

# 低磷胁迫下辣椒幼苗过氧化物酶活性及其同工酶谱的分析

裴冬丽<sup>1</sup>, 王冲<sup>1</sup>, 李成伟<sup>1,2</sup>

(1. 商丘师范学院 生命科学学院, 植物与微生物互作重点实验室, 河南 商丘 476000;

2. 周口师范学院 生命科学学院, 植物遗传与分子育种重点实验室, 河南 周口 466001)

**摘 要:**以 4 个辣椒品种“牛角椒”、“南纬金峰二号”、“茄门椒”和“8819 线椒”为试材, 采用水培方法, 研究了常磷(1 mmol/L)和低磷(0.01 mmol/L)2 个磷水平处理对不同辣椒品种叶片中过氧化物酶(POD)活性及其同工酶谱的影响。结果表明:低磷胁迫下,“牛角椒”、“茄门椒”和“8819 线椒”的 POD 活性随着胁迫时间的延长出现先升高再下降随后又升高的趋势,“南纬金峰二号”的 POD 活性在整个胁迫过程一直升高;过氧化物同工酶谱的变化与酶活性变化相一致,低磷组酶活性均显著高于同期常磷组,且酶谱染色深度和谱带条数均高于同期常磷组,说明 POD 活性与植物的耐低磷性有关。

**关键词:**辣椒;低磷胁迫;过氧化物酶(POD);同工酶

**中图分类号:**S 641.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)23-0113-04

辣椒(*Capsicum frutescens* L.)是人们喜爱的蔬菜作物之一,在我国,其种植面积仅次于白菜,为第二大蔬菜作物,现在全国各地已形成相当规模的生产产区,如分布于四川、河南、湖南、广西、广东及海南冬季“南菜北运”的辣椒生产基地<sup>[1]</sup>。磷是植物生长发育所必需的营养元素,是构成植物体内重要有机化合物的组成成分,同时还参与植物体内多种生理过程,对植物的生长发育、生理代谢、产量和品质起非常重要的作用。尽管有的土壤中磷的总含量很高,但土壤中有效磷的含量却不能满足植物的需要,原因主要是由于土壤对水溶解磷的吸附和固定,这已成为磷肥利用效率不高,制约植物生长发育的重要因素之一<sup>[2]</sup>。研究表明,肥料中 80%~90% 的磷都被土壤颗粒所吸附,使没有特殊适应性的植物无法利用这些被吸附的磷<sup>[3]</sup>。过氧化物酶(POD)是广泛存在于动物、植物、微生物内的一种重要氧化酶,催化由过氧化氢参与的各种还原剂的氧化反应,以减少对生物体的损伤。POD 是植物体内的保护酶之一,参与植物的抗逆性,普遍存在于植物各组织器官中,具有物种组织器官和发育阶段的特异性<sup>[4-5]</sup>。POD 对环境变化十分敏感,重金属、低温、盐胁迫等逆境都会引起酶活性和酶谱的变化。POD 也受低磷胁迫的影响,其酶活性和酶谱的

变化在一定程度上可反映植物抗低磷能力的强弱<sup>[6-8]</sup>。

该试验以辣椒 4 个品种“牛角椒”、“南纬金峰二号”、“茄门椒”和“8819 线椒”为试材,研究常磷(1 mmol/L)和低磷(0.01 mmol/L)2 个磷水平下不同品种辣椒叶片中过氧化物酶(POD)活性及其同工酶谱的变化,旨在探究其变化规律,为筛选出耐低磷的辣椒品种提供依据,并为辣椒耐低磷基因的筛选与克隆提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试辣椒品种“牛角椒”、“南纬金峰二号”、“茄门椒”、“8819 线椒”,购自河南商丘市种子市场。

### 1.2 试验方法

1.2.1 辣椒的培养 挑选籽粒饱满、大小均匀的辣椒种子,于 55℃温水(种子体积的 4~5 倍)中不停搅拌至水温降到 30℃,继续浸种 10 h 左右。培养皿用 0.1%氯化汞消毒 15 min,自来水洗净后,在底部垫 1 层吸水纸,将催芽后的辣椒种子放在其上,上面盖 2 层纱布,放入 28℃恒温培养箱中至萌芽后播种于蛭石中。种子长到 3 叶期时,选均匀一致的幼苗,分别移栽至含有常磷(1 mmol/L) Hoagland 营养液和低磷(0.01 mmol/L) Hoagland 营养液的盆钵中培养,营养液配方参照张宪政等<sup>[9]</sup>的方法,每个品种对照和处理各种 6 盆,每盆定植 10 株。每隔 3 d 换 1 次营养液,中间酌情补充水分。处理前以及处理第 3、6、9 天取样,3 次重复。

1.2.2 POD 活性测定 酶液的提取:称取新鲜叶片 0.2 g 于预冷的研钵内,加入 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8)定容至 1 mL,冰浴研磨成匀浆,置 1.5 mL 离

**第一作者简介:**裴冬丽(1971-),女,博士,教授,研究方向为植物病原菌互作分子生物学。E-mail:peidongli@126.com

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31071807);河南省教育厅资助项目(13B210199)。

**收稿日期:**2013-07-24

心管,4℃ 10 000 r/min 离心 15 min,取上清于 4℃ 冰箱中备用。POD 活性测定参考张志良<sup>[10]</sup>的方法。取 1 支试管,加入 3.0 mL 25 mmol/L 愈创木酚溶液、0.4 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液和 0.1 mL 酶提取液,再加入 200  $\mu$ L 0.5 mol/L  $H_2O_2$  溶液,迅速混合启动反应,同时立即开始计时。将反应混合液倒入比色杯中,置于分光光度计样品室中。以蒸馏水为参比,在 470 nm 下读数,每隔 1 min 记录 1 次,连续测定,至少获取 6 个时间点的数据。以 1 min 内  $OD_{470}$  变化 0.01 为 1 个过氧化物酶活性单位。酶活计算公式为:酶活( $U \cdot g^{-1} FW \cdot min^{-1}$ ) =  $\Delta A_{470} \times V_T / W \times V_S \times 0.01 \times t$ 。 $\Delta A_{470}$  为反应时间内吸光度的变化,  $W$  为植物鲜重(g),  $V_T$  为提取酶液总体积(mL),  $V_S$  为测定时取用酶液体积(mL),  $t$  为反应时间(min)。

1.2.3 过氧化物酶同工酶电泳 过氧化物同工酶电泳采用 10% 分离胶,4% 浓缩胶。电泳完毕后,取下凝胶用蒸馏水漂洗 3 次,醋酸联苯胺染色法对其进行染色,染液成分为 0.1 g 联苯胺,0.9 mL 冰醋酸,97.1 mL 双蒸水,2.0 mL 3%  $H_2O_2$ ,于室温下染色 5 min,显带清晰后,倒掉染液加蒸馏水冲洗,并浸入水中,酶带由蓝色变为棕色,倒掉溶液,于透色光源下照相并分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 磷处理对辣椒叶片 POD 活性的影响

从图 1 可知,正常磷水平下,4 个辣椒品种叶片中 POD 活性基本保持不变;但在低磷胁迫下,处理第 3 天,POD 活性迅速上升,而后又迅速下降,整个低磷处理过程中叶片中 POD 活性显著高于正常磷水平( $P < 0.05$ )。其中“牛角椒”和“8819 线椒”在处理第 3 天时 POD 活性达到最高,随后下降,但第 9 天的时候 POD 活性又有所上升;“茄门椒”POD 活性在第 3 天升高随后下降,但在第

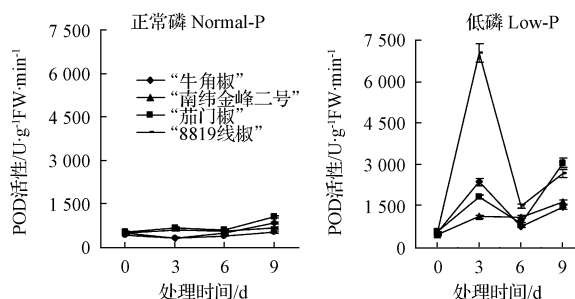


图 1 正常磷组和低磷组辣椒叶片 POD 活性变化

Fig. 1 Changes of POD activity in pepper leaves under low phosphorous and normal phosphorous treatments

9 天又大幅度增加;而“南纬金峰二号”POD 活性一直升高。

### 2.2 磷处理对过氧化物同工酶谱的影响

从图 2 可知,辣椒叶片 POD 同工酶酶带共有 7 条,根据迁移率可以将酶带分成 A、B、C 3 个区,其中 C 区酶带最多,活性较强。4 个辣椒品种低磷处理前后各酶带数目及活性有一定变化。低磷处理 3 d,相对常磷组,“牛角椒”增加 5 条酶带 E2、E4、E5、E6、E7;“南纬金峰二号”增加 3 条酶带 E5、E6、E7;“茄门椒”增加 4 条酶带 E2、E5、E6、E7;“8819 线椒”增加 5 条酶带 E2、E4、E5、E6、E7。低磷处理 6 d,低磷组“牛角椒”酶带 E2、E4 消失;“南纬金峰二号”和“茄门椒”酶带数目没有增减,一些酶带活性发生变化;“8819 线椒”酶带 E2、E4、E5、E6、E7 消失。低磷处理 9 d,低磷组“牛角椒”、“南纬金峰二号”和“茄门椒”酶带数目没有增减,一些酶带活性发生变化;“8819 线椒”增加 3 条酶带 E5、E6、E7。而常磷组“牛角椒”只有在第 9 天增加 1 条酶带 E5;“南纬金峰二号”和“茄门椒”酶带数目没有增减,只有一些酶带活性变化;“8819 线椒”只有在第 9 天增加 1 条酶带 E5。综上所述,

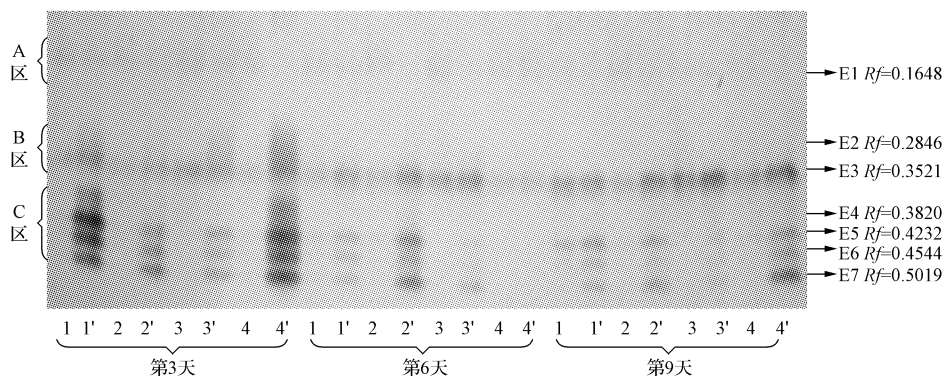


图 2 正常磷组和低磷组 POD 同工酶的电泳图谱

注:1:常磷“牛角椒”;1':低磷“牛角椒”;2:常磷“南纬金峰二号”;2':低磷“南纬金峰二号”;3:常磷“茄门椒”;3':低磷“茄门椒”;4:常磷“8819 线椒”;4':低磷“8819 线椒”。

Fig. 2 POD isozyme electrophoretograms spectrum under low phosphorous and normal treatment treatments

Note: 1: 'Niujiiao pepper' under normal phosphorous treatment; 1': 'Niujiiao pepper' under low phosphorous treatment; 2: 'Nanweijinfeng 2' under normal phosphorous treatment; 2': 'Nanweijinfeng 2' under low phosphorous treatment; 3: 'Qimen pepper' under normal phosphorous treatment; 3': 'Qimen pepper' under low phosphorous treatment; 4: '8819 line pepper' under phosphorous treatment; 4': '8819 line pepper' under normal low phosphorous treatment.

随着磷胁迫时间的延长,过氧化物同工酶酶带在第3天的时候数目最多且颜色最深,第6天酶带数目减少且颜色变浅,第9天酶带颜色又稍微加深。这说明,在外界磷胁迫的环境下,过氧化物同工酶可能被激活或被抑制。

### 3 讨论

植物在逆境胁迫如低磷胁迫下会产生大量的活性氧,包括羟自由基、超氧阴离子和  $H_2O_2$  等,会对细胞造成损伤,如氧化性很强的羟自由基会引发或加剧膜脂质过氧化产生丙二醛(MDA),从而造成细胞膜系统损伤,使膜透性增高<sup>[11]</sup>。因此,植物体会应激地产生有效的保护酶系统和自由基清除剂,以清除这些有毒物质<sup>[12]</sup>。过氧化物酶(POD)是普遍存在于植物体内活性较高的一种酶,是植物体内的主要防御因子之一,是体内分解氢、氧的关键酶类,与生物的胁迫状态密切相关<sup>[13]</sup>。郑金凤等<sup>[6]</sup>研究表明,低磷胁迫下小麦叶片中的 POD 活性上升;王晶等<sup>[7]</sup>研究指出,低磷胁迫下番茄叶片中 POD 活性变化的幅度高于正常磷水平,且在磷胁迫的初期就迅速上升,而后又迅速下降。该试验得到的 POD 活性变化规律与其相一致,进一步证实了 POD 在低磷胁迫中发挥了重要作用,POD 活性可以作为辣椒耐低磷胁迫的指标之一。该试验结果表明,低磷胁迫下4个辣椒品种叶片第3天 POD 活性都有显著升高,第6天活性下降,而后第9天活性又有所增高,但整个过程 POD 活性均显著高于正常供磷。分析原因可能在胁迫期间辣椒体内的 POD 系统迅速启动,通过提高 POD 的活性来防御低磷胁迫,但随着处理时间的延长,辣椒的生理代谢受到抑制,因而 POD 活性不能继续维持在较高水平,但随后活性又有所升高,具体原因有待进一步探讨。

植物体内各细胞、组织、器官的基因组成完全一致,但基因的表达存在空间、时间的差异。同工酶是基因表达的产物,是生物体为适应细胞代谢的多方面要求而形成的。在细胞生长发育过程中,受到低磷胁迫时,植物会从代谢的不同层次和水平上作出相应的应答,在遗传上则表现为基因表达的改变。低磷胁迫时通过细胞内代谢产物的诱导或阻遏作用,诱导有关基因的表达而相应地关闭某些基因,以适应低磷胁迫下细胞内的特殊代谢反应<sup>[14]</sup>。该试验研究表明,低磷处理辣椒幼苗的 POD 同工酶和其活性的测定结果是一致的。以辣椒品种“8819 线椒”为例,低磷胁迫 3 d,叶片中 POD 活性显著升高,增加 5 条酶带 E2、E4、E5、E6、E7;胁迫 6 d,叶片

中 POD 活性迅速下降,酶带 E2、E4、E5、E6、E7 消失;胁迫 9 d,POD 活性又有所升高,增加 3 条酶带 E5、E6、E7。表明低磷胁迫下过氧化物酶同工酶基因表达发生了明显的变化。总体来看,谱带的变化主要表现在谱带数目的变化(增加),谱带染色程度的变化(加深)和新的同工酶的产生,可能是植物体通过控制基因的转录、翻译影响表达,从而达到植物体对逆境的抵抗作用,提高植物的抗逆性。

总之,辣椒在受到低磷胁迫时,过氧化物酶谱和酶活性都发生了显著的变化。酶活的变化是符合自由基伤害学说的,体现了过氧化物酶作为一种保护酶的功能。酶谱的变化比较复杂,研究其机理为进一步提高辣椒的抗低磷性,筛选辣椒抗低磷品系都是有一定意义的。但在低磷条件下,叶可能经历了复杂的生化代谢,导致其酶谱变化的差异性,其具体机制有待更深一步探究。

### 参考文献

- [1] 易籽林,赵坤,董文武,等.辣椒高温胁迫研究进展[J].辣椒杂志,2011(3):5-9.
- [2] 鲁如坤.中国土壤氮、磷、钾的基本状况[J].土壤学报,1989,26(3):280-286.
- [3] 章爱群,贺立源,李德华.作物耐低磷营养性状遗传研究进展[J].山地农业生物学报,2008,27(2):162-169.
- [4] 彭永康,张丰德.不同剂量 Co-r 射线对小麦水稻幼苗生长的影响[J].华北农业学报,1987,2(1):13-18.
- [5] 孙静,王宪泽.盐胁迫对小麦过氧化物酶同工酶基因表达的影响[J].麦类作物学报,2006,26(11):42-44.
- [6] 郑金凤,董少鸣,李成璞,等.低磷胁迫对小麦代换系保护酶活性和丙二醛含量的影响及染色体效应[J].植物营养与肥料学报,2010,16(6):1366-1372.
- [7] 王晶,韩晓日,站秀梅,等.低磷胁迫对番茄叶片膜脂过氧化及保护酶活性的影响[J].植物营养与肥料学报,2005,11(6):851-854.
- [8] 李志刚,宋书宏,李瑞平,等.磷胁迫下大豆叶片及根部超氧化物歧化酶酶谱的研究[J].内蒙古民族大学学报,2008,23(2):147-149.
- [9] 张宪政,陈凤玉,王荣富.植物生理学试验技术[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,1994:45-48.
- [10] 张志良.植物生理学实验指导[M].1版.北京:高等教育出版社,1990:367-219.
- [11] 冯佰利,高小丽,王长发,等.干旱条件下不同温型小麦叶片衰老与活性氧代谢特性的研究[J].中国生态农业学报,2005,13(4):74-76.
- [12] 邵雪梅,范金梅.树轮宽资料所指示的川西过去气候变化[J].第四纪研究,1999(1):81-89.
- [13] 敖雪.磷素对不同磷效率基因型大豆的影响[D].沈阳:沈阳农业大学,2009.
- [14] 谭晓荣,吴兴泉,杜书文,等.干旱胁迫对小麦幼苗活性氧清除能力的影响[J].安徽农业科学,2006,34(15):3565-3567.

## Study on POD Enzyme Activity and Isozyme Pattern Analysis of Peppers Under Low Phosphorous Stress

PEI Dong-li<sup>1</sup>, WANG Chong<sup>1</sup>, LI Cheng-wei<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Plant-Microbe Interactions, College of Life Science, Shangqiu Normal University, Shangqiu, Henan 476000; 2. Key Laboratory of Plant Genetics and Molecular Breeding, College of Life Science, Zhoukou Normal University, Zhoukou, Henan 466001)

# 油菜 HY5 基因的电子克隆及生物信息学分析

郭继平<sup>1,2</sup>

(1. 衡水学院 生命科学系, 河北 衡水 053000; 2. 哈尔滨工业大学 食品科学与工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090)

**摘 要:**利用已知的芜菁 HY5 编码基因序列为探针, 采用电子克隆的方法获得了油菜 HY5 基因 cDNA 的序列。采用生物信息学工具对其编码蛋白序列进行了研究, 并将其编码蛋白同芜菁和拟南芥的 HY5 蛋白进行了同源性比较, 构建了其系统发育树。结果表明: 油菜 HY5 基因编码 164 个氨基酸, 其分子量为 18 037.8 Da, 是亲水蛋白, 同芜菁 HY5 具有高度的同源性, 高于和拟南芥的同源性; 该试验初步获得了油菜 HY5 基因的编码序列, 为进一步研究其功能打下基础。

**关键词:**HY5; 油菜; 光受体; 电子克隆

**中图分类号:**S 634.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)23-0116-03

光是影响植物生长发育的重要外界因子之一。植物对光的感受及光信号传导以及光形态建成一直是相关领域的热点研究内容之一<sup>[1-2]</sup>。植物通过众多调控因子来进行对光信号的感受和相应生理变化的调节。其中从拟南芥的突变体中克隆得到的 HY5 (Long Hypocotyl 5) 是一个对植物光形态建成起重要调节作用的调控因子<sup>[3]</sup>, 它参与了植物对红光<sup>[4]</sup>、蓝光和紫外光的感受和信号传导。

目前, 少数一些植物如拟南芥、水稻等的 HY5 基因已经公布, 但是总体还很有限, 蔬菜植物芸薹属中芜菁 (*Brassica rapa*) HY5 的编码基因已经被克隆, 但是油菜 (*Brassica napus*) HY5 编码基因序列还未被克隆。该研究采用已知的芜菁 HY5 编码基因 cDNA 为探针, 利用已经公布的油菜表达序列标签 (EST) 数据库对油菜

HY5 基因进行了电子克隆, 初步获得了其 cDNA 编码序列, 并采用生物信息学的方法对其蛋白序列以及蛋白性质进行了研究。同时研究了其与芜菁和拟南芥 HY5 蛋白同源性, 以及同其它物种 HY5 之间的进化关系, 以期更好的研究油菜这种常见叶菜类蔬菜对光的感受, 以更好地服务于生产实践提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

电子克隆的探针序列采用芜菁 (*Brassica rapa* subsp. *rapa* cultivar Tsuda) HY5 基因的 cDNA 序列 (GenBank: EU386772.1)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 油菜 HY5 基因的电子克隆技术路线 种子序列选取芜菁的 HY5 基因的 cDNA 序列 (GenBank: EU386772.1), BLAST 搜索油菜: *Brassica napus* (taxid: 3708) EST 数据库, 在线 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) 拼接得到的片段, 得到的 contig 再分别对油菜 EST 数据库进行 BLAST 检索至不能再进行延伸。将得到 contig 进行开放读码框的查找 (<http://www.ncbi>).

**作者简介:**郭继平 (1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为基因工程。E-mail: guojiping888@163.com.

**基金项目:**河北省高等学校自然科学研究计划资助项目 (Z2012045); 河北省科学技术研究与发展计划资助项目 (12212702)。

**收稿日期:**2013-06-19

**Abstract:** Taking four varieties of peppers leaves of 'Niujiiao pepper', 'Qiemen pepper', 'Nanweijinfeng 2' and '8819 line pepper' as test materials, with water culture, the effect of 1 mmol/L and 0.01 mmol/L phosphorus (P) on peroxidase (POD) activity and their isoenzymic bands were studied. The results showed that POD activity in leaves of 'Niujiiao pepper', 'Qiemen pepper' and '8819 line pepper' increased firstly, decreased secondly and then increased again with time, while the POD activity of 'Nanweijinfeng 2' increased during the whole test time, and the changing trend of POD isozyme zymogram was accordance with POD activity. The enzymatic activity under low phosphorus was stronger than that of normal phosphorus treatment and the isozyme bands and expression quantity of POD were more than that of normal phosphorus treatment at the same time. The result suggested that POD was related with plant against low phosphorous stress.

**Key words:** peppers; low phosphorous stress; peroxidase (POD); isozyme