

蝴蝶兰叶外植体发生褐变超微细胞结构和酚类物质分布观察

许传俊^{1,2}, 谭茹芳¹, 陈冬茵¹, 赖艳艳¹, 李玲¹

(1. 华南师范大学 生命科学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广东 广州 510631; 2. 福建省亚热带植物研究所, 福建 厦门 361006)

摘 要: 观察蝴蝶兰叶外植体发生褐变后的细胞亚显微结构发现, 细胞膜以及细胞壁扭曲变形甚至断裂, 细胞壁降解严重, 集聚大量黑色颗粒物质, 细胞内出现黑色絮状物质, 叶绿体结构破坏。Pauly 试剂和亚硝酸钠溶液染色结果表明: 褐变外植体存在有较多酚类物质, 染色较深。以上结果说明, 外植体在褐变过程中, 细胞膜完整性被破坏, 酚类含量增加促进褐变。

关键词: 蝴蝶兰; 外植体; 褐变; 亚显微结构; 酚类

中图分类号: Q 943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)21-0090-03

外植体褐变是影响植物组织培养成功的一个重要因素, 研究认为多酚氧化酶(PPO)催化酚类物质生成褐色醌类物质, 醌又再经非酶促聚合, 形成深色物质(羟醌与黑色素等)^[1-2]。一般认为多酚氧化酶分布于细胞质体, 酚类物质存在于液泡, 培养过程中细胞结构损伤, 打破 PPO 与酚类物质的区域化分布, 造成培养物褐化。经前期研究发现, 目前对外植体褐变的发生多集中在相关酶活性的研究, 以及筛选防褐剂等, 对发生褐变的外植体细胞结构变化及其与褐变关系研究较少。Lukkanen 等^[3]指出褐变的疏松愈伤组织细胞结构被破坏, 细胞间和细胞质中沉积鞣质。发生褐变的水稻花药表皮细胞和药室内壁降解严重, 集聚大量黑色颗粒物; 中层与绒毡层降解消失^[4]。蝴蝶兰褐变的叶外植体细胞皱缩, 细胞边界模糊, 维管束已被完全破坏并有填充物堵塞, 颜色反应表明鞣质存在, 部分薄壁细胞中有不明物质沉积^[5]。现研究蝴蝶兰叶外植体在发生褐变后的细胞亚显微结构变化, 以及酚类物质在细胞内分布变化, 探讨酚类分布与结构变化以及与其外植体褐变发生间的关系, 为进一步认识外植体褐变发生的机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蝴蝶兰(*Phalaenopsis*, sp.), 取自华南师范大学生物园, 按照文献[5]离体培养。选取培养 8 d 发生褐变的外植体进行观察。

1.2 试验方法

1.2.1 电镜观察 将外植体切割成长 1 cm、宽 1 mm、厚 1 mm 的组织小块; 置于 2%戊二醛 PBS 固定液中固定 4 h。固定后于 4℃冰箱保存。0.1 M 磷酸缓冲液冲洗 6 次, 每次 20 min; 漂洗后置于 1%锇酸 PBS 固定液中固定 3 h。0.1 M 磷酸缓冲液再冲洗 6 次, 每次 10 min。对漂洗干净后的材料进行脱水, 50%乙醇漂洗 15 min、70%乙醇脱水过夜, 依次通过 80%—90%—100%—100%乙醇逐级脱水, 每次 15 min。脱水后的材料用环氧丙烷置换 2 次, 每次 15 min。再依次用 812 环氧树脂包埋液与环氧丙烷(1:3)、812 环氧树脂包埋液与环氧丙烷(1:1)、812 环氧树脂包埋液与环氧丙烷(3:1)分别浸透 1.3.5.1 h, 最后用纯 812 环氧树脂包埋液包埋过夜。包埋好的材料通过 LKB 型超薄切片机切片, 观察并拍照。以新鲜材料为对照。

1.2.2 酚类组织化学观察 取外植体 0.4%多聚甲醛固定后, 低温冷冻切片, 切片分别置于 Pauly 试剂和 10%亚硝酸钠溶液孵育 30 min 后, 置于显微镜下观察并拍照。以新鲜材料为对照。

2 结果与分析

2.1 蝴蝶兰叶外植体发生褐变后亚显微结构观察

亚显微结构观察发现, 与对照外植体(图 1-I)比较, 发生褐变的外植体细胞的细胞间质发生皱缩(图 1-A), 细胞膜以及细胞壁扭曲变形(图 1-B), 细胞器被降解, 细胞内含物解体, 囊泡内有黑色物质沉积, 细胞内出现黑色絮状物质(图 1-B), 细胞膜断裂(图 1-E)。细胞壁集聚大量黑色颗粒物质(图 1-C、D), 甚至断裂(图 1-G)。褐变外植体的细胞壁与细胞膜分离, 细胞之间的连接处充满不明物质(图 1-F)。褐变外植体的叶绿体受到严重破坏, 整体收缩, 变成巨大的深色的电子致密结构(图 1-H)。

第一作者简介: 许传俊(1970-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为植物细胞分子生物学。E-mail: xcj8899@126.com.

收稿日期: 2010-07-22

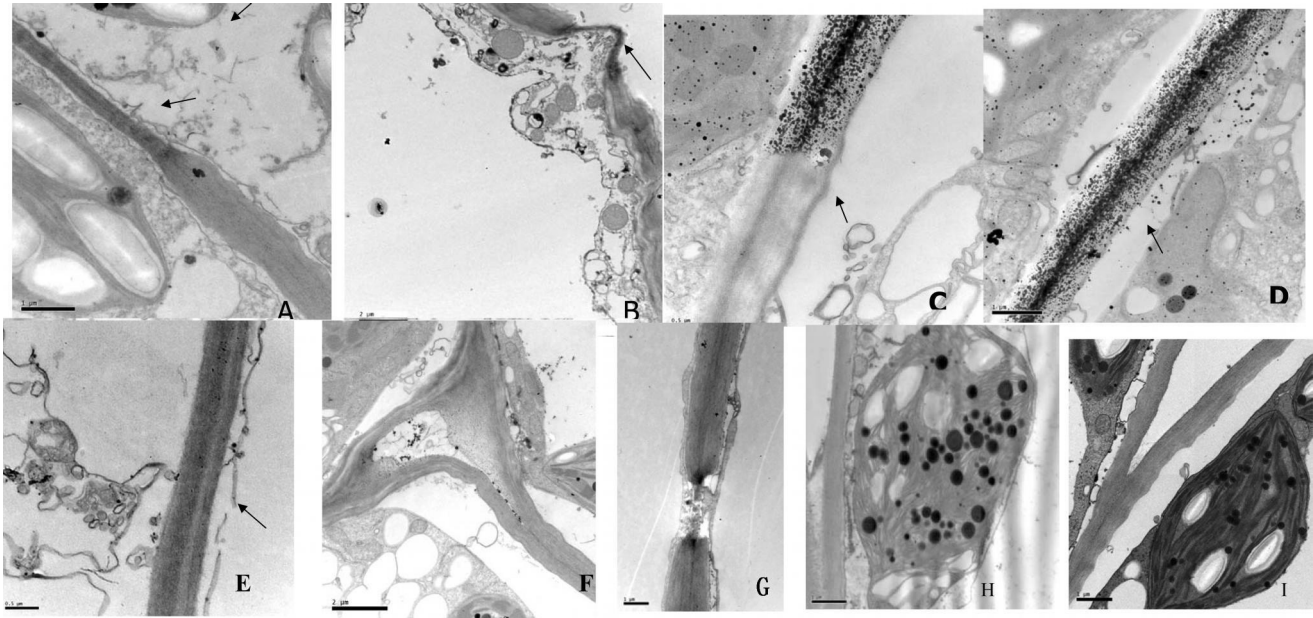


图 1 蝴蝶兰褐变叶外植体亚显微结构(I 为对照)

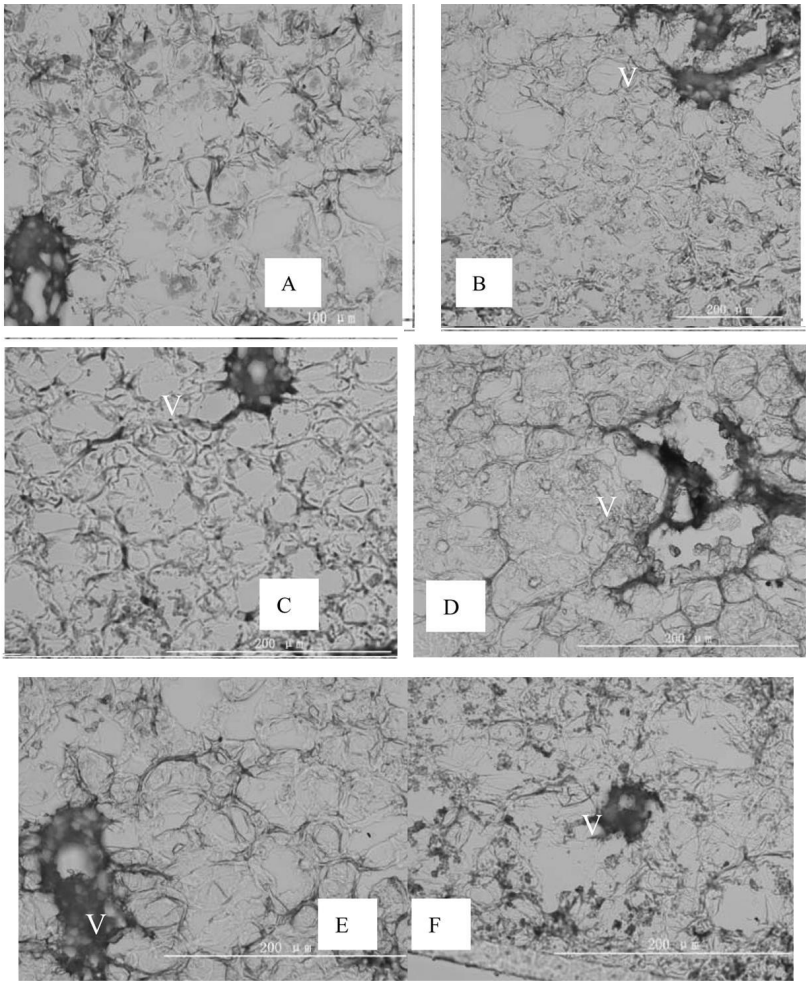


图 2 褐变外植体酚类染色反应

注: 左: 培养 0 h 外植体; 右: 培养 8 d 褐变外植体; A、B: 未染色; C、D: 10% 亚硝酸钠处理; E、F: Pauly 试剂处理; V: 维管束

2.2 蝴蝶兰褐变外植体酚类物质分布变化

褐变的蝴蝶兰叶外植体细胞内叶绿体减少, 维管束结构破坏(图 2B)。10%亚硝酸钠染色结果表明 对照外植体着色较浅, 只维管束有轻微着色(图 2D), 而褐变的外植体细胞质与维管束都呈现深褐色, 说明褐变的外植体细胞质和维管束都有较多的酚类物质分布; 经 Pauly 试剂染色的对照外植体基本没染色(图 2E), 而褐变的外植体细胞质与维管束染色较深(图 2F), 分布较多酚类物质。

3 讨论

细胞在正常情况下, 酚和酶呈局域化分布, 在组织发生褐变时, 这种局域化分布被破坏。陈国刚等^[9]研究发现褐变的香梨果实细胞膜的电解率上升与褐变呈正相关, 龙眼^[7]和荔枝^[8]的果皮褐变时细胞膜完整性被破坏。该研究证实蝴蝶兰外植体离体培养发生褐变时, 细胞膜完整性被破坏, 细胞壁降解严重。前期分析外植体分泌的成分表明, 分泌到培养基中的褐色物质中存在缩合鞣质, 显微结构观察证实大量的鞣质沉积在维管束内^[9]。褐变发生后叶绿体结构破坏, 叶绿素含量下降^[9]。现观察到褐变外植体细胞内细胞器、叶绿体等被降解, 叶绿体呈现黄褐色, 数量较少, 叶绿体遭到破坏。说明在外植体发生褐变时, 膜的通透性改变, 导致褐变发生, 产生的有毒物质毒害细胞, 造成细胞内细胞器和叶绿体被进一步破坏, 导致细胞死亡。

研究表明在蝴蝶兰叶外植体褐变过程中, 酚类物质的含量增加, 与褐变呈现相关性^[9], 分析 PAL 活性随褐变发生逐渐升高, PAL 的表达量增加, 褐变发生早的外植体其 PAL 基因表达出现增加的时间也提前^[10], 说明

酚类的增加与酶的活性和基因的表达有一定的相关性。该研究发现外植体褐变后, 细胞内酚类物质的分布发生变化, 结合前期发现的外植体褐变发生前酚氧化相关酶 PPO、POD 的活性增加, 出现新的同工酶酶带^[9]的结果说明褐变发生因为细胞膜系统破坏, 酶、酚的相互作用产生对细胞有毒害物质, 导致细胞死亡, 培养失败。

参考文献

- [1] Huang L C, Lee Y L, Huang B L. High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture[J]. In vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 2002, 38: 358-365.
- [2] Sittiwat L, Keitipum P, Wannee T. Evidence of enzymatic browning due to laccase-like enzyme during mash fermentation in Thai soybean paste[J]. Food Chemistry, 2003, 80: 171-176.
- [3] Laukkanen H, Rautiainen L, Taulavuori E. Changes in cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds[J]. Tree Physiology, 2000, 20: 467-475.
- [4] 姚焱, 刘向东, 汪珍春, 等. 低温预处理对水稻花药培养中花药壁褐变的结构影响[J]. 热带亚热带植物学报, 2006, 14(4): 307-311.
- [5] 许传俊, 李玲, 李红, 等. 蝴蝶兰褐变外植体的显微结构观察以及褐变成分的初步分析[J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1111-1113.
- [6] 陈国刚, 王祯丽, 董军茂, 库勒勒香梨采后果实褐变与多酚氧化酶、酚类物质及细胞膜结构的关系[J]. 中国农学通报, 2005, 21(8): 83-85.
- [7] 林河通, 陈莲, 孔祥佳, 等. 包装对龙眼果实贮藏期间果皮失水褐变和细胞超微结构的影响[J]. 农业工程学报, 2007, 23(12): 237-241.
- [8] 段学武, 蒋跃明, 苏新国, 等. 纯氧对荔枝果实贮藏期间果皮褐变和细胞超微结构的影响[J]. 热带亚热带植物学报, 2004, 12(6): 565-568.
- [9] 许传俊, 李玲. 蝴蝶兰外植体褐变发生与总酚含量、PPO、POD 和 PAL 的关系[J]. 园艺学报, 2006, 33(3): 671-674.
- [10] 许传俊, 李红, 李玲. 蝴蝶兰叶片外植体褐变过程中 PAL 基因的表达变化[J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(1): 50-54.

Ultrastructure and Distribution of Phenol in *Phalaenopsis* Browning Leaf Explants

XU Chuan-jun^{1,2}, TAN Ru-fang¹, CHEN Dong-yin¹, LAI Yan-yan¹, LI Ling¹

(1. Guangdong Key Lab of Biotechnology for Plant Development, College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631; 2. Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen, Fujian 316006)

Abstract: In the browning *Phalaenopsis* explants, cell walls were distorted. The cell membranes as well as the cell walls were twist distorted even broken. And there were abundant of black pellet substance gather in the degraded cell wall. The chloroplasts were shrunked to deep color structure. The results showed that there a lots of phenol in vascular tissues when the browning explant cell treated with Pauly reagent and 10% NaNO₂. The integrity of cellular membrane structure of browning explant was destroyed during explant browning. The increasing of polyphenol content in explant aggravated browning.

Key words: *Phalaenopsis*; explant; browning; ultrastructure; phenol