

韭发育雌配子体中Ca²⁺分布特征

邓伟, 成诚, 高凯, 李庆阁, 田惠桥*

厦门大学生命科学学院, 福建厦门361102

摘要: 对韭开花前1 d到开花后2 d的发育胚囊中Ca²⁺分布特征进行研究, 结果显示: 在开花前1 d游离核胚囊形成细胞, Ca²⁺主要分布在极核周围的细胞质小液泡中, 与中央细胞的大液泡形成有关; 在开花当天, 卵细胞大液泡体中Ca²⁺增多, 与其大液泡形成有关; 开花后1 d, 卵细胞大液泡中钙沉淀颗粒减少, 助细胞珠孔段的Ca²⁺增多, 合点端较少, 呈极性分布; 开花后2 d, 卵细胞大液泡和中央细胞大液泡珠孔部位Ca²⁺再次明显增加。助细胞珠孔端丝状器中Ca²⁺也增加, 一个助细胞退化, 呈现接受花粉管状态。韭发育胚囊中Ca²⁺分布特征显示其参与调控胚囊细胞的分化, 揭示雌配子体中Ca²⁺分布的时空特征是深入研究胚囊细胞分化的基础。

关键词: 韭; 雌配子体; 细胞分化; 钙

The Characteristic of Calcium Distribution in Developing Female Gametophyte of *Allium tuberosum*

DENG Wei, CHENG Cheng, GAO Kai, LI Qing-Ge, TIAN Hui-Qiao*

School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102, China

Abstract: Characteristic of Ca²⁺ distribution in developing female gametophyte of *Allium tuberosum* was studied from 1 d before anthesis to 2 d after anthesis. At 1 d before anthesis, the nuclear embryo sac differentiates gametophyte cells. Calcium precipitates of young embryo sac were few and mainly located in the small vacuoles surrounding polar nuclei, suggesting Ca²⁺ relating with the formation of the large vacuole of central cell. At anthesis, the precipitates in large vacuole of egg increased, also suggesting Ca²⁺ relating with formation of the large vacuole of egg cell. At 1 d after anthesis, the precipitates in egg cell decreased and increased in synergid cells, in which the precipitates displayed polarity distribution: more in the micropyle end of the cell than in the chalazal end. At 2 d after anthesis, the precipitates in the large vacuole of egg and the micropyle part of central cell appeared again. The precipitates in filiform apparatus of both synergids also increased. One synergid cell degenerated, which prepared to accept pollen tube. The characteristic of calcium distribution in developing embryo sac of *A. tuberosum* suggests that Ca²⁺ may regulate cell differentiation of embryo sac. Exploring the spatial-temporal feature of Ca²⁺ distribution in developing embryo sac is a base of further study of cell differentiation of embryo sac.

Key words: *Allium tuberosum*; female gametophyte; cell differentiation; calcium

在早期花粉体外培养试验中有两个重要的发现: 第一, 当花粉数量很少时很难离体萌发(花粉萌发的群体效应), 但在培养基内添加Ca²⁺就可以弥补花粉数量的缺陷, 促使花粉萌发(Brewbaker和Kwack 1963); 第二, 花粉管具有向Ca²⁺浓度高的方向生长的特征(花粉萌发的向化性)(Mascarenhas和Machlis 1962)。这两个发现为以后植物生殖过程中开展Ca²⁺作用的研究奠定了基础。花粉管为顶端极性生长。后来的研究发现花粉管顶端的Ca²⁺呈现梯度分布的特征, 与花粉管的极性生长有关(Rathore等1991; Miller等1992; Holdaway-Clarke和Hepler 2003)。

被子植物雌配子体位于子房的胚珠中。受精过程中, 雌、雄性多种结构、功能不同的细胞相互作用才能使受精顺利完成。需要从雌、雄性细胞相互作用的角度揭示受精过程的调控机制。花粉体外实验结果只显示了Ca²⁺与花粉管之间的关系, 不能证明体内雌蕊中的Ca²⁺与花粉管生长的关系。研究体内花粉管生长调控机制, 需对雌蕊中的Ca²⁺分布特征进行调查, 结合花粉管的向化性特

收稿 2015-07-01 修定 2015-08-27
资助 国家自然科学基金(31170289)、公益性行业(农业)科研专项课题(200903016)。

* 通讯作者(E-mail: hqtian@xmu.edu.cn; Tel: 0592-2186486)。

征,全面揭示 Ca^{2+} 调控花粉管生长的机制。然而,不同植物雌蕊组织的结构差异及发育特征具多样性,关于 Ca^{2+} 在雌蕊组织中的分布特征的报道很少,其生理功能也不清楚。在探索植物受精机制中,雌配子体中 Ca^{2+} 分布特征和功能是揭示受精调控机制的一项课题。

韭的雌配子体发育比较特殊:(1)2个助细胞的形态呈现异型性,大助细胞为宿存助细胞,可保留到开花后5 d,小助细胞为退化助细胞,受精前退化成为花粉管进入的场所;(2)卵细胞在未受精时也可分裂,具孤雌生殖潜力;(3)合点端的3个反足细胞的形态、结构类似卵器三细胞,1个具有大液泡,类似卵细胞,2个没有大液泡,类似助细胞(田惠桥和杨弘远1991a, b);(4)卵状反足细胞具有无配子生殖的潜力,可分裂形成原胚(田惠桥和杨弘远1989)。韭雌配子体的这些罕见的特征在研究植物受精和胚胎发生中独具特色。本文以韭为实验材料,探索其雌配子体发育中 Ca^{2+} 的分布特征。

材料与方 法

实验所用韭(*Allium tuberosum* Rottl. ex Spreng)为栽培品种‘黄格子’,由武汉市蔬菜研究所赠。韭为多年生植物,在厦门地区每年10月份开花。采集标记的开花前1 d、开花当天、开花后1和2 d的花,在解剖镜下剥取胚珠,置于含2.5%戊二醛、1%焦锑酸钾、50 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.0)配制的前固定液中,室温固定3 h。用含1%焦锑酸钾和50 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液配制的洗涤液换洗3次,每次30 min。之后将前固定的胚珠转入含1%锇酸、1%焦锑酸钾和50 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液配制的后固定液中,在4℃下过夜。次日用相同的洗涤液换洗3次,每次30 min。然后用梯度系列丙酮脱水,Spurr树脂包埋。利用焦锑酸钾定位 Ca^{2+} 的原理是 Ca^{2+} 与锑的亲和力比 K^+ 更强,细胞中的 Ca^{2+} 可与锑结合形成焦锑酸钙沉淀颗粒。电镜的电子束不能穿过这种沉淀颗粒,形成黑色斑点,显示细胞中 Ca^{2+} 的多寡和分布部位(Ge等2007)。包埋的胚珠用Leica Ultracut R型超薄切片机切片,切片厚度80 nm。用JEM-100CXII透射电子显微镜观察和拍照。

实验结果

韭胚珠为倒生型,珠孔邻近珠柄。胚囊的珠

孔端着生卵器三细胞,包括1个卵细胞和2个助细胞,合点端着生3个反足细胞,中间为1个体积很大的中央细胞,连接卵器和反足器细胞(图1-A)。胚囊体积很大,被5~6层珠心细胞包围,易于辨认。

1 开花前1 d的幼小雌配子体

在花冠张开前1 d,珠心内部的幼小胚囊已高度液泡化。幼小胚囊珠孔端的游离细胞核已开始细胞化,先在3个游离核之间产生质膜,形成卵器三细胞。刚分化的卵器三细胞之间没有明显差异,细胞核中的染色质状态和细胞质的电子密度相似。但在幼小卵细胞的珠孔端有较多小液泡,其中有一些钙沉淀颗粒,而在助细胞中小液泡很少。在刚形成的卵器三细胞中有少量零散分布的钙沉淀颗粒(图1-B)。在胚囊的合点端,3个反足细胞核仍处于游离状态,核之间还没有形成质膜。其中,1个大细胞核位于合点的顶端,2个小细胞核紧邻大细胞核但分布在大核的下方。3个细胞核中的染色质状态相似,没有明显差异,但在大核与1个小核之间的细胞质中有较多的小液泡,而与另一小核相应位置的细胞质中小液泡较少。在3个反足细胞核周围细胞质中有少量的钙沉淀颗粒(图1-C)。此时,将要形成中央细胞的合点极核和珠孔极核已迁移到胚囊中间的腹部,相互紧邻(图1-D)。在极核周围的细胞质中各类细胞器丰富,尤其是线粒体和内质网较多。在极核周围的细胞质中有较多的钙沉淀颗粒,而在大液泡中,也有一些细小钙沉淀颗粒(图1-E),这些含钙沉淀颗粒的液泡呈现出液泡体积与钙沉淀颗粒体积相反的关系:细胞质内部的小液泡中钙沉淀颗粒体积较大,而大液泡中的钙沉淀颗粒较小(图1-F)。

2 开花当天的雌配子体

在开花当天,韭雌配子体已细胞化。在珠孔端的3个细胞中,2个助细胞的液泡化程度较低,而卵细胞的液泡化程度较高,一个大液泡将其细胞核和大部分细胞质挤到细胞合点端,形成明显极性。卵细胞位于一个助细胞的上端,使2个助细胞呈现出体积差异。3个卵器细胞的特征易于辨认(图2-A)。在卵细胞的大液泡中有很多细小的钙沉淀颗粒(图2-B),但在细胞核周围的细胞质基质中,钙沉淀颗粒则较少,仅在小液泡的边缘处有一些(图2-C)。在中央细胞的大液泡中钙沉淀颗粒较前减少(图2-D),但在极核中钙沉淀颗粒则增加(图

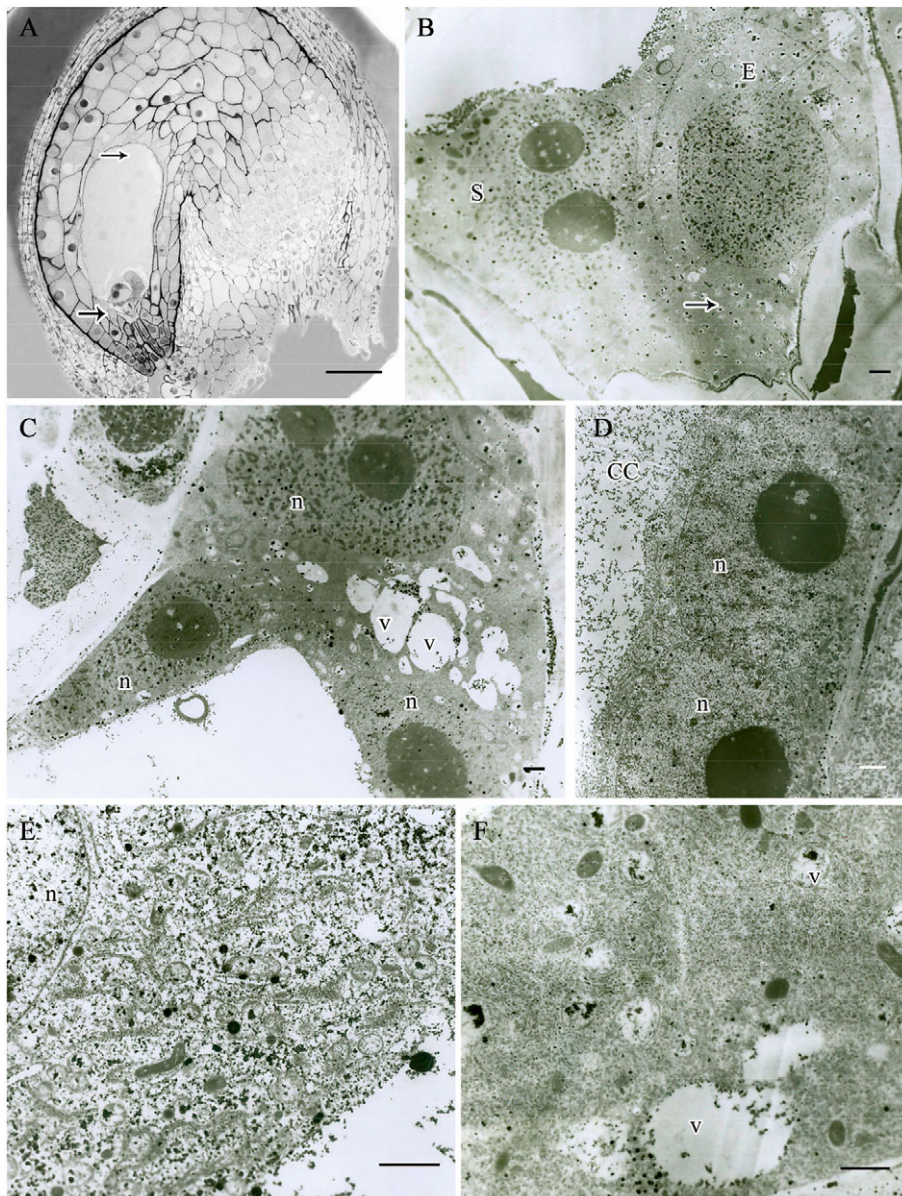


图1 韭开花前1 d发育胚囊中Ca²⁺分布

Fig.1 The calcium distribution in developing embryo sac of *A. tuberosum* at 1 d before anthesis

图片均按倒生胚珠的珠孔在下,合点在上方向排列。A: 标尺=100 μm; B~F: 标尺=1 μm。A: 韭胚珠切片, 示其胚囊结构。上面箭头为胚囊合点端, 下面箭头为胚囊珠孔端。B: 开花前1 d的胚囊珠孔端的游离核分化。E: 卵细胞; S: 助细胞。C: 胚囊合点端的3个游离核(n)还未分化细胞, 但小液泡(v)特异分布。D: 2个极核(n)已迁移到胚囊中部。CC: 中央细胞。E: 极核(n)附近的细胞中有较多的钙沉淀颗粒。F: 在离极核较远的细胞质小泡(v)中有钙沉淀颗粒。

2-E)。在胚囊合点端, 反足细胞基部也高度液泡化, 其中有很多细小的钙沉淀颗粒。在2个助反足细胞之间也形成类似助细胞丝状器的壁突起结构(图2-F)。

3 开花后1 d的雌配子体

开花后1 d, 胚囊珠孔端的壁外侧聚集了较多的钙沉淀颗粒, 但壁内侧较少(图3-A)。此时, 2个

助细胞之间的公共壁在珠孔端指状加厚, 形成了丝状器, 其中的钙沉淀颗粒不多(图3-B)。助细胞中的钙沉淀颗粒呈现出明显的极性分布, 在珠孔端丝状器附近的细胞质中有大量附有钙沉淀颗粒的内质网聚集(图3-C), 但在助细胞的合点端细胞质中钙沉淀颗粒较少(图3-D)。在助细胞旁的卵细胞极性增强, 细胞中的大液泡将细胞核和大部分

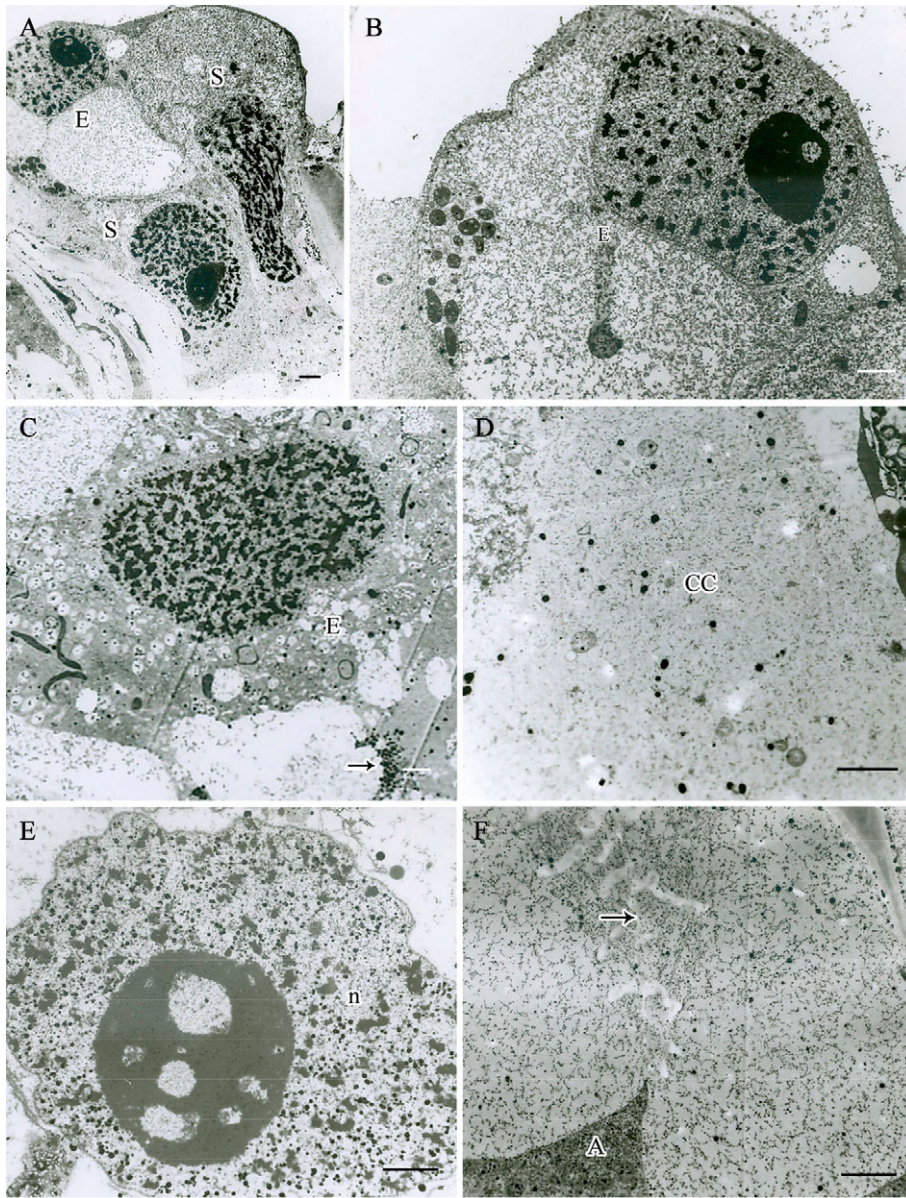


图2 韭开花当天发育胚囊中 Ca^{2+} 分布

Fig.2 The calcium distribution in developing embryo sac of *A. tuberosum* at anthesis

图片均按倒生胚珠的珠孔在下, 合点在上方向排列。标尺=1 μm 。A: 开花当天, 卵器细胞已分化, 2个助细胞(E)的液泡化程度较低, 卵细胞(S)的液泡化明显; B: 卵细胞(E)液泡中聚集许多细小钙沉淀颗粒; C: 卵细胞(E)小液泡边缘有较多钙沉淀颗粒(箭头); D: 中央细胞(CC)液泡中的钙沉淀颗粒减少; E: 在极核(n)核仁出现液泡, 核质中钙沉淀颗粒增多; F: 反足细胞(A)合点端液泡中有较多钙沉淀颗粒, 反足细胞有形成壁内突(箭头)的迹象。

细胞质挤到合点端。原先在卵细胞大液泡中的细小钙沉淀颗粒明显减少(图3-E)。在卵细胞质中钙沉淀颗粒大部分聚集在小液泡中。另外, 在细胞核中也有一些钙沉淀颗粒(图3-F)。在胚囊合点端, 2个助反足细胞将卵状反足细胞包裹, 其电子密度明显增加, 尤其是细胞核中的染色质凝聚, 难以区分其中的钙沉淀颗粒。而在细胞质中各种细胞

器的轮廓不清, 难以分析(图4-A)。但卵状反足细胞仍保持原有轮廓, 在细胞的大液泡中有较少的钙沉淀颗粒(图4-B)。

4 开花后2 d的雌配子体

开花后2 d, 雌配子体发育成熟。在胚囊珠孔端的细胞壁中, 细小钙沉淀颗粒的数目比前1 d的(图3-A)明显增加(图4-C)。同时, 在助细胞的丝状

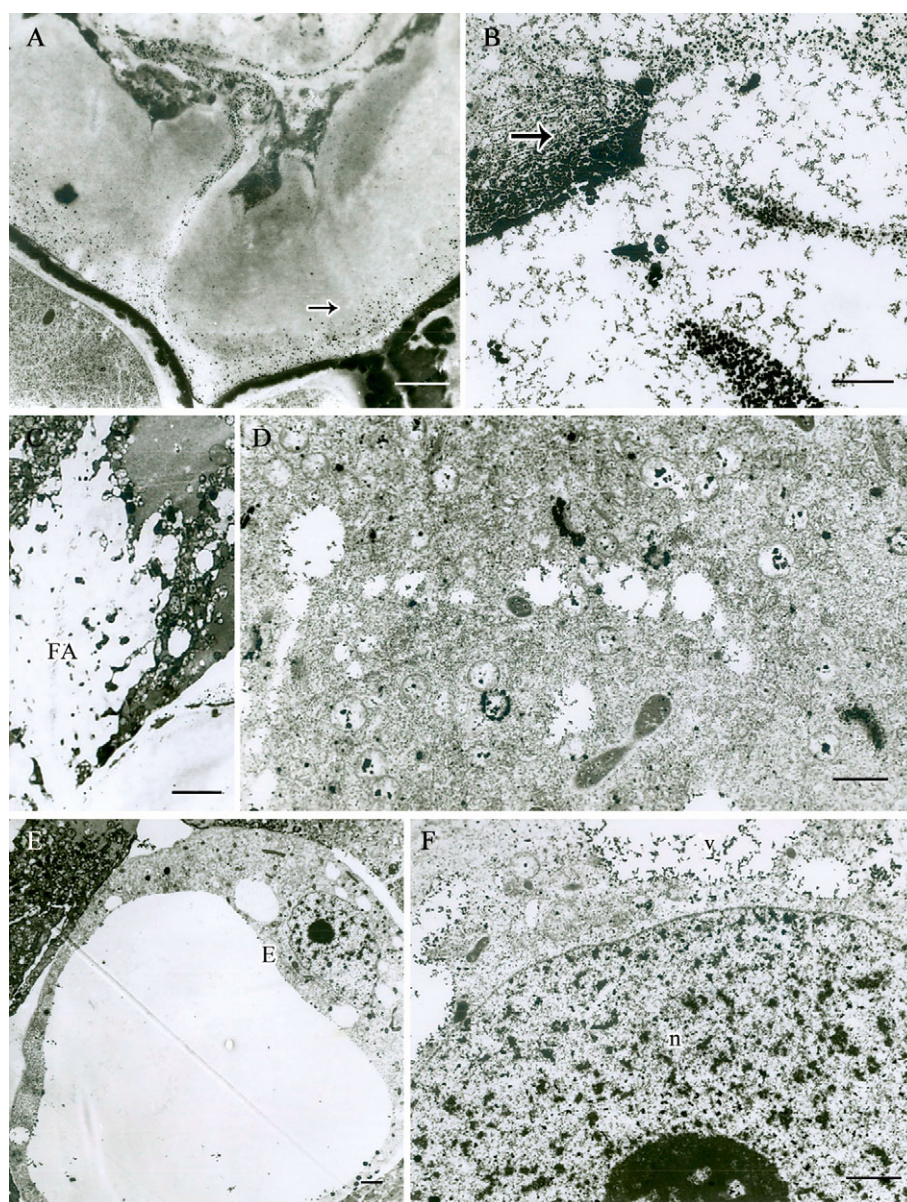
图3 韭开花后1 d发育胚囊中Ca²⁺分布

Fig.3 The calcium distribution in developing embryo sac of *A. tuberosum* at 1 d after anthesis

图片均按倒生胚珠的珠孔在下, 合点在上方向排列。标尺=1 μm。A: 开花后1 d, 胚囊的珠孔端壁极性聚集钙沉淀颗粒(箭头); B: 在助细胞珠孔端出现较多含钙沉淀颗粒的内质网片层(箭头); C: 在2个助细胞珠孔端的公共壁上形成丝状器(FA), 其中钙沉淀颗粒很少; D: 助细胞小液泡中有钙沉淀颗粒; E: 卵细胞(E)大液泡中钙沉淀颗粒明显减少; F: 在卵细胞小液泡(v)中有钙沉淀颗粒; n为卵细胞核。

器中钙沉淀颗粒也比以前增加(图4-D)。此时, 2个助细胞之间已发生了明显的差异: 宿存助细胞的细胞质没有明显变化, 细胞器轮廓清晰, 结构完整, 细胞中的钙沉淀颗粒主要分布在小液泡中; 而退化助细胞的细胞质电子密度显著增加, 导致其中的各类细胞器难以区分(图4-E)。受精前, 卵细胞的极性进一步加强, 细胞的2/3体积被位于细胞珠孔端的

大液泡占据, 细胞核和大部分细胞质分布在细胞合点端。在卵细胞的大液泡中又聚集了大量细小的钙沉淀颗粒, 而在卵细胞外的中央细胞的大液泡中也聚集了大量的细小钙沉淀颗粒(图4-F)。这与前1 d卵细胞(图3-E)和中央细胞中的钙沉淀颗粒分布不同。在胚囊合点端, 3个反足细胞的命运发生了很大变化, 由于中央细胞向合点端扩展, 将其外面

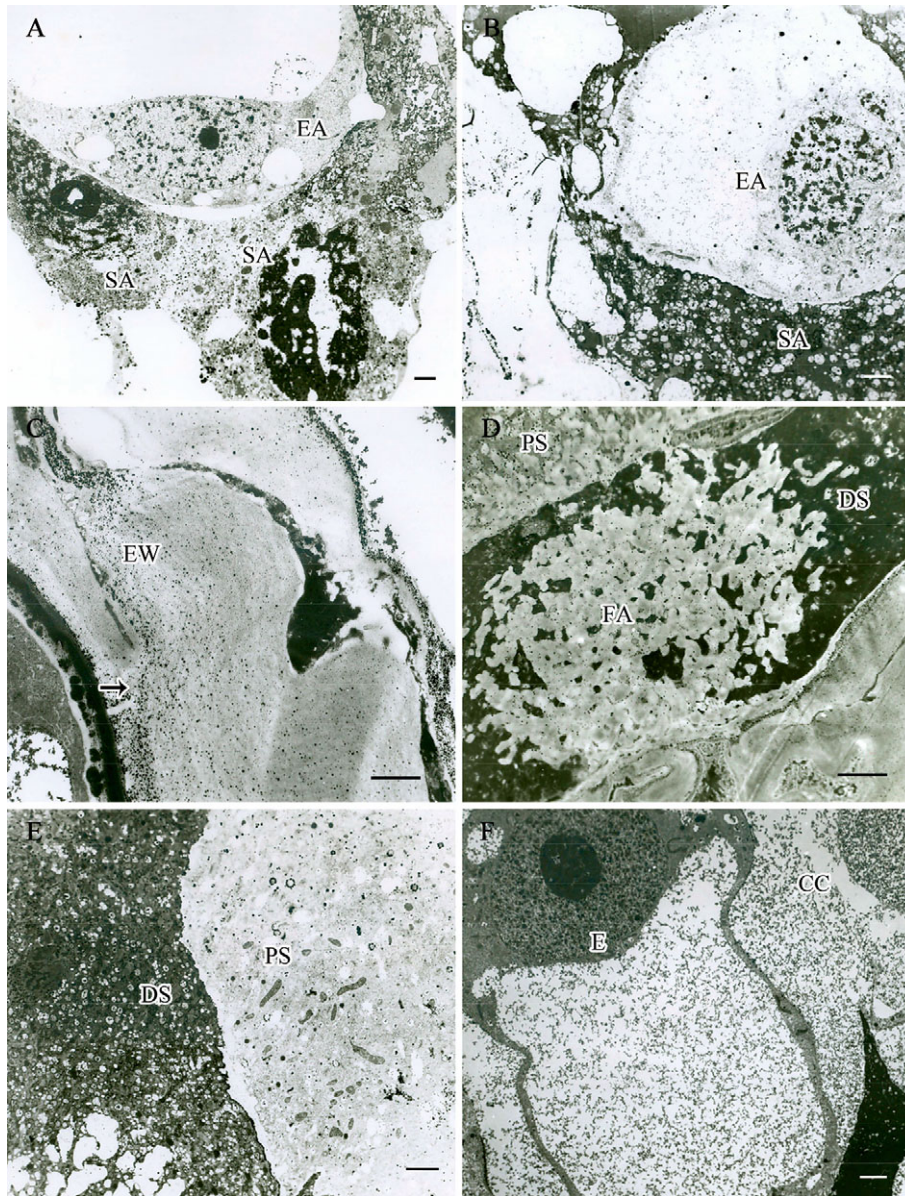


图4 韭开花后2 d发育胚囊中Ca²⁺分布

Fig.4 The calcium distribution in developing embryo sac of *A. tuberosum* at 2 d after anthesis

图片均按倒生胚珠的珠孔在下,合点在上方向排列。标尺=1 μm。A: 胚囊合点端2个助状反足细胞(SA)已呈退化状,将仍完好的卵状反足细胞(EA)包围。B: 卵状反足细胞(EA)大液泡中有少量钙沉淀颗粒。C: 开花后2 d, 胚囊珠孔壁(EW)中的钙沉淀颗粒增多。D: 助细胞丝状器(FA)更发达,其中的钙沉淀颗粒增加。E: 2个助细胞发生明显差异: 左边助细胞的电子密度增加,呈退化状(DS); 右边助细胞仍保持完好,为宿存助细胞(PS)。F: 成熟卵细胞(E)及中央细胞(CC)的液泡中又聚集较多的细小钙沉淀颗粒。

的珠心细胞溶解,使反足细胞失去了附着在珠心细胞上的基础,常看到3个反足细胞呈游离状态。这些游离反足细胞呈现出退化状态。

讨 论

Ca²⁺作为生物体内常见的化学元素,通过量变的方式调控细胞的很多生理活动和信号转导事

件。生物体内Ca²⁺含量在特定时间和特定部位发生的时空变化特征是其调控细胞分化机制的征兆。细胞中游离Ca²⁺的微量变化是细胞刺激反应信号转导机制的关键环节之一,已有大量的文章和专著报道(Bush 1993, 1995; Gilroy等1993; Sanders等1999)。然而,有关细胞中Ca²⁺的生理功能研究,即在非刺激条件下Ca²⁺对细胞分化的调控机制还

很少报道。大多数被子植物雌配子体由4种、7个高度特化的细胞组成,是植物体内营养物质运输的终点,形态和生理极性特征明显,尤其是卵细胞的极性奠定了其受精后的胚胎发生方向。雌配子体细胞的极性特征与其高度液泡化有关。然而,雌配子体细胞中液泡形成的调控机制研究还是空白。

1 Ca²⁺与胚囊细胞的液泡化

植物雌配子体细胞,尤其是中央细胞高度液泡化。在分离卵细胞的实验中常用8%~12%甘露醇作为渗透剂(菅明霞等2009;魏冬梅等2009;陈琳等2010),显示胚囊细胞处于较高渗透压环境中。胚囊细胞的高渗透压状态可能是雌配子体极性产生和维持的主要生理原因。在非早期的八核胚囊中,虽然8个细胞核同处在相同的细胞质中,但在珠孔端和合点端的细胞质中钙沉淀颗粒较少,而在胚囊中部极核附近细胞质中钙沉淀颗粒较多。这些钙沉淀颗粒主要位于细胞质小液泡中(图1-E和F),并呈现出随着液泡体积增加,其中的钙沉淀颗粒减小的现象,很可能是钙沉淀颗粒在液泡中被溶解了,暗示着胚囊中部细胞质中Ca²⁺调控小液泡的形成,这些小液泡再融合成大液泡。此外,进入大液泡的Ca²⁺也可作为渗透剂维持液泡的渗透压,或者调控其他渗透剂维持液泡的高渗透压状态。非游离核胚囊中Ca²⁺分布的时空特征提示在胚囊细胞分化前,其生理活动主要为构建大液泡系统,加强其本身的极性特征。

Ca²⁺调控液泡形成的迹象也发生在卵细胞的发育中。在八核胚囊中,珠孔端的3个细胞核将分化为2个助细胞和1个卵细胞。3个细胞核是从共同的细胞质中分化为3个细胞。卵器三细胞刚形成时具有相近的电子密度和相同的细胞器形态、结构,但在卵细胞珠孔端细胞质中产生了较多的小液泡,其中有明显的钙沉淀颗粒(图1-B)。随着卵细胞的发育,这些小液泡融合构成卵细胞中大液泡(图2-A)。开花后2 d,卵细胞成熟,在其大液泡中又聚集了大量细小的钙沉淀颗粒(图4-F),可能是液泡中的Ca²⁺含量达到一定阈值时形成较大的可见沉淀颗粒。Ca²⁺也可能起维持卵细胞液泡渗透压的功能。这些结果提示在非胚囊细胞发育中Ca²⁺可能与形成液泡的调控和维持液泡化状态有关。

2 助细胞中的Ca²⁺分布特征

助细胞位于胚囊珠孔端,处于接受花粉管的最有利位置。在助细胞珠孔端,细胞壁增厚形成了独特的结构——丝状器。由于助细胞的特殊位置和特异的结构,花粉管通过助细胞的丝状器进入胚囊。助细胞与花粉管之间的关系是受精调控研究领域中的一个热点。在已研究过的植物中,助细胞中Ca²⁺分布有几个主要特点:(1)助细胞是雌配子体中Ca²⁺含量最高的部位,而细胞壁加厚的丝状器又是助细胞Ca²⁺含量最高的部位。(2)助细胞Ca²⁺分布具有梯度特征:一类是从助细胞珠孔端到合点端Ca²⁺依次递减,尤其是丝状器中最多,如小麦(Chaubal和Reger 1992)、珍珠粟(Chaubal和Reger 1993)、烟草(Tian和Russell 1997)和油菜(余凡立等1998);另一类从助细胞珠孔端到合点端钙沉淀颗粒依次递增,如向日葵(He和Yang 1992)。(3)不同植物Ca²⁺在退化助细胞与宿存助细胞中的分布具有差异。在小麦(Chaubal和Reger 1992)、珍珠粟(Chaubal和Reger 1993)、向日葵(He和Yang 1992)的成熟胚囊中,姊妹助细胞的钙沉淀颗粒基本相等,但在烟草成熟雌配子体中,2个助细胞中的钙沉淀颗粒的数量不同,接受花粉管的退化助细胞中,钙沉淀颗粒比宿存助细胞中的多(Tian和Russell 1997)。

助细胞中Ca²⁺含量与助细胞的发育密切相关。在向日葵未授粉时,2个助细胞中Ca²⁺含量没有明显区别,当向日葵授粉后,接受花粉管的助细胞中钙沉淀颗粒明显增加,随后该助细胞退化(He和Yang 1992)。与之相似,油菜授粉后2个助细胞中的钙含量明显增加,且两者的钙沉淀颗粒大小有所不同,接受花粉管的退化助细胞中钙沉淀颗粒较小(余凡立等1998)。烟草的2个助细胞中Ca²⁺含量在花粉管到达前就出现差异,花粉管进入钙沉淀颗粒较多的退化助细胞中,而宿存助细胞中的钙沉淀颗粒则基本保持不变,直至受精过程完成。在对烟草去雄处理5 d后,其过熟助细胞未出现退化迹象,在丝状器中仍含有大量钙沉淀颗粒,表明花粉管对助细胞变化具有信号效应(Tian和Russell 1997)。在莴苣开花前3 d,助细胞刚刚形成,其中钙沉淀颗粒很少;开花前2 d,助细胞的细胞壁中钙沉淀颗粒有所增加;开花当天,助细胞珠孔端

的丝状器中分布着大量的钙沉淀颗粒;授粉1 h后,2个助细胞的结构以及Ca²⁺分布特征发生差异,一个助细胞中钙沉淀颗粒明显增多,细胞出现退化特征,另一个助细胞中的Ca²⁺分布基本不变,成为宿存助细胞(邱义兰等2007)。在本实验中,非助细胞中的Ca²⁺含量也显示随其发育增加的特征:在开花当天,助细胞刚分化,其中的钙沉淀颗粒不多;在开花后1 d,在助细胞的局部区域钙沉淀颗粒明显增加;开花后2 d时,雌配子体成熟。在助细胞珠孔端的细胞壁和丝状器中的钙沉淀颗粒达到最多状态,其中一个助细胞退化,其无组织状的细胞质为花粉管的进入提供了空间,准备接受花粉管。非助细胞没有大液泡,其钙沉淀颗粒主要聚集在细胞珠孔端的壁和丝状器部位,这与中央细胞和卵细胞中Ca²⁺聚集在液泡中不同,呈现胚囊细胞中Ca²⁺分布的特异性。联系花粉培养实验中向化性特征,极性分布在助细胞珠孔端细胞壁中的Ca²⁺很可能具有吸引花粉管进入的功能。非发育雌配子体中Ca²⁺的时空分布特征可能具有不同的生理功能,这些Ca²⁺分布特征将为深入研究雌配子体细胞发育和功能的调控机制打下基础。

参考文献

- 陈琳,张亚楠,邱一兰,田惠桥(2010). 莴苣胚囊细胞分离. 云南植物研究, 32 (4): 232~327
- 菅明霞,张亚楠,王雅英,田惠桥(2009). 葱卵细胞的分离. 植物学报, 44 (3): 345~350
- 邱义兰,刘如石,田惠桥(2007). 莴苣助细胞发育过程中钙的分布研究. 分子细胞生物学报, 40 (4): 253~261
- 田惠桥,杨弘远(1989). 韭菜未传粉子房培养中单倍体的胚胎发生和植株再生. 实验生物学报, 22 (2): 139~147
- 田惠桥,杨弘远(1991a). 韭菜胚囊发育与胚胎发生. 武汉植物学研究, 9 (1): 5~10
- 田惠桥,杨弘远(1991b). 韭菜孤雌生殖和反足细胞无配子生殖的超微结构观察. 植物学报, 33 (11): 819~824
- 魏冬梅,菅明霞,陈琳,田惠桥(2009). 韭菜卵细胞、合子及原胚的分离. 细胞生物学杂志, 31 (2): 286~290
- 余凡立,梁世平,杨弘远,汪艳(1998). 甘蓝型油菜授粉前后珠孔和胚囊中钙分布的超微细胞化学定位. 植物学报, 40 (6): 591~597
- Brewbaker JL, Kwack BH (1963). The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am J Bot*, 50: 859~865
- Bush DS (1993). Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiol*, 103: 7~13
- Bush DS (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 46: 95~122
- Chaubal R, Reger BJ (1992). The dynamics of calcium distribution in the synergid cells of wheat after pollination. *Sex Plant Reprod*, 5: 206~213
- Chaubal R, Reger BJ (1993). Prepollination degeneration in mature synergids of *Pearl millet*: an examination using antimonate fixation to localize calcium. *Sex Plant Reprod*, 6: 225~238
- Ge LL, Tian HQ, Russell SD (2007). Calcium function and distribution during fertilization in angiosperms. *Am J Bot*, 94: 1046~1060
- Gilroy S, Bethkeand PC, Jones RL (1993). Calcium homeostasis in plants. *J Cell Sci*, 106: 453~462
- He CP, Yang HY (1992). Ultracytochemical localization of calcium in the embryo sac of sunflower. *Chin J Bot*, 4: 99~106
- Holdaway-Clarke TL, Hepler PK (2003). Control of pollen tube growth: role of ion gradients and fluxes. *New Phytol*, 159: 539~563
- Mascarenhas JP, Machlis L (1962). Chemotropic response of *Antirrhinum msjus* pollen to calcium. *Nature*, 196: 292~293
- Miller DD, Callaham DA, Gross DJ, Hepler PK (1992). Free Ca²⁺ gradient in growing pollen tubes of *Lilium*. *J Cell Sci*, 101: 7~12
- Rathore KS, Cork RJ, Robinson KR (1991). A cytoplasmic gradient of Ca²⁺ is correlated with the growth of lily pollen tubes. *Dev Biol*, 148: 612~619
- Sanders D, Brownlee C, Harper JF (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell*, 11: 691~706
- Tian HQ, Russell SD (1997). Calcium distribution in fertilized and unfertilized ovules and embryo sacs of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, 202: 93~105