

冰核细菌对仁用杏胚珠超微结构的影响

彭伟秀 杨建民* 张 芹 孟庆瑞

(河北农业大学园林与旅游学院, 保定 071000)

摘 要: 应用透射电镜对两个仁用杏品种‘白玉扁’和‘一窝蜂’接种冰核细菌并低温处理后的胚珠超微结构进行了观察, 发现冰核细菌对胚珠的超微结构有一定影响: (1) 使珠心细胞发生严重的质壁分离, 细胞质中存在大量泡状结构, 线粒体的内部结构完全被破坏, 呈透明状, 而且有些珠心细胞中形成同心圆状的多膜内含物; (2) 使胚囊中卵细胞的细胞核外膜膨胀, 甚至核膜局部解体, 细胞质中细胞器减少。这些变化致使胚珠发育不正常, 影响受精而导致减产或绝收。接种冰核细菌并低温处理比单纯低温处理对胚珠超微结构的破坏程度重。

关键词: 杏; 冰核细菌; 胚珠; 超微结构

中图分类号: S 662.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 01-0021-04

Effect of Ice Nucleation Active Bacteria on the Ultrastructure of Apricot Varieties Ovule

Peng Weixiu, Yang Jianmin, Zhang Qin, and Meng Qingrui

(College of Gardens and Tourism, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

Abstract: The ultrastructure of two kinds of apricot (*Prunus ameniaca* L.) ovule by ice nucleation active (INA) bacteria and low temperature was investigated with transmission electron microscopy. The results showed that the ultrastructure of ovule was influenced by the INA bacteria. (1) The plasmolysis phenomenon occurred in the nucellus cells, a great lot of vesicle structures existed in the cytoplasm. The structures of mitochondrion was entirely damaged and turned transparent. Furthermore there were multi-membrane inclusions with concentric circles in some nucellus cells. (2) The ectoblast nuclear membrane of ovum in embryo-sac was inflated. The nuclear membrane was disintegrated partly and number of organelles in cytoplasm decreased. Therefore, the ovule could not develop normally, which interfered the spermatiation and led to the reduction in apricot yield or even no output at all. In addition, compared with the treatment of only low temperature, the ovule ultrastructure by the treatment of both low temperature and INA bacteria inoculation were devastated more seriously. Therefore, INA bacteria was one important factor to aggravate frost injury to apricot flowers.

Key words: Apricot; Ice nucleation active bacteria; Ovule; Ultrastructure

近年来国内外的研究证明, 在自然界广泛存在冰核活性细菌 (Ice nucleation active bacteria, 简称 INA 细菌), 它可在 -2 ~ -5℃ 诱发植物细胞水结冰而发生霜冻, 无 INA 细菌存在的植物一般可耐 -7 ~ -8℃ 的低温而不发生霜冻^[1~5]。这一发现为研究和防御植物霜冻提出了新的方向。

杏树春季开花较早, 花期常常遇到霜冻危害^[6]。孙福在等^[7]的研究表明, 杏树上存在有两种 INA 细菌, 冰核活性中等, 能提高杏花器官的过冷却点 2℃ 左右, 使其霜冻加重。杨建民等^[8,9]、孟庆瑞等^[10]通过 INA 细菌对杏花器官和幼果的抗寒性、激素水平、叶绿素荧光参数等影响的研究, 证明了

收稿日期: 2003 - 03 - 13; 修回日期: 2003 - 06 - 05

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (399147)

* 通讯作者

INA 细菌是诱发和加重杏花器官霜冻害的重要因素。作者^[1]曾研究 INA 细菌对仁用杏花粉超微结构的影响,在此基础上我们以仁用杏品种为试材研究了 INA 细菌对仁用杏胚珠超微结构的影响,旨在从细胞结构的变化方面探讨 INA 细菌与杏树霜冻害的关系,为减轻或控制杏树霜冻害提供理论依据。

1 材料与方法

选用河北省涿鹿县保岱镇杏树园的仁用杏 (*Prunus ameniaca* L.) 品种‘白玉扁’和‘一窝蜂’,树龄 8 年,管理水平较高。每一品种选 9 株树,每株取 4 个 5~15 cm 的短果枝,共计 36 个盛开花枝。

用采自仁用杏花芽上的冰核细菌 (*Pseudomonas syringae* pv.), 涂接 KB 平板培养基,置 20℃ 培养 48 h,再用灭菌无离子水配成 5×10^8 个/mL 菌悬液,放在 4℃ 冰箱内,以备接菌。

将每一品种的盛开花朵分为三部分:第一部分不接种 INA 细菌,第二部分接种 INA 细菌(用毛笔沾菌悬液涂接于雌蕊上),然后均放入用半导体制冷、电脑控温,能自动记录的人工模拟霜箱中进行处理,先以 19℃/h 的速度降温,降至 4℃ 时,以 2℃/h 的速度降温,降至 -3℃ 时,持续 30 min。第三部分盛开花朵作为对照。分别取上述低温处理、接种 INA 细菌并低温处理以及常温下(作对照)的白玉扁、一窝蜂的胚珠,用 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液,固定 24 h,1% 锇酸固定液进行后固定,丙酮系列脱水,EPON812 包埋,LKB 超薄切片机切取 3~4 μm 的半薄切片,0.05% 苯胺蓝染色,光学显微镜下观察并定位,用 LKB 超薄切片机切取 50~80 nm 的超薄切片,经醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色后,于日立 H-650 型透射电镜下观察并照相。

试验于 1999~2002 年在中国农业科学院植物保护研究所重点实验室和河北大学电镜室进行。

2 结果与分析

2.1 低温条件下冰核细菌对珠心细胞超微结构的影响

常温下,白玉扁的珠心细胞结构完整,细胞核位于细胞中央,形状正常,核仁、核膜清晰;细胞质较浓,其中含有丰富的细胞器,如线粒体、液泡等(图版,1、2)。

-3℃ 低温处理后,抗霜性强的白玉扁,其珠心细胞未发生质壁分离现象,细胞核的形状和结构正常,线粒体的结构基本正常,在液泡中存在一种体积较大,染色很深的圆形颗粒(图版,3);而抗霜性弱的一窝蜂,其珠心细胞发生质壁分离,细胞核的形状不规则,结构被破坏,并且细胞质中存在大量的小泡(图版,4)。

接种 INA 细菌并于 -3℃ 低温处理后,白玉扁的珠心细胞,细胞核的核仁分散,核质稀薄,核膜在某一区域膨胀形成大囊泡(箭头),细胞质中存在许多大小各异的泡状结构,而且液泡中有淀粉粒分布(图版,5);而一窝蜂的珠心细胞,发生明显的质壁分离,质膜大量内陷形成小囊泡,细胞质中的细胞器被破坏,胞基质被水解,细胞核解体,细胞中部呈空腔状(图版,6)。另外还发现,一窝蜂的某些珠心细胞中含有多膜内含物(图版,7)。

由此可见,同一品种在不同的处理条件下存在明显差异,白玉扁的珠心细胞在接种 INA 细菌并于 -3℃ 低温处理后所受到的破坏比单纯低温处理的更严重;一窝蜂珠心细胞的情况也是如此。从而说明低温条件下,INA 细菌的存在对胚珠中珠心细胞超微结构的破坏程度加重。

2.2 低温条件下冰核细菌对胚囊中卵细胞超微结构的影响

以抗霜性强的白玉扁品种为例加以说明:常温下,卵细胞其细胞核呈圆形,被膜清晰完整,有明显的核仁和核质,细胞质中含有大量的线粒体等细胞器(图版,8)。-3℃ 低温处理后,卵细胞其细胞核外膜膨胀(箭头),有的区域外膜膨胀形成大囊泡;细胞质中细胞器较少(图版,9)。接种 INA 细菌并于 -3℃ 低温处理后,卵细胞其细胞核外膜也有膨胀现象,有的区域核膜解体消失(箭头);细胞质中细胞器很少(图版,10)。通过对比发现,在低温条件下,INA 细菌的存在使白玉扁胚囊中卵细胞的细胞核和细胞器遭到严重破坏。

3 讨论

通过研究表明, 在低温条件下, INA 细菌可使胚珠中的珠心细胞发生严重的质壁分离, 细胞质中产生大量泡状结构, 线粒体内部结构完全被破坏, 呈透明状, 且使有些珠心细胞中形成同心圆状的多膜内含物; 另外 INA 使胚囊中最重要的细胞——卵细胞的细胞核外膜膨胀, 甚至核膜局部解体, 细胞质中的细胞器减少。

接种 INA 细菌并低温处理后, 珠心细胞中存在的泡状结构可能有 3 种来源: 第一, 由于质膜内陷而形成。质膜大量内陷形成各种泡状结构, 这样既增加了质膜的表面积, 又有利于水分外迁。这种现象的出现是细胞对低温的一种适应性反应。第二, 由于液泡膜内吞而形成。液泡膜内吞, 可以增大液泡膜的表面积, 使其在冻融膨胀中不致被拉伤损坏, 从而保护液泡膜。在液泡膜内吞的同时, 细胞质乃至某些细胞器也常常被吞噬到液泡中, 膜层结构和吞噬物被液泡中有关酶降解, 使液泡中的细胞液浓度提高, 降低细胞液的冰点。同时也避免液泡中的水分大量进入细胞质, 使细胞质过度稀释, 产生胞内结冰, 导致细胞解体^[12]。第三, 由于线粒体或其他细胞器内部结构破坏解体形成。而线粒体的主要功能是为正常生理活动提供所需的能量, 必然会影响细胞正常代谢, 从而影响胚珠的正常发育。

在有些珠心细胞中出现的多膜内含物, 是由数圈内质网呈同心圆卷绕或折叠状排列包围部分细胞质形成的^[13]。关于多膜内含物的功能有不同的解释: 一种认为是保护被包围在内的核糖体免遭水解酶降解的结构; 另一种则认为具有自噬泡的功能, 能消除核糖体、部分线粒体及其他细胞质组分。

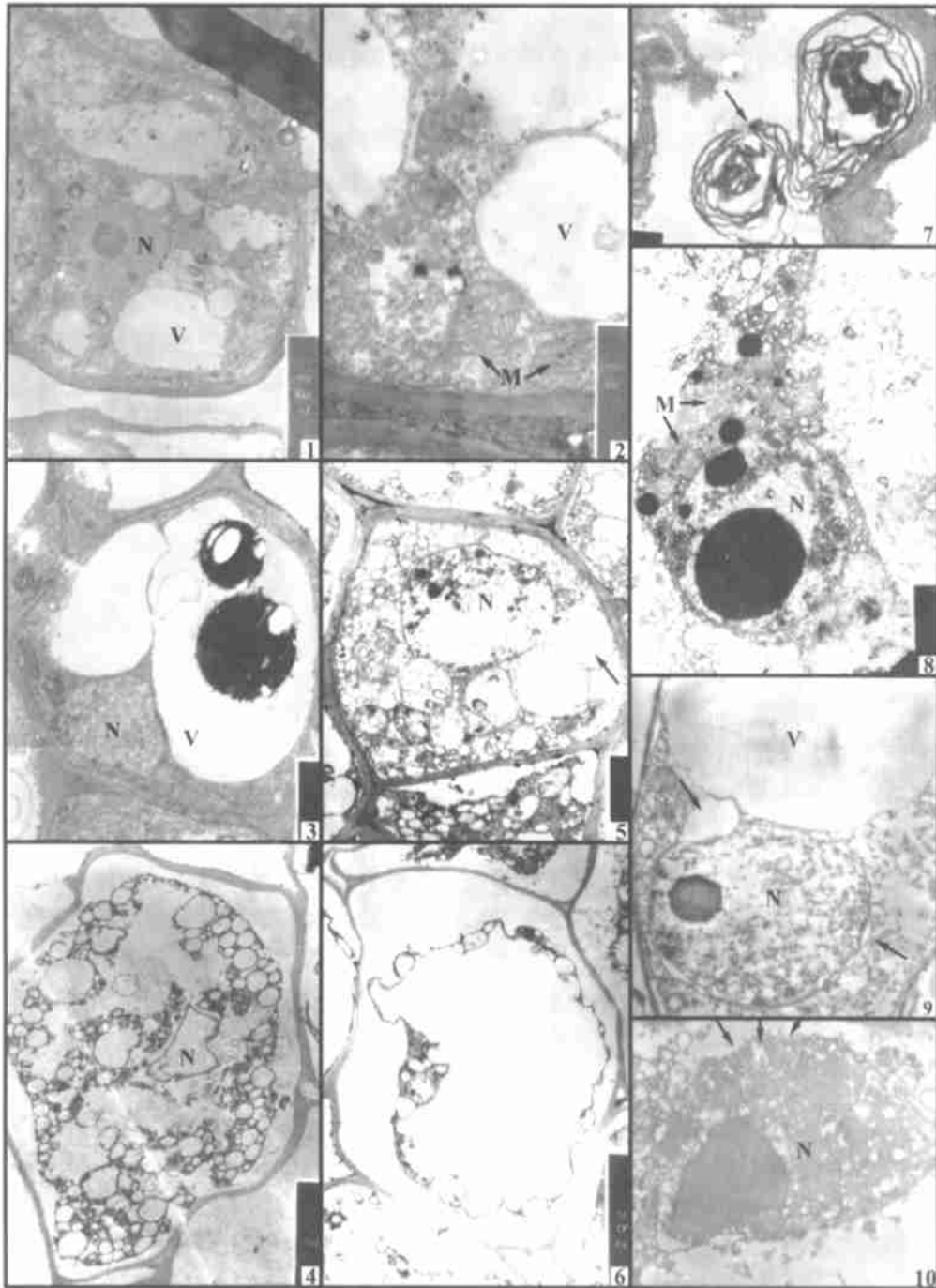
从组织结构上看, 珠心组织处于胚囊周围, 因此胚囊的整个表面可以从周围珠心组织中吸收营养, 这是胚囊发育获得营养物质的一条重要途径。在低温条件下, INA 细菌使珠心细胞结构遭到一定破坏, 胚囊的营养来源受到阻隔, 从而影响胚囊的进一步发育。

典型的成熟胚囊是由一个卵细胞、两个助细胞、一个含两个极核的中央细胞和三个反足细胞组成的。但是我们连续 4 年取样, 进行了大量的超薄切片并观察, 结果有的处理在胚囊中看到了助细胞, 未看到中央细胞, 而有的处理在胚囊中看到了中央细胞, 未看到助细胞, 因此无法加以系统比较, 难以说明冰核细菌对胚囊中助细胞和中央细胞的影响。出现这些情况的原因可能是有的细胞在处理过程中被破坏, 也可能是由于有的细胞已退化。关于这方面的工作, 有待于进一步观察研究。

总之, 在低温条件下, 冰核细菌的存在使胚珠中的珠心细胞及胚囊中的卵细胞超微结构受到严重破坏, 从而影响受精结实从超微结构方面证实 INA 细菌是诱发和加重杏花器官霜冻害的重要因素。

参考文献:

- 1 刘建华, 陶毓汾, 何维勋, 等. 冰核活性细菌与玉米和大豆霜冻关系研究. 中国农业气象, 1990, 11 (2): 1~6
- 2 孙福在. 我国生物冰核研究进展. 中国农业科学, 1996, 29 (5): 62~68
- 3 Lindow S E. The role of bacteria ice nucleation in frost injury to plant. Ann. Rev. Phytopathol., 1983, 21: 362~384
- 4 Lindow S E. Competitive exclusion of epiphytic bacteria by ice *Pseudomonas syringae* mutants. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53 (10): 2520~2527
- 5 冯玉香. 黄瓜霜冻与冰核活性细菌的关系. 园艺学报, 1990, 17 (3): 211~216
- 6 杨建民, 李艳华, 杨敏生, 等. 几个仁用杏品种抗寒性比较研究. 中国农业科学, 1999, 32 (1): 46~50
- 7 孙福在, 赵廷昌, 杨建民, 等. 杏树上冰核细菌种类及其冰核活性与杏花霜冻关系的研究. 中国农业科学, 2000, 33 (6): 50~58
- 8 杨建民, 孟庆瑞, 彭伟秀, 等. 冰核细菌对仁用杏花器官抗寒性的影响. 园艺学报, 2002, 29 (1): 20~24
- 9 Yang Jiannin, Meng Qingrui, Peng Weixiu, et al. Effects of low temperature stress and INA bacteria on chlorophyll a fluorescence induction kinetics in young fruit of two apricot cultivars. Agricultural Sciences in China, 2002, 1 (12): 1344~1349
- 10 孟庆瑞, 杨建民, 樊英利, 等. 冰核活性细菌 (INA bacteria) 对杏花器官 ABA、IAA 和可溶性蛋白质含量的影响. 果树学报, 2002, 19 (4): 243~246
- 11 彭伟秀, 杨建民, 张 芹, 等. 冰核细菌对仁用杏花粉超微结构的影响. 园艺学报, 2001, 28 (5): 453~456
- 12 韩善华, 王 双, 李 琪. 冬季沙冬青液泡中膜状内含物的超微结构研究. 电子显微学报, 1994, 13: 241~246
- 13 欧阳学智, 谢绍苹, 陈睦传, 等. 甜菊愈伤组织分生区细胞中膜内含物的超微结构研究. 西北植物学报, 1997, 17 (3): 326~331



图版说明: 1. 常温下‘白玉扁’正常珠心细胞, $\times 5000$; 2. 常温下‘白玉扁’珠心细胞中线粒体, $\times 20000$; 3. -3 低温处理后‘白玉扁’珠心细胞, $\times 6000$; 4. -3 低温处理后‘一窝蜂’珠心细胞, $\times 6000$; 5. 接种 INA 细菌并于 -3 低温处理后‘白玉扁’珠心细胞, $\times 6000$; 6, 7. 接种 INA 细菌并于 -3 低温处理后‘一窝蜂’珠心细胞, $\times 6000$; 8. 常温下‘白玉扁’正常卵细胞, $\times 6000$; 9. -3 低温处理后‘白玉扁’卵细胞, $\times 8000$; 10. 接种 INA 细菌并于 -3 低温处理后‘白玉扁’卵细胞, $\times 10000$ 。N. 细胞核; V. 液泡; M. 线粒体。

Explanation of plates: 1. The cell of nucellus of ‘Baiyubian’ at normal temperature, $\times 5000$; 2. The mitochondrion in nucellus cell, $\times 20000$; 3. At -3, the nucellus cell of ‘Baiyubian’, $\times 6000$; 4. At -3, the nucellus cell of ‘Yiwofeng’, $\times 6000$; 5. The nucellus cell after inoculated INA bacteria and -3 treatment on ‘Baiyubian’, $\times 6000$; 6, 7. The nucellus cell after inoculated INA bacteria and -3 treatment on ‘Yiwofeng’, $\times 6000$; 8. The ovum of ‘Baiyubian’ at normal temperature, $\times 6000$; 9. After -3 treatment, the ovum of ‘Baiyubian’, $\times 8000$; 10. After inoculated INA bacteria and -3 treatment, the ovum of ‘Baiyubian’, $\times 10000$. N. Nucleus; V. Vacuolus; M. Mitochondrion.