

# 青藏高原植物抗逆性的生理生化基础研究\*

## II. 矮嵩草叶片过氧化物酶和酯酶的同工酶 及酶活性对不同海拔高度的反应

韩发 贲桂英 张树源 师生波 武海

(中国科学院西北高原生物研究所)

### 摘 要

本文研究了生长在不同海拔地区(2 200米、3 200米和4 000米)的同种矮嵩草(*Kobresia humilis*)叶组织中的过氧化物酶同工酶、酯酶同工酶和其酶活性的变化。结果表明,不同海拔矮嵩草叶片中的过氧化物酶同工酶酶谱之间存在明显差异。同工酶谱带随着海拔高度升高而减少。其中,在草返青后期,海拔4 000米处的同工酶谱带比海拔3 200米和2 200米处的分别减少2条和5条谱酶带。草盛期时分别减少1条和4条酶带。在草生长后期分别减少1条和2条酶带。但酶总活性则随海拔高度的上升而明显增强。酯酶同工酶谱带无明显变化,但酶活性升高。这两种酶的同工酶谱带数和酶活性的改变与矮嵩草产地的海拔高度不同有关。

关键词:矮嵩草;同工酶;海拔高度

青藏高原地区的特有植物由于长期受高寒低温、低气压和强光辐射等生态因子的影响,其外部形态和内部结构形成了适应特殊生态环境的独特方式和途径(王为义,1985,1990;王勋陵,1989;周广泰等,1992)。近年来,有关抗性生理的研究指出,植物对逆境条件的抵抗或适应的能力是与许多酶系统功能活性的改变有关。每种酶系统各个同工酶的合成不仅受基因控制,而且也与对不良环境条件的抵抗过程有关(张庆朝,1993;季成等,1989;戴金平等,1991;Kovacs等,1980;Moss,1982;Frank,1990)。然而,有关从生理生化——遗传的特异性揭示青藏高原特有植物抗逆性的机理研究,目前尚未见报道。

矮嵩草(*Kobresia humilis*)是青藏高原高寒气候的独特产物,它是经过长期自然选

\* 中国科学院海北高寒草甸生态系统定位站基金资助项目及中国科学院西北高原生物研究所所长基金资助项目。

择和适应发展起来并广泛分布的一种优势种,是该地区的主要牧草,国内学者对它的形态——生态学已有较多研究(周兴民,1982,1979;杨永昌,1976;陈庆诚,1966;王启基等,1985)。本文从生物化学角度,对分布在不同海拔高度同种矮嵩草的过氧化物酶同工酶、酯酶同工酶和酶活性进行比较分析,探讨它们与抗寒性的关系。

## 材料与方法

### 1. 材料

试验于1990年和1991年的6—10月份进行,供试材料矮嵩草取自生长在西宁、海北站和大阪山等不同海拔地区,用塑料花盆将其连根带土移回所内,恢复1—2天后进行酶的分

表1 采样地区的海拔和气候条件  
Table 1 Altitude and Climatic Character of the sampling area

| 项 目<br>Item                                 | 大 阪 山<br>Daban Mt. | 海 北 站<br>Haibei Station | 西 宁<br>Xining |
|---------------------------------------------|--------------------|-------------------------|---------------|
| 海拔高度(米)<br>Altitude(m)                      | 4 000              | 3 200                   | 2 200         |
| 观测日期(月·日)<br>Date of observation            | July 28            | August 2                | August 3      |
| 气压(kPa)<br>Atmosphere Pressure              | 63.9               | 70.0                    | 77.1          |
| 总辐射( $W \cdot m^{-2}$ )<br>Global Radiation | 1 130              | 907                     | 825           |
| 有效辐射( $\mu Em^{-2}S^{-1}$ )PAR*             | 1 740              | 1 625                   | 1 435         |
| 相对湿度(%)<br>Relative Humidity                | 62                 | 55                      | 53            |
| 温度( $^{\circ}C$ )<br>Air Temperature        | 13.5               | 21.5                    | 24.5          |

\* Photosynthetically active radiation

### 2. 酶的提取

选生长一致的矮嵩草植株若干株,从第三叶中部取样2克,用蒸馏水冲洗,滤纸吸干水后剪碎,放入预冷的研钵中加入0.1摩尔的  $KH_2PO_4$  缓冲液(pH7.5)4毫升和少许石英砂研磨成匀浆,匀浆离心( $4\ 000rmin^{-1}$ )15分钟,上清液用作酶活性及同工酶测定。

### 3. 同工酶的分离

采用不连续的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Davis, 1964) 垂直平板法进行分离, 成层胶浓度为2.5%, 分离胶浓度为7.5%, 每个样品上样量, 过氧化物酶为25微升, 酯酶为50微升, 凝胶每厘米加电流2毫安, 电压60伏, 电泳缓冲液为0.005摩尔 Tris-甘氨酸 (pH8.3), 做正极向单向电泳。进行负极向电泳时, 需预电泳以除去过硫酸铵对酶蛋白分离的影响。

### 4. 酶的染色

按 Pearse (1960) 改良的联苯胺方法进行过氧化物酶同工酶染色, 按吴少伯 (1979) 方法进行酯酶同工酶染色, 分别用7%冰醋酸固定, 然后扫描。

参照章骏德等 (1982) 方法测定过氧化物酶活性。

## 结果与分析

### 1. 不同海拔高度对矮嵩草叶片中的过氧化物酶同工酶的影响

试验结果表明, 生长在三个不同海拔高度地区的同种矮嵩草叶片的过氧化物酶同工酶谱具有明显的差别。其中, 酶谱带随海拔的升高逐渐减少, 并且, 迁移率较快的个别酶带活性减弱。如图1所示, 在草返青后期 (6月25日), 西宁地区的矮嵩草叶片过氧化物

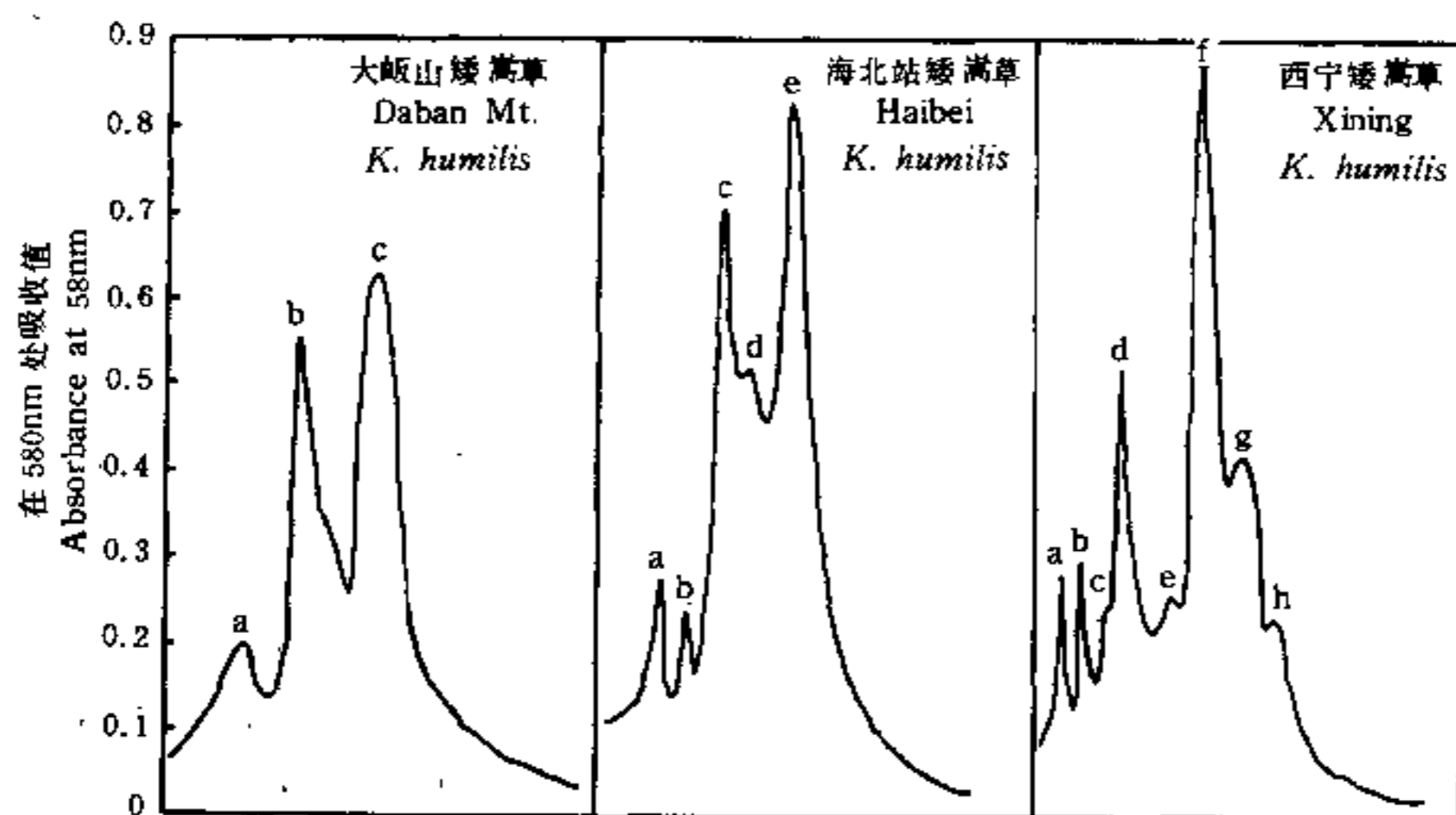


图1 返青后期不同海拔矮嵩草叶片过氧化物酶同工酶的电泳谱带扫描

Fig. 1 Scans of Electrophoresis for Peroxidase Isoenzyme of *K. humilis*

Leaves at different altitude during late green up

酶同工酶有8条酶带; 海北站地区的有5条酶带; 大坂山的出现3条酶带。三者相比, 海拔200米地区的植株叶组织中出现的b、c、e、g及h 5条酶带在海拔4000米处的酶谱的相应

位置中完全消失，而在海拔3 200米处的酶谱的相应位置中只消失了2 200米处叶组织中所出现的c、g和h 3条酶带。即高海拔地区比低海拔地区减少了3—5条酶带。同时也表明，酶谱带的迁移率在高海拔的植株叶组织中则表现较慢，而在低海拔的植株叶组织中则表现较快。

图2是不同海拔矮嵩草在草盛期（8月24日）叶片过氧化物酶同工酶酶谱的扫描。从图2可见，西宁、海北站和大岷山等地区的植株叶组织中分别明显出现9条，6条和5条酶带。后者的同工酶酶带分别比前两者的少4条酶带和1条酶带。其中大岷山植株叶片酶谱中出现的b和c两条酶带在海北站植株叶片酶谱的同一位置上已消失。而在海北站植株叶片中出现的新酶带d、e和f在大岷山植株叶片中均已消失。在西宁植株叶片的酶谱中，迁移率较快的f、g、h和i酶带在大岷山植株叶片中也已完全消失。

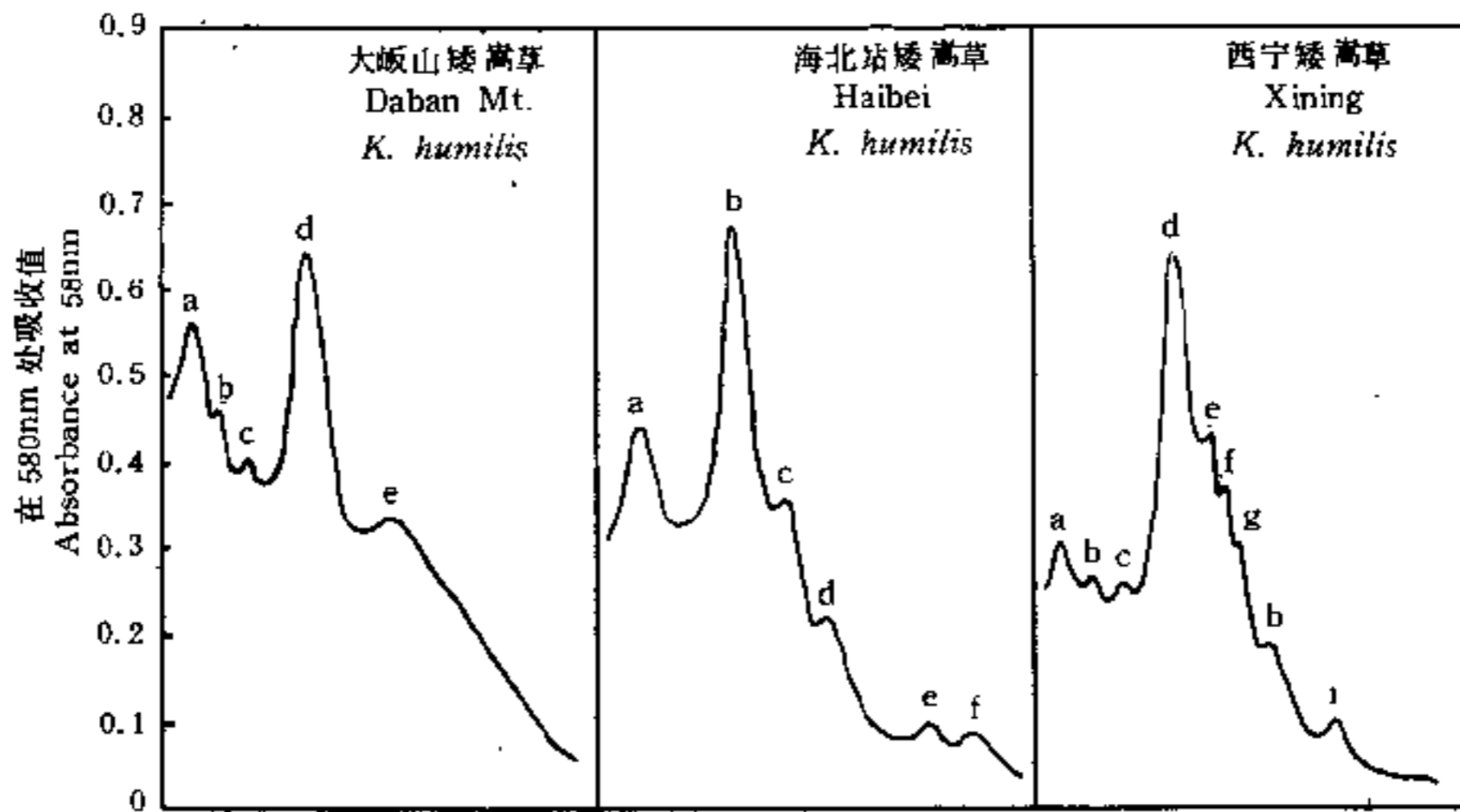


图2 草盛期不同海拔矮嵩草叶片过氧化物酶同工酶的电泳谱带扫描  
Fig. 2 Scans of electrophoresis for Peroxidase Isoenzyme of *K. humilis*  
Leaves at different altitude during exuberance

在牧草生长后期（10月3日），三个地区植株叶片的同工酶酶谱如图3所示，不论是较低海拔的植株，还是高海拔的植株，其同工酶谱带数都趋于减少。如生长在西宁地区的出现5条酶带；海北站地区的出现4条酶带，大岷山的只出现3条酶带。但是，酶谱的变化趋势与返青后期和草盛期的变化规律一致，大岷山植株叶片的同工酶酶带分别比海北站和西宁的少1条酶带（d）和2条酶带（d和e）。

## 2. 不同海拔地区矮嵩草叶片过氧化物酶活性的变化

测定结果表明，矮嵩草的叶片过氧化物酶活性变化规律为高海拔地区大于较低海拔地区。特别是草盛期，叶片的过氧化物酶活性随海拔高度升高而明显增强。如表2指出，在

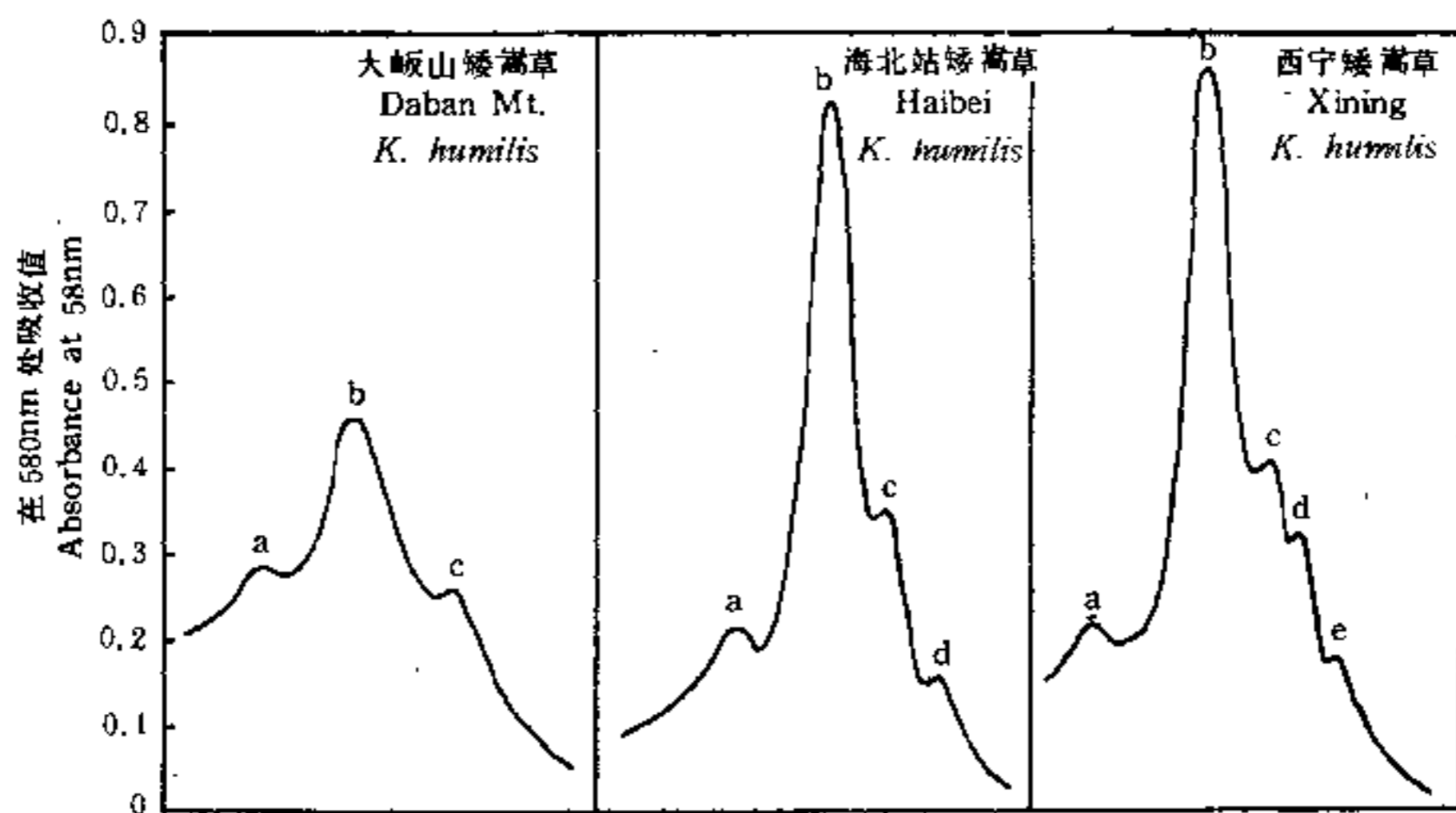


图3 生长后期不同海拔矮嵩草叶片过氧化物酶同工酶的电泳谱带扫描  
 Fig. 3 Scans of electrophoresis for peroxidase isoenzyme of *K. humilis* leaves at different altitude during late growth

草返青后期,草盛期和草生长后期三个不同生长期,海北站和大阪山植株叶片的过氧化物酶活性平均比西宁的分别高37.9%、125.5%和51.2%。随着生育期和生长季节进程,三个不同海拔地区植株叶片的过氧化物酶活性均开始降低,且仍存在差异。这种变化趋势与矮嵩草生长地区的海拔高度有密切关系。

表2 不同海拔地区矮嵩草叶片过氧化物酶活性变化  
 Table 2 Changes of the peroxidase activity in *K. humilis* leaves of different altitude

| 项 目<br>Item                              | 过氧化物酶活性[单位:愈创木酚/(克鲜重·小时)]<br>Activity of Peroxidase [Unit: Guaiacol/g FW·h] |                                    |                                     |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
|                                          | 返青后期(6月25日)<br>Late green up (June, 25)                                     | 草盛期(8月24日)<br>Exuberance (Aug. 24) | 生长后期(10月3日)<br>Late growth (Oct. 3) |
| 西宁(2 200m) Xining                        | 34.2±3.10                                                                   | 20.2±2.13                          | 16.9±1.82                           |
| 海北定位站(3 200m)<br>Haibei research station | 41.3±2.2                                                                    | 30.1±1.62                          | 23.8±3.0                            |
| 大阪山(4 000m) Daban Mt.                    | 52.9±3.1                                                                    | 61.0±2.32                          | 27.3±1.93                           |

### 3. 不同海拔地区矮嵩草叶片酯酶同工酶的变化

图4指出,矮嵩草叶片中酯酶同工酶酶谱的分布与过氧化物酶同工酶谱的分布情况不

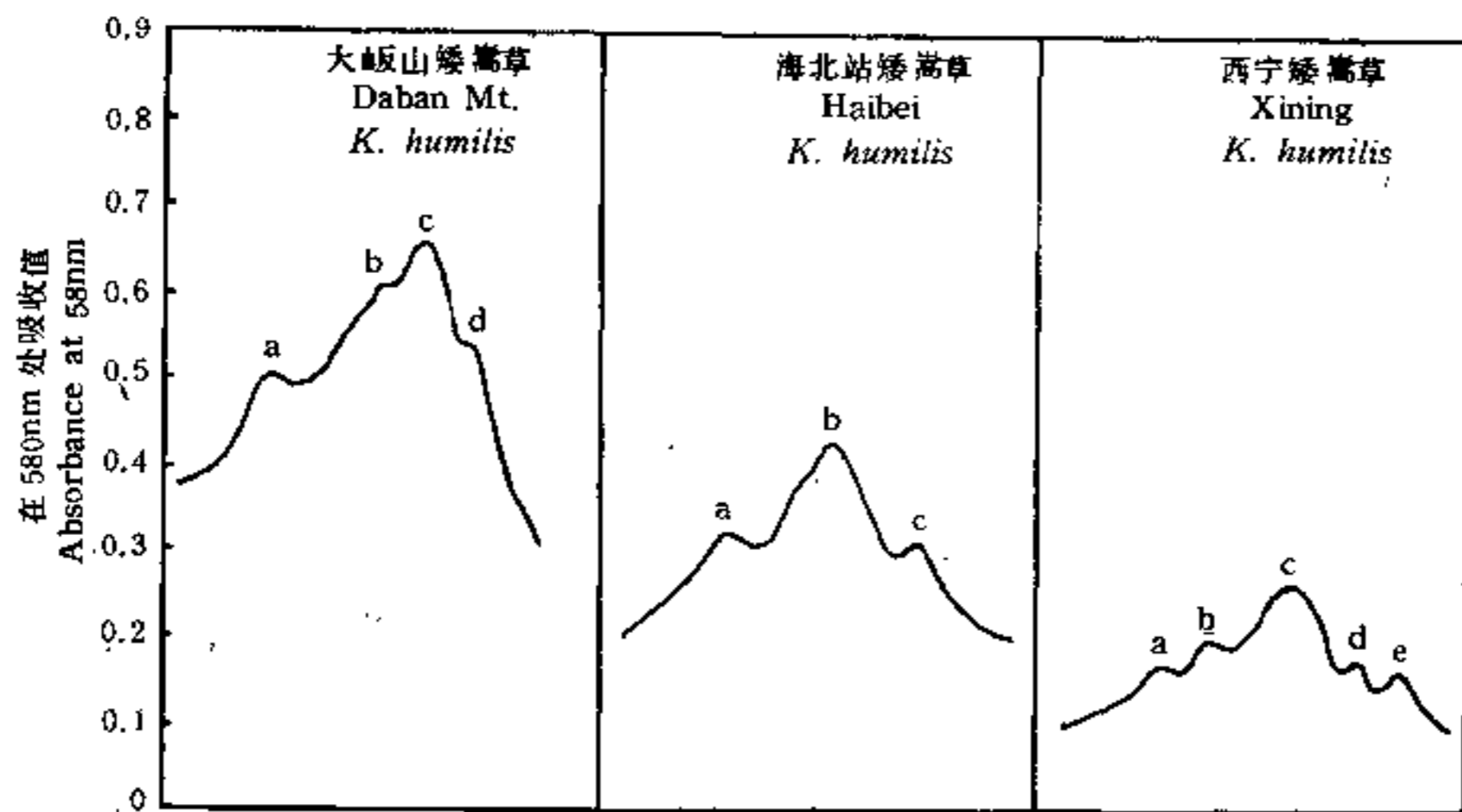


图4 不同海拔矮嵩草叶片酯酶同工酶的电泳谱带扫描  
fig. 4 Scans of electrophoresis for esterase isoenzyme of *K. humilis* leaves in different altitude

同, 西宁、海北定位站和大坂山不同海拔地区的矮嵩草叶片酯酶同工酶分别出现5条、3条和4条酶带。不论是草返青期, 还是在生长后期, 同工酶谱带均无明显变化, 但在高海拔地区的酶活性明显增强, 低海拔地区的趋于降低。

## 讨 论

综上所述, 矮嵩草叶片组织中的过氧化物酶和酯酶同工酶酶谱以及酶活性存在多样性, 这与其对环境变化的适应性有关。植物的抗寒性乃是植物为适应低温胁迫而诱导体内相应酶系统和代谢过程改组的结果 (陈贻竹, 1989; 刘鸿先等, 1981; 杨肇驯等, 1981; Kovacs 等, 1978)。本文结果已表明不同海拔地区矮嵩草叶片中的过氧化物酶同工酶谱带数和酶活性明显受到海拔高度的影响。随着海拔升高相应会引起气温、气压、二氧化碳和氧气含量下降, 辐射增强从而导致了植株叶片组织中的酶活性增强与同工酶酶带减少, 矮嵩草的这种生理生化反应对适应高寒环境的不良温度、气压和辐射等的胁迫可能是相当重要的。从过氧化物酶和酯酶的同工酶可以看出, 酶带数量减少而存留的酶带位置则未明显改变, 说明其各有自己特有的酶谱带, 这可能与青藏高原地形演变, 经长期自然选择形成自己独特的基因表达类型有关。由于同工酶谱出现多样性变化, 无疑是矮嵩草对青藏高原高寒低温胁迫生境适应的结果。

## 参 考 文 献

王为义, 1985, 高山植物结构特异性的研究, 高原生物学集刊, 第4集, 19—32。

- 王为义, 1990, 垫状植物对青藏高原高山环境形态——生态学适应的研究. 高原生物学集刊. 第9集, 13—26.
- 王勋陵、王 静, 1989, 植物形态结构与环境. 105—138, 兰州大学出版社.
- 王启基、杨福圃, 1985, 高寒草甸 C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>植物叶片解剖特征的初步研究. 高原生物学集刊. 第4集, 1—12.
- 刘鸿光、曾韶西、李 平, 1981, 植物抗寒性与酶系统多态性的关系. 植物生理通讯. 6: 6—11.
- 张庆朝, 1993, 同工酶的种类与生理功能. 生命的化学. 13 (6): 18—20.
- 杨永昌, 1976, 青海的高草属植物. 植物分类学报. 14 (1): 41—50.
- 杨肇驯、王文宏、谭克辉, 1981, 冬小麦幼苗春化期间过氧化物酶的变化. 植物生理学报. 7 (4): 311—316.
- 陈庆诚, 1966, 甘肃省祁连山东段一些高山植物的形态——生态学特征的观察. 植物生态学与地植物学丛刊. 4 (1): 39—64.
- 陈贻竹, 1989, 低温对植物叶片中超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶水平的影响. 植物生理学报. 14 (4): 323—328.
- 吴少伯, 1979, 植物蛋白质及同工酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳. 植物生理通讯. 1: 30—33.
- 季 成、王崇效、余叙文, 1989, 凤眼莲超氧化物歧化酶活性与抗寒性的关系. 植物生理学报. 15: 133—137.
- 周广泰、刘凤琴、韦梅琴, 1992, 青海高寒地区50种植物解剖特点的研究. 全国高原植物生理学术讨论会论文摘要汇编. 45—46.
- 周兴民, 1982, 青藏高原嵩草 (*Kobresia*) 草甸的基本特征和主要类型. 高原生物学集刊. 第1集, 151—160.
- 周兴民, 1979, 青藏高原嵩草属 (*Kobresia*) 八种植物的形态——生态学特性的初步研究. 植物学报. 21 (2): 135—142.
- 章骏德、刘国屏、施水宁、高 芳, 1982, 植物生理实验法. 30—33, 江西人民出版社.
- 沈征言、简会成, 1991, 低温锻炼对黄瓜幼苗几种酶活性的影响. 植物学报. 33 (8): 627—632.
- Davis B. J., 1964, Disc Electrophoresis. I. Method and Application to Human Serum Proteins. Ann Nrr Acad Sci 121: 402—427.
- Frank K., 1990, Environmental Injury to Plants. 1—58, Academic Press, New York.
- Kovacs I., Fejer, O., Davay, M., 1980, Cold induced changes in the peroxidase multiple enzyme pattern in winter wheat cultivars during the hardening period, Biochem. Physiol. 173: 327—332.
- Moss D. W., 1982, Isoenzymes. 39—182, New York, Chapman and Hall.
- Pearse A. G., 1960, An improved Benzidine-peroxidase reaction. Histochemistry, 903—904.

# STUDIES ON THE PHYSIOLOGICAL- BIOCHEMICAL BASE OF PLANT RESISTANCE IN QINGHAI- XIZANG PLATEAU

## I. THE EFFECT OF DIFFERENT ALTITUDE ON ISOPEROXIDASE, ISOESTERASE AND ITS ENZYME ACTIVITIES IN *Kobresia humilis* LEAVES

Han Fa    Ben Guiying    Zhang Shuyuan    Shi Shengbo    Wu Hai

(Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences)

### Abstract

The isoenzyme of peroxidase and esterase and its enzyme activities in the *Kobresia humilis* leaves organization at different altitude (2,200m, 3,200m and 4,000m above sealevel) were studied. The results showed as follow:

The isoenzyme of peroxidase exhibited significant difference among three different altitude, the number of isoenzyme bands varied with altitude rise. The number of isoenzyme bands of peroxidase at 4,000m were less 2 and 5 enzyme bands than 3,200m and 2,200m during late green up, respectively. The former were less 1 and 4 enzyme bands than latter during exuberance; and the former were less 1 and 2 enzyme bands than latter during late growth respectively (see fig. 1, 2, 3). The enzyme activity increased strength obviously with rise of altitude.

The isoenzyme bands of esterase were no change obviously neither grass green up nor late growth. But the activity of esterase presented strong in the high altitude, and it trended decrease in the low altitude. The experimental results indicated that change of the number of isoenzyme band and the activities of the two enzymes in the leaves was closely related to the different altitude of the productive area of *K. humilis*.

**Key words:** *Kobresia humilis*; Isoenzyme; Altitude