网络出版时间:2025-10-31 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.04.014

不同育性枸杞小孢子减数分裂过程及其结构特征差异分析

杨小惠,周婷,魏雅茹,梁文裕,杨淑娟
(宁夏大学 生命科学学院,西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室,宁夏 银川 750021)

[摘 要] 【目的】系统比较可育系‘宁杞1号’和不育系‘宁杞5号’花药形态与小孢子发育的对应关系,明确枸杞小孢子败育的关键时期,并揭示两者超微结构的差异特征,为阐明宁夏枸杞雄性不育的分子调控机制提供理论依据。【方法】以宁夏枸杞可育系‘宁杞1号’和不育系‘宁杞5号’不同发育阶段的花蕾为试材,对小孢子发育过程进行表型观测和对比分析,并采用压片法和透射电镜技术对花粉母细胞减数分裂过程及小孢子败育结构特征进行观察。【结果】两种枸杞花粉母细胞减数分裂过程中染色体行为正常,均可形成正常的四分体。‘宁杞1号’形成的四分体继续发育,最后形成充满淀粉粒和脂滴的可育花粉粒;‘宁杞5号’四分小孢子在胼胝质中逐渐收缩、变形、解体,且超微结构显示‘宁杞5号’小孢子在胼胝质中形成初生花粉外壁,但靠近细胞壁的细胞质逐渐液泡化,细胞核凝集,最终完全解体消失。另外‘宁杞5号’绒毡层细胞的细胞壁还出现异常加厚现象,这也是其细胞程序性死亡异常的一个重要特征。【结论】不育花药败育时期发生在四分体时期,小孢子外的胼胝质不降解是败育的直接原因。推测由于绒毡层细胞发育异常,胼胝质酶缺乏或酶活性不足导致四分小孢子不能游离,最终引起雄性不育。

[关键词] 宁夏枸杞;雄性不育;小孢子发育;减数分裂
[中图分类号] S567.19 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)04-0123-10

Analysis of the differences in meiosis process and structural characteristics *Lycium barbarum* L. microspore with different fertility levels

YANG Xiaohui, ZHOU Ting, WEI Yaru, LIANG Wenyu, YANG Shujuan
(*College of Life Sciences, Ningxia University, Key Laboratory of Conservation and Utilization of Special Biological Resources in Western China, Ministry of Education, Yinchuan, Ningxia* 750021, *China*)

Abstract: 【Objective】 The study aims to systematically compare the correlation between anther morphology and microspore development in the fertile line ‘Ningqi 1’ and the male sterile line ‘Ningqi 5’, identify the critical stage of microspore abortion, and reveal the differences in ultrastructure between the two lines, thereby providing a theoretical basis for clarifying the molecular regulatory mechanism of male sterility in *L. barbarum* L.. 【Method】 Flower buds at different developmental stages of the fertile line ‘Ningqi 1’ and the sterile line ‘Ningqi 5’ were used as experimental materials. Phenotypic observations and comparative analyses of microspore development were performed. The meiotic process of pollen mother cells and the structural characteristics of microspore abortion were analyzed using the squash methods and transmission electron microscopy. 【Result】

[收稿日期] 2025-02-24 [修回日期] 2025-04-14
[基金项目] 宁夏自然科学基金项目“DYT1对宁夏枸杞花药绒毡层及花粉发育的调控机制研究”(2024AAC03106);国家自然科学基金项目“雄性不育枸杞绒毡层细胞对育性影响机制的研究”(32060077)
[作者简介] 杨小惠(1997—),女,甘肃庆阳人,在读硕士,主要从事植物生殖生物学研究。E-mail:15209512293@163.com
[通信作者] 杨淑娟(1979—),女(回族),宁夏吴忠人,教授,博士,硕士生导师,主要从事植物生殖生物学研究。E-mail:nxyang11@126.com

中国知网 https://www.cnki.net

During the meiosis in pollen mother cells of both lines, chromosome behavior was normal, yielding normal tetrads. Tetrads in 'Ningqi 1' developed into fertile pollen grains filled with starch granules and lipid droplets. In contrast, microspores in 'Ningqi 5' underwent progressive shrinkage, deformation, and disintegration within the callose. Ultrastructural analysis revealed that microspores in 'Ningqi 5' could form a primary pollen exine within the callose, but the cytoplasm adjacent to the cell wall gradually vacuolated, the nuclei condensed, and eventually the microspores completely disintegrated, leading to pollen abortion. Additionally, the cell walls of the tapetum cells in 'Ningqi 5' exhibited abnormal thickening, which indicated abnormal programmed cell death.【Conclusion】Anther abortion in sterile lines occurs at the tetrad stage, and the failure of callose degradation around microspores is the direct cause of abortion. It is speculated that abnormal development of tapetum cells results in callase deficiency or insufficient enzyme activity, thereby preventing the release of tetrad microspores and ultimately causing male sterility.

Key words: *Lycium barbarum* L.; male sterility; microspore development; meiosis

植物发育过程中由于遗传、生理或环境因素导致发育异常,无法产生有功能花粉的现象称为雄性不育(male sterility,MS),其在开花植物中较为常见。雄性不育种质是杂交育种及亲本选配的重要资源,被广泛用于杂交作物(如水稻和玉米)育种[1]。前人已从细胞结构特征、生理生化特性和基因调控等方面对植物雄性不育花药进行了大量研究,并在禾本科、茄科及十字花科等多种作物中取得一系列进展,阐明了雄性不育的发生时期、细胞学特征及基因对雄性不育的调控机制[2-4]。花粉发育是一个多步骤的复杂过程,从孢原细胞分化开始,历经小孢子母细胞减数分裂、花粉壁形成、绒毡层适时退化,直至花药正常开裂释放出花粉粒[5]。花药败育涉及一系列细胞结构、生理生化变化过程及众多基因的调控,败育机制非常复杂。基因的表达亦存在时空特异性,任何一个基因的结构或表达异常都可能引起花粉发育异常。花粉败育与绒毡层细胞程序性死亡、胼胝质沉积、物质及能量代谢等因素密切相关,尤其绒毡层细胞,为小孢子发育和花粉粒形成提供各种酶及多种营养物质,其程序性死亡与四分体胼胝质壁解体、小孢子中物质合成及能量代谢密切相关,直接影响花粉正常发育[6]。

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)是茄科枸杞属多年生落叶灌木,也是我国北方重要的经济植物。宁夏枸杞果实富含多糖、黄酮类和类胡萝卜素等多种有益健康的营养成分,是中国著名的药食同源植物,目前人工种植技术已较为成熟[7-8]。然而宁夏枸杞现有品种的产量和品质还不能满足栽培要求,所以鉴别并创制有价值的种质资源对新品种的培育十分重要。目前仅有'宁杞5号'一个枸杞雄性不育系,其雄蕊败育彻底,雌蕊正常。以'宁杞5号'为母本进行杂交,已成功培育出多个新品种。因此,对该材料的研究和利用对创制枸杞优良雄性不育系及加速枸杞育种工作具有重要意义。前期研究已有'宁杞5号'花药败育显微结构特征的一些报道,其异常表现在细胞结构异常收缩、四分小孢子不分开、药腔空泡化等[9-10],但小孢子败育的超微结构尚不清楚。为进一步深入研究该雄性不育花药的详细败育过程,明确其败育时期,本研究采用压片法和透射电镜技术,观察分析败育过程中小孢子及绒毡层细胞的发育动态及超微结构特征,揭示该不育花粉的细胞学败育机制,为枸杞的杂交育种和杂交优势利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为宁夏枸杞研究所提供的可育株'宁杞1号'和不育株'宁杞5号',取不同发育时期的新鲜花蕾进行试验。

1.2 试验方法

1.2.1 花器官外观形态观察与指标测定 在宁夏枸杞盛花期的晴天上午08:00—10:00,从生长状态良好、长势一致的植株上收集不同大小的新鲜花蕾,按花蕾大小分装并置于冰盒中带回。使用游标卡尺测量花蕾的长度和宽度,记录其外部形态特征。每个发育阶段分别选取3~5个花蕾进行观察和测量。

1.2.2 压片法对比观察 按照花蕾体积从小到大的顺序依次采集'宁杞1号'和'宁杞5号'花蕾,进行对比、测量及观察。剥开花药后,采用压片法制备临时装片,分别用I_2-KI法观测'宁杞1号'和'宁杞5号'花药的育性;用醋酸洋红染色,观察不同发

中国知网 https://www.cnki.net

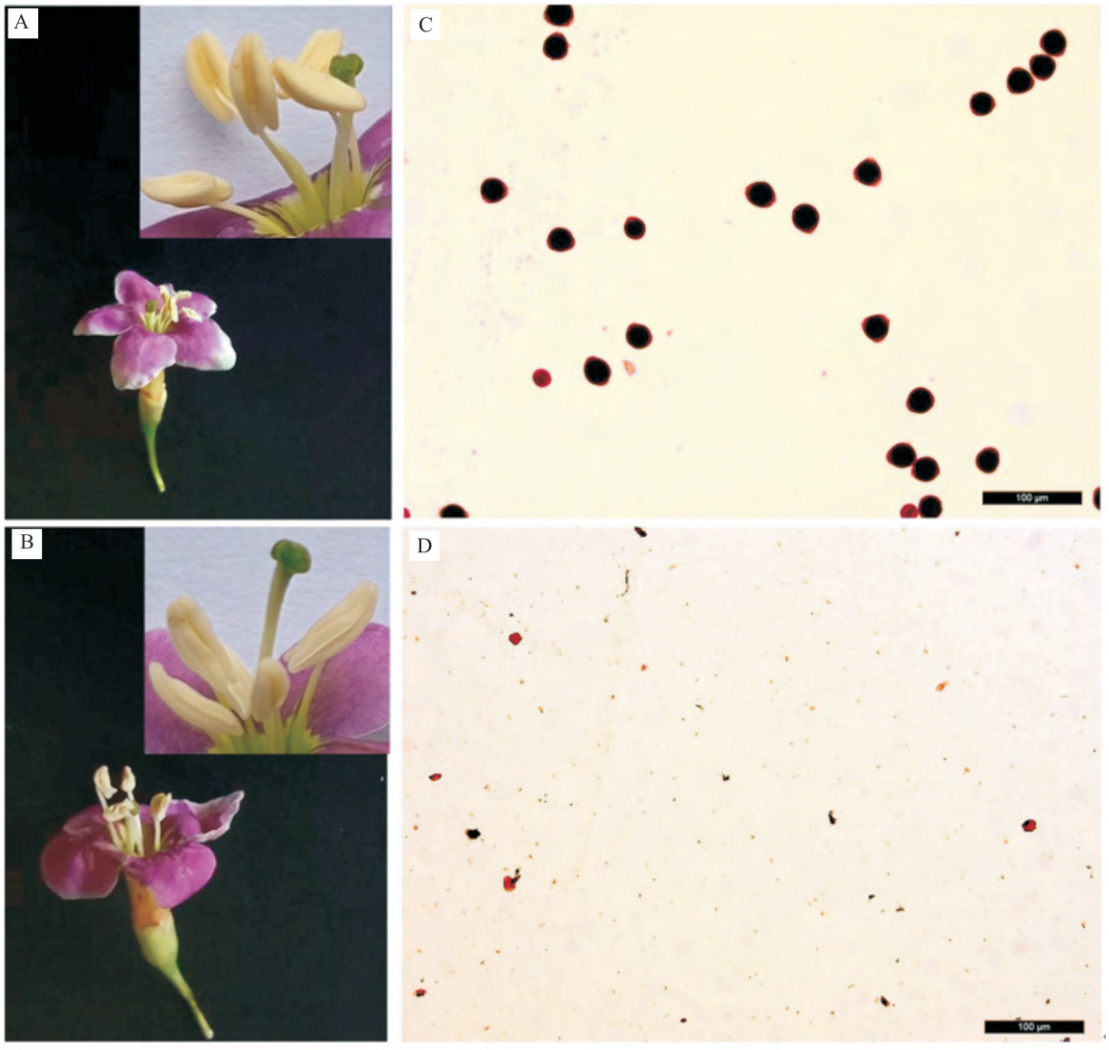
育阶段小孢子的细胞学特征，确定花粉内部发育时期与外部形态大小的对应关系。

1.2.3　*半薄切片制备及超微结构对比研究*　根据压片法结果，选取‘宁杞1号’和‘宁杞5号’不同发育时期的花蕾，快速剥开花蕾并取出花药。将花药置于含体积分数2.5%戊二醛和50 mmol/L磷酸缓冲液（pH 7.0）的前固定液中室温固定5 h；随后用50 mmol/L磷酸缓冲液（pH 7.0）清洗3次，每次30 min；再转至含1%锇酸和50 mmol/L磷酸缓冲液（pH 7.0）的后固定液中，4 ℃冰箱过夜，次日用50 mmol/L磷酸缓冲液洗涤3次，每次30 min。经梯度系列丙酮脱水后，用Epon 812树脂包埋，制备花药树脂包埋块。使用Leica UC7超薄切片机将树脂块切成厚度70～90 nm的超薄切片，用铜网捞片。附有切片的铜网用柠檬酸铅染色8～10 min，干燥后在Hitachi HT7800透射电子显微镜下观察并拍照。

2　结果与分析

2.1　两种枸杞花部表型比较

宁夏枸杞花冠由5片花瓣组成，花瓣为紫色，每1朵花由1个雌蕊和5个雄蕊构成，‘宁杞5号’花的各个组成部分略大于‘宁杞1号’（图1）。



A、C.‘宁杞1号’花蕾和花粉粒；B、D.‘宁杞5号’花蕾和花粉粒。标尺＝100 μm。

A abd C. Flower bud and pollen grain of ‘Ningqi 1’; B and D. Flower bud and pollen grain of ‘Ningqi 5’. Scale bar＝100 μm.

图1　‘宁杞1号’和‘宁杞5号’植株花药的I_2-KI染色结果

Fig. 1　I_2-KI staining of anthers in ‘Ningqi 1’ and ‘Ningqi 5’ plants

‘宁杞5号’花柱较长，柱头明显高于雄蕊，不利于授粉，而‘宁杞1号’柱头位于花药下方，便于授粉。开花后‘宁杞1号’花药饱满，呈黄色，富含成熟花粉粒，用手碾碎后有花粉逸出，经I_2-KI染色显示花粉育性较

中国知网　https://www.cnki.net

高(图1-A,C);而'宁杞5号'花药为淡白色,较干瘪,无花粉溢出,经I_2-KI染色显示花粉为中空,无染色(图1-B,D)。

进一步采集'宁杞1号'和'宁杞5号'的花蕾及花朵,按从小到大的顺序进行排序、测量,通过压片法确定两种材料小孢子各发育阶段的内部发育时期与外部花蕾形态的对应关系,结果(表1)显示,'宁杞5号'同一发育时期的花蕾比'宁杞1号'更大一些。

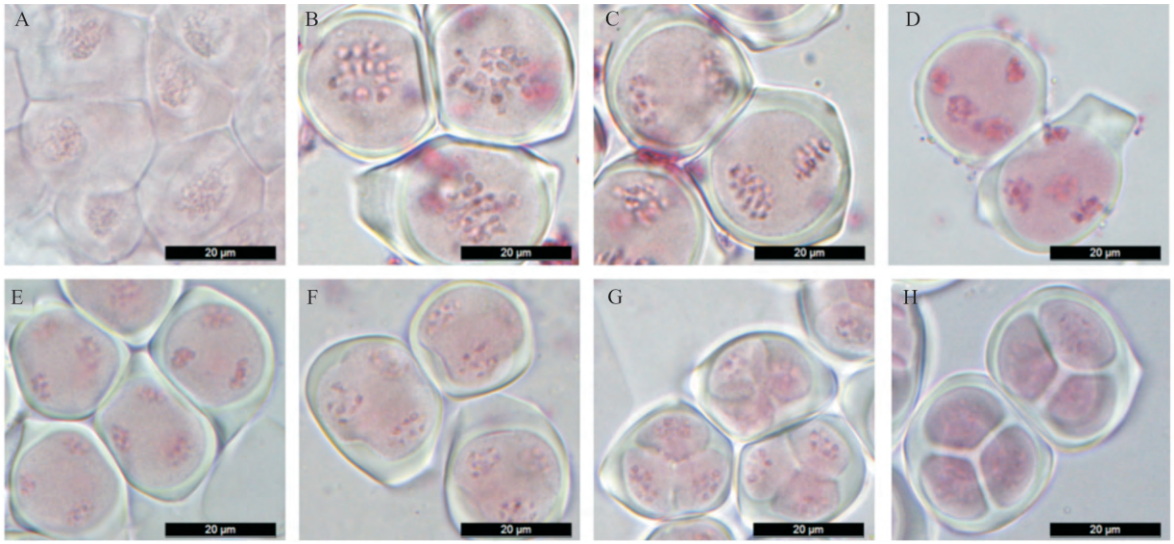
表1 '宁杞1号'和'宁杞5号'小孢子发育时期与花蕾形态特征的对应关系

Table 1 Correspondence between the microspore developmental stages and the flower bud morphological characteristics of 'Ningqi 1' and 'Ningqi 5'

小孢子发育阶段 Microspore developmental stage	花蕾长/mm Flower bud length		花蕾宽/mm Flower bud width	
	宁杞1号 Ningqi 1	宁杞5号 Ningqi 5	宁杞1号 Ningqi 1	宁杞5号 Ningqi 5
小孢子母细胞 Microspore mother cell	3.02～3.21	3.21～3.30	1.47～1.78	1.67～1.80
四分体时期 Tetrad stage	4.21～4.55	5.12～5.26	2.17～2.26	2.16～2.36
单核期 Uninucleate stage	4.57～4.67	6.51～6.62	2.27～2.33	2.48～2.57
大液泡时期 Vacuole stage	4.87～5.87	8.37～8.65	2.62～2.89	2.97～3.27
成熟期 Maturation stage	6.95～7.21	10.57～10.80	2.91～3.02	3.20～3.37

2.2 枸杞花粉母细胞减数分裂动态观察

减数分裂过程是花粉发育的关键过程,与植物雄性不育密切相关。本研究根据花药发育时期与外部形态的对应关系,分别对'宁杞1号'和'宁杞5号'母细胞时期的花药进行压片,经醋酸洋红染色后详细观察花粉母细胞减数分裂过程,结果见图2。



A. 花粉母细胞;B. 前期Ⅰ(终变期);C、D. 末期Ⅰ;E. 前期Ⅱ;F. 中期Ⅱ;G. 后期Ⅱ;H. 末期Ⅱ。标尺=20 μm。

A. Pollen mother cell; B. Prophase I (Pachytene); C and D. Anaphase I; E. Prophase Ⅱ; F. Metaphase Ⅱ; G. Anaphase Ⅱ; H. Telophase Ⅱ. Scale bar=20 μm.

图2 宁夏枸杞花粉母细胞减数分裂过程

Fig. 2 Meiotic process of pollen mother cells of *Lycium barbarum* L. in Ningxia

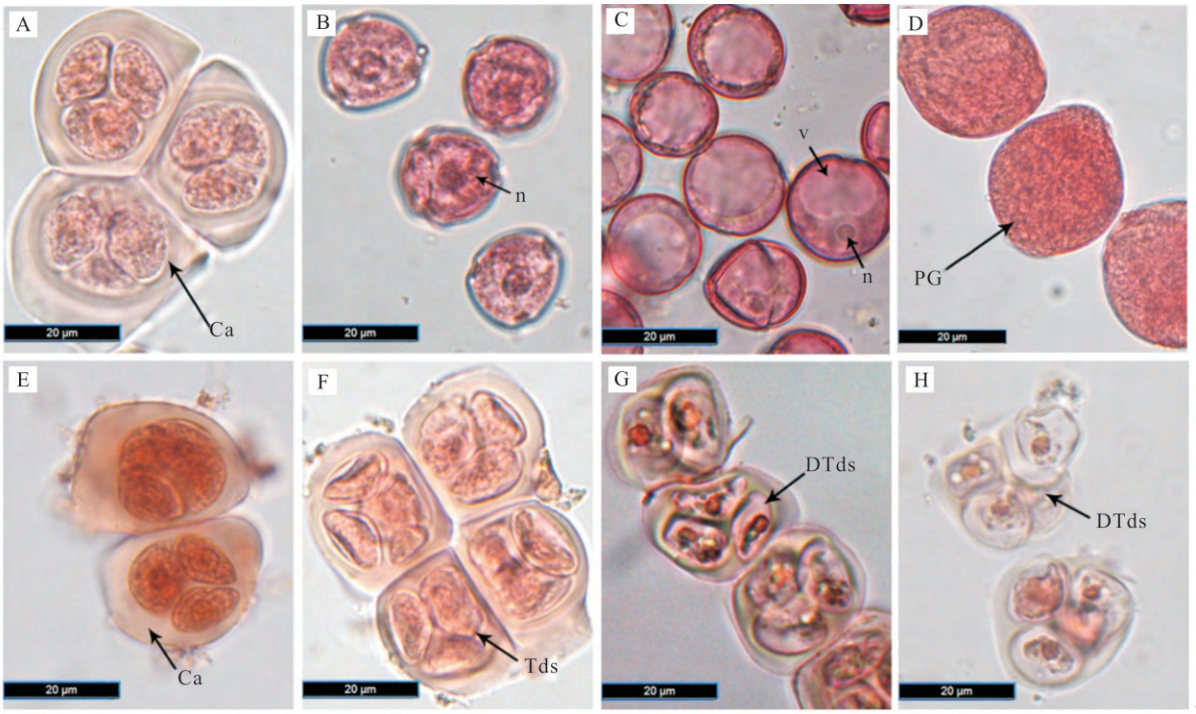
由图2可以看出,两种枸杞花粉母细胞的减数分裂过程一致,均可形成四分体。花粉母细胞的染色体被染成红色且着色较深,细胞质着色较浅或基本不着色。从减数分裂前期Ⅰ开始,细胞核逐渐消失,核仁解体,染色体逐渐螺旋化并缩短变粗至终变期(图2-B),此时染色体进行同源染色体联会。在减数第一次分裂后期,同源染色体联会和交叉互换,并在纺锤丝的牵引下分开,分别移向细胞两极(图2-C～D)。到达两极后,染色体缩短,直接进入减数分裂前期Ⅱ(图2-E);着丝粒完成复制并分开,姐妹染色单体从着丝粒处分裂为二,在纺锤丝的作用下分别移向细胞的4个角(图2-F～G)。到达两极的染色体解螺旋,浓缩成团,胞质分裂,1个母细胞最终分裂成4个子细胞,进入四分体时期(图2-

中国知网 https://www.cnki.net

H）。整个减数分裂过程中，宁夏枸杞花粉母细胞均被透明的胼胝质包围，胞质分裂属于同时型，最终形成正四面体型四分体（图 2-H）。

2.3　枸杞小孢子显微及超微结构特征

2.3.1　*四分体时期*　通过大量压片观察发现，‘宁杞 1 号’和‘宁杞 5 号’花粉母细胞均可形成无明显形态差别的四分体，小孢子多以四面体形排列，具有厚薄不均的胼胝质壁，细胞核较大且位于中央（图 3-A、E）。



A～D 为‘宁杞 1 号’可育花粉发育特征：A. 四分体时期；B. 单核时期；C. 大液泡时期；D. 成熟花粉粒时期。
E～H 为‘宁杞 5 号’不育花粉的败育过程：E. 不育四分体前期；F. 四分体中期；G. 四分体后期；H. 四分体末期。
DTds. 退化的四分体；v. 液泡；n. 细胞核；Tds. 四分体；Ca. 胼胝质壁；PG. 花粉粒。标尺＝20 μm。
A－D show the fertile pollen development characteristics of ‘Ningqi 1’: A. Tetrad stage; B. Uninucleate stage; C. Vacuole stage; D. Mature pollen grain stage. E－H show the abortion process of male sterility in ‘Ningqi 5’: E. Sterile tetrad prophase; F. Tetrad metaphase; G. Tetrad anaphase; H. Tetrad telophase abbreviations. DTds. Degenerating tetrads; v. Vacuole; n. Nucleus; Tds. Tetrad; Ca. Callose wall; PG. Pollen grain. Scale bar＝20 μm.

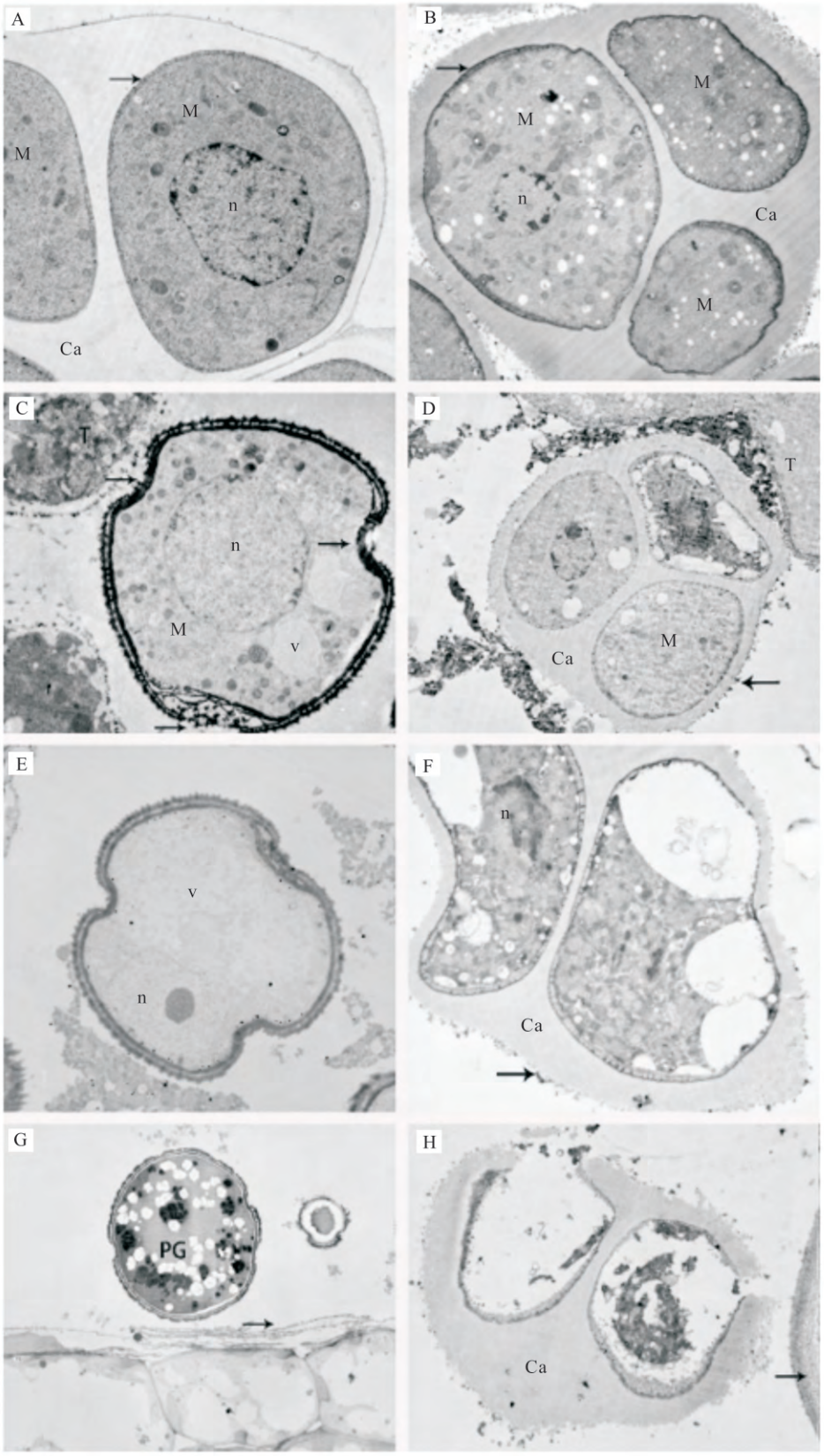
图 3　‘宁杞 1 号’和‘宁杞 5 号’小孢子发育显微结构

Fig. 3　Microstructures of microspore development of ‘Ningqi 1’and ‘Ningqi 5’

超微结构观察结果显示，‘宁杞 1 号’小孢子外形饱满，核体积较大，细胞质浓厚，含有较多线粒体和内质网，显示出旺盛的细胞代谢，为花粉外壁的合成提供物质和能量。小孢子已形成初生花粉外壁，表明胼胝质不仅临时保护小孢子、限制其膨大，还为花粉外壁发育提供结构支撑，参与花粉壁的模式形成（图 4-A）。‘宁杞 5 号’四分体外的胼胝质致密，小孢子也形成了初生花粉外壁，但大小差异较大，部分外形不规则；细胞质中除了大量线粒体外，还出现了一些小液泡（图 4-B）。

2.3.2　*单核时期*　四分体胼胝质壁是一种临时性结构，发育到一定时期四分体胼胝质壁即在胼胝质酶的作用下分解消失，释放出小孢子。‘宁杞 1 号’刚从四分体中释放的小孢子体积较小，外形呈圆形，细胞核大而明显，并位于细胞中央，可见 3 个凹陷的萌发孔（图 3-B），小孢子不断分化并从解体的绒毡层细胞吸取营养，体积变大（图 4-B）。与此时期对应的‘宁杞 5 号’花药四分体外胼胝质未发生降解，小孢子形态明显不规则（图 3-F）。超微结构观察结果显示，‘宁杞 1 号’单核小孢子细胞质浓，含有较多细胞器，并分化出液泡；花粉外壁变厚，形成完整的覆盖层、基柱层和基足层，萌发孔处的花粉外壁覆盖层完全缺失或退化，其中两个萌发孔处的外壁内层略有增厚，另一个有径向排列的小管分布其中，易于接受来自绒毡层的各种分泌物质；此时期绒毡层细胞电子密度增大并进一步降解，细胞壁较薄、不完整，局部发生降解（图 4-C）。

中国知网　https://www.cnki.net



A、C、E和G为‘宁杞1号’:A.四分体时期,×12 500;C.单核时期,×4 000;E.大液泡时期,×3 150;G.成熟时期,×1 600。B、D、F和H为‘宁杞5号’:B.四分体前期,×3 150;D.四分体中期,×4 000;F.四分体后期,×8 000;H.四分体末期,×8 000。T.绒毡层;M.小孢子;n.细胞核;v.液泡;Ca.胼胝质壁;PG.花粉粒。
A,C,E and G are ‘Ningqi 1’:A.Tetrad stage,×12 500; C.Uninucleate stage,×4 000; E.Vacuole stage,×3 150; G.Maturation stage,×1 600.B,D,F and H are ‘Ningqi 5’:B.Uninucleate stage,×3 150; D.Mid-tetrad stage,×4 000; F.Tetrad late stage,×8 000; H.Tetrad terminal stage,×8 000. T.Tapetum;M.Microspore; n.Nucleus;v.Vacuole; Ca.Callose wall;PG.Pollen grain.

图4 ‘宁杞1号’和‘宁杞5号’小孢子发育超微结构
Fig. 4 Ultrastructure of microspore development in ‘Ningqi 1’and ‘Ningqi 5’

‘宁杞5号’四分体外仍有致密的胼胝质壁,并在外方有呈绒毛状沉积物分布;各个小孢子细胞质出现不同程度的液泡化现象,其中有2个小孢子细胞质中仍含有较多线粒体,但另一个小孢子皱缩、

中国知网 https://www.cnki.net

体积较小，细胞核变形凝聚，胞质凝集，内含物浓缩致密。靠近细胞壁的细胞质完全空泡化，呈一圈分布，出现了明显退化解体特征；绒毡层细胞壁则较厚，其中含有大量前乌氏体（图 4-D）。

2.3.3　*单核靠边期*　随着花药发育‘宁杞 1 号’小孢子中的液泡逐渐汇集，最后形成一个透亮的大液泡，细胞体积变大，细胞核从中央向细胞壁一侧靠近，核仁明显（图 3-C）。与可育花粉相对应时期的‘宁杞 5 号’，其 4 个小孢子仍保留在透亮的胼胝质壁，呈四分体状态；细胞质没有进一步发育形成中央大液泡，而是进一步退化、空瘪，只剩少量内含物，各个小孢子出现不同程度解体（图 3-G）。超微结构观察显示，‘宁杞 1 号’小孢子由于形成了大液泡而显得细胞质电子密度低，花粉外壁物质孢粉素等不断沉积加厚，细胞核及核仁明显，紧贴花粉壁，周围分布绒毡层细胞解体后释放的物质（图 4-E）。在‘宁杞 5 号’中，作为临时细胞功能结构成分的胼胝质壁仍未降解，4 个小孢子仍以四分体状态存在，并且仍在边缘沉积了大量未知成分的黑色物质，很明显胼胝质成为一道物理屏障阻碍了单核花粉粒互相分离及物质的进出；败育的小孢子细胞核明显变形，细胞质收缩，电子密度增高，初生花粉外壁未继续发育成完整的花粉外壁，花粉壁周围的小泡汇合成几个大泡（图 4-F）。

2.3.4　*成熟花粉期*　枸杞花粉的可育花药发育到成熟花药时期，花粉粒中的大液泡消失，细胞质中形成并积累大量不同种类的营养物质。‘宁杞 1 号’的成熟花粉粒呈圆形，内部充满营养物质，不易观察到细胞核，此时花粉体积较单核靠边期显著增大（图 3-D）。超微结构观察显示，‘宁杞 1 号’成熟花粉粒内部积累了大量淀粉粒（白色）和脂滴（黑色）；由孢粉素构成的花粉外壁表面常有复杂的纹饰，有助于花粉的识别和附着。外壁内侧形成了一层颜色较浅的花粉内壁层，较外壁薄，由纤维素和果胶等物质构成；此时期绒毡层细胞结构消失，只剩一层膜结构（图 4-G）。与‘宁杞 1 号’成熟花药时期相对应的‘宁杞 5 号’四分孢子周围仍有透明状胼胝质壁，有些小孢子内部已完全解体透亮，只剩一个明显的细胞核，呈现完全败育（图 3-H）。‘宁杞 5 号’超微结构和显微结构一致，小孢子变形，胼胝质明显可见，内部只剩少许凝缩的细胞质或几乎完全解体，只留小孢子空壳，呈完全败育，此时可见周围绒毡层细胞加厚的细胞壁（图 4-H）。

3　讨　论

3.1　不育枸杞‘宁杞 5 号’小孢子败育结构特征及原因分析

花粉发育是一个复杂的过程，小孢子败育形成的时期和原因依植物不同而异，甚至同一种植物发生败育的时期也有所不同[11]。形态学上的表现是基因表达的结果，准确掌握植物雄性不育的发生时期和败育方式是进一步开展研究的前提，也是研究雄性不育机理的关键。减数分裂异常与花粉败育密切相关。在峨眉拟单性木兰中发现减数分裂出现明显差异，如形成落后染色体、染色体桥和断片、微核、单价染色体、不均等分离等异常现象，导致不能形成四分体[12]。在菊花小孢子败育试验中发现，小孢子母细胞减数分裂正常，而四分体时期小孢子开始退化，花药中未观察到小孢子[13]。大白菜细胞核雄性不育系败育发生在小孢子四分体时期，由于绒毡层细胞异常膨大，挤压四分体，使四分体不能分开而萎缩变空[14-15]，均能导致花粉败育的细胞结构异常变化。

以往基于对植物雄性不育的研究结果认为，双子叶植物花药败育多在四分体时期或小孢子早期发育阶段[16]，本研究也证实了这一结果。通过观察对比‘宁杞 5 号’花粉囊中的小孢子母细胞减数分裂正常，最初也能形成形态饱满、形状规则的四分体，其败育发生在四分体形成时，随着进一步发育，由于四分体胼胝质壁不降解，小孢子在四分体形成之后开始发生败育。虽然有些小孢子也能形成初生花粉外壁结构，但细胞质中相继出现小液泡，并逐渐大量液泡化，细胞核凝集，最终细胞质解体消失。小孢子外的胼胝质外壳却一直保存下来，小孢子一直均处于四分体状态。通过转录组数据及 qPCR 验证发现，相比于‘宁杞 1 号’，‘宁杞 5 号’胼胝质降解酶（如 β-1，3-葡聚糖酶）基因的表达显著下调或缺失，结合其显微和超微结构显示，胼胝质壁不降解与胼胝质降解酶的合成及绒毡层的异常等因素相关[17]。研究发现，拟南芥中花药特异蛋白 6（简称 A6）是一种能够降解胼胝质壁的酶，其只在绒毡层特异性表达，在小孢子释放前 *A6* 的表达量达到最高值。另外，bHLH 家族转录因子 *DYT1* 可通过调控胼胝质的降解来影响花药发育过程，*DYT1* 突变体中胼胝质酶相关基因 *A6* 的表达严重下调，导致胼胝质壁降解能力下降[18]。在核不育大白菜的研

中国知网　https://www.cnki.net

究发现,*BcA6*基因在四分体时期的表达量极显著低于可育花药,导致该时期β-1,3-葡聚糖酶(BG)活性过低,影响胼胝质的降解,表明*BcA6*基因表达量过低可能与胼胝质降解酶活性下降有关。胼胝质在胼胝质合酶(GSL)的作用下合成,其降解由BG作用,在不育突变体中,*GSL*基因的表达量很高,而*BG*基因的表达量低,导致胼胝质合成增强而降解能力下降,这种失衡造成胼胝质在不育花蕾中沉积异常[19]。在马铃薯延薯4号和水稻nsm1突变体等植物中也发现胼胝质未完全降解现象[20]。本研究发现,胼胝质外沉积了大量物质,暗示绒毡层发育异常导致胼胝质降解酶无法适时运输到胼胝质中,影响胼胝质降解,导致花粉败育。

3.2 绒毡层对不育枸杞'宁杞5号'小孢子败育的影响

绒毡层是花粉发育重要的营养"供给者",在花粉发育的不同时期,绒毡层细胞分泌不同的营养物质供给花粉发育需要。如果绒毡层发育异常,可导致小孢子发育受阻,不育系小孢子败育与绒毡层程序性细胞死亡(programmed cell death,PCD)异常是一个连续的过程[21],这一系列的变化在时间和空间上都有严格的规定。绒毡层作为孢子体最内层,在小孢子形成中起主要作用[22],首先为小孢子的生长提供蛋白质和脂质,然后为孢子的释放提供酶[23],之后需要经历PCD过程,为花粉发育和沉积成分腾出空间[24]。诸多报道表明,小孢子败育与绒毡层细胞程序性死亡异常有关。研究发现*bHLH* 142(OE 142)的过表达触发PCD的早期发生,导致水稻雄性不育[25]。在甘蓝型油菜不育系SaNa-1A中,绒毡层细胞发育异常和延迟降解抑制小孢子生长[26]。在以前的研究报道中,已经在棉花A、C2P5A,水稻WA-CMS、K87B1-706A,小麦K87B1-706A中描述了绒毡层PCD过早降解导致花粉败育[27-28]。而小麦u87B1-706A和甘蓝型油菜绒毡层发生延迟降解,致使花粉败育[29-30]。本研究结果表明,'宁杞5号'小孢子败育的直接结构异常是由于包裹四分小孢子的胼胝质壁未被降解,致使四分小孢子不能释放形成单个游离小孢子,导致花粉雄性不育。很多研究已证明,在减数分裂前,胼胝质开始在花粉母细胞的细胞壁中沉积,参与胞质分裂,整个四分体都被胼胝质壁包裹着,随后胼胝壁被降解而释放小孢子,花粉外壁形成、花粉萌发和花粉管生长也需要胼胝质的参与[31-32]。而分解包裹四分体胼胝质壁的胼胝质酶是由绒毡层细胞合成并分泌到药腔中,降解包裹四分体的胼胝质壁,从而释放单核小孢子。本研究发现'宁杞1号'绒毡层细胞基本降解完成时,'宁杞5号'绒毡层细胞仍可观察到清晰的轮廓,显示其细胞程序性死亡发生延迟,不能及时合成胼胝质酶降解胼胝质壁,致使四分小孢子不能游离;同时也不能为小孢子发育提供重要的营养物质,导致小孢子空泡化、外壁发育异常,出现了不正常加厚现象,最终花粉发生败育。由此推断,不育系绒毡层的提前解离是造成小孢子营养不足、逐渐凋亡,最终导致败育的原因之一。

4 结 论

本研究确定了枸杞不育系小孢子败育的发生时期和直接原因。宁夏枸杞不育系和可育系在母细胞时期和四分体时期没有明显差别,减数分裂过程正常,均能形成胼胝质壁包裹的四分小孢子。表明'宁杞5号'败育的原因不是在母细胞时期,与减数分裂无关。但在四分体中后期胼胝质壁的降解显示异常,至开花时四分体外始终包裹着胼胝质壁,致使4个小孢子不分开,胼胝质壁的存在成为阻碍来自绒毡层细胞分泌的各种酶类及营养物质进入小孢子的一道屏障。而胼胝质酶是绒毡层细胞的产物,超微结构观察到不育花药绒毡层细胞延迟发生细胞程序性死亡,导致胼胝质酶合成不足或合成的酶活性不够,不足以降解小孢子的胼胝质,四分小孢子无法释放并进一步发育,最终败育。

[参考文献]

[1] 周玉强,曹枭雄,王婧,等. 玉米雄性不育突变体ms20s2的表型鉴定与基因定位[J/OL]. 植物遗传资源学报,2023:1-14(2023-09-19). http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=ZWYC20230913001&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ.
ZHOU Y Q,CAO X X,WANG J,et al. Phenotypic identification and gene mapping of maize male sterile mutant ms20s2[J/OL]. China Industrial Economics,2023:1-14(2023-09-19). http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=ZWYC20230913001&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ.

[2] 沈亚琦,蒋文翔,项圆圆,等. 水稻雄性不育突变体dtp1的细胞学分析与基因定位[J]. 核农学报,2022,36(4):689-697.
SHEN Y Q,JIANG W X,XIANG Y Y,et al. Cytological analysis and gene mapping of male sterile mutant dtp1 in rice[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences,2022,36(4):689-697.

[3] 吕晓菡,方献平,柴伟国,等. 辣椒胞质不育系与保持系花药的细胞学和蛋白质组学差异分析[J]. 浙江大学学报(农业与生

中国知网 https://www.cnki.net

命科学版），2015，41（1）：44-55.
LÜ X H，FANG X P，CHAI W G，et al. Comparative analysis of cytology and proteomics in anthers between cytoplasmic male sterile line and its maintainer line of peppers[J]. Journal of Zhejiang University（Agriculture and Life Sciences），2015，41（1）：44-55.

[4] 唐鑫，李圆圆，陆俊杏，等. 甘蓝型油菜温敏细胞核雄性不育系160S花药败育的形态学特征和细胞学研究[J]. 作物学报，2021，47（5）：983-990.
TANG X，LI Y Y，LU J X，et al. Morphological characteristics and cytological study of anther abortion of temperature-sensitive nuclear male sterile line 160S in *Brassica napus*[J]. Acta Agronomica Sinica，2021，47（5）：983-990.

[5] 廖杨梅，赵国春，翁学煌，等. 无患子雄性不育品种‘琦蕊’不同发育时期雄花转录组分析[J]. 生物技术通报，2024，40（7）：197-206.
LIAO Y M，ZHAO G C，WENG X H，et al. Transcriptome sequencing of male sterile buds at different developmental stages in *Sapindus mukorossi* ‘Qirui’[J]. Biotechnolgy Bulletin，2024，40（7）：197-206.

[6] 刘淑娟，朱祺，幸学俊，等. 植物雄性不育影响因素研究进展[J]. 中国农学通报，2014，30（34）：46-50.
LIU S J，ZHU Q，XING X J，et al. Advanced research on male sterility of plant[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin，2014，30（34）：46-50.

[7] SHI J，CHEN L，ZHENG R，et al. Comparative phenotype and microRNAome in developing anthers of wild-type and male-sterile *Lycium barbarum* L.[J]. Plant Science，2018，274：349-359.

[8] CHAO J C，CHIANG S W，WANG C C，et al. Hot water-extracted *Lycium barbarum* and *Rehmannia glutinosa* inhibit proliferation and induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cells[J]. World Journal of Gastroenterology，2006，12（28）：4478-4484.

[9] 韩璐，郑蕊，岳思君，等. 枸杞雄性不育花药中蛋白质和几种酶的电泳分析[J]. 宁夏大学学报（自然科学版），2012，33（2）：210-213.
HAN L，ZHENG R，YUE S J，et al. Electrophoretic analysis of soluble protein and enzymes of male sterility anther in *Lycium barbarum* L.[J]. Journal of Ningxia University（Natural Science Edition），2012，33（2）：210-213.

[10] 周婷，魏雅茹，孙旭冉，等. 宁夏枸杞雄性不育花药中胼胝质动态变化特征[J]. 西北植物学报，2024，44（1）：105-111.
ZHOU T，WEI Y R，SUN X R，et al. Characteristics of callose dynamics in male sterile anthers of Ningxia *Lycium barbarum* L.[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica，2024，44（1）：105-111.

[11] WANG S P，ZHANG G S，SONG Q L，et al. Abnormal development of tapetum and microspores induced by chemical hybridization agent SQ-1 in wheat[J]. PLoS One，2015，10（3）：e0119557.

[12] 余道平，李策宏，李小杰，等. 峨眉拟单性木兰雄性不育的细胞形态学及生理生化特性研究[J/OL]. 广西植物，2023：1-14（2023-06-30）. http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=GXZW20230625001&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ.
YU D P，LI C H，LI X J，et al. Study on cell morphology and physiological and biochemical characteristics of male sterility of *Parakmeriaemei*[J/OL]. Guihaia，2023：1-14（2023-06-30）. http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=GXZW20230625001&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ.

[13] WANG F，ZHONG X，HUANG L，et al. Cellular and molecular characteristics of pollen abortion in chrysanthemum cv kingfisher[J]. Plant Molecular Biology，2018，98（3）：233-247.

[14] 叶纨芝，曹家树，余小林，等. 白菜细胞核雄性不育两用系的细胞学观察[J]. 细胞生物学杂志，2004，26（5）：516-522.
YE W Z，CAO J S，YU X L，et al. The cytomorphology of microsporogenesis in genie male sterile a/b line of Chinese cabbage（*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino var. *communis* Tsen et Lee）[J]. Chinese Journal of Cell Biology，2004，26（5）：516-522.

[15] 岳艳玲，郭瑛琪. 大白菜核不育花药超显微结构观察[J]. 沈阳农业大学学报，2023，54（1）：10-15.
YUE Y L，GUO Y Q. Observation on the ultrastructure of anthers of genic male sterile in Chinese cabbage[J]. Journal of Shenyang Agricultural University，2023，54（1）：10-15.

[16] 全雪丽，玄春吉，吴京姬，等. 马铃薯（延薯4号）小孢子发生的细胞学观察[J]. 种子，2013，32（6）：28-30.
QUAN X L，XUAN C J，WU J J，et al. Cytological observation on microsporogenesis of potato（Yanshu No. 4）[J]. Seed，2013，32（6）：28-30.

[17] 周婷，魏雅茹，梁文裕，等. 基于RNA-seq技术分析雄性不育宁夏枸杞花药不同发育时期基因表达特征[J]. 基因组学与应用生物学，2024，43（3）：400-415.
ZHOU T，WEI Y R，LIANG W Y，et al. Analysis of gene expression characteristics at anther development stages of the male sterile in wolfberry（*Lycium barbarum*）based on RNA-seq[J]. Genomics and Applied Biology，2024，43（3）：400-415.

[18] 宋垚，李晖，石其龙，等. 拟南芥bHLH家族转录因子DYT1在花药发育过程中调控胼胝质降解[J]. 上海师范大学学报（自然科学版），2009，38（2）：174-182.
SONG Y，LI H，SHI Q L，et al. The *Arabidopsis* bHLH transcription factor DYT1 regulates callose degradation during anther development[J]. Journal of Shanghai Normal University（Natural Sciences），2009，38（2）：174-182.

[19] 崔海芳. 大白菜核不育小孢子发育胼胝质沉积相关基因的表达分析[D]. 昆明：云南农业大学，2017.
CUI H F. Expression analysis of callose deposition related genes in microspore development of Chinese cabbage with genic male sterility[D]. Kunming：Yunnan Agricultural University，2017.

[20] CHEN H Y，ZHANG S B，TANG W J，et al. Non-separated microspores 1 controls male meiotic callose deposition at the cell plate in rice[J]. The Crop Journal，2024，12（6）：1559-1568.

[21] 徐青，秦垦，冯爱玲，等. 枸杞不育系与可育系花药发育的细

中国知网　https://www.cnki.net

胞学研究[J]. 宁夏大学学报(自然科学版),2009,30(3):263-267.
XU Q,QIN K,FENG A L,et al. Cytological investigation on anther development of a male sterile and fertile line in *Lycium barbarum* L. [J]. Journal of Ningxia University (Natural Science Edition),2009,30(3):263-267.

[22] GOLDBERG R B,BEALS T P,SANDERS P M. Anther development: basic principles and practical applications[J]. The Plant Cell,1993,5(10):1217-1229.

[23] SUN Y J,HORD C L,CHEN C B,et al. Regulation of *Arabidopsis* early anther development by putative cell-cell signaling molecules and transcriptional regulators[J]. Journal of Integrative Plant Biology,2007,49(1):60-68.

[24] ZHU J,LOU Y,XU X F,et al. A genetic pathway for tapetum development and function in *Arabidopsis*[J]. Journal of Integrative Plant Biology,2011,53(11):892-900.

[25] KO S S,LI M J,LIN Y J,et al. Tightly controlled expression of bHLH142 is essential for timely tapetal programmed cell death and pollen development in rice[J]. Frontiers in Plant Science,2017,8:1258.

[26] DU K, XIAO Y Y, LIU Q E, et al. Abnormal tapetum development and energy metabolism associated with sterility in SaNa-1A CMS of *Brassica napus* L. [J]. Plant Cell Rep,2019,38:545-558.

[27] ZHANG M,GUO L,QI T,et al. Integrated methylome and transcriptome analysis between the CMS-D2 line ZBA and its maintainer line ZB in *Gossypium hirsutum*[J]. International Journal of Molecular Sciences,2019,20(23):6070.

[28] LI Y Q,QIN T F,WEI C Y,et al. Using transcriptome analysis to screen for key genes and pathways related to cytoplasmic male sterility in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. International Journal of Molecular Sciences,2019,20(20):5120.

[29] LIU Z H,SHI X Y,LI S,et al. Oxidative stress and aberrant programmed cell death are associated with pollen abortion in isonuclear alloplasmic male-sterile wheat [J]. Frontiers in Plant Science,2018,9:595.

[30] LUO D P,XU H,LIU Z L,et al. A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice[J]. Nature Genetics,2013,45(5):573-577.

[31] BIACKMORE S, WORTLEY A H, SKVARLA J J, et al. Pollen wall development in flowering plants[J]. The New Phytologist,2007,174(3):483-498.

[32] ARIIZUMI T, TORIYAMA K. Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development[J]. Annual Review of Plant Biology,2011,62:437-460.

(责任编辑:屈李纯)

(上接第99页)

[25] 陈白,刘克飞,刘卓香. 梨树幼树整形修剪技术[J]. 落叶果树,2010,42(4):57-58.
CHEN B,LIU K F,LIU Z X. Pruning techniques for young pear trees[J]. Deciduous Fruits,2010,42(4):57-58.

[26] 艾沙江·买买提,阿布都外力·木米尼,王晶晶,等. 富士苹果短截、拉枝对当年生新梢叶片光合特性的影响[J]. 中国农业大学学报,2013,18(6):126-131.
MAIMAITI AISHAJIANG, MUMINI ABUDUWAILI, WANG J J, et al. Effects of cutting back and branch-bending on photosynthetic characteristics of new shoots[J]. Journal of China Agricultural University,2013,18(6):126-131.

[27] 戴文圣,王白坡,钱银才,等. 拉枝对不同品种幼龄梨树生长结果的影响[J]. 浙江林学院学报,1996,13(2):123-129.
DAI W S,WANG B P,QIAN Y C,et al. Branch drawing influence on growth and fruit setting for young tree of pear varieties[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 1996, 13(2):123-129.

[28] 刘小阳,李玲,史宏伟,等. 光强对砀山酥梨果实发育期可溶性糖、可滴定酸和V_C含量的影响[J]. 林业科学,2007,43(7):134-137.
LIU X Y,LI L,SHI H W,et al. Influence of light intensity on soluble sugar, organic acid and V_C content of *Pyrus bretschneideri* cv. Dangshansu pear fruit in its growth phase[J]. Scientia Silvae Sinicae,2007,43(7):134-137.

[29] 施泽彬,戴美松,孙田林,等. 翠冠与玉冠梨果实发育过程中色素、糖、酸累积特性研究[J]. 果树学报,2007,24(6):833-836.
SHI Z B,DAI M S,SUN T L,et al. Comparative studies on the accumulation process of the pigments, sugar and acid in fruit of Cuiguan and Yuguan pear cultivars[J]. Journal of Fruit Science,2007,24(6):833-836.

[30] 常尚连,于贤昌,于喜艳. 西瓜果实发育过程中糖分积累与相关酶活性的变化[J]. 西北农业学报,2006,15(3):138-141.
CHANG S L,YU X C,YU X Y. Change of sugar accumulation and related enzyme activity during fruit development of watermelon[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica,2006,15(3):138-141.

(责任编辑:屈李纯)

中国知网 https://www.cnki.net