

技术与方法 Techniques and Methods

激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)法观察宁夏枸杞的胚珠发育

杨淑娟*, 彭励, 罗安, 肖丽华

宁夏大学生命科学学院, 银川750021

摘要: 宁夏枸杞胚珠孚尔根染色后经透明用激光扫描共聚焦显微镜直接观察各发育时期胚珠内部结构。结果显示, 用孚尔根染色后, 枸杞大孢子发生和雌配子体发育的各个阶段都可在激光共聚焦显微镜下清楚呈现。此种方法克服了胚囊因深埋在胚珠体细胞组织中而难以观察的问题。与经典的切片方法相比, 该法可对胚珠整体进行观察, 操作简单、可在较短时间内大规模地检测胚囊发育状况。

关键词: 激光扫描共聚焦显微镜; 胚珠; 宁夏枸杞; 孚尔根染色

Observation of the Development of Ovule in *Lycium barbarum* Linn. by Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)

YANG Shu-Juan*, PENG Li, LUO An, XIAO Li-Hua

School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

Abstract: The ovules of *Lycium barbarum* were observed using confocal laser scanning microscope (CLSM) after stained by Feulgen reaction. The ovules in different development stages of megasporogenesis and female gametophyte could be observed clearly. The method overcame the problem of the embryo sac of angiosperms embedded deeply in ovule, which made embryo sac difficultly to be observed. Comparing with classical section method, CLSM method was more simple and easier operating, which could observe abundant samples in a short time.

Key words: confocal laser scanning microscope (CLSM); ovule; *Lycium barbarum*; Feulgen reaction

被子植物的大孢子发生和雌配子体发育是在子房内的胚珠中进行。受精后, 受精卵细胞的胚胎发生和受精中央细胞的胚乳发育仍在胚珠中完成。被子植物雌配子体细胞深藏于层层体细胞组织中的状态是对高度简化的雌配子体的一种保护, 也是种子植物的一大优势。然而, 雌配子体-胚囊深藏在胚珠中的状态阻碍了对胚囊操作, 使我们对高等植物有性生殖过程的调控机制难以研究。以往对胚囊的研究多采用切片法进行光学显微镜和电子显微镜的观察。切片法的操作过程繁琐、实验周期长、工作量大, 且看到的是胚囊的二维图像, 需要丰富的经验通过观察到的二维图像建立胚囊内各细胞的三维立体空间结构。另外, 胚囊和周围的珠心体细胞组织具有一定的结构联系, 而切片法也很难反映出胚囊与珠心体细胞组织的准确联系。利用激光扫描共聚焦显微镜观察植物胚囊, 不仅操作简单, 节省时间, 所得到的图像具有高反差、高清晰度、定位准确的特点(周丽华和黄光文2005)。国内较早报道用激光扫描共聚焦显微镜观

察了水稻胚囊的发育过程(任宏等1998), 也有用曙红作为荧光染料观察水稻胚囊(代西梅等2008)。

宁夏枸杞属茄科落叶灌木, 为两性花, 单珠被, 薄珠心, 是宁夏重要的经济植物及药用资源植物。本研究利用激光扫描共聚焦显微镜技术的“细胞CT”功能(赵彩平等2005; 樊慧梅等2012), 选用对DNA具有特殊染色性质的孚尔根染色方法(Chieco和Derenzini 1999; Hardie等2002)和整体透明技术对枸杞胚珠发育过程做了整体观察, 获得了清晰、可靠的图片, 为探索利用激光扫描共聚焦显微镜观察植物胚囊发育提供了有效方法。

材料与方法

1 材料

供试材料为栽种于宁夏枸杞育新公司种植地

收稿 2013-12-16 修定 2014-01-15

资助 国家自然科学基金青年基金(31100225)。

* 通讯作者(E-mail: nxyang11@126.com; Tel: 18909510011)。

的‘宁杞1号’ (*Lycium barbarum* Linn.)。枸杞为茄科枸杞属落叶小灌木, 每年六、七月份为盛花期。

2 方法

2.1 固定

选择不同发育时期的宁夏枸杞花蕾, 剥出子房, 迅速投入到FAA固定液中固定24 h, 以50%乙醇洗涤, 后转入到70%乙醇溶液中保存在4 °C冰箱中备用。

2.2 孚尔根染色

固定的子房先在室温下经1 mol·L⁻¹ HCl处理0.5 h, 5.8 mol·L⁻¹ HCl处理2 h, 再经1 mol·L⁻¹ HCl处理1 h。然后用蒸馏水洗涤3次, 每次3 min, 并用Schiff试剂染色(室温3 h或4 °C冰箱过夜)。染色时注意避光, 用锡箔纸包好材料瓶。用30%、50%、70%、90%、95%和100%的乙醇溶液梯度脱水(100%乙醇中重复2次), 每级间隔30 min。最后将材料转入到含水杨酸甲酯(冬青油)和无水乙醇各一半的混合液中过夜, 第2天再置换到100%冬青油中透明12~48 h。

2.3 显微观察

取干净的载玻片, 在中央滴1滴香柏油(或冬青油), 将子房放在香柏油中, 在解剖镜下用解剖针将胚珠从子房中拨出, 盖上盖玻片。用Leica SP5激光扫描共聚焦显微镜对整个胚珠进行分层扫描观察并获取图像。用63×油镜镜头观察, 所用激光的波长是543 nm, 图片像素为1 024×1 024。

实验结果

1 大孢子发生

宁夏枸杞具中轴胎座, 每个子房中有40~50个倒生胚珠。枸杞胚珠虽为薄珠心, 但具一层很厚的珠被, 胚囊位于胚珠深处。

枸杞的胚珠原基形成突起时, 内部就已分化, 一个细胞体积增大, 细胞核也较大, 分化为孢原细胞。在孢原细胞外是一层珠心表皮细胞(图1-A)。随着胚珠的发育, 在胚珠的基部形成了由几层细胞构成的珠被原基。珠被细胞的生长速度比珠心细胞快, 随着发育超过珠心, 将珠心包围。珠被细胞一侧生长得快, 一侧较慢, 使胚珠外形呈现弯曲(图1-B)。珠心中的孢原细胞直接分化为大孢子母细胞: 细胞逐渐纵向拉长, 形态上呈长圆形, 体积

较大, 细胞核明显, 核内的染色质开始凝聚(图1-C)。大孢子母细胞进入减数分裂期时, 细胞核内出现染色比较深的染色丝, 分布在核膜周围, 并进一步缩短成为染色体(图1-D)。此时, 胚珠中央是一个大孢子母细胞, 外表是一层珠心细胞, 属薄珠心胚珠。

减数分裂I完成后形成2个子细胞(图1-E), 构成二分体。二分体的2个细胞再经过一次分裂, 完成减数分裂II, 形成纵向排列的4个大孢子, 构成四分体。在四分体的4个大孢子中, 珠孔端的2个大孢子最先退化, 细胞和细胞核的体积变小, 形态不规则; 核内的染色质高度浓缩, 呈现退化迹象。而合点端的2个大孢子形态结构完整(图1-F)。接着2个完好大孢子中靠近珠孔端的第3个大孢子也退化, 只有合点端的大孢子保留下来, 发育为功能大孢子(图1-G)。功能大孢子继续发育, 体积增大, 位于细胞中央的细胞核及核仁较大, 细胞中的液泡明显。此时, 退化大孢子只有一些残迹(图1-H)。功能大孢子的细胞核位于一端, 另一端则形成了一个液泡。此时, 也是通常所说的单核胚囊(图1-I)。

2 雌配子体发育

单核胚囊经过1次有丝分裂后即形成二核胚囊, 2个游离核随即分别移向胚囊两极, 两核之间被1个大液泡分隔(图1-J)。2个游离核继续向胚囊两极移动, 最终到达珠孔端和合点端, 中央仍被大液泡所占据(图1-K)。到达两极的2个游离核经过1次有丝分裂形成四核胚囊, 分别位于两极(图1-L)。八核胚囊发育相当迅速, 且8个核处于同一平面的机会很少, 很难同时被观察到。8核胚囊中, 珠孔端的4个核分别分化为1个卵细胞, 2个助细胞和中央细胞的珠孔极核(图1-M)。在胚囊合点端的4个核中, 3个核分化为3个反足细胞和1个中央细胞的合点极核(图1-N), 形成完整的雌配子体。在观察中还发现一些发育异常的胚珠, 大孢子核位于细胞一端(图1-O)和胚珠中形成2个类似大孢子的结构(图1-P)。

讨 论

1 不同胚囊观察方法的比较

胚囊发育是植物雌性生殖器官形成的过程,

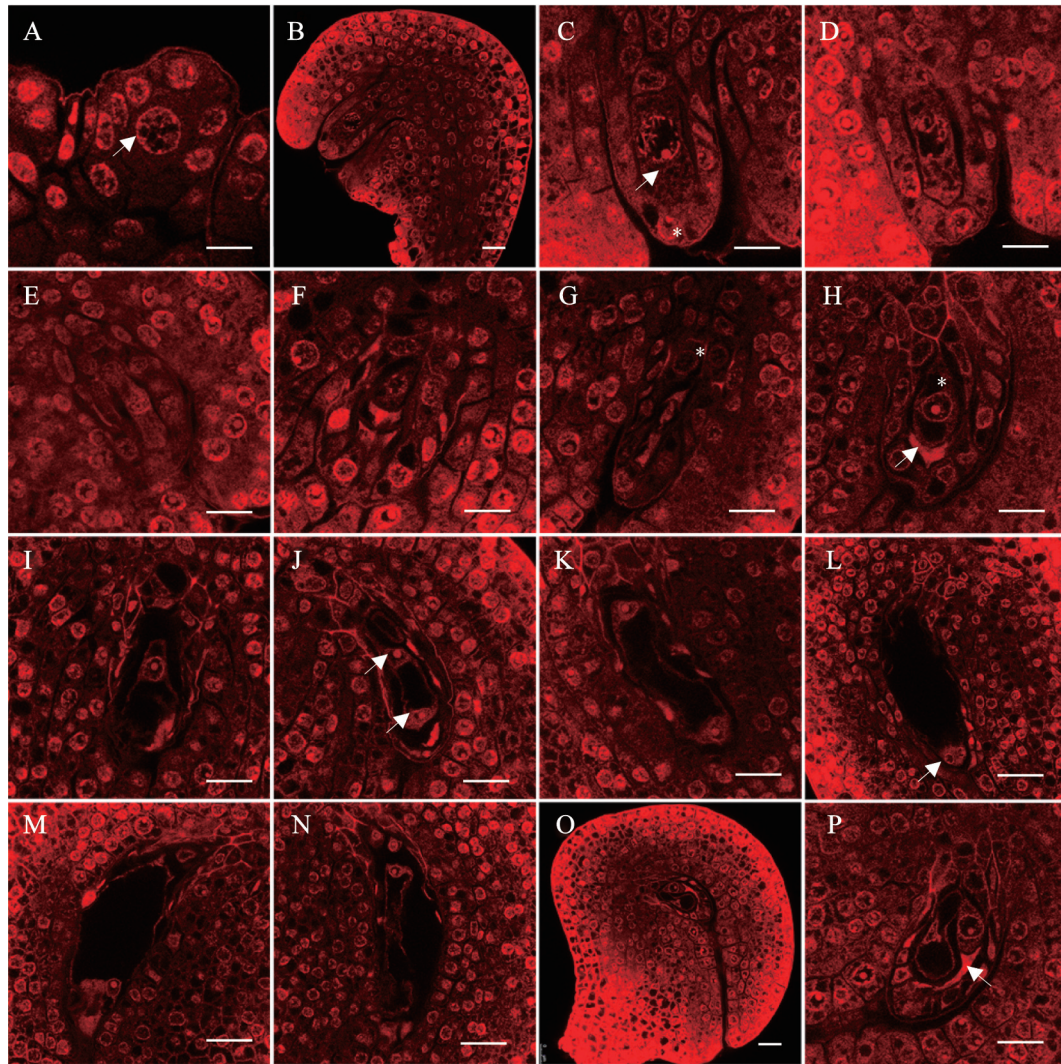


图1 宁夏枸杞胚珠的不同发育阶段

Fig.1 The different development stages of ovule in *L. barbarum*

除A外, 其它图的方向都是合点端在上方, 珠孔端在下方。A: 幼小胚珠, 示胚珠突起中的孢原细胞, 细胞核(箭头)明显大于周围细胞; B: 胚珠开始转向形成倒生胚珠; C: 胚珠中的大孢子母细胞(箭头)纵向伸长, 体积是周围珠心细胞(星号)的几倍, 细胞核中出现染色线; D: 大孢子母细胞的染色体; E: 大孢子母细胞减数分裂中期; F: 减数分裂后四分体中珠孔端的2个大孢子退化; G: 珠孔端第3个大孢子退化, 只留合点端一个完整的功能大孢子(星号); H: 功能大孢子体积增大(星号), 可见细胞里有2个液泡, 第3个大孢子只有退化痕迹(箭头); I: 单核胚囊形成; J: 二核胚囊形成(箭头); K: 2个游离核到达胚囊两极; L: 四核胚囊中珠孔端的2个游离核(箭头); M: 示珠孔端卵器; N: 胚囊合点端的3个游离核; O: 异常胚囊中细胞核极性分布; P: 异常胚珠中有2个功能大孢子及退化痕迹(箭头)。标尺=10 μm 。

是生殖生物学研究的重要部分。目前胚囊的观察方法主要有: 切片法、酶法分离、整体染色透明和激光扫描共聚焦技术等(杨鹭生和李国平2004; 李德明等2007)。切片法是经典的观察方法, 但切片法最少需要10 d以上的操作时间才能观察到结果, 而且切片观察到的是二维图像, 需要一定的专业经验才能得到胚囊细胞结构的整体概念。酶解法是用纤维素酶和果胶酶将珠被和珠心体细胞酶

解, 释放出胚囊, 虽也能快速获得大量裸露胚囊, 但不同植物的胚珠结构及化学组分存在差异, 酶解的条件如酶的种类及配比等常常需要花费大量时间去摸索尝试, 此法是一项探索中的技术, 迄今无成熟经验可循(杨弘远和周嫦1984; 邱德勃等1991)。整体染色透明技术对材料的处理上和激光扫描共聚焦技术有相似之处, 但对材料的选择性很大, 这种方法只适用于一些结构简单, 体细胞组

织较少的植物如拟南芥(王利文2013)等。我们也尝试过这种方法,但由于枸杞厚珠被的存在,内部胚囊结构无法辨认。

激光扫描共聚焦显微镜是荧光显微镜的升级,可以对材料进行连续扫描,并能排除非聚焦平面信息,提高分辨率和对比度,较易获得清晰图像。本实验表明,这一技术不但适合结构简单、体积较小的胚珠,还适用于一些发育后期的大胚珠材料,可以快速鉴定胚珠发育时期以及胚囊的发生和组成特征。和常规切片技术相比,除了简单易操作,操作时间短外,激光扫描共聚焦技术还可克服切片技术中出现的方位不正而使图像难以拼接的问题。与其他三种方法相比较,激光扫描共聚焦技术在制备材料上简单得多。我们在本实验中通过利用激光扫描共聚焦技术得出的结果和前人通过切片对枸杞胚囊的观察结果(李文钿等1979;田惠桥1987)基本一致,而且胚囊立体感强,使我们对胚囊内各细胞的结构和空间分布特征有了更清晰的认识。激光扫描共聚焦技术作为一项显微观察技术是有前途的。

2 激光扫描共聚焦显微镜的改进方法

发育中的植物胚囊具有自发荧光的特点,可以利用激光共聚焦显微镜观察胚囊的发生发育或变异等。但如果没有其他处理而直接观察,则由于自发荧光相对较弱,观察到的细胞轮廓比较模糊,反差小,获得的图像不清晰。有学者采用曙红对材料进行整体染色(代西梅等2008),曙红(又名伊红)是一种发荧光的氧杂蒽类弱酸性有机染料。本实验中,我们选用可以特异性地结合DNA成分的希夫试剂染色细胞核,再通过透明处理,用激光共聚焦技术进行观察(Barrell和Grossniklaus 2005),在543 nm波长激发光下,细胞核可发出明亮荧光,枸杞雌配子体发育的各个阶段包括减数分裂和大

孢子退化过程都可以在激光共聚焦显微镜下清晰的观察到,大孢子及胚囊很容易与周围的胚珠体细胞组织区分,细胞轮廓清晰,结构层次明显,观察效果远较常规其他染色法理想,达到了较好的实验效果。

参考文献

- 代西梅,黄群策,秦广雍(2008). 水稻双受精过程的共聚焦显微镜观察. 广西植物, 28 (1): 15~19
- 樊慧梅,仇建飞,宋志峰,杨建,马虹,魏春雁(2012). 激光扫描共聚焦显微镜的原理及其在植物学中的应用概况. 河南农业科学, 41 (2): 9~11, 53
- 李德明,张秀娟,宾金华(2007). 蓝猪耳胚囊结构观察方法的比较. 长江大学学报(自科版)农学卷, 4 (2): 66~69
- 李文钿,王锡林,罗蕴芳(1979). 宁夏枸杞开花结果形态发育的初步观察. 宁夏农业科技, (6): 38~47
- 邱德勃,陆锋,谢石文(1991). 用酶解压片法分离巴西橡胶树和番木瓜的胚囊. 植物学报, 33 (5): 350~355
- 任宏,刘永胜,孙敬三(1998). 用共聚焦扫描显微镜检测水稻胚囊发育. 植物学报, 40 (9): 786~789
- 田惠桥(1987). 宁夏枸杞的大、小孢子发生和雌、雄配子体发育. 武汉植物学报, 5 (1): 17~22
- 王利文(2013). *kinesin-12*基因在拟南芥减数分裂过程中的功能研究[学位论文]. 临汾: 山西师范大学
- 杨弘远,周嫦(1984). 用酶解技术观察泡桐与芝麻的大孢子发生和雌配子体发育过程. 植物学报, 26 (4): 355~358
- 杨鹭生,李国平(2004). 被子植物胚囊结构的观察方法. 实验室研究与探索, 23 (2): 9~11
- 赵彩平,徐国华,张绍铃,张超英(2005). 激光共聚焦扫描显微镜数据采集与分析技术研究. 果树学报, 22 (2): 111~114
- 周丽华,黄光文(2005). 激光扫描共聚焦显微镜在植物学中的应用. 激光生物学报, 14 (1): 76~79
- Barrell PJ, Grossniklaus U (2005). Confocal microscopy of whole ovules for analysis of reproductive development: the *elongate1* mutant affects meiosis II. Plant J, 43: 309~320
- Chieco P, Derenzini M (1999). The Feulgen reaction 75 years on. Histochem. Cell Biol, 111: 345~358
- Hardie DC, Gregory TR, Herbert PDN (2002). From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. J Histochem Cytochem, 50: 735~749