

毛竹竹秆基本组织 发育过程中 ATP 酶的超微定位

于 芬¹, 丁雨龙^{2*}

(1. 江西农业大学 江西省竹子种质资源与利用重点实验室, 江西 南昌 330045; 2. 南京林业大学 国际教育学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 利用电镜细胞化学技术对毛竹 [*Phyllostachys edulis* (Carr.) H De Lehaie] 竹秆基本组织发育过程中的 ATP 酶进行细胞化学定位。竹秆基本组织细胞分化早期, 细胞具有较高的 ATP 酶活性, 细胞核、质膜、内质网、线粒体等细胞器的膜系统上都具有 ATP 酶活性。随着基本组织的分化和发育, 长细胞液泡膜上的 ATP 酶活性增强, 而短细胞液泡膜上 ATP 酶活性相对较弱; 至初生壁发育后期, 质膜上的 ATP 酶活性升高; 次生壁发育期, 短细胞质膜上的 ATP 酶活性显著增强, 而长细胞的相对较弱; 细胞核、质膜、线粒体、胞间连丝、内质网、质体膜、运输小泡膜以及细胞质内和胞间隙都具有 ATP 酶活性, 在次生壁发育期液泡膜上已观察不到 ATP 酶反应物。长细胞质膜 ATP 酶活性从第 4 年开始降低, 短细胞质膜的 ATP 酶活性始终很高, 且无论生长期还是休眠期, 短细胞一直保持旺盛的物质主动吸收和活跃的新陈代谢过程。同时短细胞内大量的运输小泡, 具有的 ATP 酶活性, 以及胞间连丝沉积有大量的 ATP 酶反应物, 都表明短细胞与周围细胞间频繁、活跃的物质交流。短细胞不仅在物质运输起到重要作用, 而且在竹秆继续成熟的过程中可能参与长细胞次生壁的形成。

关键词: 竹秆; 长细胞; 短细胞; ATP 酶; 分化; 生理功能

中图分类号: Q944.64; Q946.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000 - 2286(2011)02 - 0300 - 06

Ultracytochemical Localization of ATPase during the Ground Tissue Development in *Phyllostachys edulis* Culms

YU Fen¹, DING Yu-long^{2*}

(1. Jiangxi Provincial Key Laboratory for Bamboo Germplasm Resources and Utilization, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. College of International Education, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: The Ultracytochemical localization of ATPase during the ground tissue development in bamboo (*Phyllostachys edulis* (Carr.) H. De Lehaie) culm was studied with cytochemical technology. At the early stage of ground tissue differentiation, the ground tissue cell had high ATPase activity. The nuclei, plasma membrane, plasmodesmata, mitochondria, endoplasmic reticulums, plastid membrane and transfer vesicles, all had ATPase activity. The ATPase activity in the tonoplast of the long cell increased with the differentiation of the ground tissue, but ATPase activity in short cell vacoules was lower than that in the long cells. At the late stage of primary wall period, ATPase activity in the plasma membrane increased. In the secondary wall period,

收稿日期: 2010 - 12 - 08 **修回日期:** 2011 - 02 - 11

基金项目: 国家自然科学基金(31000289)、江西省自然科学基金项目(2009GQN0011)、江西农业大学博士启动项目、国家“十一五”科技支撑项目(2006BAD19B04)和江苏省普通高校研究生科研创新计划资助项目

作者简介: 于芬(1980—),女,讲师,博士,主要从事植物发育和解剖学研究, E-mail: yufen930@163.com; * 通讯作者: 丁雨龙,教授,博士生导师, E-mail: ylding@njfu.com.cn。

ATPase activity in the plasma membrane of the short cell increased remarkably, while lower in that of the long cell. There was little peroxidase reactive product in the tonoplast. ATPase activity in plasma membrane of the long cells began to decline in four-year-old culms, but the short cell plasma membrane maintained high ATPase activity whether in growing period or in period of dormancy, suggesting that the short cells kept active absorption and metabolism. Transfer vesicles and pits also had high ATPase activity. The above results indicated that the short cells had active exchange and transport with other cells chiefly by symplastic transport and apoplasmic transport. A relationship between ATPase and the differentiation of the ground tissue in bamboo culms was also discussed.

Key words: culm; long cell; short cell; ATPase; differentiation; physiological function

毛竹 [*Phyllostachys edulis* (Carr.) H De Lehaie] 是特殊的多年生常绿木质草本植物, 材质优良, 用途广泛。基本组织约占竹秆组织总量的 52%, 参与了各种生理代谢活动。竹秆基本组织由长、短两种薄壁细胞组成。长细胞垂直排列, 具有多层、较厚且木质化的细胞壁, 休眠期有淀粉粒贮藏于长细胞内^[1-2]。而短细胞较短, 散布于其中, 细胞质较浓, 细胞壁较薄, 仅局部木质化, 即使在老的竹秆内也是如此^[1,3-5]。基本组织长、短细胞间具有明显的差异, 说明两种细胞执行不同的生理功能。ATP 是所有生命体系的能量载体, 它参与生命物质的代谢、运输和信息传递等能量转换过程。在真核细胞中, 除了线粒体和叶绿体中的 ATP 酶功能是合成 ATP, 其他部位的 ATP 酶都是水解 ATP 获取能量^[6]。每个细胞都具有水解 ATP 的生理功能, 它在细胞中分布的部位与多少和细胞的生理功能有密切联系。而通过对 ATP 酶的定位研究, 可以明确在某一时空内哪些细胞组分在活跃地参与细胞代谢及个体发育过程^[7]。探索 ATP 酶在细胞中的分布状态是研究细胞物质运输和能量代谢的重要手段^[8-9]。本文拟通过对竹秆基本组织生长发育过程中 ATP 酶的定位研究, 进一步探讨基本组织细胞分化和长、短细胞间生理功能的差异。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料毛竹 [*Phyllostachys edulis* (Carr.) H De Lehaie] 采自于南京林业大学竹类植物园, 生长期材料分别采取不同发育阶段的竹笋和当年生、一、三、四、五年生竹秆。而休眠期材料分别采取一、三、四和五年生竹秆。竹笋从上至下连续截取各个节间中部的材料, 而当年生幼竹和老竹秆则从竹秆中部的节间中部取材。

1.2 方法

取材后迅速将材料切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 左右的小块投入 50 mmol/L (pH 7.2) 二甲胍酸钠缓冲液配制的 4% 多聚甲醛与 2.5% 戊二醛的固定液中, 4 °C 下初固定 2 h; 用 50 mmol/L (pH 7.2) 的二甲胍酸钠缓冲液 4 °C 下清洗 2 次, 每次 0.5 h; 再用 50 mmol/L (pH 7.2) 的 Tris-Maleate 缓冲液清洗 3 次, 每次 0.5 h, 4 °C 下进行。然后转移到酶孵育液中, 休眠期的材料 28 °C 下孵育 2.5 h。生长期的材料 26 °C 下孵育 2.5 h, 酶孵育液的组成为 50 mmol/L (pH 7.2) 的 Tris-Maleate 缓冲液中含 ATP 钠盐 2 mmol/L, Pb(NO₃)₂ 3 mmol/L, MgSO₄ 5 mmol/L。对照实验的酶孵育液中分别不加底物 ATP 和加入抑制剂 NaF。

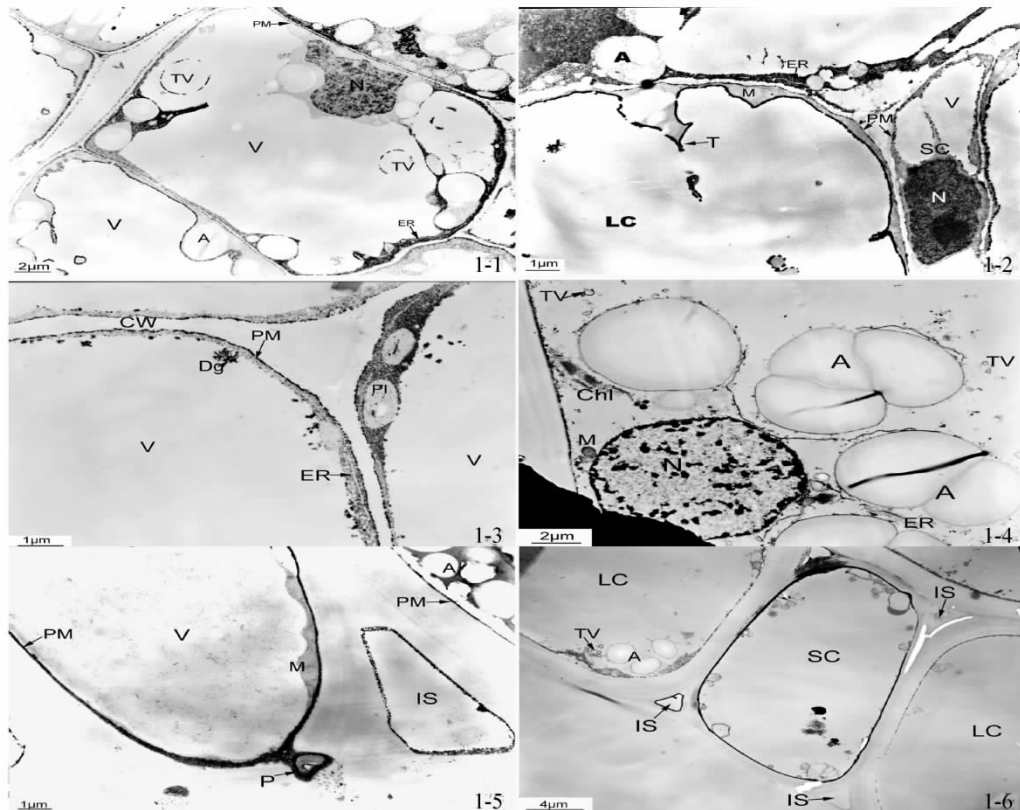
孵育后, 在 4 °C 下先用 50 mmol/L (pH 7.2) 的 Tris-Maleate 缓冲液再用 50 mmol/L (pH 7.2) 的二甲胍酸钠缓冲液各清洗 2 次, 每次 0.5 h; 接着 50 mmol/L (pH 7.2) 的二甲胍酸钠缓冲液配制的 1% 锇酸固定液中 4 °C 下固定过夜; 再用 50 mmol/L (pH 7.2) 的二甲胍酸钠缓冲液 4 °C 下清洗 2 次, 每次 20 min, 最后用重蒸水清洗 3 次, 每次 0.5 h; 清洗好的材料经丙酮系列脱水, Spurr 树脂包埋, LKB-V 型超薄切片机切片, 切片不经染色, 在 H-600 型透射电镜下观察、拍照。

2 结果与分析

竹秆基本组织发育过程主要分为 2 个时期: 初生壁发育期和次生壁发育期。在不同的发育时期和同一时期不同的组织细胞其 ATP 酶活性具有明显的差异。

2.1 初生壁发育期 ATP 酶活性

竹秆基本组织细胞分化早期,细胞具有较高的 ATP 酶活性,细胞核、质膜、内质网等细胞器的膜系统上都可以观察到 ATP 酶反应物(图 1-1)。随着基本组织的发育和分化,中央大液泡逐渐形成,初生壁加厚。长细胞液泡膜上的 ATP 酶活性增强,而短细胞的细胞核仍较大居中,没有形成中央大液泡,细胞质相对长细胞较浓。与基本组织长细胞相比,短细胞的液泡膜上 ATP 酶活性相对较弱(图 1-2)。至初生壁发育后期,质膜上的 ATP 酶活性升高,细胞器上仍具 ATP 酶活性,这一阶段以细胞核和质膜上的 ATP 酶活性最高(图 1-2,图 1-3)。



1-1. 基本组织分化早期基本组织细胞 ATP 酶活性; 1-2. 初生壁发育早期基本组织长、短细胞 ATP 酶活性; 1-3. 基本组织细胞初生壁发育后期细胞内质膜、液泡膜上的 ATP 酶活性; 1-4. 当年生竹秆基本组织长细胞 ATP 酶活性; 1-5. 当年生竹秆基本组织细胞 ATP 酶活性,示长、短细胞质膜 ATP 酶活性差异,液泡膜已没有 ATP 酶分布; 1-6. 三、四年生竹秆基本组织长、短细胞生长期 ATP 酶活性。A: 淀粉体; Chl: 叶绿体; CW: 细胞壁; Dg: 降解物; ER: 内质网; IS: 胞间隙; LC: 长细胞; M: 线粒体; N: 细胞核; P: 纹孔; Pl: 质体; PM: 质膜; SC: 短细胞; T: 液泡膜; TV: 运输小泡; V: 液泡。

1-1. ATPase distribution in ground tissue at early stage of differentiation; 1-2. ATPase activity in the long cell and short cell at early stage of differentiation; 1-3. Showing ATPase activity in the tonoplast and plasmodesmata at the late stage of primary wall period; 1-4. ATPase distribution in one year old long cells; 1-5. ATPase distribution in one year old ground tissue, showing the difference between ATPase distribution in long cells and short cells, and the tonoplast with no ATPase distribution; 1-6. ATPase activity in three or four years old ground tissue in growing period; A: Amyloplast; Chl: Chloroplast; CW: Cell wall; Dg: Degradating; ER: Endoplasmic reticulum; IS: Intercellular space. LC: Long cell; M: Mitochondia; N: Nucleus; P: Pit; Pl: Plastid; PM: Plasma membrane; SC: Short cell; T: Tonoplast; TV: Transfer vesicles; V: Vacuole.

图 1 不同发育期竹秆基本组织细胞 ATP 酶活性

Fig. 1 ATPase distribution in ground tissue

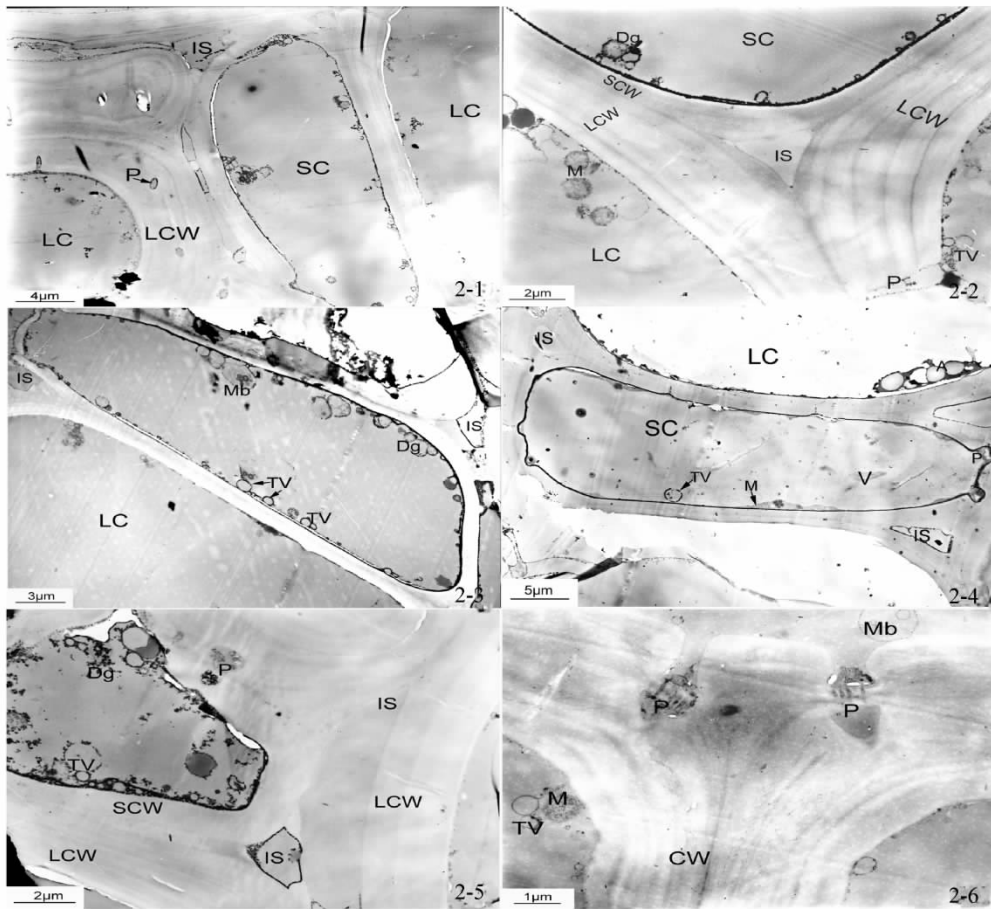
2.2 次生壁发育期 ATP 酶活性

在基本组织细胞次生壁发育期,多数长细胞内的降解物具有 ATP 酶活性,细胞核染色质减少,ATP 酶活性下降,运输小泡膜、线粒体、降解物和淀粉体膜上仍具有较高的 ATP 酶活性(图 1-4)。随着次生

壁的发育,胞间连丝上的ATP酶活性增高,而液泡膜上已观察不到的ATP酶反应物。长、短细胞质膜间的ATP酶活性具有很大的差异,短细胞质膜上的ATP酶活性显著增强,而长细胞质膜上的酶活性较弱(图1-5)。随着秆龄的增加,长细胞次生壁逐渐加厚,短细胞壁加厚不明显,ATP酶活性也产生相应变化。从三、四年生竹秆基本组织长细胞质膜上的ATP酶活性开始降低,而短细胞的质膜上的ATP酶活性一直保持较高的ATP酶活性(图1-6,图2-1)。即使在休眠期内,短细胞仍具有较强的ATP酶活性(图2-2,图2-3)。

次生壁发育期,短细胞的胞间隙一直具有较高的ATP酶活性,但两侧的胞间隙内ATP酶活性始终存在极性现象,短细胞一端的胞间隙具有ATP酶活性,而另一端胞间隙的酶活性很弱甚至没有(图1-6,图2-4,图2-5)。

对照试验基本上没有观察到ATP酶反应物,表明实验结果是可靠的(图2-6)。



2-1. 五年生竹秆基本组织细胞生长期ATP酶活性; 2-2. 三年生竹秆基本组织长、短细胞休眠期ATP酶活性; 2-3. 五年生竹秆基本组织细胞休眠期ATP酶活性; 2-4. 示当年生竹秆基本组织短细胞两端的胞间隙ATP酶活性差异; 2-5. 五年生竹秆基本组织短细胞胞间隙ATP酶的极性分布; 2-6. 对照实验,没有ATP酶反应物。A: 淀粉体; CW: 细胞壁; Dg: 降解物; IS: 胞间隙; LC: 长细胞; LCW: 长细胞的壁; M: 线粒体; Mb: 多泡体; P: 纹孔; SC: 短细胞; SCW: 短细胞的壁; TV: 运输小泡; V: 液泡。

2-1. ATPase distribution in five years old ground tissue; 2-2. ATPase activity in three years old ground tissue in period of dormancy; 2-3. ATPase distribution in five years old ground tissue in period of dormancy; 2-4. The polar distribution of ATPase in intercellular space of one year old short cell; 2-5. The polar distribution of ATPase in intercellular space of five years old short cell; 2-6. Control experiment, showing no ATPase reacting substance. A: Amyloplast; CW: Cell wall; Dg: Degradating; IS: Intercellular space; LC: Long cell; LCW: Long cell wall; M: Mitochondia; Mb: Multivesicular bodies; P: Pit; SC: Short cell; SCW: Short cell wall; TV: Transfer vesicles; V: Vacoule.

图2 不同发育期竹秆基本组织细胞ATP酶活性

Fig.2 ATPase distribution in ground tissue

3 结论与讨论

3.1 ATP 酶与基本组织细胞壁的形成

毛竹茎秆基本组织细胞壁形成的整个过程中,细胞核、质膜、胞间连丝、内质网、质体膜、运输小泡膜以及细胞质内和胞间隙都具有 ATP 酶活性。不同部位的 ATP 酶参与调控细胞的不同功能。目前一般认为:胞间隙和细胞壁上的 ATP 酶主要参与物质的质外体运输过程,胞间连丝、质膜、内质网、高尔基体、液泡、小泡、核膜等膜系上的 ATP 酶主要参与物质的分泌和共质体运输过程,线粒体、叶绿体片层内的 ATP 酶则主要参与物质的分解和合成^[10]。对于核质内 ATP 酶的功能,Almouzni et al^[11]认为细胞核中的 ATP 酶在染色质组装时核小体与核小体之间生理空间的形成与稳定方面起重要作用,代谢活跃的细胞具有较高的与染色质相联系的 ATP 酶活性。而田国伟等^[12]则提出核仁中的 ATP 酶有可能参与核糖体前体的合成。在细胞核降解阶段,细胞核上的 ATP 酶活性还可能与染色质的断裂、浓缩以及降解有关。竹秆基本组织细胞质膜、运输小泡以及胞间连丝上较高的 ATP 酶活性说明在基本组织细胞壁形成过程中,可能是细胞壁物质通过质膜和胞间连丝的吸收和分泌,经高尔基体和内质网等细胞器的合成加工分泌运输小泡,再通过这些运输小泡与质膜融合,形成新的细胞壁物质沉积。液泡也参与了这一过程中的物质分泌和共质体运输。细胞膜是细胞内外环境的边界,是物质交换和细胞识别的重要场所,它可以调节细胞代谢的变化。质膜上的 ATP 酶在物质的吸收与运输上起着质子泵的作用,它的活动形成离子跨膜运输的原动力,为物质的吸收、分泌和运输提供能量^[13]。所以质膜上的 ATP 酶对于促进新细胞壁的形成最终导致细胞壁伸展具有至关重要的作用,ATP 酶活性的提高,增强了细胞对植物激素的敏感性^[14]。在信号的调节下,它可以使细胞外 H^+ 量增加,引起细胞壁酸化,细胞壁纤维素微纤丝的交联变得松弛,增加细胞壁的可塑性,细胞壁伸展性增加,最终细胞扩展增大。而基本组织细胞内细胞核及细胞器上较强的 ATP 酶活性正好体现了这个时期细胞活跃的物质合成和代谢能力。

细胞内贮存的淀粉粒体和晶体上都具有 ATP 酶活性,同时在附近常分布有大量的沉积有 ATP 酶活性反应物的细胞器,表明基本组织细胞的这些物质处于贮存或转移的动态变化之中,推测这些淀粉粒和晶体降解的物质可能用于合成初生壁。

次生壁形成期,细胞质膜和胞间连丝上的 ATP 酶活性增强。细胞核上 ATP 酶活性反应物减少,这个时期细胞核开始降解,染色质减少,细胞核上的 ATP 酶活性可能参与了染色质的断裂和降解。而运输小泡仍然具有较高的 ATP 酶活性。次生壁形成期部分细胞质出现降解,含有降解物甚至细胞器的多泡体、降解物上具有较强的 ATP 酶活性。次生壁形成物质不仅通过纹孔、质膜、运输小泡在细胞间运输,也有部分来自于自身部分细胞质的降解物质。长细胞次生壁加厚在四年后开始减慢,与之相伴的是,质膜 ATP 酶的活性也降低,从而可以看出质膜 ATP 酶在次生壁形成中具有非常重要的地位。而胞间隙上的 ATP 酶活性有所增强,细胞间的物质运输转移增加,细胞壁物质的运输可能主要通过共质体和质外体两种方式。次生壁形成期细胞间的纹孔、胞间隙 ATP 酶活性的增强,而短细胞质膜上的 ATP 酶活性始终比较高,表明细胞间物质、信息的交流增加。以上研究结果表明短细胞在竹秆继续成熟的过程中可能参与了长细胞次生壁的形成。

3.2 ATP 酶与基本组织细胞的分化

在初生壁形成期,长、短细胞分化,短细胞内的中央大液泡形成较晚,两者的 ATP 酶活性也具有差异。短细胞内液泡膜上的 ATP 酶活性较长细胞的低。中央大液泡最重要的作用可能是增加细胞体积,大部分来自于液泡对水分的吸收。液泡对于维持细胞内环境稳定,缓冲外界环境对植物生长发育的影响等具有重要的作用。蔗糖、多聚糖、有机酸和蛋白质等细胞生长发育所需的物质主要贮存于液泡内。植物液泡参与并调节细胞新陈代谢,控制多种细胞物质的合成、积累和运输^[15]。液泡膜 ATP 酶与物质的吸收或分泌有关,参与了细胞间物质的共质体运输^[16]。短细胞液泡的水解酶类在处于相对不活跃状态,加上液泡膜完整,可能有利于水解酶类的屏蔽,保护细胞不被消化,液泡的吸收和分泌与长细胞相比不是很活跃。而长细胞已经形成中央大液泡,液泡膜有较活跃的 ATP 酶活性,显示这个时期长细胞的液泡吸收和分泌活跃,以上 ATP 酶定位结果同时也说明基本组织长液泡与短细胞液泡功能在初生壁形成期存在明显差异,已经出现分化。这个时期长细胞伸长较快,长细胞液泡 ATP 酶活性较高表现了其

活跃的物质吸收、分泌代谢,保证了快速伸长的细胞壁物质合成和分泌。

对不同年龄竹秆基本组织细胞 ATP 酶进行定位后发现,四年生竹秆中的基本组织长细胞质膜 ATP 酶活性开始降低。细胞的次生壁在 1—4 年期间快速沉积加厚,而五年生的细胞开始,细胞壁加厚的速率降低,合成细胞壁所需的物质、能量有所降低。其质膜 ATP 酶活性降低也反应了长细胞内这种生理代谢状态。短细胞内具有大量的运输小泡,其上较高的 ATP 酶活性,以及纹孔和胞间隙中沉积有大量的 ATP 酶反应物,都表明短细胞与周围细胞间频繁、活跃的物质与信息交流。并且无论生长期还是休眠期,短细胞一直保持较高的 ATP 酶活性,短细胞始终具有活跃的生理代谢活动,尤其是质膜 ATP 酶活性,细胞内保持着旺盛的主动物质吸收和活跃的新陈代谢过程。以前的研究结果也表明竹秆基本组织短细胞与长细胞相比细胞质较浓,结构老化程度低^[1,3-5],这对于维持竹子的多年生生长具有重要意义。短细胞的胞间隙 ATP 酶活性呈极性分布。一般认为胞间隙是物质进行质外体运输的通道,一些研究也表明胞间隙中存在的 ATP 酶参与了细胞物质的质外体运输过程^[10,17]。短细胞与周围细胞间的胞间隙中 ATP 酶活性的不同反映了短细胞与周围细胞进行物质的质外体运输差异,这种差异与短细胞功能之间的关系还有待于深入研究。

参考文献:

- [1] Parameswaran N, Liese W. On the polylamellate structure of parenchyma wall in *Phyllostachys edulis* [J]. IAWA Bulletin, 1975, 4: 57 - 58.
- [2] Liese W, Weiner G. Aging of bamboo culms: A review [J]. Wood Science and Technology, 1996, 30: 77 - 89.
- [3] Parameswaran N, Liese W. Ultrastructural aspects of bamboo cells [J]. Cellulose Chemistry and Technology, 1980, 14: 587 - 609.
- [4] Alivin K L, Murphy R J. Variation in fiber and parenchyma wall thickness in culms of the bamboo *Sinobambusa tootsik* [J]. IAWA Bulletin, 1988, 9: 353 - 361.
- [5] He X Q, Suzuki K, Kitamura S, Lin J X, et al. Toward understanding the different function of two types of parenchyma cells in bamboo culms [J]. Plant Cell Physiology, 2002, 43(2): 186 - 195.
- [6] Pederson P L, Carafoli E. Ion motive ATPases (I): Ubiquity, properties and significance to cell function [J]. Trends in Biochemical Sciences, 1987, 12: 146 - 150.
- [7] 王雅清, Mwangi K K, 崔克明. 杜仲次生木质部细胞分化和脱分化过程中 ATPase 的超微细胞化学定位 [J]. 植物学报, 2000, 42(5): 455 - 460.
- [8] Serrano R. Structure and function of plasma membrane ATPase [J]. One Year old Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1989, 40: 61 - 94.
- [9] Fedorova E, Thomson R, Whitehead L F, et al. Localization of H⁺ - ATPase in soybean root nodules [J]. Planta, 1999, 209: 25 - 32.
- [10] 何才平, 杨弘远. 金鱼草胚珠中 ATP 酶活性的超微细胞化学定位 [J]. 植物学报, 1991, 33(2): 85 - 90.
- [11] Almouzni G, Méchali M. Assembly of spaced chromatin involvement of ATP and DNA topoisomerase activity [J]. EMBO, 1988, 7: 4355 - 4365.
- [12] 田国伟, 申家恒. 小麦胚珠在受精过程中 ATP 酶的超微细胞化学定位 [J]. 植物学报, 1993, 35(5): 329 - 336.
- [13] 王延枝, 斯海文. 植物细胞液泡膜 H⁺ - ATPase 的初步研究 [J]. 武汉大学学报: 自然科学版, 1987(1): 101 - 106.
- [14] 李杉, 刑更妹, 崔凯荣, 等. 植物体细胞胚发生中 ATP 酶活性时空分布动态与内源激素的变化 [J]. 植物学通报, 2001, 18(3): 308 - 317.
- [15] Taiz L. The plant vacuole [J]. Journal of Experimental Biology, 1992, 72: 113 - 122.
- [16] 关和新, 田惠桥, 朱英国, 等. 马协不育花药药隔 ATPase 超微结构定位 [J]. 作物学报, 2000, 26(5): 613 - 620.
- [17] 简令成, 孙龙华, 孙德兰. 小麦穗轴中 ATP 酶活性及物质运输通道的定位与分布及其与小穗发育的关系 [J]. 植物学报, 1983, 25: 313 - 317.