

黄瓜果实衰老过程中果皮超微结构的变化

王志坤, 秦智伟*, 李艳秋, 周秀艳

(东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 以抗衰老 '649' 和易衰老 'D0313' 两个不同黄瓜品种为试验材料, 观察活体黄瓜果实衰老过程中果皮细胞壁及叶绿体、线粒体超微结构的变化。结果显示: '649' 授粉后 30 d 果壁中胶层质密度降低, 叶绿体基质片层向两端拉伸; 授粉后 40 d 细胞壁开始降解, 叶绿体基粒片层变得膨大并开始解体, 线粒体内脊数目开始减少。'D0313' 授粉后 20 d 果壁中胶层断续不均匀, 叶绿体基粒类囊体开始膨大; 授粉后 30 d, 细胞壁中胶层开始溶解, 叶绿体内部结构开始解体, 线粒体内脊模糊。表明, 衰老过程中, 易衰老品种 'D0313' 果皮细胞壁、叶绿体、线粒体的衰老症状出现的都比耐衰老品种 '649' 早。衰老过程中线粒体是较稳定的细胞器, 其变化迟于叶绿体。

关键词: 黄瓜; 活体; 衰老; 果皮; 超微结构

中图分类号: S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 04-0889-06

Ultrastructural Changes of Pericarp of Cucumber *in vivo* During Senescence

WANG Zhi-kun, QIN Zhi-wei*, LI Yan-qiu, and ZHOU Xiu-yan

(Horticulture College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Ultrastructural changes of pericarp of cucumber *in vivo* were investigated in cucumber cultivars D0313 and 649 during senescence. The results showed that in the cultivar 649, cell wall dissolution was initiated along the middle lamella and granum lamellae were extended towards both sides at 30 d after pollination. At 40 d after pollination, cell wall disruption was advanced, grana began to dissolve and cristae of mitochondria were fewer in number. In the cultivar D0313, dissolution of the middle lamella has occurred, grana were dilated and single thylakoids were distributed at 20 d after pollination. At 30 d after pollination, middle lamella disappeared, chloroplasts degraded and cristae of mitochondria were illegibility. So, cell wall, chloroplasts and mitochondria of D0313 began to degrade prior to that of 649 during senescence. And mitochondria were stable cellular organelles; the changes of mitochondria were later than chloroplasts during senescence.

Key words: Cucumber; *in vivo*; Senescence; Pericarp; Ultrastructure

黄瓜果皮细胞含有丰富的叶绿体进行光合作用, 是果实发育过程中营养供给源之一, 果皮细胞衰老直接影响果实的整体衰老。前人对果实衰老过程的研究主要集中在果实采后生理生化及细胞结构的变化, 对自然生长状态下果实衰老过程中细胞超微结构变化的研究少有涉及。而且, 目前研究比较集中于苹果 (Ruth & Naomi, 1979; 吴明江等, 1995; 彭宜本和张大鹏, 2000)、葡萄 (张大鹏等, 1997)、梨 (Ruth & Naomi, 1979; Platt-Aloia & Thomson, 1982)、桃 (陈安均等, 2002; 段玉权等, 2004)、猕猴桃 (杨德兴等, 1993; 王仁才等, 2000)、菠萝 (屈红霞等, 2001) 和番茄 (Philip & Donald, 1998; 生吉萍等, 2000; 张玉等, 2005) 等果实, 对于黄瓜尤其是衰老过程中其细胞结构的变化更少报道。本试验以两个衰老表现不同的黄瓜品种为材料, 研究自然生长状态下黄瓜果实衰老过程中果皮超微结构的变化, 旨在确定果实衰老过程果皮细胞水平的衰老特性, 为揭示黄瓜果

收稿日期: 2007-03-09; 修回日期: 2007-04-23

基金项目: 国家 '863' 项目 (2006AA10Z1B9)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: qinzv@neau.edu.cn)

实自然衰老规律和机制以及指导黄瓜耐贮运品种选育奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

黄瓜耐衰老品种‘649’和易衰老品种‘D0313’由东北农业大学园艺学院提供。‘649’植株生长势强，果实授粉后 40 d 左右果皮开始变黄；‘D0313’植株生长势弱，果实授粉后 20 d 左右果皮便开始变黄。于 2005 年 3 月 25 日播种，5 月 2 日三叶一心期定植在东北农业大学塑料大棚里。采用随机区组排列，3 次重复，5 月 22 日初花期开始授粉，挂牌标记。为保证每个瓜生长一致，单株留瓜 3 个，其余均摘除。

1.2 试验方法

取长势一致同一节位授粉后 20 d (‘649’深绿色，‘D0313’浅绿色)，30 d (‘649’绿色，‘D0313’黄绿色)，40 d (‘649’开始变黄，‘D0313’黄色)，50 d (‘649’黄色，‘D0313’黄褐色) 的黄瓜果实各 3 个，在每个果实中间部位切取果皮各 10 块，然后迅速将材料放在 2.5% 戊二醛 (pH 7.2) 固定液中固定，用真空排气法使材料沉入固定液中，在 4℃ 下固定 2 h。磷酸缓冲液清洗，再用 1% 四氧化锇后固定。然后用不同浓度梯度的乙醇做脱水剂，从 50%—70%—95%—100% 进行脱水，转移至 100% 丙酮内，最后用 Epon 812 环氧树脂浸透包埋。用 ULTRACUTE 型超薄切片机制片，经醋酸双氧铀—柠檬酸铅双重染色，在 JEM21200EX 型透射电镜下观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 黄瓜果实衰老过程中果皮细胞壁的变化

在透射电子显微镜下观察，两个品种果皮细胞壁超微结构有明显差异 (图 1)。授粉后 20 d，‘649’

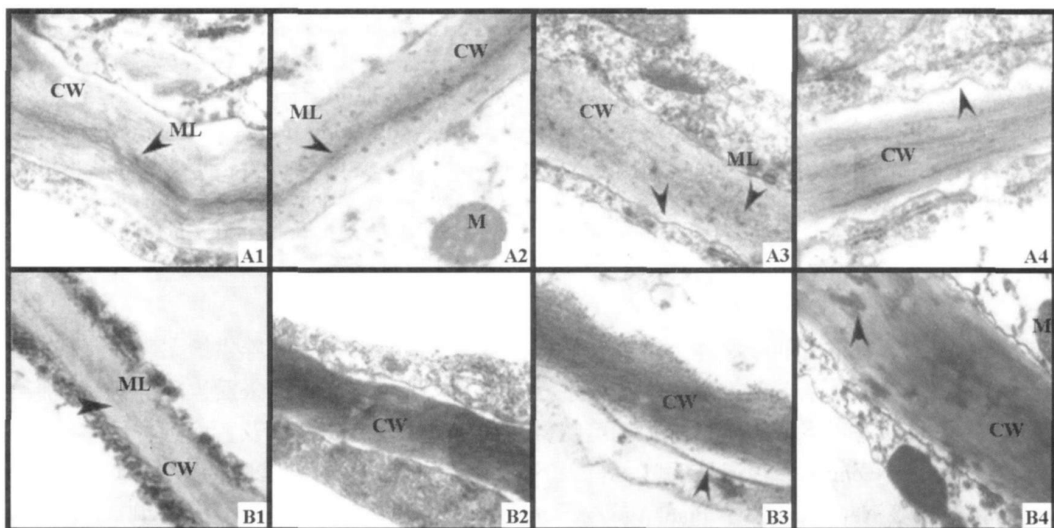


图 1 衰老过程中黄瓜果皮细胞壁超微结构的变化

A1~A4: ‘649’果实分别在授粉后 20、30、40 和 50 d 果皮细胞壁的超微结构 (×15 000); B1~B4: ‘D0313’果实分别在授粉后 20、30、40 和 50 d 果皮细胞壁的超微结构 (×15 000)。CW: 细胞壁; ML: 中胶层; M: 线粒体; 箭头: 变化明显部位。

Fig. 1 Ultrastructural changes of cell wall of cucumber pericarp during senescence

A1 - A4: Ultrastructure of cell wall of ‘649’ fruits at 20, 30, 40 and 50 d respectively after pollination (×15 000);

B1 - B4: Ultrastructure of cell wall of ‘D0313’ fruits at 20, 30, 40 and 50 d respectively after pollination (×15 000).

CW: Cell wall; ML: Middle lamella; M: Mitochondria; Arrowhead: The visible changes

果皮细胞壁层次清晰，初生壁和次生壁结构致密，中胶层紧密，均匀而连续；‘D0313’可见中胶层，但断续而不均匀，初生壁和次生壁结构较‘649’松散。授粉后 30 d，‘649’果皮细胞壁中胶层仍十分明显，但致密度降低，开始松散；‘D0313’细胞壁中胶层已溶解消失，纤维结构松散紊乱，细胞壁明显膨胀增大。授粉后 40 d，‘649’果皮细胞壁可见微弱的中胶层结构，但致密度已经很差，细胞壁边缘开始松散，初生壁的纤维开始松散；‘D0313’细胞壁已出现质壁分离现象。授粉后 50 d，‘649’果皮细胞壁中胶层消失，细胞发生质壁分离；‘D0313’细胞壁膨胀解体，构成纤维素壁的 microfibrils 降解物扩散，细胞壁结构松散，呈现明显絮状。

2.2 黄瓜果实衰老过程中果皮细胞叶绿体结构的变化

在超薄切片中观察到的叶绿体呈长椭圆形，环绕在细胞内表面（图 2）。授粉后 20 d，‘649’果皮细胞叶绿体为长椭圆形，被膜清晰，基粒片层类囊体膜叠垛整齐，基质片层与基粒片层紧密相连，整个叶绿体内部呈现一个完整的膜系统结构；叶绿体内部出现少量嗜锇颗粒；‘D0313’果皮叶绿体形状开始趋于圆形，被膜清晰，基粒类囊体开始膨大，基质片层与基粒片层连接不是很紧密，基质片层向两端拉伸，嗜锇颗粒数目比‘649’多。授粉后 30 d，‘649’叶绿体仍为椭圆形，被膜清晰，基粒片层排列较整齐，基质片层向两端拉伸；‘D0313’叶绿体膨大呈圆形，基质片层由于叶绿体膨大而被拉长，并出现断裂，基粒片层变得膨大模糊并开始解体。授粉后 40 d，‘649’果皮叶绿体外形开始膨胀，基质片层被拉长，出现断裂，基粒片层变得膨大并开始解体；‘D0313’果皮叶绿体进一步膨大变形，被膜凹凸不平，变得模糊，基粒片层松散，结构紊乱。授粉后 50 d，‘649’果皮叶绿体膨大呈圆形，外膜模糊不清，基粒片层解体严重；‘D0313’果皮叶绿体变形严重，外膜解体破裂，嗜锇颗粒体积变大，数目明显增多，基质片层和基粒片层解体严重。

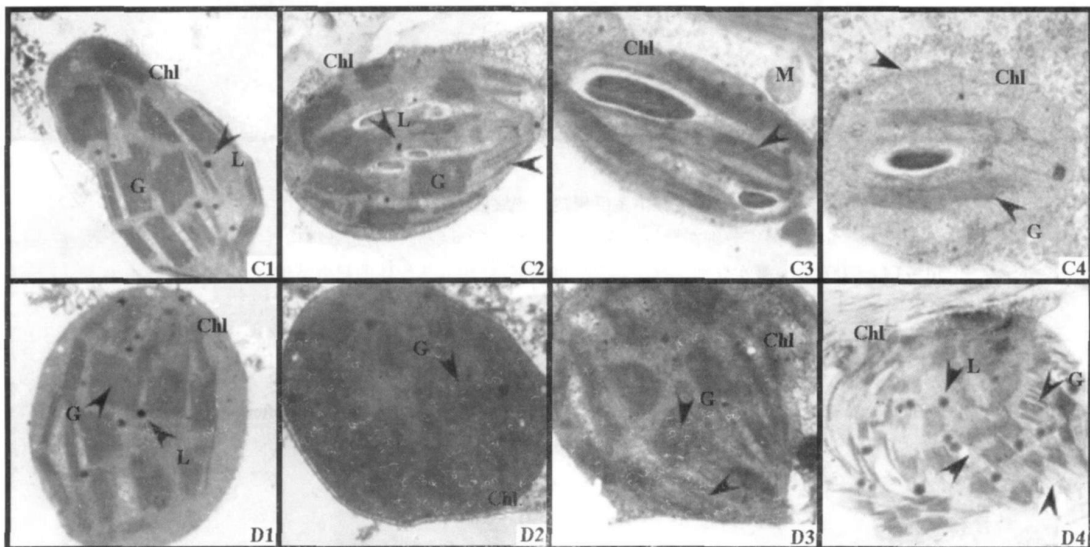


图 2 衰老过程中黄瓜果皮细胞叶绿体超微结构的变化

C1 ~ C4: ‘649’果实分别在授粉后 20、30、40 和 50 d 叶绿体的超微结构 ($\times 25\ 000$);

D1 ~ D4: ‘D0313’果实分别在授粉后 20、30、40 和 50 d 叶绿体的超微结构 ($\times 25\ 000$).

Chl: 叶绿体; G: 基粒; L: 脂肪滴; M: 线粒体; 箭头: 变化明显部位。

Fig. 2 Ultrastructural changes of chloroplast of cucumber pericarp during senescence

C1 - C4: Ultrastructure of chloroplast of ‘649’ fruits at 20, 30, 40 and 50 d respectively after pollination ($\times 25\ 000$);

D1 - D4: Ultrastructure of chloroplast of ‘D0313’ fruits at 20, 30, 40 and 50 d respectively after pollination ($\times 25\ 000$).

Chl: Chloroplast; G: Granum; L: Lipid droplet; M: Mitochondria; Arrowhead: The visible changes

2.3 黄瓜果实成熟衰老过程中果皮细胞线粒体结构的变化

授粉后 20 d, '649' 果皮细胞中线粒体结构完整, 双层膜结构清晰, 内脊数目众多; 而 'D0313' 果皮细胞中线粒体结构与 '649' 授粉后 30 d 果皮细胞中线粒体结构相似, 线粒体结构完整, 内脊清晰 (图 3)。

授粉后 30 d, 'D0313' 线粒体内脊已开始模糊。

授粉后 40 d, '649' 果皮细胞中线粒体双层膜结构不明显, 内脊数目减少; 'D0313' 线粒体内部结构开始解体, 出现空洞。

授粉后 50 d, '649' 果皮细胞中线粒体外膜开始降解, 内部结构变得模糊不清; 'D0313' 线粒体结构丧失, 外膜系统与内部结构完全降解。

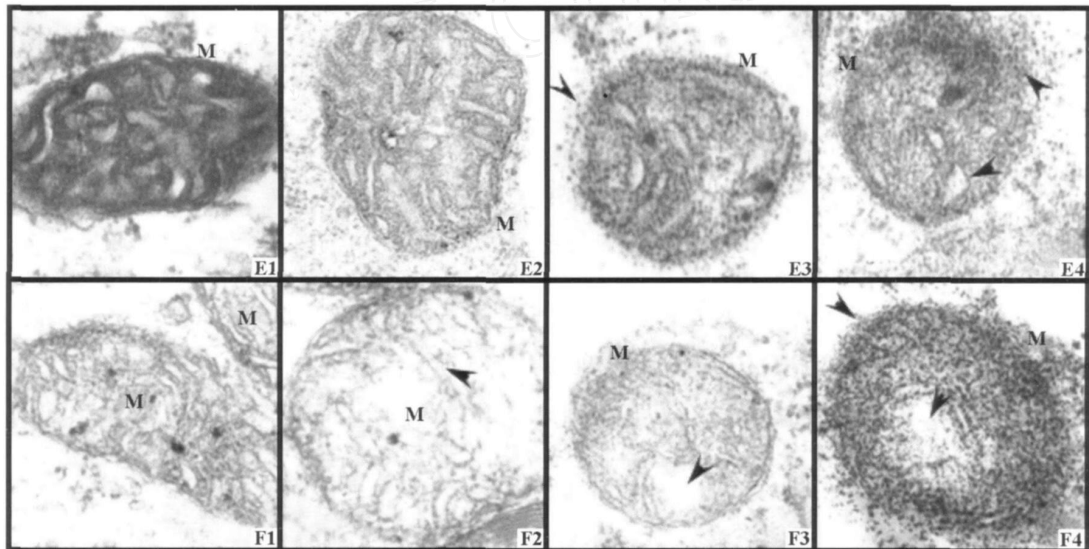


图 3 衰老过程中黄瓜果皮细胞线粒体超微结构的变化

E1 ~ E4: '649' 果实分别在授粉后 20、30、40 和 50 d 线粒体的超微结构 ($\times 40\ 000$);

F1 ~ F4: 'D0313' 果实分别在授粉后 20、30、40 和 50 d 线粒体的超微结构 ($\times 40\ 000$)。

M: 线粒体; 箭头: 变化明显部位。

Fig. 3 Ultrastructural changes of mitochondria of cucumber pericarp during senescence

E1 - E4: Ultrastructure of mitochondria of '649' fruits at 20, 30, 40 and 50 d respectively after pollination ($\times 40\ 000$);

F1 - F4: Ultrastructure of mitochondria of 'D0313' fruits at 20, 30, 40 and 50 d respectively after pollination ($\times 40\ 000$).

M: Mitochondria; Arrowhead: The visible changes

3 讨论

细胞壁结构的完整性是否保持良好, 对于维持果皮细胞结构和果实硬度至关重要。前人观察证明, 细胞壁中胶层退化是导致许多果实果肉软化絮败 (Woolliness) 的主要原因 (Harker & Hallett, 1992; 杨德兴等, 1993; 吴明江等, 1995)。易衰老品种 'D0313' 果皮在成熟衰老过程中细胞壁的中胶层致密度差, 消失早。而 '649' 细胞壁结构完整, 中胶层明显, 消失时间晚。'D0313' 果皮细胞壁超微结构发生破坏的时间早, 会导致其细胞间聚合的丧失和果实硬度下降, 加速果实衰老。

植物对光能的高效吸收、传递和转换是在类囊体膜上具有一定分子排列方式及空间构象的

膜脂蛋白中进行的。许多重要光合蛋白都组合在类囊体膜上的膜脂中, 衰老过程中类囊体膜的分解导致了自由态不饱和脂肪酸的释放, 脂肪酸释放使膜结构和组分发生量变和质变, 游离的不饱和脂肪酸可以与某些敏感位点, 如 PS 供体侧、放氧复合体和 PS 反应中心等组合, 抑制电子传递效率 (高忠等, 1995)。因而, 类囊体膜的完整性是决定植物光合作用能力的关键。类囊体膜膨大、肿胀表明叶绿体的光合作用能力开始减退, 当类囊体膜降解、减少表明叶绿体功能已开始丧失。易衰老品种 'D0313' 在授粉后 20 d, 叶绿体已趋于圆形, 基粒类囊体开始膨大, 基质片层向两端拉伸, 叶绿体在内部结构上已经开始表现出衰老迹象。抗衰老品种 '649' 在授粉后 30 d 叶绿体才表现出该衰老征兆。易衰老品种 'D0313' 在授粉后 30 d, 基质片层出现断裂, 基粒片层变得膨大模糊并开始解体, 说明叶绿体的内部结构已经解体, 功能开始丧失。而抗衰老品种 '649' 在授粉后 40 d, 基粒片层才变得膨大并开始解体, 其功能丧失要比 'D0313' 晚 10 d 左右。叶绿体是衰老过程中变化最敏感的细胞器。从果皮衰老过程叶绿体超微结构变化上看, 'D0313' 比 '649' 早衰 10 d 左右。李艳秋等 (2006) 研究结果表明品种 'D0313' 果皮叶绿素含量在授粉后 20 d 开始下降, 而 '649' 在授粉后 30 d 下降, 与果皮细胞叶绿体超微结构变化一致, 叶绿素的降解也是导致叶绿体解体、光合作用能力下降的主要原因之一。并且, 李艳秋等 (2006) 测量的其它生理指标的变化也支持了上面结果。黄瓜绿色果皮可进行光合作用, 在果实发育过程中也可作为营养供给源之一。果皮细胞内叶绿体功能的衰退导致果皮对果肉营养物质供给的减弱或停止, 这将可能与黄瓜果实成熟衰老有一定关系, 因此应进一步试验验证叶绿体是否可作为黄瓜果实衰老的细胞器特征指标。

线粒体是保证细胞内新陈代谢活动正常进行的能量供给者, 也是最不敏感的细胞器 (戴伟民等, 2001)。线粒体内膜与脊的内表面上分布许多电子传递粒, 这些电子传递粒含有三磷酸腺苷酶 (ATP酶), 能催化 ATP 的合成。因此, 脊的数量常常是发生呼吸作用的量上标志, 有大量的脊, 就会摄取大量的氧, 使呼吸强度提高。反之, 脊稀疏, 代谢较弱。所以可用线粒体的活性来判断细胞的生活力。衰老过程中, 线粒体内脊的数量减少, 内部结构变得不清晰, 导致附着在脊上的大量酶系统降解, 使能量供给能力降低。对两个品种各细胞器的超微结构观察, 发现线粒体的衰退变化发生的较晚。在授粉后 30 d 'D0313' 线粒体开始出现衰老症状, 而 '649' 在授粉后 40 d 开始衰老。说明线粒体是成熟衰老过程稳定的细胞器, 这与彭宜本和张大鹏 (2000)、张玉等 (2005) 的研究结果一致。

References

- Chen An-jun, Pu Biao, Luo Yun-bo, Liu Yuan-peng. 2002. Study on the relationship between the flesh ultrastructural changes and the related metabolism of the ripening peach fruit. *Journal of Fruit Science*, 19 (1): 67 - 69. (in Chinese)
- 陈安均, 蒲彪, 罗云波, 刘远鹏. 2002. 不同成熟期桃果实超微结构及相关代谢的研究. *果树学报*, 19 (1): 67 - 69.
- Dai Weimin, Zhao Yan, Cai Run, Pan Jun-song, He Huan-le, Lu Ya-jun. 2001. Selection of NaCl tolerant calli and observation of microstructure. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)*, 19 (2): 112 - 116. (in Chinese)
- 戴伟民, 赵艳, 蔡润, 潘俊松, 何欢乐, 陆雅君. 2001. 番茄耐盐愈伤组织的筛选及纤维结构观察. *上海交通大学学报 (农业科学版)*, 19 (2): 112 - 116.
- Duan Yu-quan, Feng Shuang-qing, Zhao Yu-mei, Ma Qiu-juan. 2004. Effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment on flesh cell ultrastructure of refrigerator-stored peaches. *Scientia Agricultura Sinica*, 37 (12): 2039 - 2042. (in Chinese)
- 段玉权, 冯双庆, 赵玉妹, 马秋娟. 2004. 1-甲基环丙烯处理对冷藏桃果肉细胞超微结构的影响. *中国农业科学*, 37 (12): 2039 - 2042.
- Gao Zhong, Zhang Rong-xian, Fang Min. 1995. Advances on mechanisms of senescence of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and photosynthetic electron transport chain in plant. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 18 (2): 26 - 33. (in Chinese)
- 高忠, 张荣铎, 方敏. 1995. 植物叶片中 RuBP羧化酶/加氧酶及光反应机构衰老机理的研究进展. *南京农业大学学报*, 18 (2): 26 - 33.

- Harker E R, Hallett I C. 1992. Physiological changes associated with development of mealiness of apple fruit during cool storage. *HortSci*, 27: 1291 - 1294.
- Li Yan-qiu, Wang Zhi-kun, Qin Zhi-wei, Zhou Xiu-yan. 2006. Changes in several physiological and biochemical indexes of cucumber fruit *in vivo* during senescence. *Plant Physiology Communications*, 42 (4): 671 - 673. (in Chinese)
- 李艳秋, 王志坤, 秦智伟, 周秀艳. 2006. 活体黄瓜果实成熟衰老过程中的几种生理生化指标变化. *植物生理学通讯*, 42 (4): 671 - 673.
- Peng Yi-ben, Zhang Da-peng. 2000. Ultrastructure of epidermis and flesh of the developing apple fruit. *Acta Botanica Sinica*, 42 (8): 794 - 802. (in Chinese)
- 彭宜本, 张大鹏. 2000. 发育过程中苹果果皮和果肉细胞的超微结构. *植物学报*, 42 (8): 794 - 802.
- Philip R C, Donald G. 1998. Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. *Plant Phys*, 72: 1088 - 1093.
- Platt-Abia K A, Thomson W W. 1982. Ultrastructure of the mesocarp of mature avocado fruit and changes associated with ripening. *Ann Bot*, 48: 451 - 465.
- Qu Hong-xia, Tang You-lin, Tan Xing-jie, Pan Xiao-ping, Jiang Yue-ming. 2001. Study on the changing of keeping quality and cell ultrastructure in postharvest pineapples. *Journal of Fruit Science*, 18 (3): 164 - 167. (in Chinese)
- 屈红霞, 唐友林, 谭兴杰, 潘小平, 蒋跃明. 2001. 采后菠萝贮藏品质与果肉细胞超微结构的变化. *果树学报*, 18 (3): 164 - 167.
- Ruth B A, Naomi K. 1979. Ultrastructural changes in the cell walls of ripening apple and pear fruit. *Plant Phys*, 64: 197 - 202.
- Sheng Ji-ping, Luo Yun-bo, Shen Lin. 2000. Effects of PG and LOX on fruit softening and ultrastructure changes of postharvest tomato fruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 27 (4): 276 - 281. (in Chinese)
- 生吉萍, 罗云波, 申琳. 2000. PG和 LOX对采后番茄果实软化及细胞超微结构的影响. *园艺学报*, 27 (4): 276 - 281.
- Wang Ren-cai, Xiong Xing-yao, Tan Xing-he, Lü Chang-ping. 2000. Changes of fruit and ultrastructure of cell wall in *Actinidia deliciosa* lines during postharvest ripening. *Journal of Hunan Agricultural University*, 26 (6): 457 - 460. (in Chinese)
- 王仁才, 熊兴耀, 谭兴和, 吕长平. 2000. 美味猕猴桃果实采后硬度与细胞壁超微结构变化. *湖南农业大学学报 (自然科学版)*, 26 (6): 457 - 460.
- Wu Ming-jiang, Zhang Zhong-heng, Yu Ping, Huang Jian, Liu Wu-lin. 1995. Studies on the ultrastructure and physiology of the interaction between cytoplasm and cell wall during apple softening. *Acta Horticulturae Sinica*, 22 (2): 181 - 182. (in Chinese)
- 吴明江, 张忠恒, 于萍, 黄剑, 刘武林. 1995. 苹果软化过程中质壁互作的生理和结构研究. *园艺学报*, 22 (2): 181 - 182.
- Yang De-xing, Dai Jing-jing, Pang Xiang-yu. 1993. Changes of polygalacturonase, pectin and ultrastructure of cell wall in kiwifruit during senescence. *Acta Horticulturae Sinica*, 20 (4): 341 - 345. (in Chinese)
- 杨德兴, 戴京晶, 庞向宇. 1993. 猕猴桃衰老过程中 PG、果胶质和细胞壁超微结构的变化. *园艺学报*, 20 (4): 341 - 345.
- Zhang Da-peng, Li Min, Wang Yi. 1997. Ultrastructural changes in the mesocarp cells of grape berry during its development. *Acta Botanica Sinica*, 38 (5): 388 - 396. (in Chinese)
- 张大鹏, 李珉, 王毅. 1997. 葡萄果实发育过程中果肉细胞超微结构的观察. *植物学报*, 38 (5): 388 - 396.
- Zhang Yu, Xu Xiang-yang, Li Jing-fu. 2005. Ultrastructural changes of fruits in tomato ripening mutant during storage. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (4): 707 - 709. (in Chinese)
- 张玉, 许向阳, 李景富. 2005. 番茄成熟突变体果实贮藏过程中细胞超微结构的变化. *园艺学报*, 32 (4): 707 - 709.