

蓝猪耳离体受精初试

于金金¹, 成诚¹, 王雅英², 张亚楠², 田惠桥^{1,*}

¹厦门大学生命科学学院, 厦门361005; ²厦门医学高等专科学校, 厦门市中医生物工程重点实验室, 厦门361008

摘要: 用体内-体外方法分离了蓝猪耳精细胞。用酶解和解剖方法分离了其成熟卵细胞。分离的精、卵细胞用电融合介导尝试了体外诱导融合。在合适的渗透压(6%甘露醇)和合适的氯化钙(0.04% CaCl₂·2H₂O)溶液中, 用交流电场为30~35 V, 10~25 s使精、卵细胞排队; 用直流电场400~600 V, 45~50 μs的脉冲穿孔条件可诱导30%的精、卵细胞融合和70%以上的卵细胞之间的融合。尝试了人工合子的单细胞培养但未获成功。诱导蓝猪耳精、卵细胞融合的条件与玉米和水稻不同。

关键词: 蓝猪耳; 精细胞; 卵细胞; 电融合; 离体受精

The Primary Attempt of *in Vitro* Fertilization of *Torenia fournieri*

YU Jing-Jing¹, CHENG Cheng¹, WANG Ya-Ying², ZHANG Ya-Nan², TIAN Hui-Qiao^{1,*}

¹School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; ²Xiamen Key Laboratory of Biological Engineering for Traditional Chinese Medicine, Xiamen Medical College, Xiamen 361008, China

Abstract: Sperm cells of *Torenia fournieri* were isolated from pollen tubes which were induced using an *in vivo-in vitro* method. Its egg cells were isolated by enzyme digesting followed by mechanical dissection. The electrical fusion method was applied to induce the fusion of the isolated sperm and egg cells. In a suitable solution containing 6% mannitol and 0.04% CaCl₂·2H₂O, 30% sperm-egg and over 70% egg-egg could be induced fusion using alternating current (30–35 V, 10–25 s) to align sperm-egg or egg-egg, following direct current (400–600 V, 45–50 μs) pulse to perforate the plasma member of both sperm and egg. The artificial zygotes were also tried to culture but no success. The conditions of inducing fusion of sperm cells and egg cells of *Torenia fournieri* are different with those of maize and rice.

Key words: *Torenia fournieri*; sperm cell; egg cell; electrical fusion; *in vitro* fertilization

被子植物独具的双受精过程是在深藏于花器官组织中雌配子体内进行的, 具有一系列严格有序的时空发育特征。被子植物花器官的复杂性和层层体细胞保护的的特性使受精生物学的研究具有很大难度, 至今对受精调控机理的认识还很有限。利用分离的精、卵细胞在控制条件下进行体外融合, 形成合子, 再将人工合子培养成植株的离体受精技术排除了体细胞的障碍, 可直接显微观察卵细胞受精和受精后的细胞学动态, 并将受精和早期胚胎发生的理论研究深入。由于离体研究具有可控性和活性两大优点, 可解决高等植物受精与早期胚胎发生的主要发育事态在体内研究难以奏效的问题。高等植物的离体受精实验系统也是用分子生物学方法研究早期胚胎发生的有效技术平台。离体受精生物学研究不仅在基础理论还是应用领域的研究均具有深远的意义。1991年Kranz等用分离的玉米精、卵细胞借助电融合介导使其在体外融合成人工合子(Kranz等1991a, b), 并

培养人工合子再生植株, 使受精与胚胎发育过程在定点、定时的显微控制条件下完成(Kranz and Lörz 1993)。他们用玉米离体受精技术进行了许多开创性的受精机理研究(Wang等2006; 田惠桥和朱学艺2012)。2007年, 另一单子叶植物——水稻的离体受精也获得了成功(Uchiumi等2007), 这是被子植物离体受精技术在植物种类上的又一突破。然而, 在玉米和水稻离体受精中发现的卵细胞变化是否具有普遍性, 尤其是能否代表双子叶植物的受精特征? 需在更多植物中进行探索。

蓝猪耳是玄参科蓝猪耳属的草本植物, 具总状花序, 开花量多, 花期时间长, 是研究植物有性生殖的适宜材料。它的组织培养过程也获得了重

收稿 2012-08-30 修定 2012-10-07

资助 国家自然科学基金(30970275和31170289)和公益性行业(农业)科研专项经费(200903016)。

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

复报道, 易建立离体再生系统。蓝猪耳的胚珠很特殊, 成熟的胚囊从珠孔端伸出, 使位于珠孔端的卵细胞、助细胞及一半中央细胞清晰可见。蓝猪耳的这一特殊结构, 使分离它的生活卵细胞相对其他植物比较容易。尤其著名的是Higashiyama等用蓝猪耳为材料深入研究了助细胞吸引花粉管进入胚囊的调控机理实验(Higashiyama等2001; Okuda等2009), 使其成为被子植物受精研究的模式植物。本文在我们前期分离蓝猪耳精、卵细胞的基础上(Chen等2006, 2008), 进一步开展了蓝猪耳的离体受精实验, 主要探索其精、卵细胞融合的特点, 为建立蓝猪耳离体受精实验平台打下基础。

材料与方法

1 实验材料

蓝猪耳(*Torenia fournieri* Linden. ex Fourn.)种子于4月份播种于厦门大学植物园, 6月下旬开花。选取当天开放的花进行去雄套袋。第2天对其中的部分去雄花进行人工授粉和半离体培养花粉管, 用于分离精细胞。另一部分去雄花用来分离成熟卵细胞。

2 方法

2.1 分离精细胞

蓝猪耳是二胞型花粉, 生殖细胞只在生长的花粉管中分裂形成2个精细胞。柱头授粉后, 花粉管在体内生长5 h, 将花柱从基部切下, 插入渗透压适宜、钙和硼含量恰当的培养液中培养2~3 h后, 从花柱基部的切口处长出花粉管。将长有花粉管的花柱转移到含5%甘露醇的花粉管爆破液中, 花粉管爆破, 一对精细胞随着花粉管内含物从花粉管释放出。分离精细胞的具体操作过程参见Chen等(2006)文献。

2.2 分离卵细胞

从去雄花中剥取的胚珠置于酶液中, 在微震荡仪上室温酶解约20 min。然后, 将酶解的胚珠在倒置显微镜下用自制解剖针横切胚珠, 轻轻挤压其珠孔端, 释放出卵细胞。分离卵细胞的具体操作过程参见Chen等(2008)文献。

2.3 诱导精、卵细胞融合

转移至电融合槽内的精、卵细胞进行电融合操作之前, 先对电融合仪进行设置。融合液成分

为: 5%~6.5%甘露醇, 0.01%~0.06% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0~0.01%牛血清白蛋白(BSA), 0~0.01%纤维素酶(Onozuka R-10), 0~0.01%果胶酶(Serva), pH 6.5。在设置电融合仪的各项参数时, 需考虑细胞的排列参数(交流电场的电压和脉冲长度, AC)、电穿孔参数(直流电场脉冲时间, 直流电压, 脉冲次数, DC)和融合后的交流电场参数(Post-Fusion AC)。在室温条件下, 将BTX EMC2001电融合仪的2个电极分别接到电融合槽的相应位置, 设置交流电场(AC)为30~35 V, 10~25 s, 直流电场(DC)为400~600 V, 45~50 μs 。在每次操作融合, 自动运行AC时, 精、卵细胞进行排列; 运行DC时, 精、卵细胞在适宜条件下发生融合。同时启动录像和照相装置, 记录精、卵细胞的融合情况。

2.4 人工合子培养

精、卵细胞融合后形成的人工合子用显微操作仪转移到培养皿中的琼脂滴中进行单细胞培养。琼脂滴用MS培养基配制, 附加2~4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D和3%甘露醇及3%葡萄糖。在琼脂滴周围加入相同成分的MS液体培养基。向琼脂培养滴中注射人工合子后, 在4℃冰箱中冷却5 min使其凝固后加入液体培养基在室温中培养。

实验结果

1 精、卵细胞的分离和采集

1.1 精细胞分离和采集

蓝猪耳精细胞的分离前提是先长出花粉管。通过培养授粉后的花柱, 使花粉管中的生殖细胞分裂形成精细胞, 爆破花粉管达到精细胞分离的目的。刚长出花柱切口处的花粉管生活力旺盛(图1-A), 内部的胞质环流活跃, 这样的花粉管很容易爆破和释放出精细胞。刚从花粉管里释放出的一对浆细胞通常是长形(图1-B), 具有活性(图1-C), 但很快变圆(图1-D)。用显微操作仪将精细胞转移至含有卵细胞的融合槽内。

1.2 卵细胞分离和采集

虽然蓝猪耳的半个胚囊从珠孔伸出(图1-E), 但不用酶, 只从切破的胚囊中也不容易释放出卵细胞。将胚珠酶解20 min后, 切破胚囊, 挤压珠孔端, 卵细胞较容易被释放出(图1-F), 通常每10 min内可分离3~8个卵细胞(图1-G、H)。分离的卵细

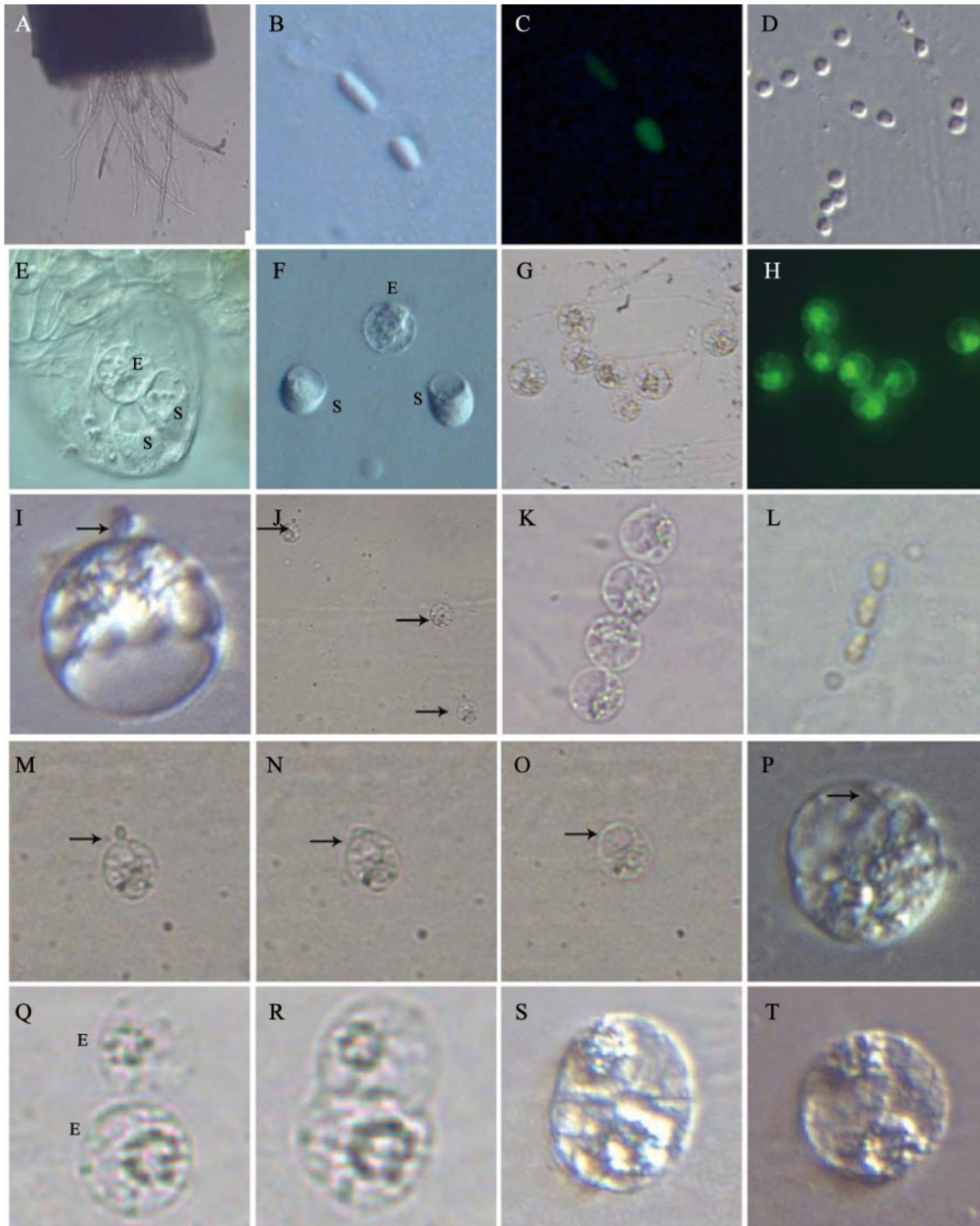


图1 蓝猪耳离体受精初试

Fig.1 The primary attempt of *in vitro* fertilization of *Torenia fournieri*

A: 蓝猪耳离体花柱切口处长出的花粉管, $\times 100$; B: 花粉管爆破后释放出的一对精细胞, $\times 800$; C: 释放出的精细胞呈现出FDA活性荧光, $\times 800$; D: 分离的7对精细胞, $\times 400$; E: 蓝猪耳的胚囊部分伸出胚珠, 示胚囊中的卵细胞和2个助细胞, $\times 400$; F: 分离的卵器3细胞, E为卵细胞; S为精细胞, $\times 400$; G: 分离的7个卵细胞, $\times 400$; H: 分离的卵细胞呈现出FDA活性荧光, $\times 400$; I: 1个精细胞(箭头)粘附在卵细胞上, $\times 800$; J: 多对粘附的精、卵细胞(箭头), $\times 100$; K: 4个排列的卵细胞, $\times 400$; L: 3个排列的精细胞, $\times 400$; M: 精细胞(箭头)粘附在卵细胞上, $\times 400$; N: 精细胞与卵细胞的融合(箭头), $\times 400$; O: 精细胞进入卵细胞(箭头), $\times 400$; P: 融合后的人工合子, 箭头示精细胞融合部位, $\times 800$; Q: 2个卵细胞(E)粘附, $\times 400$; R: 2个卵细胞开始融合, $\times 400$; S: 2个卵细胞的融合完成, $\times 400$; T: 2个卵细胞融合后的二核细胞, $\times 400$ 。

胞用显微操作仪转移至电融合槽内。为了保证精、卵细胞融合的成功率,每次用3~5个卵细胞进行融合实验(图1-J)。

2 精、卵细胞融合

精、卵细胞融合的过程可大致分为:排列,粘附,融合。将电融合仪先设置一定的交流电场参数(AC),电融合槽两极被加上了交流电场,使一定距离的精、卵细胞进行自动排列,最终二者粘附在一起(图1-I)。有时实施交流电压后,多个卵细胞排列(图1-K),有时多个精细胞排列(图1-L)。在设置好的直流电场(DC)脉冲1次或2次,使精、卵细胞的质膜穿孔融合,可见精细胞快速进入卵细胞,完成融合,持续时间1~2 s。

在融合过程中,先用解剖针对精、卵细胞进行人工配对,使二者距离靠近或粘附在一起,便于融合(图1-M、N、O、P)。若二者间的距离过远,则不发生排列,也就不发生融合。由于精、卵细胞体积相差较大,在相同的电场下,二者经常移动的距离相差较大,过远的距离使精卵细胞无法排列,影响了融合效率。即使在精、卵细胞粘附在一起的条件下,精、卵细胞融合情况也不稳定,有时可得到较高融合率,有时却无法融合成功。

对融合液的条件进行了优化选择。首先,在仅含甘露醇的溶液中诱导精、卵细胞融合时,尝试了56次在不同甘露醇浓度中的诱导融合实验,均未成功(表1)。在不加Ca²⁺的融合液中,已粘连在一起的精、卵细胞不能融合的原因是在电穿孔操作时相互弹开。不同浓度甘露醇(5%~6.5%)对精

表1 不同甘露醇浓度对精卵细胞和卵细胞之间融合的影响

Table 1 Effect of mannitol concentrations on sperm-egg and egg-egg fusion

甘露醇/%	精-卵细胞/(融合数/总数)	卵-卵细胞/(融合数/总数)
5.5	0/18	0/6
6.0	0/31	10/69
6.5	0/7	0/12

卵细胞的融合效率有明显影响。融合液中甘露醇浓度过低时,卵细胞易吸水膨胀而在较低融合电压下发生破裂;浓度过高时,精细胞通常发生皱缩而影响其活力。在6%甘露醇融合液中,精、卵细胞状态保持较正常,且融合产物状态佳。加入一定CaCl₂和酶后,精卵细胞相互弹开的现象消失。对融合液中的CaCl₂浓度进行了筛选:CaCl₂浓度较低时,随着浓度的增大,融合率升高;但超过0.04%时,融合率又下降。在0.04% CaCl₂融合液中精、卵细胞的融合率达到30% (3/10)。融合液中加入低浓度的纤维素酶和果胶酶,可明显增加精卵细胞的融合率(表2)。融合液中加入BSA(牛血清白蛋白)后,精、卵细胞间粘附性增强,但对于是否影响融合效果还需进一步确认。

3 卵细胞与卵细胞的融合

由于每次在电融合槽中放置了多个精细胞和卵细胞,卵细胞之间也有发生融合的可能。融合槽接通电源开始融合程序后,融合仪运行AC程序时,邻近的卵细胞之间和精细胞之间(2个或多个)也能自动排列成直线(图1-K、L),运行DC阶段时,

表2 不同甘露醇、CaCl₂、酶浓度对精卵细胞和卵细胞之间融合的影响

Table 2 Effects of differential concentrations of mannitol, calcium and enzymes on sperm-egg and egg-egg fusion

甘露醇浓度/%	CaCl ₂ 浓度/%	纤维素酶浓度/%	果胶酶浓度/%	精-卵细胞/(融合数/总数)	卵-卵细胞/(融合数/总数)
5.0	0.03	0.005	0.005	0/4	2/7
5.5	0.03	0.005	0.005	0/5	0/6
6.0	0.01	0.0025	0.0025	0/7	6/8
6.0	0.02	0.0025	0.0025	2/11	1/2
6.0	0.03	0	0	1/9	3/4
6.0	0.03	0.01	0.01	0/1	1/1
6.0	0.03	0.0025	0.0025	0/2	2/3
6.0	0.03	0.005	0.005	0/9	5/7
6.0	0.04	0.0025	0.0025	3/10	11/16
6.0	0.05	0.0025	0.0025	0/11	7/17
6.0	0.06	0.0025	0.0025	1/9	2/7

排列的卵细胞发生融合(图1-Q、R、S、T), 之后的融合产物由椭圆形变为圆形。从融合开始至融合产物变圆所需的时间从几秒到十几分钟不等, 推测与卵细胞状态和融合条件有关。

卵细胞之间在只含甘露醇的融合液中也能发生融合, 但是融合率较低(13.3%, 10/75), 且融合后的卵细胞易破裂。不同浓度的甘露醇对融合有影响, 浓度低于6%时, 几乎不发生融合; 高于6%时, 结果也不理想(表1)。蓝猪耳卵细胞分离的最适甘露醇浓度为7%, 融合液中甘露醇浓度稍低的渗透压有利于卵细胞的融合。在低渗透压溶液中, 卵细胞吸水稍有膨胀, 使细胞膜易被电穿孔。

融合液中没有 Ca^{2+} 卵细胞之间也可融合(表1), 但加入 Ca^{2+} 后可使卵细胞之间的融合率大幅增加。在0.01%~0.04% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 范围内可达70%以上的融合率。 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度高于0.04%时, 融合率下降(表2)。

4 人工合子的培养

精、卵细胞融合形成的融合产物(人工合子)数量很少, 培养其分裂再生植株的培养方法只能采用单细胞培养技术。在体内, 卵细胞受精后经历约1 d的休眠便开始分裂。但在我们的实验中, 离体合子培养1 d后没有分裂。绝大多数情况下, 人工合子培养1 d后已明显污染。虽然在合子培养中的器皿和培养基可进行消毒灭菌, 但在柱头和花粉管生长过程中的无菌操作很难掌握。授粉后的花柱用消毒液(升汞, 次氯酸钠等)处理时间短了, 无法保证彻底灭菌; 而处理时间长了, 又影响其中的花粉管生长。以我们现有条件还难以克服精细胞分离中的灭菌障碍。因此, 在我们的实验中, 尝试人工合子的培养实验未有进展。

讨 论

诱导精、卵细胞融合的技术是沿用以前体细胞杂交中的电融合和化学融合技术。首例离体受精实验中的精、卵细胞融合是Kranz等(1991a)采用电融合方法在玉米中获得成功的。在精、卵细胞的186次融合中, 融合率平均达79%。在助细胞与精细胞的21次融合中, 融合率为75%。在精细胞与精细胞的77次融合试验中, 融合率可高达85%。但在中央细胞与精细胞的15次融合中, 融合率为

55% (Kranz等1991b)。Kovács等(1995)在小麦离体受精试验中, 采用相同的融合方法, 精、卵细胞的平均融合率为30%左右, 最高达59%。在水稻离体受精实验中, 在1 043次精、卵细胞的电融合中, 平均融合率为86.6% (Uchiumi等2007)。在我们进行的蓝猪耳精、卵细胞融合实验中, 用电融合诱导的融合率平均为9% (7/78), 最高的达到30% (3/10) (表2)。与玉米、小麦和水稻精、卵细胞的融合结果相比, 蓝猪耳精、卵细胞的融合率较低。在蓝猪耳精、卵细胞电融合过程中, 卵细胞对渗透压较敏感, 在较低渗透压时, 操作脉冲穿孔时常发生卵细胞爆破的现象。单子叶植物的卵细胞中没有大液泡, 只有许多小液泡; 而双子叶植物的卵细胞中常有一个明显的大液泡。这种结构上的差异可能使双子叶植物卵细胞对融合条件要求更严格。

高 Ca^{2+} 也是诱导原生质体融合的常用方法之一。Kranz和Lörz (1994)用高钙($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$)和高pH (pH 11)的方法诱导玉米精、卵细胞融合, 在精、卵细胞相粘10~20 min后, 细胞融合发生, 融合过程不到1 s。但在 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ 和pH 6.0时, 精、卵细胞不发生融合。然而, Faure等(1994)用 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ 、pH 6.0~6.5诱导了玉米79.7%精、卵细胞融合。精、卵细胞相粘约4 min后发生融合, 整个过程不到10 s。用相同方法, 玉米精细胞与中央细胞的融合过程则不到1 s (Faure等1994)。Khalequzzaman和Haq (2005)用 $7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ 诱导18次水稻精、卵细胞融合, 其中有10次成功, 融合率达到55.6%。这几个实验都显示出 Ca^{2+} 在诱导玉米和水稻精卵细胞的效能。然而, 在双子叶植物烟草精、卵细胞融合试验中, 探索 Ca^{2+} 介导精、卵细胞融合的实验没有成功(Tian和Russell 1997)。这是否与单子叶植物和双子叶植物的卵细胞结构差异有关, 需要进行广泛研究。

在玉米、小麦和水稻的精、卵细胞电融合实验中, 融合液中只有甘露醇, 没有 Ca^{2+} , 表明玉米和小麦精卵细胞电融合中 Ca^{2+} 不是必需的。然而, 在本实验用蓝猪耳精、卵细胞进行的电融合实验中, Ca^{2+} 显示出其重要作用: 融合液中没有 Ca^{2+} , 56次精卵细胞融合实验均未获得成功(表1)。而加入0.04% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 后, 10次精卵细胞融合实验中有3次获得了成功(表2)。证明在蓝猪耳精卵细胞电

融合实验中, Ca^{2+} 起重要作用。这与玉米、小麦和水稻不同。本实验中 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度超过0.04%则将导致精、卵细胞的融合率下降。

参考文献

- 田惠桥, 朱学艺(2012). 被子植物生殖生物学. 北京: 科学出版社, 139~157
- Chen SH, Liao JP, Kuang AX, Tian HQ (2006). Isolation of two populations of sperm cells from the pollen tube of *Torenia fournieri*. *Plant Cell Rep*, 25: 1138~1142
- Chen SH, Yang YH, Liao JP, Kuang AX, Tian HQ (2008). Isolation of egg cells and zygotes of *Torenia fournieri* L. and determination of their surface charge. *Zygote*, 16: 179~186
- Faure J-E, Digonnet C, Dumas C (1994). An *in vitro* system for adhesion and fusion of maize gametes. *Science*, 263: 1598~1600
- Higashiyama T, Yabe S, Sasaki N, Nishimura Y, Miyagishima S, Kuroiwa H, Kuroiwa T (2001). Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science*, 293: 1480~1483
- Khalequzzaman M, Haq N (2005). Isolation and *in vitro* fusion of egg and sperm cells in *Oryza sativa*. *Plant Physiol Biochem*, 43: 69~75
- Kovács M, Barnabás B, Kranz E (1995). Electro-fused isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) gametes develop into multicellular structures. *Plant Cell Rep*, 15: 178~180
- Kranz E, Bautor J, Lörz H (1991a). *In vitro* fertilization of single, isolated gametes of maize mediated by electrofusion. *Sex Plant Reprod*, 4: 12~16
- Kranz E, Bautor J, Lörz H (1991b). Electrofusion-mediated transmission of cytoplasmic organelles through the *in vitro* fertilization process, fusion of sperm cells with synergids and central cells, and cell reconstitution in maize. *Sex Plant Reprod*, 4: 17~21
- 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
- Kranz E, Lörz H (1994). *In vitro* fertilization of maize by single egg and sperm cell protoplast fusion mediated by high calcium and high pH. *Zygote*, 2: 125~128
- Okuda S, Tsutsui H, Shiina I, Sprunck S, Takeuchi I, Yui R, Kasahara I, Hamamura Y, Mizukami A, Susaki D et al (2009). Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature*, 458: 357~362
- Tian HQ, Russell SD (1997). Micromanipulation of male and female gametes of *Nicotiana tabacum*: II. preliminary attempts for *in vitro* fertilization and egg cell culture. *Plant Cell Rep*, 16: 657~661
- Uchiumi T, Uemura I, Okamoto T (2007). Establishment of an *in vitro* fertilization system in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 226: 581~589
- Wang YY, Kuang A, Russell SD, Tian HQ (2006). *In vitro* fertilization as a tool for investigating sexual reproduction of angiosperms. *Sex Plant Reprod*, 19: 103~115