出微管在小麦根尖细胞有丝分裂过程中除了有周质微管、早前期带、纺锤体微管、成膜体微管四种典型的时相变化外, 还存在许多中间过渡类型, 这说明微管在小麦根尖细胞有丝分裂过程中是一个完整的连续的动态变化, 而非固定的机械的模式。这种动态的变化对维持细胞有丝分裂有着非同寻常的作用, 以保证细胞正常的生理功能及遗传功能的稳定性。

微管作为一种高度动态的结构能对外界环境条件及理化因子做出快速的反应, 已有研究表明, 微管能对微重力、冷害刺激、病原微生物的侵入、激素、光电信号等作出灵敏的反应^[12]。其中研究最为深入的是微管与冷稳定性的机制, 低温引起微管骨架的广泛解聚, 且微管解聚常伴随着植株的伤害^[13,14]。本研究表明, 增强 UV-B 辐射使微管结构出现异常阵列, 且与 CK 组相比达到了显著水平。使细胞周质微管的定向发生改变, 由原本平行排列变为紊乱分布, 同时出现断裂和解聚现象。周质微管直接或间接地维

持细胞的空间结构, 即决定细胞的形状, 且它与质膜相连接, 起着稳定质膜的作用^[11], 周质微管发生断裂或解聚, 更加重了 UV-B 对细胞屏障——质膜的损伤, 而这必然会降低细胞内各种细胞器和细胞结构的稳定性, 破坏细胞内外物质交换平衡及细胞内物质的代谢, 使植物生理功能发生障碍, 从而使植株抗逆境能力下降^[13]。

早前期带一般认为是预定胞质分裂发生的位置, 指导细胞板的形成^[11]。本研究表明增强 UV-B 辐射使细胞内出现双 PPB, 这可能导致细胞内形成多个胞质分裂点, 最终产生多个细胞或染色体不均等分配及多核细胞的异常分裂。纺锤体的主要功能是牵引染色体, 支配染色体的移动, 增强 UV-B 辐射使纺锤体微管结构损伤, 聚集成棒, 直接影响染色体与纺锤体的结合, 在染色体分配的关键时刻易使其聚集或丢失, 这很可能导致细胞中形成落后染色体、染色体桥甚至可能使染色体像微管一样聚集成束而形成“分束分裂”细胞。增强 UV-B 辐射还使细胞在分裂末期没有成膜体微管, 而不能控制细胞板物质沉积, 这样在子细胞中无法构成新的细胞壁, 最终导致细胞产生多核现象。因此, 增强 UV-B 辐射不仅改变了微管结构, 还使其分布发生改变。在细胞分裂中微管与染色体的关系密切, 微管分布发生改变直接影响染色体的分布, 这些都可能使细胞分裂发生异常而形成“分束分裂”, 最终改变细胞的遗传学性质。

已有研究表明微管骨架参与第二信使转导中信号的扩大过程, 钙离子能直接调控细胞骨架的稳定性^[15], 也可以通过与钙调蛋白结合发挥作用, 还可以由 Ca^{2+}/CaM 通过微管骨架相关蛋白影响骨架成分的稳定性并调节它们之间的相互作用^[15]。完整的细胞微管骨架是信号转导所必需的, 如果微管受到干扰, 依赖细胞骨架进行的信号转导反应也会受到干扰或终止发生, 而增强 UV-B 辐射使微管受到了哪些信号分子的影响及它又是通过哪些信号转导途径发生作的? 这

些问题仍有待于进一步研究。

参考文献(References)

- 1 Yan SR, Huang XH, Zhou Q. Effect of lanthanum (III) on reactive oxygen metabolism of soybean seedlings under supplemental UV-B irradiation. *J Rare Earth* 2007; 25(3): 352-8.
- 2 Tanaka A, Sakamoto A, Ishigaki Y, Nikaido O, Sun G, Hase Y, *et al.* An ultraviolet-B-resistant mutant with enhanced DNA repair in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2002; 129(1): 64-71.
- 3 Hopkins L, Bond MA, Tobin AK. Ultraviolet-B radiation reduces the rates of cell division and elongation in the primary leaf of wheat (*Triticum aestivum* L. cv Maris Huntsman). *Plant Cell Environ* 2002; 25(5): 617-24.
- 4 韩 榕, 王勋陵, 岳 明. He-Ne 激光对增强 UV-B 辐射损伤小麦 DNA 非按期合成的影响. *作物学报* 2003; 29(4): 633-6.
- 5 韩 榕, 王勋陵, 岳 明. He-Ne 激光对小麦 DNA 环丁烷嘧啶二聚体切除修复的影响. *科学通报* 2002; 47(6): 435-8.
- 6 张 娟, 韩 榕. He-Ne 激光辐照与 UV-B 辐射对小麦幼苗细胞器中 Na⁺/K⁺-ATP 酶活性的影响. *植物学报* 2009; 44(4): 451-6.
- 7 Yu J, Tang XX, Zhang PY. Physiological and ultrastructural changes of *Chlorella* sp. induced by UV-B radiation. *Prog Nat Sci* 2005; 15(8): 678-83.
- 8 Jung G, Hellmann A, Wernicke W. Changes in the density of microtubular networks in mesophyll cells and mesophyll derived protoplasts of *Nicotiana* and *Triticum* during leaf development. *Planta* 1993; 190(1): 10-16.
- 9 韩 榕, 王勋陵, 岳 明, 齐 智. 增强 UV-B 辐射对小麦体细胞分裂的影响. *遗传学报* 2002; 29(6): 537-41.
- 10 McCurdy DW, Gunning BE. Reorganization of cortical actin microfilaments and microtubules at preprophase and mitosis in wheat root-tip cells: a double label immunofluorescence study. *Cell Motil Cytoskel* 1990; 15: 76-87.
- 11 徐是雄, 朱 徽. 植物细胞骨架. 北京: 科学出版社, 1996, 60-83, 94-104.
- 12 于 荣, 袁 明, 王学臣. 微管骨架的动态特性及其调控. *植物学通报* 1998; 15(6): 19-29.
- 13 田景花, 张 红, 李 明, 乜兰春, 王惠英. APM 对黄瓜幼叶细胞超微结构冷稳定性的影响. *电子显微学报* 2002; 21(2): 129-33.
- 14 简令成. 植物微管和微丝骨架研究的进展. *细胞生胞学杂志* 1992; 14(3): 115-9.
- 15 Cyr RJ. Calcium/calmodulin affects microtubule stability in lysed protoplasts. *J Cell Sci* 1991; 100: 311-7.

Influence of Enhanced Ultraviolet-B Radiation on Microtubule Cytoskeleton in Wheat Root-tip Cells

Ai-Hua Guo, Li-Mei Gao, Yong-Feng Li, Jing-Ru Zhai, Rong Han*

(Institute of Cell Engineering, College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China)

Abstract In order to further investigate the effects of ultraviolet-B (UV-B) radiation on the relationships between microtubule arrangements and 'Partition-bundle division', the dynamic variation of microtubules in wheat root-tip cells exposed to enhanced UV-B radiation (10.08 kJ·m⁻²·d⁻¹) was studied with confocal laser scanning microscopy (CLSM). The results showed that the microtubule arrays presented a periodicity during mitosis of wheat root-tip cells, the obvious microtubule cycle and high fluorescence intensity were observed in control group; However, under the condition of enhanced UV-B radiation, the structure of microtubules were disorder while microtubules appeared a lot of abnormal arrangements. The cortical microtubules changed orientation to network and depolymerized significantly to stick and spot; the cells had abnormal structure of double preprophase bands; the arrangement of spindle microtubules showed accumulation and the phragmoplast microtubules were dispersivity or disappeared due to enhanced UV-B radiation.

Key words microtubule cytoskeleton; enhanced UV-B radiation; wheat; confocal laser scanning microscopy; partition-bundle division

Received: January 5, 2010 Accepted: March 24, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30671061), the Natural Science Foundation of Shanxi Province (No.2008011059-1, No.20041101)

*Corresponding author. Tel: 86-357-2051050, E-mail: hanrong@dns.sxnu.edu.cn