

# 失水胁迫对月季花瓣内肽酶活性的诱导及对花朵衰老进程的影响

赵喜亭, 丛日晨, 刘晓静, 高俊平

(中国农业大学观赏园艺与园林系, 北京 100094)

**摘要:** 【目的】研究失水胁迫对月季切花花瓣内肽酶活性和种类的诱导与花朵衰老进程加速之间的关系。【方法】以切花月季Samantha为试材, 分别进行了如下处理: (1) 反复失水胁迫处理, 即依次失水胁迫 24 h、复水 12 h、然后再次失水胁迫 24 h, (2) ABA预处理后的失水胁迫处理, 即 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的ABA处理 12 h后, 失水胁迫 24 h; 并以直接蒸馏水瓶插作为对照。【结果】(1) 失水胁迫和再次失水胁迫, 即两次胁迫处理期间花颈的弯曲状况相近, 但失水胁迫后花朵的瓶插状况差异非常明显, 其中, 再次失水胁迫后的花朵出现了严重的僵蕾现象。ABA预处理明显减轻了失水胁迫期间花颈的弯曲程度。(2) 第 1 次失水胁迫后复水 6 h, 花朵水势能够恢复到胁迫前的水平, 而花枝鲜重和花瓣内肽酶活性在复水 12 h后才能恢复到胁迫前的水平; 再次失水胁迫后, 花朵水势下降和花枝鲜重损失率都呈现与第 1 次胁迫相近的变化, 但是花瓣内肽酶活性的变化更为剧烈, 上升幅度更大。ABA预处理有效抑制了失水胁迫带来的水势降低、鲜重损失以及内肽酶活性的升高。(3) 对照花材在自然开放和衰老进程中, 没有检测到金属蛋白酶和巯基蛋白酶活性; 丝氨酸蛋白酶活性一直占据主导地位, 在衰老时进一步显著升高。失水胁迫对花瓣内肽酶活性和种类的诱导与花朵自然衰老诱导一致。失水胁迫明显诱导提高了丝氨酸蛋白酶活性, 复水使其活性恢复到胁迫前的水平, 再次失水胁迫进一步加剧其活性的升高。ABA预处理显著降低了失水胁迫诱导的丝氨酸蛋白酶活性的增加。【结论】失水胁迫对花瓣中丝氨酸蛋白酶活性的强烈诱导与复水后瓶插期间衰老进程加速之间存在一定的联系。

**关键词:** 月季切花; 失水胁迫; 丝氨酸蛋白酶; 衰老进程

## Water Deficit Stress-Induced Changes of Endopeptidase Activity and Types and Acceleration of Flower Senescence Process in Cut Rose (*Rosa hybrida*)

ZHAO Xi-ting, CONG Ri-chen, LIU Xiao-jing, GAO Jun-ping

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

**Abstract:** 【Objective】 This work was aimed to investigate relationship between induction of endopeptidase (EP) activity and classes and acceleration of flower senescence process by water deficit stress (WDS) in cut rose (*Rosa hybrida* L.) cv. Samantha. 【Method】 Flowers at opening stage 2 were treated with repeated WDS, namely 24 h WDS (the first WDS), 12 water recovery, and 24 h WDS (the second WDS), or by 24 h WDS followed 12 h 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA pretreatment, or held in distilled water directly as untreated controls. 【Result】 (1) Between the first WDS and the second WDS, no difference was observed in bend neck phenomena during the treatment, but obvious difference was in vase quality of cut flowers after the treatment, and severe phenomena of bull bud was obtained during vase after the second WDS. However, bend neck degree of flowers was alleviated obviously by ABA pretreatment. (2) When the first WDS was finished, water potential of flowers was recovered to the level before treatment after 6 h water recovery, while fresh weight loss of branch and EP activity of petals was recovered to the low level before treatment after 12 h water recovery. As the second WDS was performed, the changes of EP activity in petals was much dramatic compared to the first WDS finished, although almost no difference was observed in water potential and fresh weight loss between the first WDS and the second WDS. The WDS-induced decrease of water potential, loss of fresh weight and raise of EP activity were effectively suppressed

收稿日期: 2005-08-22; 接受日期: 2007-11-05

基金项目: 国家科技攻关计划项目 (2004BA521B02)

作者简介: 赵喜亭 (1971-), 女, 河南孟津人, 博士, 研究方向为植物生理与生物技术的教学和研究。通讯作者高俊平 (1960-), 男, 山西太原人, 教授, 研究方向为观赏植物采后与逆境生理。E-mail: gaojp@cau.edu.cn

by ABA pretreatment. (3) For control flowers, during the processes of flower opening and senescence, the hydrolytic activity of metalloprotease and cysteine protease in petals was undetectable, while serine protease hydrolytic activity was dominant, and further increased during senescence. The changes of EP activity and types in petals induced by WDS were consistent with that induced by flower opening and senescence. Serine protease activity in petals was induced strongly by the first WDS, and recovered to the primary level after water recovery; and the activity was elevated dramatically by the second WDS. The increment of serine protease activity induced by WDS was significantly depressed by ABA pretreatment. 【Conclusion】 These results above suggested that the increment of serine protease activity induced by WDS might be related to acceleration of flower senescence process after WDS.

**Key words:** Cut rose; Water deficit stress; Serine protease; Flower senescence process

## 0 引言

【研究意义】当前,国内外鲜切花供给主要凭借异地之间的余缺互补,即长途运输。在运输中,多采用没有任何水分补充措施的干运方式贮运。切花从采收、预冷、包装、以及贮藏等各个采后环节中,都有可能遭到不同程度的失水胁迫<sup>[1,2]</sup>。在大宗切花中,月季是对失水胁迫非常敏感的种类,当失水胁迫达到一定程度时,往往导致僵蕾、僵花、弯颈、萎蔫等,使得花朵不能正常开放,进而缩短瓶插寿命,成为月季切花长途采后流通损耗的主要原因<sup>[3]</sup>。因此,月季切花失水胁迫耐性机理的研究是国内外学者近30年来关注的热点<sup>[4-7]</sup>。【前人研究进展】植物在自然衰老进程中或遭受逆境胁迫后,能引起器官中内肽酶活性和种类的变化<sup>[8-19]</sup>,这些变化进而加速植物的衰老进程。自20世纪90年代初起,笔者以探讨月季切花失水胁迫耐性机理和发掘改善耐性措施为目标,从失水胁迫与抗氧化酶系统和非酶系统以及与内肽酶的变化之间的关联等方面进行了系列研究。笔者的前期工作表明,月季切花花瓣衰老伴随着内肽酶活性的迅速上升<sup>[20]</sup>,乙烯处理促进内肽酶活性的升高<sup>[21]</sup>;失水胁迫在加速月季切花衰老进程的同时,诱导提高了花瓣内肽酶活性<sup>[22,23]</sup>。【本研究切入点】切花经失水胁迫诱导的内肽酶是否与切花衰老过程中内肽酶活性的诱导一致?失水胁迫过程中诱导的花瓣内肽酶活性和种类的变化是否与复水后瓶插寿命缩短之间存在联系?【拟解决的关键问题】为了回答这些问题,本研究采用失水胁迫-复水-再失水胁迫,这样反复失水胁迫处理来分析失水胁迫有关的内肽酶活性和种类的变化动态;通过ABA预处理来分析失水胁迫对内肽酶诱导的可能机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及处理

试验于2003年7月~2005年5月在中国农业大学进行。供试材料为切花月季(*Rosa hybrida*)品种Samantha,是一个失水胁迫耐性较强的品种。所用花材部分购自北京郊区农场,部分取自本校科学院花卉试验区。采收标准为开花指数2级<sup>[24,25]</sup>。采切后,将花材装入盛水的容器内运回实验室。花材按花枝长30cm、留3片复叶的基准剪切后备用。

1.1.1 反复失水胁迫处理 将花材水平干置在实验台上,进行24h的失水胁迫处理,然后复水12h,接着再进行24h的失水胁迫处理,即反复失水胁迫处理。处理结束后蒸馏水瓶插。并以直接瓶插作为对照。失水胁迫环境条件为25℃、相对湿度30%~40%、80  $\mu\text{Em}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强。花枝瓶插和复水环境条件为:20℃、相对湿度40%~60%、80  $\mu\text{Em}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强、12h光周期。

1.1.2 ABA预处理 经预试验确定了ABA的适宜处理时间和浓度。将花材置于50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的ABA溶液中,在25℃、相对湿度40%~60%、和80  $\mu\text{Em}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强下,进行12h预处理。对照花材用蒸馏水在相同条件下预处理12h,然后进行24h的失水胁迫处理。

失水胁迫和瓶插期间定期进行形态学观察,并取样进行有关生理指标测定。

### 1.2 测定项目与方法

1.2.1 形态学观测 花朵形态变化用数码相机在相应时间进行拍照。开花级数按照以下标准进行判断:2级为绽蕾期,萼片下垂,外层花瓣开始松散;3级为初开期,初开,外层花瓣展开;4级为盛开期,盛开,多层花瓣展开;5级为盛末期,盛末,花朵露心;6级为萎蔫期,花瓣翻转或开始萎蔫、蓝变、焦边<sup>[24,25]</sup>。

1.2.2 鲜重损失率和水势测定 花枝鲜重损失率和花朵水势按照惯行的方法进行<sup>[23]</sup>。

1.2.3 花瓣可溶性蛋白含量和内肽酶活性测定 花瓣可溶性蛋白含量采用Bradford的方法<sup>[26]</sup>;内肽酶活性测定是在Carrasco等方法<sup>[27]</sup>的基础上进行了改进<sup>[20]</sup>。以每小时 $A_{340\text{nm}}$ 的变化值为1个酶活单位(1 unit),

内肽酶活性用每毫克蛋白中的酶单位 (units·mg<sup>-1</sup>·pro.) 表示。

**1.2.4 花瓣内肽酶种类测定** 花瓣内肽酶种类的测定采用专一性抑制法, 是在Nieri等方法<sup>[28]</sup>的基础上进行了改进<sup>[23]</sup>。内肽酶专一性抑制剂选用金属蛋白酶抑制剂乙二胺四乙酸二钠 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA, 溶剂为 330 mmol·L<sup>-1</sup> KOH溶液)、巯基蛋白酶抑制剂碘乙酸 (iodoacetic acid, IA, 溶剂为 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 7.0 的磷酸钠缓冲液)、丝氨酸蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF, 溶剂为甲醇)。底物偶氮酪蛋白终浓度为 1%。0.1 ml酶液添加到酶反应体系中。该体系由 0.25 ml 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 10 Tris-HCl缓冲液、0.15 ml 偶氮酪蛋白母液、0.1 ml抑制剂母液组成。其中, 抑制剂EDTA的终浓度为 4.0 mmol·L<sup>-1</sup>, IA和PMSF的终浓度均为 5.0 mmol·L<sup>-1</sup>。对照管和 100%酶活体系都分别加入 0.1 ml抑制剂溶液的相应溶剂。酶液体系在 37℃下保温 3 h, 然后通过添加 1 ml 10%的TCA终止反应; 对照管则在反应前加TCA。然后, 在 4℃下静置 30 min, 8 000×g离心 10 min, 取上清液, 用UV7500紫外-可见

分光光度计在 340 nm下测定吸光度。抑制百分比以  $(1 - A^0_{340} / A^i_{340}) \times 100\%$  表示, 其中,  $A^0_{340}$ 、 $A^i_{340}$  分别为 100%酶活体系、抑制剂体系与对照相比在 340 nm波长下的吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 失水胁迫对花朵开放状况的影响

切花月季Samantha直接瓶插自然开放进程中, 要经历初开、盛开、盛末以及萎蔫的过程 (图 1-A)。第 1 次 24 h失水胁迫处理, 期间 18 h起出现明显的弯颈症状, 24 h症状进一步加剧; 12 h复水, 基本恢复正常, 在接着进行的第 2 次失水胁迫中, 花枝弯颈状况与第 1 次相近 (图 1-B)。但是, 比较两次失水胁迫后瓶插状况, 差异非常明显, 即第 1 次失水胁迫 24 h后, 花朵衰老进程比直接瓶插对照明显加快; 而第 2 次失水胁迫 24 h后, 瓶插后花朵已经无法开放, 出现严重的僵蕾现象 (图 1-C)。可见月季切花反复失水胁迫对花朵开放带来的累加效应极其显著。此外, 从图 1-D可以看出, 50 μmol·L<sup>-1</sup>的ABA预处理 12 h, 明显减轻了失水胁迫期间花颈弯曲程度。

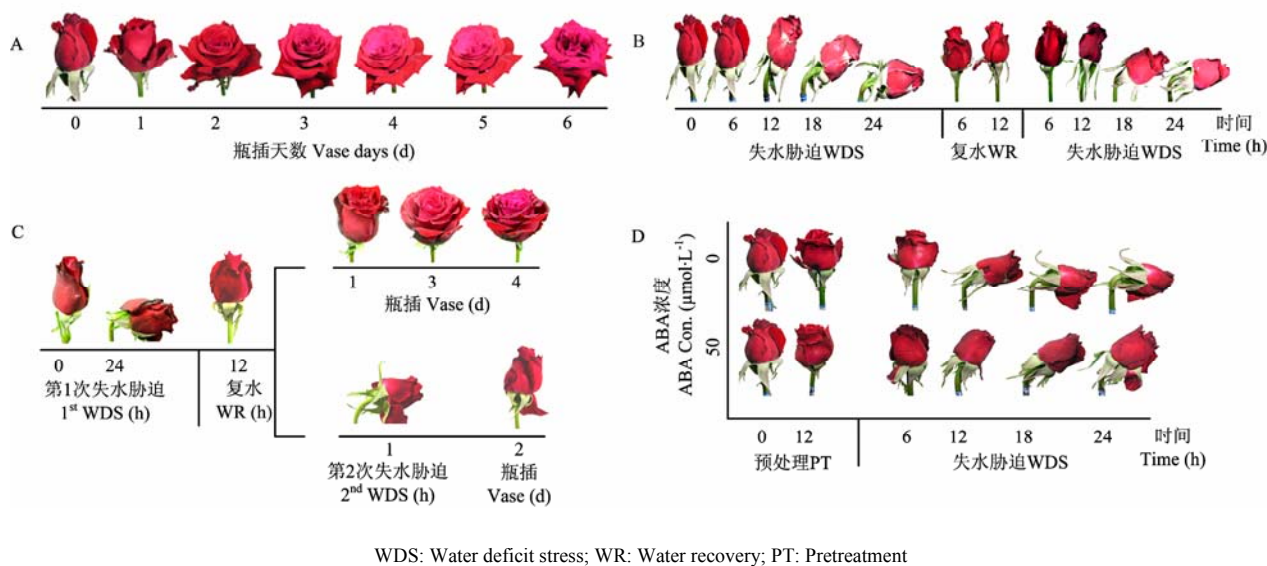


图 1 切花月季 Samantha 自然开放过程中 (A)、失水胁迫过程中 (B)、失水胁迫后瓶插期间 (C) 以及 ABA 预处理后失水胁迫期间 (D) 花朵开放状况

Fig. 1 Flower opening of cut rose Samantha during natural opening process (A), WDS (B), vasing after WDS (C), and WDS after ABA pretreatment (D)

### 2.2 失水胁迫对花枝水分状况的影响

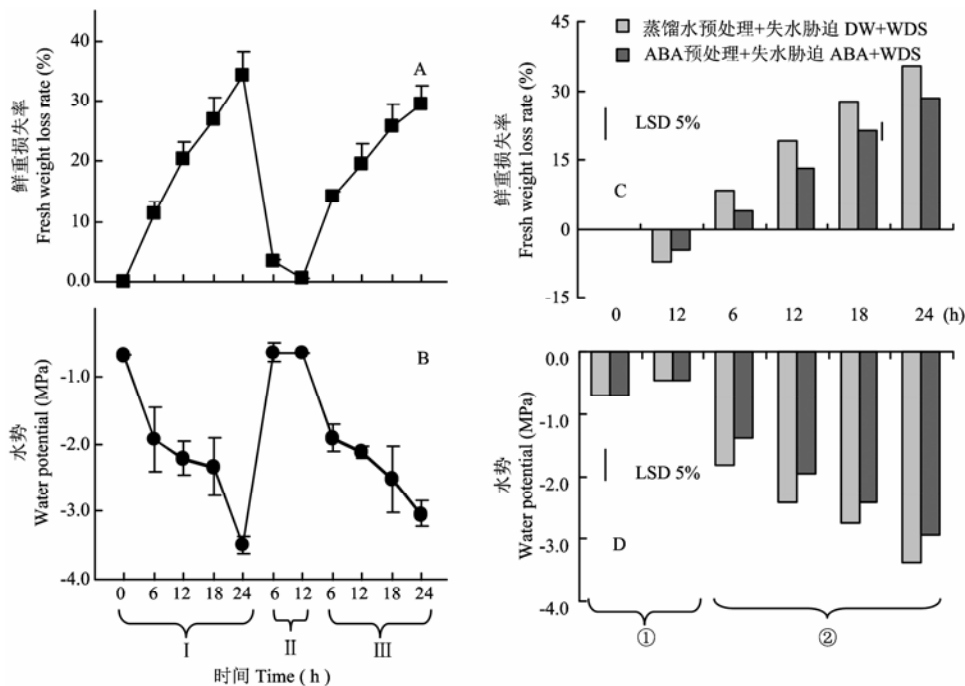
第 1 次 24 h 失水胁迫过程中, 花枝鲜重损失率呈

线性增加, 复水 12 h 后恢复到失水前的水平。接着进行第 2 次 24 h 失水胁迫处理, 这时花枝鲜重损失率的

增加趋势与第 1 次胁迫处理相近 (图 2-A)。并且, 失水过程中的鲜重变化与上述花朵形态变化一致。

在 0~24 h 的失水胁迫过程中, 花朵水势从 -0.65 MPa 迅速降到 -3.49 MPa (图 2-B); 复水又使水势快速回升, 6 h 恢复到失水胁迫前的水平。这时, 花颈在

形态上已经完全恢复 (图 1-B)。再次失水胁迫时, 花朵水势又表现出与第 1 次相似的变化趋势 (图 2-B), 说明反复失水胁迫没有加重水势变化程度。ABA 预处理明显减轻了失水胁迫期间花枝鲜重损失和水势降低程度 (图 2-C、D)。



图中每一数据为 10 (A, C) 或 5 朵花 (B, D) 的平均值。A 和 B 图中短竖线为相应结果的标准误差; C 和 D 图中左侧短竖线长度表示处理间 0.05 水平上最小显著差数值, 即 LSD 5% 的值, 其中, C 中鲜重损失率  $LSD5\%=2.61$ , D 中水势  $LSD5\%=0.34$ 。I: 第 1 次 24 h 失水胁迫; II: 复水 12 h; III: 第 2 次 24 h 失水胁迫。①: ABA 预处理 12 h; ②: 失水胁迫 24 h。DW: 蒸馏水  
Each data is an average,  $n=10$  (A, C) or  $n=5$  (B, D). Vertical lines mean the standard errors of their corresponding data in A and B. Vertical bars on the left of C and D indicate LSD values ( $P=0.05$ ), for water potential,  $LSD5\%=0.34$ , for fresh weight loss rate,  $LSD5\%=2.61$ 。I: The first WDS for 24 h; II: Water recovery for 12 h; III: The second WDS for 24 h。①: ABA pretreatment for 12 h; ②: WDS for 24 h. DW: Distilled water

图 2 切花月季 Samantha 反复失水胁迫和 ABA 预处理后失水胁迫期间花枝鲜重损失率 (A, C) 和花朵水势 (B, D) 的变化动态

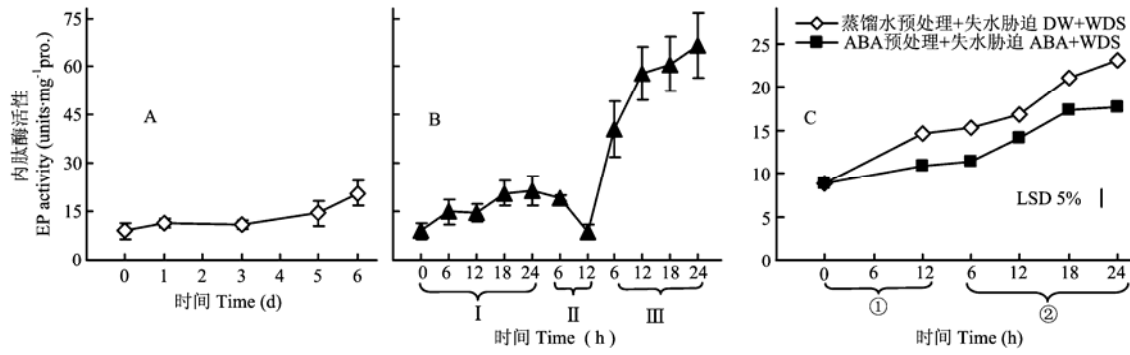
Fig. 2 Changes in fresh weight loss rate of branch and water potential of flower during repeated WDS or during WDS followed ABA pretreatment in cut rose Samantha

### 2.3 失水胁迫对花瓣内肽酶活性的影响

以偶氮酪蛋白为底物测定了切花月季 Samantha 自然开放衰老期间花瓣内肽酶活性变化动态, 结果见图 3-A。内肽酶活性在瓶插前 3 d (4 级, 盛开期) 变化平稳; 以后增加迅速, 第 6 天达到 20.8 unit, 为初始值 (第 0 天) 的 2.3 倍。说明花瓣内肽酶活性的迅速增加与切花的衰老密切相关。

反复失水胁迫期间花瓣内肽酶活性检测结果见图 3-B。花瓣内肽酶活性在失水胁迫过程中的变化趋势与自然开放衰老过程相似, 但前者活性变化远比后者剧

烈。失水胁迫 18 h, 花瓣内肽酶活性已达到直接瓶插自然开放进入衰老萎蔫期 (第 6 天) 的水平 (均为 20.8 unit)。由胁迫引起的内肽酶活性升高, 复水 6 h 只能得到部分恢复, 12 h 后才恢复到胁迫前的水平。再次失水胁迫时, 内肽酶活性急剧增加, 24 h 时, 活性高达 66.4 unit, 约是衰老时的 3 倍。由此可见, 在遭受失水胁迫时, 内肽酶的反应更敏感。失水胁迫使花瓣内肽酶活性在量上提前达到自然衰老时的水平与加速切花月季 Samantha 失水胁迫后衰老进程密切相关。



图中数据为 3 次重复的平均值。A 和 B 图中短竖线为相应结果的标准误；C 图中右侧短竖线长度表示处理间 0.05 水平上最小显著差数值，即 LSD 5% 的值，LSD5%=2.80。I：第 1 次 24 h 失水胁迫；II：复水 12 h；III：第 2 次 24 h 失水胁迫。①：ABA 预处理 12 h；②：失水胁迫 24 h。EP：内肽酶 Each data is an average, n = 3. Vertical lines mean the standard error of their corresponding data in A and B. Vertical bars on the right of the Fig-C indicate a LSD value (P=0.05), LSD5%=2.80。I：The first WDS for 24 h；II：Water recovery for 12 h；III：The second WDS for 24 h。①：ABA pretreatment for 12 h；②：WDS for 24 h。EP：Endopeptidase

图 3 切花月季 Samantha 在自然开放 (A)、反复失水胁迫 (B) 以及 ABA 预处理后失水胁迫 (C) 过程中花瓣内肽酶活性变化动态

Fig. 3 Changes of EP activity in petals of cut rose Samantha during natural opening (A), repeated WDS (B), and WDS following ABA pretreatment (C)

Mayak 和 Halevy 早在 1974 年就研究发现，适宜浓度的 ABA 可以促进月季花枝的气孔开放和蒸腾，延长其瓶插寿命。本研究 ABA 预处理明显降低了失水胁迫对花瓣内肽酶活性的诱导提高，其降低效果在 12 h 后已经达到 0.05 水平上的差异显著水平(图 3-C)。这可能的原因是 ABA 作为一种干旱胁迫的信号分子，启动了切花内部的防御机制，增强了处理时的吸水能力和失水胁迫时的保水能力，进而影响了花瓣内肽酶活性。进一步说明，失水胁迫使花瓣维持较高的内肽酶活性水平与加速切花月季 Samantha 失水胁迫后衰老进程密切相关。

2.4 失水胁迫对花瓣内肽酶种类的影响

为了确认失水胁迫诱导的内肽酶种类，采用反复失水胁迫处理措施；为了明确失水胁迫诱导的内肽酶种类变化是否与花朵自然开放衰老过程中诱导的种类变化一致，对比分析了直接瓶插期间的内肽酶种类变化，结果见表 1。蛋白酶专一性抑制剂结果显示，自然开放衰老过程中只有丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 对 Samantha 花瓣内肽酶活性有强烈的抑制作用，并且在衰老后期活性增强，说明丝氨酸蛋白酶活性的变化与月季切花的自然衰老关系密切。

失水胁迫没有明显诱导金属蛋白酶和巯基蛋白酶的活性，但使丝氨酸蛋白酶活性在失水胁迫 24 h 时就达到了自然衰老 6 级时的水平。接下来的复水过程虽

表 1 切花月季 Samantha 花朵自然开放中和反复失水胁迫过程中花瓣内肽酶种类和活性的变化

Table 1 Changes of EP types and activity in petals of cut rose Samantha during process of flower opening and repeated WDS (inhibiting activity, %)

处理 Treatment	处理时间 Treatment time	抑制剂 Inhibitor		
		EDTA	IA	PMSF
对照 Control	0 d	0 a	0 a	57 b
	3	3 a	0 a	64 ab
	5	1 a	0 a	64 ab
	6	0 a	1 a	72 a
第 1 次失水胁迫 The first WDS	0 h	0 a	0 a	57 d
	6	0 a	0 a	57 d
	12	0 a	0 a	58 cd
	18	0 a	4 a	60 bcd
复水 WR	24	5 a	0 a	77 a
	6 h	0 a	0 a	58 cd
	12	0 a	0 a	51 d
	第 2 次失水胁迫 The second WDS	6 h	0 a	0 a
第 2 次失水胁迫 The second WDS	12	0 a	3 a	61 bcd
	18	0 a	0 a	70 ab
	24	1 a	0 a	68 abc

同列相同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 0.05 水平上差异不显著，n=3。下同

The same letter in the same low means no significant differences at 5% level by Duncan's multiple range, n=3. The same as below

然使其活性恢复到胁迫前的水平, 但再次失水胁迫进一步加快了丝氨酸蛋白酶活性的增加, 18 h 就使其活性达到衰老时的水平(表 1)。说明失水胁迫使花瓣丝氨酸蛋白酶活性在量上提前达到自然衰老时的水平, 这可能与失水胁迫加速切花衰老进程相联系。

表 2 ABA 预处理对切花月季 *Samantha* 失水胁迫期间花瓣内肽酶种类和活性的影响

Table 2 Effect of ABA pretreatment on EP types and activity in petals of cut rose *Samantha* (inhibiting activity, %)

处理 Treatment	处理时间 Treatment time (h)	0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA			50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA		
		EDTA	IA	PMSF	EDTA	IA	PMSF
ABA pretreatment	0	0	0	57 b	0	0	57 ab
	12	4	9	64 a	0	0	61 a
WDS	6	0	0	63 ab	0	0	50 bc
	12	0	0	59 b	0	0	41 c
	18	0	0	72 a	0	0	63 a
	24	0	0	66 ab	0	0	56 ab

### 3 讨论

#### 3.1 关于失水胁迫对内肽酶活性和种类诱导的研究方法

反复失水胁迫作为一种研究手段, 较早的报道是用来鉴定印度主栽的 10 个抗旱性不同的高粱品种的抗旱性<sup>[29]</sup>。Jensen 利用反复干旱法对上万份小麦资源进行了鉴定, 弄清了生态地理环境与品种的抗旱性关系, 建立了抗旱、抗热基因库<sup>[30]</sup>。用反复干旱胁迫手段研究外源甜菜碱对小麦幼苗抗旱性的影响, 明确了在干旱条件下保水能力强、失水缓慢、恢复速度快的幼苗在极其干旱条件下的存活率较高<sup>[31]</sup>。

反复水分胁迫下, 植物蛋白质代谢变化规律与植物抗旱性的关系研究也已经展开。利用反复水分胁迫手段对小麦蛋白质代谢变化规律与植物抗旱性的关系进行研究, 发现复水后干旱诱导的蛋白消失, 再胁迫时, 该蛋白又重新出现<sup>[32]</sup>。对园艺作物牛耳草进行反复失水胁迫, 发现当失水胁迫程度较轻不足以造成膜不可修复的损伤时, 在复水后, 蛋白、脂类和叶绿素含量仍能恢复到失水胁迫以前的水平<sup>[19]</sup>。

反复胁迫法应用于对植物器官内肽酶活性和种类诱导的研究相对很少。对豇豆叶片的研究发现, 失水胁迫诱导了多种半胱氨酸蛋白酶活性升高, 这些半胱氨酸蛋白酶在衰老的叶片中没有发现<sup>[17]</sup>。总之, 反复胁迫法应用于观赏植物的研究未见报道。

从表 2 看出, ABA 预处理没有影响到巯基蛋白酶和金属蛋白酶的诱导情况, 但使丝氨酸蛋白酶活性在处理结束时和相应的胁迫时间段分别降低了 11、13、18、9、10 个百分点, 在  $P=0.05$  水平上都达到了显著水平。说明减缓失水胁迫的措施能降低丝氨酸蛋白酶活性。

本研究采用反复胁迫方法来探讨失水胁迫过程中月季切花花瓣内肽酶活性和种类的诱导与花朵衰老进程加速之间的联系, 结果表明, 切花在经过 24 h 的失水胁迫后瓶插衰老进程明显加快, 复水到 6 h, 花颈恢复到胁迫前的状态(图 1-B), 花朵水势恢复到胁迫前的水平, 鲜重损失也大幅下降(图 2-A, C), 而花瓣内肽酶活性却保持较高水平(图 3-B); 复水到 12 h, 花枝鲜重和花瓣内肽酶活性也基本上恢复到胁迫前水平(图 2-A、图 3-B), 再次失水胁迫, 衰老进程进一步加速, 瓶插后花朵已经无法开放, 出现严重的僵蕾现象; 鲜重损失率及花朵水势都表现出了第 1 次胁迫相似的变化(图 2-B), 但花瓣内肽酶活性的变化较第 1 次胁迫过程中的更剧烈, 上升幅度更大(图 3-B)。由此说明, 反复失水胁迫法应用于切花失水胁迫诱导花瓣内肽酶的研究是可行的。

#### 3.2 失水胁迫对内肽酶活性和种类的诱导

关于水分胁迫对内肽酶活性的诱导提高, 已经在模式植物拟南芥<sup>[33]</sup>、豇豆叶片<sup>[17]</sup>、平邑甜茶叶片<sup>[34]</sup>、以及花椰菜小花球<sup>[16]</sup>上得到证实。拟南芥的研究结果表明干旱胁迫诱导了半胱氨酸蛋白酶基因 *rd12*、*rd9* 的显著表达<sup>[33]</sup>。干旱胁迫使豇豆叶片中多种半胱氨酸蛋白酶活性升高, 干旱胁迫在蚕豆细胞壁诱导出一个编码内肽酶的 *Cyp15a* 基因<sup>[17]</sup>; 花椰菜采后在空气中放置 72 h 后, 诱导出 4 个半胱氨酸蛋白酶<sup>[16]</sup>; 在 PEG 渗透胁迫下, 提高了平邑甜茶叶片中巯基蛋白酶、丝氨

酸蛋白酶及金属蛋白酶活性,其中最活跃的是巯基蛋白酶<sup>[34]</sup>。

笔者前期的工作表明,月季切花花瓣衰老伴随着内肽酶活性的迅速上升<sup>[20]</sup>,乙烯处理促进内肽酶活性的升高<sup>[21]</sup>;失水胁迫在加速月季切花衰老进程的同时,诱导提高了花瓣内肽酶活性<sup>[22,23]</sup>。本研究在前期研究的基础上对失水胁迫对花瓣内肽酶活性和种类的诱导与衰老进程加快之间的联系进行了探讨。结果表明,花瓣内肽酶活性在失水胁迫过程中与自然开放衰老过程中的变化趋势相似,但前者活性变化要远比后者剧烈,失水胁迫使花瓣内肽酶活性在量上提前达到自然衰老时的水平与加速切花月季Samantha失水胁迫后衰老进程密切相关。

内肽酶抑制剂结果表明,失水胁迫显著诱导了花瓣丝氨酸蛋白酶活性的提高。失水胁迫使花瓣丝氨酸蛋白酶活性在量上提前达到自然衰老时的水平,可能与失水胁迫加速切花衰老进程相联系。

已有研究报道,ABA能促进水分吸收,并减少水分运输的质外体途径,增加共质体途径水流<sup>[35,36]</sup>,增强植株抵抗逆境的能力<sup>[37,38]</sup>。在瓶插液中加入ABA,促进了月季花枝的气孔开放和蒸腾,延长了寿命<sup>[39]</sup>。本研究进行了月季切花处理浓度和时间的筛选试验。用0~75  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA预处理切花后,再进行失水胁迫,发现预处理12 h以前,在0~50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内,切花在失水胁迫过程中的弯颈被减轻,且具有浓度的依赖性。当浓度大于50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后切花出现毒害现象,弯颈加重,复水困难;同时发现在0~50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,当预处理时间超过12 h,随时间延长,切花逐渐开放,浓度越高,开放程度越大,这样不能保持2级状态进入失水胁迫(结果未列出),因此本研究用50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABA对切花进行12 h预处理分析失水胁迫对内肽酶可能的诱导机理。结果表明,失水胁迫过程中,ABA预处理明显减轻了花颈缩水程度和弯头状况,说明,ABA预处理减轻了切花失水胁迫中的受害征状。同时ABA预处理也明显降低了失水胁迫对花瓣内肽酶活性的诱导提高,其降低效果在12 h后已经达到0.05水平上的差异显著水平(图3-C)。由此推测,ABA作为一种干旱胁迫的信号分子,可能启动了切花内部的防御机制,增强了处理时的吸水能力和失水胁迫时的保水能力,进而影响了花瓣内肽酶活性。进一步说明,失水胁迫对花瓣内肽酶活性的诱导提高与加速切花月季Samantha失水胁迫后的衰老进程相联系。

## 4 结论

采用反复失水胁迫法对失水胁迫过程中诱导的花瓣内肽酶活性和种类进行了探讨,明确了失水胁迫对内肽酶活性和种类的诱导与花朵自然开放和衰老诱导一致;明确了失水胁迫对花瓣丝氨酸蛋白酶的诱导可能与失水胁迫加速花朵衰老进程相联系。

## References

- [1] Mayak S, Halevy A H. Water stress as the cause of failure of flower bud opening in Iris. *Journal of American Society Horticultural Science*, 1971, 96: 482-483.
- [2] Mayak S, Borochov A, Tirosh T. Transient water stress in carnation flowers: Effect of Amino-oxyacetic acid. *Journal of Experimental Botany*, 1985, 166: 800-806.
- [3] 唐雪梅, 高俊平, 艾光艳, 孙自然. 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.  
Tang X M, Gao J P, Ai G Y, Sun Z R. Preliminary study on difference and critical value of tolerance to water stress in cut rose cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 1999, 26 (1): 41-48. (in Chinese)
- [4] Zieslin N, Kohl H C, Kofranek Jr A M, Halevy A H. Changes in the water status of cut roses and its relationship to bent-neck phenomenon. *Journal of American Society of Horticulture Science*, 1978, 103(2): 176-179.
- [5] Zieslin N. Postharvest control of vase life and senescence of rose flowers. *Acta Horticulture*, 1989, 261: 257-264.
- [6] Slootweg G. Effect of water temperature on water uptake and vase life of different cut flowers. *Acta Horticulture*, 1995, 405: 67-75.
- [7] Urban L, Six S, Barthélémy L, Bearez P. Effect of elevated CO<sub>2</sub> on leaf water relations, water balance and senescence of cut roses. *Journal of Plant Physiology*, 2002, 159(7): 717-723.
- [8] Brady C J. Nucleic acid and protein synthesis. In: Noodén L D, Leopold A C. *Senescence and Aging in Plants*. San Diego: Academic press, 1988: 147-179.
- [9] Halls C E, Rogers S W, Rogers J C. Purification of a proaleurain maturation protease. *Plant Science*, 2005, 168(5): 1267-1279.
- [10] Panavas T, Pikula A, Reid P D, Rubinstein B, Walker E L. Identification of senescence-associated genes from daylily petals. *Plant Molecular Biology*, 1999, 40(2): 237-248.
- [11] Roberts I N, Murray P F, Caputo C P, Passeron S, Barneix A J. Purification and characterization of a subtilisin-like serine protease induced during the senescence of wheat leaves. *Physiologia Plantarum*, 2003, 118: 483-490.

- [12] Wagstaff C, Leverenz M, Griffiths G, Thomas B, Chanasut U, Stead A, Rogers H J. Cysteine protease gene expression and proteolytic activity during senescence of *Alstroemeria* petals. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(367): 233-240.
- [13] Yamauchi Y, Sugimoto T, Sueyoshi K, Oji Y, Tanaka K. Appearance of endopeptidases during the senescence of cucumber leaves. *Plant Science*, 2002, 162(4): 615-619.
- [14] 李妮亚, 高俊凤. 水分胁迫对抗旱性不同的冬小麦幼芽蛋白质的影响. 干旱地区农业研究, 1997, 15(1): 85-90.  
Li N Y, Gao J F. Effects of water stress on protein in shoots of drought-tolerant and drought-sensitive cultivars of winter wheat. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 1997, 15(1): 85-90. (in Chinese)
- [15] 石 岩, 于振文, 位东斌, 余松烈. 土壤水分胁迫对小麦根系与旗叶衰老的影响. 西北植物学报, 1998, 18(2): 196-201.  
Shi Y, Yu Z W, Wei D B, Yu S L. Effects of soil water stress on the senescence of root system and flag leaves in wheat. *Acta Botany Boreali-Occidentalis Sinica*, 1998, 18(2): 196-201. (in Chinese)
- [16] Coupe S A, Sinclair B K, Waston L M, Heyes J A, Eason J R. Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54(384): 1045-1056.
- [17] Khanna-Chopra R, Srialli B, Ahlawat Y S. Drought induces many forms of cysteine proteases not observed during natural senescence in cowpea leaf. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 255(2): 324-327.
- [18] Kingston-Smith A H, Bollard A L, Minchin F R. Stress-induced changes in protease composition are determined by nitrogen supply in non-nodulating white clover. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(412): 745-753.
- [19] Navari-Izzo F, Quartacci M F, Pinzino C, Rascio N, Vazzana C, Sgherri C L M. Protein dynamics in thylakoids of the desiccation-tolerant plant *boea Hygroscopica* during dehydration and rehydration. *Plant Physiology*, 2000, 124(3): 1427-1436.
- [20] 丛日晨, 赵喜亭, 刘晓辉, 高俊平. 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.  
Cong R C, Zhao X T, Liu X H, Gao J P. Difference of endopeptidase activity in petals between two cut rose cultivars with different tolerance to water deficit stress during flower opening and senescence. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30(2): 232-235. (in Chinese)
- [21] 刘晓辉, 朱旭晖, 赵喜亭, 谭 辉, 高俊平. 两个切花月季品种花朵开放和衰老对乙烯的反应及其与内肽酶的关联. 中国农业科学, 2005, 38(3): 589-595.  
Liu X H, Zhu X H, Zhao X T, Tan H, Gao J P. Responses of flower opening and senescence to ethylene and its relation with endopeptidase in two cultivars of cut rose. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(3): 589-595. (in Chinese)
- [22] 丛日晨, 赵喜亭, 高俊平. 失水胁迫对切花月季‘贝拉米’内肽酶的影响. 园艺学报, 2003, 30(3): 352-354.  
Cong R C, Zhao X T, Gao J P. Effect of water deficit stress on endopeptidase activity in petals of cut rose ‘Belami’. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30(3): 352-354. (in Chinese)
- [23] 赵喜亭, 丛日晨, 单宁伟, 高俊平. 切花月季品种间失水胁迫耐性与花瓣内肽酶活性之间的关联. 园艺学报, 2005, 32(5): 854-860.  
Zhao X T, Cong R C, Shan N W, Gao J P. The relationship between endopeptidase activity in petals and the tolerance to water deficit stress of two cut rose cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32(5): 854-860. (in Chinese)
- [24] 马 男, 蔡 蕾, 陆旺金, 谭 辉, 高俊平. 外源乙烯对月季(*Rosa hybrida*)切花花朵开放的影响与乙烯生物合成相关基因表达的关联. 中国科学 C 辑生命科学, 2005, 35(2): 104-114.  
Ma N, Cai L, Lu W J, Tan H, Gao J P. Exogenous ethylene influences flower opening of cut roses (*Rosa hybrida*) by regulating the genes encoding ethylene biosynthesis enzymes. *Science in China Series C-Life Sciences*, 2005, 48(5): 434-444.
- [25] Wang D, Fan J, Ranu R S. Cloning and expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase cDNA from *rosa (Rosa hybrida)*. *Plant Cell Reports*, 2004, 22(6): 422-429.
- [26] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [27] Carrasco P, Carbonell J. Changes in the level of peptidase activities in pea ovaries during senescence and fruit set induced by gibberellic acid. *Plant Physiology*, 1990, 92(4): 1070-1074.
- [28] Nieri B, Canino S, Versace R, Alpi A. Purification and characterization of an endoprotease from alfalfa senescent leaves. *Phytochemistry*, 1998, 49(3): 643-649.
- [29] Nour A E M, Weibel D E, Todd G W. Effect of repeated drought periods on the survival of sorghum seedling. *Agronomy Journal*, 1978, 70: 509-510.
- [30] Jensen H E. Drought matter production of spring wheat subjected to water stress at various growth stage. *Cereal Research Communication*, 1984, 12(1): 19-25.
- [31] 景蕊莲, 昌小平, 胡荣海. 外源甜菜碱对小麦幼苗抗旱性的影响. 干旱地区农业研究, 1998, 16(2): 1-5.  
Jing R L, Chang X P, Hu R H. Effects of exogenous betaine on the



- drought resistance of winter wheat seedlings. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 1998, 16(2): 1-5. (in Chinese)
- [32] 李妮亚, 高俊凤, 汪沛洪. 小麦幼芽水分胁迫诱导蛋白的特征. *植物生理学报*, 1998, 24(1): 65-71.
- Li N Y, Gao J F, Wang P H. The characteristics of induced protein in shoots of wheat seedlings under water stress. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1998, 24 (1): 65-71. (in Chinese)
- [33] Koizumi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Tsuji H, Shinozaki K. Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine peptidases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 1993, 129: 175-182.
- [34] 曹 慧, 韩振海, 许雪峰. 水分胁迫诱导平邑甜菜碱叶片衰老期间内肽酶活力的变化及其生化特性研究. *中国农业科学*, 2002, 35(2): 1514-1518.
- Cao H, Han Z H, Xu X F. Effects of water stress on endopeptidases activity and biochemical properties of malus hupehensis leaves during aging process. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(2): 1514-1518. (in Chinese)
- [35] Morillon R, Chrispeels M J. The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(24): 14138-14143.
- [36] Steudle E. Water uptake by roots: effects of water deficit. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51(350): 1531-1542.
- [37] Wang X J, Loh C S, Yeoh H H, Sun W Q. Drying rate and dehydrin synthesis associated with abscisic acid-induced dehydration tolerance in *Spathoglottis plicata* orchidaceae protocorms. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(368): 551-558.
- [38] Gao X P, Pan Q H, Li M J, Zhang L Y, Wang X F, Shen Y Y, Lu Y F, Chen S W, Liang Z, Zhang D P. Abscisic acid is involved in the water stress-induced betaine accumulation in pear leaves. *Plant Cell Physiology*, 2004, 45(6): 742-750.
- [39] Mayak S, Halevy A H. Interrelationships of ethylene and abscisic acid in the control of rose petal senescence. *Plant Physiology*, 1972, 50(3): 341-346.

(责任编辑 曲来娥)

---

## 更正

经中国新闻出版总署批准备案,《中国农业科学》于2008年起订价改为70元/册,全年订价840元。由于编辑部的疏忽,该刊2008年第一期版权页处未做相应更改。特此说明。并对广大读者致以诚挚的歉意。

编辑部