

被子植物受精生物学

Biology of Angiosperm Fertilization

胡适宜 杨弘远 主编

生 · 命 · 科 · 学 · 专 · 论

被子植物受精生物学

Biology of Angiosperm Fertilization

胡适宜 杨弘远 主编

科学出版社

2002

内 容 简 介

本书介绍了被子植物有性生殖过程中的双受精机理和离体实验研究。在阐述双受精基本规律的基础上,着重介绍了此领域的最新研究进展。全书内容主要有5部分:①双受精的研究历史与双受精起源;②配子体和配子发生时期,包括花粉发育的基因表达,花粉和花粉管及其生殖细胞和精细胞的细胞骨架,雄性和雌性生殖单位;③受精前期,包括钙在受精中的作用,自交不亲和性及其分子生物学基础;④配子融合时期,包括配子融合的方式和膜融合的机理,配子识别,配子的细胞质遗传,配子核DNA的含量、核配合与细胞周期的关系;⑤离体受精,包括精、卵细胞分离与融合技术,体外受精系统的细胞生物学和分子生物学研究。本书可供从事植物学、生殖生物学、发育生物学等领域及相关领域的院校师生和研究人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

被子植物受精生物学/胡适宜,杨弘远主编. -北京:科学出版社,2002.1
ISBN 7-03-009473-5

I. 被… II. ①胡…②杨… III. 被子植物-受精-研究 IV. Q949.705

中国版本图书馆CIP数据核字(2001)第053576号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

丽源印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2002年1月第一版 开本:787×1092 1/16

2002年1月第一次印刷 印张:16 1/2

印数:1—1 500 字数:371 000

定价:45.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

《被子植物受精生物学》编著者

(按姓氏笔画排序)

- | | | |
|-----------|--------------------|---|
| 申家恒 Shen | Jiaheng | 哈尔滨师范大学,生物系,哈尔滨 150080 |
| 田国伟 Tian | Guowei | Division of Biological Sciences, University of Missouri-Columbia, 109 Tucker Hall Columbia, MO 65211, U. S. A. (University of Missouri-Columbia 访问学者) |
| 田惠桥 Tian | Huiqiao | 厦门大学,生命科学学院,厦门 361005 |
| 朱 澂 Zhu | Zheng | 北京大学,生命科学学院,北京 100871 |
| 朱至清 Zhu | Zhiqing | 中国科学院,植物研究所,北京 100093 |
| 孙蒙祥 Sun | Mengxiang | 武汉大学,生命科学学院,武昌 430072 |
| 杨弘远 Yang | Hongyuan | 武汉大学,生命科学学院,武昌 430072 |
| 赵 洁 Zhao | Jie | 武汉大学,生命科学学院,武昌 430072 |
| 周 嫦 Zhou | Chang | 武汉大学,生命科学学院,武昌 430072 |
| 胡适宜 Hu | Shiyi | 北京大学,生命科学学院,北京 100871 |
| 徐是雄 Xu | Shixiong (Zee SY) | 香港大学,植物学系 香港薄扶林道 |
| 徐恒平 Xu | Hengping | University of Nebraska-Lincoln, School of Biological Sciences, Plant Science Initiative E211 Beadle center, Lincoln, NE 68588-0666 U. S. A. |
| 黄炳权 Huang | Bingquan | Cell Biology Program, Mayo Clinie, Minnosota, U. S. A. |
| 曹宗巽 Cao | Zongxun (Tsao T H) | 北京大学,生命科学学院,北京 100871 |
| 崔海洋 Cui | Haiyang | 中国科学院,发育生物研究,北京 100080 |
| 赖 钊 Lai | Zhao | 中国科学院,发育生物研究所,所北京 100080 |
| 薛勇彪 Xue | Yongbiao | 中国科学院,发育生物研究所,北京 100080 |

前 言

在有性生殖过程中,受精始终占有中心的位置。近 20 年,在被子植物受精作用的几个重要研究方面都取得惊人的进展。在细胞生物学方面,在采用超微结构为主的观察方法的同时,还发展了三维重构、图像分析和免疫化学等精密方法。揭示了雄性生殖单位、精子二型性、偏向受精等现象。形成的新概念已在胚胎学文献中确认;揭示了配子体及配子的细胞骨架分布规律,融合时雄配子的状态及细胞质的参与;对精细胞的运动与传递,细胞质的遗传方式有了新的理解。在生理及生物化学方面,最突出的是采用了分子生物学技术,研究花粉发育、花粉与雌蕊组织间的识别反应、配子间的识别反应的分子生物学基础,从而对受精的机理的许多问题提高到从基因表达和调控的水平去理解。在实验研究方面,采用了性细胞的分离和培养技术,在几种植物中实现了真正的离体受精,这是受精研究领域的重大突破。由此推动了整个受精与胚胎发生的生物学研究。

在被子植物受精作用的研究迅速发展和不断出现新成果的情况下,国际上陆续有一些综述论文及时反映了研究的动态,特别是有关性细胞的分离和离体受精方面的进展;也出版了一些涉及受精范围更广的或更专门的问题的专著[如 Russell S. D. and Dumas, C. (Eds.): *Sexual Reproduction on Flowering Plant*. 1992; Cresti, M et al. (Eds.): *Fertilization in Higher Plants*, 1998]。被子植物受精作用已是当今植物生殖生物学研究中极为活跃的领域,在这种形势的激励下,我们决定编写这本书,旨在系统地介绍被子植物受精的生物学和在实验研究上的进展。本书力求反映我国在这一领域的重要研究成果,及国际上最新的研究资料。范围从配子体和配子至受精前期及至配子融合时期,以及将离体受精及产生人工合子作为一个重要部分,介绍研究的进展。全书共分 15 个专题叙述。

我们十分高兴得到我国从事这个领域研究的专家们的支持,他们大多数承担着国家重大科研项目,有的远在海外。他们在科研任务极为繁重的情况下,热心和积极为本书执笔,谨致衷心的感谢。

胡适宜 杨弘远

2000 年 12 月

目 录

前言

第一章 被子植物受精作用研究的历史及双受精的起源·····	(1)
1.1 引言·····	(1)
1.2 被子植物双受精研究历史的回顾·····	(1)
1.3 双受精的起源·····	(7)
1.4 双受精的生物学意义·····	(11)
1.5 结语·····	(12)
参考文献·····	(12)
第二章 花粉发育及其基因的调节与表达·····	(16)
2.1 引言·····	(16)
2.2 花粉发育的一般过程·····	(17)
2.3 花粉母细胞减数分裂阶段的基因表达·····	(18)
2.4 四分体和单核花粉时期的基因表达·····	(21)
2.5 花粉第一次有丝分裂及晚期花粉的基因表达·····	(22)
2.6 成熟花粉中的基因表达·····	(24)
2.7 结语·····	(24)
参考文献·····	(25)
第三章 花粉管及其生殖细胞和精细胞中的细胞骨架·····	(29)
3.1 引言·····	(29)
3.2 花粉粒及花粉管中的细胞骨架·····	(30)
3.3 生殖细胞及精细胞中的细胞骨架及其功能·····	(38)
3.4 花粉管顶端生长的机制·····	(41)
3.5 基于细胞骨架的花粉管内的运动系统·····	(46)
3.6 花粉管内生殖细胞分裂中的细胞骨架·····	(49)
3.7 结语·····	(53)
参考文献·····	(54)
第四章 雄性生殖单位的结构与功能·····	(59)
4.1 引言·····	(59)
4.2 雄性生殖单位概念的建立·····	(59)
4.3 精细胞与精细胞及精细胞与营养核之间的联结·····	(60)
4.4 雄性生殖单位建立的时期和在发育中的动态·····	(67)
4.5 一对精细胞的分化——精子二型性·····	(68)
4.6 雄性生殖单位形成的意义·····	(72)



4.7 结语	(73)
参考文献	(73)
第五章 胚囊的发育、组成和功能	(78)
5.1 引言	(78)
5.2 雌配子体的发育	(79)
5.3 雌性生殖单位的组成	(91)
5.4 在胚囊中精细胞的传递和受精过程中钙信号与细胞骨架的作用	(102)
5.5 结语	(108)
参考文献	(108)
第六章 钙在植物受精过程中的作用	(116)
6.1 引言	(116)
6.2 钙与花粉管的离体生长	(117)
6.3 钙在雌蕊中的分布及其与花粉管体内生长的关系	(120)
6.4 钙与精卵融合及卵的激活	(122)
6.5 结语	(123)
参考文献	(124)
第七章 不亲和性和自交不亲和性及其分子生物学基础	(128)
7.1 引言	(128)
7.2 花粉和花柱的相互作用	(129)
7.3 自交不亲和性	(130)
7.4 自交不亲和性的起源与进化	(139)
7.5 结语	(141)
参考文献	(142)
第八章 配子融合的方式与膜融合的机理	(149)
8.1 引言	(149)
8.2 配子融合时雄配子细胞质的参与	(150)
8.3 偏向受精	(153)
8.4 配子质膜的融合	(154)
8.5 膜融合的机理	(155)
8.6 结语	(157)
参考文献	(157)
第九章 配子识别	(159)
9.1 引言	(159)
9.2 被子植物配子识别的假说	(160)
9.3 糖蛋白在配子识别中的作用	(161)
9.4 被子植物配子识别的研究手段与近期进展	(165)
9.5 结语	(167)
参考文献	(167)



第十章 雄配子细胞质的命运与细胞质遗传	(170)
10.1 引言.....	(170)
10.2 单亲母系质体遗传.....	(171)
10.3 双亲质体遗传的机理.....	(177)
10.4 单亲父系质体遗传的机理.....	(181)
10.5 结语.....	(182)
参考文献.....	(184)
第十一章 雄性和雌性配子及合子核中 DNA 的含量与细胞周期的状态	(188)
11.1 引言.....	(188)
11.2 孚尔根反应显示的配子和合子核中 DNA 存在的状态	(188)
11.3 配子核 DNA 含量与细胞周期的状态	(190)
11.4 种子植物配子配合与细胞周期之间的关系.....	(194)
11.5 结语.....	(196)
参考文献.....	(197)
第十二章 植物离体受精与合子培养研究概述	(200)
12.1 引言.....	(200)
12.2 操作技术的研究.....	(201)
12.3 细胞生物学与分子生物学研究.....	(203)
12.4 结语.....	(205)
参考文献.....	(206)
第十三章 雌、雄性细胞的分离技术	(209)
13.1 引言.....	(209)
13.2 花粉原生质体与脱外壁花粉的分离.....	(210)
13.3 生殖细胞与精细胞的分离.....	(213)
13.4 胚囊、卵细胞、合子与中央细胞的分离.....	(216)
13.5 结语.....	(219)
参考文献	(220)
第十四章 植物雌、雄性细胞离体融合的细胞学事态	(224)
14.1 引言.....	(224)
14.2 性细胞形态与体积对离体融合的影响.....	(225)
14.3 融合过程中的细胞膜动态.....	(227)
14.4 融合过程中的细胞质动态.....	(231)
14.5 融合过程中的细胞核动态.....	(232)
14.6 精、卵融合的亲和性	(235)
14.7 结语.....	(235)
参考文献.....	(236)
第十五章 受精前后卵细胞和中央细胞的培养	(239)
15.1 引言.....	(239)



15.2 细胞学事态及植株再生·····	(240)
15.3 影响合子离体发育的因素·····	(244)
15.4 结语·····	(248)
参考文献·····	(248)

第一章

被子植物受精作用研究的历史及双受精的起源

胡适宜

1.1 引言

在植物生活周期中,受精与有性生殖联系是恒定不变的。高等植物的受精作为世代转换的一个转折点,由此开始二倍体孢子体时期的发育。被子植物的受精事件具独有的双受精特点。在双受精过程中,一个雄配子与卵融合产生胚,另一个雄配子与中央细胞的极核融合产生胚乳。胚的发育依赖胚乳组织提供必须的营养。被子植物受精研究的历史可追溯到 19 世纪初花粉管的发现,至 20 世纪上半期,经过几十年的研究对双受精事态逐渐得到认识。在这一历史阶段的研究是在光学显微镜观察的水平,是受精研究的形态描述时期。20 世纪后半期,随着植物胚胎学在总体上向生殖生物学演进,研究手段扩展应用各种现代生物学技术,在这一阶段,受精的研究超越原来局限于形态学的范畴,及发展了多个的研究方向——生理的和实验的,在探索受精的机理、性细胞的离体操作等方面有许多突破。本章简述上述两个阶段的历程。此外,最近 10 年,由于发现了在裸子植物中的麻黄属和买麻藤属中有类似的双受精,这方面的工作代表了高等植物受精的比较研究方向,由此对双受精的起源问题提到讨论的日程,在本章也包括这一研究进程的内容。

1.2 被子植物双受精研究历史的回顾

1.2.1 双受精的发现

被子植物的双受精是在有性生殖的各个环节——从雄配子体和雌配子体的发育,直到胚的发育已有基本认识后才发现的。这一历史时期的研究,Maheshwari (1950)已有总结,下面根据所述资料作简要介绍。

19 世纪是植物胚胎学的奠基时期,花粉管生长的发现是了解植物有性生殖过程的一个重大突破,可认为是认识被子植物受精过程的起始点。1824 年,意大利数学家和天文学家(也是高明的显微镜制造者)Amici 报道了在显微镜下看到在马齿苋(*Portulaca oleracea*)柱头毛上的花粉粒长出花粉管。其后对许多传粉的雌蕊的研究,很快证明了花粉管的形成是普遍的现象。然而当时对花粉管的作用,它与胚的关系,存在两种不同的见解,



即胚是从原先存在胚囊中的物体产生,还是从花粉管末端产生?这个问题曾经历长达 20 多年的探讨,直至 1847 年 Amici 根据红门兰属(*Orchis*)的观察,证明了在胚珠中当花粉管进入之前已存在“芽泡”(germinal vesicle)的物体(即现在知道的卵细胞),这“芽泡”受到花粉管的影响后才产生了胚。这一结论得到德国植物学家 Hofmeister (1849)进一步确证,最终使相信花粉管末端进入胚囊中变成了“胚泡”(embryonal vesicle)及由“胚泡”形成胚的研究者不得不放弃他们的错误见解。

参与受精作用一方的花粉粒,最早的知识是从 Hofmeister 的研究获得。1848 年他报道了小孢子四分体形成的过程,其后他和他的学生 Elfving (1879)证明了花粉粒具双核的状态是普遍的,并发现了萌发的花粉管中存在 3 个核(即现在所知的 2 个雄配子核和 1 个营养核)。

参与受精另一方的胚囊,最早的知识也是从 Hofmeister 的研究(1847~1861)获得。他首次明确地指出在胚囊中相反的两极存在的细胞群。对胚囊的发生和结构的进一步认识,德国植物学家 Strasburger 有重要的贡献。他描述了叉分蓼(*Polygonum divaricatum*)胚囊发育的过程,这就是后来被确定的最普遍的蓼型胚囊发育的形式;确定了成熟胚囊的结构,包含卵器(1 个卵细胞和 2 个助细胞)、3 个反足细胞及 2 个极核;描述了 2 个极核后来融合形成一个次生核及从它产生胚乳;提出了助细胞是有助于受精过程的结构。

上面所述的有关雄配子体与雌配子体的知识,现在看来是很平常的事实,但只要想到在科学发展的早期,研究者们借助于原始的技术制作切片,这些工作许多是从透明、徒手切片或整体封片的观察中获得,就会体会这些研究成果来之不易。

雄配子与雌配子的融合是有性生殖的中心步骤,观察这一过程在技术上尤为困难,因为配子的融合自始至终,时间是如此短促,很难捕捉到关键的时期。况且,在足够大的胚囊中要得到恰当的切面也要碰机会,在胚囊中分辨体积很小的精子也不是容易的事。雌雄配子融合的具体过程,在被子植物中首先由 Strasburger (1884)发现。他对水晶兰(*Monotropa hypopitys*)受精的观察,揭露了由花粉管释放出的两个雄核,其中之一与卵融合。Strasburger 根据这一观察,他总结的受精概念是:①受精过程包括雄配子核和卵核的融合;②配子的细胞质与受精过程无关;③精子核和卵核都是真核。当时,对花粉管所释放出的第二个精子的命运还未被认识。直到 1898 年俄国植物学家 Nawaschin 发表了在欧洲百合(*Lilium martagon*)和细弱贝母(*Fritillaria tenella*)中发生双受精的论文,第一次宣告被子植物的受精是双受精。仅隔数个月,法国 Guignard (1899)也报道了在百合和贝母中同样的双受精现象。双受精现象报道后,立即得到当时许多著名的学者如 Strasburger, Arnoldi, Sargent 等的承认。他们在 Nawaschin 论文发表后才在自己的老切片上找到了双受精的景象。特别值得提出的,在双受精报道几年前,俄国植物学者 Arnoldi 制作的西伯利亚绵枣儿(*Scilla sibirica*)的切片上,配子配合和三核并合已是十分明显,但他将第二精核误认为是在切片时一个离散的核(可能从珠心)被带入了胚囊而忽略它的真实意义。后来这张切片落到 Finn 手中,他将切片中双受精的景象绘成图,发表在他的“双受精发现的历史”的论文中(Maheshwari, 1950)。回顾双受精发现的历史是大有教益的,它说明对一个新的事实作出肯定的结论,并指出它的真实意义,需有锐敏的



洞察力和判断力。

双受精的发现,可认为是被子植物有性生殖研究历史上一个重大里程碑,它推动了有性生殖的研究迅速发展。知识的积累为植物胚胎学作为植物学的一门分支学科奠定了基础,从而在 20 世纪初期有可能作出文献的总结。1903 年美国 Coulter 和 Chamberlin 的《被子植物形态学》;1929 年德国 Schnarf 的《被子植物胚胎学》出版,这是最早的两本植物胚胎学著作。

1.2.2 20 世纪前半期受精的研究

双受精发现至今已过去了一个世纪。在 20 世纪上半期,运用光学显微镜在有性生殖领域开展了大量的研究,对涉及受精的雄性和雌性配子体的发育、雌雄配子的结构以及配子融合过程的形态学已有许多的描述。这些资料已为卓越的印度植物胚胎学家 Maheshwari (1950)在他的《被子植物胚胎学引论》一书中加以系统和详细地总结。这本著作包括了被子植物全面的早期有性生殖研究资料,至今仍不失为有价值的植物胚胎学著作。

20 世纪前半期的研究工作,为受精过程发生的事态积累了非常宝贵的知识,对受精过程的基本程序已经了解,但仍有许多问题尚未有明确的答案。例如雄配子是否真正的细胞?胚囊中细胞的状态,它们是否有壁包围?花粉管如何进入胚囊中及如何将它的内含物释放?助细胞的作用是什么,它对花粉管的释放是否起作用?为什么第一雄核常进入卵和第二雄核进入中央细胞?一对雄配子在大小和形状上是否有差异?雄配子能否运动?雄性细胞质是否参与受精作用?雄性与雌性核是如何融合的?这些问题局限于光学水平的研究是难以解决的。显然,研究的进一步深入,必须引入新的技术。

1.2.3 20 世纪后半期受精的研究

20 世纪 50~60 年代,双受精的研究进入一个新的阶段。随着植物胚胎学向生殖生物学演进(胡适宜,杨弘远,1994),有性生殖的研究运用了电子显微镜、显微荧光术、细胞化学及分子生物学等多种新技术,在双受精领域获得了许多新的成果,明确了许多前期局限于光学显微镜观察未被认识的问题。

在 20 世纪 60~70 年代的 10 年间,受精过程的研究明显地沿下列三个主要方向发展。

第一,对有关双受精的结构进行深入的探索,主要开展了电子显微镜的研究。运用电子显微镜研究受精过程,美国植物胚胎学家 Jensen 和他的合作者最早进行了大量的工作和作出突出的贡献。他们早期用棉花,其后增加用荠菜(*Capsella bursa-pastoris*)和盾片美洲兰(*Epidendrum scutella*)作为研究对象。在电镜的观察中揭露了许多在光镜下未能看到的结构。从 1966 至 1968 年的 3 年时间里,Jensen 与其合作者发表了共 26 篇论文(Jensen,1998)。他们的研究涉及精子和胚囊的细胞的结构,花粉管进入胚囊及至精核与卵核融合的过程。在开展电镜研究最初的 10 年(1963~1973),Jensen 实验室及其他一些作者所获得的有关受精作用的超微结构研究成果,可概括为下列几个主要方面。



(1) 精子的结构

对棉花(Jensen and Fisher, 1968a)、矮牵牛(Sassen, 1964)、甜菜(Hoefert, 1969)和大麦(Cass, 1973)精子的电子显微镜的研究, 提供了精子是真正的细胞的证据。精细胞具质膜, 缺少细胞壁; 精核具浓厚的染色质和一小的核仁; 细胞质含少量细胞器, 有线粒体、高尔基体、内质网、核糖体和小泡, 但缺少质体。在甜菜和大麦中还发现存在微管。

(2) 胚囊的细胞

早期用电镜研究胚囊的各种细胞的结构的工作, 大部分在于正常型的胚囊和在成熟的和受精前的时期。所用植物主要有棉花(Jensen, 1965a, b), 蓝猪耳(Pluijm, 1964), 玉米(Diboll, Larson 1966), 荠菜(Schulz, Jensen, 1968a, b) 和矮牵牛(Van Went, 1970a, b, c)。对助细胞、卵细胞和中央细胞的观察结果得出了一般的结论。

助细胞 光镜的观察对助细胞珠孔端的丝状器的性质是什么未能了解。电镜的研究揭露了丝状器是助细胞壁的扩展部分。在形状上, 丝状器有的象数个指状突起(棉花), 有的呈不规则的分枝状(荠菜、玉米)伸进细胞内。现在已很清楚, 助细胞这种极度发达的壁内突的形成是传递细胞的特征, 在功能上起扩大质膜的表面积的作用。此外, 电镜的观察还发现了助细胞的壁与寻常的细胞壁不同, 壁从细胞的珠孔端至合点端逐渐变薄(荠菜、矮牵牛), 或在合点端部分缺少细胞壁(蓝猪耳、棉花、玉米)。

助细胞的超微结构特征表现为高度活跃的细胞。细胞具大的细胞核和含一显著的核仁。细胞质浓厚和含大量的细胞器, 包括线粒体、质体、内质网、高尔基体、核糖体和小泡。

卵细胞 包围卵细胞的壁是不完全的, 这与助细胞相似。在卵的合点端仅被质膜包围(蓝猪耳、棉花、玉米、矮牵牛)或壁很薄(荠菜)。卵细胞质的超微结构有较大的变异, 液泡化的程度不同, 细胞质一般含线粒体、造粉质体、高尔基体和核糖体。内质网不发达, 不过, 在棉花中有较大量的内质网。卵细胞的超微结构特征表现为代谢不活跃的。

中央细胞 中央细胞是胚囊中一个曾被忽视的细胞, 电镜的观察表明中央细胞是被明显的自己的质膜包围, 具一大的中央液泡, 细胞质被挤向细胞的外围。中央细胞的壁与胚囊壁结合, 在荠菜中发现了壁扩展形成突起(Schulz, Jensen, 1969)。中央细胞的细胞质含丰富的内质网、核糖体、线粒体和造粉质体, 也常见高尔基体。中央细胞中的极核是胚囊中最大的核, 常含数个核仁。在棉花和矮牵牛中都曾描述了内质网与极核的核膜之间有许多联结点及两个极核通过膜进行融合的方式。中央细胞的超微结构特征表现为代谢很活跃的细胞。

(3) 花粉管进入胚囊和释放的方式

在电子显微镜的研究之前, 曾认为花粉管生长进入胚囊有各种方式(Maheshwari, 1950), 但用电子显微镜观察过的种——蓝猪耳(Pluijm, 1964), 玉米(Diboll, 1968; Schulz, Jensen, 1968a), 棉花(Jensen, Fisher, 1968b) 和盾片美洲兰(Cocucci, Jensen, 1969), 花粉管都是到达胚囊中两个助细胞中的一个。花粉管生长通过丝状器进入助细胞, 在这一助细胞内释放它的内含物。在棉花和盾片美洲兰中, 花粉管是通过其亚顶端侧



面的孔将细胞质和精细胞释放至退化的一个助细胞的细胞质中。

(4) 精子转移至卵和中央细胞的方式

精子释放后如何转移至卵和中央细胞？这是一个很复杂的问题，而且这一过程在研究技术上难度较大，在早期电镜研究的基础上，Jensen (1974) 提出一个假说，解释从精子释放至进入卵和中央细胞的细胞质中的过程(图 1.1)。这个假说的要点是：①精子被释放至退化的助细胞，这个助细胞的质膜已经消失；②由释放的力量使精子与卵和中央细胞的质膜接触；③精子的质膜与卵或中央细胞的质膜融合，两个精核分别移动至卵和中央细胞的细胞质中。根据这一假说，精子的细胞质是不参与融合的。

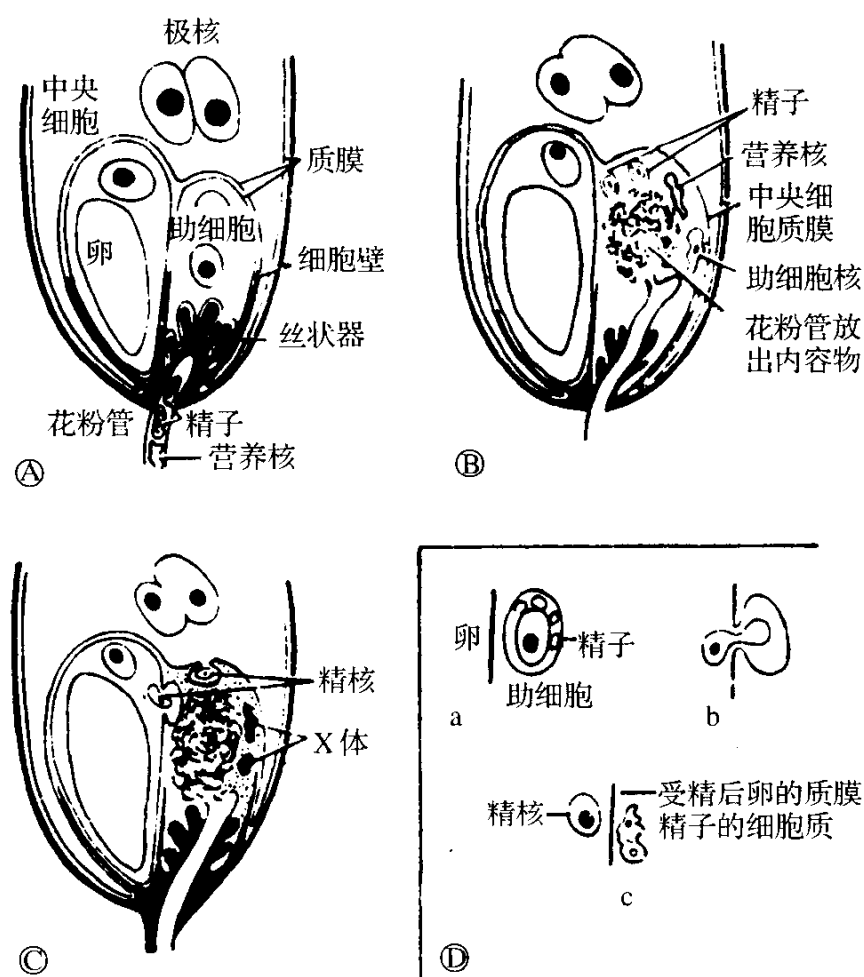


图 1.1 图解示被子植物双受精作用中精子转移至卵细胞和中央细胞的过程

A. 花粉管进入胚囊；B. 花粉管释放出内含物；C. 两个精子分别转移至卵和中央细胞；D. 精核转移的细节示意图：a. 精子与卵接近，b. 精核在转移中，c. 精核转移到卵细胞中。(引自 Jensen, 1974)

(5) 配子核的融合

在光学显微镜下的研究，仅 Gerassimova (1933) 曾对还阳参(*Crepis capillaris*)的配子核融合的过程完成了详尽的描述，可认为这是被子植物在光镜下所能辨认的配子核融合的一般的模式。这一模式，事实上对精核如何“陷入”卵核内是不清楚的。电镜的研究在这一问题上进一步弄清核膜的融合过程，这是实现核融合的第一步。在棉花(Jensen,



1964)和矮牵牛(Van Went, 1970c)中曾先后描述了配子核融合时核膜按下列基本的程序进行:二核彼此接近;与核连接的内质网分子融合;连接的内质网缩短;核的内膜会合;形成许多的小桥;二核间小桥结合在一起,二核间形成一大的中央的桥。精核与卵核及与极核融合表现同样的形态。

综上所述,表明这些早期电子显微镜的研究,回答了许多光镜研究时期不明确的问题,但仍有不少问题未有答案。显然,在受精过程中许多活动的机理,不可能是仅从结构的研究可以弄清楚的。因此,近代出现多个研究方向可认为是发展的必然趋势。

20 世纪的 60~70 年代,在运用电子显微镜开展研究的同时,用其他的新细胞生物学技术探讨有性生殖过程有关生理生化的问题也在进行,这是研究的第二个方向。主要是用组织化学、免疫荧光及生理生化方法,研究花粉发育和花粉管生长过程中的一些问题。这一方向的研究在阐明在雌蕊中指引花粉管定向生长的因素,及花粉壁蛋白与柱头表面蛋白的不亲和性反应等方面,都获得重要的成果。Mascarenhas 在前一问题, Heslop-Harrison、Heslop-Harrison 和 Knox 在后一问题作出的贡献是突出的(Mascarenhas, 1975; Knox, 1976)。研究的许多资料,在出版的《被子植物花粉的发育和生理学》(Shivanna *et al.*, 1979)一书中曾加以总结。

最后的一个研究方向是,受精的实验研究。20 世纪的 60~70 年代,开展了用组织培养技术,试图使在离体条件下实现受精。从杂交实践出发,很早就有人试验人为控制受精的方法,但除了在花粉的贮存的实验外,试验过的一些方法,如将花柱嫁接到子房上、把花粉送进子房内,甚少达到有效的控制受精的结果(见 Maheshwari, 1950)。20 世纪 60 年代初,在组织培养技术蓬勃发展的影响下,发展了将胚珠或子房在离体培养的条件下进行授粉和受精的方法。这种称为“试管受精”(“test-tube fertilization”)的技术,首先在印度德里大学的一个实验室进行,于 1962 年 Kanta 等人报道了罂粟在离体条件下成功地实现了传粉、双受精以及胚和胚乳的发育全部的过程,最后结出生活的种子,种子正常地萌发。在其后的十余年中,开展了不少这种技术的研究,表明“试管受精”的技术在克服自交和杂交不亲和性上有一定价值(胡适宜, 1983),不过后来这方面的研究停滞,没有进一步发展。

最近的 20 年,在受精领域前面述及的几个研究方向都有重大的进展。

第一,围绕结构与功能的关系的问题,广泛的超微结构研究和发展的电镜三维重构及定量细胞学研究工作,积累的丰富资料使形成了一些新的概念——雄性生殖单位(male germ unit)、雌性生殖单位(female germ unit)和偏向受精(preferential fertilization)(Dumas *et al.*, 1984; Russell, 1985)。这些从结构与功能的关系建立的概念,使对双受精过程中配子如何实现融合有了比较深入的认识。在电镜的观察揭露了生殖细胞中存在微管的基础上,进一步应用免疫荧光定位和其他的实验方法,研究花粉管、精细胞和胚囊中的细胞骨架的结构和分布,获得了许多新的知识:明确了微管在花粉管的顶端生长起重要的作用;生殖细胞与精细胞的移动与细胞骨架有关。

第二,受精过程的生理生化和分子生物学研究,在近 20 年发展迅速。这方面的研究工作与结构的研究工作汇合,使对受精机理的认识更全面和更深刻。例如,花粉特异基因表达的研究在阐明细胞质雄性不育受线粒体上几个基因表达控制;研究有关自交不亲和基因和基因产物的鉴定和特性的初步确定,加深了我们对花粉与雌蕊识别机理的认识;钙



在受精中作用的研究,已得出了一般的结论:钙信号参与调节受精过程中许多的环节——花粉萌发与花粉管生长,雌蕊中花粉管导向,以及在精卵融合及卵的激活中起作用(杨弘远,1999)。

第三,受精的实验研究在最近的一二十年,发展了用显微操作技术进行体外受精。这方面研究的两个主要策略:一种是显微注射精细胞(Keijzer *et al.*, 1988)或分离的精细胞核(Matthys-Rochon *et al.*, 1994)到分离的胚囊的细胞,这种离体受精的产物未能再生植株;另一种是从配子体分离的配子使在体外完成融合。后一种方法首先在玉米上试验成功,用分离的精细胞和卵细胞借助电融合介导使成对的配子融合(Kranz *et al.*, 1990, 1991a,b),并从离体受精产生的人工合子培养再生植株,受精与胚胎发育的整个过程完全在离体条件下完成(Kranz, Lörz, 1993)。这是首次在被子植物中真正的体外受精成功。在玉米离体受精模式系统建立后,促进了许多方面的研究,包括对更多的植物离体受精与合子培养的研究;研究其他代替电融合这种强制性介导融合的方法;利用离体受精系统和用细胞生物学和分子生物学的方法,研究受精过程中的一些理论问题。利用离体受精系统的分子生物学研究是当前受精生物学的前沿课题,主要的工作是通过构建 DNA 文库研究基因表达。此外,还尝试将外源基因导入卵和合子的实验。应用显微注射技术将外源基因导入玉米合子中(Leduc *et al.*, 1996)和小麦卵和合子中(Ponya *et al.*, 1999),都证明了被导入的基因在卵和/或合子中瞬间表达(Ponya, 1999)。显微注射技术在动物受精机理和受精工程研究中是一项有力的手段,同样,在植物中也必然有重大意义。

综上所述,被子植物受精的研究,从一个阶段到另一阶段向前发展,正如科学不断前进的规律一样。19 世纪可认为是受精研究的奠基阶段;20 世纪的上半期,是受精过程的描述时期;20 世纪的下半期,受精作为综合的生物学问题,发展了生理学的和实验的研究方向。

1.3 双受精的起源

长期以来,双受精作用被看作是被子植物独特的特征。在过去的差不多一个世纪,一直对双受精的起源不清楚。裸子植物的买麻藤目有许多特征与被子植物相似(例如买麻藤属的导管分子、复合网状叶脉),一般认为该目与被子植物关系最密切。买麻藤目受精的研究工作,有可能提供双受精来源的认识。

在被子植物双受精发现后不久,在买麻藤属(*Genetum*)和麻黄属(*Ephedra*)的有性生殖研究报道中,已有指出存在与被子植物类似的双受精作用。1899 年,在买麻藤属报道了在雌配子体中发生两次融合,即两个精核分别与雌配子体中的两个核融合。其后只有少数报道支持在这一属内存在双受精,并认为是有性生殖中不正常的现象(见 Carmichael, Friedman, 1996)。在麻黄属,从 1907~1978 年多次报道了有几个种偶尔有第二受精现象。这是根据观察到腹沟核进入卵细胞质较中央的位置,或第二精核接近腹沟核等现象的判断(见 Friedman, 1990)。这些早期的研究都未能提供明确的显示第二受精作用照片,而且也不能确定这种双受精形式在麻黄属的这些种的有性生殖中是有规律的或是偶然的事件。



最近, Friedman 和 Carmichael 对麻黄属和买麻藤属进行的受精过程的研究, 运用组织学、细胞学和超微结构的方法, 确证在这两属存在有规律的双受精, 为讨论双受精的起源提供了极为有意义的资料。

1.3.1 麻黄属的双受精过程

麻黄属雌配体的发育与基准的被子植物(雌配体发育为单孢子的蓼型胚囊特征)相似, 是单孢子形式, 但在雌配体中发育数个颈卵器, 即一雌配体中有多数的卵进行受精。受精作用在粗麻黄(*Ephedra nevadensis*) 和长叶麻黄(*Ephedra trifurca*) 这两个种中是一致的。当精子进入卵时, 腹沟核仍然存在及处于靠卵的顶部。卵核位于近中部细胞质浓厚的区域, 这里有大量含 DNA 的细胞器。在受精过程中, 花粉管进入颈卵器内, 将含二核的精细胞的两个精核释放至卵细胞内。第一精核向卵核移动并与之接触。其后这一对配子核移动至先前卵细胞的基部, 即合点端, 在这里它们融合形成一核, 即合子核。与此同时, 发生第二受精。在第一精核与卵核接触后不久, 腹沟核与第二精核一前一后开始向合点端移动及彼此建立接触。这一对核到达距卵细胞顶端约 $1/3$ 至 $1/4$ 处停下来, 在这里进行融合。双受精的结果, 第一受精产物(合子核)位于先前卵细胞的合点端, 第二受精产物(从腹沟核与第二精核融合的核)处于靠珠孔端(图 1.2) (Friedman, 1990 a, b)。

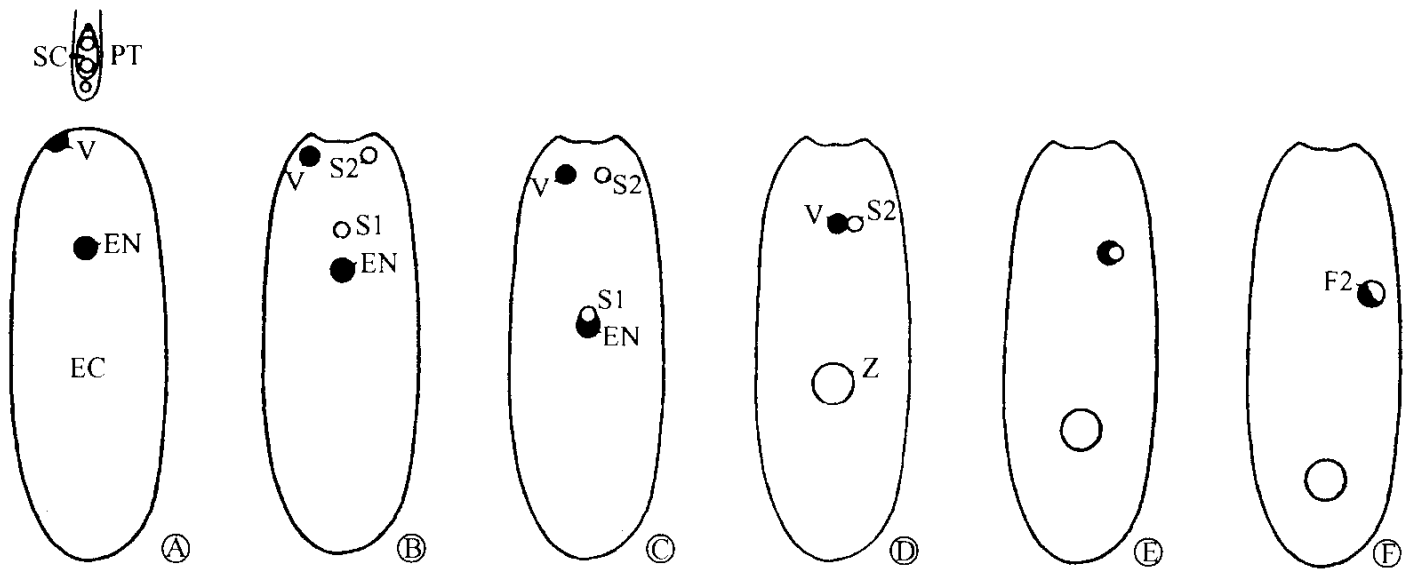


图 1.2 图解示在粗麻黄中的双受精作用

A. 含精细胞的花粉管生长至卵; B~D. 第一精核与卵受精产生一个合子核的过程; D~F. 合子核转移至先前卵细胞的基部; C~F. 腹沟核从卵细胞的顶端位移及与第二精核融合的过程。EC. 卵, EN. 卵核, F2 第二受精, PT. 花粉管, SC. 精细胞, S1. 第一精核, S2. 第二精核, V. 腹沟核, Z. 合子核。(引自 Friedman, 1990 b)

第二精核与腹沟核融合形成的核, 在遗传上和细胞学上与由第一精核与卵核融合形成的合子核是等同的。这从受精过程中核中 DNA 含量的研究得到证明。用显微分光光度计对长叶麻黄第一受精和第二受精产生的核 DNA 的测定, 证明都是二倍体和具 4C DNA 量 (Friedman, 1991)。

受精后合子核发育的研究, 发现了第一受精和第二受精产生的合子核都进行有丝分裂。连续两次分裂的结果, 形成 8 个游离核。其中第一受精产生的 4 核(来源于真正的合