

- [8] 薛庆中、张能义、熊兆飞等, 1998, 浙江农业大学学报, **24**: 581 - 582.
- [9] Sigh S, Sidhu JS, Huang N et al., 2001, *Theor Appl Genet*, **102**: 1011 - 1015.
- [10] Huang N, Angeles ER, Domingo J et al., 1997, *Theor Appl Genet*, **95**: 313 - 320.
- [11] Chen S, Lin XH, Xu CG et al., 2000, *Crop Science*, **40**: 239 - 244.
- [12] 曹立勇、庄杰云、占小登等, 2003, 中国水稻科学, **17**: 184 - 186.
- [13] 李仕贵、王玉平、李平等, 1999, 生物技术在水稻育种上的应用研究, 中国农业科技出版社, 201 - 205.
- [14] Hittalmani S, Parco A, Mew TV et al., 2000, *Theor Appl Genet*, **100**: 1121 - 1128.
- [15] Katiyar SK, Tan Y, Huang B et al., 2001, *Theor Appl Genet*, **103**: 953 - 961.
- [16] 王春明、安井秀、吉村醇等, 2003, 中国农业科学, **36**: 237 - 241.
- [17] Jia JH, Zhang DS, Li CY et al., 2001, *Theor Appl Genet*, **103**: 607 - 612.
- [18] Torieux M, Petrov M, Huang N et al., 1996, *Theor Appl Genet*, **93**: 1145 - 1151.
- [19] Ahn SN, Bollich CN, Tanksley SD, 1992, *Theor Appl Genet*, **84**: 825 - 828.
- [20] Garland S, Lewin L, Blakeney A et al., 2000, *Theor Appl Genet*, **101**: 364 - 371.
- [21] Lorieux M, Ndjiondjop MN, Ghesquiere A, 2000, *Theor Appl Genet*, **100**: 593 - 601.
- [22] 向太和、杨剑波、杨前进等, 2003, 中国水稻科学, **17**: 113 - 117.
- [23] Shen L, Courtois B, McNally KL et al., 2001, *Theor Appl Genet*, **103**: 75 - 83.
- [24] Zhang J, Zheng HG, Aarti A et al., 2001, *Theor Appl Genet*, **103**: 19 - 29.
- [25] Ali ML, Pathan MS, Zhang J et al., 2000, *Theor Appl Genet*, **101**: 0756 - 0766.
- [26] Lin HX, Yamamoto T, SaSaki T et al., 2000, *Theor Appl Genet*, **101**: 1021 - 1028.
- [27] Monna L, Lin H, Kojima S et al., 2002, *Theor Appl Genet*, **104**: 772 - 778.
- [28] Fukuoka S, Okuno K, 2001, *Theor Appl Genet*, **103**: 185 - 190.
- [29] Reddy OUK, Siddiq EA, Sarma NP et al., 2000, *Theor Appl Genet*, **100**: 0794 - 0801.
- [30] Tanksley SD, Nelson JC, 1996, *Theor Appl Genet*, **92**: 191 - 203.
- [31] 李德军、孙传清、付永彩等, 2002, 科学通报, **47**: 854 - 858.

高等植物合子离体培养研究进展

李爱贞 田惠桥*

(厦门大学生命科学学院 厦门 361005)

摘要 合子是高等植物个体发育的第一个细胞, 在研究植物个体发育机理中有着不可替代的位置。植物体内合子细胞分裂并以胚胎发生方式形成新个体的特征在植物生物工程应用中独具特色。随着离体受精技术的发展和合子分离技术的改进, 已从多种植物中得到了人工合子和从体内直接分离出了合子。合子离体培养系统的建立为研究高等植物个体发育最初阶段的合子激活机理提供了条件, 也为探索利用合子胚胎发生的特征进行植物基因工程打下了基础。另外, 探索异种植物间人工杂种合子的培养也是进行远缘杂交的新尝试。

高等植物的卵细胞位于雌配子体胚囊中, 而胚囊又位于孢子体组织的胚珠和子房中。传粉后, 花粉管经花柱长入胚珠, 进入胚囊, 释放出两个精细胞, 其中一个与卵细胞融合形成合子, 另一个与中央细胞融合产生胚乳。合子是高等植物个体发育的第一个细胞, 是植物个体发育的起点。然而, 由于卵细胞和合子位于体细胞组织层层包围中, 形成了对高等植物合子发育机理研究的障碍。过去 30 年中对高等植物受精前、后的卵细胞做了大量的超微结构观察, 获得了一些有关这方面的信息。但通过切片进行超微结构的观察具有很大的局限性, 对合子发

育过程中的一些短暂和关键性的变化很难了解。而且用于观察超微结构的细胞是经过固定的死细胞, 显示细胞生命活动的很多分子生物学实验难以进行。迄今为止, 我们对高等植物合子激活过程还了解很少。在生产应用方面, 传统的育种方法费工费时并受到广泛的受精不亲和的限制。应用细胞工程和基因工程可克服植物间的不亲和问题, 但可育植株的再生仍有许多困难需要克服。近年来, 随着离体受精技术的发展, 已有多种植物的卵细胞和合子

* 通讯作者。E-mail: hqtian@xmu.edu.cn

被分离出来。离体合子培养时仍保留了体内合子胚胎发育的一些特征,这引起了植物学家的很大兴趣,显现出一个新研究领域正在形成的趋势。本文简要介绍目前有关高等植物合子分离及培养研究的新进展,针对当前细胞工程和基因工程中的问题,结合合子培养的特色,就利用合子培养解决这些问题进行了初步探讨。

一、人工合子的产生

应用分离的精、卵细胞在体外将其人工诱导融合产生人工合子是获得合子的方法之一。目前已有多种植物进行了离体受精实验,其中以玉米(*Zea mays*)的离体受精实验最为成功。用电融合方法诱导玉米精、卵细胞融合,20分钟后精细胞核就与卵细胞核接触,45-60分钟时精、卵细胞核开始融合并在105-120分钟时完全融合^[1]。人工合子在培养31-86天形成了小植株。植株移栽后约100天开花并当代结实^[2]。Kovács等也是用电融合的方法诱导了小麦(*Triticum aestivum*)精、卵细胞融合,最好的融合结果是55%的融合率。融合的人工合子培养2天后有60%的合子开始分裂,其中又有88.5%形成了多细胞团结构。他们还进行了卵细胞培养的尝试,但卵细胞无论是否先用交流电场处理或电激处理都不分裂^[3]。烟草离体受精研究也有报道,Tian和Russell用PEG方法融合了烟草(*Nicotiana tabacum*)精、卵细胞并探索了人工合子的培养^[4]。Sun等也进行了烟草离体受精的研究,但没有人工合子培养的报道^[5]。

除同种植物的精、卵细胞融合外,Kranz等还进行了异种植物精、卵细胞的融合实验。用玉米卵细胞与蕹苳(*Coix lacryma-jobi*)、高粱(*Sorghum vulgare*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、小麦的精细胞融合实验中,分别得到了78%(21/27)、50%(17/34)、43%(13/30)和23%(9/38)杂种多细胞团的结果。用玉米卵细胞与油菜属(*Brassica*)植物精细胞的融合实验中,杂种合子没有分裂。值得注意的是玉米卵细胞在没有融合的状态下可培养20天仍保持活力,但与油菜属植物的精细胞融合后培养18-42小时内所有的61个融合产物全部死亡,反映出远缘植物间受精的不亲和作用^[6]。

从玉米离体受精研究的报道可以看出:应用人工合子的最大优势就是可对合子形成的最初时期进行体外定点观察。以往,由于高等植物的卵细胞深

藏于胚珠中,很难对高等植物受精前后的卵细胞进行超微结构以外的深入研究。现在,离体受精技术可以使人工合子置于可控制的条件下直接观察合子的生理生化变化。另外,卵细胞和合子的分离使得对这些细胞进行分子生物学研究成为可能。Dresselhaus等用RT-PCR方法从104个离体受精18小时的玉米人工合子中构建了cDNA文库,从中筛选出一种位于细胞内质网中的钙储藏蛋白基因。这种基因在卵细胞受精后表达增强,与细胞分裂密切相关^[7]。最近,他们又从玉米卵细胞和合子的cDNA文库中差异筛选出了50多个离体受精后表达的相关基因,其中包括一个编码真核细胞翻译启动因子的基因。这种高度保守的因子是某些特有mRNA的稳定和翻译所必需的。在代谢活动不高的卵细胞中存储了大量的该基因的转录产物。他们推测这是卵细胞为受精后某些特定mRNA的翻译做准备^[8]。这些分子生物学研究结果对了解高等植物受精机理有很大帮助。

二、体内合子的分离与培养

在卵细胞分离技术的突破和微培养成功的带动下,分离、培养体内受精卵细胞成为研究植物发育新热点之一。Campenot等和Möl等培养了授粉后一天的玉米胚囊,由合子再生出植株^[9,10]。Holm等培养大麦和小麦未受精的卵细胞没有结果,但培养机械分离的大麦合子时,在1ml培养基中培养的40个合子都分裂形成了小细胞团,然而它们在培养8天后都退化了。用具胚胎发生能力的大麦小孢子培养物与合子共培养3-4天,合子形成了球状多细胞团。培养2-3周时,75%的多细胞团发育成胚状体,其中一半最终形成了可育植株。在55个再生植株中,35%的植株完全可育,41%的植株具75%以上的可育性。用大麦小孢子培养物饲养小麦合子获得了一株可育植株^[11]。Leduc等用大麦小孢子培养物饲养玉米合子也获得了正常植株。在最好的结果中有61%的合子发育成胚状体结构。但将玉米合子与玉米小孢子培养物共培养则不成功,因为合子分裂后只生长到100-150 μm 的多细胞团为止^[12]。傅春梅等做了烟草合子的培养并使合子分裂一次^[13]。Kumlehn等对小麦合子培养做了一系列的研究。他们将186个合子转移到预先用2,4-D处理过的小麦子房的胚珠中,有17.2%的合子直接形成了胚并再生出可育植株^[14]。接着他们又将小

麦合子与具胚胎发生能力的大麦小孢子培养物共培养,合子以类似体内发育的方式先形成长形原胚,再分化成胚,最终有 80% - 90% 的胚形成可育植株^[15]。最近,他们采用将合子包埋在固体培养基中,周围放置大麦小孢子培养物的方法对小麦合子的发育过程定点追踪观察。授粉后 5 小时,新分离的小麦合子呈圆形,细胞核位于中间,体积在 $91952 - 147137 \mu\text{m}^3$ 。授粉后 15 小时,合子膨大为 $121793 - 183470 \mu\text{m}^3$ 。然后在分裂前,合子体积减小约 8.2%。授粉后 17 小时,合子分裂。从 2 胞原胚到 32 胞原胚需要 26 小时,平均细胞周期为 6.5 小时。有趣的是合子中原卵细胞核仁体积较大,而受精后新出现的第二、第三核仁较小。新核仁出现 1 小时后,原卵细胞核仁先开始液泡化,逐渐消失,合子开始分裂^[16]。韩红梅等用横断胚珠的方法剥离水稻合子,一般 2 小时可剥离 20 个子房,从中分离出 5 - 8 个合子^[17]。在水稻培养的 56 个合子中,有 31 个(55.4%)发生第一次分裂,其中的 14 个(25%)进一步分裂成多细胞团结构^[18]。Zhang 等用水稻悬浮细胞做饲养物,在籼稻和粳稻的两个品种中,各有 40% 左右的合子形成了多苗结构,再经诱导生根,各再生出约 80 株可育植株^[19]。从上述结果看,与卵细胞相比,合子离体培养时具有很高的分裂能力。由合子分裂形成的细胞团也基本遵循体内胚胎发生途径再生可育植株,这是当前植物组织培养和转基因研究中体细胞所没有的特征,在植物遗传工程研究中具有很大优势。

三、显微注射 DNA 到合子中

将 DNA 显微注射到细胞中是目前转移外源基因的方法之一。在动物中,Brinster 等向老鼠卵细胞中注射外源 DNA 并获得了很高的转化率^[20]。由于合子的数量有限,采用显微注射的方法转入外源基因比较合适。Leduc 等在玉米合子分离、培养成功的基础上尝试了向合子显微注射 DNA 的实验。刚分离的合子注射时易破裂。将合子先培养一段时间等长出细胞壁后再注射就可克服这一困难。在 227 个被注射外源 DNA 的合子中有 8 个(3.5%)在培养 4 天后显示了 GUS 报告基因的表达^[21]。Pónya 等用小麦卵细胞和合子做了外源 DNA 显微注射的实验。他们采用高频交流电场固定细胞的方法使 98 个被注射卵细胞中的 45 个(46%)以及 77 个被注射合子中的 40 个(52%)显示 GFP 和 GUS 基因

的瞬间表达。在不同时期卵细胞中,开花前一天被注射的卵细胞表达率可达 73.91%。但在不同时期被注射的合子中外源基因表达率的差异不是非常显著。他们进一步对卵细胞和合子的 DNA 含量做了测定,设想在细胞的 S 期进行外源 DNA 注射,但因合子数量有限没能成功^[21]。Holm 等将机械分离的大麦合子包埋在琼脂滴中,向其显微注射了一种具水稻肌动-肌球蛋白启动子的 Act1-GusA-nos 的外源基因构件。被注射的合子中有 62% 存活,其中一半多(55%)发育成胚状体并再生植株。用 PCR 筛选显示 21% 的胚状体中有外源 DNA 的整合,但只有两个胚状体显示了 GUS 基因的表达。他们认为外源 DNA 很可能被降解了^[22]。

四、合子培养的应用前景

1. 遗传转化

合子细胞易分裂并按体内胚胎发生途径再生植株且当代可育结实,这在目前的高等植物基因工程中具有明显优势。高等植物基因工程分为两个主要技术操作环节:基因分离、克隆和转移的分子生物学方法和转入外源基因的受体细胞培养的组织培养方法。前一环节一直有所改进,目前已取得很大进展,而后一环节则进展很小,仍沿用 2、30 年前的植物组织培养方法。目前,尽管有人用胚状体作遗传转化受体,但一般仍以愈伤组织或直接以植物体的器官、组织作为转基因工程的受体细胞,转基因后再诱导这些组织长出新的愈伤组织,从中筛选出含有外源基因的被转化细胞。在这一过程中,能够分裂的细胞未必都转入了外源基因,而转入了外源基因的细胞又未必都能分裂。此外,在植物组织培养中,并非所有愈伤组织都能分化成苗。这些问题使植物转基因工作的转化效率大打折扣。另外,在植物组织培养中显示愈伤组织的生长很不稳定,常发生各种染色体变异。因此,经愈伤组织培养诱导成苗的周期长、后代不稳定、个体之间差异大是组织培养中的常见现象。合子细胞易分裂并以胚胎发生途径再生植株,这正好弥补了愈伤组织培养中的缺陷。以合子细胞作为转基因研究的受体细胞,虽然数量有限,但效率将明显增加,而且使转基因研究的后期工作大大简化。

2. 生物安全

应用合子细胞作为转基因研究中的受体细胞还可能有其潜在的价值:排除应用抗菌素基因作为筛

选基因的可能。因为合子培养的上述特征,使转基因的效率大大增加,如用显微注射外源基因可确保每个细胞中都转入了所需要的外源基因片段。这就有可能避免用抗菌素基因作为与外源基因相连的筛选基因^[22]。这将对目前植物转基因工程中的生物安全性争论产生一定的影响。

3. 远缘杂交

异种植物离体受精的人工杂种合子培养是进行远缘杂交的新尝试。以目前的细胞融合技术已可进行任何植物之间的细胞融合实验了,但目前的体细胞杂交工作反而处于研究低谷状态,主要原因就在于杂种细胞的培养困难重重。大多数体细胞杂种的双亲都处于二倍体状态,融合后的杂种细胞内部很难在短时间内达到一种生理上的一致状态,具体的表现就是在亲缘关系较远的体细胞杂交中常出现一方亲本染色体被排除的现象。因此,在体细胞杂交中往往存在着杂种细胞不分裂,杂种愈伤组织不分化,后代长期不稳定等诸多问题。即使在双亲亲缘关系较近的体细胞杂交中,杂种细胞能够发育为具双亲染色体的完全杂种植株,它也面临着使双二倍体的杂种染色体减半为二倍体的问题。培养人工杂种合子则正好在上述的这些问题上显示出优势:精细胞所含细胞质很少,从细胞质含量上看,杂种合子中绝大部分的细胞质来源于卵细胞,至少在早期双亲细胞质的矛盾可能不大。根据玉米卵细胞与小麦、大麦、高粱、蕈苡精细胞融合的杂种合子能以很高频率分裂的事实以及精细胞基因组早期暂时不活动的结果,人工杂种合子与体细胞杂种细胞还是有差异的。另外,人工杂种合子的培养也不存在使杂种个体染色体减半的问题。杂种合子如此高的分裂比例使属间和种间异种植物的离体受精实验成为开展远缘杂交实验的潜在有效方法。当然,人工杂种合子的培养并没有克服亲缘关系越远杂种越难产生的困难,在开展人工杂种合子培养之前还是应考虑选择适当亲缘关系的双亲,为杂种合子的后期培养尽量减少困难。

五、合子激活机理的研究

合子的激活一直是高等植物发育生物学中最吸引人的研究领域之一。Faure等在5mmol/L CaCl₂、pH6-6.5的条件下,使79.7%的玉米精、卵细胞相黏约4min后融合。精、卵细胞的融合过程不到10s,而精细胞与中央细胞的融合则不到1s^[23]。与

电诱导融合和PEG诱导融合相比,这是目前在最小人为因素条件下诱导高等植物精、卵细胞融合的实验结果。Digonnet等用同样方法在融合液中加入钙离子荧光探针Fluo-3-AM观察玉米人工合子中游离钙的变化动态。在用Fluo-3-AM预处理的未受精卵细胞中,细胞核周围的细胞质中显示含有一定的钙荧光,而用Fluo-3-AM预处理的精细胞中则没有显示游离钙的荧光。当卵细胞黏附了精细胞后,其游离钙含量无变化。精、卵细胞相黏30s-2min后,融合开始。首先显示的是卵细胞中的钙荧光扩散到精子细胞质中并持续约10s直到精子细胞质完全溶入卵细胞中。精细胞进入卵细胞后,卵细胞核周围的游离钙增加并在85s达到最高,持续约2min后,游离钙的含量开始下降。到融合后29min时,受精卵中的游离钙恢复到原卵细胞中的水平。约有20%的精卵细胞对未发生融合,卵细胞中显示游离钙的荧光强度不变,证明受精卵中游离钙含量的变化是精、卵细胞的融合引起的^[24]。Antoine等进一步用钙特异振动探针测定了精、卵细胞融合前后外源钙流入受精卵的速度,发现融合前外源钙基本不向卵细胞中流入。然而配子融合后 1.8 ± 0.6 s时细胞外的钙在融合位点开始向受精卵中流入,并以 $1.13 \mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$ 的速度向整个卵细胞表面扩散。外源钙向受精卵中流入的平均强度是 $14.92 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ 。融合后的受精卵很快开始合成细胞壁,并有一个收缩过程。如果融合后8min时加入钙离子通道阻塞剂GdCl₃(氯化钆)可使收缩的受精卵恢复原状,暗示卵细胞受精后的收缩与外源钙的流入有关。另外,他们在融合前的卵细胞溶液中加入钙离子载体A23187以促进细胞外的钙进入卵细胞中,结果卵细胞也合成细胞壁,表明是外源钙的流入引起卵细胞的细胞壁合成。他们提出了一种假设:配子膜的融合启动了外源钙向受精卵中的流动,同时也激活了细胞中肌动-肌球蛋白的活性,导致了细胞的收缩。而细胞的收缩反过来又开通了更多被激活的钙离子通道,从而启动了合子的激活过程^[25]。这是高等植物受精机理研究中有关合子激活的第1篇报道^[26]。

合子是个体发育的起点,体内合子通过胚胎发生过程形成胚。上述结果显示玉米离体受精的人工合子和玉米、小麦体内合子的离体培养倾向按胚胎发生途径形成可育植株的特征,表明在合子中已有控制胚胎发生的机制。玉米离体受精实验表明卵细胞的发育需要精细胞的刺激。在游离钙与合子激活

的研究中,只有精细胞进入卵细胞才引起受精卵中的游离钙增加,接着受精卵才开始合成细胞壁,启动合子的发育。从逻辑上和上述实验结果可以肯定精细胞在激活合子过程中起着关键性的作用。然而在玉米离体受精的合子中,精细胞核的染色质与卵细胞核的染色质似乎处于不同状态,前者呈现出更浓集的状态^[27]。Kumlehn 等在小麦合子培养中也发现:合子中第二核仁的出现是卵细胞受精成功的标准,当新核仁出现 1 小时后,来自卵细胞核的大核仁开始液泡化,这是合子核准备分裂的前兆^[18]。他们的结果表明在合子中来自父母双亲的核仁不但在大小上有差异,在出现的时间上也有差异。最近,有些实验显示受精后促使合子发育的主要因素来源于卵细胞的母性基因活动。虽然受精使父、母双亲的遗传物质在合子中各占一半,但通过精细胞带来的父性基因在合子中则处于一种不表达的休眠状态,因而胚的早期发育主要受由卵细胞而来的母性基因控制^[28-30]。上述这些结果似乎相互矛盾:一方面卵细胞需要精细胞的刺激才能进一步发育,另一方面合子中的精细胞基因又处于不活动状态。这可能正是高等植物受精与合子早期发育的特征,来自雌雄双亲的基因组在严格的时空调控下的活动使合子分裂按胚胎发生途径形成胚。

六、结束语

高等植物的合子是雌雄配子结合的产物,是孢子体发育的第一个细胞。体内合子的生物学功能就是分裂形成胚,进而长成新个体。以前,因高等植物卵细胞和合子位于层层体细胞组织的包围之中,难以深入研究合子的发育机理。现在卵细胞与合子的分离已在多种植物中获得成功,为研究和利用高等植物的合子开创了良好的开端。受精过程中有关游离钙在卵细胞中的动态变化研究就是一个标志性结果。当然,目前分离出的合子数量有限、分离出合子的植物还太少,主要的研究工作集中在禾本科的玉米、小麦、大麦等单子叶植物中;且合子的分离和培养需要研究者具有娴熟的实验技能。为了研究高等植物合子发育的普遍机理并充分利用高等植物合子发育的特性,需要在更多植物中分离出合子并进行培养,尤其是在双子叶植物中加强这方面的工作。可以设想:当更多高等植物卵细胞和合子的分离与

培养获得成功时,发育生物学的最初阶段研究和用合子为转基因受体的高等植物的遗传转化研究将进入一个新阶段。

参 考 文 献

- [1] Kranz E. et al. , 1991, *Sex Plant Reprod*, **4**:12-16.
- [2] Kranz E. et al. , 1993, *Plant Cell*, **5**:739-746.
- [3] Kovács M et al. , 1995, *Plant Cell Reports*, **15**: 178-180.
- [4] Tian H. Q. et al. , 1997, *Plant Cell Reports*, **16**:657-661.
- [5] Sun M. X. et al. , 2000, *Sex Plant Reprod*, **12**:267-375.
- [6] Kranz E. et al. , 1995, *Plant J.* **8**:9-23.
- [7] Dresselhaus T. et al. , 1996, *Plant Mol Biol*, **31**:23-34.
- [8] Dresselhaus T. et al. , 1999, *Plant Mol Biol*, **39**:1063-1071.
- [9] Campenot M. K. et al. , 1992, *Am J Bot*, **79**:1368-1373.
- [10] Mól R. et al. , 1993, *Planta*, **189**:213-317.
- [11] Holm P. B. et al. , 1994, *Plant Cell*, **6**:531-543.
- [12] Leduc N. et al. , 1996, *Del Biol*, **177**:190-203.
- [13] 傅春梅等, 1996, *植物学报*, **38**:262-267.
- [14] Kumlehn J. et al. , 1997, *Plant J*, **12**:1473-1479.
- [15] Kumlehn J. et al. , 1998, *Planta*, **205**:327-333.
- [16] Kumlehn J. et al. , 1999, *Protoplasma*, **208**:156-162.
- [17] 韩红梅等, 1998, *植物学报*, **40**:186-188.
- [18] Zhao J. et al. , 2000, *Plant Cell Reports*, **19**:321-326.
- [19] Zhang J. et al. , 1999, *Plant Cell Reports*, **19**:128-132.
- [20] Brinster R. L. et al. , 1985, *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**:4438-4442.
- [21] Pónya Z. et al. , 1999, *Protoplasma*, **208**:163-172.
- [22] Holm P. B. et al. , 2000, *Transgenic Res*, **9**:21-32.
- [23] Faure J-E. et al. , 1994, *Science*, **263**:1598-1600.
- [24] Digonnet C. et al. , 1997, *Development*, **124**:2867-2874.
- [25] Antoine A. F. et al. , 2000, *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**:10643-10648.
- [26] Antoine A. F. et al. , 2001, *Sex Plant Reprod*, **14**:21-26.
- [27] Tirlapur U. K. et al. , 1995, *Zygote*, **3**:57-64.
- [28] Vielle-Calzada J. P. et al. , 2000, *Nature*, **404**:91-94.
- [29] Vielle-Calzada J. P. et al. , 1999, *Genes Dev*, **13**:2971-2982.
- [30] Evans M. M. S. et al. , 2001, *Genetics*, **159**:303-315.