

水平回转对马铃薯细胞超微结构的影响

刘敏 薛淮 王亚林 张赞 张纯花

(中国科学院遗传与发育生物学研究所 北京 100101)

宇宙空间中存在着微重力、高真空和各种不同能量的宇宙射线,这些与人类及各种动植物的生存环境有着巨大的差异。这样的外界因素为生命物质的生存、生长和发育提供了一种导致变异的可能。因此,空间环境对人类和各种生物的影响,一直是科学家们关注的问题^[1]。微重力作为空间环境的一个重要因素,向来是一个重要的研究内容。国外从60年代末开始在研究微重力及模拟微重力对各种生物系统的遗传、生长发育、老化等过程的影响方面取得了许多进展^[2,3]。国内研究空间生命科学的起步不晚,60年代初利用火箭和高空气球等运载工具研究动物在空间条件下生存后生理和心理的变化。但此研究后来因故停止。直到1986年国家863高科技计划实施后,空间生命科学又重新开始^[4]。目前除利用卫星搭载、飞船搭载及高空气球外,还利用回转仪进行模拟微重力实验。

到目前为止,用电镜技术研究高等植物细胞在微重力状态下细胞器等超微结构的反应的报告比较多,但大部分集中在各种植物根部平衡器的研究,而对叶和茎的研究还很有限。如蔡伟明^[5]提出了轮藻假根中的平衡石在回转器回转时的运动,发现假根中的平衡石复合体中心离假根顶端的距离比在原来沿重力方向生长的假根中的距离增加了60%,并且平衡石中心在这个新的位置上出现了一个新的动态平衡状态。

微重力状态下细胞结构发生比较多的变化^[6-8],主要表现在细胞形状、细胞壁、液泡、淀粉粒、叶绿体、线粒体等细胞器,以及细胞骨架的微管系统等。Kordyum^[6]比较了经空间飞行与经回转器水平回转的植物细胞生长发育的差别,指出微重力下植物细胞发生细胞器的重组和微管系统的重新安排,这种情况无论在单细胞还是多细胞团,在原核植物还是真核植物中都有发生,但是不同年龄的植物细胞其结构和功能在对微重力的适应性上有差别。

吴敦肃等^[9]研究了水稻幼苗叶细胞的超微结

构,发现经水平回转后细胞骨架变得疏松,细胞壁变得凹凸不平,叶绿体的基粒和线粒体内的嵴也都有部分变化。他们认为其变化机制是与细胞内 Ca^{2+} -ATP酶活性, Ca^{2+} 浓度变化有关。Rasmussen等^[10]1995年研究了微重力对于甘蓝和萝卜的影响,发现微重力条件下培养3天的原生质体具有较大液泡,淀粉储量轻微降低。

Hilaire等^[11]用细胞松弛素D处理草木犀的根并将之培养在水平回转仪上(2rpm),结果表明微重力产生了几种超微结构效应,包括核和淀粉粒的重定位,内质网环生体的形成等。在对苜蓿根柱细胞的超微结构研究中,Hilaire等^[12]发现 Ca^{2+} 沉淀剂产生的沉淀物位于紧邻细胞壁处,一些沉淀与液泡、淀粉体、线粒体及核常染色质相连。定量分析表明,微重力状态下根柱细胞内与核及淀粉体相连的沉淀较对照的数量降低。

目前,还未见对脱离微重力环境后植株的生长情况、细胞结构的报道,因此,本实验除对经水平回转即模拟微重力处理的马铃薯植株的生长情况及叶片细胞的超微结构与正常重力条件下生长的植株进行比较之外,还对脱离模拟微重力环境一周后的植株也进行了比较。

材料与方法

一、材料

马铃薯的试管苗(苗龄2个月左右)。

取生长势相等的马铃薯试管苗,在超净工作台上将1瓶试管苗均等分为几瓶,尽量使苗的高度、茎的粗细相等。然后,一半用于模拟微重力实验,另一半用于对照。

二、方法

1. 模拟微重力回转仪是按重力补偿原理研制的回转装置,水平回转按Silver理论^[5,9],在角速度0.209弧度/s(相当于2rpm)的条件下,作用于植物的总重力为零。

本文2002年2月8日收到,5月20日接受。

E-mail: mliu@genetics.ac.cn

2. 回转时的培养条件为:温度 25℃ 左右,光照强度为 $50\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,转速 2r/min,时间 168h。

3. 电镜样品制备 固定

1) 取对照与处理相同部位小区 1-2mm² 的叶片样品放入用 0.05mol/L 磷酸缓冲液配制的 1.5% 戊二醛固定液 (pH6.8) 中,室温处理 30min;

2) 把样品转入相同缓冲液的 3% 戊二醛中,室温处理 2min;

3) 材料转入 0.025mol/L 磷酸缓冲液,在 1-2h 内至少更换 3 次缓冲液;

4) 在相同缓冲液的 1% 四氧化锇中室温固定 1h,或在 0℃ 下过夜;

5) 在双蒸水中洗涤 2-3 次,每次 30min,温度控制在 0℃。

脱水

样品用系列丙酮(30%、50%、70%、80%、90%、95%)脱水(每次约 15min),在无水丙酮中 3-24h,其间更换 2 次,保持在 0℃。置于室温,并更换 2 次丙酮。

渗透和包埋

1) 倒掉大部分溶剂。在 6h 内,逐滴加入包埋介质,使与溶剂成 50:50 混合液,直至溶剂挥发后剩下的环氧树脂能将标本覆盖;

2) 所有溶剂蒸发后,标本转入新的树脂内,进一步渗透 1-2d;

3) 将标本转入包埋管中;

4) 在适宜温度下聚合(35℃, 2h; 45℃, 4h; 60℃, 12h)

超薄切片机切片(LKB-V 型,切片厚度 50nm)染色和观察:用柠檬酸铅染液染色 30 分钟,3 次重蒸水冲洗,干燥后即可镜检。

透射电镜为 JEOL 100CX, 33k。

结 果

1. 回转器处理后马铃薯组培苗的生长情况

模拟微重力下的马铃薯组培苗与对照出现明显差异,具体表现在:植株明显高于对照,茎略细,但模拟微重力对植株的根部影响不明显。

2. 回转器处理后马铃薯叶片细胞超微结构

细胞外型 比较图版图 1a 和图版图 1b。对照的细胞之间结合紧密,细胞整体呈规则的球型或椭圆型,而在模拟微重力条件下的细胞结合疏松,并且发生扭曲。

细胞壁与细胞质结构 模拟微重力处理后,出现细胞质壁分离(图版图 2)及细胞液泡化(图版图 3)现象。一些细胞的中央大液泡占据细胞的绝大部分,将少量的细胞质和细胞挤至边缘靠壁部位,有的细胞核也移至边缘。细胞内容物减少,个别细

胞在细胞边缘的大部分区域仅存质膜与液泡膜之间一层很薄的细胞质。

线粒体 线粒体数目增多(见图版图 3),嵴模糊不清,有的线粒体外膜破裂(图版图 4b),对照的线粒体结构严整,嵴明显且规则排列(图版图 4a)。

叶绿体 一些叶绿体形状由典型的凸透镜状转变为长形、圆形、不规则变形虫型等类型。内部片层扭曲结构也有变异,出现空泡。对样品(图版图 5a)的叶绿体片层结构规则,层次清晰,堆叠紧密并且具有相当的基粒囊体,而微重力下细胞叶绿体片层扭曲,模糊,大多为基质类囊体(图版图 5b)。

另外,模拟微重力下的细胞有的细胞质中可观察到大量的淀粉粒出现(图版图 6),有的叶绿体中也可观察到这种现象。

从图 7 可看出,模拟微重力处理后细胞间区域分布的胞间连丝较为丰富,有的胞间连丝很粗大,说明细胞间进行着旺盛的物质交流和信息交流。

细胞核 与对照相比,模拟微重力下细胞的核膜、核仁模糊,并且有的出现环状片层(图版图 3)。

模拟微重力下细胞内质网、高尔基体结构的变化:模拟微重力处理后,细胞质中内质网和高尔基体数量增多,一些内质网体积增大,有的内质网和高尔基体周围分布有许多小囊泡,推测,内质网膜库直接膨大或内质网的“出芽”方式可能是形成这些小囊泡的原因之一。

3. 脱离回转器处理一周后马铃薯叶片细胞的超微结构

与刚经回转器处理完的样品相比,一周后细胞的超微结构的变化出现部分或完全恢复,如:图版图 8,叶绿体基本恢复正常,重新具有相当数量的基粒类囊体,片层也较整齐,但附近的线粒体还没有恢复正常。嵴还有些模糊。

讨 论

1. 水平回转即模拟微重力影响植物生长发育

关于微重力影响植物生长发育的机制,现在一般认为:当外界微重力信号被细胞膜表面受体分子识别后,可通过调节质膜上, Ca²⁺ 转运系统,或经过磷酸肌醇信使系统把刺激信号传递给细胞内贮钙体,引起贮钙体内 Ca²⁺ 的释放,使细胞质内 Ca²⁺ 浓度发生改变,从而影响与一些钙受体蛋白的结合,其中最重要的是 CaM(钙调蛋白)。Ca²⁺ - CaM 是 ATP 酶和蛋白质激酶等植物体内多种重要酶的活

性调节剂,是位于多种细胞信息传递中心的 Ca^{2+} 第二信使系统的重要组成部分^[13]。

但是,关于微重力影响植物生长发育的机制的假说还缺乏足够的实验支持,对微重力的诱变效应的研究也多侧重于直观描述,应深入探讨植物在微重力下的生化和分子生物学机理,研究各因素间的相互作用,从而在空间育种方面更好的了解并利用微重力。

2. 水平回转即模拟微重力下植株叶片细胞的超微结构发生的变化非常显著

从电镜图片可以看出,模拟微重力条件使植物实际上是处于不正常生长的逆境条件下,由于植物长期处于重力条件下,已形成了一系列生长发育规律,微重力条件对植物起到了胁迫作用,细胞的各个结构在这种胁迫作用下呈现出不适应性,其中,以叶绿体和线粒体的改变最为明显,这是可以理解的,因为叶绿体和线粒体都作为植物细胞进行物质代谢和能量代谢的重要细胞器,植物的生理生化一发生变化,肯定要在代谢上反应出来。例如线粒体的结构受损,有氧呼吸的功能就要减弱,但是线粒体的数量也相应的增多,以满足细胞正常的能量需求。胞间连丝的增多表示植物细胞之间进行着旺盛的物质与信息交流,这与一些报道^[14]的观点是一致的。

应该说明的是,微重力对于植物细胞的影响广泛而又具有不均一性。我们所观察的各种超微结构的变化并不是在所有的处理细胞中同时出现的,而仅是在大部分细胞或细胞的某些部分呈现。

3. 水平回转即模拟微重力对植物造成的影响可能恢复

Grigor'ev^[15]曾指出在长时间的微重力状态下,生物机会建立一种相对稳定的动态平衡。但是无论国外还是国内,都未见有植物在微重力状态下的变化是脱离微重力后继续保持还是发生恢复的报道。本实验发现在脱离回转器一周后,马铃薯叶片细胞的超微结构的显著差异趋向消失,也就是说,植物在一周的时间内出现了不同程度的恢复。这种现象还没见报道。有可能因为微重力处理没有影响植物的DNA,而仅仅从生理方面给予了类似胁迫的作用,结果在微重力消失后植物逐渐恢复了正常状态。王琳清等^[16]就提出多细胞机体中,空间诱变产生的损伤具有随机的性质,有的细胞可能受严重损伤而死亡,有的受损伤轻微,也有的没有什么损伤,有机体在受空间条件作用后有修复、恢复的能力,甚至在

细胞群间,未受损的细胞对受损细胞,以及一个细胞内未受损的部分对受损部分,也有“接管”的代谢过程,并使其恢复到正常水平的能力。

本实验模拟微重力的时间较短,若将时间持续延长,植物细胞将发生什么变化,是否会建立起适应微重力条件的新的细胞模式,长时间的微重力撤去后植物细胞还能否恢复,我们将继续深入研究。

摘 要

本文报道了水平回转即模拟微重力条件下马铃薯植株的生长及叶片细胞超微结构的变化,如:植株长高,叶片细胞出现了壁质分离现象,部分细胞壁扭曲、收缩变形,部分叶绿体片层结构出现了弯曲、排列疏松、内含物溢出,部分线粒体出现了边缘模糊及嵴消失,同时有细胞内淀粉粒明显增多的现象发生。在脱离水平回转即模拟微重力处理一周后,电镜观察发现变异的超微结构出现不同程度的恢复。

关键词:水平回转 微重力 马铃薯 超微结构

参 考 文 献

- [1] 韩东等,1996,航天医学与医学工程,9(6):412-416.
- [2] 李社荣等,1998,核农学报,12(5):275-280.
- [3] 赵林姝、刘录祥,1998,核农学报,12(4):218-223.
- [4] 蒋兴村等,1991,科学能报,36(23):1820-1824.
- [5] 蔡伟明等,1997,实验生物学报,30(2):147-153.
- [6] Klimchuk DA. et al., 1995, *Isitologiyai Genetika*, 29(4): 15-21.
- [7] Kordyum EL. et al., 1995, *Botanicheskii-Zhurnal*, 80(6):74-80.
- [8] Li Sherong 等,1998,航天医学与医学工程,6:396-400.
- [9] 吴敦肃等,1994,植物学报,36(5):364-369.
- [10] Rasmussen-O. et al., 1992, *Plant Physiology*, 100(2): 692-698.
- [11] Hilaire E. et al., 1996, *Plant and Cell Physiology*, 37(7): 929-934.
- [12] Hilaire E. et al., 1996, *Plant and Cell Physiology*, 36(5): 831-837.
- [13] Gu Ruiqi. et al., 1989, *Acta Phytophysiological Sinica*, 15(4):403-407.
- [14] 李社荣等,1998,核农学报,12(5):274-280.
- [15] Grigor'ev AI and Egorov AD., 1998, *Aviakosm Ekolog Med*, 32(6):20-26.
- [16] 王琳清,1989,见蔡旭主编《植物遗传育种学》,中国科学出版社,北京:536-550.

EFFECTS OF HORIZONTAL CLINOSTAT TREATMENT TO ULTRASTRUCTURE OF POTATO CELL

LIU Min XUE Huai WANG Yalin ZHANG Zan ZHANG Chunhua
(Institute of Genetics and Developmental Biology, CAS, Bei jing 100101)

ABSTRACT

Ultrastructural analysis by transmission electron microscope showed variation in Potato cell ultrastructure after the treatment of simulated microgravity. Those ultrastructural changes included plasmolysis, twist, contraction and deformation of cell walls, culvatures and loose arrangement of chloroplast lamellae, breach of mitochondria, overflow of inclusions, disappearance of cristae, and significant increase in number of starch grains per cell, etc. One week after eliminating the treatment of simulated microgravity, the variate cells return to normal on various degree.

Key words: Horizontal clinostat Microgravity Potato Ultrastructure

叶绿体分裂相关基因 *NtFtsZ2-1* 在大肠杆菌中的表达与定位*

孔冬冬^{***} 王东^{****} 胡勇^{**} 鞠传丽^{**} 何奕昆^{**} 孙敬三^{**}

(^{**}中国科学院植物研究所 100093 北京 ^{***}首都师范大学生物系 100037 北京

^{****}北京师范大学生命科学学院 100875 北京)

叶绿体是存在于植物细胞中的一种重要的细胞器。从起源上看,它来源于早期具有光合能力的原核生物和原始真核生物的内共生事件^[1,2];从分裂方式上看,它采用与细菌相同的二分裂方式,因此人们提出叶绿体和细菌的分裂过程具有相似的遗传基础^[3]。由于在光合作用中所负担的重要作用,使得有关叶绿体光合机制及其分裂机制的研究一直是人们研究的热点。近来有研究表明 *FtsZ* 基因与叶绿体的分裂过程有着密切关系^[4-6]。*FtsZ* 基因最初发现于细菌之中,是一种控制细菌分裂的关键基因。通过细菌 *FtsZ* 蛋白的同源性检索与生化分析,发现其与真核细胞骨架蛋白-微管具有相似的生化特性与结构特征^[7-9]。在大肠杆菌中当细胞分裂事件发生时,*FtsZ* 蛋白最早出现于分裂位点并聚集形成一个环状结构,进而控制原核细胞的分裂过程^[10-12]。至今在不同的真核生物中也发现了 *FtsZ* 基因的存在,并且通过聚类分析,可以将植物中所发现的 *ftsZ* 基因分为两个不同的家族^[13]。为了深入研究高等植物中 *FtsZ* 蛋白与原核生物 *FtsZ* 蛋白在功能上的差异,我们从烟草中克隆了 *FtsZ2* 家族基因的成员 *NtFtsZ2-1*,并将 *NtFtsZ2-1* 与绿色荧光蛋白基因构建成融合表达质粒,对其在大肠杆菌中的表达和定位进行了研究。以上也为烟草中不同 *ftsZ* 基因家族成员在质体分裂中的作用机制奠定了基础。

材料与amp;方法

1. 材料

pEGFP 质粒购自 Clontech 公司,烟草 *NtFtsZ2-1* 全长 cDNA 的克隆质粒由本室构建和保存。大肠杆菌菌株 JM109 由本室保存。实验所用植物材料为普通烟草 *Nicotiana tabacum* var. SR1。各种限制性内切酶及工具酶购自 Promega 及华美公司,RT-PCR Kit 购自 TaKaRa 公司,Gold beads 质粒提取 Kit 购自上海生工公司,DNA 序列测定由 TaKaRa 公司完成。

2. 烟草 *NtFtsZ2-1* cDNA 的克隆

取 25℃ - 28℃ 条件下培养的烟草材料 lg(16 小时光照/8 小时黑暗),按异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取总 RNA。根据 GenBank 中公布的烟草 *NtFtsZ2-1* cDNA 序列(GenBank accession number AJ271750)设计了一对引物:NP5 5'-TCTAGAAACAATGGCTACTTGTACATCAGCGT-3'; NP6 5'-GGTACCGCTCTCTTGGGTAGCGTGAT C-3' 为方便后续操作分别在引物的 5' 端加上相应的酶切位点(*Xba* I 和 *Kpn* I)并在下游引物 NP6 中去除终止密码子,以便与绿色荧光蛋白基因同框翻译。RT-PCR 采用 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 2.1,逆转录除采用 NP6 作为特异下游逆转

* 国家自然科学基金(批准号:GN39970356)和北京市自然科学基金(批准号:GN5992003)资助项目。

孔冬冬、王东对该论文有相同贡献。

**** 联系人。E-mail: yhe@duke.edu; sunjs@ns. ibcas. ac. cn