

盐胁迫下芦荟叶同化组织细胞中 ATP酶活性超微结构定位及 Si的作用

徐呈祥^{1,2,3*}, 刘友良², 於丙军², 甘习华³

(¹金陵科技学院园艺学院, 南京 210038; ²南京农业大学生命科学院, 南京 210095; ³南京林业大学森林资源与环境学院, 南京 210037)

摘要: 利用电镜—细胞化学技术研究了盐胁迫下芦荟 (*Aloe vera* L.) 叶同化组织细胞中 ATP酶 (ATPase) 分布特性及外源硅 (Si) 的作用。结果表明, 正常生长情况下, 芦荟叶同化组织细胞中液泡膜 ATPase活性明显强于质膜 ATPase, 在细胞壁初生纹孔场观察到很强的 ATPase活性。NaCl 100 mmol · L⁻¹ 处理 30 d, 浇灌的营养液中不加可溶性 Si, 芦荟叶同化组织细胞中液泡膜、质膜和初生纹孔场 ATPase活性显著减弱, 浇灌的营养液中加入 Si 2.0 mmol · L⁻¹ 处理, 芦荟叶同化组织细胞中 ATPase活性则显著增强, 尤其是在液泡膜和初生纹孔场。叶同化组织细胞中 ATPase活性的差异性反映芦荟叶生理状态和功能的差异性, 可溶性 Si增强盐胁迫下芦荟 ATPase活性是 Si缓解芦荟盐胁迫伤害效应的重要细胞生理机制。

关键词: 芦荟; 盐胁迫; Si; 叶同化组织细胞; ATP酶活性; 超微结构定位

中图分类号: Q 945; S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 11-1661-06

Ultrastructural Localization of ATPase Activity in Cells of Leaf Chlorenchyma of *Aloe vera* L. under Salt Stress and The Effect of Silicon

XU Cheng-xiang^{1,2,3*}, LIU You-liang², YU Bin-jun², and GAN Xi-hua³

(¹College of Horticulture, Jinling Institute of Science and Technology, Nanjing 210038, China; ²College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ³College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: Ultrastructural localization of ATPase activity in cells of leaf chlorenchyma of *Aloe vera* L. under NaCl stress with or without Si addition was investigated by electron microscopy-cytochemical technique. The results showed that ATPase activities, indicated by the status of cerium phosphate (CePO₄) precipitated products, were mainly localized in primary pit field and tonoplast of chlorenchyma cells of aloe seedlings irrigated with Hoagland's solution, next was in plasma membrane. Treated with 100 mmol · L⁻¹ NaCl without added Si for 30 d, ATPase activities in primary pit field, plasma membrane and tonoplast of the cells were all significantly decreased. Nevertheless, irrigated with 100 mmol · L⁻¹ NaCl with 2.0 mmol · L⁻¹ added Si, ATPase activities in these apartments of the cell were significantly enhanced, particularly in tonoplast and primary pit field. Based on results in this study and our previous findings, we believe that differences of ATPase activity in cells of aloe leaf chlorenchyma reflect the differences of physiological status and function of aloe leaves, regulating and/or enhancing ATPase activity is an important cyto-physiological mechanism of Si-alleviated effect on salt injury to aloe.

Key words: *Aloe vera* L.; salt stress; silicon; leaf chlorenchyma cell; ATPase activity; ultrastructural localization

收稿日期: 2008 - 07 - 28; 修回日期: 2008 - 10 - 08

基金项目: 国家 '863' 计划项目 (2002AA2Z4061); 江苏省博士后科研资助计划项目 (0701039B)

* E-mail: xucx2006@yahoo.com.cn

ATPase是膜整合运输蛋白,它们水解ATP,跨膜运输 H^+ ,维持膜电化学势梯度,从而推动离子吸收、营养物质次级运输、气孔开放、pH稳态和细胞伸长等(Mansour et al, 2003; Zhang et al, 2004)。由于膜电位和质子梯度都可影响 K^+ 、 Na^+ 等离子的吸收、排出和固定,因此,通过作用于膜电位和质子梯度,离子泵活性可对植物耐盐性产生重大影响(刘友良和汪良驹, 1998; Ma et al, 2002; Mansour et al, 2003)。

硅(Si)是地球表面最丰富的元素,植物中可能普遍存在调节Si吸收和沉积的基因与蛋白(Hildebrand et al, 1993; Richmond & Sussman, 2003),但土壤中的Si大多呈难溶态,生物有效性很低(Liang, 1999)。现已知,盐胁迫下增施可溶性Si可提高芦荟*Aloe vera* L. (Xu et al, 2006)、黄瓜*Cucumis sativus* L. (Zhu et al, 2004)、番茄*Lycopersicon esculentum* Mill (Al-Aghabary et al, 2004)、大麦*Hordeum vulgare* L. (Liang, 1999)等植物的耐盐性。迄今,关于盐胁迫下外源Si对植物细胞中ATPase活性影响的研究甚少,在叶中未见有文献报道(Liang et al, 2003; Xu et al, 2006)。作者利用电镜—细胞化学技术对盐胁迫下芦荟叶同化组织细胞中ATPase分布特性及Si的作用进行了研究。

1 材料与方法

1.1 植物材料培养及处理

以库拉索芦荟(*Aloe vera* L.)组培繁殖的幼苗为试验材料,试验于2004年4—10月在金陵科技学院园艺科学实验中心进行。将在珍珠岩基质上炼苗成活的3叶龄植株栽植于以石英砂为基质的塑料(PVC)盆中,以Hoagland营养液浇灌栽培,至6叶龄时选择大小均匀的幼苗进行NaCl和Si处理。NaCl浓度为 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Si源为 K_2SiO_3 (化学纯),加Si浓度为 $2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,不加NaCl和Si的处理为对照。加Si所引入的 K^+ 量从配制Hoagland溶液所用的 KNO_3 中扣除,由此所引起的 NO_3^- 的减少以稀 HNO_3 补偿。培养室内的光强为 $60\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光周期 $14\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$,昼夜温度 $(26\pm 1)/(22\pm 1)$,相对湿度 $(80\pm 5)\%$ 。每隔3 d浇灌1次,每次每盆浇灌400 mL处理液。处理30 d结束时,取心叶以下第4片叶制样观察。

1.2 ATPase活性定位的电镜—细胞化学方法

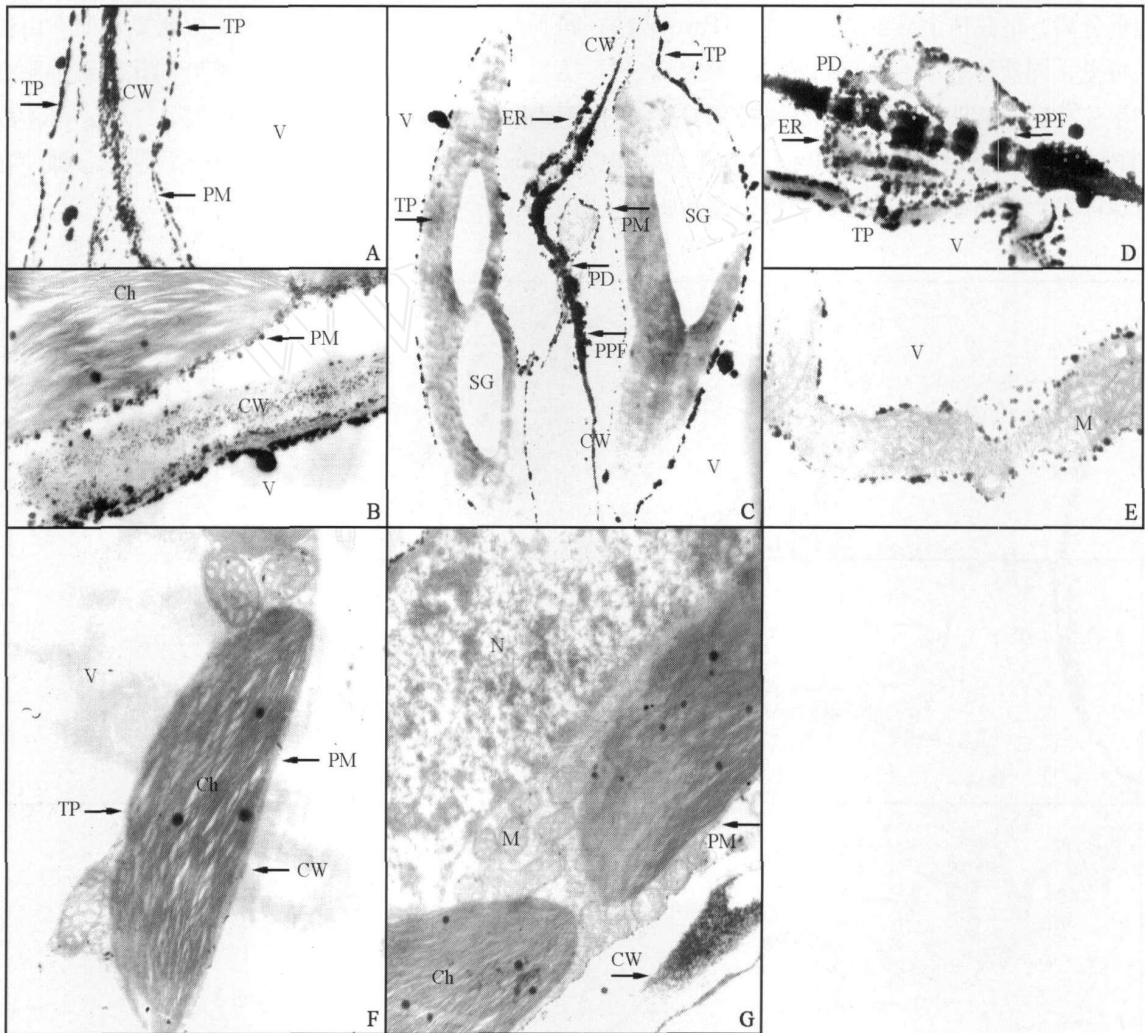
参照Wang等(2000)的方法,略加修改。将芦荟叶片的绿色部分切成 $0.5\text{ mm}\times 0.5\text{ mm}$ 的块,迅速投入用 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二甲砷酸钠(sodium cacodylate)缓冲溶液(pH 7.2)配制的2.5%戊二醛和4.0%多聚甲醛混合液中初固定24 h(4℃),依次用 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium cacodylate缓冲液和 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-顺丁烯二酸(maleate)缓冲液(pH 7.2)各清洗2次(每次0.5 h)。清洗过的材料转移至ATPase反应液中,于37℃下孵育3 h。ATPase反应液的组成是 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-maleate缓冲液中含 $CeCl_3\ 3.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $MgSO_4\cdot 7H_2O\ 5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $ATP\cdot Na_2\ 2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。对照切片的ATPase反应液中不加底物ATP。ATPase反应后的材料依次用 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-maleate缓冲液和 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium cacodylate缓冲液分别清洗2次,然后转移至用 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的sodium cacodylate缓冲液配制的 $O_2SO_4\ 1\%$ 溶液中后固定(4℃, 12 h)。系列浓度乙醇脱水,环氧树脂Epon812渗透、包埋, LKB-V型超薄切片机制片。为防止电子染色过程中的污染及人工假象,切片不经醋酸铀染色,直接在HIACH I H-600型透射电子显微镜下观察。每处理拍摄不少于15个视野的照片,酶反应所形成的颗粒状磷酸铈沉淀物的数量及大小示ATPase活性强弱。

2 结果与分析

2.1 芦荟叶同化组织细胞中ATPase活性超微结构分布

电镜—细胞化学试验结果表明,正常条件下生长的芦荟,叶同化组织在ATPase反应液中于37

下孵育 3 h 后，ATPase 活性反应生成的 CePO_4 黑色沉淀物在细胞中的一定部位界限明显，以在液泡膜 (TP) 和初生纹孔场 (PPF) 的活性最强，质膜 (PM) ATPase 活性明显低于液泡膜 ATPase，它们在电镜照片放大 10 000 ~ 20 000 倍时均可很清楚地观察到 (图版 A ~ D)，而线粒体上的 ATPase 活性只有在更高放大倍数 (25 000 倍) 时才有较清晰的显示 (图版 E)。在未加底物 ATP 的对照切片上，未观察到 ATPase 活性反应产物—— CePO_4 黑色沉淀物 (图版 F、G)，说明照片上所反映的结果是可靠的。



图版 说明：盐胁迫下芦荟叶同化组织细胞中 ATPase 活性超微结构分布 (处理 30 d)

A ~ E: 对照，样品取自正常生长的芦荟叶片，所浇灌的 Hoagland 溶液中不加 NaCl 和 Si，绿色组织块于 37℃ 下孵育 3 h，切片未经醋酸铀染色，反应产物—— CePO_4 黑色沉淀物表示 ATPase 活性。下同。F 和 G: 证实 ATPase 活性反应产物真实性的对照，样品取自正常生长的芦荟叶片，酶反应液中未加底物 ATP。CW: 细胞壁; Ch: 叶绿体; ER: 内质网; IS: 细胞间隙; M: 线粒体; N: 细胞核; PD: 胞间连丝; PM: 质膜; PPF: 初生纹孔场; SG: 淀粉粒; TP: 液泡膜; V: 液泡。

Explanation of plates : Ultrastructural localization of ATPase activity in cells of leaf chlorenchyma of *Aloe vera* L. under salt stress (treated for 30 d)

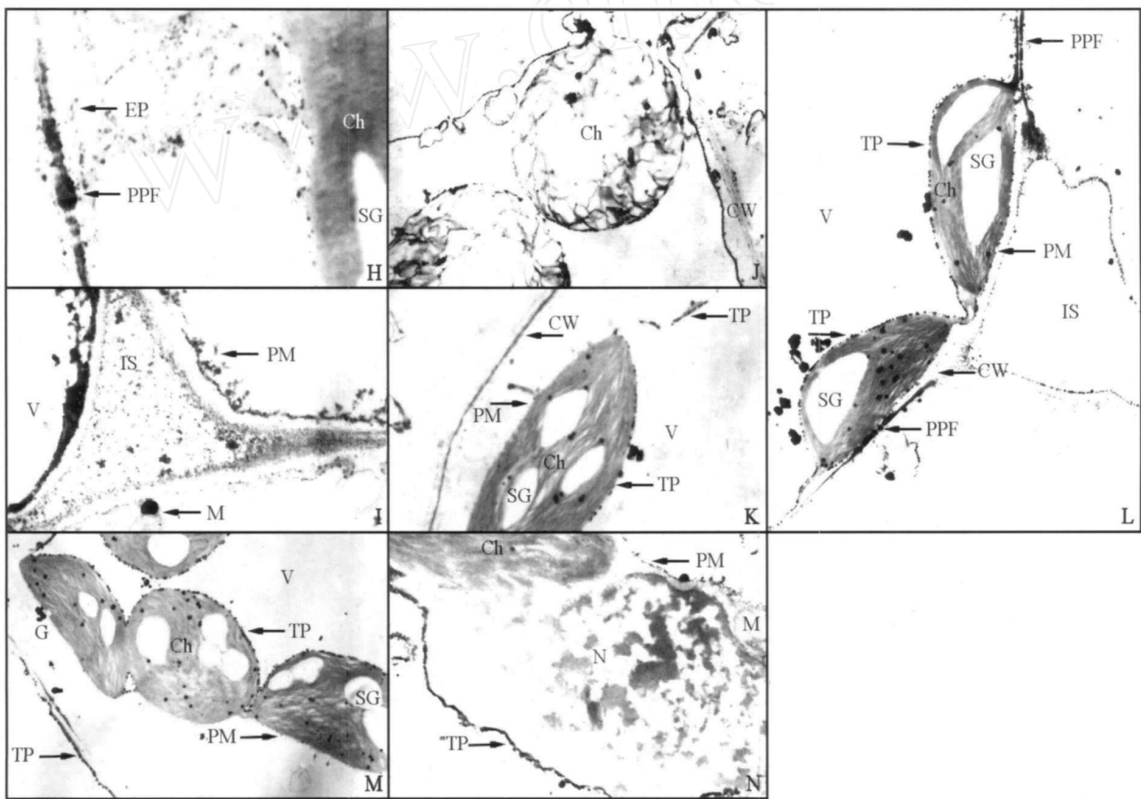
A - E: Control, samples were collected from the leaves of *Aloe vera* L. seedlings irrigated with Hoagland's solution only. The slices of chlorenchyma were incubated at 37℃ for 3 h. The black deposits, i. e. enzymic reaction product CePO_4 , indicate ATPase activity. Slices were not stained with uranyl acetate. The same below. F and G: The control to demonstrate the truthfulness of ATPase activity reaction product, its samples were incubated in the enzymic reaction solution without added ATP at 37℃ for 3 h.

CW: Cell wall; Ch: Chloroplast; ER: Endoplasmic reticulum; IS: Intercellular space; M: Mitochondria; N: Nucleus; PD: Plasmodesma; PM: Plasma membrane; PPF: Primary pit field; SG: Starch granule; TP: Tonoplast; V: Vacuole

A, C, G ×10 000; B, ×20 000; D, ×17 000; E, ×25 000; F, ×18 000.

2.2 盐胁迫下芦荟叶同化组织细胞中 ATPase活性变化及 Si的作用

NaCl 100 mmol · L⁻¹处理 30 d, 芦荟叶同化组织细胞大多数发生质壁分离, 内质网、初生纹孔场及穿越其中的胞间连丝上 ATPase活性显著下降 (图版 , H), 质膜和液泡膜上均未显示出明显的 ATPase活性 (图版 , D); 在叶绿体膨胀为球形的细胞中, 前述各细胞结构基本不显示 ATPase活性 (图版 , J); 在叶绿体形态与结构看似正常的少数细胞中, 液泡膜 ATPase活性也显著下降 (图版 , K)。NaCl 100 mmol · L⁻¹ + Si 2.0 mmol · L⁻¹处理 30 d, 芦荟叶同化组织细胞尽管也有一些发生质壁分离, 但总体上显示出较强的 ATPase活性, 同 NaCl胁迫下不加 Si的处理形成明显对照。由图版可见, 同盐胁迫下不加 Si的相比 (图版 , H~K), 盐胁迫下加 Si处理, 芦荟叶同化组织细胞壁初生纹孔场上 ATPase活性反应产物 CePO₄的电子密度很大, ATPase活性很强 (图版 , L); 液泡膜 ATPase活性显著增强, 由 ATPase反应生成物构成的边缘清晰, ATPase活性明显强于质膜上, 即使在叶绿体发生较明显膨胀的少数细胞中也是如此 (图版 , L~N)。



图版 说明: 盐胁迫下芦荟叶同化组织细胞中 ATPase活性变化及 Si的作用 (处理 30 d)

H~K: 样品取自 NaCl处理 30 d的芦荟叶片, 所浇灌的 Hoagland溶液中含 NaCl 100 mmol · L⁻¹。L~N: 样品取自 NaCl+Si处理的芦荟叶片, 所浇灌的 Hoagland溶液中含 NaCl 100 mmol · L⁻¹和 Si 2.0 mmol · L⁻¹。

CW: 细胞壁; Ch: 叶绿体; ER: 内质网; IS: 细胞间隙; M: 线粒体; N: 细胞核; PD: 胞间连丝; PM: 质膜; PPF: 初生纹孔场; SG: 淀粉粒; TP: 液泡膜; V: 液泡。

Explanation of plates : Change of ATPase activity in cells of leaf chlorenchyma of Aloe vera L. under salt stress and the effect of exogenous silicon (treated for 30 d)

H - K: Samples were collected from the leaves of abe seedlings irrigated with NaCl 100 mmol · L⁻¹ in Hoagland ' s solution L - N: Samples were collected from the leaves of abe seedlings irrigated with Hoagland ' s solution with NaCl 100 mmol · L⁻¹ and Si 2.0 mmol · L⁻¹.

CW: Cell wall; Ch: Chloroplast; ER: Endoplasmic reticulum; IS: Intercellular space; M: Mitochondria; N: Nucleus; PD: Plasmodesma; PM: Plasma membrane; PPF: Primary pit field; SG: Starch granule; TP: Tonoplast; V: Vacuole

H, N. ×10 000; I ×12 000; J, K, L, M. ×5 000.

3 讨论

ATPase是生物体细胞内广泛存在的代谢酶 (Pederson & Calafoli, 1987)。探索 ATPase在细胞中的分布状态是研究细胞生理的一种重要手段 (Serrano, 1989; Fedorova et al, 1999; 吕丹等, 2007; 王建跃和张飞雄, 2008)。ATPase在细胞中的多少可反映出细胞当时的生活状态, 这一技术已被广泛应用于植物逆境生理及发育调控研究中 (刘友良和汪良驹, 1998; Zhang et al, 2004; Xu et al, 2006)。

离子驱动酶系中, 质膜 ATPase和液泡膜 ATPase是植物细胞中离子泵的重要组成部分。质膜 ATPase为吸收 K^+ 和通过 Na^+ / H^+ 反向运输排 Na^+ 提供动力, 液泡膜 ATPase和液泡膜 PPase则为盐分离子集中于液泡中提供动力 (Zhang et al, 2004), 而初生纹孔场及胞间连丝调节植物对环境胁迫的响应与适应也离不开 ATPase的作用 (Lueas et al, 1993; Ding et al, 1999; Jian et al, 2000)。因此, 这些细胞结构组分上 ATPase活性对植物耐盐性均可产生重要影响 (Wang et al, 2000; Zhang et al, 2004)。

本试验中以电镜—细胞化学技术探索了盐胁迫下芦荟 ATPase活性的响应特性及增施可溶性 Si的作用。结果清楚地表明, 盐胁迫下不加 Si, 芦荟叶同化组织细胞中 ATPase活性显著下降, 加 Si增强盐胁迫下这些细胞中 ATPase活性, 结果同 Liang等 (2003) 和 Xu等 (2006) 分别用生化方法对盐胁迫下加 Si和不加 Si大麦和芦荟根尖细胞中 ATPase活性变化的研究结果相似, 但 ATPase活性在芦荟叶同化组织细胞不同结构组分上的分布差异明显: 在质膜上增强较小, 在液泡膜和初生纹孔场显著增强, 暗示盐胁迫下 Si促进芦荟叶同化组织细胞中盐离子向液泡中积累的功能强于向质外体排出的功能, 并且在加强盐胁迫下这类细胞之间物质与信息交流方面具有突出作用。基于本试验结果以及作者此前的研究 (Xu et al, 2006, 2007), 叶同化组织细胞中 ATPase活性的差异性反映着芦荟叶生理状态和功能的差异性, Si可调节或增强盐胁迫下芦荟 ATPase活性与表达是 Si缓解芦荟盐胁迫伤害效应的重要细胞生理机制。

References

- Al-Aghabary K, Zhu Z J, Shi Q H. 2004. Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, and anti-oxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress. *Journal of Plant Nutrition*, 27: 2111 - 2115.
- Ding B, Itaya A, Woo Y M. 1999. Primary pit field and cell to cell communication in plants. *International Review of Cytology*, 190: 251 - 316.
- Fedorova E, Thomson R, Whitehead L F, Maudoux O, Udvardi M K, Day D A. 1999. Localization of H^+ -ATPase in soybean root nodules. *Plant*, 209: 25 - 32.
- Hildebrand M, Higgins O R, Busser K. 1993. Silicon responsive cDNA clones isolated from the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis*. *Gene*, 132: 213 - 218.
- Jian L C, Ji H L, Li J H, Li P H, Chen T H H. 2000. 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*, 10: 103 - 114.
- Liang Y C. 1999. Effects of silicon on enzyme activity and sodium, potassium and calcium concentration in barley under salt stress. *Plant and Soil*, 209: 217 - 224.
- Liang Y C, Chen Q, Liu Q, Zhang W H, Ding R X. 2003. Exogenous silicon (Si) increase antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordium vulgare* L.). *Journal of Plant Physiology*, 160 (10): 1157 - 1165.
- Liu You-liang, Wang Liang-ju. 1998. Responses to salt stress in plants and its salt tolerance // Yu Shu-wen, Tang Zhang-cheng eds. *Plant physiology and molecular biology*. Beijing: Science Press: 752 - 769. (in Chinese)
- 刘友良, 汪良驹. 1998. 植物对盐胁迫的响应及其耐盐性 // 余叔文, 汤章城编. *植物生理学与分子生物学*. 北京: 科学出版社: 752 - 769.
- Lü Dan, Zhang Ya-nan, Ye Jin, Zhao Yu-hui, Tian Hui-qiao. 2007. The distribution of ATPase during the pollen development of *Allium cepa* L. *Journal of Molecular Cell Biology*, 40 (1): 69 - 75. (in Chinese)
- 吕丹, 张亚楠, 叶津, 赵玉辉, 田惠桥. 2007. 洋葱花粉发育中 ATP酶的分布特征. *分子细胞生物学报*, 40 (1): 69 - 75.

- Lueas W J, Ding B, Schoot C V D. 1993. Primary pit field and the super-cellular nature of plants. *New Phytologist*, 125: 435 - 476.
- Ma J F, Tamai K, Ichii M, Wu G F. 2002. A rice mutant defective in Si uptake. *Plant Physiology*, 130: 2111 - 2117.
- Mansour M M F, Salama K H A, Al-Mutawa M M. 2003. Transport proteins and salt tolerance in plants. *Plant Science*, 164: 891 - 900.
- Pederson P L, Calafoli E. 1987. In motive ATPase. I Ubiquity, properties and significance to cell function. *Trends in Biochemical Sciences*, 12: 146 - 150.
- Richmond K E, Sussman M. 2003. Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 268 - 272.
- Serrano R. 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annual Review in Plant Physiology and Molecular Biology*, 40: 61 - 94.
- Wang Jian-yue, Zhang Fei-xiong. 2008. Ultrastructural localization of ATPase activation on the chromosomes/chromatin of the root tip meristatic cells in wheat. *Journal of Capital Normal University: Natural Science Edition*, 29 (2): 45 - 48. (in Chinese)
- 王建跃, 张飞雄. 2008. 小麦根端分生组织细胞内染色体/质上 ATP酶活性的超微结构定位. *首都师范大学学报: 自然科学版*, 29 (2): 45 - 48.
- Wang Y Q, Kalima N, Koma MWANGE, Cui K M. 2000. Ultracytochemical localization of ATPase during the secondary xylem differentiation and dedifferentiation in *Eucumia ulmoides* trunk. *Acta Botanica Sinica*, 42 (5): 455 - 460.
- Xu Cheng-xiang, Liu You-liang, Zheng Qing-song, Liu Zhao-pu. 2006. Silicon improves growth and ion absorption by and distribution in *Aloe vera* plant under salt stress. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 32 (1): 73 - 78.
- Xu Cheng-xiang, Liu You-liang, Ma Yan-ping. 2007. Effects of Silicon on parameters of chlorophyll fluorescence and ultrastructure of chloroplast in *Aloe vera* L. under NaCl stress. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (4): 979 - 984. (in Chinese)
- 徐呈祥, 刘友良, 马艳萍. 2007. 硅对盐胁迫下库拉索芦荟叶绿素荧光参数和叶绿体超微结构的影响. *园艺学报*, 34 (4): 979 - 984.
- Zhang W H, Yu B J, Chen Q, Liu Y L. 2004. Tonoplast H^+ -ATPase activity in barley roots is regulated by ATP and pyrophosphate contents under NaCl stress. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 30 (1): 45 - 52.
- Zhu Z J, Wei G Q, Li J, Qian Q Q, Yu J Q. 2004. Silicon alleviates salt stress and increase antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science*, 167: 527 - 533.

《园艺学报》最新被引频次和影响因子

据中国科学技术信息研究所 2008年 10月统计,《园艺学报》总被引频次为 4213,影响因子为 1.323,他引率 0.917,引用期刊数 405。

欢迎订阅《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会主办的学术期刊,创刊于 1962年,刊载有关果树、蔬菜、观赏植物、茶及药用植物等方面的学术论文、研究简报、专题文献综述、问题与讨论、新技术新品种以及园艺研究动态与信息,适合园艺科研人员、大专院校师生及农业技术推广部门专业技术人员阅读参考。

《园艺学报》是中国科技核心期刊,被中国科学引文数据库 Chinese Science Citation Database等多家重要数据库收录,2005年荣获第三届国家期刊奖,2006—2008年连续 3年获中国科协精品科技期刊工程项目(B类)资助。2007年度报告《园艺学报》总被引频次 3457次,影响因子 1.057。

《园艺学报》为月刊,每月 25日出版。每期定价 15.00元,全年 180.00元。国内外公开发行,全国各地邮局办理订阅,国内邮发代号 82 - 471,国外发行由中国国际图书贸易总公司承办,代号 M448。漏订者可直接寄款至本编辑部订购。

编辑部地址:北京市海淀区中关村南大街 12号 中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部。

邮政编码:100081;电话:(010) 82109523。

E-mail: yuanyixuebao@126.com; 网址: <http://www.ahs.ac.cn>