

谷胱甘肽还原酶和超氧化物歧化酶在玉米幼苗热激诱导的交叉适应中的作用

郭丽红¹ 吴晓岚² 龚明^{2,*}

¹昆明学院生物系, 昆明 650031; ²云南师范大学生命科学院, 昆明 650092

摘要 玉米幼苗经过热激处理后, 在随后的高温、低温、干旱和盐胁迫环境中, 其存活率明显高于未热激的幼苗, 表明热激能提高植物的抗热性、抗冷性、抗旱性和抗盐性, 证实了玉米幼苗交叉适应现象的存在; 热激还可提高谷胱甘肽还原酶(GR)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性, 且在上述4种胁迫过程中 GR、SOD 活性水平与玉米幼苗的存活率呈正相关, 表明 GR 和 SOD 参与玉米幼苗交叉适应的形成。

关键词 玉米; 热激; 交叉适应; 谷胱甘肽还原酶; 超氧化物歧化酶

Roles of Glutathione Reductase and Superoxide Dismutase in Heat-shock-induced Cross Adaptation in Maize Seedlings

GUO Li-Hong¹, WU Xiao-Lan², GONG Ming^{2,*}

¹Department of Biology, Kunming College, Kunming 650031, China; ²School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China

Abstract Short-term heat-shock pretreatments at 42°C for 4 h, followed by a 4-h recovery, significantly increased survival percentage of maize seedlings under severe heat, chilling, drought and salt stress, indicating that the heat-shock pretreatments not only enhanced the resistance of maize seedlings to heat, but also improved their resistances to chilling, drought and salt stress, in other words, heat-shock pretreatments could simultaneously induce cross adaptation of maize seedlings to heat, chilling, drought and salt stress. Measurements of antioxidant enzymes glutathione reductase (GR) and superoxide dismutase (SOD) showed that the maize seedlings with heat-shock pretreatment, which induced cross adaptation, could retain relatively higher activities of GR and SOD under heat, chilling, drought and salt stress as compared with the control seedlings without heat-shock pretreatments. The enhancements of GR and SOD in maize seedlings under the four stresses were positively correlated with survival rate of maize seedlings. It indicated that GR and SOD could play an important role in the formation of cross adaptation.

Key words maize; heat-shock; cross adaptation; glutathione reductase; superoxide dismutase

植物置于超过其正常生长温度10~15°C的环境中数个小时(热激), 可快速诱导一系列编码热激蛋白的基因表达, 并提高植物对随后更强的热胁迫的抗性^[1~3]。热激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^[4,5]、抗盐性^[6]、抗旱性^[7]和抗重金属离子^[8]的能力。我们曾报道两种抗性不同的玉米品种幼苗热激后其抵抗高温、低温、干旱和盐渍的能力同时提高^[9]。另据报道, 当植物进行某种逆境锻炼时, 不仅其对这种逆境的抗性增强, 也增强了对其它几种逆境的抗性, 这即是交叉适应现象^[9~11]。交叉适应现象的存在暗示植物对各种不同逆境的抗性之间可能存在着某种或某些共同的抗性适应机制。但目前这一领

域的研究尚在起步阶段, 仅证实交叉适应过程中有新的蛋白质合成^[4,11], 交叉适应的启动信号和适应机制尚不清楚。

另一方面, 已知各种逆境胁迫都可诱发细胞内活性氧浓度的增加而导致氧化胁迫, 所以, 植物抗逆性的形成常常与抗氧化系统活性的增强密切

收稿 2004-10-13 修定 2005-01-18

资助 国家自然科学基金(39860009)、云南省自然科学基金重点项目(98C00027)、教育部高校优秀青年教师教学科研奖励计划(2001年度)、昆明师范专科学校重点学科建设项目(Z-002)。

*通讯作者(E-mail: gongming@public.km.yn.cn, Tel: 0871-5516244)。

相关^[12, 13]。业已查明植物体内的抗氧化酶如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD, EC 1.15.1.1)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR, EC 1.6.4.2)等在抗氧化系统和植物对逆境的适应中起重要作用。逆境胁迫初期常引发 SOD 和 GR 相关基因的快速上调, 而 SOD 和 GR 等过量表达均能提高植物对各种逆境胁迫的抗性^[14~16]。这暗示 SOD 和 GR 可能参与植物对逆境胁迫交叉适应的形成过程, 但对此迄今尚无明确报道。

本文研究热激诱导的玉米(*Zea mays*)幼苗对高温、低温、干旱和盐渍的交叉适应过程中 GR 和 SOD 的作用, 以期能为阐明抗氧化系统参与交叉适应的形成机制这一假说提供参考。

材料与方法

玉米(*Zea mays*)品种为大黄。种子以 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min, 漂洗干净后, 在 25℃ 下以蒸馏水浸种 12 h, 而后播种到垫有 6 层湿润滤纸的带盖磁盘中, 于 28℃ 下暗萌发 60 h。取生长均匀的玉米幼苗用于下列处理: (1) 经暗萌发 60 h 的 1/3 幼苗转移到 42℃ 暗中热激 4 h, 后放在 28℃ 下处理 4 h, 此即为热激和恢复的幼苗; (2) 经上述暗萌发 60 h 后的 1/3 幼苗转移到 42℃ 暗中热激 4 h, 不经 28℃ 下的恢复就直接转入进行下列 4 种胁迫处理, 即热激未恢复幼苗; (3) 另外的 1/3 幼苗作为对照, 其在热激处理期间一直置于 28℃ 下。热激和未热激的幼苗均转移到下述各种逆境处理中: (1) 50℃ 下 12 h 进行高温处理; (2) 0.5℃ 下 5 d 进行低温处理; (3) 垫有 6 层干滤纸的带盖磁盘中幼苗放在 28℃ 下进行干旱处理 5 d; (4) 于 28℃ 下以 700 mmol·L⁻¹ NaCl 下处理 5 d。上述热激处理和各种胁迫处理均在暗中进行。所有处理结束后, 幼苗转移到 25℃ 和光照 12 h·d⁻¹ 的环境中恢复 8 d 后统计存活率。以恢复 8 d 后能变绿并重新生长的幼苗算为存活的幼苗。

GR 的测定按文献 17 的方法, 并作一些修改^[18]。

SOD 活性测定方法基本按照邹国林等^[19]及张伯科和郑荣梁^[20]的方法。

蛋白质含量测定采用 Bradford^[21]的方法, 以牛血清蛋白为标准蛋白。

上述所有实验均重复 2 次, 每次实验中有 2

个取样重复和 4 次测定重复。图中所有数据均为平均值 ± 标准误。

NADPH、NADP、氧化型谷胱甘肽(GSSG)、还原型谷胱甘肽(GSH)、DTT、邻苯三酚等均购自 Sigma 公司。

实验结果

1 热激诱导玉米幼苗对逆境因素的交叉适应

如表 1 所示, 热激处理并经 28℃ 下恢复过的幼苗存活率, 热胁迫下提高 200%, 冷胁迫下提高 96.9%, 干旱胁迫下提高 146.1%, 盐胁迫下提高 112.2%。而经在 42℃ 下热激处理 4 h 后不作 28℃ 下恢复就直接转入各种逆境下, 即热激未恢复的幼苗, 其存活率仍比不热激幼苗的高。这些表明热激能提高玉米幼苗的抗热、抗冷、抗旱、抗盐能力, 显示玉米幼苗中交叉适应现象的存在。但热激未恢复的幼苗存活率与热激并恢复的幼苗之间有一定的差异, 说明玉米幼苗经热激处理后的恢复期对是否发生交叉适应现象是重要的。

2 玉米幼苗经热激诱导及其后各种胁迫因素影响下的 GR 活性变化

如图 1 所示, 玉米幼苗在热激(42℃)处理 4 h 后, 其 GR 活性迅速下降; 经热激后并在 28℃ 下恢复 4 h 后, 其 GR 活性基本回升到原来的水平。而后无论热激与否, 玉米幼苗的 GR 活性在各种胁迫因素的影响下均呈规律性变化, 即在胁迫初期上升直至达到峰值, 在胁迫后期降至较低水平。不同胁迫因素下的 GR 活性变化范围和时间不一致。在 4 种胁迫因素的影响下, 经热激处理过的玉米幼苗 GR 活性均比未热激处理的高, 表

表1 热激与不同的胁迫因素下玉米幼苗的存活率

Table 1 The survival percentages of maize seedlings under heat, chilling, drought and salt stresses

处理	幼苗存活率/%			
	热胁迫	冷胁迫	干旱胁迫	盐胁迫
不热激	23.8±9.2 ^a	38.5±7.2 ^a	34.7±4.8 ^a	36.2±6.3 ^a
热激后不恢复	55.3±3.6 ^b	58.6±3.0 ^b	60.5±2.9 ^b	53.1±5.4
热激后恢复	71.4±4.7 ^c	75.8±3.8 ^c	85.7±3.7 ^c	76.8±3.6 ^c

a、b、c 表示 5% 水平的差异分析结果; 相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著。

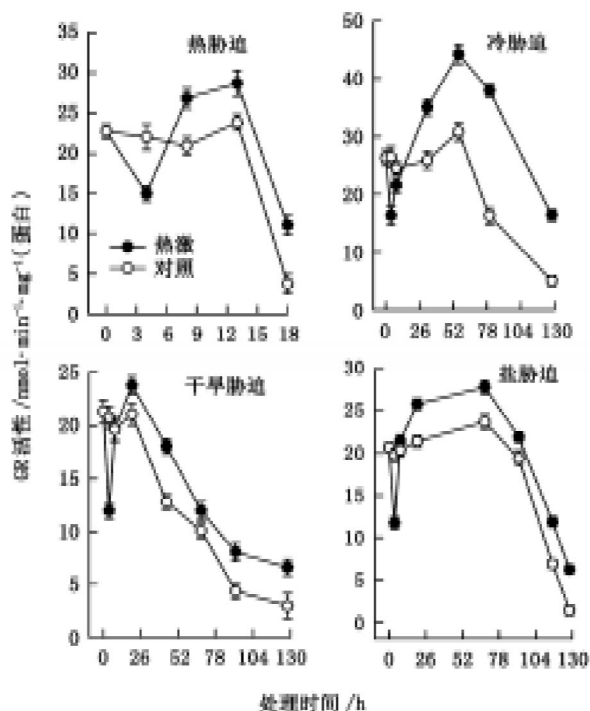


图1 玉米幼苗经热激诱导及其后的不同胁迫因素影响下的GR活性变化

Fig. 1 Changes in GR activity in maize seedlings under heat, chilling, drought and salt stresses after heat shock

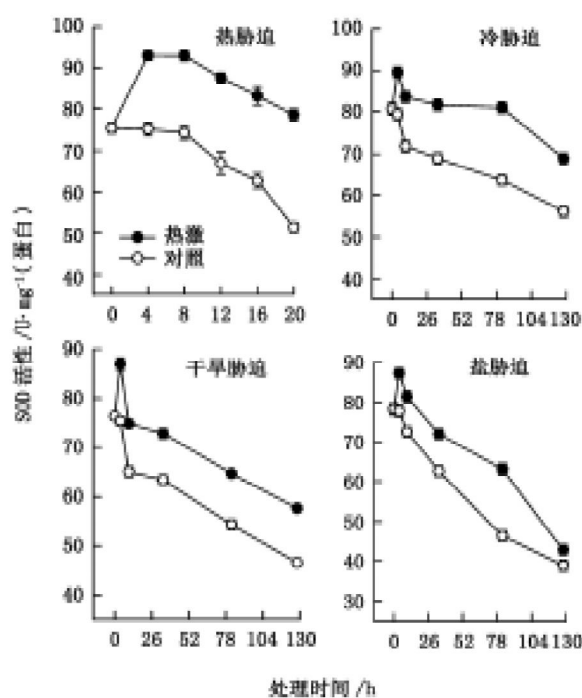


图2 玉米幼苗经热激诱导及其后的不同胁迫因素影响下的SOD活性变化

Fig. 2 Changes in SOD activity in maize seedlings under heat, chilling, drought and salt stresses after heat shock

明热激处理后玉米幼苗在各种胁迫因素影响下可保持较高的GR活性。

3 玉米幼苗经热激诱导及其后的不同因素影响下的SOD活性变化

如图2所示,玉米幼苗经热激(42℃)处理4 h后,其SOD活性上升,而后下降。无论经热激处理与否的玉米幼苗,其SOD活性在各种胁迫因素的影响下皆下降。不同的胁迫因素影响下的SOD活性变化的范围和时间不一致。在高温、低温、干旱和盐胁迫过程中,热激处理过的玉米幼苗SOD活性均比未经热激处理的高,表明热激处理后的玉米幼苗在4种胁迫因素影响下可保持较高的SOD活性。

讨 论

植物对逆境胁迫的交叉适应现象已在部分植物中得到证实^[2~8],但所有的报告仅局限于一个热激处理可诱导植物另一种抗胁迫能力(如抗冷性、抗旱性、抗盐性等)的描述。本文结果则表明玉

米幼苗经42℃热激处理4 h后,其玉米幼苗在低温、高温、干旱和盐渍下的存活率可显著提高(表1),说明热激处理可以诱发玉米幼苗对热、冷、干旱和盐胁迫的交叉适应。且热激后恢复4 h的玉米幼苗存活率比热激后未经恢复的高,表明热激后的恢复期对交叉适应能否发生很重要。交叉适应现象暗示植物对不同逆境因素的抵御能力之间有某种或某些共同的机制。迄今,人们仅证实交叉适应过程需新的蛋白质合成^[4,11],钙和活性氧作为信号分子在此种交叉适应过程中有作用^[9,10],但对交叉适应的形成机制尚不十分清楚,应该深入探讨。

各种逆境胁迫都可诱发细胞内活性氧浓度的增加而导致氧化胁迫,这暗示植物在多种逆境因素胁迫下发生的交叉适应可能与抗氧化系统有关^[12~16]。本文结果表明,经热激处理过的玉米幼苗中GR和SOD活性比未经热激处理过的明显高(图1、2),表明热激可增强高温、低温、干旱和盐渍胁迫下的玉米幼苗中GR和SOD活性,并与幼苗的存活

率呈正相关, 显示GR和SOD在此种交叉适应过程中起一定的作用。

参考文献

- Nover L, Neumann D, Scharf KD. Heat Shock and Other Stress Response Systems of Plants. Berlin:Springer-Verlag, 1989
- Waters ER, Lee GJ, Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. J Exp Bot, 1996, 47: 325~338
- Gong M, van der Luit AH, Knight MR et al. Heat shock-induced changes of intracellular Ca^{2+} level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. Plant Physiol, 1998, 116: 429~437
- Sabehat A, Lurie S, Weiss D. The correlation between heat shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruits. Plant Physiol, 1996, 111: 531~537
- Kadyrzhanova DK, Vlachonasios KE, Ververidis P et al. Molecular cloning of a novel heat induced/chilling tolerance related cDNA in tomato fruit by use of mRNA differential display. Plant Mol Biol, 1998, 36: 885~895
- Kuznetsov VV, Rakutin VY, Borisova NN et al. Why does heat shock increase salt resistance in cotton plants? Plant Physiol Biochem, 1993, 31: 181~188
- Kuznetsov VV, Rakutin VY, Zholkevich VN. Effect of preliminary heat-shock treatment on accumulation of osmolytes and drought resistance in cotton plants during water deficiency. Physiol Plant, 1999, 107: 399~406
- Orzech KA, Burke JJ. Heat shock and the protection against metal toxicity in wheat leaves. Plant Cell Environ, 1988, 11: 711~714
- Gong M, Chen B, Li ZL et al. Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H_2O_2 . J Plant Physiol, 2001, 158: 1125~1130
- Bowler C, Fluhr R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-adaptation. Trends Plant Sci, 2000, 5: 241~246
- Sabehat A, Weiss D, Lurie S. Heat-shock proteins and cross-tolerance in plants. Physiol Plant, 1998, 103: 437~441
- Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. Physiol Plant, 1997, 100: 224~233
- Mallick N, Mohn FH. Reactive oxygen species: Response of algal cells. J Plant Physiol, 2000, 157: 183~193
- Mullineaux PM, Creissen GP. Glutathione reductase: Regulation and role in oxidative stress. In: Scandalios JG (ed). Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. United Kingdom: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. 667~713
- Breusegem FV, Slooten L, Stassart JM et al. Effects of overproduction of tobacco Mn-SOD in maize chloroplasts on foliar tolerance to cold and oxidation stress. J Exp Bot, 1999, 50(332): 71~78
- Tyystjärvi E, Riikonen M, Arisi ACM et al. Photoinhibition of photosystem II in tobacco plants overexpressing glutathione reductase and poplars overexpressing superoxide dismutase. Physiol Plant, 1999, 105: 409~416
- Knörzer OC, Durner J, Böger P. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. Physiol Plant, 1996, 97: 388~396
- 郭丽红, 陈善娜, 龚明. 钙对玉米幼苗谷胱甘肽还原酶活性的影响. 植物生理学通讯, 2002, 38(2): 115~117
- 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌等. 一种SOD的测活方法——邻苯三酚自氧化法的改进. 生物化学与生物物理进展, 1986, 4: 71~73
- 张伯科, 郑荣梁. 用邻苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶分光光度法的改进. 兰州大学学报, 1990, 26(3): 99~102
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal Biochem, 1976, 44: 276~287