

DOI: 10.13376/j.cblls/2017041

文章编号: 1004-0374(2017)03-0310-09



秦源, 福建农林大学教授, 博士生导师, 植物学学科带头人, “国家优秀青年科学基金”获得者, 福建省“闽江学者”特聘教授、福建农林大学“金山学者”特聘教授、“福建省高等学校新世纪优秀人才”、福建青年五四奖章获得者。主要研究方向为植物雌配子体发育和雌雄蕊相互作用的分子机制。研究组近年来主要研究工作包括: (1) 染色质重塑因子 ARP6 调控植物雌性减数分裂; (2) 利用比较转录组分析揭示调控植物大孢子发生的新基因; (3) 雌雄蕊相互作用过程中雌蕊分泌的信号分子和雄蕊的转录应答。研究结果在 *Plant Cell*、*PLoS Genetics* 等刊物上发表。

植物雌配子体发育的分子调控

王路路, 秦 源*

(福建农林大学生命科学学院基因组与生物技术研究中心, 福建省海峡植物应用系统生物学重点实验室, 福州 350002)

摘 要: 植物雌配子体发育是一个复杂而有序的生物学过程, 这个过程包括大孢子发生和雌配子体发生两个连续的阶段, 涉及许多重要的生物学事件和复杂的调控过程。近年来, 分子生物学研究迅速发展, 植物雌配子体发育研究取得了重要进展。现主要对近年来雌配子体发育中关键调控事件的研究进展进行归纳和总结。

关键词: 雌配子体发育; 大孢子发生; 雌配子体发生; 表观遗传调控; 植物激素

中图分类号: Q944.4 **文献标志码:** A

Molecular control of female gametophyte development in flowering plants

WANG Lu-Lu, QIN Yuan *

(Fujian Provincial Key Laboratory of Haixia Applied Plant System Biology, Center for Genomics and Biotechnology, College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Female gametophyte development is a complicated and ordered biological process. It can be divided into two successive processes, namely, megasporogenesis and megagametogenesis. It contains plenty of important events and complicated processes that are well controlled. Recently, the research of molecular biology develops efficiently, leading to important advances in plant female gametophyte development. This article summarized recent findings in the molecular control of female gametophyte development in flowering plants.

Key words: female gametophyte development; megasporogenesis; megagametogenesis; epigenetic regulation; phytohormone

雌配子体发育是植物有性生殖的前提, 是成熟雌配子体的形成、完成世代交替所必需的生命活动。

在动物中, 生殖细胞前体在细胞减数分裂后立刻分化成生殖细胞, 而植物在形成生殖细胞前则必须要

收稿日期: 2016-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31522009, 31470284, U1605212)

*通信作者: E-mail: yuanqin@fafu.edu.cn

经历配子体的发育阶段, 减数分裂产物需经过有丝分裂才能分化发育形成生殖细胞^[1]。高等植物雌配子体发育一般包括大孢子发生和雌配子体发生两个阶段(图1)。大孢子发生一般是从胚珠原基顶端的1个亚表皮细胞分化形成大孢子母细胞开始的, 该细胞经过一次减数分裂形成4个单倍体大孢子, 随着发育进行, 处在珠孔端的3个大孢子退化, 仅剩合点端的一个大孢子即功能大孢子幸存并参与雌配子体发生; 雌配子体发生是从功能大孢子的形成开始, 其经过三次连续核有丝分裂形成合胞体, 再经过细胞化, 最终形成“七胞八核”的雌配子体(也称之为胚囊)的过程。

植物的雌配子体通常由4类细胞组成: 卵细胞、助细胞、中央细胞和反足细胞。在拟南芥等一些模式植物中, 反足细胞在受精前已经退化, 只留下由中央细胞、助细胞和卵细胞构成的雌性生殖单位(图1)。在有性生殖过程中, 卵细胞和中央细胞分别与1个精细胞融合形成受精卵(合子)和受精极核完成双受精过程, 发育成为新一代的孢子体。植物的雌配子体不仅为植物提供了受精的场所, 也在植物生殖的诸多方面发挥着重要调控作用, 如助细胞分泌信号引导花粉管向珠孔生长, 帮助植物完成受精作用; 当花粉管进入雌配子体后, 雌配子体细胞(主要是助细胞)又分泌一种因子, 促使花粉管停止生长并释放精细胞, 以及促进精-卵及精-中央细胞的融合和受精后合子的激活等等^[2-4]; 在受精作用完成以后, 雌配子体还在种子发育的母本控制上发挥着关键作用^[5-6]。因此, 对植物雌配子体发育的研究有助于加深对雌配子体发育和其他有性生殖调控机理的认识, 也可为农作物新品种的遗传改良和选育提供重要参考依据。

此外, 研究大孢子发生和雌配子体发生过程也是研究细胞分化发育遗传调控机制的优良体系, 在这两个发育过程中, 涉及许多重要的生物学调控过程, 如体细胞与生殖细胞互作、表观遗传的调控、植物激素的调控等等。近几年通过研究大孢子发生和雌配子体发育过程来研究细胞分化发育的遗传调控机制取得了众多进展, 本文主要介绍近些年来高等植物雌配子发育调控领域的进展。

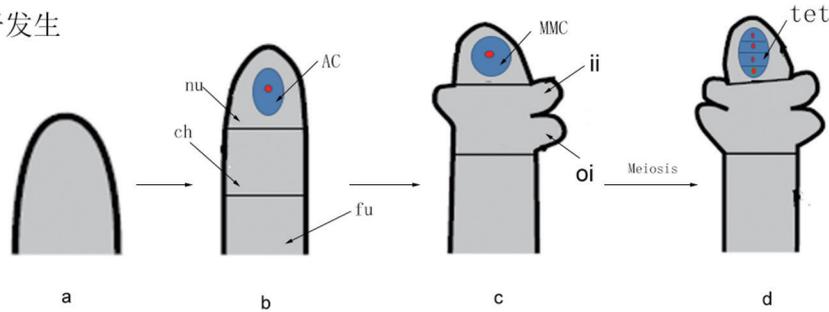
1 体细胞向生殖细胞的转变

被子植物的生殖细胞(单倍体)是由一个被叫作原细胞的体细胞(二倍体)经过分化发育而来的。通常植物雌配子体的产生都起始于珠心组织顶

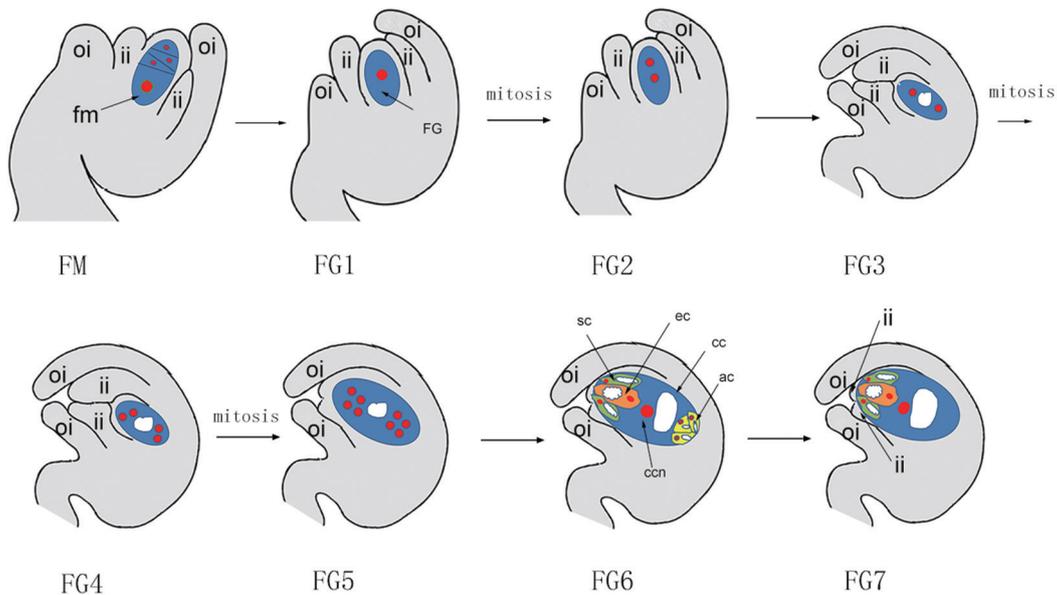
端的一个亚表皮层(L2层)细胞的特化, 形成的雌配子体前体细胞再经历减数分裂、有丝分裂和细胞化, 最终形成生殖细胞、卵细胞和中央细胞^[7]; 但是胚珠顶端的L2层细胞属于体细胞, 它是怎样转变成生殖细胞的, 在生殖细胞形成过程中细胞命运是如何确定的, 它们的分子机制是怎样的以及调控机理是什么, 有哪些基因参与调控这些生物学过程, 这些问题都有待解答。

近些年, 随着研究技术的进步和方法的创新, 人们对于植物雌配子体发育调控的研究不断深入。1999年, Yang等^[8]和 Schiefthaler等^[9]研究表明, 拟南芥 *SPOROCTELESS (SPL)/NOZZLE (NZL)* 基因参与配子体发育起始的调控作用, 文章指出在拟南芥 *spl* 突变体中, 雄性和雌性生殖细胞都不能形成, 但是 Yang 等根据细胞形态推测, *spl* 突变体的胚珠中胞原细胞是可以形成的, 因此, 推断 *SPL* 基因参与调控胞原细胞到大孢子母细胞的转变过程。2004年, Ito等^[10]构建了 *SPL* 的过表达载体, 他们发现在 *SPL* 的过表达植株中, 花瓣体细胞转变成了生殖细胞, 并最终分化形成花粉。另外, 他们还发现 *SPL* 的激活是通过 *AGAMOUS (AG)* 与其3'的 *CARbox* 结合来实现的, 从而调节体细胞向生殖细胞的转变, 这表明 *SPL* 是调控体细胞向生殖细胞转变的关键基因。虽然这些研究都表明 *SPL* 是调控雌配子发育过程的关键基因, 但是其具体的作用方式并不清楚。直到2014年 Wei等^[11]发现, *SPL* 作为一个转录阻遏物发挥作用, 它通过其C端的 *EAR* 结构域招募已知的转录因子辅阻遏物 *TPL/TPRs*, 并通过其N端直接与 *CIN* 类似的 *TCP* 转录因子结合来抑制其表达; 在研究中, 他们还发现 *TPL* 和 *SPL* 具有相似的表达模式, 而且 *tpl-1* 的突变体植株胚珠的表型和 *spl* 一致, 当 *TCPs* 的表达被抑制时, 其胚珠发育和功能获得性突变体 *spl-D* 的表型相似。*WUSCHEL (WUS)* 是调控干细胞分化的一类转录因子家族基因, 最初在根尖分生组织中被发现。2000年, Brand等^[12]揭示 *WUS* 通过与 *CLV (CLAVATA)* 形成一个反馈调节环来调控干细胞的自我更新, 维持茎尖的顶端优势; 2011年, Lieber等^[13]发现, 如果 *WUS* 位于 *SPL* 下游, *WUS* 基因发生突变, 其大孢子发生也会出现问题; 进一步的研究揭示 *WUS* 基因在珠心组织也有表达, 并且间接激活 *WINDHOSE1 (WIH1)* 和 *WINDHOSE2 (WIH2)* 两个基因的表达, 其编码产生的 *WH1* 和 *WH2* 两个小肽与四次跨膜蛋白 *TRN2 (TETRASPANIN-TYPE PROTEIN 2)* 共同调控大孢

A 大孢子发生



B 雌配子体发生



A: 大孢子发生过程。a, 胚珠原基顶端隆起, 形成指状结构; b, 孢原细胞时期, 顶端珠心组织中的一个细胞特化形成孢原细胞; c, 孢原细胞经过细胞命运转变, 发育成为大孢子母细胞, 同时胚珠的内外珠被开始发育; d, 四分体时期, 大孢子母细胞经历减数分裂, 形成四个单倍体的大孢子。

B: 雌配子体发生过程。FM, 功能大孢子时期, 大孢子母细胞经过减数分裂形成的四个单倍体大孢子, 经过细胞命运的决定, 只有处在合点端的一个大孢子能够继续发育, 成为功能大孢子; FG1, 单核雌配子体时期, 此时胚囊里只有一个细胞核; FG2, 雌配子体经历一次细胞核有丝分裂, 形成一个二核的胚囊; FG3, 随着发育的进行, 胚囊内的两个核逐渐向两极移动, 被中央液泡所分离; FG4, 胚囊中的两个核在胚囊的两极分别同时进行第二次有丝分裂, 形成四核胚囊; FG5, 第三次核有丝分裂发生, 最终在胚囊中形成八个细胞核, 与此同时细胞化开始进行, 并且在胚囊的两极各有一个细胞核向中央移动; FG6, 移向中央的两个细胞核发生融合形成中央极核, 细胞化完成, 胚囊中形成四种类型的细胞, 包括一个卵细胞、一个中央细胞、二个助细胞、三个反足细胞; FG7, 处于合点端的三个助细胞退化, 胚囊中只剩下一个卵细胞、一个中央细胞和两个助细胞。备注: ac: 反足细胞; cc: 中央细胞; ccn: 中央极核; ch: 合点端; ec: 卵细胞; fm: 功能大孢子; fu: 珠柄; ii: 内珠被; meiosis: 减数分裂; mitosis: 有丝分裂; nu: 珠心; oi: 外珠被; tet: 四分体; sc: 助细胞; AC: 孢原细胞; FG: 雌配子体; MMC: 大孢子母细胞。

图1 拟南芥雌配子体发育过程示意图

子母细胞的形成和大孢子的发生。

对于特定的物种来说, 其孢原细胞和大孢子母细胞发育的模式是固定的, 它们的数目也是既定的, 那么在这个过程中又存在怎么样的调控作用呢? 生物体怎么控制大孢子母细胞的数量呢? 1996年, Sheridan等^[14]发现玉米的 *MULTIPLEARCHESPORIAL*

CELLS (MAC1) 基因发生突变, 会导致玉米胚珠的多个 L2 层体细胞特化成为孢原细胞, 并且这些额外的多个孢原细胞又能够经过正常分化形成减数分裂母细胞, 最后完成减数分裂, 结果导致每个胚珠中形成多个胚囊。MAC1 是隐性突变基因, 它通过调控一个抑制相邻原基细胞转变为孢原细胞的信号

的产生来调控孢原细胞的分化, 从而控制生物体中生殖细胞的数目。2008年, Ravi等^[15]发现, 如果调控染色体减数分裂的基因 *DYAD/SWITCH (SWI1)* 突变, 将会导致拟南芥大孢子细胞不进行减数分裂, 并且受精后产生三倍体的种子。*RETINOBLASTOMA RELATED (RBR)* 基因是一个细胞周期调控因子, 它通过抑制转录因子 E2F 来调控细胞周期, 在拟南芥的 *rbr* 突变体中, 功能大孢子发生多次有丝分裂 (多于3次), 导致含有多个卵细胞的异常雌配子体形成^[16]。另外一些研究表明, 细胞中普遍存在蛋白激酶信号转导途径可能参与植物大孢子母细胞数目的调控。2002年, Zhao等^[17]与 Canales 和 Anuj^[18]发现拟南芥的 *EXCESS MI-CROSPOROCTE1 (EMS1)/EXCESS SPOROCTE1 (EXS1)* 基因突变会影响雄性生殖细胞的数目。2003年, Nonomura^[19]在水稻中发现了控制水稻大孢母细胞数目的基因 *MULTIPLE SPOROCTE1 (MSP1)*, 在 *mSP1* 突变体中发现了大孢子母细胞数目最多可达到15个, 同时, 其小孢子数目也明显增多。通过分析 *MSP1* 的表达模式, 他们还发现 *MSP1* 基因只在孢原细胞周围的体细胞中表达, 而在孢原细胞和大孢子母细胞中则不表达。因此, 确定 *MSP1* 的作用是限制孢原细胞周围的体细胞, 使其不能分化成生殖细胞。

大孢子母细胞在经过减数分裂后形成功能大孢子, 紧接着功能大孢子进行3次连续的有丝分裂, 而后经历细胞化过程, 最终形成4种类型的7个细胞。最近有研究表明, 这7个细胞在胚囊中的命运是由有丝分裂过程中细胞核的位置决定的, 卵细胞和助细胞的核一般处在胚珠的珠孔端, 反足细胞的核则处在合点端^[20]。然而, 在拟南芥的 *eostre*、*lachesis*、*clotho*、*atropos* 突变体中, 可以观察到助细胞的核频繁出现在别处, 卵细胞的核也经常异位^[21-23]; 在 *lachesis*、*clotho*、*atropos* 突变体的胚囊中, 所有的细胞都具有了分化成为生殖细胞的能力, 原来的中央细胞分化成为卵细胞, 反足细胞分化成为中央细胞, 而且不仅只在细胞形态上发生转变, 细胞核也具有了新细胞的功能。这些研究表明, 在雌配子发育的过程中存在一种内源的信号机制调控这些细胞的分化以及最终的生殖细胞数目。

2 表观遗传在雌配子体发育过程的调控作用

过去十几年里, 人们对于表观遗传学的研究逐渐深入。在表观遗传机制中, DNA 序列不发生变化, 但基因表达却发生了可遗传的改变, 它的研究对象

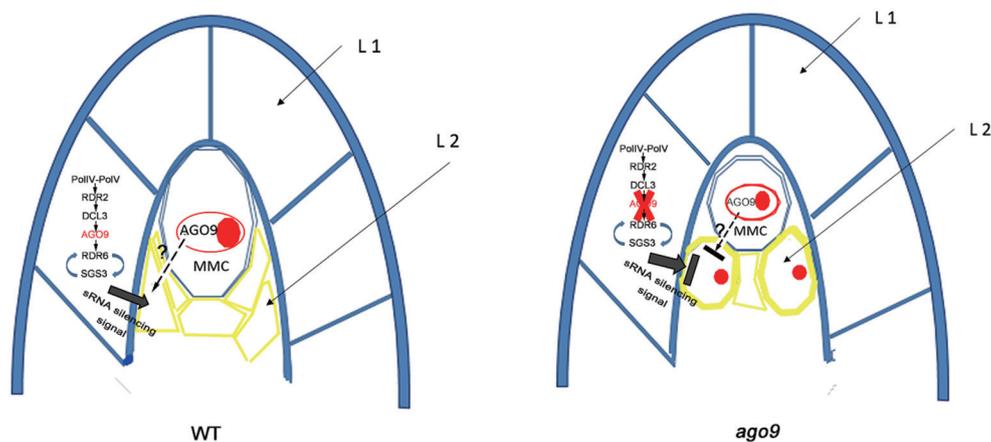
主要有: DNA 甲基化、RNA 干扰、组蛋白修饰和染色质重塑等。2010年, Garcia-Aguilar 等^[24]和 Pillot 等^[25]发现植物雌配子的发育过程不仅受到基因的遗传调控, 也同样受表观遗传的调控。

在植物里, 基因新获得的表观遗传状态很容易传递到下一代中, 但是在动物中则不会, 只有极少数基因在获得表观遗传状态后能够传递到子代中去^[26-28]。植物中表观遗传作用大多依靠胞嘧啶甲基化来维持, 通过减数分裂和有丝分裂过程传递到配子体中去, 尤其是 CpG 的甲基化作用 (mCpG), 它作为一个中心角色指导其他的甲基化作用, 如组蛋白 H3 甲基化、非 CpG DNA 甲基化和 RNA 依赖的 DNA 甲基化等。植物 DNA 的甲基化作用除了上述的 mCpG, 还有 mCpNpG 和 mCpNpN 等都可以作为甲基化的靶标。DNA 甲基化作用在植物的配子体阶段会产生什么样的作用呢? 2010年, Garcia-Aguilar 等^[24]发现, 在玉米中如果下调表达拟南芥 DNA 甲基转移酶 (DRM2) 的同源基因, 玉米胚囊中就会出现多个大孢子母细胞。最近的一些研究表明, 在孢原细胞的分化调控中表观遗传机制也发挥了重要作用, 它通过抑制孢子母细胞周围的细胞, 使其不能分化发育成孢子细胞, 从而控制胚囊里面雌配子体的数目。在拟南芥里, 胚囊中最终形成4种类型的细胞, 那么在细胞分化时它们的命运是怎么决定的? 有人推测在合胞体发育阶段涉及表观遗传调控, 2007年, Evans^[29]以及2009年 Purugganan 和 Fuller 等^[30]研究表明, 雌配子体的命运不仅受到细胞位置的影响, 也受到表观遗传的调控。Garcia-Aguila 和 Pillot 在2010年发现, 染色体结构的变化会影响雌配子体发育进程。在生物体的发育和接受细胞外信号时, 染色体的结构是动态变化的, 这种动态的变化过程是通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰和 ATP 依赖的酶等来调控的。2005年, Huanca-Mamani 等^[31]发现, ATP 依赖的染色质重塑因子 SWI2/SNF2 家族基因 CHR11 参与了拟南芥雌配子体的发育过程, 该基因发生突变导致拟南芥的雌配子体发育停滞在不同的发育阶段。2014年, 本课题组研究发现, 拟南芥 ATP 依赖的染色质重塑复合物 SWR1 家族的成员 ACTIN-RELATED PROTEIN6 (ARP6) 发生突变, 雌配子体发育过程中的减数分裂异常, 同源染色体之间无法配对重组, 导致功能大孢子无法形成、胚囊缺失^[32]。这些研究结果表明, 染色质重塑也在植物雌配子体发育过程中发挥了重要作用。

在植物中主要存在两种类型的 sRNA, 一种是

miRNAs, 由不完全互补的长转录本折叠形成双链 RNAs 前体加工而成; 另一种是 siRNAs, 它是由长的单链 RNA 前体经过加工而产生的。然而, 无论是 miRNA, 还是 siRNA 的产生都依靠一类叫作 DICER 或者 DICER-LIKE (DCL) 的 RNase 酶^[33-34]。产生的 sRNA 通过一个保守的 PAZ 结构域与 ARGONAUTE (AGO) 家族蛋白结合, 通过碱基互补配对与它们的目的基因结合, 再利用 AGO 蛋白的作用, 剪切内源的 mRNA 实现转录或转录后沉默。2010 年, Mallory 和 Vaucheret^[35] 研究发现, AGO 蛋白介导的 RNA 沉默机制涉及到转录本的剪切、转录后抑制和基因组区域的染色体修饰。最近的研究表明, 在胚珠发育的大孢子形成过程中存在一种新的 sRNA 介导的调控过程, 拟南芥中 ARGONAUTE9 (AGO9) 蛋白通过一个非细胞自主沉默机制来限制雌配子体前体细胞 (即大孢子母细胞) 的特化 (图 2)。2010 年, Olmedo-Monfil^[36] 发现在胚珠孢子体细胞和配子体细胞中都有 *AGO9* 基因表达的 mRNA, 但 AGO9 蛋白只在胚珠的 L1 层细胞的细胞质中被检测到, *ago9* 突变体胚珠中会有多个大孢子母细胞形成 (图 2)。2015 年, Rodríguez-Leal 等^[37] 研究发现, 自然变异会影响表观遗传对雌配子发育的调控, 但是这个过程有 *AGO9* 和 *RDR6* 基因的参与, 他们发现不同生态型拟南芥胚珠的大孢子母细胞中 *AGO9* 和 *RDR6* 的表达有一定差异, 这可能是不同生态型中表观遗传对大孢子母细胞特化的调控。有意思的是, 他们还检测到 AGO9 蛋白在大孢子母细胞的细

胞核中有短时间的富集 (图 2), 这对大孢子母细胞的发生有何调控作用还有待揭示。2011 年, Singh 等^[38] 在玉米中发现了一个与拟南芥 *AGO9* 类似的基因 *AGO104*, 它的作用方式与 *AGO9* 相似, 在玉米胚珠的 L1 层细胞中表达, 抑制孢子体的命运转变。*AGO9* 与 *AGO104* 的表达模式暗示, 它们是通过调节一个沉默信号机制从胚珠的 L1 层细胞传递到 L2 层细胞, 以非细胞自主的方式调控大孢子母细胞形成的数目。2010 年, Molnar 等^[39] 和 Dunoyer 等^[40] 研究发现, 21~24 nt 的双链 sRNA 可以在细胞间进行传递并完成 RNA 干扰过程。2010 年, Law 和 Jacobsen 等^[41] 通过分子生物学和系统发育生物学的证据发现, AGO 家族中的 AGO4、AGO6 和 AGO9 参与 RNA 介导的 DNA 甲基化 (RdDM) 和异染色质沉默过程, 这些蛋白与 sRNA 的结合是依靠它们特殊的表达模式, 而不是依靠 sRNA 的长度和其 5' 端的核苷酸序列^[42]。2015 年, Zhai 等^[43] 研究显示, 在玉米雄配子体发育过程中, 有两种不同大小的 phasiRNAs (phased small-interfering RNAs) 参与, 其中减数分裂前的玉米花药中富集 21-nt-phasiRNAs, 而减数分裂后则由 24-nt-phasiRNAs 起主导作用。这与动物系统中 piRNAs 在雄配子发育中的功能互相印证^[44], 但 phasiRNAs 在雌配子体发育中的功能还不清楚。在雌配子体形成过程中 sRNA 参与的沉默机制仍然存在许多悬而未决的问题, 更加全面的分子和遗传学证据需要研究者们进一步探索。



A: 野生型(WT)拟南芥中, 由于AGO9蛋白正常发挥作用, sRNA信号在胚珠L1和L2层细胞中传递, 抑制胚珠L2层中与大孢子母细胞(MMC)相邻的体细胞转变为生殖细胞。MMC细胞核中表达的AGO9蛋白是否参与抑制相邻体细胞转变为生殖细胞还未确定。B: *ago9*突变体中, sRNA信号不能在细胞间正常传递, 导致多个大孢子母细胞形成。

图2 拟南芥AGO9依赖的sRNA信号非细胞自主地抑制多个大孢子母细胞形成

3 植物激素在雌配子体发育中的调控作用

植物激素是植物自身合成的能调节自身细胞分裂、分化与伸长、组织与器官分化、开花与结实、成熟与衰老、休眠与萌发等一系列生命过程的一类有机物质, 最常见的植物激素有: 生长素、赤霉素、脱落酸、乙烯、细胞分裂素和油菜素内酯等。虽然它们都是一些简单的有机小分子, 但是在植物中的生理作用却相当重要, 不仅可以在植物的营养生殖中发挥作用, 在植物配子体的发育过程中也发挥了重要的作用。

在拟南芥等一些开花植物中, 雌配子体的发育最初形成一个七胞八核的胚囊, 在胚囊中, 这 7 个细胞的分布是高度极化的, 卵细胞和助细胞分布在胚囊的珠孔端, 中央细胞和反足细胞分布在胚囊的合点端^[45], 最终只有卵细胞和中央细胞与精子结合, 完成双受精过程。在这些细胞的分化和细胞命运的决定过程中, 它们的位置分布也占据了一定原因。2007 年, Pagnussat 等^[22]发现, 在拟南芥 *eostre* 突变体中, 一个助细胞变成了卵细胞, 其胚囊细胞核迁移的过程也出现了问题。2007 年, Evans^[29]发现, 玉米的 *ig* 突变, 其胚囊中配子体的数目也发生了变化。植物生长素调控植物细胞的分裂、分化与伸长, 生长素的局部积累为植物多细胞发展过程提供了位置信息, 如根尖或者茎尖分生组织顶端、器官分化、维管束的分化区域等都有生长素的大量累积^[46-49]。为了确定雌配子体发生过程中生长素是否作为调控细胞分化的位置决定因素, 1999 年, Sabatini 等^[49]和 1997 年, Ulmasov 等^[50]分别构建了一个生长素分布报告基因的载体 *DR5::GFP* 和 *DR5::GUS*, 他们发现生长素信号可以追溯到孢子发生时期, 最初生长素只分布在珠心, 随着发育的进行, 生长素的信号不断增强, 在第三次核有丝分裂完成后生长素信号达到最强, 但是他们发现生长素在胚珠中只分布在珠孔端, 而在合点端则没有分布。随着雌配子体发育的进行, 细胞化结束之后生长素极性分布减弱, 到胚囊发育成熟时期, 所有胚囊细胞中都检测到生长素的存在。这些结果表明生长素在胚囊细胞中的分布是极度不均匀的, 暗示生长素在雌配子体细胞分化过程中发挥了一定作用。为了确定生长素在这个过程中发挥的作用, 2009 年, Pagnussat 等^[51]构建了一个干扰生长素应答因子基因表达的载体 *amiR-ARFa*, 结果发现在 *ARF* 下调表达的拟南芥植株中, 雌配子体发育过程受到影响, 其胚囊

中出现多个卵细胞, 这说明生长素对于卵细胞的分化有相当重要的作用。此外, 如果异位表达拟南芥的生长素生物合成基因 *YUCCA1*, 将导致胚囊珠孔端的雌配子体细胞分化受到影响^[51]。虽然多种研究结果证明了胚珠中生长素浓度梯度对雌配子体细胞分化的影响, 但是 2013 年, Lituiev 等^[52]研究显示在植物雌配子体内部检测不到明显的生长素浓度梯度, 暗示生长素对雌配子体发育的调控可能是一种间接的作用。

除了生长素在雌配子体的发育过程中发挥作用外, 其他的一些植物激素同样也参与了植物雌配子体的发育过程, 2002 年, Pischke 等^[53]发现, 拟南芥的细胞分裂素依赖 *CYTOKININ INDEPENDENT1 (CKI1)* 基因参与了雌配子体发育的调控, 在 *cki1* 突变体中, 雌配子发育到 FG4 时期时出现了问题, 处在合点端的两个核发生退化, 结果导致拟南芥的成熟雌配子体异常。2012 年, Bencivenga 等^[54]分析了细胞分裂素信号通路在拟南芥雌配子体发育过程中的作用, 他们通过构建 *IPT1pro:GUS*、*CRE1pro:GUS*、*AHK2pro:GUS* 和 *AHK3pro:GUS* 等细胞分裂素信号途径中的一些重要基因与报告基因的融合表达载体, 分析它们在胚珠发育中的表达情况, 结果发现这些基因在胚囊发育的不同时期具有时空表达特异性, 暗示细胞分裂素对植物雌配子体的发育有调控作用。2013 年, Cheng 等^[55]在细胞分裂素 *AHK* 受体的三突变体中观察到雌配子体发育的缺陷, 进一步证明了细胞分裂素对植物雌配子发育的调控。虽然其他植物激素, 如赤霉素、脱落酸等对于植物雌配子体发育的调控作用还未见报道, 但是已有研究表明赤霉素与油菜素内酯等在植物的雄配子体发育过程起到了一定的调控作用^[56-57]。相信在今后的研究中, 植物激素在雌配子体发育中更精确的调控模式和复杂的信号调控网络会不断被世人所揭晓。

4 结语与展望

雌配子体发育是植物有性生殖过程中的一个重要环节, 它的顺利进行是保证植物完成整个生命周期的前提。高等植物的卵细胞和中央细胞包裹在整个雌性生殖单位里面, 植物的双受精过程也是在雌性生殖单位里面完成的, 其中涉及到众多的生物学事件, 如花粉管导向、精细胞的释放、合子的形成和发育等, 因此, 对于植物雌配子体发育的研究不仅有助于对生殖细胞形成的了解, 也有助于对植物整个有性生殖过程的了解。

由于高等植物的雌配子体被深深包裹在胚珠中, 研究相对比较困难, 目前雌配子体发育研究进展相对于雄配子体发育研究还较缓慢。鉴于雌配子体发生过程的分子机制仍很不清楚, 可以继续采用正向遗传学大规模筛选的方法获得雌配子发生异常的突变体, 通过克隆突变体中的异常基因来揭示该基因在雌配子发生过程中发挥的关键作用^[58]。另一方面, 也可以利用反向遗传学的方法, 通过激光辅助显微切割、特异细胞荧光分选和测序等技术进行转录组分析, 获得大量的候选基因, 通过对候选基因的研究, 找到参与雌配子发生的重要基因。本课题组最近的研究证明该方法是行之有效的^[59]。

植物的雌配子发生是一个复杂而精细的过程, 涉及诸多基因的参与和调控。如何建立基因之间的联系, 构建信号调控网络, 深刻了解该过程的分子机理仍是一项十分严峻的挑战。另外, 高等植物的雌配子体发生存在多种模式, 虽然大部分高等植物都遵循寥属雌配子体发生的模式, 但是要全面认识雌配子体发生的分子机理, 研究其他类型的模式仍是必要的。而目前研究雌配子体发育的技术和体系尚不成熟, 这无异于增加了研究的难度。因此, 改进研究方法、完善研究体系、攻克技术难关、打破技术瓶颈是本领域亟待解决的关键问题。

[参 考 文 献]

- [1] Armenta-Medina A, Demesa-Arévalo E, Vielle-Calzada JP. Epigenetic control of cell specification during female gametogenesis. *Sex Plant Reprod*, 2011, 24: 137-47
- [2] Rotman N, Rozier F, Boavida L, et al. Female control of male gamete delivery during fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 2003, 13: 432-6
- [3] Rotman N, Gourgues M, Guitton AE, et al. A dialogue between the sirène pathway in synergids and the fertilization independent seed pathway in the central cell controls male gamete release during double fertilization in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2008, 1: 659-66
- [4] Miyazaki S, Murata T, Sakurai-Ozato N, et al. *ANXURI* and 2, sister genes to *FERONIA/SIRENE*, are male factors for coordinated fertilization. *Curr Biol*, 2009, 19: 1327-31
- [5] Evans MM, Kermicle JL. Interaction between maternal effect and zygotic effect mutations during maize seed development. *Genetics*, 2001, 159: 303-15
- [6] Grini PE, Jürgens G, Hülskamp M. Embryo and endosperm development is disrupted in the female gametophytic capulet mutants of *Arabidopsis*. *Genetics*, 2002, 162: 1911-25
- [7] 杨维才, 石东乔. 植物雌配子体发育研究进展. *植物学通报*, 2007, 24: 302-10
- [8] Yang WC, Ye D, Xu J, et al. The *SPOROCTELESS* gene of *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Genes Dev*, 1999, 13: 2108-17
- [9] Schiefthaler U, Balasubramanian S, Sieber P, et al. Molecular analysis of *NOZZLE*, a gene involved in pattern formation and early sporogenesis during sex organ development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 11664-9
- [10] Feng X, Zilberman D, Dickinson H. A conversation across generations: soma-germ cell crosstalk in plants. *Dev Cell*, 2013, 24: 215-25
- [11] Wei B, Zhang J, Pang C, et al. The molecular mechanism of *SPOROCTELESS/NOZZLE* in controlling *Arabidopsis* ovule development. *Cell Res*, 2014, 25: 121-34
- [12] Brand U, Fletcher JC, Hobe M, et al. Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. *Science*, 2000, 289: 617-9
- [13] Lieber D, Lora J, Schrempf S, et al. *Arabidopsis* *WIHI* and *WIH2* genes act in the transition from somatic to reproductive cell fate. *Curr Biol*, 2011, 21: 1009-17
- [14] Sheridan WF, Avalkina NA, Shamrov II, et al. The *mac1* gene: controlling the commitment to the meiotic pathway in maize. *Genetics*, 1996, 142: 1009-20
- [15] Xu W, Feng L, Wu Y, et al. Construction and photophysics study of supramolecular complexes composed of three-point binding fullerene-trispyridylporphyrin dyads and zinc porphyrin. *Phys Chem Chem Phys*, 2011, 13: 428-33
- [16] Ingouff M, Sakata T, Li J, et al. The two male gametes share equal ability to fertilize the egg cell in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 2009, 19: R19-R20
- [17] Zhao DZ, Wang GF, Speal B, et al. The *EXCESS MICROSPOROCTES1* gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. *Genes Dev*, 2002, 16: 2021-31
- [18] Canales C, Bhatt AM, Scott R, et al. *EXS*, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2002, 12: 1718-27
- [19] Nonomura KI. The *MSP1* gene is necessary to restrict the number of cells entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in Rice. *Plant Cell*, 2003, 15: 1728-39
- [20] Russell SD. The egg cell: development and role in fertilization and early embryogenesis. *Plant Cell*, 1993, 5: 1349-59
- [21] Groß-Hardt R, Kägi C, Baumann N, et al. *LACHESIS* restricts gametic cell fate in the female gametophyte of *Arabidopsis*. *PLoS Biol*, 2007, 5: e47
- [22] Pagnussat GC, Yu HJ, Sundaresan V. Cell-fate switch of synergid to egg cell in *Arabidopsis eostre* mutant embryo sacs arises from misexpression of the BEL1-like homeodomain gene *BLH1*. *Plant Cell*, 2007, 19: 3578-92
- [23] Sebastian J, Ravi M, Andreuzza S, et al. The plant adherin *AtSCC2* is required for embryogenesis and sister-chromatid cohesion during meiosis in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2009, 59: 1-13

- [24] Garcia-Aguilar M, Michaud C, Leblanc O, et al. Inactivation of a DNA methylation pathway in maize reproductive organs results in apomixis-like phenotypes. *Plant Cell*, 2010, 22: 3249-67
- [25] Pillot M, Baroux C, Vazquez MA, et al. Embryo and endosperm inherit distinct chromatin and transcriptional states from the female gametes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2010, 22: 307-20
- [26] Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, et al. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in A^{vy/a} mice. *FASEB J*, 1998, 12: 949-57
- [27] Rakyan VK, Chong S, Champ ME, et al. Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin^{Fu} allele occurs after maternal and paternal transmission. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 2538-43
- [28] Wang Y, Cheng Z, Huang J, et al. The DNA replication factor RFC1 is required for interference-sensitive meiotic crossovers in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, 2012, 8: e1003039
- [29] Evans MM. The indeterminate gametophyte1 gene of maize encodes a LOB domain protein required for embryo Sac and leaf development. *Plant Cell*, 2007, 19: 46-62
- [30] Purugganan MD, Fuller DQ. The nature of selection during plant domestication. *Nature*, 2009, 457: 843-8
- [31] Huanca-Mamani W, Garcia-Aguilar M, Leon-Martinez G, et al. CHR11, a chromatin-remodeling factor essential for nuclear proliferation during female gametogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 17231-6
- [32] Qin Y, Zhao L, Skaggs MI, et al. ACTIN-RELATED PROTEIN6 regulates female meiosis by modulating meiotic gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2014, 26: 1612-8
- [33] Farazi TA, Juranek SA, Tuschl T. The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development*, 2008, 135: 1201-14
- [34] Vaucheret H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev*, 2006, 20: 759-71
- [35] Mallory A, Vaucheret H. Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell*, 2010, 22: 3879-89
- [36] Olmedo-Monfil V, Duran-Figueroa N, Arteaga-Vazquez M, et al. Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature*, 2010, 464: 628-32
- [37] Rodriguez-Leal D, Leon-Martinez G, Abad-Vivero U, et al. Natural variation in epigenetic pathways affects the specification of female gamete precursors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2015, 27: 1034-45
- [38] Singh M, Goel S, Meeley RB, et al. Production of viable gametes without meiosis in maize deficient for an ARGONAUTE protein. *Plant Cell*, 2011, 23: 443-58
- [39] Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, et al. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science*, 2010, 328: 872-5
- [40] Dunoyer P, Schott G, Himber C, et al. Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science*, 2010, 328: 912-6
- [41] Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 204-20
- [42] Havecker ER, Wallbridge LM, Hardcastle TJ, et al. The *Arabidopsis* RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell*, 2010, 22: 321-34
- [43] Zhaia J, Zhangb H, Arikita S, et al. Spatiotemporally dynamic, cell-type-dependent premeiotic and meiotic phasiRNAs in maize anthers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 3146-51
- [44] Grivna ST, Beyret E, Wang Z, et al. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev*, 2006, 20: 1709-14
- [45] Christensen CA, Subramanian S, Drews GN. Identification of gametophytic mutations affecting female gametophyte development in *Arabidopsis*. *Dev Biol*, 1998, 202: 136-51
- [46] Benkova E, Michniewicz M, Sauer M, et al. Local, efflux-dependent Auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 2003, 115: 591-602
- [47] Friml J, Vieten A, Sauer M, et al. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 2003, 426: 147-53
- [48] Mattsson J, Ckurshumova W, Berleth T. Auxin signaling in *Arabidopsis* leaf vascular development. *Plant Physiol*, 2003, 131: 1327-39
- [49] Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, et al. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell*, 1999, 99: 463-72
- [50] Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, et al. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*, 1997, 9: 1963-71
- [51] Pagnussat GC, Alandete-Saez M, Bowman JL, et al. Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte. *Science*, 2009, 324: 1684-9
- [52] Lituiev DS, Krohn NG, Müller B, et al. Theoretical and experimental evidence indicates that there is no detectable auxin gradient in the angiosperm female gametophyte. *Development*, 2013, 140: 4544-53
- [53] Pischke MS, Jones LG, Otsuga D, et al. An *Arabidopsis* histidine kinase is essential for megagametogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 15800-5
- [54] Bencivenga S, Simonini S, Benkova E, et al. The transcription factors BEL1 and SPL are required for cytokinin and auxin signaling during ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2012, 24: 2886-97
- [55] Cheng CY, Mathews DE, Schaller GE, et al. Cytokinin-dependent specification of the functional megaspore in the *Arabidopsis* female gametophyte. *Plant J*, 2013, 73: 929-40
- [56] Ye Q, Zhu W, Li L, et al. Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in *Arabidopsis* anther and pollen development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 6100-5

- [57] Voeller BR. Gibberellins: their effect on antheridium formation in fern gametophytes. *Science*, 1964, 143: 373-5
- [58] Christensen CA, King EJ, Jordan JR, et al. Megagametogenesis in *Arabidopsis* wild type and the *Gf* mutant. *Sex Plant Reprod*, 1997, 10: 49-64
- [59] Zhao L, He J, Cai H, et al. Comparative expression profiling reveals gene functions in female meiosis and gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2014, 80: 615-28