

# 洋葱表皮和小麦幼苗自发荧光的研究

刘宗玲, 刘培祥, 杨森, 刘春香\*, 孙海燕

潍坊学院, 山东 潍坊

Email: \*chunxiangliu@126.com

收稿日期: 2021年7月8日; 录用日期: 2021年8月6日; 发布日期: 2021年8月16日

## 摘要

自发荧光是多数植物组织具有的特征, 这对于通过荧光标记手段研究基因表达非常不利, 对自发荧光的认识有助于对其进行科学地应用。本研究选择常用的洋葱表皮细胞做参照, 对比研究小麦的自发荧光现象, 将小麦在有光照、无光照下幼苗不同发育天数的根、叶鞘、叶片制成装片, 在激发光源的作用下, 观察小麦不同时期根、叶鞘、叶片的蓝色、绿色、红色自发荧光的分布情况; 最后通过 $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的卡那霉素处理使小麦幼苗白化, 制备叶片装片观察三种颜色的荧光。实验结果表明黄皮洋葱的内、外表皮细胞均检测不到红、绿、蓝色荧光; 紫皮洋葱的表皮细胞色素会影响红色荧光的观察, 也不具有荧光。在 $500 \text{ nm}$ 波长的激发光照射下, 见光小麦的根在第1 d以及6~10 d具有红色荧光; 叶片及叶鞘从第3 d起一直有强烈的红色荧光; 黑暗培养的小麦根在第16 d出现红色荧光; 叶鞘始终无荧光产生, 叶片有较弱的红色荧光。 $450 \text{ nm}$ 激发光照射下, 见光小麦, 根在第1 d以及6~10 d有明显的绿色荧光; 黑暗培养的小麦根从第16 d起出现绿色荧光。光照、黑暗下培养的小麦叶鞘都从第22 d起有明显的绿色荧光, 两种条件下培养的小麦叶片始终检测不到绿色荧光;  $400 \text{ nm}$ 激发光照射下, 小麦的根、叶鞘、叶片中蓝色荧光始终存在, 且叶鞘中蓝色荧光随着发育天数增加逐渐强烈; 处理后白化的叶片无法观察到红色和绿色荧光, 蓝色荧光依然存在。白化处理后有利于通过红色荧光蛋白标记目的基因, 为小麦的组织、细胞定位研究提供便利。

## 关键词

自发荧光, 小麦幼苗, 洋葱表皮

# Study on Autofluorescence of Onion Epidermis (*Allium cepa*) and Wheat Seedlings (*Triticum aestivum*)

Zongling Liu, Peixiang Liu, Sen Yang, Chunxiang Liu\*, Haiyan Sun

Weifang University, Weifang Shandong

\*通讯作者。

## Abstract

Autofluorescence is a characteristic of most plant tissues, which is very unfavorable for studying gene expression through fluorescent labeling methods. The understanding of plant autofluorescence can benefit for proper application. In this study, the commonly used onion epidermal cells were selected as a reference to compare and study the autofluorescence phenomenon of wheat seedling. The roots, sheaths, and leaves of wheat seedlings in different days of development under light and dark were used to make slices to stimulate the light source. Next, we observed the distribution of blue, green, and red autofluorescence in the roots, leaf sheaths, and leaves of wheat in different periods. Finally, the wheat seedlings were albino treated with 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  kanamycin, and the leaves were mounted to observe the fluorescence of three colors. The results of the experiment showed that the red, green, and blue fluorescence could not be detected in the epidermal cells of the yellow onion; the epidermal cytochrome of the purple onion would affect the observation of red fluorescence, and it did not have fluorescence. Under the excitation light of 500 nm wavelength, the roots of visible wheat have red fluorescence on the 1st and 6~10 d; the leaves and leaf sheaths have always had strong red fluorescence from the 3rd day onwards; the wheat roots in the dark have red fluorescence on the 16th day; The leaf sheath always has no fluorescence, and the leaf has weak red fluorescence. Under 450 nm excitation light, the roots showed obvious green fluorescence on the 1st day and 6~10 d when the wheat was exposed to light; in the dark, the roots showed green fluorescence on the 16th day. The leaf sheaths of wheat cultivated under light and dark showed obvious green fluorescence on the 22nd day, and the leaves of wheat cultivated under the two conditions could not always detect green fluorescence; under the irradiation of 400 nm excitation light, in the roots, sheaths, and leaves of wheat, the blue fluorescence always exists, and the blue fluorescence in the leaf sheath becomes stronger with the increase of the development days; the red and green fluorescence cannot be observed in the albino leaves after treatment, and the blue fluorescence still exists. After bleaching treatment, red fluorescent protein can be used to label the target gene, which provides convenience for the study of the tissue and cell location of wheat.

## Keywords

Autofluorescence, Wheat Seedlings, Onion Epidermis

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

植物自发荧光现象广泛存在,植物的自发荧光具有一定的应用价值,如徐国华[1]等人发现,梨花柱头的荧光现象差别可以鉴别花粉是否与柱头亲和;Lloyd Donaldson 等人[2]利用木质素荧光来评估木材形成以及化学改性;梁艳丽等人[3] [4]借水稻叶片细胞壁自发荧光变化来研究不同品种的抗性;Pascale Talamond 等人[5]通过自发荧光对活体植物的次生代谢产物进行定位。左敏[6]等人报道,低温会抑制叶绿

体的自发荧光, 通过对其自发荧光强度的观察, 可以比较多个品种的抗冷能力[7] [8]。黑麦草种子的自发荧光特性可以鉴别与其外形相似种子的物种[9]。然而, 有时人们又不希望植物具有自发荧光, 因为利用荧光染料或融合荧光蛋白进行辅助目标分子的细胞定位及基因表达研究是重要的分子生物学手段, 自发荧光则限制了这些方法的应用。

降低植物自发荧光的手段很受研究人员的关注, Kodama Yutaka 利用“时间门控成像技术”完全消除了植物的自发荧光[10]。意味着当用荧光显微镜进行激发时, 要控制时长, 特定时长会产生消荧光现象[11], 然而时长的控制在实验中是很难掌控的, 植物自发荧光强度也会影响时间的把握; Randall W. Shultz 等人用三氯乙酸-丙酮法大大降低了植物组织蛋白质提取物的红外自发荧光, 还能保留靶蛋白的免疫原性[12]; J. YANG 用氯仿来降低角质层的自发荧光[13], 然而有机物处理后植物细胞会死亡, 不利于观察活体细胞内的状态。

绿色荧光蛋白(GFP)已经作为分子探针得到广泛应用[14] [15]。然而如果 GFP 的表达量低, 植物叶绿素的红色自发荧光会掩盖 GFP 的绿色荧光。虽然已有利用 GFP 作为选择标记成功转化小麦、大麦、水稻等[16]的报道, 但我们对这些物种自身荧光的特性了解并不是很透彻, 自发荧光会不会影响用于表达检测的荧光也未可知。在植物学领域, 应用最广的是洋葱表皮细胞, 依赖洋葱表皮细胞进行的组织或细胞定位报道较多[17] [18], 蛋白质定位的研究往往都是依赖于荧光标记, 洋葱表皮细胞是公认的基因表达定位的重要材料。因此, 本研究以洋葱表皮细胞的红、绿、蓝三种荧光检测为参照, 研究小麦的自发荧光现象, 并通过适当的处理设法消除小麦的自发荧光, 为小麦的荧光标记应用及自发荧光利用提供参考。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验材料

本实验选择小麦常规品种洛早 8 号作为实验材料, 培养条件分别为 22℃/24 h 光照和 22℃/24 h 黑暗。参照植物洋葱为超市购买的商品洋葱, 黄皮和紫皮两种, 撕取活体洋葱鳞叶表皮作为实验材料。

### 2.2. 小麦幼苗的培养与黑暗处理

实验材料采用水培法处理, 将小麦种子均匀撒在发芽盒中, 盒里铺两层已灭菌的发芽纸, 因有黑暗处理, 为了维持生长, 加入浓度为 2% 的无菌蔗糖水 10 ml。种子发芽后, 将幼苗塞入种植棉中, 以无菌的 2% 蔗糖水溶液为营养液, 培养幼苗。发芽 1~7 d 内每天取样观察, 8~31 d 内每 3 d 观察一次。将植物的根、叶鞘、叶片置于载玻片上, 滴加蒸馏水做成临时装片, 立即在荧光显微镜下观察根、叶鞘、叶片部位的自发荧光并进行拍照保存。

### 2.3. 小麦幼苗的白化处理

以方形发芽纸 2 张作为发芽床, 在方形发芽盒内加水 12 ml 对小麦种子进行催芽, 第 2 d 更换发芽床, 加入 12 ml 浓度为 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的卡那霉素, 按照 22℃、12 h 光照/12 h 黑暗的发芽条件进行幼苗培养, 之后以含有 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  卡那霉素的液体补充水分, 到幼苗约 8~10 cm 高, 取颜色纯白的幼苗与正常叶片一起制备临时装片, 观察红、绿、蓝三种颜色的荧光。

### 2.4. 小麦自发荧光图像观察与获取

采用奥林巴斯(olympus) BX53 荧光显微镜, 4× 物镜观察, 分别用 400 nm、450 nm、500 nm 的荧光光源激发植物组织, 分别用于蓝色、绿色、红色荧光的观察, 拍照时关闭明场的光源, 仅使用激发光源, 使用 CCD 摄像机将所观察的图片拍照, 曝光时间为 58 s。

### 3. 结果与分析

#### 3.1. 洋葱表皮细胞自发荧光的观察

植物组织中不发光的组织较难寻找，本研究以常用的荧光标记实验材料洋葱表皮细胞为参考植物组织，来对比研究小麦幼苗的自发荧光。从图 1~图 2 可知，将黄皮洋葱的内表皮(图 1)和外表皮(图 2)分别进行红色、绿色、蓝色荧光的观察，三种颜色的荧光均未在黄皮洋葱内出现，但撕取表皮时粘连的极少量洋葱鳞叶组织细胞会呈现蓝色荧光或绿色荧光，很少见红色荧光，外表皮粘连的非表皮细胞多于内表皮。

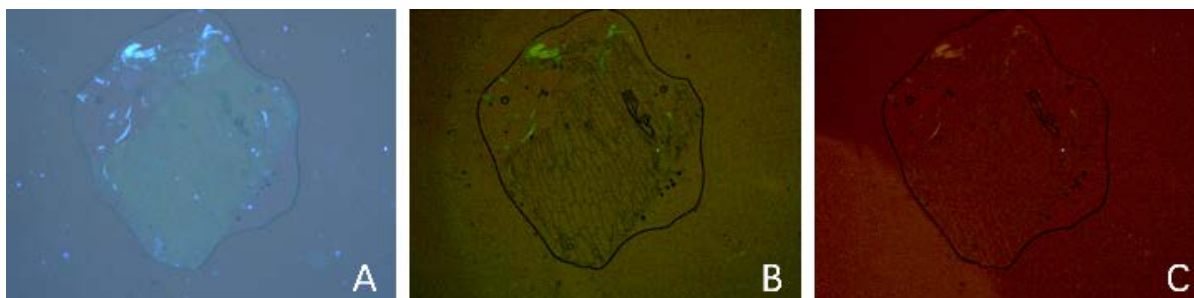
紫皮洋葱的内(图 3)、外表皮(图 4)也不显蓝、绿、红三种自发荧光，而紫皮洋葱自身的紫色色素在荧光显微镜下呈现红色(图 4(C))，对红色荧光检测会有一些的干扰。外表皮比内表皮紫色色素更多。

#### 3.2. 不同光照下小麦根、叶鞘和叶片红色的自发荧光

##### 3.2.1. 不同光照下小麦幼苗根组织的红色荧光

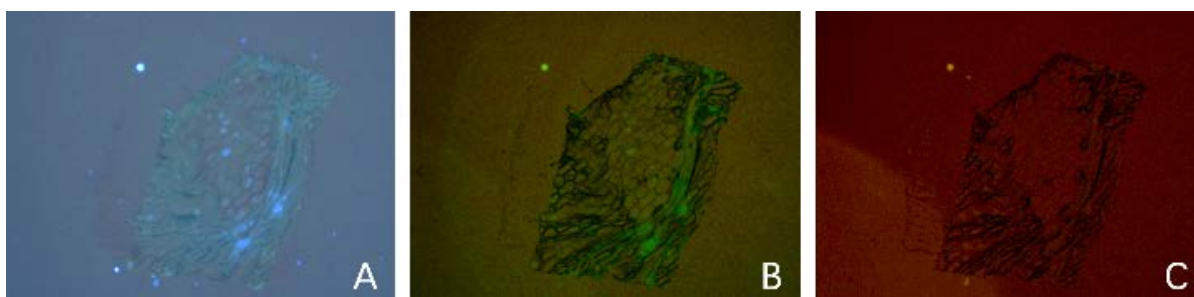
在 500 nm 波长的激发光照射下，光照培养条件下小麦的幼根在第 1 d、第 4 d、以及 6 d~10 d 具有较弱的红色荧光(如图 5(A)、图 5(D)、图 5(F)~图 5(I))；光照培养下小麦的根在第 10 d 以后红色荧光不稳定，第 19 d~31 d 可见较弱的红色荧光。

从图 6 可知，黑暗培养下小麦的根在第 16 d (图 6(J))出现红色荧光，荧光一直持续到第 31 d 观察结束，说明黑暗条件下小麦是可以产生微弱的红色荧光的。且光照和黑暗不同条件培养会引起小麦根内可发光物质含量的区别。黑暗处理下幼苗在发芽期幼苗根内几乎不会有红色荧光。



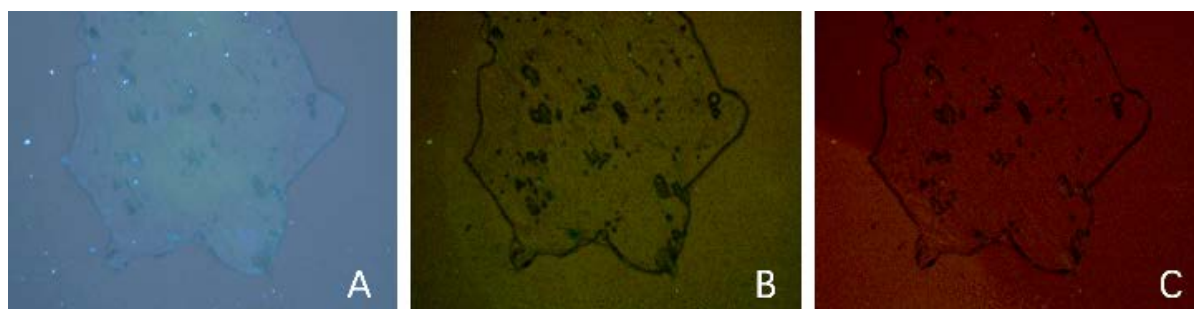
**Figure 1.** Fluorescence image of yellow onion inner epidermis. Note: A is ultraviolet excitation light, used to detect blue light; B is blue excitation light for detection of green light; C excited green light for detection of red light

**图 1.** 黄色洋葱内表皮荧光图像。注：A 为紫外激发光照射，用于检测蓝光；B 为蓝色激发光照射，用于检测绿光；C 为绿色激发光照射，用于检测红光



**Figure 2.** Fluorescence image of yellow onion outer epidermis. Note: A is ultraviolet excitation light, used to detect blue light; B is blue excitation light for detection of green light; C excited green light for detection of red light

**图 2.** 黄色洋葱外表皮荧光图像。注：A 为紫外激发光照射，用于检测蓝光；B 为蓝色激发光照射，用于检测绿光；C 为绿色激发光照射，用于检测红光



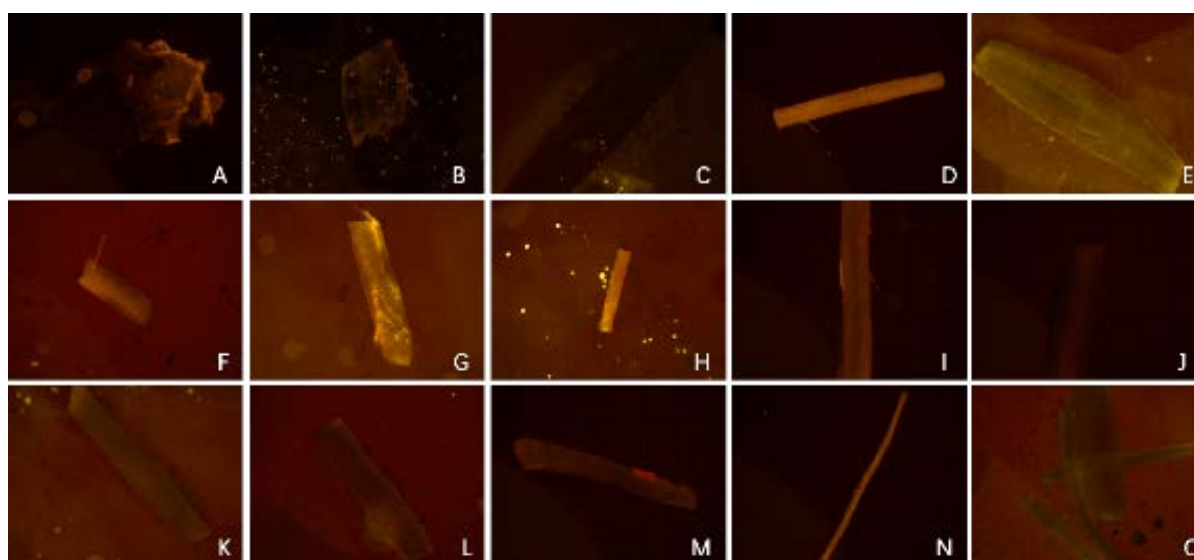
**Figure 3.** Fluorescence image of purple onion inner epidermis. Note: A is ultraviolet excitation light, used to detect blue light; B is blue excitation light for detection of green light; C excited green light for detection of red light

**图 3.** 紫色洋葱内表皮荧光图像。注：A 为紫外激发光照射，用于检测蓝光；B 为蓝色激发光照射，用于检测绿光；C 为绿色激发光照射，用于检测红光



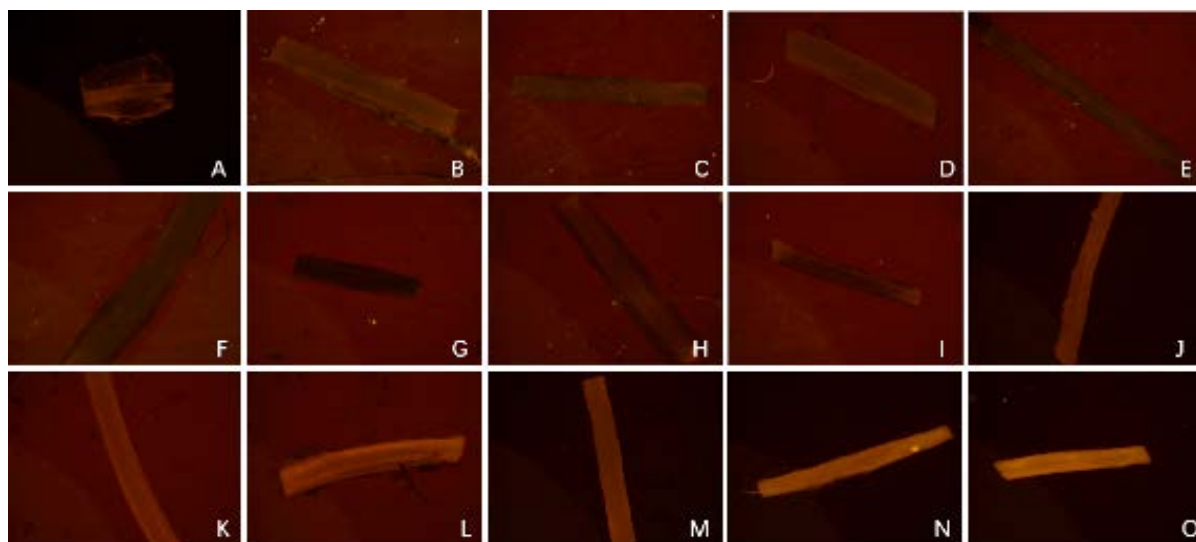
**Figure 4.** Fluorescence image of purple onion outer epidermis. Note: A is ultraviolet excitation light, used to detect blue light; B is blue excitation light for detection of green light; C excited green light for detection of red light

**图 4.** 紫色洋葱外表皮荧光图像。注：A 为紫外激发光照射，用于检测蓝光；B 为蓝色激发光照射，用于检测绿光；C 为绿色激发光照射，用于检测红光



**Figure 5.** Red fluorescence observation of wheat roots under light culture. Note: Figure (A)~(O) are red fluorescence observation on day 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 in turn

**图 5.** 光照培养下小麦根红色荧光观察。注：图(A)~(O)依次是第 1、2、3、4、5、6、7、10、13、16、19、22、25、28、31 d 的红色荧光观察

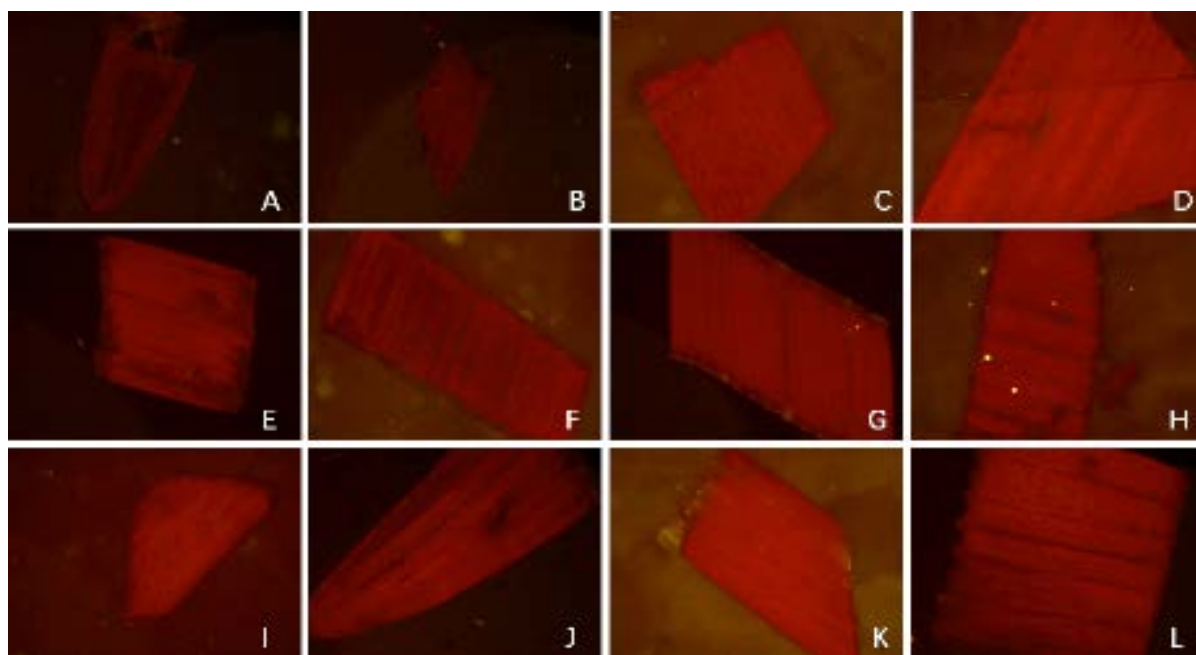


**Figure 6.** Red fluorescence observation of wheat roots under dark culture. Note: Figure (A)~(O) show the red fluorescence observation on day 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 and 31, respectively

**图 6.** 黑暗培养下小麦根部的红色荧光观察。注：图(A)~(O)依次是第 1、2、3、4、5、6、7、10、13、16、19、22、25、28、31 d 的红色荧光观察

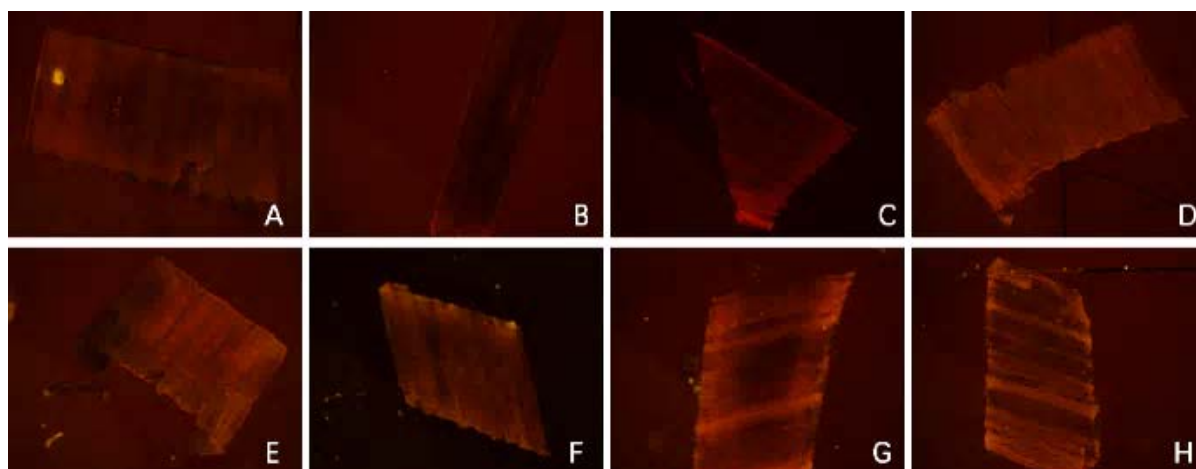
### 3.2.2. 不同光照下小麦幼苗叶片组织的红色荧光

从图 7 可知，光照培养下小麦的叶片除了第 1 d~2 d 荧光较弱外，其它时间均表现出了强烈的红色荧光，荧光一直持续到第 31 d 观察结束，与小麦叶片一直保持绿色趋势相符。从图 8 可知，黑暗条件下叶片呈黄色，荧光观察可以见到微弱的红色荧光，强度远小于光照下。



**Figure 7.** Red fluorescence observation of wheat leaves under light culture. Note: Figure (A)~(L) are the red fluorescence phenomenon of wheat leaves on day 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 and 28

**图 7.** 光照培养下小麦叶片的红色荧光观察。注：图(A)~(L)依次是第 3、4、5、6、7、10、13、16、19、22、25、28 d 的小麦叶片红色荧光现象

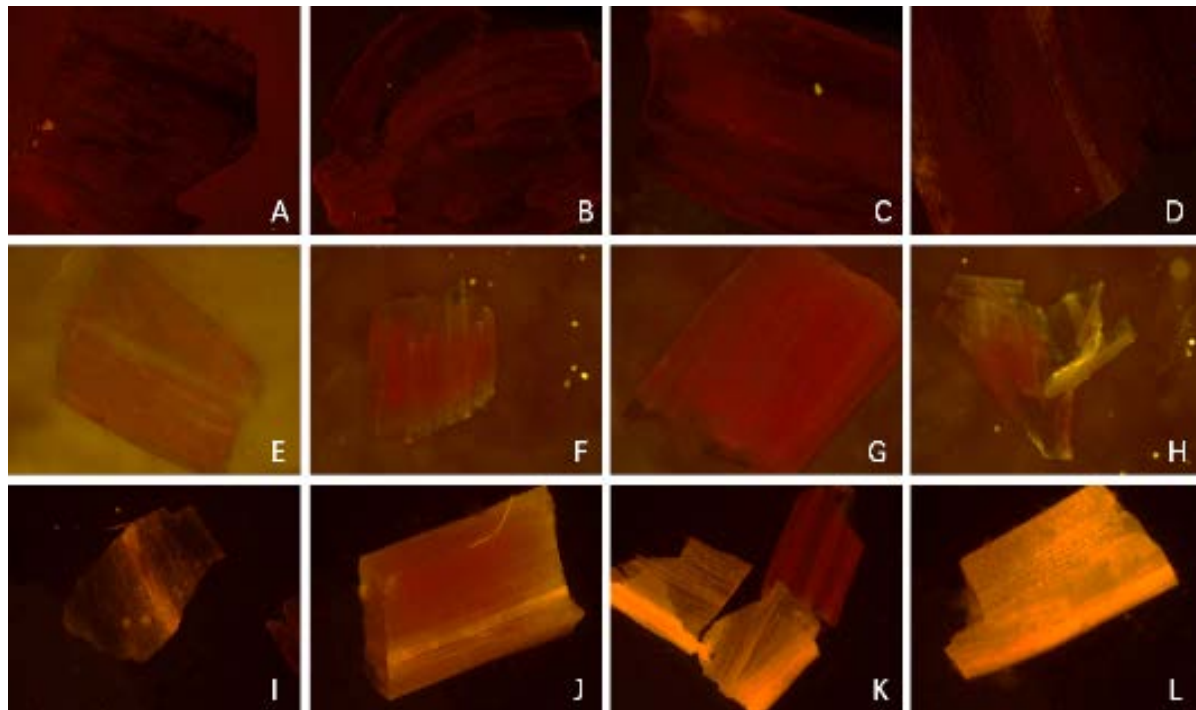


**Figure 8.** Red fluorescence observation of wheat leaves under dark culture. Note: Figure (A)~(H) are the red fluorescence phenomenon of wheat leaves on the 3rd, 4th, 5th, 6th, 7th, 10th, 13th, 16th day

**图 8.** 黑暗培养下小麦叶片的荧光观察。注：图(A)~(H)依次是第 3、4、5、6、7、10、13、16 d 的小麦叶片红色荧光现象

### 3.2.3. 不同光照下小麦幼苗叶鞘组织的红色荧光

从图 9 可知，光照培养下小麦的叶鞘除了第 3 d~6 d 荧光较弱外，其它时间均表现出了较强的红色荧光，荧光一直持续到第 28 d 停止观察，与小麦叶鞘的绿色变化趋势相符。从图 10 可知，黑暗条件下幼苗黄化，从第 3 d~28 d 均无红色荧光现象。



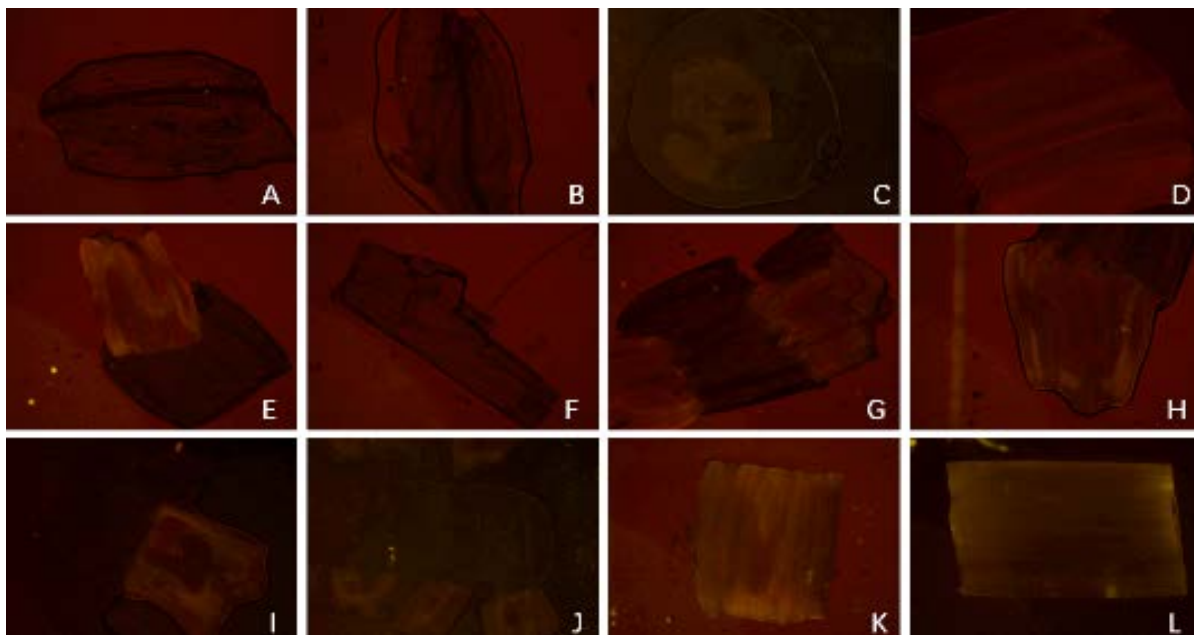
**Figure 9.** Red fluorescence observation of wheat bud sheath under light culture. Note: Figure (A)~(L) are red fluorescence observation on day 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 and 28

**图 9.** 光照培养下小麦的芽鞘的红色荧光观察。注：图(A)~(L)依次是第 3、4、5、6、7、10、13、16、19、22、25、28 d 的红色荧光观察

### 3.3. 不同光照下小麦根、叶片、叶鞘绿色自发荧光的分析

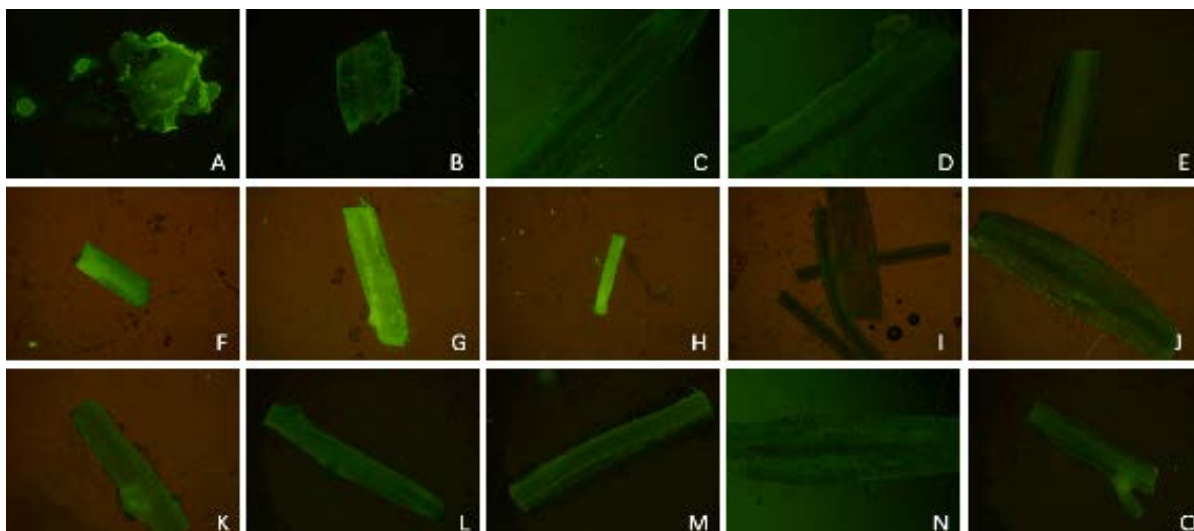
#### 3.3.1. 不同光照下小麦幼苗根组织的绿色荧光

采用 450 nm 波长的激发光对小麦的根、叶片、叶鞘组织进行照射,从图 11、图 12 可知,光照条件下的小麦根在第 1 d 以及 6~10 d (图 11(A)、图 11(F)、图 11(G)、图 11(H))可见绿色荧光;黑暗下,根在 16 d 起出现绿色荧光(图 12(J)),绿色荧光持续天数较多,说明黑暗处理并不能抑制根组织的绿色荧光。



**Figure 10.** Red fluorescence observation of wheat bud sheath under dark culture. Note: Figure (A)~(L) are red fluorescence observation on day 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 and 28

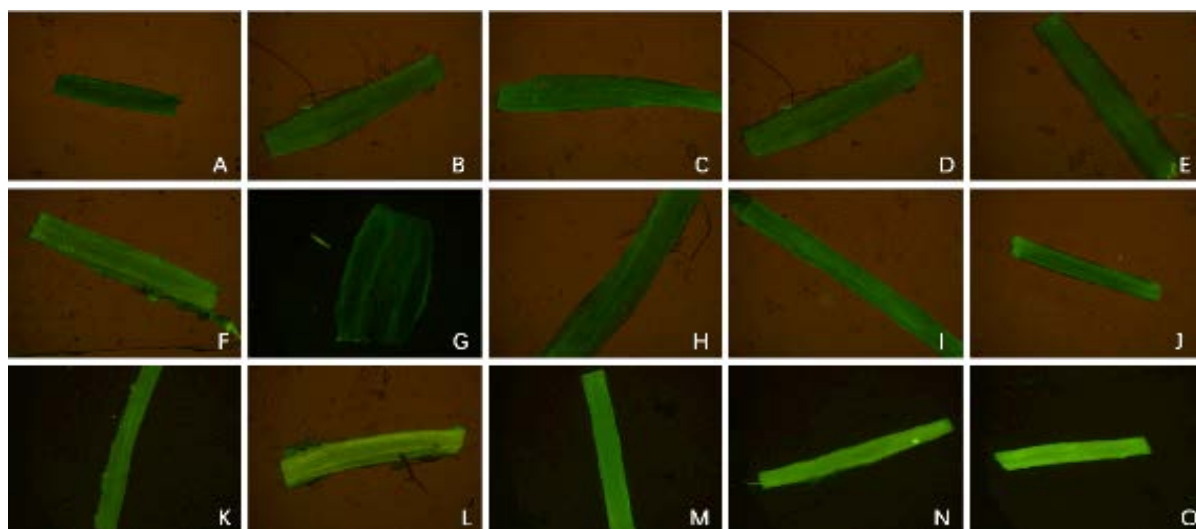
**图 10.** 黑暗培养下小麦芽鞘的红色荧光观察。注:图(A)~(L)依次是第 3、4、5、6、7、10、13、16、19、22、25、28 d 的红色荧光观察



**Figure 11.** Green fluorescence observation of young roots of wheat under light culture. Note: Figure (A)~(O) show the green fluorescence of root tissues on day 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 and 31, respectively

**图 11.** 光照培养下小麦幼根的绿色荧光观察。注:图(A)~(O)依次是第 1、2、3、4、5、6、7、10、13、16、19、22、25、28、31 d 根组织的绿色荧光



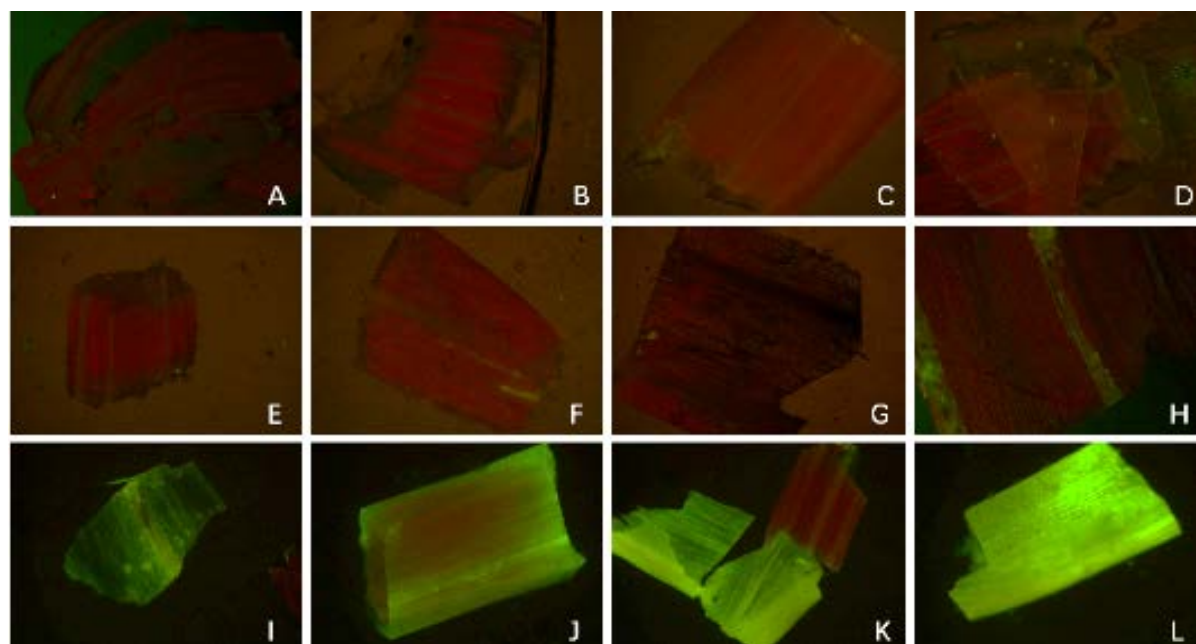


**Figure 12.** Green fluorescence observation of young roots of wheat under dark culture. Note: Figure (A)~(O) are green fluorescence observation of root tissue on day 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 and 31

**图 12.** 黑暗培养下小麦幼根的绿色荧光观察。注：图(A)~(O)依次是第 1、2、3、4、5、6、7、10、13、16、19、22、25、28、31 d 根组织的绿色荧光观察

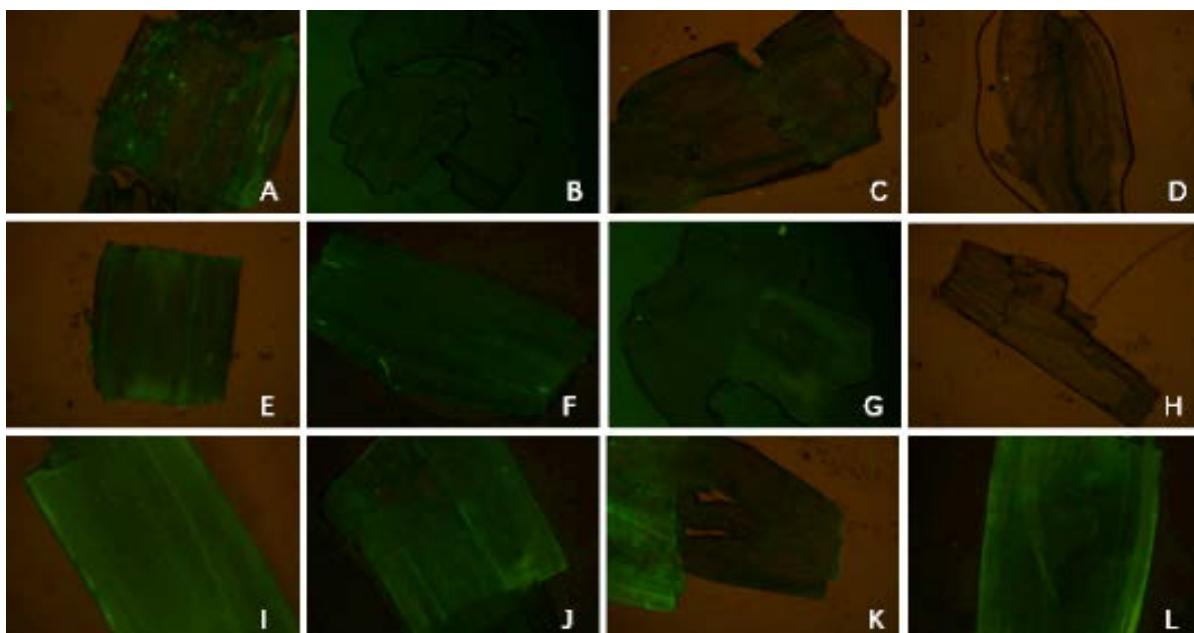
### 3.3.2. 不同光照下小麦幼苗叶片、叶鞘组织的绿色荧光

由于叶片、叶鞘有大量的叶绿素，因此光照下的小麦叶鞘难观察到绿色荧光，前期红色荧光能掩盖其他荧光(图 13)，但到后期叶鞘变浅变硬后可以观察到，表现为光照条件下 22 d 以后绿色荧光越来越明显。黑暗培养时(图 14)，前期叶鞘的绿色荧光几乎观察不到，但都后期可见绿色荧光，荧光强度不及对应的光照条件下的，荧光较弱。



**Figure 13.** Green fluorescence observation of wheat leaf sheath under light culture. Note: Figure (A)~(L) are the green fluorescence of day 3, 5, 6, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31

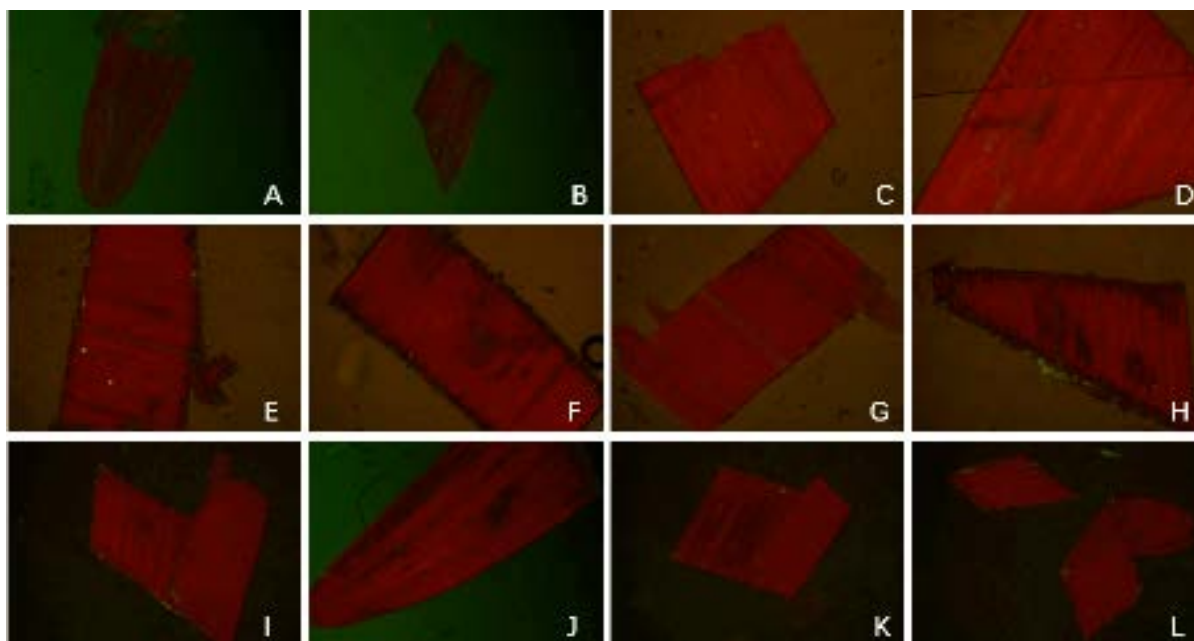
**图 13.** 光照培养下小麦叶鞘的绿色荧光观察。注：图(A)~(L)依次是第 3、5、6、7、10、13、16、19、22、25、28、31 d 的绿色荧光



**Figure 14.** Green fluorescence observation of wheat leaf sheath under dark culture. Note: Figure (A)~(L) are the green fluorescence of day 3, 5, 6, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31

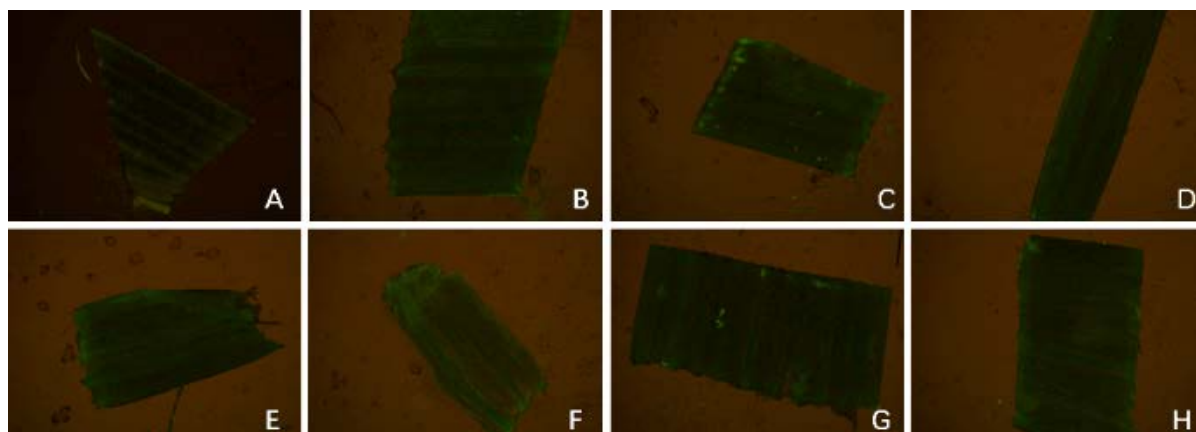
**图 14.** 黑暗培养下小麦叶鞘的绿色荧光观察。注：图(A)~(L)依次是第 3、5、6、7、10、13、16、19、22、25、28、31 d 的绿色荧光

叶片组织在光照培养下红色荧光完全盖过绿色荧光(图 15)，除第 1 d~2 d 红色较弱外，其他时间所有叶片均有强烈的红色荧光。黑暗条件下(图 16)，整个苗期所取的时间点叶片均能够看到微弱的绿色荧光。



**Figure 15.** Green fluorescence observation of wheat leaves under light culture. Note: Figure (A)~(L) show the green fluorescence observation on the 3rd, 4th, 5th, 6th, 7th, 10th, 13th, 16th, 19th, 22nd, 25th and 28th day, respectively, but the green fluorescence of all materials was covered by red fluorescence

**图 15.** 光照培养下小麦叶片的绿色荧光观察。注：图(A)~(L)依次是第 3、4、5、6、7、10、13、16、19、22、25、28 d 的绿色荧光观察，但所有材料荧光均被红色掩盖



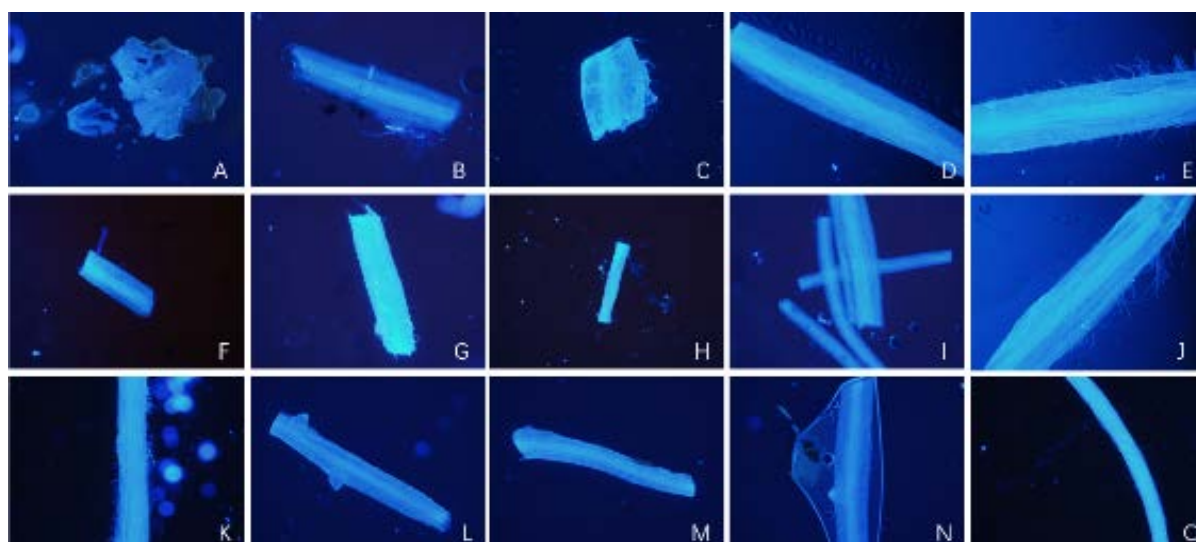
**Figure 16.** Green fluorescence observation of wheat leaves under dark culture. Note: Figure (A)~(L) are the green fluorescence observation on day 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 and 28

**图 16.** 黑暗培养下小麦叶片的绿色荧光观察。图(A)~(L)依次是第 3、4、5、6、7、10、13、16、19、22、25、28 d 的绿色荧光观察

### 3.4. 小麦幼苗不同时期根、叶鞘、叶片蓝色自发荧光的分析

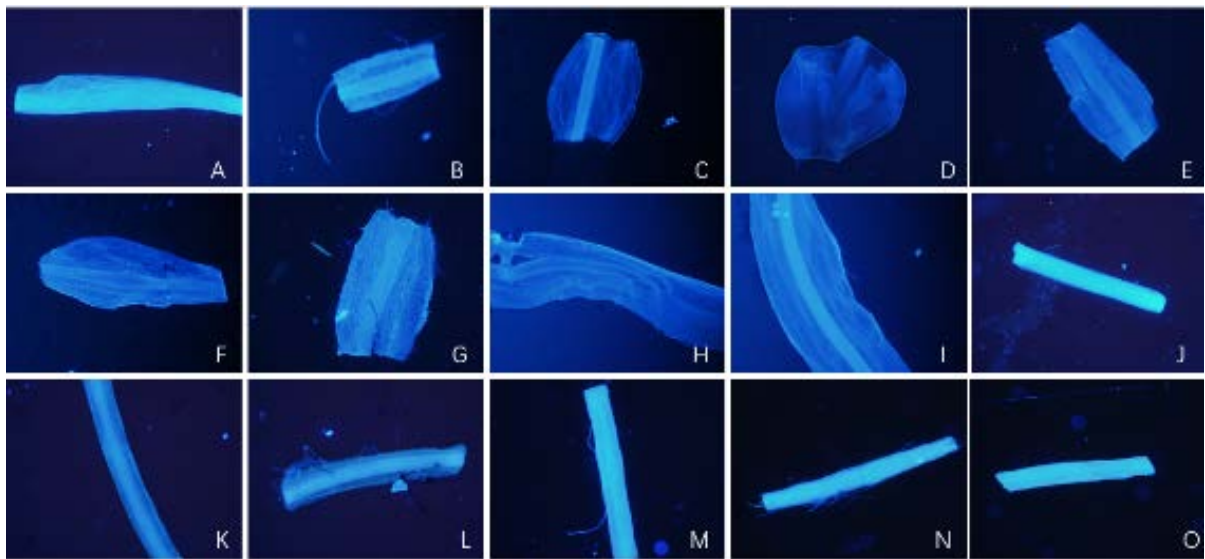
采用 400 nm 波长激发光对小麦的根、叶片和叶鞘组织进行照射, 小麦组织发出的荧光为浅蓝色, 荧光越强, 蓝色越亮。从图 17~图 22 可见, 无论是从培养 1 d 到培养 31 d 任何时期、根组织(图 17、图 18)、叶组织(图 19、图 20)、叶鞘组织(图 21、图 22)都显示较强的蓝色荧光, 黑暗培养和见光培养, 均能检测到明显的蓝色荧光。尤其是叶片表皮毛蓝色更明显, 说明小麦是否有蓝色自发荧光不受光照的影响, 在幼苗不同的发育时期、不同器官会有荧光强弱的差异。

黑暗条件下 2~6 d 幼嫩的根荧光略微弱一些, 叶鞘(图 21、图 22)也有相似的趋势, 在萌发初期荧光略微弱一点, 到后期蓝色荧光较强。从图 19、图 20 可知, 叶片组织的蓝色荧光不及叶鞘组织亮, 叶片的表皮毛蓝色荧光很鲜明, 无论见光还是黑暗培养荧光现象相似。

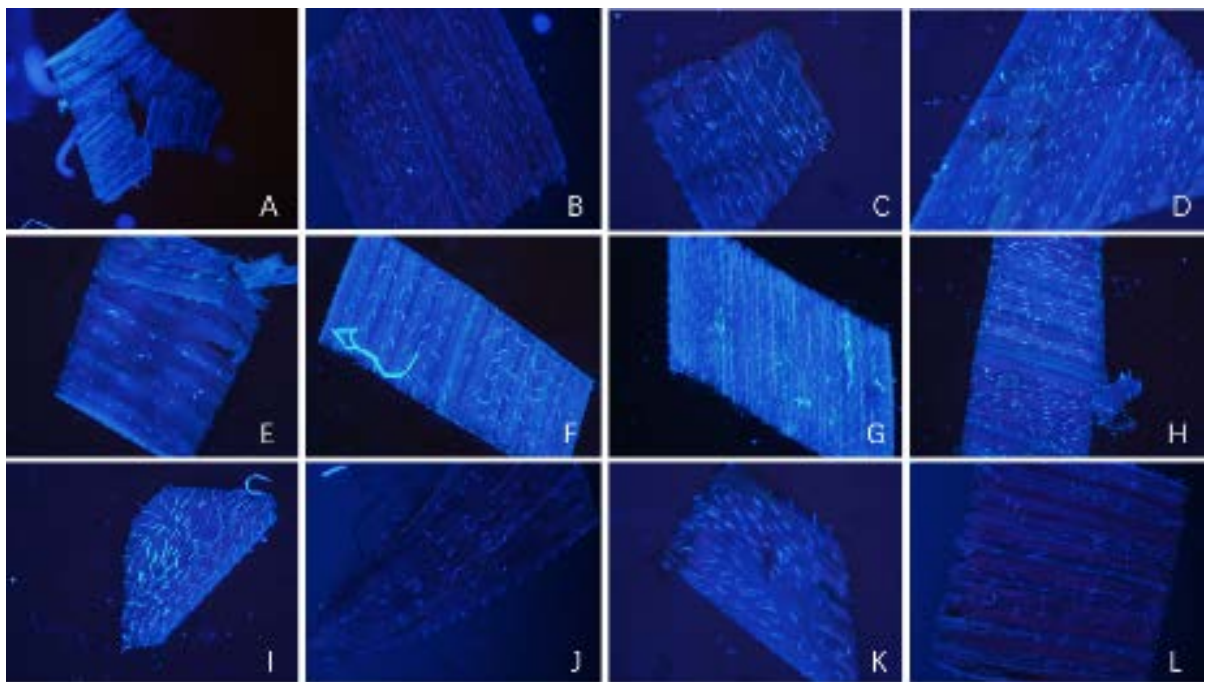


**Figure 17.** Blue fluorescence of wheat root tissue under light culture. Note: Figures (A)~(G) are cultured for 1~7 days. Figures (H), (I), (J), (K), (L), (M), (N) and (O) are the tissues sampled on day 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 and 31, respectively

**图 17.** 光照培养下小麦根组织蓝色荧光。注: 图(A)~(G)为培养 1~7 d, 图(H)、(I)、(J)、(K)、(L)、(M)、(N)、(O)依次是第 10、13、16、19、22、25、28、31 d 取样的组织

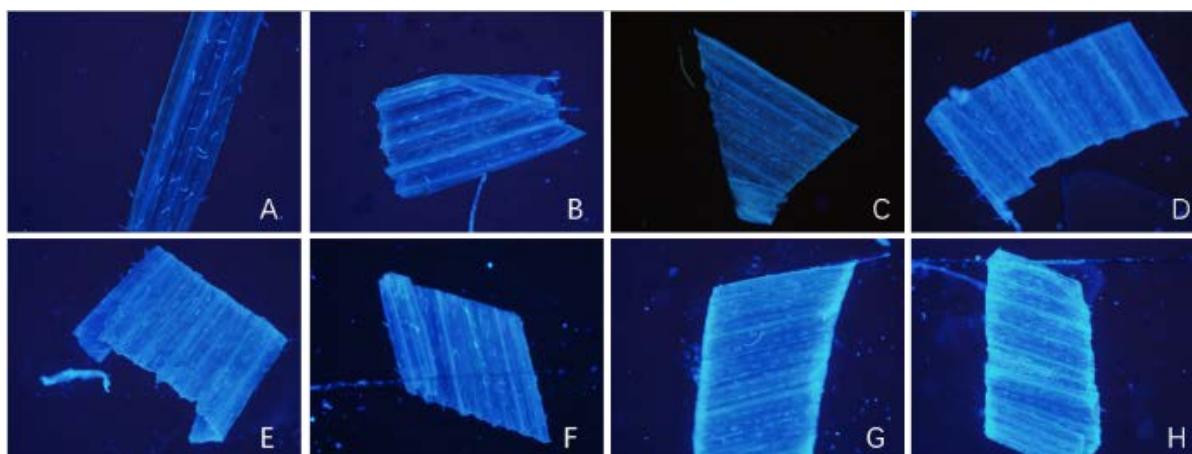


**Figure 18.** Blue fluorescence of wheat root tissue under dark culture. Note: Figures (A)~(G) are cultured for 1~7 days. Figures (H), (I), (J), (K), (L), (M), (N) and (O) are the tissues sampled on day 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 and 31, respectively  
**图 18.** 黑暗培养下的小麦根组织蓝色荧光。注：图(A)~(G)为培养 1~7 d，图(H)、(I)、(J)、(K)、(L)、(M)、(N)、(O)依次是第 10、13、16、19、22、25、28、31 d 取样的组织



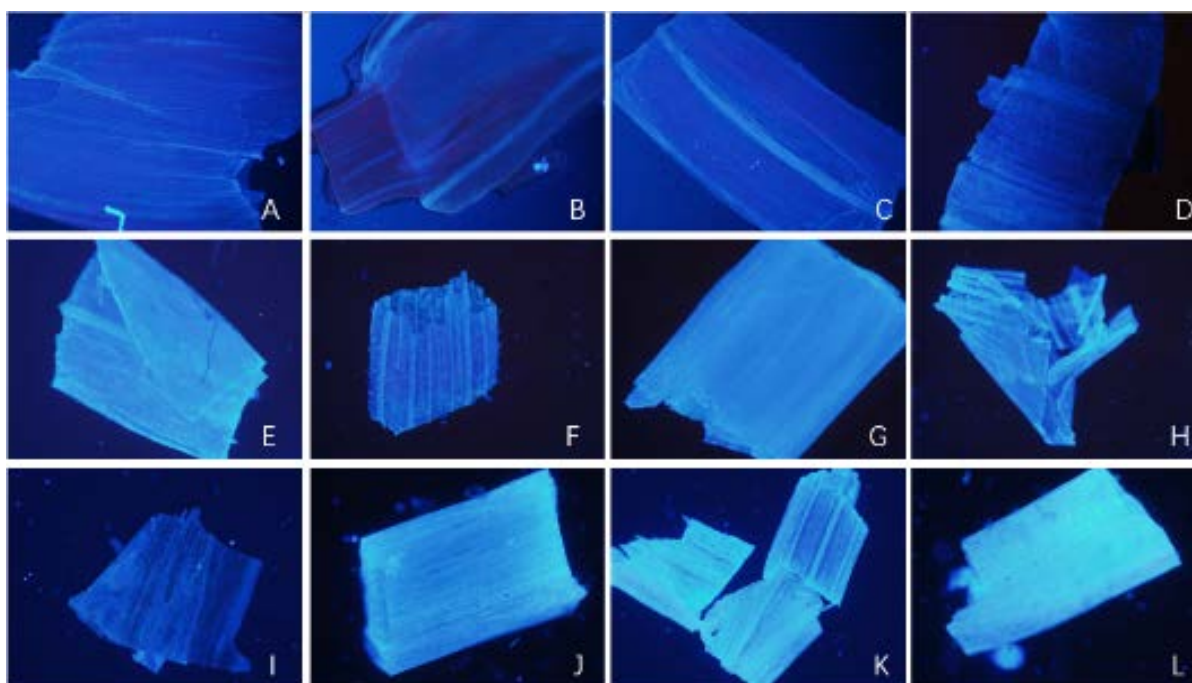
**Figure 19.** Blue fluorescence of wheat leaves under light culture. Note: Figures (A)~(G) are cultured for 1~7 days. Figures (H), (I), (J), (K), (L), (M), (N) and (O) are the tissues sampled on day 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 and 31, respectively  
**图 19.** 光照培养下小麦叶组织蓝色荧光。注：图(A)~(G)为培养 1~7 d，图(H)、(I)、(J)、(K)、(L)、(M)、(N)、(O)依次是第 10、13、16、19、22、25、28、31 d 取样的组织

变化趋势最鲜明的是叶鞘组织(图 9、图 10)，随着植株生长天数的增加，蓝色荧光越来越强，这与叶鞘的硬度变化趋势是相似的。无论黑暗还是光照条件下，都有随着生长天数增加蓝色荧光变强的趋势。



**Figure 20.** Blue fluorescence of wheat leaves under dark culture. Note: Figures (A)~(G) are cultured for 1~7 days. Figures (H), (I), (J), (K), (L), (M), (N) and (O) are the tissues sampled on day 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 and 31, respectively

**图 20.** 黑暗培养下小麦叶组织蓝色荧光。注：图(A)~(G)为培养 1~7 d，图(H)、(I)、(J)、(K)、(L)、(M)、(N)、(O)依次是第 10、13、16、19、22、25、28、31 d 取样的组织

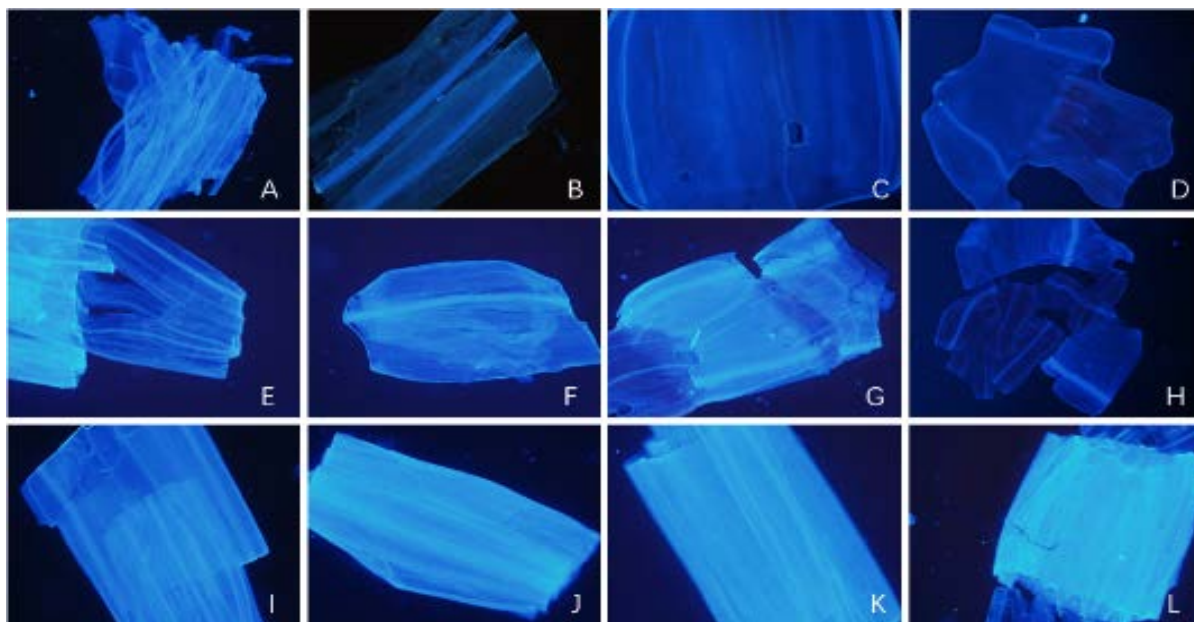


**Figure 21.** Blue fluorescence of wheat leaf sheath under light culture. Note: Figures (A)~(D) are cultured for 4~7 days. Figs (E), (F), (G), (H), (I), (J), (K) and (L) are the tissues sampled on day 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 and 31, respectively

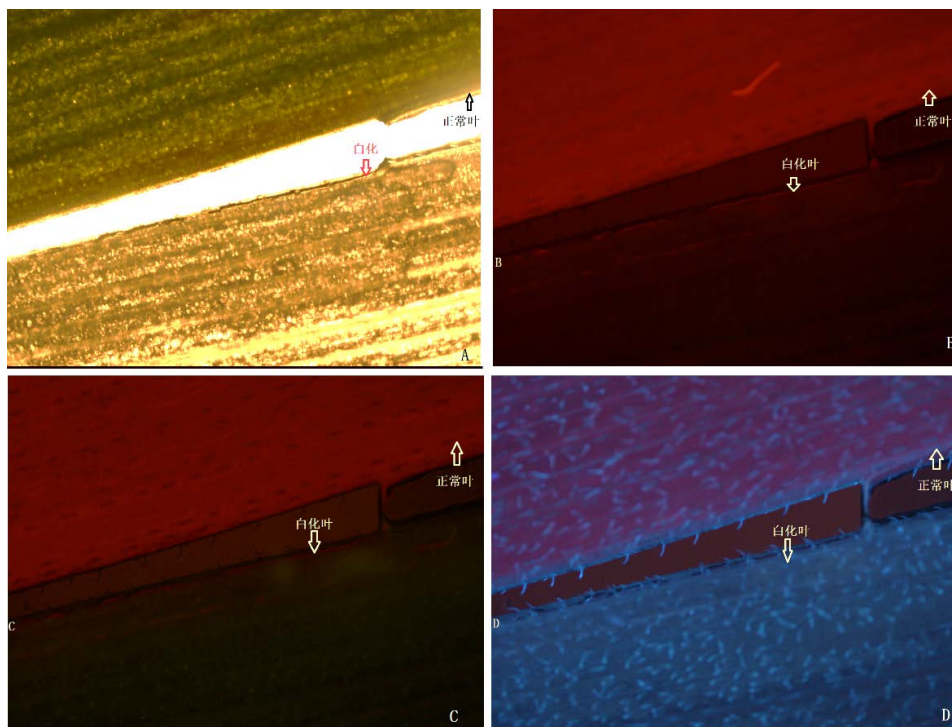
**图 21.** 光照培养下小麦叶鞘组织蓝色荧光。注：图(A)~(D)为培养 4~7 天，图(E)、(F)、(G)、(H)、(I)、(J)、(K)、(L)依次是第 10、13、16、19、22、25、28、31 d 取样的组织

### 3.5. 白化幼苗的三种荧光变化

经过卡那霉素处理后，叶片变为白色，称之为白化，从图 23 可以看出，与正常叶片对比，白化幼苗的红色荧光消失了(图 23(B))，绿色荧光也消失了，正常叶片因为红色荧光太强，也观察不到绿色荧光(图 23(C))，只有红色荧光，两种叶片只有蓝色荧光是同时显现的(图 23(D))，其中正常叶片观察蓝色荧光时还可以看到红色荧光没有散去的底色。



**Figure 22.** Blue fluorescence of wheat leaf sheath under dark culture. Note: Figures (A)~(G) are cultured for 1~7 days. Figures (H), (I), (J), (K), (L), (M), (N) and (O) are the tissues sampled on day 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 and 31, respectively  
**图 22.** 黑暗培养下小麦叶鞘组织蓝色荧光。注：图(A)~(G)为培养 1~7 d，图(H)、(I)、(J)、(K)、(L)、(M)、(N)、(O)依次是第 10、13、16、19、22、25、28、31 d 取样的组织



**Figure 23.** Observation of three kinds of spontaneous fluorescence in normal and albino leaves of wheat seedlings. Note: (A) is under white light, (B) is under green excitation light to observe red, (C) is under blue excitation light to observe green, (D) is under ultraviolet excitation light to observe blue. Each picture is divided into two parts; the upper part is green leaves, and the lower part is white leaves

**图 23.** 小麦幼苗正常叶片和白化叶片的三种自发荧光的观察。注：(A) 为白光下，(B) 为绿激发光观察红色、(C) 为蓝激发光观察绿色、(D) 为紫外激发光观察蓝色。每张图片分上下两部分，上半部分为绿色叶片，下半部分为白化叶片

## 4. 讨论

植物组织最强烈的自发荧光是叶绿素荧光, 叶绿素荧光信号是研究光合作用的重要手段, 植物的光合作用可以通过叶绿素荧光的参数进行间接检测, H. R. Oppenheimer 等发现, 植物的各色荧光在叶片中都会被叶绿素的强烈红色荧光所掩盖[19]。这与本实验的结果是一致的, 光照条件下, 小麦叶片中的红色荧光比黑暗中明显, 并且正常绿色叶片始终无法检测到绿色荧光。

植物中的另一重要荧光是蓝色荧光。报道认为, 植物细胞壁物质会引发植物发出蓝色或绿色荧光[20] [21]。S. Meyer 等对小麦细胞壁自发荧光的研究认为细胞壁中阿魏酸所发出的蓝绿色荧光随着小麦叶龄的增加而减少, 其荧光强度与叶绿素的荧光强度成正比, 可以作为一种荧光探针来检测小麦的叶龄[22] [23], 但在本实验中并没有观察到此现象, 小麦幼苗叶片的表皮毛蓝色荧光明显, 而叶片并未表现明显的强度变化, 可能与小麦的培养条件差异有关, 田间生产和室内培养的叶片硬度是不一致的。叶鞘组织的蓝色荧光反而是随着苗龄增加而荧光强度增加, 与叶鞘的硬度变化趋势是一致的。报道认为蓝色荧光一般是细胞壁物质引起的[20] [21], 可能是因为细胞壁增厚组织变硬引发了荧光变强。有研究表明酚类物质的积累可以增加自发荧光[22], 不是所有的酚类都会发荧光, 推测降低植物中酚类物质的含量能降低植物的自发荧光, 但目前没有有效的办法降低植物酚类物质。因此, 难以消除小麦的蓝色自发荧光。小麦的蓝色荧光非常强烈, 且不论是根、叶、叶鞘, 不同部位还是光照、黑暗的不同方式培养, 都无法避免强烈的蓝色自发荧光。因此, 对小麦进行荧光标记时, 不宜选择蓝色的荧光标记物。

荧光显微镜以及更高级的激光共聚焦显微镜为细胞内特定蛋白质、核酸、糖类、脂质及某些离子组分的定位研究提供了便利, 然而, 植物材料因为其强烈的自发荧光使得这一应用受到限制。黑暗培养可以抑制叶绿素的形成, 可一定程度降低叶绿素的红色荧光强度[24] [25] [26]。但是绝对的黑暗很难控制, 植物对光极其敏感, 本实验一直避光生长也可检测到微弱的红色荧光。本研究认为通过卡那霉素处理引发白化现象是克服叶绿素形成的有效方法, 因为白化幼苗完全是白色的, 不会有叶绿素的干扰, 因而, 选择红色荧光蛋白来标记推测是可行的, 没有叶绿素的干扰, 获得的信号将是准确的。且卡那霉素处理技术简单, 对植物转基因熟悉的研究人员都会使用, 是一种克服小麦红色自发荧光的有效手段, 前提是目的基因与光合作用无关或对白化不敏感。

小麦各种组织有绿色荧光, 根中也不例外, 有时也会没有, 即便探明绿色荧光的发生规律, 也依然受叶绿素荧光自发荧光的干扰。本研究发现白化处理以后, 小麦叶片也检测不到绿色荧光了, 但原因仍不清楚, 绿色荧光标记是否适合做荧光标记还有待进一步研究。

本文认为由于没有自发荧光干扰, 黄皮洋葱磷叶内表皮是优秀的荧光标记表达定位材料, 如果要探索地上部组织的基因表达定位, 可以通过卡那霉素处理的方式使小麦发生白化, 再通过荧光显微观察进行亚细胞定位。

## 致 谢

感谢 Bah Chernor Sulaiman 对英文摘要的修改, 感谢国家大学生创新研究项目和山东省自然科学基金对本项目的支持。

## 基金项目

国家大学生创新计划项目(S202011067003)山东省自然科学基金(ZR2014JL017)。

## 参考文献

- [1] 徐国华, 张绍铃, 张超英, 等. 梨白花及异花授粉对其花柱自发荧光的影响[J]. 园艺学报, 2003, 30(4): 439-442.

- [2] Donaldson, L. and Croce, A.C. (2020) Autofluorescence in Plants. *Journal Molecules*, **25**, 324-430. <https://doi.org/10.3390/molecules25102393>
- [3] 梁艳丽. 水稻苗期叶片细胞壁对稻瘟病菌侵染的响应研究[D]: [博士学位论文]. 昆明: 云南农业大学, 2016: 153-210.
- [4] 梁艳丽, 赵婧, 刘林, 等. 水稻细胞自发荧光加强对抵抗稻瘟病菌侵染的作用[J]. 分子植物育种. 2016, 14(6): 679-700.
- [5] Barber, J.L., et al. (2004) A Novel Analytical Approach for Visualizing and Tracking Organic Chemicals in Plants. *Environmental Science & Technology*, **38**, 4195-4199. <https://doi.org/10.1021/es049915u>
- [6] 左敏, 张成军, 陈国祥, 等. 低温对水稻幼苗叶绿体自发荧光及抗氧化系统的分析[J]. 西北农业学报, 2006, 15(3): 20-26.
- [7] Roshchina, V.V. (2003) Autofluorescence of Plant Secreting Cells as a Biosensor and Bioindicator Reaction. *Journal of Fluorescence*, **13**, 403-420. <https://doi.org/10.1023/A:1026164922760>
- [8] Yutaka, K. (2016) Time Gating of Chloroplast Autofluorescence Allows Clearer Fluorescence Imaging in Planta. *PLoS ONE*, **11**, 57-81. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152484>
- [9] 颜启传. 种子检验原理与技术[M]. 杭州: 浙大大学出版社, 2006: 113-114.
- [10] Shultz, R.W., Settlege, S.B., Hanley-Bowdoin, L., et al. (2005) A Trichloroacetic Acid-Acetone Method Greatly Reduces Infrared Autofluorescence of Protein Extracts from Plant Tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*, **23**, 405-409. <https://doi.org/10.1007/BF02788888>
- [11] 李祥生, 王应宗, 付克德, 等. 植物叶片的消荧光现象[J]. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22(1): 91-93.
- [12] Yang, J., Verma, P.R. and Lees, G.L. (1992) The Role of Cuticle and Epidermal Cell Wall in Resistance of Rapeseed and Mustard to *Rhizoctonia solari*. *Plant and Soil*, **142**, 315-321. <https://doi.org/10.1007/BF00010977>
- [13] Borucki, W. and Sujkowska, M. (2008) The Effects of Sodium Chloride-Salinity upon Growth, Nodulation, and Root Nodule Structure of Pea (*Pisum sativum* L.) Plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, **30**, 293-301. <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0120-8>
- [14] 黄国存, 朱生伟, 董越梅, 等. 绿色荧光蛋白及其在植物研究中的应用[J]. 植物学通报, 1998, 15(5): 24-30.
- [15] 赵华, 梁婉琪, 杨永华, 等. 绿色荧光蛋白及其在植物分子生物学研究中的应用[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(2): 171-178.
- [16] Jordan, M.C. (2000) Green Fluorescent Protein as a Visual Marker for Wheat Transformation. *Plant Cell Reports*, **19**, 1069-1075. <https://doi.org/10.1007/s002990000246>
- [17] 田英, 赵彩平, 韩明玉. 桃脂氧合酶基因(PpLOX-3)在洋葱表皮细胞中的定位表达[J]. 西北农业学报, 2011, 20(9): 104-107.
- [18] 刘海燕, 冯冬茹, 刘兵, 等. 农杆菌介导的 MpASR 蛋白在洋葱表皮细胞的定位研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2009, 17(3): 218-222.
- [19] Oppenheimer, H.R. and Jacoby, B. (1961) Usefulness of Autofluorescence Tests as Criterion of Life in Plant Tissues. *Protoplasma*, **53**, 220-226. <https://doi.org/10.1007/BF01248106>
- [20] 贺新强, 李素文, 胡玉熹, 等. 毛竹细胞壁自发荧光的显微荧光分光光度分析[J]. 植物学报, 1999(7): 2-4.
- [21] Schoenwaelder Monica, E.A. (2008) The Biology of Phenolic Containing Vesicles. *ALGAE*, **23**, 163-175. <https://doi.org/10.4490/ALGAE.2008.23.3.163>
- [22] Meyer, S., Cartelat, A., Moya, I., et al. (2003) UV-Induced Blue-Green and Far-Red Fluorescence along Wheat Leaves: A Potential Signature of Leaf Ageing. *Experimental Botany*, **54**, 757-769. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg063>
- [23] 姜淑媛. 茶树荧光性绿斑病叶的自发荧光显微分析[D]: [硕士学位论文]. 泰安: 山东农业大学, 2008: 35-40.
- [24] 段青青, 丁明, 姜武, 等. 黑暗对西瓜幼苗叶片叶绿体超微结构的影响[J]. 电子显微学报, 2009, 28(3): 275-279.
- [25] 徐兵强, 贺庭琪, 王力敏, 等. 黑暗条件下木薯叶绿体比较蛋白质组学初步研究[J]. 江西农业大学学报, 2015, 37(2): 269-277.
- [26] 薛娴. 光照和黑暗对杉木子叶光合系统建成的影响研究[D]: [博士学位论文]. 北京: 北京林业大学, 2017: 72-79.