

# TMV 侵染番茄引起的细胞结构变化及细胞程序化死亡

刘文娜<sup>1</sup> 汪矛<sup>1</sup> 孔令安<sup>1</sup> 李重九<sup>2</sup>

(1. 中国农业大学 生物学院,北京 100094; 2. 中国农业大学 理学院,北京 100094)

**摘要** 为研究植物系统反应过程中出现的细胞程序化死亡(PCD)现象,用烟草花叶病毒(TMV)接种番茄叶片,光镜和电镜观察到茎尖顶端细胞出现 PCD 特征:线粒体嵴数目减少直至双层膜破毁、前质体基粒扭曲变形、细胞核畸形、核染色质浓缩并边缘化、细胞质和液泡中出现大量环状片层及酚类物质、多泡体出现、细胞壁膨胀扭曲、叶肉细胞的叶绿体基粒和基质片层结构破坏。试验表明:TMV 侵染番茄引起的系统反应过程中有 PCD 发生;茎尖细胞发生的 PCD 现象类似于动物细胞中细胞质的细胞死亡。

**关键词** 烟草花叶病毒;系统反应;番茄;PCD

**中图分类号** Q 942.4;S 432.41

**文章编号** 1007-4333(2003)03-0019-05

**文献标识码** A

## Ultra-structural changes of tomato cells induced by TMV and PCD

Liu Wenna<sup>1</sup>, Wang Mao<sup>1</sup>, Kong Ling'an<sup>1</sup>, Li Chongjiu<sup>2</sup>

(1. College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract** To investigate the involvement of Programmed Cell Death (PCD) in systemic response, tomato cells infected with TMV were studied. After inoculation with TMV on tomato leaves, the structure of shoot tip and leaf cells were studied with light and transmission electron microscope. The results showed that shoot tip cells appeared characteristics of programmed cell death (PCD): fewer cristae and broken double-layer membrane of mitochondria, distorted proplastid grana lamellae, abnormal nuclei, condensed chromatin, abundant annulate lamellae and phenolics, multi-vesicle-bodies and swollen cell wall were observed in top cells. In addition, the structure of grana and stroma lamellae of chloroplast were disrupted in mesophyll cells. These results demonstrated that PCD was involved in the progress of systemic response, and the form of PCD in shoot tip cells might be similar to cytoplasmic cell death in animal cells.

**Key words** TMV; systemic response; tomato; PCD

细胞程序化死亡(programmed cell death, PCD)是一种基因调控、主动、有序的细胞死亡过程,它普遍存在于动植物体整个生命活动中<sup>[1,2]</sup>。许多研究发现在植物生长发育过程(如管状分子的分化、糊粉层细胞退化及胚乳细胞衰退等<sup>[3~6]</sup>)和抗病反应<sup>[7]</sup>中伴随着 PCD 发生,此外胁迫因子也可诱导 PCD 发生<sup>[8]</sup>。其中病原物与寄主植物互作引起的 PCD 现象是近年来 PCD 和植物抗病研究的热点话题之一<sup>[9,10]</sup>。在植物抗病反应中,植物与病原物互作引发的过敏反应(HR)中的 PCD 现象研究较多<sup>[11~13]</sup>;与 HR 相比,系统反应过程中的 PCD 研究较少。系统反应是病原物引起植株全身而非局部的一种反应,因此对系统反应引发植株某部位细胞特别是茎尖顶端细胞的 PCD 研究罕见。本试验通过研究

TMV 侵染番茄过程中植株茎尖和叶片的细胞结构变化与 PCD 发生,探讨 TMV 侵染对番茄植株生长的影响以及系统反应与 PCD 之间的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

烟草花叶病毒(TMV)和番茄(佳粉二号),由中国农业大学理学院李重九老师提供。番茄植株温室培养,在二、三真叶期于第二片真叶上摩擦接种 TMV,接种后 30、60 和 90 d 分别取茎尖和上部未接种叶片作试验材料。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 光镜制片** FAA 固定后,系列浓度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡、包埋、切片、染色、封片,Olym-

收稿日期:2003-02-24

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970501)

作者简介:刘文娜,硕士研究生;汪矛,教授,博士生导师,主要从事发育植物学研究

pusBH2 显微镜观察并照相。

**1.2.2 电镜制片** 5%戊二醛固定后,1%锇酸后固定,系列浓度丙酮脱水,Spurr树脂浸透、包埋,瑞典LKB型超薄切片机切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色,日立H7500型透射电镜观察并照相。

## 2 结果

### 2.1 茎尖细胞结构的变化

健康植株(CK)的茎尖顶端细胞光镜下观察:细胞核大,细胞质浓,核内染色质均匀分散;感病植株(TMV)茎尖顶端细胞的核内染色质聚集在核膜边缘(图1-1~3)。电镜观察:健康植株茎尖顶端细胞的核染色质均匀分散;线粒体、前质体、内质网结构完整且发育正常(图1-4,5)。接种后30和60d,感病植株茎尖顶端细胞中未发现病毒粒子,少数细胞出现PCD症状:核染色质聚集并趋于核膜边缘,细胞核畸形(图1-6,7),线粒体的嵴减少,但双层膜完整(图1-8),前质体基粒扭曲变形,液泡体积增大且液泡内出现酚类物质,细胞质和液泡内出现环状片层;接种后90d,感病植株茎尖原套细胞的细胞质和液泡内出现大面积的病毒粒子群(图2-19),大多数茎尖细胞出现PCD症状,核染色质明显浓缩聚集在核膜边缘,线粒体嵴大量减少呈空洞状,部分双层膜出现破毁(图1-9),前质体基粒扭曲变形且出现大量的黑色嗜锇颗粒(图1-10,11),液泡化程度明显增强且酚类物质增多(图1-12),大量环状片层出现(图2-13,14),细胞壁膨胀扭曲或断裂,细胞中出现多泡体(图2-15)。

### 2.2 叶肉细胞结构的变化

光镜观察发现健康植株叶片的栅栏组织细胞排列整齐,其细胞内叶绿体数目较多,海绵组织细胞均匀分布(图2-20)。感病植株随着感病时间的延长,叶片叶肉细胞的叶绿体破坏的数量增多且程度加重。接种后90d,感病植株叶片栅栏组织细胞畸形,且沿其长轴方向缩短;海绵组织细胞平行于表皮方向横向拉长,并有垛叠的趋势;叶绿体数量减少(图2-21)。电镜观察发现健康植株叶肉细胞的叶绿体基粒与基质片层排列整齐,且平行于叶绿体长轴方向,被膜完整;线粒体双层膜完整,嵴丰富,基质电子密度大(图2-16);感病植株叶肉细胞的叶绿体呈现不同程度的变化,有的叶绿体基粒扭曲且基质片层结成网状,但被膜完整;有的叶绿体基粒和基质片层瓦解,部分被膜降解;有的叶绿体则全部解体(图2-17,18)。

## 3 讨论

### 3.1 TMV侵染番茄引起的系统反应中有PCD发生

在植物抗病机制研究中,过敏反应过程中发生的PCD已被大家所承认,植株以局部的细胞死亡来阻止病毒的进一步扩散,且线粒体内的变化与HR相连的PCD有关<sup>[11~13]</sup>。本试验电镜观察发现,接种后30和60d茎尖顶端细胞中没有发现病毒粒子,少数细胞出现PCD现象,线粒体嵴数目减少,但双层膜完整;接种后90d大面积的病毒粒子群在茎尖原套细胞的细胞质和液泡中分布,大多数细胞出现PCD现象,线粒体呈空洞状且双层膜出现破毁。因此,本实验认为TMV侵染番茄引起的系统反应和HR一样,也存在PCD现象,线粒体结构的破坏与PCD发生有关。感病30和60d,病毒未到达茎尖顶端细胞时出现的PCD现象可能是植物体内信息传递所致;感病90d,植株生长势减弱,病毒的侵入进一步加剧了茎尖细胞程序化死亡这一趋势。

### 3.2 TMV侵染番茄引起的茎尖细胞PCD类似于动物细胞细胞质的细胞死亡

Gunawardena等<sup>[14]</sup>指出动物细胞中的PCD现象,根据细胞降解的顺序不同分为细胞凋亡(apoptosis)和细胞质的细胞死亡(cytoplasmic cell death)。细胞凋亡在初期染色质浓缩在核边缘,膜膨胀,胞质浓缩,完整细胞器可保留到细胞死亡的后期;细胞质的细胞死亡,核初期没有变化,但随着大型自噬泡的形成,细胞质发生很大的变化。后期细胞器被吸收,核染色质浓缩并且DNA片段化。王大勇等<sup>[15]</sup>发现类Fas蛋白介导的胞质死亡途径可能参与植物细胞中的PCD。本试验电镜观察发现接种后30和60d,茎尖顶端细胞的线粒体和前质体已发生明显变化,但细胞核染色质没有呈现明显的边缘化现象;而接种后90d,茎尖顶端细胞的细胞核染色质则出现显著的浓缩并边缘化现象,且线粒体和前质体破坏程度加重。因此推测本试验中茎尖细胞的PCD可能类似于动物细胞中细胞质的细胞死亡。

此外,许多研究发现PCD是植物抗病性的一种表现<sup>[11~13]</sup>。本试验发现番茄感染病毒后的系统反应过程中有PCD发生,推测PCD的产生与植株抗病性有关;同时发现细胞中出现大量的酚类物质,酚类物质被认为与寄主本身抗性有关<sup>[16]</sup>。那么究竟是PCD、还是酚类物质或其它因子起主要的抗病作用,由于系统反应过程中寄主与病毒互作的复杂性,还有待于进一步研究。

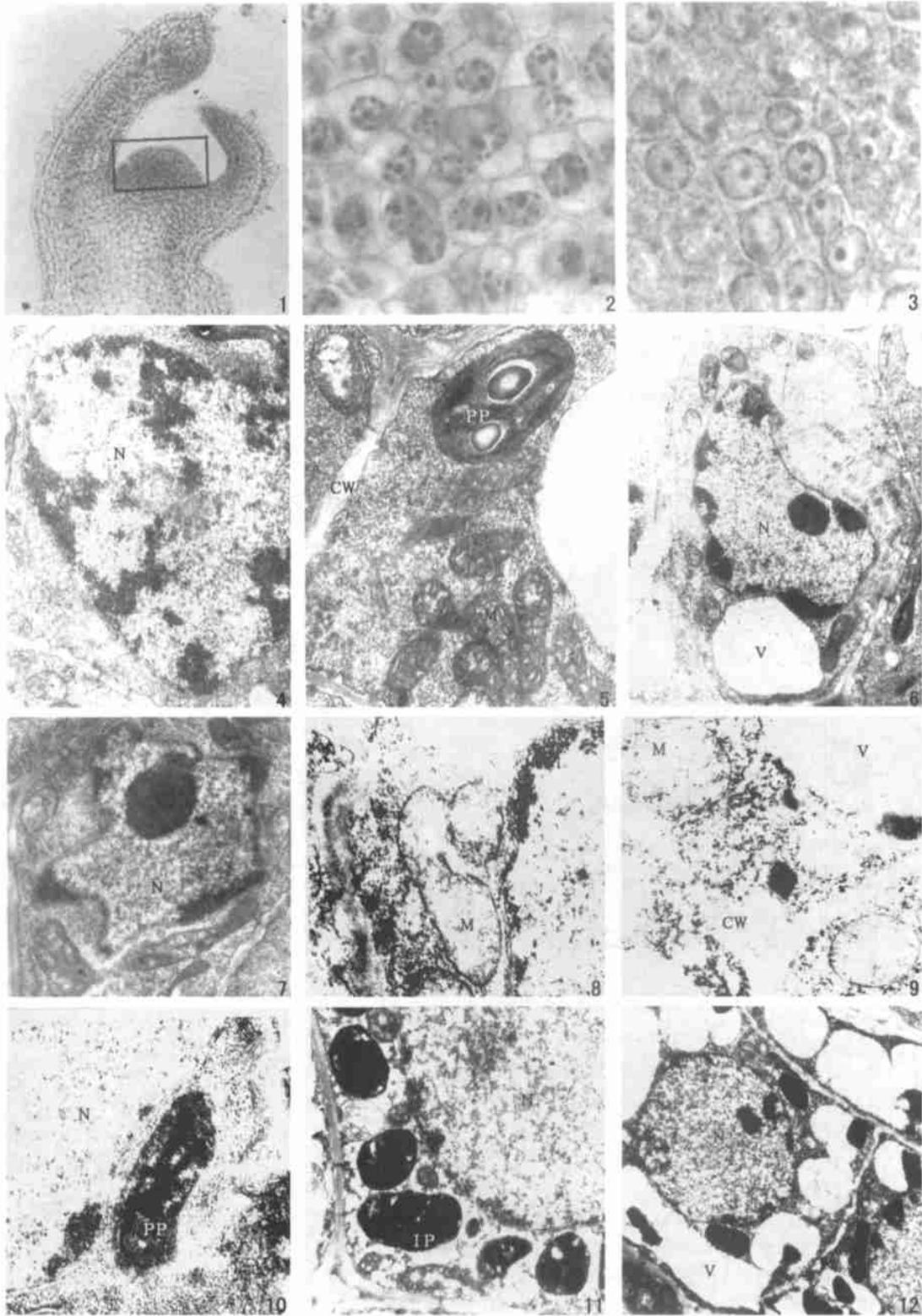


图 1 TMV 侵染番茄引起的细胞结构变化及细胞程序化死亡 (1 ~ 12)

Fig. 1 Ultra-structural changes of tomato cells induced by TMV and PCD(1 ~ 12)

N:细胞核; CW:细胞壁; M:线粒体; PP:前质体; V:液泡; AL:环状片层; MVB:多泡体

- 1. 植株茎尖端取材部位(方框内为超薄切片位点, ×10);
- 2. 健康植株茎尖端细胞的横切面(示染色质均匀分散, ×100);

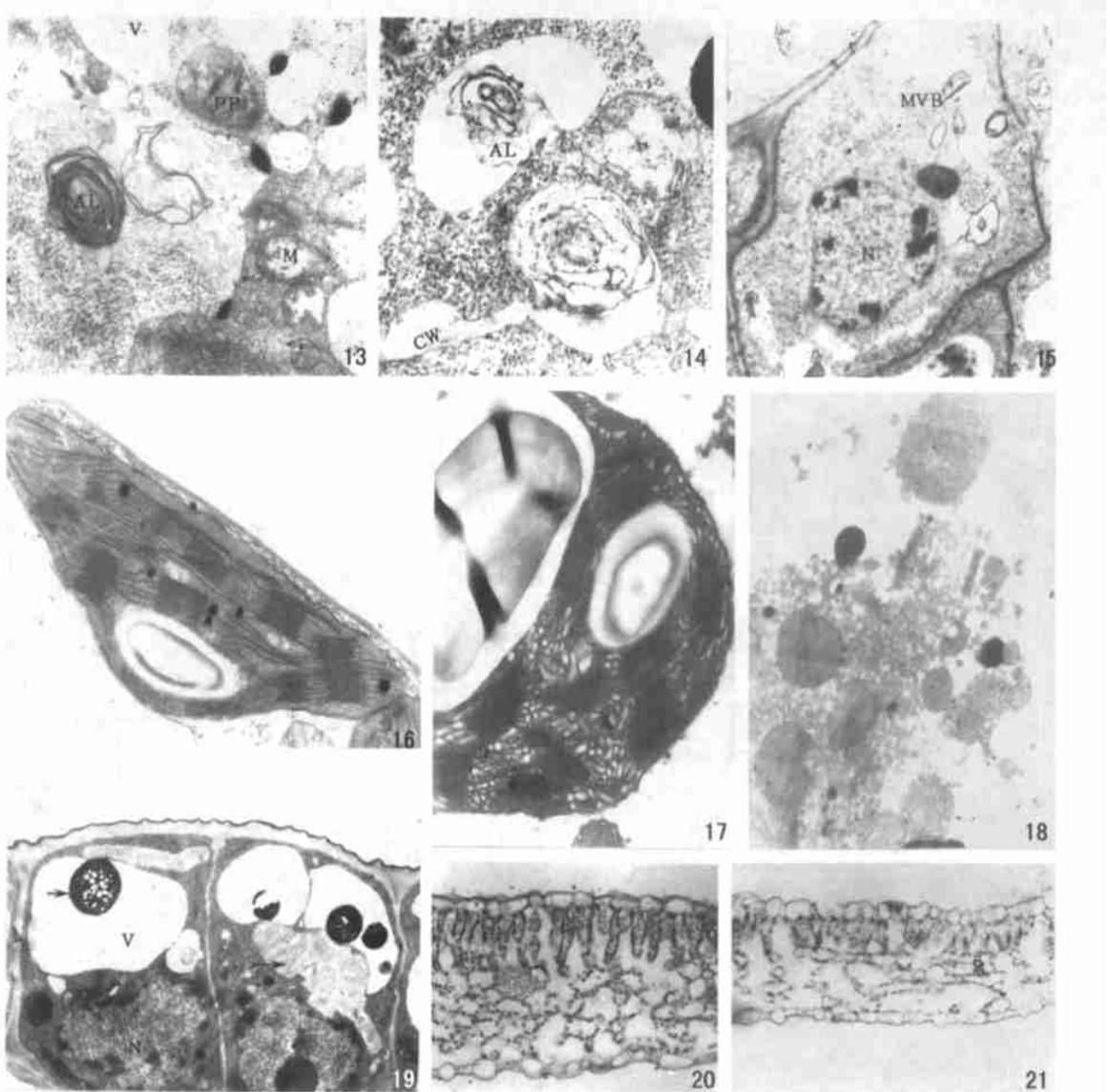


图2 TMV侵染番茄引起的细胞结构变化及细胞程序化死亡(13~21)

Fig. 2 Ultra-structural changes of tomato cells induced by TMV and PCD(13~21)

3. 感病植株茎尖顶端细胞的横切面(示染色质边缘化,  $\times 100$ );
- 4~5. 健康植株茎尖顶端细胞超微结构: 4. 细胞核( $\times 15\ 000$ ); 5. 线粒体和前质体( $\times 20\ 000$ );
- 6~15. 感病植株茎尖顶端细胞超微结构变化:
  6. 核染色质浓缩并边缘化( $\times 8\ 000$ );
  7. 细胞核畸形( $\times 12\ 000$ );
  8. 线粒体嵴减少( $\times 25\ 000$ );
  9. 线粒体空洞化( $\times 20\ 000$ );
  10. 前质体基粒扭曲( $\times 20\ 000$ );
  11. 前质体内出现的大量嗜钨颗粒( $\times 10\ 000$ );
  12. 细胞液泡化( $\times 6\ 000$ );
  13. 细胞质中的环状片层( $\times 12\ 000$ );
  14. 液泡中的环状片层( $\times 25\ 000$ );
  15. 细胞中的多泡体( $\times 7\ 000$ );
16. 健康植株叶片叶肉细胞中的叶绿体( $\times 15\ 000$ );
17. 感病植株的叶绿体基质片层扭曲呈网状( $\times 15\ 000$ );
18. 感病植株的叶绿体解体( $\times 15\ 000$ );
19. 感病植株茎尖原套细胞中的大面积病毒粒子群和酚类物质(实箭头示酚类物质, 空箭头示病毒粒子,  $\times 5\ 000$ );
20. 光镜下健康植株叶片结构( $\times 20$ );
21. 光镜下感病植株叶片结构( $\times 20$ ).

## 参 考 文 献

- [1] Pennell R I, Lamb C. Programmed cell death in plants [J]. *Plant Cell*, 1997, 9:1157 ~ 1168
- [2] Jacobson M D, Weil M, Raff M C. Programmed cell death in animal development [J]. *Cell*, 1997, 88:347 ~ 354
- [3] Obara K, Kuriyama H, Fukuda H. Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in *Zinnia* [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125: 615 ~ 626
- [4] Caspers M P M, Lok F, Sinjorgo K M C, et al. Synthesis, processing and export of cytoplasmic endo- $\beta$ -1,4-xylanase from barley aleurone during germination [J]. *Plant J*, 2001, 26(2): 191 ~ 204
- [5] Beligni M V, Fath A, Bethke P C, et al. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129:1642 ~ 1650
- [6] 汪矛, 崔跃华, 孙克莲. 杜仲胚乳衰退过程中程序性细胞死亡的研究 [J]. *植物研究*, 1999, 19(4): 401 ~ 406
- [7] 刘文娜, 汪矛, 李重九. 植物细胞程序化死亡研究进展 [J]. *植物学通报*, 2002, 19(5): 546 ~ 551
- [8] 宁顺斌, 宋运淳, 王玲, 等. 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
- [9] Xu P, Roossinck M J. Cucumber mosaic virus D satellite RNA-induced programmed cell death in tomato [J]. *Plant Cell*, 2000, 12:1079 ~ 1092
- [10] Jones A M. Programmed cell death in development and defense [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125:94 ~ 97
- [11] Wright K M, Duncan G H, Pradel K S, et al. Analysis of the N gene hypersensitive response induced by a fluorescently tagged tobacco mosaic virus [J]. *Plant Physiol*, 2000, 123: 1375 ~ 1385
- [12] Lam E, Kato N, Lawton M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response [J]. *Nature*, 2001, 411:848 ~ 853
- [13] Ordög S H, Higgins V J, Vanlerberghe G C. Mitochondrial alternative oxidase is not a critical component of plant viral resistance but may play a role in the hypersensitive response [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129:1858 ~ 1865
- [14] Gunawardena A H L A N, Pearce D M, Jackson M B, et al. Characterisation 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
- [15] 王大勇, 高云飞, 崔克明, 等. 植物细胞质中存在类 Fas 死亡因子的实验证据 [J]. *科学通报*, 2002, 47(3): 211 ~ 215
- [16] Beckman C H. Phenolic - storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2000, 57: 101 ~ 110

## 科研简讯

## 我校三项成果获国家科学技术进步奖

2003年2月28日在人民大会堂隆重召开的2002年度国家科学技术奖励大会上,我校获奖三项:

- 1) 许启凤教授 20 年精心选育的“优质高产杂交玉米品种农大 108”荣获国家科学技术进步一等奖;
- 2) 高焕文教授主持的“旱地农业保护性耕作技术与机具研究”获国家科学技术进步二等奖;
- 3) 李德发教授主持的“猪优质高效饲料产业化关键技术研究与推广”获国家科学技术进步二等奖。

(科技处供稿)