

蕨类植物性别分化对环境的响应

宋莹莹, 高 晶, 戴绍军*

(东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 生命科学院, 哈尔滨 150040)

摘要: 蕨类植物是维管植物中唯一的孢子体和配子体都能独立生活的类群。同型孢子蕨类配子体的性别分化受到激素和环境因子的影响。生理学研究表明, 成精子囊素与赤霉素能诱导雄配子体发育, 抑制雌配子体发育; 脱落酸阻止成精子囊素诱导的精子器形成; 乙烯合成前体 ACC 促进赤霉素诱导的精子器形成, 而乙烯合成抑制因子 AOA 通过抑制细胞分化来抑制精子器形成。光照对不同种类蕨类配子体分化的影响存在差异。糖类能够促进雄配子体形成, 并可加速成熟雌配子体向两性分化。钙离子、钴离子和甲硫氨酸等分别参与了蓝光和赤霉素对配子体性别分化的调控过程。培养密度影响配子体生长及性别表达, 高密度下雄性和无性配子体居多, 而低密度下两性和雌性配子体居多。近年来的突变体表型分析与分子生物学研究表明, 成精子囊素通过影响 *AN11*、*HER*、*TRA*、*FEM* 和 *MAN* 等基因的表达调控配子体性别分化。综述了蕨类植物性别分化对环境响应的研究进展。

关键词: 蕨类植物; 性别决定; 环境因子; 配子体

文章编号: 1000-0933(2009)09-5030-09 中图分类号: Q142, Q948 文献标识码: A

Sex differentiation in ferns response to environmental factors

SONG Ying-Ying, GAO Jing, DAI Shao-Jun*

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, MOE; College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China
Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(9): 5030 ~ 5038.

Abstract: The life cycle of ferns involves a small, haploid gametophyte alternating with a large, independent, diploid sporophyte. Since spore germination and free-living gametophyte development are completely independent of the diploid sporophytic plant, the gametophyte sex differentiation is affected by various environmental factors. Factors studied in recent years include hormones (such as antheridiogen, gibberellic acids (GAs), abscisic acid (ABA) and ethylene), light, population density, nutrition (such as sugar and methionine) and metal ions (such as calcium and cobalt ions) to the fern gametophyte sex differentiation. Results of these physiological researches suggested that: (1) Antheridiogens induce male development and repress female development of the gametophyte, and GAs play a similar function with antheridiogens in sex determination. However, ABA blocks antheridiogen-induced antheridium formation. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), the ethylene precursor, can enhance the number of antheridia induced by GA, while an inhibitor of ACC synthesis aminooxyacetic acid (AOA) restrains antheridia formation via inhibition of cell division. (2) Light intensity and quality affect sex expression, while the effect is varies by species. (3) Sugar addition not only promotes male sex expression in young differentiating *Equisetum* gametophytes, but also accelerates the onset of hermaphroditism in mature females. (4) Calcium is required in blue-light-promoted and red-light-inhibited antheridiogenesis in the fern *Anemia phyllitidis*. Moreover, increasing methionine concentrations mixed with GA₃ enhances the number of precociously formed antheridia, and cobalt ions also stimulate the GA₃-induced antheridia formation. (5) Population density also affects gametophyte growth and sexual expression. Female and asexual gametophytes dominated in populations of low and high densities respectively while hermaphroditic and male gametophytes were dominant at intermediate population densities. Furthermore, recent

基金项目: 国家教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目 (NECT-06-0327); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2007AA021405)

收稿日期: 2008-09-26; 修订日期: 2008-12-17

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: daishaojun@hotmail.com

mutant phenotype analysis and molecular biological research revealed that some specific genes, including *AN11*, *AN11*, *HER*, *TRA*, *FEM*, and *MAN*, involved in the sex differentiation under the regulation of antheridiogen. This paper gives an overview of ferns sex determination in response to environmental factors and its mechanism.

Key Words: ferns; sex determination; environmental factors; gametophyte

植物性别决定机制是近年来植物学研究的热点问题之一。人们已经清楚地认识到了激素等物质对种子植物性别决定的作用,并克隆和表征了一系列参与种子植物性别决定的基因^[1],但是对蕨类植物性别分化的分子机制并不十分清楚。蕨类植物是从苔藓植物到种子植物的过渡类群,是维管植物中唯一的孢子体和配子体都能独立生活的类群。对其配子体性别分化的研究对于揭示植物性别决定机制和不同进化位置植物类群有性生殖的特异性都具有重要意义,是进化-发育(evo-devo)生物学研究的重要组成部分。同型孢子蕨类植物的孢子可以发育为雌配子体、雄配子体,或两性配子体。由于其孢子萌发和配子体发育过程在自然环境中完成,因此,同型孢子蕨类植物的性别决定受到激素类物质及其它环境因子的影响^[2]。现有研究表明,激素(如成精子囊素^[3]、赤霉素^[4]、脱落酸^[5]和乙烯^[6, 7])、光照(光照强度^[8]和光质^[9])、营养(如糖类物质^[10]、钙离子^[11]、钴离子和甲硫氨酸^[12])、种植密度^[13]等多种环境因子都会影响蕨类植物配子体的性别分化。然而,对这些现象的认识仍然更多地停留在形态学和生理学水平,而且研究的物种分散,不同研究中各种环境因子处理强度(包括浓度、处理时间等)也并不一致。一直以来,对蕨类植物生长发育和生理代谢机制的研究与种子植物相比相对滞后。近年来,虽然以水蕨(*Ceratopteris richardii*)^[14]、鳞毛蕨(*Dryopteris* spp.)^[15]、金毛狗(*Macrothelypteris torresiana*)^[16]和蜈蚣草(*Pteris vittata*)^[17]等植物为代表,蕨类植物孢子萌发、配子体发育,以及孢子体抵抗/适应逆境等过程的生理与分子机制被相继报道,但是国际和国内研究蕨类植物性别分化的实验室仍然十分有限。在已有报道中,研究人员利用突变体表型分析和分子生物学研究方法,从蕨类植物中获得了有限的可能参与成精子囊素调控性别决定的基因^[3],以及与种子植物调控生殖器官形成基因同源的基因^[18],但是对蕨类植物性别分化过程中响应各种环境因子的信号调控网络和分子机制并不清楚,也未见有相关的综述性文章发表。本文综述了蕨类植物性别分化对环境响应的研究进展。

1 影响性别分化的环境因素

1.1 外源激素与生长调节物质

激素对植物的性别分化具有重要的作用。细胞分裂素、赤霉素(GA)和乙烯等都可以影响开花植物的性别表达,并且对不同物种的作用存在差异,如细胞分裂素对山黧(*Mercurialis leiocarpa*)具有明显的促雌作用;赤霉素促进黄瓜(*Cucumis sativus*)雄性化,却引起玉米(*Zea mays*)和秋海棠(*Begonia evansiana*)雌性化^[19];内源乙烯含量与黄瓜雌花形成呈显著正相关^[20]等等,这些激素同样会影响蕨类植物性别分化。同型孢子蕨中合成的成精子囊素(Antheridiogen)是一类疏水小分子激素类物质,可以诱导雄配子体发育而抑制雌配子体发育,而且在浓度低至 10^{-14} mol L⁻¹时就可发挥作用^[3]。人们已经从蕨属(*Pteridium*)、凤尾蕨属(*Pteris*)、密穗蕨属(*Anemia*)、球子蕨属(*Onoclea*)、海金沙属(*Lygodium*)、水蕨属(*Ceratopteris*)植物中分别分离纯化了 Apt、Aps、Aan、Aon、Aly 和 Ace 等多种成精子囊素^[21]。早期研究表明,成精子囊素 Aan 具有一个经重新排列的赤霉烷环结构,而且具有与赤霉素相近的层析位点,这表明成精子囊素可能是与赤霉素结构和功能相似的激素类物质^[21, 22]。多数同型孢子蕨类植物的配子体能产生成精子囊素并对其做出反应,从而决定配子体的性别^[4]。孢子萌发后最先形成的配子体多为雌性,雌配子体可以分泌成精子囊素释放到周围环境中,并作用于生长较慢的配子体,使之发育为雄配子体^[22]。如果将雄配子体所处环境中的成精子囊素除去,雄配子体上还未发生性分化的细胞就会逆转,使雄配子体发育为雌雄同体配子体^[23, 24]。对模式植物水蕨的研究表明,成精子囊素 Ace 在水蕨孢子壁破裂后到发育成 4 个细胞配子体这个极短的时间段内起作用,使之发育为雄配子体,此后若缺乏 Ace,雄配子体将会分化为雌雄同体配子体。由此可见,成精子囊素对雄配子体性别诱导和性

别维持都起作用^[23, 24]。现有研究表明,不同种类的成精子囊素作用范围不同,有的比较广泛,例如从欧洲蕨(*Pteridium aquilinum*)中分离出的成精子囊素 Apt 可以诱导 8 科 25 属 36 种蕨类植物原叶体产生精子器^[25];有的专一性强,例如 Apt 不能对莎草蕨科(*Schizaeaceae*)的成员起作用,莎草蕨科植物产生的成精子囊素只在本科成员中有作用^[22], Aly 可诱导海金沙精子器形成,但对密穗蕨(*Anemia phyllitidis*)精子器形成无作用,密穗蕨产生的成精子囊素 Aan 与 Apt 不同,两者不能互相使对方的原叶体发生反应^[4]。此外,在部分蕨类植物中,有可能有多种不同类型的成精子囊素共同发挥作用^[4, 24]。

虽然人们对成精子囊素参与蕨类植物性别分化的作用机理并不清楚,但是发现一些成精子囊素与赤霉素的作用相似。比如, Aan 和外源 GA₃都能使密穗蕨属和海金沙属植物原叶体形成丰富的精子器,但是对莎草蕨科植物性别决定的作用都有限^[4]。赤霉素对不少蕨类植物性别分化起作用。例如,外源赤霉素可以对欧洲鳞毛蕨(*Dryopteris filix-mas*),以及莎草蕨科的密穗蕨属、海金沙属、非洲蕨属和莎草蕨属植物性别分化起作用^[4, 21];但是,外源赤霉素对北美球子蕨(*Onoclea sensibilis*)、蹄盖蕨属的 *Aspidium oreopteris*、叉蕨属的 *Tectaria beracleifolia*、凤尾蕨属的 *Pteris tremula* 和狗脊属的 *Woodwardia areolata* 的性别分化作用较弱^[4],并且无法诱导水蕨精子器的形成^[26]。Menendez 等^[27]对乌毛蕨(*Blechnum spicant*)已经形成的雄性和雌性配子体施加多种外源赤霉素(GA₁、GA₃、GA₄、GA₇、GA₉、GA₂₀和 GA₄₊₇),结果表明,除了 GA₄₊₇对精子器和颈卵器的形成起到轻微作用以外,GA 对性别分化和成精子囊素的生物合成没有显著作用。内源 GA 对蕨类植物性别分化的作用微弱,在不同性别的乌毛蕨配子体之间没有显著差异,内源 GA 能够促进两种性器官的发育,但是不对特别的一类性器官的发育有促进作用^[27]。

成精子囊素和赤霉素对蕨类植物性别分化的作用具有相似性。从密穗蕨属植物中分离的成精子囊素 Aan 与赤霉素在诱导密穗蕨原叶体产生精子器时的效应非常相似。两者对性别决定作用的相似性主要表现在:(1)两者诱导精子器的发育方式是一样的;(2)原叶体对两者的敏感性相似,都随着年龄的增加而增大;(3)两者具有相似的剂量反应曲线,从施用到发生反应的时间间隔及每个精子器形成精细胞的数目都一样;(4)两者的层析位点相同。但是两者的诱导机理似乎有很大区别,表现在低浓度的 GA 即可诱导密穗蕨精子器形成,而较高浓度的 Aan 才有此作用^[21]。另外,GA 的拮抗剂 Phosphon、矮壮素(CCC)和 AMO-1618 都不能抑制 Aan 对精子器的诱导^[25]。

脱落酸可以阻止几种水蕨属植物对成精子囊素的反应^[5, 28]。在外源脱落酸存在时,水蕨配子体对成精子囊素的敏感性下降,表现为形成雄配子体的数量减少,精子器形成受抑制,配子体生长缓慢。由此推测,成熟孢子和性别未分化的配子体内源脱落酸水平也可以影响配子体对成精子囊素的敏感性^[28]。

乙烯会影响密穗蕨配子体发育和性别分化。当乙烯前体 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)的浓度为 10 μmol·L⁻¹时,就可以增加由 GA₃诱导的密穗蕨精子器数目,而缺乏 GA₃时,ACC 不诱导精子器形成^[6]。ACC 合成抑制剂氨基氧乙酸(aminooxyacetic acid, AOA)通过抑制细胞分裂来限制密穗蕨精子器的形成。AOA 影响精子器细胞骨架的排列和弹性,进而影响细胞伸展。增加 AOA 浓度会降低由 GA₃诱导的精子器数目,细胞数目、大小及原叶体长度也随之降低^[7]。

除了上述激素以外,其它植物生长调节物质对蕨类植物性别分化也有一定作用。如矮壮素(chlormequat chloride, CCC)、吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、香豆素(coumarin)、N-二甲胺基琥珀酰胺酸(N-(Dimethylamino) succinamic acid B-995)、长蠕孢醇(helminthosporol)、长蠕孢酸(helminthosporic acid)和双氢长蠕孢酸(dihydrohelminthosporic acid)对精子器的形成、成熟或数量增加分别有不同程度的促进作用,而马来酰肼(3,6-dihydroxypyridazine)会降低裸子蕨(*Gymnogramme calomelanos*)精子器和颈卵器的数量,尤其是对颈卵器形成影响更大^[2, 22]。

1.2 光照

光照对植物的发育和代谢有着全面的调节作用。光照强度、光照时间(光周期)和光质对植物的性别分化和育性都有一定影响。人们对开花植物通过光敏色素和蓝光受体感受光照强度和光周期,从而调节自身性

别分化和育性的生理与分子机制已经进行了很多研究^[29],虽然在蕨类植物中也已经鉴定了光敏色素和蓝光受体,然而有关光照对蕨类植物性别分化的研究相对较少^[1,9]。

光照强度影响木贼属(*Equisetum*)植物配子体的性别分化,而且不同种类间存在差异。增加光照强度能够提高问荆(*E. arvense*)雄配子体比率^[30],抑制节节草(*E. ramosissimum*)雄配体形成^[31],而对水问荆(*E. fluviatile*)和木贼(*E. hyemale*)的性别表达没有影响^[30]。Guillon 等^[8]对犬问荆(*E. palustre*)、兴安木贼(*E. variegatum*)和沼生问荆(*E. telmateia*)的研究表明,光强同样会影响这些种类配子体的性别表达。当光合有效辐射(PAR)为 $24 \sim 48 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时,大多数配子体分化成雌性,而当 $\text{PAR} < 6 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 时,只能观察到雄性配子体。多数在黑暗条件下培养的配子体会死亡或是维持在性别未分化状态,而存活的小部分则分化为雄性^[8]。

光质对蕨类植物性别的影响同样表现出种间差异。对有些蕨类植物配子体而言,如铁角蕨属(*Asplenium*)、乌毛蕨属(*Blechnum*)、鹿角蕨属(*Platynerium*)和水龙骨属(*Polypodium*)植物,可见光、红光、远红光和蓝光均可抑制其精子器的发生^[32]。黑暗条件下,95%的蜈蚣草配子体产生精子器,而连续光照条件下生长的配子体则无精子器形成^[32]。在黑暗条件下萌发的*Polypodium crassifolium*孢子能够直接产生精子器,连续白光照射则不形成精子器^[33]。白光下生长的欧洲鳞毛蕨(*Dryopteris filix-mas*)原叶体转移到红光或蓝光下时,形成精子器和颈卵器。北美球子蕨(*Onoclea sensibilis*)丝状体经欧洲蕨(*Pteridium aquilinum*)分泌的诱导因子处理后,在红光下培养能形成精子器。短时间(5min)红光照射暗培养植物配子体可以抑制精子器形成,而这种抑制作用能被其后的远红光照射所逆转^[2]。蓝光不影响水蕨野生型配子体对成精子囊素 Ace 的敏感性,但在 Ace 存在的情况下,对 Ace 不敏感的 *her1* 突变体发育为雄性,这表明蓝光促进水蕨配子体向雄性发育。与之相反,红光抑制水蕨 *her1* 突变体向雄性发育。如果同时照射红光和蓝光,雄性发育也会受抑制,这表明红光对水蕨性别诱导起主导作用^[9]。

1.3 外源 Ca^{2+}

作为信号分子, Ca^{2+} 参与很多受信号转导调节的重要生理过程。 Ca^{2+} 同样参与光照对蕨类植物性别分化影响。蓝光对密穗蕨精子器形成的促进和红光对其的抑制作用依赖于 Ca^{2+} 。在蓝光照射 1h 或 24h 条件下,外源 Ca^{2+} 能极大地促进密穗蕨精子器形成。高于或等于 0.1 mmol L^{-1} 的外源 Ca^{2+} 能缩短连续的蓝光照射诱导精子器形成的时间。外源 Ca^{2+} 存在时, $0.1 \sim 5 \text{ mmol L}^{-1}$ 的镧(钙通道阻断剂)推迟了蓝光诱导的精子器形成,6d 后有精子器发生的配子体不超过 10%,而只含外源 Ca^{2+} 的对照组 3d 后就有 90%的配子体产生精子器。此外, Ca^{2+} 和 EGTA 一起对红光抑制精子器形成起协同作用。外源 Ca^{2+} 存在时,随着钙螯合剂 EGTA 浓度升高($2 \sim 10 \text{ mmol L}^{-1}$),红光对精子器形成的抑制作用减轻^[11]。

1.4 糖类

早期研究发现糖类对蕨类植物配子体性别分化有影响,然而由于在不同种类间的表现不同,始终没有得到一致的结论^[31, 34]。蔗糖会抑制节节草雌配子体分化,提高雄配子体比率^[31],降低问荆雄性配子体比率^[30, 34],而对木贼性别表达没有影响^[34]。这些并不一致的研究结果很可能是由于培养条件的差异导致其它环境因子(如光照和培养密度)对性别分化产生了影响,也可能是来自同一种类不同个体或不同种类个体间的差异^[10]。Guillon 等^[10]分析了 4 种木贼属植物(犬问荆、问荆、沼生问荆和兴安木贼)配子体性别分化与糖浓度的关系,结果表明增加蔗糖或葡萄糖浓度均有利于雄性表达,而且雄性比率会随着蔗糖浓度增加而升高。当蔗糖浓度为 $60 \sim 120 \text{ mmol L}^{-1}$ 或葡萄糖浓度为 120 mmol L^{-1} 时,雄配子体数目多于雌配子体,而在缺乏糖时,大多数配子体分化为雌性。对沼生问荆和兴安木贼而言,加入 120 mmol L^{-1} 葡萄糖比 120 mmol L^{-1} 蔗糖更有益于提高雄性比率。将成熟雌配子体转移至含有蔗糖培养基后,出现两性性状的时间会比在不含蔗糖培养基中提前,且含 60 mmol L^{-1} 蔗糖和 90 mmol L^{-1} 蔗糖培养基中两性配子体的比率明显高于生长于不含糖培养基的配子体。由此表明,糖不仅促进木贼属幼嫩配子体的雄性表达,而且也能加速成熟雌配子体向两性配子体分化^[10]。外源糖类物质很可能像拥挤、干旱、矿物质缺乏、高温等胁迫因子一样,影响幼配子体向雄性分

化^[10],但是与之不同的是糖类同时又作为营养物质提高配子体生长速率。外源糖类物质可能通过影响光照或激素等的作用而间接影响配子体性别分化。

1.5 培养密度

培养密度不仅会影响同型孢子蕨类植物配子体的生长而且会影响性别分化^[13, 35]。当培养密度过大时,配子体通常发育成无性或雄性的狭长丝状体;当培养密度低时,配子体通常发育成雌性或两性的心形原叶体^[22]。如在不同种植密度下,桂皮紫萁(*Osmunda cinnamomea*)配子体的大小、形状,以及性别分化都受到影响。低密度时,体积相对较大的雌性和两性配子体较多,随密度的增加,配子体逐渐发育为小而狭长的雄配子体。在某一特定密度水平会获得一个相对恒定的性别比率,当紫萁培养密度小于 $3 \text{ 个} \cdot \text{cm}^{-2}$ 时,只产生雌性配子体,而当密度超过 $66 \text{ 个} \cdot \text{cm}^{-2}$ 时,只出现无性配子体。各类型配子体体积大小的顺序依次为:雌配子体>两性配子体>雄配子体>无性配子体^[13]。这种现象可能是因为低密度培养条件下的配子体有利于获得更多营养等资源,从而易于配子体生长和颈卵器形成,而高密度培养时配子体生长受限并倾向于形成精子器^[22]。Rubin 等^[35]对北美球子蕨的研究表明,种植密度对性别表达的影响与培养介质有关。当球子蕨配子体生长在琼脂上时,种植密度会影响其性别表达。低种植密度下性特征发生的时间提前,雌性比例增加,个体生长速度快。而当球子蕨生长在灰土(具有灰化淀积层的矿质土壤,剖面中有活性铁、铝、非晶质粘粒和腐殖质的淀积层)上时,种植密度对性别表达和个体生长速度均无影响。密度对性别表达的影响很大程度上与生长速度相关。在各种培养密度下,灰土上生长的原叶体前3周生长缓慢,分生组织形成后在原叶体心型处发生精子器。低培养密度下,琼脂上生长的原叶体生长迅速,雌性比例相对较高。而高密度时,原叶体起初生长迅速然后生长非常缓慢^[35]。可以认为除了种植密度导致的营养与空间资源分配的差异外,由种植密度引起的激素等物质分泌与利用的差异很可能是导致性别分化的直接原因。此外,陆生植物种群内个体之间的相互作用是在一定的空间范围内进行(即存在邻体效应)^[36]。特定空间内个体之间的竞争直接反映在对营养资源和配偶的竞争上,由此导致植物选择了偏雌的性别资源分配模式,把更多的资源投入到受精卵的生产,从而使种群在低密度时有较高的种群增长^[37]。蕨类配子体的有性繁殖过程在有限的时间内完成,如水蕨配子体在孢子接种14d后达到性成熟,受精作用完成后便逐渐死亡。因此,蕨类植物形成的这种高种群密度时通过增加雄性比例来促进交配,低种群密度时通过增加两性配子体比例来促进自体受精的性别分化机制,最大程度保证了受精比率^[1, 38]。这种受种群密度调节的性别分化机制更加有利于维持种群大小并保持种群适度增长。

1.6 甲硫氨酸和钴离子

甲硫氨酸和钴离子很可能参与了其它环境因子对蕨类植物性别分化的调控。在 GA_3 存在时,提高甲硫氨酸的浓度,有助于增加密穗蕨精子器数目,每个配子体上平均精子器数目由2.7个($0 \mu\text{mol L}^{-1}$ 甲硫氨酸)增加到3.7个($100 \mu\text{mol L}^{-1}$ 甲硫氨酸)。钴离子同样刺激 GA_3 诱导的精子器形成,当钴离子浓度为 $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ 时,配子体上精子器数目增加到3.9个。与此相反,在不含 GA_3 的条件下用甲硫氨酸和钴离子刺激幼嫩配子体(30个细胞)的顶端,能够诱导分生组织分化和雌性生殖器官形成^[12]。

2 性别分化相关基因

2.1 受成精子囊素影响的性别分化相关基因

对水蕨突变体的表型分析表明,Ace抑制了某些促进两性发育的基因,或诱导了某些促进雄性发育基因的表达。野生型水蕨配子体在不含成精子囊素的基质中发育为两性,而在含有成精子囊素的基质中发育为雄性。已获得的水蕨性别分化相关突变体包括两性突变体(*hermaphroditic, her*)、转换突变体(*transformer, tra*)、雌性化突变体(*feminization, fem*)、多精子器突变体(*many antheridia, man*),以及这些基因的双突变体或多突变体(表1)^[39~42]。其中,*her*、*tra*、*fem*是影响水蕨性别分化的典型突变体,3种突变体对Ace都不敏感^[40]。无论基质中是否含有Ace,*her*突变体均发育为雌雄同体配子体,这表明Ace能够诱导激活*HER*基因,而*HER*基因能够促进雄性发育,抑制雌性发育。*tra1*突变体的分生组织和颈卵器形成受到影响,即使基质中不含有

Ace, *tra1* 突变体也发育为雄性, 由此表明 *TRA* 基因能促进雌性发育或抑制雄性发育, 而 *Ace* 抑制其表达。*fem1* 突变体的雄性和两性配子体上精子器发育受到影响, 无论 *Ace* 存在与否, 均发育为雌配子体, 这表明 *FEM1* 基因抑制雌性发育。当基质中含有 *Ace* 时, *man1* 突变体发育为雄性, 而当基质中不含有 *Ace* 时, *man1* 突变体发育为具多精子器的个体, 同时产生颈卵器^[40~42]。由此可见, 环境中存在的 *Ace* 会激活 *HER* 基因, *HER* 基因的活化抑制 *TRA* 基因, 从而促进 *FEM* 基因表达, 产生雄配子体。当环境中缺乏 *Ace* 时, *HER* 基因被抑制, *TRA* 基因得以表达, 产生雌配子体。*FEM* 和 *TRA* 的表达相互抑制, 同一配子体中只表达其中之一。*FEM1* 和 *TRA1* 在同一个配子体中双突变时会使配子体表现为雌雄兼性, 不同于任何一个单突变体的表现型。这表明性别表达受 *FEM* 和 *TRA* 两套基因的调控。此外, *MAN1* 影响雌雄同体配子体产生精子器的数量, *TRA* 基因通过激活 *MAN1* 基因抑制雄性发育^[39,41,42] (图 1)。

表 1 水蕨响应成精子囊素 *Ace* 的性别决定基因突变体
Table 1 Gene mutant of sex determination in *Ceratopteris* response to antheridiogen (*Ace*)

基因型 Genotype	表现型 Phenotype	
	- <i>Ace</i>	+ <i>Ace</i>
野生型 Wild type	两性 Hermaphrodite	雄性 Male
<i>her</i>	两性 Hermaphrodite	两性 Hermaphrodite
<i>tra1</i>	雄性 Male	雄性 Male
<i>fem1</i>	雌性 Female	雌性 Female
<i>man1</i>	多个精子器 Many antheridia	雄性 Male
<i>herfem1</i>	雌性 Female	雌性 Female
<i>her1</i> , <i>11</i> , <i>13</i> <i>tra1</i>	雄性 Male	雄性 Male
<i>tra1 fem1</i>	兼性 Intersex	兼性 Intersex
<i>man1 her1</i> , <i>3</i> , <i>5</i> , <i>7</i> , <i>10</i> , <i>15</i> , <i>19</i>	多个精子器 Many antheridia	多个精子器 Many antheridia
<i>man1 her1</i> , <i>3</i> , <i>14</i> , <i>17</i>	多个精子器 Many antheridia	雄性 Male
<i>fem1 man1</i>	雌性 Female	雌性 Female
<i>man1 tra</i>	雄性 Male	雄性 Male
<i>her1 tra1 fem1</i>	兼性 Intersex	兼性 Intersex

Wen 等^[3]利用 cDNA 消减杂交技术, 分离出了水蕨配子体中由 *Ace* 诱导的基因 *ANI1* (antheridiogen induced), 并发现 *ANI1* 的表达抑制因子或其转录本的失稳定因子受到性别决定基因 *TRA5* 的编码或调控。在缺少 *Ace* 的情况下, *TRA5* 直接或间接阻止 *ANI1* 转录或转录物积累, 而 *Ace* 使 *TRA5* 基因或它的产物失活, 导致 *ANI1* 表达上调。序列和蛋白质结构分析表明 *ANI1* 是一种新型的细胞外蛋白。*ANI1* 蛋白的分泌部分形成了一个 β 桶型结构, 表面与质脂运载蛋白 (lipocalins) 结构相似, 连接例如激素、类固醇、嗅素等小的疏水分子。在蕨类植物性别分化过程中, *ANI1* 作为一种启动雄性发育程序所需的 *Ace* 细胞外载体发挥作用^[3]。

2.2 其它性别分化相关基因

MADS-box 基因是广泛存在于动植物体中的调节基因家族, 分为 *ARG80-like* (或 *SRF*)、*MEF2-like* 和 *MIK3* 3 个亚家族, 植物中具有的是 *MIK3* 亚家族^[43, 44]。裸子植物中隶属于此家族的 *AG-like*、*AGL2-like*、*AGL6-like* 和 *GGM* 基因与生殖器官的形成有关^[45], 被子植物中的 *FDRMADS5*、*LFY*、*AP1*、*SQUA*、*AP3*、*DEF*、*PI*、*GLO*、*AG*、*PLEN*、*AP2* 和 *OVU* 等基因参与生殖器官的形成^[46, 47]。刘建武等^[44]从水蕨中获得的 15 个 cDNA (*CRM1* ~ *CRM10*) 与典型的种子植物 *MICK* 基因有极高的序列同源性, 其中 *CRM1* ~ *CRM10* 是在水蕨中是单

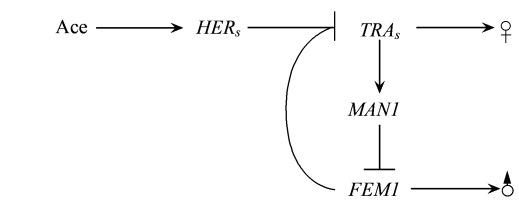


图 1 水蕨响应 *Ace* 性别决定基因的相互关系
Fig. 1 The correlation of sex determination genes in *Ceratopteris* response to *Ace*

拷贝基因,这些基因很可能对蕨类植物性别分化也具有一定作用。此外,刘建武等^[18]通过对只在蕨颈卵器时期配子体表达而早期配子体不表达的 cDNA 片段进行 PCR 扩增得到 6 个与其发育相关的特异基因 *FA1* ~ *6*,并发现这些基因序列与水稻雌蕊特有的一些 cDNA 亲缘关系较近,这表明 *FA1* ~ *6* 很可能与蕨配子体发育后期的颈卵器形成有关^[18]。

3 结论与展望

蕨类植物特殊的系统进化位置以及独特的生活史类型,使之成为研究进化-发育生物学的良好模型,同时,蕨类植物孢子体具有药用、食用、观赏、工艺等多种价值。进行蕨类植物配子体性别分化研究,不仅可以为揭示植物有性生殖的进化与发育机制提供证据,而且为进行人工蕨类快速繁殖提供理论基础。虽然开展蕨类植物配子体性别分化研究的意义重大,然而由于受到研究经费的限制,国内外的相关研究都远远滞后于对种子植物的研究。已有的报道分析了激素类物质、光照、营养成分(钙离子、糖类和氨基酸等)和种植密度等对蕨类植物性别分化过程的影响,并初步分析了少数相关基因的功能。但是,对蕨类植物性别分化机理的研究仍存在如下问题:(1)研究对象的种类分散,已有报道中涉及到了几十个属中的百余种类;(2)不同报道中环境因子的处理强度不一致,如激素浓度、光照强度、营养物质含量等;(3)由于上述两方面问题,在已有研究结果中,很难比较不同种类植物性别分化响应环境因子过程中的差异,也无法总结出同一类群的共同特征和不同类群间的差异;(4)更多的研究停留在对生理现象的描述,缺乏对环境因子作用机理和分子生物学机制的分析。鉴于此,今后应在如下几方面开展工作:(1)建立蕨类植物性别分化的模式研究体系。近年来,人们已经利用以水蕨等为代表的一些模式蕨类植物为材料,应用分子生物学研究手段分析了蕨类植物孢子萌发与配子体发育的分子机制^[14, 48, 49]。在此基础上,应逐渐建立适合研究蕨类植物性别分化的模式体系和技术平台;(2)明确影响蕨类植物性别分化的主要环境因子,进行分子机理研究。在上述生理生态学研究的基础上,确定以成精子囊素、光照强度和光质为主的几种环境因子的处理强度,利用在种子植物中应用成熟的基因克隆与转化技术、RNAi 技术、基因芯片技术、荧光标记与瞬时表达技术、蛋白质分离与生物质谱技术等,分析蕨类植物性别分化过程中响应环境因子的相关基因/蛋白质的功能。(3)在上述研究基础上,逐渐构建蕨类植物性别分化的信号与分子调控的网络体系,并通过与种子植物中已经获得的相关信息比较,揭示蕨类植物性别分化的独特机制和在系统进化中的重要作用。

References:

- [1] Tanurdzic M, Banks J A. Sex-determining mechanisms in land plants. *The Plant Cell*, 2004, 16 (4): 61—71.
- [2] Liu J W, Liu N. The progress in study on development of fern gametophytes and differentiation of sex organ. *Chinese Bulletin of Botany*, 2001, 18 (2): 149—157.
- [3] Wen C K, Smith R, Banks J A. *AN11*: A sex pheromone-induced gene in *Ceratopteris* gametophytes and its possible role in sex determination. *The Plant Cell*, 1999, 11 (7): 1307—1317.
- [4] Voeller B R. Gibberellins: Their effect on antheridium formation in fern gametophytes. *Science*, 1964, 143 (3604): 373—375.
- [5] Hickok L G. Absciscic acid blocks antheridiogen-induced antheridium formation in gametophytes of the fern *Ceratopteris*. *Canadian Journal of Botany*, 1983, 61 (3): 888—892.
- [6] Kazmierczak A. Ethylene is a positive regulator for GA₃-induced male sex in *Anemia phyllitidis* gametophytes. *Plant Cell Reports*, 2003, 22 (5): 295—302.
- [7] Kazmierczak A. Aminoxyacetic acid inhibits antheridiogenesis and development of *Anemia phyllitidis* gametophytes. *Plant Cell Reports*, 2004, 23 (4): 203—210.
- [8] Guillon J M, Fievet D. Environmental sex determination in response to light and biased sex ratios in *Equisetum* gametophytes. *Journal of Ecology*, 2003, 91 (1): 49—57.
- [9] Kamachi H, Iwasawa O, Hickok L G, Nakayama M, Noguchi M, Inoue H. The effects of light on sex determination in gametophytes of the fern *Ceratopteris richardii*. *Journal of Plant Research*, 2007, 120 (5): 629—634.
- [10] Guillon J M, Raquin C. Environmental sex determination in the genus *Equisetum*: sugars induce male sex expression cultured gametophytes. *International Journal of Plant Science*, 2002, 163 (5): 825—830.

- [11] Grill R. Calcium requirement in blue-light-promoted and red-light-inhibited antheridiogenesis in the fern *Anemia phyllitidis* L. Sw. . Plant Physiology, 1995, 145 (3): 285—290.
- [12] Kazmierczak A. The effects of methionine and cobalt ions on sex expression and development of *Anemia phyllitidis* gametophytes. Acta Physiologiae Plantarum, 2005, 27 (4): 447—454.
- [13] Huang Y M, Chou H M, Chiou W L. Density affects gametophyte growth and sexual expression of *Osmunda cinnamomea* (Osmundaceae: Pteridophyta). Annals of Botany, 2004, 94 (2): 229—232.
- [14] Chatterjee A, Roux S J. *Ceratopteris richardii*: a productive model for revealing secrets of signaling and development. Journal of Plant Growth Regulation, 2000, 19 (3): 284—289.
- [15] Quintanilla L G, Escudero A. Spore fitness components do not differ between diploid and allotetraploid species of *Dryopteris* (Dryopteridaceae). Annals of Botany, 2006, 98 (3): 609—618.
- [16] Zhang K M, Shi L, Jiang C D, Li Z Y. Inhibition of *Ageratina adenophora* on spore germination and gametophyte development of *Macrothelypteris torresiana*. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50 (5): 559—564.
- [17] Dhankher O P, Li Y, Rosen B P, Shi J, Salt D, Senecoff J F, Sashti N A, Meagher R B. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and gamma-glutamylcysteine synthetase expression. Nature Biotechnology, 2002, 20 (11): 1140—1145.
- [18] Liu J W, Liu N, Sun H, Cai W Q. Cloning and initial research of cDNA in adult gametophytes (archegioium) of *Pteridium aquilinum*. Journal of Beijing Normal University (Natural Science), 2002, 38 (4): 530—534.
- [19] Lu X D, Liu H Y, Xiao L T. Higher plant sex differentiation. Biology Teaching, 2004, 29 (12): 4—6.
- [20] Ying Z T, Li S X. Relation of sex expression to ethylene evolution and oxidase activity in *Lagenaria leucantha* and *Cucumis sativus*. Acta Horticulturae Sinica, 1990, 17 (1): 52—58.
- [21] Li Z L, Yuan Y B, Tsao T H. View of the cytology and biochemistry of sexual reproduction of algae and pteridophyta. Chinese Bulletin of Botany, 1995, 12 (2): 1—8.
- [22] Miller J H. Fern gametophytes as experimental material. The Botanical Review, 1968, 34 (4): 361—440.
- [23] Banks J A, Hickok L, Webb M A. The programming of sexual phenotype in the homosporous fern *Ceratopteris richardii*. International Journal of Plant Science, 1993, 154 (4): 522—534.
- [24] Korpelainen H. Labile sex expression in plants. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 1998, 73 (2): 157—180.
- [25] Raghavan V. Developmental Biology of Fern Gametophytes. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 203—226.
- [26] Eberle J, Nemacheck J, Wen C K, Hasebe M, Banks J A. *Ceratopteris*: a model system for studying sex determining mechanisms in plants. International Journal of Plant Sciences, 1995, 156 (3): 359—366.
- [27] Menendez V, Revilla M A, Bernard P, Gotor V, Fernandez H. Gibberellins and antheridiogen on sex in *Blechnum spicant* L. Plant Cell Reports, 2006, 25 (10): 1104—1110.
- [28] Warne T R, Hickok L G. Control of sexual development in gametophytes of *Ceratopteris richardii*: antheridiogen and abscisic acid. Botanical Gazette, 1991, 152 (2): 148—153.
- [29] Mathews S. Phytochrome-mediated development in land plants: red light sensing evolves to meet the challenges of changing light environments. Molecular Ecology, 2006, 15 (12): 3483—3503.
- [30] Hauke R L. The effect of light quality and intensity on sexual expression in *Equisetum* gametophytes. American Journal of Botany, 1971, 58 (5): 373—377.
- [31] Mohan Ram H Y, Chatterjee J. Gametophytes of *Equisetum ramosissimum* subsp. *ramosissimum*. II. Sexuality and its modification. Phytomorphology, 1970, 20 (2): 151—172.
- [32] Gemmrich A R. Antheridiogenesis in the fern *Pteris vittata*. I. Photocontrol of antheridium formation. Plant Science, 1986, 43 (2): 135—140.
- [33] Schraudolf H. Die Steuerung der Antheridienbildung in *Polypodium crassifolium* L. (*Pessopteris crassifolia* Underw. and Maxon) durch Licht. Planta, 1967, 76 (1): 37—46.
- [34] Hauke R L. Experimental studies on growth and sexual determination in *Equisetum* gametophytes. American Fern Journal, 1977, 67 (1): 18—31.
- [35] Rubin G, Robson D S, Paolillo Jr D J. Effects of population density on sex expression in *Onoclea sensibilis* L. on agar and ashed soil. Annals of Botany, 1985, 55 (2): 205—215.
- [36] Zhang D Y, Zhao S L, Zhang P Y, Chen Q C. On neighbourhood effects in a successional community and an improved index of neighbourhood interference. Acta Ecologica Sinica, 1989, 9 (1): 53—58.
- [37] Zhang D Y, Jiang X H. Plant sex allocation and the maintenance of species diversity in plant communities. Acta Botanica Boreale-Occidentalia

- Sinica, 1995, 15 (5): 106—109.
- [38] Jimenez A, Quintanilla L G, Pajaron S, Pangua E. Reproductive and competitive interactions among gametophytes of the allotetraploid fern *Dryopteris corleyi* and its two diploid parents. *Annals of Botany*, 2008, 102 (3): 353—359.
- [39] Eberle J R, Banks J A. Genetic interactions among sex-determining genes in the fern *Ceratopteris richardii*. *Genetics*, 1996, 142 (3): 973—985.
- [40] Banks J A. Sex-determining genes in the homosporous fern *Ceratopteris*. *Development*, 1994, 120 (7): 1949—1958.
- [41] Banks J A. Sex determination in the fern *Ceratopteris*. *Trends in Plant Science*, 1997, 2 (5): 175—180.
- [42] Banks J A. The *TRANSFORMER* genes of the fern *Ceratopteris* simultaneously promote meristem and archegonia development and repress antheridia development in the developing gametophyte. *Genetics*, 1997, 147 (4): 1885—1897.
- [43] Theissen G, Becker A, Rosa A D, Kanno A, Kim J T, Munster T, Winter K, Saedler H. A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology*, 2000, 42 (1): 115—149.
- [44] Liu J W, Liu N, Sun H, Cai W Q. Advances in the study on MADS-box genes of archegoniatae. *Chinese Bulletin of Botany*, 2002, 19 (2): 150—155.
- [45] Winter K U, Becker A, Munster T, Kim J T, Saedler H, Theissen G. MADS-box genes reveal that gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 1999, 96 (13): 7342—7347.
- [46] Gao Z Z, Chen R, Zhan S X, Sun C R, Cao K M. Detecting the expression of a flower development MADS-box gene in rice. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 2002, 41 (1): 52—56.
- [47] Li X L, Yuan Z Y, Gao D S. The research achievements on mechanism of floral formation in plants. *Acta Botanica Boreale-Occidentalia Sinica*, 2002, 22 (1): 173—183.
- [48] Rutherford G, Tanurdzic M, Hasebe M, Banks J A. A systemic gene silencing method suitable for high throughput, reverse genetic analyses of gene function in fern gametophytes. *BMC Plant Biology*, 2004, 16 (4): 4—6.
- [49] Dai S J, Gao J, Mu H F, Song Y Y. Comparison of germination between fern spores and spermatophyte pollen. *Chinese Bulletin of Botany*, 2008, 25 (2): 139—148.

参考文献:

- [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. *植物学通报*, 2001, 18 (2): 149~157.
- [18] 刘建武, 刘宁, 孙卉, 蔡文启. 蕨晚期配子体发育相关 cDNA 的克隆和初步研究. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 2002, 38 (4): 530~534.
- [19] 鲁旭东, 刘华英, 萧浪涛. 高等植物的性别分化. *生物学教学*, 2004, 29 (12): 4~6.
- [20] 应振土, 李曙轩. 瓠瓜与黄瓜的性别表现和内源乙烯与氧化酶活性的关系. *园艺学报*, 1990, 17 (1): 52~58.
- [21] 李兆亮, 原永兵, 曹宗巽. 藻类植物和蕨类植物有性生殖的细胞学和生物化学研究现状. *植物学通报*, 1995, 12 (2): 1~8.
- [36] 张大勇, 赵松岭, 张鹏云, 陈庆诚. 青杆林恢复演替过程中邻体效应和邻体干扰指数的改进方式. *生态学报*, 1989, 9 (1): 53~58.
- [37] 张大勇, 姜新华. 植物性别分配与植物群落中的物种多样性的维持. *西北植物学报*, 1995, 15 (5): 106~109.
- [44] 刘建武, 刘宁, 孙卉, 蔡文启. 颈卵器植物 MADS-box 基因的研究进展. *植物学通报*, 2002, 19 (2): 150~155.
- [46] 高之桢, 陈锐, 詹树萱, 孙崇荣, 曹凯鸣. 水稻中一个与花发育相关的 MADS-box 基因的表达检测. *复旦学报(自然科学版)*, 2002, 41 (1): 52~56.
- [47] 李宪利, 袁志友, 高东升. 高等植物成花分子机理研究现状及展望. *西北植物学报*, 2002, 22 (1): 173~183.
- [49] 戴绍军, 高晶, 牟鸿飞, 宋莹莹. 蕨类植物孢子与种子植物花粉萌发的比较. *植物学通报*, 2008, 25 (2): 139~148.