

垂丝海棠插穗生根与可溶性蛋白和激素变化的关系

许晓岗¹, 王 俊², 童丽丽³, 李志文²

(1. 南京林业大学 森林资源与环境学院 南京 210037; 2. 南京莫愁湖公园管理处, 南京 210006; 3. 金陵科技学院 园艺学院, 南京 210001)

摘 要: 利用 SDS-PAGE 电泳技术和酶联免疫吸附分析法, 研究了垂丝海棠插穗切口处的可溶性蛋白质变化和激素变化与生根的关系。结果表明: 46KD、39KD、31KD、28KD、26KD、24KD 等可溶性蛋白质等与生根有关。其中, 39KD、26KD、24KD 是调控蛋白, 其作用是诱导细胞的脱分化和再分化, 愈伤组织形成及根原基的产生有关, 当不定根形成后即消失, 46KD、31KD、28KD 蛋白是伴随不定根产生而新形成的蛋白, 促进垂丝海棠插穗的生根, 46KD 蛋白 是一种阻碍细胞分化的蛋白, 对生根不利。

关键词: 垂丝海棠; 可溶性蛋白; 不定根; 插穗
中图分类号: S 685. 99; Q 946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2008)01—0107—05

垂丝海棠(*Malus halliana* Roehne)是重要的观花及观果树木, 其苗木需求量逐年增加, 如何快速繁殖大量优质苗木已成为垂丝海棠苗木生产上急需解决的关键问题。多年来, 人们对海棠类的生根特性进行了在一些细胞学水平上的研究, 主要包括外源激素、扦插基质、扦插季节等因素对扦插生根能力的影响以及扦插生根的解剖学过程等方面。但从分子水平对垂丝海棠进行蛋白质组分及含量变化的研究尚未见报道, 对垂丝海棠生根过程不同时期插穗中可溶性蛋白质变化进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)^[1], 以及扦插生根过程中激素变化的测定试验(ELISA), 通过分析比较来研究对生根有影响的特异蛋白, 从分子水平上初步探索了不定根的发端与其发育的过程中可溶性蛋白质变化的关系, 为垂丝海棠的苗木扦插繁殖提供理论依据。

1 试验方法

内源激素测定采用酶联免疫吸附分析法(ELISA)。可溶性蛋白质的测定试验采用十二烷基磺酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium Dodecyl Sulphate-PolAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)法。

1.1 试验材料

试验材料为 2005 年 4~5 月间取自南京中山植物园实验基地的 3 a 生垂丝海棠的实生苗。每插穗长 10~12 cm, 保留 3 个芽。垂丝海棠的插穗分别用不同处理后扦插: A 处理为 500 mg/L 的 NAA 水溶液; B 处理为 500 mg/L 的 NAA+IBA 水溶液(2 种激素含量各占一半)。2 种处理的时间均为 60 min。在扦插后, 于不同时

期取插穗切口处 5 cm 茎段带回实验室作为待用的试验材料^[2]。

1.2 试验溶液的配制和插穗切口处可溶性蛋白的提取

1.2.1 提取缓冲液的配制 0.0625 mol/L Tris-HCL (pH 6.8), SDS 0.5%, 甘油 5%, β-巯基乙醇 3%。

1.2.2 上样缓冲液的配制 0.05 mol/L Tris-HCL (pH 6.8)12.5%, 甘油 10%, β-巯基乙醇 5%。

1.2.3 提取过程 取大约 0.5 g 的插穗切口的组织放在研钵中, 再加入材料重量 10% 的 PVP(即约 0.05 g)和少许的石英砂(PVP 的作用是防止蛋白在研磨过程中被氧化)并加入液氮进行研磨。将充分研磨过的样品转入 5 mL 的离心管中, 再加入 2.5 mL 的提取缓冲液, 摇匀后在 -4℃ 下提取 1 h。然后用 10 000 rpm 离心 20 min。取上清液装入 2 个 5 mL 的离心管中, 按 1/3.5 加入预冷(-20℃)的丙酮, 即每个管中加入丙酮 3.5 mL。然后放在 -20℃ 沉淀蛋白 40 min。沉淀后以 10 000 rpm 离心 18 min。将丙酮倒掉, 离心管在 -20℃ 的冰箱放 20 min, 让丙酮充分挥发。用乙醇/乙醚(1/1)600 μL 升溶解上述蛋白, 并转入 1 mL 离心管。用 10 000 转离心 16 min, 倒掉上清液, 将离心管放在 -20℃ 的冰箱内 30 min, 让乙醇和乙醚充分挥发。用上样缓冲液溶解上述蛋白质, 上样缓冲溶液的用量按 600 μL/g 加入。以 9 000 rpm 离心 5 min。上清液放在 -20℃ 下保存备用。

1.3 SDS 聚丙烯酰胺凝胶的制备

需要配制的贮存液为: 30% 丙烯酰胺溶液[丙烯酰胺 N, N'-甲基双丙烯酰胺(W/V)], 1.5 mol/L Tris (pH 8.8), 1.0 mol/L Tris (pH 6.8), 10% SDS, 10% 过硫酸铵(现用现配)。

1.4 电泳、染色和脱色

进行 SDS-PAGE 使用了 6 种标准蛋白, 分别是磷酸

第一作者简介: 许晓岗(1968-), 男, 江苏南京人, 博士, 南京林业大学森林资源与环境学院讲师。
收稿日期: 2007-09-03

化酶 B(Rabbit phosphorylase, 分子量 97.4 KD), 牛血清蛋白(Bovine serum albumin, 66.2 KD), 兔肌动蛋白(Rabbit action, 43 KD), 牛碳酸酐酶(Bovine carbonic anhydrase, 31 KD), 胰蛋白酶抑制剂(Trypsin inhibitor, 20.1 KD), 鸡蛋清溶菌酶(Hen egg white lysezyme, 14.4 KD)。

表 1 分离胶和浓缩胶的配比		
溶液成分 (胶粘度 3.33%)	分离胶 20 mL) 胶浓度 12%	浓缩胶(14 mL) 胶浓度 5%
水	6.6	9.5
30% 丙烯酰胺溶液	8.0	2.37
1.5 mol/L Tris (pH 8.8)	5.0	—
1.0 mol/L Tris (pH 6.8)	—	1.75
10% SDS	0.2	0.14
10% 过硫酸铵	0.2	0.14
TEMED	0.08	0.28

注 TEMED-N, N' : N' -四甲基乙二胺。

电泳缓冲液的组成: 25 mmol/L Tris, 250 mmol/L 甘氨酸(pH 8.3)0.1% SDS 在 900 mL 去离子水中溶解 15.1 g 甘氨酸、Tris 碱和 94 g 甘氨酸, 然后加入 50 mL 10%(W/V)的电泳级 SDS 贮存液, 用去离子水定容至 1 000 mL 配成 5 倍的贮存液。染色液的成分: 0.1% 考马斯亮兰 R-250, 50% 甲醇, 10% 冰醋酸, 40% 蒸馏水。脱色液的成分: 5% 甲醇, 7% 冰醋酸, 88% 蒸馏水。电泳时间 4.5 h, 电压 130~150 V。当溴酚兰指示剂到达电泳槽的底部时, 取下凝胶, 作好标记, 放入染色液中过夜染色。染色后的凝胶转入脱色液中脱色 2~3 d, 直到凝胶的背景色变得很浅, 条带清晰可见时停止脱色。

1.5 凝胶照像

电泳结束的凝胶用 UVP 凝胶成像系统 GDS 7600 (Gel Documentation System)进行照像。

2 试验结果

2.1 插穗生根过程中 4 种内源激素的变化

经过 2 种不同处理后扦插试验, B 处理在生根率和生根数量上总是比 A 处理要高许多。垂丝海棠 A 处理生根率为 34.5%, 垂丝海棠 B 处理生根率为 91.02%。

表 2 不同处理后插穗的扦插生根率			
处理方式	生根插穗数	插穗总数	生根率%
A 处理	158	464	34.50
B 处理	436	479	91.02
对照	39	376	10.37

2.1.1 激素 ZR 在不同处理的垂丝海棠插穗间的变化

ZR 对细胞的延伸生长起重要作用。当插穗从母体取下的初始阶段, 由于 ZR 的供应路线被切断, 插穗切口处组织细胞的脱分化, ZR 的消耗利用正常进行, 因此其含量逐渐下降(见图 1)。当扦插一段时间后, 插穗自身启动了 ZR 的合成机器, 其含量随着扦插时间的推移而不断增加。比较垂丝海棠不同处理后 ZR 的含量变化可

见, 生根率高的 B 处理中的 ZR 含量在不定根产生过程中始终维持在相对较高的水平。ZR 在促进生根, 提高扦插生根率方面起主要作用。

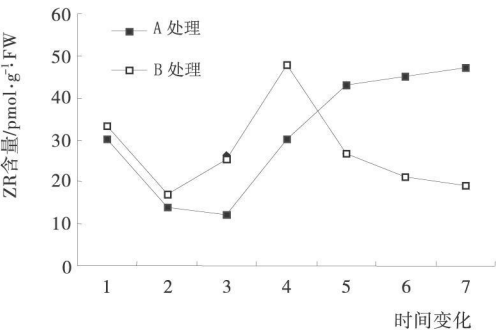


图 1 插穗生根过程中 ZR 含量变化

注: 标有数字的时间所代表的时间为: 1-4 月 6 日; 2-4 月 13 日; 3-4 月 20 日; 4-4 月 27 日; 5-5 月 4 日; 6-5 月 11 日; 7-5 月 18 日。

2.1.2 不同处理垂丝海棠插穗在生根过程中内源激素 IAA 的变化

从图 2 可以看出, 垂丝海棠生根率高的 B 处理的插穗刚从母树上取下时 IAA 的含量最低, 而生根率相对低的 A 处理在扦插初期 IAA 含量却较高。IAA 在 2 组处理插穗生根过程中的含量和变化规律与激素 ABA 大致相同。IAA 是生长促进物质, 在垂丝海棠扦插生根过程中的含量变化规律同抑制物质 ABA 相同, 未表现出对插穗生根的决定作用^[3], 说明 IAA 在海棠插穗生根时不起主要作用, 只是协同作用。

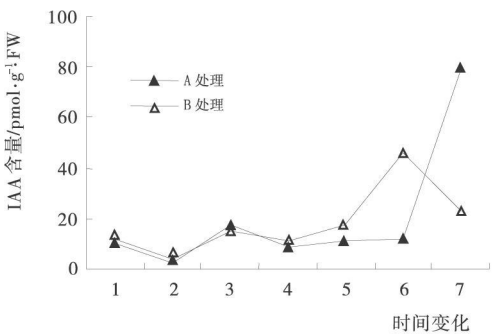


图 2 插穗生根过程中 IAA 含量变化

注: 标有数字的时间所代表的时间为: 1-4 月 6 日; 2-4 月 13 日; 3-4 月 20 日; 4-4 月 27 日; 5-5 月 4 日; 6-5 月 11 日; 7-5 月 18 日。

2.1.3 激素 GA 在不同处理垂丝海棠插穗中的变化

从图 3 可看出: 在插穗刚脱离母树后, 垂丝海棠 A 处理的插穗中的激素 GA 的含量没有太大的差别。从扦插后大约第 14~24 天, 生根率高的 B 处理的含量在升高, 而 A 处理则增加的比较缓慢。从扦插第 21~35 天, 垂

丝海棠 B 处理插穗中的 GA 含量比 A 处理全面高。此时正是根原基形成并分化的时间。由此可知, 在根原基分化的时期, GA 起很重要的作用^[4]。

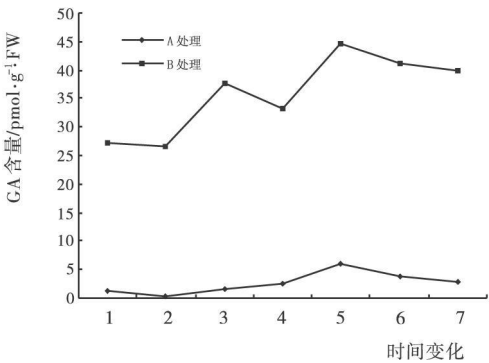


图3 插穗生根过程中 GA 含量变化

注: 标有数字的时间所代表的时间为: 1-4月6日; 2-4月13日; 3-4月20日; 4-4月27日; 5-5月4日; 6-5月11日; 7-5月18日。

2.1.4 生长抑制剂脱落酸在不同处理的垂丝海棠插穗间的变化 从图4可见, ABA 在海棠插穗的 B 处理中, 初始浓度以及插穗生根过程中的浓度均保持在相对较低的水平。A 处理的 ABA 含量相对较高。插穗的初始 ABA 浓度决定着愈伤组织或不定根原基的形成, 影响着插穗的生根率^[5]。

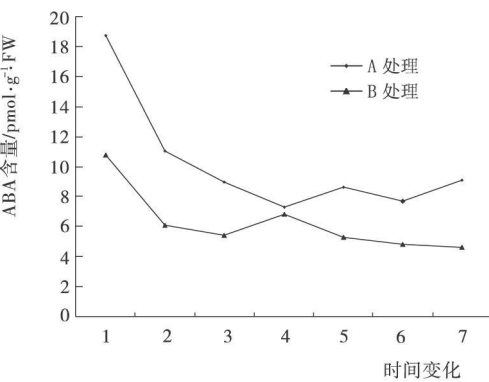


图4 插穗生根过程中 ABA 含量变化

注: 标有数字的时间所代表的时间为: 1-4月6日; 2-4月13日; 3-4月20日; 4-4月27日; 5-5月4日; 6-5月11日; 7-5月18日。

2.2 不同处理后的垂丝海棠插穗生根过程中可溶性蛋白的变化

A 处理的垂丝海棠插穗生根过程中可溶性蛋白的 SDS-PAGE 图谱如图5。SDS-PAGE 图谱上方标有字母 M 的泳道表示标准蛋白质 Marker 所在的泳道; 标有数字的泳道表示各时期的可溶性蛋白质电泳结果, 代表的

时期为: 1-4月6日; 2-4月13日; 3-4月20日; 4-4月27日; 5-5月4日; 6-5月11日; 7-5月18日。左边一列数值(未标箭头的)是 Marker 的分子量, 单位是 KD(千道尔顿)。由图可知, 随着时间推移, 插穗切口处可溶性蛋白 46KD、39KD、31KD、28KD、26KD、24KD 等与生根有关^[6]。

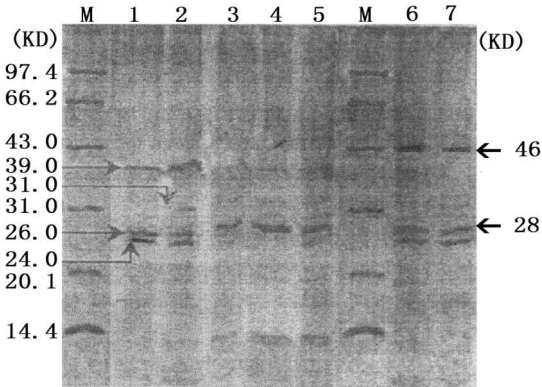


图5 垂丝海棠插穗生根过程可溶性蛋白的 SDS-PAGE 图谱(A 处理)

注: 标有数字的时间所代表的时间为: 1-4月6日; 2-4月13日; 3-4月20日; 4-4月27日; 5-5月4日; 6-5月11日; 7-5月18日。

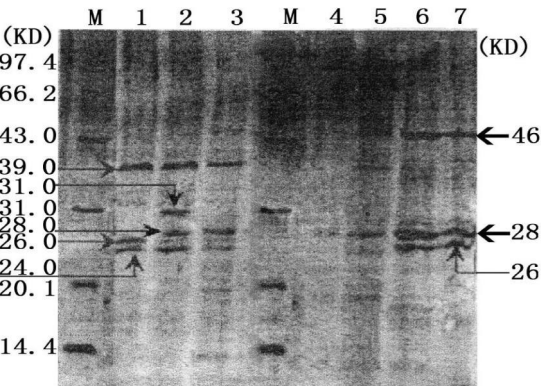


图6 垂丝海棠插穗生根过程可溶性蛋白的 SDS-PAGE 图谱(B 处理)

注: 标有数字的时间所代表的时间为: 1-4月6日; 2-4月13日; 3-4月20日; 4-4月27日; 5-5月4日; 6-5月11日; 7-5月18日。

在 2 种处理后的插穗切口中, 39KD、26KD、24KD 的变化相似, 在 4 月 6 日, 4 月 13 日含量都较高, 到了 4 月 20 日后急剧下降, 且一直保持在较低的水平。显然, 这 3 种蛋白含量的下降与细胞的脱分化和再分化, 根原基的产生有关^[7]。28KD、31KD、46KD 蛋白亚基在 2 种处理

中均是新生成的, 28KD、31KD 蛋白均在 4 月 13 日左右出现并持续到 5 月 18 日都存在。从 4 月 13 日到 4 月 20 日左右是愈伤组织中产生不定根原基的时期, 需要合成新的功能蛋白; 该时期新生成的这 2 种蛋白与该过程呈明显的一致性关系。而 46KD 蛋白亚基在 5 月 11 日开始产生, 此时是不定根伸长生长的时期^[8], 46KD 蛋白质与根系的伸长生长有关。可见, 控制愈伤组织分化出不定根原始体的基因在很早的 4 月 6 日就开始启动, 产生相应的功能蛋白和停止或降低一些蛋白的合成^[9]。

3 分析与讨论

3.1 不同处理后插穗生根过程中可溶性蛋白质的分析

为了更准确的分析垂丝海棠插穗中可溶性蛋白在生根过程中的作用, 将 2 种不同的处理结果进行比较: A 处理产生了大量的愈伤组织, 但生根率很低 (34.05%); 处理 B 的生根率很高 (91.02%)。见图 7 和图 8。



图 7 垂丝海棠插穗生根外部形态特征(A 处理)



图 8 垂丝海棠插穗生根外部形态特征(B 处理)

从图 5 和图 6 中可以看出: 与处理 B 相比, 在处理 B 中 39KD 和 24KD 2 种蛋白亚基初期含量较高, 后来在生根的过程中含量急剧下降。这 2 种蛋白是生根中有影响作用的 2 种蛋白。对生根可能的作用方式是: 它们作为生根过程的执行者, 其大部分被用来参与生根有关的合成过程^[10], 使相关的蛋白亚基 28KD 开始产生; 同

时它们本身的含量由于消耗而急剧降低。

28KD 蛋白在处理 B 中出现的时间 (4 月 13 日) 比 A 处理出现的时间 (4 月 20 日) 早。相反, 46KD 蛋白在处理 B 中在 5 月 11 日和 5 月 18 日才有少量产生, 而在处理 A 中出现的时间比较早, 在 4 月 20 日就有少量产生。出现这种情况的原因可能是由于 IBA 诱发某种基因提前开启对 28KD 的表达, 而且“遏制”或“遮蔽”了对 46KD 的启动^[11]。这 2 种蛋白亚基对插穗生根的作用可能是相反的, 46KD 蛋白可能是一种阻碍愈伤组织细胞再分化的蛋白, 而 28KD 蛋白亚基促进愈伤组织细胞的再分化。当 28KD 蛋白出现的比 46KD 早时, 28KD 蛋白的促进作用是主要的; 当 46KD 蛋白出现的早时, 标志着细胞开始老化, 分化受阻^[12]。

3.2 插穗切口处可溶性蛋白与激素的分析比较

分析插穗生根过程中的内源激素、DNA 与 RNA 含量和可溶性蛋白质的变化可知, 对插穗生根有影响的内源激素是 ABA、GA 和 ZR, 与生根有关的可溶性蛋白是 46KD、39KD、28KD、24KD。通过分析生根率高的 B 处理插穗切口的内源激素和可溶性蛋白质变化发现, 39KD 和 24KD 蛋白质在扦插初期含量较高, 因此这 2 种蛋白质是扦插母树自身合成的, 到 4 月 20 日, 愈伤组织和不定根分化后, 2 种蛋白质消失。而 ZR 的含量在扦插的初期也较高, 且在 4 种内源激素中对生根起重要的促进作用。由此可以推断, 39KD 和 24KD 可能影响激素 ZR 的含量的变化^[13]。当 39KD 和 24KD 与 ZR 相互作用时, 被激活的 39KD 和 24KD 或者调节细胞的生长分化或者调节其它功能的开启。在此过程中, 39KD 和 24KD 由于被激活执行相应的功能而被消耗掉, 此时正是根原始体开始发端时期; 因此, 它们在 4 月 20 日以后消失。

插穗生根过程中新合成的 28KD 蛋白质在 4 月 13 日出现 (见图 5 和图 6), 而 GA 的量在 4 月 27 日急剧增加。这 2 种物质对生根都起促进作用, 由此推得 28KD 蛋白可能与合成 GA 基因的过程有关^[14]。28KD 产生后影响 GA 基因, 使之合成量增加, 以调节根原基的分化。

阻碍生根的 46KD 蛋白质大约在 5 月 11 日产生 (见图 5 和图 6), 但此时 ABA 的含量也在大量增加, DNA 和 RNA 的含量也迅速下降。46KD 蛋白质也可能是影响 ABA 含量变化的蛋白, 对 ABA 量的增加起促进作用。

3.3 存在问题

3.3.1 虽然 SDS-PAGE 对一定分子量范围内的可溶性蛋白质有很高的分辨率, 但要确切地找出与生根有关的蛋白质还应进行双向 SDS-PAGE 来验证^[15]。

3.3.2 植物的内源激素作为生长发育的调节物质, 通过与受体结合, 使受体被激活, 引发细胞的生理功能发生变化。如果被激活的受体在细胞核内, 就可能作用于核

酸 从而引起某些基因的开启和关闭^[6]。激素及其受体要靠基因的转录合成。而可溶性蛋白可能是受体,也可能是基因的调控蛋白^[7]。试验所分析的几种激素与几种可溶性蛋白的关系,应进一步进行证明^[8]。

参考文献

[1] 梁明山,杨晓娟,侯留计.烟草种子蛋白的 SDS-PAGE 测定[J].西南农业学报,1998,11(3): 118-121.
[2] 姬生栋,胡铁红,徐存拴.用 SDS-PAGE 分析小麦灌浆期叶片、籽粒蛋白质变化及其与产量关系的初步研究[J].河南职技师院学报,1997,25(2): 6-10.
[3] Toumaire C. A Thiol Protease and an Anionic Peroxidase Are Induced by Lowering Cytokinins during Callus Growth in Petunia[J]. Plant Physiol, 1996, 111: 159-168.
[4] LI Jun-Hua, XU Yun-Yuan, CHONG Kang. Analysis of Transgenic Tobacco with Overexpression of Arabidopsis WUCHEL Gene[J]. 植物学报, 2004, 46(2): 224-229.
[5] 江玲,周燮.外源生长素和细胞分裂素对莴苣幼苗侧根原基发生和内源激素含量的影响[J].南京农业大学学报,2000,23(1): 19-23.
[6] 朱新开,周君良,封超年,等.不同类型专用小麦籽粒蛋白质及其组分含量变化动态差异分析[J].作物学报,2005,31(3): 342-347.
[7] Abel S. Early Genes and Auxin Action[J]. Plant Physiol, 1996, 111: 9-17.
[8] 许晓岗,童丽丽.垂丝海棠插穗扦插生根过程解剖学研究[J].安徽农

业科学, 2006, 34(19): 4889-4891.
[9] Venis M. A. Molecular Analysis of Auxin-Specific Signal Transduction [J]. Plant Growth Regul, 1996, 18: 1-6.
[10] Kulaeva O N. Cytokinin Signalling Systems [J]. Plant Growth Regul, 1996, 18: 29-37.
[11] Li C J, Guveara E, Herrera J. et al. Effect of apex excision and replacement by 1-naphthylacetic acid on cytokinin concentration and apical dominance in pea plant [J]. Physiol Plant, 1995, 94: 465-468.
[12] Taipaleen J. A Wound and Methyl Jasmonate-Inducible Transcription Coding for a Myrosinase-Associated Protein with Similarities to an Early Nodulin [J]. Plant Physiol, 1996, 110: 483-491.
[13] 孙果忠,张秀英,肖世和.不同穗发芽抗性的小麦胚 ABA 敏感性的蛋白质组分析[J].中国农业科学,2005,38(9): 1739-1747.
[14] Bruxelles G L D. Abscissic Acid Induces the Alcohol Dehydrogenase Gene in Arabidopsis [J]. Plant Physiol, 1996, 111: 381-391.
[15] 王台.一种适于双向电泳凝胶的染色方法[J].植物学通报,1996,13(4): 56-57.
[16] Wu S C. Characterization of an Endo-β-1,4-Glucanase Gene Induced by Auxin in Elongating Pea Epicotyl [J]. Plant Physiol, 1996, 110: 163-170.
[17] WANG Lei, ZHAO Jun, FAN Yunliu. Gene cloning and function analysis of ABP9 protein which specifically binds to ABRE2 motif of maize Cat1 gene [J]. Chinese Science Bulletin, 2002, 47 (22): 1871-1875.
[18] 谷瑞升,刘群录,陈雪梅,等.木本植物蛋白质提取和 SDS-PAGE 分析方法的比较和优化[J].植物学报,1999,16(2): 171-177.

Studies on Changes of Soluble Proteins in the Cuttings
Rooting of *Malus halliana* Roehne

XU Xiao-gang¹, WANG Jun², TONG Li-li³, LI Zhi-wen²

(1. Faculty of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Management Department of Nanjing Mochou Lake Park, Nanjing 210006, China; 3. College of Horticulture Department, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210001, China)

Abstract: By applying the techniques of SDS-PAGE & ELISA, this thesis researched explored the relationship between rooting and the variances of both soluble proteins and endogenous plant hormones in the process of *Malus halliana*'s cutting. The experiment results showed that: during the cutting procedure, the soluble proteins of 46KD, 39KD, 31KD, 28KD, 26KD, 24KD were related to the rooting. The soluble proteins in 46KD, 39KD, 31KD, 28KD controlled the callus' growing and adventitious root primordium differentiation, furthermore, they disappear when the cuttings generated adventitious roots. While the rooting proceeded, some new kinds of soluble proteins, like 46 KD, 31 KD, 28 KD, which were good for promoting new adventitious roots had been generated. It seemed that the soluble protein 46KD in the cuttings had some disadvantages to the adventitious root primordium differentiation of the cuttings rooting.

Key words: *Malus halliana*; Soluble proteins; Adventitious root; Cuttings

欢迎订阅《北方园艺》期刊

邮发代号 14-150 单月刊 每册定价 6.00 元 全年 72.00 元