植物学通报 2005, **22** (4): 396~407
Chinese Bulletin of Botany

综述

胚珠发育的分子机理①

[1]宿红艳② [1]王 磊 [2]张宪省

[1](烟台师范学院生命科学学院 烟台 264025) [2](山东农业大学生命科学学院 泰安 271018)

摘要 胚珠是研究器官形态发生和模式建成遗传分子机理的一个理想系统。近年来, 关于胚珠特征的决定、模式建成、珠被形态建成和胚囊形成等发育事件分子机理的研究取得了重要进展, 初步建立了胚珠发育的基因调控模型。同时, 离体花器官再生系统为研究激素调控胚珠发育的机理提供了有效途径。本文对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)胚珠发育的分子调控机制进行了综述。

关键词 胚珠, 突变体, 基因表达, 激素

The Molecular and Genetic Control of Ovule Morphogenesis

[1]SU Hong-Yan② [1]WANG Lei [2]ZHANG Xian-Sheng

[1] (*College of Life Sciences, Yantai Normal University*, Yantai 264025)
[2](*College of Life Sciences, Shandong Agricultural University*, Tai'an 271018)

Abstract The ovule has been used as an excellent model system to study morphogenesis and organogenesis. Progress has been made in investigating the molecular mechanisms of several aspects of ovule development, such as identity control, early pattern formation, integument morphogenesis, and embryo sac development. A genetic network that controls the ovule development process is presented. In addition, the *in vitro* floral regeneration system is useful for studying the regulation of ovule development by plant hormones. This paper reviews the progress made in the investigation of ovule development.

Key words Ovule, Mutant, Gene expression, Hormone

胚珠作为雌配子体的载体, 是种子的前身, 在被子植物有性生殖过程中起重要作用。胚珠的发育过程伴随着显著的形态变化, 并且相关基因一旦发生突变, 往往造成雌性不育, 该特点为进行遗传分析提供了极大的方便。因此, 胚珠的发育为研究器官的形态发生和模式建成机理提供了一个理想的研究系统(Gasser *et al*., 1998; Schneitz *et al*., 1998b; Schneitz, 1999; Jiirgens, 2001)。本文将主要以拟南芥为例对胚珠发育的分子机理做一简要综述。

1 胚珠的发育

受精前的拟(*Arabidopsis thaliana*)南芥

①国家自然科学基金项目(30270651)和烟台师范学院校基金项目(043302)资助。
②通讯作者。Author for correspondence. E-mail: suhongyan66@126.com
收稿日期: 2004-06-02 接受日期: 2004-07-27 责任编辑: 孙冬花

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-086

胚珠属于倒生胚珠, 包括珠心、珠被和珠柄。胚珠原基来自于心皮内侧的胎座分生组织。原基的前端发育成珠心, 后端形成珠柄。内、外两层珠被先后以环状从珠心基部起始, 向上生长将珠心包围, 仅在顶端留下一孔, 即珠孔。伴随珠被的生长, 胚囊在珠心内发育成熟。胚囊的发育过程可分为大孢子发生和雌配子体发育两个阶段。成熟的胚囊内含有单倍体的卵细胞和由两个极核融合形成的中央细胞核, 它们在受精之后分别发育成胚和胚乳, 而珠被则发育成种皮(Schneitz *et al*., 1995)。

借助于光学显微镜和激光共聚焦显微镜等观察手段, Schneitz等(1995)对处于不同发育时期的胚珠进行观察, 将胚珠的整个发育过程分为胚珠发育早期、大孢子发生、雌配子体发生和受精后发育4个阶段(表1), 并以拟南芥为例详细描述了每个发育阶段的形态特征, 为今后对胚珠发育进行系统的分子遗传学分析奠定了基础。

2 胚珠发育的遗传控制及基因表达

为便于研究分析, 将胚珠的发育过程分为4个时期: 胚珠原基特征的决定、原基模式的建成、珠被的形态建成及胚囊的形成(Schneitz *et al*., 1995)。人们通过化学诱变、转座子和T-DNA插入诱变的方法, 已经获得了一些胚珠发育异常的突变体。同时, 一些

表 1 不同发育时期拟南芥胚珠的形态特征

Table1 Stages of ovule development in *Arabidopsis thaliana*

胚珠的发育时期			相应的花发育时期	
	胚囊发育	孢子体组织发育	花发育时期*	持续时间(小时)*
1. 胚珠的早期发育				
1- I		胚珠原基起始	4 枚长雄蕊中出现小室(时期 8)	24
1- II		原基伸长	花瓣原基基部具柄(时期 9)	60
2. 大孢子发生				
2- I	大孢子母细胞体积增大		花瓣与两枚短雄蕊在同一水平线上(时期 10)	12
2- II		内珠被起始		
2- III		外珠被起始, 合点端珠心细胞分裂		
2- IV	减数分裂	合点端珠心细胞体积增大	花丝开始伸长, 雄蕊变绿(时期 11)	30
2- V	四分体形成	两层珠被不断向上生长		
3. 雌配子体形成				
3- I	珠孔端的 3 个大孢子退化, 单核胚囊形成	珠心和珠柄发生弯曲		
3- II	二核胚囊	外珠被将珠心和内珠被包围, 胚珠开始扭转	花瓣与长雄蕊在同一水平线上, 花药变黄(时期 12)	42
3- III	液泡出现	胚珠在珠柄上呈 90°		
3- IV	四核胚囊	内珠被将珠心包裹, 内层细胞开始分化		
3- V	八核胚囊形成, 并发生细胞化			
3- VI	中央细胞核融合, 反足细胞退化	内珠被中开始出现额外细胞层		
4. 受精后发育				

*. 花发育时期的划分标准参照文献(Müller, 1961; Smyth *et al*., 1990)

*. Floral landmarks of corresponding floral stages are taken from Müller (1961) and Smyth *et al*. (1990)

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-086

在胚珠和雌配子体中特异表达的基因也已被分离出来(Gasser *et al*., 1998; Schneitz *et al*., 1998b; Schneitz, 1999; Jiirgens, 2001)。

2.1 胚珠原基特征的决定

2.1.1 胚珠特征基因 基于对拟南芥和金鱼草(*Antirrhinum majus*)的各类花器官突变体的研究, 人们发现了一系列调控花器官形成的基因。在此基础上, Coen 和 Meyerowitz (1991)提出了花器官发育的“ABC 模型”。该模型认为, 被子植物四轮花器官的形成是由具有不同功能的 A、B 和 C 3 类基因控制的, 每类基因均在相邻两轮花器官中起作用。序列分析结果表明, 大多数花器官特征基因属于 MADS (MCM1、AGAMOUS、DEFICEENS 和 SRF)box 家族(Yanofsky *et al*., 1990; Coen and Meyerowitz, 1991)。

从进化的角度讲, 胚珠作为独立的花器官, 其出现早于心皮(Herr, 1995)。因此, 人们推测胚珠的特征同样是由MADS box基因控制, 实验结果证实了这一推测。目前, 已经鉴定出的胚珠特征基因有矮牵牛(*Petunia hybrida*)的 *FLORAL BINDING PROTEIN7/11*(*FBP7/11*)、拟南芥的 *SEEDSTICK*(*STK*)、*SHATTERPROOF1/2*(*SHP1/SHP2*)、百合(*Lilium longiflorum*)的*LMADS2*与风信子(*Hyacinthus orientalis*)的*HoMADS1*, 它们所编码的蛋白均含有非常保守的 MADS box 功能结构域(Angenent *et al*., 1995; Colombo *et al*., 1995; Tzeng *et al*., 2002; Favaro *et al*., 2003; Pinyopich *et al*., 2003; Xu *et al*., 2004)。

FBP7/11 *FBP7/11* 是由 Angenent 等(1995)通过筛选 cDNA 文库分离到的 2 个 MADS box 基因, 两者同源性高达 90%。原位杂交结果表明, *FBP7/11*最初在胎座中表达, 之后, 集中在胚珠原基及随后分化的珠柄和珠被中表达, 而在成熟的胚珠中仅在内珠被内层细胞中有高水平的表达。将 *FBP11* 接在 35S 启动子下游, 转化矮牵牛。在一些转基因植株中, *FBP7/11* 的表达因共抑制而降低, 从而导致胚珠突变为花柱状的结构。在另一些转基因植株中, *FBP11*过量表达, 结果在萼片近轴面有异位胚珠的产生, 并且产生胚珠部位的表皮已分化为胎座组织。此外, 在花瓣筒的外侧也着生有异位胚珠。以上这些结果均表明在矮牵牛中, 胚珠的形态建成是由 MADS box 基因 *FBP7/11* 决定的。为此, Colombo 等(1995)将“ABC 模型”延伸为“ABCD 模型”, *FBP7* 和 *FBP11* 属于 D 类基因, 决定胚珠的特征。

AGAMOUS *AGAMOUS*(*AG*)是最早被分离出的C类花器官特征基因之一, 在拟南芥的雄蕊和心皮形成过程中起主要作用(Bowman *et al*., 1991; Mizukami and Ma, 1992)。原位杂交结果显示, 在花芽形成的早期, *AG*在雄蕊和心皮中特异表达, 而在发育后期, 其转录产物则集中在胎座组织及随之产生的胚珠中(Bowman *et al*., 1991)。在 *AG* 过量表达的突变体中, 除花瓣变短、缺失或雄蕊化之外, 第一轮花器官亦发育异常, 表现心皮的特征。有的强突变体的第一轮花器官上还着生有异位的胚珠。由此推测, *AG* 也参与了胚珠形成及模式建成过程(Mizukami and Ma, 1992)。由于在*AG*功能失活的突变体中, 雄蕊和心皮完全被花瓣和萼片取代, 因此人们无法利用突变体 *ag* 研究 *AG* 基因在胚珠发育过程中所起的作用。突变体 *ap2* 的表型与上述 *AG* 过量表达的突变体表型基本一致, 即在第一轮花器官上也着生有异位的胚珠, 其中少数异位胚珠发育成了心皮状结构。如果将突变体 *ap2* 中的 *AG*基因敲除, 尽管胚珠转变为心皮状结构的比率会由40%上升至55%, 但在第一轮花器官上仍可观察到异位胚珠的产生, 由此说明*AG* 对于胚珠的形成并不是必需的(Western and Haughn, 1999)。

STK *AGL11*(即*STK*)是拟南芥中*FBP7/11*的同源基因, 在决定拟南芥胚珠特征中起重

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-086

要作用。在一些 35S::*STK* 转基因植株中, 第一轮花器官上着生有异位的胚珠状结构, 说明 *STK*与*FBP7/11*类似, 其过量表达亦导致异位胚珠的产生。但与 *FBP7/11* 过量表达的转基因植物的表型相比, 35S::*STK*的第一轮花器官具有更为显著的心皮特征, 即在其顶端还具有心皮状的乳突细胞, 表明在拟南芥中, 异位胚珠的发生与心皮的形成是密不可分的(Rounsley *et al*.,1995; Favaro *et al*., 2003)。

为了更全面的揭示 *STK* 的生物学功能, Pinyopich等(2003)利用T-DNA插入的方法获得了 *STK*的功能缺失突变体。研究发现, *STK* 功能失活影响了珠柄离区细胞的分化, 因此, 果实成熟之后, 种子无法从此部位正常脱落。这与*STK* 集中在成熟胚珠的珠柄中表达是一致的。以上结果说明, 一方面 *STK* 在胚珠特征的决定、珠柄的正常生长及种子发育过程中均发挥重要的作用; 另一方面, *STK*功能缺失后, 胚珠的发生仍能起始, 推测可能存在与 *STK* 功能重叠的其他基因(Pinyopich *et al*., 2003)。

SHP1/SHP2 *SHP1*/*SHP2*(即 *AGL1*/*AGL5*)是在拟南芥心皮和胚珠中特异表达的 MADS box基因, 其异位表达与*AG*过量表达所产生的效应是类似的(Ma *et al*., 1991; Flanagan *et al*., 1996; Liljegren *et al*., 2000)。出人意料的是, 尽管在雄蕊中检测不到*SHP1/SHP2*的表达, 但其组成型表达足可以补偿*AG* 所具有的启动雄蕊发育的功能。对于基因之间的这种功能重叠机制, 目前的一种解释是 *SHP1/2*与*AG*可能起源于1个共同的基因, 尽管它们的表达模式发生了差异, 但仍保留了类似的功能(Pinyopich *et al*., 2003)。

如上所述, *SHP1/SHP2*亦在胚珠中特异表达, 并且其编码的氨基酸序列与D类基因也具有高度的同源性, 那么它们在胚珠发育过程中担当什么样的角色呢？研究发现, 双突变体 *shp1 shp2* 胚珠的发育未出现异常; 而三突变体*shp1 shp2 stk*的一些胚珠发育受到抑制, 另一些却被心皮状或叶状的结构取代, 其表型比其中的任一个单基因突变体表型均显著。此结果表明, *STK* 与 *SHP1/2* 在决定胚珠特征方面存在功能重叠(Favaro *et al*., 2003; Pinyopich *et al*., 2003)。

综上所述, 在拟南芥中, *AG*、*STK* 和 *SHP1/2* 共同参与了胚珠发育过程, 并且在此过程中这 4 个基因存在功能重叠。所不同的是, *AG* 在雄蕊和心皮中均表达, *SHP1/2* 只在心皮中表达, 而 *STK* 的 mRNA 则集中在胎座组织及胚珠中(Pinyopich *et al*., 2003)。那么, 在控制胚珠发育过程中 AG、STK 与 SHP1/2 是如何协同作用的呢？已有的研究结果表明, MADS-box基因之间往往以蛋白质复合体的形式调控花器官的发育, 而这种复合体的形成需要一类称为 SEPs 的 MADS box 蛋白参与(Pelaz *et al*., 2000)。Favaro 等(2003)利用酵母双杂交和三杂交实验证实, AG、STK 与 SHP1/2同样是在SEPs桥梁的作用下形成了蛋白复合体, 参与胚珠的正常发育过程, 并且它们之间的作用强度是有差异的, 其中AG-SEP3-STK或AG-SEP3-SHP之间的作用比较稳固。这样, 对于 *STK* 与 *SHP1/2* 在启动胚珠特征上功能重叠这一现象, 便可作出比较合理的解释。例如, *SHP1/2*功能缺失后, AG-SEP3-STK 复合体仍可以形成, 因此双突变体 *shp1 shp2* 的胚珠未表现异常。此外, *SEP1*/ *sep1 sep2 sep3*、 *SEP2*/ *sep1 sep2 sep3* 、*SEP3*/ *sep1 sep2 sep3* 与 *sep1 sep2 sep3* 的表型比较分析结果进一步证实, SEPs的功能对胚珠的发育是必需的, 其中 SEP3 对启动胚珠发生最有效(Favaro *et al*., 2003)。

HoMADS1 *HoMADS1*基因为在风信子胚珠中特异表达的 1 个 MADS box 基因。序列的同源性分析及功能分析均表明, 该基因为 *FBP11* 和 *STK* 的同源基因。*HoMADS1* 在风信子花器官再生系统中的表达模式表明, 离体

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-086

培养条件下, 降低生长素和细胞分裂素浓度诱导的 *HoMADS1* 表达对于启动胚珠发生是必需的(Xu *et al*., 2004)。

除以上所述的D类MADS box基因之外, 其他植物中的一些候选D类基因也被分离出来, 如玉米(*Zea mays*)的 *ZAG2* 和 *ZMM1*、水稻(*Oryza sativa*)的 *OsMADS13* 等。它们的氨基酸序列以及表达模式与已确定的D类基因都基本一致, 但目前对于其在胚珠发育过程中的作用尚缺乏相应突变体的遗传分析和进一步的基因功能分析(Schmidt *et al*., 1993; Lopez-Dee *et al*., 1999; Tzeng *et al*., 2002)。

2.2 原基的模式建成

模式建成指器官原基形成过程中细胞的区域化和功能分化。如图 1 所示, 沿远端-近端轴(D-P)方向可将胚珠原基划分为3个区: 珠心区、合点区和珠柄区。顶部是具有大孢子母细胞的珠心, 中部是合点区, 从它的侧面产生 2 层珠被, 而具有维管束的珠柄则位于基部。这种 D-P 轴(distal-proximal axis)模式在胚珠发育的早期1-Ⅱ就已经建立, 并且在进化过程中高度保守, 普遍存在于种子植物中(Schneitz *et al*., 1995)。

突变体的筛选及分子遗传学分析为揭示其分子机制提供了一条有效途径。Robinson-Beers等(1992)发现一个由胚珠发育异常而引起雌性不育的拟南芥突变体, 命名为 *bell1* (*bel1*)。在胚珠发育时期 2-Ⅱ, *bel1* 表现为内珠被不能发生, 外珠被起始后不久便发育成项圈状结构, 在胚珠发育后期, 转变为心皮状结构。此外, *bel1* 胚珠中的大孢子母细胞可以进行减数分裂, 但不能形成正常的胚囊(Ray *et al*., 1994)。*BEL1* 基因是利用 T-DNA 标签法分离到的, 从核苷酸序列上推断其编码的蛋白是一类定位于细胞核内的转录因子。通过序列比较进一步发现, 该转录因子与 ARABIDOPSIS THALIANA HOMEOBOX1(ATH1)同源性最高。因此推测, BEL1 与 ATH1 同属一类新的 homeodomain 蛋白家族。此外, 它与 KN1-like也有一定同源性, 但是缺乏此类蛋白所具有的典型 ELK 功能域(Reiser *et al*., 1995)。

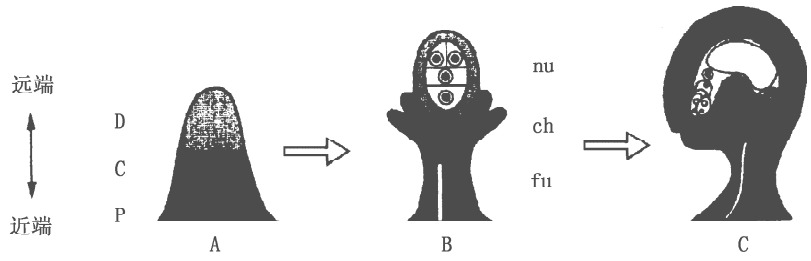

图 1 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)胚珠远端-近端轴模式建成示意图
A. 沿远端-近端轴(D-P)方向可将胚珠原基划分为 3 个区: 远端区、中部区和近端区; B. 远端区细胞进行分裂、分化形成具有四分体的珠心, 中部区侧面的细胞产生珠被, 而位于近端区的细胞则形成具有维管束的珠柄。图中省略了背腹面的不对称生长; C. 未受精的成熟胚珠; 缩写: D. 远端区; C. 中部区; P. 近端区; nu. 珠心; ch. 合点; fu. 珠柄

Fig. 1 A scheme depicting the postulated proximal-distal pattern elements
A. The ovule primordium is subdivided into at least three elements along the distal-proximal axis; B. The distal element gives rise to the nucellus with a tetrad. The central domain produces the chalaza with the two integuments and the proximal elements generates the funiculus, which eventually contains the vascular strand. The beginning curvature of the ovule is omitted at the stage; C. A mature ovule without being fertilized. Abbreviations: D. Distal pattern element; C. Central pattern element; P. Proximal pattern element; nu. Nucellus; ch. Chalaza; fu. Funiculus

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-086

原位杂交结果表明, 在野生型胚珠中, *BEL1* 最初在整个胚珠原基中表达, 之后其mRNA集中在介于珠心和珠柄的合点区及随之从合点区产生的珠被中。根据*BEL1*在胚珠中的表达模式, 并结合突变体*bel1*的表型, 推断在珠被发生之前, 胚珠原基的细胞沿D-P轴已经发生分化为3个区域: 珠心区、合点区和珠柄区。*BEL1*作为合点区的标记基因, 为证明该区的存在提供了分子生物学证据(Reiser *et al*., 1995)。

对于内、外两层珠被的起源问题一直存在争议。从进化的角度来看, 外珠被可能是由苞叶衍化而来, 其发生晚于内珠被。因此, 目前人们普遍认为内珠被和外珠被的发育是两个相对独立的过程。如上文所述, *BEL1*基因功能缺失后, 内珠被不能发生, 而外珠被仍然可以起始, 尽管形态发生了改变。内、外珠被在突变体*bel1*中的这种不同表现支持了内外珠被不同起源的观点(Reiser *et al*., 1995)。

在突变体 *bel1* 中, 不仅内、外珠被的发育被抑制, 雌配子体的发育也受到影响。但原位杂交结果显示, 在大孢子母细胞、功能大孢子和雌配子体中均未检测到 *BEL1* 的转录, 说明*BEL1*对雌配子体发育的作用是间接的。同时也说明, 珠被和雌配子体的形成是密不可分的两个发育过程, 珠被所提供的发育信号、营养和机械支持对于雌配子体的正常发育都是必需的(Reiser *et al*., 1995)。

2.3 珠被发育的遗传控制

珠被原基从合点区侧面发生之后, 细胞沿垂周方向进行分裂并伴随细胞伸长, 从而使珠被不断生长。人们以拟南芥为材料, 通过筛选和分析突变体的方法, 已经分离到一系列与珠被发育有关的基因(Gasser *et al*., 1998; Grossniklaus and Schneitz, 1998; Schneitz *et al*., 1998b; Schneitz, 1999)。这些基因被大致分为两类: 一类是控制珠被早期发育的基因, 如*HUELLENLOS*(*HLL*)、*AINTEGUMENT*(*ANT*)、*NOZZLE*(*NZZ*)和*INNER NO NOUTER*(*INO*)等; 另一类是控制珠被后期发育的基因, 如 *SHORT INTEGUMENT1*(*SIN1*)、*SUPERMAN*(*SUP*)、*STRUBBELIG*(*SUB*)和 *TSO1* 等(Schneitz, 1999)。

2.3.1 珠被发生的遗传控制 *ANT* Elliott等(1996)和Klucher等(1996)同时报道了突变体*aintegument*(*ant*)的筛选分析及*ANT*基因的克隆。强突变体*ant*中, 在即将产生珠被位置的表皮细胞可以进行平周分裂, 但形成一小的突起后便停止发育。弱突变体 *ant* 的珠被可以发生, 但与野生型相比, 其珠被既短又小。解剖学观察发现, 突变体*ant*的雌配子体停留在四分体阶段(Schneitz *et al*., 1997)。*ANT*基因编码的蛋白质具有AP2家族的典型特征, 包含2个由60~70个氨基酸组成高度保守的AP2功能域。目前, 已有实验结果证实 ANT 可以通过2个AP2功能域与特定DNA序列结合(Nole-Wilson and Krizek, 2000)。

与*BEL1*基因的表达模式类似, 在胚珠发育时期 1, *ANT* 在整个胚珠原基中均有高水平的转录, 直到时期 2-Ⅱ, 则集中在合点区及随后产生的内、外 2 层珠被中表达。然而, 在*ANT*胚珠的合点区仍可检测到合点区标记基因*BEL1*的表达, 并且在*ANT*胚珠发育至时期1-Ⅱ, 分别位于珠心区、合点区和珠柄区的表皮细胞已呈现出不同的形态和排列特征, 说明 *ANT* 功能缺失并未影响 D-P 轴模式的建立(Baker *et al*., 1997)。

除在珠被形成过程中发挥重要作用之外, *ANT*基因在胚珠分生组织形成过程中也起关键作用。一方面与分生组织特征基因*STM*协同作用维持心皮原基的生长; 另一方面启动胎座的生长和胚珠原基的产生(Skinner *et al*., 2004)。

HLL 突变体 *huellenlos*(*hll*)与突变体 *ant* 表型相似, 具体表现为 2 层珠被发生后不

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-086

久便停止发育(时期2-Ⅱ), 胚囊的发育停留在时期2-Ⅴ, 即四分体时期, 珠柄变短, 并且未观察到成熟维管束的存在。此外, 在个别突变体 *hll* 的发育后期(时期 3-Ⅴ), 珠心、合点及珠柄呈现出不同程度的细胞死亡。其中珠心细胞表现最为严重, 其次是合点区的细胞, 此现象在其他胚珠发育异常的突变体中尚未观察到。由此推测, *HLL*参与了胚珠发育过程中细胞死亡的时空控制过程。对这种现象的另一种解释是*HLL*功能失活导致珠柄发育异常, 进一步引起了异位细胞及组织的退化死亡(Schneitz *et al.*, 1998b)。

与单突变体相比, 双突变体 *ant hll* 的胚珠沿D-P轴明显变短, 分化合点和珠柄的位置被一直径宽于珠心的亚珠心细胞簇(sub-nucellar cell cluster)取代。该结构虽不具有合点和珠柄的形态特征, 但在时期 1-Ⅱ至时期 2-Ⅰ时, 整个结构或者其基部可以检测到*BEL1*的表达, 说明该结构具有或部分具有合点区的性质, *HLL/ANT*功能失活导致合点区和珠柄区的建成分别受到部分或完全抑制, 这亦为胚珠原基中 D-P 轴模式的存在提供了一个分子生物学证据。由此, Schneitz 等(1998a)认为, 野生型胚珠原基沿 D-P 轴划分的珠心区、合点区和珠柄区是从远端到近端依次建成的, 而且这 3 个区的建成是相对独立的过程。这与所观察到的胚珠发育过程是一致的(表1), 如珠心中大孢子母细胞在珠被和珠柄发育之前体积已增大(时期 2-Ⅰ)(Schneitz *et al.*, 1995)。

INO 背-腹极性的建立是胚珠发育过程中的一个重要方面。靠近心皮顶端的一侧为近轴面即腹面, 而靠近心皮基部的一侧为远轴面即背面。当胚珠发育至时期 2-Ⅲ时, 与内珠被不同, 外珠被从胚珠的远轴面发生, 并且该部位细胞分裂的速度远远高于近轴面。此外, 珠柄也向远轴面方向发生弯曲, 因此整个胚珠由辐射对称转变为两侧对称。Baker 等(1997)利用化学诱变的方法筛选到一背、腹极性丧失的突变体 *inner no outer*(*ino*)。*ino* 表现为外珠被不能从胚珠原基的远轴面发生, 而在相对一侧即近轴面却出现一突起, 但只进行了几次分裂便停止发育。

INO 基因编码的蛋白质包含 1 个 Cys2-Cys2 锌指结构域和1个HMG-like(high mobility group)结构域, 这是YABBY基因家族典型的特征, 该家族成员如 *FILAMENTOUS FLOWER*(*FIL*)、*YABBY2*(*YAB2*)和 *YABBY3*(*YAB3*)编码的蛋白质是一类转录因子, 参与了多种器官远轴面特征的建立(Siegfried *et al.*, 1999)。原位杂交结果显示出, *INO* mRNA 最初在胚珠原基的远轴面即外珠被发生位置处的表皮细胞中积累, 到时期2-Ⅲ时, 特异地在外珠被中积累。以上序列分析和杂交结果说明, INO属于YABBY家族, 在胚珠远轴面特征的决定过程中起重要作用(Villanueva *et al.*, 1999)。

在突变体 *ant*、*hll* 与 *bel1* 背景下, *INO* 表达的范围均得到不同程度的扩大。除胚珠的远轴面之外, 在珠心、合点或珠柄中也检测到 *INO* mRNA 的积累, 说明, *ANT*、*HLL* 与 *BEL1* 是 *INO* 的上位基因, 抑制 *INO* 在胚珠近轴面之外的区域中表达。此外, 这些研究结果还表明, 胚珠的远-近轴模式与背-腹轴模式建成是两个相互关联的过程(Villanueva *et al.*, 1999)。

ATS 拟南芥野生型胚珠的内、外珠被分别由2~3层细胞组成, 其中内珠被的最内层细胞分化为珠被绒毡层, 外珠被的外层细胞形成柱状细胞。然而, 在突变体 *altered testa shape*(*ats*)中, 内、外 2 层珠被则融合为 1 个由 3 层细胞组成的珠被状结构, 该结构具有内、外珠被的特征。对此现象的一种解释是 *ATS*突变之后, 2层珠被之间不能形成凹沟, 从而使二者融合在一起, 但在这一复合结构中, 每层细胞仍然保持它们原来的特征。此外, 突变体*ats*的胚囊未发现异常, 说明该基因突变

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-086

不影响胚囊的正常发育(Gasser *et al.*, 1998)。

2.3.2 珠被形态建成的遗传控制 *SUP* or *FLO10* 突变体 *superman*(*sup*)的外珠被近轴面和远轴面同步生长, 从而导致成熟胚珠为辐射对称。进一步研究发现, 这是由远轴面细胞分裂和伸长加快引起的, 说明*SUP*能抑制外珠被远轴面的生长(Gaiser *et al.*, 1995)。在 *sup* 胚珠中 *INO* 基因的表达由外珠被的远轴面扩展到近轴面, 因此, *SUP*可能通过抑制*INO*在外珠被远轴面的表达控制了背 - 腹轴的形态建成(Villanueva *et al.*, 1999)。

此外, *SUP* 对于确立第3、4轮花器官的位置界限也起重要作用。*SUP* 功能缺失会导致雄蕊数目增多和心皮减少, 与*AP3*组成型表达的表型相似。因此人们推测, *SUP* 的这种作用是通过抑制*AP3*在第4轮花器官中的表达而实现的(Bowman *et al.*, 1992)。而双突变体 *sup*/*ap3* 与单突变体 *sup* 胚珠的表型基本一致, 说明*AP3*的作用对于维持*sup*胚珠的表型不是必需的, *SUP*是通过两条不同的途径调控*AP3*和*INO*的表达, 进而影响花器官的早期和晚期发育(Gaiser *et al.*, 1995)。

SIN1 在 *short integument1*(*sin1*)突变体中, 外珠被细胞可以进行正常的分裂, 但不能正常伸长。这一结果表明, 在珠被发育过程中细胞分裂和细胞伸长是由相对独立的不同遗传因子控制的(Lang *et al.*, 1994)。

2.4 胚囊的发育

近年来, 人们利用T-DNA插入和转座子标签法筛选到一些雌配子体发育异常的突变体。通常情况下, 这些突变体表现为不能产生有功能的胚囊。此外, enhancer-trap screens和筛选cDNA等方法为分离雌配子体特异基因提供了有效的途径(Schneitz, 1999)。

目前, 已分离到的调控胚囊发育的基因包括: 拟南芥中的 *GAMETOPHYTIC FACTOR*(*GFA*)和 *FEMALE GAMETOPHYTE*(*FEM*)基因簇, *Gf*、*PROLIFERA*(*PRL*)、*ANDARTA*(*ADA*)、*TISTRYA*(*TYA*)和*HADAD*(*HDD*); 玉米中的*LETHAL OVULE2*(*LO2*)和 *INDETERMINATE GAMETOPHYTE1*(*IG1*)。这些基因功能失活能导致雌配子体的发育停滞在不同阶段。例如 *fem2* 或 *ada* 的胚囊发育至单核期便停止, *hdd*、*prl* 和 *lo2* 的胚囊分别停滞在二核、四核和八核期。而 *GFA2* 和 *FEM4* 则主要影响胚囊的后期发育, 如 *gfa2* 表现为中央细胞中的两极核不能融合, *fem4* 的卵细胞和助细胞不能正常分化(Schneitz, 1999)。

如上文所述, 珠被和雌配子体的形成是密不可分的两个发育过程, 有些控制珠被发育的基因突变之后也影响了胚囊的发育, 如 *ant*和*bel1*的雌配子体败育, *sin1*胚珠的大孢子异常。实验还表明, 单突变体 *ats* 和 *ino* 的珠心周围只有1层珠被包被, 但仍能产生有功能的胚囊, 而在双突变体 *ats ino* 中 2 层珠被同时缺失, 裸露的珠心则不能产生胚囊, 说明至少1层珠被的存在是维持胚囊正常发育所必需的(Gasser *et al.*, 1998)。

3 胚珠发育的基因调控模型

在前人工作的基础上, Schneitz等(1998b)提出了胚珠发育的基因调控模式(图 2)。根据该模型, 胚珠发育的过程包括胚珠原基特征的决定、原基的生长、模式建成和形态建成等几个方面。胚珠原基在胚珠特征基因的作用下形成。随后, 远端 - 近端轴向和径向模式逐渐建立。内、外珠被的发育是两个相对独立的过程, 珠被生长过程中细胞分裂和细胞伸长亦是由不同的遗传因子控制。伴随珠被不断生长, 位于珠心区的细胞逐渐发育为成熟的胚囊(Schneitz *et al.*, 1998b)。

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-086

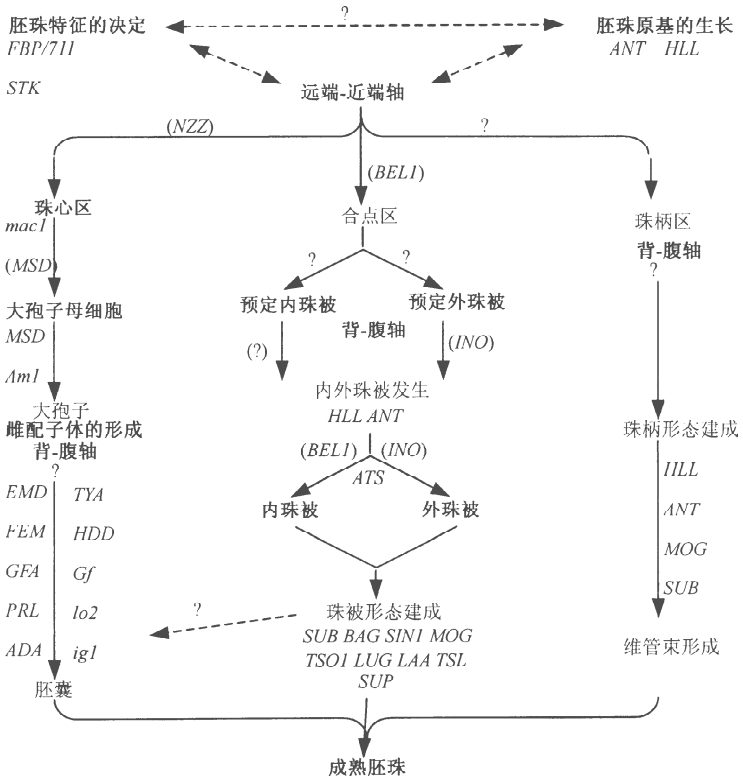

图 2　胚珠发育的遗传调控模型

黑体字表示胚珠发育过程中的重要阶段, 无间断箭头表示胚珠发育过程, 间断箭头表示胚珠发育的主要过程是相互关联的, 括号内的基因表示其功能尚未确定

Fig. 2　Flowchart outlining salient process and known genes involved in the ovule developmental pathaway (Schneitz *et al*., 1998b)

Main stages of ovule development are marked in bold. Unbroken arrows indicate the process of ovule development. Broken arrows mark the interplay of the main ovule processes. Genes in parentheses indicate uncertainty about the gene function

4　激素对胚珠发育过程的调控

激素作为重要的调节物质, 参与了植物生长发育的许多过程, 胚珠的发育同样受到激素的调节。在蝴蝶兰(*Phalaenopsis* spp.)中, 授粉通过诱导雌蕊中乙烯合成酶和ACC**氧化酶基因的表达促进了乙烯的合成, 而雌蕊中乙烯浓度的升高进而启动了胚珠的发育**(O'Neill *et al*., 1993; Zhang and O'Neill, 1993; Nadeau *et al*., 1993)**。然而, 迄今为止人们对于激素调节胚珠发育的分子机理了解甚少。这主要是由于自然条件下各类花器官的发育在种类、时间和空间上呈高度复合状态, 并且植物体内存在多种激素, 从而给研究工作带来一定困难。**Lu **等**(1988)**报道, 以花粉粒处于二胞晚期的风信子花被片作为外植体, 在含有** 2 mg·L^{-1} 6-BAP (N^6-benzylaminopurine)**和** 0.1 mg·L^{-1} 2,4-D (dichlorophenoxyacetic acid)**的培养基上培养一段时间后, 可以诱导再生花芽的产生, 如果保持高浓度激素不变, 从再生花芽的中心部位会连续不断地分化出新的花被片, 而将再生花芽转移到含有**6-BA 0.2 mg·L^{-1}**和**2,4-D 0.01 mg·L^{-1}**的**MS **培养基上则诱导胚珠的分化。表明离体条件下, 降低生长素和细胞分裂素浓度能诱导胚珠的产生。风信子离体**

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-086

实验系统将花器官分化的复杂过程成功地简化为单类器官的发生, 初步建立起激素与花芽和单类花器官对应关系, 为研究激素调节花发育的分子机理提供了方便。我们已从风信子中分离出 *HAG1*、*HAP2*、*HPI* 和 *HoMADS1* 等花器官特征决定基因。进一步研究工作揭示, 在离体条件下, 高浓度外源激素通过激活*HAG1*的表达促进了花芽再生和花器官的分化, 而胚珠特征基因 *HoMADS1* 的表达则受到低浓度激素的诱导(Li *et al*., 2002; Xu *et al*., 2004)。研究工作为理解激素控制胚珠发育的机理提供了重要的资料。

5 结语

胚珠虽然结构简单, 但其发生及形态建成过程体现了植物个体发育的核心过程, 即顶端生长加侧生器官的持续生长(白书农, 2003)。例如, 在胚珠原基即将产生的部位可以同时检测到 *STM*、*CUC2* 和 *SPT* 等分生组织特征基因及 *REV* 等近轴面特征基因的表达, 二者这种平行表达的现象在腋生分生组织形成过程中也能观察到, 说明胚珠和腋芽的形成机制类似。由此, 人们认为胚珠可以看作一个具有生殖能力的腋芽, 而外珠被则是从腋芽上进一步产生的侧生器官(Skinner *et al*., 2004)。因此, 研究胚珠发育可以揭示许多具有普遍意义的发育机制。近年来, 通过对模式植物拟南芥的分子遗传分析, 胚珠发育的基因调控网络已初步建立。但一些重要调控基因, 特别是影响植物早期发育的基因如 *STM* 等在胚珠发育过程中的功能尚未完全揭示。胚珠特异启动子、RNA 干涉技术的应用以及突变体库的构建将有助于确定这些基因的功能。此外, 可以通过对双突变体及三突变体的分析, 研究各基因之间的相互作用, 是上位作用、相互拮抗还是存在功能重叠？并利用酵母杂交等方法从分子水平上揭示基因间的相互作用。同时, 离体花器官再生系统为进一步研究激素调控胚珠发育的作用机理提供了一条有效的途径。

参 考 文 献

白书农 (2003) 植物发育生物学(第一版). 北京大学出版社, 北京, pp. 28-33

Angenent GC, Franken J, Busscher M, van Dijken A, van Went JL, Dons HJM, van Tunen AJ (1995) A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in petunia. *The Plant Cell*, **7:** 1569-1582

Baker SC, Robinson-Beers K, Villanueva JM, Gaiser JC, Gasser CS (1997) Interactions among genes regulating ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **145:** 1109-1124

Bowman JL, Drews GN, Meyerowitz EM (1991) Expression of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS* is restricted to specific cell types late in flower development. *The Plant Cell*, **3:** 749-758

Bowman JL, Sakai H, Jack T, Weigel D, Mayer U, Meyerowitz EM (1992) *SUPERMAN*, a regulator of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. *Development*, **114:** 599-615

Coen ES, Meyerowitz EM (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, **353:** 31-37

Colombo L, Franken J, Koetje E, van Went J, Dons HJM, Angenent GC, van Tunen AJ (1995) The petunia MADS box gene *FBP11*determines ovule identity. *The Plant Cell*, **7:** 1859-1868

Elliott RC, Betzner AS, Huttner E, Oakes MP, Tucker WQJ , Gerentes D, Perez P, Smyth DR (1996) *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development floral organ growth. *The Plant Cell*, **8:** 155-168

Favaro R, Battaglia R, Kooiker M, Borghi L, Ditta

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-086

G, Yanofsky MF, Kater MM, Colombo L (2003) MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **15:** 2603-2611

Flanagan CA, Hu Y, Ma H (1996) Specific expression of the *AGL1* MADS-box gene suggests regulatory functions in *Arabidopsis* gynoecium and ovule development. *The Plant Journal*, **10:** 343-353

Gaiser JC, Robinson-Beers K, Gasser CS (1995) The *Arabidopsis SUPERMAN* gene mediates asymmetric growth of the outer integument of ovules. *The Plant Cell*, **7:** 333-345

Gasser CS, Broadhvest J, Hauser BA (1998) Genetic analysis of ovule development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49:** 1-24

Grossniklaus U, Schneitz K (1998) The molecular and genetic basis of ovule and megagametophyte development. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **9:** 227-238

Herr JM (1995) The origin of the ovule. *American Journal of Botany*, **82:** 547-564

Jiirgens G (2001) New embo member's review: a pical-basal pattern formation in *Arabidopsis* embryogenesis. *The EMBO Journal*, **20:** 3609-3616

Klucher KM, Chow H, Reiser L, Fischer RL (1996) The *AINTEGUMENTA* gene of *Arabidopsis* required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2*. *The Plant Cell*, **8:** 137-153

Lang JD, Ray S, Ray A (1994) *sin1*, a mutation affecting female fertility in *Arabidopsis*, interacts with *mod1*, its recessive modifier. *Genetics*, **137:** 1101-1110

Li QZ, Li XG, Bai SN, Lu WL, Zhang XS **(**2002) Isolation of *HAG1* and its regulation by plant hormones during *in vitro* floral organogenesis in *Hyacinthus orientalis* L. *Planta*, **215:** 533-540

Liljegren SJ, Ditta GS, Eshed Y, Savidge B, Bowman JL, Yanofsky MF (2000) *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature*, **404:** 766-770

Lopez-Dee ZP, Wittich P, Enrico Pe M, Rigola D, Del Buono I, Gorla MS, Kater MM, Columbo L **(**1999). *OsMADS13*, a novel rice MADS-box gene expressed during ovule development. *Developmental Genetics*, **25:** 237-244

Lu WL, Enomoto K, Fukunaga Y, Kuo C (1988) Regeneration of tepals, stamens and ovules in explants from perianth of *Hyacinthus orientalis* L. *Planta*, **175**: 478-484

Ma H, Yanofsky MF, Meyerowitz EM (1991) *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcriptin factor genes. *Genes &* Development, **5:** 484-495

Mizukami Y, Ma H (1992) Ectopic expression of the floral homeotic gene AGAMOUS in transgenic *Arabidopsis* plants alters floral organ identity. *Cell*, **71:** 119-131

Müller A (1961) Zur charakterisierung der Blüten und infloreszenzen von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynth. *Kulturpflanze*, **9:** 364-393

Nadeau JA, Zhang XS, Nair H, O'Neill SD (1993) Temporal and spatial regulation of 1-aminocylopropane-1-carboxylate oxidase in the pollination-induced senescence of orchid flowers. *Plant Physiology*, **103:** 31-39

Nole-Wilson S, Krizek BA (2000) DNA binding properties of the *Arabidopsis* floral development protein AINTEGUMENTA. *Nucleic Acid Research*, **28:** 4076-4082

O'Neill SD, Nadeau JA, Zhang XS, Bui AQ, Halevy AH (1993) Interorgan regulation of ethylene biosynthetic genes by pollination. *The Plant Cell*, **5:** 419-432

Pelaz S, Ditta G , Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF (2000) B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature*, **405:** 200-203

Pinyopich A, Ditta GS, Savidge B, Liljegren SJ, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF (2003) Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature*, **424:** 85-88

Ray A, Robinson-Beers K, Ray S, Baker SC, Lang JD,

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-086

Preuss D, Milligan SB, Gasser CS (1994) *Arabidopsis* floral homeotic gene *BELL* (*BEL1*) controls ovule development through negative regulation of *AGAMOUS* gene (*AG*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **91:** 5761-5765

Reiser L, Modrusan Z, Margossian L, Samach A, Ohad N, Haughn GW, Fischer RL (1995) The *BELL1* gene encodes a homeodomain protein involved in pattern formation in the *Arabidopsis* ovule primordium. *Cell*, **83:** 735-742

Robinson-Beers K, Pruitt RE, Gasser CS (1992) Ovule development in wild-type *Arabidopsis* and two female-sterile mutants. *The Plant Cell*, **4:** 1237-1249

Rounsley SD, Ditta GS, Yanofsky MF (1995) Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *The Plant Cell*, **7:** 1259-1269

Schmidt RJ, Veit B, Mandel MA, Mena M, Hake S, Yanofsky MF (1993) Identification and molecular characterization of *ZAG1*, the maize homolog of *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS*. *The Plant Cell*, **5:** 729-737

Schneitz K (1999) The molecular and genetic control of ovule development. *Current Opinion in Plant Biology*, **2:** 13-17

Schneitz K, Baker SC, Gasser CS, Redweik A (1998a) Pattern formation and growth during floral organogenesis, *HUELLENLOS* and *AINTEGUMENTA* are required for the formation of the proximal region of the ovule primordium in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **125:** 2555-2563

Schneitz K, Balasubramanian S, Schiefthaler U (1998b) Organogenesis in plants: the molecular and genetic control of ovule development. *Trends in Plant Science*, **3:** 468-472

Schneitz K, Hülskamp M, Kopczak SD, Pruitt RE (1997) Dissection of sexual organ ontogenesis: a genetic analysis of ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **124:** 1367-1376

Schneitz K, Hülskamp M, Pruitt RE (1995) Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*. A light microscope study of cleared whole-mout tissue. *The Plant Journal*, **7:** 731-749

Skinner DJ, Hill TA, Gasser CS (2004) Regulation of ovule development. *The Plant Cell*, **16:** S32-S45

Siegfried KR, Eshed Y, Baum SF, Otsuga D, Drews GN, Bowman JL (1999) Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development*, **126:** 4117-4128

Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **2:** 755-767

Tzeng TY, Chen HY, Yang CH (2002) Ectopic expression of carpel-specific MADS Box genes from lily and lisianthus causes similar homeotic conversion of sepal and petal in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **130:** 1827-1836

Villanueva JM, Broadhvest J, Hauser BA, Meister RJ, Schneitz K, Gasser CS (1999) *INNER NO OUTER* regulates abaxial-adaxial patterning in *Arabidopsis* ovules. *Genes & Development*, **13:** 3160-3169

Western TL, Haughn GW (1999) *BELL1* and *AGAMOUS* genes promote ovule identity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **18:** 329-336

Xu HY, Li XG, Li QZ, Bai SN, Lu WL, Zhang XS (2004) Characterization of *HoMADS1* and its induction by plant hormones during *in vitro* ovule development in *Hyacinthus orientalis* L. *Plant Molecular Biology*, **55:** 209-220

Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL, Drews GN, Feldmann KA, Meyerowitz EM (1990) The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. *Nature*, **346:** 35-39

Zhang XS, O'Neill SD (1993) Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. *The Plant Cell*, **5:** 403-418

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t24-086