

小麦颖果发育中筛分子和导管结构变化 及酸性磷酸酶作用

吕亚妮¹ 杨文丽¹ 张智慧¹ 梅方竹² 李继伟³ 邓祥宜³ 周竹青^{1,4}

1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070;

2. 华中农业大学科学技术发展研究院, 武汉 430070;

3. 武汉设计工程学院食品与生物科技学院, 武汉 430070;

4. 华中农业大学农业部马铃薯生物学与生物技术重点实验室, 武汉 430070

摘要 导管经历了完整的细胞程序性死亡过程(programmed cell death, PCD), 形成运送水分的管状通道; 而筛分子分化则经历了细胞程序性半死亡过程, 形成运输有机养分的通道。为了进一步弄清二者在小麦(*Triticum aestivum* L.)颖果发育过程中超微结构上的变化, 本研究利用生物电镜和酶的超微细胞化学定位技术比较了筛分子和导管分化过程中超微结构的变化, 以及酸性磷酸酶(ACPase, acid phosphatase)活性的分布动态。结果表明: 筛分子呈对称性半圆形分布于导管的两侧, 且筛分子内细胞核的降解晚于导管, 筛分子细胞质主要通过液泡膜内陷包裹细胞器, 形成自噬体进行降解, 最终仍保留了部分细胞器碎片, 筛分子仍然存活; 而在导管分化中, 主要是液泡破裂后, 胞内细胞质被完全降解, 导管最终死亡, 形成管状分子。ACPase作为液泡的标志性酶, 在导管液泡膜破裂后, 多定位于线粒体等发生降解的细胞器上。而在筛分子中, 不仅在发生降解的线粒体等细胞器上检测到了ACPase活性, 在成熟筛分子胞间连丝上也检测到了ACPase活性, 表明ACPase不仅参与了小麦颖果筛分子和导管发育中PCD进程, 可能还与细胞间物质运输有关。

关键词 小麦; 颖果发育; 筛分子; 导管; 酸性磷酸酶; 细胞程序性死亡

中图分类号 S 512.101 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)01-0024-08

细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)是指生物体生长发育过程中, 由自身基因编码的、主动和有序的细胞死亡进程, 是生物体自身新陈代谢过程中正常的生理反应, 也称为细胞凋亡(cell apoptosis)。近年来, 越来越多的研究表明, 无论是在植物的生长发育过程(包括根冠细胞、导管、大孢子细胞等)中, 还是在超敏反应(hypersensitive reaction)中, 都普遍存在着细胞凋亡现象^[1-2]。其中, 管状分子(如导管和筛管)的研究一直受到学者的重视。王雅清^[3]发现杜仲次生木质部导管分子PCD包括一系列物质的合成、细胞结构的解体和自溶。在百日菊、拟南芥、美洲黑杨等植物导管分化过程中, 也观察到了类似的现象^[4-7], 已证实导管的分化是一种典型的植物PCD。与导管PCD相比, 筛分子PCD具有其特殊性。在拟南芥原生韧皮部筛分子发育过程中, 细胞质内含物选择性地逐渐降解, 细

胞内的电子致密度降低, 在完全成熟的筛分子中保留了少量的线粒体、质体和内质网碎片^[8]。针叶树和隐花植物的筛分子发育过程中, 发现筛分子成熟后, 在很长一段时间内仍有核碎片的残留^[9]。在前期研究工作中, Wang等^[10]观察发现, 小麦颖果筛分子的分化过程中涉及到细胞核降解、染色质凝集、细胞质降解等形态学特征, 但在发育后期, PCD停止, 细胞仍具有活性。细胞中PCD降解产物和衰老的细胞器可通过微自噬和巨自噬途径被吸收^[11]。Yang等^[12]发现小麦颖果筛分子半死亡的发生, 是由液泡和多种蛋白酶共同作用的结果。目前, 对小麦颖果导管中细胞结构解体及相关机制知之甚少。

酸性磷酸酶(ACPase, acid phosphatase)是一类专一性较低的水解酶, 能参与多种生物大分子的降解活动。在动物细胞中, ACPase是溶酶体系统的标志酶, 已经证明溶酶体与细胞自溶、异体消化作

收稿日期: 2017-05-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171469; 31471428)

吕亚妮, 硕士研究生。研究方向: 植物细胞结构与功能。E-mail: 674130697@qq.com

通信作者: 周竹青, 教授。研究方向: 植物逆境细胞生物学、植物细胞结构与功能。E-mail: zhouzhuqing@mail.hzau.edu.cn

用相关^[13],而在植物中,ACPase 主要分布于液泡中。Cai 等^[14]采用电镜细胞化学技术,发现 ACPase 在细胞质的降解过程中发挥着重要作用。Wang 等^[15]通过研究 *Eucommia ulmoides* 木质部导管分子发育中 ACPase 的分布,推测其可能在多糖的分泌和转运以及次生壁的形成中起重要作用。在水稻珠心细胞的退化过程中,也检测到了 ACPase 活性^[16]。因此,有理由相信 ACPase 在筛分子与导管 PCD 过程中可能起着重要作用。但是,ACPase 分布的时空变化与筛分子和导管 PCD 的关系仍不清楚。本研究通过观察小麦颖果筛分子和导管发育过程中超微结构的变化,利用酶的超微细胞化学技术探究 ACPase 的变化,旨在为进一步研究 ACPase 可能参与筛分子与导管 PCD 过程中的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以小麦(*Triticum aestivum* L.)品种华麦8号为供试材料,温室培养,温度控制在20℃。试验期间定时浇水,在3叶期和抽穗期浇2次营养液,并定期喷洒农药,防治病虫害。在开花当天(记为0 d)挂牌标记开花麦穗,用剪芒的方法标记开花小花(仅标记中部开花小穗)。取花后0~7 d的小麦颖果,用锋利刀片去掉颖果两端,保留颖果中部,剥出腹部维管组织用于实验。

1.2 筛分子和导管显微以及超微结构观察

取小麦颖果腹部维管组织,按常规方法进行电镜制样^[10]。将包埋好的材料在超薄切片机(LKB-2088, Bromma, Sweden)上进行半薄切片和超薄切片。然后将厚度约1 μm的半薄切片捞在干净的载玻片上,用0.5%(m/V)甲苯胺蓝染色2 min,后用双蒸水清洗,干燥后于普通光学显微镜(Nikon Eclipse 80i, Japan)下观察拍照。将厚度约80 nm的超薄切片,不染色直接在HITACHI, H-7650型透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)下观察并拍照。

1.3 筛分子和导管吖啶橙/碘化丙啶(AO/PI)荧光复色

参照 Yang 等^[12]的方法,取小麦花后1~6 d的颖果腹部维管束,置于50%福尔马林-醋酸-乙醇固定液(FAA)中固定。乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。蜡块置于石蜡切片机(Leica RM 2235,

Germany)上切片。二甲苯中脱蜡5~10 min。换用新鲜的二甲苯,再脱蜡5~10 min。然后依次无水乙醇5 min、90%乙醇2 min、70%乙醇2 min、蒸馏水2 min。切片经0.01%的吖啶橙(AO; Amresco, BA0043; ddH₂O 配制)染色15 min, ddH₂O 清洗3 min,再用1 μg/mL的碘化丙啶(PI; Sigma, P4170; ddH₂O 配制)复染色15 min, ddH₂O 清洗3 min,于荧光显微镜(Nikon Eclipse 80i, Japan)B激发下观察拍照。

1.4 筛分子和导管内酸性磷酸酶的化学定位

取样方式参照 Wang 等^[10]的方法,将样品在2.5%戊二醛中4℃固定2 h。然后用二甲胂酸钠缓冲液洗涤3次,再用预冷的0.05 mol/L Tris-顺丁烯二酸缓冲液(pH 5.2)洗涤3次。将洗涤后的样品在不含底物β-甘油磷酸钠的孵育液中预孵育15 min后转入含有β-甘油磷酸钠的孵育液中25℃孵育4 h。对照反应的孵育液中加入抑制剂NaF(0.01 mol/L)。孵育完成后用1%的四氧化锇后固定,4℃下过夜,Tris-顺丁烯二酸缓冲液和二甲胂酸钠缓冲液各清洗3次。后续步骤同常规电镜制样,切片不经染色直接在透射电子显微镜下观察拍照。

2 结果与分析

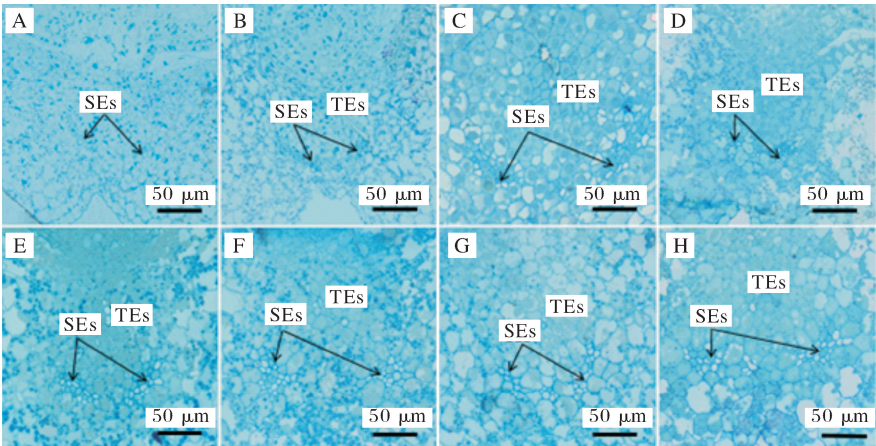
2.1 小麦颖果筛分子和导管发育过程中显微结构的变化

总体来看,筛分子和导管发育初期在形态上与周围细胞相差不大,随着发育的进行,筛分子与导管的细胞壁较周围细胞的厚(图1)。开花当天(0 d)未观察到导管细胞,但腹沟两侧开始出现筛分子,此时筛分子的数量较少(图1A);花后1 d,出现导管细胞(图1B);随着颖果的发育,筛分子的数量逐渐增加,在花后3 d明显增多,而此时导管细胞的数量基本保持稳定不变,且筛分子呈现对称性半圆形分布于导管的两侧(图1E-H)。在光学显微镜下观察发现,成熟的筛分子与导管都出现了大量内含物缺失的现象(图1F-H)。

2.2 吖啶橙/碘化丙啶(AO/PI)染色检测筛分子和导管细胞核的形态变化

AO/PI染色结果显示:筛分子与导管细胞壁均呈黄绿色荧光,而细胞核呈现红色荧光(图2)。花后1 d,筛分子和导管中均存在完整的细胞核(图2A);花后2 d,少数筛分子中的细胞核变得模糊不

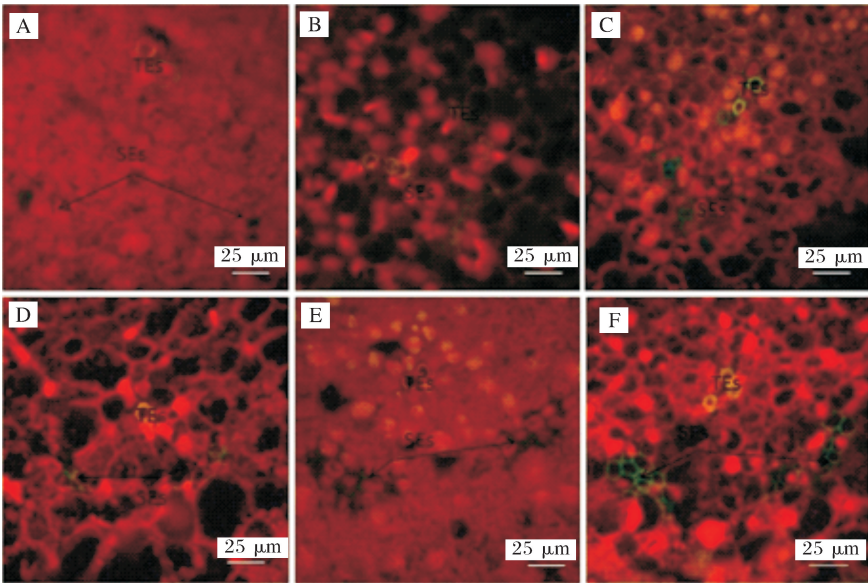
清,此时导管中的细胞核也严重降解(图 2B);花后 3 d,导管中的细胞核已全部降解,与此同时,发生核降解的筛分子的数量也越来越多(图 2C);从花后 4 d起,筛分子内发生核降解的数量越来越多



A - H 分别为小麦开花 0~7 d 颖果腹部维管组织半薄切片。SEs:筛管;TEs:导管。A-H represent the cross section of wheat caryopsis at 0-7 d after flowering respectively. SEs: Sieve elements; TEs: Tracheary elements.

图 1 小麦颖果筛分子和导管的显微结构观察

Fig.1 Microscopical structure observation of the SEs and TEs in wheat caryopsis



A - F 分别为小麦开花 1~6 d 的颖果腹部维管组织石蜡切片。A - F represents the paraffin section of wheat caryopsis at 1-6 d after flowering respectively.

图 2 小麦筛分子和导管的吖啶橙和碘化丙啶荧光复染色

Fig.2 SEs and TEs of wheat stained with AO and PI

2.3 小麦颖果筛分子和导管发育过程中超微结构的变化

筛分子超微结构观察结果显示,花后 2 d,细胞核比较完整,部分染色质凝集,且筛分子中存在多个小液泡(图 3A,A1);花后 3 d,随着液泡体积逐渐增

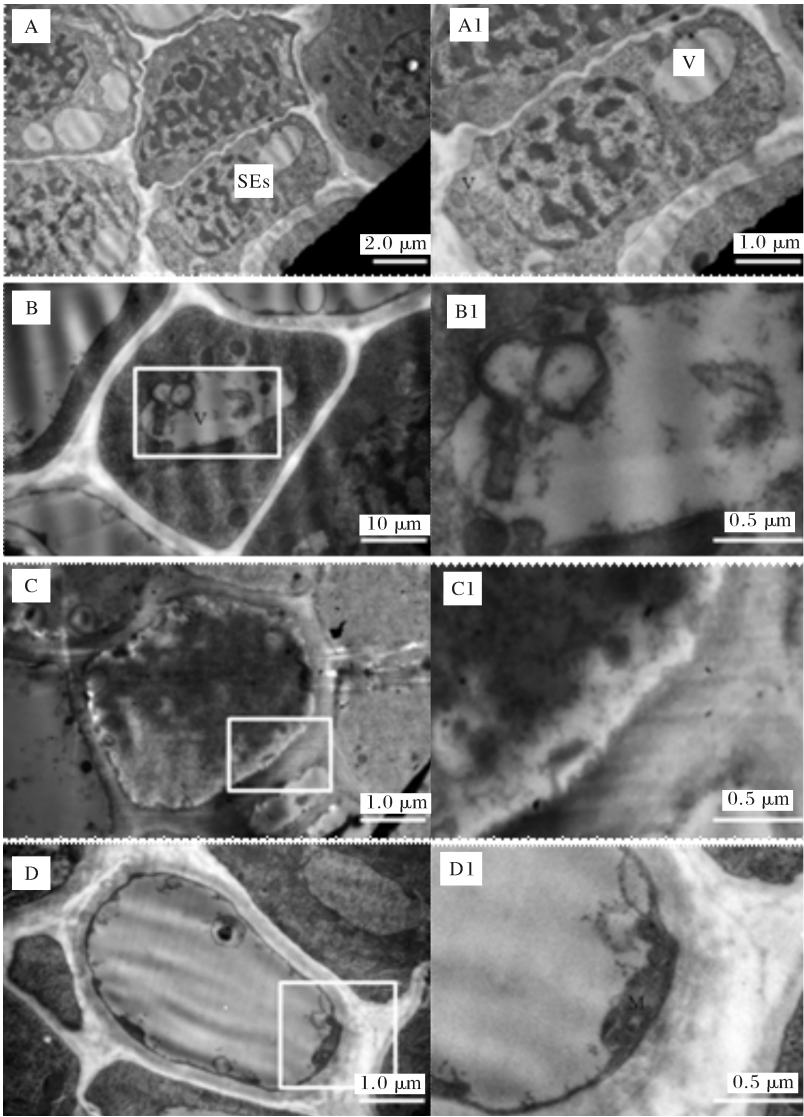
大,液泡膜内陷,大量细胞质被包裹到液泡中(图 3B,B1);花后 4 d,细胞核降解较严重,但是仍可看到部分残留的核膜(图 3C,C1);花后 5 d 时筛分子内已观察不到细胞核,部分液泡膜与质膜融合,且在融合的膜之间仍有残留的线粒体;同时也观察到包

裹着电子染色深的物质的小囊泡(图 3D,D1)。

导管超微结构观察结果显示,花后 1~2 d,导管中液泡膜破裂,形成多个小囊泡(图 4A、B)。同时,细胞核发生降解(4C),线粒体内部结构紊乱,嵴极不清晰,有的线粒体局部出现一些电子密度低的透明区(图 4D);内质网片段化,无规则的散落在细胞内,有的内质网腔形成空泡状;高尔基体扁平囊解体,断裂成小泡(图 4E)。花后 3 d,导管细胞中细胞

核与细胞器均被降解(图 4F)。

对小麦颖果筛分子和导管发育过程中超微结构变化比较发现,筛分子内各组分降解的时间较导管长;二者细胞内各组分降解方式不同:在筛分子分化过程中,液泡首先融合为大液泡,随后液泡膜内陷,包裹细胞器和细胞质,形成自噬体,进而被降解。而导管细胞主要是通过液泡膜破裂后,胞内小囊泡降解细胞质。分化成熟后,导管细胞中内含物



A-A1: 花后 2 d,SEs 细胞核形态正常,部分染色质凝集细胞中有许多小液泡; B-B1: 花后 3 d,液泡内有大量细胞质; C-C1: 花后 4 d,细胞核降解,核膜变得模糊; D-D1: 花后 5 d,示 SEs 中无细胞核,液泡膜与质膜融合,细胞内有线粒体残留。A1、B1、C1、D1 分别为 A、B、C、D 中白色方框放大图; M:线粒体;V:液泡。A-A1:2 d after flowering,a developing SEs with a normal nucleus,condensed chromatin and small vacuoles.B-B1:3 d after flowering,more cytoplasm in the vacuole.C-C1:4 d after flowering,the nucleus degraded and the obscure nuclear envelope could be observed.D-D1:5 d after flowering,SEs with mitochondria but without nucleus.The tonoplast fused with plasma membrane.A1,B1,C1,D1 was amplification of white frames in A,B,C,D. M:Mitochondria; V:Vacuole.

图 3 小麦颖果筛分子的超微结构变化

Fig.3 Ultrastructure of the SEs in wheat caryopsis

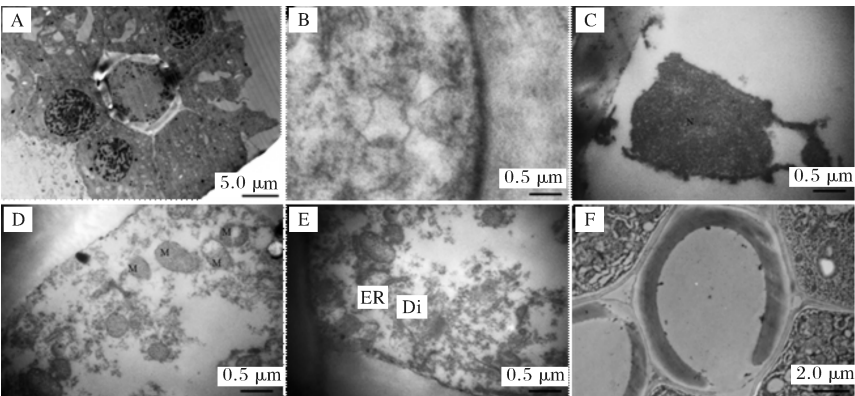


图 4 小麦颖果导管的结构变化

Fig.4 Ultrastructure of the TEs in wheat caryopsis

全部降解,而在筛分子中,仍能检测到少量的线粒体和包裹着电子染色深的物质的小囊泡。

2.4 小麦颖果筛分子和导管发育过程中 ACPase 活性变化

筛分子发育初期,在细胞核附近的小液泡内零星分布着 ACPase 的活性产物(图 5A,A1)。花后 3 d,大量的酶活性产物分布于筛分子线粒体、细胞质和散落的内质网中(图 5B)。花后 4 d,液泡和细胞质内均检测到 ACPase 活性(图 5C)。花后 5 d 时,细胞内的 ACPase 活性较低,大部分酶活性产物

分布在细胞膜上。同时,细胞内残留的部分线粒体与胞间连丝上也检测到 ACPase 活性(图 5D-D2)。在对照反应的切片中,几乎未见反映 ACPase 活性的酶活性产物沉积(图 5E)。

花后 2 d 的导管细胞线粒体膜和内质网上均检测到 ACPase 活性,且在降解的细胞核上分布着大量的酸性磷酸酶的活性产物(图 6A-D)。花后 3 d,仅在靠近细胞壁的位置检测到少量的 ACPase 活性(图 6E)。对照组没有检测到 ACPase 活性产物(图 6F)。

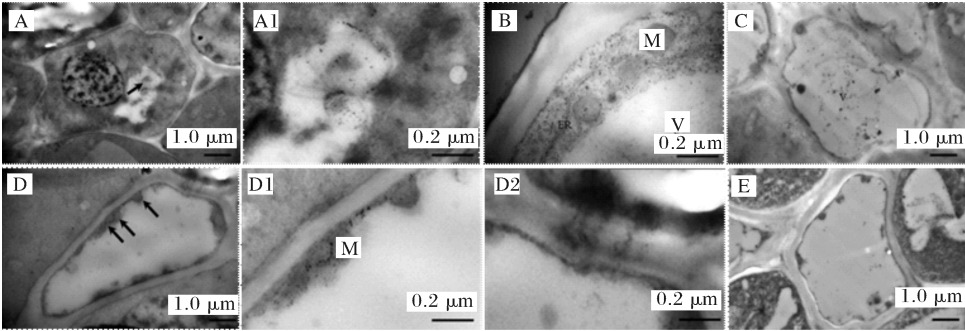
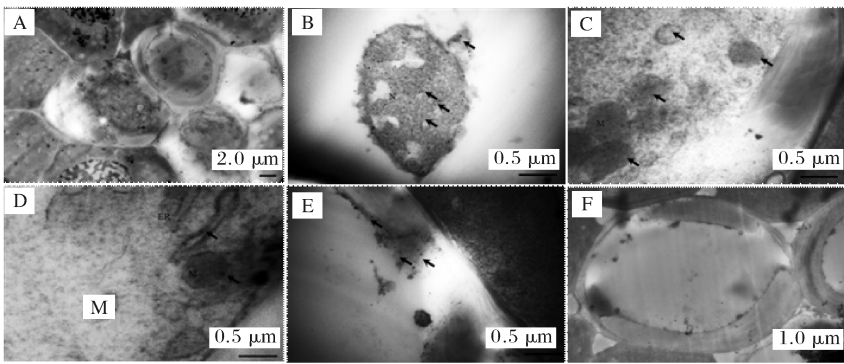


图 5 小麦颖果筛分子中 ACPase 定位

Fig.5 Localization of ACPase in SEs of wheat caryopsis

A- E 均为 SEs 横切照片。A-A1:花后 2 d,示 ACPase 活性产物分布于细胞核附近的小液泡中; B:花后 3 d,线粒体和内质网上有较 强的 ACPase 活性; C:花后 4 d,液泡和细胞质内 ACPase 活性减弱; D-D2:花后 5 d,示酶活性产物分布于细胞膜和胞间连丝; E:对照, 无 ACPase 活性产物。A- E are cross-sections of SEs.A-A1:2 d after flowering,showed the active products of ACPase in vesicles (ar- row).B:3 d after flowering,showed the high ACPase activity in mitochondria and endoplasmic reticulum.C:4 d after flowering,showed the ACPase activity decreased in vacuoles and cytoplasm.D-D2:5 d after flowering,showed the active products of ACPase on plasmale- mma and plasmodesmata (arrow).E:Control,no active products of ACPase could be observed.



A-F 均为 TEs 横切照片。A:花后 2 d 的导管; B-D:花后 2 d, ACPase 活性产物分布于细胞核、线粒体、内质网(箭头示); E:花后 3 d, 酶活性产物靠近细胞壁分布; F:对照,无 ACPase 活性产物。A-F is cross-sections of TEs.A: showing TE at 2 d after flowering. B-D: 2 d after flowering, showed the active products of ACPase in nucleus, mitochondria and endoplasmic reticulum (arrow). E: 3 d after flowering, showing ACPase active products distributed close to the cell wall. F: Control, no active products of ACPase could be observed.

图 6 小麦颖果导管中 ACPase 定位

Fig.6 Localization of ACPase in TEs of wheat caryopsis

3 讨 论

利用透射电子显微镜观察细胞的形态变化已成为研究 PCD 的常用手段^[17-18]。本研究通过超微细胞结构观察发现,在小麦颖果筛分子和导管发育过程中,均经历了细胞核解体、细胞器降解等过程,此现象与经典的植物细胞 PCD 特征一致^[19]。

观察结果显示,在小麦颖果发育过程中,液泡破裂后,导管中细胞核的降解速度快于筛分子。Obara 等^[4]在百日菊细胞培养的体外分化实验中,通过对单个导管细胞进行观察发现,在导管分化过程中,液泡膜在液泡体积膨大到一定程度后发生破裂,液泡破裂后的 10~20 min 内,细胞核快速降解,表明液泡的完整性与否对导管中细胞核的降解具有重要作用。Yang 等^[12]在研究小麦颖果韧皮部筛分子发育时发现核染色质完全降解之后,仍有完整的液泡结构,推测液泡裂解并非是筛分子降解细胞核的关键因素。尤瑞麟^[20]发现植物细胞中内质网和液泡等多种细胞器可以起到类似动物细胞溶酶体的作用。由液泡介导细胞质降解的方式分为巨自噬和微自噬两类,巨自噬是细胞受外界信号诱导,形成自噬泡,进而包裹细胞质,形成自噬体进行降解胞内物质;而微自噬则由液泡自身发生内陷将底物包裹进行降解^[21]。本研究结果表明,小麦筛分子 PCD 过程中主要是液泡执行溶酶体功能,液泡膜内陷包裹细胞质,形成双层膜的自噬体结构,进而细胞质被降解;而在导管分子中液泡膜破裂后,在细胞内观察到

的小囊泡,推测其可能来源于内质网和高尔基体而起自噬作用。此外,Tolkovsky 等^[22]发现少量的线粒体能使细胞自 PCD 过程中复活,且能量供应使细胞能够存活一段时间。欧阳学智等^[23]在研究玉米叶片韧皮部筛分子分化时发现,当细胞核解体后,细胞中还能检测到类似于液泡膜片段的结构;针叶树等植物筛分子成熟后仍保留细胞核和细胞质碎片^[9]。与之类似的是,在本研究中也发现花后 5 d 的筛分子,部分液泡膜与质膜融合的空间仍保留了部分线粒体,揭示这些保留的细胞质和细胞器为筛分子最终保有活性提供了可能。

与动物细胞 PCD 相比,由于植物中没有溶酶体结构,因此不能够自我吞噬死亡细胞。但是植物细胞中存在着液泡,液泡膜破裂,释放多种水解酶,引起细胞死亡,已被发现在 PCD 中发挥着巨大作用。利用超微细胞化学定位技术,在植物细胞的许多部位和细胞器上均检测到 ACPase 活性^[24],且存在于细胞器上的 ACPase 具有水解功能^[14]。甘小洪等^[25]应用磷酸铅沉淀技术对毛竹茎秆纤维细胞 PCD 过程中 ACPase 的动态变化进行研究,揭示了 ACPase 活性的增强可能是引起纤维细胞程序性死亡的原因之一。本研究发现 ACPase 活性产物在筛分子和导管内细胞核和多种细胞器上均有分布,其活性的变化与筛分子和导管 PCD 进程存在一定关联。花后 3 d 时,大量的 ACPase 活性产物分布于细胞质以及细胞器上,筛分子内含物逐渐被降解。此时筛分子液泡膜并没有破裂,推测植物体可能存

在一种自我保护机制,即在液泡破裂前已排空了其中所含的酸性水解酶类。花后 5 d,胞内残留的部分线粒体不受液泡破裂的影响。这也为筛分子的程序性半死亡提供了理论依据。相比筛分子的发育,在导管分化过程中,随着液泡的破裂,在细胞核、线粒体膜、内质网和高尔基体上均检测到大量 ACPase 活性。这些研究结果均表明,ACPase 作为水解酶类参与了细胞核和细胞器的降解。在小麦筛分子 PCD 进程停止时,细胞内仍有未降解的线粒体等细胞器,推测 ACPase 只有在弱酸性条件下才能发挥水解功能^[26]。而筛分子在分化后期,细胞质呈中性环境^[12]。此外,在小麦颖果筛分子和导管分化成熟后,筛分子是活细胞,而导管是死细胞,成熟的筛分子胞间连丝上能够检测到 ACPase 活性产物,表明 ACPase 可能参与了细胞间物质的运输、磷酸转移等相关生理活动^[27]。

参 考 文 献

- [1] SHINOHARA N, DEMURA T, FUKUDA H. Isolation of a vascular cell wall specific monoclonal antibody recognizing a cell polarity by using a phage display subtraction method[J]. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97(6): 2585-2590.
- [2] SHISHKOVA S, DUBROVSKY J G. Developmental programmed cell death in primary roots of Sonoran Desert Cactaceae[J]. Am J Bot, 2005, 92(9): 1590-1594.
- [3] 王雅清, 杜仲次生木质部细胞分化和脱分化的超微结构和生物化学研究[D]. 北京: 北京大学, 2000.
- [4] OBARA K, KURIYAMA H, FUKUDA H. Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in Zinni[J]. Plant physiology, 2001, 125(2): 615-626.
- [5] FURUTA K M, YADAV S R, LEHESRANTA S, et al. Plant development *Arabidopsis* NAC45/86 direct sieve element morphogenesis culminating in enucleation[J]. Science, 2014, 345(6199): 933-937.
- [6] KWON S I, CHO H J, PARK O K. Role of *Arabidopsis* RabG3b and autophagy in tracheary element differentiation [J]. Autophagy, 2010, 6(8): 1187-1189.
- [7] 尹增芳, 樊汝汶. 美洲黑杨次生木质部导管分化进程的超微结构分析[J]. 浙江农林大学学报, 2008, 25(4): 431-436.
- [8] 程兴妍. 拟南芥与小麦筛分子超微结构的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [9] VANBEL A J E. The phloem, a miracle of ingenuity[J]. Plant cell environment, 2003, 26(1): 125-149.
- [10] WANG L, ZHOU Z, SONG X, et al. Evidence of ceased programmed cell death in metaploem sieve elements in the developing caryopsis of *Triticumaestivum* L. [J]. Protoplasma, 2008, 234(1): 87-96.
- [11] WOLTERING E J, DOORN W G V. Apoptosis in plants: does it exist? [J]. Apoptosis, 2005, 217: 187-206.
- [12] YANG W, CAI J, ZHOU Z, et al. Microautophagy involves programmed cell semi-death of sieve elements in developing caryopsis of *Triticumaestivum* L. [J]. Cell Biol Int, 2015, 39(12): 1364-1375.
- [13] BRIGHT N, DAVIS L, LUZIO J P. Endolysosomes are the principal intracellular sites of acid hydrolase activity[J]. Curr Biol, 2016, 26(17): 2233-2245.
- [14] CAI X, LI W, YIN L. Ultrastructure and cytochemical localization of acid phosphatase of laticifers in *Euphorbia kansui* Liou [J]. Protoplasma, 2009, 238(1): 3-10.
- [15] WANG Y, CHAI J, CUI K. Ultracytochemical localization of acid phosphatase during differentiation and dedifferentiation of the secondary xylem in *Eucommia ulmoides* trunk[J]. Acta botanica sinica, 1999, 41(11): 1155-1159.
- [16] 韦存虚, 钟方旭, 李睿, 等. 水稻淀粉型胚乳细胞发育中核的衰退和水解酶的细胞化学定位[J]. 作物学报, 2006, 32(2): 298-300.
- [17] OTSUKI Y, LI Z, SHIBATA M A. Apoptotic detection methods-from morphology to gene[J]. Prog Histochem Cyt, 2003, 38(3): 275-339.
- [18] 韦存虚, 蓝盛银, 徐珍秀. 水稻花后衰退珠心和胚乳发育初期 Ca^{2+} 的超微细胞化学定位[J]. 电子显微学报, 2002, 21(1): 34-38.
- [19] DAS A, KAWAIY M, UCHIMIYA H. Programmed cell death in plants[J]. Biochemistry, 2009, 16(1): 371-383.
- [20] 尤瑞麟. 小麦珠心细胞的超微结构研究[J]. 实验生物学报, 1985(4): 4-12.
- [21] BASSHAM D C, LAPORTE M, MARTY F, et al. Autophagy in development and stress responses of plants[J]. Autophagy, 2006, 2(1): 2.
- [22] TOLKOVSKYA M, XUE L, FLETCHER G C, et al. Mitochondrial disappearance from cells: a clue to the role of autophagy in programmed cell death and disease? [J]. Biochimie, 2002, 84(2/3): 233-240.
- [23] 欧阳学智, 谢绍萍, 李宝健. 玉米叶片细脉原生韧皮部筛分子的分化和超微结构: 原生质体的变化[J]. 植物学报, 1998, 40(1): 14-22.
- [24] ASGHAR R, DEMASON D A. Differential activities of acid phosphatase from adaxial and abaxial regions of *Lupinus luteus* (Fabaceae) Cotyledons[J]. Am J Bot, 1992, 79(10): 1134-1144.
- [25] 甘小洪, 丁雨龙. 毛竹茎秆纤维发育的细胞生物学研究: 全国植物结构与生殖生物学学术研讨会论文摘要集[C]. 北京: 中国植物学会, 2004.
- [26] FIALHO E, SILVEIRA A B, MASUDA H, et al. Oocyte fertilization triggers acid phosphatase activity during *Rhodnius prolixus*, embryogenesis [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2002, 32

(8):871-880.

[27] BOZZO G G,RAGHOTHAMA K G,PLAXTON W C.Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersiconesculentum*) cell cultures[J]. Eur J Biochem, 2003, 269 (24): 6278-6286.

Ultra-structural changes of sieve elements and tracheary elements and the roles of acid phosphatase in wheat caryopsis development

LYU Yani¹ YANG Wenli¹ ZHANG Zhihui¹ MEI Fangzhu²
LI Jiwei³ DENG Xiangyi³ ZHOU Zhuqing¹

- 1.College of Life Science and Technology ,Huazhong Agricultural University,Wuhan 430070,China ;
- 2.The Development Research Institute of Science and Technology , Huazhong Agricultural University ,Wuhan 430070,China ;
- 3.College of Food Science & Technology ,Wuhan Institute of Designand Sciences ,Wuhan 430070,China ;
- 4.Key Laboratory of Potato Biology and Biotechnology ,MOA , Huazhong Agricultural University ,Wuhan 430070,China

Abstract Programmed cell death is known to be an essential process for tracheary elements and sieve elements. Tracheary elements undergo PCD, which forms a tubular channel for transporting water, while sieve elements go through programmed cell semi-death process to transport organic nutrients. Biological electron microscopy and ultracytochemical technology was used to further clarify the ultra-structural changes and ACPase dynamic distribution of sieve elements and tracheary elements in wheat (*Triticumaestivum* L.) caryopsis development. The dynamic changes and the distribution of active products of ACPase were studied. Results showed that the sieve elements were distributed as semi-circular at the outside of tracheary elements.The degradation of the nucleus in sieve element was later than that in tracheary elements. The organelles were wrapped by the autophagosome for degradation in the process of developing sieve elements.The mature sieve element retains some organelle fragment and is alive. When the tonoplast in tracheary elements was ruptured, the cytoplasm were degraded by the vesicles in the cell and the cytoplasm was completely degraded. Fully degraded tracheary elements were obviously dead.After the tonoplast was ruptured, ACPase as a key enzyme of vacuole in organelles including mitochondria of tracheary elements was most notable. In the development of sieve element, ACPase activity was detected in the mitochondria and the plasmodesmata of the mature sieve cells. It is indicated that ACPase may be involved in the transportation of materials between cells.

Keywords wheat (*Triticum aestivum*L.); caryopsis development; sieve elements; tracheary elements; ACPase; programmed cell death

(责任编辑:张志钰)