

狗枣猕猴桃彩叶色素含量和结构共同影响叶色

王振兴¹, 曹建冉¹, 秦红艳¹, 赵滢¹, 陈丽², 艾军^{1*}, 刘涛³

¹中国农业科学院特产研究所, 长春130112; ²吉林农业大学园艺学院, 长春130112; ³集安市特产局, 吉林集安134200

摘要: 以狗枣猕猴桃彩叶和绿叶为实验材料, 通过叶片结构及光谱学特性探讨了彩叶的呈色原因。结果显示: (1)尽管彩叶(白色和粉红色)与绿叶的颜色差异很大, 但彩叶仍保持较高的叶绿素含量; (2)所有彩色叶表均无特殊结构, 但其叶肉结构更疏松且与正常叶片差异显著; (3)白色叶片对红、绿和蓝光的反射均很强, 而粉红色叶片对红光反射较强。此外, 叶片两侧的光谱学特性也存在一些差异。基于上述研究, 我们认为狗枣猕猴桃叶片呈现白色不是由于叶绿素的严重缺失, 而是与特殊叶片结构导致的光反射有关; 粉红色叶片的叶色一方面取决于较高的花青素含量, 另一方面叶片结构可能对其叶色也有影响。

关键词: 狗枣猕猴桃; 彩叶; 结构特征; 反射光谱

狗枣猕猴桃(*Actinidia kolomikta*)为猕猴桃科猕猴桃属多年生藤本植物, 俗称狗枣子。主要分布于我国西南高山及东北亚地区。狗枣猕猴桃叶片颜色在一年中动态变化, 具有极高的观赏价值, 是一个有发展前景的彩叶树种。研究表明叶片叶绿素分布、含量以及其他色素的存在是叶片呈现彩色的主要原因(Konoplyova等2008; Rocca等2011)。然而, 也有研究表明植物叶片呈现白色或银色归因于叶面表皮绒毛、表皮蜡质的存在以及其他结构变化(Liakopoulos等2006; Sheue等2012)。这些特殊的结构使叶表皮反射了大量可见光, 从而导致叶片呈现白色。根据彩叶的形成原因, 彩叶可划分为四类: (1)叶绿素亏缺型, 如拟南芥及水稻突变体; (2)其他色素型, 如花色苷大量积累导致叶片呈现红色; (3)气室型, 如秋海棠属彩叶植物叶片显示白色主要由于栅栏组织层含有大量气室, 使得入射光大量反射, 造成叶片呈现白色; (4)表皮型, 表皮细胞的变异及表皮细胞上具有蜡质等附着物(王振兴等2016)。前两者属于色素型彩叶, 后两者属于结构型彩叶。迄今为止, 狗枣猕猴桃叶色变化是由叶片结构变化所致还是色素和结构两种原因兼而有之, 尚未得出明确的结论。因此, 本文通过比较彩叶与绿叶的表皮细胞形态、叶片结构、叶片反射光谱以及色素的含量, 探讨叶片结构和叶色的关系, 为阐明狗枣猕猴桃彩叶呈色机理提供理论依据。

材料与方法

1 材料

狗枣猕猴桃(*Actinidia kolomikta* (Maxim. et Rupr.) Maxim.)每片彩叶的颜色变化规律是叶片首

先呈现白色, 在6月初由白色变成粉红色。由于不同新梢的发育时期的差异, 在6月中下旬至7月初会出现两种颜色并存的现象。为保证采样时期的统一性以及避免同一彩叶由于采样时期不同而不断受损伤等原因, 选择在同一时间点取样。白叶期叶片为变白的时期, 红叶期叶片为白色叶片变成粉红色的时期。

试验于2015年7月在中国农业科学院特产研究所北方特色浆果资源圃中进行, 选择生长势、株高和树龄等相近的狗枣猕猴桃植株3株, 每株选取大小、生长状况一致的向阳功能叶片为试验材料供测定。

2 方法

2.1 叶片表皮光学特性观察

表皮亮度观察: 表皮亮度和表皮细胞反射模式能够很好地反映叶片光学特性(Zhang等2009), 具体方法为: 叶片用蒸馏水冲洗干净后, 置于载玻片上, 用配有汞灯的解剖镜于暗室内观察。

2.2 显微结构观察

采用石蜡切片法, 于2015年7月取绿叶、白叶及粉红色叶, 经FAA固定、叔丁醇梯度脱水、渗蜡、浸蜡、包埋等过程, 最后用旋转式切片机切片, 切片厚度10~12 μm 。为观察淀粉类的分布, 参照李正理(1978)席夫试剂组织化学染色法。染色后, 用加拿大树胶封片, Olympus CX-31显微镜观察并照相。

收稿 2016-07-25 修定 2016-10-21

资助 吉林省科技公关计划(20140204034NY)。

* 通讯作者(E-mail: aijun1005@163.com)。

2.3 超微结构观察

参照Tsukaya等(2004)的方法, 样品采用4%戊二醛常温下固定2 h以上(4°C 6 h以上); 用pH 6.8、浓度 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液浸洗4次, 每次10 min; 用30%、50%、70%、80%、90%乙醇梯度脱水各1次, 每次15~20 min; 100%乙醇脱水1次、100%丙酮2次, 每次30 min, 置换新旧脱水剂时动作要迅速; 乙酸异戊酯置换2次, 每次20 min, 第1次置换时原丙酮液留1/2加置换液; 液化 CO_2 临界点干燥, 置BC-II离子溅射仪中镀金属膜, 经JSM-6610扫描电镜观察组织的超微结构。

半薄切片的制作参照巩玥等(2014)的方法, 取白色、粉红色及绿色叶片(3 mm×1 mm), 用3%戊二醛前固定, 用PBS溶液漂洗3次后, 用锇酸固定过夜, 经系列乙醇脱水、Spur树脂包埋、切片(厚度为1 μm)、甲苯胺蓝染色。Olympus CX-31显微镜观察并照相。

2.4 反射光谱测量

参照Xue等(2013)的方法, 用配有叶片专用测量探头的Unispec田间便携式光谱仪(PP-System, 美国), 测量连体叶片的反射光谱。光谱仪的测定波段范围为310~1 100 nm, 光谱采样间隔(波段值)为313 nm, 光谱分辨率<10 nm。根据不同波段光谱反射率, 按照Gitelson和Merzlyak (1994)、Gitelson

等(2001)的方法计算叶片近轴侧和远轴侧的叶绿素和花色苷的相对含量, (1)叶绿素含量: $\text{PSND}_{635} = (R_{800} - R_{635}) / (R_{800} + R_{635})$; (2)花色苷含量: $\text{ARI} = R_{800} [(1/R_{510}) - (1/R_{700})]$ 。

2.5 色素含量的测定

叶绿素含量参照高俊凤(2006)的方法, 取不同颜色叶片, 用丙酮提取叶绿素, 使用分光光度计测定在665 nm和649 nm的吸光值, 每种颜色叶片测定3次。花色苷相对含量参照Kytridis和Manetas (2006)的方法, 取不同颜色叶片, 用甲醇、水和盐酸(90:10:1, $V/V/V$)提取液提取, 使用分光光度计测定在527 nm的吸光值, 花色苷相对含量用吸光值进行评估。

实验结果

1 狗枣猕猴桃叶色变化

狗枣猕猴桃芽开始萌发后, 新稍枝条1~3节位的叶片一般为绿色, 4~12节位叶片展开后一般为白色斑叶, 随着叶片发育, 白色叶片逐渐转变成粉红(图1)。通过测定白色、粉红色和绿色叶片的叶绿素总含量和花色苷相对含量(表1), 发现白色和粉红色叶的叶绿素总量较绿叶分别低25%和23%, 而粉红色叶片花色苷的相对含量显著高于白叶和绿叶。



图1 狗枣猕猴桃叶片在生长期内的颜色变化

Fig.1 Colour changes during leaf development of variegated leaves in *A. kolomikta*

A: 白色叶片; B: 粉红色叶。

表1 不同颜色叶片叶绿素和花色苷含量的变化

Table 1 Total chlorophyll and anthocyanin content changes of different color leaf

叶片类型	叶绿素含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	花色苷吸光度/ $A \cdot \text{g}^{-1}$
绿色叶片	65.67 ± 5.30^a	0.01 ± 0.00^b
白色叶片	49.21 ± 3.35^b	0.00 ± 0.00^c
粉红色叶片	50.74 ± 2.81^b	0.06 ± 0.00^a

同列不同小写字母表示数据间存在显著性差异($P < 0.05$)。

2 叶表面光学特性

通过在解剖镜下观察(图2), 发现狗枣猕猴桃彩叶有两种光反射模式: 点状反射(spotted pattern, SP)和多角形反射(polygonal pattern, PP)。正常绿色叶片的上表皮细胞在解剖镜下可以观察到细胞中央存在一个亮点, 称为点状反射(SP); 而白色叶片(图2-A)和粉红色叶片(图2-B)上表皮细胞在解

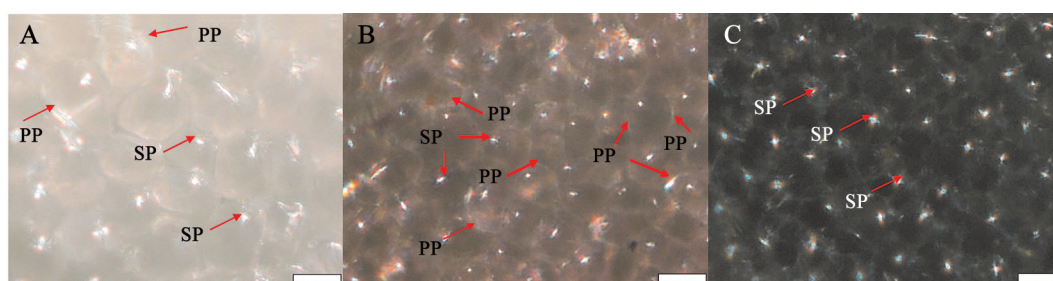


图2 狗枣猕猴桃叶片近轴面表皮光学特性

Fig.2 Optical properties of variegated leaves adaxial surface in *A. kolomikta*

A: 白叶表面; B: 粉红叶表面; C: 绿叶表面。SP: 点状反射; PP: 多角形反射。标尺= 100 μm 。

剖镜下不仅可以观察到点状反射(SP), 也可以观察到表皮细胞周围存在较弱的亮圈, 这些亮圈可以一定程度上反映细胞的形状, 由于多数细胞为不规则多边形, 因此称这类反射为多角形反射(PP)。

3 叶片结构特征

通过对叶片表皮细胞形状观察(图3、4), 发现绿色叶片表皮细胞扁平, 而白色和粉红色叶片表皮细胞呈现半圆形。通过对叶表皮进行观察(图

3-D、E), 发现表皮细胞上并没有观察到绒毛和蜡质等明显的附着物。通过观察半薄切片(图4), 发现绿色叶片栅栏组织由紧密排列的长圆柱形细胞组成, 细胞内还有大量叶绿体。白色和粉红色叶片的栅栏组织细胞均呈不规则圆形, 细胞排列松散, 栅栏组织层内有大量“气室”, 细胞内没有或含有极少量叶绿体。白色、粉红色和绿色叶片远轴侧都含有发育完善的海绵组织, 细胞内均有叶绿体(染色较深的圆点)。

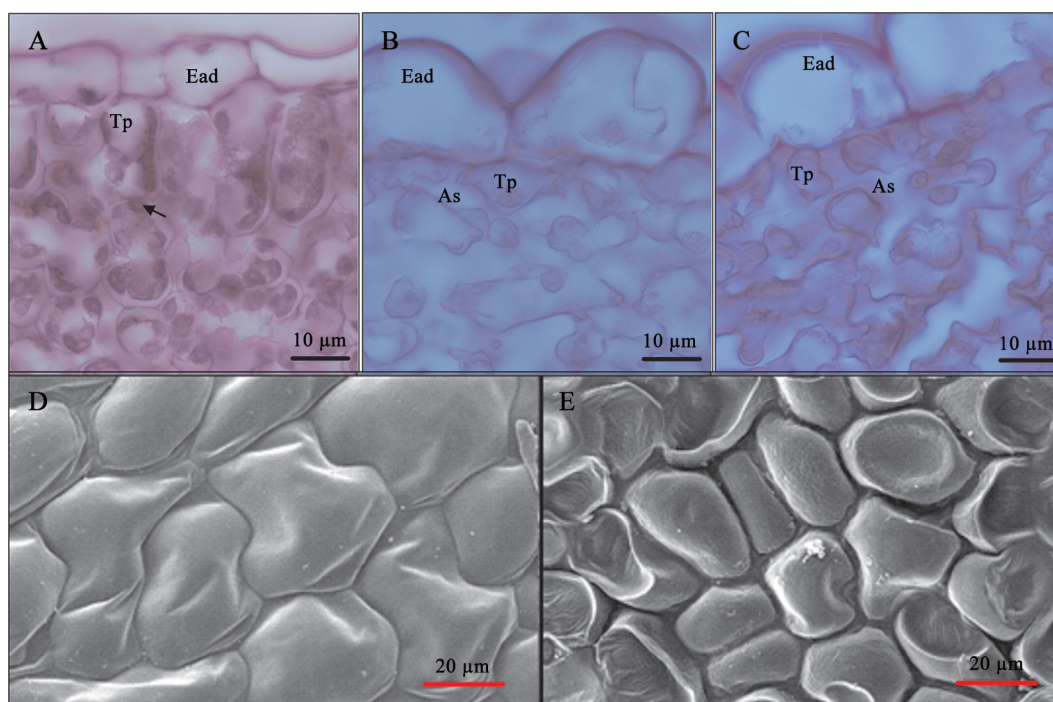


图3 狗枣猕猴桃彩叶显微结构及超微结构

Fig.3 Microstructure and ultrastructure of variegated leaf in *A. kolomikta*

A: 绿叶表皮细胞及栅栏组织; B: 白叶表皮细胞及栅栏组织; C: 粉红色叶表皮细胞及栅栏组织; D: 绿叶表皮细胞; E: 白叶表皮细胞。
Ead: 近轴表皮细胞; Tp: 栅栏组织; As: 气室。

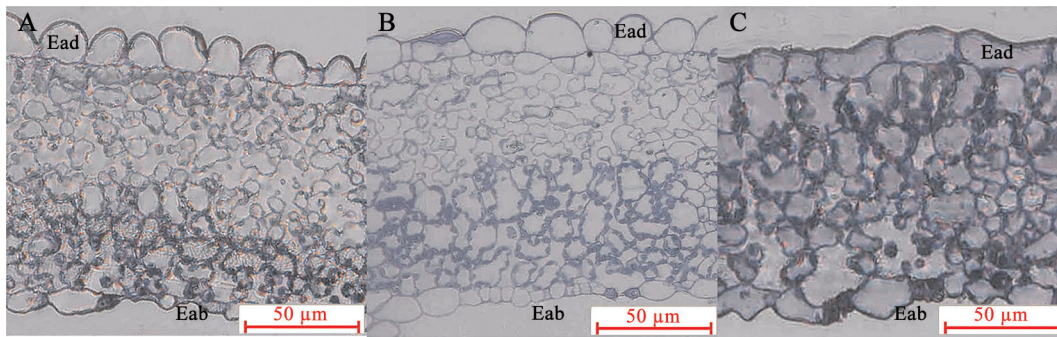


图4 狗枣猕猴桃彩叶半薄切片

Fig.4 Semi-thin sections of variegated leaf in *Actinidia kolomikta*

A: 白色叶片; B: 粉红色叶片; C: 绿色叶片。Ead: 近轴表皮细胞; Eab: 远轴表皮细胞。

4 光谱学特征

不同颜色叶片在425~1 100 nm的反射光谱分析结果显示(图5), 在近轴表面, 白色和粉红色叶片反射率显著高于绿色叶片。白色和粉红色叶片反射率也不相同, 白叶期反射率最高, 其次是粉红色叶片。此外, 白色和粉红色叶片近轴面在近红外波段区域(750~1 100 nm)的反射光谱特征与正常绿

色叶片差异明显, 显著高于绿色叶片。

在远轴表面, 白色和粉红色叶片在425~700 nm的反射光谱无明显差异, 但白色叶片在500~680 nm区段的反射光谱显著高于粉红色和绿色叶片。白色和粉红色叶片近红外波段区域(750~1 100 nm)的反射光谱特征与绿色叶片差异明显, 显著高于绿色叶片。

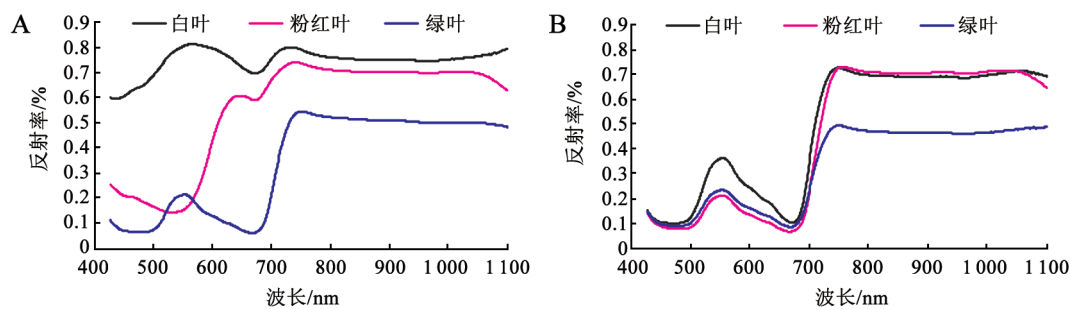


图5 狗枣猕猴桃不同颜色叶片光谱反射的变化

Fig.5 Spectra reflectance changes of different color leaf in *A. kolomikta*

A: 近轴表面光谱反射率; B: 远轴表面光谱反射率。

从图6可以看出, 在近轴表面, 白色叶片在转变成粉红的过程中叶绿素的相对含量呈现逐渐升高的趋势, 而花青素的相对含量表现为红色叶片最高。对于远轴面而言, 白叶转变成粉红的过程中叶绿素的相对含量呈现升高趋势, 粉红色叶的花青素相对含量高于绿叶。

讨 论

众所周知, 影响叶色的主要因素是色素含量。一般情况下叶片中叶绿素含量较其他色素含

量高, 而叶绿素反射绿光, 所以多数情况下叶片呈绿色。本研究中, 白色叶片叶绿素含量仅仅比绿色叶片低20%左右。很显然, 如果没有其他因素的影响, 该条件下叶片应为浅绿色, 而不是白色和粉红色。因此, 很可能由于其他因素的干扰影响了叶片的颜色。

有研究表明, 叶表腺毛和蜡质等附属结构的的存在会影响叶片颜色(Reicosky和Hanover 1978; Karabourniotis等1999)。我们的研究结果显示, 白色叶片近轴面表皮均没有发现明显的腺毛和蜡质,

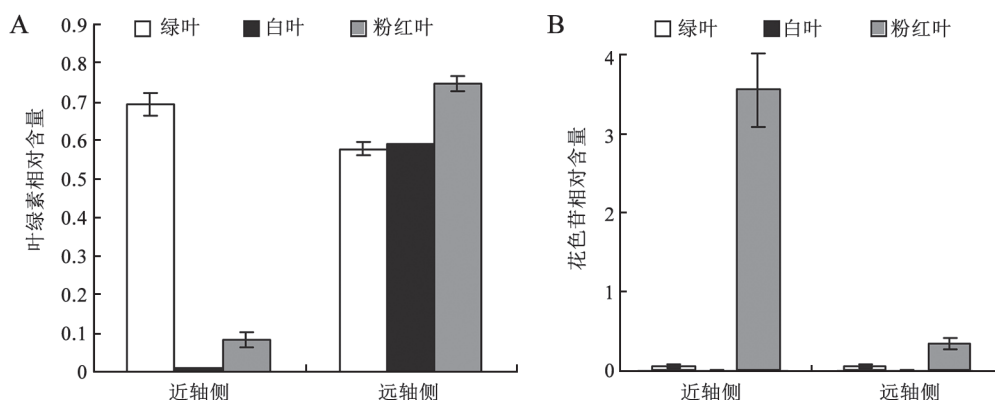


图6 不同颜色叶片近轴侧及远轴侧叶绿素(A)和花青素(B)相对含量

Fig.6 Chlorophyll (A) and anthocyanin (B) relative content of different color leaf in adaxial and abaxial surface

说明没有特殊附着物影响叶片颜色。还有研究表明,彩叶可能由于叶片内部结构变化导致叶片呈现不同颜色(Sheue等2012)。本研究中,我们观察到白色叶片与绿色叶片相比,其栅栏组织层存在大量空隙(气室)。Zhang等(2009)和Sheue等(2012)的研究表明秋海棠属等彩叶植物叶片之所以具有白色斑块主要由于栅栏组织细胞间存在气室,入射光在叶肉细胞气室间形成漫反射的缘故。对于狗枣猕猴桃彩叶而言,我们也观察到气室分布于上表皮细胞与叶肉细胞间以及栅栏组织细胞间,而且,在反射光谱中蓝光(450~490 nm)、绿光(490~570 nm)和红光(620~760 nm)的反射率都高于60%。由于入射光在不同气室界面上产生强烈的光反射,在可见光区段呈现全谱均匀反射,类似于太阳光,从而使得白色叶片呈现耀眼的金属白。此外,也有研究表明半球形突状细胞较扁平状细胞具有增强光反射的作用(Gorton和Vogelmann 1996),进而影响叶片颜色。因此,狗枣猕猴桃叶片呈现白色不是由于叶绿素的完全缺失,而是与特殊的叶片结构导致的光反射有关。此外,狗枣猕猴桃彩叶的反射结构不完全相同于之前报道的其他彩叶植物,如秋海棠属(*Begonia*)、粗肋草属(*Aglaonema nitidum*)和广西落檐(*Schismatoglottis calyptata*)等彩叶植物(Sheue等2012),这些植物中气室往往仅分布在栅栏组织细胞与近轴表皮细胞之间。

粉红色叶片与白色叶片不仅仅在叶绿素含量方面非常接近,而且它们在叶表和叶片结构等方面也很相似,两者的主要区别是前者含有很高的

花青素含量。因此,粉红色叶片的红色主要取决于花青素。但是,光谱反射特征和表皮细胞光反射模式的结果显示该叶片也具有反射结构,所以不能安全排除叶片结构对其叶色的影响。也许,结构对光的反射一定程度上减弱了花青素的红色,从而使得叶片呈现粉红色。

因此,狗枣猕猴桃白叶主要由于光反射结构而不是叶绿素的亏缺造成的;随着叶片发育,白叶转变成粉红色叶则主要是花青素积累的结果。

参考文献

- Gao JF (2006). Experiment of Plant Physiology. Beijing: Higher Education Press, 74-76 (in Chinese) [高俊凤(2006). 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 74-76]
- Gitelson AA, Merzlyak MN (1994). Spectral reflectance changes associated with autumn senescence of *Aesculus hippocastanum* L. and *Acer platanoides* L. leaves: spectral features and relation to chlorophyll estimation. *J Plant Physiol*, 143: 286-292
- Gitelson AA, Merzlyak MN, Chivkunova OB (2001). Optical properties and nondestructive estimation of anthocyanin content in plant leaves. *Photochem Photobiol*, 74: 38-45
- Gong Y, Chen HM, Jiang CD, Shi L (2014). Quantification of leaf anatomical structure and its application in a C4 plant, sorghum. *Chin Bull Bot*, 49 (2): 173-182 (in Chinese with English abstract) [巩玥, 陈海苗, 姜闯道, 石雷(2014). 植物叶片解剖结构的量化及其在C4植物高粱中的应用. *植物学报*, 49 (2): 173-182]
- Gorton HL, Vogelmann CT (1996). Effects of epidermal cell shape and pigmentation on optical properties of *Antirrhinum* petals at visible and ultraviolet wavelengths. *Plant Physiol*, 112: 879-888
- Karabourniotis G, Bornman JF, Liakoura V (1999). Different leaf surface characteristics of three grape cultivars affect leaf optical properties as measured with fibre optics: possible implication in stress tolerance. *Aust J Plant Physiol*, 26: 47-53
- Konoplyova A, Petropoulou Y, Yiotis C, Psaras GK, Manetas Y (2008).

- The fine structure and photosynthetic cost of structural leaf variegation. *Flora*, 203: 653–662
- Kytridis VP, Manetas Y (2006). Mesophyll versus epidermal anthocyanins as potential *in vivo* antioxidants: evidence linking the putative antioxidant role to the proximity of oxy-radical source. *J Exp Bot*, 57: 2203–2210
- Liakopoulos G, Nikolopoulos D, Klouvatou A, Vekkos KA, Manetas Y, Karabourniotis G (2006). The photoprotective role of epidermal anthocyanins and surface pubescence in young leaves of grapevine (*Vitis vinifera*). *Ann Bot*, 98: 257–265
- Li ZL (1978). *Plant Flaking Technology*. Beijing: Science Press, 77–78 (in Chinese) [李正理(1978). 植物制片技术. 北京: 科学出版社, 77–78]
- Reicosky DA, Hanover JW (1978). Physiological effects of surface waxes. *Plant Physiol*, 62: 101–104
- Rocca NL, Rascio N, Pupillo P (2011). Variegation in *Arum italicum* leaves. A structural-functional study. *Plant Physiol Biochem*, 49: 1392–1398
- Sheue CR, Pao SH, Chien LF, Chesson P, Peng C (2012). Natural foliar variegation without costs? The case of *Begonia*. *Ann Bot*, 109: 1065–1074
- Tsukaya H, Okada H, Mohamed M (2004). A novel feature of structural variegation in leaves of the tropical plant *Schismatoglottis calyptrate*. *J Plant Res*, 117: 477–480
- Wang ZX, Yu YF, Chen L, Qin HY, Liu YX, Ai J, Zhao Y, Yang YM, Li XY, Wang GF, et al (2016). Advances in leaf pigment composition, structure and photosynthetic characteristics of colored-leaf plants. *Plant Physiol J*, 52 (1): 1–7 (in Chinese with English abstract) [王振兴, 于云飞, 陈丽, 秦红艳, 艾军, 赵滢, 杨义明, 李晓燕, 刘迎雪, 王广富, 等(2016). 彩叶植物叶片色素组成、结构以及光合特性的研究进展. 植物生理学报, 52 (1): 1–7]
- Xue ZC, Gao HY, Zhang LT (2013). Effects of cadmium on growth, photosynthetic rate, and chlorophyll content in leaves of soybean seedlings. *Biol Plant*, 57: 587–590
- Zhang Y, Hayashi T, Hosokawa M, Yazawa S, Li Y (2009). Metallic lustre and the optical mechanism generated from the leaf surface of *Begonia rex* Putz. *Sci Hortic*, 121: 213–217

Common effect of pigment content and leaf structure on leaf color in *Actinidia kolomikta*

WANG Zhen-Xing¹, CAO Jian-Ran¹, QIN Hong-Yan¹, ZHAO Ying¹, CHEN Li², AI Jun^{1*}, LIU Tao³

¹Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China; ²College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun 130112, China; ³Ji'an Special Product Bureau, Ji'an, Jilin 134200, China

Abstract: Coloring reason of variegated leaves in *Actinidia kolomikta* was studied on the base of leaf structure and spectrum characteristics. The results showed: (1) Although variegated leaf color (white and pink) have significantly differed with green leaf, chlorophyll content of variegated leaf still retained higher level; (2) All kind of variegated leaves had no special leaf epidermis structure, but their mesophyll cells were loose, and structure difference of variegated and green leaf was very greatly; (3) White leaf reflected more red, green and blue light, but pink leaf reflected more red light. In addition, reflectance rate of variegated leaves in adaxial and abaxial surface also exit difference. In conclusion, white leaves were not the result of chlorophyll deficiency, it may be due to internal reflection structure; pink leaves were due to anthocyanin accumulation, and leaf structure may also affect leaf color to some degree.

Key words: *Actinidia kolomikta*; variegated leaf; structural characteristic; reflection spectrum

Received 2016-07-25 Accepted 2016-10-21

This work was supported by Jilin Provincial Science & Technology Development Project Agreement (Grant No. 20140204034NY).

*Corresponding author (E-mail: aijun1005@163.com).