

## 石竹玻璃化苗的显微结构及气孔运动特性

高弘扬<sup>1</sup>, 夏秀英<sup>1,\*</sup>, 张静雪<sup>1</sup>, 辛学锐<sup>2</sup>

<sup>1</sup>大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁大连116024; <sup>2</sup>大连好地农业有限公司, 辽宁大连116024

**摘要:** 为从细胞水平研究组培苗玻璃化发生规律及机制, 用透射电子显微镜和扫描电子显微镜观察了石竹玻璃化苗解剖结构、细胞亚显微结构及气孔运动特性。结果表明, 与正常苗相比, 石竹玻璃化苗表皮蜡质层薄, 细胞膨大变形, 相邻细胞不能紧密嵌合; 气孔器畸形, 气孔密度降低, 开度增大。薄壁组织细胞排列散乱, 膨胀变形, 部分细胞破裂, 溶质外渗; 细胞中细胞质稀薄, 细胞器稀少, 内膜系统遭到破坏; 叶绿体中类囊体解体, 淀粉粒数量减少, 嗜铁颗粒体积增大、数量增多。输导组织发育不良, 导管管壁变薄、松弛皱缩, 导管腔出现塌陷、堵塞。气孔在脱落酸、黑暗及脱水处理下均不能正常关闭。说明玻璃化苗细胞过度吸水, 气孔运动异常, 细胞亚显微结构受到破坏, 组织结构及功能受损, 影响了气体的交换、水分的吸收及物质的合成和运输。

**关键词:** 石竹; 玻璃化; 显微结构; 气孔运动

## Microstructure and Stomata Movement Characteristic of Hyperhydric Pink (*Dianthus chinensis* L.)

GAO Hong-Yang<sup>1</sup>, XIA Xiu-Ying<sup>1,\*</sup>, ZHANG Jing-Xue<sup>1</sup>, XIN Xue-Rui<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China; <sup>2</sup>Dalian Good Farmland Limited Company, Dalian, Liaoning 116024, China

**Abstract:** This research was performed to investigate the occurrence regulation and mechanism of hyperhydricity from cellular level. Transmission electron microscopy and scanning electron microscope were used to observe the anatomical structure, subcellular ultrastructure and characteristics of stomatal movement during micro-propagation of pink plants. The results showed that compared with healthy plantlets, hyperhydric plantlets showed abnormal microstructure. Epicuticular wax was thinner, cells were swelling and deformed and therefore cells arrayed loosely. Stomatal apparatus was malformed and its density was decreased. Swelling deformation and arranging disorder occurred in parenchymatous cells, leading to cell rupture and solute leaking. Cytoplasm became rareer, organelles were lesser and the endomembrane system was damaged. In hyperhydric leaves, thylakoids were collapsed and the number of starch grains was decreased significantly in chloroplasts, osmiophilic granule became larger in size and more in number. Conducting tissue was maldeveloped and the cell wall became thin, loose and shrinking, which resulted in collapse and blocking appearing in lumen. The stoma could not close properly when treated with ABA, dark and dehydration. These results indicated that the subcellular ultrastructure of hyperhydric cellular was damaged and stomata movement was abnormal, which affected the exchange of air, the absorption of water as well as the synthesis and transport of substance.

**Key words:** pink (*Dianthus chinensis* L.); hyperhydricity; microstructure; stomata movement

石竹(*Dianthus chinensis*)为石竹科石竹属多年生草本植物, 是中国传统名花之一, 具有较高的观赏价值, 而且适应性强, 被广泛应用于园林绿化。石竹常采用扦插、分株等方法进行繁殖, 速度慢, 规模小, 且容易导致种性退化。组织培养技术不但可在短时间内获得大量优质种苗, 而且能保持物种优良性状, 从而满足市场对苗木品质及品种多样性的需求(陈利萍等2006)。组织培养技术对石竹种质资源保存及新品种培育也具有重要意

义。但石竹组培苗极易发生玻璃化, 是石竹大规模快速繁殖的主要障碍, 也是限制组织培养技术广泛应用的主要难题。

玻璃化是植物组织培养过程中特有的一种生理失调或生理病变(Rojas-Martinez等2010), 广泛发

收稿 2015-01-26 修定 2015-03-27

资助 国家级大学生创新创业训练计划项目(201410141351)。

\* 通讯作者(E-mail: xx47@dlut.edu.cn; Tel: 13504088133)。

生于不同物种中(Chakrabarty等2006; Wu等2009)。玻璃化苗形态、显微结构、生理生化等都发生明显的改变。如: 植株矮小、密集丛生, 叶片脆弱、卷曲、半透明; 叶片表皮蜡质层发育差, 栅栏组织细胞减少, 叶肉细胞间隙增大(Olmos和Hellm 1998; Jausoro等2010), 气孔畸形(Apóstolo和Llorente 2000); 植株含水量高、叶绿素含量低、酶活性异常、活性氧代谢紊乱(Delarue等1997; 吕敏等2014)。玻璃化会导致植物品质和繁殖率显著下降, 严重的玻璃化会导致植株死亡。

研究表明, 引发组培苗玻璃化的原因多种多样。通常认为玻璃化的发生是人工提供的培养基和培养条件不能完全符合不同种类培养物固有需求而引起的适应性问题(Kevers等2004)。在离体培养阶段, 植物生长在高相对湿度、低光照、少气体交换及与植物体不一致的渗透势等特殊的环境条件下, 这些条件都可能作为胁迫因素引起植株形态结构及生理生化的异常, 从而导致玻璃化的发生。目前, 虽然关于玻璃化诱因、影响因素和恢复方法的研究有很多报道(王爱芝等2009; 李海刚和孔祥生2010; Chen等2014), 但对玻璃化发生机制及规律仍缺乏全面了解(Ziv 1991)。

在细胞水平上研究玻璃化苗结构特点可揭示玻璃化苗形态畸形、代谢紊乱、无法继代培养的原因。目前, 相关研究已取得了一些进展, 如, 常有宏等(2011)通过对‘黄冠’梨玻璃化苗叶片超微结构的研究推断, 叶绿体数量减少、体积变小、类囊体松散无序、光合器官受到伤害可能是引起玻璃化苗光合产物积累减少、碳水化合物含量降低、后代增殖能力降低的重要原因。van den Dries等(2013)在拟南芥和勿忘我的研究中发现, 玻璃化苗气孔开度减少, 认为气孔关闭减轻了蒸腾作用, 反过来加重质外体充水, 导致玻璃化加剧。还有研究认为, 玻璃化叶片的异常形态与逆境导致的细胞水平的细胞膜组成及DNA含量变化相关(Franck等1998; Ochatt等2002)。

虽然玻璃化现象是在石竹中首次发现(Phillips和Matthews 1964), 但有关石竹玻璃化苗解剖结构及亚显微结构的研究却较少, 目前尚未有玻璃化苗气孔运动特性的报道。本研究观察了石竹玻璃化苗叶片、茎的显微结构变化及气孔运动特性,

为从细胞及亚显微结构水平深入研究玻璃化发生机制及规律, 开发有效预防措施及恢复技术提供有价值的参考。

## 材料与方法

### 1 材料

试验材料为石竹(*Dianthus chinensis* L.)玻璃化及正常试管苗, 由本实验室培养。培养基为MS附加 $5.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂及 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖, pH为5.6。培养室光照强度为 $30\sim 40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 光照时间为16 h, 温度为 $(25\pm 2)^\circ\text{C}$ 。

### 2 显微及亚显微结构观察

将叶片切成 $1 \text{ mm}\times 2 \text{ mm}$ 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, 制成半薄及超薄切片。半薄切片于Olympus IX 71倒置显微镜下观察并拍照; 超薄切片于JEM-2000EX型透射电子显微镜下观察并拍照。

### 3 扫描电镜样品制备及观察

从培养相同时间的玻璃化苗及正常苗上取相同部位的完整叶片及1 cm茎段, 放入2.5%戊二醛溶液, 抽真空使材料下沉, 固定24 h。经不同梯度的乙醇脱水, 叔丁醇干燥后, 置镀膜仪上喷金, 在KYKY2008B型扫描电镜下观察拍照。

观察黑暗对叶片气孔运动的影响时, 将组培苗置于完全黑暗处5 h后取叶片进行固定; 观察ABA对气孔运动的影响时, 取光下培养的组培苗叶片, 浸泡在含有 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA的Mes缓冲液中3 h (Trejo等1993), 迅速放入2.5%戊二醛溶液中固定。观察脱水处理对气孔运动的影响时, 取玻璃化及健康的整株组培苗, 放入无菌干燥空瓶中, 放置2 h后取叶片固定。

## 实验结果

### 1 石竹玻璃化苗形态特征

石竹玻璃化后, 苗形态发生畸变、生长及分化能力下降。如图1所示, 与正常苗相比, 石竹玻璃化苗植株矮小、丛生; 节间缩短; 茎叶半透明水渍状, 脆弱易碎, 叶片肥厚肿胀; 基部愈伤组织增

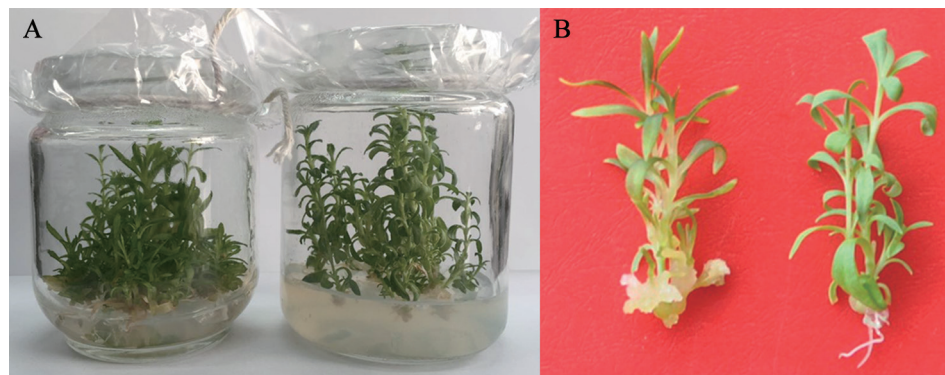


图1 石竹玻璃化试管苗的形态

Fig.1 Difference in the morphology between hyperhydric plants and normal plants of pink

A: 玻璃化(左)和正常(右)石竹生长状态; B: 玻璃化(左)和正常(右)石竹形态。

多、不能生根。

## 2 石竹玻璃化苗茎及叶片解剖结构特征

石竹玻璃化苗茎叶解剖结构发生改变, 保护组织、同化组织及输导组织结构均异常。正常石竹苗茎(图2-A)表皮细胞椭圆形、排列整齐紧密, 表面覆盖蜡质层, 气孔清晰可见; 皮层细胞排列紧密有序, 细胞间空隙均匀; 维管柱中可见多束维管束呈单环状排列, 木质部与韧皮部较为发达; 髓部细胞较大, 多呈球形, 中央形成髓腔。玻璃化苗茎(图2-B)表皮细胞膨大变形, 蜡质层不明显, 未见明显气孔; 皮层细胞肿胀畸形, 排列散乱, 部分细胞破裂, 溶质外渗; 维管柱外层细胞膨大, 木质部和韧皮部发育不良、排列杂乱无序; 髓部细胞膨大、形状不规则, 没有形成髓腔。

正常苗叶片(图2-C)表皮细胞大小均匀、排列整齐、嵌合紧密, 气孔器发育良好, 气孔下腔空隙明显; 叶肉细胞形状规则, 排列较紧密, 细胞中叶绿体丰富; 维管组织分化良好, 导管、筛管排列整齐、清晰可辨, 维管束鞘细胞嵌合紧密, 可见传递细胞。玻璃化苗叶片(图2-D)表皮细胞变形、相邻细胞不再紧密嵌合, 气孔器畸形、气孔下腔体积变小; 叶肉细胞拉长变形, 排列散乱, 叶绿体数量减少; 维管组织发育不良, 导管分子排列散乱, 维管束鞘细胞膨大变形, 未见传递细胞分化。

## 3 石竹玻璃化苗叶肉细胞亚显微结构变化

经透射电镜观察发现, 玻璃化苗叶肉细胞超微结构异常, 细胞器及内膜系统遭到破坏, 呈现衰老症状。正常试管苗叶肉细胞(图3-A)结构完整,

细胞质浓厚, 细胞器丰富, 内膜系统结构完整, 叶绿体数量较多; 叶绿体(图3-C)双层膜结构完整, 类囊体片层清晰可见, 排列整齐, 内含较多淀粉粒; 线粒体结构完整。玻璃化苗叶肉细胞(图3-B)体积增大, 细胞质稀薄, 细胞器稀少, 内膜系统散乱, 叶绿体数量较少; 叶绿体(图3-D)变形, 叶绿体膜及类囊体片层结构模糊, 含有较少淀粉粒, 嗜铁颗粒体积增大、数量增多; 线粒体内膜散乱, 部分膜结构解体。

## 4 石竹玻璃化苗叶片及茎的扫描结构特性

玻璃化苗茎、叶表皮结构也发生了明显改变。正常试管苗叶片(图4-A)表面覆盖蜡质; 表皮细胞呈不规则多角形, 细胞饱满, 排列紧密、规则, 相互嵌合; 气孔发育良好, 开放正常; 保卫细胞(图4-B)肾形, 下陷于叶表。玻璃化试管苗叶片(图4-C)表面蜡质较少; 表皮细胞变形、肿胀拉长, 下陷于叶表面, 细胞间界限模糊, 细胞密度明显低于正常苗; 气孔结构受损, 气孔密度降低, 气孔短轴与长轴比明显增大, 开度增大; 保卫细胞(图4-D)呈不规则半月形, 突出于叶表或者与叶表相平, 多数保卫细胞肿胀破裂, 内容物外渗, 堵住气孔。

正常苗茎(图5-A)表皮结构完整, 细胞排列整齐、紧密, 气孔下陷, 保卫细胞肾形; 而玻璃化苗茎(图5-B)表皮细胞皱缩、变形, 细胞间隙增大, 保卫细胞畸形, 破裂, 内容物渗出堵住气孔。正常苗茎横切面(图5-C)皮层、韧皮部、木质部和髓层次清晰, 细胞排列整齐、饱满, 细胞壁厚实, 导管管壁光滑、管腔清晰; 而玻璃化试管苗(图5-D)各结

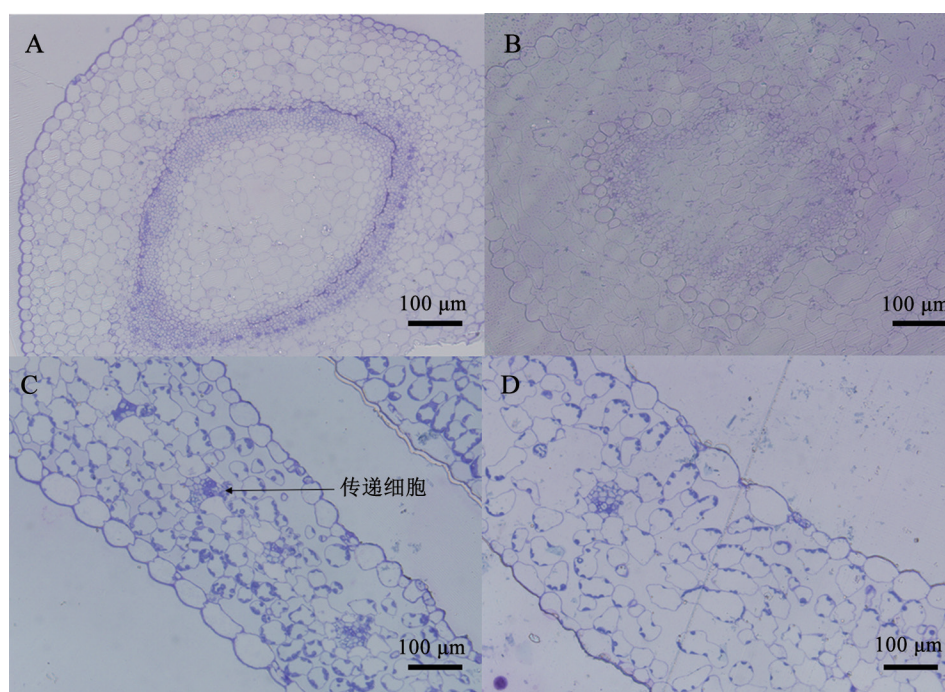


图2 石竹正常苗和玻璃化苗显微结构

Fig.2 Difference in the microstructure between hyperhydric plants and normal plants of pink

A: 正常苗茎横切; B: 玻璃化苗茎横切; C: 正常苗叶片横切; D: 玻璃化苗叶片横切。

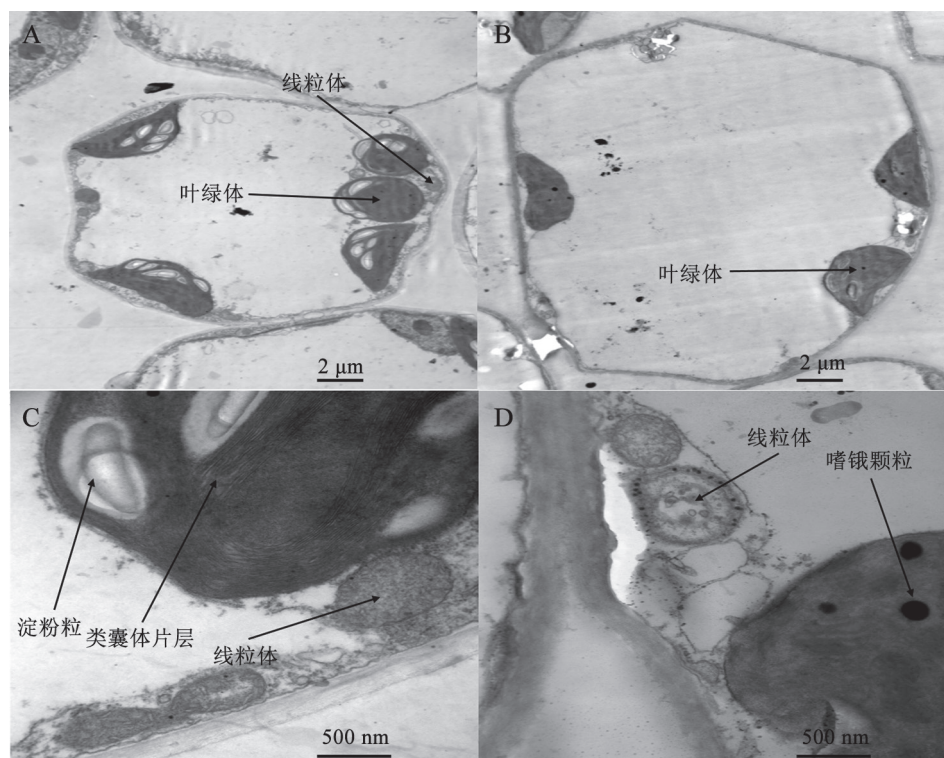


图3 石竹正常苗和玻璃化苗叶肉细胞超微结构比较

Fig.3 Comparison in ultrastructure between mesophyll cells from hyperhydric leaves and normal leaves

A: 正常苗叶肉细胞; B: 玻璃化苗叶肉细胞; C: 正常苗叶绿体; D: 玻璃化苗叶绿体。

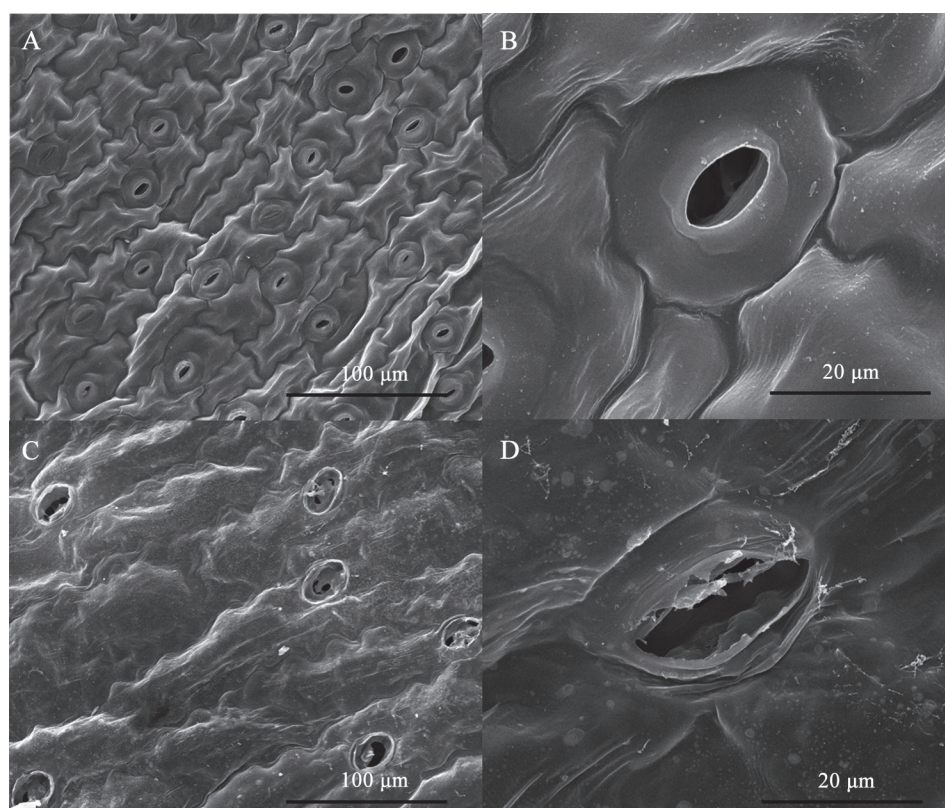


图4 石竹正常苗和玻璃化苗叶片扫描结构

Fig.4 Scanning electron microscopy micrographs of the abaxial surface of normal leaves and hyperhydric leaves

A: 正常苗叶片; B: 正常苗气孔; C: 玻璃化苗叶片; D: 玻璃化苗气孔。

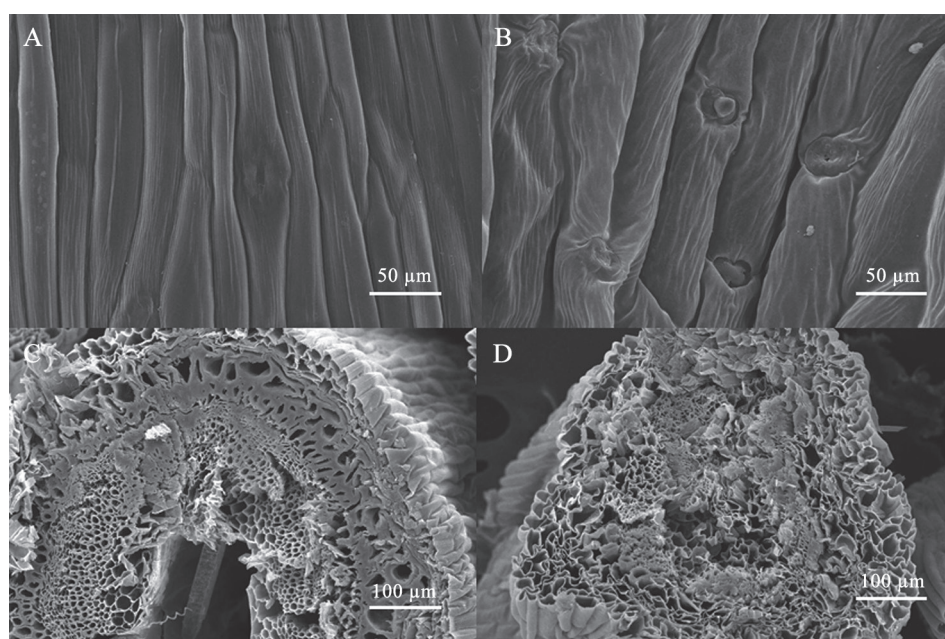


图5 石竹正常苗和玻璃化苗茎扫描结构

Fig.5 Scanning electron microscopy micrographs of stems from normal plants and hyperhydric plants

A: 正常苗茎表皮结构; B: 玻璃化苗茎表皮结构; C: 正常苗茎横切面结构; D: 玻璃化苗茎横切面结构。

构排列散乱、界限不清, 细胞壁较薄, 导管管壁松弛皱缩, 管腔出现塌陷、堵塞。

### 5 石竹玻璃化苗叶片气孔运动特性变化

气孔是植物气体和水分交换的主要通道, 气孔的大小及密度与蒸腾作用、光合作用和呼吸作用密切相关。气孔运动主要受保卫细胞液泡水势的调节, 光照、温度、水分、CO<sub>2</sub>浓度及脱落酸是调节气孔运动的主要因素(匡逢春等2003; 钱宝云

和李霞2013)。气孔运动对外界环境的响应也与植物对逆境的适应及响应关系密切。本部分实验用扫描电镜观察了玻璃化苗叶片经黑暗、1 μmol·L<sup>-1</sup> ABA及脱水处理后气孔运动的特性, 发现黑暗、脱落酸、脱水都可以诱导正常苗叶片气孔关闭(图6-A、C、E); 而玻璃化苗的气孔在黑暗、ABA、脱水处理后, 只有少量气孔完全闭合, 多数气孔只是开度减小, 不能正常关闭(图6-B、D、F)。

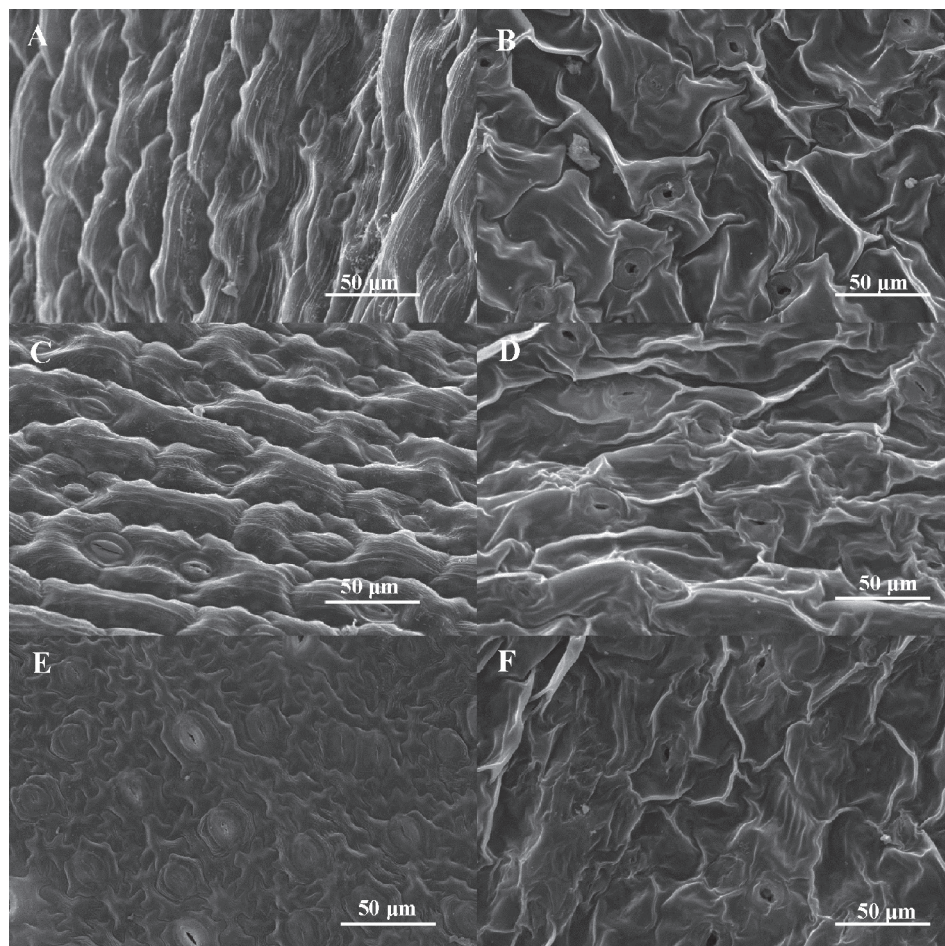


图6 石竹正常苗和玻璃化苗叶片气孔对外界环境的响应

Fig.6 Difference in the stomatal response to the external environment between hyperhydric leaf and normal leaf

A: 正常苗暗处理; B: 玻璃化苗暗处理; C: 正常苗ABA处理; D: 玻璃化苗ABA处理; E: 正常苗脱水处理; F: 玻璃化苗脱水处理。

## 讨 论

组培苗可从异养生长逐渐过渡到自养生长, 其同化组织的光合能力影响植株的生长、发育和分化; 输导组织在植物体内担负物质长途运输及物质的重新分配和转移功能, 同时还具有支持作用。同化组织和输导组织细胞结构异常, 会直接

影响到植株的物质代谢及能量代谢进而影响其生长发育。许多研究发现, 玻璃化苗叶片及茎解剖结构及细胞亚显微结构发生改变: 玻璃化苗栅栏组织细胞层数减少或缺失(郑秀芳等2014)、海绵组织形状不规则、细胞间隙变大(Jausoro等2010); 叶肉细胞叶绿体数量减少, 类囊体解体(Yu等2011); 维管束退化(Chakrabarty等2006; Sreedhar等

2009)。本研究也观察到石竹玻璃化苗细胞亚显微结构发生了明显的改变: 叶肉细胞中叶绿体数量减少、线粒体结构破坏、内质网解体, 叶绿体中类囊体发育不良或退化、淀粉粒数量减少; 茎、叶输导组织发育不良, 韧皮部筛管及木质部导管数量减少, 排列紊乱, 导管管壁变薄、塌陷, 木纤维及韧皮纤维发育不良。细胞结构与其功能相适应, 毫无疑问, 细胞亚显微结构的这些异常会直接影响到各细胞器的功能, 造成物质合成、运输、转移及电子传递等功能受阻, 引起体内物质代谢、能量代谢、基因表达及调控的紊乱, 进而导致植物体形态学上的异常症状及生理功能丧失。石竹玻璃化苗形态异常, 生长、分化及抗逆能力下降可能都是由于细胞亚显微结构的异常导致。

嗜锲体指细胞超微结构中能强烈吸附锲酸的颗粒, 在细胞质、线粒体、质体、叶绿体中均可见嗜锲体。在叶绿体中, 嗜锲体是脂类物质的贮存库, 当叶绿体在光下形成类囊体时, 嗜锲体减少, 当叶片衰老或在逆境胁迫下, 类囊体解体, 嗜锲体又大量出现, 因此, 嗜锲体的多少, 可作为叶绿体光合膜完整的指标之一。嗜锲体也能表示细胞受破坏程度(赵晨晨等2014), 在逆境胁迫下及衰老的植株体内均可见嗜锲体增多或体积增大的现象。本研究中, 玻璃化苗叶绿体及线粒体中也见嗜锲颗粒增多、体积增大现象, 表现出衰老细胞的特征, 表明玻璃化苗细胞已受到破坏, 已经开始走向衰老死亡。另外, 玻璃化苗细胞其他亚显微结构也呈现与衰老相似的特征, 推测玻璃化的发生可能与逆境胁迫引起的细胞衰老或死亡相关。但其具体关系、影响衰老的因素是否也会影响玻璃化的发生、延迟衰老的措施是否能够用于预防及减少玻璃化发生或玻璃化苗的恢复等问题还有待于进一步的研究。

尽管玻璃化的发生是不可预知的, 而且许多因素都可以诱导玻璃化, 但目前人们公认逆境胁迫是试管苗玻璃化的主要诱因(Debergh等1981; 周书利等2013)。在离体培养过程中, 由于剪切及培养条件的剧烈变化, 如高湿、气体积累、营养或激素组成的改变、渗透势的变化等, 使植物体暴露在各种逆境胁迫中, 尽管大多数培养物能够适应这些环境的变化, 但有些植物体由于各种原因

不能及时调整自身的信号及代谢, 导致其在解剖结构、生理代谢、基因表达等水平上发生改变, 最终产生玻璃化苗(Debergh等1992)。近年来, 逆境胁迫引起的过氧化氢及活性氧积累在玻璃化形成及发展中的作用得到了证实(Saher等2004; Wang等2007)。多数研究认为, 细胞及组织过度积累水分引起缺氧是造成活性氧大量产生的主要原因(Asada 1999; Rojas-Martinez等2010)。Olmos和Hellin (1998)认为玻璃化苗细胞超微结构改变是由于水的过度积累和随后诱导的氧化应激的结果, 玻璃化苗解剖学和形态学上的症状都是由于质外体积水引起的二次事件。本研究中, 石竹玻璃化苗最显著的显微结构特征是细胞膨胀变形, 有的细胞甚至破裂, 内容物外渗。这些特征最有可能是细胞过度吸水导致。研究还发现, 石竹玻璃化苗茎叶表面蜡质层减少, 表皮细胞排列疏松, 气孔密度降低, 保卫细胞内容物外渗堵塞气孔, 气孔下腔空隙变小。这些结构变化都会影响植株与外界的气体交换及水分吸收。因此认为, 水分代谢失衡、细胞过度积累水分可能也是石竹组培苗玻璃化发生及发展的关键因素。由于水分积累, 细胞与外界气体交换不畅, 细胞内部信号分子及氧气、水分状况发生改变, 引起信号传递障碍及低氧胁迫, 重要生理功能及氧化平衡失调, 导致玻璃化异常形态出现。

虽然大量研究表明细胞及组织过度积累水分是玻璃化产生的主要原因, 但目前细胞过度积累水分的机制还不明确。蒸腾作用是植株吸收水分的主要动力, 蒸腾作用加强, 植株吸收水分能力增强。气孔是水分蒸腾的主要通道, 在调节植物水分代谢中起着非常重要的作用(Apóstolo和Llorente 2000; Picoli等2001; 郭瑶琳等2014)。许多研究发现玻璃化苗气孔开度发生变化, 本研究推测, 气孔可能在细胞过度吸水中发挥了重要作用。为探讨玻璃化苗过度吸水的细胞学机制, 本研究观察了石竹玻璃化苗叶片保卫细胞、气孔器结构及气孔运动的变化, 结果发现石竹玻璃化苗气孔开度增加, 在黑暗、脱水及脱落酸诱导下不能正常关闭。而在先前的研究中发现, 石竹组培苗继代培养时, 转接在新鲜培养基中的正常苗叶片的气孔最初呈关闭状态, 说明气孔关闭可能是组培苗响

应剪切及环境剧烈变化等胁迫的一种保护机制,因而推测,气孔不能正常关闭可能是组培苗最初过度吸水的原因。在离体培养或继代转接的最初阶段,暴露在各种逆境胁迫中的部分石竹组培苗,由于ABA、乙烯及过氧化氢等参与的逆境信号转导通路发生异常,不能及时响应逆境胁迫信号,保护机制不能启动,导致气孔不能正常关闭,植株散失的水分增多,增加了叶肉细胞与茎部导管间的水势差,促使植株不断从培养基中吸收水分,导致这部分植株过度吸水,生理功能失调。而最初水分平衡的破坏若不能及时得到恢复,可能会引起氧化平衡的丧失,使细胞结构及功能受损,进一步加剧水分吸收与散失的不平衡,引起随后的水分过度积累。但植物气孔应答环境因子的机制很复杂(郭瑶琳等2014;陈骏和梁宗锁2013),尤其对于尚未生根、培养在密闭容器中的组培苗,其吸收水分的机制及气孔调控的机理还有待深入研究及探讨。对于玻璃化苗气孔开度的变化,有些研究也得出不同的结论,如van den Dries等(2013)的研究发现,拟南芥、勿忘我玻璃化植株的气孔开度减小,在康乃馨中还发现玻璃化苗气孔关闭的现象(Ziv和Ariel 1994)。气孔在玻璃化形成中的真正作用,气孔运动对玻璃化形成的影响是否存在物种差异,导致信号转导障碍的原因,ABA、乙烯及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>谁是最初的信号物质,以及三者的关系如何,该信号通路中其他传递体的特性及功能如何,都有待进一步的实验去揭示或加以验证。

### 参考文献

- 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
- 陈利萍,王艳菊,葛亚明,赵成雨(2006). 石竹科植物组织培养与细胞工程. 细胞生物学杂志, 27 (5): 545~548
- 陈骏,梁宗锁(2013). 气孔导度对空气湿度的反应的数学概括及其可能的机理. 植物生理学报, 49 (3): 241~246
- 郭瑶琳,王俊斌,丁博,李明,陈帅君,张卫国,黄国中,谢晓东(2014). 低空气湿度下气孔运动的调控. 植物生理学报, 50 (8): 1144~1150
- 匡逢春,萧浪涛,夏石头(2003). 脱落酸对植物气孔运动的调控作用. 植物生理学通讯, 39 (3): 262~266
- 李海刚,孔祥生(2010). 牡丹试管苗玻璃化的研究. 生物学杂志, 27 (5): 35~37
- 吕敏,夏秀英,徐品三,李波,郭照东(2014). 蓝莓玻璃化试管苗的显微结构及生理生化特性变化. 植物生理学报, 50 (4): 453~460
- 钱宝云,李霞(2013). 植物气孔运动调节的新进展. 植物研究, 33 (1): 120~128
- 王爱芝,沈海龙,张鹏,尹永花,李长海(2009). 花楸组织培养中玻璃化现象的发生与防治. 东北林业大学学报, 37 (10): 18~22
- 赵晨晨,黄福灯,龚盼,杨茜,程方民,潘刚(2014). 水稻叶片早衰突变体 *osled* 的生理特征与基因定位. 作物学报, 40 (11): 1946~1955
- 郑秀芳,高海宁,张超强,李彩霞(2014). 披针叶黄华试管正常苗与玻璃化苗茎叶的解剖特征比较. 草业科学, 31 (4): 668~671
- 周书利,汤浩茹,陈清,张晓楠,于定群(2013). 不同因素对草莓玻璃化试管苗恢复的影响. 生物技术通报, (9): 89~93
- 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-Pl*, 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 Biol*, 50 (1): 601~639
- Chakrabarty D, Park S, Ali M, Shin K, Paek K (2006). Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. *Tree Physiol*, 26 (3): 377~388
- Chen R, Jin Y-H, Li Q-L, Chen X-L, Yang Y-S, Wu H (2014). Some effective methods for dealing with the problem of hyperhydricity in cloning purple coneflower. In: Purshotaman E (ed). 2013 International Conference on Biological, Medical and Chemical Engineering (BMCE 2013), Hong Kong, China, 2013. Lancaster, USA: DEStech Publications, Inc, 319~325
- 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*, 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
- Delarue M, Santoni V, Caboche M, Bellini C (1997). Cristal mutations in *Arabidopsis* confer a genetically heritable, recessive, hyperhydric phenotype. *Planta*, 202 (1): 51~61
- Franck T, Crèvecoeur M, Wuest J, Greppin H, Gaspar T (1998). Cytological comparison of leaves and stems of *Prunus avium* L. shoots cultured on a solid medium with agar or gelrite. *Biotech Histochem*, 73 (1): 32~43
- Jausoro V, Llorente BE, Apóstolo NM (2010). Structural differences between hyperhydric and normal *in vitro* shoots of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC) Mattos (Bignoniaceae). *Plant Cell Tiss Org*, 101 (2): 183~191
- Kevers C, Franck T, Strasser RJ, Dommes J, Gaspar T (2004). Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell Tiss Org*, 77 (2): 181~191
- Ochatt SJ, Muneaux E, Machado C, Jacas L, Pontécaille C (2002). The hyperhydricity of *in vitro* regenerants of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) is linked with an abnormal DNA content. *J Plant Physiol*, 159 (9): 1021~1028
- Olmos E, Hellin E (1998). Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. *Sci Hor*



- tic-Amsterdam, 75 (1): 91~101
- Phillips DJ, Matthews GJ (1964). Growth and development of carnation shoot tips *in vitro*. Bot Gaz, 125 (1): 7~12
- Picoli EA, Otoni WC, Figueira ML, Carolino S, Almeida RS, Silva EA, Carvalho CR, Fontes EP (2001). Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). Plant Sci, 160 (5): 857~868
- Rojas-Martinez L, Visser RG, de Klerk G-J (2010). The hyperhydricity syndrome: waterlogging of plant tissues as a major cause. Propag Ornament Plants, 10 (4): 169~175
- Saher S, Piqueras A, Hellin E, Olmos E (2004). Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. Physiol Plantarum, 120 (1): 152~161
- 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
- Trejo CL, Davies WJ, Ruiz L (1993). Sensitivity of stomata to abscisic acid (an effect of the mesophyll). Plant Physiol, 102 (2): 497~502
- van den Dries N, Gianni S, Czerednik A, Krens FA, de Klerk G-JM (2013). Flooding of the apoplast is a key factor in the development of hyperhydricity. J Exp Bot, 64 (16): 5221~5230
- Wang Y-L, Wang X-D, Zhao B, Wang Y-C (2007). Reduction of hyperhydricity in the culture of *Lepidium meyenii* shoots by the addition of rare earth elements. Plant Growth Regul, 52 (2): 151~159
- Wu Z, Chen L, Long Y (2009). Analysis of ultrastructure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots. In Vitro Cell Dev-Pl, 45 (4): 483~490
- Yu Y, Zhao Y-Q, Zhao B, Ren S, Guo Y-D (2011). Influencing factors and structural characterization of hyperhydricity of *in vitro* regeneration in *Brassica oleracea* var. *italica*. Can J Plant Sci, 91 (1): 159~165
- Ziv M (1991). Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. Micropropagation: technology and application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 45~69
- Ziv M, Ariel T (1994). Vitrification in relation to stomatal deformation and malfunction in carnation leaves *in vitro*. In: Lumsden PJ, Nicholas J, Davies WJ (eds). Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 143~154