

# 葡萄糖和 ABA 对小麦胚萌发过程中 -淀粉酶表达的调控

孙果忠,张秀英,闫长生,肖世和

(中国农业科学院 作物科学研究所,北京 100081)

**摘要:**为了探讨种子的萌发特性与胚对 ABA 的敏感性和 -淀粉酶表达之间的关系,比较了葡萄糖和 ABA 对不同生理状态的小麦离体胚萌发过程中 -淀粉酶表达的调控作用。结果表明,葡萄糖对未成熟胚、休眠成熟胚和不休眠成熟胚的萌发均有促进作用;葡萄糖能够抵消 ABA 对胚萌发的抑制作用,对于不休眠成熟胚,葡萄糖可以减轻 ABA 对胚根发生的抑制作用,但对随后的形态发生无影响。葡萄糖可以抑制小麦胚萌发过程中 -淀粉酶的表达;ABA 可以抑制未成熟胚与休眠成熟胚中 -Amy-1 的表达,但在不休眠成熟胚中则诱导 -Amy-1 表达。因此,小麦离体胚的萌发特性、胚对 ABA 敏感性和 -淀粉酶的表达均与生理状态有密切关系。

**关键词:**小麦;脱落酸;-淀粉酶;葡萄糖

**中图分类号:**S512.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)01-0044-05

## Regulation of Glucose and ABA on the Expression of Alpha-amylase in Wheat Embryo

SUN Guo-zhong, ZHANG Xiu-ying, YAN Chang-sheng, XIAO Shi-he

(Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100081, China)

**Abstract:** The sprouting resistant mechanism of wheat is related to ABA sensitivity of embryo and activity of  $\alpha$ -amylase. We studied the effects of glucose and ABA on germination and  $\alpha$ -amylase expression in different physiological state of wheat embryo, including immature embryo (IME), dormant mature embryo (DME) and non-dormant mature embryo (NDME). The results indicated that glucose could stimulate germination of embryo in different physiological states, and ABA sensitivity of embryo is related to its physiological state. Glucose could mitigate the inhibition of ABA on embryo germination in all physiological states. To NDME, glucose could suppress the inhibition of ABA on radicle emergence but not in later morphological growth. Expression of  $\alpha$ -amylase in embryos could be inhibited by glucose, but the effect of ABA on  $\alpha$ -amylase expression was related to the physiological state of embryos. The expression of  $\alpha$ -Amy-1 was inhibited in IME and DME, but was induced in NDME. Thus, the physiological state of seeds should be considered when ABA embryonic sensitivity and  $\alpha$ -amylase activity was evaluated.

**Key words:** Wheat; Absciscic acid;  $\alpha$ -amylase; Glucose

小麦穗发芽是一种世界性的气候灾害,不仅降低产量而且严重劣化加工品质和种用价值,给生产者造成重大经济损失<sup>[1]</sup>。田间的穗发芽是基因型与环境互作的结果,涉及因素极其复杂,而且往往多个因素交织在一起,育种实践中难以把握。因此,摸清穗发芽发生的生理生化机理是有效认识和控制穗发

芽问题的重要基础。

品种的穗发芽抗性受多种因素影响,但其内在机制与胚对 ABA 的敏感性和 -淀粉酶活性有密切关系。在小麦、大麦等植物上均发现种子的穗发芽表现与胚对 ABA 的敏感性相关<sup>[2,3]</sup>。尽管许多学者从生理生化、细胞信号转导和 ABA 诱导的基因表达

收稿日期:2008-12-20

基金项目:国家自然科学基金(30070473;30471084)

作者简介:孙果忠(1973-),男,河北青县人,副研究员,博士,主要从事小麦遗传育种研究。

通讯作者:肖世和(1955-),男,四川广汉人,研究员,博士,主要从事小麦遗传育种研究。

等多个角度对胚的 ABA 敏感性问题进行了研究,但内在机制仍不清楚<sup>[4]</sup>。糖是种子萌发过程中的重要信号分子。研究表明,果糖可以促进休眠的野燕麦胚萌发<sup>[5]</sup>;可溶性的单糖能抵消 ABA 对拟南芥种子萌发时胚根生长的抑制作用<sup>[6]</sup>。但对 ABA 与休眠抑制的萌发之间有无相关性尚不清楚。

穗发芽过程中产生的  $\alpha$ -淀粉酶是重要的水解酶,低  $\alpha$ -淀粉酶活性被认为是抗穗发芽的主要机理之一<sup>[7]</sup>。在遗传上,  $\alpha$ -淀粉酶是由位于不同染色体上的基因控制的一系列同工酶组成的。依据等电聚焦电泳时 pI 的高低,可分为  $\alpha$ -Amy-1 (高 pI) 和  $\alpha$ -Amy-2 (低 pI) 两个类群<sup>[8]</sup>。随着功能基因组学的发展,生物学研究的焦点逐渐从基因结构转向对基因功能和表达调控的研究。 $\alpha$ -淀粉酶的表达机制引起了许多学者的关注,禾谷类作物的胚和糊粉层为研究  $\alpha$ -淀粉酶基因表达提供了理想的模式系统<sup>[9]</sup>。糖作为信号分子对种子萌发具有重要调控作用。在种子萌发过程中,  $\alpha$ -淀粉酶的表达会降解淀粉成为可溶性的糖,糖可以明显抑制盾片中  $\alpha$ -淀粉酶的表达,而糊粉层中  $\alpha$ -淀粉酶的表达则不受影响<sup>[10]</sup>。GA、ABA 等激素也能影响  $\alpha$ -淀粉酶基因的表达,糖和上述因子间存在信号互作。外施的葡萄糖或蔗糖可以在转录水平抑制大麦胚中 GA 诱导的  $\alpha$ -淀粉酶 mRNA 表达<sup>[9]</sup>。在水稻胚中,葡萄糖可以在转录和转录后的水平上抑制由 ABA 诱导的  $\alpha$ -淀粉酶家族中 *Rab16A* 基因的表达<sup>[11]</sup>。因此,了解各种因子如何调控不同生理状态的种子萌发过程中的  $\alpha$ -淀粉酶表达特性,对正确评价品种穗发芽抗性的生理生化机制具有重要参考价值。

本试验以抗穗发芽小麦品种陕优 225 的未成熟胚 (Immature embryo, IME)、休眠成熟胚 (Dormant mature embryo, DME) 和不休眠成熟胚 (Non-dormant mature embryo, NDME) 为研究对象,比较了葡萄糖和 ABA 对离体胚萌发以及  $\alpha$ -淀粉酶表达的影响。旨在探讨种子不同发育阶段的萌发特性、胚对 ABA 的敏感性和  $\alpha$ -淀粉酶表达之间的关系,为抗穗发芽品种的筛选提供生理生化依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料及处理

以白皮抗穗发芽小麦品种陕优 225 (小堰 6 号/NS2761) 为试材,2002 年播种于北京作物科学研究所试验田。2003 年夏季,挂牌标记扬花期,分别取扬花后 20 d 和 35 d 的穗子,去掉上、下部两个小穗及中部小穗的中间小花,剥取一致籽粒备用。其中,

20 d 的籽粒立即进行离体胚萌发。35 d 的籽粒部分于室内风干 80 d,以充分解除休眠;部分置于 -80 冰箱中使种子保持休眠性。

### 1.2 试验方法

1.2.1 离体胚的萌发 本试验主要采用 4 种培养基处理:以 8 g/L 琼脂培养基为对照;在浓度筛选的基础上,依据胚的不同生理状态加入适量 ABA、IME、DME 和 NDME 的 ABA 浓度依次为 1, 25, 50  $\mu$ mol/L; 90 mmol/L 葡萄糖; 90 mmol/L 葡萄糖和适量 ABA。所用试剂为国产分析纯。IME 培养时,籽粒依次用 75% 乙醇消毒 1 min, 0.1% 升汞消毒 7 min,最后用无菌水浸洗 5~6 次。无菌操作下,剥下的胚盾片朝下摆放在培养基上,每个处理 25 个胚,2 个重复,20 $^{\circ}$ C 暗培养 7 d。以胚根尖端变白、膨大后直径 > 1 mm 为萌动标准。萌发能力用萌发势 (GI) 来评估,  $GI = ((7 \times n_1 + 6 \times n_2 + \dots + 1 \times n_7) / (7 \times \text{总胚数})) \times 100$ ; 其中,  $n_1$ 、 $\dots$ 、 $n_7$  为第 1 天、 $\dots$ 、第 7 天的萌发胚数。成熟胚培养时,先将种子消毒,并在 20 $^{\circ}$ C 的无菌水中浸泡 6 h。无菌操作下,用锋利的手术刀切胚,取完整无损且不带胚乳的胚,盾片朝下置于培养基上。每个处理 30 个胚,2 个重复,培养条件同上。以胚部露白为萌发标准进行调查。

1.2.2  $\alpha$ -淀粉酶同工酶表达分析 取 30 个代表性的胚,去掉种皮后,放入 1.5 mL 离心管内,加入样品提取液 (10 mmol/L NaAC, 10 mmol/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $10 \times 10^{-6}$  GA<sub>3</sub>) 150  $\mu$ L。研磨后,震荡 1 min, 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min。13 000 r/min 离心 5 min,上清液即为提取的  $\alpha$ -淀粉酶,分装、-20 $^{\circ}$ C 保存。利用 Multiphor 系统 (GE 公司) 在 4 $^{\circ}$ C 进行等电聚焦电泳。电泳参数为 2 500 V、50 mA、30 W。程序为预聚焦 30 min;滤纸片上样 10  $\mu$ L,电泳 30 min;去掉上样滤纸片,继续电泳 3.5 h。电泳结束后,胶先在 4% (m/V) 淀粉液中静置 1 h,再用少量的 0.15 mol/L NaAC (pH 5.0) 洗去胶面上残余的淀粉。重新加入 0.15 mol/L 的 NaAC 在 37 $^{\circ}$ C 静置 1.0~1.5 h,加入终浓度至 1% 的  $\text{I}_2$ -KI 溶液,避光振荡 10 min,最后用 7% (V/V) 的乙酸固定。以 Image Master Labscan 软件控制扫描仪进行凝胶图像扫描,利用 Image Master TotalLab 1.0 软件 (APB 公司) 对谱带进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄糖和 ABA 对小麦胚萌发的影响

离体胚的萌发能力在种子发育、成熟和后熟的过程中呈现“高-低-高”的动态变化,表明胚所含

的萌发调节因子或胚对这些调节因子的反应能力存在差异。葡萄糖对三种生理状态的胚萌发均有明显促进作用,但作用方式不同。对于 IME,葡萄糖对萌发启动和形态建成均有促进作用。对于 DME,葡萄糖的促进作用仅限于胚根突出阶段,多数胚不表现形态建成,而表现生长点的分裂膨大,呈“愈伤化”。因而,葡萄糖对 DME“萌发”的促进作用,是加速细胞分裂而不是分化。对于 NDME,葡萄糖对萌发启动无明显作用,但可加速形态建成后的胚根和胚芽生长(图 1,2)。

ABA 对三种胚的萌发均有明显的抑制作用。胚对 ABA 的敏感性与其生理状态系密切。对于

IME,1  $\mu\text{mol/L}$  的 ABA 可以抑制全部胚的萌发;在 DME 中,尽管仍有少量胚可以萌发,但加入 25  $\mu\text{mol/L}$  的 ABA,即可抑制全部胚的萌发。而 NDME 在 25  $\mu\text{mol/L}$  的 ABA 浓度下萌发势为 29%;当 ABA 浓度升高至 50  $\mu\text{mol/L}$  时,萌发势仍达 6.7%(图 2)。葡萄糖可明显降低 ABA 对 IME 和 NDME 胚萌发的抑制作用。但加入葡萄糖仅可促进胚根的突出,随后的形态建成仍然受阻;这些胚与 DME 在只含葡萄糖的培养基上萌发相似,呈“愈伤化”(图 1,2)。当 DME 在含 25  $\mu\text{mol/L}$  ABA 的培养基上培养时,加入葡萄糖也难以“萌发”。



图 1 三种不同生理状态的小麦胚在培养基上的萌发比较  
Fig. 1 Germination assays of wheat embryos on different medium

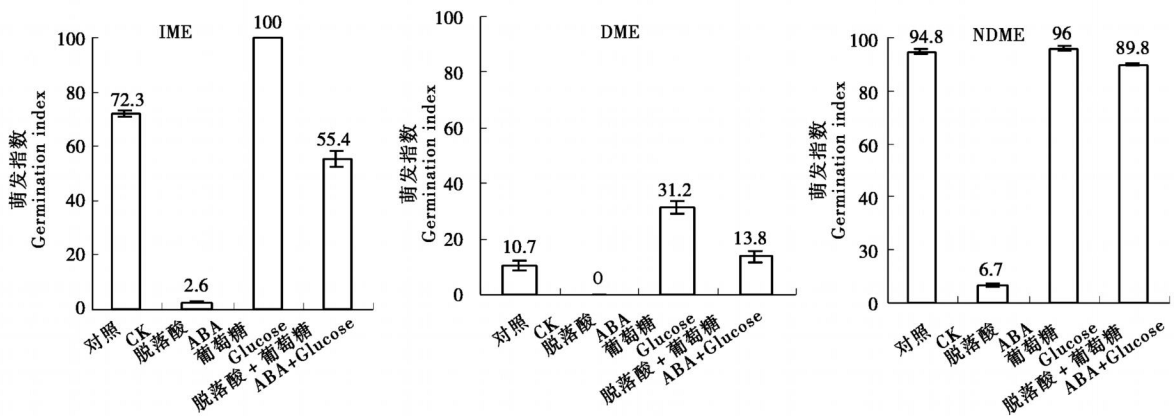


图 2 三种不同生理状态的小麦胚在培养基上的萌发比较  
Fig. 2 Germination assays of wheat embryos on different medium

## 2.2 葡萄糖和 ABA 对小麦胚萌发过程中 $\alpha$ -淀粉酶表达的调节

培养 7 d 后,三种胚的  $\alpha$ -淀粉酶表达模式相似, $\alpha$ -Amy2 表达丰度明显高于  $\alpha$ -Amy1。在休眠的胚中仍有  $\alpha$ -淀粉酶的表达,表明萌发与  $\alpha$ -淀粉酶的表达并没有必然联系。ABA 对三种胚萌发过程中  $\alpha$ -淀粉酶的表达均表现出抑制作用,但对  $\alpha$ -淀粉酶家族的不同类群乃至不同成员的抑制作用因胚的生理状

态而异。在 IME 与 DME 中, $\alpha$ -Amy1 的表达受 ABA 的明显抑制;而在 NDME 中, $\alpha$ -Amy1 可以被 ABA 诱导表达。葡萄糖可以明显抑制三种胚内  $\alpha$ -淀粉酶的表达,但在 NDME 中仍有少量  $\alpha$ -Amy2 表达。只有 ABA 和葡萄糖同时存在时,NDME 的  $\alpha$ -淀粉酶表达才能全被抑制。上述结果表明,ABA 和葡萄糖对  $\alpha$ -淀粉酶表达的调节途径是不同的(图 3)。

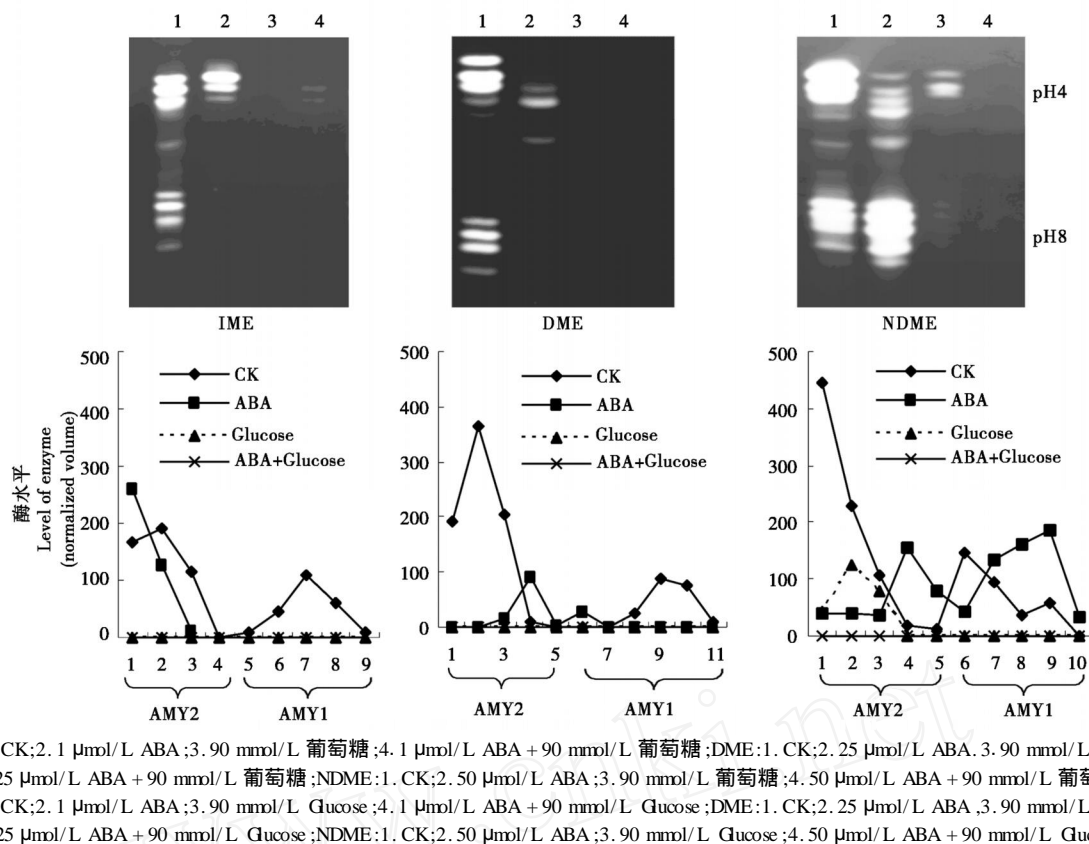


图 3 不同生理状态的胚培养 7 d 后的  $\alpha$ -amylase 等电聚焦电泳图谱  
Fig. 3 IEF zymograms of  $\alpha$ -amylase extracted from embryos cultured on different medium for 7 days

### 3 讨论

#### 3.1 葡萄糖和 ABA 在小麦胚萌发中的作用机制

本研究表明,葡萄糖对 DME 和 ABA 抑制的 NDME 的萌发均有明显的促进作用,但仅限于胚根突出阶段。除个别胚外,多数胚不表现形态建成,而表现生长点的分裂膨大,呈“愈伤化”。因而,葡萄糖对上述胚“萌发”的促进作用是促进细胞分裂而不是分化。对 IME 和 NDME,可加速形态建成后的胚根和胚芽生长。这表明,葡萄糖并不能调控种子的萌发启动,但对萌发后的胚可以提供物质和能量,促进根、叶等器官的生长。前人的研究表明,葡萄糖促进萌发的作用与渗透势无关。葡萄糖的类似物( $\alpha$ -GLC)不能促进休眠野燕麦胚的萌发<sup>[5]</sup>,也不能抵消 ABA 对正常拟南芥种子萌发的抑制作用<sup>[6]</sup>。

前人研究表明,糖对胚萌发的调控涉及特定基因的表达以及与其他激素之间的互作。糖和 ABA 在种子发育、萌发和幼苗形成阶段均存在直接或间接的信号互作。突变体的分子遗传学研究证实,葡萄糖不敏感的拟南芥突变体 *gin1* 与控制 ABA 合成的 *aba2* 的是等位基因,其生理作用是导致 ABA 水平下降;而葡萄糖不敏感的拟南芥突变体 *gin5, 6* 与控制 ABA 不敏感的 *abi4* 是等位基因,其生理作用

是导致萌发时种子对 ABA 不敏感<sup>[9]</sup>。研究表明,ABA 阻止胚根的延伸可能与抑制细胞壁的松弛有关,即使在种子萌发后期加入 ABA 仍能有效地阻止胚根的伸长<sup>[12]</sup>。在本试验中,葡萄糖对 ABA 抑制的 NDME 萌发的促进作用,可能与减轻 ABA 对细胞壁松弛的抑制有关。葡萄糖对休眠成熟胚的萌发也表现出了明显的促进作用,这暗示休眠的胚中可能存在抑制细胞壁松弛的因素。这些因素是 ABA 还是其他物质,休眠种子萌发的真正缺陷是否决定于胚根细胞壁的延伸,这些问题需要进一步的研究。

#### 3.2 葡萄糖和 ABA 对 $\alpha$ -淀粉酶表达调节的差异

在种子萌发过程中,为了确保足够的能量和碳骨架供应细胞的生长,贮藏物的代谢必须受到精确的控制<sup>[9]</sup>。已知  $\alpha$ -淀粉酶是一个受多基因家族编码的重要的水解酶,其表达受多种时间、空间、激素和代谢物等因素的调节<sup>[1,10,13]</sup>。本试验中,在含葡萄糖的培养基上,虽然胚能够萌发,但是胚内  $\alpha$ -淀粉酶的表达受到明显的抑制。这个结果与 Loreti 等在大麦胚上的研究结果相一致,在转录水平上葡萄糖可以降低  $\alpha$ -淀粉酶 mRNA 的稳定性<sup>[10]</sup>。本试验中,尽管 DME 没有萌动,但其  $\alpha$ -淀粉酶的表达模式和 NDME 十分相似,而 DME 在含葡萄糖的培养基上与 NDME 在含 ABA 的培养基上萌发表现相似,但它们

的 $\alpha$ -淀粉酶表达明显不同。表明控制萌发和贮藏物代谢的基因表达之间是相互独立的,这与 Pritchard 等的研究相符<sup>[14]</sup>。本研究中,胚对 ABA 敏感性的生理差异与 $\alpha$ -淀粉酶同工酶的表达密切相关,表明不同的 $\alpha$ -淀粉酶同工酶成员在萌发中的作用可能不同,如图 3 所示, $\alpha$ -Amy-1 对胚萌发的促进作用可能低于 $\alpha$ -Amy-2。通过 $\alpha$ -淀粉酶基因表达鉴定小麦穗发芽抗性水平时,最好选择 $\alpha$ -Amy-1 家族进行检测。胚对 ABA 反应的差异与相应的 $\alpha$ -淀粉酶同工酶成员表达之间的内在机制仍需进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Derera N F. Pre-harvest field sprouting in cereals [M]. USA, Florida: CRC Press, 1989.
- [2] Walker-Simmons M. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars [J]. Plant Physiol, 1987, 84: 61 - 71.
- [3] Romagosa I, Prada D, Moralejo M A, et al. Dormancy, ABA content and sensitivity of a barley mutant to ABA application during seed development and after ripening [J]. J Exp Bot, 2001, 52(360): 1499 - 1506.
- [4] 孙果忠, 肖世和. 脱落酸与种子休眠 [J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(1): 115 - 119.
- [5] Foley M E. Carbohydrate metabolism as a physiological regulator of seed dormancy [M]// Lang G. Plant Dormancy: physiology, biochemistry and molecular biology. UK, Wallingford: CABI Press, 1996: 245 - 254.
- [6] Finkelstein R R, Lynch T J. Abscissic acid inhibition of radicle emergence but not seedling growth is suppressed by sugars [J]. Plant Physiol, 2000, 122: 1179 - 1186.
- [7] Gale M D, Fintham J E, Arthur E D. Alpha-amylase production in the late stages of grain development-An early sprouting damage risk period [M]// Kruger J E, LaBerge D E. Third international symposium on Pre-harvest sprouting in cereals. USA, Boulder: Westview Press, 1983: 29 - 35.
- [8] 肖世和, 闫长生, 张海萍, 等. 小麦穗发芽研究 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004.
- [9] Finkelstein R R, Gibson S I. ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd [J]. Curr opin in Plant Biol, 2001, 5: 26 - 32.
- [10] Loreti L, Alpi A, Perata P. Glucose and disaccharide-sensing mechanisms modulate the expression of $\alpha$ -amylase in barley embryo [J]. Plant Physiol, 2000, 123: 939 - 948.
- [11] Toyofuku K, Loreti E, Vernieri P, et al. Glucose modulate the abscisic acid-inducible *Rab16A* gene in cereal embryos [J]. Plant Mol Biol, 2000, 42: 451 - 460.
- [12] Beweley J D. Seed germination and dormancy [J]. Plant Cell, 1997, 9: 1055 - 1066.
- [13] Loreti E, De Bellis L, Alpi A, Perata P. Why and how do plants cells sense sugars [J]. Ann Bot, 2001, 88: 803 - 812.
- [14] Pritchard S L, Charlton W L, Baker A. et al. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis* [J]. The Plant J, 2002, 31(5): 639 - 647.