

温度胁迫对植物花粉发育的影响

冯瑶瑶^{1#} 孙继^{2#} 俞洋³ 武婷³ 刘丹丹¹ 林苏娥⁴ 赵玉雪¹ 黄鹂^{1*}

(¹浙江大学蔬菜研究所, 杭州 310058; ²温州科技职业学院, 温州 325006; ³浙江美之奥种业股份有限公司, 嘉兴 314023; ⁴温州大学生命科学研究院, 温州 325000)

摘要 温度是影响开花植物有性繁殖的重要环境因子之一, 在雌雄配子的发育过程中, 温度胁迫常导致花粉败育。该文总结了目前研究已知的温度胁迫对植物花粉发育的影响, 包括花粉发育对温度胁迫的最敏感时期、温度胁迫引起的花药绒毡层、糖代谢、激素水平的变化, 并对低温与高温胁迫对花粉发育的影响进行了比较讨论。文章同时还概述了花粉响应温度胁迫的分子机理研究进展, 重点介绍了目前已知的6个参与花粉响应低温胁迫的基因的功能, 并总结了此研究领域存在的不足及展望了今后研究重点, 以期为进一步解析花粉响应温度胁迫的机制提供参考。

关键词 花粉发育; 温度胁迫; 分子机理

The Effects of Temperature Stress on Pollen Development

Feng Yaoyao^{1#}, Sun Ji^{2#}, Yu Yang³, Wu Ting³, Liu Dandan¹, Lin Sue⁴, Zhao Yuxue¹, Huang Li^{1*}

(¹Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; ²Wenzhou Vocational College of Science and Technology, Wenzhou 325006, China; ³Zhejiang MITSUO Seed Incorporated Company, Jiaxing 314023, China; ⁴Institute of Life Science, Wenzhou University, Wenzhou 325000, China)

Abstract Temperature is one of the most essential factors which would affect the sexual reproduction in flowering plants. Temperature stress often leads to pollen abortion. Here, the effects of temperature stress on pollen development were summarized, including the most sensitive stage of pollen development to temperature stress, the change of tapetum, sugar metabolism and hormone levels caused by temperature stress. The effects of cold and heat stress on pollen development were also briefly compared. The progresses of molecular mechanism of pollen response to cold stress were simply summarized and six genes involved in pollen response to cold stress were emphatically introduced. Furthermore, the main problems in current researches and the key points in future studies were also proposed, in hope of providing reference for further revealing the molecular mechanisms of pollen response to temperature stress.

Keywords pollen development; temperature stress; molecular mechanism

有花植物花粉发育从花粉母细胞(pollen mother cell, PMC)的分化开始, 经历一次减数分裂和一次或

两次有丝分裂从而形成成熟花粉粒。有花植物的繁殖依赖于有活力的花粉, 花粉粒落到柱头(stigma)表

收稿日期: 2018-07-02 接受日期: 2018-10-15

浙江省农业(蔬菜)新品种选育重大科技专项(批准号: 2016C02051-6-1)、中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: 2018QNA6016)和嘉兴市科技计划项目(批准号: 2017C11101)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0571-88982597, E-mail: lihuang@zju.edu.cn

Received: July 2, 2018 Accepted: October 15, 2018

This work was supported by the Grand Science and Technology Special Project of Zhejiang Province (Grant No.2016C02051-6-1), the Fundamental Research Funds for the Central University (Grant No.2018QNA6014) and the Science and Technology Project of Jiaxing City (Grant No.2017C11101)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-571-88982597, E-mail: lihuang@zju.edu.cn

网络出版时间: 2018-12-26 18:28:30

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181226.1828.006.html>

面,经识别、黏附、萌发形成花粉管(pollen tube)。花粉管将雄配子运输至胚囊,完成受精。花粉发育与授粉受精这两个过程既相互独立又紧密相连。多种因素均能影响花粉的正常发育,甚至导致花粉败育,产生功能丧失的花粉。花粉败育是引起作物减产或杂种不育的重要因素之一。花粉败育的原因大体可分为遗传和环境两个方面。从遗传方面看,有的是细胞核雄性不育,有的则是细胞质雄性不育;从环境方面看,干旱、温度胁迫、光照不足、施肥不当、环境污染以及化学药剂处理等,均可导致花粉败育^[1]。

温度在植物生长发育过程中起着非常关键的作用,当环境温度超出了植物的适应范围,就会对植物形成胁迫,影响植物光合作用、氧化还原反应、细胞膜流动性、细胞渗透压、蛋白质和核酸的结构等生理和代谢反应^[2]。事实上,由于植物为固着生长,不能通过移动或其他方式逃避温度胁迫对其造成的伤害,因此只能通过启动一系列复杂的生理生化反应来抵御温度胁迫。

研究表明,在植物生长发育过程中,开花期对温度的要求最为严格,温度胁迫会引起花期的推迟或提早,而由于花粉比雌蕊对温度更敏感,温度胁迫常导致花粉败育、花粉和子房发育不同步等结果^[3-4]。早期关于温度胁迫的研究主要集中在低温胁迫领域。近些年来,由于全球温度呈上升的趋势,研究者们对高温对植物生长发育的影响上也投入了越来越多的关注。弄清楚温度胁迫对植物花粉发育的影响以及花粉如何响应温度胁迫,不仅是全面理解植物响应外界环境胁迫机理的重要组成部分,也对指导作物育种、繁种等生产实践具有重要的意义。近年来,人们在模式植物拟南芥、水稻、大豆、油菜、鹰嘴豆、苜蓿等作物以及杨树、蔷薇等植物中开展了温度胁迫如何影响花粉发育的相关研究,发现温度胁迫对不同物种花粉发育的影响具有保守性,目前已经较为清楚高、低温胁迫对花粉发育造成的细胞学和生理学上的变化,发现高、低温胁迫对花粉发育造成的影响有类似之处,同时还发现,花粉发育的不同阶段对温度的敏感程度有所差异,并非所有发育时期均受到温度胁迫的严重影响。另外,人们对花粉响应温度胁迫的分子机制也进行了初步的探索。本文就近年来的这些研究作一综述,以期为更好地阐明花粉响应低温胁迫的分子机理、制定相应的抵御温度胁迫的生产技术措施等提供新的思路。

1 温度胁迫对植物花粉发育的影响

1.1 花粉发育对温度胁迫的敏感时期

在以拟南芥、水稻等模式植物为主的研究中发现,低温胁迫影响花粉发育主要表现为育性降低、花粉数目减少、结构异常、生活力下降、花粉萌发率降低、结籽率降低、绒毡层和胼胝质降解异常等^[5-7]。花粉发育是一个包含多步骤、复杂的生物学过程,通常分为花粉母细胞时期、减数分裂时期、单核小孢子时期、双核期和成熟花粉期等几个特征发育阶段^[8]。低温胁迫对花粉发育的各个时期都会造成损伤,但不同发育时期对低温胁迫的敏感程度不一。关于花粉发育过程中哪一阶段对温度胁迫最为敏感,目前有两种观点。Takeoka等^[9]、Satake等^[10]研究者认为,四分体产生以前是最敏感的时期;而其他一些研究者认为,从花粉母细胞减数分裂至受精和种子发育过程对温度胁迫都非常敏感^[11]。Ohnishi等^[12]对处于不同开花时期的大豆用15/12 °C(昼/夜)处理5天后发现,低温胁迫对大豆四分体形成时期影响最大,由四分体释放出的小孢子有一半发育不正常。De Storme等^[13]用4 °C低温对减数分裂时期的拟南芥花蕾进行了40 h的处理后发现,短期低温胁迫会阻碍减数分裂和有丝分裂末期赤道板两侧微管的形成,影响细胞质的正常分裂,并最终诱导多倍体大花粉粒的产生。在热敏雄性不育小麦品种‘BS366’中的研究发现,在花粉发育早期给予10 °C、5天的低温处理,会影响减数分裂I末期成膜体(phragmoplast)及细胞板的正常形成,这预示着减数分裂胞质分裂异常,最终导致花粉母细胞死亡。进一步通过转录组测序发现,许多细胞骨架信号组分在低温处理后被诱导,而许多调控细胞骨架动态组织的关键基因的表达却被大幅度抑制^[14]。荧光标记进一步显示,低温胁迫导致成膜体肌动蛋白纤维排列紊乱,而肌动蛋白动态形式的改变是导致减数分裂细胞板不能正常形成的关键因素^[15]。

高温胁迫同样影响花粉减数分裂。对杨树不同发育阶段的花序进行36~40 °C高温处理,发现随着处理时间的延长,大花粉和败育花粉的比例增加,其中,在终变期向减数第一次分裂中期过渡时进行高温处理产生的大花粉频率最高。细胞学观察发现,高温胁迫下减数分裂时期染色体行为异常,出现平行、融合、三极型纺锤体。免疫定位实验发现,高温对减数分裂时期的部分微管骨架造成了不可逆的

损伤, 这是导致大花粉产生的原因^[16]。对蔷薇进行 36 °C、48 h 的高温处理产生的未减数花粉是因为减数第二次分裂时期纺锤体极性受到影响所致^[17], 在苜蓿、番薯中也出现了同样的表型^[18]。事实上, 植物本身对温度的耐受程度有所差别, 不同物种花粉对温度胁迫的敏感程度不一。但在花粉发育过程中, 减数分裂时期, 尤其是减数分裂胞质分裂形成四分体的时期, 是花粉发育过程中对温度胁迫最为敏感的时期, 这与花粉发育在不同物种中的保守性不无关系。

1.2 温度胁迫影响绒毡层降解进而影响花粉壁形成

研究发现, 温度胁迫影响花粉发育早期造成的最终影响常常是花粉壁发育的异常^[5-6]。花粉壁是花粉结构中最特别的一部分, 其精细构建由小孢子本身和花药绒毡层共同控制。不同物种花粉壁的形态千差万别, 但基本组成高度相似, 均由来源和成分截然不同的外壁和内壁两层结构组成。花粉外壁为孢子体起始, 由从绒毡层分泌而来的孢粉素堆积形成, 既是花粉的保护屏障, 也是花粉与柱头识别的重要媒介^[19]。花粉内壁为配子体起始, 主要由小孢子自身合成的多糖类物质组成, 作为花粉管壁的最初起始物, 直接参与花粉萌发和花粉管伸长, 同时还在花粉稳定性的维持、萌发沟的形成以及花粉水合作用的激活中起作用^[20]。因此, 花粉壁发育异常是导致花粉不具备正常生物学功能的原因之一。在减数分裂之前, 小孢子母细胞的细胞壁由一层介于细胞纤维素壁和质膜之间、含有胼胝质和 1,3- β -葡聚糖酶的特殊物质构成。在减数分裂时期, 胼胝质在小孢子四周逐渐积累。减数分裂完成后, 小孢子从四分体释放, 外围胼胝质壁逐渐降解, 以提供小孢子外壁合成所需物质。在该过程中, 若胼胝质壁提前降解, 释放出的小孢子其外壁不能正常发育, 极易死亡^[21]。而胼胝质壁的正常降解又依赖于绒毡层细胞中粗糙型内质网合成并分泌的一些胼胝质降解酶类。绒毡层对于花粉外壁发育的作用远不仅于此, 在正常情况下, 绒毡层通过自身代谢降解, 即绒毡层的程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD), 不仅为临近小孢子发育提供养分, 还提供孢粉素、乌氏体等外壁发育所必需的物质^[22-23]。换言之, 花粉外壁的形成离不开绒毡层的正常降解。

现有研究发现, 低温胁迫通过影响四分体时期小孢子外围的胼胝质正常降解和绒毡层的PCD过

程, 最终引起花粉外壁发育异常, 致使花粉不具备正常的生物学功能^[6,24-25]。以水稻为例, 其花粉发育早期若遭受低温胁迫, 其胼胝质壁将提前降解, 而部分降解物会积累在绒毡层, 致使绒毡层肿大, 正常的PCD过程受阻, 最终导致花粉外壁构建所需物质及花粉发育所需要的养分缺乏, 致使花粉过早败育^[5]。低温胁迫本身也会直接影响绒毡层的正常降解。Yu等^[26]通过对一种油菜温敏型雄性不育系观察发现, 低温胁迫下的不育系花粉异常始于四分体时期, 此时期绒毡层开始出现空泡化, 在单核小孢子时期绒毡层完全降解, 小孢子细胞质丢失, 导致成熟期花粉完全败育。研究证实, 绒毡层不能正常降解是导致花粉败育的主要原因^[5-6,27]。细胞超微结构观察显示, 低温胁迫对绒毡层的影响最早出现在粗糙型内质网的结构上, 造成两个典型的表型: 异常的内质网排列方式和内质网小体的出现^[24]。此外, 低温还可以通过直接破坏花粉壁结构的方式影响花粉发育。例如, 对发育中的杏花进行-2 °C处理 4 h后, 其花粉外壁覆盖层发生溶解, 在部分区域甚至发生整个外壁结构的解体^[28]。

绒毡层的不正常降解也是高温胁迫引起的重要表型。大麦经高温处理后, 其花粉发育后期绒毡层不能正常降解, 致使花粉败育^[29]。类似的现象同样出现在C3模式植物短柄草中^[30]。大麦经高温处理后绒毡层细胞过度肥大, 花药中缺乏花粉粒并且花药变短^[31]。超微结构观察发现, 高温处理使四季豆绒毡层粗糙型内质网结构发生了改变, 与正常呈堆积状的结构相比, 呈现不正常的线状、波浪状以及环状等^[32]。一种水稻热敏性雄性不育系在高温处理后出现四分体时期的绒毡层提前降解、细胞空泡化、单核期小孢子破裂, 最终无法产生花粉^[33]。这些表型均与低温引起的绒毡层变化类似。

1.3 温度胁迫影响花粉发育过程中的糖代谢

低温胁迫对花粉发育的影响还表现在花粉发育过程中的糖代谢上。在正常花粉发育过程的糖代谢中, 淀粉在第一次有丝分裂后的小孢子营养核中开始慢慢合成, 在双核时期其含量达到最高, 而至花粉成熟后, 淀粉又逐渐转化为可溶性糖类^[34-35]。在花粉成熟末期, 淀粉的生物合成至关重要, 不仅因为淀粉是花粉萌发时所需能量的储备源, 同时也是指示花粉是否成熟的一个重要指标。在一些雄性不育突变体中, 包括玉米的S型细胞质雄性不育(S-CMS),

淀粉含量达不到既定的水平,花粉成熟过程提早终止,花粉活力受到影响^[36]。

在小孢子发育早期对水稻进行低温处理,结果导致约98.7%的花粉在成熟时淀粉被耗尽,而在双核早期进行低温处理则导致约11.9%的花粉在成熟时淀粉消失,说明低温胁迫影响了花粉中淀粉的积累,而淀粉含量与花粉活力成正比^[37]。然而,低温处理却导致水稻小孢子发育早期的花药中蔗糖含量的显著升高,待移至正常温度下发育至双核花粉时,蔗糖含量恢复至正常水平;同时低温处理还导致了花药中葡萄糖和果糖含量的升高^[37]。此外,研究发现,低温还会导致淀粉在水稻花粉囊内层异常积累^[5]。在正常温度下,游离小孢子释放不久后的花粉囊内层细胞含有数个叶绿体及其他细胞器,而这些叶绿体不含有淀粉粒或仅含有非常小的淀粉粒,且这些小淀粉粒也在逐渐降解;但在低温处理后,内层细胞叶绿体中的淀粉粒体积和数目均增大,伴随着淀粉的积累,叶绿体中的类囊体和叶绿体基粒以及外膜均降解^[5]。然而,目前仍不清楚低温导致花粉及花药中糖代谢变化的具体原因,但毋庸置疑的是,低温打乱了花药中包含糖代谢和积累过程在内的碳水化合物循环。

然而,高温胁迫在影响花粉淀粉积累方面与低温胁迫有所不同。Zinn等^[38]用40℃的高温处理拟南芥1 h后发现,其结荚率严重下降,结籽率降低50%,且结籽集中在角果顶端,进一步的研究发现,高温通过使花粉中碳水化合物的代谢失衡影响花粉管的生长,进而影响受精。然而,与低温不同的是,高温对花粉糖代谢会因物种不同而产生不同的影响,例如30℃的高温会使水稻成熟花粉中积累更多的淀粉^[39],而棉花中短暂的高温却会改变碳水化合物的代谢,使花粉发育过程中淀粉积累减少,最终导致花粉败育^[40]。

1.4 温度胁迫影响花粉发育过程中的激素水平

植物激素参与调节植物生长发育的各个过程,越来越多的研究表明,低温会破坏多种激素动态平衡。Sakata等^[41]在水稻中研究发现,低温抑制了花药中促进赤霉素(gibberlic acid, GA)合成的两个氧化酶基因*GA20ox3*和*GA3ox1*的表达,导致内源性GA减少,而外施适量的GA可以在一定程度上减轻低温胁迫对花粉发育造成的伤害。低温胁迫还会通过增加花药中脱落酸(abscisic acid, ABA)的含量,负调控绒毡层细胞壁转化酶和单糖转运基因的表达,导致花

药中的碳水化合物紊乱并最终引起花粉败育^[42]。众多研究结果说明,激素信号途径参与了花粉对温度胁迫的响应。而在植物的营养生殖过程中,低温与ABA、乙烯、GA、细胞分裂素、生长素、茉莉酸(jasmonic acid, JA)等激素信号均有交叉,其中乙烯调节植物的低温响应具有物种差异性,其他激素在植物对低温响应中的作用也存在争议^[43]。在水稻冷抗品种‘TNG67’中通过转录组测序发现,与ABA、JA、生长素相关的基因与其抗冷性相关^[44]。但关于激素调控花粉响应低温胁迫的作用与其调控营养生长的作用是否相同目前还没有定论。

高温胁迫也会影响花粉发育过程中的激素水平。对热抗和热敏两种棉花进行35℃~39℃的高温处理7天,发现热敏型棉花H05系在小孢子时期出现异常导致花粉最终败育,进一步利用比较转录组分析和RT-PCR验证发现,高温诱导花药中生长素合成基因的上调表达,从而揭示了生长素信号途径参与花药响应高温胁迫的路径^[45]。在番茄、拟南芥、百合、水稻等物种中均已印证高温影响花粉激素水平,然而不同激素在花粉对高温的耐受性作用方面却不尽相同^[46]。

植物花粉发育时期遭受高低温胁迫后表型的主要异同归纳见表1。

2 花粉响应温度胁迫的分子机理

植物生长发育的可塑性使得其在受到外界环境胁迫时会重组基因表达系统^[47]。这些表达的基因大致分为两类:编码信号传导和转录调控的相关物质;编码直接参与生理作用的蛋白质及酶类。植物响应低温过程涉及一系列生理生化反应,这个过程受高度复杂的基因网络调控,此外,在这个过程中还会受到一些激素及一些非编码RNA的影响^[37]。在拟南芥中,低温胁迫响应基因大约占整个基因组的4%~20%^[48-49]。近年来,在以拟南芥和水稻等模式植物为代表的相关研究中,研究者鉴定了大量在幼苗中参与响应低温胁迫的转录因子和响应蛋白,并初步梳理了幼苗响应低温胁迫的表达调控通路,其中涉及众多基因的表达重塑和信号转导途径的诱导^[47,50]。相较于植物营养生长过程,花粉发育时期虽然短暂但具有其特异且复杂的发育特点,但目前对花粉响应低温胁迫的分子机理的研究却少之又少,功能已知的与花粉响应低温胁迫相关的基因目

表1 温度胁迫对植物花粉发育的影响

Table 1 The influence of heat and cold stress on pollen development

胁迫类型 Stress	最敏感时期 Sensitive stage	主要表型 Main phenotypic	主要研究物种 Main species
Cold stress	Meiosis (MII cell plate formation)	Imbalance of sugars metabolism, hypertrophy of the tapetum, premature breakdown of callose, defects in postmeiotic cell plate formation, abnormal rough endoplasmic reticulum	<i>Arabidopsis thaliana</i> ^[13] , <i>Oryza sativa</i> ^[5,38] , <i>Triticum aestivum</i> ^[14] , <i>Glycine max</i> ^[12] , <i>Brassica napus</i> ^[26]
Heat stress	Meiosis (MII spindle formation)	Imbalance of sugars metabolism, premature breakdown of tapetum, spindle disorientation, defects of microtubule cytoskeleton, abnormal rough endoplasmic reticulum	<i>Arabidopsis thaliana</i> ^[39] , <i>Oryza sativa</i> ^[33] , <i>Hordeum vulgare</i> ^[29] , <i>Phaseolus vulgaris</i> ^[32] , <i>Populus</i> ^[16] , <i>Rosa sp</i> ^[17] , <i>Brachypodium distachyon</i> ^[30] , <i>Medicago sativa</i> ^[18]

前仅查到6个。相比之下,关于花粉响应高温胁迫的研究则较多,主要集中在热激转录因子(heat shock transcription factors, HSFs)和热激蛋白(heat shock proteins, HSPs)的研究。

2.1 温度胁迫响应基因的大规模筛选

早期运用基因表达系列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)和基因芯片技术分析低温处理前后的拟南芥成熟花粉,筛选出了一系列差异表达基因,推测植物花粉发育时期对低温胁迫敏感可能是因为胁迫响应基因表达低或不表达的缘故^[51-52]。进一步分析结果显示,在2 127个受低温调控表达的基因中,其中697个受低温诱导上调表达,1 430个基因则下调表达。在这些差异表达的基因中,有很大一部分与信号转导相关或编码转录因子,此外,还有一部分基因与激素如ABA、生长素和JA等的合成和信号通路相关。有意思的是,在这些基因中,还发现159个已知花粉特异的与育性相关的基因,暗示这些基因可能在花粉发育和花粉响应低温胁迫这两个过程中均发挥作用。同时,在这些差异表达基因中,并没有发现在幼苗或叶片中高表达、被认为是与低温胁迫响应相关的基因,如COR15A、COR15B、LTP3、 β -淀粉酶(β -amylase)编码基因等,它们在低温处理后的花粉中并没有被诱导表达或仅微弱表达,暗示植物在营养生长期和花粉发育时期对低温胁迫的响应能力和机制不尽相同^[51-52]。Yamaguchi等^[53]通过cDNA微阵列技术检测水稻单核早期花药遭受低温胁迫时基因的表达变化,筛选到160多个ESTs(expressed sequence tag),并鉴定到3个可能参与单核期花药对低温胁迫响应的新基因。此外,Sharma等^[54]通过mRNA差异显示技术(differential display of reverse transcriptional PCR, DDRT-PCR)分析低温

胁迫下的鹰嘴豆花药转录本,结果发现,糖、三酰甘油代谢基因和花粉发育相关基因的表达上升,从而维持了花粉的正常发育。

花粉响应高温胁迫基因的筛选主要以基因芯片和基因组学、转录组学、蛋白质组学等组学技术为辅助^[55]。代表性的研究有以下一些例子。例如,通过改变温度和氮肥施用量设计不同组合处理水稻,对其减数分裂期颖花进行转录组测序分析发现,NN(正常氮肥施用量,正常温度)和NH(正常氮肥施用量,高温)两种处理下检测到151个温度响应差异表达基因,其中40个上调表达,111个下调表达,这些基因与热激蛋白、过氧化物酶、钙依赖性蛋白等相关,当处于高温胁迫时提高氮肥使用量会部分恢复花粉育性^[56]。在温度响应协同表达基因中,有5个孢粉素合成基因和7个花粉外壁形成基因在高温下表达降低,提高氮肥用量后则有所提高,说明这些基因在高氮肥施用响应高温胁迫具有重要作用^[56]。对拟南芥野生型和cngc突变体经40 °C高温处理1 h后的花粉进行转录组测序,在野生型植株和突变体中分别检测到2 102、3 936个转录本的表达发生显著变化,比较野生型花粉和营养组织高温胁迫的转录本以及突变体花粉高温胁迫的转录本,发现89个转录因子是依赖于高温在花粉中特异变化的,花粉和营养组织对高温的响应有所区别,而突变体对高温的超敏性可能是由于其花粉在热胁迫响应时转录组无法重新编码所致^[57]。

2.2 花粉响应温度胁迫关键基因的鉴定

响应温度胁迫关键基因的鉴定主要通过突变体的筛选来实现。拟南芥WRKY34是一个受低温诱导、在成熟花粉细胞核中特异表达的转录因子编码基因^[7]。其突变体在正常温度下的花粉活力、体内

萌发率、角果种子数量都与野生型无明显差异,但受低温胁迫后,花粉活力、体内萌发率、角果种子数量都显著高于野生型;而*WRKY34*过表达植株花粉几乎全部败育;利用正反交等实验证实,*WRKY34*负调控成熟花粉对低温的耐受力^[7]。进一步研究证实,参与花粉萌发和花粉管伸长的重要调节因子MIKC类转录因子可以结合到*WRKY34*启动子序列的MEF2基序上,从而负调控该基因的表达。拟南芥花粉遭受低温胁迫后,*MIKC*的表达受抑制,*WRKY34*积累,在叶片和幼苗期响应低温胁迫中起关键作用的CBFs和一些*COR*基因的表达会受到*WRKY34*的抑制,无法在成熟花粉抵御低温胁迫时发挥作用^[52,58]。

水稻*OsINV4*基因编码一个细胞壁转化酶,它在四分体向单核小孢子过渡时期的绒毡层和维管束、双核期的花粉粒中特异表达,这些时期遭受低温后其表达量降低,进而导致花药中蔗糖积累、成熟花粉中淀粉耗尽和大量花粉丧失活性^[37]。

水稻单糖转运蛋白基因*OsMST7*和*OsMST8*在低温处理后的单核小孢子早期绒毡层和小孢子中表达量明显下降。低温处理导致该时期的绒毡层细胞出现空泡、小孢子细胞壁孢粉素沉积受损、形状扭曲等表型。透射电镜观察进一步发现,低温处理后的花药内壁细胞中存在过量的淀粉积累,同时,四分体时期胼胝质提前降解。推测低温可能通过抑制*OsMST7*和*OsMST8*的表达,而在花粉发育关键的时间点阻碍花药内壁向绒毡层和花粉粒的糖供给,从而导致花粉败育^[5,59]。

*GA20ox3*和*GA3ox1*是水稻花药内源性GA合成时的两个主要氧化酶基因,催化GA前体物质向有活性GA的转变,在双核期时表达量达到顶峰。低温胁迫

下,水稻花粉大量败育,结籽率降低,检测花药中内源性GA含量及GA前体物质,发现低温仅破坏了GA前体物质转化为有活性GA这一过程。*GA20ox3*和*GA3ox1*在多个花粉发育阶段的表达均被抑制,几种GA合成受影响的突变体也对低温更敏感,而外施GA后可以恢复部分花粉育性,因此这两个基因在花粉遭受低温胁迫时起着至关重要的作用^[41]。

到目前为止,对低温胁迫响应机理的研究主要还集中在植物的营养生长期,对生殖生长期尤其是花粉发育过程中的低温胁迫响应机理特别是关键基因的功能鉴定的研究少之又少。相信随着转录组测序等高通量技术的发展,在花粉发育时期响应低温胁迫的更多编码基因和非编码基因会陆续被发现。

关于花粉响应高温胁迫的HSFs和HSPs的诱导表达研究在Muller等^[46]的综述中有详细的介绍,其中一些基因如*AtCNGC16*、*IRE1*在花粉响应高温胁迫时的功能已经被鉴定^[60-61],在此不再赘述。但目前,与花粉发育相关的基因在高温胁迫时是否有响应还尚待深入研究,并且花粉响应高温胁迫的分子网络关系有待建立。

花粉响应温度胁迫关键基因归纳见表2。

3 展望

随着全球气候的变化,科学家预测,到2100年,全球平均气温将会有1.5 °C~5.8 °C的升高,温度的变化将会更加剧烈,这将对植物生长造成巨大的威胁^[62]。虽然温度胁迫对植物花粉发育的影响迄今已有为数不少的研究,但仍有许多问题尚未回答清楚。例如,温度胁迫对花粉发育造成的最致命的影响是什么,发育中的花粉在遭受温度胁迫后是否存在修复

表2 花粉响应温度胁迫关键基因

Table 2 Key genes involved in temperature stress response of pollen

基因名称 Gene	编码蛋白 Protein	基因来源 Species
<i>WRKY34</i>	WRKY transcription factor	<i>Arabidopsis thaliana</i> ^[7]
<i>OsINV4</i>	Cell wall acid invertase	<i>Oryza sativa</i> ^[37]
<i>OsMST7</i>	Monosaccharide transporter	<i>Oryza sativa</i> ^[59]
<i>OsMST8</i>	Monosaccharide transporter	<i>Oryza sativa</i> ^[5]
<i>GA20ox3</i>	Gibberellins biosynthesis enzyme	<i>Oryza sativa</i> ^[41]
<i>GA3ox1</i>	Gibberellins biosynthesis enzyme	<i>Oryza sativa</i> ^[41]
<i>AtCNGC16</i>	Cyclic nucleotide-gated channel16	<i>Arabidopsis thaliana</i> ^[60]
<i>IRE1</i>	Dual protein kinase/ribonuclease	<i>Arabidopsis thaliana</i> ^[61]

机制, 哪些影响可以修复, 哪些无法修复, 在什么条件下可以修复, 植物在花粉发育阶段对温度胁迫的响应机制是否与营养生长阶段相同, 对高低温胁迫响应的机制是否类似, 以及与干旱、盐胁迫等其他胁迫响应途径的交叉如何等等, 这些问题都有待于进一步的解答。目前关于花粉响应温度胁迫的分子机制研究鲜有报道, 随着高通量测序技术的发展, 相信未来参与花粉响应温度胁迫的更多基因会被挖掘, 研究方向应该更关注基因功能鉴定及上下游调控通路, 以形成完整的花粉响应温度胁迫的分子调控网络。另外, 非编码RNA、表观遗传修饰等在调控花粉发育中也起重要作用, 近几年来曾经被视为转录组中“暗物质”的长链非编码RNA(lncRNA)在调控植物响应非生物胁迫中的功能陆续被发现。对拟南芥进行苗期低温处理, 筛选到13个响应低温胁迫的候选lncRNA, 这无疑说明lncRNA参与了温度胁迫响应^[63]。此外, 还筛选到参与氮胁迫的5个反义lncRNA^[63-64], 以及桑树中参与干旱和盐胁迫的*MuLnc1*^[65]。事实上, 无polyA尾的lncRNA在植物参与非生物胁迫时的作用已引起研究者的关注, 相比于有polyA尾的lnc-RNA, 其具有更短的转录本、更低的表达量以及在不同胁迫刺激时才特异性表达的特点, 这也将为筛选更多的lncRNA和其在非生物胁迫下的功能研究指明方向^[63]。lncRNA参与植物响应非生物胁迫主要通过5种方式: 作为miRNA的内源性伪靶基因、作为sRNA的前体物质、作为天然反义转录本(NATs)调控正义mRNA的表达、染色质修饰和DNA甲基化途径^[66]。然而关于植物响应低温的lncRNA的功能研究, 除春化过程中受低温诱导的*COLD AIR*、*COO AIR*和*COLD WRAP*^[67-68]这3个基因外, 最近几年并无进展, 而对于花粉响应低温胁迫的lncRNA更是没有进行过系统鉴定。对以上这些问题进行解析将进一步推进对花粉响应温度胁迫的理解。

参考文献 (References)

- 1 康向阳. 毛白杨花粉败育机制的研究. 林业科学[Kang X. Study on mechanism of pollen abortion in Chinese white poplar (*Populus tomentosa* Carr.). *Sci Silv Sinic* 2001; 37(3): 35-9.
- 2 Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci* 2007;12(10): 444-51.
- 3 Balasubramanian S, Sureshkumar S, Lempe J, Weigel D. Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genet* 2006; 2(7): e106.
- 4 Sakata T, Takahashi H, Nishiyama I, Higashitani A. Effects of high temperature on the development of pollen mother cells and microspores in barley *Hordeum vulgare* L. *J Plant Res* 2000; 113(4): 395-402.
- 5 Mamun EA, Alfred S, Cantrill LC, Overall RL, Sutton BG. Effects of chilling on male gametophyte development in rice. *Cell Bio Int* 2006; 30(7): 583-91.
- 6 Oda S, Kaneko F, Yano K, Fujioka T, Masuko H, Park JI, et al. Morphological and gene expression analysis under cool temperature conditions in rice anther development. *Genes Genet Syst* 2010; 85(2): 107-20.
- 7 Zou CS, Jiang WB, Yu DQ. Male gametophyte-specific WRKY34 transcription factor mediates cold sensitivity of mature pollen in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2010; 61(14): 3901-14.
- 8 Sanders PM, Bui AQ, Weterings K, McIntire KN, Hsu YC, Lee PY, et al. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sex Plant Reprod* 1999; 11(6): 297-322.
- 9 Takeoka Y, Mamun AA, Wada T, Kaufman PB. Reproductive adaptation of rice to environmental stress. *Reprod Adapt Rice Environ Stress*. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1992.
- 10 Satake T. Determination of the most sensitive stage to sterile-type cool injury in rice plants. *Res Bull Hokkaido Nat Agricul Exp Stat* 1976; 113: 1-43.
- 11 Thakur P, Kumar S, Malik JA, Berger JD, Nayyar H. Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. *Environ Exp Bot* 2010; 67(3): 429-43.
- 12 Ohnishi S, Miyoshi T, Shirai S. Low temperature stress at different flower developmental stages affects pollen development, pollination, and pod set in soybean. *Environ Exp Bot* 2010; 69(1): 56-62.
- 13 De Storme N, Copenhaver GP, Geelen D. Production of diploid male gametes in *Arabidopsis* by cold-induced destabilization of postmeiotic radial microtubule arrays. *Plant Physiol* 2012; 160(4): 1808-26.
- 14 Tang Z, Zhang L, Yang D, Zhao C, Zheng Y. Cold stress contributes to aberrant cytokinesis during male meiosis I in a wheat thermosensitive genic male sterile line. *Plant Cell Environ* 2011; 34(3): 389-405.
- 15 Xu C, Liu Z, Zhang L, Zhao C, Yuan S, Zhang F. Organization of actin cytoskeleton during meiosis I in a wheat thermo-sensitive genic male sterile line. *Protoplasma* 2013; 250(1): 415-22.
- 16 Wang J, Li D, Shang F, Kang X. High temperature-induced production of unreduced pollen and its cytological effects in *Populus*. *Sci Rep* 2017;7(1): 5281.
- 17 Pecrix Y, Rallo G, Folzer H, Cigna M, Gudín S, Le Bris M. Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa sp.* *J Exp Bot* 2011; 62(10): 3587-97.
- 18 De Storme N, Geelen D. The impact of environmental stress on male reproductive development in plants: biological processes and molecular mechanisms. *Plant Cell Environ* 2014; 37(1): 1-18.
- 19 Quilichini TD, Grienenberger E, Douglas CJ. The biosynthesis, composition and assembly of the outer pollen wall: a tough case to crack. *Phytochemistry* 2015; 113(2): 170-82.
- 20 Blackmore S, Wortley AH, Skvarla JJ, Rowley JR. Pollen wall development in flowering plants. *New Phytol* 2007; 174(3): 483-98.
- 21 Zhang Z, Lu Y, Liu X, Feng J. Dynamic changes of callose in

- microsporogenesis and microgametogenesis of rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agron Sinica* 2007; 33(8): 1293-8.
- 22 Pacini E, Franchi GG, Hesse M. The tapetum-its form, function, and possible phylogeny in embryophyta. *Plant Syst Evol* 1985; 149(3/4): 155-85.
- 23 Ariizumi T, Toriyama K. Genetic Regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annu Rev Plant Biol* 2011; 62(1): 437-60.
- 24 Gothandam KM, Kim ES, Chung YY. Ultrastructural study of rice tapetum under low-temperature stress. *J Plant Biol* 2007; 50(4): 396-402.
- 25 De Storme N, Geelen D. Callose homeostasis at plasmodesmata: molecular regulators and developmental relevance. *Front Plant Sci* 2014; 5(138): 138.
- 26 Yu C, Xu X, Ge J, Guo Y, Dong J, Dong Z. Premature breakdown of tapetum associated with reverse thermo-sensitive genic male-sterile line Huiyou50S in rapeseed (*Brassica napus*). *Acta Physiol Plant* 2016; 38(2): 54.
- 27 Li N, Zhang DS, Liu HS, Yin CS, Li XX, Liang WQ, *et al.* The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development. *Plant Cell* 2006; 18(11): 2999-3014.
- 28 张俊环, 王玉柱, 孙浩元, 杨丽, 姜凤超. 外源SA对低温下杏花器官超微结构的影响. *园艺学报*(Zhang Junhuan, Wang Yuzhu, Sun Haoyuan, Yang Li, Jiang Fengchao. Effect of exogenous SA pretreatment on the ultrastructure of flower cells in apricot under chilling stress. *Acta Horticult Sinica* 2014; 41(3): 429-36.
- 29 Oshino T, Abiko M, Saito R, Ichiishi E, Endo M, Kawagishi-Kobayashi M, *et al.* Premature progression of anther early developmental programs accompanied by comprehensive alterations in transcription during high-temperature injury in barley plants. *Mol Genet Genomics* 2007; 278(1): 31-42.
- 30 Harsant J, Pavlovic L, Chiu G, Sultmanis S, Sage TL. High temperature stress and its effect on pollen development and morphological components of harvest index in the C3 model grass *Brachypodium distachyon*. *J Exp Bot* 2013; 64(10): 2971-83.
- 31 Oshino T, Abiko M, Saito R, Ichiishi E, Endo M, Kawagishikobayashi M, *et al.* Premature progression of anther early developmental programs accompanied by comprehensive alterations in transcription during high-temperature injury in barley plants. *Mol Genet Genom* 2007; 278(1): 31-42.
- 32 Suzuki K, Takeda H, Tsukaguchi T, Egawa Y. Ultrastructural study on degeneration of tapetum in anther of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under heat stress. *Sex Plant Reprod* 2001; 13(6): 293-9.
- 33 Ku S, Yoon H, Suh HS, Chung YY. Male-sterility of thermosensitive genic male-sterile rice is associated with premature programmed cell death of the tapetum. *Planta* 2003; 217(4): 559-65.
- 34 Datta R, Chamusco KC, Chourey PS. Starch biosynthesis during pollen maturation is associated with altered patterns of gene expression in maize. *Plant Physiol* 2002; 130(4): 1645-56.
- 35 Pressman E, Peet MM, Pharr DM. The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers. *Ann Bot* 2002; 90(5): 631-6.
- 36 Wen LY, Chase CD. Mitochondrial gene expression in developing male gametophytes of male-fertile and S male-sterile maize. *Sex Plant Reprod* 1999; 11(6): 323-30.
- 37 Oliver SN, Van Dongen JT, Alfred SC, Mamun EA, Zhao XC, Saini HS, *et al.* Cold-induced repression of the rice anther-specific cell wall invertase gene OSINV4 is correlated with sucrose accumulation and pollen sterility. *Plant Cell Environ* 2005; 28(12): 1534-51.
- 38 Zinn KE, Tunc-Ozdemir M, Harper JF. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *J Exp Bot* 2010; 61(7): 1959-68.
- 39 Chung P, Hsiao HH, Chen HJ, Chang CW, Wang SJ. Influence of temperature on the expression of the rice sucrose transporter 4 gene, OsSUT4, in germinating embryos and maturing pollen. *Acta Physiol Plant* 2014; 36(1): 217-29.
- 40 Jain M, Chourey PS, Boote KJ, Allen LH. Short-term high temperature growth conditions during vegetative-to-reproductive phase transition irreversibly compromise cell wall invertase-mediated sucrose catalysis and microspore meiosis in grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *J Plant Physiol* 2010; 167(7): 578-82.
- 41 Sakata T, Oda S, Tsunaga Y, Shomura H, Kawagishi-Kobayashi M, Aya K, *et al.* Reduction of gibberellin by low temperature disrupts pollen development in rice. *Plant Physiol* 2014; 164(4): 2011-9.
- 42 Sharma KD, Nayyar H. Regulatory networks in pollen development under cold stress. *Front Plant Sci* 2016; 7: 402.
- 43 丁杨林, 施怡婷, 杨淑华. 植物响应低温胁迫的分子机制研究. *生命科学*(Ding Yanglin, Shi Yiting, Yang Shuhua. Molecular mechanisms of plant responses to cold stress. *Chin Bull Life Sci* 2015; 27(3): 398-405.
- 44 Yang YW, Chen HC, Jen WF, Liu LY, Chang MC. Comparative transcriptome analysis of shoots and roots of *TNG67* and *TCN1* rice seedlings under cold stress and following subsequent recovery: insights into metabolic pathways, phytohormones, and transcription factors. *PLoS One* 2015; 10(7): e0131391.
- 45 Min L, Li Y, Hu Q, Zhu L, Gao W, Wu Y, *et al.* Sugar and auxin signaling pathways respond to high-temperature stress during anther development as revealed by transcript profiling analysis in cotton. *Plant Physiol* 2014; 164: 1293-308.
- 46 Muller F, Rieu I. Acclimation to high temperature during pollen development. *Plant Reprod* 2016; 29(1/2): 107-18.
- 47 Chen LP, Zhao Y, Xu SJ, Zhang ZY, Xu YY, Zhang JY, *et al.* *OsMADS57* together with *OsTBI* coordinates transcription of its target *OsWRKY94* and *D14* to switch its organogenesis to defense for cold adaptation in rice. *New Phytol* 2018; 218: 219-31.
- 48 Lee BH, Henderson DA, Zhu JK. The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell* 2005; 17(11): 3155-75.
- 49 Hannah MA, Heyer AG, Hinch DK. A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 2005; 1(2): 179-96.
- 50 Zhao CZ, Lang ZB, Zhu JK. Cold responsive gene transcription becomes more complex. *Trends Plant Sci* 2015; 20(8): 466-8.
- 51 Lee JY, Lee DH. Use of serial analysis of gene expression technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* pollen undergoing cold stress. *Plant Physiol* 2003; 132(2): 517-29.
- 52 Zou CS, Yu DQ. Analysis of the cold-responsive transcriptome in the mature pollen of *Arabidopsis*. *J Plant Biol* 2010; 53(6): 400-16.
- 53 Yamaguchi T, Nakayama K, Hayashi T, Yazaki J, Kishimoto N, Kikuchi S, *et al.* cDNA microarray analysis of rice anther genes

- under chilling stress at the microsporogenesis stage revealed two genes with DNA transposon castaway in the 5'-flanking region. *Biosci Biotech Bioch* 2004; 68(6): 1315-23.
- 54 Sharma KD, Nayyar H. Cold stress alters transcription in meiotic anthers of cold tolerant chickpea (*Cicer arietinum* L.). *BMC Res Notes* 2014; 7(1): 717.
- 55 Sita K, Sehgal A, HanumanthaRao B, Nair RM, Vara Prasad PV, Kumar S, *et al.* Food legumes and rising temperatures: effects, adaptive functional mechanisms specific to reproductive growth stage and strategies to improve heat tolerance. *Front Plant Sci* 2017; 8: 1658.
- 56 Yang J, Chen X, Zhu C, Peng X, He X, Fu J, *et al.* RNA-seq reveals differentially expressed genes of rice (*Oryza sativa*) spikelet in response to temperature interacting with nitrogen at meiosis stage. *BMC Genomics* 2015; 16(1): 959.
- 57 Ishka M R, Brown E, Weigand C, *et al.* A comparison of heat-stress transcriptome changes between wild-type *Arabidopsis* pollen and a heat-sensitive mutant harboring a knockout of cyclic nucleotide-gated cation channel 16 (*cngc16*). *BMC Genomics* 2018; 19(1): 549.
- 58 Honys D, Oh SA, Renak D, Donders M, Solcova B, Johnson JA, *et al.* Identification of microspore-active promoters that allow targeted manipulation of gene expression at early stages of microgametogenesis in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* 2006; 6(1): 31.
- 59 Oliver SN, Dennis ES, Dolferus R. ABA regulates apoplastic sugar transport and is a potential signal for cold-induced pollen sterility in rice. *Plant Cell Physiol* 2007; 48(9): 1319-30.
- 60 Tunc-Ozdemir M, Tang C, Ishka MR, Brown E, Groves NR, Myers CT, *et al.* A cyclic nucleotide-gated channel (*CNGC16*) in pollen is critical for stress tolerance in pollen reproductive development. *Plant Physiol* 2013; 161(2): 1010-20.
- 61 Deng Y, Srivastava R, Quilichini TD, Dong H, Bao Y, Horner HT, *et al.* IRE1, a component of the unfolded protein response signaling pathway, protects pollen development in *Arabidopsis* from heat stress. *Plant J* 2016; 88(2): 193-204.
- 62 Rosenzweig C, Iglesias A, Yang XB, Epstein PR, Chivian E. Climate change and extreme weather events; implications for food production, plant diseases, and pests. *Glob Change Hum Health* 2001; 2(2): 90-104.
- 63 Di C, Yuan JP, Wu Y, Li JR, Lin HX, Hu L, *et al.* Characterization of stress-responsive lncRNAs in *Arabidopsis thaliana* by integrating expression, epigenetic and structural features. *Plant J* 2014; 80(5): 848-61.
- 64 Chen M, Wang CL, Bao H, Chen H, Wang YW. Genome-wide identification and characterization of novel lncRNAs in *Populus* under nitrogen deficiency. *Mol Genet Genomics* 2016; 291(4): 1663-80.
- 65 Gai YP, Yuan SS, Zhao YN, Zhao HN, Zhang HL, Ji XL. A novel lncRNA, *MuLnc1*, associated with environmental stress in Mulberry (*Morus multicaulis*). *Front Plant Sci* 2018; 9: 669.
- 66 Wang JJ, Meng XW, Dobrovolskaya OB, Orlov YL, Chen M. Non-coding RNAs and their roles in stress response in plants. *Genom Proteom Bioinf* 2017; 15(5): 301-12.
- 67 Csorba T, Questa JI, Sun QW, Dean C. Antisense *COOLAIR* mediates the coordinated switching of chromatin states at FLC during vernalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(45): 16160-5.
- 68 Kim DH, Sung S. Vernalization-triggered intragenic chromatin loop formation by long noncoding RNAs. *Dev Cell* 2017; 40(3): 302-12.