

技术与方法

洋葱卵细胞的分离

陈美灵¹ 于金金¹ 吴晓琛¹ 魏冬梅² 田惠桥^{1*}¹厦门大学生命科学学院, 厦门 361005; ²台州学院生命科学学院, 临海 317000

摘要 将洋葱的胚珠置于酶液中酶解50~110 min后剥去其珠被, 可清楚地看到珠心中的胚囊轮廓。用解剖针将珠心中部横切, 然后挤压其珠孔部位, 卵器细胞从胚珠的切口处逸出。再用显微操作仪的玻璃针将卵细胞和两个助细胞分开, 达到分离洋葱卵细胞的目的。酶对分离卵细胞具有重要作用, 在最佳的酶液浓度[0.02%果胶酶Y23、0.08%果胶酶(Serva)、0.05%纤维素酶和0.05%半纤维素酶]下酶解胚珠110 min后, 解剖1 h可从24个胚珠中分离出10个卵细胞(41.67%)。随着胚囊的发育, 两个助细胞的体积出现明显的二形性。洋葱生活卵细胞的分离为开展洋葱离体受精建立了基础, 也为研究洋葱卵器细胞的发育创造了条件。

关键词 洋葱; 卵细胞; 分离

高等植物卵细胞被胚珠体细胞层层包裹着, 胚珠又位于雌蕊的子房之中, 这成为探索高等植物受精调控机制的主要障碍。利用分离的精、卵细胞在体外诱导融合, 排除了体细胞的干扰, 重演受精过程, 使定点追踪合子胚胎的变化得以实现, 是目前研究受精机理的有效手段。离体受精的前提之一是分离出卵细胞。1985年, 胡适宜等^[1]最早从烟草中分离出了生活的卵细胞。以后又从玉米^[2]、大麦^[3]、小麦^[4]、蓝猪耳^[5]、白花丹^[6]、水稻^[7]、黄花木本曼陀罗^[8]、莴苣^[9]和胡萝卜^[10]等植物中分离出生活的卵细胞。其中, 1993年, Kranz和Lörz^[11]用玉米卵细胞进行的离体受精最先获得成功, 进行了许多开创性的受精机理研究^[12]。2007年, 另一种单子叶植物——水稻的离体受精也获得了成功^[13]。分离的植物卵细胞结合目前的分子生物学技术也可进行卵细胞发育调控机制的研究。虽然这方面的研究目前刚开始, 但已取得了前所未有的成绩^[14]。植物卵细胞分离技术的突破预示着植物受精的研究内容将由过去的了解受精过程进入探索调控受精机制的新阶段。

葱属植物是不同于禾本科植物的另一类单子叶植物, 具有良好的细胞学特征。洋葱良种的繁殖也是我国目前的一个公关课题。2009年, 魏冬梅等^[15]分离了韭菜卵器细胞; 同年, 菅明霞等^[16]分离了葱卵器细胞, 发现葱的两个助细胞体积差异显著。这在

研究助细胞功能中可能具有特殊意义^[17]。我们开展了洋葱卵器细胞的分离实验, 尝试建立洋葱离体受精实验体系的可行性, 也为探索洋葱卵器细胞发育机理的研究提供了实验基础。

1 材料与方法

实验材料为市场上销售的红皮洋葱(*Allium cepa* L.)。2011年11月15日种植于厦门大学生命科学学院实验地。植株于2012年4月上旬开花, 花期约两个星期。选取开花当天和开花后1, 2, 3 d的花, 从子房中剥出胚珠, 置于酶液中, 震荡酶解50~110 min。对酶液中的甘露醇浓度(渗透压)、酶种类和各种酶浓度的效果进行了筛选。酶液的基本成分为0.4% CaCl₂、1%牛血清白蛋白(BSA)、12%甘露醇(W/V), 附加0.01%~0.2%果胶酶(Pectolyse Y-23)、0.05%~0.8%果胶酶(Serva)、0.05%~0.8%纤维素酶(Onozuka RS)、0.05%~0.5%半纤维素酶(Sigma公司)。酶解后, 在Leica DM IRB倒置显微镜下, 用自制解剖针先将胚珠剥去珠被, 再从中部横切珠心, 轻轻挤压其珠孔端, 卵细胞及两个助细胞即从切口部位溢出。用

收稿日期: 2012-08-03 接受日期: 2012-08-30

国家自然科学基金(No.31170289)、公益性行业(农业)科研专项经费(No.200903016)和浙江省自然科学基金(No.Y3110395)资助项目

*通讯作者。Tel: 0592-2186486, E-mail: hqian@xmu.edu.cn

Leica DC-180显微操作仪从卵器三细胞中分离出卵细胞并收集成群体。分离的卵细胞用20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 荧光素二醋酸酯(fluorescein diacetate, FDA)检测其生活力。

2 结果

2.1 分离不同发育时间的卵细胞及助细胞

洋葱开花时的花器官雌雄异熟现象明显: 洋葱有6个花药, 开花当天的花冠部分展开, 6个花药中的3个花丝伸长, 花药伸出花冠, 花药开裂。开花后1 d, 花冠完全展开, 另3个花药开裂。开花当天的花柱很短, 约2 mm(图1A)。开花后1 d花柱伸长到约3 mm(图1B)。开花后2 d花柱长至约5 mm(图1C)。到开花后3 d花柱达到最长, 约6 mm, 并在顶端膨大形成柱头(图1D), 这时的花柱才具有使花粉萌发的功能。推测洋葱花药开裂的时间与花柱伸长和成熟时间的不同步使其避免了自花授粉的发生, 是植物界中避免近亲繁殖的一种常见现象。

洋葱每个子房由3室构成, 每室中有2个胚珠(图1E)。胚珠为双珠被、薄珠心。去掉珠被的珠心在倒置显微镜下可清楚看到胚囊轮廓, 为切割胚珠确定了位置(图1F)。取开花当天、开花后1, 2, 3 d的胚珠解剖, 做卵细胞的分离。由于卵器细胞的体积较大并且形态特殊, 从胚囊中逸出的卵器细胞很容易与珠心体细胞区别, 而且随着胚囊的发育成熟, 卵器细胞的形态特异性也愈加明显。从开花当天胚珠中分离出的卵器细胞都呈梨形, 但在数分钟内变圆。

三个卵器细胞中, 卵细胞的体积较小、细胞质较少、高度液泡化、细胞内含物比较透明。两个助细胞的体积较卵细胞大、细胞质较多、液泡化程度较低、细胞内含物较模糊, 很容易辨认卵细胞和两个助细胞。开花当天的两个助细胞大小相似, 细胞核都位于细胞的一端, 呈现出相同的极性(图1G)。开花后1 d, 卵器三细胞之间的差异有一定增加, 卵细胞的体积变化不大, 但两个助细胞的体积明显增加。而且两个助细胞之间也出现差异, 一个助细胞较大, 另一个较小。开花后3 d, 分离的卵器细胞体积差异更明显, 卵细胞的体积较以前明显增大, 两个助细胞的体积差异进一步增大, 大助细胞的体积是小助细胞的2倍以上, 也是卵细胞体积的2倍以上。卵细胞由于大液泡的存在产生明显极性, 而两个助细胞中则没有大液泡, 充满了细胞质基质(图1H)。

分离出的卵器三细胞通常相互连接在一起, 易于辨认。用显微操作仪的玻璃针可将开花当天的卵细胞和两个助细胞分开, 达到分离卵细胞的目的(图1I)。用鉴定细胞生活力的荧光素二醋酸酯(FDA)染色, 分离1 h后的卵细胞依然显示出活性荧光(图1J)。分离出的卵细胞用显微操作仪可收集成群体(图1K), 它们依然显示出了活性荧光(图1L)。用相同的方法, 也可将开花后3 d的成熟卵细胞分离、收集(图1M-图1P), 为以后研究卵细胞发育提供了分子生物学实验材料。

2.2 分离卵细胞的最佳条件筛选

洋葱每个子房中有6个胚珠。每次取4朵花的

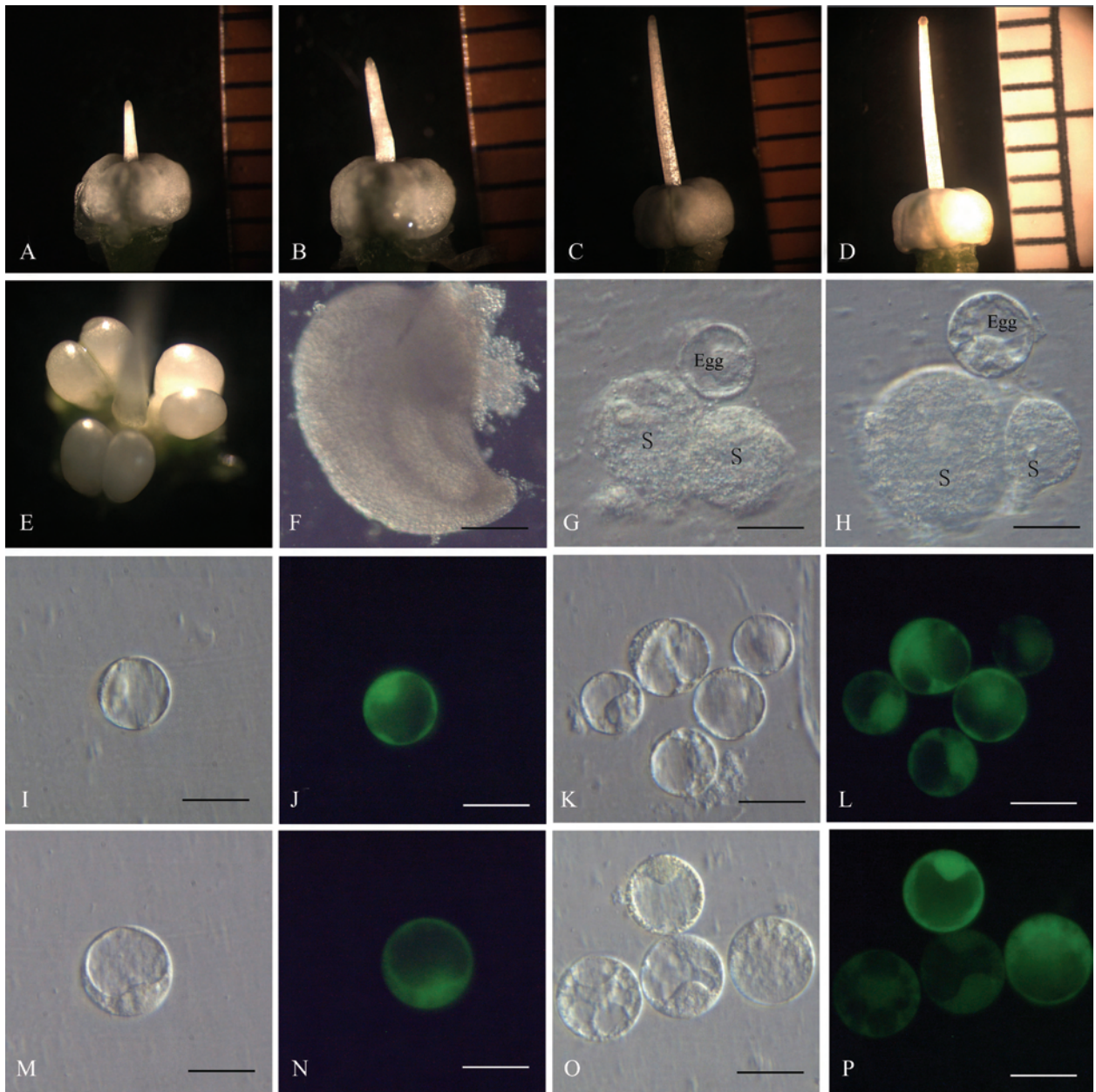
表1 酶液成分及分离效果

Table 1 The effect of enzymic component on isolating ration of egg cell

果胶酶Y-23(%)	果胶酶(%)	纤维素酶(%)	半纤维素酶(%)	酶解时间(min)	分离卵细胞数	卵细胞分离率(%)
Pectolyse Y-23(%)	Pectinase (Serva)(%)	Cellulase RS(%)	Hemicellulase(%)	Time of digesting (min)	Number of egg cell	Ratio of isolated egg cells(%)
0.20	0.80	0.80	0.50	30	0	0.00
0.20	0.80	0.50	0.50	30	0	0.00
0.20	0.40	0.40	0.40	50	2	8.33
0.10	0.40	0.25	0.25	50	4	16.67
0.08	0.32	0.20	0.20	50	3	12.50
0.10	0.25	0.25	0.25	90	4	16.67
0.08	0.20	0.15	0.15	90	5	20.83
0.06	0.16	0.10	0.10	90	6	25.00
0.04	0.16	0.10	0.10	90	6	25.00
0.02	0.08	0.05	0.05	110	10	41.67
0.01	0.05	0.05	0.05	110	4	16.67

酶液的基本成分为12%甘露醇、0.4% CaCl_2 、1%牛血清白蛋白, 解剖时间为1 h。

The basic compositions of enzyme solution are 12% mannitol, 0.4% CaCl_2 , 1% bovine serum albumin(BSA), digesting for 1 h.



A: 开花当天的雌蕊, 花柱只有约2 mm; B: 开花后1 d的雌蕊, 花柱生长到约3 mm; C: 开花后2 d的雌蕊, 花柱生长到约5 mm; D: 开花后3 d的雌蕊, 花柱顶端膨大形成柱头; E: 将子房壁剥去后的6个胚珠; F: 酶解后剥去珠被的珠心, 可看清里面的胚囊轮廓; G: 开花当天的卵器三细胞, 两个助细胞(S)已有体积差异, 卵细胞(Egg)的体积小于助细胞; H: 开花后3 d的卵器三细胞, 两个助细胞(S)体积差异更明显, 卵细胞(Egg)的体积较之前增加; I: 分离开花当天的卵细胞; J: 分离的卵细胞呈现出活性荧光; K: 分离的5个开花当天的卵细胞; L: 分离的卵细胞1 h后呈现的活性荧光; M: 分离开花后3 d的卵细胞; N: 分离开花后3 d的卵细胞呈现活性荧光; O: 分离的4个开花后3 d的成熟卵细胞; P: 成熟卵细胞分离1 h后仍呈现活性荧光。F: 80 \times , 标尺=100 μ m; G-P: 800 \times , 标尺=10 μ m。

A: pistil at anthesis with a 2 mm style; B: pistil at 1 day after anthesis with a 3 mm style; C: pistil at 2 days after anthesis with a 5 mm style; D: pistil at 3 days after anthesis with a style which enlarges in top to form stigma; E: six ovules in a ovary; F: nucellus after its integument peeled off to show the outline of embryo sac; G: three cells of egg apparatus isolated from flower in anthesis, two synergids(S) display difference in size, and egg cell(Egg) is smaller than both synergids; H: three cells of egg apparatus isolated from flower 3 day after anthesis, the difference between two synergids(S) is more obvious, and egg cell(Egg) increases in size than before; I: an isolated egg cell in anthesis; J: the isolated egg cell displays living fluorescence; K: a population of 5 isolated egg cells of anthesis; L: the isolated egg cells still display living fluorescence after 1 h; M: an isolated egg cell from the flower at 3 days after anthesis; N: the isolated egg cell displays living fluorescence; O: a population of 4 isolated egg cells at 3 days after anthesis; P: the isolated egg cells display living fluorescence. F: 80 \times , bar=100 μ m; G-P: 800 \times , bar=10 μ m.

图1 洋葱卵细胞的分离

Fig.1 Isolation of egg cells from *Allium cepa* L.

24个胚珠进行操作易于统计。虽然在没有酶的溶液中也可将外珠被剥掉,但珠被组织有很强的韧性,剥离珠被费时费力,很难操作。在适当的酶液中,洋葱胚珠的珠被易于剥离。在酶液中,所用酶的成分很重要,尤其是果胶酶Y-23,若不加此酶,即使有其他酶成分,珠被仍不容易被彻底剥掉;但该酶的浓度过高时,整个胚珠变的过于柔软,反而不易准确切割胚珠。过高的果胶酶Y-23同时对卵器细胞也造成了较大的伤害,挤压出来的卵细胞和助细胞很容易破裂。通过筛选,以0.02%的果胶酶Y-23结合其他果胶酶和纤维素酶对洋葱卵细胞的分离最为有利。酶液中其他酶成分也与卵细胞分离有关:当纤维素酶浓度过高时,就会使卵细胞与助细胞之间易黏连,在卵器三细胞的剥离过程中易造成卵细胞的破裂。通过筛选以0.05%的纤维素酶和0.05%半纤维素酶处理后的分离效果最好(表1)。

酶液中的渗透压也是影响卵细胞分离效果的一个重要因素,在较低的渗透压中(8%甘露醇),从切口溢出的卵器细胞很快膨大、破裂。这些低渗溶液中分离出的卵细胞在活性检测中,显示活性的荧光时间很短。在12%的甘露醇溶液中,分离出的卵细胞可保持1 h以上的活性荧光。超过12%甘露醇的渗透压时,卵细胞不易逸出切破的胚囊,即使有少数逸出的卵器细胞也常出现萎缩变形等现象,它们具有生活力的时间也很短。结合卵器细胞的分离效果以及分离卵细胞的生活状态,在酶液中加入12%的甘露醇为宜。

3 讨论

在分离胚囊细胞的过程中,酶的种类和浓度对分离效果有很大影响。虽然在没有酶的溶液中也可将外珠被剥掉,但分离出有活性卵细胞的几率很小。酶的种类和浓度在分离卵细胞的过程中直接或间接地影响到分离结果。最初我们采用葱卵细胞分离的最佳酶浓度[0.2%果胶酶Y-23、0.8%果胶酶(Serva)、0.8%纤维素酶(RS)和0.5%半纤维素酶]^[15]酶解30 min后解剖洋葱胚珠,但效果很差,珠被难剥离,珠心中的胚囊轮廓不清,没有分离出卵细胞。随后我们尝试降低各种酶的浓度,筛选最佳的分离酶液浓度。在将上述酶浓度逐步降低到约1/10[0.02%果胶酶Y-23、0.08%果胶酶(Serva)、0.05%纤维素酶(RS)和0.05%半纤维素酶]并延长酶解时间(110 min)后,达

到了最佳的分离效果,1 h从24个胚珠中可分离到10个卵细胞(41.67%)。酶浓度继续降低则分离效果较差。洋葱和葱的卵细胞分离结果差异很可能是不同植物的胚珠生理状况不同造成的。各种植物胚珠生理状况不同的另一个特征是分离洋葱卵细胞的渗透压(12%甘露醇)比分离葱(10%甘露醇)^[15]和韭菜(10%甘露醇)^[14]的都高。因此,对不同植物的卵细胞分离的技术需要进行筛选。

被子植物中有80%是蓼型胚囊,成熟胚囊中有两个助细胞,与卵细胞毗邻,在受精中起吸引花粉管的作用,是大多数被子植物受精过程中的一个关键环节。在分离卵细胞时,一个或两个助细胞常与卵细胞同时释放出(图1G和图1H)。洋葱助细胞的分离为研究其分化和功能提供了分子生物学实验材料,尤其是洋葱两个助细胞的体积差异特征为研究两个助细胞之间的功能提供了条件。受精时花粉管进入其中一个退化助细胞中释放内含物,两个精细胞分别与卵细胞和中央细胞融合,完成双受精过程。助细胞的功能是吸引花粉管进入胚囊。花粉管进入助细胞的过程是随机地进入其中的一个,还是有选择地进入其中一个助细胞?这是被子植物有性生殖中的一个有趣问题。然而,由于胚囊深藏在子房中的胚珠内,很难对这个问题进行深入研究。Higashiyama等^[18]用激光消除卵器细胞的方法证实了助细胞对花粉管具有吸引功能。他们将胚珠和花粉管共同培养在一起,花粉管可进入胚囊。当用激光杀死卵细胞后,花粉管仍可进入胚囊;当将一个助细胞杀死时,花粉管可进入另一个助细胞,但当两个助细胞都杀死后,花粉管就不进入胚囊,证明了助细胞对花粉管的吸引作用。然而,该实验结果并未解释两个助细胞之间对花粉管的吸引是随机性的,还是选择性的问题。曾发现韭菜的两个助细胞体积有差异,但因为是切片制样,观察的是二维图像,不同的切片角度对观察结果有很大影响,当时无法证实^[19]。葱的两个助细胞在开花当天没有体积差异,但在开花后3 d时,两个助细胞之间的体积差异非常明显^[16]。在本实验中,分离的两个成熟助细胞也呈现出体积差异,证实了两个助细胞的体积差异是发育的结果。这就面临一个有趣的问题:当两个助细胞出现差异时,花粉管是经哪个助细胞进入胚囊的?即花粉管进入两个助细胞中的一个具有预定性吗?目前对这一问题还没有报道,值得进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 胡适宜, 李乐功, 朱 徽. 烟草生活胚囊及胚囊原生质体的分离. 植物学报(Hu Shiyi, Li Legong, Zhu Hui. Isolation of viable embryo sacs and their protoplasts of *Nicotiana tabacum*. Acta Botanica Sinica) 1985; 27(4): 337-44.
- 2 Kranz E, Bautor J, Lörz H. *In vitro* fertilization of single, isolated gametes of maize mediated by electrofusion. Sex Plant Reprod 1991; 4(1): 12-6.
- 3 Holm PB, Knudsen S, Mouritzen P, Negri D, Olsen FL, Roue C. Regeneration of fertile barley plants from mechanically isolated protoplasts of the fertilized egg cell. Plant Cell 1994; 6(4): 531-43.
- 4 Kovács M, Barnabás B, Kranz E. Electro-fused isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) gametes develop into multicellular structures. Plant Cell Reports 1995; 15(2): 178-80.
- 5 Kristóf Z, Imre K. Isolation of living magaspores of *Torenia fournieri*. Protoplasma 1996; 192(3): 245-8.
- 6 Cao YJ, Russell SD. Mechanical isolation and ultrastructural characterization of viable egg cells in *Plumbago zeylanica*. Sex Plant Reprod 1997; 10(6): 368-73.
- 7 Zhang J, Dong WH, Galli A, Potrykus I. Regeneration of fertile plants from isolated zygotes of rice (*Oryza sativa*). Plant Cell Reports 1999; 19(2): 128-31.
- 8 刘欢欢, 菅明霞, 王雅英, 田惠桥. 黄花木本曼陀罗卵细胞的分离. 分子细胞生物学报(Liu Huanhuan, Jian Mingxia, Wang Yaying, Tian Huiqiao. Isolation of egg cells from *Brugmansia aurea Lagerh* "Goildens Kornet". Journal of Molecular Cell Biology) 2008; 41(6): 489-94.
- 9 陈 琳, 张亚楠, 邱一兰, 田惠桥. 莴苣胚囊细胞分离. 云南植物研究(Chen Lin, Zhang Yanan, Qiu Yilan, Tian Huiqiao. Isolation of embryo sac cells of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Acta Botanica Yunnanica) 2010; 32(4): 232-7.
- 10 宋玉燕, 包 晗, 陈美灵, 朱 云, 田惠桥. 胡萝卜精、卵细胞、助细胞和中央细胞的分离. 植物生理学报(Song Yuyan, Bao Han, Chen Meiling, Zhu Yun, Tian Huiqiao. Isolation of sperms, eggs, synergids and central cells of Carrot (*Daucus carota* L.). Plant Physiology Journal) 2012; 48(1): 90-4.
- 11 Kranz E, Lörz H. *In vitro* fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants. Plant Cell 1993; 5(7): 739-46.
- 12 Wang YY, Kuang A, Russell S.D, Tian HQ. *In vitro* fertilization as a tool for investigating sexual reproduction of angiosperms. Sex Plant Reprod 2006; 19(2): 103-15.
- 13 Uchiumi T, Uemura I, Okamoto T. Establishment of an *in vitro* fertilization system in rice (*Oryza sativa* L.). Planta 2007; 226(3): 581-9.
- 14 田惠桥, 朱学艺. 被子植物生殖生物学. 北京: 科学出版社 (Tian Huiqiao, Zhu Xueyi. Reproductive biology of angiosperms. Beijing, Science Press), 2012, 139-57.
- 15 魏冬梅, 菅明霞, 陈 琳, 田惠桥. 韭菜卵细胞、合子及原胚的分离. 细胞生物学杂志(Wei Dongmei, Jian Mingxia, Chen Lin, Tian Huiqiao. Isolation of egg cell, zygote and proembryo from *Allium tuberosum* Roxb. Chinese Journal of Cell Biology) 2009; 31(2): 286-90.
- 16 菅明霞, 张亚楠, 王雅英, 田惠桥. 葱卵细胞的分离. 植物学报 (Jian Mingxia, Zhang Yanan, Wang Yaying, Tian Huiqiao. Isolation of egg cells from *Allium fistulosum*. Chinese Bulletin of Botany) 2009; 44(3): 345-50.
- 17 Li DX, Lin MZ, Wang YY and Tian HQ. Synergid: A key link in fertilization of angiosperms. Biologia Plantarum 2009; 53(3): 401-7.
- 18 Higashiyama T, Yabe S, Sasaki N, Nishimura Y, Miyagishima S, Kuroiwa H, *et al.* Pollen tube attraction by the synergid cell. Science 2001; 293(5534): 1480-3.
- 19 田惠桥, 杨弘远. 韭菜胚囊发育和胚胎发生. 武汉植物学研究 (Tian Huiqiao, Yang Hongyuan. Embryo sac development and embryogeny in *Allium tuberosum*. Journal of Wuhan Botanical Research) 1991; 9(1): 5-10.

Isolation of Egg Cells from *Allium cepa* L.

Chen Meiling¹, Yu Jinjin¹, Wu Xiaochen¹, Wei Dongmei², Tian Huiqiao^{1*}

(¹School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; ²School of Life Science, Taizhou University, Linhai 317000, China)

Abstract Viable egg cells of *Allium cepa* L. were isolated using enzymic digestion and mechanical dissection. The onion ovules were incubated in an enzymic solution for 50~110 min and then peeled its two integuments. The outline of embryo sac in nucellus was seen clearly. Using a dissecting needle cutting nucellus transversely and pushing its micropyle part, three cells of egg apparatus could be released from cut end of the nucellus. The egg cell could be separated with two synergids, reaching the purpose of isolation of onion egg cell. Enzymes are very important for isolating egg cell, and in optimal enzyme solution containing 0.02% Pectolyse Y-23, 0.08% Pectinase (Serva), 0.05% Cellulase (Onozuka RS), 0.05% Hemicellulase (Sigma), 10 egg cells (41.67%) could be isolated from 24 ovules in 1 h. With embryo sac development, two synergids display dimorphism in size. The isolation of onion egg cells makes a base for its *in vitro* fertilization, and provides the condition to study onion egg development using methods of molecular biology.

Key words *Allium cepa*; egg cell; isolation

Received: August 3, 2012 Accepted: August 30, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31170289), Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (No.200903016) and Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y3110395)

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