

激光扫描共聚焦显微镜在植物研究中的应用

李珊珊, 刘 松, 宋克难, 邹 运, 张珍珠

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要: 荧光成像技术、光学显微镜和计算机成像分析系统的完美结合催生了激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)的出现,其优越的结构特点实现了将较厚样品能够逐点逐层扫描成清晰图像,有利于各种荧光信号的采集,直观进行三维重建和样品多重荧光信号采集进行的定量分析。这些优势功能极大地提高了从细胞、分子水平来探求生物时空表达基本功能的能力。本文详细阐述了近年来随着该项技术发展的日益多样化,激光扫描共聚焦显微镜技术在植物组织化学、植物细胞器和细胞骨架、植物发育方面的应用。

关键词: 激光扫描共聚焦显微镜;细胞骨架;Ca²⁺;荧光染料

中图分类号: Q336 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2017)03-0138-06 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.03.0138

激光扫描共聚焦显微镜(Laser scanning confocal microscope, LSCM)是包括激光光源、扫描器、荧光显微镜系统、光学装置、计算机图像存储与处理为集合的大型图像采集和分析的精密仪器。1957年 Marvin Minsky 首先提出以白光为光源的激光共聚焦显微镜技术原理,由于受到当时光源研制技术水平限制,使得 LSCM 没有被大规模使用。1978年牛津大学的 Sheppard 和 Wilson 设计出一套激光扫描程序,1985年 Wijnandts Van Resandt^[1]发表了第一篇 LSCM 在生物学中应用的文章,1987年第一台商品化的激光扫描共聚焦显微镜才得以问世。LSCM 在传统光学显微镜基础上加装激光扫描装置,使用紫外光或可见光激发荧光探针,实现点光源在样品上的切片扫描,并且能根据样品中荧光信号强弱、大小和分布情况,调节激光能量、电子放大倍数等优化荧光采集效果。LSCM 与普通荧光显微镜相比较,其最大优势是具有抑制焦平面外荧光信号的能力,有很好的深度分析能力或光学切片功能,因此能够对样品进行显微断层扫描、Z 扫描切片进行 3D 重建以及解决较厚样品扫描分辨率低的问题,极大地避免了对样品实物的损坏,保证检

测结果真实准确。同时 LSCM 实现了全自动程序化控制采集(监测)样品荧光图像的时间和空间,能对样品进行多重荧光信号的分解及合成图像,可定量分析。鉴于 LSCM 这些优势性的功能,使其在植物细胞生物学、植物生理学、植物生长发育、信号动态等方面进行了深入地研究并取得了一定进展^[2]。

1 激光扫描共聚焦显微镜技术在植物组织化学研究方面的应用

植物在受到外界刺激后,其单个细胞不同部位或者不同组织区域会针对刺激的不同和程度做出相应的变化反应,这主要体现在细胞内各种离子(包括 Ca²⁺, pH 等)、活性氧、膜电位等的变化。在结合了特异荧光探针标记后,激光扫描共聚焦显微镜可以对接受刺激后单个细胞内的离子、活性氧的比例及动态变化进行定量分析,完成活细胞生理信号的动态监控,还可以通过荧光漂恢复试验检测细胞内、细胞间分子流动及荧光共振能量转移情况。

1.1 激光扫描共聚焦显微镜技术在植物细胞中 Ca²⁺ 变化及其作为信号转导的研究

Ca²⁺ 是植物生长发育过程中非常重要的信息传递、合成与释放的第二信使,其通过在细胞内外浓度的变化来调控多个生命活动过程,如花粉管增长,细胞骨架形态建成、细胞的分化、运动、增殖等。Ca²⁺ 特异性荧光探针 Indo-1^[3]、Fluo-3^[4] 等(见表 1)在激光扫描共聚焦显微镜技术上的应用,极大地方便了对活体细胞内 Ca²⁺ 的动态变化测定的研究。

其中 Fluo-3 荧光探针最为常用,它对细胞生

收稿日期:2017-02-01

基金项目: 国家级大学生创业创新训练计划资助项目(201510221012);黑龙江省教育厅基本科研业务专项资助项目(齐齐哈尔大学科学研究类项目)(135109255);齐齐哈尔市科学技术计划资助项目(NYGG-201518);齐齐哈尔大学青年教师科研支持计划资助项目(2014k-M22)

第一作者简介: 李珊珊(1993-),女,黑龙江省大庆市人,学士,从事生命科学研究。E-mail:512594570@qq.com。

通讯作者: 张珍珠(1979-),女,讲师,从事植物分子与细胞生物学研究。E-mail:zhenzhu_zhang@sina.com.cn。

理过程干扰比较小,Fluo-3 以乙酰羟基甲酯(Fluo-3 AM)无荧光的形式,渗透质膜进入活细胞,在胞内被非特异酯酶水解,释放出无荧光的游离酸形式探针分子,并与 Ca^{2+} 结合形成复合物,产生较强的荧光,从而发挥钙探针的作用^[2]。

表 1 测量细胞内 Ca^{2+} 的荧光探针^[2]

Table 1 Fluorescent probe for measuring intracellular Ca^{2+}

荧光探针 Fluorescent probe	激发光峰值波长/nm Peak wavelength of stimulate light	可用于检测的荧光 峰值波长/nm Fluorescence peak wavelength used to detect
Fluo-3	488	525
Fura-Red	488(高钙)	660
Calcium Crimson	588(高钙)	611
Calcium orange	554(高钙)	575
Rhod-2	550(高钙)	575
Calcium green-5N	506(高钙)	531
Indo-1	355(高钙)	405

An^[5]等利用 Fluo-3/AM 对花粉管进行荧光标记,用以研究 5-aminolevulinic acid(ALA)作用下梨花粉管中 Ca^{2+} 浓度变化情况。结果表明 ALA 不仅降低胞内 Ca^{2+} 浓度 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$,同时降低了花粉管尖部 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 梯度,结合体内外研究表明,ALA 显著抑制花粉萌发和花粉管的伸长,提示 ALA 通过负调控 Ca^{2+} 信号来抑制花粉管的生长。Fang^[6]等同样利用荧光探针 Fluo-3/AM 对苹果花粉管内 Ca^{2+} 进行标记,结果显示苯硼酸(phenylboronic acid,PBA)诱导了外源 Ca^{2+} 内流的增加,使得胞质内 Ca^{2+} 浓度提升,并且消除了 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 梯度。因此硼通过调节 Ca^{2+} 的内流而控制 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 梯度,以此调控花粉管的发育。Zhang^[7]等,利用 Fluo-3/AM 对茶树根部细胞内 Ca^{2+} 外流进行标记,研究发现,阴离子通道抑制剂 NPPB^[8]激发了茶根部成熟区内 Ca^{2+} 外流,从而降低茶树内氟积累。在添加了 Ca^{2+} 螯合剂(EGTA)和 CaM 拮抗剂(CPZ 和 TFP)的预处理后,则抑制了 NPPB 引发的细胞内 Ca^{2+} 荧光强度,因此显著地缓解了 NPPB 抑制 F 积累的现象。

1.2 激光扫描共聚焦显微镜技术在植物细胞中 pH 的测定研究

细胞接受刺激后往往伴随着 pH 的改变,因

此细胞内 pH 是细胞激活过程中的重要参数。常用的荧光探针有 BCECF(2',7'-Bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein)^[9],其激发光谱具有 pH 依赖性,低 pH 环境中激发峰为 450 nm,高 pH 环境中激发峰为 500,其发射峰对 pH 不敏感,约为 530 nm。在生理 pH 范围内(pH6.4~7.4),BCECF 测量细胞内 pH 采用比例法,即分别用 490 nm 和 440 nm 光激发 BCECF 所得到的发射荧光之比。BCECF 的比例荧光与 pH 具有良好的线性关系,被估计的细胞内的最大分辨率为 0.4 pH 单位。这种测量方法其测量值不受染料进入细胞多少、细胞的厚度、光淬灭情况及染料漏出的影响^[2]。用激光扫描共聚焦显微镜测定测定过程中,可用 488 nm 激发,测量 530/640 nm 发射荧光比值。BCECF/AM 可自由穿过细胞膜,但 BCECF 不能透过细胞膜。

Wilkins 等^[10]采用 BCECF/AM 作为 pH 荧光指示剂检测野罂粟花粉管细胞中 pH_{cyt} (cytoplasmic pH) 变化情况,荧光比值采用 488/458 nm。结果发现 pH_{cyt} 的微量降低能够抑制花粉管生长所需的可溶性无机焦磷酸酶活性。同时 pH_{cyt} 的酸化是激发自交不亲和(SI)诱导的细胞程序性死亡(PCD)信号途径的标志性特征,并显著地激活了 DEVDase/caspase-3 酶活性和 SI 诱导的点状肌动蛋白灶的形成。Wang 等^[11]利用 BCECF/AM 荧光染料对胞内 pH_{cyt} 的变化情况进行了检测,冷处理 1 h 后 pH_{cyt} 下降,提示冷胁迫诱导了花粉管顶端区域酸化。NO 处理组荧光信号也降低。添加了 cPTIO 的冷处理组中胞浆内酸化程度显著降低。这一结果用以支持解释冷处理茶树花粉管生长途径中,NO 调控包括 pH 在内的信号途径。

1.3 激光扫描共聚焦显微镜技术在植物细胞中活性氧(ROS)的测定研究

细胞的线粒体内膜、细胞膜、细胞溶胶内膜、内质网及核膜的单电子氧化还原系统中、细胞内过氧化物酶体中均有 ROS 的存在和参与。细胞内自由基的产生和清除维持在动态平衡的状态,缺少和过多都会给机体造成损伤。用激光扫描共聚焦显微镜检测就是基于荧光探针标记来检测活性氧的方法。常用 DCFH-DA (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate)^[12] 检测细胞内 ROS 的动态变化。不发荧光的 DCFH-DA 在细胞内生,形成去酯(DA)的 DCFH,DCFH 被氧化成发

荧光的 DCF, 因为 DCF 荧光强度与 ROS 的含量呈正比, 因此可以用来指示细胞内活性氧的整体情况^[2]。

Ye 等^[13]利用荧光免疫杂交技术和 LSCM 相结合研究了 ABA 对水稻种子萌发的影响情况。根据荧光结果发现, ROS 定位于水稻种子糊粉层中, ROS 是细胞壁松弛、种皮和胚乳弱化的主要成分, 对于胚根的伸出起重要作用, 而 ABA 处理水稻种子使得 ROS 荧光亮度减弱或没有, 表示 ABA 处理抑制 ROS 的产生, 因此间接负调控了水稻种子的萌发。

1.4 细胞内特异蛋白及内生物物质分布和定位的研究

自 1994 年发现绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 以来, 它已成为跟踪活组织或细胞内基因表达及蛋白质定位的标记物, 被广泛应用在基因转录调控、转基因动植物、细胞骨架等研究中。类似 GFP 的荧光蛋白还包括蓝色荧光蛋白 (BFP)、青色荧光蛋白 (CFP)、黄色荧光蛋白 (YFP) 和红色荧光蛋白 (RFP) 等。这四种荧光蛋白在联合使用被激光共聚焦检测时, 其荧光发射光谱之间会存在严重的光谱交叉现象, 而且某些荧光蛋白的激发光又是相同的, 用顺序扫描方法难于将其分开。如果使用光谱形态分析技术就能够解决多种荧光蛋白之间的光谱交叉干扰问题。

Li 等^[14]构建了 CsMTP8:GFP 融合蛋白载体, 利用 LSCM 通过洋葱表皮细胞瞬时表达及质壁分离实验, 确定茶树 CsMTP8 蛋白定位在细胞质膜上, 进一步验证 CsMTP8 是锰元素吸收转运相关的重要蛋白; Wu 等^[15]利用 GFP 构建 pCambia2300-P35S; ZmARF31-eGFP 载体, 农杆菌侵染法转基因入烟草叶片中, 对玉米基因 ZmARF31 蛋白进行亚细胞定位, 结果显示 ZmARF31 是一个转录因子, 在烟草叶片的细胞核和细胞质中进行表达。Zhu 等^[16]构建 p35S-LRD6-6-GFP 融合蛋白载体, 农杆菌侵染法转入烟草叶片, GFP 荧光信号在细胞质和细胞核中进行了表达。又利用轰击介导转染的手段观察, 发现 GFP 荧光信号在洋葱中为点状表达。LRD6-6 蛋白亚细胞定位形式与拟南芥中该蛋白的同源基因 AtSKD1 相似, 而 AtSKD1 定位在多泡体 (MVBs) 中。同时利用 MVBs 定位分析特异蛋白 Rab GTPase RabF1/ARA6 蛋白构建了

RabF1/ARA6-GFP 和 RabF1/ARA6-RFP 融合蛋白, 分别和共转染了 LRD6-6-RFP 与 LRD6-6-GFP, 荧光表达结果进一步证实 LRD6-6-GFP 蛋白定位在 MVBs 上。Lin 等^[17]构建 GFP 突变体 pAtZIP4:eGFP 和 pNcZNT1:eGFP, 用以研究拟南芥 AtZIP4 和同源的 *Noccaea caerulea* NcZNT1 基因启动子在 Zn 缺乏条件下的表达情况, 结果两种蛋白都在两物种根皮质、内皮层和周鞘中进行了表达, 且 NcZNT1 基因启动子在 Zn 缺乏的 *Noccaea caerulea* 根中蛋白表达略高于拟南芥, 并且表达定位不局限于皮质、内皮层和周鞘, 还在更深层的中柱和外表皮进行了表达, 也不受限于缺锌的条件。结合其他实验结果共同证明 NcZNT1 是 *Noccaea caerulea* 促进重金属 Zn 富集的重要因素。

2 激光扫描共聚焦显微镜技术在植物细胞器和细胞骨架的观察研究

细胞骨架是由微管、微丝等细胞器组成, 是细胞运动、支撑、信息传递的重要组成。生理条件的改变导致微丝结构变化, 进行组装和去组装, 在空间和时间上均受到细胞内外因素的调控。因而从形态观察、定位、定量到分子结构与功能调节等某方面对微丝进行研究, 成为植物细胞骨架研究的重要手段。肌动蛋白 (actin) 是微丝的基本成分, 鬼笔环肽 (phalloidin) 及其衍生物对肌动蛋白微丝具有强烈的专一亲和特性, 能够形成稳定微丝, 利用鬼笔环肽研制的荧光标记物, 能够通过荧光图像显示出细胞微丝的结构和分布、含量变化, 可作为肌动蛋白的理想探针。结合 DAPI 或 Hoechst 探针标记处细胞核的位置, 可以更清楚地定位出微丝的结构和分布, 及其与细胞核的关系^[18]。

Fang 等^[6]应用免疫荧光标记法结合激光扫描共聚焦技术, 对 PBA 处理苹果花粉管细胞肌动蛋白微丝进行了研究。结果显示对照组花粉管细胞肌动蛋白微丝形成三维网络结构, 而 PBA 处理组诱导的肌动蛋白微丝呈现扭曲和浓缩, 肌动蛋白微丝碎片在花粉管尖端区域积累成簇。推测由于 PBA 诱导的外源 Ca^{2+} 内流使得 Ca^{2+} 浓度增加, 以及 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 梯度的消失, 引起了肌动蛋白的高度凝聚。

Fang 等^[19]用异硫氰酸-鬼笔环肽 (FITC-Ph) 标记和共聚焦激光扫描显微镜观察硼酸处理苹果花粉管一定时间后, 发现对照花粉管内肌动蛋白

丝骨架保持完整平行状态,而 0.2% 硼酸处理组中花粉管顶端肌动蛋白丝表现出严重的断裂,说明过量的硼酸对花粉管微丝骨架的建成有毒性。硼毒性导致的肌动蛋白丝畸形会破坏花粉管壁前体的转运,导致细胞壁建成缺陷和花粉管顶部发育的改变。

Winnicki 等^[20]利用激光扫描共聚焦技术结合免疫技术,采用荧光色素 TRITC、FITC 和 DAPI 进行染色,检测细胞分裂活性蛋白激酶 MAPKs 在 *Vicia faba*、*Pisum sativum*、*Lupinus luteus* 和 *Lycopersicon esculentum* 根部分生组织细胞中的定位。结果发现 MAPKs 在这 4 个物种细胞核中均有分布。MAPKs 在 *Lycopersicon esculentum* 有丝分裂微管中共存的证据很多,*Pisum sativum* 和 *Vicia faba* 的根分生组织有丝分裂时期中只有 50% 的有丝分裂细胞微管表现出 MAPKs 的定位活性。此外,*Lupinus luteus* 的纺锤体微管和成体膜中没有看见 MAPKs 荧光信号的表达。因此,MAPKs 可能不是在所有植物微管动力学调控过程中起主要作用。

Li 等^[21]利用桑色素(morin)^[22]对豌豆根尖进行染色,检测不同 Al 浓度处理下的荧光密度。桑色素是一种非常适合研究铝在根尖分布的绿色荧光依赖染料,能够检测铝在根尖细胞质和细胞核的分布。研究结果发现 30 μm 铝处理 24 h 后,根尖 0~3 mm 处比其它区域显示出更强烈的荧光效应。之后检测距离根尖 600、1 500、3 000 和 6 000 μm 处横截面荧光密度,显示铝不敏感品种荧光亮度变化不明显,而铝敏感品种呈现升高后降低的显著变化。因此铝敏感品种根过渡区细胞质中铝积累高于不敏感品种。

3 激光扫描共聚焦显微镜技术在植物发育研究方面的应用

各种生物和非生物胁迫都在不同程度上影响和制约着植物的生长发育过程,植物机体会迅速调整以应对环境变化,完成生长发育过程。因此了解和探究植物内部响应的具体机制和原理,对揭示植物生长发育过程,有效利用和改造作物,对珍稀物种的保护等都具有积极重要的意义。在掌握了多种荧光探针、免疫技术和激光共聚焦显微镜操作特点的基础上,结合多种技术可用于研究复杂的植物生长发育过程、信号传导途径等。

Fang 等^[19]利用免疫荧光标记法结合激光扫描共聚焦技术,发现硼毒性处理的苹果花粉管壁

定位了大量酸性果胶,这为 Ca^{2+} 提供了更多的结合位点,导致胞质内 Ca^{2+} 减少。因此去酯化果胶相对于酯化果胶,在调整胞质内钙离子水平,及硼毒性诱导的花粉管发育中起到了关键作用。另外阿拉伯半乳糖蛋白(AGPs)正常表达水平时从花粉管基底部向末端逐渐减少,而硼毒性处理组中 AGPs 几乎在整个花粉管表达。硼毒性处理导致的 AGPs 分布的改变,与钙离子和肌动蛋白变化有关。AGPs 能够结合更多的钙,从而导致 Ca^{2+} 浓度降低,这一结果会导致花粉管壁硬度和延展性的改变,花粉管生长逐渐减缓直至停止发育。

Wang 等^[11]采用激光扫描共聚焦技术,结合多种染料对冷胁迫中茶树花粉管生长途径中,NO 合成途径相关因子表达情况进行了检测。利用染料 Fluo-4/AM 对花粉管顶端细胞胞浆内 Ca^{2+} 分布进行检测,结果显示对照组 Ca^{2+} 在花粉管中从头至尾都有表达,冷处理后 Ca^{2+} 浓度梯度在花粉管顶部表达混乱,花粉管布满不规则荧光。NO 处理组导致胞浆内 Ca^{2+} 浓度梯度中断。冷处理中加入 NO 清除剂 cPTIO,使得冷胁迫造成的 Ca^{2+} 浓度梯度混乱得以缓解。利用 CM-H2DCF-DA 荧光标记 ROS,对照中 ROS 信号分布在花粉管,冷处理 1 h 后,ROS 荧光信号增强,特别是在顶端区域尤为显著。激光扫描共聚焦技术与免疫技术相结合,用 FITC 荧光素标记,分别检测花粉管细胞壁中酸性果胶(LM19)、酯化果胶(LM20)和 AGPs(LM2)的分布表达情况。冷处理和 NO 处理中,花粉管细胞壁中酸性果胶在整个花粉管中表达,对照中酸性果胶只在花粉管基部表达;酯化果胶花粉管基部区域近萌发孔处表达,对照中该种果胶限制在发育中的花粉管顶端表达。添加了 cPTIO 的冷处理组中花粉管顶端酸性果胶荧光信号减弱,而花粉管柄的酯化果胶分布增多。与对照相比,冷胁迫和 NO 处理组 AGPs 沉积在花粉管顶部的点增强和环状结构均消失,直至花粉管柄出现荧光。cPTIO 的添加可以逆转冷胁迫中 AGPs 的异常表现。这些结果都支持了冷胁迫处理的茶树花粉管发育过程中,NO 调控了一个包括 Ca^{2+} 、活性氧、pH 等在内的复杂的信号网络。

ABA 诱导的 H_2O_2 积累和 H_2O_2 活化胞质钙离子增加是 ABA 诱导的气孔闭合的重要机制,An 等^[23]利用荧光探针 H2DCF-DA 和 Fluo-3/AM 分别对拟南芥叶片气孔闭合相关因子 H_2O_2

和 Ca^{2+} 进行荧光标记,通过激光扫描共聚焦显微镜发现,ABA 作用下保卫细胞重要信号分子 H_2O_2 表达量迅速增加,ABA 作用 10 min 内 H_2O_2 的荧光表达密度持续不断增多,添加 ALA 处理 18 min 后,ABA 诱导的 H_2O_2 荧光表达密度受损并且持续减弱,这一结果显示外源或者过表达外源 ALA 能减少保卫细胞中 ABA 诱导的 H_2O_2 的积累。外源或者过表达外源 ALA 处理 14 min 后,保卫细胞中起第二信使作用的 ABA 诱导的胞质 Ca^{2+} 积累量也降低。因此,ALA 能够通过降低保卫细胞中 H_2O_2 和 Ca^{2+} 的表达水平抑制 ABA 诱导的气孔闭合,从而显著提高植物的抗旱性能。在此基础上,An 等^[24] 利用黄酮醇类特异荧光染料 DPBA^[25] 对气孔中主要的黄酮醇类激素槲皮黄酮和山奈酚进行荧光标记,ALA 预处理 4 h 后可显著提高黄酮醇类的积累,其保卫细胞中荧光亮度比对照组高出 2.44 倍。将槲皮黄酮和山奈酚分别作用于 ABA 处理的拟南芥时发现气孔孔径张开度超过对照 50%。这一结果显示 ALA 处理导致的黄酮醇类物质的积累,能够抑制 ABA 诱导的气孔闭合。同时激光扫描共聚焦显微镜下观察到外源黄酮醇类处理的 ABA 诱导的保卫细胞中 H_2O_2 荧光亮度显著减少,这一结果显示黄酮醇类的积累能够降低 H_2O_2 的含量,同时抑制了 ABA 诱导的气孔闭合。因此 ALA 诱导了保卫细胞中黄酮醇的积累,使其参与清除 H_2O_2 ,因而抑制了 ABA 诱导下的气孔闭合。

4 激光扫描共聚焦显微镜技术在植物研究中的应用和展望

激光扫描共聚焦显微镜技术已经为植物的研究提供了大量有参考和借鉴价值的方法和结论,极大地推动着植物生物学的发展。但也有不足之处,例如为了获得足够的信噪比需要提高激光的强度,但样品荧光会在高强度激光作用下迅速淬灭;许多荧光染料分子会在激光照射下产生单态氧和自由基等细胞毒素,制约了激光强度和扫描时间。同时由于 LSCM 操作复杂,对操作人员技术要求高,LSCM 本身及样品处理价格昂贵等,都在一定程度上限制着 LSCM 在植物中的应用研究。现在许多研究者正努力通过深入研究和采取相应措施来避免这些不利因素,例如选择合适的荧光染料减少对样品的毒性,适当调整激光的光强等。同时 LSCM 相对荧光显微镜所展现的

高分辨率和超强的三维重建优势,依旧在植物显微图像科学研究中极具吸引力,可以相信随着对植物世界更深入的探索和显微技术的不断完善,LSCM 将会带来更多可视性的科技创新。

参考文献:

- [1] Van Meer G S E, Wijnaendts-Van-Resandt RW, Simons K, et al. Sorting of sphingolipids in epithelial(Madin-Darby canine kidney) cells [J]. J Cell Biol, 1987, 105(4): 1623-1625.
- [2] 袁兰. 激光扫描共聚焦显微镜技术教程[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2004.
- [3] Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties [J]. J Biol Chem, 1985, 260(6): 3440-3450.
- [4] Minta A, Kao J P, Tsien R Y. fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophore [J]. J Biol Chem, 1989, 264(14): 8171-8178.
- [5] An Y, Li J, Duan C, et al. 5-Aminolevulinic acid thins pear fruits by inhibiting pollen tube growth via Ca^{2+} -ATPase-Mediated Ca^{2+} efflux[J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 121.
- [6] Fang K, Gao S, Zhang W, et al. Addition of Phenylboronic acid to Malus domestica pollen tubes alters calcium dynamics, disrupts actin filaments and affects cell wall architecture[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0149232.
- [7] Zhang X C, Gao H J, Yang T Y, et al. Anion channel inhibitor NPPB-inhibited fluoride accumulation in tea plant (Camellia sinensis) is related to the regulation of Ca^{2+} , CaM and depolarization of plasma membrane potential[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(1): 57.
- [8] Zhang X C, Gao H J, Zhang Z Z. Influences of different ion channel inhibitors on the absorption of fluoride in tea plants[J]. Plant Growth Regul, 2013, 59(1): 99-106.
- [9] Bosch M, Franklin-T V. Temporal and spatial activation of caspase-like enzymes induced by self-incompatibility in Papaver pollen [J]. Process Natl Acad Sci USA, 2007, 104(46): 18327-18322.
- [10] Wilkins K A, Bosch M, Haque T, et al. Self-incompatibility-induced programmed cell death in field poppy pollen involves dramatic acidification of the incompatible pollen tube cytosol[J]. Plant Physiol, 2015, 167(3): 766-779.
- [11] Wang W, Sheng X, Shu Z, et al. Combined cytological and transcriptomic analysis reveals a nitric oxide signaling pathway involved in cold-inhibited camellia sinensis pollen tube growth[J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 456.
- [12] He J, Yue X, Wang R, et al. Ethylene mediates UV-B-induced stomatal closure via peroxidase-dependent hydrogen peroxide synthesis in Vicia faba L[J]. J Exp Bot, 2011, 62(8): 2657-2666.
- [13] Ye N, Zhu G, Liu Y, et al. Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds[J]. J Exp Bot, 2012, 63(5): 1809-1822.
- [14] Li Q, Li Y, Wu X, et al. Metal transport protein 8 in Ca-

- mellia sinensis confers superior manganese tolerance when expressed in yeast and *Arabidopsis thaliana* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 39915.
- [15] Wu F, Liu Z, Xu J, et al. Molecular Evolution and association of natural variation in ZmARF31 with low phosphorus tolerance in maize [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1076.
- [16] Zhu X, Yin J, Liang S, et al. The multivesicular bodies(MVBs)-localized AAA ATPase LRD6-6 inhibits immunity and cell death likely through regulating MVBs-mediated vesicular trafficking in rice [J]. *PLoS Genet*, 2016, 12(9): e1006311.
- [17] Lin Y F, Hassan Z, Talukdar S, et al. Expression of the ZNT1 Zinc transporter from the metal hyperaccumulator *Noccaea caerulea* confers enhanced zinc and cadmium tolerance and accumulation to *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0149750.
- [18] Hao H, Chen T, Fan L, et al. 2,6-Dichlorobenzonitrile causes multiple effects on pollen tube growth beyond altering cellulose synthesis in *Pinus bungeana* Zucc [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76660.
- [19] Fang K, Zhang W, Xing Y, et al. Boron toxicity causes multiple effects on *Malus domestica* pollen tube growth [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 208.
- [20] Winnicki K, Zabka A, Bernasinska J, et al. Immunolocalization of dually phosphorylated MAPKs in dividing root meristem cells of *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Lupinus luteus* and *Lycopersicon esculentum* [J]. *Plant Cell Rep*, 2015, 34(6): 905-917.
- [21] Li X, Li Y, Qu M, et al. Cell Wall Pectin and its methylesterification in transition zone determine al resistance in cultivars of pea (*Pisum sativum*) [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 39.
- [22] Zhu X F, Lei G J, Wang Z W, et al. Coordination between apoplastic and symplastic detoxification confers plant aluminum resistance [J]. *Plant Physiol*, 2013, 162 (4): 1947-1955.
- [23] An Y, Liu L, Chen L, et al. ALA inhibits ABA-induced stomatal closure via reducing H_2O_2 and Ca^{2+} levels in guard cells [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 482.
- [24] An Y, feng X, Liu L, et al. ALA-induced flavonols accumulation in guard cells is involved in scavenging H_2O_2 and inhibiting stomatal closure in *Arabidopsis Cotyledons* [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1713.
- [25] Watkins J M, Hechler P J, Muday G K. Ethylene-induced flavonol accumulation in guard cells suppresses reactive oxygen species and moderates stomatal aperture [J]. *Plant Physiol*, 2014, 164(4): 1707-1717.

Application of Laser Scanning Confocal Microscopy in Plant Research

LI Shan-shan, LIU Song, SONG Ke-nan, ZOU Yun, ZHANG Zhen-zhu

(College of Life Science and Agriculture Forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

Abstract: Fluorescence imaging technology, optical microscope and computer image analysis system spawned a perfect combination of laser scanning confocal microscope (LSCM), and its superior structure features to achieve the thicker sample could be scanned from point to layer into a clear image, which was conducive to all kinds of fluorescence signal acquisition, three-dimensional reconstruction and quantitative analysis of sample the multiplex fluorescence signal acquisition. These advantages greatly enhanced the ability to explore the basic functions of biological space-time expression from the cellular and molecular levels. Laser scanning confocal microscopy were reviewed in the fields of plant tissue chemistry, plant organelles and cytoskeleton, plant development and so on, with the increasing diversification of the technology,.

Keywords: laser scanning confocal microscope (LSCM); cell skeletons; Ca^{2+} ; fluorescent dye

欢迎投稿

欢迎订阅