

小麦与玉米及鸭茅状摩擦禾远缘杂交的胚发育过程中同工酶和蛋白质的变化^①

董效成 李大玮

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要 通过比较小麦与玉米及鸭茅状摩擦禾属间杂交获得的胚与小麦正常自交的胚之间在不同发育时期过氧化物酶和酯酶的同工酶谱, 发现过氧化物酶同工酶表现出时空顺序的特异性变化。在同一发育时期, 远缘杂交的具胚子房和无胚子房之间存在过氧化物酶同工酶谱的差异, 这可能涉及到与胚发育相关的同工酶的出现。远缘杂交的具胚子房和正常自交的小麦子房之间也有一定的酶谱差异。同时, 同一材料还表现出不同发育时期的过氧化物酶酶谱差别。在远缘杂交后的胚发育期间, 酯酶同工酶的时空表达不如过氧化物酶显著。此外, 对远缘杂交后的胚中的水溶性蛋白质进行了 SDS-PAGE 分析, 初步的分析结果表明, 可能存在与胚发育相关的蛋白质。

关键词 小麦, 玉米, 鸭茅状摩擦禾, 胚发育, 同工酶, 蛋白质

Changes of Isozymes and Proteins During Embryo Development in Crosses of Wheat with *Zea mays* and *Tripsacum dactyloides*

Dong Xiaocheng Li Dawei

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101)

普通小麦 (*Triticum aestivum*) 用玉米或鸭茅状摩擦禾 (*Tripsacum dactyloides*) 花粉授粉后可以高频率地获得胚⁽²⁾。但对于这类通过远缘杂交得到的胚在其发育期间同工酶和蛋白质的分析尚未见有报道。前人的研究表明, 过氧化物酶同工酶是一个较好的遗传信息表达的标志, 它不但在胚中的活力较强⁽³⁾, 而且其酶活力和同工酶的变化, 可能还与一些高等植物的发育关系密切^(1, 8, 15, 16, 18, 19)。酯酶同工酶与胚胎发育也有一定关系^(9, 11, 17)。由于蛋白质是基因时空表达的产物, 可能直接参与胚胎的分化与发育, 因而胚胎发育特异蛋白质的研究备受重视。本文分析了普通小麦与玉米及鸭茅状摩擦禾杂交后的胚发育期间一些同工酶和蛋白质的变化, 为阐明远缘杂交中胚发育过程中的一些生理生化事件做初步的探索。

1 材料与方法

1.1 材料

小麦 (*Triticum aestivum*) 品种“Fukuho”和品系“93-3600”作为杂交母本材料, 玉米 (*Zea mays*) 和鸭茅状摩擦禾 (*Tripsacum dactyloides*) 为杂交父本。按常规方法去雄, 套袋, 授粉。授粉后向穗下茎节注入 100ppm 浓度的 2, 4-D 溶液约 5ml。用作对照的是相同发育时期的自交授粉的小麦。分别于授粉后 5、10、15 天取回杂交穗和自交穗, 并立刻投入液氮中, 速冻 2 天后, 放置于 -80℃ 低温冰箱中保存备用。

^①中国科学院重大科研项目课题资助。

从杂交穗取下子房, 解剖后按有胚或无胚分成两组, 同时剥取用作对照的子房, 一起用于同工酶和蛋白质的分析。

1.2 方法

同工酶的提取和分析, 参照胡能书等的方法⁽⁶⁾。

样品提取液为: 50mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 内含 2%Nonidet-40 (V/V)。

分离胶: T=10%, C=2.6%; 浓缩胶: T=4%, C=2.6%, 上样量为每孔 20 μ l。

过氧化物酶显色采用改良的联苯胺法, 配方是: 2%联苯胺溶液: 4%氯化铵溶液: 5%EDTA-Na 溶液: 0.3% H_2O_2 溶液: 蒸馏水=1:1:1:1:9 (V/V)。

酯酶显色采用坚牢蓝 (Fast Blue RR) 和醋酸- α -萘酯法。可溶性蛋白质的提取参照 Zivy 等的方法⁽²⁰⁾。

提取液改为: 0.01mol/L Tris-HCl, pH8.0, 2%SDS, 5%巯基乙醇, 10%甘油, 0.02%溴酚蓝。

蛋白质的 SDS-PAGE 电泳参考何忠效等的方法⁽⁵⁾。采用不连续梯度胶: 下 (15%): 中 (12%): 上 (10%) = 5:5:2 (V/V)。上样量为每孔 50 μ l, 电泳条件是: 24mA 恒流, 4 $^{\circ}$ C 下电泳 8 小时。电泳后的凝胶采用 Henkeshoven 和 Dernick 的银染方法显色^(13,14)。

2 结果和讨论

2.1 远缘杂交后胚发育期间过氧化物酶同工酶酶谱的变化

从图 1 中可以看到, 小麦“93-3600”与玉米杂交后获得的具胚子房在发育过程中和自交发育的子房之间在过氧化物酶同工酶谱上均表现有差异, 主要反映在以下几方面:

2.1.1 在同一发育时期的不同样品间存在酶谱差异

在授粉后的第 10 天, 以自交发育的子房的过氧化物酶同工酶谱带最丰富, 至少可以鉴别出 10 条酶带, 它比同一时期杂交后的具胚子房多出 1 条酶带 (Rm 0.16)。杂交后的具胚子房和对应的无胚子房有 3 条酶带有差别, 即在具胚子房中有 Rm 0.13 和 Rm 0.85 酶带, 而在无胚子房中没有; 但无胚子房中的 Rm 0.16 酶带在具胚子房中却未见到。在授粉后的第 15 天, 正常自交的子房比杂交后的具胚子房多 1 条 Rm 0.46 酶带, 正常自交的子房和杂交后的具胚子房均比杂交后的无胚子房多出 3 条酶带, 即 Rm 0.16、Rm 0.21 和 Rm 0.94。

2.1.2 同一样品在不同时期也表现有酶谱差异

授粉后 15 天时的酶谱和授粉后 10 天的相比, 自交授粉的子房 15 天的样品在阴极侧比 10 天时少 1 条酶带 (Rm 0.13), 然而在中部区和靠阳极侧却分别多出 1 条带, 即 Rm 0.46 和 Rm 0.94。杂交后的具胚子房也表现出类似的酶谱差别, 但杂交后的无胚子房 15 天比 10 天时在阴极侧少了两条酶带。

这一结果说明, 过氧化物酶同工酶在胚发育过程中有着良好的时空表达特异性, 这与文献报道是一致的^(8,15-19)。对我们的实验来说, 空间顺序上的表达可能更具有意义。因为小麦与玉米或鸭茅状摩擦禾杂交所得的胚一般均没有周围的胚乳组织。从这种特殊情况下讲, 正常自交的子房表现出更丰富的过氧化物酶同工酶谱, 一方面归功于胚乳中的同工酶, 另一方面是否存在由于不同的父本花粉而引起同工酶的差异表达? 此外, 从实验结果看, 多数酶带在不同材料间是相同的, 但酶的活性存在一些差异, 这种差异是可否认为是该同工酶在胚和胚外的组织中均有不同程度的表达呢? 从另一方面来看, 杂交后的具胚子房比相应的无胚子房多出的同工酶, 或许是与胚发育相关的酶。因为这些同工酶在远缘杂交的具胚子房和正常自交子房中是一致的, 唯独在无胚子房中缺少, 如 Rm 1.3 和 Rm 0.94 同工酶。从本实验中并没有看到只在杂交的子房中(具胚或不具胚)出现的同工酶。也许这正反映了遗传机制的内在根本作用。但不排除同工酶的表达也受各种因素的影响, 包括内环境和外环境中的因素, 如有的报道称, 早期胚的萌发与否就表现出过氧化物酶同工酶的差异⁽⁷⁾。

2.2 远缘杂交后的胚发育期间酯酶同工酶酶谱的变化

从图 2 中可以看到, 自交授粉的子房在第 10 天、15 天时的酯酶同工酶酶谱要比相应的远缘杂交的子房丰富得多, 其中有 6 条酶带是自交子房中具有而远缘杂交的子房所没有的。而且自交授粉的子房还表现有时间顺序上的表达, 即随着发育的进程依次有同工酶出现。远缘杂交后的各组材料在酯酶同工酶酶谱上有相当大的保守性, 除授粉后第 15 天的各远缘杂交组 (包括具胚子房和无胚子房) 均比之前的各材料少 1 条同工酶 (Rm0.71)。以上结果表明, 酯酶同工酶在杂交后得到的胚中没有多少特异性表达。因为在杂交后的有胚子房和无胚子房之间酯酶同工酶没有多大差别, 尽管有文献报道酯酶同工酶在小麦体细胞胚发生、大麦花药的体细胞胚发生以及小麦、大麦、玉米愈伤组织的形态发生中具有特异性表达^(9, 11, 17)。不过, 从另一个侧面可以推测, 胚乳组织中的酯酶同工酶可能有差次表达, 因为在自交有胚乳的子房中同工酶谱是有时间顺序表达的。

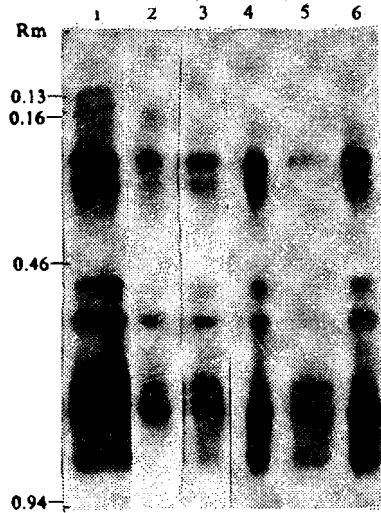


图 1 小麦“93-3600”×玉米后不同发育时期的子房过氧化物酶同工酶酶谱

1、4 分别是授粉后 10、15 天时的自交子房作为正常对照; 2、5 分别是授玉米花粉后 10、15 天时的无胚子房; 3、6 分别是授玉米花粉后 10、15 天的有胚子房。

2.3 远缘杂交后的胚发育期间可溶性蛋白质的初步分析

我们用 SDS-PAGE 电泳方法初步分析了授粉后不同时期 (5、10、15 天) 的不同样品中水溶性蛋白质的表达情况, 结果表明, 授过玉米或鸭茅状摩擦禾花粉的具胚子房不但比同期的无胚子房有更多的特异蛋白质表达, 而且还表现出时间顺序的表达。这方面的工作仍在深入进行。

由于蛋白质直接参与植物组织器官的形成, 因此对胚发育过程中特异蛋白质的分析可能会更直接地阐明某个发育环节。张斌等曾对不同发育时期的水稻胚蛋白质进行过单向 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 在单向电泳图中发现 1 个 20kD 左右胚分化完成期以后特有的蛋白质。根据双向电泳电泳图谱, 他们把稻胚总蛋白按其在胚胎发育过程中的动态分为 7 类。其中, 组成性表达的蛋白质约占 85%, 具有发育时期特异性的蛋白质约占 15%⁽⁴⁾。我们正努力从这占少数的特异性表达的蛋白质中寻找与胚形成关系密切的蛋白质。另外也有人发现在体细胞胚发生过程中也有发育时期特异性的蛋白质出现^(10, 12)。

2.4 小结

小麦与玉米或鸭茅状摩擦禾杂交产生的胚在母体植株上由于缺乏胚乳的滋养, 生长得不象正常自交的胚那样

有规则, 但仍有明显的组织器官分化。这说明, 在此类胚发育的早期, 内在的遗传机制仍起根本作用, 而且伴随着与胚胎发育相关的一系列基因的时空顺序表达。但小麦与玉米或鸭茅状摩擦禾杂交后的胚的发生发育是在非正常条件下进行的, 这表现为以下几个方面: (1) 由来自远缘花粉中的精子的受精导致合子形成; (2) 在合子胚发育的早期常发生父本染色体的排除; (3) 杂交后的胚一般都是在缺少胚乳的情况下发育的。因而, 比较处于这种异常状态下的远缘杂交后的胚与正常自交的胚发育期间同工酶和蛋白质表达上的异同, 对于加深了解远缘杂交的胚发生发育的遗传调控不无所助。

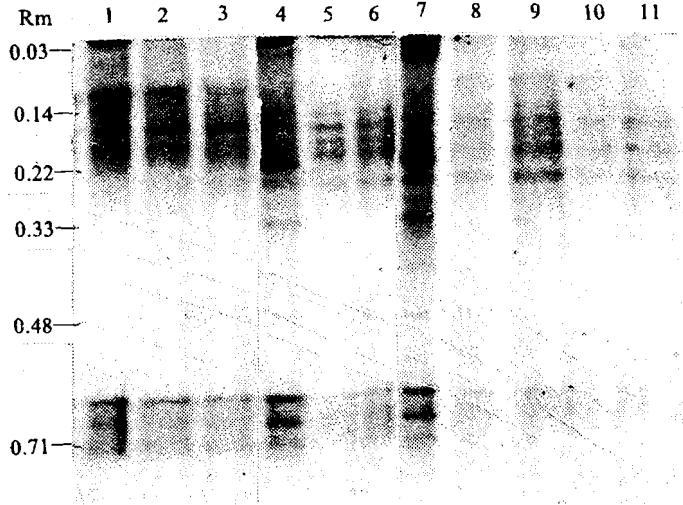


图2 小麦“Fukuho”×玉米/鸭茅状摩擦禾后不同发育时期的子房酯酶同工酶电泳图谱

1、4、7分别是授粉后5、10、15天时的正常自交的子房作为正常对照组; 2、5分别是授玉米花粉后5、10天的子房; 3、6分别是授鸭茅状摩擦禾花粉后5、10天的子房; 8、9分别是授玉米花粉后15天时的有胚子房和无胚子房; 10、11分别是授鸭茅状摩擦禾花粉后15天时的有胚子房和无胚子房。

参 考 文 献

- (1) 王 熊等, 1981. 植物生理学报, 7 (1): 73—82.
- (2) 李大玮等, 1994. 遗传学报, 21 (5): 398—402.
- (3) 朱治平等, 1981. 植物生理学报, 6 (2): 141—148.
- (4) 张 斌等, 1992. 植物生理学报, 18 (1): 85—92.
- (5) 何忠效等, 1990. 电泳. 北京: 科学出版社, 143—155.
- (6) 胡能书等, 1985. 同工酶技术及其应用, 长沙: 湖南科学技术出版社, 96—110.
- (7) 唐锡华等, 1983. 植物生理学报, 9 (4): 357—365.
- (8) Bapat S A *et al*, 1992. *Plant Sci.*, 82: 235—242.
- (9) Chawla H S, 1988. *Plant Cell Tiss. and Org. Culture*, 12: 299—304.
- (10) Choi J H *et al*, 1984. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 2: 19—25.
- (11) Everett N P *et al*, 1985. *Plant Sci.*, 41: 133—140.
- (12) Hahne G *et al*, 1988. *Plant Sci.*, 55: 267—279.
- (13) Henkeshoven J *et al*, 1985. *Electrophoresis*, 6: 103.
- (14) Henkeshoven J *et al*, 1986. *Electrophoresis*, 1: 22.
- (15) Kay L E *et al*, 1987. *Plant Physiol.*, 84: 99—105.
- (16) Kochba J, 1977. *Plant Cell Physiol.*, 10: 463—467.
- (17) Pedersen S, 1993. *Plant Sci.*, 91: 75—86.
- (18) Verma D P S *et al*, 1970. *Can. J. Bot.*, 48: 429—431.
- (19) Wochok Z S *et al*, 1974. *Physiol. Plant*, 31: 73—75.
- (20) Zivy M *et al*, 1983. *Theor. Appl. Genet.*, 66: 1—7.

本文于1994年9月5日收到。