

细胞骨架抑制剂对玉米雄性不育 细胞质粘滞度的影响*

王立安** 马春红 闫芝芬 魏建昆

(河北省农林科学院农业物理生理生化研究所, 石家庄 050051)

摘 要 用细胞骨架抑制剂秋水仙素(colchicine)、细胞松弛素 B(cytochalasin B, CB) 处理玉米同核异质体芽鞘, 可使其细胞质的粘滞度下降, 说明细胞质粘滞度与由微管、微丝等构成的细胞骨架密切相关; 同核异质体四种细胞质粘滞度的强弱顺序为 $N > S > C > T$, 在相同条件下, 使粘滞度下降到同一程度所需的抑制剂浓度也为 $N > S > C > T$, 说明粘滞度越大, 细胞骨架受到抑制剂影响的程度越轻。造成同核异质体四种细胞质粘滞度存在明显差异的原因可能与其细胞骨架的特异性密切相关。

关键词 芽鞘 粘滞度 微管 微丝 细胞骨架 细胞质雄性不育

玉米细胞质雄性不育(CMS)可划分为 S、C、T 三大类群, 它们是生产上配制杂交种的重要种质资源。粘滞度是用来反映细胞原生质特性的重要理化参数, 粘滞度的大小可用在离心条件下叶绿体位移百分率来表示^[6]。魏建昆等在研究 CMS 玉米细胞质理化参数时证明, 细胞质粘滞度、溶质势、基质浓度(O_g 值)、胞质环流、膜水透性、膜稳定性等可作为衡量细胞质质量优劣的指标, 正常细胞质(N)与同核异质的 CMS-S、C、T 相比有显著差异, 质量优劣的顺序为 $N > S > C > T$, 这与不同细胞质具不同抗旱能力及在生产上 T、C 细胞质先后受小斑病菌生理小种专化侵害的事实相吻合。CMS 细胞质的粘滞度与其叶片抗脱水性、抗病能力相关, 并指出粘滞度与细胞质内的大分子有关^[6], 但未阐明这种大分子的理化本质。Mansour-MMF 等发现细胞质粘滞度与小麦、大麦的抗盐性有关, 高耐盐品种具较高的粘滞度^[10, 11]。Griffith 等在研究动物细胞纯化的微丝(MF)和微管(MT)之间的相互关系时发现, 微管和微丝的混合物粘滞度较低, 接近纯微管或微丝的值, 但在加入微管结合蛋白(MAPs)后, 混合物的粘滞度显著高于各自的粘滞度; MAPs 可使微丝的粘滞度有大的增加。电镜观察显示微管微丝之间靠 MAPs 相连, MAPs 控制混合物的高粘滞度^[8]。由此可看出粘滞度与动物细胞骨架有关。现已证明, 在植物细胞中普遍存在由 MT、MF 和 MAPs 构成的细胞骨架网络系统, 它参与植物生命活动的许多过程, 包括有丝分裂、细胞运动、对细胞质的组织、细胞器在胞内的运动、排布及细胞形态的维持等。本研究旨在找出 CMS 玉米细胞质粘滞度的理化本质, 揭示玉米同核异质体四种细胞

1996-12-09 收稿。

* 河北省自然科学基金资助项目。

** 现在河北师范大学生物系工作。

质(T、C、S、N)之间粘滞度存在明显差异的机理, 阐明细胞骨架、原生质特性与抗性之间的相互关系, 并为揭示 CMS 细胞质专化性病害的机理及植物耐盐、抗旱等抗逆机理提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

两种基因型 B₇₃ 与 C₁₀₃ 的同核异质体玉米, 包括 T、C、S、N 四种细胞质类型由本室提供。细胞松弛素 B 由 Sigma 公司生产, 秋水仙素由 Serva 公司生产。

1.2 方法

玉米芽鞘获得方法: 将玉米种子用 0.1% 升汞消毒 5min, 洗净后用自来水浸泡 24h 过夜, 于铺有湿滤纸的培养皿中 27℃ 培养, 生根后移到光照培养箱中, 三叶期幼苗芽鞘供实验用。

药物配制: CB 用 pH=6.8 的 0.2M 的 HEPES 缓冲液配制, 内含 1% 的二甲基亚砜(DMSO); 秋水仙素用 pH=6.8 的 0.2M 磷酸盐缓冲液配制。配制浓度详见图 1、图 2。

处理方法: 将芽鞘直接浸泡于药液中, 于 27℃ 保温 1h。

粘滞度测量: 采用离心条件下观测芽鞘细胞叶绿体位移率的方法, 具体方法和叶绿体位移标准参照《植物细胞原生质研究方法》^[6]。

2 结果与分析

用一系列不同浓度的 CB、秋水仙素按上述方法分别处理两种基因型的玉米同核异质体, 即 B₇₃N (正常细胞质) 及同核的 CMS-S、C、T; C₁₀₃N 和同核的 CMS-S、C、T。在显微镜下用直接观察和显微照相相结合的方法, 记录处理后叶绿体的位移率, 将两种基因型的观测数据进行平均处理(见图 1 与图 2)。

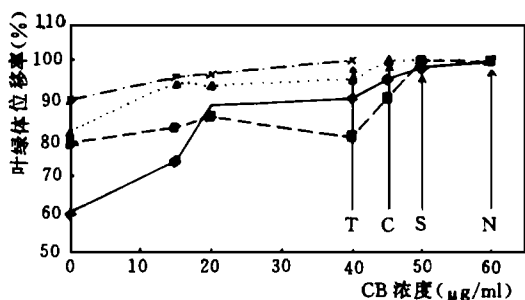


图 1 CB 对玉米四种细胞质粘滞度的影响

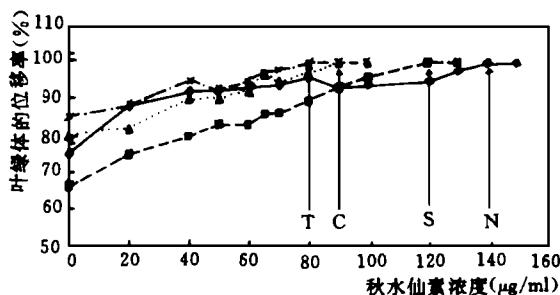


图 2 秋水仙素对玉米四种细胞质粘滞度的影响

图 1 说明不同浓度的 CB 处理玉米芽鞘 1h, 于 2000r/min 离心 5min 后, 同核异质体玉米细胞内叶绿体位移率达 100% 所需的 CB 浓度分别为: 正常细胞质(N) 为 60μg/ml; CMS-S 为 50μg/ml; CMS-C 为 45μg/ml; CMS-T 为 40μg/ml。图 2 表明不同浓度的秋水仙素处理芽鞘 1h 后, 于 2000r/min 离心 5min 后, 同核异质体玉米细胞质叶绿体位移率达 100% 所需的秋水仙素的浓度依次为: N 为 140μg/ml; S 为 120μg/ml; C 为 90μg/ml; T 为 80μg/ml。

本实验用 CB 或秋水仙素处理玉米芽鞘细胞后, 只需离心 5min, 四种细胞质即可实现叶绿体 100% 位移。两种试剂所需浓度如上所述, 皆呈 $N > S > C > T$ 。在正常情况下实现叶绿体位移率达 95% 以上所需的时间分别是 N 为 31min, S 为 17min, C 为 15min, T 为 12min^[6], 表明四种细胞质粘滞度的强弱为 $N > S > C > T$ 。由此可见, 处理与对照呈相同趋势, 即 N 细胞质的粘滞度最强, 叶绿体位移所需的时间最长, 经药物处理所需的剂量最大, 受抑制剂的影响程度最轻; 随后为 S 细胞质、C 细胞质与 T 细胞质。尽管四种细胞质的粘滞度有大有小, 且差异显著, 但均受 CB 或秋水仙素的作用而急剧下降。

Kersey 将扫描与透射电镜结合起来曾观察到藻类细胞中肌动蛋白和叶绿体之间直接相连, 即微丝束和叶绿体面向流动的内质一面结合, 平均 4~6 条微丝束与一系列叶绿体相结合^[7]。高志强等用光镜也曾直接观察到转板藻细胞叶绿体端部有刷样丝束结构, 并证明这种结构就是微丝^[8]。高等植物中虽缺乏直接证据, 但已有证据显示细胞骨架参与细胞器及亚细胞器在空间的分布, 叶绿体在原生质体内的分布和运动与微管、微丝有关。光照下叶绿体的向光运动是由肌动蛋白聚合成微丝过程中产生的动力带动的^[9,3]。因此用微丝的特异解聚剂 CB 作用于细胞, 直接造成叶绿体在离心条件下发生位移时所受来自微丝的阻力变小, 达 100% 位移率的时间必然缩短, 本实验获得证实。

在研究过程中发现, CB 对细胞骨架的作用要比秋水仙素灵敏得多。这和 L. C. Morejohn (1987) 的研究结果一致。他曾对比分析过动物、植物微管蛋白在体外对秋水仙素的亲和系数, 发现秋水仙素对植物微管的亲和力是动物的 1/1000, 秋水仙素并不是植物微管的有效解聚剂。但本实验证明在较高浓度条件下, 秋水仙素仍然对细胞骨架的微管具有破坏作用, 且微管遭破坏后, 离心条件下叶绿体实现 100% 位移率所需的时间缩短, 即细胞质粘滞度下降。

文献记载 CB 破坏微丝的有效浓度一般在 20~30 μ g/ml, 这些文献多用藻类细胞或其它单细胞做为研究材料, CB 很容易进入细胞; 本实验采用芽鞘做为研究材料, 低浓度 CB 处理效果不明显, 可能因为低浓度下 CB 进入植物组织或器官(芽鞘)比较困难, 所以本实验采用了较高的浓度和较长的处理时间, 把用药物处理后的材料用对应的缓冲液浸泡洗涤 1h, 芽鞘细胞仍可恢复生活状态, 表明药物没有将芽鞘毒害致死。

研究中还发现, 经 CB 和秋水仙素处理之后的细胞质叶绿体实现 100% 位移率时, 叶绿体的排布状态有明显差别, CB 作用后叶绿体紧密聚集在一起, 呈“凝集”状态, 胞质环流停止, 同时有许多微小的颗粒随叶绿体一起下沉; 秋水仙素处理后叶绿体则表现为“聚集”, 松散堆在一起。这似乎说明粘滞度与微丝关系更大。

已知 CB 通过与 MF 的正端进行特异结合, 阻碍 MF 延伸, 破坏 MF 形成; 秋水仙素通过和微管蛋白形成的二聚体进行特异结合, 阻止二聚体进一步聚合成 MT。既然两者均专一破坏细胞骨架系统, 并导致细胞质的粘滞度下降, 说明玉米细胞质的粘滞度与细胞骨架密切相关, 与粘滞度相关的胞内大分子可能是肌动蛋白、微管蛋白及与之相关的结合蛋白(MAPs)等。

3 讨论

细胞骨架的知识, 已经并正在深化和更新着人们对细胞结构和功能的概念。细胞骨架不仅仅是活细胞的支撑结构, 决定细胞的形状, 赋予其强度, 而且是对各细胞器乃至某些大分子聚

合体如膜蛋白、膜受体、RNA 等进行空间组织安排的统一基质^[12], 是能量转换的主要场所。从细胞骨架的最新功能看, 它可能做为一种新的信号传递系统, 起着从细胞膜, 通过细胞质到核传导某些信息的作用, 并参与核对整个细胞生命活动的调节过程。目前已有一些证据: MT 至少是部分的解聚, 是 DNA 合成启动的必要条件; MT 的破坏可抑制多种生长因子所诱导的 DNA 合成的启动; 细胞表面的受体紧密连在细胞骨架纤维上; 破坏细胞骨架纤维可推迟小泡与溶酶体的融合; 某些生长因子在调节细胞的生长和繁殖时, 早期事件之一就是引起细胞骨架的强烈变化^[1]。虽然这些证据主要来自动物细胞, 但可以肯定植物细胞骨架参与了植物细胞对外界刺激如病害侵染、创伤、脱水等做出反应的过程。

本实验证实粘滞度受细胞骨架抑制剂的影响而下降, 而我们前期的工作^[6]把粘滞度作为细胞质质量的重要参数之一, 发现它与不育胞质的抗病性密切相关, 从而可以推断雄性不育胞质的抗病过程可能有细胞骨架的参与; 同理可推断, 植物耐盐、抗旱等过程也有细胞骨架的参与。我们前期的工作还发现 C 毒素和 T 毒素可分别降低 C 细胞质和 T 细胞质的粘滞度^[13], C 毒素和 T 毒素对细胞骨架有无作用是我们正在研究的课题, 如有作用则可直接说明雄性不育胞质的专化感病过程有细胞骨架的参与, 为揭示 CMS 专化性病害机理提供了新思路。

高等植物细胞质中肌动蛋白基因属多基因家族, 基因拷贝数从三到数十个不等, 肌动蛋白在高等植物中的表达具组织和器官特异性^[9]。因此, 玉米同核异质体四种细胞质之间肌动蛋白的表达必然存在特异性, 细胞骨架存在一定差异, 也许这就是造成同核异质的玉米四种细胞质粘滞度存在明显差异的重要原因。

鸣谢 河北师范大学生物系 96 届毕业生王曙光、李志勇参加了部分实验工作, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- 1 王昆仁, 薛绍白主编. 细胞生物学. 北京: 北京师范大学出版社, 1990, 202 ~ 270
- 2 刘雄, 阎隆飞. 植物细胞器的运动. 植物生理学通讯, 1994, 30(5): 321 ~ 326
- 3 陈梓卿. 植物微管. 植物生理学通讯, 1987, (4): 7 ~ 16
- 4 高志强. CaM 抑制剂对转板藻细胞骨架的影响. 植物生理学通讯, 1989, (3): 25 ~ 28
- 5 魏建昆等编译. 植物细胞原生质研究方法. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1991, 259 ~ 269
- 6 Wei JK, Liu KM, Deng LY, et al. Protoplasmic parameters of *Zea mays* with normal and male sterile cytoplasm. *Physiol and Molec Plant Path*, 1989, 35: 543 ~ 553
- 7 Kersey YM. Localization of actin filaments in internodal cells of Characean algae. *J Cell Biol*, 1976, 68: 264
- 8 Griffith LM and Pollard TD. Evidence for actin filament-microtubule interaction mediated by microtubule-associated proteins. *J Cell Biology Rapid Communication*, 1978: 958 ~ 965
- 9 Meagher RB, McLean BG. Diversity of plant actins. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 1990, 16: 164 ~ 166
- 10 Mansour-MMF, Lee-Stadelmann-OK, Stadelmann-EJ. Solute potential and cytoplasmic viscosity in *Triticum* and *Hordeum vulgare* under salt stress. *J Plant Physiol*, 1993, 142(5): 623 ~ 628
- 11 Mansour-MMF, Stadelmann-EJ. NaCl-induced changes in protoplasmic characteristic of *Hordeum vulgare* cultivars differing in salt tolerance. *Physiologia-Plantarum*, 1994, 91(3): 389 ~ 394
- 12 Stankovic B, Abe S and Davies E. Co-localization of ploysomes, cytoskeleton, and membranes with protein bodies from corn endosperm. *Protoplasma*, 1993, 177: 66 ~ 72
- 13 Wei JK, Liu KM, Chen JP, et al. Pathological and physiological identification of race C of *Bipolaris maydis* in China. *Phytopathology*, 1988, 78: 550 ~ 554

Effects of Cytoskeleton Inhibitor on Viscosity of Male Sterile Cytoplasm in *Zea mays* L.

Wang Lian Ma Chunhong Yan Zhifen Wei Jiankun

(Agrophysics, Plant Physiology and Biochemistry Institute,
Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051)

Abstract That cytoskeleton inhibitors colchicine and cytochalasin B were used to treat the coleoptile of maize homokaryotic heteroplasmon could make the viscosity of the cytoplasm decrease. It was found that cytoplasmic viscosity was closely related to cytoskeleton composed of microtubule and microfilament. Four kinds of cytoplasmic viscosity of homokaryotic heteroplasmon were arranged to be $N > S > C > T$ in big and small order. In the same conditions, concentration of inhibitor which were used to reduce the viscosity to the same level was also $N > S > C > T$, indicating that the bigger the viscosity was, the lighter the cytoskeleton was affected by inhibitor. The reason of different cytoplasmic viscosity could be correlated with the specific characteristics of cytoskeleton.

Key words: Coleoptile; Viscosity; Microtubule (MT); Microfilament (MF); Cytoskeleton; Cytoplasmic male sterility (CMS)