

# 过氧化氢对水稻幼苗中 CAT 和 POD 活性的影响\*

刘大永<sup>1</sup> 王维香<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>西南农业大学农学系 重庆 400716; <sup>2</sup>辽宁师范大学食品生化所 辽宁大连 116029)

**提 要** 用稀 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (低于 10 mg/L) 处理稻苗, 其过氧化氢酶 (CAT) 和氧化物酶 (POD) 活性增加, 10 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后酶活性提高 30%~40%。<sup>3</sup>H-L-亮氨酸掺入蛋白示踪试验显示: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理两酶蛋白放射性强度比 CK 高 26%~59%, 表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能增进酶的合成。用转录抑制剂放线菌素 D (AMD) 处理稻苗时, 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 增进的两酶合成有抑制作用, 使酶活性降至去除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的水平, 说明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的诱导作用可能发生在基因表达的转录过程。10 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 还使稻苗的可溶性蛋白质含量、超氧化物歧化酶活性 (SOD) 提高, 而丙二醛 (MDA) 含量下降, 使叶绿素含量和苗长略有提高。

**关键词** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; CAT; POD; 诱导; 抑制剂

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是需氧生物通过许多酶促反应而产生的正常代谢产物<sup>[1~3]</sup>, 也是过氧化氢酶 (CAT) 和过氧化物酶 (POD) 的底物。前人研究表明, 外加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能提高生物体内 CAT 和 POD 的活性。Groute 等报道<sup>[4]</sup>, 在草履虫无性生长期的培养基中加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 会显著地提高 CAT 的活性。王康等用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理稻种其 CAT 和 POD 活性随 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理浓度的提高和作用时间的延长而增加, 并认为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可能促进了 CAT 和 POD 的合成<sup>[4]</sup>。本文在前人研究的基础上旨在进一步探讨 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对水稻幼苗中 CAT 和 POD 活性的影响以及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 CAT 和 POD 合成的可能机理, 为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在农业上应用的可能性提供生理生化依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及处理方法

供试材料为常规稻 83-225, 按常规方法育苗, 以三叶期稻苗供试验用。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理时, 将三叶期稻苗移入含有 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5, 10, 25, 50 mg/L) 的埃斯彼诺水稻营养液中<sup>[5]</sup>, 进行根灌和喷雾处理。根灌每皿 80 ml, 每 24 h 更换一次新鲜的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 水稻营养。喷雾 10 ml, 早晚各喷一次。照度 3500 Lux, 每天光照 16 h, 25℃ 下恒温培养。从不同的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度对 CAT 和 POD 活性影响的测定中, 选择最佳处理浓度。CAT 和 POD 酶蛋白的合成用 <sup>3</sup>H-L-亮氨酸 (<sup>3</sup>H-L-Leucine) 掺入法; 抑制剂 AMD 浓度 10 mg/L, CHI 浓度 5 mg/L。

### 1.2 测定项目

CAT 的提取及活力测定参照何钟佩 (1992) 的方法<sup>[6]</sup>。POD 的提取及活力测定参照波钦诺克 (1981) 方法<sup>[7]</sup>。可溶性蛋白质含量测定采用 Lowry 法, 以牛血清蛋白为标准<sup>[9]</sup>。叶绿素

收稿日期: 1996-06-12, 收到修改稿日期: 1997-05-13

含量测定参照苏正淑和张宪政的方法<sup>[11]</sup>。丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸比色法<sup>[8]</sup>。超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用 NBT 还原法<sup>[10]</sup>。放射性 CAT 和 POD 的分离提纯及放射性强度测量按照王康和冯有胜的方法<sup>[4]</sup>进行两次聚丙烯酰胺凝胶电泳, 第一次分离胶浓度 7%, 第二次为 10%。用 Beckman LS-9800 液闪谱仪测定<sup>3</sup>H 的放射性强度(CPM)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对水稻幼苗中 CAT 和 POD 的诱导

2.1.1 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的水稻营养液培养三叶期稻苗, 逐日测定地上部分 CAT 和 POD 的活性(表 1) 结果表明 CAT 和 POD 活性随底物 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度的增加和处理时间的延长而提高, CAT 和 POD 活性分别提高 5.2%~40.0% 和 2%~43%, 方差分析表明处理与对照的差异达显著和极显著水平。其中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 ml/L 左右浓度使酶活性提高最快, 超过此浓度, 则有所回落, 但仍高于对照, 这与周群等用极谱氧电极法测定动物组织 CAT 活性时, CAT 活性在一定范围内随 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度增加而升高<sup>[12]</sup>相一致, 即 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可作为激活剂对 CAT 起作用。

表 1 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对稻苗 CAT 和 POD 活性的影响  
Table 1 Effects of different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations on activities of CAT and POD in rice seedling

酶类 Enzymes	处理时间 Treatment time(h)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 浓度 Concentration of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L.)					F
		0	5	10	25	50	
CAT 活性 Activity of CAT (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mg · g <sup>-1</sup> FW · min <sup>-1</sup> )	12	31.3±2.4	38.6±0.1 (22.7%)	44.1±3.7 (40.9%)	34.2±14 (9.3%)	33.9±5.5 (8.3%)	3.11*
	24	38.9±0.7	48.7±1.9 (25.2%)	51.4±0.6 (33.2%)	46.5±2.2 (19.6%)	48.4±1.5 (24.4%)	19.88**
	48	38.1±2.8	52.4±0.3 (37.5%)	52.2±0.3 (34.4%)	46.4±0.6 (21.8%)	42.8±0.6 (12.3%)	59.88**
	72	49.8±4.4	54.9±3.4 (10.2%)	66.8±2.6 (34.1%)	54.6±2.9 (9.6%)	52.5±1.0 (5.4%)	4.34*
	96	57.2±3.8	69.2±3.1 (21.0%)	78.5±3.7 (37.2%)	62.6±3.9 (9.4%)	58.7±3.6 (2.6%)	9.60*
POD 活性 POD activity (μmol · g <sup>-1</sup> FW · min <sup>-1</sup> )	24	575±28	656±29 (14.6%)	821±16 (43.0%)	621±21 (8.0%)	630±16 (10.0%)	7.57*
	36	700±21	814±23 (16.0%)	797±12 (14.0%)	801±21 (14.0%)	788±23 (12.0%)	3.84*
	48	721±27	759±2.5 (5.0%)	860±14 (19.0%)	822±21 (14.0%)	864±8 (20.0%)	5.68*
	60	679±19	776±10	877±14	843±2.4	907±19	4.41*
	84	780±29	793±22 (2.0%)	870±18 (12.0%)	919±24 (18.0%)	940±18 (20.0%)	6.74**

\* 表示显著水平 Significant level; CAT; F<sub>0.05</sub>=3.20, F<sub>0.01</sub>=5.32; POD; F<sub>0.05</sub>=3.48, F<sub>0.01</sub>=5.99.

括号内数字表示提高率 Numbers in parenthesis are the increase rate (%)

2.1.2 10 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对水稻幼苗生理特性的影响 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为一种活性氧, 在生物体内积累过多时, 会对生物体产生毒害作用, 有文献报道 0.5 mmol/L 以上 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 会钝化 SOD 活性<sup>[13]</sup>, 为此, 本文再用 10 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理稻苗, 以验证其对稻苗生长是否安全无害。结果表明(表 2): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理稻苗后, 其株高、叶绿素含量比对照略有提高, SOD 酶活性比对照提高 4%~20%, 达显著水平。作为衡量膜脂受过氧化损伤程度的 MDA 含量, 却随着 SOD 活性提

高而相应的降低 5.98%~14.4%，并且可溶性蛋白质含量比对照也有所提高，说明采用低浓度(10 mg/L 或 10 mg/L 以下浓度)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理稻苗是有益无害的，它能提高水稻的生理代谢活动，这可能在水稻育秧中应用。在本研究的后继试验中，均采用 10 ml/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为处理浓度。

表 2 10 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对稻苗生理特性的影响  
Table 2 Effects of 10 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on physiological properties of rice seedlings

项目 Item	处理 Treatment	处理时间 Treatment time(d)			
		1	2	3	4
苗长 Height of seedling (cm)	CK	9.9±0.8	11.0±0.4	11.4±0.7	12.5±0.5
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	11.1±0.4	11.8±0.6	12.5±0.5	13.0±0.7
	%	12.1	7.3	9.6	4.0
叶绿素含量 Chlorophyll content (mg·g <sup>-1</sup> FW)	CK	1.01±0.15	1.11±0.19	1.18±0.2	0.82±0.1
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.08±0.13	1.16±0.11	1.25±0.09	0.86±0.09
	%	6.93	4.5	5.93	4.88
可溶性蛋白质含量 Soluble protein content(%)	CK	6.44±0.1	6.61±0.21	6.89±0.25	6.62±0.37
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6.62±0.04	7.06±0.2	7.38±0.14	6.91±0.43
	%	3.15	5.28	4.92	5.03
SOD 活性 Activity of SOD (Units·g <sup>-1</sup> FW)	CK	124±8	141±5	130±6	135±11
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	149±10	147±5	149±5	154±8
	%	20	4	15	14
丙二醛含量 MDA content (nmol·g <sup>-1</sup> FW)	CK	5.85±0.16	5.33±18	7.05±0.21	7.2±0.13
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5.50±0.2	4.87±0.14	6.16±0.17	6.8±0.23
	%	-5.98	-8.63	-14.44	-5.73

## 2.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 促进稻苗 CAT 和 POD 生物合成的效应

2.2.1 10 ml/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对水稻体内蛋白质含量的影响及与 CAT 和 POD 活性的关系 用 10 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理三叶期稻苗，测定<sup>3</sup>H-L-亮氨酸掺入酶蛋白的放射性强度，由表 3 结果可以看出无论是根或叶片，经处理分离纯化的 CAT 和 POD 酶蛋白放射强度分别比对照高 34%

表 3 10 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理稻苗对<sup>3</sup>H-L-亮氨酸掺入 CAT 和 POD 的影响  
Table 3 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(10 mg/L) on <sup>3</sup>H-L-Leucine incorporation into CAT and POD in rice seedlings

器官 Organs	总放射性强度(cpm) Total radioactivity							
	CAT				POD			
	CK	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+%	F	CK	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+%	F
叶 Leaf	148±16	198±14	34	8.97**	54.0±27	68.0±24	26	4.79
根 Root	47±19	68.0±15	45	10.62*	111±29	177±25	59	8.13*

F<sub>0.05</sub>=7.71, F<sub>0.01</sub>=21.20

~45%和 26%~59%，说明<sup>3</sup>H-L-亮氨酸掺入酶蛋白的量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理者比对照多，这与表 2 中可溶性蛋白质含量提高 3%~5%的结果相符。由此可见 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可能有诱导两种酶蛋白合成的作用。<sup>3</sup>H-L-亮氨酸掺入蛋白的试验结果与王康和冯有胜的结果相一致<sup>[4]</sup>，但他们所用材料为水稻种子，而且可溶性蛋白质含量与 CAT 和 POD 活性的关系还未见报道。

2.2.2 AMD 和 CHI 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 促进 CAT 和 POD 合成的影响 用不同浓度的转录抑制剂(AMD)和不同浓度的翻译抑制剂(CHI)处理经 10 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 预先作用 48 h 的稻苗。在抑制剂处理 48 h 和 72 h 分别测定 CAT 和 POD 活性发现 10 mg/L AMD 和 5 mg/L CHI 对 CAT 和 POD 酶活性的抑制效果最强，对植株生长无害。超过此二浓度则抑制效果增加不多，并导

表 4 不同浓度 AMD、CHI 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 ml/L) 处理的稻苗中 CAT 和 POD 活性的影响  
Table 4 Effects of different concentrations of AMD and CHI on activities of CAT and POD in rice seedling treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mg/L)

酶类 Enzymes	处理时间 Treatment time (h)	AMD 浓度 AMD concentration (mg/L)			CHI 浓度 CHI concentration (mg/L)						
		CK (10 mg H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /L)	1.0	5.0	10.0	20.0	CK (10 mg H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /L)	1.0	5.0	10.0	20.0
CAT 活性											
CAT activity	48	70.8±1.4	69.2±1.4	66.5±1.4	63.8±1.0	63.5±0.9	59.8±1.1	55.0±2.2	41.7±1.8	37.5±1.6	35.5±1.4
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mg · g <sup>-1</sup> FW · min <sup>-1</sup>	72	80.7±1.0	73.7±1.6	68.7±2.1	63.4±0.7	61.4±1.4	69.6±0.9	57.5±0.1	41.0±1.8	35.3±2.6	32.1±2.8
POD 活性											
POD activity	48	879±21	859±24	841±16	836±14	829±17	932±12	829±17	793±11	769±6	636±18
(μmol · g <sup>-1</sup> FW · min <sup>-1</sup> )	72	1028±23	992±18	929±21	887±16	865±19	997±15	751±14	634±13	632±7	583±15

表 5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、AMD 和 CHI 对 CAT 和 POD 合成的影响  
Table 5 Effects H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AMD and CHI on synthesis of CAT and POD

处理 Treatment	CAT activity (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mg · g <sup>-1</sup> FW · min <sup>-1</sup> )				POD activity (μmol · g <sup>-1</sup> FW · min <sup>-1</sup> )									
	时间 Time(h)	24	48	60	72	96	120	0	24	48	60	72	96	120
10 mg/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	40.0±0.9	51.5±1.1	59.4±1.1	59.4±1.1	64.2±2.0	69.8±1.3	79.5±1.8	711±9	775±15	818±10	848±17	910±18	916±7	957±16
(check)														
10 mg/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	40.0±0.9	51.5±1.3	57.4±1.1	58.8±1.1	62.1±1.6	62.7±1.4	62.2±0.8	711±9	775±16	818±10	844±13	869±14	866±10	892±14
+10 mg/L AMD														
10 mg/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	40.0±0.9	51.5±1.3	57.4±1.1	55.4±1.2	53.0±2.1	51.5±1.6	50.9±0.1	711±9	775±16	818±10	763±10	679±15	634±13	623±18
+5 mg/L CHI														
-10 mg/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	40.0±0.9	51.5±1.3	57.4±1.1	58.8±1.2	59.1±1.1	60.8±1.3	61.1±0.3	711±9	775±16	818±10	843±15	847±17	867±10	816±18

括弧内数字为降低百分比, Numbers in parenthesis are the declined percentage

致叶片萎蔫。为防止抑制对稻苗的伤害,采用 10 ml/L AMD 和 5 mg/L CHI 为最适有效处理浓度(表 4)。

进一步将预先以 10 mg/L  $H_2O_2$  处理 48 h 的稻苗,分别再作 +10 mg/L  $H_2O_2$ 、10 mg/L  $H_2O_2$ +10 mg/L AMD、10 mg/L  $H_2O_2$ +5 mg/L CHI 和 -10 mg/L  $H_2O_2$  处理,25℃培养,于不同时间测定 CAT 和 POD 活性,比较处理的结果显示: +AMD 处理使 CAT 和 POD 的活性下降,其下降趋势与 - $H_2O_2$  者相近。 $H_2O_2$ +AMD 和 - $H_2O_2$  处理与单加  $H_2O_2$  处理相比,CAT 活性降低分别为 1.0%~21%和 1%~23.1%;POD 活性下降分别为 0%~12%和 0%~10%。 $H_2O_2$ +CHI 处理有类似现象。两者的差异在于: +AMD 与 - $H_2O_2$  处理的两酶活性大小变化的时间进程基本重合,而  $H_2O_2$ +CHI 与 - $H_2O_2$  处理则不相重合,是 - $H_2O_2$  酶活性 >  $H_2O_2$ +CHI(表 5),说明  $H_2O_2$  处理对 CAT 和 POD 活性大小的影响不仅有浓度效应,还可能在转录和翻译水平上调节两酶的合成。

### 参 考 文 献

- 1 吴相钰、汤佩松,1958,植物学报,7(3),135~147
- 2 梁之彦,1983.生理化学,上海科学出版社,上海,653~664
- 3 方允中、李中杰,1989,自由基与酶,科学出版社,北京,61~62,154~155
- 4 王康、冯有胜,1988,西南农业大学学报,10(1),101~103
- 5 龙崇魁,1987,水耕栽培法,园艺世界出版社,北京,23~68
- 6 何钟佩,1992,农作物化学控制实验指导,北京农业大学出版社,北京,27~29
- 7 X. H. 波钦诺克著,荆家海,丁钟荣译,1981,植物生物化学分析方法,科学出版社,北京,198~201
- 8 林植芳,1989,植物学报,31(11),860~866
- 9 西北农业大学主编,1985,基础生物化学实验指导,陕西科学技术出版社,西安,64~66
- 10 王爱国、罗广华、邵从本等,1983,植物生理学报,9(1),77~87
- 11 苏正淑、张宪政,1989,植物生理通讯,(5),77~78
- 12 周群、毛良,1988,生物化学及生物物理进展,15(1),42~44
- 13 钱永常、余淑文,1991,植物生理通讯,27(5),326~332
- 14 Groute, F., S. Vidal, D. Dupouy et al., 1985, Chemical Abstracts, 102, 163454q

## Effect of $H_2O_2$ on Activities of Catalase and Peroxidase in Rice Seedlings

Liu Dayong<sup>1</sup> Wang Weixiong<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Department of Agronomy, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716; <sup>2</sup> Research Institute of Food Biochemistry, Liao Ning Normal University, Dalian 116029)

**Abstract** The activities of Catalase and Peroxidase in the rice seedlings were enhanced by the treatment of lower concentration  $H_2O_2$  (less than 10 mg/L). At the concentration of 10 mg/L  $H_2O_2$ , the enzymatic activities increased by about 30%~40%. Tracing experiment with  $^3H$ -L-Leucine showed that the radioactivities of the two enzymes in  $H_2O_2$  treated seedlings exceeded that in the control by 26%~59%. It indicated that  $H_2O_2$  could enhance the biosynthesis of those two enzymes. When the rice seedlings were treated with  $H_2O_2$  and the specific transcription inhibitor (Actinomycin D), the biosynthesis of two enzymes were inhibited and their activity levels became close to that of the  $H_2O_2$  removal. It suggested that the mechanism of the biosynthesis promoted by  $H_2O_2$  occurred probably in the transcription process of gene expression. 10 mg/L  $H_2O_2$  can also increase the content of soluble protein and the activity of superoxide dismutase (SOD) in rice seedlings, but decrease the content of malondialdehyde (MDA). The content of chlorophyll and the height of seedlings were affected by  $H_2O_2$  slightly.

**Key words**  $H_2O_2$ ; Catalase; Peroxidase; Induce; Inhibitor