

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.22082

刘向峰, 孙蒙祥, 彭雄波. 引导花粉管生长与防止多管入囊的分子基础[J]. 植物科学学报, 2023, 41(1): 128-137

Liu XF, Sun MX, Peng XB. Molecular basis of pollen tube guidance and avoidance of polytubey fertilization[J]. *Plant Science Journal*, 2023, 41(1): 128-137

引导花粉管生长与防止多管入囊的分子基础

刘向峰, 孙蒙祥*, 彭雄波*

(武汉大学生命科学学院, 杂交水稻国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 被子植物中, 成熟花粉落在柱头上萌发出花粉管。花粉管在珠柄信号和珠孔信号的引导下, 准确生长进入胚珠内的胚囊中, 然后破裂释放两个精细胞完成双受精。被子植物建立了一套精细的调控机制, 保证有且仅有一根花粉管进入胚囊完成双受精, 从而保证遗传信息的稳定传递。本文对近年来国内外在花粉管引导与多管入囊阻断的机理研究进行了综述, 并对花粉管导向的后续机制研究及利用其克服远缘杂交进行了展望。

关键词: 花粉管; 花粉管导向; 胚囊; 珠柄; 多管入囊

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2023)01-0128-10

Molecular basis of pollen tube guidance and avoidance of polytubey fertilization

Liu Xiang-Feng, Sun Meng-Xiang*, Peng Xiong-Bo*

(State Key Laboratory of Hybrid Rice, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: In angiosperms, mature pollen falls on the stigma to germinate the pollen tube. Under the guidance of funiculus and micropyle signals, the pollen tube grows accurately into the embryo sac in the ovule, and then ruptures to release two sperm cells to complete double fertilization. Ensuring that only one pollen tube enters the embryo sac for complete double fertilization and stable transmission of genetic information is carefully regulated. This paper reviews recent research on the mechanisms of pollen tube guidance and polytubey block.

Key words: Pollen tube; Pollen tube guidance; Embryo sac; Funiculus; Polytubey block

当花粉在花药内从小孢子母细胞发育至成熟花粉时, 会先脱水形成干燥的花粉粒, 同时花药的表皮收缩开裂, 花粉被释放出来^[1,2]。雌蕊组织包含接收花粉的柱头、花柱、引导组织和胚珠。花粉落在柱头上后, 和乳突细胞发生相互识别, 经过黏附水合后从花粉萌发处长出花粉管^[3]。花粉管通过柱头进入花柱, 在引导组织内生长^[4]。花粉管在引导组织的珠柄着生处发生第 1 次转向生长, 之后花粉管穿出隔膜并在珠柄上攀附生长, 在接近珠孔处发生第 2 次转向^[5]。花粉管从珠柄顺

利转向穿过珠孔后进入胚囊, 穿过一个助细胞后花粉管破裂并释放两个精细胞, 其中之一与卵细胞结合发育成胚胎, 另一个精细胞与中央细胞结合发育成胚乳^[6,7]。

双受精的正常进行受到精密的调控, 涉及到雌配子体与雄配子体的正常发育, 雄配子体与雌蕊以及雌配子体之间的相互作用。其中, 雌、雄配子体相互识别是花粉管正确靶向胚珠和进入珠孔的重要前提^[8,9]。花粉管从引导组织内穿出之后的生长受胚珠信号的引导。对于胚珠引导花粉管, 国内外研

收稿日期: 2022-07-01, 修回日期: 2022-08-30。

基金项目: 国家自然科学基金 (31870302)。

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (31870302).

作者简介: 刘向峰 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物生殖发育生物学 (E-mail: xiangliu@whu.edu.cn)。

* 通讯作者 (Authors for correspondence. E-mail: mxsun@whu.edu.cn; bobopx@whu.edu.cn)。

究人员将其分为珠柄导向和珠孔导向两类^[5]。珠柄导向决定着花粉管从引导组织内穿出并转向胚珠，随后攀附珠柄生长；珠孔导向则吸引花粉管从珠柄转向后进入珠孔。此外，进入雌蕊的花粉管数量远远多于雌蕊中的胚珠数量，为了避免“多精受精”造成遗传的不稳定，被子植物演化出了特定的多管

入囊（Polytubey）阻断机制，限制多根花粉管进入同一个胚珠内的胚囊。近年来，国内外在花粉管引导与多管入囊阻断的机理研究方面取得一系列进展，发现了一些参与该过程的重要蛋白（表 1）。本文对这些进展进行了综述，并对花粉管导向的后续机制研究及利用其克服远缘杂交障碍进行了展望。

表 1 参与花粉管导向与多管入囊阻断中的重要分子
Table 1 Molecules involved in different stages of fertilization

蛋白名称 Protein name	蛋白类型 Protein type	细胞定位 Cell location	调控阶段 Regulation stage
PDIL2-1	二硫键异构酶	内质网	珠柄导向
MPK3/MPK6	蛋白激酶	泛表达	珠柄导向
CHX21/CHX23	质子交换器	花粉管内质网	珠柄导向
PRP8A/8B	mRNA 剪切体	细胞核	珠柄导向
MYB98	转录因子	助细胞丝状器	珠孔导向
LURE	分泌性小肽	助细胞丝状器	珠孔导向
XIUQIU	分泌性小肽	助细胞丝状器	珠孔导向
PRK6	LURE 受体	花粉管膜	珠孔导向
MIK1/2	LURE 受体	花粉管膜	珠孔导向
MDIS1	LURE 受体	花粉管膜	珠孔导向
CNGC18	Ca ²⁺ 门控通道	花粉管细胞质、膜	珠孔导向
MLO5/MLO9/MLO15	膜结合蛋白	花粉管膜	珠孔导向
ZmEA1	多肽	玉米卵器	珠孔导向
CCG	转录因子	中央细胞	珠孔导向
CBP1	转录因子	中央细胞	珠孔导向
FER	受体激酶	引导组织隔膜、助细胞丝状器	多管入囊阻断
ANJ	受体激酶	引导组织隔膜、助细胞丝状器	多管入囊阻断
HERK1	受体激酶	引导组织隔膜、助细胞丝状器	多管入囊阻断
RALF6/7/16/36/37	分泌性小肽	花粉管	多管入囊阻断
ECS1/2	分泌性蛋白	卵细胞	多管入囊阻断
APTG1	甘露糖基转移酶	花粉、成熟胚囊、胚胎	多管入囊阻断

1 花粉管珠柄导向机制

花粉管在引导组织内生长后会在珠柄处发生转向，沿着珠柄进行生长。研究发现，胚珠内的胚囊作为信号源引导花粉管珠柄转向。早期的遗传学研究证实，当胚珠的珠心细胞发育正常，但是胚囊不能正常发育时，花粉管不会靶向该胚珠^[10]。在一些 T-DNA 插入突变体中，会产生染色体易位的突变体。在杂合突变体背景中，胚珠的孢子体组织发育正常，但是其内部的胚囊停留在单核时

期，这些胚珠不能够引导花粉管进行珠柄转向^[11, 12]。该研究提示单核期之后的胚囊在花粉管珠柄转向中发挥重要作用。在拟南芥（*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.）中，PDIL2-1（Protein disulfide-isomerase like 2-1）是一种蛋白质二硫键异构酶，在功能获得性突变体 *pdil2-1* 中，约有 70% 的花粉管无法正确攀附珠柄^[13]。进一步的分析发现，*pdil2-1* 单突变体中胚珠的形态基本正常，但是胚囊的形态异常，部分胚囊成熟延迟。通过与野生型的正反交，表明孢子体异常引起的胚囊发育异常导致

花粉管不能进行珠柄转向。

PRP8 (Pre-mRNA-processing-splicing factor 8) 的两个亚基 PRP8A 和 PRP8B 同样在珠柄吸引中起着协同作用^[14]。*prp8a prp8b* 双突变体胚珠败育, 苯胺蓝实验结果显示这是由花粉管导向缺陷所导致的。在突变体自交实验中约有 27% 的花粉管丧失珠柄导向, 花粉管在距离胚珠 100 μm 外生长, 但无法靶向胚珠。经观察发现 *prp8a prp8b* 双突变体胚囊形态发生异常, 出现膨大或者塌陷, 但是雌配子体极核融合和细胞化过程是正常的。这表明成熟的胚囊对于花粉管珠柄转向至关重要。

为了寻找胚囊中参与花粉管珠柄转向的分子, 研究者分离了野生型与 *prp8a prp8b* 双突变体的胚珠, 对其转录组进行了分析。相对野生型胚珠, *prp8a prp8b* 双突变体胚珠中有 26 个 CRPs (Cysteine-rich proteins) 表达量显著下调, 其中 *LURE1.1-1.5* (Protein LURE) 和 *MYB98* (MYB domain protein 98) 均被显著下调, 除此之外, *RALF* (Rapid alkalization factor) 基因家族部分成员和 *EC1* (Egg cell-secreted protein) 家族部分成员的表达量也出现了显著下调。但并不清楚 PRP8A 和 PRP8B 影响了哪一类基因的表达, 进而参与珠柄导向。

作为接受胚珠引导信号的一方, 花粉管中也存在控制珠柄转向的信号途径。在花粉管中, MPK3 (Mitogen-activated protein kinase 3) 和 MPK6 两种蛋白激酶可能在感受珠柄导向信号中发挥作用^[15]。*mpk3 mpk6* 双突变体花粉管丢失了珠柄导向, 在引导组织隔膜附近弯曲生长。半离体培养下的花粉管自引导组织生长出来后, 则可以顺利靶向珠孔, 说明 MPK3 和 MPK6 的缺失不影响珠孔导向, 而是特异的损害珠柄导向。MPK3 和 MPK6 在花粉管珠柄转向过程中如何被激活还不清楚。

拟南芥中预测的两种阳离子/质子交换器 CHX21 (Cation/proton exchangers) 和 CHX23, 对花粉管引导至关重要^[16]。在 *chx21* 或 *chx23* 单突变体中, 花粉的育性没有变化。然而, *chx21 chx23* 双突变体花粉的育性受损。与用 *chx23* 单突变体花粉授粉的野生型雌蕊相比, 用数量有限的 *chx21* 单突变体和 *chx21^{-/-} chx23-4^{+/-}* 双突变体花粉授粉雌蕊在后续的发育中产生了更少的种子,

表明 *chx21 chx23* 突变体花粉受到严重损害。双突变体花粉能够萌发并生长出花粉管, 但花粉管不能离开花柱道转向胚珠。在限量授粉情况下, 双突变体花粉授粉导致野生型雌蕊产生的种子减少 62%。融合蛋白定位显示 CHX23 定位于花粉管的内质网。进一步的研究发现 CHX23 可能介导了花粉管内的钾离子转运, 因为 CHX23 在大肠杆菌中的表达以 pH 依赖的方式增加了钾离子的吸收和促进生长。CHX21 和 CHX23 可能通过改变局部阳离子平衡和 pH 值, 从而影响来自胚珠的引导信号接收或转导的步骤。这些信号接收或转导步骤对花粉管的转向并靶向胚珠生长至关重要。但是位于内质网的 CHX21 和 CHX23 如何感知来自胚珠的珠柄转向信号并被激活尚不清楚。

2 花粉管珠孔导向机制

助细胞是花粉管进入珠孔后接触到的第一个卵器细胞^[17]。花粉管进入胚囊后会导致一个助细胞破裂, 另外一个宿存助细胞会在受精后消失。传统植物胚胎学和早期的遗传学工作都暗示助细胞可能有吸引花粉管的作用。

早期通过化学固定与电镜的研究发现胚珠中的 Ca^{2+} 集中在珠孔端, 尤其是在胚囊中的助细胞中^[18]。授粉后在花粉管沿着引导组织生长的过程中, 珠孔端 Ca^{2+} 一直有较高的水平, 当花粉管到达珠孔端时, Ca^{2+} 达到最大值^[19]。而当花粉管穿过助细胞并完成双受精时, Ca^{2+} 迅速消失^[20]。利用活细胞成像的方法, 发现花粉管中表达的信号分子会诱导助细胞中 Ca^{2+} 出现动态变化。当花粉管到达助细胞时, 助细胞会出现 Ca^{2+} 震荡。当花粉管破裂时, 则出现急剧的 Ca^{2+} 水平增加, 达到一次 Ca^{2+} 峰值^[19, 21]。但是助细胞内 Ca^{2+} 的变化在花粉管珠孔导向中的作用以及引起 Ca^{2+} 产生变化的信号通路并不清楚。

在野生型拟南芥中, 授粉后 7 h 就会观察到第一个助细胞的死亡^[22], 而宿存助细胞会在受精后通过与受精的中央细胞融合而失去功能^[23]。在拟南芥雌配子体突变体 *gfa2* (*gametophytic factor2*) 中, 授粉 7 h 后两个助细胞都不会死亡。*GFA2* 是酵母的同源基因, 定位于线粒体基质中, 可能作为分子伴侣行使功能。突变体 *gfa2* 的胚珠能吸引花粉管进入胚囊, 表明助细胞死亡与否不影响花粉管

的导向。在突变体 *smn* (*sirène*) 中, 第一个助细胞在花粉管进入后会死亡, 但是宿存助细胞受精后仍保持完整^[22, 24], 这个突变体在受精后仍能吸引另外的花粉管进入胚囊, 暗示助细胞是吸引花粉管的信号来源。助细胞在珠孔端的细胞膜向内形成指突状的丝状器, 拟南芥突变体 *myb98* 的雌配子体丝状器发生了变化, 于是丧失了吸引花粉管从珠柄到达珠孔的能力^[25], 暗示助细胞丝状器在花粉管珠孔导向中发挥重要作用。

助细胞吸引花粉管的直接证据来自于对蓝猪耳 (*Torenia fournieri* Linden. ex Fourn.) 的研究。蓝猪耳胚囊的珠孔端没有被珠被组织包裹, 暴露在珠孔外, 这为在生活状态下直接观察和操作胚囊成员细胞提供了极大的便利^[26, 27]。研究者建立了一套蓝猪耳胚珠离体培养系统, 发现体外培养的成熟胚珠可以引导 100 ~ 200 μm 范围内的花粉管朝向胚珠生长。值得注意的是, 完全体外萌发的花粉管不能朝向胚珠生长, 只有在花柱中生长一段时间的花粉管才能朝向胚珠生长。蓝猪耳胚珠不能吸引异种的狭叶母草 (*Lindernia micrantha* D. Don) 的花粉管^[28-30]。激光切割实验表明, 将蓝猪耳卵细胞和中央细胞切除并不影响花粉管进入胚囊。只有当两个助细胞都被切除后, 胚囊才失去了对花粉管的吸引力^[30]。这一实验明确揭示了两个现象: (1) 诱导花粉管进入胚囊的信号来自于助细胞; (2) 花粉管只有在雌蕊组织中生长后, 才具有对这种信号作出反应的能力。这些数据表明, 花粉管的生长是直接或间接由助细胞的某种成分或其释放的某种物质所引导的, 但这种起源于助细胞的信号尚未确定。

为了寻找助细胞中引导花粉管进入胚囊的物质, 研究者分离了蓝猪耳的助细胞并对其转录组进行了测序。通过生物信息学分析鉴定到了一类在助细胞中特异表达的小分子多肽 LUREs, 其富含半胱氨酸, 属于 Defensin-like 基因家族^[31]。纯化的 LURE1 和 LURE2 能够引导半离体培养生长的花粉管发生转向, 而在胚囊内下调 LURE1 和 LURE2 的表达后干扰了其引导花粉管的能力^[31]。这些证据表明 LURE 就是助细胞中引导花粉管进入胚囊的分子。随后研究者在模式植物拟南芥中也鉴定了一类 Defensin-like 基因, 命名为 *AtLURE1s*。*AtLURE1s* 的荧光融合蛋白集中于助细胞丝状器,

并能分泌到细胞外引导花粉管进入珠孔^[32]。纯化的 *AtLURE1s* 能够引导半离体培养生长的拟南芥花粉管发生转向, 但是不能有效吸引拟南芥的近缘种琴叶拟南芥 (*A. lyrata* (L.) O Kane & Al-Shehbaz) 的花粉管。如果将琴叶拟南芥花粉与 WT (Col-0, 哥伦比亚野生型) 花粉同时授粉 WT 和 *LURE1* 突变体柱头上, *LURE1* 突变体中出现更多无法受精的胚珠, 说明 LURE 在引导花粉管方面具有物种特异性, 可能在物种的生殖隔离中具有重要作用^[33]。另有研究发现, 在胚珠中可以通过分泌 AMOR (Ovular methyl-glucuronosyl arabinogalactan) 增强花粉管对 LURE 的趋化性, 从而使花粉管更快速地对珠孔信号产生反应, 并产生转向^[34]。

敲除 LURE1.1-1.8 的突变体, 拟南芥的育性并没有受到影响, 这说明还存在着其余的吸引分子以保证双受精的完成。研究发现, XIUQIU (*AtLURE1*-related Brassicaceae-conserved cysteine-rich peptides) 的 4 个成员具有吸引花粉管的特性。与 LURE 不同, 在拟南芥表达 XIUQIU 可以引导琴叶拟南芥的花粉管转向^[33]。在同时敲除了 *LURE1.1-1.8* 以及 XIUQIU 的 4 个成员后, 突变体 *hendecuple* 中出现大概 20% 的胚珠败育。在这些败育胚珠中, 有 65% ~ 70% 的比例是花粉管无法找到珠柄, 另有 30% ~ 35% 的比例是花粉管在珠孔迷失方向, 无法进入珠孔。而 XIUQIU 基因可以恢复 *hendecuple* 的育性缺陷, 说明 XIUQIU 与 LURE 共同调控花粉管的导向。相比于 LURE 只能吸引同种花粉管的转向而言, XIUQIU 在不同物种间均能引导花粉管的转向, 表明该吸引物可能是一种进化过程中的保守物质, 为克服远缘杂交障碍奠定了基础。

助细胞分泌的 LURE 等吸引物质需要被花粉管感知才能发挥导向作用。定位于花粉管顶端的 PRKs (Pollen receptor-like kinase) 蛋白是助细胞分泌的 LURE 信号受体, 尤其是 PRK6^[35]。在半离体生长中, *prk6*、*prk1 prk3* 以及 *prk1 prk3 prk6* 对 LURE 信号的敏感性降低, 其花粉管在 LURE 培养液中扭曲程度小, 或者不扭曲。另外, LURE1 信号可以诱导花粉管转向前 PRK6 在花粉管顶端质膜的不对称分布, 花粉管从而转向 PRK6 含量高的一侧。除 PRKs 蛋白以外, MDIS1

(Protein Male Discoverer 1) 与 MIK1/2 (MDIS1-interacting receptor like kinase) 作为一类受体样激酶, 存在的胞外结构域会感知 LURE 信号, 而胞内的激酶结构域可将信号传递给花粉管的其他分子^[36]。另外一种定位于花粉管尖端膜上的受体样激酶 LIP1 (Pollen tube guidance) 和 LIP2 同样参与花粉管的珠孔导向^[37]。通过正反交实验证明了 *lip1 lip2* 的雄配子体出现了异常, 在花粉中有更低的遗传率, 但是花粉发育以及萌发是正常的, 这表明花粉管在引导组织生长后, 其转向受到了影响。在 *lip1 lip2* 的双突变体的苯胺蓝和扫描电镜实验中, 观察到了其花粉管丧失了珠孔导向, 同时 LURE1 对双突变体的吸引力也出现了减弱。在后续的研究里, 通过蛋白互作手段验证了 PRK6 与花粉表达的 ROPGEFs (Rho of plant guanine nucleotide-exchange factors)、PRKs 以及 LIPs 的互作, 调控花粉管的导向生长^[36]。

花粉管中的 Ca^{2+} 通道可能作为受体的下游信号感知珠孔导向信号。通过膜片钳技术鉴定出 CNGCs (Cyclic nucleotide-gated ion channel) 的多个 Ca^{2+} 门控通道, 其中在已知的 8 个 Ca^{2+} 门控通道中, CNGC18 已被证实是唯一一个参与花粉管珠孔导向的 Ca^{2+} 门控通道^[38]。*cngc18* 的完全缺失突变体的雄配子体完全不育, 因此在后续筛选了较弱表型的两个点突变株系。通过检测 *cngc18* 的两个点突变体的花粉管尖端 Ca^{2+} 含量, 发现在花粉管尖端出现异常的 Ca^{2+} 震荡, 同时其花粉管在胚珠表面生长, 无法找到珠孔位置。后续的研究证明 CNGC18 受到 MLO (MLO-like protein) 的调控, 蛋白互作实验也发现 MLO 可以通过招募 CNGC18 控制花粉管的导向^[39]。半离体和苯胺蓝实验结果显示, *mlo5 mlo9* 双突变体和 *mlo5 mlo9 mlo15 3* 基因突变体花粉管在感知胚珠信号时发生紊乱, 导致花粉管在珠柄上出现扭曲和分支, 无法靶向珠孔^[39]。在含有 LURE1.2 的培养液中, *mlo5 mlo9* 的花粉管对 LURE 不敏感, 无法产生扭曲的表型, 通过 Ca^{2+} 显示 Marker 的观察, 发现花粉管丧失了 Ca^{2+} 浓度。融合蛋白分析发现 MLO5 和 MLO9 定位于花粉管质膜, 当胚珠分泌的吸引信号与花粉管上的受体结合时, MLO 通过 R-SNARE 招募包含有 Ca^{2+} 通道 CNGC18 的囊泡到达质膜, 控制花粉管朝向胚珠的生长。

除了助细胞之外, 雌性生殖细胞中的卵细胞与中央细胞也在花粉管珠孔导向中发挥作用。在玉米 (*Zea mays* L.) 卵器特异表达并在卵细胞和助细胞中持续存在的 ZmEA1 (Protein EGG APPARATUS-1) 在花粉管导向中发挥了重要作用^[40, 41]。纯化的 ZmEA1 可以在体外吸引玉米花粉管的转向, 通过荧光观察确定了 ZmEA1 在助细胞丝状器位置高表达。通过转基因手段在拟南芥表达 *ZmEA1* 时, 可以吸引玉米花粉管的转向, 说明 ZmEA1 是与种间隔离相关的蛋白。中央细胞特异表达的 CCG (Central cell guidance) 转录因子对于花粉管的珠孔导向也是必要的, 当 CCG 缺失时, *ccg* 具有正常的雌配子体, 花粉管顺利靶向胚珠, 但是无法进入珠孔端^[42]。进一步的研究表明, CBP1 (CCG-binding protein 1) 可以和 CCG 互作, 共同调控中央细胞以及助细胞中 CRPs 基因的表达量, 进而对花粉管的导向产生影响^[43]。*cbp1* 的花粉管出现两种类型的导向缺陷, 一种是大约 16% 的比例吸引两根花粉管, 只有一根进入珠孔; 另一种约 8% 的比例则是两根花粉管都进入珠孔中。转录组测序结果显示, *ccg* 和 *cbp1* 的中央细胞以及助细胞中的 CRPs 基因都有所下调, 表明这两种转录因子可能共同调控助细胞以及中央细胞的花粉管导向。

3 多管入囊阻断机制

在高等植物中, 如何保证只有一根花粉管进入胚珠内, 并完成双受精过程至关重要。为了保证双受精的完成与有性生殖的高效性, 植物进化出多种方式来阻止多花粉管进入胚囊。多管入囊阻断发生的第一个位置在隔膜珠柄着生处, 其阻止更多的花粉管穿出引导组织隔膜, 靶向胚珠。通过分离引导组织和隔膜进行转录组测序, 最终得到在引导组织和隔膜以及胚珠表皮高表达的 3 个受体激酶 FER (FERONIA)、ANJ (ANJEA) 和 HERK1 (HERCULES RECEPTOR KINASE 1), 它们的单突变体均能出现多花粉管的表型^[44-46], 在 *fer anj herk1 3* 基因突变体中有着更高的水平, 表明这三者形成一个受体复合物^[47]。在 *myb97 myb101 myb120 3* 基因突变体中具有与 3 个受体激酶缺失突变体类似的表型, 在对 *myb97 myb101*

myb120 花粉转录组测序中发现了花粉管分泌的 5 个 RALF 小肽 RALF6/7/16/36/37。通过 Pull-down 技术证实了引导组织隔膜处的受体激酶复合体正是花粉管分泌的 RALFs 小肽的受体。当花粉管生长到一定的位置时, 其表达的 RALFs 小肽可以与引导组织珠柄着生处的隔膜中的受体结合, 打开引导组织隔膜, 使花粉管穿出, 同时还会防止第 2 根花粉管的穿出。如果缺失这些受体或者同时缺失这 5 个小肽, 都会出现多花粉管靶向胚珠的现象。

多管入囊阻断发生的第 2 个位置在花粉管接触助细胞处。受体激酶 FERONIA 在助细胞中高度表达且在丝状器处富集, 其调控了低甲酯化果胶质在助细胞丝状器积累。第 1 根花粉管与助细胞接触后, 会诱导一氧化氮在丝状器的积累, 这一过程依赖 FERONIA 和低甲酯化果胶质的存在。助细胞处产生的一氧化氮对 LURE1 进行亚硝基化修饰, 阻止其分泌, 使其不能与花粉管上的受体结合, 从而在一段时间内不再吸引第 2 根花粉管进入胚囊。而在 *fer* 突变体中, 胚珠中助细胞丝状器部位的低甲酯化的果胶质及一氧化氮的含量都显著低于野生型, 因此在第 1 根花粉管进入后 LURE1 仍能发挥作用, 可以引导其他花粉管进入胚珠^[48]。

多管入囊阻断发生的第 3 个位置在受精部位。被子植物中如果所吸引的第 1 根花粉管受精失败, 雌配子体会继续吸引第 2 根花粉管以保证受精完成, 这一现象被称为受精补偿 (Fertilization recovery)。前人曾在统计种子败育率时发现一种 T-DNA 插入突变体 *g21* 的遗传比例高于期望的 50%, 接近 80%^[49]。进一步的鉴定发现这一基因是 *DUO3* (*DUO POLLEN3*), 并重命名为 *duo3-2*。在 *duo3-2* 的花粉存在异常, 部分花粉仅有 1 个精细胞样结构 (One sperm-like cell, SLC)。完成受精后, 有 50% 比例是吸引单根花粉管的, 除此之外另有 18.1% 的胚珠吸引了两根花粉管并完成双受精; 在败育的胚珠中, 有 15.4% 的比例吸引单根花粉管, 还存在 16.6% 的胚珠吸引了两根花粉管。通过限时观察, 发现第 2 根花粉管在 28 h 后才被宿存助细胞重新吸引。这说明 *duo3-2* 中的第 1 根花粉管进入后, 由于没有正常的精细胞导致受精失败后, 仍可吸引第 2 根花粉管穿过宿存

助细胞, 只有两根花粉管均受精失败才会出现败育。同一时间, 另有研究人员在 *GCS1* (*GENERATIVE CELL SPECIFIC 1*) 突变体 *gcs1(hap2)* 和 *duo1* 报道了这一现象^[50]。*gcs1* 在之前已被报道其精细胞在精卵融合过程中受到损害^[51], 在新的研究中, *gcs1* 胚珠内发现多个未融合的精细胞, *duo1* 则出现吸引 2 根和 3 根的表现。

进一步的研究发现, 中央细胞或卵细胞在无法完成受精时会启动受精补偿机制, 进而继续吸引第 2 根花粉管^[52]。研究人员利用 *cdka;1* 只有单个精细胞, 并能随机和卵细胞或中央细胞受精的特点^[53], 在未受精的卵细胞和已发育为多核胚乳的胚珠中观察到约 33% 的多花粉管吸引; 在未受精的中央细胞和发育为胚胎的胚珠中观察到吸引多花粉管的比例为 32%, 而中央细胞与卵细胞均受精仅有 2.1% 的胚珠吸引多花粉管, 二者的比例相似, 说明卵细胞和中央细胞的受精都可以独立阻止多花粉管的吸引。当卵细胞和中央细胞都不受精时, 出现多花粉管的比例可以达到 80%^[49]。这些结果表明中央细胞和卵细胞的受精分别激活不同的通路, 协同作用阻断多管入囊。FIS-PRC2 复合物通过对组蛋白的 27 位赖氨酸进行三甲基化来抑制基因表达^[54]。中央细胞与胚乳中特异表达的 FIS-PRC2 复合物组分包括 MEDEA^[55]、FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED2 (FIS2)^[56] 和 FERTILIZATION IN DEPENDENT ENDOSPERM (FIE)^[57]。在这些组分蛋白的突变中, 即使中央细胞已经受精也不能阻断第 2 根花粉管进入胚囊, 表明中央细胞受精阻断多管入囊依赖于 FIS-PRC2。

最新的研究揭示了卵细胞受精如何阻断多管入囊的分子机制^[58]。植物通过在卵细胞内特异表达的 ECS1/2 (EGG CELL-SPECIFIC 1/2) 分泌性蛋白来应对是否需要第 2 根花粉管的进入。在 *ecs1 ecs2* 双突变体中观察到了多花粉管表型, 融合蛋白表明 ECS1/2 特异性在卵细胞内表达, 在精卵融合后, 卵细胞则会迅速分泌 ECS1/2 到助细胞的位置。经过检测发现, ECS1/2 具有酶的活性并特异性切割助细胞分泌的 LURE1.2 信号, 从而防止多花粉管的进入^[58]。通过比对 LUREs 和 XIUQUIs 蛋白序列发现 LURE1.1-1.5 具有相同的保守性肽序列, 而这段序列正是 ECS1/2 所结合的特异性位点。

将这段序列缺失后, LURE 的活性丧失, 在体外实验中无法吸引花粉管的转向。除卵细胞和助细胞分泌的蛋白阻止多花粉管的吸引之外, 一些具有酶活性的蛋白可能也在其中发挥着重要作用。一种甘露糖基转移酶 APTG1 (ABNORMAL POLLENTUBE GUIDANCE 1) 在花粉、成熟的胚囊以及胚胎中都有表达, *aptg1* 的花粉管则会出现吸引多根花粉管的异常表现, 但最终只有一根花粉管进入珠孔^[59]。

中央细胞受精成功能够启动宿存助细胞与初生胚乳细胞的融合, 防止宿存助细胞继续分泌 LURE1 吸引花粉管, 从而阻断多管入囊^[23]。为了探讨宿存助细胞的降解机制, 研究人员利用 MYB98 特异表达在助细胞内的特点, 构建助细胞显示 Marker, 通过限时授粉发现在授粉 7 h 后, 中央细胞内表达了助细胞的 GFP 信号, 同时宿存助细胞内的 GFP 信号减弱, *pAtLURE1::AtLURE1-GFP* 表现出相同的信号变化。在中央细胞受精完成后, 宿存助细胞会和二核胚乳融合, 并迅速减少 LURE 的表达, 降低对花粉管的吸引。FIS-PRC2 复合物不影响膜融合过程, 但是会影响宿存助细胞核与胚乳核之间的融合。因此 FIS-PRC2 复合物组分的缺失会导致多管花粉管进入胚囊^[52]。

被子植物多管入囊阻断的 3 个位置之间存在着密切的信号联系, 保证受精的正常进行。当第 1 根花粉管在引导组织内生长, 经珠柄信号产生第 1 次转向, 此时在引导组织隔膜处存在的 FER/ANJ/HERK1 受体激酶复合体可以与花粉管上的 RALFs 小肽结合, 进而启动下游未知信号, 阻止第 2 根花粉管转向。当第 1 根花粉管接触到助细胞破裂后, 花粉管中的 RALFs 小肽急剧减少, 导致隔膜处的多管入囊阻断信号解除^[47]。如果此时第 1 根花粉管释放的 2 个精子与卵细胞和中央细胞成功受精, 就会激活受精部位的多管入囊阻断信号, 中央细胞与宿存助细胞融合使得 LURE1 不再分泌, 卵细胞分泌 ECS1/2 降解已产生的 LURE1, 导致 LURE1 快速消失。虽然隔膜处的多管入囊阻断信号已解除, 但是由于没有 LURE1 的吸引信号存在, 不会有第 2 根花粉管穿出隔膜转向珠柄生长。这样, 就能保证正常受精时有且仅有 1 根花粉管进入胚囊完成双受精。反之, 如果第 1 根花

粉管释放的两个精子没有与卵细胞和中央细胞成功受精, 就不会激活受精部位的多管入囊阻断信号, 助细胞分泌的 LURE1 就会发挥作用, 继续引导第 2 根花粉管穿出隔膜转向珠柄生长。这样, 就能保证非正常受精时有补偿的花粉管能够进入胚囊完成双受精。

4 展望

近年来, 植物生殖生物学领域取得了一系列的研究进展, 主要集中在花粉管的珠孔导向和多管入囊阻断机制研究方面。在花粉管导向的研究中, 珠孔导向机制已经相对清晰, 已鉴定到了花粉管的吸引分子和对应的受体, 下一步需要明晰受体的下游信号途径如何控制花粉管转向。相对于珠孔导向机制, 关于珠柄导向机制的研究还较少, 珠柄导向吸引信号来源于胚囊内的什么细胞, 起作用的信号分子以及花粉管上对应的受体还需要进一步鉴定。此外, 虽然已发现一些重要的分子参与多管入囊阻断, 但仍然有一些问题需要关注, 如 RALF 小肽与受体激酶相互作用后产生什么信号阻断其它花粉管穿出隔膜? 受精时什么信号触发了卵细胞 ECS1 和 ECS2 的分泌? 近年来发展的一些新技术, 如单细胞多组学以及基因编辑技术可为回答这些问题提供很好的帮助。

对花粉管导向的研究可以为后续分子育种克服远缘杂交障碍以及揭示被子植物中重要的生命过程建立理论基础, 而植物防止多管入囊的机制是保证后代正常发育以及遗传信息稳定的重要手段。目前的研究多集中于模式植物拟南芥, 以及雌配子体裸露的蓝猪耳中, 如何将当前的研究应用到农作物生产中是未来需要考虑的重要问题。远缘杂交的障碍之一是父方的花粉管生长受阻, 不能进入母本的胚囊。但已有研究表明, 在蓝猪耳中表达拟南芥的花粉管吸引分子 AtLURE1.2 可以吸引拟南芥的花粉管进入胚囊^[32], 显示在花粉管导向分子机制这一基础研究中取得的成果可以用于打破种间杂交障碍。通过实验可以探究在其他十字花科植物, 如白菜 (*Brassica rapa* var. *glabra* Regel)、油菜 (*Brassica rapa* var. *oleifera* DC.)、甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)

中是否也存在类似机制, 如果存在则可以利用其提高远缘杂交的成功率。

参考文献:

- [1] Wei DH, Liu MJ, Chen H, Zheng Y, Liu YX, *et al.* INDUCER OF CBF EXPRESSION 1 is a male fertility regulator impacting anther dehydration in *Arabidopsis*[J]. *PLoS Genet*, 2018, 14 (10): e1007695.
- [2] Shi DQ, Yang WC. Pollen germination and tube growth [M] // Pua EC, Davey MR, eds. *Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives: Vol 1*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010: 245-282.
- [3] Edlund AF, Swanson R, Preuss D. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination[J]. *Plant Cell*, 2004, 16 (S1): S84-S97.
- [4] Jiang LX, Yang SL, Xie LF, Pua CS, Zhang XQ, *et al.* VANGUARD1 encodes a pectin methylesterase that enhances pollen tube growth in the arabidopsis style and transmitting tract[J]. *Plant Cell*, 2005, 17 (2): 584-596.
- [5] Higashiyama T, Kuroiwa H, Kuroiwa T. Pollen-tube guidance: beacons from the female gametophyte[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6 (1): 36-41.
- [6] Faure JE. Double fertilization in flowering plants: discovery, study methods and mechanisms[J]. *C R Acad Sci III*, 2001, 324 (6): 551-558.
- [7] Dresselhaus T. Cell-cell communication during double fertilization[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9 (1): 41-47.
- [8] Kim MJ, Jeon BW, Oh E, Seo PJ, Kim J. Peptide signaling during plant reproduction[J]. *Trends Plant Sci*, 2021, 26 (8): 822-835.
- [9] Zhang JH, Yue L, Wu XL, Liu H, Wang W. Function of small peptides during male-female crosstalk in plants[J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 671196.
- [10] Ray SM, Park SS, Ray A. Pollen tube guidance by the female gametophyte[J]. *Development*, 1997, 124 (12): 2489-2498.
- [11] Schiefthaler U, Balasubramanian S, Sieber P, Chevalier D, Wisman E, Schneitz K. Molecular analysis of NOZZLE, a gene involved in pattern formation and early sporogenesis during sex organ development in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (20): 11664-11669.
- [12] Yang WC, Ye D, Xu J, Sundaresan V. The SPOROXYTE-LESS gene of *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein[J]. *Genes Dev*, 1999, 13 (16): 2108-2117.
- [13] Wang HZ, Boavida LC, Ron M, McCormick S. Truncation of a protein disulfide isomerase, PDIL2-1, delays embryo sac maturation and disrupts pollen tube guidance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Cell*, 2008, 20 (12): 3300-3311.
- [14] Kulichová K, Kumar V, Steinbachová L, Klodová B, Timofejeva L, *et al.* PRP8A and PRP8B spliceosome subunits act coordinately to control pollen tube attraction in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Development*, 2020, 147 (11): dev186742.
- [15] Guan YF, Lu JP, Xu J, McClure B, Zhang SQ. Two mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, are required for funicular guidance of pollen tubes in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2014, 165 (2): 528-533.
- [16] Lu YX, Chanroj S, Zulkifli L, Johnson MA, Uozumi N, *et al.* Pollen tubes lacking a pair of K⁺ transporters fail to target ovules in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2011, 23 (1): 81-93.
- [17] Jensen WA, Fisher DB. Cotton embryogenesis: the entrance and discharge of the pollen tube in the embryo sac[J]. *Planta*, 1967, 78 (2): 158-183.
- [18] Tian HQ, Russell SD. Calcium distribution in fertilized and unfertilized ovules and embryo sacs of *Nicotiana tabacum* L.[J]. *Planta*, 1997, 202 (1): 93-105.
- [19] Iwano M, Ngo QA, Entani T, Shiba H, Nagai T, *et al.* Cytoplasmic Ca²⁺ changes dynamically during the interaction of the pollen tube with synergid cells[J]. *Development*, 2012, 139 (22): 4202-4209.
- [20] Tian HQ, Zhu H, Russell SD. Calcium changes in ovules and embryo sacs of *Plumbago zeylanica* L.[J]. *Sex Plant Reprod*, 2000, 13 (1): 11-20.
- [21] Hamamura Y, Nishimaki M, Takeuchi H, Geitmann A, Kurihara D, Higashiyama T. Live imaging of calcium spikes during double fertilization in *Arabidopsis*[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4722.
- [22] Christensen CA, Gorsich SW, Brown RH, Jones LG, Brown J, *et al.* Mitochondrial GFA2 is required for synergid cell death in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2002, 14 (9): 2215-2232.
- [23] Maruyama D, Völz R, Takeuchi H, Mori T, Igawa T, *et al.* Rapid elimination of the persistent synergid through a cell fusion mechanism[J]. *Cell*, 2015, 161 (4): 907-918.
- [24] Rotman N, Rozier F, Boavida L, Dumas C, Berger F, Faure JE. Female control of male gamete delivery during fertilization in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Curr Biol*, 2003, 13 (5): 432-436.
- [25] Kasahara RD, Portereiko MF, Sandaklie-Nikolova L, Rabiger DS, Drews GN. MYB98 is required for pollen tube guidance and synergid cell differentiation in

- Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2005, 17 (11): 2981–2992.
- [26] Erdelská O, Vidovencová Z, Erdelský K. Cleavage polyembryos as explants for plant regeneration in wheat[J]. *Plant Cell Rep*, 1996, 15 (5): 342–344.
- [27] Higashiyama T, Kuroiwa H, Kawano S, Kuroiwa T. Guidance in vitro of the pollen tube to the naked embryo sac of *Torenia fournieri*[J]. *Plant Cell*, 1998, 10 (12): 2019–2031.
- [28] Higashiyama T, Inatsugi R, Sakamoto S, Sasaki N, Mori T, et al. Species preferentiality of the pollen tube attractant derived from the synergid cell of *Torenia fournieri*[J]. *Plant Physiol*, 2006, 142 (2): 481–491.
- [29] Higashiyama T, Kuroiwa H, Kawano S, Kuroiwa T. Explosive discharge of pollen tube contents in *Torenia fournieri*[J]. *Plant Physiol*, 2000, 122 (1): 11–14.
- [30] Higashiyama T, Yabe S, Sasaki N, Nishimura Y, Miyagishima SY, et al. Pollen tube attraction by the synergid cell[J]. *Science*, 2001, 293 (5534): 1480–1483.
- [31] Okuda S, Tsutsui H, Shiina K, Sprunck S, Takeuchi H, et al. Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells[J]. *Nature*, 2009, 458 (7236): 357–361.
- [32] Takeuchi H, Higashiyama T. A species-specific cluster of defensin-like genes encodes diffusible pollen tube attractants in *Arabidopsis*[J]. *PLoS Biol*, 2012, 10 (12): e1001449.
- [33] Zhong S, Liu ML, Wang ZJ, Huang QP, Hou SY, et al. Cysteine-rich peptides promote interspecific genetic isolation in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 2019, 364 (6443): eaau9564.
- [34] Mizukami AG, Inatsugi R, Jiao J, Kotake T, Kuwata K, et al. The AMOR arabinogalactan sugar chain induces pollen-tube competency to respond to ovular guidance[J]. *Curr Biol*, 2016, 26 (8): 1091–1097.
- [35] Takeuchi H, Higashiyama T. Tip-localized receptors control pollen tube growth and LURE sensing in *Arabidopsis*[J]. *Nature*, 2016, 531 (7593): 245–248.
- [36] Wang T, Liang L, Xue Y, Jia PF, Chen W, et al. A receptor heteromer mediates the male perception of female attractants in plants[J]. *Nature*, 2016, 531 (7593): 241–244.
- [37] Liu JJ, Zhong S, Guo XY, Hao LH, Wei XL, et al. Membrane-bound RLCKs LIP1 and LIP2 are essential male factors controlling male-female attraction in *Arabidopsis*[J]. *Curr Biol*, 2013, 23 (11): 993–998.
- [38] Gao QF, Gu LL, Wang HQ, Fei CF, Fang X, et al. Cyclic nucleotide-gated channel 18 is an essential Ca^{2+} channel in pollen tube tips for pollen tube guidance to ovules in *Arabidopsis*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113 (11): 3096–3101.
- [39] Meng JG, Liang L, Jia PF, Wang YC, Li HJ, Yang WC. Integration of ovular signals and exocytosis of a Ca^{2+} channel by MLOs in pollen tube guidance[J]. *Nat Plants*, 2020, 6 (2): 143–153.
- [40] Márton ML, Cordts S, Broadhvest J, Dresselhaus T. Micropylar pollen tube guidance by egg apparatus 1 of maize[J]. *Science*, 2005, 307 (5709): 573–576.
- [41] Márton ML, Fastner A, Uebler S, Dresselhaus T. Overcoming hybridization barriers by the secretion of the maize pollen tube attractant ZmEA1 from *Arabidopsis* ovules[J]. *Curr Biol*, 2012, 22 (13): 1194–1198.
- [42] Chen YH, Li HJ, Shi DQ, Yuan L, Liu J, et al. The central cell plays a critical role in pollen tube guidance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2007, 19 (11): 3563–3577.
- [43] Li HJ, Zhu SS, Zhang MX, Wang T, Liang L, et al. *Arabidopsis* *CBP1* is a novel regulator of transcription initiation in central cell-mediated pollen tube guidance[J]. *Plant Cell*, 2015, 27 (10): 2880–2893.
- [44] Huck N, Moore JM, Federer M, Grossniklaus U. The *Arabidopsis* mutant *feronia* disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception[J]. *Development*, 2003, 130 (10): 2149–2159.
- [45] Escobar-Restrepo JM, Huck N, Kessler S, Gagliardini V, Gheyselinck J, et al. The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception[J]. *Science*, 2007, 317 (5838): 656–660.
- [46] Kessler SA, Lindner H, Jones DS, Grossniklaus U. Functional analysis of related CrRLK1L receptor-like kinases in pollen tube reception[J]. *EMBO Rep*, 2015, 16 (1): 107–115.
- [47] Zhong S, Li L, Wang ZJ, Ge ZX, Li QY, et al. RALF peptide signaling controls the polytubey block in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 2022, 375 (6578): 290–296.
- [48] Duan QH, Liu MCJ, Kita D, Jordan SS, Yeh FLJ, et al. FERONIA controls pectin- and nitric oxide-mediated male-female interaction[J]. *Nature*, 2020, 579 (7800): 561–566.
- [49] Kasahara RD, Maruyama D, Hamamura Y, Sakakibara T, Twell D, et al. Fertilization recovery after defective sperm cell release in *Arabidopsis*[J]. *Curr Biol*, 2012, 22 (12): 1084–1089.
- [50] Beale KM, Leydon AR, Johnson MA. Gamete fusion is

- required to block multiple pollen tubes from entering an *Arabidopsis* ovule[J]. *Curr Biol*, 2012, 22 (12): 1090–1094.
- [51] Mori T, Kuroiwa H, Higashiyama T, Kuroiwa T. GENERAL CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization[J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8 (1): 64–71.
- [52] Maruyama D, Hamamura Y, Takeuchi H, Susaki D, Nishimaki M, *et al*. Independent control by each female gamete prevents the attraction of multiple pollen tubes[J]. *Dev Cell*, 2013, 25 (3): 317–323.
- [53] Aw SJ, Hamamura Y, Chen Z, Schnittger A, Berger F. Sperm entry is sufficient to trigger division of the central cell but the paternal genome is required for endosperm development in *Arabidopsis*[J]. *Development*, 2010, 137 (16): 2683–2690.
- [54] Köhler C, Wolff P, Spillane C. Epigenetic mechanisms underlying genomic imprinting in plants[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2012, 63: 331–352.
- [55] Hennig L, Derkacheva M. Diversity of polycomb group complexes in plants: same rules, different players?[J]. *Trends Genet*, 2009, 25 (9): 414–423.
- [56] Chaudhury AM, Ming L, Miller C, Craig S, Dennis ES, Peacock WJ. Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94 (8): 4223–4228.
- [57] Ohad N, Yadegari R, Margossian L, Hannon M, Michaeli D, *et al*. Mutations in *FIE*, a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization[J]. *Plant Cell*, 1999, 11 (3): 407–415.
- [58] Yu XB, Zhang XC, Zhao P, Peng XB, Chen H, *et al*. Fertilized egg cells secrete endopeptidases to avoid polytubey[J]. *Nature*, 2021, 592 (7854): 433–437.
- [59] Dai XR, Gao XQ, Chen GH, Tang LL, Wang H, Zhang XS. ABNORMAL POLLEN TUBE GUIDANCE1, an endoplasmic reticulum-localized mannosyltransferase homolog of GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL10 in yeast and PHOSPHATIDYLINOSITOL GLYCAN ANCHOR BIOSYNTHESIS B in human, is required for *Arabidopsis* pollen tube micropylar guidance and embryo development[J]. *Plant Physiol*, 2014, 165 (4): 1544–1556.

(责任编辑: 周媛)