盐生植物星星草叶表皮具有泌盐功能的蜡质层

韦存虚¹,王建波¹,陈义芳²,周卫东²,孙国荣¹*

(1. 扬州大学 生物科学与技术学院,杨州 225000;2. 扬州大学 测试中心,扬州 225009)

摘要:利用扫描电镜和X射线电子探针研究了星星草(Puccinellia tenuiflora)的叶表皮及其与生境高盐的关系。结果表明,叶表 皮由表皮细胞和气孔器组成,下表皮气孔器多于上表皮,且常下陷,表皮具表皮毛。表皮细胞外存在丰富的蜡质纹饰和蜡质颗 粒,这些蜡质包含盐离子,具有泌盐的功能。这些特征表明星星草受外界生态因素的影响,而演化出具有泌盐功能的蜡质层来适 应所生长的高盐生境。

关键词:星星草;叶表皮;蜡质层;泌盐;生态适应

Epicuticular wax of leaf epidermis: a functional structure for salt excretion in a halophyte *Puccinellia tenuiflora*

WEI Cun-Xu¹, WANG Jian-Bo¹, CHEN Yi-Fang², ZHOU Wei-Dong², SUN Guo-Rong^{1*} (1. College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University Yangzhou, 22500, China; 2. Center of Surveying, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China). Acta Ecologica Sinica, 2004, 24(11): 2451~2456.

Abstract: As an adaptive consequence, plants growing in saline habitats have developed various salt tolerant mechanisms such as ion selectivity through the membrane system and intracellular ion compartmentation, anatomical modifications such as salt gland on their leaves and special transfer cells for ion transport. *Puccinellia. tenuiflora* is prevalent in the saline swamps of northern China where soil is essentially composed of sodium carbonate, sodium sulphate or sodium chloride. *P. tenuiflora* grows well in these areas because of its high salt tolerance. Based on reported work, it was thought that the salt tolerant mechanism of *P. tenuiflora* could be attributed to their high ion selectivity. From data obtained through leaf-washing experiments, it appeared that the salt tolerance of *P. tenuiflora* was due to salt excretion through the leaves. However, the salt gland was not observed. This study investigated epicuticular wax from the leaf epidermis of *P. tenuiflora* as a mode of salt excretion using environmental scanning electron microscopy and X-ray electron probe microanalysis through different preparation methods for structure and elemental analysis.

The results showed that the epidermis consisted of epidermis cells and stoma complexes. On the lower surface of leaves, epidermal hairs were observed along with a mass of sunken stomata grouped in parallel rows between the veins. In addition, wax ornamentation and wax grains were present on the surface of the leaves. These structures are characteristic for plants resisting the saline-alkaline and the drought environment.

Wax ornamentation and wax grains contained significant amounts of salt ions in response to salt stress. This indicated that epicuticular wax possessed salt excretion capability. Therefore, it is reasonable to assume that the epicuticular waxes of *P*. *tenuiflora* may undergo structural and physiological changes to excrete salt ions and adapt to halomorphic conditions. **Key words**:*Puccinellia tenuiflora*; leaf epidermis; epicuticular wax; salt excretion; ecological adaptation

文章编号:1000-0933(2004)11-2451-06 中图分类号:Q143 文献标识码:A

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270234);扬州大学高层次人才科研启动基金资助项目

收稿日期:2003-12-15;修订日期:2004-07-12

Biography: W白石醉那作h. D., Associate professor, mainly engaged in plant cell structure and function.

作者简介:韦存虚(1973~),男,安徽临泉人,博士,副教授,主要从事植物细胞结构与功能研究。

^{*} 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: sunguorong2002@yahoo.com.cn

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30270234);

Received date: 2003-12-15; Accepted date: 2004-07-12

世界上有大面积的盐碱地,我国盐碱地总面积约为 9913 万 hm²,而且还在迅速扩大,要改善那些具有耕作或放牧潜力的土 地,通过筛选能适应高盐环境的优良耐盐植物来逐步地适应环境并最终达到改良土壤是花费较少,切实可行的一种方法,因此 对抗盐、耐盐植物的研究具有重要意义^[1]。而耐盐植物在长期的生物演化过程中,逐步形成了自己独特的防御机制,在形态构造 和生理功能方面都有一套完善的对盐渍环境适应的特征,所以研究耐盐植物的形态结构和生理功能是研究植物耐盐性的基础。 在植物的结构与环境关系方面,历来研究最多的器官是叶片,这是由于叶片的组织结构对生境条件的反应最为敏感^[2]。星星草 (*Puccinellia tenuiflora*)是一种盐碱耐性较强的禾本科牧草,属碱茅属多年生草本植物,能够在碱斑土壤上生长发育^[3]。近年来, 科学工作者在耐盐生理生态方面对星星草做了一定的研究^[3~7],为弄清其适应高盐生境的根本原因,对星星草进行了叶表皮结 构与功能的研究,旨在为改良碱化草地,研究碱地牧草的生理生态学特征,提供一些基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料培养

用长 20 cm 宽 13 cm 的塑料盆装 2/3 体积的珍珠岩,加 600 ml的Hoagland 培养液至其表面湿润,将星星草种子均匀地播撒 其上,于室内培养,待幼苗长至二叶期时,用浓度为 0.6%的 Na₂CO₃ 溶液于 8:00 处理,处理时用漏斗将溶液加至塑料盆底部,处 理 7d 后取幼苗倒第 3 叶片中部进行扫描电镜分析,以不加 0.6%的 Na₂CO₃ 作对照。

1.2 叶表皮蜡质含量的测定

在已经称重(G_1)的 50 ml 烧杯中加入三氯甲烷约 40 ml,将新鲜叶片剪下,用双蒸水洗净,晾干叶片,并测出叶片总重量(约 5g)(G_2)。将叶片浸入三氯甲烷中轻轻晃动5 min,沥尽叶片上的残液后取出。将提取液放入通风橱,风干后称重(G_3)。叶表皮蜡质含量为蜡质净重($G_3 - G_1$)与叶片总重量(G_2)之比。重复 3 次,取其平均值。

1.3 环境扫描电镜的观察

直接将新鲜的、未经任何处理的星星草叶片用导电银胶粘在样品台上,在荷兰飞利浦公司的XL-30型环境扫描电镜下观察 与能谱分析。样品室的环境条件为:冷台温度选定5 C,样品室气压4 Torr,加速电压15 kV。

1.4 冷冻干燥样品的制备与观察

取新鲜材料,于液氮中迅速冷冻,经真空冷冻干燥、粘样、喷金,最后在荷兰飞利浦公司的 XL-30 型环境扫描电镜下观察与 能谱分析。

1.5 常规扫描电镜样品的制备与观察

取新鲜叶片于 FAA 固定液固定,抽气使材料下沉,然后转入 2.5%戊二醛和 4%多聚甲醛混合固定液(0.1 mol/L,pH 7.2 磷酸缓冲液配制)固定24 h,缓冲液清洗3 次,经系列乙醇脱水至100%乙醇后,将其取出,放入醋酸异戊酯内30 min,然后进行临界点干燥,把已干燥好的材料粘在样品台上,进行离子溅射镀金膜,镀金后的材料放入荷兰飞利浦公司的 XL-30 型环境扫描电子显微镜下进行形态观察和能谱分析。

1.6 脱蜡样品的制备与观察

样品的制备与常规扫描电镜样品制备相类似,只是在脱水到100%乙醇后,将材料转入二甲苯中,45 C脱蜡12h,然后再转入100%乙醇内,以下步骤同1.5常规扫描电镜样品制备。

1.7 X 射线电子探针显微分析

上述样品在扫描电子显微镜下进行形态观察的同时,进行 X 射线电子探针显微分析。能谱仪为美国 Thermo 公司的 Kevex 能谱仪,加速电压为 20 kV,速流为 0.15 μA,样品倾角为 0°,样品与探针间的角度为 33°,工作距离为 10.0 mm。对样品进行点分 析(每种制样分别扫描 5 次,获得的结果一致),计算机在自动扣除各元素的背景值后根据点分析图谱中各元素峰谱通过面积分 析法计算出相对含量百分数。

2 实验结果

扫描电镜观察结果表明,盐胁迫和未胁迫下星星草叶表皮结构没有什么变化,说明叶片表皮结构是长期演化的结果。盐胁 迫下星星草叶片表皮的结构如下。叶表皮由表皮细胞和气孔器组成(图1,a,e)。叶上表皮无表皮毛,气孔器不下陷(图1,a);而 气孔器在下表皮呈纵列分布于平行叶脉之间,数目比上表皮多,且常下陷(图1,e)。在叶下表皮的叶脉上生有刺状的表皮毛,表 皮毛外壁平滑,毛基部直接插入表皮细胞(由表皮细胞延伸而成),其毛尖端渐尖(图1,e)。星星草叶表皮的最明显的特征是表皮 外有大量蜡质存在,主要以蜡质纹饰的形式存在于表皮细胞外(图1,c,f),也有大量以颗粒形式存在(图1,b,d,g),这些结构在 常规制样和冷冻干燥制样中都能清楚地被观察到。对星星草叶进行脱蜡处理后,发现叶表皮细胞变得非常光滑而无纹饰和颗粒 的存在(图1,h)。比较环境扫描制样(图1,b)、冷冻干燥制样(图1,c,d)、常规制样(图1,f,g)和脱蜡制样(图1,h)下的叶表皮结 构,发现叶表皮生数衡和颗粒被二甲苯脱去,进一步证明叶表皮中的纹饰和颗粒是一种蜡质,蜡质除去后暴露出光滑的叶角质 层。星星草叶表皮蜡质含量经测定高达5.98 mg/g,说明星星草蜡质非常丰富,有利于星星草在高盐的生境下生长。



图1 盐胁迫下星星草叶表皮结构

Fig. 1 The structure of leaf epidermis in Puccinellia tenuiflora to salt stress

A. 环境扫描下叶上表皮,示叶表皮细胞与气孔器分布 (×400) Environmental scanning electron microscope (ESEM) photograph of the upper epidermal surface, showing epidermis cells and the distribution of stoma complexes (×400); B. 环境扫描下叶表皮,示蜡质颗粒的分布 (×550) ESEM photograph of the epidermal surface, showing the distribution of wax grains (×550); C. 冷冻干燥下叶表皮,示丰富的蜡质纹饰 (×1500) Photograph of the epidermal surface prepared by the freeze-drying method, showing the wax ornamentation (×1500); D. 冷冻干燥下叶表皮,示蜡质颗粒的分布 (×400) Photograph of the epidermal surface prepared by the freeze-drying method, showing the distribution of wax grains (×400); E. 常规制样下叶下表皮,示表皮毛和气孔器的分布,气孔器下陷 (×250) Photograph of the lower epidermal surface prepared by the conventional method, showing the distribution of epidermis hairs and stoma complexes (×250); F. 常规制样下叶表皮,示丰富的蜡质纹饰 (×3000) Photograph of the epidermal surface prepared by the conventional method, showing the significant wax ornamentation (×3000); G. 常规制样下叶表皮,示蜡质颗粒 (×750) Photograph of the epidermal surface prepared by the conventional method, showing the significant wax ornamentation (×3000); G. 常规制样下叶表皮,示蜡质颗粒 (×750) Photograph of the epidermal surface prepared by the conventional method, showing the epidermal surface prepared by the conventional method, showing the epidermal surface prepared by the conventional method, showing the significant wax ornamentation (×3000); G. 常规制样下叶表皮,示蜡质颗粒 (×750) Photograph of the epidermal surface prepared by the conventional method, showing the epidermal surface prepared by removal epicuticular waxes method, showing the epidermis cells and stoma complexes (×3000)

by the conventional method

对不同方法制样下的盐胁迫星星草叶表皮蜡质纹饰和蜡质颗粒进行能谱分析,结果见图2。图2(a)是环境扫描下表皮蜡质 颗粒(图1,b)X射线电子探针元素点分析结果,从图中可以看出,C、O、Mg、Al、Si、S、K、Ca元素的峰值较高。图2(b)是冷冻干燥 制样下表皮蜡质纹饰(图1,c)X射线电子探针元素点分析结果,从图中可以看出,除去背景的金峰外,C、O、Na、Mg、Si、S、Cl、K、 Ca元素的峰值较高。图2(c)是冷冻干燥制样下蜡质颗粒(图1,d)X射线电子探针元素点分析结果,从图中可以看出,除去背景 的金峰外,C、O、Mg、Al、Si、S、Cl、K、Ca元素有明显峰。比较图2(b)和图2(c)的图谱可以发现,它们的峰谱相类似,说明蜡质纹



图 2 盐胁迫下星星草叶表皮 X 射线电子探针元素点分析图谱

Fig. 2 X-ray microanalysis of leaf epidermis of P. tenuiflora to salt stress

a 环境扫描下的蜡质颗粒微区 Wax grains by Environmental scanning method; b 冷冻干燥下的蜡质纹饰微区 Wax ornamentation by the freeze-drying method; d 常规制样下的蜡质颗粒微区 Wax grains by the freeze-drying method; d 常规制样下的蜡质颗粒微区 Wax grains

饰和蜡质颗粒的组成元素相同,各元素的含量也近似,表明蜡质颗粒可能来源于蜡质纹饰。比较图2a、图2b和图2c可以发现,三 者的图谱类似,说明从元素组成分析上看,冷冻干燥制样能够反映材料的真实情况。图2d为常规制样下颗粒(图1,g)的X射线 电子探针元素点分析结果,从中可以看出,除去金背景峰外,其它金属离子峰消失。对常规制样下纹饰进行X射线电子探针元素 分析(图1,f),其结果与图2(d)相似,说明在制样过程中原来存在于蜡质中的金属离子被洗去。比较图2a与图2d不难发现,星星 草叶表皮蜡质含有盐离子,也即星星草可以通过蜡质向外分泌盐分,来适合星星草的高盐生境。对未经盐胁迫的星星草叶表皮 蜡质纹饰和蜡质颗粒进行能谱分析,结果与图2类似,说明蜡质泌盐可能是星星草演化出的一种正常的生理功能。 3 讨论

植物生长的环境是多种多样的,为了适应不同环境,植物在长期进化过程中逐渐形成了与其生长环境相适应的结构,而植物的表面直接与外界环境接触,外界环境的各种不利因素首先作用于叶片表面,植物叶表面结构特征可以真实再现植物与环境相适应^[2,8]。因此,结合生态环境研究叶片的表面结构,对探讨植物演化具有一定的学术价值和意义。对星星草叶表皮扫描电镜的观察结果证明它对于干旱环境的适应,突出表现在表皮细胞及其附属物上。表皮细胞上的蜡质颗粒和蜡质纹饰是植物对不同生态环境的适应特征,表皮细胞外切向壁蜡质纹饰对保持体内水分不过多散失,减少强光对植物的"灼伤"等均能起到保护作用。上表皮气孔较少,下表皮气孔多,且常常下陷关闭,减少了蒸腾,使其体内保持有必要的水分,是旱生植物表皮结构的特征。表皮毛的存在有助于减少强光照射,增大反射,降低光吸收。陆静梅^[8]认为叶表面表皮毛具有两重性,一是控制水份蒸腾;二是保护作用。

对于星星草能够在高盐的生境下生长,陆静梅^[9]认为这与根部薄壁细胞形成发达的通气组织有关,这种结构使根直接通过 地上部器官自空气中获得氧气,弥补碱性土壤板结缺乏的氧。目前的研究表明,盐胁迫是一种复合胁迫,表现为渗透胁迫、营养 胁迫和离子毒害等^[10]。植物将钠离子排除在苗外可通过限制吸收进入根或阻止向苗的转运来实现^[11,12],然而对于盐生植物在 盐渍条件下大量有毒钠离子流入根皮层则不主要通过限制吸收进入根或阻止向苗的转运来实现其耐盐的,因为有毒钠离子不 会在盐生植物体内过多累积,可以通过盐腺等将盐排出体外。在碱茅属植物抗盐碱生理机制的研究中,阎秀峰和孙国荣等^[13]根 据确定植物能否泌盐的常用方法——洗叶技术^[14],认为星星草具有泌盐能力,并认为这是星星草具有很强耐盐碱能力的机制 之一。但是,植物是否具有泌盐能力最终必须确定其是否具有可泌盐的结构。朱兴运等^[15]、陆静梅等^[9]、阎顺国^[16]和沈禹颖^[17]对 星星草解剖学和叶表面扫描电镜观察均未发现星星草具有盐腺或类似的泌盐结构,本文通过不同方法制样观察星星草叶片表 面结构也未发现盐腺。但是这并不意谓着星星草不具有泌盐能力,因为对星星草叶表面蜡质纹饰和蜡质颗粒的能谱分析发现, 蜡质中含有钠、镁、钾、氯、钙、硫等元素,其中一些元素与已报道的盐腺分泌液中的元素相同^[18]。由于星星草叶表面没有任何类 似于盐腺的泌盐结构,因此体内过多的盐分可能通过蜡质的形成随蜡质排出体外。由于盐胁迫和未胁迫条件下星星草蜡质都含 有盐离子,因此蜡质泌盐可能是星星草特有的正常功能。

环境扫描电镜是近年出现的一种新型电镜,样品无须干燥及镀金,结构真实性得以体现,对样品X 射线元素分析,可以排除 由于样品处理(固定、脱水、导电)产生的干扰,获得更精确的结果,但分辨率有限,样品在样品室内观察时间较短^[19]。冷冻干燥 制样不经过固定和脱水等过程,对样品进行 X 射线元素分析较准确,其缺陷是细胞发生不同程度的变形^[20]。从本文的结果看, 常规制样可以清晰地显示叶表皮的蜡质层,脱蜡制样展现了叶表皮蜡质层脱去后光滑的角质层,进一步确证叶表皮含有丰富的 蜡质层,但常规制样和脱蜡制样由于制样过程(固定、脱水)使金属元素丢失,对样品进行 X 射线元素分析不能反映出真实的情 况。环境扫描制样和冷冻干燥制样对样品X 射线元素分析较为精确,利用这两种制样方法对盐胁迫和未胁迫的星星草叶片进行 X 射线元素分析,结果都表明蜡质纹饰和蜡质颗粒都富含盐离子。上述的结果都表明星星草叶表皮的蜡质层具有一定泌盐功 能,而星星草的这种通过蜡质层分泌的盐分在其适应盐碱生境中的作用到底有多大?星星草叶片表面的蜡质层的形成是随叶片 的发育完全一次形成的还是不断形成的? 蜡质中的盐分是随蜡质层的形成逐渐产生的,还是在蜡质层形成之后加入的? 这些问 题均有待于进一步研究。

References:

- [1] Wang Z Q. Salted soil in China. Beijing: Science Press, 1993. 1~6.
- [2] Gong M, Ding N C, He Z Y, et al. Correlation between lipid preoxidation damage and ultrastructural changes of mesophyll cells in barley and wheat seedlings during salt stress. Acta Botanica Sinica, 1989, 31(11): 841~846.
- [3] Yan Y F, Sun G R. Study of physiological ecology of Puccinellia tenuiflora. Beijing: Science Press, 2000.
- [4] Yin S J, Shi D C, Yan H. Main strain responses in the plants of *Puccinellia tenuiflora* (Griseb.) scribn et merr. to alkaline (Na₂CO₃) stress. Job Bullet alkaline (Na₂CO₃) stress. Job B
- [5] Yan S G, Baker D A. Adaptive responses of Puccinellia tenuiflora to salinity and osmotic stress. Acta Prataculture Sinica, 1994, 3(3):

24 **卷**

 $43 \sim 51.$

- [6] Sun G R, Guan Y, Yan X F. Effect of Na₂CO₃ stress on defensive enzyme system of *Puccinellia tenuiflora* seedlings. Acta Agrestia Sinica, 2001, 9(1): 34~38.
- [7] Wang P, Li J D, Eo Y L. Studies on the adaptability and tolerance of *Puccinellia tenuiflora* to salinity in the salinized grassland in songnen plain. Acta Agrestia Sinica, 1997, 5(2): 80~84.
- [8] Lu J M, Li J D. Anatomical observation of leaves epidermis of five xerophytes in the grass of song nen. J. Northeast Normal Uvirersity, 1994, (3): 79~82.
- [9] Lu J M, Li J D, Jing D Z, et al. The anatomical study of Puccinella tenuiflora (turcz.) scribn. et merr. J. Northeast Normal Uvirersit, 1994, (1): 63~66.
- [10] Nublat A, Desplans J, Casse F, et al. Sas1, an Arabidopsis mutant overaccumulating sodium in the shoot, shows deficiency in the control of root radial transport of sodium. Plant Cell, 2001, 13:125~137.
- [11] Schachtman D P, Bloom A J, Dvorak J. Salt-tolerant *Triticum × Lophopyrum* derivatives limit the accumulation of sodium and chloride ions under saline-stress. *Plant Cell Environ.*, 1989, **12**: 47~55.
- Schachtman D P, Munns R. Sodium accumulation in leaves of triticum species that differ in salt tolerance. Aust. J. Plant Physiol. 1992, 19: 331~340.
- [13] Yan X F, Sun G R, Li J X, et al. Primary studies on salt excretion ability of Puccinellia tenuiflora. Pratacultural Science, 1994, 11(3): 36~39.
- [14] Thomson W W, Faraday C D, Oross J W. Salt glands. In: Baker D. A. ed. Solute transport in plant cells and tissues. New York: Jhon Wiley and Sons, 1988. 498~537.
- [15] Zhu X Y, Wang S M, Yan S G, et al. The research progresses of plant resistance to salt and its mechanism of resistance in the genus Puccinellia. Acta Prataculture Sinica, 1994, 3(3): 9~15.
- [16] Yan S G. Observation on ultrastructure of leaf epidermis of Puccinellia tenuiflora: salt—secretive or not. Acta Prataculturae Sinica, 1997, 6(3): 32~36.
- [17] Shen Y Y. Scanning electron microscopic observation on leaves of some plants species. Acta Prataculturae Sinica, 1997, 6(3): 32~36.
- [18] Fahn A. Secretory tissues in vascular plants. New Phytol., 1987, 108: 229~257.
- [19] Egerton-Warburton L M, Griflin B J. Levels of mineral nutrients in fresh and frozen bulk hydrated biological specimens: a comparison of EDS data collected in the environmental SEM and a conventional cryo-SEM. *Micron.*, 1994, 25(6): 607~612.
- [20] Michael S, Werner M K. Ion relations of symplastic and apoplastic space in leaves from Spinacia oleracen L. and Pisum sativum L. under salinity. Plant Physiol., 1991, 97: 990~997.

参考文献:

- [1] 王遵亲. 中国盐渍土. 北京: 科学出版社, 1993. 1~6.
- [2] 龚明,丁念诚,贺子义,等.盐胁迫下大麦和小麦叶片脂质过氧化伤害与超微结构变化的关系.植物学报,1989,31(11):841~846.
- [3] 阎秀峰,孙国荣. 星星草生理生态学研究. 北京:科学出版社, 2000.
- [4] 尹尚军,石德成,颜宏.碱胁迫下星星草的主要胁变反应.草业学报,2003,12(4):51~57.
- [6] 孙国荣,关,阁秀峰.盐胁迫对星星草保护酶系统的影响.草地学报,2001,9(1):34~38.
- [7] 王苹,李建东,欧勇玲. 松嫩平原盐碱化草地星星草的适应性及耐盐生理特性的研究. 草地学报,1997,5(2):80~84.
- [8] 陆静梅,李建东. 松嫩草地五种耐盐碱植物叶表皮的解剖观察. 东北师大学报(自然科学版),1994,(3):79~82.
- [9] 陆静梅,李建东,景德章,等. 星星草解剖研究. 东北师范大学学报(自然科学版),1994,(1):63~66.
- [13] 阎秀峰,孙国荣,李景信,等. 星星草泌盐能力的初步研究. 草业科学,1994,(3):36~39.
- [15] 朱兴运,王锁民,阎顺国,等.碱茅属植物抗盐性及抗盐机制的研究进展.草业学报,1994,3(3):9~15.
- [16] 阎顺国.碱茅叶表面超微结构的观察——碱茅不是泌盐植物的结构证据.草业学报,1997,6(3):32~36.
- [17] 沈禹颖. 三种盐生植物叶表的扫描电镜观察. 草业学报, 1997, 6(3): 32~36.