

技术与方法 Techniques and Methods

胡萝卜精、卵细胞、助细胞和中央细胞的分离

宋玉燕, 包晗, 陈美灵, 朱云, 田惠桥*

厦门大学生命科学学院, 厦门361005

摘要: 用两个解剖针挤压胡萝卜花粉使其破裂释放出精细胞。用酶解-解剖方法分离胡萝卜胚囊中的卵细胞、助细胞和中央细胞。胡萝卜胚珠先在酶液中酶解40~50 min, 然后将其转移到不含酶的分离液中进行解剖针解剖胚珠。将胚珠的合点端切破, 轻轻挤压胚珠的珠孔, 卵细胞、助细胞和中央细胞即可逸出。在最佳条件下, 20 min可从20个胚珠中分离出5个卵细胞。对分离胚囊细胞的渗透压和酶液成分进行了筛选。分离出的卵细胞用显微操作仪收集。胡萝卜精、卵细胞的成功分离为在双子叶植物中进行离体受精探索创造了条件。

关键词: 胡萝卜; 卵细胞; 精细胞; 助细胞; 中央细胞

Isolation of Sperms, Eggs, Synergids and Central Cells of Carrot (*Daucus carota* L.)

SONG Yu-Yan, BAO Han, CHEN Mei-Ling, ZHU Yun, TIAN Hui-Qiao*

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

Abstract: Carrot (*Daucus carota* L.) two sperms could be released by squeezing pollen grain using two dissecting needles. Viable egg cells, synergids and central cells of carrot were isolated using enzymatic digestion and mechanical dissection. The ovules were digested in enzymatic solution for 40–50 min, and then transported into the isolation solution without enzymes to dissect. When dissected ovules were sliced from their chalazal ends, eggs, synergids and central cells could be released by gently pushing ovule micropyle part. In optimal isolation condition, 5 egg cells could be isolated from 20 ovules during 20 min. The osmolality and enzymes in the enzymatic solutions were screened. The isolated egg cells could be collected using micromanipulator for preparation of molecular biology of egg cell of carrot. The isolation of egg cell of carrot will make a great chance for *in vitro* fertilization in a dicot plant.

Key words: carrot (*Daucus carota* L.); egg cell; sperms; synergid; central cell

高等植物的双受精过程发生在子房内的胚珠深处。对高等植物受精机制的认识还不清楚。将高等植物的精、卵细胞分离出来, 在没有其他组织影响的单细胞水平上探索受精发生过程, 为研究高等植物的受精机制提供有效手段(田惠桥2003)。分离的卵细胞不仅可用于开展离体受精研究, 也提供了用分子生物学方法研究被子植物卵细胞和合子发育的实验基础(Wang等2006)。胡适宜等(1985)首次从烟草中分离出高等植物的生活卵细胞。Kranz等(1991)用分离的玉米精、卵细胞体外诱导融合并在两年后成功地再生出可育植株(Kranz和Lörz 1993)。然而, 被子植物卵细胞的分离操作并不容易, 到目前为止, 也只在10余种被子植物中分离出了生活卵细胞(Wang等2006)。2007年才在水稻中成功地建立了第2例高等植物的离

体受精实验体系(Uchiumi等2007)。双子叶植物的离体受精技术至今仍是空白。胡萝卜是一种双子叶伞形科植物。目前国外胡萝卜品种大多为杂交种, 有些甚至无雄蕊。在种植进口胡萝卜的地区, 每年购买种子的费用占了很大的生产成本。需要探索生产优质胡萝卜种子技术。本文介绍胡萝卜精细胞、卵细胞、助细胞和中央细胞的分离操作技术, 为建立胡萝卜的离体受精实验体系创造了条件, 也为用分子生物学方法深入研究胡萝卜受精调控机制打下基础。

收稿 2011-10-17 修定 2011-11-14

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

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

材料与方 法

实验材料为胡萝卜(*Daucus carota* L.)日本杂交种‘坂田7寸’(‘Sakata 316’)和国内品种‘早春红冠’(由河北省大禹种业有限公司生产)。(‘坂田7寸’是杂交种,只有雌蕊,没有雄蕊,只能用于胚囊细胞的分离。‘早春红冠’具有雄蕊,用于分离精细胞。10月中旬将两个品种胡萝卜种子播种于厦门大学植物园,到第2年4月开花。

胡萝卜子房下位,胚珠位于表皮带刺的子房内。选取开花当天的小花,剥出胚珠,置于酶液中,振荡酶解40~50 min。酶液的基本成分为:0~1.5%纤维素酶(cellulase RS, Onozuka),0~1.5%半纤维素酶(hemi-cellulase, Sigma),0~0.4%果胶酶(pectolyse Y-23),0~1.5%果胶酶(pectinase, Serva)和7%~13%甘露醇(W/V)。酶解后,将胚珠转移至不含酶的分 离液中进行解剖。分离液的基本成分:0.04% CaCl₂,1%牛血清白蛋白(BSA),7%~13%甘露醇(W/V)。在倒置显微镜(Leica DM IRB)下用自制解剖针对胚珠进行横切并轻轻挤压胚珠的珠孔部位,胚囊里的卵细胞、助细胞和中央细胞即从中逸出。分离出的胚囊细胞用0.5 μg·mL⁻¹的荧光素二醋酸酯(FDA)染色处理,测定其活性。用Leica DC-180显微操作仪将分离的胚囊细胞收集、转移。分离液的渗透压用自动冰点渗透压仪OSMOMAT 030测量。

实验结果

1 精细胞分离

‘早春红冠’胡萝卜的花粉呈棒状(图1-A),萌发孔位于中央。采用了多种方法尝试分离胡萝卜的精细胞。(1)直接爆破法:将花粉分别放入3%、5%、10%、20%的甘露醇溶液中,都有部分花粉细胞质从萌发孔处缓慢流出,但流出的花粉细胞质粘成团,精细胞被裹在其中难以释放和区分。(2)渗透压冲击法:将花粉先分别用10%和20%的甘露醇温育10 min,然后加入等量的水进行渗透压冲击,虽然有较多的花粉爆破,但没有精细胞释放。(3)匀浆法:花粉分别在5%以及7%的甘露醇溶液 中用匀浆器研磨,但在浑浊的研磨液中很少看到精细胞。(4)机械挤压法:在7%甘露醇中用两个解剖针轻轻挤压花粉粒(图1-B),可使一些花粉爆发式地爆破,在流出的细胞质中释放出一对精细胞(图

1-C、D)。刚释放的精细胞为条状,但在几秒钟内变为圆形。用这种机械挤压法可在30 min使约40个花粉粒爆破。但将释放出的精细胞用FDA荧光染料处理后,分离精细胞的FDA荧光十分微弱。

2 卵细胞、助细胞和中央细胞的分离

‘坂田7寸’胡萝卜是日本培育的一个杂交种,没有雄蕊(图1-E)。自然条件下不结种子。该胡萝卜被用于分离卵细胞。胡萝卜的花柱比较特殊,两个花柱的下端形成两个膨大体(图1-F)。其二室子房下位,每室中着生1个胚珠(图1-G)。通常在10 min内可剥出20个胚珠(图1-H)。将胚珠置于酶液中酶解40~50 min。然后转移到不含酶液的分 离液中用解剖针解剖。除不含酶以外,分离液与酶液的其他成分相同(甘露醇为渗透压调节剂,补充CaCl₂和牛血清白蛋白)。胚珠经酶解后,可看到内部的胚囊轮廓,为切割胚珠确定了位置。用解剖针在胚珠中部或偏合点端横切,将胚珠切成两半,然后挤压胚珠的珠孔端,使胚囊细胞从切口处释放。由于胚囊细胞的体积较大并且形态特异,逸出的卵细胞很容易与离散的珠心体细胞区别。释放出的3个卵细胞中,卵细胞的体积最小,细胞中有一个明显的大液泡将细胞核挤到细胞周缘区域,形成明显的极性。两个助细胞的体积较大些,细胞内部没有大液泡。两个助细胞的体积有一些差异(图1-I)。分离的3个卵细胞30 min后用测量细胞活性的荧光染料FDA染色,仍呈现出明显的荧光,证明分离的胡萝卜卵细胞具有较强的活力(图1-J)。用显微操作仪可以将卵细胞和助细胞分开,达到分离卵细胞的目的。在10%的甘露醇溶液中(渗透压约为0.638 mOsmol·kg⁻¹),分离的卵细胞的状态很好(图1-K、L)。通常解剖20个胚珠约需要20 min。用显微操作仪可将分离的卵细胞收集成群体(图1-M、N)。

在对胚珠的切割过程中,如果在胚珠合点端用解剖针划的切口合适,不伤及中央细胞,随着挤压胚囊珠孔端,中央细胞也会从切口处逸出(图1-O、P)。

3 胚囊细胞分离条件的筛选

在分离胚囊细胞的实验中,对分离条件进行了筛选。首先对酶液和分离液的渗透压进行了筛选。根据我们以往的经验,胚囊细胞的渗透压较高。在7%以下的甘露醇分离液中解剖胚珠,没有胚囊细胞的释放。在7%甘露醇分离液中(渗透压

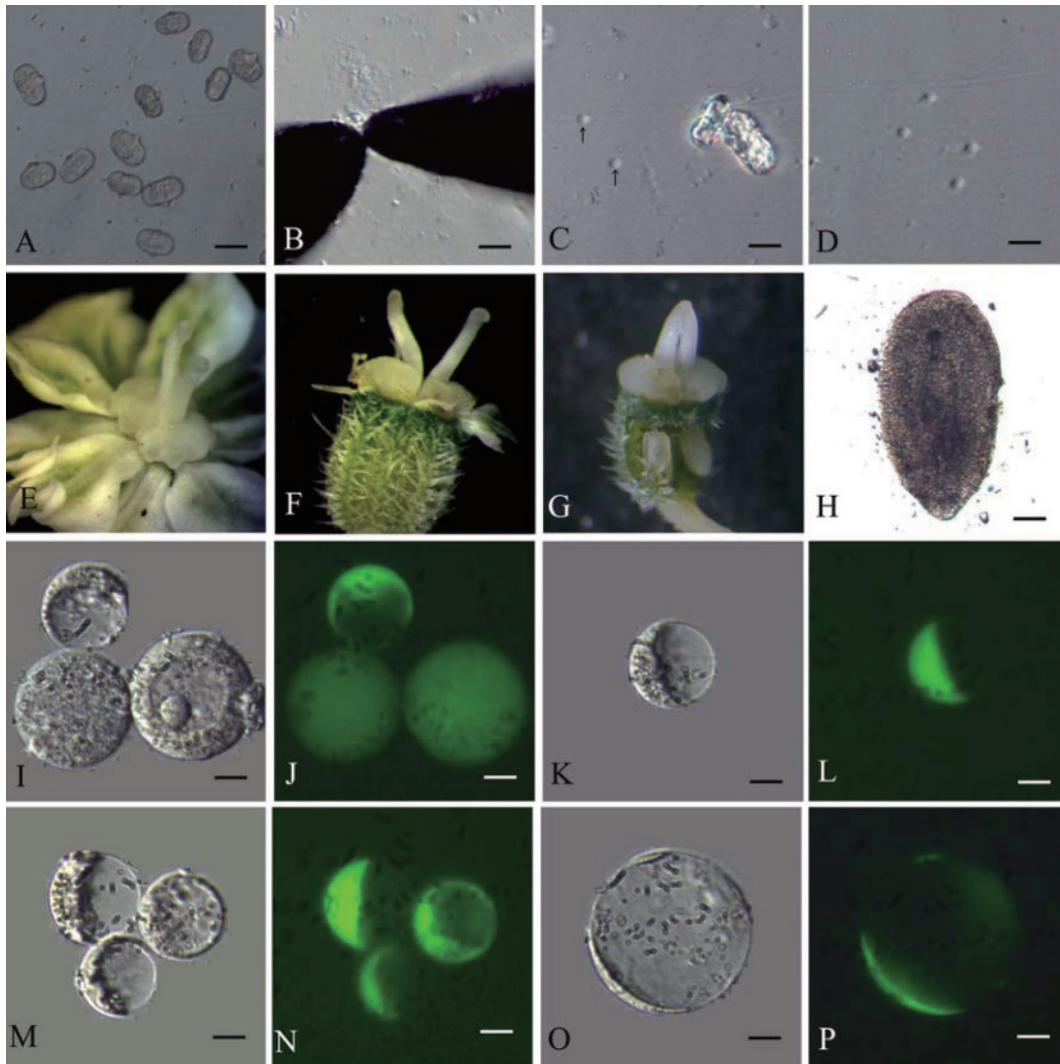


图1 胡萝卜精、卵细胞、助细胞和中央细胞的分离

Fig.1 Isolation of sperms, eggs, synergids and central cells of carrot

A: 胡萝卜“早春红冠”的花粉($\times 600$, 标尺=40 μm); B: 用两个解剖针挤压花粉($\times 600$, 标尺=40 μm); C: 花粉释放出的两个精细胞(箭头)($\times 1\ 200$, 标尺=20 μm); D: 收集的4个精细胞($\times 1\ 200$, 标尺=20 μm); E: 胡萝卜“坂田7寸”的花, 没有花药; F: 剥去花冠后的胡萝卜子房及花柱; G: 剥去子房壁后显示两个胚珠的位置; H: 剥出的胡萝卜胚珠($\times 100$, 标尺=100 μm); I: 从胚珠中分离的卵器三细胞($\times 1\ 200$, 标尺=8 μm); J: 卵器三细胞呈现的FDA荧光($\times 1\ 200$, 标尺=8 μm); K: 从卵器三细胞中分离的卵细胞($\times 1\ 200$, 标尺=8 μm); L: 分离卵细胞呈现的FDA荧光($\times 1\ 200$, 标尺=8 μm); M: 收集的三个卵细胞($\times 1\ 200$, 标尺=8 μm); N: 三个分离卵细胞呈现的FDA荧光($\times 1\ 200$, 标尺=8 μm); O: 分离的中央细胞($\times 1\ 200$, 标尺=8 μm); P: 中央细胞呈现的FDA荧光($\times 1\ 200$, 标尺=8 μm)。

约为 $0.462\ \text{mOsmol}\cdot\text{kg}^{-1}$), 从18个胚珠中分离出2个卵细胞和1个助细胞, 没有中央细胞释放。卵细胞和助细胞被分离出来后很快膨大、破裂。这些从低渗溶液中分离出的卵细胞和助细胞在活性检测中, 具有生活力的时间也较短。而在13%甘露醇分离液中(渗透压约为 $0.860\ \text{mOsmol}\cdot\text{kg}^{-1}$), 从12个胚珠中分离出了5个卵细胞和5个助细胞。结合胚囊细胞的分离效果和分离出的卵细胞的生活状态, 在酶

液和分离液中加入10%的甘露醇较为适宜。酶液和分离液渗透压对分离胚囊细胞的影响见表1。

解剖胚珠是分离卵细胞的关键步骤。在没有酶的情况下, 很难解剖胚珠。加入适当的酶, 经过一段时间的酶解后, 解剖胚珠的操作较容易进行。不同酶的组合和浓度对分离效率有明显影响。果胶酶(Y-23)的酶解性能非常强, 对于胚珠体细胞的软化有重要作用, 没有果胶酶(Y-23), 仅用

表1 渗透压调节剂对分离胚囊细胞的影响

Table 1 Effect of osmotic regulator on the isolation of embryo sac cells

甘露醇浓度/%	胚珠数	卵细胞数	助细胞数	中央细胞数
7	18	2	1	0
10	21	3	3	1
13	12	5	5	0

在0.04% CaCl₂、1% BSA、1%纤维素酶、1%半纤维素酶、1%果胶酶(Serva)和0.2%果胶酶(Y-23)的条件下, 不同渗透压对胚囊细胞分离的结果。

其他酶很难剥出胚囊。对0.2%~0.4%的果胶酶(Y-23)进行了筛选, 发现0.2%的果胶酶(Y-23)分离效果较好。增加该酶浓度并不能增加分离卵细胞的数量(表2)。而且该酶过高时, 对分离的卵细胞活性有一定影响(保持FDA荧光的时间较短)。

在分离液中, 纤维素酶对分离胚囊细胞也有

表2 果胶酶(Y-23)对分离胚囊细胞的影响

Table 2 Effect of pectolyse (Y-23) on the isolation of embryo sac cells

果胶酶(Y-23)浓度/%	胚珠数	卵细胞数	助细胞数	中央细胞数
0	19	1	1	0
0.2	20	4	0	1
0.3	20	3	0	1
0.4	23	3	4	1

在10%甘露醇、0.04% CaCl₂、1% BSA、1%纤维素酶、1%半纤维素酶和1%果胶酶(Serva)的条件下, 不同浓度的果胶酶(Y-23)对胚囊细胞分离的结果。

一定影响, 随着纤维素酶的浓度增加, 分离的卵细胞数量也增加。但纤维素酶浓度过高似对助细胞的分离不利, 在超过0.5%的纤维素酶液中, 助细胞很难分离(表3)。

在酶液中还加入了普通果胶酶(Serva), 随着该酶浓度的增加, 分离的卵细胞也有一定增加, 另外加入该酶对助细胞的分离也有一定效果(表4)。但如果该酶含量过高, 则分离出来的卵器细胞不仅是细胞间粘连紧密, 而且淀粉颗粒物质也容易粘附于细胞表面。这样不利于从卵器中分离卵细胞。

在酶液中没有半纤维素酶时, 虽然也能分离出卵细胞, 但在加入0.5%的半纤维素酶后, 从14个胚珠中分离出了3个卵细胞(21.42%)。然而, 再增加半纤维素酶浓度并不能提高分离卵细胞的数量(表5)。

表3 纤维素酶对分离胚囊细胞的影响

Table 3 Effect of cellulase on the isolation of embryo sac cells

纤维素酶浓度/%	胚珠数	卵细胞数	助细胞数	中央细胞数
0	18	2	1	0
0.5	18	2	3	0
1.0	20	3	0	0
1.5	21	4	0	0

在10%甘露醇、0.04% CaCl₂、1% BSA、1%半纤维素酶、1%果胶酶(Serva)和0.2%果胶酶(Y-23)的条件下, 不同浓度的纤维素酶对胚囊细胞分离的结果。

表4 果胶酶(Serva)对分离胚囊细胞的影响

Table 4 Effect of pectinase (Serva) on the isolation of embryo sac cells

果胶酶(Serva)浓度/%	胚珠数	卵细胞数	助细胞数	中央细胞数
0	19	3	0	0
0.5	18	2	2	1
1.0	19	4	1	1
1.5	22	4	2	0

在10%甘露醇、0.04% CaCl₂、1% BSA、1%半纤维素酶、1%纤维素酶和0.2%果胶酶(Y-23)的条件下, 不同浓度的果胶酶(Serva)对胚囊细胞分离的结果。

表5 半纤维素酶浓度对分离胚囊细胞的效果

Table 5 Effect of hemi-cellulase on the isolation of embryo sac cells

半纤维素酶浓度/%	胚珠数	卵细胞数	助细胞数	中央细胞数
0	20	2	2	0
0.5	14	3	0	0
1.0	19	2	0	0
1.5	21	3	0	0

在10%甘露醇、0.04% CaCl₂、1% BSA、1%纤维素酶、1%果胶酶(Serva)和0.2%果胶酶(Y-23)的条件下, 不同浓度的半纤维素酶对胚囊细胞分离的结果。

综合上述筛选结果, 胡萝卜胚囊细胞分离的渗透压以10%甘露醇附加0.04%氯化钙和1%牛血清白蛋白较为合适。离析胚珠的酶液成分和浓度以1%纤维素酶、0.5%半纤维素酶、1%果胶酶(Serva)和0.2%果胶酶(Y-23)较为适宜。

讨 论

高等植物精、卵细胞的分离是开展离体受精研究的前提, 也是利用分子生物学方法研究卵细胞发育机理的实验基础(Wang等2006)。然而, 目

前高等植物的离体受精只在玉米和水稻两种单子叶植物中获得成功,其受精特征能否代表双子叶植物需在双子叶植物中进行探索。本实验中胡萝卜精、卵细胞以及中央细胞的成功分离为在胡萝卜中开展离体受精实验克服了主要的技术障碍。

植物胚囊中的渗透压比一般体细胞高(van Went和Kwee 1990; Imre和Kristof 1999)。不同植物的胚囊最适渗透压不同。分离胚囊中的卵细胞和其他细胞时,分离液中的渗透压值需要进行筛选。分离液中渗透压过低时,胚囊中的细胞难释放,在操作时胚囊细胞易破裂。分离液中渗透压过高时,释放的胚囊细胞易收缩,对细胞生活力的损伤也较大。分离液中合适的渗透压不仅要易释放胚囊细胞,也要考虑对分离胚囊细胞的活性影响尽可能小些。同时还要考虑与分离精细胞的溶液渗透压相匹配,为以后的精、卵细胞融合做准备。在胡萝卜卵细胞分离中,以10%甘露醇的渗透压较为合适。

用机械解剖法分离卵细胞的报道很少。大多数卵细胞分离实验需要用酶分解胚珠体细胞组织(Theunis等1991)。在葱的卵细胞分离实验中,果胶酶(Y-23)非常重要,若不加此酶,即使有其他酶成分,外珠被仍不能被彻底酶解掉。但是该酶的浓度若大于0.5%,外珠被被彻底酶解的同时对卵器细胞也造成了较大的伤害,导致以后在卵细胞的分离中,挤压出来的卵细胞或助细胞很容易破裂。酶液中的纤维素酶(cellulase RS)浓度过高时,会使得卵器与内珠被细胞之间、卵细胞与助细胞之间易发生粘连,在分开卵器三细胞的过程中造成卵细胞的破裂。而半纤维素酶(hemi-cellulase)

则与内珠被的最外层细胞酶解有关,没有半纤维素酶或其浓度过低时,内珠被外膜很难被解剖针切开,从而也影响分离卵细胞的效果(菅明霞等2009)。在本实验中,胡萝卜卵细胞和中央细胞分离时的最佳酶液成分和浓度为1%纤维素酶、0.5%半纤维素酶、1%果胶酶(Serva)和0.2%果胶酶(Y-23),20个胡萝卜胚珠经酶液处理后可在20 min分离出5个卵细胞。这将确保进行离体受精的操作所需,也为研究胡萝卜卵细胞的基因表达的分子生物学实验提供一定数量的卵细胞。

参考文献

- 胡适宜,李乐功,朱微(1985).烟草生活胚囊及胚囊原生质体的分离.植物学报,27(4):337-344
- 菅明霞,张亚楠,王雅英,田惠桥(2009).葱卵细胞的分离.植物学报,44(3):345-350
- 田惠桥(2003).高等植物离体受精研究进展.植物生理与分子生物学学报,29:3-10
- Imre K, Kristof Z (1999). Isolation and osmotic relations of developing megagametophytes of *Torenia fourieri*. Sex Plant Reprod, 12: 152-157
- Kranz E, Bautor J, Lörz H (1991). *In vitro* fertilization of single, isolated gametes of maize mediated by electrofusion. Sex Plant Reprod, 4: 12-16
- 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
- Theunis CH, Pierson ES, Cresti M (1991). Isolation of male and female gametes in higher plants. Sex Plant Reprod, 4: 145-154
- Uchiumi T, Uemura I, Okamoto T (2007). Establishment of an *in vitro* fertilization system in rice (*Oryza sativa* L.). Planta, 226: 581-589
- Van Went JL, Kwee HS (1990). Enzymatic isolation of living embryo sacs of *Petunia*. Sex Plant Reprod, 3: 257-262
- 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