

不同海拔珠芽蓼抗氧化系统的研究*

周党卫 朱文琰 腾中华¹ 师生波 刘健全 韩发**

(中国科学院西北高原生物研究所 西宁 810001)

(¹西南农业大学农学系 重庆 410006)

摘要 对生长在青藏高原不同海拔地区的多年生高山植物珠芽蓼 (*Polygonum viviparum* L.) 的抗氧化系统进行了测试,以探讨高山植物对于高寒环境的适应机理。结果表明:随着海拔的升高,叶绿素 a(chla)、叶绿素 b(chlb) 含量明显下降, chla/chlb 增大,珠芽蓼叶和根细胞的膜脂过氧化均加剧,丙二醛(MDA) 含量明显增加。3种抗氧化酶的活性受到明显影响,其中叶片中过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)活性,随海拔升高而活性降低,而均与根中的变化趋势相反。过氧化氢酶(CAT)活性随海拔升高呈增强的趋势,且叶片中活性较根中变化明显。抗坏血酸(AsA)随海拔的升高,含量呈明显增加。膜脂过氧化与抗氧化酶的变化具有不一致性,这可能表明两种抗氧化系统之间存在一定的协同作用,特别是高含量的抗坏血酸,可能在高山植物适应高寒环境的胁迫方面具有更加重要的作用。图5表1参22

关键词 珠芽蓼; 海拔; 抗氧化系统; 适应性

CLC Q948.11

ANTIOXIDATIVE COMPOUNDS OF POLYGONUM VIVIPARUM L. FROM DIFFERENT ALTITUDES*

ZHOU Dangwei, ZHU Wenyan, TENG Zhonghua¹, SHI Shengbo, LIU Jianquan & HAN Fa**

(Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810001, China)

(¹Department of Agronomy, Southwest Agriculture University, Chongqing 410006, China)

Abstract In order to reveal the adaptation mechanism of alpine plant species to the Qinghai - Tibet Plateau environment, compared in this study are mainly antioxidative compounds of *Polygonum viviparum* L. from different altitudes. At the higher altitude, the amount of both chla and chlb decreased, but chla/chlb increased. With the increase of altitude, the membrane lipid peroxidation also became stronger in both leaves and roots, and the MDA accumulated more. Both the activity and amount of three detected antioxidant enzymes varied also with altitude. At the higher altitude, the activity of both SOD and POD declined in leaves, but increased in roots, while that of CAT increased in both leaves and roots, and this trend more distinct in the former organs. The amount of AsA accumulated more with the increase of altitudes. Although the amount and activity of three antioxidative enzymes were not accurately correlated with each other, their variations with altitude, especially the higher amount of AsA at the higher altitude, inferred a similar role of this alpine species in adapting to the plateau surrounding. Fig 5, Tab 1, Ref 22

Keywords *Polygonum viviparum* L.; altitude; antioxidative compounds; adaptation

CLC Q948.11

青藏高原的高山环境具有强烈的日辐射、低温、疾风等不利于植物生长的生态条件。在长期的适应与进化中,植物必须形成一整套适应机制,以抵御低温冰冻等不利环境条件的伤害。大量研究表明,低温等逆境均可引起植物体内活性氧自由基代谢的紊乱^[1~3],对植物细胞产生伤害。植物体内普遍有一套抗氧化系统包括低分子量抗氧化剂如抗坏血酸(AsA)、谷胱甘肽(GSH)等和抗氧化酶如过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)等,能有效清除过量自由基,保护细胞免受活性氧自由基的损伤。因此,高山植物体内抗

氧化系统活性可能在其适应逆境环境中具有一定作用。但关于高山植物的抗氧化适应方面的研究仅见零星报道^[4~6]。

珠芽蓼是青藏高原高寒草甸生态系统的重要组成部分,是构成高寒草甸的优势种和建群种,其草质柔软多汁,蛋白质含量丰富且广布于青藏高原,是一种重要的多年生优质牧草^[7]。魏婕等(2000,2001)研究发现,珠芽蓼的光合作用和超微结构受到海拔影响^[8,9],但其具体机制仍不清楚,本文通过对不同海拔生长的珠芽蓼抗氧化系统的比较,以期揭示高山植物的抗氧化生理适应机制。

1 材料与方法

1.1 实验地概况

实验区位于青藏高原东部,相距较近的四个地区:西宁,海拔 2 200 m,年均温为 5.8,最冷月均温为 - 8.1,7 月份月

收稿日期: 2002-12-25 修回日期: 2003-04-24

*国家自然科学基金(No. 30270240)和中国科学院海北高寒草甸生态系统定位站基金资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30270240) and Fund of Haibei Alpine Meadow Ecosystem Station of CAS

** 通讯作者 Corresponding author

均温为 20.0, 年总辐射为 612.5 MJ m⁻², 7 月份降水量 79.8 mm, 盆中土壤样同 3 200 m, 为高山灌丛草甸土; 大通县老爷山山腰地段, 海拔 2 700 m, 年均气温为 5.6, 最冷月平均气温 - 11.3, 7 月份平均气温 17.2, 年总辐射为 586.2 MJ m⁻², 7 月份降水量 102.5 mm, 为高山灌丛草甸土; 门源县境内的中国科学院海北高寒草甸生态系统定位站附近河滩区草甸地带, 海拔 3 200 m, 年均气温 - 1.7, 最冷月平均气温 - 15.0, 7 月份平均气温为 10.1, 年总辐射为 650 MJ m⁻², 7 月份降水量 109.0 mm, 为高山灌丛草甸土; 门源县境内的大坂山山脊, 海拔 3 900 m, 此处与 3 200 m 采样地一样同属于高寒灌丛、高寒草甸地区, 气候极为寒冷, 由于常有高空急流经过, 大风或冰雪天气频繁, 为原始高山灌丛草甸土。供试植物生长的环境土壤肥力高。

1.2 实验方法

供试的珠芽蓼 (*Polygonum viviparum* L.) 分别在 2001 年 7 月采自青藏高原的 4 个地区, 其中西宁生物所院内的植株为海北河滩区的带土样, 已经在园中盆栽适应 2 a, 经常进行灌溉。将植株带土挖取后, 用冰瓶带回, 洗净根和叶后, 立即分析。

1.2.1 抗坏血酸 (AsA) 含量的测定 按照李合生等 (2000) 方法^[10], 测定进行 3 次重复。

1.2.2 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定 按照刘祖祺等 (1994) 方法^[11], 称取 0.500 g 鲜样, 置于研钵中, 再加入少量石英沙和 5.0 mL 62.5 μmol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液 (含 3% PVP), 冰浴下匀浆, 匀浆在 15 000 g, 4℃ 下离心 15 min, 上清液保存, 用于酶活性测定。以抑制 NBT 光化还原 50% 作为一个酶单位 (unit), 酶活性用 U mg⁻¹ 表示, 测定重复 3 次。

1.2.3 过氧化物酶 (POD) 活性测定 按照刘祖祺等 (1994) 方法^[11], 470 nm 波长处用 UV-1601 型紫外-可见分光光度计作时间扫描, 测定前 10 秒内的吸光度变化值。以每分钟的 D_{470 nm} 增加 0.01 为一个酶活性单位, 酶活性以 U mg⁻¹ min⁻¹

表示, 测定重复 3 次。

1.2.4 过氧化氢酶 (CAT) 活性测定 称取植物样 0.500 g, 加入 5 mL 150 mmol/L pH 7.0 磷酸缓冲液在 4℃ 下, 研磨成匀浆, 匀浆在 4℃ 15 000 r/min 下离心 10 min, 上清液用于酶活性测定, 测定方法参照 Chance 等方法^[12]。取 0.05 mL 酶液, 加入 295 mL 的 150 mmol/L H₂O₂ 在 25℃ 温育 5 min, 测定 H₂O₂ 减少时, 240 nm 处吸光值的变化。以每分钟 D_{240 nm} 下降 0.01 为 1 个酶活性单位, 酶活性以 U mg⁻¹ min⁻¹ 表示, 重复 3 次。

1.2.5 丙二醛 (MDA) 含量的测定 提取方法同 SOD 酶液, 取 1.5 mL 提取液, 加入 1.0 mL 磷酸缓冲液 (62.5 mmol/L pH 7.8), 2 mL 10% 三氯乙酸 (含 0.5% 硫代巴比妥酸 (TBA)), 煮沸 15 min 后于冰水中快速冷却, 4 000 r/min 离心 20 min, 以 10% 三氯乙酸 (含 0.5% TBA) 为参比, 在 532 nm, 600 nm 和 450 nm 波长下测定吸光度值, 按照赵世杰等 (1993) 方法^[13], 计算 MDA 含量, 重复 3 次。

1.2.6 可溶性蛋白质含量的测定 按照 Bradford 方法^[14], 用考马斯亮蓝 (G-250, 进口分装) 染色, 以 BSA 作为标准进行测定, 重复 3 次。

1.2.7 叶绿素含量的测定 参照 Aron 法^[15]。

2 结果

2.1 海拔对叶绿素含量的影响

实验表明 (表 1), 生长于不同海拔的珠芽蓼叶片中的叶绿素含量有着明显差别。随着海拔的升高, 叶绿素 a (chl a) 和叶绿素 b (chl b) 均呈现出下降的趋势, 而 chl a 与 chl b 的比值则呈现出增加的趋势。其中海北站生长的珠芽蓼叶片中 chl a / chl b 的比值最高, 这可能与大坂山寒冷多变的气候有关。叶绿素是植物光合复合体的重要组分, 叶绿素含量的下降, 可能有利于减少叶片对光的吸收, 使植物免受强辐射的损伤^[16]。

表 1 不同海拔地区珠芽蓼叶片中叶绿素含量的变化

Tab 1 Changes of chlorophyll content in *Polygonum viviparum* L. at different altitudes

	w _{FW} (chl a) / mg g ⁻¹	w _{FW} (chl b) / mg g ⁻¹	w _{FW} chl (a + b) / mg g ⁻¹	w (chl a) / w (chl b)
西宁 Xining	2.35 ± 0.015	0.80 ± 0.013	3.15	2.94
大通 Datong	1.81 ± 0.023	0.58 ± 0.081	2.39	3.12
海北站 Haibei station	1.61 ± 0.026	0.47 ± 0.086	2.08	3.43
大坂山 Daban Mount	1.44 ± 0.0318	0.45 ± 0.052	1.89	3.22

2.2 膜脂过氧化产物 MDA 含量的变化

从图 1 可见, 珠芽蓼叶中膜脂过氧化产物的含量随海拔升高呈增加趋势。其中西宁生长的珠芽蓼叶片组织中 MDA 含量最低, 以西宁生长的珠芽蓼为对照 (CK), 大通、海北站和大坂山三地珠芽蓼叶中 MDA 含量分别较大坂山高 1.08, 1.78 和 1.85 倍。其中海北站和大坂山两地珠芽蓼叶中 MDA 含量明显高于西宁珠芽蓼 ($P < 0.01$, $N = 3$)。根中 MDA 含量的变化与叶中的趋势一致。其中大坂山生长的珠芽蓼根中 MDA 含量最高, 较西宁高出 2.89 倍, 两地差异极为显著 ($P < 0.01$)。大量研究表明, 植物在遭受到低温等胁迫时, 细胞中活性氧代谢失衡, 产生过量的自由基, 从而导致膜脂过氧化。MDA 作为膜脂过氧化的最终产物, 其含量的多少常用来表示膜受到损伤程度

的大小^[1]。由此可见, 高山环境对珠芽蓼的细胞膜造成了一定的伤害, 这种伤害随着海拔的升高而加剧。

2.3 抗坏血酸含量的变化

AsA 是植物体内的重要的抗氧化剂, 具有多种抗氧化功能, AsA 含量的高低对消除或减轻膜脂过氧化, 保持细胞膜系统的完整性, 具有重要作用^[2]。由图 2 可以看出, 随着海拔的增加, 叶中的 AsA 含量增大。其中生长在大通、海北站和大坂山的珠芽蓼叶中的 AsA 含量分别较西宁高出 119%, 136% 和 135%。珠芽蓼根中 AsA 含量随海拔的变化趋势与叶片组织含量随海拔升高的变化趋势一致, 且根中含量均较同海拔叶组织中的值高。可能 AsA 在高山植物的抗氧化方面具有重要的作用。

2.4 超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化

从图3可见,珠芽蓼叶中SOD活性从西宁至大坂山呈现出降低的趋势,其中海北站珠芽蓼叶SOD活性下降最多,随海拔的升高降低的幅度分别为19%、72%和45%。但珠芽蓼根中SOD活性随海拔的升高呈增大的趋势,这与高山植物车前中的SOD变化趋势一致^[6]。但大坂山生长的珠芽蓼根中SOD活性却较其它海拔的值低,其原因有待于进一步研究。根中SOD活性随海拔的变化与叶中并不一致,这可能与叶和根在高山环境中所受的环境胁迫不同有关,根中可能有与叶片中不同的抗氧化机制^[17]。

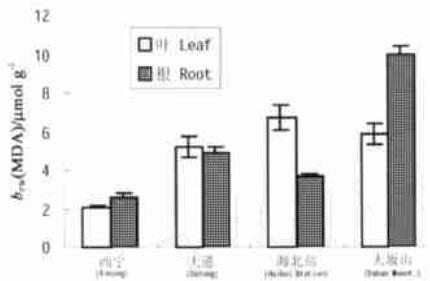


图1 不同海拔珠芽蓼细胞中MDA含量的比较
Fig 1 Comparison of MDA content in the cells of *P. viviparum* at different altitudes

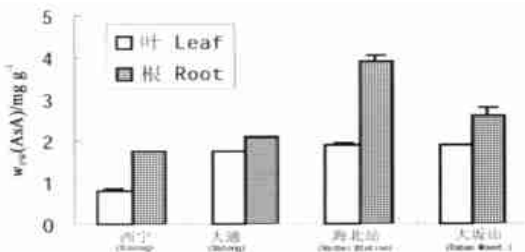


图2 不同海拔珠芽蓼细胞中抗坏血酸含量的比较
Fig 2 Comparison of AsA content in the cells of *P. viviparum* at different altitudes

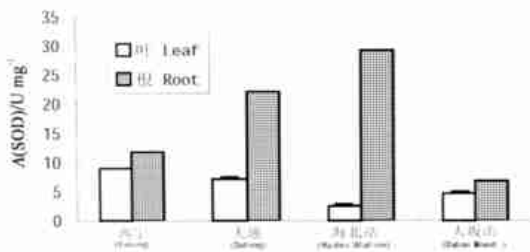


图3 不同海拔珠芽蓼细胞中超氧化物歧化酶活性的比较
Fig 3 Comparison of SOD activity in the cells of *P. viviparum* at different altitudes

2.5 过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性的变化

POD是植物体内另一种重要的自由基清除酶,主要存在于叶绿体中,清除细胞中的自由基对细胞起保护作用。如图4所示,珠芽蓼叶片组织中POD活性随海拔的升高有明显降低的趋势,其中较低海拔的西宁和大通老爷山两地珠芽蓼叶组织中的活性比高海拔的海北站和大坂山高,其中大坂山珠芽蓼叶中过氧化物酶活性仅是西宁地区的48.6%。珠芽蓼根中POD活性随海拔的变化趋势与叶中不同,与海拔升高呈正相关性。其中海北站和大坂山生长的珠芽蓼根中POD活性分别较西宁地区高出

25%和53%。珠芽蓼叶中的过氧化氢酶活性与海拔变化趋势一致(如图5所示),其中大通老爷山、海北站和大坂山分别是西宁珠芽蓼叶中活性的1.49、1.67和1.21倍。根中的CAT活性随海拔升高而活性显著增大,其中大通、海北站和大坂山珠芽蓼根中的CAT活性分别是西宁的1.05、1.25、1.98倍。

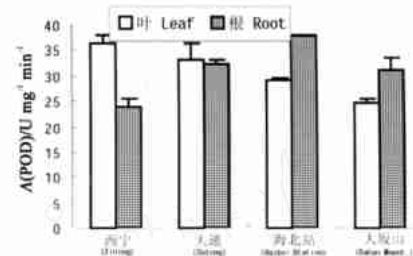


图4 不同海拔珠芽蓼细胞中过氧化物酶活性的比较
Fig 4 Comparison of POD activity in the cells of *P. viviparum* at different altitudes

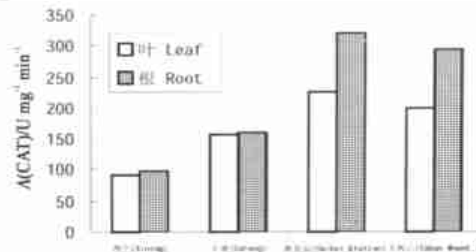


图5 不同海拔珠芽蓼细胞中过氧化氢酶活性的影响
Fig 5 Comparison of CAT activity in the cells of *P. viviparum* at different altitudes

3 讨论

生长在青藏高原极端环境下的植物,经受着高寒低温、缺氧和强烈的太阳辐射特别是大量的紫外线等逆境因子的胁迫,各种胁迫因子往往相继或相互“耦联”发生作用。这些逆境因子对于植物的生长和繁殖十分不利。逆境条件,低温和强辐射等胁迫均能引起细胞中的自由基代谢失衡,活性氧自由基含量积累,导致膜系统、蛋白质、核酸等大分子的破坏^[1]。然而植物体内的非酶抗氧化系统和抗氧化酶系统,能清除活性氧自由基,维持细胞中活性氧代谢的平衡。高山植物虽然地处恶劣的环境条件下,但其光合作用等生命过程并未明显减弱,而呈现出很强的适应性^[9,18],这可能与其体内的抗氧化系统的保护有很大关系。

珠芽蓼是一种多年生的高山植物,在青藏高原不同海拔都有分布。魏婕等(2000,2001)研究表明,随海拔的升高,珠芽蓼内囊体膜减少,膜垛叠程度减少,内囊体肿胀,内囊体膜溶解,且叶绿体破裂。认为这种结构特征与高原环境特点有关^[8,9]。本研究结果表明,随着海拔的升高,珠芽蓼叶中的活性氧含量相应的增大,膜脂过氧化水平升高,表明珠芽蓼受到高山低温、强辐射等环境因子的胁迫。叶中超微结构的改变可能与细胞中的抗氧化系统的受高海拔的生境影响有关。随着海拔的升高,珠芽蓼叶片中的SOD和POD的活性并未明显增加,而呈现出降低的趋势。SOD被认为是细胞抗氧化胁迫的中心,其活性的降低不利于光合作用中O₂等活性氧自由基的清除。这可能是叶细胞中内膜系统受到破坏的根本原因所在。但叶片中的CAT活性并未降低,这有利于细胞质中H₂O₂的清除。POD是叶绿体中H₂O₂的主要清除者,对于光合作用的正常进行具有保护作用。Foyer等认

为,一些抗氧化酶活性的降低可能作为一种胁迫信号而激活其它抗氧化保护机制^[19]。本研究结果显示,随着海拔的升高,非酶抗氧化系统中的关键物质 AsA 含量在根和叶中都相应增加。AsA 可以清除细胞中的 O₂⁻, ·OH, H₂O₂ 等活性氧自由基,在清除植物体内自由基和活性氧方面有重要作用。有研究结果显示,低温和强光能促进 AsA 含量的下降^[20],但高原植物受到的低温寒冷和紫外线辐射等胁迫增大,细胞中 AsA 含量并未降低。低温下 AsA 和 GSH 含量变化呈正相关^[21],AsA 和 GSH 共同清除叶绿体中的 H₂O₂ 和 O₂⁻ 等活性氧自由基。在海拔生长的珠芽蓼叶中 AsA 含量的增大,可能暗示着 GSH 的升高。Wildi 等(1996)研究认为,抗坏血酸在高山植物适应高海拔的低温和强辐射方面具有重要作用^[4]。本研究结果也证实了这一点。由于 AsA 为小分子物质,在细胞中可以自由通过,在叶绿体中也较高含量,这有利于及时弥补由于酶活性受到影响时细胞代谢的进行。这可能也是珠芽蓼叶细胞中膜虽然受到伤害,但其光合作用等生命过程仍能完成的重要原因。三种抗氧化酶活性随海拔增加的变化趋势在根和叶中变化并不一致。这与一些学者研究干旱胁迫下植物抗氧化系统的变化所得的结论一致^[22],可能单一的一种酶活性的提高,并不一定使植物具有较强的抗氧化能力,而一种酶活性的下降,也并不能说明植物抗氧化能力的下降。高山植物的抗氧化酶系统之间可能存在一定的协同关系,这种协同作用可能是珠芽蓼适应高山环境胁迫的重要生理机制之一。

致谢 感谢青海师范大学 1999 级学生孙静在实验的野外采样和分析过程中提供的热情帮助。感谢张树源教授对本文提出的宝贵建议。

References

- Chen SY(陈少裕). Membrane lipid peroxidation and plant stress. *Chin Bull Bot (植物学通报)*, 1997, **14**(2): 1~8
- Jiang MY(蒋明义), Guo SC(郭绍川). Oxidative stress and antioxidation induced by water deficiency in plants. *Plant Physiol Commun (植物生理学通讯)*, 1996, **32**(2): 144~150
- Walk MA, Mckersie BD. Role of the ascorbate - glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. *Plant Physiol*, 1993, **141**: 234~239
- Wildi B, Lütz B. Antioxidant composition of selected high alpine plant species from different altitudes. *Plant, Cell & Environ*, 1996, **19**: 138~146
- Han F(韩发), Ben GY(贡桂英), Shi SB(师生波). Comparative study on the resistance of *Kobresia humilis* grown at different altitudes. *Acta Ecol Sin (生态学报)*, 1998, **18**(6): 654~659
- Chen X(陈雄), Wang ZL(王宗灵), Ren HX(任红旭), Zhu YL(朱元林). Effects of altitude on antioxidative system in leaves and roots of *Plantago major*. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 1999, **41**(8): 846~850
- 周兴民,王启基,师生波,张金鑫,张耀生,赵新全,姜文波,姜永进,曹广民. 中国嵩草草甸. 北京:科学出版社,2001. 26~51
- Wei J(魏婕), Yu H(余辉), Kuang TY(匡廷云), Ben GY(贡桂英). Ultrastructure of *Polygonum viviparum* L. grown at different elevations on Qinghai - Tibet Plateau. *Acta Phytocol Sin (植物生态学报)*, 2000, **24**(3): 304~307
- Wei J(魏婕), Yu H(余辉), Zhong ZP(钟泽璞), Kuang TY(匡廷云), Ben GY(贡桂英). Comparison of photosynthetic adaptability between *Kobresia humilis* and *Polygonum viviparum* on Qinghai Plateau. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 2001, **43**(5): 486~489
- 李合生,孙群,赵世杰,章文华. 植物生理生化实验原理和技术. 北京:高等教育出版社,2000. 248~250
- 刘祖琪,张石诚. 植物抗逆生理学. 北京:中国农业出版社,1994. 369~382
- Chance B, Mechly AC. Assay of catalase and peroxidase. *Methods Enzymol*, 1955, **2**: 755~764
- Zhao SF(赵世杰), Xu CC(许长诚), Zou Q(邹琦), Meng QW(孟庆伟). Improvement of method for measurement of malondialdehyde in plant tissues. *Plant Physiol Commun (植物生理学通讯)*, 1994, **30**(3): 207~210
- 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, **72**(5): 248~254
- Arnon DI. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol*, 1949, **24**: 1~15
- Lu CF(卢存福), Ben GY(贡桂英). Photosynthetic characteristics of plants at high altitudes. *Chin Bull Bot (植物学通报)*, 1995, **12**(2): 38~42
- Zhou RL(周瑞莲), Cheng GD(程国栋). Changes in the roots of alpine grasses in relation to late fall, winter and spring freezing tolerance. *Acta Phytocol Sin (植物生态学报)*, 2000, **24**(5): 554~559
- Ben GY, Lu CF, Han F, Shi SB. Characteristics of the photosynthesis in alpine plants on Qinghai plateau. In: Murata N ed. Research in Photosynthesis. Vol 4. Dordrecht/ Boston /London: Kluwer Academic Publishers, 1992. 173~176
- Foyer CH, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 1976, **133**: 21~25
- Neelam P. Mishra, Ranjit K, Singhal S. Changes in the activities of antioxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors. *Plant Physiol*, 1993, **102**: 1057~1060
- Zeng SX(曾韶西), Wang YR(王以柔), Liu HY(刘鸿先). The effect of chilling stress on the content of ascorbic acid in rice seedlings. *Acta Phytophysiol Sin (植物生理学报)*, 1987, **3**(4): 365~370
- Yan CS(阎成仕), Li DQ(李德全), Zhang JH(张建华). Oxidative damage antioxidant responses during drought - induced winter wheat flag leaf senescence. *Acta Bot Bor - Occid Sin (西北植物学报)*, 2000, **20**(4): 568~576