

离体受精作为技术平台在被子植物 有性生殖研究中的应用

邱义兰 郑茂钟 田惠桥*

(厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 被子植物的离体受精 10 a 前在玉米中已获得成功, 尽管目前只在玉米获得完全成功和小麦获得部分成功, 但离体受精技术的研究成果非常显著。目前离体受精技术已被用于其他的研究, 如用分离的精细胞和卵细胞筛选配子细胞的特异基因和蛋白质; 研究合子细胞被激活的机理; 用不同种植物的精、卵细胞体外融合进行新的远缘杂交尝试; 利用合子细胞易分裂和胚胎发生特征探索用其作为转基因研究的受体细胞等。以离体受精技术为基础在高等植物发育生物学和生殖生物学领域的基础研究和应用探索显示了巨大潜力。介绍了离体受精技术在被子植物有性生殖的研究成果和应用前景, 为研究和利用被子植物有性生殖过程中的生殖细胞特征提供线索。

关键词: 被子植物; 有性生殖; 离体受精

中图分类号: Q944.44

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2003)03-0290-07

In vitro Fertilization as a Technique Platform Used in the Research of Sexual Reproduction of Angiosperms

QIU Yi-lan ZHENG Mao-zhong TIAN Hui-qiao

(The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: *In vitro* fertilization technique using male and female gametes completely isolated from their paternal and maternal structures has been developed for ten years. Using electric fusion, zygote, embryo and fertile plants of maize can now be produced *in vitro* from individual fusions of pairs of sperm and egg cells. The culture conditions allow control of the parameters of fertilization and early steps of zygote development. Although this technique was successfully performed only in maize it helped us to understand a lot of information about fertilization mechanism of higher plants. Following successful isolating male and female gametes and culturing artificial zygote, *in vitro* fertilization as a research platform can be extended to more purposes in the research of sexual reproduction in higher plants. We knew the phenomenon of sperm dimorphism in many plants and also confirmed the preferential fertilization of both sperm cells in *Plumbago zeylanica* since 1985. We, however, know nothing for molecular mechanism of gamete recognition in higher plants. Now the special genes of male and female gametes, and zygote can be screened out using isolated gametes, which changes the research method from cell structure to molecular level. Zygote activation is a very interesting topic in plant developmental biology. But it is difficult to probe the mechanism of zygote activation because egg cell and zygote are imbedded deeply in ovules. Using microculture of zygote from both *in vivo* and *in vitro* created, the zygote can be observed on schedule and manipulated using modern biological techniques. The first confirmed zygote activation was free calcium change at the beginning of development after fusion of both male and female gametes of maize. Fertile plants can be easily developed from

收稿日期: 2003-05-29 接受日期: 2003-07-16

基金项目: 国家自然科学基金(30170060).

* 通讯作者 Corresponding author

few zygotes under *in vitro* condition by means of embryogenesis, which is greatly interested in transgenic study in higher plants. *In vitro* fertilization and zygote culture also have great potential in overcoming incompatibilities of interspecies barriers in creating new hybrid plants. The fusion of isolated gametes from different plants can create a artificial hybrid zygote which can not be obtained from normally sexual crossing. This review describes the significant advances in *in vitro* fertilization in the research of sexual plant reproduction of angiosperms and discusses its use in plant improvement in higher plants.

Key words: Angiosperm; Sexual reproduction; *In vitro* fertilization

双受精是被子植物有性生殖的关键环节。精、卵细胞融合时发生的遗传重组是植物进化过程的最主要途径,也是人类进行植物品种改良的理论基础。然而,被子植物雌、雄配子深藏于花器官的组织内使得对受精过程的研究受到很大的限制,至今对其受精机理的认识还非常有限。离体受精技术是利用分离方法,将雌、雄配子置于离体控制条件下进行操作,可排除体细胞组织的干扰,用于探索精、卵细胞的识别和合子的激活的问题。此外,离体受精操作有可能为单倍体育种、远缘杂交、基因工程等应用领域提供新的技术手段,现已成为植物发育生物学和植物生殖生物学的一个研究热点。

胡适宜 1985 年首次分离出烟草生活的卵细胞^[1]。1991 年德国的一个实验室首次将分离的玉米精、卵细胞用电融合的方法在体外诱导融合形成了人工合子并培养成多细胞团^[2],1993 年玉米人工合子最终发育成可育的植株^[3]。Kovács 等 1995 年将小麦精、卵细胞用同样的方法诱导融合,人工合子分裂形成了多细胞团^[4]。虽然目前被子植物的离体受精仍只在玉米中获得了完全的成功和在小麦中获得部分的成功,但用这一技术却获得了相当丰富的有关玉米受精过程的新信息。现在这一技术已不仅仅局限在分离精、卵细胞,配子细胞的体外融合和人工合子的培养研究这 3 个环节,经过 10 多年的发展,已扩展成为探索和利用被子植物有性生殖的一个技术平台,在研究配子细胞的发育和结合转基因技术方面显示了其独特利用价值。有关被子植物离体受精研究的新进展我们已及时做了总结^[5],本文从离体受精作为一个技术平台的角度,着重介绍该技术平台在被子植物有性生殖研究中已取得的成果和应用潜力。

1 用分子生物学方法研究被子植物生殖细胞的发育特征

1.1 雄性生殖细胞的分子生物学研究

上世纪 80 年代 Rusell 应用电子显微镜结合三

维重构技术发现白花丹 (*Plumbago zeylanica*) 的两个精细胞在花粉粒中总是与营养核相联结并在精细胞的发育过程中逐渐显示出了形态和结构上的差异,提出了雄性生殖单位和精子二型性的概念^[6]。进一步观察发现白花丹的两个异型精子特异性地参与双受精:在一个花粉管中的两个精细胞,一个含有大量的线粒体而质体很少,另一个含有大量的质体而线粒体很少。受精时,含质体多线粒体少的精细胞与卵细胞融合,而含线粒体多质体少的精细胞与中央细胞融合,他又提出了被子植物倾向受精的概念^[7]。精子二型性和倾向受精的现象表明了白花丹的受精过程中存在着细胞水平的雌雄配子识别机制。虽然倾向受精现象只在白花丹中得到证实,但精细胞的二型性现象在数十种植物中都观察到^[8],这些具有二型性精细胞的植物也都有可能存在着倾向受精现象。最近,Saito 等检查了 56 个科、104 个属的 115 种植物的花粉生殖细胞或精细胞中的细胞器 DNA 分布,发现在没有密切亲缘关系的 4 个科、6 个属的 6 种植物中,生殖细胞或精细胞中细胞器 DNA 呈极性分布,暗示着除白花丹外,其他植物中也存在着精细胞的分化和倾向受精现象^[9]。然而,对雌、雄配子识别的机理问题,用电子显微镜技术就很难解决了。

被子植物的雄配子发育始于小孢子的不等分裂,形成一个大的营养细胞和一个小的生殖细胞,生殖细胞进一步分裂产生两个精细胞。Southworth 和 Kwiatkowski 用阿拉伯半乳糖蛋白 (arabino-galactan proteins) 的抗体检测了油菜 (*Brassica campestris*) 的精细胞,发现有两个单克隆抗体 JIM8 和 JIM13 附在油菜精细胞的表面^[10]。Xu 和 Tsao 分离了玉米精细胞质膜上的蛋白质,用过氧化物酶交联的伴刀豆凝集素 A (peroxidase-conjugated Con A) 鉴别膜上的糖蛋白,发现其中有些蛋白质与体细胞质膜上的不同^[11]。Sun 等用 3 种交联荧光团的凝集素 (FITC-conjugated lectin) Con A, WGA 和 PHA-E 检测玉米精细胞、卵细胞、助细胞、中央细胞和反足

细胞的质膜糖蛋白,发现 FITC-Con A 在精细胞表面有显示但不如卵细胞表面的强;而 FITC-WGA 和 FITC-PHA-E 在精细胞表面没有显示^[12]。Xu 等用麝香百合 (*Lilium longiflorum*) 的生殖细胞构建 cDNA 文库,从中筛选出两种编码生殖细胞特有的组蛋白基因,原位杂交实验显示这两个基因在生殖细胞形成后开始活动,随着生殖细胞的成熟,其转录产物增加^[13]。接着,他们又分离出了雄配子的特异基因 *LGCI*,其转录产物被定位在雄配子细胞的表面,可能与受精前的精、卵细胞识别有关^[14]。Ueda 等从百合精细胞中分离出了 3 种核组蛋白基因,它们所编码的蛋白在两个精细胞中含量最高,推测这些蛋白可能参与雄配子染色质浓缩或重新改组并抑制雄配子的基因表达^[15]。精细胞在受精过程中具有与雌配子识别、粘附和融合等多种功能,这些高度特化的配子识别功能可能受一组特异基因所控制。最近, Xu 等构建了烟草精细胞 cDNA 文库,从 396 个克隆基因中初步筛选出 2 个在生殖细胞和精细胞中特异表达的 *NtS1* 和 *NtS2* 基因,发现 *NtS1* 基因编码一个多聚半乳糖醛酸酶,推测该酶在烟草雄配子分化过程中的细胞壁降解中起作用^[16]。Singh 等以 RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 技术为基础,构建了麝香百合生殖细胞和白花丹精细胞的 cDNA 文库,在 cDNA 文库中各有一个基因编码一个相同的氨基酸序列,但这两个基因编码区外的 DNA 核苷酸则有差异。他们认为这两个基因的功能是参与蛋白质的泛素化 (ubiquitination),很可能在两个雄配子的发育过程中增加蛋白质的差异,这种差异可能导致两个雄配子在倾向受精中起作用^[17]。上述这些研究结果在揭示雄配子发育的分子基础以及与受精过程有关的雌、雄配子的识别问题上迈出了重要的一步。

1.2 雌性生殖细胞的分子生物学研究

被子植物卵细胞与合子之间的 cDNA 文库的比较是当前了解合子特异基因的有效方法。与精细胞相比,卵细胞和合子的数量非常少,而且卵细胞的分离要困难得多。Dresselhaus 等先用约 100 个植物体细胞通过 RT/PCR 技术构建 cDNA 文库获得成功,又用 128 个玉米卵细胞构建出卵细胞 cDNA 文库并对二者进行了比较,通过差异筛选首次分离出了在被子植物卵细胞中特异表达的基因,为研究被子植物卵细胞和合子中的特异基因打下了基础^[18]。合子激活是新一代孢子体发育的最初关

键事件。被子植物合子激活的研究起步较晚,对其激活的机理了解极少。Dresselhaus 等在玉米离体受精的基础上又用 128 个未受精的卵细胞和 104 个离体受精 18 h 的人工合子分别构建了 cDNA 文库,从离体受精的合子 cDNA 文库中筛选出了一种钙网 (calreticulin) 蛋白基因,这是首次从被子植物合子中分离出的基因,其表达产物是一种定位于内质网中的储钙蛋白。该钙网蛋白基因在卵细胞受精后表达增强,与细胞分裂密切相关^[19]。接着他们又从二者的 cDNA 文库中筛选出了 50 多个不同的基因,发现在未受精的卵细胞中储存了相当多的翻译启动子的转录本 eIF-5A,这些启动因子与卵细胞中的某些 mRNA 的稳定和翻译有关。另外,其中有些基因在受精后表达,有 7 个基因编码的蛋白质可能与转录有关;有 2 个基因是受精 18 h 后开始转录的,其编码的蛋白质可能与 DNA 的复制和修复有关^[20]。Sauter 等对与玉米生殖细胞有关的细胞周期基因进行了研究。他们分析了精细胞、卵细胞、中央细胞、助细胞、反足细胞及合子的细胞分裂周期基因 *cdc2* (*cdc2ZmA/B*)、细胞周期蛋白基因 (*cyclin*; *Zeama*; *CycB1*; 2, *Zeama*; *CycA1*; 1, *Zeama*; *CycB2*; 1) 和一种组蛋白基因 (*histone H3*) 的表达,发现 *cdc2* 和组蛋白基因在胚囊的所有成员和精细胞及合子的整个发育过程中均有表达。但 *cyclin* 基因则在胚囊不同细胞中特异表达并在合子的发育过程中呈现表达差异^[21]。Vielle-Calzada 等对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 胚胎发育早期进行研究,发现多个来自父本的等位基因的转录推迟到 32–46 个细胞的幼胚时期才开始^[22]。

细胞质膜上的糖组分与蛋白质结合构成的糖蛋白是细胞间识别的机构。最近, Sun 等用 3 种交联了荧光 (FITC) 的凝集素 Con A, WGA 和 PHA-E 标记玉米分离的胚囊细胞表面,结果显示受精前的卵细胞和中央细胞都可被 FITC-Con A 和 FITC-WGA 标记,且标记位点相同,但受精前的卵细胞未能被 FITC-PHA-E 标记。受精后,原来标记在卵细胞上的 FITC-WGA 荧光加强,而原来未能被标记的 FITC-PHA-E 荧光显现。他们认为是玉米的受精引起了卵细胞质膜上的糖组分的变化^[12]。

上述雌、雄性细胞的分子生物学研究都是在雌、雄性生殖细胞能被分离出来的基础上进行的。分离的生殖细胞、精细胞以及卵细胞和合子完全避免了体细胞的干扰,使调控精、卵细胞发育的特异基因

的分离成为可能。目前,在生殖细胞成功分离的基础上,有关精、卵细胞的分子生物学研究已成为被子植物生殖生物学的研究热点之一,研究结果逐年增多。

2 探索被子植物合子激活的机理

动物和低等植物的精、卵细胞相对容易分离,有关受精卵的激活机理也研究得比较深入。在被子植物精、卵细胞被分离之前,对合子激活过程的认识仅是通过电子显微镜观察它的超微结构的变化,有很大的局限性。现在利用被子植物离体受精技术,可将精、卵细胞的融合过程和合子启动发育过程置于显微镜下进行定点、定时的追踪观察,利用一些特殊的分子探针技术,使对被子植物合子激活过程的研究成为可能。

合子是个体发育的第一个细胞,它的激活一直是一个非常吸引人的神秘领域。在体内,精、卵细胞可自发融合形成合子,但将分离的多种植物精、卵细胞放置在普通培养基中,精、卵细胞并不能自发融合^[3,23,24]。在玉米离体受精实验中,有两种方法可以产生人工合子:一种是德国的 Kranz 等^[2]所用的电融合方法,但这种借助电激诱导精、卵细胞融合的方法显然不适于合子激活的研究;另一种是法国的 Faure 等在 pH 6-6.5、5 mmol/L CaCl₂ 溶液中,79.7%的玉米精、卵细胞相粘 4 min 后发生融合,融合过程不到 10 s^[25]。这种钙诱导的精、卵细胞融合方法人为因素较小,更接近体内合子形成状态,有利于对合子形成初期变化的研究。Digonnet 等用这种方法研究了玉米人工合子激活过程中游离钙的变化动态,发现卵细胞中游离钙的含量很少,当粘附了精细胞后,卵细胞中的游离钙含量没有发生变化,精细胞中没有钙荧光显示;当精、卵细胞开始融合时,卵细胞中的钙荧光首先向精细胞扩散,扩散过程持续约 10 s,直到精细胞完全溶入卵细胞中。精、卵细胞的融合也引起卵细胞的游离钙增加,这种游离钙的快速增加现象仅持续 2 min,然后钙荧光强度开始下降,融合后 29 min 受精卵中的游离钙恢复到融合前的水平^[26]。Antoine 等又用钙特异振动电极测量了精、卵细胞融合前后外源钙流入卵细胞的速度,发现融合前外源钙很少向卵细胞流入。精、卵细胞融合后,外源钙从融合位点开始向卵细胞中流入,同时钙流入的部位也从融合位点以 1.13 μm s⁻¹ 速度向整个卵细胞表面扩散^[26]。这是第一例探索被子植

物合子激活机理的研究结果,表明玉米受精引起受精卵细胞中游离钙发生了变化。最近,Han 等向蓝猪耳(*Torenia fournieri*)成熟的中央细胞中注射其精细胞提取物,结果引起游离钙的增加,在注射后 20 min 时达到最高,然后开始下降。他们也试着用玉米精细胞提取物注射到蓝猪耳未成熟的中央细胞中,但并没有引起游离钙的增加。向中央细胞注射肌醇也会引起游离钙的增加,而且增加的速度比用精细胞提取物诱导的快。他们认为精细胞提取物中可能含有启动中央细胞从细胞内钙库释放钙离子的因子^[28]。对于钙与合子激活的关系,Antonie 等提出了一个假设:配子膜的融合启动了外源钙向卵细胞流入,同时也激活了细胞中肌动-肌球蛋白的活性,引起细胞的收缩。而卵细胞的收缩又开通了更多被激活的钙离子通道,迅速产生了钙信号,导致了合子的激活^[27]。然而,蓝猪耳的实验结果则表明增加的游离钙是从细胞内的钙库中释放出来的^[29]。这些问题的提出使我们首次对合子的激活有了一个初步的认识,有关合子激活研究的大门已被打开。

在研究合子激活过程中游离钙变化的同时,意大利的 Cresti 小组也对烟草精、卵细胞融合过程做了一系列的细胞学观察,发现在 PEG 溶液中,精、卵细胞相粘即会引起卵细胞中的细胞质索形成,精、卵细胞融合后,卵细胞质中就有了细胞器长距离运动的变化。但在精细胞与中央细胞融合后 30 min 时,中央细胞的细胞质没有明显的变化。他们发现细胞的体积与细胞的融合有密切的关系。用不同体积的叶肉细胞融合,两个细胞的体积差异越大,融合越有效^[29]。尽管采用的融合技术是用 PEG 强迫细胞融合,不能解释配子识别的问题,甚至有些现象可能并不在体内发生,但这些结果对理解被子植物受精过程还是有幫助的。

3 利用不同种植物配子融合进行新的远缘杂交

用不同植物的精、卵细胞融合产生人工杂种合子是进行远缘杂交的新尝试,这样既可完全避免柱头、花柱、胚珠等体细胞的影响,又可避免在体细胞杂交中产生的倍性问题。用目前发展的细胞融合技术可对任何植物之间的细胞进行融合实验。然而,体细胞杂交的研究反而处于低谷状态,主要原因就是杂种细胞培养困难。体细胞融合的双亲都处于二倍体状态,细胞质含量差异也不大,融合后的杂种

细胞内部在短时间内很难达到一种生理上的平衡状态,具体表现在亲缘关系较远的体细胞杂交中常出现一方亲本染色体被排除的现象。因此,在体细胞杂交中往往存在着杂种细胞不分裂、杂种愈伤组织不分化、后代长期不稳定等诸多问题。正是由于上述问题长期困扰着植物体细胞杂交研究,使上世纪 70 年代发展起来的体细胞杂交技术没有取得最初预期的效果,随着基因工程的兴起,植物体细胞杂交研究被冷落也就在所难免了。利用培养的人工杂种合子对解决上述体细胞杂交中难以克服的问题则显示出优势:在体内,精细胞所含的细胞质很少,受精后,合子中绝大部分细胞质来源于卵细胞,因此,合子的早期发育过程是靠卵细胞中早已储存的物质调控^[20]。另外,精细胞的基因是在合子分裂到 32-46 个细胞时才开始活动,暗示着在合子发育早期卵细胞基因起主导作用^[22]。因而,尽管合子是精、卵细胞融合的产物,但因为精细胞的上述特征,使合子的早期发育基本以母本的卵细胞为主。在异种植物离体受精实验中,Kranz 等用玉米卵细胞与小麦、大麦、高粱、薏苡的精细胞融合,杂种合子分别以 23% (9/38)、43% (13/30)、50% (17/34) 和 78% (21/27) 的频率形成杂种多细胞团^[30]。以现在的培养技术诱导这些小细胞团的继续分裂相对要容易些,如此高的杂种合子分裂频率使属间植物的离体受精实验成为开展远缘杂交的一种潜在的有效方法。离体远缘杂交产生的人工杂种合子容易分裂的原因很可能是合子早已储存了与细胞分裂有关的蛋白质,并且在发育早期双亲的细胞质矛盾不大,因而使得在自然情况下很难进行的属间杂交达到了杂种多细胞团的程度。然而,人工杂种合子的培养并没有克服植物亲缘关系越远越难成功的问题,用玉米卵细胞与油菜精细胞融合的人工杂种合子就没有分裂^[30]。因此,在开展人工杂种合子培养之前还是要考虑选择有适当亲缘关系的双亲,尽量减少杂种合子的后期培养障碍。

4 利用合子的生长特性改进转基因方法

自上世纪 80 年代初获得转基因烟草以来,植物基因工程就一直是植物分子生物学研究和应用的活跃领域。迄今为止,植物转基因方法有根瘤农杆菌介导的基因转化法、PEG 介导的 DNA 转入法、电激介导的 DNA 转入法以及基因枪和微注射等多

种外源基因的转入法。这些方法有着不同的适用范围和优缺点。众多转基因方法的建立和改进使植物的转基因研究获得空前的发展。然而,植物基因工程研究的后一环节,即转入外源基因的受体细胞培养工作则没有明显的进展。首先,现在大多仍采用以植物组织作为转基因的受体单位,结果往往是转入外源基因的细胞未必都能分裂,而分裂的细胞又未必是含有外源基因的细胞,从而大大降低了转化效率。其次,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及组织培养过程,在长时间的组织培养过程中,容易产生无形变异系和不育株,影响了转化效率。

在体内,合子细胞具有旺盛的生命力,合子易分裂且以胚胎发生方式形成胚的特征正好弥补了上述植物转基因研究中的受体细胞培养的问题,用合子作为转基因的受体细胞在转化率和后代中外源基因的遗传稳定性方面具有明显的优势。玉米和小麦的精、卵细胞分离技术已很成熟,很容易得到这两种植物的人工合子。玉米、小麦、大麦体内合子的分离也获得成功。这些人工合子和体内合子在离体培养条件下确实显示出了合子细胞易分裂的特征并基本遵循胚胎发生的途径再生可育植株^[31-33],为利用其作为转基因的受体细胞创造了条件。分离的合子数目有限,采用显微注射的方法转移外源基因比较合适。Leduc 等在玉米体内合子分离、培养成功的基础上首次采用显微注射方法向授粉 24 h 后分离出的 227 个合子注射两种报告基因,约 3.5% 的合子细胞团在培养 4 d 时显示出报告基因的瞬时表达^[34]。Pónya 等分别向小麦的 98 个卵细胞注射了带有泛蛋白启动子的绿色荧光蛋白(GFP)基因,向 77 个合子注射具 35S 启动子的 *GUS* 基因,卵细胞和合子的平均瞬时表达率分别为 46% (45/98) 和 52% (40/77),远远高于以玉米体细胞为受体的外源基因瞬时表达率。其中卵细胞瞬时表达率的高低与卵细胞分离的时间有关,开花前 1 d 的卵细胞瞬时表达率可达 73.91%,而不同时期合子的外源基因瞬时表达率没有明显差异^[35]。Holm 等向分离的大麦合子注射了一种具水稻肌球蛋白启动子的 *GUS* 基因。被注射的上百个合子中有 34% 发育成胚状体结构,PCR 检测显示 21% 的胚状体有转入的外源 DNA^[36]。Scholten 和 Kranz 向玉米的卵细胞、助细胞、中央细胞和精细胞中注射了具有 35S 启动子的 *GFP* 基因,

除在精细胞中没有检测到 GFP 荧光, 其余 3 种细胞都呈现出 GFP 荧光^[37]。

由于是对单个细胞进行遗传操作并且有较高的转化率, 因而可以不用抗菌素基因和抗除草剂基因等作为筛选的标记基因^[38]。目前进行田间实验和被批准商业化使用的转基因植物产品中都含有标记基因。有关这些标记基因的安全性问题已引起了科学家和社会的广泛关注。用高等植物合子作为转基因的受体细胞的转基因体系可能会在今后的转基因农作物商业化生产中具有较高的应用价值。

5 结语

动物和低等植物的有性生殖机理研究要比被子植物的深入得多, 因为动物和低等植物的生殖细胞离体程度高, 容易进行体外操作。现在, 在被子植物离体受精的基础上, 利用现代生物技术对分离出来的生殖细胞进行各个层次上的分析研究, 可探索被子植物有性生殖的基本规律。如同上世纪 70 年代电子显微镜技术运用于植物胚胎学领域中获得了大量的生殖细胞超微结构信息、提高了对生殖细胞形态结构与生理功能的认识一样, 现在, 随着被子植物离体受精技术的突破, 被子植物生殖生物学的研究已进入到一个新的层次。分子生物学方法的应用使植物受精机理的许多问题有望得到解答。同时利用生殖细胞和合子细胞的特点, 结合转基因技术和细胞杂交技术有可能成为植物生物工程技术的新技术。

目前, 利用被子植物离体受精作为技术平台研究高等植物有性生殖的最大障碍是精、卵细胞的分离, 尤其是卵细胞的分离只在几种植物中获得成功。迄今为止, 离体受精技术也仅仅是在玉米中获得了完全的成功和在小麦中获得了部分的成功, 这极大地限制了离体受精技术的利用。现在有关受精和合子激活的信息都是来自玉米一种植物。表明高等植物的离体受精确实是一个未开垦的研究领域, 需要继续深入探索。另外, 玉米离体受精试验所取得的结果是否适用于其他植物, 需要在其他植物, 尤其是双子叶植物中得到证实, 这样才能更全面地认识高等植物的受精机理。

参考文献

- [1] Hu S Y (胡适宜), Li L G (李乐功), Zhu C (朱徽). Isolation of viable embryo sacs and their protoplasts of *Nicotiana tabacum* [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1985, 27:337-344. (in Chinese)
- [2] Kranz E, Bautor J, Lörz H. *In vitro* fertilization of single, isolated gametes of maize mediated by electrofusion [J]. Sex Plant Reprod, 1991, 4:12-16.
- [3] Kranz E, Lörz H. *In vitro* fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants [J]. Plant Cell, 1993, 5:739-746.
- [4] Kovács M, Barnabás B, Kranz E. Electro-fused isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) gametes develop into multicellular structures [J]. Plant Cell Rep, 1995, 15:178-180.
- [5] Tian H Q (田惠桥). Advances in *in vitro* fertilization study of higher plants [J]. J Plant Physiol Mol Biol (植物生理与分子生物学学报), 2003, 29:3-10. (in Chinese)
- [6] Russell S D. Ultrastructure of the sperm of *Plumbago zeylanica*. 2. Quantitative cytology and three-dimensional reconstruction [J]. Planta, 1984, 162:385-391.
- [7] Russell S D. Preferential fertilization in *Plumbago*: ultrastructural evidence for gamete-level recognition in an angiosperm [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82:6129-6132.
- [8] Hu S Y (胡适宜), Tian H Q (田惠桥). The structure and function of male germ unit [A]. In: Hu S Y, Yang H Y. Biology of Angiosperm Fertilization [M]. Beijing: Science Press, 2002. 59-77. (in Chinese)
- [9] Saito C, Nagata N, Sakai A, et al. Angiosperm species that produce sperm cell pairs or generative cells with polarized distribution of DNA-containing organelles [J]. Sex Plant Reprod, 2002, 15:167-178.
- [10] Southworth D, Kwiatkowski S. Arabinogalactan proteins at the cell surface of *Brassica* sperm and *Lilium* sperm and generative cells [J]. Sex Plant Reprod, 1996, 9:269-272.
- [11] Xu H P, Tsao T H. Detection and immunolocalization of glycoprotein of the plasma membrane of maize sperm cells [J]. Protoplasma, 1997, 198:125-129.
- [12] Sun M X, Kranz E, Yang H Y, et al. Fluorophore-conjugated lectin labeling of the cell surface of isolated male and female gametes, central cells and synergids before and after fertilization in maize [J]. Sex Plant Reprod, 2002, 15:159-166.
- [13] Xu H L, Swoboda I, Bhalla P L, et al. Male gametic cell-specific gene expression in flowering plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96:2554-2558.
- [14] Xu H L, Swoboda I, Bhalla P L, et al. Male gametic cell-specific expression of *H2A* and *H3* histone genes [J]. Plant Mol Biol, 1999, 39:607-614.
- [15] Ueda K, Kinoshita Y, Xu Z J, et al. Unusual core histones specifically expressed in male gametic cell of *Lilium longiflorum* [J]. Chromosoma, 2000, 108:491-500.
- [16] Xu H P, Weterings K, Vriezen W, et al. Isolation and characterization of male-germ-cell transcripts in *Nicotiana tabacum* [J]. Sex Plant Reprod, 2002, 14:339-346.
- [17] Singh M B, Xu H L, Bhalla P L. Developmental expression of polyubiquitin genes and distribution of ubiquitinated proteins in generative and sperm cells [J]. Sex Plant Reprod, 2002, 14:325-329.

- [18] Dresselhaus T, Lörz H, Kranz E. Representative cDNA libraries from few plant cells [J]. *Plant J*, 1994, 5:605-610.
- [19] Dresselhaus T, Hagel C, Lörz H, et al. Isolation of a full-length cDNA encoding calreticulin from a PCR library of *in vitro* zygotes of maize [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 31:23-34.
- [20] Dresselhaus T, Cords S, Heuer S, et al. Novel ribosomal genes from maize are differentially expressed in the zygotic and somatic cell cycles [J]. *Mol Gen Genet*, 1999, 261:416-427.
- [21] Sauter M, von Wiegen P, Lörz H, et al. Cell cycle regulatory genes from maize are differentially controlled during fertilization and first embryonic cell division [J]. *Sex Plant Reprod*, 1998, 11:41-48.
- [22] Vielle-Calzada J P, Baskar R, Grossniklaus U. Delayed activation of the paternal genome during seed development [J]. *Nature*, 2000, 404:91-94.
- [23] Tian H Q, Russell S D. Micromanipulation of male and female gametes of *Nicotiana tabacum*: II. Preliminary attempts for *in vitro* fertilization and egg cell culture [J]. *Plant Cell Rep*, 1997, 16:657-661.
- [24] Cao Y J, Russell S D. Mechanical isolation and ultrastructural characterization of viable egg cells in *Plumbago zeylanica* [J]. *Sex Plant Reprod*, 1997, 10:368-373.
- [25] Faure J E, Digonnet C, Dumas C. An *in vitro* system for adhesion and fusion of maize gametes [J]. *Science*, 1994, 263:1598-1560.
- [26] Digonnet C, Aldon D, Leduc N, et al. First evidence of a calcium transient in flowering plants at fertilization [J]. *Development*, 1997, 124:2867-2874.
- [27] Antoine A F, Faure J E, Cordeiro S, et al. A calcium influx is triggered and propagates in the zygote as a wave front during *in vitro* fertilization of flowering plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:10643-10648.
- [28] Han Y Z, Huang B Q, Guo F L, et al. Sperm extract and inositol 1, 4,5-triphosphate induce cytosolic calcium rise in the central cell of *Torenia fournieri* [J]. *Sex Plant Reprod*, 2002, 15:187-193.
- [29] Sun M X, Moscatell A, Yang H Y, et al. *In vitro* double fertilization in *Nicotiana tabacum* (L.): fusion behavior and gamete interaction traction traced by video-enhanced microscopy [J]. *Sex Plant Reprod*, 2000, 12:267-275.
- [30] Kranz E, Wiegen P, Lörz H. Early cytological events after induction of cell division in egg cells and zygote development following *in vitro* fertilization with angiosperms gametes [J]. *Plant J*, 1995, 8:9-23.
- [31] Holm P B, Knudsen S, Mouritzen P, et al. Regeneration of fertile barley plants from mechanically isolated protoplasts of the fertilized egg cell [J]. *Plant Cell*, 1994, 6:531-543.
- [32] Kumlehn J, Lörz H, Kranz E. Differentiation of isolated wheat zygotes into embryos and normal plants [J]. *Planta*, 1998, 205:327-333.
- [33] Kumlehn J, Lörz H, Kranz E. Monitoring individual development of isolated wheat zygotes: a novel approach to study early embryogenesis [J]. *Protoplasma*, 1999, 208:156-162.
- [34] Leduc N, Mattys-Rochon E, Rougier M, et al. Isolated maize zygotes mimic *in vivo* embryonic development and express microinjected genes when cultured *in vitro* [J]. *Dev Biol*, 1996, 177:190-203.
- [35] Pónya Z, Finy P, Fehér A, et al. Optimisation of introducing foreign genes into egg cells and zygotes of wheat (*Triticum aestivum* L.) via microinjection [J]. *Protoplasma*, 1999, 208:163-172.
- [36] Holm P B, Olsen O, Schnorf M, et al. Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts [J]. *Transgen Res*, 2000, 9:21-32.
- [37] Scholten S, Kranz E. *In vitro* fertilization and expression of transgenes in gametes and zygotes [J]. *Sex Plant Reprod*, 2001, 14:35-40.
- [38] Zhang J, Dong W H, Galli A, et al. Regeneration of fertile plants from isolated zygotes of rice (*Oryza sativa*) [J]. *Plant Cell Rep*, 1999, 19:128-131.