

灵武长枣果实发育过程中阿拉伯半乳糖蛋白胶体金免疫分布特征

马小玲 章英才* 王静 郑国琦

(宁夏大学生命科学学院, 银川 750021)

摘要 阿拉伯半乳糖蛋白(AGPs)在果实的成熟与软化中发挥重要作用,为了探讨灵武长枣(*Ziziphus jujuba* 'Lingwu Changzao')果实发育过程中AGPs的分布特征和动态变化规律,该研究使用单克隆抗体JIM13,采用胶体金免疫电镜技术,对4个不同发育时期灵武长枣果实超微结构特征及AGPs的免疫细胞分布进行分析。结果表明:使用10 nm胶体金颗粒对果实标记后,在膨大前期,韧皮部的薄壁细胞和离维管束较远的薄壁细胞内部和细胞壁上均分布有大量的胶体金颗粒,细胞内的液泡、质体等细胞器中也有胶体金颗粒的分布;在快速膨大期,筛管分子和离维管束较远的薄壁细胞的细胞壁及细胞内部均分布有大量的胶体金颗粒;在着色期,维管束韧皮部的筛管、伴胞和薄壁细胞,以及离维管束较远的薄壁细胞的细胞壁及细胞内部胶体金颗粒的分布较少;在完熟期,维管束韧皮部的伴胞及离维管束较远的薄壁细胞在细胞壁上及靠近质膜部位分布有少量的胶体金颗粒,并且细胞内部的胶体金颗粒数量较少,在囊泡、线粒体、质体及中央大液泡上分布有零星的胶体金颗粒。研究认为,果实AGPs主要分布在细胞壁上、靠近质膜的区域、细胞内部及细胞器上;不同发育时期果实AGPs的分布存在一定的差异,在膨大前期和快速膨大期细胞壁及细胞内部AGPs分布较多,在着色期和完熟期细胞壁及细胞内部AGPs分布的数量较少。上述结果为揭示AGPs对果实品质的影响提供细胞学依据。

关键词 灵武长枣;果实;阿拉伯半乳糖蛋白;胶体金免疫电镜

中图分类号:Q942.6;Q944.62;S665.1 文献标志码:A doi:10.7525/j.issn.1673-5102.2026.01.011

The Colloidal Gold Immune Distribution Characteristics of Arabinogalactan Proteins during Fruit Development of *Ziziphus jujuba* 'Lingwu Changzao'

MA Xiaoling ZHANG Yingcai* WANG Jing ZHENG Guoqi

(School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021)

Abstract Arabinogalactan proteins (AGPs) play an important role in fruit ripening and softening. In order to explore the distribution characteristics and dynamic changes of AGPs in fruits of *Ziziphus jujuba* 'Lingwu Changzao' during development, the monoclonal antibody JIM13 and colloidal gold immunoelectron microscopy technology were used to analyze the ultrastructural characteristics and the immunological cell distribution of AGPs of *Ziziphus jujuba* 'Lingwu Changzao' fruits at four different developmental stages. The results showed that after labeled with 10 nm colloidal gold particles, there were a large number of gold particles distributed in the cell interior and cell walls of parenchymal cells in the phloem and far away from the vascular bundles, and there were also gold particles distributed in the vacuoles, plastids and other organelles during the early stage of fruit enlargement. During the rapid enlargement period, there were a large number of gold particles distributed in the cell walls and cell interior of sieve tube molecules and parenchymal cells far away from the vascular bundles. During the coloring period, there were a few gold particles in the cell walls and cell interior of sieve tubes, companion cells and parenchymal cells in phloem of vascular bundles, as well as parenchymal cells far away from the vascular bundles. During the maturation period, in the companion cells in phloem of vascular bundles, as well as parenchymal cells far away from vascular bundles, there were a small number of gold particles on the cell walls and close to the plasma membrane, and a few gold particles inside the cell wall, and

基金项目:宁夏自然科学基金项目(2022AAC03087)。

第一作者简介:马小玲(2003—),女,本科生,主要从事植物资源保护与利用研究。

* 通信作者:E-mail:yingcaizh@163.com。

收稿日期:2024年12月13日。

on the vesicles, mitochondria, plastids and large central vacuoles. The results suggested that AGPs were mainly distributed on the cell wall, near the plasma membrane, inside the cell and the organelles, and there were some differences in distribution of AGPs in fruits at different developmental stages: more AGPs distributed in the cell wall and inside the cell in the early bulking period and the rapid enlargement period, and a small number of AGPs distributed in the cell wall and inside the cell in the coloring and ripening periods. The results provided cytological basis for revealing the effect of AGPs on fruit quality.

Key words *Ziziphus jujuba* ‘Lingwu Changzao’; fruit; arabinogalactan proteins; colloidal gold immunoelectron microscopy

阿拉伯半乳糖蛋白(AGPs)是一类结构复杂、高度糖基化的蛋白分子,是高等植物细胞壁和细胞膜的重要组成部分,主要由蛋白质骨架和糖基侧链以N-连接的方式组成。在不同植物体中,AGPs及其糖和蛋白质的含量和组成都有明显的差异^[1-2]。

AGPs参与植物的营养、生殖和发育的各个环节^[2],例如,促进植物器官如根、茎、叶的分化和发育^[3];使用能与AGPs特异性结合的 β GlcY处理拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)植株,子叶生长非常缓慢^[4];使用 β GlcY处理拟南芥幼苗,发现其形态异常^[5-6];AGPs主要通过影响细胞壁结构和组分来参与植物的生长发育。AGPs还大量存在于植物的花粉、柱头、胚胎细胞中,在花粉萌发、花粉与柱头间的黏附与识别、花粉管生长、卵细胞受精及胚胎发育中都发挥非常重要的作用^[7-8]。

AGPs是细胞壁的重要组成成分,还与细胞壁中其他组分交联,形成复杂的网状结构。果实的成熟和软化与细胞壁结构和组分变化有关,因此AGPs在果实的成熟与软化中发挥着重要作用。Leszczuk等^[2]发现,苹果(*Malus pumila*)成熟果实中AGPs含量是未成熟果实中AGPs含量的8倍;在苹果果实成熟过程中AGPs结构和组成也发生了显著变化^[9-11]。

在细胞与亚细胞水平,对AGPs的分布进行定位常用的手段为单克隆抗体与AGPs特异性结合,常用的抗体主要有JIM、LM和MAC系列。胶体金免疫技术是继荧光素标记、放射性同位素标记和酶标记技术之后的一种新型标记技术,利用电子无法穿透胶体金颗粒的特性,与透射电镜相结合,对细胞或亚细胞结构上分布的目标蛋白进行精准定位^[10]。胶体金免疫标记技术在生物微量活性物质的亚细胞定位、定量及植物病理学、昆虫病理学、植物检疫、真菌毒素检测等方面应用广泛。梁艳丽^[12]利用胶体金免疫标记技术追踪

AGPs在水稻(*Oryza sativa*)叶片细胞中的分布及其与植物抗病免疫之间的关系,结果表明,AGPs在水稻抵抗稻瘟病菌病害中起到重要作用;刘云霞等^[13]利用此技术观察到水稻根细胞中内生菌的位置;齐国亮^[10]也利用此技术对宁夏枸杞(*Lycium barbarum*)果实AGPs进行了标记,结果表明,识别AGPs的胶体金颗粒主要分布在薄壁细胞的质壁之间、质膜、液泡膜、囊泡及胞质内的叶绿体、有色体等质体内和膜周围;Leszczuk等^[2]利用胶体金免疫标记技术揭示了AGPs分布在苹果果实细胞中靠近质膜的壁附近区域。

灵武长枣(*Ziziphus jujuba* ‘Lingwu Changzao’)原产于宁夏灵武市,果实中多糖蛋白是最重要的药用生物活性成分之一^[14]。近年来,在灵武长枣果实贮藏保鲜、品种选育方面有了较多的研究成果^[15],而有关果实AGPs的亚细胞定位及其对果实品质影响的研究鲜见报道。最近研究^[16]表明,果胶酶作用引起灵武长枣果实AGPs聚糖链的缺失,导致细胞壁组分之间交联和细胞壁结构的重塑受阻,诱导细胞壁结构的改变和果实品质变化,影响果实的成熟。这说明AGPs在灵武长枣果实的成熟与软化中发挥着重要作用,果实中AGPs含量和分布的变化可能影响果实品质。因此,本研究以灵武长枣果实为试验材料,利用胶体金免疫标记技术,研究不同发育时期果实AGPs在细胞和亚细胞水平上的分布特征,以期为灵武长枣果实品质调控奠定细胞学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以位于宁夏灵武市的宁夏红枣工程技术研究中心试验基地(38°12'N, 106°34'E)6年生灵武长枣为供试材料,采用随机设计,试验重复3次,每次重复选择生长良好、树势适中、长势和花期相似、枣树树龄、植株密度、水肥条件和栽培管理水平一致的植株5~10株,于2023年6月10日用毛线标记

同一天开放的花朵,每个重复标记3 000朵。

在灵武长枣开花、坐果到果实成熟的发育过程中,分别在果实膨大前期(7月10日)、快速膨大期(8月9日)、着色期(9月8日)、完熟期(9月28日),按树冠东、西、南、北4个方位及上、中、下、里、外各部位采摘标记花朵的枣吊用冰壶带回实验室。每次采摘时间均设定于09:00—11:00。

AGPs单克隆抗体JIM13购自美国乔治亚大学,10 nm金颗粒偶联的金标山羊抗小鼠IgG二抗购自Sigma Aldrich公司。

1.2 试验方法

1.2.1 树脂包埋和超薄切片

选取不同发育时期果实,用锋利的刀片将果实材料切成1 mm×1 mm×3 mm的果实组织,立即放入盛有4%多聚甲醛-0.5%戊二醛的PBS(10 mmol·L⁻¹, pH=7.4)固定液的小瓶中,盖紧瓶盖后注射器冰浴多次抽气至样品沉落瓶底,冰上(或4℃)固定4 h,再分别转移至新鲜的固定液中,冰上(或4℃)固定4 h。

样品在4℃下摇床中以PBS(10 mmol·L⁻¹, pH=7.4)漂洗3次,每次15 min。在4℃下摇床中分别以30%、50%、70%、90%乙醇脱水,每次15 min;100%乙醇脱水15 min,100%丙酮脱水15 min,共2~3次。样品经脱水后渗透并包埋聚合于Spurr树脂。在LEICA EM UC7超薄切片机下制作60~90 nm厚的超薄切片,放在150目网孔的覆膜铜网上,置于干燥的环境中。

1.2.2 胶体金免疫细胞化学分析

室温下,在培养皿中放1片纸巾(或滤纸),滴水湿透,自制成湿盒,在滤纸上贴一层封口膜,将3%的H₂O₂滴在封口膜上,使之形成水珠,用镊子夹住载网的边缘,将有切片的铜网切片朝下浮于液滴上蚀刻10 min左右,盖上培养皿。将载有样品切片的铜网先后置于ddH₂O、PBS(10 mmol·L⁻¹, pH=7.4)中,重复2~3次,2 min·次⁻¹;然后在湿盒内,用含50 mmol·L⁻¹甘氨酸、2% BSA的PBS(10 mmol·L⁻¹, pH=7.4)封闭液室温孵育作用20 min;室温下用PBS(10 mmol·L⁻¹, pH=7.4)洗涤2~3次,2 min·次⁻¹;在湿盒内,将稀释体积比1:10的单克隆抗体JIM13一抗(含1%BSA的PBS)滴加到铜网上,37℃黑暗温育2~3 h。对照试验用含1%BSA的PBS溶液代替一抗。室温下用PBS缓冲液洗涤3次,2 min·次⁻¹。然后用PBS(含1%BSA)按照体

积比1:30比例稀释10 nm金颗粒偶联的二抗,在湿盒内,将稀释后的金标山羊抗鼠IgG二抗滴加到铜网上,37℃温育2 h。然后室温下用PBS缓冲液洗涤3次,2 min·次⁻¹;再用ddH₂O洗涤3次,2 min·次⁻¹,洗涤后晾干、干燥。晾干后经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染,干燥后在透射电镜(Hitachi HT7700,日本)下观察和拍照。

2 结果与分析

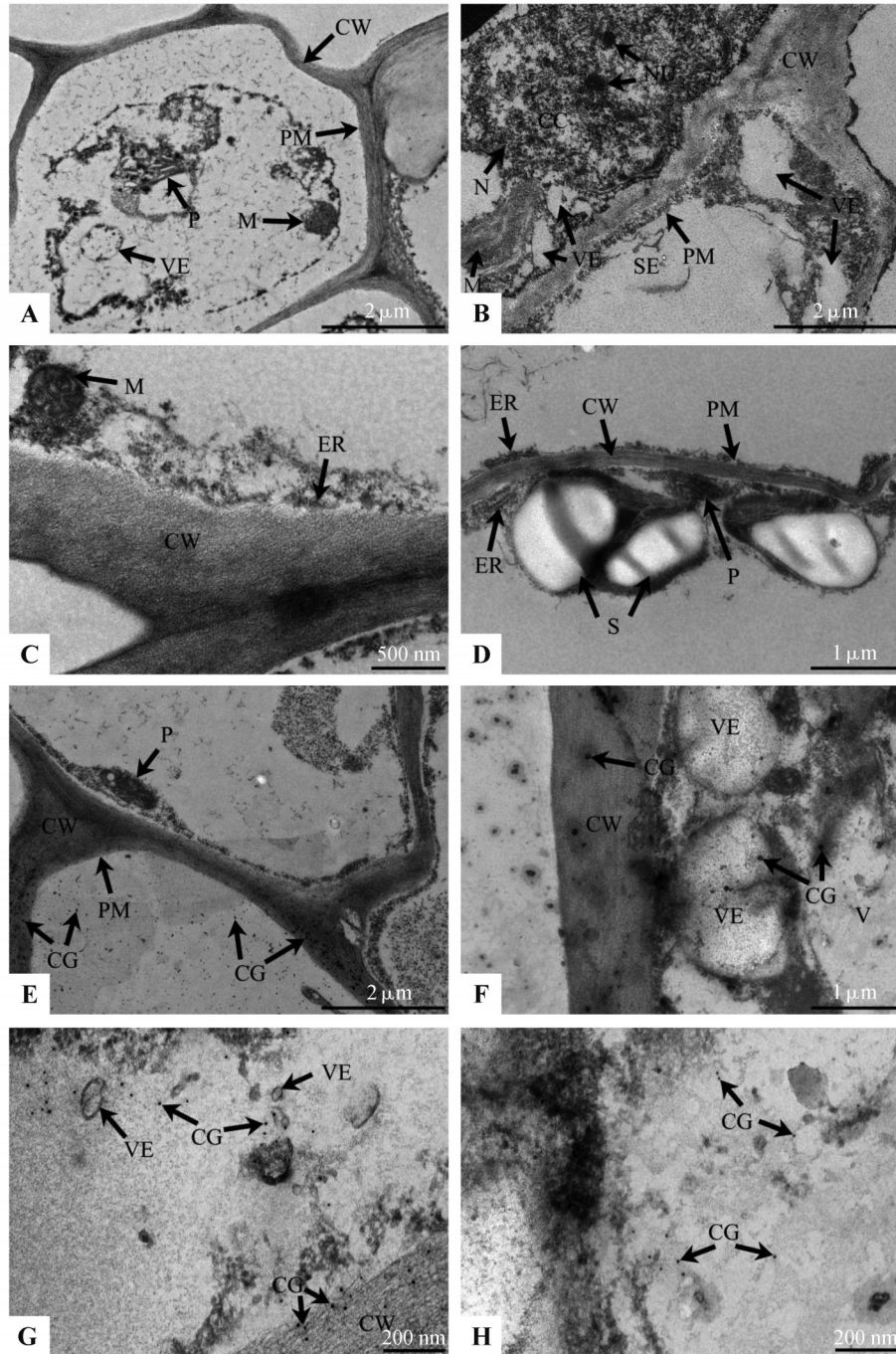
2.1 膨大前期果实AGPs胶体金免疫电镜定位

不同类型的细胞组成了果实维管束韧皮部,膨大前期果实韧皮部细胞初生壁结构明显,细胞质膜紧贴细胞壁(图1A~1D)。在细胞壁附近或细胞中央有少量囊泡(图1A、1B);粗面内质网位于薄壁细胞壁内侧(图1C、1D),其上附着有核糖体;靠近细胞壁内侧还分布有一定数量的淀粉粒,其中储藏着营养物质;线粒体呈圆形,嵴的结构清晰(图1A、1C、1D);质体片层结构明显,主要分布在靠近细胞壁内侧和维管束韧皮部薄壁细胞中央(图1A、1D);筛管分子的细胞核及细胞器退化,而伴胞和韧皮部薄壁细胞具有细胞核及各种细胞器,细胞核核膜界限清晰,细胞核中有2个核仁,紧挨着细胞核有椭圆状的线粒体及囊泡等细胞器(图1B)。

使用JIM13对切片进行孵育后,在细胞壁及韧皮部薄壁细胞和离维管束较远的薄壁细胞内部均分布有大量的胶体金颗粒(图1E~1H),在韧皮部薄壁细胞中,中央大液泡内分布有少量的胶体金颗粒,在紧挨着细胞壁内侧的囊泡和片层结构明显的质体中也分布有少量的胶体金颗粒(图1F)。在离维管束较远的薄壁细胞中,细胞壁及细胞内部都分布有大量的胶体金颗粒,在囊泡未见有胶体金颗粒的分布(图1G、1H)。

2.2 快速膨大期果实AGPs胶体金免疫电镜定位

快速膨大期果实韧皮部细胞及薄壁细胞初生壁结构明显,质膜位于细胞壁内侧(图2A~2D),相比离维管束较远的薄壁细胞,韧皮部薄壁细胞结构略复杂。在韧皮部大型薄壁细胞中,细胞核体积较大,在细胞核周围紧密围绕着大量质膜内陷形成的囊泡,紧挨着囊泡分布有大量内质网,并且在靠近细胞壁内侧存在少量的质体(图2A、2B)。离维管束较远的薄壁细胞结构较为简单,细胞内部细胞器较稀少(图2C、2D)。在对照试验中,各细胞



A~D. 未用一抗孵育的果实; E~H. 一抗孵育的果实。A~B. 维管束韧皮部及薄壁细胞中的细胞器; C. 韧皮部薄壁细胞的细胞壁及细胞器; D. 维管束韧皮部薄壁细胞中的细胞器; E. 离维管束较远的薄壁细胞的细胞壁及细胞器; F. 维管束韧皮部薄壁细胞的细胞壁及细胞器; G~H. 离维管束较远的薄壁细胞的细胞壁及细胞内部。SE. 筛管分子; CC. 伴胞; VE. 囊泡; V. 液泡; ER. 内质网; M. 线粒体; N. 细胞核; P. 质体; S. 淀粉粒; NU. 核仁; CW. 细胞壁; PM. 质膜; CG. 胶体金颗粒。下同。

A~D. Fruits unincubated with primary antibody; E~H. Fruits incubated with primary antibody. A~B. Phloem and parenchymal cells of vascular bundle and the organelles in them; C. Cell walls and organelles of the parenchymal cells of phloem; D. Organelles in the parenchymal cells of the phloem of vascular bundle; E. Cell walls and organelles of parenchymal cells distant from the vascular bundle; F. Cell walls and organelles of parenchymal cells in the phloem of the vascular bundle; G~H. Cell walls and cell interiors of parenchymal cells distant from the vascular bundle. SE. Sieve tube molecules; CC. Companion cells; VE. Vesicles; V. Vacuoles; ER. Endoplasmic reticulum; M. Mitochondria; N. Nucleus; P. Plastids; S. Starch grains; NU. Nucleoli; CW. Cell wall; PM. Plasma membrane; CG. Colloidal gold particles. The same as below.

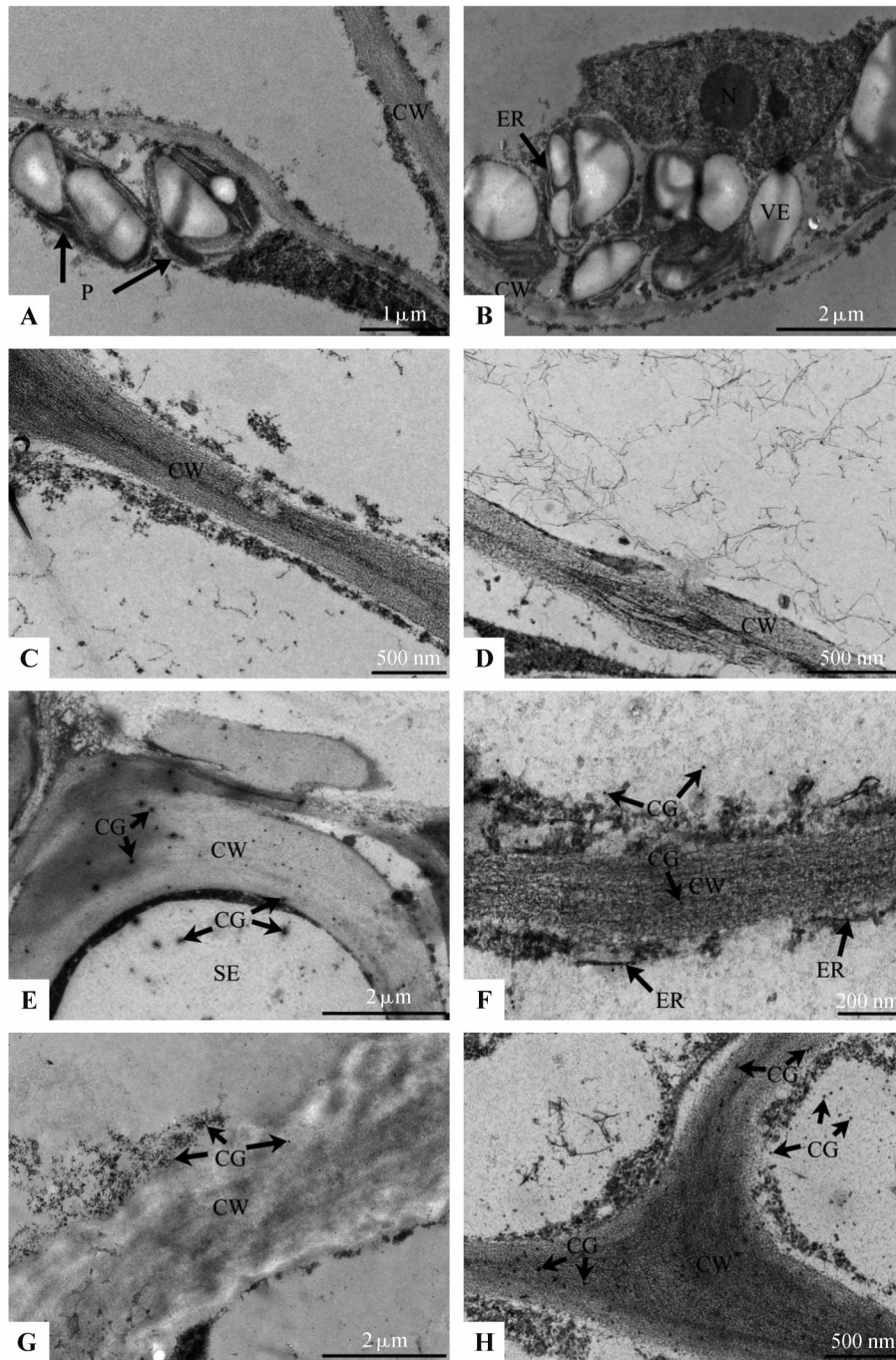
图1 果实膨大前期 AGPs 的胶体金免疫定位

Fig.1 Colloidal gold immunolocalization of AGPs in fruit in the early bulking period

细胞壁及细胞内部均无胶体金颗粒分布,不同细胞器上也无胶体金颗粒分布(图2A~2D)。

使用JIM13对切片进行孵育后,在筛管分子的细胞壁及细胞内部均分布有较多的胶体金颗粒

(图2E)。在离维管束较远的薄壁细胞中,细胞壁及细胞内部均有大量胶体金颗粒分布(图2F~2H),在细胞内部的内质网及内质网附近也有零星的胶体金颗粒分布(图2F)。



A~D. 未用一抗孵育的果实;E~H. 一抗孵育的果实。A~B. 维管束韧皮部薄壁细胞中的细胞器;C~D. 离维管束较远的薄壁细胞的细胞壁及细胞内部;E. 筛管的细胞壁;F~H. 离维管束较远的薄壁细胞的细胞壁及细胞内部。

A~D. Fruits unincubated with primary antibody; E~H. Fruits incubated with primary antibody. A~B. Organelles in the parenchymal cells of the vascular bundle phloem; C~D. Cell walls and cell interiors of parenchymal cells distant from vascular bundle; E. Cell walls of sieve tubes; F~H. Cell walls and cell interiors of parenchymal cells distant from the vascular bundle.

图2 果实快速膨大期 AGPs 的胶体金免疫定位

Fig.2 Colloidal gold immunolocalization of AGPs in fruit in the rapid enlargement period

2.3 着色期果实 AGPs 胶体金免疫电镜定位

着色期果实细胞壁发生曲折,结构较为疏松,初生壁结构明显(图 3A~3D)。果实维管束韧皮部细胞排列较为紧密,由筛管、伴胞、韧皮部薄壁细胞等不同类型细胞组成,筛管分子无细胞核且细胞器退化(图 3A);位于筛管分子旁边的伴胞内含有丰富的细胞器,紧挨着细胞壁内侧分布着粗面内质网和嵴结构较为清晰的线粒体,以及位于细胞中间片层结构明显的质体和大量由于质膜内陷形成的囊泡(图 3A、3D);位于韧皮部的薄壁细胞与其他细胞略有不同,细胞内的大部分空间被中央大液泡占据,液泡周围分布着嵴结构明显的线粒体及片层结构清晰的质体,紧挨着细胞壁内侧还有少量的内质网及囊泡(图 3B);而离维管束较远的薄壁细胞结构较为简单,内部只有少量内质网(图 3C)。在细胞壁、细胞内部和细胞器上均未有胶体金颗粒分布(图 3A~3D)。

使用 JIM13 对切片进行孵育后,在韧皮部的筛管和伴胞及薄壁细胞的细胞壁上均分布有少量的胶体金颗粒(图 3E、3F);韧皮部薄壁细胞内部的胶体金颗粒数量显著减少,在囊泡、线粒体、质体及中央大液泡上分布有零星的胶体金颗粒(图 3E、3G);薄壁细胞质膜上分布的胶体金颗粒较细胞壁上略多一些(图 3F、3H)。通过对比膨大前期及快速膨大期细胞壁、细胞内部及细胞器上的胶体金颗粒数量,发现着色期胶体金颗粒数量显著减少。

2.4 完熟期果实 AGPs 胶体金免疫电镜定位

完熟期果实细胞壁曲折疏松(图 4A~4D)。韧皮部的筛管分子不具有细胞核,随着细胞的不断分化,液泡解体,细胞膜内陷形成囊泡,线粒体嵴结构清晰且紧挨着囊泡(图 4A、4C);韧皮部的伴胞体积大小及形状各异,呈狭长形或两端尖削型,紧邻一到数个高度特化的薄壁细胞,细胞核较大,细胞质浓密,在细胞核周围囊泡较多,紧挨着细胞壁内侧有少量内质网存在,细胞内部线粒体数量较多,呈圆状或椭圆状、嵴结构清晰(图 4B~4D);韧皮部薄壁细胞体积较大,具有明显的中央大液泡,占据细胞内部大部分空间,紧挨着中央大液泡周围分布有嵴结构明显的线粒体和高尔基体(图 4B)。完熟期果实各个细胞的细胞壁及细胞内部均未有胶体金颗粒分布(图 4A~4D)。

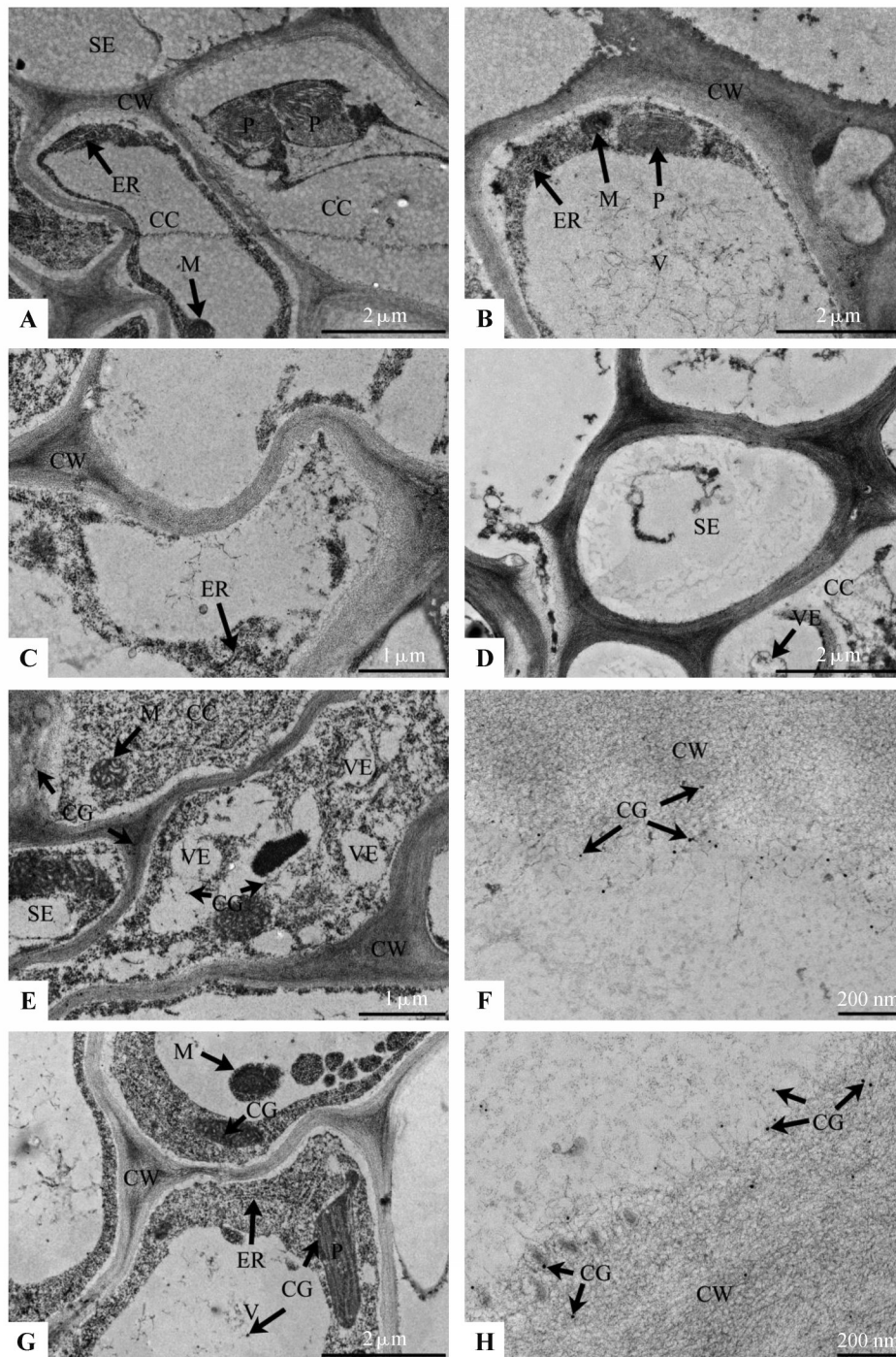
使用 JIM13 对切片进行孵育后,在韧皮部的伴

胞和离维管束较远的薄壁细胞的细胞壁及靠近质膜部位分布有少量的胶体金颗粒(图 4E~4H),细胞内部的胶体金颗粒数量较少(图 4E、4F、4H),在囊泡、线粒体、质体及中央大液泡上分布有零星的胶体金颗粒(图 4E、4G、4H),可以清晰地看到片层结构明显的质体上有少量胶体金颗粒。相比膨大前期、快速膨大期和着色期,完熟期细胞壁、细胞内部及细胞器上的胶体金颗粒数量较少。

综上所述,胶体金颗粒所结合的 AGPs 主要分布在各个细胞的细胞壁上、靠近质膜的区域、细胞内部的细胞器上,且在膨大前期和快速膨大期细胞壁及细胞内部分布的胶体金颗粒较多,随着果实的发育,在着色期和完熟期,胶体金颗粒在细胞壁及细胞内部分布的数量较少。

3 讨论

AGPs 主要分布在细胞壁间隙、质膜的外表面、质膜与细胞壁间隙及细胞器中,前人^[17]通过细胞化学、免疫组织化学在细胞水平上证实了这一点。本研究以灵武长枣果实为试验材料,使用胶体金免疫标记技术研究了 4 个不同发育时期果实中 AGPs 的分布变化。结果表明:AGPs 与金颗粒结合,主要分布在维管束的维管束鞘、木质部和韧皮部所有细胞的细胞壁和细胞内部、薄壁细胞的细胞壁与质膜之间的区域、质膜、液泡膜及形成的囊泡上,并且在膨大前期和快速膨大期细胞壁、细胞内部及细胞器上分布的胶体金颗粒明显较着色期和完熟期多。果实 AGPs 分布规律与免疫荧光定位得到的结果^[11]一致。另外,不同发育时期果实不同细胞中胶体金颗粒的数量存在一定的差异,这可能与细胞壁的生理变化有关^[2],果实细胞壁 AGPs 等组分的变化及在细胞壁中的分布与果实的发育和成熟过程密切相关,尤其是细胞壁中的果胶重排^[1]。由于 AGPs 是一种广泛糖基化的富含羟脯氨酸糖蛋白(HRGPs),在果实成熟过程中多糖基质逐步解聚、碳水化合物链的组成发生变化及与果实软化相关的半乳糖含量降低,可能导致 AGPs 分布及含量的变化^[9]。胶体金免疫电镜观察还发现胶体金颗粒在质膜、液泡膜及其形成的囊泡上均有分布,随着灵武长枣果实发育,质膜逐渐内陷形成囊泡和液泡内囊泡,细胞壁逐渐解体,囊泡数量不断增多;并且在果实发育后期 β GlcY-AGPs 形成的棕红色沉淀和抗体识别的

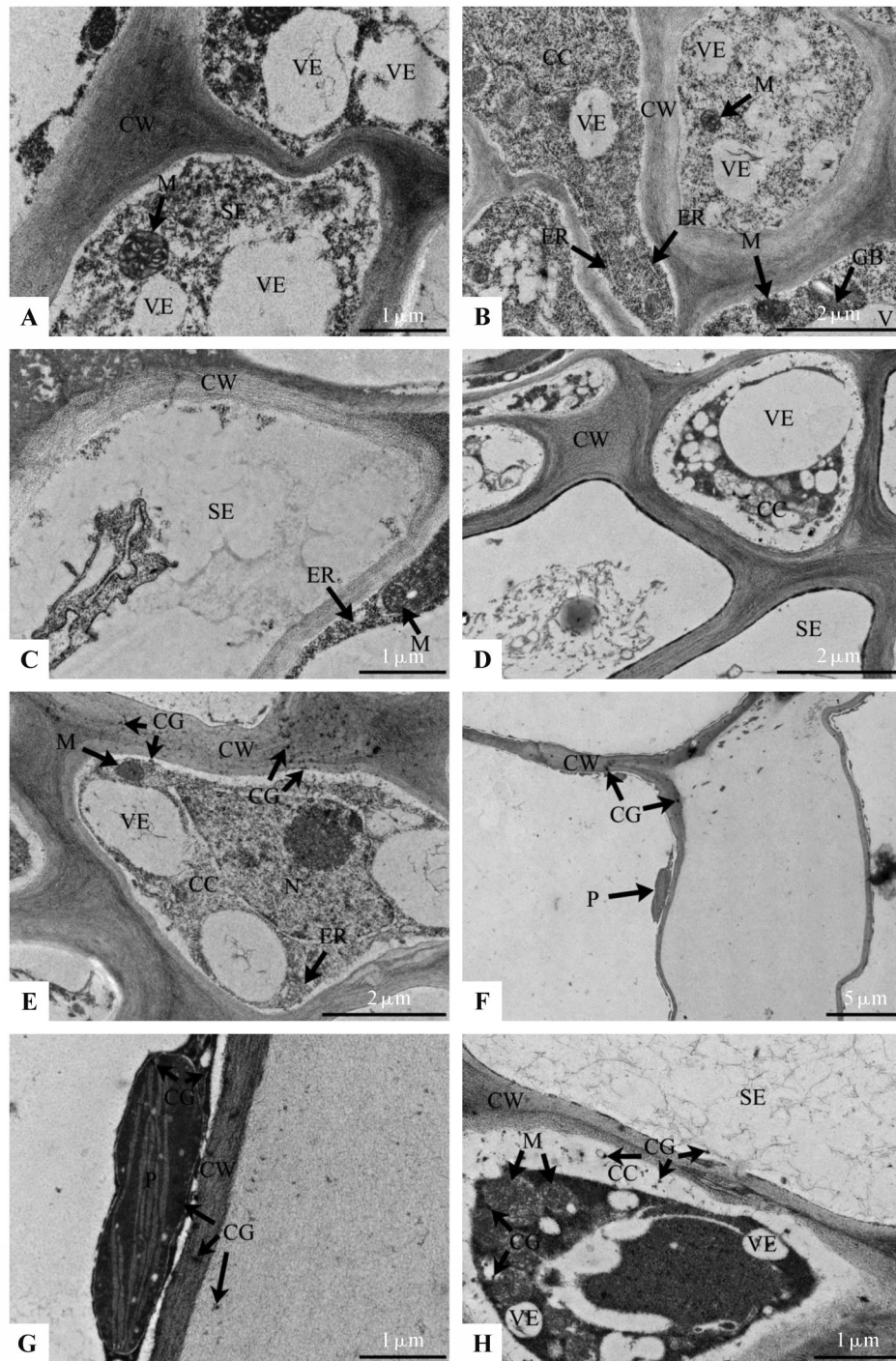


A~D. 未用一抗孵育的果实; E~H. 一抗孵育的果实。A. 维管束韧皮部的筛管和伴胞; B. 维管束韧皮部的薄壁细胞及细胞内部; C. 离维管束较远的薄壁细胞的细胞壁及细胞内部; D~E. 维管束韧皮部的筛管和伴胞; F. 韧皮部薄壁细胞的细胞壁及细胞内部; G. 维管束韧皮部薄壁细胞中的细胞器; H. 离维管束较远的薄壁细胞的细胞壁及细胞内部。

A~D. Fruits unincubated with primary antibody; E~H. Fruits incubated with primary antibody. A. Sieve tubes and companion cells of vascular bundle phloem; B. Parenchymal cells and cell interiors of the phloem of vascular bundle; C. Cell walls and cell interiors of parenchymal cells distant from the vascular bundle; D~E. Sieve tubes and companion cells in the phloem of vascular bundle; F. Cell walls and cell interiors of parenchymal cells of the phloem; G. Organelles in parenchymal cells of the phloem of vascular bundle. H. Cell walls and cell interiors of parenchymal cells distant from vascular bundle.

图3 果实着色期AGPs的胶体金免疫定位

Fig.3 Colloidal gold immunolocalization of AGPs in fruit in the coloring period



A~D. 未用一抗孵育的果实; E~H. 一抗孵育的果实。A. 维管束韧皮部筛管的细胞壁及细胞器; B. 维管束韧皮部的伴胞; C. 维管束韧皮部的筛管; D. 维管束韧皮部的筛管和伴胞; E. 维管束韧皮部的伴胞; F~G. 离维管束较远的薄壁细胞的细胞壁及细胞器; H. 维管束韧皮部的伴胞。GB. 高尔基体。

A~D. Fruits unincubated with primary antibody; E~H. Fruits incubated with primary antibody. A. Cell walls and organelles of sieve tubes of the vascular bundle phloem; B. Companion cells of the vascular bundle phloem; C. Sieve tubes of the vascular bundle phloem; D. Sieve tubes and companion cells of the vascular bundle phloem; E. Companion cells of the vascular bundle phloem; F~G. Cell walls and organelles of parenchymal cells distant from the vascular bundle; H. Companion cells of the vascular bundle phloem. GB. Golgi apparatus.

图4 果实完熟期 AGPs 的胶体金免疫定位

Fig.4 Colloidal gold immunolocalization of AGPs in fruit in the maturation period

AGPs 抗原分布逐渐减少,而果实多糖含量却显著升高,说明 AGPs 对多糖物质积累有重要作用^[11]。结合胶体金免疫电镜结果表明,灵武长枣果实多糖在 AGPs 参与下可能由薄壁细胞壁解体或细胞分解形成,通过囊泡运输形式从细胞壁卸载并运输到其他部位,这与宁夏枸杞果实同化物通过膜泡运输的方式进行卸载相似^[10]。

通过对比 4 个不同时期灵武长枣果实中 AGPs 的分布特征,本研究认为:首先,不同时期果实细胞 AGPs 分布存在差异,JIM13 是果实 AGPs 胶体金免疫标记较有效的抗体。AGPs 的单克隆抗体探针绝大多数针对的是糖基部分,其中,JIM13 识别的是 β -D-Glcp A-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galp A-(1 \rightarrow 2)-L-Rha 表位,能识别从 40 kDa 到 223 kDa 相对分子质量的 AGPs,JIM8 可识别 AGPs 的糖基表位,LM2 识别 β -D-Glcp A 表位,MAC207 则识别 β -GlcA-(1 \rightarrow 3)- α -Gal A-(1 \rightarrow 2)- α -Rha 表位^[18]。Leszczuk 等^[9]使用胶体金免疫标记法揭示了 AGPs 在果实细胞中的特殊空间分布,发现 JIM13 是与果实中 AGPs 结合最有效的抗体,LM2 和 LM14 虽然也与 AGPs 结合,但效果不如 JIM13。Leszczuk 等^[2]还发现在成熟果实、未成熟果实及储藏果实中 AGPs 的分布存在显著差异,本研究各时期灵武长枣果实的不同细胞 JIM13 抗体所结合的胶体金颗粒数量存在一定差异的结果与之一致。另外,不同抗体在灵武长枣果实不同细胞中的表达情况存在一定的差异^[19],这说明不同组织在不同时期不同抗体所识别 AGPs 的种类或数量不同,AGPs 在果实发育过程中发挥的作用也不尽相同。第二,AGPs 在果实中可能起到保护屏障的作用,不同发育时期灵武长枣果实细胞壁均分布 AGPs 胶体金颗粒,果实发育过程中 AGPs 含量呈动态变化,在快速膨大期其表达量达到最高水平。AGPs 含量在果实成熟过程中受到严格的调控,较高水平的表达量表明它们参与了对生物胁迫的防御,对冬瓜 (*Benincasa hispida*) 接种枯萎病菌后,JIM11、JIM20 和 MAC204 抗体标记的荧光水平较高,HRGPs 的含量显著上调,这说明 HRGPs 含量的增加与冬瓜对枯萎病的抗性密切相关,而 AGPs 是 HRGPs 中的亚家族,说明 AGPs 可能参与植物对生物胁迫的防御^[20]。对苹果果实细胞壁中 AGPs 分布研究^[9]发现,AGPs 存在于不同的区域,这取决于成熟过程中细胞壁-质膜的变化,而细胞壁-质膜的状况又随着采后贮藏

或真菌侵染的过程而发生变化,这表明 AGPs 可能起到保护屏障的作用。第三,AGPs 可能作为信号物质改变细胞环境,AGPs 自身的结构特点为其联系各种不同的信号物质提供了前提条件^[21]。有研究^[22]表明,AGPs 可以作为信号分子在信号传导过程中发挥作用,而在灵武长枣果实快速膨大期胶体金颗粒的数量有所增加,这可能是果实中多糖作为信号物质对细胞环境改变做出的反应,在生长过程中通过降解旧分子合成新分子,从而改变细胞壁的分子组成。并且 AGPs 的正确糖基化对于细胞壁组装是必不可少的,rolyl 4 羟基酶 (P4Hs) 可以催化细胞壁上富含羟脯氨酸糖蛋白的主要翻译后修饰,从而影响细胞壁正确的结构和功能。而所有的翻译后修饰,包括 P4Hs 将脯氨酸残基转化为羟脯氨酸,都会对细胞壁中共价网络产生影响,因此,AGPs 对细胞壁的重排十分重要^[9]。

AGPs 在果实的成熟与软化中发挥重要作用^[16]。果实的成熟与软化受到多种因素影响,果实软化可能是多种因素共同作用引起细胞壁多糖降解进而导致 AGPs 与细胞壁中纤维素与半纤维素、果胶等其他基本组分复杂网络破坏的结果,影响 AGPs 在细胞壁分布及 AGPs 抗原表位排列的改变^[23]。不同发育时期灵武长枣果实细胞 AGPs 胶体金颗粒分布存在差异,随发育进程,着色期至成熟期果实细胞不同部位 AGPs 减少、细胞壁硬度降低导致熟化过程中细胞壁松弛^[16]。因此,根据果实质地和成熟软化机制不同,通过果胶酶等多因素调控果实成熟进程,对果实成熟、软化及品质调控具有重要意义。但是,仅以本研究结果还无法深刻阐明 AGPs 在细胞和亚细胞水平上分布变化的调节机制及其分布与 AGPs 功能的关系,需要进一步结合分子生物学、分析化学、超微细胞化学等多学科手段开展研究,以更全面地揭示 AGPs 在果实品质调控中的功能。

参 考 文 献

- [1] LESZCZUK A, SZCZUKA E, LEWTAK K, *et al.* Effect of low temperature on changes in AGP distribution during development of *Bellis perennis* ovules and anthers [J]. *Cells*, 2021, 10(8): 1880.
- [2] LESZCZUK A, CYBULSKA J, SKRZYPEK T, *et al.* Properties of arabinogalactan proteins (AGPs) in apple (*Malus×Domestica*) fruit at different stages of ripening [J].

- Biology, 2020, 9(8): 225.
- [3] BAUMANN A, PFEIFER L, CLASSEN B. Arabinogalactan-proteins from non-coniferous gymnosperms have unusual structural features [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 261: 117831.
- [4] WILLATS W G T, KNOX J P. A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of β -glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 1996, 9(6): 919-925.
- [5] VICRÉ M, SANTAELLA C, BLANCHET S, et al. Root border-like cells of *Arabidopsis* microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria [J]. Plant Physiology, 2005, 138(2): 998-1008.
- [6] 胡欣. β GlcY 对拟南芥根发育的影响及 AGPs 基因干扰载体的构建与油菜遗传转化 [D]. 武汉: 湖北大学, 2016.
- HU X. Influence on root development in *Arabidopsis* by β GlcY and construction of AGPs gene interference vectors and the genetic transformation in *Brassica* [D]. Wuhan: Hubei University, 2016.
- [7] 林苏娥. 白菜花粉壁发育相关的四个多糖代谢基因的表达分析与功能鉴定 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- LIN S E. Expression and functional characterization of four polysaccharide metabolism genes related to pollen wall development in *Brassica campestris* ssp. *chinensis* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014.
- [8] 项青. 番茄斑萎病毒利用寄主植物阿拉伯半乳糖蛋白 AGP 调控自身侵染的机制研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2019.
- XIANG Q. Molecular mechanism of tomato spotted wilt virus utilizing the host plant arabinogalactan protein to facilitate viral infection [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019.
- [9] LESZCZUK A, ZAJĄC A, KURZYNA-SZKLAREK M, et al. Investigations of changes in the arabinogalactan proteins (AGPs) structure, size and composition during the fruit ripening process [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 20621.
- [10] 齐国亮. 气象因子对宁夏枸杞外观品质及药用成分多糖积累的影响 [D]. 银川: 宁夏大学, 2015.
- QI G L. Influence of meteorological factors on the appearance quality of *Lycium barbarum* L. and the accumulation of medicinal composition of *Lycium barbarum* polysaccharides [D]. Yinchuan: Ningxia University, 2015.
- [11] 王静, 章英才, 陶珊珊. 灵武长枣果实发育过程中阿拉伯半乳糖蛋白组织化学分布 [J]. 植物研究, 2022, 42(6): 1106-1120.
- WANG J, ZHANG Y C, TAO S S. Histochemical localization of arabinogalactan proteins during fruit development from *Ziziphus jujuba* 'Lingwu Changzao' [J]. Bulletin of Botanical Research, 2022, 42(6): 1106-1120.
- [12] 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]. 昆明: 云南农业大学, 2016.
- LIANG Y L. Response of rice leaves cell wall to *Magnaporthe oryzae* infection at seedling stage [D]. Kunming: Yunnan Agricultural University, 2016.
- [13] 刘云霞, 张青文, 周明. 电镜免疫胶体金定位水稻内生细菌的研究 [J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(4): 354-358.
- LIU Y X, ZHANG Q W, ZHOU M. Immuno-gold staining techniques for detection of endophytic bacteria in rice plant [J]. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology, 1996, 4(4): 354-358.
- [14] 李金娜. 温度结合低压静电场对灵武长枣贮藏保鲜效果的研究 [D]. 银川: 宁夏大学, 2019.
- LI J N. Study on the effect of temperature combined with low voltage electrostatic field on the storage and preservation of *Ziziphus jujuba* Mill cv. Lingwu changzao [D]. Yinchuan: Ningxia University, 2019.
- [15] 张晓波, 苏伟东, 章英才. 灵武长枣研究进展 [J]. 北方园艺, 2014, 38(22): 200-203.
- ZHANG X B, SU W D, ZHANG Y C. Research progress on *Ziziphus jujuba* Mill cv. 'lingwuchangzao' [J]. Northern Horticulture, 2014, 38(22): 200-203.
- [16] 王静, 章英才, 陶珊珊, 等. 果胶酶对灵武长枣果实发育中阿拉伯半乳糖蛋白分布的影响 [J]. 植物研究, 2024, 44(1): 62-74.
- WANG J, ZHANG Y C, TAO S S, et al. Effects of pectinase on the distribution of arabinogalactan proteins in developing fruit of *Ziziphus jujuba* 'Lingwu Changzao' [J]. Bulletin of Botanical Research, 2024, 44(1): 62-74.
- [17] LESZCZUK A, KALAITZIS P, BLAZAKIS K N, et al. The role of arabinogalactan proteins (AGPs) in fruit ripening—a review [J]. Horticulture Research, 2020, 7(1): 176.
- [18] 秦源, 陈丹, 赵洁. 烟草柱头和花柱中阿拉伯半乳糖蛋白的定位 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32(3): 307-314.
- QIN Y, CHEN D, ZHAO J. The localization of arabinogalactan-proteins in stigma and style of *Nicotiana tabacum*

- cum* L. [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2006, 32(3): 307-314.
- [19] 王静, 章英才, 陶珊珊. 灵武长枣果实阿拉伯半乳糖蛋白免疫荧光定位[J]. *电子显微学报*, 2022, 41(3): 293-307.
- WANG J, ZHANG Y C, TAO S S. Immunofluorescence localization of arabinogalactan proteins in *Ziziphus jujuba* Mill cv. Lingwuchangzao fruit [J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2022, 41(3): 293-307.
- [20] 杜琳. 富含羟脯氨酸糖蛋白(HRGPs)在冬瓜-枯萎病菌互动中的诱导调控及亚细胞定位分析[D]. 南昌: 江西农业大学, 2014.
- DU L. Inducible regulation and subcellular localization analyses of the hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs) in interaction between wax gourd and *Fusarium oxysporum* Schl. Sp. Benincasae [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2014.
- [21] 巩万奎. 阿拉伯半乳糖蛋白及其在植物细胞分化中的作用[J]. *生物技术通报*, 1999, 15(4): 12-15.
- GONG W K. Arabinogalactan-proteins and their roles in plant cell differentiation [J]. *Biotechnology Bulletin*, 1999, 15(4): 12-15.
- [22] 秦源, 赵洁. 阿拉伯半乳糖蛋白在被子植物有性生殖中的作用[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, 30(4): 371-378.
- QIN Y, ZHAO J. The roles of arabinogalactan-proteins in sexual reproduction of angiosperms [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2004, 30(4): 371-378.
- [23] LESZCZUK A, CHYLIŃSKA M, ZDUNEK A. Enzymes and vitamin C as factors influencing the presence of arabinogalactan proteins (AGPs) in *Solanum lycopersicum* fruit [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 139: 681-690.