

## 长时间盐胁迫对苋菜叶片细胞结构的影响

王羽梅<sup>1,\*</sup> 任安祥<sup>1</sup> 潘春香<sup>1</sup> 新居直祐<sup>2</sup>

<sup>1</sup>韶关大学英东生物工程学院, 韶关 512005; <sup>2</sup>日本名城大学农学部, 日本名古屋 468-8502

**摘要** 生长40 d的苋菜秧苗用300 mmol·L<sup>-1</sup>的NaCl处理28 d后, 生长受抑, 叶面积变小, 叶绿素含量降低; 叶肉增厚、微管束变小, 细胞内容物减少、叶绿体收缩、液泡扩大, 细胞核染色程度变浅, 形状拉长; 细胞内淀粉含量增加。

**关键词** 苋菜; 盐胁迫; 叶绿体; 淀粉; 细胞结构

## Effect of Long-time Salt Stress on Cell Structure of Leaves in *Amaranthus tricolor*

WANG Yu-Mei<sup>1,\*</sup>, REN An-Xiang<sup>1</sup>, PAN Chun-Xiang<sup>1</sup>, NII Naosuke<sup>2</sup>

<sup>1</sup>College of Yingdong Bioengineering, Shaoguan University, Shaoguan 512005; <sup>2</sup>College of Agriculture, Meijo University, Tempaku, Nagoya 468-8502, Japan

**Abstract** The results indicated that, after exposed to 300 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl for 28 d, the growth of amaranth was limited, the leaf area was reduced, as the results, the chlorophyll content decreased, the leaf thicken, the vascular bundle diminished, the inclusion cut down, the chloroplast shranked, the vacuole enlarged, the coloration extent of karyon thinned, the shape of karyon elongated, and the starch content increased.

**Key words** *Amaranthus tricolor*; salt stress; chloroplast; starch; cell structure

苋菜是苋科C<sub>4</sub>植物, 其耐盐性报道很少。我们就苋菜在盐渍条件下的光合适应性<sup>[1]</sup>, 渗透压调节物质甜菜碱合成酶的表达<sup>[2]</sup>, 光合、甜菜碱含量等随盐处理时间的变化动态<sup>[3]</sup>, 不同种类和浓度盐对其生长、离子吸收和甜菜碱含量的影响<sup>[4,5]</sup>进行研究的结果表明, 人工培养室内栽培的苋菜用300 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl处理后, 生长、光合活性和蒸腾速度均受抑, 叶片中甜菜碱含量增加达40倍<sup>[3]</sup>。这些都是短时间(5~7 d)盐胁迫后的结果, 而且以研究生长和生理代谢为主。此外, 迄今有关盐胁迫对植物内部细胞显微结构影响的报道还很少。崔世茂等<sup>[6]</sup>报道, 柑桔实生苗用500 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl处理1 d和用300 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl处理3 d后, 根尖细胞的细胞质减少, 液泡扩大, 细胞核染色程度低下。NaCl处理时间延长和处理浓度增加时, 液泡化程度加剧, 细胞核崩溃。Katsuhara等<sup>[7~9]</sup>的实验结果表明, 盐引起大麦根尖细胞中DNA的降解和细胞核的崩溃。至于长时间盐胁迫对植物叶片细胞显微结构的影响则还未见报道。为此, 本文延长处理时间到28 d, 观察长时间盐胁迫后, 叶片内部和细胞显微结构

的变化。

### 材料与方法

将在25℃下发芽的苋菜(*Amaranthus tricolor*)种子(来自日本Takii种苗株式会社)于12月2日播种在装有蛭石和腐叶土(按4:1混合)培养基的200 mL容积苗钵中, 在玻璃温室中栽培。出苗后用1/2浓度的MS营养液浇灌。生长40 d后, 选择大小比较一致的苗分为2组, 每组各30株。NaCl处理液的浓度为300 mmol·L<sup>-1</sup> (用基本营养液调整盐浓度), 以1/2基本营养液为对照。处理开始后的最初1周, 每日从苗钵的上面充分浇液, 之后将底部有孔的营养钵浸在溶液中2~3 cm深。为防止吸收和水分蒸发引起盐浓度的改变, 每2 d更换处理液和营养液1次。处理28 d后, 取样测定叶绿素含量, 并作叶组织固定。

测定叶绿素含量用直径8 mm的打孔器从叶的

收稿 2003-06-23 修定 2003-12-05

资助 广东省自然科学基金项目(021272)。

\*E-mail:wym990@sina.com, Tel:0751-8120069

绿色部分取叶圆片各5片,置于100%的乙醇溶液中,用锡箔纸包住,于4℃黑暗下抽提。当叶圆片完全变白时,取出叶圆片,稀释定容提取液后,用分光光度计按Wintermans和De Mots<sup>[10]</sup>的方法比色,并计算出叶绿素a和b的含量。每个处理均重复3次,取平均值。

叶面积根据叶长乘叶宽与叶面积的相关法<sup>[11]</sup>( $r^2=0.994$ )求得。叶片厚度和维管束直径按Hattersley<sup>[12]</sup>所描述的方法,将从显微镜下拍摄的叶切片照片放大后描绘其轮廓,从轮廓的数值和放大比例求得。

观察叶片显微结构时,从充分展开的叶片上切取一定大小的组织于固定液(含有4%低聚甲醛和1%戊二醛的 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二甲胂酸缓冲液,pH 7.2)中,真空脱气后在4℃下过夜固定。固定的切片用乙醇系列脱水后,用Technovit 7100树脂(Kulzer, Wehrheim, Germany)包埋。切片厚度为1.5 mm,染色后用光学显微镜(LM)观察,经甲基蓝染色后观察叶片的整体结构;用DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)染色后,以荧光显微镜观察细胞核的形状和亮度;用 $\text{I}_2\text{-KI}$ 染色后观察淀粉的积累情况<sup>[11,13]</sup>。

## 结果与讨论

### 1 盐胁迫对叶片生长和叶绿素含量的影响

表1显示,300  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 处理的苋菜幼

表1 盐胁迫对苋菜叶面积、叶绿素含量和叶绿素a/b的影响

Table 1 Effects of salt stress on leaf area, chlorophyll contents and chl a/b

处理	叶面积 / $\text{cm}^2$	叶绿素含量 / $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-2}$	叶绿素 a/b
对照	18.2±1.9A(100)	4.28±0.17A(100)	3.1
盐处理	6.7±0.5B(36.7)	1.23±0.15B(28.7)	2.6

苗生长明显受抑,新叶的展开速度和叶片的扩大速度都减慢。另外,随着盐处理时间的延长,全株叶片都有显著的退绿黄化现象。叶绿素含量和叶绿素a/b均下降,表明盐对叶绿素a的影响大于b。这与前文<sup>[1]</sup>中三色苋叶色变化的结果是一致的。据此可以推测,盐不仅抑制叶绿素的合成,而且还有可能加速叶绿素的分解。

### 2 盐胁迫对叶片厚度和维管束直径的影响

盐处理前,将如表2所示的未展开叶的大小进行标记,处理28 d后标记叶取样固定,测量叶厚度和维管束鞘的直径。结果表明,处理开始时,经盐处理的植株,其刚刚展开的叶厚度增加;而处理前已经分化和处理期间展开的叶,则因盐的影响,分化速度和叶面积生长速度均受抑,所以叶片不但小而且薄。盐处理时已经展开的叶,其维管束鞘已经分化完成<sup>[11]</sup>,所以,尽

表2 处理前后标记叶的大小及处理后叶片厚与维管束鞘直径

Table 2 The leaf size, thickness, and bundle sheath diameter before and after treatment

叶序号	处理前 叶长/cm	取样时叶片长×宽/cm		叶片厚/ $\mu\text{m}$		维管束鞘直径/ $\mu\text{m}$	
		对照	盐处理	对照	盐处理	对照	盐处理
1	3.0~4.0	8.0×3.9	5.7×2.4	194.6±16.8	219.8±35.6	93.4±12.3	94.3±12.0
2	2.1~2.4	8.7×3.3	5.3×2.2	185.6±12.0	193.0±6.3	84.6±13.1	78.1±6.3
3	1.2~1.5	8.2×3.2	3.2×1.3	183.9±12.1	143.7±14.4	89.8±8.7	63.6±5.6
4	<1.0	9.2×3.2	1.9×0.5	193.3±9.1	111.3±6.1	79.0±8.6	48.2±5.2

管面积较小,但维管束鞘的直径与未经盐处理的没有差异;而未展开叶维管束鞘的分化受到了盐的抑制,直径明显变小(表2)。

### 3 盐胁迫对叶片内部显微结构的影响

如图1所示,未经盐处理的叶中叶绿体大而饱满,在叶肉细胞和维管束鞘细胞中占去绝大部

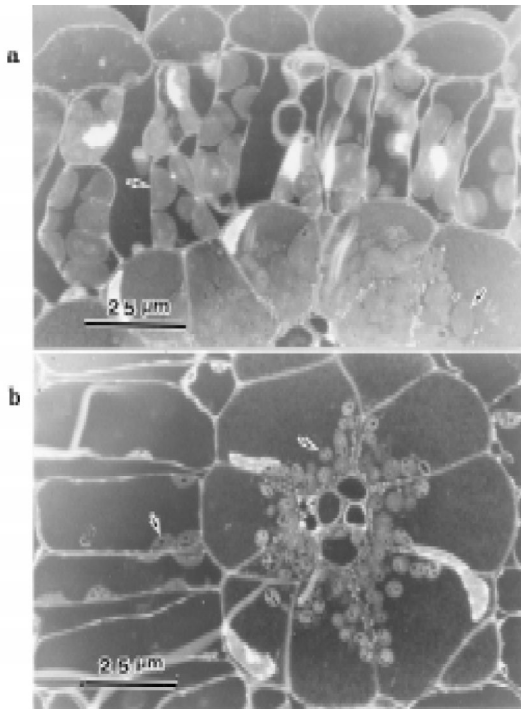


图1 甲基蓝染色的苋菜叶片纵切面

Fig.1 Photomicrographs of cross-sections of amaranth leaves stained with methyl blue showing differences of chloroplast distribution between control (a) and NaCl treatment (b)

a. 对照; b. NaCl 处理。箭头所指为叶绿体。

分体积; 而盐处理的叶中叶绿体明显变小, 在叶肉细胞中紧靠细胞壁排列, 在维管束鞘细胞中向心排列, 在叶肉细胞和维管束鞘细胞中比例极小, 表明盐对叶绿体发育有明显影响。其中机制尚待进一步研究。盐处理的叶肉细胞的绝大部分

被液泡充满, 液泡化程度显著加剧。这与崔世茂等<sup>[6]</sup>在柑桔根尖细胞中的结果相一致。我们的实验中盐处理时间长, 液泡化程度更加突出。至于盐处理后叶细胞液泡化的生理意义也待深入探讨。

此外, 盐对叶细胞的细胞核也有影响。图2显示, 经盐处理的叶细胞的细胞核不但明显变小, 而且染色程度也明显变弱, 表明盐处理后细

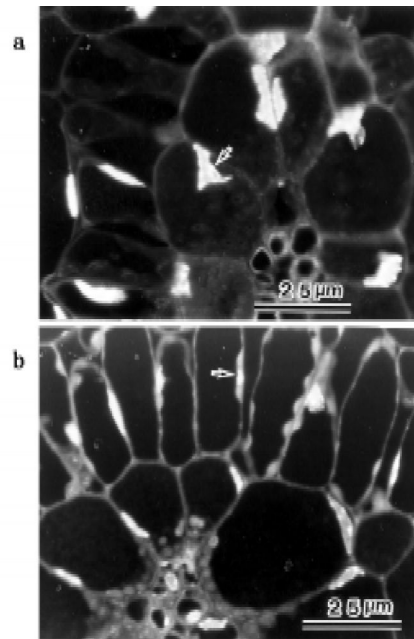


图2 DAPI荧光染色的苋菜叶片纵切面

Fig.2 Fluorescence micrographs of cross-sections of amaranth leaves stained with DAPI showing differences of cell nucleus between control (a) and NaCl treatment (b)

a. 对照; b. NaCl 处理。箭头所指为细胞核。

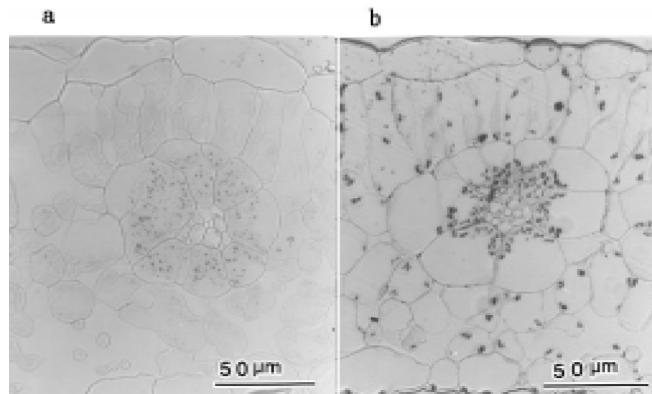


图3 I<sub>2</sub>-KI溶液染色的苋菜叶片纵切面

Fig.3 Photomicrographs of cross-sections of amaranth leaves stained with I<sub>2</sub>-KI solution showing differences of starch accumulation between control (a) and NaCl treatment (b)

a. 对照; b. NaCl 处理。黑色颗粒为淀粉粒。

细胞核中 DNA 含量减少。盐处理的细胞核在形态上也发生变化, 细胞核呈长条形, 紧贴于细胞壁上, 这可能和液泡的扩大挤压有关。崔世茂等<sup>[6]</sup>和Katsuhara和Kawasaki<sup>[8]</sup>分别在柑桔和大麦见到短时间盐处理会促使根尖细胞中细胞核 DNA 降解、细胞核崩溃。我们的结果也表明盐处理会使叶片的 DNA 含量降低, 细胞核形态虽也发生改变, 但并没有引起核的崩溃。这表明盐处理对根尖细胞核的影响可能比对叶片细胞核的影响更大。

#### 4 盐胁迫对苋菜淀粉积累的影响

从图 3 可以看到, 盐处理的苋菜, 不但叶片细胞中淀粉积累量明显增加, 而且淀粉粒也显著变大, 叶绿体中充满了淀粉粒。另外, 淀粉的分布也发生明显变化: 未作盐处理的淀粉主要积蓄在维管束鞘细胞中, 叶肉细胞中很少; 而经盐处理的叶肉细胞和维管束鞘细胞中都观察到大量大而多的淀粉粒。这可能是由于盐对光合产物的代谢和运出的抑制比对光合作用的抑制影响更大所致。

#### 参考文献

- 1 Wang Y, Meng Y-L, Ishikawa H et al. Photosynthetic adaptation to salt stress in three-color leaves of a *C<sub>4</sub>* plant *Amaranthus tricolor*. *Plant Cell Physiol*, 1999, 40:668~674
- 2 Meng Y-L, Wang YM, Zhang DB et al. Isolation of a choline monoxygenase cDNA clone from *Amaranthus tricolor* and its expressions under stress conditions. *Cell Res*, 2001, 11(3): 187~193
- 3 Wang Y, Nii N. Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *J Hort Sci Biotech*, 2000, 75(6):623~627
- 4 王羽梅, 藤井清永, 原田健一等. 各種の塩処理がアマランサスの成長、イオン含量ならびにグリシンベタイン含量とその生成酵素の発現に及ぼす影響. 名城大学農学報, 2001, 37: 119~127
- 5 王羽梅, 任安祥, 潘春香等. 不同浓度 NaCl 对苋菜幼苗生长、光合速率、离子吸收和甜菜碱含量的影响. *植物生理学通讯*, 2003, 39(1):13~16
- 6 崔世茂, 高瀬わかな, 新居直祐. NaCl 処理がスダチ実生の Na, Cl 含量ならびに根の細胞構造に及ぼす影響. 名城大学農学報, 2002, 38:23~31
- 7 Katsuhara M. Apoptosis-like cell death in barley roots under salt stress. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38:1091~1093
- 8 Katsuhara M, Kawasaki T. Salt stress induced nuclear and DNA degradation in meristematic cell of barley roots. *Plant Cell Physiol*, 1996, 37:169~173
- 9 Katsuhara M, Shibasaka M. Cell death and growth recovery of barley after transient salt stress. *J Plant Res*, 2000, 113:239~243
- 10 Wintermans JFGM, De Mots DA. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls and their pheophytins in ethanol. *Biochim Biophys Acta*, 1965, 109:448~453
- 11 Wang Y, Nii N. Anatomical development and biochemical in ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase accumulation during leaf enlargement in *Amaranthus tricolor*. *J Jpn Soc Hort Sci*, 2001, 70(6):675~681
- 12 Hattersley PW. Characterization of *C<sub>4</sub>* type leaf anatomy in grasses (Poaceae). Mesophyll: bundle sheath area ratios. *Ann Bot*, 1984, 53:163~179
- 13 Kuroiwa H. The application of the Technovit embedding method for the research of plant embryology. *Plant Morphol*, 1991, 3: 43~47