

349-354

## 植物受精工程\*

莫永胜

(武汉大学生物系, 武汉430072)

黄敏仁、李仕琼

(南京林业大学林学系, 南京210037)

Q945.63

**摘要** 植物受精工程是正在发展之中的高技术领域。近年来, 雌雄配子的人工分离取得了较大进展, 两者的体外模拟受精在玉米中已首次成功。本文对该领域的理论体系形成和实验系统创建作了评述, 对目前存在的问题和今后的发展趋势进行了讨论。

**关键词** 雌雄配子(精卵细胞); 分离; 融合和培养; 受精工程

组织培养;

植物有性生殖过程是植物个体发育中最复杂、最曲折的阶段, 也是最重要的环节。围绕有性生殖过程的研究, 在植物科学研究中历来占居十分重要的地位, 并已在理论上尤其在农业实践中显示出重要的意义和巨大的价值。应用现代生物科学的新理论和技术, 迄今对其核心环节——受精——作了大量的工作, 获得了许多新的认识<sup>[7, 10, 30]</sup>。随着生物科学多学科的渗透和汇合, 该领域目前的主要研究工作正朝控制和利用受精过程从而改良植物的实验操作方向纵深发展<sup>[1]</sup>。在此基础上, 较成熟的植物细胞工程技术的引进, 必将导致植物受精工程应用技术领域的形成。

### 一、从性别认识到受精控制

我们对植物有性生殖的认识和利用, 可追溯到三千年以前, 那时的阿拉伯人和亚术人就已认识到海枣植株有雌雄之分并进行了人工授粉。但对植物是否存在性别直到十七、十八世纪才有科学认识。农业生产实践需要植物学家不断揭示植物有性生殖的奥秘。从Amici(1824)观察到花粉管, 揭示了花粉在植物受精过程中的作用, 到Nawaschin(1898)发现被子植物的双受精现象, 是植物受精生物学理论研究的奠基阶段。在这之后的近一百年中, 随着植物胚胎学整体研究体系从传统的形态描述过渡到比较胚胎学研究并继而发展到生理生化水平和离体实验研究的宏观发展趋势, 关于植物受精过程的研究亦相应地发生了变化, 主要形成了两大研究方向, 一是研究受精的内在机制, 迄今已在超微结构和分子水平上积累了相当丰富的新资料, 二是控制和利用植物受精过程, 后者在农业生产上具有更直接的应用价值。

早期对植物受精过程的利用就是授粉受精以保证丰收, 但在育种实践中常遇到自交或杂交不亲合性造成不孕的问题。六十年代后, 经过不断积累经验, 逐渐摸索出较多克服不亲合性的有效方法。其中, 至今得到广泛研究和实践应用的是子房内授粉、雌蕊离体授粉和胚珠离

\*承杨弘远教授、周锦教授给予关心, 蒙北京大学胡适宜教授、西安植物园叶炳茂副研究员惠赠部分文献资料。一并谨致谢忱。

体受精技术<sup>[1, 2, 5, 7, 11]</sup>。子房内授粉就是将花粉引入子房而进行正常的受精作用；雌蕊离体授粉就是将雌蕊进行离体培养，在试管内对其柱头进行人工授粉而得到能育种子的果实；而胚珠离体受精则是将未受精的胚珠进行离体培养，在试管内对胚珠进行授粉而结出正常种子。一般将胚珠离体受精称为植物“试管受精”，但广义的植物“试管受精”还包括雌蕊离体授粉，有时甚至将子房内授粉也包括在内<sup>[2]</sup>。可以说，到七十年代初期，对植物受精作用的控制和利用从应用角度来分析仍维持在组织、器官水平上的“试管受精”。

## 二、受精工程理论体系的形成

有必要对前述的几种试管受精技术进行分析。同田间人工授粉相比，子房内授粉技术保证了花粉粒萌发和花粉管生长不需要通过柱头和花柱组织而得以直接伸入胚珠完成受精作用，避免了花粉和柱头、花粉管和花柱组织间的不亲合性。该技术存在的一个主要问题就是整个过程仍在母体植株上进行，这对于某些容易落花落果的植物来说，难以避免在杂交试验中子房的早脱问题<sup>[11]</sup>；雌蕊离体授粉技术从授粉到最终果实成熟都是在试管内进行的，因此，避免了子房脱落问题，但因为其受精过程仍需通过柱头和花柱组织，所以又出现了花粉—柱头、花粉管—花柱组织间的不亲合性问题；而胚珠离体受精技术则是兼顾了前述两种技术的特点，既克服了子房早脱现象又解决了花粉—柱头和花粉管—花柱组织间的不亲合性问题。尽管如此，该技术中精卵受精作用仍然在胚珠内完成，精卵之间可能的受精不亲合性仍未解决，人工直接控制其受精过程仍十分困难。

1974年，著名植物学家 Linskens 指出，“对受精作用控制的研究将导致受精工程的发展”<sup>[27]</sup>。这是对建立能控制和利用植物受精作用的理论体系富有启发性的最初思想。1978年，叶树茂等在一篇关于试管受精的评述中提出了从胚囊和花粉管中取出卵细胞和精子在人工条件下直接受精或人工选用“代用配子”\*与正常配子进行受精的观点，作者还进一步设想对配子的一方或双方预先进行遗传组成控制再离体受精<sup>[1]</sup>。1985年，胡适宜等在用酶法分离烟草生活胚囊组成细胞原生质体的基础上，明确提出了开拓“植物受精工程”研究的设想<sup>[6]</sup>。到今天，植物受精工程的理论体系已初具规模，研究设想趋于成熟。图1为植物受精工程的形成过程。植物受精工程指在细胞和分子水平上应用现代生物科学的理论和方法在离体条件下控制雌雄配子融合从而达到改良植物的高技术领域，其研究内容不仅仅指精卵细胞的人工模拟受精，还包括精卵细胞同其它细胞原生质体的融合以及相关的遗传操作。

\* “代用配子”指同配子融合的其他细胞或原生质体，如花粉原生质体、生殖细胞、助细胞、中央细胞及多种来源的细胞原生质体等。

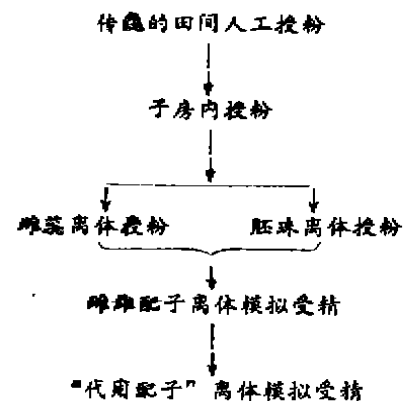


图1 植物受精工程的形成过程

### 三、实验系统的创建及成就

这里着重就迄今在原生质体水平上植物受精工程实验系统的创建所取得的成就进行综述。原生质体水平上的植物受精工程可分为三个环节: 一是雄配子分离, 二是雌配子分离, 三是雌雄配子的融合——离体模拟受精。早在受精工程设想萌芽之际, 就有这方面的实验尝试。近年来在三个环节上均有很大的进展。

**1. 雄配子分离** 雄配子(即精子)在体内包藏于花粉或花粉管中。Cass (1973) 首先尝试了大麦精子的人工分离<sup>[1,2]</sup>。之后, 该领域工作几乎趋于停顿。Russell 和 Cass (1981) 在白花丹中继续了这方面的探索<sup>[3,7]</sup>。最近几年, 精子的分离有了突破性进展。迄今已从 9 科 15 种植物中分离出大量精子(表 1)。并且, 建立了有效的分离方法, 如研磨法、渗透压冲击法和活体——离体技术<sup>[8,41]</sup>。在多种植物中还解决了精子分离后的生活力问题<sup>[6]</sup>。分离的紫菜苔精子能低温存活近一周<sup>[6]</sup>。

**2. 雌配子分离** 在体内, 雌配子(卵细胞)位于被包藏于胚珠的最内层的胚囊内。因此, 分离卵细胞的一条思路是从分离胚囊着手。早在 1948 年 Braaley 就首先采用压片法分离烟草和矮牵牛的胚囊。七十年代后, 国内外学者先后建立了解剖法、酶解法和显微操作术, 从几十种植物

中分离出胚囊。在此基础上, 1985 年胡适宜等从茄科的烟草<sup>[8]</sup>、Allingto 从几种禾本科植物<sup>[10]</sup>中首次分离出卵细胞。至今还从茄科的颠茄<sup>[8]</sup>、玄参科的蓝猪耳<sup>[80]</sup>、禾本科的玉米<sup>[44,45]</sup>和蓝雪科的白花丹<sup>[17]</sup>等植物中分离出卵细胞。分离卵细胞的方法一般是酶解法。

**3. 雌雄配子融合——离体模拟受精** 精子和卵细胞人工分离的成功为离体模拟受精奠定了基础。1988 年, Keijzer 等在蓝猪耳中首先试探了将分离的精子显微注射到胚囊进行人工受精<sup>[20]</sup>。最近, 德国马克斯普朗克育种研究所的 Kranz 等在用单个玉米花粉粒进行显微

表 1 精子大量分离成功的物种名录

材 料	参 考 文 献
蓝雪科	
白花丹 ( <i>Plumbago zeylanica</i> )	[38]
禾本科	
小麦 ( <i>Triticum aestivum</i> )	[28]
大麦 ( <i>Hordeum vulgare</i> )	[18]
玉米 ( <i>Zea mays</i> )	[13,14,15,28,29,36,46]
黑麦 ( <i>Secale cereale</i> )	[46]
十字花科	
白菜型油菜 ( <i>Brassica campestris</i> )	[9,13,16,21]
甘蓝型油菜 ( <i>Brassica napus</i> )	[29,46]
甘蓝 ( <i>Brassica oleracea</i> )	[28,36]
藜科	
菠菜 ( <i>Spinacia oleracea</i> )	[36,43]
甜菜 ( <i>Beta vulgaris</i> )	[31]
玄参科	
蓝猪耳 ( <i>Torenia fournieri</i> )	[20]
菊科	
非洲菊 ( <i>Gerbera jamesonii</i> )	[40,41,42]
鸢尾科	
唐昌蒲 ( <i>Gladolus gandavensis</i> )	[39]
杜鹃花科	
杜鹃花 ( <i>Rhododendron</i> )	[39]
百合科	
麝香百合 ( <i>Lilium longiflorum</i> )	[41]

操作和离体受精<sup>[22]</sup>的基础上,应用电融合方法使分离的玉米精子和卵细胞融合,创建了高等植物第一例“人工合子”,然后,应用精密的单细胞培养技术使融合体分裂形成多细胞结构,并以胞质体作为“代用配子”,进行了精子和胞质体融合的模拟受精尝试<sup>[23,24]</sup>。这些突破性工作为实现前述的受精工程的设想迈进了一大步。

#### 四、展 望

尽管被子植物雌雄配子的人工分离已取得了很大进展,但倘若要应用于受精工程及相关的遗传操作研究,在分离率和生活力两方面仍存在不少问题。因此,改善精卵细胞的分离、纯化和保存技术已显得十分重要,而且,生活卵细胞的分离仅在少数植物中取得成功,尚需扩大研究对象进行试探。雌雄配子或代用配子的体外融合和培养是一项正在探索之中的新技术,迄今无成熟经验可循。Kranz等人的人工模拟受精工作是具两方面成功基础的:一是玉米精卵细胞的人工分离技术已相当成熟,二是采用了体细胞原生质体实验系统中的微滴融合和培养技术。从第一方面分析,迄今在白花丹和蓝猪耳等植物中精卵细胞的人工分离技术也已建立,可望进行其离体模拟受精研究;从第二方面分析,该技术具有微量(单细胞)、选择和确定性等优点,值得推广。当然,如何应用常规细胞融合与培养技术在更多的供试植物中进行模拟受精更值得探索。可以期望不久实现“人工合子”培养后再生植株。

从广义的受精工程角度来设想进一步研究的课题有:精卵细胞(或预先经遗传转化)同体细胞原生质体或胞质体的杂交,这方面的研究可借鉴新近烟草属种间和矮牵牛属种间和种内四分体原生质体和体细胞原生质体融合再生可育三倍体杂种植株<sup>[25,26,32-34]</sup>的成功先例;精卵细胞一方或双方先经遗传转化再进行融合;精卵细胞同生殖系统的其它单倍体原生质体的融合,如精子同花粉原生质体或生殖细胞的融合;将遗传转化过的精子显微注射进同种或不同种植物的花粉管甚至直接注射进胚囊内进行人工受精;进行精卵识别机制的离体研究,这方面近年来在免疫学、生物化学和分子生物学水平上已有若干很有意义的开创性工作,今后也许可望进行精卵自然融合识别蛋白基因的遗传工程研究;此外,尚可进行花粉原生质体授粉和受精的工作,为外源DNA的导入开辟新途径。

精卵细胞的离体受精成功将为人类从根本上突破体内受精过程中精卵细胞间的可能不亲合性以及远缘杂交中不亲合性的束缚和阻碍铺平道路,开创野生种有用基因导入栽培种研究的新局面。当前日趋成熟的细胞工程和遗传工程技术的不断渗透,势必将促进受精工程研究向更高的水平发展。如果说关于植物离体受精的研究,在六、七十年代达到器官和组织水平,到八十年代和九十年代初闯入细胞和原生质体水平,那么,今后将从原生质体水平迈向分子水平。毋庸置疑,植物受精工程技术的发展将为改良和培育农林作物新品种开辟一条新的尝试途径。

## 参 考 文 献

- [1] 叶树茂等, 1978: 科学通报, 23(9): 574—576.
- [2] 叶树茂, 1988: 《经济作物组织培养》(罗士韦和许智宏主编), 科学出版社, 61—72.
- [3] 李乐工, 胡适宜, 1986: 实验生物学报, 19(2): 255—259.
- [4] 杨弘远, 周 嫦, 1989: 植物学通报, 6(4): 193—196.
- [5] 岳绍先, 刘伯林, 1988: 植物学通报, 5(1): 14—17.
- [6] 周 嫦, 杨弘远, 1989: 植物学报, 31(11): 726—734.
- [7] 胡适宜, 1982: 被子植物胚胎学, 高等教育出版社.
- [8] 胡适宜等, 1985: 植物学报, 27(4): 337—344.
- [9] 莫永胜, 杨弘远, 1991: 植物学报, 33(9): 649—657.
- [10] Allingto P. M., 1985: *Experimental manipulation of ovule tissues* (Chapman G. P. et al. eds.), Longman, Essex, 39—51.
- [11] Bhojwani S. T., 1984: *Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol I* (Vasil I. K. ed.), Academic Press Inc., 269—275.
- [12] Cass D. D., 1973: *Can. J. Bot.*, 51: 601—605.
- [13] Cass D. D. et al., 1986: *Plant Physiol.*, 80(4, suppl.): 130.
- [14] Cass D. D., Fabi G. C., 1988: *Can. J. Bot.*, 66: 819—825.
- [15] Dupuis I. et al., 1987: *Plant Physiol.*, 85(4): 876—879.
- [16] Hough T. et al., 1986: *J. Immunol. Meth.*, 92: 103—108.
- [17] Huang B. Q., Pussell S. D., 1989: *Plant Physiol.*, 90: 9—12.
- [18] Jensen C. J. et al., 1986: *Genetic manipulation in plant breeding* (Horn W. et al. eds.), de Gruyter, 473—475.
- [19] Johri B. M., 1984: *Embryology of angiosperms*, Springer.
- [20] Keijzer C. J. et al., 1988: *Sexual reproduction in higher plants* (Cresti M. et al. eds.), Springer, Berlin, 245—250.
- [21] Knox R. B. et al., 1988: *Eukaryotic cell recognition* (Chapman G. P. et al. eds.), Cambridge Univ. Press, 175—193.
- [22] Kranz E., Lorz H., 1990: *Sex. Plant Reprod.*, 3: 160—169.
- [23] Kranz E. et al., 1990: *Progress in plant cellular and molecular biology* (Nijkamp H. J. J. et al. eds.), Kluwer Academic Publishers 252—257.
- [24] Kranz E. et al., 1991: *Sex. Plant Reprod.*, 4: 12—16.
- [25] Lee C. H., Power J. B., 1986: *Plant cell, tissue and organ Culture*, 12: 197—200.
- [26] Lee C. H., Power J. B., 1988: *Plant Cell, Reports*, 7: 17—18.
- [27] Linskens H. F., 1974: *Fertilization in higher plants*, Horth—Horthand Publ. Comp.
- [28] Matthys-Rochon E. et al., 1987: *Plant Physiol.*, 83: 464—466.
- [29] Matthys-Rochon E. et al., 1988: the same one as [20].
- [30] Mol R., 1986: *Plant Cell Reports*, 3: 202—206.
- [31] Nielsen J. E., Olesen P., 1988: *Plant Sperm Cells as Tools for Biotechnology* (Wilms H. J., Keijzer C. J. eds.), Pudoc, Wageningen, 111—122.
- [32] Petnal D. et al., 1988: *Theor. appl. genet.*, 76: 237—243.

- [ 33 ] Pental D. et al., 1989: *Theor. appl. genet.*, 78: 547—552.
- [ 34 ] Pirrie A., Power J. B., 1986: *Theor. appl. genet.*, 72: 48—52.
- [ 35 ] Parshava V., 1986: *Embryogenesis in angiosperms: A developmental and experimental study*. Cambridge Univ. Press.
- [ 36 ] Roedel P. et al., 1988: the same one as [ 31 ].
- [ 37 ] Russell S. D., Cass D. D., 1981: *Protoplasma*, 107: 85—107.
- [ 38 ] Russell S. D., 1986: *Plant Physiol.*, 81: 317—319.
- [ 39 ] Shivaana K. R. et al., 1988: *Plant Physiol.*, 87: 647—650.
- [ 40 ] Southworth D., 1986: *Pollination' 86* (Williams E. G. et al. eds.), Univ. of Melbourne, 172—177.
- [ 41 ] Southworth D., Knox R. B., 1988: the same one as [ 31 ].
- [ 42 ] Southworth D., Knox R. B., 1989: *Plant Science*, 60: 273—277.
- [ 43 ] Theunis C. H. et al., 1988: the same one as [ 20 ].
- [ 44 ] Wagner V. T. et al., 1988: the same one as [ 20 ].
- [ 45 ] Wagner V. T. et al., 1989: *Plant Science*, 59: 127—132.
- [ 46 ] Yang H. Y., Zhou C., 1989: *Chinese J. Bot.*, 1: 80—84.

## PLANT FERTILIZATION ENGINEERING

Mo Yongsheng

(Department of Biology, Wuhan University, Wuhan 430072)

Huang Minren and Li Shiqiong

(Department of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037)

**Abstract** Plant fertilization engineering, one of the most exciting areas of plant science today, is the important part of modern plant reproductive biology and plant cell engineering. This review deals with the overall tentative ideas and the advances made up-to-date, such as, the isolation of viable sperm cells and protoplasts of embryo sac elements as well as the true testtube fertilization of isolated sperm cells fusion with egg and central cells, in this HI-TECH field. Some problems and future perspectives related to the new area also discussed.

**Key words:** Male and female gametes (Sperm and egg cells); Isolation; Fusion and culture; Fertilization engineering