

月季切花采后花瓣内肽酶活性的变化

丛日晨 赵喜亭 刘晓辉 高俊平*

(中国农业大学观赏园艺与园林系, 北京 100094)

摘 要:以切花月季耐失水胁迫品种‘萨蔓莎’和中度耐失水胁迫品种‘贝拉米’为试材,研究了采后开花衰老进程中可溶性蛋白质和游离氨基酸含量及内肽酶活性和种类的变化。结果表明,两品种可溶性蛋白质和游离氨基酸含量及内肽酶活性在开花衰老进程中的变化趋势基本一致,但是在量上差异非常明显。可溶性蛋白质含量‘萨蔓莎’低于‘贝拉米’; pH 6 时,内肽酶活性‘萨蔓莎’低于‘贝拉米’, pH 10 时相反。两品种花瓣中都存在巯基蛋白酶和丝氨酸蛋白酶。切花月季的失水胁迫耐性可能与其内肽酶活性有关。

关键词:月季;切花;开花;衰老;内肽酶

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 02-0232-04

1 目的、材料与方法

自 1995 年以来,我们以研究月季 (*Rosa hybrida*) 切花失水胁迫耐性机理和寻求提高失水胁迫耐性的措施为目的,展开了系列研究^[1~5]。本试验以不同失水胁迫耐性的切花月季品种为试材,对开花衰老进程中内肽酶活性、可溶性蛋白质和游离氨基酸含量的变化进行了比较,以期进一步揭示月季切花的衰老机理。

试验于 2000 ~ 2002 年在中国农业大学进行。试材选用耐失水胁迫品种‘萨蔓莎’和中度耐失水胁迫品种‘贝拉米’^[1],采自河北省固安县园艺场。采收标准为开花级数 2 级^[2]。将采切的花材插于盛有清水的桶中,取回后在室温下平衡 4 h,按枝长 25 cm,留 3 片复叶,在水下剪切。在室温 22 ~ 25℃、相对湿度 30% ~ 50%、散射光下于蒸馏水中瓶插。瓶插期间每日定时观测花朵开放情况(开花级数和花径增大率^[5,6]);定期取出花瓣样品液氮冷冻处理后保存在 -40℃ 冰箱中,用于可溶性蛋白质含量^[7]、游离氨基酸含量^[8]测定(单枝花样本,3 次重复)。内肽酶液提取参照 Ye 等^[9]的方法,活性测定参照 Pedro 等^[10]的方法进行,即以偶氮酪蛋白 (azocasein) 作底物,酶反应体系由 0.1 mL 酶液,0.25 mL 缓冲液,其浓度为 50 mmol/L, pH 分别为 6.0 (KH₂PO₄-NaOH) 和 10.0 (Tris-HCl), 0.15 mL 终浓度为 10g/L 的 azocasein。混合物于 37℃ 温育 3 h,然后加 1 mL 100 g/L 的三氯乙酸 (TCA) 终止反应(对照管则在温育前加 TCA),4℃ 静置 30 min,8,000 × g 离心 10 min,上清液用 UV7500 紫外—可见分光光度计记录 340 nm 下的吸光度。酶活力以比活力 $\Delta A_{340} \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1} pro.$ 表示。内肽酶种类的确定采用专一性抑制剂法,以萎蔫 (6 级) 时的花瓣为试材,按 Barbara^[11] 的方法进行。

2 结果与分析

2.1 花径增大率和开花级数的变化

图 1 表明,‘萨蔓莎’在瓶插第 2 天盛开 (4 级),第 6 天萎蔫 (6 级),而‘贝拉米’在瓶插第 3 天盛开 (4 级),第 5 天萎蔫 (6 级)。两品种花径增大率都在瓶插第 4 天达到最大,但是‘萨蔓莎’花茎增大率大于‘贝拉米’。这些结果说明,耐失水胁迫品种‘萨蔓莎’与中度耐失水胁迫品种‘贝

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

拉米’在开花和衰老进程方面存在不同。

2.2 花瓣中可溶性蛋白质和游离氨基酸含量的变化

从图 2 可以看出,花瓣可溶性蛋白质含量,两品种均随开花进程而增加,盛开末期(5 级)达最大值,然后呈下降趋势;‘萨蔓莎’低于‘贝拉米’。花瓣中游离氨基酸含量,两品种的变化趋势非常接近,都在盛开末期迅速升高。

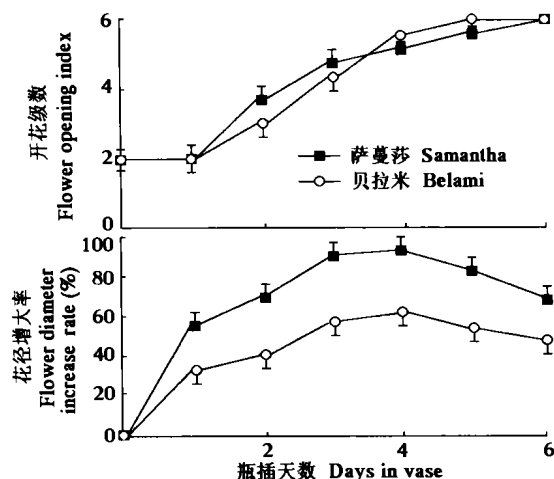


图 1 月季切花瓶插期间开花级数和花径增大率的变化

Fig. 1 Changes of flower opening index and flower diameter increase rate of cut rose in vase periods

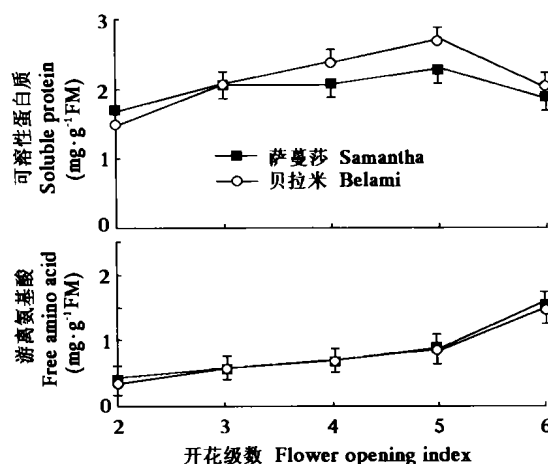


图 2 月季切花瓶插期间花瓣可溶性蛋白质和游离氨基酸含量的变化

Fig. 2 Changes of soluble protein and free amino acid content in petals of cut rose in vase periods

2.3 花瓣内肽酶活性测定中最适 pH 的确定

在测定内肽酶总活性之前,首先探讨了测定中的最适 pH 条件,结果见图 3。从中看出,在整个瓶插过程中,在 pH 6 条件下‘贝拉米’花瓣内肽酶出现了活性高峰,但‘萨蔓莎’花瓣没有活性高峰出现;在 pH 10 条件下两品种花瓣都表现了较高内肽酶活性。说明耐失水胁迫品种‘萨蔓莎’花瓣中内肽酶只在碱性环境下表现较高活性,而中度耐失水品种‘贝拉米’花瓣在酸性和碱性条件下都能表现较高活性。

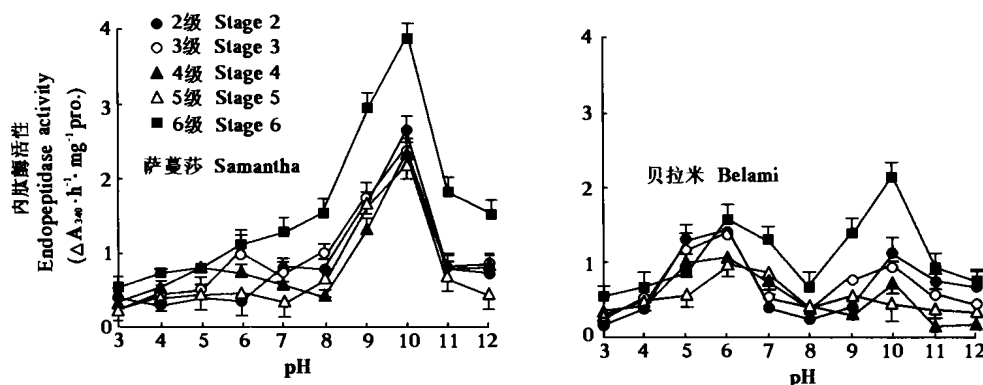


图 3 pH 值对月季切花瓶插期间花瓣内肽酶活性的影响

Fig. 3 Effects of pH value on endopeptidase activity in petals of cut rose in vase periods

2.4 花瓣中内肽酶总活性比较

进一步比较了两品种开花衰老进程中花瓣内肽酶在 pH 6 和 pH 10 条件下总活性(图 4)。pH 6 时,两品种花瓣内肽酶活性在盛开末期(5 级)以前变化趋势存在明显差异,‘萨蔓莎’在初开期(3 级)

以前有所增加,以后有所下降,盛开末期(5级)降至与绽蕾(2级)相近水平;而‘贝拉米’自蕾期至盛开末期呈下降趋势,萎蔫期略有回升。两品种在盛开末期(5级)至萎蔫期(6级)以后都呈现增加趋势。pH 10时两品种花瓣内肽酶活性变化趋势相同,为瓶插至盛开末期(5级)之前有所降低,盛开末期(5级)最低,以后迅速升高。

从图4还可以看出,在pH 6条件下‘萨蔓莎’花瓣内肽酶活性低于‘贝拉米’,但是在pH 10条件下得出相反的结果。为此,我们测定了这两个品种在整个开花衰老进程中花瓣pH值变化。所得结果是花瓣的pH值在4~6范围内变化。据此推测在实际开花和衰老过程中,耐失水胁迫品种‘萨蔓莎’花瓣中内肽酶活性可能低于中度耐失水胁迫品种‘贝拉米’。

2.5 花瓣中内肽酶种类确定

从表1可以看出,在pH 6和pH 10条件下,两品种花瓣中都存在两类内肽酶,一类在pH 6条件下,能被IA专一抑制,为巯基蛋白酶;另一类能被PMSF专一抑制,为丝氨酸蛋白酶。其中丝氨酸蛋白酶存在两种活性形式,在pH 6下表现较低活性和在pH 10下表现较高活性。

以上结果说明,两品种的共同趋势是在切花开始走向衰老时,花瓣内肽酶活性迅速升高,可溶性蛋白质含量迅速下降,游离氨基酸含量大幅度升高。但是,不同失水胁迫耐性品种内肽酶活性在开花衰老进程中存在明显差异。

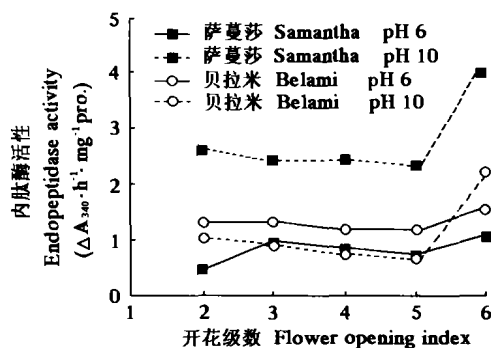


图4 切花月季‘萨蔓莎’和‘贝拉米’瓶插期间花瓣中内肽酶活性变化

Fig. 4 Changes of endopeptidase activity in petals of cut roses ‘Samantha’ and ‘Belami’ in vase periods

表1 抑制剂对切花月季‘萨蔓莎’和‘贝拉米’花瓣中内肽酶相对活性的影响

Table 1 Effect of different inhibitors on endopeptidase relative activity in petals of cut rose ‘Samantha’ and ‘Belami’ (%)

抑制剂处理 Inhibitors treatment	‘萨蔓莎’ ‘Samantha’		‘贝拉米’ ‘Belami’	
	pH 6	pH 10	pH 6	pH 10
对照 Control	100 a	100 b	100 a	100 b
EDTA	102 a	112 a	105 a	115 a
PMSF	76 b	39 c	90 b	13 c
IA	85 b	100 ab	75 b	100 ab

注: 切花开花级数6级; 同一列相同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在0.05水平上差异不显著, n=3。

Note: The petals at opening stage 6 were used as materials; The same letter in the same low means no significant differences at 5% level by Duncan's multiple range, n=3.

参考文献:

- 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
- 丛日晨, 赵喜亭, 高俊平, 等. 环己酰亚胺对月季切花开花进程及可溶性蛋白和游离氨基酸含量的影响. 见: 朱德蔚主编. 中国园艺学会第九届学术年会论文集. 北京: 中国科学技术出版社, 2001. 386~391
- 李永红, 张常青, 谭辉, 等. 提高月季切花失水胁迫耐性的抗氧化剂筛选. 见: 朱德蔚主编. 中国园艺学会第九届学术年会论文集. 北京: 中国科学技术出版社, 2001. 386~391
- 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
- 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
- 黄绵佳, 高俊平, 唐雪梅, 等. PPOH 延缓月季切花开花和衰老的研究. 园艺学报, 1998, 25 (1): 70~74
- 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
- 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
- Ye Z H, Varner J E. Induction of cystein and serine proteases during xylogenesis in Zinnia elegans. Plant Molecular Biology. 1996, 30: 1233~1246
- 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

- 11 Barbara N, Stedfania C, Raffaella V, et al. PI purification and characterization of an endoprotease from alfalfa senescent leaves. *Phytochemistry*, 1998, 49 (3): 643~649

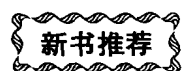
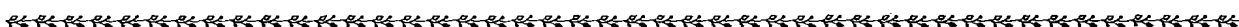
Difference of Endopeptidase Activity in Petals between Two Cut Rose Cultivars with Different Tolerance to Water Deficit Stress during Flower Opening and Senescence

Cong Richen, Zhao Xiting, Liu Xiaohui, and Gao Junping

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

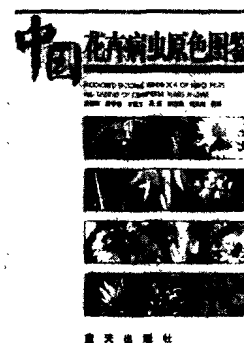
Abstract: Cut rose (*Rosa hybrida*) 'Samantha', a cultivar with strong tolerance to water deficit stress, and 'Belami', a cultivar with middle range tolerance were used to investigate the changes of contents of soluble protein and free amino acid, and endopeptidase activity in petals during flower opening and senescence. The results showed that obvious differences between the two cultivars were obtained in contents of soluble protein and free amino acid, and endopeptidase activity during flower opening and senescence, although the same change patterns were obtained. Soluble protein content was lower in 'Samantha' than in 'Belami'. Endopeptidase activity was much higher at pH 10, although it was lower at pH 6 in 'Samantha' than in 'Belami'. However, it was confirmed in petals of the two cultivars that there were two kinds of endopeptidase: mercapto proteinase and serine acid proteinase. The results above suggested that the difference of endopeptidase activity between two cultivars might be related to their tolerance to water deficit stress.

Key words: Rose; Cut rose; Flower opening; Flower senescence; Endopeptidase



《中国花卉病虫原色图鉴》 吕佩珂等主编

该图鉴共有彩版 208 页,彩色生态照片 1664 幅,病原墨线和电镜扫描图片 171 幅,文字 137 万,含花卉病虫害 1608 种,其中病害 1321 种,虫害 287 种,分上下两册。上册包括草本花卉、木本花卉、仙人掌与多浆类花卉病害 903 种,彩色照片 896 幅,彩版 112 页,文字 68 万。下册重点介绍 115 种鲜切花和草坪草病害 418 种,花木害虫 287 种,文字 69 万,含彩色生态照片 768 幅。该图鉴图文并茂、内容新颖、实用性强,是我国第一部花卉病虫害识别与防治大全,是观赏植物植保重要工具书。



农业出版社



《花卉资源原色图谱》 金波主编

本书以彩色照片为主体,展现花卉婀娜的姿态和绚丽的色彩。以植物学分类的科属排列,以种为单元,介绍其中名、别名、学名、科属、产地与习性、形态特征,繁殖栽培和应用等内容。全书囊括 142 个科的 699 种植物,千余幅彩图,包含部分野生植物资源,内容丰富,可供花卉园艺科研工作者、技术员、有关大专院校师生及广大花卉爱好者参阅。

本书科学性较强,彩图清晰、艳丽、逼真,文字简练流畅,深入浅出。既是工具书,又具可读性,兼有观赏功能,全彩印精装,为近年来国内少有的广谱性花卉原色图谱。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部,邮编 100081。