

不同硼营养下甘蓝型油菜体内游离 氨基酸成分变化分析*

王震宇 张福锁

沈康

(中国农业大学植物营养系,北京 100094)

(南京农业大学农学系)

摘要: 本文研究了不同供硼水平(缺硼、正常供硼、硼过量)对油菜幼苗叶片及花药内游离氨基酸成分的影响。实验结果表明,缺硼和硼过量都会造成植株生长异常,幼苗干物重显著下降,植株幼苗叶片与花药内蛋白水解酶的活性升高,而游离氨基酸总量增加,同时,氨基酸的组分也发生了明显的变化。不适宜供硼(缺硼、硼过量)使幼苗叶片内脯氨酸含量明显升高,与之相伴随的是一些氨基酸含量的下降,而花药内脯氨酸含量有所减少。

关键词: 硼; 游离氨基酸; 甘蓝型油菜; 幼苗叶片; 花药

中图分类号: S311

硼是植物生长发育所必需的营养元素之一。大量研究结果证明,我国南方油菜产区的土壤大面积缺硼或严重缺硼,施用硼肥的效果十分显著,这就促使人们对硼的作用机理及缺硼的有效防治措施进行深入的研究。目前国内的研究主要集中在施硼技术和效果方面,有关硼对植株代谢,特别是对氮素代谢的影响报道较少。本实验结合我国南方冬油菜产区缺硼的特点,采用营养液和土壤盆栽两种培养方法,对不同供硼水平下油菜生长发育、植株体内氨基酸组分和含量的变化进行了分析,进一步探讨了氨基酸组分的含量变化与硼胁迫造成油菜“花而不实”之间的关系。

1 材料与方 法

1.1 植物材料 甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)宁油8号,系低芥酸品种,种子由江苏省农业科学院作物研究所提供。

1.2 溶液培养试验 种子用0.1% HgCl_2 溶液灭菌5 min,在25℃培养箱中用蒸馏水浸泡10 h,取出后播于湿润的蛭石中,待子叶展开后,移栽于Hoagland营养液中培养。试验设3个处理:缺硼(B 0.01 mg/L, 0.01B),正常供硼(B 1 mg/L, 1B),硼过量(B 20 mg/L, 20B)。待油菜生长到4叶1心时,分别将0.01B和20B营养液转换为1B的营养液,作为缺硼转正常(0.01B→1B)、硼过量转正常(20B→1B)的处理,营养液pH调整至5.5左右。五叶一心时,于上午8~9时取地上部第4、5片展开叶,供测定分析。

1.3 土培试验 供试土壤采自江苏省溧水县傅家边林场,土壤类型为马肝土,质地为壤质粘土。土壤含有效硼0.1 mg/kg(40℃热水溶性)。试验用塑料桶,每桶装土10 kg。氮、磷、

收稿日期: 1994-11-16

修回日期: 1995-07-15

* 国家自然科学基金资助项目

钾用分析纯试剂 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2SO_4 , 按每公斤土壤 0.15 gN, 0.2 g P_2O_5 和 0.2 g K_2O 加入混匀。试验设 3 个水平, 即缺硼(B 0.1 mg/kg, 0.1B), 正常供硼(B 1 mg/kg, 1B), 硼过量(B 10 mg/kg, 10B)。所有肥料均在播种前作基肥一次施入。整个生育期间均用蒸馏水浇灌, 每桶定株两棵。在开花期采取上午 8 时开放的主花序上的花朵, 放入 -40°C 冰箱中备用。

1.4 游离氨基酸的提取和测定 氨基酸的提取参照 Barnert 和 Kern 及 Atkins^[1,2] 的方法。样品在小型玻璃匀浆器中研磨, 用 1 mL 80% 乙醇提取, $12\,000 \times g$ 离心 10 min, 共提取 4 次, 合并上清液, 于 80°C 水浴上蒸去乙醇, 然后浓缩到 0.5 mL, 按 1:1 的比例加入 5% 的磺基水杨酸(蛋白质沉淀剂), 于 $15\,000 \times g$ 下离心 15 min, 取上清液用 Beckman121-BM 型氨基酸分析仪分析。

1.5 蛋白酶活性的测定 利用内源蛋白质作底物, 将反应液与对照液过滤后, 沉淀部分用凯氏定氮法测定蛋白氮。反应液与对照液的蛋白质含量作为计算酶活性的基础^[3,4]。蛋白酶活性单位为每小时每克蛋白所含 $\text{NH}_2\text{-N}$ 的毫克数(见图 1、2)。

2 结果与分析

2.1 施硼对油菜幼苗生长的影响 由表 1 可见, 无论是缺硼或是硼过量处理, 其植株地上部与根的干物重均显著低于正常供硼处理。若在五叶一心时转入正常供硼处理, 对前期缺硼处理的植株根系生长无明显的改善作用, 而前期硼过量的植物根干物重可提高 34.26%; 这两种处理的地上部干物重都比未转入正常供硼处理的植株有所增加。

表 1 不同供硼状况下幼苗叶片干物重的变化

Table 1 Dry weights of seedling leaves under different boron treatments

项目 Item	硼 处 理 Boron treatment				
	0.01B	1B	20B	0.01B→1B	20B→1B
干物重/ $\text{g} \cdot \text{plant}^{-1}$ Dry weight	0.019d	0.060a	0.035c	0.019d	0.047b
	± 0.001	± 0.008	± 0.007	± 0.002	± 0.003
	0.284d	0.526a	0.341c	0.305d	0.447b
	± 0.021	± 0.012	± 0.030	± 0.013	± 0.006

注: a, b, c, d 表示不同处理间差异显著($P < 5\%$)。

Figures in a row followed by different letters are different to the level of significance of $P < 5\%$

2.2 幼苗叶片内游离氨基酸成分和含量的变化 表 2 的分析结果表明, 在营养生长阶段, 不同硼供应水平的植株叶片内游离氨基酸的组分无明显差异, 但其含量差异较明显, 突出表现在脯氨酸方面, 即缺硼幼叶中脯氨酸含量比对照高 28 倍多, 缺硼也使得幼叶中绝大多数其他的氨基酸含量明显升高。高硼处理也有类似的趋势, 但变化幅度相对要小些。然而, 缺硼和硼过量处理下, 丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、赖氨酸的含量有所减少。尤其是甘氨酸, 缺硼或硼过量处理下, 其含量分别降至对照的 19.30% 和 38.50%。

另外, 不同供硼水平的幼叶内游离氨基酸总量差异也较显著。其中, 缺硼处理的幼叶内游离氨基酸的总量比对照增加了 55.69%, 硼过量处理增加了 20.20%, 说明不适宜供硼都会导致叶片内的总游离氨基酸积累。

2.3 花药内游离氨基酸的含量变化 不同的硼供应水平对花药内游离氨基酸的含量有一定的影响,但其变化趋势与幼苗叶片大不相同(表3)。除脯氨酸、精氨酸、赖氨酸的含量比正常供硼花药有少量减少外,其它大多数的氨基酸含量都有不同程度的增加。其中,缺硼花药中脯氨酸的含量比正常供硼花药减少了4.30%;高硼处理的花药游离氨基酸变化趋势与缺硼处理的大体一致,只是比较程度相对要小些。

2.4 蛋白酶活性的差异 蛋白酶活性能反映植株体内蛋白质的水解状况。缺硼和硼过量的幼苗叶片和花药中蛋白酶活性均有不同程度的增高,尤以缺硼处理植株表现最为明显(图1,2)。在缺硼、硼过量处理植株恢复正常供硼后,幼苗叶片中蛋白酶活性都有所下降。由此可见,硼胁迫下,蛋白酶活性被激发,加速了蛋白质的水解作用,造成植株中可溶性蛋白质含量下降,同时造成游离氨基酸库容增大。

3 讨论

硼胁迫造成油菜植株生长异常,植株体内一系列氮化物的代谢发生变化。从本文对油菜幼苗叶片及花药内游离氨基酸组分含量的分析

表2 不同硼处理下幼苗叶片游离氨基酸组分的变化

Table 2 Changes in free amino acid composition of seedling leaves under different boron treatments FW/mg·g⁻¹

氨基酸 Amino acid		硼处理 Boron treatment		
		0.01B	1B	20B
苏氨酸	Thr.	0.356 3	0.249 5	0.323 3
丝氨酸	Ser.	0.095 4	0.104 2	0.103 8
谷氨酸	Glu.	0.357 4	0.347 8	0.345 2
甘氨酸	Gly.	0.021 9	0.113 5	0.043 7
丙氨酸	Ala.	0.082 9	0.107 8	0.105 7
半胱氨酸	Cys.	—	—	—
缬氨酸	Val.	0.018 8	0.014 4	0.016 1
蛋氨酸	Met.	—	—	—
异亮氨酸	Ileu.	0.013 2	0.011 3	0.010 2
亮氨酸	Leu.	0.003 5	0.002 9	0.002 7
色氨酸	Tyr.	—	—	0.004 0
苯丙氨酸	Phe.	0.014 7	0.015 1	0.105 3
赖氨酸	Lys.	0.017 2	0.026 0	0.026 0
组氨酸	His.	0.013 1	0.012 9	0.135
精氨酸	Arg.	0.041 5	0.045 4	0.056 1
脯氨酸	Pro.	0.635 1	0.022 5	0.224 5
总氨基酸	Total	1.671	1.073 3	1.290 1

表3 不同硼处理下花药内游离氨基酸组分的变化

Table 3 Changes in free amino acid composition of anthers under different boron treatment FW/mg·g⁻¹

氨基酸 Amino acid		硼处理 Boron treatment		
		0.1B	1B	10B
苏氨酸	Thr.	0.145 8	0.075 7	0.077 3
丝氨酸	Ser.	0.288 9	0.162 8	0.022
谷氨酸	Glu.	0.413 1	0.113 3	0.24 4
甘氨酸	Gly.	0.398 4	0.337 8	0.24 5
丙氨酸	Ala.	0.550 3	0.480 5	0.80 9
半胱氨酸	Cys.	0.103 1	0.058 4	0.79 1
缬氨酸	Val.	0.671 1	0.429 0	0.511 6
蛋氨酸	Met.	0.019 9	0.014 8	0.176 0
异亮氨酸	Ileu.	0.546 6	0.331 7	0.75 8
亮氨酸	Leu.	0.371 7	0.258 1	0.284 9
色氨酸	Tyr.	0.076 9	0.051 6	0.062 9
苯丙氨酸	Phe.	0.480 9	0.304 7	0.44 1
赖氨酸	Lys.	0.252 1	0.257 4	0.02 9
组氨酸	His.	0.299 7	0.223 1	0.68 0
精氨酸	Arg.	0.309 2	0.432 1	0.319 2
脯氨酸	Pro.	2.489 2	2.601 0	5.28 0
总氨基酸	Total	7.4169	6.0191	6.6263

结果可以看出,不适宜供硼会使氨基酸总量增加,这主要是由于不适宜供硼导致蛋白酶活性被激发,蛋白水解作用增强^[5],从而使游离氨基酸库容增大。

另外,从我们的实验结果来看,缺硼导致油菜叶片中全氮、蛋白蛋的含量显著下降。说明缺硼抑制了叶的幼苗叶片中氮素的同化,不仅表现在对氮素的吸收,而且更加严重地抑制了叶片中蛋白质的合成^[6]。这也从实验中得到了进一步的证明,缺硼油菜叶片及花药内 RNA 含量明显下降, DNA 含量下降幅度要小些,而 RNA 水解酶活性却显著升高^[7]。这都说明了缺硼在限制了氨基酸利用的同时,对蛋白质合成系统产生抑制^[1,8]。

在逆境生理学中,对脯氨酸的研究比较引人注目,其原因是它在逆境下具有异乎寻常的变化。大量的研究报告^[9~12],在逆境条件下植物体内脯氨酸含量急剧增加。本实验也得到了类似的结果(表 2)。虽然目前对硼胁迫条件下油菜叶片脯氨酸含量急剧增加的机制还不了解,但从其它胁迫条件下脯氨酸积累的成因^[13~15]可以推测,在硼胁迫条件下,脯氨酸增加很可能是由于其合成增加,氧化受抑和蛋白质合成受阻所致。另外,从试验结果还可看出,叶片中脯氨酸含量的增加与叶片中一些氨基酸含量的下降几乎是同步的(表 2)。因而可以推论,在硼胁迫的叶片中,这些氨基酸的相互转化对脯氨酸的积累有促进作用,但这还需对氨基酸的合成转化进行系统研究来加以证实。

大量的研究也表明^[16,17],正常花药富含脯氨酸,不育性植物的花药中脯氨酸含量很低。本文的结果表明,不适宜供硼的花药内脯氨酸含量有所下降,但变化幅度并不大(表 3),这主要是由于不适宜硼条件并未达到使所有被测花药完全都是败育的,但这些结果仍说明了硼素胁迫对氨基酸的含量产生了一定的影响。然而对花药内低脯氨酸含量是造成花药败育的原因还是其败育的结果看法不一。Sarvella 等^[18]证明花药内游离脯氨酸与花药败育之间有直接关系。Britikov 等^[19]则认为,无论脯氨酸在生殖过程中多么重要,脯氨酸缺乏可能只是减数分裂某些缺陷的结果,不能认为

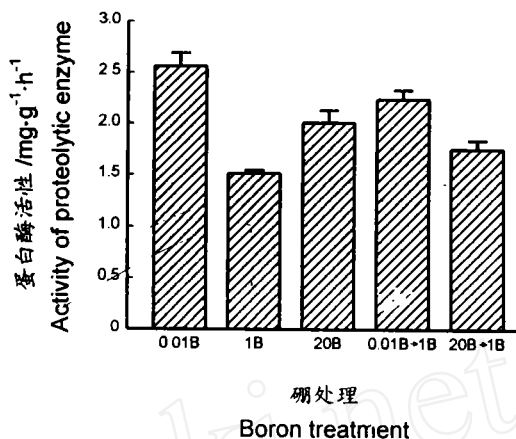


图 1 硼对幼苗叶片蛋白酶活性的影响
Fig. 1 Effect of boron on the activity of proteolytic enzyme in seedling leaves

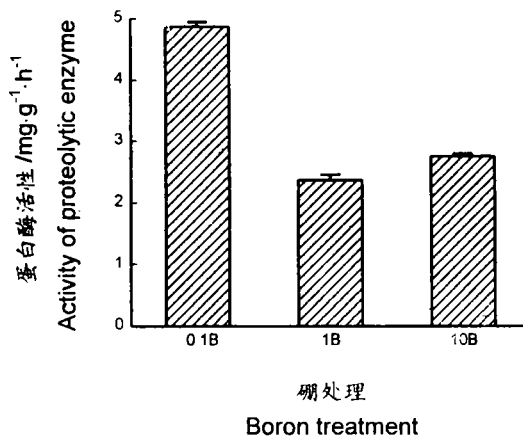


图 2 硼对花药中蛋白酶活性的影响
Fig. 2 Effect of boron on the activity of proteolytic enzyme in anthers

脯氨酸的缺乏是花粉败育的主要原因。

参 考 文 献

- 1 Barnert N M, Naylor A W. Amino acid and protein metabolism in bermuda grass during water stress. *Plant Physiol*, 1966, 41:1222~1230
- 2 Kern J J, Atkins R E. Free amino acids content of the anthers of male~sterile and fertile lines of grain *Sorghum bicolor* (L.). *Moench Crop Science*, 1972, 12:835~838
- 3 朱广廉,钟海文,张爱琴编. 植物生理学实验. 北京大学出版社,1990
- 4 波钦诺克(荆家海等译). 植物生物化学分析法. 北京:科学出版社,1981,221
- 5 王震宇. 硼对甘蓝型油菜氮代谢的影响. 南京农业大学硕士学位论文,1993
- 6 王震宇,沈康,张福锁. 硼对甘蓝型油菜核酸代谢的影响. *植物生理学报*. 1995, 21(2):189~194
- 7 王震宇,沈康,张福锁. 硼对甘蓝型油菜生长和蛋白质代谢的影响. *现代土壤科学研究,中国农业科技出版社*,1994, 685~687
- 8 Nir I, Poljakoff-Mayber A, Klein S, The effect of water on the polysome population and the ability to incorporate amino acid in maize root tips. *Israel J Bot*, 1970, 19:451~462
- 9 Stewart C R, Hanson A D. Proline accumulation as a metabolic response to water stress. In Turner N C, Kramer P J. (eds): *Adaptation of plants to water and high temperature stress*. John Wiley & Sons New York, 1980, 173~189
- 10 Levy D. Water deficit enhancement of proline and its association with susceptibility to drought. *Physiol Plant*, 1983, 57:169~173
- 11 汤章城. 逆境条件下植物脯氨酸的累积及其可能的意义. *植物生理学通讯*,1984,1:15~21
- 12 汤章城,王育启,吴亚华,王洪春. 高粱幼苗对高渗培养的生长生理反应及其抗逆性. *植物生理学报*, 1984,10:37~45
- 13 Boggess S F, Stewart C R, Aspinnall D, Palag L G. Effect of water stress on proline synthesis from radioactive precursors. *Plant Physiol*, 1976, 58:398~401
- 14 Stewart C R, Metabolism of 5-³H proline by leaves and its use in measuring the effect of water stress on proline oxidation. *Plant Physiol*, 1978, 61:654~657
- 15 Stewart C R. The effect of wilting on proline metabolism in excised bean leaves in the dark. *Plant Physiol*, 1972, 51:508~511
- 16 Fukassma H. On the free amino acids in anthers of male-sterile wheat and maize. *Jap J Gen*, 1954, 29:135~137
- 17 Brooks M Z. Comparative analysis of the free amino acids in anther of fertile and genetic cytoplasmic male sterile songhum. *Genetics*, 1962, 47:1629~1638
- 18 Sarvella P, Stojanovic B J, Crogon C O. Amino acids in different plant parts of normal and male-sterile maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci*, 1971, 11:805~807
- 19 Britikov E A, Musatova N A. Proline in the reproductive system of plants. In: "Pollen Physiology and Fertilization" . Linskens H F, ed. Amsterdam North-Holland Pub Co. 1961, 77~85

Comparative Analysis of the Component of Free Amino Acids in *Brassica napus* L. under Different Boron Nutritional Conditions

Wang Zhenyu Zhang Fusuo

Shen Kang

(Dept. of Plant Nutrition, CAU, Beijing 100094) (Nanjing Agricultural University)

Abstract: Effect of boron nutritional conditions on the changes of free amino acids in leaves and anthers of young rape (*Brassica napus* L.) plants was studied in nutrient solution and soil culture. The results showed that under boron stress (low or high boron) conditions the plants grew abnormally and their dry weight was lower than that of the control plants. And the increase of the activities of proteolytic enzyme and the accumulation of free amino acids in leaves and anthers of these plants were observed. The types and quantities of amino acids in the same parts of the plants were also changed. An obvious increase in the concentration of proline in leaves with a decrease of that of some amino acids was observed. On the contrary, the proline content in anthers of the plants under the boron stress condition declined.

Key words: boron; free amino acids; *Brassica napus* L.; seedling leaves; anthers