

ABA 和 GA₃ 对黑穗醋栗二次萌芽超微结构的影响

秦 栋, 张椿浩, 刘庆帅, 薛晓晓, 霍俊伟*, 员盎然

(东北农业大学园艺园林学院·农业部东北地区园艺作物生物学与种质创新重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】分析黑穗醋栗二次萌芽过程中超微结构特征及变化规律,为全面揭示黑穗醋栗二次萌芽的内在机制提供科学依据。【方法】以黑穗醋栗易二次萌芽品种‘亚德’和不易二次萌芽品种‘巴基拉’为试材,以清水为对照,用 30 mg·L⁻¹ GA₃ 和 50 mg·L⁻¹ ABA 处理,用透射电镜观察芽内细胞超微结构。【结果】GA₃ 处理促进 2 品种二次萌芽加快,使细胞内质壁分离现象消失,胞间连丝、内质网提前分化,淀粉粒加速分解,线粒体更加活跃,分散的小液泡最终形成中心大液泡,且液泡中电子致密物质分解;ABA 处理抑制 2 品种的二次萌芽,使细胞保持质壁分离状态,抑制胞间连丝出现,线粒体、内质网、淀粉粒分化均晚于同时期 GA₃ 处理,ABA 抑制了‘巴基拉’液泡中电子致密物质分解。【结论】黑穗醋栗二次萌芽本质是细胞破除休眠的过程。外源 GA₃ 处理加速黑穗醋栗解除休眠,而外源 ABA 则是促进休眠,2 者作用相反。GA₃ 和 ABA 影响黑穗醋栗二次萌芽最主要的差异在于细胞内是否存在质壁分离、胞间连丝是否分化和电子致密物质是否分解。细胞超微结构的变化反应了二次萌芽的进程。

关键词: 黑穗醋栗;二次萌芽;赤霉素(GA₃);脱落酸(ABA);超微结构

中图分类号: S664.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2017)10-1301-08

Effect of GA₃ and ABA on cell ultra-structure of the secondary-bursting buds in blackcurrant (*Ribes nigrum*)

QIN Dong, ZHANG Chunhao, LIU Qingshuai, XUE Xiaoxiao, HUO Junwei*, YUN Angran

(Horticultural College, Northeast Agricultural University · Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North-east region), Ministry of Agriculture, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: 【Objective】Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) is a small perennial shrub with good winter hardiness, but it has the problem of secondary bud burst on their stems occurring in late summer to autumn, which causes yield reduction by 10% to 20%. In order to elucidate the mechanism of secondary sprouting in black currant, cell ultra-structure of the secondary bursting buds in two different black currant varieties was observed and changes in response to exogenous GA₃ and ABA treatments were analyzed. The study not only provides understandings of the comprehensive revelation of secondary bud sprouting but also provides artificial regulation in actual production. 【Methods】Two different varieties, ‘Yade’ and ‘Bajila’, in the period of secondary bud burst were taken as materials. ‘Yade’ is high yielding but highly prone to secondary burst, while ‘Bajila’ is the opposite. After harvest, 30 mg·L⁻¹ GA₃ and 50 mg·L⁻¹ ABA solutions were sprayed onto the green leaves (on August 13th, 2016), plants sprayed with water were taken as the control. Foliar spray was conducted until drip-off for two consecutive days. From the first day of treatment, the bud in the middle of the branch was collected. The buds with scales removed were observed for ultra-structure under transmission electron microscopy. 【Results】GA₃ treatment significantly promoted secondary bud sprouting. Under GA₃ treatment, the phenomenon of plasmolysis in two varieties was disappeared; plasmodesmata and endoplasmic reticulums differentiated earlier; the decomposition of starch

收稿日期: 2017-02-06 接受日期: 2017-06-02

基金项目: 东北农业大学“青年才俊”(16QC07); 国家自然科学基金青年科学基金(31201584)

作者简介: 秦栋, 副教授, 主要从事小浆果栽培生理的研究工作。Tel: 0451-55190769, E-mail: dongq9876@126.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0451-55190769, E-mail: junweihuo@aliyun.com

granules was faster; the number of mitochondria was increased; the large vacuoles formed and the electronic dense materials in vacuoles degraded. On the contrary, ABA treatment inhibited the secondary sprouting. Under the treatment, the phenomenon of plasmolysis occurred and the intercellular association was limited. Endoplasmic reticulum differentiated later and its length was shorter; the decomposition of starch granules was inhibited and their number increased; mitochondria were fewer and their structure was not clear. In the bud cells of 'Yade', the electronic dense materials in the vacuoles decomposed completely, while in 'Bajila' bud, these materials maintained. **[Conclusion]** The occurrence of the secondary sprouting in black currant is a result of bud dormancy breaking. Exogenous GA₃ treatment accelerates the release of dormancy and ABA treatment promotes dormancy maintenance. This study showed that when the cells were in the state of plasmolysis, the plasmodesmata differentiation failed to occur, and secondary bud burst would not take place; when plasmolysis disappeared, which is favorable for plasmodesmata differentiation, bud burst would occur. GA₃ and ABA treatments had opposite effects on plasmolysis and plasmodesmata differentiation. Therefore, it was suggested that the plasmolysis and plasmodesmata formation were the key to the secondary bud burst in black currant. There was a close relationship between decomposition of starch granules and the number of mitochondria. GA₃ treatment promoted the decomposition of the electronic dense materials in the vacuoles and also promoted the the differentiation of endoplasmic reticulum, mitochondria and other organelles. ABA treatment slowed down the decomposition of electron dense materials in the vacuoles, which might be important for the resistance of black currant to poor environmental conditions in the fall or winter.

Key words: *Ribes nigrum*; Secondary sprouting; GA₃; ABA; Cell ultrastructure

黑穗醋栗(*Ribes nigrum* L.)属虎耳草科(Saxifragaceae)茶藨子属,又名黑加仑,俗称黑豆^[1]。黑穗醋栗营养丰富,富含棕榈酸、 γ -亚麻酸、亚油酸、 α -亚麻酸、油酸等不饱和脂肪酸,黑穗醋栗种子中 γ -亚麻酸含量较高,含量达到12.4%,它是抗心血管疾病的药理活性成分。果实中维生素C、B₁₁、B₂含量丰富,尤其维生素C含量可高达400 mg·(100 g)⁻¹(以鲜质量计),氨基酸总量达到了1.63%,含有的8种人体必需氨基酸中以组氨酸和赖氨酸含量较高,另外矿物质含量也非常丰富^[2]。黑穗醋栗的果实可加工成果汁、果酱,籽可以榨油,叶片可以入药,因此拥有巨大的开发潜力^[3]。自上世纪80年代以来,黑穗醋栗一直备受人们的钟爱,目前随着人们对蓝莓、蔓越橘等营养保健食品喜爱的增加,黑穗醋栗也有着更好的市场前景。

黑龙江省是我国黑穗醋栗的主产区,约占全国总产量的75%左右^[4]。但主栽品种‘布劳得’‘亚德’等在实际生产中存在不好的现象——“二次萌芽”。即在果实采收之后1 a生枝条上的芽在秋季会再次萌芽。二次萌芽一般发生在果实采后(7月下旬至8月初),此时黑龙江地区气温仍处于较高的温度。有

研究表明,短暂高温处理对果树的芽解除休眠有促进作用^[5-7]。二次萌芽会严重造成树体营养流失,并且芽萌发形成的枝条延迟进入休眠,容易遭受冻害,据估算这种二次萌芽可造成第2年产量损失为10%~20%,严重影响了产业发展,亟待解决。

植物细胞的超微结构变化与休眠、萌发有着密切联系,这在细叶百合、杨树等植物上均有所研究^[8-9]。在休眠时期,杨树顶端分生组织细胞间物质运输与细胞内酶活性处于相对的不活跃状态,胞间连丝由于内质网的收缩而中断^[9]。龙牙百合鳞茎在低温解除休眠过程中,茎尖细胞线粒体的数量达到峰值,大液泡裂解成小液泡,造粉质体向前质体转变,内质网数量增加,这些现象被视为是解除休眠的转折点^[10]。

笔者课题组已对黑穗醋栗的二次萌芽进行了初步研究,发现25 mg·L⁻¹的GA₃可明显促进二次萌芽,而50 mg·L⁻¹的ABA则会抑制二次萌芽的发生^[11]。目前对于ABA和GA₃对黑穗醋栗二次萌芽调控下的超微结构变化还未见有研究报道,笔者以易二次萌芽品种‘亚德’和不易二次萌芽品种‘巴基拉’为试材,通过外源喷施ABA和GA₃对二次萌芽进行调控,

研究二次萌芽过程中超微结构的变化,以期从解剖学角度揭示二次萌芽现象的内在原因,为全面揭示黑穗醋栗二次萌芽的机理提供科学依据,为人工调控黑穗醋栗二次萌芽提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 材料

试验于2015年8月在东北农业大学黑穗醋栗种质资源圃进行,选择8 a 生生长势相对一致的品种‘亚德’‘巴基拉’各15株,其中‘亚德’为大果、丰产品种,自然条件下易萌芽;‘巴基拉’为小果品种,中等产量,自然条件下不易二次萌芽。试材常规管理,长势中庸。

1.2 方法

1.2.1 试验处理 配制30 mg·L⁻¹ GA₃和50 mg·L⁻¹ ABA的水溶液,以清水处理作为对照,在果实采收后开始处理,于2015年8月12日进行第1次采样,并作为空白对照组。从8月13日开始连续处理3 d,每个品种分别喷施GA₃、ABA、清水各5株,以叶片滴水为止,然后选择树体中部1 a 生枝条剪取并带回实验室,将芽鳞片及叶原基部位剥离,在芽基部生长点位置取材,并进行超微结构试验观察。从8月16日开始观察芽的形态学,在萌芽的各个时期取1 a 生枝条的芽进行固定,用于超微结构观察。

1.2.2 透射电镜观察 将取回的芽修成1 mm×1 mm×3 mm的长方体,用2.5%戊二醛固定2 h以上,然后用0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 6.8)漂洗3次,再用1%锇酸固定液固定2~3 h时后,用0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 6.8)再漂洗3次。在4℃冰箱中按浓度梯度为50%、70%、90%、100%的乙醇分别进行15~20 min的脱水处理,后在室温下用100%丙酮进行5~10 min的脱水处理。用纯丙酮和包埋液在室温下进行浸透,次日进行包埋。等待包埋液聚合后修块,用ULTRACUT-E超薄切片机切成50~60 nm的薄片后,用醋酸铀-枸橼酸铅双染色。在东北农业大学生命科技中心电镜室内通过H-7650X型透射电镜观察并拍片。

2 结果与分析

2.1 清水处理下黑穗醋栗芽内超微结构及变化特征

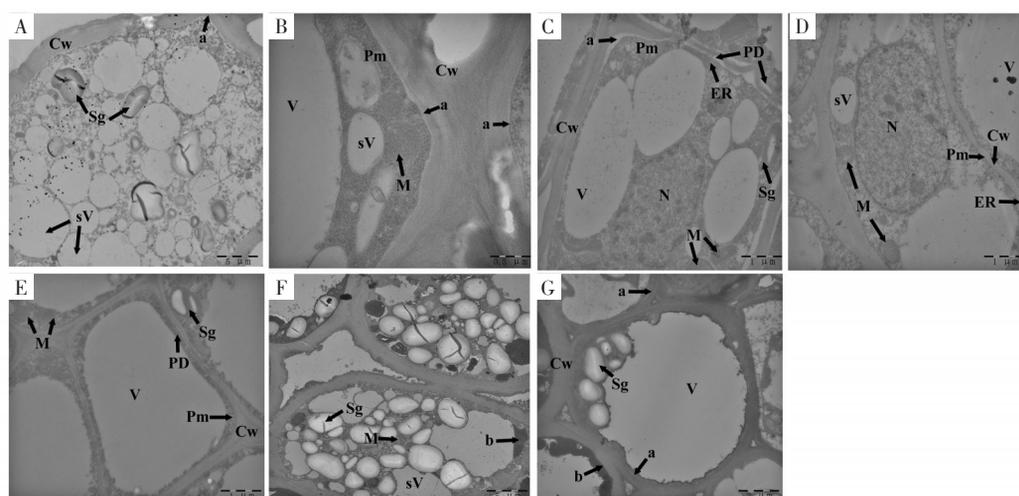
2.1.1 清水处理下‘巴基拉’芽内超微结构特征及变化 不易二次萌芽品种‘巴基拉’在清水处理下芽内

超微结构并没有发生显著的变化。8月12日(对照)采集的芽处于休眠期,细胞有质壁分离现象,细胞中分散大量小液泡和淀粉粒;细胞器分散杂乱无章,未观察到内质网以及胞间连丝(图1-A)。8月26日(处理后第14天)采集的芽细胞仍有质壁分离现象,虽已形成了相对较大的液泡,但并未形成中心大液泡;但细胞质浓度明显增加;淀粉粒已消失不见,此时可以观察到线粒体成椭圆形,内部结构完整,内质网表面粗糙;线粒体和内质网分布在细胞壁周围,但并未有胞间连丝出现(图1-B)。这表明在清水处理下,‘巴基拉’芽仍处于休眠状态。

2.1.2 清水处理下‘亚德’芽内超微结构特征及变化 易于二次萌芽品种‘亚德’在清水处理下芽内超微结构有明显变化。8月12日(对照)采集的芽细胞并没有发生质壁分离现象,细胞中游离更多的淀粉粒;未形成中心大液泡,但是液泡所占空间明显大于‘巴基拉’分散的小液泡;细胞中游离大量结构更加完整的线粒体;此时的‘亚德’芽细胞中并未有内质网和胞间连丝结构(图2-A)。8月14日(处理后第2天)芽细胞进一步分化,细胞中同样存在大量淀粉粒,并且淀粉粒有聚拢的趋势;液泡中出现合并吞噬物,体积逐渐扩大,小液泡进一步减少;线粒体被挤到了细胞壁周围;此时期同样未分化出内质网和胞间连丝(图2-B)。8月26日(处理后第14天)芽细胞已经形成了中心大液泡;内质网和线粒体被大液泡挤到了细胞壁周围,淀粉粒已经消失,线粒体数量减少,但是体积明显增大,变成哑铃型;细胞壁部分变薄,并且分化出胞间连丝(图2-C)。这说明在清水处理下,‘亚德’在第14天时已打破休眠。

2.2 GA₃处理下黑穗醋栗芽内超微结构特征及变化

2.2.1 GA₃处理下‘巴基拉’芽内超微结构特征及变化 ‘巴基拉’芽内超微结构随着GA₃处理时间的增加发生显著变化。8月12日(对照)芽处于休眠期,细胞器处于杂乱无章状态(图1-A)。8月14日(处理后第2天)芽细胞仍处于质壁分离状态,但是已经可以清晰观察到胞间连丝出现,细胞间已经拥有信息物质传递的桥梁;细胞出现细胞核,细胞核双层膜结构明显,核膜附近分散着染色质;细胞中液泡有聚拢趋势,通过水合作用正在逐渐形成中心大液泡;细胞壁周围有线粒体及内质网出现,淀粉粒



A. 细胞质壁分离,细胞高度液泡化,细胞器杂乱无章(8月12日,对照)。B. 细胞仍处于质壁分离状态,细胞器明显,未发现胞间连丝(8月26日,对照)。C. 细胞质壁分离,胞间连丝,细胞核出现,中心大液泡正在逐渐形成,淀粉粒数量明显减少(8月14日,GA₃)。D. 细胞质壁分离现象消失,形成了中心大液泡,染色质聚集,线粒体、内质网结构清晰(8月21日,GA₃)。E. 细胞被中心大液泡占据,线粒体和内质网数量减少,有胞间连丝(8月29日,GA₃)。F. 细胞内部淀粉粒数量增加,液泡内部出现电子密度较高的物质(8月14日,ABA)。G. 细胞形成中心大液泡,内有电子密度较高物质,质壁分离,淀粉粒数量减少,线粒体及内质网数量明显减少,未出现胞间连丝(8月26日,ABA)。Pm=质膜;V=中央大液泡;sV=小液泡;Sg=淀粉粒;Cw=细胞壁;M=线粒体;ER=内质网;N=细胞核;PD=胞间连丝;a=质壁分离现象;b=电子致密物质;c=吞噬小泡;下同。

A. Plasmolysis in a bud collected on 12 Aug. and organelles were out of order. B. Bud collected on 26 Aug., with plasmolysis, clear organelles but no plasmodesmata. C. Cells in buds treated with GA₃ on 14 Aug. still in plasmolysis status, with observable plasmodesmata, cell nucleus and large centralized vacuole, and fewer starch grains. D. Bud treated with GA₃ on 21 Aug., undergoing breaking, with plasmolysis disappeared, a large central vacuole formed, chromatin gathered, and well developed mitochondria and endoplasmic reticulum. E. Bajila buds applied with GA₃ on 29 Aug., had broken. The cells were occupied by a large central vacuole, with the numbers of mitochondria and endoplasmic reticulum reduced and plasmodesmata appeared. F. Cells of bud treated with ABA on 14 Aug., with more starch grains and dense substances in the vacuole. G. Buds treated with ABA on 26 Aug., with a large centralized vacuole still containing dense substances, observable plasmolysis, fewer starch grains, mitochondria and endoplasmic reticuli, and no plasmodesmata. Pm=plasma membrane; V=central vacuole; sV=small vacuole; Sg=starch grain; Cw=cell wall; M=mitochondria; ER=endoplasmic reticulum; N=cell nucleus; PD=plasmodesmata; a=plasmolysis; b=electron dense substance; c=phagocytic vesicle; The same below.

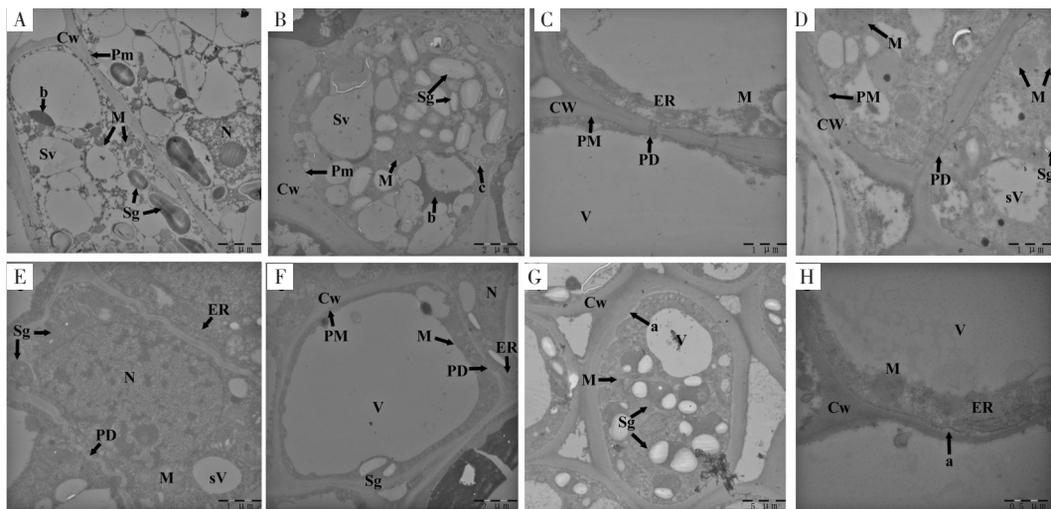
图 1 不同处理‘巴基拉’得到不同时期二次萌芽芽的超微结构

Fig. 1 Ultra structure of the buds undergoing secondary sprouting at different Stages and under different hormone treatment in ‘Bajila’

数量明显减少(图1-C)。8月21日(处理后第9天)‘巴基拉’已经开始萌芽,芽细胞质壁分离现象消失,细胞已经形成了中心大液泡,细胞核中染色质正在进一步聚集;线粒体及内质网被液泡和细胞核挤到细胞壁附近,线粒体结构清晰,淀粉粒消失(图1-D)。8月29日(处理后第17天)‘巴基拉’已完全萌芽,芽细胞已经被中心大液泡占据,线粒体和内质网数量减少,有胞间连丝存在,淀粉粒完全消失(图1-E)。表明不易二次萌芽的品种‘巴基拉’在GA₃处理下细胞内大液泡加速形成,淀粉粒快速分解,胞间连丝提前分化,休眠提前打破并萌芽。

2.2.2 GA₃处理下‘亚德’芽内超微结构特征及变化 GA₃处理下的‘亚德’芽内超微结构变化明显,其二次萌芽时间早于‘巴基拉’。8月12日(对照)芽

细胞内各类细胞器均存在,并未发生质壁分离现象(图2-A)。8月14日(处理后第2天)芽细胞内小液泡聚拢,淀粉粒逐步减少;有的细胞已形成细胞核,结构更加清晰,内质网加长,线粒体结构完整,且有胞间连丝出现(图2-D)。8月21日(处理后第9天)芽细胞结构进一步分化,细胞核结构完整,可以看到染色质存在;细胞中形成了单独的大液泡;淀粉粒几乎消失,线粒体数目增多,结构完整,内质网出现在细胞壁胞间连丝附近(图2-E)。8月29日(处理后第17天)‘亚德’已经完全二次萌芽,芽细胞已经形成中心大液泡,并且通过脂膜内吞进一步扩大,细胞核也已消失;细胞壁周围分布了丰富的线粒体和内质网,胞间连丝的存在证明细胞与细胞之间有着密切的联系(图2-F)。表明GA₃处理加快了易二次萌芽的品种



A. 细胞没有质壁分离,游离大量淀粉粒和线粒体,未形成中心大液泡,未发现内质网和胞间连丝(8月12日,对照)。B. 细胞存在大量淀粉粒,液泡扩大,有吞噬小泡出现,未发现内质网和胞间连丝出现(8月14日,对照)。C. 细胞形成中心大液泡,淀粉粒消失,线粒体数量减少,体积增大,细胞壁部分变薄,有胞间连丝出现(8月26日,对照)。D. 细胞内小液泡聚拢,淀粉粒减少,内质网加长,线粒体完整,且有胞间连丝出现(8月14日,GA₃)。E. 细胞核结构完整,有染色质存在,形成大液泡,线粒体数目增多,结构完整,内质网出现在细胞壁胞间连丝附近(8月21日,GA₃)。F. 细胞形成中心大液泡,细胞核消失,存在胞间连丝(8月29日,GA₃)。G. 细胞发生质壁分离,淀粉粒增多,形成大液泡,游离着体积较小的线粒体和内质网,未发现胞间连丝(8月14日,ABA)。H. 细胞处于质壁分离状态,淀粉粒完全消失,形成中心大液泡,线粒体、内质网体积较小,未发现有胞间连丝(8月26日,ABA)。

A. Cells of the control bud on 12 Aug., with no plasmolysis, large centralized vacuole, endoplasmic reticulum or plasmodesmata structures observed but with abundant scattered starch grains and mitochondria. B. Control bud cells on 14 Aug., with large number of aggregating starch grains, enlarging vacuole but no endoplasmic reticulum or plasmodesmata observed. C. Control bud cells on 26 Aug., with a large central vacuole, starch grain disappeared, and fewer swelled mitochondria. D. Cells of buds treated with GA₃ on 14 Aug., with small gathering vacuoles, gradually decreasing starch grains, elongated endoplasmic reticulum, and broken mitochondria but plasmodesmata appeared. E. Cells of buds treated with GA₃ on 21 Aug. with a well developed cell nucleus containing chromatin, a large central vacuole, starch grains largely disappeared, increased well-developed mitochondria, and endoplasmic reticulum observed close to the plasmodesmata. F. Cells of bud treated with GA₃ on 29 Aug., with a large central vacuole, mitochondria and endoplasmic reticulum closed to the cell walls and plasmodesmata but with no nucleus. G. Cells of buds treated with ABA on 14 Aug., with plasmolysis, a lot of starch grains, a large central vacuole, and cattered small mitochondria and endoplasmic, but with no plasmodesmata found. H. Cells of buds treated with ABA on 28 Aug., with plasmolysis, a large central vacuole and small mitochondria and endoplasmic reticulum but no starch grains or plasmodesmata.

图2 不同激素处理‘亚德’得到不同时期二次萌芽芽的超微结构

Fig. 2 Ultra structure of the buds undergoing secondary sprouting at different stages and under different hormone treatment in ‘Yade’

‘亚德’各细胞器分化,加快二次萌芽。

2.3 ABA 处理下黑穗醋栗芽内超微结构特征及变化

2.3.1 ABA 处理下‘巴基拉’芽内超微结构特征及变化 与GA₃处理相比,ABA处理抑制了黑穗醋栗的二次萌芽,其芽内超微结构变化并不明显。8月12日(对照)‘巴基拉’芽细胞处于休眠状态,细胞内液泡和淀粉粒占绝大部分(图1-A)。8月14日(处理后第2天)芽细胞内淀粉粒数量增加,细胞壁也有部分程度加厚现象;液泡有聚集现象,但是分布较分散,并且液泡内部出现了电子密度较高的物质(图1-F)。至8月26日(处理后第14天),‘巴基拉’仍然没有二次萌芽现象,多数芽细胞形成了中心大液泡,

大液泡中电子密度较高物质仍然存在,部分细胞中电子致密物质大量存在;并且细胞发生了质壁分离现象;淀粉粒数量减少,但仍然存在;线粒体及内质网数量明显减少,并且始终未观察到胞间连丝出现(图1-G)。表明ABA处理抑制了‘巴基拉’品种的萌芽,使芽处于休眠状态,细胞内液泡出现电子密度较高的物质,细胞始终处于质壁分离状态,胞间连丝始终未出现。

2.3.2 ABA 处理下‘亚德’芽内超微结构特征及变化 ABA处理下‘亚德’芽内超微结构与‘巴基拉’类似,由于ABA的限制,并未发生明显变化。8月12日(对照)观察到的‘亚德’样品已经不处于休眠期(图2-A)。8月14日(处理后第2天)‘亚德’芽细胞发生

了部分质壁分离,并且淀粉粒进一步增多;细胞形成了大液泡,但是体积不大;细胞中游离着许多小线粒体和内质网,未发现胞间连丝出现(图2-G)。8月26日(处理后第14天)‘亚德’并未发生二次萌芽现象,‘亚德’芽细胞依旧处于质壁分离状态,淀粉粒已经完全消失;细胞已经形成了中心大液泡;线粒体分布在细胞壁周围,胞间连丝未出现(图2-H)。ABA限制了‘亚德’芽的萌芽,使芽处于休眠状态。

3 讨 论

黑穗醋栗具有较高的营养保健价值和极好的市场前景,但在生产中出现的二次萌芽不良现象严重阻碍了产业的健康发展,亟待解决。本课题组在前期的试验中已经证明 ABA 和 GA_3 可以有效的调控黑穗醋栗的二次萌芽^[11],但对于黑穗醋栗二次萌芽的机理还不清楚,尤其在细胞解剖学方面,本试验以易二次萌芽品种‘亚德’和不易二次萌芽的品种‘巴基拉’为试材,通过喷施 ABA 和 GA_3 , 观察二次萌芽过程中细胞超微结构的变化,以期从细胞超微结构入手,阐明黑穗醋栗二次萌芽的细胞学机制,进而为黑穗醋栗二次萌芽的调控提供理论依据。

植物细胞在休眠中常有质壁分离的现象^[12-13],质壁分离还可作为应对环境胁迫的一种反应机制,与植物抗寒性密切相关,如抗寒性较强的小麦品种更易发生质壁分离^[14]。本试验结果表明‘巴基拉’在入秋时细胞处于质壁分离状态,即处于休眠中;而‘亚德’细胞的细胞壁与质膜紧密相连,表明此时‘亚德’已经打破休眠。细胞壁与原生质体产生间隙,可以防止细胞质受到细胞间冰晶体的机械损伤^[15]。秋季昼夜温差加大,温度不稳定,处于休眠期的‘巴基拉’不易受到伤害,而‘亚德’在恶劣环境会有潜在危险,易发生冻害而造成产量降低。

入秋后随着黑穗醋栗休眠的解除,二次萌芽的细胞中会伴随细胞壁变薄现象,这在杨树^[16]、核桃^[17]、构树^[18]上已得到证实。这可能与胞间连丝有关,细胞壁变薄有利于构成胞间连丝的“内质网桥”贯穿细胞壁。同时胞间连丝与质壁分离现象联系密切,苹果深度休眠的细胞发生质壁分离,胞间连丝相应发生中断,二者成正比关系^[19]。本试验结果表明在 GA_3 处理下,黑穗醋栗品种均发生二次萌芽,且伴有胞间连丝出现,而 ABA 处理黑穗醋栗品种均未萌芽,且未观察到胞间连丝,这表明胞间连丝与黑穗醋

栗二次萌芽有密切关系。

水仙顶端分生组织休眠时期胞间连丝通路多被电子致密物质所堵塞,而打破休眠之后,胞间连丝通路被打开^[20]。杨树和冬小麦的研究表明胞间连丝是否通畅可作为休眠的一种响应机制^[21-22]。本试验未观察到电子致密物质堵塞胞间连丝的现象,这可能是由于不同植物之间的差别,也可能是有电子致密物质堵塞胞间连丝但不易观察到所致;在打破休眠之后观察到胞间连丝出现,并且是直通型胞间连丝,这与水仙顶端分生组织休眠解除后观察到的胞间连丝特点相吻合^[20]。

细胞间能够形成共质体主要通过胞间连丝和其内部的“内质网桥”所构成,因此内质网与各细胞器有着密切联系,同时对植物细胞休眠有一定调控能力。因此外源激素能够通过影响内质网长度及分化时间来调控二次萌芽的进程, GA_3 处理诱导下内质网提前分化、长度较长,能够有效增加膜系统的联系,形成“内质网桥”,增强了胞间联系。ABA 处理则推迟了内质网分化,减弱了胞间联系,从而抑制了休眠的解除。有研究指出长日照能够促进休眠解除,诱导杨树顶端分生组织细胞的内质网收缩现象消失,从而加强膜系统联系^[9],本试验与该研究结论相吻合。

碳水化合物是植物打破休眠和萌芽相关代谢变化的主要能量来源^[23]。美国短叶松休眠期的苗端存在大量脂滴^[24]。本试验观察到休眠期的芽细胞存在大量淀粉粒,随着休眠的解除芽细胞中淀粉粒迅速分解。因此认为淀粉粒是二次萌芽主要供能物质。本课题组前期研究指出 GA_3 处理后第 5 天‘亚德’二次萌芽内可溶性糖含量与清水处理相比明显增加,ABA 处理后第 5 天芽内可溶性糖与清水处理无差异性^[25]。 GA_3 处理后二次萌芽总淀粉粒分解速率明显高于清水处理,而 ABA 处理后‘巴基拉’芽内仍存在淀粉粒,但‘亚德’二次萌芽中淀粉粒已完全分解。可以看出外施 ABA 对二次萌芽有明显抑制作用。

线粒体作为氧化磷酸化、释放能量的场所,其数目及结构与植物细胞生理需求密切相关^[26]。浙贝母休眠前后细胞间物质与信息交换增加是细胞活跃指标之一,线粒体大量出现在细胞壁周围,这与胞间联系增加有关^[27]。本试验研究表明淀粉粒和线粒体的数量呈负相关。 GA_3 处理下黑穗醋栗二次萌芽的芽中线粒体明显多于 ABA 处理,同时发现 GA_3 处理

下线粒体出现多集中在细胞壁附近,而ABA处理需要中心大液泡形成之后才被挤到细胞壁附近。GA₃处理下‘亚德’和‘巴基拉’都有细胞内线粒体变成纺锤形的1个时期,而ABA和清水处理的2个品种并没有发现这个时期。细叶百合上的研究表明哑铃型线粒体增多,说明这个时期线粒体在大量分裂增殖^[28]。因此可以认为喷施GA₃使黑穗醋栗二次萌发的芽细胞中的线粒体在一个阶段内快速增长,为萌芽提供充足能量。植物液泡作为细胞集中绝大部分水的水溶液体系,在越冬过程中是遭受冻害最危险的部位^[29],因此液泡应该是最早进入休眠期的细胞器。黑穗醋栗处于休眠中时细胞高度液泡化,部分液泡中存在电子致密物质,在秋季珍珠梅顶芽细胞中同样观察到了电子致密物质存在^[30],这可能是黑穗醋栗休眠期预防冷害的细胞学机理,液泡通过吞噬细胞内物质从而提高液泡内浓度,以达到预防形成冰晶的效果,这与沙冬青和黄瓜上的研究相一致^[31-32]。GA₃处理能够打破这种保护机制,二次萌发的液泡中电子物质彻底分解;ABA处理则会抑制电子致密物质分解。因此入秋后黑穗醋栗二次萌芽过程中液泡的保护机制遭到破坏,容易受到低温胁迫伤害。

本试验通过外源激素处理对黑穗醋栗二次萌芽芽细胞中各个细胞器进行了分析,初步推测了细胞器的变化规律,但并没有细化到二次萌芽各个时期对应的变化,另外这种超微结构的变化是否与春季黑穗醋栗正常萌芽时变化相一致,还需要进一步研究。

参考文献 References:

- [1] GHEDIRA K, GOETZ P, JEUNE R L. *Ribes nigrum* L.[J]. Phytotherapie, 2008, 6(2): 125-128.
- [2] 刘洪章,文连奎,郝瑞,贾慧鸣. 黑穗醋栗果实营养成分研究[J]. 吉林农业大学学报, 1998, 20(3): 1-4.
LIU Hongzhang, WEN Liankui, HAO Rui, JIA Huiming. Study on the nutrient constituents in black currant berries[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 1998, 20(3): 1-4.
- [3] 霍俊伟,李著花,秦栋. 黑穗醋栗营养成分和保健功能及产业发展前景[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(2): 139-144.
HUO Junwei, LI Zhuhua, QIN Dong. Review of nutritional ingredients and health protectal function of black currant fruit and its prospect in industrial development[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2011, 42(2): 139-144.
- [4] QIN D, HUO J W, SEI W. Black currant production, breeding and processing in China[J]. Acta Horticulturae, 2012, 926(926): 119-122.
- [5] 谭钺,冷传远,李玲,徐臣善,陈修德,高东升. 高温和单氰胺对油桃休眠花芽呼吸代谢的影响[J]. 应用生态学报, 2012, 23(9): 2504-2508.
TAN Yue, LENG Chuanyuan, LI Ling, XU Chenshan, CHEN Xiude, GAO Dongsheng. Effects of high temperature and hydrogen cyanamide on dormant nectarine's floral bud respiratory metabolism[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2012, 23(9): 2504-2508.
- [6] 王海波,高东升,王孝娣,李疆. 短时间高温对‘曙光’油桃芽自然休眠调控的研究[J]. 园艺学报, 2006, 33(3): 601-604.
WANG Haibo, GAO Dongsheng, WANG Xiaodi, LI Jiang. Effects of short-term heating on bud dormancy in ‘Shuguang’ nectarine tree[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2006, 33(3): 601-604.
- [7] 董杰. 短时高温打破桃花芽休眠效应及机理研究[D]. 石家庄: 河北农业大学, 2006.
DONG Jie. Effect and mechanism of short-term heating treatment on breaking bud dormancy in peach trees[D]. Shijiazhuang: Hebei Agricultural University, 2006.
- [8] 刘芳. 细叶百合鳞茎休眠解除过程的生物学分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2014.
LIU Fang. The biological analysis of *Lilium pumilum* bulbs during breaking dormancy under refrigerated condition[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2014.
- [9] JIAN L H. Structural association of endoplasmic reticulum with other membrane systems in *Populus deltoides* apical bud cells and its alterations during the short day-induced dormancy[J]. Acta Botanica Sinica, 2000, 42(8): 803-810.
- [10] 贺晓芳. 龙牙百合低温解除休眠中茎尖的显微和超微结构变化[D]. 南昌: 南昌大学, 2006.
HE Xiaofang. Microstructural and ultrastructural changes of shoot-tip in *Lilium brownii* var. *viudulum* during releasing dormancy with low temperature[D]. Nanchang: Nanchang University, 2006.
- [11] 王欢欢,霍俊伟,秦栋,谢福春,张永和,李兴国. 赤霉素与脱落酸对黑穗醋栗二次萌发形态指标的影响[J]. 北方园艺, 2015(18): 13-17.
WANG Huanhuan, HUO Junwei, QIN Dong, XIE Fuchun, ZHANG Yonghe, LI Xingguo. Effect of GA₃ and ABA on morphological indexes of secondary germination *Ribes nigrum* L.[J]. Northern Horticulture, 2015(18): 13-17.
- [12] 方强恩. 紫花苜蓿根颈芽发育成枝及越冬休眠特性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
FANG Qiang'en. Study on the rules of alfalfa crown bud developing into shoot and its winter hardiness in the state of dormancy [D]. Lanzhou: Gansu Agriculture University, 2016.
- [13] 丁小余,施国新,陈维培,徐祥生. 茭白冬芽的发育及抗寒性的形态学研究[J]. 植物科学学报, 1993, 11(2): 104-110.
DING Xiaoyu, SHI Guoxin, CHEN Weipei, XU Xiangsheng. Morphological studies on the development and cold resistance of the winter buds of *Zizania caduciflora* Hand.-Mazz.[J]. Plant Science Journal, 1993, 11(2): 104-110.
- [14] 简令成,吴素萱. 植物抗寒性的细胞学研究——小麦越冬过程

- 中细胞结构形态的变化[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1965, 13(1): 1-15.
- JIAN Lingcheng, WU Suxuan. Cytological studies on the cold resistance of plant-morphological changes of the intracellular structures of wheat in the overwintering period[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1965, 13(1): 1-15.
- [15] 根凯里. 根据植物细胞和组织的休眠深度对植物耐寒力的鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 1957.
- Генкель. Identification of plant cold tolerance based on dormancy depth of plant cells and tissues[M]. Beijing: Science Press, 1957.
- [16] 尹增芳, 樊汝汶, 黄金生. 美洲黑杨维管形成层活动周期性及细胞超微结构的动态变化[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2006, 30(6): 1-6.
- YIN Zengfang, FAN Ruwen, HUANG Jinsheng. Periodicity of vascular cambial activity and dynamic changes of cell ultrastructure in *Populus deltoides*[J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 2006, 30(6): 1-6.
- [17] 李杰. 核桃形成层活动规律及其响应机制研究[D]. 石家庄: 河北农业大学, 2011.
- LI Jie. Studies on cambium activity rule and its response mechanism in *Juglans regia* L. [D]. Sehijiazhuang: Agricultural University of Hebei, 2011.
- [18] 魏令波, 林金星, 蔡雪. 构树形成层细胞超微结构的周期性变化[J]. *应用基础与工程科学学报*, 1995(3): 105-111.
- WEI Lingbo, LIN Jinxing, CAI Xue. Periodical variation in the ultrastructure of cambial cells in *Broussonetia papyrifera*[J]. *Journal of Basic Science and Engineering*, 1995(3): 105-111.
- [19] 黄义江, 王宗清. 苹果属果树抗寒性的细胞学鉴定[J]. *园艺学报*, 1982(3): 23-30.
- HUANG Yijiang, WANG Zongqing. Cytological determinations of cold resistance of fruit trees in *Malus*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 1982(3): 23-30.
- [20] 邓新杰. 崇明水仙休眠机理研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2011.
- DENG Xinjie. Dormancy regulation of Chongming Narcissus (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*) [D]. Shanghai: East China Normal University, 2011.
- [21] RINNE PL, KAIKURANTAL PM, SCHOOT C. The shoot apical meristem restores its symplasmic organization during chilling-induced release from dormancy[J]. *The Plant Journal*, 2001, 26(3): 249-264.
- [22] JIAN Lingcheng, WANG Hong. Plasmodesmal dynamics in both woody poplar and herbaceous winter wheat[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(2): 230-235.
- [23] 王慧. 自然休眠期油桃花芽碳水化合物变化规律及相关基因的表达分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.
- WANG Hui. Carbohydrate variation and expression analysis of related genes in endo-dormant nectarine floral buds[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2011.
- [24] Cecich RA. An electron microscopic evaluation of cytohistological zonation in the shoot apical meristem of *Pinus banksiana*[J]. *American Journal of Botany*, 1977, 64(10): 1263-1271.
- [25] 王欢欢. 黑穗醋栗(*Ribes nigrum* L.)二次萌发呼吸代谢机制的初步研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.
- WANG Huanhuan. A preliminary studies on respiration metabolism in secondary germination of black currant(*Ribes nigrum* L.) [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015.
- [26] 汪玺仁, 薛绍白, 柳惠图. 细胞生物学[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1998.
- WANG Qianren, XUE Shaobai, LIU Huitu. Cell biology[M]. Beijing: Beijing Normal University Publishing Group, 1998.
- [27] 高文远, 杨世杰. 浙贝母鳞片细胞休眠解除前后超微结构的变化[J]. *广西植物*, 1997, 17(1): 85-88.
- GAO Wenyuan, YANG Shijie. Ultrastructural changes of some cells in the scale of *Fritillaria thunbergii* Miq. before and after releasing dormancy[J]. *Guihaia*, 1997, 17(1): 85-88.
- [28] 刘芳, 王家艳, 王晓丽, 周蕴薇. 细叶百合鳞茎在低温解除休眠过程中茎尖细胞超微结构的变化[J]. *园艺学报*, 2013, 40(6): 1110-1118.
- LIU Fang, WANG Jiayan, WANG Xiaoli, ZHOU Yunwei. The apical bud cell ultrastructure changes of *Lilium pumilum* bulbs during breaking dormancy under refrigerated condition[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, 40(6): 1110-1118.
- [29] 孙龙华, 简令成. 杨树冬芽过冷机理的超微结构研究[J]. *电子显微学报*, 1995(5): 327-331.
- SUN Longhua, JIAN Lingcheng. An ultrastructural study on the super-cooling mechanism of poplar winter buds[J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 1995(5): 327-331.
- [30] 侯燕平, 牛吉山, 杨煜升. 珍珠梅顶芽抗寒机理的超微结构研究[J]. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 1998, 18(1): 63-64.
- HOU Yanping, NIU Jishan, YANG Yusheng. An ultrastructural study on cold resistance mechanism of sorbaria[J]. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 1998, 18(1): 63-64.
- [31] 韩善华, 王双, 李琪, 郑国辑. 冬季沙冬青液泡中膜状内含物的超微结构研究[J]. *电子显微学报*, 1994(4): 241-246.
- HAN Shanhua, WANG Shuang, LI Qi, ZHENG Guochang. Ultrastructural studies on membraneous inclusions in the vacuoles of *ammopitanthus mongolicus* in winter[J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 1994(4): 241-246.
- [32] 王毅, 方秀娟, 付宏兰, 马淑芳. 冷胁迫下黄瓜幼苗叶片内膜系统反应动态[J]. *电子显微学报*, 1996(5): 408.
- WANG Yi, FANG Xiujuan, FU Honglan, MA Shufang. Reaction dynamics of endomembrane system in leaves of cucumber seedlings under chilling stress[J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 1996(5): 408.