

# 水稻双受精过程的共聚焦显微镜观察

代西梅, 黄群策, 秦广雍

(郑州大学 离子束生物工程省重点实验室, 郑州 450052)

**摘要:** 首次利用核特异荧光染色与整体透明技术并利用激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)对水稻双受精过程进行了观察。激光扫描共聚焦显微镜具有“组织与细胞CT”的功能,可以对整体组织进行扫描并构建三维结构。经荧光染色及透明处理后,在激光扫描共聚焦显微镜下经488 nm激光激发,胚囊内各细胞的细胞核以及核仁发出明亮荧光,细胞核轮廓比较清晰,层次感强,并能清晰观察到胚囊内各细胞的结构特点和空间位置关系。不论是对开花前较小的成熟胚囊材料还是开花后较大的胚囊材料都取得了较好的观察效果。同传统的光学显微镜和荧光显微镜相比,其观察到的图像更清晰、更直观、更具立体感。

**关键词:** 水稻; 胚囊; 双受精; 激光扫描共聚焦显微镜

**中图分类号:** Q944.44 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)01-0015-05

## Observation on the double fertilization in rice by using confocal microscopy

DAI Xi-Mei, HUANG Qun-Ce, QIN Guang-Yong

(Henan Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

**Abstract:** Nucleus fluorescent staining and whole clearing technique was first used in this study to observe the process of the double fertilization in rice by using Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM). LSCM is a powerful tool in studying the structure of tissues and cells because of the function of "CT Scanning". When the sample, which was stained with nucleus fluorescent and cleared with whole clearing technique, was excited by 488 nm laser, the nucleus and nucleolus of the cells in it excited bright fluorescent color and the profile of the nucleus was very clear. And the LSCM image showed perfectly the structure and special position of the cells in the embryo sac. Not only the images of small embryo sacs before fertilization, but also the images of big embryo sacs during and after fertilization were perfect. The results suggested that the LSCM was an ideal tool to study the process of double fertilization compared to traditional photics microscope.

**Key words:** rice; embryo sac; double fertilization; Laser Scanning Confocal Microscope(LSCM)

受精作用是生殖生物学的中心问题之一,自1898年俄国植物学家 Nawaschin 首次在欧洲百合和细弱贝母中发现双受精作用以来,人们对各种植物的双受精作用进行了广泛研究,积累了较为丰富的资料。水稻是主要的农作物之一,国内外对其雌配子体及雄配子体的发育过程作了大量形态学及细胞学研究。有关其双受精过程的研究,虽然也有过一些报道(吴素萱等,1965;黄群策等,2000;Akemi-

nev,1914;Cho,1956;Terada,1928),但由于受制片技术及观察手段的限制,对其雌、雄核融合过程及受精时间都有待于进一步的认识。

激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)是20世纪80年代发展起来的当今世界最先进的分子细胞生物学分析仪器,在观察水稻双受精过程中具有重要作用。它在荧光显微镜的成像基础上加装激光扫描装置,利用紫外或可见光激发荧光探针,可得到细胞或组

收稿日期: 2006-07-03 修回日期: 2007-01-23

基金项目: 国家“863”项目(SZ-01-01-03);国家“十五”科技攻关项目(2001BA302B)[Supported by National“863”Program(sz-01-01-03);Key Technologies Research and Development Program of State Tenth Five-Year Project(2001BA302B)]

作者简介: 代西梅(1974-),女,河南郑州人,讲师,博士,主要研究方向为植物遗传育种。

织内部较清晰的荧光图像。利用 LSCM 可以对活的或固定的细胞及组织进行无损伤的系列“光学切片”,得到其各层面的信息,这种功能也被形象地称为“显微 CT”(李楠等,1997)。此外,还可以对样品材料进行连续扫描,通过电脑处理获得其三维立体结构,对其样品内各细胞的空间分布有更清晰的认识。利用 LSCM 观察水稻胚囊结构、形成及发育过程等研究已有一些报道(任宏等,1998;张华华等,2003)。Christensen 等(1997)利用激光扫描共聚焦显微镜检术对拟南芥菜(*Arabidopsis thaliana*)胚珠进行观察,取得理想效果。从而证明了 LSCM 在水稻生殖发育研究中有巨大的应用前景。本文首次利用核荧光染色和子房整体透明技术并利用 LSCM 对水稻双受精过程及胚和胚乳的早期发育进行了详细的观察,得到了大量清晰的图片,为正确认识水稻的双受精过程提供了一些有力的证据。LSCM 在被子植物双受精研究中的应用,将会大大推动双受精在细胞水平及分子水平上的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

紫梗和 IR36。2004~2005 年将实验材料种植于河南新乡市农业科学研究所水稻研究所的实验田内,采用常规管理。

### 1.2 实验方法

分别于开花前 1 d,开花后 0.5、1、2、3、4、5、6、12、24 h 取颖花用 FAA 固定液固定,并保存于固定液中。每个时期约取颖花 50 个。观察前用 70% 的酒精冲洗一下,接着在解剖镜下分离出子房,保存于 70% 酒精中备用。染色前,各个时期的水稻子房经 50%、30%、15% 乙醇至蒸馏水,每次 20 min。然后用 pH8.2 磷酸盐缓冲液预处理 2 h,再用 0.005% 水溶性苯胺蓝溶液染色 2 h。蒸馏水冲洗 2~3 次,然后再用 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 DAPI 溶液染色 12 h。用蒸馏水冲洗 2~3 次,乙醇梯度(15%、30%、50%、70%、85%、95%)脱水,每级 20 min,随后将子房放入无水乙醇中脱水两次,每次的脱水时间为 2 h,接着,再转入无水乙醇中过夜。第 2 天将已经脱水的材料放入由无水乙醇和水杨酸甲酯(1:1)组成的混合液中过渡 1 h,再用水杨酸甲酯透明处理 3 次。在前两次透明时,每次 2 h,最后一次透明的时间为 15 h。所有的试验材料经过水杨酸甲酯透明处理后可

以在水杨酸甲酯中保存备用。观察前,用镊子轻轻将处理好的子房夹出,置于凹玻片上,用丁香油封片(注意加盖玻片时,不要挤压,防止子房变形或破裂)。将制备好的载玻片倒置于 Leica SP2 激光共聚焦扫描显微镜上,用 488 nm 波长的激光激发,扫描获得双受精各个时期的清晰图片,并用 Leica 相关软件对系列扫描图片进行 3 D 重建。

## 2 结果与分析

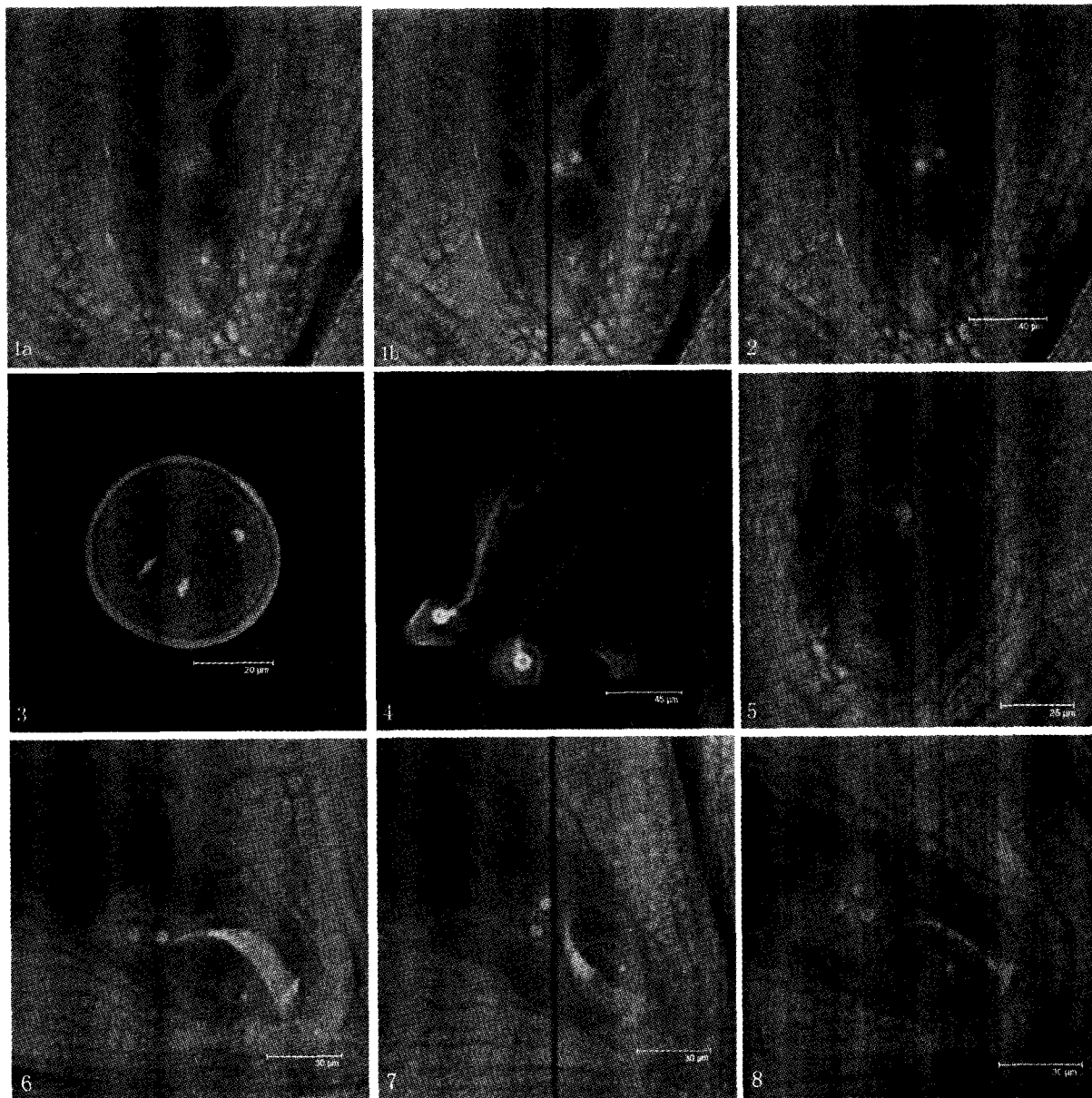
### 2.1 受精前雌、雄配子体在 LSCM 下的结构状态

水稻子房或花粉粒经荧光染色及透明处理后,通过 LSCM 可清晰的观察到胚囊内各细胞结构及花粉粒内部结构。细胞核及核仁经激光激发后可以显示较强的荧光,通过 LSCM 的激光扫描系统可以清晰的观察到胚囊内各细胞的结构及空间分布情况。由于水稻胚囊在成熟期较大,在观察时发现胚囊内各细胞不一定在同一个光学切面上,此时可利用 LSCM 系列扫描功能进行逐层扫描,即“细胞 CT”功能。如图版 I:1a,1b 即为同一成熟胚囊的两个不同光学切片。LSCM 的这种功能可以使我们更准确地观察组织内不同层面的结构,并免去石蜡切片、超薄切片等繁琐的制片工作。系列扫描图像经计算机三维重建后,可得到样品的三维重建结构(图版 I:2),三维重建后的图像可沿 X、Y、Z 轴进行任意角度的旋转,可从不同的角度观察样品内的结构及空间关系。利用 LSCM 的这种连续扫描及重建功能同样也可以清晰的观察到水稻成熟花粉内各细胞结构及其空间分布关系(图版 I:3)。

### 2.2 双受精过程

水稻开花后不同时期的子房经整体染色后,在 LSCM 下可清晰地显示水稻双受精的整个过程及合子和初生胚乳核有丝分裂的情况。

开花后 0.5 h,可清晰地观察到花粉粒在柱头上萌发,形成花粉管。花粉管形成后,进入柱头组织,并在柱头组织中伸长(图版 I:4)。在开花后 1~2 h,可见花粉管经珠孔进入胚囊,但此时未观察到花粉管内精子的释放。在开花后 2~3 h,花粉管在退化助细胞的位置释放出两个精子以及其它一些内含物(图版 I:5)。杨弘远(2005)认为水稻花粉管在退化助细胞中释放精子及其它内含物的细节,尚缺乏足够翔实的证据。作者在利用激光共聚焦显微镜对水稻双受精的观察过程中,确实观

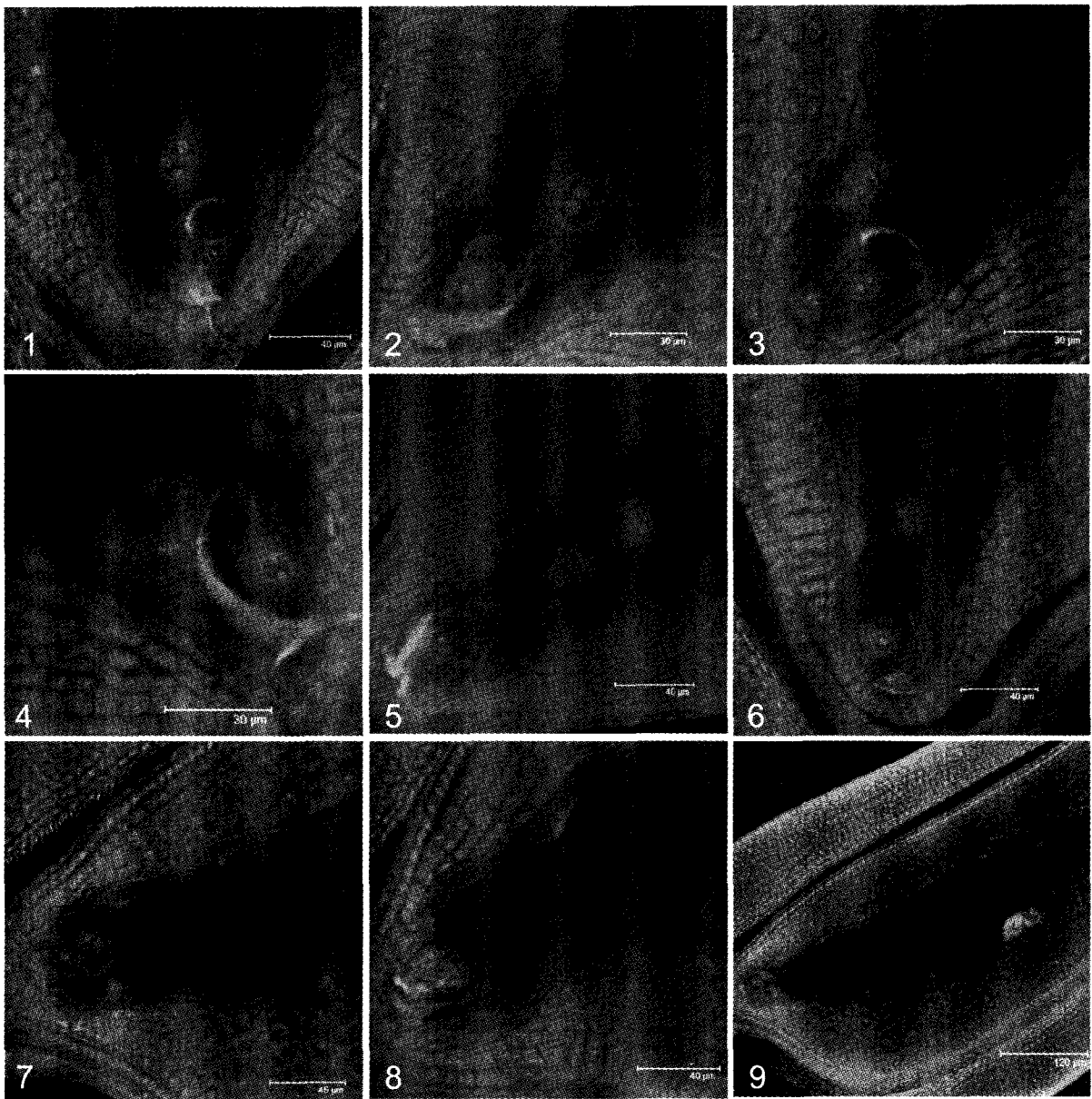


**图版 I** 1a-1b. 同一成熟胚囊 2 个不同切面；2. 1a, 1b 重构形成的图片；3. 成熟花粉粒，示营养细胞与两个精细胞；4. 开花 0.5 h 后，花粉粒在柱头上萌发形成花粉管，花粉管在柱头中伸长；5. 开花后 2~3 h，花粉管在退化助细胞的位置释放出两个精细胞，精细胞呈卵圆形；6. 精核内容物分别进入卵细胞与极核；7. 在一个极核内出现一个小的雄性核仁；8. 开花后 3~4 h 左右，精核的染色质在卵核内扩散，与此同时，极核内的雄性核仁逐渐变大，最后差不多与极核核仁一样大。

**Plate I** 1a-1b. Two different sections of 1 mature embryo sac; 2. Reconstruction picture of 1a and 1b; 3. Mature pollen grain, showing one vegetative cell and two sperm cells; 4. 0.5 hafter flowering, pollen tube generates and elongates in the stamen; 5. 2~3 h after flowering, the oval sperm cells are released at the site of the degenerated synergid; 6. The inclusion of sperm cells migrates toward the point of fusion. 7. A small male nucleolus appears in the polar nucleus. 8. About 3~4 h after flowering, the chromatin of the sperm nucleus diffuses in the egg nucleus, and at the same time, the male nucleolus becomes larger, perhaps no smaller than the female one.

察到了花粉管在退化助细胞的位置释放出两个精子的过程，如图版 I : 5。随后，精核分别进入极核与卵细胞，精核的染色质向极核内分散（图版 I : 6）。之后在极核内出现一个小的雄性核仁（图版 II : 7）。雄卵核内出现一个雄性核仁（图版 II : 1, 2），而此时，极

性核仁会慢慢变大，最后增大至与极核的核仁差不多大小（图版 I : 8）。进入卵细胞的精核也慢慢移动到卵核的位置（图版 I : 7）。开花后 4~5 h，可见精核的内容物慢慢进入卵细胞核（图版 I : 8），随后在核已完成受精作用形成初生胚乳核，并很快进行有



**图版 II** 1. 开花后 4 h 左右, 在卵核内出现 1 个雄性核仁; 极核核膜与雄性核膜融合, 形成具 3 个核仁的初生胚乳核; 2. 1 个极核的核仁与雌性核仁完成融合, 形成具有 2 个核仁的初生胚乳核; 3. 初生胚乳核处在第一次分裂中期; 4. 初生胚乳核处于第一次分裂后期; 5. 开花后 6 h, 卵核内雌性核仁与雄性核仁尚未融合, 初生胚乳核已分裂 1~2 次; 6. 开花后 12 h 左右, 卵核内的雌性核仁与雄性核仁完成融合, 形成一个较大的核仁, 卵细胞完成受精作用; 7-8. 开花后 24 h 左右, 合子完成第一次分裂(4 示横裂; 5 示纵裂); 9. 开花后 24 h, 合子完成第一次有丝分裂时, 已经形成 8 个或更多的游离核, 形成的游离核绕胚囊周缘分布。

**Plate II** 1. 4 h after flowering, a small male nucleolus appears in the egg nucleus, while nuclear membrane of polar nuclei and that of sperm has completed fusion and forms primary endosperm nucleus, which contains three nucleolus. 2. The male nucleolus is fusing with one of the female nucleolus, forming primary endosperm nucleus, which contains two nucleolus. 3. The primary endosperm nucleus is in division (showing mitosis metaphase); 4. The primary endosperm nucleus is in division (showing mitosis anaphase); 5. 6 h after flowering, the male and female nucleolus do not complete fusion. At the same time, the primary endosperm nucleus has completed 1~2 mitoses; 6. 12 h after flowering, the male and female nucleolus complete fusion and form a large nucleolus, then the fertilization of the egg cell completed; 7-8. 24 h after flowering, zygote completes one mitosis (4 showing transverse segmentation, 5 showing longitudinal segmentation); 9. 24 h after flowering, zygote completes one mitosis, and forms two-cell proembryo. At the same time, the primary endosperm nucleus has divided into 8 or more free nuclei, distributing around the circumference of embryo sac.

丝分裂(图版 II : 3, 4)。初生胚乳核分裂前, 核仁一直保持不融合状态, 这与申家恒等在玉米中观察到

的情况相同(申家恒等, 1987)(图版 II : 1)。有时雄性核仁与 1 个雌性核仁融合, 即将分裂的初生胚乳

核呈现出 2 个核仁的情况(图版 II:2)。这种情况类似于卫星等(2004)在羊草双受精过程中观察到的现象。开花后 6 h, 卵细胞核内的雌性核仁与雄性核仁仍未融合, 而初生胚乳核已分裂 1~2 次, 形成 2~4 个游离核(图版 II:5)。在开花后 12 h, 雌性核仁与雄性核仁才完成融合。至此, 卵细胞与精子的融合完成而形成合子。在合子内只有一个较大的核仁(图版 II:6)。此时, 在卵细胞核周围有浓厚的细胞质围绕。雄性核仁与卵核仁的融合一般发生在合子分裂之前, 合子以一个大核仁的形式进入分裂期。

合子一般在开花后 16~18 h 进行第一次有丝分裂, 至开花后 24 h, 合子完成第一次分裂, 形成 2 细胞原胚。水稻大多数合子的第一次分裂为横分裂(图版 II:7), 但也有进行纵分裂的(图版 II:8)。通常情况下, 第一次分裂形成的两个细胞在形态上大小较均等。到合子完成第一次有丝分裂时, 已形成 8 个或更多的游离核, 形成的游离核绕胚囊周缘分布(图 II:9)。水稻胚乳的发育类型为核型胚乳(胡适宜, 1982)。

水稻受精作用属有丝分裂前的配子融合类型。精核与卵核的融合过程和精核与极核的融合过程相似, 但精核与极核的融合速度比其与卵核的融合速度快。精核与极核融合形成的初生胚乳核不经静止期直接进入分裂, 而精核与卵核融合形成合子后一般有 6~8 h 的静止期, 然后才启动第一次有丝分裂过程。

### 3 讨论

关于花粉管进入胚囊及发生受精作用的时间。Akimine(1914)和 Terada(1928)曾报道过水稻的受精时间是在开花后 12 h 进行的。Noguchi 也对水稻花粉粒的萌发和花粉管的生长过程进行了观察, 认为开花后 9 h 花粉管才能到达珠孔, 因而受精时间与作者上述的观察结果一致, 即在开花后 12 h 进行。Cho(1956)对不同温度条件下水稻花粉粒萌发及花粉管生长速度进行了观察, 认为温度对花粉粒的萌发及花粉管生长的速度影响很大, 一般在 30 °C 的田间条件下, 花粉粒萌发和花粉管生长的速度是相当快的, 水稻开花后 30 min, 花粉管已达到珠孔, 有一些已经进入胚囊, 并释放出其中的内含物于卵细胞的上部。吴素萱等(1965)对水稻双受精过程也

进行了较为详细的观察, 观察结果与 Cho 所观察到的结果相一致。本研究用激光共聚焦扫描显微镜对水稻花粉粒的萌发、花粉管的生长及受精时间进行了系统的观察, 在开花后 0.5 h, 花粉粒在柱头上萌发, 并长出一定长度的花粉管延伸到在花柱及子房中, 但未见花粉管到达珠孔端及进入胚囊。开花后 1~2 h, 花粉管进入胚囊。在开花后 4~5 h, 极核完成受精作用; 开花后 12 h, 卵细胞完成受精作用。

### 参考文献:

- 李楠, 尹岭, 苏振伦. 1997. 激光扫描共聚焦显微技术[M]. 北京: 人民军医出版社: 1-11
- 胡适宜. 1982. 被子植物胚胎学[M]. 北京: 人民教育出版社
- 杨弘远. 2005. 水稻生殖生物学[M]. 杭州: 浙江大学出版社
- Akimine M. 1914. Ueber das blühen des Reises und einige sich daran anknüpfende Erscheinungen[J]. *Zeitschr f Pflanzenzucht*, **2**: 339-375
- Cho J. 1956. Double fertilization in *Oryza sativa* and development of the endosperm with special reference to the aleuron layer[J]. *Bull Nat Inst Sci Ser D*, **6**: 61-101
- Christensen C A, King E J, Jordan J R, et al. 1997. Megagametogenesis in *Arabidopsis* wild type and the Gf mutant[J]. *Sex Plant Reprod*, **10**(1): 49-64
- Huang QC(黄群策), Xiang MC(向茂成), Ji BJ(李彪俊). 2000. Cytological observation on double fertilization of autotetraploid rice (同源四倍体水稻双受精过程的细胞学观察)[J]. *J Xiangtan Normal Univ*(湘潭师范学院学报), **21**(6): 84-87
- Ren H(任宏), Liu YS(刘永胜), Sun JS(孙敬三). 1998. Observation of rice embryo sac development with confocal laser scanning microscopy(用共聚焦扫描显微镜技术观察水稻胚囊发育)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **40**(9): 786-789
- Shen JH(申家恒), Li HR(李慧荣), Li YF(李玉芬), et al. 1987. Cytologic observations on the double fertilization in maize(玉米双受精过程的细胞学观察)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **29**(5): 480-485
- Terada S. 1928. Embryological studies in *Oryza sativa*[J]. *J Coll Agric Hokkaido Imp Univ*, **19**: 245-260
- Wei X(卫星), Shen JH(申家恒). 2004. Observations on fertilization and early development of embryo and endosperm in *Aneurolepidium chinense*(星星草受精作用及其胚与胚乳早期发育的观察)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), **24**(1): 31-37
- Wu SX(吴素萱), Cai QG(蔡起贵). 1965. Cytological studies of the double fertilization in rice(水稻双受精过程的细胞学观察)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **13**(2): 114-121
- Zhang HH(张华华), Feng JH(冯九焕), Lu YG(卢永根), et al. 2003. Observation on formation and development of autotetraploid rice embryo sac using Laser Scanning Confocal Microscope(利用激光扫描共聚焦显微镜观察同源四倍体水稻胚囊的形成与发育)[J]. *J Chin Electron Microscopy Society*(电子显微学报), **22**(5): 380-384