

Na₂CO₃ 胁迫下星星草 (*Puccinellia tenuiflora*) 幼苗叶表皮和叶肉细胞中 K、Na 的相对含量

陈 刚^{1,2}, 杨 威³, 孙国荣^{1,2,*}, 彭永臻^{4,5}, 周晓阳⁶, 周卫东⁷, 杜 坤², 张 彪²

(1. 扬州大学 江苏省作物遗传生理重点实验室, 江苏扬州 225009; 2. 扬州大学生物科学与技术学院, 江苏扬州 225009;

3. 哈尔滨商业大学食品工程学院环境工程系, 哈尔滨 150076; 4. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150009;

5. 北京工业大学环境与能源工程学院, 北京 100022; 6. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083;

7. 扬州大学测试中心, 江苏扬州 225009)

摘要: 对不同强度 Na₂CO₃ 胁迫处理下星星草幼苗叶片表皮和叶肉细胞中 K、Na 的透射电镜 X-射线电子探针显微分析和叶片表面扫描电镜 X-射线电子探针显微分析, 结果表明: 在相同胁迫强度下, 无论是表皮细胞还是叶肉细胞的细胞壁和液泡中的 Na 相对含量均明显高于细胞质中的 Na 相对含量, 并且 K 的相对含量均明显比相应部位 Na 的相对含量高, 细胞壁与液泡中的 Na 相对含量变化范围非常接近。在 Na₂CO₃ 胁迫浓度低于 0.1 mol/L 时, 在相同胁迫强度下, K 的相对含量高于 Na 的相对含量, 使细胞质保持相对高的 K/Na 比。而尽管向细胞壁和液泡分流了大量的 Na, 但是细胞质中的 Na 相对含量仍然随着 Na₂CO₃ 胁迫强度的增加而增加, 一方面证明星星草在 Na₂CO₃ 胁迫下维持相对高的 K/Na 比的能力是有一定限度的, 另一方面暗示星星草作为盐生植物在盐碱环境中一定程度上 Na 可以部分地代替 K 而行使部分 K 的生理功能。

关键词: 星星草 (*Puccinellia tenuiflora*); 叶表皮和叶肉细胞; Na₂CO₃ 胁迫; K 和 Na 相对含量; X-射线电子探针显微分析

文章编号: 1000-0933(2007)12-5408-06 中图分类号: Q948 文献标识码: A

The content of K and Na in epidermis and mesophyll cells of *Puccinellia tenuiflora* seedling leaves under Na₂CO₃ stress

CHEN Gang^{1,2}, YANG Wei³, SUN Guo-Rong^{1,2,*}, PENG Yong-Zhen^{4,5}, ZHOU Xiao-Yang⁶, ZHOU Wei-Dong⁷, DU Kun², ZHANG Biao²

1 Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology of Jiangsu Province, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

2 College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

3 College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

4 School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China

5 College of Environmental and Energy Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China

6 School of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

7 Testing Center of Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(12): 5408 ~ 5413.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270234, 30770344, 50138010); 国家 863 重大科技专项资助项目 (2007AA021402); 扬州大学高层次人才科研启动基金资助项目

收稿日期: 2006-10-24; **修订日期:** 2007-04-29

作者简介: 陈刚 (1973 ~), 男, 江苏吴江人, 博士, 主要从事植物生理生态学教学与研究. E-mail: zwsl @ yzu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: grsun @ yzu.edu.cn

Foundation item: The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30270234, 30770344, 50138010), 863 Key Sci-tech Special Program (No. 2007AA021402), Science Foundation of High Level Scholar of Yangzhou University

Received date: 2006-10-24; **Accepted date:** 2007-04-29

Biography: CHEN Gang, Ph. D., mainly engaged in plant physiology and ecology. E-mail: zwsl @ yzu.edu.cn

Abstract: *Puccinellia tenuiflora*, a perennial gramineal plant, which can grow in alkalized soil after artificial planting, and it has been employed in the biological harness of alkalized soil. The salt entered *Puccinellia tenuiflora* can be eliminated via stoma or along with wax secretion to leaf surface. There is high content of Na and K and other elements on leaf surface when it grows normally, and content of Na and K on leaf surface shows regular changes under the Na₂CO₃ stress of different concentrations. However, how the Na and K content alternate and the function of maintaining the ion balance and osmotic adjustment in mesophyll cells under Na₂CO₃ stress are not completely understood? The K and Na level in epidermis and mesophyll cells of *Puccinellia tenuiflora* seedling leaves under the Na₂CO₃ stress of different concentrations was investigated by using transmission electron microscopy, environmental scanning electron microscopy, and X-ray electron probe microanalysis. Under the same stress intensity, the relative content of Na in either cell wall or vacuole of epidermis and mesophyll cells was higher than that in cytoplasm, and the K level was significantly higher than Na in the same location. The changes of Na content in cell wall and vacuole had the same range. When Na₂CO₃ concentration was lower than 0.1 mol L⁻¹, the relative content of K was higher than that of Na under the same stress intensity, so the K / Na ratio in cytoplasm was relatively high. Although plenty of Na was dispersed into cell wall and vacuole, the relative content of Na in cytoplasm was still elevated along with Na₂CO₃ stress. These data confirmed that the ability of *Puccinellia tenuiflora* to maintain the higher K / Na ratio in cytoplasm is finite, and implied that *Puccinellia tenuiflora*, as salt tolerant plant growing in salt and alkali environment, its cytoplasmic Na may partially substitutes for K and takes the function of K to some extent.

Key Words: *Puccinellia tenuiflora*; epidermis and mesophyll cells; Na₂CO₃ stress; relative content of K and Na; X-ray electron probe microanalysis

韦存虚和孙国荣等证实盐生植物星星草(*Puccinellia tenuiflora*)叶表皮具有泌盐功能的蜡质层^[1]; Pritchard 等观察到沉积在长叶松(*Pinus palustris*)气孔器表面的来源于气孔器保卫细胞的盐结晶^[2]。由此 Sun 等人确定:由于星星草叶表面没有任何类似于盐腺的泌盐结构,气孔便可能成为星星草排出体内盐分的通道^[3]。由气孔排出的盐分可能是随蒸腾流沉积在气孔器附近的^[4]。星星草除了通过气孔排盐之外,也可以通过向叶片表面分泌蜡质的同时伴随有盐分向外分泌,并且这种伴随蜡质分泌的排盐方式是星星草正常的生理功能^[1],因为通过能谱分析检测到在无盐胁迫下星星草叶片表面含有较高含量的 Na 和 K 以及 Mg、Ca、Zn、Cu、Cl、P、S、Si 等元素^[3],其中一些元素与已报道的盐腺分泌的元素相同,如 Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Cl⁻、SO₄²⁻、PO₄³⁻^[4],以及在盐土植物美洲黑红树(*Avicennia germinans* L.)中^[5],伴随 Na 和 Cl 的分泌还有 K、S、Ca、Br 和 Zn 等元素^[6-9],且星星草叶片表面的 Na 和 K 含量因 Na₂CO₃胁迫强度的不同而呈现规律性的变化^[3]。那么,这种变化与叶片细胞内的 Na 和 K 含量以及离子平衡的调节是一种什么关系?在 Na₂CO₃胁迫下叶片不同细胞 Na 和 K 含量如何变化?在维持叶片细胞内的离子平衡和渗透调节中起着什么样的作用?这些问题均尚待回答。因此,本文通过采用透射电镜 X-射线能谱显微分析技术测定不同 Na₂CO₃胁迫强度下叶片表皮细胞和叶肉细胞细胞壁、细胞质和液泡中的 Na 和 K 相对含量尝试回答上述问题。

1 材料与方法

1.1 材料培养与胁迫处理

星星草种子由大庆市畜牧局草原站提供,用容积为 600 ml 的塑料盆装满珍珠岩,加注 Hoagland 培养液至珍珠岩表面湿润,然后将星星草种子均匀撒在其上,于人工气候箱中培养,昼/夜温度为 25℃/20℃,光照 65 klx,相对湿度 75%。待幼苗长到二叶期以上(50 d)进行盐胁迫处理。将幼苗分为 7 组,分别用漏斗加 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 ml 10 % Na₂CO₃至珍珠岩底层,并补充相应容量的 Hoagland 培养液至原湿润程度,使 7 组塑料盆中 Na₂CO₃溶液浓度相应为 0, 0.2% , 0.4% , 0.6% , 0.8% , 1.0% , 1.2%。取倒二功能叶的中部叶块进行测定。

1.2 测定方法

1.2.1 渗透势测定

在盐胁迫处理 7 d 后,采用 5520 型蒸压计渗压计(Hansatech 公司)测定星星草培养基质的渗透势^[9,10]。

星星草培养基质的渗透势与 Na_2CO_3 胁迫溶液浓度之间的关系见图 1。

1.2.2 透射电镜 X-射线能谱显微分析样品的制备

将 $2\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ 大小的植物材料小块装入一个用铝网制成的封闭小盒中,迅速投入液氮冷却的异戊烷和丙烷混合液中(异戊烷和丙烷的体积比为 1:3)进行快速冷冻,之后转入冷冻干燥机中进行冷冻干燥,干燥好的材料装入 T 型真空渗透管中,将材料用乙醚在真空及 $27\text{ }^\circ\text{C}$ 下进行渗透 24 h;然后将材料用苯乙烯-甲基丙烯酸丁酯在常压下渗透后,转入小胶囊在 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 下聚合一周。包埋后的材料用超薄切片机干刀切片,制成厚度为 $1\text{ }\mu\text{m}$ 的半薄切片,喷碳后备用^[11]。

1.2.3 透射电镜能谱分析

将制备好的片子,在配有 EDAX-9100 能谱仪的日立 H-800 型透射电镜下进行测定。加速电压为 150

kV,取出角为 25° ,样品的测量计数时间为 60 s,测出的数值分别表示每种元素的峰值减去背景值后的每秒脉冲数(CPS),以 CPS 表示元素的相对含量。在检测时,测量细胞壁、细胞质、液泡中的钠(Na)和钾(K)的相对含量^[11],结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示($n = 7$)。

1.2.4 叶片表面 K 和 Na 元素相对含量分析

采用环境扫描电镜结合 X 射线电子探针显微分析方法^[1,3]。

1.2.5 数据统计分析

采用 SigmaPlot2000 统计软件进行相关分析并作图,图中数据均为 6~7 次重复实验的平均值。

2 结果与分析

2.1 Na 在细胞中的相对含量

随着 Na_2CO_3 胁迫强度的增高,星星草叶片表皮细胞和叶肉细胞内 Na 的相对含量的变化总体上均呈现上升趋势,在本实验 Na_2CO_3 胁迫强度变化的范围内,在相同胁迫强度下,无论是表皮细胞还是叶肉细胞的细胞壁和液泡中的 Na 相对含量均明显高于细胞质中的 Na 相对含量(图 2)。说明在 Na_2CO_3 胁迫下,星星草幼苗

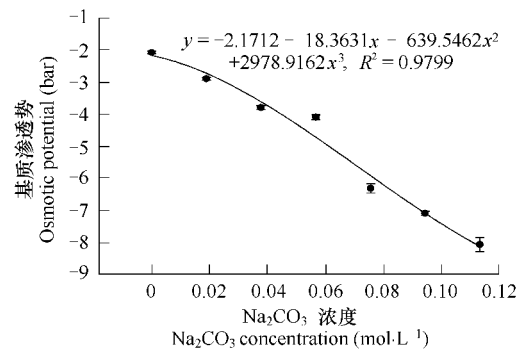


图 1 星星草幼苗培养基质的渗透势与 Na_2CO_3 浓度的关系

Fig. 1 Relationship between osmotic potential and Na_2CO_3 concentration of culture solution

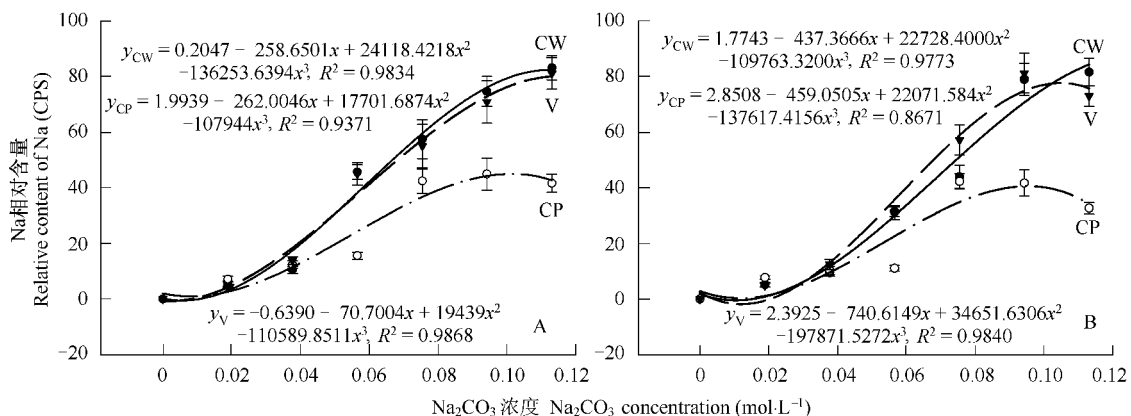


图 2 星星草叶片表皮细胞(A)和叶肉细胞(B)的细胞壁(CW)、细胞质(CP)和液泡(V)内 Na 的相对含量和培养基中 Na_2CO_3 浓度的关系

Fig. 2 Relationship between relative content of Na in cell wall (CW), cytoplasm (CP) and vacuole (V) of epidermis (A) and mesophyll (B) cell of seedling leaves of *P. tenuiflora* and Na_2CO_3 concentration of culture solution

叶片内存在一种 Na 排出细胞质进入细胞壁或液泡的调节机制,从而降低细胞质中的 Na 浓度,以维持细胞内的渗透平衡。

2.2 K 在细胞中的相对含量

随着 Na₂CO₃胁迫强度的增高,星星草幼苗叶片表皮细胞和叶肉细胞的细胞壁、细胞质和液泡中 K 相对含量与 Na₂CO₃胁迫强度均呈显著的非线性关系,只是在本实验 Na₂CO₃胁迫强度变化的范围内,表皮细胞壁的 K 相对含量变化范围(100 ~ 130(CPS)左右)均较叶肉细胞的细胞壁以及表皮细胞和叶肉细胞的细胞质和液泡的小(100 ~ 170(CPS)左右)(图 3A 和图 3B)。

从 K 和 Na 在细胞中相对含量的对比可以看出,在相同胁迫强度下,无论是表皮细胞还是叶肉细胞的细胞壁、细胞质和液泡 K 的相对含量均明显比相应部位 Na 的相对含量高(图 2 和图 3)。总体上看,随着 Na₂CO₃胁迫强度的增高,无论表皮细胞还是叶肉细胞中 Na 的相对含量呈明显增加趋势,在无 Na₂CO₃胁迫条件下最低;而 K 的相对含量变化则明显不同,但均表现为在无 Na₂CO₃胁迫的条件下最高(图 2 和图 3)。

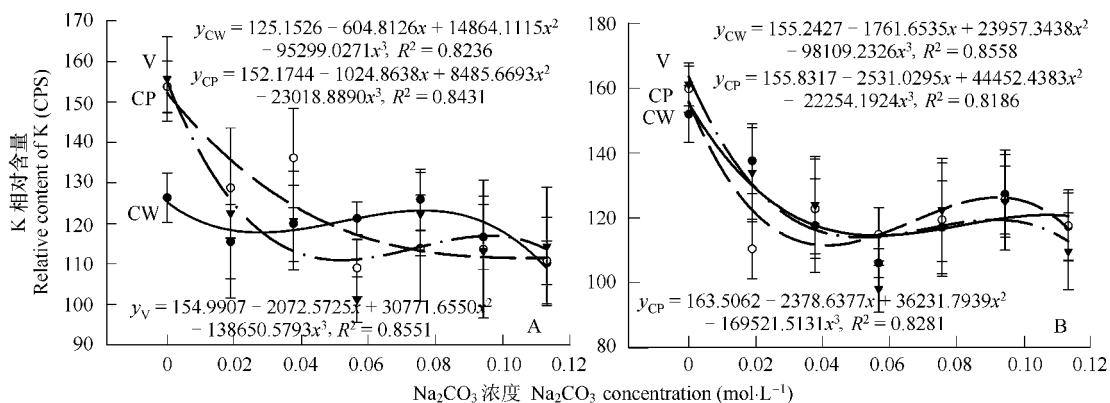


图3 星星草叶片表皮细胞(A)和叶肉细胞(B)的细胞壁(CW)、细胞质(CP)和液泡(V)内 K 的相对含量和培养基质中 Na₂CO₃ 浓度的关系

Fig. 3 Relationship between relative content of K in cell wall (CW), cytoplasm (CP) and vacuole (V) of epidermis (A) and mesophyll (B) cell of seedling leaves of *P. tenuiflora* and Na₂CO₃ concentration of culture solution

2.3 细胞中的 Na/K 比值

随着 Na₂CO₃胁迫强度的增高,星星草幼苗叶片表皮细胞和叶肉细胞的细胞壁、细胞质和液泡中 Na/K 比值与其培养基渗透势均呈显著的非线性关系(图 4)。在本实验 Na₂CO₃胁迫强度变化的范围内,总体变化趋势上看,表皮细胞和叶肉细胞的细胞壁、液泡中的 Na/K 比值变化规律相似,而细胞质的 Na/K 比值变化规律则明显不同。在相同胁迫强度下,表皮细胞和叶肉细胞的细胞质的 Na/K 比值均较表皮细胞和叶肉细胞的细胞壁和液泡中的低。

3 讨论

在盐胁迫下,Na 在胞质中的大量积累,造成细胞生理生化代谢过程的抑制以及胞质内离子平衡的破坏。而细胞质维持 K/Na 比相对恒定的能力是植物盐适应的决定因素之一,具有高 K/Na 比的植物耐盐性较强^[12~14]。本试验和前人研究结果均表明,作为盐生植物的星星草,无论在碱性盐还是中性盐胁迫下,Na 作为渗透调节物质,在其离子平衡的调节中是不可或缺的元素^[15~17]。盐胁迫下星星草幼苗体内 Na 的积累在某种程度上是由于叶片通过表面蜡质或气孔分泌相对较多的 K 而维持的^[3,16](图 5),这也是星星草作为盐生植物的典型特征之一。

植物细胞溶质在盐胁迫下通过 Na 的排出或 Na 的分室化作用保持高的 K/Na 比^[18,19]。无论是表皮细胞还是叶肉细胞的细胞壁和液泡中的 Na 相对含量变化范围均明显高于细胞质中的 Na 相对含量的变化范围(图 2),并且 K 的相对含量均明显比相应部位 Na 的相对含量高(图 2 和图 3)。尤其是细胞壁与液泡中的 Na

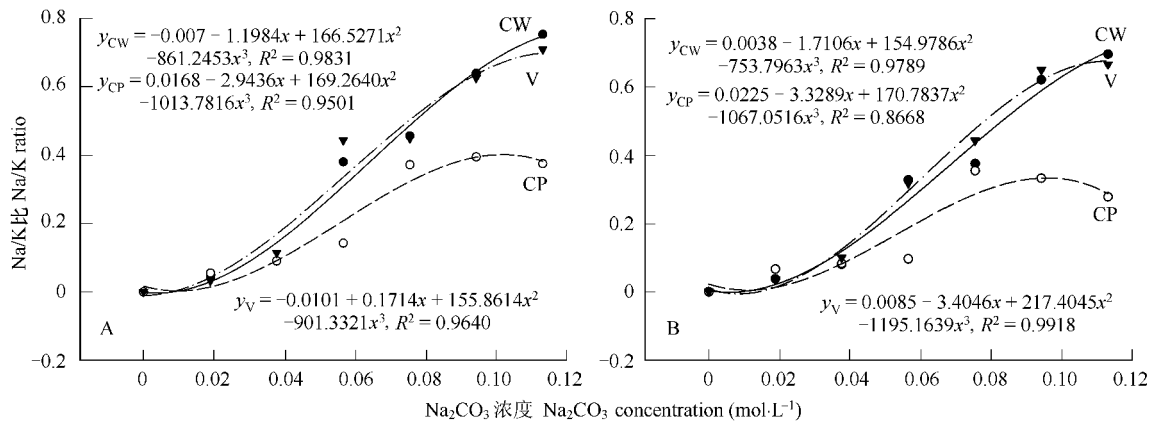


图4 星星草叶片表皮细胞(A)和叶肉细胞(B)的细胞壁(CW)、细胞质(CP)和液泡(V)内Na/K比和培养基质中Na₂CO₃浓度的关系

Fig. 4 Relationship between Na / K ratio in cell wall (CW), cytoplasm (CP) and vacuole (V) of epidermis (A) and mesophyll (B) cell of seedling leaves of *P. tenuiflora* and Na₂CO₃ concentration of culture solution

相对含量变化范围非常接近,说明Na₂CO₃胁迫下,星星草幼苗通过两条途径保持细胞内相对高的K/Na比,一是利用能量通过质膜反向转运体将Na⁺排出细胞^[18, 19]进入细胞壁,进而通过叶片表面蜡质的分泌^[1]和气孔排除细胞内过剩的Na,二是利用跨液泡膜的pH梯度交换质子并通过Na⁺/H⁺反向转运体向液泡积累Na^[20]。

星星草幼苗表皮细胞的细胞壁中K相对含量随着Na₂CO₃胁迫强度的增加而变化不大(图2A),可能是由叶片表面伴随蜡质的分泌^[1]或气孔排出K较多引起的(图5)。而尽管向细胞壁和液泡分流了大量的Na,但是细胞质中的Na相对含量仍然随着Na₂CO₃胁迫强度的增加而增加,说明星星草在Na₂CO₃胁迫下维持相对高的K/Na比的能力是有一定限度的,亦或是在不同强度盐胁迫下Na和K在生理功能方面存在转换过程,即在低盐胁迫下正常生理代谢需要K,而在高盐胁迫下Na取代K而行使K的功能或Na行使抗性生理调节功能^[3],因为在盐生植物中Na可以部分地代替K,如在维持气孔保卫细胞正常膨压的调节中Na可以取代K^[21]。

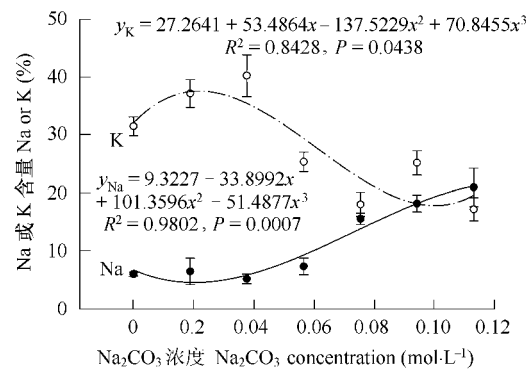


图5 不同Na₂CO₃胁迫下星星草幼苗叶片表面Na和K的百分含量

Fig. 5 The percentage content of Na and K in the surface of seedling leaves of *P. tenuiflora* under different concentration of Na₂CO₃ stress

References:

- [1] Wei C X, Wang J B, Chen Y F, et al. Epicuticular wax of leaf epidermis: a functional structure for salt excretion in a halophyte *Puccinellia tenuiflora*. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(11): 2451—2456.
- [2] Pritchard S G, Prior S A, Rogers H H, et al. Calcium sulfate deposits associated with needle substomatal cavities of container-grown longleaf pine (*Pinus palustris*) seedlings. *Int. J. Plant Sci.*, 2000, 161 (6): 917—923.
- [3] Sun G R, Peng Y Z, Shao H B, et al. Do *Puccinellia tenuiflora* have the ability of salt exudation? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005, 46: 197—203.
- [4] Fahn A. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytol.*, 1988, 108: 229—257.
- [5] Sobrado M A, Greaves E D. Leaf secretion composition of the mangrove species *Avicennia germinans* (L.) in relation to salinity: a case study by using total-reflection X-ray fluorescence analysis. *Plant Sci.*, 2000, 159: 1—5.
- [6] Boon P I, Allaway W G. Rates of ionic specificity of salt secretion from excised leaves of the mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Aquat.*

- Bot. , 1986, 26: 143 — 153.
- [7] Lüttge U. Structure and function of plant glands. Ann. Rev. Plant Physiol. , 1971, 22: 23 — 44.
- [8] Mac Farlane G R, Burchett M D. Zinc distribution and excretion in the leaves of the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Environ. Exp. Bot. , 1999, 41: 167 — 175.
- [9] Wang J B, Sun G R, Chen G, *et al.* The relationship between light energy utilization and dissipation of PSII of *Puccinellia tenuiflora* seedlings and osmotic potential of culture solution under Na₂CO₃ stress. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(1): 115 — 121.
- [10] Wang Y X, Sun G R, Wang J B, *et al.* Relationships among MDA content, plasma membrane permeability and the chlorophyll fluorescence parameters of *Puccinellia tenuiflora* seedlings under NaCl stress. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(1): 122 — 129.
- [11] Li Q, Fritz E. X-ray microanalysis of ion contents in roots of *Populus maximowiczii* grown under potassium and phosphorus deficiency. J. Plant Physiol. , 1991, 138: 180 — 185.
- [12] Maathuis F J M, Amtmann A. K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity; the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. Ann. Bot. , 1999, 84: 123 — 133.
- [13] Ram n S, Rodríguez-Navarro A. Ion homeostasis during salt in plants. Curr. Opin. Cell Biol. , 2001, 13: 399 — 404.
- [14] Gao Y S, Chen J S. Regulatory Mechanism of Ions Transporters on Salt Adaptation in Plants. Bulletin of Science and Technology, 2005, 21(6): 683 — 688.
- [15] Yan S G, Baker D A. Adaptive responses of *Puccinellia tenuiflora* to salinity and osmotic stress. Acta Prataculturae Sinica, 1994, 3(3): 43 — 51.
- [16] Yan X F, Sun G R, Li J, *et al.* Changes of several osmotica in *Puccinellia tenuiflora* seedling under alkali salt stress. Bulletin of Botanical Research, 1999, 19(3): 347 — 355.
- [17] Yan S G. The responses of *Puccinellia tenuiflora* to the salinity and osmotic stress in nutrient absorption. Acta Prataculturae Sinica, 1995, 4(2): 66 — 70.
- [18] Blumwald E. Sodium transport and salt tolerance in plants. Current Opinion in Cell Biology, 2000, 12: 431 — 434.
- [19] Eckardt N A. Plant Biology. Plant Cell, 2001, 13: 2165 — 2137.
- [20] Zhang J L, Zhang J W, Chen Z H, *et al.* Research progress on Na⁺/H⁺ antiporter of plant and its relation to salt tolerance. Grassland and Turf, 2005, (4): 3 — 8.
- [21] Robinson M F, Very A A, Sanders D. How can stomata contribute to salt tolerance? Ann. Bot. , 1997, 80: 387 — 393.

参考文献:

- [1] 韦存虚, 王建波, 陈义芳, 等. 耐盐植物星星草叶表皮具有泌盐功能的蜡质层. 生态学报, 2004, 24(11): 2451 ~ 2456.
- [9] 王建波, 孙国荣, 陈刚, 等. Na₂CO₃胁迫下星星草幼苗叶片 PSII 光能利用和耗散与培养基质渗透势的关系. 生态学报, 2006, 26(1): 115 ~ 121.
- [10] 汪月霞, 孙国荣, 王建波, 等. NaCl 胁迫下星星草幼苗 MDA 含量与膜透性及叶绿素荧光参数之间的关系. 生态学报, 2006, 26(1): 122 ~ 129.
- [14] 高永生, 陈集双. 膜离子转运蛋白对植物盐适应能力的调节机制. 科技通报, 2005, 21(6): 683 ~ 688.
- [15] 阎顺国, Baker D A. 碱茅(*Puccinellia tenuiflora*)对盐胁迫及渗透胁迫的适应性反应. 草业学报, 1994, 3(3): 43 ~ 51.
- [17] 阎顺国. 碱茅营养吸收对盐胁迫及渗透胁迫的反应. 草业学报, 1995, 4(2): 66 ~ 70.
- [20] 张俊莲, 张金文, 陈正华, 等. 植物 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白与植物耐盐性的研究进展. 草原与草坪, 2005, (4): 3 ~ 8.