

蓝猪耳精细胞的分离及两个精细胞群体的收集

陈素红¹, 杨延红², 廖景平^{1*}, 田惠桥^{2*}

(1. 中国科学院华南植物园, 广东 广州 510650; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要:蓝猪耳是二细胞型花粉, 生殖细胞在花粉管中分裂形成两个精细胞。用体内-体外技术培养出花粉管后, 将其置于爆破液中即可释放出花粉管内含物, 其中包括两个精细胞和营养细胞。在显微镜下两个精细胞具二型性: 体积较大的精细胞与花粉管的营养核相连, 体积较小的精细胞只与大精细胞连接。两个精细胞之间的连接比较结实, 需用微量酶液将两个精细胞分开。用显微操作仪就可分别挑选出两个精细胞群体, 分别有上百个细胞。蓝猪耳精细胞的成功分离为利用蓝猪耳开展离体受精研究打下了良好的基础。这种单一纯化的精细胞群体的获得为用分子生物学方法区分两个精细胞的特异基因和蛋白质创造了条件。

关键词:精细胞; 精细胞二型性; 精细胞分离; 蓝猪耳

中图分类号: Q944.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2004)06-0557-05

Isolation and Collection of Two Groups of Sperm Cells from *Torenia fournieri*

CHEN Su-hong¹, YANG Yan-hong², LIAO Jing-ping^{1*}, TIAN Hui-qiao^{2*}

(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Pollen of *Torenia fournieri* is two-celled and the division of generative cell occurs in the pollen tube. *In vivo - in vitro* technique was applied to get isolated sperm cells. After growing *in vivo* for 5 h, the pollinated style was cut and transferred into a medium containing 5% (w/v) sucrose, 0.01% (w/v) H₃BO₃, 0.01% (w/v) CaCl₂, 0.01% (w/v) KH₂PO₄, at pH 5.0. Numerous pollen tubes emerged from the cut end of the style after culture for 2-3 h. When the pollen tubes were transferred to a broken solution containing 5% mannitol, some pollen tubes broke and the tube contents including two sperm cells were released in the broken solution. The two sperm cells of *Torenia fournieri* are dimorphism: one is big and the other small. The bigger one (S_{vn}) associates with vegetative nucleus and the small one (S_{ua}) associates with the bigger one. Two sperm cells can be divided into two individual groups using a micromanipulator. These two dimorphic sperm cells could provide male gametophytic cells for further *in vitro* studies and various biotechnological experiments, such as preferential fertilization and gametic recognition in higher plants.

Key words: Sperm cell; Dimorphism; Isolation of sperm; *Torenia fournieri*

精细胞分离是进行高等植物离体受精研究的前提之一。对具三胞花粉的植物, 精细胞的分离比较简单, 将花粉粒直接撒到含一定渗透压的培养基上, 花粉粒爆破释放出精细胞。而对于具二胞花粉的植物, 它的精细胞是在花粉管中形成, 必须培养

出花粉管。目前, 常应用活体-离体方法^[1]培养出近似体内生长的花粉管, 从而分离出发育成熟的精细胞^[2]。

蓝猪耳(*Torenia fournieri*)是玄参科蓝猪耳属植物。它的胚囊裸露出胚珠的珠孔端, 在光学显微镜

收稿日期: 2004-02-09 接受日期: 2004-04-15

基金项目: 国家自然科学基金(30170060, 30370099, 40332021)资助

* 通讯作者 Corresponding author

下可清楚地观察到卵细胞和助细胞的动态。近年来用蓝猪耳为实验材料研究其受精机理的报道较多^[3-5],已被认为是研究被子植物受精机理的一种模式植物。蓝猪耳胚囊部分裸露的特征有利于卵细胞的分离,减少了离体受精操作中的主要技术障碍。相比之下,精细胞的分离就成为在蓝猪耳中进行离体受精操作的主要问题。通过离体萌发花粉管分离蓝猪耳精细胞的工作已有报道^[9]。本文介绍用活体-离体方法分离出蓝猪耳精细胞的操作技术,分离出精细胞不仅可为蓝猪耳的离体受精研究作准备,也可将收集的两个精细胞群体用于精细胞的分子生物学研究,为探索高等植物的有性生殖机理创造条件。

1 材料和方法

蓝猪耳幼苗种在厦门大学花圃,开花前置于生长室中生长。其生长条件控制在 22-28℃,人工光照 14 h d⁻¹。蓝猪耳是二胞花粉植物,开花时花粉中只含有一个营养细胞和一个生殖细胞,精细胞在花粉管中形成。把即将开花的蓝猪耳去雄,开花 1 d 后用新鲜成熟的花粉进行人工授粉。授过粉的花柱在体内生长约 5 h 后,将其从基部切下,立即插入培养基中培养。培养基由 0.01% (w/v)磷酸二氢钾、0.01% (w/v)氯化钙、0.01% (w/v)硼酸、5% (w/v)蔗糖和双蒸水配制,pH 5.0,渗透压为 148 mOsmol kg⁻¹ H₂O。花柱在培养基中培养 2-3 h 后从花柱下端的切口处长出许多花粉管。将这些花粉管置于 5% (w/v)甘露醇爆破液(pH 5.0,渗透压 243 mOsmol kg⁻¹ H₂O)中,5-10 min 后大量花粉管接连不断爆破,花粉管内含物从顶端喷出,其中包括成对的精细胞和营养核。

成对精细胞与花粉管的营养核是以一个整体结构释放出。营养核很快胀大、破裂并消失,但两个精细胞仍长时间地保持紧密连接。根据在烟草中的实验结果^[10],在爆破液中加入少量的酶液后,两个精细胞之间的紧密连接可被破坏。在本实验中,向爆破液中加入 1/5 的酶液即可使两个精细胞分开。酶液的成分为 0.05% (w/v)果胶酶,0.05% (w/v)纤维素酶,5% (w/v)甘露醇。大多数蓝猪耳的两个精细胞在形态上有明显的大小差异,而且总是大的与营养核相连接,小的不与营养核相连。这种体积差异使二者很容易区分。根据 Russell 的定义:与营养核相连的精细胞为 Svn,而不与营养核直接连接的精细胞为 Sua^[11]。释放出的精细胞用倒置显微镜 (Leica DM

IRB) 观察。酶液处理后用 Leica DC-180 显微操作仪将两个精细胞分别挑选成 Svn 和 Sua 两个群体。将收集起来的两个精细胞群体放入离心管中,置于液氮中保存,为进一步的分子生物学研究作好准备。

分离的成对精细胞通过荧光染料反应 (fluorochromatic reaction, FCR) 来测定其活性。用 0.5 mg ml⁻¹ 的荧光素二醋酸酯 (fluorescein diacetate, FDA) 以 1/100 的量进行处理后,用荧光显微镜 (Leica DM R-60) 观察,拍照。

2 结果和讨论

经人工授粉,适当的花粉粒在柱头上萌发出的花粉管穿过柱头进入花柱。蓝猪耳的花粉与柱头似乎并不是同时成熟,因此,选择适当的花柱和花粉进行授粉对能否长出花粉管很重要。开花当天的柱头授粉时往往不长出花粉管。一般选择花药当天完全开裂的新鲜花粉给去雄后 2 d 的花(开花后 1 d 的花)的柱头授粉效果最好。蓝猪耳的花柱长约 1.5-1.8 cm。柱头被授粉后在体内生长 5 h,然后从花柱基部切下,插入渗透压适宜,钙和硼含量恰当的培养基中,经 2-3 h 培养,花粉管从花柱切口处长出(图版 I: 1)。在本实验中,授粉后切下花柱的时间过早或过晚都会影响花粉管的获得。授粉后花柱在体内生长时间少于 4 h 就进行离体培养,很少有花粉管长出,即使有,数量也很少(数根花粉管),生长状态也很差(花粉管的直径不均匀,花粉管顶端膨大)。授粉 3 h 就切下花柱进行离体培养,培养时间即使超过 12 h 也没有花粉管长出。而授粉后花柱在体内生长超过 7 h 再进行离体培养,也很少有花粉管长出。

蓝猪耳花柱离体培养的培养基渗透压也有特殊的要求。烟草花柱培养基的渗透压介质是 15% 的蔗糖^[9]。但蓝猪耳仅需要 5% 蔗糖。在 10%-15% 蔗糖的培养基中,没有花粉管长出。在 3%-7.5% 蔗糖的培养基中,以 5% 蔗糖最合适,不仅长出的花粉管数量多,质量也好,具体表现为花粉管不仅直,粗细均匀而且在显微镜下可清晰看到花粉管内的胞质环流运动。当这种花粉管置于爆破液中,可爆破的花粉管数量较多,花粉管内含物从花粉管顶端喷出,花粉管细胞质很快消失,两个精细胞和花粉管的营养核很容易区分(图版 I: 2, 3)。花柱离体培养的时间过长,花粉管也长些,但花粉管的生活状态下降,

花粉管中的胞质环流速度减慢。在将过长的花粉管转入到爆破液中,能爆破的数量很少,而且释放出的花粉管细胞质很浓厚,像挤牙膏一样地被挤出花粉管,精细胞被包裹在细胞质中,很难区分。

花粉管爆破释放出内含物,包括两个精细胞。爆破的花粉管顶端由圆形变尖。刚从花粉管中进出的一对精细胞呈长条形,但很快变成椭圆形(图版 I: 2),最后随着包裹精细胞表面的花粉管细胞质的减少,精细胞最终变成圆形(图版 I: 3, 4)。最初释放出的两个精细胞与营养核(VN)连接在一起,保持完整的雄性生殖单位结构(图版 I: 2, 3)。通常两个精细胞显示出大、小的差异,总是大的与营养核相连,小的只与大的精细胞相连。也有极少数花粉管释放出一对精细胞很难区分两个精细胞的大小,对这种精细胞类型通常不予选择。随着精细胞被释放出的时间延长,包裹在雄性生殖单位外的花粉管细胞质的消失,营养核也胀大、破裂,最后完全消失。而两个精细胞则变成两个清晰的球状体。精细胞形状上的改变很可能是所处空间环境的变化所导致。

虽然两个球形精细胞之间看不到任何花粉管细胞质物质,但在用显微操作仪挑选精细胞时往往是两个精细胞一起移动,说明两个精细胞之间存在一定的联系。这种连接状态对挑选精细胞很不利,尤其是用显微操作仪将大量成对的精细胞挑选成两个群体时比较困难。花粉管爆破 10 min 后,成对的精细胞都沉淀到爆破液的底部,加入少量酶液后,精细胞之间的联系消失,但两个精细胞仍保持在原来的位置,这样就容易进行两个精细胞的挑选(图版 I: 5a, 5b)。根据一对精细胞体积大小的差异,可分别挑选出两个精细胞群体,分别是 Svn 和 Sua 群体。有时从一个花柱中长大的花粉管经爆破后可在 30 min 内挑选出上百个精细胞,这两个精细胞群体比较干净,仅含有很少的花粉管细胞质(图版 I: 6, 7)。将这些精细胞群体放入 eppendorf 管中即可储藏到液氮中备用。酶液的加入不能太早,过早将使正在移动的一对精细胞在移动中分开,有可能与其他精细胞混合而不易区分。

从花粉管中释放出的成对精细胞 1 h 后用 FDA 处理仍有荧光,表明被释放出的精细胞仍有生活力,但精细胞的荧光衰退得非常快,很难被照相记录下。而在本实验分离的精细胞及收集的精细胞群体都是在 40 min 之内完成的,因而确保了离体受精所用的精细胞的质量以及构建蓝猪耳精细胞

cDNA 文库工作的可靠性。

Keijzer 等用 10% 蔗糖溶液作为花粉粒萌发培养基,培养 12 h 后将长出的花粉管放入水中爆破分离得到精细胞^[9]。用花粉粒直接萌发出的花粉管与体内生长的花粉管在生长时间上有差异,蓝猪耳的花柱长约 1.5 cm,在体内从授粉到受精约需要 8 h。而用花粉粒萌发的花粉管生长要慢得多,精细胞的生活状态是否与体内的一致需要进一步验证。另外,用这种方法分离的精细胞都混在一起,不易将两种精细胞分开。我们采用活体-离体技术从约 2 cm 长的花柱中培养出花粉管,其所含的精细胞发育状况更符合体内即将参与受精的精细胞。从花柱切口端同一方向长出的花粉管释放出的精细胞分布比较有规律,将花柱带花粉管取出后,精细胞的分布不受影响,一对对的精细胞清晰可见,这为我们用显微操作仪挑选两个精细胞群体创造了条件。精细胞纯化的效果远比用离心方法纯化的精细胞群体要好。挑选出的两个精细胞群体可用于分子水平的研究。

高等植物花粉管中的一对精细胞在形态和结构方面具有差异的现象早已被发现^[12-13]。一对精细胞在形态和结构上有差异,自然就被联想到二者在双受精过程中的命运。Russell 在白花丹中发现两个异型精细胞中,含线粒体的和中央细胞融合,含质体的和卵细胞融合,表现出精细胞的倾向受精(preferential fertilization)^[14]。表明有差异的一对精细胞在与卵细胞和中央细胞的融合过程中是有选择性的,同时也说明了在高等植物中配子细胞之间存在着一种识别关系。然而,受研究手段的限制,高等植物的“倾向受精”现象只在白花丹一种植物中得到证实,而且对高等植物配子识别的机制有待进一步研究。

当前,很多学者希望从分子生物学的角度探索高等植物的配子识别问题。但过去分离精细胞的方法是两种精细胞的混合群体,两个精细胞之间的差异难以区分。最近,Zhang 等用显微操作仪分别挑选白花丹一对精细胞,然后收集成两个数量上千的精细胞群体^[17]。Singh 等用这种方法分离的白花丹两个精细胞群体,构建了 cDNA 文库,筛选出参与蛋白质泛素化(ubiquitination)的相关基因^[18]。两个精细胞群体的分离为鉴别一对异型精细胞之间的基因和其表达产物创造了条件,也可能为两个精细胞与卵细胞和中央细胞的识别提供线索。蓝猪耳的两个精

细胞在体积上有明显差异,这种差异是否与高等植物的倾向受精有关值得深入研究。本实验在分离蓝猪耳精细胞的基础上,分别挑选出一定数量的两个精细胞群体,这就为下一步用分子生物学方法研究受精机理和构建精细胞 cDNA 文库提供材料,有望在高等植物倾向受精的配子识别过程中获得新信息。

参考文献

- [1] Shivanna K R, Xu H, Taylor P, et al. Isolation of sperms from the pollen tubes of flowering plants during fertilization [J]. *Plant Physiol*, 1988, 87:647-650.
- [2] Tian H Q, Zhang Z J, Russell S D. Isolation of the male germ unit: origination and function in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. *Plant Cell Rep*, 1998, 18:143-147.
- [3] Han Y Z, Huang B Q, Zee S Y. Symplastic communication between the central cell and the egg apparatus cells in the embryo sac of *Torenia fournieri* L. [J]. *Planta*, 2000, 211:158-162.
- [4] Higashiyama T, Kuroiwa H, Kawano S, et al. Kinetics of double fertilization in *Torenia fournieri* based on direct observations of the naked embryo sac [J]. *Planta*, 1997, 203:101-110.
- [5] Higashiyama T, Kuroiwa H, Kawano S, et al. Guidance *in vitro* of the pollen tube to the naked embryo sac of *Torenia fournieri* [J]. *Plant Cell*, 1998, 10:2019-2031.
- [6] Higashiyama T, Kuroiwa H, Kawano S, et al. Explosive discharge of pollen tube contents in *Torenia fournieri* [J]. *Plant Physiol*, 2000, 122:11-13.
- [7] Higashiyama T, Kuroiwa H, Kawano S, et al. Pollen tube attraction by the synergid cell [J]. *Science*, 2001, 293:1480-1483.
- [8] Huang B Q, Fu Y, Zee S Y, et al. Three-dimensional organization and dynamic changes of the actin cytoskeleton in embryo sacs of *Zea mays* and *Torenia fournieri* [J]. *Protoplasma*, 1999, 209:105-119.
- [9] Keijzer C J, Reinders M C, Leferink-ten K H B. A micromanipulation method for artificial fertilization in *Torenia* [A]. In: Cresti M. *Sexual Reproduction in Higher Plants* [M]. New York: Springer-Verlag, 1988. 119-124.
- [10] Tian H Q, Russell S D. The fusion of sperm cells and function of male germ unit (MGU) of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. *Sex Plant Reprod*, 1998, 11:171-176.
- [11] Russell S D. Ultrastructure of the sperm of *Plumbago zeylanica*. II. Quantitative cytology and three-dimensional reconstruction [J]. *Planta*, 1984, 162:385-391.
- [12] Jensen W A, Fisher D B. Cotton embryogenesis: the pollen tube in the stigma and style [J]. *Protoplasma*, 1970, 69:215-235.
- [13] Russell S D, Cass D D. Ultrastructure of the sperms of *Plumbago zeylanica*. I. Cytology and association with the vegetative nucleus [J]. *Protoplasma*, 1981, 107:85-107.
- [14] Wilms H J, Van Aelst A C. Ultrastructure of spinach sperm cells in mature pollen [A]. In: Erdelska O. *Fertilization and Embryogenesis in Ovulated Plants* [M]. Bratislava, Czech: Center of Biol and Ecol Sci Slovak Acad Sci, 1983. 105-112.
- [15] McConchie C A, Jobson S, Knox R B. Analysis of the ultrastructure of sperm cells of *Brassica campestris* by computer-assisted three-dimensional reconstruction [A]. In: Williams E G, Knox R B. *Pollination* [M]. Melbourne: University of Melbourne, 1984. 26-29.
- [16] Russell S D. Preferential fertilization in *Plumbago*: ultrastructural evidence for gamete-level recognition in an angiosperm [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82:6129-6132.
- [17] Zhang Z J, Xu H L, Singh M B, et al. Isolation and collection of two populations of viable sperm cells from the pollen of *Plumbago zeylanica* [J]. *Zygote*, 1998, 6:295-298.
- [18] Singh M B, Xu H, Bhalla P L, et al. Development expression of polyubiquitin genes and distribution of ubiquitinated proteins in generative and sperm cells [J]. *Sex Plant Reprod*, 2002, 4:325-329.

图版说明

图版 I

VN: 花粉管的营养核。Svn: 与营养核相连的精细胞。Sua: 不与营养核直接相连的精细胞。

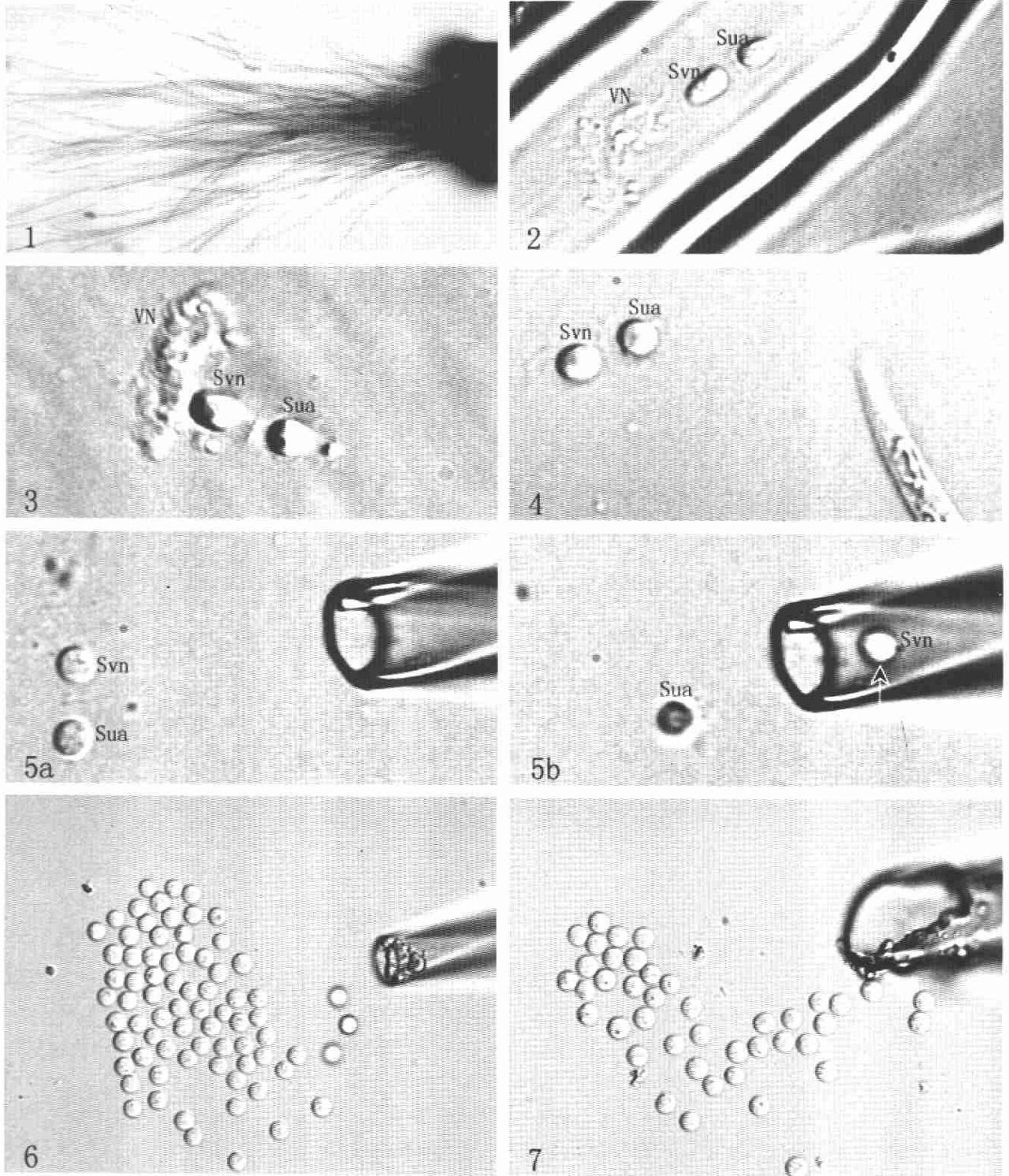
1. 花柱在体内生长 5 h 后切下, 在培养基中培养 2-3 h, 许多花粉管从花柱的切口端长出; ×200
- 2, 3. 花粉管爆破后释放出一对长形的精细胞, 体积较大的精细胞与营养核相连; ×800
4. 一对形状变圆的精细胞。在爆破液中 10 min 后, 包裹在精细胞表面上的花粉管细胞质已逐渐消失, 但两个精细胞之间仍然相互连接; ×800
- 5a, 5b. 用显微操作仪将一对精细胞分别收集的过程。箭头示一个精细胞被吸入到显微操作仪的玻璃针中; ×800
6. 用显微操作仪收集的小精细胞 (Sua) 群体; ×400
7. 用显微操作仪收集的大精细胞 (Svn) 群体; ×400

Explanation of plate

Plate I

VN: Vegetative nucleus of pollen tube. Svn: Sperm cell connected with VN. Sua: Sperm cell unassociated with VN.

1. After growing *in vivo* for 5 h, the pollinated style was cut and transferred into a medium cultured for 2-3 h, numerous pollen tubes emerged from the cut end of the style; ×200
- 2, 3. A released male germ unit with a VN and two brother sperm cells. The bigger sperm cell associates with VN; ×800
4. A pair of brother sperm cells become rounded in shape. Pollen tube cytoplasm wrapping around two sperm cells disappears in the broken solution after 10 min, but two sperm cells are still associated; ×800
- 5a, 5b. Sperm cells were collected from a pair of sperm cells using a micromanipulator. The arrow indicates one sperm cell being drawn into flame-drawn glass capillaries; ×800
6. A group of Sua (small sperm cells); ×400
7. A group of Svn (big sperm cells). ×400



陈素红等:图版 I

CHEN Su-hong et al.: Plate I