

Ca²⁺和Ca²⁺-ATPase在小麦颖果筛分子分化中的动态变化

李继伟, 邓祥宜, 周竹青, 王利凯, 阳超男, 樊海燕

(华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070)

摘要:【目的】探讨Ca²⁺和Ca²⁺-ATPase在小麦颖果筛分子(sieve elements, SEs)分化过程中的动态变化及其在SEs的细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)中的作用。【方法】用透射电子显微术观察小麦颖果韧皮部分化过程中的超微结构变化;用Ca²⁺特异性荧光染色法和焦锑酸钾沉淀法,对小麦颖果韧皮部分化过程中的Ca²⁺进行组织和亚细胞水平的定位;同时用铅盐沉淀法对Ca²⁺-ATPase进行定位。【结果】超微结构观察发现,在SEs发育初期,细胞壁逐渐加厚,且内壁呈突起状,随着分化的进行,SEs细胞壁较以前明显变薄且平滑。Ca²⁺荧光试验表明,花后6~10 d,SEs细胞壁中有Ca²⁺的积累,其中花后9 d,SEs细胞壁Ca²⁺浓度最高;到花后14 d,细胞壁Ca²⁺浓度下降至对照水平。Ca²⁺亚细胞定位表明,在SEs中,花后1~2 d Ca²⁺主要分布在细胞膜上和细胞核中;花后4 d,SEs细胞质中Ca²⁺浓度增加,并且线粒体中也出现Ca²⁺颗粒;但到花后5~8 d, Ca²⁺主要分布在SEs细胞壁中,此时线粒体中未发现Ca²⁺颗粒;在花后10~18 d, Ca²⁺再次从细胞壁转移到胞内;花后20 d, SEs中Ca²⁺消失。在中间细胞(intermediary cells, ICs)中,花后1~18 d始终都有Ca²⁺颗粒,主要分布在细胞内壁上和液泡中。在SEs发育过程中, Ca²⁺-ATPase的活性发生显著变化。花后3 d时,SEs中的Ca²⁺-ATPase活性最弱;花后4~14 d SEs有较强的Ca²⁺-ATPase活性,且主要分布在SEs的细胞壁、细胞膜、胞间连丝等部位和线粒体、细胞核等细胞器上。【结论】Ca²⁺和Ca²⁺-ATPase在小麦颖果SEs的分化过程中呈动态变化, Ca²⁺可能参与介导了SEs的PCD过程。此外, Ca²⁺和Ca²⁺-ATPase可能对SEs细胞壁的加厚和SEs的功能实施有一定调控作用。

关键词:小麦(*Triticum aestivum* L.);颖果;筛分子;Ca²⁺;Ca²⁺-ATPase

Dynamic Changes of Ca²⁺ and Ca²⁺-ATPase in Sieve Elements in the Developing Caryopsis of *Triticum aestivum* L.

LI Ji-wei, DENG Xiang-yi, ZHOU Zhu-qing, WANG Li-kai, YANG Chao-nan, FAN Hai-yan

(College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract:【Objective】 Previous study revealed that sieve elements (SEs) in the developing caryopsis of *Triticum aestivum* L. underwent a unique type of programmed cell death (PCD). In this paper, the dynamic changes and the roles of Ca²⁺ and Ca²⁺-ATPase in SEs during the PCD were studied.【Method】 The ultrastructural aspects of phloem cells in wheat caryopsis were examined by transmission electron microscopy (TEM). Using specific fluorescence staining and potassium pyroantimonate precipitation method, Ca²⁺ was localized at histological and sub-cellular levels in SEs in the developing wheat caryopsis. TEM and lead nitrate were used to locate Ca²⁺-ATPase in SEs.【Result】 TEM studies showed that the cell walls of SEs thickened at the beginning of differentiation, and then became thinner and smoother. Fluorescence staining showed that the fluorescence due to Ca²⁺ appeared in cell walls of SEs from 6 to 10 d after flowering. The fluorescence due to Ca²⁺ in cell walls of SEs was most notable on 9 d after flowering and disappeared on 14 d after flowering. Sub-cellular localization of Ca²⁺ showed that Ca²⁺ was localized on plasma membrane and in nuclei from 1 to 2 d after flowering. On 4 d after flowering, Ca²⁺ was localized in cytoplasm and mitochondria of SEs. From 5 to 8 d after flowering, Ca²⁺ was transported to the cell walls of SEs and no Ca²⁺ precipitates were observed in mitochondria. From 10 to 18 d after flowering, Ca²⁺ was transported into the cytoplasm again from cell walls and no Ca²⁺ precipitates were observed on 20 d after

收稿日期: 2009-03-16; 接受日期: 2009-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571101)

作者简介: 李继伟(1983-),女,山西大同人,硕士研究生,研究方向为细胞的结构与功能。E-mail: lijawei1205@163.com。通信作者周竹青(1965-),男,湖北安陆人,教授,博士,研究方向为作物生理与细胞生物学研究。E-mail: zhouzhuqing@mail.hzau.edu.cn

flowering. In intermediary cells (ICs), Ca^{2+} precipitates were observed from 1 to 18 d after flowering, and Ca^{2+} mainly distributed on intine and tonoplast. The activity of Ca^{2+} -ATPase changed obviously during the SEs differentiation. There was lowest activity of Ca^{2+} -ATPase on 3 d after flowering in SEs. High levels of Ca^{2+} -ATPase activity were found from 4 to 14 d after flowering in SEs, and the enzyme was mainly localized in cell walls, cytoplasm, plasmodesmata, mitochondria and nuclei. 【Conclusion】 These results showed the dynamic changes of Ca^{2+} and Ca^{2+} -ATPase in SEs differentiation. Ca^{2+} might play important roles in SEs during the PCD. In addition, Ca^{2+} and Ca^{2+} -ATPase might be also related to cell wall thickening and functions of SEs.

Key words: wheat (*Triticum aestivum* L.); caryopsis; sieve elements; Ca^{2+} ; Ca^{2+} -ATPase

0 引言

【研究意义】小麦颖果（习惯称籽粒）大维管束处于颖果腹部，称为腹部维管束，它包括韧皮部和木质部。筛管（sieve tube）是韧皮部的主要成分之一，它是由筛分子（sieve elements, SEs）相连接形成的管道。SEs 是光合同化物从植株向籽粒运送的主要通道。运输通道的建成过程和光合同化物运输效率直接影响小麦籽粒同化物的积累，进而影响小麦的产量和品质。

【前人研究进展】在前期的工作中，Wang 等^[1]通过 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) 标记和透射电子显微术已经证明 SEs 的分化是一种特殊的细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 过程——细胞程序性半死亡 (programmed cell semi-death)。 Ca^{2+} 是真核细胞信号转导的核心组分之一，具有重要的生物学作用，它参与了植物的发育^[2]、衰老^[3]和光合同化物运输^[4]等的调节。Hirschi^[4]指出高浓度的 Ca^{2+} 定位在细胞壁、质膜、内质网和液泡等部位。细胞内 Ca^{2+} 保持低浓度是其发挥信使功能的前提条件。 Ca^{2+} -ATPase 对维持细胞质内较低的 Ca^{2+} 水平起重要作用。它可以将细胞质中过高浓度的 Ca^{2+} 连续不断的转运到胞外或细胞器中储藏起来，使胞质 Ca^{2+} 浓度恢复到正常水平^[5]。Lam 等^[6] 和 Zuppini 等^[7]指出，在植物发生 PCD 的过程中，细胞内 Ca^{2+} 起着重要作用。Jones 等^[8]指出，人为改变 Ca^{2+} 浓度可使液泡破裂进而导致染色质凝集，最终导致 PCD 的发生。导管分子分化过程中， Ca^{2+} 的内流是导管 PCD 必需的，内流的 Ca^{2+} 最终导致液泡膜解体和细胞质流动停止，然后解体的液泡和细胞质混合而引起了细胞的原位自溶^[9]。通常，细胞在 PCD 过程中会出现 Ca^{2+} 浓度升高、核 DNA 片段化、蛋白磷酸化、核异染色质化和活性氧升高等典型特征^[10]。【本研究切入点】目前，对植物果实韧皮部细胞的超微结构和功能研究报道较多^[11-12]，但是在超微细胞化学方面研究相对较少，其中还未发现小麦颖果腹部韧皮部细胞

Ca^{2+} 和 Ca^{2+} -ATPase 的定位，以及二者的时空变化与韧皮部细胞分化和发育关系的报道。【拟解决的关键问题】本研究通过对小麦颖果腹部韧皮部细胞 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} -ATPase 的定位，探讨 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} -ATPase 在 SEs 分化过程中的动态变化及其在 SEs 的 PCD 过程中的可能作用，为小麦灌浆过程提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

以小麦品种华麦 8 号为供试材料，2007 年种植于华中农业大学网室，株行距 25 cm×25 cm。10 月 27 日播种，11 月 6 日出苗。2008 年 2 月下旬施复合肥 (N : P : K=30 : 10 : 10)，用量平均 0.05 kg·m⁻²。小麦于 2008 年 3 月 28 日抽穗，4 月 5 日开花。在抽穗当天挂牌标记抽穗小麦；再在开花当天（记为 0 d）挂牌标记开花麦穗，用剪芒的方法标记开花小花（仅标记小穗的第 1、2 位的小花）。从开花当天到花后 10 d，每天取样 1 次，以后分别在花后 14、18、20 和 28 d 取样。

1.2 方法

1.2.1 显微和超微结构观察 去掉颖果两端，留取中部，快速剥取颖果腹部维管组织，按常规方法进行电镜制样^[1]。将包埋好的材料在超薄切片机 (LKB-2088, Bromma, Sweden) 上进行半薄切片和超薄切片。将厚约 1 μm 的半薄切片捞在干净的载玻片上，不经过染色直接在显微镜 (Nikon Eclipse 80i, Japan) 下观察、拍照。将厚约 80 nm 的超薄切片，经过铅、铀盐双重染色后，在 HITACHI, H-7650 型透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 下观察并拍照。

1.2.2 Ca^{2+} 荧光观察 去掉颖果两端，留取中部，快速剥取颖果腹部维管组织，用 Tissue-Tek OCT 4583 compound (sakura finetek USA) 包埋，在冰冻切片机 (Leica CM1850, Germany) 上切片，切片厚度 8 μm。 Ca^{2+} 的检测用 Ca^{2+} 指示剂 fluo-3 AM (Fluka)，参照

Bouranis 等^[13]的方法。切片在 fluo-3 AM(蒸馏水配制, $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 中染色 1 h (25°C), 蒸馏水洗, 用荧光显微镜 (Nikon Eclipse 80i, Japan) 进行显微结构观察和荧光观察。荧光观察中, 激发光和散射光波长分别是 $450\sim 490 \text{ nm}$ (蓝光) 和 526 nm (绿光); 部分切片同时观察了紫外光激发下的自发荧光 (激发光波长 365 nm)。对照设置: 将未染色的切片放在蒸馏水中, 进行显微结构观察和自发荧光 (激发光波长为 $450\sim 490 \text{ nm}$) 观察。

1.2.3 Ca^{2+} 的亚细胞定位 去掉颖果两端, 留取中部, 快速剥取颖果腹部维管组织, 以焦锑酸钾沉淀法 (Ca^{2+} 与焦锑酸钾反应生成高电子致密度的焦锑酸钙沉淀, 即观察到的 Ca^{2+} 颗粒) 进行 Ca^{2+} 的亚细胞定位^[14]。厚约 80 nm 的超薄切片不经过染色, 直接在 TEM 下观察。对照设置: 固定液和缓冲液中不含焦锑酸钾。

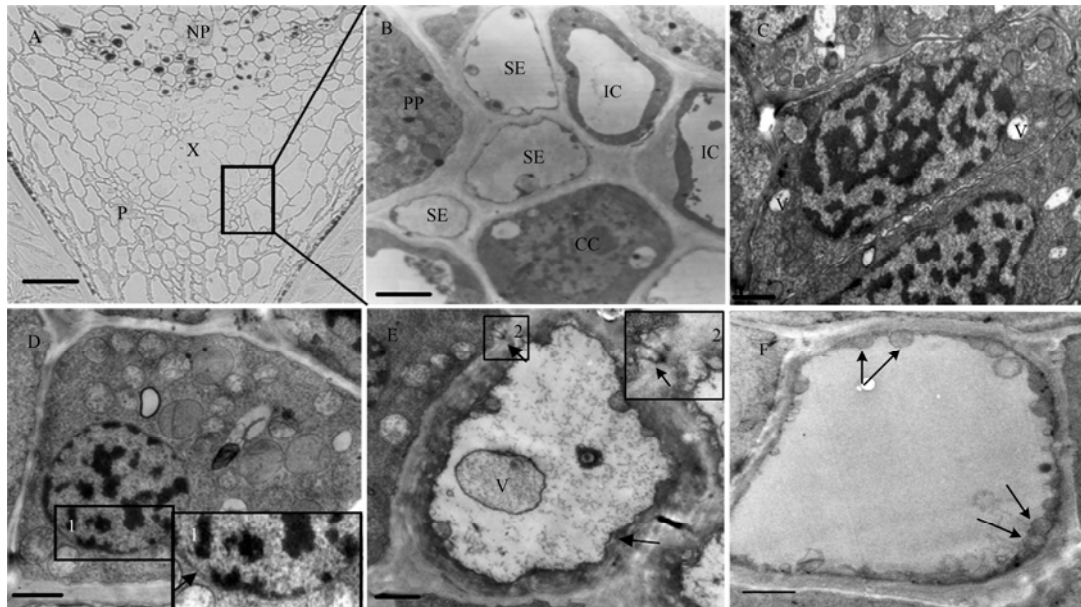
1.2.4 Ca^{2+} -ATPase 的亚细胞定位 去掉颖果两端,

留取中部, 快速剥取颖果腹部维管组织, 以铅盐沉淀法 (Ca^{2+} -ATPase 在有 Ca^{2+} 的情况下以 ATP 钠盐为底物生成的磷酸根与铅离子形成高电子致密度的磷酸铅沉淀, 即观察到的酶反应颗粒) 进行 Ca^{2+} -ATPase 的亚细胞定位^[15]。厚约 80 nm 的超薄切片不经过染色, 直接在 TEM 下观察。对照设置: 孵育液中含有抑制剂 NaF。

2 结果与分析

2.1 小麦颖果韧皮部显微和超微结构观察

小麦颖果腹部维管束包括韧皮部和木质部 (图 1-A)。韧皮部主要由 SEs、伴胞 (companion cells, CCs)、中间细胞 (intermediary cells, ICs) 和韧皮薄壁细胞 (phloem parenchyma cells, PPCs) 等构成, 通常 CCs 和 ICs 均比 SEs 大, CCs 有浓厚的细胞质, ICs 有中央大液泡 (图 1-B)。SEs 在发育早期时, 形态



A 为维管束横切; B 为韧皮部横切; C~F 为 SEs 横切。A: 花后 28 d, 示维管束主要由韧皮部 (P) 和木质部 (X) 组成; NP, 珠心突起 (Bar= $50 \mu\text{m}$); B: 花后 14 d, 示韧皮部的筛分子 (SEs)、伴胞 (CCs)、中间细胞 (ICs) 和韧皮部薄壁细胞 (PPs) (Bar= $2 \mu\text{m}$); C: 开花当天, 示 SE 细胞核形态正常, 细胞中有小液泡 (V) 且细胞壁开始加厚 (Bar= $1 \mu\text{m}$); D: 花后 2 d, 示 SE 细胞壁厚度增加, 染色质凝集, 右下角的方框 1 是图中方框的放大, 示核膜变得模糊 (箭示) (Bar= $1 \mu\text{m}$); E: 花后 3 d, 示 SE 细胞壁显著加厚且内壁呈突起状 (长箭示), 分支状的胞间连丝 (短箭示) 和细胞内的液泡 (V)。右上方方框 2 是图中方框的放大 (Bar= $1 \mu\text{m}$); F: 花后 6 d, 示成熟 SE 中无细胞核, 线粒体 (箭示) 沿胞壁周缘分布, 细胞壁较以前变薄而且平滑 (Bar= $1 \mu\text{m}$)

A is a cross-section of phloem; B is a cross-section of phloem; C-F are cross-sections of SEs. A: 28 d after flowering, vascular is composed of phloem (P) and xylem (X); NP, Nucellar projection (Bar= $50 \mu\text{m}$); B: 14 d after flowering, showing sieve elements (SEs), companion cells (CCs), intermediary cells (ICs) and phloem parenchyma cells (PPs) in Phloem (Bar= $2 \mu\text{m}$); C: The flowering day, a developing SE with a normal nucleus, small vacuoles (V) and slight thickening cell wall (Bar= $1 \mu\text{m}$); D: 2 d after flowering, a developing SE with a chromatin-condensed nucleus and thicker cell wall, the boxed area 1 in the lower right-hand corner is the magnification of the boxed area in the image, showing obscure nuclear envelope (Bar= $1 \mu\text{m}$); E: 3 d after flowering, a developing SE with considerably thickened and rough cell wall, branching plasmodesmata (short arrow) and a vacuole (V). The boxed area 2 in the top right-hand corner is the magnification of the boxed area in the image (Bar= $1 \mu\text{m}$); F: 6 d after flowering, a mature SE with mitochondria (arrow) but without nucleus. The cell wall becomes thinner and smoother than before (Bar= $1 \mu\text{m}$)

图 1 小麦颖果维管束及 SEs 结构变化

Fig. 1 Structure of the vascular tissue and SEs in wheat caryopsis

与其它细胞相似,细胞核形态正常,可见许多线粒体随机分布在细胞质中(图 1-C;图 5-A)。到花后 2 d 时,正在发育的 SEs 中可见线粒体、高尔基体和内质网均匀分布于细胞质中,细胞核中染色质凝集并且边缘化,部分核膜已经变得模糊,细胞壁稍有加厚(图 1-D;图 5-B, C)。在花后 3 d, SEs 细胞壁显著加厚且内壁呈突起状,中央有液泡,可见分支状的胞间连丝,在 SEs 一边为单开口,在 ICs 一边为多开口(图 1-E)。此时,线粒体数量明显减少,SEs 中细胞质变得稀薄,核染色质严重凝集(图 5-D)。发育成熟的 SEs 缺乏细胞核和液泡,只保留少量线粒体等细胞器,并且贴近质膜分布,此时 SEs 的细胞壁较以前变薄且平滑(图 1-B, F)。

2.2 Ca^{2+} 荧光观察

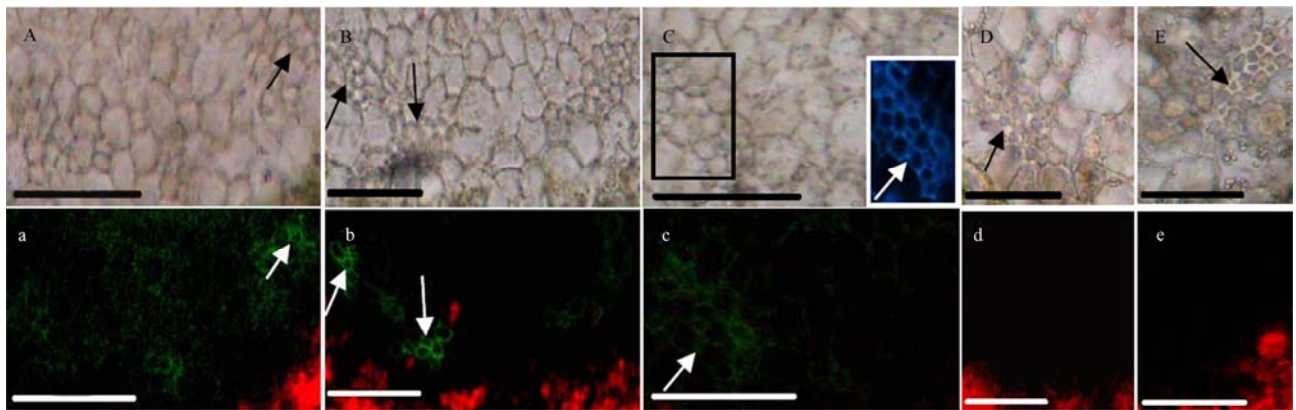
Ca^{2+} 荧光定位中,绿色荧光的强弱代表着 Ca^{2+} 浓度的高低,紫外光激发下细胞壁呈现蓝色自发荧光。SEs 发育过程中韧皮部细胞 Ca^{2+} 荧光发生显著变化。花后 6 d, SEs 细胞壁有较弱 Ca^{2+} 荧光出现,表示细胞壁中存在较低浓度的 Ca^{2+} (图 2-a)。花后 9 d,检测到 SEs 细胞壁有较强 Ca^{2+} 荧光,说明此时细胞壁中有较高浓度的 Ca^{2+} (图 2-b)。到花后 10 d, SEs 细胞壁 Ca^{2+} 荧光变弱,表示 Ca^{2+} 浓度降低(图 2-c)。到花后 14 d 时, SEs 细胞壁 Ca^{2+} 荧光消失(图 2-d)。同时,可观察到果皮细胞中叶绿体发出的火红色自发荧光。

对照中未观察到 Ca^{2+} 荧光(图 2-e)。

2.3 Ca^{2+} 的亚细胞定位

2.3.1 SEs 中 Ca^{2+} 分布的时空变化 花后 1~2 d,正在发育的 SEs 细胞质浓厚, Ca^{2+} 颗粒主要分布在细胞膜和细胞核上,细胞质中有少量分布(图 3-A, B)。花后 4 d,在 SEs 的细胞膜和细胞质中有大量细小的 Ca^{2+} 颗粒,线粒体上也发现 Ca^{2+} 颗粒沉积(图 3-C~E)。此外,在 SEs 中未完全降解的液泡膜上也有 Ca^{2+} 颗粒存在(图 3-C)。花后 5 d,在 SEs 中, Ca^{2+} 颗粒主要出现在细胞壁上,质膜上也有少量分布。此时,线粒体和其它细胞器中均未见 Ca^{2+} 颗粒(图 3-F)。花后 6 d, SEs 内壁上有大量 Ca^{2+} 颗粒(图 3-G),线粒体“空泡”化。花后 10~18 d, SEs 中的 Ca^{2+} 颗粒呈聚集态分布在细胞质中和一些小囊泡上(图 3-I~K)。花后 20 d, SEs 中 Ca^{2+} 颗粒消失(图 3-L)。在对照中, SEs 中无 Ca^{2+} 颗粒出现(图 3-H)。

2.3.2 ICs 中 Ca^{2+} 分布的时空变化 花后 1 d, ICs 有一个大液泡和若干随机分布的小液泡,细胞质均匀分布。 Ca^{2+} 颗粒主要分布在细胞内壁上、液泡和细胞质中(图 4-A)。花后 2 d, ICs 中央有一个较大的液泡,其中含有被包裹进的膜状结构。 Ca^{2+} 颗粒主要分布在液泡膜及其内含物上,细胞质也有少量 Ca^{2+} 颗粒(图 4-B)。花后 4~5 d, ICs 中有一个中央大液泡,细胞质沿壁分布。 Ca^{2+} 颗粒主要分布在液泡膜和细胞内壁

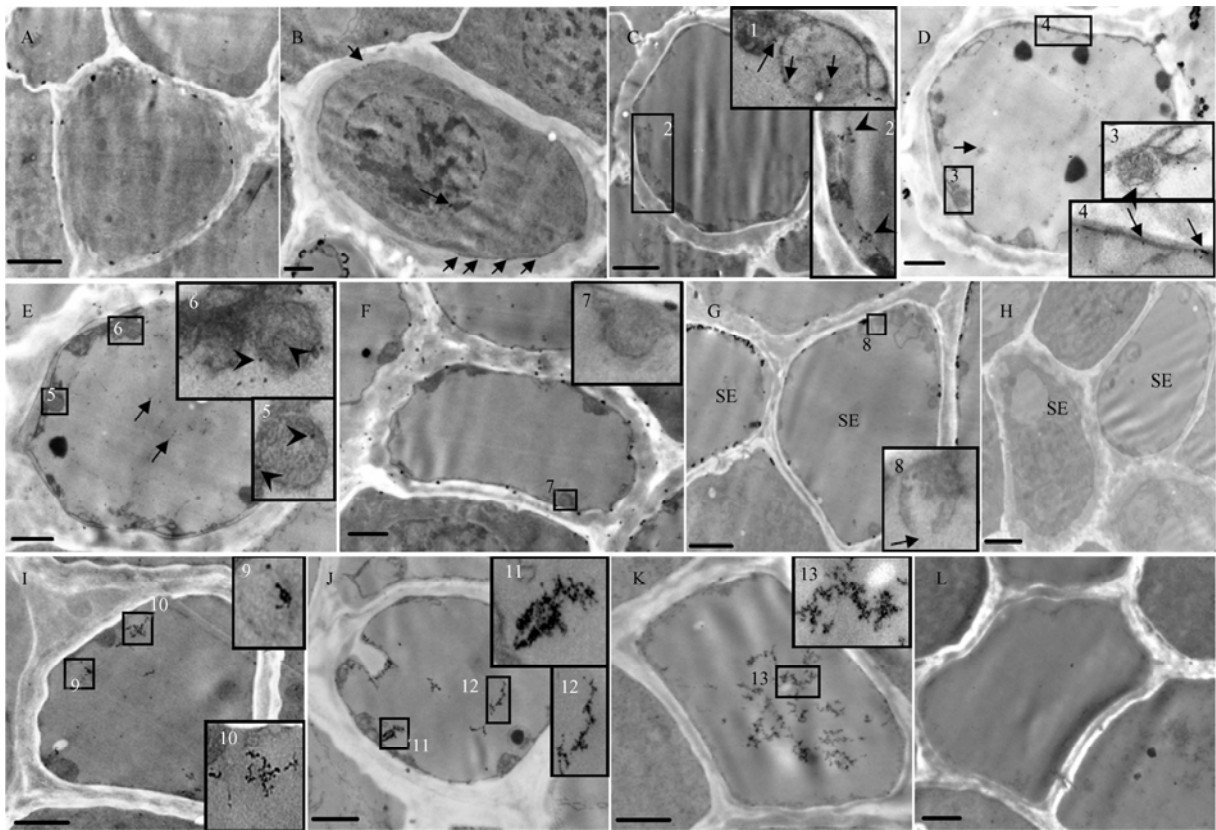


韧皮部横切照片。A, B, C, D, E 为 a, b, c, d, e 对应的光镜结构照片, 箭指示 SEs, Bar=50 μm 。a: 花后 6 d, 示 SE 细胞壁有 Ca^{2+} 荧光; b: 花后 9 d, 示 SE 细胞壁 Ca^{2+} 荧光变强; c: 花后 10 d, 示 SE 细胞壁 Ca^{2+} 荧光减弱, C 图右下角方框 1 中是紫外光激发下的自发荧光照片; d: 花后 14 d, 示 SE 细胞壁 Ca^{2+} 荧光消失; e: 花后 10 d, 对照, 无 Ca^{2+} 荧光出现

Cross-sections of phloem. Structures found on fluorescence microscope images (a, b, c, d and e) correspond to structures observed on the light microscope images (A, B, C, D and E). Arrows denote SEs, Bar=50 μm . a: 6 d after flowering, green fluorescence due to Ca^{2+} appears in cell walls of SEs; b: 9 d after flowering, more intensive green fluorescence due to Ca^{2+} appears in cell walls of SEs; c: 10 d after flowering, less intensive green fluorescence due to Ca^{2+} appears in cell walls of SEs, the boxed area 1 in the lower right-hand corner in C is UV-excited autofluorescence; d: 14 d after flowering, no green fluorescence due to Ca^{2+} appears in cell walls of SEs; e: 10 d after flowering, control, no fluorescence due to Ca^{2+} appears in cell walls of SEs

图 2 Ca^{2+} 荧光定位

Fig. 2 Localization of Ca^{2+} fluorescence



A~L 均为 SEs 横切照片, 右边角落处的方框 2~13 是 C~K 中相应方框的放大。A: 花后 1 d, 示 Ca^{2+} 颗粒主要分布在细胞膜上 (Bar=2 μm); B: 花后 2 d, 示染色质凝集, Ca^{2+} 颗粒主要分布在细胞膜 (短箭) 和细胞核 (长箭) (Bar=1 μm); C: 花后 4 d, 示 SE 中未完全降解的液泡膜上的 Ca^{2+} 颗粒 (方框 2, 箭头) 上的 Ca^{2+} 颗粒。右上角的方框 1 是一张单独放大的照片, 示 SE 中的线粒体 (长箭) 和囊泡 (短箭) 中的 Ca^{2+} 颗粒 (Bar=1 μm); D: 花后 4 d, 示细胞质中大量细小 Ca^{2+} 颗粒 (短箭), 线粒体 (方框 3, 箭头) 和细胞膜 (方框 4, 长箭) 上也有 Ca^{2+} 颗粒 (Bar=1 μm); E: 花后 4 d, 示细胞质 (箭头) 和线粒体 (方框 5 和 6, 箭头) 中的 Ca^{2+} 颗粒 (Bar=1 μm); F: 花后 5 d, 示细胞壁上的 Ca^{2+} 颗粒, 线粒体中未发现 Ca^{2+} 颗粒 (方框 7) (Bar=1 μm); G: 花后 6 d, 示细胞壁上的 Ca^{2+} 颗粒, 线粒体“空泡”化、膜变得模糊 (方框 8) (Bar=2 μm); H: 花后 3 d, 对照, SEs 中未见 Ca^{2+} 颗粒 (Bar=2 μm); I: 花后 10 d, 示细胞质 (方框 10) 和小囊泡 (方框 9) 中聚集态的 Ca^{2+} 颗粒 (Bar=1 μm); J~K: 花后 14 d 和 18 d, 示细胞质中聚集态的 Ca^{2+} 颗粒 (方框 11~13) (Bar=1 μm); L: 花后 20 d, 示 SE 中 Ca^{2+} 颗粒消失 (Bar=1 μm)

A-L are cross-sections of SEs, the boxed areas 2-13 in the right-hand corner are the magnifications of the boxed areas in image C-K respectively. A: 1 d after flowering, showing Ca^{2+} precipitates distributed on plasmalemma (Bar=2 μm); B: 2 d after flowering, showing condensed chromatin, Ca^{2+} precipitates distributed on plasmalemma (short arrows) and in nucleus (long arrow) (Bar=1 μm); C: 4 d after flowering, showing the localization of Ca^{2+} on tonoplast fragments (the boxed area 2, arrow heads). The boxed area 1 in the top right-hand corner is a single image, showing the distribution of Ca^{2+} precipitates in a mitochondrion (long arrow) and a vesicle (short arrows) of SE (Bar=1 μm); D: 4 d after flowering, showing the distribution of Ca^{2+} precipitates in cytoplasm (short arrow), mitochondrion (the boxed area 3, arrow head) and on plasmalemma (the boxed area 4, long arrows) (Bar=1 μm); E: 4 d after flowering, showing the distribution of Ca^{2+} precipitates in cytoplasm (arrows) and mitochondria (the boxed areas 5 and 6, arrow heads) (Bar=1 μm); F: 5 d after flowering, showing Ca^{2+} precipitates distributed in cell wall, showing a vacuolated mitochondrion without Ca^{2+} (the boxed area 7) (Bar=1 μm); G: 6 d after flowering, showing Ca^{2+} precipitates distributed in cell walls, showing a vacuolated mitochondrion with obscured membrane (the boxed area 8) (Bar=2 μm); H: 3 d after flowering, control, SEs without Ca^{2+} precipitates (Bar=2 μm); I: 10 d after flowering, showing Ca^{2+} precipitates aggregated in a vesicle (the boxed area 10) and cytoplasm (the boxed area 9) (Bar=1 μm); J-K: 14 d after flowering and 18 d after flowering, showing Ca^{2+} precipitates aggregated in cytoplasm (the boxed areas 11-13) (Bar=1 μm); L: 20 d after flowering, a mature SE without Ca^{2+} precipitates (Bar=1 μm)

图 3 SEs 中 Ca^{2+} 定位

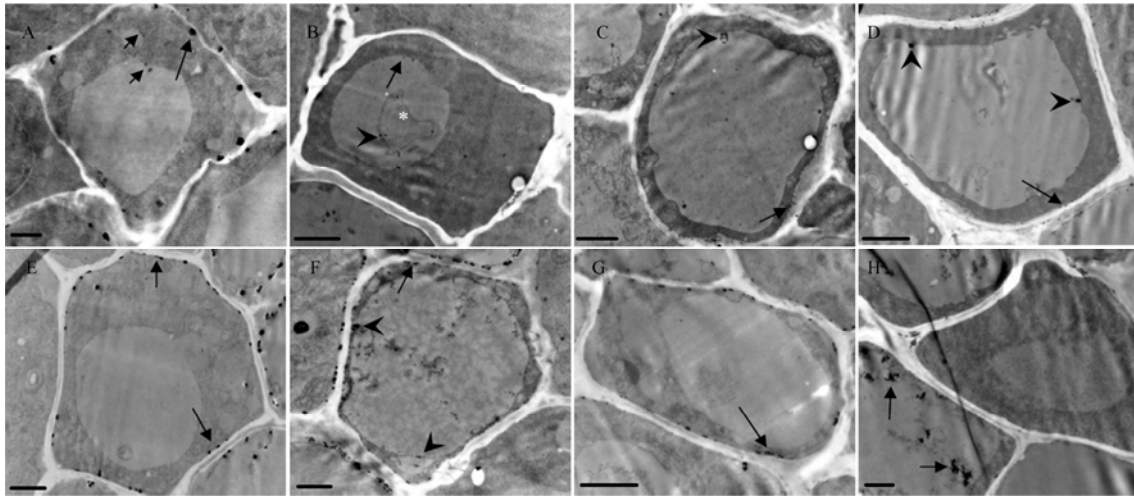
Fig. 3 Localization of Ca^{2+} in SEs

上, 细胞质中也有少量 Ca^{2+} 颗粒 (图 4-C, D)。花后 6 d, ICs 中 Ca^{2+} 主要定位在细胞内壁上, 细胞质和细胞膜上也有少量分布, 但液泡中未见有 Ca^{2+} 颗粒 (图 4-E)。花后 8 d, ICs 的中央大液泡中有电子致密度较高的内含物, Ca^{2+} 分布与花后 6 d 时相似, 但液泡中出现少量 Ca^{2+} 颗粒 (图 4-F)。花后 14 d, ICs 中的 Ca^{2+} 颗粒出现在细胞内壁上 (图 4-G)。花后 18 d, ICs

的液泡中有大量 Ca^{2+} 颗粒的聚集 (图 4-H)。

2.4 Ca^{2+} -ATPase 分布的时空变化

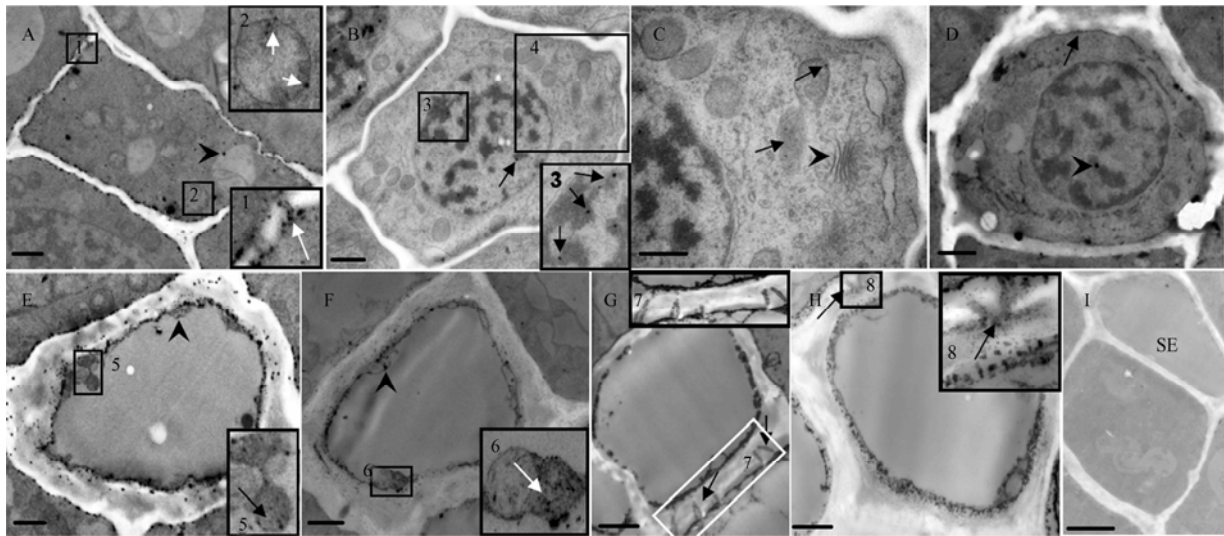
在韧皮部发育过程中, SEs 中的 Ca^{2+} -ATPase 活性发生显著变化。开花当天, 正在发育的 SEs 中, Ca^{2+} -ATPase 活性产物主要分布于细胞膜、胞间连丝、线粒体和细胞质中 (图 5-A)。花后 2 d, 酶活性产物主要分布在细胞核中, 线粒体中也有少量分布 (图



A~H均为 ICs 横切照片。A: 花后 1 d, 示液泡膜(短箭)和细胞内壁上(长箭)的 Ca^{2+} 颗粒 (Bar=1 μm) ; B: 花后 2 d, 示液泡膜(箭)及其内吞物(箭头)上的 Ca^{2+} 颗粒 (Bar=2 μm) ; C~D: 花后 4~5d, 示液泡膜(箭头)和细胞内壁(箭)上的 Ca^{2+} 颗粒 (Bar=2 μm) ; E: 花后 6 d, 示细胞内壁(箭)上的 Ca^{2+} 颗粒, 液泡中未见 Ca^{2+} 颗粒 (Bar=2 μm) ; F: 花后 8 d, 示细胞内壁(箭)和液泡膜(箭头)上的 Ca^{2+} 颗粒 (Bar=1 μm) ; G: 花后 14 d, 示细胞内壁(箭)上的 Ca^{2+} 颗粒 (Bar=2 μm) ; H: 花后 18 d, 示液泡(箭)中有 Ca^{2+} 颗粒的聚集物 (Bar=1 μm)
 A-H are cross-sections of ICs. A: 1 d after flowering, showing Ca^{2+} precipitates distributed on tonoplast (short arrows) and intine(long arrow) (Bar=1 μm) ; B: 2 d after flowering, showing Ca^{2+} precipitates distributed on tonoplast (arrow heads) and in residues of vacuole (arrow) (Bar=2 μm) ; C-D: 4-5 d after flowering, showing Ca^{2+} precipitates distributed on tonoplast (arrow heads) and intine (arrows) (Bar=2 μm) ; E: 6 d after flowering, showing Ca^{2+} precipitates distributed on intine (arrows), and there is no Ca^{2+} precipitate in vacuole (Bar=2 μm) ; F: 8 d after flowering, showing Ca^{2+} precipitates distributed on tonoplast (arrow heads) and intine (arrow) (Bar=1 μm) ; G: 14 d after flowering, showing Ca^{2+} precipitates distributed on intine (arrow) (Bar=2 μm) ; H: 18 d after flowering, showing Ca^{2+} precipitates aggregated in vacuole (arrows) (Bar=1 μm)

图 4 ICs 中 Ca^{2+} 定位

Fig. 4 Localization of Ca^{2+} in ICs



A~I均为 SEs 横切照片, 右边角落处的方框 1~3 和 5~8 是 A~B 和 E~H 中相应方框的放大。A: 开花当天, 示 Ca^{2+} -ATPase 活性产物分布于胞间连丝(方框 1)、线粒体(方框 2)、小囊泡(箭头示)、细胞质中和细胞膜上(Bar=1 μm) ; B: 花后 2 d, 示 Ca^{2+} -ATPase 活性产物分布于细胞核中(方框 3) (Bar=0.5 μm) ; C: B 中方框 4 的放大, 示 SE 中的高尔基体(箭头示), Ca^{2+} -ATPase 活性产物分布于线粒体(箭示)中 (Bar=0.5 μm) ; D: 花后 3 d, 示细胞膜(箭示)和细胞核(箭头示)酶活性下降 (Bar=1 μm) ; E~F: 花后 4 d 和 7 d, 示 Ca^{2+} -ATPase 活性产物分布于线粒体(方框 5 和 6, 箭示)、细胞壁、小囊泡(箭头示)中和细胞膜上(Bar=1 μm) ; G~H: 花后 10 d 和 14 d, 示酶活性产物分布于细胞膜和分支状的胞间连丝(方框 7 和 8, 箭示)上 (Bar=1 μm) ; I: 花后 4 d, 对照, 无 Ca^{2+} -ATPase 活性产物。(Bar=2 μm)
 A-I are cross-sections of SEs, the boxed areas 1-3 and 5-8 in the right-hand corner are the magnification of the boxed areas in image A-B and E-H respectively. A: The flowering day, showing Ca^{2+} -ATPase active products distributed in plasmodesmata (the boxed area 1), mitochondria (the boxed area 2), vesicles (arrow) and cytoplasm as well as on plasmalemma (Bar=1 μm) ; B: 2 d after flowering, showing Ca^{2+} -ATPase active products distributed in nucleus (the boxed area 3) (Bar=0.5 μm) ; C: Magnification of the boxed area 4 in B, showing a Golgi body (arrow head) and Ca^{2+} -ATPase active products distributed in mitochondria (arrows) (Bar=0.5 μm) ; D: 3 d after flowering, showing reduced active products of Ca^{2+} -ATPase in plasmalemma (arrow) and nucleus (arrow head) (Bar=1 μm) ; E-F: 4 d after flowering and 7 d after flowering, showing the active products of Ca^{2+} -ATPase distributed in a mitochondrion (the boxed areas 5 and 6, arrows), cell wall, vesicles (arrow heads) and on plasmalemma (Bar=1 μm) ; G-H: 10 d after flowering and 14 d after flowering, showing the active products of Ca^{2+} -ATPase distributed on plasmalemma and branching plasmodesmata (the boxed areas 7 and 8, arrows) (Bar=1 μm) ; I: 4 d after flowering, control, showing SE without active products of Ca^{2+} -ATPase (Bar=2 μm)

图 5 SEs 中 Ca^{2+} -ATPase 定位

Fig. 5 Localization of Ca^{2+} -ATPase in SEs

5-B, C)。花后 3 d, SEs 中的 Ca^{2+} -ATPase 活性最低, 在细胞膜和细胞核中有极少量酶活性产物(图 5-D)。花后 4~7 d, 大量的酶活性产物分布于 SEs 细胞膜、线粒体、细胞壁和一些小囊泡上(图 5-E, F)。花后 10~14 d, SEs 细胞壁中分枝状的胞间连丝上有较强的 Ca^{2+} -ATPase 活性。此时, 细胞膜上也有较多酶活性产物分布(图 5-G, H)。在对照中, SEs 中均未见到有 Ca^{2+} -ATPase 活性产物出现(图 5-I)。

3 讨论

3.1 Ca^{2+} 在 SEs 分化中的作用

3.1.1 Ca^{2+} 可能介导了 SEs 的 PCD Ca^{2+} 是真核细胞信号转导的核心组分之一, 对调节植物的生长、发育、生理代谢和功能有重要意义。一般情况下, 细胞内自由 Ca^{2+} 浓度必须保持在较低的稳态平衡, 细胞才能进行正常的生理活动。焦锶酸钾沉淀法用来定位细胞中的疏松态结合 Ca^{2+} [16]。 Ca^{2+} 荧光定位中, 所用染料 fluo-3 AM (Fluka) 是一种高度特异性 Ca^{2+} 荧光探针, 可以灵敏地反应游离 Ca^{2+} 浓度变化。试验过程中, 由于试验材料的特殊性和显微镜的分辨率有限, 笔者只能观察到细胞壁 Ca^{2+} 荧光的变化。

Wang 等[1]已经证实, SEs 发育是一种特殊的细胞程序性死亡过程。本试验中, 胞质 Ca^{2+} 浓度的动态变化恰好与 SEs 的 PCD 发生相对应。 Ca^{2+} 亚细胞定位发现, 在 SEs 发育的早期, 胞质 Ca^{2+} 浓度较低。到花后 2~4 d 时, 胞内 Ca^{2+} 浓度由低变高, 即此时 Ca^{2+} 在 SEs 胞质中大量积累。Wang 等[1]通过 TUNEL 检测发现在花后 3~4 d 时, SEs 出现阳性反应, 说明此时 SEs 中 DNA 已经片段化。对导管分子的研究表明, 导管分子分化的启动和程序性死亡过程的调节都需要 Ca^{2+} 的参与, Ca^{2+} 在细胞内长期大量滞留, 激活核酸内切酶和其它水解酶, 进而导致导管发生 PCD [9,17-18]。McConkey 等[19]研究证实胞质中 Ca^{2+} 浓度的增加激活了核酸内切酶, 导致 DNA 片段化, 致使 PCD 的发生; 当加入核酸内切酶抑制剂时 DNA 片段化消失。因此笔者推测, SEs 胞质中 Ca^{2+} 浓度的升高可能介导了 SEs 的 PCD 过程。

对 Ca^{2+} 亚细胞定位观察发现, 花后 4 d 时, 线粒体中出现了 Ca^{2+} 颗粒, 之后线粒体中 Ca^{2+} 颗粒减少直至消失。线粒体中 Ca^{2+} 的动态变化可能与 SEs 的 PCD 有关。动物细胞中, 关于线粒体介导 PCD 发生的研究较多[20-22]。细胞受到刺激时, 活化质膜上的钙通道使 Ca^{2+} 顺浓度梯度进入细胞质中, 导致细胞质中 Ca^{2+} 浓

度增加。高浓度的 Ca^{2+} 刺激线粒体摄入 Ca^{2+} , 导致线粒体内出现 Ca^{2+} 超载[2, 23]。线粒体内过高的 Ca^{2+} 则可促进线粒体膜上的 PTP 孔 (permeability transition pore) 开放, 使线粒体外膜通透性增加, 导致线粒体肿胀、破裂, 并释放出诱导凋亡的因子, 如细胞色素 c 等[24]。细胞色素 c 可以激活 caspases, 破坏核染色质, 促发细胞凋亡级联反应[20, 25]。因此, 线粒体是动物细胞 PCD 信号转导的重要参与者, 但它在植物细胞 PCD 中的作用不是很清楚。植物中有功能类似于动物细胞中 caspases 的蛋白酶, 称为 caspase-like proteases[26]。植物细胞 PCD 的过程中也伴随有细胞色素 c 的释放[27-28]。在植物发生 PCD 时, 有两种核酸酶的活性与线粒体有关, 这两种核酸酶最终都可以导致 DNA 片段化和染色质凝集[28]。Li 等[14]和 Lacomme 等[29]指出线粒体在植物细胞 PCD 中的作用很可能类似于动物细胞。本试验结果表明, 在 SEs 中, 花后 1~2 d, Ca^{2+} 主要分布在细胞膜上和细胞核中; 花后 4 d, SEs 细胞质中 Ca^{2+} 浓度增加, 并且线粒体中也出现了 Ca^{2+} 颗粒; 当 SEs 分化完成, 即 PCD 停止时(花后 5~8 d), Ca^{2+} 完成其使命从 SEs 的胞内转移到细胞壁中储存起来, 此时线粒体中未发现 Ca^{2+} 颗粒, 同时 Ca^{2+} 荧光检测也发现了 SEs 细胞壁中有大量 Ca^{2+} 积累。因此笔者推测, 胞质 Ca^{2+} 的增加促进了 SEs 的 PCD 进程, 一方面通过激活核酸内切酶, 引起 SEs 细胞核 DNA 片段化, 进而导致 PCD; 另一方面, 高浓度的 Ca^{2+} 使线粒体释放细胞色素 c, 进而导致 PCD。

3.1.2 Ca^{2+} 可能是韧皮部功能的调节者 Ca^{2+} 亚细胞定位表明, 花后 10~18 d, Ca^{2+} 从 SEs 的细胞壁转移到胞质中, 而且以聚集态存在的。游离 Ca^{2+} 检测发现, SEs 细胞壁上的绿色荧光减弱, 说明细胞壁中的 Ca^{2+} 浓度降低, 可能是被转运到了胞质中。此时 Ca^{2+} 在胞质中聚集的作用还不是很清楚, 可能是 Ca^{2+} 聚集在某些物质上, 作为长距离运输的信号被利用。Van Bel 等[30]指出 Ca^{2+} 可能是韧皮部远距离运输的一种信号分子。尹增芳等[31]在研究杨树韧皮部筛管/伴胞复合体功能时发现筛管内游离 Ca^{2+} 含量的增加以及松弛结合 Ca^{2+} 的减少促进了筛管结构的解体和功能的丧失。在小麦颖果韧皮部中, 花后 20 d 时, SEs 中线粒体、P 型-质体和内含物明显减少[32]。因此笔者推测, 花后 20 d 时 SEs 中疏松态结合 Ca^{2+} 的消失可能标志着 SEs 功能已经开始衰退。

3.2 Ca^{2+} -ATPase 的作用

Ca^{2+} -ATPase 对维持细胞质内较低的 Ca^{2+} 水平起

重要作用。它是一个高亲和、低容量的 Ca^{2+} 运输系统, 可以将胞质过高浓度的 Ca^{2+} 连续不断的转运到胞外或细胞器中储藏起来, 使胞质 Ca^{2+} 浓度恢复到正常水平^[5]。

Groover 等^[9]发现质膜和细胞内膜上 Ca^{2+} -ATPase 活性的减弱, 导致 Ca^{2+} 在胞内长期大量滞留, 核酸内切酶和其它水解酶被激活, 进而导致细胞发生 PCD。本试验结果表明, 在 SEs 发育过程中, Ca^{2+} -ATPase 的活性有明显的动态变化。花后 3 d 时 Ca^{2+} -ATPase 活性最弱, 同时, Ca^{2+} 亚细胞定位显示在花后 2~4 d 时, 胞内 Ca^{2+} 浓度由低变高, Ca^{2+} 在 SEs 中大量积累。说明在 SEs 分化过程中, Ca^{2+} -ATPase 通过调节细胞质中 Ca^{2+} 浓度, 从而对 SEs 的 PCD 起着调节作用。

Ca^{2+} 具有调节胞间连丝口径大小的作用, Ca^{2+} 含量高时, 胞间连丝口径缩小或封闭^[33]。在 SEs 发育成熟后, 细胞膜、胞间连丝和线粒体上始终都有 Ca^{2+} -ATPase 活性, 特别是胞间连丝上始终有较强的 Ca^{2+} -ATPase 活性。推测 Ca^{2+} -ATPase 可能参与了对韧皮部运输功能和胞间物质及信息交流的调节过程。

3.3 Ca^{2+} 与 SEs 细胞壁加厚的关系

在小麦根的原生韧皮部 SEs 分化过程中, 细胞骨架成分——微管与细胞壁的加厚方式有关^[34]。微管在 SEs 发育早期开始增加, 当细胞壁开始加厚时达到最大值, 并且始终维持较高浓度; 当细胞壁停止加厚时, 微管的量迅速下降到零, 此时 SEs 发育成熟^[34-35]。本研究表明, 花后 5 d 时小麦颖果大部分 SEs 已经发育成熟, 据前期试验结果, 此时 SEs 的细胞壁厚度达到最大值^[15], 这与 Eleftheriou^[34-35]的试验结果一致。 Ca^{2+} 可以诱导微管蛋白解聚, 当使用抗 CaM 的药物时能减少 Ca^{2+} 诱导的微管解聚^[36]。 Ca^{2+} 在导管和纤维细胞次生壁加厚的过程中起了重要的作用^[28,37]。本研究 Ca^{2+} 的亚细胞定位显示, 在 SEs 细胞壁加厚的过程中 (花后 1~4 d), SEs 细胞壁上几乎没有 Ca^{2+} 颗粒的沉积。笔者推测, 正在加厚的 SEs 细胞壁需要大量的微管参与 SEs 细胞壁加厚, 而细胞壁上 Ca^{2+} 的缺乏可以避免微管的解聚, 从而保证成壁物质能持续的沉积, 使细胞壁不断的加厚。当 SEs 细胞壁加厚完成时 (花后 5 d), Ca^{2+} 颗粒又开始积累和储藏在细胞壁中。

4 结 论

在小麦韧皮部 SEs 分化过程中, Ca^{2+} 在 SEs 细胞质中呈现出从无到有再到无的变化规律, Ca^{2+} -ATPase 活性的高低与 Ca^{2+} 浓度变化密切相关, 而且这两者的动态变化与 SEs 的 PCD 过程 (染色质片段化, 细胞壁

加厚等) 相关联。上述结果表明, Ca^{2+} 和 Ca^{2+} -ATPase 可能参与介导了 SEs 的 PCD 过程, 而且可能与线粒体介导的信号途径相关。同时, 它们还可能对 SEs 细胞壁的加厚和 SEs 的功能进行了调控。

致谢: 感谢曹剑波老师和秦利鸿老师在透射电子显微镜样品观察中给予的帮助。感谢姚家玲教授在冰冻切片中给予指导。

References

- [1] Wang L K, Zhou Z Q, Song X F, Li J W, Deng X Y, Mei F Z. Evidence of ceased programmed cell death in metaphloem sieve elements in the developing caryopsis of *Triticum aestivum* L.. *Protoplasma*, 2008, 234: 87-96.
- [2] Putney J W, Thomas A P. Calcium signaling: double duty for calcium at the mitochondrial uniporter. *Current Biology*, 2006, 16(18): R812-R815.
- [3] Huang F Y, Philosoph-Hadas S, Meir S, Callahan D A, Sabato R, Zelcer A, Hepler P K. Increases in cytosolic Ca^{2+} in parsley mesophyll cells correlate with leaf senescence. *Plant Physiology*, 1997, 115: 51-60.
- [4] Hirschi K D. The calcium conundrum. Both versatile nutrient and specific signal. *Plant Physiology*, 2004, 136(1): 2438-2442.
- [5] Jian L C, Li J H, Li P H, Chen T H. An electron microscopic-cytochemical localization of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase activity in poplar apical bud cells during the induction of dormancy by short-day photoperiods. *Cell Research*, 2000, 10: 103-114.
- [6] Lam E, Pontier D, del Pozo O. Die and let live - programmed cell death in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1999, 2: 502-507.
- [7] Zuppin A, Navazio L, Sella L, Castiglioni C, Favaron F, Mariani P. An endopolygalacturonase from *Sclerotinia sclerotiorum* induces calcium-mediated signaling and programmed cell death in soybean cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18(8): 849-855.
- [8] Jones A M. Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiology*, 2001, 125: 94-97.
- [9] Groover A, Jones A M. Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiology*, 1999, 119: 375-384.
- [10] Jones A M, Dangl J L. Logjam at the Styx: programmed cell death in plants. *Trends in Plant Science*, 1996, 1(4): 114-119.
- [11] Xia G H, Zhang D P. Intercellular symplastic connection and isolation of the unloading zone in flesh of the developing grape berry. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42 (9): 898-904.
- [12] 吕英民, 张大鹏, 严海燕. 苹果果实韧皮部及其周围薄壁细胞的超微结构观察和功能分析. *植物学报*, 2000, 42(1): 32-42.

- Lü Y M, Zhang D P, Yan H Y. Ultrastructure of phloem and its surrounding parenchyma cells in the developing apple fruit. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42 (1): 32-42. (in Chinese)
- [13] Bouranis D L, Chorianopoulou S N, Siyiannis V F, Protonotarios V E, Hawkesford M J. Aerenchyma formation in roots of maize during sulphate starvation. *Planta*, 2003, 217: 382-391.
- [14] Li D H, Yang X, Cui K M. Formation of archegonium chamber is associated with nucellar-cell programmed cell death in *Ginkgo biloba*. *Protoplasma*, 2007, 231: 173-181.
- [15] 王利凯. 小麦颖果筛分子和果皮发育中的细胞编程性死亡研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- Wang L K. Study on programmed cell death of sieve elements and pericarp cells in developing caryopsis of *Triticum aestivum* L. [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008. (in Chinese)
- [16] Wick S M, Hepler P K. Selective localization of intracellular Ca^{2+} with potassium antimonate. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1982, 30(11): 1190-1204.
- [17] Roberts A W, Haigler C H. Rise in chlorotetracycline fluorescence accompanies tracheary element differentiation in suspension cultures of *Zinnia*. *Protoplasma*, 1989, 152: 37-45.
- [18] 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. *科学通报*, 2001, 46 (13): 1098-1100.
- Zhang Z S, Li R Q, Wang J B. Dynamic changes of Ca^{2+} distribution during the programmed cell death of tracheary tube. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 46 (13): 1098-1100. (in Chinese)
- [19] McConkey D J, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S. Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *The FASEB Journal*, 1989, 3 (7): 1843-1849.
- [20] Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000, 407: 770-776.
- [21] Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998, 281: 1309-1312.
- [22] Ferri K F, Kroemer G. Mitochondria: the suicide organelles. *Bioessays*, 2001, 23: 111-115.
- [23] Voronina S, Sherwood M, Barrow S, Dolman N, Conant A, Tepikin A. Downstream from calcium signalling: mitochondria, vacuoles and pancreatic acinar cell damage. *Acta Physiologica*, 2009, 195: 161-169.
- [24] Roy S S, Hajnoczly G. Calcium, mitochondria and apoptosis studied by fluorescence measurements. *Methods*, 2008, 46: 213-223.
- [25] Desagher S, Martinou J C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 2000, 10: 369-377.
- [26] Lam E, del Pozo O. Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Molecular Biology*, 2000, 44: 417-428.
- [27] Reape T J, McCabe P F. Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytologist*, 2008, 180: 13-26.
- [28] Balk J, Chew S K, Leaver C J, McCabe P F. The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death. *Plant Journal*, 2003, 34: 573-583.
- [29] Lacomme C, Cruz S S. Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96: 7956-7961.
- [30] Van Bel A J E, Gaupels F. Pathogen-induced resistance and alarm signals in the phloem. *Molecular Plant Pathology*, 2004, 5 (5): 495-504.
- [31] 尹增芳, 宁代峰, 张 著. Ca^{2+} 在杨树韧皮部筛管/伴胞复合体的分布与功能分析. 中国细胞生物学学会第九次会员代表大会暨青年学术大会论文摘要集, 2007.
- Yin Z F, Ning D F, Zhang J. Distribution and functional analysis of Ca^{2+} on sieve element/companion cell complexes in poplar. *9th Congress of the General Assembly of Chinese Conference on Cell Biology & Youth Academic Conference Dissertation Summaries*, 2007. (in Chinese)
- [32] 周竹青, 蓝盛银, 朱旭彤, 王维金, 徐珍秀. 小麦颖果腹部维管束韧皮部细胞的超微结构与功能分析. *作物学报*, 2004, 30 (2): 163-168.
- Zhou Z Q, Lan S Y, Zhu X T, Wang W J, Xu Z X. Ultrastructure and its function of phloem cell in abdominal vascular bundle of wheat caryopsis. *Acta Agronomica Sinica*, 2004, 30(2): 163-168. (in Chinese)
- [33] Holdaway-Clarke T L, Walker N A, Hepler P K, Overall R L. Physiological elevations in cytoplasmic free calcium by cold or ion injection result in transient closure of higher plant plasmodesmata. *Planta*, 2000, 210: 329-335.
- [34] Eleftheriou E P. Microtubules and cell wall development in differentiating protophloem sieve elements of *Triticum aestivum* L.. *Journal of Cell Science*, 1987, 87: 595-607.
- [35] Eleftheriou E P. Abnormal structure of protophloem sieve-element cell wall in colchicine-treated roots of *Triticum aestivum* L.. *Planta*, 1994, 193: 266-274.
- [36] Adamikova L, Straube A, Schulz I, Steinberg G. Calcium signaling is involved in dynein-dependent microtubule organization. *Molecular Biology of the Cell*, 2004, 15: 1969-1980.
- [37] 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. *电子显微学报*, 2006, 25(5): 420-425.
- Gan X H, Ding Y L. Dynamic changes of Ca^{2+} distribution during the development of fiber in *Phyllostachys edulis* culms. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2006, 25(5): 420-425. (in Chinese)

(责任编辑 郭银巧)