

不同磷素水平下大豆叶片超显微结构的观察

王金生¹, 吴俊江¹, 马凤鸣², 林蔚刚¹, 钟 鹏¹, 董德建¹

(1. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 50086; 2. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: 利用筛选获得的表现稳定的磷高效基因型和磷低效基因型大豆品种各4个为材料, 在不同供磷水平条件下培养至盛花期, 取大豆生长点以下第二片复叶中间叶进行超显微结构观察。结果表明: 无论磷高效还是磷低效基因型品种随着施磷量的增加, 叶片上单位面积气孔数目、气孔大小以及气孔开度均有所提高。在低磷处理下, 磷高效基因型品种的气孔大小小于磷低效基因型品种, 但气孔开度大于磷低效基因型品种, 磷高效基因型品种低磷处理及中磷处理的单个叶肉细胞内叶绿体数量显著高于磷低效基因型品种, 而高磷处理单个叶肉细胞内叶绿体数量则显著低于磷低效基因型品种。磷低效基因型品种随着磷肥施入量的增加, 叶绿体的数量有所增加, 且叶绿体形态较规则。对于磷高效基因型品种而言, 高量的磷肥对叶绿体可能有一定的毒害作用, 叶绿体破坏较为严重。因此, 针对不同磷效基因型大豆合理地施用磷肥能有效改善叶片气孔及叶绿体的超微结构, 提高大豆叶片光合作用的执行功能。

关键词: 大豆; 磷效率; 超显微结构

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)02-0242-05

Observation of Soybean Ultrastructure with Different Phosphorous Treatments

WANG Jin-sheng¹, WU Jun-jiang¹, MA Feng-ming², LIN Wei-gang¹, ZHONG Peng¹, DONG De-jiang¹

(1. Soybean Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 2. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: Eight soybean cultivars with different P efficiency were cultivated until flowering in 3 P levels (0, 640 and 960 mg · kg⁻¹) and then took the mid-leaf of the second ternate for ultrastructure observation. The result showed that with the increase of P amount, the stoma number, size and aperture in unit leaf area of high or low P efficiency cultivars were increased. Under P₀ control, the stoma size of high P efficiency cultivar was smaller than low P ones, but the aperture was bigger than low P cultivars. The chloroplast number in single mesophyll cell of high P efficiency cultivars in low and middle P levels were significantly higher than low P efficiency ones, but opposite in high P treatment. With the increase of P amount, the chloroplast number was increased with regular shape. However, a large amount of P fertilizer may be harmful to the chloroplast of high P efficiency genotypes and destroyed chloroplast shape seriously. In conclusion, scientifically P utilization could improve the ultra microscopic structure of stomata and chloroplast, finally increase the efficiency of photosynthesis.

Key words: Soybean; Phosphorus efficiency; Ultra microscopic structure

由于磷在植物生长发育中的重要作用及其在土壤中存在状态的特殊性, 国内外已有许多学者研究了植物适应低磷胁迫的生理生化代谢^[1-2]、生长发育变化^[3-4]及其与植物磷营养效率的关系。磷素营养对植物生长发育的影响是形态、解剖结构、生理及生化过程的综合结果^[5], 因此研究磷素对植物解剖结构变化具有一定的理论价值。大豆超显微结构观察已经成为大豆生长发育机理、抗病机制、遗传进化等方面研究的重要内容^[6]。电子显微镜技术已经应用于如大豆生长发育机理^[7-10]、大豆抗病机制^[11-12]、不良环境对大豆影响^[13-14]以及大豆遗传进化和分类^[15-17]等方面的研究。有关磷素对大豆叶片显微结构及细胞器超微结构影响变化的报道

很少。该试验以8个磷效率差异明显的大豆基因型为研究对象, 探讨不同供磷水平条件下大豆叶片显微结构的基因型差异, 从解剖结构方面研究大豆磷效率差异的光合基础, 以期为农业生产中磷肥的合理施用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以前期不同磷效率基因型筛选中获得的表现稳定的大豆品种为材料, 磷高效基因型: 丰收24、黑河27、绥农4和克交05-1397; 磷低效基因型: 垦鉴4、丰收25、绥农23和绥农10。

收稿日期: 2011-12-07

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(C201104); "十二五"国家科技支撑计划资助项目(2011BAD35B06); 现代农业产业技术体系资助项目(nycyt-004)。

第一作者简介: 王金生(1981-), 男, 硕士, 研究实习员, 主要从事大豆耕作与栽培技术研究。E-mail: jinshengwang1981@yahoo.cn。

通讯作者: 吴俊江(1970-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事大豆耕作与栽培技术研究。E-mail: nkywuji@126.com。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 试验所用土壤已有近 20 a 未施磷肥,含有效磷 $7.96 \pm 2.33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ 浸提,钼锑抗比色法测定),属缺磷土壤。土壤其它基本理化性质:速效氮(N) $85.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、速效钾(K_2O) $83.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、有机质 1.5%、pH 5.51。盆栽试验每盆(直径 30 cm)装土 20 kg,装盆后与尿素、硫酸钾、磷酸二铵 3 种肥料混匀。磷肥共设置低磷(P0)、中磷(P640)和高磷(P960)3 个处理,施入磷酸二铵的量分别为 0、640 和 960 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,所有处理施尿素 60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、硫酸钾 15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。采用随机区组排列,每盆定苗 3 株,每个处理 3 盆,每个处理 3 次重复。

1.2.2 大豆叶片的超薄切片制作及超显微结构观察 采取定叶位、定叶龄、多次重复取样和单片多部位、多细胞观测的方法,取盛花期大豆生长点以下第二片复叶中间叶,每个基因型品种每个处理取形态规则一致的 5 片标记叶进行电镜制样,每片叶取 3 次样制 3 张光镜片,每个光镜片观察 10 次视野。电镜切片制作参照洪健^[18]的方法并加以改进,观察扫描电镜切片记录每次视野中的气孔数量、气孔开度及气孔形态;观察透射电镜切片记录叶绿体的数量及形态,同时观察基粒片层结构变化。

2 结果与分析

2.1 不同磷素水平对叶片气孔的影响

由表 1 可知,磷高效和磷低效基因型的叶片单位面积气孔数目在低磷和中磷水平差异并不显著,而在高磷水平下,呈现极显著差异。无论磷高效基因型品种还是磷低效基因型品种随着施磷量的增加,叶片上单位面积气孔数目均有所增加。其中,磷高效基因型低磷与高磷处理差异显著;磷低效基因型低磷与中磷处理差异不显著,但二者与高磷处理差异显著。

表 1 不同磷效基因型大豆叶片单位面积气孔数目的差异
Table 1 Stoma number in unit area of different P efficiency soybean genotypes

基因型 Genotypes	低磷 P0	中磷 P640	高磷 P960
磷高效基因型 HP	19aB	21aAB	22bA
磷低效基因型 LP	19aB	22aB	26aA

同列/行数后不同小/大写字母表示在 0.05 水平差异显著,下表同。

Values in the same column or row followed by different lowercase or capital letters are significantly different at 0.05 probability level;

HP: High P efficiency; LP: Low P efficiency; the same below.

如图 1 所示,随着施磷水平的提高,不同磷效

基因型的气孔大小以及气孔开度均有所变大。低磷处理磷高效基因型的气孔小于磷低效基因型,但气孔开度大于磷低效基因型(图 1A、E、B、F),低磷胁迫下气孔保持一定的开度对维持光合作用的正常进行尤为重要。同时,随着施磷水平的提高,叶片气孔周围的叶肉细胞形态不规则,明显变厚,堆积,气孔较低磷水平有所下陷(图 1C、D)。

2.2 不同磷素水平对叶绿体数目的影响

如表 2 所示,对于单个叶肉细胞内叶绿体数量,磷高效基因型低磷和中磷处理显著高于磷低效基因型,而高磷处理则显著低于磷低效基因型;磷高效基因型低磷和中磷处理显著高于高磷处理;磷低效基因型随着磷素含量增加,叶绿体的数量逐渐增加,低磷和中磷处理差异不显著,但二者与高磷处理差异达到极显著水平。

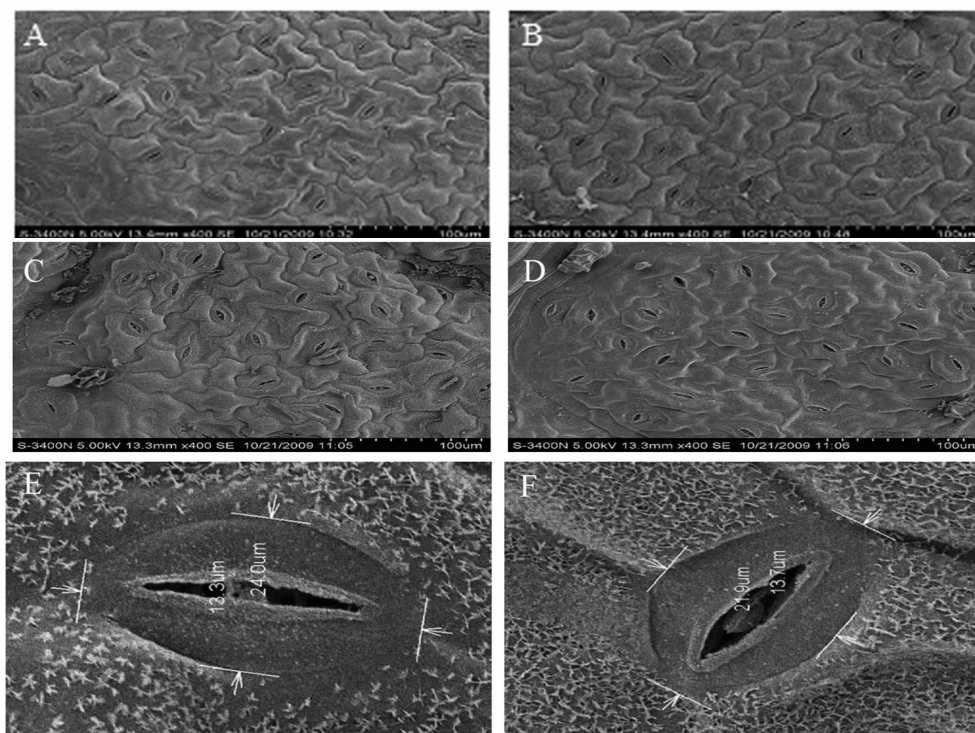
如图 2 所示,高磷条件下,磷低效基因型叶绿体连接成链珠状紧贴细胞壁分布(图 2B)。这可能有利于叶绿体光合作用的发挥,促进碳水化合物的合成及运输。高磷对磷高效基因型的叶绿体可能有一定的毒害作用,液泡被推至细胞边缘且零散分布于细胞中(图 2C)。

表 2 不同磷效基因型大豆叶肉细胞叶绿体数目的差异
Table 2 Stoma number in mesophyll cell of different P efficiency soybean genotypes

基因型 Genotypes	低磷 P0	中磷 P640	高磷 P960
磷高效基因型 PH	9.33aA	11.0aA	7.68bB
磷低效基因型 PL	7.20bB	8.20bB	12.4aA

2.3 不同磷素水平对叶绿体超显微结构的影响

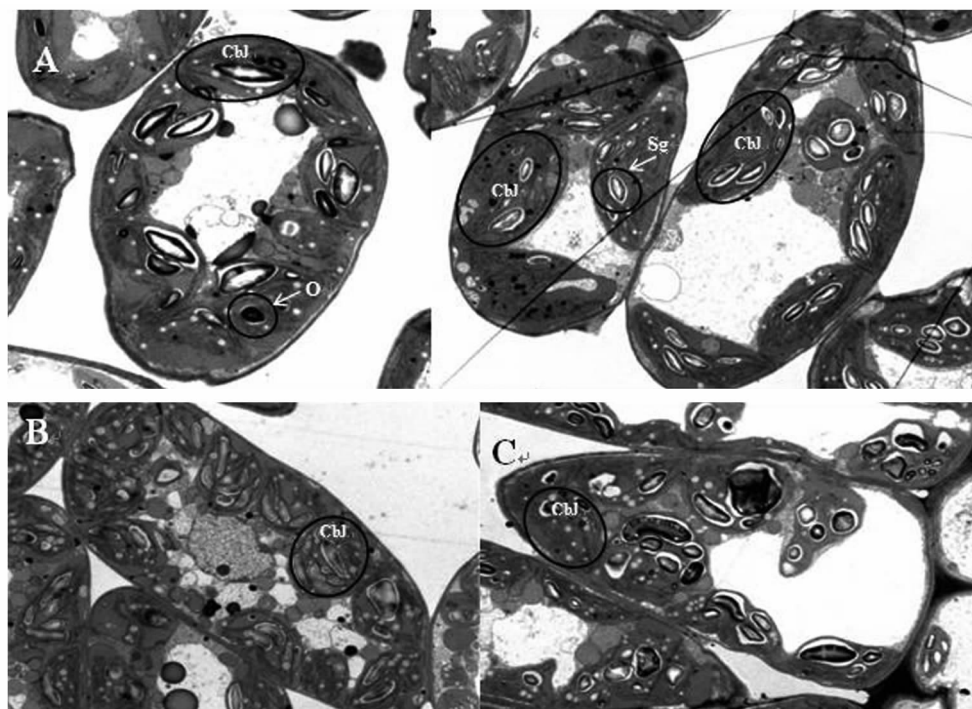
植株正常生长状态,其叶片中叶绿体近似椭圆形,大多数叶绿体长轴与细胞壁平行。叶绿体中基粒片层排列整齐,大多数基粒片层与叶绿体长轴平行,少数靠叶肉细胞壁一侧的基粒片层呈辐射状排列。基质浓厚,贮藏有淀粉粒,嗜锇颗粒较少。在叶绿体周围有较多的线粒体,线粒体呈圆形或椭圆形,基质浓厚(图 3A、B)。随着施磷水平的提高,磷低效基因型的叶绿体变大,叶绿体的基粒片层数明显增加,而且基粒片层垛叠致密,高磷水平更为明显。叶绿体内的淀粉粒随施磷水平的提高明显变大,但数量没有明显增加,说明叶绿体光合作用增强。嗜锇颗粒数量增多但体积明显变小,叶绿体基质变淡薄(图 3C、D、E)。与磷低效基因型相比,随着磷素水平的增高,磷高效基因型品种的叶绿体超显微结构变化则呈现出明显的不同。叶绿体明显皱缩,形状极不规则。基粒片层变薄,甚至解体,叶绿体内能见到一些松散的、无序的片层结构,嗜锇颗粒增多、增大,淀粉粒明显变少、变小(图 3F、G)。



A、E: 磷低效基因型低磷处理; B、F: 磷高效基因型低磷处理; C: 磷低效基因型高磷处理; D: 磷高效基因型高磷处理
A, E: P0 treatment of low phosphorus efficiency genotypes; B, F: P0 treatment of high phosphorus efficiency genotypes; C: P960 treatment of low phosphorus efficiency genotypes; D: P960 treatment of high phosphorus efficiency genotypes

图 1 不同磷素水平下不同磷效率基因型大豆叶片气孔变化

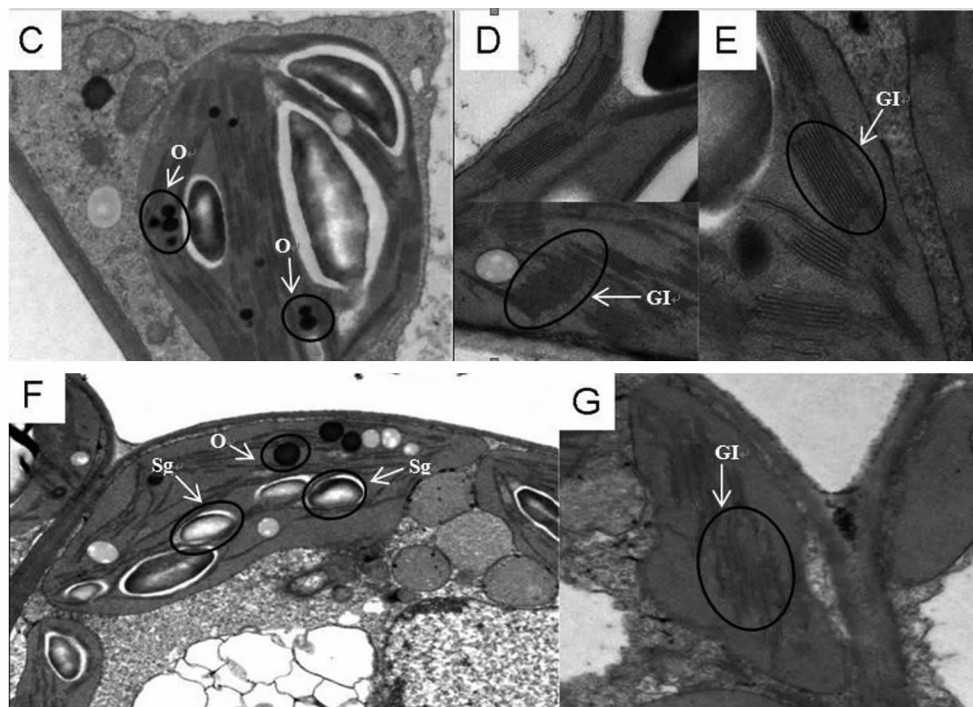
Fig. 1 Soybean stoma of different P efficiency soybeans



Chl: 叶绿体; Sg: 淀粉粒; A: 正常植株低磷处理; B: 磷低效基因型高磷处理; C: 磷高效基因型高磷处理
Chl: Chloroplast; Sg: Starch grain; A: the common ones without phosphorus treatment; B: P960 treatment of low phosphorus efficiency genotypes; C: P960 treatment of high phosphorus efficiency genotypes

图 2 不同供磷水平下不同磷效率基因型大豆叶绿体数目变化

Fig. 2 Change of chloroplasts number of different P efficiency soybean genotypes



Sg: 淀粉粒; O: 嗜锇颗粒; GI: 基粒片层; A, B: 正常植株低磷处理; C ~ E: 磷低效基因型高磷处理; F, G: 磷高效基因型高磷处理

Sg: Starch grain; O: Osmiophilic granules; GI: Grana lamella; A, B: the common ones without phosphorus treatment; C-E: P960 treatment of low phosphorus efficiency genotypes; F, G: P960 treatment of high phosphorus efficiency genotypes

图3 不同供磷水平下不同磷效率基因型大豆叶绿体超显微结构

Fig. 3 Chloroplast ultrastructure of different P efficiency soybeans

3 讨论

植物的叶片担负着植物生活中最重要的生理功能——光合作用,是植物进化过程中对环境变化较敏感且可塑性较大的器官,在不同选择压力下已经形成各种适应类型,其结构特征最能体现环境因子的影响或植物对环境的适应^[19],尤其是作为植物保护组织的叶表面,其气孔的分布和结构决定了叶片功能的执行情况。该研究结果表明:无论磷高效还是磷低效基因型品种随着施磷量的增加,叶片上单位面积气孔数目均有所增加,气孔大小以及气孔开度均变大。在较低的施磷水平下,磷高效基因型品种的气孔大小小于磷低效基因型品种,但气孔开度大于磷低效基因型品种,这与余海秋等^[20]的研究结果相一致。低磷胁迫下气孔保持一定的开度对维持光合作用的正常进行尤为重要。同时,随着施磷水平的提高,叶片气孔周围的叶肉细胞形态不规则,明显变厚,堆积,气孔较低磷水平有所下陷。这可能导致光合作用下降。有待于结合光合作用的变化加以研究。

Anderson 等^[21]认为,基粒片层垛叠的程度与叶绿体内叶绿素总含量直接相关,因为基粒片层的垛叠意味着捕获光能的装置高度密集,从而能更有效地吸收光量子,提高光能的转化效率。淀粉粒的形态结构与叶绿体的发育和功能紧密相关,叶绿体发育良好时,淀粉粒数量较多,体积较大^[22-23]。该研究中磷低效基因型品种随着磷肥施入量的增加,单个细胞内叶绿体数目有所增加,且叶绿体连接成链珠状紧贴细胞壁分布。叶绿体变大,叶绿体的基粒片层数明显增加,而且基粒片层垛叠致密,尤以高磷水平(P960)的结果更为明显。叶绿体内的淀粉粒随施磷水平的提高明显变大,但数量没有明显增加。嗜锇颗粒数量增多但体积明显变小,叶绿体基质变浓厚。这可能有利于叶绿体光合作用的发挥,促进碳水化合物合成及运输。针对磷高效基因型品种而言,高量的磷肥对叶绿体可能有一定的毒害作用,液泡被推至细胞边缘,叶绿体形状极不规则且零星分布于细胞中;基粒片层变薄,甚至解体,叶绿体内能见到一些松散的、无序的片层结构,嗜锇颗粒增多、增大,淀粉粒则没有明显的变化。这

些结构特征可能是导致其叶片光合速率迅速降低的原因。

参考文献

- [1] 童学军,严小龙,李惠珍,等.大豆磷效率与形态生理性状的关系.福建师范大学学报(自然科学版),2000,16(1):84-88. (Tong X J, Yan X L, Li H Z, et al. Studies on characteristics of phosphorus efficiency of soybean genotypes and relationship between those and some morphological, physiological traits[J]. Journal of Fujian Teachers University (Natural Science), 2000, 16(1):84-88.)
- [2] Hinsinger P. Bio-availability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes[J]. Plant Soil, 2001, 237:173-95.
- [3] Wang L D, Liao H, Yan X L, et al. Genetic variability for root hair traits as related to phosphorus status in soybean[J]. Plant and Soil, 2003, 261(1):77-84.
- [4] Lynch J P, Brown K M. Topsoil foraging-an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability[J]. Plant and Soil, 2001, 237(2):225-237.
- [5] Sarić M R. Progress since the first international symposium: 'Genetic aspects of plant nutrition', Beograd, 1982, and perspectives of future research[J]. Plant and Soil, 1987, 99(1):197-209.
- [6] 刘杰,刘丽君,吴俊江,等.大豆超微结构的研究进展及展望[J].大豆科学,2004,23(3):228-231. (Liu J, Liu L J, Wu J J, et al. Progress and Prospect of research on soybean ultrastructures[J]. Soybean Science, 2004, 23(3):228-231.)
- [7] Lott J N A, Buttrose M S. Globoids in protein bodies of legume seed cotyledons[J]. Plant Physiology, 1978, 5(1):89-111.
- [8] Młodzianowski F. The fine structure of protein bodies in lupin cotyledons during the course of seed germination[J]. Plant Physiology, 1978, 86:1-13.
- [9] Ullah A H J, Gibson D M. Purification and characterization of acid phosphate from cotyledons of germinating soybean seeds[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1988, 260:514-520.
- [10] 王延枝,斯海文.植物细胞液泡膜 H^+ -ATPase 的初步研究[J].武汉大学学报(自然科学版),1987(1):101-106. (Wang Y Z, Si H W. The preliminary study of the tonoplast H^+ -ATPase from plant cell[J]. Journal of Wuhan University (Natural Sciences Edition), 1987(1):101-106.)
- [11] 颜清上,陈品三,王连铮.中国小黑豆抗源对大豆胞囊线虫4号生理小种抗性机制研究[J].植物病理学报,1997,27(1):37-41. (Yan Q S, Chen P S, Wang L Z. Mechanism of Resistance to race 4 of heterodera glycines in Chinese black soybeans[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1997, 27(1):37-41.)
- [12] 邵伯飞,胡东维,李德葆.大豆与白粉病菌相互作用的超微结构与细胞化学[J].电子显微学报,2001,20(6):744-747. (Shao B F, Hu D W, Li D B. Ultrastructural and cytochemical studies on interaction between soybean and its powdery mildew pathogen, Erysiphe glycines[J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2001, 20(6):744-747.)
- [13] 金平.有机肥对水分胁迫下大豆几种生理指标和茎叶组织超微结构的影响[J].大豆科学,1997,16(1):76-79. (Jin P. Influence of organic fertilizer on some physiological indices and ultra-structure of stem and leaf of soybean plant grown under water stress condition[J]. soybean science, 1997, 16(1):76-79.)
- [14] 李学湛.渍水条件下不同抗性大豆根组织细胞结构的观察研究[J].大豆科学,1998,17(3):276-279. (Li X Z. Study on the structure of root tissue cells from soybeans with different resistance to water-logged stress [J]. Soybean Science, 1998, 17(3):276-279.)
- [15] 庄炳昌,惠东威,王玉民.中国不同纬度不同进化类型大豆 RAPD 分析[J].科学通报,1994,39(23):2178-2178. (Zhuang B C, Hui D W, Wang Y M. RAPD analysis of different evolutionary type soybeans in different latitude of China [J]. Chinese Science Bulletin, 1994, 39(23):2178-2178.)
- [16] 庄炳昌,王玉民,徐豹,等.大豆 *Soja* 亚属植物花粉形态的比较观察[J].作物学报,1997,23(1):111-113. (Zhuang B C, Wang Y M, Xu B, et al. Comparison survey of pollen structure and ultra-structure of different species within subgenus *soja* [J]. Acta Agonomica Sinica, 1997, 23(1):111-113.)
- [17] 陆静梅.中国大豆属植物抗拮逆境的演化结构研究[D].南京:南京农业大学,1997. (Lu J M. Study on the evolving structure of Chinese *Glycine* L. crop of Antagonism on adverse environment [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 1997.)
- [18] 洪健,陈玉银,饶立华.水稻叶片的电镜制样技术探讨[J].植物生理学通讯,1990(6):58-60. (Hong J, Chen Y Y, Rao L H. The preparation of rice leaf specimen with electron microscopy [J]. Plant Physiology Communications, 1990(6):58-60.)
- [19] Yu S W. Plant physiology and molecular biology [M]. Science Press, 1992:141-146.
- [20] 余秋海,彭新湘,严小龙,等.缺磷对大豆叶片显微结构及光合作用的影响[J].吉林农业大学学报,2006,28(2):127-132. (Yu Q H, Peng X X, Yan X L, et al. Effect of phosphorus deficiency on microstructure and photosynthesis in soybean leaves [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2006, 28(2):127-132.)
- [21] Anderson J M, Goodchild D J, Boardman N K. Composition of the photosystems and chloroplast structure in extreme shade plants [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1973, 325:573-585.
- [22] 范燕萍,李慧玲,李浩健.几种花叶浅艺兰叶片色素斑组成和叶绿体超微结构研究[J].华中农业大学学报,2006,27(2):8-12. (Fan Y P, Li H L, Li H J. Pigment composition and ultrastructural difference of chloroplast in three kinds of variegation leaf of *Cymbidium sinense* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2006, 27(2):8-12.)
- [23] Grover A, Mohanty P. Leaf Senescence-induced alterations in structure and function of higher plant chloroplasts [M]//Abrol Y P, Mohanty P. Photosynthesis: photoreactions to plant productivity. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1992:225-255.