

草莓和番茄果实采后 NAD 激酶、NADP 磷酸酶活性变化的研究

顾采琴^{1,2}, 关军锋², 席珺芳¹, 李广敏²

(¹ 浙江大学农工食品学院, 杭州 310029; ² 河北省农林科学院农业物理生理生化研究所, 石家庄 050051)

摘要: 研究了草莓和番茄果实采后在 4℃ 和 20℃ 下, NAD 激酶(NADK)、NADP 磷酸酶活性变化及其与果实呼吸、乙烯释放率、钙调素拮抗剂三氟啦嗪(Trifluoperazine, TFP)的关系。结果表明, 两种果实的 NADK、NADP 磷酸酶活性变化趋势存在显著差异, 草莓果实采后 NADK 活性先下降、后上升, NADP 磷酸酶活性出现第 1 个峰后继续缓慢上升, 而番茄果实 NADK 活性先上升、后下降, NADP 磷酸酶活性在出现第 1 个峰后继续下降; 两种果实 NADK 活性变化与呼吸变化趋势相似, NADP 磷酸酶变化与乙烯释放率变化趋势相似; 低温激活 NADK, 抑制 NADP 磷酸酶, TFP 对 NADK 有激活作用, 对 NADP 磷酸酶影响较小。表明果实后熟衰老过程与 NAD 激酶、NADP 磷酸酶密切相关, 激活 NADK 可能与延缓果实后熟衰老有关。

关键词: 草莓; 番茄; 果实; 后熟衰老; NAD 激酶; NADP 磷酸酶

Changes of Activities of NAD Kinase and NADP Phosphatase in Postharvested Tomato and Strawberry Fruits

GU Cai-qin^{1,2}, GUAN Jun-feng², XI Yu-fang¹, LI Guang-min²

(¹ Agri-Industry Food College, Zhejiang University, Hangzhou 310029; ² Institute of Agro-Physics, Plant Physiology and Biochemistry, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051)

Abstract: Activities of NAD kinase and NADP phosphatase and relationship between the two enzymes and temperature, respiration, ethylene production and Trifluoperazine in postharvested strawberry and tomato fruits under 4℃ and 20℃ were studied. The activity of NAD kinase in strawberry decreased slowly during first four days, then increased gradually. The NADP phosphatase activity increased at the second day after harvest, decreased the next day, then increased again. For tomato fruits, the activity of NAD kinase and NADP phosphatase increased at the second day after harvest, decreased with the ripening and senescence. The changing model of NADK and respiration in two fruits were similar, the same were NADP phosphatase and ethylene production. TFP enhanced the activity of NADK and had little effect on NADP phosphatase. Low temperature (4℃) activated the NADK and reduced the activity of NADP phosphatase. These results indicated that the NAD kinase and NADP phosphatase were related with the ripening and senescence of strawberry and tomato fruits. The activation of NAD kinase probably postponed the ripening and senescence of fruit.

Key words: Strawberry; Tomato; Fruits; Ripening and senescence; NAD Kinase; NADP phosphatase

植物中 NAD 激酶催化 NAD(辅酶 I) 和 ATP 生成 NADP(辅酶 II)^[1], NADP 磷酸酶催化 NADP 脱磷酸生成 NAD 和无机磷^[2], 它们是细胞质膜氧

化还原系统中多种酶的辅酶, 参与细胞 300 多种氧化还原反应, 同时, 质膜上的多数氧化还原酶可以利用 NADH 和 NADPH 最终生成 H₂O₂ 和 O₂^{·[3]}。由

收稿日期: 2002-04-03

基金项目: 河北省农林科学院博士资金资助项目

作者简介: 顾采琴(1964-), 女, 贵州贵阳人, 副教授, 博士, 主要从事果蔬采后生理和贮运方面的教学和科研。关军锋为通讯作者, Tel: 0311-7813046, 7652132; Fax: 0311-7042490; E-mail: junfeng_guan@263.net

于 NAD 激酶、NADP 磷酸酶活性变化直接影响 NAD(H) 和 NADP(H) 的相对水平从而影响细胞的氧化代谢速率和途径^[2,4],因此,NAD 激酶、NADP 磷酸酶与植物的种子萌发、抗逆性^[5]、育性转换^[6]等多种生理过程密切相关,但其与果实后熟衰老的关系目前尚未见研究报道。

果实后熟衰老过程涉及一系列复杂的生理、生化变化,而生物氧化是其主要过程。因此,本研究以非跃变型果实草莓和跃变型果实番茄为试材,初步研究了果实采后 NAD 激酶、NADP 磷酸酶活性变化及其与呼吸、乙烯、贮藏温度和钙调素拮抗剂的关系,以期为进一步探讨果实后熟衰老机理及调控提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试草莓(*Fragaria ananassa* Duch.)品种为处于粉红色期的“春星”,番茄(*Lycopersicon esculentum*)品种为处于绿熟期和粉红色期的“保冠”。两种果实来自河北省农林科学院石家庄果树研究所和石家庄市郊温室大棚。草莓于 2001 年 5 月采收,番茄于同年 12 月采收。果实运回实验室经预冷、挑选后,将草莓和粉红色期番茄果实分别装入塑料筐,置于 4℃ 和 20℃ 下贮藏。草莓每个处理为 3kg,番茄为 5kg,重复 3 次,每天抽样测定 1 次。另外对绿熟期番茄果实进行如下处理:果实用三氟啦嗪(TFP,100 μ mol \cdot L⁻¹)和蒸馏水(对照)浸泡抽真空(500 mmHg,3 min)处理后,晾干,置于 20℃ 下贮藏,每天取样测定。

1.2 测定项目与方 法

1.2.1 NAD 激酶与 NADP 磷酸酶活性测定 参照杨万年等^[6]方法并作适当的修改:取 5g 草莓果实或番茄果实加适量 NAD 激酶和 NADP 磷酸酶提取液,在冰浴中研磨,4℃ 下离心,取上清液分别测定 NAD 激酶和 NADP 磷酸酶的活性,以 $\Delta OD \text{ mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 表示 NAD 激酶活力单位,以 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 表示 NADP 磷酸酶活力单位。所有测定至少重复 3 次。

1.2.2 蛋白含量测定 参照 Bradford^[7]的方法,以 BAS 为标准蛋白。重复 3 次。

1.2.3 乙烯释放率 将 0.5 kg 草莓果实或 1 kg 番茄果实放进密闭容器内,一定时间后用气相色谱仪检测乙烯含量。气相色谱仪为 SP-518 型, N₂ 为载气,氢离子火焰检测器,柱温 90℃,检测器温度为

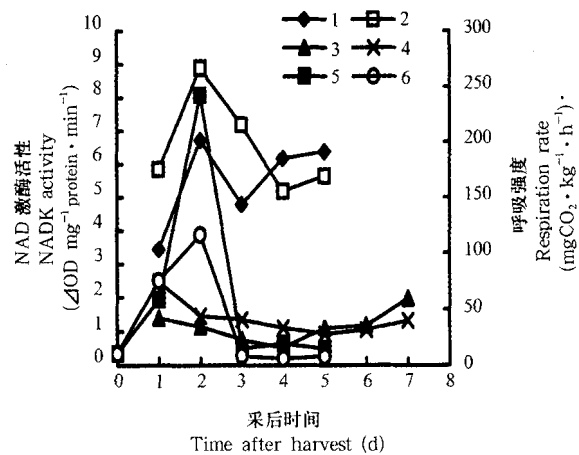
120℃。

1.2.4 呼吸强度测定 按静置法测定^[8]。

2 结果与分 析

2.1 NADK 活性的变化

采后草莓果实前 4 d NADK 呈下降趋势,随后逐渐上升;而粉红色期番茄果实的 NADK 则表现先上升、后下降的变化趋势,高峰值比起始值多出近 1 倍(常温)和 1.5 倍(低温)。采后前 3 d,番茄 4℃ 下的 NADK 活性比 20℃ 下的高(图 1),说明果实后熟衰老过程 NADK 活性变化因果实种类、贮藏环境不同而异。



1. Tomato (NADK, 20℃), 2. Tomato (NADK, 4℃), 3. Strawberry (NADK), 4. Strawberry (Respiration), 5. Tomato (Respiration, 20℃), 6. Tomato (Respiration, 4℃)

图 1 草莓和番茄粉红色期果实采后 NADK 活性和呼吸强度的变化

Fig.1 The changes in NAD kinase activity and respiration rate in postharvested strawberry and tomato fruits at pink stage

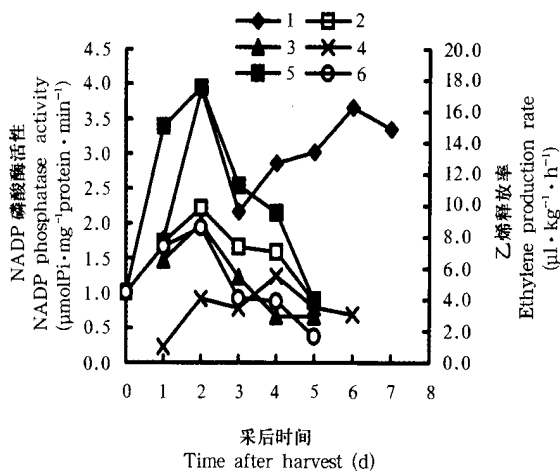
2.2 NADP 磷酸酶活性的变化

采后第 2 天草莓果实 NADP 磷酸酶活性达到高峰,下降后又缓慢上升,到采后第 7 天,该酶活性仍比起始值高 2 倍(图 2)。从总的趋势看,在草莓果实后熟衰老过程中,NADP 磷酸酶活性呈上升趋势;而番茄果实 NADP 磷酸酶活性于采后第 2 天也达到高峰,但峰值只比第 1 天高 22%~26.1%,随后一直下降,到采后第 5 天,酶活性降至起始值的 50%左右,4℃ 下的 NADP 磷酸酶活性低于 20℃ 下的酶活性(图 2),可见,NADP 磷酸酶活性变化也与果实种类、贮藏温度有关。

2.3 呼吸强度和乙烯释放率的变化

草莓果实采后呼吸变化平缓,先缓慢下降,直至

采后第 5 天,之后又缓慢上升(图 1),其变化趋势与其成熟过程呼吸的变化趋势相似^[9];而番茄果实采后的呼吸变化表现为典型的跃变型特征。草莓果实采后乙烯释放率前 4d 上升,以后逐渐下降(图 2),这与草莓绿熟期果实采后乙烯的变化趋势相似^[9]。番茄果实采后乙烯释放率与呼吸一样,呈现典型的跃变型特征。



1. Strawberry(NADP phosphatase), 2. Tomato(NADP phosphatase , 20 °C), 3. Tomato(NADP phosphatase , 4 °C) 4. Strawberry(Ethylene) ,5. Tomato(Ethylene , 20 °C) ,6. Tomato(Ethylene , 4 °C)

图 2 草莓和粉红色番茄果实采后 NADP 磷酸酶活性和乙烯释放率的变化

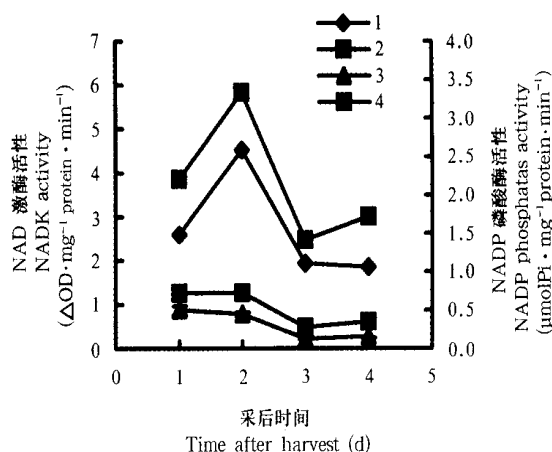
Fig. 2 The changes in NADP phosphatase activity and ethylene production rate in postharvested strawberry and tomato fruits at pink stage

2.4 TFP 对番茄果实 NADK、NADP 磷酸酶活性的影响

为了探讨果实 NADK、NADP 磷酸酶活性的调控,本研究用钙调素拮抗剂三氟啦嗪(TFP) 处理绿熟番茄果实,结果表明,TFP 对果实 NADK 活性有激活作用,对 NADP 磷酸酶也有一定的促进作用(图 3)。但 TFP 抑制番茄果实呼吸作用,对乙烯释放率抑制不明显(图 4),与黄国存等^[10]的研究结果一致。另观察表明,TFP 处理的绿熟番茄果实于 20 °C 贮藏 20 d 后,好果率为 62.5%,对照好果率为 28.57%,说明 TFP 激活 NADK 可能与其延长果实后熟衰老有关。

3 讨论

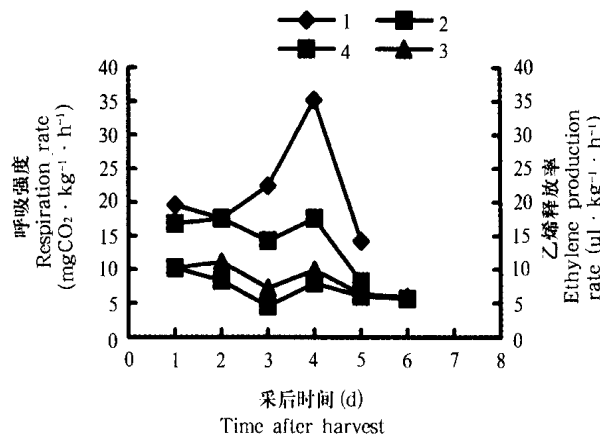
根据采后呼吸变化趋势或乙烯产生模式将草莓和番茄分成非跃变型和跃变型,它们在采后生理代



1. CK(NADK), 2. TFP(NADK), 3. CK(NADP phosphatase), 4. TFP(NADP phosphatase)

图 3 TFP 对绿熟期番茄果实采后 NAD 激酶和 NADP 磷酸酶活性的影响

Fig. 3 The effects of TFP on NADK and NADP phosphatase activity in postharvested tomato fruit at green mature stage



1. CK(Respiration), 2. TFP(Respiration), 3. CK(Ethylene), 4. TFP(Ethylene)

图 4 TFP 对绿熟期番茄果实采后呼吸强度和性乙烯释放率的影响

Fig. 4 The effects of TFP on respiration and ethylene production rate in postharvested tomato fruit at green mature stage

谢特性上存在许多差异。本研究表明,草莓和番茄果实后熟衰老过程中 NAD 激酶、NADP 磷酸酶活性变化趋势也完全不同,但无论草莓还是番茄果实,采后 NADK 的变化均与呼吸变化趋势相似(图 1、图 2)。由于呼吸作用是细胞氧化还原反应强弱的重要指标,也是果实后熟衰老的重要指标,有研究者认为,NAD 主要参与糖酵解和三羧酸循环,NADP 主要参与磷酸戊糖途径^[12],可见,NAD 激酶、NADP

磷酸酶活性变化直接影响 NAD(H) 和 NADP(H) 的比例,因此参与细胞氧化还原反应的调控。

乙烯是启动和加速果实后熟衰老的主要激素,乙烯的产生与 $O_2^{\cdot -}$ 的形成有关^[13],由于质膜上的多数氧化还原酶可以利用 NAD(H) 和 NADP(H) 而产生 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot -}$ ^[13],因此,NAD 激酶、NADP 磷酸酶的活性变化可能对乙烯形成有一定影响,本研究结果显示,两种果实后熟衰老过程中 NADP 磷酸酶活性变化与乙烯变化趋势相似。

NAD 激酶有钙调素依赖型和钙调素非依赖型 2 种,它们因植物种类^[5]、生理状态^[14]以及生长时期不同^[15]所占比例不同,因而调控方式也不同。但有关果实中 NAD 激酶活性的调控研究尚未见报道。番茄果实 NAD 激酶受钙调素拮抗剂 TFP 的激活(图 3),与 Gallais 等^[15]对燕麦种子用 TFP 激活钙调素依赖型 NADK 活性的报道一致。NADP 磷酸酶活性受 TFP 影响不显著。TFP 在激活 NAD 激酶的同时也抑制了果实的呼吸和乙烯释放率(图 4)。因此,激活 NADK 可能与延缓果实后熟衰老有关。

综上所述,本研究认为,NAD 激酶、NADP 磷酸酶活性变化可能与果实后熟衰老过程密切相关,如延缓果实后熟衰老的低温处理在降低番茄呼吸和乙烯释放率的同时促进 NADK 活性和抑制 NADP 活性(图 1、图 2),与 Juan 等^[11]将绿豆幼苗置于 4℃后 NADK 受到激活的报道一致,其详细机理有待进一步研究。

Reference

- [1] Mcguinness E T, Butler J R. NAD kinase-a review Int. J. Bioch. 1985,17(1): 1 - 11 .
- [2] Yamamoto K. Variation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate level in bean hypocotyls in relation to O_2 concentration. *Plant Physiol.* 1966,41: 519 - 522 .
- [3] Sun D Y, Guo Y L, Ma L G. *Cell Signal Transduction*. Beijing: Science Press, 1998:195 - 200. (in Chinese)
孙大业,郭艳林,马力耕. 细胞信号转导. 北京:科学出版社, 1998:195 - 200 .
- [4] Zerez C R, Moul D E, Andreoli A J. NAD kinase from *Bacillus licheniformis*: inhibition by NADP and other properties. *Arch Microbiol.* 1986,144:313 - 316 .
- [5] Stephan C, Laval M D L. Changes in NAD⁺ kinase activity during germination of *Phaseolus vulgaris* and *P. acutifolius*, and effects of drought stress. *J. Plant Physiol.* 2000,57(1): 65 - 73 .
- [6] Yang W N, He Z C,Zhang J Y,Yu H Z. Changes in activity of NAD kinase and NADP phosphatase during fertility transformation period in leaves of photoperiod-sensitive cytoplasmic male-sterile wheat. *Acta Phyto. Sinica*, 1998,24(4): 385 - 391 . (in Chinese)
杨万年,何之常,张景昱,于华忠. 光敏胞质雄性不育小麦育性转换期叶片中 NAD 激酶和 NADP 磷酸酶的变化. 植物生理学报,1998,24(4):385 - 391 .
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the pinciple of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72: 248 - 254 .
- [8] Gao J F. *Plant Physiology Experiment Technology*. Xian: World Book Publication Company, 2000:30 - 35. (in Chinese)
高俊凤. 植物生理实验技术. 西安:世界图书出版公司,2000: 30 - 35 .
- [9] Perkins P M, Huber D. *In vitro* growth and ripeing of strawberry fruit in the presence of ACC,STS or propylene. *Ann. Appl. Biol.* 1996,128:105 - 116 .
- [10] Huang G C, Zhang J S, Sun D Y. Effects of TFP on calmodulin levels, respiration rate and ethylene production of postharvested tomato. *Acta Horticulturae Sinica*, 1993, 20(4):403 - 404. (in Chinese)
黄国存,张继澍,孙大业. TFP 对番茄 CaM、呼吸强度及乙烯产生的影响. 园艺学报,1993,20(4):403 - 404 .
- [11] Juan M, Ruiz Esteban S, Pablo C Gareia, Luis R Lopez Lefebvre, Rosa M Rivero, Luis Romero. Proline metabolism and NAD kinase activity in greenbean plants subjected to cold-shock. *Phytochemistry*, 2000, 59:473 - 478 .
- [12] Yang W N, He Z C. Calmodulin - dependent kinase and its functions in plants. *Journal of wuhan Botanical Research*, 1999,17(Suppl.):99 - 104. (in Chinese)
杨万年,何之常. 钙调素依赖性 NAD 激酶及其在植物体内的功能. 武汉植物学研究,1999,17(增刊):99 - 104 .
- [13] Lieberman M. Biosynthesis and action of ethylene. *Ann Rev Plant Physiol*, 1979, 30:353 .
- [14] Gallais S, Laval Martin D L. Pyridine nucleotides and NAD kinase activity in dormant and non-dormant dry seeds of *Avena sativa* L. *Seed Sci. and Tech.* 1999, 27(3): 839 - 850 .
- [15] Gallais S, Pou de Crescenzo M A, Laval Martin D L. Changes in soluble and membrane-bound isoforms of calcium-calmodulin-dependent and-independent NAD⁺ kinase, during the culture of after ripened and dormant seeds of *Avena sativa*. *Austr. J. Plant Physiol.* 2000, 27(7): 649 - 658 .