

# 蓝猪耳受精生物学研究进展

陈素红<sup>1,2</sup>, 田惠桥<sup>3</sup>, 廖景平<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 厦门大学生命科学院, 福建厦门 361005)

**摘要:** 蓝猪耳 (*Torenia fournieri* L.) 胚囊半裸露, 在光学显微镜下能清楚观察到卵细胞、助细胞及部分中央细胞的形态结构, 有助于原位观察卵细胞在受精前后的变化状态, 被认为是研究被子植物体内受精机理的一种模式植物。综述了蓝猪耳的受精机理: 花粉管定向进入胚囊的方式与机理、钙在受精过程中的作用、受精前后胚囊细胞骨架的动态变化。简要介绍了离体受精技术在蓝猪耳受精生物学中的发展应用。根据前人对蓝猪耳的研究成果并结合我们的研究, 指出蓝猪耳在受精生物学中的应用, 特别是借助离体受精技术平台, 将具有更大的研究前景。

**关键词:** 蓝猪耳; 花粉管; 钙; 细胞骨架; 离体受精; 综述

中图分类号: Q944.44

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)06-0532-07

## Advances in Studies on Fertilization of *Torenia fournieri* (Scrophulariaceae)

CHEN Su-hong<sup>1,2</sup>, TIAN Hui-qiao<sup>3</sup>, LIAO Jing-ping<sup>1\*</sup>

(1. South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Graduate University of the Chinese Academy of Science, Beijing 100039, China; 3. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** *Torenia fournieri* (Scrophulariaceae) is a suitable experimental plant for studies of angiosperm fertilization since it has semi-naked embryo sac within which egg cell, two synergids and part of the central cell are clearly visible under the light microscope, which facilitates the in situ observation of egg cell before and after fertilization. Progress in researches on fertilization mechanism of *T. fournieri* is reviewed in the following aspects: how the pollen tubes get into the embryo sac, dynamics of calcium in fertilization process, changes in the cytoskeleton of embryo sacs before and after fertilization. The significance of *T. fournieri* in the studies of *in vitro* fertilization is briefly described.

**Key words:** *Torenia fournieri*; Pollen tube; Calcium; Cytoskeleton; *In vitro* fertilization; Review

受精是生物体世代转换的重要转折点, 与有性生殖有着密切联系。动物和低等植物具有生殖细胞离体程度高的优越性, 因此目前在生殖机理的研究上较为深入。而高等植物独具的双受精过程因发生在深藏于花器官组织中的雌配子体内, 加大了对这一系列严格有序的时空发育特征研究的难度, 至今对高等植物受精机理的认识还很有限。如花粉管如

何将雄配子输送到胚囊, 雌、雄配子之间是否有识别至特异结合, 受精激活卵细胞的机理是什么等等有趣的双受精问题仍待深入研究。为了克服被子植物雌配子体难研究的缺陷, 寻找一种具特殊胚囊结构、便于观察受精过程的植物势在必行。

蓝猪耳 (*Torenia fournieri*) 是玄参科 (Scrophulariaceae) 蝴蝶草属 (*Torenia* L.) 植物。其胚囊结构

收稿日期: 2006-02-27 接受日期: 2006-05-30

基金项目: 国家自然科学基金 (30170060, 30370099, 40332021) 资助

\* 通讯作者 Corresponding author

特殊:成熟胚囊在珠孔端裸露出卵细胞、助细胞及一半中央细胞,这为受精生物学研究提供了很大方便。再者蓝猪耳是草本植物,总状花序,花期长达6-7个月,给试验者提供充裕的实验材料。由于蓝猪耳易培养,花的数量多,花期长,特别是具有半裸露的胚囊结构,因而许多科研人员对蓝猪耳的受精机理进行了大量的深入研究<sup>[1-11]</sup>,并认为蓝猪耳是研究被子植物受精生物学的一种模式植物。本文对蓝猪耳受精生物学近几十年的研究加以总结和讨论,同时结合我们的研究工作寻找一条对蓝猪耳受精研究的新途径。

## 1 蓝猪耳的花粉管定向进入胚囊的研究

Higashiyama 等<sup>[1]</sup>通过对蓝猪耳半裸露胚囊结构的研究得到了受精全过程的大致时刻表,这就为深入研究花粉管如何进入胚囊和两个精细胞如何与各自的靶细胞相结合建立了离体体系。针对花粉管是否随机进入胚囊这一问题,Higashiyama 等<sup>[2]</sup>以蓝猪耳为材料,将其萌发的花粉管与胚珠共培养发现:半离体培养的花粉管比离体萌发的花粉管能更精确有效地通过助细胞丝状器进入胚囊;没能顺利进入胚囊的花粉管在珠孔处打个卷后仍会进入同一丝状器;花粉管只能进入完整、未受精的胚囊,而不会进入受热处理或助细胞已损坏的胚囊。从而得出结论:在离体条件下,花粉管只进入具活性助细胞且未受精的胚囊。在绝大多数具有助细胞的被子植物中,花粉管都是经助细胞将两精细胞释放到受精靶区。雄配子的运输载体花粉管与助细胞之间存在怎样的关系? Higashiyama 等<sup>[3]</sup>在已建立的蓝猪耳离体体系上采用激光消除胚囊内雄性细胞的方法证实助细胞对花粉管具有特异吸引的功能。他们认为,存在一个具有功能的助细胞就有能力产生吸引花粉管的信号,存在两个则可以增强这个信号;但在已受精的胚囊内,即使宿存一完整助细胞,也不再具有吸引花粉管的能力,这种吸引能力的中止可能就是打破多精入卵的主要原因。

被子植物从授粉到受精需经历两个阶段:花粉粒萌发长出花粉管,花粉管被吸引进入胚囊;花粉管在胚囊内释放两个精细胞,它们分别与卵细胞和中央细胞融合完成受精。前一阶段的关键在于花粉管能否准确无误地从珠孔端经过助细胞进入胚囊。

由于助细胞是花粉管进入胚囊的必经途径,因此才被认为具有吸引花粉管的功能。直到 Higashiyama 等建成蓝猪耳离体体系后,采用激光消除细胞法才真正证实了花粉管是被助细胞吸引进入胚囊的。但花粉管对两个助细胞是有选择地进入还是随机进入尚不清楚。研究者在烟草(*Nicotiana tabacum* L.)和矮牵牛(*Petunia hybrida* L.)中发现姊妹助细胞中钙含量差异明显<sup>[12-13]</sup>,其中烟草退化助细胞中的钙含量高于宿存助细胞<sup>[12]</sup>。之后,Tian 和 Russell 研究证实,花粉管正是进入钙含量较高的退化助细胞中<sup>[14]</sup>。然而,在小麦(*Triticum aestivum* L.)、珍珠谷(*Pennisetum glaucum* L.)、向日葵(*Helianthus annuus* L.)和油菜(*Brassica napus* L.)的成熟胚囊中,姊妹助细胞的钙含量没有明显差异,但在传粉后,向日葵退化助细胞中的钙含量剧增,油菜两个助细胞中钙沉淀颗粒大小显示出差异<sup>[15-20]</sup>。这些结果表明,花粉管在进入助细胞时可能存在着选择性,两个助细胞中钙含量的差异可能是花粉管选择性进入的依据。根据助细胞吸引花粉管的有关研究推测,花粉管很可能只从含钙量高的完整助细胞进入胚囊。未受精的胚囊中助细胞产生吸引花粉管的信号,花粉管就向胚珠珠孔端生长,在珠孔处花粉管选择从含钙量高的助细胞进入胚囊;在人为破坏一个助细胞的未受精胚囊中,另一个完整助细胞仍能产生吸引花粉管的信号,花粉管生长到珠孔处,完整的助细胞较已破坏的助细胞含钙量高,花粉管选择从完整的助细胞中进入胚囊;在已受精的胚囊中,宿存的助细胞也能产生吸引花粉管的信号,但由于退化的助细胞较宿存的助细胞含钙量高,因而花粉管不会选择从宿存助细胞进入胚囊,因此打破了多精入卵。在助细胞吸引花粉管进入胚囊这个现象中,助细胞中的钙一直行使着调节功能,使花粉管能顺利地完成任务。这一推测需要选择蓝猪耳这种具特殊胚囊结构的植物,应用细胞学和分子生物学方法深入研究加以证明。

## 2 蓝猪耳受精过程中钙的研究

钙作为第二信使在植物信号转导中的作用,一直是植物生理学、细胞生物学和发育生物学研究的热点,对于被子植物双受精的研究也不例外。目前,钙在胚囊中分布的研究方法有 X 射线能谱法

(energy-dispersive X-ray analysis, EDXA)、金霉素法(CTC)和焦锑酸钾沉淀法。焦锑酸钾沉淀法不仅可以原位定位钙,还可用于钙沉淀的数量统计<sup>[14-15,21]</sup>,是目前研究雌蕊中钙分布的常用方法。Kristóf 等采用焦锑酸钾沉淀法研究了蓝猪耳从授粉到受精期间胚珠中钙分布变化。蓝猪耳受精前,大量的钙主要分布在胚囊表层、胚囊内粘质和卵器细胞间的胞外区域,少量钙仅在胚囊周围的珠心细胞和中柱及珠柄的表皮细胞内有;授粉后,钙大量分布在珠孔表层处由珊瑚状细胞壁构成的迷路结构中,花粉管进入胚囊后退化助细胞中钙含量增加且主要分布在退化助细胞的液泡中<sup>[22]</sup>。目前,对蓝猪耳受精过程中钙动态分布研究还比较浅显,加之采用焦锑酸钾沉淀法研究钙动态分布具一定的局限性,因而对钙在受精中信号转导的研究还需注重对游离钙时空动态分布的研究。

被子植物胚囊深藏于胚珠珠心组织内,在双受精时期直接研究钙的动态分布存在很大难度。欲取得钙在助细胞退化与吸引花粉管、雄配子释放与转移等方面的确切实证,则应选择具裸露胚囊的蓝猪耳这种材料为研究对象,研究其中 $[Ca^{2+}]_c$ 的变化规律。Han 等首次将蓝猪耳精细胞提取物注入成熟的中央细胞后,发现有明显的游离钙浓度增加,这种钙浓度增加延续 20 min 达到最高峰,接着平稳下降,然而高钙水平可持续 40 min;同时他们将玉米(*Zea mays* L.)精子提取物和肌醇三磷酸分别注入蓝猪耳中央细胞中,发现玉米精子提取物不能诱导中央细胞中 $[Ca^{2+}]_c$ 增加,肌醇三磷酸虽可诱导 $[Ca^{2+}]_c$ 增加,但波峰出现快,高钙水平仅持续 300 s。这些结果说明精细胞内可能存在某些专一因子直接诱导钙的增加,并且提示精子提取物引起钙增加可能与肌醇三磷酸途径有关<sup>[9]</sup>。

目前为止,针对被子植物双受精过程中直接测定游离钙的动态变化仅限于玉米精、卵细胞体外融合实验<sup>[23]</sup>。对体内受精过程游离钙的研究资料还十分欠缺。蓝猪耳这种具有透明胚珠的材料,可尝试研究其从授粉到受精过程中各个生殖细胞内游离钙的动态变化,以期更深入地解释受精机理问题。

### 3 蓝猪耳胚囊中细胞骨架的研究

植物细胞骨架的研究自 80 年代开始成为细胞

生物学研究的热点。维持植物细胞空间结构的细胞骨架包括微管、微丝和中间纤维三种类型,它们参与植物细胞的分裂机制、细胞运动及细胞器运动、细胞的极性以及物质运输等活动,可能还与信息传递有关<sup>[24]</sup>。近年对细胞凋亡信号转导的研究发现,三种细胞骨架在凋亡过程中变化非常活跃,它们在细胞内的状态直接影响凋亡信号的终止,这表明细胞骨架可能是信号转导的空间调控者和功能性分子<sup>[25]</sup>。据此,研究植物细胞骨架对揭示植物细胞生命活动中的细胞学事件具有重要作用。

大多植物的胚囊深藏于胚珠珠心组织内,难以直接观察雌配子的生命活动。目前,植物细胞骨架领域的研究多集中在花粉管中,对受精过程微管、微丝骨架研究较少。现多用冰冻包埋,结合免疫细胞化学技术等方法开展植物细胞骨架的研究,在白花丹(*Plumbago zeylanica* L.),烟草和玉米中都取得了一些研究成果。然而,蓝猪耳半裸露胚囊的特殊结构为借助荧光反应物直接观察细胞骨架的动态分布提供了可能。目前,对蓝猪耳受精过程的细胞骨架研究也取得了一些成果。蓝猪耳胚囊的珠孔端有大量的微丝分布,且微丝呈帽状,这个帽状的微丝结构在开花前两天出现,但花粉管进入胚囊时即消失,因此推测丝状器附近的微丝可能与分泌吸引花粉管的向化性物质使花粉管进入有关<sup>[7]</sup>。同时还发现蓝猪耳助细胞的合点端和卵细胞中的微丝多随机分布,而中央细胞的微丝呈网状分布,且在其膜下有很多的微丝束<sup>[7,26]</sup>。通常认为蓝猪耳助细胞中微丝的变化与授粉无关,助细胞在开花后就退化,显微注射标记的微丝同时解聚,肌动蛋白聚集在合点端<sup>[7]</sup>。但卵细胞的微丝在授粉后发生很大的变化,首先是珠孔端的膜下微丝片段化和解聚,最后聚集成一条明显的肌动蛋白带,推测这条带应是冠状带的一个组成部分,但它由胞内微丝组成,与授粉有关。在花粉管释放内含物后,冠状带变得更浓密<sup>[7,26]</sup>。近年来在中央细胞也发现类似的变化,这种肌动蛋白的动态变化可能涉及次生核的移动。对蓝猪耳中央细胞受精过程不同阶段的微丝动态变化研究表明,成熟的中央细胞在开花后微丝分布成网状,特别多的微丝束环绕在次生核周围,大量微丝束连接着次生核膜,并延伸到珠孔端的膜下,这可能与次生核在受精时向珠孔端移动有关<sup>[9]</sup>。

选用蓝猪耳这种特殊材料较便于研究细胞骨

架在生命活动中的重要功能,从而解释植物整个生活周期发生各式各样的事件。在被子植物双受精过程中细胞骨架起到了不可取代的作用,例如在花粉管萌发、生长过程中细胞骨架发生怎样的动态变化,在双受精过程中细胞骨架与细胞核迁移、胞质重组以及细胞信号转导存在怎样的关系。这些问题都有待进行深入的探讨与研究。

#### 4 蓝猪耳生殖细胞的分离及离体受精技术平台的建立

离体的精、卵细胞在体外融合,再培养“人工合子”成再生植株的研究需三项技术前提:(1)雌、雄配子体分离技术;(2)单对原生质体融合技术;(3)微培养技术。九十年代初,单子叶植物玉米在离体受精获得了首次突破<sup>[24]</sup>。目前,其他植物的离体受精也相应有所突破。分离技术广泛应用于烟草<sup>[25]</sup>、白花丹<sup>[26]</sup>、大麦<sup>[27]</sup>、玉米<sup>[28]</sup>等几十种高等植物,并针对不同植物、不同研究目的在方法上亦有不断改进。由于分离的卵细胞数量有限,采用微电融合技术<sup>[29]</sup>可有目的地挑选单对原生质体进行融合。现已在玉米<sup>[25]</sup>、小麦<sup>[33-34]</sup>、烟草<sup>[34]</sup>精、卵融合上获得成功。“人工合子”的数量少,培养难度较大,因此微培养技术只在玉米、小麦(“自然合子”)中获得成功。建立离体受精体系的各项技术虽已比较成熟,但对被子植物的实际操作而言仍存在着较大的难度。被子植物的卵细胞深藏于厚的胚珠珠心组织中,获得生活状态优良的游离生殖细胞并成功地完成离体受精难度很大,特别是再将体外融合的合子微培养成再生植株,到目前仅在单子叶植物玉米中获得了完全成功。但是离体受精研究具有可控条件和生活

状态两大优点,因此选择一种模式植物研究受精生物学相当必要。蓝猪耳因其特殊的胚囊结构及自身生活特性适宜于离体受精体系的建立,且目前在受精生物学研究上也已奠定了一定基础。

八十年代末,Keijzer等<sup>[35]</sup>提出运用显微操作技术将分离出的精细胞注射到胚囊中,完成离体条件下的受精过程。他们选用胚囊半裸露的蓝猪耳为实验材料,直接萌发花粉粒,将花粉管中分离的精细胞从中央细胞一侧注射到胚囊中,注入的精细胞与卵细胞融合的次数极少,结果并不理想。这条途径虽未成功,但Keijzer指出了显微操作技术对受精过程研究的重要意义:(1)研究显微注射后损伤细胞的生理变化;(2)研究种内或种间分离的精细胞被注射到完整胚囊后与卵细胞融合的命运;(3)成功地完成离体受精,可获得新的种间杂交<sup>[35]</sup>。自此,近几十年来,试图应用显微操作技术在蓝猪耳受精上的研究也屡见不鲜。雄配子体分离方面,最初Keijzer从蓝猪耳花粉粒萌发的花粉管中分离出精细胞;而后Pál Vágl在研究雄配子体发育过程中运用活体-离体法(Shivanna)分离出精细胞<sup>[14]</sup>;陈素红等<sup>[26]</sup>不仅从全长花柱长出的花粉管中分离到大量的成对精细胞,而且分别收集到精细胞的两个群体。雌配子体分离方面,Mol首先运用酶解法分离蓝猪耳胚囊,但没有检验活性<sup>[17]</sup>;Kristóf和Imre用酶解法成功地分离了蓝猪耳的生活胚囊<sup>[38]</sup>;此后,他们根据渗透压与发育阶段的相关性,利用适宜于各个时期渗透压的酶液分离出蓝猪耳各个发育时期雌配子体,并从中发现大孢子母细胞渗透压最低,随后直到四核阶段渗透压都在升高,到完全成熟胚囊阶段渗透压又逐渐降低<sup>[39]</sup>。目前分离蓝猪耳卵细胞的主要方法是酶解法,此法虽比较凑效,但较高浓

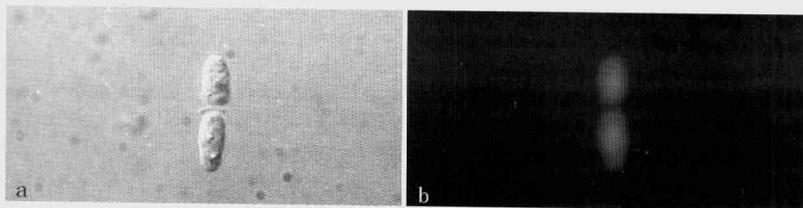


图1 蓝猪耳一对精细胞的活性检验( $\times 1\ 000$ 倍)

Fig. 1 Fluorescein diacetate (FDA) test of isolated two sperm cells from *Torenia fournieri* ( $\times 1\ 000$ )

a, b 分离出的一对精细胞及其二乙酸荧光素反应 Two sperm cells and both stained by fluorescein diacetate

度的酶液对卵细胞会产生较大的不良影响,因此迫切需要改进分离方法。

离体受精技术在被子植物有性生殖的研究中具有重要意义,它不仅可排除体细胞组织的干扰来探索精、卵细胞的识别和合子的激活问题,还可能作为单倍体育种、远缘杂交等应用领域的技术手段<sup>[40]</sup>。因此,我们试图建立蓝猪耳(具半裸露胚囊)的离体受精技术平台。目前,我们已成功地分离出最接近受精前的生活精细胞(图 1a,b),并能收集大量的 Sua 和 Svn 群体<sup>[36]</sup>。对于被子植物较难分离的雌配子体,我们已用解剖法分离出生活的卵细胞<sup>[41]</sup>。蓝猪耳的精、卵细胞的分离操作都已获得成功,接着我们将进行体外融合及合子的体外微培养。培养蓝猪耳的再生植株为双子叶植物体外融合合子培养再生植株的成功开创先例。

### 5 结束语

受精作用在有性生殖过程中始终占有中心的位置<sup>[42]</sup>。对高等植物双受精作用的研究主要表现在:细胞骨架在花粉管萌发、生长及生殖细胞发育中的

功能,钙在植物受精过程中的作用,配子融合机理和植物离体受精在有性生殖研究中的应用。近二、三十年来,在被子植物受精作用的这几个重要研究方面取得了惊人的进展。在细胞生物学方面,在采用超微结构观察方法的同时,还发展了三维重构、图象分析、免疫化学和荧光探针技术等精密方法,揭示了雄性生殖单位、精子二型性、选择性受精等现象。形成的新概念如雌性生殖单位、精子二型性等,在胚胎学文献中已确认,并揭示了配子体的细胞骨架分布规律,融合中雄配子体的状态及细胞质的参与;对精细胞的运动与传递,细胞质的遗传方式有了新的理解。在生理生化方面,最突出的是采用分子生物学技术研究花粉发育、花粉与雌蕊组织间的识别反应、配子间的识别反应的分子生物学基础,从而对受精机理的许多问题提升到从基因表达和调控的水平去理解。在实验研究方面,采用性细胞的分离和培养技术,在单子叶植物玉米中实现了真正的离体受精,并获得了相当丰富的有关玉米受精过程的新信息。然而,目前迫切需要在高等植物,尤其是在双子叶植物中开展离体受精的研究,以验证高等植物受精机理的普遍性。

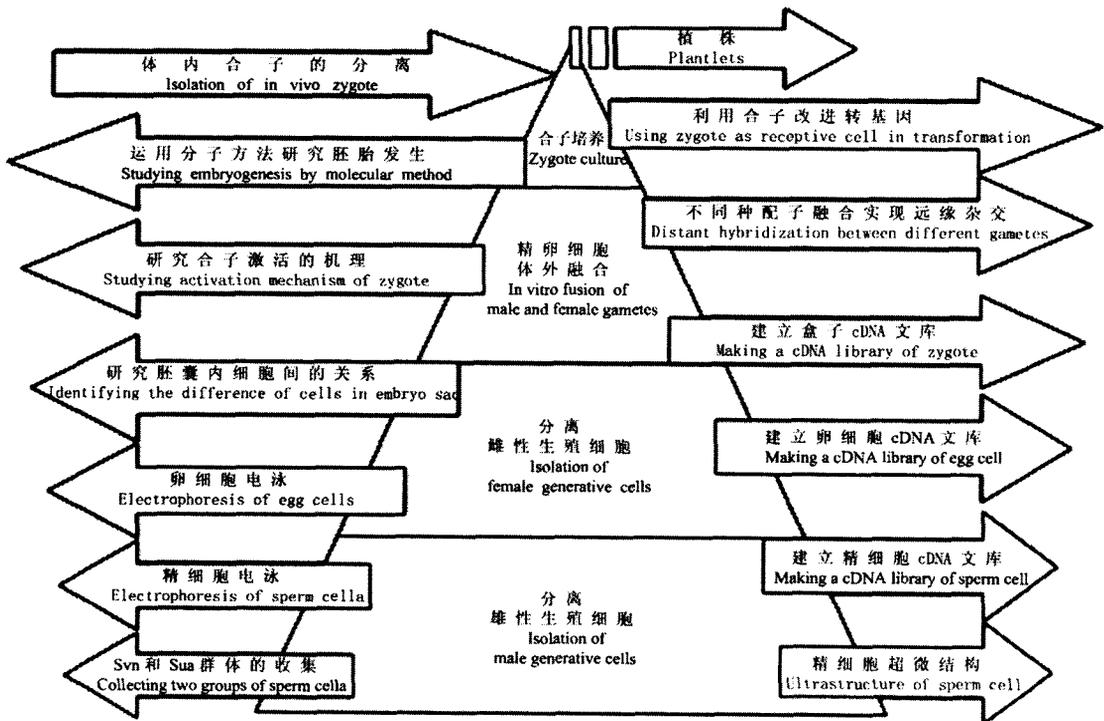


图 2 离体受精技术平台在植物有性生殖研究中的应用

Fig 2 *In vitro* fertilization used in the research of plant sexual reproduction as a technique platform

高等植物受精作用的研究在迅速发展,并不断出现新成果。国际上已陆续出现反映受精动态的研究论文,特别是有关性细胞的分离和离体受精方面的进展突飞猛进。但被子植物的离体受精难度在于胚囊外有厚的珠心包被。而玄参科植物蓝猪耳具有独特的胚囊结构,利于离体受精的研究,被视为受精生物学的模式植物。因此,建立蓝猪耳离体受精的实验体系,研究受精生物学问题具有深远的意义。离体受精作为技术平台在有性生殖研究中的深入发展如图2所示。即借助离体受精技术平台从细胞、分子两方面更深入地研究高等植物生殖生物学的机理。

### 参考文献

- [1] Higashiyama T, Kuroiwa H, Kawano S, et al. Kinetics of double fertilization in *Torenia fournieri* based on direct observations of the naked embryo sac [J]. *Planta*, 1997, 203:101–110.
- [2] Higashiyama T, Kuroiwa H, Kawano S, et al. Guidance *in vitro* of the pollen tube to the naked embryo sac of *Torenia fournieri* [J]. *Plant Cell*, 1998, 10:2019–2031.
- [3] Higashiyama T, Kuroiwa H, Kawano S, et al. Explosive discharge of pollen tube contents in *Torenia fournieri* [J]. *Plant Physiol*, 2000, 122:11–13.
- [4] Higashiyama T, Kuroiwa H, Kawano S, et al. Pollen tube attraction by the synergid cell [J]. *Science*, 2001, 293:1480–1483.
- [5] Higashiyama T. The synergid cell: attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization [J]. *J Plant Res*, 2002, 115:149–160.
- [6] Wallwork M A B, Sedgley M. Early events in the penetration of the embryo sac in *Torenia fournieri* L [J]. *Ann Bot*, 2000, 85:447–454.
- [7] Fu Y, Yuan M, Huang B Q, et al. Changes in actin organization in the living egg apparatus of *Torenia fournieri* during fertilization [J]. *Sex Plant Reprod*, 2000, 12:315–322.
- [8] Han Y Z, Huang B Q, Zee S Y. Symplastic communication between the central cell and the egg apparatus cells in the embryo sac of *Torenia fournieri* L [J]. *Planta*, 2000, 211:158–162.
- [9] Han Y Z, Huang B Q, Guo F L, et al. Sperm extract and inositol 1,4,5-triphosphate induce cytosolic calcium rise in the central cell of *Torenia fournieri* [J]. *Sex Plant Reprod*, 2002, 15:187–193.
- [10] Yuan M, Fu Y, Wang F, et al. Fertilization in *Torenia fournieri*: actin organization and nuclear behavior in the central cell and primary endosperm [J]. *Sci China (Series C)*, 2002, 45:211–224.
- [11] Vági P, Martínez K, Kristóf Z. Development and isolation of the male gametophyte of *Torenia fournieri* [J]. *Sex Plant Reprod*, 2004, 17:110–115.
- [12] Huang B Q, Russell S D. Synergid degeneration in *Nicotiana*: a quantitative, fluorochromatic and chlorotetracycline study [J]. *Sex Plant Reprod*, 1992, 5:151–155.
- [13] Tirlapur U K, Van Went J L, Cresti M. Visualization of membrane calcium and calmodulin in embryo sacs *in situ* and isolated from *Petunia hybrida* L. and *Nicotiana tabacum* L [J]. *Annu Bot*, 1993, 71:161–167.
- [14] Tian H Q, Russell S D. Calcium distribution in fertilized and unfertilized ovules and embryo sacs of *Nicotiana tabacum* L [J]. *Planta*, 1997, 202:93–105.
- [15] Yu F L (余凡立), Liang S P (梁世平), Yang H Y (杨弘远). Ultracytochemical localization of calcium in micropyle and embryo sac of *Brassica napus* before and after pollination [J]. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 1998, 40:591–597. (in Chinese)
- [16] Chaubal R, Reger B J. Relatively high calcium is localized in synergid cells of wheat ovaries [J]. *Sex plant Reprod*, 1990, 3: 98–102.
- [17] Chaubal R, Reger B J. Calcium in the synergid cells and other regions of pearl millet ovaries [J]. *Sex plant Reprod*, 1992, 5:34–46.
- [18] Chaubal R, Reger B J. Prepollination degeneration in mature synergids of pearl millet: an examination using antiminate fixation to localize calcium [J]. *Sex plant Reprod*, 1993, 6:225–238.
- [19] Chaubal R, Reger B J. Dynamics of antimonite-precipitated calcium and degeneration in unpollinated pearl millet synergids after maturity [J]. *Sex plant Reprod*, 1994, 7:122–134.
- [20] He C P, Yang H Y. Ultracytochemical localization of calcium in the embryo sac of sunflower [J]. *Chin J Bot*, 1992, 4:99–106.
- [21] Tian H Q, Zhu H, Russell S D. Calcium changes in ovules and embryo sacs of *Plumbago zeylanica* L [J]. *Sex Plant Reprod*, 2000, 13:11–20.
- [22] Kristóf Z, Tímár O, Imre K. Changes of calcium distribution in ovules of *Torenia fournieri* during pollination and fertilization [J]. *Protoplasma*, 1999, 208:149–155.
- [23] Kranz E, Lörz H. *In vitro* fertilization of maize by single egg and sperm cell protoplast fusion: mediated by high calcium and high pH [J]. *Zygote*, 1994, 2:125–128.
- [24] Xu S X (徐是雄), Zhu Z (朱徽). *Plant Cytoskeleton* [M]. Beijing: Science Publishing Company, 1996. i. (in Chinese)
- [25] Xia W (夏伟), Zhou J W (周建伟). The relation between cytoskeleton and apoptosis, communication access in cell [J]. *Chin J Cell Biol (细胞生物学杂志)*, 2001, 23: 205–209. (in Chinese)
- [26] Huang B Q, Fu Y, Zee S Y, et al. Three-dimensional organization and dynamic changes of the actin cytoskeleton in embryo sacs of *Zea mays* and *Torenia fournieri* [J]. *Protoplasma*, 1999, 209:105–119.
- [27] Hu S Y (胡适宜), Li L G (李乐功), Zhu Z (朱徽). Isolation of viable embryo sacs and their protoplasts of *Nicotiana tabacum* [J]. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 1985, 27:337–344. (in Chinese)
- [28] Cao Y J, Russell S D. Mechanical isolation and ultrastructural characterization of viable egg cells in *Plumbago zeylanica* [J]. *Sex*

- Plant Reprod, 1997, 10:368-373.
- [29] Cass D D. An ultrastructural and Nomarski-interference study of the sperms of barley [J]. Can J Bot, 1973, 51:601-605.
- [30] Kranz E, Bautor J, Lörz H. *In vitro* fertilization of single isolated gametes of maize mediated by electrofusion [J]. Sex Plant Reprod, 1991, 4:12-16.
- [31] Koop H U, Schweiger H G. Regeneration of plants after electrofusion of selected pairs of protoplasts [J]. Eur J Cell Biol, 1985, 39:46-49.
- [32] Kranz E, Bautor J, Lörz H. Electrofusion-mediated transmission of cytoplasmic organelles through the *in vitro* fertilization process, fusion of sperm cells with synergids and central cells, and cell reconstitution in maize [J]. Sex Plant Reprod, 1991, 4:17-21.
- [33] Kovács M, Barnabás B, Kranz E. Electro-fused isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) gametes develop into multicellular structures [J]. Plant Cell Rep, 1995, 15:178-180.
- [34] Kumlehn J, Kovács M, Lörz H, et al. *In vitro* fertilization in wheat (*Triticum aestivum* L.) via electrofusion of isolated egg and sperm cells [J]. Eur J Cell Biol, 1996, 69:108.
- [35] Keijzer C J, Reinders M C, Leferink-ten Klooster H B. A micromanipulation method for artificial fertilization in *Torenia* [A]. In: Cresti M, Gori P, Pacini E. Sexual Reproduction in Higher Plants [M]. New York: Springer-Verlag, 1988. 119-124.
- [36] Chen S H (陈素红), Yang Y H (杨延红), Liao J P (廖景平), et al. Isolation and collection of two populations of sperm cells from *Torenia fournieri* [J]. J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报), 2004, 12:557-561. (in Chinese)
- [37] Mól R. Isolation of protoplasts from female gametophytes of *Torenia fournieri* [J]. Plant Cell Rep, 1986, 3:202-206.
- [38] Kristóf Z, Imre K. Isolation of living megasporangia of *Torenia fournieri* [J]. Protoplasma, 1996, 192:245-248.
- [39] Imre K, Kristóf Z. Isolation and osmotic relations of developing megagametophytes of *Torenia fournieri* [J]. Sex Plant Reprod, 1999, 12:152-157.
- [40] Qiu Y L (邱义兰), Zheng M Z (郑茂钟), Tian H Q (田惠桥). *In vitro* fertilization as a technique platform used in the research of sexual reproduction of angiosperms [J]. J Trop Subtrop Bot (热带与亚热带植物学报), 2003, 11:290-296. (in Chinese)
- [41] Chen S H (陈素红), Yang Y H (杨延红), Liao J P (廖景平), et al. Isolation of egg cells and zygotes from *Torenia fournieri* [J]. J Plant Physiol Mol Boil (植物生理与分子生物学学报), 2005, 31:383-388. (in Chinese)
- [42] Hu S Y (胡适宜), Yang H Y (杨弘远). Biology of Angiosperm Fertilization [M]. Beijing: Science Publishing Company, 2002. preface. (in Chinese)