

# 玉米幼苗热激诱导抗冷性过程中钙的效应\*

郭丽红<sup>1</sup>, 陈善娜<sup>2</sup>, 龚明<sup>3</sup>

(1. 昆明师范高等专科学校 生物系, 云南 昆明 650031;

2. 云南大学 生命科学学院, 云南 昆明 650091; 3. 云南师范大学 生命科学系, 云南 昆明 650092)

**摘要:** 玉米幼苗在冷胁迫前经过热激处理或  $\text{CaCl}_2$  浸种后再热激处理, 其存活率, 抗氧化酶 GR 的活性、可溶性蛋白质中热稳定蛋白质和游离脯氨酸的含量在冷胁迫中均发生了变化, 发现热激处理幼苗的这些参数高于对照, 而最高的是  $\text{CaCl}_2$  浸种后再热激处理的, 表明热激能提高玉米幼苗的抗冷性, 而  $\text{Ca}^{2+}$  对上述热激处理有加强作用。

**关键词:** 玉米幼苗; 热激;  $\text{CaCl}_2$

**中图分类号:** Q 945.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2003)05-0449-04

钙作为第二信使在植物的生长发育中具有广泛的生理调节作用, 因此, 在植物抗逆性的研究中钙的作用也引起了人们的兴趣, 并有大量的报道<sup>[1,2]</sup>. 近年的研究表明热激(非致死温度的热锻炼)处理不仅能提高植物的抗热性, 还能提高多种植物的抗冷性<sup>[3,4]</sup>, 但其机理至今还不清楚. 多种逆境(如低温、高温、干旱等)都可诱发植物细胞内活性氧浓度的增加而导致氧化胁迫是绿色植物中存在的一种普遍现象<sup>[5]</sup>, 植物的抗氧化作用是植物适应逆境的一个重要方面<sup>[6]</sup>. 植物抗氧化系统包括抗氧化酶及非酶的抗氧化剂, 抗氧化酶的研究主要集中在超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT), 而对谷胱甘肽还原酶(GR)的研究相对较少. 自 Smirnov 和 Cumbes<sup>[7]</sup>证实外源脯氨酸具有清除活性氧的作用以后, 脯氨酸积累与抗氧化系统的关系也引起了人们的极大关注. 本文采用  $\text{CaCl}_2$  浸种结合热激处理提高植物的抗冷力, 研究  $\text{Ca}^{2+}$  对玉米幼苗胚芽鞘在热激诱导抗冷性过程中的存活率、GR 活性、蛋白质含量及游离脯氨酸变化的影响, 以探讨  $\text{Ca}^{2+}$  在热激诱导抗冷性过程中对提高植物抗冷性的作用机理。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 植物材料为玉米 (*Zea mays.*), 品种为晴 3. 挑选饱满的具有发芽的种子, 经 0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒 10 min 后, 用蒸馏水冲洗干净, 浸种液分别为蒸馏水(-Ca)和+Ca(20 mmol/L)于 25℃ 下吸胀 12 h, 然后转移到垫有 6 层湿润滤纸的白磁盘中, 于 28℃/25℃(昼/夜)下暗萌发 60 h, 每天补充蒸馏水, 以保持滤纸的湿润, 取生长均匀的玉米幼苗备用。

**1.2 热激处理** 把上述暗萌发 60 h 幼苗的一部分转移到 42℃ 暗中热激 4 h, 然后在 28℃ 下恢复 4 h, 为热激幼苗; 而另一部分在热激处理期间一直置于 28℃ 下. 热激及未热激的幼苗皆被转移到下述低温处理中。

**1.3 低温处理及幼苗生活力的统计** 上述热激及未热激的幼苗被转移到 0.5℃ 下, 以进行低温处理 5 d, 上述热激处理及低温处理均在暗中进行. 处理结束后, 幼苗被转移到 25℃ 下每天光照 12 h 的环境中恢复 8 d, 计算存活率. 以恢复 8 d 后能变绿并重新生长的幼苗为存活的幼苗, 同时测定叶绿素的含量<sup>[8]</sup>, 观察幼苗的生长情况, 统计幼苗鲜重和幼

\* 收稿日期: 2003-05-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39860007); 云南省自然科学基金重点项目(98C002Z); 教育部高校优秀青年教师教学科研奖励计划资助项目。

作者简介: 郭丽红(1971-), 女, 云南人, 讲师, 硕士, 主要从事植物生理生化及分子生物学方面的研究。

苗高度。

1.4 谷胱甘肽还原酶活性的测定 GR( EC, 1, 6, 4, 2) 的测定按 Knörzer 等方法<sup>[9]</sup>。

1.5 蛋白质含量的测定 采用 Bradford 的方法<sup>[10]</sup>, 以牛血清蛋白为标准. 以上述提取液测出的蛋白质含量为总可溶性蛋白质含量, 取适量提取液煮沸 10 min 后, 于 4000 r/min 离心 20 min, 上清液为热稳定蛋白质, 沉淀部分为热不稳定蛋白质。

1.6 游离脯氨酸含量的测定 测定参照张殿忠等的磺基水杨酸法<sup>[11]</sup>。

上述所有实验被重复 2 次, 每次实验中有 2 个取样重复和 6 次测定重复. 图中所有数据均为平均值±标准误。

表 1  $\text{Ca}^{2+}$  对玉米幼苗热激诱导的抗冷力的影响

Tab. 1 The effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on heat shock induced chilling resistant in maize seedling

处理	存活率/%	叶绿素质量比 (DW)/(mg·g <sup>-1</sup> )	每株幼苗鲜重/ mg	幼苗高度/cm
- HS- Ca	13.5 ± 3.6a	11.02 ± 2.2a	1.11 ± 0.11a	12.33 ± 0.4a
- HS+ Ca	66.4 ± 2.1b	13.56 ± 1.9b	1.31 ± 0.12b	15.21 ± 0.2b
+ HS- Ca	72.4 ± 4.2b	13.09 ± 2.1b	1.36 ± 0.14b	15.74 ± 0.3b
+ HS+ Ca	88.6 ± 3.8c	16.33 ± 3.0c	1.55 ± 0.18c	18.96 ± 0.4c

- HS- Ca: 未经热激及钙处理的苗; - HS+ Ca: 未经热激而经钙处理的苗; + HS- Ca: 热激处理过而未经钙处理的苗; + HS+ Ca: 经热激及钙处理的苗. 表中 a, b, c 表示 5% 水平的差异状况, 相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著。

2.2  $\text{Ca}^{2+}$  对热激诱导抗冷性过程中 GR 活性的影响 分别用  $\text{Ca}^{2+}$  和蒸馏水浸种, 萌发 60 h, 热激处理后置于冷胁迫中, 发现 GR 活性发生明显的变化(图 1). 玉米幼苗胚芽鞘内 GR 的活性在冷胁迫初期明显上升, 在 0℃ 下 3 d 左右酶活性达到最高, 之后, 酶活性急剧下降, 在低温下 5 d 降至一较低水平. 从整个过程来看, 无论是哪一时期, 热激处理幼苗的 GR 活性比未热激幼苗的高, 热激结合  $\text{CaCl}_2$  浸种的玉米幼苗的 GR 酶活性最高, 表明热激能提高 GR 活性, 且  $\text{Ca}^{2+}$  对 GR 酶有激活效应, 而使 GR 酶活性上升。

2.3  $\text{Ca}^{2+}$  对热激诱导抗冷性过程中蛋白质含量的影响 图 2 的实验结果表明, 冷锻炼的结果降低了玉米幼苗胚芽鞘中总可溶性蛋白质的含量. 分析总可溶性蛋白质中热稳定蛋白和热不稳定蛋白的含量, 表明热激明显提高热稳定蛋白的含量, 尤以结合  $\text{CaCl}_2$  处理更为显著. 因此, 纯热激和结合

## 2 实验结果

2.1  $\text{Ca}^{2+}$  对玉米幼苗热激诱导的抗冷力的影响 如表 1 所示, 玉米幼苗经过 0.5℃, 5 d 的低温处理后, 其存活率仅为 13.5%;  $\text{CaCl}_2$  处理幼苗的为 66.4%, 经热激诱导, 幼苗的存活率可达 72.4%; 结合  $\text{CaCl}_2$  处理幼苗的高达 88.6%。

在冷胁迫恢复期间, 叶绿素含量、幼苗鲜重和高度也存在一定的差异(表 1). 我们观察到热激幼苗的叶片的颜色较黄; 而结合  $\text{CaCl}_2$  处理的幼苗, 叶色浓绿, 粗壮, 而且株高增长快. 说明结合  $\text{CaCl}_2$  处理的热激, 不仅抗冷力优于单纯热激, 而且恢复生长的能力强。

$\text{CaCl}_2$  的热激的总可溶性蛋白质降低主要是由热不稳定蛋白质的含量下降引起的. 冷胁迫使各处理的

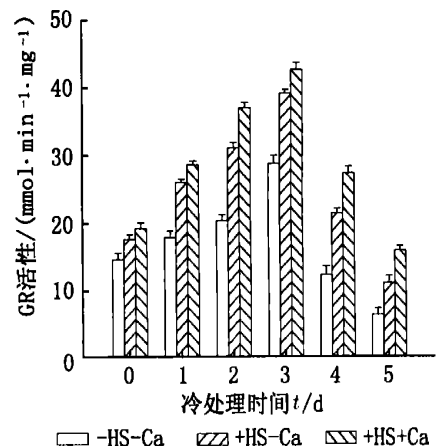


图 1 热激结合  $\text{Ca}^{2+}$  对玉米幼苗在冷处理过程中 GR 活性的影响

Fig. 1 Effect of heat shock and  $\text{Ca}^{2+}$  on GR activity of maize seedling during chilling stress

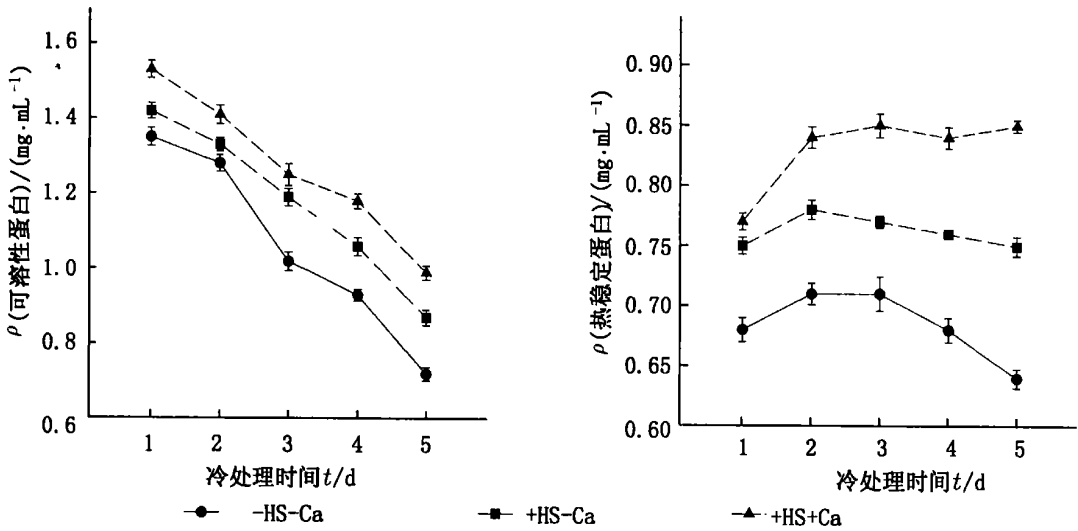


图 2 热激结合 Ca<sup>2+</sup> 对冷胁迫过程中蛋白质含量变化的影响

Fig. 2 Effect of heat shock and Ca<sup>2+</sup> on protein content of maize seedling during chilling stress

可溶性蛋白质含量均下降, 亦引起热稳定蛋白质含量的下降, 但结合 CaCl<sub>2</sub> 处理的热激苗其含量仍高于单纯热激苗, 二者又高于未锻炼苗。

**2.4 Ca<sup>2+</sup> 对热激诱导抗冷性过程中游离脯氨酸含量变化的影响** 为了进一步探讨钙提高热激诱导的抗冷性的生理机制, 我们测定了玉米幼苗热激、未热激及热激结合钙处理后, 在冷胁迫环境中游离脯氨酸的含量。见图 3, 在冷胁迫过程中, 脯氨酸的含量迅速上升; 经热激诱导, 脯氨酸的含量比未热激的幼苗高; 而结合 CaCl<sub>2</sub> 处理幼苗的脯氨酸含量最高。

### 3 讨论

植物对逆境抵抗能力的变化与细胞生理生化的一系列适应性变化有关。热激是植物在较高但非致死的温度下的一种预锻炼, 热激使植物从某些生理功能方面去适应逆境, 如膜脂变化、酶结构稳定、活性升高等。热激还使植体基因迅速转录, 翻译产生热激蛋白(HSP), 这些 HSP 多为一些热稳定同功酶或具有分子伴侣的作用, 保护某些高分子物质结构不被逆境伤害, 从而提高植物抗逆性, 以适应环境胁迫<sup>[12]</sup>。Ca<sup>2+</sup> 不仅作为植物必需营养元素, 它还具有更重要的生理功能, 它具有稳定膜结构的功能还作为某些酶分子的结构“稳定剂”, 同时, Ca<sup>2+</sup> 作为第二信使在植物体对外界信号的感应, 传递和响应过程中起着重要作用, 细胞内 [Ca<sup>2+</sup>] 低而胞

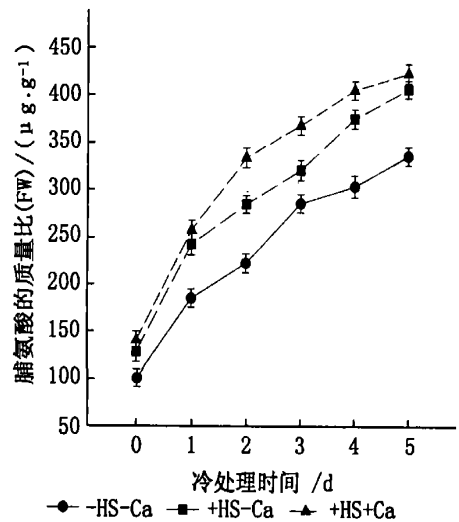


图 3 热激结合 Ca<sup>2+</sup> 对冷胁迫过程中脯氨酸含量变化的影响

Fig. 3 Effect Effect of heat shock and Ca<sup>2+</sup> on pro content of maize seedling during chilling stress

外、细胞器中浓度高, 胞外 Ca<sup>2+</sup> 的进入及细胞器中 Ca<sup>2+</sup> 的释放均能引起胞质中 [Ca<sup>2+</sup>] 的较大升高, 当达阈值时 Ca<sup>2+</sup> 与 CaM (钙调素) 形成 Ca-CaM (钙-钙调素) 复合物, 此复合物作用于靶酶或磷酸化等激活某些酶类, 最终启动各种生理生化适应机制<sup>[1,2]</sup>。本研究发现, 热激能提高玉米幼苗的抗冷性, 且使幼苗长势较好; 结合 CaCl<sub>2</sub> 处理的热激, 不仅抗冷力优于单纯热激, 而且恢复生长的能力也比单纯热激强。环境胁迫损伤细胞膜系统并导致氧胁迫, 即产生超氧化物阴离子自由基 O<sup>2-</sup>, O<sup>2-</sup> 可通过

启动自由基的链式反应及其它类型的再氧化等产生羟基自由基(OH<sub>1</sub>), 单线氧和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). 这些活性氧对细胞具有很强的伤害能力. 为此抗氧化系统(如抗氧化酶 GR) 积极参与活性氧的清除, 使活性氧维持在一个低水平, 以免自由基伤害植物体<sup>[5,6]</sup>. 本研究发现热激能提高抗氧化酶 GR 活性, 且Ca<sup>2+</sup>对 GR 酶有激活效应, 而使 GR 酶活性上升, 正如我们最近在离体 GR 酶上得到的结果一样(排除了Cl<sup>-</sup>的影响)<sup>[13]</sup>. 有研究认为热稳定蛋白质有抵抗逆境的作用<sup>[4]</sup>, 这可能与它们具有特异性的序列、高度的亲水性和调节渗透压的作用. 本研究发现热激使热稳定蛋白质增加, Ca<sup>2+</sup>处理对热激提高细胞中热稳定蛋白质的水平有明显加强作用. 到目前为止大量的证据表明脯氨酸累积有多种生理意义<sup>[14]</sup>, 如作为细胞质渗透调节物质、稳定生物大分子结构等. 最近的研究发现在氧化胁迫中植物内源的脯氨酸可能具有清除活性氧的作用<sup>[7]</sup>. 在本研究中, 发现在冷胁迫过程中, 脯氨酸的含量迅速上升; 经热激诱导, 脯氨酸的含量比未热激的幼苗高; 而结合CaCl<sub>2</sub>处理幼苗的脯氨酸含量最高, 说明脯氨酸的积累可能是钙提高热激诱导的抗冷力的生理基础之一.

### 参考文献:

[1] 龚明, 李英, 曹宗. 植物体内的钙信使系统[J]. 植物学通报, 1990, 7(3): 19—29.

[2] WEBB AAR, MCAINSH M R, TAYLOR J E, et al. Calcium ions as intracellular second messengers in higher plants[J]. Adv Bot Res, 1996, (22): 45—96.

[3] LURIE S, KLEIN J D. Acquisition of low temperature tolerance in tomatoes by exposure to high temperature stress [J]. J Am Soc Hort Sci, 1991, (116): 1 007—1 012.

[4] JENNINGS P, SALVEIT M E. Temperature and chemical shocks induce chilling tolerance in germinating *Cucumis sativus* (cv Poinsett76) seeds [J]. Physiol Plant, 1994, (91): 703—707.

[5] ALSCHER R G, DONAHUE J L, CRAMER C L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells [J]. Physiol Plant, 1997, (100): 224—233.

[6] SMIRNOFF N. Antioxidant systems and plant response to the environment [A]. Smirnoff N (ed) environment and plant metabolism: flexibility and acclimation [C]. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1995, 217—243.

[7] SMIRNOFF N, CUMBES Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. Phytochem, 1989, (28): 1 057—1 060.

[8] JOHNHOK X H C. 植物生物化学分析方法 [M]. 北京: 科学出版社, 1981.

[9] KNÖRZER O C, DURNER J, BÖGER P. Alterations in the antioxidative system of suspension cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress [J]. Physiologia Plantarum, 1996, (97): 388—396.

[10] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding [J]. Analyt Biochem, 1976, (44): 276—287.

[11] 张殿忠, 汪沛洪, 赵会贤. 测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法 [J]. 植物生理学通讯, 1990, (4): 62—65.

[12] WATERS E R, LEE G J, VIERLING E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants [J]. J Exp Bot, 1996, (47): 325—338.

[13] 郭丽红, 陈善娜, 龚明. 钙对玉米谷胱甘肽还原酶的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(2): 115—117.

[14] 赵可夫, 王韶唐. 作物抗性生理 [M]. 北京: 农业出版社, 1990.

## The effect of heat shock associated with calcium on the resistance of maize seedlings to chilling

GUO Li Hong<sup>1</sup>, CHEN Shan Na<sup>2</sup>, GONG Ming<sup>3</sup>

(1. The Department of Biology, Kunming Teachers College, Kunming 650031, China;

2. School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China;

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

(下转第 462 页)

# The 16S rRNA of *Thermus* thermophiles from two high temperature hot springs of West Yunnan

GUO Churlei, WANG Tao, ZHU Wei, CHAI Lihong, ZHANG Dong-hua,

CUI Xiao-long, XU Lihua, PENG Qian

(The Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education, P. R. China

Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

**Abstract:** Based on culture dependent method and culture independent method, several *Thermus* 16S rDNA sequences were amplified. The results of 16S rDNA phylogenetic analysis and 16S rRNA secondary structure comparison showed that there are at least two novel *Thermus* species in the two hot springs and they constituted an independent cluster on the phylogenetic tree. The secondary structure of 16S rRNA helix 10 with novel evolution characters also showed differences with other *Thermus* species.

**Key words:** West Yunnan; *Thermus*; 16S rRNA; secondary structure

\*\*\*\*\*

(上接第 452 页)

**Abstract** The survival rate, GR activity and the content of heat stable protein and proline of maize seedlings were surveyed after the seeds were soaked with CaCl<sub>2</sub> solution and/or the seedlings were shocked with heat prior to chilling treatment. It was found these parameters of the heat shocked seedlings were higher than that of contrast, and the highest ones of them were is that of seedlings which were treated by heat shock associated with CaCl<sub>2</sub> solution. So it is suggested heat shock pretreatment can raise the resistance of plants to chilling, and Ca<sup>2+</sup> can strengthen this function of heat shock.

**Key words:** maize seedlings; heat shock; CaCl<sub>2</sub>