

专题介绍 Special Topics

高等植物的雄核发育

李贤*, 姚泉洪, 彭日荷, 熊爱生, 薛永, 高峰

上海市农业遗传育种重点实验室, 上海市农业科学院生物技术研究所, 上海 201106

Androgenesis in High Plant

LI Xian*, YAO Quan-Hong, PENG Ri-He, XIONG Ai-Sheng, XUE Yong, GAO Feng

Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Biotech Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106, China

提要: 雄核发育的过程可以人为划分为3个阶段: 小孢子胚性潜能的获得、细胞分裂的起始和胚胎的分化形成。文章介绍每一阶段所发生的细胞和分子水平的变化, 其中侧重点在基因表达的变化, 包括转录因子基因、与胁迫有关的蛋白质基因、淀粉合成及蛋白质分解相关基因以及近年来发现的与胚胎发生有关的调节基因的研究进展。

关键词: 雄核发育; 小孢子; 胚性; 胚胎发生; 基因表达; 胁迫

在植物育种中, 为了便于优质基因的组合, 获得一系列基因纯合的株系尤为重要。获得纯合子的传统手段是反复回交, 这是一项十分耗时的的工作。雄核发育是小孢子可直接再生单倍体植株, 而单倍体经染色体加倍后得到的是双单倍体。因此, 小孢子培养(或花药培养)可为纯合子的获得开辟一条新路(Wang等2000)。虽然在某些植物中雄核发育可以自发产生, 但频率很低。高效的雄核发育通常依赖胁迫诱导和离体培养, 即通过花药培养或小孢子培养来获得。自从胡萝卜的花药培养再生单倍体植株以来, 通过改良诱导和培养条件, 在许多物种中已获得雄核发育和单倍体植株, 并在植物育种中得到应用。但是, 雄核发育在许多重要农作物中尚未获得根本性的成功, 或在同一物种中的不同基因型表现出很大的差异。究其原因, 主要是雄核发育的机制尚不完全清楚。因此, 加强对雄核发育机制的研究, 对细胞发育的机制和农业遗传育种的应用都有意义。

大麦的雄核发育已经成为研究从单细胞的诱导到胚胎形成的模式系统。从大麦的小孢子开始到胚胎的形成, 雄核发育可以划分为3个阶段: 通过胁迫诱导作用促使小孢子产生胚性(即获得雄核发育的潜能), 小孢子分裂形成多细胞结构(multicellular structures, MCSs)和MCSs分化(pattern formation)形成胚胎。众所周知, 小孢子的正常发育途径是经过一次不均等分裂而形成一个

大的营养细胞和一个小的生殖细胞的, 生殖细胞进一步分裂产生两个精细胞, 由此产生成熟的花粉。胁迫诱导改变了小孢子的发育开关, 即关闭小孢子形成成熟花粉的发育途径和开启进一步分裂和形成单倍体胚胎发生的发育途径。从小孢子分裂到MCSs的形成, 根据小孢子第一次分裂的对称性和子代细胞的命运可以分为A、B、C三条途径。在A途径中, 小孢子核不对称分裂导致生殖细胞和营养细胞的产生, MCSs是通过营养细胞的反复分裂和生殖细胞的最终消亡形成的。在B途径中, 小孢子通过反复的对称分裂形成MCSs。在C途径中, 小孢子核不对称分裂导致生殖细胞和营养细胞的产生, 营养细胞和生殖细胞各自独立地分裂得到异源的MCSs, 但它们有各自的细胞区域, 因此可以认为是A途径的变化形式。上述发育途径存在于多数单雄胚胎发生中, 它们与物种、细胞的发育阶段和胁迫诱导的类型有关(Kim等2004)。从MCSs到形成胚胎, 这一阶段与体细胞胚及合子胚胎发生没有本质差别, 在双子叶植物都经历从原球胚到心型胚, 再到鱼雷胚和子叶胚的发育阶段, 同时都有细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)发生。这3个发育阶段都牵涉到基因表达的变化, 包括基因表

收稿 2007-12-29 修定 2008-05-30

* E-mail: xianlisiwei@163.com; Tel: 021-52211055

达量的改变和基因的特异性表达;而在细胞形态上体现出细胞大小、星形结构、细胞分裂和分化方式等的变化。

1 雄核发育中胁迫诱导的作用

大麦、油菜和小麦被认为是研究胁迫诱导雄配子胚胎发生的模式植物。由于实验程序设计和技术的提高,其他物种如玉米、甜椒等雄核发育的过程也可用于形态和分子研究。从这些模式系统的研究中可以看到,雄配子的胚胎可以在一个相对宽的发育范畴内发生。最有效时期是小孢子单核处于不均等分裂时期,它将形成具有极性的花粉粒,其中包含一个体积较小的生殖细胞和一个体积较大的营养细胞。生殖细胞进行一次有丝分裂产生两个精细胞;而营养细胞则可启动一套表达程序,如合成淀粉、油脂等贮藏物质,直至花粉进一步成熟。一般认为,一旦花粉形成两个细胞后营养细胞开始积累淀粉,雄配子的发育就不可逆转,也即难以诱导雄核发育。另外一个来自实践经验的结论是:改变小孢子发育命运的胁迫诱导因素常取决于物种和种内的基因型。在大麦的小孢子培养中,通过饥饿和高渗透胁迫处理处于单核中晚期的小孢子,可得到较高的植株再生频率。在小麦和烟草中,饥饿胁迫加上热激处理可以得到较高的小孢子胚胎发生诱导频率。而对油菜和甜椒而言,仅仅热激处理就可以诱导较高的小孢子胚胎发生。另外,其他类型的胁迫处理也可以在花粉发育的反应期内低频率地诱导雄核发育。这些胁迫包括秋水仙素、氮饥饿、外源植物激素、化学试剂和伽玛射线,还有低温处理等。如此多的胁迫因素可以改变花粉发育的途径,说明可能存在多条雄核发育的信号途径;当然,不同的胁迫也可能启动同一条下游途径。此种现象也存在于体细胞的胚胎发生中。体细胞的胚性获得或转变受各类植物激素调控,如生长素、细胞分裂素、脱落酸等;同时,体细胞胚性转变还受诸如创伤、渗透胁迫、饥饿和重金属离子胁迫的调控(Ikeda-Iwai等2003)。而在合子胚形成中,这些胁迫因素不直接参与调控作用,但有人发现,从合子到胚胎形成与受精后乙烯利及生长素合成增加密切相关(Mol等2004)。活性氧(reactive oxygen species, ROS)可能在生长素和胁迫诱导的胚胎发生中充当第二信使(Nagata等

1994),而丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的级联作用(MAPK cascades)可能在生长素信号到氧化胁迫反应以及细胞周期调控中起连接作用(Hirt 2000),还有人曾报道,与胁迫相关的ABA也可以激活MAPK(Knetsch等1996)。这些说明,诱导信号途径下游的调节蛋白如MAPKs,在胚胎发生的诱导中可能是起桥梁作用。

2 雄核发育中的细胞和分子变化

处于诱导适宜期的小孢子,在受到胁迫因素的诱导时,正常的花粉发育的途径即会改变而转向雄核发育(即胚胎发生)途径。在这个过程中,细胞内的基因表达和生理生化反应均发生根本性变化,最终表现出细胞形态结构、分裂和分化状态的改变。

2.1 小孢子获得胚性过程中的细胞形态和基因表达

2.1.1 细胞形态变化 当用甘露醇溶液处理诱导大麦雄核发育时,小孢子体积变大,这和小孢子获得雄核发育的潜能密切相关。进入雄核发育途径的小孢子,首先表现为中央液泡膨大,细胞质清晰(Maraschin等2003)。在胡萝卜体细胞胚胎发生时,胚性细胞也具有较大的液泡。在合子胚胎发生时,卵细胞在受精后体积也迅速增大。但在有些物种(如挪威云杉)体细胞胚发生时体积增大的细胞不具有胚性,而体积小、细胞质浓的部分细胞具有胚性。这就表明,除了细胞大小变化之外,其他形态标志也和胚性有关。在雄核发育时,一个重要的标志是细胞的脱分化程度。胁迫(包括高温、高渗等)处理的小孢子的启动分裂和细胞趋向脱分化的结构变化密切相关,这些变化包括细胞器的消失、线粒体和油脂体的减少及核糖体的总体下降。由此推测,胁迫处理导致小孢子的脱分化,而抑制了花粉发育的途径。现在已知有两条途径导致真核细胞质的重塑(remodeling):泛素-26S蛋白酶系统途径和自噬体(autophagy)系统途径。前者是细胞内高分子(包括短命分子和长寿分子)的主要降解途径,后者是细胞器通过溶酶体降解及其再循环的基本机制。虽然这两条途径都受细胞发育的内在调控,但也可被某类胁迫(如高温或高渗)所激活。在烟草雄核发育的早期,细胞器出现程序式的毁坏,这个过程是由溶酶体介导的(Levine和Klionsky 2004)。但在(高渗)胁迫诱导

大麦雄核发育时,除了自噬体在小孢子脱分化阶段参与细胞质重塑外,泛素-26S蛋白酶系统中的酶也受诱导而表达(Maraschin等2005)。

随着细胞质的脱分化,细胞核向细胞中央迁移,而中央大液泡为放射状的细胞质丝分割成小液泡,这种形态通常被称作星型结构(star-like structure),在许多雄核发育的模式系统(如大麦、小麦、油菜和烟草等)中都有描述。在花粉发育中,细胞核为微管和微丝系统固定在细胞边缘。当用秋水仙素或细胞松弛素D处理单核时期的小孢子时,细胞核向中央迁移,对某些物种而言,这种处理也可诱导雄核发育。由此可推测,细胞骨架的重排也和雄核发育的诱导有关(Gervais等2000)。有一种推测认为,细胞骨架重排的作用在于导致细胞的对称分裂。细胞示踪实验表明,大麦和小麦细胞星形结构的形成标志着从脱分化状态向细胞分裂过渡,这是小孢子进入雄核发育途径中最先发生的形态改变。大麦的星形结构超微技术观察表明,营养核迁移到中央,生殖核附在细胞内壁上。随着营养核位移到中央,营养细胞和生殖细胞都开始分裂。这一现象印证这样一种假说,即细胞核定位于中央与启动细胞分裂有关,而星形结构的形成代表了胚胎发生早期的细胞形态变化。用激素和热处理诱导体细胞胚胎发生和在受精卵离体培养中得到的结果都验证了这一假说(Kranz等1995)。

2.1.2 基因表达变化 从分子和生化水平上分析细胞内变化是研究雄核发育机制的手段之一。差异显示技术分析通过胁迫处理诱导雄核发育的小孢子,发现了一批和雄核发育潜能获得(acquisition of androgenic potential)有关的基因。这些基因包括与激素(如ABA)、细胞保护、蔗糖-淀粉代谢、蛋白分解有关的基因。这些结果说明,雄核发育潜能的获得依赖于细胞的脱分化过程,这个过程发生基因转录和翻译水平上的改变,它可能是阻止花粉正常发育和启动胚胎发生的根本原因。

2.1.2.1 与激素调节有关的基因 细胞受到诸如渗透、盐害、冷冻和低氧胁迫时,植物细胞中产生ABA。用甘露醇处理诱导大麦的雄核发育时,发现植株的再生频率与渗透胁迫强度及ABA生成量呈正相关。在小麦雄核发育诱导初期,Reynolds和Crawford(1996)分离到一个金属硫蛋白基因

(*EcMt*)。小孢子在含有生长素的培养基上诱导处理6h就可检测到*EcMt*基因的表达。在小麦*EcMt*的启动子区,包含一个对ABA响应的元件,而这个基因表达的上调和细胞内源ABA的生成量呈正相关。有人进一步研究结果表明, Ca^{2+} 参与ABA的信号转导过程,这个过程可能还牵涉到钙调蛋白(Reynolds 2000)。乙醇脱氢酶基因(*ADH*)家族的某些成员表达也受ABA的调控(Macnicol和Jacobsen 2001)。在胁迫诱导大麦的雄核发育时,发现*ADH3*的诱导表达和植株再生频率有关,而反过来又和细胞内的ABA水平有关。虽然还不知道*EcMt*或*ADH3*在雄核发育的潜能获得中是否起作用,但从它们和ABA的关联来看,在胁迫诱导雄核发育的过程中,可能存在ABA信号转导级联(ABA signalling cascade)途径,而这一途径在某些基因的活化和表达中均起作用。在氮饥饿的烟草小孢子中,Kyo等(2000)分离到一个磷蛋白(NtEPc)。NtEPc的表达限定在小孢子胁迫处理的早期,同时也受低pH诱导,但受细胞分裂素的抑制。这些结果显示,在雄核发育诱导过程中,除ABA信号以外,其他激素信号转导途径也可能参与基因表达的调控过程。

2.1.2.2 与细胞保护有关的基因 在热激和饥饿胁迫诱导雄核发育的起始阶段,热激蛋白(heat shock protein, HSP)基因家族显现出高表达(Barany等2001)。在体细胞胚胎发生初期,也发现HSP基因的高表达(Kitamiya等2000)。这些结果说明,HSP的提高可能与细胞胚性获得有关。然而有人在油菜的雄核发育诱导中发现,秋水仙素可以诱导雄核发育,但并不改变HSP的水平(Zhao等2003)。这又暗示HSP的亚细胞定位与基因调控作用有关。[事实上,Binarova等(1997)早就发现热激诱导油菜雄核发育过程中,存在HSP的核穿梭(nuclear shuttling)控制;秋水仙素处理可能改变了HSP的核穿梭强度和HSP的亚细胞定位。]由于HSP具有分子伴侣的功能活性,在雄核发育的发生过程中,它起调控其他功能蛋白亚细胞定位的作用,或者赋予这些调控蛋白较高水平的耐热能力。另外与雄核发育胁迫诱导相关的基因族还有谷胱甘肽转移酶(glutathione S-transferase, GST)基因。GST编码的蛋白参与许多生理功能,包括异生物素(xenobiotics)的解毒和

对氧化胁迫的保护(Marrs 1996)。GST 基因家族的成员在大麦雄核发育的起始阶段上调表达(Vrienten 等 1999)。在生长素诱导的体细胞胚胎发生中,也发现 GST 基因上调表达(Thibaud-Nissen 等 2003),而且 ROS 也可能作为信号分子参与防御有关的基因和激素响应相关的基因的诱导表达(Caliskan 等 2004)。

2.1.2.3 与蔗糖-淀粉代谢有关的基因 在花粉发育过程中的基因表达可以分为早晚两个阶段,早期阶段是花粉母细胞减数分裂到小孢子第一次有丝分裂,晚期阶段则指有丝分裂之后直到产生成熟花粉。花粉中淀粉合成属于晚期,因为淀粉的积累是在第一次有丝分裂之后发生的。体内研究表明,抑制与淀粉合成有关的基因后,花粉的正常发育即受阻(Datta 等 2002)。类似的机制还可能存在于雄核发育中。在甘露醇处理诱导大麦的雄核发育时,淀粉合成的关键酶基因(如蔗糖合成酶 1、磷酸葡萄糖变位酶、UDPG 差向异构酶、1-磷酸葡萄糖腺苷转移酶、1-磷酸 UTPG 腺苷转移酶和淀粉合成酶)都下调表达。与此同时,一些与淀粉及蔗糖分解有关的酶也可受诱导表达。这些结果为如下假说提供了分子证据,即认为在雄核发育的诱导中,淀粉合成受抑制对阻止雄配子发育是有作用的。

2.1.2.4 蛋白水解酶基因 许多研究揭示,胁迫处理过的小孢子蛋白质总体水平下降。花粉特异蛋白表达的下调和蛋白质分解的增强可能对小孢子脱分化非常重要。这种可能性和花粉特异蛋白基因表达的抑制对启动雄核发育有益这一事实相吻合。在植物细胞中,饥饿处理导致所谓“饥饿基因”的表达,这类基因和细胞组分的降解及营养成分的重新调动分配有关。在饥饿中,与碳及氮再循环有关的基因表达上调(Lee 等 2004)。氮的再循环包含以氮的重新分配为目的蛋白质的降解过程,这一过程又包括不同类的蛋白酶和泛素-26S 蛋白分解途径(Smalle 和 Vierstra 2004)。在体细胞胚胎发生过程中,细胞脱分化伴随着蛋白水解酶及泛素-26S 蛋白分解途径有关的酶基因表达增加(Thibaud-Nissen 等 2003; Mitsushashi 等 2004)。在糖缺乏时,蛋白酶的作用对氮的重新调配异常重要,蛋白酶的作用导致原处于分化状态的细胞的蛋白质呈现有选择性的破坏。铁硫蛋白酶

(FtSH)的作用就是这样,它参与由于光氧化而导致不可逆损坏的光合系统 II 反应中心 D1 蛋白的降解,从而有利于蛋白质的周转(Yu 等 2004)。突变体实验证实, *FtSH* 基因在正常叶绿体形成中是必要的。叶绿体的生物合成对从小孢子形成绿色植株是一个重要因素,而在许多物种中只能形成白化苗,以致限制了小孢子培养在育种中的应用。虽然迄今尚不知道 FtSH 是否在雄核发育的启动中对叶绿体生物合成有作用,但这些结果表明蛋白质周转对细胞脱分化过程的调节作用是重要的。越来越多的证据支持这一观点,即蛋白质分解与细胞调控的许多方面有关。譬如,激素信号转导和细胞周期调控就与蛋白降解有关(Hellmann 和 Estelle 2004)。正常花粉发育在细胞周期中受到紧密控制。在不对称分裂后,营养细胞锁定在 G₁ 期,而生殖细胞再进行一次有丝分裂产生两个精细胞。雄核发育诱导时,胁迫处理打破这种调控,营养细胞重新进入 S 期,尔后步入持续的细胞分裂周期。从这个意义上来看,泛素-26S 蛋白分解途径中有关成员和蛋白酶基因表达的诱导,可能都与雄核发育时潜能获得中细胞分裂的调控有关。

2.2 小孢子启动分裂到 MCSs 胁迫诱导小孢子分裂到形成具有胚性的 MCSs,其中也牵涉到数个基因的特异表达。体细胞胚胎发生类似受体激酶(somatic embryogenesis recept-like kinase, SERK)基因最早是从生长素诱导胡萝卜体细胞胚胎发生中分离出来的,它编码一个穿膜的富含亮氨酸重复序列的类似受体激酶。在体细胞胚和合子胚发生时, *DcSERK* 只在胚胎发生的启动到球形胚产生阶段表达。异位表达拟南芥的 *SERK* (*AtSERK*),可以提高拟南芥幼苗的胚胎发生率(Hecht 等 2001)。在玉米雄核发育时,具有雄核发育潜能的小孢子及其 MCSs 形成的初期, *ZmSERK* 呈高水平表达,这说明可能存在一条依赖 SERK 的信号途径,与胚胎发生的起始过程有关(Baudino 等 2001)。另外,一个编码脂质转移蛋白的基因 *EP2* 也与胚胎发生有关。只有在有 *EP2* 表达的细胞团或组织中,体细胞胚或合子胚才能发生。*EP2* 的同源基因 *ECLTP*,经证实是参与大麦雄核发育启动的(Vrienten 等 1999)。Magnard 等(2000)用差异显示技术研究玉米雄核发育的 MCSs 时,发现了

两个胚乳特有基因, *ZmAE1* 和 *ZmAE3*。在体内合子胚发育过程中, *ZmAE1* 和 *ZmAE3* 于胚乳发育的起始时期在胚周围区域瞬时表达。在雄核发育中, *ZmAE1* 和 *ZmAE3* 的表达只在 1~7 d 的 MCSs 中检测到, 而这个时期相当于胚乳发生时。这两个基因的发现暗示, MCSs 发育可能需要类似胚乳的功能。最近, 有人发现雄核发育过程中 MCSs 分泌的蛋白质可以维持合子胚的体外发育(Paire等 2003)。所有上述结果显示, 细胞胚胎发育进程中需要依赖外部信号的感知, 这种感知对细胞的时空发育调节, 尤其是某些特别程序的开启和活化是至关重要的。

2.3 从 MCSs 到胚胎形成 合子胚发育时, 最初的不对称分裂决定了胚的顶端基体轴(apical-basal axis) (Jurgens 2001; Friml 等 2003)。而在雄核发育的胚胎发育中, 顶端基体轴的建立发生在形成球形胚之后(Maraschin 等 2003)。在雄核发育时, 在类似胚胎结构(embryo-like structure, ELS)的周围细胞发生平周分裂, 从而导致表皮分化。随着表皮的分化, 油菜 ELS 经历了如同合子胚类似的心形胚和鱼雷胚阶段。体细胞胚胎发生与此类似, 球形胚以后的发育与合子胚发育雷同。由此看来, 3 种不同的胚胎(合子胚、体细胞胚和花粉胚)发生系统都具有固定的发育程序和时期, 这暗示它们可能有相同的分子机制。14-3-3 调节蛋白家族的时空表达在合子胚和花粉胚形成前是相似的。大麦雄核发育时, *14-3-3A* 的表达位于 ELS 的外层, 发生在表皮分化之前, 而 *14-3-3C* 的极性表达与盾片形成是相对应的。在胚胎形成晚期, *14-3-3C* 的表达限定在盾片和茎分生组织 L1 层下的一群细胞中, 在时间上先于 L2 层的特化; 合子胚发育中也是如此(Testerink 等 1999)。

3 诱导胚胎发生的调节基因

从雄核发育的油菜 MCSs 中, 分离到 *BABY BOOM (BBM)* 基因, 它是 AP2/ERF 转录因子家族中的一员, 在单雄胚胎发生和合子胚胎发生中强表达。从 *BBM* 基因的功能分析中发现, 它在拟南芥和油菜中异位表达(ectopic expression), 可以导致体细胞胚在幼小植株叶片上自发形成(Boutilier 等 2002)。有趣的是, 上述实验还显示, *BBM* 异位表达只能在幼苗中诱导胚胎发生, 而在成熟植株上是没有反应的。另外一个调节蛋白 AGAMOUS-

LIKE 15 (AGL15)被认为是在启动细胞分裂中起作用, 它是 MADS 功能域家族转录因子成员之一。虽然 AGL15 对发育的作用尚不很清楚, 但在合子胚胎发生、体细胞胚胎发生、孤雌生殖和雄核发育的细胞起始分裂阶段, 它转运到核内(Perry 等 1999)。另外, 有人采用突变体差显技术从拟南芥中分离出和合子胚发育有关的转录因子, LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)、LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)和 FUSCA3 (FUS3) (Harada 2001)。与 *BBM* 一样, 在营养组织中表达 *LEC1* 和 *LEC2* 基因, 可以引发体细胞胚胎发生(Stone 等 2001)。因此认为 LEC 转录因子在胚性获得、胚胎发生和成熟中具有关键的调控作用。WUSCHEL (WUS), 一个具有同源异型结构域(homeodomain)的蛋白, 也可以促进营养组织向胚性的转变(Zuo 等 2002); 它同时还参与合子胚胎发育时的茎和花原基的分化(Mayer 等 1998)。*PICKLE (PKL)* 基因编码 CHD 蛋白, 是染色体重塑(remodelling)因子, 在拟南芥中广泛表达。在胚发育后期, PKL 通过抑制和种子贮藏蛋白有关基因(Ogas 等 1999)和 *LEC* 基因(Rider 等 2003)的转录阻止胚的发育。因此认为 PKL 也是一个胚胎发生的主要调节者。虽然 PKL 是否在雄核发育中发生作用尚不清楚, 但种子贮藏蛋白基因家族与油菜雄核发育的启动表现出较大的关联。由此可推测, 染色体重塑在胁迫诱导雄核发育的过程中起对转录体的协调以至阻止某些基因表达的作用。

4 结语

雄核发育在细胞发育和农业遗传育种研究中有一定的意义, 多年来, 雄核发育机制的研究一直是作物育种基础研究中的热点之一, 并且取得了可喜的进展。细胞示踪技术在发现小孢子雄核发育的形态变化和发育途径中起了关键作用。从细胞水平上来说, 星形结构的形成是小孢子脱分化和持续分裂形成 MCSs 的前提条件。由于缺乏分析雄核发育信号转导途径的遗传工具, 差显技术的应用对发现与雄核发育有关的基因起了一定作用, 由此遂发现了一批与雄核发育有关的基因的差异表达, 如与激素(如 ABA)响应、细胞保护、蛋白分解及淀粉代谢有关的基因等; 更重要的是还发现了一些与诱导胚胎发生有关的调节基因(如 *BBM*、*AGL15*、*LEC*、*PKL* 等)。但这些发现

尚比较零散,其间从胁迫诱导到小孢子胚胎发生的信号转导途径尚不清楚。胁迫处理导致ABA产生,不仅是在小孢子中,还是在其他组织中也都有类似现象,在植物抗逆生理中存在着依赖ABA和不依赖ABA产生的两条抗逆途径。从ABA信号转导到雄核胚胎发生,其途径尚不明确,至于其他激素在雄核发育中的作用则更不清楚。此外,与胚胎发生有关的调节蛋白(转录因子)对雄核发育的机制研究也起了一定的启发作用。但这类调节蛋白的作用只是在油菜等体细胞胚胎发生相对容易的物种中得到验证,而在豆科或葫芦科等相对比较难的物种中尚待进一步试验。而且,这类调节蛋白是否是体细胞胚胎发生中所必需的还待用基因敲除或RNAi技术进一步确证。因此,在雄核发育机制的研究中,应当进一步采用日新月异的分子生物学理论和技术手段。另外,从这一领域研究的现状来看,植物雄核发育机制研究结果大多是用大麦为材料得到的,这只能代表单子叶植物。而茄科和十字花科是公认的组织培养再生植株中比较容易的植物,今后应多考虑烟草、茄子或油菜用以研究双子叶植物的雄核发育机制;这类植物的花器官较大,细胞个体也大,在形态观察中比较方便。总之,在今后的研究中,可以扩大植物的研究范围,并结合采用诸如基因组学、蛋白组学和代谢组学研究成果和技术手段,深入探讨雄核发育的机制。

参考文献

- Barany I, Testillano PS, Mityko J, Risueno MC (2001). The switch of the microspore developmental program in *Capsicum* involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants. *Int J Dev Biol*, 45: S39~S40
- Baudino S, Hansen H, Bretschneider R, Hecht VFG, Dresselhaus T, Lorz H, Dumas C, Rogowsky PM (2001). Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the *SERK* gene family. *Planta*, 213: 1~10
- Binarova P, Hause G, Cenklova V, Cordewener JHG, van Lookeren Campagne MM (1997). A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. *Sex Plant Reprod*, 10: 200~208
- Boutillier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu CM, van Lammeren AAM, Miki BLA et al (2002). Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryogenic growth. *Plant Cell*, 14: 1737~1749
- Caliskan M, Turet M, Cuming AC (2004). Formation of wheat (*Triticum aestivum* L.) embryogenic callus involves peroxide generating germin-like oxalate oxidase. *Planta*, 219: 132~140
- Datta R, Chamusco KC, Chourey PS (2002). Starch biosynthesis during pollen maturation is associated with altered patterns of gene expression in maize. *Plant Physiol*, 130: 1645~1656
- Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jurgens G (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 426: 147~153
- Gervais G, Newcomb W, Simmonds DH (2000). Rearrangement of the actin filament and microtubule cytoskeleton during induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Protoplasma*, 213: 194~202
- Harada JJ (2001). Role of *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON* genes in seed development. *J Plant Physiol*, 158: 405~409
- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt ED, Boutillier K, Grossniklaus U, de Vries SC (2001). The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol*, 127: 803~816
- Hellmann H, Estelle M (2004). Plant development: regulation by protein degradation. *Science*, 297: 793~797
- Hirt H (2000). Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase. *Proc Nat Acad Sci USA*, 97: 2405~2407
- Ikeda-Iwai M, Umehara M, Satoh S, Kamada H (2003). Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 34: 107~114
- Jurgens G (2001). Apical-basal pattern formation in *Arabidopsis* embryogenesis. *EMBO J*, 20: 3609~3616
- Kim M, Kim J, Yoon M, Choi DI, Lee KM (2004). Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell Tiss Org Cult*, 77: 63~72
- Kitamiya E, Suzuki S, Sano T, Nagata T (2000). Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. *Plant Cell Rep*, 19: 551~557
- Knetsch ML, Wang M, Snaar-Jagalska BE, Heimovaara Dijkstra S (1996). Abscisic acid induced mitogen-activated protein kinase activation in barley aleurone protoplasts. *Plant Cell*, 8: 1061~1067
- Kranz E, von Wieggen P, Lorz H (1995). Early cytological events after induction of cell division in egg cells and zygote development following *in vitro* fertilization with angiosperm gametes. *Plant J*, 8: 9~23
- Kyo M, Miyatake H, Mamezuka K, Amagata K (2000). Cloning of cDNA encoding NtPEc, a marker protein for the embryogenic differentiation of immature tobacco pollen grains cultured *in vitro*. *Plant Cell Physiol*, 41: 129~137
- Lee EJ, Koizumi N, Sano H (2004). Identification of genes that are up-regulated in concert during sugar depletion in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*, 27: 337~345
- Levine B, Kliionsky DJ (2004). Development by self-digestion:

- molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 6: 463~477
- Macnicol PK, Jacobsen JV (2001). Regulation of alcohol dehydrogenase gene expression in barley aleurone by gibberellin and abscisic acid. *Physiol Plant*, 111: 533~539
- Magnard JL, Le Deunff E, Domenech J, Rogowsky PM, Testillano PS, Rougier M, Risueno MC, Vergne P, Dumas C (2000). Genes normally expressed in the endosperm are expressed at early stages of microspore embryogenesis in maize. *Plant Mol Biol*, 44: 559~574
- Maraschin SF, Lamers GEM, de Pater BS, Spaink HP, Wang M (2003). 14-3-3 isoforms and pattern formation during barley microspore embryogenesis. *J Exp Bot*, 51: 1033~1043
- Maraschin SF, Vennik M, Lamers GEM, Spaink HP, Wang M (2005). Time-lapse tracking of barley androgenesis reveals position determined cell death within pro-embryos. *Planta*, 220: 531~540
- Marrs KA (1996). The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47: 127~158
- Mayer KFX, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jurgens G, Laux T (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*, 95: 805~815
- Mitsushashi W, Yamashita T, Toyomasu T, Kashiwagi Y, Konnai T (2004). Sequential development of cysteine proteinase activities and gene expression during somatic embryogenesis in carrot. *Biosci Biotechnol Biochem*, 68: 705~713
- Mol R, Filek M, Machackova I, Matthys-Rochon E (2004). Ethylene synthesis and auxin augmentation in pistil tissues are important for egg cell differentiation after pollination in maize. *Plant Cell Physiol*, 45: 1396~1405
- Nagata T, Ishida S, Hasezawa S, Takahashi Y (1994). Genes involved in the dedifferentiation of plant cells. *Int J Dev Biol*, 38: 321~327
- Ogas J, Kaufmann S, Henderson J, Somerville C (1999). *PICKLE* is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 13839~13844
- Paire A, Devaux P, Lafitte C, Dumas C, Matthys-Rochon E (2003). Proteins produced by barley microspores and their derived androgenic structures promote *in vitro* zygotic maize embryo formation. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 73: 167~176
- Perry SE, Lehti MD, Fernandez DE (1999). The MADS-domain protein AGAMOUS-like 15 accumulates in embryonic tissues with diverse origins. *Plant Physiol*, 120: 121~129
- Reynolds TL (2000). Effects of calcium on embryogenic induction and the accumulation of abscisic acid, and an early cysteine-labeled metallothionein gene in androgenic microspores of *Triticum aestivum*. *Plant Sci*, 150: 201~207
- Reynolds TL, Crawford RL (1996). Changes in abundance of an abscisic acid-responsive, early cysteine-labeled metallothionein transcript during pollen embryogenesis in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Mol Biol*, 32: 823~826
- Rider SD, Henderson JT, Jerome RE, Edenberg HJ, Romero-Severson J, Ogas J (2003). Coordinate repression of regulators of embryonic identity by *PICKLE* during germination in *Arabidopsis*. *Plant J*, 35: 33~43
- Smalle J, Vierstra RD (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Ann Rev Plant Biol*, 55: 555~590
- Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2001). *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 11806~11811
- Testerink C, van der Meulen RM, Oppedijk BJ, de Boer AH, Heimovaara-Dijkstra S, Kijne JW, Wang M (1999). Differences in spatial expression between 14-3-3 isoforms in germinating barley embryos. *Plant Physiol*, 121: 81~87
- Thibaud-Nissen F, Shealy RT, Khanna A, Vodkin LO (2003). Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. *Plant Physiol*, 132: 118~136
- Vrienten PL, Nakamura T, Kasha KJ (1999). Characterization of cDNAs expressed in the early stages of microspore embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare*) L. *Plant Mol Biol*, 41: 455~463
- Wang M, van Bergen S, van Duijn B (2000). Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiol*, 124: 523~530
- Yu F, Park S, Rodermeel SR (2004). The *Arabidopsis* FtsH metalloprotease gene family: interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. *Plant J*, 37: 864~876
- Zhao JP, Newcomb W, Simmonds D (2003). Heat-shock proteins 70 kDa and 19 kDa are not required for induction of embryogenesis of *Brassica napus* L. cv. Topas. *Plant Cell Physiol*, 44: 1417~1421
- Zuo J, Niu QW, Frugis G, Chua NH (2002). The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J*, 30: 349~359