

萘乙酸对小麦幼苗乙醇酸氧化酶和过氧化氢酶活性的影响

黄卓烈 李明启

(华南农业大学生物技术学院,广州,510642)

摘要 用 NAA 喷施小麦幼苗时,体内的蛋白质含量升高,乙醇酸氧化酶(GO)和过氧化氢酶(Cat)活性受到明显的抑制。NAA 浓度与酶活性之间呈负相关,对 GO 的相关系数是 -0.9875 ,直线回归方程是: $Y = 0.1359583 - 0.0000299X$;对 Cat 相关系数是 -0.9811 ,直线回归方程是: $Y = 10.1793 - 0.0026X$ 。用 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NAA 处理幼苗 30 h 后,GO 活性下降 22.46%,Cat 活性下降 21.64%,蛋白质含量升高 7.90%。用 NAA 处理离体的 GO 和 Cat,GO 活性受到抑制,而对 Cat 活性无影响。用乙醛酸处理离体的 Cat,酶活性受到明显抑制。

关键词 小麦;萘乙酸;乙醇酸氧化酶;过氧化氢酶

中图分类号 Q 945; Q 946

自从人们发现了萘乙酸(NAA)具有生长素的活性以来,已经用人工方法合成了大量的 NAA 应用于农业生产。已经知道,NAA 具有多种生理功能,其中之一是对高等植物的光合作用有明显的影响。有人曾用 NAA 处理风信子 *Hyacinthus orientalis* L.,其体内光合色素含量下降。用 NAA 喷施三叶橙和酸橙,发现降低了叶绿素 a 和 b 的含量。用 NAA 处理麦仙翁 *Agrostemma githago*,其后熟胚的双子叶的生长和叶绿素的累积均受到抑制。用 NAA 处理 *Citrus jambhiri*,体内的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性下降 45% ~ 60%。可见,生产上使用 NAA 对光合作用有一定的负作用。

光呼吸作用是与光合作用伴随发生的代谢过程,其代谢有两个重要的酶即乙醇酸氧化酶(GO)和过氧化氢酶(Cat)。这两种酶的活力高低在一定程度上反映了光呼吸代谢的强弱。在农业生产上,使用 NAA 的浓度差异很大,有些很高,有些较低。而使用 NAA 后对此两酶乃至对光呼吸是否有某些影响和调节,这个问题在国内外还未有人研究过。本试验着重从体内与体外两方面研究高浓度的 NAA 对该两酶活性的作用,以了解 NAA 对光呼吸的影响,为生产上使用 NAA 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验用小麦 *Triticum aestivum* 为研究材料。将种子浸泡半天后,用先经酸洗后经多次水洗至中性的干净沙来培育幼苗,盆栽。幼苗 1 片叶后,每隔 3 d 加入定量的营养溶液。营养液大量元素参考 Chevalier 等(1977)的配方,微量元素参考 Schrader 等(1967)的配方。当小麦长至 3 片叶时,用各种浓度的 NAA 溶液喷施幼苗,NAA 溶液中含有 0.1% 的

tween 20,以增强药液对叶片的附着力.以喷至叶正反面全湿为度.对照则用蒸馏水喷至叶的正反面全湿.喷后在规定时间内取样.将收集的叶片用蒸馏水洗2~3次后吸干,剪碎,从其中称取定量的样叶测定各项指标.试验重复次数见各表注.

1.2 测定方法

蛋白质含量用 Bradford(1977)的方法进行,用牛血清蛋白作标准. GO 的提取用 Passera 等 (1978)的方法,活性测定用 Mukherjee 等 (1981)的方法,酶活性用“每克蛋白质在每分钟内催化乙醛酸的生成量” $[g(g\ min)^{-1}]$ 表示. Cat 的提取用 Powles 等 (1987)的方法,活性测定用 Biswas 等 (1978)的方法, Cat 活性用每克蛋白质在每分钟内催化 H_2O_2 分解的克数 $[g(g\ min)^{-1}]$ 表示.

2 结果与分析

2.1 各浓度的 NAA对小麦 GO活性的影响

用不同浓度的 NAA 喷施 3 叶期的小麦幼苗,喷后 15 h 取样测定 GO 活性.结果(表 1)表明,使用外源 NAA 可使叶片的 GO 活性下降.在所用浓度范围内,NAA 浓度越高,GO 活性下降得越多.浓度升至 $900\ mg\ L^{-1}$ 时,酶活性下降了 19.83%.为了验证不同浓度的 NAA 对 GO 活性的实际影响,将结果进行相关分析和直线回归分析.相关分析结果(表 2)表明,相关系数为 -0.9875 ,说明了 GO 活性与 NAA 浓度呈负相关.经测验,相关系数达极显著水平.又因为决定系数是 0.9751,说明 GO 活性变化有 97.51% 的可能性是由 NAA 浓度的改变而造成的,其余原因引起 GO 活性改变的可能性只占 2.49%.此外,回归分析结果显示,GO 活性与 NAA 浓度间的回归直线方程为 $Y = 0.1359583 - 0.0000299X$.经方差分析,直线代表的相互关系达到极显著水平.

表 1 不同浓度的 NAA 对小麦幼苗乙醇酸氧化酶和过氧化氢酶活性的影响¹⁾

测定项目	NAA 浓度 $[g(g\ min)^{-1}]$					
	0	100	300	500	700	900
GO 活性 $[g(g\ min)^{-1}]$	0.136	0.131	0.130	0.121	0.114	0.109
比对照下降 $[(\%)]$		3.68	4.41	11.03	16.18	19.85
Cat 活性 $[g(g\ min)^{-1}]$	10.31	9.77	9.53	8.76	8.10	8.01
比对照下降 $[(\%)]$		5.24	7.57	15.03	21.44	22.31

1) 每次取样 3 g,试验重复 6 次

表 2 NAA 浓度对乙醇酸氧化酶和过氧化氢酶活性影响

酶	相关系数	决定系数	S_r	$ t $	$t_{0.05}$	$t_{0.01}$
GO	-0.9875	0.9751	0.0790	12.507 *	2.776	4.604
Cat	-0.9811	0.9626	0.0967	10.143 *	2.776	4.604

2.2 各浓度 NAA对小麦 Cat活性的影响

用不同浓度的 NAA 喷施小麦幼苗后 15 h,体内的 Cat 活性也明显地受到 NAA 的抑制,而且抑制程度比 GO 的大(表 1).在所用的 NAA 浓度范围内,随着浓度增大,酶活性下降的程度越大. NAA 浓度为 $700\ mg\ L^{-1}$ 时,酶活性只有对照的 78.56%.相关分析结果(表 2)显示,相关系数为 -0.9811 ,说明 Cat 活性与 NAA 的浓度成负相关,显著性测验显示其相关关系极显著;决定系数 0.9626 说明 Cat 活性的变化在 96.26% 的程度上是 NAA 浓度改

变所引起的。回归分析显示, Cat 活性与 NAA 浓度之间亦为直线关系, 方程是 $Y=10.1793-0.0026X$ 。方差分析结果证明, 直线方程极显著。

2.3 NAA处理后不同时间 GO和 Cat活性的变化

图 1 和图 2 分别示出了用 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NAA 处理后体内 GO 和 Cat 活性的变化情况。数据表明, GO 活性随着 NAA 处理时间延长而缓慢下降。24 h 后 GO 活性下降了 17.39%, 30 h 后下降了 22.46%。同样 Cat 活性也有相似的下降趋势。24 h 后酶活性下降了 20.77%, 30 h 后下降了 21.64%。

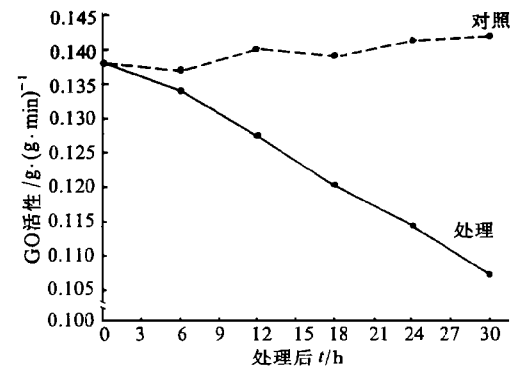


图1 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NAA 处理后 GO 活性的变化*

* 每次取样 3.0 g, 重复 6 次

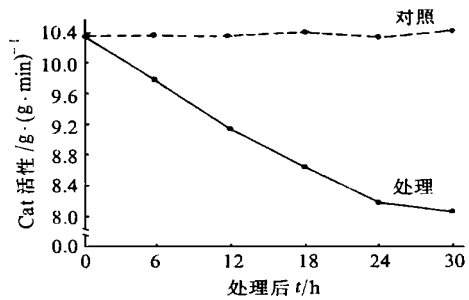


图2 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NAA 处理后 Cat 活性的变化*

* 每次取样 3.0 g, 重复 6 次

2.4 NAA处理对小麦蛋白质含量的影响

当分别用各种浓度的 NAA 喷施 3 叶期的小麦幼苗时, 15 h 后叶片内蛋白质含量有上升的趋势。在浓度为 $100\sim 700\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内, 随着所用浓度升高, 蛋白质含量增加, 但增幅不算很大。浓度为 $700\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 蛋白质含量增加 8.40% (表 3)。另外, 用 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NAA 喷施小麦幼苗后, 随着时间的延长, 体内蛋白质含量缓慢升高 (表 4)。处理 30 h 后, 蛋白质含量比对照升高 7.90%。试验结果证明, NAA 作为一种生长素类的植物生长调节剂, 在体内可促进蛋白质合成, 从而增加蛋白质含量。

表 3 各浓度的 NAA 对小麦叶片蛋白质含量的影响¹⁾

项 目	NAA 浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$					
	0	100	300	500	700	900
蛋白质含量 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	2.823	2.841	2.860	2.990	3.060	2.910
相对百分率 / (%)	100	100.64	101.17	105.92	108.40	103.29

1) 每次取样 3.0 g, 8 次重复

2.5 NAA对离体 GO和 Cat活性的影响

为了探讨 NAA 对 GO 和 Cat 活性的影响是直接的还是间接的, 本试验用不同浓度的 NAA 处理提取出来的离体 GO 和 Cat 的酶促反应系统。结果 (表 5) 表明, NAA 对离体的 Cat 无影响。说明 NAA 对体内 Cat 活性的影响不是直接的, 而是通过体内代谢系统起间接作用。然而, NAA 对离体的 GO 活性则有抑制作用。当 NAA 的浓度为 $15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 抑制了酶活性的 18.98% (表 5)。此结果说明, NAA 对小麦幼苗体内 GO 活性的影响很可能是直接

的。

表 4 用 500 mg L⁻¹的 NAA处理后不同时间幼苗体内蛋白质含量的变化¹⁾

项 目	处理后时间 /h					
	0	6	12	18	24	30
处理幼苗蛋白质含量 /mg g ⁻¹	2. 82	2. 84	2. 91	3. 06	3. 11	3. 14
对照幼苗蛋白质含量 /mg g ⁻¹	2. 82	2. 87	2. 87	2. 88	2. 90	2. 91
处理比对照升高 /(%)	0	- 1. 05	1. 39	6. 25	7. 24	7. 90

1)每次取样 3. 0 g, 8次重复

表 5 NAA对离体乙醇酸氧化酶和过氧化氢酶活性的影响¹⁾

项 目	NAA浓度 /mg L ⁻¹			
	0	5	10	15
Cat 活性 /g(g·min) ⁻¹	10. 31	10. 38	10. 38	10. 26
GO 活性 /g(g·min) ⁻¹	0. 137	0. 132	0. 122	0. 111
GO 活性比对照下降 /(%)		3. 65	10. 95	18. 98

1) 7次重复

2. 6 乙醛酸对离体 Cat活性的影响

在体内, GO催化乙醇酸转变为乙醛酸和 H₂O₂, 乙醛酸形成后是否对 Cat活性有影响? 本试验用各种浓度的乙醛酸处理离体的 Cat反应系统, 结果(表 6)表明, 乙醛酸对 Cat活性有明显的抑制。随着乙醛酸浓度升高, 酶活性的抑制程度也迅速增大。到乙醛酸浓度为 15 mg L⁻¹时, Cat活性被抑制了 80. 97%。这也说明在植物体内, 乙醛酸可直接抑制 Cat活性。

表 6 乙醛酸对离体过氧化氢酶活性的影响¹⁾

项 目	乙醛酸浓度 /mg L ⁻¹					
	0	2. 5	5	10	15	250
Cat活性 /g(g·min) ⁻¹	10. 14	8. 94	5. 69	2. 41	1. 93	1. 68
比对照下降 /(%)		11. 83	43. 89	76. 23	80. 97	83. 43

1) 7次重复

3 讨论

以 NAA处理植物时, NAA首先与细胞膜上的生长素结合蛋白可逆地结合(Loebler et al, 1985), 然后通过载体运输到所需要的部位去与受体结合(Libbenga et al, 1982)。据研究, NAA可促进 DNA复制, 促进基因表达, 促进 mRNA的合成(Walker et al, 1985)和 rRNA的合成(Grover et al, 1987)。与此同时, NAA还能促进体内氨基酸的合成(马庆虎等, 1987)。这就解释了 NAA促进蛋白质含量上升的试验结果(表 3, 4)。

从分子结构上考虑, 乙醇酸和 NAA都是乙酸的被取代物。乙酸的 α-C上的 H被-OH取代就成为乙醇酸, 被萘基取代即成为 NAA。因此, NAA与乙醇酸分子也有部分相似之处。NAA可能作为 GO的竞争性抑制剂, 从而影响 GO的活性。但尚需进一步证明。在乙醇酸途径中, 由 RuBP加氧酶催化产生的磷酸乙醇酸经磷酸酶作用生成乙醇酸。乙醇酸在 GO作用下生成乙醛酸。乙醛酸经转氨作用变成甘氨酸, 以后再进一步转变(图 3)。使用

NAA 处理幼苗后, NAA 是否对乙醛酸以后的转化有直接或间接抑制还不得而知, 但 Brightman 等 (1988) 发现, NAA 对体内的 NADH 氧化酶活性有极强烈的促进作用, NAA 可使该酶活性提高 2~3 倍。这样就会造成体内 NADH 含量降低, 而 NADH 正是羟基丙酮酸还原酶的辅酶。若 NADH 缺乏, 羟基丙酮酸还原酶活性势必下降, 进而导致乙醇酸途径中间产物 (包括乙醛酸) 积累。而乙醛酸还原酶也部分地使用 NADH 作为辅酶。NAA 导致的 NADH 含量下降可能也导致乙醛酸还原酶活性下降。这样, 由于两条路线受挫, 导致乙醛酸含量上升, 乙醛酸即对 Cat 起抑制作用。这可能是 NAA 间接抑制 Cat 活性的一个原因。但详情有待深入研究。

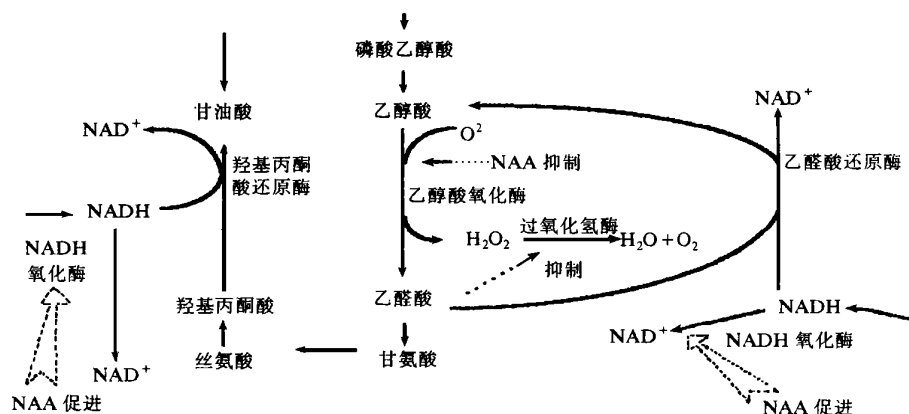


图 3 NAA 对过氧化氢酶活性间接抑制假设

至于乙醛酸抑制酶活性的机理, Hamilton 等 (1979) 曾发现, 乙醛酸可与酶分子上的游离巯基结合成加合物, 其结合以牢固的共价键进行, 从而使酶活性受到抑制。但乙醛酸抑制 Cat 活性是否也以同样方式进行, 尚待研究。

参 考 文 献

- 马庆虎, 崔 微. 1987. 萘乙酸、激动素和伤害对绿豆子叶愈伤组织形成的作用以及色氨酸、吲哚乙酸生物合成的关系. 植物学报, 29(3), 276~282
- Biswas A K, Choudhuri M A. 1978. Differential behaviour of flag leaf of intact rice during ageing. Biochem Physiol Pflanzen, 173 220~240
- Bradford M M. 1977. A rapid and sensitive method for the quantation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72 248~254
- Brightman A O, Barr R, Crane F L, et al. 1988. Auxin-stimulated NADH oxidase purified from plasma membrane of soybean. Plant Physiol, 86(4): 1264~1269
- Chevalier P, Schrader L E. 1977. Genotypic difference in nitrate absorption and partitioning of N among plant parts in maize. Crop Sci, 17 897~901
- Grover A, Kapoor H C. 1987. Stimulation of RNA synthesis by auxin and cAMP in Bengal gram (*Cicer arietinum*) seedlings and probable role of cAMP as secondary messenger in mediating hormone action. Indian J Exp Biol, 25(5): 333~336
- Hamilton G A, Buchat D J, Mortensen R M, et al. 1979. Reactions of cysteamine and other amine

- metabolites with glyoxylate and oxygen catalyzed by mammalian D- amino acid oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76 2625~ 2629
- Libbenga K R, Maan A C, Bogers R J. 1982. Auxin- binding sites from tobacco cell and tissue cultures. *Dev Plant Biol*, 7: 285~ 292
- Loebler M, Klaemdt D. 1985. Auxin- binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.) (I) Purification by immunological methods and characterization. *J Biol Chem*, 260(17): 9848 ~ 9853
- Mukherjee S P, Choudhuri M A. 1981. Effect of water stress on some oxidative enzymes and senescence in *Vigna* seedlings. *Physiol Plant*, 52 37~ 42
- Passera C, Albuzio A. 1978. Effect of salinity on photosynthesis and photorespiration of two wheat species (*Triticum durum* cv. PEPE 2122 and *Triticum aestivum* cv. Marzotto). *Can J Bot*, 56 121 ~ 126
- Powles S B, Cornic G. 1987. Mechanism of paraquat resistance in *Hordeum glaucum* (I) Studies with isolated organelles and enzymes. *Aust J Plant Physiol*, 14 81~ 89
- Schrader L E, Hageman R H. 1967. Regulation of nitrate reductase activity in corn (*Zea mays* L.) seedlings by endogenous metabolites. *Plant Physiol*, 42 1750~ 1756
- Walker J C, Legocka J, Eoleman L, et al. 1985. An analysis of growth regulator interactions and gene expression during auxin- induced cell elongation using cloned complementary DNAs to auxin- responsive messenger RNAs. *Plant Physiol*, 77(4): 847~ 850

EFFECTS OF NAPHTHYLENEACETIC ACID ON THE ACTIVITIES OF GLYCOLATE OXIDASE AND CATALASE IN WHEAT SEEDLINGS

Huang Zhuolie Li Mingqi

(College of Biotechnology, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

When 3- leaf- stage wheat seedlings were treated with different concentrations of naphthyleneacetic acid (NAA), the protein content increased, and the activities of glycolate oxidase and catalase were inhibited significantly. The relationships between the enzyme activities and the concentration of NAA were negatively correlated. The correlation coefficients to glycolate oxidase and catalase were - 0.987 5 and - 0.981 1, respectively. The linear regression equations to glycolate oxidase and catalase were $Y = 0.135\ 958\ 3 - 0.000\ 029\ 9X$ and $Y = 10.179\ 3 - 0.002\ 6X$, respectively. At 30 hours after the seedlings were treated with $500\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA, the activity of glycolate oxidase decreased by 22.46%, the activity of catalase decreased by 21.64%, and the content of protein increased by 7.90%. When the *in vitro* enzymes were treated with NAA, the activity of glycolate oxidase was inhibited, but that of catalase was not affected. When catalase *in vitro* was treated with glyoxylate, the activity was inhibited severely. The mechanisms of the inhibition of the enzymes by NAA were discussed in this paper.

Key words wheat; naphthyleneacetic acid; glycolate oxidase; catalase