

DOI:10.13332/j.1000-1522.20180375

CMLs 参与调控植物花粉授粉竞争的作用

高述民¹ 杨慕菡^{1,2} 祝园园^{1,2} 周燕^{1,2}

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 北京市园林科学研究院, 北京 100102)

摘要:【目的】在显花植物生殖过程中花粉萌发和花粉管生长起着至关重要的作用,这一过程受许多因素的影响,其中钙调素类似蛋白(calmodulin-like proteins, CMLs)通过直接或间接的作用机制调控花粉萌发及花粉管生长。然而,迄今人们对CMLs的功能研究尚少。本文旨在初步了解CMLs蛋白在花粉竞争优势中的作用,为深入探究CMLs蛋白在植物花粉竞争优势中的分子机制奠定理论基础。【方法】本文主要通过对参与调控花粉萌发以及花粉管生长过程的CMLs蛋白的结构、表达水平、细胞定位及其作用机理的归纳,结合不同植物中出现的花粉竞争现象,综合分析并总结国内外相关研究结果。【结果】CMLs蛋白约有4个保守的EF手性结构域,当CMLs蛋白结合Ca²⁺时,其构象发生变化,增强与下游受体蛋白的结合能力,并启动Ca²⁺依赖的级联信号放大效应,引起花粉管中Ca²⁺的浓度变化,影响从萌发孔到花粉管顶端Ca²⁺浓度梯度的形成,从而调控花粉管的正常生长。CMLs蛋白的表达还可以影响Mg²⁺、NO等离子的浓度变化,影响Ca²⁺与EF手性结构域的结合及花粉管生长的导向。不同CMLs蛋白具有不同生理功能,其中参与花粉萌发及花粉管生长的CMLs蛋白主要在植物花器官中表达;部分显花植物在受精过程中,不同倍性花粉之间可能由于基因组大小或者营养物质含量的差异,导致萌发率及生长速率的不同。【结论】CMLs蛋白可能通过在不同倍性花粉中的差异表达,影响花粉在体内萌发的进程,使其在某一时期表现出竞争优势。

关键词: CMLs; 花粉萌发; 花粉管生长; 竞争强势; 调控

中图分类号: S718.47; Q944.42 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1522(2019)03-0143-08

引文格式: 高述民, 杨慕菡, 祝园园, 等. CMLs 参与调控植物花粉授粉竞争的作用 [J]. 北京林业大学学报, 2019, 41(3): 143-150. Gao Shumin, Yang Muhan, Zhu Yuanyuan, et al. Role of CMLs in regulating the competition of plant pollen pollination [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2019, 41(3): 143-150.

Role of CMLs in regulating the competition of plant pollen pollination

Gao Shumin¹ Yang Muhan^{1,2} Zhu Yuanyuan^{1,2} Zhou Yan^{1,2}

(1. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. Beijing Institute of Landscape Architecture; Beijing Key Laboratory of Greening Plants Breeding, Beijing 100102, China)

Abstract: [Objective] Pollen germination and pollen tube growth play a critical role in reproductive process of flowering plants. Pollen germination and pollen tube growth is regulated directly or indirectly by many factors, such as calmodulin-like proteins (CMLs). However, very little research has focused on the function of CMLs till now. The aim of this paper is to reveal the role of CML proteins in the competitive advantage of pollen, and to provide a theoretical foundation for further exploring the molecular mechanism of CMLs in plant pollen competitive advantage. [Method] This paper comprehensively summarizes the structure, expression level, cell localization and mechanisms of CMLs proteins involved in the regulation of pollen germination and pollen tube growth, and analyzes the pollen competition phenomena in different plants. [Result] There were about four conserved EF-hand domains in CMLs. When CMLs bind to Ca²⁺, its

收稿日期: 2018-11-21 修回日期: 2019-01-03

基金项目: 北京市自然科学基金项目(6162014), 北京市公园管理中心课题(ZX 2018014), 国家自然科学基金项目(31870573)。

第一作者: 高述民, 博士, 教授。主要研究方向: 园林植物生殖发育与育种。Email: gsm689@sohu.com 地址: 100083 北京市海淀区清华东路35号北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者: 周燕, 博士, 教授级高工。主要研究方向: 园林植物的引选育研究。Email: zhouy661@sohu.com 地址: 100102 北京市朝阳区花家地甲7号北京市园林科学研究院。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

conformation changes enhanced its binding ability to downstream receptor proteins, and initiated Ca^{2+} dependent cascade signal amplification effect, which resulted in changes in Ca^{2+} concentration in pollen tube and influenced the formation of Ca^{2+} concentration gradient from germination aperture to the top of pollen tube, thus regulating the normal growth of pollen tube. The expression of CML proteins can also affect the concentration of Mg^{2+} , NO and the binding of Ca^{2+} to EF-hand domains and the orientation of pollen tube growth. Different CML proteins had different physiological functions. Among them, CML proteins involved in pollen germination and pollen tube growth were mainly expressed in plant floral organs. During fertilization of some flowering plants, different ploidy pollens may have different germination rates and growth rates due to differences in genome size or nutrient content. [Conclusion] CMLs proteins may affect the process of pollen germination in vivo by differentially expressing in different ploidy pollens, and make them show competitive advantage in a certain period of time.

Key words: CMLs; pollen germination; pollen tube growth; competitive advantage; regulating

CMLs 蛋白作为 Ca^{2+} 在植物体中识别的主要感受器之一,使 Ca^{2+} 在花粉管生长过程中形成一定浓度梯度,从而调控其生长。同时还与钙调素、钙依赖蛋白激酶等钙离子感受器一起结合钙离子发挥其特有的作用(图 1)。当植物生长发育受到胁迫时,这些 Ca^{2+} 传感器至少具备一个保守的 Ca^{2+} 结合结构域——EF 手性结构^[1],在结合 Ca^{2+} 时通过构象改变,促进 Ca^{2+} 传感器与下游目标的相互作用^[2-3]。CMLs 蛋白广泛参与到钙依赖的信号转导途径^[4]。CML 是一类钙调素(CaM)钙受体蛋白,与钙调素蛋白的氨基酸相似性大于 16%,且每个蛋白约有 4 个保守的 EF 手性结构域。当一些 CMLs 蛋白结合 Ca^{2+} 时,会增加其 α -螺旋含量,三级结构更加稳定,引发构象发生变化会导致疏水基团(hydrophobic patch instrumental)的暴露,有助于靶蛋白的识别^[5]。与下游受体蛋白的结合能力增强,进而启动 Ca^{2+} 依赖的级联信号放大效应^[6]。CMLs 蛋白通过 EF 手性结构域结合钙离子,钙离子再结合不同数量的 helix-loop-helix 模体(两个正交 α -螺旋通过一段含有 12 氨基酸残基的环相连接),最终改变蛋白构象^[7-8]。在豆科(Leguminosae)植物中发现,一些没有其他功能域的 CMLs 成员与 CaM 类似,由 EF 手性组成,已知 CaM 的大多数 EF 手性结构域严格保持保守的 Ca^{2+} 结合残基^[9]。CMLs 蛋白家族在 Ca^{2+} 存在情况下,CML16 蛋白 α -螺旋含量适度增加,CML15 的螺旋含量仅在 Ca^{2+} 结合时经历轻微变化^[10]。与 CAMs 对 Ca^{2+} 结合的反应变化相比,CMLs 蛋白主要表现为其螺旋的重新定向,而不是严格地改变 α -螺旋含量^[11-12]。CMLs 结合 Ca^{2+} 的亲合力可能与 CaMs 结合 Ca^{2+} 的亲合力不同。研究发现 CMLs 之间与 Ca^{2+} 亲合力也有差异^[13],但是大多数的 CMLs 蛋白通过改变细胞溶质 Ca^{2+} 信号,改变与靶蛋白结合,最终引起植物细胞产生一系列生理反应^[14]。

不同植物的 CMLs 蛋白功能具有一定的差异。目前有关钙调素类蛋白的作用研究不断增多。从水稻(*Oryza sativa*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中分别鉴定出 32 个^[15]和 50 个^[9]CMLs 基因,广泛参与到细胞的生物学过程中。大豆(*Glycine max*)有 68 个 GmCMLs 蛋白,这类蛋白含有 2~4 个保守的 EF 手性结构。对碱胁迫下野生大豆的叶和根中的 CMLs 基因表达模式分析发现,26 个 GsCMLs 基因在不同组织中的表达有显著差异,间接表明了这些基因不仅参与植物碱胁迫应答,而且在不同植物组织中具有表达特异性^[5]。

CMLs 蛋白的功能研究尚少,但对钙调素的功能研究较成熟。CMLs 蛋白与钙调素蛋白较为相似,其在植物体内作用方式可在一定程度上解释其他含有 EF 手性结构域的钙感受蛋白的作用方式。在有性生殖过程中,钙调素可能通过 Ca^{2+} -CaM 信号途径调节小孢子发育、花粉萌发、花粉管生长以及物质运输等生理过程^[16-17]。CMLs 蛋白具有自己的特异性,譬如拟南芥基因组编码的 50 多种钙调素类似蛋白(AtCMLs)行使着不同的生物学功能。有关 CMLs 蛋白在响应不同生物/非生物刺激、参与花粉萌发以及花粉管生长、参与植物营养生长、参与激素调节、影响植物细胞结构和发育等方面有部分研究报道(表 1),本文在阐述上述功能外,主要论述 CMLs 在花粉萌发以及花粉管生长过程中表现出花粉优势的生理学功能。通过对 CMLs 蛋白参与授粉过程功能的总结和阐述,有助于我们较全面的认识显花植物有性生殖过程的分子机制。

1 不同倍性花粉的竞争强势

2n 花粉的产生源于 2n 配子的出现。花粉发育阶段,某些因素导致减数分裂异常,形成具有体细胞染色体数的配子,即 2n 配子,这一普遍现象对物种

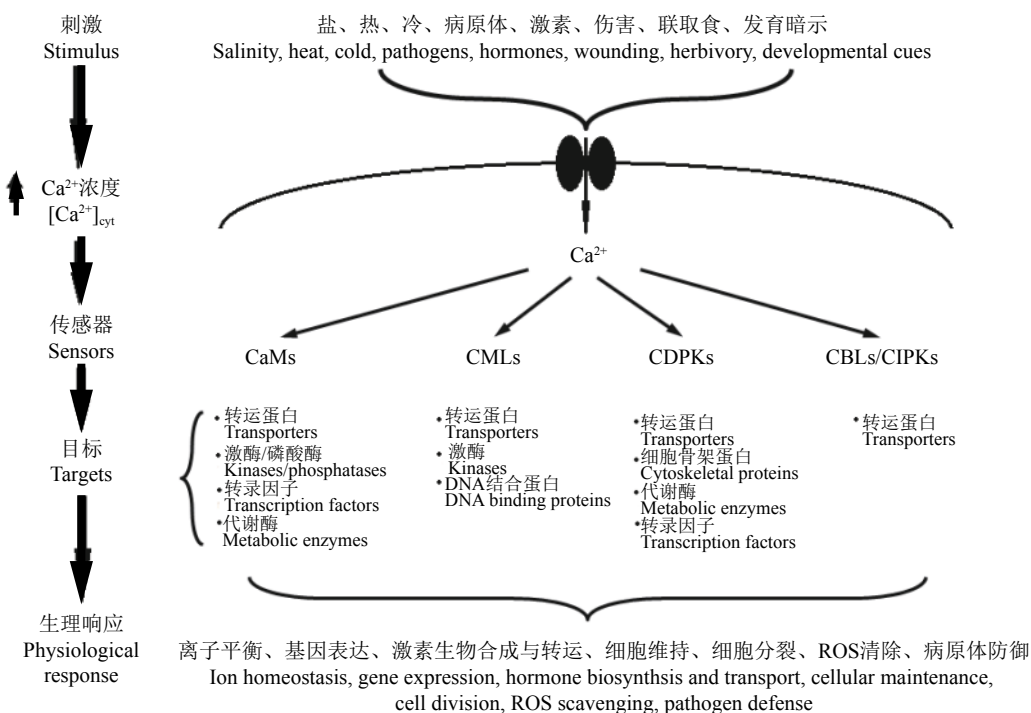


图 1 Ca²⁺信号感受器^[1]

Fig. 1 Ca²⁺ signal sensor^[1]

表 1 植物 CMLs 蛋白的功能

Tab. 1 Function of CML proteins in plants

CMLs 蛋白 Calmodulin-like protein	来源植物 Affiliated plant	功能 Function
CML37, 38, 39 ^[18] ; CML24 ^[19] ; CML8 ^[20]	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	响应不同生物/非生物刺激 Respond to different biological/abiotic stimuli
OSCML4, 5, 8和11 ^[21]	水稻 <i>Oryza sativa</i>	
CML25 ^[22] ; CML24 ^[23]	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	参与花粉萌发以及花粉管生长 Participate in pollen germination and pollen tube growth
CML49 ^[7]	甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	
CML7 ^[24] ; CML39 ^[25]	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	参与种子萌发、幼苗生长、根毛伸长等 Participate in seed germination, seedling growth, root hair elongation, etc.
CML24 ^[25] ; CML9 ^[26]	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	参与激素调节 Participate in hormone regulation
CML20 ^[27] ; CML42 ^[28]	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	调节细胞分裂、细胞壁合成、毛状体形成 Regulate cell division, cell wall synthesis, trichome formation

进化和植物育种意义重大。与正常产生的 1n 花粉相比, 2n 花粉萌发的情况因染色体条数以及基因表达的差异而有所不同。在授粉受精过程中, 花粉到达柱头上的时间以及花粉的类型均会影响下一步受精过程^[29], 首先与柱头识别的花粉具有生殖优势^[30-31]。在研究其他物种雌蕊接受花粉过程中, 花粉管生长速率常常会影响成花率^[32-33], 但花粉萌发率^[34]和花粉大小^[35]也可以产生影响。因此, 2n 花粉和 1n 花粉与柱头识别过程中, 因大小差异或组成成分变化, 可能导致相同时间内两者在柱头上萌发率产生差异。

有关 2n 花粉和 1n 花粉之间的竞争关系因植物而异。用秋水仙碱诱导木薯 (*Manihot esculenta*) 花序, 获得加倍的 2n 大花粉与未加倍的 1n 小花粉, 2n 大花粉粒在柱头上萌发速度及花粉管生长速度

与 1n 花粉基本同步, 说明在木薯中两种花粉具有相同的授粉竞争能力^[36]。无论是天然的还是人工诱导的白杨 (*Populus tomentosa*) 2n 花粉, 其在体内生长进程大体上与 1n 花粉近似, 但是萌发速率和萌发量远远不及 1n 花粉。因此, 就萌发这一过程而言, 2n 花粉与 1n 花粉相比, 并没有竞争优势^[37]。然而在马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 中却发现不同倍性花粉管存在竞争现象, 在四倍体和二倍体花柱中, 2n 花粉管都比 1n 花粉管生长得快, 说明 2n 花粉的强势可能表现在花粉管在花柱中的生长过程中^[38]。

花粉之间的竞争优势除了直接通过花粉在柱头的萌发过程体现外, 还可通过杂交后代的遗传分析进行证实。Qu 等^[39]对马铃薯 TD 后代 (2n 花粉与普通栽培品种杂交) 与优良四倍体株系杂交后代进行

遗传分析时发现, 2n 花粉在传递遗传杂合性等方面具有优势。自然界中普遍存在的白菜 (*Brassica pekinensis*) 是二倍体, 用大白菜自交不亲和系 BP058 与四倍体‘水仙花’进行杂交, 后代四倍体占 93% 以上, 而三倍体或者二倍体很少, 这可能由于在授粉受精过程中二倍体 BP058 本身能形成未减数的 2n 雄配子, 并可能与四倍体‘水仙花’产生的 1n 配子结合, 即二倍体 BP058 2n 配子比 1n 配子更具有优势所致^[40]。

2 CMLs 蛋白参与调控花粉萌发和花粉管生长

2.1 CMLs 蛋白参与花粉萌发和花粉管生长及其定位

花粉萌发和花粉管生长是开花植物有性生殖过程的重要阶段。一旦花粉感受到外部的信号, 花粉内部就会产生一系列的信号转导级联反应, 引起花粉、花粉管内离子浓度、微丝骨架及囊泡转运动态平衡发生变化, 直接或间接调控花粉的萌发和花粉管定向生长。花粉之间竞争强势现象的出现受到多种基因、蛋白及转录因子的调控。其中, CMLs 蛋白作为调控花粉萌发及花粉管生长的蛋白种类之一, 主要通过在不同时期的表达发挥生理功能。CMLs 蛋白在不同时期的表达量变化可作为其行使功能的判定标准之一。观察干燥脱水的成熟花粉, 刚完成水合的花粉以及体外培养 4 h 的花粉管等 3 种实验材料, 第三者表达的总基因数显著多于前两者, 其中钙调素/类钙调素相关基因、热激蛋白相关基因的变化尤为显著。在拟南芥 CMLs 家族 50 个 CMLs 基因中有 19 个在花粉和花粉管中表达, 其中 9 个基因在花粉中特异表达, *CML6*、*CML13*、*CML25*、*CML28* 在花粉萌发和花粉管生长过程中的表达水平很高^[41]、*CML39*、*CML49*、*CML3* 和 *CML16* 等 4 个基因在花粉萌发过程中上调表达, *CML49* 在花粉管转录水平增加。体内萌发和体外萌发实验均发现反义 *CML49* 能使花粉萌发率降低, 花粉管不能正常伸长。同时 *CML49* 基因的表达量在花粉萌发后发生下调, 萌发前约为萌发后的 2.73 倍^[6], 本实验室研究发现, 月季 (*Rosa chinensis*) 中不同倍性花粉之间存在竞争强势, 且强势表现在花粉进入柱头时(尚未发表); *CML49* 表达量有显著变化, 说明其不仅调控花粉管的生长, 还有可能参与了花粉竞争强势过程。*CML21* 蛋白调控拟南芥花粉管生长, 在 *CML21-GFP* 转基因植株中, 花粉管生长受到明显抑制, 长度比野生型下降约 18%, 花粉管宽度发生轻微变化^[42]。本实验室对月季花粉转录组测序结果发现, 与花粉萌发和花粉管生长有关的 CMLs 蛋白主要有 *CML6*、

CML24、*CML25*、*CML49*(尚未发表)。

CMLs 蛋白的生物学功能与其结构和特性密不可分。除上述提到在花粉发育和生长时期表达量有所不同外, CMLs 蛋白在同一植物的不同组织, 或者同一组织的不同部位的表达存在显著差异, 影响 CMLs 对花粉以及花粉管的调控作用。对大豆的转录组聚类分析显示大多数 CMLs 蛋白广泛分布于不同组织中, 其中至少 7 个 CMLs 特异存在花器官中^[8]。*CML42* 蛋白广泛存在于拟南芥各组织中, 且在不同生长阶段无显著表达差异, 而与其密切的旁系同源物 *CML43* 在植株正常生长条件下仅限于根尖中表达^[28,43]。同样, *CML39* 主要在雄性花组织中表达, 而 *CML38* 则在更广泛的组织中表达^[18]。对未授粉和授粉后的矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 钙调蛋白 (CaMs) 和钙调素类似蛋白 (CMLs) 的表达和定位进行测定, 发现 CaMs 在引导组织细胞的细胞质中表达, 钙调素类似蛋白 (CMLs) 则位于引导组织的细胞外基质 (ECM) 中。CaM 和 CMLs 蛋白都参与体内花粉管生长, 在花粉管中, CaM 主要存在于顶端细胞质的一些囊泡内及其周围^[44]。CMLs 蛋白家族的 *PGCML1* 是花粉萌发和花粉管生长的正调控因子, 通过参与胞内 NO 和 Ca^{2+} 信号调控, 影响花粉管对胞外 Ca^{2+} 和 K^{+} 浓度的依赖, 该基因功能一旦发生缺失将导致花粉萌发率降低, 花粉管生长速率降低, 影响花粉管的最终长度。其主要定位于胞质中, 在柱头、花药壁及花丝中没有表达, 但在花粉和柱头萌发的花粉管中大量表达^[22]。

2.2 CMLs 蛋白在花粉萌发和花粉管生长过程中的作用机制

CMLs 蛋白作为一种钙离子结合蛋白, 主要通过影响 Ca^{2+} 的浓度变化, 间接地发挥其在植物体中的生理功能。所以, 了解花粉萌发及花粉管生长过程中的 Ca^{2+} 信号转导网络, 对于阐明 CMLs 蛋白在植物有性生殖过程中的作用机制尤为重要。不同 CMLs 蛋白的作用机制存在差异, 通过调控不同生物分子的变化, 达到其特定的生物学功能。目前, 主要有两个方面的研究成果: (1) CMLs 通过调控 Ca^{2+} 等阳离子 (K^{+} 、 Mg^{2+}) 浓度的变化, 实现信号转导的过程, 改变花粉管的 Ca^{2+} 浓度梯度破坏花粉管的生长方向; Ca^{2+} 浓度的升高同样使花粉管肌动蛋白束碎片化, 从而破坏花粉管的骨架, 影响花粉管的生长。当花粉落在柱头的乳突细胞上, 接触处形成高浓度的钙, 而后由乳突细胞上的钙通道蛋白释放出钙离子被正在进行水合作用的花粉吸收, 花粉由于钙感应蛋白对钙离子的响应, 启动钙信号向靶标转导, 最终引起花粉萌发和花粉管伸长^[24]。在正常花

粉管中,微丝束作为胞质环流及细胞器移动的分子轨道,与花粉管长轴平行排列,大多数植物花粉管尖端缺乏明显的微丝束,微丝骨架组织的变化以及肌动蛋白结合蛋白活性的调节影响花粉萌发以及花粉管顶端的生长^[45-47]。胞内 Ca^{2+} 与细胞骨架之间是紧密联系的,高浓度 Ca^{2+} 会破坏百合属(*Lilium*)植物花粉管的细胞骨架结构,从而影响花粉管的生长^[48]。当花粉吸水后膨压增加,花粉开始萌发。此时 Ca^{2+} 在萌发孔周围浓度最高,而且在胞质中出现逐级递减的 Ca^{2+} 梯度,决定花粉管生长的方向^[49-50]。当花粉细胞接收到信号,胞内钙离子库的钙离子释放将刺激 Ca^{2+} 依赖性多磷酸肌醇特异性磷脂酶 C 的活性,增加 IP₃ 形成的速度,并导致 Ca^{2+} 释放,使胞内 Ca^{2+} 浓度增加^[51];胞外钙离子通过花粉管顶端的囊泡分泌和胞吐过程进入花粉管中^[52],影响胞内 Ca^{2+} 梯度,从而调控花粉管的生长以及生长方向。除了尖端聚集钙离子形成梯度,还有果胶酯化/脱酯化相关的细胞壁延伸性的改变同样调节花粉管的生长^[53]。除了 Ca^{2+} 之外,为了维持花粉萌发和花粉管生长过程中的膨压和膜电位,快速生长的花粉管需要大量的 K^{+} ^[54]。研究还发现在植物体内, $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 可能比 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 大 3 个数量级,估计在 100~200 nmol/L 范围内^[55],基于与 EF 手性结构结合时 Mg^{2+} 与 Ca^{2+} 之间存在竞争关系,在 Mg^{2+} 存在的情况下,蛋白质与 Ca^{2+} 普遍具有较弱的亲和力^[56-59]。(2) CMLs 蛋白会影响阳离子的变化,通过影响 NO 的浓度影响花粉管的生长。转录组分析结果表明,月季中 CMLs 蛋白参与植物病原体相互作用的信号通路, Ca^{2+} 通过环核苷酸门通道蛋白(CNGCs)从质外体进入细胞质中,作用于 CaM 和 CMLs 蛋白,使一氧化氮合酶(NOS)合成 NO,最终调控植物气孔关闭,同时与 NADPH 氧化酶(Rboh 蛋白)合成的活性氧(ROS)共同调控植物的抗逆反应以及细胞壁生长等。

拟南芥 CMLs 蛋白的功能研究有报道。CML25 蛋白作为一个新的钙信号下游响应元件在花粉和花粉管中大量表达,参与 Ca^{2+} 调控花粉萌发及花粉管生长的信号转导途径。作者对月季 CML25 基因序列进行 Blastx 分析发现,该基因含有 EF 手性结构域,分泌蛋白呈酸性,富含半胱氨酸 Ca^{2+} 结合区。CML25 与拟南芥中 CML25 基因具有 70% 的同源性,说明两者很可能具有相似的生物学功能。CML25 在胞内介导 Ca^{2+} 信号对成熟花粉和花粉管 K^{+} 的吸收过程,进而参与 Ca^{2+} 调控的花粉萌发及花粉管生长^[22]。由此可见, K^{+} 通道的活性在花粉萌发及花粉管生长中也起作用,它主要与胞内 Ca^{2+} 和质子的流动紧密相关。花粉水合时,花粉吸水,膨压增加,萌发孔

处牵拉质膜,激活该处的钙通道和钙依赖的 K^{+} 通道,形成稳定的 K^{+} 内流和局部高 Ca^{2+} 浓度,花粉管由此长出,含有通道蛋白的囊泡膜运送到花粉管顶端,增强了极性生长^[45]。CMLs 蛋白除了结合 Ca^{2+} 之外, CML36 蛋白直接与拟南芥质膜上 Ca^{2+} -ATPase8(ACA8)的调节性 N 末端相互作用,从而刺激 ACA8 蛋白活性。推测 CMLs 蛋白家族还可能参与植物自身抑制 Ca^{2+} 泵的调控^[60]。

AtCML24 是一种 CaMs 相关蛋白,与保守的 CaMs 的整体序列同一性共享 40%,其经过结合 Ca^{2+} 产生的构象变化,不受 Ca^{2+} 作用的影响。CML24 是第一个被鉴定为触感诱导型基因,对多种非生物胁迫和激素具高反应性。低表达 CML24 的转基因植物参与 ABA 的调节和盐胁迫反应,对花粉萌发和花粉管发育具积极作用^[61],同时, CML24 还参与了 NO 诱导的花粉管正常生长过程。与野生型相比, CML24 突变体发芽较慢,花粉管的延伸速度变慢,最终长度变短,并且突变体中花粉管的伸长对外部 K^{+} 和 Ca^{2+} 浓度变化不敏感;同时, cml24 突变体的花粉和花粉管的肌动蛋白细胞骨架混乱,敏感度降低。由此表明 CML24 和胞内游离 Ca^{2+} 之间相互作用,并且参与肌动蛋白组织的构成,共同影响花粉的萌发和花粉管伸长。此外,胞外的 K^{+} 还会借助质膜上的各类 K^{+} 通道或转运体进入胞内影响花粉管生长,这些通道及转运体的活性受到胞内信号的严格调控。大部分参与花粉管生长的 CMLs 主要定位于细胞质, CML24 突变体阻断 Ca^{2+} 下游调控通路,引起反馈调节,胞内 Ca^{2+} 浓度升高,破坏花粉管的细胞骨架,同时破坏正常花粉管中从萌发孔到顶端逐渐递增的 Ca^{2+} 浓度梯度,从而影响花粉管生长^[24];另一方面突变体中, NO 荧光强度明显高于野生型,花粉管生长速率降低,且花粉管转向对 NO 诱导弱敏感,导致花粉管不能精准进入胚珠完成双受精,进而阻碍了种子的形成。说明花粉管中的 NO 浓度增加,会改变花粉管生长导向,同时这也是造成最终结实率降低的原因之一(图 2)^[62]。

3 总结和展望

通过归纳分析 CMLs 蛋白在花粉萌发及花粉管生长过程中的表达特征及作用机理,认为 CMLs 蛋白主要通过结合 Ca^{2+} 来调控花粉管中 Ca^{2+} 浓度的变化从而影响花粉萌发和花粉管的生长。花粉之间的竞争强势则主要体现在花粉在柱头上的萌发以及花粉管在花柱中的生长时期;而 CMLs 蛋白表达量在花粉萌发、花粉管穿过柱头、进入花柱、到达子房等不同生长时期呈现出不同的变化,表明 CMLs 蛋白

可能参与到花粉的竞争优势中。然而,在不同倍性花粉中 CMLs 蛋白除了表达量的差异之外,是通过何种机制影响花粉在柱头上的萌发及花粉管生长的

尚不清楚,有待深入探究。通过对 CMLs 蛋白参与授粉过程作用的总结和阐述,有助于我们全面认识显花植物有性生殖过程的机制。

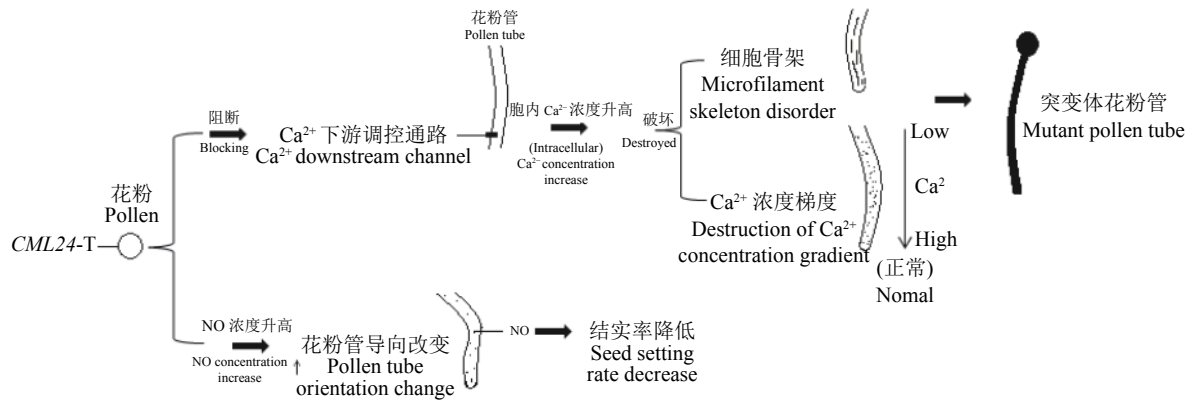


图2 CML24 基因调控花粉管生长的机理

Fig. 2 Mechanism of CML24 gene regulating pollen tube growth

参 考 文 献

- [1] DeFalco T A, Bender K W, Snedden W A. Breaking the code: Ca^{2+} sensors in plant signaling[J]. *Biochemical Journal*, 2010, 425(1): 27–40.
- [2] Bender K W, Snedden W A. Calmodulin-related proteins step out from the shadow of their namesake[J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(2): 486–495.
- [3] Abbas N, Maurya J P, Senapati D, et al. *Arabidopsis* CAM7 and HY5 physically interact and directly bind to the HY5 promoter to regulate its expression and thereby promote photomorphogenesis[J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(3): 1036–1052.
- [4] Chen C, Duanmu H Z, Zhu D, et al. Bioinformatics analysis of *GmCML* genes in soybean genome[J]. *Soybean Science*, 2015, 13(7): 427–435.
- [5] Perochon A, Aldon D, Galaud J P, et al. Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling[J]. *Biochimie*, 2011, 93(12): 2048–2053.
- [6] Song M, Xu J Q, Sun Z J, et al. Molecular cloning and expression analysis of cam-like protein genes (bocml49) from cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2012, 38(12): 2162–2169.
- [7] La V V, Trande M, D'Onofrio M, et al. Binding of calcium and target peptide to calmodulin-like protein CML19, the centrin 2 of *Arabidopsis thaliana* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 108: 1289–1299.
- [8] Zeng H Q, Zhang Y X, Zhang X J, et al. Analysis of EF-hand proteins in soybean genome suggests their potential roles in environmental and nutritional stress signaling[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 877.
- [9] McCormack E, Braam J. Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis* [J]. *New Phytologist*, 2003, 159(3): 585–598.
- [10] Ogunrinde A, Munro K, Davidson A, et al. *Arabidopsis* calmodulin-like proteins, CML15 and CML16 possess biochemical properties distinct from calmodulin and show non-overlapping tissue expression patterns[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 2175.
- [11] Finn B E, Evenäs J, Drakenberg T, et al. Calcium-induced structural changes and domain autonomy in calmodulin[J]. *Nat Struct Biol*, 1995, 2(9): 777–783.
- [12] Ikura M, Tanaka T, Zhang Q M. Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin[J]. *Nature Structural Biology*, 1995, 2(9): 758–767.
- [13] Chigri F, Flosdorff S, Pilz S, et al. The *Arabidopsis* calmodulin-like proteins AtCML30 and AtCML3 are targeted to mitochondria and peroxisomes, respectively[J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 78(3): 211–222.
- [14] Yang T B, Poovaiah B W. Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants[J]. *Trends in Plant Science*, 2003, 8(10): 505–512.
- [15] Boonburapong B, Buaboocha T. Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins[J]. *Bmc Plant Biology*, 2007, 7(1): 4–10.
- [16] Gong M, Yang Z H, Cao Z X. Involvement of calmodulin in pollen germination and pollen tube growth[J]. *Acta Phytophysiological Sinica*, 1994(3): 240–248.
- [17] Ma L G, Fan Q S, Yu Z Q, et al. Does aluminum inhibit pollen germination via extracellular calmodulin? [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2000, 41(3): 372–376.
- [18] Vanderbeld B, Snedden W A. Developmental and stimulus-induced expression patterns of *Arabidopsis* calmodulin-like genes *CML37*, *CML38* and *CML39* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 64(6): 683–697.
- [19] 李娜. 拟南芥钙调素类似蛋白 CML24 调控铝抑制根伸长的机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2015.
- Li N. Calmodulin like protein (CML24) mediates Al-induced root growth inhibition of *Arabidopsis* [D]. Jinan: Shandong University, 2015.

- [20] Zhu X Y, Robe E, Jomat L, et al. CML8, an *Arabidopsis* calmodulin-like protein, plays a role in pseudomonas syringae plant immunity[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2017, 58(2): 307–319.
- [21] Aumnart C, Kampon L, Srivilai P, et al. Expression analysis of calmodulin and calmodulin-like genes from rice, *Oryza sativa* L.[J]. *Bmc Research Notes*, 2012, 5(1): 625–625.
- [22] Wang S S, Diao W Z, Yang X, et al. *Arabidopsis thaliana* CML25 mediates the Ca^{2+} regulation of K^{+} transmembrane trafficking during pollen germination and tube elongation[J]. *Plant Cell & Environment*, 2015, 38(11): 2372–2386.
- [23] Yang X, Wang S S, Wang M, et al. *Arabidopsis thaliana*, calmodulin-like protein CML24 regulates pollen tube growth by modulating the actin cytoskeleton and controlling the cytosolic Ca^{2+} concentration[J]. *Plant Molecular Biology*, 2014, 86(3): 225–236.
- [24] Lin W D, Liao Y Y, Yang T J, et al. Coexpression-based clustering of *Arabidopsis* root genes predicts functional modules in early phosphate deficiency signaling[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 155(5): 1383–1402.
- [25] Bender K W, Rosenbaum D M, Vanderbeld B, et al. The *Arabidopsis* calmodulin-like protein, CML39, functions during early seedling establishment[J]. *Plant Journal*, 2013, 76(4): 634–647.
- [26] Magnan F, Ranty B M, Sotta B, et al. Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid[J]. *Plant Journal*, 2010, 56(4): 575–589.
- [27] Azimzadeh J, Nacry P, Christodoulidou A, et al. *Arabidopsis* TONNEAU1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin[J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(8): 2146–2159.
- [28] Dobney S, Chiasson D, Lam P, et al. The calmodulin-related calcium sensor cml42 plays a role in trichome branching[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(46): 31647–31657.
- [29] Pannell J R, Labouche A M. The incidence and selection of multiple mating in plants[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 2013, 368(1613): 20120051.
- [30] Marshall D L, Ellstrand N C. Proximal causes of multiple paternity in wild radish, *Raphanus sativus*[J]. *American Naturalist*, 1985, 126(5): 596–605.
- [31] Burkhardt A, Internicola A, Bernasconi G. Effects of pollination timing on seed paternity and seed mass in *Silene latifolia* (Caryophyllaceae)[J]. *Annals of Botany*, 2009, 104(4): 767–773.
- [32] Snow A A, Spira T P. Pollen vigour and the potential for sexual selection in plants[J]. *Nature*, 1991, 352(6338): 796–797.
- [33] Pasonen H L, Pulkkinen P, Kapyla M, et al. Pollen-tube growth rate and seed-siring success among *Betula pendula* clones[J]. *New Phytologist*, 2010, 143(2): 243–251.
- [34] Jolivet C, Bernasconi G. Within/between population crosses reveal genetic basis for siring success in *Silene latifolia*, (Caryophyllaceae)[J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 2007, 20(4): 1361–1374.
- [35] McCallum B, Chang S M. Pollen competition in style: effects of pollen size on siring success in the hermaphroditic common morning glory, *Ipomoea purpurea*[J]. *American Journal of Botany*, 2016, 103(3): 460.
- [36] 赖杭桂. 木薯 2n 配子途径诱导多倍体的研究[D]. 海口: 海南大学, 2014.
- Lai H G. Research on induction of cassava polyploid through 2n gametes[D]. Haikou: Hainan University, 2014.
- [37] Kang X Y, Zhu Z T. A study on the 2n pollen vitality and germinant characteristics of white poplars[J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 1997, 19(4): 402–406.
- [38] Vanbreukelen E W M, 董延瑜. 快速测定活体马铃薯花柱上 2X 和 X 花粉间的竞争[J]. *园艺与种苗*, 1984(3): 26–27.
- Vanbreukelen E W M, Dong Y Y. Rapid determination of competition between 2X and X pollen on living potato style[J]. *Horticulture & Seed*, 1984(3): 26–27.
- [39] Qu D Y, Zhu D W, Ramanna M S, et al. A comparison of progeny from diallel crosses of diploid potato with regard to the frequencies of 2n-pollen grains[J]. *Euphytica*, 1995, 92(3): 313–320.
- [40] Liu X. Investigation of ploidy level and embryogenesis of progeny from crosses of tetraploid with diploid in Chinese cabbage[J]. *British Journal of Haematology*, 1996, 27(1): 153–161.
- [41] Wang Y, Zhang W Z, Song L F, et al. Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(3): 1201–1211.
- [42] Zhou L, Ying F U, Yang Z. A genome-wide functional characterization of *Arabidopsis* regulatory calcium sensors in pollen tubes[J]. *Journal of Integrative*, 2009, 51(8): 751–761.
- [43] Bender K W, Dobney S, Ogunrinde A, et al. The calmodulin-like protein CML43 functions as a salicylic-acid-inducible root-specific Ca^{2+} sensor in *Arabidopsis*[J]. *Biochemical Journal*, 2014, 457(1): 127–136.
- [44] Lenartowska M, Rodríguez-García M I, Bednarska E. Calmodulin and calmodulin-like protein are involved in pollen-pistil interaction: immunocytochemical studies on petunia hybrida hort[J]. *Acta Biologica Cracoviensia*, 2001, 43(2): 117–123.
- [45] Sun Y, Sun D. Signal transduction in pollen germination and tube growth[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43(12): 1211–1217.
- [46] Staiger C J, Poulter N S, Henty J L, et al. Regulation of actindynamics by actin-binding proteins in pollen[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(7): 1969–1986.
- [47] Zhang Y, McCormick S. The regulation of vesicle trafficking by small gtpases and phospholipids during pollen tube growth[J]. *Sexual Plant Reproduction*, 2010, 23(2): 87–93.
- [48] Luis Cárdenas, Lovywheel A, Kunkel J G, et al. Pollen tube growth oscillations and intracellular calcium levels are reversibly modulated by actin polymerization[J]. *Plant Physiology*, 2008, 146(4): 1611–1621.

- [49] Dodd A N, Kudla J, Sanders D. The language of calcium signaling[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61(1): 593–620.
- [50] Hepler P K, Kunkel J G, Rounds C M, et al. Calcium entry into pollen tubes[J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(1): 32–38.
- [51] Franklinton V E, Drobak B K, Allan A C, et al. Growth of pollen tubes of papaver rheas is regulated by a slow-moving calcium wave propagated by inositol 1,4,5-trisphosphate[J]. *Plant Cell*, 1996, 8(8): 1305–1321.
- [52] Magnan F, Ranty B M, Sotta B, et al. Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid[J]. *Plant Journal*, 2010, 56(4): 575–589.
- [53] Li Y Q, Zhang H Q, Pierson E S, et al. Enforced growth-rate fluctuation causes pectin ring formation in the cell wall of liliun longiflorum pollen tubes[J]. *Planta*, 1996, 200(1): 41–49.
- [54] Mouline K, Véry A A, Gaymard F, et al. Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K⁺ channel in *Arabidopsis* [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(3): 339–350.
- [55] Waters B M. Moving magnesium in plant cells[J]. *New Phytologist*, 2011, 190(3): 510–513.
- [56] Ohki S, Ikura M, Zhang M. Identification of Mg²⁺-binding sites and the role of Mg²⁺ on target recognition by calmodulin[J]. *Biochemistry*, 1997, 36(14): 4309–4316.
- [57] Malmendal A, Linse S, Evenäs J, et al. Battle for the EF-hands: magnesium-calcium interference in calmodulin[J]. *Biochemistry*, 1999, 38(36): 11844–11850.
- [58] Clapham D E. Calcium signaling[J]. *Cell*, 2007, 131(6): 1047–1058.
- [59] Gifford J L, Walsh M P, Vogel H J. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs[J]. *Biochemical Journal*, 2007, 405(2): 199–221.
- [60] Astegno A, Bonza M C, Vallone R, et al. *Arabidopsis* calmodulin-like protein CML36 is a calcium (Ca²⁺) sensor that interacts with the plasma membrane Ca²⁺-ATPase Isoform ACA8 and stimulates its activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(36): 15049–15061.
- [61] Delk N A, Johnson K A, Chowdhury N I, et al. CML24, regulated in expression by diverse stimuli, encodes a potential Ca²⁺ sensor that functions in responses to abscisic acid, daylength, and ion stress[J]. *Plant Physiology*, 2005, 139(1): 240–253.
- [62] 杨雪. 拟南芥 CML24 调控花粉萌发及花粉管生长的功能研究 [D]. 济南: 山东大学, 2014
Yang X. Functional study of CML24 in regulating pollen germination and pollen tube growth in *Arabidopsis* [D]. Jinan: Shandong University, 2014.

(责任编辑 赵 勃
责任编辑委 蒋湘宁)