

· 研究简报 ·

甜菊不同叶龄叶片细胞ATPase活性的定位

欧阳学智 谢绍萍

(中山大学孙文学院)

摘 要

在甜菊幼叶细胞中, ATPase活性定位于质膜、液泡、胞间连丝、细胞间隙及细胞壁的某些部位上。成熟叶细胞的液泡ATPase活性增强, 而质膜ATPase活性减弱。当叶片接近衰老时, 除叶绿体片层膜上表现较弱的ATPase活性外, 其它部位的ATPase活性丧失。

关键词 甜菊, ATPase细胞化学定位, 液泡

甜菊 (*Stevia rebaudiana* Bertoni) 是近年来被广泛重视的甜料作物, 其叶片中含有多种低热量、高甜度的甜菊糖苷。甜菊糖苷的含量与叶片的细胞结构及发育状态密切相关, 液泡是甜菊糖苷的主要贮藏场所^[1]。关于质膜、液泡膜ATPase对物质运输与积累的作用已有许多报道^[2,3]。本文应用电镜细胞化学方法观察了甜菊不同叶龄细胞ATPase分布及活性的变化, 以探讨ATPase活性与甜菊苷积累的相关性。

1 材料和方法

甜菊 (*Stevia rebaudiana* Bertoni) 叶片取自厦门大学植物园。从植株上选取下列叶龄的叶片: ①现蕾期幼叶, 顶芽下第2、3对叶片, 呈淡绿色; ②现蕾期成叶, 顶芽下第7、8对叶片, 呈深绿色; ③现蕾期老叶, 顶芽下第11对以下叶片, 呈褐绿色。从不同叶龄的叶片中切取小于0.5mm的小块, 用50mmol/L二甲腈酸钠缓冲液(pH7.2)配制的4%甲醛和2.5%戊二醛混合固定液于4℃下固定75min, 经同样的缓冲液充分洗涤后, 用Tris-maleate缓冲液换洗后, 转入酶反应液中。酶反应液的组成是: 50mmol/L Tris-maleate缓冲液(pH7.0~7.2)中包含2mmol/L 5'-ATP (Sigma产品)、3mmol/L Pb(NO₃)₂、2mmol/L Mg(NO₃)₂。在20℃下温育2h。采用两种对照实验: ①不加底物ATP; ②加入0.01mcu/L氰化钠抑制剂。酶活性反应后, 用50mmol/L二甲腈酸钠缓冲液充分洗涤后, 用同样的缓冲液配制的1%锇酸后固定2h(pH7.2, 4℃), 缓冲液充分洗涤后, 经酒精系列脱水, 环氧丙烷过渡, Epon812包埋, LKB-2088 V型超薄切片机切片。不经染色置JEM-100CX II型透射电镜下观察与照相。

本文1989年9月30日收到

2 观察结果

电镜观察表明,由ATPase活性反应形成的磷酸铅沉淀在细胞内的定位分明,没有出现反应产物扩散的现象。在无底物和加入酶抑制剂的对照样品中没有磷酸铅沉淀物。

幼叶细胞显示出活跃的ATPase活性,其活性反应产生的磷酸铅沉淀主要分布在质膜、液泡膜及液泡内、胞间连丝、细胞间隙及其周围的细胞壁表面。细胞壁上的某些部位及核膜的某些部位也显示酶的活性反应(图版I-1, 2)。在有的叶绿体片层膜上也有酶的活性反映(图版I-1)。

成熟叶细胞中的ATPase活性的分布与强弱,同幼叶细胞比较有较大的变化。由于细胞高度液泡化,一个巨大的中央液泡占据了细胞大部分空间,细胞质成为贴壁的薄层。细胞壁上的ATPase活性丧失,质膜ATPase活性大大减弱,但液泡膜及液泡内的ATPase活性大大增强(图版I-3, 4)。幼叶及成叶细胞的液泡ATPase均有两种存在状态:一种是膜束缚状态,一种是游离状态。

在趋于衰老的叶片中,质膜、液泡膜及液泡内的ATPase活性基本丧失,液泡中的内含物亦大大减少,但在叶绿体片层膜上显示ATPase活性反应。此外,在这些衰老细胞中,还观察到一些ATPase活性反应产生的磷酸铅小颗粒呈扩散状态、非特异地分布于细胞中,这可能是由于细胞衰老、细胞的区域化遭受破坏之故(图版I-5, 6)。

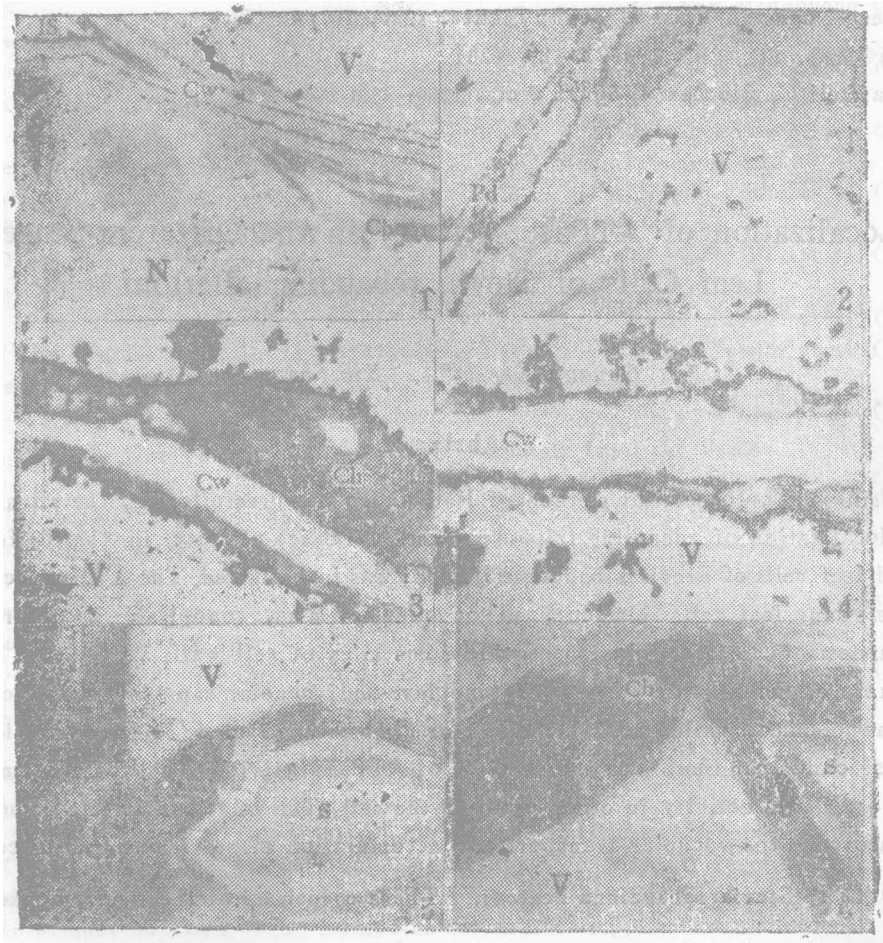
3 讨论

植物细胞的中央液泡是次生产物的主要贮藏场所^[4]。Deus和Zenk^[5]首次证实液泡的高度敏感性与选择性调节机理控制着生物碱通过液泡膜的运输及在液泡中的积累,并进一步证实,液泡对生物碱的运输是逆浓度梯度的主动运输,可能是对环境温度和pH敏感的需能过程^[6]。显然,这种与液泡(很可能是液泡膜)有关的运输与贮藏过程很可能是影响植物次生产物产量的一个重要控制因子。近年来,关于液泡膜ATPase对液泡物质运输与积累的作用已有一些报道,烟草叶片细胞的液泡膜ATPase在吸收与积累尼古丁上起着泵的作用^[2]。简令成等^[7]报道,冬小麦幼苗经低温锻炼时幼叶细胞液泡膜上高ATPase活性形成,与抗寒锻炼中液泡内糖分的积累相关。最近Deus-Neumann和Zenk^[8]用ATPase抑制剂能抑制生物碱的运输,而添加适量的ATP却能大大促进液泡对生物碱的积累。甜菊糖苷是甜菊成熟叶中的主要次生产物,其含量以成熟叶最高,与此相对应的,在成熟叶细胞中,液泡膜与液泡内也表现出高的ATPase活性,其他许多研究及本研究均证实ATPase的活性变化与液泡中的物质积累呈正相关。至于液泡ATPase在甜菊糖苷运输和积累中是直接起着运输载体的作用,还是通过水解ATP提供能量而起着间接的作用,还有待进一步研究。

质膜是细胞间物质交换的必经之道。许多关于ATPase细胞化学定位的研究都指出,ATPase活性广泛地定位于植物细胞的质膜上。我们在甜菊叶片细胞中的观察结果也证实了这一点。质膜上的ATPase一般认为是与质膜的主动运输有关^[8]。此外,在甜菊叶片中,质膜ATPase活性因叶片发育状态的不同而不同,说明ATPase随着细胞生理状态的变化而变化,也表明ATPase活性与多种生理功能有关。幼叶细胞质膜ATPase

活性高, 可能与其生长期活跃的物质交换有关。

甜菊老叶细胞内叶绿体片层膜上显示清晰的ATPase活性反应, 这种片层膜上的ATPase活性反应在幼叶细胞中也偶有见到。筒令成等^[9]在番茄子叶细胞中也观察到可起这样的现象。已经知道, 叶绿体光合磷酸化偶联因子(CF_1)在结合状态下和游离状态下表现出不同的催化功能, 当处于结合态时, 有在光下催化ATP合成的功能, 游离时则ATPase的作用——水解ATP, 而且结合态的 CF_1 在二硫苏糖醇或胰蛋白酶存在时, 也可产生水解ATP的效应^[10]。本文为 CF_1 水解ATP活性提供了超微结构的形象的证据。



图版 I Plate I

- 1~2. 幼叶细胞。1. 磷酸铅沉淀位于质膜、液泡膜、细胞间隙、核膜(箭头)、叶绿体片层, $\times 15000$ 。2. 磷酸铅沉淀位于液泡质膜、胞间连丝, $\times 14000$ 。
 3~4. 成熟叶细胞。在液泡膜及液泡内出现强烈的活性反应, 3. $\times 15000$; 4. $\times 20000$ 。
 5~6. 老叶细胞。5. 叶绿体片层显示ATPase活性反应, $\times 17000$ 。6. 叶绿体片层显示磷酸铅沉淀, 箭头示呈扩展状分布的磷酸铅颗粒, $\times 18000$ 。
 缩写符号: Ch, 叶绿体; Cw, 细胞壁; IS, 胞间连丝; N, 细胞核; Pd, 胞间连丝; S, 淀粉粒; V, 液泡

参 考 文 献

- 1 洪维廉等. 武汉植物学研究, 1987; (5): 211~218
- 2 Saunders J A. Plant Physiol, 1979; 64: 74~78
- 3 Chaffey N J, N Harris. J Exp Bot, 1985; 36: 1612~1619
- 4 Raven J A. New Phytol, 1987; 106: 357~422
- 5 Deus B, M H Zenk. Biotech Bioeng, 1982; 24: 1965~1974
- 6 Deus-Neuman B, M H Zenk. Planta, 1984; 162: 250~260
- 7 简令成等. 植物学报, 1982; 24: 408~412
- 8 Deus-Neumann B, M H Zenk. Planta, 1986; 167: 44~53
- 9 简令成等. 植物学报, 1981; 23: 257~261
- 10 Carmeli C. Biochem Biophys Acta, 1969; 189: 256~266

Localization of ATPase Activity in the Different-Staged Leaf Cells of *Stevia rebaudiana* Bertoni

Ouyang Xuezhi* Xie Shaoping

Abstract

Using the cytochemical method of lead phosphate precipitation, the ultrastructure localization of adenosine triphosphatase (ATPase) activity in the different-staged leaf cells of *Stevia rebaudiana* Bertoni was investigated. The ATPase activity in the young leaf cells was localized on plasmolemma, tonoplast, vacuolar sap, plasmodesmata, intercellular spaces and some sites of cell wall. When the leaves got mature, the ATPase activity in tonoplast and vacuolar sap tended to increase, at plasmolemma, while, markedly reduced or almost inactivated. In the aging leaves, it was found that there was the reaction of ATPase activity in chloroplast lamellae, but no ATPase activity in other parts of the cell. The relationship of the vacuolar ATPase with the vacuolar transport and accumulation of stevioside was discussed.

Keywords *Stevia rebaudiana* Bertoni, ATPase cytochemical localization, vacuole

• Sunwen College, Zhongshan University