

云杉针叶三磷酸腺苷酶活性的超微细胞化学定位^①

贾敬鸾 陈正华

(中国科学院遗传研究所, 北京, 100101)

陈晓松

(北京师范大学生物系, 北京, 100875)

摘要 用磷酸铅沉淀技术研究了云杉幼龄针叶及成龄树针叶细胞的三磷酸腺苷酶(ATPase)活性定位。从形态结构上可以看到, 种子萌发的幼龄针叶细胞的细胞壁较薄, ATP酶活性反应产物磷酸铅颗粒主要分布于细胞质和细胞质膜上。成龄针叶细胞壁较厚, 内质网等细胞器发达, ATP酶主要在细胞壁有较高的活性反应。两者细胞的液泡及细胞核中也有少量定位。幼龄针叶ATP酶活性较成龄针叶的活性较弱, 这种活性变化与不同发育时期叶的生理功能有关。

关键词 云杉, 超微结构定位, 针叶

The Ultracytochemical Localization of ATPase Activity in the Needle Leaves of Spruce

Jia Jingluan Chen Zhenghua

(Institute of Genetics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Chen Xiaosong

(Department of Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875)

云杉(*Picea asperata* Mast)为松科云杉属植物, 是我国分布较广的重要林木树种, 为适应大量绿化造林, 通过生物技术改良和利用已是当务之急。云杉为种子繁殖, 需时长而且缓慢, 而建立一种优良的体细胞无性系又受到细胞再生能力的影响, 特别是受多年生的幼龄和老龄型的影响很大。ATP酶是植物发育中生理代谢的一项重要指标, 为揭示其幼龄老龄的差异, 以及为体细胞无性繁殖的适合期选择提供一个指标, 本文通过电子显微镜对云杉针叶的ATP酶进行了研究, 比较了云杉不同发育时期针叶的ATP酶活性定位, 并观察了针叶的超微结构, 以期为杉木的育种及开展高技术提供基础资料。

1 材 料 和 方 法

本工作使用的实验材料云杉属(*Picea* Dietr)的云杉(*P. asperata* Mast), 幼叶系种子萌发的小叶丛, 成龄针叶为40龄树当年新生针叶叶丛的针叶, 采自中国林业科学院林业科学研究所院内。

取新鲜材料清洗后, 切成 0.1mm^3 的小块, 用 50mmol/L 二甲砷酸缓冲液(pH7.2)配制的2.5%的戊二醛和4%的多聚甲醛混合液固定2~4小时, 用pH7.2的二甲砷酸钠缓冲液洗2次, 再以 50mmol/L Tris-顺丁烯二酸缓冲液(pH7.2)洗3次, 每次1小时, 然后在 22°C 的酶反应液中培育2小时。

酶反应液的成份为: 50mmol/L Tris-顺丁烯二酸缓冲液(pH7.2)中含有ATP(钠盐) 2mmol/L , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 3.6mmol/L , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2mmol/L 。对照反应液为反应液中不加底物ATP和反应液中加入抑制剂

^①本课题为国家自然科学基金资助的重点项目。

NaF。酶反应后,用 50mmol/L 二甲砷酸缓冲液 (pH7.2)洗 2~3 次,每次 30 分钟,在 1%的钨酸中(用 50mmol/L 二甲砷酸缓冲液配制)固定 2~4 小时或过夜。重蒸水洗涤 3~4 次,每次 30 分钟,然后经过系列乙醇脱水后包埋于 Spurr 胶中,超薄切片后进行观察。文中 ATP 酶是以磷酸铅沉淀颗粒多少来显示酶的活性及分布定位。

2 结 果

2.1 ATP 酶在云杉针叶细胞中的分布

观察表明,ATP 酶在云杉针叶细胞内活性明显,但不同龄材料的超微结构和 ATP 酶定位有所不同。酶反应颗粒均匀分布,在不加底物和加抑制剂氟化钠的两个对照样品中,未发现有磷酸铅沉淀颗粒(图版 1, 2),说明 ATP 酶活性反应是可靠的。在云杉针叶叶肉细胞及维管束组织细胞内有较高的 ATP 酶活性存在,ATP 酶反应产物分布于细胞壁、细胞质膜及液泡上,在某些部位的细胞核上也有该酶定位(图版 I, 1),表皮细胞及角质层中没有发现明显的 ATP 酶活性。

2.2 不同发育时期的针叶细胞 ATP 酶活性存在差异

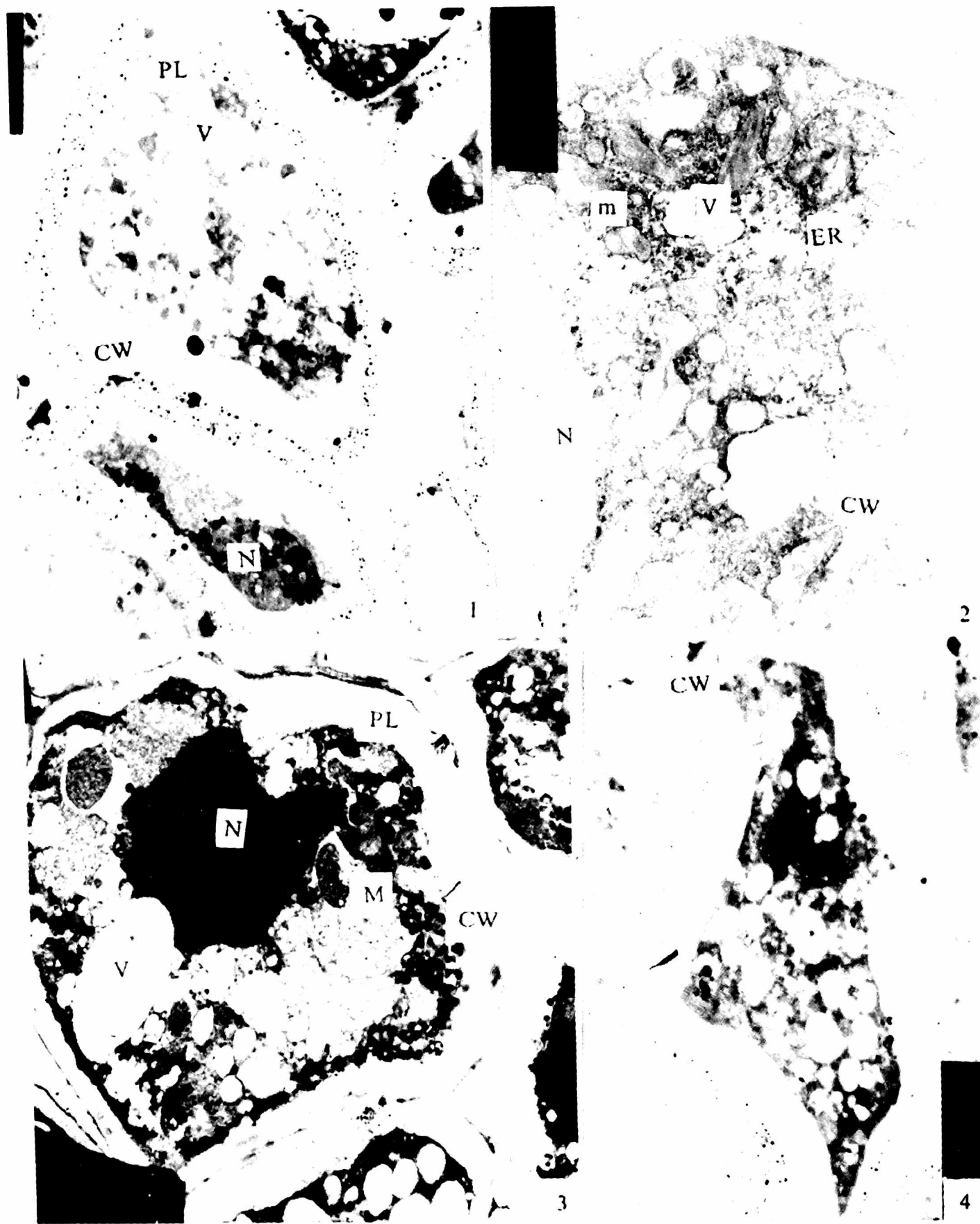
幼龄针叶细胞是在分化中的细胞,细胞壁薄,原生质稠密,细胞器较少,电镜分析结果表明,ATP 酶活性主要定位于细胞质及质膜上,在细胞壁、细胞核等部位也有少量分布(图版 I, 3),但以质膜活性反应较强。来源于成龄植株的针叶细胞中,线粒体、内质网、高尔基体等细胞器结构较丰富(图版 I, 2),ATP 酶活性主要显示在细胞壁上,而质膜、液泡膜、细胞核上也有轻度活性反应(图版 I, 1),以细胞壁上表现较强。幼态的针叶和成龄针叶在超微结构及 ATP 酶定位上的差异,反映了它们在生理代谢上的不同。在同一针叶组织中不同的组织部位,ATP 酶定位也有差异,如在韧皮部的薄壁细胞中,ATP 酶活性高于叶肉组织及其他部位(图版 I, 4),韧皮部是维管植物的输导组织,该组织细胞的细胞壁、质膜及液泡等处均有 ATP 酶定位。在针叶的表皮细胞及角质层细胞中则很少有该酶显示。

3 讨 论

云杉针叶在发育时期 ATP 酶分布和活性的变化,说明 ATP 酶在不同细胞部位出现与发育时期有关。云杉针叶在由幼龄至成龄的生长发育过程是伴随着分解作用与合成作用进行的,发育至成龄时,则是合成作用占优势,因此这个时期酶活性增强,不仅在质膜上有较高活性而且在细胞壁及其他部位酶活性也增强,而在幼龄细胞中,仅质膜上的活性高。一些学者⁽²⁾认为 ATP 酶参与分泌活动,参与分泌物质包括 ATP 酶或 ATP 酶的激活因子。成龄针叶叶肉细胞的细胞壁及质膜上明显的 ATP 酶活性,表明该膜系统在这个时期是处在生理上十分活跃的状态。膜活性增强,说明它还承担着转运和调节的重要功能⁽³⁾。叶片的发育过程也是促进营养物质的形成过程,这个过程是需要能量的过程⁽⁵⁾、为保证大分子物质的合成,同时也动员 ATP 大量合成⁽⁴⁾。因此成龄针叶具有较高的 ATP 酶活性是正常的。

参 考 文 献

- 1 贾敬鸾,陈晓松,陈正华. 云杉针叶的扫描电镜观察. 遗传, 1996, 18(2): 25~27
- 2 朱 彤,李文细. 牵牛开花诱导和 ATP 水平的关系. 植物学报, 1988, 30: 20~26
- 3 彭时尧. 蒜苔韧皮部内三磷酸腺苷酶活性的超微结构定位. 植物学报, 1986, 31: 24~28
- 4 Browning A J, Hall J L, Baker D A. Cytochemical localization of ATPase activity in phloem tissues of *Ricinus communis*. Protoplasma, 1980, 104: 55~65
- 5 Hall J L. Electron microscopy and cytochemistry of plant cells. Proc. Elsevier / North-Holland, New York, 1978, 98~101



1. 云杉成龄针叶叶肉细胞中 ATP 酶活性定位, 细胞壁表面及膜上有大量 ATP 酶定位颗粒, 在细胞质、核及液泡上亦有酶活性($\times 4700$); 2. ATP 酶在成龄针叶的对照细胞中基本没有酶活性反应, 可见细胞器, 如线粒体、内质网、液泡等($\times 7000$); 3. 幼龄针叶维管组织细胞, 磷酸铅沉淀颗粒分布于质膜及胞质中($\times 4800$); 4. 云杉针叶韧皮组织薄壁细胞, 示 ATP 酶定位于质膜细胞壁及液泡等处($\times 3700$). CW. 细胞壁; ER. 内质网; M. 线粒体; N. 细胞核; V. 液泡; PL. 质膜.