

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2016.40637

罗岸, 覃建兵. 被子植物雌雄配子及早期胚胎的分离与研究应用[J]. 植物科学学报, 2016, 34(4): 637-653

Luo A, Qin JB. Research and application of gametes and early embryo isolation technology in angiosperms[J]. *Plant Science Journal*, 2016, 34(4): 637-653

被子植物雌雄配子及早期胚胎的分离与研究应用

罗岸*, 覃建兵

(长江大学生命科学学院, 湖北荆州 434023)

摘要: 被子植物的有性生殖过程复杂精巧并深藏于母体组织内进行, 一直以来难以对该过程进行直接的细胞学和分子生物学研究。如今在多种植物中获得了有活力而无污染的配子细胞和早期胚胎, 结合少量细胞 mRNA 提取技术、基因组深度测序以及离体授精系统等技术, 人们已能对被子植物受精过程中的配子识别、配子融合、合子激活等重要发育事件进行深入分析。本文对有代表性的被子植物配子和早期胚胎的分离技术及其在受精作用研究中的应用、存在的问题和前景进行了总结, 旨在为植物生殖发育研究提供帮助。

关键词: 精细胞; 卵细胞; 早期胚胎; 分离纯化; 受精作用

中图分类号: Q944.4

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2016)04-0637-17

Research and Application of Gametes and Early Embryo Isolation Technology in Angiosperms

LUO An*, QIN Jian-Bing

(College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434023, China)

Abstract: Sexual reproduction in angiosperms is complicated and occurs deep within maternal tissues, making it difficult to study by direct cellular and molecular methods. Recently, with the progression of micromanipulation and other techniques, researchers have been able to obtain viable gametes and early embryos in a wide range of plant species. Combined with mRNA extraction from a small amount of cells, genome-wide deep sequencing, the establishment of *in vitro* fertilization systems and new molecular and genetic approaches, new light has been shed on the cellular and molecular mechanisms of the fertilization process. In this review, we focus on representative isolation methods in gametes and early embryos and application of these methods in plant sexual reproduction research. This review will provide a useful reference for research in this field.

Key words: Sperm cell; Egg cell; Early embryo; Isolation and purification; Fertilization

被子植物的有性生殖过程中, 雌、雄配子形成于单倍体的配子体世代。卵细胞位于胚囊中, 精细胞则存在于花粉或萌发的花粉管中。精细胞经由花粉管传导至胚囊, 分别与卵细胞和中央细胞结合完成双受精。不同于动物, 被子植物的整个受精过程都发生在体内深层组织中, 这导致难以对植物受精

过程中的许多事件进行观察并调查其分子机制。

20 世纪初, 人们利用光学显微镜对多种植物雌雄配子的发育过程、结构和配子融合的时间进程等做了较细致的研究。随着细胞分离技术的进步, 现已可在相对广泛的植物种类, 比如玉米 (*Zea mays* L.)、烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)、拟南芥

收稿日期: 2016-01-25, 退修日期: 2016-03-09。

基金项目: 长江大学自然科学基金项目 (2014NSFY023)。

This work was supported by a grant from the Science Foundation of Yangtze University (2014NSFY023)。

作者简介: 罗岸 (1984-), 男, 讲师, 博士, 研究方向为植物生殖发育方面的研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: anluo@whu.edu.cn)。

(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh)、水稻(*Oryza sativa* L.)和大麦(*Hordeum vulgare* L.)中分离到有活力且纯净的雌、雄配子和早期胚胎^[1-5]。这使得研究配子的生理生化特性成为可能,并能直接运用于与配子识别相关的离体研究中。而构建雌、雄配子和早期胚胎的 cDNA 文库或者进行基因组范围的转录谱分析,能够获得受精过程中的特异表达基因,为通过反向遗传学研究受精作用的分子机制提供了新的可能;此外,基于配子分离和合子培养技术建立的离体受精系统,也为精确研究受精过程中的重要事件,如质膜融合和核融合等提供了强有力的保障。本文对目前比较有代表性的植物雌、雄配子和早期胚胎的分离技术及其在植物受精和胚胎发育研究领域的应用、存在的问题和前景作一概述。

1 雌雄配子及早期胚胎的分离与纯化

1.1 雄配子的分离纯化

植物的雄配子体(花粉)的发育过程精密复杂。花药中的小孢子母细胞经过减数分裂成为小孢子。小孢子经历一次不等分裂形成两个细胞,较大的称为营养细胞,较小的称为生殖细胞,营养细胞将生殖细胞整体包围。这时的花粉称为二细胞花粉。在有些植物中,生殖细胞会在花粉成熟前再进行 1 次有丝分裂形成 2 个精细胞,这时花粉包含 1 个营养细胞和 2 个精细胞,称为三细胞花粉(图 1)。根据花粉类型不同,精细胞的分离、收集方式灵活多

样,但关键是要尽可能提高精细胞的产率和纯度,减少分离时间和步骤,保持细胞原始状态。

1.1.1 从花粉中直接获得精细胞

对三细胞花粉而言,精细胞太过微小且被营养细胞包裹,难以通过解剖获取,故常利用渗透压变化、机械破碎等方法处理花粉使精细胞释放出来。渗透压冲击法的原理是将花粉置于渗透压较低的缓冲液中,花粉迅速吸水,从而使花粉壁被涨破以释放出精细胞。Cass^[6]于 1973 年首次报道用低渗冲击法分离大麦精细胞的研究,其后多种三细胞花粉的精细胞采用此法被成功分离。例如,Russell^[7]将白花丹(*Plumbago zeylanica* L.)的成熟花粉粒放入 20%的蔗糖溶液中利用渗透压的冲击获得了完整的精细胞。经过离心富集的精细胞浓度可达到 8.8×10^6 cell/mL,且收集到的精细胞能在 24 h 内保持完好。随后玉米^[8]、甜菜(*Beta vulgaris* L.)^[9]、多年生黑麦草(*Lolium perenne* L.)^[10]和水稻^[11]的精细胞也通过类似方法相继获得。

但某些植物的花粉对渗透压变化不敏感,或渗透压变化容易导致精细胞发生破裂,因此对花粉进行机械破碎收集精细胞是另一种选择。该方法相对简单,对花粉的生活状态和发育状况要求不高。Southworth 和 Knox^[12]最早使用组织匀浆器对非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus)的花粉进行破碎分离出精细胞。后来莫永胜和杨弘远^[13]发现将紫菜苔(*Brassica campestris* var. *purpurea*)花粉放在等

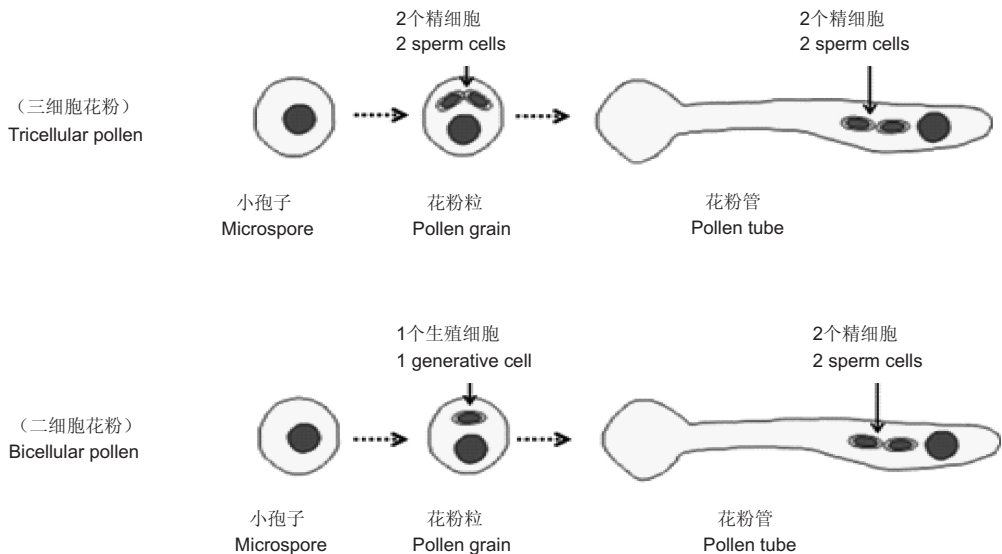


图 1 植物花粉精细胞形成示意图
Fig. 1 Diagram of sperm development in plant pollen

渗蔗糖液中水合后,再在含保护剂的培养基中用玻璃匀浆器轻轻研磨花粉获得的精细胞效果最佳。应用改良的研磨法,花粉破裂率最高为53%,生活精细胞分离率为26%,生活力最长能保持24 h。但机械破碎通常容易导致大量杂质,且分离效果不稳定,影响精细胞纯度。

1.1.2 花粉萌发后获取精细胞

二细胞花粉中只含有1个营养细胞和1个生殖细胞,所以不能直接通过破碎花粉获得精细胞。另外有些三细胞花粉置于低渗溶液中很难涨破,如欧洲油菜(*Brassica napus* L.)的花粉,亦难以直接通过破碎花粉得到精细胞^[14]。

针对这种情况,必须使用新的技术方法。第一种方法称为渗透冲击二步法:即先将花粉置于花粉萌发液中萌发长出较短的花粉管,再将花粉置于渗透压较低的缓冲液或酶液中使对渗透压变化更敏感的花粉管破裂从而释放出精细胞。欧洲油菜^[14]、蓝猪耳(*Torenia fournieri* Linden.)^[15]的精细胞可用此方法获得。第二种方法是活体-离体技术:对预先去雄的花进行人工授粉,花粉萌发后花粉管在花柱中生长一段时间后生殖细胞分裂为两个精细胞。估算此时花粉管的生长长度,切下比花粉管生长长度稍长的花柱,将花柱切口置于花粉萌发液中等待花粉管继续生长。当花粉管长出切口后,将其置于渗透压较低的缓冲液或酶液中使花粉管破裂释放出精细胞。Shivanna等^[16]首次利用此方法分离到大量杜鹃(*Rhododendron simsii* Planch.)和唐菖蒲(*Gladiolus gandavensis* Vaniot Houtt)的精细胞,之后玉帘(*Zephyranthes candida* Herb.)等多种植物的精细胞也成功获得^[15,17]。活体-离体技术相较于其他分离方法,最大优点是得到的精细胞所处时期较为一致,比较均一。

1.1.3 收集纯化与鉴定

精细胞一旦被释放出来,即处于非细胞环境,在缓冲液中放置时间过长会影响精细胞的状态,因此在后续操作中保持精细胞的活性、减少实验环节、提高收集速度十分重要。而根据实验目的和要求的不同,收集方式也有区别。

(1) 大量细胞的收集

经过花粉(管)破碎产生的精细胞通常会附带许多杂质,比如细胞碎片、细胞质团等。要获得纯度较高的精细胞必须经过纯化,一般使用一定孔径

的过滤装置去除较大的杂质,再采用Percoll密度梯度离心进行收集。由于操作简单、收集产物的纯度和数量都比较理想,Percoll密度梯度离心是最常用的精细胞分离纯化方法。有时也可以利用该方法获得含有精细胞的粗提物,再使用流式细胞仪进行纯化^[1,18],但分选过程必须利用荧光标记,即所谓FACS(fluorescence activated cell sorting)技术。比如Engel等^[1]以Hoechst染料标记玉米精细胞DNA;拟南芥通常使用GFP(green fluorescent protein)绿色荧光蛋白标记精细胞^[18-20]。

(2) 少量细胞的收集

收集大量精细胞须使用大型仪器设备,且难以对精细胞进行个性化区分,而使用显微操作则可做到对特定类型精细胞的收集,在显微镜下使用微管进行收集即可。比如Gou等^[21]将百花丹花粉放入分离溶液中使其破裂释放出精子,然后利用微管,根据大小、形状、相对位置和与营养核的联系分离出两种类型的精细胞。同理亦分离得到烟草和蓝猪耳的二型性精细胞^[22,23]。此法虽获得的精细胞纯度高,且能够将具有二型性的精细胞分开,但收集效率相对较低。

(3) 细胞鉴定

经上述不同方式收集到的精细胞,一般需使用FDA染色确认其活性,并对精细胞的纯度进行检测,以确定收集产物不含杂质颗粒。可使用显微镜进行镜检^[1],也可以使用细胞染料如DAPI和醋酸洋红进行染色观察^[24,25]。使用分子生物学手段进行检测则更加精确,利用RT-PCR技术对收集产物中精细胞和营养细胞等的特异表达基因进行检测,可判断收集产物中是否存在非精细胞组分的污染^[1,18,26]。

1.2 雌配子及早期胚胎的分离纯化

植物雌配子体的发生场所位于胚珠中,雌配子体由大孢子母细胞发育而来,又被称为胚囊,一般包括1个卵细胞、1个中央细胞、2个助细胞和3个反足细胞。植物卵细胞和早期胚胎通常包裹于胚珠中难以获取。但雌配子与早期胚胎的形态较精细胞大,容易观察并进行显微操作。一般使用切割或酶解等方式破碎胚珠得到胚囊,进而通过显微操作,使用微针、微管分离和收集卵细胞或者早期胚胎,用FDA染色检测细胞活性。卵细胞及早期胚胎有许多异于体细胞和其他胚囊细胞的细胞学特

征,在显微镜下可根据折光率、液泡和细胞大小、形状以及核的数目与形态将卵细胞和早期胚胎与其他细胞区分开。目前已从十种植物中分离得到了生活状态良好的卵细胞或早期胚胎。在分离过程中,酶的种类和浓度以及酶液和分离液的渗透压都可直接或间接的影响分离后的细胞状态。分离卵细胞或早期胚胎的方法一般有2种:酶解—解剖法和解剖法。

(1) 酶解—解剖法

此法是使用酶液处理胚珠,待其变松软后,在显微镜下借用微针、微管或其他机械力量将卵细胞或早期胚胎分离出来。胡适宜等^[27]在1985年采用酶解压片法,利用崩溃酶处理胚珠后,首次从高等植物烟草中成功地分离出生活卵细胞。此后Huang和Russell^[28]使用纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、 β -葡(萄)糖苷酸酶和果胶酶Y-23处理生活的白花丹胚珠,在显微镜下收集得到卵细胞。采用类似方法,使用不同的酶组合和处理时间,相继获得了玉米^[29]、烟草^[30,31]、蓝猪耳^[32]、水稻^[33]等十种植物的卵细胞、合子或早期胚胎^[34-41]。

(2) 解剖法

使用非酶解的方式也可以得到卵细胞或早期胚胎。解剖法即不经过酶解,直接进行显微解剖,从胚珠中将细胞分离出来。直接解剖可避免酶液对细胞的不利影响,使分离出的细胞更接近体内状态。Holm等^[42]首次直接解剖出小麦(*Triticum aestivum* Linn.)和大麦的卵细胞和合子。其将解剖针直接刺入小麦或大麦胚珠的中央细胞,引起了胚囊内膨压巨变而导致卵细胞和合子溢出。韩红梅等^[43]通过解剖法也获得水稻卵细胞与合子。蓝猪耳卵细胞^[32]、小麦原胚^[44],百花丹卵细胞^[45],拟南芥早期胚胎^[46]也可通过非酶解获得。Wuest等^[47]将拟南芥雌蕊固定后使用激光显微切割技术获得了雌配子中的各种细胞,包括卵细胞、助细胞和中央细胞。不过这种获取方式易导致轻微的组织污染。

激光显微切割与前文提到的FACS技术,以及在FACS技术基础上发展起来的FANS(fluorescence-activated nuclear sorting)技术都是针对微小的难于分离的特异细胞或组织进行分析的技术方法。但这3种方法对仪器设备要求较高。此外激光显微切割不能分离活细胞,不能完全排除组织污染;FACS、FANS技术需要提前用荧光标记所需

细胞的DNA;且FANS技术只针对细胞核进行分析不能反映细胞的完整信息。因此目前3种技术没有广泛应用于雌雄配子和早期胚胎的分离。

2 分离技术的应用

2.1 合子激活前后基因和蛋白表达的研究

合子是由卵细胞和精细胞融合而成,精、卵融合不仅导致双方基因组的融合,而且许多细胞质组分也会相互融合。如线粒体一般由母本遗传,但烟草受精卵中亦发现有精细胞的线粒体^[48]。研究表明动物的合子储存着大量卵细胞携带的母本转录本,其在合子基因组激活前参与了许多发育过程,包括胚胎极性形成、细胞分化、模式形成等。一旦受精激活细胞内基因表达谱就将发生显著改变,随后胚胎发育秩序得以建立。但目前对植物合子激活前精、卵细胞质携带的转录本和蛋白质在受精和早期胚胎发生中的作用以及合子自身基因组激活的时间点和激活后的效应还认识的不多。

(1) 精细胞转录本和蛋白质组的分析

精细胞的结构比较简单,包括细胞核和少量细胞质。由于精细胞基因组高度浓缩,通常认为其转录不活跃,对于早期胚胎发育不重要,这种观点在动物中得到支持是因为受精卵中几乎所有的mRNAs都来自卵细胞^[49]。但精细胞可能在被子植物早期胚胎发生中有重要作用:一是Zhang等^[50]发现玉米精细胞中的某些蛋白质含量会随着分离时间的变化而发生上调或下调;二是通过检测RNA中放射性UTP(uridine triphosphate)的含量证实分离纯化的玉米精细胞核具有转录活性^[51]。目前新的证据再次表明精细胞中确实存在多种转录本,因此精细胞高度浓缩的染色质仍有转录活性。例如水稻、烟草、玉米和白花丹的精细胞被分离以构建cDNA文库,获得了大量表达标签序列^[1,21,24,52,53]。另外基因组范围的基因表达也在许多植物中进行了研究,如使用基因芯片对水稻和拟南芥精细胞转录组进行调查^[18,26,54];使用基因组深度测序技术对水稻精细胞的转录组进行调查。这些结果均显示各物种的精细胞mRNA的组成广泛而丰富,参与诸如DNA修复、泛素/蛋白酶系统、细胞循环和表观遗传等不同调控途径^[4],且与花粉粒和母体组织的转录谱有明显差别。而对烟草、拟南芥和玉米精细胞的转录本进行比较后发现,只

有35个基因为这3个物种所共有。这35个基因均参与了精细胞许多基本的细胞通路和生化过程,比如代谢、转录、翻译、信号传导和细胞间运输等^[53]。

基因要参与具体的生物学过程一般需要翻译成蛋白质,随着单细胞蛋白质组检测技术的进步,对精细胞所含的蛋白质组进行调查的可行性已变得越来越高。Zhao等^[25]通过使用双向凝胶电泳和光谱测定对百合精细胞和生殖细胞的蛋白质组进行了比较,发现两者之间有101个差别表达的蛋白存在,涉及不同的细胞生活过程和代谢途径。通过分析蛋白表达变化,他们认为在精细胞的发育和功能特化中,参与SCF(Skp1-Cul1-F-box)蛋白复合物介导的蛋白质降解途径、DNA修复及细胞周期调控相关蛋白之间存在明显的关联^[25]。Abiko等^[55]利用高度敏感的液相色谱仪和串联质谱法对水稻单细胞蛋白质组进行检测,共测定了2179个在精细胞中表达的蛋白,其中77个是精细胞特异的;对部分编码精细胞特异蛋白的基因进行突变体分析发现了明显的发育缺陷。

(2) 卵细胞和早期胚胎的转录本和蛋白质组的分析

通过分离卵细胞和早期胚胎进行cDNA文库构建,基因芯片分析或者基因组深度测序,也在许多植物卵细胞和早期胚胎中发现了大量而丰富的转录本,其功能类型也是多种多样。Dresselhaus^[56]首次通过分离玉米卵细胞构建了cDNA文库,随后结合体外受精合子的cDNA文库进行分析、筛选得到一系列卵细胞特异表达基因^[57,58]。Kumlehn等^[59]则通过构建小麦有性生殖的卵细胞和单性生殖卵细胞的cDNA文库筛选出一些卵细胞特异和与单性生殖相关的基因。随后对卵细胞整体转录状况的分析在不同物种中相继展开。如Sprunck等^[44]利用分离的小麦卵细胞构建了cDNA文库,发现的基因类型主要涉及细胞代谢,mRNA翻译和蛋白质翻转。有趣的是烟草卵细胞cDNA文库的分析结果也表明了卵细胞转录本的多样性^[2,60]。此外,基因芯片技术也被用于分析拟南芥^[47]、水稻^[54,61]和小麦卵细胞的转录谱^[5]。而利用基因组深度测序技术分析水稻卵细胞^[4],共检测到约27 000个基因的表达,涉及诸多生理生化过程,包括小RNA合成途径相关基因^[62]。分析还发现卵细胞转录谱与精细胞和营养细胞的转录谱差异较

大^[4],而比较拟南芥和水稻卵细胞的转录谱,发现这两个物种卵细胞之间的基因表达也有较大差异^[61]。

卵细胞的受精产物是合子,继而发育成原胚。由于合子或原胚的分离方法与卵细胞类似,所以在对小麦^[5,44]、烟草^[60]、水稻^[54]卵细胞转录谱进行分析的同时,研究者也分析了合子或原胚的转录谱以便对受精前后基因差异表达进行比较。所有的结果表明在受精后合子或原胚的转录谱相对卵细胞转录谱有了较大的改变,一些特定基因会上调或者下调。Abiko等^[54]在基因组范围内的分析证实水稻合子相比卵细胞而言,萜烯、类黄酮、氨基酸等合成途径的基因下调;而细胞壁、生长素和乙烯合成途径及受体激酶等相关信号转导途径的基因被激活;同源框基因和一些转录因子的表达高度上调;染色体/DNA组织和装配相关基因也有所上调。除利用完整的细胞进行转录谱分析,Slane等^[63]还利用FANS技术对拟南芥的完整早期胚胎、胚体和胚柄细胞细胞核的转录状况分别进行调查。基因芯片数据显示早期胚胎发生时期,胚体和胚柄的基因表达有明显差别。这说明胚体、胚柄形态和功能上的不同是基因表达谱差异的体现,而数据显示胚体显然比胚柄有着更强的细胞活性。

2004年Okamoto等^[64]发现了玉米卵细胞包含6种主要蛋白质,其中膜联蛋白p35在卵细胞中特异表达,并参与Ca²⁺介导的细胞壁形成。之后又分离出水稻卵细胞富含的3种蛋白,包括分子伴侣和过氧化物酶^[65]。不过这些分析都不是对卵细胞蛋白质的整体分析,最近Abiko等^[55]对水稻卵细胞的蛋白质组进行检测,共测定出2138个在卵细胞中表达的蛋白,其中102个是卵细胞特异的,而部分蛋白的缺陷会导致发育障碍。综上所述,精细胞蛋白质组的检测和精细胞特异蛋白的鉴定数据将有助于解析精、卵细胞特化、精卵融合、合子激活等早期胚胎发育事件。

(3) 配子传递的转录本在早期胚胎中的作用

多年来,植物科学家一直想知道精细胞转录本是否通过受精作用传递到合子中,以及在合子或早期胚胎发生中起何作用。Ning等^[60]研究发现烟草授粉后96h的合子中存在精细胞特异转录本。之后,Xin等^[53]在烟草中发现两种未知功能的精细胞特异转录本出现在受精后10h的合子

中,这暗示其极可能是受精过程中由精子携入。相似的研究^[54,66]认为,水稻基因 *Os07g0182900* 在精细胞中大量表达,但在卵细胞中不表达,该转录本在受精后 10 ~ 20 min 的合子中即被检测到,暗示这个转录本也是通过精卵细胞融合传递至合子。*Os07g0182900* 基因编码 DNA 甲基转移酶 (MET1),可能在合子向二细胞原胚的转变中起作用。结合已被证实的由父本传递到合子中的拟南芥 *SSP* 转录本在合子不等分裂中所起的作用^[67],有理由相信精细胞传递的转录本对于胚胎发生有重要作用。

目前,卵细胞转录本在合子和早期胚胎中的作用还不十分清楚。虽然玉米、烟草、拟南芥的研究显示合子基因组从头合成的转录本在受精后几个小时就被激活,但卵细胞中储存的转录本依然在合子发育的起始阶段起着关键作用^[2,3,68]。利用分离的烟草合子进行研究,发现转录受到抑制的合子发育能够不依赖新合成的转录本而支撑到授粉后 72 h。包括配子融合、合子体积的减小、完整细胞壁的形成、大液泡的消失等早期发育事件均可由配子携带的转录本控制完成^[2]。这与拟南芥中观察到的结果一致,利用 RNA 干扰抑制拟南芥胚胎中 RNA 合成酶 II 从而抑制转录的进行,拟南芥胚胎的发育仍然能够进行到早球形胚时期^[69]。此外雌雄配子中小 RNA 介导的转座子沉默被认为是一种重要的调控机制,Anderson 等^[4]检测了水稻卵细胞转录组中 miRNA 和 siRNA 通路中相关基因的表达,发现相关通路中的所有重要组分都有活性,认为卵细胞中产生的小 RNA 介导了自身转座子沉默,而且卵细胞中的小 RNA 还可传递到合子中介导其转座子沉默。

(4) 合子发育中父母本基因组的激活

目前普遍认为,动物合子继承了卵细胞中储存的大量来自母本基因组的产物,其控制着早期胚胎发育,直到胚胎基因组激活^[70]。但植物中父母本基因组对胚胎发育的贡献还有争论。有报道称植物早期胚胎中的转录本大部分来自母本基因组,而父本基因组的转录则被推迟启动^[71,72]。Baroux 等^[73]则认为植物早期胚胎发生像动物一样是受母本控制的,母本转录产物足够维持胚胎发生直到原胚时期。也有研究证实父本基因组在早期胚胎发生时期就被激活^[74]。

Scholten 等^[75]首次利用体外受精技术证实受精后 6 h 的合子即存在父本基因组的转录活性。随后 Meyer 和 Scholten^[68]对分离出的玉米合子中父母本转录本的相对水平进行量化,认为父母本基因组对早期合子发育有着相同的贡献。他们还发现杂种早期胚胎高度的杂种优势与父本基因组的广泛激活相关。为了解来自父母双方的基因是否对早期胚胎的贡献一致,Zhang 等^[38]对烟草远缘杂交的合子和早期胚胎中的父母本基因进行了检测,证实父母双方的基因在不同发育事件中各自行使自己的功能。使用基因组深度测序技术,Autran 等^[46]认为拟南芥早期胚胎中父母本基因组都有贡献,但母本转录本显然在早期胚胎中较多。随着发育的进行,父本基因组的贡献会逐渐上升,显示了胚胎基因组的全面激活。但是 Nodine 和 Bartel^[3]认为前者的研究因缺乏反交实验而有局限性,他们认为拟南芥中来自父母双方的等位基因在早期胚胎发生中的贡献是等同的。最新的研究认为可能是两个实验所采用的拟南芥生态型不同,从而导致了两个不同的结论^[76]。尽管由于分离合子和早期胚胎的困难导致了许多有争议的结论,但植物父本基因组在合子或早期胚胎时期已被激活这一观点已成为共识。Leljak-Levanic 等^[77]发现一些合子基因组转录产生的基因编码蛋白类似于分泌型信号肽和与 Cullin 3 相关的泛素 3 连接酶的底物结合受体,这暗示在合子形成和早期胚胎发生中,细胞间的通讯和有目的的蛋白质降解,可能是合子基因组参与的重要事件。

动物不同物种中合子基因组激活 (zygotic gene activation) 的时间点差异很大,有时胚胎的基因组甚至在二细胞胚或中囊胚时期才开始转录,此时从头合成的转录本才开始掌控胚胎的发育。但目前对植物的合子激活研究不多,通过比较卵细胞和二胞原胚基因表达的变化,Okamoto 等^[78]发现 12 个在卵细胞中不表达而在受精后表达的基因,推测玉米的合子激活发生在第一次分裂前。而烟草中,Ning 等^[60]和 Zhao 等^[2]则通过检测合子和卵细胞差异表达基因、观察 mRNA 从头合成受阻的合子发育后也认为,烟草合子基因的激活发生于合子第一次分裂前。支持该结果的还有对小麦的研究,小麦合子和卵细胞基因表达谱的差异表明小麦中合子基因激活发生在合子第一次分裂前^[5,77]。当然植物合子基因激活的时间点是否早于动物还有

待于更多的实验证实^[2,60]。

(5) 顶基细胞差异表达与顶基细胞命运决定

在大多数被子植物中,合子的第一次分裂是横向不均等分裂。这次不均等分裂会产生一个具有顶基轴向的二细胞原胚,包括顶细胞和基细胞。两者的形态和发育命运完全不同,顶细胞将发育成为胚体,而基细胞则发育成为胚柄。一直以来研究者们都在思考为什么来自合子的两个子细胞的命运会如此不同。有两种理论来解释这一现象,一是不等分裂造成子代细胞中含有不同的发育决定子^[79];二是子代细胞不同的相对位置导致其迥异的发育命运^[80],但目前还没有定论。

胞质决定子显然具有重要作用,早前已发现拟南芥 *AtML1* 基因只在顶细胞中表达^[81],红花菜豆的 *G564* 和 *G541* 两个基因只存在于四细胞原胚时期的两个基细胞中^[79],而拟南芥的两个转录因子 *WOX2* 和 *WOX8* 被发现分别特异存在于二细胞原胚的顶基细胞中^[82]。这些结果表明合子不等分裂产生的两个子细胞可能有着不同的转录谱,因此直接获得顶、基细胞的转录谱进行比对分析是解决这个难题的有效办法。通过分离出二胞原胚的顶细胞和基细胞进行检测,Okamoto 等^[78]发现玉米顶、基细胞相对于合子而言有部分基因的表达水平发生了变化,他们认为顶基细胞中的某些基因可能早就存在于合子的不同区域中并随着不等分裂而被分配到不同的子代细胞,或者合子分裂后某些基因的转录本在特定子代细胞中被迅速降解掉,从而造成了顶、基细胞间基因表达的差异。随后 Hu^[83] 等和 Ma^[84] 等相继对烟草顶、基细胞的胞转录本进行分析比较,发现顶、基细胞中各自存在着特异的转录本。而合子不等分裂导致的这种基因表达差异可能是顶基细胞不同发育命运的原因^[83,84]。有趣的是,特异位于基细胞中的 *NtCYS* 基因被证实调控了基细胞的细胞程序性死亡,证明基因差异表达决定了顶、基细胞不同的发育方向^[85]。尽管顶、基细胞之间有明显的表达差异,但是两者之间依然存在着大分子的交流,顶基细胞中存在着从基细胞向顶细胞的单向蛋白质运输,而胞间连丝可能是其运输通道。要指出的是,顶、基细胞的发育命运也不是一成不变的,尽管 Slane 等^[63]发现早期胚胎发生时期胚体和胚柄的基因表达有明显差别,但最新研究显示胚柄的细胞属性是由胚体来控制,一旦去掉胚

体,在生长素的参与下,胚柄还可以重新发育成胚体^[86,87]。

2.2 配子识别机制的探索

雌雄配子相互融合形成合子是植物个体发育的起点。被子植物具双受精特征,在受精过程中2个精细胞与卵细胞和中央细胞如何相互识别对于植物正常受精十分重要。早期发现2个精细胞之间有差异,但目前被子植物的雌雄配子间是否存在识别作用仍未得到证据。对拟南芥突变体 *cdka1*^[88]、*lachesis(lis)*^[89] 和 *eoste*^[90] 的研究表明,雌雄配子的结合可能存在某种识别机制。相反对拟南芥突变体 *caf1*^[91] 和 *rbr1*^[92] 的研究则认为雌雄配子的结合不存在特异识别。

(1) 配子表面特异识别蛋白

利用配子分离技术获得精、卵细胞进行生理生化和分子生物学检测是解决配子识别问题的一个突破口。早前的研究主要利用生化手段检测分离出的精细胞膜表面是否存在可特异结合的单克隆抗体^[93-96]或特异的膜蛋白^[97],特别是与受精有密切相关的糖蛋白组分,取得了一些研究进展^[98-102]。利用植物凝集素对糖蛋白的专一性,Fang 等^[103,104]亦在蓝猪耳和烟草的卵细胞表面发现有糖蛋白组分的存在,而且首次发现卵细胞和中央细胞中细胞核的位置与某些糖蛋白的极性分布紧密相关。这些结果暗示了精、卵细胞膜表面存在着特异蛋白,并对受精识别有潜在作用。

由于精、卵细胞蛋白质的提取量和纯度相对有限,为了更好地寻找配子识别相关蛋白,研究者开始分离植物精卵细胞或生殖细胞,构建 cDNA 文库寻找配子特异表达基因。Xu 等^[105]首先在麝香百合(*Lilium longiflorum* Thunb.)中分离到位于雄性生殖细胞表面的特异表达基因 *LGC1*, *LGC1* 蛋白特异定位于生殖细胞的质膜,推测可能是编码与精卵相互作用有关的蛋白。随后 Mori 等^[106]在百合中分离到位于雄性生殖细胞表面的特异表达基因 *GCS1*, *GCS1* 蛋白特异定位于生殖细胞的质膜。在拟南芥 *gcs1/hap1* 突变体中,雌雄配子无法融合,导致雄性败育,暗示 *GCS1* 蛋白可能在配子识别中具有重要作用^[106,107]。最近 *GEX2* 基因的发现更表明了精细胞膜表面蛋白对于受精的重要性^[108]。

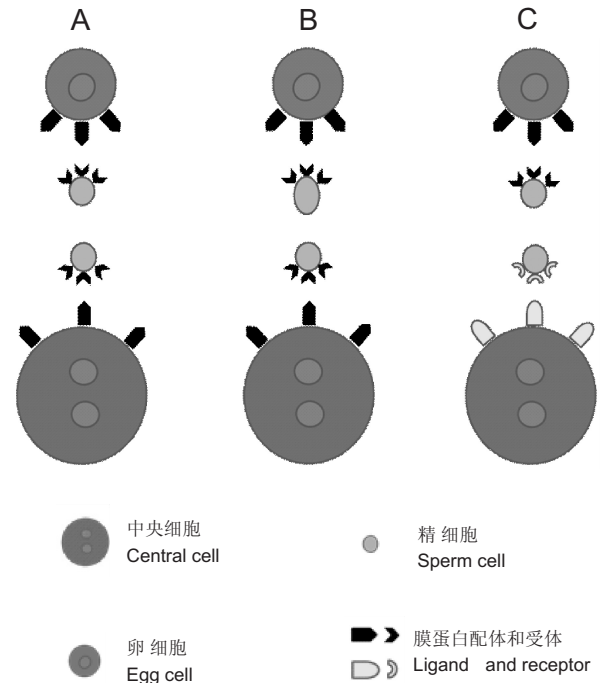
相对于精细胞,虽然卵细胞的分离相对较难、

数量较少，但依然可通过构建 cDNA 文库寻找特异表达基因。Dresselhaus 等^[56-58,109]首次利用玉米卵细胞和体外受精合子构建 cDNA 文库筛选特异表达基因^[109]。还有研究对烟草、小麦、水稻等物种中卵细胞与合子或原胚 cDNA 文库进行差减分析^[5,44,54,60]；对玉米卵细胞与中央细胞 cDNA 文库进行差减分析^[110]；对水稻精卵转录谱进行分析比对^[4]，这都有助于筛选出与配子识别相关的配子特异表达基因。引人注目的是，Sprunck 等^[111]基于小麦卵细胞 cDNA 文库中检测到的转录本，在拟南芥中发现了其同源基因 *EC1*。*EC1* 积累在拟南芥卵细胞的液泡中，经胞吐作用向外分泌，与精子质膜表面的 GCS1 蛋白的相互作用导致配子融合。这些探索为认识植物雌雄配子识别机制指明了方向。

(2) 倾向性受精与精子二型性

被子植物独特的双受精过程中，2 个精细胞与卵细胞和中央细胞的结合是随机还是有倾向性一直是植物生殖过程中最有趣的问题。Faure^[112]提出了 3 种模型来解释精、卵细胞间结合的可能性(图 2)。研究发现有些被子植物花粉产生的两个精细胞有差异，两者可能在大小、形态、细胞器种类和数量上，乃至染色体数量上有差别^[113-115]。这种差别称为精子的二型性，但至今只在约 10 种植物中发现了此类现象。后来发现有二型性的两个精细胞在与卵细胞和中央细胞的结合上具有倾向性，最初倾向性受精只在白花丹和玉米中得到证实^[115,116]，近年来拟南芥中的研究结果暗示配子融合存在识别机制，且表现出受精倾向性^[117-120]。但是也有反面的证据显示拟南芥的受精过程中两个精细胞都具有结合卵细胞的能力^[121]，且精细胞与卵细胞和中央细胞的结合没有明显的倾向性^[122]。总之精子二型性与倾向性受精的发现暗示了双受精过程中配子特异性结合的可能。而同时进入胚囊中的 2 个精细胞分别与卵细胞和中央细胞融合的现象说明有一种机制确保 2 个融合过程。至于被子植物中是否广泛存在精细胞二型性及倾向性受精，及其内在的分子机制仍需更多研究结果予以证实。

利用精细胞分离纯化技术对具有精子二型性的植物的精细胞进行分类收集研究，是破解这一问题的良方。目前研究者可以分离白花丹^[123]、蓝猪耳^[23]、烟草^[22]和五唇兰(*Doritis pulcherrima*)^[17]



A. 融合没有特异识别，两个精细胞形态一样且带有相同的配体，均可以和卵细胞融合；B. 精卵识别存在特异性，特定精细胞才与卵细胞融合；C. 两个精细胞表面带不同的配体，决定其不同的融合命运。

A. No selective recognition exists in egg-sperm fusion; two sperm cells are the same with identical ligands, so both can fuse with the egg cell. B. Selective recognition exists in egg-sperm fusion; the particular sperm cell can fuse with the egg cell. C. Different ligands are on the surface of two sperm cells, which then fuse with the egg cell or central cell.

图 2 配子识别假说的三种模型(引自 Faure^[112])
Fig. 2 Model of gamete recognition hypothesis
(cited from Faure^[112])

等具有精子二型性的物种的精细胞。Southworth 等^[124]首次对分离的白花丹二型性精细胞的膜表面进行超微结构观察，发现虽然两者所含细胞器确有不同，但是膜表面没有表现出明显差别。而 Zhang 等^[123]对白花丹二型性精细胞表面肌球蛋白和电荷进行了检测，发现倾向于卵细胞融合的精细胞与倾向于中央细胞融合的精细胞表面所带电荷不同。而二型性精细胞表面电荷的差异同样在烟草中被证实^[22]。Hirano 等^[125]在垂筒花(*Cyrtanthus mackenii*)中还发现微管对于维持二型性精细胞的细胞核型态上的差异非常重要。除了形态上的差别以外，Singh 等^[126]通过分析精细胞和生殖细胞差异表达基因，发现有一种多聚泛素蛋白在白花丹的一种精细胞类型中特异高表达。Gou 等^[21]利用白花丹精子的二型性，分离到两种精细胞，通过比较不同类型精细胞的基因表达模式分析倾向性受精的

分子机理,发现两种精细胞的基因表达模式差异较大,倾向与卵细胞结合的精细胞中转录和翻译相关基因的表达上调,而与中央细胞结合的精细胞在激素合成类的基因表达上调。这种差异化的基因表达模式与受精后的胚胎与胚乳可能的基因表达模式不谋而合,暗示2个精细胞可通过受精作用将细胞质中不同的转录本传递给受精产物影响其发育,证明了倾向受精的结果。Faure等^[127]利用同一个花粉管中产生的携带或不携带B染色体的两个精细胞进行体外受精,发现两者对于与卵细胞结合没有偏向性。总的来说,虽然对精细胞二型性的研究结果相对较少,相互之间也有矛盾之处,但这些研究为探索配子识别,尤其是倾向受精机理打下了基础。

2.3 胚胎印迹基因的寻找

哺乳动物和开花植物中基因组印迹是一个普遍的表现遗传机制,其参与调控父母本等位基因的印迹表达。母本印迹表达的基因称为MEGs(maternally expressed imprinted genes),而父本印迹表达基因称为PEGs(paternally expressed imprinted genes)。

(1) 胚胎中的印迹基因

现已从胚乳中鉴定出数百个印迹基因,而玉米*Mee1*基因的发现还是首次证实胚胎中存在印迹基因。Jahnke和Scholten^[128]检测了玉米*Mee1*基因父母本等位基因在精卵细胞、合子、早期胚胎与胚乳中的表达情况及甲基化状态。发现*Mee1*基因在早期胚胎和胚乳中存在母本印迹表达,而这可能是由于*Mee1*基因父母本等位基因之间不同的甲基化状态导致的。但目前*Mee1*基因参与了何种胚胎发育过程尚未报道。随后对拟南芥、玉米和水稻进行全基因组范围内的基因表达分析^[129-132],又发现了一些疑似的胚胎印迹基因,但由于组织污染等可能的原因,这些基因是否存在还需要进一步确认。

近期,Raissig等^[133]利用拟南芥不同生态型杂交后获得的胚胎构建cDNA文库筛选到11个MEGs和1个PEG。研究者将候选印迹基因的启动子连接GUS(β -glucuronidase)报告基因后构建转基因植株,并与野生型正反杂交,杂种F₁胚胎的染色结果证实有6个MEGs不是具有完全印迹表达就是有强烈的母本表达偏向。而且研究者还证实不同的生态型杂交或不同的胚胎发育时期对大多数印迹基因的表达模式不造成影响。因此这些结果

暗示基因组印迹可能并不限制于胚乳中,而是在胚胎中也有广泛存在^[133]。虽然这些拟南芥印迹基因的突变体中没有明显异常的胚胎表型,但一些MEGs参与细胞代谢,且所有MEGs在胚珠中表达,有7个MEGs在胚胎下部和胚柄还有轻微的偏向性表达。因此研究者认为这些MEGs可能在胚胎和母体组织的连接处起作用,参与连接珠被和胚胎之间的代谢,并将之置于母本控制下^[133]。当然对于胚胎中的印迹基因还需继续搜寻并研究,以了解基因组印迹在胚胎发育中的功能和在植物进化上的意义。

(2) 胚胎印迹基因的调控

DNA甲基化和组蛋白修饰是两种不同的表现遗传机制。DNA糖基化酶DEMETER(DME)的活性和甲基转移酶MET1的表达抑制共同调控了CG位点上DNA的去甲基化。但对某些基因而言,DNA甲基化不足以建立起印迹标记,还需要多梳抑制复合体PRC2(polycomb repressive complex 2)的参与。PRC2复合物可催化组蛋白H3的27号赖氨酸的三甲基化从而建立表现印迹。Raissig等^[133]调查了拟南芥胚胎中印迹基因的分子机制,发现*fie*基因(PCR2组分之一)功能的缺失能够改变2个MEGs和1个PEG的印迹表达,但*met1*基因的功能缺失对MEGs的影响不大。因此Raissig等^[132]认为胚胎印迹的表达不是由DNA甲基化造成。这与之前在玉米中的研究类似,Jahnke和Scholten^[128]发现合子和晚期胚乳中*Mee1*基因甲基化程度和*Mee1*的表达不一致,因此推测DNA甲基化可能不是该基因首要的印迹标记,而有其他未发现的机制参与了胚胎印迹的建立。

2.4 体外受精与合子体外培养系统的建立与应用

因为被子植物的受精和受精后发育事态都发生在子房组织中深藏不露,这导致很难直接研究其受精和胚胎发生中的细胞学过程和分子学机制。但是近年来,体外受精系统的建立已成为研究这一过程的有效工具。研究者可应用离体培养技术在人工可控的条件下研究受精前后的发育事件和早期信号。

(1) 体外受精系统

通过电融合、高钙高pH、聚乙二醇、钙离子或牛血清白蛋白介导等方式,有学者对玉米^[134-138]、烟草^[139,140]、水稻^[141]和小麦^[142]的配子融合研究进行了许多有益的尝试。通过钙离子介

导玉米配子的融合, Digonnet 等^[143]首次发现体外精卵融合会引起胞内钙离子浓度变化, Antoine 等^[144]进一步发现配子融合导致的钙流可诱导细胞壁的形成, 并描述了胞内钙离子变化和胞外钙流对配子融合和卵细胞激活的作用。Sun 等^[145]利用显微录像跟踪记录了聚乙二醇介导的烟草配子融合和相互作用, 并研究了多精入卵阻断机制^[146]。但是通过钙流和聚乙二醇介导融合得到的烟草合子^[140, 145]和通过钙流介导融合的玉米合子都没有完全发育成可育植株^[136], 因此想通过化学融合的方法获得状态良好的合子进行胚胎发育研究还需进一步优化实验条件。

Kranz 和 Lörz^[135]首次使用分离的玉米配子和电融合方式成功构建了体外受精系统。体外融合产生的玉米合子能够通过胚胎发生, 按照体内相似的发育进程, 从合子发育成为有育性的植株。因此, 玉米中体外受精系统被用于观察和分析受精后的各种事件, 包括利用图像分析技术研究卵细胞和体外受精产物的特征^[147]、核融合^[148]、合子发育^[149]、合子中父本基因组的激活^[75]、倾向性受精^[127]、合子微管结构的变化^[150]和受精诱导的基因的筛选^[78]等。利用电融合介导小麦精、卵细胞融合却没有完全成功, 虽然受精卵能够发育成多细胞团, 但没有得到有育性的植株^[151]。利用小麦体外受精系统也作了一些研究, Pónya 等^[152]观察了小麦体外受精过程中细胞内微丝的变化, 卵细胞内质网与钙离子的关系^[153], 并对体外受精中卵细胞出现的钙振荡做了详细研究^[154]。之后 Uchiumi 等^[33, 155]成功建立了水稻体外受精系统, 能够产生人工合子, 并使之发育成有育性的植株。水稻体外培养系统也用于观察合子发育过程中极性变化^[156], 体外受精中精卵融合点和合子第一次分裂面的关系^[157]。最近 Ohnishi 等^[66]利用带有荧光标记的融合蛋白标记配子的核和核膜, 在水稻中研究了受精前后精卵核融合的动态变化和分子机制。发现配子融合 5 ~ 10 min 后精核依赖微丝迁移至卵核, 30 ~ 70 min 后精细胞染色体开始去致密化合成新转录本, 合子不同发育阶段的精确时间节点被一一设定。除了种内配子融合外, 利用体外受精进行种间远缘杂交也有尝试, 如: 高粱 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)、薏苡 (*Coix chinensis* Tod.)、小麦、大麦等禾本科植物的精细胞被用于与玉米卵细

胞融合, 其融合组合的产物都能发育至多细胞团^[158], 这在远缘杂交中可能有重要应用。但由于离体配子融合受多种因素影响, 虽然在玉米和水稻中均已成功建立了体外受精系统, 但双子叶植物配子体外融合的离体受精系统尚需进一步完善。

(2) 合子体外培养系统

除了上述体外受精形成的合子可通过体外培养进行观察研究, 体内分离的自然合子同样适用。Holm 等^[42]利用解剖法分离出大麦的合子原生质体, 并利用大麦小孢子作为饲养物进行合子培养, 大麦合子可成功发育成胚状物, 其中一半继而成长为可育植株。将大麦小孢子作为饲养物还可使小麦合子和玉米合子也通过类似方式产生了可育植株^[42, 159, 160], 最近 Kumlehn 等^[161]改用胚性花粉与合子进行共培养大大提高了小麦合子体外培养的效率。而利用水稻悬浮细胞作为饲养物, Zhang 等^[162]使粳稻和籼稻两个品种的合子都成功长成可育植株。在双子叶植物中, 目前只有烟草中建立了有效的体外合子培养体系。孙蒙祥课题组通过使用受精的胚珠作为饲养物, 使合子通过胚胎发生发育成为有育性的植株, 其中合子原始细胞壁的完整性是体外培养中合子保持顶基轴向和正常细胞分离方向的关键^[163]。由于双子叶模式植物的发育有更清晰的细胞分裂模式和可用于追踪早期胚胎发生的细胞系, 因此在研究合子发育重要事件中更显重要。除基础研究外, 体外合子培养还可用于遗传育种, 如发展 DNA 显微注射技术对合子进行转基因操作^[160, 164, 165], 通过培养可直接获得转基因植株, 能避免愈伤培养导致的周期长等缺点。一旦找到绿色高效的筛选手段, 该技术未来将在农业生产方面发挥重要作用。此外体外合子培养亦可用于研究外源添加剂对合子或原胚发育的影响^[166, 167], 体内自然合子和体外培养合子发育的比较^[168]、体内自然合子和体外培养合子基因差别表达的分析^[169]等诸多方面。

3 结语

全面了解被子植物受精过程是植物发育生物学的重要理论课题, 虽然目前对被子植物受精过程的研究取得了很大的进步, 但是相对于动物和低等植物而言还有很大差距。包括精、卵细胞的发育、倾向性受精、配子识别的分子机制、配子

携带的转录本在合子发育中的作用、合子激活等诸多植物生殖发育生物学领域的前沿课题都期待着有更多的突破性进展。随着短时高效的精、卵细胞和早期胚胎分离技术和双子叶植物体外受精体系的完善,再加上基因组深度测序、单细胞测序和蛋白质组检测技术的应用,结合包括拟南芥和水稻等更多植物物种基因组序列的数据,高效的受精和早期胚胎相关基因筛选方法的建立^[170],植物受精过程中的分子生物学过程将更加清晰,且目前尚未完全涉及的精、卵细胞中积累的蛋白质、线粒体与质体基因组所扮演的遗传角色也将会得到关注。当然基于生殖发育障碍突变体的体内研究和基于细胞分离技术的离体研究各有所长,将两种研究方法的优势结合将能更全面地认识植物复杂的生殖发育过程。

参考文献:

- [1] Engel ML, Chaboud A, Dumas C, McCormick S. Sperm cells of *Zea mays* have a complex complement of mRNAs [J]. *Plant J*, 2003, 34(5): 697-707.
- [2] Zhao J, Xin H, Qu L, Ning J, Peng X, Yan T, Ma L, Li S, Sun MX. Dynamic changes of transcript profiles after fertilization are associated with *de novo* transcription and maternal elimination in tobacco zygote, and mark the onset of the maternal-to-zygotic transition [J]. *Plant J*, 2011, 65(1): 131-145.
- [3] Nodine MD, Bartel DP. Maternal and paternal genomes contribute equally to the transcriptome of early plant embryos [J]. *Nature*, 2012, 482(7383): 94-97.
- [4] Anderson SN, Johnson CS, Jones DS, Conrad LJ, Gou X, Russell SD, Sundaresan V. Transcriptomes of isolated *Oryzasativa* gametes characterized by deep sequencing: evidence for distinct sex-dependent chromatin and epigenetic states before fertilization [J]. *Plant J*, 2013, 76(5): 729-741.
- [5] Domoki M, Szűcs A, Jäger K, Bottka S, Barnabás B, Fehér A. Identification of genes preferentially expressed in wheat egg cells and zygotes [J]. *Plant Cell Rep*, 2013, 32(3): 339-348.
- [6] Cass DD. An ultrastructural and Nomarskiinterference study of the sperms of barley [J]. *Can J Bot*, 1973, 51(3): 601-605.
- [7] Russell SD. Isolation of sperm cells from the pollen of *Plumbago zeylanica* [J]. *Plant Physiol*, 1986, 81(1): 317-319.
- [8] Dupuis I, Roeckel P, Matthys-Rochon E, Dumas C. Procedure to isolate viable sperm cells from corn (*Zea mays* L.) pollen grains [J]. *Plant Physiol*, 1987, 85(85): 876-878.
- [9] Nielsen JE, Olesen P. Isolation of sperm cells from the trinucleate pollen of sugar beet (*Beta vulgaris*) [M]//Plant Sperm Cells as Tools for Biotechnology. Wageningen: Pudoc, 1988: 111-122.
- [10] van der Maas HM, Zaal MACM, de Jong ER, Went JLV, Krens FA. Optimization of isolation and storage of sperm cells from pollen of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. *Sex Plant Reprod*, 1993, 6(1): 64-70.
- [11] 苟小平, 王胜华, 陈放. 水稻生活精细胞的分离及细胞学观察 [J]. 植物学报, 1999, 41(6): 669-671.
Gou XP, Wang SH, Chen F. Isolation and cytological observation of viable sperm cells of rice [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1999, 41(6): 669-671.
- [12] Southworth D, Knox RB. Flowering plant sperm cells: isolation from pollen of *Gerbera jamesonii* (Asteraceae) [J]. *Plant Sci*, 1989, 60(2): 273-277.
- [13] 莫永胜, 杨弘远. 紫菜苔精细胞的大量分离和生活力保存 [J]. 植物学报, 1991, 33(9): 649-657.
Mo YS, Yang HY. Mass isolation and preservation of viable sperm cells in *Brassica campestris* var. *purpurea* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1991, 33(9): 649-657.
- [14] Taylor PE, Kenrick J, Blomstedt CK, Knox RB. Sperm cells of the pollen tubes of *Brassica*: ultrastructure and isolation [J]. *Sex Plant Reprod*, 1991, 4(3): 226-234.
- [15] 莫永胜, 杨弘远. 几种具二核型花粉植物精细胞的分离和融合 [J]. 植物学报, 1992, 34(9): 688-697.
Mo YS, Yang HY. Isolation and fusion of sperm cells in several bicellular pollen species [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1992, 34(9): 688-697.
- [16] Shivanna KR, Xu H, Taylor P, Knox RB. Isolation of sperms from the pollen tubes of flowering plants during fertilization [J]. *Plant Physiol*, 1988, 87(3): 647-50.
- [17] 伍成厚, 赵玉辉, 杨延红, 田惠桥. 五唇兰精细胞的分离 [J]. 热带亚热带植物学报, 2012, 20(4): 393-398.
Wu CH, Zhao YH, Yang YH, Tian HQ. Isolation of sperm cells in *Doritis pulcherrima* [J]. *Jouranal of Tropical and Subtropical Botany*, 2012, 20(4): 393-398.
- [18] Borges F, Gomes G, Gardner R, Moreno N, McCormick S, Feijó JA, Becker JD. Comparative transcriptomics of *Arabidopsis* sperm cells [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148(2): 1168-1181.
- [19] Borges F, Gardner R, Lopes T, Calarco JP, Boavida LC, Slotkin RK, Martienssen RA, Becker JD. FACS-based purification of *Arabidopsis* microspores, sperm cells and vegetative nuclei [J]. *Plant Methods*, 2012, 17, 8(1): 44.
- [20] Calarco JP, Borges F, Donoghue MT, Van Ex F, Jullien PE, Lopes T, Gardner R, Berger F, Feijó JA, Becker JD, Martienssen RA. Reprogramming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA [J]. *Cell*, 2012, 151(1): 194-205.
- [21] Gou X, Yuan T, Wei X, Russell SD. Gene expression in

- the dimorphic sperm cells of *Plumbago zeylanica*: transcript profiling, diversity, and relationship to cell type[J]. *Plant J*, 2009, 60(1): 33–47.
- [22] Yang YH, Qiu YL, Xie CT, Tian HQ, Zhang Z, Russell SD. Isolation of two populations of sperm cells and micro-electrophoresis of pairs of sperm cells from pollen tubes of tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. *Sex Plant Reprod*, 2005, 18(2): 47–53.
- [23] Chen SH, Liao JP, Kuang AX, Tian HQ. Isolation of two populations of sperm cells from the pollen tube of *Torenia fournieri*[J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25(11): 1138–1142.
- [24] Xu HP, Weterings K, Vriezen W, Feron R, Xue YB, Derksen J, Mariani C. Isolation and characterization of male-germ-cell transcripts in *Nicotiana tabacum*[J]. *Sex Plant Reprod*, 2002, 14(6): 339–346.
- [25] Zhao X, Yang N, Wang T. Comparative proteomic analysis of generative and sperm cells reveals molecular characteristics associated with sperm development and function specialization[J]. *J Proteome Res*, 2013, 12(11): 5058–5071.
- [26] Russell SD, Gou X, Wong CE, Wang X, Yuan T, Wei X, Bhalla PL, Singh MB. Genomic profiling of rice sperm cell transcripts reveals conserved and distinct elements in the flowering plant male germ lineage[J]. *New Phytol*, 2012, 195(3): 560–573.
- [27] 胡适宜, 李乐工, 朱激. 烟草生活胚囊及胚囊原生质体的分离[J]. *植物学报*, 1985, 27(4): 337–344.
- Hu SY, Li LG, Zhu J. Isolation of viable embryo sac and their protoplasts of *Nicotiana tabacum*[J]. *Acta Botanica Sinica*, 1985, 27(4): 337–344.
- [28] Huang BQ, Russell SD. Isolation of fixed and viable eggs, central cells, and embryo sacs from ovules of *Plumbago zeylanica*[J]. *Plant Physiol*, 1989, 90(1): 9–12.
- [29] Kranz E, Bautor J, and Lörz H. In vitro fertilization of single, isolated gametes of maize mediated by electrofusion[J]. *Sex Plant Reprod*, 1991, 4(1): 12–16.
- [30] Sun MX, Yang HY, Zhou C. A new method for embryo sac isolation and in situ fusion of egg and synergid protoplasts in *Nicotiana tabacum*[J]. *Acta Bot Sin*, 1993, 35(12): 893–900.
- [31] Fu CM, Sun MX, Zhou C and Yang HY. Isolation of fertilized embryo sacs and zygotes and triggering of zygote division *in vitro* in *Nicotiana tabacum*[J]. *Acta Bot Sin*, 1996, 28(5): 1528–1540.
- [32] 陈素红, 杨延红, 廖景平, 田惠桥. 蓝猪耳卵细胞和合子的分离[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2005, 31(4): 383–388.
- Chen SH, Yang YH, Liao JP, Tian HQ. Isolation of egg cells and zygotes from *Torenia fournieri* [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2005, 31(4): 383–388.
- [33] Uchiumi T, Komatsu S, Koshiba T, Okamoto T. Isolation of gametes and central cells from *Oryza sativa* L.[J]. *Sex Plant Reprod*, 2006, 19(1): 37–45.
- [34] Hoshino Y, Murata N, Shinoda K. Isolation of individual egg cells and zygotes in *Alstroemeria* followed by manual selection with a microcapillary-connected micropump[J]. *Ann Bot*, 2006, 97(6): 1139–1144.
- [35] 刘欢欢, 菅明霞, 王雅英, 田惠桥. 黄花木曼陀罗卵细胞分离[J]. *分子细胞生物学报*, 2008, 41(6): 489–494.
- Liu HH, Jian MX, Wang YY, Tian HQ. Isolation of egg cells from *Brugmansia aurea* Lagerh “Goildens Kornett” [J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2008, 41(6): 489–494.
- [36] 魏冬梅, 菅明霞, 陈琳, 田惠桥. 韭菜卵细胞、合子及原胚的分离[J]. *细胞生物学杂志*, 2009, 31(2): 286–290.
- Wei DM, Jian MX, Chen L, Tian HQ. Isolation of egg cells, zygotes and proembryos from *Allium tuberosum* Roxb[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2009, 31(2): 286–290.
- [37] 菅明霞, 张亚楠, 王雅英, 田惠桥. 葱卵细胞的分离[J]. *植物学报*, 2009, 44(3): 345–350.
- Jian MX, Zhang YN, Wang YY, Tian HQ. Isolation of egg cells from *Allium fistulosum* [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2009, 44(3): 345–350.
- [38] Zhang JE, Luo A, Xin HP, Zhao J, Li SS, Qu LH, Ma LG, Scholten S, Sun MX. Genes of both parental origins are differentially involved in early embryogenesis of a tobacco interspecies hybrid[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23153.
- [39] 陈琳, 张亚楠, 邱义兰, 田惠桥. 莴苣胚囊细胞分离[J]. *云南植物研究*, 2010, 32(4): 323–327.
- Chen L, Zhang YN, Qiu YL, Tian HQ. Isolation of embryo sac cells of Lettuce (*Lactuca sativa*) [J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 2010, 32(4): 323–327.
- [40] 宋玉燕, 包晗, 陈美灵, 朱云, 田惠桥. 胡萝卜精、卵细胞、助细胞和中央细胞的分离[J]. *植物生理学报*, 2012, 48(1): 90–94.
- Song YY, Bao H, Chen ML, Zhu Y, Tian HQ. Isolation of sperms, eggs, synergids and central cells of carrot (*Daucus carota* L.) [J]. *Plant Physiology Journal*, 2012, 48(1): 90–94.
- [41] 陈美灵, 于金金, 吴晓琛, 魏冬梅, 田惠桥. 洋葱卵细胞的分离[J]. *中国细胞生物学学报*, 2012, 34(11): 1123–1128.
- Chen ML, Yu JJ, Wu XC, Wei DM, Tian HQ. Isolation of egg cells from *Allium cepa* L.[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2012, 34(11): 1123–1128.
- [42] Holm PB, Knudsen S, Mouritzen P, Negri D, Olsen FL, Roue C. Regeneration of fertile barley plants from mechanically isolated protoplasts of the fertilized egg cell [J]. *Plant Cell*, 1994, 6(4): 531–543.
- [43] Han HM, Zhao J, Shi HZ, Yang HY, Zhou C. Isolation of egg cells and zygotes in *Oryza sativa*[J]. *Acta Bot Sin*,

- 1998, 40(2): 186–188.
- [44] Sprunck S, Baumann U, Edwards K, Langridge P, Dresselhaus T. The transcript composition of egg cells changes significantly following fertilization in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant J*, 2005, 41(5): 660–672.
- [45] Cao Y, Russell S D. Mechanical isolation and ultrastructural characterization of viable egg cells in *Plumbago zeylanica* [J]. *Sex Plant Reprod*, 1997, 10(6): 368–373.
- [46] Autran D, Baroux C, Raissig MT, Lenormand T, Wittig M, Grob S, Steimer A, Barann M, Klostermeier UC, Leblanc O, Vielle-Calzada JP, Rosenstiel P, Grimanelli D, Grossniklaus U. Maternal epigenetic pathways control parental contributions to *Arabidopsis* early embryogenesis [J]. *Cell*, 2011, 145(5): 707–719.
- [47] Wuest SE, Vijverberg K, Schmidt A, Weiss M, Gheyselinck J, Lohr M, Wellmer F, Rahnenführer J, von Mering C, Grossniklaus U. *Arabidopsis* female gametophyte gene expression map reveals similarities between plant and animal gametes [J]. *Curr Biol*, 2010, 20(6): 506–512.
- [48] Yu HS, Russell SD. Occurrence of mitochondria in the nuclei of tobacco sperm cells [J]. *Plant Cell*, 1994, 6(10): 1477–1484.
- [49] Krawetz SA. Paternal contribution; new insights and future challenges [J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(8): 633–642.
- [50] Zhang G, Gifford DJ, Cass DD. RNA and protein synthesis in sperm cells isolated from *Zea mays* L. pollen [J]. *Sex Plant Reprod*, 1993, 6(6): 239–243.
- [51] Matthys-Rochon E, Møl R, Heizmann P, Dumas C. Isolation and microinjection of active sperm nuclei into egg cells and central cells of isolated maize embryo sacs [J]. *Zygote*, 1994, 2(1): 29–35.
- [52] Gou XP, Xu Y, Tang L, Yan F, Chen F. Representative cDNA library from isolated rice sperm cells [J]. *Acta Bot Sin*, 2001, 43(10): 1093–1096.
- [53] Xin HP, Peng XB, Ning J, Yan TT, Ma LG, Sun MX. Expressed sequence-tag analysis of tobacco sperm cells reveals a unique transcriptional profile and selective persistence of paternal transcripts after fertilization [J]. *Sex Plant Reprod*, 2011, 24(1): 37–46.
- [54] Abiko M, Maeda H, Tamura K, Hara-Nishimura I, Okamoto T. Gene expression profiles in rice gametes and zygotes: identification of gamete-enriched genes and up-or down-regulated genes in zygotes after fertilization [J]. *J Exp Bot*, 2013, 64(7): 1927–1940.
- [55] Abiko M, Furuta K, Yamauchi Y, Fujita C, Taoka M, Isobe T, Okamoto T. Identification of proteins enriched in rice egg or sperm cells by single-cell proteomics [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69578.
- [56] Dresselhaus T, Lörz H, Kranz E. Representative cDNA libraries from few plant cells [J]. *Plant J*, 1994, 5(4): 605–610.
- [57] Dresselhaus T, Cordts S, Heuer S, Sauter M, Lörz H, Kranz E. Novel ribosomal genes from maize are differentially expressed in the zygotic and somatic cell cycles [J]. *Mol Gen Genet*, 1999, 261(2): 416–427.
- [58] Dresselhaus T, Cordts S, Lörz H. A transcript encoding translation initiation factor eIF-5A is stored in unfertilized egg cells of maize [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 39(5): 1063–1071.
- [59] Kumlehn J, Kirik V, Czihal A, Altschmied L, Matzk F, Lörz H, Bäuml H. Parthenogenetic egg cells of wheat: cellular and molecular studies [J]. *Sex Plant Reprod*, 2001, 14(4): 239–243.
- [60] Ning J, Peng XB, Qu LH, Xin HP, Yan TT, Sun M. Differential gene expression in egg cells and zygotes suggests that the transcriptome is restricted before the first zygotic division in tobacco [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(7): 1747–1752.
- [61] Ohnishi T, Takanashi H, Mogi M, Takahashi H, Kikuchi S, Yano K, Okamoto T, Fujita M, Kurata N, Tsutsumi N. Distinct gene expression profiles in egg and synergid cells of rice as revealed by cell type-specific microarrays [J]. *Plant Physiol*, 2011, 155(2): 881–891.
- [62] Takanashi H, Ohnishi T, Mogi M, Hirata Y, Tsutsumi N. DCL2 is highly expressed in the egg cell in both rice and *Arabidopsis* [J]. *Plant Signal Behav*, 2011, 6(4): 604–606.
- [63] Slane D, Kong J, Berendzen KW, Kilian J, Henschen A, Kolb M, Schmid M, Harter K, Mayer U, De Smet I, Bayer M, Jürgens G. Cell type-specific transcriptome analysis in the early *Arabidopsis thaliana* embryo [J]. *Development*, 2014, 141(24): 4831–4840.
- [64] Okamoto T, Higuchi K, Shinkawa T, Isobe T, Lörz H, Koshiba T, Kranz E. Identification of major proteins in maize egg cells [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(10): 1406–1412.
- [65] Uchiumi T, Shinkawa T, Isobe T, Okamoto T. Identification of the major protein components of rice egg cell [J]. *J Plant Res*, 2007, 120(4): 575–579.
- [66] Ohnishi Y, Hoshino R, Okamoto T. Dynamics of male and female chromatin during karyogamy in rice zygotes [J]. *Plant Physiol*, 2014, 165(4): 1533–1543.
- [67] Bayer M, Naway T, Giglione C, Galli M, Meinel T, Lukowitz W. Paternal control of embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Science*, 2009, 323(5920): 1485–1488.
- [68] Meyer S, Scholten S. Equivalent parental contribution to early plant zygotic development [J]. *Curr Biol*, 2007, 17(19): 1686–1691.
- [69] Pillot M, Baroux C, Vazquez MA, Autran D, Leblanc O, Vielle-Calzada JP, Grossniklaus U, Grimanelli D. Embryo and endosperm inherit distinct chromatin and transcriptional states from the female gametes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(2): 307–320.

- [70] Tadros W, and Lipshitz HD. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts [J]. *Development*, 2009, 136 (18): 3033–3042.
- [71] Vielle-Calzada JP, Baskar R, Grossniklaus U. Delayed activation of the paternal genome during seed development [J]. *Nature*, 2000, 404(6773): 91–94.
- [72] Baroux C, Blanvillain R, Gallois P. Paternally inherited transgenes are down-regulated but retain low activity during early embryogenesis in *Arabidopsis* [J]. *FEBS Lett*, 2001, 509(1): 11–16.
- [73] Baroux C, Autran D, Gillmor CS, Grimanelli D, Grossniklaus U. The maternal to zygotic transition in animals and plants [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2008, 73: 89–100.
- [74] Weijers D, Geldner N, Offringa R, Jurgens G. Seed development: early paternal gene activity in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2001, 414(6865): 709–710.
- [75] Scholten S, Lörz H, Kranz E. Paternal mRNA and protein synthesis coincides with male chromatin decondensation in maize zygotes [J]. *Plant J*, 2002, 32(2): 221–231.
- [76] Leó TD, Garcíaaguiar M, Gillmor CS. Non-equivalent contributions of maternal and paternal genomes to early plant embryogenesis [J]. *Nature*, 2014, 514 (7524): 624–627.
- [77] Lejcek-Levanić D, Juranić M, Sprunck S. De novo zygotic transcription in wheat (*Triticum aestivum* L.) includes genes encoding small putative secreted peptides and a protein involved in proteasomal degradation [J]. *Plant Reprod*, 2013, 26(3): 267–285.
- [78] Okamoto T, Scholten S, Lörz H, Kranz E. Identification of genes that are up-or down-regulated in the apical or basal cell of maize two-celled embryos and monitoring their expression during zygote development by a cell manipulation-and PCR-based approach [J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(2): 332–338.
- [79] Weterings K, Apuya NR, Bi Y, Fischer RL, Harada JJ, Goldberg RB. Regional localization of suspensor mRNAs during early embryo development [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(11): 2409–2426.
- [80] Laux T, Wurschum T, Breuninger H. Genetic regulation of embryonic pattern formation [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: S190–S202.
- [81] Lu P, Porat R, Nadeau JA, O'Neill SD. Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes [J]. *Plant Cell*, 1996, 8 (12): 2155–2168.
- [82] Haecker A, Gross-Hardt R, Geiges B, Sarkar A, Breuninger H, Herrmann M, Laux T. Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Development*, 2004, 131(3): 657–668.
- [83] Hu TX, Yu M, Zhao J. Comparative transcriptional profiling analysis of the two daughter cells from tobacco zygote reveals the transcriptome differences in the apical and basal cells [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 167.
- [84] Ma L, Xin H, Qu L, Zhao J, Yang L, Zhao P, Sun M. Transcription profile analysis reveals that zygotic division results in uneven distribution of specific transcripts in apical/basal cells of tobacco [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e15971.
- [85] Zhao P, Zhou XM, Zhang LY, Wang W, Ma LG, Yang LB, Peng XB, Bozhkov PV, Sun MX. A bipartite molecular module controls cell death activation in the basal cell lineage of plant embryos [J]. *PLoS Biol*, 2013, 11(9): e1001655.
- [86] Liu Y, Li X, Zhao J, Tang X, Tian S, Chen J, Shi C, Wang W, Zhang L, Feng X, Sun MX. Direct evidence that suspensor cells have embryogenic potential that is suppressed by the embryo proper during normal embryogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(40): 12432–12437.
- [87] Gooh K, Ueda M, Aruga K, Park J, Arata H, Higashiyama T, Kurihara D. Live-cell imaging and optical manipulation of *Arabidopsis* early embryogenesis [J]. *Dev Cell*, 2015, 34(2): 242–251.
- [88] Nowack MK, Grini PE, Jakoby MJ, Lafos M, Koncz C, Schnittger A. A positive signal from the fertilization of the egg cell sets off endosperm proliferation in angiosperm embryogenesis [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(1): 63–67.
- [89] Gross-Hardt R, Kägi C, Baumann N, Moore JM, Baskar R, Gagliano WB, Jürgens G, Grossniklaus U. LACHESIS restricts gametic cell fate in the female gametophyte of *Arabidopsis* [J]. *Plos Biol*, 2007, 5(3): e47.
- [90] Pagnussat GC, Yu HJ, Sundaresan V. Cell-fate switch of synergid to egg cell in *Arabidopsis* eostre mutant embryo sacs arises from misexpression of the *BEL1-like* homeodomain gene *BLH1* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(11): 3578–3592.
- [91] Chen Z, Tan JL, Ingouff M, Sundaresan V, Berger F. Chromatin assembly factor 1 regulates the cell cycle but not cell fate during male gametogenesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Development*, 2008, 135(1): 65–73.
- [92] Ingouff M, Sakata T, Li J, Sprunck S, Dresselhaus T, Berger F. The two male gametes share equal ability to fertilize the egg cell in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Curr Biol*, 2009, 19(1): R19–20.
- [93] Hough T, Singh MB, Smart IJ, Knox RB. Immunofluorescent screening of monoclonal antibodies to surface antigens of animal and plant cells bound to polycarbonate membranes [J]. *J Immunol Methods*, 1986, 92(1): 103–107.
- [94] Pennell RI, Russell SD. Production and partial characterization of hybridoma antibodies elicited to the sperm of

- Plumbago zeylanica* [J]. *Bot Gaz*, 1987, 148(4): 401–406.
- [95] Knox RB, Singh MB. Tansley review no. 61 male gametes and fertilization in angiosperms [J]. *New Phytol*, 1993, 125(4): 679–694.
- [96] Southworth D, Kwiatkowski S, Smith AR, Marusich M. Antibodies to flowering-plant sperm [J]. *Protoplasma*, 1999, 208(1): 115–122.
- [97] Blomstedt CK, Xu H, Singh MB, Knox RB. The isolation and purification of surface specific proteins of somatic and reproductive protoplasts of lily and rapeseed [J]. *Physiol Plantarum*, 1992, 85(2): 396–402.
- [98] Southworth D, Kwiatkowski S. Arabinogalactan proteins at the cell surface of Brassica sperm and Lilium sperm and generative cells [J]. *Sex Plant Reprod*, 1996, 9(5): 269–272.
- [99] Xu HP, Tsao TH, Cao ZX. Labeling the plasma membrane of isolated viable sperm cells of *Zea mays* L. by fluorophore-conjugated lectins [J]. *Acta Photophysiological Sinica*, 1997, 23(4): 399–404.
- [100] Xu HP, Tsao TH. Detection and immunolocalization of glycoproteins of the plasma membrane of maize sperm cell [J]. *Protoplasma*, 1997, 198(198): 125–129.
- [101] Sun MX, Kranz E, Moscatelli A, Yang HY, Lorz H, Cresti M. A reliable protocol for direct detection of lectin binding sites on the plasma membrane of a single living sperm cell in maize [J]. *Sex Plant Reprod*, 2002, 15(1): 53–55.
- [102] Fang KF, Sun MX. Probing lectin binding sites on isolated viable generative and sperm cells of tobacco [J]. *Plant Sci*, 2005, 168(5): 1259–1265.
- [103] Fang KF, Sun MX, Kranz E, Zhou C. In vitro and in situ localization of concanavalin A and wheat germ agglutinin binding sites on the surface of female cells in *Torenia fournieri* L. [J]. *Israel J Plant Sci*, 2003, 51(2): 83–90.
- [104] Fang KF, Yan TT, Sun MX. Mosaicism in the organization of Con A binding sites on the membrane surface of female cells of *Nicotiana tabacum* [J]. *New Phytol*, 2005, 167(3): 743–750.
- [105] Xu H, Swoboda I, Bhalla PL, Singh MB. Male gametic cell-specific gene expression in flowering plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(5): 2554–2558.
- [106] T Mori, H Kuroiwa, T Higashiyama, T Kuroiwa. GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(1): 64–71.
- [107] Wong JL, Leydon AR, Johnson MA. HAP2 (GCS1)-dependent gamete fusion requires a positively charged carboxy-terminal domain [J]. *PLoS Genet*, 2010, 19: 6(3): e1000882.
- [108] Mori T, Igawa T, Tamiya G, Miyagishima SY, Berger F. Gamete attachment requires GEX2 for successful fertilization in *Arabidopsis* [J]. *Curr Biol*, 2014, 24(2): 170–175.
- [109] Márton ML, Cordts S, Broadhvest J, Dresselhaus T. Micropylar pollen tube guidance by egg apparatus 1 of maize [J]. *Science*, 2005, 307(5709): 573–576.
- [110] Lê Q, Gutiérrez-Marcos JF, Costa LM, Meyer S, Dickinson HG, Lörz H, Kranz E, Scholten S. Construction and screening of subtracted cDNA libraries from limited populations of plant cells: a comparative analysis of gene expression between maize egg cells and central cells [J]. *Plant J*, 2005, 44(1): 167–178.
- [111] Sprunck S, Rademacher S, Vogler F, Gheyselinck J, Grossniklaus U, Dresselhaus T. Egg cell-secreted EC1 triggers sperm cell activation during double fertilization [J]. *Science*, 2012, 338(6110): 1093–1097.
- [112] Faure JE. double fertilization in flowering plants: origin, mechanisms and new information from in vitro fertilization [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1999: 79–89.
- [113] Maheshwar P. An introduction to the embryology of angiosperms [M]. New York: McGraw-Hill Book Co Inc, 1950: 1904–1966.
- [114] Russell SD. Ultrastructure of the sperm of plumbago zeylanica; II. quantitative cytology and three-dimensional organization [J]. *Planta*, 1984, 162(5): 385–391.
- [115] Roman H. Directed fertilization in maize [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1948, 34(2): 36–42.
- [116] Russell SD. Preferential fertilization in plumbago-zeilanica ultrastructural evidence for gamete-level recognition in an angiosperm [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(18): 6129–6132.
- [117] Gusti A, Baumberger N, Nowack M, Pusch S, Eisler H, Potuschak T, De Veylder L, Schnittger A, Genschik P. The *Arabidopsis thaliana* F-box protein FBL17 is essential for progression through the second mitosis during pollen development [J]. *PLoS One*, 2009, 4(3): e4780.
- [118] Frank AC, Johnson MA. Expressing the diphtheria toxin A subunit from the HAP2 (GCS1) promoter blocks sperm maturation and produces single sperm-like cells capable of fertilization [J]. *Plant Physiol*, 2009, 151(3): 1390–1400.
- [119] Pagnussat GC, Yu HJ, Sundaresan V. Cell-fate switch of synergid to egg cell in *Arabidopsis* eostre mutant embryo sacs arises from misexpression of the BEL1-like homeodomain gene *BLH1* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(11): 3578–3592.
- [120] Kong JX, Lau S, Jürgens G. Twin plants from supernumerary egg cells in *Arabidopsis* [J]. *Curr Biol*, 2015, 25(2): 225–230.
- [121] Ingouff M, Sakata T, Li J, Sprunck S, Dresselhaus T, Berger F. The two male gametes share equal ability to fertilize the egg cell in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Curr Biol*, 2009, 19(1): R19–20.

- [122] Chen Z, Tan JL, Ingouff M, Sundaresan V, Berger F. Chromatin assembly factor 1 regulates the cell cycle but not cell fate during male gametogenesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Development*, 2008, 135(1): 65–73.
- [123] Zhang Z, Xu H, Singh MB, Russell SD. Isolation and collection of two populations of viable sperm cells from the pollen of *Plumbago zeylanica*[J]. *Zygote*, 1998, 6(4): 295–298.
- [124] Southworth D, Strout G, Russell SD. Freeze-fracture of sperm of *Plumbago zeylanica* L. in pollen and *in vitro* [J]. *Sex Plant Reprod*, 1997, 10(4): 217–226.
- [125] Hirano T, Hoshino Y. Sperm dimorphism in terms of nuclear shape and microtubule accumulation in *Cyrtanthus mackenii*[J]. *Sex Plant Reprod*, 2010, 23(2): 153–162.
- [126] Singh MB, Xu H, Bhalla PL, Zhang ZJ, Swoboda I, Russell SD. Developmental expression of polyubiquitin genes and distribution of ubiquitinated proteins in generative and sperm cells[J]. *Sex Plant Reprod*, 2002, 14(6): 325–329.
- [127] Faure JE, Rusche ML, Thomas A, Keim P, Dumas C, Mogensen HL, Rougier M, Chaboud A. Double fertilization in maize; the two male gametes from a pollen grain have the ability to fuse with egg cells[J]. *Plant J*, 2003, 33(6): 1051–1062.
- [128] Jahnke S, Scholten S. Epigenetic resetting of a gene imprinted in plant embryos[J]. *Curr Biol*, 2009, 19(19): 1677–1681.
- [129] Gehring M, Missirian V, and Henikoff S. Genomic analysis of parent-of-origin allelic expression in *Arabidopsis thaliana* seeds[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23687.
- [130] Hsieh TF, Shin J, Uzawa R, Silva P, Cohen S, Bauer MJ, Hashimoto M, Kirkbride RC, Harada JJ, Zilberman D, Fischer RL. Regulation of imprinted gene expression in *Arabidopsis* endosperm[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(5): 1755–1762.
- [131] Luo M, Taylor JM, Spriggs A, Zhang H, Wu X, Russell S, Singh M, Koltunow A. A genome-wide survey of imprinted genes in rice seeds reveals imprinting primarily occurs in the endosperm[J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(6): e1002125.
- [132] Waters AJ, Makarevitch I, Eichten SR, Swanson-Wagner RA, Yeh CT, Xu W, Schnable PS, Vaughn MW, Gehring M, Springer NM. Parent-of-origin effects on gene expression and DNA methylation in the maize endosperm[J]. *Plant Cell*, 2011, 23(12): 4221–4233.
- [133] Raissig MT, Berner M, Baroux C, Grossniklaus U. Genomic imprinting in the *Arabidopsis* embryo is partly regulated by PRC2[J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(12): e1003862.
- [134] Kranz E, Bautor J, Lörz H. *In vitro* fertilization of single, isolated gametes of maize mediated by electrofusion [J]. *Sex Plant Reprod*, 1991, 4(1): 12–16.
- [135] Kranz E, Lörz H. *In vitro* fertilization with isolated, single gametes resulted in zygotic embryogenesis and fertile maize plants[J]. *Plant Cell*, 1993, 5(5): 739–746.
- [136] 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(2): 125–128.
- [137] Faure JE, Digonnet C, Dumas C. An *in vitro* system for adhesion and fusion of maize gametes [J]. *Science*, 1994, 263(5153): 1598–1600.
- [138] Peng XB, Sun MX, Yang HY. A novel *in vitro* system for gamete fusion in maize[J]. *Cell Res*, 2005, 15(9): 734–738.
- [139] Sun MX, Yang HY, Zhou C, Koop, HU. Single pair fusion of various combinations between female gametoplasts and other protoplasts in *Nicotiana tabacum*[J]. *Acta Bot Sin*, 1995, 37(1): 1–6.
- [140] Tian HQ, Russell SD. Micromanipulation of male and female gametes of *Nicotiana tabacum*; II. Preliminary attempts for *in vitro* fertilization and egg cell culture[J]. *Plant Cell Rep*, 1997, 16(9): 657–661.
- [141] Khalequzzaman M, Haq N. Isolation and *in vitro* fusion of egg and sperm cells in *Oryza sativa* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43(1): 69–75.
- [142] Kümlehn J, Kovács M, Lörz H, Kranz E. *In vitro* fertilization in wheat (*Triticum aestivum* L.) via electrofusion of isolated egg and sperm cells[J]. *European J Cell Biol*, 1996, 69: 108.
- [143] Digonnet C, Aldon D, Leduc N, Dumas C, Rougier M. First evidence of a calcium transient in flowering plants at fertilization[J]. *Development*, 1997, 124(15): 2867–2874.
- [144] Antoine AF, Faure JE, Dumas C, Feijó JA. Differential contribution of cytoplasmic Ca^{2+} and Ca^{2+} influx to gamete fusion and egg activation in maize[J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(12): 1120–1123.
- [145] Sun MX, Moscatelli A, Yang HY, Cresti M. *In vitro* double fertilization in *Nicotiana tabacum* (L.): fusion behavior and gamete interaction traced by video-enhanced microscopy[J]. *Sex Plant Reprod*, 2000, 12(5): 267–275.
- [146] Sun MX, Moscatelli A, Yang HY, Cresti M. *In vitro* double fertilization in *Nicotiana tabacum* (L.): polygamy compared with selected single pair somatic protoplast and chloroplast fusions[J]. *Sex Plant Reprod*, 2000, 13(2): 113–117.
- [147] Tirlapur UK, Kranz E, Cresti M. Characterisation of isolated egg cells, *in vitro* fusion products and zygotes of *Zea mays* L. using the technique of image analysis and confocal laser scanning microscopy[J]. *Zygote*, 1995, 3(1): 57–64.

- [148] Faure JE, Mogensen HL, Dumas C, Lorz H, Kranz E. Karyogamy after electrofusion of single egg and sperm cell protoplasts from maize: cytological evidence and time course[J]. *Plant Cell*, 1993, 5(7): 747–755.
- [149] Kranz E, von Wiegen P, Lorz H. Embryogenesis and Plant Regeneration from in Vitro Fused Isolated Gametes of Maize[M]. Berlin: Springer Netherlands, 1995: 201–206.
- [150] Hoshino Y, Scholten S, von Wiegen P, Lorz H, Kranz E. Fertilization induced changes in the microtubular architecture of the maize egg cell and zygote—an immunocytochemical approach adapted to single cells[J]. *Sex Plant Reprod*, 2004, 17(2): 89–95.
- [151] Kovacs M, Barnabás B, Kranz E. Electro-fused isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) gametes develop into multicellular structures[J]. *Plant Cell Rep*, 1995, 15(3–4): 178–180.
- [152] Pónya Z, Barnabás B. Microinjected fluorescent phalloidin *in vivo* reveals F-actin dynamics in isolated egg cells of wheat (*Triticum aestivum* L.) developed in situ and fertil[J]. *Plant Physiol*, 2001, 158(12): 1527–1539.
- [153] Pónya Z, Kristóf Z, Ciampolini F, Faleri C, Cresti M. Structural change in the endoplasmic reticulum during the in situ development and in vitro fertilisation of wheat egg cells[J]. *Sex Plant Reprod*, 2004, 17(4): 177–188.
- [154] Pónya Z, Corsi I, Hoffmann R, Kovács M, Dobosy A, Kovács AZ, Cresti M, Barnabás B. When isolated at full receptivity, *in vitro* fertilized wheat (*Triticum aestivum* L.) egg cells reveal $[Ca^{2+}]$ cyt oscillation of intracellular origin[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(12): 23766–23791.
- [155] Uchiumi T, Uemura I, Okamoto T. Establishment of an in vitro fertilization system in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Planta*, 2007, 226(3): 581–589.
- [156] Sato A, Toyooka K, Okamoto T. Asymmetric cell division of rice zygotes located in embryo sac and produced by in vitro fertilization[J]. *Sex Plant Reprod*, 2010, 23(3): 211–217.
- [157] Nakajima K, Uchiumi T, Okamoto T. Positional relationship between the gamete fusion site and the first division plane in the rice zygote[J]. *J Exp Bot*, 2010, 61(11): 3101–3105.
- [158] 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.
- [159] Kumlehn J, Lörz H, Kranz E. Differentiation of isolated wheat zygotes into embryos and normal plants[J]. *Planta*, 1998, 205(3): 327–333.
- [160] Leduc N, Matthys-Rochon E, Rougier M, Mogensen L, Holm P, Magnard JL, Dumas C. Isolated maize zygotes mimic *in vivo* embryonic development and express microinjected genes when cultured *in vitro*[J]. *Dev Biol*, 1996, 177(1): 190–203.
- [161] Kumlehn J. Embryogenesis and plant regeneration from isolated wheat zygotes[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1359: 503–514.
- [162] Zhang J, Dong W H, Galli A, Potrykus I. Regeneration of fertile plants from isolated zygotes of rice (*Oryza sativa*) [J]. *Plant Cell Rep*, 1999, 19(2): 128–132.
- [163] He YC, He YQ, Qu LH, Sun MX, Yang HY. Tobacco zygotic embryogenesis *in vitro*: the original cell wall of the zygote is essential for maintenance of cell polarity, the apical-basal axis and typical suspensor formation[J]. *Plant J*, 2007, 49(3): 515–527.
- [164] Pónya Z, Finy P, Fehér A, Mitykó J, Dudits D, Barnabás B. Optimisation of introducing foreign genes into egg cells and zygotes of wheat (*Triticum aestivum* L.) via microinjection[J]. *Protoplasma*, 1999, 208(1–4): 163–172.
- [165] Holm PB, Olsen O, Schnorf M, Brinch-Pedersen H, Knudsen S. Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplast [J]. *Transgenic Res*, 2000, 9(1): 21–32.
- [166] Qin Y, Zhao J. Localization of arabinogalactan-proteins in egg cells, zygotes and two-celled proembryos and effects of β -D-glucosyl Yariv reagent on egg cell fertilization and zygote division in *Nicotiana tabacum* L. [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(9): 2061–2074.
- [167] Yu M, Zhao J. The cytological changes of tobacco zygote and proembryo cells induced by beta-glucosyl Yariv reagent suggest the involvement of arabinogalactan proteins in cell division and cell plate formation[J]. *BMC Plant Biol*, 2012, 12: 126.
- [168] Bakos F, Szabó L, Olmedilla A, Barnabás B. Histological comparison between wheat embryos developing *in vitro* from isolated zygotes and those developing *in vivo* [J]. *Sex Plant Reprod*, 2009, 22(22): 15–25.
- [169] Hu TX, Yu M, Zhao J. Comparative transcriptional analysis reveals differential gene expression between asymmetric and symmetric zygotic divisions in tobacco[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27120.
- [170] 黄洁, 李鑫波, 严海龙, 陈丹, 孙蒙祥, 彭雄波. 快速筛选拟南芥受精和早期胚胎发生相关基因的方法[J]. 植物科学学报, 2015, 33(4): 564–571.
- Huang J, Li XB, Yan HL, Chen D, Sun MX, Peng XB. A convenient method for screening genes related to fertilization and embryogenesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Science Journal*, 2015, 33(4): 564–571.