

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2008.01608

## 外源一氧化氮供体硝普钠对小麦种子萌发早期 $\beta$ -淀粉酶及其亚细胞分布的影响

孙永刚\*\* 凌腾芳\*\* 王家杰 徐 晟 宣 伟 汤国辉 沈文飏\*

(南京农业大学生命科学学院, 江苏南京 210095)

**摘 要:** 采用药理学和生物化学实验技术, 研究了外源一氧化氮(nitric oxide, NO)供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)处理对小麦种子萌发早期  $\beta$ -淀粉酶及其亚细胞分布的影响。 $\beta$ -淀粉酶的专一性抑制剂  $\alpha$ -环糊精可以明显抑制 0.5 mmol L<sup>-1</sup> SNP 诱导的小麦种子萌发, SNP 还能诱导自由型  $\beta$ -淀粉酶活性, 上调  $\beta$ -淀粉酶基因转录本的水平。Western blotting 结果发现, SNP 处理可以增加  $\beta$ -淀粉酶蛋白的表达; 运用 NO 专一性清除剂 cPTIO 及转录抑制剂放线菌素 D 可以逆转上述转录本和蛋白水平的变化。免疫电镜亚细胞定位证实小麦胚内的  $\beta$ -淀粉酶主要定位于蛋白储藏体内, 并可能附着在淀粉粒上, SNP 处理增加了  $\beta$ -淀粉酶蛋白的分布。推测外源 NO 供体 SNP 在小麦种子萌发早期不仅提高了自由型  $\beta$ -淀粉酶的活性, 还可能诱导了  $\beta$ -淀粉酶的重新合成。

**关键词:** 一氧化氮;  $\beta$ -淀粉酶; 转录调控; 亚细胞定位; 小麦种子

## Effects of Exogenous Nitric Oxide Donor Sodium Nitroprusside on $\beta$ -Amylase and Its Subcellular Localization during Early Stage of Seed Germination in Wheat

SUN Yong-Gang\*\*, LING Teng-Fang\*\*, WANG Jia-Jie, XU Sheng, XUAN Wei, TANG Guo-Hui, and SHEN Wen-Biao\*

(College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

**Abstract:** Nitric oxide (NO) is an important signaling molecule with diverse physiological functions in plants. NO can break dormancy of seeds, and promote seeds germination under various stresses and normal growth conditions. In this report, treatment with 0.5 mmol L<sup>-1</sup> sodium nitroprusside (SNP) promoted seeds germination by increasing  $\beta$ -amylase activity, while the application of  $\alpha$ -cyclodextrin, a specific inhibitor of  $\beta$ -amylase, could apparently inhibit the process induced by SNP. Semi-quantitative RT-PCR analysis indicated that the application of SNP induced the free  $\beta$ -amylase activity, and up-regulated  $\beta$ -amylase transcript. Western-blotting result showed that SNP increased the protein level of  $\beta$ -amylase, whereas the cPTIO (a specific scavenger of NO) and actinomycin-D (a transcriptional inhibitor) reversed changes in transcriptional and the protein levels mentioned above. Subcellular localization studies of proteins via immunoelectron microscopy technique illustrated that SNP could increase the quantity of  $\beta$ -amylase which was predominantly located in protein storage vacuole, and adhered to starch granules. The above results suggest that SNP might not only enhance the activity of free  $\beta$ -amylase, but also induce the  $\beta$ -amylase synthesis *de novo* at the early stage of wheat seed germination.

**Keywords:** Nitric oxide;  $\beta$ -amylase; Transcriptional regulation; Subcellular localization; Wheat seeds

谷类作物种子萌发所需的物质和能量完全来源于自身储存物质的动员, 这一过程一直持续到幼苗开始进行光合作用为止<sup>[1-2]</sup>。通常, 储存物质的动员

需要各种水解酶的参与。正常成熟的小麦种子内没有  $\alpha$ -淀粉酶的存在, 它是在萌发过程中受到 GA 的诱导而生, 并在萌发早期对 GA 无响应<sup>[3]</sup>。与  $\alpha$ -

基金项目: 国家自然科学基金项目(30471049); 江苏省青年科技创新人才学术带头人项目(BK2004417)

作者简介: 孙永刚(1981-), 男, 内蒙古人, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学。\*\*共同第一作者。

\*通讯作者(Corresponding author): 沈文飏。Tel: 025-84398602; E-mail: wbshenh@njau.edu.cn

Received(收稿日期): 2007-12-20; Accepted(接受日期): 2008-03-26.

淀粉酶不同,  $\beta$ -淀粉酶是在种子成熟过程中积累, 且主要以无活性的结合态形式存在<sup>[4]</sup>。Nandi 等<sup>[5]</sup>认为  $\beta$ -淀粉酶在种子萌发早期起着重要的作用。在种子萌发过程中, 无活性的  $\beta$ -淀粉酶聚合体在蛋白水解酶的作用下, 释放出有活性的游离单体, 进而水解淀粉等多糖物质以供胚的生长发育。免疫定位技术的结果证实, 旋花科植物<sup>[6]</sup>根茎细胞质中的  $\beta$ -淀粉酶还具有植物储藏蛋白的功能, 在甘薯块根<sup>[6]</sup>和苹果<sup>[7]</sup>的研究中发现  $\beta$ -淀粉酶主要分布于其功能区域, 这证实了在植物活细胞或至少是活营养细胞中普遍存在着催化淀粉水解的  $\beta$ -淀粉酶。Qin 等<sup>[6]</sup>认为  $\beta$ -淀粉酶活性的升高主要是由于  $\beta$ -淀粉酶蛋白表达量的增加, 也说明  $\beta$ -淀粉酶可能参与了淀粉的水解。有趣的是, 有研究发现大麦中游离和结合态  $\beta$ -淀粉酶的催化能力远超过萌发的需要, 这种现象的存在对于植物生长发育过程中物质能量的经济利用是难以解释的<sup>[8]</sup>。而水稻  $\beta$ -淀粉酶缺失体品种“日本晴”的种子萌发并未受到明显的影响<sup>[9]</sup>。 $\beta$ -淀粉酶在活细胞中确实经常定位于叶绿体或质体之外, 与催化反应的底物在空间上分离<sup>[7]</sup>, 因此至今尚不能完全确定该酶在植物体内的具体生理功能。

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种新发现的植物生长调节物质<sup>[10-13]</sup>。许多证据表明, NO 信号在种子萌发过程中起着重要的作用<sup>[14-15]</sup>。Bethke 等的研究发现 NO 可能作为一种信号分子参与打破种子休眠的过程。此外, 我们发现外源 NO 供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)处理能够明显提高逆境和正常条件下植物种子的萌发<sup>[16-17]</sup>, 并可诱导  $\beta$ -淀粉酶的活性, 且与 GA 无关<sup>[18]</sup>。在此基础上, 本文进一步探索了 SNP 处理对小麦(*Triticum aestivum* L.)种子  $\beta$ -淀粉酶活性、蛋白和转录本变化的影响, 并结合免疫电镜技术进行了该酶在亚细胞水平上的定位及不同处理后的分布情况, 以期对种子生理研究提供进一步的知识。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与处理

选择整齐一致的扬麦 158 种子, 用 0.5%次氯酸钠消毒 5 min, 自来水快速冲洗, 晾干后分别进行 SNP(0.5 mmol L<sup>-1</sup>)、 $\beta$ -巯基乙醇(15 mmol L<sup>-1</sup>, 用 B 表示)处理, 以蒸馏水处理为对照。各清除剂或抑制剂的处理浓度为 NO 清除剂 2,4-羧基苯-4,4,5,5-四甲基咪唑-1-氧-3-氧化钾盐[2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,

5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide potassium salt, cPTIO] 100  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>;  $\beta$ -淀粉酶专一抑制剂  $\alpha$ -环糊精( $\alpha$ -cyclodextrin,  $\alpha$ -CD) 20 mmol L<sup>-1</sup>; 转录抑制剂放线菌素 D(actinomycin-D, ACD) 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>。

### 1.2 发芽试验

将处理后的种子播于铺有滤纸的培养皿内, 每个处理设 3 个重复, 每个重复 50 粒种子, 在培养箱内 25℃催芽, 每 12 h 记录一次发芽率, 3 次重复, 以根长达到种子总长为发芽标准。

### 1.3 淀粉及淀粉酶的提取与测定

按照李合生等<sup>[19]</sup>的方法提取和测定种子中淀粉含量。采用 3,5-二硝基水杨酸法<sup>[19]</sup>测定  $\alpha$ -淀粉酶和总淀粉酶的活性, 以 37℃、pH 6.8 条件下, 每分钟水解淀粉生成 1 mg 还原糖所需的酶量为 1 个淀粉酶活性单位(U)。

参照凌腾芳<sup>[20]</sup>的方法测定自由型及结合型  $\beta$ -淀粉酶活性和蛋白质含量, 并略有改动。取 5 粒种子, 用 0.1 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 2 mL(含 1 mmol L<sup>-1</sup> EDTA)溶液在 20℃下研磨成匀浆, 12 000 $\times$ g 离心 30 min, 收集上清液, 沉淀用提取液悬溶、离心, 并收集上清液; 重复一次, 合并上清液(含自由型  $\beta$ -淀粉酶)共 6 mL。剩余沉淀以 50 mmol L<sup>-1</sup> 醋酸缓冲液(含 0.5%木瓜蛋白酶, pH 5.0) 4 mL 于 30℃下提取 30 min, 12 000 $\times$ g 离心 30 min, 上清液含结合型  $\beta$ -淀粉酶。将适度稀释的酶液 10  $\mu$ L 与 20  $\mu$ L 底物硝基苯酚麦芽五糖和辅助酶  $\alpha$ -葡萄糖苷酶混合, 40℃温浴反应 4 min, 以 0.25 mol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 300  $\mu$ L 溶液中中止反应, 在 410 nm 处测定反应产物的吸光值。反应产物对硝基苯酚的摩尔消光系数为 17 800, 以每分钟产生 1  $\mu$ mol 对硝基苯酚所需的酶量为一个酶活单位(U)。

### 1.4 NO 含量的测定

参照 Xu 等<sup>[21]</sup>的比色法测定 NO 的含量。

### 1.5 RNA 提取及 $\beta$ -淀粉酶基因的 RT-PCR 反应

用 Trizol 试剂(Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)提取不同处理种子内的总 RNA, 按产品说明书进行 RNA 的反转录, RNA 的用量大约为 4  $\mu$ g。为了使结果标准化, 以 18S rRNA 基因(NCBI 登录号: AJ272181)的相对丰度作为内参。内参及  $\beta$ -淀粉酶基因(NCBI 登录号: AF470353)引物序列分别为 18S rRNA-f: 5'-CAAGCCATCGCTCTGGATACATT-3'; 18S rRNA-r: 5'-CTGTATTGCCTCAAACCTCC-3';  $\beta$ -amylase-f: 5'-TGAGCAGGGGAGGTTTTTC-3';  $\beta$ -amylase-r: 5'-TAGCACGGTGCCTTTTGAG-3'。18S rRNA 基因和  $\beta$ -淀粉酶基因转录本扩增的长度分别为 658 bp 和 245 bp。以

cDNA 为模板用上述引物进行 PCR, 循环次数根据能否获得最显著的条带, 且未饱和来进行调整。PCR 反应使用 2%琼脂糖凝胶电泳后 EB 染色, 拍照记录。

### 1.6 $\beta$ -淀粉酶的 Western blot 实验

参照 Laemmli<sup>[22]</sup>的方法进行 SDS-PAGE, 参照 Evan 等<sup>[23]</sup>的方法进行 Western blot, 并略做改动。蛋白样品经 SDS-PAGE(T=12.5%)电泳(上样量为 30  $\mu$ g 蛋白质)后, 一块胶用于转移, 另一块胶进行考马斯亮蓝染色, 并作为相同上样量的参照。进一步将蛋白转移至 PVDF(0.45  $\mu$ m)膜上, 以 3%牛血清白蛋白(BSA)封闭过夜, 用适度稀释的一抗(澳大利亚 Tasmania 大学 Evan 博士惠赠)溶液孵育, 再经羊抗兔二抗(1:500)孵育, 二氨基联苯胺(DAB)显色。

### 1.7 免疫电镜观察

参照 Wang 等<sup>[7]</sup>的方法, 略加改进。将各处理的小麦胚切成 2~3 mm<sup>3</sup> 的小块, 迅速投入已预冷的 1%多聚甲醛和 1%戊二醛[由 100 mmol L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(PBS)制成, pH 7.4]的混合固定液中, 4 $^{\circ}$ C 下固定 18 h, 然后以含 0.9% NaCl 的 PBS 清洗, 再将样品置 TPBS(PBS 添加 0.05% Tween-20)稀释的 3% BSA 封闭液室温封闭 2 h, 之后样品不经清洗直接置 TPBS 稀释的  $\beta$ -淀粉酶抗体(一抗)中, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 再以 TPBS 充分清洗(3 次, 每次 10 min), 转入 PBS 稀释的 3%过氧化氢溶液中孵育 10 min, 以去除内源过氧化物酶, 再次用 TPBS 清洗, 然后投入 TPBS 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗中 4 $^{\circ}$ C 过夜, 以 TPBS 充分清洗, DAB 染色 5 min。样品经 TPBS 和双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)洗涤后, 2%锇酸室温染色 30 min, 清洗后经乙醇系列脱水、包埋、切片, 最后进行透射电镜观察。为了检验免疫定位的特异性和可靠性, 设两种不同的对照, 即以 BSA 代替  $\beta$ -

淀粉酶抗体以检验一抗的特异性, 以及未孵育一抗而进行后继操作以检测二抗的非特异性标记, 试验 3 次重复。

### 1.8 统计分析

用 Microsoft Excel 2000 分析数据, 采用 *t* 测验法检验同一时间点数据的显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\alpha$ -环糊精对 SNP 诱导种子萌发的影响

与对照相比, SNP 处理 24 h 后显著( $P < 0.05$ )提高小麦种子的萌发率和发芽速率; SNP 与  $\beta$ -淀粉酶专一性抑制剂  $\alpha$ -环糊精共同处理明显降低 SNP 对早期小麦种子萌发的诱导效应(图 1)。此外,  $\alpha$ -环糊精单独处理极显著( $P < 0.01$ )抑制小麦种子的萌发。

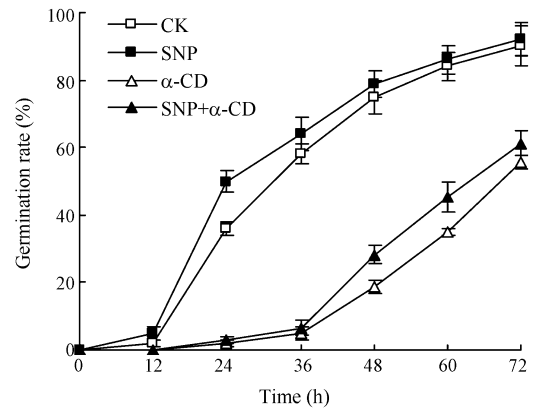


图 1 SNP 和  $\alpha$ -CD 对小麦种子萌发的影响

Fig. 1 Effects of SNP and  $\alpha$ -CD on seed germination in wheat

### 2.2 SNP 处理对小麦种子早期淀粉含量和总淀粉酶活性的影响

图 2 显示, SNP 处理提高了萌发早期种子内总淀粉酶的活性, 处理 6 h 时达显著水平( $P < 0.05$ )(图 2-A), 但在处理 12 h 内, 几乎检测不到  $\alpha$ -淀粉酶的

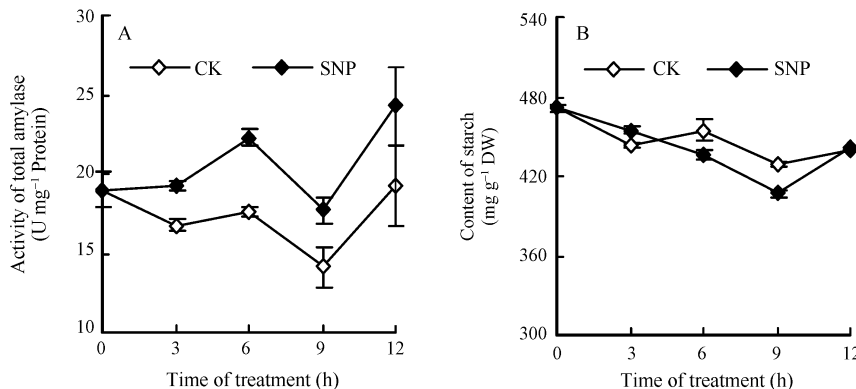


图 2 SNP 对萌发早期小麦种子淀粉酶活性(A)和总淀粉含量(B)的影响

Fig. 2 Effects of SNP on contents of total amylase activity (A) and starch (B) in seeds at early stage of germination

活性(具体数据未列出); 并且促进了种子中淀粉的降解, 处理 9 h 后与对照差异显著( $P < 0.05$ )(图 2-B)。

### 2.3 不同处理对萌发前期小麦种子中 NO 含量的影响

图 3 表明, 种子内 NO 含量在 SNP 处理 6 h 后显著提高( $P < 0.05$ ), NO 专一性清除剂 cPTIO 与 SNP 共同处理后种子中 NO 浓度则降低至对照水平( $P > 0.05$ )。cPTIO 单独处理种子及  $\beta$ -巯基乙醇的各种处理(B 和 B+cPTIO)后, NO 浓度与对照相比没有显著变化( $P > 0.05$ )。

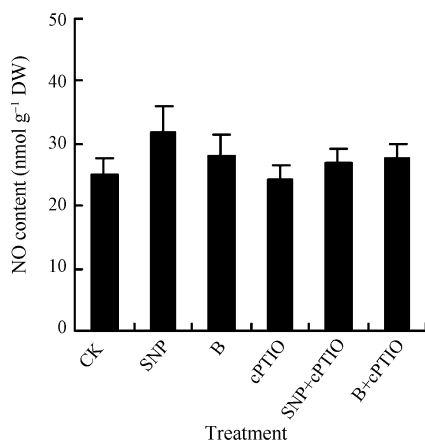


图 3 不同处理对萌发早期种子中 NO 含量的影响

Fig. 3 Effects of different treatments on NO content in seeds at early stage of germination

### 2.4 小麦种子萌发前期不同处理对 $\beta$ -淀粉酶的影响

SNP 和  $\beta$ -巯基乙醇处理 6 h 后均显著( $P < 0.05$ )提高种子中自由型  $\beta$ -淀粉酶的活性(图 4)。同对照相比, SNP 处理没有显著降低结合型  $\beta$ -淀粉酶的活性, 而  $\beta$ -巯基乙醇则使其降低, 原因可能是还原剂  $\beta$ -巯基乙醇通过破坏以多聚体形式存在无活性的结合型  $\beta$ -淀粉酶, 进而释放出有活性的自由型  $\beta$ -淀粉酶, 最终提高了  $\beta$ -淀粉酶活性。应用 NO 特异性的清除剂 cPTIO 能够消除 SNP 对自由型  $\beta$ -淀粉酶活性的提高, 而对  $\beta$ -巯基乙醇则没有作用, 同时 cPTIO 单独处理对小麦种子的  $\beta$ -淀粉酶活性没有明显影响, 暗

示 SNP 诱导的自由型  $\beta$ -淀粉酶活性与 NO 有关, 而  $\beta$ -巯基乙醇的作用则与 NO 无关。

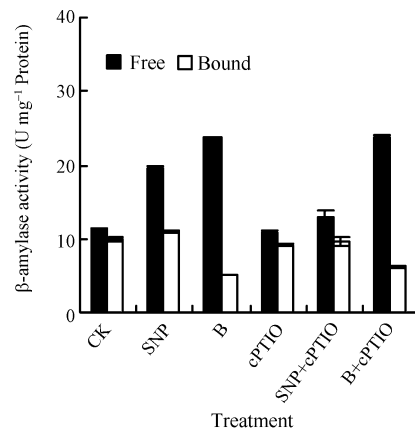


图 4 不同处理对萌发早期种子内自由型和结合型  $\beta$ -淀粉酶活性的影响

Fig. 4 Effects of different treatments on the activities of free and bound  $\beta$ -amylase in seeds at early stage of germination

### 2.5 不同处理对种子萌发早期 $\beta$ -淀粉酶基因表达的影响

半定量 RT-PCR 结果表明(图 5), SNP 处理 6 h 后小麦种子中的  $\beta$ -淀粉酶基因表达上调, 外源 NO 供体 SNP 与 NO 的特异性清除剂 cPTIO 共同处理后, 发现这一现象被逆转, 而 cPTIO 单独处理种子 6 h 后在种子中检测不到  $\beta$ -淀粉酶基因的转录本, 说明 SNP 对  $\beta$ -淀粉酶基因转录本的诱导效应与 NO 有关。 $\beta$ -巯基乙醇无论是与 cPTIO 结合处理与否均不能影响  $\beta$ -淀粉酶基因的表达。该结果进一步暗示 NO 可能作为一种信号分子来诱导  $\beta$ -淀粉酶转录本的上升, 而还原剂  $\beta$ -巯基乙醇诱导  $\beta$ -淀粉酶活性上调效应则与 NO 无关。

### 2.6 种子萌发早期 $\beta$ -淀粉酶的 Western blot 分析

Western blot 可以在蛋白水平上反映  $\beta$ -淀粉酶蛋白含量的变化情况, 但是难以区分结合型和自由型  $\beta$ -淀粉酶蛋白。图 6 表明, SNP 处理小麦种子 6 h 后不仅明显增强了  $\beta$ -淀粉酶蛋白条带(Type-II, 40 kD), 而且还在一定程度上提高自由型的  $\beta$ -淀粉酶蛋白含

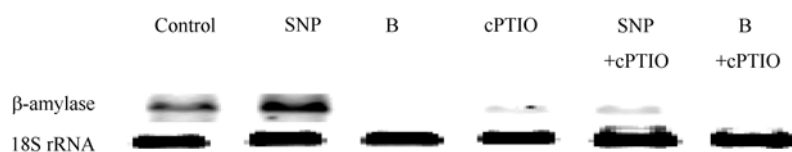


图 5 不同处理对萌发早期种子  $\beta$ -淀粉酶基因表达的影响

Fig. 5 Effects of different treatments on expression of  $\beta$ -amylase gene at early stage of seed germination

量(Type-I, 58 kD), SNP 与 cPTIO 共处理可以逆转此过程。还原剂  $\beta$ -巯基乙醇虽然也具有与 SNP 类似的现象, 但结合 cPTIO 处理不能导致 Type-II 条带的减弱。转录抑制剂放线菌素 D 可以明显逆转 SNP 处理而增加的  $\beta$ -淀粉酶 Type-II。

## 2.7 不同处理的萌发前期小麦种子中 $\beta$ -淀粉酶的免疫电子显微镜亚细胞定位

图 7 为各种处理 6 h 后小麦胚内的  $\beta$ -淀粉酶的

分布情况, 代表  $\beta$ -淀粉酶的黑色小颗粒主要分布在包含淀粉粒的蛋白储藏体中, SNP 和  $\beta$ -巯基乙醇浸种处理后蛋白储藏体内分布的  $\beta$ -淀粉酶数量明显增加, 且 SNP 处理较  $\beta$ -巯基乙醇更为明显; SNP 与 NO 清除剂 cPTIO 共同处理后  $\beta$ -淀粉酶分布基本恢复至与清水处理对照相当的水平, NO 专一性清除剂 cPTIO 单独处理未对  $\beta$ -淀粉酶的分布造成明显影响。

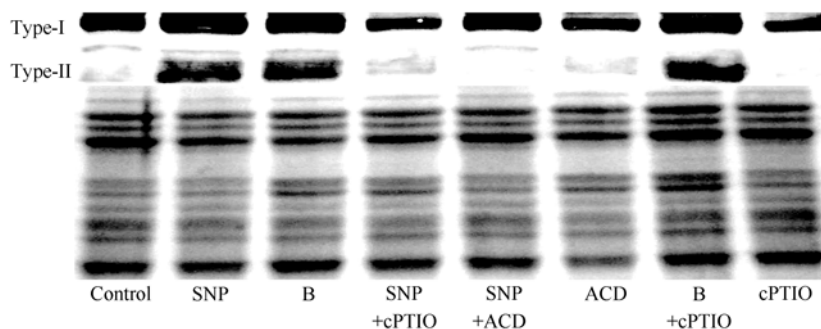


图 6 cPTIO 和 ACD 对萌发早期种子中  $\beta$ -淀粉酶蛋白含量的影响

Fig. 6 Effects of cPTIO and ACD on  $\beta$ -amylase protein in seeds at early stage of germination

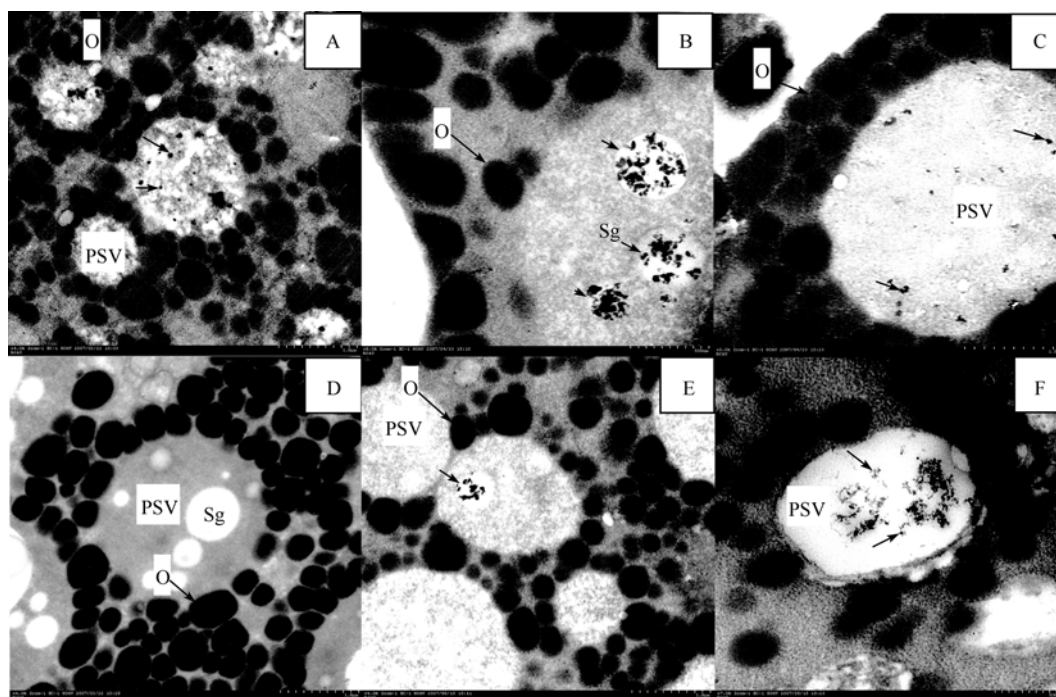


图 7 不同处理的萌发早期种子中  $\beta$ -淀粉酶的免疫电子显微镜亚细胞定位

Fig. 7 Subcellular localization of  $\beta$ -amylase in early germinating seeds under different treatments through immunoelectron microscopy

A: 清水处理 6 h (对照); B: SNP 处理 6 h; C: SNP+cPTIO 处理 6 h; D:  $\beta$ -淀粉酶抗体杂交的阴性对照; E: cPTIO 处理 6 h; F:  $\beta$ -巯基乙醇处理 6 h。O: 油体; PSV: 蛋白储藏体; Sg: 淀粉粒。黑箭头示  $\beta$ -淀粉酶。图 A、C、D、E 标尺示 1  $\mu$ m; B、F 标尺示 0.5  $\mu$ m。  
A: treated with water for 6 h (control); B: treated with SNP for 6 h; C: treated with SNP+cPTIO for 6 h; D: hybridized without  $\beta$ -amylase antibody as negative control; E: treated with cPTIO for 6 h; F: treated with B for 6 h. O: oil body; PSV: protein storage vacuole; Sg: starch granule. Black arrow heads indicate  $\beta$ -amylase. Bar = 1  $\mu$ m in Fig. A, C, D, E, and 0.5  $\mu$ m in Fig. B, F.

### 3 讨论

植物个体发育的最初阶段是种子萌发, 而萌发所需要的物质和能量来源于贮存物质(淀粉和贮存蛋白等)的氧化分解与能量的释放。而作为主要碳源的淀粉, 其代谢是种子萌发的关键步骤。淀粉代谢主要由各种水解酶协作完成的, 其中最关键的酶是淀粉酶, 包括 $\alpha$ -淀粉酶和 $\beta$ -淀粉酶。经典的种子萌发理论认为, 水解酶类的表达是受胚合成的 GA 所调控的, 其中的代表为 $\alpha$ -淀粉酶。一般认为,  $\alpha$ -淀粉酶首先直接水解完整的淀粉, 释放出糊精, 然后由 $\beta$ -淀粉酶、脱分支酶和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶等几种酶共同作用将其水解为麦芽糖和葡萄糖。因此,  $\alpha$ -淀粉酶通常被认为是作物种子萌发过程中的关键酶<sup>[3]</sup>。然而越来越多的研究表明, 作为调控 $\alpha$ -淀粉酶的激素 GA 主要是在种子萌发后期, 尤其是幼苗生长过程中起重要作用<sup>[24]</sup>, 同样, Collins 等<sup>[25]</sup>的研究表明, GA<sub>3</sub> 对小麦种子 $\alpha$ -淀粉酶无明显影响(处理 12 h 内), 暗示贮藏型的淀粉水解酶类及其调控机制在萌发中可能发挥重要作用。

与 $\alpha$ -淀粉酶不同,  $\beta$ -淀粉酶是在小麦属作物如大麦、小麦和燕麦等种子籽粒发育和成熟过程中形成, 并以无活性的聚合体的形式积累并贮藏于干种子中的, 在萌发时逐步释放和激活<sup>[4]</sup>。Nandi 等<sup>[5]</sup>也发现 $\beta$ -淀粉酶对种子萌发起着至关重要的作用, 说明 $\beta$ -淀粉酶的活化、解聚、释放或重新合成也可能是淀粉型种子萌发过程中的关键, 并进一步为萌发后期受 GA 调控的 $\alpha$ -淀粉酶基因表达并降解淀粉粒创造条件。我们发现, 以 $\beta$ -淀粉酶专一性抑制剂 $\alpha$ -环糊精处理能明显抑制小麦种子萌发(图 1), 暗示了种子萌发过程中 $\beta$ -淀粉酶的重要作用。

NO 作为一种重要的气体信号分子, 广泛参与植物和动物许多重要的生理过程, 尤其是种子萌发早期<sup>[10,26]</sup>, 包括打破种子休眠<sup>[15,27]</sup>, 促进植物种子在胁迫和正常条件下的萌发<sup>[16-18]</sup>。外源 NO 供体 SNP 处理显著地提高了小麦种子内总淀粉酶活性(图 2-B), 从而加快淀粉的降解(图 2-A), 促进小麦种子萌发(图 1)。而我们先前的研究发现, 在小麦种子萌发早期(0~12 h), 并未检测到 $\alpha$ -淀粉酶活性, 本试验也显示外源 NO 供体 SNP 处理显著提高了自由型 $\beta$ -淀粉酶活性<sup>[18]</sup>, 说明总淀粉酶活性的上升主要是由 $\beta$ -淀粉酶活性的增加所致。

作为还原剂的 $\beta$ -巯基乙醇不仅可以破坏 $\beta$ -淀粉酶多聚体间或 $\beta$ -淀粉酶自由型单体同麦谷蛋白间的

作用力<sup>[28]</sup>, 还可以提高提高种子内蛋白水解酶的活性<sup>[29]</sup>, 本研究结果显示, SNP 诱导淀粉酶活性增加的效应可能是通过信号分子 NO 来介导的, 用外源 NO 供体 SNP 处理可以明显增加 $\beta$ -淀粉酶转录本和 $\beta$ -淀粉酶蛋白含量, SNP 结合 NO 清除剂 cPTIO 共同处理则逆转了该现象, 而 $\beta$ -巯基乙醇则没有类似的作用(图 5 和图 6)。

近年来, 关于外源 NO 供体可以调节植物体内抗性基因表达的报道屡见不鲜, Durner 等<sup>[30]</sup>发现 NO 供体处理烟草悬浮细胞 9 h 和 5 h 后能够诱导 PAL 和 PR-1 基因的表达, Parani 等<sup>[31]</sup>利用基因芯片技术发现用外源 NO 供体 SNP 处理拟南芥根后, 有 342 个基因表达上调, 其中 162 个具有浓度依赖诱导效应。虽然在水稻和玉米等非小麦属作物种子萌发过程中存在糊粉层细胞重新合成低含量或活性的 $\beta$ -淀粉酶的现象<sup>[32]</sup>, 但在小麦中还暂时没有发现存在该种机制。在本试验条件下, 我们从 3 个方面考察小麦种子早期萌发过程中, 外源 NO 供体是否可以诱导 $\beta$ -淀粉酶从头合成的可能性。转录水平数据显示,  $\beta$ -淀粉酶转录本在外源 NO 供体 SNP 处理过的种子中的表达量高于对照组(图 5); 在蛋白水平上, SNP 可以提高 $\beta$ -淀粉酶蛋白的表达, 增加了 40 kD 左右大小的蛋白带(Type-II), 同时使得主带(Type-I)亮度增加。加入转录抑制剂放线菌素 D 可以明显逆转新条带的增加(图 6); 从细胞分布上看, 利用免疫电镜技术发现胚乳中 $\beta$ -淀粉酶定位于包含淀粉粒的蛋白储藏体, 且 SNP 处理后的 $\beta$ -淀粉酶数量上变化同 Western blotting 结果一致。以上结果说明外源 NO 供体 SNP 处理后小麦种子中可能发生了 $\beta$ -淀粉酶的重新合成现象, 尽管也不能完全排除 SNP 通过诱导蛋白水解酶的表达, 水解 Type-I 从而增加 Type-II 蛋白的可能性。

### 4 结论

NO 供体 SNP 处理能显著提高小麦种子 $\beta$ -淀粉酶活性, 增加其蛋白质含量, 从而促进种子萌发。0.5 mmol L<sup>-1</sup> SNP 很可能通过促进 $\beta$ -淀粉酶蛋白结合型向游离型转变和诱导 $\beta$ -淀粉酶的重新合成等途径, 增加 $\beta$ -淀粉酶蛋白含量。本试验结果为 NO 供体应用于农业生产实践提供了初步的理论证据。

### References

- [1] Bewley J D. Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 1997, 9: 1055-1066

- [2] Bewley J D, Black M. Seeds: Physiology of Development and Germination. New York & London: Plenum Press, 1985. pp 256–263
- [3] Lovegrove A, Hooley R. Gibberellin acid and abscisic acid signaling in aleurone. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 102–110
- [4] Ziegler P. Cereal beta-amylases. *J Cereal Sci*, 1999, 29: 195–204
- [5] Nandi S, Das G, Sen-Mandi S.  $\beta$ -amylase activity as an index for germination potential in rice. *Ann Bot*, 1995, 75: 463–467
- [6] Qin Y, Wang Y, Duan C Q, Zhang D P.  $\beta$ -amylase is predominantly localized to plastids in the developing tuberous root of sweet potato. *Acta Bot Sin*, 2003, 45: 581–588
- [7] Wang Y Z, Zhang D P. Activities, quantitative changes and subcellular localization of  $\alpha$ -amylase during development of apple fruit. *Acta Bot Sin*, 2002, 44: 34–41
- [8] Ahokas H, Manninen M L. Thermostabilities of grain  $\beta$ -amylase and  $\beta$ -glucanase in Finnish landrace barleys and their putative past adaptedness. *Hereditas*, 2000, 132: 111–118
- [9] Xia S-F(夏叔芳), Yu X-J(於新建), Su L-Y(苏丽英). The properties of amylases in soybean leaves. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 1989, 15(1): 41–45 (in Chinese with English abstract)
- [10] Beligni M V, Lamattina L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*, 2000, 210: 215–221
- [11] Bethke P C, Badger M R, Jones R L. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell*, 2004, 16: 332–341
- [12] Mata C G, Lamattina L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1196–1204
- [13] Neill S J, Desikan R, Clarke A, Hancock J T. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol*, 2003, 128: 13–16
- [14] Bethke P C, Gubler F, Jacobsen J V. Dormancy of Arabidopsis seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta*, 2004, 219: 847–855
- [15] Bethke P C, Libourel I G L, Jones R L. Nitric oxide reduces seed dormancy in Arabidopsis. *J Exp Bot*, 2005, 57: 517–526
- [16] Ling T-F(凌腾芳), Xuan W(宣伟), Fan Y-R(樊颖瑞), Sun Y-G(孙永刚), Xu S(徐晟), Huang B-K(黄本开), Sa Z-S(萨支圣), Shen W-B(沈文飏). The effect of exogenous glucose, fructose and NO donor sodium nitroprusside (SNP) on rice seed germination under salt stress. *J Plant Physiol Mol Biol* (植物生理与分子生物学学报), 2005, 31(2): 205–212 (in Chinese with English abstract)
- [17] Zhang H, Shen W B, Xu L L. Effects of nitric oxide on the germination of wheat seeds and its reactive oxygen species metabolism under osmotic stress. *Acta Bot Sin*, 2003, 45: 901–905
- [18] Zhang H, Shen W B, Zhang W, Xu L L. A rapid response of  $\beta$ -amylase to nitric oxide but not gibberellin in wheat seeds during the early stage of germination. *Planta*, 2005, 220: 708–716
- [19] Li H-S(李合生). Principles and Techniques for Plant Physiological Biochemical Experiment (植物生理生化实验原理和技术). Beijing: Higher Education Press, 2000. pp 164–167 (in Chinese)
- [20] Ling T-F(凌腾芳), Lin J-S(林锦山), Liu H(刘辉), Zhang B(张博), Li J(李静), Yu T(于阗), Ye M-B(叶茂炳), Shen W-B(沈文飏). A micro-volume and rapid method for determining  $\beta$ -amylase activity in plant seed. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2006, 23(3): 281–285 (in Chinese with English abstract)
- [21] Xu M J, Dong J F, Zhu M Y. Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced hypericin production of hypericum perforatum cell suspension cultures through a jasmonic-acid-dependent signal pathway. *Plant Physiol*, 2005, 139: 991–998
- [22] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1977, 227: 680–685
- [23] Evans D E, MacLeod L C, Eglinton J K, Gibson C E, Zhang X, Wallace W, Skerritt J S, Lance R C M. Measurement of beta-amylase in malting barley (*Hordeum vulgare* L.): I. Development of a quantitative ELISA for beta-amylase. *J Cereal Sci*, 1997, 26: 229–239
- [24] Gallardo K, Job C, Groot S P C, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, Job D. Proteomics of Arabidopsis seed germination: A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiol*, 2002, 129: 823–837
- [25] Collins G G, Jenner C F, Paleg L G. The metabolism of soluble nucleotides in wheat aleurone layers treated with gibberellic acid. *Plant Physiol*, 1972, 49: 404–410
- [26] Beligni M V, Fath A, Bethke P C, Lamattina L, Jones R L. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1642–1650
- [27] Bethke P C, Libourel I G L, Aoyama N, Chung Y Y, Still D W, Jones R L. The Arabidopsis aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiol*, 2007, 143: 1173–1188
- [28] Sopenan T, Lauriere C. Release and activity of bound  $\beta$ -amylase in a germinating barley grain. *Plant Physiol*, 1989, 89: 244–249
- [29] Moczón T. A cysteine proteinase in the cercariae of *Diplostomum pseudospathaceum* (Trematoda, diplostomatidae). *Parasitol Res*, 1994, 80: 680–683
- [30] Durner J, Wendehenne D, Klessig D F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 10328–10333
- [31] Parani M R, Myers R, Weirich H, Smith B, Leaman D W, Goldman S L. Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in Arabidopsis. *J Plant Biotech*, 2004, 2: 359–366
- [32] Wang S M, Lue W L, Eimert K, Chen J. Phytohormone-regulated  $\beta$ -amylase gene expression in rice. *Plant Mol Biol*, 1996, 31: 975–982