

脱落酸和抑制剂对萌发花生子叶肽链内切酶和花生球蛋白降解的影响

宾金华* 沈芸 傅家瑞

(中山大学生物系, 广州 510275)

摘要 脱落酸(Abscisic acid, ABA)抑制花生种子萌发的作用与核酸和蛋白质合成抑制剂的作用不同。ABA(100 μ mol/L)在萌发零时施用, 明显抑制肽链内切酶活性和同工酶表现以及花生球蛋白降解, 萌发48h施用ABA(100 μ mol/L)只降低肽链内切酶活性。ABA的抑制作用不依赖于核酸和蛋白质合成。核酸合成抑制剂(3'-脱氧腺苷, 放线菌素D, 5-氟尿嘧啶)和蛋白质合成抑制剂(亚胺环己酮)只能部分降低肽链内切酶活性, 对肽链内切酶同工酶表现和花生球蛋白降解无明显影响。实验结果表明花生子叶肽链内切酶不是在种子萌发过程中重新(de novo)合成, 文中讨论了肽链内切酶活性调节和花生贮藏蛋白降解的起始模式。

关键词 脱落酸; 核酸和蛋白质合成抑制剂; 种子萌发; 肽链内切酶; 花生球蛋白降解

EFFECTS OF ABSCISIC ACID AND INHIBITORS ON ENDOPEPTIDASE AND ARACHIN DEGRADATION DURING PEANUT (*ARACHIS HYPOGAEA* L.) SEED GERMINATION

Bin Jinhua Sheng Yun Fu Jiarui

(Biology Department, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract During germination of peanut seeds, exogenous abscisic acid(ABA) affected the endopeptidase and degradation of storage proteins. When dry peanut seeds were germinated directly with 100 μ mol/L ABA, the endopeptidase activity and arachin degradation were severely inhibited and the endopeptidase isoenzyme was not displayed on polyacryamide gel after electrophoresis. After peanut seeds were germinated 2 days in water, exogenous ABA (100 μ mol/L) only reduced endopeptidase activity, but did not affect endopeptidase isoenzyme, storage proteins and arachin degradation. The experiments in which peanut seeds were germinated in the presence of ABA and cycloheximide (protein synthesis inhibitor) and 5-fluorouracil (RNA synthesis inhibitor) showed that the role of ABA in inhibiting endopeptidase activity and arachin degradation was not dependent on the synthesis of nucleic acid and protein. The nucleic

国家自然科学基金资助课题

* 现工作单位: 广州华南师范大学生物系, 广州 510631

1995-06-02 收稿; 1995-10-20 修回

缩略语: Act-D—放线菌素D; 5Fu—5-氟尿嘧啶; BAPA—苯甲酰精氨酸对硝基苯胺; β -ME—巯基乙醇;

CHM—亚胺环己酮; PAGE—聚丙烯酰胺凝胶电泳; Cord—3'-脱氧腺苷; SDS—十二烷基硫酸钠

acid synthesis inhibitors (Actinomycin D, Cordycepin, 5-Fluorouracil) and protein synthesis inhibitor (Cycloheximide) depressed endopeptidase activity, but did not affect the endopeptidase isoenzyme and arachin degradation. The results showed that the endopeptidase which degraded arachin in cotyledons during peanut seed germination was not de novo synthesized. We propose that the endopeptidase was synthesized during seed development and played an important role in degradation of arachins during germination. The regulation of endopeptidase activity and the model of storage protein degradation during peanut seed germination were discussed.

Key words Abscisic acid; Nucleic acid synthesis inhibitor; Protein synthesis inhibitor; Seed germination; Endopeptidase; Arachin degradation

种子萌发是植物个体发育的一个重要环节,它由子叶或胚乳中的贮藏物质降解供应胚的生长。贮藏蛋白质是种子的重要贮藏物质之一,植物种子贮藏蛋白质的快速有效降解依赖于肽链内切酶^[1,2]。但该酶的来源问题一直困扰着人们。一般认为肽链内切酶是在种子萌发中重新合成的,也有研究者认为它以酶原形式存在于成熟种子中,或受蛋白酶抑制剂调控。这些研究多集中在豆类 and 禾谷类作物上^[3,4]。脱落酸在种子发育,萌发及休眠等许多生理生化过程中起重要作用^[5],它抑制发育种子胎萌和成熟种子萌发,但至今对其抑制机理不很清楚。花生是重要的经济作物,目前对其种子萌发过程中贮藏蛋白质降解已有一些了解,但关于降解的调控仍不清楚。本文应用脱落酸,核酸和蛋白质合成抑制剂探讨了花生子叶肽链内切酶的来源,活性表达以及该酶对花生球蛋白降解的作用。

1 材料和方法

材料 供试花生(*Arachis hypogaea* L.)为粤油-116品种,由广东省农业科学研究院经济作物研究所提供。

种子萌发 选取中等大小种子,用1%次氯酸钠消毒5min,蒸馏水冲洗6次后置于 28 ± 1 ℃中暗萌发,一定时间(0-48h)后转入抑制剂溶液中继续萌发5d(直立玻板法),然后取出测量下胚轴-胚根长并称重,以两者之积为萌发生长量(cm×g)。子叶保存于-20℃中备用,每粒种子的一片子叶用于酶活性测定,另一片子叶用于贮藏蛋白质测定。

蛋白质提取和测定 按照Yamada等^[6]的方法提取盐溶蛋白。其中的花生球蛋白用0-40%饱和硫酸铵沉淀^[7]。蛋白质含量测定按Bradford^[7]方法进行。

SDS-PAGE 取盐溶蛋白质提取液,加入5倍体积预冷丙酮(-20℃),在-20℃下过夜,离心所得沉淀风干后加入SDS样品溶解液,沸水中加热3min,参照Laemmli^[8]方法进行凝胶电泳。分离胶浓度为10%,电泳时每板恒流50mA,凝胶用含50%甲醇,10%醋酸的0.3%考马斯亮蓝R-250染色,用30%甲醇和7%醋酸溶液脱色。

蛋白酶制备 取子叶按1:5(g/ml)加入预冷的含 $10 \mu\text{mol/L}$ β -ME的磷酸缓冲液(pH7.2, 20mmol/L)在冰浴中研磨成匀浆,浸提4h后在 $10000 \times g$,离心20min。取上清液加入固体硫酸铵使饱和度达80%,静置2h后再离心($10000 \times g$, 20min),所得蛋白质沉淀溶于含 $10 \mu\text{mol/L}$

β -ME 的 50mmol/L 醋酸缓冲液 (pH5.4), 并对该液透析 24h。透析液经离心 (10000 \times g, 20min) 除去不溶物, 所得上清液即为酶提取液, 所有操作均在 -4-0 $^{\circ}$ C 下进行。

肽链内切酶活性测定 以 BAPA 为底物测定肽链内切酶活性, 参照 Harris 和 Chrispeel^[9] 的方法, 以波长 410nm 下的 OD 值每分钟变化 0.01 为 1 个酶活性单位。电泳后检测肽链内切酶活性则按 Jammel 等^[10] 的方法进行, 但分离胶改为 7.5%, 明胶底物终浓度为 0.8%。

2 实验结果

2.1 ABA 和核酸及蛋白质合成抑制剂对花生种子萌发生长的影响

在种子萌发过程中加入 ABA、核酸和蛋白质合成抑制剂明显抑制花生下胚轴和胚根的生长, 抑制程度与施用浓度和施用时间有关, ABA 在萌发 12h 施用抑制作用较弱, 而核酸和蛋白质合成抑制剂在萌发 24h 施用较弱。100 μ mol/L ABA 几乎完全抑制种子的萌发生长, 5Fu 在萌发 12h 后施用抑制剂作用明显减弱。这些抑制剂对花生种子萌发生长的抑制按顺序排列为 ABA>Act-D>Cord>CHM>5FU, ABA 的抑制作用最大, 5FU 抑制作用最小(表1)。

表1 ABA 和核酸及蛋白质合成抑制剂对花生种子萌发生长、肽链内切酶活性和花生贮藏蛋白降解的影响

Table 1 Effects of ABA and inhibitors on the growth, endopeptidase activity and storage protein degradation during peanut seed germination

指标 Index	处理前水中 萌发时间 Germination in water before tre- atments (h)	ABA 和/或抑制剂溶液中萌发5d Germination in ABA and/or inhibitor solution for 5 days											
		H ₂ O	ABA (μ mol/L)		CHM (μ g ml ⁻¹)		Act-D (μ g ml ⁻¹)	Cord (μ g ml ⁻¹)		5Fu CHM+5Fu (μ g ml ⁻¹) (μ g ml ⁻¹)		ABA+CHM+5Fu*	
			100	10	40	20	20	40	20	40	20	20+20	10+20+20
生长量 Growth (cm \times g)	0	9.4	0.1	2.0	1.3	1.6	0.7	0.9	1.7	2.2	3.4	1.7	0.8
	12	9.5	0.7	7.4	2.9	4.0	1.0	-	2.1	7.1	11.2	4.1	2.4
	24	16.3	0.3	7.0	2.8	4.6	1.9	1.9	2.7	9.2	14.3	4.3	2.2
	48	25.3	0.5	6.1	2.2	3.6	-	1.6	1.5	13.1	19.5	5.3	1.8
肽链内切酶活性 (U/子叶)	0	100.3	24.0	69.6	81.2	91.3	89.8	94.2	97.0	87.9	94.1	81.7	61.8
Endopeptidase activity	12	95.5	26.5	63.4	97.1	103.6	93.2	-	91.6	82.8	97.3	82.8	74.1
(U/cotyledon)	24	102.1	40.1	84.8	99.4	101.1	101.8	101.6	105.7	101.7	101.2	93.1	74.9
	48	99.2	54.9	72.1	81.2	88.4	-	63.2	95.3	101.1	101.3	99.1	75.3
花生球蛋白含量 (mg g ⁻¹ 脱脂粉)	0	64.5	380.7	206.7	77.1	62.5	59.0	-	99.5	50.3	53.0	203.3	177.1
Arachin content	12	60.3	385.7	134.6	70.1	61.3	-	-	69.5	72.5	55.3	65.3	87.2
(mg g ⁻¹ defatted powder)	24	57.2	150.2	86.2	66.7	58.4	57.4	-	64.3	64.2	66.3	62.1	83.5
	48	54.1	72.3	59.4	55.4	54.3	-	-	56.1	56.7	58.2	56.3	61.3
盐溶蛋白含量 (mg g ⁻¹ 脱脂粉)	0	571.1	673.4	678.6	645.9	561.2	-	-	626.2	608.5	618.3	680.4	672.5
Salt-solution	12	545.7	699.1	628.3	628.3	627.2	-	-	576.3	619.3	521.8	555.3	620.1
proteins (mg g ⁻¹	24	521.8	646.9	614.4	551.4	548.1	-	-	542.5	555.3	542.5	512.0	598.6
defatted powder)	48	512.0	527.7	510.0	586.8	546.3	-	-	512.0	580.9	546.3	546.3	558.3

* 单位为 μ mol/L + μ g ml⁻¹ + μ g ml⁻¹

2.2 ABA 和核酸及蛋白质合成抑制剂对肽链内切酶活性的影响

ABA 与核酸和蛋白质合成抑制剂对子叶肽链内切酶活性的抑制完全不同。ABA 明显抑制肽链内切酶活性, 与施用浓度有关, 萌发后施用抑制作用减弱; 核酸和蛋白质合成抑制剂则只是部

分抑制肽链内切酶活性,一般抑制程度约20%以内,且萌发后施用抑制作用减弱。CHM和5Fu一起施用的抑制效果并无明显加强,对ABA的抑制作用也没有明显影响(表1)。

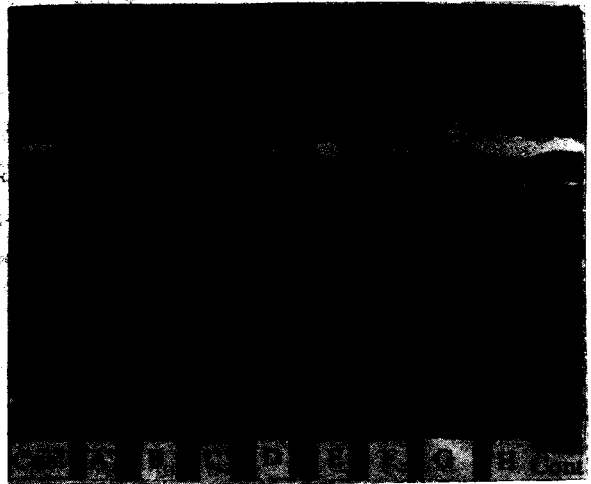
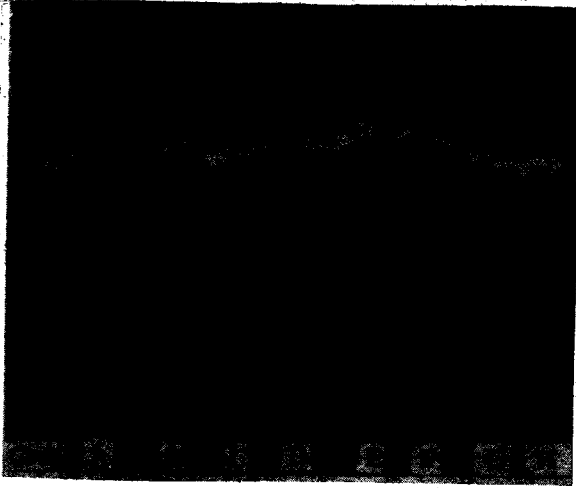
用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测肽链内切酶活性,所得结果与定量分析一致,只有ABA明显抑制肽链内切酶活性在凝胶上表现,与施用浓度及施用时间有关,而核酸和蛋白质合成抑制剂无明显影响。萌发零时用 $100\mu\text{mol/L}$ ABA处理,完全抑制肽链内切酶带的出现, $10\mu\text{mol/L}$ ABA处理只使第二条酶带活性减弱(图1-I);萌发12h用 $100\mu\text{mol/L}$ ABA处理,第一条酶带仍表

I: 处理前水中萌发 0h

Germination in water 0h before treatments

II: 处理前水中萌发 12h

Germination in water 12h before treatments



III: 处理前水中萌发 24h

Germination in water 24h before treatments

IV: 处理前水中萌发 48h

Germination in water 48h before treatments

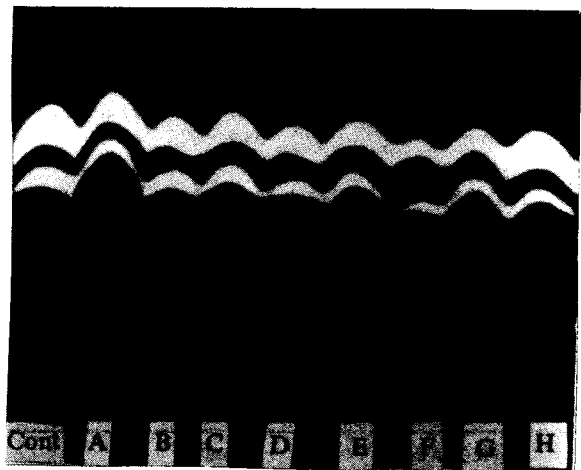
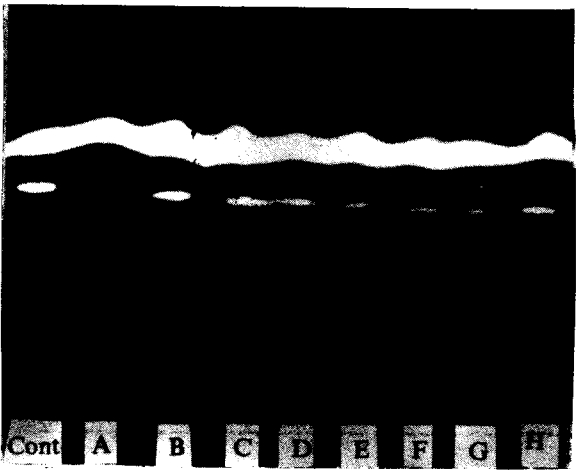


图1 花生种子萌发时 ABA 和核酸及蛋白质合成抑制剂对子叶肽链内切酶同工酶的影响

Fig. 1 The effects of ABA and/or inhibitors on endopeptidase isoenzyme of cotyledon during peanut seed germination

Cont: Water; A: $100\mu\text{mol/L}$ ABA; B: $10\mu\text{mol/L}$ ABA; C: $40\mu\text{g ml}^{-1}$ CHM; D: $20\mu\text{g ml}^{-1}$ CHM;
E: $20\mu\text{g ml}^{-1}$ Cord; F: $20\mu\text{g ml}^{-1}$ 5Fu; G: D+F; H: B+D+F

现弱活性, 第二条酶带却消失, $10\mu\text{mol/L}$ ABA 处理对第一条酶带无影响, 使第二条酶带活性减弱(图 1-II)。萌发 24h 再用 ABA 处理, 抑制作用明显减弱, $100\mu\text{mol/L}$ ABA 处理只使第二条酶带趋于消失而对第一条酶带无明显影响, $10\mu\text{mol/L}$ ABA 处理无影响(图 1-III)。萌发 48h 再处理, ABA 对酶带已无明显影响(图 1-IV)。

2.3 ABA 和核酸及蛋白质合成抑制剂对贮藏蛋白降解的影响

ABA 明显抑制花生球蛋白和盐溶蛋白的降解, 抑制效果与施用浓度有关, 萌发后施用抑制作用减弱。在萌发零时施用 $100\mu\text{mol/L}$ ABA 几乎完全抑制花生球蛋白的降解, 萌发 48h 后施用则没有抑制作用。单独使用核酸合成抑制剂(Cord, Act-D, 5Fu)或蛋白质合成抑制剂(CHM)均不能明显阻碍花生球蛋白在种子萌发中的降解, 但对盐溶蛋白降解有一定的影响, 因为盐溶蛋白的降解还需要其它蛋白酶的参与, 如二肽酶和羧肽酶, 它们可能是在萌发中重新合成。CHM 和 5Fu 一起在萌发零时使用只部分抑制花生球蛋白降解, 但没有明显影响 ABA 的抑制作用(表 1)。

用 SDS-PAGE 检测 ABA 和抑制剂对花生贮藏蛋白降解的影响, 得到结果与定量分析一致, 只有 ABA 明显抑制贮藏蛋白降解, 与施用浓度有关, 萌发后施用抑制作用减弱。萌发零时用 $100\mu\text{mol/L}$ ABA 处理, 完全抑制花生的贮藏蛋白降解(图 2-I); 萌发 12、24h 用 $100\mu\text{mol/L}$ ABA 处理, 部分抑制花生贮藏蛋白降解(图 2-II, III); 萌发 48h 再处理, ABA 没有明显影响花生贮藏蛋白降解(图 2-IV)。核酸和蛋白质合成抑制剂对贮藏蛋白降解没有明显影响, CHM 和 5Fu 一起施用对 ABA 抑制贮藏蛋白降解作用也无明显影响(图 2-I-IV)。

2.4 相关性分析

分别对下胚轴-胚根生长量及花生球蛋白含量与肽链内切酶活性进行回归分析, 可以看到在萌发 0-24h 后使用抑制剂的情况下, 花生种子萌发中下胚轴-胚根生长量与肽链内切酶活性

表 2 肽链内切酶活性与萌发生长量及花生球蛋白含量的回归分析

Table 2 The regression of endopeptidase activity in relation to the growth or arachin contents

处理前水中 萌发时间 Germination in water before treatments (h)	指标 Index	回归方程 Regression equation	相关系数 r	自由度 df	t 检验 $t_{0.001}$	相关性 Correlativity
0	a	$Y = -0.2069 + 0.05157X$	0.449	10	0.703	不显著 Unnoticeable
	b	$Y = 475.3 - 4.323X$	-0.916	9	0.735	显著 Noticeable
12	a	$Y = -0.1002 + 0.07696X$	0.492	8	0.765	不显著 Unnoticeable
	b	$Y = 429.1 - 4.06X$	-0.892	8	0.765	显著 Noticeable
24	a	$Y = -0.4040 + 0.1048X$	0.381	10	0.703	不显著 Unnoticeable
	b	$Y = 197.5 - 1.348X$	-0.966	9	0.735	显著 Noticeable
48	a	$Y = -19.19 + 0.3220X$	0.631	9	0.735	不显著 Unnoticeable
	b	$Y = 68.93 - 0.1329X$	-0.730	8	0.765	不显著 Unnoticeable

a: 生长量-酶活性 Growth-Enzyme activity; b: 球蛋白-酶活性 Arachin content-Enzyme activity

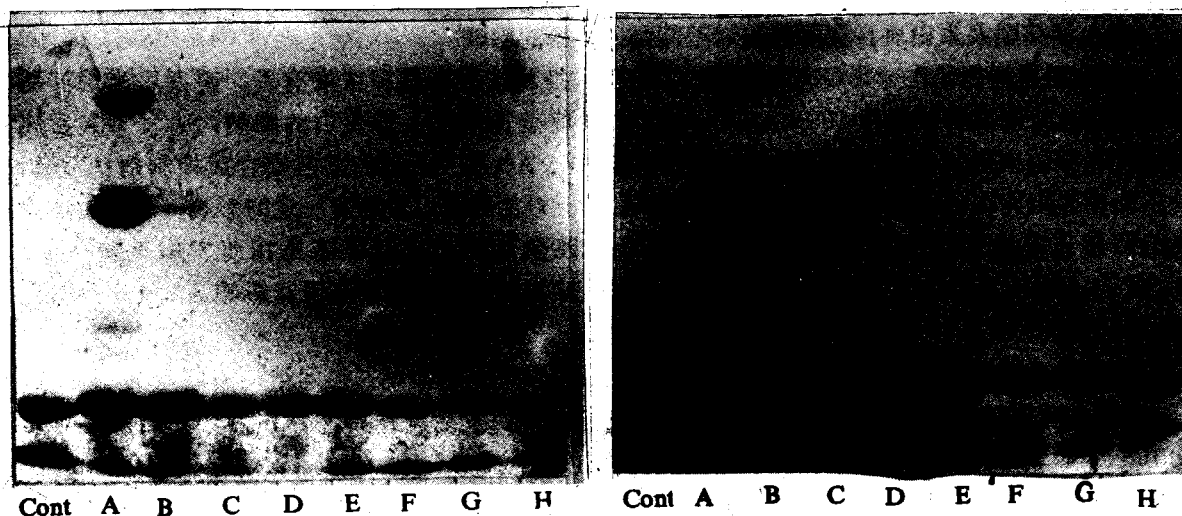
的相关性不高, 相关系数低于 0.5, 而花生球蛋白含量与肽链内切酶活性的相关系数在 -0.9 左右, 两者成显著负相关。可是萌发 48h 再施用 ABA 和抑制剂, 不但生长量与酶活性的相关性不高,

I: 处理前水中萌发 0h

Germination in water 0h before treatments

II: 处理前水中萌发 12h

Germination in water 12h before treatments



III: 处理前水中萌发 24h

Germination in water 24h before treatments

IV: 处理前水中萌发 48h

Germination in water 48h before treatments

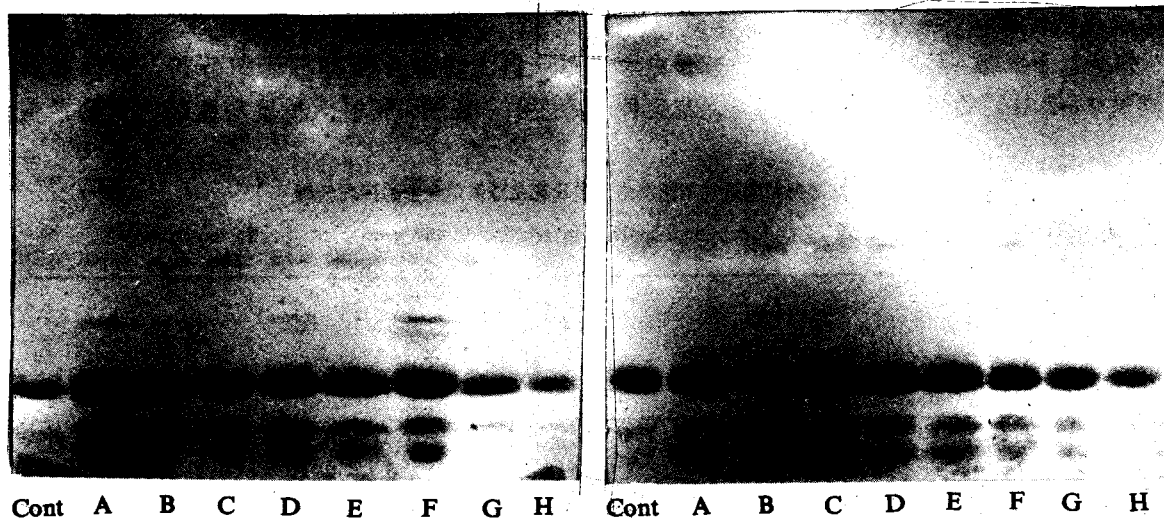


图2 花生种子在 ABA 和核酸及蛋白质合成抑制剂溶液中萌发 5d 子叶盐溶蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE of salt-soluble proteins in cotyledon of peanut seeds germinating in ABA and/or inhibitor solution for 5 days

I and II, Cont: Water; A: $100\mu\text{mol/L}$ ABA; B: $10\mu\text{mol/L}$ ABA; C: $40\mu\text{g ml}^{-1}$ CHM; D: $20\mu\text{g ml}^{-1}$ CHM; E: $20\mu\text{g ml}^{-1}$ Cord; F: $20\mu\text{g ml}^{-1}$ 5Fu; G: C+F; H: B+C+ $20\mu\text{g ml}^{-1}$ 5Fu; III and IV, A, B, C, D, E are the same as in I and II; F: A+C+ $20\mu\text{g ml}^{-1}$ 5Fu; G: B+D+Fu; H: B+ $20\mu\text{g ml}^{-1}$ 5Fu

而且花生球蛋白含量与酶活性的相关系数也仅为-0.73。因而花生种子萌发中花生球蛋白降解与肽链内切酶活性密切相关。

3 讨论

核酸合成抑制剂(Act-D, Cord, 5Fu)和蛋白质合成抑制剂(CHM)常应用于生物学研究, 它们的抑制机理各不相同。本实验发现除5Fu外, 在不同萌发时间施用这些抑制剂都会明显抑制花生种子的萌发和生长。5Fu抑制细胞中tRNA和rRNA的合成, 萌发12h后施用5Fu对萌发和生长的抑制作用明显减弱, 说明正常萌发花生种子在萌发初期即有tRNA和rRNA的合成, 即使以后合成受到抑制, 也能部分满足种子萌发和生长的需要。

成熟种子胚中有许多mRNA, Ihel和Duer^[11]发现棉花种子的肽链内切酶的mRNA贮存于成熟种子的子叶中, 萌发时此mRNA转译而合成肽链内切酶。对花生种子使用不同的核酸和蛋白质合成抑制剂, 均只能部分抑制肽链内切酶活性, 对酶电泳图谱(图1), 花生球蛋白降解(表1)和贮藏蛋白降解(图2)没有明显影响, 说明花生种子萌发中肽链内切酶活性的表达不依赖于核酸和蛋白质的合成。发育花生胚的子叶在结荚20d后即可测到肽链内切酶活性, 并随发育进程酶活性逐渐增加^[12]。因而我们认为花生子叶的肽链内切酶并非以mRNA形式预存于成熟种子中, 更不是种子萌发中重新形成。

一些植物的未成熟胚从种子分离出来后可以在水或培养基中萌发, 当加入ABA可以阻止胚萌发和促进其继续发育, 并诱导培养胚产生许多新蛋白^[5,13], 花生也是如此^[14]。意味着ABA抑制贮藏物质降解而阻止胚的萌发。一些文章报道ABA通过抑制水解酶活性来抑制成熟种子萌发^[13]。玉米种子在ABA溶液中萌发时有两条肽链内切酶同工酶带消失^[15], 肽链内切酶抑制剂亮肽素抑制蓖麻种子萌发^[16]。本实验发现ABA在萌发零时施用明显抑制肽链内切酶活性和花生球蛋白降解(表1), CHM和5Fu不能根本阻碍ABA的作用。因而我们认为ABA抑制花生种子萌发原因之一是抑制了贮藏物质降解, 其中肽链内切酶被抑制起主要作用, ABA的抑制作用不依赖于核酸和蛋白质的合成。

花生种子正常萌发两天即出现两条肽链内切酶同工酶带, 萌发1-1.5d中只有一条同工酶带(待发表)。本实验发现ABA的抑制作用与施用时间有关, 萌发零时施用完全抑制肽链内切酶带出现和贮藏蛋白降解(图1-A, 图2-A); 萌发48h施用则无抑制作用(图1-D, 图2-D)。以萌发24h为分界点(图1-C, 图2-C), 这意味着花生子叶肽链内切酶的激活在种子萌发的头2d内完成, 同工酶之一在萌发1d前被激活, 另一同工酶在萌发1d后被激活。肽链内切酶的激活有两种可能: (1)蛋白酶抑制剂活性消失; (2)酶原激活。花生子叶含多种蛋白酶抑制剂^[17], 抑制剂的消失调节着蛋白酶的激活^[18]。我们从萌发花生子叶提取肽链内切酶, 其酶的性质与从未萌发花生子叶提取肽链内切酶的性质极为接近(待发表), 两者是同一种酶, 即可排除肽链内切酶以酶原形式贮存于干种子的可能。Elpidina等^[19]证明荞麦的贮藏蛋白质, 金属蛋白酶和金属蛋白酶抑制剂同时存在于蛋白体中。因而我们认为花生子叶肽链内切酶是在种子发育过程中合成, 在成熟种子中受抑制剂作用而无法表现活性, ABA通过控制另一种蛋白酶活性而调节这种抑制剂的活性。

禾谷类和其它豆类种子的贮藏蛋白质在萌发中的降解已有详细的模式，花生种子贮藏蛋白萌发中降解的模式也有初步报道^[2]，但有关降解起始的模式未见报道。花生球蛋白是花生贮藏蛋白的最主要成分，可占子叶蛋白70%的比例，而伴花生球蛋白只占5.6%，2S蛋白虽占20%，但分子量较低^[2]，因而花生球蛋白的降解可基本上代表了花生贮藏蛋白的降解。花生种子存在着蛋白酶抑制剂，种子贮藏蛋白的降解需要有关蛋白酶和贮藏蛋白双激活的过程^[20]。Basha和Beever^[21]证明种子贮藏蛋白降解之前经历了脱氨基的步骤。我们从萌发生花生子叶提取的肽链内

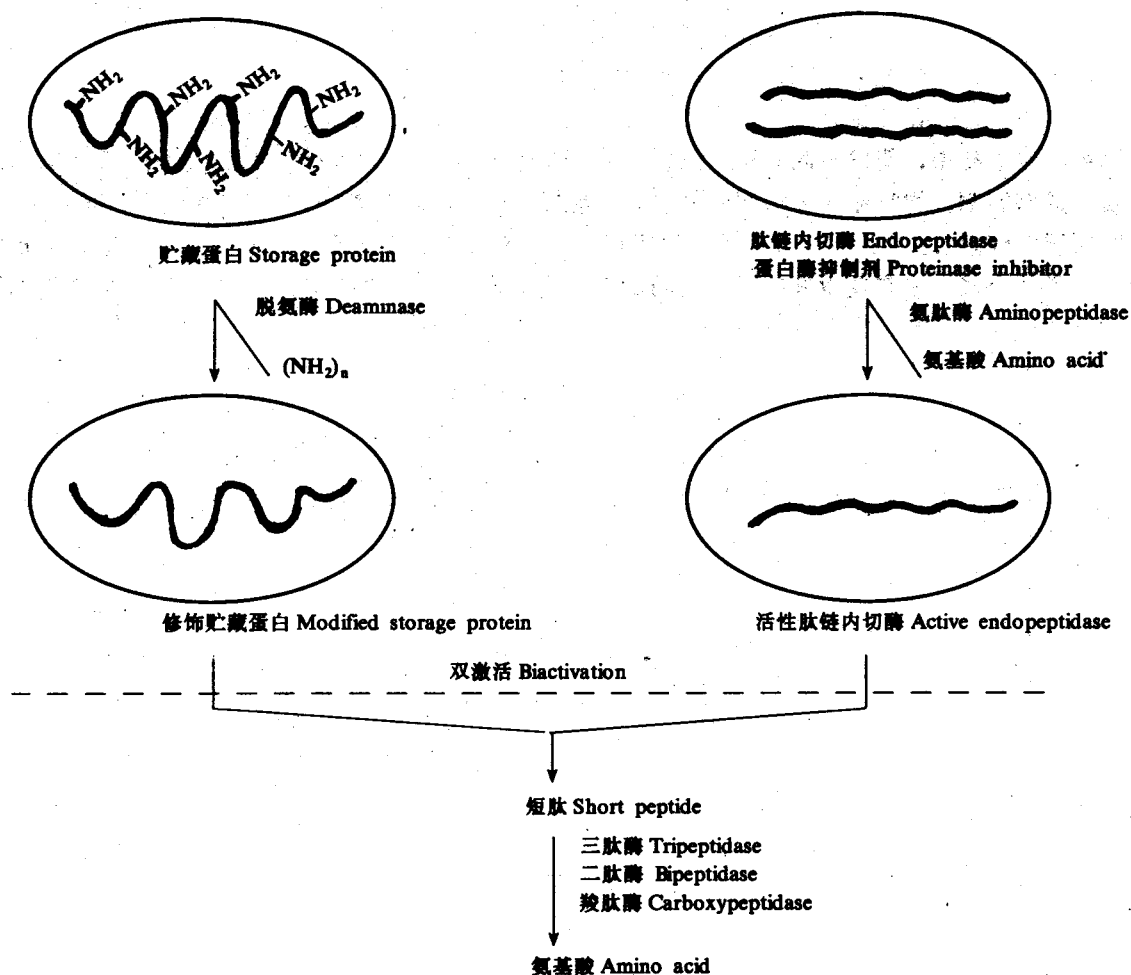


图3 花生种子贮藏蛋白质在萌发中降解的起始模式

Fig. 3 The model of storage protein degradation during peanut seed germination

切酶不能明显降解未萌发花生种子的花生球蛋白，伴花生球蛋白和2S蛋白(待发表)，说明花生种子贮藏蛋白降解之前需要被修饰。由于氨肽酶在花生种子萌发初期活性极高和稳定^[22]，很可能就是降解蛋白酶抑制剂的蛋白酶。羧肽酶在花生种子萌发后期才表现出高活性^[22]，且在贮藏蛋白降解中起的作用极小^[23]。根据现有资料，我们认为花生种子贮藏蛋白质在萌发中降解的起始模式如图3。

参考文献

- 1 Nilson S S, Liener I E. Degradation of the storage protein of *Phaseolus vulgaris* during germination—roles of endopeptidase and protease inhibitor. *Plant Physiol*, 1984, 74:494
- 2 黄上志, 傅家瑞. 花生种子贮藏蛋白与活力的关系及其在萌发时的降解模式. *植物学报*, 1992, 34:543
- 3 Mosse J, Pernollet J C. Storage proteins of legume seeds. In: Arora S K eds. *Chemistry and Biochemistry of legumes*, Edward Arnold, 1983, 96
- 4 Fincher G B. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germination cereal grains. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1989, 40:305
- 5 Zeevaart J A D, Creelman P A. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1988, 39:439
- 6 Yamada T, Aibara S, Morita Y. Accumulation pattern of arachin and its subunits in maturation of groundnut seeds. *Plant Cell Physiol*, 1980, 21:1217
- 7 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72:248
- 8 Lampli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 1970, 227:680
- 9 Harris N, Chrispeel M J. Histochemical and biochemical observations on storage protein metabolism and protein autolysis in cotyledons of germinating Mung beans. *Plant Physiol*, 1975, 56:292
- 10 Jameel S, Reddy V V, Rhodes W G et al. Gel electrophoretic profiles of protease in dark-germinated flax seed. *Plant Physiol*, 1984, 76:730
- 11 Ihel I N, Dure L. The developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination. *J Biol Chem*, 1972, 247:5048
- 12 黄上志, 宾金华, 林鹿等. 不同成熟度花生种子萌发时子叶贮藏蛋白质的降解. *植物生理学报*, 1993, 19:257
- 13 Kermode A R, Oishi M Y, Bewley J D. Regulation role for desiccation and abscisic acid in seed development: A comparison of the evidence from whole seeds and isolated embryos. In: Bewley J D eds. *Seed Moisture*. *Crop Sci Soc Am Special*, 1989, 14:23
- 14 黄上志, 傅家瑞. 脱落酸对发育中花生胚萌发和贮藏蛋白质合成的影响. *植物生理学报*, 1993, 19:31
- 15 Segundo B S, Casacuberta J M, Puigdomenech P. Sequential expression and differential hormonal regulation of proteolytic activities during germination in *Zea Mays* L. *Planta*, 1990, 181:467
- 16 Alpi A, Beevers H. Effect of luopeptin on proteinase and germination of castor beans. *Plant Physiol*, 1981, 68:851
- 17 Ahmed E M, Applwhite J A. Characterization of trypsin inhibitor in florunner peanut seeds (*Arachis hypogaea* L.). *Peanut Sci*, 1988, 15:81
- 18 Shain Y, Mayer A M. Activation of enzymes during germination trypsin-like enzyme in lettuce. *Phytochemistry*, 1968, 7:1491
- 19 Elpidina E N, Voskoboinikova N E, Belozersky M A et al. Localization of a metalloproteinase and its inhibitor in the protein bodies of buck wheat seeds. *Planta*, 1991, 185:46
- 20 Basha S M M, Cheery J P. Proteolytic enzyme activity and storage protein degradation in cotyledons of germinating peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. *J Agric Food Chem*, 1978, 26:229
- 21 Basha S M M, Beevers L. The development of proteolytic activity and protein degradation during the germination of *Pisum sativum* L. *Planta*, 1975, 124:77
- 22 Fu J R, Huang S Z, Li H J. Seed vigor in relation to the synthesis and degradation of storage protein in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. In: Fourth International Workshop on Seeds, Basic and Applied Aspects of Seed Biology. Daniel Come and Francoise Corbineau, Universite Pierre et Marie Curie, Paris, 1993, 3:811
- 23 Ryan C A, Simmons M W. Plant Proteinase. In: Marcus A eds. *The biochemistry of plant* Vol. 6, A Comprehensive Treatish. Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1981, 231