

矩镰荚苜蓿地下芽越冬期间超微结构适应性变化

杨小霞,方强恩*,张勃,张金青

(甘肃农业大学草业学院,草业生态系统教育部重点实验室,中-美草地畜牧业可持续发展研究中心,
甘肃 兰州 730070)

摘要:为了研究矩镰荚苜蓿地下芽越冬期超微结构变化,利用透射电镜技术,对该植物越冬期地下芽幼叶细胞进行了观察。结果显示:越冬期间,矩镰荚苜蓿越冬芽幼叶细胞超微结构发生了一系列积极适应低温的变化。细胞内的大体积液泡被分解为小液泡,液泡不断地溶解和吞噬;质体由圆形和椭圆形变形为马蹄状和变形虫状,质体内淀粉粒减少甚至消失;脂滴细胞器增多;由于细胞内发生质壁分离现象,胞间连丝断连且逐渐变模糊甚至消失。分析认为,矩镰荚苜蓿在越冬期间可通过地下芽幼叶细胞器结构的变化,使其自身进入休眠状态,进而抵御寒冷胁迫。

关键词:矩镰荚苜蓿;地下芽;超微结构;抗寒性

中图分类号:S551⁺.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2022)06-0044-06

DOI:10.13817/j.cnki.cyycp.2022.06.006



植物在低温胁迫环境中,一些组织细胞的超微结构会有一些的变化^[1],这些变化主要集中于液泡、质体、脂滴、细胞壁、以及质膜等亚细胞结构。如,质体通常通过变形的方式分解淀粉来增加细胞质的可溶性糖浓度,从而增强植物的抗寒能力^[2-3]。质膜的外吐作用将细胞质小泡(包括小液泡)中包含的大分子物质释放到质膜外,参与细胞壁构建,增加细胞壁的坚固性,增强植物细胞的抗寒性,防止植物细胞因冰冻失水而造成机械性损害^[4-5]。杜艳等^[6]对七叶树(*Aesculus chinensis*)冬芽的研究表明,随温度的降低,其冬芽细胞内的液泡黑色致密物、膜泡和吞噬泡不断增加,这些液泡内含物的增加有利于阻止冰晶的形成,可以提高越冬植物细胞的抗寒防冻能力,且细胞间发生质壁分离的现象。方强恩等^[7]对紫花苜蓿(*Medicago sativa*)越冬芽的研究中表明,在自然越冬过程中,越冬芽幼叶细胞内的液泡由大体积液泡且透明逐渐被分割为小体积液泡,透明度也逐渐降低,质

膜内陷,质体变为月牙形或马蹄状,质体内淀粉粒减少甚至消失,细胞之间发生质壁分离,细胞超微结构经过适应性调整,逐渐提高了越冬芽的抗寒能力。植物越冬芽细胞器与膜结构的稳定性是植物安全越冬的关键^[8]。因此,植物超微结构的观察和分析对揭示植物越冬芽越冬抗寒具有重要的科学意义。

矩镰荚苜蓿(*M. archiducis-nicolai*),又称青藏扁蓿豆,是豆科(Leguminosae)苜蓿属(*Medicago*)多年生野生优质牧草,分布于我国西部高寒地区^[9]。研究表明,该植物的越冬芽对寒冷的环境具有极强的耐受性^[10]。目前,关于矩镰荚苜蓿的研究主要涉及地理分布、栽培技术^[11]、营养价值的^[12]、遗传多样性^[10,13]等方面。但是,矩镰荚苜蓿地下芽在低温胁迫下超微结构的变化仍不清楚。因此,本试验以矩镰荚苜蓿地下芽幼叶为材料,通过观察其自然越冬过程中芽幼叶细胞超微结构的适应性变化,旨在解释矩镰荚苜蓿地下芽越冬抗寒的细胞学机制,以期矩镰荚苜蓿抗寒育种与寒地栽培技术研究提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

研究材料为矩镰荚苜蓿(*M. archiducis-nicolai*)自然种群个体,采自青藏高原东缘天祝县甘肃农业大

收稿日期:2021-06-30;修回日期:2021-09-16

基金项目:国家自然科学基金(31760703)

作者简介:杨小霞(1992-),女,甘肃陇西人,硕士研究生。

E-mail:1985661212@qq.com

*通信作者。E-mail:fangqe@gsau.edu.cn

学高山草原试验站禁牧草场。

1.2 试验方法

1.2.1 矩镰茛苳地下芽的取样方法 试验在2018年8月—2019年2月进行。根据当地气温(图1)的变化,将矩镰茛苳地下芽分4个时期取样4次。1)生长期(SS):最低气温在5℃以上,平均气温不低于10℃,取样日期为2018年7月15日;2)秋末冷适应期(CA):最低气温在0℃以上,平均气温不低于5℃,取样日期为2018年9月24日;3)初冬冷胁迫期(ES):从最低气温降到0℃以下开始,到平均气温降到0℃前,取样日期为2018年10月26日;4)隆冬冻胁迫期(FS):从平均气温降到0℃以下开始,到回升至5℃之前,取样日期为2018年12月11日;根据气温的变化,每次在试验地采集矩镰茛苳苳生长健康、长势一致的地下芽8—10个,迅速清洗干净,以备切块固定。

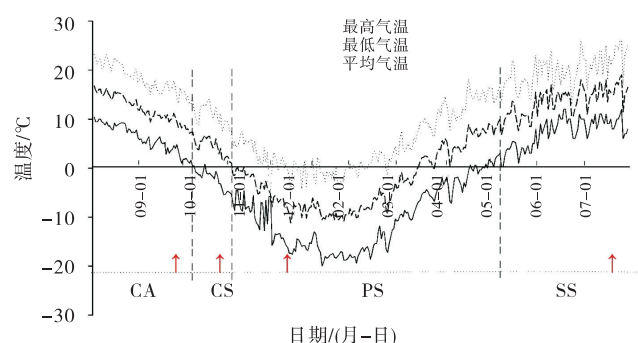


图1 试验期内平均气温。

Fig. 1 Daily maximum temperature.

注:CA:秋末冷适应期;CS:初冬冷胁迫期;FS:隆冬冻胁迫期;SS:生长期。箭头表示取样时间

1.2.2 透射电镜芽幼叶切片的制备 预冷及固定:将矩镰茛苳地下芽快速清洗干净,放在预冷处理的载玻片上,用锋利刀片从芽端幼叶顶部切取0.1 cm×0.2 cm的小块,置于青霉素小瓶中,加入预冷的固定液(0.1 mol/L、pH值=7.0的磷酸缓冲液)中,室温下固定2 h。

脱水:室温下用漂洗液漂洗3次,每次漂洗15 min,再用1%四氧化锇固定2 h。吸出四氧化锇,加入磷酸缓冲液(0.1 mol/L、pH值=7.0)漂洗1 h,其中中间进行4次换液,随后在50%,70%,80%,90%,95%,100%乙醇(2次)溶液中逐级进行常温脱水,每次20 min,EPON812环氧树脂浸透、包埋、聚合。

切片和染色:用(EMUC6)莱卡超薄切片机切片,

厚度为70 nm。最后将超薄切片捞于载物网上,经醋酸双氧铀(30 min)和柠檬酸铅(10 min)进行双重染色。

观察:样品放于电镜下(JEM-1230,日本)进行观察、拍照。

2 结果与分析

2.1 矩镰茛苳在生长期芽幼叶细胞超微结构

矩镰茛苳地下芽幼叶细胞内液泡大,细胞核位于细胞壁附近,核仁清晰可见。细胞核外面有少数质体(图2-A,B,C),质体内含少量淀粉(图2-C),多数质体为圆形和椭圆形(图2-A,B,C),少数为变形虫状(图2-D)。细胞壁薄,胞间连丝数量多且清晰可见(图2-F)。质膜光滑,细胞未发生质壁分离的现象。少数液泡在吞噬一些脂内物质和细胞器(图2-E,F,白色箭头),多数液泡体积增大。

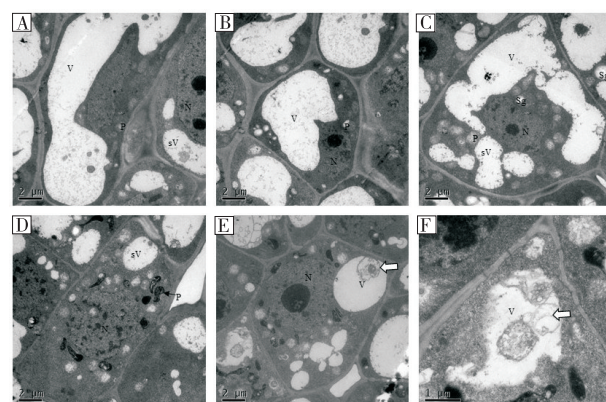


图2 矩镰茛苳地下芽生长期幼叶细胞超微结构

Fig. 2 Ultrastructural changes of young leaf cells of *Medicago archiducis-nicolai* in underground budding stage

注:1—3:细胞核位于细胞壁附近,液泡大,细胞核内核仁大且清晰;4:质体为变形虫状;5—6:液泡体积增大(白色箭头)6:胞间连丝;V:液泡;sV:小液泡;P:质体;Sg:淀粉粒;N:细胞核。下同

2.2 矩镰茛苳在秋末冷适应期芽幼叶细胞超微结构

矩镰茛苳地下芽幼叶细胞内大多数液泡还未开始溶解,部分液泡开始溶解为小液泡(图3-D)。细胞核开始向细胞中央移动,核膜边缘有少量异染色体,核仁清晰。质体内含大量淀粉,且有许多质体围绕在细胞核周围,质体被膜完整,多为卵圆形状和椭圆形状(图3-A)。胞间连丝的数量多,细胞壁薄。质

膜依然光滑,细胞未发生质壁分离的现象。细胞内有脂滴出现(图3-A,B,E)。

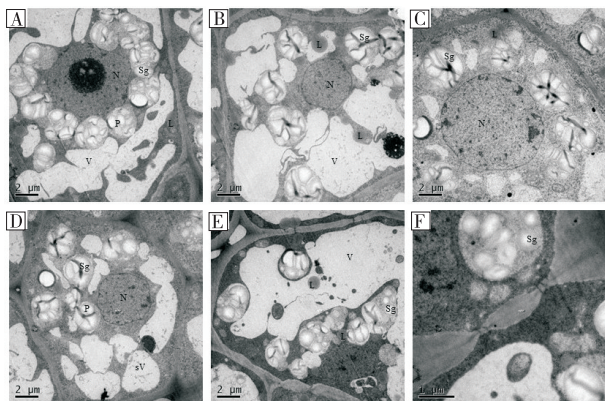


图3 矩镰荚苜蓿地下芽秋未冷适应期幼叶细胞超微结构
Fig. 3 Ultrastructural changes of young leaf cells of underground buds in *Medicago archiducis-nicolai* in late autumn cold adaptation

注:1:细胞核往细胞中央移动,大液泡开始溶解,细胞核内核仁大且清晰,淀粉粒数量多且围在细胞核周围;2:有少量脂滴出现,细胞核仁消失;3:核膜周缘分布少量异染色体;4:质体为卵圆形状或椭圆形状;5:液泡在溶解;6:胞间连丝;L:脂滴。

2.3 矩镰荚苜蓿在初冬冷胁迫期芽幼叶细胞的微结构

矩镰荚苜蓿地下芽幼叶细胞内的大体积液泡基本已经溶解为小体积液泡,且液泡正在内吞细胞器和脂内物质(图4A-F)。细胞核向细胞中央移动,核仁较清晰(图4-A)。质体变形为马蹄状和变形虫状(图4-B),内含少量淀粉。芽幼叶细胞内质膜内陷呈波状,发生质壁分离现象(图4-C),胞间连丝开始变得模糊(图4-F),细胞壁较厚。细胞内有脂滴出现(图4-A)。

2.4 矩镰荚苜蓿在隆冬冻胁迫期芽幼叶细胞超微结构

温度在0~-20℃,矩镰荚苜蓿地下芽幼叶细胞内的大液泡基本均溶解为小体积液泡,小体积液泡数量较多(图5A-F)。细胞核几乎都移动到细胞的正中央,部分细胞核仁消失(图5-B),细胞核中有少量异染色体出现(图5-A,B,C)。矩镰荚苜蓿地下芽幼叶细胞内有大量脂滴出现(图5-C,D)。质体内含有少量淀粉。细胞发生质壁分离,使得胞间连丝被阻断而变得模糊且数量也减少,细胞壁增厚(图5-F)。

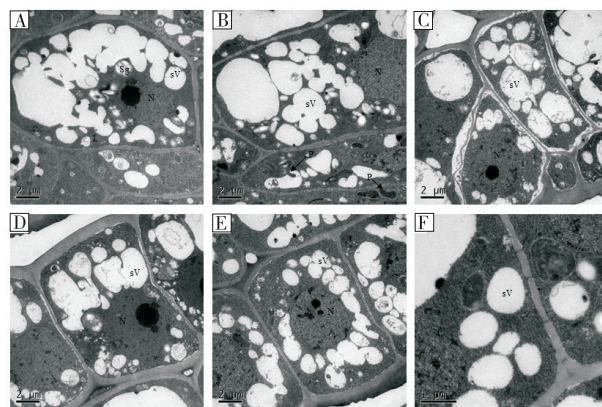


图4 矩镰荚苜蓿地下芽冷胁迫期幼叶细胞超微结构
Fig. 4 Ultrastructural changes of young leaf cells in early winter cold stress stage of underground buds of *Medicago archiducis-nicolai*

注:1:大液泡被分割,细胞核往细胞的中心移动靠近,只有少数淀粉粒出现;2:质体变形为马蹄状和变形虫状(黑色箭头),细胞核仁消失;3:发生质壁分离;4-5:液泡正在吞噬、溶解;6:胞间连丝

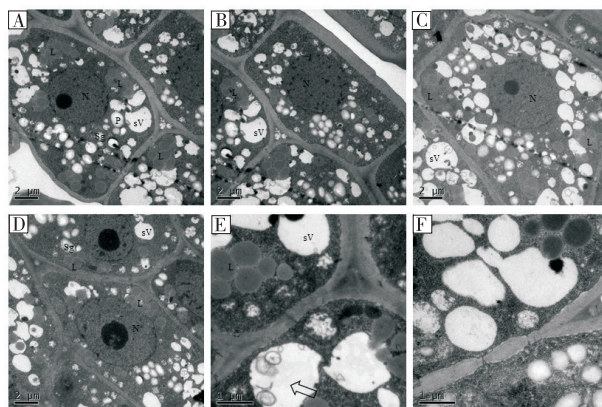


图5 矩镰荚苜蓿地下芽隆冬冻胁迫期幼叶细胞超微结构
Fig. 5 Ultrastructural changes of young leaf cells of *Medicago archiducis-nicolai* underground buds during the early stage of winter freezing stress

注:1:很少有大液泡出现,只有少量的小液泡,细胞核往细胞中央移动,有少量淀粉粒,质体为圆形或椭圆形;2:细胞核中有少量异染色体,细胞内核仁消失;3-4:出现丰富的脂滴细胞器;5:液泡内还有各种小球状的细胞质以及各种细胞器(白色箭头);6:胞间连丝

3 讨论

3.1 矩镰荚苜蓿越冬芽幼叶细胞超微结构对秋冬低温的适应

植物细胞中的水分主要来自液泡,低温环境下,液泡通过减小体积,增大其内密度来减少内部水分,以此来抵御低温环境,一旦液泡结冰受冻将会使整个

植物受冻害^[14]。本研究发现,自然越冬过程中,矩镰茛苳地下芽幼叶细胞内的液泡初始较大且内部透明,随后被分割为小体积的液泡,并且逐步吞入脂内物质和各种细胞器。这与人对其他植物的研究结果相类似,如韩善华等^[15]对冬季沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)叶肉细胞、杨凤仙等^[5]对棉花(*Gossypium* spp.)叶肉细胞的研究均发现,低温环境条件下,植物叶肉细胞内液泡小且含有一些膜状结构的物质,液泡的体积也变小,研究表明,植物细胞在低温环境下,液泡中会出现多膜状结构或小泡,液泡逐渐被分割为小液泡。这种变化可以防止细胞结冰,从而使植物适应低温环境^[5,8]。

质体是有机体细胞中的一种原质体,具有多种形态,会因为外界环境的影响而发生变形,多变为变形虫状、哑铃形状、马蹄形状等^[3]。在自然低温环境中,质体中的淀粉粒随日均气温的降低而减少,起初聚集在细胞核的周围,后期几乎消失,推测分解淀粉粒是质体变形的原因之一^[2]。淀粉粒通过不断分解为可溶性糖,增加细胞质浓度,以此适应低温环境^[16]。本研究发现,矩镰茛苳芽幼叶细胞内的质体在越冬过程中,质体由圆形或椭圆形变形为马蹄形、变形虫状,其质体内的淀粉粒也逐渐减少。这与前人的研究结果相似,如陈旭微^[6]对蚕豆(*Vicia faba*)下胚轴的研究发现,低温胁迫下,蚕豆下胚轴细胞内质体中淀粉粒数量显著下降,且部分质体的形态由圆形变为哑铃型。这表明矩镰茛苳地下芽可能通过分解淀粉粒使质体发生变形来适应冬季寒冷的环境。有研究发现,当质体不再以分裂的方式增加数目时,质体的形状多为圆形或椭圆形^[17]。本研究中,冻胁迫期,部分质体的形状为圆形,这可能是因为矩镰茛苳芽幼叶在该时期处于休眠状态,因而质体停止分裂,数目不再增加,不再分解淀粉,形状也不再发生变化。

脂滴是一种分布广泛、进化高度保守的细胞器,由磷脂单分子层、中性脂核和大量脂滴以及相关蛋白组成^[18]。研究发现,脂滴的出现与活性氧的清除有关,是在低温环境下类囊体降解产物的聚集^[19]。本研究发现,矩镰茛苳地下芽幼叶细胞内均有脂滴的出现,在隆冬冻胁迫期出现的脂滴最多。王丽雪等^[20]和刘艳^[21]等的研究也表明,随着低温的加剧,葡萄(*Vitis vinifera*)和梨(*Pyrus* spp.)枝条细胞出现了大量的脂

滴。已有研究表明,植物在低温胁迫下出现大量脂滴可能是为了适应其低温的环境^[22-23]。本研究中,随着日均气温的逐渐降低,矩镰茛苳地下芽幼叶细胞内出现了大量的脂滴,这可能是该植物对低温环境的一种积极的适应性行为。

3.2 矩镰茛苳越冬芽越冬期抗寒性的变化

上述分析表明,秋末冷适应期低温环境中,越冬芽细胞内的液泡、质体、细胞核与脂滴的数量与功能经过积极的适应性变化,逐步增强了矩镰茛苳的抗寒性。到初冬冷胁迫期和隆冬冻胁迫期,随着气温的逐渐降低,矩镰茛苳地下芽幼叶细胞发生了质壁分离现象,致使胞间连丝的数量减少且逐渐变得模糊(图4-3,图5-6)。大量研究表明,低温胁迫下,植物会发生质壁分离的现象,使得胞间连丝发生阻断或断连,从而产生共质体分区,使植物体的整体连丝网络被破坏,体内的物质运输和信息传递受阻,甚至完全中断,使植物的生长减弱甚至停止,植物体进入暂时性的休眠,从而提高植物体对逆境的抗性^[24]。据此分析,通过前期的低温锻炼,到严冬时期矩镰茛苳越冬芽细胞内的生理活动已经减弱至极低点,并通过进入休眠状态来适应寒冷的冬季。

4 结论

自然越冬过程中,矩镰茛苳地下芽幼叶细胞的各种细胞器的结构与功能发生了相应的变化。随低温的加剧,芽幼叶细胞内质体变形,质体内淀粉粒不断降解,大体积液泡几乎消失,小液泡不断的吞入脂内物质和各种细胞器。脂滴细胞器数量不断增加,细胞发生质壁分离,胞间连丝逐渐变模糊甚至发生断连。该植物地下芽通过细胞器结构的变化,使得自身进入休眠状态,进而抵御寒冷胁迫,安全越冬。

参考文献:

- [1] 简令成. 生物膜与植物寒害和抗寒性的关系[J]. 植物学通报, 1983(1): 19-25.
- [2] 简令成, 王红. 逆境植物细胞生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 140-143.
- [3] 汪堃仁, 薛绍白, 柳惠图. 细胞生物学(第二版)[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 2002: 685-689.
- [4] 胡翠翠, 路雄, 王虹. 冰川两种藓在超低温胁迫与恢复生长状态下叶肉细胞的超微结构[J]. 广西植物, 2020. 40

- (11):1653—1660.
- [5] 陈旭微. 低温胁迫对绿豆和蚕豆下胚轴及子叶抗寒生理特性研究[D]. 杭州:浙江大学,2004.
- [6] 杜艳. 喻方圆. 甘习华. 等. 低温胁迫下两种七叶树苗木超微结构的比较[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2007(3):111—114.
- [7] 方强恩. 张勃. 李宇泊. 等. 紫花苜蓿根颈芽越冬期间幼叶细胞超微结构的适应性变化[J]. 草业学报, 2016. 25(3):96—107.
- [8] 葛秀秀. 房克凤. 郝强. 等. 北方四种卫矛属常绿阔叶植物叶肉细胞超微结构在冬季的适应性变化[J]. 电子显微学报, 2010. 29(2):167—172.
- [9] 李玉玲. 青藏扁蓿豆根瘤菌接种效果试验[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2007(4):5—6.
- [10] 王英芳. 张业猛. 刘德梅. 等. 基于转录组测序的青藏扁蓿豆 EST—SSR 标记开发与验证[J]. 草业科学, 2020. 37(4):718—727.
- [11] 李玉玲. 徐成体. 不同处理方法对青藏扁蓿豆种子发芽率的影响[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2007(3):20—21.
- [12] 李玉玲. 西宁地区青藏扁蓿豆地上生物量观察研究[J]. 草业与畜牧. 2007(9):16—17.
- [13] 吴小培. 沈迎芳. 王海庆. 基于 trnL-trnF 序列的扁蓿豆和青藏扁蓿豆遗传多样性及其群体遗传结构分析[J]. 草业科学, 2016, 33(6):1136—1146.
- [14] 侯燕平. 牛吉山. 杨煜升. 珍珠梅顶芽抗寒机理的超微结构研究[J]. 山西农业大学学报, 1998(1):65—66.
- [15] 韩善华. 王双. 高度抗寒植物冬季线粒体的电镜观察[J]. 西北植物学报, 2000. 20(4):539—543.
- [16] Jian L C. Deng J M. Li P H. Seasonal alteration of the cytosolic and nuclear Ca^{2+} concentration in over-wintering woody and herbaceous perennials in relation to the development of dormancy and cold hardiness[J]. Journal of the American society for Horticultural Science. 2003. 128(1):29—35.
- [17] 杨涛. 陈德海. 吴荔萍. 安祖花组织培养及其细胞的叶绿体发育过程的电镜观察[J]. 亚热带植物通讯, 1998, 27(1):1—7.
- [18] Meyers A. Weiskittel T M. Dalhaimer P. Lipid Droplets: Formation to Breakdown[J]. Lipids. 2017. 52(6):1—11.
- [19] 吴学明. 青藏高原篇蓄、车前叶绿体超微结构研究[J]. 西北植物学报, 1997, 17(4):551—555.
- [20] 王丽雪. 李荣富. 马兰青. 等. 葡萄枝条中淀粉、还原糖及脂类物质变化与抗寒性的关系[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1994(4):1—7.
- [21] 刘艳. 赵虎成. 李雄. 等. 梨枝条中淀粉、还原糖及脂类物质动态变化与抗寒性的关系[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2002(1):57—60.
- [22] 白志英. 李存东. 屈平. 干旱胁迫对小麦中国春—Synthetic6x 代换系叶片超微结构的影响[J]. 电子显微学报, 2009, 28(1):68—72.
- [23] 刘卫国. 丁俊祥. 邹杰. 等. NaCl 对齿肋赤藓叶肉细胞超微结构的影响[J]. 生态学报, 2016. 36(12):3556—3563.
- [24] 周蕴薇. 低温锻炼和低温胁迫期间翠南报春叶肉细胞超微结构的适应变化[J]. 植物生理学通讯, 2007(2):255—2.

Adaptive changes in the young leaf cell ultrastructure of underground-buds in *Medicago archiducis-nicolai* during overwintering

YANG Xiao-xia, FANG Qiang'en*, ZHANG Bo, ZHANG Jin-qing

(College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Key Laboratory of Grassland Ecosystem, Ministry Of Education, Sino-U. S. Center for Grassland Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China)

Abstract: To explore the ultrastructure changes of underground-buds in *Medicago archiducis-nicolai* during over wintering, young leaf cells of underground buds in *M. archiducis-nicolai* was investigated by transmission electron microscopy (TEM). The results showed that in order to adapt to cold environment, there were a series of changes in cell ultrastructure. The large volume vacuoles in the cell were decomposed into small vacuoles, which was

constantly dissolved and phagocytized. The plastids changed from round and oval to horseshoe and amoeba, and the starch grains were decreased or even disappeared. The number of lipid droplet organelles increased. Due to the separation of plasma wall in cells, plasmodesmata was disconnected and gradually blurred or even disappeared. In conclusion, the results suggest that the change of the organelle structure of young leaf cells of underground buds in *M. archiducis-nicolai* makes it enter the dormant state, which could help with the resist to the cold stress.

Key words: *Medicago archiducis-nicolai*; underground bud; ultrastructure; cold hardiness

(上接 43 页)

The accuracy of artificial grassland coverage measurement of photo line interception method

WANG Huan-huan¹, PU Hong-mei¹, YANG Qin¹, CHENG Hua², PENG Jing³,
LI Zhong-cai³, HAN Min^{3*}, JIN Bao-cheng^{1*}

(1. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 3. Guizhou Institute of Natural Resources Survey and Planning, Guiyang 550001, China)

Abstract: Grassland coverage is the percentage of vertical projection area of plants in the total area of sample land. It is an objective index and serves as an important ecological parameter that is used to evaluate vegetation. An ideal method to measure the grassland coverage should be quick, requires few tools and must be accurate. In this study, the traditional field line interception method was applied to sample photo analyses, and the photo line interception method used to measure the grassland coverage was assessed. The grass coverage was measured by taking quadrat photos in the field followed by using the virtual scale in the computer as the line interception. Three types of artificial grassland, including *Zoysia japonica*, *Trifolium repens* and *Paspalum thunbergii*, were used as the research objects. The photographic method was used as the reference, the accuracy of the measurement and the applicability of photo line interception method were analyzed by comparing the visual estimation of the field, visual estimation of the photos and the field line interception method. The results showed that the measurement errors of the field visual estimation, photo—visual estimation and field line interception method were 5.6%, 14.6% and 2.7%, respectively. It took approximately 3.5 minutes to measure the field for each 50 cm × 50 cm grass quadrat using the field line interception method. The average measurement error of the photo line interception method was 3.3%; the measurement error of different grasslands was <5%, and it took approximately 3.7 minutes to measure each 50 cm × 50 cm grass quadrat indoors. The increase of the number of interception lines did not significantly improve the accuracy of measurement. When the number of interception lines increased from 2 (a total of 1.4 m) to 4 (a total of 2.4 m), the error was reduced by only 0.1%, but the time taken was almost doubled (3.5 minutes). The photo line interception method showed to be time-saving with a high degree of precision. Therefore, the photo line interception method with two interception lines is recommended to be used as a similar grass cover measurement method.

Key words: grassland; photo line interception method; photographic method; grassland coverage