

# 失水胁迫对切花月季‘贝拉米’内肽酶的影响

丛日晨 赵喜亭 高俊平\*

(中国农业大学观赏园艺与园林系, 北京 100094)

**摘 要:** 以中度耐失水胁迫切花月季品种‘贝拉米’(*Rosa hybrida* ‘Belami’)为试材, 在室温条件下进行 30 h 失水胁迫处理后复水并瓶插, 研究花瓣中可溶性蛋白质和游离氨基酸含量以及内肽酶活性的变化。结果表明, 失水胁迫提高了可溶性蛋白质和游离氨基酸含量, 复水后处理花瓣仍高于对照; 失水胁迫提高了内肽酶活性, 复水后, 在碱性条件下仍高于对照, 在酸性条件下却低于对照。失水胁迫可能启动了新型内肽酶种类。

**关键词:** 月季; 切花; 失水胁迫; 内肽酶

**中图分类号:** S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 03-0352-03

## 1 目的、材料与方法

近年来我们以探讨月季切花失水胁迫耐性机理为目的开展研究<sup>[1,2]</sup>。最近探讨了耐失水胁迫品种‘萨蔓莎’和中度耐失水胁迫品种‘贝拉米’在开花和衰老进程中花瓣内肽酶活性和种类的变化, 明确了不同类型之间存在一定的差异<sup>[3]</sup>。本研究旨在探讨失水胁迫处理对中度耐失水胁迫切花月季品种‘贝拉米’(*Rosa hybrida* ‘Belami’)内肽酶活性和种类的影响。

试验于 2001 年在中国农业大学进行。月季切花为春季试材, 采收标准为花朵 2 级<sup>[4]</sup>。花材采收后到失水胁迫处理开始时, 一直插于盛有清水的桶中。花枝按照长 25 cm、3 片复叶的标准统一剪切。失水胁迫采用 30 h 的断水处理, 温度为 22 ~ 25℃、相对湿度为 30% ~ 35%。胁迫结束后, 在水中把花枝末端剪掉 1 cm, 在蒸馏水中复水 2 h, 再转入清水中进行瓶插观察。对照花材一直置于清水中。处理前后和瓶插期间定期观测开花级数, 同时定期取花瓣样品液氮速冻后在 -40℃冰箱保存。失水胁迫程度用花朵水势和花枝鲜样质量损失率来表示<sup>[1]</sup>。

把两轮外层和内层花瓣去掉, 取中层花瓣用于测定内肽酶活性<sup>[5,6]</sup>、可溶性总蛋白质<sup>[7]</sup>和游离氨基酸<sup>[8]</sup>含量。对胁迫结束后的和未经胁迫的 2 级花朵在 pH 6 和 pH 10 条件下的内肽酶进行抑制剂种类检验<sup>[9]</sup>: 在上清液中分别加入 1.0 mmol/L、5.0 mmol/L 和 1.0 mmol/L 的金属蛋白酶抑制剂 Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)、丝氨酸蛋白酶抑制剂苯基磺酰氟化物 Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、巯基蛋白酶抑制剂碘乙酸 Iodoacetic acid (IA)。单枝花样本, 3 次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 失水胁迫对花朵水势和开花进程的影响

对‘贝拉米’在室温下进行 30 h 失水胁迫处理后, 花朵水势为 -2.10 MPa, 比处理前降低了 1.25 MPa, 花枝鲜样质量降低了 14.4%。失水胁迫后, 处理与对照的开花级数在前两天都为 2 级, 从第 3 天开始, 处理花朵盛开 (4 级), 第 4 天开始萎蔫 (6 级); 对照在第 5 天才达到盛开期。这说明失水胁迫加快了开花进程 (图 1)。

收稿日期: 2002-08-10; 修回日期: 2003-02-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39870490)

\* 通讯作者, E-mail: gaojpcy@95777.com

## 2.2 失水胁迫对花瓣中可溶性蛋白质和游离氨基酸含量的影响

失水胁迫处理后, 花瓣中可溶性蛋白质含量明显增高。在复水后的整个瓶插过程中, 处理花朵可溶性蛋白质含量都高于对照, 但是变化趋势没有改变, 都在盛开(4级)时达到最高。失水胁迫提高了从胁迫到复水瓶插整个过程中游离氨基酸的含量, 但没有改变变化趋势, 对照与处理都在萎蔫时(6级)达到最高(图2)。

## 2.3 失水胁迫对花瓣中内肽酶活性的影响

前面的工作表明, 分光光度法测定内肽酶活性时, 存在 pH6 和 pH10 两个峰值<sup>[3]</sup>。分别用 pH6 和 pH10 缓冲液对‘贝拉米’内肽酶活性进行测定。图3表明, 无论是 pH6 还是 pH10, 失水胁迫处理花朵内肽酶活性明显高于对照。但是, 复水后内肽酶活性在 pH6 测定条件下胁迫处理低于对照, 而 pH10 测定条件下, 胁迫处理却显著高于对照。

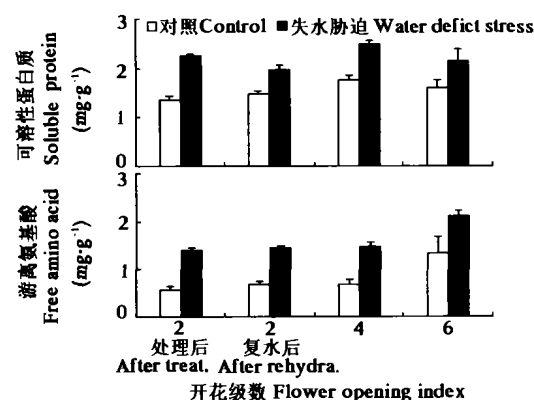


图2 失水胁迫对切花月季‘贝拉米’花瓣中可溶性蛋白质和游离氨基酸含量的影响

Fig. 2 Effect of water deficit stress on the contents of soluble protein and free amino acid in petals of cut rose ‘Belami’

## 2.4 失水胁迫对花瓣中内肽酶种类的影响

对未经胁迫的2级花朵和胁迫结束后的花朵在 pH6 和 pH10 条件下进行内肽酶抑制剂检验, 以不加任何抑制剂的酶原液为参照, 抑制剩余活性结果见表1。

在 pH6 条件下, IA 和 PMSF 对处理和对对照花朵的内肽酶活性产生了相同程度的抑制作用, 说明对照和处理花朵在酸性条件下存在巯基蛋白酶和丝氨酸蛋白酶。结合图2结果推测在酸性条件下内肽酶活性的提高可能是由其它内肽酶所致, 即失水胁迫可能启动了新型内肽酶种类; 在 pH 10 条件下, PMSF 对处理和对对照花朵的内肽酶活性产生了抑制作用, 对处理花朵内肽酶活性的抑制作用大于对照花朵, 达到了显著差异水平, 说明在碱性条件下, 处理与对照花朵均存在丝氨酸蛋白酶, 失水胁迫提高了丝氨酸蛋白酶的活性。

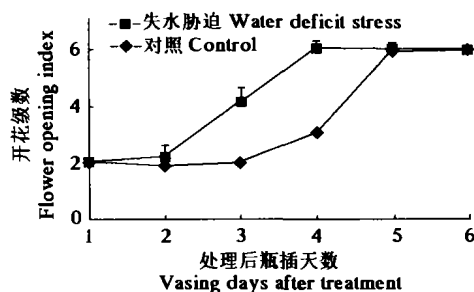


图1 失水胁迫对切花月季‘贝拉米’开花级数的影响

Fig. 1 Effect of water deficit stress on flower opening index of cut rose ‘Belami’

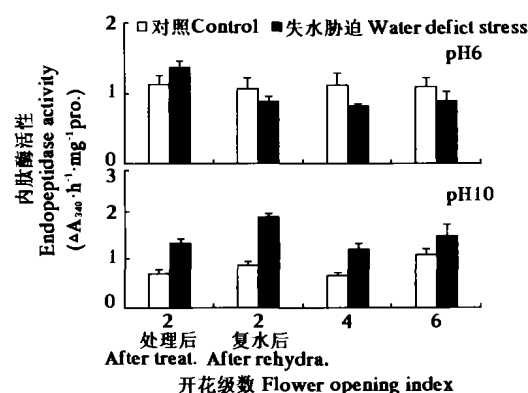


图3 失水胁迫对切花月季花‘贝拉米’花瓣内肽酶活性的影响

Fig. 3 Effect of water deficit stress on endopeptidase activity in petals of cut rose ‘Belami’

表1 不同抑制剂对失水胁迫后切花月季‘贝拉米’花瓣中内肽酶活性的影响

Table 1 Effect of different inhibitors on endopeptidase activity in petals of cut rose ‘Belami’ ( $\Delta A_{340} \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1} \text{ pro.}$ )

处 理 Treatment	pH6				pH10			
	-	EDTA	IA	PMSF	-	EDTA	IA	PMSF
对照 Control	100 a	100 a	84 a	80 a	100 a	100 a	100 a	60 a
失水胁迫 Water deficit stress	100 a	103 a	79 a	88 a	100 a	111 a	103 a	14 b

注: 同列相同字母表示在 5% 水平上差异不显著,  $n=3$ 。

Note: The same letter in the same row means no significant difference at 5% level by Duncan's multiple range test ( $n=3$ ).

归纳上述结果,失水胁迫提高了切花月季‘贝拉米’花瓣中可溶性蛋白和游离氨基酸含量,复水后,仍保持了较高的水平。失水胁迫提高了花瓣内肽酶活性,复水后,内肽酶活性变化较为复杂。对失水胁迫后启动的新型内肽酶种类以及调控机理,尚需进一步研究。

#### 参考文献:

- 1 唐雪梅,高俊平,艾光艳,等.切花月季品种失水胁迫耐性差异及忍耐极限初探.园艺学报,1999,26(1):41~48
- 2 张常青,唐雪梅,高俊平,等.切花月季‘萨蔓莎’和‘加布里拉’失水胁迫耐性的差异.园艺学报,2002,29(6):556~560
- 3 丛日晨,赵喜亭,刘晓辉,等.月季切花采后花瓣内肽酶活性的变化.园艺学报,2003,30(2):232~235
- 4 高俊平,张晓红,黄绵佳,等.月季切花开花和衰老进程中乙烯变化类型初探.园艺学报,1997,24(3):274~278
- 5 Ye Z H, Varner J E. Induction of cysteine and serine proteases during xylogenesis in *Zinnia elegans*. Plant Molecular Biology, 1996, 30: 1233~1246
- 6 Pedro C, Juan C. Changes in the level of peptidase activities in pea ovaries during senescence and fruit set induced by gibberellic acid. Plant Physiol., 1990, 92: 1070~1074
- 7 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem., 1976, 72: 248~254
- 8 波钦诺克 X H 著.植物生物化学分析方法.荆家海译.北京:科学出版社,1981.95~101
- 9 Barbara N, Stefania C, Raffaella V, et al. PI purification and characterization of an endoprotease from alfalfa senescent leaves. Phytochemistry, 1998, 49(3): 643~649

## Effect of Water Deficit Stress on Endopeptidase Activity in Petals of Cut Rose ‘Belami’

Cong Richen, Zhao Xiting, and Gao Junping

(Department of Ornamental Horticulture and Landscape Architecture, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** Flowers with branches of cut rose ‘Belami’ (*Rosa hybrida* ‘Belami’), a cultivar with middle range tolerance to water deficit stress, were treated with 30 h water deficit stress at room temperature and 40% relative humidity. Then the flowers were reup in water, and vased continuously until loss of vasing value. Changes of the contents of soluble protein and free amino acid, and endopeptidase activity in petals were determined. The contents of soluble protein and free amino acid were increased obviously in treated petals as compared with untreated control, and the effect was lasted even after rehydration and during flowers vasing. Endopeptidase activity of petals in treated flowers was much higher than in control immediately after treatment, however the activity in treated flowers was lower than in control at pH6 determination condition although it was higher at pH10 after rehydration. A new kind of endopeptidase might be induced by the treatment.

**Key words:** Rose; Cut flower; Water deficit stress; Endopeptidase activity



#### 征文通知

### “全国桃遗传育种与栽培技术学术研讨会”征文通知

**会议时间:** 2003年9月中旬。**会议地点:** 河南省郑州市。**征文内容:** 桃种质资源的收集、保存、鉴定、创新、利用;桃遗传改良研究的新成果;桃育种技术研究,包括生物技术、抗病性鉴定技术在桃育种中的应用;栽培生理及技术研究,品种比较及生产试验总结;桃遗传育种、栽培技术研究等专题综述。**征文截止日期:** 2003年8月31日,以当地邮局邮戳为准。论文限4000~5000字,格式参照《园艺学报》,清样稿和软盘各一份,也可网上投稿。论文收到后将组织专家评审,入选者发正式会议通知,并编辑论文集。

**论文邮寄地址:** 郑州市二里岗南,中国农业科学院郑州果树研究所; **邮政编码:** 450009;

**联系人:** 王志强 王力荣; **联系电话:** 0371-6815714, 6815741; **E-mail:** peachcaas@hotmail.com

中国园艺学会 2003-04-09