

# 黄瓜低农药残留品种的外果皮组织解剖学特征比较分析

赵文 秦智伟\* 吴鹏 周秀艳

(东北农业大学园艺学院, 农业部东北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 黑龙江省寒地蔬菜生物学重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

**摘要:** 以黄瓜低农药残留品系 D0351 及其相对应的高农药残留品系 D9320 作为材料, 在始收期分别喷施霜霉威和毒死蜱两种农药, 对两个品系外果皮细胞的形态、气孔、叶绿体以及线粒体超微结构进行比较分析。结果表明: 在自然状态下, 两个品系的最大差异是外果皮细胞结构, D0351 品系外果皮细胞呈长条形, D9320 品系呈近正方形, D0351 品系的外表皮细胞面积小于 D9320 品系。两个品系经农药处理后, D0351 外果皮细胞变成近圆形或长圆形, D9320 外果皮细胞形态没有改变, 两个品系的外果皮细胞面积都增加, 且 D0351 的细胞面积仍小于 D9320; 气孔开口度 D0351 的增大程度比 D9320 小; 两个品系的叶绿体内的嗜锶颗粒数量变多、体积变大; 线粒体形态及内部结构没有改变。

**关键词:** 黄瓜; 农药残留; 外果皮; 超微结构

中图分类号: S642.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-6346 (2013) 20-0032-07

## Comparative Analysis of Epicarp Tissue Anatomical in Low Pesticide Residue Cucumber Strain

ZHAO Wen, QIN Zhi-wei\*, WU Peng, ZHOU Xiu-yan

(College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (Northeast region), Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Cold Area Vegetable Biology, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** The low pesticide residue cucumber (*Cucumis sativus* L.) strain (D0351) and the high pesticide residue strain (D9320) were taken as tested materials. Chlorpyrifos and propamocarb pesticide were sprayed on cucumber plants in harvest beginning stage. The epicarp cells morphology, stoma, chloroplast and mitochondria ultra-structure of these 2 strains were compared. The result indicated that the biggest difference between these 2 strains was the structure of the epicarp cells. The epicarp cell of strain D0351 was elongated, while that of strain D9320 was foursquare. The outer area of the epicarp cell of D0351 was smaller than that of D9320. After pesticide sprayed treatment, the epicarp cells of the strain D0351 became round or oblong, and the epicarp morphology of strain D0351 was changed, while that of strain D9320 was not changed. The epicarp cell areas of both strains were increased. As for the stoma opening degree the strain D9320 is bigger than strains D0351. The number

收稿日期: 2013-03-16; 接受日期: 2013-05-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272158), 国家科技计划“863”课题 (2012AA100105)

作者简介: 赵文, 女, 硕士研究生, 专业方向: 黄瓜遗传育种, E-mail: zhaowenxingfu@163.com

\* 通讯作者 (Corresponding author): 秦智伟, 男, 教授, 博士生导师, 专业方向: 蔬菜遗传育种, E-mail: qzw303@126.com

of osmium particle of both strains were increased and their sizes became larger in the chloroplast. Mitochondrial morphology and internal structure was not changed.

**Key words:** Cucumber; Pesticide residue; Epicarp; Ultrastructure

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 是设施园艺主要栽培的蔬菜作物之一, 并且是世界上栽培面积最大的果菜类蔬菜 (曲波等, 2003)。在农业生产的过程中极易受到病虫害的侵袭, 为了保证农产品的增产增收, 施用农药是避不可少的环节, 随之而产生的农药残留问题成为大家关注的焦点, 但不适量的施用化学农药不仅会影响到产品的安全品质及生态环境, 同时也可能会影响植物的超微结构并破坏其正常的生理代谢过程。以往研究自然环境的变化, 比如干旱、盐渍、低温、重金属等对植物超微结构变化的影响较多 (吴凯和周晓阳, 2007; Gao et al., 2010; Liu et al., 2012; Trotta et al., 2012), 但对植物受到化学农药胁迫下的超微结构变化的报道比较少。

果实表皮的最外层是蜡质层, 是与外界接触的第一道防线, 可以保护果实免受外界生物以及非生物的伤害, 具有阻止水分非气孔性的散失, 减少大气中有毒物质沉积和表面伤害等作用。蜡质的组分、含量、结构受到外界环境条件, 如干旱、温度、湿度、微生物、光照等环境的影响。农药污染植物后, 可渗透其表皮蜡质层或组织内部, 进入到细胞中。有研究报道喷施氧化乐果、吡虫啉、苦参碱对大叶黄杨的蜡质含量有影响, 喷施农药对表皮产生了胁迫, 使蜡质含量降低, 随着时间的推移, 这种胁迫效应消失 (马永亮等, 2006; 李婧婧等, 2011)。低磷胁迫对甜菜根的生长发育有重要的影响 (周建朝和奚红光, 2006), 土壤农药残留物可以导致蚕豆根尖细胞微核及染色体畸变, 随着处理时间的延长, 蚕豆根尖细胞微核率及染色体畸变率随之增加, 农药残留对细胞结构产生了很大的影响 (李宏, 2009)。

依据东北农业大学园艺学院黄瓜课题组前期工作基础, 已经筛选出农药残留量高低不同的品种, 并初步确定了农药残留量高低的指标, 建立了评价黄瓜种质资源农药残留性评价指标体系回归方程 (刘芳芳等, 2010)。低农药残留符合加性-显性遗传模型, 受环境影响不大, 是多基因控制的数量性状, 具有遗传属性 (马佰慧, 2010)。所以本试验选择农药残留量高低差异显著的两个品系为试材, 试图通过对农药胁迫后黄瓜外果皮超微结构变化的分析比较, 探明低农药残留品种果皮解剖结构特征, 为今后开展黄瓜低农药残留机理及遗传育种研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选取东北农业大学园艺学院黄瓜课题组已筛选出的低农药残留黄瓜品系 D0351, 高农药残留黄瓜品系 D9320 作为研究对象 (刘芳芳等, 2010), 种子均由黄瓜课题组提供。

### 1.2 试验处理

试验于 2012 年 4~7 月在东北农业大学园艺试验站黄瓜课题组阳光棚中进行, 小区设计采用随机区组法, 品种栽培按照当地正常栽培管理进行, 做到肥、水、光照、温度供给一致。

1.2.1 农药喷施方法 试验喷施两种农药, 霜霉威 (Propamocarb) 用来防治黄瓜霜霉病; 毒死蜱 (Chlorpyrifos) 主要防治黄瓜虫害。根据农药说明书上推荐的稀释倍数, 配制 72.2% 霜霉威水剂 400 倍液, 48% 毒死蜱乳油 800 倍液, 在植株始收期开始喷施农药, 将两种化学农药分别均匀地喷施于两个品系的地上部, 同时用水喷施黄瓜植株作为对照, 共喷施 3 次, 每隔 5 d 喷 1 次, 在最后一次喷药后 5 d 取样。

1.2.2 扫描电镜样品制备与观察 选取长势相同的对照和处理相同节位上的果实, 取果实中部的果皮组织用双面刀片切成 2 mm × 5 mm 的小条, 迅速放入 2.5% 戊二醛 (磷酸缓冲液配制)

固定,抽气至样品沉淀,放置于4℃冰箱中固定1.5 h以上。吸去戊二醛,用0.1 mol·L<sup>-1</sup> pH为6.8的磷酸缓冲液冲洗3次,每次10 min,接着分别用浓度为50%、70%、90%乙醇进行梯度脱水,每次15 min,100%乙醇脱水2次,每次15 min。再用100%乙醇:叔丁醇=1:1,纯叔丁醇各置换1次,每次15 min,置于ES-2030(HITACHI)型冷冻干燥仪对样品进行干燥,大约4 h;用导电胶带粘在扫描电镜样品台上,用E-1010(HITACHI)型离子溅射镀膜仪在样品表面镀一层15 nm厚的金属膜;最后在S-3400N扫描电镜下观察拍照。

**1.2.3 透射电镜样品制备与观察** 同扫描电镜相似,选取相同节位的果实,取果实中部的外果皮组织用双面刀片切成3 mm×1 mm的小条,用2.5%戊二醛(磷酸缓冲液配制)固定,抽气至样品沉淀,放置于4℃冰箱中进行前固定并保存;吸去戊二醛,用pH 6.8的磷酸缓冲液冲洗3次,每次15 min。在通风橱中用2%四氧化锇固定3.5 h,再次用pH 6.8的磷酸缓冲液冲洗3次,每次15 min。接着分别用浓度为50%、70%、90%乙醇进行梯度脱水,每次15 min,100%乙醇脱水2次,每次10 min。再用100%乙醇:丙酮=1:1置换1次,10 min;100%丙酮置换1次,5 min。用纯丙酮:环氧树脂812包埋剂=1:1包埋40 min,再加入1份环氧树脂812包埋剂包埋2 h,再加入1份环氧树脂812包埋剂开盖过夜。将样品置于恒温箱中聚合,磨块后用ULTRACUTE型切片机进行切片,厚度为50~70 nm。经醋酸双氧铀、柠檬酸铅分别对样品染色,在JEM21200EX型透射电镜下观察并拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄瓜低农药残留品系 D0351 和高农药残留品系 D9320 果实的外部形态

黄瓜低农药残留品系 D0351 果实的外果皮呈现黄白色,带有刺瘤,刺瘤坚硬,果实纵径14.79 cm,横径6.31 cm,而高农药残留品系 D9320 果实的外果皮呈现浅绿色,带有刺瘤,果实纵径25.46 cm,横径5.78 cm。

### 2.2 黄瓜低农药残留品系 D0351 和高农药残留品系 D9320 在两种农药处理下外果皮细胞结构

未经农药处理的低农药残留品系 D0351 外果皮细胞为长条形(图1-1);毒死蜱处理后外果皮细胞变成了近圆形(图1-2);霜霉威处理后外果皮细胞由长条形变成长圆形,长度变小,宽度未发生变化(图1-3);两种农药处理相比较表明农药种类的差异对外果皮细胞变化的影响是不同的,说明不同种类农药作用植株的方式是不同的。

未经农药处理的黄瓜高农药残留品系 D9320 外果皮细胞为近正方形(图1-4);毒死蜱和霜霉威处理后外果皮细胞形状没有变化,但细胞的面积都增大,毒死蜱处理后外果皮细胞的面积增加幅度比霜霉威处理的小(图1-5、1-6);说明霜霉威处理对植株外果皮细胞的作用力大。

未经农药处理的品系 D0351 与 D9320 的外果皮细胞结构分别为长条形与近正方形,差异显著,表皮细胞形态的差异是导致农药残留量高低的解剖学特征之一。

毒死蜱处理的两个品系的外果皮细胞的形状及面积都不同,并且细胞面积 D0351 比 D9320 的小。

霜霉威处理的两个品系的外果皮细胞的形状及面积都不同, D0351 外果皮细胞的形状为长圆形, D9320 的形状是近正方形, D0351 的外果皮细胞面积小于 D9320 品系。

### 2.3 黄瓜低农药残留品系 D0351 和高农药残留品系 D9320 在两种农药处理下的气孔结构

未经农药处理的 D0351 气孔是由两个保卫细胞组成的肾形结构,嵌入外果皮上(图2-1);两种农药处理下的 D0351 气孔组成方式没有改变,都是由两个保卫细胞组成的肾形结构;毒死蜱处理的 D0351 气孔近似于圆形,气孔下陷的现象消失,气孔的开口度变大(图2-2);霜霉威处理的 D0351 气孔椭圆形,下陷消失,气孔整体变大,气孔的开口度变大(图2-3)。



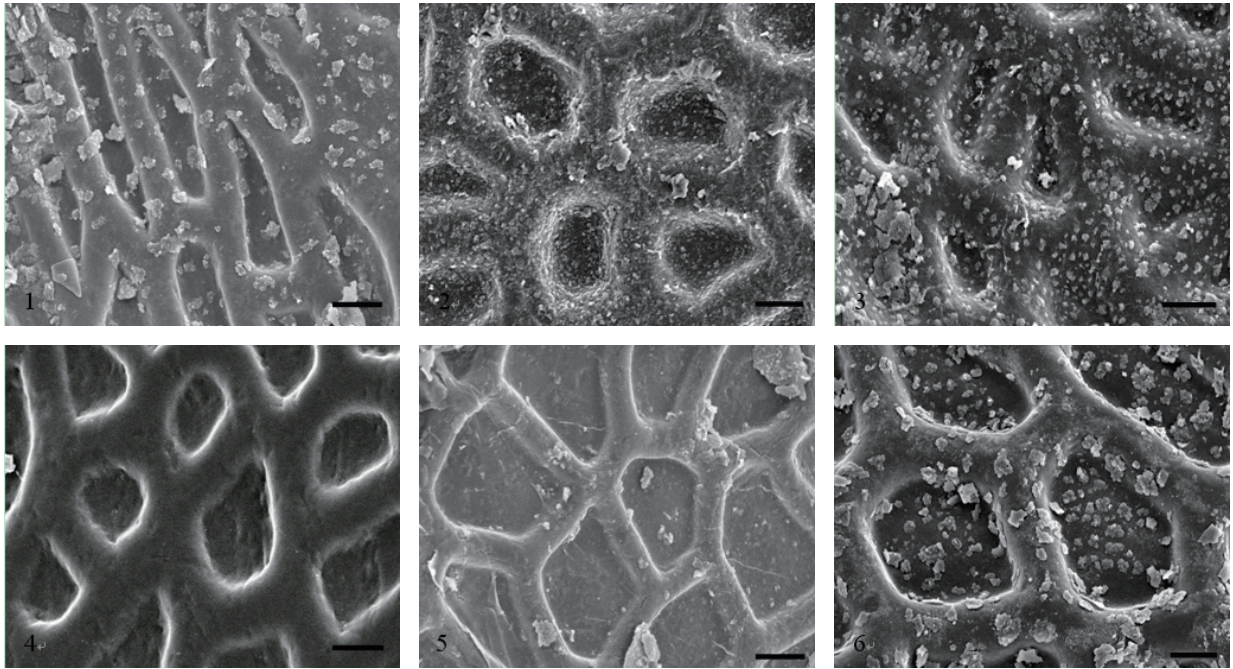


图1 D0351品系与D9320品系不同处理下外果皮细胞的结构

1: 未经农药处理的低农药残留黄瓜品系D0351, 放大3 000倍; 2: 毒死蜱处理的低农药残留黄瓜品系D0351, 放大3 000倍; 3: 霜霉威处理的低农药残留黄瓜品系D0351, 放大3 700倍; 4: 未经农药处理的高农药残留黄瓜品系D9320, 放大3 500倍; 5: 毒死蜱处理的高农药残留黄瓜品系D9320, 放大3 000倍; 6: 霜霉威处理的高农药残留品系D9320, 放大3 000倍; Bar=10  $\mu$ m。

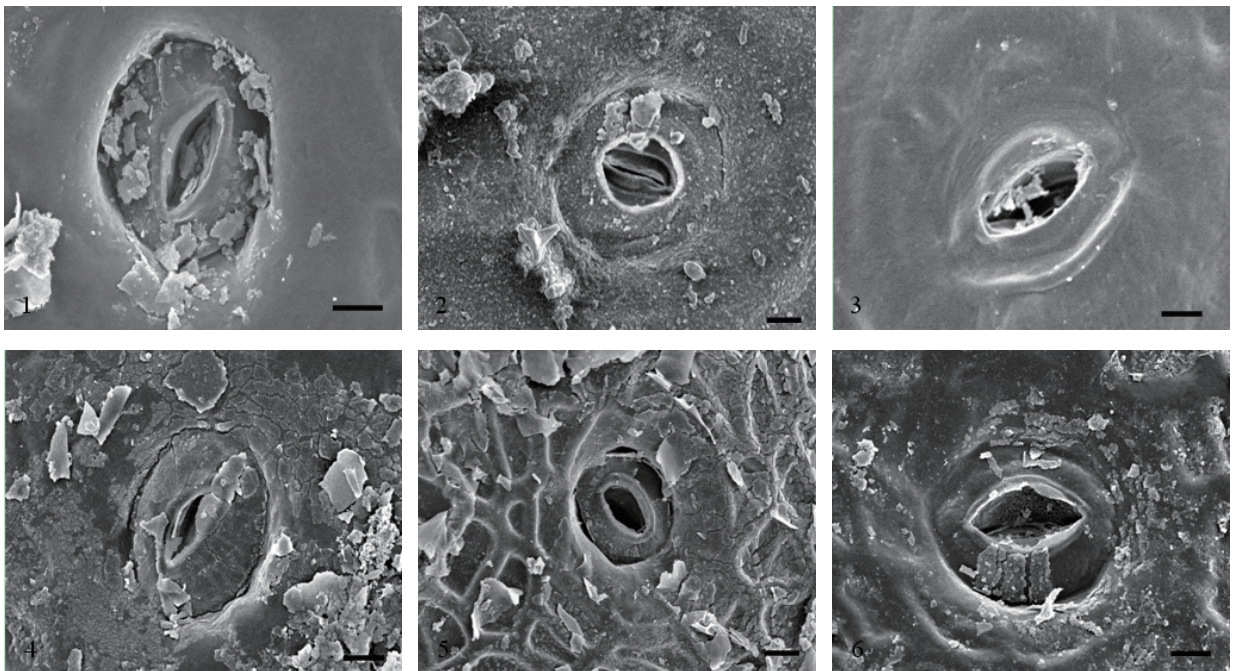


图2 D0351品系与D9320品系不同处理下气孔的特征

1: 未经农药处理的低农药残留黄瓜品系D0351, 放大3 200倍; 2: 毒死蜱处理的低农药残留黄瓜品系D0351, 放大2 000倍; 3: 霜霉威处理的低农药残留黄瓜品系D0351, 放大2 000倍; 4: 未经农药处理的高农药残留黄瓜品系D9320, 放大2 500倍; 5: 毒死蜱处理的高农药残留黄瓜品系D9320, 放大2 300倍; 6: 霜霉威处理的高农药残留品系D9320, 放大1 800倍。Bar=10  $\mu$ m。



未经农药处理的 D9320 气孔是由两个保卫细胞组成的肾形结构, 嵌入外果皮上(图 2-4), 毒死蜱农药处理的 D9320 的气孔组成与未经农药处理相同, 气孔变大, 开口度变大(图 2-5); 霜霉威处理的 D9320 气孔变大, 开口度变大(图 2-6); 霜霉威处理比毒死蜱处理的气孔开口度变化大。

未经农药处理的 D0351 与 D9320 两个品系气孔都是由两个保卫细胞组成的肾形结构, D0351 品系比 D9320 品系气孔在外果皮嵌入得深, 气孔大小相近, D0351 品系气孔开口度小于 D9320 品系。

毒死蜱处理后的两个品系的气孔和开口度都发生了变化, 气孔的长宽比变小, 但气孔的开口度变大, D0351 品系的变化程度比 D9320 品系小, D0351 品系的气孔在外果皮的下陷消失, D9320 品系的气孔在外果皮的下陷程度加重。

霜霉威处理后的两个品系的气孔和开口度都发生变化, 气孔的长宽比变小, 气孔的开口度变大, D9320 品系的变化程度比 D0351 品系显著。

未经农药处理的两个品系气孔形态、大小基本相同, 喷施农药后由于气孔开口度大小的变化, 导致两个品系的残留量发生了变化。因此, 黄瓜品种外果皮气孔的大小和开张程度的变化是农药残留量高低的一个重要的解剖学指标。

#### 2.4 黄瓜低农药残留品系 D0351 和高农药残留品系 D9320 在两种农药处理下的叶绿体结构

未经农药处理的 D0351 品系的叶绿体椭圆形, 膜系统完整, 基粒片层结构清晰可见, 排列整齐, 方向与叶绿体长轴平行, 叶绿体内含有椭圆形的淀粉粒, 嗜饿颗粒圆形(图 3-1); 毒死蜱和霜霉威两种农药处理后 D0351 品系的叶绿体形态及内部结构均没有改变, 毒死蜱农药处理的嗜饿颗粒变多, 体积增大(图 3-2); 霜霉威处理下嗜饿颗粒体积略变大(图 3-3)。

未经农药处理的高农药残留黄瓜品系 D9320 叶绿体梭形, 叶绿体膜系统清晰可见且有完整

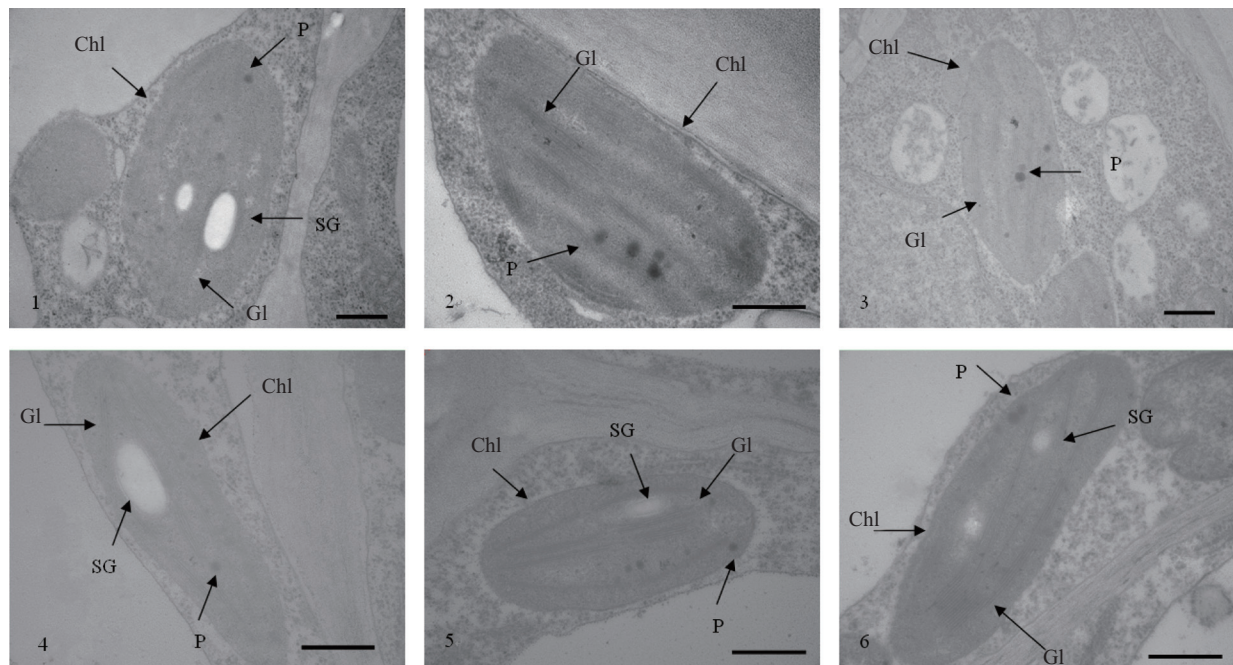


图 3 D0351 品系和 D9320 品系不同处理下叶绿体的结构

1: 未经农药处理的低农药残留黄瓜品系 D0351, 放大 4 000 倍; 2: 毒死蜱处理的低农药残留黄瓜品系 D0351, 放大 6 000 倍; 3: 霜霉威处理的低农药残留黄瓜品系 D0351, 放大 4 000 倍; 4: 未经农药处理的高农药残留黄瓜品系 D9320, 放大 6 000 倍; 5: 毒死蜱处理的高农药残留黄瓜品系 D9320, 放大 6 000 倍; 6: 霜霉威处理的高农药残留品系 D9320, 放大 6 000 倍。Bar=500 nm; Chl: 叶绿体; Gl: 基粒片层; P: 嗜饿颗粒; SG: 淀粉粒。

的膜系统, 基粒片层结构清晰并与叶绿体长轴方向平行, 淀粉粒椭圆形在叶绿体内部, 嗜锇颗粒圆形, 比较小(图 3-4); 经过两种农药处理后, 嗜锇颗粒数量变多, 体积变大(图 3-5、3-6)。

未经农药处理的两个品系的叶绿体在形状上有细微的差异, 内部结构并没有差异。

毒死蜱处理的 D0351 品系的嗜锇颗粒体积比 D9320 品系的大。

霜霉威处理的两个品系叶绿体形态结构及内部组成没有差异。

## 2.5 黄瓜低农药残留品系 D0351 和高农药残留品系 D9320 在两种农药处理下线粒体解剖学特征

两个品系无论是否经过农药的处理, 农药的种类是否相同, 线粒体的结构特征都没有发生变化, 双层膜结构清晰可见, 膜系统完整, 内部嵴无规则排列(图 4-1~4-6)。

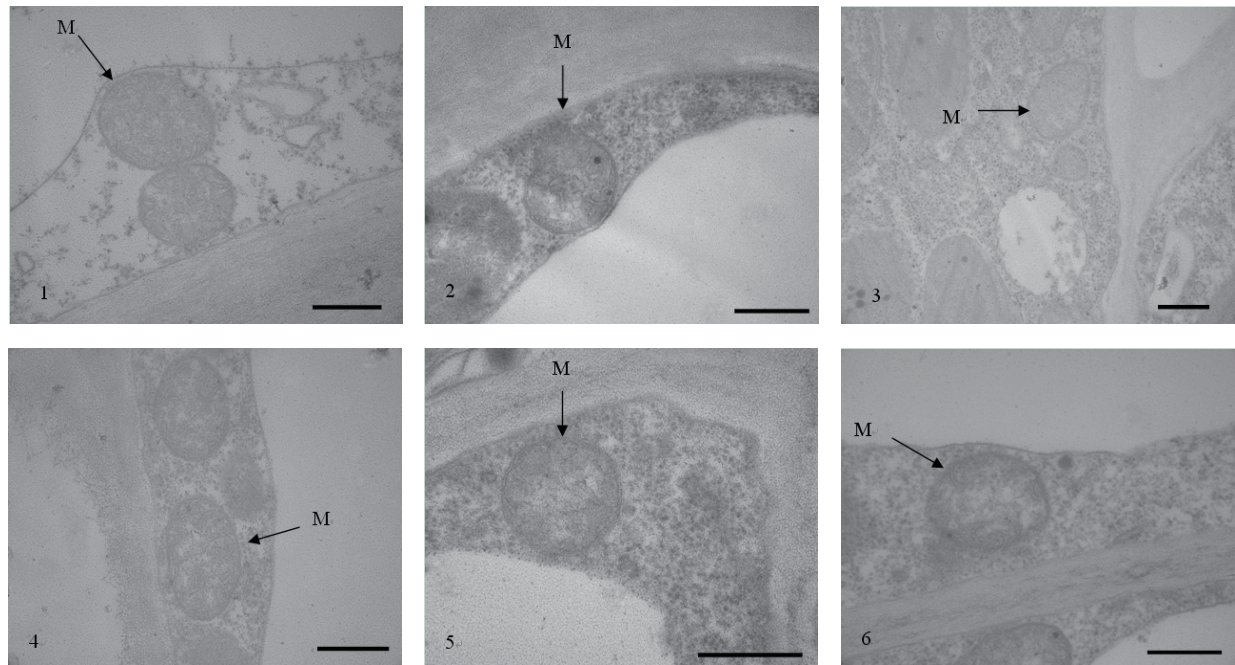


图 4 D0351 品系与 D9320 品系不同处理下线粒体结构

1: 未经农药处理的低农药残留黄瓜品系 D0351, 放大 6 000 倍; 2: 毒死蜱处理的低农药残留黄瓜品系 D0351, 放大 6 000 倍; 3: 霜霉威处理的低农药残留黄瓜品系 D0351, 放大 4 000 倍; 4: 未经农药处理的高农药残留黄瓜品系 D9320, 放大 6 000 倍; 5: 毒死蜱处理的高农药残留黄瓜品系 D9320, 放大 8 000 倍; 6: 霜霉威处理的高农药残留品系 D9320, 放大 6 000 倍。Bar=500 nm; M: 线粒体。

## 3 结论与讨论

低农药残留黄瓜品系 D0351 与高农药残留黄瓜品系 D9320 的外果皮细胞在自然状态下形态有显著差异, 低农药残留品系 D0351 的外果皮细胞呈长条形, 而高农药残留品系 D9320 的外果皮细胞呈近正方形。细胞大小的差异导致细胞对环境中的悬浮物及其他化学物质的接触面积和吸收量不同, 外果皮细胞在形态上的差异是比较两个黄瓜品系农药残留量高低的一个指标。喷施化学农药后, 通过表皮细胞形态变化改变了农药在植株体内的残留量, 细胞形态变化大, 对农药的抵抗作用强。两种农药喷施于植株果实上, 细胞表面的微环境发生变化, 影响了细胞结构变化, 导致生理代谢异常(张清智等, 2008); 无论是哪种农药处理, 低农药残留品系 D0351 的外果皮细胞面积均小于高农药残留品系 D9320。

自然状态下 D0351 气孔开口度小于 D9320; 经过农药处理后, D0351 品系气孔开张程度比



D9320 品系变化小。气孔是植株进行气体交换最重要的器官, 喷施农药后农药通过气孔进入植株体内, 所以当气孔开口度比较大时, 农药进入植株体内的量较多, 这也是 D0351 品系农药残留量比 D9320 品系低的原因之一, 接触农药后 D0351 品系的气孔开口度也很小, 在组织结构上阻止药液进入。因此, 黄瓜外果皮气孔大小及开口度变化的程度可以作为低农药残留的一个重要的解剖学指标。

两个品系果实的外部形态及农药残留量都有很大的差异, 但叶绿体的形态及内部结构相同, 叶绿体都能正常进行光合作用, 提供植株生长必要的养料, 所以叶绿体不能作为评价残留量高低的解剖学特征。喷施农药量过大, 植株叶片边缘出现白斑, 叶片变硬, 叶绿体内嗜银颗粒数量及体积增大, 加速植株正常的代谢, 是植株衰老的一个标志(王志坤等, 2007)。

线粒体是为植株生长提供能量的场所, 两个农药残留量不同的黄瓜品系线粒体的结构相同, 线粒体的功能相同; 当喷施了两种不同类型的农药后, 线粒体没有发生变化, 说明线粒体对化学农药的毒害有一定的抗性, 或者化学农药的残留量不足以引起线粒体的伤害。

低农药残留品种 D0351 外果皮细胞形状呈长条形、细胞面积小、气孔的开口度小是导致植株农药残留量低的重要解剖学特征。化学农药对植株的解剖结构有一定的影响, 毒死蜱和霜霉威处理的外果皮细胞、气孔及叶绿体中嗜银颗粒发生了改变, 低农药残留品种对化学农药引起的变化抵御能力比较强。喷施高浓度天王星处理棉花叶片, 对叶肉细胞、叶绿体、线粒体都有一定的毒害作用(郭明和李志军, 2000)。这种变化是由药害作用引起, 还是由植物本身作用仍需要进一步的研究。至于农药影响植物的超微结构并破坏正常的生理代谢过程的作用机理、作用方式等深层次原因有待进一步的探讨研究。

#### 参考文献

- 郭明, 李志军. 2000. 天王星对棉株叶组织超微结构的影响. 应用与环境生物学报, 6(6): 530-534.
- 李宏. 2009. 土壤农药残留物对蚕豆根尖细胞微核及染色体畸变的影响. 贵州农业科学, 37(4): 182-183.
- 李婧婧, 黄俊华, 谢树成. 2011. 植物蜡质及其与环境的关系. 生态学报, 31(2): 565-574.
- 刘芳芳, 秦智伟, 周秀艳. 2010. 低农药残留量的黄瓜种质资源筛选. 东北农业大学学报, 41(7): 32-36.
- 马佰慧. 2010. 黄瓜果实霜霉病残留性的遗传分析与 SSR 分子标记. 哈尔滨: 东北农业大学.
- 马永亮, 杨玉武, 刘立杰, 曲爱军. 2006. 氧化乐果、吡虫啉和苦参碱对大叶黄杨蜡质层含量的影响. 林业科技, (1): 19-20.
- 曲波, 李宝聚, 范海延, 朱延姝. 2003. 黄瓜病害发展新趋势与无公害防治策略. 北方园艺, (5): 7-8.
- 王志坤, 秦智伟, 李艳秋, 周秀艳. 2007. 黄瓜果实衰老过程中果皮超微结构的变化. 园艺学报, 34(4): 889-894.
- 吴凯, 周晓阳. 2007. 环境胁迫对植物超微结构的影响. 山东林业科技, (3): 80-83.
- 张清智, 陈振德, 王文娇, 刘红玉. 2008. 毒死蜱胁迫对小白菜抗氧化酶活性和相关生理指标的影响. 生态学报, 28(9): 4524-4530.
- 周建朝, 奚红光. 2006. 不同基因型甜菜根形态和解剖学研究. 中国甜菜糖业, (4): 2-4.
- Gao Yang, Guo Yan-Kui, Lin Shao-Hang, Fang Ye-Ying, Bai Ji-Gang. 2010. Hydrogen peroxide pretreatment alters the activity of antioxidant enzymes and protects chloroplast ultrastructure in heat-stressed cucumber leaves. Scientia Horticulturae, 126(1): 20-26.
- Liu Yubing, Li Xinrong, Liu Meiling, Cao Bo, Tan Huijuan, Wang Jin, Li Xiaojun. 2012. Responses of three different ecotypes of reed (*Phragmites communis* Trin.) to their natural habitats: leaf surface micro-morphology, anatomy, chloroplast ultrastructure and physio-chemical characteristics. Plant Physiology and Biochemistry, 51: 159-167.
- Trotta A, Redondo-Gómez S, Pagliano C, Clemente M E F, Rascio N, La Rocca N, Antonacci A, Andreucci F, Barbato R. 2012. Chloroplast ultrastructure and thylakoid polypeptide composition are affected by different salt concentrations in the halophytic plant *Arthrocnemum macrostachyum*. Journal of Plant Physiology, 169: 111-116.