

李 余, 石 辉, 段保正, 等. 不同植物叶片角质膜分离方法对角质膜水分渗透性的影响[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(4): 769-773.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.04.009

不同植物叶片角质膜分离方法对角质膜水分渗透性的影响

李 余, 石 辉, 段保正, 魏小芳, 蒋子银

(西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 陕西 西安 710055)

摘要: 为了探究草酸/草酸铵、果胶酶/纤维素酶、氯化锌/盐酸、三氧化铬 4 种叶片角质膜分离方法对角质膜水分渗透性的影响, 以大叶女贞 (*Ligustrum lucidum* Ait.)、大叶黄杨 (*Euonymus japonicus*)、海桐 (*Pittosporum tobira*) 叶片上表皮无气孔角质膜为材料, 利用扫描电镜和微蒸腾室分别对角质膜结构与水分渗透速率进行研究。结果表明, 与完整叶片对照相比, 草酸/草酸铵法剥离出的 3 种叶片角质膜结构较为完整, 且水分渗透速率与完整叶片相近, 为最佳的叶片角质膜剥离方法; 植物叶片质地的差异影响角质膜剥离方法的选择, 纸质叶可优先选择氯化锌/盐酸法、草酸/草酸铵法, 厚革质叶片角质膜的剥离可优先选择草酸/草酸铵法。

关键词: 角质膜; 分离方法; 微蒸腾室; 水分渗透速率

中图分类号: S688 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2016)04-0769-05

Water permeability of plant cuticular membranes isolated with different chemical agents

LI Yu, SHI Hui, DUAN Bao-zheng, WEI Xiao-fang, JIANG Zi-yin

(School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China)

Abstract: Four chemical agents, oxalic acid / ammonium oxalate solution, cellulase/pectinase solution, zinc chloride-hydrochloric acid solution and chromium trioxide solution were applied to isolate the upper astomatous cuticular membranes of *Ligustrum lucidum* Ait, *Euonymus japonicus* and *Pittosporum tobira* to study the structure of plant cuticles with scanning electron microscope and the speed of water infiltration of cuticular membranes in a micro-transpiration chamber. Compared with unisolated leaf, the structure of plant cuticles was relatively integrated when isolated with oxalic acid/ammonium oxalate solution, and the rate of water infiltration was close to that of complete leaf, which made oxalic acid/ammonium oxalate solution the preferred agent for isolation. Leaf texture was associated with the selection of isolation agents. The zinc chloride-hydrochloric acid solution and oxalic acid/ammonium oxalate solution were the choice for cuticular membranes isolation of papery leaves, and oxalic acid/ammonium oxalate solution was the choice for thick and leathery leaves.

Key words: cuticular membrane; isolation; micro-transpiration chamber; water permeability

植物在大约 5 亿年前由水生向陆生过渡, 植物

从水环境到相对缺水的自然陆地环境, 为维持体内水分, 一方面依靠根系从土壤汲取水分, 另一方面进化出一种重要的保护结构, 即角质膜^[1], 因此植物表面角质膜的产生是植物适应陆地环境而进化的结果。早在 1757 年就有人在甘蓝叶上发现了角质膜^[2-4], 之后植物学家陆续在很多植物叶片表面都

收稿日期: 2015-11-19

基金项目: 陕西省自然科学基金重点项目 (2014JZ011); 林业公益性行业科研专项 (201304301-05)

作者简介: 李 余 (1989-), 男, 四川广安人, 硕士研究生, 研究方向为环境生态。(E-mail) liyu_data@163.com

发现了角质膜。近年来对植物角质膜的研究越来越受到了诸多研究者的关注,角质膜渗透性能及机理的揭示有助于现代农业的发展,角质膜与植物抗旱性关系的研究也可作为农作物改良开辟一条新的途径^[5-6]。一般认为植物角质膜具有防止组织内部水分被动散失,维持体内水分平衡,保护植物免遭病原菌侵入,避免昆虫蚕食以及防止有害光线损伤等^[7-8]。植物角质膜作为植物与外界环境的第一道屏障,其厚度介于 0.7 μm 至 13.5 μm 之间^[2,4-5],在自我保护方面起着非常重要的作用,但同时也限制了植物尤其是农作物对保护剂、生长调节剂、除草剂以及叶面肥养分的吸收和利用^[6]。一般认为外界物质通过角质膜是一个扩散过程,其扩散过程可分为 3 步:第 1 步是吸附进入角质膜,物质必须先克服蜡质层的阻碍进入膜内;第 2 步是跨角质膜运输,从角质层的分子间隙进入角质层;第 3 步是从角质膜上解吸附,通过果胶等物质进入到表皮细胞外壁^[9-10]。

植物叶片角质膜渗透性的研究有助于认识植物抗旱性机理。目前植物叶片角质膜的分离方法主要有以下 4 种:草酸/草酸铵法、果胶酶/纤维素酶法、氯化锌/盐酸法、三氧化铬法。不同的叶角质膜分离方法各有优缺点,然而不同分离方法对植物叶片角质膜渗透性差异的影响却鲜报道,以及造成这些影响的原因也不得而知。因此本研究通过对以上 4 种植物叶片角质膜分离方法及其对角质膜渗透性试验结果进行比较分析,为植物叶片角质膜分离方法的选择提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验选用 3 种绿化植物,分别为大叶女贞、大叶黄杨、海桐,均采集于西安建筑科技大学雁塔校区。在每种植物冠层的 2/3 处于东南西北 4 个方向分别采集 10 片树叶。采集的叶片用清水冲洗 2~3 遍,然后用滤纸轻轻吸去叶表层的水分。选取没有破损的叶片,用小剪刀避开中心叶脉剪下边长约为 20 mm 的小方片。为了在角质膜剥离后容易识别无气孔的上表皮角质膜并按试验要求分类存放,用针轻轻划破小方片的下表皮。

1.2 试验方法

1.2.1 草酸/草酸铵法^[11] 用超纯水配制 4 g/L 草酸溶液和 16 g/L 草酸铵溶液,再将所配草酸溶液和

草酸铵溶液以体积比为 1:1 的比例混合。把经过前期处理的小方叶片分别单独用去离子水浸泡 12 h,电炉煮沸 1 h,再将小叶片放入到草酸和草酸铵混合溶液中,30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下磁力搅拌 24 h。从草酸/草酸铵混合液中取出的整片角质膜方片即为叶片的上表皮角质膜,再对其进行超声清洗以去除表面残留物质。将脱离下来的角质膜浸泡于超纯水中以备后续试验使用。

1.2.2 果胶酶/纤维素酶法^[12] 用 2:3 的甘油和水混合溶液作溶剂配制质量浓度为 4% 的果胶酶溶液和 1% 的纤维素酶溶液,以超纯水为溶剂配制 0.02% 柠檬酸溶液和 1% 硫柳汞钠溶液(抑制微生物的生长)。将配制好的果胶酶溶液、纤维素酶溶液、柠檬酸溶液以 1:1:8 的体积比混合,调节 pH 为 3.8,滴加几滴硫柳汞钠溶液以抑制微生物的增长。把经过前期处理的小方叶片分别单独浸泡于混合液中,放置于室温条件下,11 d 后用镊子轻轻地把角质膜从小方片上揭下来,再对其进行超声清洗以去除表面残留物质,清洗干净后将角质膜浸泡于超纯水中以备后续试验使用。

1.2.3 氯化锌/盐酸法^[13] 按每 1.7 ml 盐酸加 1 g 氯化锌的比例配制氯化锌和盐酸混合液。把经过前期处理的小方叶片分别单独浸泡于混合液中,放置于室温下,5 h 后用镊子轻轻地把角质膜从小方片上揭下来,再对其进行超声清洗以去除表面残留物质,清洗干净后将角质膜浸泡于超纯水中以备后续试验使用。

1.2.4 三氧化铬法^[14] 用超纯水配制质量浓度为 20% 的三氧化铬溶液。将经过前期处理的小方叶片分别单独浸泡于三氧化铬溶液中,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中放置 24 h。用镊子夹出角质膜并对其进行超声清洗以去除表面残留物质,清洗干净后将角质膜浸泡于超纯水中,放置室温条件下以备后续试验使用。

1.3 叶片角质膜的扫描电镜观察

将超声清洗后的植物叶片角质膜用吸滤纸吸干水分,用剪刀剪取 1 cm \times 5 mm 的长方形,将样品粘到样品柱上,用 JFC-1600 型离子溅射仪喷金镀膜,用扫描电子显微镜观察拍照。

1.4 叶片角质膜水分渗透性测定

用于水分渗透性测定的微蒸腾室结构^[15]如图 1 所示。将真空油脂均匀涂抹在空心柱管 A 下部,用镊子将离体植物角质膜取出,将其上表面朝下粘

贴在柱管上;将盖帽 B 的内层涂上真空油脂,按照图示方向将管柱和盖帽小心密封,这一过程需要防止因滑动而导致角质膜破损或移位。然后从柱管 A 的上端小孔处向内注满超纯水,并用胶带将小孔封闭,把密封好的装置放置在铺有吸水纸的托盘上,放置 1 h。1 h 后检测角质膜是否破损,如有破损,可以看到吸水纸上有水迹。将无破损角质膜按剥离方法的不同分类放置。把微蒸腾室放在离心管架上,将下表面用凡士林均匀涂抹,上表皮避开叶脉处留取用于与水分测定相同的角质膜面积后,其余上表皮面积均匀涂抹凡士林的完整叶片置于 20 ℃ 恒温箱培养箱中作为对照,每隔 24 h 用分析天平测量微蒸腾室及叶片质量,连续测量 6 次。两次所测数据差即为相应时间段内通过角质膜渗透出来并挥发掉的超纯水的量。试验测出的累计失水过程可以直接反映超纯水透过角质膜的速度。

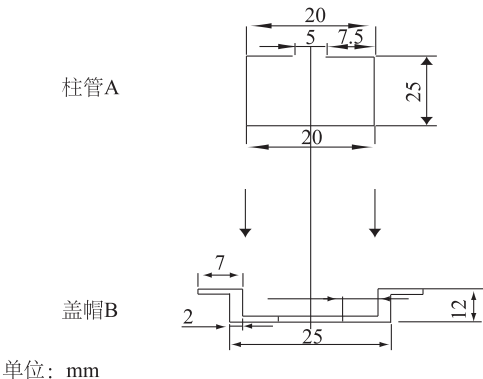


图 1 微蒸腾室结构图
Fig.1 Structure chart of micro-transpiration chamber

2 结果与分析

2.1 3 种植物叶片角质膜剥离时间

不同叶片角质膜剥离方法下,3 种植物叶片角质膜剥离所需时间具有明显差异(表 1)。氯化锌/盐酸法脱离 3 种植物叶片角质膜所需时间最短,仅 5 h;草酸/草酸铵法和三氧化铬法次之,分别为 25 h 和 8 h;而果胶酶/纤维素酶法最长,为 11 d。其中果胶酶/纤维素酶法未成功分离大叶女贞叶片角质膜。

2.2 3 种植物叶片角质膜结构扫描电镜图

为直观认识 4 种不同角质膜剥离方法对 3 种植

表 1 分离角质膜所用时间
Table 1 Time used for isolating cuticular membranes

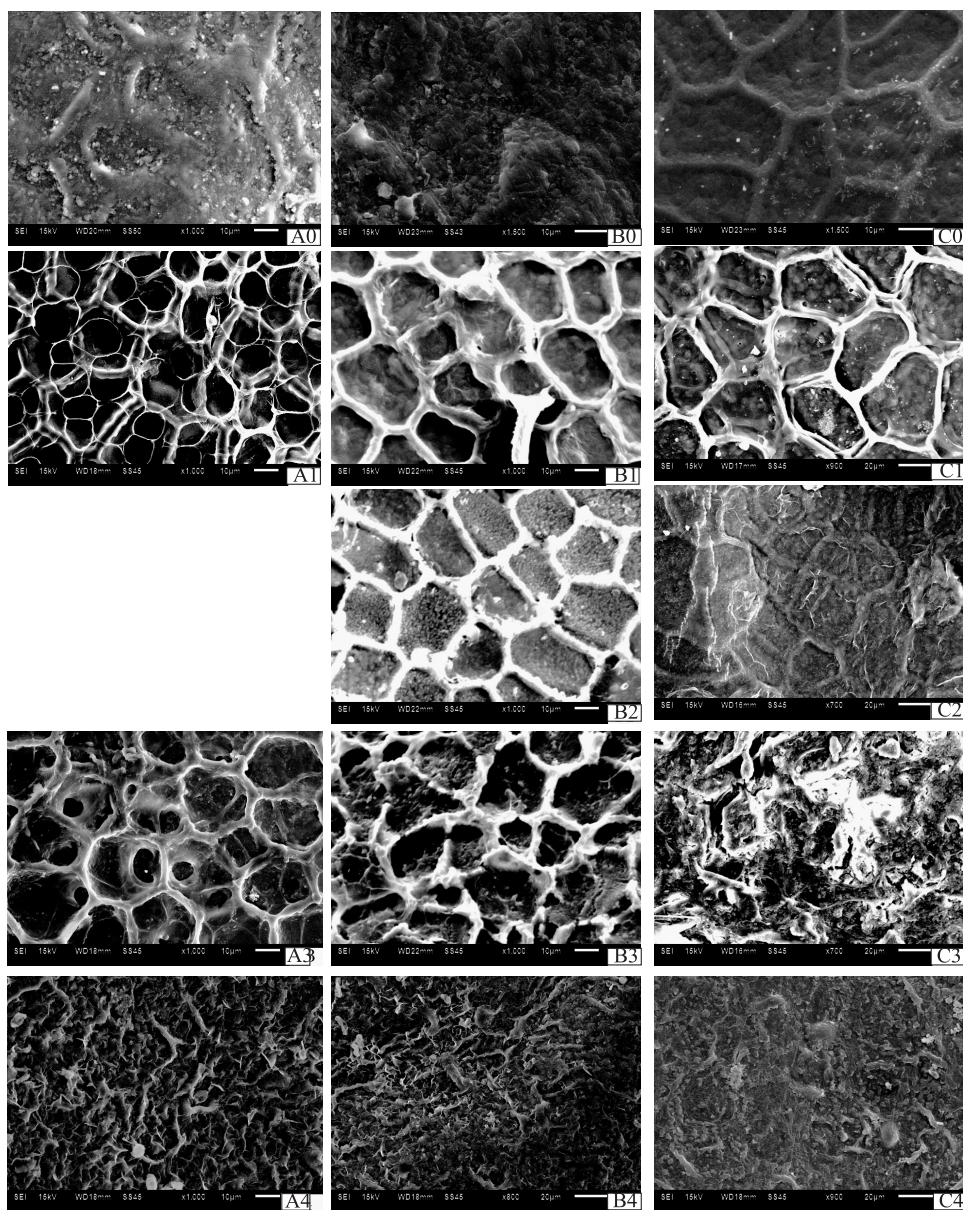
物种	分离所用时间			
	草酸/草 酸铵法(h)	果胶酶/纤 维素酶法(d)	氯化锌/ 盐酸法(h)	三氧化 铬法(h)
大叶女贞	25	—	5	8
大叶黄杨	25	11	5	8
海桐	25	11	5	8

“—”未成功分离角质膜。

物叶片角质膜结构的影响,通过扫描电子显微镜对剥离的叶片角质膜结构进行观察(图 2)。以未处理的完整叶片作为对照,同一植物叶片在不同角质膜分离方法下的角质膜扫描电镜图差别较大,叶表皮结构都有不同程度的破坏。但大叶女贞叶片在草酸/草酸铵法、氯化锌/盐酸法下分离的叶角质膜结构较为完整;与酶液法、氯化锌/盐酸法相比,草酸/草酸铵法分离的大叶黄杨叶片角质膜结构最为完整,而酶液法、氯化锌/盐酸法分离的角质膜细胞壁结构呈现腐蚀态;草酸/草酸铵法分离的海桐叶片角质膜结构比其他 3 种方法分离的完整,其中氯化锌/盐酸法分离的角质膜结构出现较重的腐蚀态,局部出现裂纹。同时发现,3 种植物叶片在三氧化铬法下分离的角质膜无细胞轮廓结构,角质膜结构损伤最为严重。

2.3 3 种植物叶片角质膜的渗透速率

为进一步认识不同角质膜分离方法对植物叶片角质膜水分渗透性造成的差异,测定了 4 种分离方法分离的角质膜渗透速率。植物叶片角质膜累计蒸腾的水量与所耗时间关系可以用通过原点的线性方程来表示,方程的斜率表征了水通过植物角质膜的速率大小(图 3)。草酸/草酸铵法、氯化锌/盐酸法、三氧化铬法分离的大叶女贞叶片角质膜失水速率分别是对照(完整叶片)的 1.44 倍、1.61 倍、7.61 倍;经草酸/草酸铵法、果胶酶/纤维素酶法、氯化锌/盐酸法、三氧化铬法分离的大叶黄杨叶片角质膜失水速率分别是完整叶片的 1.80 倍、5.20 倍、5.60 倍、27.40 倍;经草酸/草酸铵法、果胶酶/纤维素酶法、氯化锌/盐酸法分离的海桐叶片角质膜失水速率分别是完整叶片的 1.86 倍、2.57 倍、13.43 倍和 14.43 倍。与完整叶片相比,经草酸/草酸铵法、氯化锌/盐酸法分离的大叶女贞



A: 大叶女贞; B: 大叶黄杨; C: 海桐; D: 完整叶片对照; 1: 草酸/草酸铵法; 2: 果胶酶/纤维素酶法; 3: 氯化锌/盐酸法; 4: 三氧化铬法。

图 2 不同分离方法分离的叶片角质膜扫描电镜图

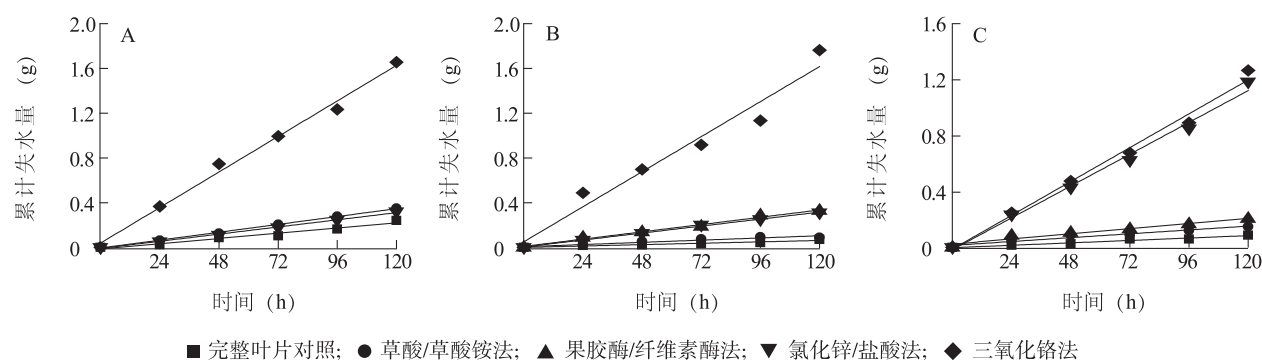
Fig.2 Scanning electron microscope of plant cuticular membranes isolated with different chemical agents

叶片角质膜失水速率并无显著增加;经草酸/草酸铵法分离的大叶黄杨叶角质膜失水速率与完整叶片的一致;而经草酸/草酸铵法、果胶酶/纤维素酶法分离的海桐叶片角质膜失水速率与完整叶片的差异不显著。三氧化铬法分离的 3 种植物叶片角质膜的失水速率最大。

3 讨论

从植物叶片剥离出的角质膜也称为角质层,可

用于组分分析和渗透性试验等。当前用于叶片角质膜渗透性试验的植物叶片按材质分为纸质叶和革质叶 2 类,革质叶又可分为厚革质叶和薄革质叶。植物叶片质地的差异在很大程度上限制了角质膜分离方法的选择。本研究结果表明,综合剥离时间及角质膜结构,纸质叶片角质膜的剥离可优先选用氯化锌/盐酸、草酸/草酸铵法,其中前者所需时间更短,如大叶女贞;厚革质叶片角质膜的剥离可优先考虑草酸/草酸铵法,其次是果胶酶/纤维素酶法、氯化



A:大叶女贞;B:大叶黄杨;C:海桐。

图3 4种方法分离的角质膜失水过程

Fig.3 Water loss of cuticular membranes isolated with 4 chemical agents over time

锌/盐酸法,如大叶黄杨、海桐等。可见,叶片角质膜分离方法的选择并不是一成不变,应根据试验实际灵活选择。

参考文献:

- [1] 魏雪琴,张长峰,庞 杰,等.植物角质层生物学特性及水分渗透性研究[J]. 植物学报,2013,48(5):573-587.
- [2] KNIGHT T G, WALLWORK M A B, SEDGLEY M. Leaf epicuticular wax and cuticle ultrastructure of four eucalyptus species and their hybrids[J]. International Journal of Plant Science, 2004, 165(1): 27-36.
- [3] JETTER R, SCHÄFFER S, RIEDERER M. Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L.[J]. Plant, Cell & Environment, 2000, 23(6): 619-628.
- [4] MATASA J, SANZ M J, HEREDIA A. Studies on the structure of the plant wax nonacosan-10-ol, the main component of epicuticular wax conifers [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2003, 33: 31-35.
- [5] 柴凌燕,董易凡,李士伟,等.植物角质膜及其渗透性与抗旱性研究进展[J]. 植物研究, 2010, 30(6): 763- 768.
- [6] 李魏强,张正斌,李景娟.植物表皮蜡质与抗旱及其分子生物学[J].植物生理与分子生物学报,2006,32(5):505-512.
- [7] BARNES J D, PERCY K E, PAUL N D, et al. The influence of UV-B radiation on the physicochemical nature of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaf surfaces[J]. Journal of Experimental Botany, 1996, 47:99-109.
- [8] EIGENBRODE S D, ESPELIE K E. Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores[J]. Annual Review of Entomology, 1995, 40:171-142.
- [9] 赵利辉.有关农药茎叶吸收屏障—角质层的研究进展[J].世界农药,2001,23(4):47-50.
- [10] KERSTIENS G. Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure function relationship [J]. Plant Science, 1996, 4(1):125-129.
- [11] SCHÖNHERR J. Plant cuticles are polyelectrolytes with isoelectric points around three[J]. Plant Physiol, 1977, 59(2): 145-150.
- [12] ORGELL W H. The isolation of plant cuticle with pectic enzymes [J].Plant Physiol,1955,30(1):1878-1879.
- [13] HOLLOWAY P J , BAKER E A. Isolation of plant cuticles with zinc chloride-hydrochloric acid solution[J]. Plant Physiol, 1968, 43(11): 1878-1879.
- [14] ALVIN K L, BOUHER M C. A controlled method of comparative study of taxodiaceous cuticles [J]. Bot J Linn Soc, 1974, 69: 277-286.
- [15] 胥 利,石 辉,武云飞,等.大叶女贞无气孔角质膜的水分渗透性研究初报[J].生物学杂志,2015,32(6):68-70.

(责任编辑:张震林)