

从低温贮藏的玉米花粉中分离生活精细胞*

徐恒平 曹宗巽

(北京大学生命科学学院,北京 100871)

摘 要 从低温 (-20°C) 贮藏的玉米花粉中分离出的生活精细胞,其产量随贮藏时间的延长而降低。但是,从 -20°C 贮藏 24 h 以内的花粉,仍可分离到相当数量的生活精细胞。以新鲜花粉作对照,从贮藏 8 h 的花粉分离生活精细胞,相对产量可达 64%。

关键词 纯系玉米,花粉,低温贮藏,生活精细胞

中图分类号 Q94-33, Q945.6

随着植物生殖生物学的迅速发展,已从 30 多种植物中获得生活精细胞^[1-3],但都局限于少量(几克)花粉。为了从生物化学的角度分析配子植物精细胞与受精识别有关的表膜特异蛋白,我们实验室进行了一系列批量分离玉米及兰州百合生活精细胞的工作^[4,5]。由于玉米花粉在常温下很容易失活,其精细胞的分离需要立即进行,并在尽可能短的时间内完成,使在暑期进行的大量制备工作紧张而艰苦。在玉米盛花期,往往可以采到大量花粉,但限于人力及其他条件,不能全部用于分离精细胞,失去积累更多精细胞的机会。鉴于 Barnabas 等的实验结果^[6],即 -70°C 或 -196°C 贮藏一年的玉米花粉仍有 50% 保持活性,约 30% 具有受精能力。本文根据人力物力条件,试从 -20°C 贮藏的玉米花粉中分离生活的精细胞,以提高批量分离玉米生活精细胞的总产量及实验操作的灵活性。

1 材料与方法

1.1 花粉材料

纯系玉米 708 种子,由科学基金委王钦南教授和中科院遗传所林建兴教授提供,播于北京农大科学园。晴天上午 9~10 时采集花粉,过筛 ($100\mu\text{m}$) 及称重后,装入 50 mL 的离心管,加盖,用 Parafilm 膜密封,贮藏于 -20°C 至 8, 24, 48 或 96 h,用于分离精细胞,并以新鲜花粉作对照材料。

1.2 分离及观察

参考 Zhang 等^[7]及杨中汉等^[4]的方法并加以改进,即所藏花粉直接用缓冲低渗液 (0.44 mol/L Suc., 2 mmol/L Mes 和 0.1% BSA, pH 6.7) 胀破 (10 mL/g), 过滤 ($38\mu\text{m}$); 滤液铺于 50 mL 离心管中 6 mL 30% Percoll (Pharmacia) 溶液 (用缓冲低渗液配制) 上,离心 (7600 g , 4°C , 1 h), 用带有 16 号弯针头的注射器收集 0/30% Percoll 不连续梯度界面上的精细胞,以缓冲低渗液洗 (3600 g , 4°C , 20 min) 2 次,留取管底沉淀部分约 $200\mu\text{L}$; 取约 $50\mu\text{L}$, 经荧光素二醋酸酯 (FDA) 染色,用 Olympass BH-2 荧光显微镜对生活精细胞计数,并按 2500 粒 /mg 花粉估计花粉精细胞总数,进而计算生活精细胞产量^[8]。对照材料的

收稿日期: 1996-03-01

* 国家自然科学基金资助项目。

处理,是以含 3% 蔗糖的 BKS 细胞培养液 (BKS35)^[9] 温育 (26°C, 0.5 h) 后胀破,再作如上分离计数 全部实验重复 2~3 次。

2 结果与讨论

附表 从低温 (-20°C) 贮藏的玉米花粉中分离的生活精细胞产量

贮藏时间 (h)	花粉胀破率 (%)	生活精细胞产量 (%)	相对产量 (%)
0	> 95	23.4 ± 2.1	100
8	> 95	15.0 ± 0.6	64.1
24	> 95	9.1 ± 1.2	38.8
48	> 95	5.3 ± 0.8	22.6
96	> 95	2.7 ± 0.5	11.5

* 新鲜花粉作对照

由于新鲜玉米花粉直接用缓冲低渗液处理,只能部分胀破 (约 50%),故采用了 BKS35 温育后以缓冲低渗液处理 (26°C, 0.5 h),花粉胀

破率提高到 95% 以上。其胀破液经 30% 的 Percoll 不连续密度梯度离心,可得到 23.4% 的生活精细胞 (附表,图 2-a) 而对经不同时间低温贮藏的花粉,直接用缓冲低渗液处理 (26°C, 0.5 h),胀破率就可达 95% 以上 (图 1) 从低温贮藏的花粉分离生活的精细胞,其产量随贮藏时间延长而降低 (附表,图 2) 但从贮藏 24 h 以内的花粉仍可获得相当数量的生活精细胞。从贮藏 8 h 的花粉分离的生活精细胞约为 15%,即达到对照产量的 64%。就低温对花粉及精细胞的作用而言,一方面,显然其对花粉及精细胞有冷冻伤害作用,且随贮藏时间延长而加深,从而导致所分

离的生活精细胞产量下降;另一方面,低温也具有保存部分生活精细胞的作用。可能起抑制有关水解酶在离体条件下降解精细胞的作用。在较短时间内低温贮藏的花粉,不仅使有关水解酶对精细胞的降解作用受到抑制,而且,细胞所受冷冻伤害程度较轻,因而由其分离的生活精细胞的相对产量较高。这些结果对于缓解前述玉米精细胞批量分离操作的紧张性,增加精细胞总产量以满足有关精细胞表膜蛋白生化分析的需要,具有重要意义。此外,花粉的含水量在低温贮藏中至为关键。在 Barnabas 等人^[6]的实验中,将花粉含水量缓慢降低到鲜重的 30%,使其低温贮藏一年之久仍有部分生活

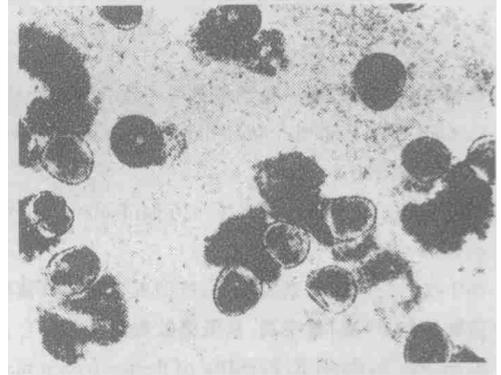


图 1 胀破的玉米花粉 (150×) 花粉经 -20°C 贮藏 8 h,直接用缓冲低渗液胀破 (26°C, 0.5 h)

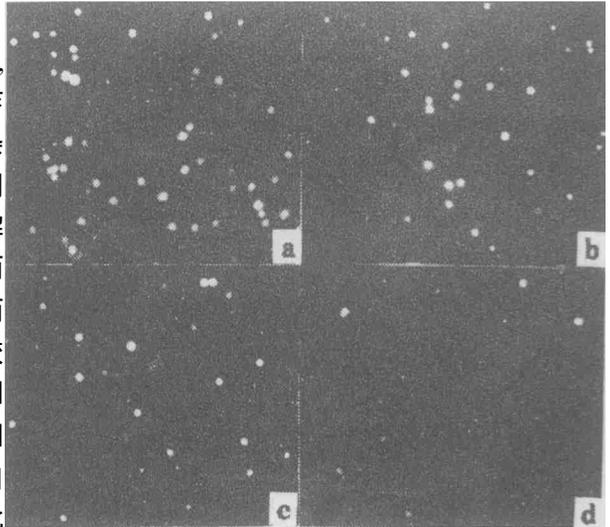


图 2 生活的玉米精细胞 (150×)

a. 从新鲜花粉分离; b~d 分别从 -20°C 贮藏 8, 24 和 48 h 的花粉分离,所分离的精细胞经 FDA 染色之后,用 Olympus BH-2 荧光显微镜观察。

花粉. 在作者的实验中, 低温贮存的玉米花粉均采取密封处理, 以防止花粉过度水合, 加深冷冻伤害, 从而降低生活精细胞的产量.

参 考 文 献

- 1 徐恒平, 曹宗巽. 被子植物雌雄配子及其表膜特异蛋白的研究进展. 大自然探索, 1995, 14(53): 50- 55
- 2 Russell S D. Isolation and characterization of sperm cells in flowering plants. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1991, 42 189- 204
- 3 Theunis C H, Pierson E S, Cresti M. Isolation of male and female gametes in higher plants. Sex Plant Reprod, 1991, 4 145- 154
- 4 杨中汉, 张一洪, 曹宗巽. 从三核型玉米花粉批量分离生活的精细胞. 科学通讯, 1994, 37(20): 1739- 1743
- 5 陈钟颖, 朱广廉, 曹宗巽. 从低温贮藏的兰州百合花粉中制备批量的生活精细胞. 植物学报, 1995, 37(8): 589- 593
- 6 Barnabas B, Rajki E. Fertility of deep- frozen maize pollen. Ann Bot, 1981, 48: 861- 864
- 7 Zhang G, Williams C M, Campenot M K, et al. Improvement of longevity and viability of sperm cells isolated from pollen of *Zea mays* L. Plant Physiol, 1992. 100 47- 53
- 8 Dupuis I, Roeckel P, Matthys-Rochon E, et al. Procedure to isolate viable sperm cells from corn *Zea mays* L. pollen grains. Plant Physiol, 1987, 85 826- 878
- 9 Brewbaker J L, Kwack B H. The essential role of calcium in pollen germination and pollen tube growth. Am J Bot. 1963, 50 859- 865

The Isolation of Viable Sperm Cells from Cryopreserved Pollen of *Zea mays* L.

Xu Hengping Cao T. H.

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing, P. R. China, 100871)

Abstract Although the yield of viable sperm cell of *Zea mays* L. decreases with the cryopreserving time of pollen at -20°C , certain amount of the viable sperm cells could still be obtained from the frozen pollen within 24 hours. The relative sperm yield from the pollen stored at -20°C for 8 hours could reach about 64%, compared with that from fresh pollen.

Key words *Zea mays* L., inbred line, pollen, cryopreservation, sperm cells