

花粉原生质体与配子原生质体操作的研究进展与前景

杨弘远* 周 嫦

(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

[摘要] 总结我们近十年来在高等植物两类重要的性细胞原生质体——花粉原生质体与配子原生质体操作方面的研究进展, 简介国际上有关的研究动态与热点, 提出今后研究的设想。

[关键词] 花粉原生质体, 配子原生质体, 遗传操作, 植物有性生殖, 植物发育生物学

有性生殖是植物个体发育中结构与功能变化最为复杂与曲折的阶段。有性生殖的研究和农业生产密切相关, 是遗传育种的理论基础之一和高新技术的重要源泉。性细胞具有自然的生殖能力和单倍性等特点, 在遗传工程中有特殊的价值。植物性细胞的操作, 是当前国际上植物生殖生物学与发育生物学中的前沿研究方向。迄今在植物生殖过程的所有环节上, 均已开展了实验操作的研究, 其结果不仅加深了人类对植物传种接代的规律性认识, 还在单倍体育种、远缘杂交、基因工程等方面提供了不少新的技术手段。

近十年来, 国际上的有关研究趋势是由性器官与组织的操作向性细胞及其原生质体的操作发展, 如: 由花药、花粉培养到花粉原生质体、生殖细胞、精细胞的操作; 由子房、胚珠培养到胚囊、卵细胞的操作; 由胚珠离体授粉到精卵体外融合; 由胚胎培养到合子培养等, 操作技术日益精密化, 与此相关的研究手段也日益多学科化。我们曾先后著文概述了本领域的研究动态, 指出植物实验胚胎学已上升为“植物实验生殖生物学”的更高阶段, 并正在开拓植物生殖工程(或性细胞工程)新技术领域。

我们实验室在长期从事子房培养等性器官操作的基础上, 近十年发展到性细胞原生质体操作。在此过程中, 曾先后数次获得国家自然科学基金的支持, 特别是在“八五”重大项目“植物性细胞的发育生物学研究与操作系统的创建”(1992—1996)中, 承担了花粉原生质体和配子原生质体的操作与研究两项课题, 在以往基础上又取得了新的进展, 共发表论文近60篇。本文旨在回顾我们迄今的研究成果, 并联系国际动态, 提出今后研究的战略设想。

1 花粉原生质体的操作与研究

花粉原生质体是一种理想的单倍性原生质体, 但因包围它的花粉外壁由不受酶解的孢素组成, 因此用一般分离原生质体的方法难以分离花粉原生质体。直至80年代后期才由日本

中国科学院院士·

本文于1996年8月12日收到·

和我们分别在几种单子叶花卉植物中取得分离大量花粉原生质体的成功。此后，我们开展了一系列关于花粉原生质体的分离、培养、融合、外源基因导入以及细胞生物学研究，同时还首次创建了脱外壁花粉实验系统。

1.1 花粉原生质体的分离

迄今，我们共在9种植物中分离出花粉原生质体，是国际上分离成功的植物种类最多的。尤其是国家自然科学基金重大项目启动以来，突破了双子叶植物中芸苔属和烟草两类经济植物与模式植物花粉原生质体的分离。此外，国外只能由成熟或近成熟的花粉分离原生质体，我们则除此以外，还由幼嫩花粉（单核至二核初期）分离出原生质体，后者在培养与融合中有特殊的价值。《美国植物学报》1992年第3期选用了我们分离的幼嫩花粉原生质体显微图像作为该期的封面照片。在各类花粉原生质体的分离中，我们针对不同植物与不同发育时期的花粉的生物学特点，创建了5种不同的分离方法，研究出由超低温保存的花粉中分离原生质体的方法，还研究出挑选单个花粉原生质体制备透射电镜样品的两种方法，使有关细胞学研究建立在精密操作的基础上。

1.2 花粉原生质体的培养

成熟花粉原生质体培养只能产生花粉管。幼嫩花粉原生质体则可在离体条件下脱分化启动细胞分裂。我们首次培养萱草幼嫩花粉原生质体形成多细胞结构，并提出花粉原生质体离体发育两条途径的设想，即成熟花粉原生质体继续体内的配子体发育途径；幼嫩花粉原生质体被诱导转向孢子体发育途径，这两条途径均可望在遗传操作中加以利用。近年，在青菜与烟草的重复试验中证明，幼嫩花粉原生质体确有孢子体发育的潜能。围绕花粉原生质体在培养中的细胞学行为，进行了超微结构与细胞骨架的研究，揭示了一些关于细胞壁再生、细胞分裂、微丝骨架动态方面的现象。

1.3 花粉原生质体与体细胞原生质体的融合

由于花粉原生质体迄今尚不能单独发育再生植株，因而开展了其与体细胞原生质体融合的试验，以图借助后者的发育能力达到再生三倍体杂种的目的。80年代国际上曾报道小孢子四分体与体细胞原生质体融合产生“配子-体细胞杂种”，而本实验室则首次以游离花粉时期的原生质体进行试验获得成功：青菜幼嫩花粉原生质体与甘蓝型油菜下胚轴原生质体融合，再生了3个小植株，根据染色体、同工酶分析，判断其中1株为异源三倍体，2株为异源四倍体；后又根据RAPD分析及成熟植株的形态与育性鉴定，证明了上述判断的正确性。烟草抗卡那霉素品系的幼嫩花粉原生质体与黄花烟草叶肉原生质体融合，也再生了异源三倍体杂种植株，而用成熟花粉原生质体作融合实验则仅产生管状结构。迄今，国际上仅在烟草属中有一篇报道^[1]。

1.4 脱外壁花粉的分离、人工萌发与离体授粉

用人工方法脱去外壁后仅为内壁覆盖的花粉，我们称之为脱外壁花粉，是介于完整花粉粒和花粉原生质体之间的结构。我们在芸苔属中首次分离出批量的脱外壁花粉，以后认识到它的价值而开展了系统的研究。最近，专文报道了烟草脱外壁花粉的制备方法，开展了其人工萌发和离体授粉实验。结果表明，脱外壁花粉对萌发条件有较严格的要求，但可顺利产生花粉管；授粉与子房培养实验证明，其花粉管可在花柱中生长，并使胚珠受精结籽，最终萌发幼苗，从而创建了脱外壁花粉离体授粉受精的完整实验系统。

1.5 花粉原生质体与脱外壁花粉的电激基因转移

花粉在遗传转化中的潜在重要价值受花粉壁对外源 DNA 的屏障所限制, 而花粉原生质体和脱外壁花粉由于完全或部分地脱去花粉壁, 应是较理想的受体系统。最近, 国际上报道用电激法将外源 GUS 基因导入百合花粉原生质体, 其瞬间表达水平远较对照花粉为高^[2]。同年, 本室以电激法将外源 GUS 基因导入紫菜苔花粉原生质体, 在有花粉特异启动子 Zm13—260 的条件下, 花粉原生质体的 GUS 活性为对照花粉的 100 倍以上。在烟草方面, 首先研究了花粉发育过程中内源 GUS 活性变化的背景, 在此基础上开展了其脱外壁花粉的电激实验。结果表明, 脱外壁花粉的外源 GUS 表达活性约为对照萌发花粉的 5 倍和未萌发花粉的 30 倍。由此可见, 无论花粉原生质体或脱外壁花粉, 确有利于外源基因的导入。这一优点与前述脱外壁花粉离体授粉实验系统结合, 将有可能开拓一种通过有性过程获得转基因植株的新途径。

2 配子原生质体的操作与研究

人工分离的雄配子(精细胞)及其前身生殖细胞通称配子原生质体, 扩而言之, 分离的雌配子(卵细胞)亦应属此范畴。国际上于 1986 年首次分离出大量的白花丹精细胞。同年, 我们报道了绣球百合生殖细胞的压片分离, 继之以蚕豆生殖细胞的渗击大量分离。至于雌配子的分离, 首先要经过胚囊分离的阶段。80 年代以来, 我们先后在金鱼草、向日葵与烟草中分离出生活胚囊。胡适宜等在烟草和颠茄中分离出胚囊细胞原生质体, 带动了国际上此后在更多的植物中胚囊与卵细胞的分离研究, 并成为后来精、卵体外融合的技术基础之一。以下仅介绍本实验室近年在雌、雄配子原生质体操作方面的研究进展。

2.1 生殖细胞与精细胞的分离

我们先后在 7 科 12 种植物中分离出大量生殖细胞, 并针对不同植物花粉的生物学特点研究出 4 种分离技术; 首次试探了分离的生殖细胞的培养并实现了其在离体条件下的核分裂; 应用扫描电镜、视频增差显微活体观察、免疫荧光显微术等研究了生殖细胞离体后的形态结构的变化。其中, 关于生殖细胞在体内发育与离体后的微管骨架的变化规律的研究, 是起步较早与较为系统的。

国际上多数由三细胞型花粉分离精细胞, 仅在少数植物中是由二细胞型花粉分离。我们由玉米、油菜、黑麦、紫菜苔等三细胞型花粉分离出精细胞, 以后又在 5 科 8 种具二细胞型花粉的植物中开展了精细胞分离的研究, 其中多数植物是首次纪录。

2.2 卵细胞与合子的分离

我们关于胚囊分离的研究, 曾与离体雌核发育研究一起, 获得 1991 年度国家自然科学基金奖。近年, 在烟草上又进一步研究出分离胚囊的新技术, 可以一次分离和收集数十个胚囊, 进而从中分离与收集一定数目的卵细胞与其它胚囊细胞原生质体。分离烟草受精后的胚囊及其中的合子的技术也已研究成功。

2.3 配子原生质体的融合

90 年代国际上植物有性生殖研究中的一项突破是玉米精、卵体外融合及培养的成功(见后文)。为开展这一高难度的课题, 我们先试验了生殖细胞和精细胞与其它原生质体的融合, 研究了荧光预标记雄性细胞核以鉴定异核体的方法。为了适应精、卵单对融合的精密要求, 创建了 PEG 微滴中以显微操作法融合单对原生质体的技术, 并用之于烟草雌性细胞与各类原

生质体(包括雄配子原生质体)融合。

2.4 合子的培养

无论是精、卵体外融合产生的“人工合子”或由体内直接分离的自然合子,数目均很有限,必须采用微培养技术。我们以烟草叶肉原生质体为先导,试验了微滴培养和微室饲养两种方法,在一个微滴或一个微室中培养5—10个原生质体,可分裂为多细胞团与愈伤组织。应用微室饲养法培养烟草合子,已分裂为二细胞与多细胞结构。

2.5 钙与花粉管生长和受精

钙对花粉管生长有重要作用。但国际上多以离体萌发的花粉管为实验系统。我们从另一角度研究雌蕊中钙的分布规律,以探讨其与花粉管生长的关系。超微细胞化学与X射线微区分析表明:向日葵与棉花雌蕊的整个花粉管生长途径(如柱头乳突、花柱引导组织、珠孔、珠心退化细胞柱、退化助细胞)中,均含有较相邻组织丰富的钙;并且钙多定位于花粉管所生长的质外体系统(胞间基质、细胞壁)中。助细胞是胚囊中含钙最多的细胞,这和前人在小麦^[3]和珍珠谷^[4]中的观察一致;不同的是,我们发现在向日葵与棉花中,当花粉管到达胚囊前即诱导两个助细胞之一钙量剧增,继之以该助细胞退化并吸引花粉管进入其中释放精子,而前述两种禾本科植物的两个助细胞没有如上差别。

关于钙对生殖核分裂的影响,前人尚未着重研究。我们应用钙离子通道阻滞剂 Nifedipine 对烟草人工萌发花粉管进行处理,表明钙离子通道的畅通不仅对花粉管生长、而且对生殖核的分裂有重要影响。钙离子载体 A23187 的实验也表明,过高或过低的钙离子浓度对生殖核分裂不利。

3 国际研究动态与我们的对策

90年代以来,国际上植物性细胞操作与研究达到了新的水平,取得了不少突破性成就。了解国际上有关研究的热点与趋势,对于我们今后的战略部署是必要的。

3.1 精、卵体外融合

90年代首次实现玉米精、卵体外融合并培养成多细胞结构^[5];接着,用来自不同玉米品种的精、卵融合,再生了杂种植株^[6]。这一突破带动了几方面的研究:在融合技术上,除最初的微电融合外,在高钙、高pH^[7],甚至一般有钙条件下^[8],精、卵亦易融合。在实验材料上,除玉米外,小麦精、卵融合^[9],玉米卵细胞与其它禾本科植物精细胞融合^[10]亦培养到多细胞结构。在细胞学研究方面,对玉米精、卵融合及人工合子早期发育事态进行了观察,揭示了合子壁再生、极性形成、合子不对称分裂等特点^[10-12]。精、卵体外融合的成功标志着高等植物受精过程的研究从此可以置于人工控制的离体的条件下进行。

3.2 合子与卵细胞培养

最近的另一项进展是合子培养。除前述“人工合子”培养外,大麦与小麦的自然合子培养,亦再生了植株^[13]。这就将植物胚胎培养的起点由本来就很困难的原胚阶段进一步提早到合子阶段。未受精卵细胞的培养也有初步进展:分离的玉米卵细胞经外源生长素2,4-D短时处理后再培养,已发育至多细胞构造^[10]。下一步将是朝实现诱导未受精卵细胞离体雌核发育为单倍体植株的目标前进。

3.3 受精与胚胎发生初期的基因表达

植物生殖过程中的基因表达研究,在花粉发育、胚胎发育方面已取得许多成就,然而涉及有性生殖的中心环节,即受精和胚胎发生的启动,由于研究难度很大,目前仅仅开始。最近,通过突变体分析,已分离出决定合子第一次分裂不对称性的基因^[14]。应用 RT-PCR 技术,分别由 100 多个分离的玉米卵细胞和“人工合子”构建 cDNA 文库^[15],通过差异筛选分离出卵细胞受精前、后的特异基因。可以预期,这将形成植物发育生物学研究中的一个新热点。

3.4 雌、雄配子识别

关于植物传粉受精中的雌、雄识别,过去集中在配子体与孢子体组织之间的识别研究上,特别是对自交不亲和的识别机理有很深入的研究。近年开始探讨配子水平上的识别,以求最终解开双受精之谜。80 年代曾企图由分离的精细胞制备单克隆抗体以寻找与识别有关的物质,但未能解决好细胞纯化问题。90 年代以来取得若干新进展:发现单克隆抗体 JIM8 与油菜精细胞结合而不与中央细胞结合,并特异地标记细胞膜^[16]。还发现单克隆抗体 LIG62 专一地与百合生殖细胞及精细胞结合^[17]。在我国,曹宗巽等近年也着手从大批量分离的玉米与百合精细胞中提取其质膜并对质膜蛋白进行生化分析,初步发现了若干可能的精细胞特异蛋白。

3.5 生殖工程

生殖工程是植物有性生殖研究在高技术中的应用。如前所述,植物生殖器官与组织的操作,如花药培养、胚胎培养等已在育种中发挥作用,而性细胞及其原生质体的操作则为今后的生殖工程提供新的技术源泉。利用有性途径进行植物遗传转化的研究,前人曾有专文评述,其中着重介绍了小孢子和花粉的转化^[18]。但以性细胞原生质体与合子为对象的研究可以说尚未开始。我们曾撰专文,从宏观的角度论述了植物改良方法,由常规有性杂交到体细胞工程再到性细胞工程的螺旋式历史发展趋势,预期一二十年内将会出现植物生殖工程研究的高潮。纵观近两年召开的国际植物有性生殖会议(1994, 1996),这一趋势已经日渐明朗。

3.6 对策

植物有性生殖研究是植物发育生物学中的核心内容之一,而性细胞操作则是性细胞发育、受精与胚胎发生研究的重要手段。通过近十多年的努力,我国在这方面已经打下了良好的基础,作出了富有特色的研究成果,其中有些方面具有一定的优势,但迄今取得的成绩仍是阶段性的。为了迎接 21 世纪的挑战,今后的战略应是:瞄准国际研究前沿,立足国内优势,依仗有自身特色的实验系统,选准新的突破口,从分子、细胞到个体各个层次上深入开展研究。其中,精卵体外融合和合子培养、受精和胚胎发生早期的基因表达、花粉原生质体和配子原生质体的遗传转化等,应是既顺应国际趋势又符合我国国情的主攻方向。

参 考 文 献

- [1] Desprez B, Chupean MC, Vermeulen A et al. *Plant Cell Reports*, 1995, **14**: 204—209.
- [2] Miyoshi H, Usami T, Tanaka I. *Sex Plant Reprod.*, 1995, **8**: 205—209.
- [3] Chaubal R, Reger BJ. *Sex Plant Reprod.*, 1990, **3**: 98—102.
- [4] Chaubal R, Reger BJ. *Sex Plant Reprod.*, 1992, **5**: 34—46.
- [5] Kranz E, Bautor J, Lorz H. *Sex Plant Reprod.*, 1991, **4**: 12—16.
- [6] Kranz E, Lorz H. *Plant Cell*, 1993, **5**: 739—746.
- [7] Kranz E, Lorz H. *Zygote*, 1994, **2**: 125—128.

- [8] Faure J E, Digonnet C, Dumas C. *Science*, 1994, **263**: 1598—1600.
- [9] Kovác M, Barnabas B, Kranz E. *Plant Cell Reports*, 1995, **15**: 178—180.
- [10] Kranz E, von Wiegen P, Lorz H. *Plant Journal*, 1995, **8**: 9—23.
- [11] Faure J E, Mogensen H L, Dumas C et al. *Plant Cell*, 1993, **5**: 747—755.
- [12] Tirlapur U, Kranz E, Cresti M. *Zygote*, 1995, **3**: 57—64.
- [13] Holm P B, Knudsen S, Moritzen P et al. *Plant Cell*, 1994, **6**: 531—543.
- [14] Jürgens G. *Cell*, 1995, **81**: 467—470.
- [15] Dresselhaus T, Lorz H, Kranz E. *Plant Journal*, 1994, **5**: 605—610.
- [16] Pennell RI, Janniche L, Kjellbom P et al. *Plant Cell*, 1991, **3**: 1317—1326.
- [17] Knox RB, Zee SY, Blomstedt C. *New Phytologist*, 1993, **125**: 679—694.
- [18] Roeckel P, Moloney MM, Drevel JR. In: Russell SD, Dumas C ed. *Sexual Reproduction in Flowering Plants*. Acad. Press, San Diego, 1992, 425—446.

ADVANCES AND PROSPECTS IN THE MANIPULATION OF POLLEN PROTOPLASTS AND GAMETOPLASTS

Yang Hongyuan Zhou Chang

(*College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072*)

Abstract This is a summarization of our achievements in the manipulation of pollen protoplasts and gametoplasts of higher plants during the last ten years, especially during 1992—1996 under the support of the project “Developmental biology and manipulation systems of sexual plant cells” by the National Natural Science Foundation of China. Recent progress in this field carried out by the investigators of other countries are briefly highlighted. Based on the international trends of research and our own studies, some suggestions for future strategy are presented.

Key words pollen protoplast, gametoplast, genetic manipulation, sexual plant reproduction, plant developmental biology