

## 技术与方法 Techniques and Methods

## 油茶胚囊观察体系优化及三维结构重建

高超<sup>1,2</sup>, 袁德义<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>贵州大学, 贵州省森林资源与环境研究中心, 贵阳550025; <sup>2</sup>中南林业科技大学, 经济林培育与保护教育部重点实验室, 经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 长沙410004

**摘要:** 筛选并利用优化的染色和透明实验方法, 结合激光共聚焦扫描显微镜观察油茶成熟胚囊内部结构。结果表明, 采用1%曙红染色1 h并用水杨酸甲酯透明5 d是观察油茶成熟胚囊较好的实验处理方案, 胚囊内细胞轮廓清晰, 对所需观察的目标有很好的表现力。基于该优化体系, 构建了油茶胚囊的三维结构, 为油茶及山茶属植物胚囊发育、受精机理等方面的研究提供了更加快速、高效的观察方法。

**关键词:** 油茶; 胚囊; 三维结构; 激光共聚焦扫描显微镜

被子植物的胚囊是雌性生殖细胞发育的场所, 是一个具有珠孔-合点轴极性的腔体。成熟胚囊中的一个卵细胞、两个助细胞和一个中央细胞构成了雌性生殖单位, 这些细胞相互合作完成种子植物世代繁衍中最重要的双受精过程, 并继续在胚囊中完成胚和胚乳的发育, 这些生殖生物学事件复杂而精巧, 具有严密的时间和空间特征, 一直是植物胚胎学研究中的热点(Lord和Russell 2002; Russell 1992)。被子植物的胚囊深埋于子房的胚珠中, 受到层层体细胞组织的包裹保护, 使得我们对胚囊的实验操作受到较大阻碍, 特别是对结构与功能的研究较难开展, 难以获得理想结果。目前对胚囊的实验观察手段较多的是基于光学显微镜或透射电镜, 运用切片法(石蜡切片、超薄切片)、酶解分离法和染色透明法等进行(杨鹭生和李国平 2004)。切片法虽然是经典的观察方法, 但最大的问题是制样过程繁琐, 耗费大量的时间, 并且只能获得二维图像, 需要一定经验才能理解胚囊的结构。酶解法在对珠被和珠心体细胞的解体过程中, 时间很难把握, 针对不同的植物没有成熟的经验可循。染色透明法虽然不用去掉胚囊外的体细胞, 节省了制样耗费的时间, 但染色的深浅也很难把握, 在光镜观察下不容易区分体细胞和胚囊细胞, 特别是对一些厚珠被的胚珠材料, 观察效果也大打折扣。

油茶原产中国, 属于山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia*)植物, 为常绿灌木或小乔木, 是我国南方重要且特有的木本食用油料树种(庄瑞林2008)。本研究组前期在对油茶生殖发育进行的大量研究(高超等2015; Liao等2014), 主要以胚囊为对象, 运

用石蜡切片法制片观察分析胚囊中的生殖生物学事件, 虽然取得较理想的结果, 但在实验过程中耗费了大量时间、人力和物力, 更多精细的观察和更深入的研究推进迟缓, 这一棘手的实验难题亟待破解。油茶为完全花, 胚珠深埋在子房中, 同时具双珠被、薄珠心、体积大等特点。本研究针对油茶胚珠的结构特征, 利用整体染色透明结合激光共聚焦扫描显微镜观察技术, 对其胚囊的观察体系进行优化, 并对油茶成熟胚囊的三维结构进行重建, 获得了比石蜡切片更加清晰、可靠的图片, 为油茶及山茶属植物胚囊发育、受精机理等方面的研究提供了更加快速、高效的观察方法。

## 材料与amp;方法

## 1 材料

选择生长健壮、能正常开花结果的油茶(*Camellia oleifera* Abel.)为试验材料, 材料种植于湖南省长沙市望城区东城镇(113°21' E, 28°05' N)。基地年平均降水量1 380 mm, 年平均气温19.3°C, 年积温5 463°C, 年平均无霜期276~291 d, 年平均日照时数1 762 h, 光热充足, 冬寒期短, 属典型中亚热带季风性湿润气候。土壤为红壤, 肥力中等, pH 5.5左右, 常规水肥管理。

收稿 2017-02-13 修定 2017-04-19

资助 贵州省森林培育及生态建设重点学科人才基地建设项目(黔人领发[2009]9号)、贵州省高层次创新型人才培养“十层次”人才项目(黔科合人才[2015]4003号)、提高马尾松用材林分质量关键技术研究与示范(黔林科合[2010]03)和国家自然科学基金(31170639)。

\* 通讯作者(E-mail: yuan-deyi@163.com)。

## 2 整体染色透明结合激光共聚焦扫描显微镜观察

将开花当天未授粉的油茶雌蕊从树上取下后,在解剖镜下剥出胚珠,立即投入卡诺氏(Carnoy's)固定液[95%乙醇:冰醋酸(V/V)=3:1]中固定6 h,后转入到70%的酒精溶液中并置于4°C冰箱保存备用。

在前期的预实验中,我们发现染液浓度和透明时间是影响观察效果最主要的因素,其他因素对观察效果影响不大,因此本研究在此基础上分别用0.5%、1%和1.5%曙红溶液(70%酒精配制)染色1 h,漂洗干净染色液,经各浓度酒精逐级脱水,水杨酸甲酯分别透明3种浓度染液染色后的材料各1、3和5 d(3种3个处理,共9个组合参数)后待观察使用。

由于油茶胚珠体积较大且有一定厚度,在观察时将胚珠置于凹面载玻片的凹面内,滴加数滴水杨酸甲酯在胚珠周围,轻盖上盖玻片,用小块封口膜绑缚盖玻片边缘固定,这里使用凹面载玻片的另一优点在于可以更好的收集光线,提高亮度便于在激光共聚焦扫描显微镜下清晰成像。用激光共聚焦扫描显微镜(Leica SP8, Germany)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,所用激发光的波长为543 nm。再利用仪器自带软件对多张图像进行三维重建。

## 实验结果

### 1 油茶胚囊观察体系的优化

通过对不同浓度染液和不同透明时间处理后的材料进行对比观察发现,采用1%曙红溶液对材料进行染色后再通过水杨酸甲酯透明处理5 d是对油茶胚囊观察较优的处理方案。而通过其他组合处理后的材料着色深浅不一,透明程度也存在很大差异,在激光共聚焦扫描显微镜下观察效果不佳,不能获得胚囊较理想的图像。从筛选出的较优组合处理后获得的图像来看,光学切片非常干净,胚囊内细胞轮廓清晰,颜色深浅适中,明暗适宜,较好地兼顾了对比度和亮度,对所需观察的目标对象有很好的表现力(图1)。通过观察油茶胚囊内的雌性生殖单位发现(图1-A),2个助细胞细胞质浓厚,均匀分布在细胞中,分别具有2个明显的细胞核,核膜轮廓清晰,核仁大而明显,同时可以观

察到被染色较深的丝状器在助细胞的珠孔端;卵细胞中细胞质很少,一个较大的细胞核清晰可见,核周围有少量细胞质分布,细胞两侧具有较厚的细胞壁;油茶胚囊内的中央细胞非常大,占据了胚囊内的大部分面积,2个极核核仁大而明显,可以明显分辨出上极核和下极核,中央细胞周围可以观察到有清晰的细胞质索出现,并分布在四周。胚珠体细胞较小,但排列紧密,细胞核被染为较深的颜色,占据了大部分面积。

### 2 油茶胚囊三维结构重建

在筛选出较为优化的处理组合后对材料进行处理,利用激光共聚焦扫描显微镜的三维重建功能,对油茶成熟胚囊进行三维结构重建,获得了油茶胚囊的3D立体图像(图1-B)。从该三维立体图像可以看出,油茶的“卵器”(2个助细胞与1个卵细胞)呈“品”字型的三角结构排列,3个细胞紧密相邻,均为洋梨形,位于胚囊珠孔端,占据胚囊约1/4的体积。从三维结构中同样可以观察到助细胞与卵细胞存在较大差异,卵细胞中细胞质很少,助细胞中则充满细胞质,并在合点端有较大的液泡存在。中央细胞高度液泡化,这些液泡占据了大部分空间,并将细胞质挤到周缘区,以极核为辐射中心的细胞质索穿过大液泡,连接细胞的珠孔端和合点端,并把极核包裹在中间,使之位于卵器下方。三维结构可以在激光共聚焦扫描显微镜成像系统中任意角度翻转后拍照获得立体图像进行观察,能够从不同角度直观地观察到胚囊内各细胞的体积大小和各细胞间的空间位置关系(图1-C和D)。

另外,在实验中还构建并观察了胚囊中发生双受精后97 d的受精卵与游离胚乳核的结构图像(图1-E和F)。此时的助细胞已完全退化,仅残存一些痕迹。受精卵的壁增厚,此时的细胞质仍然较少,细胞核位于中间,合子还处于休眠状态;受精卵外零星分布着游离胚乳核,呈团状,为合子发育提供营养准备。

## 讨 论

胚珠是被子植物中种子的前体物,是显花植物中最重要的生殖器官,同时也是被子植物雌配子体的载体和发育场所,在被子植物的有性生殖过程和后代繁衍中占有重要地位(胡适宜2005; Shi

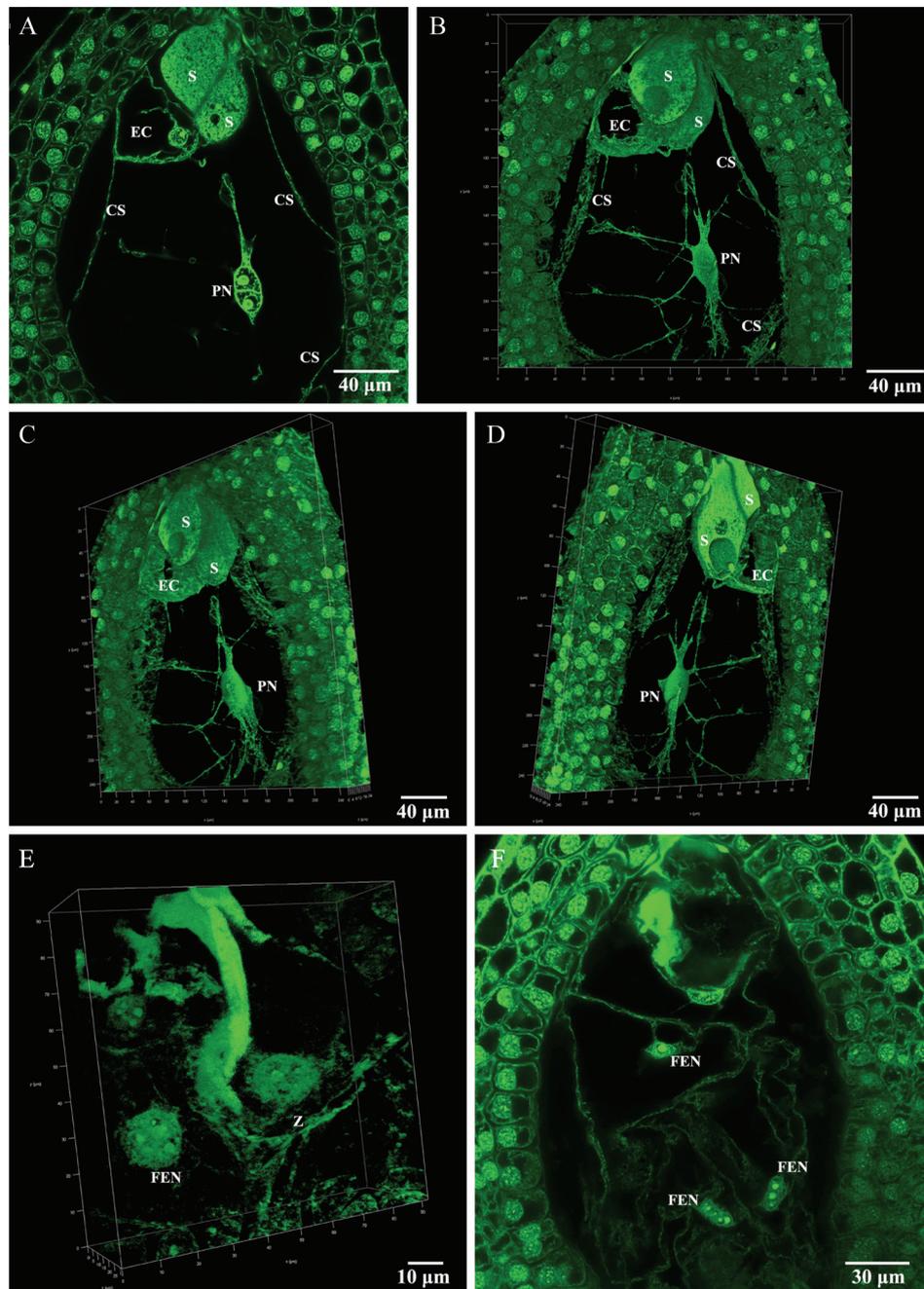


图1 油茶胚囊及其三维结构观察

Fig.1 The observation of embryo sac and its three-dimensional structure in *C. oleifera*

A: 胚囊中的雌性生殖单位(一个光学切面, 二维图像), 卵细胞与助细胞差异显著, 极核位于卵器下方; B: 胚囊的三维结构图像, 卵细胞与两个助细胞呈三角排列; C、D: 在共聚焦显微镜成像系统中从不同角度拍照观察胚囊的立体结构; E: 双受精后97 d的受精卵与游离胚乳核的三维结构图像, 助细胞仅残存痕迹, 胚乳核分布在合子周围; F: 双受精后97 d的游离胚乳核零星分布在胚囊内(一个光学切面, 二维图像)。S: 助细胞; CS: 细胞质索; PN: 极核; EC: 卵细胞; Z: 受精卵; FEN: 游离胚乳核。

和Yang 2011)。在胚囊中, 雌配子体发育形成分为大孢子发生和雌配子体发生两个时期, 大孢子发生是雌配子体发生的前阶段, 是从孢原细胞分化, 形成大孢子, 直至功能大孢子的成熟; 雌配子体发

生时期是从大孢子有丝分裂到细胞化, 直到雌配子体成熟(Reiser和Fischer 1993)。双受精和胚胎发育则是在成熟胚囊形成后在其中发生的最重要的生殖生物学事件。本研究组曾就油茶胚囊内发生

的双受精过程和早期胚胎发育进行了详细报道(Gao等2015; 廖婷等2014), 但都是基于传统的石蜡切片技术结合普通光学显微镜观察, 这一方法耗费了研究者大量的时间, 在一定程度上阻碍了后续对油茶受精机理、合子长时间休眠后激活及自交不亲和性等方面的研究。在前期进行大量预实验探索并不断优化实验体系的基础上, 找到了染色浓度和透明时间是决定观察效果的较为重要的因素, 通过本研究中对二者不同组合的实验观察发现, 采用1%曙红染色1 h并透明5 d是观察油茶成熟胚囊较好的实验处理方案, 能够获得优质的图像。基于该优化的观察体系, 通过该方法处理的材料并结合激光共聚焦扫描显微镜观察得出的胚囊三维结构的结果和前期对油茶胚囊在二维层面上的观察结果基本一致, 并且对胚囊内各细胞的立体结构和空间分布特征有了更加清晰的认识。

对植物胚囊结构与功能的研究是植物生殖生物学研究的一个重要方面, 已有学者利用激光共聚焦扫描显微镜技术观察了水稻(郭海滨等2006)、甜樱桃(朱东姿等2014)、蓝猪耳(李德明等2007)、枸杞(杨淑娟等2014)和苹果(李林光等2011)等植物胚囊的发育特征, 观察效果明显优于使用其他方法。通常对胚囊结构的研究中使用最多的是石蜡切片结合光学显微镜观察显微结构, 或者树脂切片结合透射电镜观察超微结构, 这都是通过细胞的二维结构特征推测细胞的生理功能(Russell 1990)。切片法的操作过程繁琐、实验周期长、工作量大, 且观察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。随着激光共聚焦显微镜在植物胚胎学研究中的运用, 使得这一操作简单, 节省时间, 所得到的图像具有高反差、高清晰度、定位准确, 具有强大的优势, 同时利用共聚焦显微镜中三维结构重建的功能, 可以把胚囊内生殖细胞的立体形态直观展现出来, 对探讨胚囊结构与功能的关系具有重要的意义。

### 参考文献

- Gao C, Yuan DY, Yang Y, Wang BF, Liu DM, Zou F (2015). Pollen tube growth and double fertilization in *Camellia oleifera*. *J Am Soc Hortic Sci*, 140 (1): 12–18
- Gao C, Yuan DY, Yang Y, Wang BF, Liu DM, Zou F, Tan XF (2015). Anatomical characteristics of *Camellia oleifera* with self-incompatibility. *Sci Silvae Sin*, 51 (2): 60–68 (in Chinese with English abstract) [高超, 袁德义, 杨亚, 王碧芳, 刘冬明, 邹锋, 谭晓凤(2015). 油茶自交不亲和性的解剖特征. *林业科学*, 51 (2): 60–68]
- Guo HB, Lu YG, Feng JH, Yang BY, Liu XD (2006). Further observation on the formation and development of autotetraploid rice embryo sac using laser scanning confocal microscopy. *Acta Laser Biol Sin*, 15 (2): 111–117 (in Chinese with English abstract) [郭海滨, 卢永根, 冯九焕, 杨秉耀, 刘向东(2006). 利用激光扫描共聚焦显微术对同源四倍体水稻胚囊形成与发育的进一步观察. *激光生物学报*, 15 (2): 111–117]
- Hu SY (2005). *Reproductive Biology of Angiosperms*. Beijing: China Higher Education Press (in Chinese) [胡适宜(2005). *被子植物生殖生物学*. 北京: 高等教育出版社]
- Li DM, Zhang XJ, Bing JH (2007). Comparison of observation techniques of *Torenia (Torenia fournieri Lind.)* embryo sac. *J Yangtze Univ (Nat Sci Edit) Agri Sci V*, 4 (2): 66–69, 129 (in Chinese with English abstract) [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, 129]
- Li LG, Wang Y, Wang YX, Zhang ZH, Yi K, Liu Z (2011). Pollen characteristic and embryonic development of Tensei Apple. *J Plant Genet Resour*, 12 (4): 662–666 (in Chinese with English abstract) [李林光, 王颖, 王玉霞, 张志宏, 伊凯, 刘志(2011). 苹果四倍体品种天星的花粉形态及胚囊发育特征研究. *植物遗传资源学报*, 12 (4): 662–666]
- Liao T, Yuan DY, Gao C, Zou F, Tang J, Tan XF (2014). Observation on the pollination, fertilization and early embryonic development of *Camellia oleifera*. *Sci Silvae Sin*, 50 (2): 51–56 (in Chinese with English abstract) [廖婷, 袁德义, 高超, 邹锋, 唐静, 谭晓凤(2014). 油茶授粉受精及早期胚胎发育. *林业科学*, 50 (2): 51–56]
- Liao T, Yuan DY, Zou F, Gao C, Yang Y, Zhang L, Tan XF (2014). Self-sterility in *Camellia oleifera* may be due to the prezygotic late-acting self-incompatibility. *PLoS One*, 9 (6): e99639.
- Lord EM, Russell SD (2002). The mechanisms of pollination and fertilization in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 18 (1): 81–105
- Reiser L, Fischer RL (1993). The ovule and the embryo sac. *Plant Cell*, 5 (10): 1291–1301
- Russell SD (1990). Isolation and characterization of the angiosperm gamete. mechanism of fertilization: plants to humans. Berlin: Heidelberg Springer-Verlag, 3–15
- Russell SD (1992). Double fertilization. *Int Rev Cytol*, 140: 357–388
- Shi DQ, Yang WC (2011). Ovule development in *Arabidopsis*: progress and challenge. *Curr Opin Plant Biol*, 14 (1): 74–80
- Yang LS, Li GP (2004). Procedures for observation of embryo sac structure of angiosperms. *Res Explor Lab*, (2): 9–11 (in Chinese with English abstract) [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*, (2): 9–11]
- Yang SJ, Peng L, Luo A, Xiao LH (2014). Observation of the development of ovule in *Lycium barbarum* Linn. by confocal laser scanning microscope (CLSM). *Plant Physiol J*, 50 (3): 347–350 (in Chinese with English abstract) [杨淑娟, 彭励, 罗安, 肖丽华(2014). 激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)法观察宁夏枸杞的胚珠发育. *植物生理学报*, 50 (3): 347–350]
- Zhu DZ, Wang JW, Zong XJ, Wei HR, Liu QZ (2014). Observation

of sweet cherry female gametophyte development with confocal scanning microscope. *J Fruit Sci*, 31 (S1): 36–40 (in Chinese with English abstract) [朱东姿, 王甲威, 宗晓娟, 魏海蓉, 刘庆忠(2014). 利用共聚焦扫描显微镜观察甜樱桃雌配子体的发

育. *果树学报*, 31 (S1): 36–40]

Zhuang RL (2008). *Camellia oleifera* in China. 2nd ed. Beijing: China Forest Press (in Chinese) [庄瑞林(2008). 中国油茶. 第2版. 北京: 中国林业出版社]

## Observation system optimization and three-dimensional reconstruction of embryo sac in *Camellia oleifera*

GAO Chao<sup>1,2</sup>, YUAN De-Yi<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute for Forest Resources & Environment of Guizhou, Guizhou University, Guiyang 550025, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-Wood Forest Trees of Ministry of Education, the Key Laboratory of Non-Wood Forest Products of Forestry Ministry, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

**Abstract:** The internal structure of mature embryo sac in *Camellia oleifera* was observed using confocal laser scanning microscope, based on choosing and utilizing the optimized staining and clearing experimental methods. The experiment methods, the samples were stained with 1% eosin solution for 1 h and treated with methyl salicylate transparent material for 5 d for embryo sac observation, was better than others. The embryo sac clearly showed cell configuration. According to the optimized experimental methods, the three-dimensional structure of *C. oleifera* embryo sac was reconstructed for the first time. The results provided an effective method for researching the development of embryo sac and the fertilization mechanism in *C. oleifera*.

**Key words:** *Camellia oleifera*; embryo sac; three-dimensional structure; confocal laser scanning microscope

Received 2017-02-13 Accepted 2017-04-19

This work was supported by the Forest Cultivation and Ecological Construction key Disciplines Talent Construction Project of Guizhou Province (Grant No. [2009]9), High Level Innovative Talents Training “Ten Levels” Talent Project of Guizhou Province (Grant No. [2015]4003), Research and Demonstration on Key Techniques for Improving the Quality of *Pinus massoniana* (Grant No. [2010]03) and National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31170639).

\*Corresponding author (E-mail: yuan-deyi@163.com).