

对锰害敏感性不同的两个苹果品种枝条中锰的积累与分布

徐圣友^{1,2} 姚青³ 王贺¹ 张福锁^{1*} 于忠范⁴ 姜学岭⁴

(¹ 中国农业大学植物营养系,教育部植物—土壤相互作用重点实验室,北京 100094; ² 黄山学院资源与环境系,黄山 245000; ³ 华南农业大学园艺学院,广州 510642; ⁴ 烟台市农业科学院土壤肥料研究所,烟台 265500)

摘要:以对苹果粗皮病抗性不同的两个苹果品种富士(感病)和乔纳金(抗病)为材料,通过田间采样、室内盆栽模拟,结合组织化学、显微鉴定和 X-射线微区分析,研究了枝条内锰的累积、分布与粗皮病抗性的关系。结果表明,锰在韧皮部的含量高于木质部,感病品种含量高于抗病品种;粗皮病病斑部位存在氧化锰沉淀,韧皮部锰的局部累积和分布与病斑的分布相一致;锰在感病品种的枝条横截面上存在局部累积现象,而在抗病品种上分布较均匀。

关键词:苹果;品种;粗皮病;锰;含量;分布

中图分类号:S 661.1 文献标识码:A 文章编号:0513-353X(2003)01-0019-04

国内外对苹果粗皮病的研究已有 90 年的历史,已经证实树体过量吸收锰是造成粗皮病的主要原因^[1~5]。由于锰易被植物吸收并迅速运输到地上部,所以锰害首先出现在地上部^[3]。锰在组织中的分布和化学形态与植物组织耐锰能力有关。Horst 等^[4]发现,耐锰能力高的植物叶片中锰的分布十分均匀,而锰敏感品种叶片中的锰呈局布累积状态。Blamey 等^[5]发现,向日葵组织细胞有分室化作用,锰在细胞中被钝化,不易发生毒害。Zeiger 等^[6]发现,产生粗皮病的红富士苹果的锰含量随季节的变化而变化。Richard 等^[7]发现锰毒表现为缺绿症、生长缓慢和粗皮病。Domoto 等^[8]发现高锰存在的土壤诱发缺铁,苹果体内的 Fe/Mn 与粗皮病有关。David 等^[9]进一步研究发现,苹果粗皮病与叶片中的锰含量有关。苹果富士系品种通常对锰敏感,易发生粗皮病,而乔纳金则相反。本研究以这两个苹果品种为试材,研究其体内锰的累积、分布,以阐明锰与苹果粗皮病发生的内在机制。

1 材料与方法

以对锰敏感性高的富士品种和敏感性低的乔纳金品种为试材。田间调查地点为山东烟台栖霞的富士苹果园(发病)和乔纳金苹果园(未发病),取样时间是 2000 年 6 月 2~8 日和 9 月 21~27 日。室内盆栽试验在中国农业大学植物营养系温室中进行。陶瓷盆直径 25 cm、深 40 cm,装土 8 kg。供试土壤为棕壤土,pH(CaCl₂)为 6.5,有效锰(DTPA-Mn)为 2.52 mg/kg。设 0、33、330 mg/kg 3 个锰水平,将 MnSO₄ 施入土壤。田间调查和盆栽试验中每个处理均设 4 个重复。选取 1、2 和 3 年生枝条,剪下后用手提冰箱带回实验室,放入冰箱中待测。2000 年 10 月将植物组织在 70℃ 烘干,粉碎后取 0.3~0.5 g 于 550℃ 灰化 7~8 h,1:1 HCl 处理后用原子吸收光度计(PE2100)测定锰含量。

荧光切片的制备^[10],用不锈钢剪刀剪取一段枝条,插入样座的小孔中切取部分横段面,在双筒解剖镜下选取所需样品于荧光显微镜下观察。X-射线显微能谱法^[11]:用超低温冷冻置换法脱去细胞内水分,材料包埋于 Spurr 树脂中,切成 2 μm 厚的切片,表面喷碳镀膜后在场发射扫描电子显微镜(JSM6300)下区分形态结构,并用 EXAC-2000 型 X-射线能谱仪(清华大学电镜室提供)测定细胞微区中锰、铁元素的分布,分析电压为 20 keV。组织化学分析法^[10]:用普通光学显微镜选取所需组织

收稿日期:2002-04-18;修回日期:2002-07-08

*通讯作者:中国农业大学资环学院植物营养系,北京 100094

切片, 分别用联苯胺染色 5 min 和 30 min, 于高倍显微镜下观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 不同品种苹果对粗皮病的敏感性

田间调查结果表明, 苹果粗皮病发病时, 皮孔向外排出溶胶物并在表皮裂口处凝结成直径小于 1 mm 的棕褐色小粒, 导致枝条表面不光滑, 小粒逐渐扩大形成棕黄色或棕褐色圆形突起。随着病情的加重, 圆形突起颜色加深, 范围扩大, 直径达 2~3 mm, 病斑变得不规则。粗皮病的发生随枝龄不同而有所差异。夏季 (6 月), 2 年生和 3 年生枝条的发病程度高于 1 年生枝条。秋季 (9 月), 1 年生枝条的发病程度则高于 2 年生和 3 年生枝条。粗皮病的发生存在着明显的基因型差异。富士为感病品种, 皮孔周围形成许多褐色圆形突起, 病斑在枝干表面平行排列, 枝条横切面的韧皮部存在褐色沉淀; 乔纳金为抗病品种, 表皮光滑, 皮孔清晰, 未见任何发病症状, 枝条横切面韧皮部无褐色沉淀。

2.2 苹果枝条内锰的累积

夏、秋季测定结果 (表 1) 表明, 锰含量整体而言韧皮部高于木质部; 同一品种同一级枝条中韧皮部比木质部高 1~4 倍; 韧皮部秋季枝条 (300 mg/kg 以上) 高于夏季枝条 (300 mg/kg 以下)。

夏季富士和乔纳金品种的枝条韧皮部中锰含量随枝龄的增加而升高, 木质部中则随枝龄的增加而降低; 韧皮部中锰含量, 1~3 年生枝条中均为富士品种显著高于乔纳金品种; 木质部中锰含量, 仅在 1 年生枝条上富士显著高于乔纳金。秋季枝条内锰含量明显高于夏季; 与夏季相似, 枝条内锰含量随枝龄的增加而趋于降低; 两品种间的差异不明显。

表 1 两个苹果品种枝条内锰的含量

Table 1 Mn content in shoots of two apple cultivars (mg/kg)							
取样时间 Sampling dates	品种 Cultivar	1 年生 First-year		2 年生 Second-year		3 年生 Third-year	
		木质部 Xylem	韧皮部 Phloem	木质部 Xylem	韧皮部 Phloem	木质部 Xylem	韧皮部 Phloem
夏季 Summer	富士 Fuji	90.2 *	229.6 *	64.32	244.0 *	58.3	282.0 *
(6 月 2~8 日)	乔纳金 Jonagold	59.2	150.4	49.9	160.8	40.1	168.2
秋季 Autumn	富士 Fuji	133.3	466.6	95.47	352.0	85.0 *	367.7
(9 月 21~27 日)	乔纳金 Jonagold	151.1	373.7	141.5	334.4	128.6	364.6

*表示两个品种间的差异达到 5% 显著水平, 下同。 * Indicates a significant different at 5% between two cultivars, the same below.

2.3 盆栽施锰条件下不同品种体内锰的累积

随盆栽土壤中施锰量增加, 苹果枝条内锰含量也迅速增加 (表 2), 尤其是施锰量增加到 330 mg/kg 时, 感病品种 1 年生和 2 年生枝条韧皮部中锰含量达到 1 499.5 和 1 644.8 mg/kg, 远远高于不施锰的对照。与田间调查的结果相同, 韧皮部中锰含量高于木质部。

表 2 的数据还表明, 在不施锰的处理中两品种枝条韧皮部和木质部锰含量没有显著差异, 但施锰量为 33 和 330 mg/kg 时, 与抗病品种相比, 感病品种 1 年生和 2 年生枝条韧皮部中锰含量显著增加, 木质部中的锰含量, 在施锰量为 330 mg/kg 的处理中也显著高于抗病品种。

2.4 粗皮病病斑部位锰的化学定位

由于联苯胺能使氧化锰变成蓝黑色的沉淀, 苹果枝条横切面染色后出现蓝黑色沉淀的区域则为富含氧化锰的区域。染色结果显示, 抗性品种的韧皮部生长良好, 未见任何病斑和锰的积累。与之形成对照, 敏感型品种的韧皮部在染色后出现蓝黑色沉淀, 且与病斑部位相吻合; 染色后 5 min 即可观察

表 2 施锰量不同时两个苹果品种枝条内锰的含量

Table 2 Mn content in shoots of two apple cultivars at different level of Mn application (mg/kg)					
品种 Cultivar	施锰量 Level of Mn application (mg/kg)	1 年生 First-year		2 年生 Second-year	
		木质部 Xylem	韧皮部 Phloem	木质部 Xylem	韧皮部 Phloem
富士	0	36.3	94.0	48.1	82.9
Fuji	33	69.4	272.8 *	88.8	285.4
	330	361.9 *	1499.5 *	447.4 *	1644.8 *
乔纳金	0	32.3	45.1	91.0	75.9
Jonagold	33	59.4	84.8	156.8	185.4
	330	121.9	147.4	699.5	744.8

病斑组织变色, 随着时间延长颜色也逐渐加深, 30 min 后变成蓝黑色 (见插页 3 图版, 1)。另外, 蓝黑色氧化锰沉淀区域全部出现在韧皮部, 木质部中没有, 表明锰的累积主要发生在韧皮部, 这与粗皮病的发生部位相一致。木栓化的细胞在荧光显微镜下能自发荧光。荧光显微镜观察表明, 敏感型品种枝条横切面上黑色的氧化锰沉淀周围包裹着木栓鞘 (见插页 3 图版, 2), 木栓鞘由几层细胞组成, 形状不规则。这可能是植物组织自身的一种防卫措施, 阻止高浓度的锰向周围扩散, 或者是防止周围细胞的可溶性锰离子继续向锰累积的病斑部位转移, 避免病情加重。

2.5 粗皮病病斑部位锰的能谱分析

锰射线扫描结果显示: 在富士的 2 年生枝条中, 与明显大小不等的病斑相对应 (图 1, A), 在 219 μm 处的病斑部位可见到明显的锰的能谱峰 (图 1, B), 峰的高低与病斑大小成正比; 在乔娜金的 2 年生枝条中, 由于未见明显病斑 (图 1, C), 锰的能谱峰比较平稳, 没有出现明显的峰值 (图 1, D)。这表明, 锰在植物体内的分布与粗皮病发生的直接相关。

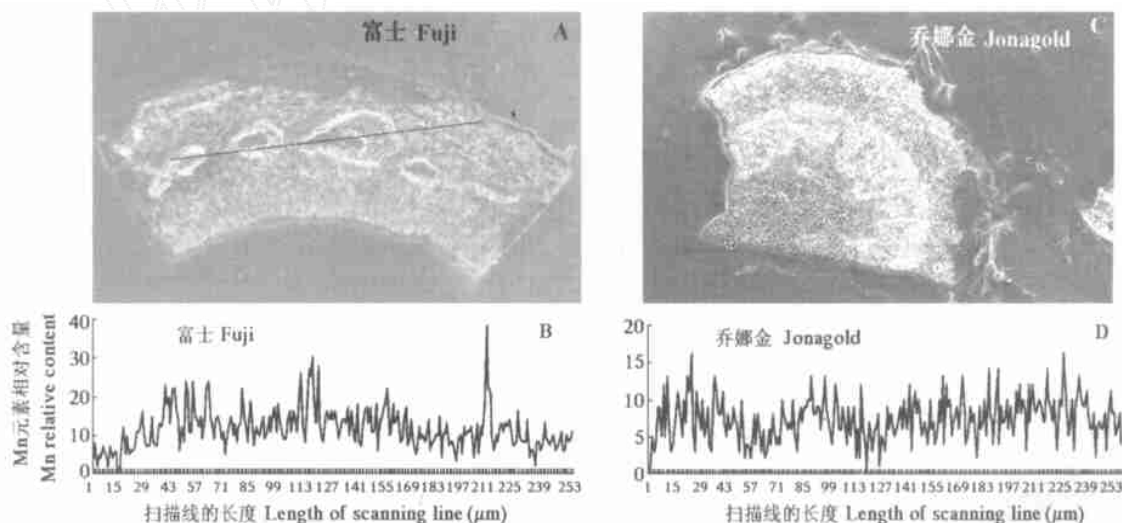


图 1 不同苹果品种 2 年生枝条内锰的能谱扫描图

Fig. 1 Mn energy spectrum scanning of two-year-old shoot cross-section of different cultivars

图 2 显示的是感病品种枝条的病斑和抗病品种健康枝条内的 X-射线电子探针元素点分析图谱。可以看出, 在能量为 6.0 keV 的横坐标处有明显的锰元素的能谱峰, 乔娜金韧皮部几乎检测不到锰的能谱峰。此外, 钾和钙的能谱峰在两个品种间也存在显著差异。

3 讨论

富士和乔纳金两个粗皮病抗性不同品种对锰的吸收和分布存在差异。这种差异可能有两个方面的原因: 一是根系还原活性差异, 敏感品种的根际还原力强, 形成 Mn^{2+} 而被吸收; 二是体内锰的区域化作用, 抗性品种的锰通常在体内均匀分布, 并积累在非代谢区域内, 如液泡。

本试验中发现, 已经出现可见粗皮病症的富士品种的 2、3 年生枝条, 其韧皮部的锰含量分别为 244.0 mg/kg 和 282.0 mg/kg, 而韧皮部锰含量为 229.6 mg/kg 的 1 年生枝条较少发病 (表 1), 表明 250 mg/kg 的韧皮部锰含量可能是富士出现粗皮病的临界点。然而在盆栽试验中, 33 mg/kg 锰处理的

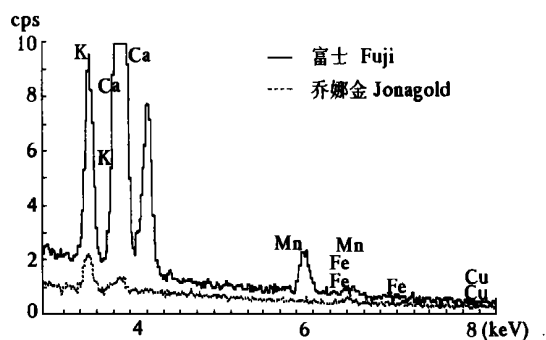


图 2 不同苹果品种 2 年生枝条的韧皮部 X-射线电子探针元素点分析图谱

Fig. 2 X-ray electronic probe analysis map of two-year-old shoot phloem cross-section of two different cultivars

富士枝条韧皮部锰含量达到 280 mg/kg 尚未出现粗皮病症, 表明粗皮病的发生不仅与韧皮部锰含量相关, 还受到树体的生理状态(如氧化活性、分室作用等)、环境条件(如病害、气候条件等)的影响, 前者是内因, 后者是外因, 基因型的差异则更大。因此, 很难给出一个粗皮病发生的临界锰浓度^[3]。

国内外关于锰引起苹果粗皮病发生的文献报道中大多是测定叶片或树体的平均锰含量^[2,4~7]。事实上, 过量吸收某种矿质元素所引起的毒害主要与该元素的局部累积有关, 有必要对其进行定位。本试验正是通过定位研究, 证实了局部锰的过量累积是粗皮病发生的直接原因^[12~14]。我们的研究还发现氧化锰的形成与感病品种较强的氧化活性有关。因此可以推测, 锰敏感型植物吸收大量的锰之后运输到地上部, 由于不均匀分布和较强的氧化活性, 导致在皮层内形成氧化锰沉淀, 出现坏死斑, 最终形成粗皮现象。抗性品种抗锰毒的机制是锰在组织细胞中分布较均匀。至于为什么感病品种体内的锰出现局部累积状态, 可能有某种诱发锰局部积累的机制, 或有某种未知因素在控制着锰离子的移动和分布, 这还有待进一步深入研究。

参考文献:

- 1 Clark R B. Iron deficiency in plants grown in the plains of the U. S. *Plant Nutrition*, 1982, 5: 25 ~ 32
- 2 Graham R D, Hannam R J, Vren N C. Manganese in soil and plants. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1988. 175 ~ 188
- 3 张福锁. 植物营养生态生理学和遗传学. 北京: 中国科学技术出版社, 1993. 231 ~ 233
- 4 Horst W J, Fecht M, Maier P. Physiology of manganese toxicity and tolerance in *Vigna unguiculata* (L.) wall. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 1999, 162: 263 ~ 274
- 5 Blamey, Joyee F P C, Edwards D C, et al. Role of trichomes in sunflower tolerance to manganese toxicity. *Plant Soil.*, 1986, 81: 171 ~ 180
- 6 Zeiger, Shelton J E. Seasonal distribution of manganese in leaves and shoots of red delicious apple trees showing internal bark necrosis (IBN). *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1958, 64: 213 ~ 215
- 7 Richard C, Thompson A H. Solution culture investigations of the influence of manganese, calcium, boron and pH on internal bark necrosis of 'Delicious' apple trees. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1972, 97 (1): 138 ~ 141
- 8 Domoto P A, Thompson A. Effect of interactions of calcium, potassium and manganese supply on 'Delicious' apple trees as related to internal bark necrosis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1976, 101 (1): 44 ~ 47
- 9 David, Ferree. Performance of eight apomictic selections as apple rootstocks. *Hortscience*, 1998, 33 (4): 641 ~ 643
- 10 孙敬三, 钱迎倩. 植物细胞学研究方法. 北京: 科学出版社, 1987. 7 ~ 35
- 11 Hodson A. Subcellular localization of mineral deposits in root of wheat. *Protoplast*, 1993, 5: 19 ~ 32
- 12 Eggert, Hayden R A. Histochemical relationship of manganese to internal bark necrosis of apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1970, 95: 715 ~ 719
- 13 李国恒. 苹果粗皮病发病症状观察. 北方果树, 1996, 4: 15
- 14 姜学玲, 于忠范. 胶东苹果粗皮病发病原因和防止对策. 落叶果树, 1998, 1: 36 ~ 38

Accumulation and Distribution of Manganese in Shoots of Apple Cultivars with Different Sensitivity to Manganese

Xu Shengyou^{1,2}, Yao Qing³, Wang He¹, Zhang Fusuo¹, Yu Zhongfan⁴, and Jiang Xueling⁴

(¹ Department of Plant Nutrition, China Agricultural University, Beijing 100094, China; ² Department of Resource and environment, Huangshan College, Huangshan 245000, China; ³ College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510000, China; ⁴ Institute of Soil and Fertilizer, Yantai Academy of Agricultural Science, Yantai 265500, China)

Abstract: With two apple cultivars of different resistance to internal bark necrosis (IBN) as plant material, field investigation and greenhouse culture were carried out to elucidate the relationship between accumulation and distribution of Mn in apple shoots and resistance to IBN. Investigation revealed higher Mn content in phloem and shoot of sensitive cultivar than those in xylem and shoot of resistant cultivar. Histochemical test, microscopic observation and X-ray analysis indicated that manganese oxide deposited in the IBN spot tissue, and the accumulation and distribution of Mn coincided with the IBN spot in phloem. Localized accumulation of Mn was found in the shoot cross-section of sensitive cultivar, while a even distribution of Mn was found in resistant cultivar.

Key words: Apple; IBN; Cultivars; Mn; Content; Distribution

徐圣友等：对锰害敏感性不同的两个苹果品种枝条中锰的积累与分布

Xu Shengyou, et al. Accumulation and Distribution of Manganese in Shoots of Apple Cultivars with Different Sensitivity to Manganese

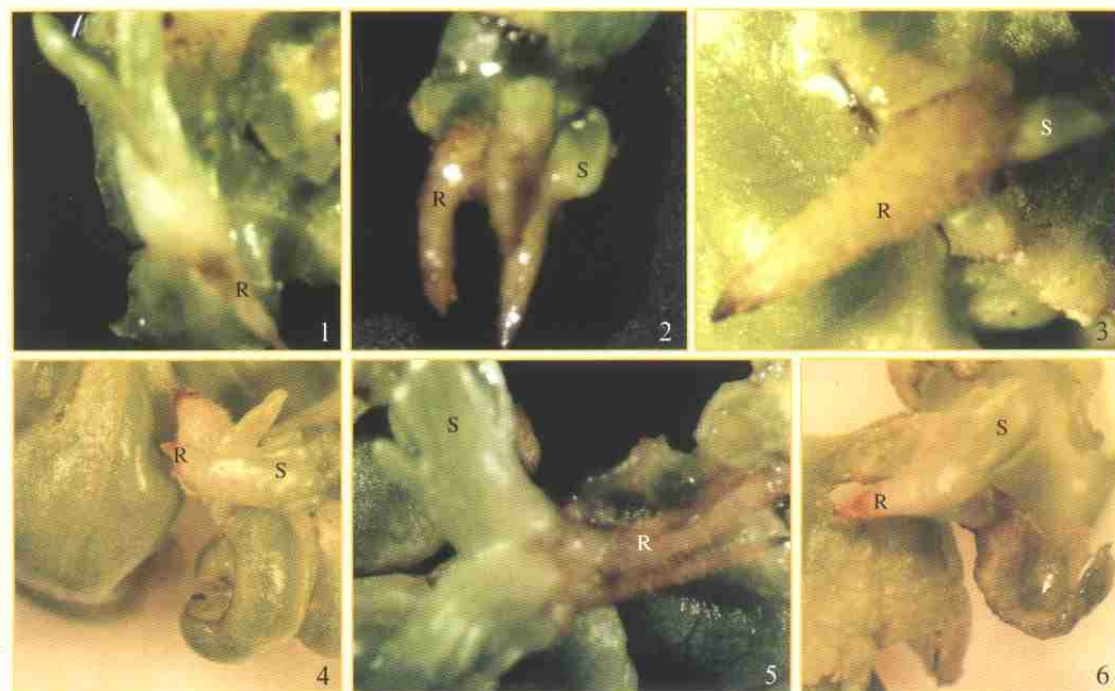


图版说明：1. 富士枝条横截面的联苯胺染色($\times 100$)；2. 富士枝条横切面的荧光切片图($\times 40$)。

Explanation of plates: 1. Phenylalanine staining of 'Fuji' shoot cross-section ($\times 100$); 2. Fluorescent slice of Fuji shoot cross-section ($\times 40$).

孙清荣等：西洋梨叶片直接再生体细胞胚

Sun Qingrong, et al. Somatic Embryo Genesis from in Vitro Leaves of Pear



图版说明：绿安久和红安久叶片接种30 d，中脉伤口处直接再生体细胞胚

1,2,4,5: 绿安久；3,6: 红安久。S: 不定芽；R: 不定根。

Explanation for plates: Somatic embryo direct regeneration from leaf cut of D'Anjou and Red D'Anjou, after inoculation 30 days
1,2,4,5: D'Anjou; 3,6: Red Anjou. S: Shoot; R: Root.