



芥菜离体培养体系的建立及 形态发生过程中蛋白变化的研究

李 彤, 汤青林, 王志敏, 宋 明

(西南大学园艺园林学院, 重庆蔬菜学重点实验室, 400716)

摘 要: 本文以芥菜子叶为外植体进行芥菜的离体培养, 实验发现在培养基为MS+0.1 mg/L NAA+3 mg/L 6-BA的条件下, 能够得到最高的愈伤率及分化率。同时本实验利用了SDS-PAGE技术比较了愈伤组织生长及分化过程中的蛋白组分的变化。

关键词: 芥菜; 组织培养; 可溶性蛋白; SDS-PAGE

芥菜(*Brassica juncea*. Coss.) 是十字花科芸苔属作物, 长江以南地区广泛种植, 分为根芥、茎芥、叶芥、薹芥四种类型^[1]。利用组织培养技术可以实现离体快繁、茎尖脱毒、同时通过花粉培养可获得单倍体等^[2]。近年来, 组织培养不断的与细胞学、遗传学、分子生物学等学科结合, 从而产生了一门独立的、崭新的遗传学分支学科——植物体细胞遗传学。其中, 一个重要的研究方向就是对植物组织培养过程中的特异性蛋白质的研究^[3,4]。在植物组织培养过程中, 无论是器官发生途径还是胚状体发生途径都伴随着特定遗传信息的表达, 其分化与发育的实质都是基因有序表达与调控的结果。很多基因表达的最终产物都是蛋白质, 故愈伤组织的分化与发育过程中必然伴随着特异性蛋白质的出现与消失, 这些蛋白质与该时期细胞的功能及组织的形态建成有密切关系, 可以作为不同发育时期的分子标记。本实验对芥菜组织培养体系进行了优化, 并对其形态发生过程中的可溶性蛋白的变化进行了SDS-PAGE电泳。

1 材料与方法

1.1 材料

圆大头菜、永胜大儿菜两个芥菜品种。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的获得

以圆大头菜、永胜大儿菜为材料培育无菌苗, 具体方法如下, 选取颗粒饱满的种子, 自来水冲洗后, 用70%的酒精消毒60秒, 加入5%的NaClO₄消毒15分钟, 无菌水冲洗3~4次, 用灭过菌的滤纸吸干种子表面水份后接种到MS(无蔗糖、卡拉胶8 g/L)培养基中, 在净化组培室(温度25℃左右, 光照4000 lx, 16 h/d)中进行培养。

1.2.2 外植体离体诱导

取播种8天后子叶完全展开, 而第一片真叶尚未长出的无菌苗子叶作为外植体, 切成2 mm × 2 mm大小的子叶块, 接种到附加不同浓度激素的MS(蔗糖30 g/L、卡拉胶8 g/L)培养基中进行培养。每个组合接种10瓶, 每瓶接种5个外植体, 重复3次, 观察并记录外植体的变化情况。

1.2.3 可溶性蛋白含量及组分变化

如表1所示, 选取不同时期的材料, 分别称重后用液氮冷冻后于-20℃下保存备用。

参考郭尧君^[5], 将材料用液氮充分研磨后, 加预冷的提取液在冰上充分提取3~5小时, 离心后取部分上清液, 加适量的5X上样缓冲液于沸水浴中加热5分钟, 离心后

表1 芥菜组织培养过程中取材时期

编号	具形态建成的愈伤组织	编号	不具形态建成的愈伤组织
1	膨大的子叶	7	膨大的子叶
2	长出少量愈伤组织的子叶	8	长出少量愈伤组织的子叶
3	大量愈伤组织	9	大量愈伤组织
4	分化出不定芽的愈伤组织	10	愈伤组织继续生长而不分化
5	长出组培苗的愈伤组织 (不含组培苗)	11	愈伤组织生长速度明显减缓
6	组培苗 (不含愈伤组织)		

点样电泳。另取部分上清液测定蛋白质含量,采用考马斯亮蓝法。

电泳时,采用5%浓缩胶,稳压50 V,12%分离胶,稳压120 V,标准蛋白分子量为105 KDa, 79 KDa, 51 KDa, 31 KDa, 25 KDa, 15 KDa, 2 KDa (购于北京鼎国生物技术有限责任公司)。

提取液:1 mol/L Tris-HCl 1.5 mL,甘油2.5 mL,PVP 0.2g,定容到10 mL。

5X样品缓冲液:0.06 mol/L Tris-HCl (PH 6.8),2% SDS,10%甘油,5%巯基乙醇,0.01%溴酚蓝。

2 结果与分析

2.1 不同激素配对外植体诱导的影响

表2 不同激素对芥菜外植体的诱导

激素(mg/L)	外植	愈伤	分化	分化	是否
NAA 6-BA 2, 4-D	体个数	率(%)	个数	率(%)	生根
0.0 0.0 0.0	50	0	0	0	生根
0.1 0.0 0.0	50	0	0	0	生根
0.3 0.0 0.0	50	0	0	0	生根
0.1 1.0 0.0	50	32	4	25	生根
0.1 3.0 0.0	50	92	41	89	未生根
0.3 1.0 0.0	50	79	0	0	生根
0.3 3.0 0.0	50	88	35	80	生根
0.1 3.0 0.05	50	95	13	27	未生根
0.1 3.0 0.25	50	98	0	0	未生根

芥菜组织培养很难得到完全脱分化的愈伤组织,在没有添加激素的MS培养基中,其外植体只能生根而不能形成愈伤组织。培养基中加入少量的2,4-D能对愈伤组织脱分化起到一定的作用,但分化频率也会降低。而

当其浓度较高时,外植体只长出少量大颗粒,排列松散且没有再分化能力的愈伤组织。最适合芥菜离体培养的培养基为MS+0.1 mg/L NAA+3.0 mg/L 6-BA。得到的组培苗在MS+0.1 mg/L NAA即可诱导生根(见表2)。

2.2 不同时期的可溶性蛋白含量及组分差异分析

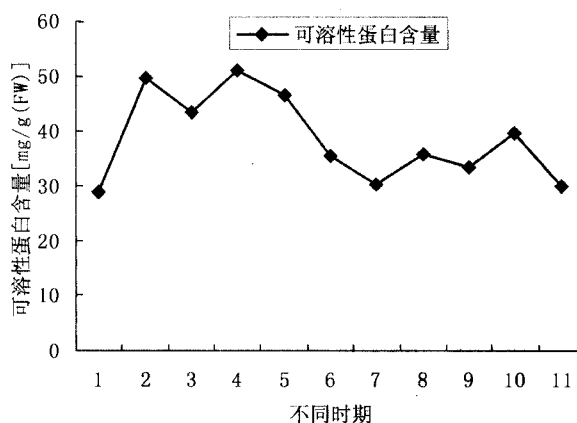


图1 不同时期愈伤组织的可溶性蛋白质含量

由图1可知,外植体培养过程中可溶性蛋白的含量出现了2个高峰,分别在第2和第4个阶段,而在第三个阶段蛋白含量有所下降,但是结合电泳图可以看出,在第三个阶段多出来2条谱带,这可能是在该时期,外植体中的某些蛋白酶被激活,使原有的蛋白质分解,而外源激素又促进了新的能够促进细胞分裂的蛋白质合成。在第4个阶段,这些蛋白继续合成,同时也伴随着新蛋白的合成,蛋白含量又达到了一个高峰。而不具形态建成的愈伤组织,其可溶性蛋白质的含量变化较为平缓,且蛋白含量较低。

由图2可知,愈伤组织生长前期,有65 KDa、70 KDa蛋白逐渐表达,外植体也逐渐膨大,愈伤组织开始形成。

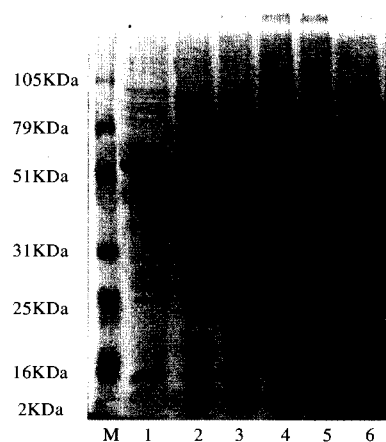


图2 具形态建成的愈伤组织诱导的蛋白质电泳图

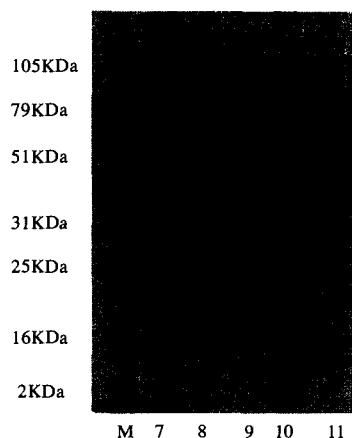


图3 不具形态建成的愈伤组织诱导的蛋白质电泳图

愈伤组织快速生长期到分化期间,蛋白组分发生了变化,在大量愈伤组织时期有,21 KDa表达,分化时期又增加了34 KDa、24 KDa、15 KDa表达,而图3中不具形态建成的愈伤组织在这个时期则没有这3种蛋白表达,当具形态建成的愈伤组织分化出不定芽后,这3种蛋白的表达又被关闭了。

在不具形态建成的愈伤中,40 KDa的蛋白始终没有表达,而在愈伤组织持续生长期18 KDa的蛋白明显表达,它在具有形态建成的愈伤组织中却没有表达,因此可能是这种蛋白的存在抵制了愈伤组织的分化。34 KDa、24 KDa、15 KDa的蛋白只在分化时期才表达,可看作是愈伤组织

分化的重要标识。

3 小结

植物离体培养的过程可以看作是一系列基因在时间和空间上顺序表达的结果,蛋白是基因表达的产物,是一定条件下基因顺序表达的引发与抑制的结果。在不具形态建成的愈伤组织中,蛋白质合成速率低,含量也少,低水平的蛋白表达量可能是愈伤组织不能进行分化的原因。而离体培养过程中外源激素对外植体的影响是通过改变其内源激素来实现的,在这个过程中内源激素如何变化还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 刘佩英. 中国芥菜. 中国农业出版社, 1996: 1-5
- [2] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程. 甘肃科学技术出版社, 1996: 1-2
- [3] 崔凯荣, 戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学[J]. 科学出版社, 2000: 1-10
- [4] L. J. Chen, D.S. Luthe. Analysis of protein from embryonic and nonembryonic rice (*Oryza sativa* L.) calli. *Plant Science*, 1987, 48: 181-188
- [5] 郭尧君. 蛋白质电泳实用技术. 科学出版社, 1999: 123-125

重庆市科委副主任张文为农业科技工作 提出五个要求

为了解重庆市水稻、玉米重大专项及蔬菜重大攻关项目的年度执行情况,重庆市2007年度重大科技项目汇报会于2008年1月8日在我院召开。会上,我院院长、重庆市水稻、玉米重大科技专项首席专家唐洪军研究员等专家介绍了各专项年度执行情况。张文副主任充分肯定了各项目在育种理论与方法技术创新、新材料创制、新品种选育等方面取得的成绩,同时为农业科技工作提出五个要求:一要处理好项目数量与质量的关系,力求在质量上有所突破;二要注意成果转化与产业基地建设,要通过建立比较稳定的产业基地,加速成果转化;三要处理好主攻目标与副产物的关系,应重视对特异材料的研究;四要注意学术水平提升与交流合作,要以更多、更广的学术交流,提升科研队伍的学术水平;五要注意配套资金与财务管理,要建立专帐,配套资金要到位。

(重庆市农业科学院 徐进)