

大豆种子发育阶段种皮细胞壁 表面糖蛋白的变化^{*}

弭忠祥¹ 赵小钊² 胡宝忠² 陆 印³

(1 东北农业大学生命中心 2 东北农业大学基础部 3 白城市师范专科学校生物系)

摘 要

利用电镜细胞化学的方法,对大豆种子在发展的不同阶段,种皮细胞壁表面糖蛋白的变化进行了定位观察。经 红标记染色,在种皮外层细胞壁的表面,糖蛋白呈现出较高电子密度,紧贴于细胞壁的表面,形成均匀的糖蛋白层。在种子发育的不同阶段,该糖蛋白层的厚度,随着种子的发育而不断增加,在开花后的第 25-30 天时,糖蛋白层的厚度达到最大,一般在 50-60nm。种子在以后的发育过程中,糖蛋白层的厚度基本维持在这一水平。

关键词 大豆;种子发育;糖蛋白;电镜细胞化学

糖蛋白是高等植物细胞壁中普遍存在的一种结构蛋白,蛋白中的羟脯氨酸含量高达 30% - 40%,所以也称之为富含羟脯氨酸糖蛋白(Hydroxyproline-Rich Glycoprotein, HRGP),是一类重要的生物大分子,它与细胞壁的精细结构及各种生理功能密切相关,并作为细胞壁的结构屏障,能够有效的阻止病原菌的侵入^[1]。当植物受到侵害时,细胞中 HRGP 的含量能够迅速的合成积累,HRGP 这种含量上的变化被普遍地认为与植物的抗性作用密切相关^[2]。因此,更加引起人们的重视,对 HRGP 的研究也在不断的深入,目前,关于 HRGP 的结构、生物合成、功能、基因及其调控等方面已有了进一步的认识。但对于植物的不同生长阶段,在发育的过程中 HRGP 的含量与植物生长发育是否存在有密切的关系,也就是说,植物的发育程序对 HRGP 的合成是否起到某种调控的作用,还缺少这方面的报导。

我们利用电镜细胞化学的方法,对大豆种皮细胞壁表面 HRGP 进行了超微结构的定位观察,并直观的测定了种皮细胞壁表面 HRGP 在种子发育过程中的变化。

材料与方法

栽培大豆 (*Glycine max*) 东农 42 号,在开花后的第 10 15 20 25 30 35 天时,分别

^{*} 收稿日期 1998-09-30
Received on Sep. 30, 1998

取材,并切取大豆种皮 0.5×0.5 mm 小块,作为实验材料。分为两组固定染色,一组是用含有 1000 ppm 红的二甲胂酸钠缓冲液 ($\text{pH} 6.8, 0.05 \text{ mol L}^{-1}$)配制的 2.5% 戊二醛固定液,于室温、黑暗条件下固定染色 2 小时,再用含有 500 ppm 红的二甲胂酸钠缓冲液冲洗,三次每次 10 分钟,之后用 500 ppm 红 2% 钨酸混合液,于室温黑暗条件下二次固定染色 3 小时,再用上述缓冲液冲洗,按常规脱水包埋、制备超薄切片。另外一组不加红,其它条件和步骤与前组相同,作为对照。两组同时经铅、铀双重染色后,在 JEM 1200EX 型透射电子显微镜下观察并拍照。

扫描电镜样品的制备,首先将大豆种皮用液氮迅速的冷冻固定,然后进行冷冻割断,割断的样品通过冷冻真空干燥后,在断裂面上用离子溅射仪镀金,进行导电处理,于 KYKY-1000B 型扫描电镜下观察、拍照。

结果与讨论

大豆种皮的横断面,在扫描电镜下,明显的分为内层和外层两部分,外层包括表皮层、栅栏层和滴漏细胞层,内层是薄壁组织,可见到一些切向伸长的细胞和一些较小且具有很多分枝的细胞(见图 1)。经红标记染色的 HRGP,在透射电子显微镜下,呈现出较高的电子密度,于细胞壁的表面形成一个糖蛋白层,紧贴细胞壁的部分比较致密,外部边缘松散,有些呈现出丝状(见图 2-7);没有加红的对照组,在细胞壁的表面没有表现出如上所述的高电子密度物质,说明红对 HRGP 具有特殊的染色作用。被红所标记的 HRGP 主要见于种皮外层分布的细胞壁表面,在这些细胞壁的表面电子密度明显的增高,显示出这些细胞壁表面 HRGP 的含量比较丰富。图 2 示开花后第 10 天的大豆种皮细胞壁表面的糖蛋白层,在细胞壁的表面可见到很薄的一层较高电子致密物质,表明种子发育的这个时期,种皮外层细胞壁的表面 HRGP 的含量是比较低的。当种子继续发育过程中,这层糖蛋白层的厚度,呈现出递增的趋势,电子致密度也随之增高。表明 HRGP 的含量是随着种子的发育而不断的增加。图 3-6 分别显示了开花后的第 15-30 天时,种皮外层细胞壁表面糖蛋白层的厚度,在开花后的第 25-30 天时,糖蛋白层的厚度达到最大,在 50-60 nm 左右。以后的发育过程中,这层糖蛋白的厚度基本上是维持在这一水平。

从上述的结果可以看出,大豆种皮细胞壁表面 HRGP 的含量,是在种子的一定发育时期内,随着种子的发育而逐渐增加,当 HRGP 的含量达到一定的水平以后,便不再随种子的发育而继续的增加。说明种子在发育的过程中,阶段性地调控了 HRGP 基因的表达,也就是说,植物发育的程序调控了 HRGP 基因表达的程序。另外的一些研究结果已经证实^[3-4],当植物受到某种机械损伤或是受到病菌的侵害时,细胞壁表面的 HRGP 会急速的增加。因此,合成 HRGP 基因的表达,不仅是受到植物发育程序的调控,环境信号的改变,对 HRGP 基因的表达也起到一种调控的作用。

Hood 等^[5]研究了授粉后 11 天到成熟的玉米种子,在整个发育时期羟脯氨酸含量的变化,以干重为基础计算在发育中期,即授粉后第 18-20 天中积累的羟脯氨酸含量最多。Cassab 等^[6]对大豆种子发育时期羟脯氨酸的含量测定中发现,种皮中羟脯氨酸的含量,在开花后的第 8-26 天内,从 $0.3 \mu\text{g/mg}$ 增加到 $4.6 \mu\text{g/mg}$ 。这些结果与我们所观察到的

细胞壁表面糖蛋白层的厚度,是随着种子的发育在一定阶段内表现出增厚的趋势相类似,只是对 HRGP含量上的表现形势有所不同。由于 HRGP中的羟脯氨酸的含量占 30% - 40%,所以羟脯氨酸含量上的变化,在某种程度上代表了 HRGP含量上的改变。而我们所应用的电镜细胞化学方法,是通过对 HRGP的标记定位,在细胞壁表面所形成的糖蛋白层,直接地测定糖蛋白层的厚度,根据糖蛋白层厚度的变化,来探讨 HRGP在种子发育过程中含量上的改变,显得更为直观。从 HRGP的组成结构来看,主要包括寡糖和肽链两部分,红与寡糖具有特异性的结合,在电镜下呈现出高的电子密度。因此,红用于特殊的标记糖蛋白,已得到广泛的应用^[7-8]

对上述工作进一步深入的研究,对于加深了解细胞壁在调节植物的生长和发育等生理过程中,结构和功能的关系,以及对种皮防御功能的认识,均有着重要意义。

参 考 文 献

- [1] Ecker JE. et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 1987, 84 5202
- [2] Hammerschmidt R. et al., Plant Physiol 1979, 24 43
- [3] Chen J. Varner JE. Proc Natl Acad Sci USA 1985, 82 4399
- [4] Esquerre- Tugaye M.T. et al. Plant Physiol 1979, 64 320
- [5] Hood EE. et al. Plant Physiol 1988, 87 138
- [6] Cassab GI. et al., Plant Physiol 1985, 77 532
- [7] 简令成等, 1992, 实验生物学报, 24(3): 249- 257
- [8] 简令成等, 1986, 实验生物学报, 19(3): 261- 271

THE DISTRIBUTION OF GLYCOPROTEINS ON CELL WALL SURFACE OF SOYBEAN SEED COAT DURING DEVELOPMENTAL

Mi Zhongxiang¹ Lu Yin² Hu Baozhong¹

(1 *North-east Agricultural University, Harbin 150030*

2 *Biology Department of Baicheng Normal School*)

Abstract

Cytochemical localization of glycoproteins on cell wall surface of soybean seed coats during developmental was observed by electron microscopy. The glycoproteins layer was shown to be present on the cell wall surface after staining with ruthenium red. The thickness of glycoprotein layer seemed to have increased during seed development, and at stages of development 25 - 30 d. after anthesis the glycoproteins layers are thickest, about 50- 60nm.

Key words *Glycine max.*; Seed development; Glycoprotein; EM. chemical

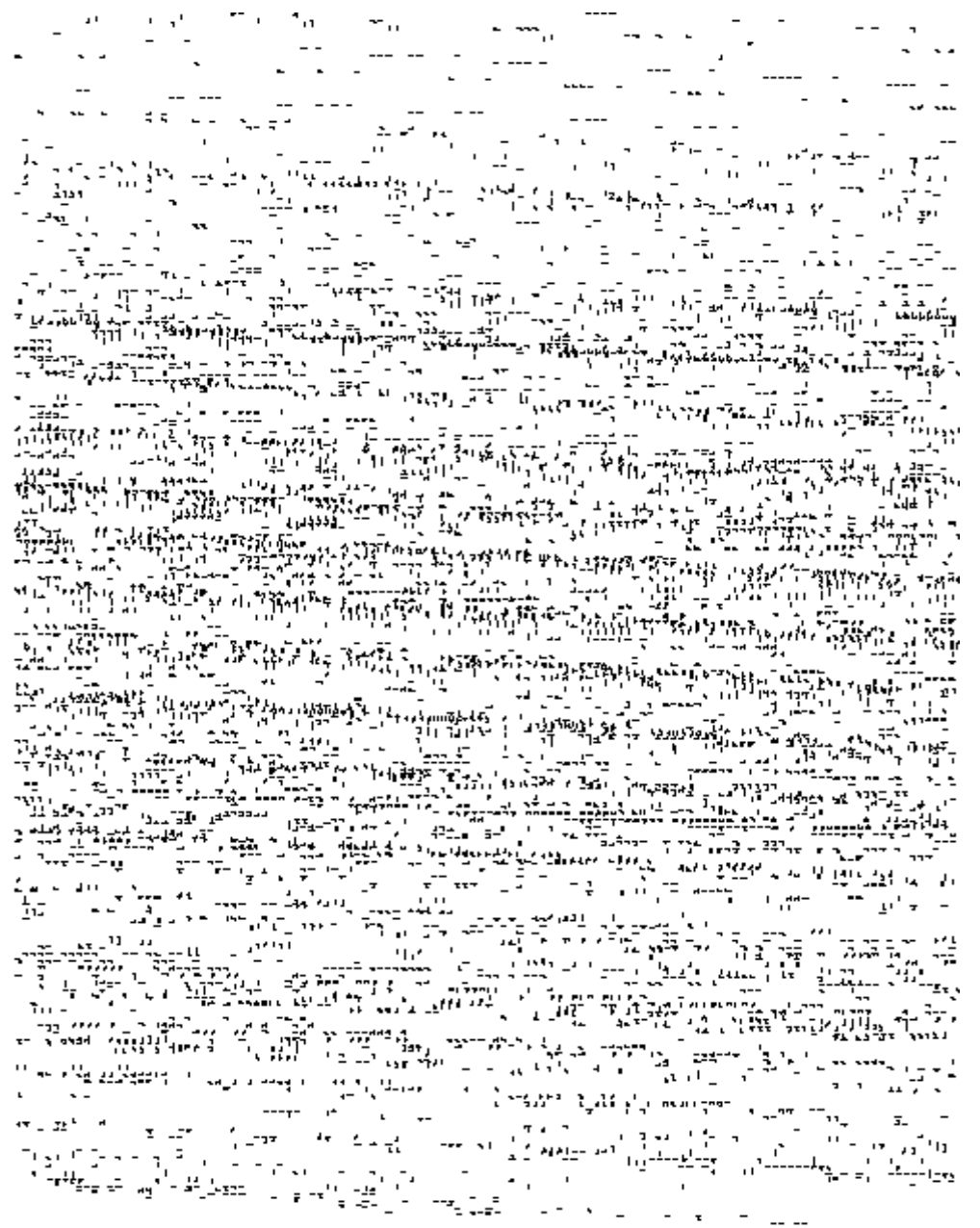


图 1 大豆种皮横断面扫描电镜下的结构,SE 表皮细胞,PG 栅栏细胞,HG 滴漏细胞,P 薄壁细胞,G 伸长细胞

Fig. 1 Anatomy of soybean seed coat was observed by scanning electron microscopy. SE: Surface layer, PG palisade cell, HG hour glass cell, P parenchyma, G compressed cell.

图 2- 7 分别显示了开花后第 10、15、20、25、30、35 天,大豆种子发育过程中,种皮细胞壁表面糖蛋白层厚度的变化。W: 细胞壁,↑: 糖蛋白层

Fig. 2- 7 The distribution of glycoproteins layer on the cell wall surface of soybean seed coats for six stages of development 10 15 20 25 30 and 35d. after anthesis. W: Cell wall,↑: Glycoprotein layer