

2,4-表油菜素内酯对低温胁迫下 辣椒幼苗抗氧化系统的影响

杨 萍, 李 杰

(红河学院 生命科学与技术学院, 云南 蒙自 661100)

摘 要:以辣椒品种“湘研 16 号”为试材,采用人工气候箱模拟低温环境,研究了 2,4-表油菜素内酯(EBR)对低温胁迫下辣椒幼苗体内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性以及抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)含量的影响,以期为油菜素内酯调控辣椒幼苗耐低温胁迫的机理研究提供参考依据。结果表明:抗氧化酶(SOD、POD、CAT、APX)活性在低温胁迫下高于 CK,而 EBR 处理的叶片酶活性显著增加。同时,EBR 提高了低温胁迫下辣椒幼苗叶片中抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)含量,降低了 MDA 含量。由此可见,EBR 能显著增加保护酶活性和非酶抗氧化物的含量,增强植株抗氧化能力,有效缓解低温胁迫引起的膜脂过氧化伤害,降低了低温胁迫对辣椒幼苗生长的抑制作用。

关键词:2,4-表油菜素内酯;低温胁迫;辣椒幼苗;抗氧化系统

中图分类号:S 641.301 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)21-0007-06

辣椒(*Capsicum annuum* L.)属喜温性蔬菜,是中国主要的大宗蔬菜作物之一,也是设施栽培面积较大的蔬菜种类之一。辣椒生长适温为 25~28℃,夜间温度不可低于 12℃^[1]。生产上,特别是早春茬、秋延后及越冬等反季节设施栽培中,都会遭遇不同程度的低温伤害^[2]。近年来,我国设施蔬菜生产发展迅速,日光温室、大棚为我国当前主要的设施类型,主要用于寒冷季节的蔬菜生产。但由于日光温室和大棚等园艺设施环境调控能力较弱,蔬菜生产中常常遭受低温逆境危害。低温胁迫下植物细胞膜系统的损伤一方面是膜脂

发生相变所致,同时也与活性氧的积累和伤害(膜质过氧化)有关^[3-5]。

油菜素内酯已被确认为第 6 类植物激素^[6],对植物生长发育十分重要。张永平等^[7]用表油菜素内酯处理甜瓜幼苗,能增强甜瓜幼苗在高温胁迫下抗氧化酶活性,降低高温胁迫对甜瓜幼苗的抑制作用。惠竹梅等^[8]用表油菜素内酯处理低温胁迫下葡萄幼苗,结果表明,低温胁迫下,外源 EBR 处理可使葡萄叶片过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性升高,同时使葡萄叶片抗氧化物质谷胱甘肽(GSH)、抗坏血酸(AsA)含量升高。李玉华等^[9]研究在低温胁迫下 EBR 对高山离子芥幼苗叶片荧光特性和抗氧化系统的影响,结果 EBR 增强了高山离子芥幼苗的抗氧化防御能力,减轻了冷害对幼苗的伤害。目前有较多的研究关注 EBR 对逆境中辣椒的光抑制特性^[10]及光合速率^[11]的影响,对辣椒抗氧化系统的研究较少。因此,该研究以辣椒为试材,探讨低温胁迫下 EBR 对其抗氧化

第一作者简介:杨萍(1985-),女,博士,讲师,研究方向为作物逆境生理。E-mail:gsau123@163.com.

责任作者:李杰(1987-),男,博士,讲师,研究方向为设施作物栽培与环境调控。E-mail:gsau23@126.com.

基金项目:红河学院质量工程资助项目(JJG161012);红河学院创新创业资助项目(DCXL161023);国家重点研发计划资助项目(2016YFD030030705)。

收稿日期:2017-07-18

酶活性和抗氧化物含量的影响,以期利用 EBR 缓解辣椒低温胁迫提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试辣椒幼苗,品种为“湘研 16 号”(中晚熟,生长势强,不耐低温)。辣椒种子经消毒(0.4% KMnO_4 , 6 min)、浸种(4 h)、催芽后于营养钵(直径 9 cm,高 9 cm)中播种,每钵 1 株,基质为蛭石:珍珠岩=2:1(体积比)的混合基质。待幼苗子叶完全平展后开始用 1/2 Hoagland 营养液(EC 值为 $1.71 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$)浇灌,每次 100 mL,以后每隔 3 d 左右浇灌 1 次,常规管理。

1.2 试验方法

试验共设 4 个处理:1)CK(昼/夜温度为 $25/15^\circ\text{C}$,光照 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$);2)CK+EBR;3)L(昼/夜温度为 $15/5^\circ\text{C}$,光照 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$);4)L+EBR。待幼苗长至 6~7 片真叶时,于每天 08:00 用 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EBR(浓度通过预备试验筛选得到)进行叶面喷施(叶面滴水为止),为增强 EBR 吸收效果,喷施液中加入 0.04%吐温 80,连续喷施 3 d 后放入 RZX 型人工智能气候箱进行处理,每个处理 20 株幼苗,重复 3 次。光照时数 12 h,空气相对湿度保持 70%~80%。

1.3 项目测定

1.3.1 株高和茎粗的测量

株高用卷尺测量,茎粗用游标卡尺测量。

1.3.2 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定

采用氮蓝四唑(NBT)法测定^[12]。以不照光的对照管(以缓冲液代替酶液)作空白,测定 560 nm 处的吸光值,SOD 活性单位以抑制 NBT 光还原 50%为一个酶活单位。

1.3.3 过氧化物酶(POD)活性的测定

采用愈创木酚法测定。取叶片 0.3 g 于冰冻研钵中,加 5 mL 预冷的 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液(pH 6.0)在冰浴上研磨成浆, 4°C 下, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,上清液即为粗酶液。在波长 470 nm 下记录 2 min 内吸光值的变化,用提取缓冲代替测定液测定 ΔOD_{470} ,以 OD_{470} 增加

1 为 1 个酶活单位。

1.3.4 过氧化氢酶(CAT)活性的测定

采用紫外吸收法测定。准确称取叶片 0.3 g,置研钵中,加入 2~3 mL 4°C 下预冷的、pH 7.8 的磷酸缓冲液和少量石英砂研磨成匀浆后,转入 25 mL 容量瓶中,用缓冲液洗研钵数次,合并冲洗液,并定容至刻度,混合均匀,在 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 15 min,取上清液 0.2 mL 加入 0.3 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 ,1.5 mL pH 7.8 磷酸缓冲液于 240 nm 波长下测定吸光度,CAT 活力以每分钟内 ΔOD_{240} 减少 0.1 的酶量为 1 个酶活性单位(U)。

1.3.5 抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性的测定

参照 NAKANO 等^[13]的方法测定。在 290 nm 下记录 1 min 内吸光度值的变化(减小),提取缓冲液代替测定液测定 ΔOD_{290} 。

1.3.6 抗坏血酸(AsA)、还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量的测定

参照 LAW 等^[14]的方法测定 AsA 含量。参照 GRIFFITH^[15]的方法测定 GSH 含量。参照李合生^[16]的方法测定 MDA 含量。

1.4 数据分析

应用 Excel 和 SPSS 软件,用 Duncan's 检验判断处理与对照叶片之间各项测定指标差异的显著性,当 $P < 0.05$ 时,处理与对照之间的差异为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗生长的影响

2.1.1 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗株高的影响

由图 1 可知,CK 与 CK+EBR 处理辣椒幼苗株高最大,分别为 11.7、12.2 cm;L 处理和 L+EBR 处理株高分别为 9.0、10.6 cm。L 和 L+EBR 处理分别显著低于 CK 及 CK+EBR,分别下降 23.08%、13.11%;L+EBR 较 L 处理亦差异显著,高出 17.78%。

2.1.2 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗茎粗的影响

由图 2 可知,CK 与 CK+EBR 处理辣椒幼苗茎粗最大,CK+EBR 处理与 CK 无显著差异;L 和 L+EBR 处理显著低于 CK,分别下降 9.41%、4.10%;L+EBR 显著高于 L 处理,高出 6.30%。

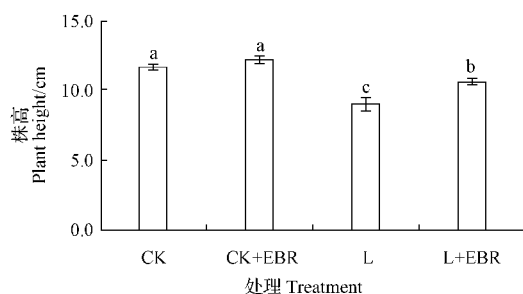


图 1 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗株高的影响

Fig. 1 Effect of EBR on plant height of pepper seedlings under chilling stress

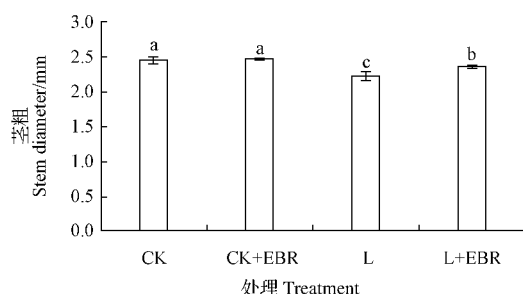


图 2 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗茎粗的影响

Fig. 2 Effect of EBR on stem diameter of pepper seedlings under chilling stress

2.2 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗叶片抗氧化酶活性的影响

2.2.1 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗叶片中超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

作为植物体内的一种保护酶,SOD 可以清除体内自由基的过多积累。由图 3 可知,L 与 L+EBR 处理的 SOD 活性最高,CK+EBR 处理与

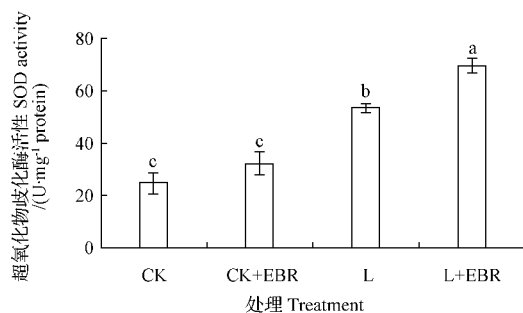


图 3 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗 SOD 活性的影响

Fig. 3 Effect of EBR on SOD activity of pepper seedlings under chilling stress

CK 间无显著差异,但 L 和 L+EBR 处理显著高于 CK,分别高出 116.16%、180.97%;L+EBR 较 L 亦差异显著,高出 29.98%。

2.2.2 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗叶片中过氧化物酶(POD)活性的影响

POD 是植物体内普遍存在的、活性较高的一种保护酶,它与光合作用、呼吸作用及生长素的等密切相关。由图 4 可知,L 与 L+EBR 处理的 POD 活性最大,CK+EBR 处理与 CK 无显著差异;L 和 L+EBR 处理显著高于 CK,分别高出 116.18%、185.17%;L+EBR 处理显著高于 L 处理。

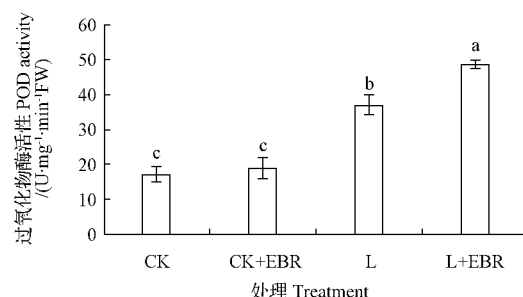


图 4 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗 POD 活性的影响

Fig. 4 Effect of EBR on POD activity of pepper seedlings under chilling stress

2.2.3 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗叶片中过氧化氢酶(CAT)活性的影响

CAT 普遍存在于植物体内的所有组织中,其活性与植物的代谢强度,抗逆能力有很大的关系。由图 5 可知,L 与 L+EBR 处理的 CAT 活性最高,CK+EBR 处理与 CK 无显著差异;L 和 L+EBR 处理显著高于 CK;L+EBR 处理显著高于 L 处理,高出 25.80%。

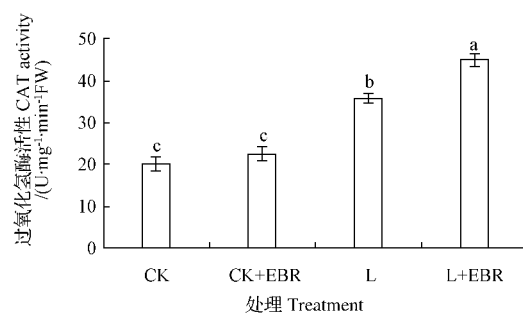


图 5 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗 CAT 活性的影响

Fig. 5 Effect of EBR on CAT activity of pepper seedlings under chilling stress

2.2.4 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗叶片中抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性的影响

APX 是细胞内清除活性氧的酶,其活性提高,可以使细胞内活性氧自由基产生速率显著下降。由图 6 可知,L 与 L+EBR 处理的 APX 活性最高,CK+EBR 处理与 CK 间无显著差异;L 和 L+EBR 处理显著高于 CK;L+EBR 处理显著高于 L 处理,高出 9.24%。

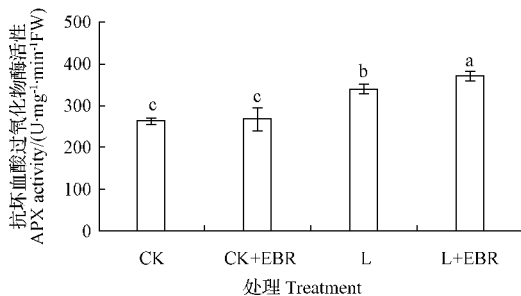


图 6 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗 APX 活性的影响

Fig. 6 Effect of EBR on APX activity of pepper seedlings under chilling stress

2.3 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗叶片中非酶物质含量的影响

2.3.1 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗叶片中抗坏血酸(AsA)含量的影响

由图 7 可知,L 和 L+EBR 处理对应的 AsA 含量最高,分别为 118.58、141.99 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,CK 与 CK+EBR 处理对应的 AsA 含量最低,分别为 72.98、71.84 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。低温胁迫(L)下,辣椒幼苗 AsA 的含量显著高于未经低温胁迫处理的对照(CK)。与低温胁迫(L)相比,L+EBR 处理

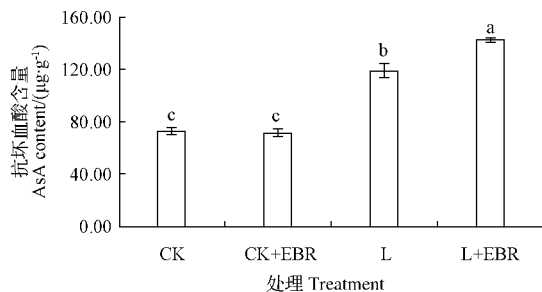


图 7 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗 AsA 含量的影响

Fig. 7 Effect of EBR on AsA content of pepper seedlings under chilling stress

AsA 含量显著提高了 19.74%;而在常温下 EBR 处理,AsA 的含量变化不显著。

2.3.2 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗叶片中谷胱甘肽(GSH)含量的影响

由图 8 可知,L 和 L+EBR 处理对应的 GSH 含量最高,CK 与 CK+EBR 处理对应的 AsA 含量最低。低温胁迫(L)下,辣椒幼苗 GSH 的含量显著高于 CK。与低温胁迫(L)相比,L+EBR 处理 GSH 的含量显著提高 13.37%;而 L+EBR 处理与 CK 相比,显著提高了 51.48%;而在常温下 EBR 处理时,GSH 的含量变化不显著。

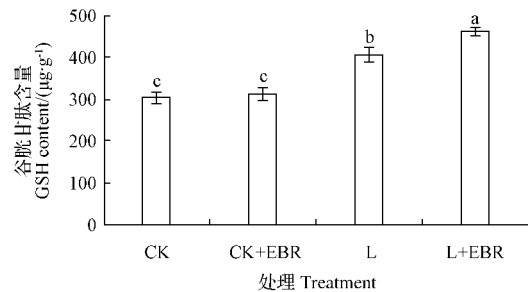


图 8 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗 GSH 含量的影响

Fig. 8 Effect of EBR on GSH content of pepper seedlings under chilling stress

2.4 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗叶片中丙二醛(MDA)含量的影响

由图 9 可知,低温条件下,辣椒幼苗 MDA 含量显著高于常温:L 处理比 CK 中 MDA 含量增加了 32.07%,L+EBR 处理比 CK+EBR 处理中 MDA 含量增加了 16.25%。低温条件下,喷施 EBR 能显著降低 MDA 含量;L+EBR 处理比 L 处理 MDA 含量降低了 16.12%。而常温条件下

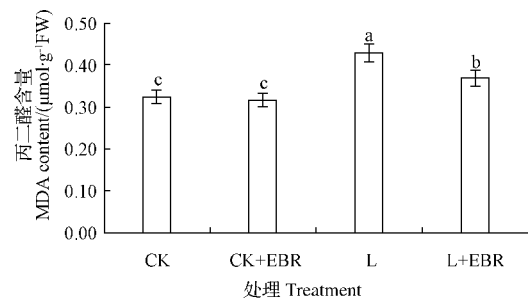


图 9 EBR 对低温胁迫下辣椒幼苗 MDA 含量的影响

Fig. 9 Effect of EBR on MDA content of pepper seedlings under chilling stress

喷施 EBR,其效果不显著。

3 讨论与结论

有研究表明,在非逆境条件下植物体内的自由基的产生和清除处于一种动态平衡,但是在逆境条件下,这种平衡就会被打破,就会产生大量自由基,植物就会受到很大的损伤^[17]。低温作为一种复杂的非生物胁迫,其可通过氧化胁迫影响作物的生理特性和生物化学过程。人们采用各种措施来减少非生物胁迫以便提高作物的产量。EBR 认为可以提高植物遭受一系列生物或者非生物胁迫耐受性。该试验结果表明,与单一低温处理相比,低温胁迫下喷施 EBR 能够显著增加辣椒的株高和茎粗(图 1、2)。另外,该研究还发现低温引起的对辣椒幼苗的不利生长可以通过喷施 EBR 来缓解。

氧化还原平衡在植物的生长代谢过程中起着非常重要的作用。逆境胁迫打破了植物体内的氧化还原平衡^[18]。植物暴露在低温下引起了活性氧的积累,导致植物的氧化伤害^[19]。在该试验中,低温下喷施 EBR 可以显著增强抗氧化酶活性,如 SOD、CAT、POD、APX 的活性(图 3~6),这些抗氧化酶在保护植株免受氧化伤害中起着很重要的作用,高山离子芥上也有类似的报道^[20]。学者们在黄瓜中的研究结果认为,EBR 介导的耐低温性与增加的编码抗氧化酶的基因表达有关,如 SOD、CAT、POD、GR 和 APX^[21]。尽管 EBR 与 ROS 被认为是植物响应逆境环境的第二信使,但它们之间在逆境胁迫中信号转导的关系仍不清楚。AsA、GSH 在植物抵御氧化胁迫中起着非常重要的作用^[22]。在该研究中,低温下喷施 EBR 具有较高的 AsA、GSH 含量,这就说明 EBR 能够通过增加 AsA、GSH 含量而增强辣椒清除 ROS 的能力。LIU 等^[20]研究表明,EBR 处理可以显著增加低温胁迫下高山离子芥愈伤细胞的 AsA、GSH 含量(图 7、8),进一步说明低温下喷施 EBR 增强了 APX 活性和 AsA、GSH 含量,认为 BRs 能够加强低温胁迫下辣椒叶片的 AsA-GSH 循环。同时,低温胁迫下增加 MDA 含量也说明了 ROS 对辣椒植株的伤害作用。但是,低温下喷施 EBR 能够减少 MDA 含量(图 9)。推断 EBR 或许能够保护细胞膜结构的完整性,在水稻

上的研究结果也支持该推论。然而,在正常温度条件下,无论是否喷施 EBR,抗氧化酶以及抗氧化剂含量均较低温处理下低,说明 BRs 在维持 ROS 的形成与 ROS 的解毒平衡中起着非常重要的作用。

综上所述,低温胁迫抑制了辣椒幼苗的生长,而 EBR 处理提高了辣椒幼苗中 SOD、POD、CAT、APX 的活性,以及 AsA、GSH 的含量,有效的降低了辣椒幼苗叶片膜质过氧化物 MDA 的含量,从而缓解了低温胁迫对辣椒幼苗的伤害作用,促进了植株的生长。

参考文献

- [1] 西尔力·阿不都热合曼. 大棚辣椒栽培要点[J]. 上海蔬菜, 2015(4):41.
- [2] 刘涛,郭世荣,徐刚,等. 5-氨基乙酰丙酸对辣椒植株低温胁迫伤害的缓解效应[J]. 西北植物学报, 2010, 30(10):2047-2053.
- [3] 王荣富. 植物抗寒指标的种类及其应用[J]. 植物生理学通讯, 1987(3):49-55.
- [4] WRIGHT M, SIMON E W. Chilling injury in cucumber leaves[J]. J Exp Bot, 1973, 24:400-411.
- [5] 郁继华,张国斌,冯致,等. 低温弱光对辣椒幼苗抗氧化酶活性与质膜透性的影响[J]. 西北植物学报, 2005, 25(12):2478-2483.
- [6] 赵敏橘. 油菜素内酯研究进展[J]. 植物学通报, 1995(12):30-33.
- [7] 张永平,杨少军,陈幼源. 2,4-表油菜素内酯对高温胁迫下甜瓜幼苗抗氧化酶活性和光合作用的影响[J]. 西北植物学报, 2011, 31(7):1347-1354.
- [8] 惠竹梅,王智真,胡勇,等. 2,4-表油菜素内酯对低温胁迫下葡萄幼苗抗氧化系统及渗透调节物质的影响[J]. 中国农业科学, 2013, 46(5):1005-1013.
- [9] 李玉华,雷志华,赵齐,等. 低温胁迫下 2,4-表油菜素内酯对高山离子芥幼苗叶片荧光特性和抗氧化系统的影响[J]. 郑州师范教育, 2013, 2(2):36-42.
- [10] DING H D, ZHU X H, ZHU Z W, et al. Amelioration of salt-induced oxidative stress in eggplant by application of 2,4-epibrassinolide[J]. Biologia Plantarum, 2012, 56(4):767-770.
- [11] MA Y H, GUO S R. 2,4-epibrassinolide improves cucumber photosynthesis under hypoxia by increasing CO₂ assimilation and photosystem II efficiency[J]. Photosynthetica, 2014, 52(1):96-104.
- [12] 王爱国,罗光华,邵从本. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究[J]. 植物生理学报, 1983, 9(1):77-84.
- [13] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. Plant Cell Physiology, 1981, 22:867-880.

- [14] LAW M Y, CHARLES S A, HALLIWELL B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts; The effect of hydrogen peroxide and of paraquat[J]. *Biochem J*, 1983, 210:899-903.
- [15] GRIFFITH O W. Determination of glutathione and glutathione disulphide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine[J]. *Anal Biochem*, 1980, 106:207-212.
- [16] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000:169-172.
- [17] 朱士龙, 郭世荣, 张爱慧, 等. NaCl 胁迫对西瓜嫁接苗叶片抗氧化酶活性及光合特性的影响[J]. *西北植物学报*, 2008, 28(11):2285-2291.
- [18] SCHWITZGUÉBEL J P, PAGE V, MARTINS-DIAS S, et al. Using plants to remove foreign compounds from contaminated water and soil[M]. In: SCHRODER P, COLLINS C D(eds). *Organic xenobiotics and plants, plant ecophysiology*. Netherlands: Springer, 2011.
- [19] KUK Y I, SHIN J S, BURGOS N R, et al. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants[J]. *Crop Sci*, 2003, 43:2109-2117.
- [20] LIU Y J, ZHAO Z G, SI J, et al. Brassinosteroids alleviate chilling-induced oxidative damage by enhancing antioxidant defense system in suspension cultured cells of *Chorispora bungeana*[J]. *Plant Growth Regulation*, 2009, 59:207-214.
- [21] CAO S, XU Q, CAO Y, et al. Loss of function mutations in *DET2* gene lead to an enhanced resistance to oxidative stress in *Arabidopsis*[J]. *Physiol Plant*, 2005, 123:57-66.
- [22] 耶兴元, 全胜利, 张燕. 油菜素内酯对高温胁迫下猕猴桃苗耐热性相关生理指标的影响[J]. *西北农业学报*, 2011, 20(9):113-116.

Effect of 2,4-epibrassinolide on Antioxidant System of Pepper Seedlings Under Low Temperature Stress

YANG Ping, LI Jie

(College of Life Science and Technology, Honghe University, Mengzi, Yunnan 661100)

Abstract: Pepper cultivar ‘Xiangyan 16’ was used as experimental material and grown in plant growth chamber, this study was carried out to investigate the effects of exogenously applied EBR on the growth, lipid peroxidation and antioxidant defense system of pepper seedlings under chilling stress in order to control pepper seedlings to provide reference for the mechanism of resistance to low temperature stress. The results showed that chilling stress inhibited the growth of pepper seedlings, but the foliar spray of EBR solution markedly decreased the oxidative stress under low temperature. The activities of antioxidative enzymes such as superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase and ascorbate peroxidase (CAT), and contents of ascorbic acid (AsA) and reduced glutathione (GSH) were significantly increased by EBR during low-temperature stress. EBR significantly decreased lipid peroxidation via the induction of antioxidant defense system. The results suggested that EBR had an anti-stress effect on pepper seedlings against chilling stress which might strengthen phytoremediation approaches by enhancing plant tolerance.

Keywords: 2,4-epibrassinolide; low temperature stress; pepper seedling; antioxidant enzyme system