

## 五唇兰精细胞的分离

伍成厚<sup>1,2</sup>, 赵玉辉<sup>1</sup>, 杨延红<sup>1</sup>, 田惠桥<sup>1\*</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 广州市园林科学研究所, 广州 510405)

**摘要:** 五唇兰(*Doritis pulcherrima*)具二胞花粉,授粉后 1 d 即有花粉开始萌发,授粉后 5 d 开始有生殖细胞完成有丝分裂形成一对精细胞。通过人工授粉使花粉管在子房内发育,再利用花粉管直接爆破,成功分离出五唇兰的精细胞。成对的 2 个精细胞在直径大小、荧光强弱上均显示出较大差异,预示 2 个精细胞具有不同的前途。

**关键词:** 五唇兰; 生殖细胞; 精细胞; 花粉管爆破; 精细胞分离

doi:10.3969/j.issn.1005-3395.2012.04.012

## Isolation of Sperm Cells in *Doritis pulcherrima*

WU Cheng-hou<sup>1,2</sup>, ZHAO Yu-hui<sup>1</sup>, YANG Yan-hong<sup>1</sup>, TIAN Hui-qiao<sup>1\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Guangzhou Institute of Landscape Gardening, Guangzhou 510405, China)

**Abstract:** The mature pollen of *Doritis pulcherrima* is two-celled. The pollen began to germinate after pollinated one day. After pollinated five days, the division of generative cell occurred in pollen tube and formed a pair of sperm cells. The pollen tubes were induced to development in the ovary after artificial pollination and sperm cells were isolated from the tubes by immediately blowing up in a broken solution containing 5%–12% mannitol. The two sperm cells isolated were dimorphism, one was big and the other small, and the fluorescent intensity was distinctly different. It suggested that both sperm cells would have different futures.

**Key words:** *Doritis pulcherrima*; Generative cell; Sperm cell; Pollen tube blow up; Sperm cell isolation

精细胞分离是进行高等植物离体受精研究的前提之一。三胞花粉植物的精细胞分离比较简单,通常将花粉粒直接撒到含一定渗透压的培养基上,花粉粒爆破即可释放出精细胞<sup>[1]</sup>,或研磨<sup>[2]</sup>或待花粉粒萌发出花粉管再分离精细胞<sup>[3]</sup>。对于具二胞花粉的植物而言,由于精细胞是在花粉管中形成,必须培养出花粉管后才可能分离精细胞,因此其精细胞的分离相对较难<sup>[1]</sup>。对二胞花粉植物的精细胞目前已建立了两种分离方法:一是由人工萌发的花粉管中分离,如百合(*Lilium davidii*)<sup>[4]</sup>、蓝猪耳(*Torenia fournieri*)<sup>[5]</sup>;一是“活体-离体技术”(in vivo-in vitro technique),即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<sup>[6-12]</sup>,后一种方法在获得均一的精细胞群体等方面比较优越,可以实现精细胞的大量分离。作为世界重要观赏植物的兰花,迄今未见有精细胞分离成功的报道。

五唇兰(*Doritis pulcherrima* Lindl.)为兰科(Orchidaceae)五唇兰属植物,产于我国海南和东南亚地区的野生兰<sup>[13]</sup>,其花型和株型相当好,具有良好的开发应用前景<sup>[14-15]</sup>。本文通过人工授粉使花粉管在子房内发育,再利用花粉管直接爆破成功分离出五唇兰成对的精细胞,为五唇兰的离体受精研究和开发应用奠定基础。

收稿日期: 2011-10-08

接受日期: 2011-12-15

基金项目: 广东省科技计划项目(2007B020801007); 广州市科技计划项目(11A63030233)资助

作者简介: 伍成厚,男,博士后,园林植物生殖生物学研究方向。E-mail: wuchenghou2000@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: hqtian@jingxian.xmu.edu.cn

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

五唇兰(*Doritis pulcherrima* Lindl.)植株从中国科学院华南植物园移栽到广州市园林科学研究所温室。开花期间进行人工授粉,每个花葶授基部2朵花,并剪除花葶其余部分。授粉成功后子房开始膨大,以授粉后发育正常的子房作为试验材料。

### 1.2 授粉后花粉发育的观察

五唇兰授粉后 1~5 d, 定期剥除蕊柱腔中的花粉粒用双蒸水在倒置显微镜下直接压片观察拍照。细胞核用稀释 100 倍的  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  4',6-二氨基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色,应用蓝色光激发观察荧光。

### 1.3 精细胞的分离

**活体-离体法分离精细胞** 将授粉后 5~60 d 子房中部横切,插入花粉管诱导培养基上进行离体培养,观察花粉管是否伸出。花粉管诱导培养基包含 0.01% (W/V)  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、0.01% (W/V)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.01% (W/V)  $\text{CaCl}_2$ 、15% (W/V) 蔗糖和双蒸馏水<sup>[10]</sup>。

**花粉管爆破分离精细胞** 将授粉后 20 d、

30 d、40 d 的子房纵向切开,用镊子从中挑取花粉管直接浸入花粉管爆破液,爆破液均为当天新配的甘露醇,浓度 5%~12%。

### 1.4 精细胞的收集和观察

将爆破出的精细胞用 Leica DC-180 显微操作仪收集并移至精细胞观察液中,精细胞观察液包含 0.01% (W/V)  $\text{CaCl}_2$ 、 $1 \text{ mmol L}^{-1}$  MES(2-N-吗啡啉乙磺酸)、6%~9% (W/V) 甘露醇。释放出的精细胞用倒置显微镜(Lcica DM IRB)观察,分离的成对精细胞活性用荧光染料反应(Fluorochromatic reaction, FCR)测定,即用稀释 100 倍的  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  FDA 处理后,在荧光显微镜(Lcica DM R-60)下观察拍照。细胞核用稀释 100 倍的  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  DAPI 染色。在 100 倍油镜下,用测微尺测量精细胞的直径,测量 20 对,计算精细胞的大小。

## 2 结果和分析

### 2.1 授粉后五唇兰花粉的发育

五唇兰授粉后 1 d (24 h),花粉块大部分四合花粉还粘合在一起(图 1: 1),位于花粉块外沿的花粉

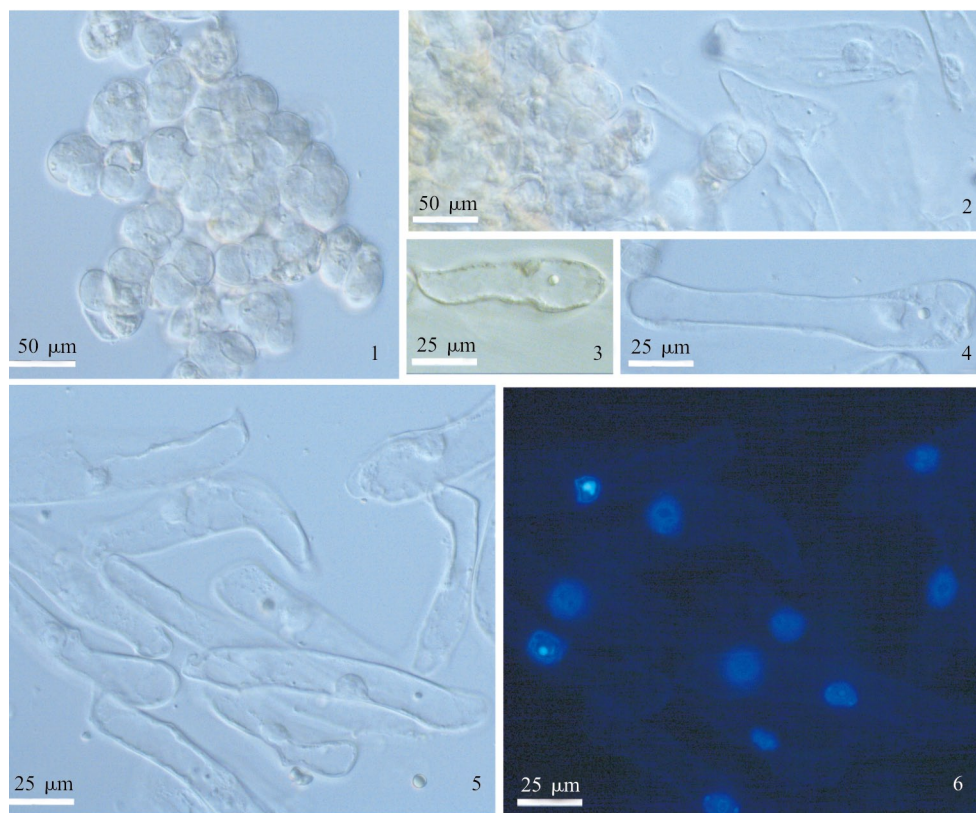


图 1 授粉 1 d 后的花粉发育。1. 花粉块; 2. 花粉块及萌发的花粉粒; 3~5. 萌发的花粉管; 6. 萌发花粉管的 DAPI 荧光反应。

Fig. 1 Pollen development after pollinated one day. 1. Pollinium; 2. Pollinium and germinating pollens; 3~5. Germinating pollen tubes; 6. DAPI fluorescence of germinating pollen tubes.

粒首先开始萌发出花粉管(图 1: 2),花粉管可能向两端(图 1: 3)或一端(图 1: 4)伸长,相应的细胞核则位于花粉管的中部或靠近顶端。用DAPI染色后,在每个萌发的花粉管中均只见到一团荧光,显示花粉管萌发后生殖细胞和营养细胞还保持原来在四

合花粉的结合状态并未散开(图 1: 5,6)。

授粉后 5 d,仍有部分花粉粒未萌发(图 2: 7)。已经萌发的花粉管长短不一,部分花粉管已经进入子房腔内(图 2: 8,9),随着花粉管的伸长,细胞质和细胞核逐步向花粉管先端聚集(图 2: 10),花粉伸长

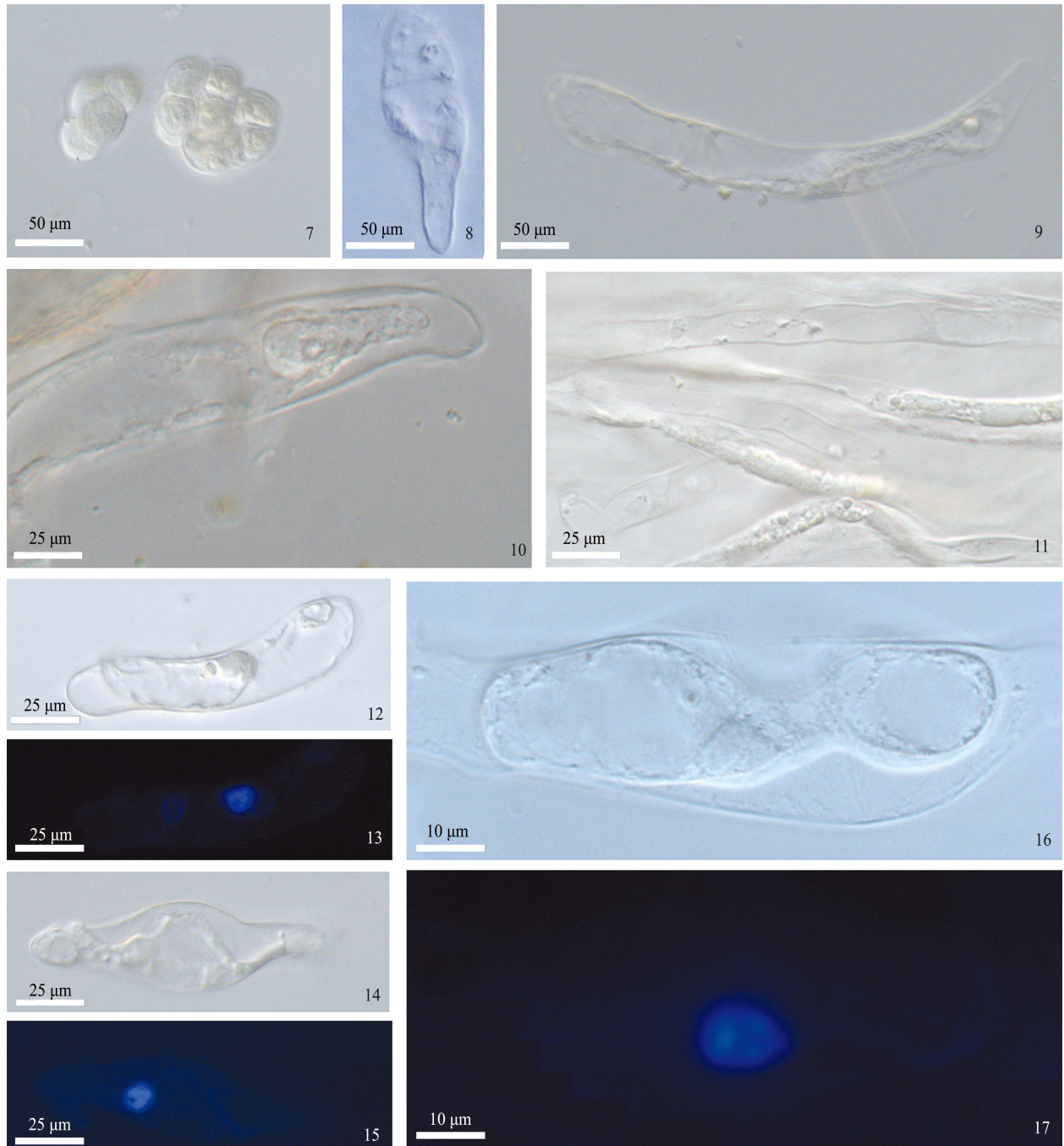


图2 授粉 5 d 后的花粉发育。7. 花粉小块; 8. 刚萌发的花粉管; 9. 较长的花粉管; 10. 花粉管先端; 11. 花粉管中部; 12~15. 萌发花粉管及其 DAPI 荧光; 16~17. 萌发的花粉管及其 3 核的 DAPI 荧光。

Fig. 2 Pollen development after pollinated five days. 7. Pollinium; 8. A just germinating pollen tube; 9. A long pollen tube; 10. The apex of pollen tube; 11. Middle of a long pollen tube; 12~15. Germinating pollen tubes and the fluorescence of DAPI; 16~17. A germinating pollen tube and the fluorescence of DAPI shown three nuclei.

到一定长度后,花粉管内每隔一定长度会形成隔离带(图 2: 11)。授粉后 5 d 刚萌发的花粉管与授粉后 1 d 的一样,生殖细胞尚未分裂(图 2: 12~15)。但也有有的花粉管内生殖细胞已经发育形成了一对精细胞的核。初形成的两个精核常常成对紧靠着,营养核则位于另一侧(图 2: 16,17)。

## 2.2 影响五唇兰精细胞分离的因素

参照活体-离体法,以 5~60 d 发育正常的子房

作为精细胞分离的材料,插入花粉管诱导培养基上进行离体培养,连续观察 3 d,均未见切口端长出花粉管,但切开子房后可见花粉管在子房壁内横向生长。

从授粉后 20 d、30 d、40 d 的子房内取花粉管直接在甘露醇中爆破,均可直接爆破出精细胞。五唇兰开花时雌配子体尚未形成,需要通过授粉刺激,子房才开始膨大,逐步分化出胚珠原基,进而分化出胚囊,五唇兰授粉后 45 d 左右胚囊才发育成熟<sup>[14-15]</sup>。虽然在五唇兰授粉 20~40 d 后,均可以从

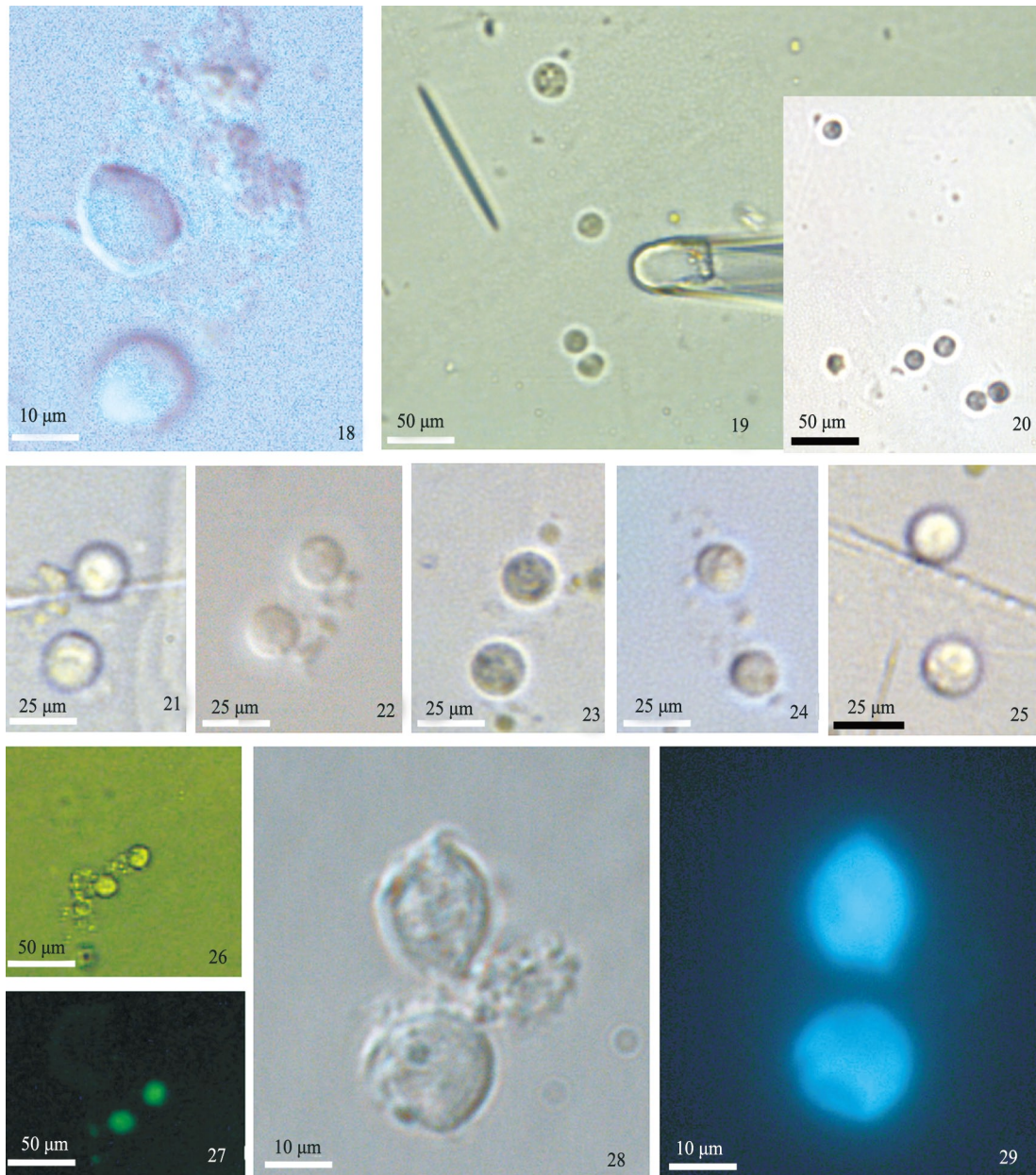


图 3 分离的精细胞。18. 刚分离的一对精细胞; 19~20. 收集的成对精细胞; 21~25. 成对的精细胞; 26~27. 成对精细胞的 FDA 荧光; 28~29. 成对精细胞的 DAPI 荧光。

Fig. 3 Isolated sperm cells. 18. Freshly isolated a pair of sperm cells; 19~20. Collection of sperm cells; 21~25. Pairs of sperm cells; 26~27. A pair of sperm cells and the fluorescence of FDA; 28~29. A pair of sperm cells and the fluorescence of DAPI.

子房内的花粉管中分离出精细胞,但只有在胚囊发育接近成熟时,分离出的精细胞才是最接近受精状态的,即作为离体受精用的五唇兰精细胞分离的最佳时间应该是授粉后 30~40 d。

五唇兰花粉管在 5%、7.5%、9%、12% 甘露醇中爆破 20~30 min 均可见到成对的精细胞。由于在 5% 甘露醇中爆破出的精细胞很容易发生吸涨现象,而在 12% 甘露醇中爆破出的精细胞容易发生皱缩现象,因此,以 7.5% 和 9% 的甘露醇较适合爆破五唇兰的精细胞。

### 2.3 五唇兰成对精细胞间的差异

刚从五唇兰花粉管爆破出的精细胞近椭圆形,在精细胞附近有营养细胞破裂的痕迹(图 3: 18)。将分离出的精细胞收集到一起一段时间(0.5~1 h)后,两个精细胞逐渐变成圆球形(图 3: 19,20)。

通常两个精细胞显示出大、小的差异,也有极少数花粉管释放出的一对精细胞很难区分两个精细胞的大小(图 3: 21~25)。2 个精细胞的直径分别是 $(9.0 \pm 2.7) \mu\text{m}$ 和 $(7.5 \pm 1.7) \mu\text{m}$ 。

精细胞经 FDA 检测呈绿色荧光(图 3: 26,27),DAPI 染色后,整个精细胞均呈现蓝色荧光(图 3: 28,29),成对的两个精细胞在荧光强度上也显示一定的差异。

## 3 讨论

### 3.1 五唇兰花精细胞分离的适宜方法

王利民等<sup>[6]</sup>利用大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)花粉进行离体培养萌发出花粉管,但并未分离出精细胞。据其报道花粉在人工培养基上的萌发率不高,一般不超过 60%,人工培养条件下大花蕙兰花粉萌发所需时间较长,约 3~4 d,而且在人工培养基上大花蕙兰的花粉管萌发后很难进一步生长。

兰科植物通常为二胞花粉,由于不像大多数被子植物一样形成柱头,花粉管萌发后不是在柱头内而是在子房腔内生长发育,因此不能像其它二胞花粉的植物一样采用“活体-离体”技术来分离精细胞,迄今为止,尚未见兰科植物精细胞分离的成功报道。本文采用“活体-离体”方法<sup>[6,10]</sup>未获得五唇兰精细胞。通过授粉使花粉管在子房内生长,再从子房内取出花粉管爆破,成功分离出五唇兰的精细胞,避免了人工培养花粉和花粉管生长困难的难

题,这一改良的“活体-离体”技术可以广泛应用于其它兰科植物精细胞的分离。

### 3.2 五唇兰成对精细胞的差异

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有报道。一对精细胞在形态和结构上有差异,自然会联想到二者在双受精过程中的命运<sup>[11]</sup>。Russell<sup>[17]</sup>报道白花丹(*Plumbago zeylanica*)的两个异型精细胞,其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)。这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,同时也说明在高等植物中配子细胞之间存在着一种识别关系。五唇兰的成对精细胞在大小、荧光强度等方面也存在差异,说明五唇兰的 2 个精细胞在双受精过程也可能具有不同的前途。

### 参考文献

- [1] Tian H Q. Advances in *in vitro* fertilization study of higher plants [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2003, 29(1): 3-10.  
田惠桥. 高等植物离体受精研究进展 [J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2003, 29(1): 3-10.
- [2] Mo Y S, Yang H Y. Mass isolation and preservation of viable sperm cells in *Brassica campestris* var. *purpurea* [J]. *Acta Bot Sin*, 1991, 33(9): 649-657.  
莫永胜, 杨弘远. 紫菜苔精细胞的大量分离和生活力保存 [J]. *植物学报*, 1991, 33(9): 649-657.
- [3] Ye Z Y, Deng H, Jian M X, et al. Anther development and sperm isolation of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) [J]. *J Mol Cell Biol*, 2007, 40(6): 428-436.  
叶祖云, 邓桦, 菅明霞, 等. 太子参花药发育及精细胞分离 [J]. *分子细胞生物学报*, 2007, 40(6): 428-436.
- [4] Chen Z Y, Zhu G L, Cao Z X. Isolation and purification of viable sperm cells from stored bicellular pollen of *Lilium davidii* Duch [J]. *Acta Bot Sin*, 1995, 37(8): 589-593.  
陈钟颖, 朱广廉, 曹宗巽. 从低温贮存的兰州百合花粉中制备批量的生活精细胞 [J]. *植物学报*, 1995, 37(8): 589-593.
- [5] Keijzer C J, Reinders M C, Lefterink-ten K H B. A micromanipulation method for artificial fertilization in *Torenia* [M]// Cresti M, Gori P, Pacini E. *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Berlin: Springer-Verlag, 1988: 119-124.
- [6] Shivanna K R, Xu H, Taylor P, et al. Isolation of sperms from pollen tubes of flowering plants during fertilization [J]. *Plant Physiol*, 1988, 87(3): 647-650.
- [7] Tian H Q, Russell S D. Micromanipulation of male and female gametes of *Nicotiana tabacum*: I. Isolation of gametes [J]. *Plant*

- Cell Rep, 1997, 16(8): 555–560.
- [8] Qiu Y L, Yang Y H, Zhang S Q, et al. Isolation of two populations of sperm cells from the pollen tube of tobacco [J]. Acta Bot Sin, 2004, 46(6): 719–723.
- [9] Chen S H, Yang Y H, Liao J P, et al. Isolation and collection of two groups of sperm cells from *Torenia fournieri* [J]. J Trop Subtrop Bot, 2004, 12(6): 557–561.  
陈素红, 杨延红, 廖景平, 等. 蓝猪耳精细胞的分离及两个精细胞群体的收集 [J]. 热带亚热带植物学报, 2004, 12(6): 557–561.
- [10] Tian H Q, Zhang Z, Russell S D. Isolation of the male germ unit: organization and function in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. Plant Cell Rep, 1998, 18(1/2): 143–147.
- [11] Tian H Q, Zhang Z J, Russell S D. Sperm dimorphism in *Nicotiana tabacum* L. [J]. Sex Plant Reprod, 2001, 14(1/2): 123–125.
- [12] Yang Y H, Qiu Y L, Xie C T, et al. Isolation of two populations of sperm cells and microelectrophoresis of pairs of sperm cells from pollen tubes of tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. Sex Plant Reprod, 2005, 18(2): 47–53.
- [13] Ji Z H, Chen X Q, Luo Y B, et al. Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomus 19 [M]. Beijing: Science Press, 1999: 276–278.  
吉占和, 陈心启, 罗毅波, 等. 中国植物志 第19卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 276–278.
- [14] Tang Y J, Ye X L, Chen Z L. The studies of the female gametophyte development and the embryogenesis in *Doritis pulcherrima* Lindl. [J]. J Trop Subtrop Bot, 1998, 6(4): 289–292.  
唐源江, 叶秀舜, 陈泽濂. 五唇兰雌配子体发育和胚胎发生的研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 1998, 6(4): 289–292.
- [15] Wu C H, Liang C Y, Ye X L. *In vitro* megagametophyte development via unfertilized ovule culture in *Doritis pulcherrima* [J]. Acta Bot Sin, 2004, 46(7): 839–845.
- [16] Wang L M, Wang S Q, Wang C X, et al. The imitative pollen budding experimentation of *Cymbidium hybridum* [J]. Chin Agri Sci Bull, 2005, 21(4): 122–124, 161.  
王利民, 王四清, 王彩霞, 等. 大花蕙兰花粉离体萌发试验初报 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(4): 122–124, 161.
- [17] Russell S D. Preferential fertilization in *Plumbago*: Ultrastructural evidence for gamete-level recognition in an angiosperm [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(18): 6129–6132.