

蓝莓玻璃化试管苗的显微结构及生理生化特性变化

吕敏, 夏秀英*, 徐品三, 李波, 郭照东

大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁大连116024

摘要: 研究了蓝莓试管苗玻璃化的显微结构、超微结构以及生理生化特性的影响。与正常试管苗相比, 蓝莓玻璃化苗的茎、叶显微结构发生了明显的改变: 叶片表皮细胞松散、不连续; 气孔结构难以辨认; 叶片增厚; 缺少栅栏组织, 海绵组织细胞间隙变大, 部分细胞解体; 茎的维管组织发育不良; 亚显微结构观察发现, 玻璃化苗叶肉细胞体积增大, 细胞壁变薄; 部分细胞缺少细胞核及线粒体; 叶绿体数目减少, 类囊体解体, 缺乏淀粉体。玻璃化试管苗的生理生化特性也发生了显著的改变: 玻璃化苗组织含水量显著增加; 叶绿素、可溶性糖及可溶性蛋白含量显著降低; O_2^- 产生速率、 H_2O_2 积累量、MDA含量及相对电导率显著升高; 活性氧清除酶系中POD活性显著升高, SOD和CAT活性显著降低; PAL活性下降。蓝莓玻璃化苗的形态结构异常, 水分及物质代谢紊乱, 活性氧清除能力降低, 表明玻璃化与氧化胁迫相关。

关键词: 蓝莓; 玻璃化; 生理生化特性; 显微结构; 活性氧

Changes in Microstructure and Physiological-Biochemical Characteristics of Hyperhydric Shoots of Blueberry (*Vaccinium* spp.) *in Vitro*

LÜ Min, XIA Xiu-Ying*, XU Pin-San, LI Bo, GUO Zhao-Dong

School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China

Abstract: This research was performed to investigate the effects of hyperhydricity on morphology, subcellular ultrastructure and physiology of leaves during micro-propagation of blueberry plants. The results showed that compared with healthy leaves, hyperhydric leaves showed abnormal microstructure. The development of the epidermis was often discontinuous and the intercellular space was large. Stomata were difficult to identify. The leaf lamina appeared thickened and was characterized by the absence of palisade mesophyll tissue and the malformation of spongy mesophyll tissue. Vascular tissue of stem developed poorly. On the aspect of ultrastructure, the size of mesophyll cell and the thickness of cell wall increased, the nucleus and mitochondria were missed in some mesophyll cells in the hyperhydric leaves. Hyperhydric leaves had a significantly lower chloroplast number per cell and chloroplasts showed collapsed thylakoid stacking compared with healthy leaves. Hyperhydricity resulted in a dramatic change about physiological and biochemical characteristics of leaves, such as a general increase of water content and decreases in the contents of chlorophyll, soluble sugar and protein. The production efficiency of O_2^- , the level of H_2O_2 , MDA and the relative conductivity in hyperhydric leaves were increased efficiently. The activities of antioxidant enzymes, such as catalase (CAT) and peroxidase (POD) were lower while superoxide dismutase (SOD) were higher in hyperhydric leaves than in healthy leaves. The activities of phenylalanine ammonialyase (PAL) in hyperhydric leaves reduced. These results reflected an abnormal in morphology, a disorder in metabolic activity and a reduction in the ability of reactive oxygen removing, indicating that hyperhydricity was associated with oxidative stress.

Key words: blueberry; hyperhydricity; physiological and biochemical characteristics; microstructure; reactive oxygen

蓝莓(*Vaccinium* spp.)属于杜鹃花科越桔属小浆果果树, 其果实富含类黄酮, 具有极高的抗氧化能力(Rowland等2012; Zifkin等2012)。研究表明蓝莓果实可以减少人类罹患癌症、心血管及神经系统疾病的风险(Neto等2007; Basu等2010)。由于蓝莓较高的经济价值及对人类健康的重要作用, 近

几年在世界范围的生产和消费不断增加, 对优质新品种种苗的需求也不断增加。组织培养技术可以在短时间内生产大量无菌种苗, 也是种质资源

收稿 2014-01-17 修定 2014-02-26

* 通讯作者(E-mail: xx47@dlut.edu.cn; Tel: 0411-84706356)。

保存的重要方法。但蓝莓组织培养快速繁殖过程中经常发生玻璃化现象(Apóstolo和Llorente 2000; Tetsumura等2008), 严重影响了种苗质量, 制约了蓝莓优质种苗的商业化生产及优良种质的保存。

玻璃化现象是在植物组织培养过程中普遍存在且经常发生的一种生理失调及形态和解剖结构的畸变现象, 是组培苗对培养环境中各种物理化学因素不适的一种反应(郝瑞庆和杨广东2002; Kevers等2004)。玻璃化苗的主要特征是: 植株生长异常, 叶、嫩梢呈透明或半透明的水浸状, 芽苗矮小、肿胀、失绿, 叶片皱缩成纵向卷曲, 脆弱易碎。玻璃化苗增殖及分化能力低下, 难以再生成苗, 难以生根, 难以移栽成活(Ziv 1990)。

由于玻璃化现象的危害性及普遍性, 近年来已引起了人们的广泛关注, 目前已针对玻璃化发生原因、影响因素、预防和恢复措施等做了许多工作(蔡祖国等2005; 李在留等2010; 张天翔等2013)。研究表明, 培养基种类、琼脂浓度、培养容器、培养环境、矿质营养、细胞分裂素和渗透状况等均对玻璃化有影响(Ivanova和van Staden 2008; Vasudevan和van Staden 2011)。通过改变培养条件或在培养基中添加活性炭、硝酸银、硝酸钙、硫胺素、抗坏血酸等可以减少部分物种的玻璃化发生频率或使部分玻璃化苗恢复正常(王爱勤等2002; Mayor等2003; 张琳等2011; Reed等2013)。但直至目前为止, 对玻璃化发生机制仍缺乏全面了解, 至今仍未获得普遍适用且行之有效的防止措施。对玻璃化苗形态学及解剖学特点、生理生化变化、基因表达差异等方面进行研究可为探讨玻璃化苗形成机制及采取有效预防措施提供有价值的参考。如Sreedhar等(2009)研究了香草(*Vanilla planifolia*)玻璃化过程中生理生化的变化, 表明玻璃化苗生化特性的改变和细胞损伤主要是由于氧化胁迫引起; 常有宏等(2011)比较了‘黄冠’梨正常试管苗与玻璃化苗生理生化及超微结构, 认为碳水化合物含量较低、激素代谢紊乱、光合结构破坏及细胞核物质减少等可能是后代增殖能力显著降低的主要因素。但纵观已有研究结果也发现, 由于物种不同, 引起玻璃化的主导因素可能不同, 玻璃化苗生理生化及结构变化也存在差异, 采取的防治措施也不尽相同, 因此有必要针对不

同物种进行深入研究。迄今为止, 尚未有玻璃化对蓝莓试管苗显微结构及生理生化影响的相关报道。本文研究了蓝莓玻璃化苗形态学、解剖学及生理生化特性的变化, 为进一步揭示蓝莓试管苗玻璃化发生机制奠定基础, 并为蓝莓试管苗玻璃化的有效预防及恢复提供参考依据。

材料与方法

1 材料

试验材料为高大越桔(*Vaccinium corymbosum* L.)品种‘北陆’(‘Northland’)正常试管苗与玻璃化苗。增殖培养基为1/2MS+2 mg·L⁻¹ ZT+5.4 g·L⁻¹琼脂+2.5%蔗糖。培养基pH为5。培养室光照强度为30~40 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间为16 h, 温度为(25±2) °C。

2 显微和亚显微结构观察

取蓝莓玻璃化苗与正常苗叶片及茎段, 放入FAA固定液中固定40 h后, 用常规方法经石蜡包埋, 用切片机切成厚度5 μm薄片, 番红-固绿染色, 加拿大树胶封片。Olympus IX 71倒置显微镜下观察并照相。

将叶片切成1 mm×2 mm小块, 立即投入2.5%的戊二醛中, 用注射器反复抽真空使叶片沉底, 固定24 h。固定结束后经过一系列的磷酸缓冲液冲洗, 锇酸固定, 乙醇脱水, 环氧树脂包埋、聚合、切片及染色, 制成超薄切片, 于JEM-2000EX型透射电子显微镜下观察并拍照。

3 生理生化指标测定

植物叶片的丙二醛(malonaldehyde, MDA)含量及相对电导率可用于评价细胞膜系统受损伤程度, 而超氧阴离子自由基(O₂⁻)与过氧化氢(H₂O₂)等活性氧的积累是引起膜脂过氧化的主要原因(Shah等2001)。相对电导率、叶绿素含量、可溶性蛋白含量、可溶性糖含量、组织自由水与束缚水含量、MDA含量测定以及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性测定方法参照植物生理学实验教程(路文静和李奕松2012); O₂⁻产生速率、H₂O₂含量测定方法参照植物生理学模块实验指导(李玲2008); 组织含水量测定采用干重法; 苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonialyase,

PAL)活性测定采用苯丙氨酸脱氨显色法(高俊凤2006)。其中,叶绿素含量、相对电导率、MDA含量、 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 含量测定使用材料为蓝莓叶片,其余指标测定使用材料为整株蓝莓苗。

实验结果

1 玻璃化苗形态及显微结构变化

蓝莓玻璃化苗(图1-A)相比较正常苗(图1-D),节间缩短,生长矮小,叶片窄而长、颜色深绿、半透明水渍状、肥厚肿胀或皱缩卷曲。

玻璃化苗的叶片和茎的显微结构与健康试管苗存在较大差异。从图1-B可见,玻璃化苗叶片厚度增大;上下表皮细胞排列疏松,有间隙,下表皮

气孔结构难以辨认;未见栅栏组织,海绵组织细胞形状不规则、间隙大。而正常苗叶片(图1-E)上下表皮细胞排列紧密,下表皮可见明显气孔结构,栅栏组织细胞呈长圆柱形,排列整齐紧密,海绵组织细胞发育良好。从图1-C可见,玻璃化苗茎表皮细胞变形,细胞排列疏松散乱,皮层细胞形状不规则,排列散乱,细胞间隙增大,出现大的空洞,木质部和韧皮部退化;而正常苗茎(图1-F)表皮细胞排列整齐紧密,皮层由多层细胞构成,且皮层细胞较大,木质部与韧皮部较为发达。这些特征说明玻璃化可引起蓝莓试管苗叶片及茎结构异常,可能会导致水分吸收、气体交换及营养物质的合成、运输紊乱,进一步影响到试管苗的生长及繁殖。

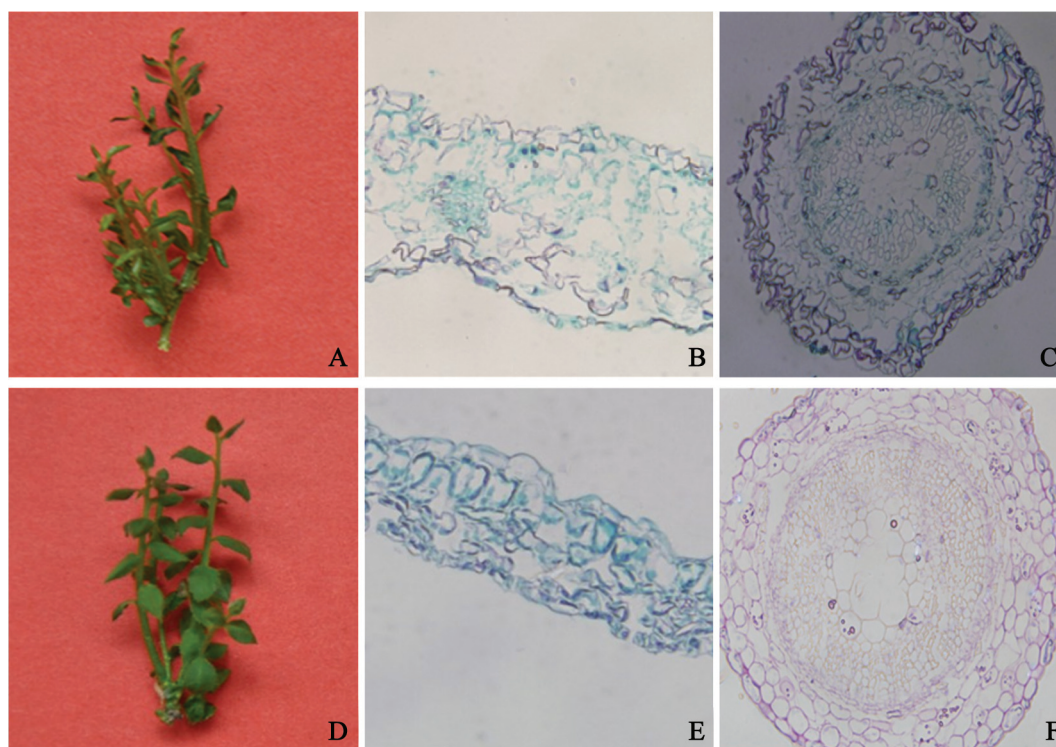


图1 蓝莓玻璃化苗与正常苗形态及显微结构差异

Fig.1 Difference in the morphology structure and microstructure between hyperhydric shoots and normal shoots of blueberry

A: 蓝莓玻璃化组培苗; B: 玻璃化苗叶片横切($\times 400$); C: 玻璃化苗茎横切($\times 400$); D: 蓝莓正常组培苗; E: 正常苗叶片横切($\times 400$); F: 玻璃化苗茎横切($\times 400$)。

经电镜观察发现,玻璃化苗(图2-A)叶肉细胞体积增大;细胞壁变薄;部分细胞缺失细胞核,叶绿体数量较少,且大部分脱离细胞壁;对叶绿体进行观察发现,叶绿体体积变小,类囊体片层模糊,淀粉粒缺失(图2-B、C)。而正常试管苗(图2-D)叶

肉细胞内含物充实,质膜清晰完整,细胞核、线粒体等清晰可见,叶绿体结构完整,紧贴细胞壁排列;叶绿体类囊体片层清晰,排列整齐,内含淀粉粒(图2-E、F)。可见,蓝莓玻璃化试管苗亚显微结构也发生较大变化,致使物质合成能力下降,进一步影

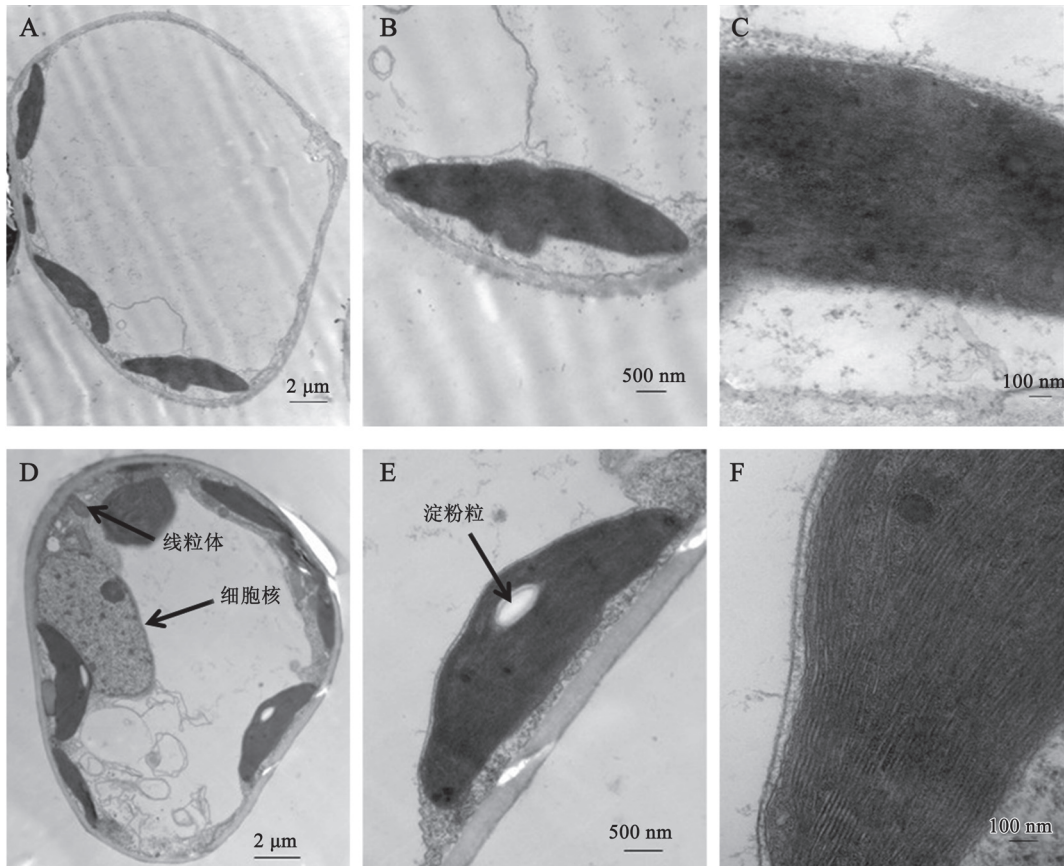


图2 蓝莓玻璃化苗与正常苗叶肉细胞超微结构差异

Fig.2 Difference in the ultra-structure between hyperhydric shoots and normal shoots of blueberry

A: 玻璃化苗叶肉细胞; B: 玻璃化苗叶绿体; C: 玻璃化苗类囊体; D: 正常苗叶肉细胞; E: 正常苗叶绿体; F: 正常苗类囊体。

响其增殖及分化。

2 玻璃化苗生长及增殖能力的变化

将已经玻璃化的试管苗进行继代培养, 结果发现, 从玻璃化苗分化出的苗仍呈玻璃化, 玻璃化苗的生长及增殖能力显著低于正常苗。如表1结果, 玻璃化苗平均株高3.12 cm, 显著低于正常苗的4.16 cm, 增值倍数为4.90, 比正常苗降低42.49%; 生长量小, 干重5.06 mg, 显著低于正常苗的12.03 mg, 说明玻璃化现象严重降低蓝莓试管苗质量及繁殖速度。

3 玻璃化苗组织含水量变化

蓝莓玻璃化苗与正常苗组织含水量差异显著。如表2, 玻璃化苗的总含水量为81.66%, 显著高于正常苗的72.81%。其中自由水含量为55.22%, 占总含水量的67.62%, 显著高于正常苗; 束缚水含量为26.44%, 占总含水量的32.38%, 显著低于正常苗的31.29%和42.97%。可见蓝莓玻璃化苗含水量

表1 玻璃化苗与正常苗生长量及增殖倍数差异

Table 1 Differences in proliferation and growth between hyperhydric shoots and normal shoots

类型	增值倍数	平均株高/cm	平均干重/mg
玻璃化苗	4.90 ^b	3.12 ^b	5.06 ^b
正常苗	8.52 ^a	4.16 ^a	12.03 ^a

同列数字旁不同小写字母表示经Duncan新复极差法检验在0.05水平上差异显著, 下表同。

较大, 可能是导致叶片呈肿胀水浸状的原因。另外, 玻璃化苗自由水相对含量较高而束缚水相对含量低, 自由水/束缚水比值高, 说明相比正常苗, 玻璃化苗可能代谢活跃, 抗逆能力较差。而且, 过多水积累在组织中还可导致细胞内氧气的消耗, 引起组织缺氧。蓝莓玻璃化苗水分代谢的紊乱可能会导致一系列生理生化变化及细胞结构的紊乱。

表2 玻璃化苗与正常苗组织含水量差异

Table 2 Differences in water content between hyperhydric shoots and normal shoots

类型	总含水量/%	自由水含量/%	自由水比例/%	束缚水含量/%	束缚水比例/%
玻璃化苗	81.66 ^a	55.22 ^a	67.62 ^a	26.44 ^b	32.38 ^b
正常苗	72.81 ^b	41.52 ^b	57.02 ^b	31.29 ^a	42.97 ^a

4 玻璃化苗叶片叶绿素含量变化

从表3结果可见, 玻璃化苗叶片叶绿素a、叶绿素b及总叶绿素含量均显著低于正常苗叶片; 而叶绿素a/b值比正常苗高36.91%。分析产生此结果的原因一方面可能是玻璃化苗叶片叶绿素合成系统受损或受阻(类囊体膜少; 图2-C), 叶绿素合成减少, 由叶绿素a转化成叶绿素b的比例也降低; 另一方面也可能是玻璃化苗叶片叶绿素降解加剧, 降解过程中叶绿素b转化为叶绿素a。玻璃化苗叶片叶绿素含量的变化可能导致其对光能的吸收、利用能力降低, 进而影响试管苗的生长及分化。

表3 玻璃化苗与正常苗叶绿素含量差异

Table 3 Differences in chlorophyll content between hyperhydric shoots and normal shoots

类型	叶绿素a含量/ mg·g ⁻¹ (FW)	叶绿素b含量/ mg·g ⁻¹ (FW)	叶绿素总量/ mg·g ⁻¹ (FW)	叶绿素 a/b值
玻璃化苗	0.25 ^b	0.09 ^b	0.33 ^b	3.19 ^a
正常苗	0.36 ^a	0.16 ^a	0.52 ^a	2.33 ^b

5 玻璃化苗可溶性糖、可溶性蛋白含量及苯丙氨酸裂解酶活性变化

蓝莓玻璃化苗可溶性糖及可溶性蛋白含量均显著低于正常苗, 只有正常苗的44.57%和63.35% (表4)。PAL是植物细胞壁主要成分木质素合成的关键酶。玻璃化苗PAL活性比正常苗低16.26%。说明蓝莓玻璃化苗有机物合成及转化能力降低, 细胞壁合成受阻, 物质代谢异常。

6 玻璃化苗叶片丙二醛含量、相对电导率及活性氧变化

蓝莓玻璃化苗MDA含量、相对电导率、O₂⁻的产生速率以及H₂O₂的积累量均显著高于正常苗。O₂⁻的产生速率以及H₂O₂的积累量分别比正常苗提高了65.49%和57.24%, 相对电导率与MDA含

表4 玻璃化苗与正常苗可溶性糖、可溶性蛋白含量及PAL活性差异

Table 4 Differences in soluble sugar content, soluble protein content and PAL activity between hyperhydric shoots and normal shoots

类型	可溶性糖含量/ mg·g ⁻¹ (FW)	可溶性蛋白含量/ mg·g ⁻¹ (FW)	PAL活性/ U·g ⁻¹ (FW)
玻璃化苗	14.12 ^b	1.02 ^b	51.31 ^b
正常苗	31.68 ^a	1.61 ^a	61.27 ^a

量分别为正常苗的2.65倍及1.7倍(表5)。表明蓝莓试管苗玻璃化过程中发生了活性氧的过度积累, 造成了膜脂过氧化损伤, 膜系统受到破坏。蓝莓玻璃化产生可能与氧化胁迫相关。

表5 蓝莓玻璃化苗与正常苗丙二醛含量、相对电导率及活性氧差异

Table 5 Differences in MDA content, relatively conductivity rate, O₂⁻ generation rate and H₂O₂ content between hyperhydric shoots and normal shoots

类型	MDA含量/ mmol·g ⁻¹ (FW)	相对电导率/%	O ₂ ⁻ 产生速率/ nmol·g ⁻¹ (FW)·min ⁻¹	H ₂ O ₂ 含量/ nmol·g ⁻¹ (FW)
玻璃化苗	41.20 ^a	41.28 ^a	10.79 ^a	97.14 ^a
正常苗	24.18 ^b	15.58 ^b	6.52 ^b	61.78 ^b

7 玻璃化苗抗氧化酶活性变化

蓝莓玻璃化苗抗氧化酶系统中SOD和CAT的活性显著低于正常苗, 分别为正常苗的64.24%和37.36%, 而POD的活性显著高于正常苗, 是正常苗的1.83倍(图3)。说明玻璃化苗抗氧化酶系统发生紊乱, 氧自由基的清除受到影响。

讨论

植物器官的形态结构与其生理功能和生长环境密切适应, 植物会对外界环境变化作出反应, 在形态结构及生理功能上发生改变, 玻璃化即是试管苗对培养环境中各种物理化学因素不适的一种反应。本研究表明, 玻璃化引起蓝莓苗形态结构、显微结构及生理生化特性发生改变, 而且这些变化相互印证, 表现一致。在本研究中, 蓝莓玻璃化苗叶片表皮细胞排列松散、不连续, 气孔结

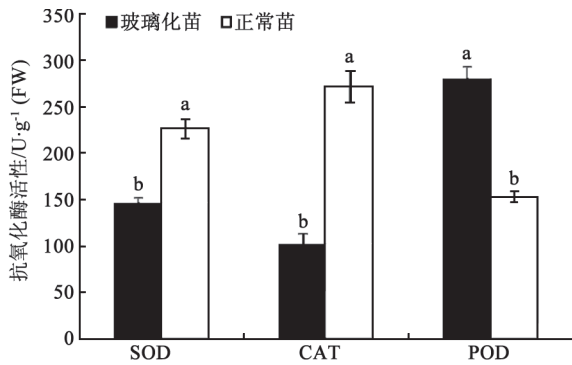


图3 蓝莓正常苗与玻璃化苗抗氧化酶活性比较

Fig.3 Comparison of autoxidant enzyme activities between normal shoots and hyperhydric shoots of blueberry

同一测定项目不同小写字母表示经Duncan新复极差法检验在0.05水平上差异显著。

构异常, 栅栏组织、海绵组织及维管组织发育不良、甚至退化。叶肉细胞体积变小、细胞壁变薄, 细胞核、线粒体等细胞器缺失, 叶绿体数量减少、类囊体膜结构散乱。同时, 玻璃化苗组织含水量显著升高; 叶绿素含量、可溶性糖及可溶性蛋白含量降低; O_2^- 产生速率、 H_2O_2 积累量、MDA及相对电导率显著增加; SOD、CAT活性降低, POD活性升高。蓝莓玻璃化苗显微结构及生理生化特性的改变反应出玻璃化会影响试管苗水分及气体的吸收、运输及交换, 降低物质合成、运输及转换能力, 最终导致玻璃化苗形态畸形、生理功能异常、抗性丧失, 干物质积累减少、分化能力下降。但引起蓝莓试管苗玻璃化的主导因素尚不确定, 有待进一步的研究。

近年来, 活性氧代谢与试管苗玻璃化的关系逐渐引起人们的重视。在甜樱桃(Franck等1995)、石竹(Piqueras等2002; Saher等2004)、独行菜(Wang等2007)、大蒜(Wu等2009)等多种植物的玻璃化试管苗中均发现MDA或 H_2O_2 的积累, 人们推测试管苗玻璃化的内在原因是氧化伤害。Asada (1999)和Rojas-Martinez等(2010)认为质外体超度含水可引起组织缺氧, 干扰呼吸作用的电子传递, 进而引起氧化胁迫, 导致试管苗玻璃化。Olmos和Hellin (1998)、Chakrabarty等(2006)研究认为, 玻璃化苗超微结构的改变是由于氧化胁迫而导致。而近期van den Dries等(2013)的研究认为玻璃化的产生是由于水分积累, 气孔关闭, 玻璃化组织中气体交换

减少, 从而引起氧化损伤造成的。李云等(1996)认为植物光呼吸途径和磷酸戊糖(HMP)途径均与玻璃化苗的产生有关, 当光呼吸途径被抑制时, 减弱了光呼吸对光合系统的保护作用, 过剩的同化物损坏了光合细胞器, 加重了对植物的伤害。张琳等(2011)研究结果表明, 外源 H_2O_2 处理使大蒜试管苗内源超氧阴离子产生速率和 H_2O_2 含量提高, 玻璃化率和玻璃化程度提高; 玻璃化现象的发生较内源超氧阴离子大量发生滞后, 与 H_2O_2 显著积累同步; 添加外源抗氧化物质抗坏血酸(AsA)可缓解超氧阴离子的产生和 H_2O_2 的积累, 对试管苗玻璃化的发生有控制效果; 说明大蒜试管苗玻璃化是由活性氧产生和抗氧化系统失调而导致的。本研究也发现, 蓝莓玻璃化苗 O_2^- 的产生速率、 H_2O_2 的积累量及MDA含量均显著高于正常苗, 说明蓝莓试管苗玻璃化过程中发生了活性氧的积累及膜的氧化损伤。因此我们推测, 活性氧过度积累引起的氧化胁迫可能也在蓝莓试管苗玻璃化中扮演重要角色。但蓝莓玻璃化的发生是由于水分吸收及代谢失调导致活性氧积累, 进而引起显微结构及其他生理生化一系列的改变, 还是由于其他因素引起的活性氧积累, 造成细胞结构氧化损伤, 进而阻碍水分及物质代谢, 还需进一步的深入研究。

为消除活性氧的伤害, 植物体内拥有复杂的抗氧化酶系统。其中SOD、POD及CAT是主要的抗氧化酶。SOD可催化生物体内超氧阴离子自由基通过歧化反应生成 H_2O_2 和 H_2O , 是抗氧化系统的第一道防线。但有关玻璃化苗SOD活性的变化趋势, 已有研究结果并不一致。Franck等(1995)、Saher等(2004)及Chakrabarty等(2006)的研究表明玻璃化苗的SOD活性高于正常苗。Lee等(2009)的研究也表明, 转正义百合Cu/Zn SOD基因的马铃薯植株玻璃化率提高, 相反, 转反义基因的植株玻璃化率较低。而在网纹甜瓜(刘雪超等2011)、豆梨(王宏伟2011)等的研究中, 玻璃化苗SOD活性低于正常苗。本研究中蓝莓玻璃化苗SOD活性也显著降低, 这可能与研究的物种不同或获得玻璃化苗的途径及玻璃化程度不同有关。我们分析, 蓝莓玻璃化苗SOD活性降低, 造成超氧阴离子的积累, 从而引起氧化损伤。POD对于植物氧化胁迫有双重作用。一方面为保护反应, 即清除 H_2O_2 ; 另一方

面,它参与叶绿素的降解和活性氧的产生,并引发膜脂氧化,为一种伤害性反应(Martinez等2000)。另外,POD还与呼吸作用、光合作用及生长素的氧化有关,POD活性高可抑制生长素的活动,使细胞伸长减少,导致组织畸变(胡能书和万贤国1985)。在康乃馨(Olmos等1997)、苹果(Chakrabarty等2006)等玻璃化苗中均发现POD活性增高现象。本研究中,蓝莓玻璃化苗POD活性显著高于正常苗,说明POD可能参与了蓝莓玻璃化苗的氧化损伤反应。CAT是植物中分解 H_2O_2 的主要酶,本研究中蓝莓玻璃化苗CAT含量显著降低,说明蓝莓玻璃化苗 H_2O_2 清除能力下降,这与甜菜(Hagege等1992)、菘蓝(客绍英等2009)等的研究结果一致。可见,抗氧化酶系统失调造成的活性氧积累可能也在蓝莓玻璃化中发挥了重要作用。

参考文献

- 蔡祖国,徐小彪,周会萍(2005). 植物组织培养中的玻璃化现象及其预防. 生物技术通讯, 16 (3): 353~355
- 常有宏,张玉娇,李晓刚,蔺经,杨青松,王中华,王宏伟(2011). ‘黄冠’梨正常试管苗与玻璃化苗生理生化及超微结构的比较研究. 园艺学报, 38 (2): 225~232
- 高俊凤主编(2006). 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 210~228
- 郝瑞庆,杨广东(2002). 大白菜试管苗玻璃化发生机理初探. 中国农学通报, 18 (3): 45~47
- 胡能书,万贤国主编(1985). 同工酶技术及其应用. 长沙: 湖南科学技术出版社, 171~180
- 客绍英,张胜珍,刘玉军(2009). 菘蓝试管苗玻璃化过程中抗氧化酶活性的变化. 华北农学报, 24 (3): 154~158
- 李玲主编(2008). 植物生理学模块实验指导. 北京: 科学出版社, 83~86
- 李云,田砚亭,罗晓芳(1996). 珠美海棠试管苗玻璃化发生机理的初步研究. 北京林业大学学报, 18 (1): 52~58
- 李在留,郭松,陈晴,胡佩龙,乔梦吉,和太平(2010). 掌叶木种子的离体培养与玻璃化逆转研究. 中国农学通报, 26 (17): 60~64
- 刘雪超,齐红岩,陈岩,华利静(2011). $AgNO_3$ 对网纹甜瓜试管苗糖代谢及抗氧化酶活性的影响. 植物生理学报, 47 (3): 286~292
- 路文静,李奕松主编(2012). 植物生理学实验教程. 北京: 中国林业出版社, 34~110
- 王爱勤,何龙飞,裴润梅,盛玉萍,唐凯砾(2002). 组培条件对不同品种芦荟试管苗玻璃化的影响. 中国农学通报, 18 (5): 46~52
- 王宏伟(2011). 豆梨组织培养过程中玻璃化形成机制及其恢复技术研究[硕士论文]. 南京: 南京农业大学
- 张琳,蒋芳玲,熊超超,孙萍萍,靳慧卿,田洁,吴震(2011). 外源 H_2O_2 作用下大蒜试管苗活性氧代谢的变化及对AsA的响应. 园艺学报, 38 (9): 1707~1716
- 张天翔,林宗铿,蔡坤秀,杨俊杰,曹明华(2013). 芦笋组织培养中玻璃化苗逆转的初步研究. 中国农学通报, 29 (25): 93~96
- Apóstolo NM, Llorente BE (2000). Anatomy of normal and hyperhydric leaves and shoots of *in vitro* grown *Simmondsia chinensis* (Link) Schn. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 36 (4): 243~249
- Asada K (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 50: 601~639
- Basu A, Rhone M, Lyons TJ (2010). Berries: emerging impact on cardiovascular health. Nutr Rev, 68: 168~177
- Chakrabarty D, Park SY, Ali MB, Shin KS, Paek KY (2006). Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. Tree Physiol, 26 (3): 377~388
- Franck T, Kevers C, Gaspar T (1995). Protective enzymatic system against activated oxygen species compared in normal and vitrified shoot of *Prunus avium* L. raised *in vitro*. J Plant Growth Regul, 16: 253~256
- Hagege D, Kevers C, Salabert P, Gaspar T (1992). Protective systems against activated oxygen species compared in normal and fully habituated non organic sugarbeet calluses. In Vitro Cell Dev Biol, 28: 143~147
- Ivanova M, van Staden J (2008). Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of *in vitro* regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. Plant Cell Tiss Organ Cult, 92 (2): 227~231
- Kevers C, Franck T, Strasser RJ, Dommès J, Gaspar T (2004). Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. Plant Cell Tiss Organ Cult, 77 (2): 181~191
- Lee YH, Kim HS, Kim MS, Kim YS, Joung H, Jeon JH (2009). Reduction of shoot hyperhydricity in micropropagated potato plants via antisense inhibition of a *chCu/ZnSOD* gene. J Korean Soc Appl Biol Chem, 52 (4): 397~400
- Martinez C, Baccou JC, Bresson E, Baissac Y, Daniel JF, Jalloul A, Montillet JL, Geiger JP, Komi Assigbetsé, Nicole M (2000). Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. Plant Physiol, 122 (3): 757~766
- Mayor ML, Nestares G, Zorzoli R, Picardi LA (2003). Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue culture. Plant Cell Tiss Organ Cult, 72 (1): 99~103
- Neto CC (2007). Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. Mol Nutr Food Res, 51: 652~664
- Olmos E, Piqueras A, Ramón-Martínez Solano J, Hellín E (1997). The subcellular localization of peroxidase and the implication of oxidative stress in hyperhydrated leaves of regenerated carnation plants. Plant Sci, 130 (1): 97~105
- Olmos E, Hellín E (1998). Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. Sci Hort, 75: 91~101
- Piqueras A, Cortina M, Serna MD, Casas JL (2002). Polyamines and hyperhydricity in micropropagated carnation plants. Plant Sci, 162 (5): 671~678
- Reed BM, Wada S, DeNoma J, Niedz RP (2013). Mineral nutrition

- influences physiological responses of pear *in vitro*. In *Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 49 (6): 699~709
- Rojas-Martinez L, Visser RGF, Klerk GJ (2010). The hyperhydricity syndrome: waterlogging of plant tissues as a major cause. *Propag Ornament Plants*, 10 (4): 169~175
- Rowland LJ, Alkharouf N, Darwish O, Ogden EL, Polashock JJ, Bas-sil NV, Main D (2012). Generation and analysis of blueberry transcriptome sequences from leaves, developing fruit, and flower buds from cold acclimation through deacclimation. *BMC Plant Biol*, 12: 46
- Saher S, Piqueras A, Hellin E, Olmos E (2004). Hyperhydricity in micro-propagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiol Plant*, 120: 152~161
- Shah K, Kumar RG, Verma S, Dubey RS (2001). Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Sci*, 161 (6): 1135~1144
- Sreedhar RV, Venkatachalam L, Neelwarne B (2009). Hyperhydricity-related morphologic and biochemical changes in vanilla (*Vanilla planifolia*). *J Plant Growth Regul*, 28 (1): 46~57
- Tetsumura T, Matsumoto Y, Sato M, Honsho C, Yamashita K, Komatsu H, Sugimoto Y, Kunitake H (2008) Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Sci Hortic*, 119 (1): 72~74
- Vasudevan R, van Staden J (2011). Cytokinin and explant types influence *in vitro* plant regeneration of Leopard Orchid (*Ansellia africana* Lindl.). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 107 (1): 123~129
- van den Dries N, Gianni S, Czerednik A, Krens FA, de Klerk GJM (2013). Flooding of the apoplast is a key factor in the development of hyperhydricity. *J Exp Bot*, 64 (16): 5221~5230
- Wang YL, Wang XD, Zhao B, Wang YC (2007). Reduction of hyperhydricity in the culture of *Lepidium meyenii* shoots by the addition of rare earth elements. *J Plant Growth Regul*, 52 (2): 151~159
- Wu Z, Chen LJ, Long YJ (2009). Analysis of ultrastructure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 45 (4): 483~490
- Zifkin M, Jin A, Ozga JA, Zaharia I, Schemthaler JP, Gesells A, Abrams SR, Kennedy JA, Constabel CP (2012). Gene expression and metabolite profiling of developing highbush blueberry fruit indicates transcriptional regulation of flavonoid metabolism and activation of abscisic acid metabolism. *Plant Physiol*, 158: 200~224
- Ziv M (1990). Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds). *Micropropagation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 45~69