

· 研究报告 ·

# 侧金盏花双受精进程研究

孙颖, 王蕾, 杨雪, 王阿香, 何淼\*

东北林业大学园林学院, 哈尔滨 150040

**摘要** 应用荧光显微镜和常规石蜡切片观察侧金盏花(*Adonis amurensis*)花粉管生长和受精作用的全过程。结果表明, 侧金盏花为湿型柱头, 授粉后1–2小时, 花粉粒与柱头识别; 授粉后2–4小时, 花粉粒萌发; 授粉后4–6小时, 花粉管进入柱头。侧金盏花的受精模式为珠孔受精, 授粉后10小时, 精子被释放; 授粉后30小时, 精核与卵核融合; 授粉后7天合子形成; 授粉后15天合子进入分裂期, 合子休眠期为8天。2个极核在受精前不融合, 授粉后14–16小时, 精核与1个极核融合; 授粉后20–22小时, 受精极核与另1个极核融合形成初生胚乳核。双受精作用属于有丝分裂前配子融合型。通过实验确定了侧金盏花受精过程的雌雄性细胞融合形态变化与相应经历的时间及其合子休眠期。研究结果丰富了侧金盏花胚胎学资料, 对其今后的育种及转基因研究具有重要意义。

**关键词** 侧金盏花, 花粉管生长, 双受精, 受精过程

孙颖, 王蕾, 杨雪, 王阿香, 何淼 (2017). 侧金盏花双受精进程研究. 植物学报 52, 480–486.

侧金盏花(*Adonis amurensis*)为毛茛科多年生草本植物, 一般生长在东北地区山坡或山脚的灌木丛间、阔叶林下以及林缘地上(王文采, 1980)。因其花色金黄, 又能在冰雪尚未消融之时绽放, 所以素有林海雪莲的美誉。侧金盏花在自然状态下有很高的观赏价值, 并具有花期早、抗寒性强及植株整齐等特点, 因而可以在高寒地区的园林绿化中加以应用, 填补北方地区早春观赏植物稀缺的空白。从国内外现有的文献记载来看, 关于侧金盏花的研究主要集中在药理学(Cunningham and Gantt, 2005; 尹蕾等, 2014)、分类学(Heyn and Pazy, 1989)、抗寒性(曲彦婷等, 2009)和开花生物学(何淼等, 2014; 孙颖等, 2015)等方面, 而关于其胚胎发育过程的研究报道较少。双受精过程是植物遗传和育种的重要理论依据。本研究以引种侧金盏花为试材, 在大量制片的基础上, 将其受精过程中雌雄性细胞融合的形态变化与相应经历的时间结合, 获得了受精过程中详细准确的形态学信息, 确定受精过程经历的时间表, 以期丰富侧金盏花的胚胎学资料, 并为侧金盏花育种及转基因研究奠定重要基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验材料为2010年从老山实验站引种至东北林业大学园林学院苗圃并正常生长5年的300株侧金盏花(*Adonis amurensis* Regel et Radde)植株。侧金盏花种植采用常规大田管理, 2014和2015年取材期间年昼夜平均温度分别为–1–11.5°C和–2–9°C, 日照条件良好。

### 1.2 方法

2014和2015年, 每年于3月中旬至4月初取材。对即将开放的花朵进行去雄和人工授粉, 授粉后套袋并做好标记, 分别在授粉后30分钟、1小时、2小时、4小时和6小时取样; 授粉后6–24小时, 每隔2小时对子房进行1次取样; 授粉后24–96小时, 每隔4小时取样1次。从开花后第4天开始, 每隔1天取样1次, 每次取3份材料。将材料去掉花丝和花瓣后立即投入FAA固定液(90 mL70%乙醇+5 mL冰醋酸+5 mL40%甲醛)中, 进行抽真空处理, 使材料下沉, 每次固定后放入

收稿日期: 2016-09-07; 接受日期: 2017-01-23

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(No.2572017CA13)

\* 通讯作者。E-mail: hemiao\_xu@126.com

4°C冰箱中保存。

采用荧光显微染色法观察侧金盏花花粉萌发和花粉管生长过程。从FAA固定液中取出雌蕊, 切取花柱后放入盛有 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH溶液的培养皿中软化处理2小时。取出材料后, 用去离子水冲洗, 再置于盛有0.1%脱色水溶性苯胺蓝染液中染色4小时。将花柱放在载玻片上, 用盖玻片将材料压平, 在LEICA DM2500荧光显微镜下观察并照相。

采用常规石蜡切片技术研究侧金盏花的受精作用。先用苏木精稀释液进行整体染色, 然后经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片、脱蜡和封片等步骤后进行制片, 切片厚度为 $8\text{--}12 \mu\text{m}$ 。在LEICA DM2500显微镜下观察并照相。

## 2 结果与讨论

### 2.1 花粉萌发和花粉管生长

侧金盏花花柱呈长圆柱形, 柱头具有明显的乳突状细

胞, 乳突细胞在花朵开放后不久便开始分泌乳白色黏液, 进入可授期。侧金盏花的柱头为湿型。花粉和花粉管经脱色水溶性苯胺蓝染色后, 在LEICA DM2500显微镜下用荧光观察, 发现柱头上的花粉和花柱中花粉管均呈现出黄绿色荧光。人工授粉后1–2小时, 花粉粒与柱头识别(图1A, B), 此时花粉为三细胞型(图2A)。人工授粉后2–4小时, 花粉粒在柱头上萌发, 花粉管头部膨大, 2个精子进入花粉管(图2B, C), 大部分花粉粒均可萌发出花粉管(图1C, D)。虽然侧金盏花花粉粒有3条萌发沟, 但只有1条萌发沟能够萌发出花粉管。人工授粉后4–6小时, 花粉管通过乳突细胞进入柱头后继续向子房方向生长(图1E, F)。

### 2.2 双受精过程

#### 2.2.1 卵细胞受精

侧金盏花人工授粉后10小时就有花粉管经由珠孔端进入胚囊, 1个助细胞破裂并释放花粉管的内容物与2个精子。故侧金盏花的受精模式为珠孔受精。刚释

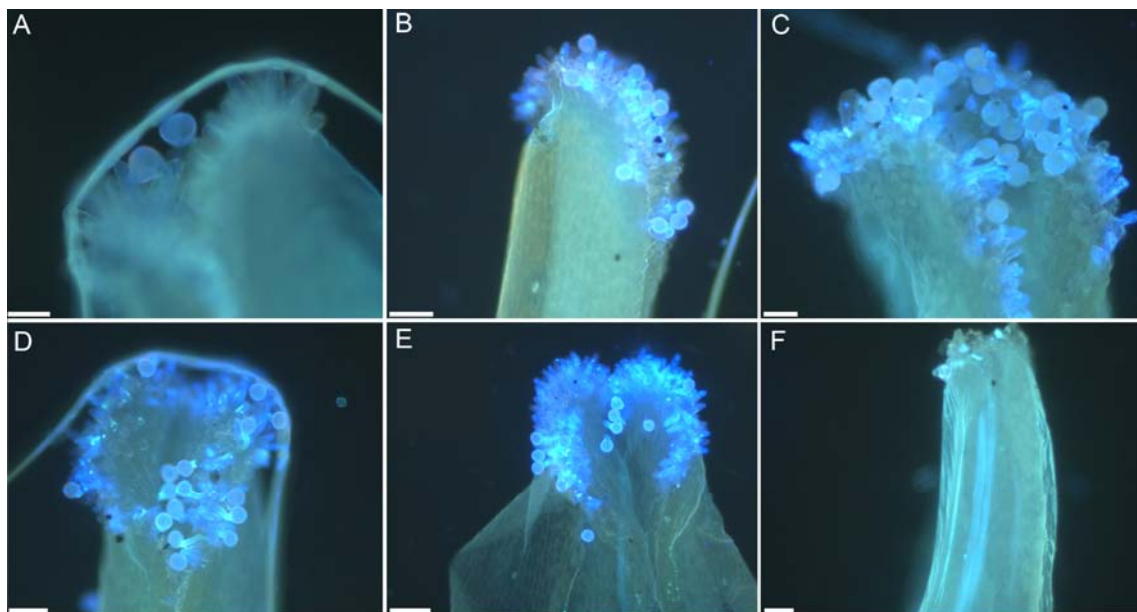


图1 侧金盏花花粉在柱头上萌发

(A), (B) 花粉落在柱头上(授粉后1–2小时); (C), (D) 花粉萌发产生花粉管(授粉后2–4小时); (E), (F) 花粉管进入柱头并向子房方向生长(授粉后4–6小时)。Bar=20  $\mu\text{m}$

Figure 1 Pollen germinates on the stigma of *Adonis amurensis*

(A), (B) Pollen on stigmas (1–2 h after pollination); (C), (D) Pollen germination and pollen tube growth (2–4 h after pollination); (E), (F) Pollen tube enters into the stigma and grows toward the ovary (4–6 h after pollination). Bar=20  $\mu\text{m}$

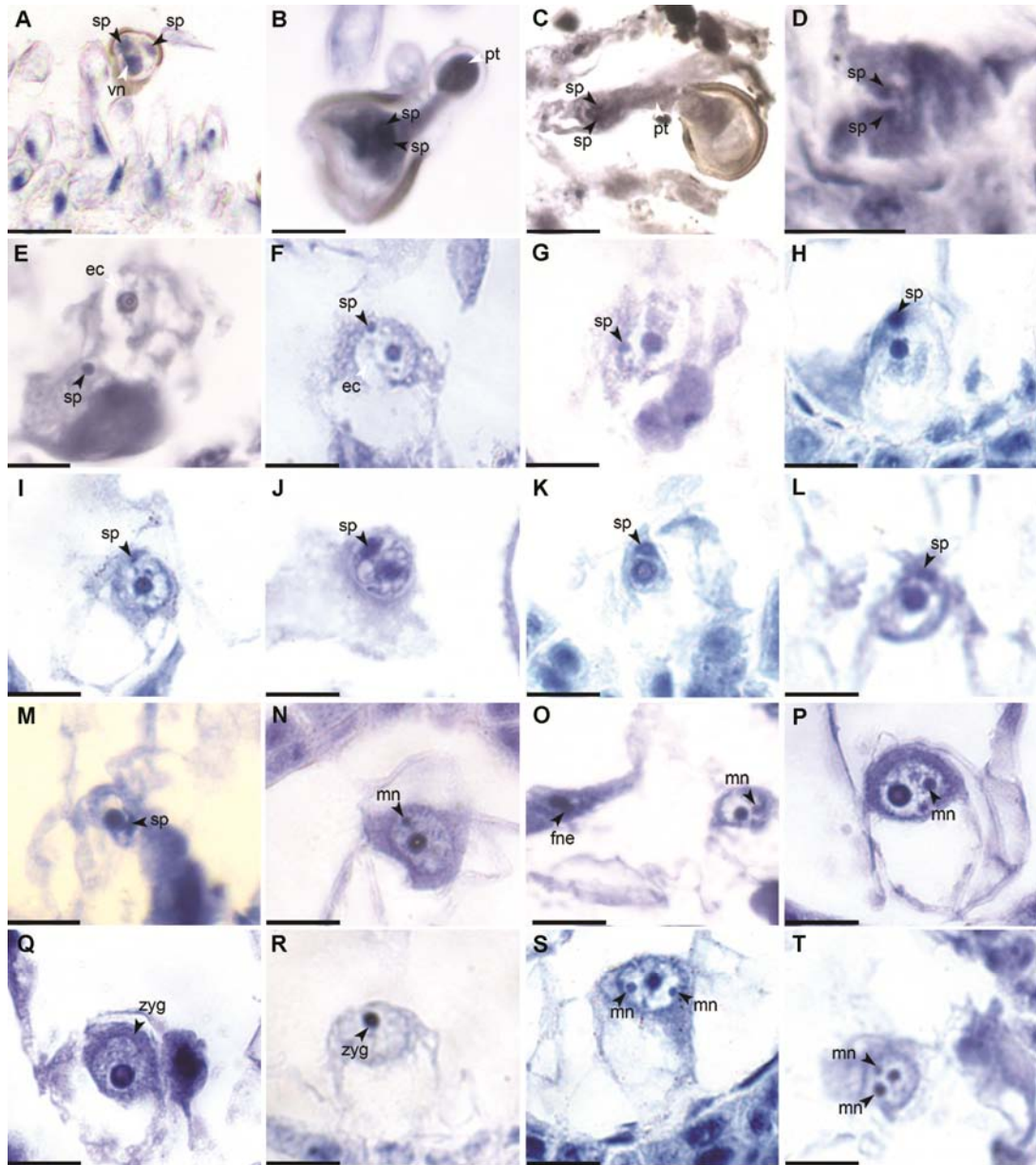


图2 侧金盏花卵细胞受精

(A) 花粉落在柱头上; (B), (C) 花粉萌发, 花粉管头部膨大; (D) 退化助细胞中有2个精子; (E) 精子向卵细胞方向移动; (F) 精核核膜贴在卵细胞膜上; (G), (H) 精子与卵细胞膜融合; (I), (J) 精核逐渐移向卵核; (K), (L) 精核以凸透镜状贴在卵核核膜上; (M) 精核中的染色质分散到卵核中, 精核和卵核融为一体; (N)–(P) 卵核里出现雄性核仁并增大; (Q), (R) 合子; (S), (T) 合子中有2个雄性核仁。ec: 卵细胞; fne: 游离胚乳核; mn: 雄性核仁; pt: 花粉管; sp: 精核; zyg: 合子; vn: 营养核。Bar=10 μm

Figure 2 Egg fertilization of *Adonis amurensis*

(A) The pollen falls onto the stigma; (B), (C) Pollen germinates, and the head of pollen tube expands; (D) Degenerated synergid contains 2 sperm cells; (E) Sperm moves to the egg cell; (F) The sperm nucleus membrane attaches to the egg cell membrane; (G), (H) Fusion of sperm and egg cell membrane; (I), (J) Sperm nucleus gradually moves to the egg nucleus; (K), (L) Sperm nucleus attaches to the egg nucleus membrane like convex lens; (M) Chromatin in the sperm nucleus is dispersed into the egg nucleus, sperm nucleus fuses with egg nucleus; (N)–(P) A small male nucleolus appears and enlarges in the egg nucleus; (Q), (R) Zygote; (S), (T) There are two small male nucleolus in zygote. ec: Egg cell; fne: Free nuclear endosperm; mn: Male nucleolus; pt: Pollen tube; sp: Sperm nucleus; zyg: Zygote; vn: Vegetative nucleus. Bar=10 μm

放的2个精核近似圆球形, 染色较深, 被细胞质鞘包围(图2D)。随后2个精子分开, 向卵细胞和极核方向移动(图2E), 在人工授粉后18小时的切片上可观察到精核的核膜刚刚接触到卵细胞膜(图2F), 随后精子的大部分表面紧紧地贴附在卵细胞膜上, 与卵细胞发生融合(图2G, H), 进入卵细胞细胞质内的精核渐渐向卵核的方向迁移(图2I, J), 而后精核紧紧附着于卵核的核膜之上, 形似凸透镜状, 与卵核的核膜发生融合, 在两核核膜相互接触的位置染色较深(图2K, L)。随后精核的染色质渐渐分散在卵核的一侧, 与卵核的染色质融合为一体(图2M)。接着, 卵核中出现了体积较小的雄性核仁, 小雄性核仁的体积渐渐增大, 最后与卵核核仁的体积基本相等(图2N-P)。此时, 有的胚囊中已经分布了数个胚乳游离核(图2O)。然后, 雄性核仁和卵核核仁相互靠近, 逐渐融合成1个体积较大的核仁, 形成合子(图2Q, R)。卵细胞的受精过程到此结束。由于精卵核的融合早于合子的有丝分裂, 所以侧金盏花受精作用的类型属于有丝分裂前配子融合型(胡适宜和朱澍, 1979)。在整个卵细胞受精过程中, 可观察到在卵细胞内有3个大小不等的核仁(图2S, T), 这是由于多个花粉管进入胚囊, 并释放多个精子到胚囊中, 使2个精子先后与卵细胞融合(多精入卵为偶发现象, 出现概率约为1/1000)。

### 2.2.2 极核受精

释放后的2个精子分别移至卵细胞和2个极核的附近, 其中1个精子游向极核的速度要快于另1个精子游向卵细胞的速度(图3A)。精核与极核的融合速度更快

(图3M, P)。在侧金盏花中, 受精前2个极核紧紧贴在一起并不发生融合, 另1个精核移至2个极核附近, 贴附于距离卵细胞较近的1个极核之上(图3B, C), 两者的核膜相互融合之后, 极核内出现小雄性核仁(图3D)。雄性核仁的体积逐渐由小变大(图3E, F), 雄性核仁和极核的核仁融合成1个大的核仁, 形成受精极核(图3G)。随后, 受精极核与另外1个极核发生融合。首先两者间的核膜逐渐消失, 核质相互融合(图3H, I, M), 然后2个极核的核仁慢慢靠近, 融合(图3J-L), 最后形成1个初生胚乳核, 内含1个体积较大的核仁(图3N, P)。初生胚乳核位于胚囊的中央。在极核受精过程中, 反足细胞逐渐退化(图3O)。至此, 侧金盏花的双受精过程完成。

### 2.2.3 双受精过程经历时间

侧金盏花从传粉到完成受精所经历的时间是从人工授粉开始, 到雌雄配子融合完成为止。栽培环境以及气候条件也影响经历时间的长短, 尤其是生长温度对其影响最大。因此, 本实验记录的双受精过程中各阶段所需要的时间(表1)仅为近似值。从表1可以看出, 精核移向极核的速度要快于精核移向卵核的速度, 且精卵核融合速度慢于精核与极核的融合。确定传粉至完成受精所需要的时间, 对于其遗传育种研究十分重要。

## 2.3 讨论

### 2.3.1 精核的移动速率

对水稻(*Oryza sativa*) (丁律庭等, 2009)和柱花草(*Stylosanthes guianensis*) (古艳和罗丽娟, 2010)双

表1 侧金盏花双受精作用时间表

Table 1 The duration of double fertilization in *Adonis amurensis*

After pollination	Egg fertilization	After pollination	Polar nuclei fertilization
1-2 h	Pollen recognition	1-2 h	Pollen recognition
2-4 h	Pollen germination	2-4 h	Pollen germination
4-6 h	Pollen tube enters into stigma	4-6 h	Pollen tube enter into stigma
10 h	Sperm enters into synergid	10 h	Sperm enters into synergid
10-20 h	Sperm moves to egg cell	10-12 h	Sperm moves to polar nucleus
20 h	The sperm nucleus attaches to the egg cell membrane	12-14 h	The sperm nuclei attache to the polar nucleus membrane
30 h	Egg nucleus fuses with sperm nucleus	14-16 h	Egg nucleus fuses with sperm nucleus
72 h	Male nucleolus appears in the egg nucleus	16-18 h	Male nucleolus appears in the polar nucleus
7 d	Zygote formed	18-20 h	Fertilized polar nucleus formed
15 d	The division of zygote	20-22 h	The endosperm nucleus formed

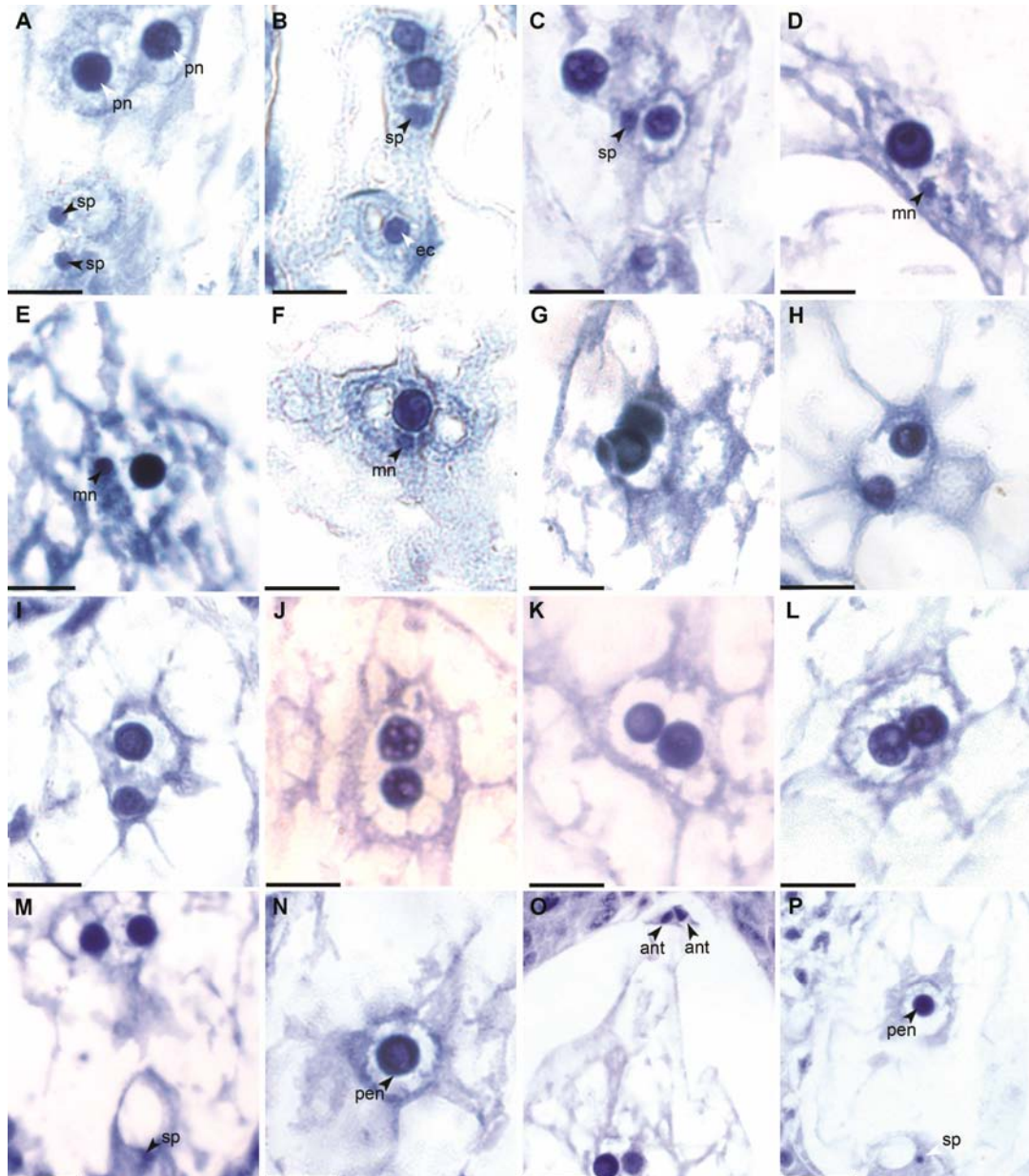


图3 侧金盏花极核受精

(A) 2个精子分别移向极核和卵核; (B), (C) 精核紧紧贴附于极核之上; (D)–(F) 极核内出现雄性核仁且其体积逐渐增大; (G) 雄性核仁与极核核仁融合; (H), (I) 2个极核间的核膜消失, 核质融为一体; (J)–(L) 2个核仁慢慢靠近、融合; (M) 2个极核融合时, 卵细胞还未开始受精; (N) 初生胚乳核; (O) 2个极核融合过程中, 反足细胞退化; (P) 初生胚乳核形成时, 卵核还未开始受精。ec: 卵细胞; mn: 雄性核仁; pn: 极核; pen: 初生胚乳核; ant: 反足细胞; sp: 精核。Bar=10 μm

Figure 3 Polar nuclei fertilization of *Adonis amurensis*

(A) Two sperm cells move to the polar nucleus and the egg nucleus, respectively; (B), (C) Sperm nucleus attaches on polar nucleus; (D)–(F) Male nucleolus appears and enlarges in polar nucleus; (G) The fusion of the male nucleus and the polar nucleus; (H), (I) The nuclear membrane of 2 polar nuclei disappear and the karyoplasm fuses; (J)–(L) Two nucleoli gradually come near and fuse; (M) When the two polar nuclei merge, the egg cell is still unfertilized; (N) Primary endosperm nucleus; (O) Antipodal cells degenerate when two polar nuclei fusing; (P) When the primary endosperm nucleus forms, the egg cell is still unfertilized. ec: Egg cell; mn: Male nucleolus; pn: Polar nucleus; pen: Primary endosperm nucleus; ant: Antipodal cell; sp: Sperm nucleus. Bar=10 μm

受精过程的研究表明, 其精核向卵细胞的移动速度快于向极核的移动速度。而玉米(*Zea mays*) (申家恒等, 1987)和大豆(*Glycine max*) (申家恒, 1983)的双受精过程则表现为2精核同时分别向卵细胞与极核方向移动, 通常精核向极核移动速度较快, 向卵核移动速度稍慢。我们对侧金盏花的研究结果与前人对玉米和大豆的研究结果一致。侧金盏花精核移动到极核需要10–12小时, 而精核移向卵细胞需要10–20小时。被子植物的精细胞无主动运动的结构, 目前对精核移动的解释为: 精核的短距离移动可能与胚囊中独特的微丝分布有关(Fu et al., 2000), 推测精核运动的动力来自肌球蛋白之间的相互作用(Zhang and Russell, 1999)。不同物种间精核向卵细胞和极核移动速度差异的原因尚需进一步研究。

### 2.3.2 雌雄性核仁融合的过程

侧金盏花精卵核的融合早于合子的有丝分裂, 所以侧金盏花受精作用的类型属于有丝分裂前配子融合型(胡适宜和朱澍, 1979)。在受精过程中, 雌雄性核仁融合的过程在不同植物中表现不同。在小麦(*Triticum aestivum*)受精过程中, 雌雄性核仁未必融合(周端和杨弘远, 1964)。而对水稻双受精过程的细胞形态学观察却表明其雄性核仁分别与卵核核仁和极核核仁融合(丁律庭等, 2009)。在黄花菜(*Hemerocallis citrina*) (申家恒等, 2005)受精作用的研究中也观察到类似情况。王建波等(1995)认为受精过程中核仁的融合问题不能一概而论, 在有些物种中核仁的融合是必然的, 在另一些物种中核仁融合则不一定是必需的, 不能把核仁融合作为受精过程的必需事件。

诸多对被子植物受精过程的研究表明, 通常情况下极核的受精过程要比卵细胞快, 其原因是中央细胞与卵细胞相比更为活跃。例如, 在棉花(*Gossypium hirsutum*) (胡适宜和申家恒, 1980)双受精过程中, 2个精子几乎同时分别与雌性核接触, 但精核与2个极核的融合早于与卵核的融合。本实验的观察结果与上述论断一致, 侧金盏花的精核从贴在卵细胞核膜到形成雄性核仁大约要经历52小时, 而精核与极核的这一过程仅需4–6小时。

### 2.3.3 多精受精

在对侧金盏花双受精的观察过程中, 偶然观察到在卵

细胞内有3个大小不等的核仁(图2S, T), 推测这是由于2个精子与卵细胞融合的结果。但侧金盏花多精入卵的比例不大, 在观察的近2 000张切片中, 仅有2张多精入卵。虽然大量的实验结果表明, 即使在人工受精条件下, 由于在配子水平上存在防止多精入卵的机制, 受精卵再次与精子融合也有困难(黄群策等, 2000), 但现在已有多篇文献对多精入卵的现象进行了报道(陈梅生和蒋继良, 1974; 丁律庭等, 2009)。在上述防御机制下, 多精入卵显然是偶发现象。丁律庭等(2009)对水稻双受精过程的研究表明, 只有在2个精核靠得足够近的前提下, 才有可能实现多精入卵。

### 参考文献

- 陈梅生, 蒋继良 (1974). 水稻(*Oryza sativa* L.)的受精作用. 遗传学报 1, 181–191.
- 丁律庭, 申家恒, 李伟, 杨虹 (2009). 水稻双受精过程的细胞形态学及时间进程的观察. 植物学报 44, 473–483.
- 古艳, 罗丽娟 (2010). 热研2号桂花草传粉受精作用的研究. 热带农业科学 30(3), 25–29.
- 何淼, 陈士惠, 马翠青, 孙颖 (2014). 野生及引种侧金盏花的开花物候与传粉特性. 草业科学 31, 431–437.
- 胡适宜, 申家恒 (1980). 棉花受精过程各个阶段的持续时间的研究. 北京大学学报(自然科学版) 1, 77–89.
- 胡适宜, 朱澍 (1979). 高等植物受精作用中雄性核和雌性核的融合. 植物学报 21, 1–10.
- 黄群策, 向茂成, 季彪俊 (2000). 同源四倍体水稻双受精过程的细胞学观察. 湘潭师范学院学报 21(6), 84–87.
- 曲彦婷, 唐焕伟, 陈菲 (2009). 低温胁迫对侧金盏花部分生理生化指标的影响. 国土与自然资源研究 3, 82–83.
- 申家恒 (1983). 大豆受精作用的研究. 植物学报 25, 213–218.
- 申家恒, 李慧容, 李玉芬, 殷华, 连永权 (1987). 玉米双受精过程的细胞学观察. 植物学报 29, 480–485.
- 申家恒, 申业, 王艳杰, 袁秋红, 于春光 (2005). 黄花菜受精过程的研究. 园艺学报 32, 1013–1020.
- 孙颖, 王阿香, 陈士惠, 马翠青, 何淼 (2015). 侧金盏花的花部特征与繁育系统观察. 草业科学 32, 347–353.
- 王建波, 陈家宽, 利容千, 王徽勤 (1995). 长喙毛茛泽泻双受精过程的细胞学观察. 武汉大学学报(自然科学版) 2, 199–202.
- 王文采 (1980). 中国植物志. 北京: 科学出版社. pp. 246–

255.

尹蕾, 张冤, 田海妍 (2014). 福寿草的化学成分研究. 中草药 45, 3361–3366.

周嫦, 杨弘远 (1964). 小麦受精过程中若干问题的胚胎学研究. 遗传学集刊 4, 39–48.

Cunningham FX, Gantt E (2005). A study in scarlet: enzymes of ketocarotenoid biosynthesis in the flowers of *Adonis aestivalis*. *Plant J* 41, 478–492.

Fu Y, Yuan M, Huang BQ, Yang HY, Zee SY, O'Brien TP

(2000). Change in actin organization in the living egg apparatus of *Torenia fournieri* during fertilization. *Sex Plant Rep* 12, 315–322.

Heyn CC, Pazy B (1989). The annual species of *Adonis* (Ranunculaceae)—a polyploid complex. *Plant Syst Evol* 168, 181–193.

Zhang Z, Russell SD (1999). Sperm cell surface characteristics of *Plumbago zeylanica* L. in relation to transport in the embryo sac. *Planta* 208, 539–544.

## Research on the Double Fertilization of *Adonis amurensis*

Ying Sun, Lei Wang, Xue Yang, Axiang Wang, Miao He\*

College of Landscape Architecture, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract** The pollen tube growth and duration of double fertilization in *Adonis amurensis* were studied by paraffin section and fluorescence microscopy observation. *A. amurensis* has a wet column cap. At 1–2 h after pollination, the pollen grain is recognized by the stigma; at 2–4 h after pollination, the pollen grain begins germination; at 4–6 h after pollination, the pollen tube enters into the stigma. *A. amurensis* is porogamous. About 10 h after pollination, the sperm is released; about 30 h after pollination the egg nucleus and sperm nucleus begin fusing; at 7 d after pollination, a sperm fuses with the egg cell to form a zygote; dormant stage of the zygote is about 8 days long and at 15 d after pollination, the first mitotic division of zygote takes place. The two polar nuclei are not fused before fertilization. At 14–16 h after pollination, the sperm nucleus fuses with a polar nucleus; at 20–22 h after pollination, the sperm nucleus fuses with another polar nucleus and forms a primary endosperm nucleus. The type of double fertilization is premitotic syngamy. This study provides an understanding for the morphological change and corresponding timing of male and female cells in *A. amurensis* fertilization, confirms the duration of zygote dormancy, and enriches the knowledge of *A. amurensis* embryological information, which has great significance for *A. amurensis* breeding and genetic modification.

**Key words** *Adonis amurensis*, pollen tube growth, double fertilization, duration of fertilization

Sun Y, Wang L, Yang X, Wang AX, He M (2017). Research on the double fertilization of *Adonis amurensis*. *Chin Bull Bot* 52, 480–486.

\* Author for correspondence. E-mail: hemiao\_xu@126.com

(责任编辑: 白羽红)