

AQPs、NO 调节水稻种子萌发过程淀粉降解的研究

卢志霞, 谭春林, 陈惠萍*

海南大学生命科学学院, 海南海口 570228

摘要: 水稻 (*Oryza sativa* L.) 是一种重要的粮食作物, 其种子的正常萌发关乎后期植株的生长及产量。种子萌发始于干种子对水分的吸收, 止于胚轴伸长。细胞内部及细胞间的水分运输, 受水通道蛋白 (aquaporins, AQPs) 高度选择性调节。禾谷类的种子富含淀粉, 内源性赤霉素可诱导 α -淀粉酶等水解酶在胚中合成, 并将其分泌至淀粉性胚乳中降解淀粉为小分子物质, 供种子萌发需要。研究表明, 只有 α -淀粉酶才能完成水稻种子淀粉的降解。一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是一种信号分子, 可形成各种活性氮物质, 并参与解除种子休眠信号传导过程, NO 供体可通过提高淀粉酶活性促进种子萌发。为探究 AQPs、NO 对水稻种子萌发的影响, 本研究以博 II 优 767 的水稻杂交种子为试验材料, 采用 NO 合成抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯 [N(G)-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME]、钨酸钠 (sodium tungstate, ST) 与 NO 外源供体硝普钠 (sodium nitroprusside, SNP)、AQPs 活性抑制剂氯化汞 (HgCl_2) 等对水稻种子进行处理, 并借助表观分析和指标检测等手段确定水稻种子萌发过程中种子吸水能力、淀粉酶活性和淀粉降解速率等的变化。研究结果表明: 经 90 mg/L HgCl_2 预处理的水稻种子, 其吸水能力、淀粉酶活性和萌发率均下降, 淀粉含量保持较高水平, 胚根和胚芽的生长受到抑制; 而 NO 外源供体 SNP 则可逆转 HgCl_2 的效应, 且 NO 合成抑制剂 L-NAME (15 mmol/L) 和 ST (80 $\mu\text{mol/L}$) 对水稻种子萌发的作用效应与 HgCl_2 的相似。结果表明, 在水稻种子早期萌发阶段, AQPs 可通过 NO 介导诱发种子吸收水分, 激发淀粉酶, 加速淀粉降解, 从而促进种子的萌发。探究 AQPs 与 NO 在调节水稻种子萌发过程中的关系, 对提高农作物产量奠定理论基础。

关键词: AQPs; NO; α -淀粉酶; 种子萌发; 种子吸胀

中图分类号: S511 文献标志码: A

Regulation of Starch Degradation by AQPs and NO During the Germination of Rice Seeds

LU Zhixia, TAN Chunlin, CHEN Huiping*

College of Life Science, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: Rice (*Oryza sativa* L.) is an important food crop, and the normal germination of rice seeds is related to the growth and yield of the plant in the later period. The germination begins with water absorption by dry seeds and ends with cotyl elongation. Water transport within and between cells is highly selectively regulated by aquaporins (AQPs). The seeds of cereal are rich in starch. And the endogenous gibberellin can induce the synthesis of hydrolase such as α -amylase in the embryo and secrete them into the starchy endosperm to degrade starch into small molecules for seed germination. Studies have shown that only α -amylase can complete the degradation of starch in rice seeds. Nitric oxide (NO) is a signaling molecule that forms a variety of active nitrogen substances. It also participated in the signaling process of seed dormancy removal. NO donor plays a role in seed germination by enhancing amylase activity. NO donor can promote seed germination by improving the activity of amylase. Rice hybrid seeds of 'Bo II you 767' were used as experimental materials to investigate the effects of aquaporins (AQPs) and nitric oxide (NO) on the germination of rice seeds. In this study, NO synthesis inhibitors N-(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and sodium tungstate (ST),

收稿日期 2022-11-07; 修回日期 2022-12-19

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31960453)。

作者简介 卢志霞 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物生长发育与调控。*通信作者 (Corresponding author): 陈惠萍 (CHEN Huiping), E-mail: hpchen@sina.com。

sodium nitroprusside (SNP), an exogenous donor of NO, and mercury chloride (HgCl_2), an activity inhibitor of AQPs, were used to treat rice seeds. The changes of water absorption capacity, amylase activity and starch degradation rate during germination of rice seeds were determined in virtue of apparent analysis and index detection. The results showed that the water absorption capacity, amylase activity and germination rate decreased in the rice seeds treated with 90 mg/L HgCl_2 , while the starch content remained high, and the growth of radicle and germ was inhibited. However, NO exogenous donor SNP could reverse the effect of HgCl_2 . And the effect of NO synthesis inhibitors L-NAME (15 mmol/L) and ST (80 $\mu\text{mol/L}$) on the germination of rice seeds was similar to that of HgCl_2 . The results indicated that AQPs could induce water uptake, stimulate amylase, accelerate starch degradation and promote seed germination in the early germinating stage of rice seeds through NO. The study would lay a theoretical foundation for improving rice yield.

Keywords: AQPs; NO; α -amylase; seed germination; seed imbibition

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.05.010

种子萌发是植物生长的开始, 是一个受内源及外源因素精确调控的复杂生理生化过程^[1]。种子要完成萌发, 必须得先吸收水分, 因此, 吸水膨胀触发了种子的萌发过程^[2]。

植物水通道蛋白 (aquaporins, AQPs) 可促进植物根部对水分吸收, 而后通过茎将水输送到叶或种子等器官中, 并且 AQPs 可根据细胞需水量来调节水跨膜运输^[3-5]。植物可通过促进 AQPs 编码基因过表达, 增强自身吸水能力, 从而响应低氧胁迫^[6]。在 AQPs 活性抑制剂 HgCl_2 处理下, 蚕豆种子的吸水能力显著降低, 而 AQPs 过表达提高了番茄种子的导水率和存活率, 同时增强渗透胁迫下油菜种子萌发特性及吸水率^[7-9]。

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是一种小的水溶性和脂溶性气体, 易透膜扩散。它既是生物体内主要的信号分子^[10], 也是种子休眠的内源性调节剂, 可促进种子萌发, 并参与缓解盐、干旱以及重金属等逆境对种子萌发的胁迫作用^[11-16]。盐胁迫下, 外源 NO 供体硝普钠 (sodium nitroprusside, SNP) 可以适当提高水稻、紫苏及白菜的种子发芽指数, 促进种子萌发及早期幼苗生长, 而 NO 合成抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯[N(G)-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME]和钨酸钠 (sodium tungstate, ST) 则显著降低种子的活力, 阻止种子的萌发^[17-20]。

水稻等禾谷类种子萌发时, 所需的物质能量来源于胚乳中淀粉降解的小分子物质^[21]。淀粉的降解可通过 α -淀粉酶、 β -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的共同作用实现, 其中 α -淀粉酶是贯穿被子植物生长周期和生命周期的关键酶, 也是第一个附着在淀粉颗粒上的酶, 可以释放葡聚糖, 进一步降解底物, 为发育中的胚提供营养物质^[22]。大多数水稻 α -淀粉酶只在发育的种子胚中表达, 并在种

子萌发过程中被诱导^[23]。

外源 NO 可通过提高七叶一枝花种子的淀粉酶活性, 加速淀粉的溶解, 促进种子的萌发^[24], 而 SNP 可缓解盐胁迫抑制蒺藜苜蓿种子中淀粉酶活性及淀粉水解的效应^[25]。

本研究通过药理学实验并结合表观分析和指标检测等手段, 探究 AQPs、NO 对水稻种子萌发的影响, 为农业生产提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 采用杂交品种博 II 优 767 的水稻 (*Oryza sativa* L.) 种子, 购自海南儋州种子站。选取大小均一、谷粒饱满的水稻籽粒, 剥去谷壳, 将余下的种子用 0.1%高锰酸钾消毒 10 min。

1.1.2 试验设计 分别用 90 mg/L HgCl_2 、15 mmol/L L-NAME 和 80 $\mu\text{mol/L}$ ST 浸种水稻种子 12 h 后, 再设置以下 8 个处理: (1) H_2O (CK); (2) 90 mg/L HgCl_2 (HgCl_2); (3) 15 mmol/L L-NAME (L-NAME); (4) 80 $\mu\text{mol/L}$ ST (ST); (5) 200 $\mu\text{mol/L}$ SNP (SNP); (6) HgCl_2 +SNP (90 mg/L HgCl_2 预处理 12 h 后, 将处理液换成 200 $\mu\text{mol/L}$ SNP); (7) L-NAME+SNP (15 mmol/L L-NAME 预处理 12 h 后, 将处理液换成 200 $\mu\text{mol/L}$ SNP); (8) ST+SNP (80 $\mu\text{mol/L}$ ST 预处理 12 h 后, 将处理液换成 200 $\mu\text{mol/L}$ SNP)。

1.2 方法

1.2.1 种子萌发率的测定 在不同处理液中播种 50 粒水稻种子, 分别记录 20、24、36 h 下的种子露白数目。种子萌发率=对应时间的露白数/供试种子总数 $\times 100\%$ 。

1.2.2 种子吸水量的测定 将水稻种子消毒后用蒸馏水清洗干净, 播种于分别盛有 8 个处理液的

培养皿中,并分别在 0、8、16、24 h 吸干种子表面水分,称取每个处理中所有种子的重量,计算每个处理时间段种子的吸水重量。每个培养皿中放置 50 粒种子,加处理液 7 mL。

1.2.3 胚根长和胚芽长的测定 随机从每个处理中选取萌发 4 d 的 10 粒种子,用直尺测量胚根长及胚芽长,取其平均值。

1.2.4 总淀粉酶及 α -淀粉酶的表观活性测定 总淀粉酶表观活性测定。取 200 mL 蒸馏水置于微波炉加热 2 min,加入 4 g 琼脂粉及 2 g 可溶性淀粉,制成培养基。随机取不同处理萌发 4 d 的水稻种子 3 粒,将其去胚后,置于盛有液氮的小研钵中研磨,静置 20 min。取上层酶液 20 μ L,垂直滴至配好的培养基上,静置 15 min,加入 10 mL 的 0.01 mol/L 碘-碘化钾溶液,观察淀粉酶与淀粉反应形成的圆斑大小及亮度,并拍照记录。

α -淀粉酶表观活性测定。将 4 g 琼脂粉和 0.5 g 可溶性淀粉溶于 198 mL 蒸馏水中,充分溶解后,分别加入 0.06 g 的 CaCl_2 、2 mL 10 mmol/L pH 5.3 的醋酸缓冲液和 4 mL 0.1 mol/L 的碘-碘化钾溶液,混匀后倒入培养皿待用。随机选取 10 粒萌发 4 d 的水稻种子进行横切,将带有胚的一半种子接种在上述培养基上,25 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 12 h,观察种子周围白色斑点直径大小及亮度,并拍照记录。

1.2.5 淀粉含量的测定 待水稻种子萌发至第 4 天,称取 0.4 g 胚乳,用液氮进行研磨,置于 25 mL 试管中,加入 10 mL 1 mol/L 稀硫酸,沸水浴 20 min。过滤后,取上清液 0.5 mL 定容至 50 mL。向试管中加入 2 mL 待测液与 1.5 mL 3,5-二硝基水杨酸试剂,沸水浴 5 min,定容至 20 mL,并于 540 nm 测定吸光度,根据标准曲线计算出其淀粉含量。

1.3 数据处理

所有数据均为 3 次重复试验的平均值,用 Microsoft Excel 软件对数据进行统计及处理,采用 SPSS 23.0 软件分析差异显著性 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

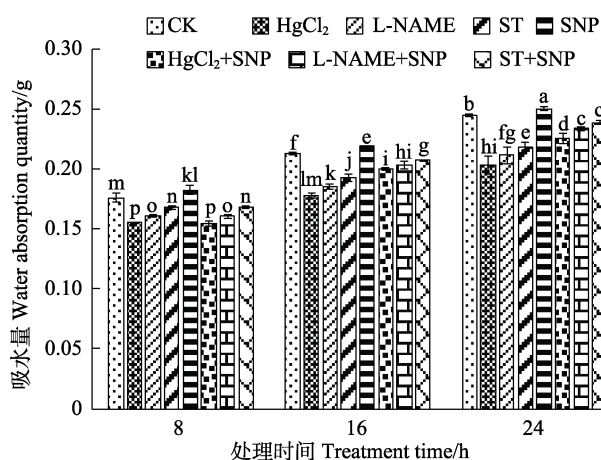
2.1 AQPs 和 NO 对水稻种子吸水量的影响

由图 1 可知,随着处理时间的延长,各处理的吸水量均呈现上升趋势。在 8 h, HgCl_2 处理的种子其吸水量比对照的降低了 11.89%;处理 16 h, HgCl_2 +SNP 结合处理的种子吸水量比单独 HgCl_2 处理的提高了 12.56%;处理 24 h,与对照相比,

单独 HgCl_2 处理的种子吸水量降低了 16.86%,而加入 SNP 后的 HgCl_2 +SNP 处理的吸水量仅下降了 7.61%,说明抑制 AQPs 活性,水稻种子的吸水能力受阻,而 SNP 则可逆转 HgCl_2 对水稻种子吸水的阻碍。

在 8 h,与对照的吸水量相比,SNP 处理的种子吸水量提高了 3.53%,而 L-NAME 与 ST 处理的水稻种子的吸水量则分别下降了 8.59%和 4.61% ($P < 0.05$);处理 16 h,与对照的吸水量相比,L-NAME 与 ST 处理的水稻种子的吸水量分别下降了 13.07%和 9.45%,而 L-NAME+SNP 处理和 ST+SNP 处理的吸水量仅分别降低了 4.65%和 2.73%;处理 24 h,与 L-NAME 处理的吸水量相比,L-NAME+SNP 结合处理的吸水量提高了 10.51%,ST+SNP 结合处理的吸水量也比单独 ST 处理的提高了 9.17%。以上结果说明,抑制种子中 AQPs 的活性,种子的吸水能力降低,而外源 NO 则可以逆转 HgCl_2 受抑的效应。同样,抑制 NO 的合成对种子的吸水能力也造成一定的影响。

综上可推测,在水稻种子早期吸水阶段,NO 可介导水稻种子中 AQPs 运输水分。



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments ($P < 0.05$).

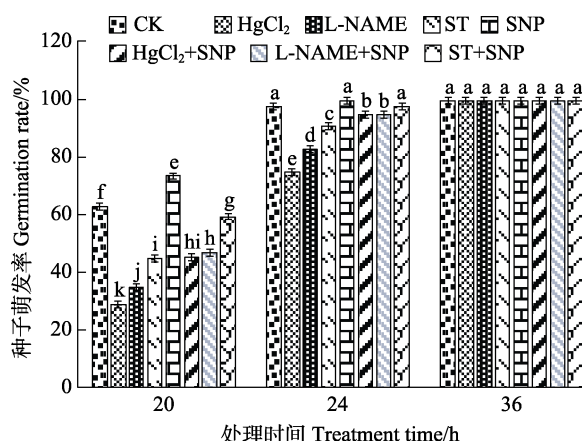
图 1 不同处理下水稻种子吸水能力的变化

Fig. 1 Changes of water absorption capacity in rice seeds after different treatments

2.2 AQPs 和 NO 对水稻种子萌发率的影响

由图 2 可知,在 20 h, HgCl_2 +SNP 结合处理的种子萌发率比 HgCl_2 单独处理的高 16.66% ($P < 0.05$),且这 2 个处理的种子萌发率均比对照的低;在 24 h,与单独 HgCl_2 处理的萌发率相比, HgCl_2 +SNP 处理的种子萌发率提高了 20.00%;在

36 h, HgCl_2 及 HgCl_2 +SNP 两个处理的种子萌发率与对照的一致, 说明外源 NO 供体 SNP 的加入可逆转 HgCl_2 对水稻种子萌发的抑制效应。在 20 h, 与对照的种子萌发率相比, 单独 SNP 处理的萌发率提高了 10.66%, 而 NO 抑制剂 L-NAME 及 ST 处理的萌发率则分别降低了 28.00% 和 18.00%。加入 SNP 后的 L-NAME+SNP 结合处理的种子萌发率比单独 L-NAME 处理的提高了 12.00%, ST+SNP 处理的种子萌发率比单独 ST 处理的提高了 14.66%; 在 24 h, L-NAME+SNP 处理的种子萌发率比单独 L-NAME 处理的提高了 12.00%, 与单独 ST 处理的萌发率相比, ST+SNP 处理的提高了 6.66%, 此时, ST+SNP 处理的萌发率与对照的一致; 在 36 h, 各处理及对照的种子均具有相同的萌发率。以上结果说明, 外源 NO 可促进水稻种子的萌发, 并缓解 AQPs 活性抑制剂及 NO 合成抑制剂对种子萌发的抑制效应。



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments ($P < 0.05$).

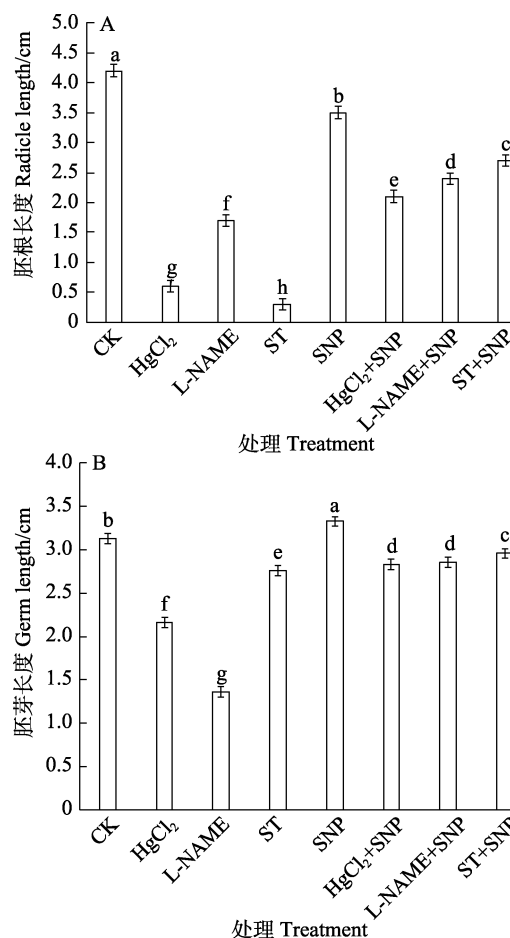
图 2 不同处理下种子萌发率的变化

Fig. 2 Changes of germination rate in rice seeds after different treatments

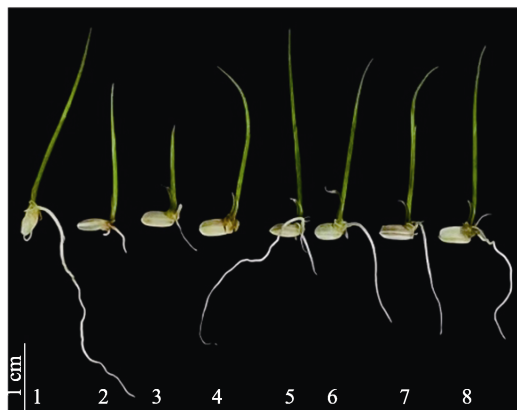
2.3 AQPs 和 NO 对萌发水稻种子胚根长和胚芽长的影响

通过对图 3A 和图 3B 进行分析可看出, 加入 SNP 后的 HgCl_2 +SNP 处理的种子胚根及胚芽的长度比单独 HgCl_2 处理的分别增加了 2.50 倍和 0.31 倍, 说明 AQPs 活性抑制剂 HgCl_2 处理水稻种子后, 均对胚根和胚芽的生长起到了抑制作用, 而外源 NO 供体 SNP 则缓解了 HgCl_2 对胚根及胚芽的抑制效应。此外, 与对照处理的种子其胚根长相比, 单独 L-NAME 及单独 ST 两个处理的胚根

长分别降低了 59.52% 和 92.86% ($P < 0.05$), 而与对照处理的胚芽长相比, SNP 单独处理的胚芽增加了 6.39% ($P < 0.05$), 单独 L-NAME 及单独 ST



C



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。1: CK; 2: HgCl_2 ; 3: L-NAME; 4: ST; 5: SNP; 6: HgCl_2 +SNP; 7: L-NAME+SNP; 8: ST+SNP。

Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments ($P < 0.05$). 1: CK; 2: HgCl_2 ; 3: L-NAME; 4: ST; 5: SNP; 6: HgCl_2 +SNP; 7: L-NAME+SNP; 8: ST+SNP.

图 3 不同处理下水稻种子胚根长和胚芽长的变化

Fig. 3 Changes of radicle length and germ length in rice seeds after different treatments

两个处理的胚芽长分别下降了 56.55% ($P<0.05$) 和 11.82% ($P<0.05$)。将外源 NO 分别与 NO 合成抑制剂 L-NAME 和 ST 组合的 L-NAME+SNP 及 ST+SNP 两个处理的胚根长与对照的胚根长相比分别仅降低了 42.86%和 35.71% ($P<0.05$)，且 L-NAME+SNP 处理及 ST+SNP 处理的胚芽长比对照的胚芽长相比分别仅下降了 8.63%和 5.43% ($P<0.05$)。

从萌发种子外观 (图 3C) 上看, HgCl₂、L-NAME 和 ST 三个处理的胚根长和胚芽长均明显短于对照, 其中, ST 处理对水稻种子胚根生长的抑制幅度最大。相比于上述 3 个处理的种子形态, 加入外源 NO 供体 SNP 后的组合处理均缓解胚根及胚芽生长迟缓的效应。说明抑制 AQPs 的活性及内源性 NO 的合成会阻碍水稻种子胚根及胚芽的生长, 而外源 NO 供体 SNP 则缓解这种抑制作用。

以上结果可推测, AQPs 和 NO 均可促进水稻种子萌发过程中胚根及胚芽的生长, 且 AQPs 可能通过 NO 发挥作用。

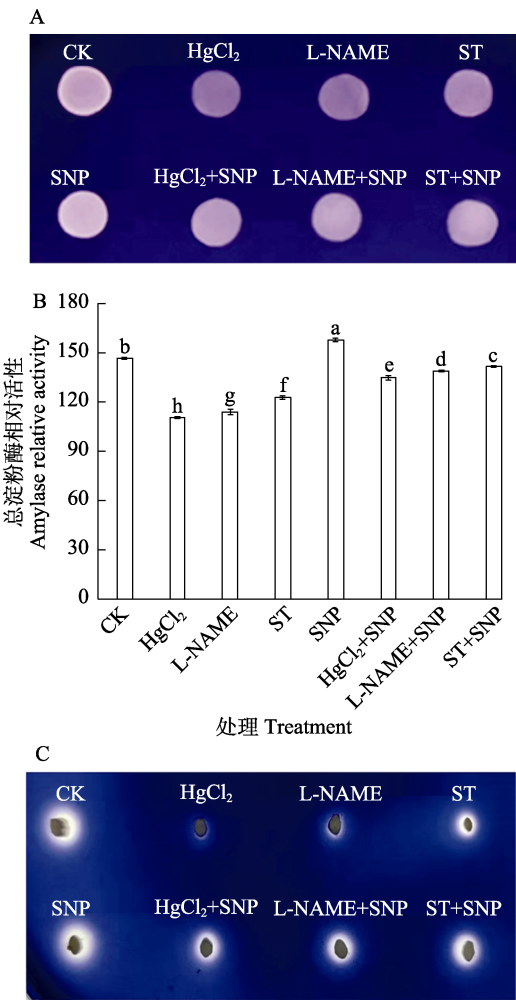
2.4 AQPs 和 NO 对萌发水稻种子淀粉酶活性的影响

根据总淀粉酶表观活性的测定方法, 培养基上圆斑的亮度越大, 表示总淀粉酶活性越强, 因此, 圆斑的明暗可代表总淀粉酶活性的强弱。由图 4A 可知, 单独 SNP 处理的圆斑亮度是所有处理液中最亮的, 而 HgCl₂、L-NAME 和 ST 三个处理的圆斑亮度都比对照的暗。分别加入 SNP 后, 含 HgCl₂、L-NAME 和 ST 的 3 个处理均提高了圆斑的亮度。

使用 Image J 软件将不同处理的圆斑亮度转化成数值绘制柱形图 (图 4B), 以便更直接地比较不同处理间的总淀粉酶相对活性。与对照相比, 单独 HgCl₂ 处理的萌发水稻种子的总淀粉酶相对活性降低了 24.77%, 而加入 SNP 后的 HgCl₂+SNP 处理的仅降低了 8.18%, 说明了 AQPs 活性受抑制时, 萌发水稻种子中总淀粉酶的活性减弱, 外源 NO 则阻缓 HgCl₂ 引起总淀粉酶活性的下调。单独 SNP 处理的萌发水稻种子其总淀粉酶相对活性比对照的高 7.50%, 而单独 L-NAME 处理和单独 ST 处理的萌发水稻种子的总淀粉酶相对活性分别比对照的低 22.50%和 16.36%。加入 SNP 后, L-NAME+SNP 处理及 ST+SNP 处理的总淀粉酶相对活性分别比对照的降低了 5.45%和 3.41%。

说明外源 NO 可显著提高总淀粉酶活性, 并缓解 AQPs 活性抑制剂及 NO 合成抑制剂降低水稻种子总淀粉酶相对活性的效应。

根据 α -淀粉酶表观活性的测定方法, 培养基上白色斑块的大小及亮度可代表 α -淀粉酶活性的强弱, 白色斑块越大越亮表明 α -淀粉酶活性越强。由图 4C 可知, 在所有的处理中, 单独 SNP 处理的萌发水稻种子其对应的白斑直径最大, 亮度最亮, 其次为对照的。单独 HgCl₂ 处理的白斑直径最小, 且亮度最暗, 而 HgCl₂+SNP 处理的白斑直径比单独 HgCl₂ 处理的大且亮, 说明抑制 AQPs 活性, α -淀粉酶活性受到显著抑制, 而这种抑制效应可被外源 NO 供体 SNP 所缓解。NO 合成抑



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments ($P<0.05$).

图 4 不同处理下水稻种子总淀粉酶表观活性 (A) 及相对活性 (B) 和 α -淀粉酶表观活性 (C)

Fig. 4 Apparent activities (A) and relative activities (B) of total amylase and apparent α -amylase activities (C) in rice seeds after different treatments

制剂 L-NAME 及 ST 分别单独处理的白斑直径比对照的小且暗, 而加入 SNP 后的 L-NAME+SNP 处理和 ST+SNP 处理比单独 L-NAME、单独 ST 处理的白斑直径大且亮。说明 AQP 活性及 NO 合成受抑下, 萌发水稻种子的 α -淀粉酶活性大幅度降低, 而且外源 NO 均可适当解除 AQP 活性抑制剂和 NO 合成抑制剂对萌发水稻种子中 α -淀粉酶活性的抑制作用。

上述结果说明, AQP 活性及外源 NO 均有助于提高萌发水稻种子中总淀粉酶及 α -淀粉酶的活性。由此以上结果推测, NO 可通过介导 AQP 增强萌发水稻种子中总淀粉酶及 α -淀粉酶的活性。

2.5 AQP 和 NO 对萌发水稻种子淀粉含量的影响

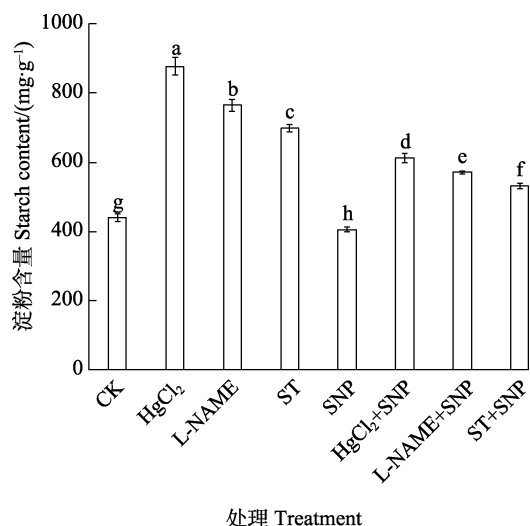
图 5 显示, 单独 HgCl_2 处理的萌发水稻种子其淀粉含量比对照的提高 0.99 倍, 是所有处理中淀粉含量最高的, 而加入 SNP 后的 HgCl_2 +SNP 处理的萌发种子淀粉含量仅比对照的提高了 0.39 倍, 说明抑制 AQP 的活性会显著减弱其降解淀粉的能力, 而这种能力的下降可由外源 NO 逆转。单独 L-NAME 处理和单独 ST 处理的种子中淀粉含量分别比对照的高 0.74 倍和 0.59 倍; 而 L-NAME+SNP 处理及 ST+SNP 处理的种子中淀粉含量则分别比单独 L-NAME 处理和单独 ST 处理的降低了 25.41% 和 23.90%。说明抑制 AQP 的活性及内源性 NO 的合成会减少水稻种子中淀

粉的降解, 而 SNP 既可显著增加水稻种子中淀粉的降解, 也可缓解 AQP 活性抑制剂及 NO 合成抑制剂对淀粉降解的阻碍效应。

3 讨论

植物的 AQP 具有运输水分的功能, 可通过协调细胞水分平衡, 控制植物的生长, 其活性受到 HgCl_2 的抑制^[26-27]。研究表明, 汞化合物影响 AQP 功能是通过与 NPA 基序的半胱氨酸残基的-SH 基团结合, 引起 AQP 孔隙堵塞, 从而影响 AQP 活性^[28]。在水分及盐胁迫下, 种子萌发及根系生长均受到明显的抑制, 而 AQP 转基因植株及过表达系赋予植物胁迫耐受性, 种子显示出高活力, 根长得到明显改善^[29-31]。在本研究中, 采用 AQP 活性抑制剂 HgCl_2 处理水稻种子后, 种子吸水量减少, 萌发率降低, 胚根及胚芽的生长受到抑制, VANDER 等^[32]的研究也得到与此类似的结果。而外源信号分子 (如乙烯和 NO) 可通过增强白杨根及水稻种子的 AQP 转录水平, 介导水分运输^[33-34]。本研究结果表明, 在 AQP 的活性受到抑制时, 外源 NO 供体 SNP 可提高 HgCl_2 处理后的吸水量, 促进水稻种子对水分的吸收, 提高种子的萌发率。田又升等^[35]的研究也显示, NO 可解除 HgCl_2 对种子萌发的胁迫作用, 与本研究结果一致。为了进一步探究 AQP 与 NO 在水稻种子萌发早期 (0~24 h) 的关系, 采用 NO 合成抑制剂 L-NAME 和 ST 及 NO 供体 SNP 分别处理萌发水稻种子, 结果发现, 单独 SNP 处理的水稻种子其吸水量及萌发率均明显比对照的高, 而抑制 NO 的合成, 种子的吸水能力受阻, 萌发率亦随之下降。因此, 推测在水稻种子早期吸水阶段, NO 可通过介导 AQP 活性, 诱发水稻种子吸收水分, 促进种子发芽。

淀粉酶是淀粉类种子萌发过程最主要的水解酶类, 主要包括 α -淀粉酶和 β -淀粉酶。只有 α -淀粉酶才能完成水稻种子中淀粉的降解^[36], 其活性与水稻的发芽率和幼苗生长属性高度相关^[37-38]。外源 NO 可增强高粱及小麦种子早期萌发过程中的淀粉酶活性, 提高淀粉转化能力, 为种子的胚根及胚芽的伸长提供物质基础^[39-40]。本研究发现, 单独 SNP 处理水稻种子后, 其总淀粉酶及 α -淀粉酶的活性均显著上升, 淀粉则快速降解, 水稻种子胚芽得到较快的生长。HAJIHASHEMI 等^[41]的研究表明, SNP 可显著提高藜麦种子中 α -淀粉酶的



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments ($P < 0.05$).

图 5 不同处理下水稻种子淀粉含量的变化
Fig. 5 Changes of starch content in rice seeds after different treatments

活性,并降低盐胁迫对酶活性的影响,从而恢复种子的萌发进程。本研究结果揭示,萌发水稻种子 AQPs 活性受抑下, α -淀粉酶及总淀粉酶的活性均显著下降,淀粉含量则维持在较高的水平,胚根及胚芽的生长也都被明显抑制,外源 NO 则可逆转这些抑制效应。与 AQPs 活性受抑类似,NO 合成受到抑制后,萌发水稻种子的总淀粉酶及 α -淀粉酶的活性均减弱,由此导致淀粉降解进程减慢、胚根及胚芽的生长受阻,这些因抑制 NO 合成而引发的抑制效应同样可以被外源 NO 所逆转。有研究证实,NO 合成抑制剂 L-NAME 及 ST 显著抑制莴苣及玉米种子中的 α -淀粉酶活性及其幼苗的生长,而 SNP 可缓解这种抑制效应^[42-43]。

综上可知,在水稻种子萌发的早期,NO 通过介导 AQPs 调节种子的吸水,从而诱导 α -淀粉酶及总淀粉酶的活性,促进淀粉的降解及胚根、胚芽的生长,提高种子的萌发进程。

参考文献

- [1] 腾英姿,顾益银,张鑫,韩莹琰.种子休眠机理及高温胁迫对种子萌发影响研究进展[J].分子植物育种:1-20[2024-04-29].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220222.2004.023.html>. TENG Y Z, GU Y Y, ZHANG X, HAN Y Y. Research progress in seed dormancy mechanism and effect of high temperature stress on seed germination[J]. Molecular Plant Breeding:1-20[2024-04-29].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220222.2004.023.html>. (in Chinese)
- [2] BARRIOS D, FLORES J, SANCHEZ J A, GONZALEZ-TORRES L R. Combined effect of temperature and water stress on seed germination of four *Leptocereus* spp. (Cactaceae) from Cuban dry forests[J]. Plant Species Biology, 2021, 36(3): 512-533.
- [3] LUU D T, MAUREL C. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status[J]. Plant, Cell and Environment, 2005, 28(1): 85-96.
- [4] DEVI M J, SINCLAIR T R, JAIN M, GALLO M. Leaf aquaporin transcript abundance in peanut genotypes diverging in expression of the limited-transpiration trait when subjected to differing vapor pressure deficits and aquaporin inhibitors[J]. Physiologia Plantarum, 2016, 156(4): 387-396.
- [5] DING L, GAO C M, LI Y R, LI Y, ZHU Y Y, XU G H, SHEN Q R, KALDENHOFF R, KAI L, GUO S W. The enhanced drought tolerance of rice plants under ammonium is related to aquaporin (AQP)[J]. Plant Science, 2015, 234: 14-21.
- [6] KUDOYAROVA G, VESELOV D, YEMEL'YANOV V, SHISHOVA M. The role of aquaporins in plant growth under conditions of oxygen deficiency[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(17): 10159.
- [7] LI R, WANG J F, LI S T, ZHANG L, QI C D, WEEDA S, ZHAO B, REN S X, GUO Y D. Plasma membrane intrinsic proteins SIPIP2;1, SIPIP2;7 and SIPIP2;5 conferring enhanced drought stress tolerance in tomato[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 31814.
- [8] LECHOWSKA K, KUBALA S, WOJTYLA L, NOWACZYK G, QUINET M, LUTTS S, GARNCZARSKA M. New insight on water status in germinating brassica napus seeds in relation to priming-improved germination[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(3): 540.
- [9] NOVIKOVA G V, TOURNAIRE-ROUX C, SINKEVICH I A, LITYAGINA S V, MAUREL C, OBROUCHEVA N. Vacuolar biogenesis and aquaporin expression at early germination of broad bean seeds[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2014, 82: 123-132.
- [10] WENDEHENNE D, DURNER J, KLESSIG D F. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2004, 7(4): 449-455.
- [11] AHMAD P, ABDEL LATER A A, HASHEM A, ABD ALLAH E F, GUCEL S, TRAN L S. Nitric oxide mitigates salt stress by regulating levels of osmolytes and antioxidant enzymes in chickpea[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 347.
- [12] SILVEIRA N M, FRUNGILLO L, MARCOS F C, PELEGRINO M T, MIRANDA M T, SEABRA A B, SALGADO I. Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit[J]. Planta, 2016, 244(1): 181-190.
- [13] PIACENTINI D, DELLA R F, SOFO A, FATTORINI L, FALASCA G, ALTAMURA M M. Nitric oxide cooperates with auxin to mitigate the alterations in the root system caused by cadmium and arsenic[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 1182.
- [14] 刘钊,雷阳,王生武,吴越莉,张旭.外源 NO 对铅胁迫下萝卜种子萌发及幼苗生理特性的影响[J].安徽农业科学, 2021, 49(8): 57-60, 65. LIU Z, LEI Y, WANG S W, WU Y L, ZHANG X. Effects of exogenous NO on seed germination and seedling physiological characteristics of radish under Pb stress[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2021, 49(8): 57-60, 65. (in Chinese)
- [15] 杨玉花,白志元,张瑞军,卫保国.外源 NO 对镉胁迫下

- 大豆幼苗生理特性的影响[J]. 山西农业科学, 2020, 48(9): 1406-1410.
- YANG Y H, BAI Z Y, ZHANG R J, WEI B G. Effects of exogenous NO on seedling physiological characteristics of soybean under cadmium stress[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2020, 48(9): 1406-1410. (in Chinese)
- [16] 王勇, 鲜靖苹, 王海龙, 全永彪, 刘璐, 马晖玲. 外源 NO 对镉胁迫下草地早熟禾种子萌发及幼苗生理特性的影响[J]. 核农学报, 2020, 34(1): 169-176.
- WANG Y, XIAN J P, WANG H L, QUAN Y B, LIU L, MA H L. Effects of exogenous nitric oxide on seed germination and physiological characteristics of poa pratensis under cadmium stress[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(1): 169-176. (in Chinese)
- [17] 凌腾芳, 宣伟, 樊颖瑞, 孙永刚, 徐晟, 黄本开, 黄思睿, 沈文飏. 外源葡萄糖、果糖和 NO 供体(SNP)对盐胁迫下水稻种子萌发的影响[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005(2): 205-212.
- LING T F, XUAN W, FAN Y R, SUN Y G, XU S, HUANG B K, HUANG S R, SHEN W B. The effect of exogenous glucose, fructose and NO donor sodium nitroprusside (SNP) on rice germination under salt stress[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005(2): 205-212. (in Chinese)
- [18] 张春平, 何平, 杜丹丹, 韦品祥, 喻泽莉, 谢英赞, 刘海英. 外源 NO 供体硝普钠(SNP)对盐胁迫下紫苏种子萌发及幼苗抗氧化酶活性的影响[J]. 中药材, 2011, 34(5): 665-669.
- ZHANG C P, HE P, DU D D, WEI P X, YU Z L, XIE Y Z, LIU H Y. Effect of exogenous nitric oxide donor SNP on seed germination and antioxidase activities of *Perilla frutescens* seedlings under NaCl stress[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2011, 34(5): 665-669. (in Chinese)
- [19] REN Y F, WANG W, HE J Y, ZHANG L Y, WEI Y J, YANG M. Nitric oxide alleviates salt stress in seed germination and early seedling growth of pakchoi (*Brassica chinensis* L.) by enhancing physiological and biochemical parameters[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 187(C): 109785.
- [20] RAIPURIA R K, KATARIA S, WATTS A, JAIN M. Magneto-priming promotes nitric oxide via nitric oxide synthase to ameliorate the UV-B stress during germination of soybean seedlings[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2021, 220: 112211.
- [21] VAN DER MAAREL M J, VAN DER VEEN B, UITDEHAAG J C, LEEMHUIS H, DIJKHUIZEN L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family[J]. Journal of Biotechnology, 2002, 94(2): 137-155.
- [22] DAMARIS R N, LIN Z Y, YANG P F, HE D L. The rice alpha-amylase, conserved regulator of seed maturation and germination[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(2): 450.
- [23] CHEN P W, LU C A, YU T S, TSENG T H, WANG C S, YU S M. Rice alpha-amylase transcriptional enhancers direct multiple mode regulation of promoters in transgenic rice[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(16): 13641-13649.
- [24] 李梅香, 李海明, 宋发军, 张丽, 张蕊, 孟艳艳. 外源一氧化氮对七叶一枝花种子萌发的影响[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(5): 58-61, 65.
- LI M X, LI H M, SONG F J, ZHANG L, ZHANG R, MENG Y Y. Effects of exogenous nitric oxide on the seed germination of *Paris polyphylla* var. *chinesis*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(5): 58-61, 65. (in Chinese)
- [25] 刘文瑜, 杨宏伟, 魏小红, 刘博, 王高强, 吴伟涛. 外源 NO 调控盐胁迫下菟葵苜蓿种子萌发生理特性及抗氧化酶的研究[J]. 草业学报, 2015, 24(2): 85-95.
- LIU W Y, YANG H W, WEI X H, LIU B, WANG G Q, WU W T. Effects of exogenous nitric oxide on seed germination, physiological characteristics and active oxygen metabolism of *Medicago truncatula* under NaCl stress[J]. Acta Physiologica Sinica, 2015, 24(2): 85-95. (in Chinese)
- [26] KALDENHOFF R, RIBAS-CARBO M, SANS J F, LOVISOLO C, HECKWOLF M, UEHLEIN N. Aquaporins and plant water balance[J]. Plant Cell Environment, 2008, 31(5): 658-666.
- [27] NIEMIETZ C M, TYERMAN S D. New potent inhibitors of aquaporins: silver and gold compounds inhibit aquaporins of plant and human origin[J]. FEBS Letters, 2002, 531(3): 443-447.
- [28] YUKUTAKE Y, TSUJI S, HIRANO Y, ADACHI T, TAKAHASHI T, FUJIHARA K, AGRE P, YASUI M, SUEMATSUM. Mercury chloride decreases the water permeability of aquaporin-4-reconstituted proteoliposomes[J]. Biology Cell, 2008, 100(6): 355-363.
- [29] KHAN K, AGARWAL P, SHANWARE A, SANE V A. Heterologous expression of two *jatropha* aquaporins imparts drought and salt tolerance and improves seed viability in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0128866.
- [30] PATANKAR H V, AI-HARRASI I, AI-YAHYAI R, YAISH M W. Functional characterization of date palm aquaporin gene *PdPIP1;2* confers drought and salinity tolerance to yeast and *Arabidopsis*[J]. Genes, 2019, 10(5): 390.
- [31] AYADI M, BRINI F, MASMOUDI K. Overexpression of a wheat aquaporin gene, *TdPIP2;1*, enhances salt and drought tolerance in transgenic durum wheat cv. Maali[J]. Interna-

- tional Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(10): 2389.
- [32] VANDER WILLIGEN C, POSTAIRE O, TOURNAIRE-ROUX C, BOURSIAIC Y, MAUREL C. Expression and inhibition of aquaporins in germinating *Arabidopsis* seeds[J]. Plant and Cell Physiology, 2006, 47(9): 1241-1250.
- [33] TAN X F, LIU M M, DU N, ZWIAZEK J J. Ethylene enhances root water transport and aquaporin expression in trembling aspen (*Populus tremuloides*) exposed to root hypoxia[J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1): 227.
- [34] LIU H Y, YU X, CUI D Y, SUN M H, SUN W N, TANG Z C, KWAK S S, SU M A. The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination[J]. Cell Research, 2007, 17(7): 638-649.
- [35] 田又升, 余丽娟, 张成双, 徐齐雯, 慕自新. NO 和水孔蛋白在小麦种子萌发中的互作效应[J]. 干旱地区农业研究, 2013, 31(4): 99-103.
- TIAN Y S, YU L J, ZHANG C S, XU Q W, MU Z X. Interactions between nitric oxide and aquaporin in seed germination of wheat[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2013, 31(4): 99-103. (in Chinese)
- [36] PERATA P, GUGLIELMINETTI L, ALPI A. Anaerobic carbohydrate metabolism in wheat and barley, two anoxia-intolerant cereal seeds[J]. Journal of Experimental Botany, 1996, 47(301): 999-1006.
- [37] MAHENDER A, ANANDAN A, PRADHAN S K. Early seedling vigour, an imperative trait for direct-seeded rice: an overview on physio-morphological parameters and molecular markers[J]. Planta, 2015, 241(5): 1027-1050.
- [38] CUI H, PENG B, XING Z, XU G, YU B, ZHANG Q. Molecular dissection of seedling-vigour and associated physiological traits in rice[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 105(5): 745-753.
- [39] ZHANG H, SHEN W B, ZHANG W, XU L L. A rapid response of β -amylase to nitric oxide but not gibberellin in wheat seeds during the early stage of germination[J]. Planta, 2005, 220(5): 708-716.
- [40] 尹美强, 王栋, 王金荣, 兰敏, 赵娟, 董淑琦, 宋喜娥, ALAM S. 外源一氧化氮对盐胁迫下高粱种子萌发及淀粉转化的影响[J]. 中国农业科学, 2019, 52(22): 4119-4128.
- YIN M Q, WANG D, WANG J R, LAN M, ZHAO J, DONG S Q, SONG X E, ALAM S. Effects of exogenous nitric oxide on seed germination and starch transformation of sorghum seeds under salt stress[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(22): 4119-4128. (in Chinese)
- [41] HAJIHASHEMI S, SKALICKY M, BRESTIC M, PAVLA V. Cross-talk between nitric oxide, hydrogen peroxide and calcium in salt-stressed *Chenopodium quinoa* willd. at seed germination stage[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 154: 657-664.
- [42] 杨北宁, 张凤芝, 苏国兴. 一氧化氮对莴苣种子萌发过程中部分物质代谢的影响[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(2): 394-398.
- YANG B N, ZHANG F Z, SU G X. Effect of nitric oxide on substances metabolism of lettuce (*Lactuca sativa* L.) during seed germination[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2013, 29(2): 394-398. (in Chinese)
- [43] PATEL P, KADUR NARAYANASWAMY G, KATARIA S, BAGHEL L. Involvement of nitric oxide in enhanced germination and seedling growth of magnetoprimed maize seeds[J]. Plant Signaling and Behavior, 2017, 12(12): e1293217.