

文章编号: 0529-6579 (2000) 04-0080-05

花生种子活力与贮藏蛋白和 rRNA 完整性关系^{*}

傅家瑞, 黄上志, 李黄金, 郑小红
(中山大学生物科学与技术学系, 广东 广州 510275)

摘 要: 以花生 (*Arachis hypogaea*) 种子为材料, 探讨了不同活力花生种子在发育中合成与积累贮藏蛋白的能力, 在萌发中贮藏蛋白的降解动员能力, 以及肽键内切酶 (主要的蛋白酶) 活性的变化, 阐明这些生物活动反映种子活力高低. 同时还研究了在蛋白合成中起重要作用的 rRNA, 阐明它的完整性也随种子活力而变化.

关键词: 花生 (*Arachis hypogaea*); 种子活力; 贮藏蛋白的合成与降解; 肽键内切酶; rRNA 完整性

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A

种子播种质量的最基本的组成是种子活力, 通常在生理成熟期达到高峰^[1]. 种子质量是在种子发育过程中形成, 在萌发中表现, 是在种子活力基础上的综合体现. 黄上志及傅家瑞^[2]认为在花生 (*Arachis hypogaea*) 种子发育过程中所合成与积累的贮藏蛋白是种子质量的主要物质基础. 随着合成和积累, 种子活力不断提高. 萌发中活力的表现在于贮藏蛋白的降解动员能力, 早期降解的关键酶是内切酶, 它的活性受制于种子活力. 这是幼苗生长的基础. 应用反映幼苗生长能力的复合活力指数, 更能反映活力的真实情况^[2].

在种子吸胀后, rRNA 及膜进行修复, 而 rRNA 的完整性与蛋白质合成能力密切相关^[3]. 所以 rRNA 损伤程度也是质量评估的一个有效的指标^[4]. 因此, 本文从花生 (*Arachis hypogaea* L.) 种子贮藏蛋白的合成与降解连系到种子活力, 同时也初步探明不同活力的种子 rRNA 的组分与完整性.

1 材料与方法

1.1 材 料

花生品种“粤油 116”, 开花后挂牌标记果针入土时间, 按规定天数收集第 1 侧枝上第 1 和第 2 节的花生荚果, 并根据荚壳形态和色泽选取发育一致的样品. 在成熟种子中按质量大小分为 5 级, 并分别测定各级种子的各种蛋白质含量以及复合活力指数. 5 个级别的每粒质量分别为: 675~725、575~625、475~525、400~450、300~350 mg.

^{*} 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (960068)

收稿日期: 1999-08-20; 作者简介: 傅家瑞 (1925~), 男, 教授, 博士生导师.

另外, 在一年前采取并贮藏在干燥器中置室温下的花生种子作为中等活力种子样品。

1.2 种子发芽和活力测定

萌发试验采用玻板直立发芽法, 每板 10 粒种子, 4 次重复。在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒暗中萌发 72 h, 计算发芽率, 测定下胚轴和胚根长度。另取种子 40 粒, 播种于盛珍珠岩的盆中, 在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 和 12 h 光/12 h 暗的生化培养箱中生长 14 d。培育期间用蒸馏水浇淋, 保持珍珠岩湿润。14 d 后测定幼苗鲜重和出苗率, 以两者之积 (复合活力指数) 表示种子的活力^[2]。

1.3 蛋白质的提取与测定

花生子叶经冰冻干燥后研磨成粉, 按每克子叶加入 10 mL 正己烷研磨, 置于 -20°C 中过夜脱脂, 离心 ($4\,000\text{ r/min}$, 10 min) 倾去正己烷后风干得脱脂粉。参照 Yamada 等 (1980) 的方法提取脱脂粉中的盐溶蛋白质。用含 ρ 为 10% NaCl、1 mmol/L PMSF 和 10 mmol/L β -巯基乙醇的 10 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.9) 研磨匀浆, 在 4°C 中提取 3 h, 然后在 4°C 中 $20\,000\times g$ 离心 30 min。上清液为盐溶蛋白质提取液。残渣中的蛋白质参照 Basha (1979) 的方法, 用 1 mol/L NaOH 溶液提取, 以 Follin 酚法 (Lowry et al, 1951) 测定蛋白质含量。为测定各类花生贮藏蛋白用固体硫酸铵加入盐溶蛋白质提取液进行分级沉淀 (Mosse & Pernoller, 1982)。0~40% 饱和度下沉淀的为花生球蛋白; 40%~65% 饱和度下沉淀的为伴花生球蛋白 I; 65%~85% 饱和度下沉淀的为 2S 球蛋白。这些蛋白质的含量均按 Bradford (1976) 采用考马斯兰法测定。总蛋白质为残渣和盐溶两部分蛋白质含量之和。

1.4 肽链内切酶制备及活性测定

按照黄上志等 (1993) 的方法制备酶液。以 BAPA 为底物测定 BAPase 活性参照 Cameron 和 Mazelis (1971) 的方法。以波长 410 nm 下的测定吸光度, 每 min 增加 0.001 为 1 个酶活性单位。

1.5 rRNA 的提取及测定

按吴少伯等 (1981) 的方法, 提取总 RNA 是采用 Tris-HCl-酚-SDS-皂土法。0.5 g 花生胚轴在 5 mL 提取缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, $\rho=1\%$ SDS, 25 mmol/L MgCl_2) 和等体积 90% 酚液 (用饱和的提取缓冲液) 中匀浆, 匀浆液振荡 10 min, 在 $10\,000\times g$ 离心 10 min, 水相再用等体积酚液提取 2 次, 最后一次的水相加 NaCl 至 2 mol/L, 加 2 倍体积 $\varphi=95\%$ 冷乙醇在 $-10\sim-15^\circ\text{C}$ 下, 离心沉淀得 RNA。

用 ρ 为 2.4% 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳法测定 rRNA。灌胶时先用 $\rho=7.5\%$ 凝胶制成 2 cm 高的圆柱, 待其聚合完全后, 再在 37°C 下灌入 $\rho=2.4\%$ 凝胶, 聚合 45 min, 加入 RNA 样品液 50 μL , 继续电泳 2~3 h。电泳后, 取出凝胶, 在 1 mol 醋酸中固定 30 min, 然后在日本岛津 CS-910 双波长薄层扫描仪 260 nm 波长下扫描。

2 结果与分析

2.1 贮藏蛋白合成与种子活力关系

随着贮藏蛋白的合成与积累, 花生种子复合活力指数迅速提高 (图 1)。花生种子发育过程中子叶中蛋白质合成与积累有 2 个迅速增加阶段, 一个在 20~40 DAP (果针入土天数), 此时种子干质量可达最大干质量的 50%, 发芽率达到 100%, 但复合活力指数却较低, 仅为最大值的 28%。第 2 个迅速生长期是在 44~62 DAP, 贮藏蛋白积累迅速, 然后

进入缓慢积累过程直至 88 DAP. 在 88 DAP 种子中, 复合活力指数达到最大值, 即种子在暗处萌发 14 d, 子叶中的盐溶蛋白基本上利用完毕.

2.2 萌发时贮藏蛋白降解能力与种子活力

在光下萌发 14 d 的种子, 子叶中 99% 以上的花生球蛋白被动用, 各类型的贮藏蛋白以不同时间顺序和速度进行降解. 种子吸胀 2 d 后, 高活力种子的盐溶蛋白含量迅速下降, 至 12 d 时它们的含量下降了 95%; 而中等活力种子则下降 55% (图 2).

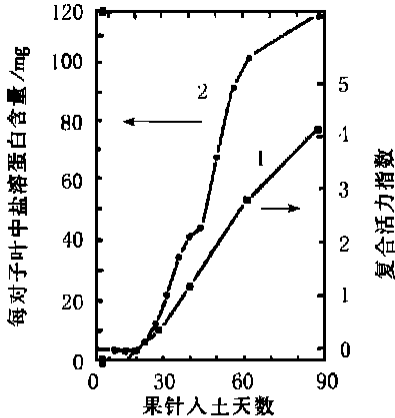


图 1 花生种子发育过程中子叶盐溶蛋白合成与复合活力指数的相关

Fig.1 The correlation between the complex vigour index and the synthesis of salt-soluble protein in cotyledon during seed development

在萌发时, 花生子叶中的贮藏蛋白为蛋白酶所降解. 氨肽酶在干种子中活性较高, 但随着种子萌发其活性下降; 而羧肽酶在萌发后期才出现活性高峰, 可见这两类酶在贮藏蛋白降解初期不起主要作用. 肽键内切酶活性变化与花生蛋白的降解相关, 在种子萌发 0 ~ 2 d, 肽键内切酶活性很低, 而贮藏蛋白未见降解 (图 2、3). 萌发 2 ~ 4 d 酶活性迅速上升 (图 3), 而贮藏蛋白的降解也开始发生 (图 2). 高活力种子肽键内切酶活性高峰出现在萌发 4d; 而中等活力种子在萌发 10 d 后才出现较高活性, 且活性高峰不明显 (图 3).

2.3 不同活力花生种子胚轴 rRNA

聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳的结果可知, 高活力花生种子经萌发 24 h 后, 其胚轴中的 28S、18S rRNA 含量明显高于中等活力种子, 而 4S、5S rRNA 含量则显著低于中等活力种子 (图 4). 实验结果表明种子活力下降 28S 及 18S rRNA 损伤, 出现较多的 4S 与 5S rRNA, rRNA 的完整性下降.

3 讨 论

花生种子活力水平在种子发育过程中持续上升, 至生理成熟期达到高峰^[3]. 与此同时贮藏蛋白含量也持续增加. 本实验表明高活力种子不但在发育过程中贮藏蛋白合成积累量较高, 而且在萌发中贮藏蛋白动员能力亦较强. 当种子劣变时, 贮藏蛋白的降解动员能力下降, 在贮藏蛋白降解动员中起主要作用的肽键内切酶活性也因种子活力高低而出现不同

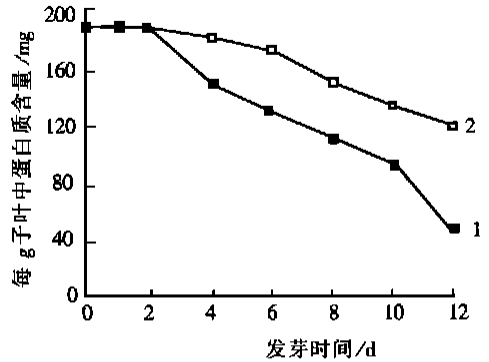


图 2 不同活力种子在萌发中子叶贮藏蛋白 (盐溶蛋白) 的降解

Fig.2 The degradation of storage proteins in the cotyledons of germinating peanut seeds (1)高活力种子;(2)中等活力种子

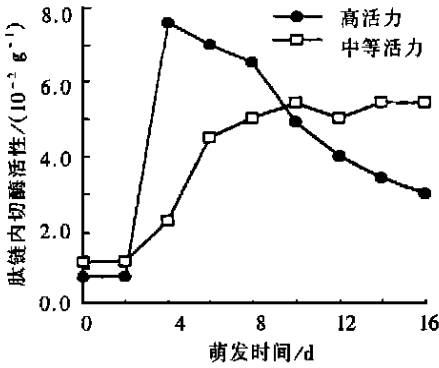


图 3 高活力和中等活力花生种子萌发时子叶肽键内切酶活性的变化

Fig.3 Changes on the activity of endopeptidase in cotyledons of germinating peanut seeds of high-vigour and medium-vigour

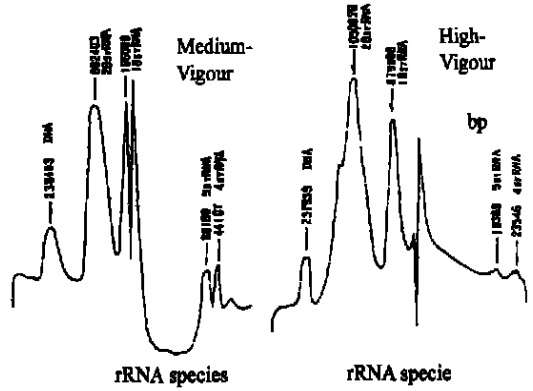


图 4 不同活力花生胚轴 rRNA 组分变化

Fig.4 Changes of rRNA species in peanut axes of high and medium vigour seed lots
在 18S rRNA 峰后面的峰是 7.5%、2.4% 凝胶界面处的 9S 左右的 rRNA 峰.

水平。肽键内切酶是在萌发中合成^[6]，它的合成速度受到劣变影响而下降。由于主要的贮藏物质——贮藏蛋白的降解动员受到阻延，将影响到活力的表现，最终影响到幼苗生长。可见种子贮藏蛋白的合成积累与降解动员效率是种子活力生理生化基础的一个重要方面。

贮藏物质的降解动员，为幼苗生长提供物质基础。在重新合成蛋白质的转译过程中，rRNA 起着重要的作用，由于种子活力下降而出现 rRNA 的完整性损伤需要一个修复过程，必然影响到幼苗的生长^[3]。

随着种子活力下降，rRNA 逐渐降解，28 及 18S rRNA 峰值下降，而 4 及 5S rRNA 峰值上升。这与 Ghosh 和 Chandhuri (1984) 观察在水稻不同活力胚中的变化相似^[7]。根据 Bray 和 Chow (1976) 的研究结果，在具活力与无活力豌豆胚轴中的核糖体亚单位无区别，它们的区别在于发生了 rRNA 完整性的丧失，使核糖体合成蛋白能力下降。^[8]。即如同在本试验中可见，出现更多的 4S 及 5S rRNA，标志着 28S 和 18S rRNA 的降解变化。Bray 等在他们的韭葱试验中也观察到种子活力变化所产生 rRNA 完整性的相似变化^[3]。可见 rRNA 完整性与蛋白合成密切相关，而它们的变化又依存于种子活力的高低。

参考文献:

[1] 傅家瑞, 种子活力的生理生化研究现状 [A]. 见: 徐是雄, 等. 种子生理的研究进展 [M]. 广州: 中山大学出版社, 1987. 64~65.

[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 [J]. 植物生理学报, 1992. 18 (2): 142~150.

[3] BRAY C M, ASHRAF M, DAVISON P A, et al. Molecular markers of seed quality [A]. In: COMED, COEBINEAU F. Fourth international workshops on seeds [M]. Paris. 1995. 887~896.

[4] NOLLER H F, HOFFARTH V, ZIMNIAK L. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures [J]. Science, 1992. 256. 1416~1419.

- [5] 傅家瑞. 花生种子活力的生理生化基础 [J]. 花生科技, 1990 (3): 1~4.
- [6] SHUTOV A D, VAINTSAUL I A. Degradation of storage positions in germinating seeds [J]. Phytochemistry, 1987, 26: 1557~1566.
- [7] GHOSH B, CHAUDHURI M M. Ribonucleic acid breakdown and loss of protein synthetic capacity with loss of rice embryos (*Oryza sativa*) [J]. Seed Science & Technology, 1984, 12: 669~677.
- [8] BRAY C M, CHOW T Y. Lesions in the ribosomes of non-viable pea (*Pisum arvense*) [J]. Biochim Biophys Acta, 1976, 442: 14~23.

Seed Vigour in Relation to the Synthesis and Degradation of Storage Protein and the Integrity of rRNA in Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Seeds

FU Jia-rui^{*}, HUANG Shang-zhi, LI Huang-jin, ZHENG Xiao-hong

Abstract: The complex vigour index is closely correlated with synthesis of storage protein in cotyledons during peanut seed development. The protein contents of high vigour seeds was high and that of medium or low vigour seeds was low. During germination of high vigour seeds, the activity of endopeptidase was higher and the degradation rate of the salt-soluble protein and arachin was faster than that of medium vigour seeds. rRNA is important for the synthesis of proteins. During seed deterioration, the degradation of rRNA species could be detected. Its integrity changed in accordance with seed vigour.

Keywords: peanut (*Arachis hypogaea* L.); seed vigour; synthesis and degradation of storage protein; endopeptidases; rRNA integrity

^{*} Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China.