

As (Ⅲ)胁迫对小麦发芽过程中木聚糖酶活性及基因表达动态变化的影响

李丹丹 李春喜* 邵 云 冯淑利 张黛静 张蓓蓓 姜丽娜

(河南师范大学生命科学学院 河南新乡 453007)

摘要 采用室内水培方法,研究了不同浓度 As (Ⅲ)胁迫对小麦发芽过程中籽粒、幼根、幼叶 3 个部位在培养 180h 内木聚糖酶活性的动态变化。并以小麦稳定表达的肌动蛋白基因作为对照,利用半定量 RT-PCR 技术,对小麦木聚糖酶基因的表达进行了研究。结果表明,小麦发芽过程中 3 个部位木聚糖酶活性平均值大小顺序为籽粒>幼芽>幼根。随着 As (Ⅲ)浓度升高,籽粒中木聚糖酶活性呈现低促高抑的趋势,幼根和幼叶中木聚糖酶活性呈上升趋势。4 个浓度 As (Ⅲ)处理后木聚糖酶基因表达强度依次为 25mg/L>5mg/L>0mg/L>0.1mg/L。

关键词 :As (Ⅲ)胁迫 小麦 木聚糖酶 木聚糖酶基因 肌动蛋白基因 半定量 RT-PCR

文章编号 :1000-0933 (2007)05-1873-06 **中图分类号** :Q786 Q948 S181 **文献标识码** :A

Effect of As (Ⅲ) stress on the xylanase activity and its gene expression during wheat germination

LI Dan-Dan ,LI Chun-Xi* ,SHAO Yun ,FENG Shu-Li ,ZHANG Dai-Jing ,ZHANG Bei-Bei ,JIANG Li-Na

College of Life Sciences ,Henan Normal University ,Xinxiang 453007 ,Henan ,China

Acta Ecologica Sinica 2007 27 (5) 1873 ~ 1878.

Abstract :The dynamic changes of xylanase activity in seed , root and plumule of wheat treated by different As (Ⅲ) concentrations were studied using the water cultivating method. The results indicated that the average xylanase activity was higher in seed than in plumule and root. With the increased As (Ⅲ) concentration ,the xylanase activity first went up then went down in seed ,while it presented a ascending trend in root and plumule.

As the sampling time prolonged ,the xylanase activity in seeds first rose then dropped with the treatment of As (Ⅲ) ,the enzyme activity on 0mg/L and 0.1mg/L As (Ⅲ) concentrations appeared a peak at 60h and 120h ,the zenith of 5 mg/L As (Ⅲ) concentration appeared at 72h and 120h ,and it came forth at 72h and 108h on 25mg/L As (Ⅲ) stress. The xylanase activity on 0.1 ,5 ,25mg/L As (Ⅲ) concentration first ascended then descended in roots ,they all appeared peaks at 60h ,but the activity presented a descendant trend with 0mg/L As (Ⅲ) treatment during the germination. As sampling time prolonged ,the xylanase activity first elevated then dropped along in plumule on As (Ⅲ) stress. The enzyme activity was moving up as the As (Ⅲ) concentration went up. Overall ,It had a strong inhibition to xylanase activity in seeds as well as a strongly stimulative effect in roots on 25mg/L As (Ⅲ) stress.

Semi-quantity Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction was used to study the xylanase gene expression. The

基金项目 河南省杰出青年科学基金资助项目 (04120001700)

收稿日期 2006-04-17 ;**修订日期** 2006-11-17

作者简介 李丹丹 (1982 ~) ,女 河南南阳人 硕士生 从事小麦生理生态研究. E-mail :didannytc@126.com

* **通讯作者** Corresponding author. E-mail :13703731637@sina.com

Foundation item :The project was financially supported by the Outstanding Youth Fundation of Henan Province (No. 04120001700)

Received date 2006-04-17 ;**Accepted date** 2006-11-17

Biography LI Dan-Dan , Master candidate , mainly engaged in wheat physiology and ecology. E-mail :didannytc@126.com

results showed that , the xylanase gene began to express at 132h on 0mg/L As (Ⅲ) stress in wheat leaves , but its expression phase was short , there was no expression after the 8th day of germination. At the same time , The xylanase gene began to express at 120h on the other As (Ⅲ) concentrations. In addition , the xylanase gene expression was enhanced when the wheat was treated in 25mg/L As (Ⅲ) concentration.

Key Words : As (Ⅲ) stress ; wheat ; xylanase ; xylanase gene ; actin gene ; semi-quantity RT-PCR

重金属是重要的环境污染物 ,随着工业化的发展及污染物排放量的日益加重 ,由重金属引起的生态危机和生态后果已引起人们的高度重视 ,研究重金属胁迫下作物生长发育的生理生化及分子机理已成为当今的热点。种子萌发既是小麦生活周期的起点 ,也是小麦感知外界环境的最初生命阶段 ,萌发是代谢开始活跃 ,一系列蛋白酶及水解酶活性逐渐增强的过程。木聚糖酶是一类半纤维素水解酶 ,也是萌发过程中一个关键酶 ,目前研究较多的是细菌、真菌来源的木聚糖酶^[2] ,对植物来源木聚糖酶的研究报道还很少。Chrispeels^[4]等发现大麦等禾本科植物在种子萌发时木聚糖酶活性在其他水解酶如淀粉酶等活性降低时仍持续升高 ,Banik等^[1]证实了在大麦种子萌发过程中 , β -1 ,4 木聚糖酶在基因表达上晚于 (1 ,3-1 ,4)- β -葡聚糖酶。另外 ,在大麦种子萌发和幼苗形成过程中 ,糊粉层细胞合成并分泌水解酶到淀粉性胚乳中 ,给正在生长的胚提供营养 ,一旦完成它们的分泌作用 ,糊粉层细胞立即死亡 ,Caspers等^[6]通过试验证明细胞质中的一种内源 β -1 ,4 木聚糖酶在大麦 (*Hordeum vulgare*)糊粉层程序性死亡中起重要作用。Bethke^[7]等认为 GA 促进糊粉层细胞水解酶的释放 ,导致 PCD (Programmed Cell Death)发生 ,而 ABA 拮抗 GA 作用 ,抑制水解酶分泌。周建明^[8]、Nemoto^[9]、LiL^[10]等认为干旱、高盐、病害等逆境条件可使小麦 *dil* 基因、*WESR* 基因 (小麦早期盐胁迫响应基因)、几丁质酶基因和 β -1 ,3-葡聚糖酶基因表达增强。由此可见 ,木聚糖酶在种子萌发过程以及植物抗逆方面都有一定的潜在作用。因此 ,研究逆境胁迫下小麦籽粒发芽过程中木聚糖酶活性及基因表达的动态变化规律 ,对我们进一步探讨糊粉层细胞 PCD 的发生以及研究重金属对植物的危害机理都具有重要意义。本试验选定重金属 As (Ⅲ)为胁迫因素 ,探讨不同浓度 As (Ⅲ)处理后小麦籽粒发芽过程中不同部位木聚糖酶活性的动态变化 ,同时运用半定量 RT-PCR (Semi-QRT-PCR)方法研究籽粒发芽过程木聚糖酶基因表达的动态变化 ,为研究逆境胁迫对小麦木聚糖酶表达的分子机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试小麦 (*Triticum aestivum* L.)品种为郑州 9023 ,供试试剂为 NaAsO₂ (A. R.)。精选粒大饱满的小麦籽粒 ,用 0.1% HgCl₂表面消毒 6min ,去离子水充分冲洗后 ,整齐地摆放在铺有滤纸的培养皿中 ,每皿 100 粒 ,分别加入 0 (对照)、0.1、5、25 mg/L 的 As (Ⅲ)溶液 ,每个处理设 3 个重复 ,置于 HP1000GS-B 型全智能人工植物气候箱中在 (18 ± 2)℃ ,75% ± 7% RH ,6000lx 条件下培养 ,每隔半天补充定量的 As (Ⅲ)溶液。从培养 48h 开始间隔 12h 连续取样 ,将取得的幼苗洗净 ,用滤纸吸干 ,分离成籽粒、幼根、幼叶 3 个部位 ,测定木聚糖酶活性 ;从培养后 96h 开始间隔 12h 连续取样 ,提取幼苗叶片的 RNA ,反转录为 cDNA ,半定量 RT-PCR 法研究木聚糖酶基因表达的动态变化。

1.2 木聚糖酶活性测定

取一定量新鲜的小麦籽粒、幼根及幼叶研磨 ,用 pH5.3 0.05mol/L 的柠檬酸缓冲液提取 ,8000r/min 离心 10min ,在试管中加入 2ml 底物 (1% 梓木木聚糖 Beechwood Sigma) ,1ml 提取酶液 ,DNS 法测定木聚糖酶活性。以 pH5.3 条件下 ,50℃ 时每分钟水解木聚糖释放 1 μ mol 木糖所需要的酶量为一个酶活力单位 (U/g)^[11 ,12]。

1.3 小麦木聚糖酶基因表达

用 TRNzol 试剂 (TIANGEN)提取小麦幼叶的总 RNA。(1)定量 :测 260、280nm 处的吸光值 ,计算 A₂₆₀/A₂₈₀ 的值 ,估计总 RNA 的纯度 ,通过 A₂₆₀ 的值分别对不同取样时间的总 RNA 进行定量。(2)RNA 完整性的检测 :

在 1% 普通琼脂糖凝胶上分离总 RNA 若有 2 条清晰无拖尾的带 ,则说明总 RNA 完整。 (3) 第一链 cNDA 合成 取等量不同取样时间的总 RNA 用 MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒 (上海生工)合成第一链 cDNA。

根据小麦 Actin 基因 (GenBank 查询号 :gi :48927617)序列 ,设计了一对特异性引物 Actin-F :5'- GTTCCAATCTATGAGGGATACACGC-3' ,Actin-R 5'-GAACCTCCACTGAGAACAACATTACC-3' [13]。 PCR 扩增采用 50μl 反应体系 ,分别加入等量不同取样时间的 cDNA (4μl)模板 ,10 × PCR Buffer (100mmol/L 的 Tris-HCl , pH8.3 ,500mmol/L 的 KCl)2.5μl ,80μmol/L 的 dNTP ,1.5mmol/L 的 MgCl₂ ,0.2mmol/L 的 Actin 基因特异引物 ,1UTaqDNA 聚合酶。反应程序 94℃ 预变性 5min ,94℃ 变性 1min ,57℃ 退火 1min ,72℃ 延伸 1min ,15 个循环 72℃ 延伸 8min。小麦 Actin 基因扩增产物长度为 422bp。取等体积的 PCR 产物加上样缓冲液经 1% 琼脂糖凝胶电泳 ,EB 染色 ,紫外灯观察照相。

根据已克隆的小麦木聚糖酶基因序列 ,设计了一对简并引物 X1 5'-CGAGAACGAGATGAACTGCT-3' ; X2 5'-GTG (CT)TGAG (GA)GAAGG (CG) (TC)ACG-3'。 PCR 扩增条件同上 ,T_m 为 54℃ ,扩增产物长度为 652bp。取等体积的 PCR 产物加上样缓冲液经 1% 琼脂糖凝胶电泳 ,EB 染色 ,紫外灯观察照相。

2 结果与分析

2.1 As (Ⅲ) 处理对小麦萌发过程中木聚糖酶活性的影响

由图 1 可以看出 ,对 3 个部位而言 ,木聚糖酶活平均值大小顺序为 :籽粒 > 幼叶 > 幼根 ,不同部位酶活平均值间差异极显著。随着 As (Ⅲ) 浓度的升高 ,籽粒木聚糖酶活性呈先上升后下降的趋势 ,幼根和幼芽中木聚糖酶活性变化趋势不明显。

从图 2 可得 ,随着培养时间的延长 ,4 个浓度 As (Ⅲ) 处理后 ,籽粒中木聚糖酶活性都呈先上升后下降的趋势 ,0.1mg/L 和对照的酶活在 60h 和 120h 时都有两个较高的点 ,5mg/L 则在 72h 和 120h 时有两个高峰 ,25mg/L 浓度在 84h 和 144h 有两个低谷。对 4 个浓度酶活平均值来说 ,25mg/L 浓度比对照低 30.17% ,和其他 3 个浓度的差异都达到显著水平 ,说明 25mg/LAs (Ⅲ) 对籽粒木聚糖酶活性有较强的抑制作用。

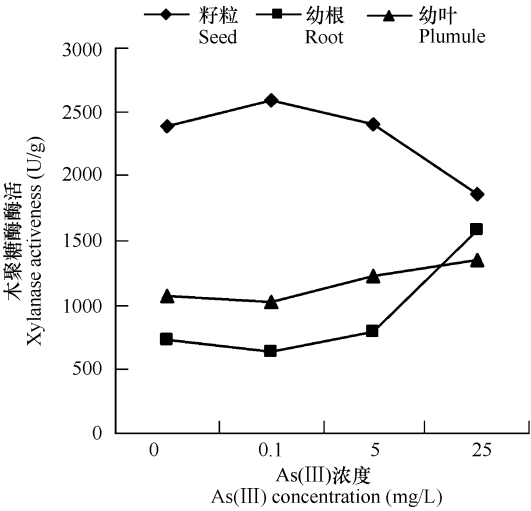


图 1 As (Ⅲ) 胁迫对小麦木聚糖酶活性的影响
Fig. 1 As (Ⅲ) stress on xylanase activity of wheat

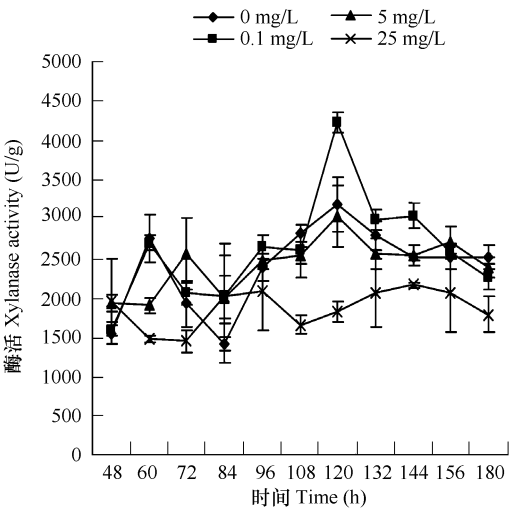


图 2 As (Ⅲ) 胁迫对籽粒木聚糖酶活性的影响
Fig. 2 As (Ⅲ) stress on xylanase activity of seed

图 3 显示了随着培养时间的延长 ,0.1、5、25 mg/L As (Ⅲ) 处理后 ,幼根中木聚糖酶活性均呈先上升后下降趋势 ,且都在 60h 时出现高峰 ;对照则呈逐渐下降的趋势。对 4 个浓度幼根酶活平均值而言 ,25mg/L > 5mg/L > 0mg/L > 0.1mg/L ,25mg/L 浓度 As (Ⅲ) 处理后酶活平均比对照高 1.02 倍 ,与其它 3 个浓度的差异都达极显著水平 ,说明 25mg/LAs (Ⅲ) 对幼根木聚糖酶活性有极大的促进作用。

图 4 表明 ,随着培养时间的延长 ,4 个浓度 As (Ⅲ) 处理后 ,幼叶中木聚糖酶活性都呈先上升后下降的趋

势。对 4 个浓度幼叶木聚糖酶活平均值而言 $25\text{mg/L} > 5\text{mg/L} > 0\text{mg/L} > 0.1\text{mg/L}$, 5 、 25mg/L 平均值比对照高 23.70% 和 35.24% ,与对照差异达极显著水平 ,说明随着 As (Ⅲ)浓度的升高 幼叶中木聚糖酶活性显著升高。综上所述 ,高浓度 As (Ⅲ)对籽粒中木聚糖酶活性有抑制作用 ,对幼根和幼叶中木聚糖酶活性有促进作用。从时间进程上来看 ,幼根中木聚糖酶活最高点出现的要早于籽粒和幼叶。

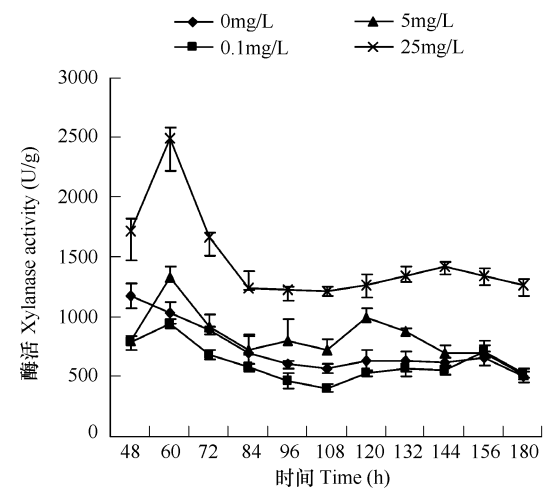


图 3 As (Ⅲ)胁迫对幼根木聚糖酶活性的影响
Fig. 3 As (Ⅲ) stress on xylanase activity of root

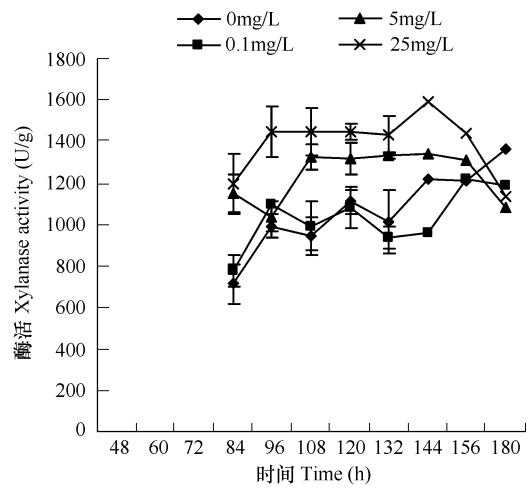


图 4 As (Ⅲ)胁迫对幼芽木聚糖酶活性的影响
Fig. 4 As (Ⅲ) stress on xylanase activity of plumule

2.2 As (Ⅲ)处理对小麦幼叶中木聚糖酶基因表达动态变化的影响

用半定量 RT-PCR 方法对小麦木聚糖酶基因表达动态变化进行分析 ,结果表明 ,小麦 Actin 基因和木聚糖酶基因分别得到与预期片段大小一致的特异性扩增产物。As (Ⅲ)处理后小麦叶片中 Actin 基因在不同取样时间扩增条带亮度基本相同。以此为对照 ,分析了叶片中小麦木聚糖酶基因在不同 As (Ⅲ)处理下不同时间的表达变化。灰度分析结果显示 25mg/L As (Ⅲ)胁迫下木聚糖酶基因在表达量上高于 0 、 0.1 、 5mg/L ,在表达时间上长于 0 和 0.1mg/L 。4 个浓度 As (Ⅲ)胁迫下木聚糖酶基因表达强度依次为 $25\text{mg/L} > 5\text{mg/L} > 0\text{mg/L} > 0.1\text{mg/L}$,这和 2.1 中木聚糖酶活性的测定结果是一致的。

图 5 显示 ,未加 As (Ⅲ)处理的小麦幼叶的木聚糖酶基因在培养后 132h 开始有表达 ,但是表达时间很短 ,只在第 $6\sim7$ 天 ,第 8 天开始已不表达。图 6 中 0.1mg/L As (Ⅲ)处理后 ,小麦幼叶的木聚糖酶基因在培养后第 5 天开始就有表达 ,但是从第 7 天开始已不表达 ,在表达时间上早于对照 ,表达量上低于对照。图 7 表明 , 5mg/L As (Ⅲ)胁迫下幼叶木聚糖酶基因从培养第 5 天已开始表达 ,持续至第 7 天后才开始下降 ,同一时间木聚糖酶基因在表达量上较对照低 ,表达时期上比 0 和 0.1mg/L 长。图 8 中 25mg/L As (Ⅲ)胁迫下木聚糖酶基因也是从第 5 天开始表达 ,延续至第 7 天仍很高 ,第 8 天时开始逐渐不表达 , 25mg/L As (Ⅲ)胁迫下小麦幼叶木聚糖酶基因在同一时间表达量上高于对照和其他两个浓度的处理。

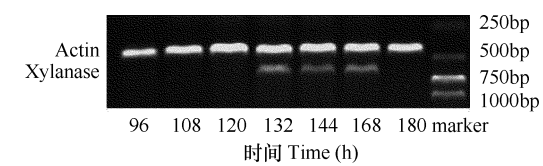


图 5 0mg/L As (Ⅲ)胁迫下小麦木聚糖酶基因表达动态变化
Fig. 5 Dynamic change of wheat xylanase gene expression on 0mg/L As (Ⅲ) stress
Actin :肌动蛋白基因 Xylanase 木聚糖酶基因

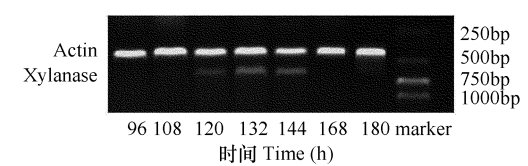


图 6 0.1mg/L As (Ⅲ)胁迫下小麦木聚糖酶基因表达动态变化
Fig. 6 Dynamic change of wheat xylanase gene expression on 0.1mg/L As (Ⅲ) stress
Actin :肌动蛋白基因 Xylanase 木聚糖酶基因

3 讨论

木聚糖酶作为一种半纤维素水解酶,它和α-淀粉酶一样,在种子萌发和幼苗生长的过程中,分解胚乳营养物质提供植物生长所需的碳源及代谢中间产物^[14-16]。如本试验中4个浓度As(Ⅲ)处理后,籽粒中木聚糖酶活都有一个先上升后下降的趋势,由试验可得,小麦幼苗3个部位木聚糖酶活性大小顺序为籽粒>幼叶>幼根,因为籽粒在小麦萌发初期是主要的营养源,呼吸代谢比较旺盛,相应酶的活性也较高。25mg/LAs(Ⅲ)处理下幼根和幼叶中木聚糖酶活性显著高于其他3个浓度,这一点从分子水平上可以加以验证。由不同取样时间幼叶中木聚糖酶基因表达情况来看,随着As(Ⅲ)浓度的升高,幼叶中木聚糖酶基因表达出现得早,结束的晚,在表达量上低浓度的As(Ⅲ)抑制木聚糖酶基因的表达,当As(Ⅲ)浓度≥25mg/L时,木聚糖酶基因表达量高于对照,说明高浓度As(Ⅲ)对叶中木聚糖酶基因的表达有促进作用。As(Ⅲ)如何影响木聚糖酶基因的表达,这一点可以从以下两方面进行推测:

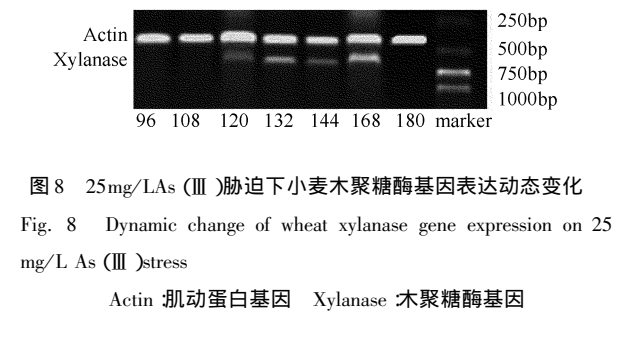
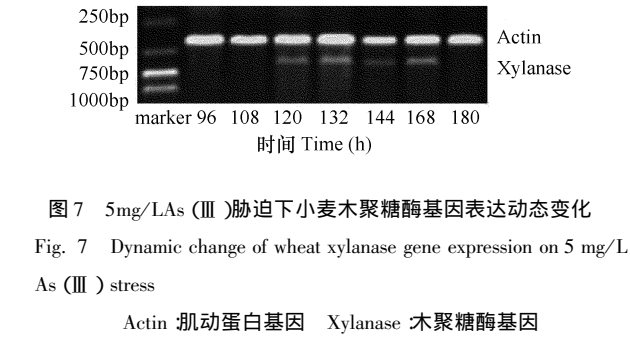


表1 电泳图谱灰度分析结果							
Table 1 The Greyscale analysis of electrophoresis result							
浓度 Concentration (mg/L)	时间 Time (h)						
	96	108	120	132	144	168	180
0 肌动蛋白基因 Actin gene	82.46	83.25	84.18	84.22	83.95	82.80	83.55
木聚糖酶基因 Xylanase gene				52.87	32.38	43.42	
灰度比值 Ratio of the greyscale				0.63	0.39	0.52	
0.1 肌动蛋白基因 Actin gene	80.19	80.65	80.35	84.23	81.95	78.27	79.57
木聚糖酶基因 Xylanase gene			15.57	33.59	29.51		
灰度比值 Ratio of the greyscale			0.19	0.40	0.36		
5 肌动蛋白基因 Actin gene	84.33	81.54	83.31	84.40	82.96	82.45	83.23
木聚糖酶基因 Xylanase gene			33.65	42.17	21.76	39.75	
灰度比值 Ratio of the greyscale			0.40	0.50	0.26	0.48	
25 肌动蛋白基因 Actin gene	83.14	82.75	84.63	82.01	82.18	81.45	82.00
木聚糖酶基因 Xylanase gene			32.33	54.46	33.11	66.57	
灰度比值 Ratio of the greyscale			0.38	0.66	0.40	0.82	

(1)植物的生长发育受到各种酶的调节,在种子萌发过程中,酶的形成有两个来源,一是由已存在的蛋白质释放或激活;二是重新合成^[17]。籽粒中木聚糖酶可能属于前者,即束缚态酶的释放,在高浓度As(Ⅲ)胁迫下,小麦根部生长受阻^[18-20],籽粒不能很好的进行吸胀吸水,相应的呼吸代谢中间酶活性也下降,根和叶中木聚糖酶可能是重新合成的酶,高浓度的As(Ⅲ)通过影响木聚糖酶基因合成过程中的一些关键因子,使根和叶中木聚糖酶基因表达量增加,酶活性增高。

(2)在小麦等禾本科植物种子萌发和幼苗形成过程中,糊粉层细胞合成并分泌水解酶到淀粉性胚乳中,给正在生长的胚提供营养,一旦完成它们的分泌作用,糊粉层细胞立即死亡^[21]。分析大麦、小麦糊粉层与玉米花粉等来源木聚糖酶结构特性发现,它们拥有许多共同点:它们具有高度同源性(41%),同属于family10,没有信号肽,无法通过正常途径分泌到细胞外,而是通过细胞进入程序性死亡,细胞破碎后释放到细胞外,最初由mRNA翻译成的蛋白质大小分别为64kD(糊粉层)和60kD(花粉),大小相近,且酶活性很小或者检测不

到酶活,随着细胞进入程序性死亡,蛋白的 N 端和 C 端在酸性蛋白水解酶的作用下多次剪切,最终形成约 35kD 的具有木聚糖水解酶活性的蛋白^[22 23 6],高浓度的 As (Ⅲ)可能作为一种信号分子诱发了细胞的程序性死亡,使小麦叶片中木聚糖酶基因表达量增加,酶活性升高,具体原因有待进一步探讨。

References :

[1] Anthony T ,Chandra Raj K ,Rajendran A. High molecular weight cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1 , *Enzyme and Microbial Technology* ,2003 ,32 :647 — 654.

[2] Neeta Kulkarni ,Malathi Lakshmikumaran , and Mala Rao. Xylanase II from an Alkaliphilic Thermophilic *Bacillus* with a Distinctly Different Structure from Other Xylanases : Evolutionary Relationship to Alkaliphilic Xylanases , *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 1999 ,263 :640 — 645.

[3] Chrispeels M J , Varner J E. Gibberelic acid enhanced synthesis and release of amylase and ribonuclease by isolated barley aleurone layers. *Plant Physiol* ,1967 ,42 :398 — 406.

[4] Slade A M , H JPB , Morrice N A , *et al.* Purification and characterization of three (1→4)β-D-xylan endohydrolases from germinated barey. *Eur J Biochem* ,1989 ,185 :533 — 539.

[5] Banik M , Li C D , Langridge P , Fincher G B , Structure , hormonal regulation and chromosomal location of genes encoding barley (1-4)-β-xylan endohydrolases. *Mol Gen Genet* ,1997 ,253 :599 — 608.

[6] Caspers MPM , Lok F , Sinjorgo KMC , van Zeijl M J ,Nielsen KA. Cameron -Mills V Synthesis ,process in gand export of cytoplasmic endo-β-1 , 4-xylanase from barley aleurone during germination. *The Plant Journal* ,2001 ,26 :191 — 204.

[7] Bethke P C , Jones R L , Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *The Plant Journal* ,2001 ,25 :19 — 29.

[8] Zhou J M , Zhu Q , Bai Y Y , Tang Z C. The cDNA segments clone and sequence analysis of water Stresses induced gene in wheat. *Science Bulletin* ,1998 ,43 (22) :2419 — 2422.

[9] Nemoto Y ,Sasakuma T ,Kawakami N. Isolation of novel early saltresponding genes from wheat *Triticum aestivum* L. by differential display. *Theor. Appl. Genet* ,1999 ,98 :673 — 678.

[10] Li W L , Muthukrishnan S , Liu D J. Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and beta-1 ,3-glucanases from wheat spikes infected infected by *Fusarium graminearum*. *Theor. Appl. Genet* ,2001 ,102 :353 — 362.

[11] Nie G X , Zhang J X , Jiang L N , Li C X , Fu Y R , You C Q. Probing into the Optimum conditions for Measuring the Activity of Xylanase by means of Orthogonal Experiments. *Cereal & Feedindustry* ,2003 ,5 (5) :44 — 46.

[12] Gerard A , Walsh M , Ghirlanda S , *et al.* Technical Note : Detection and Quantification of Supplemental Fungalβ-glucanase Activity in Animal Feed. *J Anim Sci* ,1995 ,73 :1074 — 1076.

[13] Zhang L N , Niu J S , Yu L , Expression Analysis of Wheat TaMlo-A1c Gene by Semi-QRT-PCR. *Acta Bot. Boreal. -Occident . Sin* ,2005 ,25 (7) : 1368 — 1371.

[14] Benjavongkulchai E , Spencer M S. Purification and characterization of barley-aleurone xylanase. *Planta* ,1986 ,169 :415 — 419.

[15] Slade A M , H j P B , Morrice N A , Fincher G B. Purification and characterization of three (1 → 4)-β-xylan endohydrolases from germinated barley. *Eur J Biochem* ,1989 ,185 :533 — 539.

[16] Caspers M P M , Lok F , Sinjorgo K M C , Zeijl M J van , Nielsen K A , Cameron-Mills V. Synthesis ,processing and export of cytoplasmic endo-β-1 4-xylanase from barley aleurone during germination. *Plant* ,2001 ,26 :191 — 204.

[17] Leopold A C , Kriedemann P E , Yan L Q. *Plant development*. Beijing : Science Press ,1984. 191 — 194.

[18] Xiao L. Arsenic stress on the enzyme activity and respiration intensity during wheat germination. *Shanxi Environment* ,1999 ,6 :22 — 24.

[19] Xiao L , Ling Q S , Wang Q H. Investigation on the effect of Arsenic on wheat seed germination. *Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalis* ,1998 ,26 (4) :56 — 60.

[20] Shao Y , Lu X Y , Jing L N. Effects of As (Ⅲ) stress on wheat germination. *Journal of Anhui Agri. S* ,2005 ,33 (6) :749 — 751.

[21] Liu W N , Wang M , Li C J. Recent progress of study on Programmed Cell Death in plants. *Chinese Bulletin of Botan* ,2002 ,19 (5) :546 — 551.

[22] Wu S S H , Suan D F , Chang Hc , *et al.* Maize tapetum xylanase is synthesized as a precursor ,processed and activated by a serine protease , and deposited on the pollen. *The Journal of Biological Chemistry* ,2002 ,277 (5) :49055 — 49064.

[23] Banik M , Garrett T P J , Fincher G B. Molecular cloning of cDNAs encoding (1 ,4) xylan endohydrolases from the aleurone layer of germinated barley (*Hordeumvulgare*). *Plant Mol Biol* ,1996 ,31 :1163 — 1172.

参考文献 :

[8] 周建明,朱群,白永延,等.水分胁迫诱导表达的小麦基因的 cDNA 片段克隆和序列分析. *科学通报* ,1998 ,43 (22) :2419 ~ 2422.

[11] 聂国兴,张建新,游长青,等.用正交法探讨木聚糖酶活性的最佳测定条件. *粮食与饲料工业* ,2003 (5) :44 ~ 46.

[13] 张丽娜,牛吉山,于玲,用半定量 RT-PCR 方法分析小麦 TaMlo-A1c 基因的表达. *西北植物学报* ,2005 ,25 (7) :1368 ~ 1371.

[17] AC 利奥波德,PE 克里德曼,颜李琼,等.植物的生长和发育.北京:科学出版社,1984. 191 ~ 194.

[18] 肖玲. 砷对小麦种子萌发酶活性及呼吸强度影响的研究. *陕西环境* ,1999 ,6 (4) :22 ~ 24.

[19] 肖玲,梁圉社,王清华. 砷对小麦种子萌发影响的探讨. *西北农业大学学报* ,1998 ,26 (6) :56 ~ 60.

[20] 邵云,鲁旭阳,姜丽娜. As (Ⅲ)胁迫对小麦萌发的影响及幼苗 As 含量特征的研究. *安徽农业科学* ,2005 ,33 (5) :749 ~ 751.

[21] 刘文娜,汪矛,李重九. 植物细胞程序化死亡研究进展. *植物学通报* ,2002 ,19 (5) :546 ~ 551.