

不同温湿条件下贮藏的3种禾本科植物花粉的一些生理变化

陈良碧^{1,2} 肖辉海² 李要民²

(1. 吉首大学生命科学与化学学院, 湖南 吉首 416000; 2*. 湖南师范大学生命科学学院, 湖南 长沙 410081)

摘要: 测定了水稻、玉米和狼尾草花粉在低温(4℃)低湿(RH 45%), 低温(4℃)高湿(RH 90%), 高温(35℃)低湿(RH 45%)和高温(35℃)高湿(RH 90%) 4种贮藏条件下的蛋白酶活性, 蛋白质含量, 游离氨基酸含量的变化, 结果表明: 在低温高湿条件下, 蛋白质降解和游离氨基酸含量上升慢; 在高温条件下蛋白质降解快, 游离氨基酸含量迅速上升。3种植物花粉中, 水稻花粉蛋白酶活性强, 在贮藏过程中蛋白质降解速率和游离氨基酸含量上升快; 狼尾草花粉蛋白酶活性低, 在贮藏过程中蛋白质降解速率和游离氨基酸含量上升慢; 玉米花粉的蛋白酶活性、蛋白质降解速率和游离氨基酸含量上升速率居两者之间。

关键词: 水稻; 玉米; 狼尾草; 花粉; 蛋白质; 氨基酸

中图分类号: Q945

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2003)03-0236-05

Changes in Proteinase Activity, Proteins and Amino Acids Contents in Three Species of Grass Pollens Stored under Different Temperature and Humidity Conditions

CHEN Liang-bi^{1,2} XIAO Hui-hai² LI Yao-min²

(1. College of Life Science and Chemistry, Jishou University, Jishou 416000, China;

2*. College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: The pollens of rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*) and *Pennisetum alopecuroides* were stored under low temperature (4℃) /low humidity (RH 45%), low temperature (4℃) /high humidity (RH 90%), high temperature (35℃) /low humidity (RH 45%) and high temperature (35℃) /high humidity (RH 90%) to determine the changes in proteinase activity, contents of proteins and free amino acids in the pollens. The results showed that the degradation of protein and the increase of the content of free amino acids were slow under low temperature and high humidity, but it was rapid under high temperature. Among the pollens of the three species, proteinase activity in rice pollen was high, and the degradation of protein contents and the increase of free amino acids were rapid. However, proteinase activity in pollen of *Pennisetum alopecuroides* was low, and the changes in protein content and free amino acids were slow. These changes in maize were intermediate between the above two species.

Key words: Rice; Maize; *Pennisetum alopecuroides*; Pollen; Protein; Amino acids

在植物杂交育种和杂种优势利用中都需要进行人工授粉。花粉活力是影响人工授粉结实率的重要因素。延长花粉寿命的贮藏措施的研究无论在理论上还是在应用上都是一个极其重要的课题。二细

胞型花粉由1个营养细胞和1个生殖细胞组成, 花粉萌发后生殖细胞在花粉管中分裂成2个精细胞, 这类花粉寿命较长。三细胞型花粉由1个营养细胞和2个精细胞组成, 花粉寿命不如二细胞型花粉

收稿日期: 2002-10-22 接受日期: 2003-03-11

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(3258)

* 通讯单位 Corresponding address

长,特别是三细胞型花粉中大多数禾本科植物花粉寿命相对更短^[1]。如水稻花粉在田间10 min后就几乎全部失去萌发能力;玉米花粉寿命仅为24 h左右,但同属禾本科植物的狼尾草花粉寿命则较长^[2]。研究表明,35℃高温是导致水稻、玉米、狼尾草花粉活力迅速下降的重要因素,干燥对延长这3种花粉的寿命不利,低温和高湿有利于延长花粉寿命^[3]。本文对不同温度和湿度条件下贮藏的花粉中蛋白质、可溶性氨基酸含量的变化以及蛋白酶活性的变化进行了比较分析,旨在进一步了解花粉活力下降的原因,为研究延长花粉寿命的贮藏技术提供参考。

1 材料和方法

实验材料 水稻(*Oryza sativa* L.)品种浙辐802;玉米(*Zea mays* L.)品种单加二号;狼尾草(*Pennisetum alopecuroides* (L.) Spreng.)品种香蒲状狼尾草。

蛋白质含量的测定 用考马斯亮蓝染料结合法测定^[4]。称取花粉20 mg,加入2 ml 0.02 mol/L磷酸缓冲液(pH7.0)匀浆,在1 000×g下离心15 min,在提取液中加入2 ml染料,用分光光度计测定A₆₂₀,以蒸馏水加染料为对照,从标准曲线查得蛋白质含量。

游离氨基酸测定 采用高压液相色谱法^[5,6]。取花粉100 mg,加3 ml 80%酒精研磨,过滤,取200 μl滤液加入50 μl新配制的衍生剂(PTTC:乙醇:三乙胺:水=1:7:1:1)充分搅拌后,室温放置20 min,用真空干燥泵抽干后加样品稀释液100 μl,使其溶解,在5 000×g下离心15 min,取上清液40 μl进样,用高压液相色谱仪进行氨基酸组成分析。

蛋白酶活性测定 用酪氨酸与Folin-酚试剂反应法测定^[7,8]。取200 mg花粉,用2 ml酶提取液匀浆,分别用3 ml酶提取液洗涤匀浆器两次,合并洗液和残渣,在1 000×g下离心10 min,上清液即为粗酶液。在试管中加入5 ml 2%牛血清蛋白溶液,25℃水浴中预热10 min,加入2 ml粗酶液(25℃下预热5 min)摇匀,25℃下保温60 min,加10 ml 5%三氯乙酸溶液,在室温下放置30 min,过滤,滤液作比色用。对照为粗酶液2 ml,加入10 ml 5%三氯乙酸溶液和5 ml 2%牛血清蛋白溶液,摇匀后在25℃下保温60 min,在室温下放置30 min后过滤。取5 ml滤液及10 ml 0.5 mol/L NaOH溶液,再加3 ml已稀释的Folin-酚试剂摇匀,室温下放置5-10 min。以

对照溶液为空白,在680 nm波长下测定光密度值,从酪氨酸标准曲线中找出相应的酪氨酸的微摩尔数,蛋白酶活力以水解产生的酪氨酸含量来表示。

花粉收集与贮藏 在上午盛花时,用具冷藏室的采花机^[9]收集花粉。将采收的花粉分别贮藏于低温(4℃)低湿(RH 45%),低温(4℃)高湿(RH 90%),高温(35℃)低湿(RH 45%),高温(35℃)高湿(RH 90%)4种条件下。

2 结果

2.1 蛋白酶活性变化

新鲜水稻花粉的蛋白酶活性高于玉米花粉和狼尾草花粉。在高温贮藏条件下,水稻花粉中蛋白酶的活性呈下降趋势,玉米花粉、狼尾草花粉蛋白酶活性先升高,后下降,高温高湿条件下贮藏3 d后因花粉霉变而没有继续测定蛋白酶活性。在低温条件下狼尾草花粉蛋白酶活性呈缓慢下降趋势,贮藏4-5 d的水稻、玉米花粉蛋白酶活性略有上升,然后逐渐下降(表1)。

花粉在贮藏过程中蛋白酶活性升高可能是原有蛋白酶的活性增强,或在花粉中有新合成的蛋白酶,且这种变化是否是花粉在丧失活力前的一种特征性代谢紊乱,还需进一步研究。

2.2 蛋白质含量的变化

新鲜水稻花粉的蛋白质含量最低,狼尾草花粉最高,玉米居中。花粉蛋白质含量都随贮藏时间延长而减少(表2)。高温下含量下降的速率大于低温下的,以低温高湿条件下下降的幅度最少,高温高湿条件下贮藏3 d后因花粉霉变而没有继续测定其蛋白质含量变化。贮藏8 d,水稻花粉的蛋白质含量下降率最大,玉米花粉次之,狼尾草花粉的最小。

2.3 游离氨基酸含量的变化

从表3可见,新鲜花粉中,水稻花粉的游离氨基酸含量最高,玉米花粉次之,狼尾草花粉最低。在贮藏期间,3种植物花粉中游离氨基酸含量呈现上升趋势,但不同植物在不同贮藏条件下的变化规律有所不同。水稻花粉贮藏1 d后游离氨基酸含量迅速升高,其中以高温低湿条件下游离氨基酸含量最高,低温条件下花粉中游离氨基酸含量逐渐升高,且低温低湿条件下比低温高湿条件下略高;高温条件下游离氨基酸含量以第3天达到最高,而第5天则下降。玉米花粉在4种温湿条件下游离氨基酸含

表 1 贮藏过程中花粉蛋白酶活性变化
Table 1 Change in proteinase activity in pollen during storage ($\mu\text{mol Tyr g}^{-1} \text{FW h}^{-1}$)

材料 Material	温度 T(°C)	湿度 RH(%)	贮藏时间 Storage time (d)							
			0	1	2	3	4	5	6	8
水稻 Rice	4	45	11.65	10.30	9.02	9.50	10.63	9.72	7.14	5.63
	4	90		9.87	8.62	9.30	10.52	9.63	7.25	5.76
	35	45		7.43	4.32	1.76				
	35	90		7.62	4.57	1.87				
玉米 Maize	4	45	7.07	6.50	5.87	5.13	6.55	6.32	4.40	2.31
	4	90		6.42	5.81	4.90	6.05	5.12	4.52	2.63
	35	45		7.63	8.24	6.35	4.86	2.23	1.07	0.00
	35	90		7.52	8.08	6.57				
狼尾草 <i>Pennisetum alopecuroides</i>	4	45	4.50	4.30	4.15	3.92	3.75	3.52	3.43	3.72
	4	90		4.25	4.10	3.95	3.68	3.42	3.30	3.64
	35	45		4.73	4.95	5.14	5.32	4.86	4.43	3.94
	35	90		4.67	4.87	5.15				

表 2 贮藏过程中花粉蛋白质含量变化
Table 2 Change in protein content in pollen during storage ($\text{mg g}^{-1} \text{FW}$)

材料 Material	温度 T(°C)	湿度 RH(%)	贮藏时间 Storage time (d)								下降率* Decreasing %
			0	1	2	3	4	5	6	8	
水稻 Rice	4	45	85.8	77.1	73.2	70.8	69.0	66.5	62.7	58.9	31.4
	4	90		78.7	75.6	73.7	71.0	69.8	66.7	61.0	28.9
	35	45		58.7	52.0	45.7	40.6	32.8	21.5	16.5	80.8
	35	90		59.2	53.3	43.2					
玉米 Maize	4	45	107.3	97.8	97.0	90.3	87.5	86.8	85.0	82.3	23.6
	4	90		98.3	97.9	91.6	88.4	87.2	86.3	84.5	21.3
	35	45		78.2	73.2	64.3	61.6	56.2	52.5	48.0	55.3
	35	90		78.5	73.5	65.6					
狼尾草 <i>Pennisetum Alopecuroides</i>	4	45	125.0	118.6	116.0	111.5	110.4	108.3	106.3	101.2	19.9
	4	90		119.1	117.3	111.4	111.2	109.3	105.6	102.1	18.8
	35	45		109.2	102.5	98.0	87.6	81.4	76.0	70.3	43.8
	35	90		109.4	105.0	99.3					

* 为第 8 天蛋白质含量比新鲜花粉下降的百分率。% of reduced protein contents in pollen at the eighth day of storage compared to the day before storage.

量都呈上升趋势, 其中低温高湿条件下上升最缓慢, 高温低湿条件下上升速度最快。狼尾草花粉在 4 种贮藏条件下游离氨基酸也呈逐渐上升趋势, 但与玉米和水稻相比, 上升幅度最小。

3 种植物新鲜花粉中能检测出的游离氨基酸共计 16 种, 其中脯氨酸含量最高, 占游离氨基酸总量的 40% 左右; 在贮藏过程中游离氨基酸总量的增加主要是由脯氨酸增加造成的, 表明花粉中存在脯氨酸库。在新鲜花粉中丙氨酸含量最少, 但在贮藏期间丙氨酸含量迅速增加。

3 讨论

人们先后研究了以溶液贮藏^[10]、超低温贮藏^[11]、不同气体贮藏^[12]、不同温湿条件对花粉活力的影响,

获得了一些延长花粉寿命的有效措施。例如, 在 -196°C 的液氮中贮藏的水稻花粉, 52 d 后仍具授粉能力^[11], 但这一方法要求苛刻, 不适于大量贮藏花粉。在低温和相对湿度高的条件下贮藏 6 d, 花粉在柱头上的萌发率仍达 11%^[3], 这种方法虽然维持花粉活力的时间相对较短, 但适于批量贮藏。本文对 3 种禾本科植物花粉在不同温湿条件下贮藏的蛋白质、氨基酸含量和蛋白酶活性的研究表明: 高温低湿贮藏的花粉蛋白质降解快, 低温高湿贮藏的降解慢, 进一步证明了低温高湿是有利于延长供试植物花粉寿命的贮藏条件。本文的 3 种植物花粉寿命以水稻花粉最短, 玉米花粉次之, 狼尾草花粉最长, 花粉中蛋白酶的活性与贮藏过程中蛋白质降解的速度之间有相关性。由此表明花粉中蛋白酶活性强

表3 花粉在贮藏过程中的游离氨基酸含量变化
Table 3 Changes in free amino acid contents in pollen during storage (mg g⁻¹ FW)

材料 Material	氨基酸 Amino acid	0**	A*			B			C			D	
			1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3
水稻 Rice	天冬氨酸 Asp	1.50	1.55	1.68	1.71	0.52	1.64	1.93	1.72	1.73	1.70	1.67	-
	丝氨酸 Ser	0.89	0.94	1.20	1.12	0.82	0.93	0.90	1.13	1.52	1.36	1.48	-
	甘氨酸 Gly	1.06	1.10	1.20	1.25	1.13	1.20	1.41	1.32	1.43	1.24	1.36	-
	精氨酸 Arg	2.30	2.50	3.25	3.22	2.40	3.10	3.23	2.70	2.40	2.60	3.40	-
	丙氨酸 Ala		1.25	1.80	1.75	1.16	1.35	2.02	1.56	1.53	1.27	1.03	-
	脯氨酸 Pro	8.60	13.00	14.10	14.50	13.10	14.10	14.80	12.80	13.60	8.20	12.90	-
	酪氨酸 Tyr	1.40	2.60	2.50	3.10	2.57	2.90	2.60	3.50	4.70	6.60	2.30	-
	缬氨酸 Val	1.20	2.10	2.60	3.40	2.16	2.50	2.80	2.90	2.10	1.80	2.20	-
	总量 Total	16.95	25.04	28.30	30.50	23.86	27.72	29.69	27.63	29.01	24.77	26.35	-
玉米 Maize	天冬氨酸 Asp	0.99	3.00	3.50	3.60	2.51	2.80	0.87	0.98	1.20	1.24	0.85	1.50
	丝氨酸 Ser	2.10	2.00	3.90	4.40	2.40	3.60	5.70	0.95	6.30	7.20	2.20	6.20
	甘氨酸 Gly	0.66	0.23	0.94	0.96	0.40	0.85	0.96	1.32	1.22	1.35	1.10	1.00
	精氨酸 Arg	0.60	1.70	1.00	2.00	1.70	1.40	3.00	1.20	4.40	4.15	4.10	7.90
	丙氨酸 Ala							0.66	1.90	1.00	1.10	1.40	1.70
	脯氨酸 Pro	7.00	13.00	13.70	14.30	13.50	13.10	12.60	16.80	18.70	22.30	14.60	16.60
	酪氨酸 Tyr	1.20	1.10	3.60	3.48	0.97	1.00	2.64	4.70	5.00	4.70	4.40	5.20
	缬氨酸 Val	0.51	0.41	0.46	1.08	0.36	0.52	0.84	2.20	2.30	1.90	1.70	1.80
	总量 Total	13.06	21.44	27.10	29.82	21.84	23.27	27.27	30.05	40.12	43.94	30.35	41.90
狼尾草 <i>Pennisetum alopecuroides</i>	天冬氨酸 Asp	0.95	0.97	1.08	1.12	0.95	9.80	1.13	1.26	1.54	1.73	1.20	1.42
	丝氨酸 Ser	0.65	0.66	0.70	0.73	0.68	0.67	0.72	0.83	0.69	1.10	0.82	0.13
	甘氨酸 Gly	0.71	0.75	0.87	0.83	0.73	0.72	0.85	0.96	1.20	1.63	1.04	1.15
	精氨酸 Arg	0.70	0.80	0.82	0.78	0.75	0.78	0.83	1.05	1.05	1.42	1.12	1.20
	丙氨酸 Ala		0.55	0.76	0.91	0.47	0.54	0.57	0.62	0.67	0.85	0.58	0.63
	脯氨酸 Pro	5.20	7.20	8.70	10.40	8.30	9.40	11.00	10.60	12.70	13.30	9.60	12.50
	酪氨酸 Tyr	1.70	2.34	2.15	2.30	2.20	2.30	2.16	2.50	2.70	3.40	2.34	2.62
	缬氨酸 Val	1.60	1.70	1.73	1.73	1.66	1.64	1.65	1.83	2.46	7.60	1.75	2.10
	总量 Total	11.51	14.97	16.81	18.76	15.74	25.85	18.91	19.65	23.28	31.03	18.45	21.57

* A: T=4°C, RH=45%; B: T=4°C, RH=90%; C: T=35°C, RH=45%; D: T=35°C, RH=90%. ** 贮藏时间 Storage time: 0 d, 1d, 3 d, 5 d.

弱,蛋白质降解速度快慢可能是影响花粉寿命的关键内因之一。因此,在花粉贮藏中蛋白质降解速度可作为重要的考察指标,且新鲜花粉蛋白酶活性高的水稻花粉更应将蛋白质含量作为花粉贮藏的重要生理指标。采用物理或化学方法抑制花粉中蛋白酶活性,可能是今后花粉贮藏研究中值得重视的一个方面。

水稻、玉米、狼尾草虽同属禾本科植物,但花粉寿命相差较大,导致这种差异的原因除了它们的花粉壁结构的差异外^[1],生理代谢差异可能是其重要原因。有研究表明水稻花粉中促进生长的 GA₃ 含量高,而与提高植物抗逆能力有关的 ABA 含量低^[4];水解酶活性强,呼吸速率高^[5],这些生理特点使水稻花粉具有较强的代谢速率,这对于花粉在柱头上快速萌发是有利的,但这也可能是花粉寿命较短的原因。因此,这类花粉的贮藏,关键是降低其代谢速率,特别是降低花粉中蛋白质等物质的降解速率,又不产生生理伤害,解除贮藏条件后花粉又能恢复较强活力和较高的花粉萌发率。到目前为止,还没

有一种理想的大批量贮藏水稻花粉的技术,攻克该技术对于解决杂交水稻制种时花期不遇,以及在发达国家推广机械化制杂交种子都是十分有利的。

参考文献

- [1] Kartha K K. Cryopreservation of Plant Cells and Organs [M]. Florida: CRC Press, 1985.
- [2] Zhao S X (赵世绪). Crop Embryology [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 1982. 50-52. (in Chinese)
- [3] Li Y M (李要民), Chen L B (陈良碧). Vigor change of several grasses pollen stored in different temperature and humidity conditions [J]. Plant Physiol Comm (植物生理学通讯), 1998, 34(1): 35-37. (in Chinese)
- [4] Zhang Z L (张志良). Experimental Instruction of Plant Physiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 1990. 165-170. (in Chinese)
- [5] Birdlignmeyer B A, Cohen S A, Tarivn T L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization [J]. J Chromatogr, 1984, 336(12):98-102.
- [6] Chen P (陈平), Liang S P (梁宋平). A method for complete amino acid analysis of proteins and peptides by reverse-phase high-performance liquid chromatography through hydrolysis in a microcapillary tube [J]. Chin Biochem J (生物化学杂志), 1996,

- 12(1):112-114. (in Chinese)
- [7] Huang X L(黄学林), Chen R Z(陈润政). Seed Physiology — A Laboratory Manual [M]. Beijing: Agriculture Press, 1990. 112-113. (in Chinese)
- [8] Teaching Group of Biochemistry, Department of Biology, Beijing Normal University(北京师范大学生物系生物化学教研室). Experiment of Basic Biochemistry [M]. Beijing: Higher Education Press, 1982. 142-145. (in Chinese)
- [9] Li X Z(李训贞), Zhou G Q(周广洽), Chen L B(陈良碧). Effects of mechanical collection and pollination of rice pollen on the vigor and seed set in hybridization [J]. Acta Agron Sin (作物学报), 1996, 22(3):353-358. (in Chinese)
- [10] Liu W L(刘武林), Cao Z X(曹宗巽). Germination, respiration and fertility of pollen of *Prunus persica* and *Malus pumila* during storage in some organic solvents [J]. Acta Phytophysiol Sin (植物生理学报), 1984, 10(3):277-283. (in Chinese)
- [11] Hu J(胡晋), Guo C G(郭长根). Studies on the cryopreservation (-196°C) of pollen of restoring line in hybrid rice [J]. Acta Agron Sin (作物学报), 1996, 22(1):72-77. (in Chinese)
- [12] Wang J X(王金祥), Chen L B(陈良碧). Changes of vigor and respiratory rate of three kinds of grasses pollen stored under different gas conditions [J]. Plant Physiol Comm (植物生理学通讯), 2001, 37(2):113-116. (in Chinese)
- [13] Fu J H, Lei L G, Chen L B. Wall ultrastructure and cytochemistry and the longevity of pollen of three species [J]. Aust J Bot, 2001, 49:771-776.
- [14] Wang J X(王金祥), Chen L B(陈良碧), Fu J H(傅建华). The comparison of the contents of phytohormone and vitamin in pollens of rice, maize and Chinese *Pennisetum* [J]. Acta Sci Nat Univ Norm Hunan (湖南师范大学自然科学学报), 1999, 22(2):81-84. (in Chinese)
- [15] Wang J X(王金祥), Chen L B(陈良碧), Pan R C(潘瑞炽). Changes in phytohormone and vitamin contents and respiratory rate in pollens of rice, maize and Chinese *Pennisetum* stored at low temperature [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2000, 8(3):245-249. (in Chinese)

欢迎订阅 2004 年《植物资源与环境学报》

"中国期刊方阵"双效期刊 "江苏期刊方阵"优秀期刊

季刊, 单价 6 元, 邮发代号: 28-213, 统一刊号: CN32-1339/S

《植物资源与环境学报》系江苏省·中国科学院植物研究所、江苏省植物学会及中国环境科学学会植物园保护分会联合主办的学术刊物, 国内外公开发行。本刊为 BA、CA、CAB、中国生物学文摘、中国林业文摘、中国环境科学文摘、中国科学引文数据库、万方数据—数字化期刊群、中国学术期刊(光盘版)和中文科技期刊数据库等国内外著名刊库收摘。本刊围绕植物资源与环境两个关系国计民生的中心命题, 报道我国植物资源的考察、开发利用和植物物种多样性保护, 自然保护区与植物园的建设和管理, 植物在保护和美化环境中的作用, 环境对植物的影响以及与植物资源和植物环境有关学科领域的原始研究论文、研究简报和综述等。凡从事植物学、生态学、自然地理学以及农、林、园艺、医药、食品、轻化工和环境保护等领域的科研、教学、技术人员及决策者, 可以从本刊获得相关学科领域的研究进展和信息。

本刊于 1992 年创刊, 全国各地邮局发行, 若错过征订时间或需补齐 1992-2003 年各期者, 请直接与编辑部联系邮购, 订价 1992-1993 年每年 8 元, 1994-2000 年每年 16 元, 2001-2004 年每年 24 元(均含邮资)。编辑部地址: 南京中山门外江苏省·中国科学院植物研究所内, 邮编: 210014, 电话: 025-4347016; Fax: 025-4432074; Email: nbjgxx@jlonline.com 或 zwzy@mail.cnbg.net。