

花生种子活力与贮藏蛋白质降解的关系

李黄金 黄上志 傅家瑞

(中山大学生物系, 广州 510275)

摘 要

花生种子吸胀 2d 后, 子叶中肽链内切酶活性上升, 贮藏蛋白质开始降解。高活力种子肽链内切酶活性在吸胀 2d 后迅速上升, 至 4d 时达到高峰, 而中等活力种子的肽链内切酶活性上升速度缓慢。高活力种子萌发时贮藏蛋白质降解速度高于中等活力种子。中等活力种子经 PEG 和 PUT 处理可提高种子活力, 也促进了种子贮藏蛋白质降解能力的提高。

关键词: 花生种子; 种子活力; 萌发; 贮藏蛋白质降解

种子活力是种子播种质量的重要指标之一。种子在贮藏过程中发生劣变而导致活力下降。对种子活力的生理生化基础已有许多研究⁽³⁾。贮藏蛋白质在种子发育中积累, 其基本功能是为种子萌发和幼苗生长提供营养⁽¹²⁾。种子的蛋白质与种子活力的关系在禾谷类特别是小麦种子中已有许多报道^(4,8,11)。Fox 和 Albrecht⁽⁹⁾报道, 同一小麦品种中高蛋白质含量的种子萌发迅速, 幼苗生长旺盛。Ries 等⁽¹¹⁾后来的工作也证实小麦种子蛋白质含量与幼苗活力及产量呈正相关。我们的工作也表明, 花生种子的蛋白质含量与幼苗活力密切相关(未发表资料)。Ching⁽⁸⁾认为, 种子萌发时贮藏蛋白质的降解为幼苗生长提供能量和营养, 高活力种子应具备酶及细胞器迅速与充分的合成能力。前人的工作只是研究了贮藏蛋白质含量的高低与种子活力的关系, 而对贮藏过程中由于劣变引起活力下降的种子萌发时, 其贮藏蛋白质降解和被利用效率的研究未见报道。本文研究了花生种子活力与贮藏蛋白质动员的关系, 同时探讨了播前处理对提高种子活力和促进贮藏蛋白质降解的作用。

材料与方 法

材料 花生 (*Arachis hypogaea* L.) 粤油 116 种子由广东省农科院经作所花生育种室提供。选取新采收种子作为高活力种子。新采收种子在 35°C 和 95% 相对湿度下老化

* 国家自然科学基金和高等学校博士学科点专项科研基金资助项目;

** 现在“美国伊利生物工程(广州)有限公司”工作

*** 缩写 PEG: 聚乙二醇; PUT: 腐胺

9d, 重新干燥后作为中等活力种子。选取大小和重量一致的种子为试验材料。PEG 和 PUT 预处理参照杨英杰等方法^[1]。

种子萌发和活力测定 种子经 5%NaClO₄ 表面消毒 5min 并用重蒸水冲洗后, 用玻板直立发芽法在 28°C 和黑暗下发芽。测定萌发了 3d 的发芽率和下胚轴至胚根长度, 两者之积作为活力指数。另在规定时间内收集子叶, 去种皮, 在 -20°C 中保存备用。

蛋白质提取和测定 子叶经冰冻干燥后研磨成粉, 按 1: 10 (w/v) 加入预冷正己烷, 在 -20°C 中过夜脱脂, 2500×g 离心 15min。脱脂粉中盐溶蛋白质和花生球蛋白的提取参照 Yamada 等^[13,14]的方法。蛋白质含量按 Bradford^[6]的方法测定。

肽链内切酶提取和活性测定 子叶按 1: 5 (W/V) 加入含 10mmol/L β-巯基乙醇的 20mmol/L 磷酸缓冲液 (PH7.2), 研磨匀浆, 25000×g 和 4°C 下离心 20min。上清液中肽链内切酶活性测定以苯甲酰-L-精氨酸对硝基苯胺 (BAPA) 作底物, 参照 Cameron 和 Memdel^[7]的方法进行。一个酶活性单位定义为 410nm 波长 F 的 O.D. 值每分钟增加 0.001。

结 果

一、不同活力种子萌发时贮藏蛋白质的降解

新采收的种子具有较高的发芽率 (100%) 和活力指数 (4.6), 而经人工老化处理后种子活力下降近 50% (发芽率和活力指数分别为 76% 和 2.4)。图 1 显示了高活力种子 (新采收种子) 和中等活力种子 (人工老化种子) 吸胀后子叶中肽链内切酶活性的变化。结果表明, 高活力种子的肽链内切酶在吸胀后 2d 内其酶活性较低, 吸胀后 2-4d 活性迅速上升, 至 4d 时出现活性峰, 其后仍保持较高的活性水平。而中等活力种子在种子吸胀 2d 以后表现出酶活性持续缓慢上升, 至 12d 仍无明显高峰出现。结果还显示, 高活力种子萌发时, 肽链内切酶活性水平比中等活力种子的高得多。

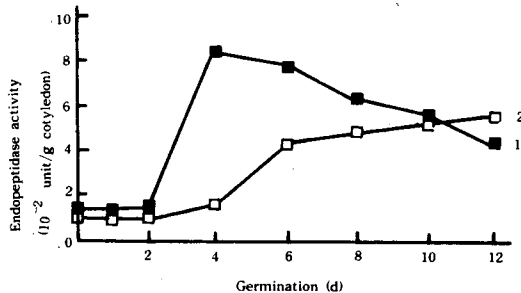


图 1 高活力和中等活力种子萌发时子叶肽链内切酶活性的变化

Fig. 1 Changes in endopeptidase activities in cotyledons of germinating peanut seeds of high-vigor and medium-vigor

1. High-vigor; 2. Medium-vigor

在花生子叶中, 盐溶蛋白质占总蛋白质的 90% 以上, 其中包括花生球蛋白、伴花生球蛋白和 2S 蛋白质。在这些蛋白质中, 花生球蛋白是主要的贮藏蛋白质, 约占 70%。种

子吸胀 2d 后, 高活力种子的盐溶蛋白质和花生球蛋白含量迅速下降, 至 12d 时它们的含量分别下降了 75% 和 95%; 而中等活力种子的盐溶蛋白质和花生球蛋白的降解速度较慢, 至吸胀 12d 时它们的含量分别下降 36% 和 55% (图 2)。

二、PEG 和 PUT 预处理对种子贮藏蛋白质动员的促进作用

中等活力种子经 PEG 和 PUT 预处理后, 种子的活力水平大大提高, 其中尤以 PUT 处理优于 PEG 处理 (表 1)。经 PEG 和 PUT 处理的种子萌发时, 肽链内切酶活性在吸胀后 2—4d 迅速上升, 4—8d 时的活性水平显著高于对照种子 (图 3)。预处理种子萌发时, 子叶中盐溶蛋白质和花生球蛋白也被迅速降解 (图 4)。至吸胀后 12d, 经 PEG 处理种子的盐溶蛋白质和花生球蛋白含量分别下降了 61% 和 84%; 而经 PUT 处理的种子则分别下降了 78% 和 91%; 具中等活力的对照种子在吸胀 12d 时, 这两种蛋白质组分含量分别下降 36% 和 55%。由此可见, PEG 或 PUT 预处理不但提高了种子萌发初期的活力, 同时也促进了贮藏蛋白质动员能力的提高。

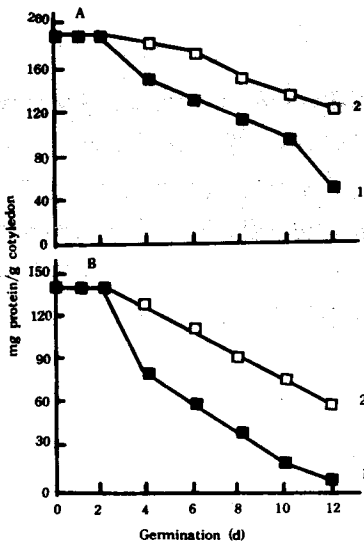


图 2 高活力和中等活力种子萌发时子叶盐溶蛋白质 (A) 和花生球蛋白 (B) 含量变化

Fig. 2 Changes in the contents of salt-soluble proteins (A) and arachin (B) in cotyledons of germinating peanut seeds of high-vigor and medium-vigor

1. High-vigor; 2. Medium-vigor

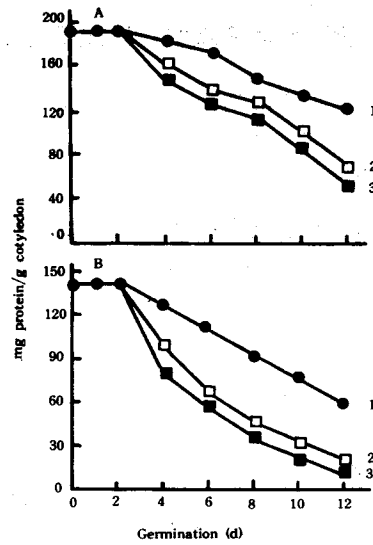


图 4 PEG 和 PUT 预处理对花生子叶盐溶蛋白质 (A) 和花生球蛋白 (B) 降解的影响

Fig. 4 Effects of PEG and PUT pretreatments on degradation of salt-soluble proteins (A) and arachin (B) in the cotyledons of germinating peanut seeds

1. Control (medium-vigor); 2. Pretreated with PEG; 3. Pretreated with PUT.

表 1 PEG 和 PUT 预处理对花生种子活力的影响
Table 1 Effects of PEG and PUT pretreatments on peanut seed vigor

Treatment	Germination (%)	Vigor index	Relative vigor
Control (medium-vigor)	76	2.4	100
PEG (20%)	90	4.0	166
PUT (0.1mmol/L)	95	4.5	188

每处理 40 粒种子, 三次重复

40 seeds in each treatment and three times repeat.

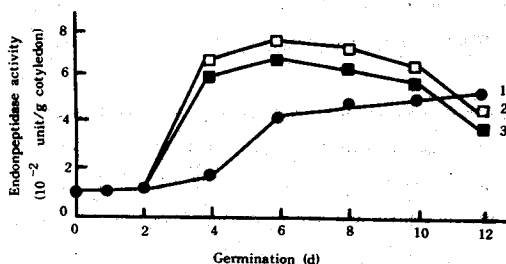


图 3 PEG 和 PUT 预处理对花生子叶肽链内切酶活性的影响

Fig. 3 Effects of PEG and PUT pretreatments on endopeptidase activities in the cotyledons of germinating peanut seeds

1. Control (medium-vigor); 2. Pretreated with PUT; 3. Pretreated with PEG.

讨 论

花生种子的活力水平在种子发育中上升, 至发育后期达最高水平, 种子的活力水平与贮藏蛋白质含量有密切关系^[2]。种子在贮藏过程中发生劣变, 活力水平下降, 劣变种子萌发时贮藏物质的转化效率也随之下降。本研究表明, 高活力种子萌发时贮藏蛋白质动员能力较强, 而劣变种子贮藏蛋白质动员能力下降。在贮藏蛋白质动员中起主要作用的肽链内切酶, 在干种子中活性很低, 被认为是在萌发过程中需要重新合成的酶^[5]。很显然, 该酶的合成涉及到基因表达过程中的每一环节, 因而种子萌发时酶合成的多少及速度与种子活力密切相关。本研究结果显示, 高活力种子萌发时, 子叶中的肽链内切酶活性迅速上升, 出现明显的峰值。劣变种子该酶活性上升速度缓慢, 说明种子劣变后酶合成能力下降。PEG 和 PUT 预处理劣变种子可提高种子的活力。PEG 渗调的作用在于延缓种子的吸水过程, 使劣变种子的细胞膜系统和一些代谢系统得到修复^[10]。PUT 处理则主要促进生物大分子的修复^[1]。因而, PEG 和 PUT 处理提高了子叶中肽链内切酶的合成能力, 使该酶活性提高, 从而促进了贮藏蛋白质的降解和利用。由此可见, 种子萌发过程中贮藏蛋白质动员和利用的效率是种子活力生理生化基础的一个重要方面。

参考文献

- [1] 杨英杰、傅家瑞、刘振声, 萌发花生胚轴中蛋白质、RNA 和 DNA 合成及 PEG 渗调和多胺对其影响。中国油料, 1990, 2: 29—34。
- [2] 黄上志、傅家瑞, 花生种子的发育与贮藏蛋白质的合成和积累。植物生理学报, 1992, 18 (2): 142—150。
- [3] 傅家瑞, 种子生理的研究进展。中山大学出版社, 1987, 64—165。
- [4] Abdul-Baki, A. A., Biochemical aspects of seed vigor. *Hortscience*. 1980, 15 (6): 765—771.
- [5] Andrei, D. S. and I. A. Vaintraub, Degradation of storage proteins in germinating seeds. *phytochemistry*. 1987, 20 (6): 1557—1566.
- [6] Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248—254.
- [7] Cameron, E. C. and M. Memdel, A non-proteolytic “trypsin-like” enzyme. *plant physiol.*, 1971, 48: 278—281.
- [8] Ching, T. M., The physiology and Biochemistry of seed development, dormancy and germination. Elsevier *Biomedical press*, 1982: 487—506.
- [9] Fox, R. L. and W. A. Abrecht, Soil fertility and the quality of seeds *Mo. Agr. Exp. Stat. Res. Bul.*, 1957, 619.
- [10] Fu, J. R., X. H. Lu and R. Z. Chen, et al, Osmoconditioning of peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds with PEG to improve vigour and some biochemical activities. *Seed Sci. & Technol.*, 1988, 16: 197—212.
- [11] Ries, S. K. and E. H. Everson, protein content and seed size relationships with seedling vigor of wheat cultivars. *Agron. J.*, 1973, 65: 884—886.
- [12] Spencer, D. and T. J. V. Higgins, The molecular biology of plant development, Oxford Landon, 1982, 306—336.
- [13] Yamada, T., S. Aibara and Y. Morita, Dissociation—association behaviour of arachin between dimeric and monomeric forms. *Agric. Biol. chem.*, 1979, 43: 2549—2556.
- [14] Yamada, T., S. Aibara and Y. Morita, Accummlation pattern of arachin and its subunits in maturation of groundnut seed. *plant & Cell physiol.*, 1980, 21 (7): 1217—1226.

DEGRADATION OF STORAGE PROTEINS IN GERMINATING PEANUT SEEDS IN RELATION TO SEED VIGOR

Li Huangjin, Huang Shangzhi and Fu Jiarui

(Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract

The endopeptidase activity in high-vigor peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds increased rapidly from the 2nd day to 4th day after imbibition and reached its peak at the 4th day after imbibition, while the endopeptidase activity in medium-vigor seeds increased slowly after imbibition. The contents of salt-soluble proteins and arachin in high-vigor seeds declined more rapidly than those in medium-vigor seeds. pretreatment with PEG and PUT enhanced both the vigor and the degradation rate of storage proteins of deteriorated peanut seeds.

Key Words: peanut seeds; Seed vigor; Germination; Degradation of storage proteins