

花粉原生质体培养技术研究进展

王玉萍¹ 张 峰² 王 蒂²

(¹ 甘肃农业大学园艺系, 兰州 730070; ² 甘肃农业大学农学院, 兰州 730070)

摘 要: 对不同发育时期的花粉原生质体分离效果和分离方法以及培养效果的研究进展进行了综述。

关键词: 花粉原生质体; 培养; 分离

中图分类号: S 60; Q 813.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 01-0120-04

Advence in the Technique of Culture of Pollen Protoplasts

Wang Yuping¹, Zhang Feng², and Wang Di²

(¹ Department of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; ² College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The advances in the isolation and culture of pollen protoplasts were reviewed.

Key words: Pollen protoplast; Isolation; Culture

花粉原生质体具有单倍体与原生质体的双重特性, 是一种特殊的实验体系^[1]。有关花粉原生质体的研究始于 20 世纪 70 年代, 然而, 因其分离与培养技术上的问题, 研究进展一直不大, 直到 80 年代后期才取得突破进展。

1 小孢子四分体原生质体的分离与培养

20 世纪 70 年代初, Bhojwari 等^[2]首次用酶法从烟草与几种禾本科作物的小孢子四分体中制备了原生质体, 此后有较多的工作涉及小孢子四分体原生质体的分离^[3~6]。20 世纪 90 年代中后期, 从陆地棉^[7]和马铃薯^[8]的小孢子四分体中也分离出了原生质体。小孢子四分体的壁由胼胝质组成^[9], 能被蜗牛酶降解, 在多种植物^[4~6, 10]中均能获得大量原生质体, 在酶浓度、渗透压和 pH 值适宜时, 分离率最高可达 100%。

20 世纪 70 年代早期小孢子四分体原生质体的培养工作只报道了细胞壁再生^[2, 6]、念珠状或管状结构的形成^[11]以及细胞核有限的分裂^[5]等现象。到 20 世纪 80 年代中期, 培养小孢子四分体原生质体诱导细胞分裂一直未能成功^[12, 13]。20 世纪 90 年代后期, 岳建雄^[7]培养陆地棉四分体原生质体, 只进行了第二次分裂。

虽然小孢子四分体原生质体的单独培养比较困难, 但用它开展融合实验却取得一些成功, Deka^[3]曾试验木豆 (*Cajanus cajan*)、玉米等小孢子四分体原生质体之间的融合, 融合率高达 70% ~ 80%, 培养后有 5% 的融合细胞发生了核融合。20 世纪 80 年代利用小孢子四分体原生质体与体细胞原生质体融合, 已在烟草属与矮牵牛属的种内与种间杂交中^[13~15]获得再生植株, RAPD 分子鉴定证明是三倍体杂种, “体一配”杂交途径有可能为选育三倍体品种开辟新道路。

2 花粉粒原生质体的分离与培养

2.1 分离

收稿日期: 2003 - 03 - 25; 修回日期: 2003 - 11 - 10

基金项目: 国家教委高等学校优秀青年教师教学和科研奖励基金项目 (9830596); 国家 ‘863’ 计划项目 (2001AA241132)

花粉壁具双层特殊结构,内壁的主要成分纤维素、果胶质等易被细胞壁降解酶消化,外壁的主要成分孢粉素具有强烈抗酸、抗生物分解等特性,这是分离花粉原生质体的主要障碍。目前花粉粒原生质体分离的技术路线主要有以下几种。

2.1.1 化学药品降解花粉壁 20世纪70~80年代,Power^[10]和Bajaj^[4]等试用多种强酸、强碱、强氧化剂和有机溶剂以及结合机械压力的方法分别在烟草和几种茄科及禾本科植物中制备花粉不同发育时期的原生质体,但强烈的化学试剂在溶解外壁的同时也破坏了原生质体,效果不佳。20世纪80年代中后期,采用化学分离和酶法相结合分离花粉原生质体取得重要进展。Loewus等^[16]采用一种多糖溶剂MMNO·H₂O,在75℃处理麝香百合花粉,快速溶解外壁与内壁,获得大量原生质体,但药物毒素和高温使原生质体大量失活。Baldi^[17]改进技术,在20℃用MMNO先溶解外壁,得到具内壁的原生质体后,再用果胶酶、纤维素酶和高浓度钙离子降解内壁获得成活率达60%的原生质体,但其分离率降低。其实,在此条件下MMNO的作用并非溶解外壁,而只是削弱了内、外壁之间的联系,从而有利于内壁的酶解。

2.1.2 非酶脱壁 迄今仅见一篇报道^[18],用不同浓度的盐溶液在渗透压作用下使花粉内外壁裂口释放原生质体,但缺乏脱壁的证据。

2.1.3 酶法降解花粉壁 迄今没有相应的酶降解花粉外壁的孢粉素。近年来针对不同植物花粉结构以及花粉粒发育时期的特点,选择萌发孔和萌发沟作为突破口,采取相应的措施,已建立了5种酶解方法。①一步酶解法:适用于外壁较薄且具宽大萌发沟的花粉。将花粉置于酶液中,通过水合膨胀,使外壁沿萌发沟裂开,内壁大面积地暴露在酶液中而分解释放花粉原生质体,水合与酶解几乎同时进行。一些单子叶花卉植物如百合科^[19]、鸢尾科^[20]、石蒜科^[21]以及双子叶植物芸薹属^[22]的一些植物均用此法成功获得花粉原生质体。在一步法中,酶的作用是降解内壁使外壁脱落,通过水合膨胀改变花粉外壁、内壁与原生质体三者间的联系状态,以解决分离的困难,获得的原生质体均具有高度活力。②水合一酶解二步法:适于外壁较厚且较坚硬的花粉,水合与酶解分两步进行。第一步,花粉粒在蔗糖溶液内充分水合,使外壁裂开(有的材料外壁完全脱落,成为仅具内壁的脱外壁花粉);第二步,将脱外壁花粉转入酶液,降解内壁,获得花粉原生质体。经济作物甘蓝型油菜与紫菜薹^[23]用此法获得成功,分离率为66.7%与70.4%。③萌发一酶解二步法:适于外壁厚且坚硬的花粉。第一步,将成熟花粉置于花粉萌发培养基中,待花粉大量萌发出短花粉管时,及时转入酶液;第二步,在酶液中酶解。酶液由降解花粉管,再扩展至降解花粉内壁,从而释放出花粉原生质体。用此法从烟草^[24]的成熟花粉中分离出大量原生质体。④花药预培养法:将花药置于蔗糖或花药培养基中漂浮培养,花药裂开陆续释放出花粉。花粉落入培养基中继续培养,待大量花粉的外壁裂开后转入酶液,脱去内壁。⑤花粉饥饿预处理法:将幼嫩花粉由花药中直接压出。在不含蔗糖仅含甘露醇和无机盐的培养基中进行饥饿预处理,然后转入高渗酶液中,花粉很快收缩成长椭圆形。在酶液作用下,原生质体在一个萌发沟处逐渐向外逸出,形成完整的花粉原生质体。已分别用④、⑤两种方法从烟草^[9]中成功分离出单核期花粉原生质体。

花粉原生质体的研究近年来取得了长足进展,然而目前能大量分离花粉原生质体的仅限于一些花卉植物和少数几种经济作物,而在主要粮食作物和大量经济作物上,至今仍未见到这方面的报道。

2.2 培养

早在20世纪70年代,Bajaj等^[4]就探索成熟花粉原生质体的培养,观察到它们能有限生长,但未能明确证实有细胞分裂。20世纪80年代中后期,Tanaka等^[19]、周嫦^[20]分别报道了麝香百合与萱草花粉原生质体培养中细胞壁的再生,类似花粉管结构的形成以及生殖细胞的分裂。Miki-Hirosige等^[25]在细胞学方面对麝香百合花粉原生质体的再生壁作了较详细的研究,发现培养初期产生无定型的纤维素性质的细胞壁,以后逐渐增厚,形成双层,但其成分与花粉内壁不同,也无类似外壁的结构。20世纪90年代初,吴燕等^[26]对唐菖蒲成熟花粉原生质体的再生壁和培养中的萌发花粉管进行了研究,

发现花粉管形态正常,在花粉管内生殖细胞分裂形成一对精子,花粉原生质体再生壁的特点及其形成过程与体细胞原生质体的再生壁比较相似,而与花粉外壁不同。但是,再生壁又与花粉内壁在萌发沟的局部增厚较为相近,表明花粉原生质体的遗传生理基础对于壁的生长有某些预定作用。周嫦^[27]首次报道了萱草单核期花粉原生质体培养启动细胞分裂,形成多细胞团,突破了花粉窄生质体离体孢子体发育的第一关。90年代中期,夏惠君等^[9]培养烟草幼嫩花粉原生质体,既可继续配子体途径萌发花粉管,又可表现出进行细胞分裂走向孢子体发育途径。陈振光等^[21]培养水仙花粉原生质体获得愈伤组织。这些研究表明,花粉原生质体在离体条件下有两条发育途径:成熟花粉原生质体分化程度高,有继续原来体内配子体发育的倾向,而幼嫩花粉原生质体则可能脱分化转向孢子体发育途径。进一步研究两条发育途径的调控机理,有望用于开展遗传工程。

2.3 花粉管原生质体的分离与培养

花粉管壁由果胶质、纤维素与胼胝质组成,可被果胶酶、纤维素酶或蜗牛酶降解得到原生质体。20世纪70年代初,Power^[10]首次分离烟草花粉管原生质体,得到含液泡和不含液泡的花粉管亚原生质体。20世纪80年代以后研究进展较快,利用质壁分离和酶解结合的方法,分别从黄菖蒲和垂笑君子兰^[28]、金鱼草^[29]和烟草^[30]等植物的花粉管中分离出花粉管亚原生质体。

朱澍^[29,30]培养金鱼草和烟草花粉管亚原生质体,由一根花粉管可以分离出2~3个大小不等的有核或无核的亚原生质体,这些亚原生质体均能再生特别厚的细胞壁,能间歇性地生长管状结构,保持正常生长以及能排出内含物等特点,但未观察到亚原生质体分裂和进一步的生长发育。由于花粉管亚原生质体分离方法简便、原生质体活性高以及能获得有核或无核亚原生质体等特点,能为细胞工程和遗传工程提供理想的材料^[28,31]。

3 影响花粉原生质体分离与培养的主要因素

不同植物花粉壁的结构不同,需采用不同的分离与培养方法。迄今获得成功的植物不多,特别是具狭小萌发孔的植物如禾本科,还不能用所建立的方法分离花粉原生质体,需要探索新途径。

花粉发育时期不同,其生理状态以及花粉壁结构与成分会有所变化,从而影响分离效果。Tanaka等^[19]比较了麝香百合不同发育时期花粉原生质体的分离率,以近成熟花粉的分离率最高,达到70%~80%,开花后,分离率又逐渐下降。萱草发育中期的小孢子很难分离出原生质体,而自小孢子后期开始,原生质体分离率明显提高,以成熟花粉粒的分离率最高^[20]。

研究表明^[27],未经低温预处理的花粉分离的原生质体不能启动细胞分裂,低温预处理造成细胞‘饥饿’,促进并诱导脱分化,启动了细胞分裂。

酶液的组成因品种而异。在一步酶解法中,纤维素酶与果胶酶足以分离大量百合科与鸢尾科一些植物的花粉原生质体,但不能分离芸薹属植物的花粉原生质体。后者需用长时间的水合一酶解法才能奏效^[21,24],如果加入Pectolyase Y-23,也能用一步酶解法分离成功^[6]。而有的材料只需纤维素酶与果胶酶效果较好,添加Pectolyase Y-23无益^[19]。酶解四分体需另加蜗牛酶^[8]。

4 展望

花粉原生质体的研究近年已取得长足进步,但发展不平衡。由于花粉壁的组成特点,从小孢子四分体与花粉管中大量分离原生质体较容易,而在成熟花粉阶段都相当困难。虽然目前已能从一些花卉植物中顺利地获得花粉原生质体,但多数植物,特别是对重要粮食作物和经济植物而言,还不能大量分离花粉原生质体。无论四分体原生质体,成熟花粉原生质体或花粉管原生质体的培养均比较困难,迄今未有重大突破。由于四分体原生质体的分离较容易,若能诱导持续分裂和分化,就可在更广泛的植物中开展有关单倍体原生质体的工作。利用花粉原生质体的两条发育途径,一方面可以为遗传操作提供各种有用的受体或靶细胞,借以开展各类细胞融合,遗传转化,突变体筛选等工作;另一方面,

还可用作载体,通过萌发花粉管受精将外源基因传给子代。因此,花粉原生质体的研究具有重要的理论和实践意义。

参考文献:

- 1 Bajaj Y P S. Haploid protoplasts. *Intern. Rev. Cytol.*, 1983, 16 (Suppl.): 113 ~ 141
- 2 Bhojwari S S, Cocking E C. Isolation of pollen protoplasts from pollen tetrads. *Nat. New Biol.*, 1972, 239: 29 ~ 30
- 3 Deka P C, Mehra A K, Pathak N N, et al. Isolation and fusion studies on protoplasts from pollen tetrads. *Experientia*, 1977, 16: 182 ~ 184
- 4 Bajaj Y P S, Davey M R. The isolation and ultrastructure of pollen protoplasts. In: Linskens H F. *Fertilization in Higher plants*. Amsterdam: Elsevier, 1974. 73 ~ 80
- 5 Rajasekhar E W. Nuclear division in protoplasts isolated from pollen tetrads of *Datura metel*. *Nature*, 1973, 246: 223 ~ 224
- 6 Bajaj Y P S, Davey M R, Grout B R. Pollen tetrad protoplasts: A model system for the study of ontogeny of pollen. In: Mulcahy D L. *Gamete Competition in Plants and Animals*. Amsterdam: North Holland, 1975. 7 ~ 18
- 7 岳建雄,李淑君,张惠军,等.陆地棉小孢子原生质体的分离与培养.见:华南农业大学编.农业科学集刊(第二集),原生质体培养专辑.北京:中国农业出版社,1995. 118 ~ 123
- 8 王玉萍,王 蓓,张 峰.马铃薯小孢子原生质体分离的影响因素.甘肃农业大学学报,2000, 35 (3): 277 ~ 281
- 9 夏惠君,周 嫦,杨弘远.烟草幼嫩花粉原生质体分离与早期离体发育.植物学报,1996, 38 (2): 113 ~ 117
- 10 Power J B. Isolation of mature tobacco pollen protoplasts. In: Street H E. *Plant Tissue and Cell Culture*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1973. 118 ~ 119
- 11 Imamura J, Potrykus I. Isolated tetrad protoplasts develop to the binucleate stage in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Havana). In: Potrykus I. 6th International Protoplast Symposium, Poster Proceedings. Base: Birkhauser, 1983. 48
- 12 Pirrie A, Power J B. The production of fertile triploid somatic hybrid plants [*Nicotiana glutinosa* (n) + *N. Tabacum* (2n)] via gametic: somatic protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.*, 1986, 72: 48 ~ 52
- 13 Lee C H, Power J B. Interspecific gametosomatic hybridization in *Petunia hybrida*. *Plant Cell Rep.*, 1988, 7: 17 ~ 18
- 14 Lee C H, Power J B. Intra-and interspecific gametosomatic hybridization within the genus *Petunia*. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.*, 1988, 12: 197 ~ 200
- 15 Pental D, Mukhopadhyay A, Grover A, et al. A selection method for the synthesis of triploid hybrids by fusion of microspore protoplasts (n) with somatic cell protoplasts (2n). *Theor. Appl. Genet.*, 1988, 76: 237 ~ 243
- 16 Loewus F A, Baldi B G, Franceschi V R, et al. Pollen sporoplasts: dissolution of pollen walls. *Plant Physiol.*, 1985, 78: 652 ~ 654
- 17 Baldi B G, Franceschi V R, Loewus F A. Dissolution of pollen intine and release of sporoplasts. In: Mulcahy D L. *Pollen Ecology and Biotechnology*. New York: Springer-Verlag, 1986. 77 ~ 82
- 18 Weaver M L, Breda V, Gaffield W, et al. Norenzymatic release of intact protoplasts from mature pollen of bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1990, 115 (4): 640 ~ 643
- 19 Tanaka I, Kitazuma C, Ito M. The isolation and cultuer of lily pollen protoplasts. *Plant Sci.*, 1987, 50: 205 ~ 211
- 20 周 嫦. 三种植物花粉原生质体的大量分离与初步培养. 植物学报, 1988, 30 (4): 362 ~ 367
- 21 陈振光,林庆良,刘 群,等.中国水仙花粉原生质体的分离与培养.福建农学院学报(自然科学版),1993, 22 (2): 159 ~ 163
- 22 梁 立,徐秉芳,郑从义,等.紫菜薹花粉超低温保存及其原生质体分离.植物学报,1993, 35 (10): 733 ~ 738
- 23 李仕琼,杨弘远,周 嫦.甘蓝型油菜和紫菜薹花粉原生质体的大量分离.植物学报,1992, 34 (5): 339 ~ 345
- 24 汪 泳,周 嫦.烟草花粉原生质体的分离.植物学报,1995, 37 (5): 413 ~ 416
- 25 Miki-Hirose H, Hakamura S, Tanaka I. Ultrastructural research on cell wall regeneration by cultured pollen protoplasts of *Lilium longiflorum*. *Sexual Plant Reproduction*, 1988, (1): 36 ~ 45
- 26 吴 燕,周 嫦.唐菖蒲花粉原生质体极其萌发花粉管的超微结构研究.植物学报,1990, 32 (7): 493 ~ 498
- 27 周 嫦.萱草幼嫩花粉原生质体培养与早期的离体发育.植物学报,1989, 31 (11): 409 ~ 413
- 28 Pargney J C. Cellular ultrastructures during plasmolysis and after protoplasts isolation from pollen tubes of *Iris pseudacorus* and *Clivia nobilis* Z. *Pflanzenphysiol.*, 1982, 107: 237 ~ 249
- 29 朱 澂,谢一鸣,胡适宜.金鱼草花粉管原生质体的分离及在培养中的行为.植物学报,1984, 26 (5): 459 ~ 465
- 30 朱 澂,王 潜,胡适宜.烟草花粉管原生质体的分离和在培养中的行为.实验生物学报,1985, 18 (2): 135 ~ 140
- 31 Condeelis J S. The identification of F actin in the pollen tube and protoplasts of *Amaryllis belladonna*. *Exp. Cell Res.*, 1974, 88: 435 ~ 439