

梨果实发育中 Ca^{2+} 在果肉细胞的定位及变化研究*

彭抒昂¹ 岩堀修²

(¹ 华中农业大学园艺系, 武汉 430070; ² 筑波大学农林学系, 日本筑波 305)

摘要: 用焦锑酸钾沉淀的细胞化学方法, 研究了‘幸水’梨果实发育中果肉细胞的焦锑酸 Ca^{2+} 定位变化及其与细胞超微结构的关系。结果表明: (1) 在未受精之前, 果肉细胞内未检测到 Ca^{2+} 沉淀颗粒, 细胞核内的染色质少且染色淡, 细胞质的细胞器数量也少; (2) 受精后果肉细胞呈现大量的 Ca^{2+} 沉淀颗粒, 主要分布在细胞核、细胞质、质体以及叶绿体外膜上, 含 Ca^{2+} 沉淀颗粒的质体非常膨大, 导管和初期发育的石细胞内也密集分布 Ca^{2+} 沉淀颗粒; (3) 受精 1 周后果肉细胞的 Ca^{2+} 移向细胞之间的连接处; (4) 生理落果的细胞和导管中 Ca^{2+} 没有或极少, 但有的细胞内沿液泡膜有 Ca^{2+} 分布; (5) 受精 3~ 4 周后, 果肉细胞中很难检测到 Ca^{2+} 沉淀颗粒, 此状态一直持续到果实采收, 但果实腐烂前 Ca^{2+} 沉淀颗粒沿果肉细胞壁两侧出现。就 Ca^{2+} 在果实发育中的作用及与细胞超微结构的关系等进行了讨论。

关键词: 梨; 果实发育; Ca^{2+} 定位

中图分类号: S 661. 2; Q 945 文献标识码: A 文章编号: 0513 353X (2001) 06 0497-07

现已清楚, 果实中钙的含量不仅关系到果实质地, 影响果实的软化和腐烂, 而且还与一些严重的生理病害有直接关系, 足够的钙含量可使细胞壁和膜系统稳定, 延迟果实的衰老^[1, 2]。近年来虽有许多关于果实钙的吸收规律及人工补钙效果的报道^[3~ 5], 但极少有对果实发育中 Ca^{2+} 的细胞学动态, 特别是果实发育不同时期 Ca^{2+} 在细胞中的定位分布及其与细胞超微结构的关系的研究。有许多研究采用焦锑酸钾沉淀法来定位植物细胞中的 Ca^{2+} , 并通过 Ca^{2+} 所分布的细胞超微结构的功能来了解其作用^[6~ 9], 但甚少应用于果实发育的研究。因此, 本研究中用电子显微镜的细胞化学方法, 对梨果实发育过程中果肉细胞的 Ca^{2+} 定位动态进行了观察, 以期进一步阐明 Ca^{2+} 在果实中的代谢规律和生理作用。

1 材料与方法

1.1 材料及采样处理

试验于 1999 年进行, 试材为日本筑波大学附属农林技术中心果园栽植的成年‘幸水’梨 (*Pyrus pyrifolia* Nakai cv. Kosui), 从 4 月 20 日盛花期开始采样, 幼果期 5~ 7 d 采样 1 次, 6 月以后约 10 d 采样 1 次, 直至 8 月 23 日采收。采收的果实于室温下存放, 10 d 取样 1 次, 直至腐烂。将采样后的果实分为果皮侧和果心侧的果肉部分。

收稿日期: 2001- 04- 03; 修回日期: 2001- 05- 25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870517)

* 试验在日本筑波大学农林学系果树研究室完成。

1.2 Ca^{2+} 的细胞化学制样

参照文献^[8,10]的方法, 将果肉细切成 $2\sim 3\text{ mm}^3$ 的小块, 用加有 2% 焦锑酸钾的 2.5 % 戊二醛+ 2% 多聚甲醛固定液 (用 0.2 mol/L 的 K_2HPO_4 缓冲液溶解, $\text{pH } 7.6$) 进行 6 h 的前固定, 开始固定时抽真空使果肉组织中的气泡排出。然后用加有 2% 焦锑酸钾的同样缓冲液洗 3 次, 每次 15 min 以除去固定液, 接着用含 2% 焦锑酸钾、同时用 K_2HPO_4 缓冲液溶解的 1% 锇酸固定液进行 $3\sim 4\text{ h}$ 的后固定, 同时再用上述的缓冲液洗涤 3 次后, 进行丙酮系列脱水, 然后用 Spurr 低粘性树脂包埋, 用超薄切片机切成 $40\sim 60\text{ nm}$ 的切片, 经 2% 醋酸铀和柠檬酸铅二重染色后, 置于透射电子显微镜下观察并照像。为证明以上用加有焦锑酸钾固定液制样的试料在电镜下所呈现的黑色颗粒是否为 Ca^{2+} , 将一部分载有切片的铜网置于 60°C 、 0.2 mol/L 的 EGTA ($\text{pH } 7.9$) 液中处理 1 h, 染色后再置于电镜下观察。

2 结果与分析

2.1 受精前

尚未受精的果肉细胞排列紧密, 大多液泡较小。细胞核内染色质少且染色淡, 细胞质内虽然有些细胞的叶绿体已充分发育, 但其周围的细胞器很少。此时无论是细胞的什么部位都未检测到 Ca^{2+} 沉淀颗粒的存在 (图版 1, A、B)。果肉的导管内也未检测到 Ca^{2+} 沉淀颗粒 (图版 1, C)。

2.2 受精后

受精的幼果在最初几天, 果肉细胞内可检测出大量的 Ca^{2+} 沉淀颗粒, 而且细胞器的数目明显增加。细胞核内的 Ca^{2+} 沉淀颗粒主要密集分布在核液部分, 核仁部分没有或极少 (图版 1, D、G、H), 细胞质的质液部分也很多 (图版 1, E、H、I), 叶绿体内极少而沿外膜却有密集分布, 线粒体内有少量 (图版 1, E); 质体在这期间体积变化很大, 有些细胞的质体异常肥大, 里面布满了 Ca^{2+} 沉淀颗粒 (图版 1, G), 而此时细胞核内的 Ca^{2+} 沉淀颗粒密度较小 (图版 1, G); 当其体积恢复正常时, 常围绕在细胞核周围分布, 细胞核内 Ca^{2+} 沉淀颗粒的密度较大 (图版 1, D、H); 果肉细胞的内质网和高尔基体很少。

石细胞在受精后的幼果时期开始发育, 到形成坚硬的石细胞群需要约 2 个月, 但石细胞只是在开始发育时能检测到细胞内布满了 Ca^{2+} 沉淀颗粒 (图版 1, I), 此后虽然一直存在细胞质 (活细胞), 但却没有 Ca^{2+} 沉淀颗粒出现。导管在幼果受精后较长一段时期内 (约 4 周) 都能检测到 Ca^{2+} 沉淀颗粒 (图版 1, F), 但以开始的 1~2 周内最多, 此后迅速减少或难以检测到。

幼果受精 5~7 d 后, 除维管束周边的少数细胞外, 大多果肉细胞中的细胞核和细胞质已难以检测到 Ca^{2+} 沉淀颗粒的存在, 果肉细胞内的细胞器数目也逐渐减少。而在细胞间隙和连接处发现了密集或堆积分布的 Ca^{2+} 沉淀颗粒 (图版 2, A~C), 放大后观察, 可见 Ca^{2+} 颗粒着生在连接细胞间的丝状物体上 (图版 2, B)。经 Ca^{2+} 的螯合剂 EGTA 处理, 可见应该分布这些颗粒的细胞间隙和连接处极少分布 (图版 2, D)。受精约 3~4 周后, 果肉细胞难以检测到 Ca^{2+} 沉淀颗粒。

2.3 生理落果

生理落果指已膨大的幼果转黄脱落。在幼果转黄时, 果肉细胞的连接处已较少有

Ca^{2+} 沉淀颗粒的分布, 特别是果肉导管内没有沉淀颗粒存在 (图版 2, E)。幼果黄化严重时, 有的果肉细胞内可检测到 Ca^{2+} 沉淀颗粒, 沿液泡膜分布 (图版 2, F)。

2.4 果实发育和衰老

幼果自受精膨大时起, 果肉细胞的液泡部分逐渐加大, 细胞质被挤向细胞壁边缘, 且细胞器数量很少。幼果发育 4 周后, 无论是果肉细胞还是导管组织, 都难以检测到 Ca^{2+} 沉淀颗粒的存在。而石细胞逐渐发育, 细胞壁增厚且聚集成团, 使得幼果发育在较长的时期内果实体积增加较慢。果实发育 2 个月, 即 6 月中下旬开始在细胞内积累淀粉, 至 7 月中旬达到高峰 (图版 2, G)。7 月下旬淀粉粒开始逐渐变小, 至 8 月份消失。整个过程都难以在果肉细胞和导管组织检测到 Ca^{2+} 沉淀颗粒。8 月 23 日采收果实并置室温下贮藏, 10 d 后有的果实开始由果心部变坏。取样观察可知, 最初的征兆是这一部分的有些细胞沿细胞壁两侧有多量的 Ca^{2+} 沉淀颗粒分布 (图版 2, H), 而经 EGTA 处理, 类似的这些颗粒几乎全部消失 (图版 2, I); 进一步发展, 细胞壁两侧不再是 Ca^{2+} 沉淀颗粒, 而是细胞分解形成的大块黑斑。

3 讨论

3.1 Ca^{2+} 定位分布与功能

从本研究结果可看出, 梨果实发育, 特别是幼果发育的不同时期, Ca^{2+} 在果肉细胞结构中的定位分布是不同的, 这样就可以通过这些细胞结构的功能来考察 Ca^{2+} 所起的作用。

在受精初期, Ca^{2+} 通过导管进入果实, 主要分布在细胞核、细胞质液、质体、线粒体等部位中。从这些细胞结构本身的功能来看, 质体是贮藏淀粉等营养物质的库源场所^[8, 11], 而在幼果受精初期它的体积变化很大, 体积大时可检测出里面布满了 Ca^{2+} 沉淀颗粒 (图版 1, G), 体积小时则里面少有沉淀颗粒分布 (图版 1, D、H), 从而说明质体在幼果发育初期可能也是 Ca^{2+} 的库源场所, 大量储存 Ca^{2+} 等营养时体积变大, 供应出去时体积变小。这一现象在梨花芽分化过程中也同样存在^[9]。细胞核的功能主要是遗传信息的复制、转录和传递, 核液中还存在着大量的与糖酵解、三羧酸循环和磷酸化有关的酶类, 也是糖代谢的场所^[12]。一些同样用焦锑酸钾标记 Ca^{2+} 的研究显示: 当植物产生一些生理变化之前或开始, Ca^{2+} 往往出现在细胞核的核液中^[6-9], 本研究的结果同样是核液中存在大量的 Ca^{2+} , 而核仁中极少。 Ca^{2+} 在这里大量分布应与促进此时果肉细胞的分裂和初期膨大时的旺盛代谢有关。此外, 从此时细胞核内 Ca^{2+} 较多, 且有大量已变小的质体围绕着细胞核分布 (图版 1, D、H) 来看, 细胞核应是主要的 Ca^{2+} 的消耗场所。

受精约 1 周后, Ca^{2+} 在果肉细胞的分布部位发生了变化, 由果肉的细胞内部转向了细胞之间的连接处 (图版 2, A~C), 直至受精 3~4 周后难以检测到 Ca^{2+} 为止。细胞之间的连接是通过果胶和果胶酸钙实现的, Ca^{2+} 大量在这一部位出现, 很容易认为是通过形成果胶酸钙来参与强化细胞间的连接的。同样可以认为这一部位 Ca^{2+} 越多, 结合得越牢固。根据以上对 Ca^{2+} 定位研究的结果, 可以将幼果吸收的 Ca^{2+} 分为两类, 受精 1 周内吸收的 Ca^{2+} 主要与促进果肉细胞分裂和初期膨大时旺盛的生理代谢活动有关, 而此后所吸收的 Ca^{2+} 则与细胞间的连接有关。 Ca^{2+} 通过导管向果实各部运输 (图版 1, D、H), 导管内 Ca^{2+} 的有无和多少同样可以用来衡量果实发育的好坏。幼果开始转黄和即将生理落果的果

实, 其导管中难以检测到 Ca^{2+} 沉淀颗粒就是极好的证明 (图版 2, E)。另一方面, 这些生理落果和采收后即将腐烂的果实都能在果肉细胞的质膜上检测到多数的 Ca^{2+} 沉淀颗粒, 这可能是参与形态构成的 Ca^{2+} 重新溶出所致。

3.2 果实吸收 Ca^{2+} 的时期

受精作用对幼果的坐果和初期膨大的重要性是众所周知的, 一般将此归结为受精后早期幼胚的发育分泌了大量激素, 刺激了果实生长与膨大。但受精作用对果实发育所需 Ca^{2+} 的吸收却报道甚少。本研究结果显示, 受精前果肉细胞和导管内检测不到 Ca^{2+} 沉淀颗粒, 而受精后却被大量检测出来, 这说明受精作用对果实钙的吸收同样有着至关重要的作用。另一方面, 许多研究都证明, 果实发育所需 Ca^{2+} 的绝大部分都是在幼果期吸收的^[13, 14], 但一般认为在 4~6 周内。而本研究结果显示, 在幼果发育期用于细胞分裂和初期膨大时旺盛代谢作用的 Ca^{2+} , 离受精作用越近, 检测到的 Ca^{2+} 沉淀颗粒就越多; 而用于细胞间起连接作用的 Ca^{2+} 则持续的时间稍长, 为 2~3 周。整体上, 幼果期越早, 越有利于 Ca^{2+} 吸收。缺 Ca^{2+} 会导致果实发育后期和贮藏期的质地变差, 或直接导致许多贮藏期的生理病害发生, 在采前采后用各种补充钙制剂的方法都可以取得一些效果^[4, 5]。但近年来对果实发育早期进行补钙的重要性已引起重视, 许多报道认为在幼果期补钙的效果要明显优于果实发育中后期和贮藏期^[15, 16], 而本研究定位观察 Ca^{2+} 的结果也支持早期补钙的观点。本研究结果显示 Ca^{2+} 是通过导管向果肉组织输送的, 而且越是在幼果发育的早期吸收的 Ca^{2+} 越多。这意味着幼果发育时期越早, 吸收 Ca^{2+} 的动力越大。从增加果实钙的含量来说, 补钙措施应在这一时期进行。

参考文献:

- 1 Poovaiah B W. Role of calcium in prolonging storage life of fruits and vegetables. *Food Technol.*, 1986, 40: 86~89
- 2 Ferguson I B and C B Watkins. Bitter pit in apple fruit. *Hort. Rev.*, 1989, 11: 289~355
- 3 龚云池, 徐季娥, 张淑珍. 鸭梨叶片和果实 Ca 素含量年周期变化的研究. *园艺学报*, 1987, 14 (4): 1~5
- 4 Siddiqui S, Bengert F. Effect of pre-harvest application of calcium on flesh firmness and cell wall composition of apple influence of fruit size. *J. Hort.*, 1995, 70 (2): 263~269
- 5 Saftner R A, Conway W S, Sams C E. Postharvest calcium infiltration alone and combined with surface coating treatments influence volatile levels, respiration, ethylene production, and internal atmospheres of 'Golden delicious' apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sic.*, 1998, 124: 553~558
- 6 Havelange A. Levels and ultrastructural localization of calcium in *Sinapis alba* during the floral transition. *Plant Cell Physiol*, 1989, 30: 351~358
- 7 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. *植物学报*, 1994, 36: 397~439
- 8 彭抒昂, 岩堀修一. ニホンナシの花芽分化に伴う茎頂細胞中のカルシウムの分布とその変化. *園芸学会雑誌*, 1995, 63 (4): 725~738
- 9 陈由强, 叶冰莹, 高一平, 等. 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. *武汉植物研究*, 2000, 18 (2): 138~142
- 10 Sloam R D, Poux S J. An improved method for the subcellular localization of calcium using a modification of the antimonite precipitation technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 1982, 30: 617~629
- 11 Gunning B E S, Steer M W. *Plant Cell Biology. An ultrastructural approach.* London: Ward Arnold, 1975. 280
- 12 郑国昌. *细胞生物学*. 北京: 人民教育出版社. 1980, 249~275
- 13 Quinlan J D. Chemical composition of developing and shed fruits of 'Laxtons Fortune' apple. *J. Hort. Sci.*, 1969, 44: 97~106
- 14 Wilkinson B C. Mineral composition of apples. IX: Uptake of calcium by fruit. *J. Sic. Food Agri.*, 1968, 19: 646~647
- 15 和田光夫, 池田英男, 池田政文. トマト植物体地上部へのCa 剤施与方法ならびに施与時期が尻腐れ果発生に及

ばす影響. 園芸学会雑誌, 1995, 64 (別冊 1): 250 ~ 251

16 Wasan N P, 川田和秀, 楠正人. '女峰' イチゴの Ca 散布効果に及ぼす散布のタイミングと部位及び Ca 剤の種類の影響. 園芸学会雑誌, 1997, 66 (別冊 1): 70 ~ 71

Studies on Localization and Change of Ca^{2+} in Fruit Flesh Cells during Fruit Development of Pear

Peng Shu' ang¹ and Iwahori Shuichi²

(¹ Department of Horticulture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070; ² Institute of Agriculture and Forestry, University of Tsukuba, Tsukuba Japan 305)

Abstract: Relationship between Ca^{2+} localization and change in the fruit flesh cells and cell ultrastructure during fruit development of pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) cv. kosui were studied using the cytochemical method of antimonite precipitation technique. The results showed that before the fertilization no Ca^{2+} sediment particles could be detected in the flesh cells and there existed little chromatin and light staining was observed in the nucleous. After fertilization many Ca^{2+} sediment particles could be detected in the flesh cells, mainly distributed in nucleus, cytoplasm, plastids and exterior membrane of chloroplast. The plastids containing Ca^{2+} expanded greatly. In addition, Ca^{2+} sediment particles could be observed in vessels and primarily developed stone cells. It was found that Ca^{2+} moved to the linking space in between the fruit flesh cells one week after fertilization. There was little or no Ca^{2+} in the cells and vessels of physiologically dropped fruits, whereas Ca^{2+} was distributed along the vacuolar membrane of some cells. Three to four weeks after the fertilization it was difficult to detect the Ca^{2+} sediment particles in the flesh cells, which continued until the fruits were harvested. However, Ca^{2+} sediment particles appeared in both sides of flesh cell wall before the fruits rotted. Relationship between function of Ca^{2+} in fruit development and ultrastructure is discussed herein.

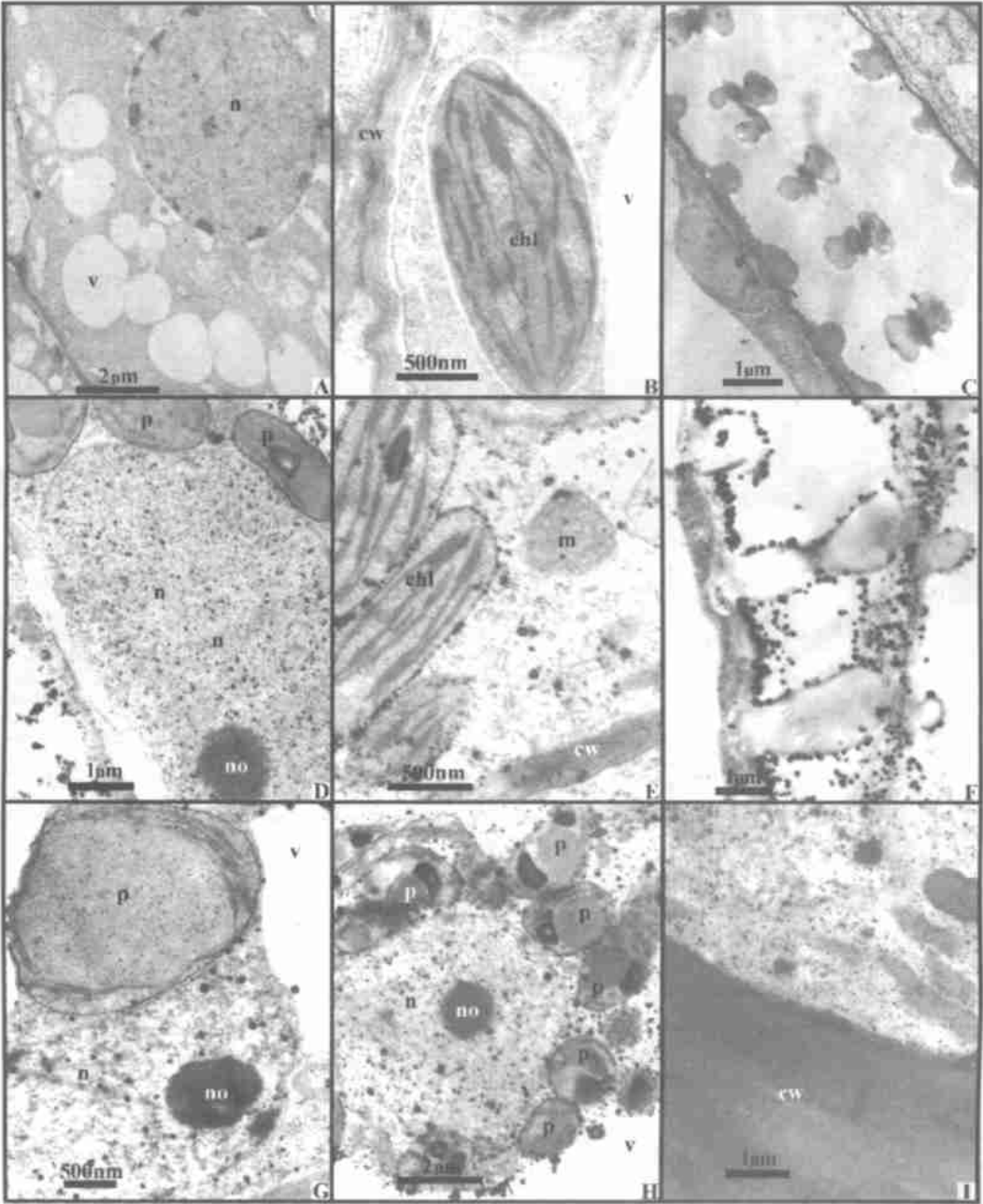
Key words: Pear; Fruit development; Localization of Ca^{2+}

图版说明 chl: 叶绿体; cw: 细胞壁; m: 线粒体; n: 细胞核; no: 核仁; p: 质体; v: 液泡

图版 1 受精前后果肉组织细胞 Ca^{2+} 定位分布及变化 A: 受精前不活跃的果肉细胞; B: 受精前果肉组织中的叶绿体及周边细胞质; C: 受精前果肉组织中的导管; D: 受精后果肉细胞的细胞核, 里面充满了 Ca^{2+} 沉淀颗粒; E: 受精后果肉组织的叶绿体及周边细胞质; F: 受精后果肉组织中的导管, 里面布满了 Ca^{2+} 沉淀颗粒; G: 受精后果肉细胞中的细胞核和特别膨大的质体, 里面充满了 Ca^{2+} 沉淀颗粒; H: 受精后果肉细胞中的细胞核和众多体积已变小的质体, Ca^{2+} 充满了细胞核, 但质体内已没有 Ca^{2+} ; I: 受精后初始发育的石细胞, 厚厚的细胞壁与布满 Ca^{2+} 沉淀颗粒的细胞质。

图版 2 受精 1 周后整个果实发育过程中果肉组织细胞 Ca^{2+} 定位分布及变化 A: 受精 1 周后 Ca^{2+} 沉淀颗粒堆积在果肉细胞之间的连接处; B, C: 同 A, 放大的果肉细胞之间的间隙与连接处; D: 同 A, 经 EGTA 处理, 相近部位果肉细胞之间的间隙与连接处的 Ca^{2+} 沉淀颗粒消失; E: 生理落果果实变黄初期的导管 (盛花后 3 周); F: 同 E, 生理落果果实变黄后的某一果肉细胞, Ca^{2+} 沉淀颗粒沿液泡膜分布; G: 6 月下旬, 果肉细胞内开始大量积累淀粉粒; H: 果实采收贮藏 10 d 后, Ca^{2+} 沉淀颗粒重新出现并沿果肉细胞壁两侧分布; I: 同 H, 经 EGTA 处理, 相近部位果肉细胞壁两侧 Ca^{2+} 沉淀颗粒消失。

图版 1 Plate 1



Explanation of plates chl: chloroplast; cw: cell wall; m: mitochondrion; n: nucleus; no: nucleolus; p: plastid; v: vacuole
Plate 1 Photomicrographs showing localization and change of Ca^{2+} in flesh cells before and after fertilization A: Inactive flesh cells before fertilization; B: Chloroplast and cytoplasm nearby in the flesh cells before fertilization; C: Vessels in flesh cells before fertilization; D: Nucleus filled with Ca^{2+} sediment particles in the flesh cells after fertilization; E: Chloroplast and cytoplasm nearby in the flesh cells after fertilization; F: Vessels filled with Ca^{2+} sediment particles in flesh cells after fertilization; G: Nucleus and expanded plastids filled with Ca^{2+} sediment particles in flesh cells after fertilization; H: Nucleus filled with Ca^{2+} sediment particles and many shrank plastids in flesh cells after fertilization; I: Primarily developed stone cells with thick cell wall and cytoplasm full of Ca^{2+} sediment particles.

图版 2 Plate 2

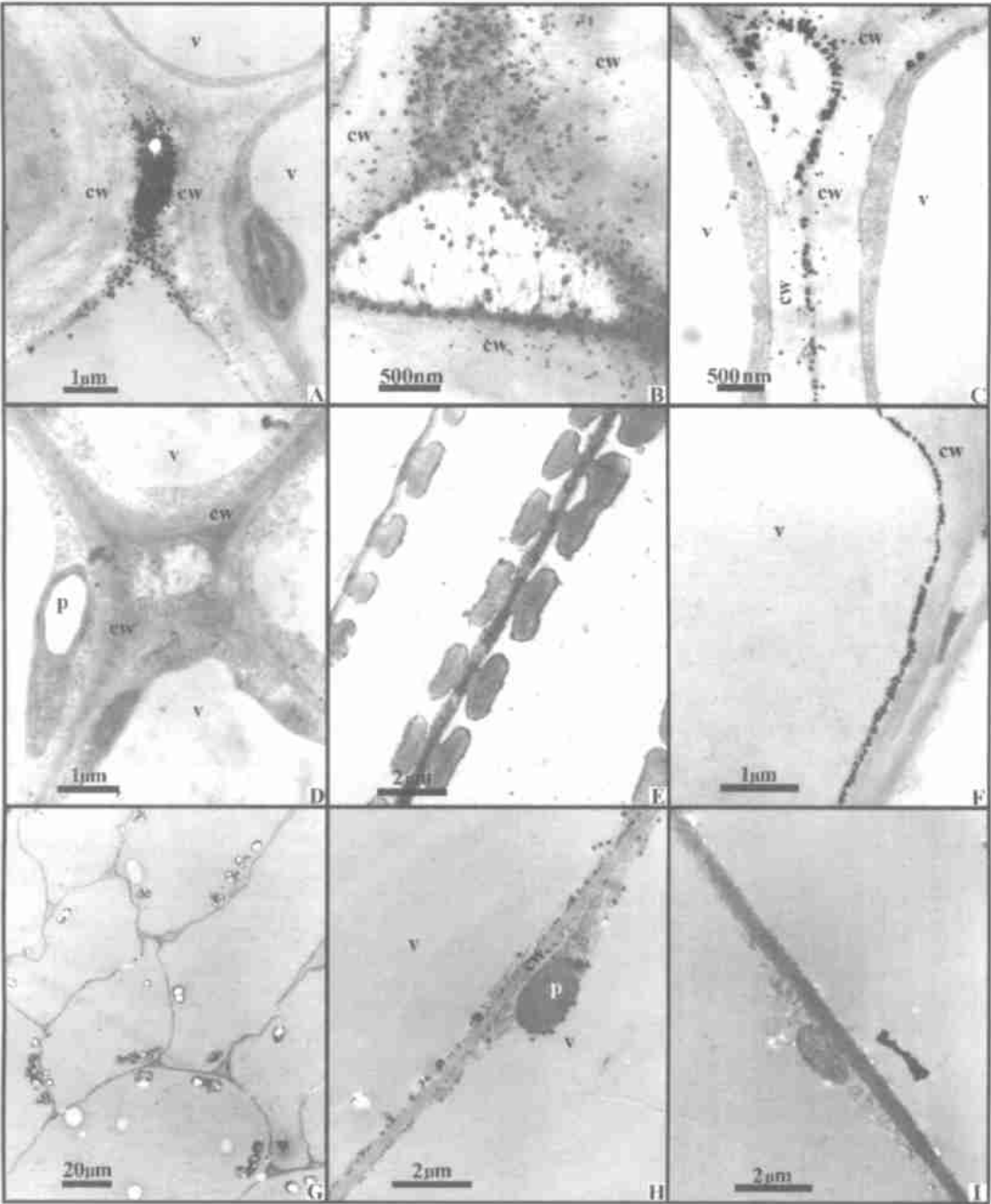


Plate 2 Photomicrographs illustrating the localization and change of Ca^{2+} in flesh cells during fruit development one week after fertilization. A: The Ca^{2+} sediment particles accumulated in the linking spot in between the flesh cells one week after fertilization; B and C: The enlarged gap and linking spot in between the flesh cells; D: The Ca^{2+} sediment particle disappeared in the gap and linking spot in between the flesh cells when treated with EGTA; E: The vessels in the physiologically dropped fruits, when they became yellow 3 weeks after full bloom; F: The flesh cell after the physiologically dropped fruits became yellow and Ca^{2+} sediment particles were distributed along the vacuole; G: Starch grains began to accumulate in the flesh cells in late June; H: The Ca^{2+} sediment particles appeared again and distributed along both sides of flesh cell wall 10 days after storage; I: The Ca^{2+} sediment particle disappeared along both sides of the flesh cell wall when treated with EGTA.