

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2017.01.032

# 细胞外 ATP 调节 NaCl 胁迫诱导的烟草悬浮细胞死亡和呼吸抑制

白晶月, 冯汉青, 戎福虎, 芦丽娜, 王庆文, 贾凌云

(西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070)

**摘要:** 本文以烟草悬浮细胞 BY-2 为材料, 探讨了胞外 ATP 对 NaCl 诱导的细胞死亡和呼吸抑制的调节作用. 实验表明, 随着 NaCl 浓度的逐渐上升 (50、100、200、400 mmol/L), 细胞的死亡水平逐渐上升, 而胞外 ATP 含量和细胞呼吸速率则随 NaCl 浓度的上升而逐渐下降. 本文在 200 mmol/L NaCl 处理下的细胞中探索了胞外 ATP 对 NaCl 诱导的细胞死亡和呼吸抑制的调节作用. 结果发现, 较之 200 mmol/L NaCl 胁迫下的细胞, 对 NaCl 胁迫的细胞加入外源 ATP (20  $\mu$ mol/L) 其使得细胞死亡水平显著性降低, 也使得胞外 ATP 含量和细胞呼吸速率均有所回升. 上述实验观察表明, NaCl 胁迫诱导的植物细胞的死亡和呼吸抑制可能和细胞外 ATP 水平的变化有关, 并且胞外 ATP 对 NaCl 诱导的细胞死亡具有一定的调节作用.

**关键词:** 细胞死亡; 胞外 ATP; NaCl 胁迫; 呼吸

**中图分类号:** Q945      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0490-6756(2017)01-0191-06

## The studies of cell death and respiration inhibition of tobacco suspension cells under NaCl stress mediated by extracellular ATP

BAI Jing-Yue, FENG Han-Qing, RONG Fu-Hu, LU Li-Na, WANG Qing-Wen, JIA Ling-Yun

(College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** In the present work, by using BY-2 tobacco suspension cells, the effect of the extracellular ATP on the cell death and respiration inhibition induced by NaCl stress were studied. The results showed that with the increment of the concentrations of NaCl (from 50 to 400 mmol/L), the level of cell death was increased, while the levels of extracellular ATP and respiratory  $O_2$  uptake were decreased. The suspension cells subjected to 200 mmol/L NaCl stress were used to study the effects of the extracellular ATP on the cell death induced by NaCl stress. Compared with the cells under NaCl stress condition (200 mmol/L), the NaCl-stressed cells with addition of exogenous ATP (20  $\mu$ mol/L) had lower cell death and higher contents of both extracellular ATP and the respiratory  $O_2$  uptake. These results suggest that the cell death and respiration inhibition induced by NaCl stress are related to the change of extracellular ATP, and extracellular ATP can function in mediating the NaCl-induced cell death and respiration inhibition.

**Keywords:** Cell death; Extracellular ATP; NaCl stress; Respiration

收稿日期: 2015-05-28

基金项目: 国家自然科学基金(31260059, 30900105); 教育部科学技术研究重点项目(211190); 甘肃省财政厅高校基本科研业务费

作者简介: 白晶月(1992-), 女, 甘肃平凉人, 硕士研究生, 研究方向为植物生理生态. E-mail: baijingyue126@163.com

通讯作者: 贾凌云. E-mail: lingyunjia1982@126.com

## 1 引言

盐害会导致植物的生长发育迟缓、光合作用下降,乃至植物细胞的死亡,从而给农业生产和生态环境造成了巨大的损失<sup>[1]</sup>. 故而,植物的耐盐机理以及如何提高植物的耐盐性始终是植物生理学和农学所关注的重点问题<sup>[2,3]</sup>. 高浓度的 NaCl 是盐害形成的主要原因<sup>[4]</sup>,因而对植物耐盐机理和耐盐性的研究也主要集中于 NaCl 胁迫下植物的生理学响应以及植物对 NaCl 胁迫的抵抗作用<sup>[5]</sup>. 目前的主流观点认为,在高浓度 NaCl 存在时,植物被迫吸收过多的钠离子,这造成了细胞中离子含量的不均衡以及活性氧等自由基的过量产生. 这些变化能够导致膜脂和膜蛋白的损伤、细胞的透性增加、细胞呼吸作用的下降、胞内水溶性物质外渗等一系列生理学变化,最终引起了植物细胞的死亡. 而植物也能够通过调节钠离子的吸收和细胞内抗氧化等生理学作用在一定程度上抵抗 NaCl 胁迫对植物造成的上述不良影响<sup>[6,7]</sup>.

三磷酸腺苷(ATP)是生物细胞内最主要的能量储存和供应物质,但细胞能够将细胞质的部分 ATP 释放到胞外基质中,使胞外也存在 ATP<sup>[8]</sup>. 在动物细胞中发现胞外 ATP 是一种重要的信号分子,能够通过作用于细胞膜上的特异受体来调控细胞内的各种生理活动,如调节平滑肌的收缩、血小板的聚合、糖原的降解以及激素的释放等<sup>[9]</sup>. 近年来的研究表明,植物细胞能够通过 ATP 结合转运载体蛋白或膜泡运输的方式将细胞内的 ATP 释放到胞外,使得植物细胞同样存在胞外 ATP<sup>[10,11]</sup>. 植物胞外 ATP 也越来越受到关注和重视. 进一步的研究揭示了植物的胞外 ATP 也是一种重要的胞外信号分子,能够通过受体介导的作用来调节植物的生长、发育、抗病反应和向地性等生理活动<sup>[12]</sup>. 最近,Choi 等<sup>[13]</sup>已在模式植物拟南芥中鉴定出能特异性结合胞外 ATP 的受体蛋白. 另有研究发现,胞外 ATP 还能够刺激  $Ca^{2+}$  通道<sup>[14]</sup>、活性氧<sup>[15]</sup>以及茉莉酸和乙烯合成相关基因的表达<sup>[16]</sup>,表明细胞中诸多的重要信号分子均受到了胞外 ATP 的调节.

如上文所述,NaCl 胁迫下植物的生理学变化及对 NaCl 胁迫的抵抗作用主要发生在胞内,而胞外的分子或组分是否也参与了 NaCl 胁迫下植物的生理学响应或是对 NaCl 胁迫的抵抗作用则未见报道. 而植物胞外 ATP 的发现则为上述问题

的解答提供了一个重要的切入点. 基于此,本文以 BY-2 烟草悬浮细胞培养物为材料,探究了胞外 ATP 对 NaCl 胁迫下烟草 BY-2 悬浮细胞程序性死亡的影响. 相信该研究将在一定程度上补充和修正人们对 NaCl 胁迫下植物细胞死亡发生机理的认识,并进一步了解胞外 ATP 这一独特信号分子的生理学作用.

## 2 材料与方 法

### 2.1 材 料

烟草悬浮细胞 BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2)由香港中文大学姜里文教授馈赠.

### 2.2 方 法

2.2.1 烟草悬浮细胞培养 将悬浮细胞置于添加了 3% (W/V)蔗糖和  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)的 MS<sup>[17]</sup>液体培养基(pH 为 5.8) (Sigma-Aldrich)中,在 25℃ 黑暗的条件下振荡培养(振荡速率为 130 r/min). 每 7 d 移取 10 mL 的细胞培养物,转至 100 mL 新鲜的 MS 培养基中进行传代培养. 所有操作都在无菌条件下完成.

2.2.2 悬浮细胞的处理 取一定体积的处于生长对数期的细胞悬液,使用前以 1:5 的体积比用去离子水稀释并摇匀、过滤并用去离子水洗涤 1~2 次后分别加入:(1)50、100、200 或 400 mmol/L 的 NaCl,(2)20  $\mu\text{mol/L}$  ATP、200 mmol/L NaCl+20  $\mu\text{mol/L}$  ATP 或 200 mmol/L NaCl. 在 25℃ 黑暗条件下振荡孵育 5 h;以等体积去离子水处理的悬浮细胞液作为对照.

2.2.3 细胞死亡水平的检测 荧光素双醋酸酯(fluorescein diacetate, FDA)可与有活力的细胞结合,并在被激发后释放出绿色荧光<sup>[18]</sup>,用于定性检测细胞死亡的水平. 悬浮细胞液中加入  $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 FDA (Sigma-Aldrich),在室温下黑暗培养 10 min. 将染色后的样品在荧光显微镜下进行观察并成像(Leica, DM5000 B, Wetzlar, Germany).

伊文思蓝(Evans blue)可与死亡的细胞结合<sup>[19]</sup>,用于定量检测细胞死亡的水平. 1 mL 的悬浮细胞液中加入 100  $\mu\text{L}$  0.25% (W/V)的伊文思蓝染液,混匀并染色 8 min,然后在  $1600 \times g$  条件下离心 3 min,吸去上清液. 用磷酸缓冲液(PBS)清洗细胞,再于  $1600 \times g$  条件下离心 3 min,吸去上清液,重复多次,以洗去未与细胞结合的染料. 之后加入 1 mL 1% (W/V)的十二烷基磺酸钠

(SDS, 用 50% 甲醇配制而成) 溶液, 在 50 °C 的恒温水浴中放置 30 min, 使细胞破裂. 在  $10\ 000\times g$  条件下离心 3 min, 取 500  $\mu\text{L}$  上清液, 加去离子水稀释至 3 mL. 用 721 分光光度计测定 600 nm 处的吸光值, 以此表示细胞的死亡程度.

**2.2.4 胞外 ATP 含量的检测** 胞外 ATP 含量使用萤火虫尾部提取物 (Sigma-Aldrich) 测定. 萤火虫尾部提取物的主要成分为虫荧光素和荧光素酶, ATP 可与虫荧光素经荧光素酶催化反应, 并释放荧光. 通过测定发光强弱, 可测定 ATP 的含量<sup>[20]</sup>. 将细胞工作液于  $1600\times g$  条件下离心 3 min, 吸取上清液, 进行胞外 ATP 含量测定, 测定方法依照制造商说明书进行.

**2.2.5 细胞总呼吸速率的检测** 细胞总呼吸速率的测定参照 Clark 氧电极方法进行: 将处理后的 3 mL 细胞悬液置于测量杯中, 并利用 Clark 氧电极

(中国科学院上海植物生理生态研究所制) 法<sup>[21]</sup> 测量细胞的耗氧速率, 所得值为细胞总呼吸速率.

**2.2.6 统计学分析** 实验结果均用平均值  $\pm$  标准差表示. 数据采用双总体 *t* 检验, 检验在  $P < 0.05$  水平上的差异显著性.

### 3 结果与分析

#### 3.1 NaCl 诱导了细胞死亡和呼吸的抑制

结果显示, 在悬浮细胞中加入 50 mmol/L、100 mmol/L、200 mmol/L、400 mmol/L 的 NaCl 处理细胞 5 h 后, 细胞死亡水平均显著上升. 其中, 50 和 100 mmol/L 的 NaCl 分别使得细胞死亡水平增加至 1.42 和 1.50 倍; 而 200 和 400 mmol/L 的 NaCl 则使得细胞死亡水平进一步剧烈上升, 较之对照分别增加至 3.87 和 4.15 倍 (图 1).

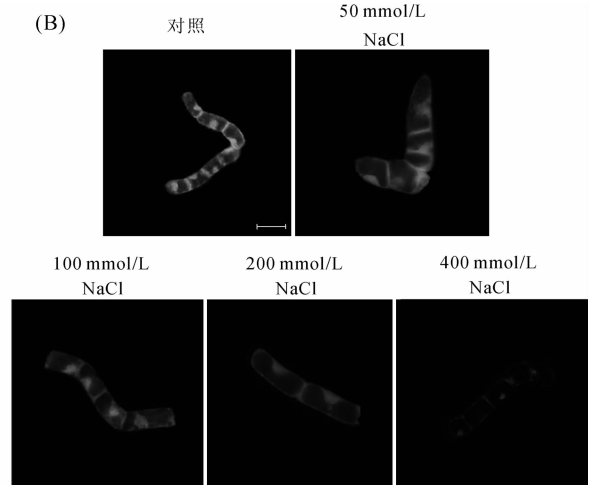
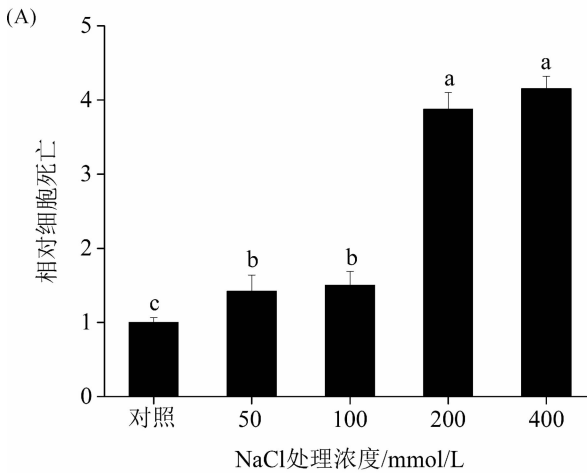


图 1 不同浓度 NaCl 处理下烟草细胞死亡水平的变化

A: 伊文思蓝染色后在 600 nm 下测量提取染料的光吸收, 结果为 6 次试验的平均值, 将对照组的设为 1.0, 便于进行不同处理间的比较, 不同字母表示在  $P < 0.05$  水平差异显著; B: FDA 染色后代表性的 NaCl 诱导细胞死亡的照片, bar=50  $\mu\text{m}$ , 下同

Fig. 1 The changes of the level of cell death under treatment with different NaCl concentrations

(A): the levels of cell death were measured using Evans blue staining assay by measuring the absorbance of extracted dye at 600 nm. Each value represents the mean  $\pm$  SD of six independent experiments. The values in the control were set into 1.0 to facilitate the comparison among the different treatments. The means denoted by the same letter did not significantly differ at  $P < 0.05$ .

(B): representative images depict the NaCl-induced cell death visualized by FDA staining, bar=50  $\mu\text{m}$ , the below is same

50 mmol/L 的 NaCl 处理使得细胞的呼吸速率有所降低, 但尚未达到显著性水平. 随着 NaCl 浓度的进一步上升, 细胞的呼吸速率也呈现出降低的趋势. 其中 100 mmol/L 的 NaCl 处理使得细胞的呼吸速率显著性降低. 而 200 和 400 mmol/L 的 NaCl 则使得细胞呼吸水平剧烈下降 (图 2).

#### 3.2 NaCl 胁迫和外源 ATP 对细胞外 ATP 水平的影响

如图 1 显示, 200 mmol/L NaCl 导致细胞死亡

水平的明显上升, 也引起了明显的呼吸抑制 (图 2). 因此, 本文在 200 mmol/L NaCl 处理下的细胞中探索了 NaCl 胁迫和外源 ATP 对细胞外 ATP 水平的影响. 结果表明, 在 200 mmol/L NaCl 胁迫后, 细胞外 ATP 含量显著性降低, 图 3 显示, 单独加入 20  $\mu\text{mol/L}$  外源 ATP 未引起胞外 ATP 水平的显著变化. 而在 200 mmol/L NaCl 处理的细胞中加入 20  $\mu\text{mol/L}$  外源 ATP 则明显提升了胞外 ATP 水平.

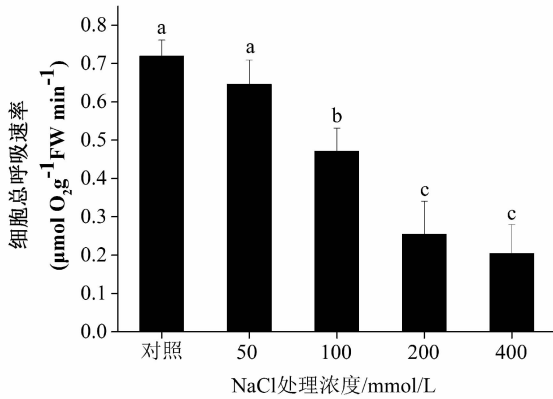


图2 不同浓度 NaCl 处理下烟草细胞总呼吸速率的变化 Clark 氧电极方法测定得出细胞总呼吸速率. 结果为 6 次试验的平均值, 不同字母表示在  $P < 0.05$  水平差异显著

Fig. 2 The changes of level of cell respiratory O<sub>2</sub> uptake under treatment with different NaCl concentrations

The respiratory O<sub>2</sub> uptake was measured by a Clark-type oxygen electrode. Each value represents the mean  $\pm$  SD of six independent experiments. The means denoted by the same letter did not significantly differ at  $P < 0.05$

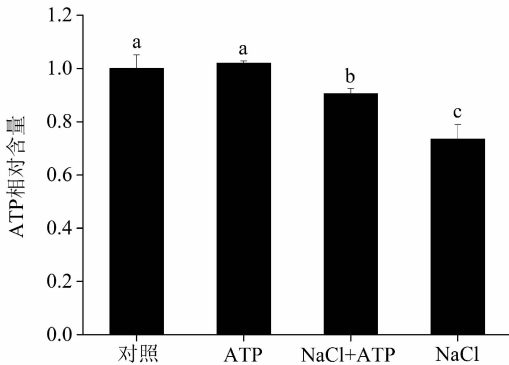


图3 不同处理下烟草悬浮细胞外 ATP 含量的变化 荧光素与荧光素酶发光法测定得出细胞外 ATP 的含量. 结果为 6 次试验的平均值, 将对照组的设为 1.0, 便于进行不同处理间的比较. 不同字母表示在  $P < 0.05$  水平差异显著

Fig. 3 The changes of level of extracellular ATP content under different treatments

The content of extracellular ATP was measured by emitting light by luciferin and luciferase. Each value represents the mean  $\pm$  SD of six independent experiments. The values in the control were set into 1.0 to facilitate the comparison among the different treatments. The means denoted by the same letter did not significantly differ at  $P < 0.05$

### 3.3 外源 ATP 缓解 NaCl 对细胞死亡的诱导和对呼吸的抑制

我们继而研究了胞外 ATP 对 NaCl 诱导的细胞死亡和呼吸抑制的影响. 结果表明, 对未经过 NaCl 胁迫的细胞加入 20  $\mu\text{mol/L}$  外源 ATP 未引起细胞死亡水平和呼吸速率的显著变化(图 4; 图 5). 而较之 200 mmol/L NaCl 处理的细胞, 在 200 mmol/L NaCl 处理的细胞中加入 20  $\mu\text{mol/L}$  外源 ATP 则明显降低细胞死亡水平并缓解了呼吸的抑

制(图 4; 图 5). 以上结果表明, 胞外 ATP 能够缓解 NaCl 诱导的细胞死亡和呼吸抑制.

## 4 讨论

许多研究表明, 在较高浓度或较长时间的 NaCl 胁迫下能够导致细胞死亡的发生<sup>[22, 7]</sup>. 本文的研究发现, 50 mmol/L 或更高水平的 NaCl 的处理导致了烟草悬浮细胞死亡水平的显著性提升(图 1). 同时, 本文也观察到, 随着 NaCl 浓度的进一步上升, 细胞的呼吸速率也呈现出降低的趋势(图 2). 因为呼吸是植物细胞产生 ATP 的主要机制, 而能量的获得是细胞能够维持活力的重要前提, 因而推测 NaCl 胁迫下导致的呼吸抑制是细胞死亡水平发生的重要原因之一.

如前文所述, 胞外 ATP 来自于细胞内的 ATP, 并由胞内 ATP 结合转运蛋白或膜泡运输的方式分泌至胞外<sup>[10, 11]</sup>. 而且, 植物细胞的细胞表面并未发现有 ATP 合酶的存在, 因此, 胞内 ATP 是植物胞外 ATP 的唯一来源<sup>[8, 12]</sup>. 同时, 本研究是以不含叶绿体的烟草 BY-2 悬浮细胞系为实验材料, 故而呼吸的水平应决定了细胞外 ATP 的水平. 通过测量细胞外 ATP 的水平发现, NaCl 胁迫的确导致了胞外 ATP 水平的显著下降(图 3). 因此, 实验中 NaCl 胁迫导致的胞外 ATP 含量的降低很可能是由于呼吸的抑制所致.

在过去的一些研究中, NaCl 胁迫对植物的生理作用以及植物对 NaCl 胁迫的抵抗机制多集中于细胞内部. 举例而言, NaCl 胁迫会引起  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  比值增大, 打破原有的离子平衡. 这不仅仅阻碍了植物对营养元素的吸收从而抑制了植物的生长, 也会改变膜的透性进而引起细胞死亡<sup>[23]</sup>. 另有观点认为, NaCl 胁迫造成活性氧等自由基的过量产生, 导致了膜脂或膜蛋白的氧化损伤, 从而使质膜的透性增加并引起细胞死亡<sup>[7]</sup>. Chivasa 等发现, 植物细胞外 ATP 的下降会引起细胞死亡, 而我们也观察到了 NaCl 胁迫在引起细胞死亡的同时也导致了胞外 ATP 水平的下降<sup>[24]</sup>. 这提示了胞外 ATP 水平有可能在 NaCl 胁迫诱导的细胞死亡过程中扮演着一定的生理学角色. 为了探讨这一机理是否存在, 本研究用外源的 ATP 对细胞进行了处理. 结果发现, 对未经过 NaCl 胁迫的细胞加入 20  $\mu\text{mol/L}$  外源 ATP 没有引起胞外 ATP 水平的显著变化(图 3), 而在 200 mmol/L NaCl 处理的细胞中加入 20  $\mu\text{mol/L}$  外源 ATP 则明显缓解了 NaCl

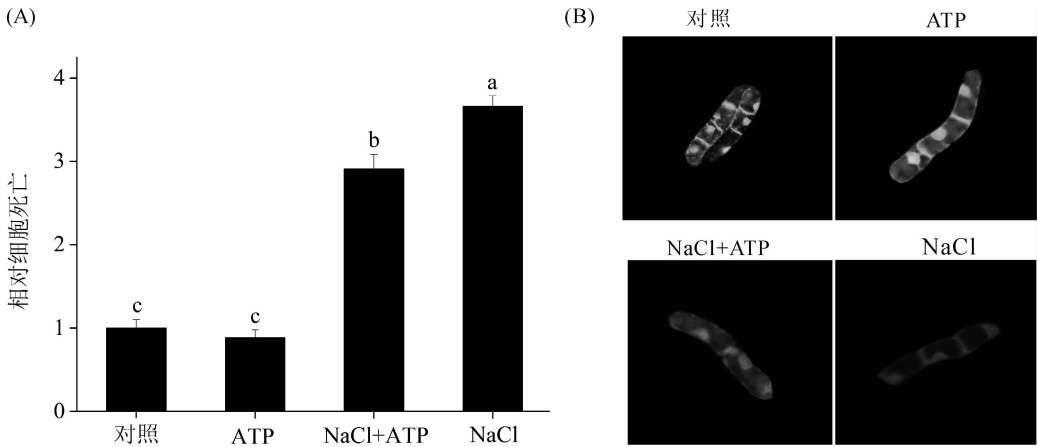


图 4 不同处理下的烟草细胞死亡水平的变化

A: 伊文思蓝染色后在 600 nm 下测量提取染料的光吸收, 结果为 6 次试验的平均值, 将对照组的设为 1.0, 便于进行不同处理间的比较, 不同字母表示在  $P < 0.05$  水平差异显著; B: FDA 染色后代表性的不同处理下细胞死亡的照片

Fig. 4 The changes of level of cell death under different treatments

A: the levels of cell death were measured using Evans blue staining assay by measuring the absorbance of extracted dye at 600 nm. Each value represents the mean  $\pm$  SD of six independent experiments. The values in the control were set into 1.0 to facilitate the comparison among the different treatments. The means denoted by the same letter did not significantly differ at  $P < 0.05$ . B: representative images depict the different treated cell death visualized by FDA staining

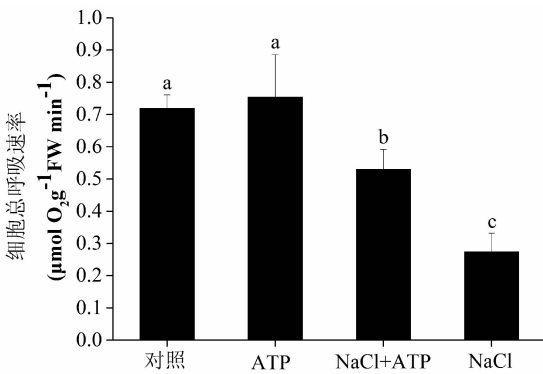


图 5 不同处理下烟草细胞总呼吸速率的变化

Clark 氧电极方法测定得出细胞总呼吸速率. 结果为 6 次试验的平均值, 不同字母表示在  $P < 0.05$  水平差异显著

Fig. 5 The changes of the level of cell respiratory  $O_2$  uptake under treatment with different treatments

The respiratory  $O_2$  uptake was measured by a Clark-type oxygen electrode. Each value represents the mean  $\pm$  SD of six independent experiments. The means denoted by the same letter did not significantly differ at  $P < 0.05$

胁迫所导致的胞外 ATP 水平的下降(图 3). 我们推测, 由于植物细胞外存在着 ATP 水解酶, 外源 ATP 的加入可能因被水解而未引起胞外 ATP 水平的显著变化; 但在较高浓度 NaCl 存在时, NaCl 可能通过破坏质膜的完整性或对 ATP 水解酶活性的抑制而使得外源 ATP 的加入缓解了胞外 ATP 水平的下降. 尽管其确切的机理可能是更加复杂的或不同的, 但这可以使得我们来判断 NaCl 胁迫引起细胞死亡和呼吸抑制是否可能和细胞外

ATP 有关. 实验结果表明, 当外源 ATP 明显缓解了 NaCl 胁迫所导致的胞外 ATP 水平的下降时, NaCl 胁迫引起的细胞死亡和呼吸抑制均得到了明显的缓解(图 3; 图 4; 图 5). 以上实验观察提示, NaCl 胁迫诱导的植物细胞的死亡和呼吸抑制可能和细胞外 ATP 水平的变化有关, 而胞外 ATP 对 NaCl 诱导的细胞死亡具有一定的调节作用.

胞外 ATP 能够缓解 NaCl 胁迫引起的细胞死亡和呼吸抑制的深入机制尚不清楚. 但胞外 ATP 已经被报道能够刺激  $Ca^{2+}$ <sup>[14]</sup> 和活性氧<sup>[15]</sup> 等信号分子. 因此我们推测, 细胞外 ATP 可能是通过调节细胞内的信号分子缓解了 NaCl 胁迫引起的细胞死亡和呼吸抑制, 但内在机制尚需进一步研究.

#### 参考文献:

- [1] 张明轩, 黄苏珍, 绳仁立, 等. NaCl 胁迫对马蔺生长及生理生化指标的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2011, 20(1): 46.
- [2] 刘奕琳, 万福绪, 娄晓瑞. 盐胁迫对 10 种墨西哥柏幼苗生理生化的影响[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2013, 37(4): 29.
- [3] 杨升, 刘涛, 张华新, 等. 盐胁迫下沙枣幼苗的生长表现和生理特性[J]. 福建林学院学报, 2014, 34(1): 64.
- [4] 闫留华, 陈敏, 王宝山. NaCl 胁迫对 2 种表型盐地碱蓬种子萌发的渗透效应和离子效应研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28(4): 718.
- [5] 陈莎莎, 贺转转, 姜生秀, 等. 藜 CaMAPKK2 的表达

- 分析及盐胁迫信号通路交互组分的筛选[J]. 中国农业科学, 2013, 46(5): 889.
- [6] Jolivet Y, Pireaux J C, Dizengremel P. Changes in properties of barley leaf mitochondria isolated from NaCl-treated plants[J]. *Plant Physiol*, 1990, 94: 641.
- [7] 王慧英, 孙建设, 张建光. NaCl 胁迫对苹果砧木  $K^+$  和  $Na^+$  吸收的影响及其与耐盐性的关系[J]. 河北农业大学学报, 2002, 25(增刊): 104.
- [8] Khakh B S, Burnstock G. The double life of ATP[J]. *Sci Am*, 2009, 301: 84.
- [9] Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor[J]. *Gen Pharmacol*, 1985, 16(5): 433.
- [10] Kim S Y, Sivaguru M, Stacey G. Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling[J]. *Plant Physiol*, 2006, 142: 984.
- [11] Thomas C, Rajagopal A, Windsor B, *et al.* A role for ectophosphatase in xenobiotic resistance[J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 519.
- [12] Tanaka K, Gilroy S, Jones A M, *et al.* Extracellular ATP signaling in plants[J]. *Trends Cell Biol*, 2010, 20: 601.
- [13] Choi J, Tanaka K, Cao Y, *et al.* Identification of a plant receptor for extracellular ATP [J]. *Science*, 2014, 343: 290.
- [14] Dichmann S, Idzko M, Zimpfer U, *et al.* Adenosine triphosphate-induced oxygen radical production and *CD11b* up-regulation;  $Ca^{++}$  mobilization and actin reorganization in human eosinophils [J]. *Blood*, 2000, 95: 973.
- [15] Demidchik V, Shang Z L, Shin R, *et al.* Plant extracellular ATP signalling by plasma membrane NADPH oxidase and  $Ca^{2+}$  channels[J]. *Plant J*, 2009, 58: 903.
- [16] Song C J, Steinebrunner I, Wang X, *et al.* Extracellular ATP induces the accumulation of superoxide via NADPH oxidases in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2006, 140: 1222.
- [17] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473.
- [18] Guilbault G G, Kramer D N. Fluorometric determination of lipase, acylase, alpha-, and gamma-chymotrypsin and inhibitors of these enzymes [J]. *Anal Chem*, 1964, 36: 409.
- [19] Kawai M, Hirofumi U. Coleoptile senescence in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Ann Bot*, 2000, 86: 405.
- [20] McElroy W D, Strehler B L. Factors influencing the response of the bioluminescent reaction to adenosine triphosphate[J]. *Arch Biochem*, 1949, 22: 420.
- [21] Bingham I J, Farrar J F. Activity and capacity of respiratory pathways in barley roots deprived of inorganic nutrients[J]. *Plant Physiol Biochem*, 1989, 27: 847.
- [22] 张士功, 刘国栋, 刘更另. 渗透胁迫和缺磷对小麦幼苗生长的影响[J]. 植物生理学报, 2001, 37(2): 103.
- [23] Curtin D, Steppuhn H. Plant responses to sulfate and chloride Salinity; growth and ionic relations[J]. *Soil Sci Soc Am J*, 1993, 57: 1304.
- [24] Chivasa S, Ndimba B K, Simon W J, *et al.* Extracellular ATP functions as an endogenous external metabolite regulating plant cell viability. *Plant Cell*, 2005, 17, 3019.