

氮素营养水平对小麦旗叶衰老过程中 蛋白质和核酸代谢的影响

王月福, 于振文*, 李尚霞, 余松烈

(山东农业大学农业部小麦栽培生理与遗传改良重点开放实验室, 山东泰安 271018)

摘要: 在大田高产条件下,研究了氮素营养水平对小麦旗叶衰老过程中蛋白质和核酸代谢变化的影响,并探讨了蛋白质和核酸代谢的关系。结果表明,小麦旗叶衰老过程中可溶性蛋白质含量、DNA 和 RNA 含量逐渐下降,而蛋白酶和核酸酶活性逐渐升高。早衰型小麦品种旗叶可溶性蛋白质含量、DNA 和 RNA 含量下降快,蛋白酶和核酸酶活性上升快;氮素营养充足可以提高旗叶可溶性蛋白质和核酸含量,降低蛋白酶和核酸酶活性,从而延缓小麦旗叶的衰老。蛋白酶活性的提高,加剧了蛋白质的降解,以及 DNA、RNA 含量的减少,限制了蛋白质的合成,是导致旗叶可溶性蛋白质含量下降的主要原因。DNA 和 RNA 含量的减少与 DNase 和 RNase 的活性升高,DNA 和 RNA 分解加剧密切相关。

关键词: 小麦; 氮素营养; 衰老; 蛋白质代谢; 核酸代谢

中图分类号: S512 **文献标识码:** A **文章编码:** 1008-505X(2003)02-0178-06

Effect of nitrogen nutrition on protein and nucleic acid metabolism during senescence of flag leaf

WANG Yue-fu, YU Zhen-wen, LI Shang-xia, YU Song-lie

(*key Lab. of Wheat Physiology and Genetics Improvement, Ministry of Agriculture, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China*)

Abstract: The effect of nitrogen nutrition on protein and nucleic acid metabolism and discussed the relationship between protein metabolism and nucleic acid metabolism were studied. The results indicated that the contents of soluble protein, DNA and RNA in flag leaf gradually reduced, but the activities of protease and nuclease gradually raised during senescence. Soluble protein, DNA, and RNA contents in flag leaf of cultivar senescence at early stage rapidly reduced and the activities of protease and nuclease rapidly raised. Sufficient nitrogen nutrition could improve the contents of soluble protein and nucleic acid in flag leaf and reduce the activities of protease and nuclease, and delay the senescence of plant. The improvement of protease activity improved to decompose the protein, decreased the contents of DNA and RNA, which led to the reduction of soluble protein in flag leaf. The reduction of DNA and RNA contents correlated to the improvement of DNase and RNase activities, and decomposition of DNA and RNA.

Key words: winter wheat; nitrogen nutrition; senescence; protein metabolism; nucleic acid metabolism

小麦子粒发育与营养器官衰老是同步进行的。因此,延缓功能叶片衰老进程,提高小麦灌浆后期光合物质生产能力,对提高粒重,增加产量具有重要的意义。关于小麦衰老的机理及其调控措施的研究已

有较多报道^[1~4],但多是从活性氧代谢、激素水平调节、蛋白质代谢等角度进行。小麦叶片衰老是基因在环境条件影响下在时间和空间上顺序表达所引起的一系列生理生化过程。蛋白质和核酸是生物体

收稿日期:2002-05-08

基金项目:国家自然科学基金项目(39970425);国家科技部“无公害优质小麦生产关键技术集成与产业化示范”项目(2002BA516A12)资助。

作者简介:王月福(1963—),博士,副教授,主要从事小麦栽培生理研究。* 通讯作者。

内最重要的成分,它们构成生命的主要物质基础。研究小麦衰老过程中蛋白质和核酸代谢的变化已有一些报道^[5,6],但较多集中于离体叶片上的研究,或只研究蛋白质代谢或核酸代谢,很少把两者联系起来进行研究;在大田高产条件下,关于小麦自然衰老过程中蛋白质和核酸代谢变化及其两者的相互关系的研究尚少见报道。为此,以两个不同衰老类型的高产小麦品种为材料,在大田高产条件下研究了氮素营养水平对小麦开花后旗叶蛋白质和核酸代谢变化的影响,探讨了蛋白质和核酸代谢的关系,试图阐明不同衰老类型小麦品种在不同氮素营养水平条件下旗叶衰老过程中蛋白质和核酸代谢的差异,为进一步认识小麦的衰老机理和调控措施的制定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料与试验设计

本研究于1999~2000年度在山东农业大学实验农场进行。试验土壤为中壤土,有机质含量12.1 g/kg、全氮含量0.89 g/kg、水解氮114.74 mg/kg、速效磷45.37 mg/kg、速效钾80.34 mg/kg。试验选用产量水平相近(7500 kg/hm²)、衰老类型不同、当前山东省大面积推广种植的2个小麦品种:济南17(早衰型)和鲁麦21(正常衰老型)。设置每公顷施纯氮0、120、240 kg 3个处理,用N0、N120、N240表示。小区面积为2 m×4 m,随机区组设计,重复3次。10月8日播种,基本苗120万/hm²。各小区于耕地前均按每公顷施有机肥45000 kg、过磷酸钙1050 kg(折P₂O₅ 172.5 kg)和氯化钾225 kg(折K₂O 142.9 kg)撒施于地表后耕翻。氮肥总量1/2于播种前均匀撒施于各小区后再耕翻,余下1/2于雌雄蕊原基分化期结合灌水开沟追施。其余管理措施同大田栽培。

于开花期选择同天开花、发育正常、大小均匀的茎秆挂牌,分别于开花期和花后每隔7d进行取样。

1.2 测定项目和方法

核酸总量、DNA和RNA含量测定 用紫外分光光度法^[7](λ=260 nm)测定核酸总量,然后样品液再进行二苯胺反应(λ=595 nm)测定DNA含量。用差值法计算RNA含量。即RNA含量=核酸总量-DNA含量。

核酸酶活性测定 参照戴秋杰和汪宗立法(1988)^[8]。酶液提取:1 g叶片加5 mL磷酸缓冲液(pH 6.5),冰浴研磨并离心25min(10000×g,0℃),上清液为粗酶液。

RNase活性测定 0.25 mL 0.2%酵母核糖核酸加0.5 mL柠檬酸磷酸缓冲液(pH 5.4)和0.25 mL酶液,在37℃下保温30min后,加入0.25 mL三氯乙酸(10%)终止反应,在4℃下过夜并离心,于260 nm下比色。

DNase活性测定 除反应底物为小牛胸腺DNA外,其它同RNase活性测定。

可溶性蛋白质含量测定 考马斯亮蓝法^[9],以牛血清蛋白作标准曲线。

蛋白酶活性测定^[10] 1g叶片加5 mL pH 7.5、50 mmol/L的Tris-HCl缓冲液(包含4 mmol/L DTT,1 mmol/L EDTA,1% PVP)和少量石英砂冰浴研磨,然后15000×g离心30min(4℃),上清液用于酶活性测定。

内肽酶活性测定 酶反应体系由以下组分组成:100 mmol/L醋酸缓冲液(pH 4.8)0.4 mL,用pH 4.8醋酸缓冲液溶解的0.05 mol/L牛血红蛋白0.2 mL,酶液0.4 mL。混合反应液于38℃保温1h,然后加1 mL 10%三氯乙酸终止反应(对照则在反应前加入三氯乙酸),4℃静止30min,4000×g离心10min,上清液用于茚三酮反应(Vc作还原剂)。用日本岛津UV-120核酸分析仪在570 nm下比色测定吸光率。

氨肽酶活性测定 以白氨酸-β-萘胺盐酸盐作底物,先用少量二甲基甲酰胺(DMF)溶解,然后加入磷酸缓冲液(pH 8.0)配成4 mmol/L的底物液,反应体系为100 mmol/L磷酸缓冲液0.4 mL,酶液0.4 mL,底物0.2 mL,在35℃水浴中反应30min,然后4000×g离心10min,上清液用日本岛津UV-120核酸分析仪在523 nm下比色测定吸光率。

以上测定每处理均重复3次,取其平均数进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 对旗叶蛋白质代谢变化的影响

2.1.1 旗叶可溶性蛋白质含量的变化 由表1可以看出,旗叶可溶性蛋白质含量在开花后持续下降,花后14d后迅速下降。处理之间,旗叶可溶性蛋白质含量随着施氮量的增加而升高。品种间比较,各期均表现为鲁麦21高于济南17,尤以花后21d后差异显著。

2.1.2 旗叶蛋白酶活性的变化 通过对开花后旗叶内肽酶和氨肽酶的活性测定结果表明(表2、表3):两种酶的活性在开花后均逐渐提高,但在花后21d之前两种酶的活性上升的较为缓慢,花后21d之后才迅速升高。处理之间比较,各时期均表现为增加施氮量可以降低旗叶的蛋白酶活性,但在花后21d之前各处理间差异较少,之后差异变大。表明增加施氮量可以延缓蛋白质的降解。品种之间比较,在开花期和花后7d两种酶的活性虽表现为济南17高于鲁麦21,但差异不显著。而在花后14d及以后各时期均表现为济南17极显著高于鲁麦21。相关分析表明,可溶性蛋白质含量和内肽酶、氨肽酶的活性均呈显著负相关,相关系数分别为0.846~0.935和0.768~0.912。说明在旗叶衰老过程中可溶性蛋白质含量的下降是由于蛋白酶活性的升高导致蛋白质的水解加剧引起的。

表 1 不同处理对旗叶可溶性蛋白质含量变化的影响

Table 1 Effect of different treatments on soluble protein content in wheat flag leaf (mg/g, FW)

品种 Cultivar	处理 Treatment	开花后天数(d) Days after anthesis					
		0	7	14	21	28	35
济南 17	N0	38.42 cC	36.25 eD	30.41 eD	22.44 eD	10.16 fE	3.91 eE
Jinan 17	N120	38.71 cC	37.53 dC	31.86 dCD	23.75 dD	10.78 eE	4.22 eE
	N240	41.14 bB	38.85 cBC	33.72 cC	26.52 cC	13.27 dD	5.14 dD
鲁麦 21	N0	41.57 bAB	39.85 cB	34.22 cBC	27.16 cBC	17.84 cC	8.12 cC
Lumai 21	N120	42.16 bAB	42.04 bA	36.17 bB	28.50 bB	19.17 bB	10.35 bB
	N240	43.41 aA	43.16 aA	39.74 aA	33.83 aA	22.54 aA	12.71 aA
	LSD _{0.05}	1.19	1.12	1.44	1.08	0.60	0.41
	LSD _{0.01}	2.25	2.17	2.35	1.93	1.31	0.86

注:不同大写字母表示 1% 差异水平,小写字母表示 5% 差异水平,下同。

Note: Figures with the different capital or small letter means significant at the 1% or 5% level, respectively, same as follows.

表 2 不同处理对旗叶内肽酶活性变化的影响

Table 2 Effect of different treatments on exopeptidases activity in wheat flag leaf [α -NH₂ nmol/(g·h), FW]

品种 Cultivar	处理 Treatment	开花后天数(d) Days after anthesis					
		0	7	14	21	28	35
济南 17	N0	0.415	1.311 a	2.205 aA	3.945 aA	8.602 aA	11.698 aA
Jinan17	N120	0.410	1.293 a	2.166 aA	3.849 aA	8.509 aA	11.620 aA
	N240	0.401	1.215 b	1.940 bBC	3.468 bB	6.581 bB	9.034 bBC
鲁麦 21	N0	0.411	1.284 a	1.985 bB	3.131 cC	6.852 bB	9.357 bB
Lumai21	N120	0.407	1.266 a	1.954 bBC	3.028 cCD	6.076 cB	8.452 cC
	N240	0.402	1.201 b	1.817 cC	2.874 dD	4.907 dC	7.493 dD
	LSD _{0.05}	0.019	0.093	0.104	0.149	0.505	0.388
	LSD _{0.01}	0.046	0.138	0.173	0.256	1.048	0.901

表 3 不同处理对旗叶氨肽酶活性变化的影响

Table 3 Effect of different treatments on aminopeptidases activity in wheat flag leaf [α -NH₂ nmol/(g·h), FW]

品种 Cultivar	处理 Treatment	开花后天数(d) Days after anthesis					
		0	7	14	21	28	35
济南 17	N0	0.133 aA	0.385 aA	0.545 aA	0.718 aA	3.526 aA	5.824 aA
Jinan17	N120	0.108 aA	0.382 abA	0.524 bA	0.652 bB	3.203 bB	5.607 bA
	N240	0.101 abA	0.371 bA	0.487 cB	0.581 cC	2.718 cC	5.174 cB
鲁麦 21	N0	0.097 abA	0.296 cB	0.415 dC	0.588 cC	2.359 dD	4.778 dC
Lumai21	N120	0.095 abA	0.293 cdB	0.407 dCD	0.524 dD	2.135 eE	4.413 eD
	N240	0.088 bA	0.281 dB	0.386 eD	0.431 eE	1.857 fF	4.146 fE
	LSD _{0.05}	0.017	0.013	0.011	0.019	0.047	0.089
	LSD _{0.01}	0.039	0.074	0.023	0.055	0.139	0.224

2.2 对旗叶核酸代谢变化的影响

2.2.1 小麦旗叶 DNA、RNA 含量的变化 由图 1 可以看出,开花后小麦旗叶 DNA 和 RNA 含量的变

化均表现为先缓慢降低,在花后 21d 之后迅速降低。如济南 17 和鲁麦 21 在开花后 21d 旗叶 DNA 和 RNA 含量分别比开花期下降了 7.54% ~ 14.02%

和 8.43%~11.68%、21.13%~23.44%和 18.09%~19.21%。处理之间,两品种均表现为增施氮肥可以显著提高旗叶 DNA 和 RNA 含量,表明增施氮肥可以延缓小麦旗叶的衰老进程。品种之间,各期均表现为鲁麦 21 旗叶核酸含量高于济南 17,并有随着生育进程差异程度变大的趋势,表明济南 17 比鲁麦 21 在灌浆后期核酸含量下降快。

由表 4 可以看出,旗叶 RNA 和 DNA 含量的比值表现为随着生育进程比值逐渐变小,表明旗叶 RNA 含量的降低显著快于 DNA 含量的降低。

2.2.2 旗叶核酸酶活性的变化 由图 2 可以看出,旗叶 DNase 和 RNase 的活性在开花后逐渐上升,但在花后 14d 之前上升的比较缓慢,之后迅速上升。处理之间表现为增施氮肥可以降低旗叶的 DNase 和 RNase 活性。品种间比较,旗叶 DNase 活性和 RNase 活性均表现为济南 17 高于鲁麦 21,只是在花后 14d 之前两品种之间差异不显著,之后济南 17 旗叶 DNase 和 RNase 活性显著高于鲁麦 21。相关分析表明,DNA、RNA 含量分别与 DNase、RNase 活性呈显著负相关,相关系数分别在 0.795~0.982 和 0.811~0.990 之间,说明小麦开花后旗叶核酸酶活

的升高,是导致核酸含量降低的原因之一。

3 讨论

蛋白质的降解和蛋白酶活性的升高是叶片衰老的显著特征。早衰型小麦品种济南 17 比正常衰老型品种鲁麦 21 旗叶可溶性蛋白质含量降低或内肽酶、氨肽酶活性升高的快。氮素营养充足可以提高旗叶可溶性蛋白质含量,降低蛋白酶的活性,从而延缓小麦旗叶的衰老进程。相关分析表明,小麦衰老过程中旗叶可溶性蛋白质含量与蛋白酶活性呈显著负相关关系,这表示了旗叶蛋白酶活性的升高引起蛋白质的水解是导致可溶性蛋白质含量下降的一个原因。

此外,小麦衰老期间蛋白质含量的变化与 DNA 和 RNA 含量变化具有密切联系。本研究表明,小麦旗叶 DNA 和 RNA 含量在小麦开花后下降缓慢,至开花 21d 之后才转为快速下降,其中 RNA 含量的下降显著快于 DNA 含量的下降。早衰型品种济南 17 比正常衰老型品种鲁麦 21 下降的快。相关分析表明,旗叶可溶性蛋白质含量与 DNA、RNA 含量均呈极显著正相关,相关系数分别在 0.739~0.980

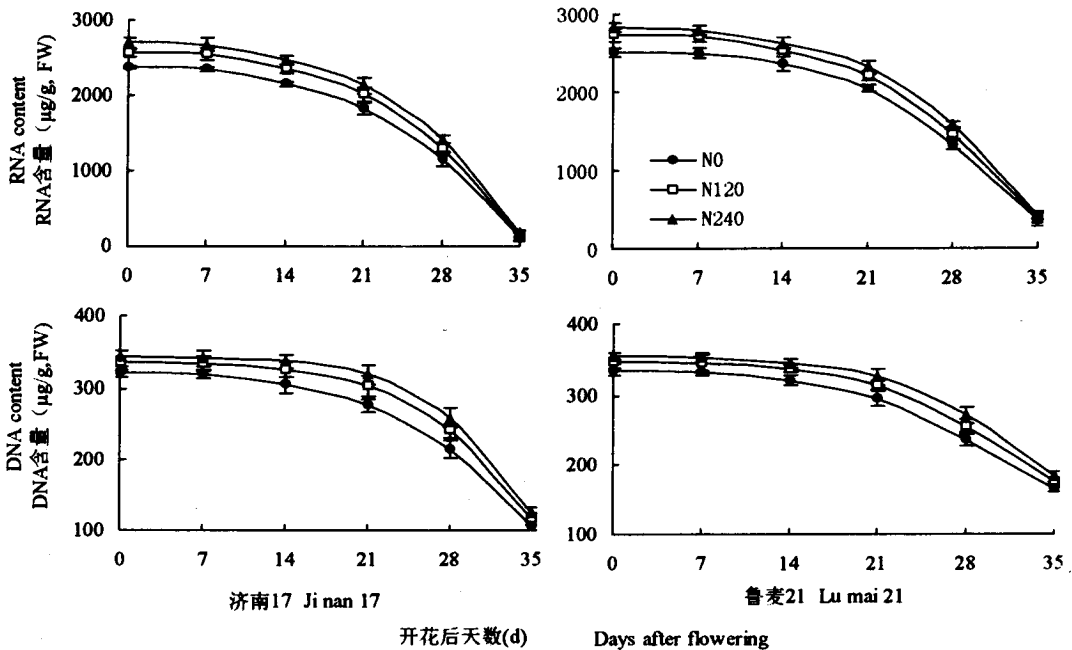


图 1 不同处理对济南 17(左)和鲁麦 21(右)旗叶 DNA 和 RNA 含量变化的影响

Fig.1 Effect of different treatments on DNA and RNA contents of Jinan 17 (left) and Lumai 21 (right) in flag leaf

表 4 不同处理对小麦旗叶 RNA/DNA 含量比值变化的影响
Table 4 Effect of different treatments on RNA/DNA ratio in wheat flag leaf

品种 Cultivar	处理 Treatment	开花后天数(d) Days after anthesis					
		0	7	14	21	28	35
济南 17	N0	7.39	7.37	7.05	6.58	5.36	1.11
Jinan17	N120	7.61	7.59	7.23	6.62	5.40	1.18
	N240	7.82	7.80	7.31	6.67	5.48	1.35
鲁麦 21	N0	7.53	7.52	7.34	6.94	5.61	2.12
Lumai 21	N120	7.84	7.83	7.48	7.02	5.70	2.17
	N240	7.95	7.92	7.56	7.11	5.83	2.25

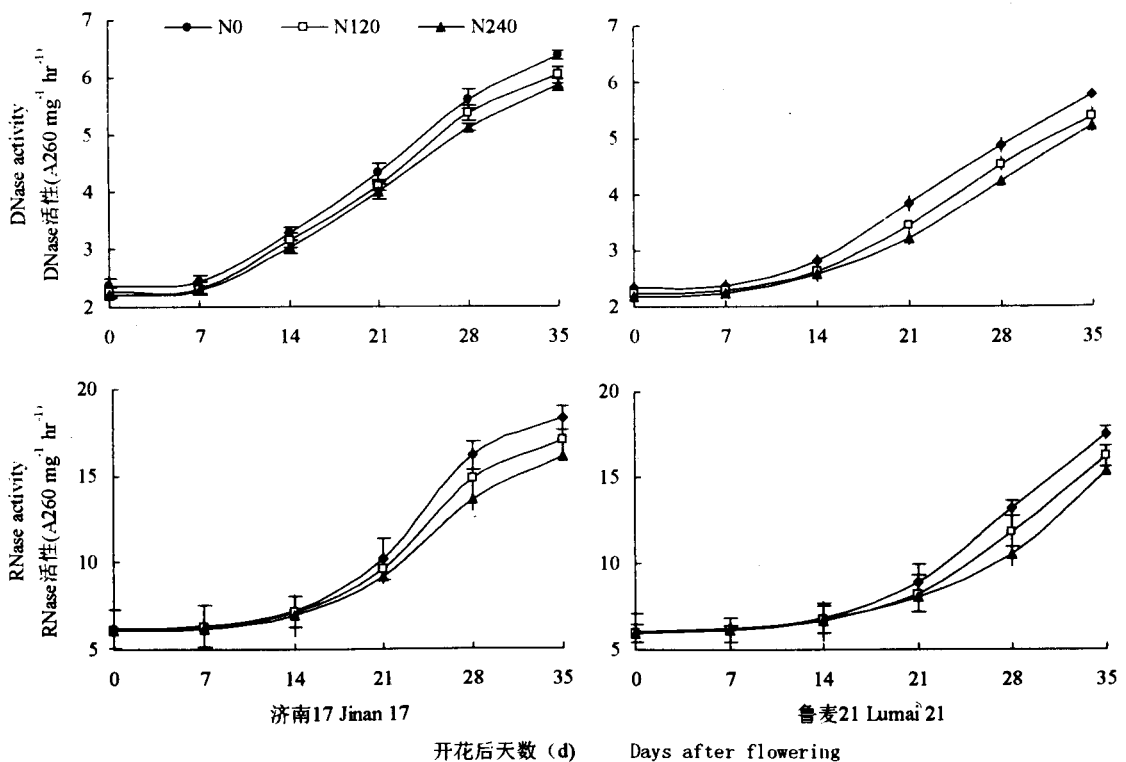


图 2 不同处理对济南 17(左)和鲁麦 21(右)旗叶核酸酶活性变化的影响

Fig.1 Effect of different treatments on nucleic acid enzyme activity

和 0.836~0.976。表明由于 DNA 含量和由 DNA 转录出的 RNA 含量减少限制了蛋白质合成,是导致小麦衰老过程中旗叶可溶性蛋白质含量下降的又一个原因。

DNA 和 RNA 含量与 DNase 和 RNase 活性相关均达到极显著负相关,相关系数分别在 0.795~0.982 和 0.811~0.990 之间,表明小麦开花后旗叶核酸酶活性的提高,加剧了 DNA 和 RNA 的分解,是导致核酸含量降低的原因之一。

参考文献:

- [1] 岳寿松,于振文,余松烈,等. 不同生育时期施氮对冬小麦旗叶衰老和粒重的影响 [J]. 中国农业科学,1997, 30(2):42-46.
- [2] 朱中华,段留生,冯雪梅,等. 内源激素对小麦叶片衰老调控的系统分析 [J]. 作物学报,1998, 24 (2): 176-181.
- [3] 肖凯,张荣铤,钱维朴. 氮素营养调控小麦旗叶衰老和光合功能衰退的生理机制 [J]. 植物营养与肥料学报,1998, 4(4):371-378.
- [4] 肖凯,张荣铤. 小麦叶片老化过程中光合功能衰退的可能机制 [J]. 作物学报,1998, 24(6):805-811.
- [5] 任东涛,赵松岭. 水分胁迫对半干旱区春小麦旗叶蛋白质代谢的影响 [J]. 作物学报,1997, 23(4):468-473.

- [6] 段辉国. 亚精胺对小麦离体叶片中蛋白质含量与蛋白酶的影响 [J]. 四川师范学院学报, 2000, 21(1): 44-47.
- [7] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理学实验 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1990. 134-138.
- [8] 戴秋杰, 汪宗立. 水稻耐盐性的生理研究. III 盐渍对体内核酸和核糖核酸酶活力的影响 [J]. 江苏农业学报, 1988, 4 (1): 31-36.
- [9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal. Biochem., 1976, 72: 248-254.
- [10] 吴光南, 刘宝仁, 张金渝. 水稻叶片蛋白水解酶的某些理化特性及其与衰老的关系 [J]. 江苏农业学报, 1985, 1 (1): 1-10.