

替码板栗芽体 PCD 过程中 Ca^{2+} 的时空变化*

郭 燕, 李 颖, 张树航, 张馨方, 王广鹏**

(河北省农林科学院 昌黎果树研究所, 河北 昌黎 066600)

摘要:【目的】探讨 Ca^{2+} 在替码板栗品种 X12 芽体细胞程序性死亡 (PCD) 过程中的时空变化及其与芽体 PCD 的关系。【方法】利用焦锑酸盐沉淀的电镜细胞化学方法, 研究替码板栗 X12 芽体 PCD 过程中 (S1~S5 时期) Ca^{2+} 的时空变化。【结果】S1 时期, 细胞结构正常, Ca^{2+} 主要分布在细胞壁和细胞间隙处, 细胞质和细胞核内有少量 Ca^{2+} , 液泡内 Ca^{2+} 含量极少; S2 时期, 部分细胞器轻微降解, 细胞间隙中 Ca^{2+} 减少, 细胞质、液泡膜和细胞核膜附近 Ca^{2+} 开始增多; S3 时期, 细胞进一步解体, 细胞壁、液泡、细胞核降解严重, 细胞间隙和细胞壁上 Ca^{2+} 颗粒极少, 细胞质、细胞核、破裂的液泡内及液泡周围 Ca^{2+} 明显增多; S4 时期, 细胞降解严重, Ca^{2+} 在细胞内呈无规则分布, 质膜和细胞壁上较少, 集中于破碎的液泡膜和液泡碎片处; S5 时期, 细胞器均降解破碎, Ca^{2+} 随降解的细胞器碎片成块状聚集。【结论】替码板栗芽体 PCD 过程中 Ca^{2+} 呈动态变化, Ca^{2+} 可能参与了 PCD 过程; 细胞质、液泡和细胞核的 Ca^{2+} 内流可能是引起替码板栗芽体 PCD 的部分重要原因。

关键词: 板栗; 芽体; Ca^{2+} ; 细胞程序性死亡

中图分类号: S 664.201

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2019) 02-0325-06

Dynamic Changes of Ca^{2+} Distribution During the Process of Programmed Cell Death in Buds of Apical-bud-senescence Chestnut

GUO Yan, LI Ying, ZHANG Shuhang, ZHANG Xinfang, WANG Guangpeng

(Changli Institute of Pomology, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Changli 066600, China)

Abstract: [Purpose] In this study, the dynamic changes of Ca^{2+} distribution during the process of programmed cell death (PCD) in bud of apical-bud-senescence chestnut X12 were studied, and the relationship between the dynamic changes of Ca^{2+} distribution and PCD were studied, too. [Method] The dynamic changes of Ca^{2+} distribution during the process of programmed cell death in buds of apical-bud-senescence chestnut X12 were investigated with electromicroscopic-cytochemical methods of calcium antimonate. [Result] During the S1 period, the cell structure was normal, and Ca^{2+} mainly distributed on the cell wall and intercellular space, and little was seen in the cytoplasm and nucleus, and few in the vacuole. During the S2 period, some organelles were slightly degraded. The concentration of Ca^{2+} in intercellular space decreased, while the level of Ca^{2+} in cytoplasm and the vicinity of vacuolar membrane and nuclear membrane were increased. During the S3 period, cells disintegrated further, and cell wall, vacuole and nucleus degraded severely. The number of calcium

收稿日期: 2017-12-02

修回日期: 2018-03-12

网络出版时间: 2019-01-27

*基金项目: 河北省财政专项项目 (F17R06007)。

作者简介: 郭燕 (1987—), 女, 四川营山人, 硕士, 助理研究员, 主要从事板栗育种及栽培生理研究。

E-mail: 529127092@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 王广鹏 (1978—), 男, 河北赞皇人, 博士, 研究员, 主要从事板栗育种及栽培生理研究。E-mail: 845034984@qq.com

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201711079](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201711079)

particles on the cell wall and intercellular space become very rare, and the level of Ca^{2+} in cytoplasm, nucleus, and cracked vacuole and around the vacuole increased significantly. During the S4 period, cells degraded severely and Ca^{2+} particles appeared irregularly in cell, little on plasma membrane and cell wall, and a great deal of Ca^{2+} concentrated upon the ruptured tonoplast and the vacuolar fragments. During the S5 period, cytoskeleton were distorted because of degradation, organelles were degraded and ruptured, the Ca^{2+} aggregated with the degraded organelle fragments in lumps. [Conclusion] The dynamic changes of Ca^{2+} appeared in buds of apical-bud-senescence chestnut during the process of PCD, and Ca^{2+} was involved in the process of PCD. The congregation of Ca^{2+} in cytoplasm, nucleus and vacuole, might contribute to the PCD in buds of apical-bud-senescence chestnut X12.

Keywords: Chinese chestnut; Ca^{2+} ; programmed cell death (PCD); bud cell

细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 是一种由基因控制的细胞自主而有序的死亡行为, 其过程受细胞内外多种信号系统的诱导, 并受细胞内部多种信号转导因子级联反应的调控^[1-2]。 Ca^{2+} 是真核细胞信号转导的核心组分之一, 在细胞 PCD 过程中具有诱导、启动和调节等十分重要的作用^[3-10]。目前有关 Ca^{2+} 与植物 PCD 的相关研究发现, Ca^{2+} 作为第二信使调控着植物 PCD 的信号转导过程^[11]。一些外界信号, 如 IAA、Eth、CTK 等第一信使经其受体进行一系列跨膜信号转换后, 调节 Ca^{2+} 的分布以及在特定部位含量瞬间变化而产生细胞内 Ca^{2+} 信号, Ca^{2+} 信号再调节或激活其他 PCD 相关因子, 进而影响着细胞 PCD 过程中一系列的生理生化反应以致形态学的变化^[8, 11]。显然, 在植物 PCD 过程中, 细胞内 Ca^{2+} 的分布与转移即“时空性”是形成 Ca^{2+} 信号的基础^[2, 12]。

为解析 Ca^{2+} 信号对植物不同部位 PCD 过程的调控关系, 人们分别对不同植物的不同器官、组织 PCD 过程中的 Ca^{2+} 分布的时空变化进行了较多的研究^[7-8, 13-14], 但至今未见有关木本植物芽体 PCD 过程中 Ca^{2+} 分布的时空变化研究。我们首次发现: 替码板栗枝条上的前段芽体可发生 PCD 导致枝条前段自然衰亡, 使其树体在栽培上具有自然控冠、修剪省工的独特优势, 并将替码板栗芽体 PCD 过程划分为 5 个特征明显时期 (S1~S5), 前 4 个时期 (S1~S4) 芽体组织内 Ca^{2+} 浓度高于非替码板栗^[1], 说明 Ca^{2+} 参与替码板栗芽体 PCD 过程。但是, Ca^{2+} 在替码板栗芽体内部分布的时空动态变化及其对 PCD 过程的调节关系未知。因此, 在已有研究的基础上, 我们在替码板栗芽体发生 PCD 时期, 利用焦锑酸盐沉淀技术在芽体

细胞超微结构水平上研究 Ca^{2+} 分布的时空变化, 对比同期 Ca^{2+} 在非替码板栗芽体内的分布差异, 探讨 Ca^{2+} 信号与芽体 PCD 过程间的关系, 以期揭示替码板栗芽体完整的 PCD 信号转导途径及胞内级联反应, 为人为调控板栗芽体 PCD 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验地位于河北省农林科学院昌黎果树研究所板栗种质资源圃, 栗园土质为砾质沙壤土, 株行距 4 m×4 m, 常规管理水平。选用树龄均为 10 年生的树体健壮、生长正常、无病虫害的替码板栗品种 X12 和非替码板栗品种大板红为试验对象, 每株树分东南西北 4 个方向随机采集树冠外围结果枝上部芽体 50 个作为 1 个试验样品, 5 次重复, 样品采集按照雄花脱落后 20 d (S1 时期)、25 d (S2 时期)、30 d (S3 时期)、35 d (S4 时期)、40 d (S5 时期) 5 个时期进行^[15]。

1.2 方法

按照焦锑酸钾沉淀法制样^[14]。样品在 Leica EM-UC6 超薄切片机上用钻石刀切片, 切片厚度为 70 nm, 不染色, 采用透射电镜 (日立, H-7 500) 观察, CCD 数码相机 (Gatan 832) 拍照。

每种材料的超微定位至少观察 10 个视野, 选取典型区域进行拍照。对对照样品的切片置于 100 mmol/L (pH 7.8) 的 EGTA 中 37 °C 孵育 2 h, 然后观察拍照。

2 结果与分析

2.1 S1 时期 X12 芽体 Ca^{2+} 超微细胞化学定位

S1 时期, 替码板栗 X12 和非替码板栗大板

红芽体细胞骨架结构正常,细胞壁清晰;质膜结构完整;细胞核结构完整,核膜双膜结构明显,核仁清晰;液泡膜结构完整,清晰(图1a、b;图2a)。

这一时期,替码板栗X12和非替码板栗大板红的 Ca^{2+} 分布差异不大, Ca^{2+} 均主要分布在细胞间隙和细胞壁处。 Ca^{2+} 呈黑色小颗粒状分散存在于细胞间隙中,或沿着细胞壁紧密整齐地排列一圈;内质网上也均有较多 Ca^{2+} 颗粒分布;质膜和液泡膜附近也有较多 Ca^{2+} 分布,但质膜附近 Ca^{2+} 沉淀颗粒比液泡膜附近多;另外,细胞质和细胞核内也有少量 Ca^{2+} 颗粒均匀存在;液泡内几乎检测不到 Ca^{2+} 存在(图1a、b;图2a)。

将样品用 Ca^{2+} 的专一性螯合剂EGTA处理后在透射电镜下观察,发现应该有焦锑酸钙沉淀颗粒的部位变成空洞(图1k、l),这说明 Ca^{2+} 沉淀颗粒被消除,本研究中 Ca^{2+} 的定位是可靠的。

2.2 S2时期X12芽体 Ca^{2+} 超微细胞化学定位

S2时期,非替码板栗大板红细胞骨架结构正常(图2b),替码板栗X12芽体细胞的细胞壁清晰,质膜结构完整,但液泡和细胞核变化较为明显,其中,液泡体积变大,个别液泡膜部分位置破裂变得不完整;细胞核体积变小,核仁变模糊(图1c、d)。

与S1时期相比,非替码板栗大板红的 Ca^{2+} 分布没有明显变化(图2b)。替码板栗X12芽体细胞内质网上 Ca^{2+} 的分布变化不明显,但其他部位 Ca^{2+} 的分布发生了变化:细胞间隙中的 Ca^{2+} 分布减少, Ca^{2+} 沉淀颗粒仅沿着细胞壁排列;细胞质中 Ca^{2+} 分布开始增多,在细胞质膜附近均匀分布着较多 Ca^{2+} 沉淀颗粒;液泡膜附近开始出现大量 Ca^{2+} 沉淀颗粒,部分解体的液泡内有大量 Ca^{2+} 的分布;细胞核膜附近 Ca^{2+} 颗粒也增加,沿着核膜分布着整齐的1圈 Ca^{2+} 沉淀颗粒,细胞核内也有少量 Ca^{2+} 分布(图1c、d)。

2.3 S3时期X12芽体 Ca^{2+} 超微细胞化学定位

S3时期,非替码板栗大板红细胞骨架结构仍保持正常(图2c),而替码板栗X12细胞结构进一步解体,细胞形状变得不规则,部分细胞壁出现断裂;液泡数量增多,液泡膜边界变得模糊,而且大部分液泡膜破裂;细胞核降解严重,细胞出现质壁分离现象(图1e、f)。

这一时期,非替码板栗大板红的 Ca^{2+} 分布没

有明显变化,仍然主要分布在细胞壁、细胞间隙和内质网上。而替码板栗X12 Ca^{2+} 的分布发生了比较明显的变化:细胞间隙中 Ca^{2+} 变得极少, Ca^{2+} 沉淀颗粒分布比较分散;细胞壁上 Ca^{2+} 颗粒也明显减少;质膜和胞间连丝处则积累大量 Ca^{2+} 颗粒;细胞质中的 Ca^{2+} 分布明显增多;破裂的液泡内和液泡周围 Ca^{2+} 颗粒也明显增多,呈小颗粒状分散分布;细胞核膜附近也积累了大量的 Ca^{2+} ,呈小颗粒状或针状分布,并且密度较大;细胞核内 Ca^{2+} 沉淀颗粒也明显增多,并呈均匀分布(图1e、f)。

2.4 S4时期X12芽体 Ca^{2+} 超微细胞化学定位

S4时期,非替码板栗大板红细胞骨架结构仍没有任何降解迹象(图2d),而替码板栗X12细胞结构则进一步解体:细胞骨架降解无法维持完整的结构,细胞壁多处出现断裂,液泡完全降解,细胞核进一步解体,由膜包被形成明显凋亡团粒,此时细胞内细胞器降解破碎,碎片浓缩于细胞中形成个数大小不等的团粒(图1g、h)。

与S3时期相比,非替码板栗大板红的 Ca^{2+} 分布依旧没有明显变化(图2d),而替码板栗X12的 Ca^{2+} 黑色沉淀颗粒在细胞内呈无规则分布,质膜和细胞壁上分布较少,几乎集中于破碎的液泡膜和液泡碎片处,个别 Ca^{2+} 成团粒状积累(图1g、h)。

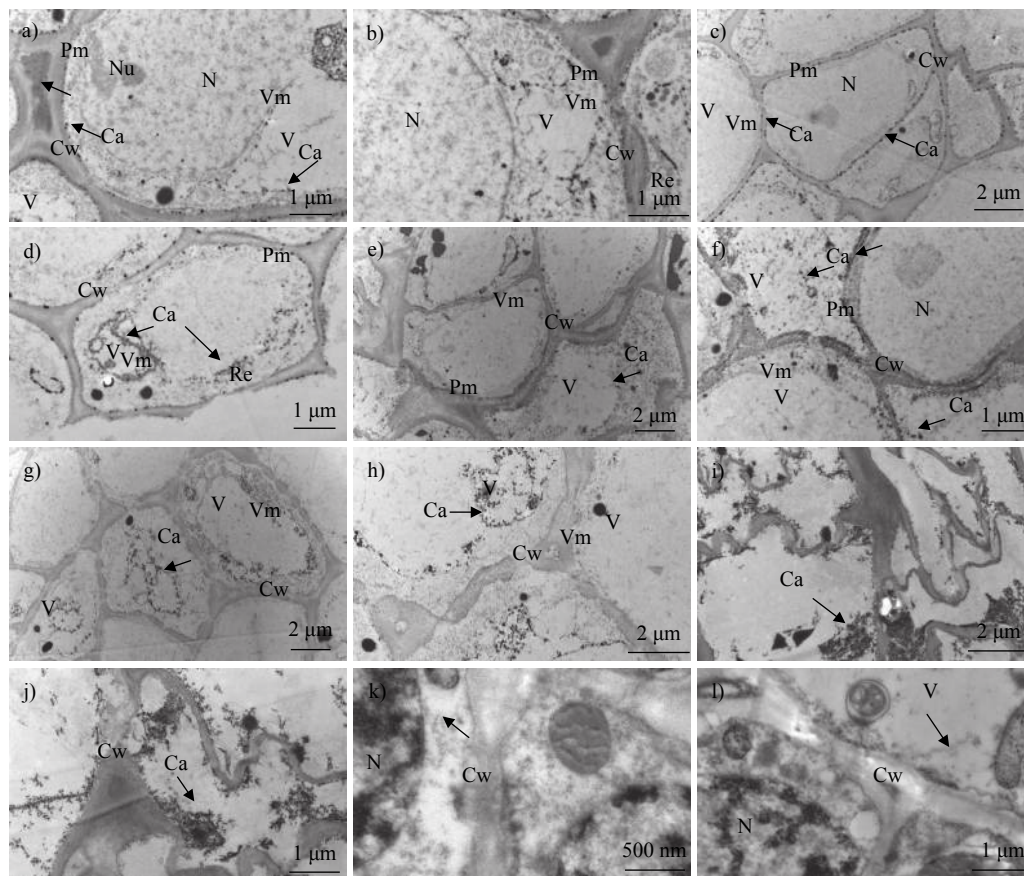
2.5 S5时期X12芽体 Ca^{2+} 超微细胞化学定位

S5时期,非替码板栗大板红细胞骨架结构仍保持正常,几乎没有变化, Ca^{2+} 仍然主要分布在细胞壁、细胞间隙和内质网上,细胞质和细胞核中 Ca^{2+} 依旧分布很少,液泡中仍检测不到 Ca^{2+} 的存在(图2e)。而替码板栗X12此时细胞已经死亡,细胞骨架降解或变形严重,细胞壁萎缩,液泡、细胞核和其他细胞器已经不完整存在,均降解破碎, Ca^{2+} 随降解的细胞器碎片成块状聚集(图1i、j)。

3 讨论

3.1 替码板栗X12芽体PCD过程中细胞内增加的 Ca^{2+} 的来源

Ca^{2+} 作为第二信使实现信号传递的过程是通过精确控制细胞质 Ca^{2+} 的时间、空间和浓度参数的变化来实现的,显然细胞内 Ca^{2+} 的分布与转移是形成 Ca^{2+} 信号的基础^[16]。在植物细胞中,细胞



注: a)~i) 中的黑色颗粒(箭头所示)是显示 Ca^{2+} 存在的焦锇酸钙沉淀; a) S1 时期: Ca^{2+} 主要分布在细胞间隙和细胞壁处, 液泡膜附近有较多 Ca^{2+} 分布, 细胞质和细胞核内有少量 Ca^{2+} 颗粒, 液泡内没有 Ca^{2+} 颗粒; b) S1 时期: 内质网上有较多 Ca^{2+} ; c) S2 时期: 细胞间隙中的 Ca^{2+} 分布较少, 较少 Ca^{2+} 颗粒沿着细胞壁排列, 细胞质中分布着较多 Ca^{2+} , 沿着核膜分布着整齐的 1 圈 Ca^{2+} 颗粒, 细胞核内有少量 Ca^{2+} 分布; d) S2 时期: 液泡膜附近, 及解体的液泡内有大量 Ca^{2+} 的分布; e) S3 时期: 细胞间隙和细胞壁上 Ca^{2+} 颗粒较少, 细胞质中的 Ca^{2+} 分布很多; f) S3 时期: 质膜和胞间连丝处有大量 Ca^{2+} 颗粒, 液泡膜和细胞核膜附近有大量的 Ca^{2+} ; g) S4 时期: 细胞壁上无 Ca^{2+} 颗粒; h) S4 时期: Ca^{2+} 呈无规则分布, 主要集中在液泡碎片处; i)、j) S5 时期: Ca^{2+} 随降解的细胞器碎片成块状聚集; k)、l) 切片经 EGTA 处理后, 箭头所示 Ca^{2+} 被螯合后的空洞, Ca^{2+} 沉淀颗粒被消除。N. 细胞核; Nu. 核仁; Cw. 细胞壁; Re. 内质网; Pm. 质膜; Vm. 液泡膜; V. 液泡。

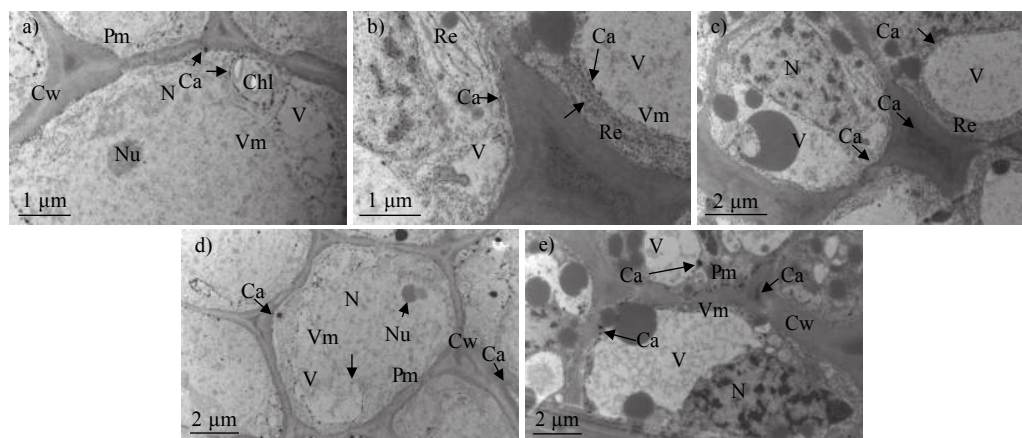
Note: The black particles (arrowhead) in a)~j) are the calcium antimonate precipitate which shows calcium's distribution. a) during the S1 period: there were a great amount of calcium particles in the intercellular space or on the cell wall, some calcium particles near the tonoplast, less calcium particles in the cytoplasm and the nucleus, no calcium particles in the vacuole; b) during the S1 period: many calcium particles on the endoplasmic reticulum; c) during the S2 period: Less calcium particles in the intercellular space, less calcium particles were arranged along the cell wall, many calcium particles in the cytoplasm, a neat circle of calcium particles is distributed along the nuclear membrane, less calcium particles in the nucleus; d) during the S2 period: many calcium particles near the tonoplast, and in the disassembled vacuole; e) during the S3 period: less calcium particles in the intercellular space or on the cell wall, and more in the cytoplasm; f) during the S3 period: there were a great amount of calcium particles on the plasma membrane and the plasmodesmata, and many calcium particles near the tonoplast and nuclear membrane; g) during the S4 period: there were almost no calcium particles on the cell wall; h) during the S4 period: calcium particles were randomly distributed at the vacuole debris; i) and j) during the S5 period: calcium particles aggregated with degraded organelle fragments; k) and l) after the slices were treated with EGTA, the arrows showed the cavity of calcium sequestered by EGTA and the calcium precipitate particles were eliminated. N. nucleus; Nu. nucleolus; Cw. cell wall; Re. endoplasmic reticulum; Pm. plasma membrane; Vm. tonoplast; V. vacuole.

图 1 替码板栗 X12 S1~S5 时期内芽体细胞 Ca^{2+} 的分布

Fig. 1 Ca^{2+} distribution of the buds cell at five stage of apical-bud-senescence chestnut X12

间隙和细胞壁是胞外 Ca^{2+} 库, 液泡、内质网和线粒体等细胞器是胞内 Ca^{2+} 库, 在植物细胞基质中游离 Ca^{2+} 水平很低, Ca^{2+} 主要储存在胞外和胞内钙库中, 当细胞受到外界生物或非生物刺激时, 引起细胞内钙库 Ca^{2+} 的释放或胞外 Ca^{2+} 内流, 造成细胞质基质内 Ca^{2+} 水平的迅速升高, 形成 Ca^{2+} 信号, 从而引起细胞体内的一系列级联反应, 引发一系列生理生化过程, 从而起到传递胞外信号

的作用^[5,17]。辣椒叶片导管分子细胞程序性死亡(PCD)过程中细胞质中增加的 Ca^{2+} 来自于胞外钙库(细胞壁和细胞间隙)^[13]; 毛竹茎秆纤维细胞 PCD 过程中细胞质中 Ca^{2+} 浓度的增加主要来自于胞内钙库(液泡)^[14]。本研究, Ca^{2+} 亚细胞定位发现: 对照的非替码板栗大板红在 S1~S5 时期, 细胞内 Ca^{2+} 的时空变化不明显, Ca^{2+} 一直主要分布在细胞壁、细胞间隙和内质网上; 而在替码板



注: a) S1 时期: Ca^{2+} 主要分布在细胞壁上, 沿着细胞壁紧密整齐地排列 1 圈; b) S2 时期: 细胞间隙中有很多 Ca^{2+} 呈黑色小颗粒状分散存在; c) S3 时期: 内质网上有很多 Ca^{2+} 颗粒分布, 细胞核内有少量 Ca^{2+} 颗粒分布; d) S4 时期: 细胞质内存在少量 Ca^{2+} 颗粒; e) S5 时期: 液泡内几乎检测不到 Ca^{2+} 存在。N. 细胞核; Nu. 核仁; Cw. 细胞壁; Re. 内质网; Pm. 质膜; Vm. 液泡膜; V. 液泡; Chl. 叶绿体

Note: a) during the S1 period: there were a great amount of calcium particles were arranged along the cell wall; b) during the S2 period: there were a great amount of calcium particles were small and scattered within the intercellular space; c) during the S3 period: many calcium particles on the endoplasmic reticulum, and less in the nucleus; d) during the S4 period: there were a few of calcium particles in the cytoplasm; e) during the S5 period: there was almost no calcium particles in the vacuole. N. nucleus; Nu. nucleolus; Cw. cell wall; Re. endoplasmic reticulum; Pm. plasmalemma; Vm. tonoplast; V. vacuole; Chl. chloroplast

图2 非替码板栗大板红 S1~S5 时期内芽体 Ca^{2+} 的分布

Fig. 2 Ca^{2+} distribution of the buds cell at five stage of no-replaceable bud chestnut Dabanhong

栗 X12 芽体 PCD 过程中细胞内 Ca^{2+} 空间和浓度发生明显变化, S1 时期 Ca^{2+} 主要分布在细胞壁和细胞间隙处, S2 时期细胞壁和细胞间隙中的 Ca^{2+} 颗粒减少, 细胞质、液泡和细胞核中的 Ca^{2+} 颗粒明显增加, S3 时期细胞质中的 Ca^{2+} 颗粒达到了最高值, 这说明替码板栗 X12 芽体 PCD 过程中激素等第一信使引起了细胞内 Ca^{2+} 的重新分布和浓度发生变化, 即形成了细胞钙信号, 而这种钙信号来源可能主要来自胞外钙库 (细胞壁和细胞间隙)。这与辣椒导管分子 PCD 的相关研究结果^[13]一致。另外, 本研究发现非替码板栗大板红在 S1~S3 时期, Ca^{2+} 除了一直主要分布在细胞壁、细胞间隙上外, 内质网上也一直分布较多, 说明在非替码板栗大板红芽体中, 内质网可能是胞内钙库, 但是替码板栗 X12 在 S1~S2 时期内质网上的 Ca^{2+} 时空变化不明显, 所以还不能确定替码板栗 X12 芽体 PCD 过程中 Ca^{2+} 信号形成的来源也包括胞内钙库 (内质网), 有关这方面的结果还需要进一步研究验证。

3.2 替码板栗 X12 芽体 PCD 与 Ca^{2+} 时空变化的关系

植物 PCD 过程受细胞内外多种信号系统的诱导和调控^[2, 5], 而 Ca^{2+} 在整个 PCD 信号转导过程中起着接收和传递信号的作用, 而且钙信使系

统起作用的中心环节是细胞中 Ca^{2+} 的空间和浓度的变化^[8, 15, 18]。前人研究表明: 细胞质内增加的 Ca^{2+} 激活了一系列用于细胞质和细胞核降解的钙依赖性水解酶活性, 从而引发了细胞的 PCD。另外还可以激活核膜上 ATP 依赖的 Ca^{2+} 摄取系统, 升高细胞核的 Ca^{2+} 浓度, 并导致核酸内切酶的活化和 DNA 的断裂^[19-20]。GROOVER 等^[21]研究认为: Ca^{2+} 的胞质内流导致液泡膜解体和细胞质流动停止, 进而启动了细胞死亡, 然后解体的液泡和细胞质混合而引起了细胞的原位自溶。本试验中, 替码板栗 X12 芽体细胞内 Ca^{2+} 空间和浓度发生的动态变化与芽体细胞 PCD 发生相对应。S1 时期, Ca^{2+} 主要分布在细胞壁和细胞间隙处, 此时细胞骨架结构正常, 细胞器完整; S2 时期, 细胞间隙中 Ca^{2+} 减少, 细胞质、液泡膜和细胞核膜附近 Ca^{2+} 开始增多, 此时部分液泡轻微破裂; S3 时期, 细胞间隙和细胞壁上 Ca^{2+} 颗粒极少, 细胞质、细胞核、破裂的液泡内及液泡周围 Ca^{2+} 明显增多, 而此时细胞进一步解体, 细胞壁、液泡、细胞核降解严重, 而且 DNA 降解严重^[22]; S4 时期, 细胞解体严重, Ca^{2+} 在质膜和细胞壁上分布较少, 主要集中于破碎的液泡膜和液泡碎片处, 此时芽体 DNA 降解片段形成了模糊的弥散带^[22]; S5 时期, 细胞死亡, 细胞骨架降解或变形

严重, 细胞壁萎缩, 液泡、细胞核和其他细胞器已经不完整存在, 均降解破碎, Ca^{2+} 随降解的细胞器碎片聚集在团粒处, 此时电泳已经检测不到芽体 DNA 的存在^[22]。而对照品种大板红在 S1~S5 时期, Ca^{2+} 一直主要分布在细胞壁、细胞间隙和内质网上, 细胞骨架结构一直保持正常, 而且芽体 DNA 一直未发生降解现象^[22]。以上结果说明: Ca^{2+} 从细胞壁和细胞间隙向细胞质内、液泡和细胞核附近及内部转移引起替码板栗芽体 PCD, Ca^{2+} 的时空变化与芽体 PCD 有密切关系。笔者推测, 细胞质、液泡和细胞核内 Ca^{2+} 的增加可能首先直接或间接导致了液泡的破裂, 之后引起 DNA 降解及细胞骨架的解体。但 Ca^{2+} 内流到细胞后到底是激活了何种促使液泡膜破裂的蛋白酶导致液泡破裂以及液泡内释放了何种 PCD 执行阶段的相关酶降解细胞仍未可知, 有关这方面的问题有待进一步细化研究。

[参考文献]

- [1] WANG G P, LIU Q X, KONG D J. Analysis of the cause of shoot apex death in the annual growth cycle of *Castanea mollissima* Blume cv. 'Xin 12'[J]. *Acta Horticulturae*, 2009, 844: 133. DOI: [10.17660/ActaHortic.2009.844.18](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.844.18).
- [2] MORI I C, SCHROEDER J I. Reactive oxygen species activation of plant Ca^{2+} channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction[J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(2). DOI: [10.1104/pp.104.042069](https://doi.org/10.1104/pp.104.042069).
- [3] VISSER E, VOESENEK L. Acclimation to soil floodign-sensing and signal-transduction[J]. *Plant and Soil*, 2005, 274(1/2): 197. DOI: [10.1007/s11104-004-1650-0](https://doi.org/10.1007/s11104-004-1650-0).
- [4] 曾爱松, 宋立晓, 高兵, 等. 低温胁迫下甘蓝叶片细胞超微结构及叶肉细胞内 Ca^{2+} 的分布变化[J]. *江苏农业学报*, 2011, 27(5): 1053.
- [5] 李继伟, 邓祥宜, 周竹青, 等. Ca^{2+} 和 Ca^{2+} -ATPase 在小麦颖果筛分子分化中的动态变化[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(12): 4209. DOI: [10.3864/j.issn.0578-1752.2009.12.011](https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2009.12.011).
- [6] BUSH D S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling (review)[J]. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology*, 1995, 46(1): 95.
- [7] LAM E, PONTIER D, DEL POZO O. Die and let live-programmed cell death in plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 1999, 2(6): 502.
- [8] ZUPPINI A, NAVAIZO L, SELLA L, et al. An endo-polygalacturonase from *Sclerotinia sclerotiorum* induces calcium-mediated signaling and programmed cell death in soybean cells[J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2005, 18(8): 849. DOI: [10.1094/MPMI-18-0849](https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0849).
- [9] ROBERTS A W, HAIGLER C H. Rise in chlorotetracycline fluorescence accompanies tracheary element differentiation in suspension cultures of *Zinnia*[J]. *Protoplasma*, 1989, 152(1): 37. DOI: [10.1007/BF01354238](https://doi.org/10.1007/BF01354238).
- [10] HE C J, MORGAN P W, DREW M C. Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia[J]. *Plant Physiology*, 1996, 112(2): 463.
- [11] MAN Y, YASNOMI T, PYOYUN P. Novel evidence for apoptotic cell response and differential signals in chromatin condensation and DNA cleavage in victorin-treated oats[J]. *Plant Journal*, 2001, 28(1): 13.
- [12] 杨蕊, 关雪莲, 张睿鹏, 等. 低温胁迫过程中北海道黄杨叶肉细胞 Ca^{2+} 的动态变化[J]. *林业科学*, 2012, 48(10): 36.
- [13] 张宗申, 利容千, 王建波. 导管分子程序化死亡过程中 Ca^{2+} 的时空变化[J]. *科学通报*, 2001, 46(13): 1098.
- [14] 甘小洪, 丁雨龙. 毛竹茎秆纤维发育过程中 Ca^{2+} 分布的时空变化[J]. *电子显微学报*, 2006, 25(5): 420.
- [15] WANG G P, ZHANG Z H, KONG D J, et al. Programmed cell death is responsible for replaceable bud senescence in chestnut (*Castanea mollissima* BL.)[J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(9): 1603. DOI: [10.1007/s00299-012-1274-4](https://doi.org/10.1007/s00299-012-1274-4).
- [16] 杨蕊, 关雪莲, 张睿鹏, 等. 低温胁迫下北海道黄杨叶肉细胞 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} -ATPase 的变化[J]. *园艺学报*, 2013, 40(6): 1139.
- [17] MORARD P, SILVESTRE J. Plant injury due to oxygen deficiency in the root environment of soilless culture: a review[J]. *Plant and Soil*, 1996, 184(2): 243. DOI: [10.1007/BF00010453](https://doi.org/10.1007/BF00010453).
- [18] 李杉, 邢更妹, 崔凯荣, 等. 枸杞体细胞胚发生中 Ca^{2+} 和 ATPase 的超微结构定位研究[J]. *实验生物学报*, 2003, 36(6): 414.
- [19] 戴云, 张兵. 细胞凋亡与细胞内信号[J]. *中国细胞生物学学报*, 1998(3): 116.
- [20] MCCONKEY D J, HARTZELL P, NICOTERA P, et al. Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes[J]. *FASEB Journal*, 1989, 3(7): 1843.
- [21] GROOVER A, JONES A M. Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis[J]. *Plant Physiology*, 1999, 119(2): 375.
- [22] 王广鹏. 替码板栗混合芽细胞程序性死亡特征及调控信号因子研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2012.

责任编辑: 何承刚