

不同活力玉米种子胚萌发过程中蛋白质的变化

刘 军 黄上志 傅家瑞

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 从不同人工老化处理中筛选出3组分别代表不同活力的玉米种子。萌发期间, 中、低活力种子胚蛋白的降解比高活力对照种子慢, 萌发前期胚蛋白合成能力也较低。吸胀24 h, 不同活力胚的蛋白合成能力差异显著, 可以作为衡量种子活力的指标。

关键词 玉米; 种子活力; 萌发; 胚蛋白

中图分类号 S330.2

CHANGES OF EMBRYO PROTEIN IN MAIZE SEEDS WITH DIFFERENT VIGOURS DURING GERMINATION

Liu Jun Huang Shangzhi Fu Jiarui

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract High, medium and low vigour maize (*Zea mays* L.) seeds were obtained from different aging treatments. The content of embryo storage proteins in high vigour seeds declined more rapidly than that in medium and low vigour seeds during germination. Protein synthesis in high vigour seeds at 24 hours after imbibition was higher than that in aging seeds.

Key words Maize (*Zea mays*); Seed vigour; Germination; Embryo protein

种子在贮藏过程中发生劣变导致活力下降, 主要是核酸、膜和蛋白质合成系统受到损害^[1,2]。种子活力下降表现为种子萌发能力的降低等, 故衡量活力的生理生化指标必然与萌发时的生理现象有机地联系起来^[3-5]。种子在采收、加工和贮藏过程中会发生不同程度的劣变, 高温高湿是导致种子劣变的主要因子^[1,4,6]。在种子萌发过程中, 首先是核酸与膜的修复, 同时出现各种类型蛋白质的表达^[1]。萌发早期胚内蛋白合成与发芽率密切相关。种子蛋白质与种子活力的关系已有许多报道^[1,2,7,8], 如发现小麦种子蛋白含量与幼苗活力及产量呈正相关^[7]。高蛋白质含量及萌发时贮藏蛋白降解速度快的种子具有较高的活力^[8]。Abdul-Baki认为蛋白质合成系统的完整性与活力的相关性更大^[2]。通过电泳分析研究老化对大豆等种子多肽的变化时, 发现不同活力的胚与“萌发特异性多肽”并无相关性^[9,10]。小麦种子用PEG或NaCl渗调能有效控制胚萌发的蛋白类型以及与萌发有关的多肽合成受水胁迫的阻碍, 解除胁迫后重新恢复^[11]。研究萌发时期蛋白合成与代谢的变化, 有可能提供一个与活力有关的分子标记。

本文探讨不同活力的玉米种子萌发早期胚内蛋白质的变化, 为探讨玉米种子劣变提供理论依据。

1 材料和方法

试验材料 玉米 (*Zea mays* L.) 品种“穗甜一号”购于广州市农业科学研究所。

种子老化 将玉米种子放于 15 °C、相对湿度 (R.H.) 85% 中预处理 3 d 后, 转移到 42 °C、85% R.H. 处理 1-8 d, 然后分别置于 25 °C、32% R.H. 干燥 3 d, 密封贮藏于 -20 °C。以未老化种子作为对照。

种子萌发 将种子 (每组 50 粒) 用 1% NaClO 溶液浸泡 5 min, 用蒸馏水冲洗后置于垫有潮湿滤纸的 15 cm 培养皿中, 在 25 °C 萌发 4 d 后测定发芽率、发芽指数 (GI) 和胚干重, 以胚干重与发芽指数的乘积作为活力指数。采用砂基种植 7 d 后统计出苗情况。实验重复 3 次。

蛋白质提取与测定 参照张斌等^[12]的方法提取蛋白质。提取液含 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L Vc, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L PMSF, 30 mmol/L Tris-HCl (pH 8.7)。取 10 个胚按 1:5 (FW/V) 加入蛋白质提取液, 冰浴研磨匀浆, 4 °C 10 000 × g 离心 15 min, 取上清液测定。蛋白质含量测定按 Bradford^[13]方法进行, 重复 3 次。

SDS-PAGE 取蛋白质提取上清液, 加入 5 倍体积的冷丙酮, 在 -20 °C 下过夜, 离心后所得沉淀加入 SDS 样品溶解液, 参照 Laemmli^[14]方法进行电泳。分离胶浓度为 10%, 每板恒流 30 mA。

蛋白质合成测定 取不同萌发时期的种子, 在无菌条件下剥取 10 胚放入小瓶中, 加 1.5 ml 含 3.7×10^5 Bq 的 ³⁵S-甲硫氨酸溶液 (含 10 μg ml⁻¹ 氯霉素溶液), 在 25 °C 下标记 4 h 后, 用预冷水和 0.1% 甲硫氨酸溶液各洗 3 次, 每次 5 ml。蛋白质提取方法同上。取上清液, 分别用于测定放射性同位素的摄取与掺入量: (1) 吸取 40 μl 上清液于液闪瓶中, 作放射性总摄入测定, 3 次重复。(2) 吸取 40 μl 上清液滴于滤纸上, 晾干后放于 0-4 °C 10% TCA 溶液中过夜。然后 90 °C 5% TCA 中 15 min、室温下 5% TCA 中 15 min、37 °C 95% 乙醇 15 min、室温下 95% 乙醇: 95% 乙醚 (1:1 V/V) 15 min, 用乙醚清洗后晾干放入液闪瓶中测定掺入量。每处理 3 次重复, 测定放射性强度。

蛋白质合成的放射自显影 取吸胀 22 h 的玉米胚 10 个进行放射性标记, ³⁵S-甲硫氨酸的标记方法同上, 但标记量为 3.7×10^6 Bq。蛋白质提取与 SDS-PAGE 分析同上。电泳后凝胶浸泡在 10 倍体积的 1 mmol/L 水杨酸钠 (pH 6.0) 中 30 min, 用凝胶真空干燥器制干胶。然后放入 X 光片暗盒, 在 -70 °C 进行放射自显影。X 光片采用富士胶片。

2 实验结果

2.1 人工老化对玉米种子发芽率及活力的影响

从不同时间老化处理玉米种子发芽动态可以看出, 不同处理间有明显的差异。初始发芽率 (图 1) 及最后发芽率均以对照为高 (表 1)。对不同老化处理种子的发芽指数及活力指数进行方差分析表明, 不同时间老化处理的差异达到显著水平, 其中对照的发芽指数和活力指数最高, 它与老化 3 d 以后各处理均有显著差异。综合考虑发芽率、发芽指数和活力指数的影响, 我们将各处理分为三种水平, 对照为高活力, 老化 4 d 为中活力, 老化 7 d 为低活力。

3 种不同活力种子幼苗的生长差异显著。高、中、低活力种子成苗率分别为 93.3%、

86.7%、76.7%; 幼苗鲜重分别为 1.26 g、1.06 g、0.92 g; 畸形苗分别为 3.3%、7%、12%。

表 1 不同老化天数对种子活力的影响
Table 1 Effect of aging time on vigour of maize seeds

老化时间 Aging time (d)	发芽率(%) Germination percentage	发芽指数 Germination index	第四天胚干重(g) Dry weight of embryo (4 d)	活力指数 Vigour index*
0 (Control)	96.0	22.33 a	0.496	11.08 a
1	94.7	21.55 ab	0.493	10.62 ab
2	94.7	21.33 ab	0.488	10.41 abc
3	94.7	20.43 bc	0.480	9.81 abc
4	93.3	20.24 bc	0.471	9.53 abc
5	93.3	19.33 cd	0.470	9.09 bc
6	90.7	19.14 cd	0.464	8.88 bc
7	90.7	19.14 cd	0.460	8.80 bc
8	87.6	18.57 d	0.460	8.54 c

* 活力指数 = 发芽指数 × 胚干重。 Vigour index = germination index × embryo dry weight. Values followed by the same letter are not significantly different from each other at p 0.05.

2.2 胚蛋白质含量及多肽组成变化

干种子中不同活力玉米种子萌发时胚的蛋白质含量差异并不显著。在吸胀 1 d 内, 各水平种子蛋白质含量的变化均不大, 且不同活力间的差异不显著。2 d 后, 不同活力种子蛋白含量开始逐渐下降, 其中以 3 d 时高活力种子下降幅度最大, 它与低活力种子差异显著, 而中、低活力种子间无明显差异(图 2)。

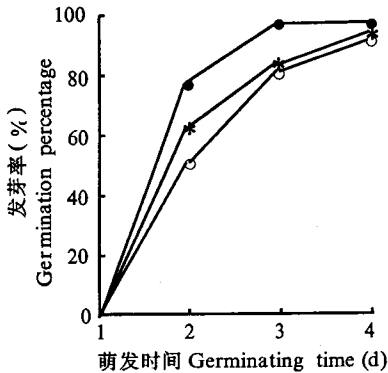


图 1 不同时间老化处理种子发芽变化

Fig. 1 Changes of germination in maize seeds after aging at 42 °C and 85% relative humidity for 4 days(*) and 7 days(○), ●— control
●— 对照; *— 老化 4 d; ○— 老化 7 d

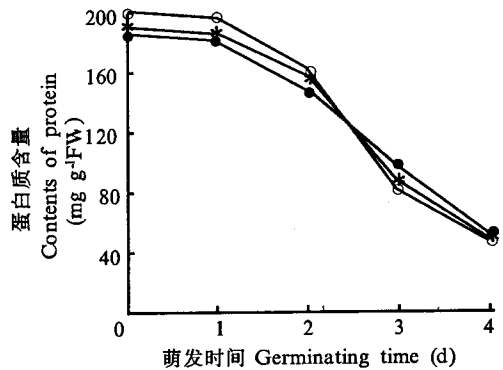


图 2 不同活力玉米种子萌发过程中胚蛋白质含量的变化

Fig. 2 Changes of embryo protein content in maize seeds with different vigours during germination (Symbols ○, ● and * represent seeds with high, low and medium vigours, respectively. Same for Figs 4 and 5.)
○— 高活力; *— 中活力; ●— 低活力
图 4, 5 同

从电泳图谱中可看出(图 3), 吸胀 1 d 后, 高活力玉米种胚贮藏的蛋白质开始出现降解, 而低活力种胚的蛋白谱带与吸胀前基本一致。吸胀 2-3 d 后, 低活力种子胚蛋白才明显降解。吸胀第 4 天后, 高、低活力种胚贮藏的蛋白降解程度趋于一致。

2.3 不同活力种子萌发时的胚蛋白质合成

萌发过程中不同活力玉米胚对 ^{35}S -甲硫氨酸摄入的量不同(图 4)。高活力种胚的摄入量高于中、低活力, 而中、低活力种胚之间在萌发初期无明显差异。高、中活力种胚吸胀后 24 h 均达到最高值, 但其差异较大。低活力种胚摄入量没有明显峰值, 吸胀 12 h 后逐渐下降。从蛋白质合成来看(图 5), 吸胀 36 h 以前, 高活力种胚的蛋白合成速率(^{35}S -甲硫氨酸掺入蛋白质占胚总摄入量的百分率)均高于中、低活力种胚。中、低活力种胚在吸胀 6-18 h 的差异不显著。比较三者的差异, 以吸胀 24 h 为极显著。这也与摄入量的趋势一致。

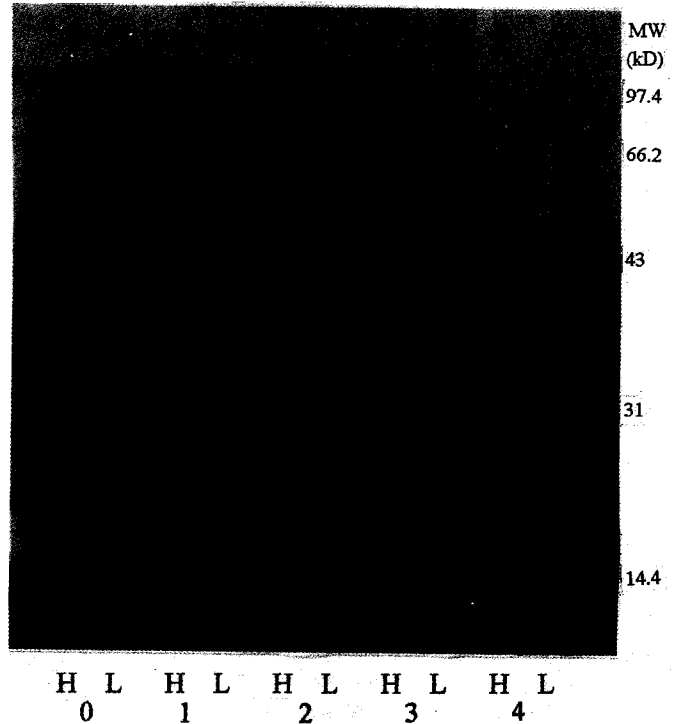


图 3 不同活力种子萌发过程中胚蛋白质的 SDS-PAGE
 Fig. 3 SDS-PAGE of embryo protein during germination in different vigour seeds
 H: High vigour embryo; L: Low vigour embryo
 0,1,2,3,4: 吸胀时间 Imbibition time (d)

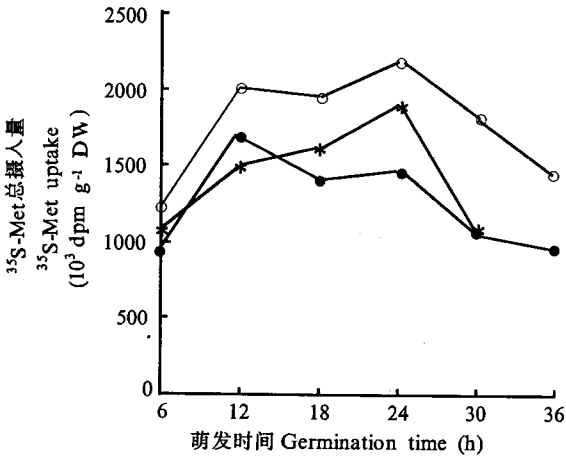


图 4 不同活力玉米种子胚萌发过程中对 ^{35}S -甲硫氨酸的摄入量
 Fig. 4 ^{35}S -Met uptake of maize embryo in different vigour seeds during germination

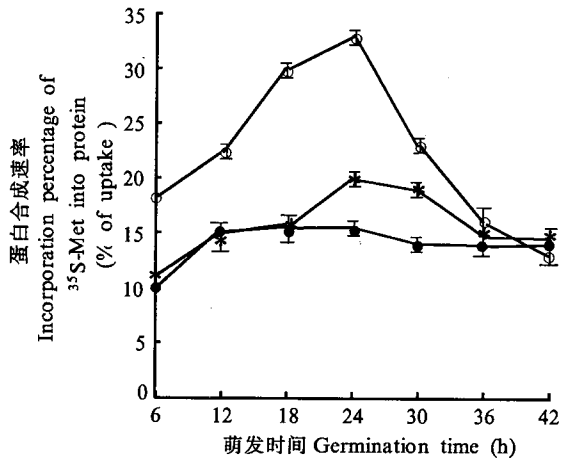


图 5 不同活力玉米种子胚萌发过程中蛋白质合成
 Fig. 5 Protein synthesis of maize embryo in different vigour seeds during germination

3 讨论

蛋白质合成对种子萌发与胚的生长有着极重要的作用。一般认为种子活力与蛋白合成能力有关, 当活力下降时, 蛋白质合成量减少, 蛋白质与酶结构降解^[2]。本实验中萌发期间³⁵S-甲硫氨酸掺入蛋白质占总摄取量的百分率即蛋白质合成速率与活力密切相关, 尤以吸胀后24 h差异显著, 证实了不同活力种子蛋白质合成量的变化与萌发时期有联系。萌发前期蛋白质含量的变化并不明显, 不同活力间的差异不大, 而后期不同活力间蛋白质降解的速率有差异。但从贮藏蛋白质降解的电泳图谱可以看出, 高活力种子吸胀24 h, 胚贮藏蛋白开始出现降解, 而低活力种胚降解不明显, 说明高活力种子蛋白质及时动员为合成新蛋白提供足够的氨基酸。本实验表明种子活力与种子萌发时胚贮藏的蛋白降解效率及新蛋白合成一致, 还表明不同活力的玉米胚吸胀24 h的蛋白质合成能力、贮藏蛋白质降解程度, 可以作为衡量玉米种子活力的生化指标。有关此时期的某些基因表达的差异有待进一步研究。

参考文献

- 1 傅家瑞. 种子生理学. 北京: 科学出版社, 1985
- 2 Abdul-Baki A A. Biochemical aspects of seed vigor. *Hort Sci*, 1980, 15:765-771
- 3 Dell' Aquila A. Wheat seed ageing and embryo protein degradation. *Seed Sci Res*, 1994, 4:293-298
- 4 Halmer P, Bewley J D. A physiological perspective on seed vigour testing. *Seed Sci Tech*, 1984, 12:561-575
- 5 Woodstock L W. Physiological and biochemical tests for seed vigor. *Seed Sci Tech*, 1973, 1:127-157
- 6 Roberts E H. Storage environment and the control of viability. In: Roberts E H ed. *Viability of Seeds*. London, Chapman and Hall, 1972, 14-58
- 7 Rics S K, Everson E H. Protein content and seed size relationship with seedling vigour of wheat cultivares. *Agron J*, 1973, 65:884-886
- 8 李黄金, 黄上志, 傅家瑞. 花生种子活力与贮藏蛋白质降解的关系. *华南植物学报*, 1993, 试刊 I:78-83
- 9 Ghanuham K P S, Gopinathan M C, Babu C R. Electrophoretic variations of protein and enzymes in relation to seed quality. *Seed Sci Tech*, 1985, 13:629-641
- 10 Gidrol X, Noubhani A, Mocquot B et al. Effect of accelerated ageing on protein synthesis in two legume seeds. *Plant Physiol Biochem*, 1988, 26:281-288
- 11 Dell' Aquila A, Spada P. Effects of low and high temperatures on protein synthesis patterns of germinating wheat embryos. *Plant Physiol Biochem*, 1994, 32:65-73
- 12 张斌, 唐锡华. 水稻胚胎发育时期的特异性蛋白质. *植物生理学报*, 1992, 18(1):85-92
- 13 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, 72:248-254
- 14 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227:680