

蔬菜作物小孢子胚胎发生机制研究进展

李婷婷¹, 马蓉丽², 成妍², 张光星¹, 焦彦生², 乔宁²

(1. 山西农业大学 园艺学院, 山西 太谷 030800; 2. 山西省农业科学院 蔬菜研究所, 山西 太原 030031)

摘要:小孢子是高等植物生活史中雄配子体发育过程中短暂而重要的阶段,是减数分裂后四分体释放出的单核细胞。现从细胞学和分子机制两方面对近年来有关蔬菜作物小孢子胚胎发生诱导中小孢子细胞形态的变化、生化改变和细胞质的模型重建、细胞核重排、分裂途径、多细胞花粉胚的发育和蔬菜作物小孢子胚胎发生的分子机制,如胚胎发生相关基因的克隆和表达、胚胎发生相关蛋白等研究进行了综述及展望,旨在为进一步研究小孢子胚胎发生机理提供理论依据和奠定技术基础。

关键词:小孢子胚胎发生;细胞学;分子机制;研究进展

中图分类号:S 601 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)03-0174-04

小孢子是高等植物生活史中雄配子体发育过程中短暂而重要的阶段,是减数分裂后四分体释放出的单核细胞^[1]。小孢子培养技术与常规育种技术、转基因技术结合可以极大提高作物育种水平。但许多蔬菜作物小孢子培养的胚状体和愈伤组织的诱导率较低,影响了该技术的进一步发展,使得现今大部分研究成果仍只停留在试验阶段,不能投入到生产实际中去。小孢子培养中的关键环节是使小孢子从正常的配子体发育途径转入非正常的孢子体发育途径。在这一过程中,小孢子无论在细胞形态结构上还是分子生化上都有显著的变化。该文从细胞学和分子机制两方面对近年来有关蔬菜作物小孢子胚胎发生的研究进行综述,旨在为进一步揭示小孢子的胚胎发生机理提供参考。

1 蔬菜作物小孢子胚胎发生的细胞学研究

1.1 胚胎发生诱导中小孢子细胞形态的变化

与正常的未经胁迫处理小孢子相比,经诱导获得胚性的小孢子体积增大。体积增大与获得胚性具有相关性^[2],但并不是说所有体积增大的小孢子都会沿着胚胎发生途径发育。刚从四分体分离的小孢子内含有丰富细胞质,其核位于细胞的正中央。随着液泡的发育和体积的增大,液泡占据了大部分的细胞空间,将细胞质和

其中的细胞核挤到了细胞的边缘。经诱导获得胚性的小孢子,细胞核重新定位,从细胞的边缘移到中央,大液泡沿细胞质的径向线破裂,产生一些小液泡,这时细胞质呈“星”形。细胞的这种“星”形预示着小孢子发生了程序重调,这可作为小孢子从配子体发育转向孢子体发育的早期标记之一^[2]。

1.2 生化改变和细胞质的模型重建

在正常的花粉发育中,大液泡在第一次有丝分裂后会被重新吸收。较大的营养细胞积累食物储备,如碳水化合物(淀粉)、脂肪、蛋白质和RNA,为花粉管伸长通过柱头到达雌配子体提供能量^[3]。而生殖细胞的储藏物质很少,其中的细胞器也少。诱导获得胚性的小孢子中,细胞器(如质体)被破坏,核糖体合成减少,同时积累淀粉和脂质体。Paul等^[3]利用流式细胞术研究发现受到热激处理的胚性细胞在培养96 h后细胞pH呈现碱性,而正常花粉发育途径的小孢子细胞内环境则向酸性变化。这一系列改变使细胞质变得清晰透明,为小孢子启动程序重排和胚胎发生做好了准备。

1.3 细胞核重排

正常的小孢子在二核阶段,营养核和生殖核行使不同的功能。营养细胞主要是积累代谢产物,其细胞核表现出较高的转录活性,染色质呈扩散状。而营养核则准备进行第二次有丝分裂,染色质极度缢缩,其转录活性很低。经诱导获得胚性的小孢子在第一次对称分裂后,2个细胞都呈现出典型的具有有丝分裂活性细胞的特征,如缢缩的染色质和凝集的核仁^[4]。这时可能观察到核DNA含量加倍,染色体恢复到正常数量。李菲等^[5]

第一作者简介:李婷婷(1988-),女,山西孝义人,硕士研究生,研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail:654334812@qq.com.

责任作者:马蓉丽(1957-),女,山西运城人,本科,研究员,研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail:mrl1957@sohu.com.

基金项目:山西省青年科技研究基金资助项目(2013021026-1)。

收稿日期:2013-11-07

根据启动膨大的小孢子细胞核 DAPI 荧光面积接近单核靠边期小孢子核荧光染色面积的 2 倍,初步断定热激启动的小孢子核发生了自然加倍。

1.4 分裂途径

被诱导的小孢子将经历多轮的有丝分裂,产生大量细胞,包裹在小孢子外壁中。从初始的“星”形小孢子至多细胞结构产生,基于小孢子最初分裂的对称性,可分为以下 4 种不同的途径,一是单核小孢子最初发生对称分裂,产生 2 个大小相同的细胞,这 2 个细胞均继续进行分裂,产生细胞团,并包裹在外壁中;二是单核小孢子发生不对称的初始分裂,产生 2 个大小不同的细胞,较大的营养细胞继续分裂产生细胞团,而较小的生殖细胞分裂几次后退化;三是单核小孢子发生不对称的初始分裂,生殖细胞不断分裂产生多细胞结构,而营养细胞不分裂;四是单核小孢子发生不对称的初始分裂后,营养细胞和生殖细胞具有相同的活性,共同分裂产生多细胞结构。

姜立荣等^[6]通过观察大白菜小孢子胚状体发生早期的超微结构认为只有对称分裂才能诱导小孢子胚胎发生。而近年来许多研究表明蔬菜作物小孢子胚胎发生过程中存在多种分裂模式并存现象。李菲等^[5]利用 DAPI 荧光染色显微观察认为大白菜小孢子以均等分裂为胚胎发生的主要途径,但也有少数小孢子通过非均等分裂形成胚状体。张菊平等^[7]在辣椒中同样发现对称分裂并不是胚性花粉形成的唯一途径,且多数胚性花粉是通过不对称的小孢子有丝分裂产生的早期双核花粉中的营养核的分裂产生的。从“星”形小孢子到多细胞结构所遵循的不同细胞分裂途径除了受小孢子发育时期、基因型和植物种类的影响之外,还受到不同的胁迫条件的影响。

1.5 多细胞花粉胚的发育

胚性的多细胞结构最终突破花粉壁的束缚,逐渐形成类似于合子胚球形时期的球形胚。胚状体转移到添加有合适比例生长调节剂的培养基中,或增殖形成愈伤组织,或通过器官形成产生根和茎。早期的多细胞胚具有 2 种细胞类型:内层是与早期胚胎类似的具有增殖细胞典型结构的细胞,外层是具有大液泡和较多淀粉沉积的分化细胞。淀粉合成的动态变化与分化过程相关,并伴随着细胞壁结构组成的特定改变^[8]。Barany 等^[9]通过比较细胞壁聚合物的分布模式与淀粉积累模式的差别,发现质粒中的淀粉积累发生在分生细胞中,这些细胞含有高水平的去脂化果胶,以及丰富的鼠李糖半乳糖醛酸聚糖 II(RGII)和木糖葡聚糖(XG),而富含脂化果胶

的增殖细胞中却完全没有淀粉积累。

2 蔬菜作物小孢子胚胎发生的分子机制研究

小孢子胚胎发生是一个极其复杂的过程,受到多种内外因素的控制与调节,因此它不是由 1 个或几个基因控制的,而是由一系列相关基因和蛋白的共同调控。鉴定小孢子胚胎发生过程中特殊的发育基因,对于胚胎发生机制的研究和发现特殊的标记具有重要意义。一些在小孢子胚胎发生早期特异表达的基因和蛋白已经在甘蓝型油菜、白菜和辣椒等蔬菜作物中被鉴定出来。

2.1 胚胎发生相关基因的克隆和表达

Boutilier 等^[10]利用抑制性消减杂交成功地从油菜小孢子胚胎发生早期分离出 *BABY BOOM(BBM)* 基因。*BBM* 在胚胎发生过程中对细胞分裂和形态形成起重要作用,被公认是在小孢子胚胎形成过程中与小孢子分裂起始相关的基因。

Malik 等^[11]通过比较油菜小孢子不同诱导时期的 cDNA 文库,从大量 EST 中筛选到 16 个可作为油菜小孢子胚胎发生特异分子标记的基因。这些分子标记基因的数量表达值对油菜品种胚胎发生潜能具有预见性。Tsuwamoto 等^[12]通过建立差减 cDNA 文库和差异显示方法,从甘蓝型油菜诱导的小孢子中分离出多个 *LTP* 基因。*LTP* 基因在玉米的合子胚形成过程中也表达。他们还从甘蓝型油菜小孢子中分离出一个与植物硫黏蛋白(PSK)的前体同源的基因。PSK 具有提高有丝分裂活性的作用,能够促进细胞生长和繁殖。

Chan 等^[13]利用 RT-PCR 技术从培养 3 d 的甘蓝型油菜小孢子中分离出 5 个 *ROP* 克隆,它们与拟南芥的 *ROP* 具有高度同源性。*BnROP5* 和 *BnROP9* 的表达水平可以作为小孢子是否获得胚性的标记。张菊平等^[14]采用 RT-PCR 方法对辣椒小孢子胚状体发育相关基因进行克隆,获得 2 个可能与辣椒花药胚状体发育相关的基因片段 *PELTP* 和 *PEGST*。序列分析表明,*PELTP* 基因与辣椒 *LTP* 基因同源性为 98%,*PEGST* 基因与辣椒 *GST* 基因的同源性为 99%。*PELTP* 和 *PEGST* 基因可能在辣椒小孢子胚状体发育早期起着重要作用。

Lee 等^[15]通过 Gene Fishing 方法研究了辣椒花药发育过程中 4 个不同的时期的 mRNA 表达谱,并分离出 1 个与胁迫相关的新基因 *DEG13*。这个基因在热激处理的小孢子中过量表达,推测其很可能与小孢子胚胎发生有关。Irikova 等^[16]利用同源克隆方法克隆到甜椒的 *BBM* 和 *LEAFY COTYLEDON(LEC)* 2 个基因,并证实它们在小孢子胚胎早期发育中高水平表达,但在成熟植株或非胚性花药中不表达。

2.2 胚胎发生相关蛋白质

在小孢子胁迫诱导获得胚性过程中,蛋白质的合成、磷酸化和糖基化都发生了变化。受胁迫处理的小孢子蛋白质整体水平下降,说明花粉特异性蛋白质下调或蛋白质解体增加在小孢子脱分化中具有重要作用^[17]。这些小蛋白质分别与油菜的未知花基因、油菜的 BAN54、甘蓝的 Bp4 及油菜的 LTP 具有一定的同源性。

热激蛋白(HSPs)是受到高温胁迫时植物细胞合成的最重要的保护性蛋白。HSPs 具有分子伴侣功能,它可能与小孢子细胞的耐热性相关,而对小孢子命运的转变起间接作用。Testillano 等^[18]发现在辣椒的热激处理后的小孢子中 HSP70 核中的富集现象。热激处理能够控制 HSP 的核穿梭,HSPs 的亚细胞定位可能与它的调节功能有关。

Fiers 等^[19]在油菜游离小孢子的球形胚到心形胚时期筛选到少量分泌性蛋白(CLE19)。CLE19 属于 CLAVATA 3/ESR 蛋白家族,可能在细胞分化和器官形成中起信号转导功能。油菜的 Rho-GT-Pases(ROPs)可能与细胞骨架结构的改变有关。通过对正常花粉发育途径中的小孢子 ROPs 和胚发生途径中的小孢子 ROPs 进行分析,表明 BnROP5 调控细胞骨架的排列,使得小孢子进行不对称分裂^[20-21]。

3 展望

蔬菜作物小孢子胚胎发生是由多种信号通路所介导的,并且这些信号通路之间存在着交叉互作,或者是不同的胁迫信号导致了相同的下游反应。因此,相关研究应整合基因组学、蛋白质组学和代谢组学,从系统生物学角度揭示不同信号级联的相互关系,才能最终弄清小孢子胚胎发生的机制。

蔬菜作物通过小孢子胚胎发生途径能够在较短时间内获得遗传上完全纯合的 DH 系,从而大大缩短了育种周期并提高了选择效率。但目前仅有少数几种蔬菜作物能成功诱导胚胎发生。随着人们对小孢子胚胎发生机理研究的不断深入,小孢子胚胎发生定会在更广泛的蔬菜作物中成为可能。

参考文献

[1] 赵建平,姚祥坦.植物小孢子胚胎发生机理[J].生物技术通报,2009(6):7-11.
[2] Maraschin S F, Priester W, Spaink H P, et al. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective[J]. J Exp Bot, 2005, 56: 1711-1726.
[3] Paul K P, Chan J, Woronuk G, et al. When microspores decide to become embryos-cellular and molecular changes [J]. Can J Bot, 2006, 84: 668-

678.

[4] Gernana M A. Anther culture for haploid and doubled haploid production [J]. Plant Cell Tiss Org, 2011, 104: 283-300.
[5] 李菲,张淑江,章时蕃,等. 大白菜游离小孢子培养胚胎发生中的加倍机制[J]. 园艺学报, 2006, 33(5): 974-978.
[6] 姜立荣,刘凡,李怀军,等. 大白菜小孢子胚状体发生早期的超微结构研究[J]. 北京农业科学, 1996, 16(3): 28-31.
[7] 张菊平,巩振辉,张兴志,等. 辣椒花药培养胚状体发生的组织学和细胞学研究[J]. 分子细胞生物学报, 2009, 42(3-4): 200-210.
[8] Barany I, Fadon B, Risueno M C, et al. Microspore reprogramming to embryogenesis induces changes in cell wall and starch accumulation dynamics associated with proliferation and differentiation events [J]. Plant Singal Behav, 2010, 5(4): 341-345.
[9] Barany I, Fadon B, Risueno M C, et al. Cell wall components and pectin esterification levels as markers of proliferation and differentiation events during pollen development and pollen embryogenesis in *Capsicum annuum* L [J]. J Exp Bot, 2010, 61(4): 1159-1175.
[10] Boutilier K, Offringa R, Sharma V K, et al. Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth [J]. Plant Cell, 2002(14): 1737-1749.
[11] Malik M R, Wang F, Dirpaul M, et al. Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus* [J]. Plant Physiol, 2007, 144(1): 134-154.
[12] Tsuwamoto R, Fukuoka H, Takahata Y. Identification and characterization of genes expressed in early embryogenesis from microspores of *Brassica napus* [J]. Planta, 2007, 225: 641-652.
[13] Chan J, Pauls K P. *Brassica napus* Rop GTPases and their expression in microspore culture [J]. Planta, 2007, 225(2): 469-484.
[14] 张菊平,巩振辉,马继鹏. 辣椒花药胚状体发育相关基因的克隆与分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, 36(9): 124-127.
[15] Lee Y, Chae K, Ha J, et al. A novel stress-related gene in developing pepper anthers [J]. Russ J Plant Physiol, 2009, 56(5): 654-662.
[16] Irkova T, Grozeva S, Denev I. Identification of *BABY BOOM* and *LEAFY COTYLEDON* genes in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genome by their partial gene sequences [J]. Plant Growth Regul, 2012, 67: 191-198.
[17] Harada H, Kyo M, Immanura J. Induction of embryogenesis and regulation of the developmental pathway in immature pollen of *Nicotiana* species [J]. Curr Top Dev Biol, 1986, 20: 397-408.
[18] Testillano P S, Coronado M J, Seguí J M, et al. Defined nuclear changes accompany the reprogramming of the microspore to embryogenesis [J]. J Struct Biol, 2000, 129: 223-232.
[19] Fiers M, Hause G, Boutilier K, et al. Mis-expression of the *CLV3/ESR* like gene *CLE 19* in *Arabidopsis* leads to a consumption of root meristem [J]. Gene, 2004(18): 37-49.
[20] Touraev A, Vicente O, Heberle-Bors E. Initiation of microspore embryogenesis by stress [J]. Trends Plant Sci, 1997, 2(8): 297-302.
[21] 汪维红,于拴仓,许明,等. 大白菜中小孢子胚胎发生相关基因 cDNA 片段的克隆与表达分析[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(12): 1191-1196.

银杏类黄酮研究进展

张传丽^{1,2}, 陈 鹏²

(1. 徐州工程学院, 江苏省食品安全生物芯片检测技术工程实验室, 江苏 徐州 221000; 2. 扬州大学 园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009)

摘 要:类黄酮是植物体内最重要的次生代谢物之一, 在植物的生长、发育、抗逆境胁迫等多种生物进程中发挥着重要的作用, 同时对人类的健康也具有多种保健与药用功能。该文在参考近年来国内外与类黄酮和银杏类黄酮相关研究的基础上, 对银杏类黄酮分类、植物体内类黄酮生物合成途径以及银杏类黄酮生物合成相关基因克隆等进行了归纳与分析, 旨在为银杏类黄酮更广泛、更深入的研究提供新的思路。

关键词:银杏; 类黄酮; 生物合成; 基因

中图分类号:S 792.95 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)03-0177-05

类黄酮是一类以 $C_6-C_3-C_6$ 为基本结构或具有苯基苯并吡喃(phenylbenzopyran)结构的植物次生代谢物^[1], 其基本结构见图 1。根据 C_3 杂环中双键、羟基以及羰基的有无, 可将常见的类黄酮分为查尔酮(chalcone)、黄酮醇(flavonol)、黄酮(flavone)、黄烷醇(flavanone)、黄烷酮(flavanone)、花青素(anthocyanidin)以及异黄酮等几类^[2-3]。类黄酮不仅在植物自身的生长、发育、抗逆境胁迫等多种生物进程中发挥着重要作用; 同时也因其高效的抗氧化、清除自由基的能力而对人类的健康具有多种保健与药用功能, 如防止衰老、抗癌、保护心血管系统和肝脏、预防心血管疾病等^[4-7]。

第一作者简介:张传丽(1983-), 女, 山东枣庄人, 博士, 讲师, 研究方向为生物有效成分研究。E-mail: zhang0708@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31270577); 江苏省林业三新工程资助项目(lysx[2011]16; lyxs[2013]05)。

收稿日期:2013-11-23

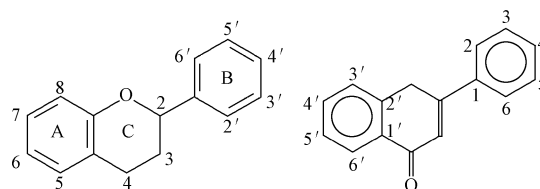


图 1 类黄酮和查尔酮基本结构

注: A, B; 类黄酮苯环; C; 类黄酮杂环。

Fig. 1 Basic structure of flavonoid and chalcone

Note: A, B; The flavonoid of benzene; C; Flavonoid heterocyclic.

1 银杏类黄酮分类

银杏(*Ginkgo biloba* L.)是第四纪冰川后孑遗在我国保存下来的侏罗纪时代的“活化石”植物, 是银杏科银杏属的唯一生存种, 属珍稀的裸子植物物种。银杏中类黄酮含量极高, 目前在许多欧美国家大量上市的银杏叶

Research Progress on Microspore Embryogenesis Mechanism of Vegetables

LI Ting-ting¹, MA Rong-li², CHENG Yan², ZHANG Guang-xing¹, JIAO Yan-sheng², QIAO Ning²

(1. Horticulture College, Shanxi Agriculture University, Taigu, Shanxi 030800; 2. Institute of Vegetable Research, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan, Shanxi 030031)

Abstract: Microspore is a short and important stage in the male gametophyte development process of higher plants life history, and it is monocyte released by tetrad in meiosis stage. From the aspects of cytology and molecular mechanisms of microspore in recent years, the microspore embryogenesis of cell morphology changes, biochemical changes, cytoplasmic model rebuilding, nuclear rearrangements, split ways, multi-cellular pollen embryos and microspore molecular mechanisms of cloning and expression of embryonic related genes and proteins of vegetables were summarized and prospected, in order to provide a theoretical basis and technological foundation for further research on microspore embryogenesis mechanism.

Key words: microspore embryogenesis; cytology; molecular mechanisms; research progress