

水分胁迫对山黧豆萌发中蛋白质和游离氨基酸的影响^{*}

薛 崧, 张林生, 曹 让, 王明华, 汪沛洪

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 对山黧豆(*Lathyrus sativus*)进行不同浓度PEG胁迫处理,研究水分胁迫对山黧豆种子萌发过程中蛋白质和游离氨基酸的影响。结果表明,水分胁迫能导致山黧豆根芽和子叶可溶性蛋白质含量增加,非可溶性蛋白质分解受到抑制;子叶游离氨基酸含量降低,而根芽游离氨基酸含量增高,尤其是丙氨酸、异亮氨酸、脯氨酸和精氨酸。随着种子萌发时间的延长,根芽 β ODAP含量逐渐增加,而子叶 β ODAP却降低;在水分胁迫下子叶和根芽 β ODAP含量均增加。

[关键词] 水分胁迫; 山黧豆; 种子萌发; 游离氨基酸

[中图分类号] Q 945 17; S529

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)05-079-05

普通栽培山黧豆(*Lathyrus Sativus*)系一年生豆科作物,抗旱、抗寒、耐贫瘠,蛋白质丰富(可高达230 g/kg以上),适于西北高寒、干旱地区种植,并有保持水土的作用^[1]。山黧豆具有较强的抗逆性,是一种较好的抗性作物材料,但有关渗透胁迫下,山黧豆种子萌发过程中蛋白质和游离氨基酸的变化与其抗旱性的关系尚未见报道。研究山黧豆的抗旱机理,不仅可以为深入研究该作物抗旱基因提供信息^[2],也为不同植物材料研究植物抗旱机理提供依据。本研究旨在探讨水分胁迫对山黧豆种子萌发过程中根芽和子叶蛋白质和游离氨基酸的影响,为进一步研究山黧豆抗旱机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

以中毒(β N-草酰-L-2, 3-二氨基丙酸, β N-Oxalyl-L-2, 3-Diaminopropanoic acid, 缩写 β ODAP)栽培山黧豆(品种由陕西省农科院于精忠研究员提供)为材料,人工选种,用TTC法测定种子活力为90%,用2 g/L的HgCl₂消毒20 min,然后用蒸馏水洗6~7次,风干备用。

1.2 试验处理

设置3个处理,处理1用蒸馏水培养作为对照,处理2和处理3分别用不同浓度的PEG(渗透势为

-0.6和-0.8 MPa)溶液胁迫处理。在直径为15 cm培养皿中萌发,每皿100粒,于25℃±1℃培养箱中,定期更换培养液,每24 h采样1次,分离根芽和子叶进行鲜样分析。

1.3 蛋白质分析

按杨浚等^[3]的方法,称取0.20 g根芽和子叶,加1 mL 1 mol/L pH 5.0的柠檬酸缓冲液研磨提取,离心15 min,上清液测定可溶性蛋白质,沉淀加入1 mL 1 mol/L NaOH溶解,在90℃水浴加热20 min,离心,上清液测定非可溶性蛋白质,蛋白质含量采用考马斯亮兰G250法检测。

1.4 游离氨基酸和 β ODAP的测定

游离氨基酸的测定依据宋治军等^[4]的分析方法; β ODAP的分析采用李天荣等^[5]的分析方法。

2 结果与分析

2.1 可溶性蛋白质

山黧豆种子在萌发过程中,经不同浓度PEG溶液胁迫处理,根芽和子叶可溶性蛋白质含量变化如图1(a, b)所示。图1(a, b)表明,随着胁迫强度的增加,根芽和子叶中可溶性蛋白质含量增加,胁迫处理均高于对照。在萌发后前4 d,根芽中可溶性蛋白含量降低幅度较大,4~7 d下降趋于平缓,从7 d后含量又逐渐增加;子叶中可溶性蛋白质含量在前4 d

^{*} [收稿日期] 2001-01-17

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39970436)

[作者简介] 薛 崧(1960-),女,山西柳林人,副教授。主要从事植物分子生物学研究。

急剧增加,从 5 d 以后快速下降。

2.2 非可溶性蛋白质

山黧豆种子含有大量的蛋白质,为种子萌发提供了充足的氮源。水分胁迫下,山黧豆萌发过程中根芽和子叶非可溶性蛋白质含量的变化如图 1(c, d)

所示。图 1(c, d) 表明,根芽和子叶非可溶性蛋白质含量随着水分胁迫的增强而增加,而且均高于对照;根芽非可溶性蛋白质在萌发 5 d 后快速下降,7 d 后趋于平缓;子叶非可溶性蛋白质在萌发前 3 d 逐渐增加,然后不断降低。

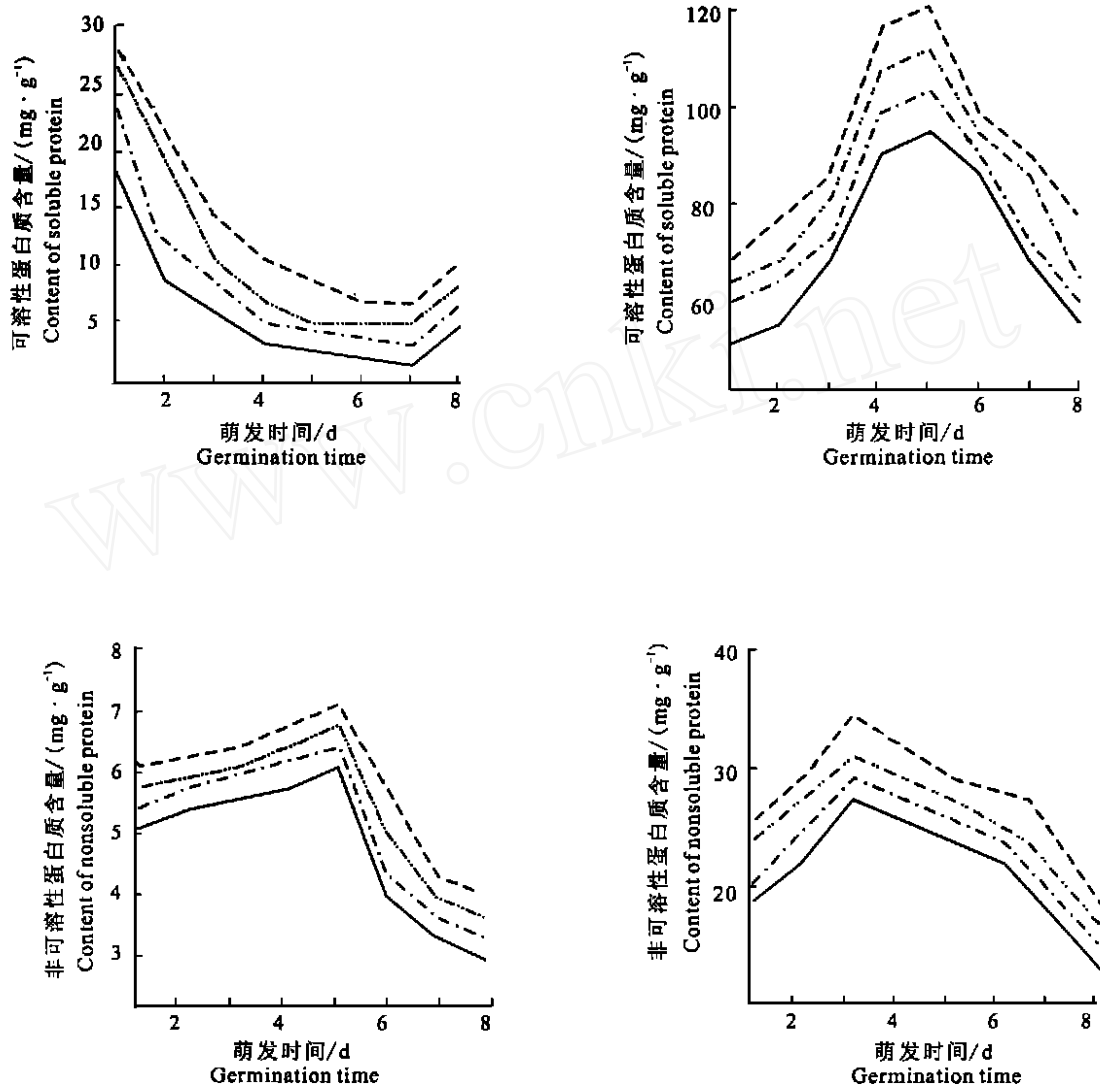


图 1 水分胁迫对山黧豆萌发过程中根芽、子叶可溶性蛋白质和非可溶性蛋白质的影响

a. 根芽可溶性蛋白质; b. 子叶可溶性蛋白质; c. 根芽非可溶性蛋白质; d. 子叶非可溶性蛋白质

—, CK; - - -, 0.6 Mpa; ·····, 0.8 Mpa; - · - · -, 1.0 Mpa

Fig. 1 Change of the soluble and non-soluble protein level in sprout and cotyledon of the *Lathyrus Sativus*'s seed by water stress during the germination

a. Soluble protein level in sprout; b. Soluble protein level in cotyledon; c. Non-soluble protein level in sprout; d. Non-soluble protein level in cotyledon

—, CK; - - -, 0.6 Mpa; ·····, 0.8 Mpa; - · - · -, 1.0 Mpa

2.3 游离氨基酸

水分胁迫下,山黧豆种子在萌发过程中,根芽总游离氨基酸(Free Amino Acid, 简写 FAA)高于子叶,二者的变化趋势相似(见表 1),总 FAA 随着种子萌发逐渐增加。根芽脯氨酸、谷氨酸和丝氨酸最高,约占总 FAA 的 68%~85%,是其生长的主要氨

基酸,其次是丙氨酸、精氨酸、缬氨酸和天冬氨酸,其余氨基酸含量较少。子叶氨基酸的变化与根芽相似,其中脯氨酸、谷氨酸和丝氨酸约占总 FAA 的 65%~71%,不同的是组氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸和异亮氨酸含量较高,这些必需氨基酸通过蛋白酶水解后在子叶中以游离态存在,然后进一步代谢,为根芽生

长提供了含氮化合物。

表 1 山黧豆种子萌发中游离氨基酸含量

		Table 1 Contents of free amino acids in <i>L anthyrus Sativus</i> L. seed gem ination																mg/g			
处理 Treatment	部位 Partition	丙氨酸 A lanine				异亮氨酸 Ileuine				精氨酸 A rginine				脯氨酸 Pro line				总游离氨基酸 Total free am ino acid			
		2 d	4 d	6 d	8 d	2 d	4 d	6 d	8 d	2 d	4 d	6 d	8 d	2 d	4 d	6 d	8 d	2 d	4 d	6 d	8 d
1	根芽 Sprout	1.43	0.46	0.35	0.28	0.08	0.018	0.018	0.014	0.29	0.023	0.083	0.16	2.19	7.36	9.57	13.00	7.87	13.09	11.97	22.58
	子叶 Cotyledon	0.42	0.45	0.18	0.42	0.055	0.094	0.22	0.40	0.18	0.33	0.38	0.43	0.76	2.73	74.36	10.33	3.38	9.17	9.40	19.18
2	根芽 Sprout	1.84	2.26	3.22	2.40	0.088	0.23	0.18	0.081	0.39	0.43	0.31	0.11	3.62	7.06	11.07	19.82	8.39	1.481	18.38	30.86
	子叶 Cotyledon	0.27	0.38	0.085	0.54	0.094	0.16	0.14	0.29	0.21	0.36	0.42	0.52	0.73	2.62	6.15	9.65	3.17	9.03	9.24	18.50
3	根芽 Sprout	2.26	2.52	3.20	2.71	0.17	0.26	0.30	0.14	0.65	0.59	0.80	0.90	2.96	11.88	13.45	17.73	8.81	21.67	19.69	28.06
	子叶 Cotyledon	0.43	0.55	0.082	0.27	0.10	0.27	0.21	0.16	0.25	0.30	0.34	0.51	0.71	2.08	5.78	7.84	3.07	6.76	81.32	15.52

从表 1 可以看出,山黧豆种子萌发过程中,随着 PEG 浓度增加,子叶总 FAA 含量降低,说明水分胁迫抑制子叶贮藏蛋白质的降解,从而减少了营养物质向根芽的运输。在萌发后前 4 d,根芽总 FAA 含量随水分胁迫增强而降低,4 d 后则随着胁迫的增强而增加,说明水分胁迫抑制根芽蛋白质合成,导致根芽生长减慢。试验结果(表 1)表明,根芽游离脯氨酸随胁迫的加强而增加,子叶脯氨酸含量则随着胁迫的增强而减少,表明根芽中脯氨酸增加与其他禾

谷类作物一样是适应逆境而合成的,子叶中脯氨酸的降低是蛋白水解受到了抑制。

根芽 βODAP 是山黧豆非蛋白质氨基酸,图 2a 表明,根芽在萌发的前 5 d 逐渐增加,然后下降;子叶 βODAP 在萌发后前 2 d 逐渐增加,并高于根芽,然后不断下降(图 2b),表明山黧豆种子含有大量的 βODAP (该物质长期食用可引起人下肢瘫痪),随着萌发而降解。在胁迫条件下根芽和子叶中 βODAP 含量增加。

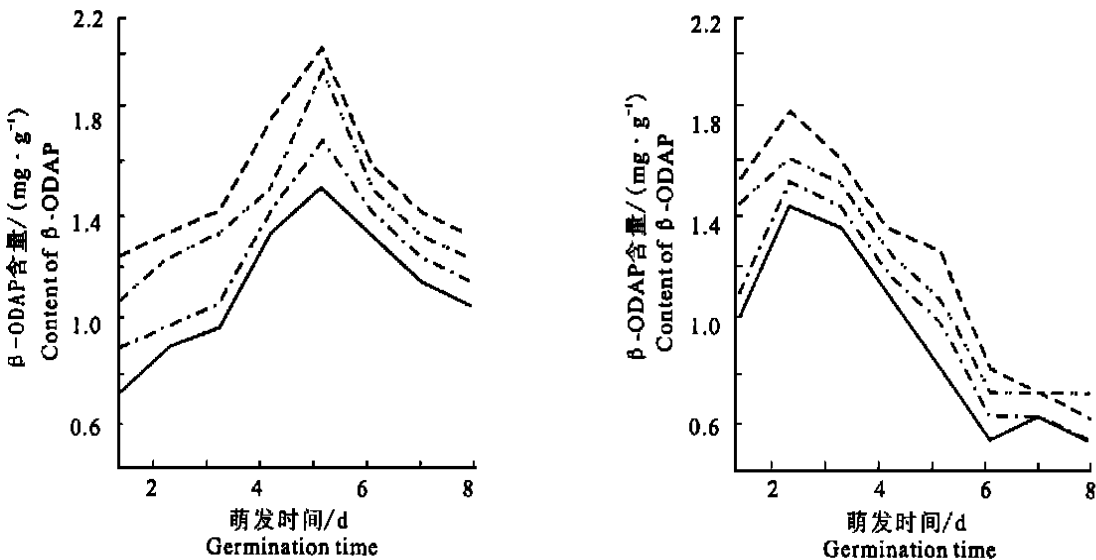


图 2 水分胁迫对山黧豆萌发中根芽和子叶 βN-草酰-L-2,3-二氨基丙酸(βODAP)的影响
a 根芽中 βODAP 的含量; b 子叶中 βODAP 的含量

—— CK; - - - 0.6 MPa; ···· 0.8 MPa; - · - · - 1.0 MPa
Fig 2 Change of the βN-Oxalyl-L-2,3-Diaminopropanoic acid (βODAP) level in sprout and cotyledon of the *Lathyrus Sativus* seed by water stress during the gem ination
a The content of βODAP in sprout; b The content of βODAP in cotyledon
—— CK; - - - 0.6 MPa; ···· 0.8 MPa; - · - · - 1.0 MPa

3 讨 论

种子萌发吸水与生命代谢活动密切相关,干旱影响种子吸水,推迟种子萌发生长。Mcgrain 等^[6]认为,大豆种子含有蛋白酶抑制剂,种子吸胀开始就启动了蛋白酶抑制剂的降解过程,通常种子蛋白酶抑制剂的启动和降解早于种子贮藏蛋白。不同的豆类启动的时间不同,绿豆种子吸胀 48 h,其主要抑制剂组分大量消失^[7],大豆种子萌发 5 d 左右^[8],稗草种子萌发 7 d^[9],所有参与蛋白酶抑制剂降解的蛋白水解酶,在种子萌动后均开始表现活性,并在萌发过程中逐渐增加。山豆种子在萌发过程中非可溶性蛋白质在萌动后前 3 d 增加,尔后下降,表明该种子蛋白酶主要抑制剂萌动 3 d 后开始消失,使贮藏蛋白逐渐降解。另外水分胁迫能抑制蛋白酶抑制剂的解离^[10],水分胁迫愈大,种子萌发过程中子叶非可溶性蛋白质含量愈高(见图 1d)。

种子萌发是贮藏蛋白质在蛋白酶作用下水解为游离氨基酸的过程,氨基酸通过脱羧或转氨作用进一步转变为可溶性氮化物及能量。Palmiano 等^[11]对水稻种子萌发的研究表明,不溶性蛋白质含量显著下降,可溶性氨基酸和可溶性蛋白质不同程度增加,山豆种子子叶非可溶性蛋白质降解为游离氨基酸,运输到根芽中重新合成新的蛋白质和其他物质。

Beloley 等^[12]对小麦胚乳蛋白质降解的研究认为, Glu, Pro, Arg 和 Gln 为小麦幼苗蛋白质合成提供了 90% 氮源,并且 Ala, Gly, Lys, Asp 和 Arg 是以氮素形式运输到幼苗供其生长,山豆萌发中, Glu, Pro 和 Ser 含量最高时约占总游离氨基酸的 70% (表 1),是代谢的主要氮源,与禾谷类种子萌发相似。水分胁迫使山豆根芽游离氨基酸增高,这些游离氨基酸的增加,对维持植物水势起到渗透调节作用,同时,也是胁迫下植物贮存物质和能量的一种形式,以免造成过多的损害消耗并缓解分解产物引起的毒害^[13]。在水分胁迫下,山豆种子叶游离氨基酸的含量降低,表明胁迫抑制根芽蛋白质合成的同时也阻止子叶蛋白质的分解。Khadem i^[14]对正在萌发的豌豆种子的研究认为,水分胁迫抑制种子贮藏蛋白质的降解,这与笔者对山豆种子萌发的研究结果相似,说明山豆种子在萌发过程中,水分胁迫的程度直接影响贮藏蛋白质降解为游离氨基酸的含量,导致萌发时间延长,代谢缓慢,影响生长。山豆 β ODAP 是一种非蛋白质氨基酸,是植物氮代谢中次生物质之一,其具体的代谢作用未报道。在种子正常萌发中,子叶中 β ODAP 含量逐渐减少;在水分胁迫下, β ODAP 含量增加与其他 FAA 变化相似,表明水分胁迫也影响 β ODAP 的代谢, β ODAP 与游离氨基酸在植物体内的代谢和功能可能相似。

[参考文献]

- [1] Hussain M, Chowdhury B, Hogue R, et al. Effect of water stress, salinity, interaction of cation, stage of maturity of seeds and storage devices on the ODA P contents of *Lathyrus sativus* [A]. Redda Takle Haimanot, Fernand Lambein. *Lathyrus and lathyrism a decade of progress* [C]. Belgium: Published by University of Ghent, 1995. 107- 110.
- [2] 沈黎明, 林生. 山豆体内游离氨基酸与土壤水势关系 [J]. 中国草地, 1996, (4): 43- 46.
- [3] 杨 浚, 俞炳果. 精胺对离体大麦叶片中叶绿素和蛋白质含量的影响 [J]. 植物生理学通讯, 1989, (2): 42- 44.
- [4] 宋治军, 纪重光. 现代分析仪器与测试方法 [M]. 西安: 西北大学出版社, 1994.
- [5] 李天荣, 路 苹, 张林生, 等. 用氨基酸分析仪测定山豆 BOAA [J]. 生物化学与生物物理进展, 1984, 11(6): 73- 74.
- [6] Megrain A K, Chen J C, Wilson, et al. Proteases catalysing processing and degradation of Kunitz soybean trypsin inhibitor during seeds maturation [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(2): 421- 428.
- [7] Lorenean E, Prevosto R, Wilson K A. The appearance of new active form of trypsin inhibitor in germinating mung bean (*Vigna radiate*) seeds [J]. *Plant Physiology*, 1981, 68: 88- 92.
- [8] Wilson K A, Tan Wilson A L. Characterization of the proteinase that initiates the degradation of the trypsin inhibitor in germinating mung beans (*Vigna radiate*) [J]. *Plant Physiology*, 1987, 84: 93- 98.
- [9] Udupe S L, Pattabiraman T N. Protease inhibitors in germinating *Echinocloa* (*Echinocloa trunscutacea*) Seeds: Changes in protease inhibitory activities during germination [J]. *J Sci Food Agri*, 1987, 38: 187- 193.
- [10] 文方德, 傅家瑞. 植物种子的蛋白酶抑制剂及其生理功能 [J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(1): 1- 9.
- [11] Palmiano E P, Juliano B O. Biochemical changes in the rice grain during germination [J]. *Plant Physiology*, 1972, 49: 751- 756.
- [12] Bewley J D, Black M. *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination* [M]. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag Berlin L., 1978. 106.

- [13] Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants[A]. Russell L J. Annu Rev Plants Physiol and Plants Mol [C]. California, U SA: Management of Annual Reviews Inc, 1996 377- 403
- [14] Khadem i M, Koranski D S, Hannapel D J, et al Water stress and storage-protein degradation during gem ination of inpatients seed[J]. J Amer Sco Hort Sci, 1991, 116(2): 302- 306

Effects of water stress on the proteins and free amino acid of the *L athyrus Sativu's* seed during the gem ination

XUE Song, ZHANG L in-sheng, CAO Rang, WANG M ing-hua, WANG Pei-hong

(College of Life Sciences, Northw est Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Shaanxi, Yangling 712100, China)

Abstract: The effects of water stress on the proteins, free amino acids and β ODAP of the *L athyrus Sativu's* seed during the gem ination was studied. The results showed that the soluble protein level in sprout and cotyledon was increased, and the decomposition of the nonsoluble protein level in sprout and cotyledon was inhibited. The amount of free amino acid was decreased in cotyledon but increased in sprout. During the proceeding of the gem ination, the level of β ODAP was increased in sprout, but decreased in cotyledon. The more severe the water stress was subjected, the higher the level of β ODAP was increased in both cotyledon and sprout.

Key words: water stress; *L athyrus Sativu's*; seed gem ination; free amino acid

· 简 讯 ·

旱地小麦新品种“西农 794”通过陕西省审定

由西北农林科技大学谢惠民研究员主持选育的旱地小麦新品种“西农 794”于日前通过陕西省农作物品种审定委员会的正式审定。

“西农 794”的选育在抗旱、抗逆、优质、稳产等综合农艺性状改进方面均取得较大进展。该品种为冬性, 株型紧凑, 分蘖力中等, 株高 80~90 cm, 较西农 1043 降低了 10 cm; 抗倒伏性强, 抗旱, 抗逆, 抗条锈病达到免疫或高抗水平; 籽粒饱满, 品质优良, 属中筋小麦, 千粒重 40 g 左右; 落黄好, 成熟期比长武 134 晚熟 1~2 d。1998~2001 年陕西省旱地 20 点中试中, 平均单产 4 873 kg/hm², 比对照长武 134 增产 6.1%。该品种适宜在陕西渭北旱塬和黄淮冬麦旱地类似生态条件地区推广种植。(温晓平 供稿)