

# 低温胁迫下董棕(*Garyota urens* L.) 幼苗叶肉细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 水平及细胞超微结构的变化

<sup>1</sup> 谢潮添 <sup>1</sup> 杨盛昌 <sup>2</sup> 廖启焯 <sup>2</sup> 丁印龙 <sup>3</sup> 陈文列

<sup>1</sup>(厦门大学生命科学学院 厦门 361005) <sup>2</sup>(厦门园林植物园 厦门 361003)

<sup>3</sup>(福建医科大学电镜室 福州 350001)

**摘要** 用焦锑酸钙沉淀的电镜细胞化学方法,研究了低温胁迫下董棕(*Garyota urens* L.) 幼苗叶肉细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平的变化。研究表明,未经低温处理的董棕幼苗叶肉细胞,焦锑酸钙沉淀颗粒大量出现在液泡和细胞间隙中,细胞壁中也可见少量沉淀,而细胞基质中则看不到焦锑酸钙沉淀;经 2~48 h 低温处理后,细胞基质和细胞膜上焦锑酸钙沉淀增加,而液泡和细胞间隙中的焦锑酸钙沉淀则显著减少,并且超微结构已初步显示出寒害的特征,叶绿体外膜部分破损,类囊体片层稀疏且排列不规则,光合速率明显下降等;经 2~120 h 低温处理后,细胞间隙内的焦锑酸钙沉淀极少,有的也紧贴在细胞外壁上,而细胞基质和细胞膜上则分布有非常多的焦锑酸钙沉淀,在核基质和液泡中也可见到少量的焦锑酸钙沉淀,并且超微结构遭到了显著破坏,叶绿体结构完全被破坏,核膜与液泡膜严重破损,内部结构模糊,细胞只表现为呼吸作用,不进行光合作用。表明  $\text{Ca}^{2+}$  的区域性分布的变化与植物抗寒性存在一定关系。

**关键词** 董棕,低温胁迫,钙细胞化学

## The Changes in $\text{Ca}^{2+}$ level and ultrastructure in the Leaf Cells of *Garyota urens* L. under Low Temperature Stress

<sup>1</sup>XIE Chao-Tian <sup>1</sup>YANG Sheng-Chang <sup>2</sup>LIAO Qi-Liao

<sup>2</sup>DING Yin-Long <sup>3</sup>CHENG Wen-Lie

<sup>1</sup>(Life Sciences College, Xiamen University, Xiamen 361005)

<sup>2</sup>(Xiamen Botanical Garden, Xiamen 361003)

<sup>3</sup>(Fujian Medical University, Fuzhou 350001)

**Abstract** The changes in  $\text{Ca}^{2+}$  localization in the leaf cells of *Garyota urens* L. under chilling stress were investigated with calcium antimonate precipitate-electronmicroscopic-cytochemical methods. When *Garyota urens* L. grew on the normal temperature, it was shown that the deposits of calcium antimonate being the indicator for  $\text{Ca}^{2+}$  localization mainly concentrated within the vacuoles and intercellular spaces and there was also some  $\text{Ca}^{2+}$  deposits in cell walls. But when *Garyota urens* L. was treated by the temperature of 2~48 h, the level of  $\text{Ca}^{2+}$  increased in cytoplasm and plasma membrane, but decreased in vacuoles and intercellular spaces considerably. At the same time, the ultrastructure of chloroplasts suffered from chilling: the membrane of chloroplasts had been damaged, the layer of thylakoids was exiguous and unclear, the photosynthetic rate decreased evidently. And when *Garyota urens* L. was treated by the temperature of 2~120 h, the deposits of

国家建设部及厦门市建委资助项目。

通讯作者。Author for correspondence. Tel.: 86-592-2184062; E-mail: ctxie@163.net

作者简介:谢潮添,1977年生,厦门大学生命科学学院在读硕士生。杨盛昌,博士,厦门大学生命科学学院副教授,主要从事植物生理及分子生物学研究。

收稿日期:2002-06-15 接受日期:2002-07-31 责任编辑:刘晖,崔郁英

$\text{Ca}^{2+}$  mainly concentrated within the cytoplasm, nucleus and plasma membrane and there was also some  $\text{Ca}^{2+}$  deposits in vacuoles, and the ultrastructure of some cells was simultaneously damaged severely: Chloroplasts structure, vacuole membrane and nuclear membrane had been damaged fully, the structure within the cell had become unclear, and the cell only have respiration. Thus it can be seen that there are some relations between the changes in  $\text{Ca}^{2+}$  distribution within the cell and plant cold-hardiness.

**Key words** *Garyota urens* L., Chilling stress, Calcium cytochemistry

近 20 年来,人们发现  $\text{Ca}^{2+}$  作为植物的第二信使,广泛参与并调节着植物体中的生理生化反应,是植物发育和代谢调节的主要调控者(Kauss,1987)。植物对低温胁迫感受适应中, $\text{Ca}^{2+}$  可能起着接受和传递胁迫信号的作用(王洪春,1992),而钙信使系统起作用的中心环节是细胞中  $\text{Ca}^{2+}$  的空间和浓度的变化,并且  $\text{Ca}^{2+}$  有防止膜损伤和渗漏,稳定膜结构和维持膜的完整性的作用(Paltra,1996)。因此,钙在植物抗逆性方面的作用越来越被人们所重视。

近年来有关低温引起植物细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  定位上的变化已有一些研究,但大多数集中在农作物和木本植物上。而对园林花卉植物的研究则未见报道。董棕是棕榈科鱼尾葵属常绿乔木,为国家二级保护植物,是热带地区优良的观赏树种,在北移引种到温带地区时,易受低温胁迫的影响,甚至受害死亡。本研究试图通过低温引起董棕幼叶细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平变化的电镜细胞化学观察,进一步阐明低温危害的机理,丰富对董棕抗寒生理学的认识,为其引种驯化提供理论知识。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及低温处理

材料取自厦门园林植物园的一年生董棕幼苗,置于  $2^{\circ}\text{C}$  的低温冰柜中进行低温冷害处理,定时取样,未经低温处理的材料直接取样固定。

### 1.2 $\text{Ca}^{2+}$ 的细胞化学方法

根据 Borgers 等(1982)的方法,稍加修改。步骤简述如下:将董棕幼苗叶片切成  $0.5\text{ mm} \times 0.3\text{ mm}$  的组织块,迅速投入用 2% 的焦锑酸钾(pH 7.6,用 100 mmol/L pH 7.1 的磷酸缓冲液配制)配制的 3% 戊二醛固定液中,室温固定 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 30 min,将洗涤过的材料转移至用 2% 焦锑酸钾磷酸缓冲液(pH 7.6)配制的 1% 钨酸中,4 $^{\circ}\text{C}$  固定过夜,先用重蒸水洗涤 3 次,再用(pH 10.0)的重蒸水洗涤 2 次,每次 30 min,随后经系列丙酮脱水,环氧丙烷过渡,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 21u-12A 型电子显微镜照相,对照切片的处理是在电镜下确定有焦锑酸钙沉淀的定位切片漂浮在 100 mmol/L 的 EGTA (pH 8.0) 溶液中,60 $^{\circ}\text{C}$  处理 30 min,  $\text{Ca}^{2+}$  与 EGTA 螯合,脱去原沉淀中的  $\text{Ca}^{2+}$ ,再置于电镜下观察照相。

### 1.3 光合速率和蒸腾速率的测定

用英国产的 CIRAS 便携式光合作用测定仪测定光合速率和蒸腾速率。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 未经低温处理的董棕幼苗叶肉细胞内 $Ca^{2+}$ 的水平及超微结构观察

钙离子定位分布的电镜观察结果显示:焦锑酸钙沉淀颗粒大量出现在液泡和细胞间隙中(图 1),而在细胞基质、叶绿体和细胞核中则看不到焦锑酸钙沉淀。以上观察到的沉淀颗粒,在切片经 EGTA 处理后,沉淀物即被消除,液泡、细胞间隙等  $Ca^{2+}$  分布的部位上表现出透明区域,说明切片中的钙离子定位反映的是真实的。这个结果表明液泡和细胞间隙是植物细胞的主要  $Ca^{2+}$  库,正常情况下,细胞基质中的  $Ca^{2+}$  浓度很低。

正常条件下叶绿体结构完整,内有较多淀粉粒分布,液泡较大,约占细胞体积的2/5,细胞核基质多为常染色质,异染色质基本看不到,有的细胞中可见核与核仁(图 2)。

### 2.2 低温处理的董棕幼苗叶肉细胞内 $Ca^{2+}$ 的水平及超微结构观察

董棕幼苗经 248 h 低温处理后,在电镜下可见液泡内和细胞间隙中的焦锑酸钙沉淀很少或消失,而细胞基质和细胞膜上则分布有较多的焦锑酸钙沉淀(图 3),这可能是因

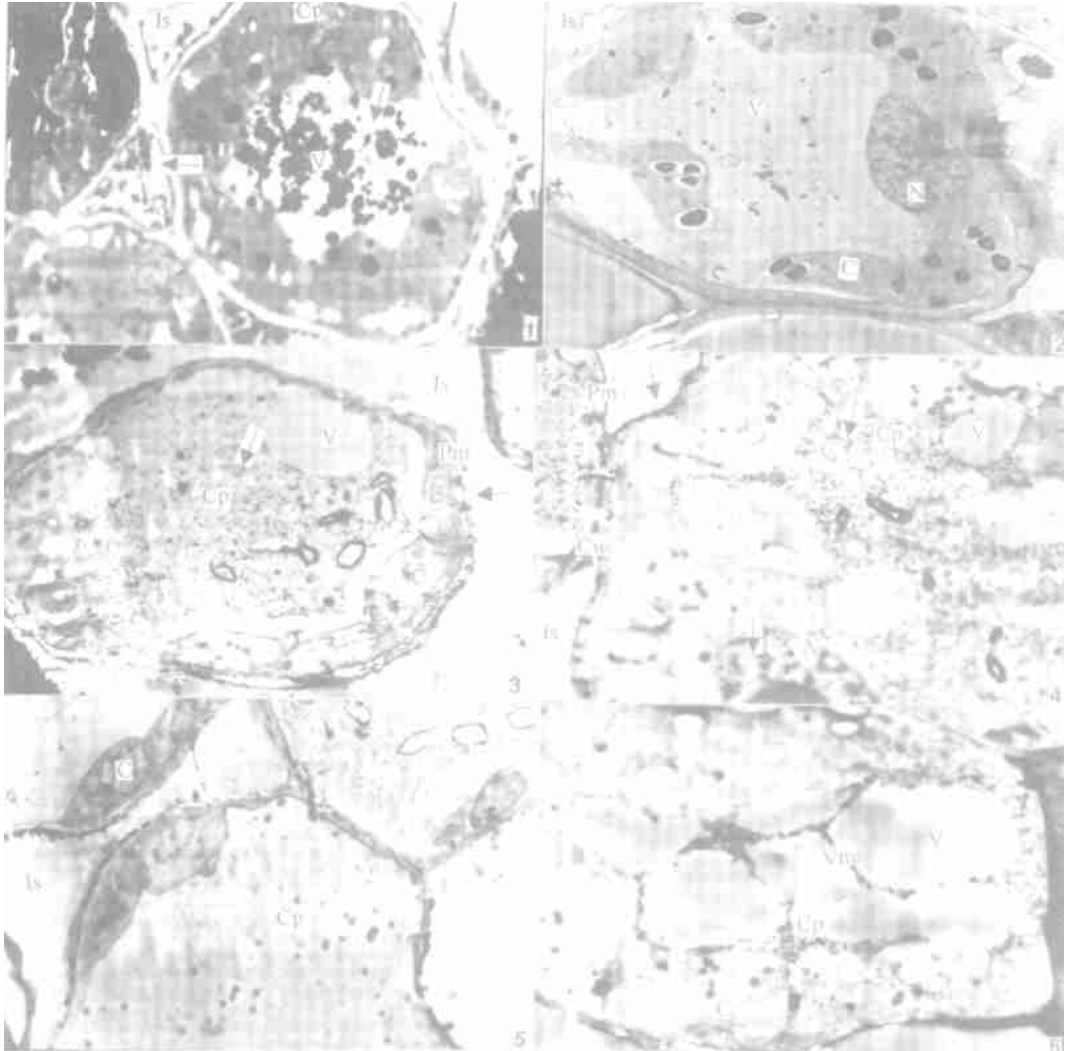


图 1 正常细胞的焦锑酸钙沉淀电镜观察。示液泡和细胞间隙中的焦锑酸钙沉淀 ( $\times 3\ 600$ ); 图 2 正常细胞的超微结构。示细胞内的完整叶绿体结构及其内部的淀粉粒, 液泡较大, 细胞核基质多为异染色体 ( $\times 4\ 800$ ); 图 3 2, 48 h 低温处理后的细胞电镜观察。示液泡和细胞间隙中的焦锑酸钙沉淀减少或消失, 细胞基质和细胞膜上有较多的焦锑酸钙沉淀, 较完整的叶绿体结构 ( $\times 3\ 600$ ); 图 4 2, 120 h 低温处理后的细胞电镜观察。细胞间隙中的焦锑酸钙沉淀极少, 有的也紧贴在细胞外壁上, 而细胞基质、核基质和细胞膜上则有非常多的焦锑酸钙沉淀, 在液泡中也可见到少量的焦锑酸钙沉淀 ( $\times 3\ 600$ ); 图 5 2, 48 h 低温处理后超微结构的变化, 示叶绿体外膜破损, 内囊体片层比对照稀疏且排列不规则, 见不到沉淀颗粒 ( $\times 3\ 600$ ); 图 6 2, 120 h 低温处理后超微结构的变化, 示叶绿体结构已经完全被破坏, 核膜与液泡膜严重破损, 内部结构模糊 ( $\times 4\ 800$ )

Cp. 细胞质; Is. 细胞间隙; C. 叶绿体; N. 细胞核; Pm. 质膜; Vm. 液泡膜; V. 液泡; Cw. 细胞壁

Fig. 1 The calcium antimonate precipitates in normal cell. Showing the calcium antimonate precipitates within intercellular spaces and vacuoles ( $\times 3\ 600$ ); Fig. 2 The ultrastructure of normal cell. Showing the chloroplast, starch and vacuoles, and the chromatin mainly is heterochromatin ( $\times 4\ 800$ ); Fig. 3 The calcium antimonate precipitates in the cell after treatment with 2 for 48 h. Showing the calcium antimonate precipitates were mainly in cytoplasm and plasma membrane, but within the intercellular spaces and vacuoles was very few ( $\times 3\ 600$ ); Fig. 4 The calcium antimonate precipitates in the cell after treatment with 2 for 120 h. Showing almost all the calcium antimonate precipitates were in the cytoplasm, nucleus and plasma membrane, and that there was also some  $\text{Ca}^{2+}$  deposits in vacuoles ( $\times 3\ 600$ ); Fig. 5 The changes in cell ultrastructure after treatment with 2 for 48 h. Showing the membrane of chloroplasts had been damaged, the layer of thylakoid was exiguous and unclear ( $\times 3\ 600$ ); Fig. 6 The changes in cell ultrastructure after treatment with 2 for 120 h. Showing the ultrastructure was damaged severity: the structure of chloroplasts, vacuole membrane and nuclear membrane had been damaged fully, and the structure within the cell had been unclear ( $\times 4\ 800$ ).

Cp. Cytoplasm; Is. Intercellular space; C. Chloroplast; N. Nucleus; Pm. Plasma membrane; Vm. Vacuole membrane; V. Vacuole; Cw. Cell wall

为在低温处理下液泡和细胞间隙中的  $\text{Ca}^{2+}$  通过膜上的钙通道进入细胞质中的结果。

经 2, 120 h 的低温处理后, 细胞间隙内的焦锑酸钙沉淀极少, 有的也紧贴在细胞外壁上, 而细胞基质、核基质和细胞膜上则分布有非常多的焦锑酸钙沉淀, 在液泡中也可见到少量的焦锑酸钙沉淀 (图 4)。推测可能是因为细胞间隙和液泡中的  $\text{Ca}^{2+}$  大量进入了细胞基质, 但由于在长时间的低温处理下, 核膜与液泡膜已经破损, 使得已经进入细胞基质中的  $\text{Ca}^{2+}$  又有部分通过膜的破损部分重新进入液泡与核质中。

在超微结构上, 经过 48 h 低温处理的幼苗, 其叶绿体外膜破损, 类囊体片层比对照稀疏且排列不规则, 见不到沉淀颗粒 (图 5), 内有中等电子密度颗粒分布。而经过 120 h 低温处理的幼苗, 其叶绿体结构已经完全被破坏, 核膜与液泡膜严重破损, 内部结构模糊 (图 6)。

### 2.3 光合速率及蒸腾速率测定结果

由图 7 可以看出: 随着低温处理天数的增加, 光合速率表现为明显的下降趋势, 并且在处理 5 d 后,

测定的光合速率为负值, 说明此时细胞只存在呼吸作用, 而不能进行光合作用; 而蒸腾速

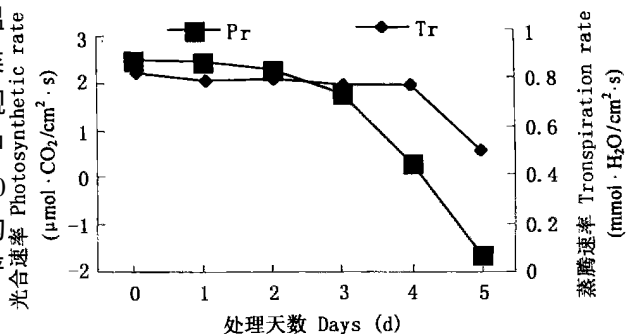


图 7 低温胁迫下董棕幼苗光合速率 (Pr) 及蒸腾速率 (Tr) 的变化

Fig. 7 Changes in photosynthetic rate (Pr) and transpiration rate (Tr) of *Garryota urens* L. seedling under low temperature stress

率在刚开始时变化不大,只在最后一天才表现为明显的下降。这可能是由于随着低温处理天数的增加,叶绿体破坏日益严重,从而导致光合速率逐渐下降,直至完全消失,而低温对气孔的影响并不显著,只在遭受了严重寒害,才表现为蒸腾速率的明显下降,这些现象与超微结构的观察结果是相符的。

### 3 讨论

许多研究已经证明  $\text{Ca}^{2+}$  是植物细胞内重要的信使,在植物的发育与代谢的调控中起着重要作用。在正常的生长条件下,植物细胞基质中的  $\text{Ca}^{2+}$  水平很低,液泡是高等植物的主要  $\text{Ca}^{2+}$  库,细胞外间隙中也存在着大量的  $\text{Ca}^{2+}$  (Jian *et al*, 2000), 我们的实验结果与此相符。越来越多的实验已经证明许多外源和/或内源的刺激因素如:光、低/高温、风、重力、缺氧、盐胁迫、激素以及由基因控制的生理状态的改变等,都可以通过质膜上  $\text{Ca}^{2+}$  载运体的运输或细胞内贮钙体的状态变化改变  $\text{Ca}^{2+}$  在细胞内的区域性分布,从而进一步引发植物细胞内的一系列生理生化反应,最终表现为植物发育或代谢状态的改变 (Poovaiah and Reddy, 1993; Bush, 1995)。因此通过测定细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平的变化,了解其在接受刺激时的时空变化规律,可以丰富对植物细胞信号传导规律的认识,同时也可对调控植物的发育和代谢提供一些理论指导。

细胞质中的  $\text{Ca}^{2+}$ , 当其浓度和分布在适当的范围内变化时,会在植物对外界环境调节适应中起着积极的作用,但当其变化超过一定的范围,就会破坏和扰乱细胞正常的结构与功能,如造成细胞骨架和膜结构的破坏,使膜透性发生变化,并最终导致细胞内物质代谢的不平衡,并发生紊乱 (Bush, 1995)。本实验的观察结果显示,董棕幼叶在低温处理 48 h 后,细胞质中的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度显著增加,而液泡和细胞间隙中的  $\text{Ca}^{2+}$  沉淀则减少,这表明液泡和细胞间隙中的  $\text{Ca}^{2+}$  由于受到冷害的刺激就通过膜上的钙离子转运通道或其他途径进入到细胞基质中,并在其中起到第二信使的作用,推测会启动和调节相应的抗寒基因的转录与调控,从而引发一系列与增强抗寒性相关的生理生化反应,如耐冷相关蛋白的出现,部分酶(如过氧化物酶,过氧化氢酶,ATP 酶等)活性增强,内源保护物质增加等,从而提高植物的抗寒力 (Monroy and Dhindsa, 1995; 雷江丽等, 2000)。从超微结构的观察、光合速率及蒸腾速率的测定中可以看出,此时细胞的内部结构已经部分破损,光合速率稍有下降,表现出了轻微的寒害特征,说明 48 h 的低温处理已经超出了植物的自我调节域。

当董棕幼苗在低温下处理 120 h 以后,细胞间隙内的焦磷酸钙沉淀极少,有的也紧贴细胞外壁上,而细胞基质、核基质和细胞膜上则分布有非常多的焦磷酸钙沉淀,在液泡中也可见到少量的焦磷酸钙沉淀,这可能是由于长时间的低温处理,液泡和细胞间隙的大部分  $\text{Ca}^{2+}$  都进入到基质中,使得细胞质中的  $\text{Ca}^{2+}$  沉淀异常聚集,而细胞基质中  $\text{Ca}^{2+}$  大量增加,结果就扰乱了细胞的正常生理代谢平衡,并对质膜的通透性和细胞骨架造成破坏,从而使植物表现出寒害的特征,如:叶片部分干枯,细胞超微结构破损严重,植株只表现呼吸作用而没有光合作用发生,蒸腾速率显著下降等,严重者可导致植物死亡。当将 2 处理 48 h 的董棕幼苗取出置于常温中继续培养,其很快就恢复正常生长,很少或几乎不出现干枯叶片;而将 2 处理 120 h 的董棕幼苗取出置于常温中继续培养,则发现董棕幼苗需经过较长时间才能恢复正常生长,并有许多叶片发生了干枯现象。因此,这个实验

初步表明了细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度与植物的抗寒性及细胞超微结构在低温下受到的破坏程度存在着一定的相关性,继续深入对低温引起  $\text{Ca}^{2+}$  区域分布的变化机理的研究,将有助于揭示植物抗寒的机理,并为植物的引种驯化,筛选抗寒品种等提供一定的理论依据。

### 参 考 文 献

- 王洪春,1992. 植物对低温逆境的反应. 见:余叔文,汤章诚编,植物生理与分子生物学. 北京:科学出版社,395
- 雷江丽,杜永臣,朱德蔚,2000. 低温胁迫下不同耐冷性番茄品种幼叶细胞  $\text{Ca}^{2+}$  分布变化的差异. 园艺学报,27(4):269~275
- Borgers M, Thone F J M, Xhonneux B J M, 1982. Localization of calcium in red blood cells. *J Histochem Cytochem*, 31:1109~1116
- Bush D S, 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 46:95~122
- Jian L C, Sun L H, Li J H, 2000.  $\text{Ca}^{2+}$ -homeostasis differs between plant species with different cold-tolerance at 4 °C chilling. *Acta Botanica Sinica*, 42(4):358~366
- Kauss H, 1987. Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. *Ann Rev Plant Physiol*, 38:47~72
- Monroy A F, Dhindsa R S, 1995. Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25 °C. *Plant Cell*, 7:321~331
- Paltra J P, 1996. Role of calcium in plant responses to stresses: linking basic research to the solution of practical problems. *Hort Science*, 31(1):51~57
- Rbovaiah B W, Reddy A S N, 1993. Calcium and signal transduction in plant. *Critical Rev Plant Sci*, 12:185~211

## 第七届全国花粉资源开发与利用研讨会在浙江缙云举行

第七届全国花粉资源开发与利用研讨会于9月20~22日在浙江省缙云县仙都度假村隆重召开,来自全国各地的70多位教授、研究员、企业家和花粉工作者出席了会议。

会议由全国花粉资源开发与利用联络组副组长高级工程师张大隆主持,全国花粉资源开发与利用联系联络组组长同济大学花粉应用研究中心主任王开发教授致开幕词,浙江省农业厅陈润龙副局长、缙云县王军副县长等到会祝贺。

此次会议主题是入世后我国花粉研究与开发,提交大会的论文有50篇,涉及到入世后我国花粉产业的分析与对策,花粉资源、花粉形态,花粉优质高产新技术,花粉产品新工艺,花粉营养成分,花粉药理药效与临床研究等,全面展示了我国花粉工作者两年来的研究和开发进展与成果,有的成果已进入国际研究的前沿。在会有22篇论文作了精彩的报告,如“把握机遇迎接入世后我国花粉事业的发展”,“花粉不同温度处理对生物效能的影响”,“花粉抗衰老的生物效应研究”,“花粉多糖组分的高效毛细管电泳分析”,“油菜花粉中脂肪酸的GC-MS分析”,“茶花粉蜂粮中花粉显微结构研究”,“花粉、蜂胶对糖尿病SD大鼠的影响”等等,还有9位老教授、著名企业家在会上作了专题发言。与会者从不同角度、不同学科、不同领域发表了各自的见解。

我国花粉产品市场不断向前发展和扩大,原料产品市场大为发展,花粉新制品不断涌现,全国花粉保健品已有32种获国家卫生部批准,名牌产品逐步形成,产品不仅在食品、保健品市场较好展开,在花粉药品、化妆品也有相当的发展,花粉饲料添加剂产品也显露角色,花粉促生剂产品有望进入市场,我国花粉市场呈现欣欣向荣的景象,只要我们很好利用加入WTO之后的机遇,注意利用WTO的规则,发挥我国花粉研究和开发既有的优势,就能很好推动我国花粉事业向前发展。

会议决定第八届全国花粉资源开发与利用研讨会于2004年在山东济南市举行。

(花宣)