蝴蝶兰合子和胚的分离

伍成厚1,2 李冬妹3 田惠桥1*

(1厦门大学生命科学学院,厦门361005;2广州市园林科学研究所,广州510405;3顺德职业技术学院,顺德528300)

摘要 该文用酶解-振荡法分离蝴蝶兰受精后的胚囊,然后显微解剖出合子、早期原胚及接近成熟的球形原胚。酶解液由0.7%~1.3%的纤维素酶、0.6%~1.0%果胶酶和10%甘露醇组成, pH5.8, 酶解时间20~30 min。分离的蝴蝶兰早期原胚和接近成熟的球形原胚均发现有发达的胚柄 吸器。

关键词 蝴蝶兰; 合子; 原胚; 胚柄吸器; 分离操作

受精和胚胎发生是植物发育的一个重要过程, 通过一系列的细胞融合、伸长、分裂和分化,完成植物的器官分化。通过分离合子和原胚可以为研究植物受精和胚胎发生提供很好的实验材料。被子植物的合子深藏在子房内的胚珠体细胞组织中,要分离合子需要排除胚珠细胞的阻碍,分离技术相对困难, 目前仅在水稻(Oryza sativa)^[1]、玉米(Zea mays)^[2]、小麦(Triticum aestivum)^[3]、烟草(Nicotiana tabacum)^[4]、蓝猪耳(Torenia fournieri)^[5]等少数植物上取得成功。近年来,人们结合分子生物学、转基因等技术利用分离的植物早期原胚开展了水稻^[6-7]、玉米^[8]、小麦^[9]、烟草^[10]、拟南芥(Arabidopsis thaliana)^[11-12]等植物的胚胎发生、基因转化和杂交优势预测等诸多研究。

作为重要观赏植物的兰花迄今未见合子与原 胚分离工作的报道。本文以蝴蝶兰杂交种(Phalaenopsis hybrid)为材料,采用酶解-振荡法分离受精后 的胚囊,继之以显微解剖分离出合子、早期原胚及 接近成熟的球形原胚。

1 材料与方法

1.1 实验材料

蝴蝶兰杂交种引自中国科学院华南植物园, 栽 培在广州市园林科学研究所的水帘温室。在蝴蝶兰 的开花期间进行人工授粉, 每个花葶授基部2朵花, 并将花葶其余部分剪除, 温室内正常管理授粉后的 植株, 授粉后60~110 d从发育正常的蒴果内剥取胚 珠作为实验材料。

1.2 实验方法

蝴蝶兰合子与胚的分离实验在厦门大学进行。基本分离液的成分为: CaCl₂ 5 mmol/L, KH₂PO₄ 5 mmol/L,

MnSO₄ 0.7 mmol/L, 2-N-吗啡啉乙磺酸(MES) 3 mmol/L, 8%~10%(W/V)的甘露醇。在基本分离液中,加入果 胶酶(Serva)和纤维素酶(Onozyka R-10), 配成含酶的 分离液(pH5.8)。实验进行了3个酶解浓度:(1)0.7%纤 维素酶+0.6%果胶酶; (2)1.0%纤维素酶+0.9%果胶酶; (3)1.3%纤维素酶+1.0%果胶酶。将不同时期、不同 处理的材料置于微振荡仪上室温酶解。为观察酶解 液对珠被细胞分离的效果,进行酶解振荡0.5,1,2,3h 的时间梯度实验。合子和早期原胚显微解剖前酶解 -振荡20~30 min, 分离接近成熟的球形原胚不酶解 而是直接进行解剖。之后在倒置显微镜(Leica DM IRB)下,将用于分离的胚珠置于10%甘露醇中,用自 制玻璃针直接解剖胚囊, 使合子与胚分离出来。应 用1 mg/mL的4,6-二氨基-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phyenylindole, DAPI), 以1/100的量染色细胞核, 采 用蓝色光激发观察荧光,以数码成相系统进行观察 与摄影。

2 结果

2.1 蝴蝶兰合子的分离

酶解-振荡蝴蝶兰的胚珠0.5 h后, 3个酶解浓度处 理均有珠被细胞被分离出来。随着酶解时间的延长, 珠被细胞被大量分离。酶解3 h观察, 3组被分离出来 的珠被细胞原生质体均完好, 呈球形, 细胞核居中或 靠边, 并有个别仅具有一层不完整珠被细胞的胚囊被 酶解出来, 但没有见到被分离出来的合子。

广东省科技计划项目(No.2007B020801007)和广州市科技计划项目(No.11A63030233)资助项目

收稿日期: 2011-10-31 接受日期: 2012-02-06

^{*}通讯作者。Tel: 0592-2186486, E-mail: hqtian@jingxian.xmu.edu.cn

应用1.0%纤维素酶+0.9%果胶酶酶解-振荡0.5 h, 结合显微解剖分离出蝴蝶兰的受精后胚囊。蝴蝶兰 授粉65~70 d, 在分离胚囊的珠孔端仍有花粉管存在 (图1A)。刺破胚囊的侧壁,可以分离出合子,在分离 液甘露醇浓度为10%时分离出来的合子近似圆球形 (图1B)。



A: 解剖的受精后胚囊, 示合子、助细胞、胚乳核、反足细胞和花粉管; B: 解剖的合子; C: 解剖的2-细胞原胚, 示顶细胞、基细胞和退化的胚乳核; D: DAPI显示2-细胞原胚的核; E: 解剖的2-细胞原胚, 示顶细胞和基细胞; F: DAPI显示2-细胞原胚, 示基细胞核正在分裂。A~F珠孔端均朝下。An: 反足细胞; ca: 顶细胞; cb: 基细胞; EN: 胚乳核; pt: 花粉管; S: 助细胞; Z: 合子。

A: a fertilized embryo sac obtained by micro-dissection, showing the zygote, synergid, antipodals and an entering pollen tube; B: a micro-dissected zygote; C: a micro-dissected two-cell proembryo, showing the apical cell, the basal cell, and the degernerating endospermal nucleus; D: the fluorescence of DAPI showing the nuclei of a two-cell proembryo; E: a micro-dissected two-cell proembryo, showing the apical cell and the basal cell; F: the fluorescence of DAPI showing the nuclei of a two-cell proembryo, the nucleus of the basal cell was dividing. Micropylar downward in A~F. An: antipodals; ca: apical cell; cb: basal cell; EN: endospermal nucleus; pt: pollen tube; S: synergid; Z: zygote.

图1 蝴蝶兰合子和2-细胞原胚的分离

Fig.1 Isolation of zygote and two-cell proembryo in Phalaenopsis

2.2 蝴蝶兰胚的分离

以酶液浓度为1.0%纤维素酶+0.9%果胶酶酶 解-振荡20~30 min,结合人工解剖法,可以分离出蝴 蝶兰的早期原胚,接近成熟的球形原胚可以不酶解 而直接解剖出来。

授粉72 d, 可以分离出2-细胞原胚, 此时基细胞

尚未分裂,仍可看到正在退化的初生胚乳核(图1C和 图1D)。授粉后73 d,亦可以分离出2-细胞原胚,此时 基细胞已经开始分裂,胚囊内已经见不到胚乳核的 痕迹(图1E和图1F)。 授粉后75~90 d, 可以分离出蝴蝶兰的3-细胞原 胚(图2A)、4-细胞原胚(图2B)、多细胞原胚(图2C和 图2D)及接近成熟的球形原胚(图2E)。

从分离的早期原胚可以看出, 蝴蝶兰合子的第



A: 3-细胞原胚, 示顶细胞和基细胞分裂的两个子细胞; B: 4-细胞原胚, 示顶细胞分裂的两个子细胞和基细胞分裂的两个子细胞; C: 授粉80 d的 多细胞原胚; D: 授粉85 d的多细胞原胚; E: 授粉87 d的接近成熟的球形原胚和胚柄吸器; F: 球形原胚(图2E)放大的胚柄吸器。除图F外, 珠孔端 均朝下。ca: 顶细胞; ci: 基细胞分裂的一个子细胞; cm: 基细胞分裂的另一个子细胞; c: 顶细胞分裂的一个子细胞; d: 顶细胞分裂的另一个子细 胞; sh: 胚柄吸器。

A: a three-cell proembryo, showing the apical cell and two daughters of the basal cell; B: a four-cell proembryo, cm and ci showing two daughters of the apical cell, c and d showing the daughters of the basal cell; C: a multicellular proembryo after pollinated 80 days; D: a multicellular proembryo after pollinated 85 days; E: a maturing spherical proembryo and its suspensor haustorium after pollinated 87 days; F: the enlarged suspensor haustorium of the spherical proembryo (Fig.2E). Micropylar downward in all figures excepted of Fig.2F. ca: apical cell; c: one daughter of the basal cell; c: another daughter of the basal cell; d: another daughter of the apical cell; sh: suspensor haustorium.

图2 蝴蝶兰原胚的分离 Fig.2 Isolation of proembryo in *Phalaenopsis* 一次分裂是横分裂,形成顶细胞和基细胞,即2-细胞 原胚(图1C和图1D)。基细胞先于顶细胞进行分裂 (图1E和图1F),其分裂是斜向的,从而形成3-细胞原 胚(图2A)。随后,顶细胞进行一次横向的分裂形成4-细胞原胚(图2B)。

在分离蝴蝶兰各期原胚的珠孔端均可见到发 达的胚柄吸器,在接近成熟的球形原胚的胚柄吸器 上还有一个吸管,管内充满内含物(图2E和图2F)。 虽然在刚受精胚囊中,其珠孔端可以看到花粉管进 入胚囊(图1A),但在其后分离的2-细胞至多细胞原 胚中均未见残留的花粉管,因此该"吸管"(图2F)应不 是残留的花粉管,而是特化的管状胚柄吸器。

3 讨论

被子植物合子的分离是利用合子进行培养与遗 传转化研究的前提,也是由此构建其cDNA文库开展 受精前后基因表达研究的起点,具有重要的意义。在 水稻^[1,13-15]、玉米^[16]、小麦^[9,15,17-18]、烟草^[19-20]等植物中, 由于已成功地开展了合子的分离,在细胞生物学和分 子生物学研究中取得了新的进展。蝴蝶兰的胚珠虽 然细小,但由于一个蒴果内含有数以万计的发育基本 同步的胚珠,可以为合子的分离提供丰富的材料。蝴 蝶兰在开花时雌配子体尚未形成, 需要通过授粉刺 激,子房才开始膨大,逐步分化出胚珠原基,进而分化 出胚囊,从授粉到胚囊发育成熟约需63 d^[21-22],也即人 工授粉后约需2个月才可以进行合子的分离。但另 一方面, 蝴蝶兰受精后合子通常有一段较长的休眠 时间(约7 d),这样可以给合子分离比较充裕的时间, 同时也便于研究合子在休眠期的一系列变化及如何 启动合子分裂等生命起源的基本问题。分离的幼胚 可用于基因转化,也是对杂交胚发育进行分子生物 学研究的极好材料[6-12]。蝴蝶兰是重要的观赏兰花, 目前主要通过杂交育种培育新品种。本文通过酶解-振荡分离出蝴蝶兰胚囊后,利用显微解剖分离出合 子和原胚, 使分离合子和原胚的离体培养成为可能, 从而为人们进一步利用离体培养的合子和早期原胚 进行基因转化和定向培育蝴蝶兰新品种打下基础。

蝴蝶兰合子第一次分裂与云南兜兰(Paphiopedilum godefroyae)^[23]、墨兰(Cymbidium sinense)^[24]、乌 天麻(Gastrodia elata)^[25]相同,均为横分裂,形成两个 细胞即顶细胞和基细胞。但蝴蝶兰顶细胞和基细胞 的分裂方式与云兰兜兰、墨兰、乌天麻均有较大差 异: 云南兜兰的顶细胞和基细胞均为横向分裂; 墨兰 顶细胞先纵向分裂, 基细胞再横分裂; 而乌天麻是基 细胞先横分裂, 顶细胞再纵向分裂。

蝴蝶兰胚发育的营养来源于哪里呢? 胚和胚乳 同是双受精的产物, 胚最后成为新一代独立生活的 孢子体, 而胚乳则是作为一种特殊的营养组织, 或迟 或早被胚的发育吸收而不复存在。在缺少胚乳的种, 例如兰科、河苔草科和菱草科的植物, 常常存在特 殊的结构, 代替胚乳的作用, 以保证胚胎发育的营养 来源^[26]。在本实验中, 蝴蝶兰胚乳核在2-细胞原胚 时期即退化, 而在蝴蝶兰分离的幼胚和接近成熟的 球形原胚中, 均见到有发达的胚柄吸器, 显示其具有 胚乳那样从周围组织吸收营养的功能。

参考文献 (References)

- Zhao J, Zhou C, Yang HY. Isolation and *in vitro* culture of zygotes and central cells of *Oryza sativa* L. Plant Cell Rep 2000; 19(3): 321-6.
- 2 Mòl R, Matthys-Rochon E, Dumas C. Embryogenesis and plant regeneration from maize zygotes by *in vitro* culture of fertilized embryo sacs. Plant Cell Rep 1995; 14(12): 743-7.
- 3 Kumlehn J, Lörz H, Kranz E. Differentiation of isolated wheat zygotes into embryos and normal plants. Planta 1998; 205(3): 327-33.
- 4 傅春梅,孙蒙祥,周 嫦,杨弘远.烟草受精后胚囊和合子的分 离及合子的离体分裂.植物学报 1996; 38(4): 262-7.
- 5 陈素红,杨延红,廖景平,田惠桥.蓝猪耳卵细胞和合子的分 离.植物生理与分子生物学学报 2005; 31(4): 383-8.
- 6 陈绍荣, 李师弢, 吕应堂, 杨弘远. 水稻原胚和刚启动分化的幼 胚cDNA文库的构建和分析. 植物学报 2000; 42(2): 214-6.
- 7 Wang SH, Zhao J, Yang HY. Gene transfer into young embryos via electroporation and regeneration of plantlets in rice. Acta Bot Sin 2002; 44(7): 827-31.
- 8 Meyer S, Pospisil H, Scholten S. Heterosis associated gene expression in maize embryos 6 days after fertilization exhibits additive, dominant and overdominant pattern. Plant Mol Biol 2007; 63(3): 381-91.
- 9 Wang LP, Zhao J. High frequency of GFP gene transient expression in electroporated zygotes and early proembryos of wheat. Acta Bot Sin 2003; 45(2): 200-4.
- 10 Li ST, Lu YT, Yang HY. Isolation of a gene preferentially expressed in heart-shaped embryos of tobacco (*Nicotiana tabacum*). Sexual Plant Reprod 2001; 14(3): 173-5.
- 11 Zou JW, Sun MX, Yang HY. Single-embryo RT-PCR assay to study gene expression dynamics during embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol Rep 2002; 20(1): 19-26.
- 12 Hu Y, Qin Y, Zhao J. Localization of an arabinogalactan protein epitope and the effects of Yariv phenylglycoside during zygotic embryo development of *Arabidopsis thaliana*. Protoplasma 2006; 229(1): 21-31.
- 13 韩红梅,赵 洁,施华中,杨弘远,周 嫦.水稻卵细胞与合子的分离.植物学报 1998; 40(2): 186-8.

- 14 Zhang J, Dong WH, Galli A, Potrykus I. Regeneration of fertile plants from isolated zygotes of rice (*Oryza sativa*). Plant Cell Rep 1999; 19(2): 128-32.
- 15 赵 洁,姚成义,周 嫦,杨弘远.应用微室饲养培养系统诱导水稻和小麦合子及早期原胚的生长.作物学报 2002; 28(3): 289-93.
- 16 Hoshino Y, Scholten S, Wiegen P, Lörz H, Kranz E. Fertilizationinduced changes in the microtubular architecture of the maize egg cell and zygote—an immunocytochemical approach adapted to single cells. Sex Plant Reprod 2004; 17(2): 89-95.
- 17 赵 洁,周 嫦,杨弘远.小麦分离合子与幼胚中膜钙和钙调素的分布.植物学报 1998; 40(1): 28-32.
- 18 Kumlehn J, Lörz H, Kranz E. Monitoring individual development of isolated wheat zygotes: A novel approach to study early embryogenesis. Protoplasma 1999; 208(1): 156-62.
- 19 Li ST, Yang HY. Gene transfer into isolated and cultured tobacco

zygotes by a specially designed device for electroporation. Plant Cell Rep 2000; 19(12): 1184-7.

- 20 He YC, Sun MX, Yang HY. Regeneration of fertile plants from isolated tobacco zygotes by *in vitro* culture. Chin Sci Bul 2004; 49(8): 810-4.
- 21 伍成厚,梁承邺,叶秀粦. 低温对蝴蝶兰胚珠发育的影响. 热带 亚热带植物学报 2004; 12(2): 129-32.
- 22 伍成厚,潘一山,罗开梅,叶秀粦,梁承邺. 蝴蝶兰未受精胚珠 离体培养的研究. 园艺学报 2006; 33(4): 891-4.
- 23 任 玲, 王伏雄. 兜兰胚胎学的研究. 植物学报 1987; 29(1):
 14-21.
- 24 叶秀粦, 郭俊彦. 墨兰雌配子体和胚胎发生. 热带亚热带植物 学报 1995; 3(1): 54-8.
- 25 梁汉兴. 天麻胚胎学的研究. 植物学报 1984; 26(5): 466-72.
- 26 胡适宜. 被子植物胚胎学. 北京: 人民教育出版社, 1983, 175-95.

Isolation of Zygotes and Embryos in Phalaenopsis

Wu Chenghou^{1,2}, Li Dongmei³, Tian Huiqiao^{1*}

(¹School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; ²Guangzhou Institute of Landscape Gardening, Guangzhou 510405, China; ³Shunde Polytechinic, Shunde 528300, China)

Abstract Zygotes, proembryos and maturing spherical proembryos were isolated from *Phalaenopsis* hybrid embryo sacs by the method of manual microdissection after a pretreatment of combinnating enzymatic maceration with shaking the ovules. The enzymatic maceration was under 0.7%~1.3% cellulase, 0.6%~1.0% pectinase, 10% mannitol, pH5.8 for about 20~30 min. Developed suspensor haustorium was discovered on the micro-dissected embryos from three-cell stage to maturing spherical.

Key words *Phalaenopsis*; zygote; proembryo; suspensor haustorium; isolation

Received: October 31, 2011 Accepted: February 6, 2012

This work was supported by the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (No.2007B020801007) and the Science and Technology Planning Project of Guangzhou City (No.11A63030233)

^{*}Corresponding author. Tel: 86-592-2186486, E-mail: hqtian@jingxian.xmu.edu.cn