

赵欣,卢海峰,钱程,等. 紫花苜蓿叶面积和叶解剖结构对盐胁迫的响应[J]. 江苏农业科学,2023,51(19):145-152.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.19.022

紫花苜蓿叶面积和叶解剖结构对盐胁迫的响应

赵欣¹, 卢海峰¹, 钱程¹, 胡雅飞¹, 刘大林¹, 王琳², 李新娥¹

[1. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009;

2. 扬州大学农业科技发展研究院(国际联合实验室), 江苏扬州 225009]

摘要:叶片大小和解剖结构的变化在植物适应盐胁迫生长中具有重要作用。为探讨盐胁迫条件下,不同耐盐性紫花苜蓿品种的叶片结构对盐胁迫的响应,选择 2 个紫花苜蓿品种 WL363HQ、WL712,利用温室盆栽试验,对其进行 3 种不同浓度 NaCl 溶液处理,栽培 60 d 后测量其叶面积、比叶面积、叶片横截面解剖特征。结果表明:(1) 对于高耐盐性品种 WL363HQ,盐胁迫降低了其叶面积,提高了其叶厚度、叶肉组织厚度及其厚度百分比、叶肉栅栏组织厚度和厚度百分比、栅海比,降低了其细胞壁厚度和海绵组织厚度百分比;(2) 对于低耐盐性品种 WL712,盐胁迫增加了其比叶面积,提高了其上表皮厚度,降低了其角质层厚度以及暴露在单位细胞间隙中的细胞壁的表面积(S_m);另外,叶厚度、叶肉、栅栏组织厚度随 NaCl 浓度先升高后降低;(3) 主成分分析结果表明,WL363HQ 品种在盐胁迫下响应的主导特征是叶肉、栅栏组织厚度,而 WL712 品种的主导特征为叶肉、栅栏组织厚度、角质层、表皮厚度。不同耐盐性紫花苜蓿品种叶面积和叶解剖特征对盐胁迫的不同响应,揭示了紫花苜蓿高耐盐品种的耐盐机制。

关键词:紫花苜蓿;叶解剖结构;叶厚度;角质层厚度;叶面积

中图分类号:S541⁺.101 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)19-0145-08

紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 属于多年生豆科牧草,是我国调整产业结构、发展畜牧产业的主要牧草之一,也是目前保留种植面积最广的多年生牧

草;其粗蛋白含量高,氨基酸种类齐全,总氨基酸含量较高,富含矿物质、碳水化合物、维生素等营养物质,适口性好,家畜喜食^[1-2],有“牧草之王”的美誉^[3-4]。此外,紫花苜蓿较强的固氮功能,可以有效改善土壤肥力^[5-6],因此还可作绿肥。目前,土壤盐渍化是影响并限制农业生产的一个重要因素,我国盐碱地总面积达 9 913 万 hm^2 ,约占我国国土面积的 10%,并且还在逐年增长^[2,7-8]。而紫花苜蓿显现出较强的耐盐性,揭示紫花苜蓿的耐盐策略对进一步发展盐碱土地的饲草种植业具有积极作用。

收稿日期:2022-07-17

基金项目:江苏现代农业(奶牛产业)技术体系建设专项[编号: JATS(2020)446]。

作者简介:赵欣(1997—),女,四川自贡人,硕士研究生,主要从事牧草生理生态相关研究。E-mail:zx18990005917@163.com。

通信作者:李新娥,博士,副教授,主要从事草地生态学和牧草生理生态学相关研究。E-mail:lixine@yzu.edu.cn。

164-169.

[16]牛先前,林秀香,郑涛,等. 不同育苗基质对番茄出芽率及生长指标的影响[J]. 农业研究与应用,2020,33(6):12-16.

[17]Marques E L S, Martos E T, Souza R J, et al. Spent mushroom compost as a substrate for the production of lettuce seedlings[J]. Journal of Agricultural Science, 2014, 6(7):138.

[18]汪树生,高双娜,冯晨,等. 玉米秸秆压缩基质对番茄、辣椒幼苗生长及营养元素吸收的影响[J]. 东北农业科学,2019,44(6):57-61.

[19]姬宇飞,张霞,徐永忠,等. 瓜果类蔬菜木薯渣育苗基质配方筛选研究[J]. 中国蔬菜,2018(7):36-43.

[20]Pascual J A, Ceglie F, Tuzel Y, et al. Organic substrate for transplant production in organic nurseries. A review[J]. Agronomy for Sustainable Development, 2018, 38(3):35.

[21]巩芳娥. 玉米秸秆与牛粪用作辣椒育苗基质的研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2011.

[22]王勤礼,闫芳,韩玉琦,等. 基于姬菇菌糠为主的番茄育苗基质配方研究[J]. 中国农学通报,2021,37(24):133-138.

[23]贺殊敏,周佩华,辛贵民,等. 基于木耳菌渣番茄育苗基质筛选研究[J]. 延边大学农学学报,2020,42(2):43-50.

[24]宋志刚,余宏军,蒋卫杰,等. 稻草复合基质对番茄育苗效果的影响[J]. 中国蔬菜,2013(14):72-77.

[25]李德翠,高文瑞,徐刚. 以木薯渣为主的番茄育苗基质配方研究[J]. 西南农业学报,2015,28(2):733-737.

[26]代惠洁,纪祥龙,杜迎刚. 椰糠替代草炭作番茄穴盘育苗基质的研究[J]. 北方园艺,2015(9):46-48.

[27]江志阳,邵玉飞,陈欣,等. 育苗基质及水稻用基质概述[J]. 腐植酸,2019(3):7-13.

植物叶片是连接植物和环境的重要器官^[9]。环境变化常导致植物叶片基本形态及叶片解剖特征的响应与适应^[10]。盐胁迫会导致植物的叶片扩展速率降低甚至停止生长,叶面积降低,比如乌拉尔甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)^[11]、空心莲子草(*Alternanthera philoxeroides*)^[12]、深紫糙苏(*Phlomis purpurea*)^[13]等。比叶面积是叶单面单位面积与干质量之比,是一个涉及植物生态学的多功能方面的变量^[14]。在有利的条件下,植物优化叶面积和比叶面积以获取光和养分;而在较高的盐浓度下,植物更倾向于将碳分配给叶质量和根,而不倾向于其表面^[15]。

有关叶片解剖特征的研究显示,叶厚度最易受盐胁迫影响而产生差异,但研究结果并不一致。有研究指出盐胁迫会导致叶厚度增加,例如 NaCl 溶液处理下,空心莲子草^[12]、三色堇(*Viola tricolor*)^[16]、木槿(*Bruguiera gymnorhiza*)^[17]的叶片表皮厚度、叶肉厚度以及叶片总厚度都显著增加^[18]。然而,盐胁迫处理的莴苣(*Lactuca sativa*)叶厚度没有显著变化^[19]。还有研究显示,紫花苜蓿^[8]、辣椒(*Capsicum annuum*)^[20]、草莓(*Fragaria ananassa*)^[21]在盐胁迫下叶厚度显著降低。还有一部分植物可以通过改善叶片内部结构的策略以适应盐胁迫的环境。栅栏组织和海绵组织厚度的比值(栅海比)是评价植物抗逆性的重要指标之一,叶片的栅海比越高,越有利于提高叶片内的气体交换和贮存,植物适应逆境的能力就越强^[22-24]。例如,三色堇^[16]、苦槛蓝(*Myoporum bontioides*)^[25]、木本苜蓿(*Medicago arborea*)^[26]的栅海比在盐胁迫下显著增高。此外,叶片其他解剖结构指标,如暴露在单位细胞间隙中细胞壁的面积(S_m)、细胞壁的厚度、细胞间隙分数(细胞间隙占叶肉总面积的分数, f_{ias}),这些指标均与叶肉导度有紧密的相关性,叶肉导度是胞间 CO_2 到达叶片内羧化位点阻力的倒数。细胞壁越厚,细胞间隙的空间较小时,扩散的阻力就越大,叶肉导度就越小,这些指标在一定程度上影响着光合作用的效率^[27-29]。有研究指出,盐胁迫会降低棉花(*Gossypium* spp.)叶片的叶肉导度,这可能是叶片叶绿体面积降低、细胞壁厚度增加导致的结果,但是与叶肉导度相关的解剖结构如何变化并不清楚^[30]。因此,需要进一步探讨盐胁迫对植物叶片解剖结构的影响。

目前,关于紫花苜蓿叶解剖结构所反映的抗盐

性或耐盐性响应研究仍然不足,限制了我们对于紫花苜蓿耐盐机制的了解。因此,本研究依托 2 个耐盐性不同的紫花苜蓿品种,采用温室盆栽试验,通过叶片扫描和石蜡切片技术,测量并计算紫花苜蓿叶面积、比叶面积、叶片横切解剖结构特征,拟探讨以下几个主要问题:(1)不同耐盐性品种紫花苜蓿叶面积和比叶面积对盐胁迫的响应;(2)不同耐盐性品种紫花苜蓿的叶片横切解剖特征对盐胁迫的响应;(3)不同耐盐性紫花苜蓿品种响应盐胁迫的主要特征指标。

1 材料与方法

1.1 研究地点及材料

试验选用 2 个紫花苜蓿品种,WL363HQ 品种秋眠级为 5,为抗寒高产多叶品种;WL712 品种秋眠级为 10,为南方高产优质品种,冬季生长活跃。试验初筛显示,WL363HQ 耐盐性较强,而 WL712 耐盐性较差。试验采用盆栽方式(花盆口径约 17.5 cm,高度约 16 cm,底径约 14 cm),于 2020 年 10 月在扬州大学智能温室内(日均最高温度 27 ℃,最低温度 15 ℃)播种。每盆均匀点播 15 粒种子(种子购买于北京正道种业有限公司),3 叶期时进行间苗,留下 10 株长势一致的健康幼苗,每 7 d 浇 500 mL 霍格兰营养液,每个品种各栽 12 盆。幼苗生长期,设置 4 个 NaCl 浓度梯度(0、50、150、250 mmol/L),3 组重复,每隔 3 d 浇 100 mL NaCl 溶液和对照蒸馏水。幼苗进行胁迫处理 60 d 后,于 2021 年 1 月中旬进行取样测量。

1.2 叶片解剖结构特征测定

每盆摘取 5 张成熟、健康的叶片,置于密封袋保鲜带回实验室,使用叶面积测定仪(YT-YMJ02,山东云唐智能科技有限公司)扫描叶面积后,称叶片鲜质量,称质量后将叶片用信封包好在 105 ℃烘箱中杀青 0.5 h,随后 72 ℃烘干 48 h 直至叶片质量不再改变后,称取叶片干质量,用于计算比叶面积(叶面积与叶干质量的比值, m^2/g)。

另取相同位置的成熟健康叶片固定于 FAA 固定液中,4 ℃保存。将固定好的叶片用乙醇(浓度梯度为 50%、70%、85%、95%、100%)脱水,每个梯度脱水 30 ~ 60 min。二甲苯透明 2 次各 30 min,浸蜡过夜,再用纯蜡置换 2 ~ 3 次,每次 1 h 左右,采用科迪 KD-BMIII 包埋机包埋,科迪 KD-2260 切片机切片,切片厚度为 8 μm ,番红-固绿双重染色,中

性树胶封片后烘干。在 Leica DM500-TR 型显微镜及 LIOO 成像系统下观察、拍照。

用 Image-J 软件测量叶片的总厚度,上角质层、下角质层厚度,角质层总厚度,上表皮细胞、下表皮细胞厚度,表皮总厚度,栅栏组织、海绵组织、叶肉组织厚度,并分别计算栅栏组织、海绵组织、叶肉组织厚度占叶片总厚度的百分比。测量细胞间隙面积、细胞壁厚度、细胞间隙中细胞壁的总长度、切片横截面总面积(图 1)。细胞间隙分数的计算方法^[27]如下:

$$f_{ias} = \frac{S_{ias}}{S}。$$

S_m 的计算方法如下:

$$S_m = F \times \frac{l_m}{S}。$$

式中: f_{ias} 是细胞间隙百分数; S_{ias} 是细胞间隙的面积, μm^2 ; S 为所计算切片的横截面积, μm^2 ; S_m 为暴露在单位细胞间隙中的细胞壁的表面积, $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$; l_m 为单位细胞间隙中的细胞壁总长度, μm ; F 是曲率修正因子,根据之前的研究取值为 $F = 1.42$ ^[31]。

每个切片选 3 个视野测量,除细胞壁厚度以外,每个指标重复测量 3 次;细胞壁厚度随机选取显示在细胞间隙中的多个细胞,重复测量 5 次。

1.3 数据分析

在 Excel 2019 对数据进行录入和整理,用统计软件 IBM SPSS Statistics 21 对数据进行统计分析,进行单因素方差分析和邓肯氏多重比较。在分析中,上、下表皮厚度,表皮总厚度,栅栏组织、海绵组织、叶肉组织厚度,叶片总厚度进行了 log 转换以符合正态

分布。本研究以 $\alpha = 0.05$ 作为差异显著性判断标准。

此外,本研究对所有测量指标进行主成分分析(PCA)。主成分分析可以把多个互相关联的指标通过降维转换为较少的指标来综合反映其变化的信息,这些综合指标即为原来多个指标的主要成分,每个主成分的贡献率反映了从原始单一指标中提取的信息量。贡献率越大表明主成分中包含的原始信息越多^[32]。很多研究应用主成分分析法将大量的性状特征转化为少量的综合特征,在产量、品质以及耐逆性状的筛选方面发挥了重要的作用^[33]。

2 结果与分析

2.1 NaCl 浓度对不同品种紫花苜蓿叶面积、比叶面积和叶厚度的影响

表 1 显示, WL363HQ 品种的叶面积在对照组(0 mmol/L NaCl)最大,平均(2.5 ± 0.3) cm^2 ,随着 NaCl 浓度的升高,分别显著降低了 12%、32%、36% ($P < 0.05$);比叶面积无显著变化。而 WL712 品种的叶面积在盐胁迫后没有显著变化,比叶面积随 NaCl 浓度升高而升高 ($P = 0.073$),最高在 NaCl 浓度为 250 mmol/L 时提高了 21%。2 个品种的叶片总厚度在对照组分别为(118.5 ± 6.6)、(127.6 ± 7.1) μm ,在 NaCl 浓度为 150 mmol/L 时均显著提高 ($P \leq 0.086$),WL363HQ 品种的叶片总厚度增加了 32.2 μm ,WL712 品种增加了 23.9 μm 。从图 1 也可观察到在 NaCl 浓度为 150 mmol/L 时,2 种紫花苜蓿的叶片总厚度最大。

表 1 不同盐浓度对两种紫花苜蓿叶面积、比叶面积和叶厚度的影响

NaCl 浓度 (mmol/L)	叶面积(cm^2)		比叶面积(cm^2/g)		叶厚度(μm)	
	WL363HQ	WL712	WL363HQ	WL712	WL363HQ	WL712
0	$2.5 \pm 0.3\text{a}$	$2.0 \pm 0.3\text{a}$	$346.7 \pm 15.7\text{a}$	$333.1 \pm 5.0\text{c}$	$118.5 \pm 6.6\text{b}$	$127.6 \pm 7.1\text{b}$
50	$2.2 \pm 0.2\text{ab}$	$1.9 \pm 0.1\text{a}$	$337.1 \pm 8.7\text{a}$	$369.0 \pm 6.3\text{bc}$	$120.8 \pm 12.4\text{b}$	$139.2 \pm 8.6\text{ab}$
150	$1.7 \pm 0.1\text{bc}$	$1.9 \pm 0.2\text{a}$	$366.3 \pm 29.7\text{a}$	$366.0 \pm 22.9\text{ab}$	$150.7 \pm 12.9\text{a}$	$151.5 \pm 4.4\text{a}$
250	$1.6 \pm 0.2\text{c}$	$1.4 \pm 0.1\text{a}$	$411.7 \pm 39.8\text{a}$	$403.2 \pm 9.5\text{a}$	$140.7 \pm 4.7\text{ab}$	$119.7 \pm 5.6\text{b}$

注:数值为平均值 \pm 标准误差,同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。表 2、表 3 同。

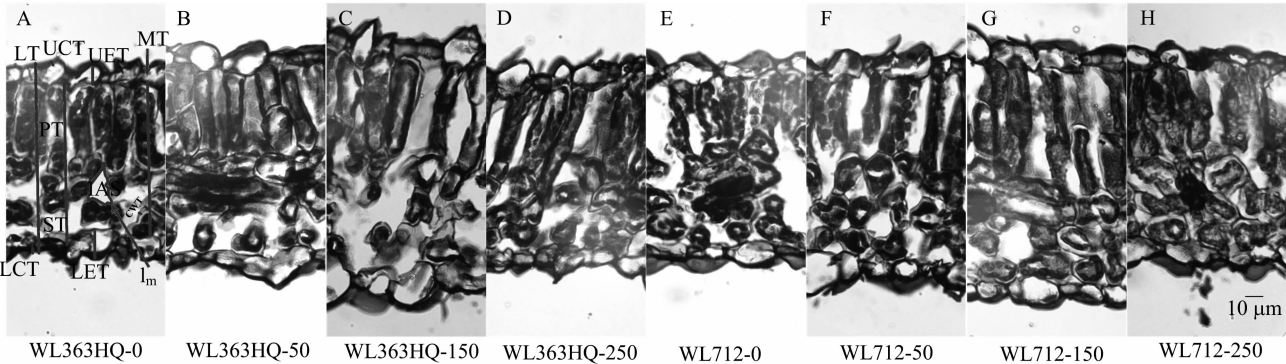
2.2 NaCl 浓度对不同品种紫花苜蓿角质层和表皮厚度的影响

紫花苜蓿叶片为典型的异面叶,其解剖结构主要分为上下角质层、上下表皮细胞和叶肉组织,细胞间隙为叶肉组织中的间隙部分(图 1)。由表 2 可知,各处理下 WL363HQ、WL712 的上角质层厚度分

别介于 4.2~5.1、3.2~5.0 μm ,下角质层厚度分别介于 4.9~5.5、3.1~5.9 μm ,上表皮厚度分别介于 12.9~14.2、11.7~15.6 μm ,下表皮厚度分别介于 12.4~13.7、12.0~15.3 μm 。NaCl 浓度升高对 WL363HQ 的上下角质层厚度没有产生显著影响,对表皮厚度的影响也不显著,但总体都是减小的趋

势。然而,WL712 品种的下角质层、总角质层的厚度都随着 NaCl 浓度的升高而显著降低 ($P<0.05$),下角质层、角质层总厚度在 NaCl 浓度为 250 mmol/L 时分别显著降低了 47%、39%;上角质层没有显著的

变化,但也呈现下降的趋势;对其表皮而言,除上表皮厚度在 NaCl 浓度为 150 mmol/L 时显著上升了 33% 外 ($P<0.05$),下表皮和总表皮厚度均无显著变化。



A~D 和 E~H 分别为品种 WL363HQ 和品种 WL712 在 0、50、150、250 mmol/L NaCl 溶液处理下的叶解剖结构。UCT—上角质层厚度; UET—上表皮厚度; PT—栅栏组织厚度; ST—海绵组织厚度; MT—叶肉组织厚度; LCT—下角质层厚度; LET—下表皮厚度; LT—叶厚度; IAS—细胞间隙; CWT—细胞壁厚度; l_m —细胞间隙中细胞壁总长度。比例尺:10 μm

图1 不同 NaCl 浓度处理下 2 个紫花苜蓿品种的叶解剖结构

表 2 不同 NaCl 浓度对两种紫花苜蓿叶片角质层和表皮厚度的影响

NaCl 浓度 (mmol/L)	厚度 (μm)											
	上角质层		下角质层		角质层总厚度		上表皮		下表皮		表皮总厚度	
	WL363HQ	WL712	WL363HQ	WL712	WL363HQ	WL712	WL363HQ	WL712	WL363HQ	WL712	WL363HQ	WL712
0	5.1 \pm 0.4a	4.7 \pm 0.4a	5.5 \pm 0.5a	5.9 \pm 0.2a	10.6 \pm 1.6a	10.5 \pm 0.4a	14.2 \pm 1.2a	11.7 \pm 0.8b	12.5 \pm 1.3a	12.7 \pm 1.3a	26.6 \pm 1.8a	24.4 \pm 2.1a
50	5.1 \pm 0.4a	5.0 \pm 0.3a	4.9 \pm 0.6a	4.0 \pm 0.3b	10.0 \pm 0.9a	9.0 \pm 0.4b	13.0 \pm 0.6a	13.9 \pm 0.8ab	12.4 \pm 1.0a	12.0 \pm 0.6a	25.4 \pm 1.5a	25.8 \pm 1.3a
150	4.2 \pm 0.6a	3.6 \pm 0.7a	5.3 \pm 0.4a	4.5 \pm 0.6ab	9.5 \pm 0.9a	8.2 \pm 0.3b	14.0 \pm 0.2a	15.6 \pm 0.7a	13.7 \pm 1.0a	15.3 \pm 2.1a	27.7 \pm 1.2a	30.9 \pm 2.2a
250	4.3 \pm 0.2a	3.2 \pm 1.0a	5.1 \pm 0.7a	3.1 \pm 0.4b	9.4 \pm 0.7a	6.4 \pm 0.2c	12.9 \pm 0.4a	13.2 \pm 1.0ab	13.2 \pm 0.7a	13.4 \pm 0.8a	26.1 \pm 0.5a	26.6 \pm 1.1a

2.3 NaCl 浓度对不同品种紫花苜蓿叶肉组织厚度和叶肉导度相关指标的影响

叶肉组织由栅栏组织和海绵组织构成。由表 3 可知,WL363HQ 品种的栅栏组织厚度在对照处理中的厚度为 (43.5 \pm 2.8) μm ,NaCl 浓度为 150、250 mmol/L 时分别显著增加了 35%、46% ($P<0.05$),叶肉组织厚度也从对照组的 (86.3 \pm 5.6) μm 显著增加了 31%、25% ($P<0.05$),而海绵组织厚度无显著变化,由此造成了栅栏组织厚度百分比、栅海比、叶肉组织厚度百分比均显著增加 ($P<0.05$),而海绵组织厚度百分比则显著下降 ($P<0.05$)。然而,对于 WL712 品种而言,除了栅栏组织厚度在 NaCl 浓度为 250 mmol/L 时比对照组显著降低了 16% ($P<0.05$),海绵组织、叶肉组织厚度无显著变化,3 个百分比指标以及栅海比也均无显著性差异。

S_m f_{ias} 、细胞壁厚度都是影响叶肉导度的重要因素之一。盐胁迫处理以后,WL363HQ 品种的 S_m 、

f_{ias} 变化均不显著,总体上在 NaCl 浓度为 50、150 mmol/L 时较高于对照和最高浓度;细胞壁厚度在对照处理时最大,为 (0.9 \pm 0.1) μm ,在 NaCl 浓度为 150、250 mmol/L 时显著降低,分别降低了 22%、33% ($P<0.05$)。WL712 品种的 S_m 随浓度升高逐渐降低,在 NaCl 浓度为 250 mmol/L 时较对照降低了 26% ($P<0.05$);细胞间隙分数在 NaCl 浓度为 50 mmol/L 时较对照显著提高了 48%,在 150 mmol/L 时较对照提高了 12%,但在高浓度 250 mmol/L 时与对照无显著性差异 ($P\geq 0.05$);WL712 的细胞壁厚度在各浓度盐胁迫处理下的变化均不显著。

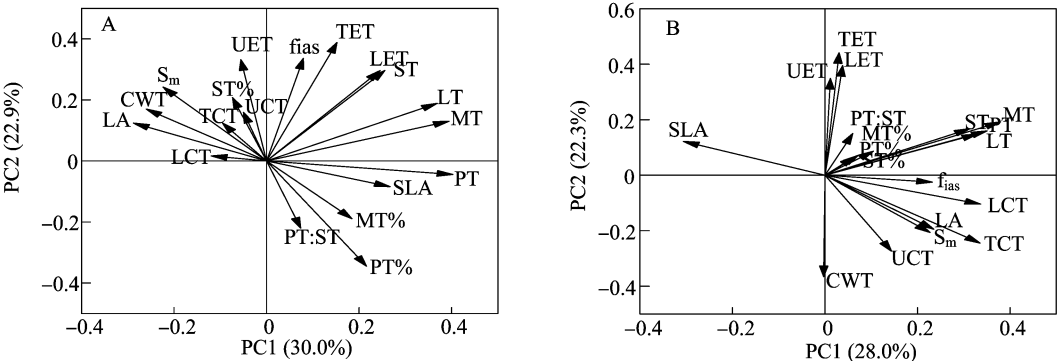
2.4 紫花苜蓿叶解剖指标的主成分分析 (PCA)

将 2 个品种的所有测量特征指标分别进行主成分分析 (图 2),各指标与前 4 个 PCA 主轴的特征值、贡献率、累计贡献率如表 4 所示。品种 WL363HQ 的前 4 个主成分轴的累计贡献率达到 81.21%,即能解释所测定指标的 81.21% 的变异。

表 3 不同 NaCl 浓度对两种紫花苜蓿叶肉组织厚度和叶肉导度相关解剖指标的影响

NaCl 浓度 (mmol/L)	栅栏组织厚度 (μm)		海绵组织厚度 (μm)		叶肉厚度 (μm)		栅栏组织厚度 百分比(%)		海绵组织厚度 百分比(%)	
	WL363HQ	WL712	WL363HQ	WL712	WL363HQ	WL712	WL363HQ	WL712	WL363HQ	WL712
0	43.5 \pm 2.8b	57.9 \pm 1.0a	42.8 \pm 2.8a	46.1 \pm 1.2a	86.3 \pm 5.6b	103.9 \pm 2.2ab	36.7 \pm 0.8b	45.6 \pm 1.7a	36.1 \pm 0.5b	36.2 \pm 1.1a
50	44.9 \pm 2.8b	58.2 \pm 3.7a	51.0 \pm 7.5a	46.3 \pm 4.5a	95.9 \pm 10.2ab	104.5 \pm 8.2ab	37.5 \pm 1.6b	41.8 \pm 0.9a	41.9 \pm 1.9a	33.1 \pm 1.4a
150	58.7 \pm 4.9a	64.8 \pm 5.0a	54.3 \pm 6.7a	54.5 \pm 4.4a	113.1 \pm 11.5a	119.3 \pm 4.8a	39.0 \pm 0.9b	42.6 \pm 2.1a	35.8 \pm 1.4b	36.1 \pm 3.5a
250	63.6 \pm 2.9a	48.9 \pm 1.9b	44.7 \pm 3.3a	42.3 \pm 3.0a	108.3 \pm 1.4a	91.1 \pm 1.2b	45.3 \pm 2.8a	41.1 \pm 3.3a	31.7 \pm 1.8c	35.3 \pm 1.5a

NaCl 浓度 (mmol/L)	栅海比		叶肉厚度 百分比(%)		S_m ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$)		f_{ias} (%)		细胞壁厚度 (μm)	
	WL363HQ	WL712	WL363HQ	WL712	WL363HQ	WL712	WL363HQ	WL712	WL363HQ	WL712
0	1.0 \pm 0.0b	1.3 \pm 0.0a	72.7 \pm 1.2c	81.8 \pm 2.9a	11.1 \pm 0.9a	11.5 \pm 0.6a	9.4 \pm 0.4a	10.9 \pm 0.9b	0.9 \pm 0.1a	0.7 \pm 0.1a
50	0.9 \pm 0.1b	1.3 \pm 0.1a	79.4 \pm 0.4a	74.9 \pm 1.8a	11.1 \pm 1.1a	12.8 \pm 1.3a	11.4 \pm 2.0a	16.1 \pm 2.0a	0.7 \pm 0.1ab	0.7 \pm 0.1a
150	1.1 \pm 0.0b	1.2 \pm 0.2a	74.8 \pm 1.7bc	78.7 \pm 2.1a	10.4 \pm 2.0a	9.4 \pm 0.3ab	12.8 \pm 1.8a	12.2 \pm 2.4ab	0.7 \pm 0.1b	0.5 \pm 0.0a
250	1.4 \pm 0.2a	1.2 \pm 0.1a	77.1 \pm 1.7ab	76.4 \pm 3.1a	8.3 \pm 0.7a	8.5 \pm 1.2b	9.1 \pm 0.3a	9.2 \pm 1.6b	0.6 \pm 0.0b	0.6 \pm 0.1a



LA—叶面积；SLA—比叶面积；UCT—上角质层厚度；UET—上表皮厚度；PT—栅栏组织厚度；ST—海绵组织厚度；MT—叶肉组织厚度；LCT—下角质层厚度；LET—下表皮厚度；LT—叶厚度；TCT—角质层总厚度；TET—表皮总厚度；PT：ST—栅海比；PT%—栅栏组织厚度百分比；ST%—海绵组织厚度百分比；MT%—叶肉组织厚度百分比； S_m —暴露于单位细胞间隙中叶肉细胞壁的表面积； f_{ias} —细胞间隙分数；CWT—细胞壁厚度

图2 紫花苜蓿品种 WL363HQ (A)、WL712 (B) 的叶解剖指标的主成分分析

第 1 主成分轴的贡献率最大,达到了 30.00%, 主要与叶肉厚度 (MT)、叶厚度 (LT)、栅栏组织厚度 (PT) 具有较强的相关性,相关系数分别为 0.40、0.37、0.40;第 2 主成分轴的贡献率为 22.86%, 主要由上表皮厚度 (UET)、表皮厚度 (TET) 和栅栏组织厚度百分比 (MT%) 决定,相关系数分别为 0.33、0.39、0.35。

WL712 品种的前 4 个主成分轴的累计贡献率达到 79.44%。第 1 主成分的贡献率达到 28.00%, 主要由叶肉组织 (MT)、角质层厚度 (TCT)、叶厚度 (LT) 决定,相关系数分别为 0.38、0.33、0.33;第 2 主成分的贡献率为 22.25%, 主要由上表皮厚度 (UET)、下表皮厚度 (LET)、表皮总厚度 (TET) 决定,相关系数分别为 0.35、0.40、0.44。

3 讨论

3.1 紫花苜蓿叶面积、比叶面积和叶厚度对盐胁迫的响应

植物叶面积的大小决定着植物光合辐射的有效面积^[34],与干物质产量具有密切的关系。WL363HQ 的叶面积随 NaCl 浓度的升高而降低,这与之前的很多研究^[11-12]一致。长期盐胁迫下植物的能量消耗可能大于能量产生,因此需要减少对叶片扩张的能量投入。较小的叶面积使得植物体的蒸腾面积进一步降低,失水速率减小,故抵御盐胁迫及防止灼烧的能力也不断增强,这是一种避盐机制,这种机制可以限制盐离子在植物地上部分的积累,并将蒸腾作用造成的水分损失降至最低^[18]。与

表 4 2 个紫花苜蓿品种叶解剖指标的前 4 个主成分的特征向量、特征值、贡献率及累计贡献率

叶片特征	各主成分的特征向量							
	WL363HQ				WL712			
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4
特征值	5.70	4.34	2.97	2.41	5.33	4.23	3.23	2.30
贡献率(%)	30.00	22.86	15.65	12.67	28.00	22.25	17.01	12.12
累积贡献率(%)	30.00	52.90	68.54	81.21	28.00	50.29	67.30	79.44
叶面积 LA	-0.29	0.13	-0.13	0.22	0.23	-0.20	-0.30	-0.08
比叶面积 SLA	0.27	-0.08	0.28	0.11	-0.31	0.12	0.26	-0.19
上角质层厚度 UCT	-0.04	0.16	0.33	0.33	0.14	-0.28	-0.24	0.11
下角质层厚度 LCT	-0.12	0.03	0.48	-0.02	0.33	-0.11	0.28	-0.03
角质层总厚度 TCT	-0.09	0.13	0.48	0.23	0.33	-0.25	0.06	0.04
上表皮厚度 UET	-0.05	0.33	0.07	-0.30	0.02	0.35	-0.22	0.00
下表皮厚度 LET	0.25	0.29	0.23	0.06	0.05	0.40	0.06	0.20
表皮总厚度 TET	0.16	0.39	0.21	-0.13	0.04	0.44	-0.08	0.12
栅栏组织厚度 PT	0.40	-0.05	0.03	-0.14	0.35	0.15	-0.11	0.20
海绵组织厚度 ST	0.26	0.28	-0.21	0.15	0.31	0.16	0.087	-0.36
叶肉组织厚度 MT	0.40	0.12	-0.10	-0.00	0.38	0.18	-0.00	-0.09
叶厚度 LT	0.37	0.18	-0.08	-0.12	0.33	0.14	-0.24	-0.21
栅栏组织厚度百分比 PT	0.20	-0.35	0.18	-0.09	0.07	0.07	0.177	0.58
海绵组织厚度百分比 ST	-0.07	0.21	-0.28	0.41	0.07	0.07	0.42	-0.35
叶肉组织厚度百分比 MT	0.18	-0.19	-0.08	0.42	0.11	0.09	0.47	0.22
单位细胞间隙中的细胞壁的表面积 S_m	-0.22	0.25	-0.00	0.06	0.22	-0.21	-0.11	0.00
细胞壁厚度 CWT	-0.25	0.18	0.05	-0.23	-0.01	-0.36	-0.00	0.23
栅海比 PT:ST	0.07	-0.22	0.14	0.39	0.06	0.15	-0.30	0.30
细胞间隙分数 f_{ias}	0.08	0.33	-0.17	0.22	0.23	-0.03	-0.17	0.06

注:粗体突出显示相关系数绝对值大于 0.3 的指标。

WL363HQ 不同的是,WL712 的叶面积没有产生较大的变化,但比叶面积在受到盐胁迫后显著增加了,在 NaCl 浓度为 250 mmol/L 时增加最明显。比叶面积增加这种反应有利于更大的全植物碳增益,从而有助于这个品种在盐碱易发地区获得更好的农艺性能^[35]。

2 个品种的叶厚度在盐胁迫后都显著地增加了,并在 NaCl 浓度为 150 mmol/L 时最明显,浓度持续升高、叶厚度下降。叶厚度与叶片的储水能力有关^[36]。厚叶通常具有较高的叶绿素,且叶厚度也是与植物产量紧密相关的特征^[37]。在高盐浓度下,更高的叶厚度有助于稀释细胞液中的盐浓度,调节渗透平衡^[19],并且可以平衡叶面积减小对于物质产量带来的消极影响。

3.2 紫花苜蓿角质层和表皮厚度对盐胁迫的响应

叶片表皮是位于叶片表面的一层细胞,角质层是位于叶片表皮外的一层疏水膜,和表皮细胞共同为叶片器官提供支撑和保护^[38]。上表皮是叶片的

向光面^[39],叶片上表皮厚度对叶片表面光的反射和折射具有密切联系,较低的厚度更利于光的透射^[40],但较高的表皮厚度对叶片起到了一个很好的支撑作用。角质层厚度可以赋予叶片机械强度,较厚的角质层更耐撕裂,撕裂力与角质层厚度成正比^[41]。本研究结果显示,WL363HQ 品种的角质层、表皮特征均没有显著的变化;而 WL712 品种紫花苜蓿的角质层厚度在高盐胁迫中显著减低,这种变化不利于植物对水分的保护以及维持叶片的正常形态,其上表皮厚度在 NaCl 浓度为 150 mmol/L 时增加,说明其叶片的光合有效辐射受到的影响较大,最终可能导致叶片扩张延缓,生物量减少等结果。

3.3 紫花苜蓿叶肉组织及叶肉导度对盐胁迫的响应

叶肉栅栏组织越厚,意味着最大单位体积内叶绿体数量越多,叶片可进行光合作用的位点更多;叶肉海绵组织越厚,海绵组织的比率越小,表示叶肉组织越紧密,细胞间隙所占的比率越小,从而减

少蒸腾作用的水分散失和保证更高的水分利用效率^[42]。因此栅海比越高越有助于缩短 CO_2 到达叶绿体的距离^[18],使叶片的光合效率得到显著的提^[43]升。试验结果表明,WL363HQ 品种的栅栏组织厚度和相对比例随 NaCl 浓度增加而显著增加,而海绵组织厚度百分比降低,栅海比升高,这些变化反映出其对高盐浓度的适应,是一种保护光合作用过程的适应性反应,该结果与在高浓度盐胁迫下具有更高栅海比的三色堇一致^[16]。然而,WL712 品种的栅栏组织厚度在 NaCl 浓度为 150 mmol/L 时达到最大,但 NaCl 浓度达到 250 mmol/L 时栅栏组织厚度降低,这表明 WL712 品种对高盐胁迫的适应性不如 WL363HQ 品种。

叶肉导度是 CO_2 在叶肉细胞内传输阻力的倒数,其大小主要取决于叶片的结构^[44],是影响叶片光合速率的关键性状^[29]。研究结果显示,WL363HQ 品种的细胞壁厚度随 NaCl 浓度升高而减小,而更薄的细胞壁表明叶肉细胞具有更大的 CO_2 导度,有助于提高叶片的光合速率。而 WL712 品种的 S_m 随 NaCl 浓度的升高而降低, f_{ias} 、 S_m 与通常叶肉导度呈正相关关系^[45-46],因此其叶肉导度也可能随之下降。这个结果也证明,相较于 WL363HQ 品种,WL712 品种受到盐胁迫的负面影响可能更严重,不适宜在高盐浓度的环境下长期生存^[44]。

3.4 2 个紫花苜蓿品种响应盐胁迫的主要特征指标

主成分分析结果显示,WL363HQ 品种的栅栏组织厚度、叶肉厚度、叶总厚度是叶片在盐胁迫中响应的主导特征,主要反映了叶片能量分配的特征,这是影响紫花苜蓿产量的重要性状,说明提高 WL363HQ 品种的耐盐性主要是提高叶片的叶肉厚度、栅栏组织和叶厚度。以前的研究也显示,在盐胁迫条件下,植物提高叶厚度和栅栏组织厚度有利于提高其生物量和存活率,叶片可以通过改变厚度来调节单位面积的生物量^[47]。

WL712 品种的第 1 主成分中,叶肉组织厚度、栅栏组织厚度、角质层厚度的绝对值较大;第 2 主成分中,上下表皮、表皮总厚度的绝对值较大。因此,角质层厚度、表皮厚度是 WL712 品种响应盐胁迫的主要特征,角质层厚度的变化与叶片的机械强度、水分屏障有关,这些特性与植物在逆境中的生存紧密相关^[38,41]。在高盐浓度下 WL712 品种的角质层厚度减小和表皮厚度增加是影响其生长发育的主要原因。

4 结论

综上所述,耐盐性较强的品种 WL363HQ 叶片的主要耐盐策略包括减小叶面积、提高叶片栅栏组织厚度,从而增大光合器官的投入、减少海绵组织的相对厚度以缩短 CO_2 的扩散距离,通过减少细胞壁厚度提高叶肉导度,从而最终提高光合效率以适应盐胁迫环境。然而,耐盐性较差的品种 WL712 虽然表现出了比叶面积和叶厚度增大的特征以积极响应盐胁迫,但其叶片在高盐浓度时角质层厚度降低,叶厚度、栅栏组织厚度降低,这些变化均不利于对盐胁迫环境的适应,最终不利于其在高盐浓度下生长发育。研究结果揭示了 2 种不同耐盐性紫花苜蓿品种在盐胁迫环境下的主要叶片策略。

参考文献:

- [1] 孙娟娟,阿拉木斯,赵金梅,等. 6 个紫花苜蓿品种氨基酸组成分析及营养价值评价[J]. 中国农业科学,2019,52(13):2359-2367.
- [2] Zhang J L, Shi H Z. Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance[J]. Photosynthesis Research, 2013, 115(1):1-22.
- [3] 韩颜隆,刘晓静,王 静,等. 施氮对不同品种紫花苜蓿根系特性和生产性能的影响[J]. 草地学报,2022,30(2):379-384.
- [4] 田小霞,毛培春,李杉杉,等. 紫花苜蓿苗期耐盐指标筛选及耐盐性综合评价[J]. 草地学报,2017,25(3):545-553.
- [5] 孙洪仁,穆尼热·买买提,沙吾列·沙比汗,等. 西北荒漠绿洲区紫花苜蓿土壤氮素丰缺指标和推荐施氮量初步研究[J]. 中国农业大学学报,2022,27(2):87-97.
- [6] 郭耀东,程 曼,赵秀峰,等. 轮作绿肥对盐碱地土壤性质、后作青贮玉米产量及品质的影响[J]. 中国生态农业学报,2018,26(6):856-864.
- [7] 杜学军,胡树文. 基于文献计量分析的近 30 年国内外盐碱地研究进展[J]. 安徽农业科学,2021,49(18):236-239,242.
- [8] 田晨霞,张咏梅,王 凯,等. 紫花苜蓿组织解剖结构对 NaHCO_3 盐碱胁迫的响应[J]. 草业学报,2014,23(5):133-142.
- [9] 王 忠. 植物生理学[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
- [10] 李芳兰,包维楷. 植物叶片形态解剖结构对环境变化的响应与适应[J]. 植物学通报,2005,40(增刊1):118-127.
- [11] 吴 琼,韩亚楠,高 睿,等. 乌拉尔甘草实生苗对土壤盐胁迫的形态与结构响应[J]. 种子,2015,34(1):25-31,34.
- [12] 刘爱荣,王桂芹,章小华. NaCl 处理对空心莲子草营养器官解剖结构的影响[J]. 广西植物,2007,27(5):682-686.
- [13] Álvarez S, Gómez - Bellot M J, Castillo M, et al. Osmotic and saline effect on growth, water relations, and ion uptake and translocation in *Phlomis purpurea* plants [J]. Environmental and Experimental Botany, 2012, 78:138-145.
- [14] Shipley B. Structured interspecific determinants of specific leaf area in 34 species of herbaceous angiosperms[J]. Functional Ecology,

- 1995,9(2):312.
- [15] Uchiya P, Escaray F J, Bilenca D, et al. Salt effects on functional traits in model and in economically important *Lotus* species[J]. Plant Biology, 2016, 18(4):703–709.
- [16] Sarker U, Oba S. The response of salinity stress – induced *A. tricolor* to growth, anatomy, physiology, non – enzymatic and enzymatic antioxidants[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11:559876.
- [17] 刘 睿, 孙 伟, 巢壮香, 等. 盐胁迫下木槿幼苗叶片的解剖学变化[J]. 热带亚热带植物学报, 2009, 17(2):169–175.
- [18] Acosta – Motos J, Ortuno M, Bernal – Vicente A, et al. Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms[J]. Agronomy, 2017, 7(1):18.
- [19] Garrido Y, Tudela J A, Marín A, et al. Physiological, phytochemical and structural changes of multi – leaf lettuce caused by salt stress [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(8):1592–1599.
- [20] 姜 伟, 崔世茂, 李慧霞, 等. 盐胁迫对辣椒幼苗根、茎、叶显微结构的影响[J]. 蔬菜, 2017(3):6–15.
- [21] Avestan S, Ghasemnezhad M, Esfahani M, et al. Effects of nanosilicon dioxide on leaf anatomy, chlorophyll fluorescence, and mineral element composition of strawberry under salinity stress[J]. Journal of Plant Nutrition, 2021, 44(20):3005–3019.
- [22] 韦江玲, 王增军. 4 种红树植物幼苗叶片解剖结构及生态适应研究[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(18):115–118.
- [23] 刘雄盛, 肖玉菲, 王 勇, 等. 江南油杉营养器官的解剖结构及其生态适应性[J]. 植物科学学报, 2020, 38(1):39–46.
- [24] 曹红星, 黄汉驹, 雷新涛, 等. 低温胁迫下椰子叶片解剖结构差异研究[J]. 热带作物学报, 2014, 35(12):2420–2425.
- [25] Xu H M, Tam N F Y, Zan Q J, et al. Effects of salinity on anatomical features and physiology of a semi – mangrove plant *Myoporum bontiodoides*[J]. Marine Pollution Bulletin, 2014, 85(2):738–746.
- [26] Boughalleb F, Denden M, Ben Tiba B. Anatomical changes induced by increasing NaCl salinity in three fodder shrubs, *Nitraria retusa*, *Atriplex halimus* and *Medicago arborea* [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2009, 31(5):947–960.
- [27] Terashima I, Hanba Y T, Tholen D, et al. Leaf functional anatomy in relation to photosynthesis [J]. Plant Physiology, 2011, 155(1):108–116.
- [28] Tomás M, Flexas J, Copolovici L, et al. Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO₂ across species: quantitative limitations and scaling up by models [J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(8):2269–2281.
- [29] Tosens T, Niinemets Ü, Westoby M, et al. Anatomical basis of variation in mesophyll resistance in eastern Australian sclerophylls: news of a long and winding path [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(14):5105–5119.
- [30] 江晓慧, 高 阳, 王广帅, 等. 基于 FvCB 模型分析盐分胁迫对棉花叶片光合作用的影响[J]. 应用生态学报, 2020, 31(5):1653–1659.
- [31] Scafaro A P, Von Caemmerer S, Evans J R, et al. Temperature response of mesophyll conductance in cultivated and wild *Oryza* species with contrasting mesophyll cell wall thickness[J]. Plant, Cell & Environment, 2011, 34(11):1999–2008.
- [32] Li L M, Zhao J, Wang C R, et al. Comprehensive evaluation of robotic global performance based on modified principal component analysis[J]. International Journal of Advanced Robotic Systems, 2020, 17(4):172988141989688.
- [33] 李 炜, 毕影东, 刘建新, 等. 寒地野生大豆资源农艺性状的相关性和主成分分析[J]. 土壤与作物, 2022, 11(1):10–17.
- [34] Yu, Shi, Hui, et al. Effects of salt stress on the leaf shape and scaling of *Pyrus betulifolia* Bunge[J]. Symmetry, 2019, 11(8):991.
- [35] Praxedes S C, de Lacerda C F, DaMatta F M, et al. Salt tolerance is associated with differences in ion accumulation, biomass allocation and photosynthesis in cowpea cultivars [J]. Journal of Agronomy and Crop Science, 2009, 196(3):193–204.
- [36] 金 鹰, 王传宽. 植物叶片水力与经济性状权衡关系的研究进展[J]. 植物生态学报, 2015, 39(10):1021–1032.
- [37] Liu C G, Zhou X Q, Chen D G, et al. Natural variation of leaf thickness and its association to yield traits in *indica* rice [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2014, 13(2):316–325.
- [38] Yeats T H, Rose J K C. The formation and function of plant cuticles [J]. Plant Physiology, 2013, 163(1):5–20.
- [39] Crang R, Lyons – Sobaski S, Wise R. Plant anatomy [M]. Switzerland: Springer Cham, 2018:419–426.
- [40] Grašič M, Budak V, Klančnik K, et al. Optical properties of halophyte leaves are affected by the presence of salt on the leaf surface[J]. Biologia, 2017, 72(10):1131–1139.
- [41] Onoda Y, Richards L, Westoby M. The importance of leaf cuticle for carbon economy and mechanical strength [J]. New Phytologist, 2012, 196(2):441–447.
- [42] Palhares Neto L, Souza L M, Morais M B, et al. Morphophysiological and biochemical responses of *Lippia grata* schauer (Verbenaceae) to water deficit [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2020, 39(1):26–40.
- [43] Navarro A, Bañón S, Olmos E, et al. Effects of sodium chloride on water potential components, hydraulic conductivity, gas exchange and leaf ultrastructure of *Arbutus unedo* plants [J]. Plant Science, 2007, 172(3):473–480.
- [44] 李 勇, 彭少兵, 黄见良, 等. 叶肉导度的组成、大小及其对环境因素的响应[J]. 植物生理学报, 2013, 49(11):1143–1154.
- [45] Xiong D L, Yu T T, Ling X X, et al. Sufficient leaf transpiration and nonstructural carbohydrates are beneficial for high – temperature tolerance in three rice (*Oryza sativa*) cultivars and two nitrogen treatments [J]. Functional Plant Biology, 2015, 42(4):347.
- [46] Ye M, Zhang Z C, Huang G J, et al. High leaf mass per area *Oryza* genotypes invest more leaf mass to cell wall and show a low mesophyll conductance[J]. AoB PLANTS, 2020, 12(4):plaa028.
- [47] Zhang Y Q, Kaiser E, Marcelis L F M, et al. Salt stress and fluctuating light have separate effects on photosynthetic acclimation, but interactively affect biomass [J]. Plant, Cell & Environment, 2020, 43(9):2192–2206.