

## 植物花粉壁的发育

石晶, 梁婉琪, 张大兵\*

上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240

## Pollen Wall Development in Plant

SHI Jing, LIANG Wan-Qi, ZHANG Da-Bing\*

School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

摘要: 文章介绍植物花粉壁形成机制及其细胞生物学功能和与其相关基因的研究进展。

关键词: 花粉; 花粉壁; 孢粉素; 绒毡层; 乌氏体

植物花粉壁在植物花粉发育和受精过程中起着作用。在小孢子发育阶段, 花粉壁是保证小孢子内部结构完整的基础, 没有花粉壁小孢子内物质即会渗漏, 从而引起小孢子的败育(Ma 2005)。在干燥状态下花粉成熟后, 由于花粉壁的理化性质相当稳定, 花粉粒中易受光、热和空气破坏的物质可得到保护, 花粉可免受病菌的侵害(Meuter-Gerhards 等 1999)。花粉壁中含油层的物质在花粉与雌蕊组织之间“识别”(recognize)或“拒绝”(reject)的过程中起作用, 这种作用主要是通过花粉壁上的蛋白质和柱头乳突细胞表面的蛋白质之间相互作用实现的(Zinkl 等 1999)。

花粉壁的作用广泛, 花粉壁是如何形成的呢? 花粉壁形成过程中的分子机制是什么? 花粉壁还有哪些不清楚的功能? 都是人们关心的问题。迄今花粉壁的形成和一些与其相关基因的研究已经有一定的进展, 现就此作介绍。

### 1 花粉壁的结构和组成

花粉的特征主要反映在花粉壁结构、花粉表面纹饰、花粉大小和形状、萌发器官特征等。植物花粉壁结构多样, 有物种特异性, 一般认为花粉壁的结构可划分为孢粉素构成的花粉外壁(exine)和果胶质、纤维素构成的花粉内壁(intine)。从图 1 可见, 花粉外壁又可分为外壁外层(sexine)和外壁内层(nexine), 外壁外层由柱状层(bacula)和覆盖层(teclum)构成。其中覆盖层、柱状层和外壁内层形态特征往往变异较大, 是花粉壁结构特征中最有代表性的部分(Stanley 和 Linskens 1974)。

孢粉素(sporopollenin)是构成植物花粉外壁的主要成分, 它是一种难于分解的物质, 具有耐

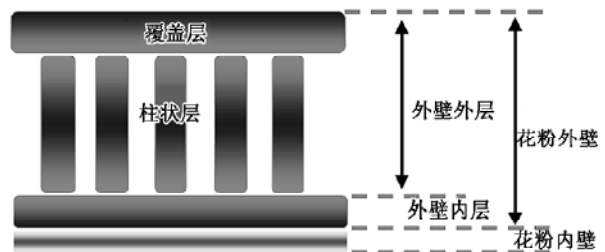


图 1 花粉壁结构模式

热、抗氧化和抗强酸碱的特性, 不溶于有机酸、无机酸、无机盐和脂溶剂等(Osthoff 和 Wiermann 1987)。由于有孢粉素, 所以花粉外壁非常牢固, 如有的花粉形成化石在地层经数万年后仍具有活性, 并能萌发, 说明孢粉素在保护花粉外壁过程中的作用之大。有的研究表明, 孢粉素的主要成分是聚合的酚类物质和长链脂肪酸衍生物(Ahlers 等 1999)。在花粉孢粉素表面缝隙中还覆盖着一层较厚的疏水性脂类和蛋白质物质, 通常称之为含油层(tryphine)。含油层主要是由脂肪酸和长链脂肪酸衍生物(如酯、挥发性脂类复合物以及各种蛋白质)组成。此外, 在花粉表面还沉积着一层由花药绒毡层分泌产生的花粉鞘物质, 它主要是由一些糖类、脂类、蛋白质和小分子物质组成(陈绍荣和杨弘远 2000)。构成孢粉素、含油层和花粉鞘的这些脂类复合物在正常的花粉发育过程中以

收稿 2007-03-22 修定 2007-05-17

资助 国家“973”项目(2006CB101700)和国家自然科学基金(30600031)。

\* 通讯作者(E-mail: zhangdb@sjtu.edu.cn; Tel: 021-34205073; Fax: 021-34204869)。

及花粉粒与柱头的识别作用中是必需的(Dickinson 等 2000; Mariani 和 Wolters-Arts 2000)。

## 2 花粉壁形成过程

植物花药中的小孢子需要经历小孢子母细胞、减数分裂、有丝分裂等过程而发育成为成熟的花粉粒。花粉外壁的形成从图2可见, 起始于花粉发育的四分体时期, 在这个时期, 小孢子为胼胝质包裹, 随着胼胝质壁的溶解, 小孢子从四分体中释放出来, 刚产生出来的自由小孢子完全看不到完整的壁结构, 就像一个裸细胞。但实际上这个时期已经出现少量孢粉素前体物质沉积在小孢子表面, 它为尔后小孢子壁的发育提供一种沉积模式。小孢子发育早期, 在其表面形成光学显微镜下不能辨认的细带状初生壁, 随后孢粉素不断在初生壁上聚集(Paxson-Sowders 等 1997)。小孢子形成中期, 外壁物质快速在小孢子表面聚

合, 小孢子质膜外侧形成3条宽窄不等的电子致密带, 从而构成光学显微镜下可见的外壁结构。随着小孢子壁的进一步发育, 中间电子致密带变细, 两侧的带明显变宽, 形成完整的花粉外壁。至此, 花粉外壁发育即基本完成, 即由两边较宽的电子致密带(覆盖层、外壁内层)和中间的透明带(柱状层)组成, 并且此时花粉的萌发孔也十分明显。在小孢子发育晚期, 外壁没有明显的形态变化, 但组成花粉壁物质孢粉素的沉积更加致密。至二胞花粉早期, 花粉外壁的覆盖层、柱状层、外壁内层, 由表及里, 层次分明, 花粉外壁已完全形成。此时, 在花粉外壁内侧, 质膜出现波浪型弯曲, 在质膜和外壁之间逐渐积累内壁物质, 花粉内壁开始发育。二胞花粉晚期, 花粉内壁基本上发育完成。至此, 花粉壁结构完全形成。

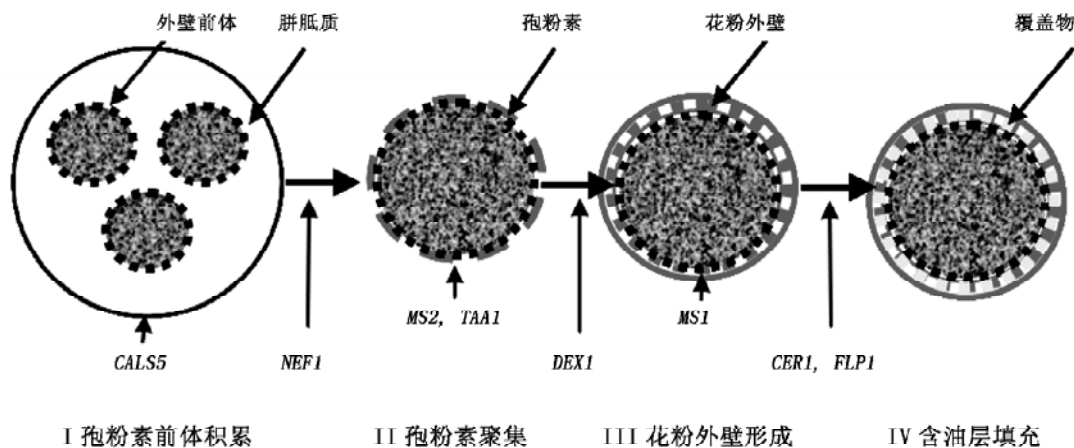


图2 花粉壁形成过程示意

## 3 绒毡层在花粉外壁发育过程中的作用

高等植物花粉及其花粉壁的发育与绒毡层分泌功能密不可分, 绒毡层不仅为花粉发育提供所需要的营养物质, 同时可分泌胼胝质酶, 影响四分体时期小孢子从四分体中释放出来, 还可通过分泌花粉鞘等物质控制花粉壁结构的建成。已有的研究表明, 花粉外壁的合成是绒毡层和小孢子共同参与的结果, 小孢子可建立起一个称为初生外壁的表面模板系统, 决定外壁的沉积模式(Heslop-Harrison 1971; Rowley 和 Skvarla 1975), 绒毡层细胞适时的分泌孢粉素等前体物质, 这些

物质在外壁模板系统中聚合, 逐渐形成花粉外壁(Bedinger 1992)。随着小孢子的空泡化, 绒毡层细胞逐渐死亡, 其分解物填入花粉壁, 形成一层由脂类、蛋白质、色素等组成的花粉包被(Scott 1994)。绒毡层细胞功能的异常, 将会直接或间接影响花粉外壁的形成, 引起花粉败育。

在花粉发育过程中, 绒毡层可以为小孢子的发育提供营养物质。据报道, 在绒毡层中存在一种叫乌氏体(ubisch body)的细胞器, 参与绒毡层壁的降解、花粉外壁的形成、识别蛋白的转运等, 乌氏体的转运作用主要表现为运输花粉鞘物

质、孢粉素、酶等(Wang等2003)。乌氏体是单胞花粉发育早期在绒毡层的内切向壁上形成的一些电子密度较液泡略深的球形小泡,绝大多数乌氏体是以单个形式存在的,也有2~3个聚在一起较均匀地分布于整个药室腔的内表面。由图3可见,乌氏体是一种不对称的结构,中央为来源于前乌氏体的乌氏体芯,外被厚薄不均匀的高电子密度的孢粉素物质,这些孢粉素在靠药室腔一侧

积累较厚,在靠绒毡层一侧积累较薄。已经发现,水稻(*Oryza sativa*)和小麦(*Triticum aestivum*)中的 *RAFTINI* 基因可在花药绒毡层中特异表达,主要存在于乌氏体中, *RAFTINI* 基因突变后阻碍了正常的孢粉素聚合和花粉外壁发育,显示花粉发育过程中绒毡层分泌的孢粉素一类营养物质由乌氏体传递给小孢子,随后孢粉素再在花粉壁上聚合,从而形成正常的花粉壁结构。

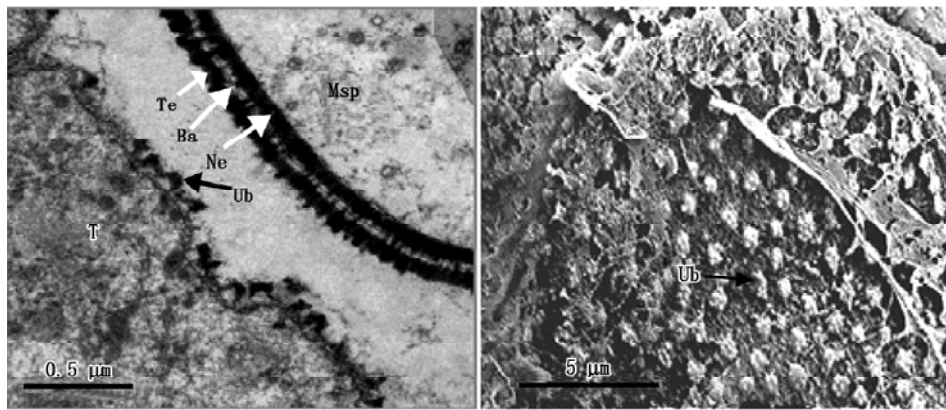


图3 绒毡层上的乌氏体结构

Msp: 小孢子; Te: 外壁外层; Ba: 柱状层; Ne: 外壁内层; Ub: 乌氏体; T: 绒毡层。

#### 4 花粉壁形成和参与的基因

花粉壁的形成是一个非常复杂的过程,并需要大量的营养物质如蜡质、脂肪类物质等来支持孢粉素和含油层的积累。近年来,通过正向和反向遗传学的方法已分离到一些参与花粉壁形成的关键基因,如 *MS1* (*MALE STERILITY 1*)、*MS2* (*MALE STERILITY 2*)、*CER1* (*ECERIFERUM*)、*DEX1* (*Defective in Exine Formation*)、*NEF1* (*No Exine Formation*)、*TAA1*、*FLP1* (*Faceless Pollen-1*)、*CALS5* (*Callose Synthase 5*)、*WDA1* (*Wax-Deficient Anther 1*)等(图2)。

*CER1*基因是拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中编码一个膜蛋白,影响花粉发育过程中蜡质和含油层合成的关键基因。*CER1*基因主要在拟南芥的茎和花中高效表达。*cer1*突变体茎上的蜡质明显减少,花粉壁上的含油层呈现出颗粒状表面,含油层中脂滴个体较小,数量增多(Aarts等1995)。有人进行生化分析表明,*cer1*突变体蜡质形成过程中烷烃、酮和醇的合成途径受阻,所以推测

*CER1*蛋白可能作为一种酶参与着蜡质合成途径中长链烷烃的形成(Hannoufa等1993; Jenks等1995)。

拟南芥的 *DEX1* 基因是一个控制花粉外壁发育过程中孢粉素积累的关键基因,该基因在根、茎、叶、花芽、种子中均有表达。*dex1*突变体主要表现为花粉发育异常,突变体虽然可以形成正常的花药4层细胞和胼胝质结构,但花粉外壁前体物质不能正常形成,孢粉素散乱地积累在外壁前体表面(Paxson-Sowders等1997, 2001)。

拟南芥的 *NEF1* 基因参与花粉发育过程中脂类物质的代谢和孢粉素积累。*nef1*突变体萼片、花瓣、芯皮、花丝的表型与野生型相比没有区别,但是 *nef1*突变体不能形成正常的花粉。形态分析表明, *nef1*突变体的小孢子可以正常地进行减数分裂,但在小孢子发育早期,突变体药室内看到一些细胞碎片,花粉成熟时期突变中的小孢子完全破碎。有人进一步观察到, *nef1*突变体小孢子壁上的外壁前体物质明显减少,导致孢粉素

不能正常积累。此外, *nefl* 突变体绒毡层中质体、脂质体和造油体的数目减少。生化分析结果表明, *nefl* 突变体的花器官中脂成分明显减少, 这些说明 *NEFL* 基因对花粉壁发育过程中脂类物质的合成代谢起作用(Ariizumi 等 2004)。

拟南芥中 *MS2* 基因是另一个参与花粉壁发育过程中脂肪类物质合成的关键基因, 该基因编码一种脂肪酰基还原酶, 包含 2 个功能域, 分别是雄性不育功能域与 NAD 结合 4 功能域。*MS2* 基因主要在花药绒毡层中表达, *ms2* 突变体中花粉外壁异常形成, 雄蕊败育。醋解实验证明, *ms2* 异常形成的花粉外壁对酸处理非常敏感, 处理后 *ms2* 花粉完全破碎。序列分析表明, *MS2* 基因与加州希门得木中的 *FAR* 基因相似性较高, 一致性达 41.1%, 由此推测 *MS2* 基因作为一种脂肪酰基还原酶参与脂肪酸向脂肪醇的转变(Aarts 等 1997)。在小麦中也分离到与 *MS2* 基因功能相似的 *TAA1* 基因, 并证明 *TAA1* 基因也参与小麦花粉发育过程中脂肪醇的合成。*TAA1* 基因在小麦花药绒毡层中特异表达, 基因突变后, 突变体花粉中脂肪醇含量减少, 花粉壁结构异常, 花粉最终完全破碎(Wang 等 2002)。这说明在单子叶植物和双子叶植物中脂肪醇对花粉壁的发育十分重要, 并且脂肪酸向脂肪醇的转变存在一种保守的分子机制。

拟南芥的 *FLP1* 基因是编码脂类转运蛋白和影响花粉发育过程中含油层积累的关键基因。突变体 *flp1* 表现出较为光滑的花粉表面, 这种光滑的表面是由于含油层过多地积累在花粉外壁上, 引起突变体含油层中的脂滴数目增加所导致的。异常的花粉壁会导致 *flp1* 突变体花粉对酸处理表现敏感, 酸处理后花粉外壁全部破碎。此外, *flp1* 突变体中茎和角果表面的蜡质明显减少。这些结果证明, 基因 *FLP1* 不仅影响花粉外壁和含油层的形成, 还参与蜡质的合成(Ariizumi 等 2003)。

水稻中的 *WDA1* 基因是另一个经证明参与花药表面蜡质合成的基因, *WDA1* 基因在减数分裂前期的小穗、内稃、外稃、浆片、柱头和花药中均有表达。电镜观察结果表明, *wda1* 突变体中花药表皮的蜡质与野生型相比明显减少, 突变体花药中不能形成乌氏体, 以致花粉壁发育停止, 花粉逐渐皱缩。序列分析表明, 水稻 *WDA1*

基因与拟南芥中 *CER1* 基因的相似性高达 51%, 这一结果说明, 无论是在单子叶植物还是在双子叶植物中, 这类基因对花药发育都十分重要, 并且在功能上很保守(Jung 等 2006)。

在被子植物花药发育过程中, 小孢子母细胞会产生一种由  $\beta$ -1,3-葡聚糖组成的特殊的细胞壁, 称之为胼胝质层。拟南芥的 *CALS5* 基因是影响胼胝质形成过程的基因, *cals5* 突变体开花时期较长, 花药皱缩, 角果较短, 角果中种子数目大量减少, 甚至没有。*cals5* 突变体在花粉发育的四分体阶段胼胝质层较薄, 含油层随机聚集在花粉上, 完全没有花粉外壁的形成, 花粉内壁结构也不能正常形成, 只有极少数花粉有活力。这些结果表明, *CALS5* 基因对胼胝质的合成和花粉内外壁形成是必不可少的(Dong 等 2005)。

拟南芥的 *MS1* 基因编码一个含 PHD 结构的转录因子, 控制花粉外壁和内壁的发育, *ms1* 突变体中小孢子从四分体中释放出来后, 花粉壁结构不能正常形成, 孢粉素不正常地积累在花粉表面, 形成不规则的透明的花粉外壁。此外, *ms1* 突变体中没有看到花粉内壁的发育(Vizcay-Barrena 和 Wilson 2006)。

## 5 结语

花粉壁发育是一个重要而复杂的生物学过程, 花粉壁可以保护花粉内部营养成分免受外界环境侵害, 花粉壁上的蛋白质在花粉与柱头识别的过程中发挥作用, 所以, 深入研究植物花粉壁的发育过程及其调控机制十分重要。近年来, 人们从细胞生物学、遗传学和分子生物学等方面对花粉及花粉壁发育进行了大量的研究, 并已取得了不少进展, 但在此基础上, 对绒毡层与花粉发育之间的物质交流以及不同物种花粉壁形成的差异等问题仍然值得深入探究。

## 参考文献

- 陈绍荣, 杨弘远(2000). 花粉-雌蕊的相互作用机制. 植物生理学通讯, 36 (4): 356~361
- Aarts MG, Hodge R, Kalantidis K, Florack D, Wilson ZA, Mulligan BJ, Stiekema WJ, Scott R, Pereira A (1997). The *Arabidopsis* MALE STERILITY 2 protein shares similarity with reductases in elongation/condensation complexes. *Plant J*, 12: 615~623
- Aarts MG, Keijzer CJ, Stiekema WJ, Pereira A (1995). Molecular

- characterization of the *CER1* gene of *Arabidopsis* involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *Plant Cell*, 7: 2115~2127
- Ahlers H, Thom I, Lambert J, Kuckuk R, Wiermann R (1999). <sup>1</sup>H NMR analysis of sporopollenin from *Typha angustifolia*. *Phytochemistry*, 50: 1095~1098
- Ariizumi T, Hatakeyama K, Hinata K, Inatsugi R, Nishida I, Sato S, Kato T, Tabata S, Toriyama K (2004). Disruption of the novel plant protein NEF1 affects lipid accumulation in the plastids of the tapetum and exine formation of pollen, resulting in male sterility in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 39: 170~181
- Ariizumi T, Hatakeyama K, Hinata K, Sato S, Kato T, Tabata S, Toriyama K (2003). A novel male-sterile mutant of *Arabidopsis thaliana*, *faceless pollen-1*, produces pollen with a smooth surface and an acetolysis-sensitive exine. *Plant Mol Biol*, 53: 107~116
- Bedinger P (1992). The remarkable biology of pollen. *Plant Cell*, 4: 879~887
- Dickinson HG, Elleman CJ, Doughty J (2000). Pollen coatings—chimaeric genetics and new functions. *Sex Plant Reprod*, 12: 302~309
- Dong X, Hong Z, Sivaramakrishnan M, Mahfouz M, Verma DP (2005). Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in *Arabidopsis*. *Plant J*, 42: 315~328
- Hannoufa A, McNeven J, Lemieux B (1993). Epicuticular waxes of eceriferum mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 33: 851~855
- Heslop-Harrison J (1971). Wall pattern formation in angiosperm microsporogenesis. *Symp Soc Exp Biol*, 25: 277~300
- Jenks MA, Tuttle HA, Eigenbrode SD, Feldmann KA (1995). Leaf epicuticular waxes of the eceriferum mutants in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 108: 369~377
- Jung KH, Han MJ, Lee DY, Lee YS, Schreiber L, Franke R, Faust A, Yephremov A, Saedler H, Kim YW (2006). *Wax-deficient anther1* is involved in cuticle and wax production in rice anther walls and is required for pollen development. *Plant Cell*, 18: 3015~3032
- Ma H (2005). Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. *Annu Rev Plant Biol*, 56: 393~434
- Mariani C, Wolters-Arts M (2000). Complex waxes. *Plant Cell*, 12: 1795~1798
- Meuter-Gerhards A, Riegart S, Wiermann R (1999). Studies on sporopollenin biosynthesis in *Cucurbita maxima* (DUCH)-II: the involvement of aliphatic metabolism. *J Plant Physiol*, 154: 431~436
- Osthoff KS, Wiermann R (1987). Phenols as integrated compounds of sporopollenin from *Pinus* pollen. *J Plant Physiol*, 131: 5~15
- Paxson-Sowders DM, Dodrill CH, Owen HA, Makaroff CA (2001). DEX1, a novel plant protein, is required for exine pattern formation during pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 127: 1739~1749
- Paxson-Sowders DM, Owen HA, Makaroff CA (1997). A comparative ultrastructural analysis of exine pattern development in wild-type *Arabidopsis* and a mutant defective in pattern formation. *Protoplasma*, 198: 53~65
- Rowley JR, Skvarla JJ (1975). The glycocalyx and initiation of exine spinules on microspores of *Canna*. *Am J Bot*, 62: 479~485
- Sanders PM, Anhthu QB, Weterings K (1999). Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sex Plant Reprod*, 11: 297~322
- Scott RJ (1994). Pollen exine: the sporopollenin enigma and the physics of pattern. In: Scott RJ, Stead AD (eds). *Molecular and Cellular Aspects of Plant Reproduction*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 49~81
- Stanley RG, Linskens HF (1974). *Pollen: Biology, Biochemistry, Management*. New York: Springer-Verlag, 13~28
- Vizcay-Barrena G, Wilson ZA (2006). Altered tapetal PCD and pollen wall development in the *Arabidopsis ms1* mutant. *J Exp Bot*, 57: 2709~2717
- Wang A, Xia Q, Xie W, Datla R, Selvaraj G (2003). The classical Ubisch bodies carry a sporophytically produced structural protein (RAFTIN) that is essential for pollen development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 14487~14492
- Wang A, Xia Q, Xie W, Dumonceaux T, Zou J, Datla R, Selvaraj G (2002). Male gametophyte development in bread wheat (*Triticum aestivum* L.): molecular, cellular, and biochemical analyses of a sporophytic contribution to pollen wall ontogeny. *Plant J*, 30: 613~623
- Zinkl GM, Zwiebel BI, Grier DG, Preuss D (1999). Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Development*, 126: 5431~5440