

## 인삼 종자의 성숙과 후숙 과정에서 배유세포내 섬유소 가수분해효소의 분포 및 기능

劉成哲·金宇甲  
(高麗人學校 理科大學 生物學科)

## Localization and Function of Cellulase in Endosperm Cells of *Panax ginseng* Seeds during Maturation and After-ripening

Yu, Seong Cheol and Woo Kap Kim  
(Department of Biology, Korea University, Seoul)

### ABSTRACT

The active sites, intracellular transport, function of cellulase in association with the disintegration of the storage materials of the endosperm cells during seed maturation and after-ripening of *Panax ginseng* C.A. Meyer seeds were studied by electron microscopy. Cytochemical activities of the cellulase occurred in protein bodies and vesicles of endosperm cells in seed with red seed coat. In after-ripening seed, the activities were strongly found in the cell wall of endosperm near the umbiliform layer and on neighbouring vesicles, so it is assumed that these cells begin to be decomposed. Cellulase activities were initiated before the decomposition of storage materials. But, no activity was observed in the umbiliform layer, so it is suggested that cellulase lose its activity after the completion of lysis process.

### 서 론

종자의 성숙 및 발아과정에 있어胚의 지속적인 발달은胚乳細胞內 저장물질의 분해로써 이루어지며, 이러한 분해는 곧胚乳의 퇴행과정인 것으로 알려져 왔다(Bagley *et al.*, 1963; Briarty *et al.*, 1970; Brown and Morris, 1980; Torrent *et al.*, 1989). 또한 배유세포내 acid phosphatase (Poux, 1963; Bailey *et al.*, 1976; Yamagata *et al.*, 1979; Akiyama *et al.*, 1981; Gabard and Jones, 1986),  $\alpha$ -amylase (Ho, 1980; Jones and Jacobsen, 1983; Meirov and Jones, 1986), ATPase(Jones, 1987), lipase(Ory *et al.*, 1968) 등의 다양한加水分解酵素는胚發生 또는發芽時胚乳, 子葉 등의 저장양분인澱粉, 多糖類(mannan, xyloglucans, galactans), 蛋白質, 脂質 등을 분해시키므로써, 胚乳의 이동을 용이하게 하는 것으로 알려져 왔다(Meier and Reid, 1982; Higgins *et al.*, 1982; MacGregor *et al.*, 1984; Nielson and Liener, 1984). 그러나 이들 저장분해물질의 胚乳의 이동에

있어서는胚乳細胞壁의 분해작용이 반드시 수반되어야 할 것으로 추정되지만, 이러한 현상의 연구보고는 별로 이루어지지 않고 있다.

세포벽 가수분해효소의 하나인纖維素加水分解酵素(cellulase)의 세포화학적 연구는 Bal(1974)에 의해 처음 시도된 이래, 대마(Nessler and Mahlberg, 1981), 야자(Hasegawa and Smolensky, 1971; DeMason *et al.*, 1989), avocado (Scott *et al.*, 1963; Dallman *et al.*, 1989), 토마토(Dickinson and McCollum, 1964; Pharr and Dickinson, 1973) 등을 대상으로 이루어져 왔지만, 種子의胚乳細胞를 대상으로 수행한 연구는 이루어지지 않고 있다.

따라서 본 연구는人蔘(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 種子의成熟 및後熟과정에 있어서胚乳細胞에 존재하는 섬유소 가수분해효소의活性 및機能을 전자현미경을 이용한 세포화학적 방법을 통해 연구함으로써胚乳細胞內貯藏物質이胚乳로 이동하는 기작을 밝히는데 그 목적이 있다.

## 재료 및 방법

**실험재료.** 강화도산 4년생 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 홍숙종자와 채종 후 4°C에 보관된 미개갑 종자의 배를 포함한 배유조직을 실험재료로 사용하였다.

**섬유소 가수분해효소의 기질처리.** 해부현미경하에서 배를 포함한 배유조직을 채취하여 인산완충용액(pH 7.2)의 paraformaldehyde-glutaraldehyde(Karnovsky, 1965)에 1시간 전고정시킨 다음, 동일한 완충용액으로 수세하였다. Bal (1974)의 방법에 따라 시료를 0.002% carboxymethylcellulose 기질내에 15분간(22~25°C) 반응시킨 다음, 85~95°C의 Benedict 용액에서 5~10분간 반응시킨 후, 증류수로 수세하였다.

**전자현미경 시료 제작.** 기질처리된 시료는 1% 인산완충용액(pH 7.2)의 osmium tetroxide에서 1시간 후고정시켰으며 여러 차례 같은 완충용액으로 수세시킨 다음, ethanol-acetone series에서 탈수시켜 Epon 혼합액(Luft, 1961)과 Spurr 혼합액(Spurr, 1969)에 포매시켰다. 포매된 시료는 LKB-V형 초박절편기로 절편을 제작하여 methylene blue 또는 toluidine blue로 염색시켜 광학현미경으로 관찰한 후, uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 JEM 100 CX-II 투과전자현미경(80 kV)으로 관찰하였다.

## 결 과

**홍숙종자의 섬유소 가수분해효소의 분포.** 성숙 중인 홍숙종자의 배의 세포질에는 여러 개의 작은 액포가 나타났고, 구형의 핵이 뚜렷하게 관찰되었다. 배유는 다양한 단계의 성숙한 세포들로 구성되어 있는데 안쪽 세포들로부터 분해과정이 점진적으로 진행되었고, 배와 배유 사이의 제형층(umbiliform layer)에는 배유세포에서 유래된 염색상이 높은 점액으로 충만하였다(Fig. 1). 소포체에서 유래된 전자밀도가 낮은 소포들은 세포벽과 밀접하게 위치하였으며, 이와 구별되는 골지체에서 생성되는 구형의 작은 소포들이 시토플라즈마에 존재하였다(Fig. 2). 배유세포의 분해과정이 더욱 진행되면서 홍숙종자의 초기에 거의 나타나지 않았던 배유세포벽과 인접한 소포들은 점차적으로 전자밀도가 높게 나타났으며, 섬유소 가수분해효소의 활성은 세포벽과 인접한 세포질에 나타나기 시작하였다(Fig. 3). 또한 효소의 반응산물은 단백질체내 기질부위로 확산되었다(Fig. 4). 기질처리를 생략한 배유세포에는 반응산물이 나타나지 않았으며, 특히 단백질체내 구상체에서 전자밀도가 높은 단백질성 물질이 관찰되었다(Fig. 5). 기질을 처리한 처리구에서는 높은 전자밀도의 섬유소 가수분해효소의 반응산물이 단백질체의 구상체에서 관찰되었다(Fig. 6). 또한 대조구(Fig. 7)와 비교하여 처리구에서는 배유세포의 분해과정이

점진적으로 진행되면서 단백질체의 분해로 인한 섬유소 가수분해효소의 반응산물은 단백질체내 기질부위로 확산되었다(Fig. 8). 단백질체가 분해되고 세포내에 스페로솜이 남아있는 배유세포에서는 세포벽과 인접한 부위에서 염색상을 갖는 함유물이 관찰되었으며(Fig. 9), 대조구와 비교하여 처리구에서는 인접한 세포벽에 강한 반응산물이 균일하게 분포하였다(Fig. 10).

**미개갑종자의 섬유소 가수분해효소의 분포.** 후숙 중인 미개갑종자의 배유세포에서 섬유소 가수분해효소의 활성은 배유세포벽 전반에 걸쳐 나타나기 시작하였으며, 세포질내 효소 반응산물은 세포벽 주변부에 위치한 전자밀도가 다소 높은 소포에서 더욱 뚜렷하게 관찰되었다(Figs. 11, 12). 또한 분해 중인 단백질체와 스페로솜 주위를 따라 균일한 양성반응을 나타냈으며 원형질막과 세포벽에서도 반응산물이 관찰되었다(Fig. 13). 분해 중인 배유세포(Fig. 14, 왼쪽 세포)와 아직 분해과정이 진행되지 않은 배유세포(Fig. 14, 오른쪽 세포)에서는 전자밀도가 높은 소포들이 분해되지 않은 배유세포쪽의 세포벽과 밀접하게 관찰되었고, 처리구에서도 이와 동일한 부위에 강한 효소의 활성이 관찰되었으며 단백질체내에서도 반응산물이 나타났으나 분해과정이 거의 완료된 배유세포에서는 섬유소 가수분해효소의 활성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 15). 제형층과 인접한 배유세포에서 단백질체는 무정형을 이루었으며 스페로솜도 점차 유리되었다. 효소의 반응산물들은 배유세포의 원형질막 부근에 집중적으로 침전되었으며, 세포벽에 균일하게 분포하였다(Fig. 16). 제형층과 접한 배유세포의 세포벽은 점차적으로 분해되어 여러 층의 섬유상구조를 이루었고 셀룰로우스 미세섬유상이 관찰되었다(Fig. 17). 처리구에서, 분해되는 배유세포의 세포벽 내측과 제형층 쪽의 내강과 접한 세포벽에 균일한 효소의 활성이 나타났다(Fig. 18).

## 고 찰

종자의 배유세포는 성숙기로부터 발아기에 이르는 동안 세포내 저장물질을 가수분해시켜 배로 전이시킨다. 종자의 다양한 가수분해효소는 배유세포내 저장물질의 이동을 용이하게 한다(Nielsen and Liener, 1984). 특히 종자의 발아시, 이들 가수분해효소는 배유의 저장물질을 분해하여 배의 성장에 필요한 에너지 원을 공급하는 것으로 알려져 있다. Maycox 등(1988)은  $\alpha$ -D-mannosidase의 활성이 종자형성시기에 단백질체에 나타난다고 하였다.

DeMason 등(1989)은 胚乳細胞壁 자체에 양분을 축적하는 대추야자(*Phonex dactylifera*)의 배유는 발아시 가수분해효소의 활성으로 세포벽의 소실을 가져오지만, 대부분 종자의 배유세포는 저장물질의 분해와 더불어 세포벽의

분해작용이 동시에 수반되어야만 배로의 저장물질의 이동이 원활하게 이루어진다고 하였다.

섬유소 가수분해효소는 섬유소의 분해에 있어 가장 중요한 역할을 담당하는 효소로서 세포의 성장과 분화의 조절작용에 관여한다(Sheldrake, 1970). Avocado(Scott *et al.*, 1963; Dallman *et al.*, 1989), 토마토(Dickinson and McCollum, 1964; Pharr and Dickinson, 1973), 야자(Hasegawa and Smolensky, 1971) 등을 대상으로 수행된 연구 결과로써 이 효소는 과실의 숙성에도 관여하는 것으로 알려졌다. 섬유소 가수분해효소는 avocado 과실에 있어서 수경 초기에 그 활성이 미약하였으나(Awad and Young, 1979), 수확 후 과실의 숙성시기에 그 활성은 급격히 증가한다고 알려졌다(Scott *et al.*, 1963; Awad, 1977). Verma 등(1975)은 완두에서 섬유소 가수분해효소의 활성이 주로 원형질막과 세포벽 사이에서 나타났으며, 골지체는 이에 관여하지 않는다고 하였고, avocado에서 이 효소의 활성이 소포체, 원형질연락사, 세포벽, 핵 등에서 나타난다고 하였다.

인삼의 배유세포는 채종 이전의 홍숙시기에 세포벽과 단백질체에서 약한 활성을 나타내었고, 단백질 기질로 이루어진 단백질체와 구상체내의 전자밀도가 높은 함유물에 섬유소 가수분해효소의 활성이 확인되었으며 미개갑종자의 배유세포는 세포벽과 원형질막 사이에서 활성을 나타내었다. 이는 홍숙시기에 저장단백질과 함께 섬유소 가수분해효소도 단백질체에 분포하며, 배유세포의 분해가 시작되는 시기에 섬유소 가수분해효소의 활성은 세포벽과 인접한 소포에 강하게 나타나는 것으로 보아 이는 섬유소 가수분해효소가 세포벽을 분해시키기 위하여 이동되는 것으로 생각된다.

완두(Verma *et al.*, 1975)에서 섬유소 가수분해효소는 막성폴리솜에 의해 합성되고 소포체와 연관이 있으며 주로 원형질막과 세포벽 사이에 축적되는데 반응산물은 세포벽이 퇴화되는 위치에 축적되나, 골지체나 미소관은 이에 관여하지 않는다고 하였다. Avocado의 경우 섬유소 가수분해효소의 활성은 소포체, 원형질연락사, 세포벽, 그리고 핵에서도 나타났는데, 골지체를 통하여 이동되며 소포체로부터 세포벽쪽으로의 이동은 원형질연락사를 통하여 일어난다고 하였다(Dallman *et al.*, 1989). 본 연구에서는 잘 발달한 소포체에서 생성된 전자밀도가 낮은 소포들이 세포벽과 인접하여 위치하였는데, 이는 점차적으로 전자밀도가 높게 나타났으며 동일한 부위에서 섬유소 가수분해효소의 활성이 강하게 나타나는 것으로 보아 이 소포체의 소포들은 비단 저장물질의 세포벽쪽으로의 이동 뿐만 아니라 새로운 섬유소 가수분해효소의 생성 및 이동에도 관여하는 것으로 생각되었다. 그리고, 단백질 기질로서 이루어진 단백질체보다는 구상체를 함유한 단백질체에서 주로 나타나는 전자밀도가 높은 함유물에서도 섬유소 가수분해

효소의 활성이 관찰되었다. 이는 소포체에 의해 이루어진 단백질체 형성시기에 합성된 섬유소 가수분해효소가 종자 성숙시기를 거치는 동안 다른 가수분해효소와 함께 활성을 보이는 것으로 생각되었다. 원형질막과 세포벽에서 활성을 보인 섬유소 가수분해효소는 성숙시기 동안 그 양이 증가하여 다량의 반응산물을 세포벽에 축적시키는 것이 관찰되었으며, 단백질체와 스페로솜 주변부에서 활성을 보였던 소량의 섬유소 가수분해효소는 점차적으로 제형층쪽을 향한 세포벽과 접한 원형질막으로 이동하는데 이미 가수분해의 작용으로 저장물질의 분해가 진행 중인 배유세포보다는 분해 이전 상태를 유지하는 배유세포의 원형질막에 반응산물이 다량으로 축적됨이 관찰되는 등 섬유소 가수분해효소는 다른 가수분해효소에 의해 분해된 저장단백질과 함께 원형질막에 막성단백질 형태로 축적되었고, 퇴화 과정이 진행됨에 따라 그 양상이 다양하게 나타남이 확인되었다.

일반적으로 숙성과정에서 과실의 "softening"은 펙틴 가수분해효소의 활성과 관련이 있다고 믿었으며(Biale and Young, 1971), 섬유소 가수분해효소가 세포벽의 변성을 유도함으로써 과실의 숙성에 중요한 역할을 한다고 하였다(Bennett and Christofferson, 1986). 인삼 종자의 배유세포는 퇴행과정이 진행 됨에 따라 세포내의 단백질체는 무정형을 이루었고, 스페로솜도 유리되었다. 또한, 제형층과 접한 세포벽은 점진적으로 분해되어 다층의 셀룰로오스 미세섬유상을 이루었다. 또한 효소의 활성은 배유세포의 분해과정 동안 더욱 증가되어 다량의 반응산물을 세포벽에 축적시키고 있었으며, 분해가 완료된 제형층의 세포벽은 섬유소 가수분해효소의 활성을 나타내지 않았고, 분해 중인 세포벽은 그렇지 않은 외부층의 세포벽에 비해서 강한 활성을 나타내었다. 이러한 양상은 후숙이 진행됨에 따라 점차 외부층의 배유세포에 까지 점진적으로 진행되었다. 이는 섬유소 가수분해효소가 세포벽의 변성을 유도하고 결국 세포벽의 분해를 초래하여 배유세포의 저장물질이 제형층을 통하여 배로 흡수되기 위한 필연적인 결과로 사료된다.

## 적 요

인삼 종자의 성숙과 후숙과정에 있어서 배유세포내 저장물질의 분해에 관여하는 섬유소 가수분해효소의 활성부위, 이동경로, 작용기작 등을 전자현미경을 사용한 세포화학적 방법을 이용하여 규명하였다. 섬유소 가수분해효소의 세포화학적 활성은 홍숙종자에 있어서는 단백질체와 소포에서 나타났으나, 후숙과정 중인 종자에 있어서는 제형층과 가까이 위치한 배유세포의 세포벽과 그 주변에 위치한 소포에 강한 활성을 나타냄으로써 이곳의 세포부터 먼저 분

해가 일어나고 있음을 확인할 수 있었고, 저장물질의 분해가 시작되기 전에 섬유소 가수분해효소의 활성이 먼저 나타나는 것을 알 수 있었다. 반면에 제형층에는 전혀 활성이 나타나지 않음으로써 배유세포의 분해과정이 완전히 이루어지면 섬유소 가수분해효소는 그 활성을 잃는 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Akiyama, T., H. Uchimiya and H. Suzuki. 1981. Gibberellic acid-induced increase in activity of a particular isozyme of acid phosphatase in wheat half seeds. *Plant Cell Physiol.* **22**: 1023-1028.
- Awad, M. and R.E. Young 1979. Postharvest variation in cellulase, polygalacturonase, and pectinmethylesterase in avocado (*Persea americana* Mill., cv. Fuerte) fruit in relation to respiration and ethylene production. *Plant Physiol.* **64**: 306-308.
- Awad, M. 1977. Variation in cellulase content of Fuerte avocado fruit after harvest. *Hort. Science* **12**: 406.
- Bagley, B.W., J.H. Cherry, M.L. Rollins and A.M. Altsxhul. 1963. A study of protein bodies during germination of peanut (*Arachis hypogaea*) seed. *Am. J. Bot.* **50**: 523-532.
- Bailey, K.M., I.D.J. Phillips and D. Pitt. 1976. Effects of gibberellic acid on the activation, synthesis and release of acid phosphatase in barley seed. *J. Exp. Bot.* **27**: 324-333.
- Bal, A. 1974. Cellulase. In, *Electron Microscopy of Enzyme*, M. Hayat (ed.), Vol. 3, Van Nostrand Reinhold Co., New York, pp. 68-79.
- Bennett, A.B. and R.E. Christoffersen. 1986. Synthesis and processing of cellulase from ripening avocado fruit. *Plant Physiol.* **81**: 830-835.
- Biale, J.B. and R.E. Young. 1971. The avocado pear. In, *The Biochemistry of Fruits and Their Products*. A.C. Hulme (ed.), Vol. 2, Academic Press, London, pp. 1-63.
- Briarty, L.G., D.A. Coult and D. Boulter. 1970. Protein bodies of germinating seeds of *Vicia faba*. Changes in fine structure and biochemistry. *J. Exp. Bot.* **21**: 513-524.
- Brown, H.T. and G.H. Morris. 1980. Researches on the germination of some Gramineae. *J. Chem. Soc. Trans.* **57**: 458-528.
- Dallman, T.F., W.W. Thomson, I.L. Eaks and E.A. Northnagal. 1989. Expression and transport of cellulase in avocado mesocarp during ripening. *Protoplasma* **151**: 33-46.
- DeMason, D.A., K.N. Chandra Sekhar and M. Harris. 1989. Endosperm development in the date palm (*Phoenix dactylifera*). *Am. J. Bot.* **76**: 1255-1265.
- Dickinson, D.B. and J.P. McCollum. 1964. Cellulase in tomato fruits. *Nature* **203**: 525-526.
- Gabard, K.A. and R.L. Jones. 1986. Localization of phytase and acid phosphatase isoenzymes in aleurone layers of barley. *Physiol. Plant.* **67**: 182-192.
- Hasegawa, S. and D.C. Smolensky. 1971. Cellulase in dates and its role in fruit softening. *J. Food Sci.* **33**: 588-591.
- Higgins, T.J.V., J.V. Jacobsen and J.A. Zwar. 1982. Gibberellic acid and abscisic acid modulate protein synthesis and mRNA levels in barley aleurone layers. *Plant Mol. Biol.* **1**: 191-215.
- Ho, D.H. 1980. Hormonal and genetic regulation of  $\alpha$ -amylase synthesis in barley aleurone cells. In, *Genome Organization and Expression in Plants*, C. J. Leaver (ed.), Plenum Press, New York, pp. 147-157.
- Jones, R.L. 1987. Localization of ATPase in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of barley aleurone. *Protoplasma* **138**: 73-88.
- Jones, R.L. and J.V. Jacobsen. 1983. Calcium regulation of the secretion of  $\alpha$ -amylase isoenzymes and other proteins from barley aleurone layers. *Planta* **158**: 1-9.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **27**: 137-138.
- Luft, J.H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**: 409-414.
- MacGregor, A.W., F.H. MacDougall, C. Mayer and J. Dausant. 1984. Changes in levels of  $\alpha$ -amylase components in barley tissues during germination and early seedling growth. *Plant Physiol.* **75**: 203-206.
- Maycox, P.R., J. Burgess, S.E. Marcus and D.J. Bowles. 1988. Studies on  $\alpha$ -D-mannosidase and Con-A during jack bean development and germination. *Protoplasma* **144**: 34-45.
- Meier, H. and J.S.G. Reid. 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In, *Encyclopedia of Plant Physiology*, F.A. Loewus and W. Tanner (eds.), Vol. 13A, Plant carbohydrates. Springer-Verlag, Berlin, New York. pp. 418-471.
- Melroy, D. and R.L. Jones. 1986. The effect of monensin on intracellular transport and secretion of  $\alpha$ -amylase isoenzymes in barley aleurone. *Planta* **167**: 252-259.
- Nessler, C.L. and P.G. Mahlberg. 1981. Cytochemical localization of cellulase activity in articulated, anastomosing laticifers of *Papaver somniferum*. *Am. J. Bot.* **68**: 730-732.
- Nielsen, S.S. and I.E. Liener. 1984. Degradation of the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* during germination. *Plant Physiol.* **74**: 494-498.
- Ory, R.L., L.Y. Yats and H.W. Kircher. 1968. Association of lipase activity with the spherosomes of *Ricinus communis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **24**: 255-264.
- Pharr, D.M. and D.B. Dickinson. 1973. Partial characterization of cellulase and cellobiose from ripening tomato fruits. *Plant Physiol.* **51**: 577-583.
- Poux, N. 1963. Localisation des phosphates et de la phos-

- phatase acide dans les cellules des embryons de blé (*Triticum vulgare* Vill.) lors de la germination. *J. Microscopie* **2**: 557-568.
- Scott, F.M., B.G. Bystrom and F. Bowler. 1963. *Persea americana*, meso-carp cell structure; Light and electron microscope study. *Bot. Gaz.* **124**: 423-428.
- Sheldrake, A.R. 1970. Cellulase and cell differentiation in *Acer pseudoplatanus*. *Planta* **95**: 167-178.
- Spurr, A. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **26**: 31-34.
- Torrent, M., I. Geli and M.D. Ludevid. 1989. Storage-protein hydrolysis and protein-body breakdown in germinated *Zea mays* L. seeds. *Planta* **180**: 90-95.
- Verma, D.P.S., G.A. Maclachlan, H. Byrne and D. Ewings. 1975. Regulation and *in vitro* translation of messenger ribonucleic acid for cellulase from auxin-treated pea epicotyls. *J. Biol. Chem.* **250**: 1019-1026.
- Yamagata, H., K. Tanaka and Z. Kasai. 1979. Isoenzymes of acid phosphatase in aleurone particles of rice grains and their interconversion. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 2059-2066.

(1993. 8. 14 接受)

### Explanation of Figures

Fig. 1. Light micrograph of the seed showing embryo (Em), endosperm (En) and umbiliform layer (UL). Bar indicates 100  $\mu$ m.

Figs. 2~18. Electron micrographs of ginseng endosperm. Bars indicate 1.0  $\mu$ m. Fig. 2. Adjacent portion of cell wall (CW), electron-lucent vesicles (arrows) are located in associated with the rough endoplasmic reticulum (RER). Vesicles produced the Golgi complex (G) appear on the cytosol. M, mitochondria; S, spherosome. Fig. 3. The uniform cytochemical reaction products (arrows) along the endosperm cell wall (CW) appeared. PB, protein body; S, spherosome. Fig. 4. Cytochemical reaction products (arrows) appear on the cell wall (CW) and the digesting protein body (PB). S, spherosome. Fig. 5. Control showing absence of the cytochemical reaction product on the endosperm cell. A few electron-densed inclusions (arrows) are observed in the globoid within the protein bodies (PB). S, spherosome. Fig. 6. Strong reaction products (arrows) in the protein bodies (PB) surrounded with numerous spherosome (S). N, nucleus. Fig. 7. Control showing absence of the reaction product on the digesting protein body (PB). S, spherosome. Bar indicates 0.5  $\mu$ m. Fig. 8. Some reaction products (arrows) distributed in the digesting protein body (PB). S, spherosome. Fig. 9. Control showing absence of the reaction product on the endosperm cell wall (CW) and the cytoplasm. S, spherosome. Fig. 10. Uniform cytochemical reaction products (arrows) beneath the cell wall (CW) appeared. S, spherosome. Fig. 11. Vesicles with cytochemical reaction product (arrows) occur in vicinity of plasma membrane. CW, cell wall; S, spherosome. Fig. 12. Strong reaction products (arrows) appeared on the vesicles near the cell wall (CW) and on the cell wall surface. Fig. 13. Cytochemical reaction product appear on the plasma membrane and some protein bodies (PB) surrounded with spherosomes (S). Abundant reaction products are shown beneath the cell wall (CW) surface of endosperm cell. Fig. 14. Control showing the electron-densed vesicles distributed beneath the cell wall (CW). PB, protein body; S, spherosome. Fig. 15. The endosperm cells showing the cytochemical reaction products distributed beneath the cell wall (CW) surface. Note the difference of enzyme activity between two cells. PB, protein body; S, spherosome. Fig. 16. Cytochemical reaction products are along the plasma membrane area of the endosperm cell. CW, cell wall; PB, proyrin body. Fig. 17. Several layers of the deformed cell wall (CW) and the cellulose microfibril (arrows) are observed. Fig. 18. Endosperm cells of the umbiliform layer (UL) showing uniformity of cytochemical reaction products (arrows) in periclinal wall area facing the cavity. S, spherosome.









