

人工老化处理对小麦种子活力和醇溶蛋白、麦谷蛋白组成的影响

张自阳, 姜小苓, 王娟娟, 陈 培, 候轩轩, 茹振钢, 刘明久*

(河南科技学院 生命科技学院, 河南 新乡 453003)

摘要: 以小麦品种周麦18、新麦208、郑麦9023为材料, 对人工加速老化种子的活力及其醇溶蛋白、麦谷蛋白组成变化进行了分析。结果表明, 高温(45 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、高湿(95%相对湿度)老化处理 20 d 后, 小麦种子的发芽势、发芽率、发芽指数、活力指数均降为 0, 活力完全丧失。与未老化种子相比, 人工老化 20 d 后的种子醇溶蛋白与麦谷蛋白组成发生了明显变化。在 ω 、 γ 、 β 、 α 4 个醇溶蛋白区, 3 个品种醇溶蛋白表达量均有明显下降, 其中在 ω 和 γ 醇溶蛋白区, 3 个品种还表现出个别谱带的增加或丢失; 郑麦 9023 部分高分子量麦谷蛋白亚基丢失, 周麦 18、新麦 208 部分麦谷蛋白亚基表达量下降, 推测种子醇溶蛋白组成的变化与种子失活有关。

关键词: 小麦; 人工老化; 种子活力; 醇溶蛋白; HMW-麦谷蛋白

中图分类号: S512.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)02-0024-04

Effects of Aging Treatment on Seed Vigor and Constitutes of Gliadin and Glutenin in Wheat

ZHANG Zi-yang, JIANG Xiao-ling, WANG Juan-juan, CHEN Pei, HOU Xuan-xuan,

RU Zhen-gang, LIU Ming-jiu*

(College of Life Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Three wheat varieties (Zhoumai 18, Xinmai 208 and Zhengmai 9023) were used to analyze the effects of artificial aging treatment on seed vigor and constitutes of gliadin and glutenin. The results showed that the germination potential, germination rate, germination index and vigor index of seeds after being treated under high temperature (45 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ and high humidity (95% RH) for 20 days all declined to zero, and the seed vigor lost completely. The results of A-PAGE and SDS-PAGE showed that the constitutes of gliadin and glutenin changed significantly compared to CK (without treatment). The expression quantity of gliadin bands in ω , γ , β and α regions decreased significantly in the three varieties, of which some bands even increased or lost in ω and γ regions. Some of the high molecular weight glutenins lost in Zhengmai 9023, and some glutenins expression quantities decreased in Zhoumai 18 and Xinmai 208. It was speculated that the changes in constitutes of gliadin and glutenin might be related to the seed vigor.

Key words: wheat; artificial aging; seed vigor; gliadin; HMW-GS

种子自然成熟后即进入衰老过程, 生活力逐渐丧失而老化。老化降低种子质量, 从而对农业生产

造成巨大损失。因此, 种子老化问题一直受到人们的关注。人工加速老化是研究种子衰老机制常用的

收稿日期: 2013-07-12

基金项目: 河南省科技攻关计划项目(122102110036); 新乡市重点科技攻关项目(ZG12005); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201210467002); 河南科技学院大学生创新训练项目(2013cx004)

作者简介: 张自阳(1984-), 男, 河南舞钢人, 实验师, 硕士, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: lanfeng0615@163.com

* 通讯作者: 刘明久(1966-), 男, 河南获嘉人, 教授, 主要从事种子学的教学和科研工作。

方法,它与自然老化有比较相近的变化过程^[1-3]。高温、高湿加速种子老化,且比一般自然老化产生更为复杂的种子损伤^[4],因此,更容易全面地研究种子衰老的机制。

贮藏蛋白在种子发育过程中形成,在种子萌发后为幼苗生长提供各种氨基酸和含氮化合物,对种子的萌发和早期生长作用重大。同时,种子活力在基因水平的差异也是通过蛋白质体现出来的,因此,研究种子活力与蛋白质的关系对种子活力的研究有重要意义。研究表明,蛋白质和酶的变化发生在多种植物老化的种子中^[1,5-7]。目前,关于老化种子的活力变化与醇溶蛋白和麦谷蛋白亚基组成及其表达量变化关系的研究报道较少。因此,以3个常规小麦品种为材料,通过人工老化处理,对种子活力及醇溶蛋白、麦谷蛋白组成变化进行分析,为进一步揭示种子活力下降的生理生化机制提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

小麦品种周麦18、新麦208、郑麦9023,均由河南科技学院小麦中心提供。

1.2 方法

1.2.1 人工加速老化处理 采用高温、高湿方法对种子进行老化处理,利用 LH-150 S 种子老化箱在 $(45\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 和相对湿度(RH)为95%的条件下处理20 d。老化处理后取出放在室温下风干到原始水分状态,以未老化处理的种子为对照。

1.2.2 种子活力测定 (1)幼苗生长测定:参照国标 GB/T 3543—1995 农作物种子检验规程^[8],采用标准发芽试验。每个品种100粒种子,4次重复,在 20°C 智能人工气候培养箱中发芽,每天记载发芽数,第4天统计发芽势,第7天统计发芽率,发芽结束测定正常单株幼苗鲜质量,并计算发芽势、发芽率、发芽指数和活力指数。发芽指数 $(GI) = \sum(Gt/Dt)$,活力指数 $(VI) = GI \times S$,式中, Dt 为发芽日数, Gt 为与 Dt 相对应的每天的发芽种子数, S 为发芽结束时单株幼苗质量。

(2)电导率测定:结合尹燕桦等^[9]和刘子凡^[10]的方法测定电导率。将处理后的种子50粒称质量,3次重复。用去离子水冲洗3次,用定性滤纸吸干种子表面水分,将种子分别装入500 mL烧杯中,加入250 mL去离子水,测定初始电导率 $d1$,烧杯盖上

薄膜,所有烧杯于 20°C 下放置24 h,然后用电导率仪测定浸泡液电导率 $d2$,种子浸出液电导率计算公式:种子浸出液电导率 $[\mu\text{S}/(\text{cm} \cdot \text{g})] = (d2 - d1)/W$, W 表示老化种子的质量。

(3)模拟田间出苗试验:取水分适宜的过筛细土置于标准发芽盒中,种子置床后在室温下发芽,每品种4次重复,每重复100粒种子,7 d后统计出苗率。

1.2.3 醇溶蛋白提取与聚丙烯酰胺凝胶电泳(A-PAGE) 称取每份材料单粒种子的质量,粉碎后放入1.5 mL离心管中,按照 $5 \mu\text{L}/\text{mg}$ 加入提取液(25% α -二氯乙醇和0.05%甲基绿),振荡混匀后浸提过夜。加样前于10 000 r/min离心10 min。

取凝胶液15 mL(丙烯酰胺9.62%,N-N 甲叉双丙烯酰胺0.38%、尿素3%、抗坏血酸0.1%、硫酸亚铁0.004%),加入 $4 \mu\text{L}$ TEMED、 $30 \mu\text{L}$ APS,摇匀后迅速封底。吸取40 mL凝胶液,加入 $10 \mu\text{L}$ TEMED、 $30 \mu\text{L}$ APS溶液,摇匀后迅速倒入胶板中,插入样品梳,静置聚合。待凝胶聚合后,拔出样品梳,用电极缓冲液冲洗点样孔。每个样品上样量为 $7 \mu\text{L}$ 。加入电极缓冲液(每1 L含冰醋酸40 mL,甘氨酸0.4 g),电压500 V,电泳时间为甲基绿指示剂移至板底时间的3倍。电泳结束后,每块凝胶用10%三氯乙酸和1%考马斯亮兰 R250 200 mL染色过夜,蒸馏水脱色,保存或拍照。

1.2.4 HMW-麦谷蛋白的提取与聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 每份材料按单粒种子称质量,粉碎后放入1.5 mL离心管中,按照 $10 \mu\text{L}/\text{mg}$ 加入50%异丙醇, $60\sim 65^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min(其间摇动2次),取出室温放置2 h,10 000 r/min离心10 min,倒出上清液,重复2次。然后,按 $7 \mu\text{L}/\text{mg}$ 加入HMW-麦谷蛋白提取液,混匀,水浴 $60\sim 65^{\circ}\text{C}$,2 h,取出放于 4°C 冰箱或立即上样。

参考张学勇等^[11]和李硕碧等^[12]的方法分离麦谷蛋白亚基并进行SDS-PAGE分析,然后按Payne等^[13]的系统命名亚基组成,中国春(null,7+8,2+12)作为对照(CK)。

2 结果与分析

2.1 老化处理对小麦种子活力的影响

由表1可知,3个小麦品种种子老化20 d后,发芽率、发芽势、发芽指数、活力指数均降为0,表明小麦种子老化20 d后完全失去活力,不再具有萌发的能力。

表 1 老化处理对小麦种子活力的影响

品种	老化天数/d	发芽率/%	发芽势/%	发芽指数	活力指数
周麦 18	0	98.75	98.00	33.030	1.901
	20	0	0	0	0
新麦 208	0	99.25	99.25	33.021	1.774
	20	0	0	0	0
郑麦 9023	0	99.50	97.50	32.136	1.768
	20	0	0	0	0

2.2 老化处理对小麦种子电导率及模拟田间出苗率的影响

由表 2 可知,与对照相比,在模拟田间出苗试验中,老化 20 d 的种子发芽率为 0;同时,电导率迅速下降,且差异达到了显著水平。

表 2 老化处理对小麦种子电导率与模拟田间出苗率的影响

品种	老化天数/d	发芽率/%	电导率/[$\mu\text{S}/(\text{cm} \cdot \text{g})$]
周麦 18	0	95a	6.895 5b
	20	0b	23.070 9a
新麦 208	0	96a	6.224 2b
	20	0b	17.564 5a
郑麦 9023	0	95b	6.397 8b
	20	0a	18.458 7a

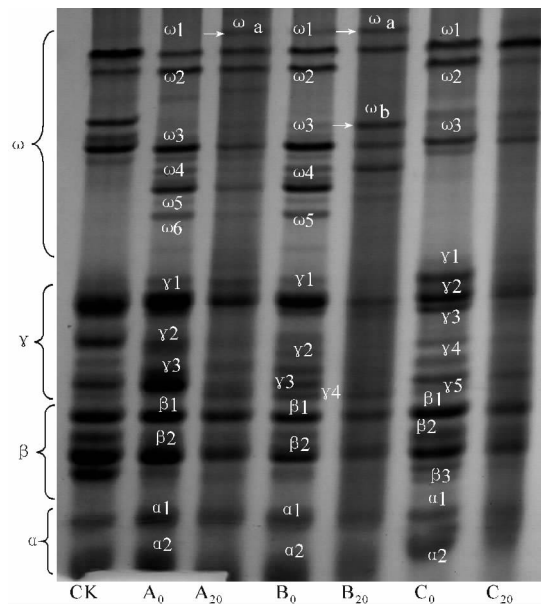
注:同列不同小写字母表示差异达显著水平($P < 0.05$)。

2.3 老化处理对小麦种子醇溶蛋白组成的影响

A-PAGE 分析表明,与对照相比,人工老化 20 d 后的种子醇溶蛋白组成发生了明显变化。总体来看,变化主要表现在醇溶蛋白表达量下降和谱带增加或丢失 2 个方面。

在 ω 、 γ 、 β 、 α 4 个醇溶蛋白区,3 个品种均有一些醇溶蛋白的表达量明显下降。例如,周麦 18 的 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\omega 3$ 、 $\omega 4$,新麦 208 的 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\gamma 1$ 、 $\omega 3$,郑麦 9023 的 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 5$ 、 $\omega 2$ 、 $\omega 3$ 谱带(图 1)。其中在 ω 和 γ 醇溶蛋

白区,3 个品种还表现出个别蛋白谱带的增加或丢失。例如,与未老化处理种子相比,老化 20 d 后周麦 18 在 ω 区出现了 1 条新的醇溶蛋白谱带(ωa),新麦 208 增加了 2 条新的醇溶蛋白谱带(ωa 和 ωb);老化 20 d 后,周麦 18 的 $\omega 6$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$,新麦 208 的 $\omega 2$ 、 $\omega 4$ 、 $\omega 5$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$,郑麦 9023 的 $\gamma 1$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 谱带均丢失。

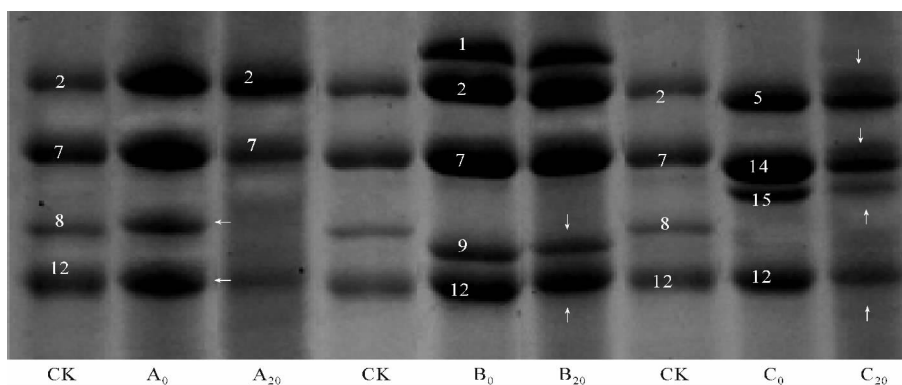


CK. 中国春; A₀. 周麦 18(未老化); A₂₀. 周麦 18(老化 20 d); B₀. 新麦 208(未老化); B₂₀. 新麦 208(老化 20 d); C₀. 郑麦 9023(未老化); C₂₀. 郑麦 9023(老化 20 d)

图 1 不同处理小麦种子醇溶蛋白 A-PAGE 电泳图谱

2.4 老化处理对小麦种子 HWM-麦谷蛋白亚基组成的影响

由图 2 可知,与对照相比,人工老化 20 d 后的种子高分子量麦谷蛋白组成发生了明显变化。郑麦 9023 的 8、12 亚基丢失(箭头所指),周麦 18 的 9、12 亚基(箭头所指)与新麦 208 的 5+12、14+15(箭头所指)亚基表达量明显下降。



CK. 中国春; A₀. 郑麦 9023(未老化); A₂₀. 郑麦 9023(老化 20d); B₀. 周麦 18(未老化); B₂₀. 周麦 18(老化 20 d); C₀. 新麦 208(未老化); C₂₀. 新麦 208(老化 20 d)

图 2 不同处理小麦种子 HWM-麦谷蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

3 结论与讨论

高温、高湿环境可以加速种子衰老,同时又是研究种子活力的一种快速方法。与此同时,电导法是测定种子活力较简易、快速、客观的方法。众多研究表明,电导率与种子活力密切相关^[14-17],本研究结果表明,小麦种子老化 20 d 后,种子活力丧失,电导率显著增加。然而,电导率大小只能判断种子活力的相对高低,不能全面准确判断种子的活力,因此本研究认为,电导率只能作为判断种子活力的一个辅助指标。

种子在外界环境胁迫下会发生一系列复杂的防御和适应反应,形成信号网络,诱导相关基因表达,引起蛋白质和代谢的改变^[18]。种子老化过程中发生了一系列生理生化反应,诱导特定基因表达,老化种子中蛋白质的种类、数量或存在形式也因此发生变化。本试验结果表明,小麦种子老化 20 d 后,高分子量麦谷蛋白和醇溶蛋白的组成与表达均发生了明显变化。与对照相比,老化处理后郑麦 9023 麦谷蛋白的 8、12 亚基消失,周麦 18 的 9、12 亚基以及新麦 208 的 14+15 亚基和 5+12 亚基表达量均下降。贮藏蛋白表达量的下降与前人^[19-20]对玉米老化后贮藏蛋白的研究结果相似。

Shepherd^[21]将醇溶蛋白基因定位在第 1 和第 6 同源染色体的短臂上。全部 γ 和 ω 醇溶蛋白基因位于第 1 同源染色体短臂上,编码基因为 *Gli-1*。种子活力在基因水平的差异也是通过基因表达的产物蛋白质体现出来。董贵俊^[22]在研究人工加速老化的向日葵种子时发现,处理 4 d 内,许多蛋白带出现或消失。本试验结果表明,老化 20 d 后,3 个品种在 ω 区出现了新的醇溶蛋白条带,同时在 ω 、 γ 区均出现了醇溶蛋白条带的丢失,在 ω 、 γ 、 β 、 α 区均出现了醇溶蛋白表达量的下降,原因可能是老化后种子内部发生了剧烈生理生化变化,导致基因无法表达,最终导致醇溶蛋白丢失。有研究表明,蛋白质标记在检测种子活力、监测种子发育等方面具有重要意义^[23]。本试验是 3 个小麦品种种子重复 20 次所获得的结果,说明丢失蛋白可能与种子的活力有一定的相关性。 ω 、 γ 区醇溶蛋白丢失的条带是否可以作为种子失活的标记还需要大量的种子鉴定和更加深入地研究。

参考文献:

[1] Rajjou L, Lovigny Y, Groot Steven P C, et al. Proteome-wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*: A comparison between artificial and natural aging protocols[J]. Plant Physiology, 2008, 148(1): 620-641.

[2] 董国军,胡兴明,曾大力,等.水稻种子人工老化和自然老化的比较研究[J].浙江农业科学,2004(1):27-29.

[3] 周小梅,王自霞,乔燕祥.人工老化处理对芝麻种子生理生化特性的影响[J].中国油料作物学报,2008,30(4):460-463.

[4] McDonald M B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment [J]. Seed Science and Technology, 1999, 27: 177-237.

[5] Murthy U M N, Sun W Q. Protein modification by the Amadori and Maillard reactions during seed storage roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation [J]. Journal of Experimental Botany, 2000, 51: 1221-1228.

[6] Hawkins C L, Davies M J. Generation and propagation of radical reactions on proteins [J]. Biochimica et biophysica acta, 2001, 1504(2/3): 196-219.

[7] Terskikh V V, Zeng Y, Feurtad J A, et al. Deterioration of western redcedar (*Thuja plicata* Donn ex D. Don) seeds: protein oxidation and *in vivo* NMR monitoring of storage oils [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(4): 765-777.

[8] 国家技术监督局. 农作物种子检验规程: 发芽试验 GB/T 3543. 4—1995 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1995.

[9] 尹燕桦, 董学会. 种子学实验技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 23-24.

[10] 刘子凡. 种子学实验指南 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2011: 35-39.

[11] 张学勇, 董玉琛, 游光侠, 等. 中国小麦大面积推广品种及骨干亲本的高分子量麦谷蛋白亚基组成分析 [J]. 中国农业科学, 2001, 34(4): 355-362.

[12] 李硕碧, 高翔. 小麦高分子量麦谷蛋白亚基与加工品质 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 139.

[13] Payne P I, Lawrence G J. Catalogue of alleles for the complex gene loci, *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat [J]. Cereal Res Commun, 1983, 11: 29-35.

[14] 陈光仪, 傅家瑞. 花生种子的活力与电导率的关系 [J]. 种子, 1983(3): 16-201.

[15] 徐祥美. 用茚三酮溶液显色法测定种子浸提液氨基酸含量方法的探讨 [J]. 种子, 1983(2): 119-211.

[16] 钱秀珍. 油菜种质资源贮藏效果的研究 [C] // 作物种质资源保存论文集. 北京: 中国农业科技出版社, 1996: 1191-1941.

[17] 郑晓鹰. 几种蔬菜种子的渗漏物质与其活力关系的研究 [J]. 园艺学报, 1991, 18(2): 143-147.

[18] 黄荟, 姜孝成, 程红焱, 等. 种子蛋白质组的研究进展 [J]. 植物学报, 2008, 25(5): 597-607.

[19] 吴淑君, 王爱国. 种子自然老化时蛋白质类型的变化 [J]. 种子, 1990(2): 8-11.

[20] 杨亚平, 姜孝成, 陈良碧. 水稻种子老化的生理机制 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2008, 34(3): 265-269.

[21] Shepherd K W. Genetics of wheat endosperm protein in retrospect and prospect [C] // Miller T E, Koebner R M D. Proceedings of the seventh international wheat genetics symposium, 1998: 919-931.

[22] 董贵俊. 向日葵 (*Helianthus annuus* L.) 种质资源的基础研究 [D]. 北京: 中国科学院, 2006.

[23] Hochholdinger F, Sauer M, Dembinsky D, et al. Proteomic dissection of plant development [J]. Proteomics, 2006, 6(14): 4076-4083.