

低温胁迫下枇杷幼叶细胞内 Ca^{2+} 水平及细胞超微结构变化的研究*

陈由强¹ 叶冰莹¹ 高一平² 陈文列³

(1 福建师范大学生物工程学院 福州 350007)

(2 福建省环境监测中心 福州 350007) (3 福建医科大学电镜室 福州 350001)

提 要 用焦锆酸钾沉淀的电镜细胞化学方法,研究了低温胁迫下枇杷幼叶细胞内 Ca^{2+} 水平变化。研究表明,枇杷幼叶细胞未经低温处理时, Ca^{2+} 定位分布的沉淀颗粒大量出现在细胞壁、细胞间隙、质膜和液泡;叶绿体、细胞质和细胞核中也有一些 Ca^{2+} 沉淀颗粒分布。枇杷幼叶经 44 h, 4℃低温处理后,在质膜和液泡膜上 Ca^{2+} 的沉淀增多,细胞质和细胞核中的 Ca^{2+} 水平增加。不抗寒品种在低温胁迫条件下可见核孔开口较大,有时可观察到核内容物外漏。抗寒品种在低温胁迫条件下核孔未见明显开口,叶绿体中类囊体不形成基粒,少数片层结合重叠后伸展在整个叶绿体中。而不抗寒品种类囊体则堆积形成明显的颗粒状基粒,类囊体片层数量较多。在 2 个叶绿体之间还常可见到线粒体紧夹其间,但线粒体的内膜模糊不清。不抗寒品种内质网和高尔基体也较多见,内膜系统比较发达,但低温胁迫条件下膜系统易受破坏,膜结构模糊不清。

关键词 枇杷, 低温胁迫, 钙细胞化学, 膜结构

CHANGES OF THE LEVEL OF Ca^{2+} IN CELLS OF LOQUAT LEAFLETS UNDER LOW TEMPERATURE STRESS

Chen Youqiang¹ Ye Bingying¹ Gao Yiping² Chen Wenlie³

(1 Bioengineering College, Fujian Teachers University Fuzhou 350007)

(2 Fujian Environmental Monitoring Centre Fuzhou 350007) (3 Fujian Medical University Fuzhou 350001)

Abstract The changes of Ca^{2+} localization in cells of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) leaflets under chilling stress were investigated with calcium antimonate precipitate-electron microscopic-cytochemical methods. When loquat leaflets grew at the optimum temperature, it was shown that the deposits of calcium antimonate, being the indicator for Ca^{2+} localization, mainly concentrated within the vacuoles and intercellular spaces, and that there was also some Ca^{2+} deposits in plastid, mitochondria, cytoplasm and nucleus. This indicates that under the normal condition, the vacuoles are the main pool of Ca^{2+} in plant cells, and that there

收稿日: 1999-10-25, 修回日: 1999-04-19。第一作者: 男, 1956 年出生, 副教授(博士)。现从事植物生理学和植物分子生物学研究。

* 福建省教委科学研究基金资助项目(编号: K95017)。

is quite an amount of Ca^{2+} in the intercellular spaces. On the contrary, the free Ca^{2+} in cytoplasm and nucleus is very low under the normal condition. When the loquat leaflet was treated at the temperature of 4°C for 44 hours, the level of Ca^{2+} in cytoplasm and nucleus increased considerably. Under the chilling stress, there are a great amount of Ca^{2+} deposits in vacuolar, chloroplast, plasma membrane and vacuole membrane. The membrane of nucleus in the cold sensible variety had been damaged and some nuclear substance let out. There were only stroma thylakoids in the cells of cold resistant variety, while many basal granules in the cold sensible variety. The membrane of chloroplasts had been damaged.

Key words Calcium cytochemistry, Calcium messenger, *Eriobotrya japonica*, Plant cold-resistance

Ca^{2+} 起着与环化腺苷酸(cAMP)相类似的作用,是调节多种细胞功能的一种细胞内第二信使^[1]。 Ca^{2+} 对作物不仅仅是一种大量元素,更重要的是作为偶连胞外信号与胞内生理生化反应的第二信使,以及植物代谢和发育的主要调控者^[2,3]。近年来,有关低温引起植物细胞内 Ca^{2+} 水平的变化已有一些研究^[4~6],但大多集中在农作物,如水稻、黄瓜等,有关果树等木本植物这方面的研究尚未见报道。枇杷是亚热带地区果树之一,经济价值高,但在生产实践中常因低温引起冻害。本研究试图通过低温引起枇杷幼叶细胞内 Ca^{2+} 水平变化的细胞化学观察,进一步阐明枇杷低温危害的机理,为探索克服低温危害的新措施提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料及低温处理

采用枇杷(*Eriobotrya japonica* Lindl.)抗寒品种长红和不抗寒品种解放钟为试验材料,由福建农科院果树研究所提供。取样时间为枇杷生长季节的1997年5月。将小枝水培,材料置 4°C 冰箱中44 h,进行低温冷害处理。未经低温冷害处理的材料直接固定。

1.2 Ca^{2+} 的细胞化学方法

采用Borger^[7]等方法,略有修改,步骤简述如下。①取材:将枇杷幼叶切成 $0.5\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ 的组织块。②初固定:将切好的组织块迅速投入用2%的焦锑酸钾($\text{pH} 7.6$,用 100 mmol/L $\text{pH} 7.1$ 的磷酸缓冲液配制)配制的3%戊二醛固定液中, 4°C 固定4 h。③洗涤:用含2%焦锑酸钾的磷酸缓冲液($\text{pH} 7.6$)洗涤3次,每次约0.5 h。④后固定:将洗涤过的材料转移至用含2%焦锑酸钾的缓冲液($\text{pH} 7.6$)配制的1%锇酸中, 4°C 冰箱内固定过4 h。⑤洗涤:先用重蒸水洗涤4次,再用($\text{pH} 10.0$)的重蒸水洗涤2次,每次约0.5 h。随后经系列冷乙醇脱水,丙酮过渡,环氧树脂618包埋,LEKB-5型超薄切片机切片,切片经醋酸双氧铀染色;在日立Hu-12A型电子显微镜下观察照相。对照切片的处理是将在电镜下已确定有焦锑酸钾沉淀的定位切片漂浮在 100 mmol/L 的EGTA($\text{pH} 8.0$)溶液中, 60°C 处理0.5~1 h,使 Ca^{2+} 与EGTA螯合,脱去原沉淀中的 Ca^{2+} ,再置于电镜下观察照相。

2 观察结果

2.1 未经低温处理枇杷幼叶细胞内 Ca^{2+} 的定位分布

电镜观察结果表明,钙离子定位分布的焦锑酸钙沉淀颗粒大量出现在细胞内的液泡

中。无论是幼龄细胞中的小液泡,或是成熟细胞中的大液泡,均产生大量的焦锑酸钙沉淀颗粒,在细胞外的细胞间隙内出现大量的焦锑酸钙沉淀颗粒(图版 I: 1)。这种现象随机观察到的机率很高,几乎在所有选取的视野中都会观察到。在叶绿体和线粒体以及细胞质和核基质中有时也会观察到一些焦锑酸钾沉淀(图版 I: 2)。一些研究指出,内质网是一种 Ca^{2+} 库,其中有较多 Ca^{2+} 的分布^[8],但我们未找到内质网中有 Ca^{2+} 存在的明显证据(图版 I: 3)。

以上观察到的沉淀颗粒,在切片经过 EGTA 处理后,沉淀物即被消除,在原有 Ca^{2+} 分布的部位上(如液泡、细胞间隙等处)表现出透明区域,说明切片中的 Ca^{2+} 定位反映是真实的(图版 I: 4)。

2.2 低温胁迫下枇杷幼叶细胞中 Ca^{2+} 分布的变化

枇杷幼叶经过 4°C 低温处理 44 h, 其幼叶细胞内的 Ca^{2+} 分布发生改变。图版 I: 5 和图版 II: 6 是幼叶经冷处理 44 h 后幼叶组织切片照片,它显示细胞超微结构形态仍保持低温胁迫前的正常状态,无明显的变化;但在细胞质中的 Ca^{2+} 沉淀增加,显示细胞质游离 Ca^{2+} 水平的提高;在液泡内看不到有大量的 Ca^{2+} 分布。当枇杷幼叶经 44 h, 4°C 冷处理后,除在细胞质观察到 Ca^{2+} 沉淀增加外,钙库液泡中的许多 Ca^{2+} 也分布在液泡膜的内侧,液泡中心部分的 Ca^{2+} 分布似乎有减少的趋势,有些颗粒趋向靠近液泡膜。在质膜和液泡膜上 Ca^{2+} 的沉淀也增多了。简而言之,低温胁迫使 Ca^{2+} 由液泡向胞质转移。而且,使质膜和液泡膜上所结合的 Ca^{2+} 浓度增加。

2.3 枇杷不同抗寒品种幼叶细胞超微结构的变化

枇杷抗寒品种幼叶细胞叶绿体中类囊体不形成基粒,少数片层结合重叠后伸展在整个叶绿体中。2 个叶绿体之间极少见线粒体夹于其间。核孔未见明显开口。线粒体嵴清晰(图版 II: 7)。不抗寒品种类囊体则堆积形成明显的颗粒状基粒,类囊体片层数量多。在 2 个叶绿体之间常可见线粒体紧夹其间(图版 II: 8),线粒体的内膜模糊不清。核孔可见较大开口,有时可观察到核内容物外漏(图版 II: 9),观察中发现内质网和高尔基体较多见(图版 II: 10),内膜系统比较发达,但低温胁迫条件下膜系统易受破坏,膜结构模糊不清。

3 讨论

上述结果表明,在正常情况下,细胞内液泡中和细胞外的细胞间隙中 Ca^{2+} 的水平很高。 Ca^{2+} 既是一种大量元素,又是植物代谢和发育的主要调控者。目前,已建立了较为完整的植物细胞内 Ca^{2+} 信使系统的概念^[1, 8, 9]。当细胞受到低温胁迫刺激时,从质外体经质膜或从胞内贮 Ca^{2+} 体流向胞液的 Ca^{2+} 量增大,使胞质中 Ca^{2+} 浓度提高。 Ca^{2+} 浓度变化可将外界信息表达为生理生化过程,完成信息传递。这样通过在胞质内的 Ca^{2+} 浓度变化,可以把细胞外的信息传递到细胞内,调节相应的生理过程,这就是 Ca^{2+} 信使功能作用模式^[1, 2, 8, 9]。已发现许多生理生化反应都受 Ca^{2+} 的调控,如光、激素、重力等原初信号调节的生理反应都通过操纵胞内 Ca^{2+} 水平而实现;胞内 Ca^{2+} 水平的改变能导致细胞代谢过程的改变而引起生理反应^[10~14]。因此,在低温影响细胞的过程中,测定胞质中 Ca^{2+} 浓度的变化是判断低温反应与信使介导关系的一个关键。胞壁是细胞最大的 Ca^{2+} 库。植物体在低温作用下的信息传递迄今知之不多。近年来,关于低温和盐碱等逆境因子引起胞内 Ca^{2+}

水平的变化已有初步报道, 并引起逆境生理研究者的广泛注意^[6, 15~17]。

我们的观察结果显示, 枇杷幼叶在低温胁迫下细胞质的 Ca^{2+} 浓度显著增加, 这与王红等对水稻的观察结果是一致的^[6]。依据已有的有关 Ca^{2+} 信使功能的知识, 胞内 Ca^{2+} 水平的提高, 会造成细胞骨架和膜结构的破坏。膜结构的变化也会使膜的透性发生变化, 最终导致细胞内物质代谢的不平衡。此外, 细胞质内 Ca^{2+} 水平过度增加还会扰乱以 Ca^{2+} 、无机磷为基础的能量代谢系统。由于 Ca^{2+} 信使诱发的这一系列变化, 致使枇杷幼叶发生低温伤害。目前, 外界信息如何引起胞内 Ca^{2+} 浓度的变化已成为 Ca^{2+} 信使系统研究中的热点。外界信息可通过引起膜透性的变化而引起胞内 Ca^{2+} 浓度的变化, 以及外界信号也可通过开启或关闭膜上的 Ca^{2+} 通道而引起胞内 Ca^{2+} 浓度的改变。这些 Ca^{2+} 通道可能是镶嵌在膜脂双分子层中的蛋白质颗粒, 其开关受膜势及其蛋白质磷酸化的控制。我们研究结果显示, 冷处理后在细胞质中观察到 Ca^{2+} 沉淀增加, 液泡中的许多 Ca^{2+} 分布在液泡膜的内侧, 液泡中心部分的 Ca^{2+} 分布减少。低温胁迫条件下在质膜和液泡膜上 Ca^{2+} 的沉淀也增多了, 这些结果说明, 枇杷幼叶细胞膜结合 Ca^{2+} 与其抗寒性关系密切。此外, 枇杷抗寒品种幼叶细胞叶绿体中类囊体不形成基粒, 少数片层结合重叠后伸展在整个叶绿体中。2个叶绿体之间极少见线粒体夹于其间。核孔未见明显开口, 线粒体嵴清晰。不抗寒品种类囊体则堆积形成明显的颗粒状基粒, 类囊体片层数量多。在2个叶绿体之间常可见线粒体紧夹其间, 但线粒体的内膜模糊不清。内质网和高尔基体较多, 内膜系统比较发达。低温胁迫条件下核孔可见较大开口, 有时可观察到核内容物外漏, 膜系统易受破坏, 膜结构模糊不清。不抗寒品种低温胁迫条件下细胞的超微结构尚未出现其他明显破坏性变化, 这表明低温胁迫条件下细胞内外 Ca^{2+} 分布的变化较为敏感, 而细胞超微结构更为明显破坏性变化一般都发生在寒害较为严重之时。

参 考 文 献

- 1 龚明, 李英, 曹宗巽. 植物体内的钙信使系统. 植物学通报, 1990, 7(3): 19~29
- 2 Kauss H. Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. *Ann Rev Plant Physiol*, 1987, 38: 47~72
- 3 Hepler P K, Wayne R O. Calcium and plant development. *Ann Rev Plant Physiol*, 1985, 36: 397~439
- 4 Macklon A E S, Sin A. Cortical cell fluxes and transport to the stele in excised root segments of *Allium cepa* L. *Planta*, 1981, 152: 381~387
- 5 王红, 简令成, 张萃仁. 低温胁迫下水稻幼叶细胞内 Ca^{2+} 水平的变化. 植物学报, 1994, 36(8): 587~591
- 6 Minorsky P V, Spanswick R W. Electrophysiological evidence for a role for calcium in temperature sensing by roots of cucumber seedlings. *Plant Cell Environ*, 1989, 12: 137~143
- 7 Borgers M, Thone F J M, Xhonneux B J M. Localization of calcium in red blood cells. *J Histochem Cytochem*, 1982, 31: 1109~1116
- 8 Somly A P. Cellular site of Ca^{2+} regulation. *Nature*, 1984, 309: 516~517
- 9 Rasmussen H, Barrett P Q. Calcium messenger system: an integrated view. *Physiol Rev*, 1984, 64: 938~984
- 10 Poovaian B W, Reddy A S N, McFadden J J. Calcium messenger system: role of protein phosphorylation and inositol biphospholipids. *Physiol Plantarum*, 1987, 69: 569~573
- 11 毛节, 陈玉银, 缪颖. 甘蓝油菜雌蕊中花粉管生长途径的钙离子定位. 植物学报, 1992, 34: 233~236
- 12 何才平. 钙与植物的向性生长. 植物学通报, 1992, 9(1): 21~25
- 13 Jian L C, Sun L H, Dong H Z. Plant Cold Hardiness and Freezing Stress Vol 2. New York: Academic Press, 1982

243~259

- 14 William son R E, Ashley C C. Free Ca^{2+} and cytoplasmic streaming in alga *Chara N ature*, 1982, **296**: 647~651
- 15 Lynch J, Polito V S, Lauchli A. Salinity stress increases cytoplasm Ca activity in maize root protoplasts *Plant Physiol*, 1989, **90**: 1271~1274
- 16 Tsien R Y, Pozzan T, Rink T J. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new. Intracellularly trapped fluorescent indicator *J Cell Biol*, 1982, **94**: 325~334
- 17 Saunders M J, Helper P K. Localization of membrane-associated calcium following cytokinin treatment in *Funaria* using chlorotetracycline *Planta*, 1981, **152**: 272~281

图版说明

CP. 细胞质; ER. 内质网; Is 细胞间隙; M. 线粒体; N. 细胞核; F. 间质片层; Pm. 质膜; Vm. 液泡膜; V. 液泡; Ne 核膜; Np 核膜孔; Cw. 细胞壁; G. 高尔基体

图版 I

1 示细胞液泡及细胞间隙的焦锶酸钙沉淀 ($\times 9\ 000$); 2 示细胞核、线粒体、核基质和叶绿体也出现一些焦锶酸钙沉淀 ($\times 13\ 000$); 3 示内质网膜看不到焦锶酸钙沉淀 ($\times 21\ 000$); 4 示经 EGTA 处理的对照切片。在原来形成沉淀的部位成为透明区域 ($\times 7\ 000$); 5 示经 44 h、 4°C 低温处理的枇杷幼叶显示细胞质中和质膜上的钙沉淀物增加。细胞壁、细胞间隙钙沉淀物减少 ($\times 12\ 000$)

图版 II

6 示经 44 h、 4°C 低温处理的枇杷幼叶液泡内钙沉淀物减少。质膜和液泡膜上的钙沉淀物增加 ($\times 24\ 000$); 7 示枇杷抗寒品种细胞全貌 ($\times 9\ 000$); 8 示枇杷不抗寒品种细胞全貌 ($\times 9\ 000$); 9 示枇杷不抗寒品种核膜开口 ($\times 16\ 000$); 10 示枇杷不抗寒品种高尔基体 ($\times 18\ 000$)

Explanation of Plates

CP. Plasmalemma; ER. Endoplasmic reticulum; Is. Intercellular space; M. Mitochondria; N. Nuclei; F. Stroma thylakoids; V. Vacuole; Ne Nuclear membrane; Np. Nuclear pore; Cw. Cell wall; G. Golgi body; Vm. Vacuole membrane; Pm. plasma membrane

Plate I

1. The calcium antimonate precipitates visualized in intercellular spaces and vacuoles ($\times 9\ 000$); 2. The calcium antimonate precipitates visualized in mitochondria, nuclear substance and chloroplast ($\times 13\ 000$); 3. No calcium antimonate precipitates on ($\times 21\ 000$); 4. Sections treated with EGTA, showing electronic transparent areas at the same sites where the precipitate located before the treatment ($\times 7\ 000$); 5. The location of calcium precipitates increased in plasmalemma and plasma membrane, and decreased in intercellular spaces and on the cell wall, in the cells of the seedlings treated at 4°C for 44 h ($\times 12\ 000$)

Plate II

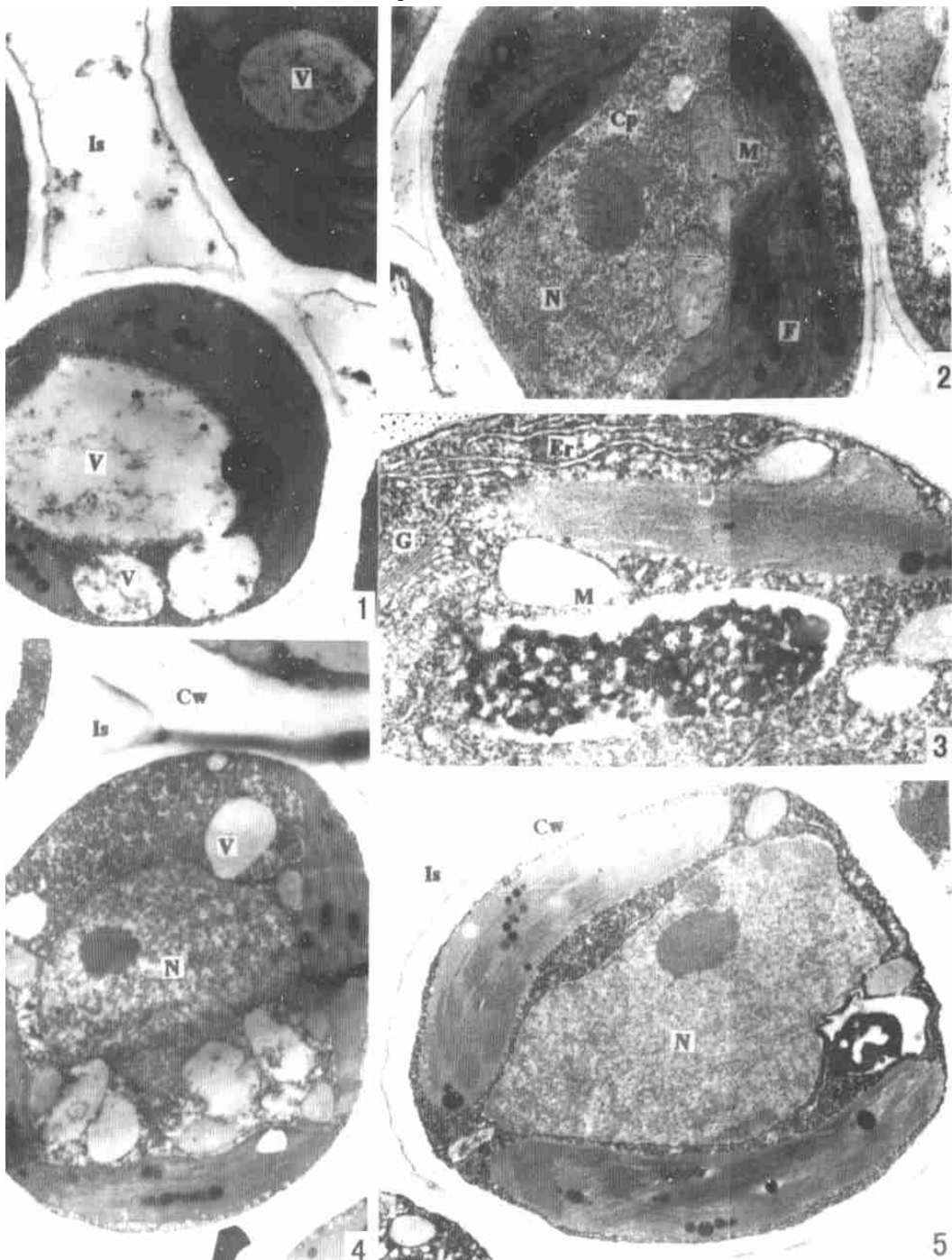
6. The location of calcium precipitates decreased in vacuoles, in the cells of the seedlings treated at 4°C for 44 h, and the location of calcium precipitates increased in vacuole membrane and plasma membrane ($\times 24\ 000$); 7. The cell outlook of the cold resistant variety ($\times 9\ 000$); 8. The cell outlook of the cold sensible variety ($\times 9\ 000$); 9. The opening on nuclear membrane and the leakage of nuclear substance in the cold sensible variety ($\times 16\ 000$); 10. The Golgi bodies in the cell of cold sensible variety ($\times 18\ 000$)

陈由强等: 低温胁迫下枇杷幼叶细胞内Ca²⁺ 水平及细胞超微结构变化

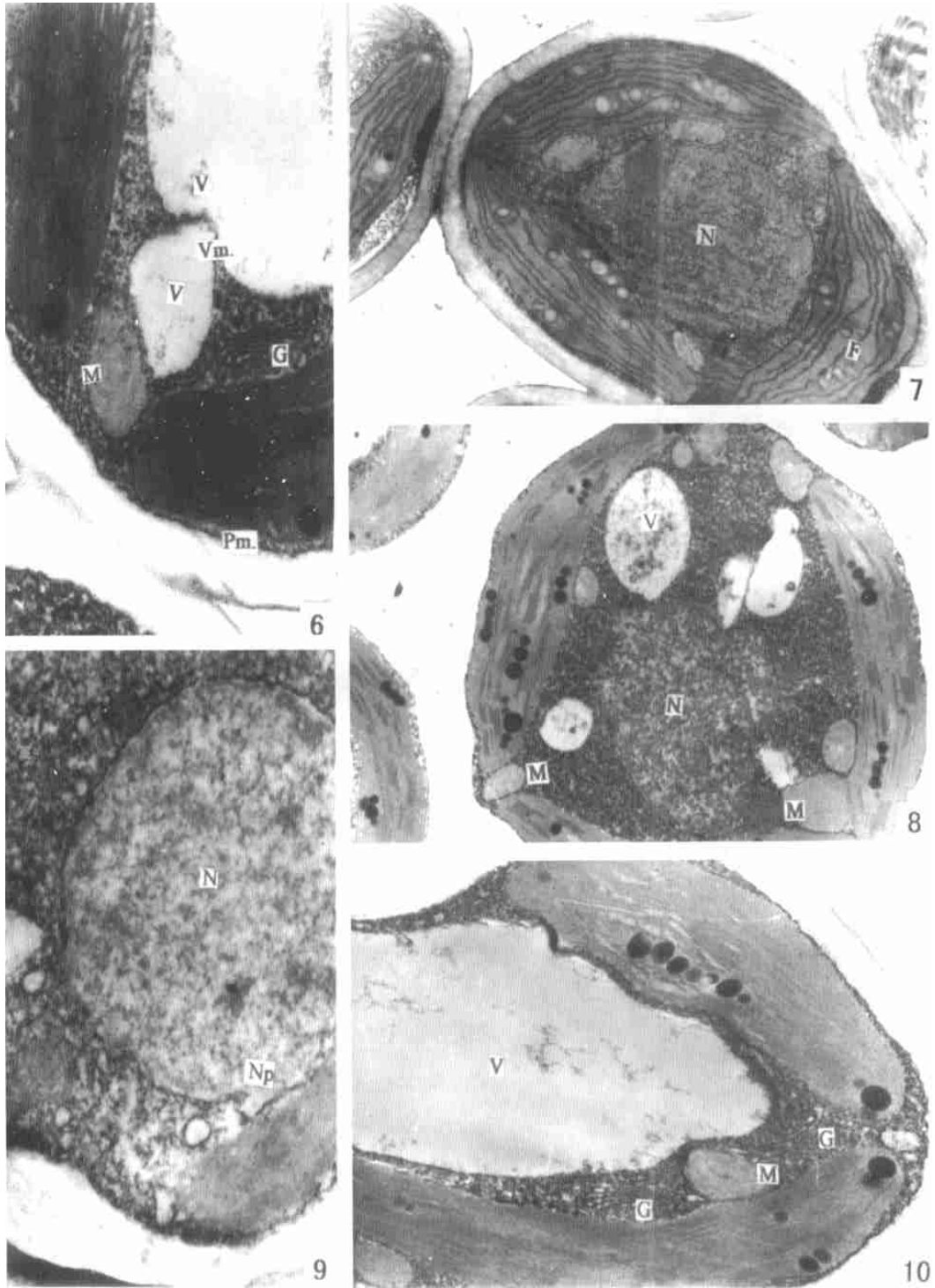
图版 I

Chen Youqiang *et al*: Changes of the level of Ca²⁺ in cells of loquat leaflets
under low temperature stress

Plate I



See explanation at the end of text



See explanation at the end of text