

低温胁迫下龙眼(*Dimocarpus longana* Lour.) 幼叶细胞内 Ca^{2+} 水平及细胞超微结构

陈由强 叶冰莹 朱锦懋 王丽雅

(福建师范大学生物工程学院, 福州 350007)

陈文列

(福建医科大学电镜室, 福州 350001)

摘要: 用焦磷酸钾沉淀的电镜细胞化学方法研究低温胁迫下龙眼(*Dimocarpus longana* Lour.)幼叶细胞内 Ca^{2+} 水平的变化。未经低温处理的幼叶, 细胞壁、细胞间隙、质膜和液泡存在大量的 Ca^{2+} 沉淀颗粒, 叶绿体、细胞质和细胞核中也有一些 Ca^{2+} 沉淀颗粒分布, 表明液泡和细胞间隙是植物细胞的钙库。龙眼幼叶经 4°C 44 h 处理后, 质膜上 Ca^{2+} 沉淀颗粒明显增多, 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下核膜开口, 有时可观察到核内容物外漏。抗寒品种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成明显的颗粒状基粒, 片层数量较多, 且叶绿体多数成蝶型排列。

关键词: 龙眼; 低温胁迫; 钙; 细胞化学; 膜结构

中图分类号: S667.2; S427 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2000)01-0012-04

Changes of the level of Ca^{2+} in cells and cytological electromicroscopic structure of longan leaflets under low temperature stress CHEN You-qiang, YE Bing-ying, ZHU Jing-mao, WANG Li-ya (Bio-engineering College, Fujian Normal University, Fuzhou 350007), CHEN Wen-lie (Fujian Medical University, Fuzhou, 350001), *J. Plant Resour. & Environ.* 2000, 9(1): 12~15

Abstract: The changes of Ca^{2+} localization in cells of longan (*Dimocarpus longana* Lour.) leaflets under chilling stress were investigated with calcium antimonate precipitate-electromicroscopic-cytochemical methods. When longan 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+} , and that there 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 longan leaflet was treated at the temperature of 4°C for 44 hours, the level of Ca^{2+} in cytoplasm and nucleus increased considerably. When the chilling stress occurs, a great amount of Ca^{2+} deposits in vacuole and chloroplast. The membrane of nucleus in the cold sensible variety had been damaged and some nuclear substances let out. There were some 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. The chloroplasts appear as butterfly-style in the cells of cold sensible variety.

Key words: *Dimocarpus longana* Lour.; low temperature stress; calcium; cytochemistry; membrane structure

Ca^{2+} 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营养元素, 更重要的是作为偶联胞外信号与胞内生理生化反应的第二信使, 调控植物代谢和发育^[2,3]。近年来, 关于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尚未见报道。龙眼是亚热带地区果树, 经济价值高, 但在生产实践中常因低温引起

冻害。本研究通过低温引起龙眼幼叶细胞内 Ca^{2+} 水平变化的细胞化学观察, 了解龙眼受低温危害的机理, 为探索克服低温危害的措施提供理论指导。

收稿日期: 1999-10-14

基金项目: 福建省教育委员会科学基金资助项目(K92020)

作者简介: 陈由强, 男, 1956年1月生, 博士生, 副教授, 从事植物生理学和植物分子生物学研究。

1 材料与方 法

1.1 材料及低温处理

龙眼(*Dimocarpus longana* Lour.)抗寒品种红核子和不抗寒品种东壁的小枝条,采自福建省农业科学院果树研究所。置冰箱中在 4°C 下水培 44 h,进行低温处理。未经低温处理的材料直接固定。

1.2 Ca^{2+} 的细胞化学方法

采用 Borger^[7] 的方法,略有修改。步骤简述如下:将龙眼幼叶切成 $0.5\text{mm} \times 3\text{mm}$ 的组织块,迅速投入用 2% 的焦锑酸钾(pH 7.6,用 100 mmol/L pH7.1 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。然后,用含 2% 焦锑酸钾的磷酸缓冲液(pH 7.6)洗涤 3 次,每次约 0.5 h。将洗涤过的材料转移至用含 2% 焦锑酸钾的缓冲液(pH 7.6)配制的 1% 锇酸中, 4°C 固定 4 h。先用重蒸水洗涤 4 次,再用(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,丙酮过度,环氧树脂 618 包埋, LKB-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 (pH 8.0) 溶液中, 60°C 处理 0.5~1 h, 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 结 果

2.1 未经低温处理龙眼东壁品种幼叶细胞内 Ca^{2+} 的定位分布

钙离子定位分布的电镜观察结果表明,焦锑酸钙沉淀颗粒大量出现在细胞内的液泡中(图版 I-1),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)。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-3)。

2.2 低温胁迫下龙眼东壁品种幼叶细胞中 Ca^{2+} 分布的变化

龙眼东壁品种幼叶经过 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-4)。细

胞超微结构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。此外,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+} 颗粒趋向靠近液泡膜(图版 I-4)。

2.3 龙眼不同抗寒品种幼叶细胞超微结构的变化

龙眼抗寒品种红核子品种幼叶细胞叶绿体中类囊体膜模糊不清,但线粒体嵴清晰,核膜未见开口(图版 I-5)。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,且叶绿体多数呈螺旋型排列(图版 I-6)。核膜可见开口,有时可观察到核内容物外漏(图版 I-7)。线粒体较多,线粒体的内膜模糊不清(图版 I-8)。

3 讨 论

上述结果表明,在正常情况下,细胞内液泡中 Ca^{2+} 的水平很高。细胞中的 Ca^{2+} 是调节多种细胞功能的一种细胞内第二信使,起着与环化腺苷酸(cAMP)相类似的作用。 Ca^{2+} 是一种大量元素,同时又作为植物代谢和发育的主要调控者。目前,已建立较为完整的植物细胞内 Ca^{2+} 信使系统的概念^[1,8-12]。当细胞受到外部刺激时,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+} 浓度提高后,通过激活 Ca^{2+} 调节的靶酶,或与 Ca^{2+} 受体蛋白如 CaM 结合,将 Ca^{2+} 浓度变化所蕴藏的外界信息表达为生理生化过程,完成信息传递。 Ca^{2+} 通过细胞中的 Ca^{2+} 跨膜运输系统如 Ca^{2+} -ATPase, 或 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向传递体与电子传递偶联的 Ca^{2+} 泵等被迅速泵出胞外或被胞内贮 Ca^{2+} 体吸收,引起胞质中 Ca^{2+} 浓度又回落到静息态的水平,从而与 Ca^{2+} 受体蛋白分离。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,近年来,关于低温和盐碱等逆境因子引起胞内 Ca^{2+} 水平的变化已有报道,并引起逆境生理研究者的广泛注意^[4-6,13-17]。

观察结果显示,龙眼幼叶在低温胁迫下细胞质的 Ca^{2+} 浓度显著增加,这与王红和张红等对黄瓜和水稻的观察结果是一致的^[4,5]。由于 Ca^{2+} 信使诱发一系列变化,致使龙眼幼叶发生低温伤害。龙眼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。核膜未见开

口。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,细胞内线粒体数量较多,在两个叶绿体之间常可见一个大的线粒体紧夹其间,叶绿体呈蝶型排列,有人认为叶绿体呈蝶型排列是在低温条件下叶绿体互相融合的结果,并认为这种融合有利于增加细胞骨架的稳定性和抵抗结冰的机械压力^[17]。但作者在龙眼抗寒品种中却没有观察到这种现象。此现象的意义有待进一步研究。

参考文献

- [1] 龚明,李英,曹宗巽. 植物体内的钙信使系统[J]. 植物学通报,1990,7(3):19~29.
- [2] Kaus H. Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism [J]. Ann Rev Plant Physiol, 1987,38: 47~72.
- [3] Hepler P K, Wayne R O J. Calcium and plant development [J]. Ann Rev Plant Physiol,1985,36: 397~439.
- [4] Macklon A E S, Sin A. Cortical cell fluxes and transport to the stele ion excised root segments of *Allium aepa* L [J]. Planta, 1981,152: 381~387.
- [5] 张红,简令成. 低温胁迫对黄瓜幼苗细胞内钙离子水平的影响及抗寒剂的调控作用[J]. 电子显微学报,1996,15(5): 386.
- [6] 王红,简令成,张举仁. 低温胁迫下水稻幼叶细胞内 Ca^{2+} 水平的变化[J]. 植物学报,1994,36(8): 587~591.
- [7] Minorsky P V, Spanswick R W. Electrophysiological evidence for a role for calcium in temperature sensing by roots of cucumber seedlings [J]. Plant Cell and Environ,1989,12: 137~143.
- [8] Borgers M, Thone F J M, Xhonneux B J M. Localization of calcium in red blood cells [J]. J Histochem Cytochem. 1982,31: 1109~1116.
- [9] Rasmussen H, Barrett P Q. Calcium messenger system; an integrated view [J]. 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 bisphospholipids [J]. 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[J]. 植物学报,1992,34:233~236.
- [12] 何才平. 钙与植物的向性生长[J]. 植物学通报,1992,9(1): 21~25.
- [13] Jian L C, Sun L H, Dong H Z, et al. Plant Cold Hardiness and Freezing Stress. Vol 2 [M]. New York: Academic Press. 1982. 243~259.
- [14] Somly A P. Cellular site of Ca^{2+} regulation [J]. Nature,1984,309: 516~517.
- [15] Williamson R E, Ashley C C. Free Ca^{2+} and cytoplasmic streaming in alga *Chara* [J]. Nature, 1982,296: 647~651.
- [16] Lynch J, Polito V S, Lauchli A. Salinity stress increases cytoplasm Ca activity in maize root protoplasts [J]. Plant Physiol, 1989,90: 1271~1274.
- [17] 韩善华. 沙冬青冬季叶绿体的超微结构特征[J]. 实验生物学报,1994,4:389~397.

图版说明 Explanation of Plate

Cp: 细胞质 cytoplasm; Cw: 细胞壁 cell wall; G: 基粒 grana; Is: 细胞间隙 intercellular spaces; M: 线粒体 mitochondrion; N: 细胞核 nucleus; Np: 核孔 nuclear pore; Pm: 质膜 plasmolemma; Vm: 液泡膜 vacuolar membrane; V: 液泡 vacuole

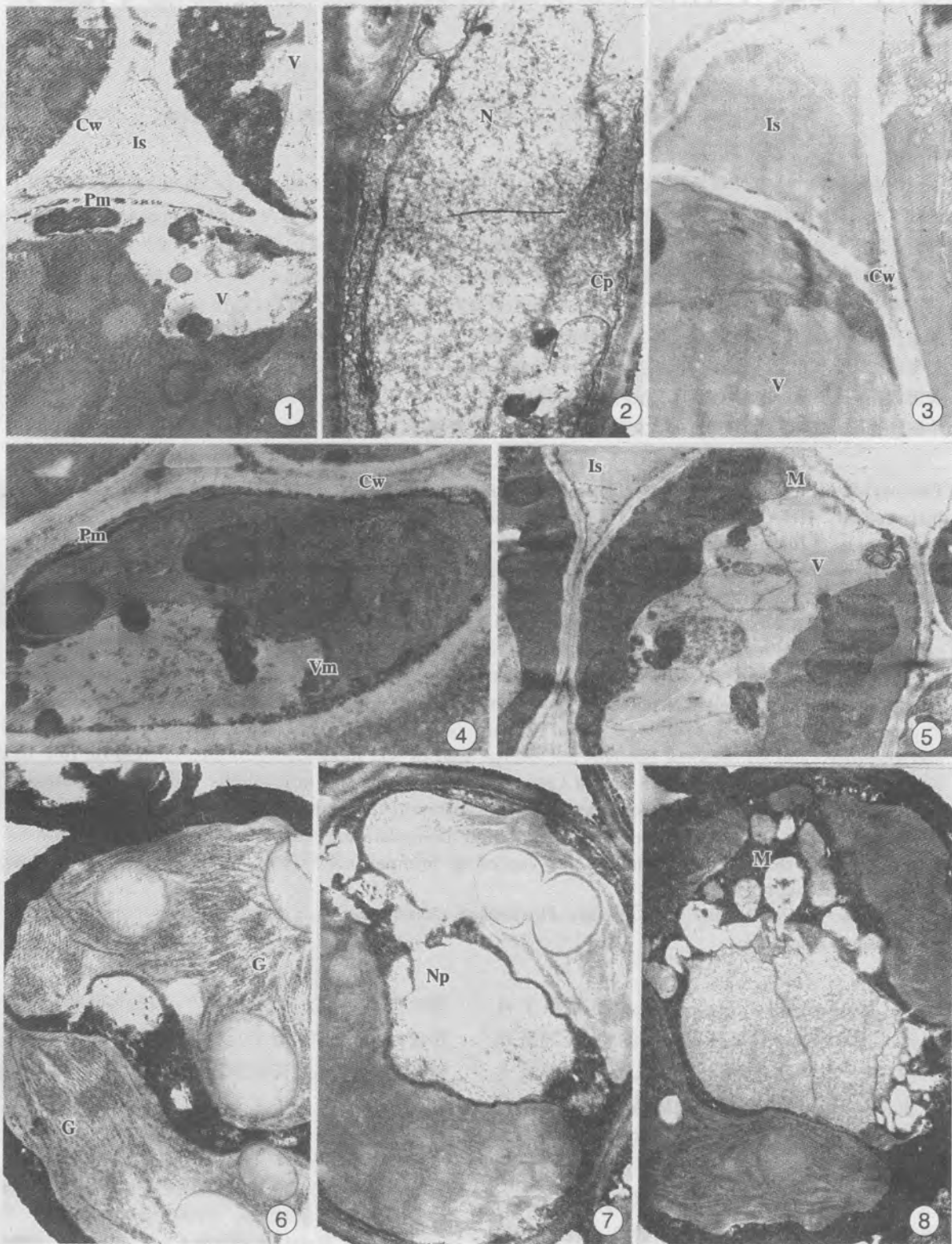
1. 示细胞壁、质膜、叶绿体、细胞间隙及液泡的焦锑酸钙沉淀($\times 12\ 000$); 2. 示细胞质膜和核基质焦锑酸钙沉淀($\times 12\ 000$); 3. 示经 EGTA 处理的对照切片。在原来形成沉淀的部位成为透明区域($\times 7\ 000$); 4. 示经 44 h 4℃ 低温处理的龙眼幼叶显示质膜,液泡膜和细胞壁中的钙沉淀物增加($\times 15\ 000$); 5. 示龙眼抗寒品种叶绿体中类囊体基粒不清晰,但线粒体清晰($\times 6\ 000$); 6. 示龙眼不抗寒品种细胞叶绿体中类囊体基粒清晰,叶绿体呈蝶型排列($\times 12\ 000$); 7. 示龙眼不抗寒品种核膜开口,内容物外漏($\times 9\ 000$); 8. 示龙眼不抗寒品种线粒体丰富,但线粒体嵴模糊不清($\times 9\ 000$)。

1. The calcium antimonate precipitates visualized in intercellular spaces, vacuoles, chloroplasts and cell wall ($\times 12\ 000$); 2. The calcium antimonate precipitates visualized in plasmolemma and nuclei ($\times 12\ 000$); 3. Sections treated with EGTA, showing electronic transparent areas at the same sites where the precipitate located before the treatment ($\times 7\ 000$); 4. The location of calcium precipitates increased in plasmolemma, vacuolar membrane and cell wall, in the cells of the seedlings treated at 4℃ for 44 h ($\times 15\ 000$); 5. The stroma thylakoids were unclear in the chloroplasts of cold resistant variety but the mitochondria membranes were clear ($\times 6\ 000$); 6. The stroma thylakoids membranes were clear, and the chloroplasts showed a butterfly-shape in non-cold-resistant variety ($\times 12\ 000$); 7. The opening on nuclear membrane and the leakage of nuclear substance in non-cold-resistant variety ($\times 9\ 000$); 8. There were more mitochondria in non-cold-resistant variety but their membranes were unclear ($\times 9\ 000$).

(责任编辑:许定发)

CHEN You-qiang *et al*: Changes of the level of Ca^{2+} in cells of longan leaflets under low temperature stress

图版 I
Plate I



See explanation of the end of text