

# 热激诱导的玉米幼苗耐热性及其与脯氨酸的关系

李忠光\*, 郭颖, 杨双梅, 张陆启, 余艳, 赵义霞

(云南师范大学 生命科学学院, 昆明 650092)

**摘要:** 研究了热激对玉米幼苗耐热性的效应及其与脯氨酸的关系。结果表明, 培养 2.5 d 的玉米幼苗经过 42 °C 热激 4 h 并于 26.5 °C 下恢复 4 h 后, 提高了玉米幼苗在 48 °C 下的存活率, 并且热激及其后的恢复过程中都表现出脯氨酸的积累。不同浓度的外源脯氨酸预处理也可提高玉米幼苗内源脯氨酸的水平 and 抗氧化酶抗坏血酸过氧化物酶(APX)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽还原酶(GR)、过氧化物酶(GPX)的活性, 从而提高玉米幼苗在高温胁迫下的存活率。这些结果暗示热激过程中脯氨酸的积累所诱发的抗氧化酶活性的增强可能是热激诱导的玉米幼苗耐热性形成的生理基础之一。

**关键词:** 玉米幼苗; 热激; 耐热性; 脯氨酸; 抗氧化酶

**中图分类号:** Q945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2010)03-0403-04

## Heat-shock-induced heat tolerance in maize seedlings and involvement of proline

LI Zhong-Guang\*, GUO Ying, YANG Shuang-Mei,  
ZHANG Lu-Qi, YU Yan, ZHAO Yi-Xia

(School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China)

**Abstract:** Effect of heat-shock (HS) on heat tolerance in maize seedlings and its relation to proline (Pro) were studied in this paper. The results showed that HS pretreatment at 42 °C for 4 h followed by a 4-h recovery at 26.5 °C significantly increased survival percentage of maize seedlings under high temperature at 48 °C, and the procedure of HS and recovery displayed Pro accumulation in maize seedlings. In addition, pretreatment of different concentration exogenous Pro markedly enhanced the level of endogenous Pro and the activities of antioxidant enzyme ascorbic acid peroxidase (APX), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR) and peroxidase (POD) in maize seedlings, and improved survival percentage of maize seedlings under high temperature. These results suggested that the increase of antioxidant enzyme activities by HS-induced Pro accumulation inducement could be one of the physiological basis in the formation of HS-induced heat tolerance in maize seedlings.

**Key words:** maize (*Zea mays*) seedlings; heat shock; heat tolerance; proline; antioxidant enzyme

高温是限制农作物产量的主要胁迫因子之一, 高温胁迫往往产生氧化胁迫, 导致生物膜过氧化作用, 蛋白质结构破坏和 DNA 损伤 (Gong 等, 1997; 李忠光等, 2007; Wahid 等, 2007)。一般认为, 植物耐热性的形成与热激蛋白 (heat shock proteins,

HSPs) 的积累和抗氧化系统活性的增强有关 (Gong 等, 1997; 李忠光等, 2007; Wahid 等, 2007)。各种逆境胁迫都往往伴随着脯氨酸 (proline, Pro) 的积累 (Molinari 等, 2007; Wahid 等, 2007), 在干旱胁迫 (Hien 等, 2003) 和盐胁迫 (Ashraf & Foolad, 2007)

收稿日期: 2008-05-15 修回日期: 2009-03-27

基金项目: 云南省自然科学基金(2006C0030M); 云南省教育厅基金(06Y117B)[Supported by Natural Science Foundation of Yunnan Province (2006C0030M); the Natural Science Foundation of Education Department of Yunnan Province(06Y117B)]

作者简介: 李忠光(1971-), 男, 云南临沧人, 高级实验师, 主要从事植物逆境生物学研究, (E-mail) Zhongguang\_li@163.com.

\* 通讯作者 (Author for correspondence)

中尤为明显。外源 Pro 预处理可提高烟草细胞的耐盐性 (Hoque 等, 2007a, b)、玉米细胞的耐冷性 (Chen & Li, 2002) 和缓解重金属对茶菱的毒害作用 (许晔等, 2007), 而对于 Pro 与植物耐热性的关系只有一些初步的报道 (Song 等, 2005; 张显强等, 2004), 外源 Pro 预处理是否可提高玉米幼苗的耐热性, 尚未见报道。本文以玉米幼苗为实验材料, 证实热激可提高玉米幼苗的耐热性, 并且阐明热激过程中 Pro 的积累所诱发的抗氧化酶活性的增强可能是热激诱导下玉米幼苗耐热性形成的生理基础之一。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料的培养

挑选饱满的玉米 (*Zea mays*) 品种晴 3 和鲁玉 13 的种子, 以 0.1%  $HgCl_2$  消毒 10 min 后, 漂洗干净, 于 26.5 °C 下吸涨 12 h, 播于垫有 6 层湿润滤纸的带盖白磁盘 (24 cm × 16 cm) 中, 于 26.5 °C 下黑暗中萌发 60 h。

### 1.2 热激 (Heat shock, HS) 和热处理

选取长势一致的玉米幼苗转入 42 °C 的培养箱中进行热激处理 4 h, 然后于 26.5 °C 下恢复培养 4 h, 非热激 (Non-HS) 的对照组玉米幼苗始终培养在 26.5 °C 的培养箱中, 最后热激和非热激的玉米幼苗同时转入 48 °C 高温下处理 17 h。处理过的玉米幼苗取出后, 于 26.5 °C、12 h 光照的植物生长箱中恢复培养 8 d, 然后计算存活率。以在恢复期间能恢复生长并转绿的玉米幼苗视为存活的幼苗。

### 1.3 Pro 处理和含量的测定

将萌发 60 h 并且长势一致的玉米幼苗分别转入垫有 2 层滤纸并加有 150 mL 蒸馏水 (对照) 或 1、5、10、40 mmol/L Pro 的带盖白磁盘中, 26.5 °C 下继续培养 8 h 后排干 Pro 溶液, 转入 48 °C 高温下处理 17 h, 按上述方法恢复后计算存活率。上述经过热激、恢复和 Pro 处理的玉米幼苗按 Lin & Kao (2001) 的方法提取和测定 Pro 含量。

### 1.4 抗氧化酶活性的测定

取经 40 mmol/L Pro 处理 8 h 后的玉米幼苗, 按李忠光等 (2002) 的方法提取并测定抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽还原酶 (GR)、过氧化物酶 (GPX) 5 种抗氧化酶活性。上述所有实验均重复 3 次, 每次实验中有 2 次测定重复, 数据处理和统计分

析用 SigmaPlot 9.0 软件进行, 图表中所有数据均为平均值 ± 标准误。

## 2 结果与分析

### 2.1 热激对玉米幼苗耐热性的效应

将萌发 60 h 的玉米幼苗经热激处理 4 h 并恢复培养 4 h 后转入高温下处理 17 h。从图 1 看出, 热激处理显著提高了晴 3 和鲁玉 13 两种玉米幼苗在高温处理下的存活率, 且无论是经热激还是未经热激的晴 3 玉米幼苗在高温处理下的存活率明显高于相对应的鲁玉 13, 表明热激处理能提高玉米幼苗的耐热性并且晴 3 玉米幼苗的耐热性强于鲁玉 13。

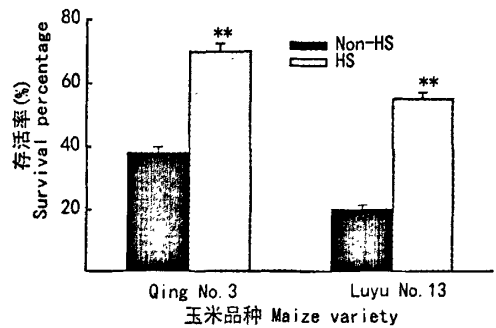


图 1 热激对玉米幼苗存活率的影响

Fig. 1 Effect of heat-shock on survival percentage in maize seedlings

\*\*  $P < 0.01$ , 与未经热激处理的对照相比

\*\* Comparing with the control without heat shock (Non-HS)

### 2.2 Pro 与热激诱导玉米幼苗耐热性形成的关系

从图 2 看出, 耐热性不同的两种玉米幼苗在热激过程中都可诱导 Pro 的迅速积累, 并且随着时间的推移而增加, 恢复 2 h (图中 6 h) 达到最高峰, 而后略有下降。另一方面, 无论是热激还是恢复过程中, 耐热性较强的晴 3 玉米幼苗 Pro 积累水平始终高于耐热性较弱的鲁玉 13。说明玉米幼苗耐热性的强弱与热激过程中 Pro 积累水呈正相关。

萌发 60 h 的玉米幼苗用不同浓度的 Pro 预处理后, 与未经 Pro 处理的对照相比, 都显著提高了玉米幼苗中 Pro 水平, 以 10 和 40 mmol/L Pro 处理尤其明显, 并且经不同浓度的 Pro 预处理的耐热性较强的晴 3 玉米幼苗 Pro 积累速度始终高于相应的耐热性较弱的鲁玉 13 (图 3:A)。此外, 图 3:B 的结果也可以看出, 玉米幼苗用不同浓度的 Pro 预处理后, 5 mmol/L 以上的 Pro 预处理可不同程度地提高玉

米幼苗在高温胁迫下的存活率,与图3:A中的Pro积累相类似,其存活率尤其以10和40 mmol/L Pro为明显。这些结果表明,外源Pro预处理后提高了玉米幼苗中内源Pro含量,从而提高了玉米幼苗的耐热性。

2.3 外源Pro预处理对玉米幼苗抗氧化酶活性的影响

为进一步阐明Pro预处理可提高玉米幼苗耐热性的可能生理生化机制,两种耐热性不同的玉米幼苗经40 mmol/L Pro处理8 h后,分别检测了抗氧化酶APX、CAT、SOD、GR和GPX的活性。从表1

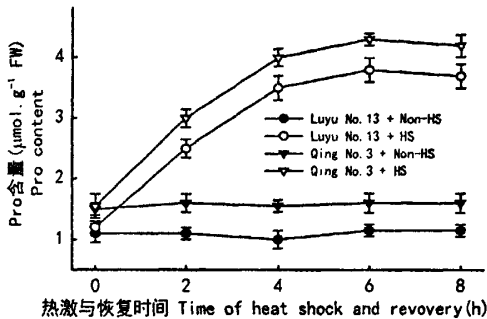


图2 热激(0~4 h)和恢复过程(6~8 h)中玉米幼苗Pro含量的变化

Fig. 2 Change of Pro content during heat shock (0-4 h) and recovery (6-8 h) in maize seedlings

表1 外源Pro预处理对玉米幼苗抗氧化酶活性的影响

Table 1 Effect of exogenous Pro pretreatment on five antioxidant enzyme activities in maize seedlings

抗氧化酶活性 Antioxidant enzyme activities	晴3 Qing No. 3		鲁玉13 Luyu No. 13	
	-Pro	+Pro	-Pro	+Pro
APX (μmol AsA/min/g FW)	27.6±1.0	33.5±1.5	25.4±1.2	28.7±1.3
CAT (μmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/g FW)	243.5±4.5	286.2±4.2	234.1±3.5	265.4±2.5
SOD (Units/g FW)	421.2±8.4	485.3±9.5	411.5±7.3	465.4±6.5
GR (μmol NADPH <sub>2</sub> /min/g FW)	1.21±0.03	1.32±0.04	1.10±0.02	1.25±0.05
GPX (μmol guaiacol/min/g FW)	4.2±0.2	4.0±0.1	3.8±0.3	3.9±0.2

看出,Pro预处理都不同程度地提高了玉米幼苗中5种抗氧化酶的活性,尤其以APX、SOD和CAT更为明显。说明Pro预处理提高抗氧化酶活性是玉米幼苗耐热性形成的生理基础之一。

3 讨论

Gong等(2001)、李忠光等(2007)和现在的结果(图1)都清楚地表明热激处理可提高玉米幼苗的耐热性,但植物耐热性形成的机制目前仍未完全清楚,一般都认为可能与HSPs的积累和抗氧化系统

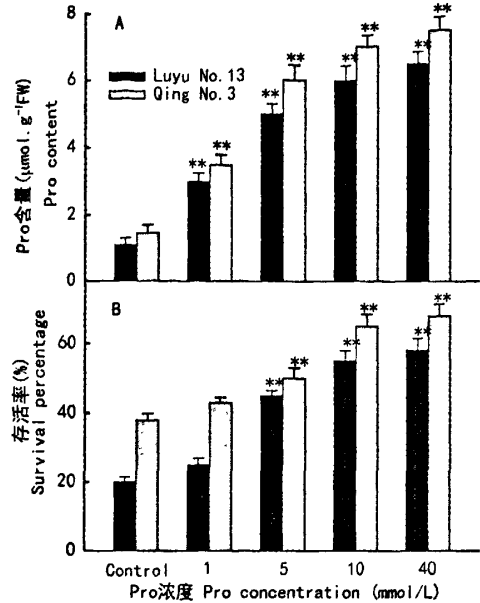


图3 外源Pro预处理对玉米幼苗内源Pro含量(A)和高温胁迫下存活率(B)的影响

Fig. 3 Effect of Pro-pretreatment on endogenous Pro content(A) and survival percentage(B) under high temperature in maize seedlings

\* \* P < 0.01, 与未经Pro处理的对照相比  
\* \* Comparing with the control without Pro pretreatment

活性的增强有关(Gong等,1997;李忠光等,2007;Wahid等,2007)。

Pro不仅是一种渗透调节物质,调节逆境胁迫过程中植物细胞的水分平衡(Hoque等,2007a;Wahid等,2007),更重要的是Pro作为一种抗氧化剂,清除逆境胁迫过程中产生的ROS,与由抗坏血酸过氧化物酶(APX)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽还原酶(GR)、过氧化物酶(GPX)等组成的抗氧化酶系统和由抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)等抗氧化剂组成的非酶系统协同作用,精密调控植物细胞中ROS水平,以免生物

膜和生物大分子如蛋白质、核酸等遭受 ROS 的攻击而破坏,从而确保了细胞膜的完整性和细胞活性(Kishor 等, 2005; Rodriguez & Redman, 2005; Ashraf & Foolad, 2007; Molinari 等, 2007), 进一步提高了植物对不良环境的抵抗能力。虽然, 也有报道高浓度的 Pro 是一种毒害剂, 用其处理拟南芥和番茄幼苗则抑制根系的生长, 降低叶绿素含量(Heuer, 2003; Nanjo 等, 2003), 但更多的研究者则认为, 外源 Pro 预处理可提高烟草细胞的耐盐性(Hoque 等, 2007a, b)、玉米细胞的耐冷性(Chen & Li, 2002)和缓解重金属对茶菱的毒害作用(许晔等, 2007)。我们现在的研究结果也表明, 外源 Pro 预处理可提高玉米幼苗的耐热性(图 1)。这些耐逆性的形成可能是外源 Pro 预处理后, 提高了内源 Pro 的含量(许晔等, 2007; 图 3: A)和抗氧化酶活性(表 1), 缓解了逆境胁迫过程中抗氧化酶系统活性下降(刘应迪等, 2001; Hoque 等, 2007b; 李忠光等, 2007; 许晔等, 2007)。上述结果表明, 热激过程中 Pro 的积累所诱发的抗氧化酶活性的增强是热激诱导的玉米幼苗耐热性形成的生理基础之一。

#### 参考文献:

- Ashraf M, Foolad MR. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance[J]. *Environ Exp Bot*, **59**: 206–216
- Chen WP, Li PH. 2002. Membrane stabilization by abscisic acid under cold aids proline in alleviating chilling injury in maize (*Zea mays*) cultured cells[J]. *Plant Cell Environ*, **25**: 955–962
- Gong M, Chen SN, Song YQ, et al. 1997. Effect of calcium and calmodulin on intrinsic heat tolerance in relation to antioxidant systems in maize seedlings[J]. *Aust J Plant Physiol*, **24**: 371–379
- Gong M, Chen B, Li ZG, et al. 2001. Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of  $H_2O_2$  [J]. *J Plant Physiol*, **158**: 1125–1130
- Heuer. 2003. Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants [J]. *Plant Sci*, **65**: 693–699
- Hien DT, Jacobs M, Angenon G, et al. 2003. Proline accumulation and  $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance[J]. *Plant Sci*, **165**: 1059–1068
- Hoque MA, Banu MNA, Okuma E, et al. 2007a. Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate-glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells[J]. *J Plant Physiol*, **164**: 1457–1468
- Hoque MA, Okuma E, Banu MNA, et al. 2007b. Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities[J]. *J Plant Physiol*, **164**: 553–561
- Kishor PBK, Sangam S, Amrutha RN, et al. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance[J]. *Curr Sci*, **88**: 424–438
- Li ZG(李忠光), Li JH(李江鸿), Du CK(杜朝昆), et al. 2002. Simultaneous measurement of five antioxidant enzyme activities using a single extraction system(在单一提取系统中同时测定五种植物抗氧化酶)[J]. *J Yunnan Normal Univ(Nat Sci Edi)*(云南师范大学学报: 自然科学版), **22**(6): 44–48
- Li ZG(李忠光), Gong M(龚明). 2007. Involvement of antioxidant systems in heat-shock-induced heat tolerance in maize seedlings(抗氧化系统在热激诱导的玉米幼苗耐热性形成中的作用)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **29**(2): 231–236
- Lin CC, Kao CH. 2001. Abscisic acid induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings[J]. *Plant Sci*, **160**: 323–329
- Liu YD(刘应迪), Cao T(曹同), Xiang F(向芬), et al. 2001. Effect of high temperature stress on the activity of peroxidase of two species of mosses(高温胁迫下两种藓类植物过氧化物酶活性的变化)[J]. *Guihaia*(广西植物), **21**(3): 255–258
- Molinari HBC, Marur CJ, Daros E, et al. 2007. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress[J]. *Physiol Plant*, **130**: 218–229
- Nanjo T, Fujita M, Seki M, et al. 2003. Toxicity of free proline revealed in an *Arabidopsis* T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase[J]. *Plant Cell Physiol*, **44**: 541–548
- Rodriguez R, Redman R. 2005. Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**: 3175–3176
- Song SQ, Lei YB, Tian XR. 2005. Proline metabolism and cross-tolerance to salinity and heat stress in germinating wheat seeds [J]. *Russian J Plant Physiol*, **52**: 793–800
- Wahid A, Gelani S, Ashraf M, et al. 2007. Heat tolerance in plants: an overview[J]. *Environ Exp Bot*, **61**: 199–223
- Xu Y(许晔), Shi GX(施国新), Xu QS(徐勤松), et al. 2007. Effects of exogenous Pro on resistance of *Trapaella sinensis* to  $Cd^{2+}$  Stress(外源脯氨酸(Pro)对茶菱抗  $Cd^{2+}$  胁迫能力的影响)[J]. *Bull Bot Res*(植物研究), **27**(2): 169–174
- Zhang XQ(张显强), Luo ZQ(罗在柒), Tang JG(唐金刚), et al. 2004. Effect of high temperature and drought stress on free proline content and soluble sugar content of *Taxiphyllum taxirameum*(高温和干旱胁迫对鳞叶蕨游离脯氨酸和可溶性糖含量的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), **24**(6): 570–573