

国家“十五”重点图书

植物有性生殖 实验研究

杨弘远 周嫦 编著

FORTY-YEAR
RESEARCHES ON
EXPERIMENTAL SEXUAL PLANT REPRODUCTION

四十年



武汉大学出版社

CF 14 5.53
127

植物有性生殖实验研究四十年

杨弘远 周 嫦 编著

武 汉 大 学 出 版 社

2001 年

图书在版编目(CIP)数据

植物有性生殖实验研究四十年/杨弘远,周嫦编著. —武汉:武汉大学出版社,2001.10

国家“十五”重点图书

ISBN 7-307-03169-8

I. 植… II. ①杨… ②周… III. 植物—有性繁殖—研究—文集
IV. Q945.53-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 02037 号

责任编辑:余运萍

责任校对:李桂珍

版式设计:支 笛

出版:武汉大学出版社 (430072 武昌 珞珈山)

(电子邮件:wdp4@whu.edu.cn 网址:www.wdp.whu.edu.cn)

发行:新华书店湖北发行所

印刷:武汉市科普教育印刷厂

开本:787×1092 1/16 印张:41.75 字数:1005 千字 插页:7

版次:2001年10月第1版 2001年10月第1次印刷

ISBN 7-307-03169-8/Q·69 定价:70.00 元

版权所有,不得翻印;凡购我社的图书,如有缺页、倒页、脱页等质量问题者,请与当地图书销售部门联系调换。

序

好几年前就有不少朋友建议我们将多年研究的成果汇集成书出版,我们则一直忙于“向前看”,把作出新成果、发表新论文当做主要任务,无暇去做“向后看”的整理总结工作,所以对于编书一事虽心有所动而踟蹰不决。现在,20世纪即将逝去,新千年的钟声即将敲响,而我们自己在科学道路上也已跋涉了40年有余了。回顾过去,展望未来,“温故而知新”,已经到了一个恰当的时刻。正在这时,“华夏英才基金”给了我们一个出版学术著作的机会。经过思考,我们决定利用这一机会,认真梳理一下以往的工作,理出一条研究思路的脉络,并纳入国际研究总趋势之中,使读者于一斑中窥全豹。于是便拟定了书名和全书的结构。

早在20世纪50年代之初,植物实验胚胎学作为植物胚胎学中最活跃的研究方向刚露头角,就展现了强大的生命力。半个世纪的经历证明,这个学科生长点仍在不断发展,并且上升到新的高度。在本书的“前言”中对此有所阐述。需要提到的是,这个前言,是我们在10多年前所发表的一篇专题论文。我们感到其内容与观点今天仍未过时,因此借用作为本书的前言,原文基本不变,仅个别词句作了修改。我们回顾自己几十年的研究历程,发现自己很幸运地顺应了学科发展的世界趋势,作为中国科学工作者由青年而中年到老年,艰难而不无自豪地在我国这片相对贫瘠的学科园地上耕耘播种,结出了一批果实。由于发表的文章散见于中外刊物,许多年轻的同行很难全面了解,更难把握其整体脉络,所以我们力求加以精选、分类、系统化为一书。希望通过本书反映植物有性生殖实验研究从性器官操作到性细胞操作的演进轨迹,并提供我们自己的研究方法和结果,以飨读者,并望不吝批评指正。

本书分五章。前三章分别汇集植物有性生殖过程中三个环节(雄性细胞发育、雌性细胞发育、传粉受精与胚胎发育)的实验研究。每章均按由性器官操作到性细胞操作的趋势分节。例如第一章,大致按花药培养——花粉人工萌发——花粉原生质体操作——生殖细胞操作——精细胞操作的思路编节,等等。第四章关于植物有性生殖过程的超微结构与细胞化学研究,则是按由结构研究向结构与功能相结合的研究趋势编节。第五章“专题论述”精选若干代表性文章,着重从理论与方法上开阔思路。

为了便于读者把握各章、节的思路,在每一章、节均安排一段简短的“提

要”，说明当时的研究背景、目的与特点。论文是以往发表的，“提要”是现在编写的，它们可以起“粘合剂”的作用，把原来零散的论文组合起来形成有机的体系。当然，所有的研究工作都是几十年间自然发展的产物，并非从一开始就按预定计划实现的，在发展中还受诸多主观与客观条件的制约，出现残缺不全是势所难免的，不可能是一部天衣无缝的体系。回顾过去，我们自己也有不少遗憾。

书中收集的论文，是从20世纪50年代开始长达数十年期间陆续发表的，每篇论文只能反映当时的研究状况，因而也只能用历史的眼光加以看待。之所以将一些早年的论文也收进本书，一则是为了反映研究由低至高、由浅入深的时代轨迹；二则也因为有些论文即使今天看来也不失可取之处，读者也许还可从中发掘某些可资利用的东西。科学研究的本质是探索未知的客观事物，只要是通过严谨的方法所揭示的新现象，只要它们还没有被彻底认识，哪怕埋没多年，也还值得加以发掘。举一个例：我们在1959年发表的一篇“处女作”中，揭示了气态化学分子诱导稻花开颖的现象，至今仍为一个悬而未决的问题，读者如有兴趣可以查阅第三章第一节的“提要”和第一篇论文。

作为单篇论文，自有其严格的结构规范。但收入书中就不必保持原有形态了。我们在编纂中保留了原来论文中的英文摘要、引言、材料与方法、结果、讨论等主要部分，精选了一部分重要的表格与插图以及少数具有代表性意义的照相图版；删除了中文摘要、关键词、大部分图、表、照相图版和全部参考文献目录，以便全书总篇幅不至过分膨胀。为了弥补以上缺陷，采取了如下一些措施：(1)在正文中凡引证的前人姓名和带方括号的文献序号一概保留，以便知其有所出处。(2)正文中引证的图、表、照相图版与参考文献，仍保留其原有的序号，以便读者了解它们原来的存在。在每篇论文末尾注明该论文的作者，原载期刊的年份、卷、期、页，原论文包含的图、表与图版总数和被选用的号码，以便读者必要时查阅期刊中的原始论文。(3)各个时期在不同刊物中发表的论文，格式差别很大，编书中尽可能按统一规范加以修正，但内容则保持原貌，以忠于历史事实。(4)选编的125篇论文，大多全文收录；少部分论文以摘要形式录入；还有不少相关的论文未能选入，只在每章之末列出目录，计70篇。总之，尽管采取了以上各种措施，也难免消弭一切缺陷。由此给读者带来的诸多不便，编著者谨表歉意。

本书得以出版，有赖“华夏英才基金”的大力支持与各级统战部的帮助。武汉大学出版社为本书作了精心的编排出版工作。书中的研究成果，是在国家自然科学基金、国家教委博士点基金等的长期资助下完成的；省、校、院、系各届领导也给予了许多关怀。书中汇集的论文曾在国内、外各种期刊中发表，尤其是《植物学报》为我们提供了发表论文的主要阵地。我们的研究成果是一个研究

集体、包括众多研究生多年劳动的结晶,部分研究成果是与国内、外同行合作完成的。在工作中,不少亲友给予了热情的鼓励。编著者谨在此一并致以诚挚的谢意。

编著者

2000年6月

曾参加该课题研究的人员(按姓氏笔画为序):

王 劲	于凡立	田惠桥	卢 萍	刘中来	孙 芹	孙蒙祥	李仕琼
李国民	李昌功	李师弢	何才平	吴 燕	吴新莉	汪 泳	陈以峰
陈绍荣	范六民	董 健	施华中	赵 洁	张劲松	梁 立	梁世平
莫永胜	徐秉芳	夏惠君	黄群飞	阎 华	傅 纓	傅春梅	蔡得田
魏正元	韩红梅						

前 言

从 1968 年召开第一次“种子植物有性生殖的细胞生物学”国际讨论会算起,到植物生殖生物学被公认为一门新学科,经历了 20 多年的孕育才达到瓜熟蒂落。现在,在生殖生物学中又出现一个活跃的研究领域,它有演进为一门新分支学科、并导向一个新技术领域的趋势,值得我们提出来讨论。这里所说的新分支学科,可以命名为“植物实验生殖生物学”;新技术领域可以命名为“植物生殖细胞工程”或简称为“植物生殖工程”。

—

植物实验生殖生物学是实验胚胎学发展的更高阶段,是生殖生物学时代的实验性分支学科。从实验胚胎学到实验生殖生物学,有继承的一面,更有发展的一面,这里着重讨论后一方面。从近年研究的动态看来,有两个主要的特征说明其质上的变化。

第一个特征是实验操作技术由器官、组织水平提高到细胞、原生质体水平。实验胚胎学所依赖的操作技术,如花药培养、子房与胚珠培养、试管受精、胚胎培养等,基本上是器官与组织的操作,这从 Johri(1982)主编的《维管植物的实验胚胎学》一书中的各章内容可以清楚地看出。但是所有这些器官、组织水平的操作都在以不同程度的势头向更加精密化的、细胞与原生质体水平的操作技术迈进。例如就雄性系统而言,20 世纪 60 年代突破了花药培养;70 年代发展到花粉培养;80 年代又在花粉原生质体、精细胞和生殖细胞的操作方面取得长足的进展,成为研究的热点。这里仅举出一些突出苗头:通过花粉四分体原生质体和体细胞原生质体融合以进行“配子-体细胞杂交”已经再生杂种植株;大量分离和纯化花粉原生质体的技术已在几种植物中完全成功;幼嫩花粉原生质体培养已诱导了多细胞团与类似原胚的构造,突破了其孢子体发育的第一关;大量分离精子及其前身生殖细胞的技术已在多种植物中过关等等。以上种种,在不久前的实验胚胎学著作中还没有反映或仅属推测,今天已经成为现实,足见其进展之迅猛。就雌性系统的操作而言,60 年代成功地实现了传粉后的子房与胚珠培养;70 年代后期又实现了未传粉的子房与胚珠培养;到了 80 年代,人们已经采取实际步骤向胚囊和卵细胞的操作前进,其第一步——生活胚囊、胚囊细胞原生质体的分离——已经突破。雌、雄两性细胞与原生质体操作技术都达到相当成熟的地步。以此为基础,开展雌雄细胞体外融合的实验,终于在 90 年代实现了以往所提出的“受精工程”的设想。过去名为“离体受精”实则离体子房或胚珠授粉的技术(器官水平的操作)现已演进为高等植物真正含义上的离体受精(原生质体水平的操作)。

实验生殖生物学的第二个主要特征是其多学科综合性研究的性质较以往更为显著。以往实验胚胎学,主要是在胚胎学中融入了生理学和遗传育种的成分。Maheshwari 与 Rangaswamy(1965)所撰长篇综述“与生理学和遗传学相关联的胚胎学”中的内容即体现了

这一特征。诚然,在某些(尤其是近年)实验胚胎学研究中也加强了细胞生物学与分子生物学的内容,但无论广度与深度都是很不够的。当代的实验生殖生物学研究中,细胞生物学、分子生物学等多学科的渗透上升到重要地位,各种新的研究方法不断被用来揭示生殖过程的奥秘。如应用超微结构和超微细胞化学技术、荧光显微术、活体观察与视频显微术、图像处理术、显微定量测定术、放射自显术、免疫学技术以及分子生物学技术,从不同角度对同一问题作了深入细致的探索,在有关研究报告中日有所见。这里仅以围绕精子分离所进行的多学科研究为例加以说明:分离精子的目的最初是为了观察它们在离体条件下的形态变化与运动性能。以后发展到观察在分离状态下的雄性生殖单位与精子二型性。最近,由于雌、雄识别的研究逐渐由花粉与雌蕊的识别向配子间的识别深入,加之关于“倾向受精”的认识表明,被子植物的一对精子可能分别具有与卵细胞或中央细胞识别的能力,目前已着手分离精子的免疫学鉴定,旨在探讨精子的识别物质。利用精、卵体外融合实验系统,已能构建受精前后卵细胞与合子的 cDNA 文库,筛选受精过程中优势表达的基因。应用共聚焦激光扫描显微术,已能测出体外受精过程中出现的钙波。由此可以看出,精子分离不只是一个操作技术的问题,而是涉及到细胞生物学、生理学、生物化学、分子遗传学等多个相邻学科的范围,囊括了分离提纯、活体观察、超微结构、生活力测定、冷冻保存、单克隆抗体制备、免疫学测定、由微量细胞构建 cDNA 文库的分子生物学技术、蛋白质分子分离与鉴定、原生质体融合等多种研究技术方法。这个例子可以很好地反映当代实验生殖生物学多学科综合性研究的特色。当然,所谓多学科综合性研究是就整体而言的,并不意味着排斥了为特定目的而进行的单项研究。这正如上文所述,实验生殖生物学的操作水平从整体上已进入细胞与原生质体操作的阶段,并不意味着排斥器官与组织的操作,其道理是不言自明的。

二

现在再讨论植物实验生殖生物学向应用方面延伸的问题。实验生殖生物学的强大生命力不仅表现在探索未知方面,而且表现在通过它开拓生殖工程应用技术的前景方面。依我们看,“生殖工程”的含义包括整个有性生殖过程的控制与利用,比“受精工程”的范围更广。它标志着人类通过生殖过程改造植物遗传性的能动性达到一个新的高度。

首先让我们从宏观上考察一下近代植物改良基本途径的演变动态。近代植物改良的主要途径是通过有性杂交结合双亲的遗传物质,即通常所称的常规杂交育种。60 年代以后,出现了两方面的重大突破:一是细胞与原生质体培养技术的建立,证实了植物细胞的全能性,初步实现了高等植物细胞的“微生物化”;二是在分子遗传学的基础上发展了基因工程技术。二者的结合导致了植物细胞工程技术的兴起。后者由于是以体细胞及其原生质体为主要实验体系的,实际上可说是“体细胞工程”。体细胞工程的成就表明人类可以在常规有性杂交之外增加一条通过体细胞培养改良植物的新途径。与此同时,实验胚胎学所创造的一系列方法也成功地用于单倍体育种和远缘杂交育种。在这样的背景下,人们对生殖系统的机能与利用潜力就投以新的眼光,试图通过实验生殖生物学的努力和借鉴体细胞工程的经验开辟生殖细胞工程或性细胞工程的新局面。可以预测,从现在开始的一二十年内将会有一个研究生殖工程的高潮。

既然有体细胞工程,何必还需要生殖工程呢?为了回答这个疑问,有必要分析生殖工程

的特点和优点。我们认为至少以下三点是很明显的:第一,有性生殖毕竟是植物的自然生殖过程,是无性的或准性的生殖过程无论如何不能完全取代的。换言之,就多数植物来说,通过有性过程繁衍后代是一条顺乎自然的、因而也是阻力较小的途径。并且近年有些研究表明,通过这一过程施行基因工程也是可行的。现在认为:花粉管不仅是雄配子的运载工具,而且具有外源基因载体的功能;卵细胞由于部分地缺壁,类似天然原生质体状态,这不仅是对受精的适应,而且也具备了基因工程受体的特征;至于合子,作为天然的胚胎发生原始细胞,其优越性更是毫无疑义的。因此,借助有性生殖施行基因工程的设想在理论上是经得起论证的。现在的问题还是在实际操作技术的有些方面尚未过关。第二,生殖系统中拥有许多天然的单倍性细胞,由它们可以直接制取单倍原生质体。小孢子四分体、小孢子、花粉粒、花粉管、生殖细胞、精子、大孢子、胚囊、卵细胞与其它胚囊成员细胞,都是单倍性细胞,其中有些细胞(如精子)还是天然的原生质体。单倍原生质体在遗传工程中的价值勿庸赘言。但迄今获得单倍原生质体的方法是先通过花药培养或其它途径诱导单倍体植株,然后再由后者的细胞制取原生质体,这种间接的方法是相当麻烦的。如果生殖系统所提供的单倍原生质体能够培养和操作,将会在遗传工程中显示巨大的优越性。第三,生殖系统中蕴藏着丰富多样的细胞类型,尤其在细胞质方面差异很大。如卵细胞有丰富的细胞质;精子的细胞质则相对贫乏,犹如天然的核质体。在一粒花粉中的两个精子,其细胞器的种类与含量也可能有很大差别,如白花丹的二型精子,一个富含质体、另一个富含线粒体,等等。这将成为开展细胞器工程研究的好材料。因此,把生殖系统中可供利用的细胞开发出来,可以建立各种有特色的细胞工程实验系统,潜力是不小的。

最后作一个简略的归纳:植物生殖生物学是以认识植物生殖过程自然规律为内容的基础研究学科。植物生殖工程是通过生殖过程改良植物的应用技术领域。而实验生殖生物学则是把二者联结起来的桥梁,是基础研究与高技术的一个结合点,我们应当给以足够的重视。

(作者:杨弘远、周嫦。原载:植物学通报,1989,6(4):
193~196。现略加文字修改,作为本书前言。)

目 录

第一章 雄性器官与细胞的实验研究	1
提要	2
第一节 花药培养与雄核发育	3
提要	3
1 水稻花粉去分化新激素的探索	4
2 外源激素在水稻花药培养中的作用	9
3 水稻花粉两条发育途径的实验研究	13
4 水稻幼花直插培养诱导花粉孢子体发育的实验	19
5 大麦的花药培养与雄核发育	22
第二节 花粉萌发与花粉管生长	23
提要	23
1 Fluorescein diacetate used as a vital stain for labeling living pollen tubes	24
2 用荧光染色与冬青油透明技术显示花粉细胞核	27
3 玉帘离体萌发花粉管中生殖细胞核的有丝分裂和无丝分裂	32
4 pH 值与聚乙二醇对芸苔属花粉人工萌发的影响	33
5 外源 Ca^{2+} 对烟草花粉管生长和生殖核分裂的调节	34
6 Ca^{2+} 载体 A23187 对烟草生殖核分裂的调节	35
7 Nifedipine 对烟草花粉萌发、花粉管生长及生殖核分裂的影响	36
8 外源钙调素和钙调素拮抗剂对烟草离体花粉管生长和生殖核分裂的调节	37
第三节 花粉原生质体操作	41
提要	41
1 三种植物花粉原生质体的大量分离与初步培养	42
2 Cell divisions in pollen protoplast culture of <i>Hemerocallis fulva</i> L.	46
3 唐菖蒲花粉原生质体及其萌发花粉管的超微结构研究	52
4 萱草幼嫩花粉原生质体培养启动细胞分裂的超微结构研究	59
5 玉米花粉与唐菖蒲花粉原生质体中肌动蛋白微丝的荧光显微观察	65
6 甘蓝型油菜和紫菜苔花粉原生质体的大量分离	70
7 紫菜苔花粉超低温保存及其原生质体分离	74
8 烟草花粉原生质体的分离	78
9 烟草幼嫩花粉原生质体分离与早期离体发育	80
10 烟草单个花粉原生质体透射电镜样品制备及其超微结构观察	84
11 紫菜苔花粉原生质体的电激转化及 Zm13-260-GUS-NOS 融合基因的时序	

表达	87
12 芸苔属花粉-下胚轴原生质体融合再生杂种小植株	90
13 Development and molecular identification of pollen-somatic hybrid plants in <i>Brassica</i> spp.	97
14 烟草属花粉-叶肉原生质体的融合及杂种植株再生	100
第四节 脱外壁花粉操作	103
提要	103
1 芸苔属脱外壁花粉的分离与人工萌发	104
2 芸苔属脱外壁花粉作为研究花粉萌发的新实验系统	110
3 Preparation of exine-detached pollen in <i>Nicotiana tabacum</i>	116
4 烟草脱外壁花粉人工萌发与离体授粉实验系统的建立	118
5 烟草花粉发育过程及不同组织中的内源 GUS 活性	125
6 烟草脱外壁花粉的电激基因转移	126
7 β -glucuronidase gene and green fluorescent protein gene expression in de-exined pollen of <i>Nicotiana tabacum</i> by microprojectile bombardment	127
第五节 生殖细胞操作	131
提要	131
1 Direct observations on generative cells isolated from pollen grains of <i>Haemanthus</i> <i>katherinae</i> Baker	132
2 Isolation and purification of generative cells from fresh pollen of <i>Vicia faba</i> L.	136
3 花粉生殖细胞的大量分离与纯化	139
4 多种被子植物花粉生殖细胞大量分离技术的比较研究	142
5 分离的黄花菜花粉生殖细胞在培养条件下的核分裂	148
6 几种植物花粉生殖细胞的融合实验	152
7 Fluorescent vital staining of plant sexual cell nuclei with DNA-specific fluorochromes and its application in gametoplast fusion	153
8 Isolated generative cells in some angiosperms: a further study	157
9 Microtubule organization of <i>in situ</i> and isolated generative cells in <i>Zephyranthes</i> <i>grandiflora</i> Lindl	163
10 Microtubule changes during the development of generative cells in <i>Hippeastrum</i> <i>vittatum</i> pollen	168
第六节 精细胞操作	174
提要	174
1 Isolation of viable sperms from pollen of <i>Brassica napus</i> , <i>Zea mays</i> and <i>Secale</i> <i>cereale</i>	175
2 紫菜苔精细胞的大量分离和生活力保存	178
3 几种具二细胞型花粉植物精细胞的分离和融合	185
其它论文目录	193

第二章 雌性器官与细胞的实验研究	195
提要	196
第一节 未传粉子房与胚珠培养和离体雌核发育	196
提要	196
1 从水稻未授粉的幼嫩子房培养出单倍体小植株	198
2 Induction of haploid rice plantlets by ovary culture	201
3 水稻未受精胚囊的离体胚胎发生	204
4 水稻子房培养时助细胞的无配子生殖和卵细胞的异常分裂	207
5 水稻子房培养中的胚状体与愈伤组织形态发生特点	212
6 水稻离体无配子生殖的进一步胚胎学研究	213
7 毒莠定作为外源激素促进水稻子房培养中胚状体的分化	217
8 水稻胚囊植株染色体倍性及其它性状的研究	220
9 水稻的未传粉子房培养	225
10 <i>In vitro</i> production of haploids in rice through ovary culture	232
11 大麦未授粉子房培养的胚胎学观察	243
12 由向日葵幼花或胚珠培养出单倍体小植株与胚状体	244
13 向日葵未受精胚珠培养时胚状体发生的显微观察	246
14 向日葵离体孤雌生殖过程的组织化学研究	250
15 几种因素对向日葵离体孤雌生殖和体细胞增生的调节作用	251
16 用整体染色与透明技术观察胚囊、胚、胚乳和胚状体	257
17 An electron microscope study on <i>in vitro</i> parthenogenesis in sunflower	262
18 <i>In vitro</i> production of haploids in <i>Helianthus</i>	272
19 韭菜未传粉子房培养中单倍体的胚胎发生和植株再生	281
20 韭菜孤雌生殖和反足细胞无配子生殖的超微结构观察	285
第二节 胚囊操作	293
提要	293
1 被子植物胚囊酶法分离的研究:固定材料的分离技术与显微观察	294
2 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	299
3 金鱼草胚囊的人工分离	304
4 酶法分离胚囊的荧光显微观察	306
5 Observations on enzymatically isolated living and fixed embryo sacs in several angiosperm species	310
6 A study of fertilization events in living embryo sacs isolated from sunflower ovules	317
7 金鱼草珠被绒毡层壁囊的分离与鉴定	321
8 分离烟草胚囊的新方法及诱导卵细胞与助细胞原生质体的原位融合	329
其它论文目录	336

第三章 授粉、受精与胚胎发育的实验研究	337
提要	338
第一节 授粉与受精	338
提要	338
1 水稻去雄方法的初步研究	339
2 小麦受精过程中若干问题的胚胎学研究	343
3 芝麻授粉方法和性因素年龄的初步研究	351
4 芝麻花粉在雌蕊上萌发与生长的研究	352
5 花粉数量对芝麻受精结实、胚胎发育和后代的作用	357
第二节 离体受精	369
提要	369
1 用聚乙二醇诱导选定的成对原生质体间的融合	369
2 烟草雌性细胞原生质体的融合实验	375
3 烟草中央细胞离体受精过程中雌雄核融合生活动态的记录	382
第三节 合子、中央细胞与幼胚的操作	384
提要	384
1 烟草受精后胚囊和合子的分离及合子的离体分裂	385
2 烟草合子与二胞原胚在离体培养中的发育	390
3 烟草未受精中央细胞及其它胚囊细胞的离体分裂	395
4 植物幼小原胚的电激转化	400
5 Gene transfer into isolated and cultured tobacco zygotes by a specially designed device for electroporation	404
6 小麦分离合子与幼胚中膜钙和钙调素的分布	408
7 水稻卵细胞与合子的分离	409
8 In vitro development of early proembryos and plant regeneration via microculture in <i>Oryza sativa</i>	410
9 Isolation and <i>in vitro</i> culture of zygotes and central cells of <i>Oryza sativa</i> L.	418
10 水稻原胚和刚启动分化的幼胚 cDNA 文库的构建与分析	425
11 一种适于植物幼胚 mRNA 整体原位杂交的方法	428
其它论文目录	431
第四章 有性生殖的超微结构与细胞化学研究	433
提要	434
第一节 胚囊和珠孔的超微结构研究	434
提要	434
1 水稻胚囊超微结构的研究	435
2 向日葵胚囊的超微结构和“雌性生殖单位”问题	446
3 Ultrastructure of the micropyle and its relationship to pollen tube growth and synergid degeneration in sunflower	454

4 陆地棉珠孔的结构及花粉管在其中的生长途径	465
5 甘蓝型油菜珠孔与胚囊的超微结构研究	467
第二节 雌蕊中钙与钙调素的细胞化学定位	468
提要	468
1 Ultracytochemical localization of calcium in the embryo sac of sunflower	469
2 向日葵柱头、花柱和珠孔中钙分布的超微细胞化学定位	480
3 陆地棉雌蕊的花粉管生长途径中钙分布的超微细胞化学定位	483
4 甘蓝型油菜授粉前后珠孔和胚囊中钙分布的超微细胞化学定位	489
5 水稻雌蕊与胚囊中钙的超微细胞化学定位	495
6 钙调素 mRNA 和蛋白在水稻花药和雌蕊发育过程中的原位定位	499
7 烟草受精前后胚囊中钙调素的免疫细胞化学定位	508
8 钙调素 mRNA 在受精前后分离的烟草胚囊中的定位	513
第三节 雌蕊中 ATP 酶与植物激素的细胞化学定位	517
提要	517
1 金鱼草胚珠中 ATP 酶活性的超微细胞化学定位	518
2 向日葵胚珠中 ATP 酶活性的超微细胞化学定位	521
3 烟草雌蕊的花粉管生长途径中几种植物激素的免疫金电镜观察	530
4 受精前后烟草卵细胞内玉米素和三类酸性植物激素分布的 免疫金电镜观察	534
5 烟草原胚中赤霉素 GA ₇ 与 GA ₄ 分布的免疫电镜观察	543
其它论文目录	546

第五章 植物实验生殖生物学专题论述	547
提要	548
1 Experimental plant reproductive biology and reproductive cell manipulation in higher plants: now and the future	549
2 <i>In vitro</i> induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules	556
3 <i>In vitro</i> gynogenesis	564
4 花粉原生质体、精子与生殖细胞的实验操作	573
5 植物性细胞原生质体的分离、培养和融合	580
6 花粉原生质体与配子原生质体操作的研究进展与前景	587
7 被子植物离体受精与合子培养研究进展	592
8 Some approaches to the experimental manipulation of reproductive cells and protoplasts in flowering plants	598
9 受精过程中助细胞退化机理的研究进展	607
10 钙在有花植物受精过程中的作用	611
11 荧光显微术在当代植物细胞生物学研究中的应用	619
12 荧光显微术	627

13 植物胚胎学中的整体透明技术.....	638
其它论文目录.....	642

彩色图版

CONTENTS

chapter 1	Experimental researches on male organs and cells	1
Note		2
Section 1	Anther culture and androgenesis	3
Note		3
1	An investigation on new exogenous hormones for pollen dedifferentiation	4
2	The role of exogenous hormones in rice anther culture	9
3	Experimental researches on the two pathways of pollen development in <i>Oryza sativa</i> L.	13
4	Induction of sporophytic development in rice pollen by flower cutting	19
5	Anther culture and androgenesis of <i>Hordeum vulgare</i> L.	22
Section 2	Pollen germination and pollen tube growth	23
Note		23
1	Fluorescein diacetate used as a vital stain for labeling living pollen tubes	24
2	A fluorescence staining-methyl salicylate clearing technique for demonstrating pollen nuclei	27
3	Mitosis and amitosis of generative cell nuclei in artificially germinated pollen tubes in <i>Zephyranthes candida</i> (Lindl.) Herb.	32
4	Influence of medium pH and polyethylene glycol on the artificial pollen germination in <i>Brassica</i>	33
5	Exogenous Ca^{2+} regulation of pollen tube growth and division of generative nucleus in <i>Nicotiana tabacum</i>	34
6	Regulation of generative nucleus division by calcium ionophore A23187 in <i>Nicotiana tabacum</i> pollen tubes	35
7	Effects of nifedipine on pollen germination, pollen tube growth and division of generative nucleus in <i>Nicotiana tabacum</i>	36
8	Regulation of <i>in vitro</i> pollen tube growth and generative nucleus division by exogenous calmodulins and calmodulin antagonist in <i>Nicotiana tabacum</i> L.	37
Section 3	Manipulation of pollen protoplasts	41
Note		41
1	Mass isolation and culture of pollen protoplasts from three plant species	42
2	Cell divisions in pollen protoplast culture of <i>Heimerocallis fulva</i> L.	46
3	An ultrastructural study on pollen protoplasts and pollen tubes germinated from	

them in <i>Gladiolus gandavensis</i>	52
4 An ultrastructural study on the triggering of cell division in young pollen protoplast culture of <i>Hemerocallis fulva</i> L.	59
5 Fluorescence microscopic observations on actin filament distribution in corn pollen and gladiolus pollen protoplasts	65
6 Release of pollen protoplasts in large quantities in <i>Brassica napus</i> and <i>B. campestris</i> var. <i>purpurea</i>	70
7 Pollen cryopreservation and pollen protoplast isolation in <i>Brassica campestris</i> var. <i>purpurea</i>	74
8 Isolation of pollen protoplasts in <i>Nicotiana tabacum</i>	78
9 Isolation and early <i>in vitro</i> development of young pollen protoplasts in <i>Nicotiana tabacum</i>	80
10 Specimen preparation of single pollen protoplasts for TEM and their ultrastructural observation in <i>Nicotiana tabacum</i>	84
11 Transient transformation of pollen protoplasts via electroporation and temporal expression of Zm 13-260-GUS-NOS chimeric gene in <i>Brassica campestris</i> var. <i>purpurea</i>	87
12 Regeneration of hybrid plantlets via pollen-hypocotyl protoplast fusion in <i>Brassica</i> spp.	90
13 Development and molecular identification of pollen-somatic hybrid plants in <i>Brassica</i> spp.	97
14 Pollen-mesophyll protoplast fusion and hybrid plant regeneration in <i>Nicotiana</i> ...	100
Section 4 Manipulation of de-exined pollen	103
Note	103
1 Isolation and artificial germination of de-exined pollen in <i>Brassica</i>	104
2 <i>Brassica</i> de-exined pollen as a new experimental system for studying pollen germination	110
3 Preparation of exine-detached pollen in <i>Nicotiana tabacum</i>	116
4 Establishment of an experimental system for artificial germination and <i>in vitro</i> pollination with de-exined pollen in <i>Nicotiana tabacum</i>	118
5 Intrinsic GUS activity in various tissues and during pollen development of <i>Nicotiana Tabacum</i>	125
6 Exine-detached pollen of <i>Nicotiana tabacum</i> as an electroporation target for gene transfer	126
7 β -glucuronidase gene and green fluorescent protein gene expression in de-exined pollen of <i>Nicotiana tabacum</i> by microprojectile bombardment	127
Section 5 Manipulation of generative cells	131
Note	131
1 Direct observations on generative cells isolated from pollen grains of <i>Haemanthus</i>	