

从油菜(*B. rassaica napus* L. cv. Topas)裂外壁小孢子培育出胚状体与小植株*

田辉 孙蒙祥*

(武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 湖北武汉 430072)

摘要 油菜(*B. rassaica napus* L. cv. Topas)小孢子经高温(32)预培养导致外壁开裂, 形成裂外壁小孢子。微室饲养培养技术结合定位追踪观察证实裂外壁小孢子具有胚胎发生能力。33.3%的裂外壁小孢子能启动细胞分裂, 其中13.3%的裂外壁小孢子能持续分裂, 并遵循胚胎发生途径。与完整小孢子不同, 第一次分裂既有均等分裂, 亦有不均等分裂, 两者均能导致胚胎发生。将已分化的胚状体转移至固体培养基上, 可经二次胚胎发生或直接再生小植株。

关键词 油菜; 裂外壁小孢子; 胚胎发生

中图分类号: S565 文献标识码: A

Embryoid Formation and Plantlet Regeneration from Exine-dehiscid Microspores in *B. rassaica napus* L. cv. Topas

TIAN Hui SUN Meng-Xiang*

(Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract By preculture in the temperature of 32 , the exine of microspores in *B. rassaica napus* L. cv. Topas could be induced to dehiscence, forming so-called exine-dehiscid microspores. With the aid of a microculture and feeder-cell system and tracing the development of individual microspores, it is proved that exine-dehiscid microspores have the capacity of embryogenesis. 33.3% of the exine-dehiscid microspores divided, and among them 13.3% developed into embryoids. Quite different from the development of wall-intact microspores, the first division of exine-dehiscid microspores could be symmetric or asymmetric. Both kinds of microspores could lead to embryogenesis. After been transferred to solid medium, the mature embryoids could go on developing, forming secondary embryos or regenerating plantlets directly.

Key words *B. rassaica napus* L. cv. Topas; Exine-dehiscid microspores; Embryogenesis

游离小孢子是一种兼具单倍性和单细胞特性的植物材料, 可以从少量花蕾中分离到大量的发育同步的细胞群体, 一直被认为是以生物技术进行作物改良的重要材料而广受重视。在甘蓝型油菜(*B. rassaica napus* L. cv. Topas)中, 利用其单花蕾的小孢子培养曾获得了70%以上的胚胎发生频率^[1], 因而常被作为研究小孢子胚胎发生的模式植物, 同时也是利用小孢子培养进行油菜遗传育种的重要材料^[2]。花粉具外壁和内壁两层壁结构。油菜花粉壁的特点在于其外壁较厚而内壁较薄^[3], 有报道认

为, 在其小孢子胚胎发生的早期, 壁的完整性是必要的^[4], 在小孢子发育为一个约含40个细胞左右的细胞团后, 外壁才开始破裂^[4, 5]。然而, 这种厚而坚硬的外壁的存在构成了在其小孢子胚胎发生的早期进行遗传转化的障碍^[6]。

脱外壁花粉是本实验室创建的一种新实验材料, 其特点是用人工方法脱去外壁, 而仅由内壁包围其内的原生质体。在芸薹属中, 已建成脱外壁花粉分离与人工萌发的实验系统^[3]。在烟草中, 电激实验表明, 脱外壁花粉和具壁的完整花粉相比, 易

* 基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目("973"项目: G1999053908)及国家自然科学基金资助项目(39970368)。

作者简介: 田辉(1977-), 女, 湖北人, 硕士研究生。本文承周嫦教授审阅并提出修改意见, 特此致谢。 * 通讯作者

Received on (收稿日期): 2001-12-26, Accepted on (接受日期): 2002-06-13

被导入外源基因^[7]。但已有的研究大都限于成熟及近成熟花粉,目前尚未发现有关芸薹属脱外壁小孢子及其胚胎发生的研究报道。

在本实验中,我们以油菜(*B. rassaica napus* L. cv. Topas)小孢子为材料,获得了一定数量的外壁破裂但仍部分包被着细胞表面的小孢子,我们称之为裂外壁小孢子,其可视为一种介于完整小孢子和完全脱外壁小孢子之间的结构单元。我们对其进行了培养与观察,并就其应用潜力进行了讨论。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试材料为油菜(*B. rassaica napus* L. cv. Topas),九月下旬播种于田间,次年2~4月开花。

1.2 油菜小孢子的培养

选取小孢子处于单核晚期、长约3 mm的花蕾材料,直接或经4 h预处理1~2 d后,置于4%的次氯酸钠溶液消毒10 min,无菌水洗3~4次,加入B5培养基^[8]4~5 mL,用平头玻璃棒轻轻挤压花蕾,使小孢子游离至培养基中,通过50 μm孔径尼龙筛网除去花蕾组织残渣,加入5 mL新鲜B5培养基冲洗筛网,收集小孢子悬液,离心(100 × g, 3 min)洗涤3次,最后用NLN-13培养基(NLN培养基^[8],附加13%蔗糖,不加外源激素, pH 6.0)将小孢子密度调至1~2 × 10⁵/mL。将小孢子悬液分装于3.5 cm小培养皿中,每皿1.5 mL,32 ℃恒温暗培养。一部分小孢子培养1周左右,稀释1~2倍,作为饲养细胞。另一部分则继续培养作为裂外壁小孢子的参照系统。

1.3 裂外壁小孢子的制备与培养

单核晚期小孢子经B5培养基洗涤3次后,用高渗培养基(NLN基本成分,0.7 mol/L蔗糖,0.4 mol/L甘露醇(山梨醇),不加外源激素, pH 6.0)将小孢子密度调至1~2 × 10⁵/mL,32 ℃恒温培养24 h后,离心(100 × g, 3 min)收集沉淀再转入NLN-13中培养。3~5 d后,部分小孢子外壁先后破裂甚至脱落,形成裂外壁小孢子(内壁部分裸露,仍为外壁覆盖的小孢子)以及脱外壁小孢子(外壁完全脱落)。用微吸管挑出10~20个裂外壁小孢子置于已加入100 μL新鲜NLN-13培养基的微室中(M L-L CELL-CM, M L L I P O R E)中,将该微室放在有1.5 mL饲养细胞的3.5 cm培养皿中,32 ℃恒温暗培养。同时,作为对照,挑取5~10个脱外壁小孢

子置于微室中,在相同的条件下培养。

培养1周后,在微室中加入15~20 μL的NLN-0(不含渗透压调节剂的NLN培养基),当其发育为较大的球形胚时,移至含NLN-10的3.5 cm培养皿中,在25 ℃继续培养2~3周后,移至MS^[9]固体培养基(附加3%的蔗糖,0.8%的琼脂,不加外源激素, pH 5.7)上,下胚轴部分插入培养基中,在25 ℃,弱光培养(16/8h循环光照)。

1.4 观察及数据处理

用荧光染料DAPI染色观察细胞核。收集新鲜的小孢子以及培养中的裂外壁小孢子,于含13%蔗糖的FPA固定液中固定2~4 h,洗涤后在20 μg/mL DAPI溶液中染色15 min,洗去染液后于荧光显微镜(Leica DM IRB)下观察。明视野及荧光图象由Cooled-CCD(MicroMAX Princeton Instruments, Inc)采集。

实验数据的计算均采用3次实验的平均值,每次随机取5个视野观察统计。

2 实验结果

2.1 裂外壁小孢子的制备及影响因素

在芸薹属的成熟花粉中,徐秉芳等曾根据其内外壁的结构特点,利用低温水合、热激、渗透程序获得了较高的脱外壁频率^[3],但据我们试验,该法用于油菜单核晚期的小孢子时,并不能获得较好的脱外壁效果和培养效果。本实验将小孢子恒温培养于32 ℃高温下,并在培养初期辅以渗透压冲击,试图在阻断其配子体发育途径的同时,通过细胞自身的膨胀以及外界因素的冲击使其外壁开裂。图1示预培养过程中小孢子的裂外壁及脱外壁频率。培养2天后,即有少部分小孢子从一个或两个萌发沟处裂开外壁(图版I, 1),同时有极少数外壁完全开裂,形成脱外壁小孢子。随培养天数的增加,外壁破裂及脱落的频率逐渐增加,形成程度不同的裂外壁小孢子(图版I, 2-4)。培养5~6天后,外壁破裂的速度逐渐减缓,同时,一部分裂外壁小孢子先后开始启动分裂,因而,在本实验中,我们选取预培养3~5天,尚未分裂的裂外壁小孢子进行培养。

外壁破裂的频率随外界条件而变化,开花初期取材的小孢子,外壁破裂较难,外壁破裂(包括脱落)的频率仅为1.1%。随花期的延伸,外壁破裂的频率逐渐增加,后花期取材的小孢子有11.7%的外壁破裂。末花期取材的小孢子,外壁破裂的频率又转低,仅为4.03%。花粉的发育时期也影响外壁破

裂频率, 在相同的培养条件下(NLN-13, 32 培养 5 天), 二核中期的花粉, 仅有 2% 左右外壁裂开后仍附着于细胞表面, 有 30% 左右的则完全脱掉外壁; 相比之下, 单核晚期小孢子则有约 8% 的裂外壁频率, 完全脱外壁的仅为 2% ~ 4%。此外, 在培养前对花蕾进行 2~ 3 天的 4 低温预处理, 以及适当提高小孢子的培养密度, 均有助提高小孢子外壁破裂的频率。

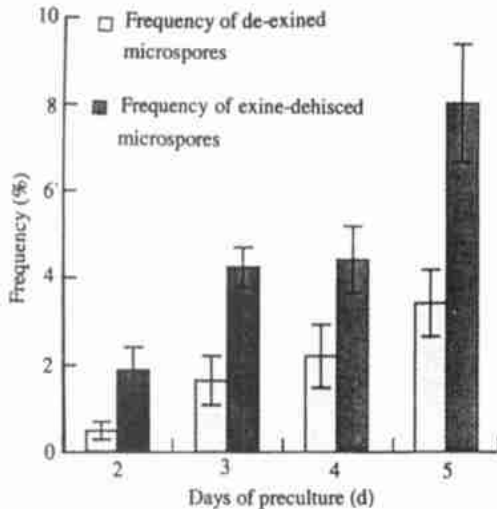


图 1 预培养天数对油菜小孢子裂外壁及脱外壁频率的影响*

Fig 1 Effects of preculture duration on the frequency of de-exined and exine-dehisced microspores of *B. rassaica napus* L. cv. Topas

* 单核晚期小孢子培养于 NLN-13, 32, pH 6.0 条件下

2.2 裂外壁小孢子的发育过程

裂外壁小孢子最初为圆形, 随着外壁破裂程度的增加, 细胞沿外壁破裂的方向伸长, 呈不规则的椭圆形。大多数裂外壁小孢子在微室培养 2~ 3 天启动分裂。分裂前, 核一般移至破裂外壁开口处附近(图版 I, 5、6)。裂外壁小孢子 33.3% 启动分裂, 其中 13.3% 的能继续分裂形成胚。外壁对小孢子的包被形式对一次分裂后子细胞的连接方式有一定影响。对 178 个已分裂的裂外壁小孢子的统计表明, 外壁松散附着在小孢子上的占 8.7%, 由其分裂的两个子细胞一般联系较为松散, 有彼此脱离的趋势; 而外壁紧密附着的小孢子占 91.3%, 分裂所形成的两个子细胞联系紧密。其第一次分裂既有不等分裂(图版 I, 7), 同时也有均等分裂(图版 I, 8)。根据分裂面与外壁开口断面的相对关系, 将其第一次分裂分为 3 种方式: 1. 分裂面平行或重合于外壁断面, 占 80.8%, 其中不等分裂占 59.5%; 均

等或近似均等分裂占 21.3%。2. 分裂面与外壁断面呈斜角, 占 7.0%。3. 分裂面与外壁断面垂直, 占 3.5%。DAPI 染色表明, 裂外壁小孢子的第一次核分裂形成两个大小及染色程度一致的子核(图版 I, 9、10)。

具完整外壁的小孢子分裂后, 首先形成一由外壁包围的无极性细胞团, 再在此基础上发生分化, 由其发育而来的胚一般缺乏胚柄结构^[4]。而裂外壁小孢子的早期发育过程与小孢子的发育明显不同。按上述 1、2 两种方式分裂的裂外壁小孢子, 其两个子细胞之一几乎完全为外壁所包被, 而另一个子细胞则只有少部分或几乎不为外壁包被。根据外壁破裂程度不同, 两个子细胞的相对大小也发生变化。在不均等分裂的情况下, 较典型的发育方式是其较大的子细胞可有多种分裂方式(图版 I, 11、12), 随后继续发育形成胚体, 其或者为外壁包被(图版 I, 13), 或者裸露(图版 I, 14), 在此过程中, 较小的细胞则平行分裂数次, 形成一系列胚柄结构。在均等或近似均等分裂的情况下, 其后的发育或类似不均等分裂后的发育, 或两子细胞沿平行于原分裂面的方向分裂数次, 形成一系列胚柄状结构, 再由其中的一个或几个细胞形成胚体。按上述方式 3 分裂的裂外壁小孢子, 两个子细胞均有部分为外壁包被, 均继续分裂形成各自的胚和胚柄结构。裂外壁小孢子在培养两周后即能形成较大的胚状体(图版 I, 15), 具明显的胚和胚柄结构。胚状体转至无激素的 MS 固体培养基上后, 89.6% (追踪观察胚状体总数: 135) 能继续发育, 经二次胚胎发生或直接再生小植株(图版 I, 16)。

同时, 还观察了作为对照的脱外壁小孢子的发育。对 135 个培养的脱外壁小孢子的观察表明, 在无激素的培养基中, 其分裂频率较低, 仅为 6.5%, 大多数分裂 1~ 2 次后, 胞质萎缩, 只有少数形成小细胞团, 最终未能得到胚状体与再生植株。

3 讨论

脱外壁花粉是近年建立的, 介于完整花粉和花粉原生质体间的研究体系, 有着独特的研究价值^[10]。然而, 迄今其大量获得只限于有限植物种类的成熟或近成熟花粉^[3, 11]。在芸薹属的成熟花粉中, 曾获得了 40% 左右的脱外壁频率^[3]。本实验发现, 就油菜小孢子及幼嫩花粉而言, 较可行的方法是将其持续培养于较高温度(32)下, 使其脱离配子体途径的同时, 通过细胞自身的膨胀和快速生

长,并辅以渗透压冲击等外界因素处理,促使外壁缓慢开裂。尽管如此,要获得高的外壁破裂频率仍存在较大困难,同时,与成熟花粉相比,单核晚期的小孢子在外壁开裂形成裂外壁小孢子后,要进一步获得完全的脱外壁小孢子,则非常困难。存在以上差别的原因可能在于,单核晚期的小孢子与成熟花粉相比,在外壁成分、弹性及内外壁的联系上存在一定差别。

彻底脱去小孢子的外壁和内壁无疑将大大提高外源基因的导入频率,但迄今为止其培养只在萱草^[12]及油菜^[13]中取得较好结果,获得了小细胞团,而持续分裂以及后续发育仍存在着困难。前人的工作表明脱外壁花粉可明显提高外源基因的导入频率^[7, 14],并在烟草中已成功地建立了脱外壁花粉人工萌发与离体授粉的实验体系^[15]。但关于脱外壁的小孢子是否具有胚胎发生能力,仍鲜有研究。本研究结果表明,油菜脱外壁小孢子在现有的培养条件下,分裂频率较低,且持续分裂存在一定困难。而裂外壁小孢子具有胚胎发生与再生植株的能力,且其培养条件与完整小孢子的培养相似。完整小孢子的饲养更有利于裂外壁小孢子胚胎发生的启动。这样,如能大量制备这种裂外壁小孢子,可在转基因操作后培养成转基因单倍体植株,为油菜的基因工程提供一条新途径。

在油菜小孢子的培养中,一般认为只有均等分裂才能导致胚胎发生,分裂后,先形成一无极性的细胞团,再在此基础上产生极性,按照胚胎发生的途径形成胚状体^[4]。本实验结果表明,裂外壁的小孢子最初的分裂既有均等,也有不均等分裂,两者均能导致胚胎发生。且与完整小孢子的胚胎发生相比,其早期的发育过程更接近于体内合子的发育。或许,利用裂外壁小孢子的胚胎发育模拟体内合子的发育,是一个很好的参照实验系统。

一个成熟的、实用性强的转化体系应具备高效,重复性高,简易、快速、适用性广等条件^[16]。理论上说,利用花粉作为外源DNA媒介的转化体系具有上述优点。因为,不仅其群体数量大,易于获得,而且由于其单倍体的遗传背景,获得的转基因植株通过染色体人工加倍,可得到纯合的二倍体。同时,小孢子经胚胎发生再生植株,可减少离体培养中的遗传变异,其单细胞发育又可避免转基因植株的嵌合体现象。因而,70年代后期至今,已有许多研究者试图利用小孢子进行作物遗传转化。但对各种转化技术的应用花粉的厚壁都是一个明显

的不利因素。裂外壁小孢子一定程度上弥补了这一缺点,可能是一种有潜力的遗传转化新方法。

References

- [1] Pechan P M, Keller W A. Identification of potentially embryogenic microspores of *B rassic a napus* L. *Physiol Plant*, 1984, 14: 377~ 384
- [2] 陈正华等. 用细胞工程技术选育油菜“双低”新品种. 见: 植物细胞工程与育种. 北京: 北京工业大学出版社, 1990: 55~ 64
- [3] Xu B-F (徐秉芳), Liang S-P (梁世平), Zhou C (周嫦), et al. Isolation and artificial germination of de-exined pollen in *B rassic a A cta B ot S in* (植物学报), 1996, 38: 963~ 968
- [4] Hause B, Van Veenendaal W L H, Hause G, et al. Expression of polarity during early development of microspore-derived and zygotic embryos of *B rassic a napus* L. cv. Topas *B otanica A cta*, 1994, 107: 369~ 372
- [5] Zaki M A M, Dickison H G. Structural changes during the first divisions of embryos resulting from anther and free microspore culture in *B rassic a napus*. *Protoplasma*, 1990, 156: 149~ 162
- [6] Shivanna K R, Sawhney V K. *Pollen Biotechnology for Crop Production and Development*. Cambridge: Cambridge University Press, 1997, 423~ 437
- [7] Shi H-Z (施华中), Wang J (王劲), Yang H-Y (杨弘远), et al. Exine-detached pollen of *Nicotiana tabacum* as an electroporation target for gene transfer. *A cta B ot S in* (植物学报), 1996, 38: 626~ 630
- [8] Satto T, Nishio T, Hirai M. Plant regeneration from isolated microspore culture of Chinese cabbage (*B rassic a campestris* ssp. *Dekinensis*). *Plant Cell Rep*, 1989, 8: 486~ 488
- [9] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473~ 497
- [10] Zhou C (周嫦), Yang H-Y (杨弘远). Some approaches to the experimental manipulation of reproductive cells and protoplasts in flowering plants. *A cta B iol Cracoviensia Series Bot*, 2000, 42: 9~ 20
- [11] Xia H-J (夏惠君), Zhou C (周嫦), Yang H-Y (杨弘远). Preparation of exine-detached pollen in *Nicotiana tabacum*. *Wuhan Univ J Natur Sci* [武汉大学学报(自然科学版)], 1996, 1: 116~ 118
- [12] Zhou C (周嫦). Cell divisions in pollen protoplast culture of *Henocallis fulva* L. *Plant Sci*, 1989, 62: 229~ 235
- [13] Sun M-X (孙蒙祥), Kieft H, Zhou C (周嫦), et al. A co-culture system leads to the formation of microcalli derived from microspore protoplasts of *B rassic a napus* L. cv. Topas. *Protoplasma*, 1999, 208: 265~ 274
- [14] Wang J (王劲), Shi H-Z (施华中), Zhou C (周嫦), et al. β glucuronidase gene and green fluorescent protein gene expression in de-exined pollen of *Nicotiana tabacum* by micro-

projectile bombardment. *Sex Plant Reprod*, 1998, 11: 159-162

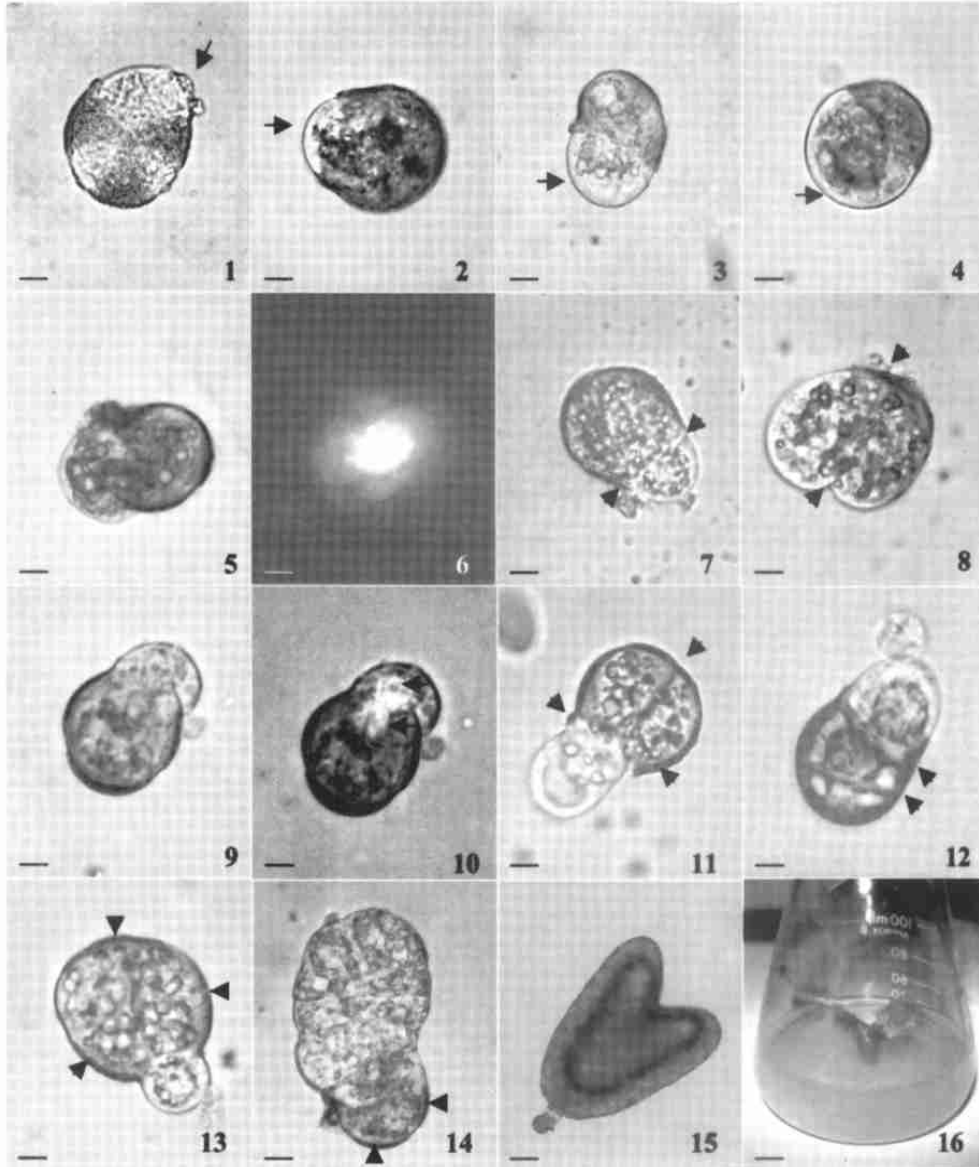
[15] Wang J (王劲), Xia H-J (夏惠君), Zhou C (周嫦), *et al*. Establishment of an experimental system for artificial gemina-

tion and *in vitro* pollination with de-exined pollen in *Nicotiana tabacum*. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 1997, 39: 405-410

[16] Jia S-R (贾士荣), Chao D-S (曹冬孙). Transgenic plant *Chin Bull Bot* (植物学通报), 1992, 9: 3-15

Explanation of Plate

Fig. 1 The exine of a microspore just dehisced at one germ furrow (arrow). Bar= 11 μm ; Figs. 2~4 Different types of exine-dehisced microspores. A row shows the exine-dehisced part of microspores; Fig. 2 Most part of a microspore still covered by exine. Bar= 11 μm .
 Fig. 3 A microspore with its half part covered by exine. Bar= 12 μm ; Fig. 4 A microspore with its small part covered by exine. Bar= 14 μm ;
 Fig. 5 An exine-dehisced microspore prior to division. Bar= 9 μm ; Fig. 6 DAPI fluorescence image of Fig. 5 showing the position of its nucleus (arrow). Bar= 9 μm ;
 Fig. 7 Unequal division of an exine-dehisced microspore. A row shows the site where new cell wall formed. Bar= 9 μm ;
 Fig. 8 Equal division of an exine-dehisced microspore. A row shows new cell wall. Bar= 9 μm ;
 Fig. 9 An exine-dehisced microspore after first division. Bar= 7 μm ;
 Fig. 10 DAPI fluorescent image of Fig. 9 with the bright field background, showing two identical daughter nuclei (arrows). Bar= 7 μm ;
 Fig. 11 Second division of an exine-dehisced microspore. A row shows the two division planes perpendicular to each other. Bar= 9 μm ;
 Fig. 12 Second division of an exine-dehisced microspore. A row shows two parallel division planes. Bar= 8 μm ;
 Fig. 13 A proembryo derived from an exine-dehisced microspore with its embryo still covered by exine (arrows). Bar= 9 μm ;
 Fig. 14 A proembryo derived from an exine-dehisced microspore with the basal suspensor cell still covered by exine. Bar= 14 μm ;
 Fig. 15 A well differentiated embryo derived from an exine-dehisced microspore. Bar= 43 μm ;
 Fig. 16 A plantlet regenerated from the exine-dehisced microspore. Bar= 0.84 cm.



图版说明

1. 小孢子外壁从一个萌发沟处破裂(箭头)。Bar=11 μm ； 2~4. 培养中不同类型的裂外壁小孢子，箭头示外壁脱掉的部位。 2. 小孢子的大部分仍为外壁所覆盖。Bar=11 μm ； 3. 小孢子有一半仍为外壁所覆盖。Bar=12 μm ； 4. 小孢子只有少部分为外壁所覆盖。Bar=14 μm ； 5. 即将分裂的裂外壁小孢子。Bar=9 μm ； 6. 图5中小孢子的DAPI染色，示核位于外壁的断面处。Bar=14 μm ； 7. 裂外壁小孢子的第一次不等分裂。箭头示新壁的部位。Bar=9 μm ； 8. 裂外壁小孢子的均等分裂。箭头示新壁。Bar=9 μm ； 9. 刚完成一次分裂的裂外壁小孢子。Bar=7 μm ； 10. 图9所示裂外壁小孢子弱光明视野条件下的DAPI染色荧光图象，箭头示两个大小及染色程度均一的核。Bar=7 μm ； 11. 裂外壁小孢子的二次分裂，箭头示相互垂直的两个分裂面。Bar=9 μm ； 12. 裂外壁小孢子的二次分裂，箭头表明两次分裂面近于相互平行。Bar=8 μm ； 13. 裂外壁小孢子形成的小的原胚，胚体仍为外壁包围(箭头)。Bar=9 μm ； 14. 裂外壁小孢子形成的较大的原胚，外壁包被基部的胚柄细胞。Bar=14 μm ； 15. 裂外壁小孢子形成的已分化的胚状体。Bar=43 μm ； 16. 裂外壁小孢子再生的小植株。Bar=0.84 cm。