

高寒山区植物根抗氧化酶系统的季节变化与抗冷冻关系

周瑞莲, 赵哈林, 程国栋

(1. 中国科学院寒区旱区环境与工程研究所, 兰州 730000)

摘要: 在高寒山区(海拔 2900m)选取 4 种多年生草本植物, 即无芒雀麦(*Bromus inermis*)、草地早熟禾(*Poa sphondylodes*)、花雀麦(*Bromus sinensis*)和垂穗披碱草(*Elymus nutans*), 测定了秋末、冬初、冬季、春季气温变化过程中其根中丙二醛(MDA)含量和抗氧化酶活力(过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD))和抗坏血酸氧化酶(APX)变化, 分析了抗氧化酶系统在根抗冷适应中的作用。结果表明, 随秋末降温植物根中 MDA 含量增加, 尔后下降, 在冬季和翌年春季保持相对稳定。从 9 月初到 10 月下旬, 4 种植物根中 SOD、CAT、POD 活力平均增加 170%、130% 和 56%, 在冬季下降, 但仍远高于 9 月, 在春季气温上升过程中酶活力上升。根能在组织结冰状况下生存与其具备完善的保护酶系统, 能及时清除氧自由基抑制膜脂过氧化维持膜完整性有关。据降温过程中 MDA 含量和抗氧化酶活力变化, 可将根冷适应分为两个阶段, 即第 1 阶段平均气温在 0℃ 以上, 抗氧化酶活力增强, MDA 增加阶段, 第 2 阶段平均气温降至 0℃ 以下, 最低气温降到 -15℃ 以下, 抗氧化酶活力下降, MDA 无明显变化阶段。

关键词: 高寒山区; 抗氧化酶; 牧草抗冷冻力; 膜脂过氧化

Seasonal changes in enzymatic antioxidant system in roots of alpine perennial forage grasses related to freezing tolerance

ZHOU Rui-Lian, ZHAO Hai-Lin, CHENG Guo-Dong (Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Four plants, *Poa sphondylodes*, *Bromus inermis*, *Bromus sinensis* and *Elymus nutans* established in alpine in 1993, were investigated throughout the winter and spring between 1995 and 1996 by monitoring MDA content and antioxidant enzymatic activities of SOD, CAT, POD and APX. Roots were sampled at approximately 15 days interval in both autumn and spring. Leakage of ions and MDA content increased, while SOD and CAT activities declined markedly from September with the drop of temperature. In contrast, in alive roots, MDA content increased markedly from September 1 to September 15, and then decreased to early October and was little fluctuated from early Oct. to December, also during spring. Average activities of SOD, CAT, POD in roots of all species increased 170%, 130%, and 56%, respectively from September to early November. Thereafter these enzymatic activities declined throughout winter, but still higher than that of September, and elevated again with rising of temperature from mid-April to early May. These results provided evidence for the ability of the alpine plant root to activate enzymatic defense mechanisms to limit the production of free radicals to protect membrane integrity. In dead leaves, it is because antioxidant enzymes inactivated lead to accumulation of AOS initiating lipid peroxidation. APX is not important scavengers for this study. Freezing tolerance in alpine grasses correlated with an increased capacity to scavenge or detoxify activated AOS by antioxidant enzymatic system.

Key words: hydrogen peroxide scavenging enzymes, seasonal changes, alpine forage grass, lipid peroxidation

基金项目: 国家自然科学基金(347940)和国家 973 课题(G2000048704)资助项目

收稿日期: 1999-06-09; **修订日期:** 2000-08-20

作者简介: 周瑞莲(1958~), 女, 汉, 博士, 副教授。主要从事高寒、干旱地区植物逆境生理生态学研究。

tion

文章编号:1000-0933(2001)06-0865-06 中图分类号:Q945.79,Q948 文献标识码:A

温带多年生草本植物可在 -5°C 到 -30°C 冷冻条件下生存。入冬后,地上枝叶枯死,根系是植物越冬和次年再生的唯一器官。然而至今人们仍不了解植物根在组织结冰状况下生存的生化生理机理^[1]。而探讨植物根抗冻机理在抗冻育种上是十分重要的^[2]。

一些研究表明,植物最高的抗冻力形成不是“天生固有的(Constitute)”,而是与环境低温诱导^[3]、冷冻适应及细胞膜特性密切相关^[4]。细胞质膜是冷冻伤害的原初部位^[5],而冷冻低温引起的氧自由基积累引发膜脂过氧化是导致细胞膜伤害的主要原因^[6-8]。然而植物也形成了分解氧自由基的解毒体系——抗氧酶系统,主要包括过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD),过氧化物酶(POD),抗坏血酸氧化酶(APX)等^[9,10],植物抗冻力与其对氧自由基的清除力密切相关^[11,12]。本研究的目的在于通过测定在晚秋、入冬、春季气温变化过程中高寒山区植物根中SOD、POD、CAT、APX和MDA的季节变化,分析抗氧化酶系统与植物冷适应、越冬、脱冻锻炼间的关系。

1 材料与方法

1.1 样地气温状况

试验地位于甘肃省天祝县金强河河谷二阶地上,海拔2900m。这里气候异常寒冷,年平均气温 -0.1°C , $\geq 0^{\circ}\text{C}$ 的年积温为 1300°C ,从9月中旬到翌年6月最低气温在 0°C 以下,从10月中旬到翌年4月土壤冻结(表1)。然而,高山多年生草本植物在此生长良好,秋季地上植株枯死,以根系越冬。

表1 1995~1996年各月旬平均气温和最高、最低气温($^{\circ}\text{C}$)

Table 1 Mean air temperatures each month in 1995~1996

年 Year	1995(平均 Mean)			1996(平均 Mean)			1995~1996	
月 Month	F.	S.	L.	F.	S.	L.	Max.	Min.
1	-12.5	-11.4	-15.8	-8.8	-15.6	-14.7	1.1	-27.4
2	-11.5	-8.3	-11.9	-9.4	-11.1	-12.4	2.4	-20.1
3	-9.9	-7.5	-2.9	-6.8	-7.2	-5.7	9.4	-15.8
4	-3.3	-1.6	-0.5	-6.5	-1.6	-3.4	16.3	-8.9
5	4.7	3.9	8.8	1.8	4.4	9.9	16.8	-5.0
6	10.9	10.7	12.3	7.3	9.3	9.4	20.2	-1.4
7	8.5	10.5	11.2	10.0	12.3	11.3	21.5	3.5
8	11.6	8.5	11.0	11.7	11.6	8.5	18.4	1.9
9	8.6	6.5	4.9	6.2	7.8	8.0	17.7	-4.6
10	1.3	3.1	-1.9	1.4	3.1	-0.9	14.3	-15.9
11	-2.4	-4.2	-7.9	-1.7	-7.8	-10.4	9.4	-17.6
12	-9.3	-12.4	-9.9	13.3	-9.8	-5.1	5.1	-21.6

* F 月上旬均温 first 10days a month; S 月中旬均温 second 10days a month; L 月下旬均温 last 10days a month

1.2 人工草地的种植与管理

本试验所采用的4种草本植物为无芒雀麦(*Bromus inermis*)、草地早熟禾(*Poa sphyondylodes*)、花雀麦(*Bromus sinensis*)和垂穗披碱草(*Elymus nutans*)。1993年5月种植于试验地中,生长良好。垂穗披碱草、无芒雀麦、花雀麦株高可达60cm,草地早熟禾可达30cm。在实验的1995~1996年间不收割,人工除草以确保试验小区牧草纯度。

1.3 植物材料的采集方法

自1995年9月到12月份和1996年4月中旬到5月底,每隔半月取一次根材料。同时在1995年9月中旬到11月1日取趋于枯死的叶材料作为根对照。每次取材时间为12:00~14:00,以避免日温差影响。取材参照Olien的方法^[13]进行,即在土壤未结冻前,直接用铁锹直立下挖一个正方形草堡,在土壤结冻后

则用铁板和锤子,取出一个近 30cm 深的草堡。草堡用冷水缓缓冲洗直到根上无附着土粒,然后自茎基处将根系剪下并用吸水纸吸去根上附着水分。根样和叶样剪成 3cm 小段随即放入液 N 固定带回室内分析。

1.4 测定方法

①冷冻伤害的测定 以测定冷冻期间叶片电解质渗透率作为冷伤害指标。用电导法测定秋末趋于枯死的植物叶片电解质渗透率,示细胞膜透性的变化。

②MDA 含量的测定 按 Dhindsa 的方法^[14]分析根、叶片膜脂过氧化,以丙二醛(MDA)含量表示膜脂过氧化程度。

③酶液的制备 从超低温冰箱(-80℃)中取出供试材料,分别取 0.5g 叶和 1g 根研磨成粉末状加 5ml 50ml/L 磷酸钠缓冲液(PH7.5,内含 10g/LPVP,0.1mg/L Na₂EDTA,0.1%β-巯基乙醇)均浆,4 层纱布过滤后,在 4℃ 下 15000g 离心 20min,上清液为粗酶液用于抗氧酶活力的测定。

④抗氧酶活力的测定 按 Beyer 和 Fridovich 光化学抑制法^[15]测定 SOD 活力;按曾韶西报道的方法,以 H₂O₂-愈创木酚为底物测定 POD 活力;按碘量法测定 CAT 酶活力;据 Gupta 方法^[16],在 290nm 处测定抗坏血酸氧化速率示 APX 活力;参照 Bradford 用的考马斯亮方法^[17]测定蛋白质含量,以 BSA 为标准样品。

2 结果与分析

2.1 秋末衰老叶片的生理变化

在高寒山区,9 月下旬多年生草本植物地上叶开始枯黄。随着 9 月下旬最低气温降到 0℃ 以下,叶中细胞膜透性增高(图 1C),MDA 含量增高(图 1D),同时 SOD 活力(图 1A)和 CAT 活力(图 1B)明显下降。这表明秋末叶片趋于枯死过程中,细胞代谢紊乱,酶系统平衡破坏,细胞内氧自由基积累速率大于酶系统清

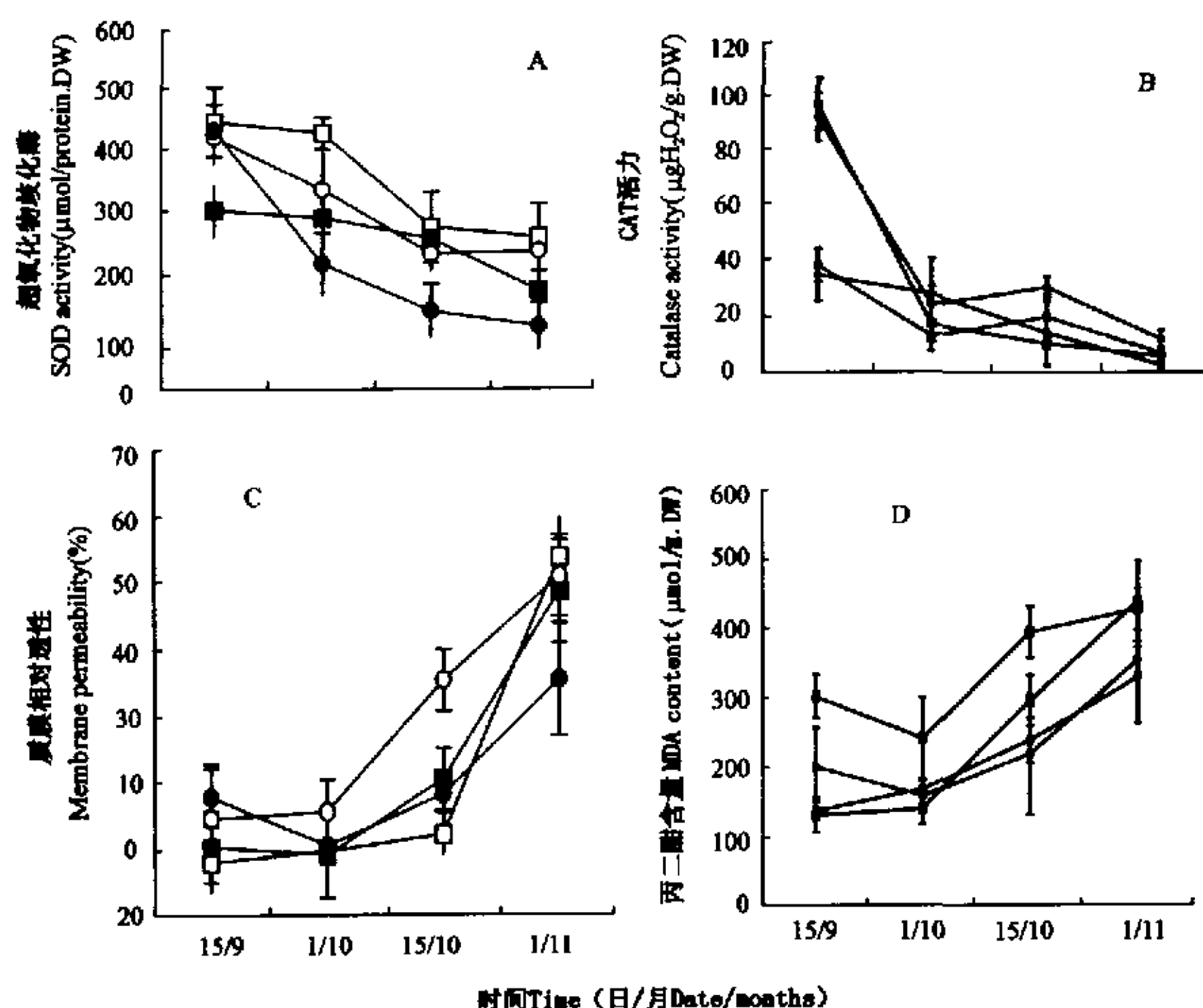


图 1 晚秋叶片 SOD 活力(A)、CAT 活力(B)、质膜相对透性(C)、MDA 含量(D)的变化

Fig. 1 Changes in activities of superoxide dismutase (A), catalase activity (B), relative membrane electrolyte leakage (C) and malondialdehyde content (D) in leaves in late fall

◇无芒雀麦 *Bromes inermis*, ○垂穗披碱草 *Elymus nutans*, ●早熟禾 *Poa sphondyliodes*, ◆花雀麦 *Bromus sinensis*

除能力引起膜脂过氧化,膜系统受损,细胞因膜破裂而死亡是叶细胞死亡的主要生理原因。

2.2 根中 MDA 含量的季节变化

为了了解草本植物根越冬生存与细胞膜完整性之间关系,测定了秋末降温及春季升温过程中根的 MDA 含量。结果表明,随秋末气温下降,从 9 月 1 日到 15 日根中 MDA 含量增加,然后下降。在平均气温下降到 0℃ 以下时(即 10 月初到 12 月初),根中 MDA 含量基本维持不变,这种状况一直保持到春季气温回升(图 2)。这表明,根系在组织结冰状况下,细胞内膜脂过氧化水平较低,其根细胞的越冬生存与其细胞控制膜脂过氧化作用、维护细胞膜完整性有关。

2.3 根中 SOD 和 CAT 活力的季节变化

随秋末气温下降,根中 SOD 活力上升,在 11 月初达到最高(图 3A),此时无芒雀麦、花雀麦、垂穗披碱草和草地早熟禾根中 SOD 活力分别提高了 186%、162%、216% 和 119%。进入冬季平均气温下降到 0℃ 以下后,根中 SOD 活力下降。但在整个冬季根中 SOD 活力仍高于秋末,并一直维持到春季。与 SOD 活力变化相同,随晚秋气温下降根中 CAT 活动增高(图 3B),到 11 月中旬无芒雀麦、花雀麦、垂穗披碱草和草地早熟禾分别增加了 97%、159%、150% 和 109%。值得注意的是,在春季气温回升过程中 CAT 活力再次上升,这可能与春季气温波动大,常出现 0℃ 以下低温,幼苗在覆雪下生长有关。

2.4 根中 POD 和 APX 活力的变化

与 SOD 和 CAT 相比,在秋末气温下降过程中根中 POD 活力增加幅度较小。到 10 月中旬无芒雀麦、花雀麦、垂穗披碱草和早熟禾 POD 分别增加了 28%、25%、137% 和 33%(图 4A)。相反,在春季气温回升过程中根 POD 活力迅速大幅度增加,从 4 月下旬到 5 月中旬无芒雀麦、花雀麦、垂穗披碱草和草地早熟禾分别提高了 261%、112%、301% 和 196%。在秋末冬初气温下降过程中,根中 APX 活力无明显变化,似乎对气温变化不敏感。

上述结果表明,在气温变化过程中,4 种植物根中的保护酶活力、MDA 含量虽然存在差异,但是它们对温度的反应是一致的。由于本文侧重探讨植物根抗冻性与保护酶活力之间的关系,至于不同植物间抗氧化酶活力和 MDA 的差异及其原因以后再做进一步分析。

3 讨论

在高寒山区,冬季多年生草本植物叶片枯死,而根则能在土壤结冰条件下越冬生存。结果表明,其越冬生存的生理机理与根系中存在有完整的抗氧化酶系统有关。根据秋末冬初和冬末春初气温变化过程中,多年生植物根抗氧化酶系统的变化规律,可以把高寒山区多年生草本植物的冷冻适应划分为两个阶段。第 1

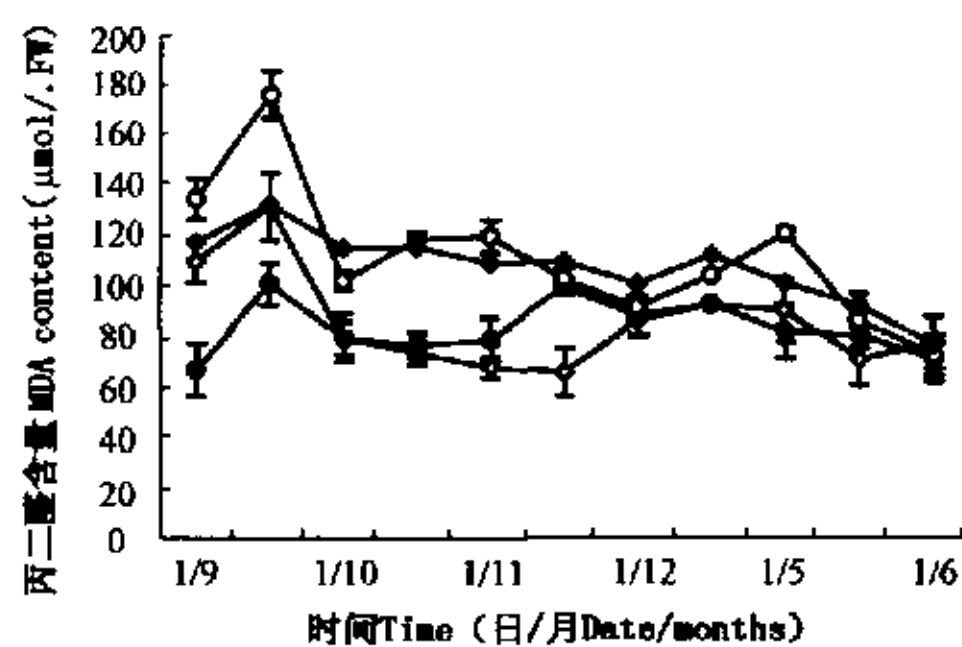


图 2 晚秋、入冬、春季植物根中 MDA 含量的变化

Fig. 2 Seasonal changes in MDA in the roots

◇无芒雀麦 *Bromes inermis*, ○垂穗披碱草 *Elymus nutans*, ●早熟禾 *Poa sphondyliodes*, ◆花雀麦 *Bromus sinensis*

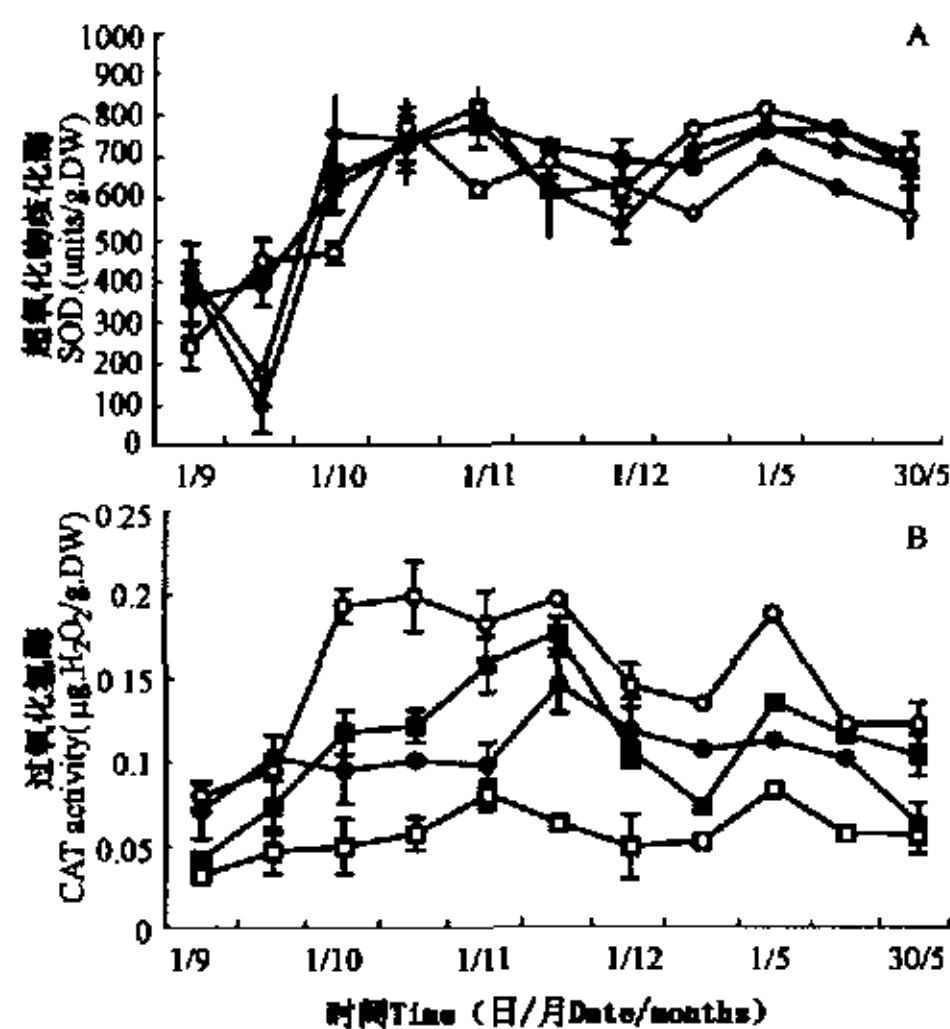


图 3 晚秋、入冬、春季植物根中 SOD 活力(A)和 CAT 活力(B)的变化

Fig. 3 Seasonal changes in activities of superoxide dismutase(A), catalase(B) in the roots

◇无芒雀麦 *Bromes inermis*, ○垂穗披碱草 *Elymus nutans*, ●早熟禾 *Poa sphondyliodes*, ◆花雀麦 *Bromus sinensis*

个阶段,是从9月初到10月初,气温在 0°C 以上,但日温差大,地表夜晚冻结,白天融化,称之为融冻阶段,也是抗氧化酶活力增强阶段;第2阶段,从10月下旬到翌年4月初,平均气温降至 0°C 以下,地表完全结冰,称之为冰冻阶段,此时抗氧化酶活力下降,但细胞内没有明显膜脂过氧化作用。Yoshida 在对晚秋和冬季冬小麦抗冻力与细胞含水量变化研究发现,随着秋末降温冬小麦根抗冻力增加,细胞含水量下降,当抗冻力进一步增加(可生存在 -15°C),细胞内含水量不变,因此他将冬小麦抗冻适应分为两个阶段^[18],Kacpersk 把冬油菜的冷适应分为两个阶段^[19],第1阶段是冷锻炼,第2阶段是冻锻炼(Frost hardening)。在本研究中抗氧化酶系统的激活与秋末最低温度间存在明显负相关,这表明植物根冷锻炼的启动部分是由低温决定的。

第1阶段是冷锻炼,随气温下降(9月1~15日),根中MDA含量上升,SOD、CAT、POD活力无明显增加。尔后随SOD、CAT活力增强,MDA含量下降(9月15~10月1日),当SOD、CAT、POD进一步增高而MDA含量无明显变化。这表明:①晚秋融冻胁迫引起根细胞中氧自由基积累;②根细胞中膜脂过氧化作用的下降与抗氧化酶的清除作用密切相关;③秋末低温即是造成根细胞中氧自由基积累引起膜脂过氧化作用的原因,同时也是根细胞抗氧化酶激活的诱发因子。但从MDA含量增加早于根中SOD、CAT和POD活力增强上看,也许低温冷冻直接引起根细胞氧自由基积累,然后积累的氧自由基诱发抗氧化酶活力。

第2个阶段是冻锻炼,根中SOD、CAT、POD活力下降,而根MDA含量没有明显增加。因此认为引起冰冻条件下根系抗氧化酶活力下降的原因可能有2点:一是在结冻状况下根细胞呼吸速率下降产生的氧自由基减少。一些研究结果表明,暗中生长的幼苗和无光合作用的组织,细胞中氧自由基来源于呼吸作用^[8]。二是此时抗氧化酶活力足以控制体内膜脂过氧化作用,抗氧化酶活力与氧自由基浓度达到平衡而使此阶段MDA含量维持相对稳定。另外此阶段SOD、CAT活力仍远远高于秋末(9月初),因而可以认为在冰冻阶段根抗氧化酶在清除氧自由基,防止膜脂过氧化,维持根细胞膜完整性上具有重要作用。然而,参与根细胞氧自由基清除的酶主要是SOD、CAT和POD,APX似乎在牧草根冷适应中不具有保护作用,这可能是由于APX主要参与清除叶绿体中产生的 H_2O_2 ^[16]。

综上所述,伴随秋末气温下降,多年生草本植物叶中保护酶系统丧失功能,酶活力下降,膜脂过氧化产物(MDA)增加,膜透性增大,地上叶片枯死。在入冬土壤冻结、根细胞结冰状况下,根系维持较高保护酶活力和较低膜脂过氧化产物。低温冷冻条件下,根系抗氧化酶系统及时清除氧自由基防止膜脂过氧化,是维持细胞膜完整性,保证其安全越冬的重要生理反应。然而植物的抗冻机理是多方面的,有关低温保护物(碳水化合物,可溶性蛋白质,脯氨酸,多胺)与多年生植物抗冻越冬关系的研究在另一文章中报道。

参考文献

- [1] ZHAO S, COLOMBO S J, BLUMWALD E. The induction of freezing tolerance in jack pine seedlings: The role of root plasma membrane H^{+} -ATPase and redox activities. *Physiol. Plant.*, 1995, 93: 55~60.
- [2] LINDSTROM A. Freezing temperatures in the root zone: effects on growth of Containered pinus sylvestris and

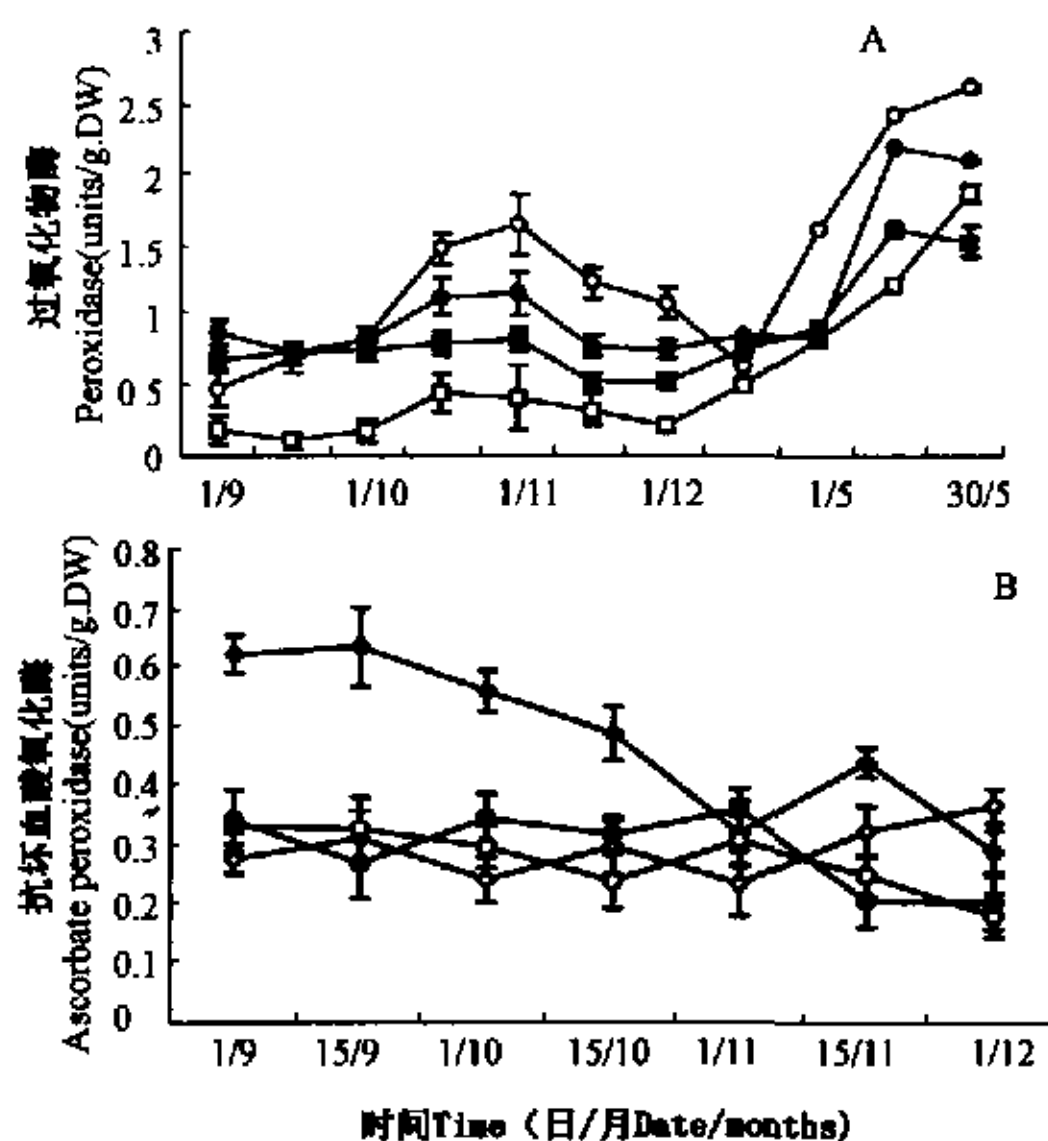


图4 晚秋、入冬、春季植物根中POD活力(A)和APX活力(B)的变化

Fig. 4 Seasonal changes in activities of peroxidase(A) and ascorbate peroxidase (B) in the roots

◇无芒雀麦 *Bromes inermis*, ○垂穗披碱草 *Elymus nutans*, ●早熟禾 *Poa sphondylodes*, ◆花雀麦 *Bromus sinensis*

- picea abies seedlings. *Scand. J. For. Res.*, 1986, 1: 371~377.
- [3] THOMASHOW M F. Role of cold responsive gene in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.*, 1998, 118: 1~7.
- [4] STEPONKUS P L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1984, 35: 543~586.
- [5] ARORA R and PALTA J P. A loss in plasma membrane ATPase activity and its recovery coincides with incipient freeze-thaw injury and post-thaw recovery in onion bulb scale tissue. *Plant Physiol.*, 1991, 95: 845~852.
- [6] Senaratna T, Mackay C E, Mckersie B D, *et al.* Uniconazole-induced chilling tolerance in tomato and its relationship to antioxidant content. *J Plant Physiol.*, 1988, 133: 56~61.
- [7] Kendall E J, Mckersie B D. Free radical and freezing injury to cell membranes of winter wheat. *Physiol Plant*, 1989, 76: 86~94.
- [8] Puntarulo S, Galleano M., Sanchez R A, *et al.* Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1074: 277~283.
- [9] Allen R D. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.*, 1995, 107: 1049~1054.
- [10] Rao M V, Paliyath G, Ormrod D P. Ultraviolet-B and ozone induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 1996, 110: 125~136.
- [11] Mckersie B D, Senaratna T, Walker M A, *et al.* Deterioration of membranes during aging in plants, evidence for free radical mediation. In: Nooden L, Leopold A C ed. *Senescence and Aging in Plants*. Academic Press, New York, 1989. 441~463.
- [12] Malan C, Greyling M M, Gressel J. Correlation between Cu/Zn superoxide dismutase and glutathione reductase, and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbreds. *Plant Sci.*, 1990, 69: 157~166.
- [13] Olien C R, Clark J L. Changes in soluble carbohydrate composition of Barley, Wheat, and Rye during winter. *Agron. J.*, 1993, 85: 21~29.
- [14] Dhindsa R S, Plumb Dhindsa, Thorpe T A. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.*, 1981, 32: 93~101.
- [15] Beyer W F, Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity; some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem*, 1987, 161: 559~566.
- [16] Gupta A S, Robert P, Webb A, *et al.* Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol.*, 1993, 103: 1067~1073.
- [17] Bradford M M. A rapid and sensitive technique to determine protein concentrations. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248~254.
- [18] Yoshida A M, Abe J, Moriyama M, *et al.* Seasonal changes in the physical state of crown water associated with freezing tolerance in winter wheat. *Physiol. Plant*, 1997, 95: 363~370.
- [19] Kacpersk A A. Water potential alterations. A prerequisite or a triggering stimulus for the development of freezing tolerance in overwintering herbaceous plant? In: P H Li and Christersson L, eds. *Advance in Plant Cold Hardiness*. CRC Press. Boca Raton, FL. ISBN 1993.