

# 大丽菊花瓣衰老过程中保护酶活性变化的研究

阚雪芹, 孙悦, 苏媚, 周丽丽, 徐文斐, 谈建中

(苏州大学 建筑与城市环境学院园艺系 江苏 苏州 215123)

**摘要:**为探讨观赏植物大丽菊衰老相关的生理生化指标, 对不同开花时期花瓣的蛋白质表达量及保护酶活性进行了研究。结果表明:随着大丽菊花朵的开放与衰老, 花瓣的可溶性蛋白质含量持续减少, 而过氧化氢酶(CAT)的表达量呈先增后减的变化倾向。同时, 过氧化氢酶与超氧化物歧化酶(SOD)活性都表现为先升后降的变化趋势, 但二者在变化时序上存在差异, 而过氧化物酶(POD)活性则表现为前期下降后期上升的倾向。由此推测SOD、CAT及POD可能依次是大丽菊花瓣衰老的不同阶段清除活性氧的关键酶。

**关键词:**大丽菊; 衰老; 双向电泳; 保护酶活性; 过氧化氢酶

**中图分类号:**S 682.2<sup>+</sup>61 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)19-0124-04

被子植物的花包括萼片、花瓣、雄蕊及雌蕊等, 其衰老速度及形态变化也因器官不同而有差异, 涉及到复杂的生理生化过程, 也是基因和环境因素综合作用的结果。因此, 国内外有关花卉衰老的研究涉及范围较广<sup>[1]</sup>, 其中大多集中在切花离体花瓣的生理生化<sup>[2-3]</sup>及保鲜技术方面<sup>[4,5]</sup>, 但对观赏植物大丽菊的衰老过程及其生理生化迄今尚少研究报道。大丽菊(*Dahlia pinnata* Cav.)为菊科大丽菊属多年生球根花卉, 花色丰富, 色泽鲜艳, 花型多样, 是重要的园林绿化植物。但大丽菊单花在自然条件下花瓣衰老较快, 盛花期仅4~5 d。因此, 研究大丽菊花瓣的衰老机理与切花保鲜技术具有较好的应用价值。该研究应用双向电泳及质谱分析技术, 以单瓣型黄色系大丽菊为材料, 对不同开花时期花瓣中蛋白质的表达量和保护酶活性进行了分析, 以期为深入探讨大丽菊花瓣衰老机理及花期调控技术提供新的试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以正常生长的黄色系大丽菊(*Dahlia pinnata* Cav.)花瓣为试验材料, 根据花瓣形态的变化, 将其发育和衰老过程分为现蕾期(A)、透色期(B)、初花期(I)、盛花期(F)、衰败期(S)、枯萎期(W)等6个时期。先后采集不同时期的在体新鲜花瓣, 用双蒸水冲洗干净、晾干后, 分别

用于蛋白质电泳及酶活性测定的样品制备。

### 1.2 蛋白质双向电泳及质谱分析

选取大丽菊开花过程中透色期、盛花期和衰败期的新鲜花瓣, 采用酚-甲醇/醋酸铵沉法提取蛋白质<sup>[6]</sup>, 采用Bradford法测定蛋白浓度。进行IPG-IEF/SDS-PAGE双向电泳、质谱分析及蛋白质鉴定<sup>[7]</sup>。

### 1.3 保护酶活性测定

保护酶液的提取: 取大丽菊不同开花时期的新鲜花瓣0.5 g于预冷的研钵中, 加入1 mL预冷的磷酸缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.8), 在冰浴上研磨成匀浆, 加入1 mL磷酸缓冲液, 将匀浆转入5 mL离心管, 再加2 mL缓冲液冲洗研钵合并匀浆, 于6 000 r/min、4℃条件下离心17 min, 取上清液为保护酶的粗提液<sup>[8]</sup>。

保护酶活性的测定: 采用紫外吸收法<sup>[9]</sup>测定过氧化氢酶(CAT)活性; 氮蓝四唑(NBT)法<sup>[10]</sup>测定超氧化物歧化酶(SOD)活性; 愈创木酚法<sup>[10]</sup>测定过氧化物酶(POD)活性。每项指标重复测定3次, 取平均值计算3种保护酶活性的大小。

## 2 结果与分析

### 2.1 大丽菊花瓣衰老过程中蛋白质表达量的变化

大丽菊花瓣从开始现蕾到花朵盛开, 是细胞扩张和生长的阶段, 此后进入衰老阶段, 表现为花瓣逐渐失水, 花色变淡, 进而萎蔫凋谢。参照芍药开花等级的划分<sup>[11]</sup>, 大丽菊花瓣的生长和衰老过程可分为6个不同的生长时期, 其色泽和形状变化如图1所示。其中现蕾期的花蕾较小, 质地坚硬, 花被全部或部分为花萼所包被; 而至枯萎期花瓣褐色增多, 并开始枯萎或脱落, 已失去观赏价值。该研究根据大丽菊花瓣衰老过程中的形态变化, 选择透色期、盛花期和衰败期等3个时期, 对花瓣

第一作者简介: 阚雪芹(1982-), 女, 江苏徐州人, 硕士, 研究方向为园林植物生物技术。

通讯作者: 谈建中(1957-), 男, 博士, 教授, 研究方向为园林植物生物技术。E-mail: szutjz@hotmail.com.

收稿日期: 2010-06-07

蛋白质表达量的动态变化进行了分析。结果表明,花瓣中可溶性蛋白质的含量随着衰老进程而显著下降,盛花期和衰败期分别下降至透色期的 77.9%和 52.4%(图

略),这种减少可能是由于蛋白质水解酶活性升高、而合成速率下降所致,与花瓣衰老进程显示了较高的关联性。

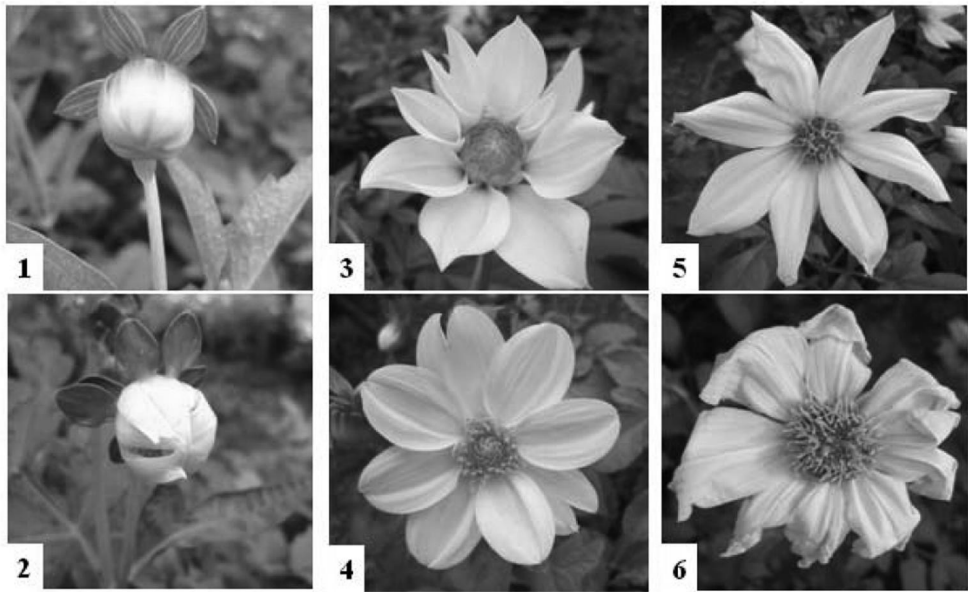


图 1 大丽菊花瓣不同开花时期的形态特征

注: 1-现蕾期(A), 2-透色期(B), 3-初花期(I), 4-盛花期(F), 5-衰败期(S), 6-枯萎期(W); 下同。

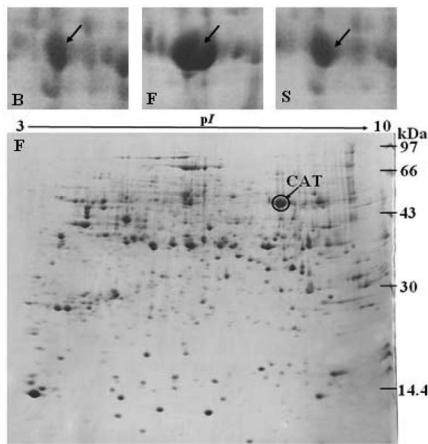


图 2 大丽菊花瓣不同开花时期 CAT 的差异表达

其次,根据蛋白质双向电泳的分析结果,在大丽菊花瓣的不同发育阶段(透色期、盛花期和衰败期)中,分别检测到了 432、421 和 387 个蛋白质组分(斑点),其中有 44 个斑点的表达量差异达到了 2 倍以上。结合质谱分析与数据库检索,结果鉴定了其中 1 个斑点为过氧化氢酶,在大丽菊花瓣中具有较高的表达量,并随花瓣衰老进程而呈先升后降的趋势,即盛花期(F)的表达量最高,分别为透色期(B)的 3.6 倍、衰败期(S)的 2.2 倍(图 2)。现已清楚,过氧化氢酶广泛存在于动物、植物和微生物体内,可以催化细胞内过氧化氢分解,防止过氧化,

是生物防御系统的关键酶之一<sup>[12]</sup>。因此,可以认为过氧化氢酶的表达量变化可以作为花瓣衰老进程的生化指标之一。

## 2.2 大丽菊花瓣衰老过程中保护酶活性的变化

2.2.1 过氧化氢酶活性的变化 为探讨大丽菊花瓣衰老与保护酶功能之间的关系,首先对不同开花时期花瓣的过氧化氢酶(CAT)活性进行了分析,结果如图 3 所示,CAT 活性在整个花期中的变化趋势是先上升后下降,呈现单峰曲线,在盛花期达到最大值,在枯萎期降到最低。这与前述双向电泳中 CAT 的表达量变化趋势相一致,也与其它多种植物的研究结果相似,如在桂花花瓣<sup>[13]</sup>、月季切花<sup>[14]</sup>、芍药花瓣<sup>[15]</sup>、红树叶片<sup>[16]</sup>的衰老过程中,过氧化氢酶活性也表现为先升后降的倾向。

2.2.2 超氧化物歧化酶与过氧化物酶活性的变化 超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)与 CAT 同属保护酶系统,其中 SOD 具有清除体内过量的活性氧,维持活性氧代谢平衡的作用,是生物防御活性氧毒害的关键性保护酶之一。在该研究中,随着大丽菊花瓣的生长发育,SOD 活性呈先升后降的趋势,透色期达到最高,随后显著降低,并且在开花后期一直维持在较低水平(图 4-A),这与牡丹<sup>[17]</sup>和海仙花<sup>[18]</sup>等花朵开放和衰老过程具有相似的变化倾向。与 CAT 和 SOD 活性的变化趋势有所不同,大丽菊花瓣开放过程中,POD 活性呈先降后升的变化趋势,初花期(I)的活性降到最低,仅为现蕾

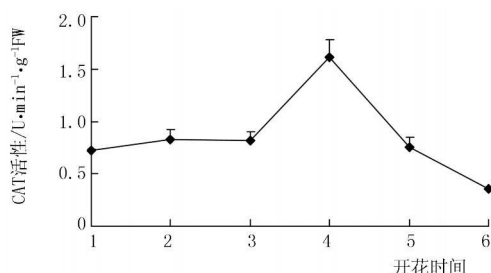


图3 大丽菊花瓣不同开花时期 CAT 活性的变化

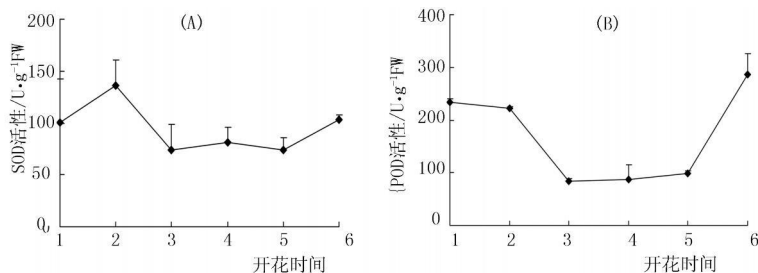


图4 大丽菊花瓣不同开花时期 SOD(A)及 POD(B)活性的变化

期的 1/2 左右;随着花朵的开放直至衰老萎蔫, POD 活性又逐渐升高, 衰败期可达到与现蕾期相当的活性水平(图 4-B), 这与于凤鸣关于唐菖蒲<sup>[9]</sup>和紫丁香<sup>[20]</sup>的结果相似。

### 3 讨论

衰老是生物界的普遍现象, 有关植物衰老的原因先后有过多种假说, 其中自由基学说认为植物衰老是由于体内产生过多的自由基, 对蛋白质、核酸、膜生物以及叶绿素等生物大分子具有破坏作用, 从而导致器官及植物体衰老、死亡。该研究以大丽菊不同开花时期的花瓣为试验材料, 通过对花瓣蛋白质双向电泳及质谱鉴定的结果分析, 发现 CAT 的表达量随花瓣衰老进程而发生显著变化, 在此基础上探讨了保护酶 CAT、SOD 及 POD 活性的动态变化, 为阐明花瓣衰老过程及调控机理提供了新的信息, 也为衰老生理研究提供了新的思路和途径。

植物自身具备的防卫系统一般能维持活性氧产生与清除之间的代谢平衡, 其中 SOD、CAT、POD 被认为是清除活性氧的关键酶<sup>[21]</sup>。现已清楚, SOD 和 CAT 活性在器官衰老前期都表现为上升趋势, 大丽菊花瓣中也检测到相同的变化倾向, 表明植物可以通过增强保护酶活性的途径来清除体内过多的活性氧物质, 以维持体内各种代谢之间的平衡。但在开花后期由于蛋白质的降解或合成减少, 酶活性降低, 活性氧清除能力下降。而此时 POD 活性随着花瓣的衰老而逐渐升高, 表明这一时期植物体内产生的过氧化物主要依赖 POD 来清除。由此推测 SOD、CAT 及 POD 可能依次是大丽菊花瓣衰老过程中不同阶段担负清除活性氧主要功能的关键酶, 它们的活性变化可以作为大丽菊花瓣衰老进程的生理生化指标。

### 参考文献

[1] Wouter G, Ernst J. Physiology and molecular biology of petal senescence [J]. Experimental Botany, 2008, 59(3): 453-480.  
[2] 刘雅莉, 王飞, 张恩让. 百合花不同发育期生理变化与衰老关系的研究 [J]. 西北农业大学学报, 2000, 28(1): 109-112.

[3] 张莉, 高宏秀. 月季切花采后生理及衰老机理研究进展 [J]. 湖南农业科学, 2009(1): 122-124.  
[4] 田月梅, 刘全国, 马显才. 扶郎花离体后生理反应及保鲜剂的应用 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(27): 8436-8437.  
[5] 蔡英卿. 保鲜剂延缓非洲菊切花衰老的生理作用 [J]. 泉州师范学院学报(自然科学), 2001, 19(6): 80-82.  
[6] Wang W, Vignani R, Sali M, et al. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis [J]. Electrophoresis, 2006, 27(13): 2782-2786.  
[7] 刘艳艳. 家蚕幼虫期和蛹期发育相关蛋白质组的研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2009.  
[8] 时连辉, 牟志美, 姚健. 不同桑树品种在土壤水分胁迫下膜伤害和保护酶活性变化 [J]. 蚕业科学, 2005, 31(1): 13-17.  
[9] 高俊凤. 植物生理学实验指导 [M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000, 194-196.  
[10] 李合生, 孙群, 赵世杰, 等. 植物生理生化试验原理与技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.  
[11] 成仿云, 高水, 于晓南. 芍药花蕾成熟及开花的阶段划分与形态类型 [J]. 园艺学报, 2009, 36(4): 611-613.  
[12] 张坤生, 田荟琳. 过氧化氢酶的功能及研究 [J]. 食品科技, 2007(1): 8-11.  
[13] 陈洪国, 刘顺枝. 湖北咸宁地区桂花开花和衰老过程中花瓣的某些生理生化指标变化 [J]. 植物生理学通讯, 2006(1): 118-120.  
[14] 曾秋莲, 徐杰, 尹汉萍, 等. 花衰老过程中的生理生化变化及对花衰老的调节(综述) [J]. 亚热带植物科学, 2004, 33(3): 73-76.  
[15] 丁义峰, 刘萍, 李娜, 等. 芍药花瓣代谢活动的初步研究 [J]. 江苏农业科学, 2009(1): 147-148.  
[16] 张平, 谢潮添, 杨盛昌, 等. 红树叶片衰老过程中活性氧和保护酶活性的变化 [J]. 海洋科学, 2004(5): 37-40.  
[17] 张圣旺, 郑荣生, 孟丽, 等. 牡丹花衰老过程中的生理生化变化 [J]. 山东农业大学学报, 2002, 33(2): 166-169.  
[18] 王支槐, 徐柳. 海仙花开花和衰老过程中的生理变化 [J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(6): 419-421.  
[19] 于凤鸣. 唐菖蒲开花过程中的部分生理生化变化 [J]. 河北农业技术师范学院学报, 1999, 13(2): 40-42.  
[20] 于凤鸣. 紫丁香花开放与衰老中几项生化指标的研究 [J]. 河北职业技术师范学院学报, 2000, 14(1): 36-38.  
[21] 夏铁骑. 自由基、活性氧及植物衰老机理研究的现状与进展 [J]. 淮阳职业技术学院学报, 2005, 18(2): 23-24.

# 边坡植被恢复技术体系及应用模式

郅凤超<sup>1</sup>, 彭国涛<sup>2</sup>, 许小娟<sup>1</sup>, 辜彬<sup>1</sup>

(1. 四川大学 生命科学学院 四川 成都 610064 2. 四川大学 建筑与环境学院, 四川 成都 610207)

**摘 要:** 对边坡植被恢复技术方法进行分类, 介绍了挡土翼工法的延伸工法—挡土匣新型工艺等各类边坡植被恢复技术方法的作用方式、特性及适用范围, 在此基础上提出了边坡植被恢复技术体系, 并针对边坡地质构造和岩性、边坡构成特点与规模特征等提出了相应边坡植被恢复工程技术方法组合和选择模式。

**关键词:** 边坡植被恢复; 技术体系; 方法组合  
**中图分类号:** S 729.29 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)19—0127—04

环境污染和生态破坏是人类面临的重大社会问题之一, 项目开发与环境保护兼顾是经济可持续发展的重大课题。对于工程建设来说, 合理利用资源、保护资源、保护环境是必须正视和认真对待的问题。在铁路、公路、水电等工程建设中, 经常要开挖大量边坡, 边坡的开挖破坏了原有的植被覆盖层, 导致出现大量的次生裸地以及严重的水土流失现象, 加剧了生态系统的退化。

## 1 边坡植被恢复存在的问题

“人类活动与自然和谐共处 经济发展与环境保护

协调并进”是人类生存和发展的基本要求<sup>[1]</sup>。公路、铁路、水电等基础设施建设工程施工中, 无疑将带来生态环境的破坏。虽然目前边坡绿化水平逐渐提高, 但也存在着不少问题。

- 1.1 边坡植被恢复技术方法多, 不成体系
- 边坡植被恢复目前没有统一的标准和规范, 在技术应用中存在着一系列问题。虽然边坡植被恢复技术方法多, 但相应的使用条件不清, 技术方法的性能存在局限性, 没有具体说明适用范围。导致业主、监理、施工等工程技术人员无法对边坡植被恢复技术进行选择。
- 1.2 边坡植被恢复技术在实际应用中存在单一性、片面性

现在还没有边坡植被恢复技术的系统规范, 也没有边坡植被恢复技术的国家技术标准, 所以针对不同对象、不同条件, 工程技术人员皆采用同样的复绿技术方法。没有对边坡植被恢复技术方法进行分类及进行方法组合, 因此有必要对边坡植被恢复技术方法进行分

**第一作者简介:** 郅凤超(1986-), 女, 在读硕士, 研究方向为生态城市园林设计与工程。  
**通讯作者:** 辜彬(1959-), 男, 博士, 教授, 研究方向为生态恢复与生态工程。E-mail: amakusa@126.com。  
**基金项目:** 浙江省国土资源厅资助项目(2006-002)。  
**收稿日期:** 2010-06-10

## Analysis of Enzyme Activity of Protective System in *Dahlia pinnata* Cav Petals During Senescence

KAN Xue-qin, SUN Yue, SU Mei, ZHOU Li-li, XU Wen-fei, TAN Jian-zhong

(Department of Horticulture, School of Architecture and Urban Environment, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123)

**Abstract:** To investigate the physiological-biochemical character related to the senescence of ornamental *Dahlia pinnata* Cav, the protein expression level and protective enzymes activity were analyzed by using the petals in different flowering periods. The results showed that the content of soluble protein decreased continuously, and the expression of CAT first increased and then decreased during the petal senescence. At the same time, the activity of CAT and SOD rose first and then fell, which changed in different periods. However, the activity of POD had an opposite change tendency compared with that of CAT and SOD. Base on the results, it can be concluded that SOD, CAT and POD may be the key enzyme to scavenge reactive oxygen in different periods of *Dahlia petal* senescence, respectively.

**Key words:** *Dahlia pinnata* Cav; senescence; two dimensional electrophoresis; protective enzyme activity; catalase