

1 个水稻雌配子不育突变体的筛选及初步分析

颜静宛¹, 吴照祥^{1,2}, 刘华清¹, 王 锋¹

(1. 福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003; 2. 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002)

摘 要: 在水稻转基因后代中, 筛选到 1 个与雌配子育性相关的突变体, 该突变体自交后代群体外源标记基因 (潮霉素磷酸转移酶 *hpt*) 保持 1 : 1 的分离规律, 连续 6 代自交没有得到纯合株系; 正、反杂交以及测交分析显示, 潮霉素抗性基因只能通过雄配子进行传递; 结实率统计分析表明具有外源标记基因 *hpt* 的单株有近乎一半的雌配子发生败育, 胚囊的育性与外源基因 *hpt* 共分离; Southern-blot 分析表明该突变体 T-DNA 是以单拷贝方式整合到水稻染色体上。这些分析表明该突变体是 1 个 T-DNA 插入导致的雌配子体不育突变体 (暂定名为 female gametogenesis sterile 1, *fgs1*)。细胞学观察显示, 突变体 *fgs1* 花粉育性与野生型明恢 86 近似, 但是其雌配子发育受阻, 突变基因型雌配子体在 8 核胚囊时期, 卵细胞、助细胞、反足细胞团以及中央极核依次解体退化, 无法完成授粉受精。

关键词: 水稻; 雌配子不育突变体; 筛选; 胚囊败育; 激光扫描共聚焦显微镜

中图分类号: S 511

文献标识码: A

Screening and Preliminary Analysis of A Female Gametophyte Sterile Mutant in Rice

YAN Jing-wan¹, WU Zhao-xiang^{1,2}, LIU Hua-qing¹, WANG Feng¹

(1. Institute of Biological Technologis, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China;

2. College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: We isolated a female gamete to a fertility-related mutant, from a T-DNA insertional population of indica rice. The transgenic plants carrying a T-DNA insertion displayed phenomena that hygromycin resistance and sensitivity segregation ratios showed 1 : 1 by χ^2 -test and the homozygous progeny was not found in 6 successive generations. Reciprocal crosses between heterozygous plants and the wild types showed that the allele could not be transmitted through the female. Statistical analysis showed that the ripening rate of exogenous marker gene *hpt* with the plant has occurred almost half of the female gamete abortion, embryo sac fertility and closely linked to the *hpt* gene. Southern-blot showed that the mutant carried with a copy of T-DNA insertion. All of these indicated that the mutant is a gametophyte ovary sterile mutant caused by T-DNA insertion (tentatively named as female gametogenesis sterile 1, *fgs1*). Cytologic observation showed that pollen fertility of *fgs1* was as normal as the wild type minghui 86, but the development of female gamete was blocked. In the female gamete of *fgs1* mutant, we found that egg cell (E), synergids (S), antipodal cells (A) and polar nuclei (P) appeared disaggregation one by one during the 8 nucleuses period and the fertilization halted.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.); female gametophyte sterile mutant; screening; embryo sac abortion; laser scanning confocal microscope (LSCM)

水稻是最重要的粮食作物之一。雌配子是水稻植物体中重要的结构, 它产生卵细胞, 受精以后发育成胚; 介导一些繁殖过程, 包括花粉管的引导、受精、种子发育的诱导等。相对于雌配子数目来说, 花粉总是远远过剩。在水稻生产上, 水稻花粉部分不育可能并不影响植株的结实率和产量, 但雌配子体即使是部分不育就会直接影响到水稻的结实

率和产量。对水稻雌配子突变体发育的深入研究, 不仅有助于进一步了解雌配子发育机制, 还会加深对植物发育生物学的认识, 有利于理解水稻结实率的变化规律。因此有关对雌配子发育的研究已成为热点的研究领域, 受到越来越多的重视^[1-4]。

雌性不育这一现象在高等植物中普遍存在, 但由于败育原因的复杂性和获得研究材料的困难, 极

收稿日期: 2011—05—25 初稿; 2011—07—11 修改稿

作者简介: 颜静宛 (1977—), 女, 硕士, 助理研究员, 从事植物功能基因组研究

通讯作者: 王锋 (1963—), 男, 博士, 研究员, 从事植物基因工程研究 (E-mail: wf@fjage.org)

基金项目: 福建省自然科学基金 (2008J0059)

大限制了学者对植物雌配子体发育的研究。近些年来,通过化学诱变以及转座子和 T-DNA 插入诱变等方法,在拟南芥、水稻、玉米等植物中鉴别出许多雌配子突变体^[5-9],利用发育中的胚囊能够产生自发荧光的特点,借助激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)观察植物胚囊的发生和发育过程^[10-12]。

本研究依托水稻转基因突变体后代,通过遗传学和结实率分析,筛选到 1 个由单拷贝 T-DNA 插入引起的水稻雌配子体发育突变体(暂定名为 female gametogenesis sterile 1, *fgs1*)。此外,运用光学显微镜和激光扫描共聚焦显微镜技术,对该突变体的胚囊发育阶段进行形态学的观察,初步阐释突变体 *fgs1* 败育发生的机理。

1 材料与方法

1.1 试验材料

明恢 86、II-32A、527、93-11、早熟 3301 及转基因植株,试验在福州吴凤试验基地进行。

1.2 载体和菌株

转化所用农杆菌菌株为 LBA4404;所用载体骨架为 pCambia1300。

1.3 水稻突变体的 PCR 分子检测

采用 CTAB 法^[13]提取水稻突变体基因组 DNA 作为 PCR 模板,扩增 *hpt* 基因。

引物序列为:

hpt1: 5'-TACACAGCCATCGGTCCAGA-3',

hpt2: 5'-TAGGAGGGCGTGGATATGTC-3';

扩增产物片段为 832 bp。

PCR 反应体系: 10× Buffer 2.5 μL, dNTP (2.5 μmol·L⁻¹) 2 μL, *hpt1* (5 μmol·L⁻¹) 1 μL, *hpt2* (5 μmol·L⁻¹) 1 μL, Taq 酶 0.4 μL, 模板 DNA (30 ng·μL⁻¹) 2 μL, ddH₂O 加至 25 μL。PCR 反应程序: 94℃ 5 min; {94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min} 30 个循环; 72℃ 5 min。取 5 μL PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。

1.4 水稻突变体的结实率考查

待上述突变体自交后代成熟时,随机取 6 株潮霉素阳性株和 6 株潮霉素阴性株单穗收种,按常规方法进行结实率的考种。考种数据用 SPSS 统计软件分析。

1.5 水稻突变体的 Southern blot 分子检测

用 CTAB 法提取水稻突变体植株的基因组 DNA,选用 5 种酶酶切水稻基因组 DNA,经印迹、预杂交、杂交,洗膜、CDP-Star 显色剂检测

杂交结果,具体按 Pharmacia Amersham 公司试剂盒方法进行。

1.6 水稻突变体的花粉育性观察

突变体自交后代群体和野生型明恢 86 的后代群体,从每个群体中随机选择 3 株,每株取 3 朵颖花进行花粉观察。取扬花盛期穗中上部颖花中花药分别置于洁净载玻片预先滴加的 I₂-KI 溶液中,用镊子夹破花药,使花粉粒释放到溶液中;显微镜下观察并随机取 3 个视野拍照后进行花粉粒的育性比较。

1.7 水稻突变体的子房形态学观察

1.7.1 子房树脂半薄切片显微镜观察 在开花当天,取突变体 *fgs1* 及野生型明恢 86 扬花盛期穗中上部小花各 50 枚,在解剖镜下解剖分离出子房,于 pH6.8、浓度 0.025 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液配置的 4% 戊二醛溶液中固定 12 h 以上;饿酸固定 4 h 后磷酸缓冲液冲洗 3~4 次;依次使用 10%、30%、50%、70%、90% 的乙醇脱水,每次 15 min,100% 乙醇脱水 2 次,每次 15 min;用环氧丙烷转换 2 次,每次 10 min;转移至 1/2 树脂 (Technovit 7100 resin 和环氧丙烷的体积比为 1:1) 中震荡 1 h;再转至 3/4 树脂 (Technovit 7100 resin 和环氧丙烷的体积比为 3:1) 中震荡 3 h 后包埋;经过 30℃ 24 h、45℃ 24 h、60℃ 24 h 的聚合后修样并使用玻璃刀切片;参照刘冬娟等^[14]的方法,稍作修改,烤片机上 60℃ 烤片至切片完全黏合载玻片;硼砂甲苯胺蓝染色 25 min;0.1% 冰醋酸分化 2 min 后自来水冲洗并烘干;番红染色 1.5~2.0 h 后晾干;加拿大树脂封片后光学显微镜观察并拍照。

1.7.2 子房激光共聚焦显微镜观察 在开花当天,取突变体 *fgs1* 及野生型明恢 86 扬花盛期穗中上部小花各 50 枚,在解剖镜下解剖分离出子房,用卡诺氏固定液固定 24 h;50% 乙醇冲洗后保存于 70% 的乙醇中,放置于 4℃ 冰箱中低温保存备用;然后依次用 70%、50%、30%、10% 的乙醇复水,每次处理 15 min;2% 钾矾溶液处理 15 min;转入 4% 的蔗糖曙红 B 溶液中染色 10~12 h;使用 1% 钾矾溶液分色 15 min 左右;蒸馏水冲洗 2~3 次,每次 15 min;再依次用梯度浓度为 10%、30%、50%、70%、90% 的酒精逐级脱水,每次 15 min;100% 乙醇脱水 3 次,每次 15 min;在 1/2 水杨酸甲酯 (水杨酸甲酯和 100% 乙醇体积比为 1:1) 中过渡 1~2 h;水杨酸甲酯中透明 1 h 以上;最后将处理好的子房置于洁净凹面玻片上,滴加少许的水杨酸甲酯,并使用加拿大树脂封片,通风厨中风

干；在 olympus FV1000 生物激光扫描共聚焦显微镜下，使用 543 nm 波长的激光分 90~260 层来整体逐层扫描观察胚囊，并储存图像。

2 结果与分析

2.1 水稻雌配子发育突变体 *fgs1* 的遗传分析

2.1.1 水稻突变体的 F1 代杂交和测交的遗传分析 提取水稻突变体（原始克隆编号为 A11B265）自交后代 622 个单株的基因组 DNA，进行潮霉素抗性基因分离比的检测（图 1 和表 1），结果 315 株 PCR 扩增 *hpt* 基因目标条带，表现为 Hpt⁺；307 株未扩出目标带表现为 Hpt⁻；潮霉素抗性基因阴阳性分离比为 1.026 : 1 (R/S)，卡方检验符合 1 : 1 分离 ($\chi^2=0.10289<3.84$)，连续 6 代自交，均没有获得纯合的转基因植株。该突变体的标记基因分离比不符合传统的孟德尔 3 : 1 的遗传分

离，说明它的配子体可能出现败育，从而引起雌配子或雄配子致死时，其后代就可有表现出 1 : 1 的偏分离现象^[15]。

为了分析突变体 *fgs1* 中潮霉素抗性基因 *hpt* 异常分离的原因，把突变体作为母本与 527、93-11 以及早熟 3301 杂交获得的杂交后代全部表现为潮霉素基因阴性株（表 1），这说明 T-DNA 插入等位基因不能通过雌配子往下一代传递。把突变体与不育系 II-32A 测交以及突变体作父本与 93-11 反交，所得后代潮霉素基因阴阳性分离比均符合 1 : 1（表 1），说明该突变体 T-DNA 插入可通过雄配子传递给下一代。

以上的遗传学分析，可以看出这个水稻突变体是 T-DNA 插入引起的雌配子败育的突变体，暂命名 *fgs1* (female gametogenesis sterile 1)。

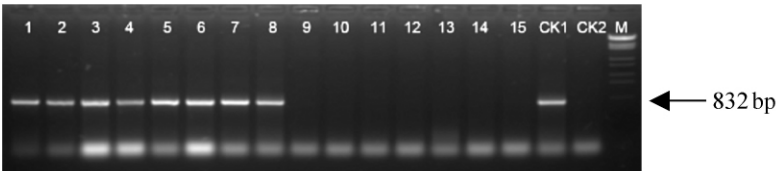


图 1 水稻突变体的 PCR 检测

Fig 1 PCR assay of rice mutants

注：1~15 为转基因植株；CK1 为阳性对照；CK2 为阴性对照；M 为 λ-14 Marker。

表 1 突变体的遗传分析
Table 1 Genetic analysis of mutant

亲本	世代	Hpt ⁻	Hpt ⁺	Hpt ⁻ :Hpt ⁺	$\chi^2(1:1)$
<i>fgs1</i>	自交	30	73	15	1:1.026
<i>fgs1</i> /93-11	杂交	78	0		
<i>fgs1</i> /527	杂交	53	0		
<i>fgs1</i> /早熟 3301	杂交	86	0		
II-32A/ <i>fgs1</i>	测交	127	115	1.104:1	0.595
93-11/ <i>fgs1</i>	反交	103	117	1:1.136	0.0727

注： $df=1$ 时 $p0.05=3.84$ 。Hpt⁻ 代表潮霉素阴性植株；Hpt⁺ 代表潮霉素阳性植株。

2.1.2 水稻雌配子发育突变体的结实率 通过对突变体 *fgs1* 自交后代群体的结实率调查发现，取自阳性株的 63 穗的结实率比较稳定，阳性株的结实率为 $(44.14 \pm 0.78)\%$ ，而取自阴性株的 57 穗的结实率也比较稳定，阴性株的结实率为 $(73.05 \pm 1.17)\%$ ，阳性株与阴性株结实率之间存在着极显著的差异（图 2），且突变体相对结实率为 60.42%（表 2）。这表明具有外源标记基因 *hpt*

的单株有近乎一半的雌配子发生败育，胚囊的育性与外源基因 *hpt* 共分离。

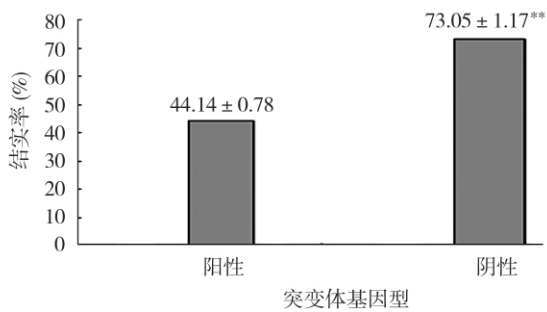


图 2 突变体 *fgs1* 自交后代群体结实率

Fig 2 The analysis of ripening rate of progeny of *fgs1* mutant

2.1.3 水稻突变体 *fgs1* 的 Southern blot 分析 以 *hyg* 基因片段为探针，用 5 种内切酶 *Bam*H I、*Bgl* II、*Eco*R I、*Sac* I、*Kpn* I，对水稻突变体 *fgs1* 的后代单株进行 Southern blot 杂交分析，结果显示各样品均只有 1 条的杂交带，表明该突变体为单拷贝 T-DNA 插入（图 3）。

表 2 突变体 *fgs1* 自交后代群体结实率
Table 2 The analysis of ripening rate of progeny of *fgs1* mutant

基因型	穗数	小穗结实率 (%)	相对结实率 (%)
Hpt(+)	63	44.14	60.42
Hpt(-)	57	73.05	
<i>P</i>	0.00		

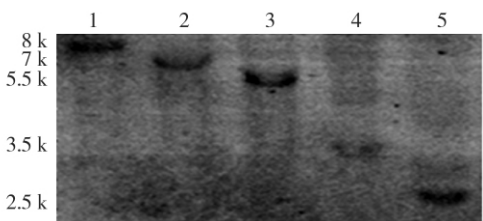


图 3 水稻突变体 *fgs1* 的 Southern blot 杂交图
Fig 3 Southern blot picture of rice mutant *fgs1*
注：1-BamHI；2-BglIII；3-EcoRI；4-SacI；5-KpnI

2.1.4 水稻突变体 *fgs1* 花粉育性分析 从图 4 可以看出，水稻突变体花粉与对照野生型明恢 86 花粉的黑染率基本一样，无明显差异，表明该突变体的花粉育性是正常的，从而也说明该突变体是雌配子发生败育的突变体。

2.2 水稻雌配子发育突变体子房的形态学观察

通过对 87 份水稻子房的树脂半薄切片的光学显微镜观察，发现这些突变体 *fgs1* 所有的胚囊和野生型明恢 86 的正常胚囊都属于蓼型胚囊结构。这些突变体胚囊中有接近 30 份样品的胚囊结构与正常的胚囊结构有所不同（图 5），表现出胚囊极度的缩小，只遗留含有大液泡的中央极核被挤向珠孔端，并有卵器退化遗留的痕迹。

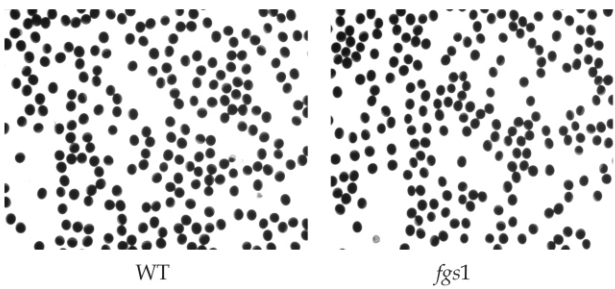


图 4 野生型明恢 86 (WT) 与突变体 *fgs1* 花粉形态比较
Fig 4 Pollen morphology comparison of minghui 86 (WT) and *fgs1* mutant

此外，通过对 106 份水稻子房的激光共聚焦显微镜观察进一步发现，胚囊发育到 8 核胚囊的中后期开始出现异常，首先表现出卵器包括卵细胞和助细胞的退化消失，遗留有雾状痕迹（图 6-c），而中央极核和反足细胞团表现正常；经过一段时间的发展，反足细胞团也消失，只见中央极核位于胚囊腔的中部（图 6-d）；此时珠心组织从不同的部位向胚囊腔内开始快速分裂，将中央极核进一步挤向珠孔端（图 6-e, 6-f）；随着珠心组织不停地快速分裂，珠心组织细胞不断的增多，将整个胚囊腔逐步的填充，最后整个胚囊腔都被珠心组织的薄壁细胞所充塞（图 6-g）；由于珠心组织的挤压，中央极核也解体消失，致使整个胚囊腔完全被珠心组织占据（图 6-j），导致不能进行正常授粉受精，表现出败育。图 6-h 显示了珠心组织填充部分胚囊腔后继续向胚囊腔内部突起，形成新的填充点。这些结果与树脂半薄切片的光学显微镜观察的结果是一致的。

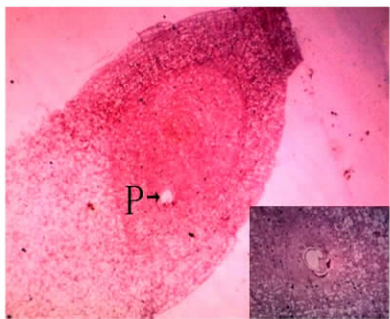
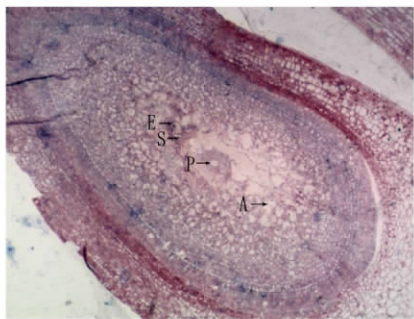


图 5 光学显微镜观察比较野生型明恢 86 (WT) 与突变体 *fgs1* 子房内部形态结构
Fig 5 Ovary morphology comparison of minghui 86 (WT) and *fgs1*mutant by CLSM
注：E-卵细胞；S-助细胞；A-反足细胞团；P-中央极核。

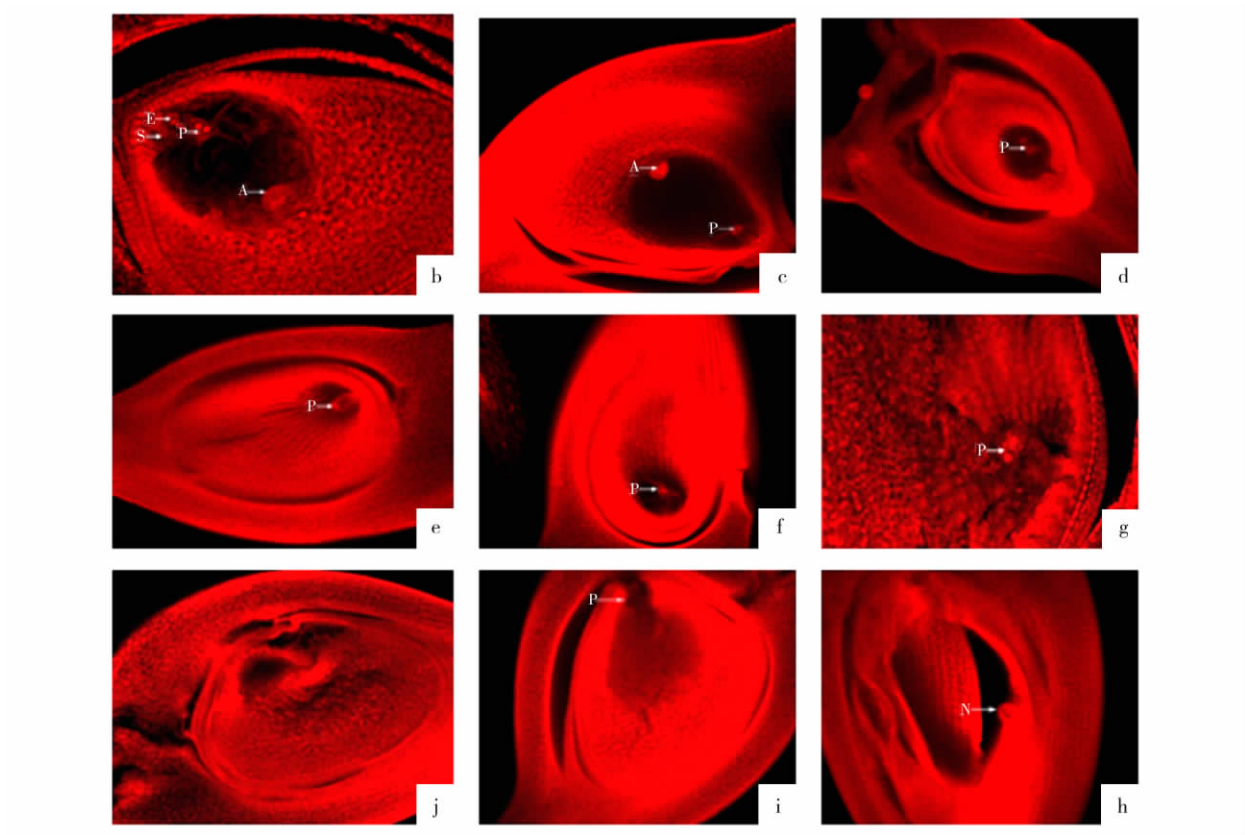


图 6 激光共聚焦显微镜观察比较野生型明恢 86 与突变体 *fgs1* 子房内部形态结构

Fig 6 Ovary morphology comparison of minghui 86 (WT) and *fgs1* mutant by optical microscope

注：E-卵细胞；S-助细胞；A-反足细胞团；P-中央极核；b 表示正常结构成熟胚囊胚囊；c 表示中央极核和反足细胞团，卵器（包括卵细胞和助细胞）消失；d、e、f 表示中央极核，卵器和反足细胞团都消失；g 表示中央极核，其他结构都已经消失，珠心组织填充胚囊腔；j 表示珠心组织完全占据胚囊腔，中央极核消失；i 表示胚囊开始解体；h 表示珠心组织向胚囊腔 突起（M）。

3 讨 论

就水稻而言，绝大多数研究的是籼粳杂交后代及离体培养产生的雌性不育突变，本研究选取的是水稻转基因突变体后代中 T-DNA 插入的突变体。本试验发现 1 个突变体其花粉细胞学观察正常，碘染黑染率高于 90%；测交及以这个突变体为父本与野生型水稻正交，其后代潮霉素抗感比符合 1：1；而以这个突变体为母本与野生型水稻反交，其后代均不抗潮霉素。此外，对其进行考种发现该突变体的结实率是对照结实率的 60.42%。鉴于与雌配子体突变紧密连锁的标记偏离典型的孟德尔 3：1 分离比例和植物表现为半不育性这两个雌配子突变的特性^[16]，推断该突变体是单拷贝 T-DNA 插入的水稻雌配子发育突变体。在大多数雌性不育材料中都具有雄性育性正常、自交结实率低、便于机械化收种的特点，今后可以把这个雌配子突变体作为雄性不育系的恢复系用于田间制种。

在观察水稻胚囊发育过程中，本试验采用了两

种观察方法，即光学显微镜和激光共聚焦扫描显微镜，两者虽有快速简便的优点，但也有其不足之处。在 LCSM 下，由于发育中的植物胚囊具有自发荧光的特点，在激光的激发下，胚囊各细胞的核仁显示明亮的荧光，胚囊各细胞及细胞核的结构轮廓能够清晰地观察和分辨，但最主要的局限在于其激发波长有限和时间分辨率不高。传统的光学显微镜虽也能清晰显现胚囊的形态，但是无法达到在三维重建方面的效果，且在前期制片过程相对繁琐复杂。相比之下，激光共聚焦显微镜技术仍不失为一种研究植物胚囊的形成与发育过程的理想工具。

赵世绪等^[17]利用子房整体透明法和微分干涉显微镜观察了水稻雌配子发育的整个过程，发现雌配子发育过程大致可以划分为孢原细胞形成期、大孢子母细胞形成期、大孢子母细胞减数分裂期、功能大孢子形成期、单核胚囊形成期、胚囊有丝分裂期、八核胚囊发育期以及胚囊成熟期等 8 个时期。本试验在观察水稻胚囊发育过程中，发现突变体雌配子的发育前期与前人报道的一致，但是在 8 核胚

囊期,观察到了胚囊内部的一些结构(包括卵器)逐步发生退化,子房壁向内增生填充胚囊腔,导致整个胚囊衰亡,从而表现出败育。张小方等^[18]研究表明雌配子的突变大多发生于减数分裂或有丝分裂过程中,但是发现的这一个突变体明显与前人的发现有所不同。前人研究表明,助细胞在花粉管穿透后发生凋亡^[19-21],因此猜测该突变体可能与细胞的凋亡有一定的关系。目前已从细胞学方面初步定位了突变的发生位点,但是对于其雌性不育的基因表达与调控机制还不清楚,下一步将深入研究探讨克隆的水稻雌配子相关基因的调控机理。

参考文献:

- [1] SHEILA M. Control of male gametophyte development [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: S142-S153.
- [2] CHANTAL E, LUISA M, WILHELM G. Plant retinoblastoma homologues control nuclear proliferation in the female gametophyte [J]. *Nature*, 2004, 429: 776-780.
- [3] YADEGARIA R, DREWS G N. Female gametophyte development [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: S133-S141.
- [4] PORTEREIKO M F, LLOYD A, STEFFEN J G, et al. AGL80 is required for central cell and endosperm development in Arabidopsis [J]. *Plant Cell*, 2006, 18 (8): 1862-1872.
- [5] KLUCHER K M, CHOW H, REISER L, et al. The AINTEGUMENTA gene of Arabidopsis required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene APETALIA2 [J]. *Plant Cell*, 1996, 8: 137-153.
- [6] DREWS G N, LEE D, CHRISTENSEN C A. Genetic analysis of female gametophyte development and function [J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 5-17.
- [7] HOWDEN R, PARK S K, MOORE J M, et al. Selection of T-DNA-Tagged male and female gametophytic mutants segregation distortion in Arabidopsis [J]. *Genetics*, 1998, 149: 621-631.
- [8] MOORE J M, VIELLECALZADA J P, GAGLIANO W, et al. Genetic characterization of hadad, a mutant disrupting female gametogenesis in Arabidopsis thaliana [J]. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 1997, 62: 35-47.
- [9] FELDMANN K A, CORY D A, CHRISTIANSON M L. Exceptional segregation of a selectable marker (KanR) in Arabidopsis identifies genes important for gametophytic growth and development [J]. *Genetics*, 1997, 147: 1411-1422.
- [10] 刘向东, 徐雪宾, 卢永根, 等. 水稻胚囊形成过程与分期 [J]. *中国水稻科学*, 1997, 11 (3): 141-150.
- [11] 任宏, 刘永胜, 孙敬三. 用共聚焦扫描显微镜技术观察水稻胚囊发育 [J]. *植物学报*, 1998, 40 (9): 786-789.
- [12] ZENG Y X, HU C Y, LU Y G. Diversity of abnormal embryo sacs in indica/japonica hybrids in rice demonstrated by confocal microscopy of ovaries [J]. *Plant Breeding*, 2007, 126: 574-580.
- [13] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8 (19): 4321-4326.
- [14] 刘冬娟, 祝素文, 李艳杰. 硼砂甲苯胺蓝染液在半薄切片染色上的应用 [J]. *中国医科大学学报*, 2004, 33 (1): 33-34.
- [15] HOWDEN R, PARK S K, MOORE J M, et al. Selection of T-DNA-Tagged male and female gametophytic mutants by segregation distortion in Arabidopsis [J]. *Genetics*, 1998, 149: 621-631.
- [16] DREWS G N, LEE D, CHRISTENSEN C A. Genetic analysis of female gametophyte development and function [J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 5-17.
- [17] 赵世绪, 杜中. 用子房整体透明法和微分干涉相差显微镜研究水稻的胚胎发育 [J]. *遗传*, 1993, 15 (4): 33.
- [18] 张小方, 范春霞, 高述民. 植物胚囊母细胞减数分裂异常研究 [J]. *现代农业科技*, 2009, (1): 274-275.
- [19] RAGHAVAN V. Some reflections on double fertilization, from its discovery to the present [J]. *New Phytol*, 2003, 159: 565-583.
- [20] HIGASHIYAMA T. The synergid cell: Attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization [J]. *Plant Res*, 2002, 115: 149-160.
- [21] LORD E M, RUSSELL S D. The mechanisms of pollination and fertilization in plants [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2002, 18: 81-105.

(责任编辑: 柯文辉)