

芸豆种子蛋白组分及其在种子萌发过程中的变化

党根友, 冯佰利, 高小丽, 高金锋, 高冬丽, 柴 岩

(西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 以 4 个具有明显差异的芸豆品种为材料, 采用 SDS-PAGE 方法研究芸豆种子萌发过程中水溶、盐溶和总蛋白组分变化及种子胚和子叶变化过程中蛋白组分变化。试验结果表明, 芸豆种子的子叶、胚含有丰富的蛋白亚基, 其中, 同一品种子叶和胚贮藏蛋白亚基差异明显, 子叶、胚的水溶蛋白、盐溶蛋白和总蛋白相差不大、条带丰富; 不同品种之间条带存在差异; 在发芽过程中, 高分子量蛋白亚基的降解速度快于低分子量蛋白亚基, 子叶亚基的降解速度明显慢于胚的亚基降解速度; 不同品种间子叶、胚条带差异明显, 种子活力高的品种(Y05, Y06)降解速度快于种子活力低的品种(Y09, Y1+ 1), 而蛋白含量高的品种(Y1+ 1, Y05)与蛋白含量低的品种(Y06, Y09)差异不明显。研究结果为芸豆品种鉴定、品种改良、优质栽培及发芽机理提供理论依据。

关键词: 芸豆; 贮藏蛋白; 子叶和胚; 种子发芽; SDS-PAGE; 蛋白亚基

中图分类号: S529.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)05-0085-04

Protein Pattern of Kidney Bean Seed and Changes during Kidney Bean Seed Germination

DANG Gen-you, FENG Bai-li, GAO Xiao-li, GAO Jin-feng, GAO Dong-li, CHAI Yan

(College of Agronomy, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract: Four kidney bean cultivars with significant difference were used to research the changes of the protein patterns of the storage proteins in the cotyledon and embryo of three protein kinds(water soluble proteins, salt soluble proteins and total proteins) during kidney bean seed germination by SDS-PAGE, the results showed that: There were plentiful storage proteins in subunits in the cotyledon and embryo, thereinto, the significant difference of the storage proteins in subunits was found in the cotyledon and embryo of one cultivar, there were less diversities and plentiful storage protein patterns among water soluble proteins, salt soluble proteins and total proteins patterns; There were differences in protein patterns among the cultivars. During kidney bean seed germination the storage prote in subunits of macromolecule were mobilized more quickly than lowermolecule, the storage prote in subunits of the cotyledon were mobilized more slowly than embryo, there were significant differences in protein patterns of the cotyledon and embryo among the cultivars, the cultivars of the hige seed vigor(Y05, Y06) were mobilized more rapidly than the varieties of the low seed vigor(Y09, Y1+ 1), and there were not diversities between the varieties of the high seed protein content(Y1+ 1, Y05) and the varieties of the low seed protein content(Y06, Y09). The results provided the theoretical basis for the identification of crop varieties, the improvement of crop varieties, quality culture and the mechanism of germination among the kidney beans.

Key words: Kidney bean; Storage proteins; Cotyledon and embryo; Seeds germination; SDS-PAGE; Prote in subunit

蛋白质和核酸是生命的主要物质基础^[1,2], 根据蛋白质的溶解性, 通常将禾本科作物谷类种子贮藏蛋白质(SP)分为溶于水的清蛋白、溶于盐溶液的

球蛋白、溶于醇溶液的醇溶蛋白和溶于酸或碱的谷蛋白 4 类^[3-5]。高等植物中, 种子在生命周期中占据核心地位, 种子的发芽过程是幼苗生长的先决条

收稿日期: 2008-05-10

基金项目: “十一五”科技支撑计划(2006BAD02B08); 公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07); 陕西省科技攻关项目(2006K01-G17-01); 西北农林科技大学育种专项、品种后补助资助

作者简介: 党根友(1983-), 男, 陕西富平人, 硕士, 主要从事作物高效栽培标准化与群体生理研究。

通讯作者: 柴 岩(1951-), 男, 陕西府谷人, 研究员, 主要从事小杂粮育种、栽培及品种资源研究。

件,生物体在不同的发育阶段会合成和分解类型数量不同的蛋白质,这些动态变化的蛋白质构成了细胞某一时刻的特征性生命活动基础,是认识生命活动本质的一个恰当而直接的途径^[6],其中,豆类为双子叶植物,贮藏蛋白以水溶蛋白与盐溶蛋白为主^[3-5],而芸豆作为我国主要的出口与食用豆类,它的蛋白含量与组成直接或间接影响芸豆的品质以及商品性,从而影响西部干旱、半干旱及边远山区芸豆的增收^[7,8]。

蛋白质具有遗传稳定性,不易受环境条件影响,聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)技术被广泛应用于检测种子贮藏蛋白质的异质性,为分类、进化和遗传研究提供依据,也成为区分植物种和品种及鉴定品种纯度的有效手段与方法^[9-12]。芸豆种子蛋白质的遗传稳定性和品种特异性是否存在,以及其时空动态变化情况则鲜有报道,这给分析芸豆遗传多态性和品种亲缘关系带来技术问题。本试验选取2003-2005年国家芸豆区域试验中的种子活力、蛋白含量差异明显的4个品种^[13],采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析芸豆贮藏蛋白构成及其在发芽过程中的变化,以及品种间的差异,以期为芸豆品种改良、优质栽培及品种鉴定提供理论依据和实践指导。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验于2005年在西北农林科技大学进行,蛋白质含量测定采用凯氏定氮法。通过对2004-2005年芸豆区域试验的品种进行种子活力(发芽势)和蛋白质含量测定,筛选出4个芸豆品种,其中,种子活力较高的品种Y05(黑芸豆100%)、Y06(奶花芸豆88%),活力较低的品种Y09(奶花芸豆72%)、Y1+1(日本白54%);蛋白含量较高的品种Y1+1(日本白25.89%)、Y05(黑芸豆23.44%),蛋白含量较低的品种Y06(奶花芸豆21.91%)、Y09(奶花芸豆20.29%)。

1.2 蛋白样品的制备

干种子样品制备:取每个品种胚和子叶各3份,每份0.02 g,磨成粉末状后用1.5 mL离心管分装,再分别加入1 mL的蒸馏水、3%的NaCl溶液和样品缓冲液(直接加入1 mol/L Tris-HCl, pH6.8; 10% SDS; 2-巯基乙醇; 87%甘油; 溴酚蓝)^[14],重复3次,漩涡振荡10 min, 10 000 r/min离心10 min,取上清液0.2 mL,加0.2 mL的样品缓冲液,作为干种子的点样样品。

选取干燥度一致、饱满、种皮色泽好的芸豆种子150粒。培养前,将所有大豆种子经0.1% HgCl₂溶液

浸没消毒2 min后用纯水漂洗10次,放入装满蒸馏水经高温消毒的培养皿(内径为15 cm)中,每品种3盘,浸种8 h后取一次样,然后置于25℃恒温光照培养箱中避光发芽。每24 h取一次样,持续3次^[15,16]。试样去皮后,分离子叶和胚,分别称取0.02 g各3份,分别加入1 mL的蒸馏水、3%的NaCl溶液和样品缓冲液(直接加入)放入4℃冰研钵中,加入样品提取液1 mL研磨,转到1.5 mL的离心管,在4℃冰箱静置24 h,将放置的样品在10 000 r/min、4℃条件下离心10 min,弃去最上层的油层,取上清液0.2 mL,加0.2 mL的样品缓冲液(1 mol/L Tris-HCl, pH6.8; 10% SDS; 2-巯基乙醇; 87%甘油; 溴酚蓝)^[16],于-20℃冰箱中冷冻保存,作为发芽过程电泳样品。

1.3 蛋白电泳

制胶-点样-电泳-胶版固定-染色-脱色-凝胶成像采用郭尧君和汪家政、范明的方法^[14,17]:浓缩胶浓度3%,分离胶浓度12.5%,每孔点样量10 μL,电极缓冲液(3 g Tris, 14.4 g 甘氨酸, 1 g SDS定容至1 L, pH8.3),电泳时采用15 mA的稳定电流。蛋白分析过程参照豆类种子蛋白分析方法^[18-23]。

2 结果与分析

2.1 芸豆种子贮藏蛋白分析

从图1可以看出,芸豆种子含有丰富的条带。其中,芸豆种子贮藏蛋白的盐溶蛋白、水溶蛋白和总蛋白差异较小,仅有条带的深浅和个别亚基的差异;每个芸豆品种子叶和胚的贮藏蛋白差异非常明显,胚的各分子量蛋白含量相对均匀,子叶蛋白分子质量在43 000 Da左右的3个亚基含量非常丰富,条带光密度约占50%以上;不同芸豆品种之间胚、子叶都有差异,子叶在不同品种之间的差异主要表现在43 000 Da左右的3个亚基以外亚基,43 000 Da左右的3个亚基在不同品种之间的差异只有含量的相对不同。

2.2 芸豆种子萌发过程蛋白变化

从图2可以看出,4个芸豆品种在发芽过程中的总体趋势为:分子质量越大的亚基越早消失,分子质量越小的亚基越晚消失,胚的降解过程明显快于子叶的降解过程。在子叶中,43 000 Da左右的3个亚基降解含量随之逐步减小,43 000 Da以上的大分子量亚基降解迅速,43 000 Da以下的小分子量的亚基降解速率慢,甚至在31 000 Da以下的亚基有增多的趋势;胚所有分子质量蛋白的含量都在相对均匀减少,且几乎同时消失,只有在97 400 Da左右的亚基没有完全降解;胚的总蛋白的亚基在发芽第3天有增多的趋势;3种贮藏蛋白的降解速率基本一致。



1~ 3. Y05 黑芸豆的胚; 4~ 6. Y05 黑芸豆的子叶; 7~ 9. Y1+ 1 日本白的胚; 10~ 12. Y1+ 1 日本白的子叶; 13~ 15. Y06 奶花芸豆的胚; 16~ 18. Y06 奶花芸豆的子叶; 19~ 21. Y09 奶花芸豆的胚; 22~ 24. Y09 奶花芸豆的子叶; 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22. 水溶蛋白; 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23. 盐溶蛋白; 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 为总蛋白。
1- 3 were the embryos of Y05 Black kidney bean; 4- 6 were the cotyledons of Y05 Black kidney bean; 7- 9 were the embryos of Y1+ 1 Jap-white; 10- 12 were the cotyledons of Y1+ 1 Jap-white; 13- 15 were the embryos of Y06 naihua kidney; 16- 18 were the cotyledons of Y06 naihua kidney; 19- 21 were the embryos of Y09 naihua kidney; 22- 24 were the cotyledons of Y09 naihua kidney; 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 were the water soluble proteins; 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23 were the salt soluble proteins; 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 were the total proteins.

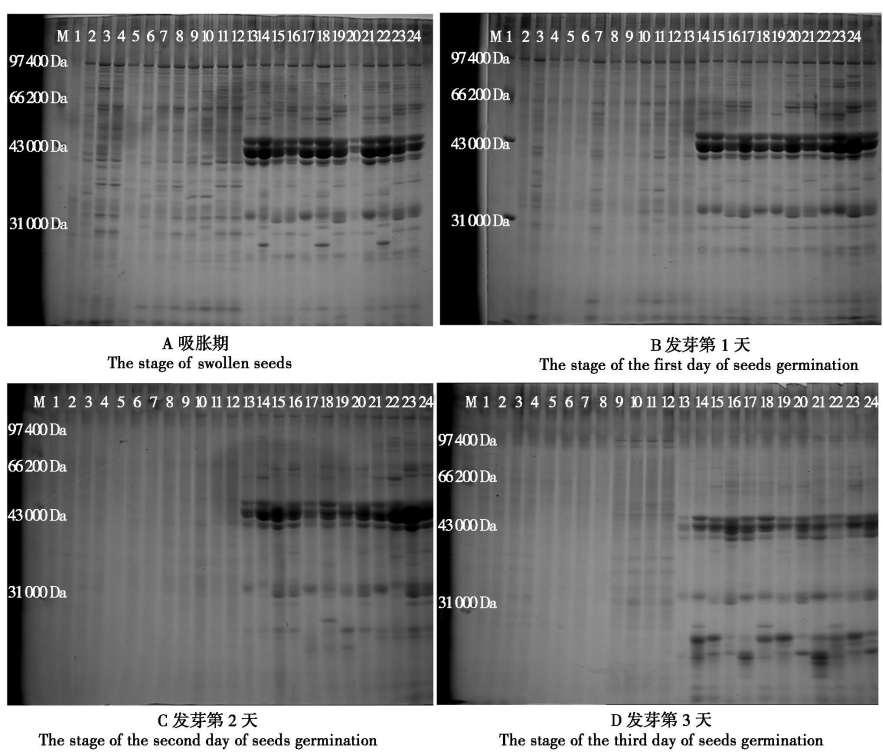
图 1 4 个芸豆品种的 3 种贮藏蛋白图谱(干种子期)
Fig. 1 SDS-PAGE patterns of the storage proteins during dry seeds of 4 varieties of kidney bean

不同芸豆品种之间的发芽过程存在差异, 种子活力高的芸豆品种(Y05, Y06) 萌发过程中亚基降解快, 而种子活力低的芸豆品种(Y09, Y1+ 1) 亚基降解慢; 蛋白含量高的(Y1+ 1, Y05) 与蛋白含量低的(Y06, Y09) 没有表现明显的差异。

3 讨论

贮藏蛋白的组成由遗传决定, 不受环境影响, 其组分上的差异可以反映出基因型的不同, 因而又称为品种的生化指纹。豆类贮藏主要由球蛋白和清蛋白组成, 其他蛋白含量很少^[3- 5], 豆类种子的水溶性蛋白和盐溶性蛋白研究已有较多的报道^[24- 26], 这与本试验结果基本一致。芸豆是自花授粉, 可通过条带有无进行品种鉴定和多样性分析, 相对于籽粒大小、粒色、株型、粒型更可靠, 且水溶和盐溶蛋白含量高, 蛋白条带丰富, 在品种鉴定时可节省成本开支^[8, 27], 本试验结果表明, 芸豆品种鉴定采用水溶蛋白、盐溶蛋白或总蛋白均可。

芸豆种子在萌发过程中, 蛋白的降解主要集中在局部区域, 它们可能是由贮藏蛋白酶降解, 这些局部降解的贮藏蛋白可供萌发期幼胚的生长和呼吸,



1~ 4. 胚的水溶蛋白; 5~ 8. 胚的盐溶蛋白; 9~ 12. 胚的总蛋白; 13~ 16. 子叶的水溶蛋白; 17~ 20. 子叶的盐溶蛋白; 21~ 24. 子叶的总蛋白; 1, 5, 9, 13, 17, 21. Y05 黑芸豆; 2, 6, 10, 14, 18, 22. Y1+ 1 日本白; 3, 7, 11, 15, 19, 23. Y06 奶花芸豆; 4, 8, 12, 16, 20, 24 为 Y09 奶花芸豆。
1- 4 were the water soluble proteins of the embryos; 5- 8 were the salt soluble proteins of the embryos; 9- 12 were the total proteins of the embryos; 13- 16 were the water soluble proteins of the cotyledons; 17- 20 were the salt soluble proteins of the cotyledons; 21- 24 were the total proteins of the cotyledons; 1, 5, 9, 13, 17, 21 were the kidney bean variety of Y05 Black kidney bean; 2, 6, 10, 14, 18, 22 were the kidney bean variety of Y1+ 1 Jap-white; 3, 7, 11, 15, 19, 23 were the kidney bean variety of Y06 naihua kidney; 4, 8, 12, 16, 20, 24 were the kidney bean variety of Y09 naihua kidney.

图 2 4 个芸豆品种的 3 种贮藏蛋白在发芽过程中变化图谱
Fig. 2 SDS-PAGE patterns of the changes of the storage proteins during seeds germination of 4 varieties of kidney bean

而 43 000 Da 左右的蛋白亚基可能为苗期需要能量提供保障; 子叶中分子质量大的亚基降解为小的亚基, 小的亚基降解为更小的亚基, 可以输送到胚中供其生长, 从而导致大分子的蛋白亚基分解快, 小的分解慢, 甚至有增加的趋势, 这与本试验结果基本一致, 但由于本试验是分析低分子蛋白亚基, 对于游离态的亚基与氨基酸不能显示^[28-31]。芸豆子叶蛋白占种子蛋白的绝大部分, 而 43 000 Da 左右的蛋白亚基占子叶蛋白的大部分, 表明 43 000 Da 左右的蛋白亚基在芸豆种子发芽过程中起到重要作用。有关芸豆蛋白亚基研究还有待进一步深入。

参考文献:

- [1] 阮禹松, 赵文明. 种子盐溶球蛋白的结构特征[J]. 西北植物学报, 2002, 22(4): 999-1003.
- [2] 何忠效, 张树政. 电泳[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [3] Gottschalk W, Mller H P. Seed Proteins[M]. Martinus Nijhoff/ DrW. Junk Publishers, Hague, 1983.
- [4] Shewry P R, Casey R. Seed Proteins[M]. Kluwer Academic, Dordrecht, 1999.
- [5] 王文军, 景新明. 种子蛋白质与蛋白质组的研究[J]. 植物学通报, 2005, 22(3): 257-266.
- [6] 何大澄, 肖雪媛. 差异蛋白质组学及其应用[J]. 北京师范大学学报, 2002, 38(4): 558-562.
- [7] 柴 岩, 万富士. 中国小杂粮产业发展报告[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2007: 84-90.
- [8] 林汝法, 柴 岩, 廖 琴, 等. 中国小杂粮[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002: 242-272.
- [9] Gardiner S E, Forde M B. Identification of grasses and forage legumes by SDS-PAGE of seed proteins[C]//Linsken H F, Jackson J F. Seed Analysis (series). Berlin: Springer Press, 1992: 43-61.
- [10] Odeigah P G C, Osanyinpeju A O. Seed protein electrophoretic characterization of cowpea (*Vigna unguiculata*) gemplasm from IITA gene bank[J]. Genet Res Crop Evol, 1996, 43: 485-491.
- [11] Valizadeh M. Seed storage protein profile of grain legumes grown in iran, using SDS-PAGE[J]. J Agric Scitechnol, 2001 (3): 287-292.
- [12] 黎 裕. 电泳在植物品种鉴定中的应用[J]. 种子, 1990 (4): 53-55.
- [13] 刘 军, 黄上志, 傅家瑞, 等. 种子活力与蛋白质关系的研究进展[J]. 植物学通报, 2001, 18(1): 46-51.
- [14] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 93-118.
- [15] 黄学林, 陈润政. 种子生理实验手册[M]. 北京: 农业出版社, 1979: 73-95.
- [16] 颜启传. 种子学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 420-470.
- [17] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 77-110.
- [18] 陈禅友, 汪仕斗, 潘 磊, 等. 豇豆萌发过程中蛋白质组分的时空变化[J]. 江汉大学学报: 自然科学版, 2006, 34(3): 60-65.
- [19] 姜振锋, 陈庆山, 杨庆凯, 等. 大豆种质资源贮藏蛋白亚基研究[J]. 东北农业大学学报, 2006, 37(5): 596-603.
- [20] 李雪琴, 苗笑亮, 裘爱泳. 蚕豆蛋白的提取分离及相对分子量的测定[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(6): 71-74.
- [21] 阮禹松, 赵文明. 黑豆盐溶球蛋白的研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(4): 581-585.
- [22] 夏幽泉, 幸亨泰. 箭筈豌豆 2 个品种的蛋白质电泳分析[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2003, 25(增刊): 115-120.
- [23] 王桂英, 胡素芹, 于同泉. 豆科蔬菜种子贮藏蛋白的电泳分析[J]. 北京农学院学报, 1995, 10(1): 43-47.
- [24] 李雪琴, 苗笑亮, 裘爱泳. 几种豆类蛋白质组成和结构比较[J]. 粮食与油脂, 2003(6): 19-20.
- [25] 周新安, 盖均镒, 马育华. 大豆种子贮存蛋白组成及其相关分析[J]. 大豆科学, 1992, 11(3): 191-197.
- [26] 岳爱琴, 杜维俊, 赵晋忠, 等. 不同大豆品质分析[J]. 华北农学报, 2005, 20(2): 30-32.
- [27] 兰海燕, 李立会. 蛋白质凝胶电泳技术在作物品种鉴定中的应用[J]. 中国农业科学, 2002, 35(8): 916-920.
- [28] 许 月, 石德成, 朱长甫. 不同进化类型大豆种子贮藏蛋白及其亚基积累和降解研究[D]. 长春: 东北师范大学, 1999: 19-25.
- [29] Wang Y, Wang B M, Liang H G. Degradation of storage proteins in germinating seeds[J]. Phytochemistry, 1985, 26(6): 1557-1566.
- [30] M ntz K, Belozerskey M A, Dunaevshy Y E, et al. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth[J]. J Exp Bot, 2001, 52(362): 1741-1752.
- [31] Schlereth A, Becker C, Horsmann J, et al. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa*) [J]. J Exp Bot, 2000, 51(349): 1423-1433.