

## 激动素促进受冷害稻苗 SOD 生物合成机理的探讨\*

吴珍龄 胡国权\*\* 王康

(西南农业大学农学系, 重庆, 400716)

**提 要** 实验表明: 外施  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的激动素(Kinetin, KT)可以提高受冷害(4℃, 36 h)稻苗体内 SOD 的活性, 而不能提高未受冷害的正常稻苗及无细胞提取液的 SOD 活性。为了研究 KT 促进冷害稻苗 SOD 从头合成机理, 本试验采用了转录抑制剂 AMD( $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )和翻译抑制剂 CHI( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )处理受冷害稻苗。试验表明, 激动素主要是在转录水平上促进 SOD 的从头合成。

**关键词** 水稻幼苗; 激动素; SOD

## Studies on Mechanism of Kinetin Promoted SOD Biosynthesis of Rice Seedlings after Chilling Injury

WU Zhen-Ling HU Guo-Quan WANG Kang

(Department of Agronomy, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716)

**Abstract** Experiments showed that exogenous KT ( $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) can increase SOD activity of rice seedlings after chilling injury, but the SOD activity of normal rice seedlings and its cell free extract did not increased with KT treatment.

For study on mechanism of de novo SOD biosynthesis of seedling after chilling injury with KT treatment, transcription inhibitor actinomycin D (AMD,  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) was used. The experiments showed that KT promoted SOD de novo biosynthesis mainly on the transcriptional level.

**Key words** Rice seedlings; Kinetin(KT); SOD

在植物抗冷作用的研究中, 谭德勇等<sup>[1]</sup>观察到, 受冷害的水稻幼苗在冷后效应中, 其 SOD 活性下降, 在移到常温后继续培养时, 其 SOD 活性不因气温的回升而提高。同位素示踪表明, 其主要原因是低温导致 SOD 生物合成受阻。谭德勇<sup>[1]</sup>、汤学军等<sup>[2]</sup>用激动素(KT)处理受冷害稻苗, 起到了提高其 SOD 活性, 保护稻苗细胞膜的作用, 从而增强抗冷害的能力。同位素示踪表明, 其主要原因是 KT 促进了 SOD 的生物合成。本研究旨在进一步探明 KT 促进冷害稻苗 SOD 合成的作用机理。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

水稻(*Oryza sativa*)83-255 品种种子, 经常规选种、浸种、催芽后, 于 Hoagland 水稻完全培养液中培养至一叶一心, 用于各项实验。

\* 国家自然科学基金资助项目(批准号 39670441)及农业部“九五”基础理论研究课题(农 95-17-01-02)的一部分

\*\* 现在工作单位: 四川省成都沼气研究所 邮编: 610041

收稿日期: 1998-12-29

## 1.2 试剂

激动素(KT)、玉米素(Z)、放线菌素 D(AMD)、氮蓝四唑(NBT)均为上海化学试剂厂产品, AR 纯; 环己亚胺(CHI)为美国 Sigma 公司产品。

## 1.3 试验方法

受冷害后的水稻幼苗用 KT 处理以促进 SOD 合成的同时, 加入专一的转录抑制剂——放线菌素 D, 以判明 KT 是在转录水平, 还是在翻译水平上促进 SOD 基因的表达。

## 1.4 测定方法

激动素和玉米素含量的测定, 参考刘贤明<sup>[3]</sup>和谈锋<sup>[4]</sup>的高效液相色谱(HPLC)法, 用 67% 丙酮代替 80% 甲醇制备样品。

丙二醛(MDA)含量按 Heath<sup>[5]</sup>和王爱国<sup>[6]</sup>等的硫代巴比妥酸法。

电解质渗漏率(R/R')按刘鸿先等的方法<sup>[7]</sup>。

SOD 活性的测定, 按 Giannoplitis 和 Ries 的氮蓝四唑(NBT)光还原法<sup>[8]</sup>, 以 SOD 抑制氮蓝四唑光还原 50% 为一个酶活力单位。

## 2 结果与分析

### 2.1 激动素对水稻幼苗 SOD 活性的影响

2.1.1 KT 对正常稻苗和无细胞提取液 SOD 活性的影响 用 0~15 mg · L<sup>-1</sup> 的 KT 处理已培养 7 天(一叶一心)的稻苗, 3 天(72 h)以后, 测定其 SOD 活性, 或用上述浓度处理正常稻苗(25℃)的无细胞提取液, 5 h 后测定其 SOD 活性。结果发现, 它们的 SOD 活性均不受 KT 浓度变化的影响, 见表 1。

表 1 KT 对正常稻苗和无细胞提取液 SOD 活性的影响

Table 1 Effects of KT on the SOD activity of normal rice seedling and its cell free extract

KT 浓度(mg · L <sup>-1</sup> )		0	0.5	1.0	2.0	5.0	10	15
SOD activity (U · g <sup>-1</sup> FW · 15 <sup>-1</sup> min)	Normal	150±2	151±1	153±2	150±1	151±1	150±2	150±3
	Cell free exaract	92±2	93±2	93±1	94±3	92±1	92±2	93±1

2.1.2 KT 对受冷害稻苗 SOD 活性的影响 当用不同浓度(0~4 mg · L<sup>-1</sup>)的 KT 处理受冷害(4℃, 36 h)的稻苗后, 再移入常温(25℃)培养 3 天, 逐日测定其 SOD 活性, 发现在各处理浓度下生长的稻苗, 其 SOD 活性均随 KT 浓度的提高和处理时间的延长显著增加, 其中以 4.0 mg · L<sup>-1</sup>、3.0 mg · L<sup>-1</sup> 和 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 的 KT 处理增加更明显, 且这几个处理间差异不大。1.0 mg · L<sup>-1</sup> 的 KT 处理增加不明显, 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 处理已出现下降趋势, 见图 1。故本研究选取 2 mg · L<sup>-1</sup>KT 为适宜的处理浓度。

2.1.3 KT 处理后, 受冷害稻苗的 SOD 活性与 MDA、R/R' 的关系 图 2 表明, 受冷稻苗的 SOD 活性始终低于正常稻苗, 在遭受冷害的 24 h 内, 略有升高, 第二、三天便迅速下降。当受冷害的稻苗经 2 mg · L<sup>-1</sup> 的 KT 处理后, 其 SOD 活性逐日增高, 到第三天几乎接近正常。图 3 显示, 在冷害苗中, 其电解质渗漏率(R/R')以及丙二醛(MDA)含量均高于正常稻苗, 且与图 2 中的 SOD 活性呈显著负相关( $r = -0.9954$ ), 图 3 中的 MDA 与 R/R' 呈显著正相关( $r = 0.9983$ )。当用 2 mg · L<sup>-1</sup>KT 处理受冷稻苗后, 其 MDA 含量及 R/R' 均逐日下降, 到第三天便接近正常。可见, KT 能促进 SOD 活性升高, 减轻膜脂过氧化程度, 从而保护细

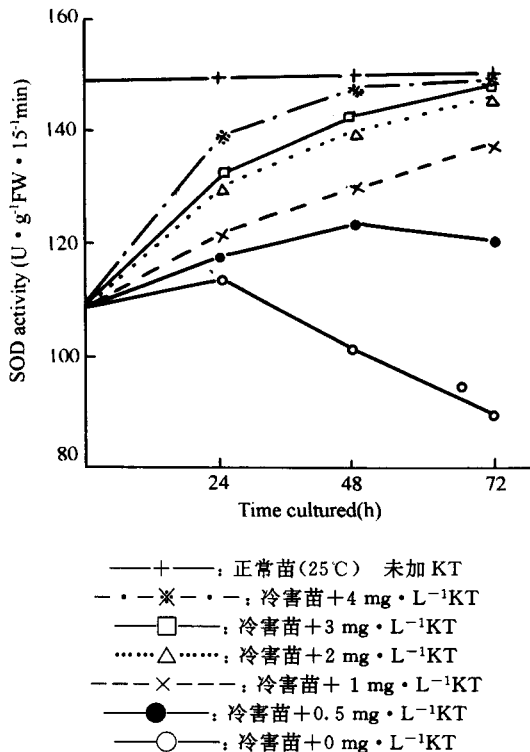


图1 KT浓度对受冷稻苗SOD活性的影响  
Fig. 1 Effects of concentration of KT on SOD activity of rice seedlings after chilling injury

胞膜的完整性,以发挥其正常的功能。

## 2.2 KT对水稻幼苗胞内激动素和玉米素含量的影响

稻苗经以下4种处理:(1) 25℃下正常生长10天的稻苗;(2) 正常生长7天后,经 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT处理后,于25℃下培养3天;(3) 正常生长7天的稻苗,经冷害处理(4℃, 36 h)后,于25℃下培养3天;(4) 7天稻苗,冷害处理后,用 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT处理,在25℃下培养3天。分别用高效液相色谱(HPLC)分析测定4种处理稻苗的激动素和玉米素含量。结果(表2)表明,冷害后稻苗

表2 外源KT对稻苗胞内激动素和玉米素含量的影响  
Table 2 Effects of exogenous KT on contents of KT and Zeatin in seedlings cell

处理 Treatment	激动素含量 ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ ) Contents of KT	玉米素含量 ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ ) Contents of Zeatin
(1) Normal	$0.04 \pm 0.00$	$0.16 \pm 0.01$
(2) Normal+KT	$1.11 \pm 0.00$	$0.21 \pm 0.00$
(3) Chilling injury	$0.03 \pm 0.00$	$0.42 \pm 0.04$
(4) Chilling injury+KT	$0.96 \pm 0.03$	$0.84 \pm 0.03$

体内激动素含量略低于正常稻苗,而玉米素含量略高于正常稻苗;用KT处理稻苗后,均能提高正常和冷害稻苗的激动素和玉米素含量,特别是使冷害稻苗的激动素从 $0.03\text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ 提高到 $0.96\text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ ,为冷害稻苗的32倍。

## 2.3 转录抑制剂(AMD)和翻译抑制剂(CHI)对SOD活性的影响

2.3.1 AMD和CHI有效浓度的选取 将已遭冷害的稻苗移到常温(25℃)用含 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的KT的Hoagland完全培养液培养,24 h后加入不同浓度的AMD或CHI逐日测定SOD活性,其结果如图4、图5所示。本试验选择 $3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的AMD和 $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的CHI为有效处理浓度。

2.3.2 AMD、CHI对KT促进SOD合成的影响 将遭受冷害(4℃, 36 h)后的稻苗移到常温(25℃)下,用含KT( $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的完全培养液培养24 h后,分别加转录抑制剂AMD(即KT+AMD)、翻译抑制剂CHI(即KT+CHI)或改用不含KT及抑制剂的培养液(对照),测定其SOD活性,其结果如图6所示。

图6表明:(A)冷害后的稻苗一直在含KT的完全培养液中培养72 h,其体内SOD活性达149个酶单位,显著高于其他处理。(B)若受冷害稻苗在含KT的培养液中培养24 h后,改用既含KT又含AMD的完全培养液中培养,到第3天(累计72 h)其SOD活性降至135个酶单位,AMD抑制的酶量为14个酶单位,或者说这是KT促进转录而增加的酶量。(C)若受冷害稻苗在含KT的培养液中培养24 h后,改用既不含KT,又不含抑制剂(AMD或CHI)的培养液中培养,到第3天(累计72 h)其SOD活性为128个酶单位,即KT+AMD的处理比无

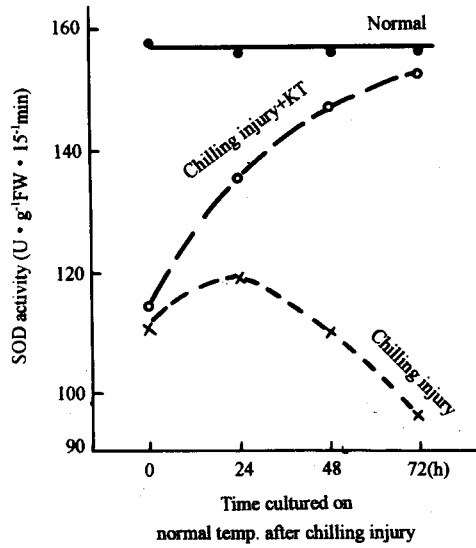


图 2  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  对受冷稻苗 SOD 活性的影响  
Fig. 2 Effects of  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  on SOD activity in rice seedlings after chilling injury  
—○—冷害+KT    ----×----冷害

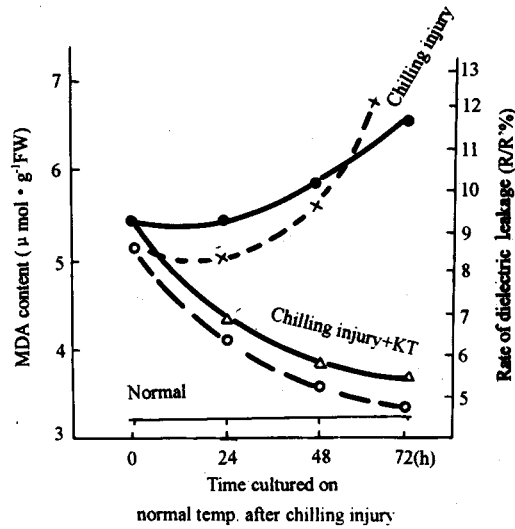


图 3  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT 对受冷稻苗 MDA 含量及 R/R' 的影响  
Fig. 3 Effects of  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  on MDA contents and the rates of membrane leakage in rice seedlings after chilling injury  
—·— R/R' (冷害)    --×-- MDA (冷害)  
—△— R/R' (冷害+KT)    —○— MDA (冷害+KT)

KT 和抑制剂的处理多 7 个酶单位，这或许是因为转录虽然被抑制了，但还可能通过翻译使 SOD 酶量少量增加；或许是抑制剂浓度不够，尚未完全抑制转录。(D) 受冷害稻苗在 KT 的培养液中培养 24 h 后，改用含 KT 和 CHI 的培养液中培养，到第 3 天，其 SOD 酶活性仅为 124 个单位，低于不含 KT 和抑制剂的对照，说明 CHI 在 KT 存在的情况下，还是抑制了 SOD 的翻译。

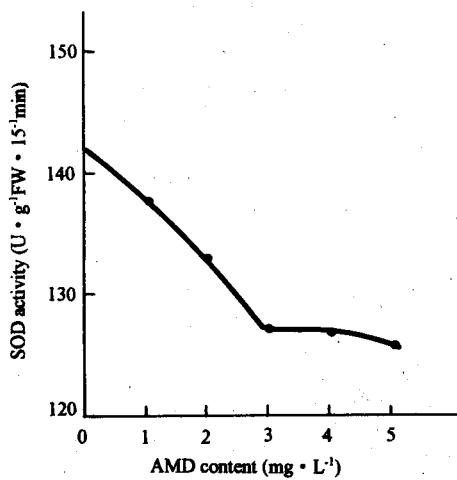


图 4 AMD 处理 72 h 后稻苗 SOD 活性  
Fig. 4 SOD activity of rice seedlings with treated AMD for 72 h

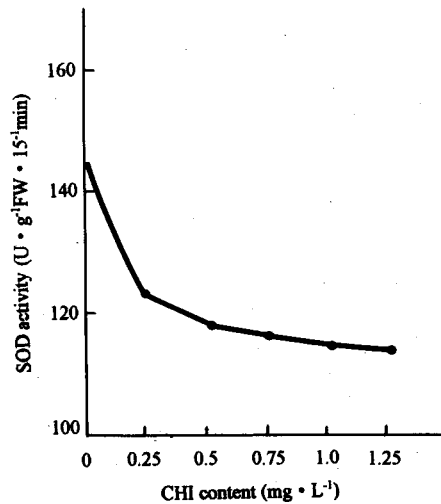


图 5 CHI 处理 72 h 后稻苗的 SOD 活性  
Fig. 5 SOD activity of rice seedlings with treated CHI for 72 h

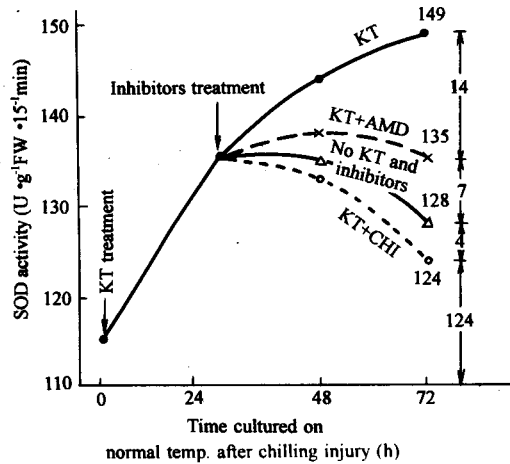


图6 抑制剂对KT促进冷害稻苗SOD合成的影响  
Fig. 6 Effects of inhibitors on KT promoted SOD biosynthesis of rice seedlings after chilling injury

抑制剂,只作用于真核细胞80S核糖体,抑制蛋白质合成体系中移位酶的反应。

试验表明,KT促进冷害稻苗SOD从头合成包括两个方面,其一是KT促进了mRNA的合成,其二是KT促进了mRNA翻译成SOD的过程,前者为主要的。

那么KT是如何作用的呢?因为基因的表达是受小分子代谢物所控制的<sup>[9]</sup>。植物激素正是一种小分子代谢物,它对酶合成的调节,可能也是通过与细胞内的某种阻遏蛋白结合,如同乳糖在启动乳糖操纵子转录中的作用一样。KT的具体作用尚待进一步的研究。当加入AMD后,破坏了DNA的模板作用,因而不能表达。从所测得的胞内KT含量看,冷害后外加KT,胞内KT含量从 $0.03 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ 增至 $0.96 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ ,说明外源KT确实进入了胞内,促进了SOD基因的表达。从测得的玉米素含量看,低温下玉米素含量较正常稻苗高,外加KT后,玉米素含量从 $0.42 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ 增至 $0.84 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$ ,这或许是KT进入(扩散或被吸收)冷害稻苗后,向玉米素转化的结果。

在正常生长的稻苗及其无细胞提取液的SOD转录和翻译系统中,由于产生SOD的基因在适宜条件下已得到充分的表达,故即使加入KT,也不能增加其SOD活性。

## 参 考 文 献

- 1 谭德勇,王康.西南农业大学学报,1988,10(1):87~91
- 2 汤学军,王康.植物学报,1993,35(增刊):45~49
- 3 刘贤明.色谱,1990,8(5):340
- 4 谈锋.植物生理学通讯,1986,(5):15~23
- 5 Heath R L and L Packer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1965, 19: 716~720
- 6 王爱国.植物生理学通讯,1986,(2):55~57
- 7 刘鸿先,曾绍先等.植物生理学报,1985,11:48~57
- 8 Grannopolitiss C N and S K Ries. *Plant Physiol.*, 1977, 59: 315~318
- 9 张德颐.植物生理学通讯,1983,(5):11~20

由此可见,一方面AMD削弱了SOD基因的转录,从而降低了KT促进SOD的生物合成的能力,另一方面,可能在AMD抑制了转录的情况下,KT仍能通过翻译来增加冷害稻苗SOD的生物合成。所以,KT主要是在DNA转录水平上促进SOD的生物合成,对SOD酶蛋白的翻译过程也有一定的作用。

## 3 讨论

本试验在研究KT促进冷害稻苗SOD从头合成机理时,使用了转录抑制剂——放线菌素D(Actinomycin D, AMD)和翻译抑制剂——环己亚胺(Cycloheximide, CHI)。AMD是转录的专一性抑制剂,它能嵌入DNA的模板,破坏其模板作用。CHI是一种强的蛋白质合成