



## 研究论文

## Research Article

# 植物脯氨酸测定方法优化及其应用

张瑛<sup>✉</sup>, 罗志祥<sup>✉</sup>, 周俊峰<sup>✉</sup>, 施伏芝<sup>✉</sup>, 阮新民<sup>✉</sup>, 滕斌<sup>✉</sup>, 吴敬德<sup>✉</sup>

安徽农科院水稻研究所, 合肥, 230031

✉ 通讯作者: lzx6176@126.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2013 年, 第 11 卷, 第 30 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0030

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

张瑛等, 2013, 植物脯氨酸测定方法优化及其应用, 分子植物育种(online), 11(30): 1219-1226 (doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0030)

引用格式(英文):

Zhang et al., 2013, The Optimization of Determination Method of Plant Proline and Its Application, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 11(30): 1219-1226 (doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0030)

**摘要** 脯氨酸(Pro)含量被认为是研究植物抗逆性的重要指标。然而, 脯氨酸测定存在一些问题, 主要表现: 已有的标准曲线范围较小, 在 0-10  $\mu\text{g/mL}$ , 而逆境胁迫处理脯氨酸浓度一般远高于该值, 测定时则需要进行范围延展或多次稀释。另外, 叶片的一般取样量在 0.2-0.5 g, 不利于实验室小微量材料的重复取样测定。本文以水稻叶片为材料, 对标准曲线和取样量进行优化, 最大标准脯氨酸浓度可达到 75  $\mu\text{g/mL}$ , 取样量减少为 0.1 g。并利用优化后的最适取样量和不同范围的标准曲线研究干旱胁迫处理下含和不含 *CBF3* 的水稻材料脯氨酸含量的变化。研究结果表明: 首先, 干旱胁迫处理下, *CBF3* 的存在能显著促进脯氨酸含量的增加并能延缓水势下降, 提高植物的耐旱性; 其次, 最适取样量和合适的标准曲线有利于提高脯氨酸含量测定的准确性。研究为探明逆境条件下植物脯氨酸的调控机制提供较好的技术与方法。

**关键词** 植物; 脯氨酸; 方法优化; *CBF3*

## The Optimization of Determination Method of Plant Proline and Its Application

Zhang Ying<sup>✉</sup>, Luo Zhixiang<sup>✉</sup>, Zhou Junfeng<sup>✉</sup>, Shi Fuzhi<sup>✉</sup>, Ruan Xinmin<sup>✉</sup>, Teng Bin<sup>✉</sup>, Wu Jingde<sup>✉</sup>

Rice Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, 230031, P.R. China

✉ Corresponding author, lzx6176@126.com; ✉ Authors

**Abstract** The content of Proline (Pro) is often considered as an important index in plant stress resistance. But to determination method of Pro, there are still some problems as follows: The standard curve varies in a narrow range, with values between 0 and 10  $\mu\text{g/mL}$ , while subjected to stress treatment, the determination of the content of Pro should need linear range extension or multitime-dilution. In addition, the sampling amount of leaves was with values between 0.2 and 0.5 g, so did not favor the repeated sampling of small trace materials in laboratory. In this paper, by using of rice leaves as experiment materials, the standard curve and sampling amount had been optimized, the maximum standard of the concentration of Pro can reach 75  $\mu\text{g/mL}$ , the optimal sampling amount was 0.1 g. Moreover, we use the optimized sampling amount and the different range for standard curve to study the relationship between the concentration of Pro of rice and *CBF3* under the simulated drought stress. The results showed that: Firstly, under drought stress, the existence of *CBF3* can promote the increase of the content of Pro significantly, and prolong the decrease of the leaf water potentials, enhance plant drought tolerance; Secondly, the suitable sampling amount and the appropriate range for standard curve are very important to the determination method of Pro. This study provides useful technology and method for pathway of plant Proline under drought stress.

**Keywords** Plant; Proline; Optimization; *CBF3*

收稿日期: 2013 年 10 月 17 日

接受日期: 2013 年 10 月 18 日

发表日期: 2013 年 12 月 24 日

基金项目: 本研究由科技部国际合作项目(2010DFA31950)、国家 863 项目(2012AA101103)、973 计划前期研究专项(2011CB111506)和安徽省自然科学基金项目(11040606M97)资助

## 研究背景

脯氨酸(Pro)作为一种植物蛋白质组分主要以游离状态广泛存在于植物体中(全先庆等, 2007)。在干旱、高盐碱等逆境条件下, 植物体内脯氨酸往往大量积累。积累的脯氨酸除作为细胞质内渗透调节物质外, 还具有稳定生物大分子结构、降低细胞酸



性、解除氨毒和作为能量库调节细胞氧化还原势等功能(王宝增, 2011, 生物学教学, 36 (11): 4-5)。

在旱、盐碱、热、冷处理的逆境条件下, 植物体内脯氨酸的含量均明显增加(谢虹等, 2011)。植物体内脯氨酸含量与植物的抗逆性能存在显著相关, 抗旱性强的品种的脯氨酸积累较多, 因此脯氨酸含量可以作为抗旱育种的主要生理指标(吴慎杰等, 2003)。另外, 脯氨酸由于其亲水性极强, 能增加原生质胶体稳定性, 降低细胞液凝固点, 防止细胞脱水, 在低温条件下, 植物组织中脯氨酸的大量存在能提高植物的抗寒性, 因此, 可作为抗寒育种的生理指标(王小华和庄南生, 2008)。

关于脯氨酸测定方法, 国内外均有文献报道, Abrahám 等(2010)介绍了 3 种脯氨酸测定方法, 分别为靛红试纸检测法、分光光度法和 HPLC 的氨基酸分析法, 其中, 靛红试纸检测法主要用于大批样品简单、快速筛选, 但显粗糙, HPLC 的氨基酸分析法主要基于氨基酸浓度变化, 精确好, 但设备较为昂贵。而分光光度法成本低、简单、快速, 因而最为常用。

针对分光光度法, 通常情况下, 采用磺基水杨酸提取, 在酸性条件下和茚三酮反应生成红色缩合物, 用甲苯萃取后, 在 520 nm 处有最大吸收峰(职明星和李秀菊, 2005)。

然而, 脯氨酸的分光光度法测定存在一些问题, 主要表现: 已有的标准曲线范围较小, 利用 0-10  $\mu\text{g/mL}$  的标准溶液配制, 可测脯氨酸含量的范围在 0-10  $\mu\text{g/mL}$ , 而一般的逆境试验中, 脯氨酸含量往往超过 15  $\mu\text{g/mL}$ , 特殊情况甚至接近 75  $\mu\text{g/mL}$ , 因而, 已有的标准曲线范围不利于逆境处理后期脯氨酸急骤变化的检测。另外, 叶片的一般取样量在 0.2-0.5 g, 也不利于试验室小微量材料的重复取样测定。

转录因子 *CBF* (CRT/DRE-binding factor) 是植物抗逆过程中一个重要的调节因子, 其广泛存在于拟南芥、欧洲油菜、水稻、玉米、小麦等各类植物中, 其本身来源于 *CBF* 基因, 能通过识别 *COR* 基因中的 CRT/DRE (C-repeat/dehydration-responsive element) 元件启动 *COR* 基因转录(李科友和朱海兰, 2011; 张瑛等, 2012a)。韩国科学家 Oh 等(2005)将拟南芥 *CBF3* 基因转入粳稻品种 Nakdong (转基因 5 NT) 中, 并获

得含 *CBF3* 基因的转基因 3 和转基因 2 材料, 进而对含 *CBF3* 的转基因材料和对照转基因 5 NT 的苗期(生长 4 周)进行干旱胁迫处理, 结果表明 *CBF3* 基因能显著提高水稻耐旱性。但对于干旱胁迫下 *CBF3* 与脯氨酸含量的相关性报道较少(张瑛等, 2012b)。

因此, 本文通过对脯氨酸测定方法中的最适取样量和标准曲线范围进行研究, 并利用不同范围标准曲线, 模拟干旱条件, 研究 *CBF3* 差异水稻材料的脯氨酸含量差异。旨在为探明逆境条件下植物脯氨酸的调控机制提供较好的技术与方法。

## 1 结果与分析

### 1.1 试验条件的优化

#### 1.1.1 标准曲线的优化

根据赵海泉的脯氨酸测定方法(赵海泉, 2008, 中国农业大学出版社, pp.21-25, 83-84)的 10  $\mu\text{g/mL}$  标准溶液进行改进, 分别再配制 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  的脯氨酸标准溶液, 按表 1 配制不同浓度的脯氨酸标准溶液。

取 17 支 20 mL 具塞刻度试管, 分别按表 1 加入不同浓度的脯氨酸标准溶液, 加入 2 mL 冰醋酸和 3 mL 酸性茚三酮显色液, 混匀, 沸水浴 1 h, 取出冷却, 加入 5 mL 甲苯, 避光静置 30 min, 用纯水调零在 520 nm 处测吸光值。试验平行 3 次, 绘制 0-75  $\mu\text{g/mL}$ 、0-10  $\mu\text{g/mL}$ 、15-35  $\mu\text{g/mL}$ 、40-75  $\mu\text{g/mL}$  标准曲线(图 1)。

从上图中可以看出, 如图 1B, 脯氨酸标准曲线在 0-10  $\mu\text{g/mL}$  范围内  $R^2=0.9997$ , 方程  $y=0.0365x-0.0024$ , 相关性较好, 但其范围延展到 15-35  $\mu\text{g/mL}$  时(图 1C),  $R^2=0.9974$ ,  $R^2$  降低, 方程  $y=0.0356x-0.0128$ , 截距变大, 即产生误差, 而当范围延展至 40-75  $\mu\text{g/mL}$  时(图 1D),  $R^2$  进一步降低为 0.991, 方程  $y=0.0387x-0.1716$ , 截距进一步变大, 表现为误差进一步增大。而 0-75  $\mu\text{g/mL}$  的脯氨酸标准曲线(图 1A)正好覆盖上述三段范围, 且其  $R^2=0.9983$ , 明显高于 15-35  $\mu\text{g/mL}$ 、40-75  $\mu\text{g/mL}$  的  $R^2$  值, 其回归方程为  $y=0.0359x-0.0095$ , 截距较小。因此, 正好解决逆境条件下高脯氨酸浓度检测的准确度问题。

表 1 不同浓度脯氨酸标准溶液配制方法

Table 1 Compound method of standard solution of proline under different concentrations

脯氨酸浓度( $\mu\text{g/mL}$ ) The concentrations of proline ( $\mu\text{g/mL}$ )	脯氨酸体积(mL) The volumes of proline (mL)	水(mL) The volumes of water (mL)
0	取浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的脯氨酸标准溶液	0.00
0.5	The standard solution of proline with 10 $\mu\text{g/mL}$ concentration	0.10
1		0.20
2		0.40
4		0.80
6		1.20
8		1.60
10	2.00	0.00
15	取浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的脯氨酸标准溶液	0.60
20	The standard solution of proline with 50 $\mu\text{g/mL}$ concentration	0.80
25		1.00
30		1.20
35		1.40
40		1.60
50		2.00
60	取浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的脯氨酸标准溶液	1.20
75	The standard solution of proline with 100 $\mu\text{g/mL}$ concentration	0.80
		1.50

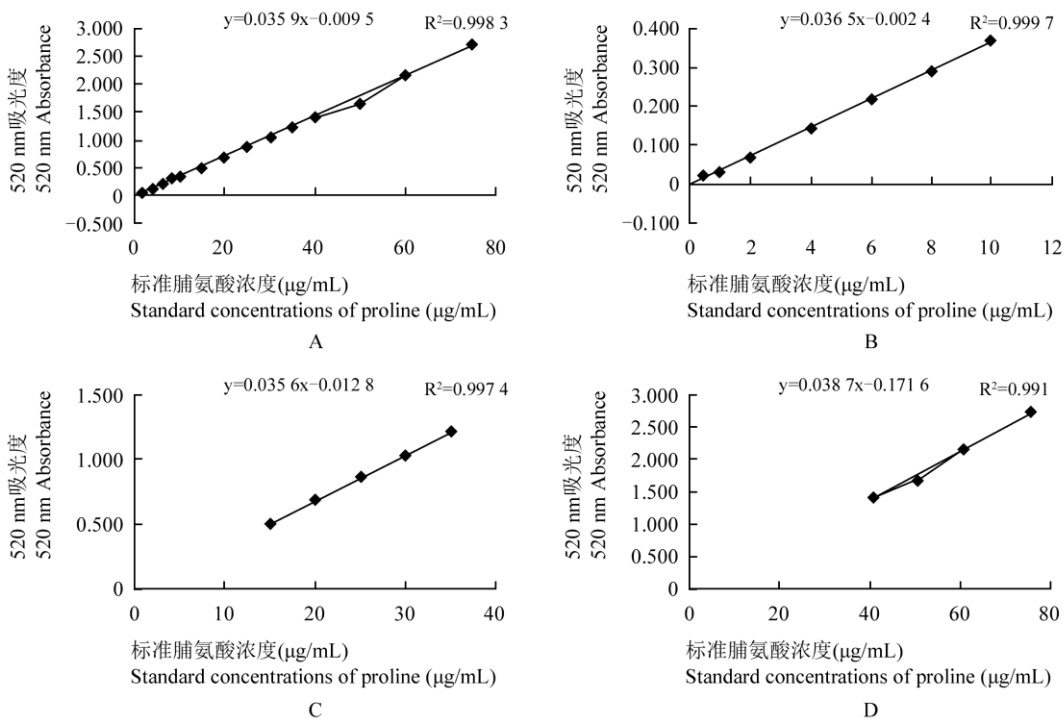


图 1 脯氨酸标准曲线

注: A: 0-75  $\mu\text{g/mL}$ ; B: 0-10  $\mu\text{g/mL}$ ; C: 15-35  $\mu\text{g/mL}$ ; D: 40-75  $\mu\text{g/mL}$ 

Figure 1 Proline standard curve

Note: A: 0-75  $\mu\text{g/mL}$ ; B: 0-10  $\mu\text{g/mL}$ ; C: 15-35  $\mu\text{g/mL}$ ; D: 40-75  $\mu\text{g/mL}$



### 1.1.2 脯氨酸测定的最适取样量

分别取 0.020 g、0.040 g、0.060 g、0.080 g、0.100 g、0.120 g、0.150 g 和 0.200 g 的未经耐旱处理和耐旱处理 30 d 的旱籼 15 水稻叶片，测定脯氨酸含量，设 3 组平行。绘制脯氨酸含量与水稻叶片重量的曲线图(图 2; 图 3)。

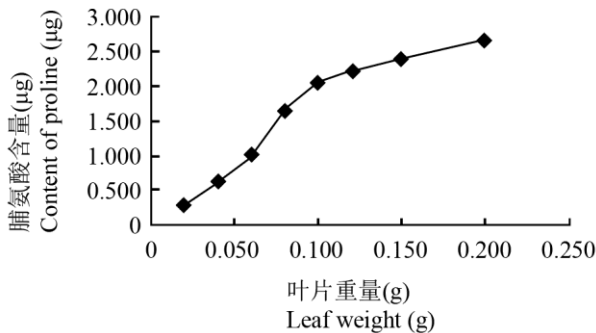


图 2 未经耐旱处理叶片脯氨酸含量和样品取样量的关系  
Figure 2 Relationship between leaf Proline content and sampling amount without drought

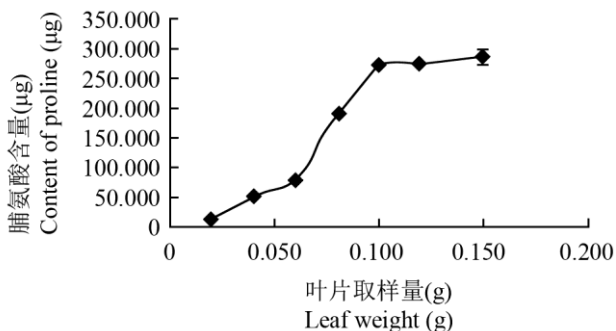


图 3 耐旱处理 30 天叶片脯氨酸含量与取样量关系  
Figure 3 Relationship between leaf proline content and sampling amount of 30 day under drought

从图 2、图 3 可以看出，无论是未经耐旱处理，还是耐旱处理 30 d，虽然其脯氨酸含量的绝对值差异较大，但其曲线都在 0.1 g 取样量处斜率发生变化，小于 0.1 g，表现为脯氨酸含量增加较快，而大于 0.1 g，则曲线变平缓，脯氨酸含量增加较慢。因此，0.1 g 叶片取样量为脯氨酸含量检测的最适取样量。

### 1.2 干旱胁迫条件下 *CBF3* 对脯氨酸含量变化的影响

脯氨酸测定方法优化后，笔者设计 1.2.2 干旱处理试验条件，分别定期取样测定其沙土含水量和水势变化，在此基础上，进一步利用含 *CBF3* 的转基因 2 材料和不含 *CBF3* 的转基因 5 NT 材料，研究干旱胁迫条件下 *CBF3* 对脯氨酸含量变化的影响。

### 1.2.1 沙土含水量变化

沙土含水量变化测定如图 4 所示。

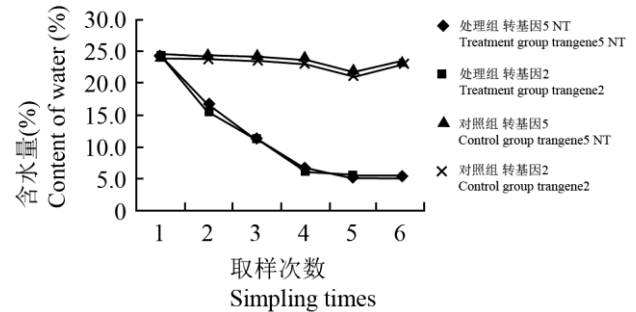


图 4 耐旱试验对照组和处理组沙土含水量的变化  
Figure 4 Change of water content of sandy soil of control and treatment group under drought

从图 4 中可以看出，对照组沙土含水量均保持在 23% 左右，而处理组均从 24% 下降至 5%，下降幅度明显，适宜做耐旱差异试验。

### 1.2.2 叶片水势变化

不同水稻材料的水势变化如图 5 所示。

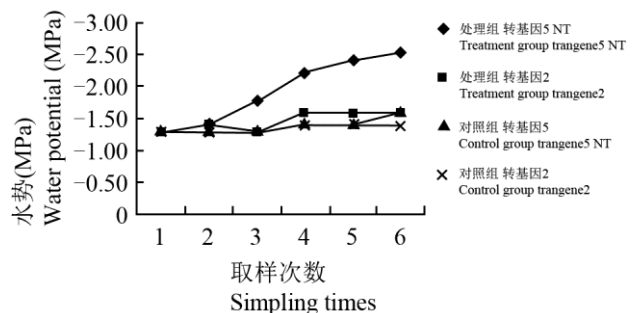


图 5 耐旱试验对照组和处理组材料水势变化  
Figure 5 Change of water potential of control and treatment group under drought

从图 5 可以看出，对照组材料和试验组转基因 2 水势下降幅度较小，差值在 0.1–0.2 之间。而处理组的转基因 5 NT 则从 -1.27 MPa 下降至 -2.5 MPa，差值达到 1.23，下降幅度明显。由此表明，*CBF3* 的存在能延缓水势的下降，提高水稻的耐旱性。

### 1.2.3 干旱胁迫条件下的 *CBF3* 对脯氨酸含量变化的影响

根据上述沙土含水量和叶片水势的变化，利用图 1 的不同范围标准曲线的脯氨酸测定方法，进一步研究干旱胁迫条件下的 *CBF3* 差异影响下的脯氨酸含量变化(图 6)。

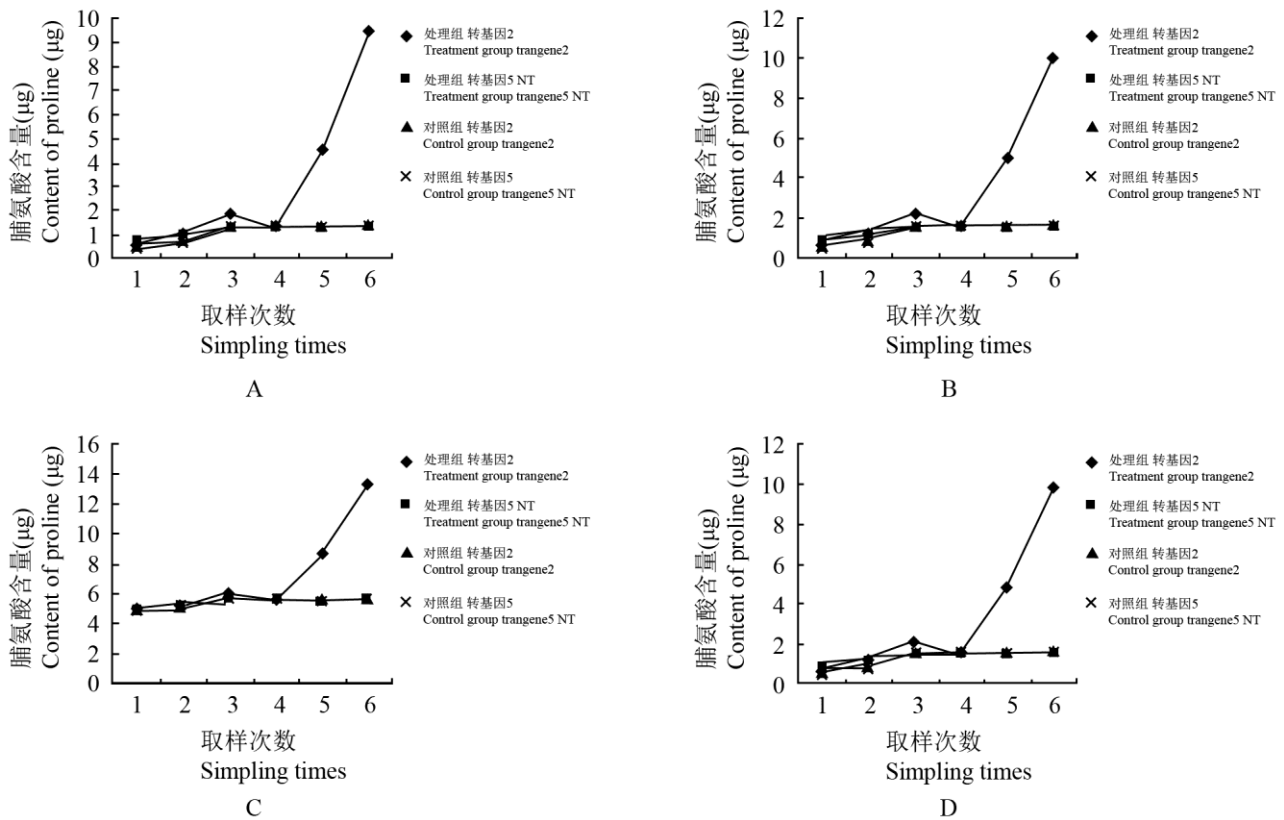


图 6 对照组与处理组脯氨酸含量差异  
注: A: 0-10 µg/mL; B: 15-35 µg/mL; C: 40-75 µg/mL; D: 0-75 µg/mL  
Figure 6 Proline content difference between control and treatment group  
Note: A: 0-10 µg/mL; B: 15-35 µg/mL; C: 40-75 µg/mL; D: 0-75 µg/mL

从图 6 中均可以看出, 对照组材料脯氨酸含量变化不大, 而处理组材料差异较大, 不含 *CBF3* 的转基因 5 脯氨酸含量增加不明显, 与未经干旱处理的对照组脯氨酸含量的变化趋势相近, 而含 *CBF3* 的转基因 2 则增加十分明显。由此表明, *CBF3* 可能通过促进脯氨酸增加途径来提高水稻的耐旱性。

另外, 通过图 6 中的图的进行对比, 可以发现, 标准曲线范围不同, 其计算的脯氨酸含量结果存在较大的差异。以处理组含 *CBF3* 的转基因 2 的脯氨酸含量变化为例(图 7), 0-75 µg/mL 范围的脯氨酸含量最大增加比例为 1081%, 如果以 0-10 µg/mL 范围计算, 最大增加比例可达到 1417%, 大大高于 0-75 µg/mL 范围, 15-35 µg/mL 范围的脯氨酸含量最大增加比例为 974%, 与 0-75 µg/mL 范围相比有所降低, 而 40-75 µg/mL 范围的脯氨酸含量最大增加比例仅为 168.9%, 与 0-75 µg/mL 范围相比则大为降低。由此表明, 合适的标准曲线范围对精确测定脯氨酸含量十分重要, 范围过小或过大, 会造成显示的差异过大或过小, 因而直接影响试验结果。

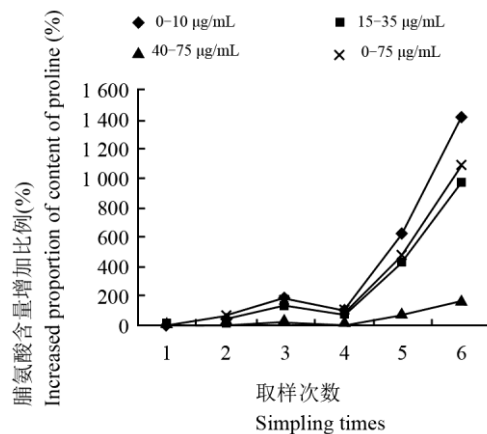


图 7 利用不同范围标准曲线计算的处理组转基因 2 的脯氨酸含量增加比例  
Figure 7 Increased proportion of content of Proline to treatment group transgene2 by using of standard curves with different range

## 2 讨论与结论

植物生长的周期性决定了其在整个生长发育过程中将不可避免地遭受到各种生物或非生物逆境胁迫(简令成和王红, 2009, 科学出版社,



pp.115-139; Jaspers and Kangasjärvi, 2010; Bartels and Phillips, 2010; Jewell et al., 2010)。高温、冷害、干旱和盐碱等非生物胁迫对植物造成伤害的主要表现为: 氧化胁迫、生物膜破坏、渗透胁迫和蛋白质变性(简令成和王红, 2009, 科学出版社, pp.115-139; Jacquot, 2009; Ruelland et al., 2009)。植物通常通过调节形态、生理生化、分子和基因等水平的变化来增强对非生物胁迫的抵抗能力, 而脯氨酸(proline, Pro)作为一种兼容性小分子, 与水有较好的亲和力, 每升水中能溶解 1623 g 脯氨酸, 并且高浓度对细胞无毒性, 对细胞的酸碱平衡无影响(刘学师等, 2002; Xue et al., 2009; Lehmann et al., 2010; Szabados and Saviouré, 2010)。研究表明, 游离的脯氨酸对植物细胞抵抗非生物胁迫中起重要作用, 而且, 其越来越多新的生理功能正在被发现, 近年来关于脯氨酸的调控机制研究倍受科学家的关注(Xue et al., 2009; Lehmann et al., 2010; Szabados and Saviouré, 2009; Verbruggen and Hermans, 2008; Trovato et al., 2008)。

然而, 目前实验指导书中的脯氨酸的测定方法使用期大都在10年以上(刘友良, 1992, 农业出版社, pp.84-89; 邹琦, 1995, 中国农业出版社, pp.96-97; 李合生, 2000, 高等教育出版社, pp.258-260; 张志良, 1990, 高等教育出版社, pp.259-260; 白宝璋和汤学军, 1993, 中国科学技术出版社, pp.156-157; 龚富生和张嘉宝, 1995, 气象出版社, pp.256-259)。职明星和李秀菊(2005)对脯氨酸测定方法的显色时间、酸性茚三酮与脯氨酸反应的关系、酸性茚三酮溶液保存时间与贮藏温度的关系进行研究, 但未对标准曲线和样品取样量进行优化。

本文以水稻叶片为试验材料, 首先对标准曲线(表1; 图1)进行优化比较, 获得0-75  $\mu\text{g/mL}$ 的脯氨酸含量范围的标准曲线,  $y=0.0359x-0.0095$ ,  $R^2=0.9983$ 。其次, 利用未经耐旱处理和耐旱处理30 d的水稻材料, 研究取样量与脯氨酸含量的相关性, 获得0.1 g最适取样量(图2; 图3)。在此基础上, 模拟耐旱试验条件(图4; 图5, 沙土含水量及叶片水势变化), 利用脯氨酸含量的不同范围的标准曲线和最适取样量通过研究干旱胁迫处理下*CBF3*差异水稻材料脯氨酸含量变化(图6), 比较不同标准曲线范围对脯氨酸含量增加比例的影响(图7)。研究结果表明: 干旱胁迫处理下, *CBF3*的存在能显著促进脯氨酸含量的增加并减缓植物水势的下降, 而合适的标

准曲线范围对精确测定脯氨酸含量十分重要。

本研究通过对脯氨酸测定方法中的最适取样量和标准曲线范围进行研究, 并利用不同范围标准曲线, 结合逆境条件下的*CBF3*差异水稻材料的脯氨酸含量变化, 从而证明测定脯氨酸含量需要有最适取样量和合适的标准曲线范围。研究为逆境条件下植物脯氨酸测定提供较好的技术与方法。

## 3 材料与方法

### 3.1 试验材料

方法优化试验的取样材料早籼 15 由安徽省农科院水稻所提供, 含 *CBF3* 的转基因 2 和不含 *CBF3* 的转基因 5 NT (为转基因 2 的野生型)由韩国明知大学生命科学学院提供。

### 3.2 试验方法

#### 3.2.1 脯氨酸测定

脯氨酸测定的方法参照(赵海泉, 2008, 中国农业大学出版社, pp.21-25, 83-84)进行修改, 主要如下: ①提取液 3%磺基水杨酸水溶液: 称取 3.00 g 磺基水杨酸, 溶解, 定容至 100 mL 容量瓶中; ②反应液 2.5%酸性茚三酮显色液: 量取 13.8 mL 磷酸, 加水至 20 mL, 为 6 mol/L 磷酸, 加 30 mL 冰乙酸, 混匀作为溶剂。称取 1.25g 茚三酮, 置于 50 mL 棕色容量瓶中, 加入溶剂, 70 摄氏度水浴溶解 1 h, 完全溶解后, 冷却至室温, 定容, 转移于棕色瓶中保存, 此溶液在 4℃下可存放 20 d。③脯氨酸的提取: 将水稻叶片去除中脉, 剪碎, 精确取 0.1000 g (最适取样量见结果 2.1.2), 置于 10 mL 具塞刻度试管中, 加入 5 mL 3%磺基水杨酸溶液, 盖紧试管塞, 沸水浴 10 min。脯氨酸的测定: 取出冷却至室温, 取 2 mL 上清液于 20 mL 具塞刻度试管, 加入 2 mL 冰醋酸和 3 mL 酸性茚三酮显色液, 沸水浴 1 h。取出冷却后, 加入 5 mL 甲苯充分振荡, 避光静置 30 min, 以纯水调零, 在 520 nm 处测定吸光值。试验设 3 次重复, 误差值均小于 1%。

#### 3.2.2 干旱处理试验条件设计

参照张瑛等(2012b)。试验于 2012 年 4 月至 7 月在安徽省水稻遗传育种重点实验室完成。采用人工盆栽控制水分的方法, 栽苗用底部带孔的圆形钵, 其直径 20 cm, 上部直径 31 cm, 盆深 33 cm, 钵则放在宽 40 cm、长 60 cm、高 30 cm 的长方形塑料盆中, 在每个圆钵底部放上 2 层滤纸, 再装入吸水性较好的经过清洗、烘干处理并先后过直

径 4 cm 和 1.5 cm×20 cm 筛的细沙土 15 kg。试验使用全营养液参照菲律宾国际水稻所配方(程维民等, 2011)。

试验分对照组和处理组, 设 4 个重复, 4 月 1 日滤纸催芽, 待苗长至 0.5 寸左右进行移栽至圆钵中, 平均每 3 天 1 次将全营养液放入长方形塑料盆中, 以确保水稻正常生长。在干旱试验处理开始时, 对照组则改营养液为加去离子水, 使其正常生长。干旱处理组则停止加入营养液和去离子水, 处理时间 15 d, 自 6 月 15 日至 6 月 31 日(必要时, 用喷洒少许去离子水以防止其枯死)。每隔 3 天取 1 次叶片样品测定脯氨酸含量, 共取 5 次, 其中, 每次取样的脯氨酸增加比例(%)=(该次脯氨酸含量-第 1 次脯氨酸含量)×100/第 1 次脯氨酸含量。同时测定其沙土水分含量和叶片的水势。

另外, 用于脯氨酸测定优化的早籼 15 的耐旱方法处理同上, 处理时间为 5 月 15 日至 6 月 15 日。

### 3.2.3 沙土水分含量测定

参照张瑛等(2012b), 上午九点半点取样, 取盆内沙表面以下 5 cm 处样, 共取 5 个散点, 散点均匀分布, 取好的沙置于小烧杯内, 并精确快速称取 10.0 g, 在 80℃烘至恒温称重, 计算相对含水量。计算公式如下:

相对含水量(%)=(湿沙土重量-干沙土重量)\*100/干沙土重量

### 3.2.4 叶片的水势测定

参照赵海泉的测定方法(赵海泉, 2008, 中国农业大学出版社, pp.21-25, 83-84)。

### 作者贡献

张瑛和周俊峰是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 张瑛、周俊峰完成数据分析, 论文初稿的写作; 施伏芝、阮新民、滕斌、吴敬德参与实验设计, 试验结果分析; 张瑛和罗志祥是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由科技部国际合作项目(2010DFA31950)、国家 863 项目(2012AA101103)、973 计划前期研究专项(2011CB111506)和安徽省自然科学基金项目(11040606M97)资助。

### 参考文献

Abrahám E., Hourton-Cabassa C., Erdei L., and Szabados L., 2010, Methods for determination of proline in plants,

Methods Mol. Biol., 639: 317-331

[http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0\\_20](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0_20)

PMid:20387056

Bartels D., and Phillips J., 2010, Drought stress tolerance, In: Kempken F., and Jung C. (eds.), Genetic Modification of Plants, Springer, Berlin Heidelberg, BD, pp.139-157

Cheng W.M., Zhang Y., Wu Y.J., Zhu G.P., Li K.R., Wang Q., Chen S.L., and Cheng T.P., 2011, Studies on Mechanism of Interaction of the Mixed Sowing of Rice and Barnyard grass, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 9(63): 1446-1449 (程维民, 张瑛, 吴跃进, 朱国平, 李克荣, 王群, 陈尚龙, 程太平, 2011, 水稻与稗草混播互作的机制研究, 分子植物育种(online), 9(63): 1446-1449)

Conte M.L., and Carroll K.S., 2009, The Chemistry of Thiol Oxidation and Detection, In: Jacquot J.P.(ed), Oxidative stress and redox regulation in plants, Academic Press, pp.26-41

Jaspers P., and Kangasjärvi J., 2010, Reactive oxygen species in abiotic stress signaling, Physiol. Plant., 138(4): 405-413 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01321.x> PMid:20028478

Jewell M.C., Campbell B.C., and Godwin L.D., 2010, Transgenic plants for abiotic stress resistance, In: Kole C., Michler C.H., Abbott A.G., and Hall T.C. (eds), Transgenic Crop Plants, Springer, Berlin Heidelberg, BD, pp. 67-132

Lehmann S., Funck D., Szabados L., and Rentsch D., 2010, Proline metabolism and transport in plant development, Amino Acids, 39(4): 949-962

<http://dx.doi.org/10.1007/s00726-010-0525-3>

PMid:20204435

Li K.Y., and Zhu H.L., 2011, Research progress of DREB/CBF transcription factor in response to abiotic-Stresses in plants, Linze Kexue (Scientia Silvae Sinicae), 47(1): 124-134 (李科友, 朱海兰, 2011, 植物非生物逆境胁迫 DREB/CBF 转录因子的研究进展, 林业科学, 47(1): 124-134)

Liu X.S., Ren X.L., Miao W.D., and Song J.W., 2002, Free proline and drought resistance of plant, Henan Zhiye Jishu Shifan Xueyuan Xuebao (Journal of Henan Vocation-Technical Teachers College), 30(3): 35-37 (刘学师, 任小林, 苗卫东, 宋建伟, 2002, 游离脯氨酸与植物抗旱性, 河南职业技术学院学报, 30(3): 35-37)



- Oh S.J., Song S.I., Kim Y.S., Jang H.J., Kim S.Y., Kim M., Kim Y.K., Nahm B.H., and Kim J.K., 2005, Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth, *Plant Physiol.*, 138(1): 341-351  
<http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.059147>  
PMid:15834008 PMCID:PMC1104188
- Quan X.Q., Zhang Y.J., Dan L., and Bi Y.P., 2007, The roles of proline in plant growth and the tolerance to abiotic stresses, *Shengwu Jishu Tongxun (Letters in Biotechnology)*, 18(1): 159-162 (全先庆, 张渝洁, 单雷, 毕玉平, 2007, 脯氨酸在植物生长和非生物胁迫耐受中的作用, *生物技术通讯*, 18(1): 159-162)
- Ruelland E., Vaultier M.N., Zachowski A., and Hurry V., 2009, Cold signaling and cold acclimation in plants, In: Kader J.C., and Delseny M.(eds), *Advance Botany Research*, Academic Press, pp.35-150
- Szabados L., and Saviouré A., 2010, Proline: a multifunctional amino acid, *Trends in Plant Sci.*, 15(2): 89-97  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>  
PMid:20036181
- Trovato M., Mattioli R., and Costantino P., 2008, Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development, *Rendiconti Lincei*, 19(4): 325-346  
<http://dx.doi.org/10.1007/s12210-008-0022-8>
- Verbruggen N., and Hermans C., 2008, Proline accumulation in plants: a review, *Amino Acids*, 35(4): 753-759  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>  
PMid:18379856
- Wang X.H., and Zhuang N.S., 2008, The Research Progress of Proline and Plant Cold Resistance, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 24(11): 398-402 (王小华, 庄南生, 2008, 脯氨酸与植物抗寒性的研究进展, *中国农学通报*, 24(11): 398-402)
- Wu S.J., Li G.Q., Li J., Du W.J., Yue A.Q., and Wu Y.S., 2003, Selecting targets and markers in drought-resistant breeding of soybean, *Ganhan Diqu Nongye Yanjiu (Agricultural Research in the Arid Areas)*, 21(1): 139-142 (吴慎杰, 李贵全, 李捷, 杜维俊, 岳爱琴, 武云帅, 2003, 大豆抗旱育种中选择指标和标记的研究现状, *干旱地区农业研究*, 21(1): 139-142)
- Xie H., Yang L., and Li Z.G., 2011, The roles of proline in the formation of plant tolerance to abiotic, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, 2: 23-27,60 (谢虹, 杨兰, 李忠光, 2011, 脯氨酸在植物非生物胁迫耐性形成中的作用, *生物技术通报*, (2): 23-27,60)
- Xue X.N., Liu A.H., and Hua X.J., 2009, Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in *Brassica napus*, *BMB Rep.*, 42(1): 28-34  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>  
PMid:18379856
- Zhang Y., Luo Z.X., Shi F.Z., Ruan X.M., Zhou J.F., Teng B., and Wu J.D., 2012a, Preliminary report on the study of the application of transcription factor *CBF3* to rice breeding, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 28(15): 87-91 (张瑛, 罗志祥, 施伏芝, 阮新民, 周俊峰, 滕斌, 吴敬德, 2012a, 耐旱转录因子*CBF3*水稻育种应用研究初报, *中国农学通报*, 28(15): 87-91)
- Zhang Y., Zhou J.F., Luo Z.X., Shi F.Z., Ruan X.M., Teng B., and Wu J.D., 2012b, *CBF3* transcription factor that may affect some physiological and biochemical indexes in the rice heading stage of under the simulated drought stress, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding)*, 10(36): 1259-1264 (张瑛, 周俊峰, 罗志祥, 施伏芝, 阮新民, 滕斌, 吴敬德, 2012b, 水稻抽穗期模拟干旱胁迫下*CBF3*转录因子可能影响水稻的一些生理生化指标, *分子植物育种(online)*, 10(36): 1259-1264)
- Zhi M.X., and Li X.J., 2005, Improvement on the method for measuring proline content, *Zhiwu Shenglixue Tongxun (Plant Physiology Communication)*, 41(3): 355-357 (职明星, 李秀菊, 2005, 脯氨酸测定方法的改进, *植物生理学通讯*, 41(3): 355-357)