

水分胁迫对抗旱性不同的荔枝叶片细胞壁 H^+ -ATPase 活性的影响

陈立松, 刘星辉

(福建农业大学园艺系, 福建 福州 350002)

摘要: 以抗旱性较强的荔枝东刘1号和抗旱性较弱的陈紫1-2年生盆栽实生幼苗为试验材料, 研究了水分胁迫对荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 叶片细胞胞质以及以离子键和共价键与细胞壁结合的 H^+ -ATPase 活性的影响。结果表明: (1) 叶片相对含水量随水分胁迫程度的增加而减少, 抗旱性强的东刘1号下降的幅度小于抗旱性弱的陈紫。(2) H^+ -ATPase 在细胞中的分布是: 细胞胞质 H^+ -ATPase 占绝大多数, 其次是共价键结合 H^+ -ATPase, 离子键结合 H^+ -ATPase 最少, 品种间差异不明显。(3) 在水分胁迫下, 荔枝叶片 H^+ -ATPase 活性 (比活性) 均上升, 抗旱性强的品种上升的幅度均大于抗旱性弱的品种。

关键词: 荔枝; 水分胁迫; H^+ -ATPase; 细胞壁

中图分类号: Q946.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-3395(2001)02-0149-05

EFFECTS OF WATER STRESS ON CELL WALL H^+ -ATPase ACTIVITY IN LEAVES OF *LITCHI CHINENSIS* SONN. WITH DIFFERENT DROUGHT-RESISTANCES

CHEN Li-song, LIU Xing-hui

(Department of Horticulture, Fujian Agricultural University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: One to 2-year-old seedlings of two lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) cultivars (drought-sensitive Chenzi and drought-resistant Dongliu 1) were planted in pots by moisture stress and normal watering to determine the relative water content (RWC) and the H^+ -ATPase activities in leaves. The effects of water stress on (specific) activity of cytoplasmic, ionically and covalently wall-bound H^+ -ATPase in leaves were studied. The results showed that RWC in leaves decreased with increasing water stress, but such decrease was less in drought-resistant cultivar than in drought-sensitive one. The activities of cytoplasmic, covalently wall-bound and ionically wall-bound H^+ -ATPase were 81.80%–83.15%, 11.48%–12.30% and 5.37%–5.90% of the total H^+ -ATPase activity, respectively. No significant difference was observed between two cultivars. Under water stress, the (specific) activities of cytoplasmic, ionically wall-bound and covalently wall-bound H^+ -ATPase in leaves increased. The extent of increase was higher in drought-resistant cultivar than in drought-sensitive one.

Key words: *Litchi chinensis*; Water stress; H^+ -ATPase; Cell wall

有关植物体内 ATPase 活性与水分胁迫的关系已有一些报道,但大多集中于线粒体、叶绿体等细胞器或质膜上^[1-3]。对水分胁迫下细胞壁 ATPase 活性变化的报道甚少。荔枝是环境适应性较差的亚热带果树之一,经常遭受土壤干旱的影响^[4]。即使在华南,仍遭受季节性干旱的影响。我们已对水分胁迫下,荔枝叶片活性氧代谢、氮代谢、核酸代谢和细胞器中 ATPase 活性的变化进行了研究^[5-7]。在此基础上,研究了水分胁迫对抗旱性不同的荔枝叶片细胞壁 H⁺-ATPase 活性的影响,旨在为荔枝抗旱机理的研究提供基础资料,并为抗旱品种的选育和山地高产优质栽培提供科学依据。

1 材料和方法

材料的培养 试验于 1996-1997 年在福建农业大学完成。试验材料为 1-2 年生实生荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 幼苗,试验品种为适应山地栽培的抗旱性较强的东刘 1 号和适应河边栽培的抗旱性较弱的陈紫。试验品种种植在花盆内,花盆口径 25 cm,高 20 cm,内装经打碎的冲积砂壤土 5 kg,每盆种植 1 株小苗,每品种种植 150 盆。定时供水,以保持每盆供水和盆内土壤湿度的一致性。

水分胁迫处理 水分胁迫处理在 7-9 月进行。处理时每品种取出 24 盆生长整齐一致有代表性的幼苗,其中 12 盆停止浇水,另 12 盆正常浇水作为对照。当植株出现中度缺水和严重缺水症状时,分别取样进行测定。叶片相对含水量减低 10%-20% 属中度缺水,20% 以上的属严重缺水^[6]。

取样方法 采样在早晨 7:30-8:30 进行,试样均取自小苗顶端第 2-4 片复叶(从上往下数)(叶龄约 50 d)。

叶片相对含水量的测定 按文献[7]进行。

H⁺-ATPase 的提取与活性测定 参照丁宝莲等^[8]的方法。1 g 样品加入适量预冷的 50 mmol/L, pH7.4 Tris-HCl 缓冲液,在冰浴中研磨成匀浆,于 15 000 ×g 下离心 20 min,上清液即为胞质部分;沉淀经 2% Triton X-100 和无离子水反复冲洗后,用 1 mol/L NaCl 增溶并于 25 °C 下保温过夜,15 000 ×g 下离心 20 min,上清液用于离子键结合蛋白及酶活性的测定;沉淀经 1 mol/L NaCl 反复洗涤后,用含 0.5% 纤维素酶和 2.5% 果胶酶的 0.1 mol/L, pH5.6 的醋酸缓冲液增溶并于 25 °C 保温过夜,15 000 ×g 下离心 20 min,上清液用于共价键结合酶类的测定。H⁺-ATPase 活性的测定按刘祖祺等^[9]的方法进行。

蛋白质含量的测定 依 Bradford^[10]的方法测定,用牛血清蛋白作标准曲线。

2 结果和分析

2.1 水分胁迫对荔枝叶片相对含水量的影响

表 1 表明,在正常浇水条件下,2 个品种间叶片相对含水量差异不显著。在水分胁迫下,叶片相对含水量极显著下降,且品种间差异明显,抗旱性较强的东刘 1 号下降的幅度明显小于抗旱性较弱的陈紫。

表1 水分胁迫对荔枝叶片相对含水量的影响
Table 1 Effects of water stress on relative water content (RWC) in lychee leaves

		水分胁迫	相对含水量 RWC (%)	
		Water stress	陈紫 Chenzi	东刘1号 Dongliu 1
中度 Moderate	对照 Control		84.98 ± 0.92aA	85.03 ± 1.14aA
	处理 Treatment		68.00 ± 2.15bB	73.50 ± 0.93bB
	相对差异 Relative difference (%)		-19.98	-13.56
严重 Severe	对照 Control		85.12 ± 0.76aA	86.04 ± 1.80aA
	处理 Treatment		45.60 ± 1.91cC	54.23 ± 0.78cC
	相对差异 Relative difference (%)		-46.43	-36.97

同一栏字母不同者为差异显著, 大小写字母分别表示 $p=0.01$ 和 $p=0.05$ 的显著水平。
Values in a column followed by the same capital or small letter are not significantly different from each other at $p=0.01$ or $p=0.05$ levels, respectively.

2.2 水分胁迫对荔枝叶片 H⁺-ATPase 活性的影响

H⁺-ATPase 在荔枝叶片细胞中的分布 如表2所示, 在荔枝叶片中, H⁺-ATPase 主要存在于细胞胞质中, 占总活性的 81.80%—83.15%, 其次是共价键结合 H⁺-ATPase, 占 11.48%—12.3%, 离子键结合 H⁺-ATPase 活性最低, 仅占 5.37%—5.90%, 品种间差异不明显。

表2 荔枝叶片中 H⁺-ATPase 的分布
Table 2 Distribution of H⁺-ATPase in lychee leaves

分布 Distribution	陈紫 Chenzi		东刘1号 Dongliu 1	
	H ⁺ -ATPase 活性 H ⁺ -ATPase activity (nmol Pi g ⁻¹ DW h ⁻¹)	占总活性的 % % of total activity	H ⁺ -ATPase 活性 H ⁺ -ATPase activity (nmol Pi g ⁻¹ DW h ⁻¹)	占总活性的 % % of total activity
	胞质 Cytoplasmic	498.42 ± 13.69aA	81.80	567.37 ± 14.36aA
离子键结合 Ionically wall-bound	35.94 ± 1.06bB	5.90	36.65 ± 0.79bB	5.37
共价键结合 Covalently wall-bound	74.97 ± 1.12bB	12.30	78.31 ± 1.97bB	11.48

H⁺-ATPase 比活性的变化 从表3可知, 水分胁迫下荔枝叶片胞质 H⁺-ATPase 和离子型 H⁺-ATPase 比活性均显著上升, 抗旱性较强的品种上升的幅度显著大于抗旱性较弱的品种。相关分析表明, 离子键结合 H⁺-ATPase 比活性的升高与胞质 H⁺-ATPase 比活性的升高呈显著正相关 [$y(\text{离子键结合 H}^+\text{-ATPase 比活性}) = 6.361x(\text{胞质 H}^+\text{-ATPase 比活性}) - 1.347, r = 0.979^{**}, DF = 6$ 。下同]。

H⁺-ATPase 活性的变化 荔枝叶片 H⁺-ATPase 活性的变化如表3。水分胁迫下, 荔枝叶片胞质 H⁺-ATPase、离子键结合 H⁺-ATPase 和共价键结合 H⁺-ATPase 活性均上升。抗旱性较强的东刘1号上升的幅度显著大于抗旱性较弱的陈紫。在中度水分胁迫下, 抗旱性较强的东刘1号三者均显著高于对照, 而抗旱性较弱的陈紫只有共价键结合 H⁺-ATPase 活性显著高于对照, 胞质 H⁺-ATPase 和离子键结合 H⁺-ATPase 活性虽有上升, 但与对照差异不显著。严重水分胁迫下, 荔枝叶片细胞壁 H⁺-ATPase 活性继续上升, 抗旱性较强的品种胞质 H⁺-ATPase、离子键结合 H⁺-ATPase 和共价键结合 H⁺-ATPase 活性仍均显著高于抗旱性较弱的品种。相关分析表明, 离子键结合 H⁺-ATPase 活性和共价键结合 H⁺-ATPase 活性的升高都与胞质 H⁺-ATPase

比活性的升高呈显著正相关 [$y(\text{离子键结合 H}^+\text{-ATPase 活性}) = 0.066x(\text{胞质 H}^+\text{-ATPase 活性}) + 1.783, r = 0.928^{**}, DF = 6; y(\text{共价键结合 H}^+\text{-ATPase 活性}) = 0.073x(\text{胞质 H}^+\text{-ATPase 活性}) + 39.571, r = 0.934^{**}, DF = 6$].

表3 水分胁迫对荔枝叶片 H⁺-ATPase 活性的影响
Table 3 Effects of water stress on H⁺-ATPase activities in lychee leaves

水分胁迫 Water stress			比活性 Specific activity (nmol Pi mg ⁻¹ protein h ⁻¹)		活性 Activity (nmol Pi g ⁻¹ DW h ⁻¹)	
			陈紫 Chenzi	东刘1号 Dongliu 1	陈紫 Chenzi	东刘1号 Dongliu 1
胞质 Cytoplasmic	中度 Moderate	对照Control	8.56 ± 0.14aA	9.12 ± 0.14aA	489.76 ± 8.01aA	559.26 ± 8.83aA
		处理Treatment	9.77 ± 0.10bA	11.46 ± 0.13bB	520.64 ± 5.60aA	679.13 ± 7.76bB
		相对差异 (%) Relative difference	+14.10	+25.63	+6.30	+21.43
	严重 Severe	对照Control	8.36 ± 0.11aA	9.58 ± 0.10aA	507.08 ± 6.73aA	575.48 ± 6.19aA
		处理Treatment	11.99 ± 0.15cB	15.06 ± 0.20cC	576.21 ± 7.33bA	813.73 ± 10.65cC
		相对差异 (%) Relative difference	+43.42	+57.19	+13.63	+41.40
离子键结合 Ionically wall-bound	中度 Moderate	对照Control	54.31 ± 1.12aA	57.03 ± 0.61aA	35.72 ± 0.74aA	37.00 ± 0.40aA
		处理Treatment	61.62 ± 1.03bAB	68.15 ± 0.81bB	37.88 ± 0.63aA	42.02 ± 0.50bA
		相对差异 (%) Relative difference	+13.46	+19.49	+6.10	+13.55
	严重 Severe	对照Control	55.70 ± 0.96aA	56.17 ± 1.06aA	36.17 ± 0.62aA	36.30 ± 0.69aA
		处理Treatment	71.95 ± 1.22cB	98.02 ± 1.73cC	41.98 ± 0.71bA	58.57 ± 1.03cB
		相对差异 (%) Relative difference	+29.18	+74.50	+16.08	+61.36
共价键结合 Covalently wall-bound	中度 Moderate	对照Control			74.81 ± 1.42aA	77.39 ± 1.53aA
		处理Treatment			81.91 ± 1.12bA	88.40 ± 1.83bAB
		相对差异 (%) Relative difference			+9.50	+14.23
	严重 Severe	对照Control			75.12 ± 1.29aA	79.20 ± 1.26aA
		处理Treatment			86.94 ± 2.06bA	99.78 ± 1.24cB
		相对差异 (%) Relative difference			+15.73	+25.98

同一酶同一栏内字母不同者为差异显著, 大小写字母分别表示 $p=0.01$ 和 $p=0.05$ 的显著水平。Values in a column for the same enzyme followed by the same capital or small letter are not significantly different from each other at $p=0.01$ or $p=0.05$ levels, respectively.

3 讨论

ATPase 在生物体内有着广泛的分布, 它与生物体内的新陈代谢活动及外部环境条件有着密切的关系。通常, 在水分胁迫下, 能够维持较高 ATPase 活性的品种, 其抗旱性也较强^[3,11]。我们发现, 水分胁迫下荔枝叶片胞质及以离子键和共价键与细胞壁结合的 H⁺-ATPase 活性 (比活性) 均上升, 且品种间差异明显, 抗旱性较强的东刘1号上升的幅度明显高于抗旱性较弱的品种。这也与前人的研究结果一致^[3]。但蒋选利等^[12]通过细胞化学定位的方法对不同抗旱性的小麦品种

进行不同程度的渗透胁迫处理时发现, 在轻度胁迫下, 抗旱性较弱的品种在细胞壁显示出 ATPase 活性(对照无), 在中度胁迫下, 抗旱性较强的品种细胞壁显示出 ATPase 活性, 抗旱性较弱的品种 ATPase 活性消失。在重度胁迫下, 抗旱性较强的品种 ATPase 活性亦消失。这看来, 水分胁迫下 ATPase 活性的变化与植物的种类、品种及胁迫的强度有关。

H⁺-ATPase 是细胞 Na⁺/H⁺、K⁺/H⁺ 等交换的主要能量来源^[9]。Guy^[10] 等的研究指出, ATPase 对蔗糖的吸收和积累起着泵的作用, 使蔗糖在细胞中累积起来, ATPase 活性越高, 蔗糖累积越多。水分胁迫下荔枝叶片 H⁺-ATPase 活性的提高, 可能有利于更多的糖分和其它物质, 运输并累积在细胞质和液泡中, 从而降低细胞水势。简令成等^[13] 研究发现, 番茄子叶细胞间隙中具有大量内含物, 并类似子叶内的贮藏物质, 同时其中的 ATPase 活性很高, 认为子叶细胞间隙可能担负着物质运输的功能。水分胁迫下细胞壁 H⁺-ATPase 活性的提高可能有利于细胞隙的运输。Paljakoff-Mayber^[17] 在甜菜干旱试验中证明, 叶片失水较多时, 叶绿体的光合磷酸化明显降低, 同时 ATPase 活力增加, 这可能是脱水引起叶绿体膜蛋白发生变化, 抑制了光合磷酸化作用而导致 ATPase 增加。基于上述结果, 我们认为水分胁迫下, ATPase 活性的提高, 可弥补水分胁迫下因光合磷酸受抑而引起的能量不足, 有利于细胞正常功能的维持及细胞内和细胞间隙的物质运输, 有利于荔枝的抗旱。

参考文献:

- [1] 王洪春, 李锦树. 干旱对玉米 Mg²⁺-ATP 酶活力的影响 [J]. 植物生理学报, 1985, 11:130-137.
- [2] 宋松泉, 傅家瑞. 植物质膜 H⁺-ATPase 的研究进展 [J]. 植物生理学通讯, 1993, 29:130-136.
- [3] 陈立松, 刘星辉, 胡又厘, 等. 水分胁迫对荔枝实年幼苗叶片质膜透性和各细胞器中 Na⁺-K⁺ATPase 活性的影响 [J]. 热带作物学报, 1998, 19(1):58-63.
- [4] 陈立松, 刘星辉. 水分胁迫对荔枝叶片氮和核酸代谢的影响及其与抗旱性的关系 [J]. 植物生理学报, 1999, 25(1):49-56.
- [5] 陈立松, 刘星辉. 水分胁迫对荔枝叶片活性氧代谢的影响 [J]. 园艺学报, 1999, 25(1):241-246.
- [6] Hsiao T C. Plant responses to water stress [J]. Ann Rev Plant Physiol, 1973, 24:519-570.
- [7] 华东师范大学植物生理教研组. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1980, 2-5.
- [8] 丁宝莲, 沈曾佑, 张志良, 等. 烟草叶肉细胞壁过氧化物酶同工酶的研究 [J]. 植物生理学报, 1982, 8:127-133.
- [9] 刘祖祺, 张石城. 植物抗性生理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1994, 372-374.
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72:248-254.
- [11] 汪沛港, 吕金印. 利用生物超弱发光鉴定抗旱性小麦品种初报 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17(5):399-400.
- [12] 蒋选利, 汪沛洪, 胡东维, 等. 渗透胁迫下不同小麦品种叶肉细胞内 ATP 酶的细胞化学研究 [J]. 干旱地区农业研究, 1994, 12(1):97-101.
- [13] 简令成, 董合铸, 孙龙华. 番茄子叶细胞内三磷酸腺苷酶活性的超微结构定位及其在冷害中的变化 [J]. 植物学报, 1981, 23:258-261.
- [14] Hassery H, Valamanesh A. Membrane ATPase activity of barley root and potassium uptake by isolated stele and cortex [J]. Physiol Plant, 1978, 42:428-434.
- [15] Gilder J, Cronshaw J. Adenosine triphosphatase in the phloem of *Cucurbita* [J]. Planta, 1973, 110:189-204.
- [16] Guy M, Reinhold L, Michael D. Direct evidence for a sugar transport mechanism in isolated vacuoles [J]. Plant Physiol, 1979, 64:61-64.
- [17] Paljakoff-Mayber A. Ultrastructural consequences of drought [A]. In: Paleg L G, Aspinall D. Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants [M]. New York: Academic Press, 1981, 389-403.