

逆境胁迫诱导植物细胞程序性死亡研究

曹 慧, 刘 和, 付循成, 李 春霞

(山西农业大学 园艺学院, 山西 太谷 030801)

摘 要: 细胞程序性死亡(PCD)是一种由基因控制的、主动的细胞死亡过程,它对植物正常生长发育起重要作用。现主要从 PCD 的特征、PCD 的可能信号传导途径、PCD 发生的重要相关酶等方面研究进行了综述。

关键词: 植物;逆境胁迫;细胞程序性死亡

中图分类号: Q 942.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)12-0052-04

程序性死亡或细胞凋亡(programmed cell death, PCD)是多细胞生物体中一些细胞所采取的一种由自身基因调控的主动死亡方式^[1]。PCD 作为生物体内广泛存在的一种机体自我调整机制,是生命活动的一个重要组成部分,近年来随着动物学和医学中细胞死亡的研究取得长足进展,植物的死亡也受到广泛关注,成为植物学研究领域的一个热点。

1 植物程序性细胞死亡的特征

发生 PCD 或凋亡的细胞有其独特的形态学特征^[2]:表现为细胞骨架破坏;细胞体积缩小、密度增大;染色质边缘化、高度凝集;核内 DNA 被诱导产生的核酸内切酶从核小体间降解断裂,并产生带有 3'-OH 端、大小不同的寡聚核小体片段,这些片段在凝胶电泳上可以见到以 140bp 倍增的“梯形”DNA 条带(DNA ladder),DNA 的片段化被认为是动植物 PCD 的“真质标记”^[3]。植物细胞核 DNA 降解断裂并最终形成膜包围的致密凋亡小体,凋亡的细胞保持细胞膜的完整性,没有细胞内含物溢出,因此,凋亡的细胞与坏死的细胞在细胞形态上表现完全不同。

2 环境胁迫诱导 PCD 的特点及环境胁迫因子的类型

2.1 环境胁迫诱导 PCD 的特点

在某一具体环境胁迫下,植物为了求得其个体生存,必须依赖细胞在不同方向进行不对称分裂或改变基因表达,甚至借助于多种途径的 PCD 途径^[4,5]。环境胁迫因子诱导植物 PCD 时有以下几个特点:①高浓度或高

强度的胁迫,细胞发生坏死(necrosis),这可能是由于细胞来不及对如此强的刺激作出反应而立即死亡;中等浓度或中等强度的胁迫能诱导细胞发生 PCD,这是由于细胞受损后激活了预定的死亡程序;低浓度或低强度的胁迫,细胞通过改变基因表达产生一些抗性蛋白如防卫蛋白、热激蛋白等来适应逆境,不发生 PCD。②在诱导过程中,存在一个胁迫阈值(stress threshold),一旦超过某一阈值,PCD 注定要发生,不同胁迫因子诱导 PCD 发生的阈值各不相同。③凡对细胞有损伤的环境胁迫因子很可能都能诱导 PCD,与胁迫因子的性质无关^[6-9]。

2.2 环境胁迫因子的类型

在实验室条件下,能诱导植物 PCD 的环境胁迫因子主要分为三大类:①生物胁迫因子如各种病原体。植物与病原体相互作用过程中,存在两种类型的细胞死亡^[10]:其一,超敏反应(hypersensitive reaction, HR),其特点是被感染位点上的细胞快速死亡,使植株获得抗性(SAR);其二,与疾病相关的细胞死亡,其特点是细胞死亡速度慢,由植物得病后引起 PCD;②物理胁迫因子如温度、水涝(低氧)、高渗、UV、臭氧、机械胁迫(如离心)、CO₂ 浓度、营养因子的缺乏等;③化学胁迫因子如 NaCl、AlCl₃、HCl、H₂O₂、CaCl₂、KCl、KCN、VK₃等。

2.2.1 水涝(缺氧)胁迫 通气组织被认为是氧气运入根内的通道,是对淹水缺氧的良好适应。通气组织有两类即裂生性和溶生性^[11]。前者具有种属的特异性,是成熟细胞经过有规律的相互分离形成的细胞间空腔,是许多水生植物的基本特性;后者源于一些活细胞的死亡和溶解。植物感受缺氧逆境后,皮层薄壁组织中只有部分细胞选择性的发生解体死亡,而周围的细胞还保持完整的现象,这意味着在皮层内细胞的解体是一个调控严格的代谢过程,因此,这是一个程序性死亡。有研究表明通气组织的形成包括感受氧的缺乏、信号的产生、原初信号传递,进而诱导乙烯的合成,通过乙烯浓度变化引起级联反应,最终诱导细胞死亡,是一系列联系紧密而

第一作者简介:曹慧(1966-),女,博士,在职博士后,教授,一直从事果树逆境生理与分子生物学领域的研究。E-mail: hui99016@sina.com。

基金项目:山西省自然科学基金资助项目(20051068)。

收稿日期:2007-07-19

有序的过程^[11, 12]。

2.2.2 温度胁迫 低温胁迫: Koukalova 等研究表明, 5~6℃低温胁迫可以诱导悬浮培养的烟草细胞发生凋亡, 并且这种细胞凋亡具有梯状 DNA 图谱, 染色质和胞质浓缩等典型的细胞凋亡特征^[13]。宁顺斌等研究发现, 玉米根尖在 4℃下处理 3 周后, 能用常规琼脂糖电泳检测出较清晰的 DNA 梯状图谱, 但尚有部分大片段存在^[14]。处理 4 周后几乎所有的大片段都断裂成小片段, 从 Marker 可以得出“梯子”是以 180 bp 为单位组成的; 以原位标记 TUNEL 检测, 发现胁迫处理 1 周后, 10% 细胞发生凋亡, 出现 TUNEL 阳性; 2 周后 25% 左右细胞出现明显的 TUNEL 阳性; 4 周后 70% 细胞呈 TUNEL 阳性。由此可见, 低温可能诱导植物细胞发生 PCD。热激: 陈浩明等研究表明, 不同剂量的热激可以诱导烟草产生 PCD, 用 TUNEL 检测, 烟草细胞受热激后其基因组 DNA 产生较多的 3'-OH 断裂, 其中 48℃ 4 h 热激处理烟草细胞凋亡率最高, 这表明适当的热激处理会导致植物产生 PCD^[15]。Balk 等的研究表明, 黄瓜子叶细胞热激(55℃)10 min, 可以引起 PCD, 并且导致细胞产生典型的形态和生化方面的变化^[16]。在热处理 12 h 后, 可以检测出明显的 DNA 梯。Leu 等研究发现, 小球藻在 46.5℃ 温度下处理 1 h, 高分子量 DNA 开始降解, 而持续处理 24 h 后, 仍然还可以检测出 DNA 片断^[17]。

2.2.3 金属离子胁迫 苏金为等研究发现, 用 0.5 mmol·L⁻¹ 镉离子胁迫茶树茎尖组织, 连续处理 10 d, 通过每天对细胞质、线粒体、细胞核、细胞壁的电子显微镜观察, 得出只有在第 5~7 d 之间植物出现 PCD^[18]。Boscolo 等研究表明, 6 mmol·L⁻¹ 铝离子胁迫玉米根尖 48 h, TUNEL 呈阳性^[19]。Yamamoto 等报告在烟草培养细胞中, 铝提高 Fe²⁺ 介导质膜脂过氧化引起细胞死亡, 这种细胞死亡要求胞内 Ca²⁺ 浓度和蛋白酶活性, 并产生 DNA 片段化, 可能属于 PCD^[20]。Pan 等报告 0.1~1.0 mmol·L⁻¹ 铝处理大麦 8 h 后, 根尖细胞产生 DNA 片段化, 但没有凋亡小体产生^[21]。

2.2.4 药物胁迫 宁顺斌等在用药物(放线菌素 D、秋水仙碱、放线菌酮)处理玉米, 经过不同的时间, 玉米根尖都出现了 PCD。3 种供试药物都诱导玉米细胞 DNA 断裂并检测出 180 bp 的 DNA 梯。宁顺斌等又用 3 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 胁迫玉米根尖 6 h, 检测出清晰的 180 bp 的 DNA 梯, 处理 8 h 后用 TUNEL 检测有 35% 细胞呈阳性^[22]。由此可见, 药物可以诱导植物的 PCD。周军等用不同浓度乙烯利诱导胡萝卜 15 h, 经过检测发现 1.4 mmol·L⁻¹ 浓度处理时, 胡萝卜原生质体细胞死亡率接近 100%, 用 DAPI 染色发现处于凋亡过程中的原生质体核内染色质固缩, 裂解成许多与动物细胞中凋亡小体类似的球状 DNA 的迁移, 说明乙烯利处理使核

DNA 发生断裂和降解^[23]。

3 环境胁迫诱导 PCD 的可能信号分子

对于逆境诱导 PCD 的信号因子已有报告, 认为活性氧、NO、Ca²⁺、乙烯、水杨酸等是环境胁迫诱导植物 PCD 的重要信号分子。

3.1 活性氧(reactive oxygen species ROS)

环境胁迫对植物细胞的伤害在很大程度上是由于 ROS 浓度上升所致, ROS 已成为环境胁迫诱导 PCD 的一个重要信号分子。在 HR 反应中, ROS 跃升(ROS burst)激活 HR 信号传导途径。最近的研究表明, 在 HR 反应中, 小 GTP 结合蛋白 Rac(动物 NADPH 氧化酶调节因子)能介导依赖于 ROS 的 HR 的发生, 推测在 HR 反应中, ROS 跃升很可能是由 NADPH 氧化酶的活性所致^[24]。氧化胁迫与植物 PCD 过程密切相关, 已证实 H₂O₂ 能诱导大豆、拟南芥、烟草悬浮培养细胞发生 PCD^[25]。

3.2 乙烯(ethylene, Eth)

乙烯是植物各种器官生长、发育、衰老等的重要信号分子。有证据表明在 HR 反应中似乎并不需要乙烯, 但在与疾病相关的细胞死亡中, 乙烯起了重要作用^[19]。对乙烯不敏感的番茄能抑制由活体营养病原体感染引起的细胞死亡。植物在遇到水涝时, 土壤低氧(hypoxia)刺激根皮层细胞形成通气组织(aerenchyma), 用乙烯生物合成抑制剂可明显抑制通气组织的形成。低氧可明显诱导番茄、水稻的 ACC 合成酶基因家族中的特异性基因的表达^[12]。因此, 低氧激活了根皮层细胞中的乙烯生物合成途径, 使 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶的活性上升, 引起乙烯跃升(ethyleneburst), 从而触发了乙烯介导的 PCD 信号传导途径。

已有试验表明, 对 ACC 氧化酶(催化乙烯合成)进行反义抑制或用乙烯拮抗剂处理, 均可延迟植物细胞的衰老与死亡。乙烯能促进细胞中 Ca²⁺ 流动, 而 Ca²⁺ 的变化可影响蛋白质磷酸化, 激活核酸内切酶, 导致 DNA 降解。因此, 乙烯诱导 Ca²⁺ 重新分布也许是植物 PCD 的机制之一。另外, 赤霉素也能刺激 PCD, 乙烯和 GA 的作用又可被细胞分裂素及 ABA 所逆转, 因此, 乙烯很可能与其他信号分子协同作用来控制 PCD 发生。

除了活性氧和乙烯以外, 另一种激发 PCD 的信号分子可能是一种糖蛋白, 发现阿拉伯、半乳聚糖蛋白特异性地存在于玉米已死亡或接近死亡的导管分子中, 该糖蛋白能结合于细胞膜上, 具有类似于凝集素的特性, 认为该糖蛋白很可能作为激发信号在组织部位特异性的 PCD 中发挥重要作用^[23]。

3.3 Ca²⁺

许多环境胁迫能引起植物细胞内 Ca²⁺ 浓度的上升。Xu 等的研究表明, 当真菌 *Uromyces viciae* 侵染抗

性豇豆植株细胞壁时,胞内 Ca^{2+} 浓度上升(敏感品种不存在这种现象),一旦真菌进入胞腔内, Ca^{2+} 浓度又回复到正常水平^[25]。因此,在真菌诱发的 HR 反应中,真菌激发子可能是通过影响质膜离子通道的活性来激活 HR 反应。通道抑制剂 Gd^{3+} 可抑制 PR 基因的表达和细胞死亡,部分抑制 ROS 跃升。最近的研究表明,大豆的 ScaM4 和 ScaM5(钙调蛋白基因家族成员)在烟草细胞中过量表达,可引起类 HR 的反应特征和细胞死亡^[26]。这些结果充分说明胞内 Ca^{2+} 水平上升对激活 HR 信号传导途径具有重要作用。

3.4 水杨酸(salicylic acid, SA)

已有研究表明,水杨酸水解酶(NahG)基因的过量表达可抑制拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, At)的病斑模拟突变体(lesion mimic mutants)lsd6, lsd7, ssl, acd6 的细胞死亡,这说明 SA 对于 HR 来说也是必需的,在臭氧(ozone)诱导的植物 PCD 中 SA 也起到重要作用^[27]。

3.5 NO(nitric oxide)

机械胁迫(如 150 g 离心)能引起红豆杉(*Taxus brevifolia*)细胞 NO 上升,从而直接或间接地诱导 PCD 的发生^[28]。豌豆和康乃馨在干旱胁迫下,释放大量 NO,在 HR 中,也存在 NO 跃升(NO burst)^[29]。这些结果说明在环境胁迫诱导 PCD 过程中,NO 也是一个重要的信号分子。但又有证据表明 NO 对植物氧化胁迫(oxidative stress)有保护作用,能减少或抑制 DNA 降解和 PCD 发生^[30]。

有报道认为,细胞的死亡程序是由核基因和线粒体基因共同编制的^[31], Ca^{2+} 、活性氧、NO 是诱导 PCD 的信号因子,一定浓度胁迫下,耐性植物受到刺激,产生一定浓度的活性氧,诱导线粒体通透性转换孔开放,影响跨线粒体膜 Ca^{2+} 转运系统,使细胞色素 C、 Ca^{2+} 等释放到细胞质中,并激活半胱氨酸酶或其它蛋白酶,从而诱发表皮、皮层细胞等产生 PCD,阻止胁迫因子进一步影响分生组织、中柱或其他组织;而敏感植物受到胁迫后,产生较高浓度活性氧或活性氮,造成膜脂严重过氧化,引起生理紊乱,直接导致细胞大量死亡。高浓度胁迫下,耐性植物和敏感植物都产生高浓度活性氧或活性氮,导致根尖细胞大量死亡,根生长均受到严重抑制。但这一假设是否正确,还需做深入研究。

近年来,关于植物 PCD 相关信号、相关蛋白、相关基因等许多方面的研究已取得重要进展,但关于 PCD 精确机制尚不了解;有关 PCD 相关信号传导定位、是否存在通用的调控途径或机制,仍待深入研究;植物细胞凋亡机制在分子水平上有何异同,核酸酶和特异性蛋白酶在植物 PCD 中的作用等问题都有待进一步深入研究。

参考文献

[1] Keer J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics[J]. Br J Cancer,

1972, 26: 239-257.

[2] Gunawardena A H L, Pearce D M, Jackson M B et al. Characterization 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.

[3] Wyllie I A H. The genetic regulation of apoptosis[J]. Curr Opin Genet Dev, 1995, 5: 97-104.

[4] 姜丽丽, 连秀芬, 樊明寿. 细胞程序性死亡在植物适应逆境中的意义[J]. 生命科学, 2005, 17(3): 267-270.

[5] 詹洁, 余永昌, 何龙飞. 逆境条件下的植物细胞程序性死亡[J]. 广西农业科学, 2006, 37(1): 13-16.

[6] 潘建伟, 陈虹, 顾青, 等. 环境胁迫诱导的植物细胞程序性死亡[J]. 遗传, 2002, 24(3): 385-388.

[7] Jones A M. Programmed cell death in development and defense[J]. Plant Physiol, 2001, 125: 94-97.

[8] Pan J W, Zhu M Y, Chen H. Aluminum-induced cell death in root tip cells of barley[J]. Environ and Experim Botany, 2001, 46: 71-79.

[9] Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi S R et al. Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of re-active oxygen species in plant cells[J]. Plant Physiol, 2002, 128: 63-72.

[10] Lam E, Pontier D, Pozo O D. Die and let live - programmed cell death in plants[J]. Curr Opin in Plant Biol, 1999, 2: 502-507.

[11] 樊明寿, 张福锁. 植物通气组织的形成过程和生理生态学意义[J]. 植物生理学通讯, 2001, 38(6): 615-618.

[12] Drew M G, He C, Morgan P W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots[J]. Trends in Plant Sci, 2000, 5(3): 123-127.

[13] Kouklova B, Kovarik A, Fajkus J, et al. Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress[J]. FEBS Lett, 1997, 414: 289-292.

[14] 宁顺斌, 宋运淳, 王玲. 低温胁迫诱导玉米根尖细胞凋亡的形态和生化证据[J]. 植物生理学报, 2000, 26(3): 189-194.

[15] 陈浩明, 颜长辉, 蒋晓芳. 热激诱导烟草悬浮细胞的凋亡[J]. 科学通报, 1999, 4(2): 196-200.

[16] Balk J, Leaver C J, McCabe P F. Translocation of cytochrome c from them itochondria to the cytosol occurs during heat induced programmed cell death in cucumber plants[J]. FEBS Lett, 1999, 463: 151-154.

[17] Leu K, Hsu B. A programmed cell disintegration of *Chlorella* after heat stress[J]. Plant Science, 2005, 168: 145-152.

[18] 苏金为, 王湘平. 铜诱导的茶树膜脂过氧化和细胞程序性死亡[J]. 植物生理与分子生物学报, 2002, 28(4): 292-298.

[19] Bosco L P R S, Meno ssi M, Jorge R A. A lum inum induced oxidat ive stress in maize[J]. Phytochem, 2003, 62: 181-189.

[20] Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi S R et al. Aluminum toxicity is associated with chondrial function and the production of reactive oxygen species in plant cells[J]. Plant Physiol, 2002, 128: 63-72.

[21] Pan J W, Zhu M Y, Chen H. A lum inum - induced cell death in root tip cells of barley [J]. Environ and Experil Botany, 2001, (46): 71-79.

[22] 宁顺斌, 覃瑞, 王玲. H_2O_2 诱导玉米根尖细胞凋亡的形态、生化及分子生物学证据[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版), 1999, 17(3): 1-7.

[23] 周军, 朱海珍, 姜晓芳. 乙烯诱导胡萝卜原生质体凋亡[J]. 植物学报, 1999, 41(7): 747-750.

[24] 陈明, 沈文彪, 阮海华. 一氧化氮对盐胁迫下小麦幼苗根生长和氧化损伤的影响[J]. 植物生理与分子生物学报, 2004, 30(5): 569-576.

[25] Xu H, Heath M C. Role of caldium signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore derived infection of the cow-pea rust fungus[J]. Plant Cell, 1998, 10: 585-597.

应用于作物体细胞杂种鉴定的遗传标记方法

张 瑜 ， 赵 云 云
(首都师范大学 生命科学学院, 北京 100037)

摘 要: 着重介绍了 4 类遗传标记方法的原理及特点, 简要概述了其在作物体细胞杂种鉴定方面的应用进展。

关键词: 体细胞杂种; 遗传标记
中图分类号: Q 943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2007)12—0055—05

作物体细胞杂种的鉴定研究离不开遗传标记, 遗传标记是遗传物质的特殊的易于识别的表现形式, 可以用于研究基因遗传和变异的规律。随着分子生物学和生物技术的迅速发展, 遗传标记技术也得到了迅猛的发展。目前, 遗传标记主要分为四大类: 形态学标记、细胞学标记、生化标记和分子标记。形态学标记指可以观察到的一些表型性状; 细胞学标记主要包括核型、染色体带型等; 生化标记主要是指同工酶和贮藏蛋白质等生化物质; 分子标记是以生物大分子, 尤其是生物体的遗传物质——核酸的多态性为基础的遗传标记。

1 形态学标记

第一作者简介: 张瑜(1982-), 女, 硕士, 主要从事植物细胞工程研究。E-mail: zhangyu19821031@163.com。
通讯作者: 赵云云。E-mail: kjc-zhaoyy@mail.cnu.edu.cn。
收稿日期: 2007—06—25

植株形态、叶片形态、花器官形态、果实特征等形态学特征是判断及筛选体细胞杂种的基本而又重要的标准。形态学标记可以直接的体现杂种与双亲的形态区别, 方法非常简单。但是它易受环境和其它遗传效应影响, 且标记的数量较少。

2 细胞学标记

核型、染色体带型和原位杂交及染色体的非整倍性和结构变异等细胞学标记是鉴定体细胞杂种的一种有效的方法。

2.1 制片分析

通常以根尖、茎尖、幼叶、叶片愈伤组织等为材料, 采用压片法进行染色体标本制备, 需用卡宝品红、醋酸洋红等染色液进行染色、镜检和计数。制片分析作为最基本的细胞学分析手段, 方法比较简单, 但是易受材料和时间的限制。

2.2 原位杂交

[26] Kawasaki T, Henmi K, Ono E, et al. The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in Plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 10922-10926.
[27] Heo W D, Lee S H, Kim M C, et al. Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance response [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999 96: 766-771.
[28] Rate D N, Cuenca J V, Bowman G R, et al. Again-of-function Arabidopsis acd6 mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid

signaling pathway in controlling cell death, defenses and cell growth [J]. Plant Cell, 1999, 11: 191-206.
[29] Delledonne M, Xia Y, Dixon R A, et al. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance [J]. Nature, 1998, 394: 585-588.
[30] Pedroso M C, Magalhaes J R, Durzan D. Nitric oxide induces cell death in taxus cells [J]. Plant Sci, 2000, 157: 173-180.
[31] 崔克明. 植物细胞程序性死亡的机理及其与发育的关系 [J]. 植物学报, 2000, 17(2): 97-107.

Programmed Cell Death of Plant Induced by Stress

CAO Hui, LIU He, FU Xun-cheng, LI Chun-xia
(Horticulture Department of Shanxi Agriculture University, Taigu, Shanxi 261061, China)

Abstract: Programmed cell death(PCD) is an active and gene-regulated process which plays an important role in normal growth and development of plants. In this review, we summarized recent studies on the features of PCD in plants including the possible pathways of signal transduction in PCD, the important enzyme related to PCD and so on.
Key words: Plant; Stress; Programmed cell death