

# 白皮松针叶内皮层在盐胁迫中的屏障作用研究

吴小琴<sup>1,2\*</sup>, 张奠湘<sup>1</sup>, 胡玉熹<sup>2</sup>, 林金星<sup>2</sup>

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

**摘要:**应用荧光显微技术、傅里叶变换显微红外光谱分析(FTIR)、扫描电镜及 X-射线能谱微区分析等手段,对白皮松(*Pinus bungeana*)子叶、初生叶及 2 a 生针叶内皮层细胞径向壁的显微结构特征、化学成分,以及在叶子横切面上 Na 和 Cl 的微区分布进行分析。通过荧光显微观察发现,白皮松子叶内皮层不具凯氏带,而初生叶及 2 a 生针叶均存在凯氏带加厚现象。根据 FTIR 的检测结果显示:子叶内皮层细胞径向壁不含木栓质或极少,2 a 生针叶内皮层细胞径向壁木栓质含量高于初生叶。对相应区域的 X 射线微区分析表明,子叶内皮层对 Na 和 Cl 在质外体运输中不起障碍作用,而初生叶与 2 a 生针叶内皮层阻碍 Na 和 Cl 以质外体途径进入维管组织。研究结果表明:具凯氏带加厚的内皮层细胞壁中木栓质含量决定其在质外体运输过程中的生理功能。

**关键词:**白皮松; 内皮层; 盐胁迫; 质外体运输; 傅里叶变换显微红外光谱

中图分类号: Q944.56

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2007)-03-0203-06

## The Function of *Pinus bungeana* Foliar Endodermis as Apoplastic Barrier under Salt Stress

WU Xiao-qin<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Dian-xiang<sup>1</sup>, HU Yu-xi<sup>2</sup>, LIN Jin-xing<sup>2</sup>

(1. South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

**Abstract:** The cellular structure, chemical nature of foliar endodermis and element cellular distribution were investigated in *Pinus bungeana* leaves by the fluorescence microscope, Fourier transform infrared (FTIR) microspectroscopy and energy-dispersive X-ray analysis. The fluorescence microscopy showed that Casparian strips were absent from cotyledon endodermis, while the radial wall of endodermis in primary and two-year-old leaves were occupied with Casparian strips. The FTIR analysis indicated that there was no or very little suberin in endodermis radial wall of cotyledon compared with primary and two-year-old leaves. Furthermore, the content of suberin in endodermis of the primary leaves was lower than that of two-year-old leaves. The energy-dispersive X-ray analysis showed that the endodermis with Casparian strips in primary and two-year-old leaves functioned as apoplastic barriers against Na and Cl. However, no blockage of Na and Cl in cotyledon was observed when they passed through endodermis. It was suggested that physiological function of endodermis with Casparian strips as apoplastic transportation depended on the content of suberin in endodermis cell wall.

**Key words:** *Pinus bungeana*; Endodermis; Salt stress; Apoplastic transportation; Fourier transform infrared (FTIR) microspectroscopy

收稿日期: 2006-10-23

接受日期: 2007-02-13

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目(06300454); 中国科学院华南植物园科研启动基金项目(O553011001)资助

\* 通讯作者 Corresponding author

叶在光合作用中产生的同化产物,通过维管组织运送到植物各个组织中去,为植物的生长发育提供了必需的能量。尽管在植物水分及营养物质的运输中,共质体运输起着重要的作用,但在叶肉组织及根中的质外体运输却占据主导地位<sup>[1,2]</sup>。几乎在所有维管植物的初生根内,其内皮层细胞的径向壁和横向壁上均具木质和栓质化增厚的凯氏带(Casparian strip)结构<sup>[3,4]</sup>,根的内皮层在质外体运输途径中起着明显的障碍作用已得到很好论证<sup>[5-8]</sup>。植物气生器官中内皮层凯氏带的结构与功能很早也已经开始研究<sup>[9]</sup>,但由于研究难度较大,因此多年来进展缓慢。甚至有关松科植物叶子内皮层细胞壁是否具凯氏带结构,过去很长一段时间内存在争议<sup>[10]</sup>。2003年,我们首次报道了从白皮松(*Pinus bungeana*)针叶内皮层中酶解分离得到与根内皮层极为相似的凯氏带结构<sup>[11]</sup>,但对于针叶内皮层及其凯氏带的生理功能并不清楚。

本研究采用白皮松幼苗作为研究材料,通过根外喷施盐溶液,利用荧光显微镜及傅里叶显微红外光谱法(FTIR)对白皮松子叶、初生叶及2a生针叶内皮层的结构与化学成分进行比较,并运用X-射线能谱对钠离子在叶的微区分布情况进行研究,以探讨白皮松叶子内皮层在盐胁迫中的作用机理,这将为进一步研究植物气生器官中内皮层及其凯氏带的生理功能提供理论依据,同时对植物环境适应机制的研究也具有重要的意义。

## 1 材料和方法

**植物材料** 白皮松(*Pinus bungeana* Zucc. ex Endl.)种子取自北京中科院植物所园内,在温室播种,温度为25℃,湿度为75%–80%,生长2a,期间浇灌1/2 MS营养液。白皮松叶子表面用砂纸轻刮,去除表面部分蜡质,然后用100 mmol/L NaCl溶液喷施白皮松叶子,对照植物用去离子水喷施,每天两次,处理时间1个月。选取子叶、初生叶、2a生针叶进行切片,所有切片均来自叶子中间部分。

**组织切片、组化染色及荧光显微镜** 取白皮松子叶、初生叶及2a生针叶的中部,分别切成2 mm大小,并用冰冻切片(AO856, USA)在-20℃下进行横向切片,切片厚度为30 μm,选取完整和较均匀的横切面置于载玻片上。木质素组织化学染

色方法参照文献[12],最后在光学显微镜下观察,并用Spot II照相机(Diagnostic Instrument Inc., USA)进行数字图像采集。凯氏带荧光染色参照Brundrett等的小檗碱-苯胺兰对染方法<sup>[13]</sup>,最后在紫外光激发波长为365 nm的荧光显微镜(Q500IW, Carl Zeiss, Germany)下观察并照相。

**傅里叶变换显微红外光谱** 将白皮松幼苗的子叶、初生叶及2a生针叶的徒手切片,置于氟化钡晶片上,经50℃充分干燥30 min后,放在装有MCT检测器及显微镜的Perkin-Elmer Cetus MAGNA 750 FTIR光谱仪(Nicolet Corp., Japan)中记录FTIR光谱,光谱分辨率8 cm<sup>-1</sup>,测量范围4 000–800 cm<sup>-1</sup>,扫描次数为128次。

**扫描电镜及X射线能谱** 将经100 mmol/L NaCl处理及未经处理的白皮松幼苗子叶、初生叶及2a生针叶,置于冰冻切片机中,在-20℃下快速冷冻切片,厚度为30 μm。然后将切片进行冷冻干燥,并在-80℃下放置7 d,再依次于-60℃、-50℃、-40℃、-30℃、-20℃、-10℃、0℃、10℃下过渡到室温,用导电胶固定在样品台上,经LB-3型离子溅射仪喷镀金膜,最后置于场发射扫描电镜(XL30 SFEG, FEI Corp., USA)进行扫描,同时对Na和Cl微区分布作X射线能谱分析。扫描电镜加速电压为30 kV,样品倾斜角30°,将入射光斑限大小为50 μm×50 μm;X射线能谱仪采用无标样定量分析程序进行定性定量分析,并计算Na和Cl相对质量百分比。

## 2 结果和分析

### 2.1 组织化学及荧光显微观察

白皮松幼苗子叶、初生叶及2a生针叶横切片经盐酸-间苯三酚染色后,置于光学显微镜下进行观察,其结果如图1:A、B、C所示。3种叶子的表皮细胞、内皮层细胞径向壁、木质部及输导组织对木质素组织化学检测均呈阳性反应,显示为红色。但运用能观察到内皮层凯氏带的小檗碱-苯胺兰对染法后,在荧光显微镜下观察发现,上述3种样品的表皮细胞、木质部及部分输导组织激发成黄绿色荧光,而子叶内皮层细胞径向壁在365 nm光波下并无激发荧光(图1:D、E、F)产生。初生叶与2a生针叶内皮层的径向壁,即凯氏带均显出黄绿色荧光,

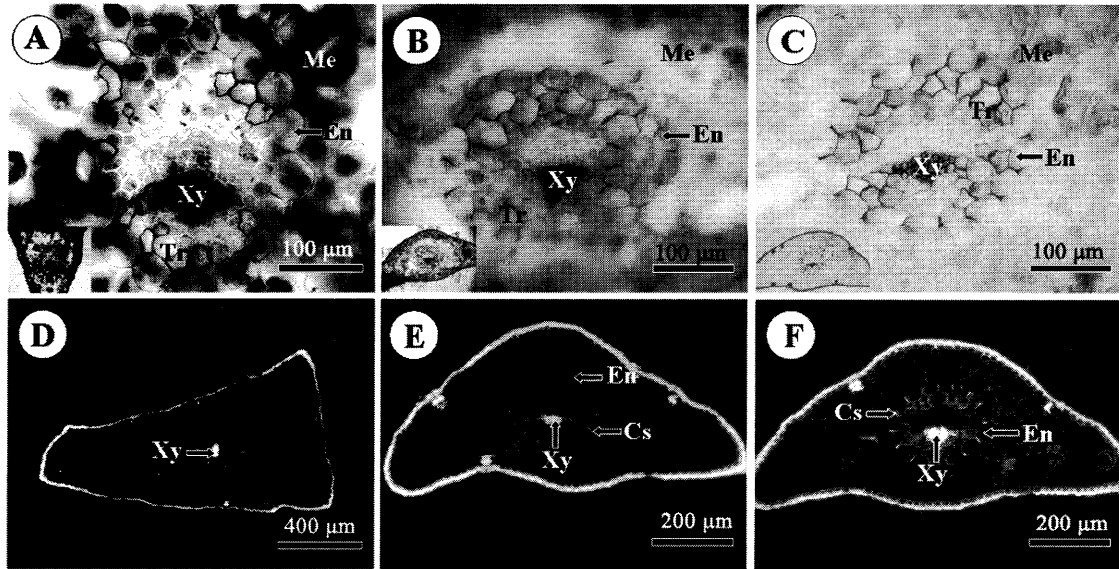


图1 白皮松叶子横切面, 示盐酸-间苯三酚组织化学染色及小檗碱-苯胺兰荧光染色图

Fig. 1 Transverse sections of leaves of *P. bungeana*, showing the HCl-phloroglucinol reaction and berberine-aniline blue-excited fluorescence

A, D: 子叶 Cotyledon; B, E: 初生叶 Primary leaf; C, F: 2 a 生针叶 Two-year-old leaf; Cs: 凯氏带 Casparian strip; En: 内皮层细胞 endodermis; Me: 叶肉细胞 mesophyll; Tr: 转输组织 transfusion tissue; Xy: 木质部 xylem.

但两者的荧光强度相比, 前者明显弱于后者。

### 2.2 傅里叶显微红外光谱分析

白皮松子叶、初生叶及2 a 生针叶内皮层径向壁的 FTIR 检测结果, 如图2所示。子叶、初生叶及2 a 生针叶内皮层径向壁在  $3347\text{ cm}^{-1}$  有较宽的吸收峰, 其对应的化学官能团为羟基中的 O-H 拉升、N-H 伸缩振动。由此表示, 甲基、亚甲基  $\text{CH}_2$  非对称伸缩振动的吸收峰在子叶、初生叶及2 a 生针叶的光谱图中分别出现在  $2931\text{ cm}^{-1}$ 、 $2915\text{ cm}^{-1}$  和  $2931\text{ cm}^{-1}$  处, 而这个峰对应于木栓质特征吸收峰<sup>[4]</sup>。同时从图2中可见, 子叶在该处的峰很弱, 2 a 生针叶吸收峰最强。 $1740\text{ cm}^{-1}$  表示木栓质中 C-O 的拉伸振动, 该峰在图中向低频位移, 出现在初生叶及2 a 生针叶内皮层径向壁显微红外光谱中  $1735\text{ cm}^{-1}$  位置, 而在子叶中该峰缺失, 这就说明子叶内皮层细胞径向壁上木栓质含量极少或无。 $1600\text{ cm}^{-1}$  和  $1500\text{ cm}^{-1}$  是芳香环高度特征的吸收峰, 但由于苯环上取代基的影响以及各峰的干扰, 苯环骨架振动频率可能高频或低频位移。从图2也可看出, 子叶和初生叶中表示木质素苯环骨架的振动的吸收峰分别出现在  $1615\text{ cm}^{-1}$  和  $1511\text{ cm}^{-1}$ , 而2 a 生针叶出现在  $1607\text{ cm}^{-1}$  和  $1511\text{ cm}^{-1}$ , 其吸收峰的强度均大于前两者。由此可以推测, 2 a 生针叶

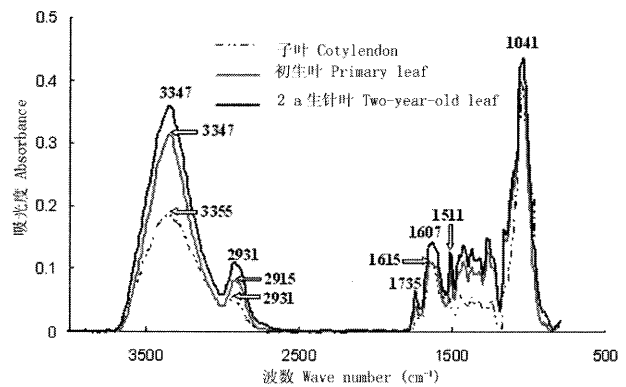


图2 白皮松子叶、初生叶及2 a 生针叶内皮层细胞径向壁 FTIR 光谱图

Fig. 2 FTIR spectra of endodermis radial wall in cotyledon, primary leaf and 2-year-old leaf of *P. bungeana*

内皮层细胞径向壁中木质素含量较初生叶和子叶高。另外,  $1041\text{ cm}^{-1}$  为碳水化合物的吸收峰, 在纤维素的红外图谱的相应处也出现。值得注意的是, 在上述3种样品中该峰的峰值均无明显差别, 由此说明它们的纤维素含量变化不大。

### 2.3 Na 及 Cl 在白皮松叶横切面上的微区分布特点

从白皮松叶的横切面结构上看, 由外到内分别为: 表皮、叶肉组织、内皮层和维管组织(木质部和韧皮部)(图3)。Na 及 Cl 在白皮松幼苗子叶、初生叶及

2 a 生针叶横切面上的微区分布如图 4 所示, 未用 NaCl 溶液处理的对照组, Na 在各组织中的含量在 X 射线能谱仪中检测不到。同样地, Cl 仅在 3 种样品的表皮中检测到, 而且含量极低(图 4A)。从图 4: B、C 可以看出, Na 及 Cl 在初生叶及 2 a 生针叶横切面上微区分布呈现一定的相似性。上述两种元素在表皮和内皮层细胞中的含量较高, 而在叶肉组织

中则含量较低, 特别是在木质部管胞中, Na 及 Cl 的含量急剧下降, 其中 2 a 生针叶木质部管胞中的 Na 和 Cl 仅占总元素含量的 0.33% 和 0.39%。而在子叶中的 Na 在各微区中的分布变化不大, Cl 在内皮层细胞中的含量最低, 木质部中的含量比起内皮层细胞有所上升。

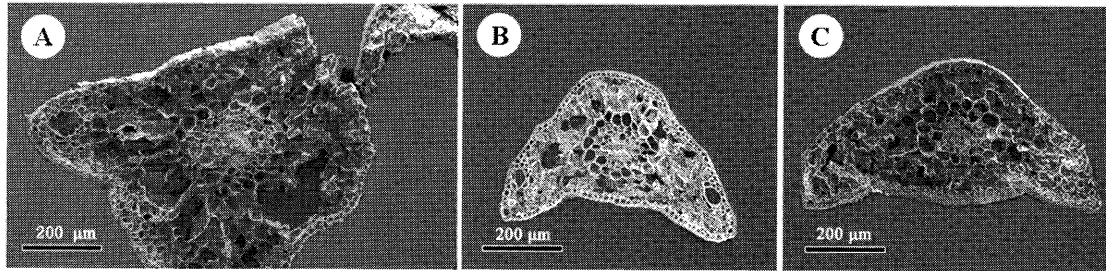


图 3 白皮松冷冻干燥子叶(A)、初生叶(B)及 2 a 生针叶(C)横切面扫描图  
Fig. 3 Scanning electron micrographs of transverse sections of freeze-dried cotyledon (A), primary leaf (B) and 2-year-old leaf (C) of *P. bungeana*

### 3 讨论

早期关于鉴定凯氏带的结构及化学成分, 主要依据光学显微镜与组织化学结合的方法<sup>[15]</sup>, 但由于组织化学方法的灵敏度与专一性的局限性, 使凯氏带的研究进展缓慢。Elisei<sup>[16]</sup>首次从白屈菜(*Chelidonium majus*)中提取的物质可用作检测凯氏带的荧光染料。此后, Brundrett 等<sup>[13]</sup>纯化了白屈菜提取物中的小檗碱作为荧光染料, 并用苯胺兰进行对染, 以淬灭背景荧光和部分不完全木质化的细胞壁染色, 从而达到专一性观察细胞壁木质化程度、内皮层或皮下层凯氏带及木栓层的目的。徐建华等<sup>[17]</sup>利用此法分别对水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)及野牛草(*Buchloe dactyloides*)根内皮层凯氏带进行检测, 均获得了理想结果。在本实验中, 用盐酸-间苯三酚检测白皮松子叶、初生叶及 2 a 生针叶内皮层细胞径向壁均呈阳性反应, 但经小檗碱-苯胺兰对染后, 子叶内皮层细胞径向壁却无激发荧光, 由此表明, 子叶内皮层细胞径向壁仅含有少量木质素, 而不具凯氏带。该实验也进一步证实了小檗碱-苯胺兰对染, 对检测凯氏带的存在具有一定的精确性。

由于 FTIR 的普适性, 以及对测试材料不具破坏性, 因此在生物研究中的应用较为广泛<sup>[11,18]</sup>。以往通过对根内皮层细胞壁的 FTIR 光谱分析发现, 木

质素是其中一种重要的生物多聚物, 同时还含有少量的木栓质及细胞壁蛋白<sup>[18-20]</sup>。利用 FTIR 对白皮松子叶、初生叶及 2 a 生针叶内皮层细胞径向壁成分的检测发现, 初生叶及 2 a 生针叶主要含有木质素和木栓质, 这与前人的研究结果较为一致<sup>[18-19]</sup>。然而在子叶内皮层细胞径向壁的成分中主要为木质素, 而木栓质含量极少或无。通常木栓质对于水分及其他物质具有高度不通透性, 这正是内皮层在质外体运输过程中对物质起选择作用的基础<sup>[20]</sup>。由此可以推测, 由于白皮松子叶、初生叶及 2 a 生针叶中木栓质含量的不同, 从而导致其内皮层在质外体运输过程中作用的差异。

在多数植物中, 水分和溶于其中的无机盐主要由木质部的导管和管胞运输<sup>[21]</sup>。在本实验中, 经 NaCl 溶液处理后, Na 在子叶内皮层以内的木质部管胞中的含量与内皮层、叶肉及表皮等细胞中的含量差别不大, 而 Cl 在木质部中的含量却高于内皮层细胞, 由此说明, 子叶内皮层对钠离子在质外体运输途径中并不起阻碍作用。相反, 从 Na 和 Cl 在初生叶和 2 a 生针叶横切面的分布图式上看, 上述内皮层对这两种离子进入维管组织起着明显的障碍作用, 而且 Na 和 Cl 在 2 a 生针叶木质部中的含量低于初生叶, 从而表明了 2 a 生针叶内皮层凯氏带的障碍作用强于初生叶。通过对 Na 和 Cl 的 X 射线能谱微区分析以及 FTIR 谱图中木栓质含量高低

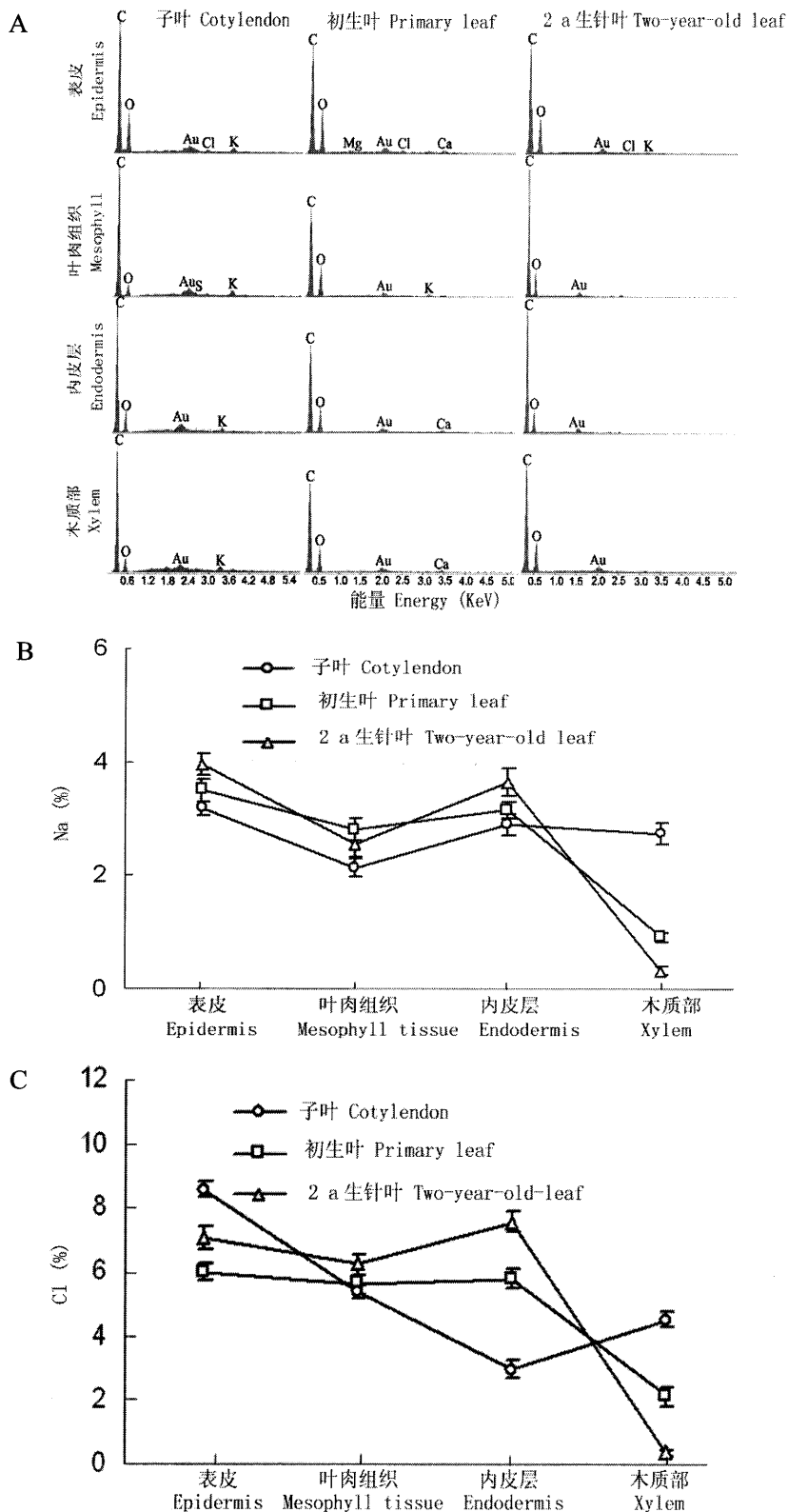


图 4 白皮松叶子 X 射线能谱图及元素相对质量百分比

Fig. 4 X-ray energy spectra and relative content of elements

A: 对照组 X 射线能谱图 X-ray energy spectra for the control samples; B, C: 分别为 Na 和 Cl 在处理组横切面的各微区中的含量。The relative contents of Na (B) and Cl (C) in the transverse sections of NaCl-treated *P. bungeana* leaves.

的结果比较,我们认为,初生叶和 2 a 生针叶内皮层之所以能控制质外体的物质运输,主要取决于其内皮层细胞径向壁中木栓质的含量,这一观点与根内皮层的研究结果相一致<sup>[22]</sup>。此外,正是由于具凯氏带的内皮层在质外体运输过程中起着障碍作用,使得这些离子被迫转入共质体途径,从而使这两种元素在初生叶及 2 a 生针叶内皮层细胞中的含量比叶肉细胞高。通过对星星草(*Puccinellia tenuiflora*)根在盐胁迫下的拒盐机制研究发现,其根茎内皮层细胞对 Na<sup>+</sup> 在质外体运输中起着明显的阻碍作用<sup>[7]</sup>。此外, Lux 等<sup>[6]</sup>还报道了通过根内皮层的选择作用,从而防止植物对镉的中毒。我们的研究结果与上述报道极为一致,即具凯氏带加厚的白皮松针叶内皮层与其它植物根内皮层的生理功能极为相似。

综上所述,在盐胁迫下,白皮松针叶内皮层具有与根内皮层相似的生理功能,可以通过调控其细胞壁的化学组成主要是木栓质,对质外体运输途径中 Na 和 Cl 从叶肉组织通过内皮层转运到维管组织起障碍作用,从而起到保护植物生长发育的作用。但外界环境如何影响其细胞壁化学组成的问题,仍有待于进一步的研究。

#### 参考文献

- [1] Geiger D R. Phloem loading [C] // Zimmermann M H, Milburn J A. Encyclopedia of Plant Physiology. Berlin and New York: Springer-Verlag, 1975: 396–431.
- [2] Ranathunge K, Steudle E, Lafitte R. Blockage of apoplastic bypass-flow of water in rice roots by insoluble salt precipitates analogous to a Pfeffer cell [J]. Plant Cell Environ, 2005, 28: 121–133.
- [3] Dickison W C. Integrative Plant Anatomy [M] // San Diego: Harcourt Academic Press, 2000: 143–146.
- [4] Soukup A, Seago J L J, Votrubova O. Developmental anatomy of the root cortex of the basal monocotyledon, *Acorus calamus* (Acorales, Acoraceae) [J]. Ann Bot, 2005, 96: 379–385.
- [5] Lehmann H, Stelzer R, Holzamer S, et al. Analytical electron microscopical investigations on the apoplastic pathways of lanthanum transport in barley roots [J]. Planta, 2000, 211: 816–822.
- [6] Lux A, Sotnikova A, Opatrna J, et al. Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity [J]. Physiol Plant, 2004, 120: 537–545.
- [7] Peng Y H, Zhu Y F, Mao Y Q, et al. Alkali grass resists salt stress through high [K<sup>+</sup>] and an endodermis barrier to Na<sup>+</sup> [J]. J Exp Bot, 2004, 55: 939–949.
- [8] Karahara I, Ikeda A, Kondo T, et al. Development of the Casparian strip in primary roots of maize under salt stress [J]. Plantarum, 2004, 219: 41–47.
- [9] Priestley J H, North E E. Physiological studies in plant anatomy. III. The structure of the endodermis in relation to its function [J]. New Phytol, 2002, 21: 113–119.
- [10] Lersten N R. Occurrence of endodermis with a Casparian strip in stem and leaf [J]. Bot Rev, 1997, 63: 265–272.
- [11] Wu X Q, Lin J X, Zhu J M, et al. Casparian strips in needles of *Pinus bungeana*: isolation and chemical characterization [J]. Physiol Plantarum, 2003, 117: 421–424.
- [12] 李正理. 植物组织制片学 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1996: 113–114.
- [13] Brundrett M C, Enstone D E, Peterson C A. A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue [J]. Protoplasma, 1988, 146: 133–142.
- [14] Lopes M H, Neto P, Barros A S, et al. Quantitation of aliphatic suberin in *Quercus suber* L. cork by FTIR spectroscopy and solid-state <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy [J]. Biopolymers, 2000, 57: 344–351.
- [15] Van Fleet D S. Histochemistry and function of the endodermis [J]. Bot Rev, 1961, 27: 165–221.
- [16] Elisei F G. Recherche microfluoroscopiche sui punti de Caspary [J]. Pavia Univ Inst Bot Atti, 1941, 13: 1–64.
- [17] Xu J H (徐建华), Tao Y (陶冶), Huang Y (黄艳), et al. A berberin-aniline blue counterstaining method for dyeing Caspary band in root endodermis [J]. Plant Physiol Commun(植物生理学通讯), 2004, 40: 479–482.(in Chinese)
- [18] Schreiber L, Hartmann K, Skrabs M, et al. Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls [J]. J Exp Bot, 1999, 50: 1267–1280.
- [19] Zeier J, Schreiber L. Fourier transform infrared-spectroscopic characterisation of isolated endodermal cell walls from plant roots: chemical nature in relation to anatomical development [J]. Planta, 1999, 209: 537–542.
- [20] Schreiber L, Breiner H W, Riederer M, et al. The Casparian strip of *Clivia miniata* Reg. roots: isolation, fine structure and chemical nature [J]. Bot Acta, 1994, 107: 353–361.
- [21] Holbrook N M. Water balance of plants [C] // Taiz L, Zeiger E. Plant Physiology. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 2002: 50.
- [22] Schreiber L, Franke R, Hartmann K. Effects of NO<sub>3</sub> deficiency and NaCl stress on suberin deposition in rhizo- and hypodermal (RHCW) and endodermal cell walls (ECW) of castor bean (*Ricinus communis* L.) roots [J]. Plant Soil, 2005, 269: 333–339.