

# 不同红麻种子耐老化性差异及热稳定蛋白的研究

王凤敏, 粟建光, 龚友才, 戴志刚, 陈基权, 郑海燕, 李 燕

(中国农业科学院麻类研究所, 长沙 410205)

**摘要:**利用 10 份红麻品种为材料, 研究红麻种子在人工老化过程中耐老化差异及其与热稳定蛋白的关系。结果表明: (1) 随着老化处理程度加深, 10 份红麻品种种子的发芽率、发芽指数及活力指数均逐渐下降, 但品种之间有显著差异; (2) 热稳定蛋白含量随着老化处理的加深呈现上升的趋势, 通过 SDS-PAGE 电泳显示, 辽 55 在 140h 老化处理中出现一条差异带, 分子量为 62.8kD, 其他 9 个品种各个处理间未出现差异带。10 份红麻品种在老化过程中, 辽 55 最耐老化, 在辽 55 中发现的热稳定蛋白可能与红麻品种的耐老化性及种子活力的丧失有关。

**关键词:** 红麻; 种子; 耐老化; 热稳定蛋白

## Difference of Aging Tolerance and Heat-Stable Proteins in Seeds of Difference Kenaf Cultivars

WANG Feng-min, SU Jian-guang, GONG You-cai, DAI Zhi-gang, CHEN Ji-quan, ZHENG Hai-yan, LI Yan

(Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410205)

**Abstract:** The difference of aging tolerance and the heat-stable proteins were among 10 kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) cultivars, though aging treatment of kenaf. The results indicated that, (1) Seed gemmation and vigor index of 10 kenaf varieties reduced with the extent time in the process of aging, while there were notable difference in 10 kenaf varieties; (2) The content of heat-stable protein gradually increased with aging treatment deepening, SDS-PAGE eletrophoresis showed that a 62.8kD heat-stable protein appeared only in liao 55 in 140h aging treatment, there were no differences in others. Liao 55 was the most anti-aging variety during aging treatment in 10 kenaf varieties, these results suggested that the special heat-stable proteins might be related to aging tolerance.

**Key words:** Kenaf; Seed; Aging tolerance; Heat-stable protein

红麻 (*Hibiscus cannabinus* L.) 是锦葵科木槿属一年生草本植物, 重要的韧皮纤维作物, 红麻种子中富含蛋白质和脂肪, 蛋白质的含量范围在 26.1% ~ 29.9%, 脂肪含量在 21.3% ~ 24.2%<sup>[1]</sup>, 与其他作物相比, 高油分、高蛋白作物的种子更易发生劣变<sup>[2]</sup>。红麻属于典型的短日照作物, 生产用种一般采用“南种北植”技术, 即在南方地区, 如广东、广西和福建繁种, 调到北方地区种植生产纤维。红麻种子常跨年度种植, 种子的贮藏过程易出现种子生活力下降现象。本研究通过对红麻衰老过程中种子活力及热稳定蛋白的变化分析, 探寻红麻种子的衰老

规律, 为种子的安全保存与利用提供理论依据。目前已在大豆<sup>[2]</sup>、玉米<sup>[3]</sup>、谷子<sup>[4]</sup>、烟草<sup>[5]</sup>、棉花<sup>[6]</sup>等作物中有种子老化方面的研究, 结果表明, 在种子老化过程中, 随着老化程度的加深, 种子生活力逐渐下降。范国强等<sup>[7]</sup>在对老化的花生种子进行研究时发现, 当种子活力下降到一定程度时, 种胚中出现一个分子量 10kD 等电点为 6.2 的新蛋白, 表明种子老化可能是特异蛋白作用的结果。有关红麻种子老化方面的研究尚未见报道。本试验采用高温高湿对红麻种子进行人工老化处理, 通过老化处理后的种子活力和热稳定蛋白的变化, 来探讨

收稿日期: 2008-04-16

修回日期: 2009-07-29

基金项目: 国家作物种质资源保护项目 (NB08-2130135-40)

作者简介: 王凤敏, 在读硕士, 研究方向为作物种质资源的保护与利用。E-mail: wangfm89@163.com

通讯作者: 粟建光, 研究员。E-mail: jgsu@vip.163.com

红麻种子衰老的机理,为红麻种质资源的安全保存提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为 10 份红麻栽培品种(表 1),于 2007 年 10 月收于中国农业科学院麻类研究所沅江试验基地。辽 55 为早熟品种,新红 95 为中熟品种,其余品种为晚熟品种。当种子完全成熟时,对其进行分期收获。

表 1 供试红麻品种、来源、初始发芽率及生育期

Table 1 The tested kenaf cultivars, origin, germination percentage and growth period

材料编号	品种	原产地	初始发芽率(%)	生育期(d)
No.	Cultivar	Origin	Germination percentage	Growth period
1	辽 55	辽宁	99.0	125
2	新红 95	山东	99.0	160
3	V379	湖南	88.0	220
4	KB11	湖南	99.7	220
5	KB2	湖南	89.7	220
6	83-20	美国	93.7	220
7	SF192	美国	92.3	220
8	红引 135	美国	87.7	220
10	福红 991	福建	94.3	220
14	台农 1 号	台湾	90.7	220

### 1.2 方法

**1.2.1 人工加速老化处理** 采用人工加速老化的方法,即高温高湿法(温度为  $44 \pm 1^\circ\text{C}$ ,湿度 95%),采用 LH-150S 种子老化箱对红麻种子进行老化处理。老化时间分别为 20h、40h、60h、80h、100h、120h、140h 共 7 个处理,未经老化处理的为对照。处理后取出种子在室温下晾 3~4d,使种子含水量降至原状态后进行各项发芽指标测定,3 次重复。

**1.2.2 种子活力测定** 种子发芽率参照 GB/T 3543—1995《农作物种子检验规程》<sup>[8]</sup>进行,4d 后统计发芽势,8d 后统计发芽率。发芽指数(GI) =  $\sum (G_t/D_t)$ ;活力指数(VI) =  $GI \times S_x$ ;简化活力指数 = 发芽率  $\times S_x$ 。G<sub>t</sub> 为 t<sub>d</sub> 后的发芽数,D<sub>t</sub> 为发芽天数,S<sub>x</sub> 为发芽 x<sub>d</sub> 后的幼苗干重。

**1.2.3 热稳定蛋白的提取、含量测定及 SDS-PAGE 电泳** 取 0.5g 种子在液氮中磨成粉,加入冷丙酮置于  $-18^\circ\text{C}$  下过夜脱脂,脱脂粉风干备用。热稳定蛋白的提取参照吴晓亮等<sup>[9]</sup>和朱诚等<sup>[10]</sup>的方法,略加修改。取 0.2g 脱脂粉加入 1ml 预冷的提取液(pH = 8.0 Tris-HCl, 0.5mol/L NaCl, 10mmol/L 2-ME, 1mmol/L PMSF),  $4^\circ\text{C}$  冰浴研磨,离心力 10000g  $4^\circ\text{C}$  离心 25min,吸取上清液,置于  $100^\circ\text{C}$  水浴中 10min,立即取出冷却后,离心力 10000g 离心 10min,取离心后的上清液加入 2 倍的冷丙酮( $-20^\circ\text{C}$ ),放于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中过夜沉淀蛋白,10000g 离心 10min 收集沉淀,用于电泳分析。热稳定蛋白的含量采用考马斯亮蓝 G-250 法测定。

取蛋白质沉淀加入 100 $\mu\text{l}$  样品缓冲液(含 50mmol/L pH = 6.8 Tris-HCl, 2% SDS, 20% 甘油, 5% 2-ME, 0.1% 溴酚蓝),  $100^\circ\text{C}$  水浴 6min,每泳道上样 10 $\mu\text{l}$ 。SDS 聚丙烯酰胺凝胶的制备参照汪家政等<sup>[11]</sup>的方法,采用浓缩胶 3%,分离胶浓度 12%,恒压浓缩胶 85V,分离胶 165V。染色脱色参照郭尧君<sup>[12]</sup>的方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 老化处理对红麻种子发芽率的影响

10 份红麻品种的种子随着老化时间延长,发芽率逐渐降低,不同品种发芽率的下降速率不同,辽 55、新红 95、KB11 的发芽率明显高于其他品种(表 2),在处理 120~140h 之间发芽率急剧降低,分别降低 42.7%、45.3%、32.0%;83-20、SF192、V379、红引 135、KB2 5 个品种发芽率的变化基本呈“S”曲线(图 1),在处理 60~80h 之间变化较大,其发芽率分别降低 20.0%、35.0%、36.0%、43.0%、29.7%;福红 991、台农 1 号发芽率下降最快,在处理 40~60h 时就出现骤降,其发芽率分别降低 45.2%、20.7%。综上可看出,处于图 1 上方曲线发芽率较高,是抗老化的品种,即辽 55、新红 95、KB11 较抗老化;而福红 991、台农 1 号的发芽率变化曲线处于最下方,随老化时间延长,发芽率快速下降,说明是不抗老化品种;从骤变阶段来看,品种越抗老化,其骤变阶段越处于老化后期。最耐老化的辽 55 为早熟品种,其次是中熟品种新红 95,晚熟品种是耐老化性较差的,说明耐老化特性也可能与生育期的长短有一定的关系。

表 2 10 份红麻品种老化过程中发芽率的变化

Table 2 Germination change in 10 accessions of kenaf cultivars										( % )
处理 Treatment	辽 55 Liao 55	新红 95 Xin hong 95	KB11	83-20	SF192	V379	红引 135 Hong yin 135	KB2	福红 991 Fu hong 991	台农 1 号 Tai nong 1
CK	99.0	99.0	99.7	93.7	92.3	88.0	87.7	89.7	94.3	90.7
20h	94.7	95.7	97.7	87.0	86.3	79.7	86.7	84.3	86.7	71.3
40h	92.3	94.0	95.0	80.3	79.7	71.0	74.7	73.7	79.7	53.3
60h	91.0	94.3	85.3	72.3	73.3	67.3	65.3	69.7	34.5	32.7
80h	84.3	89.3	69.7	52.3	38.3	31.3	35.7	26.7	9.3	21.3
100h	79.0	70.3	38.0	21.0	27.3	16.3	16.3	24.0	1.0	9.7
120h	55.0	52.3	33.7	7.7	19.3	16.3	9.7	10.3	0.3	5.0
140h	12.3	7.0	1.7	4.3	5.7	6.7	0.3	1.7	0.0	0.0

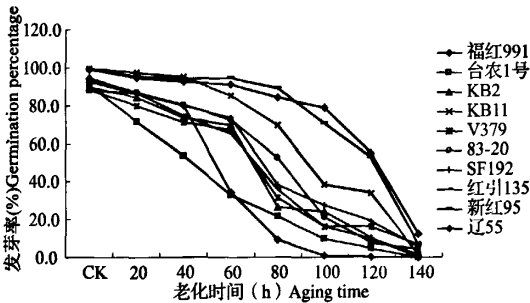


图 1 老化处理下红麻品种种子发芽率的变化曲线

Fig. 1 Germination percentage changes on 10 accessions of kenaf cultivars during aging

2.2 红麻品种抗老化的综合评价

用模糊数学函数隶属法<sup>[13]</sup>对 10 份红麻品种种子的发芽势、发芽率、发芽指数、活力指数、简化活力指数和苗干重进行分析,从而评价其耐老化性。结果表明,10 份红麻种子的发芽率、发芽势差异显著(表 3),辽 55、新红 95 的发芽率、发芽势显著高于其他品种,而福红 991、台农 1 号显著低于其他品种,

其中辽 55 具有较强的耐老化性。根据 10 份品种之间的模糊数学隶属函数总平均值(表 4),其耐老化性由强到弱的综合排名是:辽 55 > 新红 95 > KB11 > 83-20 > SF192 > V379 > 红引 135 > KB2 > 福红 991 > 台农 1 号。

表 3 10 份红麻品种发芽率和发芽势方差分析

Table 3 Analysis of variance of germination percentage and germination power about 10 accessions of kenaf cultivars

品种 Cultivar	发芽率(%) Germination percentage	发芽势(%) Germination power
辽 55	76.5a	72.7a
新红 95	75.5a	72.5a
KB11	65.1b	59.6b
SF192	52.8c	49.2c
83-20	52.3c	51.3c
KB2	47.5c	46.0c
V379	47.1c	44.8c
红引 135	47.0c	44.8c
福红 991	38.3d	36.6d
台农 1 号	35.5d	34.0d

表 4 10 份红麻品种抗老化综合评价

Table 4 The aging-resistant ability assessment of 10 accessions of kenaf cultivars

品种 Cultivar	发芽势 GPI	发芽率 GP2	发芽指数 GI	活力指数 VI	简化活力指数 SVI	苗干重 SDW	平均值 Mean	综合排名 CR
辽 55	0.7483	0.7596	0.5859	0.5087	0.6468	0.7533	0.6671	1
新红 95	0.7175	0.7525	0.6112	0.5277	0.6389	0.7319	0.6633	2
V379	0.4479	0.4708	0.3631	0.2951	0.2975	0.4413	0.3860	6
KB11	0.5958	0.6508	0.4584	0.5161	0.4747	0.5685	0.5441	3
KB2	0.4604	0.4750	0.3752	0.2370	0.1978	0.4098	0.3592	8
83-20	0.5133	0.5233	0.3877	0.2721	0.6646	0.4734	0.4724	4
SF192	0.4921	0.5279	0.4002	0.2637	0.3372	0.4629	0.4140	5
红引 135	0.4475	0.4704	0.3698	0.2258	0.2765	0.3880	0.3630	7
福红 991	0.3660	0.3823	0.2820	0.2015	0.2674	0.3275	0.3045	9
台农 1 号	0.3379	0.3550	0.2829	0.1562	0.1865	0.2926	0.2685	10

GP1: Germination percentage; GP2: Germination power; GI: Germination index; VI: Vigor index; SVI: Simple vigor index; SDW: Seedling dry weight; CR: Comprehensive ranking

### 2.3 不同红麻品种种子热稳定蛋白含量比较

从图2可以看出,10份红麻材料随着老化时间的延长,红麻种子中热稳定蛋白的含量将逐渐升高,热稳定蛋白含量变幅为0.68~2.43mg/g。V379热稳定蛋白含量的变幅为0.68~1.79mg/g,此品种热稳定蛋白含量始终处于最低的水平;而

辽55热稳定蛋白含量的变幅为1.89~2.43mg/g,在整个老化过程中始终处于最高水平,在处理140h时,辽55的热稳定蛋白含量达到最高水平2.43mg/g,平均值大于2.0mg/g,而其他品种的平均值均小于2.0mg/g,说明辽55热稳定蛋白的含量明显高于其他品种。

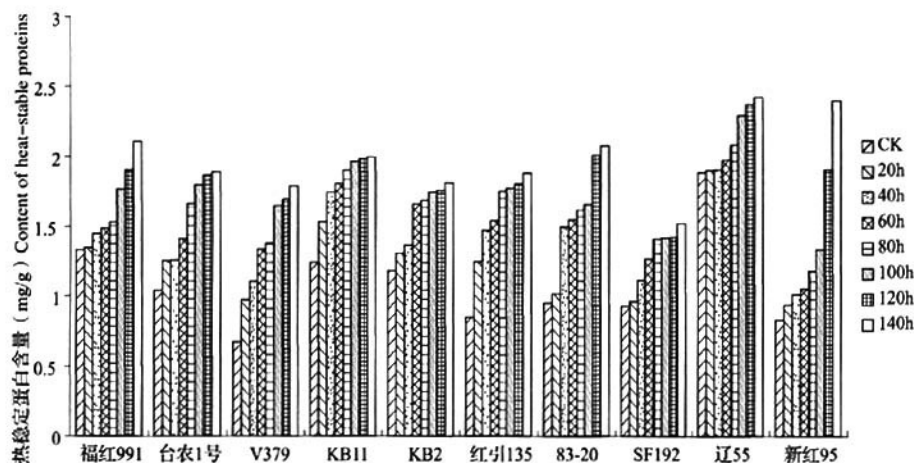


图2 红麻品种老化过程中热稳定蛋白含量变化

Fig.2 Change of heat-stable protein content of kenaf cultivars

### 2.4 不同红麻品种种子热稳定蛋白 SDS-PAGE 电泳

通过对10个红麻品种的老化处理及其对照处理后热稳定蛋白的SDS-PAGE电泳图谱分析得知,其中9个品种在各个老化处理后没有出现新的蛋

白,而辽55在140h的老化处理后出现了一条明显的差异带,分子量为62.8kD(图3),其他的9个品种(图4)没有出现,由此可推测此热稳定蛋白和红麻种子的抗老化性有一定的关系,对今后耐老化品种的研究有一定的指导意义。

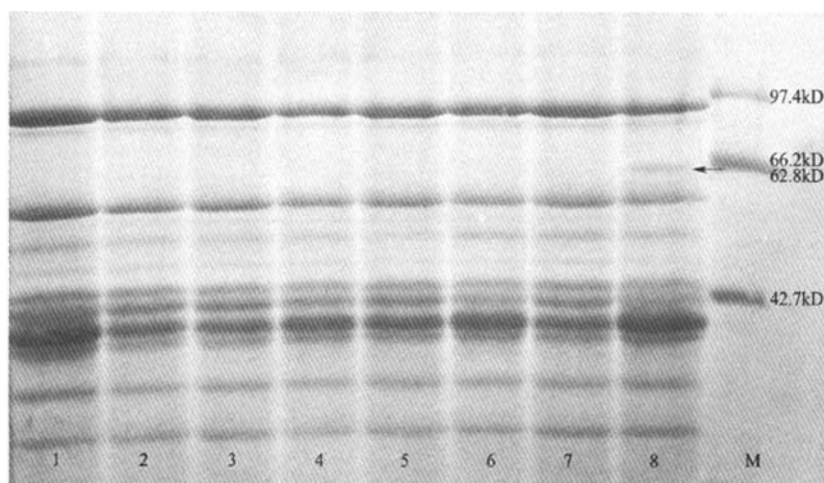


图3 辽55种子在老化处理后热稳定蛋白的SDS-PAGE电泳图谱

Fig.3 SDS-PAGE of heat-stable protein in kenaf cultivar Liao 55 during different aging treatment

1: 未经老化处理的; 2~8: 经老化处理后的, 处理水平分别为20h、40h、60h、80h、100h、120h、140h。下同  
1: without aging; 2-8: Aging treatment levels were 20h, 40h, 60h, 80h, 100h, 120h, 140h respectively. The same as below

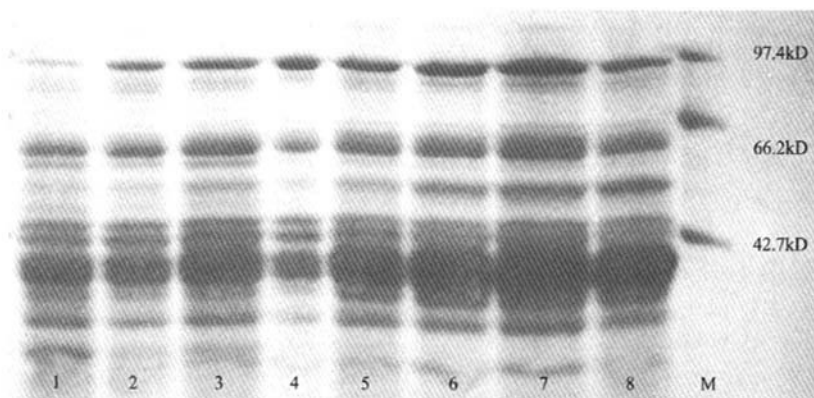


图4 83-20种子在老化处理后热稳定蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.4 SDS-PAGE of heat-stable protein in kenaf cultivar 83-20 during different aging treatment

### 3 讨论

本实验的研究结果表明,供试的 10 份红麻品种中台农 1 号、福红 991 耐老化能力最差,而辽 55 品种的耐老化能力最强,其中种子活力随着老化程度加深逐渐降低,与大豆<sup>[2]</sup>、玉米<sup>[3]</sup>、谷子<sup>[4]</sup>、烟草<sup>[5]</sup>、棉花<sup>[6]</sup>、大白菜<sup>[14]</sup>、花生<sup>[15]</sup>的研究结果一致。由此说明,高温高湿的处理会加速种子的老化进程,种子首先发生生化劣变,然后发生生理劣变,最后导致种子发芽指标迅速下降。加速老化法是反映这种活力内在变化最可靠而直接的方法

近年来,种子蛋白与种子活力的关系已有很多报道,朱诚等<sup>[10]</sup>在研究不同品种水稻间耐贮藏性的差异时发现,籼稻和粳稻之间有一条明显的 36.3kD 的热稳定蛋白差异带;刘军等<sup>[16]</sup>对不同活力的玉米种子胚萌发过程中蛋白质变化做了研究,结果表明高活力的种胚与低活力种胚 SDS-PAGE 图谱有所不同;Gidrol 等<sup>[17]</sup>通过电泳分析老化后大豆等种子多肽的变化,发现不同活力的胚与“萌发特异性多态”并无相关性。在本研究中,红麻种子老化后,热稳定蛋白的含量明显增加,这与种子活力高低趋势相反,表明热稳定蛋白可能是应激老化胁迫的蛋白;最耐老化的品种辽 55 在 140h 的老化处理中发现了新的条带,与刘军等<sup>[16]</sup>的研究存在一致性,可推测此蛋白条带与种子的耐老化特性有一定的相关性;新红 95 的发芽指标与辽 55 相近,但新红 95 中没有出现差异带,这可能与品种特性有关;辽 55 可能有热稳定蛋白方面的特异性,而品种新红 95 就没有这种特异性,这充分体现了品种间的差异。本文发现了可

能与耐老化相关的热稳定蛋白,为今后进一步深入的研究奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 肖爱平,田小兰,冷鹏.红麻种子化学成分的分析研究[J].中国麻作,1993(3):16-17
- [2] 周建群,乔燕祥,穆志新,等.大豆种子老化过程中活力指标的研究[J].山西农业科学,2007,35(3):33-35
- [3] 渠云芳,马金虎,贺润平,等.高温老化对两个玉米品种种子活力发芽指标影响的研究[J].中国农学通报,2006,2(22):156-159
- [4] 智慧,陈洪斌,凌莉.加速老化法测定谷子种子活力的研究[J].中国农业科学,1999,32(3):66-71
- [5] 许美玲.烟草种子的老化及发芽规律研究[J].种子,2006,9(25):9-13
- [6] 马金虎,王宏富,王玉国,等.高温老化对棉花种子发芽及生理特性影响的研究[J].棉花学报,2005,17(1):42-46
- [7] 范国强,傅家瑞.花生种子老化与蛋白质变化关系的研究[J].种子,1996(2):6-8
- [8] 国家技术监督局.农作物种子检验规程 GB/T3543.4-1995[M].北京:中国标准出版社,1995
- [9] 吴晓光,辛萍萍,张志娥,等.水稻种子室温贮藏最适含水量及其热稳定蛋白的研究[J].中国农业科学,2006,39(11):2214-2219
- [10] 朱诚,刘信,曾广文,等.不同水稻品种种子耐超干性差异及其热稳定蛋白的研究[J].中国水稻科学,2001,15(4):287-290
- [11] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2000:77-91
- [12] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,1999
- [13] 朱媛媛,史团省,谷卫彬.种子萌发期甜高粱对耐胁迫的响应及其耐盐综合评价分析[J].种子,2008,2(27):43-47
- [14] 唐祖君,宋明.大白菜种子人工老化及劣变的生理生化分析[J].园艺学报,1999,26(5):319-322
- [15] 杜红,路红卫.吸湿-回干处理对老化花生种子活力的影响[J].中国种业,2008(6):35-36
- [16] 刘军,黄上志,傅家瑞.不同活力玉米种子胚萌发过程中蛋白质的变化[J].热带亚热带植物学报,1999,7(1):65-69
- [17] Gidrol X, Noubhani A, Mocquot B. Effect of accelerated aging on protein synthesis in two legume seeds[J]. Plant Physiol Biochem, 1988,26:281-288

# 不同红麻种子耐老化性差异及热稳定蛋白的研究

作者: [王凤敏](#), [粟建光](#), [龚友才](#), [戴志刚](#), [陈基权](#), [郑海燕](#), [李燕](#)  
作者单位: [中国农业科学院麻类研究所, 长沙, 410205](#)  
刊名: [植物遗传资源学报](#)   
英文刊名: [JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES](#)  
年, 卷(期): 2010, 11(1)

## 参考文献(17条)

1. 肖爱平;田小兰;冷鹃 [红麻种子化学成分的分析研究](#) 1993(03)
2. [Gidrol X;Noubhani A;Mocquot B](#) [Effect of accelerated aging on protein synthesis in two legume seeds](#) 1988
3. 刘军;黄上志;傅家瑞 [不同活力玉米种子胚萌发过程中蛋白质的变化](#) 1999(01)
4. 杜红;路红卫 [吸湿-回干处理对老化花生种子活力的影响](#)[期刊论文]-[中国种业](#) 2008(06)
5. 唐祖君;宋明 [大白菜种子人工老化及劣变的生理生化分析](#)[期刊论文]-[园艺学报](#) 1999(05)
6. 柴媛媛;史团省;谷卫彬 [种子萌发期甜高粱对耐胁迫的响应及其耐盐综合评价分析](#) 2008(27)
7. 郭尧君 [蛋白质电泳实验技术](#) 1999
8. 汪家政;范明 [蛋白质技术手册](#) 2000
9. 朱诚;刘信;曾广文 [不同水稻品种种子耐超干性差异及其热稳定蛋白的研究](#)[期刊论文]-[中国水稻科学](#) 2001(04)
10. 周建萍;乔燕祥;穆志新 [大豆种子老化过程中活力指标的研究](#)[期刊论文]-[山阿农业科学](#) 2007(03)
11. 吴晓亮;管萍萍;张志娥 [水稻种子室温贮藏最适含水量及其热稳定蛋白的研究](#)[期刊论文]-[中国农业科学](#) 2006(11)
12. [国家质量技术监督局](#) [农作物种子检验规程GB/T3543. 4-1995](#) 1995
13. 范国强;傅家瑞 [花生种子老化与蛋白质变化关系的研究](#) 1996(02)
14. 马金虎;王宏富;王玉国 [高温老化对棉花种子发芽及生理特性影响的研究](#)[期刊论文]-[棉花学报](#) 2005(01)
15. 许美玲 [烟草种子的老化及发芽规律研究](#)[期刊论文]-[种子](#) 2006(25)
16. 智慧;陈洪斌;凌莉 [加速老化法测定谷子种子活力的研究](#)[期刊论文]-[中国农业科学](#) 1999(03)
17. 渠云芳;马金虎;贺润平 [高温老化对两个玉米品种种子活力发芽指标影响的研究](#)[期刊论文]-[中国农学通报](#) 2006(22)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zwyczyxb201001002.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201001002.aspx)