

## 黄瓜和黑籽南瓜幼苗 RBCs 对低温胁迫的应答差异

乔永旭

(唐山师范学院 生命科学系,河北 唐山 063000)

**摘要** 为探索低温胁迫对黄瓜和黑籽南瓜根系边缘细胞(Root border cells,RBCs)生理特性的影响,以2种瓜类作物的幼苗为试材,研究25和15℃对二者RBCs的数量、活率、黏胶层厚度、凋亡率及根系活力的影响。结果表明:15℃胁迫下,黄瓜RBCs数目和黏胶层厚度的增加程度低于黑籽南瓜,RBCs凋亡率则明显高于黑籽南瓜。此外低温也降低了二者RBCs的活性,黄瓜RBCs活性降低的更明显。RBCs附着根尖时,15℃处理的黄瓜的根系活力明显降低,为对照的28.9%;黑籽南瓜的根系活力变化不明显。去除RBCs后,15℃处理的黄瓜和黑籽南瓜根系活力分别下降了42.6%和27.5%,且均较25℃时差异显著。总之,RBCs能增强植物抵御低温的能力,黑籽南瓜RBCs抵御低温胁迫的能力强于黄瓜。

**关键词** 黄瓜;黑籽南瓜;低温;根系边缘细胞;胁迫

中图分类号 S567

文章编号 1007-4333(2015)04-0107-06

文献标志码 A

## Different responses of root border cells in cucumber and figleaf gourd seedlings to low temperature

QIAO Yong-xu

(Department of Life Science, Tangshan Normal University, Tangshan 063000, China)

**Abstract** This paper is concerned on the effect of low temperature stress on biological of root border cells (RBCs) from cucumber and figleaf gourd seedlings. The numbers of RBCs, viability of RBCs, thickness of mucilage layer of RBCs, the apoptosis rate of RBCs and root activities were investigated in both species seedlings under 15 and 25 °C. The results showed that the numbers of RBCs and a thicker mucilage layer of RBCs in figleaf gourd were higher than those in cucumber seedlings. The same trend was observed for apoptosis rate of RBCs and a lower viability of RBCs in cucumber. Root activities under 15 °C decreased by 28.9% in cucumber seedlings, but no obvious changes in root activities in figleaf gourd seedlings. Removal of RBCs from root tips led to more severe decline of root activities induced by low temperature in both cucumber and figleaf gourd seedlings. It was concluded that the function of RBCs in protecting root from chilling injury in figleaf gourd seedlings was more important than that in cucumber seedlings.

**Key words** cucumber; figleaf gourd; low temperature; root border cells; stress

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)是典型的冷敏感作物,通常在10~13℃时生理活动失调,生长发育减缓,叶片失绿,植株脱水;遭受严重冷害时,果实腐烂,植株死亡<sup>[1-2]</sup>。作为我国一种重要的反季节设施栽培蔬菜,低温已成为其正常生长的主要限制因子,因此研究黄瓜的耐冷性机理在农业生产中具有重要的意义。

根系边缘细胞(Root border cells,RBCs)是来

源于根尖表皮并附着在根尖顶端的活细胞,保护植物根尖抵御外界的生物和非生物胁迫<sup>[3]</sup>。大量研究表明,RBCs能够抵御的生物胁迫主要有根结线虫<sup>[4]</sup>、致病细菌和真菌<sup>[5-6]</sup>;非生物胁迫主要有Al<sup>3+</sup>毒害<sup>[7]</sup>、Fe<sup>2+</sup>毒害<sup>[8]</sup>、肉桂酸胁迫<sup>[9]</sup>和高浓度CO<sub>2</sub>危害等<sup>[10]</sup>。目前关于温度胁迫与RBCs的关系研究存在一定争议,Pan等<sup>[11]</sup>认为温度对于RBCs的

收稿日期:2014-11-08

基金项目:河北省科技计划项目(13226922);河北省高等学校科学技术研究青年基金(QN20132018);唐山师范学院博士基金项目(2014A04)

作者简介:乔永旭,副教授,主要从事园艺植物细胞工程与逆境过程研究,E-mail:qiaoyx123@163.com

发生没有影响,但李荣峰等<sup>[12]</sup>发现低温可诱导RBCs产生草酸氧化酶,过氧化氢酶等活性氧清除剂,其活性和含量均较常温下大幅增加,以清除植株体内因逆境胁迫产生的活性氧,从而减轻了活性氧对植株的伤害。对于低温对RBCs生物学特性的影响研究尚少。农业生产中,低温严重抑制了黄瓜的生长发育,但对其常用砧木黑籽南瓜(*Cururbita ficifolia* Bouche')影响不大<sup>[13]</sup>,这可能和黑籽南瓜根系发达,具有较强的耐低温能力有关。黄瓜和黑籽南瓜受到低温胁迫时的应答差异是不是和它们的RBCs特性有关,尚无人研究。基于此,本试验以黄瓜和黑籽南瓜为材料,研究低温对二者根系活性和RBCs发育的影响,旨在探明RBCs抵御低温胁迫的生理机制及黄瓜和黑籽南瓜受到低温胁迫时的应答差异,为嫁接黄瓜提高耐冷性提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料培养与处理

分别取‘津研四号’黄瓜和黑籽南瓜种子各180粒,用70%的乙醇消毒30s,无菌蒸馏水冲洗3次并浸泡3h。之后转移到25℃培养箱内催芽,待种子露白后备用。用橡皮筋将纱网固定于装有100mL蒸馏水的500mL的烧杯中,将穿孔滤纸置于纱网上。之后把露白种子播于网孔中,每个烧杯播种30粒,用塑料薄膜和橡皮筋封口并置于25℃(90粒种子)和15℃(90粒种子)培养箱中黑暗培养。之后将种子分成2组:组一,不同温度处理的黄瓜和黑籽南瓜各取54粒萌发种子,待根系长至25mm时测定RBCs数目、活性、黏胶层厚度、凋亡率和根系活力;组二,不同温度处理的黄瓜和黑籽南瓜各取18粒萌发种子,种子在培养箱培养过程中,每4h用小水流(蒸馏水)冲洗一次,以去掉RBCs,待根系长至25mm时测定根系活力。为了使根尖保持湿润,每2h对根尖喷施无菌蒸馏水,以根尖不积聚水滴为宜,为了增加研究的准确性,每个处理均重复3次。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 RBCs数目及活性

挑选9个均匀一致的根尖,将其根尖浸泡在含有50μL蒸馏水的离心管中1min,并用巴斯德吸液管轻微搅拌以便释放大量RBCs。取10μL细胞悬浮液与FDA-PI(FDA 25μg/mL,PI 10μg/mL)复合染液以1:1混合,染色10min。在荧光显微镜Olympus BX 51,DP70下镜检,活细胞呈现绿色

(FDA 荧光),死细胞呈现红色(PI 荧光),血细胞计数板计数<sup>[12]</sup>。

#### 1.2.2 RBCs黏胶层厚度的测定

将获得的RBCs悬浮液10μL和墨水10μL混合,将混合液滴在载玻片上,盖片,在荧光显微镜Olympus BX 51,DP70下观察测量。每个RBCs的黏胶层测量3个不同位置,取其平均值<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.3 RBCs凋亡率的测定

将获得的RBCs悬浮液静置2h,弃去蒸馏水,加入少许95%乙醇,静置30min,再用磷酸缓冲液(pH 6.0)冲洗2~3次,取细胞悬浮液与Hochest-33258染液(10μg/mL)以1:1混合,在荧光显微镜Olympus BX 51,DP70下观察活细胞与凋亡细胞的形态特征并计数<sup>[14]</sup>。

#### 1.2.4 根系活力的测定

根系活力采用氯化三苯基四氮唑(TTC)<sup>[15]</sup>法测定。

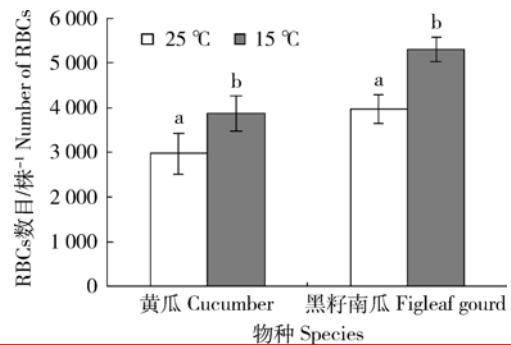
### 1.3 数据统计与分析

所有数据均重复3次,采用DPS7.05软件进行单因素方差分析,LSDF法进行差异显著性比较,应用Microsoft Excel 2010进行图表绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 温度对黄瓜和黑籽南瓜RBCs数目的影响

由图1可知,低温促进了黄瓜和黑籽南瓜RBCs数目的增加,黑籽南瓜RBCs的增加幅度较黄



线上马齿线代表3次重复平均值的标准偏差,不同字母表示同一物种的对照和处理之间在0.05水平上具有差异性。下同。

Data are the means of three independent replicates with standard errors shown by vertical bars. Different letters mean significant differences between the control and the CA treatment within the species ( $P < 0.05$ ). The same as below.

图1 温度对黄瓜和黑籽南瓜RBCs数目的影响

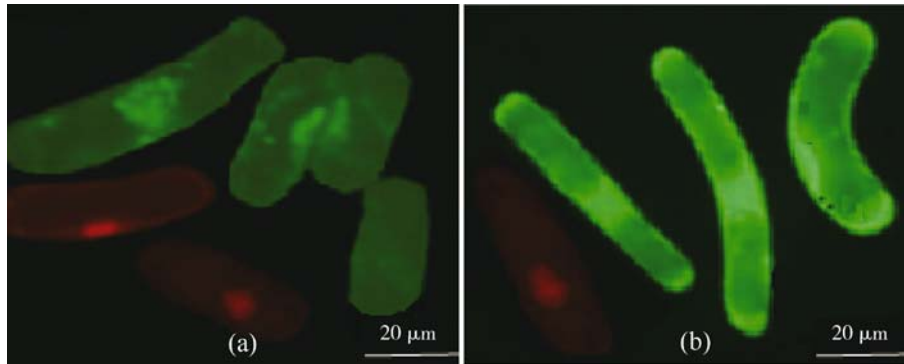
Fig. 1 The number of RBCs in cucumber and figleaf gourd plants under different temperatures

瓜明显。低温处理后,黄瓜 RBCs 数目较对照增加了 30.0%,黑籽南瓜则增加了 33.6%,二者均较各自的对照增加显著,此外,黑籽南瓜 RBCs 的数目增幅高出黄瓜 3.6%。因此低温更能促进黑籽南瓜 RBCs 数目的增加。

### 2.2 温度对黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 活性的影响

FDA-PI 染色发现,活的 RBCs 呈现绿色的荧

光,颜色明亮;死亡的 RBCs 则为红色荧光,颜色晦暗(图 2(a)~(b))。由图 3 可知,低温降低了 RBCs 的活性,黄瓜 RBCs 活性降低的幅度较黑籽南瓜明显。低温处理后,黄瓜 RBCs 活性较对照降低了 21.4%,差异达显著水平;黑籽南瓜则降低了 11.2%,无显著性差异。



活的 RBCs 呈现绿色;死的 RBCs 呈现红色。The live RBCs are green, The dead RBCs are red.

图 2 FDA-PI 染色的黄瓜(a)和黑籽南瓜(b)的 RBCs

Fig. 2 RBCs of cucumber (a) and figleaf gourd (b) dyed by FDA-PI

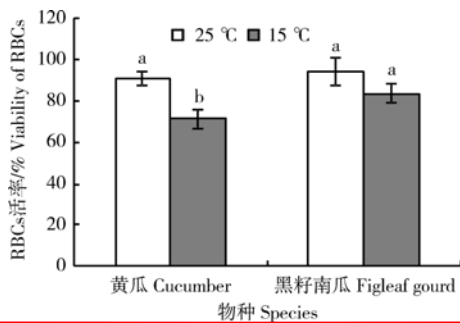
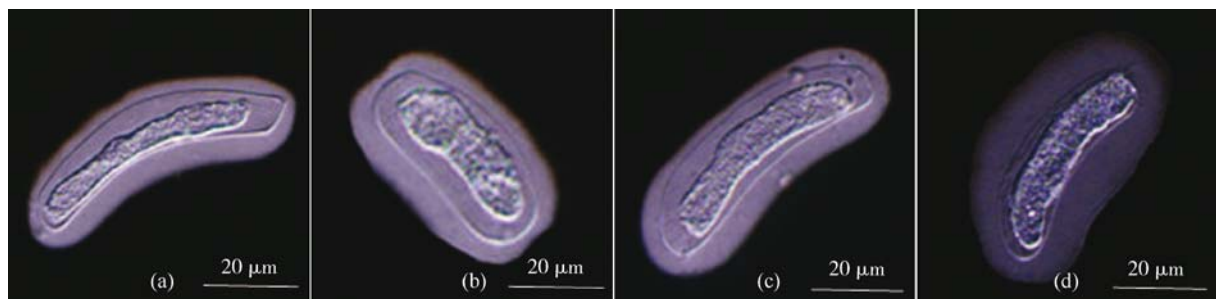


图 3 温度对黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 活性的影响

Fig. 3 RBCs viability of cucumber and figleaf gourd under different temperatures

### 2.3 温度对黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 黏胶层厚度的影响

由图 4 和图 5 可知,低温处理明显增加了黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 黏胶层的厚度,黑籽南瓜 RBCs 黏胶层厚度的增加程度高于黄瓜。15 °C 处理后,黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 黏胶层厚度分别增加了 17.8% 和 23.6%,其中黑籽南瓜的增加量达显著水平( $P < 0.05$ )。由此可知 RBCs 增加植物的耐低温能力,在受到低温胁迫时 RBCs 通过产生更厚的黏胶层来保护根尖。



(a) 黄瓜 25 °C, (b) 黄瓜 15 °C, (c) 黑籽南瓜 25 °C, (d) 黑籽南瓜 15 °C。

RBCs of cucumber (a-b) and figleaf gourd (c-d) exposure to 25 °C ((a) and (c)), or 15 °C ((b) and (d)).

图 4 温度处理后黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 的黏胶层

Fig. 4 Mucilage layer around RBCs from cucumber and figleaf gourd subjected to different temperature treatments

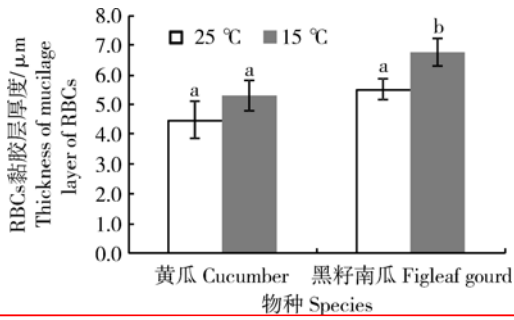
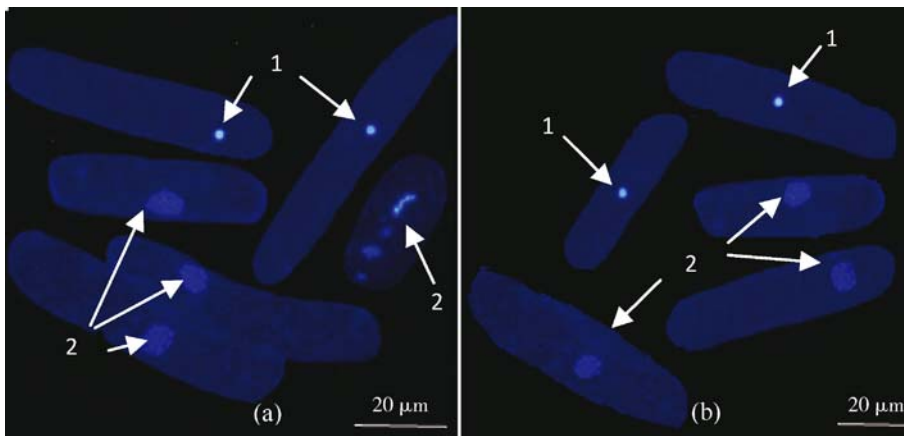


图5 温度对黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 黏胶层厚度的影响  
Fig. 5 Thickness of mucilage layer of RBCs of cucumber and figleaf gourd under different temperatures



1: 正常的 RBCs, 2: 出现凋亡片段的 RBCs。1: Normal RBCs, 2: Apoptosis RBCs.

图6 Hoechst-33258 染色的黄瓜(a)和黑籽南瓜(b)的 RBCs

Fig. 6 Dispersed RBCs from root-tips of cucumber (a) and figleaf gourd (b) dyed by Hoechst-33258

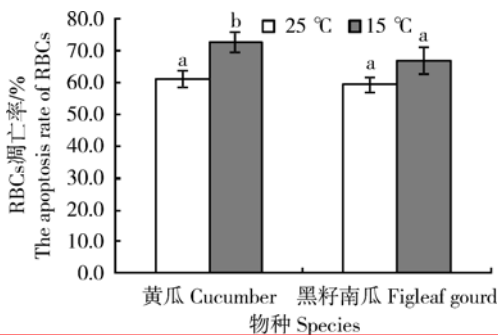


图7 温度对黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 凋亡率的影响  
Fig. 7 Apoptosis of root border cell of cucumber and figleaf gourd under different temperatures

2.5 温度对黄瓜和黑籽南瓜根系活力的影响

由图8可知,没有低温胁迫时,有无 RBCs 对根系的活力影响不大。RBCs 附着根尖时,15 °C 处理后,黄瓜的根系活力明显降低,较对照降低了

2.4 温度对黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 凋亡的影响

由图6可知,没有凋亡现象 RBCs 的细胞核外形较小,且质地均匀一致,Hoechst-33258 染色后呈现蓝色亮斑(图6(a),(b-1));出现凋亡现象 RBCs 的细胞核出现弥散现象,外形变大,质地明暗交错,降解为微亮的蓝色片段(图6(a),(b-2))。由图7可知,低温处理能明显增加 RBCs 的凋亡率,黄瓜的凋亡率增加量高于黑籽南瓜。低温处理后黄瓜 RBCs 凋亡率增加 19.2%,较对照差异显著;黑籽南瓜则增加 13.0%,较对照无显著差异。

23.4%,达显著水平;而黑籽南瓜的根系活力则受低温的影响不显著。RBCs 去除后,低温处理后,黄瓜和黑籽南瓜的根系活力较 RBCs 去除前分别下降 42.9%和 27.2%,均较 RBCs 去除前差异显著。

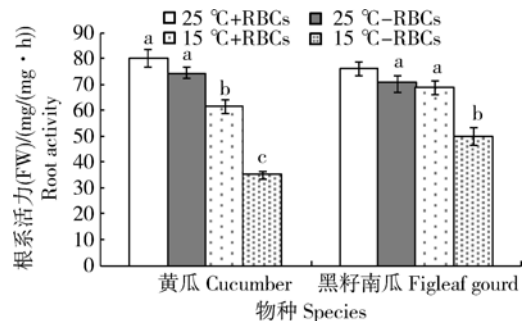


图8 温度对黄瓜和黑籽南瓜根系活力的影响

Fig. 8 Changes in the root activity in cucumber and figleaf gourd roots as influenced by temperature

### 3 讨论

由于 RBCs 具有帮助植物抵御多种逆境的能力,受到了学者们的广泛关注,至今已经在 14 科 49 种植物中发现了大量存活的 RBCs<sup>[16-18]</sup>。为了研究 RBCs 的发育过程,Cai 等<sup>[7]</sup>比较了水稻和其他作物,发现 RBCs 的数目在科间存在明显差异,科内差异不明显。然而本研究发现虽然黄瓜和黑籽南瓜同属于葫芦科植物,但黑籽南瓜在 RBCs 的数量上明显高于黄瓜,其中的机理需要继续研究。另外 RBCs 的数量还和根系的长度有关,Qiao 等<sup>[9]</sup>研究发现黄瓜和黑籽南瓜的根系长至 25 mm 时,RBCs 的数量最多,活率也最大,因此本研究采用了这一结论。试验中发现,25 °C 条件下根系长至 25 mm 时需要 22~24 h,15 °C 条件下则需要 27~29 h,因此低温处理的时间较常温下增加了 5~7 h。低温胁迫时间的延长,可能会增加胁迫效果,增大试验误差,因此研究低温胁迫时间对 RBCs 发生的影响是今后的方向之一。

温度是植物根生长的重要影响因子,也是重要的外源信号,影响着一些植物 RBCs 的产生。Pan 等<sup>[11]</sup>研究发现 Al<sup>3+</sup>抑制了大麦 RBCs 的产生并降低了其活性,低温和高温对 RBCs 的产生没有显著影响;马伯军等<sup>[19]</sup>则认为,与 25 和 35 °C 相比,15 °C 的低温更容易对初生根生长及 RBCs 的发育产生胁迫作用,RBCs 数目的增加和黏胶层厚度增大是抵御温度胁迫的可能机制,本研究证实了这一点。低温胁迫下,黄瓜和黑籽南瓜 RBCs 数量和黏胶层均增加,其中黑籽南瓜的增幅较黄瓜明显;此外低温降低了二者 RBCs 的活性,黄瓜 RBCs 的活性降低较黑籽南瓜明显,这种差异性可能和物种的特异性有关。由此可以推测,低温胁迫下,黑籽南瓜通过增加 RBCs 的数目,减缓其死亡率,增厚黏胶层来增强自我保护功能,黄瓜在这方面则不如黑籽南瓜,这也为农业生产过程中黑籽南瓜耐低温的能力强于黄瓜的现象提供了理论依据<sup>[20-21]</sup>。

细胞凋亡是一种正常生理条件下的程序性细胞死亡过程<sup>[22-23]</sup>,植物生长发育和受到逆境胁迫时,都存在细胞凋亡<sup>[14]</sup>。细胞凋亡可以从细胞结构方面进行检测<sup>[24]</sup>。本研究通过 Hoechst-33258 染色发现,低温促使 RBCs 染色体裂解成凋亡片段,并提高了 RBCs 的凋亡率,凋亡率的增加,必然促使大量的 RBCs 死亡,这也为低温降低黄瓜和黑籽南瓜 RBCs

活力提供了证据。本研究也发现黄瓜 RBCs 的凋亡率高于黑籽南瓜,可见从细胞学的角度来看,黑籽南瓜耐低温的能力确实强于黄瓜。

此外,根系活力是反映植株吸收功能的综合指标,影响着根系的生长、代谢和吸收功能,进而影响地上部的生长发育<sup>[25]</sup>。低温胁迫下,RBCs 具有减缓根系活力降低的作用,无论是黄瓜和黑籽南瓜,RBCs 去除后的根系活力较其去除前均大幅度降低。说明 RBCs 的存在确实能增强根系抵御低温的能力。并且,由本研究可知,黑籽南瓜的 RBCs 在保持根系活力方面明显强于黄瓜的 RBCs,说明黑籽南瓜抵御低温胁迫能力强于黄瓜,在农业生产中为以黑籽南瓜为砧木嫁接黄瓜奠定了理论依据。

### 参 考 文 献

- [1] 赵宇瑛,杨静,陈金凤,等. 黄瓜果实不同部位的耐冷性差异[J]. 园艺学报,2009,36(7):1060-1064
- [2] 乔永旭,张永平,高丽红. 黄瓜和黑籽南瓜对肉桂酸及亚低温交叉胁迫的应答差异[J]. 中国农业大学学报,2014,19(4):86-94
- [3] Hawes M C, Gunawardena U, Miyasaka S, et al. The role of root border cells in plant defense [J]. Trends in Plant Science, 2000,5,127-133
- [4] Wuytsl N, Maung Z T Z, Swennenl R, et al. Banana rhizodeposition: Characterization of root border cell production and effects on chemotaxis and motility of the parasitic nematode *Radopholus similis* [J]. Plant and Soil, 2006, 83, 217-228
- [5] Knox O G G, Gupta V V S R, Nehl D B, et al. Constitutive expression of cry proteins in roots and border cells of transgenic cotton[J]. Euphytica, 2007, 154, 83-90
- [6] Jaroszuk-Scisef J, Kurek E, Rodzik B, et al. Interactions between rye (*Secale cereale*) root border cells (RBCs) and pathogenic and nonpathogenic rhizosphere strains of *Fusarium culmorum* [J]. Mycological Research, 2009, 113: 1053-1061
- [7] Cai M Z, Zhang S N, Xing C H, et al. Developmental characteristics and aluminum resistance of root border cells in rice seedlings [J]. Plant Science, 2011, 180: 702-708
- [8] Xing C H, Zhu M H, Cai M Z, et al. Developmental characteristics and response to iron toxicity of root border cells in rice seedlings [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2008, 9: 261-264
- [9] Qiao Y X, Zhang Y P, Zhang H X, et al. Developmental characteristics and cinnamic acid resistance of root border cells in cucumber and figleaf gourd seedlings [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2013, 12(11): 2065-2073
- [10] Zhao X. Stimulation of border cell production in response to increased CO<sub>2</sub> levels [J]. Plant Physiology, 2000, 122: 181-188

- [11] Pan J W, Ye D, Wang L L, et al. Root border cell development is a temperature-insensitive and Al-sensitive process in barley [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2004, 45, 751-760
- [12] 李荣峰, 蔡妙珍, 刘鹏, 等. 植物根边缘细胞的抗逆性研究进展 [J]. *广西植物*, 2007, 27(3): 497-502
- [13] Ding J, Sun Y, Xiao C L, et al. Physiological basis of different allelopathic reactions of cucumber and figleaf gourd plants to cinnamic acid [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58, 3765-3773
- [14] 马春红, 李秀丽, 董文琦, 等. HMC 毒素诱导玉米同核 C、N 细胞质细胞凋亡的荧光显微观察 [J]. *中国农业科学*, 2011, 44(9): 1823-1829
- [15] 王宁, 田晓莉, 段留生, 等. 缩节胺浸种提高棉花幼苗根系活力中的活性氧代谢 [J]. *作物学报*, 2014, 47(7): 1220-1226
- [16] Rodger S, Bengough A G, Griffiths B S, et al. Does the presence of detached root border cells of zea mays alter the activity of the pathogenic nematode *Meloidogyne incognita* [J]. *The American Phytopathological Society*, 2003, 93, 1111-1115
- [17] Cheng W R, Liu P, Xu G D, et al. Effects of Al<sup>3+</sup> on the biological characteristics of cowpea root [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2008, 30, 303-308
- [18] Yu M, Shen R F, Liu J Y, et al. The role of root border cells in aluminum resistance of pea (*Pisum sativum*) grown in mist culture [J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift fur Pflanzenernahrung*, 2009, 172, 528-534
- [19] 马伯军, 潘建伟, 傅少娟, 等. Al<sup>3+</sup> 大豆根边缘细胞的发育及其影响因素 [J]. *作物学报*, 2005, 31(2): 165-169
- [20] Zhang Y P, Jia F F, Zhang X M, et al. Temperature effects on the reactive oxygen species formation and antioxidant defence in roots of two cucurbit species with contrasting root zone temperature optima [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2012, 34, 713-720
- [21] Zhang Y P, Qiao Y X, Zhang Y L, et al. Effects of root temperature on leaf gas exchange and xylem sap abscisic acid concentrations in six *Cucurbitaceae* species [J]. *Photosynthetica*, 2008, 46(3): 356-362
- [22] Weinrauch Y, Zychlinsky A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens [J]. *Annual Review of Microbiology*, 1999, 53: 155-187
- [23] Gadjev I, Stone J M, Gechev T S. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide [J]. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2008, 270: 87-144
- [24] Greenberg J T. Programmed cell death: A way of life for plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, 1996, 93(22): 12094-12097
- [25] 杨素苗, 李保国, 齐国辉, 等. 根系分区交替灌溉对苹果根系活力、树干液流和果实的影响 [J]. *农业工程学报*, 2010, 26(8): 73-79

责任编辑: 王燕华