

## 光敏核不育水稻‘农垦58S’精细胞的分离

赵玉辉, 田惠桥\*

厦门大学生命科学学院, 福建厦门361005

### Isolation of Sperm Cells from Photoperiod-sensitive Genic Male-Sterile Mutant of Rice (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*)

ZHAO Yu-Hui, TIAN Hui-Qiao\*

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

**摘要:** 文章对常用的渗透压冲击法作了改进, 并从水稻成熟花粉粒中分离出大量精细胞。显微镜下的2个精细胞具有二型性, 用显微操作仪从中分别挑选出2个细胞群体, 并以荧光素二醋酸酯(FDA)染色的结果表明, 分离的精细胞是活的。

**关键词:** 精细胞; 分离; 光敏核不育水稻

精细胞作为雄配子在被子植物的双受精过程中有重要地位, 分离精细胞是进行精子二型性和生理生化研究的基础, 也是研究高等植物精、卵识别过程中生理生化和分子生物学的前提。水稻是具三胞花粉的植物, 精细胞的分离可直接从花粉粒爆破出来。水稻花粉精细胞的分离已有陆续报道(苟小平等1998, 1999, 2001; Khalequzzaman和Haq 2005), 但资料仍较少。‘农垦58S’是我国发现的一种对光周期敏感的雄性不育水稻, 本文报道其精细胞分离的结果。

#### 材料与方 法

材料为光敏核不育水稻(*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*)品种‘农垦58S’。

对渗透压冲击法(苟小平等1998; Russell 1986)作了一些改良。试验中设置不同浓度的渗透液, 分别为15%、12%和9%的甘露醇溶液, 在渗透液中加入0.05% (W/V)果胶酶、0.05% (W/V)纤维素酶和0.6%的牛血清白蛋白(BSA)。选取刚刚开放的颖花, 用镊子夹碎花药, 放入渗透液中进行水合, 花粉可直接吸水破裂。或者先将花粉放入渗透液中水合, 几分钟后将渗透液倾去, 再分别加入7.5%、6%和4.5%的甘露醇低渗溶液, 进行冲击。

于显微镜下, 用多个视野中破裂花粉占花粉总数的百分率作为花粉的爆破率。分离的成对精细胞用 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 荧光素二醋酸酯(FDA, 厦门泰京生物技术有限公司)测定其生活力; 用 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

DAPI 溶液染色, 观察释放的精细胞的细胞核; 用荧光显微镜(Leica DM R-60)观察花粉破裂和精细胞的释放过程, 并摄影。用Leica DC 180显微操作仪可收集到较为纯化的精细胞群体。

#### 实验结果

##### 1 花粉的破裂和不同分离方法的比较

水稻成熟花粉在渗透液中发生轻微质壁分离, 有大约一半的花粉在浸入到渗透液中即吸水膨胀而破裂, 其内含物即从萌发孔处喷出或从花粉裂开处喷出(图1); 也有一些花粉在较长时间(大约3 min)吸水膨胀而破裂。在3种浓度的渗透液中, 以9%甘露醇爆破效果较好(平均爆破率为70.5%), 精细胞释放效果也最好。在渗透液中加入少量酶液, 可以将花粉中爆破出来的细胞质等内含物酶解, 而不破坏精细胞, 并可将2个精细胞之间的连接破坏, 但2个精细胞仍保留在原来的位置上, 这样就容易进行精细胞的挑选。通过试验证实, 在渗透液中加入酶液后, 能很好地分离精细胞, 而不需再用低渗溶液进行冲击, 因为2个精细胞之间的连接已被酶解, 如果再进行冲击, 则会将对成对精细胞分开。

##### 2 显微观察

**2.1 细胞学观察** 水稻成熟花粉中有2个精细胞,

收稿 2006-09-11 修定 2007-01-04

\*通讯作者(E-mail: hqtian@jingxian.xmu.edu.cn; Tel: 0592-2186486)。

2个精细胞有大小差异,即精细胞的二型性(胡适宜1990)(图2-a、h)。刚从花粉中释放的精细胞,两两相连,有的可清楚看到2个精细胞呈现结构上的连接(图2-b)。刚释放的精细胞为长椭圆型(图2-c),这时看不出其大小差异,在爆破几秒钟后,精细胞就吸水变成圆球形,分散于介质中。精细胞变为圆形时,可很明显地区分精细胞的大小,也有极少数花粉释放出的一对精细胞很难区分大小,对这种类型的精细胞通常不予选择。花粉爆破后,仍然可观察到完整的雄性生殖



图1 光敏核不育水稻花粉粒的爆破( $\times 300$ )

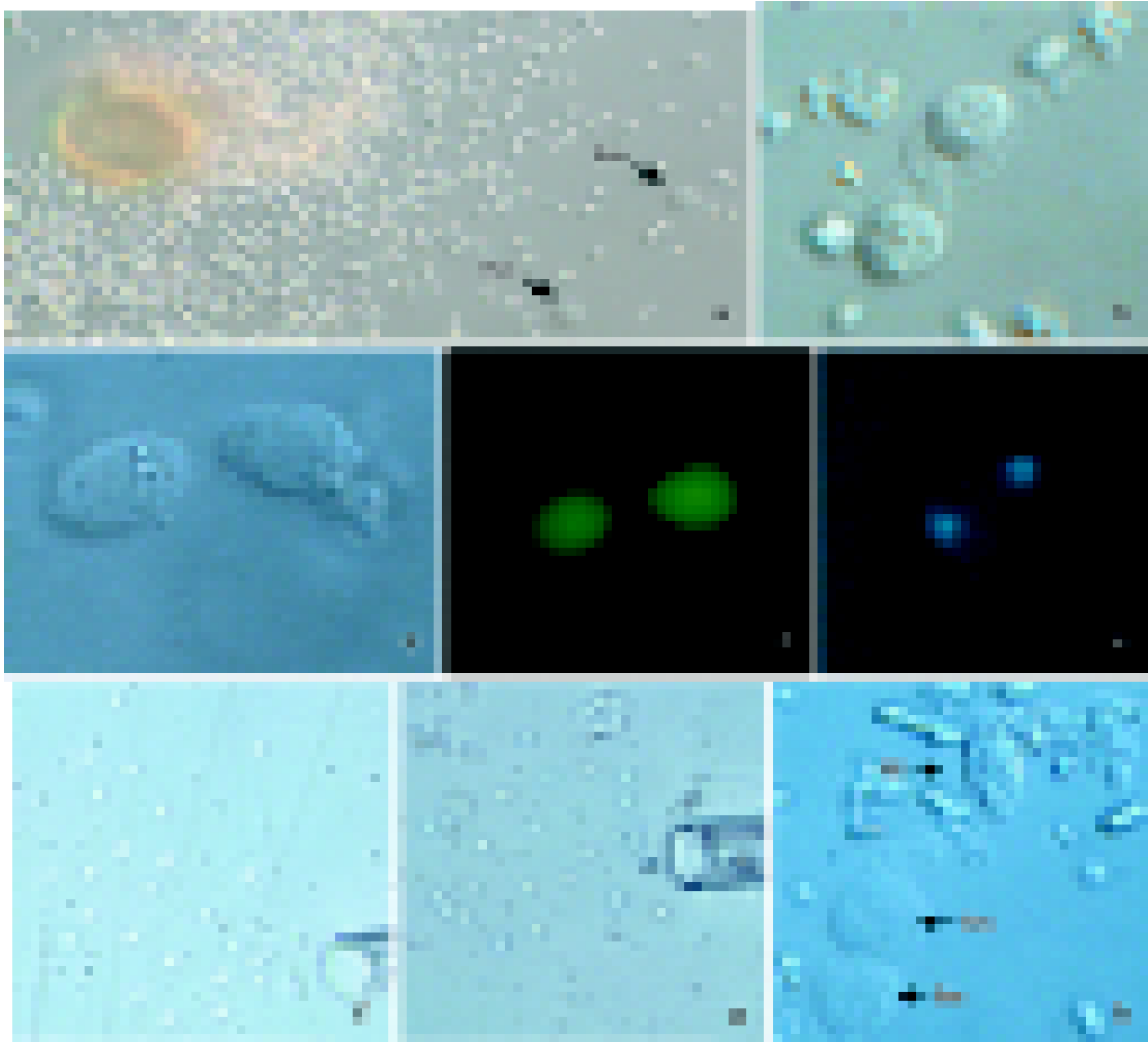


图2 光敏核不育水稻精细胞的分离

VN: 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。a: 花粉破裂后释放的2个精细胞( $\times 420$ ); b: 1对离体的精细胞,可清楚看到2个精细胞之间具结构上的连接( $\times 1\ 250$ ); c: 刚释放出来的长椭圆型的精细胞( $\times 1\ 600$ ); d: 刚从花粉中释放的1对精细胞, FDA染色( $\times 1\ 375$ ); e: 水稻精细胞核, DAPI染色( $\times 1\ 500$ ); f: 用显微操作仪收集的大精细胞群体( $\times 375$ ); g: 用显微操作仪收集的小精细胞群体( $\times 300$ ); h: 花粉破裂后释放的1个营养细胞核和2个精细胞( $\times 2\ 000$ )。

单位,这与苟小平等(1999)观察到的情况一致,其中大的精细胞和营养核连在一起(图2-h),随着时间的延长,营养核也胀大、破裂。

**2.2 精细胞活性鉴定** 采用FDA荧光反应作为生活细胞的标志,可以清楚的观察到精细胞呈现出均匀的绿色荧光,说明分离的精细胞活性较好(图2-d)。DAPI染色后,在荧光显微镜下,分离的精细胞核发出明亮的蓝色荧光(图2-e)。在渗透液中加入BSA可延长精细胞的生活力。在加入BSA保护剂3 h后,我们见到其精细胞仍然保持较高的亮度,不加BSA保护剂的水稻精细胞的FDA荧光亮度减弱。

### 3 2个精细胞群体的分离

在渗透液中加入微量的酶液[0.05%果胶酶和0.05%纤维素酶]后,取成熟的水稻花粉,放入渗透液中直接爆破。在酶的作用下,成对的精细胞之间联系消失,但2个精细胞仍保留在原来的位置,这样就可以用显微操作仪收集精细胞群体。分离的较大精细胞(S<sub>vn</sub>)直径为7~9 μm,较小的精细胞(S<sub>ua</sub>)直径为6~8 μm。苟小平等(1998)报道从水稻中分离的精细胞直径在5~7.5 μm,由此可以看出不同品种水稻的精细胞大小是有差异的。

## 讨 论

在我们的试验中观察到,花粉在渗透液中爆破后,其内含物呈团状,精细胞很难从中释放出来;当用低渗溶液进行冲击,也只有较少的精细胞从成团的细胞质和淀粉粒中释放出来;如在渗透液中加入少量的酶液,然后进行花粉爆破,这样的效果较好,细胞质和淀粉粒都逐渐分散开来,并很快释放出成对的精细胞。

有报道认为刚释放的水稻精细胞呈现长的尾状延伸(苟小平 1998),但在本试验中未观察到,推测可能是渗透液的浓度较低和精细胞吸水较快之果,如果提高渗透液的浓度则可观察到精细胞的最初状态,但花粉爆破的效果可能会受到影响。

本试验中观察到的‘农垦58S’精细胞,其二型性与苟小平等(2001)认为未分离的水稻精细胞没有二型性的结果不一致,说明精细胞的二型性可能是因品种而异。关于试验中观察到刚刚释放的长椭圆形精细胞看不出大小差异问题,我们认为,精细胞本来的大小差异可能就不大,所以,长椭圆形精细胞无法准确测量,也很难从外型上辨别大小,而当精细胞吸水变为圆形时,就能看出2个精细胞的大小差异,本文中的2个精细胞差异在0.5~1 μm。总之,我们分离得到了水稻品种‘农垦58S’的精细胞,并可从中挑选出一定数量的2个精细胞群体,这为进一步研究水稻离体受精奠定了基础。

## 参考文献

- 苟小平,唐琳,颜钊,陈放(2001). 水稻精细胞的超微结构. 四川大学学报, 38 (3): 434~439
- 苟小平,王胜华,陈放(1998). 水稻生活精细胞的大量分离. 四川大学学报, 35 (6): 942~945
- 苟小平,王胜华,陈放(1999). 水稻生活精细胞的分离及细胞学观察. 植物学报, 41 (6): 669~671
- 胡适宜(1990). 雄性生殖单位和精子异型性研究的现状. 植物学报, 32 (3): 230~240
- Khalequzzaman M, Haq N (2005). Isolation and *in vitro* fusion of egg and sperm cells in *Oryza sativa*. Plant Physiol Biochem, 43: 69~75
- Russell SD (1986). Isolation of sperm cells from pollen of *Plumbago zeylanica*. Plant Physiol, 81: 317~319