



# 枸杞单倍体花粉败育的细胞学观察

罗 青,张 波,戴国礼,赵建华,曹有龙

(国家枸杞工程技术研究中心,宁夏 银川 750002)

**摘要:**为揭示枸杞单倍体不育特性,对可育的宁杞1号和花药培养获得的单倍体的花药进行细胞学观察。结果表明:在花药母细胞时期,宁杞1号和单倍体的花药发育没有明显差异,减数分裂后两者都顺利形成四分体。宁杞1号的四分体可以释放出小孢子,同时绒毡层细胞能够为其提供营养并发育为成熟的花粉粒。而单倍体的花药在四分体时期虽然也能释放出小孢子,但绒毡层细胞提前降解使释放出来的小孢子不能发育为成熟的花粉粒,导致单倍体花粉败育。

**关键词:**枸杞花药;单倍体;花粉败育;细胞形态学

单倍体是进行植物基因组测序、功能基因的发掘与鉴定、遗传图谱的构建、QTL定位等遗传分析以及开展植物育种工作的理想材料。单倍体已经在多个研究领域得以成功应用,无论在植物生物学,还是遗传学研究方面有着重要的作用。枸杞(*Lycium barbarum* L.)为茄科(Solanaceae)枸杞属(*Lycium* L.),多年生落叶灌木,是药食同源植物,其果实枸杞子,具有滋补肝肾、益精明目、提高免疫力、抗衰老、抗肿瘤、抗氧化之功效。本研究用的枸杞单倍体<sup>[1]</sup>是本课题采用枸杞花药离体培养获得的单倍体,移栽到大田后,通过植物形态学观察,发现单倍体的形态特征表现为花蕾小,花柄短,花药偏黄,花瓣卷曲,花丝弯曲,花药不开裂,花开后即干枯脱落的现象。根据这一观察结果,本试验采用石蜡切片法,对枸杞花药5个发育时期的花蕾进行了细胞学观察,探讨单倍体小孢子发育受阻的时期和特点,为进一步研究其花粉败育的机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料种植在宁夏农林科学院枸杞工程技术研究所枸杞种质资源圃。试验材料为单倍体花药,以正常发育的宁杞1号花药作为对照。采集花药发育的5个时期,即:造孢细胞时期、小孢子母细胞时期、四分体时期、单核小孢子时期、花粉

粒成熟期的花蕾。

### 1.2 方法

在枸杞现蕾期,在枸杞枝条上选取以上5个发育时期的花蕾,采用FAA固定液固定,4℃冰箱保存。按照常规石蜡切片方法<sup>[2]</sup>,经过脱水、透明、浸蜡、包埋步骤后切片,期间采用爱氏苏木精整体染色,对样品进行横切,切片厚度8 μm,阿拉伯树胶封片,显微镜下观察并拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 宁杞1号花药不同发育时期的细胞学特征

2.1.1 造孢细胞时期 宁杞1号的一个花药由4个花粉囊组成,分为左、右二半,中间由药隔相连。从横切面可看到4个花粉囊,药壁由外到里依次为表皮、药室内壁、绒毡层,造孢细胞位于药室中间。绒毡层细胞排列整齐,相对体积较大(图1A)。

2.1.2 小孢子母细胞时期 随着造孢细胞的不断分裂,进入到小孢子母细胞发育时期,即花粉母细胞时期。此时小孢子母细胞的体积及其细胞核体积增大,细胞质增稠,枸杞的两种绒毡层即药壁绒毡层和药隔绒毡层分化完成,药壁绒毡层细胞的细胞质浓密,呈正方形或不规则多边形排列整齐;药隔绒毡层细胞的细胞质也浓密,体积相对较大,且呈放射状紧密排列(图1B)。

2.1.3 四分体时期 四分体时期绒毡层细胞近正方形或不规则多边形排列整齐,细胞质仍然浓密,四分体的四个细胞成四面体,外面被厚厚的胼胝质包围,随着胼胝质壁逐渐减薄直至完全消失,游离出单核小孢子(图1C)。

2.1.4 单核小孢子时期 刚释放出来的小孢子早期,药壁绒毡层和药隔绒毡层细胞质密度依旧很大,绒毡层细胞近正方形或不规则多边形,随着小孢子液泡化,小孢子大部分空间被大液泡占据,

收稿日期:2018-08-15

基金项目:宁夏回族自治区自然科学基金资助项目(NZ16097);宁夏回族自治区农业育种专项资助项目(2013NYYZ0105)。

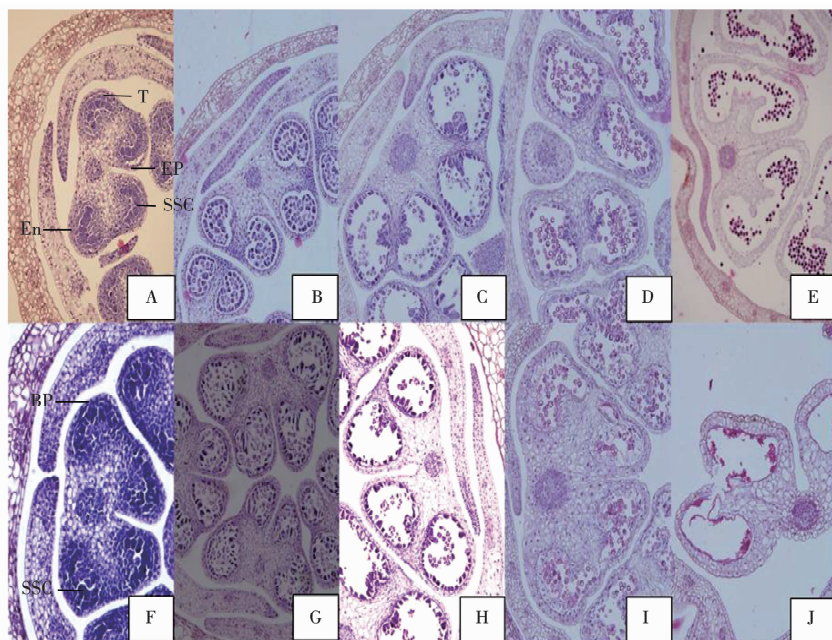
第一作者简介:罗青(1964-),女,学士,副研究员,从事植物组织培养研究。E-mail:575758544@qq.com。

通讯作者:曹有龙(1963-),男,博士,研究员,从事枸杞遗传育种及分子生物学等研究工作。E-mail:youlongchk@163.com。

细胞核被挤到边沿(图 1D)。

2.1.5 花粉粒成熟时期 伴随着小孢子液泡化,药隔绒毡层细胞、药壁绒毡层细胞逐步降解消失,

小孢子发育为饱满的成熟花粉粒,花粉粒染色较深,变大变圆。最后药室壁开裂,散出成熟的花粉粒(图1E)。



EP: 表皮;En: 药室内壁;T: 绒毡层;SSC: 次生造孢细胞;A-E: 分别为宁杞1号正常材料的造孢细胞时期、小孢子母细胞时期、四分体时期、单核小孢子时期和花粉粒成熟时期; F-J: 分别为宁杞1号单倍体材料的造孢细胞时期、小孢子母细胞时期、四分体时期、单核小孢子时期和花粉败育时期。  
EP: Epidermis; En: Endothecium; T: Tapetum; SSC: Secondary sporogenic cells; A-E: the sporogenous cell stage, microspore mother cell phase, tetrad phase, mononuclear microspore phase and mature pollen period of normal material of Ningqi No.1 (*L. barbarum* Linn); F-J: the sporogenous cell phase, microspore mother cell phase, tetrad phase and pollen abortion of haploid material of Ningqi No.1(*L. barbarum* Linn).

图1 宁杞1号正常材料及单倍体的花粉发育细胞学观察

Fig. 1 Cytological observation of pollen development of normal material and haploid of Ningqi No. 1

## 2.2 单倍体花药不同发育时期的细胞学特征

宁杞1号单倍体材料的花药和正常材料的花药相比,造孢细胞时期也由4个药室组成,花药壁也同样由外到里依次为表皮、药室内壁、绒毡层,造孢细胞位于药室中间。绒毡层细胞排列整齐,相对体积较大(图1F)。小孢子母细胞时期也同宁杞1号正常材料的这个时期一样没有差异(图1G),也可以正常地形成四分体(图1H)。四分体后期小孢子也能正常的释放出来,形成一个一个的单核花粉粒。释放出来的小孢子在发育为成熟花粉粒的这一过程中,枸杞单倍体同宁杞1号正常材料的小孢子发育在细胞结构特征上有了明显的差异,表现为绒毡层细胞发生了变异(图1I)。观察图片发现,单核小孢子时期,从外形上看,宁杞1号正常材料的花药在这个时期绒毡层细胞的细胞质浓厚,而单倍体的花药在这个时期药壁绒毡层细胞和药隔绒毡层细胞的细胞质稀薄,这种异常的绒毡层细胞已经由正方形变为长形侵入到了药室中,四个药室都是这种异常的绒毡层细胞,随着小孢子液泡化,慢慢的绒毡层细胞仅剩细胞壁残留在原位。由于绒毡层细胞的提前降解,不能

为小孢子的正常发育提供丰富的营养,使小孢子发育受阻,最终导致花粉败育,单倍体的花药内花粉囊成了空腔(图1J)。

## 3 结论与讨论

### 3.1 雄性不育花粉败育与单倍体花粉败育在发生时期上的差异

花粉败育的时期和形式是多种多样的<sup>[3]</sup>,随植物不同而异。一般情况下,单子叶植物花粉败育多发生在四分体形成前,双子叶植物花粉败育多发生在四分体形成之后。马哈利樱桃<sup>[4]</sup>、新梨7号<sup>[5]</sup>、揪树<sup>[6]</sup>、洋葱<sup>[7]</sup>、萝卜<sup>[8]</sup>、辣椒<sup>[9]</sup>等花粉败育发生时期均在四分体时期。雄性不育花粉的败育是由基因控制绒毡层的发育和降解<sup>[10]</sup>。由于不同的不育系控制绒毡层发育的基因不同,其花粉的败育时期也会因为基因的表达时期和基因作用机制不同而有差异。因此,即使是同一种作物的不同类型、不同来源的雄性不育花粉败育时期也不相同。不结球白菜细胞核雄性不育株花粉败育发生在花粉母细胞的各个时期,但主要还是在小孢子的发育过程中<sup>[11-13]</sup>。茄子<sup>[14-15]</sup>、番茄<sup>[16]</sup>的

雄性不育在败育时间上同样表现出多样性,小孢子的败育发生在小孢子母细胞时期、四分体时期以及单核小孢子时期。在对枸杞雄性不育花粉败育的研究中,徐青等<sup>[17-18]</sup>通过对枸杞育新 1 号雄性不育枸杞的花粉败育研究认为不育系枸杞小孢子和药壁组织在四分体刚形成之前的各个时期发育正常,花粉败育在四分体形成之后开始发生,具体原因是四分体败育的过程中,绒毡层细胞剧烈的液泡化,细胞质、细胞核和细胞壁提前解体造成。田英等<sup>[17,19]</sup>对宁夏枸杞雄性不育材料小孢子发生的细胞形态学观察也验证了枸杞雄性不育系花粉败育发生在四分体时期。本试验通过对单倍体花药的细胞学形态观察,结果表明枸杞单倍体花粉败育时期发生在单核小孢子时期,比育新 1 号雄性不育枸杞花粉败育的时期推后,表现在单倍体花药小孢子母细胞进入减速分裂期后,也可以正常地形成四分体,小孢子也能正常释放,形成一个个单核小孢子。但在单核小孢子时期向成熟的花粉粒发育的这一过程中,枸杞单倍体的小孢子发育同宁杞 1 号小孢子发育在细胞结构特征上有了明显的差异。

### 3.2 单倍体花粉败育的原因

许多研究表明花粉败育与绒毡层的发育异常有密切关系<sup>[20]</sup>。绒毡层作为花药壁的最内层的特殊体细胞,提供小孢子母细胞减数分裂和小孢子发育所需要的营养成分。有研究表明<sup>[7,21-23]</sup>,绒毡层能够合成蛋白质、脂肪、碳水化合物和分泌胼胝质酶等。绒毡层以程序性死亡(PCD)的形式适时为小孢子发育提供营养物质,分泌胼胝质酶,参与花粉粒外壁形成,同时也为花粉的成熟提供空间。徐青等<sup>[24]</sup>研究认为可育枸杞的绒毡层降解时间是在单核花粉中期前后,而育新 1 号雄性不育的花粉在四分体时期绒毡层细胞就异常肥大、高度液泡化,表现出了明显的过早退化和解体的现象,由于绒毡层细胞的过早退化不能合成和分泌胼胝质酶,使四分体时期的胼胝质壁不能及时降解,四分体孢子因营养受阻而最终导致花粉败育。李彦龙等<sup>[25]</sup>通过对雄性不育枸杞宁杞 5 号的研究认为,枸杞雄性不育是枸杞胼胝质酶基因(*LG1*)表达沉默所致。枸杞胼胝质酶基因(*LG1*)属于植物糖基水解酶的第 17 家族基因,*LG1* 在正常可育的枸杞花药中表达量高,而在雄性不育枸杞花药中表达沉默,枸杞雄性不育花药四分体分解受阻与 *LG1* 基因表达沉默同步,*LG1* 基因沉默是雄性不育枸杞花粉败育的一个重要原因。本试验的单倍体花粉在单核小孢子时期,绒毡层细胞结构已经出现了异常、形状不规

则,细胞质稀薄,绒毡层细胞表现出了过早降解的现象,它不能为小孢子发育提供营养物质,难以满足花粉成熟的需求,最终导致花粉败育。单倍体花粉败育具体受哪些基因的控制有待后续研究。研究单倍体花粉败育机理,对单倍体的利用、功能基因挖掘具有重要的意义。

### 参考文献:

- [1] 罗青,张波,李彦龙,等.枸杞花药离体培养获得单倍体植株[J].宁夏农林科技,2016,57(6):17-19.
- [2] 林加涵,魏文铃,彭宜宪.现代生物学实验[M].北京:高等教育出版社,2000.
- [3] Leser K D, Lersten N R. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms[J]. Bot Rev, 1972,38(3):425-454.
- [4] 李彬,蔡宇良,赵晓军,等.‘马哈利’樱桃雄性不育细胞学观察[J].西北植物学报,2015,35(10):2007-2011.
- [5] 韩爱华,尹克林,宋来庆,等.‘新梨 7 号’雄性不育特性及其败育的细胞学研究[J].西南农业大学学报(自然科学版),2004,26(1):64-67.
- [5] 张博,李利平,毛伟兵,等.雄性不育与可育揪树花发育的细胞学比较研究[J].植物研究,2015,35(6):812-818.
- [7] 程雨,宋策,陈典,等.洋葱细胞质雄性不育系小孢子败育的细胞形态学结构[J].江苏农业科学,2017,45(7):107-110.
- [8] 刘育华,李德超,骆海波,等.早秋萝卜不育系花药形态比较及细胞学观察[J].长江农业,2013(8):5-7.
- [9] 邱义兰,刘珠丽,李红,等.辣椒细胞质雄性不育花药败育及淀粉粒分布的细胞学观察[J].分子细胞生物学报,2008,41(4):283-293.
- [10] Mariani C, Canesi M, Barbien S, et al. Amantadine for Friedreich's ataxia[J]. Neurology,1990,40(1):194.
- [11] 单奇伟,陈龙正,徐海,等.不结球白菜 *Ogura* 雄性不育花器官形态及败育细胞学的研究[J].华北农学报,2009,24(S):25-29.
- [12] 周巍,徐明.不结球白菜细胞核雄性败育过程的细胞学研究[J].安徽农业科学,2007,35(6):1600-1601.
- [13] 谢潮添,杨延红,朱学艺,等.白菜细胞核雄性不育花药的细胞化学观察[J].实验生物学报,2004,37(4):296-302.
- [14] 郭丽娟,申书兴,陈雪平,等.茄子雄性不育系花蕾内源激素研究[J].植物遗传资源学报,2006,7(4):434-436.
- [15] 毛秀杰,刘婷,孙中峰,等.番茄雄性不育系 JL-2 小孢子发育的细胞学观察[J].种子,2009,28(5):1-3.
- [16] 袁亦楠,朱德蔚,连勇,等.番茄雄性不育突变体小孢子发育的细胞学研究[J].华北农学报,2000,15(3):61-65.
- [17] 秦垦,刘元恒,唐惠峰.枸杞雄性不育株系(YX-1)与宁杞 1 号的形态学比较及配套栽培技术[J].宁夏农林科技,2008(3):12-13.
- [18] 徐青,秦垦,冯爱玲,等.枸杞不育系花药的细胞学研究[J].宁夏大学学报,2009,30(3):263-267.
- [19] 田英,李云翔,秦垦,等.宁夏枸杞雄性不育材料小孢子发生的细胞形态学观察[J].西北植物学报,2009,29(2):263-268.
- [20] 刘忠松,官春云,陈社员.植物雄性不育机理的研究及应用[M].北京:中国农业出版社,2001.
- [21] 李懿星,李莉,陈光辉.高等植物花药绒毡层发育研究进展[J].作物研究,2009,23(5):287-289.

(下转第 27 页)