

# 外源过氧化物酶对辣椒果实抗氧化酶活性与品质的影响

杨 静, 李小娟, 王 丽, 穆 春, 王林嵩, 徐 扬

(河南师范大学 生命科学院, 河南 新乡 453007)

**摘 要:**为了探讨外源萝卜过氧化物酶(RsPOD)对果蔬类作物影响的普遍性,将 RsPOD 定期喷洒辣椒植株,并测定辣椒果实的抗氧化酶(过氧化物酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶)活性、可溶性蛋白含量、维生素 C 含量和叶绿素含量等生化指标以及 POD 同工酶谱。结果表明:Rs-POD 不同程度地提高了这些生化指标在辣椒中的活性和含量,增强甚至提前了一些 POD 同工酶的表达。由此进一步证明外源 RsPOD 可以促进果蔬类作物的抗氧化能力和营养价值,具有一定的经济价值。

**关键词:**过氧化物酶;过氧化氢酶;超氧化物歧化酶;可溶性蛋白;维生素 C;叶绿素

**中图分类号:**Q 554 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)08-0001-04

过氧化物酶(POD)是植物在逆境条件下酶促防御系统的关键酶之一,它与超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)相互协调配合,清除过剩的自由基,使体内自由基维持在一个正常的动态水平,以提高植物的抗逆性<sup>[1-3]</sup>。POD 参与植物的许多生理生化过程,在植物的生长发育方面发挥着重要的作用,相关的研究报道颇多<sup>[1,4-6]</sup>,但大多集中研究外界胁迫条件处理下植物自身过氧化物酶的应激变化或集中在不同时期、组织的表达差异<sup>[7]</sup>,而对有关安全的酶制剂处理对植物尤其是对蔬菜果实抗氧化酶的影响则鲜见报道<sup>[8]</sup>,该试验针对外源萝卜过氧化物酶喷洒辣椒植株进行了一系列研究,为安全有效地提高蔬菜的抗氧化性和营养价值提供了一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试辣椒品种为“特大甜椒”,产自河南省郑州市成海种苗有限公司,RsPOD 由河南师范大学生命科学学院实验室从萝卜中用超滤法分离纯化而得<sup>[9]</sup>。

### 1.2 处理方法

试验辣椒种植于河南师范大学生命科学学院生物

园内。外源 RsPOD 用蒸馏水配置。

试验共设 5 个处理,分别为:清水处理(空白对照)、灭活处理(煮沸失活的 0.07%RsPOD 酶液)、低浓度处理(0.02%RsPOD 酶液)、中浓度处理(0.07%RsPOD 酶液)、高浓度处理(0.2%RsPOD 酶液),辣椒开始结果实(7月23日)后对植株进行叶面喷施,第1次喷施后的第10天(8月2日)进行2次喷施。从7月28日起每隔5d取1次样,每次每个处理各取6~10个大小一致的辣椒果实,及其对应植株上的嫩叶6~10片,共采样5次。3次重复。

### 1.3 试验方法

1.3.1 POD、SOD、CAT 样品的制备、活性测定及 POD 同工酶电泳分析 不同处理的辣椒果实各 1.0 g,加适量的石英砂充分研磨(冰浴),加 1 mL 缓冲液,混匀抽提后 10 000 r/min,4℃离心 20 min,取上清分装后贮藏于-20℃备用。POD 活性测定参照张龙翔等的愈创木酚法<sup>[10]</sup>方法;SOD 活性测定采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法<sup>[10]</sup>;CAT 活性测定采用贝尔斯-西第尔斯法(改进型)<sup>[11]</sup>,酶活性用 U/g<sup>1</sup>FW 或 U/mgFW 来表示。采用聚丙烯酰胺不连续垂直板状活性电泳(不加 SDS 和巯基乙醇)方法分离 POD 同工酶<sup>[12]</sup>。POD 电泳后参照胡能书<sup>[13]</sup>联苯胺染色的方法进行染色,用天能 GIS-1000 凝胶成像和分析系统进行拍照分析。

1.3.2 含量测定 可溶性蛋白样品制备同 POD,含量测定采用 Bradford<sup>[14]</sup>的方法,以牛血清白蛋白作标准曲线;维生素 C 的制备同之前的报道<sup>[8]</sup>,维生素 C 含量测定采用 2,6-二氯酚酚滴定法<sup>[10]</sup>,单位为 mg/100g(FW);叶绿素采用丙酮乙醇混合液浸提法<sup>[15]</sup>,单位为 mg/g(FW)。

**第一作者简介:**杨静(1985-),女,在读硕士,现主要从事生物化学与分子生物学研究工作。E-mail:yangjing7198@126.com。

**责任作者:**王林嵩(1957-),女,博士,硕士生导师,教授,现从事生物化学与分子生物学研究工作。E-mail:wls@henannu.edu.cn。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30570135);河南省生物化学与分子生物学重点学科资助项目。

**收稿日期:**2010-11-26

## 2 结果与分析

## 2.1 RsPOD 对辣椒果实抗氧化酶活性的影响

由表 1 可知,辣椒 POD 活性随着植株的生长发育,呈持续上升趋势。不同浓度的 RsPOD 处理时对辣椒中 POD 活性的影响不同,其中低浓度和中浓度处理表现出明显促进作用,与对照相比分别增加 0.5%、22.6% 和 0.4%、43.3%,与灭活处理相比分别增加 1.4%、61.3% 和 17.9%、28.5%,而高浓度处理在一次喷施后有一定的抑制作用,但在二次喷施后具有明显的促进作用,比对照增加 3.1%、8.1%,比灭活增加 5.3%、15.1%,说明

外源 RsPOD 有累积促进的作用。经灭活 RsPOD 处理降低辣椒内源 POD 活性,比对照降低了 1%、11%,说明起增加作用的是 RsPOD,并不是其它物质;随着植物的生长,SOD 活性在对照组呈现先升高后下降的趋势,RsPOD 处理后,SOD 出现先下降,后升高而后又下降的趋势,总体上来说,经 RsPOD 处理后,低浓度和中浓度处理对辣椒中 SOD 活性起促进作用,而高浓度处理则起抑制作用,并且促进和抑制的作用均达极显著差异( $P < 0.01$ )。CAT 活性一次喷施后的第 5 天和二次喷施后的第 10 天和第 15 天具有明显的促进作用( $P < 0.01$ )。

表 1 不同浓度 RsPOD 处理对辣椒抗氧化酶活性的影响  
Table 1 The effect of different concentrations of RsPOD on the activities of antioxidant enzymes in pepper

项目 Item	处理 Treatment	5	10	15	20	25
POD 活性 POD activity /U · g <sup>-1</sup> · (FW)	清水 Water control	284.80 ± 4.38Aa	360.00 ± 6.53Cc	260.00 ± 19.04Bb	374 ± 7.66 Cc	414.40 ± 3.58Bb
	灭活 Deactivation	282.00 ± 7.66 Aa	320.00 ± 13.06Dd	270.40 ± 10.43 Bb	376.00 ± 6.53 Bb	389.33 ± 15.73Cc
	低浓度 Low dose	280.00 ± 9.80 Aa	411.20 ± 12.13Bb	318.67 ± 11.78Aa	376.00 ± 6.53 Bb	458 ± 15.14Aa
	中浓度 Middle dose	286.00 ± 4.00 Aa	516.00 ± 13.86Aa	313.33 ± 0.00Aa	512 ± 0.00 Aa	418.67 ± 9.24Bb
SOD 活性 SOD activity /U · g <sup>-1</sup> · (FW)	高浓度 High dose	274.67 ± 4.62 Ab	318.00 ± 4.00 Id	268.00 ± 14.97 Bb	396 ± 19.04 Bb	448.00 ± 12.65Aa
	清水 Water control	74.59 ± 0.28Dd	75.83 ± 0.58Bc	73.49 ± 0.74Bb	71.49 ± 1.09Cc	72.67 ± 0.62 Bb
	灭活 Deactivation	75.48 ± 0.32Cc	74.22 ± 0.29Cd	73.65 ± 0.41Bb	77.67 ± 0.44Aa	72.44 ± 0.94 Bb
	低浓度 Low dose	77.05 ± 0.56Bb	77.02 ± 0.52Ab	77.08 ± 0.48Aa	68.86 ± 0.72Dd	76.51 ± 0.34Aa
CAT 活性 CAT activity /U · g <sup>-1</sup> · (FW)	中浓度 Middle dose	82.36 ± 0.76Aa	77.83 ± 0.13Aa	73.69 ± 0.79Bb	75.92 ± 0.52Bb	72.89 ± 0.71 Bb
	高浓度 High dose	75.08 ± 0.56CDcd	71.03 ± 0.48De	68.89 ± 0.86Cc	67.71 ± 0.41De	72.17 ± 0.84 Bb
	清水 Water control	30.50 ± 1.05Dd	32.00 ± 2.43Aa	34.75 ± 1.82Aa	20.64 ± 1.26Bb	20.64 ± 0.79Bb
	灭活 Deactivation	47.48 ± 1.82Cc	35.26 ± 1.98Aa	31.65 ± 3.51Aa	20.87 ± 1.43Bb	19.27 ± 0.89Bb
	低浓度 Low dose	54.01 ± 1.19Bb	35.09 ± 3.31Aa	28.21 ± 0.97Bb	22.71 ± 0.97Bb	27.52 ± 4.80Aa
	中浓度 Middle dose	56.94 ± 1.18Aa	28.90 ± 1.95Bb	34.06 ± 1.64Aa	27.52 ± 1.82Aa	26.97 ± 1.32Aa
	高浓度 High dose	54.24 ± 0.92Bb	34.40 ± 1.38Aa	32.75 ± 2.15Aa	26.66 ± 1.53Aa	18.92 ± 0.40Bc

注:数据是重复 3 次的平均值,小写字母代表  $P < 0.05$ ;大写字母代表  $P < 0.01$ 。下同。

Note: The values are the average of triplet, the lowercase stands for  $P < 0.05$ ; the uppercase stands for  $P < 0.05$ . The same below.

## 2.2 RsPOD 对辣椒可溶性蛋白和维生素 C 含量的影响

由表 2 知,随着植物的生长,对照组的可溶性蛋白含量持续下降,经 RsPOD 处理一次喷施后第 5 天与对照组相比均有明显的下降趋势,一次喷施后的第 10 天和二次喷施后的第 5、10 天各个处理与对照相比呈现上升趋势,并且以二次喷施后的第 5、10 天最为明显( $P < 0.01$ ),其中低浓度和中浓度促进效果较好,与对照相比分别增加了 0.32 和 0.15 倍。随着辣椒植株的生长,对

照组辣椒中维生素 C 含量先逐渐上升后下降,最后一次采样又有所回升。经 RsPOD 处理后,能够显著增加辣椒中的维生素 C 含量( $P < 0.01$ ),各个处理与对照相比均有增加,总体而言,低浓度和中浓度处理增加效果最为明显,与对照相比分别增加了 0.13~1.02 倍和 0.72~1.94 倍,与灭活相比分别增加 0.08~0.37 倍和 0.35~3.74 倍。

表 2 不同浓度 RsPOD 处理对辣椒可溶性蛋白和维生素 C 含量的影响

Table 2 The effect of different concentrations of RsPOD on the contents of soluble protein and vitamin C in pepper

项目 Item	处理 Treatment	5	10	15	20	25
可溶性蛋白 Soluble protein /mg · g <sup>-1</sup> · (FW)	清水 Water control	1.69 ± 0.00Aa	1.27 ± 0.027Bb	1.10 ± 0.04Cc	0.79 ± 0.02Cc	1.06 ± 0.02Bc
	灭活 Deactivation	1.45 ± 0.04Bb	0.98 ± 0.021Cc	1.14 ± 0.03Bb	0.79 ± 0.01Cc	1.17 ± 0.01Aa
	低浓度 Low dose	1.45 ± 0.08 Bb	1.25 ± 0.054Bb	1.45 ± 0.02Aa	0.84 ± 0.02BCb	1.01 ± 0.02Cd
	中浓度 Middle dose	1.11 ± 0.03Cc	1.36 ± 0.037Aa	1.16 ± 0.02Bb	0.91 ± 0.01Aa	1.07 ± 0.01Bb
维生素 C Vitamin C /mg · (100g) <sup>-1</sup> FW	高浓度 High dose	1.14 ± 0.02Cc	1.28 ± 0.017Bb	1.12 ± 0.02Cc	0.76 ± 0.03Cc	1.08 ± 0.02Bb
	清水 Water control	26.25 ± 2.50Cc	34.06 ± 2.58Dd	106.25 ± 4.79Dd	83.33 ± 8.52Dd	128.05 ± 3.52De
	灭活 Deactivation	27.50 ± 4.08Cc	43.75 ± 0.00Cc	135.00 ± 0.00Cc	156.92 ± 12.13Bb	152.44 ± 7.87Cd
	低浓度 Low dose	29.69 ± 1.08Cc	51.25 ± 2.50Bb	185.00 ± 4.08Aa	168.44 ± 14.44Bb	163.11 ± 3.05Bc
	中浓度 Middle dose	91.25 ± 5.29Aa	207.50 ± 2.89Aa	182.50 ± 10.41Aa	244.68 ± 9.37Aa	256.10 ± 3.52Aa
	高浓度 High dose	66.56 ± 1.20Bb	52.50 ± 5.00Bb	151.25 ± 7.50Bb	123.67 ± 7.98Cc	246.95 ± 4.98Ab

2.3 RsPOD 对辣椒叶片中叶绿素 a、b 含量的影响

由表 3 可知,RsPOD 对辣椒植株叶片中叶绿素 a 和 b 含量的影响,整体上而言,随着辣椒的生长,辣椒叶片中叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量均呈现先上升后下降的趋势。经 RsPOD 处理,对辣椒叶片中的叶绿素含量有微弱的促进作用,最明显的表现在二次喷施后的第 5

天,尤其是低浓度和中浓度处理叶绿素 a 和叶绿素 b 含量与对照和灭活相比均达极显著性差异( $P<0.01$ )。高浓度处理对辣椒叶片的光合作用影响较小。综上,随着植物的衰老,辣椒中的叶绿素含量逐渐下降,其光合作用逐渐减低。

表 3 不同浓度 RsPOD 处理对辣椒叶片中叶绿素含量的影响

Table 3		The effect of different concentrations of RsPOD on the contents of chlorophyll in the leaf of pepper					mg · g <sup>-1</sup> · (FW)
项目	处理	时间 Time /d					
Item	Treatment	5	10	15	20	25	
叶绿素 a Chlorophyll a	清水 Water control	1.65±0.03Cc	1.85±0.01Bb	1.71±0.05BCc	1.5285±0.03Bb	1.25±0.06Bb	
	灭活 Deactivation	1.77±0.00Bb	1.97±0.03Aa	1.79±0.02Bb	1.7241±0.03ABa	1.22±0.01Bb	
	低浓度 Low dose	1.90±0.01Aa	1.91±0.03ABab	2.14±0.03Aa	1.8107±0.06Aa	1.49±0.030Aa	
	中浓度 Middle dose	1.67±0.01Cc	1.92±0.05ABab	2.09±0.01Aa	1.6062±0.05Bb	1.26±0.04Bb	
	高浓度 High dose	1.56±0.01Dd	1.71±0.00Cc	1.62±0.02Cd	1.7506±0.00Aa	1.47±0.02Aa	
叶绿素 b Chlorophyll b	清水 Water control	0.50±0.02Bb	0.55±0.02Bc	0.49±0.00Bbc	0.3388±0.01Cd	0.35±0.01Bb	
	灭活 Deactivation	0.54±0.03Aa	0.64±0.00Aa	0.50±0.01Bb	0.4656±0.02Bb	0.35±0.01Bb	
	低浓度 Low dose	0.58±0.03Aa	0.57±0.00Bb	0.68±0.03Aa	0.5356±0.02Aa	0.41±0.00Aa	
	中浓度 Middle dose	0.47±0.02Bbc	0.56±0.00Bbc	0.68±0.01Aa	0.4039±0.01Bc	0.33±0.00Bc	
	高浓度 High dose	0.42±0.01Cc	0.49±0.01Cd	0.44±0.03Bc	0.4887±0.04ABb	0.43±0.01Aa	

2.4 RsPOD 对辣椒果实 POD 同工酶谱的影响

由图 1 可知,辣椒内源 POD 有 4 条同工酶谱带(A、B 2 个区),辣椒 A 区有 1 条带和 RsPOD 其中 1 条带的迁移率是相一致的,但辣椒在喷施外源 RsPOD 前后均有此带,说明是辣椒内源 POD 条带,因此辣椒和萝卜具有一定的同源性。B 区有 3 条主带,不同于外源 RsPOD 谱带,说明经 RsPOD 处理并未诱导辣椒内源 POD 表达新的同工酶,只是通过一定的途径改变了同工酶的表达

量。图中箭头所指是在不同处理和不同时间所出现的条带,从一次喷施后的第 5 天起,中浓度处理首先出现这 2 条带,随着辣椒的生长,到二次喷施后的第 5 天,清水对照也出现了此带,而中浓度处理该酶持续表达,表明该酶的表达具有一定的时间差异,并且外源 RsPOD 处理后能够促进该酶提前表达,中浓度处理作用最为明显。

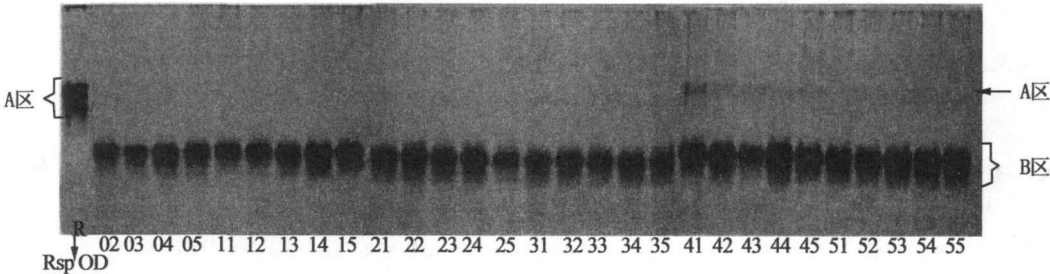


图 1 不同浓度 RsPOD 处理后辣椒 POD 同工酶活性电泳图谱

Fig. 1 The POD isoenzymes patterns by PAGE in pepper after treatment with different concentrations of RsPOD

注:01~05 分别代表 0 d 的清水对照,灭活处理,低浓度处理,中浓度处理和高浓度处理;11~15 分别代表 5 d 的清水对照,灭活处理,低浓度处理,中浓度处理和高浓度处理;21~25 分别代表 10 d 的清水对照,灭活处理,低浓度处理,中浓度处理和高浓度处理;31~35 分别代表 15 d 的清水对照,灭活处理,低浓度处理,中浓度处理和高浓度处理;41~45 分别代表 20 d 的清水对照,灭活处理,低浓度处理,中浓度处理和高浓度处理;51~55 分别代表 25 d 的清水对照,灭活处理,低浓度处理,中浓度处理和高浓度处理;RsPOD 为外源萝卜过氧化物酶。

Note: 01~05represent Water control, Deactivation, Low dose, Middle dose, High dose of the 0 day,respectively; 11~15represent Water control, Deactivation, Low dose, Middle dose, High dose of the 5 day,respectively; 21~25represent Water control, Deactivation, Low dose, Middle dose, High dose of the 10 day,respectively; 31~35represent Water control, Deactivation, Low dose, Middle dose, High dose of the 15 day,respectively; 41~45represent Water control, Deactivation, Low dose, Middle dose, High dose of the 20 day,respectively; 51~55represent Water control, Deactivation, Low dose, Middle dose, High dose of the 25 day,respectively; RsPOD was the external radish peroxidase.

## 3 讨论

试验结果表明,外源 RsPOD 对辣椒果实 POD、SOD、CAT 的酶活都有促进作用,外源 RsPOD 的喷洒明显提高了内源 POD 表达。高等植物的 POD 参与多种不同的生理功能<sup>[4-6]</sup>,它以 CAT 或其他底物作为电子受体,从而参与细胞的许多氧化还原反应<sup>[1-2]</sup>,能提高植株对外界不良环境的抵抗力,如对病虫害、高温、病毒侵染、重金属或盐胁迫等<sup>[3,5]</sup>,所以辣椒体内一些抗氧化酶活性的增加和提前表达可能会帮助植株对某些胁迫作用做出及早的防御,对辣椒的生长更加有利。RsPOD 在提高 POD 活性的同时也提高了 SOD、CAT 的活性,从而全面提高了植株的抗性。另外,该试验证实 RsPOD 处理提高了可溶性蛋白含量和维生素 C 含量,尤其是维生素 C 含量最高能增加 1.94 倍,这表明 RsPOD 不仅提高了植株的抗性,对果实的营养成分也有很大的提高,这与已有报道的关于 RsPOD 喷洒黄瓜的研究结果相符合<sup>[8]</sup>,黄瓜和辣椒分属于不同作物品种,说明 RsPOD 对果蔬类作物生长有一定的促进作用,而并非局限于某一种果蔬作物。因此,若将此技术应用于农业生产将会产生很大的经济效益。

综上所述,喷洒 RsPOD 对辣椒的生长具有促进作用,不仅提高了其抗氧化酶(POD、CAT、SOD)的活性,增加了自身的抗性,而且提高了其营养价值,可以广泛应用于果蔬作物的生产。

## 参考文献

- [1] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction [J]. Annu. Rev. Plant. Phys. 2004, 55: 373-399.
- [2] Foyer C H, Noctor G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation

and signaling[J]. New Phytol, 2000, 146: 359-388.

- [3] Abdullahil B M, Lee E J, Paek K Y. Medium salt strength induced changes in growth, physiology and secondary metabolite content in adventitious roots of *Morinda citrifolia*: the role of antioxidant enzymes and phenylalanine ammonia lyase[J]. Plant Cell Rep, 2010, 29(7): 685-694.
- [4] Passardi F, Cosio C, Penel C, et al. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife[J]. Plant Cell Rep, 2005, 24: 255-265.
- [5] Bouazizi H, Jouli H, Geitmann A, et al. Structural changes of cell wall and lignifying enzymes modulations in bean roots in response to copper stress [J]. Biol Trace Elem Res, 2010, 136(2): 232-240.
- [6] Mura A, Medda R, Longu S, et al. A  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-binding peroxidase from *euphorbia latex*: novel aspects of calcium-hydrogen peroxide cross-talk in the regulation of plant defenses [J]. Biochemistry, 2005, 44: 14120-14130.
- [7] Welinder K G, Justesen A F, Kjaersgaard I V, et al. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*[J]. Eur J Biochem, 2002, 269(24): 6063-6081.
- [8] 王林嵩, 车淑红, 李小娟, 等. 外源过氧化物酶对黄瓜果实抗氧化酶体系的影响[J]. 西北农业学报, 2007, 16(6): 159-163.
- [9] Wang L, Wei L, Wang L, et al. Effect of peroxidase on hyperlipidemia in mice[J]. J Agric. Food Chem, 2002, 50(4): 868-870.
- [10] 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: 164-167, 43-44, 246-247, 134-135.
- [11] B. 施特而赫著, 钱家渊译. 酶的测定方法[M]. 北京: 中国出版社, 1992: 186-188.
- [12] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [13] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科技出版社, 1985: 58-61.
- [14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Annal. Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [15] 苏正淑, 张宪政. 几种测定植物叶绿素含量的方法比较[J]. 植物生理学通讯, 1989, 13(5): 77-78.

## Effect of External Peroxidase on the Activities of Antioxidant Enzymes in Pepper

YANG Jing, LI Xiao-juan, WANG Li, MU Chun, WANG Lin-song, XU Yang  
(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007)

**Abstract:** In order to investigate further the effect of the external radish peroxidase (RsPOD) on the growth of vegetables, the different concentrations of RsPOD were sprayed periodically on the pepper. After then the activities of POD, superoxidase dismutase (SOD) and catalase (CAT), the contents of vitamin C, the soluble proteins, and the chlorophyll were determined. Besides, the patterns of peroxidase isozyme were measured by polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed that, to some extent, the external RsPOD increased the activities of POD, SOD, and CAT and the contents of the soluble proteins and chlorophyll. Moreover, the external RsPOD enhanced, even advanced the expression of the peroxidase isozyme. Therefore, the external RsPOD can increase antioxidant ability and nutrient in vegetables.

**Key words:** peroxidase; catalase; superoxidase dismutase; soluble protein; vitamin C; Chlorophyll