

种子萌发过程中胚乳的突破性研究

徐振江, 陈兵先, 赵晟楠, 袁红霞, 郇珊珊, 张瑜, 陈靖, 王晓峰*

华南农业大学生命科学学院种子科学与技术研究室, 广州510642

摘要: 胚乳将许多种子的胚完全包裹, 是这些种子萌发的物理屏障, 其破裂与否是决定种子萌发与否的最后开关。胚乳破裂是胚生长产生由内向外“顶”的机械力量以及胚乳组织本身机械强度下降(胚乳弱化)的共同结果, 而胚乳弱化则包括细胞壁的酶促和非酶促松弛机制。本文综述胚生长产生的机械力量、胚乳破裂的部位和方式、胚乳的组织结构及其细胞壁的化学组成、各种细胞壁降解酶及非酶的扩展蛋白(expansin)和活性氧在胚乳弱化中的作用等方面的研究进展。

关键词: 种子萌发; 胚乳弱化; 细胞壁降解酶; 扩展蛋白; 活性氧

Breaking through the Endosperm during Seed Germination

XU Zhen-Jiang, CHEN Bing-Xian, ZHAO Sheng-Nan, YUAN Hong-Xia, GAO Shan-Shan, ZHANG Yu, CHEN Jing, WANG Xiao-Feng*

Laboratory of Seed Science and Technology, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: Endosperm completely encloses the embryo of many seeds and is a mechanical restraint for the completion of germination. Thus, rupture of the endosperm is the last key step controlling the process of germination. Rupture of the endosperm requires the growth potential of embryo and weakening of the endosperm after imbibition. Weakening of the endosperm involves enzymatic and non-enzymatic mechanisms. This review summarizes research progress in growth potential of embryo, location and ways of endosperm rupture, structure of the endosperm and chemical composition of endosperm cell walls, roles of cell-wall-degrading enzymes, expansin and reactive oxygen species.

Key words: seed germination; endosperm weakening; cell-wall-degrading enzymes; expansin; reactive oxygen species

种子是重要的农业生产资料, 其萌发质量的好坏将直接关系到农业生产的成败。种子萌发(seed germination)是指具有生活力的干种子从吸水开始至胚根露出种子被覆物(seed coverings)的过程, 期间包含了一系列肉眼不可见的生理、生化和分子生物学变化以及唯一可见的胚根露出种子被覆物的形态特征(Bewley和Black 1994; Bewley 1997a; Finch-Savage和Leubner-Metzger 2006; Nonogaki等2010)。根据定义, 胚根露出种子被覆物之后的过程则属于后萌发(post-germination)和幼苗生长阶段。

对一些植物如豌豆(*Pisum sativum*)而言, 种子被覆物只有种皮(testa或seed coat); 但对另一些植物如十字花科的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、独苣菜(*Lepidium sativum*)、钻果大蒜芥(*Sisymbrium officinale*)等, 菊科的莴苣(*Lactuca sativa*)等, 茄科的番茄(*Solanum lycopersicum*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、辣椒(*Capsicum annuum*)、茄子(*Solanum*

melongena)、曼陀罗(*Datura ferox*)、洋茄(*Solanum lycocarpum*)等, 豆科的葫芦巴(*Trigonella foenum-graecum*)、长角豆(*Ceratonia siliqua*)、瓜尔豆(*Cyamopsis tetragonoloba*)等, 茜草科的咖啡(*Coffea arabica*)等, 伞形科的旱芹(*Apium graveolens*)等, 葫芦科的甜瓜(*Cucumis melo*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)等, 柏科的黄柏(*Chamaecyparis nootkatensis*)等而言, 种子被覆物除种皮外还包括一至几层生活细胞所组成的胚乳(endosperm)组织, 而且胚乳像套子一样完全将胚包围在其中。胚根所正对的那部分胚乳被称为珠孔端胚乳(micropylar endosperm)或胚乳帽(endosperm cap), 而珠孔端胚乳以外的部分胚乳则被称为非珠孔端胚乳(non-micropylar en-

收稿 2012-06-04 修定 2012-07-19
资助 国家自然科学基金(30870224)和广东省自然科学基金(07006658)。

* 通讯作者(E-mail: xfwang@scau.edu.cn; Tel: 020-38632105)。

dosperm)。

被覆物包括种皮和胚乳的种子, 萌发过程分为两个阶段: 第一阶段从吸水开始至种皮破裂(*testa rupture*), 生活和死亡种子皆可发生(因为成熟种皮是死亡组织, 其破裂是一个物理过程); 第二阶段从种皮破裂至胚乳破裂(*endosperm rupture*), 只在可萌发的种子中发生(因为死亡和休眠种子胚乳不破裂)。因此, 胚乳成为这类种子萌发的限制因子, 其能否被突破(胚乳的突破性)是种子感受外界环境条件决定自身萌发与否的最后开关。本文综述种子萌发过程中有关胚乳破裂研究的相关问题及进展。

1 胚乳破裂的部位和方式

种子萌发时, 胚乳破裂一般发生在珠孔端胚乳处。但钻果大蒜芥胚乳破裂的位置不是正好在珠孔端胚乳, 而是在珠孔端胚乳的附近(Iglesias-Fernández和Matilla 2010)。

珠孔端胚乳的破裂可能存在两种方式: 一是裂口处胚乳细胞的胞间层降解后, 细胞彼此分离产生裂缝, 但细胞还保持完整性, 比如旱芹种子(Jacobsen等1976); 二是裂口处胚乳细胞的整个细胞壁(包括胞间层、初生壁甚至次生壁)都降解, 细胞被撕裂, 细胞完整性丧失, 如da Silva等(2004)发现咖啡种子的珠孔端胚乳在破裂前, 细胞被挤压变形且丧失完整性。我们对莴苣珠孔端胚乳破裂后的断面进行扫描电镜观察, 也发现破裂处的细胞不完整, 细胞壁被明显撕裂(未发表资料)。

2 胚生长产生的机械力量是胚根突破胚乳的前提条件但不是唯一条件

胚根能否突破胚乳从而完成萌发过程, 首先取决于种子吸水后胚生长产生由内向外“顶”的力量(*growth potential*)大小。若胚的生长被抑制, “顶”的力量缺失, 种子就无法完成萌发过程。例如, ABA抑制番茄种子萌发就是因为ABA抑制了胚的生长(Wu等2001)。

2.1 胚轴细胞伸长是种子萌发完成前胚生长的主要方式

组织或器官的生长是通过细胞分裂(增加细胞总数)和细胞伸长(增加细胞体积)实现的。但是, 研究发现莴苣、拟南芥等种子的被覆物被突破前, 胚细胞并未发生细胞分裂(Haber和Luippold 1960;

Sliwinska等2009)。因此, 种子萌发完成前, 胚生长主要是通过细胞伸长完成的。定位细胞伸长发生具体部位的实验结果表明, 番茄、拟南芥等种子萌发时, 发生细胞伸长的部位不在胚根区域, 而在下胚轴及下胚轴与胚根之间的过渡区域(Chen等2001; Sliwinska等2009; Gimeno-Gilles等2009)。

2.2 单靠胚轴伸长产生的力量不足以将珠孔端胚乳顶破

有学者认为, 种子吸水后, 下胚轴及下胚轴与胚根之间过渡区域细胞伸长产生的由内向外“顶”的机械力量就足以使胚根穿透珠孔端胚乳(Nabors和Lang 1971)。但Pavlišta和Haber (1970)却发现, 当利用含氯化物处理莴苣种子时, 一些种子出现胚轴能正常伸长但珠孔端胚乳不破裂的情况, 结果生长的胚由于受到胚乳的限制而在里面成卷曲状, 有些种子的胚乳甚至在子叶端破裂, 但珠孔端胚乳始终不破裂。Arcila和Mohapatra (1983)研究烟草种子萌发时也发现, 珠孔端胚乳破裂可能不是由于胚根“顶”的结果, 而是由于胚乳本身“溶解”造成。因此, 单靠“顶”的力量还不足以将珠孔端胚乳顶破, 可能还需要珠孔端胚乳本身的机械强度在吸水后下降相配合。胚乳的机械强度与其组织结构和细胞壁特性相关, 因此, 很有必要对胚乳(特别是珠孔端胚乳)的组织结构及细胞壁化学组成做一番了解。

3 胚乳组织的结构及胚乳细胞壁的化学组成

3.1 胚乳组织的结构特点

成熟种子中胚乳组织的厚度因植物种类不同而异, 如拟南芥、钻果大蒜芥的胚乳只有一层细胞(Müller等2006; Iglesias-Fernández和Matilla 2010), 独行菜的只有1~2层细胞(Müller等2006), 莴苣只有2~3层细胞(Jones 1974), 番茄、烟草、咖啡等则有多层细胞(Bewley 1979a)。一般珠孔端胚乳的细胞层数比非珠孔端胚乳的要少, 但独行菜珠孔端胚乳细胞层数(2层)比非珠孔端胚乳(1层)要多(Müller等2006)。这类种子胚乳细胞的一个显著特征是细胞壁明显加厚, 因而使胚乳组织具有很高的机械强度(Jones 1974; Gong等2005)。此外, 莴苣胚乳细胞壁还从四周向内形成一些凸起伸入到细胞质中, 凸起常常相连成桥穿透细胞质(就像一些建筑物的大厅里的柱子将天花板和地板连在一起

一样), 使细胞壁更加坚固(Jones 1974)。一般珠孔端胚乳的细胞壁比非珠孔端胚乳的要薄(Nijse等1998; Toorop等2000; Williams等2001; da Silva等2004; Gong等2005), 而曼陀罗种子珠孔端胚乳与非珠孔端胚乳细胞壁在加厚程度上则没有明显差别, 但珠孔端胚乳细胞比非珠孔端细胞要小(Sánchez等1990)。珠孔端胚乳与非珠孔端胚乳在细胞层数及细胞壁结构上的差异, 可能决定了种子萌发时胚根突破胚乳的具体位置。

3.2 胚乳细胞壁的化学组成

与其他组织相比, 这类种子的胚乳在细胞壁的化学组成上也有自己的特点, 一般纤维素含量较低, 而半纤维素含量较高(Otegui 2007)。Halmer等(1975)认为, 莴苣种子萌发时, 胚根细胞壁不会被胚乳产生的细胞壁降解酶破坏的原因, 可能正是胚乳与胚根在细胞壁化学组成上的差别造成的。组成胚乳细胞壁的单糖包括葡萄糖、鼠李糖、岩藻糖、核糖、阿拉伯糖、木糖、半乳糖、甘露糖和糖醛酸等, 莴苣、番茄、海枣(*Phoenix dactylifera*)、咖啡、长角豆、葫芦巴等胚乳细胞壁化学组成的显著特点是甘露糖和半乳糖的含量非常高, 推测其可能以半乳甘露聚糖的形式存在(Halmer等1975; Reid和Bewley 1979)。前面提到的莴苣胚乳细胞壁形成一些向内的凸起, 可能就是半乳甘露聚糖形成的微纤丝(Halme等1975)。海枣和咖啡种子胚乳细胞壁中水不溶晶状体甘露聚糖的存在是种子异常坚硬的原因所在(Bewley和Reid 1985), 而长角豆(McCleary和Matheson 1975)和葫芦巴(Reid 1971)种子中因含有亲水性的半乳甘露聚糖, 吸水一段时间后通常会变得很黏稠。

胚乳细胞壁的化学组成除了与其他组织不同外, 就胚乳本身而言, 珠孔端胚乳与非珠孔端胚乳之间也有显著差别。Dutta等(1994)发现莴苣珠孔端胚乳细胞壁中甘露糖的含量仅为非珠孔端胚乳的52%, 而阿拉伯糖和半乳糖的含量则分别是非珠孔端的3.8倍和2倍。因此, 珠孔端胚乳之所以成为胚根突破的位置, 除了与前面提到的细胞层数和细胞壁加厚程度与非珠孔端胚乳不同外, 还可能与珠孔端胚乳细胞壁的化学成分不同有关。

4 胚乳弱化

前已述, 胚乳组织由于细胞壁加厚具有较高

的机械强度, 单靠胚轴伸长产生的机械力量还不足以被顶破。因此, 种子吸涨后胚乳本身的机械强度可能还有一个逐渐下降的过程, 这一过程被称为胚乳弱化(endosperm weakening)。

4.1 珠孔端胚乳机械强度的测定

分离种子的珠孔端胚乳, 利用与胚根差不多大小的玻璃或金属棒穿透珠孔端胚乳, 棒的另一端连接传感器, 就可测定穿透珠孔端胚乳所需机械力量(puncture force)的大小。Nabors和Lang (1971)首先采用该方法测定了莴苣胚乳的穿透力, 此后该方法被用于辣椒(Watkins和Cantliffe 1983)、番茄(Groot和Karssen 1987; Toorop等1998; Wu等2001; Chen和Bradford 2000)、甜瓜(Welbaum等1995)、咖啡(da Silva等2004, 2005)、独苣菜(Müller等2006, 2007; Graeber等2010)和洋茄(Pinto等2007; Anese等2011)等种子珠孔端胚乳穿透力的测定。结果表明, 这些种子吸涨后, 珠孔端胚乳破裂之前穿透力逐渐下降。因此, 研究者普遍认为胚根突破珠孔端胚乳之前, 珠孔端胚乳已经弱化, 说明珠孔端胚乳的弱化是种子萌发时胚根突破胚乳的另一前提条件。目前认为, 胚乳弱化存在细胞壁酶促和非酶促松弛两种机制。

4.2 胚乳弱化的细胞壁酶促松弛机制

有关种子萌发过程中胚乳弱化的机制, 早在1963年Ikuma和Thimann就提出了孵化酶假说(hatching-enzyme hypothesis), 认为控制莴苣种子萌发过程的最后步骤是产生一种酶, 能够使胚根穿过种皮(胚乳), 但作者并未明确是胚还是胚乳本身产生了这种酶。现在研究者普遍认为, 是胚乳本身产生了细胞壁降解酶导致了自身的降解(一种程序化死亡事件), 而且胚乳弱化不可能由一种细胞壁降解酶来完成, 而是多种细胞壁降解酶协同作用的结果(Bewley 1997a, b; Finch-Savage和Leubner-Metzger 2006)。细胞壁由纤维素、果胶和半纤维素等组成, 降解这些细胞壁多糖的酶可能都在胚乳弱化中发挥作用。下面分别叙述各种细胞壁降解酶与胚乳弱化的关系。

4.2.1 纤维素酶与胚乳弱化的关系 纤维素是葡萄糖以 β -1,4-糖苷键相连形成的多糖, 纤维素酶(EC 3.2.1.4)可打断 β -1,4-葡萄糖苷键从而可使纤维素发生降解。

纤维素酶可能在曼陀罗和咖啡种子的胚乳弱化过程中发挥作用。曼陀罗种子萌发时, 胚乳中纤维素酶活性的增加发生在胚乳破裂之前(Sánchez等1986)。在咖啡种子中, Takaki和Dietrich (1980)检测到纤维素酶活性, Giorgini (1992)从胚乳中提纯了两种纤维素酶的同工酶, da Silva等(2004)用组织印迹法(tissue-printing)发现纤维素酶活性存在于咖啡种子的各种组织中, 其活性的增加与珠孔端胚乳穿透力下降的第一阶段相对应。

纤维素酶与莴苣种子胚乳弱化的关系则还存在争论: Ikum和Thimann (1963)首次提出纤维素酶可能与胚乳弱化相关, Pavlišta和Valdovinos (1975)也发现从整粒种子中用低盐缓冲液提取的纤维素酶活性在胚乳破裂前有增加的趋势; 但Bewley等(1983)发现莴苣种子中纤维素酶的活性非常低, 且酶活性在胚乳破裂前没有增加, 胚乳破裂后也保持在非常低的水平, 因而认为纤维素酶与莴苣种子胚乳弱化的关系不大。

然而纤维素酶与番茄和辣椒种子胚乳弱化的关系可能不大。Leviatov等(1995)发现番茄种子萌发时, 纤维素酶活性的增加发生在胚乳破裂之后, 认为纤维素酶不是控制胚乳破裂的关键酶。赤霉素缺陷型突变体番茄种子只有在添加GA的萌发介质中才能萌发, 但Groot等(1988)发现添加GA后并没有在突变体种子中检测到纤维素酶的活性。Watkins等(1985)则未能在萌发辣椒种子的胚乳中检测到纤维素酶的活性。

4.2.2 降解果胶的酶与胚乳弱化的关系 果胶主要由两类多糖组成(Carpita和McCann 2000), 一类是同半乳糖醛酸聚糖(homogalacturonan), 另一类是鼠李半乳糖醛酸聚糖(rhamnogalacturonan)。同半乳糖醛酸聚糖主链是由单半乳糖醛酸以 α -1,4-糖苷键相连而成, 主链上一些半乳糖醛酸的羧基被甲基化。而鼠李半乳糖醛酸聚糖主链则是由鼠李糖和半乳糖醛酸交替地以 α -1,4-和 α -1,2-糖苷键连接而成, 主链上的鼠李糖上还常常连接有阿拉伯聚糖(阿拉伯糖以 α -1,5-糖苷键连接而成)和半乳糖聚糖(半乳糖以 β -1,4-糖苷键连接而成)侧链。因此, 果胶的降解需要多种酶的参与。

(1)果胶甲酯酶(EC 3.1.1.11)。果胶甲酯酶可将甲酯化的多聚半乳糖醛酸上的甲基脱去。有关

果胶甲酯酶与种子胚乳弱化的关系研究不多。Ren和Kermode (2000)发现黄柏种子的胚乳中存在果胶甲酯酶的活性, ABA抑制、GA促进种子萌发的同时, 也抑制、促进了果胶甲酯酶的活性, 推测果胶甲酯酶在黄柏种子胚乳弱化中起作用。Salanenka等(2009)发现果胶甲酯酶在酶活性水平上可能与黄瓜种子的胚乳弱化相关。

(2)多聚半乳糖醛酸酶(EC 3.2.1.15)。多聚半乳糖醛酸酶水解两个相邻的没有酯化的半乳糖醛酸间的 α -1,4-糖苷键。在酯化度很高的果胶中, 需要果胶甲酯酶先脱去主链上半乳糖醛酸的甲基后, 多聚半乳糖醛酸酶才能发挥作用。多聚半乳糖醛酸酶与胚乳弱化的关系也只有少量报道。Sitrit等(1999)在萌发番茄种子中检测到依赖钙离子的外(exo)-多聚半乳糖醛酸酶活性, 发现酶活性在萌发完成前升高, 并克隆了编码番茄多聚半乳糖醛酸酶的一个基因*LeXPG1*, 转录水平分析结果表明, *LeXPG1*主要在萌发种子的珠孔端胚乳与胚根尖中表达, 胚乳破裂前表达水平升高。因此, 多聚半乳糖醛酸酶在酶活性和mRNA水平上与番茄种子的胚乳弱化可能相关。

(3)其他果胶降解酶。果胶裂解酶(EC 4.2.2.2)催化两个相邻的、皆甲酯化的半乳糖醛酸间 α -1,4-糖苷键的断裂, 这种断裂不是通过水解, 而是通过将半乳糖醛酸第5位 β -碳原子上的氢转移到糖苷键的氧原子上、在半乳糖醛酸第4和第5位碳原子之间形成双键从而导致糖苷键断裂。但果胶裂解酶与种子胚乳弱化是否存在相关性还不清楚。而降解位于鼠李半乳糖醛酸聚糖侧链的阿拉伯聚糖和半乳糖聚糖的酶, 如 α -阿拉伯聚糖酶(EC 3.2.1.99)、 α -阿拉伯糖苷酶(EC 3.2.1.55)、 β -半乳糖聚糖酶(EC 3.2.1.89)和 β -半乳糖苷酶(EC 3.2.1.23)与种子胚乳弱化的关系也不清楚。

4.2.3 降解半纤维素的酶与胚乳弱化的关系 半纤维素由更复杂的细胞壁多糖组成, 主要包括木葡聚糖、木聚糖、甘露聚糖、 β -1,3-葡聚糖等。因此, 降解半纤维素的酶也多种多样。

(1)降解木葡聚糖的酶。木葡聚糖的主链与纤维素分子相似, 由单葡萄糖分子以 β -1,4-糖苷键连接而成, 但主链上一些葡萄糖分子以 α -1,6-糖苷键的形式与木糖相连, 且木糖还可能与阿拉伯

糖或半乳糖相连。降解木葡聚糖的酶主要是木葡聚糖内转糖基/水解酶(EC 2.4.1.207/3.2.1.151), 是一种具有双功能的酶。首先, 该酶发挥水解酶的功能, 将一条木葡聚糖分子内切, 切口的非还原端游离, 而还原端却与酶结合在一起; 然后, 该酶发挥转糖基酶的功能, 将与之结合的还原端产物与另一木葡聚糖分子的非还原端连接在一起(Rose等2002), 从而将一条木葡聚糖分子的一段“嫁接”到另一木葡聚糖分子上导致细胞壁松弛。关于木葡聚糖内转糖基/水解酶与种子胚乳弱化关系的研究较少。Chen等(2002)从番茄种子中克隆了一个木葡聚糖内转糖基/水解酶基因*LeXET4*, 发现该基因特异地在珠孔端胚乳中表达, 且表达水平在胚乳破裂前出现高峰, 因而认为*LeXET4*可能与番茄种子的胚乳弱化相关。

(2)降解木聚糖的酶。木聚糖是木糖分子通过 β -1,4-糖苷键连接而成的多糖, 主链上的一些木糖分子还可能通过 α -1,2或 α -1,3糖苷键与阿拉伯糖相连, 形成阿拉伯木聚糖。水解木聚糖和阿拉伯木聚糖的是 β -1,4-木聚糖酶(EC 3.2.1.8)和 α -阿拉伯糖苷酶。前已述, α -阿拉伯糖苷酶与种子胚乳弱化的关系还不清楚, 而 β -1,4-木聚糖酶与胚乳弱化的关系也仅有Bewley等(1983)在莢苣整粒种子中检测到该酶的活性, 但发现种子吸胀过程中酶活性没有变化, 因而认为该酶与莢苣种子胚乳弱化的关系可能不大。

(3)降解甘露聚糖的酶。甘露聚糖主链由甘露糖以 β -1,4-糖苷键连接而成, 主链上的一些甘露糖以 α -1,6-糖苷键与半乳糖残基相连, 则被称为半乳甘露聚糖(galactomannan), 有时主链上还会夹杂一段以 β -1,4-糖苷键连接的葡聚糖, 则被称为葡甘露聚糖(glucomannan)。种子中的甘露聚糖多为半乳甘露聚糖(Dea和Morrison 1975), 其彻底降解需要 β -甘露聚糖酶(EC 3.2.1.78)、 α -半乳糖苷酶(EC 3.2.1.22)和 β -甘露糖苷酶(EC 3.2.1.25)的协同作用: α -半乳糖苷酶负责切割位于侧链位置的半乳糖, β -甘露聚糖酶随机地打断主链上的 β -1,4糖苷键生成甘露二糖和三糖, 而 β -甘露糖苷酶则将甘露二糖和三糖彻底水解为甘露单糖。

β -甘露聚糖酶与胚乳弱化的关系是所有细胞壁降解酶中被研究得最多的(Bewley 1997b)。

Groot等(1988)发现在水中添加GA促进赤霉素缺陷型突变体番茄种子萌发的同时, 提高了胚乳中 β -甘露聚糖酶的活性。随后发现非突变体番茄种子萌发时, 珠孔端胚乳中 β -甘露聚糖酶活性的增加发生在胚乳破裂之前, 而非珠孔端胚乳中酶活性的增加则发生在胚乳破裂之后(Nonogaki等1992; Nomaguchi 等1995; Toorop等 1996; Nonogaki和Morohashi 1996)。Bewley等(1997)从番茄种子中克隆了植物的第一个 β -甘露聚糖酶基因*LeMan1*, 但发现其转录发生在胚乳破裂之后。Nonogaki等(2000)从番茄种子中克隆了第二个 β -甘露聚糖酶基因*LeMan2*, 发现*LeMan2*只在胚乳破裂之前的珠孔端胚乳中表达, 而*LeMan1*只在胚乳破裂之后的非珠孔端胚乳中表达, 表明*LeMan2*与珠孔端胚乳弱化相关。Belotserkovsky等(2007)将番茄的第三个 β -甘露聚糖酶基因*LeMan3*在番茄中过表达, 反而抑制了转基因种子的萌发, RT-PCR分析发现过表达*LeMan3*抑制了*LeMan2*的转录, 进一步证实了*LeMan2*在番茄胚乳弱化中的功能。曼陀罗种子萌发时, 珠孔端胚乳中 β -甘露聚糖酶活性在胚乳破裂之前已有显著增加, 红光促进、远红光抑制种子萌发的同时, 也促进、抑制了 β -甘露聚糖酶活性的增加(Sánchez等1990; Sánchez和de Miguel 1997; Arana等2006), 因此, β -甘露聚糖酶与曼陀罗种子的胚乳弱化可能存在关系。拟南芥整粒种子的 β -甘露聚糖酶活性在种子萌发完成前有两次升高过程, 编码拟南芥 β -甘露聚糖酶的8个基因中, 有4个(*AtMAN7*、*AtMAN6*、*AtMAN5*和*AtMAN2*)在萌发种子中表达, 原位杂交分析结果表明4个基因只在胚乳破裂前的珠孔端胚乳和胚根中表达, 基因敲除实验进一步表明*AtMAN7*、*AtMAN6*和*AtMAN5*与拟南芥的胚乳弱化相关(Iglesias-Fernández等2011a和b)。本文作者参与的关于独行菜种子萌发机理的研究发现, 独行菜种子萌发时, 珠孔端胚乳中 β -甘露聚糖酶的活性在胚乳破裂前增加, 克隆的 β -甘露聚糖酶基因*Lesaman7*的转录水平也在胚乳破裂前上升, 表明 β -甘露聚糖酶可能在独行菜种子的胚乳弱化中发挥作用(Morris等2011)。黄瓜和甜瓜种子珠孔端胚乳中存在 β -甘露聚糖酶活性, 而且在胚乳破裂前增加, 表明 β -甘露聚糖酶可能与黄瓜和甜瓜种子的胚乳弱化相关(Ramakrishna和Amrit-

phale 2005)。虽然莴苣种子是最早被用来研究 β -甘露聚糖酶与胚乳弱化关系的材料(Halmer等1975), 但关于该酶是否在莴苣胚乳弱化中发挥作用却还存在争论: 一些研究者发现 β -甘露聚糖酶活性的增加发生在胚乳破裂之后(Halmer等1975, 1976, 1978; Halmer和Bewley 1979; Bewley等1983; Powell等1984; Halmer 1989; Dulson和Bewley 1989; Bewley 1997b; Toorop等1999; Nonogaki和Morohashi 1999), 认为该酶的作用是降解和动员胚乳细胞壁中的多糖为幼苗生长提供养料。Wang等(2004)从莴苣种子中克隆了 β -甘露聚糖酶基因*Ls-Man1*, 也发现其转录发生在胚乳破裂之后, 因而他们认为 β -甘露聚糖酶与莴苣种子的胚乳弱化关系不大。而另一些研究者却发现 β -甘露聚糖酶活性的增加发生在胚乳破裂之前(Dutta等1997; Nascimento等2000, 2001, 2004, 2005), 因此认为 β -甘露聚糖酶与莴苣的胚乳弱化相关。而咖啡(Marraccini等2001)、辣椒(Watkins等1985)、芦笋(Williams等2001)和一些豆科(Bewley 1997b; Gong等2005)种子萌发时, β -甘露聚糖酶活性或基因转录水平的增加主要发生在胚乳破裂之后, 因此 β -甘露聚糖酶与这些种子胚乳弱化的关系可能不大。

Leung等(1979)在莴苣胚乳中检测到 α -半乳糖苷酶活性, 发现酶活性在萌发完成前逐渐增加。Leung和Bewley (1981a, b)发现红光和GA促进种子萌发的同时, 也促进了 α -半乳糖苷酶活性在萌发完成前增加, 但他们认为萌发与 α -半乳糖苷酶并不一定关联, 因为在萌发被抑制时, α -半乳糖苷酶活性也会增加(Leung和Bewley 1981b)。Bewley等(1983)不能断定胚乳中的 α -半乳糖苷酶是胚乳自己产生的, 还是从子叶中扩散过去的。Leung和Bewley (1983)证明 α -半乳糖苷酶需要 β -甘露聚糖酶先将半乳甘露聚糖降解成寡糖后才能发挥作用。因此, α -半乳糖苷酶与莴苣种子胚乳弱化的关系还不是很清楚。Groot等(1988)发现GA处理可恢复赤霉素缺陷型突变体番茄种子在水中的萌发, GA处理也增加了 α -半乳糖苷酶的活性。Reid和Meier (1973)在葫芦巴种子萌发早期的胚乳中未检测到 α -半乳糖苷酶活性, 酶活性在胚乳破裂之后才出现, 因此 α -半乳糖苷酶可能与葫芦巴种子的胚乳弱化关系不大。

β -甘露糖苷酶与番茄种子的胚乳弱化可能存在相关性。Groot等(1988)发现GA处理促进赤霉素缺陷型突变体番茄种子在水中萌发的同时, 也提高了 β -甘露糖苷酶活性。Mo和Bewley (2002)发现番茄种子珠孔端胚乳中 β -甘露糖苷酶的活性大于非珠孔端胚乳中的酶活性, 且活性在胚乳破裂前上升, 并从番茄种子中提纯了 β -甘露糖苷酶, 克隆了其基因*LeMside1*, 发现种子萌发过程中, 该基因首先在珠孔端胚乳中表达, 萌发完成后表达水平下降。曼陀罗种子萌发时, 珠孔端胚乳中 β -甘露糖苷酶活性的增加发生在胚乳破裂前, GA和红光促进种子萌发的同时促进了酶活性的增加, 因此 β -甘露糖苷酶可能与曼陀罗种子的胚乳弱化相关(Sánchez和de Miguel 1997)。关于 β -甘露糖苷酶与莴苣种子胚乳弱化的关系, 研究者虽然在种子中检测到酶活性, 但活性在种子萌发过程中没有变化, 因而认为该酶可能与莴苣种子的胚乳弱化关系不大(Leung等1979; Bewley等1983; Quellet和Bewley 1986)。而葫芦巴(Reid和Meier 1973)和芦笋(Williams等2001)种子萌发时, β -甘露糖苷酶活性的出现都是在胚乳破裂之后, 因此 β -甘露糖苷酶可能与这两种种子胚乳弱化的关系不大。

(4) β -1,3-葡聚糖酶(EC 3.2.1.39)。植物细胞壁中含有的少量 β -1,3-葡聚糖由葡萄糖以 β -1,3-糖苷键相连而成, β -1,3-葡聚糖酶可打断 β -1,3-葡萄糖苷键使其发生降解。 β -1,3-葡聚糖酶集中在烟草种子珠孔端胚乳中, 胚乳破裂前, 酶在活性、蛋白质和mRNA水平上增加, GA促进、ABA抑制胚乳破裂的同时, 也促进、抑制了 β -1,3-葡聚糖酶在珠孔端胚乳中的表达(Vögeli-Lange等1994; Leubner-Metzger等1995, 1996; Leubner-Metzger 2003)。Leubner-Metzger和Meins (2000)利用胚乳特异性启动子将 β -1,3-葡聚糖酶基因 β -GLUI在烟草中过表达, 促进了转基因烟草种子胚乳的破裂, 但转反义基因的烟草种子的胚乳破裂情况却没有变化(Leubner-Metzger和Meins 2001)。以上结果表明, β -1,3-葡聚糖酶可能与烟草种子的胚乳弱化相关。Morohashi和Matsushima (2000)发现 β -1,3-葡聚糖酶集中在萌发已完成的番茄种子的珠孔端胚乳中, 但原本不存在酶活性的非珠孔端胚乳被机械伤害(被切割或被穿破)后酶活性也增强, 因此认为珠孔端

胚乳中 β -1,3-葡聚糖酶活性可能是由胚根突破珠孔端胚乳时带来的伤害造成的。Wu等(2001)虽然发现 β -1,3-葡聚糖酶特异地存在于番茄种子珠孔端胚乳中,胚乳破裂前酶在活性、蛋白质和mRNA水平上增加,但却发现番茄胚乳细胞壁中不存在 β -1,3-葡聚糖酶的底物,而且ABA不抑制胚乳弱化但却降低了酶的表达水平。因此, β -1,3-葡聚糖酶与番茄种子的胚乳弱化可能无关。

4.3 胚乳弱化的细胞壁非酶促松弛机制

除了上述的细胞壁降解酶外,一些非酶因子也可能在胚乳弱化中发挥重要作用,主要包括扩展蛋白(expansin)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)。

4.3.1 扩展蛋白与胚乳弱化的关系 扩展蛋白是不具有水解等酶促活性,但可打断纤维素和半纤维素之间的非共价键(如氢键)从而使细胞壁松弛的一类细胞壁蛋白(Cosgrove 2000)。

关于扩展蛋白和胚乳弱化的关系有一些研究报道。Chen和Bradford (2000)从番茄种子中克隆了3个扩展蛋白基因*LeEXP4*、*LeEXP8*和*LeEXP10*,发现*LeEXP4*特异地在珠孔端胚乳中表达,且胚乳破裂前表达量达到最大值,破裂后表达量降低。GA处理恢复GA缺陷型番茄突变体种子在水中萌发的同时,促进了*LeEXP4*的表达。而*LeEXP8*和*LeEXP10*不在胚乳中表达,只在胚中表达(Chen等2001)。表明3个扩展蛋白基因中只有*LeEXP4*可能与番茄胚乳弱化相关,而*LeEXP8*和*LeEXP10*则可能与胚的生长相关。

Mella等(2004)从曼陀罗种子中克隆了2个扩展蛋白基因片段(AF442772和AF442773),发现AF442773在胚乳破裂前的珠孔端胚乳中表达,红光促进、远红光抑制种子萌发的同时,也促进、抑制了该基因在珠孔端胚乳中的表达。结果表明,扩展蛋白可能与曼陀罗种子的胚乳弱化相关。

Soós等(2009)发现烟水溶液可促进莴苣种子的萌发,他们克隆了两个莴苣扩展蛋白基因*EXP-LIKE*和*EXP5*,发现烟水溶液处理在种子吸胀的早期阶段提高了整粒种子中*EXP5*的转录水平,但降低了*EXP-LIKE*的转录水平。由于他们是从整粒种子中提取RNA用于RT-qPCR分析,没有单独分析珠孔端胚乳中的情况,因此其结果只能说明*EXP5*可

能与莴苣种子的萌发相关,但是否与胚乳弱化相关则还不清楚。

扩展蛋白可能在独行菜种子珠孔端胚乳弱化中发挥作用(Voegele等2011)。

4.3.2 活性氧与胚乳弱化的关系 活性氧是直接或间接由氧转变而来,但具有比氧更强氧化活性的含氧物质的统称,在植物体内主要包括超氧阴离子自由基(O_2^-)、羟自由基($\cdot OH$)、过氧化氢(H_2O_2)等(Apel和Hirt 2004)。活性氧可以攻击细胞中的生物大分子,包括细胞壁多糖,其中以 $\cdot OH$ 的攻击性最强(Fry 1998)。由于ROS可攻击细胞壁导致其松弛,因而可能与胚乳弱化也存在相关性。Morohashi (2002)发现番茄种子胚乳破裂前, H_2O_2 和过氧化物酶特异地在珠孔端胚乳中积累,但他们认为 H_2O_2 和过氧化物酶的功能可能是与抵御病原微生物的侵入有关,没有意识到与胚乳弱化的相关性。Müller等(2007)首次提出活性氧(特别是 $\cdot OH$)可能在胚乳弱化过程中发挥重要作用的假设,他们发现外源 H_2O_2 处理可以解除ABA对独行菜种子胚乳破裂的抑制作用,定量测定和组织化学染色进一步发现,胚乳破裂前 $\cdot OH$ 和 O_2^- 在珠孔端胚乳中积累,GA促进、ABA抑制胚乳破裂的同时,促进、抑制了 $\cdot OH$ 的积累(Müller等2009)。Linkies等(2010)发现过氧化物酶特异地在珠孔端胚乳和胚根尖表达。以上结果表明,活性氧可能在番茄和独行菜种子的胚乳弱化过程中发挥作用。

5 展望

生活的胚乳组织是许多种子完成萌发的物理障碍,其破裂与否是这些种子能否萌发的最后开关,而胚乳弱化是胚乳破裂的前提条件,许多细胞壁降解酶及非酶的扩展蛋白及ROS可能在其中发挥重要作用。一种种子的胚乳弱化可能有多种细胞壁降解酶的参与,但是否所有酶都是必需的或者说是否只有一两种酶起主要作用,是一个值得研究的问题。此外,一种细胞壁降解酶可能在某种种子的胚乳弱化中发挥作用,但可能与另一种种子的胚乳弱化并不相关,是否与酶的底物(细胞壁多糖)在不同种子胚乳中的存在与否以及含量不同相关?而扩展蛋白和ROS非酶,不存在底物特异性,是否在不同种子的胚乳弱化中发挥普遍作用也是一个非常有意义的问题。为了验证细胞壁降

解酶及扩展蛋白在胚乳弱化中的功能, 需要研究过表达和敲除这些酶或蛋白质对胚乳弱化的影响, 但目前仅有研究者在烟草中开展了转 β -1,3-葡聚糖酶基因、在番茄和拟南芥中转 β -甘露聚糖酶基因对胚乳弱化影响的研究。总之, 胚乳的突破性决定了种子萌发的速度及整齐度, 有关其机理的研究具有重要的理论和实践意义, 但还有许多未知的问题有待探索。

参考文献

- Anese S, da Silva EAA, Davide AC, Rocha Faria JM, Soares GCM, Matos ACB, Toorop PE (2011). Seed priming improves endosperm weakening, germination, and subsequent seedling development of *Solanum lycocarpum* St. Hil. *Seed Sci Technol*, 39: 125~139
- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 373~399
- Arana MV, de Miguel LC, Sánchez RA (2006). A phytochrome-dependent embryonic factor modulates gibberellin responses in the embryo and micropylar endosperm of *Datura ferox* seeds. *Planta*, 223: 847~857
- Arcila J, Mohapatra SC (1983). Development of tobacco seedling. 2. Morphogenesis during radicle protrusion. *Tobacco Sci*, 27: 35~40
- Belotserkovsky H, Berger Y, Shahar R, Wolf S (2007). Specific role of *LeMAN2* in the control of seed germination exposed by overexpression of the *LeMAN3* gene in tomato plants. *Planta*, 227: 199~209
- Bewley JD (1997a). Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9: 1055~1066
- Bewley JD (1997b). Breaking down the walls—a role for endo- β -mannanase in release from seed dormancy? *Trends Plant Sci*, 2: 464~469
- Bewley JD, Black M (1994). *Seeds: Physiology of Development and Germination*. New York: Plenum Press
- Bewley JD, Burton RA, Morohashi Y, Fincher GB (1997). Molecular cloning of a cDNA encoding a (1 $\rightarrow$ 4)- β -mannan endohydrolase from the seeds of germinated tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Planta*, 203: 454~459
- Bewley JD, Leung DWM, Ouellette FB (1983). The cooperative role of endo- β -mannanase, β -mannosidase and α -galactosidase in the mobilization of endosperm cell wall hemicelluloses of germinated lettuce seed. In: Nozzolillo C, Lea PJ, Loewus FA (eds). *Mobilization of Reserves in Germination*. New York: Plenum Press, 137~152
- Bewley JD, Reid JSG (1985). Mannans and glucomannans. In: Dey PM, Dixon RA (eds). *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*. London: Academic Press, 289~304
- Carpita N, McCann M (2000). Cell wall. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, MD: The American Society of Plant Physiologists, 52~108
- Chen F, Bradford KJ (2000). Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiol*, 124: 1265~1274
- Chen F, Dahal P, Bradford KJ (2001). Two tomato expansin genes show divergent expression and localization in embryos during seed development and germination. *Plant Physiol*, 127: 928~936
- Chen F, Nonogaki H, Bradford KJ (2002). A gibberellin-regulated xyloglucan endotransglycosylase gene is expressed in the endosperm cap during tomato seed germination. *J Exp Bot*, 53: 215~223
- Cosgrove DJ (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407: 321~326
- da Silva EAA, Toorop PE, Nijssse J, Bewley JD, Hilhorst HWM (2005). Exogenous gibberellins inhibit coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination and cause cell death in the embryo. *J Exp Bot*, 56: 1029~1038
- da Silva EAA, Toorop PE, van Aelst AC, Hilhorst HWM (2004). Abscissic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea Arabica* cv. Rubi) seed germination. *Planta*, 220: 251~261
- Dea ICM, Morrison A (1975). Chemistry and interactions of seed galactomannan. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 31: 241~312
- Dulson J, Bewley JD (1989). Mannanase from *Lactuca sativa*: metabolic requirements for production and partial purification. *Phytochemistry*, 28: 363~369
- Dutta S, Bradford KJ, Nevins DJ (1994). Cell-wall autohydrolysis in isolated endosperms of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Physiol*, 104: 623~628
- Dutta S, Bradford KJ, Nevins DJ (1997). Endo- β -mannanase activity present in cell wall extracts of lettuce endosperm prior to radicle emergence. *Plant Physiol*, 113: 155~161
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol*, 171: 501~523
- Fry SC (1998). Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochem J*, 332: 507~515
- Gimeno-Gilles C, Lelievre E, Viau L, Malik-Ghulam M, Ricoult C, Niebel A, Leduc N, Limami AM (2009). ABA-mediated inhibition of germination is related to the inhibition of genes encoding cell-wall biosynthetic and architecture: modifying enzymes and structural proteins in *Medicago truncatula* embryo axis. *Mol Plant*, 2: 108~119
- Giorgini JF (1992). Purification and partial characterization of two isozymes of cellulase from GA₃-treated coffee endosperm. *R Bras Fisiol Veg*, 4: 75~80
- Gong X, Bassel GW, Wang A, Greenwood JS, Bewley JD (2005). The emergence of embryos from hard seeds is related to the structure of the cell walls of the micropylar endosperm, and not to endo- β -mannanase activity. *Ann Bot*, 96: 1165~1173
- Graeber K, Linkies A, Müller K, Wunchova A, Rott A, Leubner-Metzger G (2010). Cross-species approaches to seed dormancy and germination: conservation and biodiversity of ABA-regulated mechanisms and the Brassicaceae *DOG1* genes. *Plant Mol*

- Biol, 73: 67~87
- Groot SPC, Karssen CM (1987). Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta*, 171: 525~531
- Groot SPC, Kieliszewska-Rokicka B, Vermeer E, Karssen CM (1988). Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. *Planta*, 174: 500~504
- Haber AH, Luippold HJ (1960). Separation of mechanisms initiating cell division and cell expansion in lettuce seed germination. *Plant Physiol*, 35: 168~173
- Halmer P (1989). *De novo* synthesis of mannanase by the endosperm of *Lactuca sativa*. *Phytochemistry*, 28: 371~378
- Halmer P, Bewley JD (1979). Mannanase production by the lettuce endosperm control by the embryo. *Planta*, 144: 333~340
- Halmer P, Bewley JD, Thorpe TA (1975). Enzyme to break down lettuce endosperm cell wall during gibberellin- and light-induced germination. *Nature*, 258: 716~718
- Halmer P, Bewley JD, Thorpe TA (1976). An enzyme to degrade lettuce endosperm cell walls. Appearance of a mannanase following phytochrome- and gibberellin-induced germination. *Planta*, 130: 189~196
- Halmer P, Bewley JD, Thorpe TA (1978). Degradation of the endosperm cell walls of *Lactuca sativa* L., cv. Grand Rapids: timing of mobilisation of soluble sugars, lipid and phytate. *Planta*, 139: 1~8
- Iglesias-Fernández R, Matilla AJ (2010). Genes involved in ethylene and gibberellins metabolism are required for endosperm-limited germination of *Sisymbrium officinale* L. seeds. *Planta*, 231: 653~664
- Iglesias-Fernández R, Rodríguez-Gacio MC, Barrero-Sicilia C, Carbonero P, Matilla A (2011a). Three endo- β -mannanase genes expressed in the micropylar endosperm and in the radicle influence germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Planta*, 233: 25~36
- Iglesias-Fernández R, Rodríguez-Gacio MC, Barrero-Sicilia C, Carbonero P, Matilla AJ (2011b). Molecular analysis of endo- β -mannanase genes upon seed imbibition suggest a cross-talk between radicle and micropylar endosperm during germination of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav*, 6: 80~82
- Ikuma H, Thimann KV (1963). The role of the seed-coats in germination of photosensitive lettuce seeds. *Plant Cell Physiol*, 4: 169~185
- Jacobsen JV, Pressman E, Pyliotis NA (1976). Gibberellin-induced separation of cells in isolated endosperm of celery seed. *Planta*, 129: 113~122
- Jones RL (1974). The structure of the lettuce endosperm. *Planta*, 121: 133~146
- Leubner-Metzger G (2003). Functions and regulation of β -1,3-glucanase during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Sci Res*, 13: 17~34
- Leubner-Metzger G, Fründt C, Meins F Jr (1996). Effects of gibberellins, darkness and osmotica on endosperm rupture and class I β -1,3-glucanase induction in tobacco seed germination. *Planta*, 199: 282~288
- Leubner-Metzger G, Fründt C, Vögeli-Lange R, Meins F Jr (1995). Class I β -1,3-glucanase in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiol*, 109: 751~759
- Leubner-Metzger G, Meins F Jr (2000). Sense transformation reveals a novel role for class I β -1,3-glucanase in tobacco seed germination. *Plant J*, 23: 215~221
- Leubner-Metzger G, Meins F Jr (2001). Antisense-transformation reveals novel roles for class I β -1,3-glucanase in tobacco seed after-ripening and photodormancy. *J Exp Bot*, 52: 1753~1759
- Leung DWM, Bewley JD (1981a). Immediate phytochrome action in inducing α -galactosidase in lettuce seeds. *Nature*, 289: 587~588
- Leung DWM, Bewley JD (1981b). Red-light- and gibberellic-acid-enhanced α -galactosidase activity in germinating lettuce seeds, cv. Grand Rapids: control by the axis. *Planta*, 152: 436~441
- Leung DWM, Bewley JD (1983). A role for α -galactosidase in the degradation of the endosperm cell walls of lettuce seeds, cv. Grand Rapids. *Planta*, 157: 274~277
- Leung DWM, Reid JSG, Bewley JD (1979). Degradation of the endosperm cell walls of *Lactuca sativa* L., cv. Grand Rapids in relation to the mobilisation of proteins and the production of hydrolytic enzymes in the axis, cotyledons and endosperm. *Planta*, 146: 335~341
- Leviatov S, Shoseyov O, Wolf S (1995). Involvement of endomannanase in the control of tomato seed germination under low temperature conditions. *Ann Bot*, 76: 1~6
- Linkies A, Schuster-Sherpa U, Tintelnot S, Leubner-Metzger G, Müller K (2010). Peroxidases identified in a subtractive cDNA library approach show tissue-specific transcript abundance and enzyme activity during seed germination of *Lepidium sativum*. *J Exp Bot*, 61: 491~502
- Marraccini P, Rogers WJ, Allard C, André ML, Gaillet V, Lacoste N, Lausanne F, Michaux S (2001). Molecular and biochemical characterization of endo- β -mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. *Planta*, 213: 296~308
- McCleary BV, Matheson NK (1975). Galactomannan structure and β -mannanase and β -mannosidase activity in germinating legume seeds. *Phytochemistry*, 14: 1187~1194
- Mella RA, Burdin MJ, Sánchez RA (2004). Expansin gene expression in *Datura ferox* L. seeds is regulated by the low-fluence response, but not by the high-irradiance response, of phytochromes. *Seed Sci Res*, 14: 61~71
- Mo B, Bewley JD (2002). β -Mannosidase (EC 3.2.1.25) activity during and following germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. Purification, cloning and characterization. *Planta*, 215: 141~152
- Morohashi Y (2002). Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion. *J Exp Bot*, 53: 1643~1650
- Morohashi Y, Matsushima H (2000). Development of β -1,3-glucanase activity in germinated tomato seeds. *J Exp Bot*, 51: 1381~1387
- Morris K, Linkies A, Müller K, Oracz K, Wang X, Lynn JR, Leubner-Metzger G, Finch-Savage WE (2011). Regulation of seed germination in the close *Arabidopsis* relative *Lepidium sativum*: a global tissue-specific transcript analysis. *Plant Physiol*, 155:

- 1851~1870
- Müller K, Hess B, Leubner-Metzger G (2007). A role for reactive oxygen species in endosperm weakening. In: Adkins SW, Ashmore SE, Navie SC (eds). *Seeds: Biology, Development and Ecology*. Wallingford, Oxfordshire, UK: CAB International, 287~295
- Müller K, Linkies A, Vreeburg RAM, Fry SC, Krieger-Liszak A, Leubner-Metzger G (2009). In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiol*, 150: 1855~1865
- Müller K, Tintelnot S, Leubner-Metzger G (2006). Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 47: 864~877
- Nabors MW, Lang A (1971). The growth physics and water relations of red-light-induced germination in lettuce seeds. I. Embryos germinating in osmoticum. *Planta*, 101: 1~25
- Nascimento WM, Cantliffe DJ, Huber DJ (2000). Thermotolerance in lettuce seeds: association with ethylene and endo- β -mannanase. *J Am Soc Hortic Sci*, 125: 518~524
- Nascimento WM, Cantliffe DJ, Huber DJ (2001). Endo- β -mannanase activity and seed germination of thermosensitive and thermotolerant lettuce genotypes in response to seed priming. *Seed Sci Res*, 11: 255~264
- Nascimento WM, Cantliffe DJ, Huber DJ (2004). Ethylene evolution and endo- β -mannanase activity during lettuce seed germination at high temperature. *Sci Agric*, 61: 156~163
- Nascimento WM, Cantliffe DJ, Huber DJ (2005). Seed aging affects ethylene production and endo- β -mannanase activity during lettuce seed germination at high temperature. *Seed Sci Technol*, 33: 11~17
- Nijse J, Erbe E, Brantjes NBM, Schel JHN, Wergin WP (1998). Low-temperature scanning electron microscopic observations on endosperm in imbibed and germinated lettuce seeds. *Can J Bot*, 76: 509~516
- Nonaguchi M, Nonogaki H, Morohashi Y (1995). Development of galactomannan-hydrolyzing activity in the micropylar endosperm tip of tomato seed prior to germination. *Physiol Plant*, 94: 105~109
- Nonogaki H, Bassel GW, Bewley JD (2010). Germination—still a mystery. *Plant Sci*, 179: 574~581
- Nonogaki H, Gee OH, Bradford KJ (2000). A germination-specific endo- β -mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. *Plant Physiol*, 123: 1235~1245
- Nonogaki H, Matsushima H, Morohashi Y (1992). Galactomannan hydrolyzing activity develops during priming in the micropylar endosperm tip of tomato seeds. *Physiol Plant*, 85: 167~172
- Nonogaki H, Morohashi Y (1996). An endo- β -mannanase develops exclusively in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiol*, 110: 555~559
- Nonogaki H, Morohashi Y (1999). Temporal and spatial pattern of the development of endo- β -mannanase activity in germinating and germinated lettuce seeds. *J Exp Bot*, 50: 1307~1313
- Otegui MS (2007). Endosperm cell walls: formation, composition, and functions. *Plant Cell Monogr*, 8: 159~177
- Pavlišta AD, Haber AH (1970). Embryo expansion without protrusion in lettuce seeds. *Plant Physiol*, 45: 636~637
- Pavlišta AD, Valdovinos JG (1975). Carboxymethylcellulase activity prior to the onset of germination of lettuce seeds. *Plant Physiol*, 56 (Suppl): 83
- Pinto LVA, da Silva EAA, Davide AC, de Jesus VAM, Toorop PE, Hilhorst HWM (2007). Mechanism and control of *Solanum lycopersicum* seed germination. *Ann Bot*, 100: 1175~1187
- Powell AD, Dulson J, Bewley JD (1984). Changes in germination and respiratory potential of embryos of dormant Grand Rapids lettuce seeds during long-term imbibed storage, and related changes in the endosperm. *Planta*, 162: 40~45
- Quellette BFF, Bewley JD (1986). β -Mannoside mannohydrolase and the mobilization of the endosperm cell wall of lettuce seeds, cv. Grand Rapids. *Planta*, 169: 333~338
- Ramakrishna P, Amritphale D (2005). The perisperm-endosperm envelope in *Cucumis*: structure, proton diffusion and cell wall hydrolysis activity. *Ann Bot*, 96: 769~778
- Reid JSG (1971). Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. (Leguminosae). *Planta*, 100: 131~142
- Reid JSG, Bewley JD (1979). A dual role for the endosperm and its galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), an endospermic leguminous seed. *Planta*, 147: 145~150
- Reid JSG, Meier H (1973). Enzymic activities and galactomannan mobilisation in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. Leguminosae). *Planta*, 112: 301~308
- Ren CW, Kermode AR (2000). An increase in pectin methyl esterase activity accompanies dormancy breakage and germination of yellow cedar seeds. *Plant Physiol*, 124: 231~242
- Rose JKC, Braam J, Fry SC, Nishitani K (2002). The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol*, 43: 1421~1435
- Salanenka YA, Goffinet MC, Taylor AG (2009). Structure and histochemistry of the micropylar and chalazal regions of the perisperm-endosperm envelope of cucumber seeds associated with solute permeability and germination. *J Am Soc Hortic Sci*, 134: 479~487
- Sánchez RA, de Miguel L (1997). Phytochrome promotion of mannan-degrading enzyme activities in the micropylar endosperm of *Datura ferox* seeds requires the presence of the embryo and gibberellin synthesis. *Seed Sci Res*, 7: 27~33
- Sánchez RA, de Miguel L, Mercuri O (1986). Phytochrome control of cellulase activity in *Datura ferox* L. seeds and its relationship with germination. *J Exp Bot*, 37: 1574~1580
- Sánchez RA, Sunell L, Labavitch JM, Bonner BA (1990). Changes in the endosperm cell walls of two *Datura* species before radicle protrusion. *Plant Physiol*, 93: 89~97
- Sitrit Y, Hadfield KA, Bennett AB, Bradford KJ, Downie AB (1999). Expression of a polygalacturonase associated with tomato seed germination. *Plant Physiol*, 121: 419~428

- Sliwinska E, Bassel GW, Bewley JD (2009). Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. *J Exp Bot*, 60: 3587~3594
- Soós V, Juhász A, Light ME, van Staden J, Balázs E (2009). Smoke-water-induced changes of expression pattern in Grand Rapids lettuce achenes. *Seed Sci Res*, 19: 37~49
- Takaki M, Dietrich SMC (1980). Effect of GA₃ and light on polysaccharide levels and metabolism in germinating coffee seeds. *J Exp Bot*, 31: 1643~1649
- Toorop PE, Bewley JD, Abrams SR, Hilhorst HWM (1999). Structure-activity studies with ABA analogs on germination and endo- β -mannanase activity in tomato and lettuce seeds. *J Plant Physiol*, 154: 679~685
- Toorop PE, Bewley JD, Hilhorst HWM (1996). Endo- β -mannanase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination. *Planta*, 200: 153~158
- Toorop PE, van Aelst AC, Hilhorst HWM (1998). Endosperm cap weakening and endo- β -mannanase activity during priming of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. moneymaker) seeds are initiated upon crossing a threshold water potential. *Seed Sci Res*, 8: 483~491
- Toorop PE, van Aelst AC, Hilhorst HWM (2000). The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germination under the control of ABA. *J Exp Bot*, 51: 1371~1379
- Voegele A, Linkies A, Müller K, Leubner-Metzger G (2011). Members of the gibberellin receptor gene family *GID1* (*GIBBERELIN INSENSITIVE DWARF1*) play distinct roles during *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana* seed germination. *J Exp Bot*, 62: 5131~5147
- Vögeli-Lange R, Fründt C, Hart CM, Beffa R, Nagy F, Meins F Jr (1994). Evidence for a role of β -1,3-glucanase in dicot seed germination. *Plant J*, 5: 273~278
- Wang A, Li J, Bewley JD (2004). Molecular cloning and characterization of an endo- β -mannanase gene expressed in the lettuce endosperm following radicle emergence. *Seed Sci Res*, 14: 267~276
- Watkins JT, Cantliffe DL (1983). Mechanical resistance of the seed coat and endosperm during germination of *Capsicum annuum* at low temperature. *Plant Physiol*, 72: 146~150
- Watkins JT, Huber DJ, Nell TA (1985). Gibberellic acid stimulated degradation of endosperm in pepper. *J Am Soc Hortic Sci*, 110: 61~65
- Welbaum GE, Muthui WJ, Wilson JH, Grayson RL, Fell RD (1995). Weakening of muskmelon perisperm envelope tissue during germination. *J Exp Bot*, 46: 391~400
- Williams HA, Bewley JD, Greenwood JS, Bourgault R, Mo B (2001). The storage cell walls in the endosperm of *Asparagus officinalis* L. seeds during development and following germination. *Seed Sci Res*, 11: 305~315
- Wu CT, Leubner-Metzger G, Meins F Jr, Bradford KJ (2001). Class I β -1,3-glucanase and chitinase are expressed in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiol*, 126: 1299~1313