

不同基因型冬小麦花药出愈率及其愈伤组织的蛋白质电泳分析

云 月 胡道芬

(北京市植物细胞工程实验室, 100081)

刘 敏

(中国科学院遗传研究所, 北京 100016)

刘立军

(中国农业科学院作物育种栽培研究所, 北京 100081)

摘 要 用不同基因型的冬小麦品种(系)花药在 W142 培养基(改进的 W14 培养基)上获得了较高的出愈率,但不同基因型之间仍存在着显著的差异。用 Pharmacia 公司 Phast System 电泳仪对不同基因型小麦花药及其愈伤组织蛋白质进行等电聚焦电泳(IEF)和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,观察到不同基因型花药蛋白质之间存在着差异,并且初步认为这种蛋白质差异与出愈率有相关性。不同基因型花药愈伤组织之间观察不到明显的带型区别,但它们和花药比较,却明显有新蛋白质的产生,这可能与出愈过程生化变化有关。

关键词 小麦 基因型 出愈率 电泳

小麦花药培养自 70 年代初在我国首先取得突破后,其各个方面的研究均取得了显著的进展并可初步运用于育种实践。但是如何提高花药培养育种的效率仍是一个值得探讨的问题,而出愈率又是影响花培育种效率的一个重要因素。为了提高出愈率和绿苗率,研究者们就小麦花培的方法和条件进行了一系列深入细致的实验,它涉及到接种时的花粉发育时期,培养基的筛选,培养的物理条件(光、温度),花药供体植株的生长条件,前处理等等。并一致认为,在小麦花药培养过程中,花粉愈伤组织的产量与供体植株的基因型有明显相关性。本实验用 5 种基因型的小麦在 W142 培养基上诱导愈伤,获得不同的出愈率。为了寻求不同基因型蛋白质的差异,利用 Pharmacia 公司的 Phast System 电泳系统对这 5 种小麦的愈伤、花药和另外两种出愈率较低的小麦花药进行了蛋白质分析,并从不同基因型的蛋白差异上对出愈率的机理做了初步探索。

1 材料和方法

1.1 供试材料

本试验采用了出愈率不同的 7 个冬小麦品种(系)为花药供试材料(表 1)。用醋酸洋红压片法镜检,取花粉处于单核中后期的穗子经 75%酒精表面消毒后将花药收集于 5cm 表面皿中,置-80℃贮存备用,并在无菌条件下将这 7 个品种(系)的小麦花药接种于 W142 培养基中(W14 培养基+2,4-D2mg/L+KT0.5mg/L+生物素 2mg/L),32℃暗培养 48h,转入 28℃自然光培养 4 周,统计出愈率。除出愈率较低的农大早 3 和小黑 041 外,对其他 5 个品种(系)的愈伤组织进行了电泳分析。

1.2 IEF 电泳

取鲜重 0.05g 未经培养的花药按 1:2.5 加入蛋白抽提液(Tris-HCl 10mol,EDTA 0.1mol,正丁醇 5%。巯基乙醇 9%,NP-40 4%,尿素 8mol, pH 值 7.5),并加入适量不溶性聚乙烯吡咯烷酮(PVP-AT,约 10:1)研磨,冰浴提取 5~10min,0~4℃,12000rpm 离心 30min,取上清液为电泳样品。取鲜重 0.2g 培养 28 天后花药产生的愈伤组织按 1:1.5 加入蛋白抽提液,蛋白抽提液的成分及抽提方法和对花药的处理相同。凝胶制作和电泳程序的设置参照刘立军的方法^[3],其中 Ampholine 的组成为 0.33% pH 值 3~10 和 0.67% pH 值 4~6。

1.3 SDS-PAGE 电泳

取鲜重 0.05g 未经培养的花药按 1:2.5 加入蛋白提取液(Tris-HCl 25mol pH 值 7.5, KCl 10mol, EDTA 20mol, 巯基乙醇 5mmol)并加入适量 PVP-AT 研磨,冰浴提取 5~10min,0~4℃,12000rpm 离心 30min。取上清加入样品缓冲液(0.5mol Tris-HCl, pH 值 6.8, 2.5% SDS, 1% 巯基乙醇, 0.05% 溴酚兰, 10% 蔗糖)沸水浴 3min,作为电泳样品。采用 12% 均匀胶:浓缩胶 0.5mol Tris-HCl pH 值 6.8,分离胶 1.5mol Tris-HCl, pH 值 8.8。以缓冲胶条代替电极缓冲液^[10],其缓冲系统为 1.5mol Tris-Gly, pH 值 8.4。凝胶、缓冲胶条的制作参考 Pharmacia 公司提供的技术资料^[9]。愈伤组织的 SDS 电泳方法同上,电泳程序参照文献^[10]。

对 SDS 和 IEF 胶采取银染色,并用 Pharmacia 公司的 Ultrosan 扫描仪和 Gelscan 扫描软件进行扫描。

2 结果与分析

2.1 不同基因型小麦花培的出愈率差异

以往研究表明,基因型与花药出愈率和绿苗率密切相关。我们用京花 1 号等 5 个冬小麦品种(系)在 W142 培养基上诱导出愈伤组织,出愈率较以前的报道^[1]有较大的提高(表 1)。但 5 个小麦品种(系)之间仍存在较大的差异。为了探讨造成这种差异的原因,我们对这 5 种小麦和另外两种出愈率极低的小麦(小黑 041,农大早 3)花药蛋白质进行了 IEF 和

表 1 7 个冬小麦品种(系)花培出愈率

品种(系)名称	接种花药数	出愈块数	出愈率
京花 1 号	20806	8069	38.8%
京作 348	1330	364	27.4%
京花 6 号	10400	1950	18.6%
京花 5 号	33005	5390	16.3%
京花 3 号	35089	3630	10.3%
小黑 041*	1107	35	3.2%
农大早 3*	1230	32	2.6%

注:*参考文献 1

SDS—PAGE 电泳分析, 并对前 5 种小麦花药愈伤组织也进行了电泳分析, 试图从分子水平找出不同基因型小麦品种间的差异对花药出愈率的影响, 以及出愈过程中蛋白质的变化。

2.2 不同基因型小麦花药蛋白质的差异

对小麦叶片及种子等外植体的蛋白质进行电泳分析比较容易, 但对其花药进行蛋白质分析尚未见报道。主要原因可能是花药小且不易收集, 受到上样量的限制, 在普通电泳仪上难以进行。Pharmacia 公司的 Pnast system 电泳系统需样品量很少, 而且速度快, 分辨率高, 重复性好, 使得对花药这样微小的组织进行电泳分析成为可能。

对 7 种不同基因型小麦花药的 IEF 电泳进行分析, 结果表明它们之间的蛋白成分区别不是很大, 只在一两种碱性蛋白上表现出差异 (图 1 中的 A 带和 B 带)。出愈率较高的京花 1 号和京作 348 两种只有 A 带, 其他 5 种 (包括出愈率中等的京花 3 号, 京花 5 号, 京花 6 号及出愈率更低的农大早 3、小黑 041) 无一例外都有 B 带, 其中京花 5 号却观察不到 A 带的存在。表明 B 带所含蛋白在花药出愈过程中可能起着某种抑制作用。这有待进一步研究。

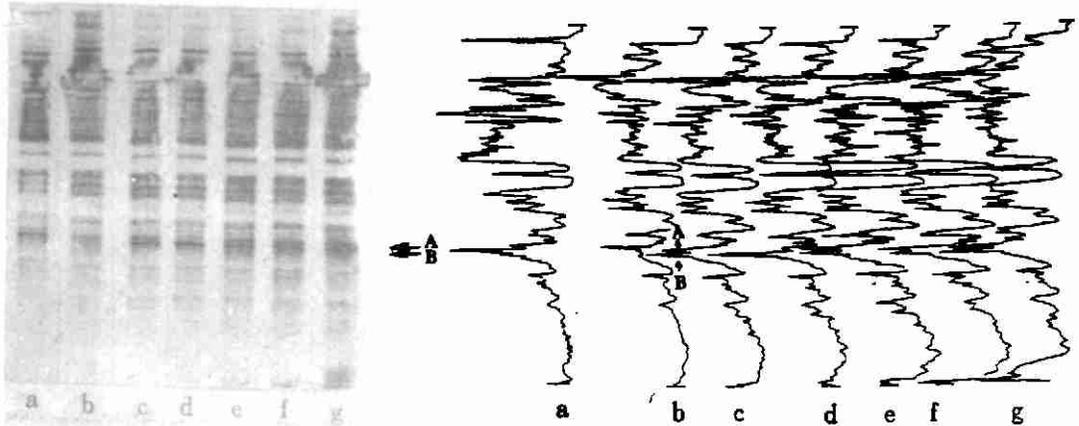


图 1 七种基因型小麦花药 IEF 电泳图谱

a. 京花 1 号; b. 京作 348; c. 京花 3 号; d. 京花 5 号; e. 京花 6 号; f. 农大早 3; g. 小黑 041

2.3 愈伤组织与花药蛋白质的差异

在从不同基因型花药诱导而来的愈伤组织之间没有显著的差异, 但它们和花药比较却明显多了一些蛋白种类 (图 2 中的 C、D 和 E 带; 图 3 中的 G、H 与 I 带)。这样一些蛋白可能在出愈过程中起着重要作用。在进一步的实验过程中, 如果限定花药接种后的时间范围 (如 2、4、24、48h……) 分别取材, 结合镜检观察, 将新蛋白的产生和愈伤组织产生过程密切联系起来, 则可以进一步肯定他们在出愈过程中的作用。

关于花粉愈伤组织诱导和苗分化的遗传机理前人已作了一些研究。如 Lazar 等^[8]和赵瑞堂等^[5]对双列杂交群体的花药培养反应进行了研究; 张玉玲和李德森^[6]利用“中国春”的 21 个单体系研究了花粉愈伤组织产量的遗传控制, 认为在有些染色体

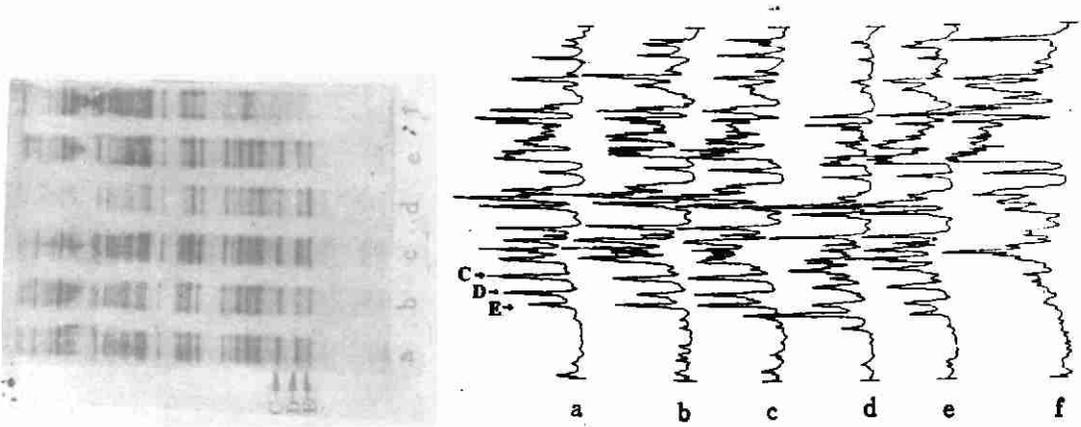


图2 五种基因型小麦花药愈伤组织蛋白 IEF 电泳图谱

a. 京花 1 号; b. 京作 348; c. 京花 3 号; d. 京花 5 号; e. 京花 6 号; f. 京花 1 号花药 (对照)

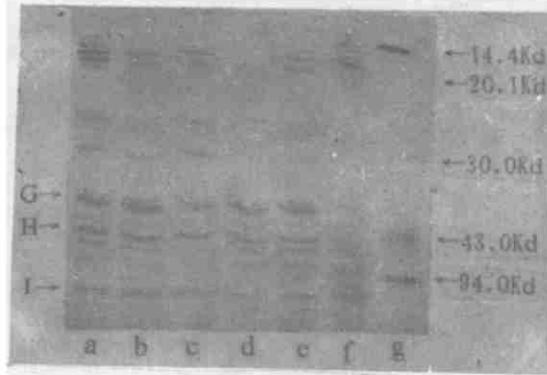


图3 不同基因型小麦花药愈伤组织蛋白 SDS 电泳图谱

a. 京花 1 号; b. 京作 348; c. 京花 3 号; d. 京花 5 号; e. 京花 6 号;
f. 京花 1 号花药 (对照); g. 标准蛋白

(如 2D) 上有抑制花粉愈伤组织形成的基因; Agache 等也利用单体系、代换系、易位系等材料观察到在“中国春”的 1D 和 5B 染色体的长臂上有促进花粉愈伤组织形成的基因。虽然我们的工作还有待深入研究, 但我们首次从分子水平对小麦花粉愈伤组织诱导的机理进行了研究, 为探讨花粉愈伤组织诱导机理提供了一个新的方法和思路。

参 考 文 献

- 1 冯锋.冬小麦不同品种花药培养出愈率及绿苗诱导率初步研究.北京农业科学, 1991, 9 (4): 13~14
- 2 郭尧君.SDS电泳技术的实验考虑及最新进展.生物化学与生物物理进展, 1991, 18 (1): 32~37
- 3 刘立军等.水稻叶片蛋白质快速双向电泳分析的新方法.生物化学与生物物理进展, 1992, 19 (5)
- 4 胡含等编.小麦花药培养研究进展, 植物细胞工程与育种.北京:北京工业大学出版社, 1990, 1~6
- 5 赵瑞堂等.小麦花药培养诱导率的配合力、遗传力初步研究.遗传, 1985, 7 (4): 17~19
- 6 张玉玲等.普通小麦单倍体的花药培养.遗传, 1984, 6 (3): 7~10
- 7 Agache S et al. Genetic analysis of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines. Theor Appl Genet, 1989, 77:7~11
- 8 Lazar MD et al. Combining abilities and heritability of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther cultures. Theor Appl Genet, 1984, 68:131~134
- 9 Pharmacia LKB. Biotechnology. Phast System Separation Technique File No. 4
- 10 Pharmacia LKB. Biotechnology. Phast System Separation Technique File No. 110

Callus Inducing Frequency from the Anther of Different Genotypes Winter Wheat and the Electrophoretic Analysis of Proteins in Calli

Yun Yue Hu Daofen

(Beijing Plant Cell Bioengineering Laboratory, Beijing 100081)

Liu Min

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100012)

Liu Lijun

(Institute of Crop Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract The high frequencies of callus induction were obtained from anthers of different genotypes winter wheat on the W142 medium (a modified W14 medium). Different genotypes showed significant differences in the frequency of callus induction, IEF and SDS-PAGE analyses on the proteins of wheat anthers and calli thereof were performed with the Phast System Electrophoresis apparatus made by the Pharmacia Company. Differences were observed in proteins from the anthers of different genotypes and relationship was considered to exist between the difference and the frequencies of callus induction. No obvious difference was observed in band patterns of anther calli among different genotypes. It was found that there some new protein bands in calli when compared with those of the anthers. This phenomenon probably resulted from the biochemical changes in the process of callus induction.

Key words: Wheat ;Genotype; Frequency of callus induction; Electrophoresis