中国生态农业学报(中英文)
Chinese Journal of Eco-Agriculture
中文核心期刊
中国科技核心期刊
中国精品科技期刊
百种中国杰出学术期刊
中国科学引文数据库源刊

棉花根系和叶片质外体汁液分离方法的改进

王果，冯康，李倩，薛惠云，李丽杰，张志勇

引用本文:
王果, 冯康, 李倩, 等. 棉花根系和叶片质外体汁液分离方法的改进[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2020, 28(6): 852–859.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.200092

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

白菜型冬油菜质外体抗冻蛋白研究

Study on apoplast anti–freeze proteins in winter turnip rape (Brassica rape L.)

中国生态农业学报. 2016(2): 210–217 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.151113

基于动态规划理论的棉花根长生长模拟方法

Simulation method of cotton root length growth based on dynamic programming theory

中国生态农业学报. 2016(1): 56–63 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.150820

2,4–表油菜素内酯对NaCl胁迫下紫花苜蓿幼苗根系生长抑制及氧化损伤的缓解效应

2,4–epibrassinolide protection aginestrootgrowth inhibition and oxidative damage ofMedicago sativa L. seedling under NaCl stress

中国生态农业学报. 2015(8): 1010–1019 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.150411

不同施氮量下干旱胁迫对棉花生长及种内关系的影响

Effects of drought stress on cotton growth and intraspecific relationship under different nitrogen application rates

中国生态农业学报(中英文). 2020, 28(5): 643–651 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.190791

施氮和干湿灌溉对水稻抽穗期根系分泌有机酸的影响

Coupling effect of alternate wetting and drying irrigation and nitrogen rate on organic acid in rice root secretion at heading stage

中国生态农业学报. 2018, 26(4): 516–525 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.170803

中国生态农业学报(中英文) 2020 年 6 月 第 28 卷 第 6 期
Chinese Journal of Eco-Agriculture, Jun. 2020, 28(6): 852−859

DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.200092

王果, 冯康, 李倩, 薛惠云, 李丽杰, 张志勇. 棉花根系和叶片质外体汁液分离方法的改进[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2020, 28(6): 852−859

WANG G, FENG K, LI Q, XUE H Y, LI L J, ZHANG Z Y. Improved methods for separating apoplastic washing fluid from roots and leaves in cotton seedlings[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2020, 28(6): 852−859

棉花根系和叶片质外体汁液分离方法的改进*

王 果, 冯 康, 李 倩, 薛惠云, 李丽杰, 张志勇**

(河南科技学院/河南省现代生物育种协同创新中心/河南省棉麦分子生态和种质创新重点实验室 新乡 453003)

摘 要: 质外体汁液(apoplastic washing fluid, AWF)在植物生长发育和抵抗生物及非生物逆境方面发挥着重要作用。目前普遍采用真空渗透离心法提取质外体汁液, 但具体提取流程和条件却因植物培养条件、种类和器官等不同而不同。本试验以营养液培养的棉花幼苗为材料, 改进了棉花根系和叶片 AWF 分离的取样方法、渗透条件和离心参数等。结果表明, 相对于通常的非整体取样, 改良后整体取样简单易操作且显著降低了质外体与共质体的苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)活性比值, 更适宜开展质外体汁液组分研究。根据真空渗透鲜重增加和 AWF 稀释因子, 进一步证明根系不用真空渗透; 而叶片需真空渗透, 适宜真空强度/时间为 –60 kPa/1 min, 真空后恢复到正常压强约 110 s。证明叶片颜色变深面积可作为判定真空渗透强度或时间是否适宜的一种简易可行方法。最后, AWF 体积、质外体与共质体的可溶性蛋白含量比值和 MDH 活性比值综合分析表明, 棉花根系适宜离心力大小/时间长度为 800 ×g/10~20 min, 叶片为 400 ×g/5 min。本改进方法为棉花 AWF 组分, 如蛋白质组学和代谢组学等研究结果的准确性和可靠性奠定了基础, 为其他作物 AWF 分离方法的优化提供了参考。

关键词: 棉花; 苹果酸脱氢酶; 真空渗透; 离心; 共质体; 质外体

中图分类号: S311 开放科学码(资源服务)标识码(OSID):

Improved methods for separating apoplastic washing fluid from roots and leaves in cotton seedlings*

WANG Guo, FENG Kang, LI Qian, XUE Huiyun, LI Lijie, ZHANG Zhiyong**

(Henan Institute of Science and Technology / Henan Collaborative Innovation Center of Modern Biological Breeding / Henan Key Laboratory for Molecular Ecology and Germplasm Innovation of Cotton and Wheat, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Apoplast washing fluid (AWF) contains minerals, metabolites, and proteins that plays an important role in plant growth and development, as well as provides biotic and abiotic stress resistance. AWF extraction is the basis of exploring the function of AWF constituents. It is generally performed via vacuum infiltration-centrifugation technique; which varies in processes and detailed parameters depending on the plan species, organs, and culture conditions. Hydro-cultured cotton seedlings were used to investigate AWF separation processes and parameters suitable for cotton root and leaf development, and further improve methods for cotton root or leaf AWF separation. Compared with traditionally split sampling (i.e., splitting samples into segments or pieces), sampling a complete unit was simple and significantly decreased the ratio of malate dehydrogenase (MDH) activity in AWF to symplast washing

* 国家自然科学基金项目(31571600)资助
** 通信作者: 张志勇, 主要研究方向为作物逆境生理。E-mail: z_zy123@126.com
王果, 主要研究方向为质外体代谢组学和蛋白质组学。E-mail: 18336063077@163.com
收稿日期: 2020-02-17 接受日期: 2020-04-09
* This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31571600).
** Corresponding author, E-mail: z_zy123@126.com
Received Feb. 17, 2020; accepted Apr. 9, 2020

fluid (SWF), which usually is used to affirm the degree of AWF substances polluted by SWF; indicating that AWF components would better to examine. Furthermore, the fresh weight increments and the AWF diluting factor after vacuum infiltration of the roots had no significant change, but significantly increased in the leaves. This indicates that vacuum infiltration is only essential for leaves, with a vacuum strength/time at –60 kPa/1 min, and about 110 s recovery from vacuum to normal atmospheric pressure. Leaf areas with dark color increased with vacuum intensity or time, which could be used as a simple indicator for determining the suitability for AWF separation. Finally, comprehensive analyses of the AWF volume, soluble protein content ratio and MDH activity ratio of AWF to SWF indicated that the suitable centrifuge forge/time was 800 ×g /10–20 min for the root, and 400 ×g /5 min for the leaf. This refined and optimized method will lay down the foundation for efficient study of AWF components such as the accuracy and reliability of proteomics and metabolomics. The approach towards establishing this method should allow it to be generally applicable to other plants.

Keywords: Cotton; Malate dehydrogenase; Vacuum infiltration; Centrifuge; Symplast; Apoplast

高等植物的质外体是指细胞膜以外的空间，包括细胞壁、细胞间隙和分化成熟的木质部，这些空间中流动的液体称为质外体汁液(apoplastic washing fluid，AWF)。质外体汁液中含有蛋白质、代谢物和矿质元素等[1-3]。AWF 成分对细胞分裂、伸长和分化以及信号转导有重要影响，参与了对生物和非生物胁迫的响应[4-8]。研究 AWF 无机离子、代谢物和蛋白质等物质组成和功能的首要步骤是获得不被或很少被共质体(symplast)离子、代谢物和蛋白质污染的 AWF。获取 AWF 的方法有压力法、洗脱法、微透析法、滤纸条法和真空渗透离心法等。压力法是利用压力室将根系或叶片 AWF 经由茎或叶柄压出来，获得的是木质部汁液[9-10]；洗脱法需先将叶片表皮层揭掉，再洗脱获得 AWF[11]；微透析法需将微透析工具植入根系或叶片中获得 AWF，但该方法获得的 AWF 中不含蛋白质[12]；滤纸条法是用滤纸条吸附根系分泌的 AWF[13]；真空渗透离心法或离心法是先真空渗透进去一部分液体再离心或不经过真空渗透直接离心获得 AWF[14]。真空渗透离心法具有简单、高效和重现性好等特点，研究 AWF 蛋白质组时，真空渗透离心法被广泛采用[1,15-20]。

因植物种类和器官等不同，可采用真空渗透离心法或直接离心法获得 AWF，并且真空渗透或离心时间、强度等参数也不尽相同。研究人员针对特定植物特定器官分别建立了不同的 AWF 分离流程，如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)叶片[21]、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)叶片[2]、水稻(*Oryza sativa*)叶片[17]、西红柿(*Solanum lycopersicum*)叶片[22]及水稻根系[23]等，用于研究 AWF 中的蛋白质组和代谢物等。将真空渗透离心法或直接离心法用于棉花(*Gossypium hirsutum*)根系和叶片 AWF 分离的研究尚少见报道。本研究以营养液培养的棉花幼苗为材料，分别研究棉花根系和叶片分离 AWF 时的适宜取样方法、真空渗透的必要性和相关参数及离心力的大小和时间等，为研究棉花根系和叶片 AWF 蛋白质组和代谢物组在生长发育和响应生物或非生物逆境方面的作用奠定基础。

1　材料与方法

1.1　培养方法

选用美国孟山都公司的棉花品种‘DP99B’为材料。当种子萌发 3 d 时，选取整齐一致的幼苗移栽至营养液中培养。营养液组成为：2.5 mmol·L^{-1} $Ca(NO_3)_2$，2.5 mmol·L^{-1} KCl，1 mmol·L^{-1} $MgSO_4$，0.5 mmol·L^{-1} $NH_4H_2PO_4$，2 mmol·L^{-1} NaCl，2×10^{-4} mmol·L^{-1} $CuSO_4$，1×10^{-3} mmol·L^{-1} $ZnSO_4$，0.1 mmol·L^{-1} EDTA-FeNa，2×10^{-2} mmol·L^{-1} 的 H_3BO_3，5×10^{-6} mmol·L^{-1} $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 和 1×10^{-3} mmol·L^{-1} $MnSO_4$。幼苗培养时的光照强度为 350 μmol·m^{-2}·s^{-1}，光照/黑暗时间为 14 h/10 h，昼/夜温度为 30 ℃/25 ℃，相对湿度为 45%。每隔 3 d 更换 1 次营养液，培养 9 d 后，分别取棉花的根系和子叶进行 AWF 分离过程中取样方法、真空渗透和真空渗透适宜度判定方法等方面的改进。

1.2　取样方法

1.2.1　根系取样方法

使用解剖刀在根茎交界处切断；根系放入蒸馏水中轻轻冲洗 2 次(洗去根系表面的营养液和切口破碎细胞)；用吸水纸蘸干表面水分后，单株根系称重备用，定义为根系整体取样；将蘸干表面水的根系用解剖刀将根系切成 1 cm 根段后，放入蒸馏水中清洗 3 次(洗去切口破碎细胞)，并用吸水纸蘸干表面水分后，立刻称重备用，定义为根系非整体取样。

1.2.2　子叶取样方法

用解剖刀在两片子叶与叶柄交界处切断；叶片放入蒸馏水中轻轻冲洗 2 次(洗去切口破碎细胞)；用吸水纸蘸干表面水分后，完整子叶直接称重备用，作为整体备用定义为叶片整体取样；蘸干水的叶片用内直径为 1 cm 的打孔器避开主叶脉进行打孔，将获得的圆形叶片，放入蒸馏水中清洗 3 次(洗去切口破

碎细胞)后, 立刻称重备用, 定义为叶片非整体取样。

1.3 真空渗透和离心收集 AWF

真空渗透: 样品分别立即浸入盛有渗透液(50 mmol·L^{-1}、pH 6.9 的磷酸缓冲液)的小烧杯中, 烧杯放入底部盛满碎冰的真空压力室中, 抽真空, 用滤网捞出样品, 轻轻蘸干表面水分, 立刻称重。

离心: 将非整体样品分别放入 10 mL 底部有 3 个 1 mm 孔径的离心管中, 然后将 10 mL 的离心管放入 30 mL 的大离心管; 根系和叶片整体样品分别从根尖开始在 5 mL 枪头的枪尖上向上缠绕和用 Parafilm 封口膜将叶片固定在 5 mL 枪头上, 枪头尖朝下(样品切口朝上)放入被扎有两个 1 mm 孔径和注射器头呈等腰三角形孔的 20 mL 注射器中, 然后将注射器放在 50 mL 离心管中。样品准备好后, 在 4 ℃条件下离心, 分别收集位于外部 30 mL 和 50 mL 离心管底部的液体即 AWF。

1.4 共质体汁液(symplast washing fluid, SWF)提取

将分离过 AWF 的根系去除主根、子叶去除主叶脉后进行研磨, 用 100 mmol·L^{-1} 含 1 mmol·L^{-1} EDTA-Na_2 和 1% PVPP 的磷酸缓冲液(pH7.5)浸提, 4℃条件下, 15 000 ×g 离心 20 min, 取上清液即 SWF。

1.5 相对电导率、可溶性蛋白质含量和苹果酸脱氢酶(Malate dehydrogenase, MDH)活性测定和比值计算

相对电导率的测定参考 Lutts 等[24]的方法; 可溶性蛋白测定采用考马斯亮蓝法[25]; MDH 活性测定采用草酰乙酸法[16], 活性定义为 OD_{340nm}·min^{-1}·g^{-1} (FW)。分别测定 AWF 和 SWF 的可溶性蛋白质含量和 MDH 活性后, AWF 中可溶性蛋白质含量与 SWF 中可溶性蛋白质含量的比值简称为可溶性蛋白质含量比值, AWF 中 MDH 活性与 SWF 中 MDH 活性的比值简称 MDH 活性比值。

1.6 AWF 稀释因子测定

AWF 稀释因子反映了根系或叶片质外体空间被气体所占据的空间大小。如果气体占据空间大, 抽真空时空气会从根系中出来, 渗透液中的水和标记物, 如靛蓝会进入质外体空间。真空渗透进去的水可以更充分地溶解质外体空间中的物质, 利于研究质外体空间代谢物和蛋白质组成和种类。反映了样品在分离质外体汁液前是否需要真空渗透。AWF 稀释因子测定参照 O'Leary 等的方法[2]。将样品放入含 50 μmol·L^{-1} 靛蓝二磺酸钠的水溶液或磷酸缓冲液(50 mmol·L^{-1}, pH 6.9)中真空渗透。叶片真空渗透时呈现 50%左右不均匀的叶色变深, 叶片比较坚挺, 定义为半绿; 呈现 90%~100%叶色变深, 叶片比较坚挺, 定义为全绿; 全部叶色变深, 且叶片变的柔软时, 定义为过绿。真空渗透后的样品离心(4 ℃, 800 ×g, 20 min)分离 AWF。测定真空渗透前的靛蓝二磺酸钠溶液的 OD_{610nm} 值($OD_{610\ 渗透液}$)和 AWF 的 OD_{610nm} 值(OD_{610AWF})。AWF 稀释因子= $OD_{610\ 渗透液}$/($OD_{610\ 渗透液}$–OD_{610AWF})。

1.7 数据分析

采用 SAS 软件的 ANOVA t-test 或 LSD 对测定指标进行比较。利用 Excel 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 整体与非整体取样方式之间 AWF 相关指标的比较

根系非整体取样方式的 AWF 体积、可溶性蛋白含量比值、MDH 活性比值和相对电导率均高于整体取样的方式, 且在可溶性蛋白含量比值和 MDH 活性比值方面达显著水平, 分别是整体取样方式的 3.1 倍和 4.6 倍(表 1)。叶片非整体取样方式的 AWF 体积、可溶性蛋白含量比值、MDH 活性比值和相对电导率均显著高于整体取样方式, 分别是整体取样方式的 1.6 倍、6.0 倍、9.9 倍和 6.0 倍(表 1)。结果表明, 非整体取样获得的 AWF 更容易受到 SWF 成分的污染。

2.2 棉花根系和叶片真空渗透后的鲜重和 AWF 稀释因子

棉花根系在真空渗透液 A 和 B 真空渗透后, 鲜重均有很小幅度的下降, 稀释因子略微大于 1, 且两者之间的增重和稀释因子均无显著差异(表 2)。棉花叶片在真空渗透后, 增重幅度为 31.50%~41.41%, 稀释因子为 2.12~3.34, 且随着渗透时间的增加, 增重量和稀释因子显著增加, 并且在渗透 2 min 时, 真空渗透液 A 的样品增重和稀释因子显著高于真空渗透液 B。稀释因子大于 1 则说明 AWF 被稀释了, 即有抽真空渗透的必要; 如果约等于 1, 则说明 AWF 没被稀释, 则没抽真空的必要。和增重与稀释因子趋势一致的是, 随着真空渗透时间延长, 叶片颜色变深的面积增大(图 1)。结果表明, 在该试验条件下, 用根系分离 AWF 时没必要进行真空渗透, 而叶片有必要进行真空渗透。

2.3 棉花叶片真空渗透时的真空强度和时间及真空后恢复正常压强所需时间

–60 kPa 条件下, 棉花叶片 AWF 体积和可溶性蛋白含量比值均显著高于–30 kPa 和–90 kPa 条件下的相应值, 并且 MDH 活性比值与–90 kPa 条件下相比没差异(表 3)。棉花叶片在–60 kPa 下随着真空时间延长, 叶片颜色变深面积增大, 颜色变深面积达

表 1　棉花幼苗根系和叶片不同取样方式的 AWF 体积、可溶性蛋白含量比值、MDH 活性比值及相对电导率

Table 1　AWF volume, ratios of soluble protein content and MDH enzyme activity in AWF to SWF and relative conductivity under sampling methods of organ segments and whole organ of cotton seedlings

器官 Organ	取样方式 Sampling method	真空强度/时间和离心力/时间 Vacuum intensity/time and centrifugal force/time	AWF 体积 AWF volume [μL·g^{-1}(FW)]	可溶性蛋白含量比值 Soluble protein content ratio (%)	MDH 活性比值 MDH enzyme activity ratio (%)	相对电导率 Relative electric conductivity (%)
根系 Root	根段 Root segments	–80 kPa/1 min 800 ×g/10 min	106.53±23.02a	0.40±0.04a	0.23±0.05a	12.80±1.37a
	整根 Whole root		91.06±13.61a	0.13±0.06b	0.05±0.01b	10.70±0.87a
叶片 Leaf	叶段 Leaf segments	–80 kPa/1 min 400 ×g/5 min	191.06±39.4a	2.34±0.46a	0.89±0.18a	11.07±0.83a
	整叶 Whole leaf		120.00±11.5b	0.39±0.04b	0.09±0.02b	1.85±0.17b

可溶性蛋白含量比值: AWF 中可溶性蛋白含量与 SWF 中可溶性蛋白含量的比值; MDH 活性比值: AWF 中 MDH 活性与 SWF 中 MDH 活性的比值。不同小写字母表示同一器官同列指标在不同取样方式间差异显著(P<0.05)。Soluble protein content ratio: the ratio of soluble protein content in AWF to SWF (symplast washing fluid); MDH enzyme activity ratio: the ratio of MDH enzyme activity in AWF to SWF. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences for the same organ between two sampling methods (P < 0.05).

表 2　棉花幼苗根系和子叶–60 kPa 真空渗透前后的颜色变化、增重情况及 AWF 稀释因子

Table 2　Fresh weight increase, color change and AWF dilution factor values for whole root and leaf of cotton seedlings after –60 kPa vacuum infiltration

器官 Organ	真空渗透液 Vacuum permeate	真空时间 Vacuum time (min)	颜色 Color	增重 Weight increment (%)	稀释因子 Dilution factor
根系 Root	A	1	不变 No change	–1.22±0.09a	1.03±0.01a
	B	1	不变 No change	–1.13±0.29a	1.05±0.02a
叶片 Leaf	A	1	半绿 Half green	33.94±3.14c	2.20±0.17c
	B	1	半绿 Half green	31.50±1.27c	2.12±0.14c
	A	2	全绿 Whole green	41.41±2.51a	3.34±0.02a
	B	2	全绿 Whole green	37.63±1.38b	2.57±0.03b

A: 50 μmol·L^{-1} 靛蓝二磺酸钠的水溶液; B: 50 μmol·L^{-1} 靛蓝二磺酸钠的磷酸缓冲液(50 mmol·L^{-1}, pH 6.9)。不同小写字母表示同一器官同列指标在不同真空渗透液间差异显著(P<0.05)。A: water solution containing 50 μmol·L^{-1} indigotindisulfonate sodium; B: phosphate solution (pH 6.9) containing 50 μmol·L^{-1} indigotindisulfonate sodium. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences for the same organ between two vacuum permeates (P < 0.05).

图 1　真空渗透后棉花幼苗叶片颜色的状态

Fig. 1　Cotton seedling leaf color status after vacuum infiltration

三角形箭头指示真空渗透后颜色变深，圆形箭头指示真空渗透后颜色没变化。左侧图片显示约 1/2 的叶片颜色变深，定义为半绿；右侧图片显示几乎整个叶片颜色变深，且叶片坚挺，定义为全绿；如叶片变软，定义为过绿。The triangle arrow shows the color darkening after vacuum infiltration, and the round arrow shows no color darkening. Left leaf photo shows about half leaf darkening, defined as half green; right leaf photo shows whole leaf darkening and firmness, defined as whole green; if leaf is floppy, defined as over green.

最大时，继续真空导致叶片从硬变软(图 1)。对子叶进行抽真空后，在 400 ×g 离心力下离心 5 min 分离 AWF 蛋白时，抽真空 1 min 处理所得 AWF 体积显著低于抽真空 2 min 和 4 min；抽真空 1 min 和 2 min 的可溶性蛋白比例无显著差异，且均显著小于抽真空 4 min; 3 个抽真空时间的 MDH 活性比值存在显著差异，其中抽真空 1 min 处理分别是抽真空 2 min 和 4 min 的 38.0%和 28.4%(表 4)。由此可见，抽真空后叶片颜色和软硬状态可作为一个抽真空强度和时间组合是否适宜的简易判断指标。未抽真空子叶的相对电导率和缓慢(110 s)恢复到压强处理相比差异不显著，但均显著低于快速(50 s)恢复到正常压强处理，

表 3 不同真空强度处理 1 min 后的棉花幼苗叶片 AWF 体积、可溶性蛋白含量比值和 MDH 活性比值

Table 3 AWF volume, ratios of soluble protein content and MDH activity in AWF to SWF of cotton seedling leaf under different vacuum intensities for 1 minute

真空强度 Vacuum intensity (kPa)	AWF 体积 AWF volume [μL·g^{-1}(FW)]	可溶性蛋白含量比值 Soluble protein content ratio (%)	MDH 活性比值 MDH enzyme activity ratio (%)
–30	69.80±9.02c	0.44±0.01c	0.15±0.002b
–60	177.54±6.07a	0.82±0.04a	0.27±0.011a
–90	128.85±9.53b	0.68±0.01b	0.27±0.018a

可溶性蛋白含量比值: AWF 中可溶性蛋白含量与 SWF 中可溶性蛋白含量的比值; MDH 活性比值: AWF 中 MDH 活性与 SWF 中 MDH 活性的比值。同列不同小写字母表示不同真空强度间差异显著(P<0.05)。离心力/时间为 400 ×g/5 min。Soluble protein content ratio: the ratio of soluble protein content in AWF to SWF (symplast washing fluid); MDH enzyme activity ratio: the ratio of MDH enzyme activity in AWF to SWF. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences among different vacuum intensities (P < 0.05). Centrifugation strength/time is 400 ×g/5 min.

表 4 –60 kPa 强度真空处理不同时间后的棉花幼苗叶片 AWF 体积、可溶性蛋白含量比值和 MDH 活性比值

Table 4 AWF volume, ratios of soluble protein content and MDH activity in AWF to SWF of cotton seedling leaf under –60 kPa vacuum intensity for different times

真空时间 Vacuum time (min)	叶片颜色 Leaf color	AWF 体积 AWF volume [μL·g^{-1}(FW)]	可溶性蛋白含量比值 Soluble protein content ratio (%)	MDH 活性比值 MDH enzyme activity ratio (%)
1	半绿 Half green	177.54±6.07c	0.82±0.03b	0.27±0.01c
2	全绿 Whole green	365.23±16.90a	0.78±0.03b	0.71±0.04b
4	过绿 Over green	202.10±13.20b	1.36±0.04a	0.95±0.05a

可溶性蛋白含量比值: AWF 中可溶性蛋白含量与 SWF 中可溶性蛋白含量的比值; MDH 活性比值: AWF 中 MDH 活性与 SWF 中 MDH 活性的比值。同列不同小写字母表示不同真空时间间差异显著(P<0.05)。离心力/时间长度为 400 ×g/5 min。Soluble protein content ratio: the ratio of soluble protein content in AWF to SWF (symplast washing fluid); MDH enzyme activity ratio: the ratio of MDH enzyme activity in AWF to SWF. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences among different vacuum times (P < 0.05). Centrifugation force/time is 400 ×g/5 min.

分别为快速恢复压强处理的 46.6%和 42.2%(表 5)。

2.4 棉花根系和叶片离心力和离心时间

离心 1 200 ×g/10 min 获得的根系 AWF 体积和蛋白含量比值显著大于其他离心力和时间组合，获得的 MDH 活性比值高于其他离心力和时间组合(1 200 ×g/5 min 除外)。随着离心力和离心时间的下降，根系 AWF 体积、可溶性蛋白含量比值和 MDH 活性比值呈下降趋势(表 6)。400 ×g/5 min 离心获得的叶片 AWF 体积、可溶性蛋白含量比值和 MDH 活性比值小于 400 ×g/10 min 和 800 ×g/5 min 组合，仅 MDH 活性比值达到显著水平，分别是 400 ×g/10 min 和 800 ×g/5 min 的 32.1%和 40.9%(表 6)。

3 讨论和结论

质外体是一个具有广泛生理功能的动态空间。依据试验目的、试验材料和培养条件等不同，获得 AWF 时可以将根系切成段或利用整体根系，可以将叶片用打孔器打成小圆片、切成片段或利用叶片整体。如营养液培养水稻幼苗根系切成 5 cm 长根段[23]、玉米(*Zea mays*)幼苗 12 mm 初生根根尖及伸长区不同部位(从根尖向后 3~7 mm 及 7~12 mm 根部位)[20]、羽扇豆(*Lupinus angustifolius*)和豌豆(*Pisum sativum*)的 2 cm 长根尖[14]等用于获得 AWF。玉米第 5 片和 6 片真叶被切成 5.5 cm 长片段[19]、青葱(*Allium cepa*)叶被切成 1 cm 长片段[26]、接种稻瘟菌(*Magnaporthe*)后的水稻叶片整体[18]、拟南芥叶片整体[21]、6 周苗龄的蚕豆(*Vicia faba*)完整叶片及不含中脉的 11 cm^2 大麦(*Hordeum vulgare*)、菠菜(*Spinacia oleracea*)和玉米等叶片片段[16]等用于 AWF 分离。采用根系或叶片整体法，可以获取组织器官本身各部位的 AWF，有利于研究其 AWF 蛋白质组或代谢组等的整体情况[1]。而且养分胁迫时，同一叶片的不同部位对养分胁迫的响应不同。如钾缺乏时，叶尖和边缘先出现响应症状[13]。因此，研究养分胁迫时，采用整体叶片或根系更有利于分析养分对叶片或根系整个质外体蛋白组和代谢组的影响。而且相对于获取局部组织而言，其操作方便简单。同时，本试验结果显示，整体取样的质外体与质内体 MDH 活性比值显著小于非整体取样，表明整体取样时，质外体蛋白质不容易受共质体蛋白质污染。

质外体空间的蛋白质和代谢物有的以共价键形式结合在细胞壁上，有的以离子键紧密结合在细胞壁上或以离子键松散结合在细胞壁上，还有大部分溶解在质外体空间流动的汁液中，获得 AWF 时通常获得溶解在 AWF 和以离子键松散结合在细胞壁上的蛋白质和代谢物[20]。分离 AWF 是直接离心还是先真空渗透再离心，取决于 AWF 的可获得性。目前报道的根系有直接离心[14]或真空渗透离心[20,23]，而叶片绝大多数采用真空渗透离心[16,18-19,21]，也有直接离心的报道[3]。是否在离心前需先真空渗透，可依据真空渗透后器官鲜重是否增加及质外体稀释因子的大小进行判定。本试验分别对根系和叶片进行真

表 5　棉花幼苗叶片真空结束后恢复到正常大气压所用时间不同时的相对电导率

Table 5　Relative electric conductivity of cotton seedling leaf at different pressure recovery times after the end of vacuum infiltration

真空强度/真空时间 Vacuum intensity (kPa)/vacuum time (min)	恢复时间 Recovery time (s)	相对电导率 Relative conductivity (%)
101(正常大气压 normal pressure)/1	0	1.16±0.18b
–60/1	110	1.05±0.10b
–60/1	50	2.49±0.29a

同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。Different lowercase letter s in the same column indicate significant differences (P < 0.05).

表 6　不同离心力/离心时间组合条件下棉花 **AWF** 体积、可溶性蛋白含量比值和 **MDH** 活性比值

Table 6　AWF volume, ratios of soluble protein content and MDH enzyme activity in AWF to SWF of cotton seedling under different regimes of centrifugal force and time

器官 Organ	离心力/时间 Centrifugation force (×g/time (min)	AWF 体积 AWF volume [μL·g^{-1}(FW)]	可溶性蛋白含量比值 Soluble protein content ratio (%)	MDH 活性比值 MDH enzyme activity ratio (%)
根系 Root	400/5	69.567±3.90c	0.013±0.001d	0.016±0.005d
	400/10	80.809±0.86bc	0.057±0.003cd	0.022±0.003cd
	400/20	81.500±6.36bc	0.054±0.013cd	0.022±0.002cd
	800/5	69.041±3.62c	0.072±0.022bcd	0.037±0.008c
	800/10	87.103±6.78b	0.102±0.009bc	0.048±0.005c
	800/20	93.000±2.83b	0.134±0.014b	0.031±0.006c
	1 200/5	88.590±1.05b	0.124±0.006b	0.195±0.004a
	1 200/10	114.338±7.34a	0.218±0.007a	0.101±0.023b
叶片 Leaf	400/5	177.538±6.07a	0.818±0.038a	0.267±0.011b
	400/10	186.395±8.44a	1.040±0.025a	0.836±0.057a
	800/5	181.864±7.35a	0.847±0.030a	0.663±0.044a

可溶性蛋白含量比值: AWF 中可溶性蛋白含量与 SWF 中可溶性蛋白含量的比值; MDH 活性比值: AWF 中 MDH 活性与 SWF 中 MDH 活性的比值。同列不同小写字母表示同一器官不同组合条件间差异显著(P<0.05)。Soluble protein content ratio: the ratio of soluble protein content in AWF to SWF (symplast washing fluid); MDH enzyme activity ratio: the ratio of MDH enzyme activity in AWF to SWF. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences among regimes for the same organ (P < 0.05).

空渗透发现, 根系鲜重几乎没变化且根系质外体稀释因子趋近于 1, 说明渗透液未进入根系质外体空间; 叶片重量显著增加且质外体稀释因子大于 2, 说明渗透缓冲液进入了叶片质外体空间。由此可见, 营养液培养条件下, 棉花根系 AWF 分离可以直接离心, 和羽扇豆和豌豆根系分离 AWF 报道的一致[14]。但是, 水稻根系和玉米根系用于分离 AWF 时分别先进行–70 kPa 和–50 kPa 真空渗透 15 min 后再离心[20,23]。棉花叶片汁液分离需先真空渗透再离心, 这和其他汁液分离叶片 AWF 时报道的一致[16-17,19,27]。

真空渗透时采取的渗透液种类和浓度有不同的报道, 如青葱叶片用 20 mmol·L^{-1} 抗坏血酸和 20 mmol·L^{-1} $CaCl_2$[26], 大麦叶片用 50 mmol·L^{-1} MES/KOH 缓冲液(pH 6.0, 40 mmol·L^{-1} KCl, 2 mmol·L^{-1} $CaCl_2$) 或 50 mmol·L^{-1} 醋酸缓冲液(pH 4.5, 100 mmol·L^{-1} KCl, 2 mmol·L^{-1} $CaCl_2$)[27]。对比研究发现, 不同植物叶片分别用去离子水、10 mmol·L^{-1} KCl、180 mmol·L^{-1}MOPS 真空渗透后离心获得的 AWF 代谢物浓度差异很小[16]; 7 种不同渗透液真空渗透, 发现用磷酸缓冲液提取的玉米叶片 AWF 蛋白质含量最高, 且受 SWF 蛋白质污染最少[19]。

不同植物叶片因结构和组成的差异, 采取渗透的真空强度和时间以及离心力和离心时间均不同[17]。例如, 青葱叶片渗透为真空–70 kPa/15 min[26]; 玉米叶片渗透为真空–20 kPa[19]; 拟南芥叶片渗透为真空–8 kPa/2 min, 重复 5 次[21]。依据 AWF 体积、可溶性蛋白含量比值和 MDH 活性比值, 本研究认为棉花叶片渗透采用–60 kPa/1 min 最为适宜, 且从真空恢复到正常压强时需相对缓慢。而且本研究提供了一种根据叶片真空渗透后颜色变化直观判定真空渗透效果的方法。真空渗透后, 蚕豆、玉米、菠菜和大麦叶片离心时的离心力分别为 75 ×g、90 ×g、220 ×g 和 620 ×g, 离心时间均为 4 min[16]; 玉米叶片 400 ×g 离心 5 min[19]; 青葱叶片 1 500 ×g 离心 20 min[26]; 水稻根系 1 000 ×g 离心 10 min[23]。

通过真空渗透和离心后, AWF 中 MDH 活性[28-31]和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性[20,23]通常被作为判定 AWF 是否受 SWF 蛋白污染的指标[32], 进而可判定真空渗透所采用液体、真空强度和真空时间等及离心强度和时间等参数是否适宜。AWF 中 MDH 活性

和共质体 MDH 活性比值通常小于 5%，比值越低说明 AWF 蛋白质受 SWF 蛋白质污染越低，如小麦(*Triticum aestivum*)茎基部小于 0.5%[31]，三叶草(*Lupinus albus*)叶片小于 3%[28]，烟草(*Nicotiana tabacum*)叶片小于 0.5%[29]。本试验中，棉花整体根系小于 0.2%，远小于棉花根系上报道的 4.2% (在该研究中棉花也为营养液培养，但根系为非整体取样，且在真空渗透后离心获得质外体汁液)[30]；棉花整体叶片小于 1%，表明分离的 AWF 用于其组分如蛋白质组和代谢组研究结果准确可靠。而且，通过抽真空后叶片颜色和软硬状态判断真空强度和时间组合是否适宜和质内体受共质体物质污染程度的研究尚鲜见报道。该试验用在营养液培养条件下的根系和叶片，进行了AWF汁液分离方法从取样到离心参数的综合性改进；如培养条件和器官状态明显变化，建议仍然采用整体取样法但需调整真空渗透和离心参数，范围不超过该报道的参数上限。

综上所述，本试验改进了取样方式，减免了根系的真空渗透步骤，提出了通过叶片颜色变深面积判定真空渗透程度的简易方法，改进了叶片真空渗透时的压强和压强恢复正常所需时间及离心力与时间，分别针对棉花根系和叶片优化了AWF分离的流程和方法，不仅为棉花根系和叶片AWF组分研究的准确性和可靠性奠定了基础，也为其他作物AWF分离方法的优化提供了参考和思路。

参考文献 References

[1] GENTZEL I, GIESE L, ZHAO W Y, et al. A simple method for measuring apoplast hydration and collecting apoplast contents[J]. Plant Physiology, 2019, 179(4): 1265–1272

[2] O'LEARY B M, RICO A, MCCRAW S, et al. The infiltration-centrifugation technique for extraction of apoplastic fluid from plant leaves using *Phaseolus vulgaris* as an example[J]. Journal of Visualized Experiments, 2014, (94): e52113

[3] CEBALLOS-LAITA L, GUTIERREZ-CARBONELL E, LATTANZIO G, et al. Protein profile of *Beta vulgaris* leaf apoplastic fluid and changes induced by Fe deficiency and Fe resupply[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 145

[4] HAN L B, LI Y B, WANG F X, et al. The cotton apoplastic protein CRR1 stabilizes chitinase 28 to facilitate defense against the fungal pathogen *Verticillium dahliae*[J]. The Plant Cell, 2019, 31(2): 520–536

[5] LEE S J, SARAVANAN R S, DAMASCENO C M B, et al. Digging deeper into the plant cell wall proteome[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2004, 42(12): 979–988

[6] DA SILVA P R A, VIDAL M S, SOARES C D P, et al. Sugarcane apoplast fluid modulates the global transcriptional profile of the diazotrophic bacteria *Paraburkholderia tropica* strain Ppe8[J]. PLoS One, 2018, 13(12): e207863

[7] NIZAM S, QIANG X Y, WAWRA S, et al. *Serendipita indica* E5'NT modulates extracellular nucleotide levels in the plant apoplast and affects fungal colonization[J]. EMBO Reports, 2019, 20(1): e47430

[8] GUERRA-GUIMARÃES L, PINHEIRO C, CHAVES I, et al. Protein dynamics in the plant extracellular space[J]. Proteomes, 2016, 4(3): 22

[9] ALEXOU M, PEUKE A D. Methods for xylem sap collection[M]//MAATHUIS F. Plant Mineral Nutrients. Totowa: Humana Press, 2013: 195–207

[10] JACHETTA J J, APPLEBY A P, BOERSMA L. Use of the pressure vessel to measure concentrations of solutes in apoplastic and membrane-filtered symplastic sap in sunflower leaves[J]. Plant Physiology, 1986, 82(4): 995–999

[11] [ONG J M, WIDDERS I E. Quantification of apoplastic potassium content by elution analysis of leaf lamina tissue from pea (*Pisum sativum* L. cv Argenteum)[J]. Plant Physiology, 1990, 94(3): 1040–1047

[12] MIRÓ M, FRENZEL W. The potential of microdialysis as an automatic sample-processing technique for environmental research[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2005, 24(4): 324–333

[13] MAKSIMOVIĆ J J D, ŽIVANOVIĆ B D, MAKSIMOVIĆ V M, et al. Filter strip as a method of choice for apoplastic fluid extraction from maize roots[J]. Plant Science, 2014, 223: 49–58

[14] YU Q, TANG C, CHEN Z, et al. Extraction of apoplastic sap from plant roots by centrifugation[J]. New Phytologist, 1999, 143(2): 299–304

[15] GUEVARA M G, OLIVA C R, HUARTE M, et al. An aspartic protease with antimicrobial activity is induced after infection and wounding in intercellular fluids of potato tubers[J]. European Journal of Plant Pathology, 2002, 108(2): 131–137

[16] LOHAUS G, PENNEWISS K, SATTELMACHER B, et al. Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species[J]. Physiologia Plantarum, 2001, 111(4): 457–465

[17] NOUCHI I, HAYASHI K, HIRADATE S, et al. Overcoming the difficulties in collecting apoplastic fluid from rice leaves by the infiltration–centrifugation method[J]. Plant and Cell Physiology, 2012, 53(9): 1659–1668

[18] SHENTON M R, BERBERICH T, KAMO M, et al. Use of intercellular washing fluid to investigate the secreted proteome of the rice-*Magnaporthe* interaction[J]. Journal of Plant Research, 2012, 125(2): 311–316

[19] WITZEL K, SHAHZAD M, MATROS A, et al. Comparative evaluation of extraction methods for apoplastic proteins from maize leaves[J]. Plant Methods, 2011, 7(1): 48

[20] ZHU J M, ALVAREZ S, MARSH E L, et al. Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. Ⅱ. Region-specific changes in water soluble and lightly ionically bound proteins under water deficit[J]. Plant Physiology, 2007, 145(4): 1533–1548

[21] ARAYA T, BOHNER A, VON WIRÉN N. Extraction of

apoplastic wash fluids and leaf petiole exudates from leaves of *Arabidopsis thaliana*[J]. Bio-protocol, 2015, 5(24): e1691

[22] BAKER C J, KOVALSKAYA N Y, MOCK N M, et al. An internal standard technique for improved quantitative analysis of apoplastic metabolites in tomato leaves[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2012, 78: 31–37

[23] ZHOU L, BOKHARI S A, DONG C J, et al. Comparative proteomics analysis of the root apoplasts of rice seedlings in response to hydrogen peroxide[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16723

[24] LUTTS S, KINET J M, BOUHARMONT J. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance[J]. Annals of Botany, 1996, 78(3): 389–398

[25] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248–254

[26] CAKMAK T, CAKMAK Z E, DUMLUPINAR R, et al. Analysis of apoplastic and symplastic antioxidant system in shallot leaves: Impacts of weak static electric and magnetic field[J]. Journal of Plant Physiology, 2012, 169(11): 1066–1073

[27] VANACKER H, CARVER T L W, FOYER C H. Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves[J]. Plant Physiology, 1998, 117(3): 1103–1114

[28] ALVES M, FRANCISCO R, MARTINS I, et al. Analysis of *Lupinus albus* leaf apoplastic proteins in response to boron deficiency[J]. Plant and Soil, 2006, 279(1/2): 1–11

[29] DANI V, SIMON W J, DURANTI M, et al. Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress[J]. Proteomics, 2005, 5(3): 737–745

[30] LI Y B, HAN L B, WANG H Y, et al. The thioredoxin GbNRX1 plays a crucial role in homeostasis of apoplastic reactive oxygen species in response to *Verticillium dahliae* infection in cotton[J]. Plant Physiology, 2016, 170(4): 2392–2406

[31] WILLICK I R, TAKAHASHI D, FLOWLER D B, et al. Tissue-specific changes in apoplastic proteins and cell wall structure during cold acclimation of winter wheat crowns[J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(5): 1221–1234

[32] TAŞGIN E, ATICI O, NALBANTOĞLU B, et al. Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves[J]. Phytochemistry, 2006, 67(7): 710–715