

玻璃化与正常苹果试管苗的叶片和茎的显微结构比较

葛红娟, 梁美霞, 戴洪义*

青岛农业大学园林园艺学院, 山东青岛 266109

摘要:以苹果品种‘鲁加5号’试管苗为试材, 其用石蜡切片和电镜扫描观察方法, 比较玻璃化与正常试管苗叶片和茎的显微结构的结果表明: 苹果玻璃化试管苗的叶片和茎的显微结构与正常试管苗有显著差异, 前者的叶片厚度变大, 表皮细胞密度极低; 表皮细胞体积膨大, 液泡化, 栅栏组织厚度减小, 海绵组织厚度增加; 气孔器的长轴变化不明显, 短轴变宽, 气孔密度极高; 茎的维管组织中有空洞和塌陷, 导管管壁多皱褶, 筛管中无淀粉粒积累。

关键词: 苹果; 试管苗; 玻璃化; 电镜扫描; 石蜡切片

Comparison of Micro-Structures of Leaves and Stems between Vitrified and Normal Apple (*Malus pumila* Mill.) Plantlets *in vitro*

GE Hong-Juan, LIANG Mei-Xia, DAI Hong-Yi*

College of Landscape and Horticulture, Qingdao Agriculture University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: ‘Lujia 5’ apple (*Malus pumila*) was used to compared the micro-structures of leaves and stems between the vitrified and normal apple plantlets *in vitro* by paraffin section and scanning electron microscopy (SEM). The results showed that there were significant differences in micro-structures of leaves and stems between the vitrified and normal apple plantlets *in vitro*. The leaves of the former was much thicker and the upper epidermis cells density was remarkably lower, and the size of upper epidermis cells became larger and vacuolated. And the thickness of the palisade parenchyma reduced, while the thickness of spongy parenchyma increased. And the major axis of stomatal apparatus didn’t change a lot, while the minor axis obviously became larger and the stoma density was significantly high. The vascular tissue in the stems appeared cavitory and collapsed, and there were many folds on the conduit wall, and there was no accumulation of starch grains in the sieve tube.

Key words: apple (*Malus pumila*); shoots grown *in vitro*; vitrification; scanning electron microscopy (SEM); paraffin section

苹果(程家胜等 1990; 牛自勉等 1994, 1995)、梨(赵剑和杨文杰 1998)、樱桃(杨振国等 2004)、草莓(曹善东 2006; 丰锋和陈厝边 2007)等 80 多种植物(谢芝馨等 2004)在植物组织培养过程中都有玻璃化现象发生。由于玻璃化苗的部分组织结构呈畸形, 水分代谢紊乱, 极易死亡, 一直是组织培养中难以解决的问题之一(卜学贤和陈维伦 1987)。玻璃化试管苗的叶片呈半透明状, 水渍化, 脆弱易破碎(Debergh 等 1981; Phan 和 Letouze 1983)。一般认为, 高温、高湿和高浓度细胞分裂素是导致玻璃苗产生的主要原因(孙阳等 2008; 张洪胜等 1991; 郑小华等 2008)。玻璃化和正常试管苗的生理指标差异研究主要集中在蔗糖和可溶性蛋白含量(孙庆春等 2009)、酶活性(张淑改等 1999)、纤维素和木质素含量(李云等 1997)以及内源激素含量(牛自勉等 1995; 吴迪等 2007)的变化。Gribble 等(1996)与

Apostolo 和 Llorente (2000)分别比较满天星和希蒙得木的玻璃化苗与正常苗的显微形态的结构表明, 玻璃化苗叶的表皮受损, 气孔形态不正常, 茎木质部液泡化。到目前为止, 有关苹果玻璃化和正常试管苗叶片和茎显微结构的研究尚未见报道。为此, 本文观察了苹果玻璃化与正常试管苗叶片和茎的显微结构的变化, 试图从显微形态上揭示玻璃化苗在继代培养中不能正常生长, 极易死亡的原因, 为深入研究试管苗玻璃化的机制提供参考。

材料与方法

苹果(*Malus pumila* Mill.)品种为‘鲁加5号’(祝

收稿 2009-11-06 修定 2010-02-24

资助 国家“十一五”科技支撑计划(2008BAD92B01)、国家现代苹果产业技术体系项目和山东良种产业化工程项目。

* 通讯作者(E-mail: hydai@qau.edu.cn; Tel: 0532-86080008)。

军和戴洪义 2004)。4月中旬, 取生长健壮无病害的顶芽, 剥取茎尖, 用75%酒精和0.1%升汞灭菌后, 接种于培养基MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹蔗糖+7 g·L⁻¹琼脂上。继代3次后, 将正常丛生新芽分别转接于培养基MS+4.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.4 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹蔗糖+6 g·L⁻¹琼脂和MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹蔗糖+7 g·L⁻¹琼脂上。培养35 d后, 获得大量的玻璃化和正常试管苗。培养温度为(25±2)°C, 光照强度约60 μmol·m⁻²·s⁻¹, 每天光照12 h。

随机选取苹果‘鲁加5号’玻璃化和正常试管苗各10株, 用直尺测量株高; 用游标卡尺于茎中部处测量茎粗; 每单株取其基部向上数第3~5片成熟叶片, 用直尺测量叶长, 叶宽。

从玻璃化和正常试管苗顶端向下取第3片叶片, 在叶中部靠近主脉处剪取0.5 cm×0.5 cm小块, 用标准固定液(FAA)固定后, 常规石蜡切片(李正理 1987), 切片厚度为10 μm, 番红-固绿染色, 中性树脂封片, 在Nikon H 600L显微镜下拍照。测量叶片厚度及上表皮、栅栏组织、海绵组织和下表皮厚度。

扫描电镜观察用的叶片取样方法与石蜡切片观察用的叶片取样方法相同。茎的取样于茎中部切取0.5 cm长茎段, 放入2.5%戊二醛进行固定, 经不同梯度的乙醇脱水, 临界点干燥后, 置镀膜仪上喷金, 在KYKY2008B扫描电镜下观察拍照。用E-ruler软件测量气孔大小, 并根据单位面积内气孔个数计算气孔密度。

结果与讨论

1 试管苗的外观形态和叶片的横切面结构特征

苹果‘鲁加5号’的玻璃化试管苗植株矮小, 株高平均不到4.00 cm, 显著低于正常苗株高; 茎粗大, 直径达0.52 cm, 为正常植株的3倍多; 叶片深

绿、半透明、水渍状肥厚肿胀(图1-a₁), 叶片厚度达177.26 μm, 极显著地大于正常苗; 叶长明显大于正常苗的叶长, 叶宽约为正常叶片的二分之一, 两者与正常苗的叶片长和宽相比, 分别达到极显著水平(表1)。苹果的正常试管苗植株, 茎直立细长, 叶较薄, 呈卵圆形, 规则整齐, 叶表光滑无毛(图1-a₂)。

苹果‘鲁加5号’的玻璃化与正常试管苗叶片上、下表皮均为单层细胞, 且不管是玻璃化还是正常试管苗两者各自的上、下表皮厚度一致; 海绵组织在整个叶片解剖结构中所占的比例最高(图2)。玻璃化试管苗叶片上、下表皮细胞空洞肿胀(图1-b₁), 与苹果正常试管苗的上、下表皮厚度差异显著; 正常苗叶片的表皮细胞排列紧密(图1-b₂)。

植物叶片的栅栏组织中含有大量的叶绿体, 是植株进行光合作用的主要场所。玻璃化试管苗叶片的栅栏组织较少, 小于整个叶片的10%, 极显著小于苹果正常试管苗的栅栏组织厚度; 正常叶片的栅栏组织由一层棒状细胞组成, 排列整齐, 与上表皮细胞垂直, 其中有叶绿体分布; 这与沈宁东(2003)、Debergh等(1992)的玻璃化试管苗观察的结果一致。同时, 由于玻璃化植株的栅栏组织厚度急剧变小, 其中叶绿体分布较少, 以致玻璃化植株的光合作用能力可能相对较小, 这可能与玻璃化植株矮小也有关。

玻璃化叶片海绵组织细胞发育异常, 细胞体积膨大为薄壁细胞, 液泡化程度高, 结构松散, 几乎没有明显的长轴(图1-b₁); 正常试管苗的海绵细胞完整, 分布均匀, 有成熟的细胞核(图1-b₂)。正常苗的海绵组织占整个叶片的比例约为50%, 而玻璃化苗则达到80%, 两者差异极显著。

2 叶片的上表皮结构特征

苹果‘鲁加5号’的玻璃化和正常试管苗的叶片上表皮均有少许蜡质, 表皮细胞呈不规则多角形, 突出叶表或与叶表相平, 叶片的上表皮均无气孔分

表1 苹果玻璃化与正常试管苗的形态比较

Table 1 Comparison of morphology of vitrified and normal apple plantlets *in vitro*

| 试管苗类别 | 株高/cm | 茎粗/cm | 叶长/cm | 叶宽/cm | 叶厚/μm |
|-------|-------|--------|--------|--------|----------|
| 玻璃化苗 | 3.75 | 0.52** | 1.59** | 0.37 | 177.26** |
| 正常苗 | 6.44* | 0.16 | 1.21 | 0.71** | 161.51 |

*、** 分别表示 *t* 测验差异显著性达5%和1%。下表同此。

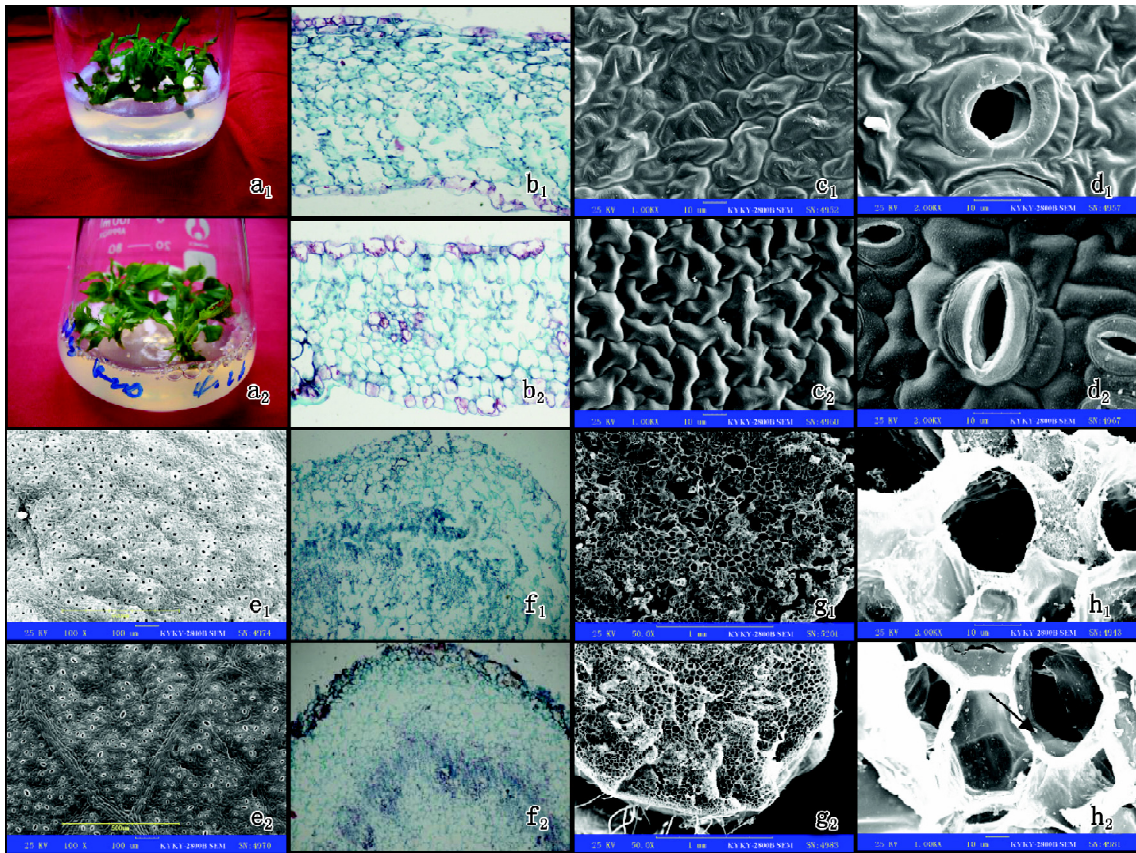


图1 苹果试管苗的外观形态和等层的横切面结构

Fig.1 Morphology and structure of cross-section in the same layer of apple plantlets *in vitro*

a₁: 苹果玻璃化试管苗外观形态; b₁: 苹果玻璃化试管苗叶片解剖结构; c₁: 苹果玻璃化试管苗叶片上表皮形态; d₁: 苹果玻璃化试管苗气孔形态; e₁: 苹果玻璃化试管苗叶片气孔密度; f₁: 苹果玻璃化试管苗茎横切解剖结构; g₁: 苹果玻璃化试管苗茎横切面电镜扫描; h₁: 苹果玻璃化试管苗茎的薄壁组织。a₂: 苹果正常试管苗外观形态; b₂: 苹果正常试管苗叶片解剖结构; c₂: 苹果正常试管苗叶片上表皮形态; d₂: 苹果正常试管苗气孔形态; e₂: 苹果正常试管苗叶片气孔密度; f₂: 苹果正常试管苗茎横切解剖结构; g₂: 苹果正常试管苗茎横切面电镜扫描; h₂: 苹果正常试管苗茎的薄壁组织(箭头所示为淀粉粒)。

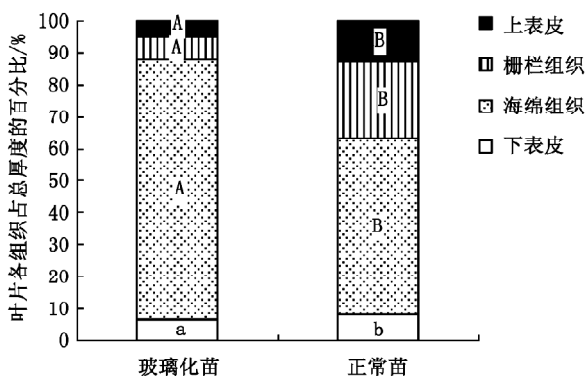


图2 苹果玻璃化与正常试管苗的叶片各组织占整个叶片厚度的比例

Fig.2 Percentage of each tissue layer in vitrified and normal leaves thickness of apple plantlets *in vitro*

不同小写字母或大写字母表示 *t* 测验差异显著性达 5% 和 1%。

布。苹果玻璃化试管苗的表皮细胞皱缩变形, 有肿胀变大的趋势, 细胞间隙大(图1-c₁), 细胞密度平均为 2 042.9 个·mm⁻²; 而正常植株的叶片上表皮细胞充实饱满, 排列紧密(图1-c₂), 细胞密度达到 3 657.1 个·mm⁻², 极显著的高于玻璃化苗。叶片表皮是植物体和外界环境接触的最外层组织, 表皮层的结构特征与其作用有关。正常试管苗得上表皮细胞排列紧密, 有机械支持作用。玻璃化苗的表皮细胞壁不完整, 细胞密度明显下降, 这可能是导致叶片脆弱和易碎的原因之一。Gribble 等(1996)在观察满天星玻璃化苗叶片表皮特征中, 曾见到玻璃化苗的表皮细胞间隙增大, 有水珠溢出。本文由于材料是电镜扫描流程中脱水的, 所以未能观测到水珠, 但可以明显地观测到其间隙增大, 表皮细胞密度极显

著的低于正常苗。这些特征都体现了玻璃化苗对湿生环境的适应性(沈宁东 2003; 韦梅琴和郑江伟 2007)。

3 叶片的下表皮结构特征

气孔是进行气体和水分交换的主要通道,其气孔的大小和密度与光合作用和呼吸作用都密切相关(闫忠业等 2007)。苹果的玻璃化试管苗叶片下表皮气孔器的保卫细胞及副卫细胞皱缩变形,保卫细胞呈不规则半月形,凹陷于叶表或者与叶表相平(图 1-d₁);正常叶片的气孔器中会有明显的肾形保卫细胞及副卫细胞结构,细胞饱满充实,突出于叶表皮上(图 1-d₂)。玻璃化叶片的下表皮气孔器短轴长度

为 21.3 μm , 极显著大于正常叶片中气孔器的短轴长度;两者的气孔器长轴长度差异不显著。玻璃化叶片的气孔与正常试管苗叶片相比,两者在长度上的差异不显著,但在宽度上的差异极显著(表 2)。玻璃化试管苗叶片的气孔器密度平均值为 446 个 $\cdot\text{mm}^{-2}$ (图 1-e₁),正常叶片气孔器密度的平均值为 384 个 $\cdot\text{mm}^{-2}$ (图 1-e₂),两者差异极显著;这与王纪方等(1998)和 Apostolo 和 Llorente (2000)分别在丝石竹和希蒙得木中的结果比较一致。苹果玻璃化试管苗的气孔密度增加,同时气孔开度也增大,这可能与玻璃化试管苗叶片卷曲和叶面积减少所导致的气孔密度增加有关。

表 2 苹果的玻璃化与正常试管苗叶片表皮的特征比较

Table 2 Comparison of leaf epidermal characteristics of vitrified and normal apple plantlets *in vitro*

| 试管苗类别 | 上表皮 | | 下表皮 | | | |
|-------|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|
| | 细胞密度 / 个 $\cdot\text{mm}^{-2}$ | 气孔器 | | 气孔 | | |
| | | 长轴/ μm | 短轴/ μm | 长度/ μm | 宽度/ μm | 密度 / 个 $\cdot\text{mm}^{-2}$ |
| 玻璃化苗 | 2 042.9** | 23.6 | 21.3* | 16.2 | 13.3** | 446** |
| 正常苗 | 3 657.1 | 21.6 | 16.0 | 14.7 | 6.8 | 384 |

4 茎的横切面结构特征

苹果‘鲁加 5 号’玻璃化试管苗的茎维管组织有明显的塌陷和空洞,导管管壁松弛多皱褶,筛管间隙大(图 1-h₁),韧皮部和木质部结构松散,分化不明显(图 1-g₁)。而正常苗的茎横切面则有较为明显的韧皮部和木质部(图 1-g₂),且分布清晰,导管管壁光滑坚韧,筛管排列紧密,截面处有半透明状薄膜,上有乳白色淀粉小颗粒分布(图 1-h₂)。从石蜡切片的解剖结构来看,苹果玻璃化试管苗茎的表皮和皮层结构不完整,在韧皮部与木质部之间有断层,皮层细胞液泡化,维管束退化(图 1-f₁);而正常试管苗的茎表皮细胞排列紧密,有明显的髓射线,维管束排列均匀(图 1-f₂)。这些特征都说明玻璃化试管苗的输导组织不能发挥正常作用,而且筛管中没有淀粉物质的积累,这可能是导致玻璃化试管苗死亡的原因之一。

总之,玻璃化苗叶片和茎的显微结构有明显变化,在继代培养过程中,其形态结构的变异导致苹果试管苗的叶片和茎不能发挥正常功能,叶片不能

进行正常的光合作用,茎的运输功能受到抑制,最终导致玻璃化苗的死亡。因此,在苹果试管苗的培养过程中,有效控制玻璃化的发生是至关重要的。玻璃化的产生与培养基中蔗糖浓度、琼脂浓度、细胞分裂素浓度均密切相关,因此如何控制这类物质的用量以防止苹果试管苗玻璃化的发生,仍待进一步研究。

参考文献

- 卜学贤,陈维伦(1987). 试管植物的玻璃化现象. 植物生理学通讯, (5): 13~18
- 曹善东(2006). 组培条件对草莓脱毒试管苗玻璃化影响的研究. 山东农业大学(自然科学版), 37 (2): 172~174
- 程家胜,史永忠,张志云,康艳玲(1990). 苹果组织培养中的玻璃苗问题. 植物生理学通讯, (1): 33~35
- 丰锋,陈厝边(2007). 草莓离体培养中玻璃化的发生及克服措施研究. 西南大学学报(自然科学版), 29 (4): 78~82
- 李云,田砚亭,罗晓芳(1997). 玻璃苗中纤维素、木素及元素含量变化的研究. 核农学报, 11 (1): 103~111
- 李正理(1987). 植物制片技术. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 60~72
- 牛自勉,王贤萍,戴桂林(1995). 苹果砧木玻璃化过程中内源激素的含量变化. 华北农学报, 10 (3): 15~19

- 牛自勉, 王贤萍, 许月明(1994). 苹果砧木茎尖培养玻璃化与内源激素的关系. 园艺学报, 21 (4): 396~397
- 沈宁东(2003). 满天星试管正常苗与玻璃苗叶片解剖结构的比较. 青海师范大学学报(自然科学版), (3): 45~47
- 孙庆春, 郑成淑, 丰震(2009). 菊花玻璃化苗与正常苗的生理特性比较. 山东农业科学, (5): 45~47
- 孙阳, 魏海蓉, 程淑云, 刘庆忠, 李宪利, 刘崇琪(2008). 蓝莓组培苗玻璃化及恢复的研究. 山东农业科学, (3): 61~63
- 吴迪, 关录凡, 王秋玉(2007). 杂种山杨玻璃化苗内源激素含量研究. 林业科学, 43 (10): 127~129
- 王纪方, 李锡香, 贾春兰, 沈镛(1998). 丝石竹玻璃苗生理特性和形成机理初探. 农业生物技术学报, 5 (1): 72~78
- 韦梅琴, 郑江伟(2007). 东方百合试管正常苗与玻璃苗叶片解剖结构的比较. 北方园艺, (12): 203~205
- 谢芝馨, 张玉喜, 于元杰, 杨龙, 王希荣(2004). 大葱试管苗玻璃化机理的探讨. 分子植物育种, 2 (1): 71~75
- 闫忠业, 伊凯, 刘志, 王冬梅, 杨锋, 吕天星(2007). 富士系苹果叶片气孔观察. 北方园艺, (9): 1~3
- 杨振国, 孟庆繁, 唐晓杰, 高文韬(2004). 酸樱桃组织培养中试管苗玻璃化的发生与防止. 经济林研究, 22 (2): 47~48
- 张洪胜, 牟云官, 辛培刚(1991). 苹果离体培养中试管苗玻璃化现象发生机理的探讨. 果树科学, 8 (2): 71~74
- 张淑改, 齐力旺, 时宝凌, 张芸香(1999). 满天星玻璃苗的酯酶和过氧化物酶研究. 山西农业科学, 27 (2): 68~70
- 赵剑, 杨文杰(1998). 梨芽离体快繁过程中玻璃化苗的发生与氧自由基胁迫的关系. 西北植物学报, 18 (2): 183~189
- 郑小华, 廖明安, 李明章(2008). 不同培养条件对软枣猕猴桃试管苗玻璃化的影响. 资源开发与场, 24 (5): 394~396
- 祝军, 戴洪义(2004). 12个苹果新品种简介. 中国果树, (6): 7~8
- Apostolo NM, Llorente BE (2000). Anatomy of normal and hyperhydric leaves and shoots of *in vitro* grown *Simmondsia chinese* (Link) Schn. *In vitro Cell Dev Biol-Plant*, 36: 243~249
- Debergh P, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, von Arnold S, Zimmerman R, Ziv M (1992). Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 30 (2): 135~140
- Debergh P, Harbaoui Y, Lemeur R (1981). Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol Plant*, 53 (2): 181~187
- Gribble K, Sarafis V, Nailon J, Holford P, Uwins P (1996). Environmental scanning electron microscopy of the surface of normal and vitrified leaves of *Gypsophila paniculata* (Babies Breath) cultured *in vitro*. *Plant Cell Rep*, 15: 771~776
- Phan CT, Letouze R (1983). A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents, and of hydroxycinnamate: CoA ligase activity of normal and vitreous plants (*Prunus avium* L.) obtained *in vitro*. *Plant Sci Lett*, 31: 323~327