

## 杜鹃精细胞的分离

张玉红, 于金金, 吴晓琛, 田惠桥

(厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 杜鹃成熟花粉为二胞型, 含一个营养细胞和一个生殖细胞, 其精细胞在花粉管中形成。应用半离体技术培养杜鹃已授粉花柱, 使花粉管从花柱中长出, 再用渗透压冲击法促使花粉管破裂, 释放出一对与营养核相连的精细胞。分离的精细胞经 FDA 方法检测, 证明具活性。用显微操作仪可收集数量较多的分离精细胞。

**关键词:** 杜鹃; 精细胞; 分离

Doi: 10.3969/j.issn.1009-7791.2013.01.002

中图分类号: Q944.62

文献标识码: A

文章编号: 1009-7791(2013)01-0005-05

### Separation of Sperm Cells of *Rhododendron simsii*

ZHANG Yu-hong, YU Jin-jin, WU Xiao-chen, TIAN Hui-qiao

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian China)

**Abstract:** The mature pollen of *Rhododendron simsii* is bicellular, containing one vegetative cell and one germ cell, with the sperm cells forming in pollen tube. Semi vitro technique was used in style pollinated to make pollen tube sprout from style. Then the pollen tube burst by osmotic shock method and released a pair of sperm cells which connected to vegetative nucleus. The sperm cells separated kept activities proved by FDA method. A fairly large number of separated sperm cells could be collected by micromanipulator.

**Key words:** *Rhododendron simsii*; sperm cell; separation

将精、卵细胞分离出来在体外诱导融合并培养的离体受精技术可克服体内的限制, 以便在人工调控的水平上研究植物的受精机制。分离精、卵细胞是开展离体受精的前提。Kranz 等<sup>[1-2]</sup>用分离的玉米精、卵细胞体外融合诱导形成了人工合子, 并最终培养成可育植株, 创建了第一例高等植物离体受精实验平台。2007 年, 用分离的水稻精、卵细胞体外诱导融合实验也获得可育植株, 建立了水稻离体受精实验平台<sup>[3]</sup>。高等植物离体受精实验平台的建立为研究植物的受精调控机制打下了基础。

被子植物精细胞位于花粉中, 分离的精细胞也可用于研究精细胞发育调控机制的分子生物学实验。Xu 等<sup>[4]</sup>用分离的麝香百合生殖细胞构建了 cDNA 文库, 从中筛选出一特异基因 (*LGCI*), 其表达产物定位在生殖细胞以及精细胞的表面, 推测可能与精、卵细胞的相互作用有关。苟小平<sup>[5]</sup>用分离的水稻精细胞构建了 cDNA 文库, 并利用抑制差减杂交技术从中筛选出一些在精细胞中特异表达的基因。Xu 等<sup>[6]</sup>等用分离的烟草精细胞构建了 cDNA 文库, 从 396 个克隆文库中初步筛选出在生殖细胞和精细胞中特异表达的 *NtS1* 和 *NtS2* 基因, 发现 *NtS1* 编码一个多聚半乳糖醛酸酶 (polygalacturonase), 推测该酶对烟草雄配子分化过程中的细胞壁降解起作用。Singh 等<sup>[7]</sup>从白花丹精细胞分离出 *LGCI* 基因的启动子序列, 并且把 *LGCI* 启动子序列和 *GFP* 或 *GUS* 基因构建在一起, 通过观察 *GUS* 基因转化的烟草植株发现, *LGCI* 在其启动子序列的驱使下, 只在二胞花粉的生殖细胞以及后来的精细胞中特异表达, 而

收稿日期: 2012-09-07

基金项目: 国家自然科学基金(30970275、31170289)、公益性行业(农业)科研专项课题(200903016)资助

作者简介: 张玉红(1988-), 女, 山东乳山人, 硕士研究生, 从事植物学研究。E-mail: 1072970432@qq.com

注: 田惠桥为通讯作者。E-mail: hqtian@xmu.edu.cn

在小孢子和成熟花粉的营养细胞以及其他营养组织和花器官中不表达。Bai 等<sup>[8]</sup>从水稻精细胞 cDNA 文库中筛选到一个在精细胞中差异表达基因 *RSG6*, 其表达活动始于二胞花粉时期, 在成熟花粉的精细胞中活性最强。Engel 等<sup>[9]</sup>构建玉米精细胞的 cDNA 文库, 在 1100 个 cDNA 克隆片段中发现 *Zmsp041*、*Zmsp943*、*Zmsp842*、*Zmsp443* 和 *Zmsp721* 都是在精细胞中特异表达。有趣的是精细胞所特有的一些转录片段在花粉发育早期就被合成 (最早的是在单胞花粉中), 如何解释这些早期存在的转录片段后来成为精细胞所特有的现象还没有答案。Xin 等<sup>[10]</sup>构建了烟草精细胞的 cDNA 文库, 进行了表达序列标签 (EST) 分析, 在 1050 表达簇中, 37% 未在基因库中发现, 42% 不与功能蛋白匹配。

杜鹃为双子叶植物杜鹃花科植物, 其成熟花粉为二胞型, 只含有一个营养细胞和一个生殖细胞, 其精细胞是在萌发花粉管中形成。本文尝试分离了杜鹃精细胞。

## 1 材料与方 法

实验材料为生长在厦门大学校园内的杜鹃 (*Rhododendron simsii*), 每年三月底至四月中旬开花。实验中的生殖细胞分离: 取开花时的花粉置于不同浓度的甘露醇溶液中破裂花粉, 使其释放内含物, 包括生殖细胞。半离体培养花粉管: 授粉后的花柱先在体内生长一段时间, 将其从基部切下, 插入培养基中诱导花粉管从花柱中长出。培养基成分为: 0.05%  $\text{CaCl}_2$ , 0.01%  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.01%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 附加 0~15% 蔗糖。花柱在体外培养一段时间后, 花粉管从花柱基部切口处长出。精细胞分离: 将长有花粉管的花柱转移到不同浓度甘露醇溶液中, 使花粉管破裂释放内含物, 包括两个精细胞。用 Leica DC-180 显微镜操作仪收集从花粉管中释放出的精细胞, 为进一步研究精细胞的分子生物学实验提供材料。花粉破裂和花粉管破裂后, 每毫升破裂液中加入 1  $\mu\text{L}$  荧光素二乙酸酯 (Fluorescein diacetate, FDA) 染色 1~2 min, 在荧光显微镜下观察, 检测生殖细胞和精细胞的活性。

## 2 结果与分析

杜鹃每朵花具 10 枚雄蕊, 花药由花丝相连, 着生于花瓣上, 花丝彼此分开, 等长, 约 2.5 cm。雌蕊具一个花柱, 长约 5 cm (图 1-A)。

### 2.1 生殖细胞分离

杜鹃花粉比较特殊, 减数分裂后形成的四分体小孢子不分开, 以四分体状态发育。开花时, 四个成熟花粉仍连在一起 (图 1-B)。取开花时的花药置于不同浓度的甘露醇溶液中, 用解剖针挤破花药, 其中的花粉释放到溶液中。花粉在 3% 甘露醇溶液中水合约 5~10 min 后, 一些花粉粒破裂, 细胞质涌出萌发孔。在涌出的花粉细胞质中有许多淀粉粒和一个体积较大的生殖细胞 (图 1-C), 证实了杜鹃二胞型花粉的特征。生殖细胞被释放后 5 min 仍有活力 (图 1-D)。用显微操作仪可将生殖细胞收集到一定数量, 为研究生殖细胞发育提供材料。

### 2.2 花粉管生长

杜鹃雌蕊在开花的前一天已具接受花粉并使其萌发的能力, 且花粉管的状态较好。选取开花前一天的小花去雄后授以成熟花粉, 可使花粉管的生长状态较为一致。所授花粉用开花当天上午的新鲜花粉最好。授粉后的花柱先在体内生长一段时间, 然后将花柱切下离体培养, 诱导花粉管从花柱切口处长出。这种半离体诱导花粉管生长的方法有两个关键步骤: 体内生长的时间和花柱离体培养的时间。杜鹃的花柱长约 5.0 cm。柱头被授粉后在体内生长约 58 h, 然后从花柱基部切下, 插入渗透压及钙和硼含量适宜的培养基中, 培养 12 h 左右, 从花柱基部切口处长出大量生活状态较好的花粉管 (图 1-E, -F)。花柱保持体内生长时间较短 (不到 55 h), 延长体外培养时间 (15 h), 也可诱导出花粉管, 但花粉管数量较少, 花粉管长度不同步, 且有很多弯曲 (图 1-G)。这种花粉管活力较差, 很难在破裂液中破裂。如花柱在体内生长时间较长, 能长出花粉管的数量亦较少 (图 1-H)。

培养基的蔗糖浓度对花粉管的诱导也有很大影响, 在不含蔗糖的培养基中, 也可长出花粉管, 但这种低渗状态的花粉管对以后破裂花粉管、分离精细胞不利。高浓度蔗糖溶液不利于花粉管的生长,

培养基中蔗糖浓度超过 10%，能长出花柱的花粉管很少，在 15% 蔗糖溶液中培养的花柱几乎没有长出花粉管（表 1）。

表 1 蔗糖浓度对花粉管生长的影响

蔗糖浓度(%)	0	5	10	15
培养花柱数	6	6	6	6
长出花粉管的花柱数	6	3	2	0
花粉管数	密集, 数不清	约 50 根	约 20 根	0

### 2.3 精细胞分离

生活状态好的花粉管在显微镜下呈现出活跃的胞质环流现象。把长出花粉管的花柱置于 3% 甘露醇破裂液中，3~5 min 后，大量花粉管破裂，花粉管内含物喷出，一对精细胞随之而出（图 1-I）。刚释放出的精细胞呈椭圆形，但在数秒钟后变圆。刚释放出的精细胞呈现明亮的绿色荧光（图 1-J, -K），显示具有较强的生活力。但在释放后 10 min，精细胞的活性荧光变弱。从花粉管中释放出的一对精细胞通常沉在培养皿底部，用显微操作仪可将成对的精细胞收集到一定数量（图 1-L），为研究精细胞发育的分子生物学实验提供材料。

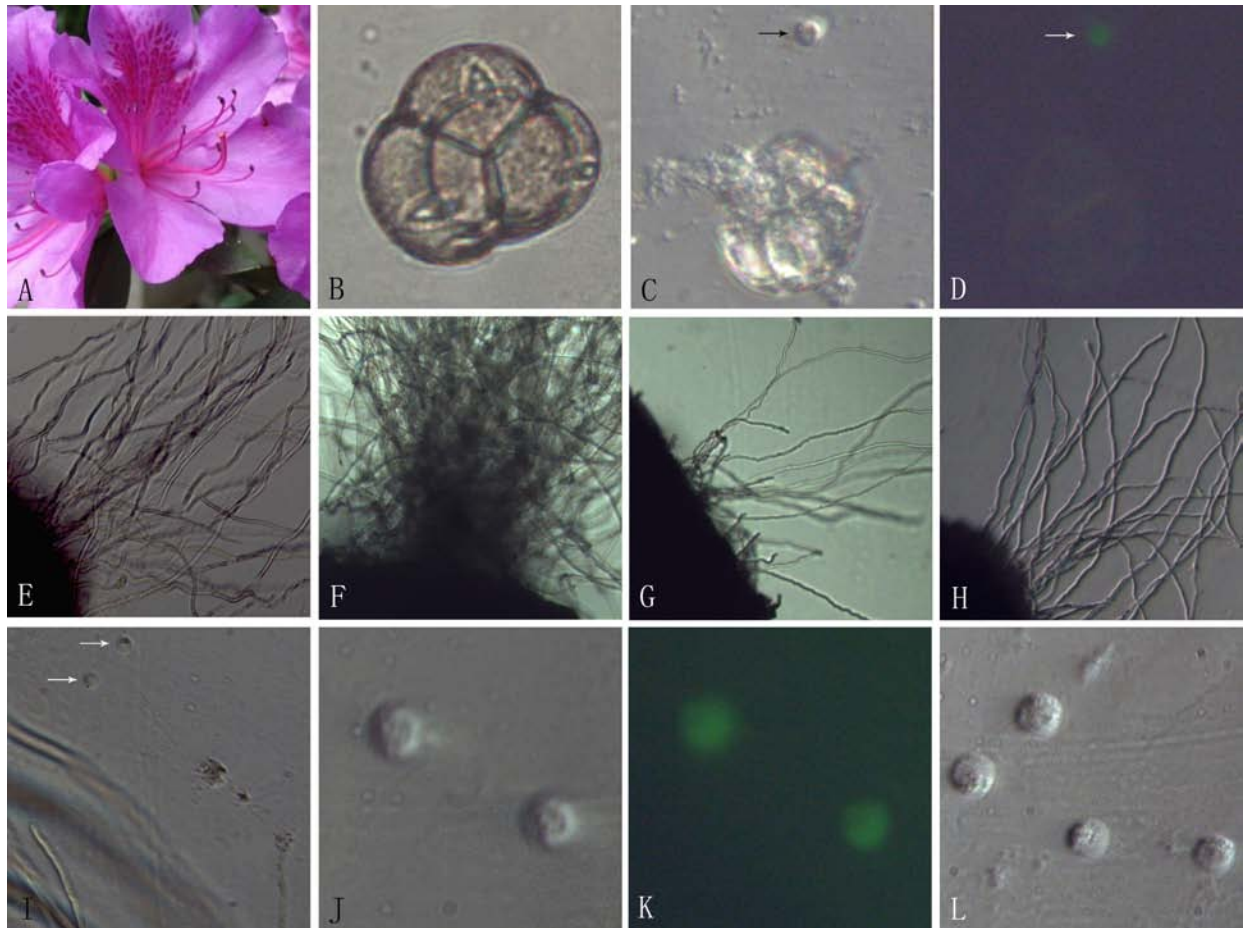


图 1 杜鹃精细胞体外分离过程

A. 杜鹃的花; B. 杜鹃成熟花呈四分体状( $\times 800$ ); C. 花粉破裂释放出生殖细胞(箭头)( $\times 400$ ); D. 释放出的生殖细胞(箭头)呈现活性荧光( $\times 400$ ); E. 从花柱切口端长出的花粉管( $\times 200$ ); F. 从花柱切口端长出的花粉管( $\times 200$ ); G. 延长花柱培养时间从其切口处长出的花粉管较少( $\times 200$ ); H. 花柱切下时间较晚时花粉管数量较少( $\times 200$ ); I. 花粉管破裂后释放出的一对精细胞(箭头)( $\times 200$ ); J. 释放出的一对精细胞很快变圆( $\times 800$ ); K. 释放出的精细胞显示活性荧光( $\times 800$ ); L. 收集的 4 个精细胞( $\times 800$ )。

### 3 讨论

被子植物的成熟花粉有两种：三胞型花粉和二胞型花粉。三胞型花粉由一个营养细胞和两个精细胞构成；二胞型花粉则由一个营养细胞和一个生殖细胞组成，它的两个精细胞在花粉萌发的花粉管里形成。根据成熟花粉的类型，需采用不同的方法分离精细胞。

三胞型花粉的精细胞分离方法主要有两种，渗透压冲击法和物理研磨法。Cass<sup>[11]</sup>首次利用渗透压冲击法将大麦花粉粒放到 20% 蔗糖的 BK 溶液中获得精细胞。利用渗透压冲击获得精细胞的方法不仅操作简单，且分离出的精细胞可保持数小时的生活力，大多数三胞型花粉的精细胞分离实验都采用此方法，如白花丹<sup>[12]</sup>、玉米<sup>[13]</sup>、甜菜<sup>[14]</sup>等。有些植物的花粉在溶液中不易破裂，利用物理研磨法可使花粉破裂释放精细胞，该方法主要采用玻璃匀浆器将精细胞从花粉粒中挤压出来，如油菜<sup>[15]</sup>、紫菜苔<sup>[16]</sup>的精细胞分离。胡萝卜花粉用匀浆器挤压也不破裂，采用两个解剖针挤压后一些花粉破裂释放出精细胞<sup>[17]</sup>。

二胞型花粉粒中仅含生殖细胞和营养细胞，精细胞是在花粉萌发后的花粉管里形成，因此需先诱导出花粉管后才能分离出精细胞。花粉管的培养常采用两种方法：离体培养和半离体培养。离体培养花粉管的方法是将花粉置于人工培养基中诱导萌发出花粉管，待精细胞在花粉管中形成后，用渗透压冲击或研磨使花粉管破裂，释放出精细胞。有些植物的花粉管易离体培养，但花粉管中的生殖细胞很难分裂，除非加入一些特殊的氨基酸后，才有少量花粉管中的生殖细胞分裂形成两个精细胞<sup>[18]</sup>。Shivanna 等<sup>[19]</sup>开创了分离二胞花粉精细胞的体内一体外方法，他们将授粉后在体内生长一段时间的花柱切下，在含硼和钙的培养基上培养，从花柱切口端长出的花粉管中已形成了一对精细胞，然后将花粉管转移到低渗透压溶液中应用渗透压冲击或用酶液处理花粉管，使花粉管顶端破裂释放出一对精细胞。莫永胜和杨弘远<sup>[20]</sup>利用该方法在具二胞花粉的 5 科 8 种植物中分离出了精细胞。此方法不仅可分离到烟草刚形成的幼小精细胞，也可分离到全长花柱中接近成熟的精细胞，用以研究不同发育时期的精细胞特征<sup>[21]</sup>。因此，半离体方法是分离二胞型花粉精细胞的有效方法。杜鹃属于二胞型花粉植物，笔者采用半离体技术培养出花粉管，并从中释放出精细胞，为研究其有性生殖中的相关问题打下基础。

### 参考文献：

- [1] Kranz E, Bautor J, Lorz H. *In vitro* fertilization of single isolated, gametes of maize mediated by electrofusion[J]. *Sexual Plant Reproduction*, 1991,4: 12-16.
- [2] Kranz E, Lorz H. *In vitro* fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants[J]. *Plant Cell*, 1993, 5: 739-746.
- [3] Uchiumi T, Uemura I, Okamoto T. Establishment of an *in vitro* fertilization system in rice[J]. *Planta* 2007,226: 581-589
- [4] Xu H L, Swoboda I, Bhalla P L *et al.* Male gametic cell-specific expression of H2A and H3 histone genes[J]. *Plant Molecular Biology*, 1991, 39: 607-614
- [5] 苟小平,徐莺,唐琳,等. 水稻精细胞 cDNA 文库的构建及分析[J]. *植物学报*, 2001,43(10): 1 093-1 096.
- [6] Xu H P, Weterings K, Vriezen W *et al.* Isolation and characterization of male-germ-cell transcripts in *Nicotiana tabacum*[J]. *Sexual Plant Reproduction*, 2002,14: 339-346
- [7] Singh M B, Xu H L, Bhalla P L. Developmental expression of polyubiquitin genes and distribution of ubiquitinated proteins in generative and sperm cells[J]. *Sexual Plant Reproduction*, 2002,14: 325-329
- [8] Bai Y, Xu Y, Tang L *et al.* Molecular cloning and preliminary study of a gene differentially expressed in rice sperm cell[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003,45(3): 346-351.
- [9] Engel M L, Chaboud A, Dumas C *et al.* Sperm cells of *Zea mays* have a complex complement of mRNAs[J]. *Plant Journal*, 2003,34: 697-707.

- [10] Xin H P, Peng X B, Ning J *et al.* Expressed sequence-tag analysis of tobacco sperm cells reveals a unique transcriptional profile and selective persistence of paternal transcripts after fertilization[J]. *Sexual Plant Reproduction*, 2011,24: 37-46
- [11] Cass D D. An ultrastructural and Nomarski-interference study of the sperms of barley[J]. *Can J Bot*, 1973,51: 601-605.
- [12] Russell S D. Isolation of sperm cells from the pollen *Plumbago zeylanica*[J]. *Plant Physiology*, 1986,81: 317-319.
- [13] Dupuis I, Roeckel P, Matthys-Rochon E. Procedure to isolate viable sperm cells from corn *Zea mays* L. pollen grain[J]. *Plant Physiology*, 1987,85: 876-878.
- [14] Nielsen J E, Olesen P, Wilms H J. Isolation of sperm cells from the trinucleate pollen of sugar beet (*Beta vulgaris*)[M]// Wilms H J, Keijizer C J. *Plants Sperm Cells as Tools for Biotechnology*, Wageningen: Pudoc, 1988: 111-112.
- [15] Cass D D, Hough R B, Knox C A *et al.* Isolation of sperms from pollen of corn and oil seed rape[J]. *Plant Physiology*, 1986,80(supp1): 130.
- [16] 莫永胜,杨弘远. 紫菜苔精细胞的大量分离和生活力的保存[J]. *植物学报*, 1991,33(9): 649-657.
- [17] 宋玉燕,包晗,陈美灵,等. 胡萝卜精、卵细胞、助细胞和中央细胞的分离[J]. *植物生理学报*, 2012,48(1): 90-94.
- [18] Read S M, Clarke A E, Bacic A *et al.* Requirements for division of generative nucleus in cultured pollen tubes of *Nicotiana*. [J]. *Protoplasma*, 1993,174: 101-115
- [19] Shivanna K R, Xu H, Taylor P *et al.* Isolation of sperms from the pollen tubes of flowering plants during fertilization[J]. *Plant Physiology* 1988,87: 647-650
- [20] 莫永胜,杨弘远. 几种具二细胞型花粉植物精细胞的分离和融合[J]. *植物学报*, 1992,34(9): 688-697.
- [21] Tian H Q, Russell SD. The fusion of sperm cells and the function of male germ unit (MGU) of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)[J]. *Sexual Plant Reproduction*, 1998,11: 171-176

---

## 《亚热带植物科学》稿约

《亚热带植物科学》(CN 35-1243/S, ISSN 1009-7791)创刊于1972年,是福建省亚热带植物研究所主办的植物学、农学类综合性学术期刊,是全国优秀农业期刊。已被《中国学术期刊综合评价数据库》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中文科技期刊数据库》、《中国科技期刊引证报告(扩刊版)》、《中国核心期刊(遴选)数据库》、华艺线上图书馆(Airity Library)等数据库收录,在“中国期刊网”、“万方数据-数字化期刊群”等全文上网。主要刊载亚热带植物生理生化与分子生物学、种质资源保护与开发利用、细胞工程、系统分类学、形态解剖、环境生态、育种栽培以及园林绿化、园艺花卉等方面的研究性论文、新技术报告及专题综述文章。

本刊对以下研究性论文减免版面费,并优先发表:

- (1) 国家自然科学基金、973计划项目、863计划项目等资助的相关论文,免收版面费;
- (2) 省级自然科学基金项目及其他部级科技计划项目资助论文,减收部分版面费。

另外,本刊已加入中国知网学术期刊数字优先出版平台,对于优质稿件,或根据作者需要,编辑部将尽快审稿,一旦录用,可在两星期内实现单篇数字优先出版(等同纸质出版),且保证能在中国期刊网([www.cnki.net](http://www.cnki.net))查阅下载。

盼即赐稿!

在线投稿网站: [www.fjjsb.com](http://www.fjjsb.com) 投稿邮箱: [yrdzwx@126.com](mailto:yrdzwx@126.com) 联系电话: 0592-5654157