



李晓易,张积贵,刘一,等.丁酸钠对玉米种子萌发和 $\alpha$ -淀粉酶活性及其基因表达的影响[J].黑龙江农业科学,2020(6):22-25.

# 丁酸钠对玉米种子萌发和 $\alpha$ -淀粉酶活性及其基因表达的影响

李晓易,张积贵,刘一,刘秀,汉丽萍

(长春师范大学 生命科学学院,吉林 长春 130032)

**摘要:**为深入研究玉米种子萌发的表观调控机制,用梯度浓度(0,0.5,1.0,5.0和10.0 mmol·L<sup>-1</sup>)丁酸钠(NaB)溶液处理玉米种子(24,48,72和96 h),比较种子萌发率、根长、根干重、根鲜重,探讨丁酸钠对玉米种子萌发的影响。结果表明:低浓度丁酸钠(0.5 mmol·L<sup>-1</sup>)处理玉米种子,上述测定的指标均上升;而较高浓度(5和10 mmol·L<sup>-1</sup>)处理,各指标均有明显的下降。说明不同浓度的丁酸钠对玉米种子萌发具有不同的影响,低浓度促进玉米种子萌发,较高浓度则抑制玉米种子的萌发,且抑制作用具有剂量依赖性。进一步选择0.5和10 mmol·L<sup>-1</sup>两个浓度的丁酸钠处理玉米种子,测定 $\alpha$ -淀粉酶活性和基因转录水平。0.5 mmol·L<sup>-1</sup>丁酸钠增强 $\alpha$ -淀粉酶活性、上调 $\alpha$ -淀粉酶基因转录;10 mmol·L<sup>-1</sup>丁酸钠降低 $\alpha$ -淀粉酶活性并下调 $\alpha$ -淀粉酶基因转录,推测低浓度丁酸钠上调 $\alpha$ -淀粉酶基因的表达可能是其促进玉米种子萌发的机制或部分机制。

**关键词:**丁酸钠;玉米;种子萌发; $\alpha$ -淀粉酶

丁酸钠(Sodium butyrate, NaB)具有组蛋白去乙酰化酶抑制剂(Histone deacetylase inhibitor, HDACI)活性,能够提高动植物细胞内组蛋白乙酰化水平,调控基因表达<sup>[1]</sup>,因此常被用来研究组蛋白乙酰化和去乙酰化对细胞生命活动的调控作用。同时丁酸钠作为饲料添加剂能改善畜禽肠道健康,提高畜禽的免疫功能<sup>[2]</sup>。丁酸钠在动物生理及肿瘤细胞的表观遗传学研究中较为常用,但在植物方面的研究和应用较少。有研究证明了丁酸钠对大麦、玉米、水稻和小麦种子萌发及生长发育的影响<sup>[3]</sup>,较高浓度丁酸钠(>10 mmol·L<sup>-1</sup>)对4种作物的发芽率、株高、根系数目及根长均有抑制作用。但是,关于低浓度丁酸钠对植物的影响鲜有研究报道。本研究以玉米种子为试验材料,研究不同浓度丁酸钠对玉米种子萌发、淀粉酶活性及淀粉酶基因表达的影响,旨在为丁酸钠在植物种植上的应用和深入研究玉米种子萌发的表观调控机制提供试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验材料 供试玉米种子为吉农大568,

由吉林农业大学提供。丁酸钠为阿拉丁(上海)产品(S102954)。

1.1.2 试验仪器 酶标仪(Synergy HTX 多功能微孔板检测仪,美国)、冷冻离心机(Centrifuge 5424 R,德国)、实时荧光定量PCR仪(Applied Biosystems 7500,美国)和光照培养箱(上海博讯 BIC-250,中国)。

### 1.2 方法

1.2.1 种子萌发试验 挑选饱满整齐的玉米种子,用10%次氯酸钠溶液表面消毒10 min,蒸馏水冲洗5次;蒸馏水浸泡24 h,再将种子置于底部铺有两层滤纸的发芽盒中,每个发芽盒加入不同浓度的丁酸钠溶液20 mL,放入恒温光照培养箱(光照周期12 h,温度25℃,光照强度3 500 lx;黑暗周期12 h,温度22℃,光照强度0 lx),每天更换滤纸和处理液。

丁酸钠浓度为0,0.5,1.0,5.0和10.0 mmol·L<sup>-1</sup>,每个处理平行3组,每组20粒玉米种子。以根长为0.2 cm作为萌发标准,分别测定0,24,48,72和96 h的发芽情况。萌发率(%)=(萌发种子数/种子总数)×100。

1.2.2  $\alpha$ -淀粉酶活性测定 取0.1 g玉米种子,加入0.8 mL蒸馏水匀浆,室温放置15 min,6 000 g离心10 min,取上清定容至10 mL即为酶原液,使用索莱宝公司的 $\alpha$ -淀粉酶活性检测试剂盒(BC0610)测定 $\alpha$ -淀粉酶活性。

1.2.3  $\alpha$ -淀粉酶基因表达水平检测 使用天根

收稿日期:2020-03-08

基金项目:国家自然科学基金(31371313)。

第一作者:李晓易(1996-),女,在读硕士,从事基因表达与调控研究。E-mail:799713660@qq.com。

通信作者:汉丽萍(1966-),女,博士,副教授,从事基因表达与调控研究。E-mail:hanliping@ccsfu.edu.cn。

公司植物总 RNA 提取试剂盒(DP432)提取玉米种子总 RNA,利用天根公司逆转录试剂盒 (FastKing KR118)合成 cDNA,利用 ABI 7500 qPCR 仪检测  $\alpha$ -淀粉酶基因表达情况。引物序列 Forward: GCTCTGTTTCCTCGTCCTTCTC;Reverse:CCA TCAGGAAGTTGTACCATC<sup>[4]</sup>,内参基因序列引物 Forward: GGTTCCTACCGACTTCCTTG GT; Reverse: TAGCCCCACTCGTTGTCGTA。通过计算  $2^{-\Delta\Delta ct}$  分析  $\alpha$ -淀粉酶基因的相对转录水平。

1.2.4 数据分析 采用 Excel 2013 和 Graph-Pad Prism 8 进行数据分析及作图。

2 结果与分析

2.1 丁酸钠对玉米种子萌发的影响

2.1.1 丁酸钠对玉米种子萌发率的影响 种子萌发是作物种植最关键的阶段。本试验用 0,

0.5,1.0,5.0 和 10.0 mmol·L<sup>-1</sup> 丁酸钠处理玉米种子,连续观察和统计发现:较低浓度(0.5 mmol·L<sup>-1</sup>) 丁酸钠处理能促进玉米种子的萌发;随着浓度的升高,玉米种子的萌发逐渐受到抑制,表现出剂量依赖的效应(图 1 左)。丁酸钠浓度为 10 mmol·L<sup>-1</sup> 时,抑制作用非常明显。0.5 和 10.0 mmol·L<sup>-1</sup> 丁酸钠处理玉米种子,96 h 萌发率分别为 71%和 24%(图 1 右)。试验结果表明不同浓度的丁酸钠对玉米种子萌发的影响具有很大的差别,较低浓度处理有利于种子萌发,而较高浓度则表现出明显的抑制作用。因为丁酸钠是公认的组蛋白去乙酰化酶抑制剂,推测低浓度的丁酸钠通过提高玉米种子组蛋白乙酰化水平,调控与萌发相关的基因表达,促进种子的萌发;而高浓度丁酸钠处理对种子产生了盐胁迫作用,抑制种子萌发。

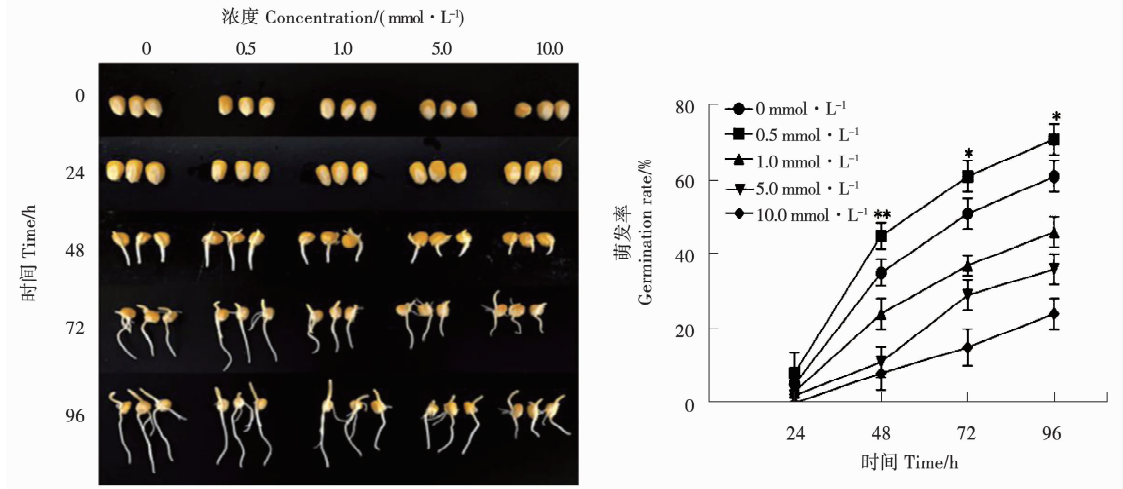


图 1 不同浓度丁酸钠对玉米种子萌发的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of NaB on germination of maize seeds

2.1.2 丁酸钠对玉米初生根生长和根鲜重、干重的影响 胚根鞘突破种皮随后胚根伸长是种子萌发的标志,初生根生长发育状态直接影响幼苗生长和作物的产量与品质<sup>[5]</sup>。测量不同浓度丁酸钠处理玉米种子萌发后初生根的长度,结果如表 1 所示,0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 丁酸钠处理组的幼根平均长度在处理 48,72 和 96 h 时均高于对照组;处理 48 h 时,0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 丁酸钠处理组幼根平均长度比对照组增加了 42.9%,但随着处理时间增加,根长的差别变小,提示低浓度丁酸钠处理玉米种子在初期有较强的促进幼根生长的作用。较高浓度丁酸钠对胚根的生长均表现出抑制作用,浓度越高,抑制作用越强。

处理 96 h 时,测定各组玉米幼根鲜重和干重,结果如图 2 所示,0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 丁酸钠处理组幼根的平均鲜重(1.84 g)大于 0 mmol·L<sup>-1</sup> 组(1.52 g)。当丁酸钠浓度高于 1 mmol·L<sup>-1</sup> 时,随着浓度的增加,幼根平均鲜重逐渐降低,10 mmol·L<sup>-1</sup> 处理组为 0.73 g。在不同浓度丁酸钠处理下幼根的平均干重呈现与鲜重相似的变化趋势(图 2)。

2.2 丁酸钠对玉米种子  $\alpha$ -淀粉酶活性和基因表达的影响

2.2.1 丁酸钠对玉米种子  $\alpha$ -淀粉酶活性的影响 种子萌发过程中,淀粉酶可水解种子里贮存的淀粉,供给种子萌发时细胞分裂及细胞生长所需

表 1 不同浓度丁酸钠对初生根生长的影响  
Table 1 Effects of different concentrations NaB on root length

丁酸钠浓度 NaB concentration/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	根长 Root length/cm( $\bar{x}\pm s$ )		
	48 h	72 h	96 h
0(CK)	1.33±0.23 bc	3.85±0.31 b	7.63±0.64 b
0.5	1.90±0.50 a	4.23±0.24 ab	8.37±0.34 a
1.0	1.63±0.21 b	3.45±0.60 abc	6.48±0.56 c
5.0	1.06±0.60 bcd	2.19±0.30 d	3.89±0.66 d
10.0	0.57±0.16 d	1.49±0.54 e	2.48±0.49 e

注:同一列不同字母代表各处理差异显著( $P\leq 0.05$ )。  
Note: Different letters in the same column indicate significant difference in different treatments ( $P\leq 0.05$ ).

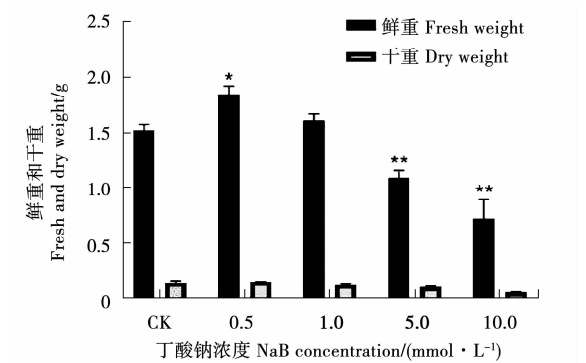


图 2 丁酸钠处理玉米种子 96 h 幼根鲜重和干重  
Fig. 2 Fresh weight and dry weight of young roots treated with NaB for 96 h

的碳素和能量<sup>[6]</sup>。淀粉酶活性的增强是种子萌发和幼苗生长所必需的。分别用 0(对照), 0.5 和 10 mmol·L<sup>-1</sup> 丁酸钠溶液处理玉米种子, 在处理 24, 48 和 72 h 时测定种子  $\alpha$ -淀粉酶的活性。由图 3 可知, 在种子萌发过程中, 对照组和 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 组  $\alpha$ -淀粉酶活性迅速升高, 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 处理组  $\alpha$ -淀粉酶活性在几个时间点均高于对照组, 而 10 mmol·L<sup>-1</sup> 组  $\alpha$ -淀粉酶活性虽然也有升高, 但活性相对较弱, 且显著低于同一时间点的对照组。

2.2.2 丁酸钠对玉米种子  $\alpha$ -淀粉酶基因表达的影响 因为不同浓度丁酸钠对玉米种子萌发过程中  $\alpha$ -淀粉酶活性有不同的影响, 推测丁酸钠对淀粉酶基因的表达可能有调控作用。用 0(对照), 0.5 和 10.0 mmol·L<sup>-1</sup> 丁酸钠处理玉米种子, 处理 24 h 时提取种子的总 RNA、通过 RT-qPCR 检测

$\alpha$ -淀粉酶的相对 mRNA 水平, 结果如图 4 所示, 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 处理 24 h,  $\alpha$ -淀粉酶 mRNA 水平是对照组的 2.1 倍, 而 10 mmol·L<sup>-1</sup> 组的  $\alpha$ -淀粉酶 mRNA 表达量是对照的 0.48 倍。丁酸钠对玉米种子  $\alpha$ -淀粉酶基因表达的影响与酶活性相吻合。

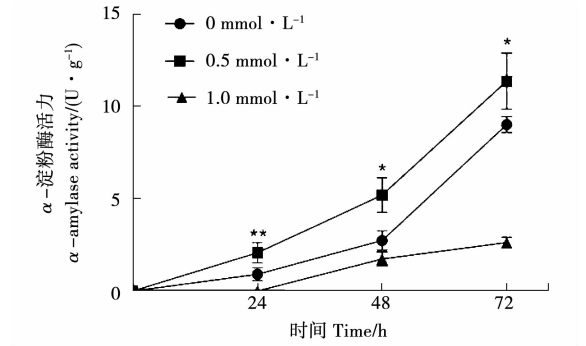


图 3 不同浓度丁酸钠对  $\alpha$ -淀粉酶活性影响  
Fig. 3 Effects of different concentrations of NaB on the activity of  $\alpha$ -amylase

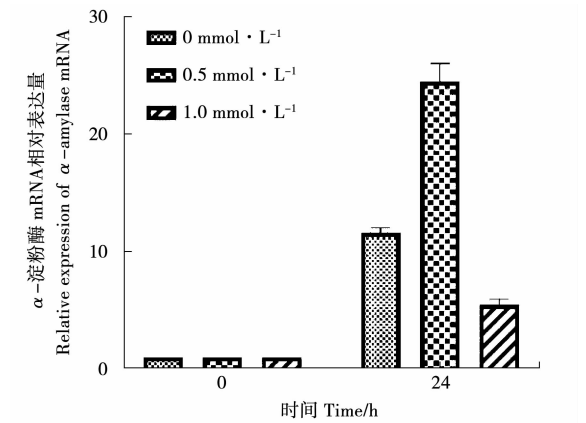


图 4 不同浓度丁酸钠对  $\alpha$ -淀粉酶基因表达的影响  
Fig. 4 Effects of different concentrations of NAB on  $\alpha$ -amylase gene expression

3 结论与讨论

不同浓度丁酸钠处理玉米种子具有截然不同的影响。较低浓度(0.5 mmol·L<sup>-1</sup>)丁酸钠对玉米种子萌发和  $\alpha$ -淀粉酶基因表达具有促进作用; 较高浓度(>1.0 mmol·L<sup>-1</sup>)则抑制玉米种子萌发和  $\alpha$ -淀粉酶基因的表达。

因为容易受环境胁迫的影响, 种子萌发被认为是植物生活周期中最重要和最脆弱阶段<sup>[7]</sup>。种子的成功萌发意味着植物度过了生命周期中最关键的阶段, 对于自然生态系统中的作物产量和植物存活都至关重要<sup>[8]</sup>。组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDACIs)正逐渐被用于植物研究中, 主要用来研究植物种子萌发和生长发育的表观遗传学机

制,研究同时发现某些 HDACIs 可以缓解环境胁迫对植物的影响<sup>[9-10]</sup>。因此,关于 HDACIs 在植物生长发育中的作用引起很多研究者的关注。丁酸是膳食纤维在动物肠道内经过微生物分解产生的短链脂肪酸。丁酸钠是常用的组蛋白去乙酰化酶抑制剂,已有研究多用较高浓度处理植物材料<sup>[3,11]</sup>。本研究用不同浓度丁酸钠处理玉米种子,结果显示较高浓度(5 和 10 mmol·L<sup>-1</sup>)丁酸钠处理对种子萌发、 $\alpha$ -淀粉酶活性和 mRNA 转录均有显著的抑制作用,支持已有的相关研究报道。推测机制可能是较高浓度丁酸钠处理对种子造成了胁迫伤害,导致一系列生理生化过程的异常。而低浓度(0.5 mmol·L<sup>-1</sup>)丁酸钠处理,与对照(0 mmol·L<sup>-1</sup>)相比较,玉米种子的萌发率和幼根长度均有所增加, $\alpha$ -淀粉酶活性和 $\alpha$ -淀粉酶 mRNA 转录水平明显上调。种子萌发过程中淀粉酶活性升高具有重要意义。淀粉酶活性增强可加速胚乳中淀粉的分解,进而促进萌发和幼苗生长<sup>[4]</sup>。本研究中低浓度(0.5 mmol·L<sup>-1</sup>)丁酸钠上调 $\alpha$ -淀粉酶基因转录可能是其促进玉米种子萌发的机制或部分机制。关于丁酸钠对玉米种子萌发过程中抗逆性的影响有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 徐延浩,侯泽豪,张文英,等. 5-氮杂胞苷和丁酸钠对大麦苗期耐湿性的影响[J]. 广东农业科学,2015,42(24):26-30.
- [2] Fang C L, Sun H, Wu J, et al. Effects of sodium butyrate on growth performance, haematological and immunological

- characteristics of weanling piglets[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2014, 98(4): 680-685.
- [3] 侯泽豪,杨飞,商水根,等. 丁酸钠和 5-氮杂胞苷对大麦、水稻、玉米、小麦种子萌发及芽苗期生长的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(22):73-77.
- [4] 文迪. 玉米淀粉分解酶活性动态以及其相关基因时空表达分析[D]. 雅安:四川农业大学,2010.
- [5] 刘丹,谭雪梅. 不同苗床对玉米种子萌发的影响[J]. 农业与技术,2017,37(10):36-37.
- [6] 丁燕,呼凤兰,畅博奇. NaCl 胁迫对玉米种子萌发特性及 $\alpha$ -淀粉酶活性的影响[J]. 黑龙江农业科学,2019(4):11-14.
- [7] Loic R, Manuel D, Karine G, et al. Seed germination and vigor [J]. Annual Review of Plant Biology, 2012, 63: 507-33.
- [8] Waterworth W M, Bray C M, West C E. Seeds and the art of genome maintenance[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10:706.
- [9] Hu Y, Zhang L, Zhao L, et al. Trichostatin a selectively suppresses the cold-induced transcription of the *ZmDREB1* gene in maize[J]. PLoS ONE, 2011, 6(7):e22132.
- [10] Onsaya P, Minoru U, Misao I, et al. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid alleviates salinity stress in *Cassava* [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7:2039.
- [11] Andrea P, Susana de S A, Anca M, et al. Metabolic and gene expression hallmarks of seed germination uncovered by sodium butyrate in *Medicago truncatula* [J]. Plant Cell Environment, 2019, 42:259-269.

## Effects of Sodium Butyrate on Seed Germination, $\alpha$ -amylase Activity and Gene Expression of Maize Seed

LI Xiao-yi, ZHANG Ji-gui, LIU Yi, LIU Xiu, HAN Li-ping

(School of Life Sciences, Changchun Normal University, Changchun 130032, China)

**Abstract:** In order to further study the apparent regulation mechanism of maize seed germination, the maize seeds were treated with gradient concentration (0, 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 mmol·L<sup>-1</sup>) NaB solution, the germination rate, the root length, dry weight and fresh weight were compared at different treatment time (24, 48, 72 and 96 h). The results showed that the above-mentioned indexes increased when maize seeds were treated with low concentration of NaB solution (0.5 mmol·L<sup>-1</sup>). But the indexes decreased significantly when treated with higher concentration (5 and 10 mmol·L<sup>-1</sup>). It was suggested that lower concentration of NaB promoted maize seed germination, but higher concentration inhibited maize seed germination, and the inhibitory effect was dose-dependent. Furthermore, maize seeds were treated with 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> and 10 mmol·L<sup>-1</sup> of sodium butyrate, respectively, and the  $\alpha$ -amylase activity and gene transcription level were measured. 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> sodium butyrate promoted  $\alpha$ -amylase activity and up-regulated its gene transcription and 10 mmol·L<sup>-1</sup> sodium butyrate reduced  $\alpha$ -amylase activity and down-regulated its gene transcription. It was speculated that low concentration of sodium butyrate might promote maize seed germination by up-regulating the expression of  $\alpha$ -amylase gene.

**Keywords:** NaB; maize; seed germination;  $\alpha$ -amylase