

Nd³⁺ 对 GA₃ 诱导小麦 α-淀粉酶活性的促进作用

陈靠山 周 燮 彭正华 徐 焱 陈坤明

(南京农业大学农学系, 南京 210014)

摘 要

1 ppm Nd³⁺ 能够明显促进 GA₃ 对 α-淀粉酶的诱导, 使该酶活性提高 70%, 并降低半粒小麦电解质外渗。Nd³⁺ 的主要效应之一在于缩短 GA₃ 作用的滞后期。其增效现象在 GA₃ 诱导 α-淀粉酶的线性浓度范围内, 均较显著。Nd³⁺ 本身不能诱导 α-淀粉酶, 未发现其对离体酶活性与还原糖显色有影响。

关键词: Nd³⁺; GA₃; α-淀粉酶; 小麦

许多证据表明, 稀土元素对植物种子萌发具有促进作用^[9]。笔者曾报道 Nd³⁺ 浓度在 1-10 ppm 时, 显著提高了小麦种子的萌发力, 并提高了萌发期间 α-淀粉酶的活性, 降低了物质的外渗^[9]。

目前, 已基本阐明禾谷类作物种子糊粉层 α-淀粉酶的诱导机理, 即 GA₃ 诱导了 α-淀粉酶的产生并增加其同工酶谱带数^[10], Jacobsen 等^[9] 用分子杂交技术证明, GA₃ 在转录水平上促进 α-淀粉酶的合成。而 ABA 对 α-淀粉酶的 mRNA 的转录有抑制作用^[9]。为了更进一步揭示 Nd³⁺ 促进小麦种子萌发的原因, 本文以无胚半粒小麦做实验材料, 经反复实验, 发现 Nd³⁺ 对 GA₃ 诱导 α-淀粉酶有明显的促进作用。

材料与方 法

植物材料 小麦 (*Triticum aestivum* cv. Tao 157) 种子经粒选, 1% 次氯酸灭菌 15 min, 无菌蒸馏水反复冲洗, 去掉有胚半粒, 将 20 粒无胚种子置培养皿中, 加 15ml 培养液 (均含 1 mg·ml⁻¹ 硫酸链霉素), 24 °C 暗培养。Nd³⁺ 由 NdCl₃ (分析纯) 配制。

α-淀粉酶的提取与活力测定 参照朱广廉^[2] 介绍的方法提取 α-淀粉酶, 即将培养液与半粒小麦一起匀浆, 5 000 rpm 离心 15 min, 定容至 25ml, 70 °C 保温 15min 以灭活 β-淀粉酶。取 1ml 酶液测定其在 37 °C、20min 水解产生的还原糖量。反应系统为 0.1mol/L, pH5.6 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液 5ml, 加 1% 淀粉 1ml, DNS(3,5-二硝基水杨酸) 法测定还原糖^[9]。

α-淀粉酶的体外处理 在反应系统中加入不同浓度 Nd³⁺, 测定 α-淀粉酶活力。

Nd³⁺ 对麦芽糖 DNS 法显色的影响 配制含不同浓度 Nd³⁺ 的 1mg·ml⁻¹ 麦芽糖溶液, 用 DNS

法显色并测定 OD_{520} 值。

培养介质电导率的测定 用 DDB-6200 型电导率仪 (上海雷磁仪器厂产) 于培养前后测定培养液的电导率, 温度 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

结果

一、不同浓度 Nd^{3+} 对 GA_3 诱导 α -淀粉酶及对培养介质电导率的影响

为了揭示 Nd^{3+} 的效应, 采用 10^{-8} mol/L 的 GA_3 与不同浓度 Nd^{3+} 的培养液培养无胚半粒小麦, 50h 后对 α -淀粉酶活力测定结果表明 (图 1), 缺乏 GA_3 时, Nd^{3+} 处理的 α -淀粉酶活力很低, 不超过 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ 半粒, 类似于或低于不加 Nd^{3+} 的, 说明 Nd^{3+} 本身不能诱导 α -淀粉酶。当 GA_3 存在时, α -淀粉酶活力与 Nd^{3+} 浓度之间呈下述关系: Nd^{3+} 浓度为 1 与 5ppm, α -淀粉酶活力均高于单加 GA_3 的对照, 以 1ppm Nd^{3+} 的效应最为显著, 酶活力比单加 GA_3 的增加了 70%。 Nd^{3+} 浓度大于 10ppm 则呈抑制效应, 并随浓度的提高而抑制加强。这与我们发现 Nd^{3+} 促进小麦种子萌发的浓度相符^[5]。 Nd^{3+} 的作用需以 GA_3 的存在为前提, 即 Nd^{3+} 促进种子萌发的作用与它促进 GA_3 效应的强度有关。

GA_3 诱导小麦糊粉层 α -淀粉酶时, 无胚半粒种子介质的电导率上升 (9.4%), 可是, 1 与 5ppm Nd^{3+} 处理介质的电导率在种子培养 50h 后仍保持原处理前的水平, 相当于此时对照 (409) 的 92% 左右。但是, 10-20ppm Nd^{3+} 处理的介质电导率却显著增加, 分别比对照高 4.8% 和 20% (表 1)。

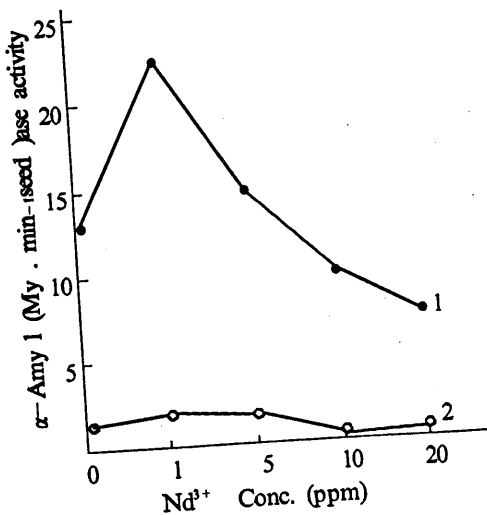


图 1 不同浓度 Nd^{3+} 对 GA_3 诱导 α -淀粉酶的影响
Fig. 1 The effect of different concentrations of Nd^{3+} on α -amylase induced by GA_3
1. $10^{-8}\text{ mol/L } GA_3 + Nd^{3+}$ 2. Nd^{3+}

表 1 半粒小麦种子培养前后电导率的变化

Table 1 The changes of electroconductivity of media solution during culture of embryo-less seeds

Electroconductivity ($\mu\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$)	Nd^{3+} (ppm)				
	0	1	5	10	20
Before culture	374	374	376	383	390
After culture for 50 h	409	379	378	429	491

上述结果显示: 当低浓度 Nd^{3+} 对 GA_3 诱导 α -淀粉酶活性呈正效应时, 小麦半粒种子介质电导率几乎不变。而较高浓度 Nd^{3+} 对 GA_3 诱导 α -淀粉酶产生负效应时, 介质电导率明显增加。这两种过程的同步变化暗示 Nd^{3+} 可能影响质膜结构与透性。

二、1ppmNd³⁺ 促进 GA₃ 诱导 α-淀粉酶的时间进程

研究 Nd³⁺ 对 GA₃ 诱导 α-淀粉酶作用的时间进程,可进一步揭示 Nd³⁺ 对 GA₃ 诱导淀粉酶的增效作用实质。图 2 可见,无 Nd³⁺ 对照经 36h 培养,α-淀粉酶活性开始升高。随着时间的推移,酶活性呈线性增加,60h 后达到 36 单位,与 Hetherington 等的实验结果相似^[7]。在 1ppm Nd₃₊ 存在下培养 24h,酶活性就开始升高,36h 后活力高达 27 单位。48h 与 60h 仍明显高于仅用 10⁻⁸ mol/L GA₃ 处理的对照。说明 Nd³⁺ 促进 GA₃ 对 α-淀粉酶诱导的原因之一在于缩短了 GA₃ 作用的滞后期,即减少了诱导酶的准备时间。联系本文表 1 的结果,以及作者前文的结果^[5],表明 Nd³⁺ 促进 GA₃ 的作用与膜确有重要的关系,值得深入研究。

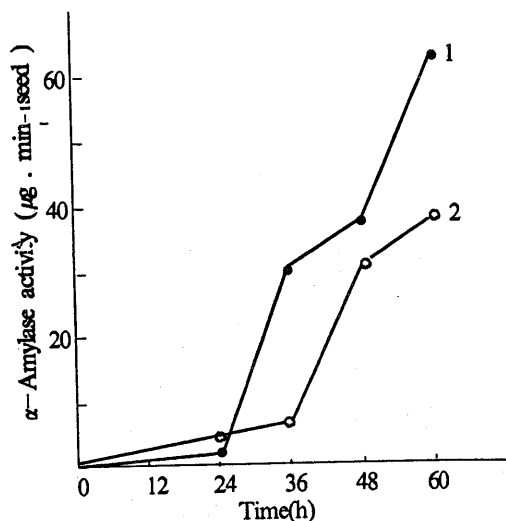


图 2 Nd³⁺ 促进 GA₃ 诱导 α-淀粉酶的时间进程

Fig. 2 Time course of Nd³⁺ on the α-amylase

promotion induced by GA₃

1. GA₃ 10⁻⁸ mol/L + Nd³⁺ 1ppm

2. GA₃

三、1ppm Nd³⁺ 对不同浓度 GA₃ 诱导 α-淀粉酶的影响

为了查清 Nd³⁺ 离子对 GA₃ 作用的特点,以 1ppm Nd³⁺ 与不同浓度 GA₃ 溶液培养无胚半粒小麦,相应的对照不加 Nd³⁺。50h 后,对照的 α-淀粉酶活力与 GA₃ 浓度在 10⁻⁹ - 10⁻⁷

mol/L 之间呈线性相关,当浓度高于 10⁻⁷ mol/L 时,酶活性不再提高。说明 GA₃ 诱导 α-淀粉酶有饱和现象,可能为糊粉层细胞质膜外侧的 GA₃ 受体量所限制^[8],当 Nd³⁺ 存在时,α-淀粉酶活性在 GA₃ 作用的线性浓度区间均有所提高。如 GA₃ 浓度为 10⁻⁷ 和 10⁻⁸ mol/L 时, Nd³⁺ 处理后,酶活力均可达到相应对照的 1.5 倍以上,当 GA₃ 浓度持续增大时, Nd³⁺ 不仅无促进作用,甚至有负作用(图 3)。我们通过反复实验证实了这一结果,表明 Nd³⁺ 与 GA₃ 之间必须有一定比例,才具有促进效应。有关稀土三价离子络合性能研究显示, Nd³⁺ 等具有极强的络合能力,常能与氨基酸、核苷酸形成 1:1 的稳定络合物^[9]。GA₃ 分子具有羟基与羧基,推测也可与 Nd³⁺ 形成某种络合物而起作用。这方面有待于从化学角度深入研究。

四、Nd³⁺ 对离体 α-淀粉酶及麦芽糖显色的影响

提取与分离的 α-淀粉酶在不同浓度 Nd³⁺ 的反应系统中活力并无明显差异, Nd³⁺ 浓度并不影响酶活力,低浓度 Nd₃₊ 不表现促进效应,高浓度 Nd³⁺ 也未显示抑制效应(图 4)。在不同浓度 Nd³⁺ 中,麦芽糖与 3,5-二硝基水杨酸显色后, O.D.₅₂₀ 值也无显著差异。可见 Nd³⁺ 对 α-淀粉酶活力的促进效应仅与其诱导过程有关。

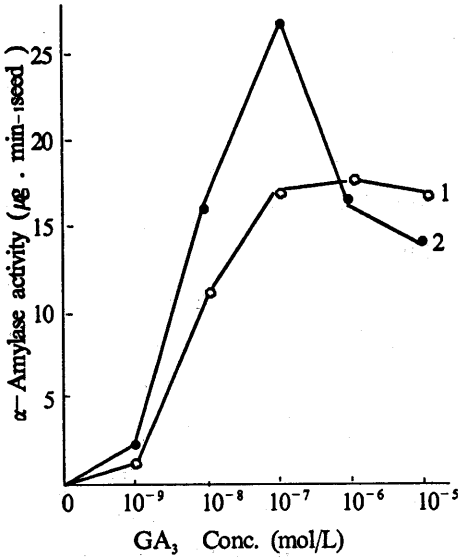


图3 Nd^{3+} 对不同浓度 GA_3 诱导 α -淀粉酶的效应

Fig. 3 The effect of 1 ppm Nd^{3+} on the induction

of α -amylase by different concentrations of GA_3

1. $GA_3 + Nd^{3+}$

2. GA_3

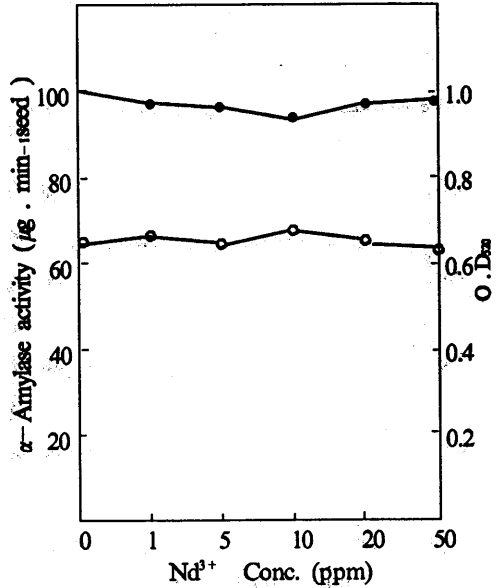


图4 不同浓度 Nd^{3+} 对 α -淀粉酶体外活性与麦芽糖 DNS 法显色的影响

Fig. 4 The effect of different concentrations of Nd^{3+} on

the activity of α -amylase *in vitro* and the reaction of maltase with DNS reagent

1. α -amylase activity

2. O. D_{520}

讨论

前人对 GA_3 诱导 α -淀粉酶的作用机理的研究发现, GA_3 的作用除了提高 α -淀粉酶 mRNA 的转录外, 还与另外一种称为 GA_3 受体的蛋白有关。Hooley 等确实发现大麦糊粉层细胞的质膜外侧有 GA_3 受体的存在^[8], Jones 等^[10]的研究已表明, 在 GA_3 诱导 α -淀粉酶产生之前, 糊粉层细胞的内质网必须先行增生。Vakharia 等^[11]则发现, 这一增生过程伴随着磷脂的代谢。可见, GA_3 诱导 α -淀粉酶的过程已基本清晰。 Nd^{3+} 是一种稀土元素, 此类元素的生理已被确认^[1,4,5,6] 本文结果揭示, 1ppm Nd^{3+} 是通过提高 GA_3 的作用而产生效应, Nd^{3+} 缩短 GA_3 作用的滞后期, 从而加快了 GA_3 对 α -淀粉酶诱导的准备时间。最近, Hetherington 等报道^[7], GA_3 诱导 α -淀粉酶出现前, 即刺激了磷脂酰胆碱“头部”的转换, 这充分说明该过程与膜的结构及功能的变化密切相关。 Nd^{3+} 降低小麦种子萌发期间电解质外渗^[5] 和半粒小麦电电解质外渗, 由此可推论 Nd^{3+} 对 GA_3 的促进效应在于它对膜的作用。有不少证据证明稀土

元素影响膜的透性^[2],李世清等^[1]报道 La^{3+} 提高小麦幼苗弱发光值,推测是增加了膜的不饱和脂肪酸。我们也曾发现, Nd^{3+} 抑制水分胁迫情况下小麦叶 K^{+} 的外渗量(未发表资料)。这种膜结构的改变也可能有利于 GA_3 与受体的作用。另外, Nd^{3+} 离子半径(100pm)与 Ca^{2+} (99pm)非常接近,又具有高度的络合力^[4],提示它很可能与 $\text{Ca}-\text{CaM}$ 系统有关。有关 Nd^{3+} 促进 GA_3 效应的机理,仍有待深入探讨。

参考文献

- [1] 李世清、冯春奎、周映忠, 稀土对苗期小麦一些生理影响。陕西农业科学, 1992, (2):7-8.
- [2] 朱文康等, 植物生理学实验。北京大学出版社, 1990, 175-178.
- [3] 张龙翔等, 生物化学实验技术和方法。人民教育出版社, 1981, 9-10.
- [4] 杨频, 生物化学中的稀土元素。化学通报, 1985, 31(7):31-36.
- [5] 陈靠山、张利平、高荣、王运博, Nd^{3+} 促进小麦种子萌发的生理机制。甘肃科学 1993, 5(1):67-71.
- [6] 郭伯生等, 农业中的稀土。中国农业科学出版社, 1988, 31-38.
- [7] Hetherington, P. R., D. L. Laidman, Influence of gibberellic acid and the Rht3 gene on choline and phospholipid metabolism in Wheat aleurone tissue. J. Exp. Bot., 1991, 42:1357-1362.
- [8] Hooley, R., M. H. Beale, S. T. Smith, et al., Novel affinity probe for gibberellin receptor in aleurone protoplast of *Avena sativa* in: Rood, S. B. and Pharis, R. P. (eds), Plant Growth Substance, 1988, Springer-verlag, New York, 36-48.
- [9] Jacobsen, J. V., L. R. Beach, Control of transcription of α -amylase and rRNA gene in barley aleurone protoplast by gibberellin and abscisic acid. Nature, 1985, 316(6025):275-277.
- [10] Jones, R. L., J. V. Jacobsen, The role of endoplasmic reticulum in the synthesis and transport of α -amylase in barley aleuronelayer. Planta, 1982, 56:421-432.
- [11] Vakharia, D. N., C. A. Brearley, M. C. Wilkinson, et al., Gibberellin modulation of phosphatidyl-choline turnover in wheat aleurone tissue. Planta, 1987, 172:502-507.

THE PROMOTATION OF Nd^{3+} ON α -AMYLASE ACTIVITY INDUCED BY GIBBERELIC ACID

Chen Kaoshan Zhor Xie Peng Zhenghua Xu Yan Chen Kunming

(Agronomy Department, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014)

Abstract

1ppm Nd^{3+} promoted the α -amylase activity induced by gibberellic acid at concentrations from 10^{-9} to 10^{-7} mol/L in embryo-less wheat seed. The activity of α -amylase in the seed treated with 1ppm Nd^{3+} and 10^{-8} mol/L GA_3 was 70% more than that just treated with GA_3 .

Nd^{3+} (1ppm) did not induce α -amylase activity and did not effect the enzyme activity in vitro, but it shortened the stagnant time of GA_3 action. It also decreased the electroconductivity of the medium in which the embryo-less seeds were cultured.

Key words: Nd^{3+} ; Gibberellic acid; α -amylase; Wheat