

劣变花生种子三磷酸腺苷酶和 酸性磷酸酶的细胞化学研究

徐是雄
(香港大学)

陈润政 李文仪 傅家瑞
(中山大学生物学系)

花生种子在贮藏中容易发生劣变,出现种子活力下降现象。我们曾研究过花生种子在劣变时细胞微细结构以及一些生理生化方面的变化^[1]。本文报导高活力的和发生劣变后的低活力花生种子胚根细胞内三磷酸腺苷酶(ATP-ase)和酸性磷酸酶的组织化学定位。

1. 材料和方法

(1) 试验材料 供试的花生种子为“粤油551”品系,由广东省农业科学院经济作物研究所提供。高活力种子系1982年秋植留种花生,采收后贮藏于干燥器内,含水量6%以下,经过半年贮藏,发芽率在90%以上,且萌发迅速。低活力种子是1982年春植留种花生,含水量9%左右,经过一年贮藏期,发芽率在50%以下,且萌发迟缓。试验用下列4种不同的花生材料胚根尖做酶定位:①高活力干种子;②低活力干种子;③高活力种子经萌发24小时;④低活力种子经萌发24小时。种子置于培养皿滤纸上,在30℃萌发。

(2) 材料固定方法 将胚根(取靠近根尖分生组织部位)切成1—2毫米小块,放入用0.05M二甲基胍酸钠缓冲液(pH7.2)配制的2%戊二醛溶液中,在室温(约30℃)固定1小时30分。固定后用同样的缓冲液洗涤2—3次(每次停留1小时),然后把材料放入加有催化剂的JB—4溶液A内,渗透4小时(每2小时换一次),最后放在4—5℃渗透4—5天。包埋时把材料和包埋液放在胶囊内,在0℃聚合过夜^[2]。

(3) 酶定位方法 ATP-ase的定位基本依照Bentwood和Cronshaw的方法^[3]。酸性磷酸酶的定位方法应用磷酸铅沉淀法^[4]和Hexagonium盐方法^[5],两种不同的方法所得出的结果是一致的。切片在室温经不同时间反应处理,结果显现ATP-ase的定位以经3小时的反应效果最好;而酸性磷酸酶则以15分钟的反应处理为最好。

2. 结果

(1) ATP-ase定位 在高活力的干种子胚根细胞内,ATP-ase活力很高,ATP-ase反应物主要集中在细胞的蛋白体内(图片1),但在劣变的干种子胚根细胞

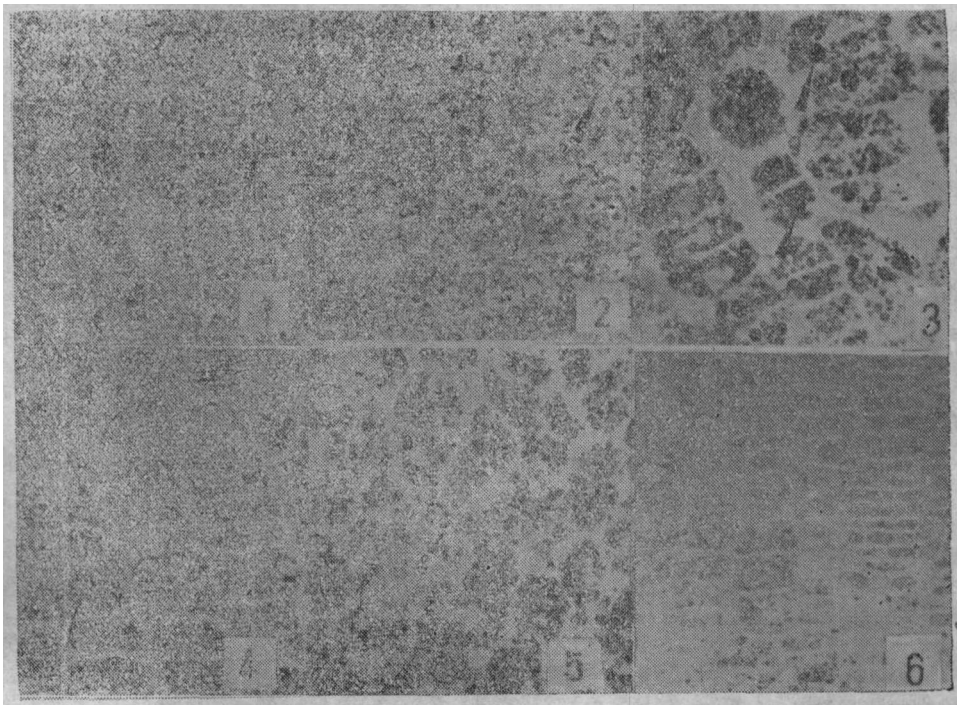
本文于1983年11月收到

内, ATP—ase 反应物则不存在(一些表皮细胞除外)。这一结果显示花生干种子劣变后, 胚根细胞内的ATP—ase已受到破坏。

萌发24小时后的高活力种子胚根细胞内的ATP—ase活性依然大量地存在(图片2), 但劣变的种子经萌发后, 胚根细胞内的ATP—ase仍然未呈活性, 显示在劣变的细胞内, 可能没有新的ATP—ase形成。

(2)酸性磷酸酶的定位 在高活力的干种子胚根细胞内, 酸性磷酸酶的活性很高(图片3)。但在劣变的干种子胚根细胞内, 酸性磷酸酶的活性则较弱(图片4)。当种子萌发后, 高活力的胚根细胞内酶活性反应物则似乎有所增加(染色较深)(图片5), 而劣变的胚根细胞内酸性磷酸酶活性则大大降低(图片6)。

在两种酶的试验中, 对照采用不加底物的反应液, 结果都为负反应。



图片说明(×320)

1. 高活力干种子胚根细胞ATP—ase定位, 酶反应物主要集中在蛋白体内(箭头指处)。
2. 萌发24小时的高活力种子胚根细胞ATP—ase定位, 在蛋白体内仍然有颇高的酶活性(箭头指处), N=细胞核(内无酶反应物)。
3. 高活力干种子胚根细胞酸性磷酸酶定位, 酶反应物主要集中在蛋白体内(箭头指处)。
4. 低活力干种子胚根细胞酸性磷酸酶定位, 蛋白体内还呈现一些反应。
5. 萌发24小时的高活力种子胚根细胞的酸性磷酸酶定位, 蛋白体内的酶反应物相当多。
6. 萌发24小时的低活力种子胚根细胞的酸性磷酸酶定位, 细胞内只有少量的反应物, 说明在这些劣变的细胞内, 酶活性已遭到很大的破坏。

3. 讨论

在种子产生劣变、活力下降时,某些酶活性明显下降,据此可作为活力测定的指标^(6,7)。老化的花生种子胚根细胞的劣变,也可从酶活性变化观察到(傅家瑞等,花生科技,1980,2)。

从大量的文献中^(8,9)我们知道ATP—ase主要存在于细胞线粒体的内膜和质膜上,因为ATP—ase的主要功能是与膜层的能量和 H^+ 、 K^+ 、 Ca^{++} 等离子的运输有关。但在高活力的花生胚根细胞内,我们在光学显微镜水平的ATP—ase定位中,并没有看到在线粒体内和质膜上有ATP—ase反应物的存在。但在蛋白体内则显示出很高的ATP—ase活性。我们推测,在胚根细胞内,ATP—ase可能主要分布在蛋白体内,而并非只分布在线粒体和质膜上。在花生胚根细胞蛋白体内,除ATP—ase之外,酸性磷酸酶的活性也很高,说明在花生胚根细胞的蛋白体内也结集有大量的酸性磷酸酶。种子细胞内的蛋白体,除贮有蛋白质外,还贮有多种的酶,显示蛋白体并非只是一个简单的贮藏细胞器,而是一个与细胞的新陈代谢有密切关系的细胞器,值得进一步研究。

ATP—ase和酸性磷酸酶的活性在高活力的花生种子胚根细胞内都是相当高的;但在劣变的花生种子胚根细胞内,酶活性则有所降低甚至趋于消失。不过,在劣变了干种子胚根细胞内,酸性磷酸酶的反应物比ATP—ase的反应物为多,而比高活力的种子胚根细胞的少。说明ATP—ase的活性,在劣变的干种子胚根细胞内,比酸性磷酸酶消失得快。

ATP—ase在离子运输方面,酸性磷酸酶在分解多种磷酸酯甚至在水解ATP中的磷酸键方面(Shaw,1966)都很重要。如果这两种酶在劣变的种子中受到破坏,那么种子的活力必定受到严重的影响。

高活力的花生种子萌发时,胚根细胞内的ATP—ase和酸性磷酸酶都有强烈的反应(其反应比干种子为强烈)。酶反应物在萌发种子胚根细胞内大量存在,显示在种子萌发时,这两种酶在细胞内可能有新的合成。而在劣变的萌发种子胚根细胞内无酶反应物的存在,因此可以认为在劣变种子的胚根细胞内,除了酶可能被破坏外,形成酶的机制也可能遭到破坏。至于酶和酶的形成机制在劣变的种子内被破坏到什么程度?而胚根细胞内酶被破坏后对种子的活力又起什么影响?值得继续研究。

参 考 文 献

- [1] 傅家瑞、李卓杰、蔡东燕, 植物生理学报, 9(1983), 93—101.
- [2] 徐是雄, 细胞生物学杂志, 1982, 9, 43—46.
- [3] Bentwood, B. J., Cronshaw, J., *Planta*, 140 (1978), 111-120.
- [4] Gomori, G., *Stain Technology*, 25 (1950), 81-85.
- [5] Davis, B. J., Ornstein, L., *J. Histochem. Cytochem.*, 7(1959), 297-298.
- [6] Ching, T. M., *Seed Sci. and Techn.*, 1 (1973), 73-88.
- [7] Woodstock, L. W., *Seed Sci. and Techn.*, 1 (1973), 127-157.
- [8] Hall, J. C., Browning, A. J., Harvey, D. M. R., *Protoplasma*, 104 (1980), 193-200.
- [9] Lerner, H. R., Reinhold, L., Gay, R., Braun, Y., Hasidim, M., Poljakoff-Mayber, A., *Plant, Cell and Environment*, 6 (1983), 501-506.