

# 常绿阔叶植物越冬期间叶片组织结构的适应性变化

董 丽 贾桂霞 苏雪痕

(北京林业大学园林学院, 北京 100083)

**摘 要:** 在北京自然越冬条件下, 黄杨叶片组织结构变化最为明显, 叶肉海绵组织分层, 被认为是避免胞内结冰的适应性变化。黄杨、扶芳藤、大叶黄杨、八角金盘、洋常春藤、女贞、广玉兰、火棘等超微结构均发生明显变化, 主要发生在叶绿体、脂质体、液泡膜及原生质膜。叶绿体的破坏及修复、液泡膜的活动特点及质壁分离程度都表现出和物种越冬能力的相关性。气孔行为及叶表皮蜡质的变化也与植物抗寒性有一定相关性。表明常绿阔叶植物在秋冬可以通过结构上的适应性变化提高抗寒性, 但种间差异明显。

**关键词:** 常绿阔叶植物; 叶片; 组织结构; 超微结构; 气孔; 叶表皮特征; 抗寒性

**中图分类号:** S 68      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0513-353X (2003) 01-0059-06

植物抗寒锻炼过程中, 细胞某些超微结构会有一些变化, 而且有些变化因物种而异<sup>[1]</sup>。这些超微结构的变化在抗寒力形成中所具有的意义有些得到了阐述<sup>[2,3]</sup>, 但大部分仍属推测, 缺乏更深入的研究。

植物叶片气孔因物种的遗传性而具有构造、数目和大小的差异, 并且随环境因子的变化开启大小不同甚至关闭, 这种变化对植物的生理过程产生重要的影响。低温下气孔行为的变化较为复杂。低温是影响气孔开度, 还是导致的水势变化影响气孔开度, 虽然研究结果不尽一致<sup>[4,5]</sup>, 但可以肯定气孔的行为变化直接或间接地影响了植物的抗寒锻炼以及低温伤害过程。

常绿阔叶植物分布于雨量充沛、年温差较小的热带、亚热带地区。选择其中分布于亚热带北缘、抗寒性相对较强的种类引种于北方园林, 对改善冬季的城市景观和生态环境具有重要意义。作者在对北京露地园林引种的阔叶常绿植物的越冬状况<sup>[6]</sup>、抗冻能力<sup>[7]</sup>测定的基础上, 对其在北京特定的自然越冬条件下叶组织结构的变化进行跟踪观察, 试图了解其规律并探讨这种变化在抗寒性发育过程中的生理意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 叶片组织结构观察

于 1997~1998 年越冬过程中, 每月中旬选黄杨 (*Buxus sinica*)、扶芳藤 (*Euonymus fortunei*)、大叶黄杨 (*Euonymus japonicus*)、八角金盘 (*Fatsia japonica*)、洋常春藤 (*Hedera helix*)、女贞 (*Ligustrum lucidum*)、广玉兰 (*Magnolia grandiflora*)、火棘 (*Pyracantha fortuneana*) 等植株中部向阳面当年生枝条顶端向下第 2~6 片生长健壮的功能叶, 在叶片中部中脉两侧切取 0.5 cm × 0.5 cm 的小块, FAA 固定液固定, 常规方法制作石蜡切片, 锡夫—考马斯亮蓝对染, 显微镜下观察照相。每周采样徒手切片观察叶组织结构的变化。

### 1.2 叶片组织超微结构观察

同期每月中旬按上述方法取黄杨、八角金盘、洋常春藤叶片, 在中部主脉两侧取 0.2 cm × 0.2 cm 小块供超薄切片制备。方法参考文献 [8] 稍作改进。戊二醛固定 4 h 以上, 1% 锇酸固定 2~4 h, 乙醇逐级脱水, 100% 丙酮置换 2 次, Spurr 树脂渗透、包埋。LKB- 型超薄切片机上切片, 醋酸双氧铀—硝酸铅双重染色, 电子显微镜下观察照相。

收稿日期: 2002-03-01; 修回日期: 2002-06-04

### 1.3 叶片气孔行为观察

分别于 10 月、1 月及 3 月下旬选晴朗无风天, 于上午 10 时左右在前述采样部位, 采八角金盘、洋常春藤、大叶黄杨、广玉兰、火棘、女贞及黄杨叶片, 现场立即液氮固定, 在实验室内从液氮取出后立即喷金, 电子扫描显微镜下观察拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 越冬期间叶片组织结构的变化

黄杨的叶片从边缘至中央横切面厚度差异较大, 平均约 280  $\mu\text{m}$ , 栅栏组织约占总厚度的  $1/2 \sim 2/3$ , 上下表皮细胞各 1 层。栅栏组织由 2~3 层纵向排列的长柱形细胞组成, 海绵组织细胞近圆形或长圆形, 靠近栅栏组织一侧的 2~3 层细胞排列较为紧密, 下部细胞排列疏松且具规律性分布的大空隙。徒手切片观察发现组织结构的变化始于 12 月中旬。在气温逐渐降低的过程中, 叶肉海绵组织从细胞排列最疏松处自然分离并向四周发展, 但细胞未见明显变形; 至 1 月, 整个叶片只剩四周边缘处相连, 分离宽度和长度都达  $3/4$  以上, 叶片明显分为上、下两层。上层初时绿色, 严冬时大部分变为褐绿色; 下层黄绿至白色, 严冬时受害重的为褐色。这种分层至 3、4 月气温回升后虽略有恢复, 但大部分不能完全复原, 中心部分仍保持离层, 直至夏初凋落 (图版 , 1~3)。

### 2.2 越冬期间叶片超微结构的变化

综观被试种类, 越冬过程中超微结构的变化程度因种而异。黄杨 10 月的叶绿体为狭长的梭形或不规则长圆形, 沿周边分布, 片层结构正常, 拟脂颗粒较多, 无淀粉粒; 线粒体扁或圆, 数量较多; 中央液泡极大, 且液泡内似有物质积累。许多细胞已明显质壁分离, 且海绵组织较栅栏组织严重 (图版 , 1)。12 月, 叶绿体较以前膨胀, 边缘模糊, 有些片层结构解体, 有些仍清晰可见, 拟脂颗粒数量减少; 液泡膜非常活跃, 连接或内陷, 从而将大液泡分成多个小液泡, 或反卷将原生质吞噬 (图版 , 2~3)。1 月最明显的变化是叶绿体片层结构模糊不清, 但拟脂颗粒增多; 质壁分离很严重 (图版 , 4)。3 月中旬, 细胞结构逐渐恢复正常, 叶绿体数量增多, 结构清晰, 淀粉粒和拟脂颗粒极多; 仍有小液泡存在, 但呈减少的趋势; 栅栏组织的质壁分离现象消失, 但海绵组织仍有轻度分离 (图版 , 5)。

洋常春藤 10 月时叶绿体呈不规则的阔椭圆形或近圆形, 沿细胞周边排列, 片层结构清晰, 排列整齐, 内有发达的淀粉粒及少量拟脂颗粒 (图版 , 6); 线粒体数量中等, 结构无异常; 液泡体积较大, 位于细胞中央, 液泡膜正常; 个别细胞出现轻度质壁分离。12 月, 叶绿体膨胀, 原来的不规则边缘变得圆滑, 片层结构仍然排列整齐, 较为清晰, 但淀粉粒消失, 拟脂颗粒增多; 线粒体没有明显变化; 质壁分离较为严重, 液泡开始发生吞噬, 膜内陷, 有些地方连接成网状结构。2 月, 叶绿体的精细结构变得模糊, 拟脂颗粒增多, 体积增大; 线粒体增多; 中央液泡体积急剧减小, 细胞质内分布大量小液泡, 液泡中有大量积累物 (图版 , 7)。3 月, 叶绿体形状和结构恢复, 拟脂颗粒减少, 但淀粉粒急剧增加; 小液泡减少; 仍有轻度质壁分离 (图版 , 8)。

八角金盘 10 月叶绿体结构清晰可见, 上有淀粉粒和拟脂颗粒, 但数量不多; 线粒体结构正常 (图版 , 9)。1 月叶绿体变得瘦长, 片层结构模糊不清, 淀粉粒消失; 但线粒体变化不明显; 液泡中有物质积累, 但无明显的液泡吞噬 (图版 , 10~11)。3 月中旬, 叶绿体形状复原, 出现了发达的淀粉粒, 拟脂颗粒减少, 但叶绿体的结构直到 4 月才变得较为清晰; 液泡内含物减少 (图版 , 12)。整个越冬过程中没有明显的质壁分离和液泡吞噬现象。

### 2.3 越冬期间气孔行为及叶表皮特征的变化

越冬过程中, 气孔行为及叶表皮蜡质层变化趋势种间差异明显。与 10 月相比, 1 月时八角金盘的气孔几乎全部关闭, 3 月有明显恢复, 但开张率和开度远未达到越冬前水平 (图版 , 1~3)。洋常春藤越冬过程中气孔关闭率也较高, 但春天恢复程度较八角金盘大, 与此类似的还有女贞。黄杨与

此相反, 翌年 1 月和 3 月的气孔开张率与开度较 10 月不仅没有下降, 反而开度还有所增加 (图版 4~6)。广玉兰、大叶黄杨及火棘的气孔行为与黄杨类似。

越冬过程中, 叶表皮蜡质层增厚在大部分种类上都有表现。八角金盘、洋常春藤、女贞等表现最为明显, 1 月蜡质增厚并皱缩, 3 月蜡质减少, 皱缩减轻。黄杨 1 月时下表皮增厚, 蜡质成乳头状或不规则突起, 但增厚程度较上述种类小, 至 3 月基本恢复。与黄杨类似的还有广玉兰、大叶黄杨及火棘, 其中火棘基本没有明显的蜡质增厚。

### 3 讨论

植物在抗寒锻炼过程中细胞结构发生的一系列变化虽然不能说明抗寒基因表达和调控的本质, 但对抗寒力的形成显然具有重要意义。细胞器和膜结构稳定性的提高是抗寒力发育的关键性变化和重要条件。对小麦的研究表明细胞器结构的稳定性同植株的抗寒力呈正相关, 同时在抗寒锻炼后这种稳定与抗寒力的增长有平行关系<sup>[9]</sup>。研究证明在越冬过程中叶绿体的变化最明显, 叶绿体的排列、片层结构以及淀粉粒和嗜锇颗粒的数量在低温锻炼过程中均发生变化<sup>[1,10]</sup>。从本试验选择的 3 个抗寒力不同<sup>[6,7]</sup>的种看, 越冬过程中变化最明显的是叶绿体、线粒体及液泡和膜系统。3 个种 10~12 月叶绿体结构都发生了变化, 片层结构有不同程度的破坏, 但以抗寒性最弱的八角金盘受害程度最重。淀粉粒与拟脂颗粒的变化趋势在洋常春藤和八角金盘上表现一致, 黄杨在 10 月未发现淀粉粒, 而有少量拟脂颗粒, 至 1 月拟脂颗粒增加。3 月随着脱锻炼的进程, 3 个种都表现出了淀粉粒增加的显著变化, 但不同的是洋常春藤和八角金盘的拟脂颗粒与寒冬时比数量上都减少, 而黄杨却有增加。越冬锻炼过程中淀粉粒的减少和代之以拟脂颗粒被认为和木本植物的休眠有关, 也是抗寒力强的品种及低温锻炼提高抗寒力的表现。同时, 春季脱锻炼后叶绿体的修复速度也表现了和越冬能力的一致性。

本试验中, 黄杨和洋常春藤在秋冬低温锻炼过程中, 液泡膜都表现得异常活跃, 膜多处内陷, 多点相连, 这种变化的意义可能在于增加膜的表面积, 使组织在结冰时液泡内的水分能尽快流出, 从而避免胞内结冰, 同时膜的面积增大还可缓解细胞冻融交替对膜产生的收缩和膨胀的机械胁迫。液泡对原生质的吞噬则导致了细胞液浓度提高, 一方面可能使得冰点降低, 提高了抗冻性; 另一方面提高了渗透势, 增加了结合水含量, 提高植物耐冰冻脱水的能力, 从而提高抗冻力。本试验中黄杨和八角金盘截然不同的表现进一步证明了液泡的吞噬活动与植物的抗寒性和抗寒锻炼密切相关<sup>[11]</sup>。

秋冬低温锻炼过程中出现的质壁分离, 导致了原生质体的隔离, 它的作用在于使胞间连丝中断, 破坏共质体的连续性, 从而促使植株停止生长, 维持越冬中稳定的抗寒力<sup>[11]</sup>。田间也观察到发生质壁分离的黄杨和洋常春藤在秋季生长停止较早, 而八角金盘的敏感性似乎小得多, 一直到冰冻温度, 其茎端仍在旺盛生长, 因而导致了冬季生长点的严重冻伤, 其细胞结构上未能发生相适应的变化可能是受害的原因之一。

黄杨叶组织在越冬过程中发生分层的现象, 而且从气温还未达到严重的冰冻温度和发生反复冻融的 12 月初即开始分层, 至春季这种分层又部分恢复, 说明似乎并非冰冻伤害和衰老导致分层, 而是在低温锻炼过程中发生的适应性变化, 在抗冻方面可能具有积极的意义。冬季田间观察到黄杨叶片结冰时, 细胞中的水分都流至离层的空隙中结冰, 从而避免或减轻胞内结冰造成的伤害, 这虽然是一种避冻性而非高度抗冰冻能力的特征, 但作为起源于亚热带边缘的常绿阔叶植物, 与其它相同地带分布的种类相比, 这种组织水平上的适应性, 加上超微结构中细胞器和膜系统的稳定性可能正是黄杨成为北京园林引种常绿阔叶植物中抗寒性最强的种类的原因。

虽然气孔对低温的反应必然要受到光、水分、CO<sub>2</sub> 浓度等因素的影响, 但对于每个因素和气孔行为的因果关系, 研究的结果并不一致。有试验证明, 气孔关闭与水分胁迫无关, 植物受冷后并不引起水分的变化, 但气孔仍然会关闭<sup>[4]</sup>, 看来似乎是低温的直接影响。Kanemasu 的试验却表明, 低温胁迫引起了水势的降低, 却观察不到气孔的关闭<sup>[5]</sup>。也有人认为气孔关闭与低温下 ABA 含量的提高有

关。可见,在低温或水分胁迫下气孔的行为变化不尽一致,显示了气孔和环境胁迫之间关系的复杂性。本试验从更长时间范围内探讨气孔对季节的适应性变化,可以看出,越冬过程中气孔行为的稳定性与越冬性之间存在高度相关性。越冬能力较好的黄杨、大叶黄杨、火棘及广玉兰<sup>[6]</sup>气孔的季节变化幅度较小,而越冬能力较差的八角金盘、女贞和洋常春藤<sup>[6]</sup>的气孔季节变化幅度较大。这是一种表面的相关现象,其内在关系显然要复杂的多。北京冬季不仅有长时间的冰冻温度,而且强风和干旱还会造成严重的水分匮乏,都势必对常绿植物的气孔行为发生作用。因此,抗寒性较差的物种在严冬关闭气孔,可能是对不良环境的适应性变化,也可能是上述综合逆境造成的伤害。这种伤害的程度依种类的抗性而异,因此春季修复的程度也因此不同,继而导致越冬能力的差异。

与八角金盘和洋常春藤相比,黄杨及火棘和广玉兰叶表皮蜡质层增厚程度较小,与此类似的还有火棘和广玉兰,似乎表明蜡质层增厚的程度也与抗寒性相关。但不难发现,这3种皆为叶片革质化程度较强、叶片的相对含水量较低的种类。因此,叶表皮蜡质冬季的变化不仅因物种抗性不同而发生不同的适应性变化,而且可能与种的叶片质地与结构有关,其对抗寒力发育的意义尚需要进一步研究。

#### 参考文献:

- 1 简令成. 生物膜与植物寒害和抗寒性的关系. 植物学通报, 1983 (1): 17~23
- 2 简令成, 孙龙华, 贺善文, 等. 柑橘叶片细胞结构的适应性变化. 园艺学报, 1984, 11 (2): 79~83
- 3 韩善华, 李劲松. 沙冬青叶片结构特征及其与抗寒性的关系. 林业科学, 1992, 28: 198~201
- 4 何 洁, 刘鸿先, 王以柔, 等. 低温与植物的光合作用. 植物生理学通讯, 1986, (2): 1~6
- 5 Kanemasu E T, Thurtell G W, Tanner C B. Design, calibration and field use of a stomatal diffusion porometer. Plant Physiol., 1969, 44: 881~885
- 6 董 丽. 北京园林中常绿阔叶植物引种栽培现状及思考. 北京林业大学学报, 2001, 23 (增刊): 68~70
- 7 董 丽, 黄亦工, 贾麦娥, 等. 北京园林引种常绿阔叶植物抗冻性及其测试方法的研究. 北京林业大学学报, 2002, 24 (3): 70~73
- 8 许是雄. 植物材料的薄切片超薄切片技术. 北京: 北京大学出版社, 1981. 5~30
- 9 简令成, 吴素萱. 植物抗寒性的细胞学研究——小麦越冬过程中细胞结构的变化. 植物学报, 1965, 13: 1~15
- 10 Levitt J. Responses of Plants to environmental stresses. Volume 1: Chilling, freezing, and high temperature stresses. 2nd Edition. New York: Academic Press, INC, 1980. 163~166
- 11 简令成. 植物冻害和抗冻性的细胞生物学研究. 植物生理生化进展, 1987, 5: 1~16

## Change of the Leaf Tissue Structure of Evergreen Broad-leaf Plants during Overwintering

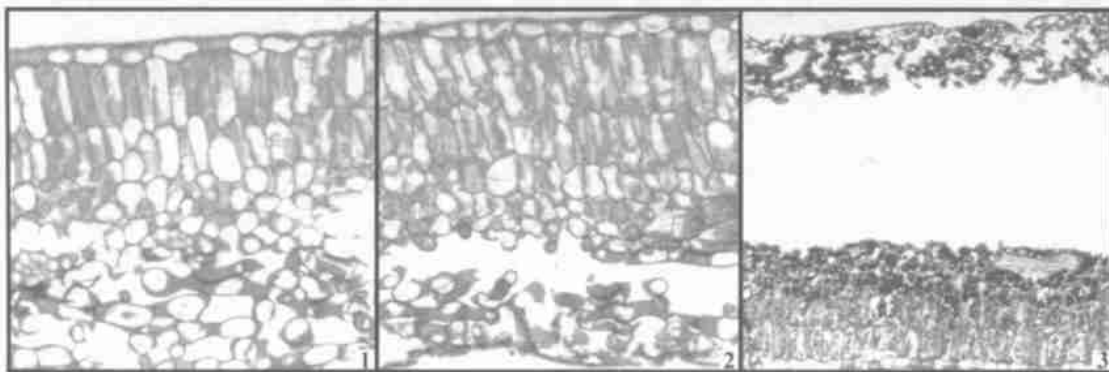
Dong Li, Jia Guixia, and Su Xuehen

(College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** In Beijing open garden, the leaf structure of *Buxus sinica* changed with the emerging of isolated layer in the spongy tissue, and is regarded as the adaptable change of avoidance of ice formation intracellular and promoting ice formation extracellular. The chloroplast, lipid granule, vacuolar membrane and protoplast are the apparatus which change most obviously in the ultra-microstructure in all tested species. Their changes, as well as the stomatal opening response and the change of character in the lower epidermis are related to the overwintering ability.

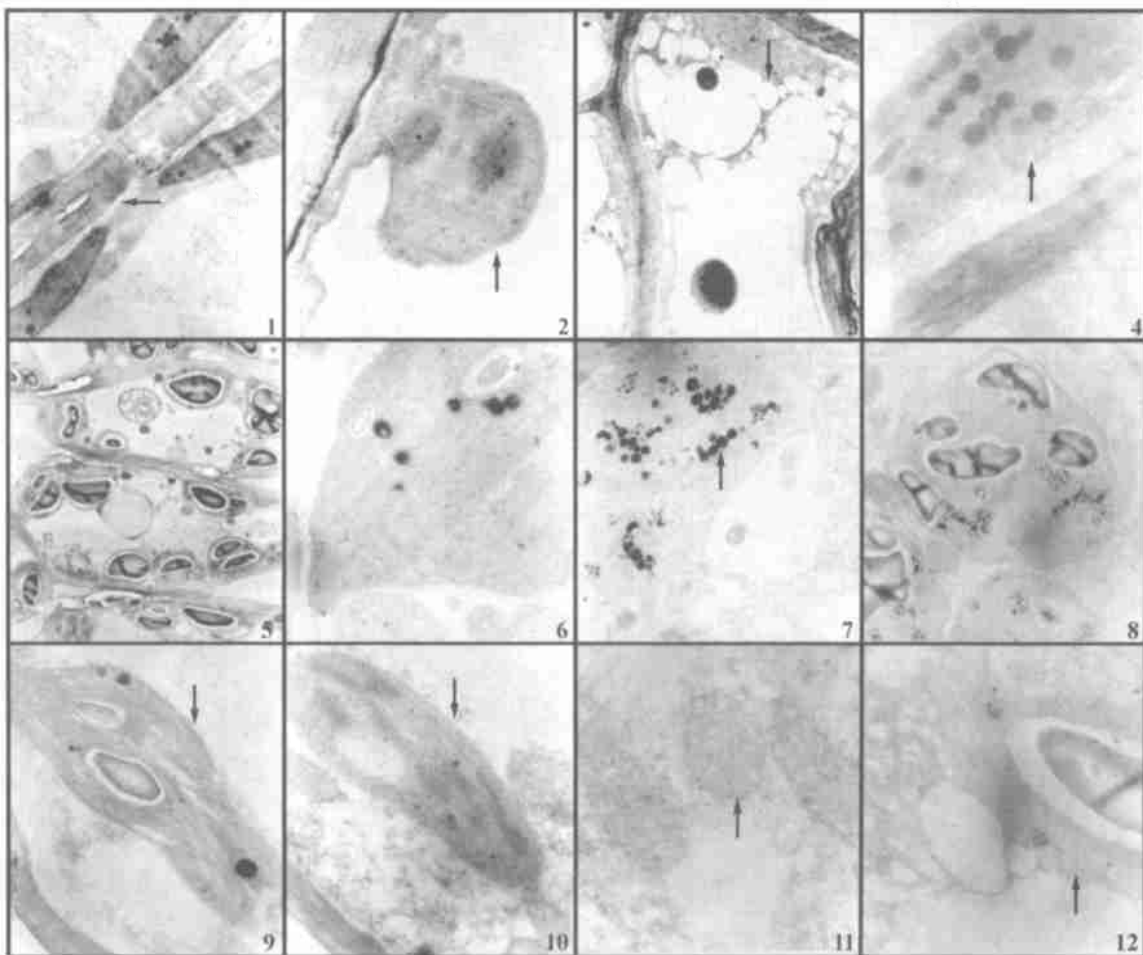
**Key words:** Evergreen broad-leaf plant; Leaf; Tissue structure; Ultra-microstructure; Stomatal opening; Cold hardiness

图版 Plate I

图版 说明 黄杨叶组织横切面 1. 10 月,  $\times 240$ ; 2. 12 月,  $\times 240$ ; 3. 翌年 4 月,  $\times 240$ 

Explanation of plate I The leaf structure of *Buxus sinica* 1. Oct.,  $\times 240$ ; 2. Dec.,  $\times 240$ ; 3. April of next year,  $\times 240$

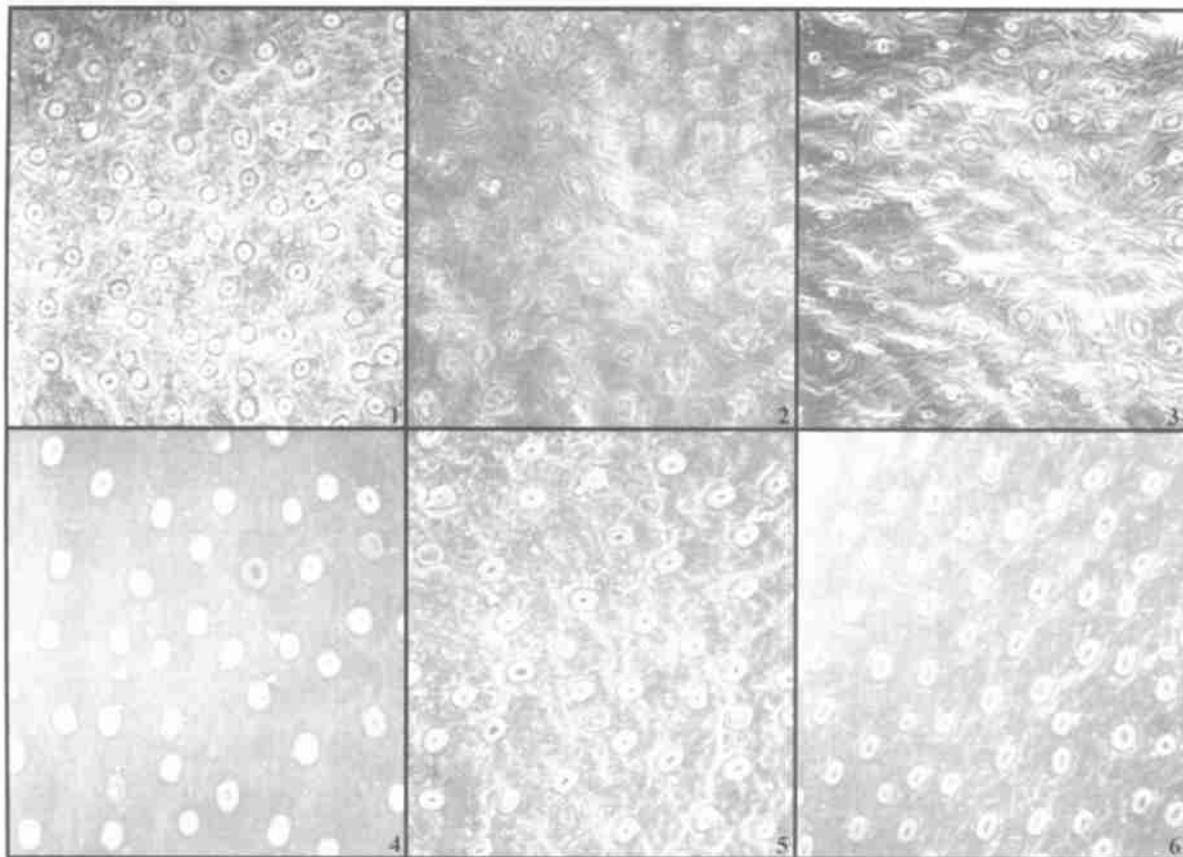
图版 Plate II



图版 说明 1~5 黄杨 (1. 10 月叶绿体及质壁分离现象,  $\times 1\ 000$ ; 2. 12 月液泡吞噬原生质,  $\times 10\ 000$ ; 3. 12 月形成大量小液泡,  $\times 6\ 000$ ; 4. 1 月叶绿体,  $\times 25\ 000$ ; 5. 3 月细胞,  $\times 2\ 000$ )。6~8 洋常春藤 (6. 10 月叶绿体,  $\times 20\ 000$ ; 7. 2 月叶绿体、脂质颗粒,  $\times 10\ 000$ ; 8. 3 月叶绿体、淀粉粒,  $\times 8\ 000$ )。9~12 八角金盘 (9. 10 月叶绿体,  $\times 17\ 000$ ; 10. 1 月叶绿体,  $\times 17\ 000$ ; 11. 1 月线粒体,  $\times 30\ 000$ ; 12. 4 月叶绿体,  $\times 17\ 000$ )。

Explanation of plate 1-5. *Buxus sinica* (1. Chloroplast and plasmolization in October,  $\times 1\ 000$ ; 2. Protoplasm swallowed by vacuolar in Dec.,  $\times 10\ 000$ ; 3. Vacuoles formation in Dec.,  $\times 6\ 000$ ; 4. Chloroplast in Jan.,  $\times 25\ 000$ ; 5. Cell in Mar.,  $\times 2\ 000$ ). 6-8. *Hedera helix* (6. Chloroplast in Oct.,  $\times 20\ 000$ ; 7. Chloroplast and lipid granule in Feb.,  $\times 10\ 000$ ; 8. Chloroplast and starch grain in March,  $\times 8\ 000$ ). 9-12. *Fatsia japonica* (9. Chloroplast in Oct.,  $\times 17\ 000$ ; 10. Chloroplast in Jan.,  $\times 17\ 000$ ; 11. Mitochondrion in Jan.,  $\times 30\ 000$ ; 12. Chloroplast in March,  $\times 17\ 000$ ).

图版 Plate III



图版 说明 1~3 八角金盘气孔及下表皮状况 (1, 10 月,  $\times 90$ ; 2. 1 月,  $\times 90$ ; 3. 3 月,  $\times 90$ )。4~6 黄杨 (4. 10 月,  $\times 90$ ; 5. 1 月,  $\times 90$ ; 6. 3 月,  $\times 90$ )。

Explanation of plate 1 - 3. Behaviour of stomata and the feature of lower epidermis. *Fatsia japonica* (1. Oct.,  $\times 90$ ; 2. Jan.,  $\times 90$ ; 3. Mar.,  $\times 90$ ). 4 - 6. *Buxus sinica* (4. Oct.,  $\times 90$ ; 5. Jan.,  $\times 90$ ; 6. March,  $\times 90$ ).

### 新书推荐

## 《中国木本植物种子》

全书共收集 492 属、1276 个种 (含变种和亚种)。按属或种简要记述生长习性、分布、用途和开花结实特点; 着重描述果实的采收、种子调制、种子储藏、发芽前的种子处理、发芽测定、播种等主要生产环节的要点。参与撰稿的多达 70 余人, 都是国内知名专家学者。本书融集体智慧之大成, 汇科学研究之精华, 既总结生产实践的先进经验, 又验之于撰稿人的直接知识; 记载翔实, 描述准确, 数据来于实际。每个属或种均配有种子外观图和剖视图, 种子发芽进程图。具有先进性、科学性和实用性, 可供植物工作者、园林工作者、院校师生以及基层技术人员、行政管理人员参考。定价: 200.00 元 (含邮费)



## 《英汉园艺学词典》 章文才主编

该词典共收集专业词汇约两万条, 按照全、新、准、精的收词原则, 收录了园艺科学的基本词汇和与园艺科学有密切联系的基础科学和边缘科学词汇, 其中从现代外文书刊中摘录的拼合新词约 100 多条。为了便于检索, 本词典将主要的果树、蔬菜、花卉种名, 按植物属分类汇编。可供我国园艺界的教学、科研、生产方面的专业人员和广大园艺工作者参考使用。定价: 23 元 (含邮费)

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。

