

种子发育与萌发过程中的程序性细胞死亡*

田向荣^{1,2}, 欧阳学智², 宋松泉^{1,2**}

(1 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 勐腊 666303; 2 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 禾谷类种子胚乳发育过程中的程序性细胞死亡(PCD)主要发生在种子成熟期的后期,并伴随着生物合成的停止和自然脱水;乙烯和活性氧促进胚乳发育中的PCD,而ABA起负调节作用。种子萌发过程中糊粉层降解的PCD被GA、Ca²⁺和活性氧促进,被ABA和抗氧化剂抑制。种子人工老化和劣变种子萌发过程中可能存在PCD事件,其研究对延长种子的贮藏寿命和提高播种品质具有重要的意义。

关键词: 种子;发育;萌发;劣变;程序性细胞死亡

中图分类号: Q 945 文献标识码: A 文章编号: 0253-2700(2003)05-0579-10

Programmed Cell Death during Seed Development and Germination*

TIAN Xiang-Rong^{1,2}, OUYANG Xue-Zhi², SONG Song-Quan^{1,2**}

(1 *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303, China;*

2 School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Programmed cell death(PCD) during endosperm development of cereal seeds mainly occurs at late maturation of seeds, and consequently there are the cessation of biosynthesis and natural drying. PCD during endosperm development is enhanced by ethylene and reactive oxygen species(ROS), and inhibited by ABA. PCD of aleurone layer degradation during seed germination is enhanced by GA, Ca²⁺ and ROS, and inhibited by ABA and antioxidants. There may be PCD events during accelerated ageing of seeds and germination of deteriorated seeds. It is very important to study these events for increasing storage life of seeds and improving the quality of sowing seed.

Key words: Seed; Development; Germination; Deterioration; Programmed cell death

植物的程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)是植物体在发育过程中或环境影响下,通过自身的内部机制启动并调节的细胞生理性自然死亡的过程。作为主动的死亡过程,其主要特征是高度的自控性,发生部位和发生时序的准确性,而且通常在细胞死亡过程中有新的生物大分子合成(翟中和等,2000)。从细胞群体水平看,PCD是一种与细

* 基金项目:中国科学院“百人计划”和知识创新工程重要方向性项目(KSCX2-SW-117)

** 通讯联系人 author for correspondence, E-mail: sqsong@xtbg.org.cn

收稿日期:2003-01-16, 2003-03-20 接受发表

作者简介:田向荣(1979-)男,硕士研究生,主要从事种子生理学研究。

胞分裂相反的方式调节细胞数量相对平衡的重要策略(张莹和丁明孝, 1997)。最近, 已经证实了与动物细胞凋亡类似的植物 PCD 过程, 如胞内 Ca^{2+} 浓度的升高, DNA 梯状(DNA ladder)电泳图谱, 半胱氨酸蛋白酶的激活, 活性氧(reactive oxygen species, ROS)的介导作用, 细胞质皱缩(cytoplasm shrinkage), 核凝聚(nuclear condensation)等形态特征(Pennell 和 Lamb, 1997)。

Jones (2000) 认为植物的 PCD 可分为程序性坏死(programmed oncosis), 自体吞噬的细胞死亡(autothagic PCD), 自溶作用(autolysis)和细胞凋亡(apoptosis) 4 种类型。而 Fukuda (2000) 认为植物的 PCD 可以分为以超敏反应为代表的类似凋亡的细胞死亡(apoptosis-like cell death), 类似叶片衰老的细胞死亡和以输导组织分化为代表的液泡起关键作用的细胞死亡等 3 种形式。

已证明 PCD 存在于一些植物的发育事件以及植物与环境的相互作用中, 如叶片衰老, 抗病超敏反应(hypersensitive response, HR)和体胚发生(somatic embryogenesis)等(Pennell & Lamb, 1997)。同样在种子发育和萌发过程中也存在 PCD 事件, 如禾谷类种子(cereal seed)胚乳发育的最后过程(Young 等, 1997; Young & Gallie, 1999)。Wang 等(1996)报道了糊粉层(aleurone layer)的降解也是典型的 PCD。此外, 种子劣变过程中出现的 DNA 片段化, 以及这些片段是自核小体连接处被切断(Boubriak 等, 2000), 这些特征也是典型的 PCD 特征。本文综述了种子发育和萌发过程中 PCD 的研究进展。

1 胚乳发育过程中的 PCD

1.1 基本过程

种子的发育大致可以分为形态建成期(morphogenesis), 成熟期(maturation)和脱水(desiccation) 3 个阶段。胚乳的发育早于胚的发育, 一般多在形态建成期完成, 并通常分为 3 种模式: 多核型(polynuclear type), 多胞型(polycellular type)和沼生目型(helobial type)(Howell, 1998)。以禾谷类种子的胚乳发育为代表的大多数单子叶植物以及部分双子叶植物的胚乳发育多属于多核型。多核型胚乳发育的主要特征是在胚乳形成初期只有核连续分裂, 胞质不分裂, 从而形成多核的单细胞。通常将多核型发育分为 4 个时期, 即多核期(syncytial), 细胞形成期(cellularization), 分化期(differentiation)和成熟期(maturation)。而禾谷类种子胚乳的 PCD 主要发生在成熟期的晚期, 并伴随着生物合成的关闭和自然脱水; 到胚乳发育的最后阶段, 仅外围糊粉层细胞保持活性, 其余的富含淀粉的贮藏组织全部死亡(Young & Gallie, 2000a)。

在形态上, 玉米(*Zea mays*)胚乳的 PCD 事件是从中心向外逐渐扩展。伊文思蓝(evansblue)活性染色实验证明, 授粉后 16 d (days after pollination, DAP)的玉米胚乳在中部开始出现死亡的症状, 20 DAP 前后的玉米胚乳在种子的冠部出现大面积死亡, 24 ~ 40 DAP 死亡的面积已扩展到胚乳的基部, 覆盖了整个胚乳; 同时, 胚乳细胞的分裂能力逐步丧失, 核内复制和贮藏物质大量积累(Young 等, 1997)。在分子水平上, 死亡过程与生物大分子的变化在时序上吻合。小麦(*Triticum aestivum*)胚乳的 PCD, 起始于开花后 16 d (days after flowering, DAF), 到 30 DAF 基本完成。除形态上扩展是随机的以外, 其它的特征与玉米有类似的趋势(Young 等, 1997)。此外, Golovina 等(2000)用电子自旋共振

(electron spin resonance, ESR) 和低温扫描电镜技术 (low temperature scanning electron microscopy, LTSEM) 检测胚乳细胞膜完整性的实验也证明了胚乳在发育过程中, 尤其是在胚乳物质积累的阶段出现 PCD。

1.2 生物大分子的变化动态及相关的酶

在玉米胚乳的发育过程中, 胚乳中的总 DNA 含量是先上升然后下降, 在 20 DAP 前后出现高峰, 而胚中的总 DNA 含量的高峰则为 36 DAP。DNA 的琼脂糖电泳实验证明, 在 20 DAP 后玉米胚乳细胞中的 DNA 逐渐降解, 28 DAP 可以开始检测到 DNA 的片断, 至 36 DAP, DNA 降解的片断大小约为 180~200 bp 的整倍数, 即开始出现与动物细胞凋亡相类似的 DNA 梯状电泳现象 (Young & Gallie, 1999)。这说明这种 DNA 的降解是有规律的从核小体连接处切断。同样在小麦胚乳发育过程中, 自 20 DAF 以后也能检测到这种 DNA 降解的现象 (Young & Gallie, 1999)。Young & Gallie (1999) 发现胚乳发育过程中核酸酶 (RNase) 活性的变化与 DNA 含量的变化相吻合。此外, 对玉米胚乳发育突变体的研究还证实核酸酶是以无活性的前体预先存留在胚乳细胞中 (Young & Gallie, 2000a), 这与动物细胞凋亡时核酸酶的变化一致。

在整个玉米胚乳的发育过程中, RNA 含量的变化趋势与 DNA 一致, 在 20 DAP 出现高峰, 而且核酸酶活性从 18 DAP 到 35 DAP 逐渐增加 (Young & Gallie, 1999)。Wilson (1980) 证明至少一种核酸酶的表达模式与总 RNA 含量的变化相关, 其活性变化的进程与胚乳发生 PCD 在时序上具有一致性。

玉米胚乳发育过程中, 胚乳中可溶性蛋白质的变化与 DNA 和 RNA 的变化一致, 但是对此过程中蛋白质水解酶活性变化的研究才刚刚开始。目前的研究主要集中在转译起始因子 (translation initiation factor, TIF) 对 PCD 的影响上。转译起始因子 eIF4B 能与 eIF3 相互作用, 并能与多聚腺苷酸结合蛋白 (poly (A) binding protein, PABP) 作用, 它的激活需要多位点的磷酸化。Le 等 (1997) 的实验证明, 在小麦胚乳细胞发生 PCD 以前和 PCD 初期, eIF4B 以高度磷酸化水平的形式存在; 但在发生 PCD 的中后期 eIF4B 逐渐发生去磷酸化, 这可能直接影响其与 PABP 的相互作用, 从而影响蛋白质的合成。Le 等 (1998) 还认为 eIF4A 的磷酸化与小麦珠心/果皮 (nucella/pericarp) 退化时的 PCD 过程有关; 但它在胚乳发育的 PCD 过程中并没有出现磷酸化, 说明 eIF4A 对 PCD 的作用是有特异性的。起始因子 eIF2 α 的变化与 eIF4B 相似, 在 PCD 发生前后出现超磷酸化 (hyperphosphorylation)。Gallie 等 (1998) 认为在小麦种子发育后期 eIF4B, eIF2 α , eIF2 β , PABP, eIF4E 和 eIFiso4G 等起始因子的减少可能是可溶性蛋白减少的原因之一。

1.3 胚乳发育过程中 PCD 的调控

实验证明许多植物的 PCD 过程受乙烯的调控, 如低氧条件下玉米通气组织 (aerenchyma) 的形成受乙烯信号的促进 (He 等, 1996)。在玉米胚乳发育过程中乙烯出现两次高峰, 并且与 DNA 降解的动态吻合; 但加入氨基乙烯基甘氨酸 (AVG) 等乙烯合成抑制剂能明显地抑制胚乳 DNA 的片断化 (Young 等, 1997; Young & Gallie, 1999)。外源乙烯能够加快胚乳 PCD 的进程并扩大 PCD 的范围。但乙烯能否直接启动 PCD 尚不清楚。此外, 乙烯对 PCD 的调控作用还取决于其受体的组织特异性和时序特异性。

对玉米胎萌 (vivipary) 突变体 *vp1* (ABA 应答相关的转录激活因子突变体) 和 *vp9*

(胡萝卜素脱氢酶突变体)的研究证明, ABA 对胚乳发育过程中的 PCD 起负调控作用。在这两种突变体中 ABA 的合成或者是信号转导受到抑制, 导致了乙烯的大量产生, 从而加速了胚乳的 PCD 进程。而施加 ABA 合成抑制剂 fluridone 的正常玉米胚乳也出现类似胎萌突变体加速 PCD 的现象 (Young & Gallie, 2000b)。ABA 是否直接调节乙烯的合成还不清楚, 其对 PCD 的抑制作用可能通过调节乙烯的下游信号来实现, 例如降低胚乳细胞对乙烯的敏感性等。

对玉米种子缺失突变体 (*defective seed*, *de*) 和谷粒缺失突变体 (*defective kernel*, *dek*) 等的研究证明, 种子发育过程中胚, 胚乳和母体组织 (*maternal tissue*) 之间的相互作用影响胚乳发育的 PCD。 *dek* 是一类胚乳和胚发育都异常的突变体, 在一些情况下 *dek* 导致胚乳提前发生 PCD (Young & Gallie, 2000a)。母体组织与胚乳相互作用的 *miniature 1* (*mn1*) 突变体则是在发育中母体和胚乳基部组织的转化酶 (*invertase*) 缺失并发生成熟前死亡, 导致蔗糖无法运输到发育中的胚乳从而无法积累贮藏物 (Miller & Chourey, 1992)。

1.4 影响胚乳发育过程中 PCD 的其他因素

核内复制 (*endoreduplication*) 广泛存在于高等植物细胞的生长和分化过程中, 在胚乳的发育中具有保证一些重要蛋白质的表达或者为种子萌发贮藏核酸等的作用。Young 和 Gallie (2000a) 发现核内复制在发育的玉米胚乳中存在的演替过程与 PCD 一致, 即由中央向四周扩散, 而且在核内复制之后胚乳马上发生 PCD。D'Amato (1984) 在对百合属 (*Lilium*) 种子发育的研究时发现, 其胚乳发育中没有核内复制, 因此其胚乳细胞一直得以存活。此外, 核内复制可能是 PCD 过程中发生核质致密化的原因。

活性氧对 PCD 的诱导作用已经在许多实验中得到了证明 (林久生和王根轩, 2001)。Golovina 等 (2000) 用 TEMPONE 为俘获剂的 ESR 证明, 在胚乳的发育过程中活性氧逐渐增多, 从而导致质膜受损, 细胞死亡。另一方面, 对胚乳发育中活性氧清除酶系统的研究发现胎萌突变体 *vp1* 中的 SOD 表达水平由于受 ABA/ETH 失衡的影响而显著降低 (Guan & Scandalios, 1998)。Starcy 等 (1996) 还证明了抗氧化的过氧化物还原酶 (*peroxiredoxin*) *Per1* 的表达仅存在于在成熟脱水后还继续存活的糊粉层和胚细胞中。

对 *sh2* (*shrunk2*) 和 *o2* (*opaque2*) 等胚乳发育突变体的研究证明, 胚乳的内含物水平也影响 PCD。 *sh2* 突变体是由于编码淀粉合成的关键酶腺苷二磷酸葡萄糖 (ADPG) 焦磷酸化酶亚基的基因发生了突变, 从而导致单糖的大量积累以及在表型上出现颗粒皱褶。而 Young 等 (1997) 却发现 *sh2* 突变还能导致胚乳发育过程中 PCD 的提前, 甚至还能引起胚的 PCD; 同时他们还提出, 与玉米胚乳蛋白质合成相关的突变体 *o2* 在发育中胚乳积累大量的氨基酸也会造成胚乳 PCD 的提前和核酸酶活性的升高。目前, 对这些现象的解释归纳为两种: 一是内含物水平的提高导致渗透胁迫, 从而使乙烯的生成量加大; 二是内含物水平的提高直接影响乙烯的合成和调节对乙烯的敏感性。遮荫导致的玉米籽粒败育的实验证明, 葡萄糖水平升高所引起的败育过程对乙烯合成的前体也敏感 (Cheng & Lur, 1996)。另外对拟南芥葡萄糖不敏感的突变体 (*arabidopsis glucose insensitive*, *GIN*) 的研究证明葡萄糖水平的提高直接调控乙烯受体 *ETR1*, 可能在信号转导的途径中与乙烯有一些共同的或者重迭的步骤 (Zhou 等, 1998)。

2 糊粉层降解过程中的 PCD

2.1 基本过程

糊粉层是胚乳的一部分，包裹在胚乳的周围，一般具有由非纤维素多糖组成的厚壁。成熟时为细胞器所充满，通常最多的细胞器是蛋白贮藏液泡（protein storage vacuoles, PSV）。PSV 中贮藏了大量的蛋白质和少量的非淀粉碳水化合物以及以植酸盐形式存在的金属离子，其周围还围绕着大量的油质体（oleosome）。种子萌发过程中，许多小的 PSV 逐渐融合形成大的中央液泡，其内部的 pH 值会逐渐下降；与此同时细胞壁逐渐变薄并消失。种子萌发到一定时间大液泡破裂，细胞开始出现皱缩并死亡，这一过程与 Kuriyama (1999) 描述的输导分子分化的 PCD 相似，都出现液泡的破裂。在此期间，糊粉层细胞不断向胚乳分泌各种水解酶类以降解贮藏物质，同时厚壁在逐步降解最后消失。Wang 等 (1998) 通过对大麦 (*Hordeum vulgare*) 糊粉层细胞 DNA 片断化存在的时空变化，证实最初发生的 PCD 是在靠近胚的糊粉层细胞，而且其 PCD 的发生迟于 α -淀粉酶 mRNA 的产生。对于禾谷类种子糊粉层细胞在萌发过程中的 PCD 类型有两种看法：Wang 等 (1996) 认为是一种细胞凋亡，而 Fath 等 (1999) 通过分析核酸酶活性和 DNA 的降解动态，认为糊粉层在萌发中的 PCD 更象是自溶过程。

2.2 生物大分子的变化动态及相关酶

Bethke 等 (1999) 用含有 GA 的培养基培养糊粉层细胞原生质模拟糊粉层在种子萌发过程中的 PCD 时发现，原生质的 DNA 含量随着培养时间的增加而逐步下降。他们的实验还证实糊粉层细胞的 PCD 过程中虽然出现了 DNA 降解，但并没有出现明显的 DNA 梯状电泳现象。TUNEL 检测和 DAPI 核荧光实验也证明在 GA 培养基上培养的原生质体中出现了 DNA 降解，但是直至细胞死亡，DNA 也没有被完全降解 (Fath 等, 2000)。Fath 等 (1999) 认为外源和内源核酸酶在 DNA 提取中造成了自身的核小体断裂，即认为很可能是人为造成的。已经鉴定的参与该过程的核酸酶有 25 kD, 27 kD 和 33 kD (*BEN1*) 3 种。Brown & Ho (1986) 用单克隆抗体免疫印迹证明，33 kD 核酸酶 (*BEN1*) 与大麦核酸酶 I 相似，而 25 kD 和 27 kD 的核酸酶则对核酸酶 I 抗体没有免疫反应。这 3 种核酸酶均可切断单链的 DNA、RNA，也可以切断双链 DNA (Fath 等, 1999)。其酶活性可以被 $MnCl_2$ 所促进，但被 EDTA 和 EGTA 所抑制 (Aoyagi 等, 1998)；说明这些酶是依赖于 Mn^{2+} 和 Ca^{2+} 的。Aoyagi 等 (1998) 还从大麦糊粉层中克隆到了编码 33 kD、S1 型核酸酶的 cDNA，同时还利用 Northern 杂交证明了在刚分离出来的糊粉层细胞中不存在 *BEN1* 的转录本。Lehmann 等 (2001) 在番茄中也得到了 S 型核酸酶 RNase LX，并认为其羧基端的 HDEF 序列是内质网的驻留信号，荧光免疫定位实验也证明了该酶在萌发中参与了胚乳动员。

与核酸酶活动相对应的是许多蛋白酶在糊粉层中的作用。目前从萌发的大麦谷粒和糊粉层中分离得到了多种类型的蛋白酶，包括天冬氨酸蛋白酶，半胱氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶等；但是导致蛋白酶累积的培养基并不能诱导 PCD，说明蛋白酶的积累不是糊粉层 PCD 的原因 (Fath 等, 2000)。然而，在 GA 处理后酶表达和酶活性提高的蛋白酶却不少。天冬氨酸植物组织蛋白酶 (aspartic protease phytepsin) 在 GA 处理 17.5 h 后出现增量表达 (Bethke 等, 1996)，其激活方式是在酶原上切除 13 ~ 15 个氨基酸残基。Bethke & Jones (2001) 认为这种酶在自溶作用中起着核心的作用；此外，它还可能参与激活其他蛋白酶

类。半胱氨酸蛋白酶在刚分离的糊粉层细胞或 ABA 处理的原生质体中就已经有活性，用 GA 处理 4~5 d 后活性达到高峰。半胱氨酸蛋白酶活性变化的时间模式与糊粉层 PCD 的一致性说明在某种程度上半胱氨酸直接参与了该过程。半胱天冬酶 (caspase) 是动物细胞凋亡的转导信号和执行者，在糊粉层细胞的原位荧光底物检测中也检测到了类 caspase1 和 caspase3 (CPP32) 的存在；但是，在动物中这类蛋白酶存在于胞质中，而在植物中则存在于液泡中 (Cohen, 1997)。

2.3 糊粉层降解过程中 PCD 的调控和信号转导

调节糊粉层降解过程中 PCD 的激素主要是 GA 和 ABA。GA 对糊粉层降解的 PCD 有促进作用，而 ABA 对该过程有抑制作用。在种子萌发过程中，GA 在糊粉层中的含量是逐步升高的。含 GA 的培养基培养的糊粉层细胞原生质体在 6~8 d 内出现大量死亡；而在含 ABA 的培养基培养的活细胞数量在 25 d 中没有明显变化，而且在含 ABA 的培养基中糊粉层细胞原生质体可以存活长达 6 个月 (Fath 等, 2000)。在形态上，GA 处理的糊粉层细胞原生质体逐渐出现液泡化 (vacuolization)。PSV 在 2 d 后迅速融合成几个大的液泡，到第 4 d 就只剩下一个中央大液泡，到第 6 d 原生质体发生死亡。而用 ABA 处理的原生质体到 11 d 时，PSV 的数量基本不变。在 GA 诱导的糊粉层细胞原生质体 PCD 的最后阶段，往往出现质膜完整性的消失。此外，GA 处理的原生质体中高尔基体的复杂程度提高，油质体数量减少，乙醛酸循环体和线粒体的数量增加 (Bethke 等, 1999; Fath 等, 2000)。生化上，GA 处理后的原生质体在短时间内 pH 值迅速下降， α -淀粉酶活性迅速升高，DNase 和 RNase 的活性也陡增，与 GA 信号转导相关的反式激活蛋白 (trans-activating protein) GAMyB 也迅速增加。

另外糊粉层细胞或原生质体内部 Ca^{2+} 含量快速增加 (Bush 等, 1989)，同时钙调素 (calmodulin, CaM) 也缓慢升高 (Bethke 等, 1997)。GA 处理的原生质体逐渐合成一系列的天冬氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶 (Fath 等, 2000)。而用 ABA 处理的原生质体中胞内 Ca^{2+} 浓度下降，pH 值迅速上升，有丝分裂原活化的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 活性升高；而且检测不到 GA 处理时存在的蛋白酶。GA 处理时，信号分子 CaM 和 GAMyB 基因及与胚乳动员相关的 α -淀粉酶基因的表达增强，而与细胞分裂相关的 MAPK 基因和贮藏球蛋白基因减量表达。ABA 处理时，与分裂相关的 Em (early-methioine-labelled-polypeptide)，Rab16 和与脱水耐性相关的脱水素 (dehydrin) 基因增量表达，而 α -淀粉酶和 GAMyB 的基因则减量表达 (Bethke 等, 1997)。

Ca^{2+} 是 PCD 信号转导的重要组成部分，胞内 Ca^{2+} 浓度的升高是动物细胞凋亡的重要标记。植物输导组织分化时，低氧条件下通气组织的形成和抗病超敏反应 (hypersensitive response, HR) 的 PCD 中胞内 Ca^{2+} 浓度的升高都被认为起第二信使的作用 (翟中和等, 2000; Penell & Lamb, 1997; Groover & Jones, 1999)。糊粉层降解前出现的胞内 Ca^{2+} 浓度骤然升高同样有启动 PCD 的作用。在上游，GA 可能通过 GA 受体激活 Ca^{2+} 通道来提高胞内 Ca^{2+} 浓度 (Bethke 等, 1997)。用鸟苷酸环化酶 (guanylyl cyclase, GC) 抑制剂 LY 83583 处理后的糊粉层细胞减少了 GAMyB 和 α -淀粉酶的表达，同时也降低了胞内核酸酶的活性，抑制了 DNA 的降解和 PCD，这说明 GA 也通过激活鸟苷酸环化酶产生 cGMP 来提高胞内 Ca^{2+} 的浓度 (Fath 等, 1999; Bethke 等, 1999)，然而其具体的过程仍然不清楚。Kuo 等

(1996) 发现用冈田酸 (okadaic acid, OA) 处理糊粉层细胞可以阻断胞内 Ca^{2+} 的浓度升高, 并延迟 PCD 发生; 由于 OA 是蛋白磷酸酶的抑制剂, 说明蛋白磷酸酶可能也参加了糊粉层降解过程中 PCD 的信号转导。在 Ca^{2+} 下游, 蛋白质的磷酸化可能是 PCD 过程的信号。将依赖 Ca^{2+} 和 CaM 的蛋白激酶的合成底物 syntide-2 注入糊粉层细胞原生质体可以在不抑制 GA 产生的胞内 Ca^{2+} 浓度上升的条件下, 抑制 GA 诱导的糊粉层细胞的液泡化 (Ritchie & Gilroy, 1998)。Bethke & Jones (2001) 认为只有广泛的液泡化才会导致 PCD, 因此认为依赖 Ca^{2+} 和 CaM 的蛋白激酶是糊粉层降解过程中 PCD 的重要信号。

ABA 抑制 PCD 的信号传递又有其自身的系统。Bethke 等 (1997) 认为 ABA 可以通过质膜上的 ABA 受体直接激活质膜上的 Ca^{2+} -ATPase, 使胞内的 Ca^{2+} 不断外流, 或者通过质膜 ABA 受体直接活化酪氨酸激酶, 激活 MAPK 级联信号, 调节 CaM 和其他基因的表达, 从而调控 PCD 的发生。同样, 胞内游离的 ABA 受体也可以通过上述途径来调节 PCD 的发生。在激素信号转导的交互 (crosstalk) 上, ABA 可以通过 G-蛋白调节磷脂酰肌醇 (PIP_2) 的第二信使途径来拮抗 GA 导致的胞内 Ca^{2+} 浓度的升高。

此外值得注意的是糊粉层降解的 PCD 和糊粉层的分泌活动不是同一个过程, 而是两种同时进行的对 GA 的不同应答 (Fath 等, 2000)。ABA 处理抑制和延迟糊粉层细胞原生质体的 PCD, 但是 ABA 并不能抑制水解酶类的分泌。在 GA 处理 24 h 后再加入 ABA, PCD 被抑制, 但 α -淀粉酶的合成并未被抑制 (Bethke 等, 1999)。

2.4 影响糊粉层降解过程中 PCD 的其他因素

活性氧同样参与了糊粉层降解过程中 PCD 的信号转导。Bethke & Jones (2001) 的实验证明, H_2O_2 能大大提高 GA 处理过的糊粉层细胞原生质体的死亡率。用 325 mmol L^{-1} 的 H_2O_2 处理 GA 处理过的原生质体, 不到 1 h 死亡数量就达到 90% 以上; 即使用 3.25 mmol L^{-1} 的 H_2O_2 处理, 在 7 h 内原生质体的死亡数量也达到 80% 左右; 有可能 GA 处理使得原生质体对 H_2O_2 更敏感。用自身无荧光但与 H_2O_2 反应可以产生荧光的二氢荧光素二乙酸 (dihydrofluorescein diacetate, DHFDA; 主要与细胞质中的 H_2O_2 结合) 和 6-羧基-2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸二乙酰氧基甲酯 (6-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate diacetoxymethyl ester, CDCDHFDA, 主要与液泡中的 H_2O_2 结合) 检测大麦糊粉层细胞原生质体的实验发现, GA 处理的原生质体无论是液泡还是细胞质的荧光水平均迅速增加。

紫外辐射和蓝光 PCD 的促进作用也是通过活性氧来介导的。用 460 ~ 500 nm 的蓝光照射 GA 处理的原生质体, 50 s 后 DHFDA 和 CDCDHFDA 的平均荧光强度象素密度值 (pixel intensity value, VIP) 都迅速增加, 而 ABA 处理的不明显。另外随着光照波长的逐渐减小, 对 GA 处理过的原生质体的致死作用也越明显 (Bethke & Jones, 2001)。

抗氧化物质的存在能延缓 PCD 的过程也说明了活性氧在该过程中的作用。抗坏血酸 (ascorbate, AsA), 丁基羟甲苯 (butylated hydroxytoluene, BHT), 还原型二巯基苏糖醇 (reductant dithiothreitol, DTT), 碘化物等抗氧化剂都在一定程度上减少了死亡率。Bethke & Jones (2001) 还认为禾谷类种子糊粉层降解的过程和其他很多植物组织的衰老有一致性, 可能与脂质过氧化造成的膜伤害有关。

3 种子人工老化和劣变种子萌发过程中可能的 PCD

3.1 PCD 可能参与种子对人工老化的应答和萌发中劣变事件的排除

种子成熟后,就进入自然老化(aging)。种子的衰老主要表现在种子的生活力(viability)和活力(vigor)降低,超微结构上表现出质膜和各种细胞器的损害,生化上体现在各种生物大分子的合成能力减弱,生理上则表现为各种酶的活性下降(宋松泉和傅家瑞,1997)。人工老化(accelerated ageing)是用人工模拟的逆境条件,如高温高湿处理种子。PCD 作为植物对逆境的一种应答方式(Katsuhara, 1997),种子对人工老化的应答也可能发生 PCD 事件。实验证明种子的发芽率降到 20% 以下时,根据细胞退化的程度,人工老化的玉米胚可以分为 3 种类型:(1) 48 h 内可以被修复的轻微劣变。在超微结构上,细胞核有裂缝,线粒体和质体异常,但高尔基体很少异常,核糖体形成缓慢。(2) 种子不能萌发,超微结构发生较严重的异常,被破坏的细胞器很少得到修补。(3) 超微结构被严重破坏,不可能被修复。在超微结构上,细胞器严重肿胀和解体,核糖体和高尔基体不能形成(宋松泉和傅家瑞,1997)。在黑麦(*Secale cereale*),莴苣(*Lactuca sativa*)和水稻(*Oryza sativa*)等种子中已经证实了类似的情况。Priestley (1986) 将这些现象解释为自溶,自溶实际上也是一种 PCD。

种子在吸胀萌发过程中可以修复在贮藏中所受到的伤害(傅家瑞,1985)。劣变的程度不同,修复的可能性和机制也不同(宋松泉和傅家瑞,1997)。种子萌发过程中对于不可修复的劣变细胞和区域的排除,类似植株生长过程中老叶的衰老(Gan & Amasino, 1997),可能也是采用 PCD 的方式。

3.2 种子在人工老化和水合初期的核酸动态

Boubriak 等(2000)用黑麦种子胚做材料研究了人工老化和水合(hydration)初期的 DNA 变化。他们发现高活力的黑麦胚在正常、人工老化 19 d 和老化后吸胀 20 h 的 3 种处理中其 DNA 含量变化不大,只是在老化吸胀后略有升高。而经过 7 年自然劣变的黑麦胚在人工老化后吸胀,其 DNA 含量比自然劣变 7 年的低。从人工老化处理后干藏的黑麦胚和老化后吸胀的黑麦胚中提取的 DNA 出现了梯状电泳。此外,用核小体酶联免疫反应(nucleosome ELISA)的实验还证明高活力黑麦胚在老化 15 d 和 19 d 后核小体的含量在逐步升高,而经人工老化后再水合的核小体含量又增加了几乎一倍。同样,自然劣变的黑麦胚在吸胀后核小体的数量也出现陡增。

4 结语

植物从胚胎发育到根、茎、叶、花、果实等器官的形成,直至衰老死亡,都伴随着 PCD 的发生(Wu & Cheung, 2000)。种子是农林业和园艺生产中最基本的生产资料,也是植物种质资源长期保存的理想材料。PCD 是种子形态建成,排除衰老和响应逆境胁迫的重要方式。

目前,种子发育和萌发过程中 PCD 的研究仍然处于初始阶段,主要集中在对突变体和原生质体的研究,而且其研究对象也主要是禾谷类种子及其贮藏组织,对胚的 PCD 研究极少。至于种子发育和萌发过程中 PCD 的诱发因子、受控基因,引起 PCD 的信号转导途径,核酸酶和特异性蛋白酶在 PCD 中的作用等仍然不清楚。种子人工老化和劣变种子

修复（预处理）过程中的 PCD 事件也有待研究。

此外，深入研究种子发育、贮藏和萌发进程中的 PCD，对于预测种子的成熟、延长种子的贮藏寿命和改善种子的播种品质都具有重要的实践意义。

〔参 考 文 献〕

- 宋松泉, 傅家瑞, 1997. 种子衰老 [A]. 见: 陆定志, 傅家瑞, 宋松泉, 植物衰老及其调控 [M]. 北京: 农业出版社
- 张莹, 丁明孝, 1997. 植物细胞的程序化死亡 [J]. 细胞生物学杂志, **19** (4): 158—164
- 傅家瑞, 1985. 种子生理 [M]. 北京: 科学出版社
- 翟中和, 王喜忠, 丁明孝主编, 2000. 细胞生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社
- Aoyagi S, Sugiyama M, Fukuda H, 1998. *BEN1* and *ZEN1* cDNAs encoding S1-type DNase that are associated with cell death in plants [J]. *FEBS Lett*, **429**: 134—138
- Bethke PC, Hillmer S, Jones RL, 1996. Isolation of intact protein storage vacuoles from barley aleurone [J]. *Plant Physiol*, **110**: 521—529
- Bethke PC, Jones RL, 2001. Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species [J]. *Plant J*, **25** (1): 19—29
- Bethke PC, Lonsdale JE, Fath A, *et al*, 1999. Hormonally regulated programmed cell death in barley aleurone cells [J]. *Plant Cell*, **11**: 1033—1046
- Bethke PC, Schuurink PC, Jones RL, 1997. Hormonal signaling in cereal aleurone [J]. *J Exp Bot*, **48**: 1337—1356
- Boubriak I, Naumenko V, Lyne L, *et al*, 2000. Loss of viability in rye embryos at different level of hydration: senescence with apoptotic nucleosome cleavage or death with random DNA fragmentation [A]. In: Black M, Brandford KJ, Vazquez-Ramos J (eds) Seed Biology: Advances and Application [M]. London: CAB publishing, 205—214
- Brown PH, Ho-T HD, 1986. Barley aleurone layer secrete a nuclease in response to gibberlic acid [J]. *Plant Physiol*, **82**: 801—806
- Bush DC, Biswas AK, Jones RL, 1989. Gibberlin-acid stimulated Ca^{2+} accumulation in endoplasmic reticulum of barley aleurone: Ca^{2+} transport and steady-state levels [J]. *Planta*, **178**: 411—420
- Cheng CY, Lur HS, 1996. Ethylene may be involved in abortion of the maize caryopsis [J]. *Physiol Plant*, **98**: 245—252
- Cohen GM, 1997. Caspase: the executioners of apoptosis [J]. *Biochem J*, **326**: 1—16
- D'Amato F, 1984. Role of polyploidy in reproductive organs and tissues [A]. In: Johri BM (ed) Embryology of Angiosperms [M]. Berlin: Springer-Verlag, 519—566
- Fath A, Bethke PC, Jones RL, 1999. Barley aleurone cell death is not apoptotic: characterization of nuclease activities and DNA degradation [J]. *Plant J*, **20**: 305—315
- Fath A, Bethke PC, Lonsdale JE, *et al*, 2000. Programmed cell death in cereal aleurone [J]. *Plant Mol Biol*, **44**: 255—266
- Fukuda H, 2000. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants [J]. *Plant Mol Biol*, **44**: 245—253
- Gallie DR, Le H, Tanguary RL, *et al*, 1998. Translation initiation factors are differentially regulated in cereals during development and following heat shock [J]. *Plant J*, **14**: 715—722
- Gan SS, Amasino RM, 1997. Making sense of senescence: molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence [J]. *Plant Physiol*, **113**: 313—319
- Golovina EA, Hoekstra FA, van Aelst A, 2000. Programmed cell death or desiccation tolerance: two possible routes for wheat endosperm cells [J]. *Seed Sci Res*, **10**: 365—379
- Groover A, Jones AM, 1999. Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis [J]. *Plant Physiol*, **119**: 375—384
- Guan L, Scandalios JG, 1998. Two structurally similar maize cytosolic superoxide dismutase genes, *Sod1* and *Sod4* respond differentially to abscisic acid and high osmoticum [J]. *Plant Physiol*, **117**: 217—224

- He CJ, Morgan PW, Drew MC, 1996. Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia [J]. *Plant Physiol*, **112**: 463—472
- Howell SH, 1998. Molecular Genetics of Plant Development [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 265—270
- Jones A, 2000. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? [J]. *Trends Plant Sci*, **5**: 225—230
- Katsuhara M, 1997. Apoptosis-like cell death in barley roots under salt stress [J]. *Plant Cell Physiol*, **38**: 1091—1093
- Kuo A, Cappelluti S, Cervantes M, 1996. Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks a calcium changes, gene expression, and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells [J]. *Plant Cell*, **8**: 375—391
- Kuriyama H, 1999. Loss of tonoplast integrity programmed in tracheary element differentiation [J]. *Plant Physiol*, **121**: 763—774
- Le H, Tangaury RL, Balasta ML, et al, 1997. The translation initiation factors eIF5a4G and eIF4B interact with the poly (A) - binding protein to increase its RNA binding affinity [J]. *J Biol Chem*, **272**: 16247—16255
- Le H, Browning KS, Gallie DR, 1998. The phosphorylation state of the wheat translation initiation factors eIF4B and eIF2 is differentially regulated during seed development and germination [J]. *J Biol Chem*, **273**: 20084—20089
- Lehmann K, Hause B, Altmann D, et al, 2001. Functional endoplasmic reticulum retention motif HDEF is expressed during programmed cell death processes, including xylem differentiation, germination and senescence [J]. *Plant Physiol*, **127**: 436—449
- Lin JS (林久生), Wang GX (王根轩), 2001. Active oxygen and programmed death in plant cell [J]. *Plant Physiol Comm* (植物生理学通讯), **37**(6): 551—555
- Miller ME, Chourey PS, 1992. The maize invertase-deficient *miniature-1* seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development [J]. *Plant Cell*, **4**: 297—305
- Pennell RI, Lamb C, 1997. Programmed cell death in plants [J]. *Plant Cell*, **9**: 1157—1168
- Priestley DA, 1986. Seed Ageing [M]. Ithaca: Cornell University Press, 39—197
- Ritchie S, Gilroy S, 1998. Calcium-dependent protein phosphorylation may mediate the gibberellic acid response in barley aleurone [J]. *Plant Physiol*, **116**: 765—776
- Starcy RAP, Munthe E, Steinum T, et al, 1996. A peroxidoxin antioxidant is encoded by dormancy-related gene, *Per1*, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains [J]. *Plant Mol Biol*, **31**: 1205—1216
- Wang M, Oppedijk BJ, Caspers MPM, et al, 1998. Spatial and temporal regulation of DNA fragmentation in aleurone of germination barley [J]. *J Exp Bot*, **49**: 1293—1301
- Wang M, Oppedijk BJ, Lu X, 1996. Apoptosis in barley aleurone during germination and its inhibition by abscisic acid [J]. *Plant Mol Biol*, **32**: 1125—1134
- Wilson CM, 1980. Plant nucleases. VI Genetic and developmental variability in ribonuclease activity in inbred and hybrid corn endosperms [J]. *Plant Physiol*, **66**: 119—125
- Wu H, Cheung AY, 2000. Programmed cell death in plant reproduction [J]. *Plant Mol Biol*, **44**: 267—281
- Young TE, Gallie DR, 1999. Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals differences in endosperm development between cereals [J]. *Plant Mol Biol*, **39**: 915—926
- Young TE, Gallie DR, 2000a. Programmed cell death during endosperm development [J]. *Plant Mol Biol*, **44**: 283—301
- Young TE, Gallie DR, 2000b. Regulation of programmed cell death in maize endosperm by abscisic acid [J]. *Plant Mol Biol*, **42**: 397—414
- Young TE, Gallie DR, DeMason D, 1997. Ethylene-mediated programmed cell death during maize endosperm development of wild-type and *shrunken2* genotypes [J]. *Plant Physiol*, **115**: 737—751
- Zhou L, Jang JC, Jones TL, et al, 1998. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 10294—10299