

硒对高温胁迫下辣椒叶片抗氧化酶活性的调节作用

尚庆茂¹ 陈淑芳² 张志刚¹

(¹ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ² 南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘要: 硒是人体或动物抗氧化反应必需的微量元素。为了研究硒在高等植物体内的生理功能, 将辣椒两个品种‘中椒 7 号’和‘耐湿椒’盆栽在不同含硒量的草炭蛭石混合基质中, 现蕾后分次将植株移入人工气候室进行高温胁迫处理 (25 2 h 35 2 h 40 2 h), 然后取叶片测定各指标。结果表明: 施硒 ($0.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 提高了叶片的总叶绿素含量, 同时, 可以分别使 GPX 和 POD 活性提高 11.5 倍和 63.6%, 对 SOD 和 CAT 则表现为负效应。另外, 硒还使叶片 MDA 含量比不加硒对照降低 36%。在不同品种的辣椒体内, 硒的作用存在一些差异, 但总体的趋势相同。以上结果说明硒对高温胁迫下辣椒叶片抗氧化酶活性有重要的调节作用, 并有利于提高辣椒植株的耐热性。

关键词: 硒 (Se); 辣椒; 高温胁迫; 活性氧; 抗氧化酶

中图分类号: S 641 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 01-0035-04

Regulation of Selenium on Antioxidative Enzymes Activity in Pepper Leaves under High Temperature Stress

Shang Qingnao¹, Chen Shufang², and Zhang Zhigang¹

(¹ Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Selenium (Se) is an essential element for antioxidation reactions in human and animals. In order to study its biological role in higher plants, two cultivars (‘Zhongjiao 7’ and ‘Naishijiao’) of pepper (*Capsicum frutescens* L.) were cultivated in pot filling peat and vermiculite with Se concentration of 0, 0.3, 0.6, 0.9 and $1.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. When the flower buds appeared, the plants were transferred into climatic room and exposed to high temperature stress by three steps (25 2 h 35 2 h 40 2 h). Then the leaves were harvested for measurement of chlorophyll and malondialdehyde (MDA) contents and activities of four antioxidant enzymes. The results showed that selenium improved the content of total chlorophyll and increased the activities of glutathione peroxidase (GPX) and peroxidase (POD) about 11.5 times and 63.6%, respectively, whereas decreased the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). In addition, selenium also decreased the MDA content of leaves by 36%. The general trends of the tested parameters in two cultivars of peppers no distinct difference is showed. It is suggested that selenium play an important regulative role on the activities of antioxidant enzymes under high temperature stress, thus decrease the content of MDA and improve the tolerance to high temperature stress of pepper plants.

Key words: Selenium (Se); Pepper; High temperature stress; Reactive oxygen species; Antioxidant enzymes

对于所有的需氧生物, 在氧的正常代谢过程中将不可避免的产生活性氧 (Reactive oxygen species, ROS)。已经证明当植物生长发育过程遭遇逆境胁迫会导致细胞活性氧水平的提高, 进而损害蛋白质、脂类、核酸等的正常功能, 促进细胞非程序死亡。植物体拥有一套比较完整的酶学和非酶学保护系统, 以遏制活性氧水平的提高。

近来, 人们已经检测到在逆境条件下植物谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GPX) 活

收稿日期: 2004 - 03 - 01; 修回日期: 2004 - 07 - 26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070523)

性的增加^[1-3]。在非逆境条件下, GPX等抗氧化酶表达水平则很低^[4]。Criqui^[5], Holland^[6], Johnson^[7]等分别从烟草、柑橘、蕨类植物中分离出植物GPX基因, 序列分析表明与动物体内的GPX存在显著的同源性, 并进一步证实了硒对GPX活性的重要性。本试验以生产上应用的两种主要类型(甜椒类和长角椒类)的辣椒为试材, 结合高温胁迫深入研究硒(Se)对叶片抗氧化酶活性和脂质过氧化的调节作用, 旨在进一步阐明硒在植物抗逆伤害中的生理作用, 为硒的科学使用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用两种典型类型的辣椒(*Capsicum frutescens* L.)品种: 甜椒类的‘中椒7号’和长角椒类的‘耐湿椒’为试材。由中国农业科学院蔬菜花卉研究所辣椒育种课题组提供。

1.2 方法

试验于2002年在该所玻璃温室内进行。8月23日开始浸种, 通过LRH-250-G光照培养箱28/25(昼/夜)的变温处理催芽, 8月31日播种于50孔塑料穴盘, 10月1日将幼苗移入上口口径90 mm的塑料营养钵中, 每钵1株。采用体积比为2:1的草炭蛭石和5%膨化鸡粪组成的混合基质(且含 $1\text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ 的复合肥, N:P:K=15%:15%:15%)。10月17日起将 Na_2SeO_3 添加到基质, 使基质元素硒含量分别达到0.3、0.6、0.9、 $1.2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 设置无硒对照。各硒水平20株。植株生长在自然温光条件下, 滴灌供给充分的水分。

当辣椒植株初现蕾时, 每品种各硒水平选生长健壮且相对一致的10株分次移入人工气候室进行高温胁迫处理: 早晨8:30开始升温, 25℃2h, 然后35℃2h, 最后升到40℃2h。高温处理前浇透水, 处理开始后不再浇水, 光照强度为 $280\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。温度胁迫后立即对生长点以下第3、4、5片完全展开叶进行混合取样, -25℃冷冻保存待测。

叶绿素含量, SOD、POD、CAT活性, MDA含量均按文献[8]方法测定。GPX活性按文献[9]测定。

2 结果与分析

2.1 高温胁迫后叶片叶绿素含量的变化及硒的作用

施硒有效地提高高温胁迫下辣椒叶片总的叶绿素含量, 其中主要是提高叶绿素b含量。与未施硒对照相比, 当基质硒浓度增加到 $0.9\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ‘中椒7号’叶片叶绿素总量增加13%, 叶绿素b增加70%, 叶绿素a则变化很小。‘耐湿椒’也表现为相似的态势(图1)。

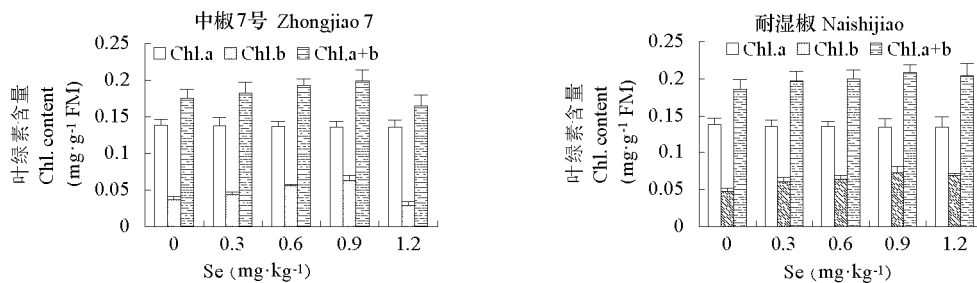


图1 高温胁迫和施硒对辣椒叶片叶绿素含量的影响

3次重复的平均±标准差, 下同。

Fig. 1 The effects of high temperature stress and selenium supplement on chlorophyll contents in pepper leaves

Each value (mean ±SE) represent of three measurements, The same as below.

2.2 硒对高温胁迫下叶片抗氧化酶活性的影响

由图2可知, 施硒对高温胁迫下辣椒叶片抗氧化酶活性的影响主要因酶种类而有不同程度的调节

作用。施硒降低了 SOD 活性, 在 $0.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 硒水平, 两个品种叶片 SOD 活性分别仅是未施硒对照的 27.8% 和 74.25%。同时, 施硒还降低了 CAT 活性, 在 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 硒水平, 与对照相比 ‘中椒 7 号’ CAT 活性降低了 69.3%, ‘耐湿椒’ 降低了 71.1%。相反, 硒对 GPX 则表现为明显的促进作用, $0.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 含硒量其酶活性分别比对照提高了 11.5 倍和 1.8 倍。硒对 POD 活性存在一定的剂量效应, 在 $0 \sim 0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 硒浓度范围内酶活性增强, 如 ‘耐湿椒’ 叶片 POD 活性在 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 硒水平时比对照提高了 63.6%, 但含硒量超过 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 硒对 POD 活性的作用则不明显或使其活性减弱。

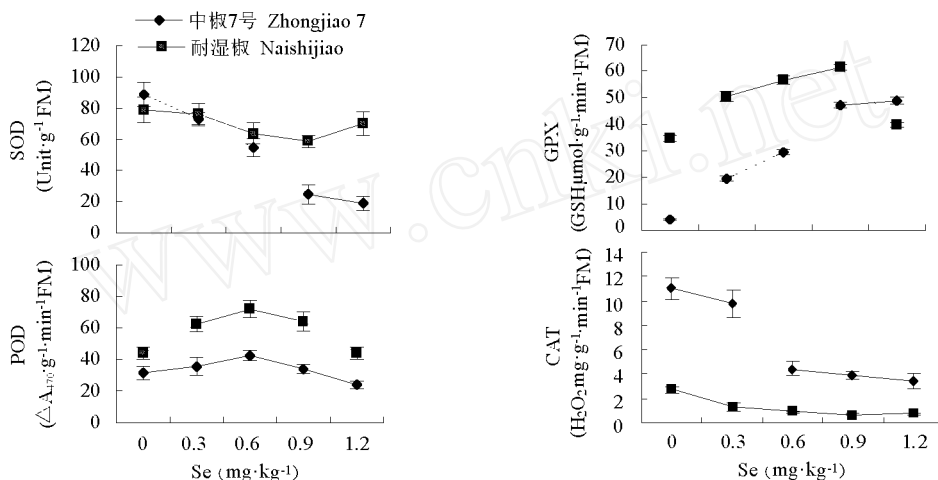


图 2 硒对高温胁迫下叶片抗氧化酶活性的影响

Fig 2 The effects of selenium supplement on antioxidant enzymes activity in pepper leaves under high temperature stress

2.3 高温胁迫和硒对叶片细胞 MDA 含量的作用

基质含硒量与高温胁迫下辣椒叶片细胞 MDA 积累水平呈负相关关系 (中椒 7 号, $r = -0.9750$; 耐湿椒, $r = -0.9204$ 。全部 $n = 5$, $P < 0.01$)。随着基质含硒量的提高, 辣椒叶片细胞 MDA 含量表现为不断下降的趋势。与未施硒对照相比, 施硒 ($1.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 使 ‘中椒 7 号’ 叶片 MDA 含量最大降低了 31%, ‘耐湿椒’ 则在 $0.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 硒水平叶片 MDA 含量最大降低了 36% (图 3)。

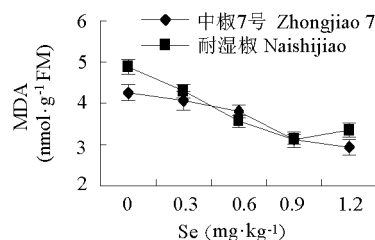


图 3 硒对高温胁迫下叶片脂质过氧化水平的影响

Fig 3 The effects of selenium supplement on lipid peroxidation in leaves of pepper

3 结论与讨论

3.1 施硒有助于高温胁迫下辣椒叶片保持较高的叶绿素含量水平

本研究观测到与对照相比, 硒提高了高温胁迫下辣椒叶片叶绿素的含量。叶绿素的合成是一系列酶促反应, 许多环境因子、发育因子和营养状况等影响其合成过程。目前已经证实 N 和 Mg 是叶绿素的组成成分, Fe、Mn、Cu、Zn 等参与叶绿素的生物合成过程。在硒的生理浓度范围内, 硒可以促进植物对 P、K、Ca、Mg、Mn、Zn、Mo 等元素的吸收^[10]。因此, 硒可能通过促进辣椒植株对叶绿素合成相关的矿质元素的吸收而提高叶绿素的合成水平。

3.2 硒对高温胁迫下辣椒叶片抗氧化酶活性的调节作用

此前, 已有大量的试验研究证实, 在非逆境条件下植物抗氧化系统酶 (如 SOD、POD、CAT、APX、GPX 等) 活性均处于相对较低的水平, 当植物接受适度的逆境诱导过程 (即促氧化) 后, 作为植物对外界逆境因子的适应性反应才表现出上升的态势^[4]。本研究结果显示, 高温胁迫下除 Se 1.2

$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理的‘耐湿椒’外,随着基质硒浓度的提高,辣椒叶片 GPX活性不断提高,再次证实了前人利用多种植物试材研究得出的结论。抗氧化酶系统中 SOD 歧化超氧自由基 (O_2^-) 为 H_2O_2 ,再被 POD、GPX、APX、CAT等清除。活性氧种类之间又可以通过质子化作用或 Fenton 循环相互转化。硒参与生物体酶促或非酶促抗氧化过程,与多种活性氧自由基发生作用,亚硒酸盐、硒酸盐本身对 O_2^- 也具有较强的清除能力,从而导致 O_2^- 水平的降低和 O_2^- 对 SOD 活性诱导能力的下降。GPX、POD 与 CAT 的作用底物相同,硒提高了 GPX、POD 活性,将有效降低 H_2O_2 浓度,同时也可能削弱对 CAT 的底物诱导作用,并进而造成 CAT 活性的下降。从酶的细胞学分布看,GPX、POD 主要分布在细胞质,而 SOD 和 CAT 则主要分布在叶绿体和过氧化物体等。硒作用方式的多样性、抗氧化酶作用底物的相互关联性及其细胞内分布的区间性等的存在,决定了硒对所有的抗氧化酶类活性产生影响以及作用方向和程度的差异。

3.3 施硒可减轻高温胁迫引发的辣椒叶片细胞脂质过氧化

脂质过氧化 (Lipid peroxidation) 是生命体的自然代谢过程。脂质中的多聚不饱和脂肪酸 (PUFA, 膜脂的主要组成) 很容易受 ROS 攻击,形成脂质氢过氧化物和脂质降解的氧化产物 (如 MDA),进而破坏细胞膜正常的结构和功能^[11]。在逆境条件下,ROS 积累,脂质过氧化加剧,因此近十年来研究 ROS 伤害常用脂质过氧化作指标。本研究结果显示,硒水平与高温胁迫下辣椒叶片 MDA 含量呈负相关,说明硒可能通过对抗氧化酶活性的调节等,有效地降低 ROS 积累水平,为保护高温逆境下细胞膜结构和功能的完整性起到积极的作用。

参考文献:

- 1 Kuroda H, Sagisaka S, Chiba K. Collapse of peroxide scavenging systems in apple flower buds associated with freezing injury. *Plant Cell Physiol*, 1992, 33: 743 ~ 750
- 2 Navari-Izzo F, Izzo R. Induction of enzyme activities and antioxidant production in barley plants as a result of SO_2 fumigation. *Plant Sci*, 1994, 96: 31 ~ 40
- 3 Dhindsa R S. Drought stress, enzyme of glutathione metabolism, oxidation injury, and protein synthesis in *Tortula ruralis*. *Plant Physiol*, 1991, 95: 648 ~ 651
- 4 Martina S, Wolfgang M, Cosima W, Win V C, Dirk I, Christian L, Heinrich S J. Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco BelW3. *The plant J*, 1998, 16: 235 ~ 245
- 5 Criqui M C, Janet E, Pamentier Y, Marbach J, Durr A, Fleck J. Isolation and characterization of a plant cDNA showing homology to animal glutathione peroxidase. *Plant Mol Biol*, 18: 623 ~ 627
- 6 Holland D, Ben-Hayim G, Faltin Z, Camoin L, Strosberg A D, Eshdat Y. Molecular characterization of salt stress associated protein in citrus: protein and cDNA sequence homology to mammalian glutathione peroxidase. *Plant Mol Biol*, 21: 923 ~ 927
- 7 Johnson R R, Cranston H J, Chaverra M E, Dyer W E. Characterization of cDNA clone for differentially expressed genes in embryos of dormant and nondormant *Avena fatua* L. caryopses. *Plant Mol Biol*, 1995, 28: 113 ~ 122
- 8 李合生主编. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000. 134 ~ 137, 164 ~ 169, 260 ~ 261
Li H S. The Experimental principles and technique of plant physiology and biochemistry. Beijing: Higher Education Press, 2000. 134 ~ 137, 164 ~ 169, 260 ~ 261 (in Chinese)
- 9 Flohe L, Gunzler W A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods enzymology*, 1984, 105: 114 ~ 121
- 10 Arvy M P, Thiersault M, Doireau P. Relationships between selenium, micronutrients, carbohydrates and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cells. *J. Plant Nutr*, 1995, 18 (8): 1535 ~ 1546
- 11 Smimoff N. Antioxidant systems and plant response to the environment. In: Smimoff N ed. *Environment and plant metabolism: flexibility and acclimation*. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1995. 217 ~ 243