

植物离体受精与受精机制的研究

施华中

(武汉大学生命科学学院植物生殖生物学研究室, 武汉 430072)

摘要 植物受精机制一直是植物生殖生物学研究领域的重要课题, 由于这一重要生殖过程发生于母体组织中, 过去对其了解主要来源于光镜与电镜的观察。近年来, 随着精细胞与卵细胞分离的成功, 离体受精与人工合子离体发育的实现, 自然合子的培养与植株再生体系的建立, 少量细胞的 cDNA 文库存构建技术的应用, 为受精机制及合子发育的早期事态的研究提供了新的手段。

离体受精

(一) 离体受精的实验体系

近年来, 生活的精子与卵细胞的分离已在多种植物获得成功(周端等, 1993; 胡适宜等, 1985; Dumas 等, 1995), 尤其是在禾谷类, 如大麦、黑麦草、小麦等。在精卵分离成的基础上, Kranz 等(1991, 1993)首次成功地进行了玉米精子与卵细胞的体外电融合, 实现了真正意义上的离体受精, 在体外培养条件下, 人工合子能进一步发育形成胚, 继而再生成完整植株。经体外电融合形成的小麦的人工合子, 离体条件下也发育成多细胞结构(Kovacs 等, 1995)。

(二) 受精过程的细胞外环境

电融合是在电脉冲作用下完成的, 对自然条件下精卵融合的外环境以及精卵相互作用等仍无法了解。为此, Faure 等(1995)利用离体受精系统观察到, 精卵体外融合完成后 30 秒, 合子即形成新的细胞壁物质, 壁物质的形成可能是防止多精受精的一种机制。

合子的离体发育

(一) 受精刺激与合子启动分裂

自然情况下, 卵细胞通常要经过受精作用后才能进行胚胎发育, 那么, 合子启动分裂是否与受精刺激有关呢? Holm(1994)用大麦胚胎发生的小孢子饲养培养分离的大麦和小麦的自然合子并再生可育植株, 再生频率达 40%, 有趣的是, 未受精的卵细胞在同样培养条件下却不能进一步发育。Kranz 和 Lorz(1993)的实验也证明, 同样培养条件下经电融合的人工合子能正常发育, 而未受精的卵细胞却不能进一步发育。这些结果说明, 合子启动分裂可能与受精刺激有关, 即精子能激活卵细胞使其进入分裂周期。这一推论似乎与体细胞胚胎发生的事实在矛盾, 但是, 事实上分化的体细胞不经诱导是无法进行胚胎发生的。或许这种体外诱导过程模拟了受精刺激作用? 最近的实验表明, 未受精的胚囊经高浓度的 2,4-D(40 ppm)预处理一小时, 然后培养于含 2 ppm 2,4-D 的培养基中, 其中的卵细胞亦能启动分裂形成多细胞结构(Kranc,

1995)。诱导卵细胞启动分裂的过程是否模拟或部分模拟了受精作用还不得而知,但如果存在这种模拟,则为阐明受精过程精子对卵细胞的激活机制,提供了一个有用的实验体系。

(二) 胚囊结构与早期胚胎模式建成

胚囊是双受精及体内合子胚胎发育所必需的结构,那么,胚囊附属细胞如助细胞、中央细胞等是否影响早期胚胎模式建立呢?从体细胞胚胎发生和花粉胚胎发生来看,胚囊的结构并非胚胎发生所必需。但是,最近有关分离的合子及分离的受精胚囊(含合子)离体培养实验却提供了另外一种可能性。在饲养培养条件下,分离合子的离体发育并非严格按体内胚胎发育过程进行,合子首先形成小愈伤组织,进而分化成胚状结构(Holm, 1994)。而分离的受精胚囊中的合子,在离体培养条件下不需饲养即可按正常的胚胎发生过程再生植株(Campenot, 1992; Mol, 1993, 1995)。尽管存在培养条件的影响,但胚囊附属细胞是否合成与传输影响合子分裂及早期胚胎模式建成的因素,应是一个没有定论而需进一步研究的课题。

(三) 受精过程的基因表达

发育过程的基因表达研究通常采用两种策略,一种策略是利用突变体研究影响某一特定发育过程的基因,另一种策略则是通过构建和筛选某一特定发育时期的 cDNA 文库,研究已知基因的表达和寻找未知的特异表达基因(Breton, 1995)。

利用胚胎特异突变体的研究已涉及早期胚胎发育过程(DeJong, 1993; Goldberg, 1994),现已克隆和分析了影响合子第一次分裂模式的基因—EMB30 基因,该基因编码与酵母 Sec7 分泌蛋白相似的蛋白质,它与细胞分裂、伸长及粘连有关,在植物的整个生命周期中都是活动的,说明该基因并非特异影响胚性细胞的分裂模式,很可能受其它基因的调控(Shevell, 1994)。但是,受精过程十分复杂,估计有众多的基因参与了受精前精子与卵细胞的发育以及受精后合子的发育,因而利用突变体研究这一复杂的发育过程是十分困难甚至是不可能的。由于精子、卵细胞以及合子分离的成功,离体受精亦能获得人工合子,因此,通过构建和筛选 cDNA 文库或利用 mRNA 差别显示的方法,研究受精前后的基因表达和寻找特异表达的基因已成为可能(Krang, 1996)。Singh 等利用分离的百合生殖细胞构建 cDNA 文库,经文库筛选获得生殖细胞特异表达基因的克隆,并证实该基因与人类的 DNA 修复酶基因相似,其功能仍在研究之中(私人通讯)。利用分离的玉米精细胞也成功地构建了其 cDNA 文库(Dumas, 1995; Kranz, 1995)。由于卵细胞和合子分离数量上的限制,构建其 cDNA 文库比较困难。利用 RT-PCR 方法,Dressethaus 等(1994)从 128 个未受精的卵细胞和 104 个离体受精后 18 小时的人工合子分别构建了 cDNA 文库,经差异筛选,已分离出可能的玉米卵细胞和人工合子的特异克隆,这些特异基因与已知的动植物的基因没有同源性;已分离出一些在人工合子中表达,而在未受精的卵细胞中不表达或表达很弱的基因。尽管上述研究还没有获得十分肯定的结果,但这些研究已为受精的分子机理,如受精识别、精卵相互作用、合子不等分裂的机制等问题的阐明,开辟了一条崭新的道路。

参 考 文 献

- 周端,杨弘远,1993,细胞生物学进展,3:201—222
胡适宜,李乐工,朱激,1985,植物学报,27:337—344
Breton C, Faure J E and C. Dumas., 1995, *Protoplasma*, 187:3—12
Campenot M K, et al., 1992, *Am J Bot*, 79:1368—1373

(下转 5 页)

(上接 2 页)

- De Jong A J, Schmidt E D L and De Vries S C ,1993, *Plant Mol Biol.*, **22**:367—377
Dressethaus T,Lorz H and E. Kranz ,1994, *Plant J.* ,**5**:605—610
Dumas C and J E. Faure,1995,*Current Opinion in Biotech.* ,**6**:183—188
Faure J E,Digonnet C and C Dumas .1994, *Science*,**263**:1598—1600
Goldberg R B,De Paiva G and R. Yadegari 1994, *Science*,**266**:605—614
Holm P B,et al. 1994, *Plant Cell*,**6**:531—543
Kovacs M,Barnabas B and E. Kranz1995, *Plant Cell Rep.* ,**15**:178—180
Kranz E,Bautor J and H. Lorz 1991, *Sex Plant Reprod*,**4**:12—16
Kranz E and H. Lorz1993, *Plant Cell*,**5**:739—746
Kranz E and H. Lorz 1994, *Zygote*,**2**:125—128
Kranz E and Bautor J, H. Lorz,1995, *Plant J* ,**8**:9—23
Kranz E and T. Dresselhaus ,1996, *Trends in Plant Sci*,**1**:82—89
Mol R,Matthy—Rochon E and C. Dumas ,1993, *Planta*,**189**:213—217
Mol R,Matthy—Rochon E and C. Dumas 1995, *Plant Cell Rep.* ,**14**:743—747
Shevell D E, et al. 1994, *Cell*,**77**:1051—1062