

被子植物离体受精系统的遗传操作

陈林姣* 李爱贞 田惠桥

厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005

Genetic Operation of *in vitro* Fertilization System of Angiosperms

CHEN Lin-Jiao*, LI Ai-Zhen, TIAN Hui-Qiao

Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005

摘要 介绍被子植物离体受精系统分子生物学研究取得的重要成果及最新进展。

关键词 精细胞;卵细胞;合子;特异基因表达;转化

被子植物的双受精和随后的胚和胚乳的发育发生于雌配子的胚囊中,而胚囊又深深嵌于母体组织的子房中,这使得被子植物的受精机理和合子发育机制的研究相当困难。因而,以往对这些问题了解很少。近10多年,随着雌雄配子分离技术的成熟和离体受精的成功,使分子生物学方法的应用成为可能,特别是近几年来逆转录酶聚合酶链式反应 reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR 技术的发展为研究植物少数或单个细胞的基因表达提供了一个灵敏、稳定、可靠的技术和手段。目前,在离体受精技术体系的基础上,运用分子生物学方法从分子水平研究被子植物精、卵细胞的发生,雌、雄配子的识别,合子激活以及早期胚胎发育的文章逐年增多,从分子水平上揭示了一些被子植物有性生殖方面的机制问题,反映出这方面的研究非常活跃。本文从3个方面介绍采用离体受精技术体系开展有关这一问题的分子生物学研究的最新进展。

1 离体受精

离体受精是指离体的精、卵细胞在离体条件下融合形成合子。整个离体受精实验体系包括配子分离、雌雄配子融合、人工合子培养3个主要技术环节。与动物和低等植物相比,被子植物的雌雄配子被体细胞组织层层包裹着。因此,分离一定数量并具有生活力的精、卵细胞是成功地实现离体受精的前提条件。自上世纪80年代中期以来,分离精细胞技术不断地发展和提高,现已从数十种植物花粉中分离出了具活力的精细胞^[1-3]。

卵细胞的分离起步较晚,且较精细胞的分离困难得多。胡适宜等^[4]最先采用酶解法从烟草中分离出卵细胞。此后这一方法在卵细胞分离中也被广泛采用,并先后从蓝猪耳(*Torenia fournieri*)^[5]、白花丹(*Plumbago zeylanica*)^[6]、玉米(*Zea mays*)^[7]、烟草(*Nicotiana tabacum*)^[8]等植物中分离出生活的卵细胞。近年来,分离卵细胞的方法在不断改进,成功分离有生活力的卵细胞的植物种类大大增加,尤其是禾谷类作物,如黑麦草(*Lolium perenne*)^[9]、大麦(*Hordeum vulgare*)^[10]、小麦(*Triticum aestivum*)^[11]、水稻(*Oryza sativa*)^[12]等。在精、卵细胞分离成功的基础上,Kranz和L. 魏z^[13]首次采用电融合方法获得了玉米离体受精的成功,并且受精形成的人工合子可经体外培养发育形成胚,继而再生成可育植株,开创了植物受精研究史上的新纪元。1995年,小麦精、卵细胞诱导融合,人工合子分裂形成了多细胞团^[14]。随后,小麦、水稻离体合子培养再生完整植株相继获得成功^[15,16]。最近,我国一些研究者对双子叶植物烟草离体受精的研究也进行了一些探索,并取得了一定的进展^[17,18]。

2 雌、雄配子和合子发育过程中的特异基因表达

随着被子植物精、卵细胞分离技术的成熟和离体受精的成功,对这些细胞进行分子生物学研究成为现实。Dresselhaus 等^[19]以RT-PCR技术为

收稿 2003-04-07 修定 2003-08-25
资助 福建省青年科技人才创新基金项目(2001J043)。
*E-mail: linjiaochen@163.com, Tel: 0592-2185695

基础,首次构建了被子植物卵细胞的cDNA文库。Richert等^[20]对这一方法作了进一步改进后,可用于研究单个植物细胞的基因转录和表达,从而克服了性细胞,特别是卵细胞,数量少的难题。离体受精技术体系与新的分子生物学技术相结合后,人们对精细胞和卵细胞、合子、胚胎发育早期的任何阶段直接进行遗传分析就成为可能。

2.1 雄配子发育过程中的特异基因表达 被子植物的雄配子发育始于小孢子的不等分裂,形成1个大的营养细胞和1个较小的生殖细胞,生殖细胞进一步分裂产生2个精细胞。雄配子(或精细胞)的染色质高度浓缩,细胞质非常少,一般认为雄配子细胞的转录是不活跃的^[21]。但也有研究表明精细胞具有转录活性,能合成RNA和蛋白质^[22,23]。精细胞在受精过程中有与雌配子识别、粘附、融合等多种功能,人们推测这些高度特异化的功能受一组特异基因的激活所控制^[24]。在白花丹和烟草等植物中发现精细胞具二型性(dimorphism)^[25,26]。两个精细胞之间以及精细胞与生殖细胞之间的基因表达程序是否有所不同,两个精细胞与卵细胞和中央细胞融合是随机的还是具有选择性,这些问题都有待从分子水平上找出证据。Dumas和Mogensen^[27]率先以玉米离体受精体系作为研究被子植物胚胎发生的实验体系,并尝试构建了玉米精细胞的cDNA文库。Southworth和Kwiatkowski^[28]、Xu和Tsao^[29]分别从白菜(*Brassica*)、百合(*Lilium*)和玉米的精细胞上分离出质膜蛋白(plasma membrane protein),其中一些可能与精细胞的识别功能有关。Xu等^[30]从麝香百合(*Lilium longiflorum*)的精细胞中鉴定出一特异基因(LGC1),其表达产物位于精细胞表面,推测可能与精、卵细胞的相互作用有关。Ueda等^[31]从麝香百合的雄配子中分离出3种核心组蛋白(core histone protein)基因,它们所编码的蛋白在两个精细胞中含量最高,推测它们与雄配子的染色质浓缩或重新改造有关,并抑制雄配子中的基因表达。最近,Xu等^[32]构建了烟草精细胞文库,从396个克隆文库中初步筛选出2个在生殖细胞和精细胞中特异表达的NtS1和NtS2基因,发现其中的NtS1编码一个多聚半乳糖

醛酸酶(polygalacturonase),推测这个酶在烟草雄配子分化过程中的细胞壁降解中起作用。Singh等^[33]构建了麝香百合生殖细胞和白花丹精细胞的cDNA文库,在两个cDNA文库中发现各有一个基因编码相同的多聚泛素(polyubiquitin),但两个基因的编码区外则有差异。这两个基因的功能是参与泛素化(ubiquitination),很可能在两个雄配子的发育过程中调节蛋白质活性。上述研究对于揭示雄配子发育的分子机制和受精时有关雌、雄配子的识别过程迈出了重要一步。

2.2 卵细胞和合子发育过程中的特异基因表达 合子激活是配子体发育转向孢子体发育的一个关键事件。在动物中,受精前卵细胞中就储藏了受精后合子分裂所需要的mRNA,其表达产物的极性分布形成合子的极性。大多数哺乳动物合子激活发生于二细胞至十六细胞阶段^[34-36],有些则更晚^[37,38]。相对于动物来说,被子植物合子激活研究起步较晚,人们对其了解甚少。比较被子植物卵细胞与合子之间的cDNA文库是了解合子特异基因的有效方法。Dresselhaus等^[19,39]在玉米离体受精成功的基础上先后构建了玉米卵细胞及合子的cDNA文库,并通过差异筛选分离出若干在卵细胞中特异表达或由受精后诱导表达的基因。从104个离体受精后18h的玉米合子cDNA文库中筛选出了一种钙网硬蛋白(calreticulin)基因。该基因的表达产物主要存在于细胞内质网中,在卵细胞受精后表达增强,与细胞分裂密切相关^[39]。这是首次从被子植物合子中分离出的基因。随后,他们又从玉米卵细胞和合子的cDNA文库中筛选出了50多个不同基因,发现未受精卵细胞中储藏有相当多的翻译启动因子的转录本,这些启动因子可能与卵细胞中的某些mRNA的稳定和翻译有关。一些基因在受精后18h内重新表达,其中有7个基因编码的蛋白可能与转录有关;有2个基因是受精18h后开始转录的,其编码的蛋白可能与DNA的复制和修补有关^[40]。一般情况下,合子在受精后42-46h发生第一次不等分裂^[41]。这暗示被子植物合子激活发生于合子第一次分裂之前,相对于动物中合子来说其激活要早许多。Sauter等^[42]对合子的细胞周期调节基因进行了研究。他们分

析了玉米离体的精和卵细胞、中央细胞、助细胞及合子的细胞分裂周期基因 *cdc2* (*cdc2ZmA/B*) 和细胞周期蛋白 *cyclin* 基因的表达, 发现 *cdc2* 基因在胚囊中的所有成员细胞和精细胞及合子整个发育过程中均有表达, 而 *cyclin* 基因仅在胚囊中特异表达, 且在受精 18 h 后重新转录, 在受精过程和合子发育过程中呈现不同的表达方式。但 Vielle-Calzada 等^[43] 研究拟南芥的早期胚胎发育时, 发现好几个来自父本的等位基因转录在 32~64 个细胞的幼胚时期才开始。合子的第一次不等分裂的发生和合子激活的分子机制尚有待深入研究。但很显然, 这领域的研究已从体外受精技术的探索深入到受精过程和合子激活基因调控的认识。

3 离体受精体系的转基因

有实验表明, 转基因方法适合研究某一基因在植物发育过程中的作用^[44]。玉米^[13]、小麦^[14,15]、水稻^[16]的离体受精和合子有效的再生培养体系的建立为开展这方面的研究打下了基础。采用离体受精实验体系不仅可筛选与受精过程和合子发育有关的新基因以及揭示其特异的表达方式, 而且可结合转基因技术, 研究某个基因在离体精和卵细胞、合子中的表达水平, 从而进一步分析这一基因在受精过程和合子发育过程中的功能。

由于分离的卵细胞和合子的数量有限, 至今显微注射法是向卵细胞和合子中导入外源基因的一种首选方法。Leduc 等^[45] 在玉米合子分离、培养成功的基础上首次采用显微注射法向授粉 24 h 后分离出来的 227 个玉米合子注射两种报告基因, 结果有 3.5% 的合子在培养 4 d 后显示出报告基因的瞬时表达。Pónya 等^[46] 分别向小麦的 98 个卵细胞注射带有泛素启动子的绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 基因, 向 77 个合子注射具 35S 启动子的 GUS 基因, 两者的平均瞬时表达率分别为 46% 和 52%, 远远高于以它的体细胞为受体的转化率。其中卵细胞的转化率高低与卵细胞分离的时间有关, 开花前 1 d 的卵细胞表达率可达 73.91%。而不同时期的合子的外源基因的表达率没有明显差异。Home 等^[47] 向分离的大麦合子注

射一种具水稻肌球蛋白启动子的 GUS 基因后, 结果在注射的上百个合子中有 34% 发育为胚状体结构。PCR 检测显示约 21% 的胚状体中有转入的外源 DNA, 但只有少数胚状体有 GUS 基因表达。他们认为外源 DNA 很可能降解。Scholten 和 Kranz^[48] 向玉米的卵细胞、精细胞、助细胞、中央细胞中注射具有 35S 启动子的 GFP 基因后, 其中卵细胞、助细胞、中央细胞呈现 GFP 荧光, 而转基因的精细胞中未检测到。转基因精细胞与没有转基因的卵细胞融合后, 在受精后不久就可诱导外源基因的转录, 合子中可检测到 GFP 荧光。由于 GFP 对细胞没有毒害作用和荧光显微镜下无扩散效果, 因此, 他们认为可以此研究离体受精所产生的人工合子和初生胚乳细胞的发育特征, 并可进一步研究受精后早期发育过程中诸多调节发育的基因功能, 从而从细胞和分子水平上揭示受精过程和早期胚胎发育的机制。

自 1983 年首次获得转基因烟草以来, 人们一直在努力探索一种高效的植物转基因方法。一般来说, 植物基因转化法有农杆菌介导的基因转化法、PEG 介导的转移、电激介导转移、基因枪转化以及微注射法等多种外源基因的转化方法。这些方法在不同的植物类型和组织中有着不同的适用范围和优缺点^[49,50]。目前, 在植物基因工程研究中尚未找到一种高效的转基因方法, 仍有许多技术问题需要解决, 如受体系统中普遍存在的转基因沉默、转化频率低、转化的植株后代遗传不稳定; 而且无论是以原生质体、幼胚或愈伤组织, 还是细胞悬浮系等作为转化受体系统都要经过繁琐的细胞组织培养和植株再生过程, 不仅实验周期长, 而且在长期的组织培养过程中, 容易产生无性系变异和造成不育、不孕株, 影响转化效率。植物精、卵细胞分离技术已日趋成熟和完善, 离体受精及人工合子、自然合子的离体培养与植株再生技术取得了重要进展和突破^[51,52], 这些都为植物转基因研究不断开辟新的途径。精和卵细胞、合子具有旺盛的生命力, 无论是人工合子或是自然合子, 在离体条件下均有很高的分裂频率, 并且基本上都遵循胚胎发育途径再生植株^[13,15,16]。以它们作为转化受体, 虽然数量有

限,但它们在转化率和外源基因在转基因后代中的遗传表达稳定性方面,都有一般体细胞所不可比拟的明显优势。此外,由于是对单个细胞进行遗传操作,并且有较高的转化效率,因而可以不用抗菌素基因、抗除草剂基因等作为筛选的标记基因。目前,在田间试验和被批准商业化应用的转基因植物中都含有标记基因,有关标记基因的安全性常是科学家和社会广泛关注的问题。因此,上述的无需标记基因的转基因体系,在今后的转基因农作物商业化生产中,将会有巨大的潜在应用前景。

4 展望

采用新的分子生物学技术开展被子植物离体受精系统的分子生物学研究方兴未艾。合子和早期胚胎极性是怎样建立的、合子细胞周期的调控、何种基因参与受精过程、合子激活以及幼胚发育等问题均已引起人们的极大兴趣。获得精和卵细胞、人工合子的方法以及从微量细胞构建和筛选 cDNA 方法已经建立,这些都是上述研究的技术基础。以合子作为转化受体,具有较高的转化率,基本能遵循胚胎发育方式再生植株,可以用于研究特定基因在受精过程、合子激活以及早期胚胎发育过程的表达和功能。这些技术和体系使得离体受精体系的转基因研究越来越具有诱惑力。相信随着研究的不断深入,人们对被子植物受精过程、合子细胞周期调节以及早期胚胎发育将会有个较全面的综合认识,以合子为受体的转基因途径也将在基因功能研究和农作物改良中得到广泛应用。

参考文献

- Theunis CH, Pierson ES, Cresi M. Isolation of male and female gametes in higher plants. *Sex Plant Reprod*, 1991, 4: 145~154
- Chaboud A, Perez R. Genitive cells and male gametes: isolation, physiology, and biochemistry. *Int Rev Cytol*, 1992, 140: 205~232
- 胡适宜 杨弘远. 被子植物受精生物学. 北京: 科学出版社, 2002. 209~220
- 胡适宜 李乐工 朱 激. 烟草生活胚囊及胚囊原生质体的分离. *植物学报*, 1985, 27: 337~344
- M d R. Isolation of protoplasts from female gametophytes of *Torenia fournieri*. *Plant Cell Reprod*, 1986, 3: 202~206
- Huang BQ, Russell SD. Isolation of fixed and viable eggs, central cells and embryo sacs from ovules of *Plumbago zeylanica*. *Plant Physiol*, 1989, 90: 9~12
- Kranz E, Bautor J, Lörz H. Electrofusion-mediated transmission of cytoplasmic organelles through the *in vitro* fertilization process, fusion of sperm cells with synergids and central cells, and cell reconstitution in maize. *Sex Plant Reprod*, 1991, 4: 17~21
- Tian HQ, Russell SD. Micromanipulation of male and female gametes of *Nicotiana tabacum*: I. Isolation of gametes. *Plant Cell Rep*, 1997, 16: 555~560
- Van der Mass H M, Zaai MACM, De Jong E R et al. Isolation of viable egg cells of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Protoplasma*, 1993, 173: 86~89
- Holm PB, Knudsen S, Mouritzen P et al. Regeneration of fertile barley plants from mechanically isolated protoplasts of the fertilized egg cell. *Plant Cell*, 1994, 6: 531~543
- Kovács M, Barnabás B, Kranz E. The isolation of viable egg cell of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sex Plant Reprod*, 1994, 7: 311~312
- 韩红梅, 赵 洁, 施华中等. 水稻卵细胞与合子的分离. *植物学报*, 1998, 40: 186~188
- Kranz E, Lörz H. *In vitro* fertilization with isolated single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plant. *Plant Cell*, 1993, 5: 739~746
- Kovács M, Barnabás B, Kranz E. Electro-fused isolated wheat gametes develop into multicellular structures. *Plant Cell Rep*, 1995, 15: 178~180
- Kunlehn J, Lörz H, Kranz K. Differentiation of isolated wheat zygotes into embryos and normal plants. *Planta*, 1998, 205: 327~333
- Zhang J, Dong WH, Galli A et al. Regeneration of fertile plants from isolated zygotes of rice (*Oryza sativa*). *Plant Cell Rep*, 1999, 19: 128~132
- Tian HQ, Russell SD. Micromanipulation of male and female gametes of *Nicotiana tabacum*: I. Isolation of gametes. *Plant Cell Rep*, 1997, 16: 555~560
- Sun MX, Moscatell Yang HY, Cresti M. *In vitro* double fertilization in *Nicotiana tabacum* (L): the role of cell volume in cell fusion. *Sex Plant Reprod*, 2001, 13: 225~229
- Dresselhaus T, Lörz H, Kranz E. Representative cDNA libraries from few plant cells. *Plant J*, 1994, 5: 605~610
- Richert J, Kranz E, Lörz H et al. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for gene expression studies at the single cell level. *Plant Sci*, 1996, 114: 93~99
- McCormick S. Male gametophyte development. *Plant Cell*, 1993, 5: 1265~1275
- Zhang G, Gifford DJ, Cass DD. RNA and protein synthesis in sperm cells isolated from *Zea mays* L. pollen. *Sex Plant Reprod*,

- 1993, 6: 239 ~ 243
- 23 Blomstedt C, Knox RB, Singh MB. Genitive cells of *Lilium longiflorum* possess translatable mRNA and functional protein synthesis machinery. *Plant Mol Biol*, 1996, 31: 1083 ~ 1086
- 24 Knox RB, Zee SY, Blomstedt C et al. Male gametes and fertilization in angiosperms. *New Phytol*, 1993, 125: 679 ~ 694
- 25 Russell SD. Ultrastructure of the sperms of *Plumbago zeylanica*. Quantitative cytology and three-dimensional organization. *Planta*, 1984, 162: 385 ~ 391
- 26 Tian HQ, Zhang Z, Russell SD. Sperm dimorphism in *Nicotiana tabacum* L. *Sex Plant Reprod*, 2001, 14: 123 ~ 125
- 27 Dumas C, Mogensen HL. Gametes and fertilization: maize as a model system for experimental embryogenesis in flowering plants. *Plant Cell*, 1993, 5: 1337 ~ 1348
- 28 Southworth D, Kwiatkowski S. A rabinogalactan proteins at the cell surface of *Brassica* sperm and *Lilium* sperm and generative cells. *Sex Plant Reprod*, 1996, 9: 269 ~ 272
- 29 Xu HP, Tsao TH. Detection and immunolocalization of glycoproteins of the plasma membrane of maize sperm cell. *Protoplasma*, 1997, 198: 125 ~ 129
- 30 Xu HL, Swoboda I, Bhalla PL et al. Male gametic cell-specific gene expression in flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999b, 96: 2554 ~ 2558
- 31 Ueda K, Kinoshita Y, Xu ZJ et al. Unusual core histones specifically expressed in male gametic cells of *Lilium longiflorum*. *Chromosoma*, 2000, 108: 491 ~ 500
- 32 Xu HP, Weterings K, Vriezen W et al. Isolation and characterization of male-germ-cell transcripts in *Nicotiana tabacum*. *Sex Plant Reprod*, 2002, 14: 339 ~ 346
- 33 Singh MB, Xu HL, Bhalla PL. Developmental expression of polyubiquitinating genes and distribution of ubiquitinated proteins in generative and sperm cells. *Sex Plant Reprod*, 2002, 14: 325 ~ 329
- 34 Schultz RM. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Biol Essays*, 1993, 15: 531 ~ 538
- 35 Davis JW, De Sousa PA, Sshultz RM. Transient expression of translation initiation factor eIF-4C during the 2-cell stage of the preimplantation mouse embryo: Identification by mRNA differential display and the role of DNA replication in zygotic gene activation. *Dev Biol*, 1996, 174: 190 ~ 201
- 36 Seydoux G, Mello CC, Pettitt J et al. Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*. *Nature*, 1996, 382: 713 ~ 716
- 37 Orr-Weaver TL. Developmental modification of the *Drosophila* cell cycle. *Trends Genet*, 1994, 10: 321 ~ 327
- 38 Zamir E, Kam Z, Yarden A. Transcription-dependent induction of G₁ phase during the zebra fish midblastula transition. *Mol Cell Biol*, 1997, 17: 529 ~ 536
- 39 Dresselhaus T, Hagel C, Lörz H et al. Isolation of a full length cDNA encoding careticulin from a PCR library of *in vitro* zygotes of maize. *Plant Mol Biol*, 1996, 31: 23 ~ 34
- 40 Dresselhaus T, Cordts S, Heuer S et al. Novel ribosomal genes from maize are differentially expressed in the zygotic and somatic cell cycles. *Mol Gen Genet*, 1999, 261: 416 ~ 427
- 41 Kranz E, Dresselhaus T. *In vitro* fertilization with isolated higher plant gametes. *Trends Plant Sci*, 1996, 1: 82 ~ 89
- 42 Sauter M, von Wieggen P, Lörz H et al. Cell cycle regulatory genes from maize are differentially controlled during fertilization and first embryonic cell division. *Sex Plant Reprod*, 1998, 11: 41 ~ 48
- 43 Vielle-Calzada JP, Baskar R, Grossniklaus U. Delayed activation of the paternal genome during seed development. *Nature*, 2000, 404: 91 ~ 94
- 44 Meisel L, Lam E. Switching on gene expression: analysis of the factors that spatially and temporally regulate plant gene expression. In: Setlow JK (ed). *Genetic Engineering*. New York: Plenum, 1997
- 45 Leduc N, Matthys-Rochon E, Rougier M et al. Isolated maize zygotes mimic *in vivo* embryonic development and express microinjected genes when cultured *in vitro*. *Dev Biol*, 1996, 177: 190 ~ 203
- 46 Pádua Z, Finy P, Fehér A et al. Optimisation of introducing foreign genes into egg cells and zygotes of wheat (*Triticum aestivum* L.) via microinjection. *Protoplasma*, 1999, 208: 163 ~ 172
- 47 Holm PB, Olsen O, Schnorf M et al. Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts. *Transgenic Res*, 2000, 9: 21 ~ 32
- 48 Scholten S, Kranz E. *In vitro* fertilization and expression of transgenes in gametes and zygotes. *Sex Plant Reprod*, 2001, 14: 35 ~ 40
- 49 Christou P. Transformation technology. *Trends Plant Sci*, 1996, 1: 423 ~ 431
- 50 Hansen G, Wright MS. Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci*, 1999, 4: 226 ~ 231
- 51 Sun MX, Yang HY. *In vitro* fertilization of angiosperms—10-year effort in China. *Acta Bot Sin*, 2002, 44: 1011 ~ 1021
- 52 田惠桥. 高等植物离体受精研究进展. *植物生理与分子生物学学报*, 2003, 29: 3 ~ 10