

# 水稻淀粉胚乳细胞发育期间程序性死亡的研究

李睿<sup>1</sup>, 兰盛银<sup>2</sup>, 徐珍秀<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>武汉工业学院生物与化学工程系, 武汉 430023; <sup>2</sup>华中农业大学生命科学院, 武汉 430070)

**摘要:** 应用透射电子显微镜观察水稻淀粉胚乳细胞核在发育期间的形态变化。结果表明, 伴随淀粉胚乳发育进程, 其细胞核呈现染色质凝聚这一程序性细胞死亡(PCD)的典型特征。水稻胚乳细胞还出现核变形、核膜破裂、核基质进入胞质乃至核降解形成核残体的现象, 细胞核从变形到解体是以一种有序的方式进行, 证实水稻淀粉胚乳的细胞死亡是程序性细胞死亡。EVANS BLUE染色结果表明, 水稻淀粉胚乳细胞死亡顺序是由胚乳中部向四周扩展。随发育进程, 水稻胚乳中的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性持续下降。对水稻淀粉胚乳中的DNA进行凝胶电泳分析, 不呈现典型的DNA梯状条带。结果表明, 水稻淀粉胚乳细胞的程序性死亡是一种特殊形式的程序性死亡现象。

**关键词:** 水稻; 籽粒发育; PCD; 淀粉胚乳; 细胞程序性死亡

## Studies on the Programmed Cell Death in Rice During Starchy Endosperm Development

LI Rui<sup>1</sup>, LAN Sheng-yin<sup>2</sup>, XU Zhen-xiu<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Biology and Chemistry Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023;

<sup>2</sup>College of Life Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract:** Morphological variations of the nucleus in starchy endosperm cell were observed by electron-transmission microscope during endosperm development in rice. Along with the development of the starchy endosperm, the nuclei of the cells showed chromatin condensation, the typical feature of programmed cell death (PCD). The nuclei also showed nucleus deformation, disruption of nuclear envelope, nucleoplasm leaking into the cytoplasm and nucleus disintegration resulting in nuclear residue formation. From the nucleus deformation to the nucleus disintegration, the morphological changes of the nucleus were orderly progressive. This indicated that the cell death of starchy endosperm in rice was programmed cell death. Evans Blue staining observation showed that the cell death was initially detected in the central part of starchy endosperm in rice, then expanded outward. The activities of Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in rice starchy endosperm both descended continuously as development progressed. The analysis of DNA of rice starchy endosperm did not show the presence of DNA laddering. It is concluded that the cell death of starchy endosperm in rice is a special form of PCD.

**Key words:** Rice; Seed development; PCD; Starchy endosperm; Programmed cell death

程序性死亡(PCD)是近年来的一个研究热点, 其机制在动物细胞中已有了较深入的研究。尽管对植物细胞PCD的认识较动物细胞晚, 但近年来人们对植物PCD也有许多研究, 并发现许多植物组织在发育期间经历程序性死亡<sup>[1~8]</sup>。

在动物细胞中, 凋亡的典型特征之一是基因组降解后, 在琼脂糖电泳时形成以180~200bp递增的DNA梯状条带。有些植物组织在PCD期间也可观察到DNA降解后类似动物的梯状条带, 例如, 小麦珠心组织的衰退就是如此<sup>[9]</sup>。但也有一些植物组织, 在PCD期间检

收稿日期: 2003-02-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070363), 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(2000050401)

作者简介: 李睿(1972-), 女, 土家族, 湖北鹤峰人, 博士, 主要从事细胞结构与功能的研究。兰盛银为通讯作者,

Tel: 027-83922123; E-mail: shengyin1@yahoo.com.cn

测不到典型的DNA梯状条带<sup>[10, 11]</sup>。

禾谷类胚乳细胞可分化为3种组织：淀粉胚乳、糊粉层和亚糊粉层。淀粉胚乳在籽粒发育的中、后期死亡，而糊粉层和亚糊粉层细胞直到籽粒成熟仍不死亡<sup>[12]</sup>。小麦和玉米淀粉胚乳细胞在发育期间发生程序性细胞死亡。直接证据是小麦和玉米胚乳在发育的特定阶段，其核内DNA被降解产生大小不同的寡聚核小体片段，经琼脂糖电泳可显示以180 bp倍增的DNA梯状条带<sup>[13~15]</sup>。Young等用Evans Blue染色法观察了小麦和玉米淀粉胚乳细胞死亡起始部位与扩展状况。结果表明，小麦细胞死亡是随机发生的，而玉米细胞死亡起始于玉米胚乳的上端并高度有序地向外扩展<sup>[15]</sup>。

电镜观察是检测PCD的可靠方法，上述报道从DNA电泳分析的角度对胚乳细胞的PCD进行了研究。有关禾谷类胚乳细胞在PCD期间的超微结构特征的研究工作尚鲜见报道。

笔者应用透射电子显微镜较系统地观察了发育期间的水稻淀粉胚乳细胞，以期查明其细胞核发生的一系列形态变化，弄清水稻淀粉胚乳细胞核死亡过程。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

水稻 (*Oryza sativa* L. ShenTai no.1) 2002年种植于武汉市华中农业大学校园网室内。挂牌与点颖结合正确标记穗中部籽粒开花时间。于开花后5、9、14、19、24、35 d，分别取样，并将部分籽粒立即用液氮冻后储存于-50℃，用于DNA抽提和酶活力测定。部分新鲜籽粒用于Evans Blue染色观察。

### 1.2 透射电镜观察制样

取新鲜籽粒，剖出胚乳后去掉两端，留中部，切成小块后投入2.5%戊二醛固定液中(0.1 mol·L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液，pH 7.2配制)，在0~4℃固定1 d，然后于1%四氧化锇(缓冲液同前)中固定2 h。样品用酒精系列脱水，Spurr树脂浸透包埋，LKB-2088上进行超薄切片，切片厚60 nm左右。切片经铀盐、铅盐双染，JEM-100CX II型透射电子显微镜观察拍照。

### 1.3 Evans Blue 染色

采用Young<sup>[14]</sup>等方法，用锋利刀片将新鲜籽粒沿横向切成数段，再浸入Evans Blue染液(0.1%，蒸馏水配制)中染色2 min，立即在清水中冲洗60 min。取出在Nikon SMZ-10体视显微镜下观察拍照。

### 1.4 DNA 抽提和电泳

参照Young等方法<sup>[14]</sup>，有所改动。分别取不同发育时期的籽粒20粒，快速剖出淀粉胚乳部分。液氮速冻后用研钵研磨。加入抽提缓冲液抽提DNA。抽提液组成为：100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 9.0，20 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA，200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl，1%+二烷基肌氨酸钠，

1%2-巯基乙醇。再加入8 ml 1:1苯酚/氯仿抽提。8 000 r/min离心10 min，上清液中加入3 mol·L<sup>-1</sup> NaAc和异丙醇，-20℃下放30 min，12 000 r/min离心15 min，DNA沉淀下来。加入1 ml TE缓冲液(10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.0，5 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA)溶解沉淀，并加入RNAase(终浓度100 μg·ml<sup>-1</sup>) 37℃下保温过夜。用苯酚/氯仿去蛋白质，异丙醇冷冻沉淀DNA，适量TE溶解DNA。DNA用1.5%琼脂糖凝胶电泳分析，EB染色观察，经3次重复试验后得到同样的结果。

### 1.5 超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性测定

将不同发育时期的籽粒分别取20粒，剖出胚乳，去胚后采用Pastori等方法<sup>[16]</sup>进行测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 水稻淀粉胚乳细胞核的解体过程

胚乳的发育可分为游离核时期、胚乳细胞化时期、胚乳细胞生长分化期、胚乳成熟期。在生长分化期，胚乳细胞逐渐分化为糊粉层、亚糊粉层和淀粉胚乳层。水稻糊粉层和亚糊粉层不死亡，淀粉胚乳细胞核则呈现PCD的一系列特征。水稻淀粉胚乳细胞核在开花后4 d(4 DAF)时形态正常，细胞核膜完整，染色质分布均匀(图版I-1)。水稻淀粉胚乳细胞核在5 DAF左右开始变形，核膜内陷形成沟槽(图版I-2，箭头)，或核膜向淀粉体的间隙内凸出(图版I-3)。随着细胞核的变形，染色质开始凝聚成块状，有的分布在核内，有的附着在核膜内表面上(图版I-3)。6~7 DAF左右，细胞核变形加剧，染色质边缘化明显(图版I-4)。核膜开始破裂，核质和染色质进入胞质。核质及染色质进入胞质主要有3种方式：(1)浓缩的染色质向细胞核被膜靠拢，一些浓缩的染色质穿过内膜破坏处，进入到细胞核膜间隙中(图版I-4，空心箭头)，然后再穿过外膜破裂处进入到胞质中(图版I-4，空心箭头)，核质可能通过小泡穿过核膜向外运输(图版I-4，箭头)；(2)细胞核内外膜均破裂而变得模糊，核质与染色质直接外泄(图版I-5，空心箭头)。在细胞核附近分布着一些泡状物(图版I-5，箭头)，泡状物中含有与核质类似的物质；(3)核膜破裂的地方分布着大量电子致密的小泡(图版I-6，箭头)，核质与染色质通过小泡向胞质外运输(图版I-6，箭头)。细胞核变形和核膜破裂加剧，细胞核被分割成孤立的核残体(图版I-6、I-7，空心箭头)。核残体与细胞核母体分离并被不断长大的淀粉质体逐渐分隔(图版I-7)。此时因核质泄露进入胞质，胞质中的水分进入细胞核中，使核质又变得稀薄(图版I-6、I-7)。10DAF后的淀粉胚乳细胞内淀粉质体很密集，细胞核不复存在。

### 2.2 水稻淀粉胚乳细胞死亡的Evans Blue染色鉴定

Evans Blue 染色可清楚地观察到水稻淀粉胚乳在发育过程中细胞死亡的发生过程。Evans Blue 将死细胞染成蓝色, 而活细胞不着色。在 9 DAF, 珠心细胞染上蓝色(箭头), 但淀粉胚乳细胞不呈蓝色(图版 II -A)。14 DAF 开始, 有些胚乳细胞开始出现 Evans Blue 染色反应, 整个细胞被染成蓝色。胚乳近中心区域的细胞蓝色较深(图版 II -B, 箭头)。19~24 DAF, 死亡细胞增多, Evans Blue 染色的蓝色反应逐渐加深, 蓝色区域由水稻胚乳的中部呈辐射状向外扩散。胚乳近中心区域的细胞蓝色最深(图版 II -C, 箭头)。至 35 DAF, 整个淀粉胚乳基本上被染成蓝色(图版 II -D)。这表明整个淀粉胚乳的细胞已基本死亡。胚乳细胞中 Evans Blue 染色的蓝色深浅与细胞中的脱氢酶活力水平有关。在发育过程中, 胚乳细胞中的脱氢酶活力水平越来越低, 因而细胞中的蓝色越来越深。图版 II 所显示的不同发育时期的胚乳细胞死亡动态, 表明了水稻胚乳的细胞死亡发生顺序是由胚乳中心向四周扩展。

2.3 发育期间水稻淀粉胚乳 DNA 的降解

从不同发育时期的水稻胚乳中抽提出 DNA 后, 用琼脂糖凝胶电泳检测。在 5 DAF 和 9 DAF, 水稻胚乳 DNA 呈现为完整的大片段。但从 14 DAF 开始, DNA 开始降解形成 SMEAR 带, 即拖尾状条带(图 1)。这一时期, 也是水稻胚乳细胞开始检测出 Evans Blue 染色的蓝色反应的时期。重复试验表明, DNA 降解形成

SMEAR 带与水稻胚乳的发育有关, 而不是由 DNA 抽提过程造成的(图 1)。

2.4 活性氧清除酶活力的变化

通常植物细胞中活性氧浓度很低, 线粒体基质和细胞质中的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)可清除活性氧, 从而起到重要的防御作用。研究证明活性氧在启动和调节细胞 PCD 的过程中起了重要作用, 较高浓度的活性氧会导致细胞凋亡<sup>[17]</sup>。

测定 9~35DAF 的水稻胚乳中的 SOD 和 CAT 酶活性发现, 随发育天数增加, 胚乳中两种酶活性均下降, SOD 酶活性下降趋势较小, CAT 酶活性则急剧下降(图 2)。

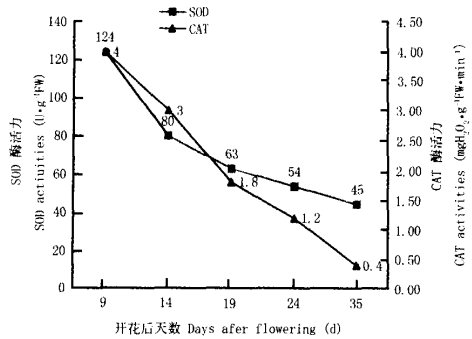
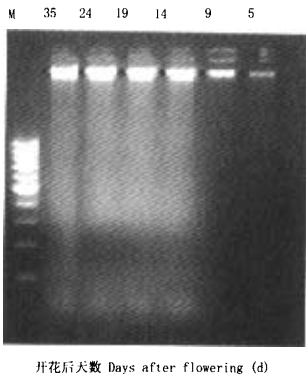


图 2 水稻胚乳发育期间 SOD、CAT 酶活性-时间变化曲线  
Fig.2 Fluctuation of SOD and CAT activity during the period of endosperm development in rice



开花后天数 Days after flowering (d)

从不同发育时期的水稻胚乳中提出 DNA, 水稻发育天数参见各泳道上的标注。然后将 DNA 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色。DNA 分子量标准物(M)见最左泳道。至少重复 3 次独立试验  
DNA was isolated from endosperm collected at developmental time points following flowering as indicated above each lane, resolved on 1.5% agarose gel, and stained with ethidium bromide. The size of standard DNA fragments (M) is indicated to the left of the panel. At least 3 independent experiments were performed and one typical experiment is presented

图 1 水稻胚乳 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Analysis of DNA in rice endosperm during development

3 讨论

细胞程序性死亡是一个复杂的基因调控过程。细胞类型的差别以及有关的 PCD 基因表达不同都可影响 PCD 的具体表现形式。一般将染色质凝聚和 DNA 片段化作为典型的细胞 PCD 特征<sup>[18]</sup>。水稻淀粉胚乳细胞在发育期间出现了染色质凝聚并边缘化、核变形、核膜破裂乃至核降解的现象, 细胞核从变形到解体是以一种有序的方式进行, 证实其细胞死亡是一种 PCD 形式。一般认为, 细胞凋亡时 DNA 的降解主要分为两个步骤。第一步是 DNA 断裂成数十至数百 KP 碱基对不等的大分子 DNA 断片, 第二步是 DNA 在核小体间被切断, 降解成为 180~200 bp 及其倍数大小的一系列 DNA 断片, 经琼脂糖凝胶电泳得到明显的 DNA 梯带<sup>[18]</sup>。目前, 较为一致的观点认为, 大分子 DNA 的断裂即可导致染色质的异常凝聚, 是细胞凋亡的关键<sup>[19]</sup>。水稻淀粉胚乳在 PCD 期间 DNA 的变化较特殊, 不形成典型的梯状条带, 仅显示有 DNA 大片段, 特定时期后 DNA 降解成 SMEAR 条带。现在许多研究表明细胞凋亡时也可不形成 DNA 的梯状条带<sup>[10,11]</sup>。水稻淀粉胚乳细胞 DNA 的降解

方式属于这种类型。

水稻淀粉胚乳细胞PCD的特殊性还表现在核的形态变化上,一般的植物组织在PCD期间核内染色质凝聚并分布在核膜边缘<sup>[9]</sup>,而水稻淀粉胚乳细胞核的染色质凝聚后可分布在核内(图版I-3、I-5),也可趋向浓缩在核膜边缘(图版I-4,空心箭头);一般的植物组织细胞核的降解表现为核膜有突起<sup>[9]</sup>,核膜破裂、核基质外泄<sup>[9]</sup>,而水稻淀粉胚乳细胞核的变形程度很剧烈,核被分割为许多核残体,并被淀粉分隔(图版I-7)。

水稻淀粉胚乳PCD期间细胞核的变化特征与胚乳组织的特殊功能有关,大麦、小麦等禾谷类植物的淀粉胚乳在发育期间也经历PCD过程,其细胞核均呈现与水稻相同的基本变化特征<sup>[20]</sup>,这是由胚乳作为植物储藏组织的特殊功能所决定的。但同是禾谷类植物,其淀粉胚乳细胞死亡的过程各有其特点。Evans Blue染色表明,水稻淀粉胚乳的细胞死亡的发生部位和方式与小麦、玉米均不同。小麦胚乳中细胞死亡的发生是无序的,而玉米胚乳中细胞死亡是高度有序的<sup>[14]</sup>。水稻胚乳中细胞死亡起源于胚乳中部,比较有规律地逐渐向外扩展。

活性氧的生成能刺激抗氧化酶包括SOD和CAT增高活性以对抗活性氧的伤害,但过多的活性氧持续积累,会损害细胞、引发细胞凋亡,损伤的细胞通过凋亡机制被清除<sup>[17]</sup>。水稻淀粉胚乳细胞的核解体过程到9DAF左右基本结束,对SOD和CAT的酶活力从9DAF以后的变化趋势进行研究,发现两种酶活性均持续下降。说明细胞核解体后,胚乳细胞中活性氧的产生与清除的平衡体系被打破,SOD和CAT等保护性酶清除活性氧的能力下降,这将导致活性氧在细胞中持续累积并损伤细胞,从而导致细胞的死亡。

在7DAF左右,水稻淀粉胚乳细胞核开始解体,但直至14DAF,水稻淀粉胚乳细胞才开始出现Evans Blue染色的蓝色反应,到35DAF左右,整个淀粉胚乳的细胞才基本死亡。这是因为水稻的程序性细胞死亡很特殊。在一般的植物组织中,细胞核是最后消失的细胞器。而水稻淀粉胚乳在PCD过程中细胞核是第一个消失的,核消亡后,细胞仍不死亡。胞质中仍正常合成和积累淀粉和蛋白质,直到细胞被淀粉充满,细胞才死亡。

## References

[1] Bell P R. Megaspore abortion: A consequence of selective apoptosis? *International Journal of Plant Science*, 1996, 157:1-7.

[2] Dangel J L, Dietrich R A, Richberg M H. Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell*, 1996, 8:1793-1807.

[3] Gan S, Amasino R M. Making sense of senescence molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology*, 1997, 113:313-319.

[4] Greenberg J T. Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1997, 48:525-545.

[5] Greenberg J T, Guo A, Klessig D F, Ausubel F M. Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense function. *Cell*, 1994, 77: 551-563.

[6] Pennell R I, Lamb C. Programmed cell death in plants. *The Plant Cell*, 1997, 9: 1157-1168.

[7] Wang H, Li J, Bostock R M, Gilchrist D G. Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *The Plant Cell*, 1996, 8: 375-391.

[8] Wang M, Oppedijk B J, Lu X, Van Duijn B, Schilperoort R A. Apoptosis in barley aleurone during germination and its inhibition by abscisic acid. *Plant Molecular Biology*, 1996, 32:1125-1134.

[9] Dominguez F, Moreno J, Cejudo F J. The nucellus degenerates by a process of programmed cell death during the early stages of wheat grain development. *Planta*, 2001, 213: 352-360.

[10] Mittler R, Lam E. In situ detection of nDNA fragmentation during the differentiation of tracheary elements in higher plants. *Plant Physiology*, 1995, 108:489-493.

[11] Ryerson D E, Heath M C. Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *The Plant Cell*, 1996, 8: 393-402.

[12] Olsen O A. Endosperm developments. *The Plant Cell*, 1998, 10: 485-488.

[13] Young T E, Gallie D R. Regulation of programmed cell death in maize endosperm by abscisic acid. *Plant Molecular Biology*, 2000, 42:397-414.

[14] Young T E, Gallie D R. Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals differences in endosperm development between cereals. *Plant Molecular Biology*, 1999, 39: 915-926.

[15] Young T E, Gallie D R. Programmed cell death during endosperm development. *Plant Molecular Biology*, 2000, 44: 283-301.

[16] Pastori G M, del Rio L A. Natural senescence of pea leaves. *Plant Physiology*, 1997, 113:411-418.

[17] 赵云罡, 徐建兴. 线粒体、活性氧和细胞凋亡. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28 (2): 168-171.

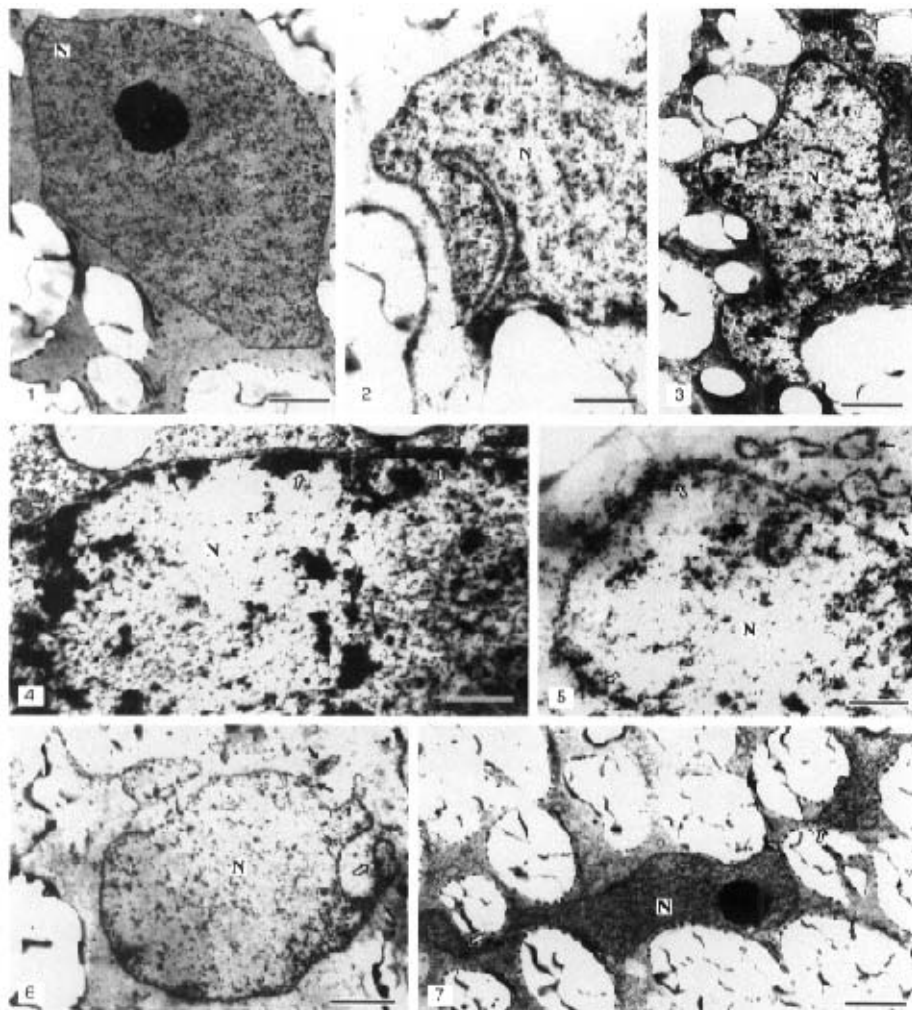
Zhao Y G, Xu J X. Mitochondrion, AOS and apoptosis. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2001, 28 (2): 168-171. (in Chinese)

[18] Gong J P, Tragnos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Analytical Biochemistry*, 1994, 218: 314-319.

[19] 阎蕴力, 郑力芬, 王美华. 染色质凝聚与细胞凋亡. 细胞生物学杂志, 1999, 21 (4):54-57.

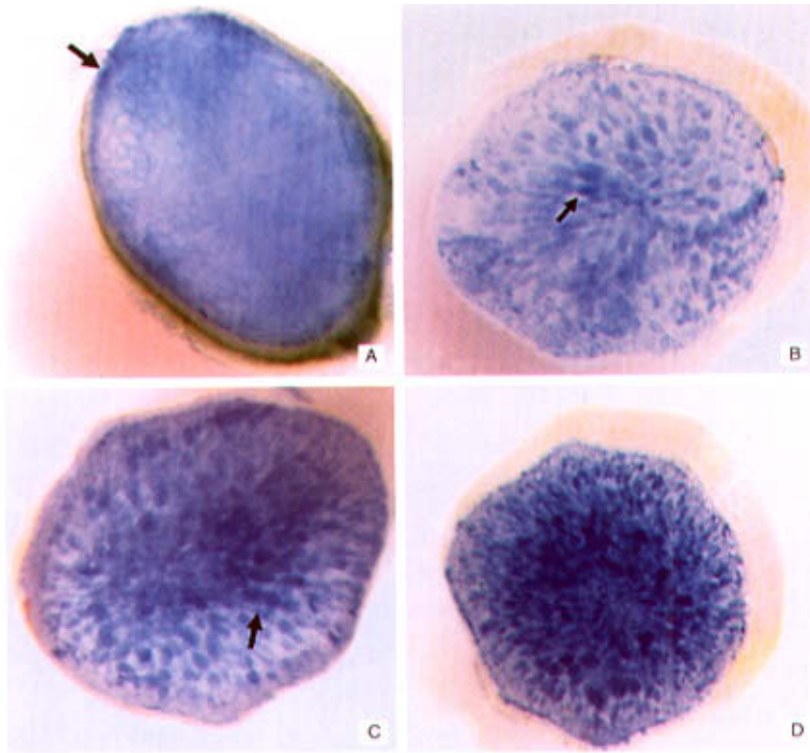
Yan Y L, Zheng L F, Wang M H. Chromatin condensation and apoptosis. *Cell Biology*, 1999, 21 (4): 54-57. (in Chinese)

[20] Li R, Lan S Y, Xu Z X. Programmed cell death in wheat during starchy endosperm development. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2004, 30(2):183-188.



水稻淀粉胚乳细胞核的超微结构。N. 细胞核。1. 4DAF 时正常的淀粉胚乳细胞核 (Bar=1.5 $\mu$ m); 2, 3. 5DAF 时变形的淀粉胚乳细胞核; 2. 核膜内陷形成沟槽 (箭头) (Bar=0.6 $\mu$ m); 3. 核膜向淀粉质体的间隙中凸出。染色质凝聚, 一些凝聚的染色质分布在核内 (Bar=1.7 $\mu$ m); 4. 6DAF 时淀粉胚乳细胞核膜破裂。一些凝聚的染色质附在核膜内表面上。空心箭头示一些凝聚的染色质正在穿越核膜破裂处。箭头示正在跨膜的小泡 (Bar=0.7 $\mu$ m); 5. 7 DAF 时核膜破裂片段化, 导致核质直接进入胞质 (空心箭头)。细胞核附近的胞质中分布一些泡状物 (箭头) (Bar=0.7 $\mu$ m); 6. 7DAF 时核解体产生凋亡小体 (空心箭头)。核膜破裂处分布许多小泡 (箭头) (Bar=1.7 $\mu$ m); 7. 8DAF 时凋亡小体 (空心箭头) 和核母体被淀粉质体分隔 (Bar=1.6 $\mu$ m)

Ultrastructure of the nucleus of starchy endosperm cells in rice; N. nucleus. 1. Starchy endosperm cell at 4DAF shows a normal nucleus (Bar=1.5 $\mu$ m); 2, 3. Starchy endosperm cells at 5DAF show nucleus deformation, 2. A groove (arrow) occurs owing to invaginations of the nuclear envelope (Bar=0.6 $\mu$ m); 3. The nuclear envelope protrudes into the interstices between amyloplasts. The chromatin is condensed and some distributes in the nucleus (Bar=1.7 $\mu$ m); 4. At 6DAF, the outer and the inner membrane of the nuclear envelope are disrupted. Some condensed chromatin abuts onto the inner surface of the nuclear envelope. Some chromatin is passing through the disrupted nuclear envelope (white arrow). A vesicle is going through the nuclear envelope (arrow) (Bar=0.7 $\mu$ m); 5. At 7DAF, cytoplasm and nucleoplasm communicate directly owing to nuclear envelope fragmentation (white arrow). Vacuole-shaped groups are present in the cytoplasm and close to the nucleus (arrow) (Bar=0.7 $\mu$ m); 6. At 7DAF, nucleus disintegration leads to formation of apoptotic bodies (white arrow). Vesicles appear at the site of nuclear envelope fragmentation (arrow) (Bar=1.7 $\mu$ m); 7. At 8DAF, apoptotic bodies (white arrow) and parent nucleus are separated from each other by amyloplasts (Bar=1.6 $\mu$ m)



不同发育时期水稻籽粒横切面的 Evans Blue 染色结果：图 A、B、C 和 D 中籽粒的取样时间分别为 9DAF、14DAF、24DAF 和 35DAF。被 Evans Blue 染成蓝色的区域显示死亡细胞区。图 A、B、C 和 D 的放大倍数分别为  $51.6 \times$ 、 $38.7 \times$ 、 $43.9 \times$  和  $41.3 \times$ 。Showing Evans Blue staining of cross-sections of developing rice grains; The grains are collected at 9DAF(A), 14DAF(B), 24DAF(C) and 35DAF(D), respectively. Cell death is indicated by the blue-staining areas. Magnifications are  $51.6 \times$  in A,  $38.7 \times$  in B,  $43.9 \times$  in C,  $41.3 \times$  in D.