

五唇兰受精过程中卵细胞的响应^{*}

李冬妹^{1,2}, 伍成厚¹, 叶秀萍¹, 梁承邨¹

(1. 中国科学院华南植物园, 广东 广州 510650
2 顺德职业技术学院, 广东 佛山 528300)

摘 要: 五唇兰 *Doritis pulcherrima* Lindl 受精过程中超微结构观察结果显示: 精子到达胚囊前, 卵细胞呈梨形; 精子到达胚囊时, 卵细胞呈典型的倒梨形; 精核和卵核融合时, 卵细胞呈长圆型, 卵核凹陷, 整个精核被卵核包围着。由此可见: 五唇兰受精过程的顺利进行, 不仅需要精细胞的主动参与, 还要卵细胞的积极响应。

关键词: 五唇兰 *Doritis pulcherrima* Lindl; 受精; 卵细胞; 响应

中图分类号: Q944.46 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2006) 06 0093-04

受精是被子植物有性生殖过程的中心环节, 卵细胞和中央细胞作为一个执行双受精功能的结构单位, 卵细胞是主体^[1]。以前对卵细胞受精前后做了大量的超微结构观察, 并取得了一些有关结构变化方面的信息。但是, 由于所用试验材料其双受精过程通常是在短时间内完成, 如大豆只有 10 h^[2], 因此双受精过程的细微变化较难被捕捉。本研究采用兰科植物五唇兰 *Doritis pulcherrima* Lindl 为材料, 因其双受精过程较缓慢, 所需时间较长, 花粉管到达珠孔端至双受精完成, 约需 72 h^[3], 所以能较详细地观察到卵细胞的变化过程。本文采用电镜制片的方法, 观察了受精过程中精卵细胞的结构变化, 为深入探讨被子植物的受精机制提供了新的资料。

1 材料和方法

供试材料为中科院华南植物园兰花园栽培的五唇兰 *Doritis pulcherrima* Lindl, 开花期间进行人工授粉, 然后采集不同发育时期的子房。

材料用戊二醛和锇酸先后固定, 乙醇系列脱水, 环氧丙烷过渡, Epon812 常规方法包埋。莱卡-S型切片机钻石刀切片, 厚度约 80~90 nm。超薄切片经 w=2%醋酸双氧铀染色 60~90 min w=6%柠檬酸铅染色 10~15 min 用日本 JEM-1010 透射电镜 100 KV 下观察, 照相。

2 观察结果

五唇兰花粉管到达珠孔端至双受精完成, 胚囊

内卵细胞的形态结构发生了系列变化。

2.1 成熟胚囊时期

胚囊成熟时, 五唇兰的卵细胞位于两个助细胞的一侧, 它的合点端向胚囊中部伸进较长一些, 看似位于胚囊中较高的位置 (图 1)。

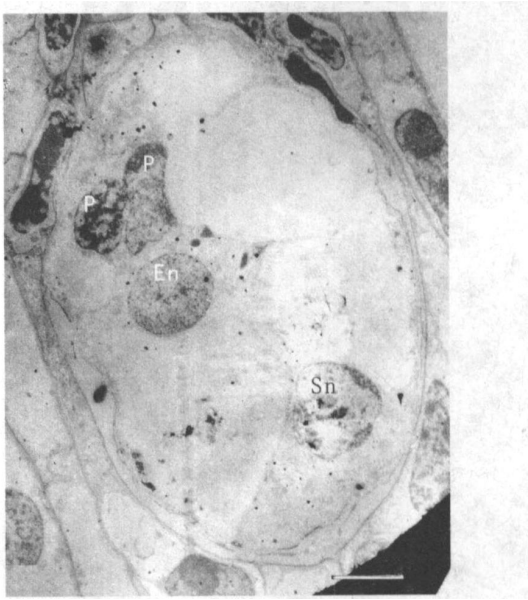


图 1 成熟胚囊: 卵细胞呈梨型, 两极核正在融合
Fig 1 Mature embryo sac The egg cell looks like a pear polar nuclear are fusing
DS 解体助细胞; E 卵细胞; En 卵细胞核;
Sn 助细胞核; P 极核; Sp 精核
(文中图片均以珠孔端朝下; bar=7 μm)

此时, 卵细胞呈梨形, 具明显的极性。细胞核

^{*} 收稿日期: 2006-02-21
基金项目: 广东省科技计划资助项目 (2006B20230004); 广东省重大科技专项资助项目 (2006A2010401)
作者简介: 李冬妹 (1970年生), 女, 博士; 通讯联系人: 叶秀萍; Email: XLYe@scib.ac.cn
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

位于合点端，大部分细胞质位于细胞核的四周，珠孔端为大型的液泡所占据，液泡周围只有一小部分细胞质。卵细胞质的特点是细胞器较少，只在靠近细胞核的有少量的质体和部分分化程度不高的线粒体。线粒体的大小与质体相近，但电子密度低些。卵细胞质中还含有油滴，为无膜结构，电子密度较低，呈淡灰色（图 2）。

五唇兰受精前，中央细胞内的两个极核融合成一个次生核（图 2）。极核融合的基本过程是：①两极核接触；②两极核之间的核膜融合（图 2 白箭头示）。极核融合时，中央细胞内被大型液泡占据，只在极核周围有少量的细胞质，细胞质内质体明显。卵细胞与中央细胞之间的分界只是两层质膜，有的部位两层质膜相互分离，形成较宽的膜间隙，其中沉积某些电子半透明的物质（图 2 黑箭头示）。

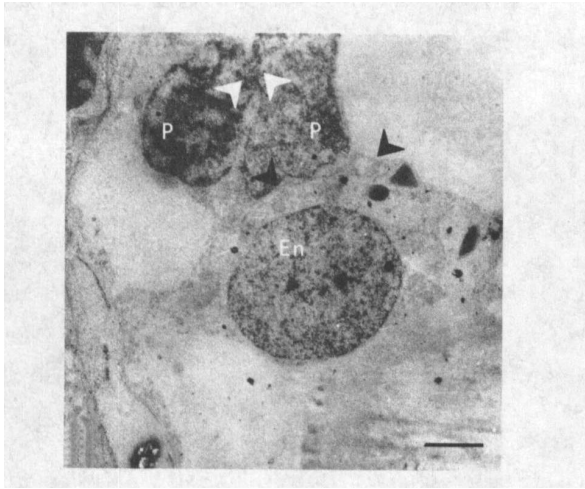


图 2 极核融合

Fig. 2 The fusion of polar nuclear

(白箭头所指为极核正在融合处； bar= 2 μm)

2.2 精子到达胚囊内

精子到达胚囊时，卵细胞呈典型的梨型，细胞质电子密度大，未见明显的细胞器，靠近珠孔端的一侧有液泡，液泡内有结构模糊的细胞器。可见一逗号状的精核位于卵细胞珠孔端细胞质的外侧（图 3），未见完整的细胞结构。中央细胞内的两个极核已融合成一个次生核，次生核内微管规则排列，融合的两极核尚可分辨（图 4）。

2.3 精卵融合时期

卵细胞体积明显增大，长圆形，细胞核位于胚囊中央，形似凹透镜，精核位于卵核的凹陷处（图 5）。卵细胞与受精极核之间有正在形成的细胞壁出现（图 5 箭头所示）。五唇兰精核与极核融合的速度比精卵与卵核的融合进行得快，当一精核

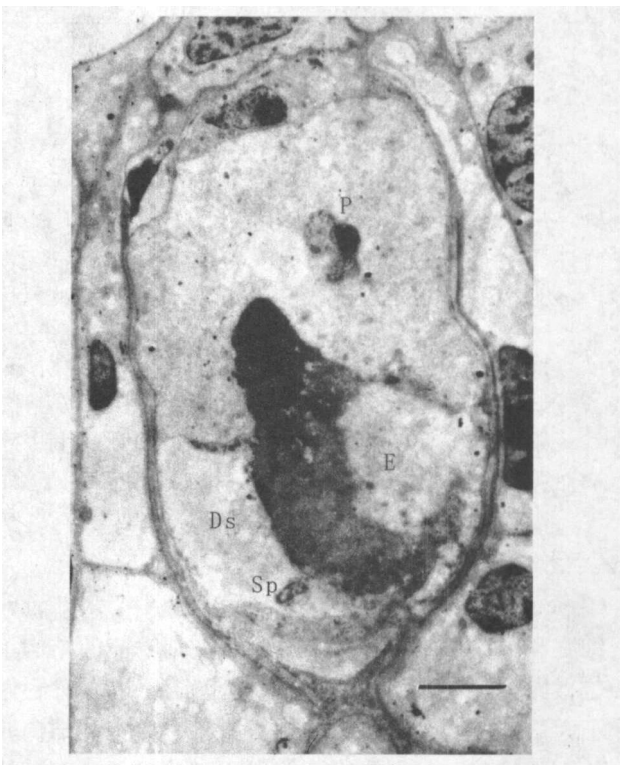


图 3 精子到达胚囊 (bar= 5 μm)

Fig. 3 Sperm cells move into the embryo sac (bar= 5 μm)

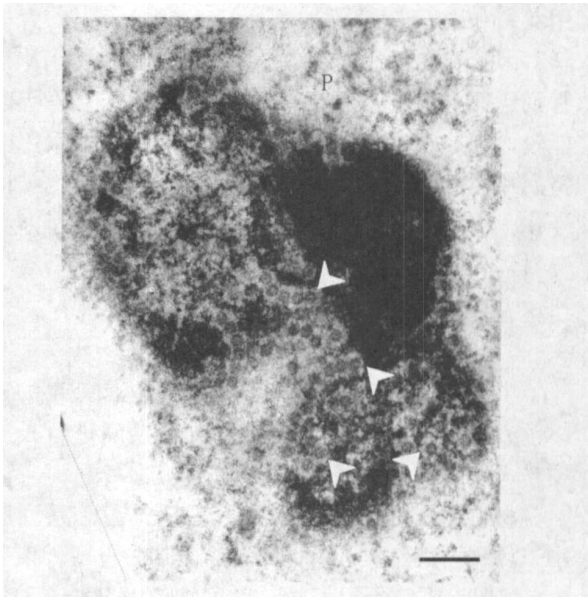


图 4 次生极核

Fig. 4 The secondary nucleus

(箭头示次生核内微管排列规则； bar= 500 nm)

与次生核融合形成胚乳核时，另一精核还处于与卵核相融合的状态。

卵细胞体积明显增大，长圆形，细胞核位于胚囊中央，形似凹透镜，精核位于卵核的凹陷处（图 5）。卵细胞与受精极核之间有正在形成的细胞壁出现（图 5 箭头所示）。五唇兰精核与极核融合的速度比精卵与卵核的融合进行得快，当一精核

与次生核融合形成胚乳核时，另一精核还处于与卵核相融合的状态。

卵核凹陷，象变形虫，包围整个精子核。胚乳核大而且明显，周围细胞质浓，油滴明显，有较多的小液泡，与卵细胞胞间的界线分明。



图 5 精卵融合

Fig. 5 The fusion of the spermatid nucleus and egg nucleus (箭头所指为精核位于卵核凹陷处，胚乳核与受精卵之间有正在形成的细胞壁；bar=5 μm)

3 讨 论

卵细胞受精前后的变化是受精过程的研究热点之一，关于卵细胞受精前后的超微结构观察的报道较多，并获得了一些有关结构变化方面的信息^[4]。普遍认为卵细胞在生理上是较不活跃或合成代谢水平较低，但也有学者认为未受精的卵细胞具较高的合成作用的生理潜能，所谓的静止只是与助细胞相比而言^[1]。五唇兰受精过程中卵细胞形态变化观察结果支持后一种观点，即五唇兰双受精过程中卵细胞并非处于“静止”状态，受精过程需要精子和卵细胞的共同响应。

当精细胞到达胚囊释放后，似乎不需要什么动力即可到达融合的靶区^[1]。而通过胚囊中微丝的研究，有的作者提出精细胞在这短距离的移动可能与独特的微丝分布有关^[5]。叶秀菴等^[6]通过研究

鹤顶兰双受精过程中精子的移动，结合前人的研究结果，认为：精子从解体的助细胞内进入在一定程度上是个自我调控的过程，解体助细胞的内容物可以给精子提供一个特别的外部力量，使精子到达它们的受精位点；精子靠近卵细胞和中央细胞时，两者都在相应的部位有一定的细胞形态变化，这种形态变化有利于细胞互相配合，使融合过程顺利进行。五唇兰受精过程中的超微结构表明：受精过程中卵细胞的外部以及细胞核均出现凹陷现象。五唇兰的这种结构变化支持叶秀菴等的观点：双受精过程不仅需要两个精子的积极参与，同时还需要卵细胞和中央细胞的共同响应。五唇兰精子核和卵核融合的过程与小麦、棉花、紫萼等通过核膜融合的方式完成精子核和卵核的融合的方式不同^[7]。在五唇兰精子核与卵核融合的过程中，卵核首先象变形虫一样，把整个精子核包围，然后核物质才融合在一起，这与体外受精条件下精细胞可以类似被吞噬的方式进入卵细胞的现象一致^[8]。

五唇兰在精子进入成熟胚囊之前卵细胞呈不够规则的长椭圆型；精子进入胚囊后，五唇兰的卵细胞呈典型的洋梨型，此时两极核已融合成一次生核，助细胞解体；当一精核与次生核融合成初生胚乳核时，另一精核位于卵细胞核的凹陷处，整个卵细胞呈长圆型。关于卵细胞的形态报道，大都属于梨型^[7,9]。胡赞民等^[10]在研究打碗花生殖细胞是发现：卵细胞的外形不规则，他们认为可能是人为引起收缩的缘故。小麦在花粉管未到达胚囊之前，卵核的形状呈不规则状；当精核与卵核融合时，卵核的形状呈近圆球状^[11]。如果说通过切片进行超微结构的观察有一定的片面性，那免疫荧光标记技术的运用则可为双受精过程的研究提供更为有价值的佐证。叶秀菴等^[5]等运用免疫荧光标记技术研究鹤顶兰双受精过程中精子的运动时发现：精子与卵细胞融合时，卵细胞朝精子的一侧略凸，延伸形成一个精子进入的凹陷，并提出双受精过程不仅需要两个精子的积极参与，还需要卵细胞和中央细胞的积极配合的观点。由此可见：在有花植物受精作用的过程中，卵细胞的形态变化是一个较为普遍的现象。

导致五唇兰受精过程中卵细胞形态变化的原因值得进一步探讨。超微结构观察的结果表明：被子植物成熟胚囊中，卵细胞在珠孔端具有典型的壁，而在合点端与助细胞和中央细胞相邻的部分留下一个较大暴露质膜的区域^[4]，向日葵^[12]、扁豆^[13]、拟南芥^[14]等都具有这样的特征。这一结构特点与雌配子接受雄配子的功能相适应，无壁的区域使配

子之间能通过膜的融合而合为一体。五唇兰成熟胚囊中, 卵细胞与中央细胞之间的分界也只是两层质膜, 有的部位两层质膜互相分离, 形成较宽的膜间隙。因此, 我们认为: 由于缺少完整的细胞壁, 胚囊内卵细胞的形态会随其它成员细胞的变化而变化。助细胞解体、中央细胞先于卵细胞受精、卵细胞本身的生理变化, 都在可能导致卵细胞的膨压发生变化而造成卵细胞形态上的变化。离体实验也有人采用刺破中央细胞, 使胚囊内部膨压减小, 从而分离出卵细胞的技术^[15]。受精前, 膨压和卵细胞本身的生理状态可能是决定卵细胞形态的重要因素。

参考文献:

- [1] 胡适宜. 被子植物双受精发现 100 年: 回顾与展望 [J]. 植物学报, 1998 40(1): 1-13.
- [2] 申家恒. 大豆受精作用的研究 [J]. 植物学报, 1983 25(3): 213-219.
- [3] 唐源江, 叶秀麟, 陈泽廉. 五唇兰雌配子体发育和胚胎发生的研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 1998 6(4): 289-292.
- [4] HUANG B Q, RUSSELL S D. Female gamete organization, isolation and function [J]. Int Rev Cytol 1992 140: 233-293.
- [5] HUANG B Q, RUSSELL S D. Fertilization in *Nicotiana glauca*: Cytoskeletal modifications in the embryo sac during synergid degeneration. A hypothesis for short distance transport of sperm cells prior to gamete fusion [J]. Planta 1994 194: 200-214.
- [6] YE X L, YEUNG E G, ZEE S Y. Sperm movement during double fertilization of a flowering plant *Pharbitis nil* [J]. Planta 2002 215: 60-66.
- [7] 胡适宜, 朱微. 高等植物受精作用中雄性核和雌性核的融合 [J]. 植物学报, 1979 21(1): 1-10.
- [8] SUN M X, YANG H Y, MAURO CRESTI. In Vitro Fertilization of Angiosperms—10-Year Effort in China [J]. 植物学报, 2002 44(9): 1011-1021.
- [9] 余凡立, 赵洁, 梁世平, 等. 水稻雌蕊与胚囊中钙的超微细胞化学定位 [J]. 植物学报, 1999 41(2): 125-129.
- [10] 胡赞民, 胡适宜. 打碗花 (旋花科) 受精前和受精后的卵器和中央细胞的超微结构 [J]. 植物学报, 1998 40(6): 487-492.
- [11] 田国伟, 申家恒. 小麦受精过程中酸性磷酸酶的超微细胞化学定位 [J]. 植物学报, 1994 36(4): 251-256.
- [12] 阎华, 杨弘远. 向日葵胚囊的超微结构和“雌性生殖单位”问题 [J]. 植物学报, 1989 30(5): 473-479.
- [13] 陈一明, 王伏雄. 扁豆成熟胚囊的超微结构 [J]. 植物学报, 1988 30(2): 117-123.
- [14] MANSFIELD S G, BRIARTY L G, ERN I S. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. I. The mature embryo sac [J]. Can J Bot 1990 69: 447-460.
- [15] HOIM P B, KNUDSEN S, MOURITZEN R et al. Regeneration of fertile barley plants from mechanically isolated protoplasts of fertilized egg cell [J]. Plant Cell 1994 6: 531-543.

The Response of Egg Cell During the Process of Fertilization in *Doritis pulcherrima* Lindl

LIDong-mei^{1,2}, WU Cheng-hou¹, YE Xi-lin¹, LIANG Cheng-ye¹

1. South China Botany Garden, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510650, China;

2. Shunde Polytechnic, Foshan 528300, China)

Abstract The response of egg cell during the process of fertilization in *Doritis pulcherrima* Lindl is studied. The results are summarized as follows: Before the sperm cell reached the embryo sac, the egg cell appeared like a pear; then the egg cell changed to a typical inverse pear as the sperm cell reached the embryo sac. Before the complete fusion of the spermatid nucleus with egg nucleus, the whole spermatid nucleus was enveloped by egg nucleus; the egg cell becomes ellipse at this stage. The ultrastructural characteristics of egg cell provided that the successful fertilization need not only the voluntary participation of sperm cell but also the active response of egg cell in *Doritis pulcherrima* Lindl.

Key words *Doritis pulcherrima* Lindl; fertilization; egg cell response