重金属胁迫对水稻萌发种子淀粉酶活性的影响*

葛才林[1], 杨小勇[1], 孙锦荷[2], 王泽港[1], 罗时石[1], 马　飞[1], 龚　峥[1]
(1 扬州大学 农学院, 江苏 扬州 225009; 2 浙江大学 核农学研究所, 浙江 杭州 310029)

[摘　要]　应用酶活性测定和聚丙烯酰胺浓度梯度凝胶电泳技术, 研究了 3 种不同浓度的重金属胁迫对不同类型水稻萌发种子中 α, β-淀粉酶同功酶活性的影响。结果表明: (1) 0.05 mmol/L 的 Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} 胁迫使水稻萌发种子中 α-淀粉酶活性有所增高, 而 > 0.05 mmol/L 的 Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} 胁迫则导致水稻各品种萌发种子中 β-淀粉酶活性显著降低。(2) Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} 胁迫使武育粳萌发种子中 β-淀粉酶活性随重金属浓度的增高呈先上升后下降的趋势, 并显著抑制(尤其是 Hg^{2+}) 扬稻 6 号和汕优 818 的 β-淀粉酶活性。(3) 0.05 mmol/L 的 Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} 胁迫能明显诱导新的淀粉酶同功酶的产生, > 0.05 mmol/L 的 Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} 则抑制一些同功酶的正常表达。

[关键词]　重金属胁迫; 淀粉酶; 水稻; 种子萌发
[中图分类号]　S511.01; Q556+.2　　[文献标识码]　A　　[文章编号] 1000-2782(2002)03-0047-06

在种子萌发过程中, 种子内淀粉酶催化贮藏淀粉水解, 为作物幼苗的形态建成和生长发育提供主要的物质和能量来源。作物体内的淀粉酶主要有 α-淀粉酶(E.C. 3.2.1.1) 和 β-淀粉酶(E.C. 3.2.1.2)。研究表明, α, β-淀粉酶均由多个同功酶构成[1~3], 不同类型作物品种 α, β-淀粉酶的含量有较大差异[4], 且 α, β-淀粉酶同功酶的表达具有组织特异性[5,6]。α, β-淀粉酶活性还受环境条件的影响。干旱胁迫能使水稻体内 α, β-淀粉酶活性增高[7,8]。无氧条件下, 水稻糊粉层中 α-淀粉酶活性下降, 而胚中 α-淀粉酶活性增高[9]。外源 Ca^{2+} 浓度能明显影响高粱籽粒中的淀粉酶活性, 3 mmol/L 的外源 Ca^{2+} 使 α-淀粉酶活性增高, 但对 β-淀粉酶没有影响。当培养液中含有 30 mmol/L Ca^{2+} 时, 籽粒中的 α, β-淀粉酶活性均下降[10]。此外, 香烟烟雾能显著延迟水稻等萌发种子中 α-淀粉酶的表达[11]。

重金属污染是构成环境污染的主要因素之一。重金属离子可随被污染的灌溉用水进入农田生态系统, 对农作物的生长发育造成伤害。目前有关重金属污染对水稻萌发种子中 α, β-淀粉酶活性影响的研究报道很少, 且缺乏系统研究。为此, 本试验研究了不同浓度的 Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} 3 种重金属胁迫对不同类型水稻品种(籼稻、粳稻和杂交稻) 萌发种子中 α, β-淀粉酶活性和同功酶表达的影响。

1　材料与方法

1.1　材　料

供试重金属离子: Cu^{2+} ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), Cd^{2+} ($CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$), Hg^{2+} [$Hg(CH_3COO)_2$]。均为化学纯。

供试水稻品种(*Oryza sativa* L.): 武育粳(粳稻型)、扬稻 6 号(籼稻型)、汕优 818(杂交稻), 由扬州大学稻麦研究室提供。

1.2　方　法

1.2.1　水稻培养和重金属胁迫处理　将浸种催芽后的萌发种子播种于培养皿中的尼龙网上, 加入稍加改进的木村 B 培养液(将培养液中的柠檬酸铁改为 EDTA-铁, 加入一定浓度的硅酸钠, pH 为 5.0 左右), 20 ℃培养。

待幼苗长至 1 叶 1 心时, 分别将各培养皿中培养液换成含有 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mmol/L Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} 的培养液, 进行重金属胁迫处理。

1.2.2　酶液提取和淀粉酶活性测定　待重金属处理 7 d 后, 取幼苗 10 株, 剪取萌发种子并去壳, 称 1 g 置于预冷的研钵中, 加入 3 mL 预冷的提取介质

* [收稿日期]　2002-01-21
[作者简介]　葛才林(1962-), 男, 江苏扬州人, 副教授, 在读博士, 主要从事生物物理和作物逆境生理研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

(蔗糖 11.98 g, Tris 0.60 g, 抗坏血酸钠 0.088 g, 半胱氨酸 0.030 g, 氯化镁 0.020 g, 定容至 100 mL, pH 值调为 7.4), 冰浴上研磨成匀浆, 15 000 r/min, 0 ℃离心 30 min, 上清液为酶提取液, -20 ℃保存备用。

取上述酶液, 按参考文献[12]所述方法进行 α, β-淀粉酶活性测定。并以每小时、每克萌发种子酶液所分解的极限糊精或生成麦芽糖毫克数分别表示 α 或 β-淀粉酶活性。

1.2.3 淀粉酶同功酶分析 吸取上述酶液 20 μL, 采用聚丙烯酰胺浓度梯度凝胶电泳技术进行同功酶分析。聚丙烯酰胺质量浓度为 40～300 g/L, 4 ℃, 220 V 稳压电泳, 电泳时间为 10 h。

电泳后的凝胶置于 10 g/L 淀粉溶液中 1 h, 待淀粉被凝胶吸收后, 置于 0.2 mmol/L, pH 为 5.0 的乙酸缓冲液中, 37 ℃保温 1.5 h, 然后进行 I_2-KI 显色。

1.2.4 α-淀粉酶和 β-淀粉酶的鉴定 将电泳后的凝胶分别置于含 10 g/L 淀粉, pH 值分别为 5.0 和 3.6 的乙酸缓冲液中进行淀粉吸收和 I_2-KI 显色, 根据 α-淀粉酶和 β-淀粉酶耐酸性不同加以区别。

2 结果与分析

2.1 重金属胁迫对 α-淀粉酶活性的影响

不同浓度的重金属对不同类型水稻品种(武育粳、扬稻 6 号和汕优 818)萌发种子中 α-淀粉酶活性的影响动态见图 1。

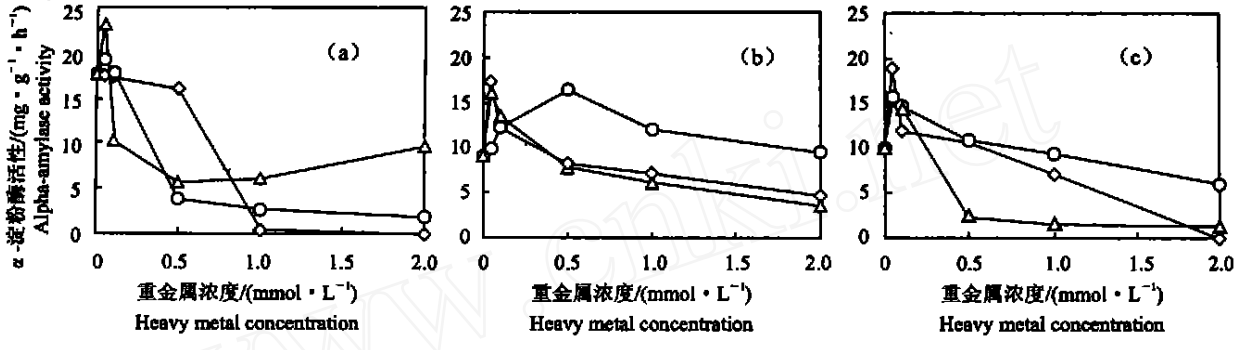

图 1 不同浓度重金属对不同类型水稻品种萌发种子 α-淀粉酶活性的影响

-◇- Cu; -○- Cd; -△- Hg; (a)武育粳; (b)扬稻 6 号; (c)汕优 818

Fig. 1 Effect of heavy metal stress on the alpha-amylase activity in germinating seeds of Wuyugeng

-◇- Cu; -○- Cd; -△- Hg; (a) Wuyujing; (b) Yangdao 6; (c) Xianyou 818

从图 1 可以看出, (1)对照各品种萌发种子中 α-淀粉酶活性大小顺序为粳稻> 籼稻> 杂交稻。(2)随 Cu^{2+}, Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 胁迫浓度的增高, 不同类型水稻萌发种子内 α-淀粉酶的活性均呈先上升后下降的规律。除籼稻萌发种子内 α-淀粉酶的活性在 Cd^{2+} 浓度达 0.5 mmol/L 时达到最大值外, 其余均在 0.05 mmol/L 时达到最大值, 以后随 Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} 胁迫浓度的进一步增大, α-淀粉酶活性迅速下降。这表明, 除 Cd^{2+} 对籼稻的影响外, 0.05 mmol/L 的重金属胁迫能使水稻萌发种子内 α-淀粉酶活性增高, 而> 0.05 mmol/L 的 Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} 胁迫则使 α-淀粉酶活性迅速下降。(3)就不同类型水稻而言, 粳稻萌发种子内 α-淀粉酶活性受重金属胁迫抑制的敏感性最强, 籼稻最低, 杂交稻居中。(4)就不同重金属而言, ≥1.0 mmol/L 的 Cu^{2+}, Cd^{2+} 对粳稻萌发种子 α-淀粉酶活性的抑制程度大于 Hg^{2+}, 而≥0.5 mmol/L 的 Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 对籼稻和杂交稻种子中α-淀粉酶活性的抑制程度大于 Cd^{2+}。

2.2 重金属胁迫对 β-淀粉酶活性的影响

不同浓度的重金属胁迫对武育粳、扬稻 6 号和汕优 818 萌发种子内 β-淀粉酶活性的影响见表 1。从表 1 可以看出, (1)对照粳稻萌发种子内有最高的 β-淀粉酶活性, 籼稻的 β-淀粉酶活性最低, 杂交稻居中。(2)随 Cu^{2+}, Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 胁迫浓度的增高粳稻萌发种子内 β-淀粉酶活性呈先上升后下降的规律。当 Cu^{2+} 浓度为 0.05 mmol/L, Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 浓度达 0.5 mmol/L 时粳稻种子内 β-淀粉酶活性最高。这表明, ≤0.05 mmol/L 的 Cu^{2+}, ≤0.5 mmol/L 的 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 胁迫能使粳稻萌发种子中 β-淀粉酶活性有所增高, 当 Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} 浓度进一步增高时则抑制 β-淀粉酶活性。(3)随 Cu^{2+}, Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 胁迫浓度的增高, 籼稻和杂交稻萌发种子内 β-淀粉

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

酶活性均表现为持续下降的趋势, 这表明 Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} 胁迫抑制籼稻和杂交稻萌发种子内 β-淀粉酶活性, 抑制程度随 3 种离子胁迫浓度的增高而增大。(4) 就不同重金属胁迫而言, Hg^{2+} 对籼稻和杂交稻萌发种子 β-淀粉酶活性的抑制程度最高, 其次为 Cd^{2+}, Cu^{2+} 对籼稻和杂交稻 β-淀粉酶活性的抑制程度最小。

表 1　重金属胁迫对水稻萌发种子 β-淀粉酶活性的影响

Table 1　Effect of heavy metal stress on the beta-amylase activity in the germinating seeds of rice

mg/(g·h)

水稻 Rice	重金属 Heavy metal	重金属浓度/(mmol·L⁻¹) Heavy metal concentration					
		0	0.05	0.1	0.5	1.0	2.0
武育粳 Wuyujing	Cu	633.8	761.8	718.7	700.8	590.8	508.8
	Cd	633.8	693.6	729.5	780.6	769.3	606.1
	Hg	633.8	642.2	672.1	730.7	623.3	526.4
扬稻 6 号 Yangdao 6	Cu	422.1	424.1	426.2	366.7	360.5	347.5
	Cd	422.1	392.7	370.8	358.5	350.9	322.9
	Hg	422.1	400.9	408.4	96.5	57.5	56.8
汕优 818 Xianyou 818	Cu	509.0	356.1	341.8	361.0	381.5	392.5
	Cd	509.0	404.5	367.0	294.8	275.8	252.8
	Hg	509.0	469.5	393.5	287.8	242.7	222.7

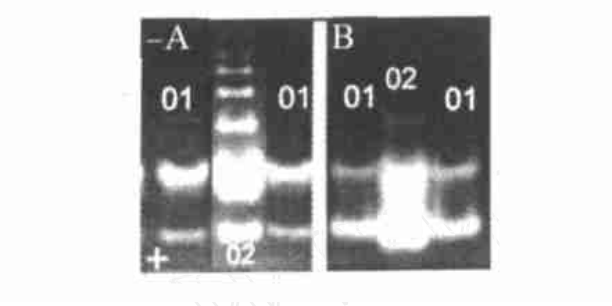

图 2　不同萌发时间扬稻 6 号籽粒中淀粉酶类型的差异

A. 在 pH = 5.0 的乙酸缓冲液中染色, B. 在 pH = 3.6 的乙酸缓冲液中染色; 01. 萌发后 3 d 的种子, 02. 萌发后 15 d 的种子

Fig. 2　Expression difference of amylase in germinating rice (Yangdao 6) seeds at different germinating time

A. Starch-I_2 staining in pH = 5.0 buffer, B. Starch-I_2 staining in pH = 3.6 buffer; 01. 3 days after germinating; 02. 15 days after germinating

2.3　重金属胁迫对 α, β-淀粉酶同功酶的影响

不同萌发时间的籼稻种子内淀粉酶同功酶类型的差别见图 2。图 2 表明, 在萌发仅 3 d 的籼稻种子内各淀粉酶同功酶表达较弱, 活性较低, 而在萌发 15 d 的籼稻种子内各同功酶表达显著增强, 活性增高, 同功酶数量增多。图 2 还表明, 在 pH = 3.6 的乙酸缓冲液中进行淀粉吸收和 I_2-KI 显色后主要显示迁移率最大的两组淀粉酶同功酶。这表明, 这两组淀粉酶同功酶比较耐酸, 尤其迁移率最大的一组淀粉酶同功酶最耐酸, 该同功酶带在 pH = 3.6 的乙酸缓冲液中的宽度和亮度大于 pH = 5.0 的宽度和亮度。由于 β-淀粉酶耐酸, 而 α-淀粉酶不耐酸[13], 因此, 迁移率最大的一组淀粉酶可能为 β-淀粉酶, 其余可能为 α-淀粉酶。

从图 3W 可以看出, 对照粳稻萌发种子主要表达第Ⅲ, Ⅴ, Ⅶ和Ⅷ这 4 组淀粉酶同功酶, 0.05 和 0.5 mmol/L 的 Cu^{2+} 胁迫则诱导了第Ⅱ, Ⅳ组同功酶的表达, 但随 Cu^{2+} 浓度的增高, 正常表达的第Ⅲ, Ⅴ组同功酶的表达逐步受到抑制, 当 Cu^{2+} 浓度达 2.0 mmol/L 时, 除第Ⅶ, Ⅷ组淀粉酶同功酶外的所有其他同功酶酶带基本消失。0.05 和 2.0 mmol/L 的 Cd^{2+} 胁迫分别明显诱导第Ⅳ, Ⅰ组同功酶的表达。同样, 随 Cd^{2+} 胁迫浓度增高, 第Ⅲ, Ⅴ组同功酶的表达逐步受到抑制, 当 Cd^{2+} 达 2.0 mmol/L 时, 第Ⅲ组同功酶完全消失。0.05 mmol/L 的 Hg^{2+} 胁迫明显诱导了第Ⅴ组同功酶的表达, 0.5 mmol/L 的 Hg^{2+} 诱导了第Ⅱ, Ⅵ组同功酶的表达。图 3W 还表明, 粳稻萌发种子中第Ⅶ, Ⅷ同功酶的酶带宽度和亮度受 Cu^{2+}, Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 胁迫的影响不明显。总之, 一定浓度的 Cu^{2+}, Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 胁迫能明显诱导粳稻萌发种子中一些淀粉酶同功酶的表达, 但正常情况下表达的第Ⅲ, Ⅴ组同功酶则受 Cu^{2+}, Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 胁迫的抑制, 且受抑制程度随 Cu^{2+}, Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 胁迫浓度的增高而增强。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

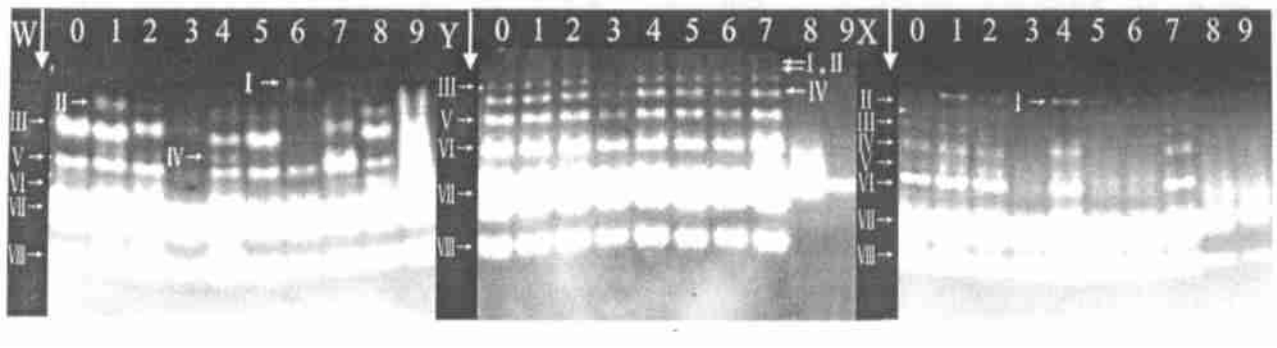

图 3 重金属胁迫对水稻萌发种子淀粉酶同功酶活性的影响

W. 武育粳, Y. 扬稻 6 号, X. 汕优 818; 0 为对照; 1, 2, 3 为 Cu^{2+} 胁迫, 浓度分别为 0.05, 0.5 和 2.0 mmol/L; 4, 5, 6 为 Cd^{2+} 胁迫, 浓度分别为 0.05, 0.5 和 2.0 mmol/L; 7, 8, 9 为 Hg^{2+} 胁迫, 浓度也分别为 0.05, 0.5 和 2.0 mmol/L; Ⅰ～Ⅶ为 α-淀粉酶; Ⅷ为 β-淀粉酶

Fig. 3 Effect of heavy metal stress on the activity of amylase isoforms in germinating rice seeds

W. Wuyujing, Y. Yangdao 6, X. Xianyou 818; 0 represent control; 1, 2, 3 represent Cu^{2+} stress, the Cu^{2+} concentration are 0.05, 0.5, 2 mmol/L; 4, 5, 6 represent Cd^{2+} stress; 7, 8, 9 represnet Hg^{2+} stress, the Cd^{2+} and Hg^{2+} concentration are also 0.05, 0.5, 2.0 mmol/L; Ⅰ- Ⅶ are probably α-amylase, Ⅷ are β-amylase

从图 3 Y 可以看出, 对照籼稻萌发种子中主要表达第Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ, Ⅵ, Ⅶ和Ⅷ 6 组淀粉酶同功酶。和粳稻及杂交稻相比, 籼稻萌发种子内淀粉酶同功酶表达受 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 胁迫的影响相对较小, 2.0 mmol/L 的 Cd^{2+} 使第Ⅲ组同功酶基本消失, 并使第Ⅳ, Ⅴ和Ⅵ组淀粉酶酶带亮度变浅。Cd^{2+} 胁迫对籼稻种子内淀粉酶同功酶的数量基本无影响, 只是当 Cd^{2+} 胁迫浓度达 2.0 mmol/L 时各酶带的亮度稍有降低。和粳稻相比, Hg^{2+} 胁迫对籼稻萌发种子内淀粉酶的表达产生强烈影响, 具体表现为 0.05 mmol/L 的 Hg^{2+} 胁迫能诱导籼稻萌发种子同第Ⅰ, Ⅱ组同功酶的表达, 且使第Ⅴ, Ⅵ组同功酶的亮度显著增加。但当 Hg^{2+} 浓度≥0.5 mmol/L 时, 各组淀粉酶同功酶的表达受到极显著抑制, 正常表达的第Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ, Ⅵ和Ⅷ 5 组同功酶酶带基本消失。第Ⅶ组同功酶带也随 Hg^{2+} 胁迫浓度的增高而逐渐变窄。总之, Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 胁迫对籼稻萌发种子内淀粉酶同功酶数量的影响不明显, 但受到≥0.5 mmol/L Hg^{2+} 胁迫的显著抑制。

从图 3 X 可以看出, 对照杂交稻萌发种子内也主要表达第Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ, Ⅵ, Ⅶ和Ⅷ 6 组淀粉酶同功酶, 0.05 mmol/L 的 Cu^{2+}, Cd^{2+} 能明显诱导杂交稻萌发种子内第Ⅰ组淀粉酶同功酶的表达。杂交稻萌发种子内的第Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ和Ⅵ组同功酶的表达受 2.0 mmol/L 的 Cu^{2+} 和≥0.5 mmol/L 的 Cd^{2+}, Hg^{2+} 胁迫的显著抑制, 表现为正常表达的这 4 组同功酶在 2.0 mmol/L 的 Cu^{2+} 和≥0.5 mmol/L 的 Cd^{2+}, Hg^{2+} 胁迫条件下基本消失。和籼稻相似, 杂交稻萌发种子内第Ⅶ, Ⅷ同功酶的表达受 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 胁迫的影响较小, 而受到≥0.5 mmol/L Hg^{2+} 胁迫的显著抑制。

3 讨 论

本研究结果表明, 正常情况下(对照)水稻萌发种子内淀粉酶同功酶由 4～6 组构成(粳稻表达 4 组, 籼稻和杂交稻主要表达 6 组)。各组淀粉酶同功酶内的酶带数量也有差异, 有的由 2 条细的酶带组成, 有的只见 1 条酶带。因此可认为, 水稻淀粉酶由多组同功酶组成, 且同一组内也可分为电泳迁移率略有不同的酶带。Yu SM 等[14]从水稻萌发种子中分离出 4 个编码 α-淀粉酶的 cDNA 克隆, 它们分别来自不同的基因。Mitsui 等[1]从水稻籽粒悬浮培养细胞中分离出 10 个 α-淀粉酶同功酶, 根据其物理化学性质的差异将其分为 4 个亚组, 并认为亚组内各同功酶的差异主要源于翻译后的修饰。因此, 作者认为本试验结果所显示的不同组淀粉酶同功酶可能源于不同淀粉酶基因的表达, 而同一组内的不同细带可能源于同一淀粉酶基因表达后产物的修饰。Awazuhara 等[6]认为, 水稻种子不同部位含有不同类型的 α-淀粉酶, 这些酶具有不同的最佳反应条件, 从而有利于将淀粉水解成不同的糖。Krrer 等[5]的研究结果也表明, 水稻种子内 α-淀粉酶的表达具有组织特异性, 有的淀粉酶基因如 Ramy1B, Ramy3C 和 Ramy3E 在糊粉层中优先表达, 而有的基因如 Ramy1A, Ramy1B 和 Ramy3D 则在胚和糊粉层中均有表达, 有的基因如 Ramy3A 和 Ramy2A

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

则在胚和糊粉层中均不表达。从上述文献可以推论, 水稻基因组中含有多个编码 α-淀粉酶的基因, 正常情况下某些编码 α-淀粉酶的基因在水稻萌发种子中并不表达, 一定浓度的重金属离子胁迫可能会诱导这些基因在水稻萌发种子内的表达, 从而诱导产生一些新的淀粉酶酶带。

Mitsunaga 等[4]报道, 在非粘性水稻品种的萌发种子中, 淀粉酶主要由 α-淀粉酶组成, 而在粘性水稻品种的萌发种子内 β-淀粉酶活性较高, 并且 α-淀粉酶的表达也受到抑制。在本试验的供试品种中, 粳稻的粘性较籼稻和杂交稻高, 测得的 β-淀粉酶活性显著高于籼稻和杂交稻。

Kohno 等[2]从苜蓿种子中分离出 5 个 β-淀粉酶, 且随种子的萌发 5 个 β-淀粉酶的活性逐步增高。Pujadas 等[3]也从大豆中分离出 5 个 β-淀粉酶。夏叔芳等[13]研究表明, α-淀粉酶活性对 Hg^{2+} 和 Ag^{2+} 比较稳定, 而 β-淀粉酶对 Hg^{2+} 和 Ag^{2+} 比较敏感, 0.01 mmol/L 的 Hg^{2+} 或 Ag^{2+} 处理可使大豆叶片 β-淀粉酶活力完全消失。本研究表明, 水稻萌发种子内第Ⅷ组淀粉酶同功酶可能为 β-淀粉酶。图 2 表明, 随着水稻种子萌发进程的推移, β-淀粉酶活性增高。图 3 的结果还证实, 各供试水稻品种萌发种子内 β-淀粉酶的表达受 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 胁迫的影响相对较小, 但籼稻和杂交稻萌发种子内 β-淀粉酶的表达受到较高浓度 Hg^{2+} 胁迫的强烈抑制。值得注意的是, 粳稻萌发种子内 β-淀粉酶的表达受 Hg^{2+} 胁迫的影响却不明显, 其原因有待于进一步研究。

重金属胁迫可能通过影响 α, β-淀粉酶的构型或基因的表达而影响 α, β-淀粉酶的活性。首先, β-淀粉酶是含 Ca^{2+} 的金属酶, 且 Ca^{2+} 和酶结合较为松散。β-淀粉酶也是含 Ca^{2+} 的金属酶, 1 个 β-淀粉酶中含有 1 个 Ca^{2+} [15]。进入萌发种子内的重金属离子可能会通过取代 α, β-淀粉酶中的 Ca^{2+} 或使 Ca^{2+} 与 α, β-淀粉酶解离, 或引起 α, β-淀粉酶空间构型的改变使淀粉酶活性降低。另外, α, β-淀粉酶的表达受到种子内植物激素和可溶性糖浓度的调节[16, 17]。至于较高浓度的重金属胁迫引起水稻萌发种子中 α, β-淀粉酶活性下降, 同功酶表达受到抑制的确切机理还值得进一步探讨。

[参考文献]

[1] Mitsui T, Yamaguchi J, Akazawa T. Physicochemical and serological characterization of rice alpha-amylase isoforms and identification of their corresponding genes[J]. Plant Physiol, 1996, 110(4): 1395-1404.

[2] Kohno A, Shinke R, Nanmori T. Features of the beta-amylase isoform system in dry and germinating seeds of alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. Biochim Biophys Acta, 1990, 1035(3): 325-330.

[3] Pujadas G, Palau J. Anatomy of a conformational transition of beta-strand 6 in soybean beta-amylase caused by substrate (or inhibitor) binding to the catalytical site [J]. Protein Sci, 1997, 6(11): 2409-2417.

[4] Mitsunaga S, Kawakami O, Numata T, et al. Polymorphism in rice amylases at an early stage of seed germination[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65(3): 662-665.

[5] Karrer E E, Litts J C, Rodriguez R L. Differential expression of alpha-amylase genes in germinating rice and barley seeds[J]. Plant Mol Biol, 1991, 16(5): 797-805.

[6] Awazuhara M, Nakagawa A, Yamaguchi J, et al. Distribution and characterization of enzymes causing starch degradation in rice (*Oryza sativa* cv. *koshihikari*)[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(2): 245-252.

[7] Yang J, Zhang J, Wang Z, et al. Activities of starch hydrolytic enzymes and sucrose-phosphate synthase in the stems of rice subjected to water stress during grain filling[J]. J Exp Bot, 2001, 52(364): 2169-2179.

[8] Todaka D, Matsushima H, Morohashi Y. Water stress enhances beta-amylase activity in cucumber cotyledons[J]. J Exp Bot, 2000, 51(345): 739-745.

[9] Hwang Y S, Thomas B R, Rodriguez R L. Differential expression of rice alpha-amylase genes during seedling development under anoxia[J]. Plant Mol Biol, 1999, 40(6): 911-920.

[10] Bhatia S, Singh R. Calcium-mediated conversion of sucrose to starch in relation to the activities of amylases and sucrose-metabolizing enzymes in sorghum grains raised through liquid culture[J]. Indian J Biochem Biophys, 2000, 37(2): 135-139.

[11] Noble R E. Effect of cigarette smoke on seed germination[J]. Sci Total Environ, 2001, 267(1-3): 177-179.

[12] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 123-124.

[13] 夏叔芳, 於新建, 苏丽英. 大豆叶片淀粉酶的特性[J]. 植物生理学报, 1989, 15(1): 41-45.

[14] Yu S M, Lee Y C, Fang S C, et al. Sugars act as signal molecules and osmotica to regulate the expression of alpha-amylase genes and

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

metabolic activities in germinating cereal grains[J]. Plant Mol Biol, 1996, 30(6): 1277- 1289.

[15] Mikami B, Adachi M, Kage T, et al. Structure of raw starch-digesting Bacillus cereus beta-amylase complexed with maltose[J]. Biochemistry, 1999, 38(22): 7050- 7061.

[16] Wang S M, Lue W L, Eimert K, et al. Phytohormone-regulated beta-amylase gene expression in rice[J]. Plant Mol Biol, 1996, 31(5): 975- 982.

[17] Umemura T A, Perata P, Futsuhara Y, et al. Sugar sensing and alpha-amylase gene repression in rice embryos[J]. Planta, 1998, 204(4): 420- 428.

Effect of heavy metal stress on the amylase activity in germinating rice seeds

GE Cai-lin[1], **YANG Xiao-yong**[1], **SUN Jin-he**[2], **WANG Ze-gang**[1], **LUO Shi-shi**[1], **MA Fei**[1], **GONG Zheng**[1]

(1 *Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu* 225009, *China*;
2 *Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang* 310029, *China*)

Abstract: In this paper, the α, β-amylase activity measuring methods and polyacrylamide concentration gradient gel electrophoresis technique were used to study the effect of heavy metal stress on amylase activity in germinating rice seeds. The results showed: (1) 0.05 mmol/L Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} stress caused α-amylase activity in germinating Wuyujing, Yangdao 6, Xianyou 818 seeds to increase obviously. However, the higher concentration of Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} stress caused α-amylase activity to decrease markedly, and the inhibited degree of α-amylase activity enhanced with the Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} concentration decreasing. (2) With the concentration of Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} increasing, the β-amylase activity in germinating Wuyujing seeds increased and then decreased. The activity of β-amylase in germinating Yangdao 6 and Xianyou 818 seeds was inhibited by all Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} treatments (especially, the Hg^{2+}). (3) Although > 0.05 mmol/L Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} stress inhibited the expression of some amylase isozymes which were expressed in normal condition (such as in control), 0.05 mmol/L Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} stress induced the expression of some amylase isozymes significantly.

Key words: heavy metal stress; amylase; rice; the germinating seeds

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net