

微环境调控对灯盏花无糖组培苗显微结构的影响*

陈疏影,王 荔**,杨艳琼,黄 平,杨 凯,刘 波

(云南农业大学农学与生物技术学院,云南 昆明 650201)

摘要:以灯盏花组培苗为材料,采用扫描电镜和光学显微镜对灯盏花无糖组培苗及有糖组培苗(CK)的叶表皮毛、气孔、蜡质层和根部的显微结构进行了比较分析。研究表明:灯盏花无糖组培苗根、叶的显微结构与有糖组培苗有明显区别,无糖组培微环境调控技术对提高组培苗的保水能力及适应外界环境的能力具有重要作用。

关键词:灯盏花;无糖组培;显微结构;扫描电镜

中图分类号:S 567. 239. 01 **文献标识码:**A **文章编号:**1004 - 390X(2007)02 - 0183 - 05

Effect of Micro-environment Control on Microstructure of Plantlet in Sugar-free Tissue Culture of *Erigeron breviscapus*

CHEN Shu-ying, WANG Li, YANG Yan-qiong, HUANG Ping, YANG Kai, LIU Bo

(Faculty of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: In this research, adventitious bud of *Erigeron breviscapus* were used as materials. And analyzed the four characteristics of the plantlet of *Erigeron breviscapus* cultured under the condition of sugar-free and sugar (CK) by using scanning electron microscopy (SEM) and optical microscopy, including the foliar trichome, stomatal, epicuticular wax, the microstructure of roots. Results showed that the microstructure of roots and leaf have the obvious difference between them, and the micro-environment control technology has the important effect to improve the capability of root to hold water and adjust to the external environment in sugar-free tissue culture.

Key words: *Erigeron breviscapus*; sugar-free tissue culture; microstructure; scanning electron microscopy (SEM)

灯盏花又名短葶飞蓬 [*Erigeron breviscapus* (Van.) Hand. Mazz], 属菊科 (Compositae) 飞蓬属 (*Erigeron* L.) 植物^[1]。有活络止痛,散寒祛风之功效,被临床称为“脑血管疾病的特效药”,并已列入中国药典。目前,灯盏花的研究报道主要限于对灯盏花的全草化学成分的分析鉴定,提取物及制剂的工艺、药理和临床应用,生物学特性、人工栽培技术^[2-5]、组织培养技术^[6-10]等方面的研究。但对于灯盏花组培快繁技术体系的建立,技术还不够完善。传统的组织培养中必须加入糖作为植株的碳源,在此种环境中进行培养,种苗长期以异养生长

为主,致使叶片表层结构发育差,气孔开闭功能差,叶片小,叶绿素含量低,最终使小植株丧失了光合作用的能力,或者由于环境条件的抑制光合能力较低^[11,12]。在生产中主要表现在:生产周期长,污染严重,驯化时死苗率高等。对于灯盏花无糖组培方面的研究,目前尚未见报道。

无糖组培快繁工厂化技术是 20 世纪 80 年代末,由日本千叶大学古在丰树教授发明的。是一种全新的植物组织培养技术,是环境控制技术和组培技术的有机结合。其特点在于:以 CO₂ 代替糖作为植物体的碳源,利用工程技术手段调节组培微环

收稿日期:2007 - 01 - 05

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30360122)。

** 通讯作者

作者简介:陈疏影(1972 -),男,讲师,主要从事植物生物化学与植物生理学研究。

境的空气、CO₂ 浓度、光照、湿度等影响因子,促进植物体自养生长^[13-15]。CO₂ 是植物进行光合作用的重要原料,同时又是呼吸作用的产物,CO₂ 浓度变化必然影响到有关植物生长的生理过程。一般情况下,当 CO₂ 浓度增加时,植物光合作用增强,光合时间延长,光能利用率提高,光补偿点明显下降^[16-20];而此时气孔阻力增加,气孔导度减小,蒸腾速率减小,呼吸速率降低,水分利用效率增加,叶面温度增加。本文研究了在微环境控制条件下对灯盏花无糖组培苗显微结构的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

相同叶龄的灯盏花无糖组培苗与传统有糖组培苗的根和叶片。

1.2 方法

1.2.1 电镜扫描法

从新鲜叶片叶脉两侧的中部,切下边长约 5 mm×5 mm 叶下表皮样品,,蒸馏水洗净后立即

放入 4% 戊二醛的小瓶中固定 2 d(约 72 h),用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液清洗 3 次,每次 10 min,然后用 30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%,100% 的酒精依次梯度脱水,每次 10~15 min,后用乙酸异戊脂置换,每次 15 min,取出材料置 HCP-2 型临界点干燥仪中干燥,达到临界状态后保持 20~30 min,用双面胶固定于操作台上,在日立 E-1010 离子溅射仪中溅射镀金膜,于加速电压 25 kV 下,KYKY-EM3200 型扫描电镜下观察拍照。

1.2.2 石蜡切片法

石蜡包埋灯盏花叶片和根样品,切片后于高倍光学显微镜下观察灯盏花叶片、根横切面结构。

2 结果与分析

2.1 微环境控制对灯盏花叶表皮形态特征的影响

电镜观察结果表明,在微环境调控下获得的灯盏花无糖组培苗,其叶片的表皮毛、气孔、蜡质等表皮特征与传统组培苗的叶片有较大差异(见表 1,图 1,图 2)。

表 1 灯盏花无糖组培苗与有糖组培苗叶表皮特征统计

Tab. 1 The characteristic statistical graph of leaf epidermis of the plantlet of *Erigeron breviscapus* cultured under the condition of sugar-free and sugar

	表皮毛平均/(根·mm ⁻²) the average foliar trichome number	气孔平均数/(个·mm ⁻²) the average stomatal number	开放气孔占总气孔 比例/% opening/total of stomatal	蜡质层 epicuticular wax
无糖组培苗 sugar-free	69	411	31	有(丰富)
有糖组培苗 sugar tissue	24	189	91	几乎无

(1) 表皮毛。灯盏花叶的表皮毛属长单毛类型的非腺毛,基部粗大,顶端尖细^[21,22]。灯盏花无糖组培苗叶下表皮的表皮毛远多于有糖组培苗叶(表 1,图 1)。植物叶表皮毛增加了叶表皮组织保护层的厚度,减少热量和水分的丧失,可提高植物对较干燥环境的适应能力。

(2) 气孔。气孔是植物进行蒸腾作用的器官,是叶片与外界环境之间水分和气体交换的通道。气孔密度越大越有利于蒸腾散热和增强被动吸水的能力,同时有利于气体交换,保持较强的光合作用^[23];气孔需根据植物体的水分状况开闭,如长期处于开放状态将使植物失水而枯萎。灯盏花无糖组培苗叶下表皮气孔密度远大于有糖组培苗叶,且气孔开度小,而有糖组培苗叶片绝大多数气孔几乎都处于完全开放状态(表 1,图 1),失水速率较快。因此,无糖组培苗对较干燥环境的适应能力更强。

(3) 蜡质层。植物叶片表皮蜡质可以限制非气孔的水分散失,对保持叶片水分含量起着重要的作用^[24]。灯盏花无糖组培苗叶下表皮表面布满波纹状蜡质层,而有糖组培苗叶下表皮表面仅在气孔旁有少量蜡质残留(表 1,图 2),其余部份无蜡质层覆盖,极易失水。

2.2 微环境控制对灯盏花叶片解剖结构的影响

从图 3 和图 4 可以看出:灯盏花无糖组培苗叶片较厚,外表皮细胞排列紧密完整,栅栏组织细胞变长,排列紧密;输导组织分区明显,结构紧密而完整。而有糖组培苗的细胞排列疏松,栅栏组织小而稀,外表皮细胞多处出现破裂;输导组织结构不完整,与周围组织分区不明显。

2.3 微环境控制对灯盏花组培苗根显微结构的影响

从图 5 以看出,灯盏花无糖组培苗的根部细胞排列紧密,组织分区明显,已显示髓部分化,可以

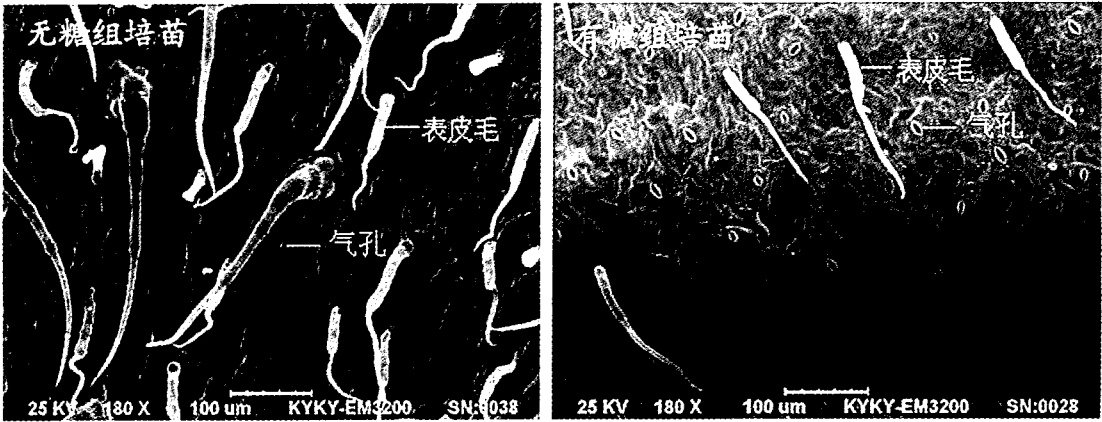


图 1 灯盏花组培苗叶下表皮扫描电镜照片 (180×)
Fig. 1 SEM of leaf abaxial epidermis of the plantlet of *Erigeron breviscapus* cultured under the condition of sugar-free and sugar (180×)

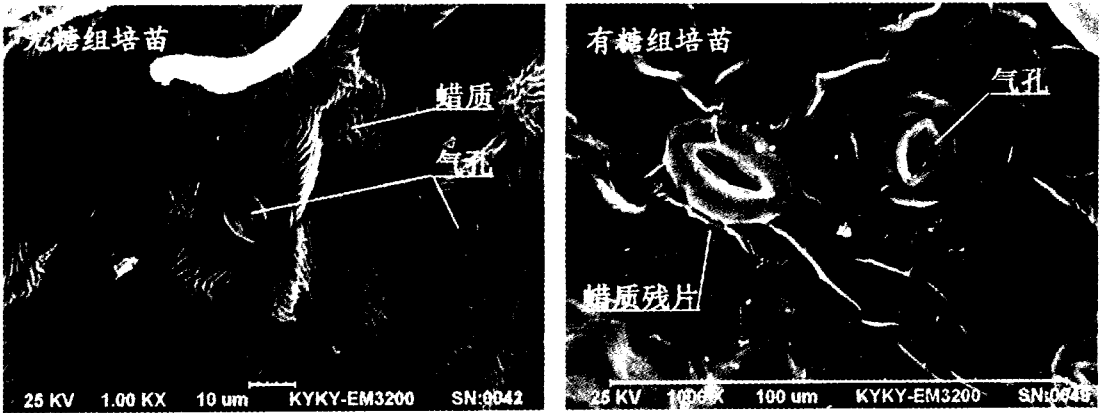


图 2 灯盏花组培苗叶下表皮扫描电镜照片 (1 000×)
Fig. 2 SEM of leaf abaxial epidermis of the plantlet of *Erigeron breviscapus* cultured under the condition of sugar-free and sugar (1 000×)

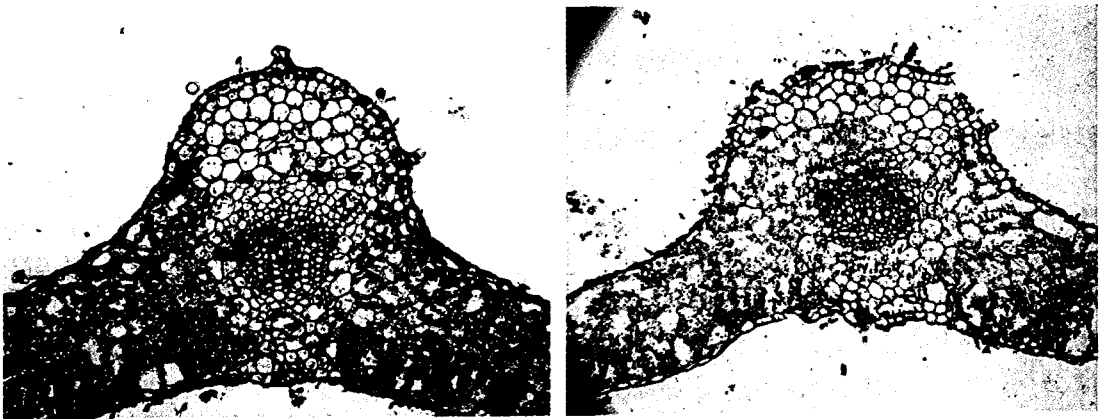


图 3 灯盏花组培苗叶主脉切面光镜照片 (400×)
Fig. 3 The optical microscopy of leaf main veins of the plantlet of *Erigeron breviscapus* cultured under the condition of sugar-free and sugar (400×)

看到明显的疏导组织、髓射线和凯氏带,初生组织和次生组织已分化;而有糖组培苗的根部细胞排列

稀疏,髓的分化不明显,疏导组织不发达,初生组织和次生组织分化不明显,看不到凯氏带。

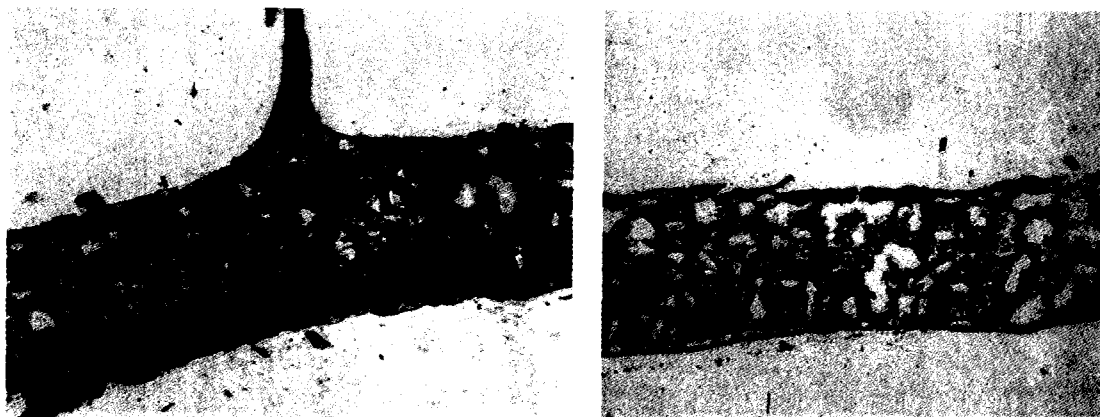


图 4 灯盏花组培苗叶切面(光学显微镜照片 400×)

Fig. 4 Leaf of the plantlet of *Erigeron breviscapus* cultured under the condition of sugar-free and sugar (The picture of optical microscopy 400×)

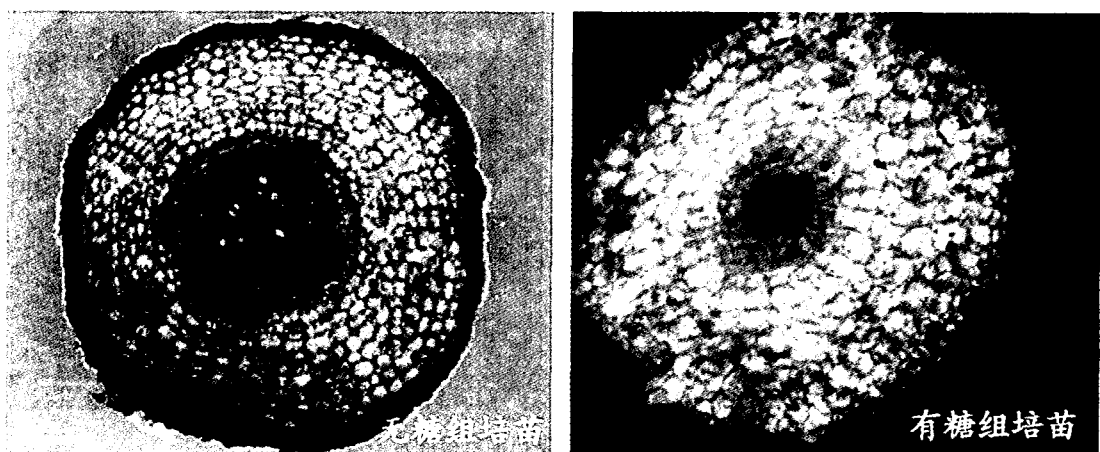


图 5 灯盏花组培苗根切面(光学显微镜照片 400×)

Fig. 5 Root of the plantlet of *Erigeron breviscapus* cultured under the condition of sugar-free and sugar (The picture of optical microscopy 400×)

3 讨论

3.1 微环境控制对灯盏花无糖组培苗叶表皮形态特征的影响

植物叶表生长的表皮毛可通过反射强光、加快散热以减少水分蒸腾,对植物在较干燥气候条件下保持水分具有一定的作用^[25]。叶片上的气孔是植株与外界环境进行水分和气体交换的主要通道;气孔的开度、大小和密度等都是重要的生理指标,对植物的蒸腾、光合及呼吸作用都有直接的影响。叶表面蜡质能防止叶片在较干燥环境下过度失水,提高植株对外界环境的适应能力^[26,27]。

组培苗移栽前,需从高湿的温室环境转移到较干燥的室外环境进行驯化,此时传统有糖组培苗叶片因叶表面形态特征不利于植株保水,常导致驯化移栽时

小植株大量失水枯死,这也是植物传统有糖组织培养产业化生产中面临的一大难题。从电镜观察结果得知,在微环境调控下生长的灯盏花无糖组培苗,其叶片气孔密度大,开度小,有较多的表皮毛和较完整的蜡质层,这些叶表皮形态特征使其在保水方面比传统方式下培养的有糖组培苗具明显优势,对提高组培苗移栽时植株的成活率具有重要作用。

3.2 微环境控制对灯盏花无糖组培苗叶片结构的影响

与传统方式下培养的有糖组培苗叶片结构相比,在微环境调控下生长的灯盏花无糖组培苗叶片解剖结构具有相对较厚的栅栏层和海绵层,细胞排列紧密,间隙小,并有一定厚度的角质层,这些都有利于防止水分经非气孔途径散失。结构完整的输导组织也使叶片在缺水时能迅速从根部获得水分。

3.3 微环境控制对灯盏花无糖组培苗根显微结构的影响

根是植株吸收水分和营养成份的主要器官,具有吸收、运输、合成、防御等功能。在传统方式下培养的有糖组培苗,常出现根部生长发育不良,如:无根,根与输导系统不相通,根很少或无须根等现象。而在微环境调控下进行光自养生长的灯盏花无糖组培苗的根部通常发育正常,根系发达。发育完善的根部输导系统能在植株缺水时迅速从周围环境吸收水分并运输到叶片等部位,对提高植物保水能力起到决定性的作用;凯氏带能在根系吸收水分和营养成份的同时防止有害物质和微生物的侵染,直到保护层的作用。

研究表明,灯盏花无糖组培苗的根、叶显微结构与有糖组培苗相比,无糖组培苗的保水能力及对外界环境的适应能力具明显优势,无糖组培微环境调控技术能够显著提高组培苗在驯化移栽时的存活率。

[参考文献]

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第4册)[M]. 北京:科学出版社. 1985.
- [2] YU H Y, CHEN Z L. Study on artificial culture of *Eri-germ breviscapus*[J]. *Acta Bot Yunnan*, 2002, 24(3): 115 - 120.
- [3] 仲艳丽. 灯盏花的利用及无公害栽培技术初探[J]. *安徽农业科学*, 2004, 32(1): 120 - 121.
- [4] 杨生超, 杨忠孝, 张乔芹, 等. 灯盏花种植技术初探[J]. *中草药*, 2004, 35(3): 318 - 321.
- [5] 李育川. 灯盏花的特征特性及人工种植技术[J]. *云南农业科技*, 2004, (3): 45 - 46.
- [6] 谢庆华, 吴毅歆. 灯盏花茎段的离体培养和植株再生[J]. *植物生理通讯*, 2004, 40(4): 467.
- [7] 邱璐, 瞿礼嘉, 罗春梅, 等. 灯盏花遗传转化中组织培养受体系统的研究[J]. *楚雄师范学院学报*, 2004, 19(3): 91 - 95.
- [8] LIN C, LIU H G, SU Y B, et al.. A brief report on the rapid propagation of herbal *erigerontis* [J]. *J Yunnan Agric Univ*, 2003, 18(3): 323 - 326.
- [9] YANG Y W, QIAN Z G, DUAN M. Primary study on tissue culture of *Eri-germ breviscapus*[J]. *J Yunnan Coll Tradit chinmed*, 2002, 25(2): 12 - 13.
- [10] 刘成洪, 张孟魁, 邓华, 等. 灯盏花快速繁殖体系的建立[J]. *中草药*, 2005, 36(4): 597 - 599.
- [11] FUJWARA K, KOZAI T. Autorophic (Sugarfree) micropropagation for a significant reduction of production costs [J]. *Chronica Hort*, 1989, 29(2): 19.
- [12] FUJWARA K, KOZAI T, WATANABE I. Development of a photoautotrophic tissue culture system for plantlet at rooting and acclimatization stages [J]. *Acta Horticulturae*, 1988, 230: 153 - 158.
- [13] KOZAI T, CHERI, BYOUNG R J. Environmental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1997, 51: 49 - 56.
- [14] KOZAI T, HIROSHI O, FUJIWARA K. Photosynthetic characteristics of cymbidium plantlet in vitro [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1990, 22: 205 - 211.
- [15] NIU G, KOZAI T. Simulation of the growth of potato plantlets cultured photoautotrophically in vitro [J]. *Trans. ASAE*, 1997, 40: 255 - 260.
- [16] 王春乙, 潘亚茹, 白月明, 等. CO₂ 浓度倍增对中国主要作物影响的试验研究[J]. *气象学报*, 1997, 55(1): 86 - 94.
- [17] 苏培玺, 张立新, 杜明武, 等. 胡杨不同叶形光合特性、水分利用效率及其对加富 CO₂ 的响应[J]. *植物生态学报*, 2003, 27(1): 34 - 40.
- [18] 周玉梅, 韩士杰, 张军辉, 等. 不同 CO₂ 浓度下长白山3种树木幼苗的光合特性[J]. *应用生态学报*, 2002, 13(1): 41 - 44.
- [19] 张富仓, 康绍忠, 马清林. 大气 CO₂ 浓度升高对棉花生理特性和生长的影响[J]. *应用基础与工程科学学报*, 1999, 7(3): 267 - 272.
- [20] 谢会成, 姜志林. 栓皮栎对 CO₂ 增长的生理生态响应[J]. *西南林学院学报*, 2002, 22(1): 1 - 4.
- [21] 徐淑红, 邢恰, 于丽杰. 黑龙江省十字花科植物叶表皮毛状体扫描电镜观察[J]. *哈尔滨师范大学自然科学学报*, 2002, 18(2): 91 - 95.
- [22] 胡惠蓉, 陈志远. 泡桐属叶表皮毛状体扫描电镜观察[J]. *华中农业大学学报*, 1996, 15(2): 190 - 193.
- [23] 石凤翎, 郭晓霞, 李红. 扁蓿豆抗旱形态解剖结构观察与分析[J]. *干旱地区农业研究*, 2005, 23(2): 115 - 118.
- [24] 黄玲, 张正斌. 小麦叶片蜡质含量与水分利用效率和产量的关系[J]. *麦类作物学报*, 2003, 23(3): 41 - 44.
- [25] 普莉, 索金凤, 薛勇彪. 植物表皮毛发育的分子遗传控制[J]. *遗传学报*, 2003, 30(11): 1078 - 1084.
- [26] 张正斌, 山仑. 小麦抗旱生理指标与叶片卷曲度和蜡质关系研究[J]. *作物学报*, 1998, 24(5): 608 - 612.
- [27] 沈禹颖. 三种盐生植物叶表的扫描电镜观察[J]. *草业学报*, 1997, 6(3): 32 - 36.