

# 茉莉幼苗 ATP 酶活性的超微细胞化学定位与耐冷性研究

苏金为<sup>1</sup> 王湘平<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 福建农林大学基础部, 福州 350002; <sup>2</sup> 福建农林大学测试中心, 福州 350002)

**摘要:** 采用磷酸铅沉淀的细胞化学方法, 电镜下观察两个抗冷力显著不同的茉莉品种幼苗 ATP 酶活性在细胞中超微结构定位及其经冷胁迫的变化。结果表明, 抗寒力强的双瓣茉莉品种比抗寒力弱的单瓣品种在低温胁迫下超微结构和 ATP 酶活性有更强的适应能力。茉莉幼苗叶肉组织 ATP 酶主要定位于细胞质膜、液泡膜、叶绿体片层、线粒体脊和胞间连丝等部位, 小叶脉维管束的 ATP 酶主要分布在筛管和伴胞。

**关键词:** 茉莉; 低温胁迫; 超微结构; ATP 酶

中图分类号: S 685.16; Q 944 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2001) 06 0544 07

茉莉 (*Jasminum sambac* L. Ait.) 是喜温植物, 常由于冬季低温伤害影响翌年花的产量。有关茉莉低温伤害机理的研究报道很少。细胞膜是低温冷害的首要部位<sup>[1]</sup>, 膜损伤导致植物代谢的变化和功能紊乱。ATP 酶是一种膜结合的功能性蛋白, 是生物生理代谢的关键酶。许多研究表明 ATP 酶对外界因子反应敏感, 与机体抗性有密切联系<sup>[2~5]</sup>。这些研究较多采用生化分析, 提取测定离体 ATP 酶活力, 对该酶的细胞学定位只有为数不多的报道<sup>[6~8]</sup>。作者采用细胞化学方法, 在电子显微镜下直观地显示耐冷力不同的两个茉莉品种幼苗 ATP 酶活性及在细胞中的超微结构定位, 探讨其冷害的原初反应及耐冷机制。

## 1 材料与方法

选用抗寒力较强的主栽双瓣茉莉品种 (广东种) 和花质优异但不耐寒的单瓣茉莉品种 (台湾种), 春季剪取枝条扦插于营养钵。当年初冬选取生长一致的幼苗转移到生长培养箱, 光强 4000 lx, 0℃下分别处理 6、12 和 24 h (12 h 黑暗+ 12 h 光照)。以未经冷处理的同期室外苗为对照。每处理 10 株。处理后将幼苗置于室外 (日均温 13℃) 观察生长状况。

**制片:** 剪取顶芽下第 2 片叶切成约 2 mm × 0.2 mm × 0.2 mm 的薄片, 放入 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 配制的 5% 戊二醛固定液, 0~4℃下固定 24 h 后用 1% 锇酸固定 4 h, 系列浓度酒精脱水, 环氧树脂 EPON812 渗透、包埋, LKB-V 型超薄切片机定位切片。切片厚约 70 nm, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色, JEM 1010 透射电镜观察拍照。

**ATP 酶的细胞超微结构定位:** 取样方法同上, 按 Bentwood 等<sup>[8]</sup>的方法略加修改。用 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 二甲基胍酸钠缓冲液 (pH 7.2) 配制的 2.5% 戊二醛和 4% 甲醛混合液固定 2 h, 0.05 mol·L<sup>-1</sup> Tris-Maleate 缓冲液 (pH 7.2) 清洗 2 h, 然后将材料放入酶反应液中<sup>[6]</sup>, 27℃ 孵育 2 h。以反应液不加底物 ATP 和在反应液中加入 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 的氟化钠酶活抑制剂

作对照。孵育后的材料用二甲基胍酸钠缓冲液清洗 1 h, 按上述制片法进行后固定, 脱水, 渗透, 包埋, 切片。切片不经染色直接观察拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 常温下叶肉细胞超微结构及 ATP 酶活性的细胞化学定位

常温下生长的单瓣品种叶片叶肉细胞结构完整, 液泡充盈, 细胞质与壁紧密相贴, 叶绿体沿壁分布, 片层丰富清晰, 基粒垛叠的层次多, 排列整齐与壁平行。线粒体脊发达, 基质电子密度高 (图版 I, 1、3)。单瓣与双瓣品种间细胞超微结构无明显差异。

叶片经 ATP 酶反应液孵育 2 h, 在电镜下观察, ATP 酶活性反应产物磷酸铅沉淀以电子致密粗细不等的黑色线条或大小不同的点状出现, 在细胞内分布位点明确, 界限分明, 主要定位在质膜、液泡膜、线粒体脊、叶绿体片层和胞间连丝上 (图版 II, 1~ 4)。单瓣与双瓣品种细胞 ATP 酶的分布和活性差别不显著。不同组织 ATP 酶活性强度差异显著。小叶脉韧皮部的筛管 ATP 酶活性比叶肉组织强, 伴胞也呈现 ATP 酶活性。叶脉周围细胞 ATP 酶活性存在梯度, 距叶脉愈近的薄壁细胞活性愈强 (图版 II, 6)。这显然与光合产物在韧皮部的逆浓度装入和运输有关。

酶孵育液中不加底物 ATP 和加酶活抑制剂 NaF 的对照切片上未观察到磷酸铅沉淀, 表明沉淀确实来源于 ATP 酶特异反应 (图版 II, 7)。

### 2.2 低温胁迫下叶肉细胞超微结构及 ATP 酶活性变化

幼苗经低温胁迫 6 h, 单瓣品种叶肉细胞在质膜和线粒体脊上的 ATP 酶活性明显降低, 液泡膜和叶绿体片层上的磷酸铅沉淀减少更甚, 酶几近失活, (图版 II, 9、10); 双瓣品种叶肉细胞仍保持高的 ATP 酶活性, 仅叶绿体片层上的酶反应产物略减, 其它部分与低温处理前比较没有显著差异 (图版 II, 5、8)。此时两品种细胞超微结构均未见明显变化 (图版 I, 2、4~ 8)。

当低温处理延续到 12 h, 单瓣品种的叶片细胞结构损伤严重, 质壁分离, 叶绿体片层紊乱、集结, 被膜破裂, 线粒体空泡化 (图版 I, 9、12); 仅有微量沉淀颗粒零星分布于质膜, 其余各细胞器均未见酶反应产物 (图版 II, 13); 冷处理结束恢复常温后, 叶片出现水渍状, 继而枯黄、萎蔫, 陆续死亡, 说明这种程度的超微结构损伤和 ATP 酶变性是不可逆的。双瓣品种细胞超微结构变化较少, 原生质轻微孤立, 液泡内含物增加, 叶绿体片层减少, 基粒排列方向改变, 线粒体脊减少, 基质电子密度降低 (图版 I, 10、13)。细胞 ATP 酶整体活性水平也开始明显下降, 液泡膜 ATP 酶大多失活, 叶绿体片层酶活性十分微弱, 与单瓣品种经 6 h 处理的现象类似, 质膜和线粒体脊的酶反应产物仍维持较高水平, 线粒体脊酶活力减少的幅度最小 (图版 II, 11、12)。

低温持续 24 h, 双瓣品种叶片细胞细胞质内陷, 分隔液泡, 叶绿体片层进一步减少, 线粒体基质凝结 (图版 I, 11、15)。ATP 酶活性继续下降, 质膜上磷酸铅沉淀呈不连续的小黑点, 线粒体脊上的 ATP 酶活性是此时细胞中的最高水平 (图版 II, 14、15)。幼苗恢复常温后能正常生长, 表明此程度的超微结构损伤和 ATP 酶变性是可逆的。单瓣品种则因作为骨架的膜结构解体, 膜结合的 ATP 酶活性消失殆尽 (图版 I, 14)。

### 3 讨论

抗寒力强的双瓣茉莉品种在 0℃胁迫 24 h 期间维持较高 ATP 酶活性, 原生质轻微孤立, 减少细胞内外物质交流, 降低代谢水平, 液泡内含物增加, 大液泡分隔成许多小液泡等, 这些都是避免冰冻伤害的适应性变化, 对低温胁迫具有一定的可塑性和缓冲能力, 使其在逆境下仍能保持活力。该品种有潜在的经低温诱导的生理耐冷特性, 如果苗期进行适当的低温锻炼, 有望提高品种耐寒力。单瓣品种在 0℃经 12 h 处理已表现伤害反应, 细胞超微结构受损, ATP 酶变性失活, 细胞内能量水平降低, 生理代谢紊乱, 细胞失去对物质主动转移的控制, 导致最终死亡。电镜观察结论与田间生长抗寒力表现一致, 与简令成等<sup>[7]</sup>在不同抗寒性小麦品种的研究结果相同, 也与苏金为等<sup>[4]</sup>采用提取测定法比较这两个茉莉品种的 ATP 酶在低温处理下的稳定性结论吻合。细胞超微结构变化和 ATP 酶活性强弱与个体耐冷力的相关性, 可作为品种抗寒力鉴定的一个参考指标。

在低温胁迫初期 (6 h) 单瓣品种细胞膜结构未出现明显变化, ATP 酶活性已急剧减弱, ATP 酶活性减弱远早于膜结构破坏。ATP 酶活性变化被认为是细胞对低温胁迫的最初生理反应<sup>[5]</sup>。比较不同细胞器的 ATP 酶的耐冷力, 两品种表现同样的趋势, 质膜比液泡膜耐冷, 线粒体脊比叶绿体片层耐冷。冷害对线粒体功能的影响较叶绿体小得多<sup>[10]</sup>, 可以推断与 ATP 酶耐冷差异有关。许多研究指出细胞边界质膜是植物遭受冷害最敏感部位<sup>[7,9]</sup>, 作者却观察到质膜比液泡膜无论是超微结构还是膜上附着的 ATP 酶活性都表现出对低温的更强的耐受力, 并不存在由表及里的次序。这些现象与其组成结构及在细胞中所处微环境有关, 也可能与细胞内信息传递和调控系统有密切联系, 有待进一步深入探究。

### 参考文献:

- 1 Lyons J M, Raison J K. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol.*, 1970, 45: 386~ 389
- 2 焦新之, 倪晋山, 李维琳, 等. 水稻及燕麦根细胞的原生质膜, 线粒体内膜与液泡膜 ATPase 的比较研究. *实验生物学报*, 1988, 21: 409~ 416
- 3 陈亚华, 沈振国, 刘友良. 低温、高 pH 胁迫对水稻幼苗根系质膜、液泡膜 ATP 酶活性的影响. *植物生理学报*, 2000, 26: 124~ 130
- 4 苏金为, 王湘平. 茉莉苗期低温伤害与几种保护性酶活性变化的关系. *福建农学院学报*, 1993, 22: 164~ 167
- 5 Yosida S, Matsuura C, Etani S. Impairment of tonoplast H<sup>+</sup>-ATPase as an initial physiological response of cells to chilling in mung bean. *Plant Physiol.*, 1989, 89: 634~ 642
- 6 简令成, 孙龙华, 孙德兰. 根尖分生区、伸长区和根毛区细胞内 ATP 酶活性的超微结构定位. *植物学报*, 1982, 24: 408~ 412
- 7 简令成, 孙龙华, 孙德兰. 小麦质膜及液泡膜的 ATP 酶活性在抗寒锻炼中的变化. *实验生物学报*, 1983, 16: 133~ 145
- 8 Bentwood B J, Cronshaw J. Cytochemical localization of adenosine triphosphatase in the phloem of *Pisum sativum* and its relation to the function of transfer cells. *Planta*, 1978, 140: 111~ 120
- 9 Palka J P, Li P H. Cell membrane properties in relation to freezing injury. In: Li P H, eds. *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress*. New York: Academic Press., 1978. 93~ 115
- 10 王毅, 杨宏福, 李树德. 园艺植物冷害和抗冷性的研究. *园艺学报*, 1994, 21: 239~ 244

# Ultracytochemical Localization of ATP-ase Activity in The Cells of *Jasminum Sambac* L. Seedlings and Its Relation to Chilling Tolerance

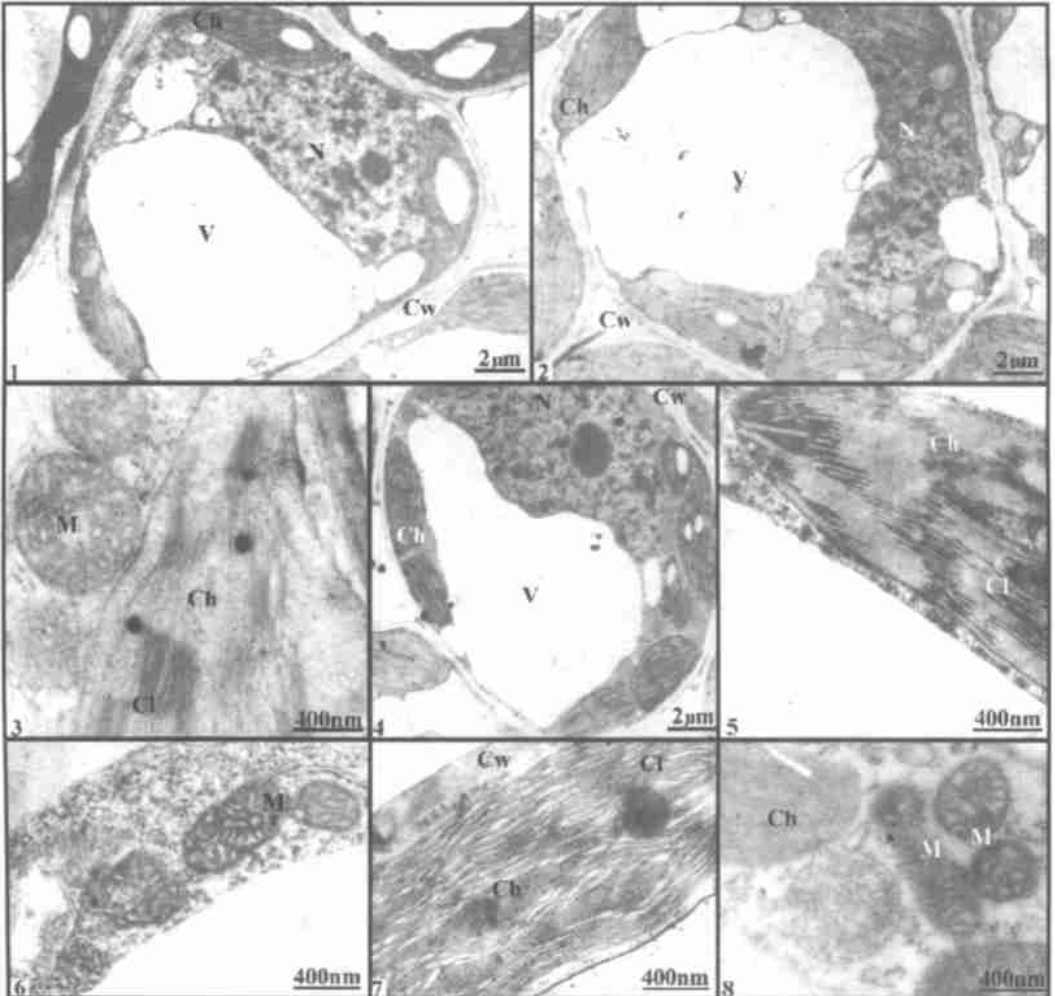
Su Jinwei<sup>1</sup> and Wang Xiangping<sup>2</sup>

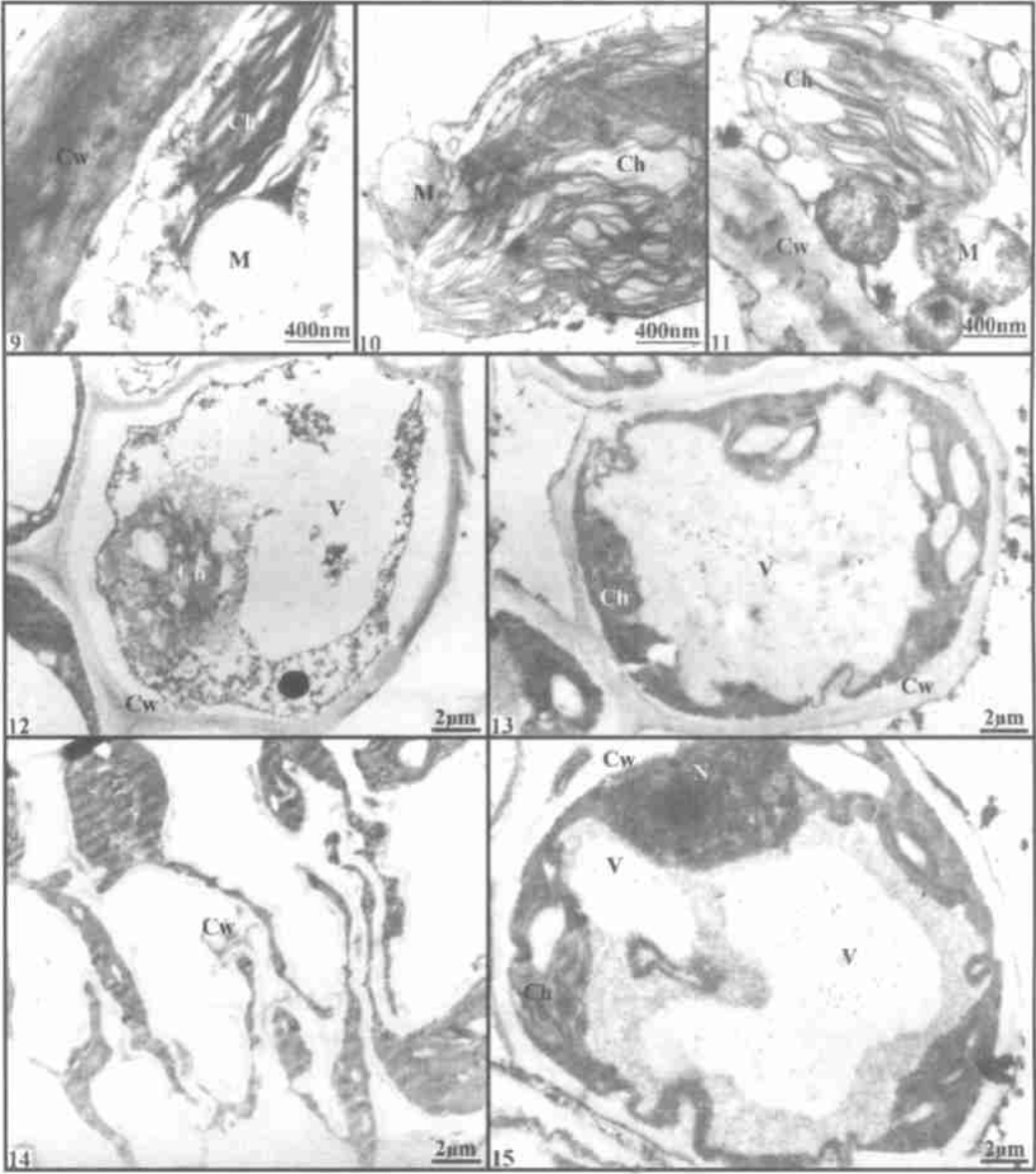
(<sup>1</sup>Department of Fundamental Subjects, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002; <sup>2</sup>Centre of Test, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

**Abstract:** Ultracytochemical localization of ATP-ase activity was carried out using a leading phosphate precipitation technique in the cells of two different chilling resistance *Jasminum sambac* L. Ait. seedlings. Under 0 °C chilling stress, the ultrastructure of cells and the ATP-ase activity in the chilling resistant Jasmine (double petal cultivar) was obviously more stable than that in the chilling sensitive Jasmine (single petal cultivar). The ATP-ase in Jasmine seedlings cells of mesophyll mainly located on plasmalemma, tonoplast, chloroplast lamellae, mitochondria cristae, and plasmodesma, whereas the ATP-ase in cells of minor leaf vein mainly located on the sieve element and the companion cell.

**Key words:** Jasmine (*Jasminum Sambac* L.); Low temperature stress; Ultrastructure; ATP-ase

图版 I Plate I





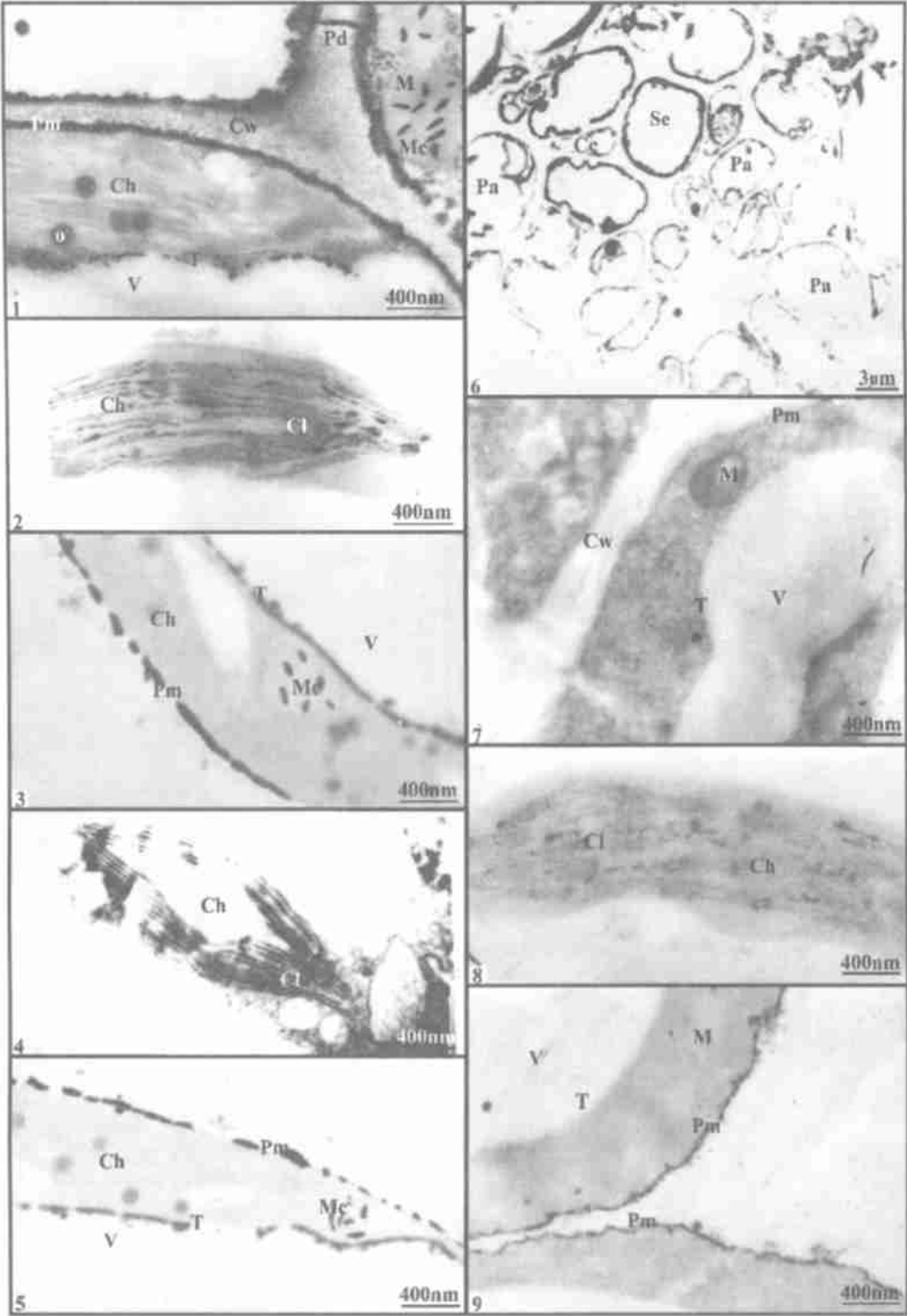
图版说明 Ch: 叶绿体, Pm: 质膜, M: 线粒体, Pd: 胞间连丝, V: 液泡, Cc: 伴胞, Se: 筛管, Cl: 叶绿体片层, Mc: 线粒体脊, T: 液泡膜, Cw: 细胞壁, O: 嗜锇颗粒, Pa: 韧皮薄壁细胞, N: 细胞核。

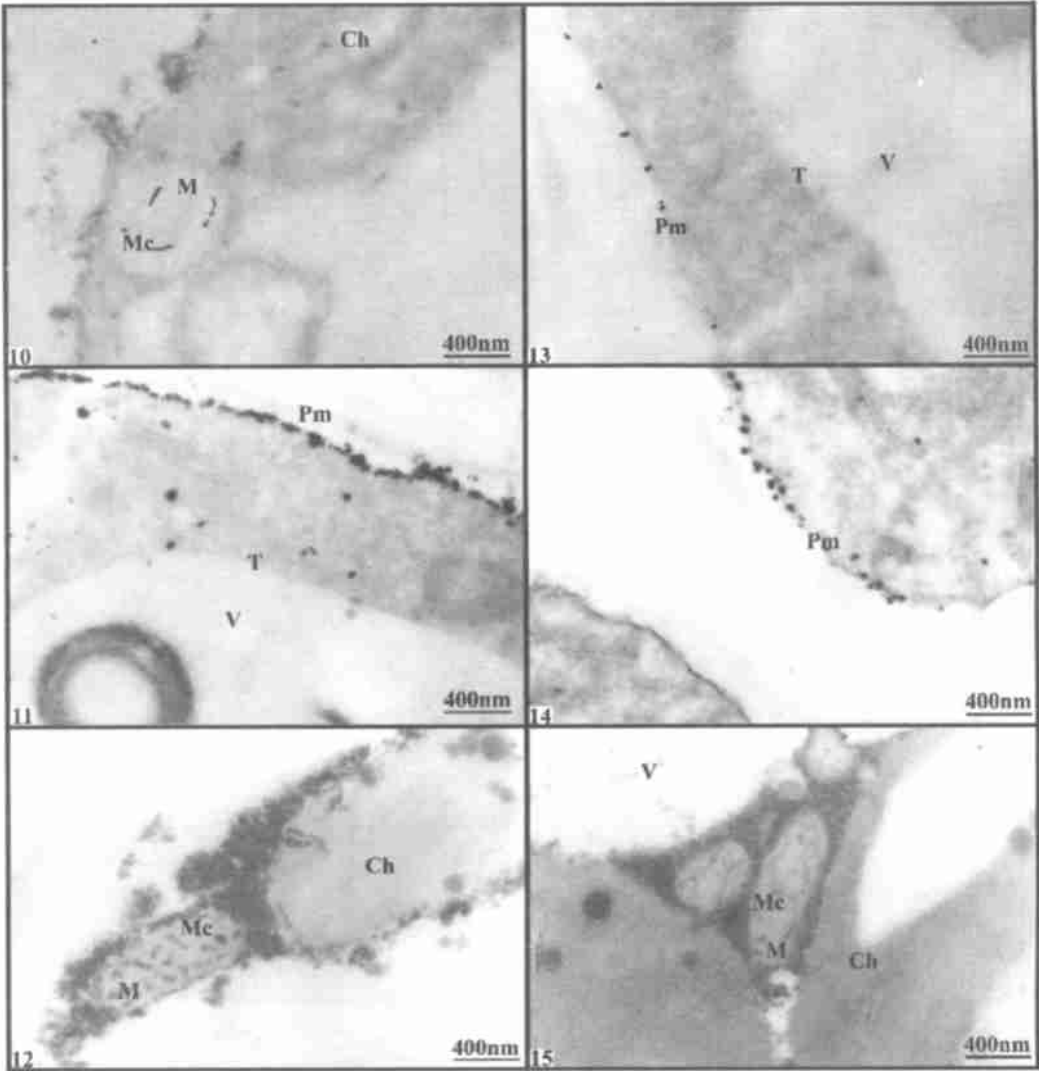
图版I 茉莉幼苗叶肉细胞超微结构 1, 3. 常温下单瓣品种; 2, 7, 8. 低温6 h 单瓣品种; 4, 5, 6. 低温6 h 双瓣品种; 9, 12. 低温12 h 单瓣品种; 10, 13. 低温12 h 双瓣品种; 14. 低温24 h 单瓣品种; 11, 15. 低温24 h 双瓣品种。

**Explanation of Plates** Ch: Chloroplast; V: Vacuole; M: Mitochondria; Pm: Plasmolemma; Pd: Plasmodesma; Se: Sieve element; Cc: Companion cell; Cw: Cell wall; Cl: Chloroplast lamellae; N: Nucleus; Mc: Mitochondria cristae; O: Osmiophilic globule; Pa: Phloem parenchyma; T: Tonoplast.

**Plate I** Ultrastructure in the mesophyllous cell of Jasmine seedlings 1, 3: The single petal cultivar grown at the optimum temperature. 2, 7, 8: The single petal cultivar subjected to chilling treatment for 6 h. 4, 5, 6: The double petal cultivar subjected to chilling treatment for 6 h. 9, 12: The single petal cultivar subjected to chilling treatment for 12 h. 10, 13: The double petal cultivar subjected to chilling treatment for 12 h. 14: The single petal cultivar subjected to chilling treatment for 24 h. 11, 15: The double petal cultivar subjected to chilling treatment for 24 h.

图版 II Plate II





图版II 茉莉幼苗 ATP 酶细胞化学定位 (未经电子染色) 1, 2. 常温下单瓣品种; 3, 4. 常温下双瓣品种; 6. 常温双瓣品种叶脉小微管束; 7. 空白对照反应切片; 5, 8. 低温处理 6 h 双瓣品种; 9, 10. 低温 6 h 单瓣品种; 11, 12. 低温 12 h 双瓣品种; 13. 低温 12 h 单瓣品种; 14, 15. 低温 24 h 的双瓣品种。

**Plate II** Ultrastructural localization of ATPase activity in the cell of *Jasmine* seedlings (Section unstained) 1, 2: The single petal cultivar grown at the optimum temperature. 3, 4: The double petal cultivar grown at the optimum temperature. 6: Cells of minor leaf vein grown at the optimum temperature. 7: Cells of mesophyll incubated in reactive solution with NaF and without substrate ATP. 5, 8: The double petal cultivar subjected to chilling treatment for 6 h. 9, 10: The single petal cultivar subjected to chilling treatment for 6 h. 11, 12: The double petal cultivar subjected to chilling treatment for 12 h. 13: The single petal cultivar subjected to chilling treatment for 12 h. 14, 15: The double petal cultivar subjected to chilling treatment for 24 h.