维普资讯 http://www.cqvip.com

广 西 植 物 Guihaia 23(2):155－159 2003 年 3 月

水蕨性别决定研究进展

刘建武[1]，刘 宁[1]*，孙成华[2]

（1. 北京师范大学生命科学学院，北京 100875；2. 北京市环境保护监测中心，北京 100044）

摘 要：介绍了成精子囊素、赤霉素、培养密度等环境因素对水蕨性别决定的影响以及和水蕨性别决定有关的遗传学和分子生物学研究，概述了以水蕨为材料研究植物性别决定的优势及研究意义，明确了水蕨作为研究植物性别决定的模式植物的地位。

关键词：性别决定；成精子囊素(Ace)；MADS-box 基因；水蕨

中图分类号：Q945 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-3142(2003)02-0155-05

Advances in the studies of sex-determining in *Ceratopteris*

LIU Jian-wu[1], LIU Ning[1]*, SUN Cheng-hua[2]

(1. *College of Life Sciences*, *Beijing Normal University*, Beijing 100875, China; 2. *Beijing Environment Monitor Center*, Beijing 100044, China)

Abstract: This paper reviewed the recent studies on the influence of environment factor (antheridiogen, GA and spore density on germination) to sex-determining in *Ceratopteris*, introduced the research of genetics and molecule biology on sex-determining in *Ceratopteris*, and summarized the advantage and signification to take *Ceratopteris* as a model system for studying sex-determining mechanisms in plants.

Key words: sex-determining; antheridiogen (Ace); MADS-box genes; *Ceratopteris*

蕨类植物位于维管植物进化树的中间位置[1]，具有明显世代交替。无性生殖产生孢子，有性生殖器官是精子器和颈卵器，精子器产生精子，颈卵器产生卵[2]。大多数蕨类植物的孢子大小形状都相同，称为孢子同型，少数有大、小孢子囊之分，产生大、小孢子，称为孢子异型。

同型孢子蕨有许多特点适合于配子体性别决定、分化和发育的研究：(1) 孢子体和配子体独立生活（种子植物配子体被孢子体组织包围，分离和研究都困难），便于分别对两者进行研究；(2) 配子体（原叶体）结构简单，多为背腹分化的绿色叶状体，幼小的原叶体通常仅由一层细胞构成，能直接在显微镜下研究其细胞的大小、形状、分裂速度、生长速度和分裂面的变化[2,3]；(3) 配子体的发育受成精子囊素调控，发育阶段明显，易于培养，生长周期短，有雌雄同体或雌雄异体的植物，分离容易；(4) 通过完全自体受精能产生基因位点完全纯合的孢子体，突变体筛选容易[4]；(5) 孢子体发达，有根、茎、叶分化和较原始的维管组织构成的输导系统，能产生大量孢子，孢子采集方便，易于贮藏[1,4]；(6) 配子体发育、性器官分化和有性生殖（包括性别决定）研究，已积累了一定的背景资料[1～20]。上述特点为利用分子生物学手段研究维管植物配子体发育提供了很大方便，其中的水蕨属（*Ceratopteris*）植物被认为是研究植物性别决定的模式植物[1,2,4]。

收稿日期：2001-11-23； **修订日期**：2002-04-12

作者简介：刘建武(1968-)，男，山西人，硕士，实验师，从事植物学教学和研究工作。*为通讯作者

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 水蕨概述

水蕨为半水生的亚热带蕨类植物。其生活周期较短，约为3～4个月。孢子体每月形成的孢子叶能产生大约10^6个孢子，孢子萌发两周后配子体就能达到性成熟，此时配子体大小为1～2 mm。孢子叶叶轴上能产生数百个有光合能力、可用于营养繁殖的芽。水蕨受精有三种方式：完全自体受精（intragametophytic selfing 或 automixis，同一配子体的精子和卵子自体受精形成基因位点完全纯合的孢子体的生殖方式，种子植物无此类有性生殖方式）；自体受精（intergametophytic selfing 或 autogamy，同一孢子体的不同孢子形成的配子体之间的精子和卵子受精形成孢子体的生殖方式）；异株受精（intergametophytic crossing 或 xenogamy，不同孢子体的孢子形成的配子体之间的精子和卵子受精形成孢子体的生殖方式）[1,4]。

经辐射、EMS等处理孢子可得到配子体突变体。孢子萌发形成单倍体（n）配子体，突变体易筛选[1,5,6]。为确定突变基因的显隐性，可通过无孢子生殖分别产生突变体和野生型的双倍体配子体（2n），然后受精产生孢子体（4n），该孢子体的配子体（2n）表型会分离，如果野生型：突变体＝6：1说明突变基因是显性；如果野生型：突变体＝1：6说明突变基因是隐性[1,7]。水蕨属有一些双倍体和四倍体纯合体被作为实验材料，最常用的是双倍体株系ΦN8、176D和Hn-n。它们孢子叶的形态差异较大。ΦN8采自尼加拉瓜，每个孢子囊有32个孢子；Hn-n和176D分别采自古巴和圭亚那，两者的每个孢子囊都为16个孢子。和ΦN8、Hn-n相比176D对Ace敏感性低，培养时形成的雄配子体少[4]。

2 水蕨性别决定有关的因素

2.1 水蕨性别决定的激素调控

成精子囊素对蕨类性别表达的影响于1950年被Döpp发现[1,2,6~8]。大多数同型孢子蕨能分泌成精子囊素，并对其发生反应[9]。孢子萌发后，生长快的配子体形成雌配子体或雌雄同体配子体并分泌成精子囊素，而生长慢的则在成精子囊素的影响下成为雄配子体[1,3]。

Schedlbauer和Klekowski于1972年得到*C. richardii*成精子囊素（Ace）并研究了它对配子体发育的影响[7]。*C. richardii*对Ace的反应只有一个极短的时间，从孢子壁破裂到四个细胞的配子体。在此期间，如果环境中一直有Ace存在，则形成雄配子体；如果除去环境中的Ace，雄配子体上还未发生性决定和性分化的细胞就会逆转，雄配子体就转化为雌雄同体配子体。即对雄配子体而言，无论性诱导阶段还是性维持阶段，都需要Ace存在，相反，雌雄同体配子体发育是稳定的，一旦决定，就不会逆转，与Ace存在与否无关[9,10]。

赤霉素（GA）能诱导密穗蕨（*Anemia phyllitidis*）、*A. rotundifolia*和海金沙（*Lygodium japonicum*）形成精子器，与天然成精子囊素（Aan）诱导密穗蕨原叶体产生精子器的效应极为相似，但GA无法诱导水蕨形成精子器。GA生物合成的抑制剂矮壮素（CCC）、嘧啶醇（ancymidol）和AMO-1618抑制Ace诱导水蕨形成精子器的能力。脱落酸（ABA）阻止水蕨属植物对Ace的反应[7,11]。

成精子囊素对蕨类的生存竞争具有积极意义：同一生境中发育较快的配子体形成雌配子体或雌雄同体配子体，其侧生分生组织分泌成精子囊素[7]，诱导其它孢子萌发形成雄配子体，增加了环境中精子的浓度，有利于自身得到优秀的精子；通过抑制其它孢子形成雌雄同体配子体，利于自身充分利用有限资源产生合子和孢子体；增强较小配子体在竞争环境中生殖行为成功的几率（形成雄配子体）；促进配子体之间的杂交，保证遗传的多样性[9]。从单个植株的角度来看，这似乎是蕨类植物之间的竞争，对蕨类植物其它个体的生存不利，但是，从蕨类植物整体的角度来看，这种竞争有利于蕨类植物的生存。

2.2 水蕨性别决定的其它调控因素

Schedlbauer发现水蕨（*C. thalictroides*）孢子的大小和孢子存储的营养物质的量、孢子萌发时间、配子体发育速度都相关。快速生长的配子体成为雌雄同体配子体，而发育较慢的配子体在其影响下成为雄配子体[12]。

培养密度、生长速度和营养状态等因素与性别决定也有关。一般而言，较弱的光照、较高的培养密度、处于饥饿状态等有利于精子器的形成，可能是营养生长的衰减导致了精子器发生基因的表达[1,4,9,13]。此现象在植物界比较普遍[9,14]，利于物

维普资讯 http://www.cqvip.com

种的生存，是物种长期适应环境的结果。

2.3 水蕨性别决定的遗传学和分子生物学研究

蕨类植物性器官分化的分子生物学研究开展较晚，标志性工作是对 Ace 不敏感 *C. richardii* 雌雄同体突变体 *her*、*tra* 和 *fem* 的分离和研究[4,20]。已分离的影响性别决定突变体有 *her*(*hermaphroditic*)、*tra*(*transformer*)、*fem*(*feminization*)、*man*(*many antheridia*)、*dim*(*disorganized meristem*)、H_nTUBE1^b(*irregular meristem*)[1] 和 *abr*(*abscisic acid-resistant*)。*her* 对 Ace 不敏感，即使有 Ace 也不形成雄配子体，总是形成雌雄同体配子体；*tra* 对 Ace 不敏感，即使没有 Ace 也不形成分生组织和颈卵器，总是形成雄配子体；*fem* 对 Ace 不敏感，无论 Ace 存在与否都不形成精子器，而是形成分生组织和大量的颈卵器；*man* 无论 Ace 存在与否都形成大量的精子器；H_nTUBE1^b 配子体多形成较大的边缘分生组织或多个边缘分生组织，有时也形成中央分生组织；*abr* 对 ABA 不敏感，环境中同时有 A_{CE} 和 ABA 时发育为雄配子体，只有 ABA 时发育为正常的雌雄同体配子体[7]。

图 1 分析了部分性别决定基因的相互关系以及对性别分化的影响[1,5~7]。*FEM* 和 *TRA* 是主要性别决定基因，*FEM* 促进雄配子体形成，*TRA* 促进雌配子体形成。*FEM* 和 *TRA* 的表达相互抑制，同一配子体中只表达其中之一，是表达 *FEM* 还是 *TRA* 和成精子囊素的存在与否相关。成精子囊素激活 *HER* 基因，*HER* 基因的活化抑制 *TRA* 基因，*FEM* 基因得以表达，产生雄配子体。成精子囊素缺乏，*FEM* 基因表达被抑制，*TRA* 基因得以表达，产生雌配子体。以上分析基于经典遗传学，其分子基础还有待研究[1,6]。配子体根据环境因素决定性别的性别决定机制在多种动物中也存在，大多数植物的性别是由遗传决定的[1,21]。

目前，已经从 *C. richardii* 的雄配子体中克隆到了 Ace 诱导基因，其 cDNA(Hn153)在 Ace 处理后 5~8 d 的配子体中有相对高的表达；在小于 4 d 的配子体、孢子体组织和成熟雌雄配子体中都没有表达[7]。

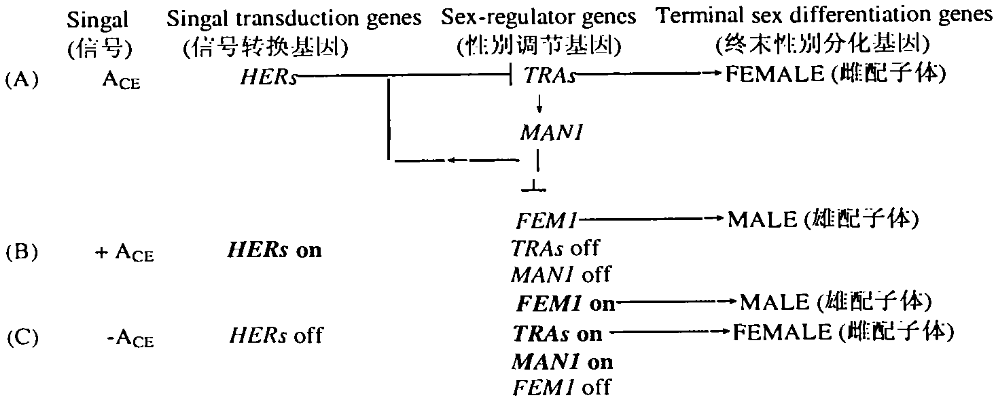

图 1　*Ceratopteris* 性别决定模型(Banks，1999)

Fig. 1　A model of the sex-determining pathway in *Ceratopteris* (Banks, 1999)

(A)性别决定基因的相互作用；(B)、(C)分别表示 A_{CE}存在或缺失时性别决定基因的活性状况；箭头表示促进作用，钉型表示抑制作用。

The potential interactions among the sex-determining genes are illustrated in (A); The activities of the sex-determining genes in the presence (B) or absence (C) of antheridiogen are shown; Lines ending in arrows indicate activating interactions and lines ending in bars indicate repressing interactions.

ΦN8、176D 和 Hn-n 的多态性(PFLPs)研究发现，176D 和 Hn-n 的多态性图谱较为相似，ΦN8 与 176D 和 Hn-n、以及四倍体株系的多态性图谱差异较大。利用 10-mer 的随机引物对它们的基因组 DNA 进行 PCR 放大(RAPDs)得到了相同的结果，该结果为进一步制定水蕨基因组图谱提供了条件[4]。

2.4 水蕨 MADS-box 基因研究

MADS-box 基因是广泛存在的调节基因家族，分为 *ARG*80-like(或 *SRF*)、*MEF*2-like 和 MIKC 类基因 3 类。前两者主要出现在动物和真菌，MIKC 类基因只见于植物[21~23]。MIKC 类基因在花分生组织、花器官及各种营养器官中时空表达模式不同，和植物所处的内外环境密切相关，起着不同的功

维普资讯 http://www.cqvip.com

能[24]，是了解最多的植物调节基因家族，它们在花器官发育中扮演的角色尤其引人注目，是目前植物发育生物学研究的热点。

蕨类植物是已发表 MADS-box 基因序列的最原始植物类群[21]。包含 MADS-box 基因序列的水蕨 cDNA 属 MIKC 类基因，和种子植物 MADS-box 基因序列同源性极高，说明蕨类植物和种子植物曾有一共同祖先。水蕨 MADS-box 基因形成 3 个独立的进化枝，交错排列于种子植物基因之间进化枝之间[21]，所以蕨类植物与种子植物的共同祖先至少有两种 MIKC 类基因[25]，该类基因发生于比蕨类植物更原始的植物类群[21]。

克隆水蕨 MADS-box 基因的部分探针或引物序列来源于拟南芥和金鱼草花同源异型基因，但没有得到它们的直向同源基因[21]，也许和蕨类植物缺少胚珠、心皮、雄蕊和花被片等结构有关[26]。但是也有相反文献：即从 *C. richardii* 克隆了被子植物分生组织特有的同源异型基因和花特有的同源异型基因的同源基因[7]。

水蕨 MADS-box 基因在孢子体、配子体时期都表达，在植物发育和细胞分化中有更广泛的功能，但是被子植物花器官决定同源异型基因表达有严格的时空限制。部分水蕨 MADS-box 基因有非典型植物 MADS-box 基因特征，*CRM*1，*CRM*4(*CerMADS*1)，*CRM*6(*CerMADS*2)和 *CRM*9 都是由一较大的初始转录物经可变剪接而来，这是动物和植物转座子元件 *MEF*2-like 基因的典型特征，在已报道的 150 多个 MIKC 类基因中是特例，可变剪接是一个基因产生不同蛋白质的古老机制。多数水蕨 cDNA 能编码(N)MIKC 类蛋白质，但 *CRM*11，*CRM*15 和 *CMADS*5 无 ORF，有无功能还不清楚[26]。

3 小 结

和种子植物相比，蕨类植物是原始的，经济价值也不高[1]，但是，正是由于蕨类植物的原始性及其简单而独特的配子体结构引起了植物学家们的青睐。经过上百年的研究，我们对蕨类植物的形态学、分类学、细胞学和遗传学等都有了较为深刻的认识，为利用分子生物学方法进一步研究植物提供了条件。而水蕨属植物由于其生长发育的特点使其成为研究植物性别决定和配子体形态建成的模式植物，倍受关注[1,2,4]。目前关于水蕨发育的分子生物学研究已经开始，我们相信利用该材料的科学研究必将取得更多成果。

参考文献：

〔1〕Banks J A. Gametophyte Development in Ferns[J]. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol.*, 1999, **50**: 163－186.

〔2〕刘建武，刘 宁. 蕨类植物配子体发育及其性器官分化的研究进展[J]. 植物学通报，2001，**18**(2)：149－157.

〔3〕Miller J H. Fern Gametophytes as Experimental Material[J]. *the Botanical Review*, 1968, **34**(4): 361－440.

〔4〕Hickok L G, Warne T R, Fribourg R S. The biology of the fern *Ceratopter* is and its use as a model system [J]. *Int J Plant Sci.*, 1995, **156**(3): 332－345.

〔5〕Eberle J R, Banks J A. Genetic interactions among sex-determining genes in the fern *Ceratopteris richardii*[J]. *Genetics*, 1996, **142**(3): 973－985.

〔6〕Banks J A. The TRANSFORMER genes of the fern *Ceratopteris* simultaneously promote meristem and archegonia development and repress antheridia development in the developing gametophyte[J]. *Genetics*, 1997, **147**(4): 1885－1897.

〔7〕Eberle J, Nemacheck J, Wen C K, *et al*. *Ceratopteris*: a model system for studying sexdetermining mechanisms in plants[J]. *Int J Plant Sci.*, 1995, **156**(3): 359－366.

〔8〕Voeller B R. Gibberellins: Their effect on antheridium formation in fern gametophytes[J]. *Science*, 1964, **143**: 373－375.

〔9〕Korpelainen H. Labile sex expression in plants[J]. *Biol Rev Cambridge Philosophic Society*, 1998, **73**(2): 157－180.

〔10〕Banks J, Hickok L, Webb M. The programming of sexual phenotype in the homosporous fern *Ceratopteris richardii*[J]. *Int J Plant Sci.*, 1993, **54**: 522－534.

〔11〕Hickok L. Abscisic acid resistant mutants in the fern *Ceratopteris*: gametophytes characterization and genetic analysis[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1985, **61**: 888－892.

〔12〕Schedlbauer M D. Fern gametophyte development: controls of dimorphism in *Ceratopteris thalictroides* [J]. *American Journal of Botany*, 1976, **63**: 1 080

维普资讯 http://www.cqvip.com

—1 087.

〔13〕 Raghavan V. Developmental Biology of Fern Gametophytes[M]. Cambridge: Cambridge Univ. 1989. 203—226.

〔14〕 Banks J A. Sex-determining genes in the homosporous fern *Ceratopteris*[J]. *Development*, 1994, **120** (7): 1 949—1 958.

〔15〕 Cooke T J, Hickok L G, Sugai M. The fern *Ceratopteris richardii* as a lower plant model system for studying the genetic regulation of plant photomorphogenesis[J]. *Int J Plant Sci.*, 1995, **156**(3): 367—373.

〔16〕 Duckett J G. Towards an understanding of sex determination in *Equisetem*: an analysis of regeneration in gametophytes of the subgenus *Equisetem*[J]. *Botanial Journal of the Linneau Society*, 1977, **74**: 215—242.

〔17〕 Grill R. Calcium requirement in blue-light-promoted and red-light-inhibited antheridiogenesis in the fern *Anemia phyllitidis* (L.) Sw[J]. *J Plant Physiol.*, 1995, **145**(3): 285—290.

〔18〕 Kanegae T, Wada M. Isolation and characterization of homologues of plant blue-light photoreceptor (cryptochrome) genes from the fern *Adiantum capillus-veneris*[J]. *Mol Gen Genet.*, 1998, **259**(4): 345—353.

〔19〕 Sobota A E, Partanen C R. The growth and division of cells in relation to morphogenesis in fern gametophytes I. Photomorphogenetic studies in *Pterdium aquilinum*[J]. *Can Jour Bot.*, 1966, **44**: 497—506.

〔20〕 Warne T, Hickok L, Scott R C. Haracterization and genetic analysis of antheridiogen insensitive mutants in *Ceratopteris richardii* [J]. *Bot J Linn Soc.*, 1988, **96**: 371—379.

〔21〕 Theissen G, Becker A, Rosa A D, *et al.* A short history of MADS-box genes in plants[J]. *Plant Mol Biol.*, 2000, **42**: 115—149.

〔22〕 刘良式. 植物分子遗传学[M]. 北京:科学出版社, 1997. 353—452.

〔23〕 许智宏, 刘春明. 植物发育的分子机理[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 39—53.

〔24〕 蔡小钿, 王金发. 植物 MADS 盒基因的功能和调节机理[J]. 植物生理学通讯, 2000, **36**(3): 277—281.

〔25〕 Hasebe M, Wen C K, Kato M, *et al.* Characterization of MADS homeotic genes in the fern *Ceratopteris richardii* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1998, **95**: 6 222—6 227.

〔26〕 Münster T, Pahnke J, Di R A, *et al.* Floral homeotic genes were recruited from homologous MADS-box genes preexisting in the common ancestor of ferns and seed plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1997, **94**: 2 415—2 420.

(上接第 168 页 Continue from page 168)

geritance of differences in calcium utilization by tomatoes under low-calcium stress [J]. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1982, **107**: 664—669.

〔21〕 Clark R B. Differential response of corn inbred to calcium [J]. *Commun Soil. Sci. Plant Anal.*, 1978, **9**: 729—744.

〔22〕 Rasmusson D C, Hester A J, Fick G N, *et al.* Breeding for mineral content in wheat and barley [J]. *Crop. Sci.*, 1971, **11**: 623—626.

〔23〕 Kawaski T, Moritsugu M A. Characteristic symptom of calcium deficiency in maize and sorghum. Commun[J]. *Soil Sci. Plant Anal.*, 1979, **10**: 41—56.