

北海道黄杨叶片解剖结构的季节变化

马 妮^{1,2} 孙振元¹ 刘庆华² 韩 蕾¹ 巨关升¹ 钱永强¹ 刘俊祥¹

(1 中国林业科学研究院林业研究所 2 青岛农业大学园林园艺学院)

摘要:以北京地区生长的常绿阔叶植物北海道黄杨为材料,应用光学显微镜和电子显微镜研究其叶片结构在不同季节的适应性变化。结果表明:叶片上下表皮外覆盖一层厚角质。从新叶期(4月)到休眠期(1、2月),叶片厚度、栅栏组织、海绵组织及角质层的厚度逐渐增大,而组织疏松度依次降低,各结构数值不同季节差异显著。新叶期和生长季节,叶绿体内积累了大量淀粉粒,细胞内有一个中央大液泡。休眠前期,液泡内陷,淀粉粒逐渐变小,嗜锇颗粒增多,叶绿体略有膨胀。休眠期,极少部分叶绿体膜破裂,基质片层断裂。叶绿体周围的线粒体数量增多,结构完整、内嵴明显,液泡分化为多个小泡,细胞内无中央大液泡。北海道黄杨的抗寒性与发达的角质层与淀粉粒生长季节的积累有关。低温休眠期线粒体和叶绿体的结构高度稳定,其抗寒性增强。

关键词: 北海道黄杨; 叶片; 显微结构; 超微结构

中图分类号: S718.4 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2011)06-0112-07

MA Ni^{1,2}; SUN Zhen-yuan¹; LIU Qing-hua²; HAN Lei¹; JU Guan-sheng¹; QIAN Yong-qiang¹; LIU Jun-xiang¹. Seasonal variation of leaf anatomical structure of *Euonymus japonicus* ‘Cu Zhi’.*Journal of Beijing Forestry University* (2011) 33(6) 112-118 [Ch, 23 ref.]

1 Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing, 100091, P. R. China;

2 College of Landscape Gardening, Qingdao Agricultural University, Shandong 266109, P. R. China.

The mesophyll cell structure of *Euonymus japonicus* ‘Cu Zhi’ in different growing periods in Beijing area was observed under microscope and transmission electron microscope in this paper. The results showed that there were relatively thicker cuticular membranes on the upper and lower epidermis. Thickness of leaves, palisade tissues, spongy tissue and cuticular membrane were enhanced gradually from new leaf period to dormant season period. But the spongy ratio was lower in the same period. In the season of new leaf and growth, starch grains accumulated in chloroplasts and there was a large central vacuole in the middle of the cell. But in dormancy season, the starch grains disappeared or diminished. The chloroplasts were injured with some abnormal chloroplasts increased plastoglobuli. The chloroplasts were elementary completed under low temperature and the chloroplast lamellar was disconnected. The number of mitochondria nearby the chloroplasts was increased. The vacuole differentiated into small vesicles. It is suggested that the cold tolerance of *E. japonicus* ‘Cu Zhi’ is related to its well-developed cuticular membranes and accumulation of starch grains in growth season. *E. japonicus* ‘Cu Zhi’ can survive in winter in the northern region of China just because of its highly stable structure of mitochondria and the chloroplasts at low temperature.

Key words *Euonymus japonicus* ‘Cu Zhi’; leaf; microstructure; ultrastructure

低温是北方城市园林绿化的重要限制因子。受自然地理位置的限制,北京冬季风大、干旱而寒冷,耐寒抗旱的阔叶树种十分缺乏,一些尚可保留绿色的针叶树,也因寒冷干旱发生褐变,因此,植物景观

相对单调。北海道黄杨(*Euonymus japonicus* ‘Cu Zhi’)是卫矛科卫矛属的常绿阔叶树,原产日本北海道,具有极强的抗寒性(能耐-23.9℃低温),冬季叶绿,观赏价值高。经过多年栽植驯化,北海道黄

收稿日期: 2011-06-01

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务专项(200704)。

第一作者: 马妮。主要研究方向: 园林植物与观赏园艺。电话: 010-62889250 Email: mani09@126.com 地址: 100091 北京市颐和园后中国林业科学研究院林业研究所。

责任作者: 孙振元,研究员,博士生导师。主要研究方向: 园林植物与观赏园艺。电话: 010-62889626 Email: sunzy@263.net 地址: 同上。

本刊网址: <http://journal.bjfu.edu.cn>

杨已成为适合中国北方气候条件的优良树种,对改善冬季城市景观和生态环境具有重要意义^[1]。

目前,从植物叶片的解剖结构,特别是从超微结构变化方面研究植物抗寒性的报道较多。卢存福等^[2]对高山植物唐古特红景天(*Rhodiola algida* var. *tangutica*)叶片结构的观察结果表明,叶片无明显的栅栏组织,细胞间隙部分占组织总体积的比例很高。Bondada 等^[3]指出,低温胁迫条件下,叶绿体的超微结构首先发生变化,淀粉粒在叶绿体中的积累改变了类囊体的结构。关于北海道黄杨的研究多集中在繁殖方面,如扦插、组培^[4-5],对其抗寒性方面的研究较少,且多侧重于低温胁迫下与抗性有关的酶、电导率、丙二醛和脯氨酸含量的变化^[6]等方面。葛秀秀等^[7]、董丽等^[8]研究了卫矛属常绿阔叶植物叶片细胞结构越冬期间的适应性变化,但未研究不同季节间的变化。本研究以北海道黄杨叶片为材料,观察其组织及细胞结构在不同季节的动态变化,并对这种变化在抗寒适应过程中的生理意义进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材 料

北海道黄杨,栽植于北京市海淀区中国林业科学研究院科研温室外试验地,5年生扦插苗。

1.2 方 法

1.2.1 取样方法

2010年4月至2011年2月,每月15日前后天气晴朗的上午(10:00至12:00)取北海道黄杨枝条顶端向下第3~6片生长健壮的功能叶36片,随机分为3个重复,每个重复12片。

1.2.2 叶片组织显微结构观察

叶片用蒸馏水清洗干净后,随机在不同叶子的主脉中部两侧切取0.5 cm×0.5 cm的小块,共10余块,于4℃ FAA固定液中固定保存。经过乙醇系列脱水→二甲苯透明→浸蜡→包埋→YD-335电脑切片机切片(厚度8 μm)→番红一固绿对染→加拿大树胶封片→贴标签。包埋时每个重复随机取4块组织块,每个组织块切5个切片。在Nikon光学显微镜下观察每张切片,拍摄互不重叠的5个视野的照片,每重复共计100张照片。从100张照片中随机抽取含有所测定指标的照片30张(测定另外一个指标时需将这30张放回后重新抽取)。使用Image-Pro图像分析软件测量叶片厚度、上表皮角质层厚度、下表皮角质层厚度、上表皮细胞厚度、下表皮细胞厚度、栅栏组织厚度、海绵组织厚度、组织紧密度和组织疏松度等9个指标。其中,组织紧密度(cell tense ration,CRT,%)和组织疏松度(spongy

ratio,SR,%)的计算方法如下^[9]:

$$\text{组织紧密度} = \text{栅栏组织厚度}/\text{叶片厚度} \times 100\%$$

$$\text{组织疏松度} = \text{海绵组织厚度}/\text{叶片厚度} \times 100\%$$

1.2.3 叶肉组织超微结构观察

与叶片组织显微结构观察同期所取的叶片,经蒸馏水清洗干净后在不同叶片主脉中部两侧取0.1 cm×0.1 cm×0.1 cm小块10余块,用4℃预冷的2.5%戊二醛固定,4℃保存。随机选取预固定的组织块3块,0.1 mol磷酸缓冲液冲洗20~30 min→1%锇酸中固定1~2 h→0.1 mol磷酸缓冲液冲洗20~30 min→丙酮系列脱水→环氧树脂Spur包埋→聚合→LEICAUC6i型切片机超薄切片(厚度70 nm)→醋酸双氧铀柠檬酸铅双重染色。每个包埋块制铜网1只,在JEM-1230透射电子显微镜下观察并拍照。

1.3 数据分析

数据的整理采用Excel 2003软件完成。差异显著性检测采用SPSS13.0软件进行分析。

2 结果与分析

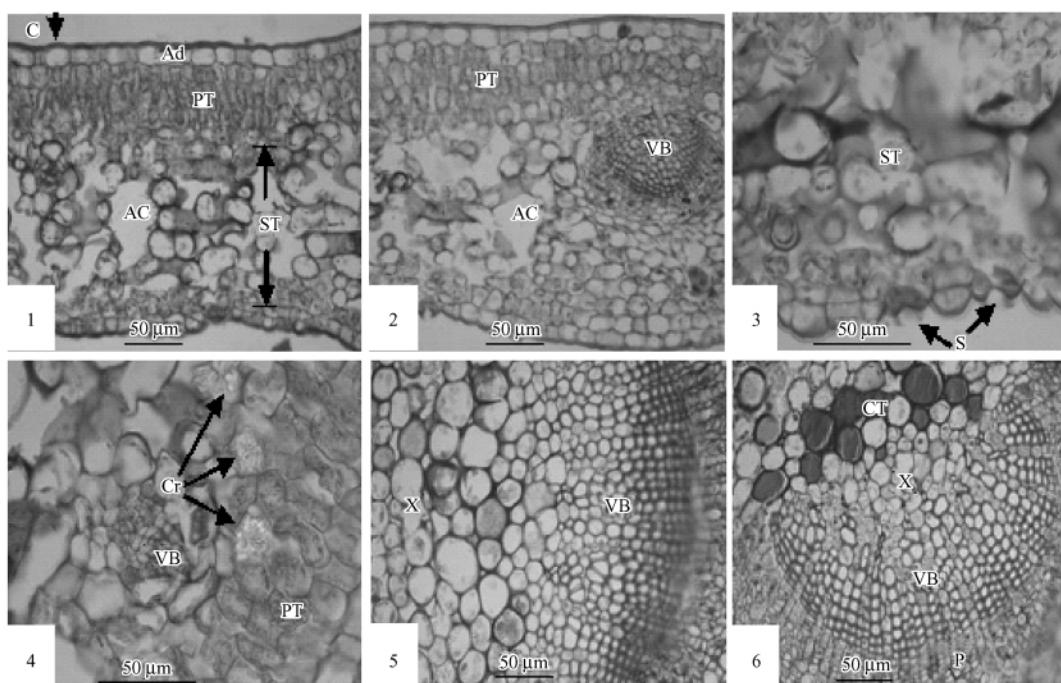
2.1 叶片组织结构特征

光学显微镜下观察北海道黄杨叶片的横切面解剖结构(图1):由表皮、叶肉和叶脉3部分组成;上、下表皮细胞各一层,细胞较大,气孔仅分布于下表皮;叶肉组织分化为栅栏组织和海绵组织;栅栏组织多由3层(少数为2或4层)柱状薄壁细胞构成,排列整齐密集,细胞间隙很小,含丰富的叶绿体;其下为海绵组织,由排列松散的薄壁细胞组成,细胞近圆形或长圆形或不规则形,排列松散,具发达的细胞间隙,含叶绿体较少;靠近海绵组织和下表皮细胞一侧的2~3层细胞排列较为紧密,中间细胞排列较疏松且规律性分布着较大空隙,叶肉中散布着许多晶细胞,晶簇的形状为菊花型或不规则性。

2.2 叶片组织结构变化

由表1~2可以看出,不同月份、不同季节叶片组织各结构的数量指标明显不同。新叶期叶片较薄,各结构数值为全年最小。叶片厚度、上表皮角质层、栅栏组织和海绵组织的厚度分别为214.95、2.03、53.36和136.35 μm,显著低于其他季节。但组织疏松度全年最大,为63.4%,显著高于其他季节。

旺盛生长期叶片增厚,叶片厚度、上表皮、下表皮、栅栏组织和海绵组织的厚度分别增加了73.93、5.28、1.65、9.81和43.92 μm,但紧实度和疏松度减小,其中紧实度21.8%,为全年最低。7月叶片厚度、上表皮、下表皮及栅栏组织的厚度持续增加,而



AC. 气腔; Ad. 上表皮; C. 角质层; CT. 厚角组织; P. 韧皮部; PT. 栅栏组织; S. 气孔; ST. 海绵组织; VB. 维管束; X. 木质部; 1~6. 北海道黄杨叶片横切图; 1~2. 叶片组织结构; 3. 箭头示下表皮的气孔; 4. 叶片组织结构中晶细胞的分布,箭头示晶细胞; 5~6. 叶脉维管束

图1 北海道黄杨叶片显微结构

Fig. 1 Leaf microstructure of *E. japonicus* 'Cu Zhi'

表1 不同月份叶片组织结构参数比较

Tab. 1 Comparison of tissue parameters at different months

物候期	月份	叶片厚度/ μm	上表皮角 质层/μm	上表皮/ μm	下表皮角 质层/μm	下表皮/ μm	栅栏组织/ μm	海绵组织/ μm	组织结构 紧实度/%	组织结构 疏松度/%
新叶期	4	214.95 ± 14.92	2.03 ± 0.24	11.04 ± 2.93	3.36 ± 0.15	10.97 ± 1.54	53.36 ± 2.11	136.35 ± 10.70	24.9 ± 0.026	63.4 ± 0.005
旺盛生长期	6	288.88 ± 1.05	3.16 ± 0.07A	16.32 ± 0.09B	2.54 ± 0.37	12.62 ± 0.61	63.17 ± 4.34	180.27 ± 1.30	21.8 ± 0.014B	62.4 ± 0.005a
	7	289.53 ± 14.36	2.07 ± 0.06B	20.66 ± 0.59A	1.84 ± 0.34	12.99 ± 0.45	82.24 ± 3.89	167.82 ± 11.81	28.4 ± 0.01A	57.9 ± 0.017b
休眠前期	10	394.46 ± 2.4A	3.97 ± 0.62	24.46 ± 2.34	4.08 ± 0.17	17.08 ± 0.83	114.57 ± 5.70a	222.24 ± 5.98A	29.0 ± 0.012	56.3 ± 0.017
	11	352.65 ± 6.08B	3.84 ± 0.35	22.90 ± 1.18	3.41 ± 0.42	15.76 ± 1.32	94.91 ± 5.4b	189.88 ± 9.76B	26.9 ± 0.017	53.8 ± 0.018
休眠期	1	397.35 ± 25.02	5.54 ± 0.35	20.14 ± 4.16	3.65 ± 0.22b	17.10 ± 3.06	115.44 ± 10.89	216.31 ± 9.18	29.2 ± 0.044	53.9 ± 0.049
	2	417.26 ± 7.23	5.02 ± 0.19	22.68 ± 1.98	4.08 ± 0.15a	16.52 ± 1.01	113.90 ± 3.32	221.91 ± 6.39	27.2 ± 0.01	53.1 ± 0.017

注: 表中数值为平均值 ± 标准差。同列数值不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) , 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$) 。表 2 同此。

表2 不同季节叶片组织结构参数比较

Tab. 2 Comparison of tissue parameters of different seasons

物候期	叶片厚度/ μm	上表皮角 质层/μm	上表皮/ μm	下表皮角 质层/μm	下表皮/ μm	栅栏组织/ μm	海绵组织/ μm	组织结构 紧实度/%	组织结构 疏松度/%
新叶期	214.95 ± 14.92d	2.03 ± 0.24c	11.04 ± 2.93c	3.36 ± 0.15a	10.97 ± 1.54b	53.36 ± 2.11c	136.35 ± 10.70c	24.9 ± 0.026	63.4 ± 0.005a
旺盛生长期	289.21 ± 9.11c	2.62 ± 0.60c	18.49 ± 2.40b	2.19 ± 0.50b	12.81 ± 1.61b	72.71 ± 11.07b	174.05 ± 10.15b	25.1 ± 0.036	60.1 ± 0.026b
休眠前期	373.56 ± 23.27b	3.91 ± 0.45b	23.68 ± 1.86a	3.75 ± 0.46a	16.42 ± 1.22a	104.74 ± 11.86a	206.06 ± 19.14a	27.9 ± 0.017	55.1 ± 0.021c
休眠期	407.47 ± 19.51a	5.28 ± 0.38a	21.41 ± 3.23ab	3.85 ± 0.29a	16.82 ± 2.06a	114.67 ± 7.25a	219.44 ± 5.89a	28.2 ± 0.030	53.9 ± 0.021c

上表皮角质层和上表皮的厚度与 6 月比较有极显著的差异, 分别减小了 1.09 和 0.7 μm。下表皮角质层厚度为全年最低, 显著低于全年其他季节。叶片组织紧实度升高 6.6%, 疏松度降低 4.5%。同为旺盛生长期的 6 月和 7 月之间各指标差异显著, 在组织结构上有很活跃的变化, 表明北海道黄杨对夏季高温的主动适应。

休眠前期(10 月和 11 月)的 10 月, 叶片厚度、上表皮角质层、下表皮角质层、上表皮、下表皮、栅栏组织和海绵组织的厚度持续增大, 上表皮厚度达全年最大。11 月所有结构的数值均较 10 月减小, 其中叶片和海绵组织的厚度差异极显著。

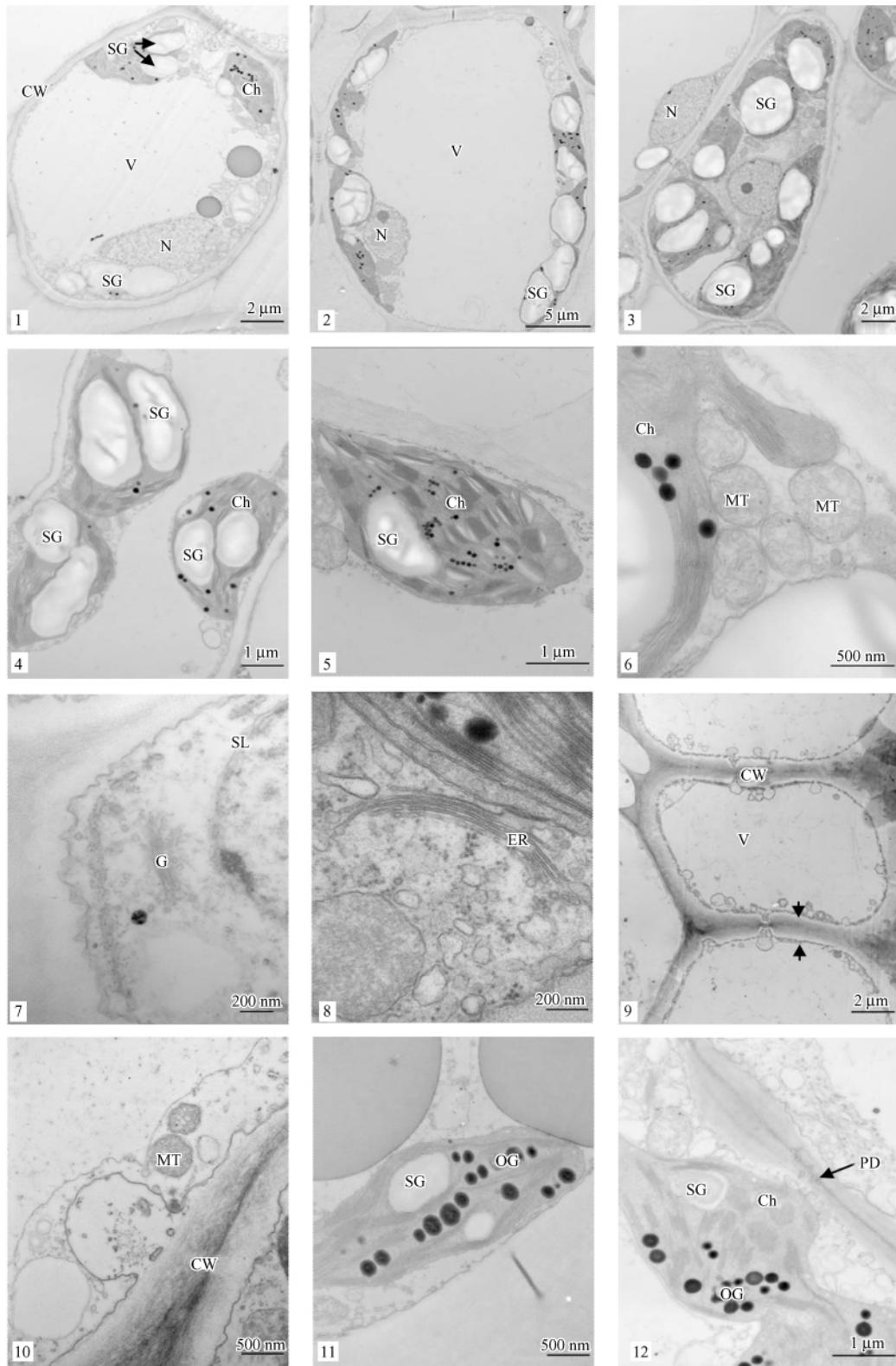
休眠期, 叶片各组织结构数值增大。其中 1 月的上表皮角质层、下表皮、栅栏组织的厚度及组织紧

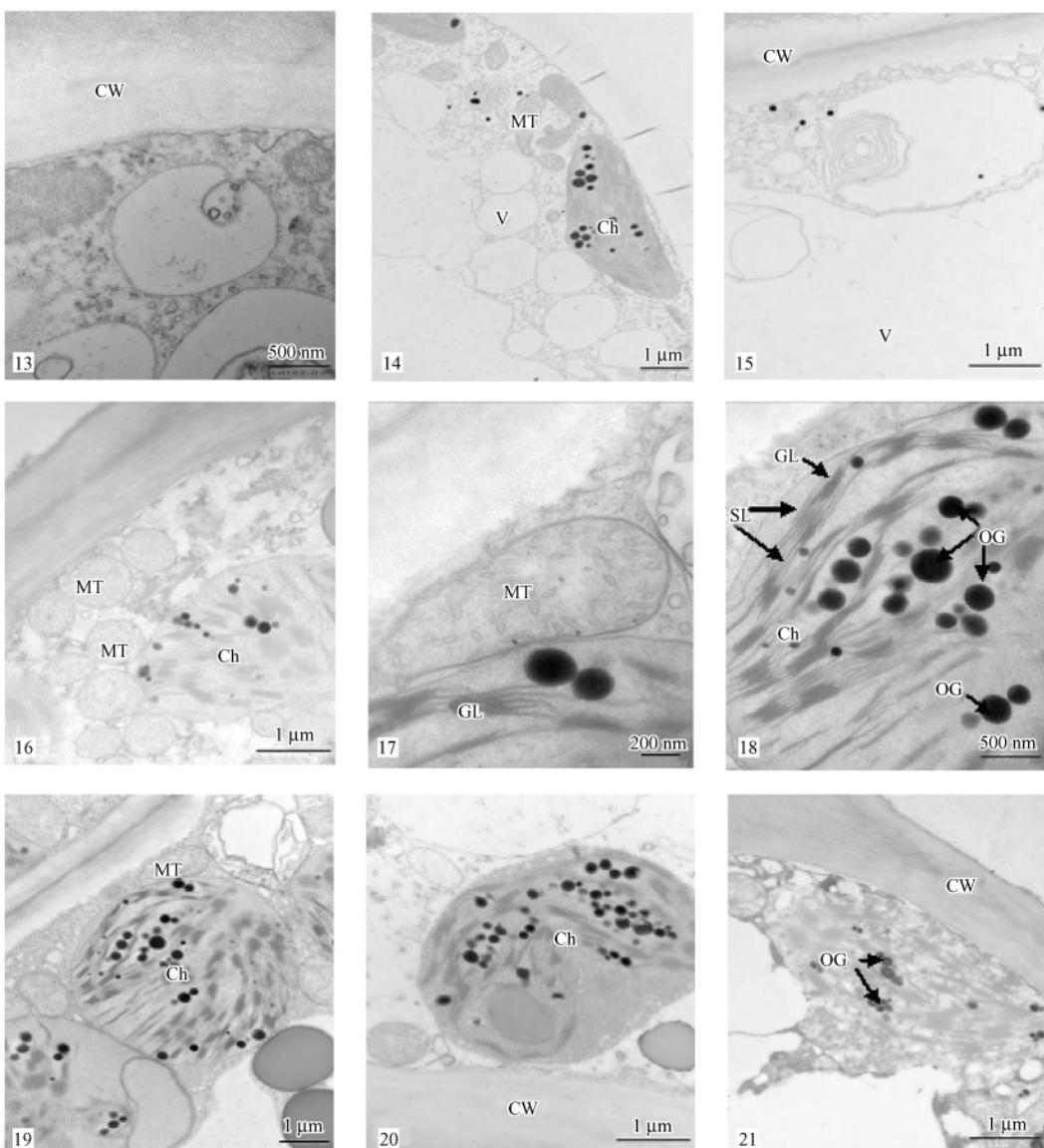
实度均达全年最大值,而疏松度则依次降低;2月叶片厚度继续增大达到全年最大值,显著高于其他季节,叶片疏松度53.1%,为全年最低值,休眠前后无显著差异。低温期间,北海道黄杨组织结构稳定,能维持正常的生理状态,可能是其耐寒性强的主要原因之一。

2.3 叶肉细胞超微结构变化

透射电镜下观察北海道黄杨叶肉细胞超微结构

(图2)发现,新叶期细胞壁较厚,细胞膜平滑,细胞中央有一个大液泡,细胞核多分布于细胞的一侧,核仁清晰。细胞内含丰富的细胞器,其中叶绿体是最明显的细胞器,数量较多,在一个细胞切面上可见3~5个,沿细胞膜排列,大小不同,但形状差别不大,一般为椭圆形、纺锤形或近圆形。叶绿体表面双层膜结构完整,被膜清晰,内含物丰富,类囊体多,基粒内囊体片层垛叠规则并和基质片层连成整体,片层





CW. 细胞壁; Ch. 叶绿体; ER. 内质网; G. 高尔基体; GL. 基粒片层; OG. 嗜锇颗粒; MT. 线粒体; N. 细胞核; PM. 质膜; PD. 胞间连丝; SG. 淀粉粒; SL. 基质片层; V. 液泡; 1~8. 北海道黄杨叶肉细胞超微结构; 1~3. 叶肉细胞结构; 4~5. 叶绿体, 内含丰富的淀粉粒; 6. 线粒体; 7. 内质网; 8. 高尔基体; 9~12. 秋季休眠前北海道黄杨叶肉细胞超微结构; 9~10. 液泡内陷; 11. 10月叶绿体; 12. 11月叶绿体; 13~21. 冬季休眠期北海道黄杨叶肉细胞超微结构; 13. 液泡内吞; 14. 液泡分割为多个小液泡; 15. 北海道黄杨多层膜结构; 16~17. 线粒体; 18. 叶绿体中淀粉粒消失; 19. 叶绿体膨胀变圆; 20. 叶绿体膜破裂损坏

图2 北海道黄杨叶肉细胞超微结构变化

Fig. 2 Annual variation of leaf ultrastructure of *E. japonicus* 'Cu Zhi'

间隙中积累有大量淀粉粒。线粒体包围在叶绿体周围，剖面呈圆形或椭圆形，体积比叶绿体小很多，但数量多，双层膜结构完整，嵴数量多且清晰，呈线形。内质网和高尔基体多分布于细胞壁附近。旺盛生长期与新叶期相比发生显著变化的是叶绿体基质片层间的淀粉粒体积增大，数量增多，叶绿体的形状多数由椭圆形变成圆形。

休眠前期温度逐渐降低，叶肉细胞液泡内吞形成小囊泡，叶绿体双层膜和类囊体片层结构清晰，片层间有较多的嗜锇颗粒，其中10月淀粉颗粒较9月显著减少，11月则只有少数叶绿体含有体积较小的

淀粉粒。线粒体双层膜结构仍清晰可见，嵴丰富完整，内部结构无明显变化。

休眠期，随温度的持续降低，叶肉细胞内已无中央大液泡，形成有大小不一的许多小液泡。液泡膜形成很多内突，并有内吞颗粒及同心圆状的多层膜结构。线粒体数量增多，双层膜完整，嵴丰富，紧密围绕叶绿体分布。与休眠前期相比，最明显的变化是少数叶绿体边缘模糊，双层膜结构破坏，极少数膜完全破裂，片层结构稀疏，部分基粒模糊不清，基粒内囊体和基质内囊体排列不规则，且多集中分布在叶绿体内的一侧，类囊腔扩大，类囊体片层间的嗜锇

颗粒增多。

3 结论与讨论

3.1 叶片组织结构特征与其抗寒性的关系

植物抗寒性不仅决定于其生理生化活动,而且取决于其自身形态结构特征。形态与结构的统一是植物适应寒冷环境的生物学基础^[10]。叶片是最先感受到寒冷而且较敏感的器官。研究表明,叶片厚度,上下表皮、栅栏组织及海绵组织厚度的增加都是对低温环境的反应^[11],说明栅栏组织、海绵组织等与抗寒性之间存在着遗传上的密切相关。房用等^[9]认为,组织结构紧密度越大,品种越抗寒,相反越不耐寒。本研究发现,北海道黄杨叶片结构随季节变化发生适应性变化,且规律明显,新叶期(4、5月)和生长季节(6、7、8月)组织结构紧密度小,休眠期组织结构紧密度大,叶片厚度、角质层厚度、栅栏组织及海绵组织厚度均随着温度的降低而增加,与房用等^[9]的研究结果相一致。叶片角质层的增厚可减小叶片表面的空气流动,提高植物叶片的热稳定性,对保持植物正常的光合作用和呼吸作用非常重要。本研究中,北海道黄杨各结构参数值在相同季节的不同月份差异显著,表明其对环境变化的主动适应。休眠季节里相邻月份间差异不显著表明低温条件下细胞结构稳定,能保持正常的生理状态,可能是其能安然越冬的主要原因之一。

3.2 叶肉细胞超微结构与其抗寒性的关系

Brooking 等^[12]指出,低温胁迫下,叶子超微结构在可见伤害发生前就发生明显又相当快的变化。其中叶绿体对低温的敏感性大于线粒体。本研究中,对低温最敏感的也是叶绿体,其次为液泡,这与杨凤仙等^[13]在低温下棉叶叶片细胞结构变化的观察结果相一致。

越冬进程中,北海道黄杨叶肉细胞叶绿体多数保持正常结构,只是略有膨胀,淀粉粒降解或消失,嗜锇颗粒增多。少数叶绿体解体,其解体过程为外膜破损,基粒膨胀松散,然后外膜破裂解体,基粒继续膨大,内部形成囊泡,随后外膜消失,基粒开始解体,囊泡在外力作用下将内膜涨破,最终内含物外泄。叶绿体中淀粉数量减少,体积变小,降解为糖^[14],提高了细胞质浓度及渗透压,有利于降低冰点,防止结冰,保护膜结构,增加抗寒性。这与张有福等^[15]对两种圆柏属(*Sabina*)植物耐寒性的研究结果相一致。生长季节里,细胞代谢旺盛,叶绿体基粒片层增厚、增多,与基质片层相互贯通,排列有序,结构清晰,体积慢慢增大,完全贴壁排列,内含较多淀粉粒,嗜锇颗粒减少,叶绿体类囊体膜降解时嗜锇

颗粒增多、变大,类囊体合成时数量减少。Steinmuller 等^[16]研究显示,嗜锇颗粒的积累是类囊体膜受伤害降解的结果。时向东等^[17]认为,产生的嗜锇物质是以脂类的形式贮存起来。本研究中,生长季节叶绿体内有少量嗜锇颗粒,休眠季节增多变大,说明低温引起极少数类囊体膜的合成受阻或发生降解,这对维持寒冷条件下正常的光合作用有重要意义,也是北海道黄杨抗寒性强的重要原因之一。

虽然在低温寒害中线粒体比叶绿体稳定,但抗寒性弱的植物线粒体会膨胀变圆,内嵴遭破坏^[18]。本试验中北海道黄杨叶肉细胞线粒体形态结构正常,清晰完整,不仅未发生肿胀变圆,而且也未出现膜断裂和嵴数量减少。这种线粒体与一般抗性的植物线粒体不同,它在低温时非常稳定,具有高度抗寒性,这一结果与 Salisbury^[19]在其他植物中的观察结果一致,且线粒体集中位于叶绿体附近及质膜大量内陷形成各种管状结构的附近。这很可能与细胞内活跃的生理生化反应有关,如果没有由线粒体产生 ATP,提供足够的能量,这些生理活动无法顺利进行。靠近细胞的最先需要能量的部位可以缩短能量运输距离,大大减少能量在运输过程中的损失,从而使细胞充分利用有限的能量抵御寒冷,保护其不受寒害。

液泡集中了细胞内大部分水分,它是冰冻受害最危险的部分^[13]。液泡的内吞作用被认为与植物的抗寒性和抗冻性锻炼密切相关。韩善华^[20]发现,在冬季,沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)细胞的液泡膜形成大量内吞,不断将大的液泡分散为小液泡。付连双等^[21]也在低温驯化不同抗寒性小麦(*Triticum aestivum*)品种细胞超微结构的比较研究中发现抗寒品种的小麦细胞内全为小液泡。本试验中,冬季低温下观察到液泡分解为多个小液泡且有液泡内陷,这与前人的研究结果一致。同时,液泡内部出现膜状内含物,在细胞质中发现类似多层膜结构,这种结构在葛秀秀等^[7]的研究中也有发现,而在卫矛属其他抗寒性较强的植物中并没有发现,这种复杂的多层膜结构是否是北海道黄杨耐低温的适应性结构还需进一步研究。

不同季节中,北海道黄杨叶肉细胞细胞壁、质膜结构完整,各细胞器形态稳定。1月严冬虽有极少数叶绿体破裂解体,但并不影响整体活性。正是由于北海道黄杨叶肉各细胞器对低温环境的高度稳定性,才使得其在北方能安然越冬。

参 考 文 献

- [1] 尚爱芹,田传卫,赵梁军,等.根癌农杆菌介导北海道黄杨遗传转化体系的建立[J].园艺学报,2008,35(3):409-414.

- [2] LU C F , CHEN Y Z , JIAN L C *et al.* Roles of mucilage cells and the glycoproteins at the cell surface in the freezing tolerance of alpine plant *Rhodiola algida* var. *tangutica* [J]. *Journal of Environmental Biology*, 2003, 29(1): 16–20.
- [3] BONDADA B R , SYVERTSEN J P. Concurrent changes in net CO₂ assimilation and chloroplast ultrastructure in nitrogen deficient citrus leaves [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2005, 54: 41–48.
- [4] 李云, 梁庆丰, 赵芳, 等. 北海道黄杨的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(4): 352.
- [5] 王瑞云, 王玉国. 北海道黄杨试管快速繁殖技术研究 [J]. 生物技术, 2004, 14(2): 51–53.
- [6] 张舜德, 刘权红, 陈玉梅. 八种常绿阔叶树种抗寒性的研究 [J]. 园艺学报, 1994, 21(3): 283–287.
- [7] 葛秀秀, 房克风, 关雪莲, 等. 北方四种卫矛属常绿阔叶植物叶肉细胞超微结构在冬季的适应性变化 [J]. 电子显微学报, 2010, 4(29): 167–172.
- [8] 董丽, 贾桂霞, 苏雪痕. 常绿阔叶植物越冬期间叶片组织结构的适应性变化 [J]. 园艺学报, 2003, 30(1): 59–64.
- [9] 房用, 孟振东, 李季芬, 等. 山东茶树叶片解剖结构分析 [J]. 茶业科学, 2004, 24(3): 190–196.
- [10] 崔国萍, 马春萍. 紫花苜蓿叶片形态结构与其抗寒性的关系 [J]. 草地学报, 2007, 15(1): 70–75.
- [11] 蔡永立, 宋永昌. 浙江天童常绿阔叶林藤本植物的适应生态学 I. 叶片解剖特征的比较 [J]. 植物生态学报, 2001, 25(1): 90–98.
- [12] BROOKING I R , TAKYLOR A O. Ultrastructural changes of cucumber at low temperature [J]. *Plant Physiology*, 1973, 52(1): 180–189.
- [13] 杨凤仙, 董俊梅, 杨晓霞. 低温胁迫下棉叶叶绿体、液泡超微结构的变化 [J]. 山西农业大学学报, 2001, 21(2): 116–117.
- [14] KIVIMAEENPAEAE M , JOENSSON A M , STJERNQUIST I , et al. The use of light and electron microscopy to assess the impact of ozone on Norway spruce needles [J]. *Environmental Pollution*, 2004, 127: 441–453.
- [15] 张有福, 陈银萍, 张满效, 等. 两种圆柏属植物不同季节显微结构和超微结构变化与耐寒性的关系 [J]. 应用生态学报, 2006, 17(8): 1393–1397.
- [16] STEINMULLER D , TEVINA M. Composition and function of plastoglobuli II. Lipid composition of leaves and plastoglobuli during beech leaf senescence [J]. *Planta*, 1985, 163: 91–96.
- [17] 时向东, 焦枫, 范豪杰, 等. 烤烟叶片发育过程中栅栏细胞超微结构的变化 [J]. 烟草农学, 2010, 13(5): 50–54.
- [18] 于晶, 周子珊, 牟永潮, 等. 低温下不同抗寒性冬小麦叶片组织结构比较 [J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(4): 7–11.
- [19] SALISBURY K. Ultrastructural change of plants exposed to low temperatures [J]. *American Journal of Biology*, 1973, 60: 1028–1033.
- [20] 韩善华. 冬季沙冬青叶肉细胞液泡中泡状内含物的研究 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(6): 1072–1076.
- [21] 付连双, 王晓楠, 王学东, 等. 低温驯化及封冻后不同抗寒性小麦品种细胞超微结构的比较 [J]. 麦类作物学报, 2010, 30(1): 66–70.

(责任编辑 冯秀兰)