

# 表面活性剂对大豆叶面气孔和蜡质层影响研究<sup>\*</sup>

叶小利 李学刚 陈时洪 王 强

(西南农业大学,中心试验室 重庆 400716)

**摘要** 本文系统地研究了烷基聚氧乙烯基醚 (PPJ) 和蔗糖脂肪酸脂 (SFE), 对大豆叶片气孔蜡质层、乙烯释放量和锰离子吸收情况等的影响。结果表明, 随着表面活性剂浓度的增加, 气孔逐渐打开, 在 PPJ 和 SFE 分别为 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L 时, 气孔的孔径达到最大, 然后气孔逐渐关闭; 蜡质层的溶解程度随表面活性剂浓度的增加而逐渐增加; 在 PPJ 和 SFE 的浓度分别小于 1 mmol/L 和 10 mmol/L 时, 乙烯的释放量几乎不受影响, 但表现活性剂的浓度进一步增加时, 乙烯的释放量增加; 锰离子的吸收随表面活性剂浓度增加而增加, 当 PPJ 的浓度为 0.6 mmol/L 左右时叶片对锰离子的吸收达到最大值, 然后下降。表面活性剂能在不同程度上调节大豆叶片气孔开闭、蜡质层的溶解、乙烯释放量和锰离子的吸收。

**关键词** 大豆; 表现活性剂; 气孔; 乙烯; 锰离子

## 0 前言

表现活性剂具有乳化、分散、润湿和渗透等作用, 在植物的叶面肥和农药的施用中广泛地被用作添加剂。表现活性剂可以改善所喷溶液在植物叶面的物理及化学特性, 它们能增加叶片对有效成分的吸收, 使肥料或药液得到更有效的利用。

表现活性剂在植物叶面上吸附后, 会与气孔和蜡质层发生一定的相互作用。R. C. Pan 等人用 Tween-80 的水溶液处理玉米叶子后, 发现叶片的蜡质有溶解现象, 并且使叶子的蒸腾作用扩大了 1-3 倍<sup>[1]</sup>; 在油菜、蚕豆等植物叶面喷洒含 OP-10 或 NP-10 的溶液后, 由于表面活性剂与膜和蛋白质的相互作用引起了叶片枯斑和组织损伤, 甚至增加了乙烯的释放量, 引起植物毒性<sup>[2-4]</sup>。

植物气孔的保卫细胞的关闭主要受到水、二氧化碳、温度、pH 值等的影响。已有报道, 保卫细胞的关闭还可以受到多种外来刺激因素的影响, 如细胞松弛素 B 能可逆地引起蚕豆气孔的关闭<sup>[5]</sup>; 水分胁迫能引起气孔的不均匀关闭现象<sup>[6]</sup>; 激素 (如激动素 KT 脱落酸 ABA) 也能够影响气孔的开闭<sup>[7-9]</sup>等。最近有报道说表面活性剂也能引起气孔的运

\* 收稿日期 1999-03-11

Received on March 11, 1999

动。例如,烷基苯磺酸钠可以破坏松树针叶上表皮的蜡质,改变气孔保卫细胞的细胞壁结构,进而引起气孔的关闭<sup>[10]</sup>;有机硅表面活性剂能够影响气孔的开闭以及气孔的透性<sup>[11]</sup>。当氧乙烯基链的长度变化时,同一浓度的 OP-*n*和 NP-*n*将不同程度地改变甘蔗和撒蓝对 glyphosate<sup>[12-13]</sup>的吸收。

我们的试验发现,表面活性剂对大豆叶面气孔的开闭有影响,因此本文选择了三种非离子表面活性剂对大豆叶片进行喷施处理,并利用扫描电镜、气相色谱、原子吸收光谱等技术,系统地研究了表面活性剂对大豆叶片气孔开闭、蜡质层的溶解、乙烯释放、锰离子在叶面的吸收等方面的影响,以探讨表面活性剂与大豆叶片的相互作用关系。

## 1 材料与方方法

### 1.1 表面活性剂

脂肪醇聚氧乙烯醚  $C_n H_{2n+1} O (C_2 H_5 O)_m H$  ( $n=12-16, m=15-16$ ) (PPJ)、蔗糖脂肪酯 (SFE)、辛基苯基聚乙二醇醚  $C_8 H_{17} \cdot C_6 H_5 \cdot O (C_2 H_5 O)_{10} H$  (OP-10),以上物质为重庆化学试剂公司化学纯产品,直接使用。

### 1.2 试验材料及处理

选大豆(西豆三号),田间种植,适时灌溉,至开花期用于实验。在开花期选择长势均匀的大豆在晴天傍晚用一定浓度的表面活性剂溶液进行叶面喷施处理。按实验需要选取中上部充分伸展的3-6位叶片用于实验。

### 1.3 电镜实验

在选定的大豆和蚕豆叶片上,分别喷施不同种类和不同浓度的表现活性剂溶液。12小时后,取下叶片用蒸馏水反复冲洗干净,用活体固定法把叶片分割为  $5\text{mm} \times 5\text{mm}$  大小的小块,并迅速投入 5% 的戊二醛中,真空抽气使叶片沉到瓶底,放入冰箱 ( $4^\circ\text{C}$ ) 固定 5-12 小时。固定完毕,取出经磷酸缓冲液 ( $0.15\text{mol/L}$ , pH7.2) 充分洗涤,再用锇酸 (1%) 固定 2 小时 ( $4^\circ\text{C}$ ),取出后用磷酸缓冲液反复冲洗。然后于  $4^\circ\text{C}$  下进行系列脱水: 35% 乙醇、50% 乙醇、75% 乙醇、90% 乙醇、90% 乙醇: 90% 丙酮 (1:1)、90% 丙酮、100% 丙酮 (3次),每个浓度处理 10-15 分钟。脱水之后,进行临界点真空干燥,粘样镀膜,最后进行电镜观察。

### 1.4 乙烯含量测定<sup>[3]</sup>

在选定的大豆叶片上喷施表面活性剂溶液 10 小时后,取处理后的叶片用打孔器打成小圆片 (直径 8mm) 并混匀,随机抽取 8 片放入 10ml 试管中,充气后用橡皮塞塞紧。2 小时后,注入 1ml 空气,混合均匀,再取试管上部的空气 2ml,用带有火焰离子化检测器的 Hitachi 163 气相色谱仪分析乙烯的含量。把样品注入到活化的氧化铝柱子上 ( $150 \times 0.2\text{cm}$ , 60/80 目),柱的入口温度和检测器的温度为  $80^\circ\text{C}$ ,载气为  $\text{N}_2$ ,其流速为  $30\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 。处理重复五次,测量误差小于 10%。

### 1.5 锰离子在叶面的吸收

配制  $30\text{mmol/L}$   $\text{MnSO}_4$  溶液,在其中加入 PPJ,使其浓度分别为 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、2.0  $\text{mmol/L}$ ;取长势几乎一致的大豆叶片进行喷施处理,10 小时后用水清洗干净,取上部充分伸展的 3-6 位叶片,用打孔器取下  $10\text{mm}$  的圆片,每样取 16 片。样

品用硝酸和高氯酸硝化,然后定容为 10ml,用原子吸收光谱法测定  $Mn^{2+}$  的含量,计算出  $Mn^{2+}$  在叶面的吸收。试验重复三次,重复误差小于 10%。

## 2 结果

### 2.1 相同浓度的不同表面活性剂对大豆叶面气孔和蜡质层的影响

图 1 示出了三种非离子表面活性剂 (SFE OP-10 PPJ)在相同浓度 (1mmol/L) 相同处理时间 (24小时)对大豆叶面气孔和蜡质层的影响。

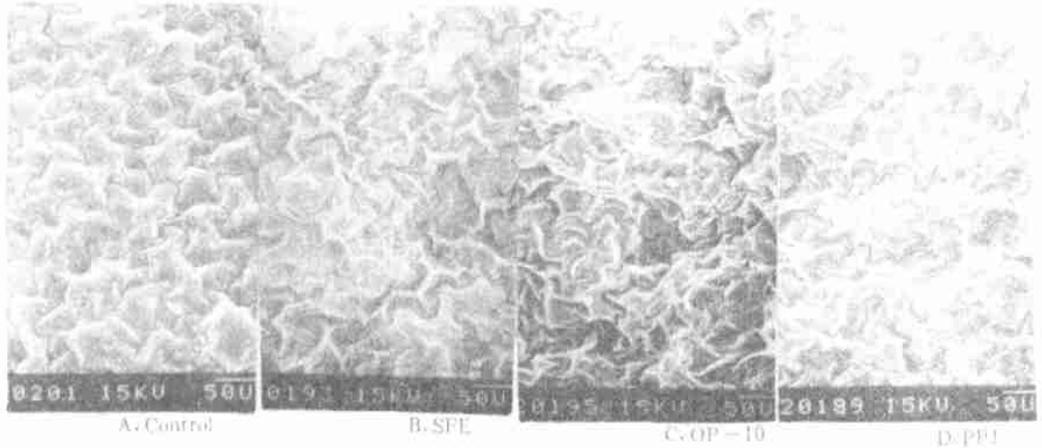


图 1 不同表面活性剂对大豆叶片气孔和蜡质层的影响

Fig. 1 Effects of surfactant on stoma and epicuticular wax of soybean leaves

(注:以喷清水为实验对照;图中的电镜图是在全面测定的基础上,选取具有普遍意义的图版;以下相同。)

从图 1中可以看出,表面活性剂在不同程度上促进了叶面气孔的开放。三种表面活性剂中,OP-10促进气孔开放的能力最强,PPJ其次,SFE最弱。另外,图版还直观地反映了气孔周围的蜡质层受到影响的情况。对照的蜡质层基本上是完好无损并且较为平整;用表面活性剂溶液处理后,它们使蜡质层“溶解”了,尤其是 OP-10使蜡质层受到了严重的破坏,相比较而言,SFE对蜡质的影响最小,只有小部分的蜡质被溶解了。

我们的试验还发现,OP-10使大豆叶片出现了较多的枯斑,这与 Moritz等报道的 OP-10或 NP-10会使油菜和蚕豆叶片出现枯斑的实验结果相类似<sup>[3]</sup>。在试验条件下,PPJ和 SFE则不引起叶片出现枯斑,因此在以后的实验中,我们主要研究 PPJ和 SFE对大豆的影响。

### 2.2 表面活性剂不同处理时间对植物叶面气孔和蜡质层的影响

用 1mmol/L的 SFE处理大豆叶片,分别于 1 5 24小时后取样观察它们对植物气孔和蜡质层的影响(图 2)。从图中可以看出,在处理表面活性剂后 1小时,气孔的保卫细胞比对照略有开放,气孔周围的蜡质也有部分溶解,说明表面活性剂在较短的时间内就开始对植物叶片产生了一定的影响;随着处理时间的增长,气孔的开放程度增加,气孔周围的蜡质层被“溶解”的面积也逐渐增加。我们进一步实验 72小时的结果表明,气孔的开放程度与蜡质层的溶解程度,到 24小时以后,几乎不变。

试验结果表明 SFE对大豆叶片的影响与 PPJ完全一样,只是程度略有不同。

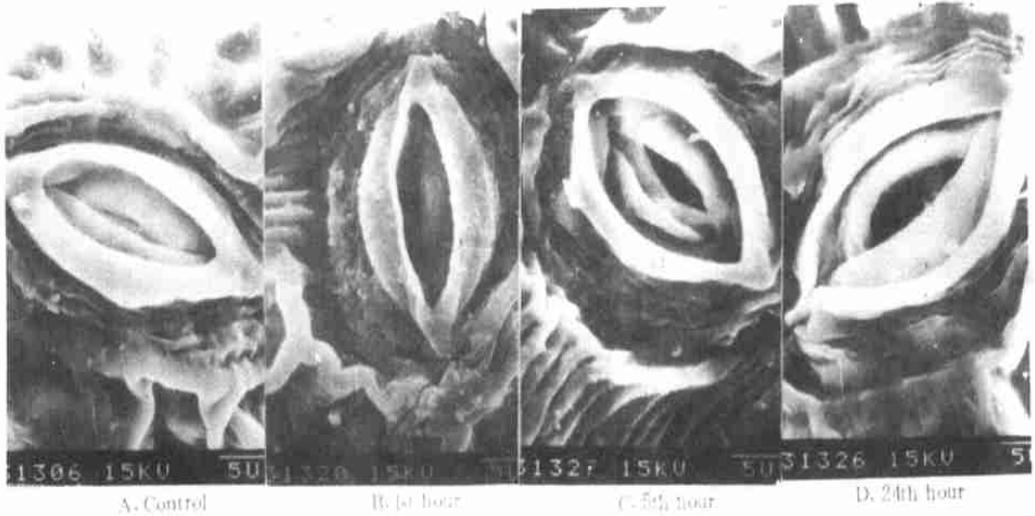


图 2 表面活性剂不同处理时间对大豆叶片气孔和蜡质层的影响

Fig. 2 Effects of different length of time of treatment on stoma and epicuticular wax of soybean

### 2.3 表面活性剂浓度对大豆气孔和蜡质层的影响

图 3示出了不同浓度(0.1mmol/L, 0.4mmol/L, 0.8mmol/L, 1.0mmol/L, 1.5mmol/L)的 SFE对大豆叶面的影响情况。

表 1 表面活性剂对蚕豆气孔和蜡质大小的影响

Table 1 Change of stoma size and wax of *Vicia faba* L. treated by surfactant

Changes of area( $\mu\text{m}^2$ )	SFE(mmol/L)						PPJ(mmol/L)					
	Control	0.1	0.5	0.8	1.2	1.5	Control	0.05	0.15	0.5	1.0	2.0
Stomata*	0.203	0.272	10.6	28.0	9.61	0.02	0.212	5.76	10.24	23.04	5.83	0.064
Wax**	145	168	192	240	288	389	126	143	167	216	297	336

\* The size of stoma calculated by aperture between two guard cells

\*\* The area of wax calculated by periphery of two guard cells.

结果表明,在大豆的叶面喷施 SFE后,随着 SFE浓度的增加,气孔的孔径首先由小到大开放,然后再由大到小直至关闭;而气孔周围的蜡质被溶解的程度则逐渐增加。

图 4 5分别示出了 SFE对气孔和蜡质层的影响。从图 4中可以看到,随着 SFE浓度的增加,气孔的孔径逐渐增大。当浓度为 1.0mmol/L时,气孔孔径达到最大(约有  $49\mu\text{m}^2$ ),然后气孔开始关闭,到浓度 2mol/L时,几乎完全关闭。从图 5中可以看到,气孔周围蜡质层的溶解却随着浓度的增加而增加。

表 1示出了表面活性剂(SFE, PPJ)对蚕豆叶面的影响。从中可以看出,尽管这两种表面活性剂对于气孔和蜡质的影响各有不同。但它们都能使气孔先打开,然后关闭;也能使蜡质的溶解程度随表面活性剂浓度的增加而增加。

以上结果说明表面活性剂与植物叶面的相互作用具有一定的相似性;即对气孔的关闭可能起着调节的作用,而对叶面蜡质层具有不可逆的破坏性作用。

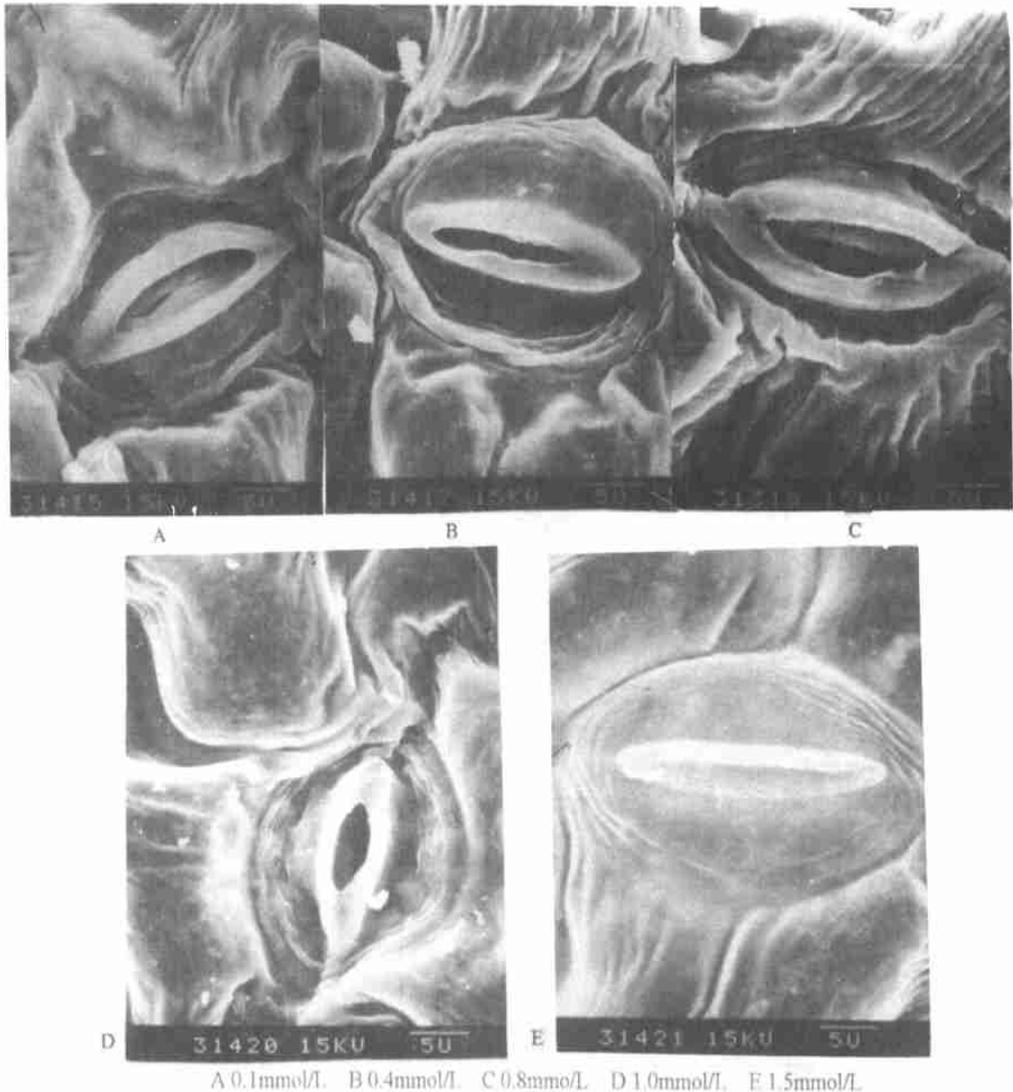


图 3 SFE对大豆叶片气孔和蜡质层的浓度效应

Fig. 3 Effects of different concentration SFE on stoma and epicuticular wax of soybean

#### 2.4 不同浓度的表面活性剂对植物释放乙烯的影响

图 6 示出了表面活性剂对大豆叶片释放乙烯的影响情况。从图中可以看出,在 PPJ 的浓度为  $1\text{mmol/L}$  以下,他们对于叶片释放乙烯的量几乎没有影响;当 PPJ 的浓度大于  $1\text{mmol/L}$  以后,随着表面活性剂浓度的增加,释放乙烯的量逐渐增加;PPJ 使乙烯释放量的增加十分明显, $10\text{mmol/L}$  的 PPJ 能使乙烯的释放量增加  $150\%$ ,达到  $46\text{nL}\cdot\text{dm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ 。当 SFE 的浓度大于  $6.0\text{mmol/L}$  时, SFE 也有类似的趋势,但促进乙烯释放的幅度明显小于 PPJ, $20\text{mmol/L}$  时 SFE 仅引起乙烯的释放量增加  $30\%$  左右,达到  $24\text{nL}\cdot\text{dm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ,比对照约高 5 个单位。这说明, SFE 对乙烯释放的影响不如 PPJ 强。试验中还发现,高浓度的 PPJ (当浓度为  $10\text{mmol/L}$  以后),可以导致叶片的萎蔫 (肉眼可见,但是未见枯斑);而

SFE对植物处理后,未见萎蔫现象。因此可以认为 SFE对植物的伤害比 PPJ要小

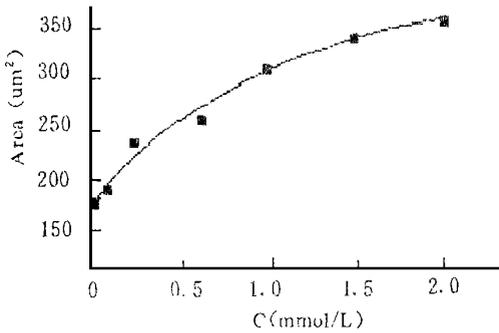


图 4 SFE对气孔大小的影响

Fig. 4 Changes of stoma area opened by SFE

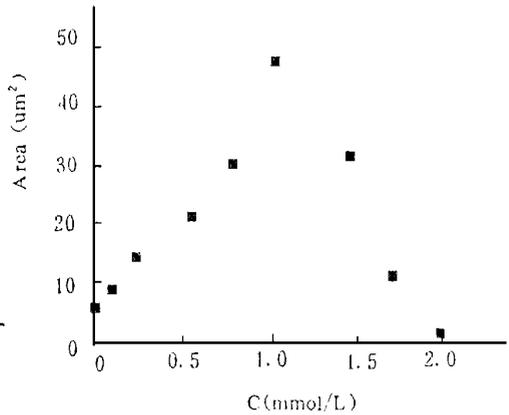


图 5 SFE对蜡质层的溶解

Fig. 5 Wax area dissolved by SFE

## 2.5 锰离子的吸收

图 7示出了 PPJ对大豆叶片吸收锰离子的影响情况。从图中可以看到,随着 PPJ的浓度增加,锰离子的吸收量增加,当 PPJ的浓度达到 0.6mmol/L时,吸收量最大,然后随着浓度的增加,锰离子的吸收量开始下降。说明表面活性剂有调节植物吸收营养物质(尤其是水溶性的无机离子)的能力。另外还发现,PPJ对大豆叶片吸收锰离子的调节恰好与它促进气孔开或闭的趋势完全一致。

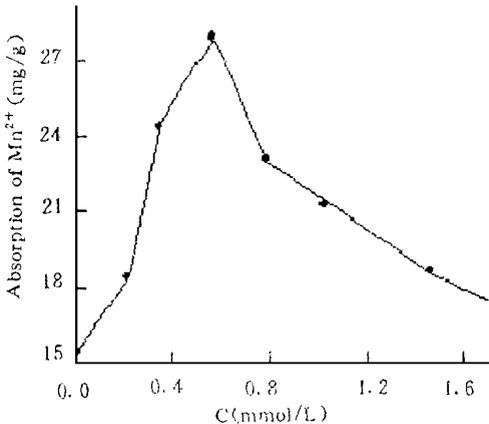


图 6 表面活性剂对大豆叶片释放乙烯的影响

Fig. 6 The effects of surfactants on the release of ethylene of soybean leaves

1 PPJ 2 SFE

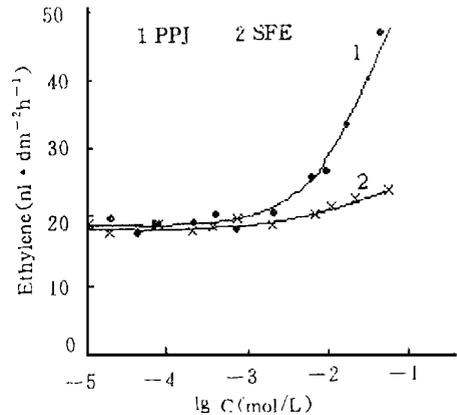


图 7 PPJ对大豆叶片吸收锰离子的影响

Fig. 7 The effects of PPJ on the Mn<sup>2+</sup> absorption of soybean leaves

## 3 讨论

气孔的开闭是通过调节保卫细胞中的水势来实现的。成熟的保卫细胞以其特殊的胞

壁结构以及非常敏感地感受外源环境信号(如水、二氧化碳、光照、温度等)的能力来调节气孔开闭,从而控制着植物体与外界环境进行的水分和气体交换,即调节植物的光合作用和蒸腾作用。关于气孔运动的机理,目前占主要地位的有以  $K^+$  为主的膨压调节理论,该理论认为  $K^+$ 、 $Cl^-$ 、苹果酸及有机化合物等渗透调节物质进出保卫细胞引起气孔开闭运动<sup>[14-16]</sup>。渗透调节物质引起气孔运动可能有 3 条途径<sup>[17]</sup>: (1)通过光合作用,积累蔗糖;(2)由淀粉降解生产的苹果酸平衡  $K^+$  的吸收;(3)淀粉降解产生的蔗糖的积累。当蔗糖的浓度增加时,相应地降低了细胞的水势,保卫细胞吸水,使气孔打开。

气孔的开闭是由于保卫细胞吸取或失去水分引起的。控制气孔的开放和控制气孔的闭合似乎是不同的。气孔的开放通常需要膨压、光照和低的二氧化碳,而且与羟基乙酸代谢有关。气孔的开放似乎是一个能量消耗的过程,闭合是一个被动过程<sup>[18]</sup>。

前面的试验结果表明,表面活性剂不但能够使气孔打开或关闭,溶解蜡质(见图 1 2 3 4 5);我们的试验还发现,表面活性剂可以提高蔗糖酶的活力和大豆叶片的叶绿素含量(待发表)。因此,我们认为表面活性剂促进气孔打开的作用机理可能是因为表面活性剂在与大豆叶片的相互作用中,增加了保卫细胞中叶绿素的含量及蔗糖酶的活力,提高了蔗糖的含量,进而使保卫细胞吸水,增加了膨压,使气孔打开。

当表面活性剂的浓度较高时,气孔关闭。试验中发现随着表面活性剂浓度的增加,大豆叶片释放的乙烯量增加;另一方面,保卫细胞周围的蜡质溶解程度也增加(见图 4 5);对照图 4和图 6还可以发现,乙烯释放量的增加是在气孔开始关闭的表面活性剂浓度下才开始发生的,这说明气孔的关闭与乙烯的释放量密切相关。乙烯释放量的增加和蜡质层的溶解,表明植物受到了一定程度伤害,使植物处于胁迫环境中;高的表面活性剂浓度可能导致细胞膜破坏,水分可能会很快地从保卫细胞和溶解的蜡质通道蒸发掉,此时,气孔的关闭可能是植物对这种逆境的主动反应。因此,可以得出结论,表面活性剂对植物叶片气孔的运动具有一定的调节作用。

对比图 7和图 4,可以看到植物叶片对锰离子的吸收程度与气孔的打开程度具有一一对应关系,说明气孔的打开对于外界物质,尤其是水溶性物质的吸收,具有十分明显的直接影响。Stevens 等也发现,气孔的打开可以促进蚕豆对于 DOG 的吸收和转移<sup>[11]</sup>,这与我们的结果类似。这些结果说明,气孔是外源物质(尤其是水溶性物质)进入植物体内的主要通道。可见,表面活性剂促进植物叶片对外源物质(主要是农药和叶面肥等)的吸收,除了表面活性剂具有改善溶液在叶面的润湿、附着、以及渗透等能力外,还与表面活性剂具有调节气孔的开闭能力直接相关。

## 参 考 文 献

- 1 Pan Re, Lwo YX, Wang YL. Adjuvants and agrochemicals Mode of action and physiology activity Chow PN P, Grant CA, Hinshal wood AM., ed. Bova Raton (Florida): CRC Press Inc. 1989, 73- 82
- 2 Helenius, A. and Simous, K. Solubilization of membranes by detergents. Biochem. Biophys. Acta. 1975, 415 29 - 39
- 3 Moritz knoche, Georg Noga and Fritz Lenz. Surfactant- induced phytotoxicity: evidence for interaction with epicuticular wax fine structure. Crop Protection. 1992, 11: 51- 56
- 4 Lownds, N. K. and Bukovac, M. J. Surfactant- induced ethylene production by leaf sissue. J. Am. Soc. Hort. Sci. 1989, 114 449- 454

- 5 黄荣峰, 王学臣. 细胞松弛素 B对蚕豆气孔运动的影响. 植物生理学报, 1996, 22(4): 404- 408
- 6 孟庆伟, 邹琦, 许长成, 赵世杰. 小麦和大豆叶片的气孔不均匀关闭现象. 植物生理学报, 1997, 23(1): 53- 60
- 7 Biddington, N. L., Thomas, T. H. Influence of difference cytokinis on the transpiration and senescence of excised oat leaves. *Physiol. Plant.* 1978, 42 369- 374
- 8 Thimann, K. V., Satler, S. Relation between senescence and stomatal opening senescence in darkness, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979a, 76 2770- 2773
- 9 Thimann, K. V., Satler, S. Relation between senescence and stomatal opening senescence in light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976b, 76 2770- 2773
- 10 Bussoetti F., Bottacci A., Grossoni P., Mori B., Tani C. Cytological and structural changes in pinus pinea L. Needles following the application of an anionic surfactant. *Plant Cell and Environment.* 1997, 20(4): 513- 520
- 11 Stevens PJG, Gaskin RE, Hong SO., Contributions of stomatal infiltration and cuticular penetration to enhancement of foliar uptake by surfactants. *Pesticide Science*, 1991, 33(3): 371- 382
- 12 Stevens, P. J. G. and Bukovac, M. J. Studies on Octylphenoxy surfactants. Part I Effects of oxyethylene content on properties of potential relevance to foliar absorption. *Pestic. Sci.* 1987, 20 19- 35
- 13 Knoche M., Bukovac M. J. Interaction of surfactant and leaf surface in glyphosate absorption. *Weed Science*. 1993, 41(1): 87- 93
- 14 Parvathi K, Raghavendra. Bioenergetic processes in guard cells related to stomatal function. *Physiol. Plant.* 1995, 93 146- 154
- 15 Javis P G, Mansfield TA. eds. *Stomatal Physiology*. Cambridge Cambridge University Press. 1981
- 16 Assmann S. M., Signal transduction in guard cells, *Ann Rev Cell Bio.* 1993, 9 45- 375
- 17 Talbott L, Eduardo Zeiger, Sugar and organic acid accumulation on guards cells of *Vicia faba* in response to red and blue light. *Plant Physiol.* 1993, 102 1163- 1169
- 18 Leggett J. E., Frere M. H. Growth and salt accumulation by soybean plants. *Plant Physiol.* 1970, 46, Suppl 12

## THE EFFECTS OF SURFACTANTS ON STOMATA AND EPICUTICULAR WAX STRUCTURE OF SOYBEAN

Ye Xiaoli Li Xuegang Cheng Shihong Wang Qiang

(*Southwest Agricultural University, Central Laboratory, Chongqing. 400716*)

**Abstract** The effects of PPJ and SFE on stomata and epicuticular wax and the ethylene production and  $Mn^{2+}$  absorption of soybean leaves have been studied systematically. With the concentration of surfactants increasing, the stomatal aperture was gradually increased and then decreased, reaching the maximum when the concentration of PPJ and SFE was 0.5mmol/L and 1.0mmol/L respectively. The area of the epicuticular wax dissolved would be increased irreversibly with the applied concentration increasing. The ethylene production would be increased only when the concentration of PPJ and SFE was higher than 1mmol/L and 10mmol/L respectively.  $Mn^{2+}$  absorption was directly proportional to the size of stomatal aperture. The results showed that PPJ and SFE could adjust in different degree to the stomatal movement and epicuticular wax dissolution and ethylene production and  $Mn^{2+}$  absorption.

**Key words** Soybean; Surfactant; Stomata; Ethylene production;  $Mn^{2+}$  absorption