

蝴蝶兰精细胞的分离和收集

伍成厚^{1,2,*}, 赵玉辉¹, 杨延红¹, 田惠桥^{1,*}

(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: 以蝴蝶兰 (*Phalaenopsis* hybrid) 为材料, 观察授粉后花粉的萌发, 并进行精细胞的分离和收集。观察发现, 蝴蝶兰花粉管萌发后营养核退化, 生殖细胞进入花粉管, 授粉后 5 d, 生殖细胞尚处于分裂期。通过授粉使花粉管在子房内发育, 再利用 5% ~ 12% 的甘露醇将花粉管直接爆破, 成功分离出成对的蝴蝶兰精细胞, 用显微操作仪 30 min 可收集精细胞 4 ~ 5 对。成对的两个精细胞在直径、荧光强度方面均有较大差异, 预示两个精细胞具有不同的前途。蝴蝶兰精细胞分离的成功为进一步开展兰花离体受精研究打下了良好的基础。

关键词: 蝴蝶兰; 生殖细胞; 精细胞分离; 精细胞收集; 花粉管爆破

中图分类号: S 682

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 04-0729-06

The Isolation and Collection of Sperm Cells in *Phalaenopsis*

WU Cheng-hou^{1,2,*}, ZHAO Yu-hui¹, YANG Yan-hong¹, and TIAN Hui-qiao^{1,*}

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

Abstract: The germination of pollens and the isolation and collection of sperm cells were studied by using a *Phalaenopsis* hybrid in this paper. The results show that the nucleus of generative cell degenerated after the pollen germinated and the generative cell moved into the pollen tube. The generative cell was still in cell division after pollinated 5 days. Pollen tubes were induced in the ovary after manual pollination and the sperm cells were isolated from pollen tubes by immediately blowing up in a broken solution containing 5% - 12% mannitol. Four to five pairs of sperms could be collected within 30 mins by using a micromanipulator. The isolated pairs of two sperm cells shown significant differences in sizes and fluorescent intensities, that suggested both sperms have different futures. The successful isolation of sperm cells from *Phalaenopsis* would provide a solid basis for the studies of *in vitro* fertilization in orchid in the future.

Key words: *Phalaenopsis* hybrid; generative cell; sperm cell isolation; sperm cell collection; pollen tube blow up

离体受精是植物生殖生物研究的热点, 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

收稿日期: 2011 - 12 - 16; 修回日期: 2012 - 03 - 22

基金项目: 广东省科技计划项目 (2007B020801007); 广州市科技计划项目 (11A63030233, 2060502)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wuchenghou2000@yahoo.com.cn; hqtian@jingxian.xmu.edu.cn)

粒爆破即可释放出精细胞(田惠桥, 2003), 或借助研磨(莫永胜和杨弘远, 1991), 或将花粉粒萌发花粉管再分离精细胞(叶祖云等, 2007)。而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(田惠桥, 2003)。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*) (陈钟颖等, 1995)、蓝猪耳(*Torenia fournieri*) (Keijzer et al., 1988); 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, 这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(Shivanna et al., 1988; Tian & Russell, 1997; Tian et al., 1998; Tian et al., 2001; 陈素红等, 2004; Qiu et al., 2004; Yang et al., 2005)。作为世界重要观赏植物的兰花迄今未见类似工作的成功报道。

兰科蝴蝶兰属(*Phalaenopsis*)植物经过长期杂交育种培育出许多具有观赏价值的品种。由于杂交育种中常因亲缘关系、环境条件等影响阻碍雌配子体发育而导致杂交育种的失败。异种植物离体精、卵细胞融合和杂种合子的培养是进行远缘杂交的一条有潜力的途径(田惠桥, 2003), 目前在玉米(*Zea mays*) (Kranz & Lörz, 1993) 和水稻(*Oryza sativa*) (Uchiumi et al., 2007) 两种植物上通过精卵细胞的离体融合分别获得了再生植株。本研究中以蝴蝶兰杂交种(*Phalaenopsis* hybrid)为材料, 进行了精细胞的分离和收集, 以为其离体受精研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蝴蝶兰杂交种(*Phalaenopsis* hybrid)引自中国科学院华南植物园, 开紫红色花, 种植在广州市园林科学研究所的水帘温室。5—9月在蝴蝶兰开花后分批进行人工授粉, 每个花葶授基部2朵花, 剪除花葶其余部分。授粉后子房开始膨大时, 以发育正常的子房作为试验材料。试验于2005—2008年进行, 每年采用50~60株蝴蝶兰, 每株授粉1个花葶。

1.2 试验方法

1.2.1 授粉后花粉发育的观察

蝴蝶兰人工授粉后, 定期剥取蕊柱腔中的四合花粉和子房内的花粉管, 用双蒸水在倒置显微镜下直接压片观察、摄影。用4,6-二氨基-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色细胞核, 应用荧光显微镜(Leica DM R-60)蓝色光激发, 观察荧光并照相。

1.2.2 花粉管爆破分离精细胞

精细胞的分离在厦门大学进行。将授粉后30~60 d正常膨大的蝴蝶兰子房纵向切开, 用镊子从中挑取花粉管直接浸入装在塑料培养皿中的花粉管爆破液中, 爆破液均为试验当天新配的甘露醇, 进行5%、7%、9%、10%和12%甘露醇梯度试验, 比较甘露醇浓度对蝴蝶兰精细胞分离的影响。在Leica DM IRB倒置显微镜下观察精细胞的分离过程。

1.2.3 精细胞的收集和观察

将爆破出的精细胞利用Leica DC-180显微操作仪移至精细胞观察液中。精细胞观察液为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ CaCl}_2$ 、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1} 2\text{-N-吗啡啉乙磺酸}$ (MES)、 $60 \sim 90 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 甘露醇。释放出的精细胞用倒置显微镜(Leica DM IRB)观察, 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, 即用 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 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。应用 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的DAPI

以 1/100 的量进行处理后染色显示细胞核。在 100 倍油镜下, 用测微尺测量 20 对精细胞的直径, 计算两个精细胞的大小。

利用 Leica DC-180 显微操作仪收集精细胞的群体。

2 结果与分析

2.1 蝴蝶兰授粉后花粉的萌发

蝴蝶兰同一药囊内的所有四合花粉粘结在一起形成花粉块。授粉后蕊柱腔闭合, 花朵即开始凋谢, 原本纤细的子房也随之慢慢膨大。花粉块在蕊柱腔内经水化作用, 各四合花粉间的粘连明显减弱, 最终成为较为分散的四合花粉。授粉后 3~5 d, 花粉块表面已有大量花粉管伸出或花粉管脱离花粉块表面而游离在花粉块周围(图 1, 1)。除花粉管外, 也有四合花粉小块散落出来(图 1, 2)。一个花粉粒通常只长出一个花粉管(图 1, 3)。

蝴蝶兰的花粉为二细胞型, 花粉成熟时生殖细胞梭形, 营养核新月形。花粉管萌发时生殖细胞变成圆球形, 营养核则已经退化(图 1, 4), 应用 DAPI 荧光显示仅见生殖细胞(图 1, 5)。蝴蝶兰花粉萌发的这一特征与黑节草(*Dendrobium candidum*)明显不同, 黑节草花粉管萌发时营养核不退化而是和生殖细胞一同进入花粉管, 且精子在花粉管内形成时仍可见营养核(徐正尧 等, 1995)。

由于花粉萌发先后不一致, 花粉管长短不一。随着花粉管伸长, 营养细胞的细胞质和生殖细胞逐步向花粉管先端聚集(图 1, 4、6), 花粉管伸长到一定长度后, 花粉管中段会形成隔离带。授粉后 5 d, 刚萌发的花粉管中生殖细胞尚未分裂(图 1, 5), 在一些伸长的花粉管内生殖细胞已经在进行分裂, 但尚未形成精细胞(图 1, 7)。

2.2 蝴蝶兰精细胞的分离和收集

从授粉后 30~60 d 的蝴蝶兰子房内取花粉管在甘露醇中爆破, 均可直接分离出精细胞, 以授粉后 40~50 d 的花粉管分离出的精细胞较多。蝴蝶兰需要通过授粉刺激才逐步分化出胚囊, 授粉后约 63 d 胚囊才发育成熟(伍成厚 等, 2004; 2006)。虽然蝴蝶兰在授粉后 30~60 d 均可以从子房内的花粉管分离精细胞, 但在胚囊发育接近成熟时, 分离的精细胞是最接近受精状态的, 故蝴蝶兰精细胞分离的最佳时间应该是授粉后 50~60 d。

进行了 5%~12%甘露醇梯度试验, 爆破 20~30 min 均可见到成对的精细胞。精细胞爆破出来后, 甘露醇浓度过高或过低对于保持其正常外形均不利, 适宜的浓度在 8%~9%。

蝴蝶兰精细胞刚分离时呈椭圆形, 在精细胞附近有营养细胞破裂的痕迹(图 1, 8)。利用 Leica DC-180 显微操作仪收集精细胞的群体, 30 min 可收集精细胞 4~5 对。分离的精细胞收集到一起一段时间(0.5~1.0 h)后, 两个精细胞逐渐变成圆球形(图 1, 9)。

2.3 蝴蝶兰成对精细胞之间的差异性

分离的成对精细胞通常显示出大小的差异, 成对精细胞的直径分别为 $(7.9 \pm 1.3) \mu\text{m}$ 和 $(6.9 \pm 1.3) \mu\text{m}$ 。也有极少数花粉管释放出的一对精细胞大小很难区分(图 1, 10、11)。

精细胞经 FDA 检测具有绿色荧光, 虽精细胞经显微操作仪收集 3~5 s 绿色荧光即消退, 两个精细胞荧光强度仍有一定差异(图 1, 12、13)。DAPI 染色观察整个精细胞均呈现蓝色荧光, 成对的两个精细胞一个荧光较强, 而另一个则较弱, 显示出明显的不同(图 1, 14、15)。

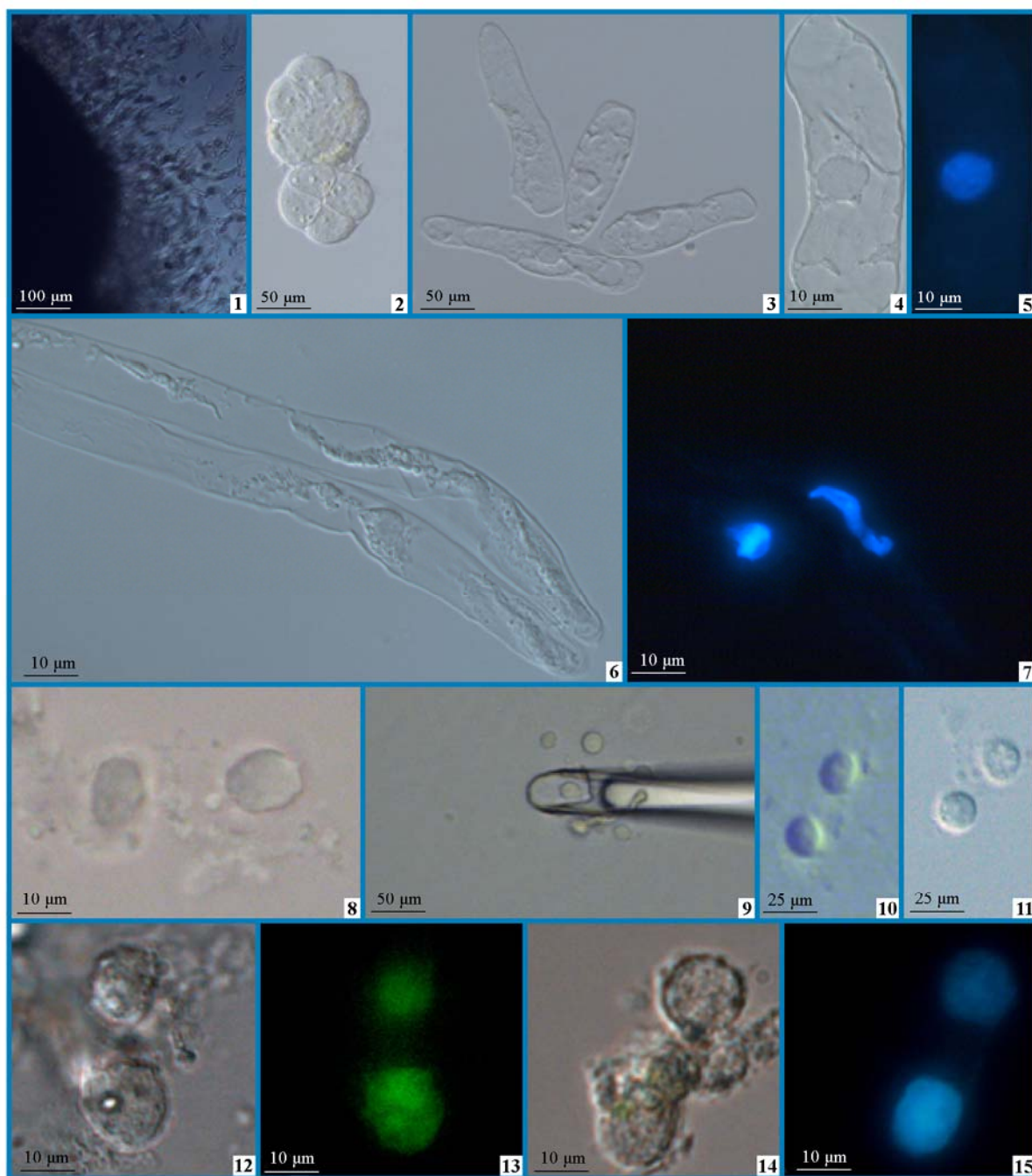


图 1 蝴蝶兰花粉的萌发、精细胞的分离和收集

1. 花粉块及萌发的花粉管; 2. 游离的花粉小块和四合花粉; 3. 刚萌发的花粉管; 4, 5. 萌发较长的花粉管及其 DAPI 荧光;
6, 7. 授粉后 5 d 花粉管先端及其 DAPI 荧光; 8. 刚分离的一对精细胞; 9. 利用显微操作仪收集精细胞群体;
10, 11. 成对的精细胞; 12, 13. 精细胞及其 FDA 荧光; 14, 15. 精细胞及其 DAPI 荧光。

Fig. 1 The pollen germination and the isolation and collection of sperm cells in *Phalaenopsis* hybrid

1. Pollinia and germinated pollen tubes; 2. A pollinium and a tetrad; 3. Pollen tubes just germinated; 4, 5. A long pollen tube and the fluorescence of DAPI; 6, 7. The front of a pollen tube and the fluorescence of DAPI after pollinated five days;
8. A pair of sperm cells just bursted; 9. Collecting sperm cells by a micromanipulator;
10, 11. Pairs of sperm cells; 12, 13. A pair of sperm cells and the fluorescence of FDA; 14, 15. A pair of sperm cells and the fluorescence of DAPI.

3 讨论

3.1 兰花精细胞分离的适宜方法

兰花的雌雄蕊融合而成蕊柱 (Column), 蕊柱腔接受花粉块后 1~2 d 即闭合, 而后花粉管萌发。兰花的花粉管在子房腔内生长发育的时间通常长达数十天, 因此不能像其它二胞花粉植物一样采用“活体—离体”技术来分离精细胞。

王利民等 (2005) 应用花粉培养法分离大花蕙兰 (*Cymbidium hybridum*) 的精细胞但未获得成功, 据其报道花粉在人工培养基中萌芽率不高, 一般不超过 60%, 且萌发所需时间较长, 约 3~4 d, 花粉管萌发后很难进一步生长。

本研究中通过授粉, 使蝴蝶兰的花粉管在子房内生长, 再通过花粉管爆破分离出精细胞, 避免了人工培养导致花粉管生长困难的难题, 这一改良的“活体—离体”技术可以在其它种类兰花精细胞分离时广泛应用。

3.2 蝴蝶兰成对精细胞的差异性

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 (Tian et al., 2001)。Russell (1985) 在白花丹 (*Plumbago zeylanica*) 中发现两个异型精细胞中, 含线粒体的与中央细胞融合, 含质体的与卵细胞融合, 表现出精细胞的倾向受精 (preferential fertilization), 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一种识别关系。

蝴蝶兰的成对精细胞在大小、荧光强度等方面也存在一些差异, 说明蝴蝶兰的两个精细胞在双受精过程也可能具有不同的前途。

References

- Chen Su-hong, Yang Yan-hong, Liao Jing-ping, Tian Hui-qiao. 2004. Isolation and collection of two groups of sperm cells from *Torenia fournieri*. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 12 (6): 557 - 561. (in Chinese)
- 陈素红, 杨延红, 廖景平, 田惠桥. 2004. 蓝猪耳精细胞的分离及两个精细胞群体的收集. *热带亚热带植物学报*, 12 (6): 557 - 561.
- Chen Zhong-ying, Zhu Guang-lian, Cao Zong-xun. 1995. Isolation and purification of viable sperm cells from stored bicellular pollen of *Lilium davidii* Duch. *Acta Botanica Sinica*, 37 (8): 589 - 593. (in Chinese)
- 陈钟颖, 朱广廉, 曹宗巽. 1995. 从低温贮存的兰州百合花粉中制备批量的生活精细胞. *植物学报*, 37 (8): 589 - 593.
- Keijzer C J, Reinders M C, Leferink-ten K H B. 1988. A micromanipulation method for artificial fertilization in *Torenia*// Cresti M. Sexual reproduction in higher plants. Berlin: Springer-Verlag: 119 - 124.
- Kranz E, Lörz H. 1993. *In vitro* fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants. *Plant Cell*, 5: 739 - 746.
- Mo Yong-sheng, Yang Hong-yuan. 1991. Mass isolation and preservation of viable sperm cells in *Brassica campestris* var. *purpurea*. *Acta Botanica Sinica*, 33 (9): 649 - 657. (in Chinese)
- 莫永胜, 杨弘远. 1991. 紫菜苔精细胞的大量分离和生活力保存. *植物学报*, 33 (9): 649 - 657.
- Qiu Y L, Yang Y L, Zhang S Q, Tian H Q. 2004. Isolation of two population of sperm cells from the pollen tube of tobacco. *Acta Botanica Sinica*, 46 (6): 719 - 723.
- Russell S D. 1985. Preferential fertilization in *Plumbago zeylanica*: Ultrastructural evidence for gamete-level recognition in an angiosperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82: 6129 - 6132.
- Shivanna K R, Xu H, Taylor P, Knox R B. 1988. Isolation of sperms from pollen tubes of flowering plants during fertilization. *Plant Physiology*, 87: 647 - 650.

- Tian H Q, Russell S D. 1997. Micromanipulation of male and female gametes of *Nicotiana tabacum*: I. Isolation of gametes. *Plant Cell Reports*, 16: 555 - 560.
- Tian H Q, Zhang Z, Russell S D. 1998. Isolation of the male germ unit: Organization and function in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Cell Reports*, 18: 143 - 147.
- Tian H Q, Zhang Z, Russell S D. 2001. Sperm dimorphism in *Nicotiana tabacum* L. *Sexual Plant Reproduction*, 14: 123 - 125.
- Tian Hui-qiao. 2003. Advances in *in vitro* fertilization study of higher plants. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 29 (1): 3 - 10. (in Chinese)
- 田惠桥. 2003. 被子植物离体受精研究进展. *植物生理与分子生物学学报*, 29 (1): 3 - 10.
- Uchiumi T, Uemura I, Okamoto T. 2007. Establishment of an *in-vitro* fertilization system in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 226: 581 - 589.
- Wang Li-min, Wang Si-qing, Wang Cai-xia, Liu Hui. 2005. The imitative pollen budding experimentation of *Cymbidium hybridum*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 21 (4): 122 - 124, 161. (in Chinese)
- 王利民, 王四清, 王彩霞, 刘 慧. 2005. 大花蕙兰花粉离体萌发试验初报. *中国农学通报*, 21 (4): 122 - 124, 161.
- Wu Cheng-hou, Liang Cheng-ye, Ye Xiu-lin. 2004. The effects of low temperature on the ovule development of *Phalaenopsis*. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 12 (2): 129 - 132. (in Chinese)
- 伍成厚, 梁承邴, 叶秀舜. 2004. 低温对蝴蝶兰胚珠发育的影响. *热带亚热带植物学报*, 12 (2): 129 - 132.
- Wu Cheng-hou, Pan Yi-shan, Luo Kai-mei, Ye Xiu-lin, Liang Cheng-ye. 2006. *In vitro* culture of unfertilized ovules in *Phalaenopsis*. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (4): 891 - 894. (in Chinese)
- 伍成厚, 潘一山, 罗开梅, 叶秀舜, 梁承邴. 2006. 蝴蝶兰未受精胚珠离体培养的研究. *园艺学报*, 33 (4): 891 - 894.
- Xu Zheng-yao, Yang Cai-yun, Yang Mao-xian. 1995. Studies on the double fertilization and embryogeny in *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 3 (2): 60 - 64. (in Chinese)
- 徐正尧, 杨彩云, 杨貌仙. 1995. 黑节草双受精过程及胚胎发育. *热带亚热带植物学报*, 3 (2): 60 - 64.
- Yang Y H, Qiu Y L, Xie C T, Tian H Q, Zhang Z, Russell S D. 2005. Isolation of two populations of sperm cells and microelectrophoresis of pairs of sperm cells from pollen tubes of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Sexual Plant Reproduction*, 18: 47 - 53.
- Ye Zu-yun, Deng Hua, Jian Ming-xia, Zheng Song, Tian Hui-qiao. 2007. Anther development and sperm isolation of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.). *Journal of Molecular Cell Biology*, 40 (6): 428 - 436. (in Chinese)
- 叶祖云, 邓 桦, 菅明霞, 郑 松, 田惠桥. 2007. 太子参花药发育及精细胞分离. *分子细胞生物学报*, 40 (6): 428 - 436.

征 订

《新编拉汉英植物名称》

本书收集具有经济价值和学术价值或通俗常见的种子植物、蕨类植物、苔藓植物、藻类植物、真菌、地衣名称 55 800 条。每种植物名称有拉、汉、英三种文字对照，按拉丁文字母顺序排列。书后附有英文俗名和汉名索引。本书可供农、林、医药、环境保护等学科的管理机构、科研单位、大学中的科技人员以及生物工程、植物检疫、花卉园艺、新闻出版、旅游、外贸等专业的技术人员使用，也是各类图书馆典藏的重要工具书。定价：185 元（含邮费）。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部，邮编 100081。