

钙离子在‘春捷’桃芽自然休眠诱导、维持和解除中的作用

王孝娣¹, 王海波¹, 高东升², 李疆³, 杨荣光⁴, 刘凤之^{1,*}, 聂继云^{1,*}

¹中国农业科学院果树研究所, 辽宁兴城 125100; ²山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东泰安 271018; ³新疆农业大学园艺学院, 乌鲁木齐 830052; ⁴山东省泰安农业气象试验站, 山东泰安 271000

摘要:以两年生低需冷量设施栽培专用毛桃品种‘春捷’为试材, 检测Ca²⁺在自然休眠过程中的动态变化。结果表明: 在季节变化过程中, Ca²⁺动态变化与自然休眠进程一致。在此过程中, Ca²⁺可传递环境信号, 诱导桃芽自然休眠和维持桃芽的深度自然休眠。

关键词: Ca²⁺; 自然休眠; 桃芽

Role of Ca²⁺ in Dormant Induction, Maintenance and Release of ‘Chunjie’ Peach Buds

WANG Xiao-Di¹, WANG Hai-Bo¹, GAO Dong-Sheng², LI Jiang³, YANG Rong-Guang⁴, LIU Feng-Zhi^{1,*}, NIE Ji-Yun^{1,*}

¹Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Xingcheng, Liaoning 125100, China; ²College of Horticultural Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China; ³College of Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, 830052 China; ⁴Agriculture Atmosphere Experimental Station, Taian, Shandong 271000, China

Abstract: To take advantage of two-year-old ‘Chunjie’ peach, we studied the changes of Ca²⁺ during the natural process of dormancy of peach buds. The results revealed that the changes of Ca²⁺ was consistent with natural dormancy in the process of seasonal changes. In this process, Ca²⁺ made effect as a messenger in signal transduction of environmental changes, induced the natural dormancy of peach buds, and maintained their deep natural dormancy.

Key words: Ca²⁺; natural dormancy; peach bud

随着果树设施栽培的发展, 温带落叶果树的芽休眠研究又成为一个新的研究热点。温带落叶果树的芽休眠是其渡过冬季不良环境条件的一个发育阶段, 是落叶果树经过长期演化而获得的一种对环境及季节性变化的生物学适应性(高东升等 2001)。

钙不仅是植物体内的必需元素, 而且是植物体内普遍存在的信号(谢玉明等 2003)。植物中几乎所有的生理活动都受Ca²⁺的调控。一般认为, 植物对许多外界环境刺激作出的反应是通过胞质内自由Ca²⁺浓度变化来传递的。非激发状态下的植物细胞质和细胞核通常是处在低浓度Ca²⁺的稳态平衡状态。已知许多刺激都能引起Ca²⁺从细胞间隙和液泡中进入植物细胞质和细胞核, 由此引起植物细胞的细胞质和细胞核内Ca²⁺水平升高后, 会相继引发一系列生理生化过程, 导致植物对这些刺激产生反应和适应(Knight 2000)。为此, 本文检测了钙离子在桃芽自然休眠进程中的动态变化, 以探讨钙离子在桃芽自然休眠中的可能作用。

材料与方法

以两年生且生长健壮的桃设施栽培专用毛桃 [*Prunus persica* (L.) Batsch.] 品种‘春捷’(需冷量极低, 108~122 CU) (砧木为青州冬雪蜜桃) 为材料在山东农业大学果树站(山东泰安, 地处东经117.13°, 北纬36.18°, 全年最长日照时期在6月21~23日, 日照时间为14 h 36 min) 进行实验, 试验于2006年7月8日开始至12月20日结束。山东农业大学果树实验站的月平均温度和月平均光周期见图1。自处理之日始每周1次定期测定新梢长度, 直至9月30日结束。于7月8日、7月12日、8月5日、8月19日、9月2日、9月16日、9月30日、10月7日、10月21日、11月4日、11月

收稿 2008-05-12 修定 2008-08-26

资助 国家“863”计划(2001AA247041)和国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD07B06)。

* 通讯作者(E-mail: haibo8316@163.com; Tel: 0429-3598127)。

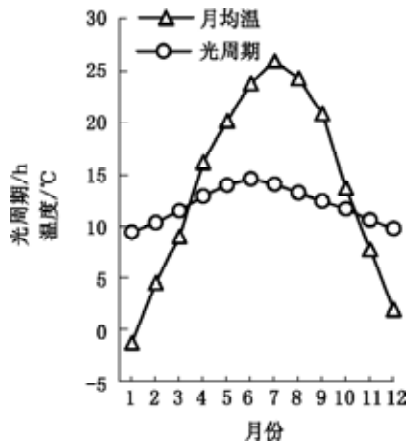


图1 山东农业大学果树实验站的月平均温度和光周期

Fig.1 Monthly mean temperature and photoperiod of the fruit experimental station in Shandong Agricultural University

18日和12月2日定期采样测定休眠状态。具体方法是:采集树冠外围生长一致且健壮的‘春捷’桃新梢用人工光照培养箱清水插枝法测定休眠状态。每处理每次采取12条长30~40 cm的新梢,在自然落叶前除去叶片,并剪去5 cm长的顶梢,然后将新梢插入盛水2~3 cm深的玻璃杯中培养,培养条件为:气温(昼/夜)25/21,光照强度 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,昼/夜16 h/8 h;相对空气湿度80%~90%;每2 d换水一次,每次剪掉2~3 mm,露出新茬。调查记录第一颗叶芽开放时所经历的时间(d),用第一颗叶芽开放所经历的时间表示休眠状态,当第一颗叶芽开放所需时间 >10 d时,记为已进入休眠状态(王海波2006)。

Ca^{2+} 的亚细胞定位自处理之日始定期采样,样品利用焦锑酸盐化学沉淀法进行 Ca^{2+} 的亚细胞定位,然后根据休眠状态确定样品进行切片观察。主要步骤为:从新梢中部取10个饱满叶芽剥除鳞片和幼叶后,立即投入到用pH 7.6的磷酸缓冲液($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)配制的含有2%戊二醛、2.5%多聚甲醛、2%焦锑酸钾和少量单宁酸的初固定液中,于完全黑暗和4℃条件下固定6 h;然后用含2%焦锑酸钾的 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液洗涤2次,每次20 min;洗涤后,将洗涤好的材料转移到含1%锇酸和2%焦锑酸钾的固定液中后固定,于4℃条件下固定16 h后,先用含2%焦锑酸钾的 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液清洗15 min,再用不含焦锑酸钾的 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸

缓冲液(pH 7.6)清洗3次,每次15 min;然后以酒精系列脱水,EM-bed812树脂包埋;用钻石刀切片,醋酸铀染色后用CM透射电镜观察和照相。

实验结果

1 ‘春捷’桃的自然休眠进程

日照长度逐渐缩短,而大气温度仍然较暖和时,‘春捷’桃新梢的生长速度即随着日照长度的变短而日益下降(图2)。8月26日时新梢生长完全停止而开始进入自然休眠,9月2日时新梢以清水插枝培养的第一叶芽开放所需时间为12 d(图3),比未进入休眠时第一叶芽开放所需时间延后4~5 d。此后随着日照时间的进一步缩短和温度的降低,休眠程度逐渐加深,并逐渐进入深自然休眠阶段,9月30日以清水插枝培养的第一叶芽开放所需时间为30 d,表明此时已经处于深自然休眠状态。而后,由于低温对自然休眠的解除作用,随着有效低温累积,休眠程度又逐渐变浅,逐渐进入浅自然休眠阶段,到11月18日时以清水插枝培养至第一叶芽开放所需时间为14 d,表明此时‘春捷’桃已经处于浅自然休眠阶段。此后随着有效低温的进一步累积并能满足‘春捷’桃的低温需求量后,‘春捷’桃进入环境休眠,到12月2日时‘春捷’桃以清水插枝培养的第一叶芽开放所需时间为8 d,表明此时‘春捷’桃自然休眠已经完全解除,处于环境休眠阶段。此时只要外界环境适宜,‘春捷’桃便可正常萌芽开花,进入新的生长周期。

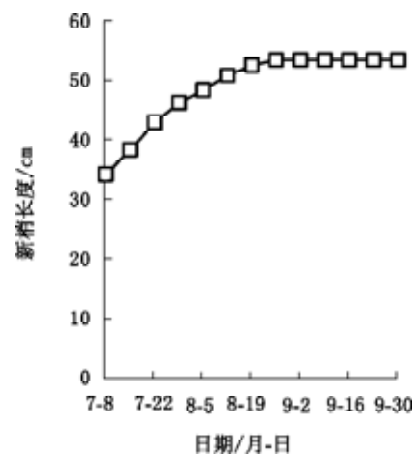


图2 ‘春捷’桃新梢生长的季节变化

Fig.2 Seasonal changes in shoot growth of ‘Chunjie’ peach

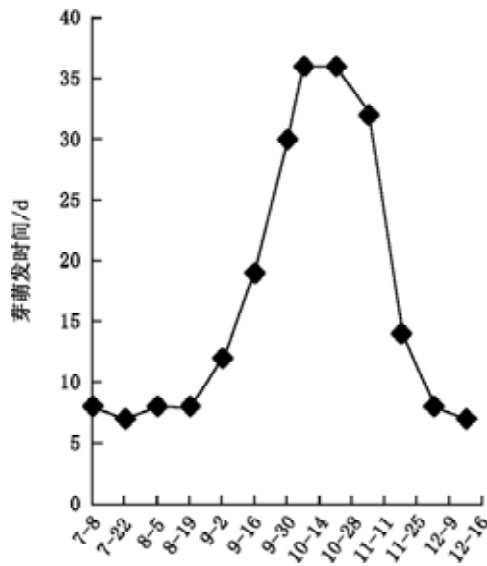


图3 ‘春捷’桃休眠状态的季节变化
Fig.3 Seasonal changes in dormancy status of ‘Chunjie’ peach

2 ‘春捷’桃芽顶端分生组织细胞内 Ca^{2+} 浓度和分布的季节变化

焦磷酸根离子可与 Ca^{2+} 结合形成焦磷酸钙沉淀。在电镜下, 焦磷酸钙沉淀产生很强的稠密电子反差, 从而显示 Ca^{2+} 在细胞内的存在和定位。从电镜观察结果(图4)可以看出, 在季节变化过程中, ‘春捷’桃芽顶端分生组织细胞内 Ca^{2+} 沉淀的分布和数量发生明显变化。在夏季7月8日(活跃生长期)的采样中, Ca^{2+} 沉淀主要分布在液泡和细胞间隙中, 而细胞质和核内很少有 Ca^{2+} 存在(图4-a), 显示‘春捷’桃植株在夏季活跃生长期, 细胞质和核内的 Ca^{2+} 浓度是处在一个低水平, 液泡和细胞间隙是植物细胞的主要 Ca^{2+} 库。秋季8月19日(此时‘春捷’桃植株尚未进入休眠, 但新梢生长已变缓)样品切片中, 细胞质和核内有许多 Ca^{2+} 沉淀(图4-b), 而液泡和细胞间隙 Ca^{2+} 减少, 显示随着日照时间的缩短、自然温度的降低和‘春捷’桃新梢生长速度的减缓, Ca^{2+} 从液泡和细胞间隙流入了细胞质和核内。10月7日(此时‘春捷’桃植株处于深自然休眠阶段)芽顶端分生组织细胞的细胞质和核内 Ca^{2+} 沉淀数量显著增加, 而此时液泡和细胞间隙中的 Ca^{2+} 沉淀数量很少(图4-c)。冬季在11月18日(此时‘春捷’桃处于浅自然休眠阶段)细胞的细胞质和细胞核内 Ca^{2+} 沉淀数量显著减少, 而液泡和细胞间隙中 Ca^{2+}

沉淀数量则显著增加(图4-d), 说明早先进入细胞质和细胞核的 Ca^{2+} 又返回到液泡和细胞间隙中。12月2日(此时‘春捷’桃处于环境休眠阶段)细胞的细胞质和细胞核内很少见到 Ca^{2+} 沉淀, 大量的 Ca^{2+} 沉淀出现在细胞间隙和液泡中(图4-e)。

讨 论

植物中几乎所有的生理活动都受 Ca^{2+} 的调控(邹寿彬等 2000)。一般认为, 植物对许多外界环境和激素的刺激所作出的反应都是通过胞质内自由 Ca^{2+} 浓度变化传递的(宋秀芬和洪剑明 2001)。非激发状态下的植物细胞质和细胞核通常是处在低浓度 Ca^{2+} 的稳态平衡。已知许多生物和非生物的刺激如低温、高温、光照、干旱、盐胁迫和缺氧胁迫都能引起 Ca^{2+} 从细胞间隙和液泡进入植物细胞质和细胞核, 由此引起的植物细胞的细胞质和细胞核内的 Ca^{2+} 水平升高后, 会相继引发一系列生理生化过程, 导致植物对这些刺激的反应和适应(Knight 2000; Bush 1995)。本文结果表明, 在季节变化过程中, 随着日照时间的逐渐缩短和温度的逐渐降低, Ca^{2+} 由细胞间隙和液泡逐渐流入细胞质和细胞核内(8月19日), 并且植株生长速度随着细胞质和细胞核内 Ca^{2+} 的流入和 Ca^{2+} 浓度的增加而变缓, 最终完全停止, 然后自然休眠开始(9月2日, 此时以清水插枝培养的第一叶芽开放所需时间为 12 d)。同时我们喷施 EGTA (EGTA 为 Ca^{2+} 螯合剂, 可与 Ca^{2+} 结合形成 Ca^{2+} 络合物, 使 Ca^{2+} 失去生理作用)的结果也显示喷施 EGTA 的‘春捷’桃植株一直保持旺盛生长未进入休眠, 直至停止喷施 EGTA 为止。这表明, 在季节变化过程中, Ca^{2+} 的流入起传递环境信号的作用。季节变化(日照时间变短, 温度降低)引起细胞质和细胞核内 Ca^{2+} 水平升高后, 可能通过活化钙调素(CaM)和某些蛋白激酶, 以及蛋白质磷酸化等过程, 诱发休眠基因的表达, 从而使‘春捷’桃植株进入自然休眠。但是在此过程中 Ca^{2+} 的详细作用机制还需深入研究。此外, 从我们的试验结果中还可以看出, Ca^{2+} 浓度和分布的动态变化与自然休眠发展进程非常一致, 即当细胞质和细胞核内 Ca^{2+} 浓度显著升高时, 休眠深度迅速加深; 10月 Ca^{2+} 浓度达到高峰, 自然休眠程度也同时最深; 11月细胞质和细胞核内 Ca^{2+} 浓度恢复到低水平, 此后12月初(12月2日)自然休眠的终结。这表明

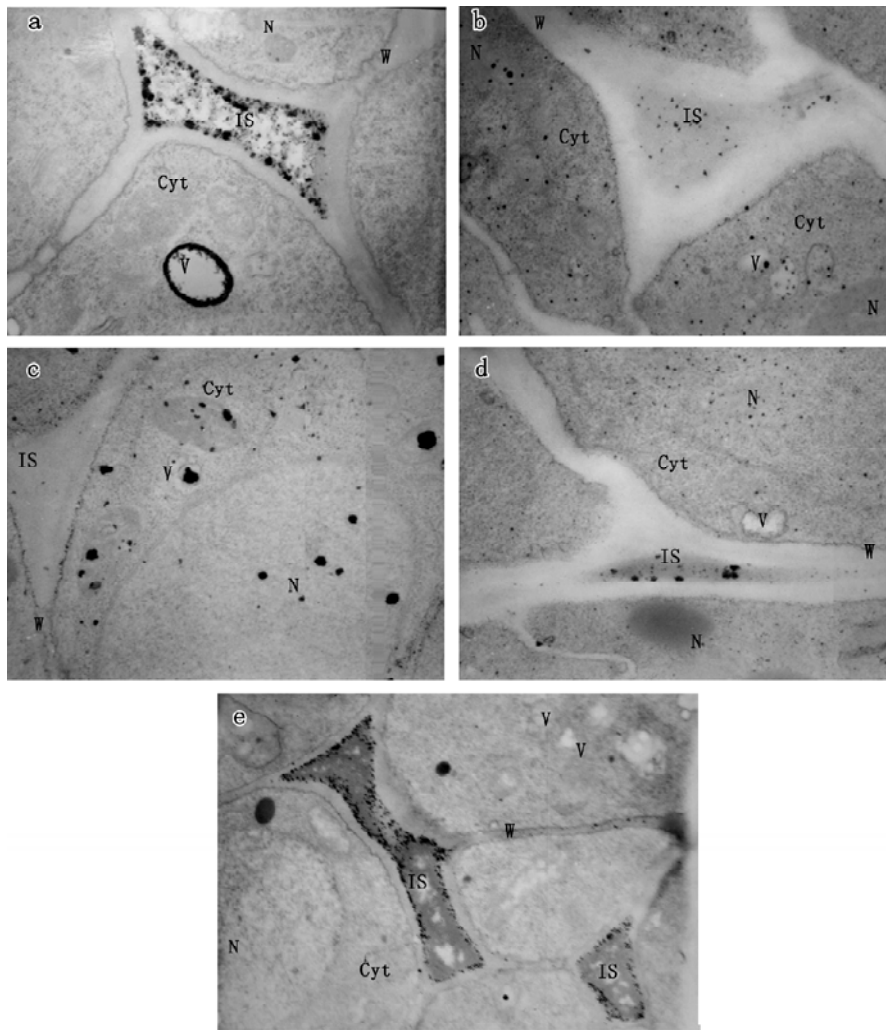


图4 ‘春捷’桃植株芽细胞内 Ca^{2+} 的分布和浓度

Fig.4 Distribution and concentration of Ca^{2+} in ‘Chunjie’ peach lateral bud cells

a: 7月8日采样的细胞($\times 20\,000$); b: 8月19日采样的细胞($\times 25\,000$); c: 10月7日采样的细胞($\times 25\,000$); d: 11月18日采样的细胞($\times 25\,000$); e: 12月2日采样的细胞($\times 10\,000$)。V: 液泡; W: 细胞壁; IS: 细胞间隙; N: 细胞核; Cyt: 细胞质。

‘春捷’桃在晚夏到冬季的自然休眠进程中, 细胞核与细胞质内 Ca^{2+} 的流入不仅起传递环境信号的作用, 导致自然休眠, 而且细胞核和细胞质内高浓度的 Ca^{2+} 还有保持深度自然休眠的作用。我们于11月喷施 CaCl_2 结果表明, 喷施 CaCl_2 后的春捷桃芽自然休眠解除延迟, 这进一步表明, 细胞核和细胞质内高浓度的 Ca^{2+} 起保持深度自然休眠的作用。

参考文献

高东升, 束怀瑞, 李宪利(2001). 几种适宜设施栽培果树需冷量的研究. 园艺学报, 28 (4): 283~289

宋秀芬, 洪剑明(2001). 植物细胞中钙信号的时空多样性与信号转导. 植物学通报, 18 (4): 436~444

王海波(2006). 桃芽自然休眠诱导和短时间高温破眠研究[硕士学位论文]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学

谢玉明, 易干军, 张秋明(2003). 钙在果树生理代谢中的作用. 果树学报, 20 (5): 369~373

邹寿彬, 陈凉怡, 康华光(2000). 胞内钙信号系统. 生命的化学, 20 (6): 254~257

Bush DS (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 46: 95~122

Knight H (2000). Calcium signaling during abiotic stress in plant. Inter Rev Cytol, 195: 269~324