

Caspase 3-like 蛋白酶和 *TaeMCA II* 基因 对小麦胚乳细胞 PCD 的影响

郭月静¹ 杨文丽¹ 周竹青¹ 俞敏¹ 梅方竹² 周广生³

1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学科学技术发展研究院, 武汉 430070;

3. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070

摘要 对正常生长和淹水处理的华麦 8 号胚乳细胞发育过程中 Caspase 3-like 蛋白酶活性和 *TaeMCA II* 基因表达量进行了研究。结果显示, 正常生长条件下, 在胚乳细胞发生 PCD 早期(花后 12 d), Caspase 3-like 蛋白酶活性较强, 且该酶主要定位于胚乳细胞中的淀粉质体上; 整个胚乳细胞 PCD 过程中 *TaeMCA II* 基因表达量变化不大。在淹水胁迫处理下, 胚乳 *TaeMCA II* 基因表达量和 Caspase 3-like 蛋白酶活性比同期正常处理高。上述研究结果表明, Caspase 3-like 蛋白酶参与了正常生长的胚乳细胞 PCD 过程; 淹水胁迫会导致 *TaeMCA II* 基因超表达和 Caspase 3-like 蛋白酶活性升高, 这可能是胚乳细胞 PCD 进程提前的原因之一。

关键词 小麦; 淹水; 胚乳 PCD; Caspase 3-like 蛋白酶; *TaeMCA II* 基因

中图分类号 Q 945.78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)04-0001-07

细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)是指生物体内由基因控制的、为适应环境变化或者发育需求而自发和有序的细胞死亡过程。有关 PCD 的研究, 最早是在动物中开展的。在动物细胞凋亡的起始和执行过程中, 半胱氨酸蛋白酶家族(Caspases)起着重要作用^[1], 其中 Caspase 3 蛋白酶是多种凋亡信号传递的汇聚点, 该蛋白酶的活化成为细胞凋亡进入不可逆阶段的标志^[2-3]。大量研究指出, Caspase 3-like 蛋白酶也参与了植物 PCD 过程, 且与植物的发育相关。通过注射 Caspase 3 蛋白酶抑制剂能够在很大程度上抑制豌豆幼苗侧根的死亡^[4]。在 UV 诱导的 PCD 过程中, DEVDase 能使拟南芥快速发生细胞程序性死亡, 而 Caspase 1 和 Caspase 3 蛋白酶抑制剂可以抑制 DNA 片段化, 从而减少细胞死亡, 减缓拟南芥 PCD 的发生^[5]。在罂粟花粉自交不亲和导致的 PCD 中, Caspase 3-like 蛋白酶迅速被激活, 并参与该 PCD 过程^[6]。在毛白杨次生木质部中提取的具有 Caspase 3-like 蛋白酶活性的 20SP 蛋白酶与次生木质部发育相关^[7]。在致病疫霉菌侵染的马铃薯叶片中也发现具有 DEV-

Dase 活性的蛋白酶^[8]。相关研究证明通过 Caspase 3-like 蛋白酶的表达量高低能够反映出小麦对于印度腥黑穗病(karnal bunt)抗性的强弱^[9], 意味着在小麦中存在具有 Caspase 3-like 蛋白酶活性的蛋白酶。

根据植物 Caspase-like 蛋白酶碱基序列、作用位点、酶活性以及与动物 Caspase 的相似性, 可将其分为 metaCaspase、VPEs 和 saspases 三类。其中, metaCaspase 属于半胱氨酸蛋白内切酶。经序列分析, metaCaspase 含有动物 Caspase 家族的保守结构域, 并且在蛋白三维结构上具有较高的同源性^[10]。大量研究证明, metaCaspase 具有 Caspase 蛋白酶活性, 其表达量变化和植物 PCD 密切相关。Piszczeck 等^[11]在小麦叶片中成功提取了一种禾谷类 metaCaspase II 基因——*TaeMCA II*, 该基因在小麦叶片热激反应中得到超表达, 与小麦叶片超敏反应相关。

Young 等^[12]发现小麦胚乳细胞在发育的中后期, 细胞核降解, DNA 断裂成 180~200 bp 及成其倍数大小的一系列 DNA 片段, 经电泳得到典型的 DNA 梯形条带。韦存虚^[13]、李睿等^[14]用透射电镜

收稿日期: 2014-06-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31071347, 31471428)

郭月静, 硕士研究生, 研究方向: 植物逆境生理学. E-mail: yuejing154@163.com

通信作者: 周竹青, 博士, 教授, 研究方向: 植物逆境细胞生物学、植物细胞编程性死亡、生物电子显微镜技术及应用. E-mail: zhouzhuqing@mail.hzau.edu.cn

观察小麦淀粉胚乳细胞发育过程时,发现随着胚乳细胞的发育,胚乳细胞核出现变形、核膜破裂、染色质凝聚、核质外泄等衰退特征。

笔者所在实验室前期研究结果证明,小麦的正常发育是特殊的胚乳 PCD 过程,淹水能导致其进程提前^[15],并认为 ROS 参与了小麦胚乳 PCD 过程^[16]。然而小麦胚乳在 PCD 过程中信号通路下游相关功能蛋白的研究尚未见报道。本研究探讨 Caspase 3-like 蛋白酶以及 *TaeMCA II* 基因在正常生长的小麦胚乳 PCD 过程中所发挥的作用,进一步研究在淹水胁迫下 Caspase 3-like 蛋白酶活性以及 *TaeMCA II* 基因表达量的变化,旨在揭示淹水胁迫下小麦胚乳 PCD 提前的原因。

1 材料与方法

1.1 材料

试验以冬小麦(*Triticum aestivum* L.) 华麦 8 号(Hua 8)为材料,于 2011 年 10 月在华中农业大学小麦试验田进行盆栽试验,2012 年 4 月中旬从开花当天(0 days after flowing, 0 DAF)挂牌标记开花麦穗,用剪芒的方法标记开花小花(仅标记中部开花小穗)。在 0 DAF 开始进行淹水处理,淹水时间分为 2 个处理:淹水 7 d(7 days waterlogging treatment, 7 DWT)和淹水 12 d(12 DWT)。淹水处理完成后,将陶盆搬出水池,放入盆栽场所,让淹水小麦继续生长,直至取样,生长条件同未淹水(0 DWT)处理。

1.2 Evans Blue 染色

取正常生长条件下 8、12、15、18 DAF 材料进行试验。采用 Young 等^[17]方法,用锋利刀片将新鲜籽粒沿横向切成数段,再浸入 0.1% Evans Blue 染液中染色 2 min,水洗 60 min,取出后在体视显微镜(NIKON, SM2800, Japan)下观察拍照。

1.3 胚乳细胞 Caspase 3-like 蛋白酶活性测定

按 Caspase 3 蛋白酶活性检测试剂盒(Beyotime)流程操作。取正常生长条件下 8、12、15、18 DAF 材料进行试验。首先,按每 15 mg 胚乳组织加入 200 μ L 裂解液的比例加入裂解液,液氮研磨,匀浆液转移至 1.5 mL 离心管,冰浴 0.5 h。4 $^{\circ}$ C 条件下 5 200 r/min,离心 30 min。取上清,转移至预冷的离心管中。提取的蛋白液于 -70 $^{\circ}$ C 保存。

按 100 μ L 体系中 80 μ L 检测缓冲液、10 μ L 待测样品、10 μ L Ac-DEVD-pNA (2 mmol/L)的比例

配置反应体系,对照为 90 μ L 检测缓冲液、0 μ L 待测样品、10 μ L Ac-DEVD-pNA (2 mmol/L)。37 $^{\circ}$ C 孵育过夜,于 BIO-TECH 公司 ELX800 酶标仪 A405 测定分光光度值。

1.4 Caspase 3-like 蛋白酶免疫电镜观察

小心剥取正常生长条件下 10、12 DAF 小麦颖果背部胚乳,样品置于 4% 多聚甲醛和 0.5% 戊二醛的混合固定液中固定, PBS 洗 30 min $\times$ 3 次。乙醇梯度脱水(30 min/次), LR-White (LR White TM Resin, London Resin Company) 树脂包埋, -20 $^{\circ}$ C 紫外光聚合,超薄切片捞于带碳膜的镍网(孔径 149 μ m)上。0.01 mol/L TBS 漂洗, BSA 封闭 15 min, 兔抗 WAP1 工作液, 室温孵育 3 h; 0.01 mol/L TBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 用胶体金标记的羊抗兔 IgG (GA1014, BOSTER) 工作液, 室温下孵育 2 h。0.01 mol/L TBS 漂洗 5 min $\times$ 2 次, 双蒸水清洗 2 次, 每次 5 min (以上步骤都在免疫染色板上进行)。醋酸双氧铀染色 30 min, 温热双蒸水冲洗; 柠檬酸铅复染 5 min, 温热双蒸水洗; 干燥后透射电镜 (Hitachi H-7650, Japan) 下观察与拍照。

1.5 Caspase 3-like 蛋白酶荧光活性检测

Caspase 3-like 蛋白酶活性原位荧光染色是利用 Caspase 3-like 蛋白酶抑制剂 DEVD-FMK 与荧光染料 FITC 偶联作为探针, 探针自由进入细胞后能不可逆地结合活化的 Caspase 3-like 蛋白酶, 其荧光的强弱能反映酶活性变化。本研究采用 Caspase 3-like 蛋白酶冰冻切片活性原位荧光染色的方法对 Hua 8 胚乳细胞进行染色。按 Caspase 3 蛋白酶荧光活性检测试剂盒操作。剥取 0、7 和 12 DWT 处理下 8、12、15、18 DAF 的小麦颖果背部胚乳, 用 Tissue-Tek OCT 4583 compound (Sakura Finetek, USA) 进行包埋, 在冰冻切片机 (Leica CM 1850, Germany) 上切片(横切), 切片厚度为 20 μ m。荧光显微镜 (Nikon Eclipse 80i, Japan) 观察, 激发光波长为 450~490 nm。

1.6 *TaeMCA II* 基因表达量检测

利用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒 (Toyobo), 以 β -actin 为内参基因, 在 170-8792iCycler iQ Calibration Kit (Bio-rad, USA) 荧光 PCR 仪上检测 *TaeMCA II* 基因相对表达情况。20 μ L 反应体系为: 1 μ L cDNA 模板, 内参与目标基因引物(表 1)各 0.5 μ L, 8 μ L 双蒸水, 10 μ L SYBER Green I。

表 1 用于分析目标基因表达的引物序列			
Table 1 Sequences of primers used to analyze the target gene expression			
基因 Gene	引物 Acc.No	引物序列 Primer sequence	产物/bp Product
<i>TaeMCA II</i>	GU130248	[F] 5'-ATGAAGGTGCAT-CAGGTGAG-3'	130
		[R] 5'-CCCATATCTTGT-TCTATCGCCG-3'	
β -actin	AB181991	[F] 5'- CAGCAATGTAT-GTCGCAATC-3'	135
		[R]5'- TAGCATGAGGAA-GCGTGAT-3	

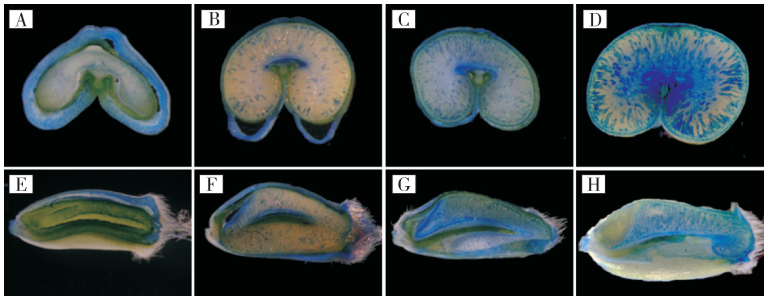
2 结果与分析

2.1 小麦胚乳发育过程中 PCD 和 Caspase 3-like 蛋白酶活性

1)Evans Blue 染色。Evans Blue 只对死细胞着色,细胞着色后显示蓝色反应,可用来检测植物细

胞 PCD 进程。如图 1,花后 8 d(8 DAF),小麦果皮染上明显的蓝色,胚乳中只有微弱的蓝色反应(图 1 A、E);12 DAF,小麦胚乳中呈现出明显的蓝色反应,但着色部位随机分布在胚乳细胞中(图 1B、F)。15 DAF,胚乳细胞中蓝色较 12 DAF 有所加深(图 1C、G);18 DAF,胚乳细胞蓝色较 15 DAF 蓝色反应更为明显(图 1D、H)。结果显示,小麦胚乳经 Evans Blue 染色后在 12 DAF 开始出现明显的蓝色反应,说明此时胚乳细胞开始发生 PCD。之后随着小麦胚乳细胞发育的进行,胚乳着色逐渐加深,胚乳细胞中死亡的细胞逐渐增多,PCD 随之逐渐增强。

2)胚乳细胞 Caspase 3-like 蛋白酶活性。由图 2可知,华麦 8 号胚乳细胞从 10~20 DAF ,均能检测到 Caspase 3-like 蛋白酶活性。10~12 DAF 胚乳细胞 Caspase 3-like 蛋白酶活性逐渐增强,并在 12DAF(胚乳细胞刚开始进行PCD时)达到最高峰。



A-D 为胚乳横切结果。A:8 DAF,未观察到蓝色反应; B:12 DAF,在胚乳组织中观察到明显的蓝色反应; C:15 DAF,胚乳组织中蓝色反应增强; D:18 DAF,蓝色反应更加强烈。E-H 为 A-D 胚乳纵切结果。A-D:Crosscutting of wheat endosperm. A:8 DAF,no blue staining was observed; B:12 DAF,weakly blue staining was observed; C:15 DAF,strongly blue staining was observed; D:18 DAF,more strongly blue staining was observed. E-H:Longitudinal cutting of wheat endosperm corresponding to A-D.

图 1 小麦胚乳 Evans Blue 染色

Fig.1 Evans Blue staining of endosperm cells

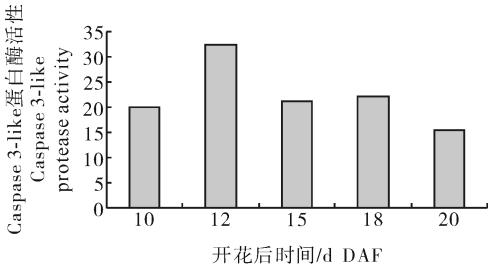


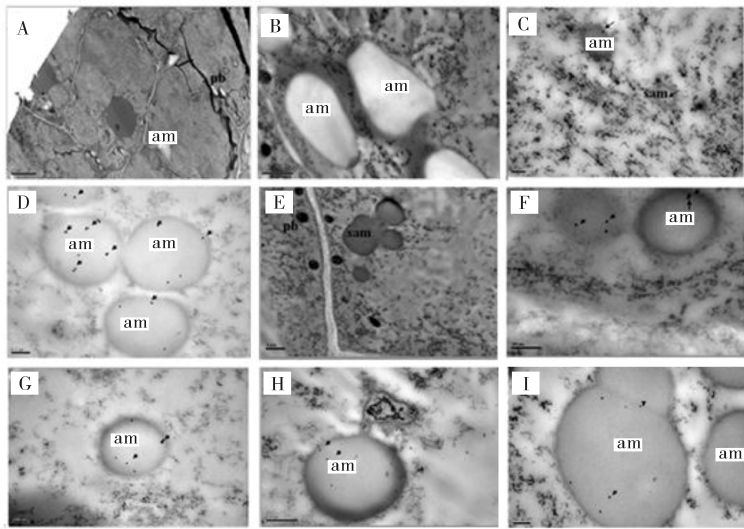
图 2 小麦胚乳细胞 Caspase 3-like 蛋白酶活性检测

Fig.2 Caspase 3-like protease activity detection in wheat endosperm cells

12~18 DAF 胚乳细胞 Caspase 3-like 蛋白酶活性逐渐降低,但 15~18 DAF 依然保持较高的 Caspase 3-like 蛋白酶活性。由此可知,当小麦胚乳刚开始

进行细胞程序性死亡时,Caspase 3-like 蛋白酶活性最强。

3)小麦胚乳细胞 Caspase 3-like 蛋白酶免疫电镜观察。小麦胚乳细胞有大、中、小 3 种类型淀粉质体^[18]。采用免疫胶体金技术对 10 DAF 和 12 DAF 胚乳细胞中 Caspase 3-like 蛋白酶进行超微定位,同时对淀粉质体形态进行观察。结果显示,在 10 DAF 胚乳细胞中能够观察到少量的胶体金颗粒,定位于小淀粉质体中(图 3C),而在胚乳细胞的细胞壁、线粒体以及细胞核附近没有观察到胶体金颗粒的存在。12 DAF,胚乳细胞中出现少量且体积较小的蛋白体,淀粉质体数量增多、体积变大;在淀粉质体中观察到少量胶体金颗粒出现(图3D-I),在胚乳



A: 胚乳细胞整体示意图($\text{bar}=10\ \mu\text{m}$); B: 对照组, 未加一抗($\text{bar}=1\ \mu\text{m}$); C: 10 DAF, 胚乳细胞小淀粉质体中, 胶体金颗粒较少($\text{bar}=0.2\ \mu\text{m}$); D: 12 DAF, 胚乳细胞中淀粉质体有所增大, 且胶体金颗粒明显增多($\text{bar}=0.4\ \mu\text{m}$); E: 12 DAF, 胚乳细胞中出现蛋白体($\text{bar}=1\ \mu\text{m}$); F: 12 DAF, 淀粉质体上出现胶体金颗粒($\text{bar}=0.2\ \mu\text{m}$); G: 12 DAF, 单个的淀粉质体形态($\text{bar}=0.2\ \mu\text{m}$); H: 12 DAF, 正在进行出芽增殖的淀粉质体($\text{bar}=0.2\ \mu\text{m}$); I: 12 DAF, 正在进行缢缩增殖的淀粉质体($\text{bar}=0.2\ \mu\text{m}$)。am: 淀粉质体; pb: 蛋白体; sam: 小淀粉质体。箭头所指为胶体金颗粒。A: Overall observation of endosperm cells ($\text{bar}=10\ \mu\text{m}$); B: Control, without primary antibody ($\text{bar}=1\ \mu\text{m}$); C: 10 DAF, few gold particles existed in the small amyloplast was observed ($\text{bar}=0.2\ \mu\text{m}$); D: 12 DAF, the amyloplast became bigger and the gold particles increased obviously ($\text{bar}=0.4\ \mu\text{m}$); E: 12 DAF, many protein bodies were observed in the endosperm cells ($\text{bar}=1\ \mu\text{m}$); F: 12 DAF, gold particles existed in the amyloplast were observed ($\text{bar}=0.2\ \mu\text{m}$); G: 12 DAF, single amyloplast ($\text{bar}=0.2\ \mu\text{m}$); H: 12 DAF, the proliferation of amyloplast by budding was observed ($\text{bar}=0.2\ \mu\text{m}$); I: 12 DAF, the proliferation of amyloplast by constriction was observed ($\text{bar}=0.2\ \mu\text{m}$). am: Amyloplast; pb: Protein body; sam: Small amyloplast.

图3 胚乳细胞 Caspase 3-like 蛋白酶免疫电镜观察

Fig.3 Immune electron microscopy observation of Caspase 3-like protease in endosperm cells

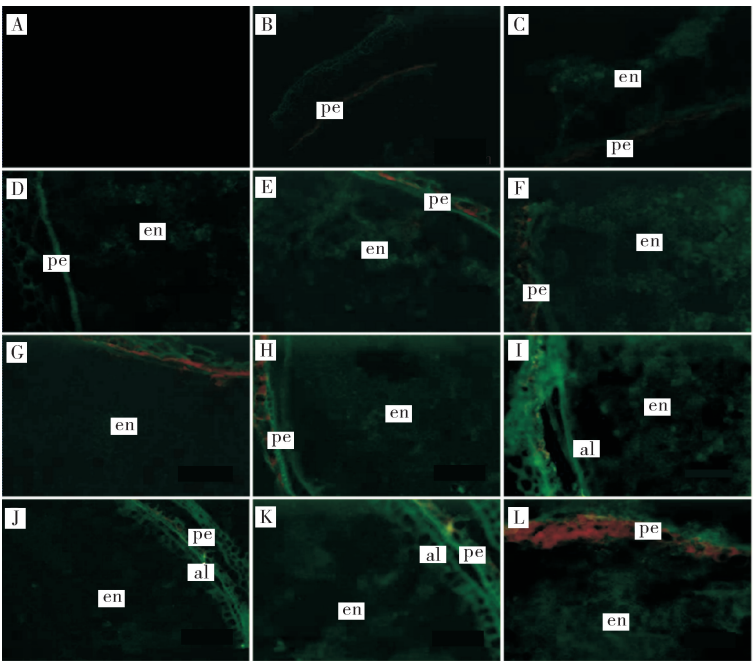
细胞其他位置没有观察到明显的胶体金颗粒。还可以观察到淀粉质体可以通过出芽以及缢缩2种方式进行增殖(图3H、I)。由此可见,小麦胚乳细胞中存在Caspase 3-like蛋白酶,且该蛋白酶主要定位在胚乳淀粉质体内,并具有高度特异性。

2.2 淹水胁迫下小麦胚乳中Caspase 3-like蛋白酶活性及其基因表达量检测

1) 胚乳细胞Caspase 3-like蛋白酶活性荧光测定。由图4可知,在8 DAF,正常处理下在小麦籽粒外果皮能够观察到明显的绿色荧光,而胚乳组织中只能观察到极其微弱的绿色荧光(图4B);7 DWT处理下,胚乳组织中的绿色荧光有所增强(图4C)。正常生长条件下,在12 DAF,胚乳组织中能够观察到明显的、均匀分布的绿色荧光,细胞结构较为清晰(图4D),说明胚乳中有明显的Caspase 3-like蛋白酶活性;7和12 DWT处理下,小麦胚乳组织中绿色荧光加强(图4E、F),说明Caspase 3-like蛋白酶活性在淹水胁迫下增强,并且随着淹水时间的延长,效果更为明显。在15 DAF,正常生长条件下胚乳组

织中能够观察到绿色荧光,绿色荧光几乎覆盖了整个胚乳,细胞结构较为模糊(图4G);7和12 DWT处理下,绿色荧光加强,胚乳糊粉层细胞周围出现绿色荧光(图4H、I)。在18 DAF,正常条件下生长的胚乳细胞中还能够观察到绿色荧光,已经观察不到完整的细胞结构,糊粉层周围细胞出现较亮的绿色荧光(图4J);7和12 DWT处理下,绿色荧光信号加强,胚乳糊粉层细胞周围出现明亮的绿色荧光(图4K、L)。对照组看不到荧光信号(图4A)。

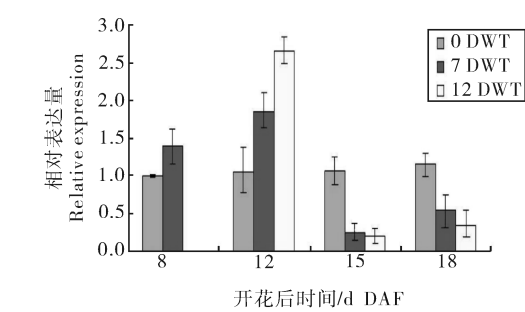
2) 小麦胚乳细胞*TaeMCA II*基因相对表达量。正常生长条件下,小麦胚乳细胞*TaeMCA II*基因相对表达量基本保持不变。7 DWT处理下,8~12 DAF该基因表达量要高于正常处理的表达量;15~18 DAF,该基因表达量要低于正常处理。12 DWT处理下,胚乳细胞在12 DAF时,表达量最高,且高于同时期0和7 DWT处理,随后*TaeMCA II*基因表达量呈逐渐降低的趋势。结果显示,淹水胁迫下该基因在8~12 DAF得到超表达;胚乳发育的中后期的15和18 DAF,淹水处理下,该基因表达量不



A:对照组,8 DAF、0 DWT,胚乳细胞内无绿色荧光出现; B:8 DAF、0 DWT,胚乳细胞内显示微弱绿色荧光; C:8 DAF、7 DWT,胚乳细胞内显示略强绿色荧光; D:12 DAF、0 DWT,胚乳细胞内显示较强绿色荧光; E:12 DAF、7 DWT,胚乳细胞内显示很强绿色荧光; F:12 DAF、12 DWT,胚乳细胞内显示更强绿色荧光; G:15 DAF、0 DWT,胚乳细胞内显示较强绿色荧光; H:15 DAF、7 DWT,胚乳细胞内显示很强绿色荧光; I:15 DAF、12 DWT,胚乳细胞内显示非常强绿色荧光; J:18 DAF、0 DWT,胚乳细胞内显示较强绿色荧光; K:18 DAF、7 DWT,胚乳细胞内显示很强绿色荧光; L:18 DAF、12 DWT,胚乳细胞内显示非常强绿色荧光。en:胚乳; al:糊粉层; pe:果皮; 所有标尺=100 μm 。A:Control,8 DAF,0 DWT,no fluorescence; B:8 DAF,0 DWT,green fluorescence was very weak in wheat endosperm; C:8 DAF,7 DWT,green fluorescence was stronger in wheat endosperm; D:12 DAF,0 DWT,green fluorescence was stronger in wheat endosperm; E:12 DAF,7 DWT,green fluorescence was stronger in wheat endosperm; F:12 DAF,12 DWT,green fluorescence was stronger in wheat endosperm; G:15 DAF,0 DWT,green fluorescence was stronger in wheat endosperm; H:15 DAF,7 DWT,green fluorescence was very strong in wheat endosperm; I:15 DAF,12 DWT,green fluorescence was stronger in wheat endosperm; J:18 DAF,0 DWT,green fluorescence was strong in wheat endosperm; K:18 DAF,7 DWT,green fluorescence was stronger in wheat endosperm; L:18 DAF,12 DWT,green fluorescence was very strong in wheat endosperm.en:Endosperm; al:Aleurone; pe:Pericarp; bars=100 μm .

图 4 小麦胚乳细胞 Caspase 3-like 蛋白酶荧光活性检测

Fig.4 Fluorescence detection of Caspase 3-like protease in wheat endosperm



采用实时定量 PCR 分析,以 β -actin 为内参基因, Error bars 显示的是标准偏差。DAF:开花后天数。DWT:淹水处理的天数。Assayed by real-time PCR. Error bars represent standard deviation. The β -actin gene was chosen as the reference gene.

图 5 淹水条件下小麦胚乳细胞 *TaeMCA II* 基因相对表达量变化

Fig.5 Relative expression of *TaeMCA II* in endosperm cells under different period of waterlogging treatments

仅没有提高,反而有所下降。

3 讨论

Caspase 3-like 蛋白酶是动物细胞凋亡过程中的主要效应因子。在细胞凋亡因子诱导下,线粒体释放细胞色素 c,然后在 Caspase 9 蛋白酶、凋亡激活因子 1 (Apaf-1) 以及 ATP 共同作用下导致 Caspase 3-like 蛋白酶的激活^[19-21]。该蛋白酶的活化成为细胞凋亡进入不可逆阶段的标志。近年来,大量研究证明在植物中存在 Caspase 3-like 蛋白酶,并且参与植物 PCD 和植物发育相关过程。

本研究结果显示,正常生长条件下,从 12 DAF 开始,胚乳细胞 Evans Blue 染色着色明显,说明胚乳 PCD 在此时开始进行;同时 Caspase 3-like 蛋白酶生理活性检测结果显示,胚乳细胞中 Caspase 3-

like 蛋白酶活性也很强,说明在胚乳 PCD 刚发生时 Caspase 3-like 蛋白酶活性最强,此后 Caspase 3-like 蛋白酶活性有所下降,但依然较高。淹水胁迫下,在小麦胚乳发育的早期,Caspase 3-like 蛋白酶活性也很强。说明 Caspase 3-like 蛋白酶不仅参与了正常生长条件下的胚乳细胞 PCD 进程,而且淹水胁迫下该蛋白酶表达提前,可能诱导了胚乳 PCD 的整体性提前。

禾谷类植物种子中糊粉层在 PCD 过程中不发生细胞死亡,仍具有较强生命力。在种子萌发过程中,糊粉层细胞发挥着重要作用,合成各种水解酶以降解胚乳中的营养物质,为胚的生长提供营养。但是在本研究中发现,在胚乳细胞发育的中后期,淹水处理下 15~18 DAF 小麦胚乳糊粉层细胞中存在较强的 Caspase 3-like 蛋白酶活性,而在胚乳正常发育的前期以及淹水处理强度较小的情况下,糊粉层细胞中几乎观察不到 Caspase 3-like 蛋白酶活性,这一现象仍需进一步研究。

近期研究发现,metaCaspase 蛋白在由 H_2O_2 诱导的 PCD 的信号途径中起到关键作用,例如 H_2O_2 能够诱导啤酒酵母发生 PCD,但酵母 metaCaspase 蛋白(YCA1)的敲除使这一过程无法完成^[22];在灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)侵染番茄叶片导致番茄叶片发生 PCD 的过程中,metaCaspase II mRNA 转录水平上调^[23]。在 UV-C 和 H_2O_2 等作用下,拟南芥 metaCaspase-8(AtMC 8)基因超表达,导致原生质体 PCD 进程加快,且敲除该基因之后细胞死亡程度降低^[24]。本研究结果也验证了这一点,正常生长条件下,小麦胚乳 *TaeMCA II* 基因表达量基本保持不变;与未淹水处理相比,淹水胁迫下,胚乳 PCD 开始之前(8 DAF)以及开始(12 DAF)时,*TaeMCA II* 基因表达量显著升高;胚乳发育的中后期,该基因表达量比未淹水处理显著下降。笔者所在实验室前期研究结果已证明小麦 PCD 过程中淹水处理导致小麦胚乳细胞壁、细胞膜、线粒体处 H_2O_2 、 O_2^- 含量升高^[15-16],淹水胁迫下小麦胚乳细胞中 ROS 的大量积累与 *TaeMCA II* 基因超表达的上下调控网络有待进一步研究。

本研究中,在正常发育的小麦胚乳细胞发生 PCD 的初期,Caspase-3 like 蛋白酶活性明显增强。淹水胁迫使得 *TaeMCA II* 基因得到超表达,且 Caspase-3 like 蛋白酶活性与同时期正常处理均上升。推测 Caspase-3 like 蛋白酶参与正常胚乳细胞 PCD 进程;淹水胁迫下,Caspase 3-like 蛋白酶活性

升高及 *TaeMCA II* 基因的超表达与胚乳细胞 PCD 进程提前密切相关,但具体调控机制有待进一步研究。

Caspase 属于半胱氨酸蛋白酶,是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶。非活性状态的 pro-Caspase-3 和活性状态的 cleaved-Caspase-3 存在于细胞质中,当 pro-Caspase-3 被剪切后剩下 p17 和 p12 2 个亚基,而产生活性。然而,本研究显示,小麦胚乳细胞中的 Caspase 3-like 蛋白酶主要定位于细胞中的淀粉质体表面,细胞质基质中胶体金颗粒出现不明显,其中原因有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] STEPIEN A, IZDEBSKA M, GRZANKAA. The type of cell death[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2007, 61: 420-428.
- [2] CRYNS V, YUAN J, ZAKERI Z, et al. The cutting edge: Caspases in apoptosis and disease[M]// LOCKSHIN R A, ZAKERI Z, TILLY J L. When cells die. New York: Wiley-Liss, 1998: 177-210.
- [3] WALTERS J, POP C, SCOTT F L, et al. A constitutively active and uninhabitable Caspase 3 zymogen efficiently induces apoptosis[J]. Biochem J, 2009, 424(3): 335-345.
- [4] BELENGHI B, SALOMON, LEVINE A. Caspase-like activity in the seedlings of *Pisum sativum* eliminates weaker shoots during early vegetative development by induction of cell death[J]. J Exp Biol, 2003, 44: 889-897.
- [5] DANON A, ROTARI V I, GORDON A, et al. Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by Caspase-like activities and which can be suppressed by Caspase inhibitors, p34 and defender against apoptotic death[J]. J Biol Chem, 2004, 279: 779-787.
- [6] BOSCH M, FRANKLIN-TONG V E. Temporal and spatial activation of Caspase-like enzymes induced by self-incompatibility[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 103(36): 18327-18332.
- [7] HAN J J, LIN W, ODA Y, et al. The proteasome is responsible for Caspase 3-like activity during xylem development[J]. Plant J, 2012, 72(1): 129-131.
- [8] FERNÁNDEZ M B, DALEO G R, GUEVARA M G. DEVDase activity is induced in potato leaves during phytophthora infestans infection[J]. Plant Physiol Biochem, 2012, 61: 197-203.
- [9] SETHY N K, PANDEY D, SINGH U S, et al. Caspase-3 like protein in wheat- *Tilletia indica* dual culture system as potential biomarker for host resistance to karnal bunt[J]. Indian J Biotechnol, 2003, 2: 596-602.
- [10] UREN A G, O'ROURKE K, ARAVIND L A, et al. Identification of paraCaspases and metaCaspases: two ancient families of Caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma[J]. Mol Cell, 2000, 6(4): 961-967.
- [11] PISZCZEK E, DUDKIEWICZ M, SOBCZAK M. Molecular cloning and phylogenetic analysis of cereal type II metaCaspase

- cDNA from wheat[J].Biol Plant,2011,55 (4):614-624.
- [12] YOUNG T E,GALLIE D R.Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals differences in endosperm development between cereals[J].Plant Mol Biol, 1999,39:915-926.
- [13] 韦存虚.水稻胚乳发育中细胞核与细胞器的结构消长与功能研究[D].武汉:华中农业大学图书馆,2002.
- [14] 李睿,蓝盛银,徐珍秀.水稻胚乳发育中线粒体向淀粉质体转变及琥珀酸脱氢酶的定位[J].电子显微学报,2002,21(2):118-121.
- [15] 樊海燕.小麦胚乳细胞程序性死亡机理初探以及淹水胁迫对其进程的影响[D].武汉:华中农业大学图书馆,2010.
- [16] 成祥旭.淹水胁迫下活性氧及抗氧化酶活性变化对小麦胚乳细胞编程性死亡的影响[D].武汉:华中农业大学图书馆,2011.
- [17] YOUNG T E,GALIE D R,DEMASON D A.Ethylene-mediated programmed cell death during maize endosperm development of wild-type and shrunken 2 genotypes[J].Plant Physiol, 1997,115:737-747.
- [18] 周竹青,朱旭彤,王维金,等.不同粒型小麦品种胚乳淀粉体的扫描电镜观察[J].电子显微学报,2001(3),178-184.
- [19] PORTER A G,JÄNICKE R U.Emerging roles of Caspase 3 in apoptosis[J].Cell Death Differ,1999,6(2):99-104.
- [20] KATUNUMA N,MATSUI A,LE Q T.Novel procaspase 3 activating cascade mediated by lysoapoptases and its biological significances in apoptosis[J].Adv Enzyme Regul,2001,31(1): 237-240.
- [21] LI P,NIJHAWAN LI P,NIJHAWAN D, et al.Mitochondrial activation of apoptosis[J].Cell,2003,116(2):47-49.
- [22] MADEO F,HERKER E,MALDENR C.A Caspase-related protease regulates apoptosis in yeast[J].Mol Cell, 2002,9: 911-917.
- [23] HOEBERICHTS A,TEN HAVE A,WOLTERING E.A tomatometacaspases gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea* infected leaves[J].Planta,2003,217: 417-422.
- [24] RUI H,GEOEGIVA E D,VITALIEI R.Metacaspases-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H₂O₂ *Arabidopsis*[J].J Biol Chem,2008,283(2):1773-1783.

Effects of Caspase 3-like proteases and *TaeMCA II* on the programmed cell death of wheat endosperm under waterlogging

GUO Yue-jing¹ YANG Wen-li¹ ZHOU Zhu-qing¹
YU Min¹ MEI Fang-zhu² ZHOU Guang-sheng³

1. College of Life Sciences and Technology, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China;

2. The Development Research Institute of Science and Technology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

3. College of Plant Sciences and Technology, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China

Abstract The Caspase 3-like protease activity and *TaeMCA II* gene expression during the process of programmed cell death (PCD) in wheat (Hua 8) endosperm under normal and waterlogging treatments were studied in this paper. The results indicated that, under normal treatments, the activity of Caspase 3-like protease was higher in the previous phase of endosperm PCD (12 DAF), and the protease was mainly located in amyloplasts of wheat endosperm cells, while the expression of *TaeMCA II* gene was similar during endosperm PCD. The Caspase 3-like protease activity and the expression of *TaeMCA II* gene were higher in wheat endosperm after waterlogging than control groups in same days after flowering. Above all, the Caspase 3-like protease participates in the PCD progression of control wheat endosperm. The rise of the overexpression of *TaeMCA II* gene and Caspase 3-like activity may cause the endosperm PCD happened earlier under waterlogging.

Key words wheat; waterlogging; endosperm PCD; Caspase 3-like protease; *TaeMCA II* gene