

领域前沿·中国



孙蒙祥, 武汉大学教授、博士生导师, 国家杰出青年基金获得者。1982年本科毕业于华中师范大学。1987年、1994年先后于武汉大学获得硕士和博士学位。1995年后分别在荷兰Wageningen University、意大利Siena University、德国University of Hamburg等从事博士后和合作研究。主要研究领域为植物生殖发育, 具体方向为被子植物受精与早期胚胎发生的分子机制。近年, 先后揭示了植物如何防止多精入卵、杂交后父本基因组激活的时间、父母亲本对杂种胚胎转录组的同等贡献、种子发育中胚乳的独立性等一系列重要机制。在*Nature*、*Nature Plants*、*Developmental Cell*、*PNAS*、*Current Biology*、*Nature Communications*、*Plant Cell*等期刊上发表论文120多篇。先后获得国家自然科学一等奖、教育部自然科学一等奖和湖北省自然科学一等奖等。

受精依赖的卵细胞调控防止多精入卵的分子机制

禹小波^{1,2} 孙蒙祥^{2*}

(¹重庆大学生物工程学院, 重庆 400044; ²武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 在动物受精过程中, 卵母细胞皮层颗粒所分泌的蛋白酶在防止多精入卵中起着重要作用。在有花植物的有性生殖过程中, 受精过程则更为复杂。这一过程涉及到花粉管所运输的一对不可移动的精子分别与卵细胞和中央细胞融合的过程。在通常情况下, 每个胚珠只会吸引一根花粉管, 从而有效地降低多精入卵可能性。植物受精后防止多余花粉管进入胚囊的机制长期以来一直不清楚。武汉大学植物生殖研究团队最近的一项工作发现卵细胞本身在防止多花粉进入胚囊的过程中发挥了重要的作用。卵细胞特异性地表达两个天冬氨酸蛋白酶基因*ECS1*和*ECS2*, 其mRNA在成功受精之后会快速降解。ECS蛋白在卵细胞的顶端区域以类似于动物皮层颗粒网络的形式分布, 且其分泌过程也是受精依赖的。*ecs1ecs2*双突变体的胚珠呈现吸引多花粉的表型。*ECS1*和*ECS2*能够特异性地切割花粉管吸引物质LURE1。*ECS1*和*ECS2*在助细胞中的异位表达则会导致LURE1蛋白水平的降低及花粉管吸引能力的减弱。因此, *ECS1*和*ECS2*快速防止了多余花粉管进入胚囊。上述发现揭示植物的卵细胞能够感知受精并建立起一种受精依赖的快速防止多花粉管进入胚囊的机制。

关键词 卵细胞; 花粉管; 多精入卵; *LURE1*; 天冬氨酸蛋白酶; 受精; 拟南芥

Fertilization-Dependent Mechanism of Egg Cell Preventing Polytubey

YU Xiaobo^{1,2}, SUN Mengxiang^{2*}

(¹Ministry of Education College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China;

²College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

国家自然科学基金重大项目(批准号: 31991201)资助的课题

*通讯作者。Tel: 027-68756170, E-mail: mxsun@whu.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31991201)

*Corresponding author. Tel: +86-27-68756170, E-mail: mxsun@whu.edu.cn

Abstract In the process of fertilization in animals, proteases secreted from cortical granules of egg cells function to prevent polyspermy. In flowering plants, fertilization is more complex and involves a pair of non-motile sperm cells delivered by a pollen tube, and then two sperm fuses with an egg cell and a central cell respectively. Usually, each ovule only attracts one pollen tube and thus efficiently reduces the possibility of polyspermy. However, the mechanism of plant preventing polytubey has remained unknown for decades. Recently, it reports that the egg cell itself plays a critical role in preventing polytubey. Two aspartic proteases, *ECS1* and *ECS2*, are specifically expressed in the egg cell and degraded soon after successful sperm-egg fusion. *ECS* locates at the apical domain of the *Arabidopsis* egg cell in the form of a cortical network. The secretion of *ECS* is triggered by sperm-egg fusion. The *ecs1ecs2* double mutants showed polytubey phenotype. Further study reveals that *ECS1* and *ECS2* can cleave pollen tube attractant *LURE1* specifically and thus quickly block the pollen tube attraction to prevent polytubey. These results indicate that plant egg cell can sense successful fertilization and establish a fertilization dependent mechanism to prevent polytubey.

Keywords egg cell; polytubey; polyspermy; *LURE1*; aspartic proteases; fertilization; *Arabidopsis*

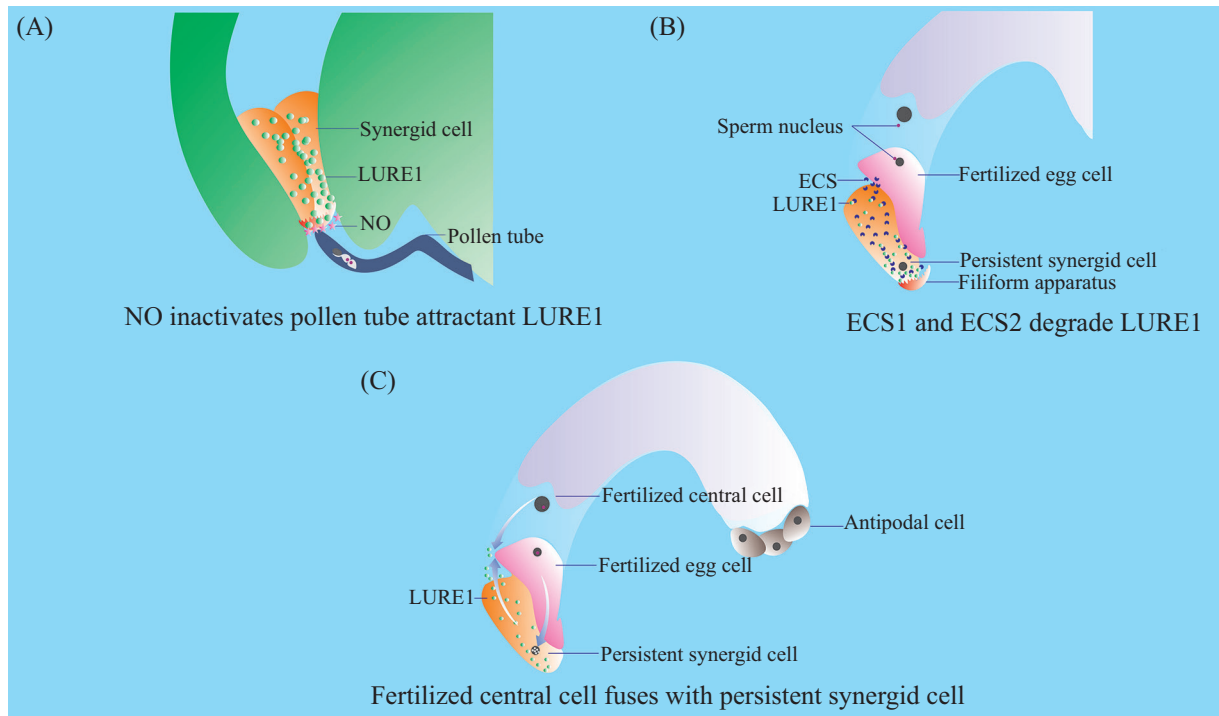
1 植物防止多精入卵研究背景

在哺乳动物研究中科研人员已经揭示了防止多精入卵的分子机制^[1]。多精入卵通常会导致譬如胚胎发育致死、基因组不平衡、基因组剂量和染色体分离缺陷等一系列严重的后果^[1]。动物防止多精入卵的机制主要与卵母细胞皮层分布的皮层颗粒(cortical granules)介导的皮层反应(cortical reaction)有关^[2]。皮层颗粒分布于成熟卵母细胞的皮层, 精卵融合会触发皮层颗粒从卵母细胞中分泌出来, 这个过程不再更新, 且具有Ca²⁺依赖性^[2]。皮层颗粒中所包含的物质十分复杂, 其中蛋白酶是皮层颗粒的主要成分之一。皮层颗粒所包含的蛋白酶Ovastacin能够分泌到透明带中并切割ZP2(zona pellucida glycoprotein 2), 从而阻止多精入卵^[3]。有花植物的有性生殖过程则更为复杂, 涉及到花粉管所运输的两个不可移动的精细胞分别与卵细胞和中央细胞融合的过程, 其中一个精子与卵细胞融合形成合子, 最终发育成为胚胎, 而另一个则会和中央细胞融合, 发育成为胚乳^[4]。在双受精过程中, 雌配子体(胚囊)与雄配子体(花粉管)之间存在着复杂的细胞间通讯, 并在花粉管导向、花粉管破裂、花粉管内含物释放及精卵融合等过程中发挥作用^[5]。其中, 花粉管导向是双受精过程顺利完成的必要保证, 这个过程被证实是由卵细胞毗邻的助细胞所分泌的花粉管吸引物质介导的。这些花粉管吸引物质如玉米中的*EAI*^[6], 拟南芥中的*LURE*^[7]、*XIUQIU*^[8], 蓝猪耳中的*LURE*^[9]等, 具有种属特异性。一旦花粉管释放两个精子并完成双受精之后, 其他花粉管就不再被胚珠吸引, 这个过

程常被称为多花粉管排斥。在拟南芥中, 这一排斥机制起始于花粉管到达胚珠珠孔端所触发的丝状器中积累的NO分子。NO分子能够修饰花粉管吸引物质*LURE1*, 使其丧失分泌性及与*LURE1*受体的结合能力, 从而阻止多花粉吸引(图1A)^[10]。另外, 卵细胞或中央细胞的单受精并不能完全建立多花粉管排斥机制, 这一事实表明, 卵细胞和中央细胞共同参与了多花粉管的排斥机制^[11]。双受精完成之后不久, 受精的中央细胞会与宿存的助细胞融合, 从源头上清除了合成花粉管吸引信号LURE的来源, 这一过程被认为是一种慢速的花粉管排斥机制(图1C)^[12]。如果受精失败, 受精恢复(fertilization recovery)机制会被激活, 宿存的助细胞能够继续吸引额外的花粉管以保证胚珠成功且完全的双受精^[3]。但是在多花粉管排斥机制的建立过程中卵细胞如何成功地感知受精, 在排斥多花粉吸引的分子机制以及植物卵细胞中是否存在与动物的皮层反应类似的细胞学过程等问题都不清楚。在我们最近的一项研究中, 关于卵细胞特异表达因子基因*ECS1*(egg cell specific 1)和*ECS2*的研究, 对这些问题进行了阐明, 填补了植物双受精过程中多花粉管排斥机制中的重要空白(图1B)^[14]。

2 ECS1和ECS2在卵细胞中特异性表达的研究

得益于拟南芥卵细胞分离技术的建立和单细胞转录组测序技术的应用, 我们成功地鉴定了一系列的卵细胞特异表达基因。其中, 两个编码具有分泌性的天冬氨酸蛋白酶的基因引起了我们的注



A: NO分子抑制花粉管吸引物质LURE1; B: 精卵融合触发分泌的ECS1和ECS2蛋白酶降解LURE1; C: 受精中央细胞与宿存的助细胞融合机制。
A: NO inactivates pollen tube attractant LURE1; B: sperm-egg fusion triggers secretion of ECS1 and ECS2 protease, to degradate LURE1; C: fertilized central cell fuses with persistent synergid cell.

图1 植物受精过程中防止多花粉管吸引的三种机制

Fig.1 Three mechanisms of preventing polytubey during plant fertilization

意。依据它们的表达模式, 这两个基因分别被命名 *ECS1* 和 *ECS2*^[14]。启动子活性分析和GFP融合蛋白分析证实, *ECS1* 和 *ECS2* 只在卵细胞中特异性地表达。*ECS1* 和 *ECS2* 的GFP信号在刚刚完成细胞化的卵细胞中就开始出现并持续积累; 受精之后, *ECS1* 和 *ECS2* 的GFP荧光信号快速减弱并在合子分裂之后彻底消失。在mRNA水平上, 原位杂交显示, *ECS1* 和 *ECS2* 的mRNA特异性地定位于卵细胞, 并于受精之后快速地降解并消失, 这暗示, *ECS1* 和 *ECS2* 中存在一个受精触发的mRNA降解机制。到目前为止, 仅有为数不多的卵细胞特异表达因子的生物学功能被鉴定研究。除 *ECS1* 和 *ECS2* 以外, 卵细胞特异性表达的 *EC1* 在双受精过程也能够激活精子^[15]。今后, 更多的卵细胞特异表达基因的生物学功能研究、转录表达调控机制研究及受精触发的mRNA降解机制研究将为植物有性生殖过程提供新的见解。

3 ECS1和ECS2蛋白在受精过程中的动态变化规律

为了研究 *ECS1* 和 *ECS2* 蛋白在受精过程中的动态变化规律, 我们分别构建了 *ECS1* 和 *ECS2* 的GFP和

mCitrine 融合蛋白株系并通过激光共聚焦显微镜进行了详细的跟踪观察。结果表明, *ECS1* 和 *ECS2* 仅在成功受精后才能分泌。通过使用分别标记 *ECS1* 和 *ECS2*、助细胞和卵细胞的三标记材料, 我们发现包含 *ECS1* 和 *ECS2* 的囊泡以类似于动物皮层颗粒网络的形式积累在成熟卵细胞的顶端区域。精卵融合之后, *ECS1* 和 *ECS2* 几乎完全向降解助细胞所在的胞外空间分泌。分泌之后, 受精卵细胞中的囊泡也随之消失, 保留在受精卵细胞中的荧光信号十分微弱并在受精卵发育晚期消失殆尽。为了研究 *ECS* 蛋白具体的分泌时间, 我们使用精子表达的 *LAT52::DsRed* 或 *HTR10::HTR10-mRFP* 来标记花粉管或精子。结果发现, 花粉管进入胚珠及以助细胞降解、花粉管破裂与精子释放等过程中都不能够触发卵细胞中的 *ECS* 蛋白的分泌, 我们推测这一分泌事件是通过精卵融合触发的。在 *gcs1* 的突变体中, 突变的精子不能成功地与卵细胞或中央细胞融合^[16]。为了验证这一推测, 我们使用了 *gcs1* 的突变体花粉来授粉 *ECS2*-GFP 融合蛋白材料的柱头。虽然精子能够成功释放并与卵细胞正常黏附, 但是精卵融合不能成功融合就不会触发 *ECS* 蛋白的分泌。在 *gex2* 突变体的受精

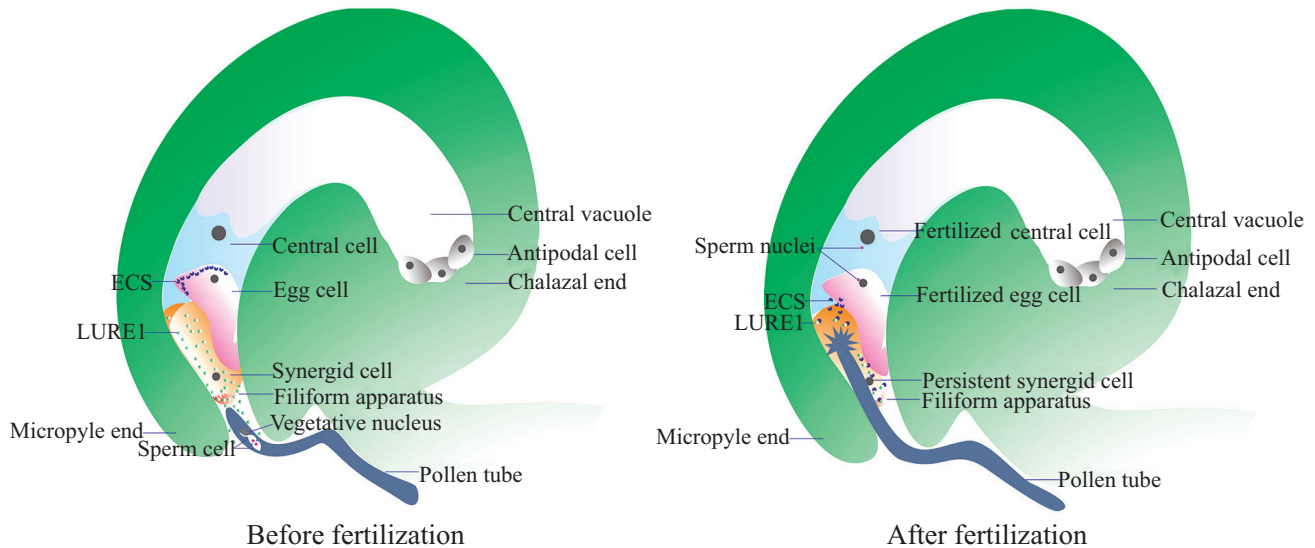


图2 精卵融合触发的卵细胞中ECS1/2分泌模式图

Fig.2 Schematic diagram of ECS1/2 secretion triggered by sperm-egg fusion

过程中,会出现一定比例的单受精表型^[17]。我们使用*gex2*突变体花粉授粉ECS2-GFP材料柱头,结果发现,精子-中央细胞的成功融合也不会触发ECS蛋白从卵细胞中的分泌,进一步证明了ECS蛋白的分泌只能依赖于精卵的成功融合(图2)。最后,我们测试了缺乏信号肽的ECS蛋白是否能够从卵细胞中分泌,在受精过程中其GFP信号一直滞留在卵细胞中。在这个部分的研究中,各种荧光蛋白标记材料、受精缺陷相关突变体以及活体荧光的动态观察很好地促进了双受精过程的观察与研究。ECS1和ECS2的融合蛋白株系也是今后进一步研究卵细胞囊泡定位、分泌以及精卵融合机制良好的标记株系。

4 ECS1和ECS2在受精过程中的生物学功能及其分子机制研究

*ECS1*和*ECS2*编码两个A1类天冬氨酸蛋白酶家族的成员,蛋白序列分析表明,其具有两个天冬氨酸蛋白酶经典的活性位点DTGS和DSGT。*ECS1*和*ECS2*的蛋白质序列与疾病抗性有关的蛋白CDR1同源性最高^[18]。为了研究ECS1和ECS2在双受精过程中的功能,我们分析了这两个基因的T-DNA插入突变体*ecs1-1*、*ecs1-2*、*ecs2-1*和*ecs2-2*。结果表明,*ecs1*和*ecs2*的纯合突变体的营养生长及生殖过程都没有任何表型。考虑到它们具有极其相似的表达模式和序列相似性,我们分别构建了两个独立的双突变株系,即*ecs1-1ecs2-1*和*ecs1-2ecs2-2*。表型分析发

现,这两个双突变株系都具有相似的多花粉管吸引表型。这一表型能够被ECS1或ECS2恢复,进一步表明其多花粉管吸引的表型是由*ECS1*和*ECS2*基因突变引起的。由于配子融合缺陷也会导致多花粉管入胚囊的表型。为此,我们观察了*ecs1ecs2*突变体中的配子融合过程。通过使用HTR10::HTR10-mRFP标记株系标记精核,我们发现,在*ecs1ecs2*双突变体中受精过程是完全正常的。然而,我们发现在授粉后6~8 h,大约16.4%的胚囊中存在额外的一对精子。这一结果表明,ECS1和ECS2参与了成功受精后的多花粉管排斥机制的建立。

为了阐明ECS蛋白分泌所介导的多花粉管排斥的分子机制,我们验证了这两个蛋白酶是否能够结合并切割花粉管吸引物质。Pull-down实验分析证明,ECS1和ECS2能够与花粉管吸引物质LURE1.2结合。为了研究蛋白酶ECS1和ECS2是否能够切割LURE1,我们在小叶烟草叶子和HEK293T细胞中对ECS1和LURE1.2分别进行了共表达试验。结果发现,在两个共表达体系中LURE1蛋白都出现了显著的下调。这一结果证实了ECS1和ECS2的确能够切割LURE1。为了鉴定ECS1和ECS2酶切花粉管吸引物质LURE1的切割位点,我们根据LURE1.2的蛋白质序列设计了7个荧光多肽底物并使用重组的ECS1和ECS2蛋白对这7个荧光多肽底物进行了酶活活性测定。结果表明,ECS蛋白酶能够高效地切割LURE1.2的中部和C-端区域。生化实验也表明,ECS1和ECS2

具有相似的生化特性, 其最适pH值为5.0且在碱性条件下没有任何蛋白酶活性。为了验证在植物体内ECS1和ECS2是否能够切割LURE1, 我们通过免疫荧光技术观察LURE1在野生型和*ecs1ecs2*双突变体中的蛋白水平变化。结果表明, 在授粉过程中野生型与双突变体的LURE1蛋白水平相当; 但当授粉10 h(受精2~4 h)后, LURE1的蛋白水平快速下降, 而在*ecs1ecs2*突变体中则几乎保持不变。进一步地, 通过体外花粉管吸引实验也发现, 将LURE1.2与ECS重组蛋白酶混合后使其丧失了花粉管吸引的能力。

以上实验结果表明, 在成功受精后不久, ECS的蛋白酶活性对于清除花粉管吸引物质LURE1是必需的。为了最终证明ECS介导的LURE1降解对于阻止花粉管吸引的重要性, 我们使用助细胞特异启动子DD31驱动ECS1和ECS2在助细胞中的异位表达。结果发现, 与卵细胞的受精触发分泌不同, 助细胞中ECS蛋白组成型地向丝状器分泌。免疫荧光和LURE1.2-GFP荧光分析表明, LURE1.2的蛋白水平显著下降。不仅如此, 在野生型中, 授粉后6 h后超过50%胚珠已经吸引花粉管, 而在过表达株系中, 仅有小于10%的胚珠能够吸引花粉管。这一结果与LURE1突变体中授粉后4~6 h的结果保持一致, 因此证实了ECS介导的LURE1降解对于花粉管吸引具有关键性作用。我们也异位表达了缺失信号肽的ECS1和ECS2以及卵细胞表达的subtilisin-like蛋白酶SBT4.13^[19], 结果发现其均不能影响LURE1.2蛋白水平, 也不能影响花粉管吸引比率。最后, 为了证明ECS1和ECS2的蛋白酶活性对于阻止多花粉吸引是必需的, 我们将ECS1和ECS2的蛋白酶活性位点发生突变后, 结果发现其丧失了切割LURE1底物的能力。活性位点突变的ECS1和ECS2也不能恢复突变体的表型。

综上所述, 该工作证明了编码两个天冬氨酸蛋白酶基因ECS1和ECS2特异性地在卵细胞中表达, 并以皮层颗粒网络的形式积累在成熟的卵细胞中。当精卵成功融合之后, ECS1和ECS2蛋白向降解助细胞的胞外空间分泌, 这一过程与动物中的Ca²⁺触发的皮层反应相似^[20]。在植物中, 玉米^[21-22]和拟南芥^[23-24]中的体外精卵融合导致的Ca²⁺上升已被报道。ECS蛋白的分泌过程是否由Ca²⁺触发还有待进一步研究验证。

5 展望

尽管动植物在卵的形态结构、精子的移动性

等方面有明显差异, 但是我们的这一研究成果表明, 受精依赖的蛋白酶释放以阻止多精入卵的机制在动物和植物中可能是保守的。值得一提的是, 虽然卵细胞调控的ECS蛋白酶途径参与防止多花粉的进入, 但胚乳与宿存助细胞的融合也能够清除花粉管吸引物质LURE1和XIUQIU的来源, 最终终止花粉管吸引^[12]。这是一个慢速的多花粉管排斥过程。因此, 卵细胞或中央细胞的单受精都不足以建立起一个完整的多花粉排斥机制^[11]。此外, 多花粉排斥机制在玉米中仅有96%有效^[25], 拟南芥中则为98%^[11,26]。这表明, NO^[10]或ECS1/2^[14]所介导的花粉管吸引物质失活都不能有效地清除其他弱花粉管吸引物质。考虑到在植物中多精入卵的比率非常低^[25,27], 远远低于多花粉管吸引的比率, 这一事实暗示植物中也存在着一个快速的阻止多精入卵的排斥机制。体外受精实验表明, 配子融合会释放细胞壁物质^[28], 这可能是植物多精入卵的最终排斥机制。ECS1和ECS2是否能够参与降解配子激活、黏附、融合等相关蛋白以及细胞壁物质的排斥机制还有待进一步研究。其他的蛋白酶譬如SBT4.13也有可能参与这一过程, 其蛋白底物也还有待鉴定。

近年来, 得益于单细胞分离、单细胞组学、高分辨率动态成像、免疫荧光等技术在有性生殖领域的应用, 双受精过程取得了一系列突破性的进展并成为植物科学研究的热点领域。随着双受精过程中分子调控途径的不断深入研究, 进一步挖掘动物与植物的普适生殖规律、低等植物到高等植物有性生殖进化规律, 将大大拓展植物有性生殖的理论研究内涵。另外, 植物的有性生殖过程与粮食作物的产量和品质密切相关, 加强在水稻、玉米及小麦等粮食作物中的有性生殖基础研究不仅能够被子植物有性生殖过程提供新的见解和研究思路, 也为粮食产量、品质改良等民生问题提供宝贵的实践经验, 其重要价值将在未来逐渐展现出来。

参考文献 (References)

- [1] WONG J L, WESSEL G M. Defending the zygote: search for the ancestral animal block to polyspermy [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2005, 72: 1-151.
- [2] LIU M. The biology and dynamics of mammalian cortical granules [J]. *Reprod Biol Endocrin*, 2011, 9(1): 1-17.
- [3] BURKART A D, XIONG B, BAIBAKOV B, et al. Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy [J]. *J Cell Biol*, 2012, 197(1): 37-44.

- [4] BLECKMANN A, ALTER S, DRESSELHAUS T. The beginning of a seed: regulatory mechanisms of double fertilization [J]. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 452.
- [5] DRESSELHAUS T, SPRUNCK S, WESSEL G M. Fertilization mechanisms in flowering plants [J]. *Curr Biol*, 2016, 26(3): R125-39.
- [6] MÁRTON M L, CORDTS S, BROADHVEST J, et al. Micro-pylar pollen tube guidance by egg apparatus 1 of maize [J]. *Science*, 2005, 307(5709): 573-6.
- [7] 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.
- [8] ZHONG S, LIU M, WANG Z, et al. Cysteine-rich peptides promote interspecific genetic isolation in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2019, 364(6443): eaau9564.
- [9] HIGASHIYAMA T. The synergid cell: attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization [J]. *J Plant Res*, 2002, 115(2): 149-60.
- [10] DUAN Q, LIU M C J, KITA D, et al. FERONIA controls pectin- and nitric oxide-mediated male-female interaction [J]. *Nature*, 2020, 579(7800): 561-6.
- [11] MARUYAMA D, HAMAMURA Y, TAKEUCHI H, et al. Independent control by each female gamete prevents the attraction of multiple pollen tubes [J]. *Dev Cell*, 2013, 25(3): 317-23.
- [12] MARUYAMA D, VÖLZ R, TAKEUCHI H, et al. Rapid elimination of the persistent synergid through a cell fusion mechanism [J]. *Cell*, 2015, 161(4): 907-18.
- [13] KASAHARA R D, MARUYAMA D, HAMAMURA Y, et al. Fertilization recovery after defective sperm cell release in *Arabidopsis* [J]. *Curr Biol*, 2012, 22(12): 1084-9.
- [14] YU X, ZHANG X, ZHAO P, et al. Fertilized egg cells secrete endopeptidases to avoid polytubey [J]. *Nature*, 2021: 592(7854): 433-7.
- [15] SPRUNCK S, RADEMACHER S, VOGLER F, et al. Egg cell-secreted EC1 triggers sperm cell activation during double fertilization [J]. *Science*, 2012, 338(6110): 1093-7.
- [16] MORI T, KUROIWA H, HIGASHIYAMA T, et al. GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(1): 64-71.
- [17] MORI T, IGAWA T, TAMIYA G, et al. Gamete attachment requires GEX2 for successful fertilization in *Arabidopsis* [J]. *Curr Biol*, 2014, 24(2): 170-5.
- [18] SIMÕES I, FARO R, BUR D, et al. Characterization of recombinant CDR1, an *Arabidopsis* aspartic proteinase involved in disease resistance [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(43): 31358-65.
- [19] BLECKMANN A, DRESSELHAUS T. Whole mount RNA-FISH on ovules and developing seeds [M]. Humana Press: New York, 2017: 159-71.
- [20] ZIMMERBERG J, WHITAKER M. Irreversible swelling of secretory granules during exocytosis caused by calcium [J]. *Nature*, 1985, 315(6020): 581-4.
- [21] ANTOINE A F, FAURE J E, CORDEIRO S, et al. A calcium influx is triggered and propagates in the zygote as a wavefront during *in vitro* fertilization of flowering plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(19): 10643-8.
- [22] DIGONNET C, ALDON D, LEDUC N, et al. First evidence of a calcium transient in flowering plants at fertilization [J]. *Development*, 1997, 124(15): 2867-74.
- [23] DENNINGER P, BLECKMANN A, LAUSSER A, et al. Male-female communication triggers calcium signatures during fertilization in *Arabidopsis* [J]. *Nat Commu*, 2014, 5(1): 1-12.
- [24] HAMAMURA Y, NISHIMAKI M, TAKEUCHI H, et al. Live imaging of calcium spikes during double fertilization in *Arabidopsis* [J]. *Nat Commu*, 2014, 5(1): 1-9.
- [25] GROSSNIKLAUS U. Polyspermy produces tri-parental seeds in maize [J]. *Curr Biol*, 2017, 27(24): R1300-2.
- [26] BEALE K M, LEYDON A R, JOHNSON M A. Gamete fusion is required to block multiple pollen tubes from entering an *Arabidopsis* ovule [J]. *Curr Biol*, 2012, 22(12): 1090-4.
- [27] NAKEL T, TEKLEYOHANS D G, MAO Y, et al. Triparental plants provide direct evidence for polyspermy induced polyploidy [J]. *Nat Commu*, 2017, 8(1): 1-8.
- [28] KRANZ E, VON WIEGEN P, LÖRZ H. Early cytological events after induction of cell division in egg cells and zygote development following *in vitro* fertilization with angiosperm gametes [J]. *Plant J*, 1995, 8(1): 9-23.