

不同活力花生种子子叶内肽酶活性及花生球蛋白的降解

宾金华* 傅家瑞

(中山大学生物系, 广州 510275)

摘要 花生种子人工劣变后活力下降, 子叶内肽酶活性降低, 花生球蛋白降解速率减慢, 内肽酶同工酶也发生变化, 种子在劣变过程中可能诱导新内肽酶产生。

关键词 花生; 种子活力; 内肽酶; 同工酶; 花生球蛋白降解

ACTIVITY OF ENDOPEPTIDASE AND DEGRADATION OF ARACHIN IN COTYLEDONS OF GERMINATING PEANUT (*ARACHIS HYPOGAEA* L.) SEEDS OF VARYING VIGOUR

Bin Jinhua Fu Jiarui

(Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract To determine the activity of endopeptidase and the degradation of arachin in cotyledons of varying vigour peanut seeds during germination, the new harvested peanut seeds (as seeds of high vigour) were stored under relative humidity of $95 \pm 1\%$ at 28°C (as seeds of medium vigour) and 40°C (as seeds of low vigour) for 7 days. After the treatment, the vigour index, endopeptidase activity and rate of arachin degradation were reduced. The isoenzyme of endopeptidase also changed. A new isoenzyme exhibited on PAGE in cotyledons of germinating seed of medium vigour on the 3rd to 6th days, and seeds of low vigour on the 6th day. The results showed that the ability of nutrition supply controlled the seed germination, and the endopeptidase played an important role. It was considered that the aging seed synthesises a new endopeptidase isoenzyme in order to accelerate the arachin degradation during seed germination.

Key words Peanut; Germinating seed; Endopeptidase; Isoenzyme; Arachin degradation

种子萌发过程中贮藏蛋白质的动员和利用效率是种子活力生理生化基础的一个重要方面^[1], 内肽酶是这个过程中贮藏蛋白降解的关键性酶^[2,3], 它可能与种子活力密切相关。

种子劣变引起一系列的生理生化变化, 其中不少同工酶也受到影晌^[4]。以往的研究极少注意

国家自然科学基金资助课题

* 现工作单位: 华南师范大学生物系, 广州 510631

1994-11-28 收稿; 1995-05-22 修回

到内肽酶,而且多是着重于内肽酶活性变化。本文研究了种子人工劣变处理后,萌发的子叶内肽酶活性变化及其同工酶所受的影响,以期了解种子劣变的有关实质。

1 材料和方法

材料 供试花生(*Arachis hypogaea* L.)为珍珠豆型的油油71品种,由广东省农科院经济作物研究所提供。

种子劣变处理 取当年采收的春花生种子定为高活力种子。将新采收种子在相对湿度 $95 \pm 1\%$, 28°C 和 40°C 各处理7d的分别定为中等活力种子和低活力种子。

种子萌发 花生种子放在1%次氯酸钠溶液中浸泡10min,蒸馏水冲洗6次后用直立玻板发芽法在 28°C 中暗萌发。在规定时间内取出,记录萌发率,测量下胚轴-胚根长,以两者之积($\text{cm} \times \%$)为活力指数。同时剥取子叶贮存于 -20°C 中备用。一片子叶用于内肽酶活性测定,另一片子叶用于蛋白质含量测定。

内肽酶制备及活性测定 按照黄上志等^[5]的方法制备酶液。按照Harris和Chrispeels^[6]的方法,以苯甲酰-L-精氨酸对硝基苯胺(BAPA)做底物测定内肽酶活性,即1个酶活性单位定义为波长410nm下的OD值每分钟增加0.01。以明胶为底物电泳后检测内肽酶活性按照Jameel等^[7]的方法进行。分离胶浓度为7.5%,明胶最终浓度为0.8%。

蛋白质提取和测定 花生球蛋白提取按照黄上志和傅家瑞^[8],蛋白质测定按照Bradford^[9]的方法进行。

2 实验结果

2.1 不同活力花生种子萌发时活力指数的变化

种子萌发3d后即可看到不同活力种子萌发的明显差别,中等活力种子和低活力种子的活力

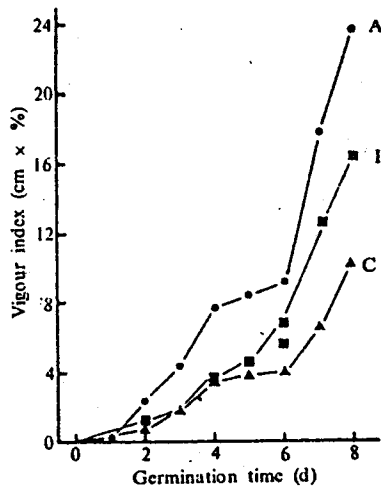


图1 不同活力花生种子萌发时种子活力指数变化
Fig. 1 Changes of vigour index of high(A); medium(B) and low(C) vigour peanut seeds during germination

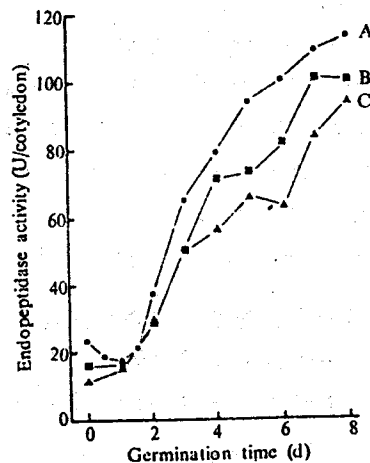


图2 不同活力花生种子萌发时子叶内肽酶活性
Fig. 2 Changes of endopeptidase activity in cotyledons of high(A), medium(B) and low(C) vigour peanut seeds during germination

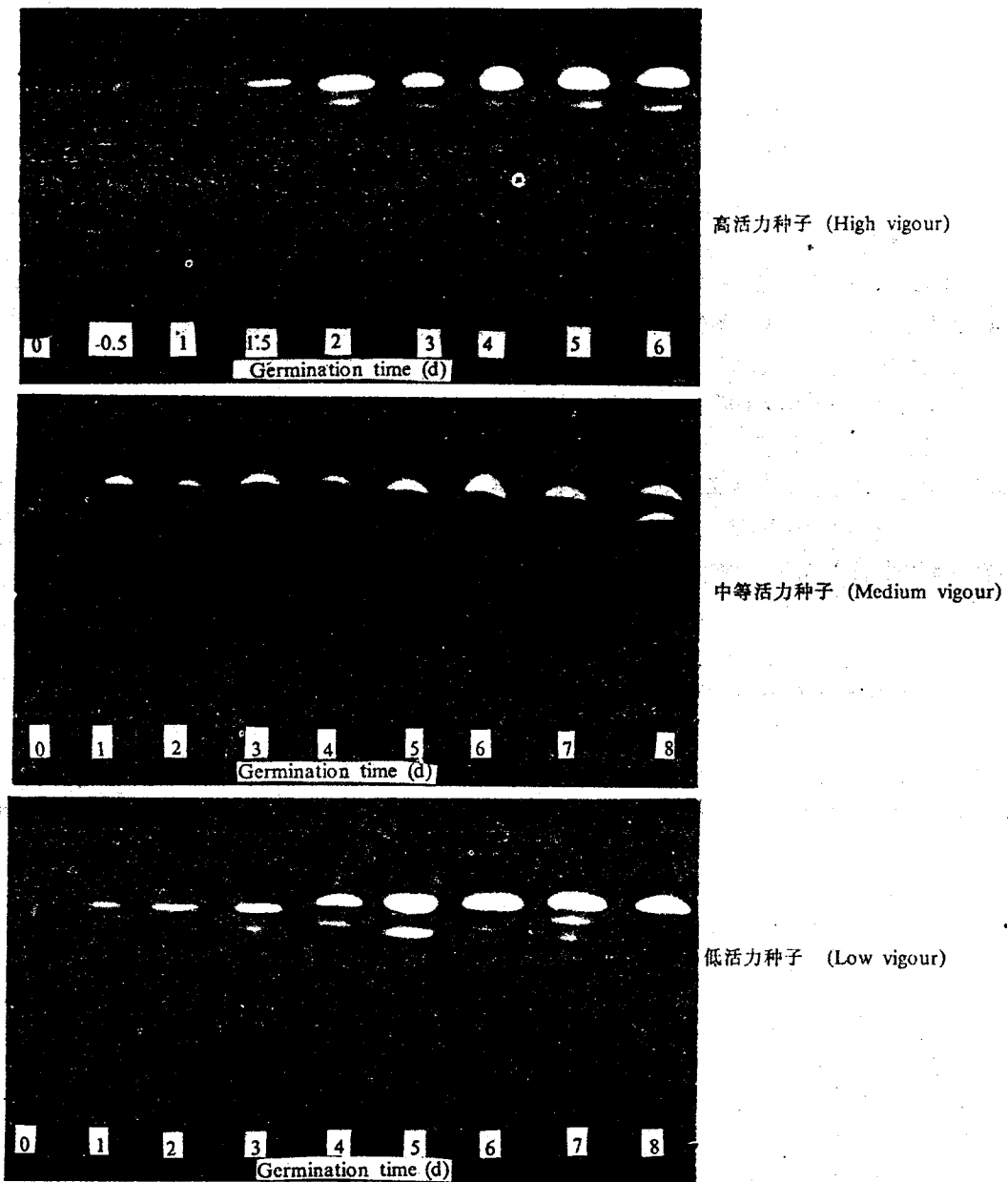


图 3 不同活力花生种子萌发时内肽酶电泳图谱(蛋白/泳道)

Fig. 3 Electrophoretograms of endopeptidase isoenzyme (60mg protein/Lane) of different vigour peanut seeds during germination

差异在 5d 后才逐渐表现出来。萌发 8d 后，三者的活力差异更加显著(图 1)。

2.2 不同活力花生种子萌发时子叶内肽酶活性的变化

劣变后花生子叶中的内肽酶活性明显降低，实验起始时三种活力种子子叶中内肽酶活性即有

差别。萌发1d时高活力种子内肽酶活性稍有降低,然后随着萌发的进程活性逐渐增加。中等活力和低活力种子内肽酶活性的变化趋势基本上与高活力种子的变化趋势一致,但它们的活性依次明显低于高活力种子的酶活性(图2),与种子活力指数变化规律一致。

应用SDS-PAGE检测内肽酶(凝胶中含0.1%十二烷基硫酸钠,电泳后被Triton x-100置换)。谱带变化表明,在未萌发种子中未检测到内肽酶活性,高活力种子萌发0.5-1.5d出现一条酶带,2d出现第2条酶带(图3-A)。中等活力种子萌发1d出现一条酶带,2d出现第2条酶带,3d出现第3条酶带,至7d此酶带消失(图3-B)。低活力种子则在萌发2-3d出现第一条酶带,4-5d出现很弱的第2条酶带,6d出现第3条酶带,活性很弱(图3-C)。

2.3 不同活力花生种子萌发时花生球蛋白的降解

高活力花生种子萌发1d后花生球蛋白即急速降解,萌发3d花生球蛋白已降解至较低水平。种子劣变后降解减慢,至6d花生球蛋白才降至较低水平(图4)。说明轻度劣变(中等活力)即对种子造成严重的伤害,导致生长点无法及时得到养分的供给。

3 讨论

子叶是双子叶种子贮藏营养物质的重要器官。在种子萌发过程中,子叶的贮藏物质降解,供应胚芽和胚根生长。花生是双子叶种子,其内肽酶是在种子发育过程中合成,并贮存于成熟种子子叶中(待发表)。本实验发现劣变影响花生子叶内肽酶活性和花生球蛋白降解速率。萌发时活力指数与子叶内肽酶活性成正比,与花生球蛋白降解速率成反比。高活力种子子叶内肽酶活性高,花生球蛋白降解速率快;低活力种子情景相反。意味着种子活力与内肽酶活性及贮藏蛋白降解密切相关(花生球蛋白是花生贮藏蛋白最主要成分),它们是种子活力生理生化基础重要方面之一。已经证实,种子萌发过程中水解酶活性和养分供应能力影响着种子的萌发^[10-13],发育花生胚也是如此,胚的萌发能力与内肽酶活性成正比^[5]。人工劣变后花生种子的活力指数,内肽酶活性和花生球蛋白降解速率都降低,表明无论是发育花生种子或成熟种子,养分供应能力直接影响到萌发,其中内肽酶可能起重要作用。

种子劣变后一些同工酶的变化已有研究,但有关内肽酶同工酶未见报道。文中劣变对花生子叶内肽酶同工酶也有影响的初步结果显示,劣变很可能诱导花生种子合成新的内肽酶。合成时间与劣变程度有关,中等活力种子在萌发3d出现,低活力种子在萌发6d出现。我们认为此酶的出现是种子为萌发保持高水平水解酶活性而采取的一种“救亡”措施,补充劣变对内肽酶造成的损害。中等活力种子萌发6d后大部分花生球蛋白被降解(图2),此酶完成任务后消失(图3-B)。

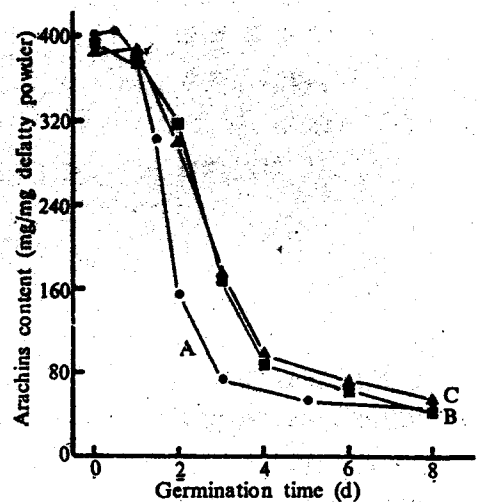


图4 不同活力花生种子萌发时子叶花生球蛋白含量变化
Fig. 4 Changes of arachin content in cotyledons of high(A), medium(B) and low(C) vigour peanut seeds during germination

低活力种子此酶出现时间较迟, 可能是种子蛋白合成能力弱的缘故, 即当劣变严重时, 种子失去自我修复能力, 对此尚需进一步研究和证实。

参考文献

- 1 李黄金, 黄上志, 傅家瑞. 花生种子活力与贮藏蛋白降解的关系. 华南植物学报, 1993, 试刊II: 78-83
- 2 Chrispeels M J, Boulter D. Control of storage protein metabolism in the cotyledons of germinating Mung beans: Role of endopeptidase. *Plant Physiol*, 1975, 55:561
- 3 Shutove A D, Vaitraub I A. Degradation of storage protein in germination seeds. *Phytochem*, 1987, 26:1557
- 4 Priestly D A. Morphological, structural and biochemical changes associated with seed aging. In Priestly A D eds. *Seed aging: Implication for seed storage and persistence in the soil*. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, 1986, 125
- 5 黄上志, 宾金华, 林鹿等. 不同成熟度花生种子胚萌发时子叶中贮藏蛋白质的降解. 植物生理学报, 1993, 19:257
- 6 Harris N, Chrispeel M J. Histochemical and biochemical observation on storage protein metabolism and protein body autolysis in cotyledon of germinating mung bean seeds. *Plant Physiol*, 1975, 56:29
- 7 Jameel S, Reddy V V, Rhodes W G et al. Gel electrophoretic profiles of proteinase in dark-germinated flax seed. *Plant Physiol*, 1984, 76:730
- 8 黄上志, 傅家瑞. 花生种子贮藏蛋白质与活力的关系及其在萌发时的降解模式. 植物学报, 1992, 34:543
- 9 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
- 10 Basha S M M, Cheery J P. Proteolytic enzyme activity and storage protein degradation in cotyledons of germinating peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. *J Agricul Food Chem*, 1978, 26:229
- 11 Bhattachryya S, Sen-Mandi S. Studies into cause of non-germination of aging weed seeds. *Ann Bot*, 1985, 56:475
- 12 Petruzzelli L, Taran G. Wheat aging: the contribution of embryonic and non-embryonic lesion to loss of seed viability. *Physiol Plant*, 1989, 76:289
- 13 Sharma A, Sengupta U K. Changes in protease and α -amylase activity in germinating seeds of groundnut. *Indian J Plant Physiol*, 1987, 30:176