

番茄成熟过程中酸性和碱性过氧化物酶活性变化

〔法〕 C·R罗森 J·N尼古拉斯

摘要 对番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Flora Dade) 果实从绿色到红熟6个成熟期中酸性和碱性过氧化物酶的活性进行了测定。酸性和碱性过氧化物酶的活性均在粉红色期达到最高, 但碱性过氧化物酶活性的相对增长更为明显。碱性过氧化物酶中过氧化物酶、IAA氧化酶、ACC氧化酶的活性的变化与乙烯生成的变化相平行。但有钙存在时, 过氧化物酶的活化程度在整个成熟期一直是稳定的, 而碱性过氧化物酶中的IAA氧化酶和ACC氧化酶则只有在粉红色期才被活化。

对果实成熟过程中过氧化物酶活性的变化已有不少研究, 其内容有总过氧化物酶, 也有过氧化物酶的不同组分, 主要是可溶性的或离子键形成的组分。对番茄果实的电泳研究表明, 过氧化物酶的不同组分包含有各种同工酶, 其活性随果实的发育阶段而变化。由于各种同工酶对基质的亲和力很不一样, 且基质过量时即被抑制, 故几乎不可能对粗提取物中真正的过氧化物酶活性作一精确评价, 因而, 对果实成熟过程中过氧化物同工酶活性的数量变化也知之甚少。但是, 由于植物体内过氧化物酶主要是酸性和碱性两种形式, 且它们对基质具有不同的专一性, 在植物体内所起的生理作用也不一样, 故其数量变化是非常重要的。在其所起的生理作用中, 碱性过氧化物酶可能参与了IAA的分解和ACC转化成乙烯的过程。本文研究了番茄

果实成熟过程中总的、酸性的和碱性的过氧化物酶活性以及碱性过氧化物酶中IAA和ACC氧化酶活性的变化。所有的测定均以自然成熟的番茄果实为材料, 而番茄果实的成熟期完全由其呼吸强度、乙烯释放的速率, 硬度及色素含量来确定。

大田种植的“Floradade”番茄在采收后将果实分为以下6个成熟期: 绿色期(G); 绿熟期(MG); 转色期(B); 粉红色(P); 橙红期(OR)及红熟期(RR)。在果实采收28小时后, 对每一成熟期的乙烯释放速率及呼吸强度用3个果实进行测定, 乙烯及二氧化碳的测定方法见Nicolas等。每一成熟期的果肉硬度采用40个番茄进行测定, 方法见Nicolas等。上述每一成熟期的40个番茄再分为8份, 每份5个, 然后将其切块, 混匀、速冻, 在液氮中粉碎并贮藏在-20℃下, 准备进行茄红素和过氧化物酶的分析。

茄红素含量按照 Lime 等的分光光度法进行测定。

过氧化物酶的提取方法如下：60克番茄粉中加入3.5克 NaCl，悬浮液用旋转搅拌器于4℃下匀浆90分钟，匀浆液于40,000×g下离心15分钟，过滤后所得上清液即为粗提取液。每一次所有成熟期的样品的提取在同一天进行，余下的步骤全部在4℃下进行。粗提取液在磷酸钠缓冲液中（PH6，5mM）渗析24小时，重复进行一次，再利用离子交换凝胶色谱法对渗析过的提取液中的酸性和碱性过氧化物酶进行分离和浓缩。

酶活性的测定在30℃下进行。在磷酸缓冲液中加入愈创木酚（20mM）和 H₂O₂（8mM），总体积为3ml，用分光光度计于470nm波长下测定过氧化物酶的活性。在测定条件下，每秒钟增加或减少1个吸收单位即为1个酶活性单位。IAA氧化酶活性的测定见Thomas等。游离细胞中碱性过氧化物酶产生的乙烯的测定在装有“血清盖”的17ml小瓶中进行，所用试剂有ACC（10mM），MnCl₂（0.01mM）和0.1个活性单位的过氧化物酶（依组分的不同，分别为0.05—0.2ml），所用缓冲液为PH7.9（100mM）的Tris-HCl缓冲液，反应液总体积为2.3ml。在反应开始后的3—7小时内，每小时测定一次乙烯生成量。在测定钙（5mM）的作用时，用PH6（100mM）的Mes缓冲液代替磷酸缓冲液。

在果实成熟前期（MG期—B期—P期），随着二氧化碳和乙烯生成量的急剧上升（图2），果肉硬度也迅速下降（图1）。茄红素在乙烯开始合成（B期）时才出现，随后便迅速增加（图1），这与Jeffery等的结果是一致的。很清楚，这些变化与番茄果实的成熟及乙烯的合成有关，它们证实了所划分的6个成熟期代表了果实外观上的成熟。而且，除了B期和P期的色素含量外，不论从哪一

种成熟标志看，6个成熟期均具有显著差异（1%*水平上）。

开始成熟前（MG期），果实粗提取物中总过氧化物酶的活性最低，成熟过程中酶活性则一直很高（图3A）。Gorin和Heidema在苹果上也观察到同样的现象。但是，由于番茄果实在成熟过程中其过氧化物酶包含有一系列活性差异颇大的同工酶，要想在果实成熟和总过氧化物酶的变化之间确定某种关系是困难的。对粗提取物中酸性和碱性过氧化物酶的分离表明，尽管酸性和碱性过氧化物酶的活性均在P期达到高峰（图3A），但碱性过氧化物酶活性的相对增长比酸性过氧化物酶要重要得多。碱性过氧化物酶只占总过氧化物酶中的9—17%，但其活性从成熟开始时急剧增加，而酸性过氧化物酶活性的增加则小得多。因此，在番茄果实成熟过程中的过氧化物酶活性的变化中，碱性过氧化物酶与乙烯生成量的变化最为相关（图2）。

与前人结果相一致，我们也观察到离体过氧化物酶中的ACC氧化酶活性主要与其碱性形式有关。如图4所示，番茄成熟过程中碱性过氧化物酶中的IAA和ACC氧化酶活性的变化与其过氧化物酶活性的变化相平行。相比之下，作为碱性过氧化物酶活化剂的钙，在果实不同的成熟期和基质不同时作用也不一样。在整个成熟过程中，由钙引发的过氧化物酶活性的增加一直是相当稳定的（图4A）。另一方面，钙只有在P期，即乙烯生成量最大的时期，才导致IAA和ACC氧化酶活性的增加，而在G期和MG期则抑制其活性（图4中B和C）。尽管对乙烯产生高峰期前钙抑制IAA和ACC氧化酶的意义并不清楚，但它表明了乙烯产生高峰期至少有一种碱性过氧化物酶同工酶是钙敏感型的。Thomas等在MG期发现2条新的碱性过氧化物酶同工酶。由于IAA和ACC氧化酶活性的变化相同，即使有钙存在时也如此，故IAA

（*：原文处为0.1%，疑有误—译者）

和ACC有可能具有相同的分解机制。这一观点得到了前人结果的支持：在花生的一条过氧化物酶同工酶上，多酚氧化酶和IAA氧化酶的活性与过氧化物氧化酶相关；在番茄的一条过氧化物酶同工酶上，多酚氧化酶的活性也与过氧化物氧化酶的活性有关。

鉴于所测定的碱性过氧化物酶活性的变化与乙烯生成速率的变化相平行，有必要明确在乙烯形成和碱性过氧化物酶之间是否存在

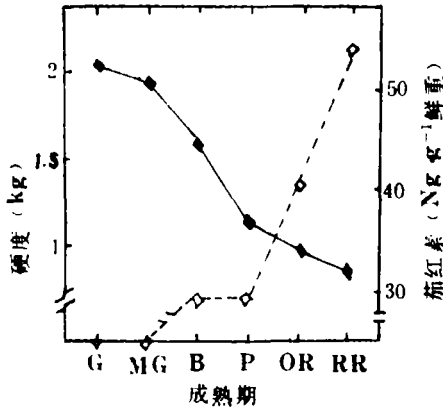


图 1 番茄果实成熟过程中硬度(◆)和茄红素(◇)的变化。成熟期间平均数分离，邓肯式新复极差检验，1%显著水平。

在某种关系。尽管由碱性过氧化物酶催化ACC的分解并不符合植株体内转化为乙烯的要求，还是有人提出碱性过氧化物酶参与了“伤乙

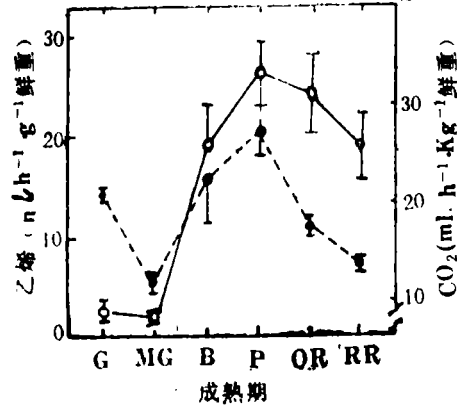


图 2 番茄果实成熟过程中乙烯释放量(○)及呼吸强度(●)的变化。垂直线表示3个果实平均数的标准差。

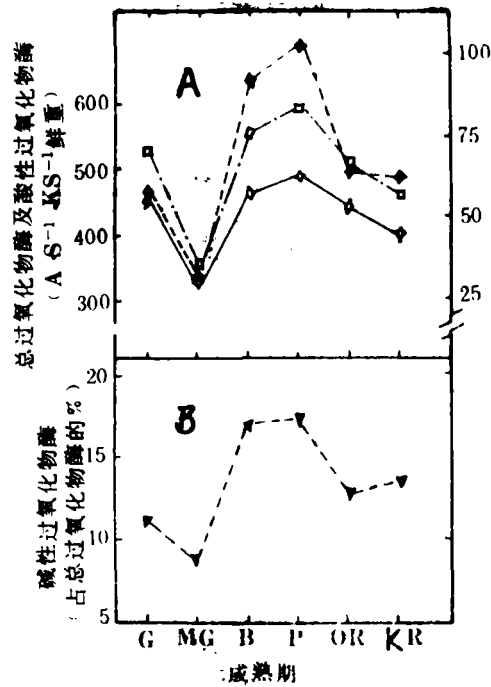


图 3 番茄果实成熟过程中过氧化物酶的变化。(A) 总过氧化物酶(◆)，脱氢过氧化物酶(◇)及碱性过氧化物酶；(B) 碱性过氧化物酶占总过氧化物酶的百分数(▼)。误差线不超过符号本身的范围。

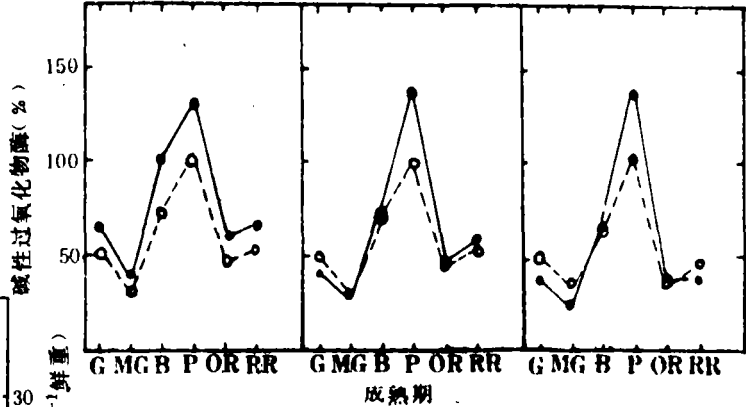


图 4 番茄果实成熟过程中碱性过氧化物酶中的过氧化物酶(A)、IAA氧化酶(B)及ACC氧化酶(C)活性的变化。(○)一未加Ca(●)。一加Ca。结果均用与未加Ca时最高活性相比的百分数表示。

烯”的形成。鉴于碱性过氧化物酶在植株体内的生理作用还不清楚，有必要做更多的工作去了解番茄成熟过程中碱性过氧化物酶和乙烯生成变化一致的含义。

(河南省农科院园艺所 乔爱民译)