

NaCl 诱导大豆根尖细胞凋亡的细胞学效应

徐明照, 郭宁, 朱贝贝

(安徽农业大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230036)

摘要:以大豆种子为试材, NaCl 溶液为诱导剂, 分别对生长中的大豆根尖进行诱导, 研究 NaCl 溶液处理浓度和处理时间对根尖细胞凋亡的影响, 并对凋亡细胞进行形态学显微观察和基因组 DNA 分子凝胶电泳分析。结果表明: 利用 NaCl 溶液处理根尖细胞, 能够引起细胞凋亡, 细胞凋亡频率与处理溶液浓度和处理时间有关; 在细胞发生凋亡时, 凋亡中的细胞形态和结构在不同时期表现各异。证明利用 NaCl 溶液作为诱导剂处理生长中的大豆根尖细胞, 能够引起细胞凋亡; 凋亡细胞的形态和结构发生变化, DNA 发生降解。

关键词:大豆根尖; NaCl; 细胞凋亡; 细胞学效应

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)01-0061-03

Cytological Effect on Apoptosis of Root Tip Cell of Soybean Induced by NaCl

XU Ming-zhao, GUO Ning, ZHU Bei-bei

(School of Science Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China)

Abstract: Treating soybean seed as experimental material, NaCl as the inducer, and by the way of inducing growing root tip of soybean, this research makes study on the response of root tip cell apoptosis of soybean to different NaCl treating hour and concentration. The microscopic observation on morphological apoptosis cell as well as gel-electrophoresis on root tip cell DNA of soybean showed: NaCl treatment on root tip cell would lead to apoptosis cell and its rate is related to NaCl concentration and treating time; the morphology and structure of apoptosis cell varied with stage. The research suggests that treatment upon root tip cell of soybean by NaCl as the inducer would lead to cell apoptosis, its morphology and structure varies and cell DNA degrades as well.

Key words: Root of Soybean; NaCl; Apoptosis; Cytological effects

土壤盐渍化是影响农作物生产的全球性问题, 全世界的盐碱地约占陆地面积的三分之一, 由于多数植物不能在盐渍条件下正常生长发育, 使作物引种易地栽培受到了很大限制。土壤中一定浓度的钠离子含量有利于植物的正常生长发育, 然而, 当钠离子的浓度超过一定阈值时, 就会对植物生长发育形成伤害, 其中, 细胞凋亡 (apoptosis) 就是植物为抵抗和适应逆境, 维护自身正常生长发育而采取的一种主动、有序的死亡方式^[1-2]。对细胞凋亡的研究最早始于动物细胞。相对于动物细胞凋亡而言, 植物细胞凋亡研究起步较晚。近年来, 植物细胞凋亡研究已成为植物细胞生物学的新兴研究领域和热点之一^[3-4]。目前已有一些有关植物细胞凋亡的报道^[5-7], 但对于钠盐胁迫植物根尖细胞凋亡的研究报道较少。因此, 该文以

不同浓度的 NaCl 溶液诱导大豆根尖细胞, 研究钠盐溶液胁迫大豆根尖细胞凋亡的细胞学效应, 为深入了解植物细胞凋亡机制, 培育耐盐大豆品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大豆品种为黄皮 4 号, 来自合肥市丰乐种业公司。试剂为 NaCl 溶液, 浓度为 0.15、0.35、0.55、0.95 mol·L⁻¹。

1.2 试验方法

1.2.1 种子催芽 挑选籽粒饱满、无虫害的大豆种子, 1% 过氧化氢溶液浸泡 10 min 消毒, 流水冲洗后等分成 12 份, 每份 100 粒, 摆放在发芽盒内, (25 ± 1) °C 恒温培养箱中催芽。

收稿日期: 2009-08-14

基金项目: 安徽农业大学细胞生物学重点课程开放性综合实验资助项目。

第一作者简介: 徐明照 (1955-), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为辐射生物学。E-mail: xmzand@163.com。

1.2.2 根尖处理 待大豆根尖长至 0.2~0.5 cm 时,改用不同浓度的 NaCl 溶液分别对根尖培养 4、8、12 h 后,取下根尖,以清水浸泡 10 min,经固定、酸解、改良品红染色后,存放于 4℃ 冰箱中,备用。以水处理根尖细胞为正对照组(正常细胞),取正对照组根尖细胞煮沸 10 min 为负对照组(煮沸细胞)。2 次重复。

1.2.3 细胞学形态观察 取各处理组根尖分生区,采用常规制片法制片,显微观察细胞凋亡的形态特征并拍照,统计细胞凋亡数(细胞凋亡以细胞核染色质出现明显的边缘化凝集为标志^[1]),计算细胞凋亡率。

细胞凋亡率(%) = (凋亡细胞数/观察总细胞数) × 100

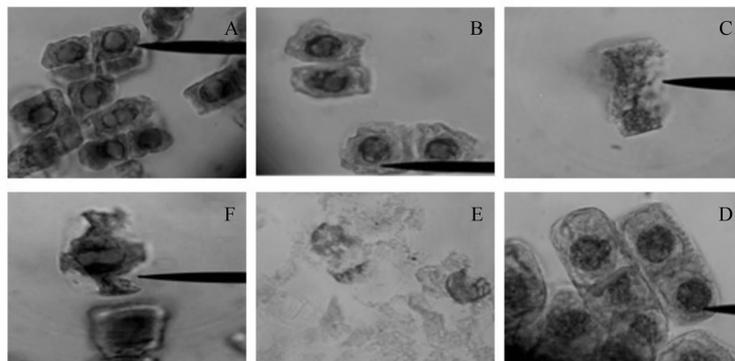
1.2.4 DNA 分析 选取各处理组具有细胞凋亡形态特征的根尖 5~10 根,采用 CTAB 法提取细胞基

因组 DNA、琼脂糖凝胶电泳^[8]、拍照。

2 结果与分析

2.1 细胞凋亡的形态学变化

对各处理组的根尖细胞做切片,显微观察细胞的形态特征。正常细胞(正对照)的细胞形态完整,细胞核呈圆球形,核、质界限分明(图 1F);煮沸细胞(负对照)的细胞壁、质膜破裂,细胞核消失,细胞质内分布有不均匀碎末状物质,细胞内物质外溢,不能保持细胞形态完整(图 1E);NaCl 溶液处理的各组细胞表现出一系列的形态特征变化,如染色质聚集沿核膜分布,并凝集成块状结构(图 1A);细胞质壁分离,细胞膜皱缩、内摺(图 1B);核膜破裂,核质融合,细胞核消失(图 1C);细胞表面有膜泡或芽状突起,直至分离形成凋亡小体(图 1D)。



A:染色质凝集,边缘化;B:细胞膜皱缩,细胞质与细胞壁分离;C:细胞核消失,细胞质与细胞核融合;D:芽状突起,形成凋亡小体;E:煮沸细胞;F:正常细胞

A:Chromatin condensation, marginalized; B: Cell shrinkage, separation of cytoplasmic and cell wall; C: Nucleus disappeared, the cytoplasm and nuclear fusion; D: Bud-like processes, the formation of apoptotic bodies; E: Boiled cell; F: Normal cells

图 1 凋亡细胞形态

Fig. 1 Apoptotic cells shape/100 ×

分别对不同浓度和不同时间处理下的根尖细胞进行观察,结果不同处理浓度和处理时间下,凋亡细胞的形态特征表现一致,但细胞凋亡的频率不同。

2.2 凋亡细胞基因组 DNA 鉴定

DNA 的特异性降解是细胞凋亡的典型特征。通过琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA,可以鉴定细胞是否发生凋亡。分别对不同浓度 NaCl 溶液处理(处理时间为 12 h)条件下,表现细胞凋亡形态特征的各组根尖细胞基因组 DNA 进行提取,并进行琼脂糖凝胶(浓度为 1.0%)电泳(图 2)。

由图 2 可知,正常细胞基因组 DNA 分子量较



图 2 不同浓度处理的细胞 DNA 电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis patterns of cell DNA under treatment with different concentration/12 h

大,电泳图谱为 1 条明显主带,是较完整的基因组 DNA 分子;煮沸处理的细胞 DNA 完全降解,电泳图谱无带型,为坏死细胞;NaCl 胁迫诱导的细胞 DNA 电泳图谱出现连续“带纹”,表明基因组 DNA 分子已经降解,而且形成的 DNA 片段大小呈连续性分布。但不同浓度间 DNA 降解片段大小差异不明显。

2.3 钠盐浓度对根尖细胞凋亡率的影响

以不同浓度 NaCl 溶液对大豆根尖分别处理 4、8、12 h,取样、制片观察,分析不同浓度和时间条件下,NaCl 溶液对根尖细胞凋亡率的影响。

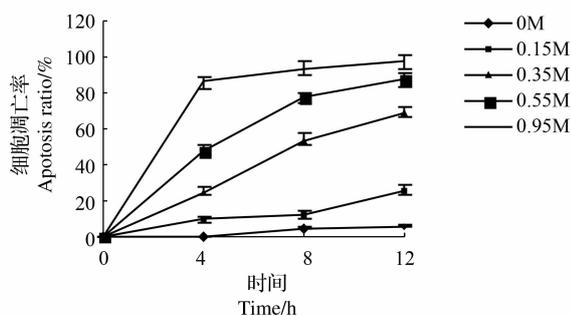


图3 氯化钠处理浓度及时间与细胞凋亡率

Fig. 3 Concentration and time of NaCl and apoptosis rate

由图 3 可知,大豆根尖细胞凋亡率与 NaCl 溶液处理的浓度和时间呈正相关,表现为处理时间相同时,处理浓度越大出现凋亡的细胞数越多,细胞凋亡率越高;反之,处理浓度相同时,处理时间越长,出现的细胞凋亡率也越高。结果表明利用 NaCl 溶液处理大豆根尖,能够诱导细胞凋亡,引起细胞凋亡的频率不仅与 NaCl 溶液浓度有关,与溶液处理时间也有密切关系。

3 结论与讨论

3.1 NaCl 诱导大豆根尖细胞凋亡的细胞学特征

细胞学特征包括细胞形态变化和基因组 DNA 改变。利用不同浓度 NaCl 溶液和对大豆根尖进行不同时间处理,显微观察结果表明,细胞凋亡的形态变化是相似的,过程是多阶段的。主要包括:细胞核浓缩、染色质断裂、边缘化,质膜卷曲,质壁分离,膜性细胞器破裂、核膜崩解,细胞核消失,胞浆聚集、直至细胞膜反折,最终形成凋亡小体(图 1)。在细胞凋亡整个过程中,细胞膜保持完整性,内容物没有释放出来。DNA 凝胶电泳分析结果表明,发生细胞凋

亡的根尖细胞基因组 DNA 已降解,形成大小不等的连续性片段(图 2)。

3.2 浓度、时间与细胞凋亡之间的关系

据 Katsuhara^[9]报道,植物细胞在高盐胁迫下可出现细胞凋亡现象。该研究以不同浓度 NaCl 溶液处理大豆根尖,结果供试浓度范围内的 NaCl 溶液均能够使根尖细胞出现凋亡现象。并且表现为细胞凋亡率随 NaCl 处理浓度和处理时间的增加而增大,呈正相关(图 3)。表明利用 NaCl 溶液作为诱导剂诱导大豆根尖细胞,处理浓度和处理时间对根尖细胞凋亡频率有直接影响。

参考文献

- [1] 翟中和,王喜忠,丁明孝. 细胞生物学(第 3 版)[M]. 北京:高等教育出版社,2007:442-445. (Zhai Z H, Wang X Z, Ding M X. Cell biology(Third Edition)[M]. Beijing: Higher Education Press, 2007:442-445.)
- [2] 张跃华,冉超,商艳艳,等. 硝基苯对蚕豆根尖细胞凋亡的影响[J]. 生物学通报,2007,42(1):47-48. (Zhang Y H, Ran C, Shang Y Y, et al. Effects of nitrobenzene to apoptosis of *Vicia* root tip cells[J]. Biology Bulletin,2007,42(1):47-48.)
- [3] Golstein P. Cell death in us and others[J]. Science,1998,281:1283.
- [4] Jabs T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals[J]. Biochemical Pharmacology, 1999,57(3):231-245.
- [5] 肖军,高洁. 高等植物细胞凋亡的诱因及生物学意义[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2008,39(1):125-128. (Xiao J, Gao J. The inducement of apoptosis in higher plants and its biological significance[J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science),2008,39(1):125-128.)
- [6] 张旭红,林爱军,苏玉红,等. 镉引起蚕豆叶片 DNA 损伤和细胞凋亡研究[J]. 环境科学,2006,27(4):787-793. (Zhang X H, Lin A J, Su Y H, et al. DNA damages and apoptosis induced by cell in the leaves of horse bean *Vicia faba*[J]. Environmental Science, 2006,27(4):787-793.)
- [7] 潘建伟,陈虹,顾青. 环境胁迫诱导的植物细胞程序性死亡[J]. 遗传,2002,24(3):385-388. (Pan J W, Chen H, Gu Q. Environmental stress-induced programmed cell death of plant[J]. Hereditas,2002,24(3):385-388.)
- [8] 马学军,舒跃龙,译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社,2005:54-55,57-58. (Ma X J, Shu Y L, Translation. Experimental protocols in molecular biology guide[M]. Beijing: Science Press,2005:54-55,57-58.)
- [9] Katsuhara M. Apoptosis-like cell death in barley roots under salt stress[J]. Plant and Cell Physiology,1997,38:1091-1093.