

特约综述

激光显微切割技术推进全面解析植物雄配子发生的分子机制

汤 湘^{1,2} 刘巧泉² 唐威华^{1*}

(¹中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032; ²扬州大学教育部植物功能基因组学重点实验室, 扬州 225009)

摘要 雄配子(又称小孢子, 即花粉)的产生是显花植物生殖发育的重要阶段之一。花粉发育是在花药中与花药发育同步进行的, 而花药内壁的绒毡层细胞直接为花粉发育提供营养。花药发育中各细胞(如花粉、绒毡层等)特异性的全基因组表达谱可为全面解析植物雄配子发育的分子调控机制提供丰富的信息。但以往的表达谱研究多基于整个花药甚至整个花序的取材, 无法提供细胞特异性的表达信息。最近, 激光显微切割技术被运用在水稻花粉发育研究这一领域, 分别获得了处于减数分裂后各时期的小孢子以及绒毡层的专一细胞类型的全基因组表达谱。在此基础上, 不仅发掘了更多新的花粉及绒毡层细胞特异性表达基因, 鉴定了花粉及绒毡层细胞中富集的生化、代谢的细胞通路; 而且还鉴定出了更多调控花粉及绒毡层细胞特异性基因表达的顺式元件, 并通过系统分析得出了多种植物激素在花粉发育中细胞水平上的时空分布。总之, 激光显微切割技术和基因组芯片联用的结果提供了很多可供检验的科学假说, 大大推动了对植物雄配子发生发育分子机制的全面了解。

关键词 激光显微切割; 基因芯片; 花粉; 绒毡层; 植物激素

配子体和孢子体的世代交替组成了植物生活周期。雄配子(即小孢子、花粉)发生和发育在花药中进行^[1]。以水稻为例^[2], 最初无细胞分化的花药原基(stamen primordium)从四角上先分化出孢原细胞(archesporial initials), 进一步分化产生初生造孢细胞(primary sporogenous cells)和初生周缘细胞(primary parietal cells)。随后, 初生造孢细胞发育成花粉母细胞(pollen mother cells), 经过减数分裂形成四分体、单核小孢子, 再经过一次非对称有丝分裂产生由营养细胞和被包埋在营养细胞中的生殖细胞组成的二核花粉, 生殖细胞再进一步分裂为两个精细胞成为三核花粉, 最终发育为成熟花粉粒。同时, 初生周缘细胞经过多次分裂形成内壁、中层和绒毡层。绒毡层作为一个营养组织, 为花粉发育提供营养, 直接参与花粉外壁形成, 并从二核花粉期开始降解。

这些重要的生物学事件是由花药和雄配子发育中孢子体和配子体中复杂的基因表达类型所调控的^[3]。尽管人们已经可以从形态学上比较清楚地了解花粉和花药发育的过程, 但对它们发育的分子机制、调控

网络仍不清楚。以往的研究, 已找到一些在花粉和绒毡层中特异表达的基因, 但数量有限^[4,5]。通过基因芯片(microarray)进行的转录组分析可以为全面理解花药和花粉发育的基因调控提供重要信息。但由于从植物器官中分离单一类型的细胞比较困难, 因此大部分基因表达谱分析时所用的起始材料都是处于不同发育阶段的整个花药或者是成熟花粉粒, 这些材料不能区分花药中的不同细胞类型。Honys 和 Twell^[6]采用 Percoll 梯度分离了拟南芥减数分裂后的单核小孢子、二核花粉、三核花粉以及成熟花粉, 并进行了不同细胞类型特异性的转录组分析。雄配子体特异的表达谱数据展示了在花粉成熟中多个基因的大规模抑制和雄配子特异转录谱比例的增加。但是, 要精确分离花药中的其它细胞仍然显得比较困难; 另外, 利用 Honys 和 Twell^[6]的方法分离其他物种或其他类型的细胞时, 仍需要进行一定的技术调整和优化。

国家重点基础研究发展规划(973 计划)(No.2007CB108700)和国家高技术研究发展计划(863 计划)(No.2006AA10A102)资助

* 通讯作者。Tel/Fax: 021-54924015, E-mail: whtang@sippe.ac.cn

激光显微切割(laser microdissection, LM)技术可以从不同组织(包括植物组织)的切片上分离特定类型的细胞。将包含目标细胞的组织切片放在显微镜下,找到目标细胞,通过激光的切割,将其与周围组织分离,从而获得单一类型的细胞;收获的细胞可进一步应用于芯片分析。近来激光显微切割结合芯片技术(LM-microarray)在植物中已有很多应用,已成功获得的特异类型细胞包括胚^[7,8]、芽顶端分生组织^[9,10]、根中柱鞘^[11,12]、长角果胎座框^[13]和雄蕊离区^[14]等。

最近, Suwabe 等^[15]将 LM 技术应用到水稻花药发育的研究中,用来分离处于不同发育阶段的花粉和绒毡层细胞;同时将 LM 与芯片技术结合,获得了花粉或绒毡层的特异细胞类型的各发育时期的表达谱。通过对这两种类型细胞在不同发育阶段表达谱的进一步比较分析,可以了解在水稻花药不同发育阶段孢子体和配子体中基因的表达特征以及特异表达的基因类型^[16],分析激素在花药发育中的表达情况^[17],据此可以分离出花药发育中特异表达基因上游的顺式调控元件^[18]。这一系列的分析是建立在精确分离花粉和绒毡层细胞基础上的,是以前采用整个花药进行分析的结果中得不到的。因此 LM 技术在水稻花药发育中的应用极大地推进了花药发育相关的研究。

本文就针对 LM-microarray 技术获得的花粉和绒毡层的表达谱及对该表达谱进行的进一步研究进行总结(图 1)和讨论。

1 通过 LM-microarray 得到水稻花粉和绒毡层的分离的动态转录组

Suwabe 等^[15]以水稻品种日本晴为材料,通过 LM 分离处于减数分裂(meiosis, MEI)、四分体(tetrad, TET)、单核小孢子(uninuclear microspore, UN)、二核花粉(bicellular pollen, BC)和三核花粉(tricellular pollen, TC)五个不同发育阶段的花粉和与花粉处于减数分裂、四分体和单核小孢子三个不同发育阶段相应的绒毡层(图 1)。分离得到微量的总 RNA(平均 12.6 ng),经线性扩增后与 44K 的水稻全基因组寡核苷酸芯片进行杂交,从而得到了花粉和绒毡层分离的转录组。

Suwabe 等^[15]选择 11 个已知的绒毡层特异表达基因(*Osc4*, *Osc6*, *YY1*, *OsRAFTIN1*, *TDR*, *YY2*, *RA8*, *OsGAMYB*, *OsCPI1*, *UDT1* 和 *OsGEN-L*)在 44K LM-microarray 结果中进行验证。这些基因被证实确实在绒毡层中特异表达,表明 LM-microarray 是可靠的。

Endo 等^[19]曾于 2004 年对含有单核小孢子、二核花粉和三核花粉的三个不同发育阶段的花药进行了 4K 水稻 cDNA 芯片的分析,得到了 140 个花药特异表达基因。Suwabe 等^[15]对这 140 个花药特异表达基因在 44K LM-microarray 表达谱中进行聚类分析,将其进一步分为三类:花粉中特异表达(71 个基因),绒毡层中特异表达(7 个基因)和两个组织中都有表达(62

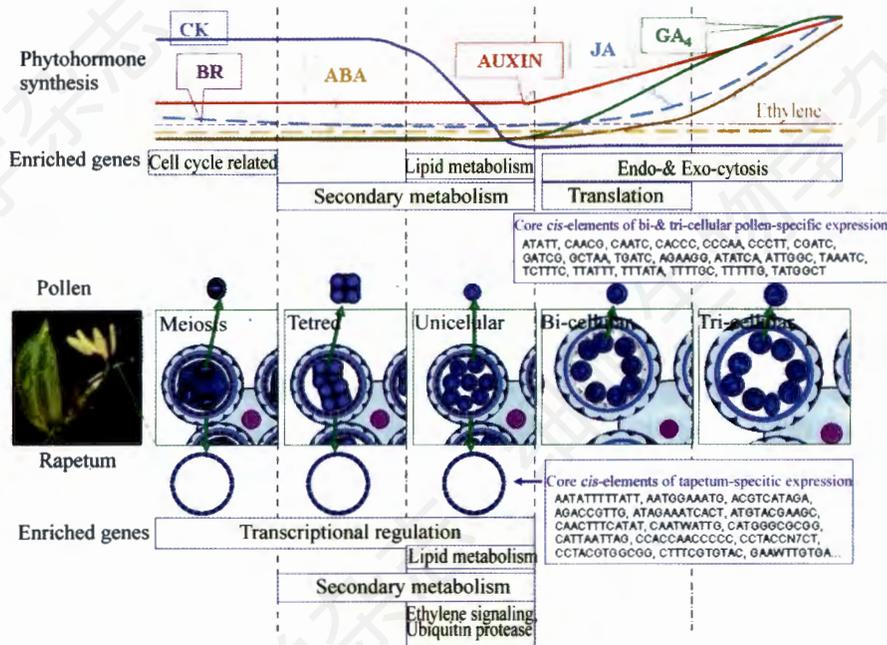


Fig.1 Laser microdissection-microarray improves our understanding of the development of microspore/pollen and tapetum in rice

个基因)。结果表明 LM-microarray 技术可以使人们对转录组研究的精准度从器官水平(花药)提高到细胞水平(花粉和绒毡层)。

Hobo 等^[16]对通过 44K LM-microarray 得到的花粉和绒毡层的基因表达谱进行聚类分析, 将 28 141 个花药发育中表达的基因依据其特异的表达谱聚为 20 个簇(cluster), 其中有 3 468 个基因是花药中特异表达的。在绒毡层表达基因的簇中(#13, 14, 15, 18), 花药特异表达基因占 2%~4%。减数分裂小孢子(#12, 17)和花粉发育后期表达基因簇中(#5, 10), 花药特异表达基因超过 20%。

在绒毡层的转录谱中, 簇 12、20 和 2 中的基因只在一个阶段优先表达(分别为 MEI, TET, 和 UN 阶段), 表明这三个阶段绒毡层基因的生物学功能不同; 簇 7 中的基因在 MEI 和 TET 阶段主要表达; 有 4 个簇中的基因在三个阶段中均持续表达。

花粉转录谱显示了更复杂的分布。从减数分裂到三核期, 花粉转录谱的基因聚类显示出多种不同的表达趋势。花粉基因表达谱的多样性表明雄配子中发生的生物学事件被许多具有不同表达类型的花药特异表达基因所调控。有趣的是, 在 8 个簇中观察到花粉和绒毡层同步的基因表达。这种同步表达是花药表达谱的主要特征。传统的观点认为绒毡层在花药中仅作为小孢子的营养细胞对其进行哺育, 小孢子和绒毡层中表达的基因应归于不同类。Hobo 等^[16]的结果与之有出入。小孢子和绒毡层中基因同步转录, 表明这些细胞共享许多发育通路, 与 Scott 等^[20]描述的一致。这也与小孢子和绒毡层同时来源于 L2 层的事实相符。

2 花药发育中表达的重要的细胞过程相关基因

Hobo 等^[16]对 44K LM-microarray 的基因聚类结果进行 GO (gene ontology) 分析, 并找出了在花药发育中表达的重要基因。结果显示, 312 个转录因子(包括 bHLH, MYB, GRAS, MADS, HD- 拉链和锌指类型)倾向在绒毡层中富集表达, 提示绒毡层中的转录调控非常活跃。翻译相关基因(149 个)则倾向在二核花粉早期富集表达。脂类代谢基因在单核期的花粉和绒毡层中高表达。这与脂类代谢对花粉发育的重要作用相符, 脂类合成缺陷往往导致雄性不育^[21]。已知的与花粉壁形成和脂肪酸代谢相关的基因, 如 *OsWDA1*, *AtCER6/CUT1* 等主要在减数分裂, 四分体和单核期

的绒毡层中表达。这表明绒毡层细胞在花粉壁形成和向孢子外壁运输脂质中起主要作用。次生代谢相关基因常在四分体和单核期的花粉和绒毡层中同步表达。细胞周期相关基因只占一小部分, 主要在减数分裂阶段富集。

目前为止, 许多与碳水化合物代谢, 细胞骨架重组, Ca^{2+} 信号, 顶端生长相关的花粉特异表达基因已在花粉发育后期被识别^[19, 22-26]。这些基因在 44K LM-microarray 结果中被证实在二核后期和三核期的花粉中优先表达。

在花粉管生长中, 顶端的物质分泌是很重要的。但目前只有很少一部分参与分泌囊泡运输的基因被识别^[27]。在 44K LM-microarray 结果中, 编码次生囊泡分子的基因(SNARE, SNAP, 小突触泡蛋白, 网格蛋白等)在二核后期和三核期的花粉中被识别。这可能帮助理解花粉管中液泡运输的分子机制。

Argonaute 蛋白参与小 RNA 介导的调控通路^[28], miRNAs 是调控许多生物过程的重要引导分子^[29]。Argonaute 蛋白和 miRNAs 在整个花粉和绒毡层的发育中均有分布, 表明小 RNA 的转录调控在花粉发育中并不缺席。

3 花药发育中的激素合成与信号调控

尽管有许多植物激素在花药发育中具有重要功能, 但它们参与花药发育的过程却不清楚。Hirano 等^[17]利用 44K LM-microarray 结果对 7 种主要植物激素的合成与信号基因进行了细胞类型特异的表达谱分析, 从而推测出植物激素在花药发育中的作用。这 7 种激素包括: 赤霉素(gibberellins, GAs), 吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA), 细胞分裂素(cytokinins, CKs), 油菜素内酯(brassinosteroids, BR), 乙烯(ethylene), 脱落酸(abscisic acid, ABA)和茉莉酸(jasmonic acids, JAs)。

LM-microarray 结果表明 IAA 和 GA_4 在成熟花药中高度积累。IAA 和 GA 合成所需要的基因在花粉发育的晚期协同表达, 暗示这些基因对于成熟花药中 IAA 和 GA 的大量积累起重要作用。与 GA 合成相反, GA 信号基因在花粉早期发育中优先表达, 在花粉发育晚期表达下调。这种 GA 合成与信号基因镜像的表达模式在生长素信号基因中并未观察到。这表明在减数分裂之前 GA 已有合成, 因此需要在花粉发育早期合成信号基因来进行下游反应; 而花粉发育后期合成的 GA_4 并不被立即利用, 而是作为储存 GA 被保持, 直到花粉萌发和花粉管伸长。另外, LM-microarray

表达谱表明 *GA20ox3* 和 *GA3ox1* 主要参与二核和三核花粉中的 GA 合成, 从而使 GA_4 积累到异常高的水平。在水稻的营养生长阶段则利用不同的 *GA20* 和 *GA3* 氧化酶: *GA20ox2* (*SD1*) 和 *GA3ox2* 来合成有生物活性的 $GA^{[30]}$ 。水稻在营养组织和花药组织中利用不同的 *GA20* 和 *GA3* 氧化酶可能是由于两个组织中主要的活性 GA 不同。在营养组织中主要使用 GA_1 , 而在花药中主要使用 GA_4 。

IAA 受体基因主要在花粉发育晚期表达, 不同的 *AUX/IAA* 和生长素应答基因 (*ARF*) 在花粉和绒毡层发育的不同阶段表达。在花粉发育后期 IAA 的高度积累支持 IAA 在花粉中的合成对于花粉萌发和花粉管伸长是重要的这一观点^[31]。

CK 的合成优先在花粉发育早期发生, 活性的 CK 在晚期被细胞分裂素氧化酶/脱氢酶去活性。减数分裂至单核期 CK 的产生可能与小孢子的减数和有丝分裂有关。在花粉发育晚期 CK 的降解明显不同于 GA 和 IAA 的快速增加。

LM-microarray 结果中, 在花粉发育阶段没有发现明显的 BR 合成基因的表达趋势, 这与配子体中的 BR 合成对于花粉的育性不是必需的^[32]观点相符。BR 合成与信号基因在绒毡层细胞中高表达, 这也与 Ariizumi 等^[33]发现 BR 对于拟南芥花粉的孢子外壁形成很重要相符。

乙烯信号基因在绒毡层, 尤其是四分体和单核期优先表达。可能在为调控绒毡层细胞的程序性死亡^[34]做准备。

在绒毡层发育后期, ABA 合成基因表达下调, 同时使 ABA 失活的酶表达上调, 推测 ABA 水平下降, 可能与 ABA 抑制绒毡层细胞的程序性死亡有关。

而 JA 合成与信号基因在整个绒毡层发育阶段中都有表达。

4 发育特异表达基因候选顺式调控元件的筛选

目前寻找顺式调控元件的方法有许多种。包括利用报告基因进行实验分析, 以及通过计算机寻找的方法, 如 MEME^[35]、AlignACE^[36] 和 Motif-Sampler^[37] 等。

Mihara 等^[18]采用了一种新的识别候选顺式调控元件方法(组合的基因簇印迹, gene-cluster fingerprints 法), 从来自发育的水稻花粉细胞的基因表达谱中, 识别调控特异基因表达的候选顺式调控元件。

根据 LM-microarray 结果, Mihara 等^[18]对 128 个只在水稻花粉发育的二核后期和成熟花粉期表达的基因的启动子区域富集的短片段核苷酸序列进行分析, 鉴定出 20 个核心顺序(5~7 nts, 图 1)。这 20 个核心顺序很可能是调控在二核至成熟花粉阶段特异性基因表达的顺式元件, 即转录因子结合位点。进一步可以根据这些核心顺序通过染色体免疫沉淀 (chromatin IP) 等方法钓出与它们结合的转录因子。

5 小结与展望

通过 LM 获得处于水稻不同发育阶段的花粉和绒毡层, 对其进行芯片分析, 结果表明它们在发育中具有不同的基因表达谱。对基因表达谱的进一步分析, 可以了解在不同细胞发育过程中基因的表达模式以及基因表达调控情况。

LM 技术极大地推动了花药发育的相关研究, 使人们对雄配子发生的分子机制有了更深入的了解。这项技术也可以被应用于分离更早期的雄配子发生时期, 以及雌配子的不同阶段, 从而进一步推进植物生殖发育分子机制及调控网络的研究。

参考文献(References)

- [1] Goldberg RB, Beals TP, Sanders PM. Anther development: basic principles and practical application, *Plant Cell*, 1993, 5 (10): 1217-1229
- [2] Lu XC, Gong HQ, Huang ML *et al.* Molecular analysis of early rice stamen development using organ-specific gene expression profiling. *Plant Mol Biol*, 2006, 61(6): 845-861
- [3] McCormick S. Control of male gametophyte development, *Plant Cell*, 2004, 16: S142-S153
- [4] 谭何新, 文铁桥, 张大兵. 水稻花粉发育的分子机理, *植物学通报*, 2007, 24(3): 330-339
- [5] 杨克珍, 叶德. 植物雄配子体发生和发育的遗传调控, *植物学通报*, 2007, 24(3): 293-301
- [6] Honys D, Twell D. Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*, *Genome Biol*, 2004, 5(11): R85
- [7] Casson S, Spencer M, Walker K *et al.* Laser capture microdissection for the analysis of gene expression during embryogenesis of *Arabidopsis*, *Plant J*, 2005, 42(1): 111-123
- [8] Spencer MW, Casson SA, Lindsey K. Transcriptional profiling of the *Arabidopsis* embryo, *Plant Physiol*, 2007, 143(2): 924-940
- [9] Ohtsu K, Smith MB, Emrich SJ *et al.* Global gene expression analysis of the shoot apical meristem of maize (*Zea mays* L.), *Plant J*, 2007, 52(3): 391-404
- [10] Zhang X, Madi S, Borsuk L *et al.* Laser microdissection of narrow sheath mutant uncovers novel gene expression in the shoot apical meristem, *PLoS Genet*, 2007, 3(6): e101
- [11] Woll K, Borsuk LA, Stransky H *et al.* Isolation, characterization,

- and pericycle-specific transcriptome analyses of the novel maize lateral and seminal root initiation mutant *rum1*, *Plant Physiol*, 2005, 139(3): 1255-1267
- [12] Dembinsky D, Woll K, Saleem M *et al.* Transcriptomic and proteomic analysis of pericycle cells of the maize primary root, *Plant Physiol*, 2007, 145(3): 575-588
- [13] Cai S, Lashbrook CC. Laser capture microdissection of plant cells from tape-transferred paraffin sections promotes recovery of structurally intact RNA for global gene profiling, *Plant J*, 2006, 48(4): 628-637
- [14] Cai S, Lashbrook CC. Stamen abscission zone transcriptome profiling reveals new candidates for abscission control: enhanced retention of floral organs in transgenic plants overexpressing *Arabidopsis* ZINC FINGER PROTEIN2, *Plant Physiol*, 2008, 146(3): 1305-1321
- [15] Suwabe K, Suzuki G, Takahashi H *et al.* Separated transcriptomes of male gametophyte and tapetum in rice: validity of a laser microdissection (LM) microarray, *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(10): 1407-1416
- [16] Hobo T, Suwabe K, Aya K *et al.* Various spatiotemporal expression profiles of anther-expressed genes in rice, *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(10): 1417-1428
- [17] Hirano K, Aya K, Hobo T *et al.* Comprehensive transcriptome analysis of phytohormone biosynthesis and signaling genes in microspore/pollen and tapetum of rice, *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(10): 1429-1450
- [18] Mihara M, Itoh T, Izawa T. *In silico* identification of short nucleotide sequences associated with gene expression of pollen development in rice, *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(10): 1451-1464
- [19] Endo M, Tsuchiya T, Saito H *et al.* Identification and molecular characterization of novel anther-specific genes in *Oryza sativa* L. by using cDNA microarray, *Genes Genet Syst*, 2004, 79(4): 213-226
- [20] Scott RJ, Spielman M, Dickinson HG. Stamen structure and function, *Plant Cell*, 2004, 16: S46-S60
- [21] Ariizumi T, Hatakeyama K, Hinata K *et al.* A novel male-sterile mutant of *Arabidopsis thaliana*, *faceless pollen-1*, produces pollen with a smooth surface and an acetolysis-sensitive exine, *Plant Mol Biol*, 2003, 53(1-2): 107-116
- [22] Cheung AY, Wu HM. Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes, *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 547-572
- [23] Endo M, Matsubara H, Kokubun T *et al.* The advantages of cDNA microarray as an effective tool for identification of reproductive organ-specific genes in a model legume, *Lotus japonicus*, *FEBS Lett*, 2002, 514(2-3): 229-237
- [24] Golovkin M, Reddy ASN. A calmodulin-binding protein from *Arabidopsis* has an essential role in pollen germination, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(18): 10558-10563
- [25] Honys D, Twell D. Comparative analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome, *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 640-652
- [26] MalhóR, Liu Q, Rato C *et al.* Signalling pathways in pollen germination and tube growth, *Protoplasma*, 2006, 228(1-3): 21-30
- [27] Sanderfoot AA, Pilgrim M, Adam L *et al.* Disruption of individual membranes of *Arabidopsis* syntaxin gene families indicates each has essential functions, *Plant Cell*, 2001, 13(3): 659-666
- [28] Vaucheret H. Plant ARGONAUTES, *Trends Plant Sci*, 2008, 13(7): 350-358
- [29] Ramachandran V, Chen X. Small RNA metabolism in *Arabidopsis*, *Trends Plant Sci*, 2008, 13(7): 369-374
- [30] Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M *et al.* Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice, *Nature*, 2002, 416(6882): 701-702
- [31] Wu JZ, Lin Y, Zhang XL *et al.* IAA stimulates pollen tube growth and mediates the modification of its wall composition and structure in *Torenia fournieri*, *J Exp Bot*, 2008, 59(9): 2529-2543
- [32] Tanabe S, Ashikari M, Fujioka S *et al.* A novel cytochrome P450 is implicated in brassinosteroid biosynthesis via the characterization of a rice dwarf mutant, *dwarf11*, with reduced seed length, *Plant Cell*, 2005, 17(3): 776-790
- [33] Ariizumi T, Kawanabe T, Hatakeyama K *et al.* Ultrastructural characterization of exine development of the *transient defective exine 1* mutant suggests the existence of a factor involved in constructing reticulate exine architecture from sporopollenin aggregates, *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(1): 58-67
- [34] Takada K, Ishimaru K, Kamada H *et al.* Anther-specific expression of mutated melon ethylene receptor gene *Cm-ERS1/H70A* affected tapetum degeneration and pollen grain production in transgenic tobacco plants, *Plant Cell Rep*, 2006, 25(9): 936-941
- [35] Bailey TL, Williams N, Misleh C *et al.* MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs, *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: W369-W373
- [36] Hughes JD, Estep PW, Tavazoie S *et al.* Computational identification of *cis*-regulatory elements associated with groups of functionally related genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Mol Biol*, 2000, 296(5): 1205-1214
- [37] Thijs G, Marchal K, Lescot M *et al.* A Gibbs sampling method to detect overrepresented motifs in the upstream regions of coexpressed genes, *J Comput Biol*, 2002, 9(2): 447-464

Laser Microdissection Facilitates a Comprehensive Understanding of Molecular Mechanisms of Plant Male Gametes Production

Xiang Tang^{1,2}, Qiao-Quan Liu², Wei-Hua Tang^{1*}

¹*Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China;* ²*Key Laboratory of Plant Functional Genomics of Ministry of Education, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)*

Abstract The production of male gametophyte (i.e. microspore, pollen) is important to sexual reproduction of flowering plants. The male gamete develops inside of the anther, and is synchronized with anther development. Tapetal cells in the anther directly provide nutrients to pollen. Genome-wide expression profiling of different types of cells (such as pollen, tapetum, etc) in anther can provide rich information for comprehensive understanding of molecular mechanisms in plant male gametophyte production. However, previous profiling used whole anthers or even whole inflorescence therefore can not provide cell-type specific expression information. Recently, laser microdissection technology has been used in the field of rice pollen development, and revealed the transcriptome of microspore and tapetum at various stages. This work not only provided, more pollen or tapetum-specific genes, but also identified pollen or tapetum-enriched biochemical and metabolizable pathways, and *cis*-regulatory elements of genes specifically expressed in pollen and tapetum. Meanwhile, spatiotemporal expressions of various phytohormones in pollen development have been systematically analyzed. In conclusion, results from laser microdissection combined with genome-scale microarray provided leads for many novel scientific hypothesis for testing, facilitated our studying towards a comprehensive understanding of molecular mechanisms of plant male gametes production.

Key words laser microdissection; microarray; pollen; tapetum; phytohormone

This work was supported by the National Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.2007CB108700) and the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No.2006AA10A102)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-21-54924015, E-mail: whtang@sippe.ac.cn