

高温胁迫下红色与绿色苋菜叶抗氧化能力的比较

邵玲¹, 李芸瑛¹, 吴晓莉¹, 彭长连^{2,*}

¹肇庆学院生命科学学院, 广东肇庆 526061; ²华南师范大学生命科学学院, 广州 510631

摘要: 研究40 °C高温下连续处理6 d的紅葉苋和綠葉苋葉中抗氧化能力的結果表明: 高溫胁迫下, 两种苋菜葉中总酚含量相近, 紅葉苋的苋菜紅素和类黄酮含量显著大于綠葉苋, 两者的抗氧化酶活性都下降, 超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化差异不大, 但紅葉苋的抗坏血酸过氧化物酶(APX)和过氧化氢酶(CAT)活性下降幅度比綠葉苋小, 其葉中H₂O₂积累较少, 总葉綠素含量较高, 热害指数也低于綠葉苋。

关键词: 高温胁迫; 苋菜; 苋菜紅素; 抗氧化能力

Comparison on Antioxidative Capability in Leaves of Red and Green Amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) under High Temperature Stress

SHAO Ling¹, LI Yun-Ying¹, WU Xiao-Li¹, PENG Chang-Lian^{2,*}

¹College of Life Science, Zhaoqing University, Zhaoqing, Guangdong 526061, China; ²College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Abstract: Antioxidative capability in leaves of two cultivars of *Amaranthus tricolor* (red and green leaf) was investigated by high temperature (40 °C) treatment for 6 d. The results showed that the contents of total phenolics were similar between two cultivars of amaranth under high temperature stress. However, contents of amaranthin (one type of betacyanins) and flavonoids increased more remarkably in red cultivar than in green cultivar. Activities of three antioxidases in both cultivars decreased, no much difference was found in the alteration of superoxide dismutase (SOD) activity between two cultivars, but compared to activities of ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) in green cultivar, activities of APX and CAT in red cultivar slightly decreased. In comparison with the green one, less accumulation of H₂O₂ in leaf tissue and higher chlorophyll content were observed in red cultivar. Hence, the heat injury index of red cultivar was obviously lower than that of green cultivar.

Key words: high temperature stress; *Amaranthus tricolor*; amaranthin; antioxidative capability

苋菜紅素(amaranthin)是一种紫红色的水溶性色素, 存在于植物细胞的液泡中。它与花色素苷(anthocyanins)有所不同, 是一种含氮的次生代谢产物, 类似甜菜素(betalain)为代表的酮类和醌类衍生物色素, 属于甜菜素类中的甜菜紅素(betacyanins)亚型, 主要分布于苋科(Amaranthaceae)苋属(*Amaranthus*)植物红色的根、茎、叶中(Cai等1998; Ptushenko等2002)。

近年来的一些研究指出, 甜菜紅素具有与花色素苷相类似的抗氧化性能(Stintzing和Carle 2004)。甜菜紅素分子结构芳香环上丰富的不饱和双键是决定其抗氧化能力的主要特征。Vogt等(1999)用高强度紫外线处理冰叶日中花(*Mesembryanthemum crystallinum*)植物显示, 甜菜紅素在叶子表皮细胞的液泡中快速积累, 说明甜菜紅素可作为紫外线的过滤器保护植物免受或降低紫外线的伤害。Sepulveda-

Jimenez等(2004)通过采用外源H₂O₂注射到甜菜的叶片中, 同样很快诱导了甜菜紅素的合成, 有效降低了逆境所导致的植物体内的氧化胁迫。同时, 体外实验也表明, 提纯的甜菜紅素具有明显的清除氧自由基和羟自由基的能力, 其清除羟自由基的效果明显强于维生素C(王长泉等2007)。以上研究说明甜菜紅素可能参与了植物体内的抗氧化过程。但迄今涉及活体植物中甜菜紅素抗氧化功能的报道还不多, 值得深入研究。为此, 本文以南方常见的富含一类甜菜紅素(苋菜紅素)的两个苋菜栽培品

收稿 2008-06-30 修定 2008-09-09

资助 国家自然科学基金(30770173)和肇庆学院科研项目(0415)。

致谢 中国科学院华南植物园植芳研究员对本文提供帮助。
* 通讯作者(E-mail: pengchl@scib.ac.cn; Tel: 020-85217612)。

种——红叶苋菜和绿叶苋菜为材料,比较40 高温胁迫下两者抗氧化能力的差异,探讨苋菜红素在高温胁迫中可能的生理作用。

材料与amp;方法

苋菜(*Amaranthus tricolor* L.)品种为肇庆市蔬菜基地主栽的‘新选红叶苋’和‘严选青叶苋’,种子由南海市大沥江志清种子公司提供,于本院生物园盆栽种植后用于试验。植株生长到4~5片叶时(约35 d),选取生长状态和盆栽株数一致的幼苗置于光强 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光周期12 h/12 h(光/暗)、湿度为60%的LRH-800-G型光照培养箱(广东省医疗器械厂生产)中昼夜进行40 全株高温胁迫处理6 d。处理过程中,参考尹贤贵等(2001)文中的方法调查苋菜植株的热害指数,植株分级标准为:植株外观正常者为0级;叶片轻度褪绿反卷者为1级;叶片发黄中度萎焉者为2级;叶片泛白萎焉者为3级;植株茎萎缩和叶大部分萎焉者为4级;整株萎焉干枯者为5级。热害指数 $=\frac{(1\times S_1+2\times S_2+3\times S_3+4\times S_4+5\times S_5)}{(5\times \text{总株数})}\times 100\%$,式中,S表示受高温热害相应级别的株数。每2 d观察统计一次,同时随机剪取自顶部向下数的第3~4位成熟叶片测定各种生理指标。试验重复4~5次。

苋菜红素含量测定参考Stintzing等(2002)文中的方法,用岛津UV-2550紫外分光光度计(下同)测定。用丙酮提取法测定总叶绿素的含量(张志良和瞿伟菁2003)。总酚、类黄酮的测定按Fukumoto和Mazza(2000)文中的方法。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)采用Giannopolitis和Ries(1977)文中方法测定。参考曾韶西等(1991)文中的方法测定抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)和过氧化氢酶(catalase, CAT)的活性。用彭长连等(2000)文中的方法测定叶的总抗氧化能力,以清除二苯基苦基苯肼自由基(DPPH·)的百分率表示。参考Lu和Higgins(1998)文中的方法进行叶圆片中 H_2O_2 组织化学定位。分别从40 热胁迫6 d和常温对照的植株中选取第4位叶片,用直径为1.5 cm的打孔器避开主叶脉截取叶圆片,迅速浸入 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的2-氨基联苯胺(2-diaminobenzidine, DAB)溶液中,真空抽气10 min,暗下放置8 h,然后在80 的恒温水浴锅中用75%乙醇除去色素,脱色后立即拍照。

所有数据测定均重复3次,用SPSS统计分析软件分析数据间的显著性差异。

结果与amp;讨论

1 高温胁迫下两种苋菜热害指数的变化

高温处理下,苋菜植株新出叶反卷,叶色发黄褪绿,红叶和绿叶苋两者均出现不同程度的热害症状。热害指数是一种常见的鉴定作物耐热性的指标。从图1可见,随着高温胁迫时间的延长,两个品种的热害指数不断升高。处理后6 d的绿叶苋和红叶苋的热害指数分别为60.6%与44.7%,两者热害指数差异达到 $P<0.01$ 的显著水平,显示红叶苋对高温胁迫的耐受性较强。

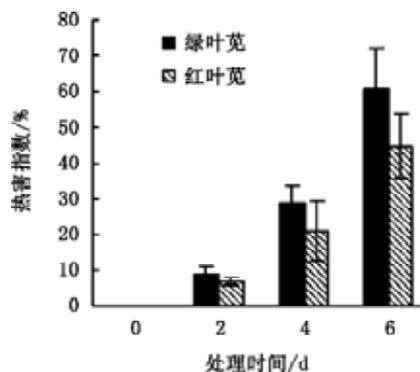


图1 高温胁迫下两种苋菜热害指数的变化

Fig.1 Changes in heat injury index between two amaranth cultivars under high temperature stress

2 高温胁迫对苋菜红素、叶绿素、总酚和类黄酮含量的影响

表1显示,持续高温诱导红叶苋中苋菜红素的大量合成,而绿叶苋叶中苋菜红素含量呈递减趋势,高温处理后6 d的红叶苋苋菜红素含量是绿叶苋的2.51倍。同时,胁迫过程中红叶苋叶绿素的降解量明显少于绿叶苋。据此推测高温处理后红叶苋中苋菜红素含量的提高可能是叶片耐热性增高的原因。

此外,类黄酮和总酚是一类存在于植物体内清除活性氧的抗氧化物质。从表2可见,相同胁迫天数内两种苋菜总酚含量差异不大,类黄酮的含量变化明显大于总酚,第4和第6天时红叶苋的类黄酮含量与绿叶苋相比达到极显著水平($P<0.01$),红叶苋中类黄酮含量较高对清除体内自由基是有利的。

表1 高温胁迫下两种苋菜叶中苋菜红素和总叶绿素含量的变化

Table 1 Changes in amaranthin and total chlorophyll contents in leaves of two amaranth cultivars under high temperature stress

品种	苋菜红素含量 / A_{538} ·(100 mg) ⁻¹ (FW)				总叶绿素含量 /mg·g ⁻¹ (FW)			
	0 d	2 d	4 d	6 d	0 d	2 d	4 d	6 d
绿叶苋	0.202±0.007	0.174±0.002	0.149±0.001	0.167±0.005	1.89±0.03*	1.45±0.01	1.01±0.06	0.92±0.25
红叶苋	0.273±0.010*	0.251±0.014*	0.373±0.022**	0.417±0.028**	1.61±0.17	1.27±0.03	1.32±0.14*	1.10±0.29

*和**分别表示同列数据差异达 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 显著水平。

表2 高温胁迫下两种苋菜叶中总酚和类黄酮含量的变化

Table 2 Changes in the total phenolics and flavanoid contents in leaves of two amaranth cultivars under high temperature stress

品种	总酚含量 / A_{280} ·(100 mg) ⁻¹ (FW)				类黄酮含量 / A_{325} ·(100 mg) ⁻¹ (FW)			
	0 d	2 d	4 d	6 d	0 d	2 d	4 d	6 d
绿叶苋	1.25±0.003	1.34±0.001	1.83±0.004	1.69±0.012	1.67±0.021	3.52±0.034	3.83±0.017	2.26±0.036
红叶苋	1.41±0.008	1.47±0.003	1.89±0.017	1.76±0.008	2.01±0.088*	3.88±0.015*	4.57±0.023**	3.30±0.067**

*和**分别表示同列数据差异达 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 显著水平。

3 高温胁迫下两种苋菜叶中的抗氧化酶活性和总抗氧化能力变化

高温逆境导致植物体内氧化胁迫加剧而产生大量自由基。H₂O₂ 和 O₂^{·-} 是叶绿体和线粒体产生的主要活性氧, 植物清除 O₂^{·-} 的酶主要是 SOD, 而清除 H₂O₂ 的任务则由 CAT 和 APX 完成(徐志防等 1999)。从两种苋菜抗氧化酶的活性变化可知(图 2), 高温胁迫前期(2 d), SOD、APX 和 CAT 的活性呈上升趋势, 随后迅速下降。其中, 红叶苋和绿叶苋对 O₂^{·-} 自由基的清除能力相近, 两者 SOD 活性只在处理 2 d 时有差别。但高温处理下红叶苋的 APX 和 CAT 活性一直明显高于绿叶苋, 显示出红叶苋对 H₂O₂ 的良好清除作用。

此外, 有报道认为, 植物叶片对有机自由基

DPPH·清除率的大小是评价植物总抗氧化能力的指标(彭长连等 2000)。高温胁迫前期, 两种苋菜叶片的 DPPH·清除率相近(图 3)。随着高温处理时间的延长, 红叶苋总抗氧化能力维持较高的水平, 第 6 天时其对 DPPH·的清除率仍达到 46.1%, 而绿叶苋则在胁迫 2 d 后呈下降趋势, 第 6 天时总抗氧化能力仅为 35.7% 左右。

4 高温胁迫下两种苋菜叶中产生的H₂O₂组织化学定位

Lu 和 Higgins (1998)指出, 在过氧化物酶作用下, DAB一旦与H₂O₂接触就会迅速形成不溶于乙醇的红褐色聚合物(DAB-H₂O₂)沉淀。因此, 采用DAB染色法可以比较直观和专一地分析热胁迫下苋菜叶中H₂O₂的存在部位和相对含量。从图 4-a 和 b 可

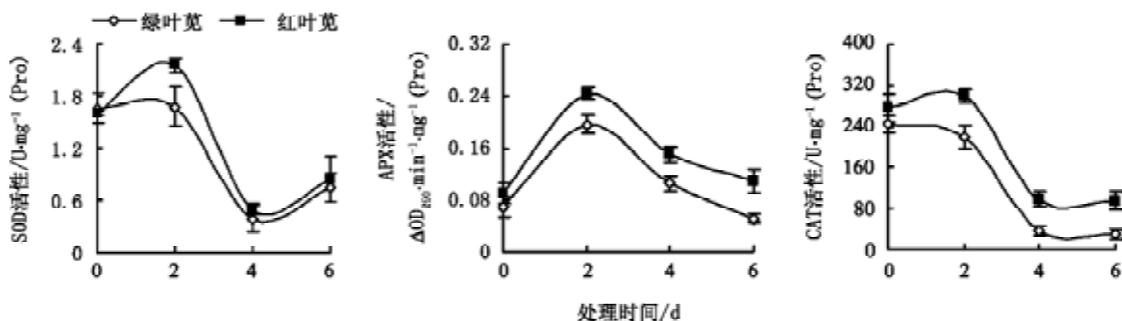


图2 高温胁迫对两种苋菜叶片中SOD、APX和CAT活性的影响

Fig.2 Effects of high temperature on the activities of SOD, APX and CAT in leaves of two amaranth cultivars

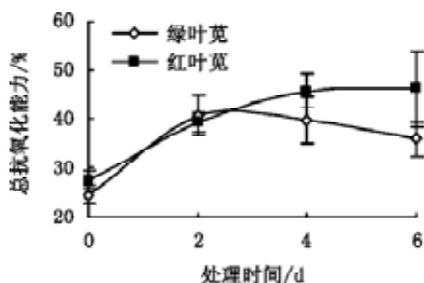


图3 高温胁迫下两种苋菜叶片总抗氧化能力的变化
Fig.3 Changes in total antioxidant capacity in leaves of two amaranth cultivars under high temperature stress

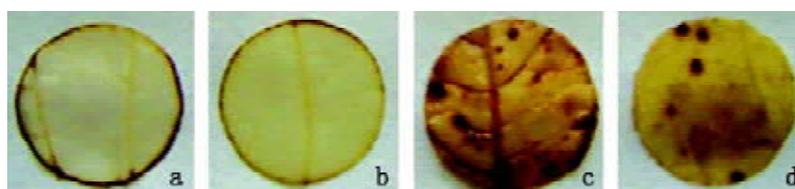


图4 高温胁迫下两种苋菜叶圆片中DAB-H₂O₂复合物的定位
Fig.4 Localization of DAB-H₂O₂ complex in leaf discs of two amaranth cultivars under high temperature stress
a: 绿叶苋(对照); b: 红叶苋(对照); c: 绿叶苋(高温); d: 红叶苋(高温)。

的变化是一致的。

植物体内活性氧的清除由酶促和非酶促两大系统完成。高温胁迫诱导红叶苋叶中苋菜红素积累及较高的抗氧化酶活性水平, 增强了植株的抗氧化能力, 降低活性氧的积累。从比较两种叶片的热害指数、苋菜红素含量与组织中的H₂O₂水平的结果推测, 红叶苋较好的抗热性可能与其具有较高的苋菜红素含量相关, 这类甜菜红素的迅速合成及其抗氧化功能的发挥缓解了高温下抗氧化酶系统失活及细胞损伤的可能性。

参考文献

林植芳, 彭长连, 徐信兰, 林桂珠, 张景六(2004). 两个新的水稻缺叶绿素突变体光合作用的热稳定性. 中国科学(C 辑), 34 (5): 395~401
彭长连, 陈少薇, 林植芳, 林桂珠(2000). 用清除有机自由基 DPPH 法评价植物抗氧化能力. 生物化学与生物物理进展, 27 (6): 658~661
王长泉, 赵吉强, 陈敏, 王宝山(2007). 过氧化氢参与了黑暗诱导的盐地碱蓬叶片甜菜红素积累. 植物生态学报, 31 (4): 748~752
徐志防, 罗广华, 王爱国, 陈贻竹(1999). 光合作用的光抑制与光合器官的活性氧代谢. 植物生理学通讯, 35 (4): 325~331
尹贤贵, 罗庆熙, 王文强, 张赞, 潘光辉, 杨琦凤, 尹诗麟(2001). 番茄耐热性鉴定方法研究. 西南农业学报, 14 (2): 62~65
曾韶西, 王以柔, 刘鸿先(1991). 低温光照下与黄瓜子叶叶绿素降低有关的酶促反应. 植物生理学报, 17 (2): 177~182

见, 未经高温胁迫处理的绿叶苋和红叶苋的叶圆片中红褐色聚合物的积累很少, 但经 40 °C 高温胁迫 6 d 后, 两种苋菜叶圆片的叶脉和叶肉组织上均可见到褐色物质沉淀(图 4-c 和 d)。其中, 红叶苋的叶圆片上斑点状沉淀物质相对较少, 颜色较浅(图 4-d), 而绿叶苋叶圆片上沉淀的红褐色聚合物多, 颜色也较深(图 4-c), 显示高温胁迫下叶组织中有 H₂O₂ 积累, 与林植芳等(2004)报道高温诱致水稻叶绿素 b 突变体叶片产生 H₂O₂ 的结果相似。绿叶苋叶中 H₂O₂ 的积累量大于红叶苋, 这与上述几种生理指标

张志良, 瞿伟菁(2003). 植物生理学实验指导. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 52~59
Cai YZ, Sun M, Wu HX, Huang RH, Harold C (1998). Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. J Agr Food Chem, 46 (6): 2063~2070
Fukumoto LR, Mazza G (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. J Agr Food Chem, 48: 3597~3604
Giannopolitis CN, Ries SK (1977). Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol, 59 (2): 309~314
Lu H, Higgins VJ (1998). Measurement of active oxygen species generated *in planta* in response to elicitor AVR9 of *Cladosporium fulvum*. Physiol Mol Plant Pathol, 52 (1): 35~51
Ptushenko VV, Gins MS, Gins VK, Tikhonov AN (2002). Interaction of amaranthin with the electron transport chain of chloroplasts. Russ J Plant Physiol, 49 (5): 585~591
Sepulveda-Jimenez G, Rueda-Benitez P, Porta H, Rocha-Sosa M (2004). Betacyanin synthesis in red beet (*Beta vulgaris*) leaves induced by wounding and bacterial infiltration is preceded by an oxidative burst. Physiol Mol Plant Pathol, 64: 125~133
Stintzing FC, Carle R (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. Trends Food Sci Tech, 15 (1): 19~38
Stintzing FC, Schieber A, Carle R (2002). Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. Food Chem, 77: 101~106
Vogt T, Ibdah M, Schmidt J, Wray V, Nimtz M, Strack D (1999). Light-induced betacyanin and flavonol accumulation in bladder cells of *Mesembryanthemum crystallinum*. Phytochemistry, 52 (4): 583~592