

植物细胞核雄性不育基因研究进展

杨莉芳,刁现民

(中国农业科学院作物科学研究所,北京 100081)

摘要:植物雄性不育既是研究植物生殖生物学重要的植物学性状,也是研究作物杂种优势利用的重要农艺性状,在遗传和分子生物学中具有重要地位。以模式植物拟南芥和水稻为主,对植物雄性不育的控制基因和相关分子机理研究已有众多进展,按照花药发育时期和雄性败育的表现形式可以归纳为减数分裂异常、胼胝质代谢异常、绒毡层发育异常、花粉壁发育异常、花药开裂异常,以及其他类型的雄性不育。在不育相关基因中,导致胼胝质代谢异常、绒毡层发育异常和花粉壁发育异常的基因往往表现一因多效,一个相关基因的突变会产生复合表型。关于植物雄性不育相关基因的研究表明,雄性器官和小孢子形成过程中的任何相关基因的改变,均可导致雄性不育的产生。本文总结了植物核基因雄性不育的研究进展,以期促进不同物种间雄性不育基因的比较分析,使植物雄性不育研究更加深入。

关键词:植物雄性不育;减数分裂;绒毡层;花药开裂

Progress in Identification of Plant Male Sterility Related Nuclear Genes

YANG Li-fang, DIAO Xian-min

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Male sterility is a common phenomenon in the plant kingdom which is important for both plant reproductive biology study and crop breeding research for heterosis utility. Many studies on this issue were reported which were mostly carried out with the model species of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza Sativa*. According to the abortion stages in anther development, plant male sterility can be classified into several types such as degradation of pollen mother cells, early or late degeneration of tapetum cells, critical chemical changes in pollen wall development, failure in anther dehiscence, and other types. Mutations in genes encoding tapetum and pollen wall development most likely create a complex phenotype in microspore development. The results so far obtained indicated that mutations of related genes that are critical for anther and pollen development will result male sterility. This paper is a review on those researches and we hope it can facilitate related studies for a much promising future.

Key words: plant male sterility; meiosis; tapetum; anther dehiscence

植物雄性不育(male sterility)是有性繁殖过程中由于生理上或遗传上的原因造成植物雌性器官正常而雄性器官不正常,不能产生花粉或花粉败育而不能授粉结实的现象。雄性不育因其在作物杂种优势利用中能够实现自花授粉作物杂交种商业化批量制种,也能使异花授粉作物杂交制种变得方便,而成为作物遗传育种关注的重点之一。雄性不育的分类方式有很多,以不育基因的遗传方式和在细胞中的定位可将其分为细胞核雄性不育和细胞质雄性不

育。这两类雄性不育材料都是宝贵的种质资源,对改进育种方法、提高育种效率具有重要作用^[1]。细胞核雄性不育是由核基因控制的雄性不育,有显性核不育和隐性核不育之分。进一步根据对光温的反应又可将植物雄性不育分为与光温无关的雄性不育和光温敏感雄性不育。而细胞质雄性不育则是由细胞质基因控制的,表现为母体遗传。以导致雄性败育时期及导致雄性不育是孢子体还是配子体的不同可分为配子体不育和孢子体不育。从遗传方式和败

收稿日期:2013-03-27 修回日期:2013-05-13 网络出版日期:2013-10-22

URL:<http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20131022.1542.017.html>

基金项目:国家现代农业产业体系(CARS07-12.5-A02)

第一作者研究方向为植物功能基因组。E-mail:yanglifang1223@126.com

通信作者:刁现民,研究方向为谷子基因资源与功能基因组。E-mail:diaoxianmin@caas.cn

育时期等方面对雄性不育只是简单的分类,实际上控制小孢子形成通路上的任何代谢相关的基因变异都会导致雄性不育,许多环境因素的改变也会影响育性,例如光、温度等条件的改变对于育性有显著的影响^[2]。近年来,对植物雄性不育的相关基因和分子机理的研究是植物分子生物学的热点之一,并已有多项重要发现,促进了植物雄性不育的深入研究。

表 1 植物雄性不育的花粉败育类型及其特征

Table 1 Pollen abortion types and the main features of male sterility

分类 Sort	相关基因 Related gene	主要作用方式 Main action mode
减数分裂异常导致的雄性不育	<i>PAIR2</i> ^[3] 、 <i>PAIR1</i> ^[4] 、 <i>PSSI</i> ^[5] 、 <i>Bubl</i> ^[6] 、 <i>MILJ</i> ^[7] 、 <i>MSP1</i> ^[8] 、 <i>AMI</i> ^[9] 等	花粉母细胞过量和发育停止、染色体联会异常、染色体浓缩不规则、同源染色体过早分离、迟滞染色体和染色体桥、花粉液泡化等
胼胝质代谢异常导致雄性不育	<i>CalS1</i> ^[10] 、 <i>CalS5</i> ^[11] 、 <i>AtGsl5</i> ^[12] 、 <i>Osg1</i> ^[13] 等	胼胝质壁不适时地合成与降解
绒毡层发育异常导致雄性不育	<i>UDTI</i> ^[14] 、 <i>OsTDLJA</i> ^[15] 、 <i>TDR</i> ^[16] 、 <i>PTC</i> ^[17] 等	绒毡层形成与分化异常、绒毡层缺失、延迟或提前降解、非程序化死亡、液泡化、分泌物异常等
花粉壁发育异常导致雄性不育	<i>CYP704B2</i> ^[18] 、 <i>DPW</i> ^[19] 、 <i>TDR</i> ^[20] 、 <i>Wdal</i> ^[21] 等	花粉外壁过薄、孢粉素和含油层发育缺陷、外壁物质运输和积累异常、次生壁完全停止发育等
花药开裂异常导致的雄性不育	<i>OPR3</i> ^[22] 、 <i>DADI</i> ^[23] 、 <i>MYB26</i> ^[24] 、 <i>AIDI</i> ^[25] 等	花药形态建成缺陷、小孢子发生分化缺陷、花药迟开裂和不开裂等
其他原因	<i>OsGAMYB</i> ^[26] 、 <i>BAMI&BAM2</i> ^[27] 、 <i>CSA</i> ^[28] 、 <i>P/TMS12-1</i> ^[29] 等	花粉发育后期以及花粉萌发期缺陷、花药中造孢细胞和体细胞的不平衡、细胞间信号转导异常等

1 减数分裂异常导致的雄性不育

开花植物必须通过减数分裂产生单倍体的配子体,才能进行有性生殖^[30]。亲本生殖细胞染色体经过一轮复制、两轮分裂,产生单倍体细胞。减数分裂 I 前期同源染色体浓缩并相互识别,其过程进一步分成 5 个亚时期,依次为细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期^[31]。在此过程中,一系列基因在时空上按照极为精确的顺序,不断的启动关闭,相互协调,最终完成减数分裂。减数分裂时期是对各种干扰非常敏感的发育阶段,此过程中任一基因发生突变都有可能影响减数分裂形成的配子的染色体数目及育性,而植物中大多数雄性不育突变都发生在减数分裂开始或减数分裂结束的某个时期^[32]。

1.1 花粉母细胞染色体联会异常

在对水稻 (*Oryza sativa*) 雄性不育的研究中, K. I. Nonomura 等^[3-4,33]发现 *PAIR* (pairing aberration in rice) 系列基因均与减数分裂的同源染色体配对有关。其中 *PAIR1* 控制水稻性母细胞同源染色体配对和胞质分裂。TOS17 转座子插入该基因产生了染

基于这些研究结果可将导致雄性不育的基因和分子机理分为以下几类:减数分裂异常导致的雄性不育、胼胝质代谢异常导致的雄性不育、绒毡层发育异常导致的雄性不育、花粉壁发育异常导致的雄性不育、花药开裂异常导致的雄性不育以及其他类型的雄性不育(表 1)。本文将沿着这一主线对国内外发表的植物细胞核雄性不育相关基因和作用机理进行总结。

染色体配对异常的 *pair1* 突变体,在其前期 I 的性母细胞中,染色体缠卷成球形并粘在核仁上而不能形成正常形态及配对,在后期 I 和末期 I 染色体不能分离且纺锤体退化,形成多个染色体数不均的小孢子,导致小孢子完全不育。TOS17 转座子插入该基因产生的 *pair2* 突变体性母细胞中,染色体不能正常联会,在粗线期和双线期只能看到 24 个不配对的单价体。W. Yuan 等^[34]发现 *PAIR3* 也控制着水稻同源染色体的配对以及联会,其编码一个含有螺旋结构域的蛋白,优先在花粉母细胞和减数分裂中的卵细胞中表达。*PAIR3-1* 和 *PAIR3-2* 是 2 个独立的等位基因, T-DNA 插入或 RNA 干扰产生的 *pair3-1* 和 *pair3-2* 突变体同源染色体配对时不能形成二价体,并导致雌雄配子同时不育。

L. Chang 等^[35]发现拟南芥的 *SDS* (solo dancers) 和 *RCK* (rock-n-rollers) 基因对雄性花的减数分裂至关重要, *SDS* 和 *RCK* 在水稻中的同源基因在幼花中优先表达,它们的突变体营养生长正常,但部分小花的花粉发育缺陷导致育性的降低。此外, *SDS* 突变植株在同源染色体互作和二价体形成方面有缺

陷, *RCK* 突变植株在染色单体交叉互换方面有缺陷。L. Zhang 等^[36]发现 *OsRad21-4* 基因是水稻减数分裂所必需的。在人工创制的 *OsRad21-4* 的 RNA 干扰植株中, 其小孢子母细胞的减数分裂表现出多种染色体行为缺陷, 包括染色体过度浓缩、同源染色体及染色体片段过早分离等。W207-2 是粳稻品种日本晴的雄性半不育突变体, S. R. Zhou 等^[5]研究发现 W207-2 的雄性不育性受控于 1 对隐性核基因 *pss1* (pollen semi-sterility1)。突变体 *pss1* 的表达影响了减数分裂同源染色体分离和花药的开裂, 导致了花粉的半不育性。当 *PSSI* 马达结构域中第 289 位保守的氨基酸 Arg 被替换成 His 后, 蛋白受微管影响的 ATPase 活性丧失, 在雄性减数分裂后期 I 和后期 II 时, 形成迟滞染色体和染色体桥, 导致了花粉的半不育性。这表明 *PSSI* 对水稻花粉母细胞减数分裂的染色体动力学、雄配子形成以及花粉囊开裂有着十分重要的意义。

有丝分裂和减数分裂染色体的运动依赖于染色单体通过着丝粒的结合。这一结合由一个四亚基结构来调节, REC8 是它的重要组成部分。*osrec8* 突变体中, 性母细胞染色体同源配对和端粒异常, 减数分裂前期 I 着丝粒完全结合, 并于第 1 次减数分裂向两极定向运动, 从而导致姐妹染色单体的过早分离, 形成雄性不育^[37]。Bub1 (Bub1-related kinase1) 是一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 它是纺锤体组装监控机制中的上游蛋白, 可以招集其他监控蛋白定位到着丝粒上。M. Wang 等^[6]在水稻中克隆了植物的首个 *Bub1* 同源基因 *BRK1* (Bub1-related kinase1)。*brk1* 突变体营养生长正常, 而在生殖生长的减数分裂中期 I 着丝粒和纺锤丝随机的 merotelic 连接方式不能被及时修正(例如一个着丝粒同时受到来自相反方向的纺锤丝牵引), 从而使同源染色体着丝粒间的拉力异常以及纺锤体形态异常, 造成减数分裂后期 I 姊妹染色单体分离不同步, 导致完全不育。蔺兴武等^[38]发现甘蓝型油菜与诸葛菜、芥菜型油菜与诸葛菜属间杂交后代存在减数分裂中期 I 和后期 I 染色体落后, 后期 I 染色体有多种分离类型和微核产生等异常现象。

1.2 花粉母细胞减数分裂停止

L. L. Hong 等^[7]通过研究水稻 *MILI* (microsporeless1) 基因, 发现小孢子母细胞中减数分裂的启动由花药特有的机制调控。*MILI* 编码一个 CC 型谷氧还蛋白, 它能与 TGA 转录因子互作。*mill* 突变体花药造孢细胞和周围体细胞减数分裂不能启动,

导致花药小室充满体细胞而不是小孢子, 但大孢子发育正常。此外, *mill* 和 *msp1* 双突变体的研究显示, 由于 *MILI* 基因的缺乏, 花药小室内的细胞同样不能被激活进入减数分裂期。D. Z. Zhao 等^[39]发现拟南芥雄性不育突变体 *ems1* 可产生过量的小孢子母细胞, 缺少绒毡层且中层异常。虽然 *ems1* 突变体在减数分裂过程中核分裂正常, 但小孢子母细胞没有经过胞质分裂, 所以导致小孢子不能发生形成雄性不育。*EMS1* (excess microsporocytes1) 基因编码一个富亮氨酸重复的受体蛋白激酶, 它的表达与小孢子母细胞和绒毡层细胞的分化有关, *EMS1* 传递了生殖细胞和它周边体细胞生长发育的信号。K. Nonomura 等^[8]对水稻中 *MSP1* (multiple sporocytes1) 的研究发现, *msp1* 突变体植株产生过多的雌雄孢子母细胞, 且形成的花药壁结构紊乱, 绒毡层完全消失, 花粉母细胞发育停滞在减数分裂前期 I 的各个阶段, 不能完成减数分裂而导致雄性不育。原位杂交试验表明, *MSP1* 基因在雌雄孢子母细胞周围的细胞中以及一些花器官组织中表达, 但在孢子母细胞中并不表达。这说明 *MSP1* 控制着水稻雌雄孢子的数量和花药壁的形成。*AGO* (argonaute) 基因家族对 RNA 介导的基因沉默具有重要作用。K. I. Nonomura 等^[40]发现它能调节生殖细胞的减数分裂前有丝分裂, 通过小 RNA 介导的基因沉默对减数分裂染色体行为进行调控来保证减数分裂的连续进行。*mell* 突变体中染色体浓缩不规则, 在发育后期常常见到液泡化花粉, 同时雌性生殖细胞发育也受到影响。

在玉米上的研究发现, *AMI* (ameiotic1) 影响着减数分裂启动和前期的各个环节, 包括减数分裂特有基因的表达, 染色体结构的建立、重组、配对、联会, 减数分裂端粒的行为, 以及减数分裂特有的细胞骨架的装配等等。在 *aml* 突变体中, 减数分裂未发生即进入有丝分裂。*AMI* 蛋白在减数分裂启动时可扩散到细胞核内, 并在减数分裂前期 I 与染色质结合, 从而调节细线期到粗线期的转变^[9]。而与玉米 *AMI* 同源的拟南芥 *SWI1* (switch1) 基因对减数分裂极其重要, M. Ravi 等^[41]发现拟南芥 *swi1* 突变体会发生不完全减数分裂, 进而产生孤雌生殖。L. X. Che 等^[11]通过图位克隆得到的水稻 *OsAMI* 基因, 是拟南芥 *SWI1* 和玉米 *AMI* 的同源基因。水稻 *osaml* 突变体花粉母细胞的发育停止在细线期, 这表明显细线期向偶线期过度需要 *OsAMI* 基因。由于 *OsAMI* 的缺乏, 许多其他关键的减数分裂元件例如 *PAIR2*、

ZEP1 和 *OsMER3* 无法装载到染色体上去。相反,在 *pair2*、*Osmer3* 和 *zep1* 等相关基因的突变体中,*OsAMI* 可正常装载。这表明 *OsAMI* 在减数分裂初期构建正常染色体结构中起着基础作用。

以上导致雄性性母细胞减数分裂异常的基因其作用时期包括减数分裂的启动、同源染色体的配对、联会、分离以及胞质分裂,但这些仅仅是减数分裂繁杂过程中的一部分。

2 胼胝质代谢异常导致的雄性不育

减数分裂之前,正常的野生型花药其花粉母细胞外围会合成一种由胼胝质(β -1,3-葡聚糖)构成的细胞壁。减数分裂开始后,胼胝质沉积增厚,并在形成四分体时达到最厚,从而形成完整的胼胝质壁。减数分裂完成后,开始形成小孢子外壁,绒毡层细胞中的粗面内质网堆叠并分泌胼胝质酶,胼胝质开始降解,并将小孢子释放到花粉囊腔中^[42]。在这一过程中,无论是胼胝质合成、积累、抑或是降解,任何一个环节出现异常都将影响减数分裂的进行和完成,从而影响植物的育性。

2.1 胼胝质合成异常

拟南芥有 12 个基因编码胼胝质合酶 CalS (callose synthase)。Z. L. Hong 等^[10]克隆了 1 个编码拟南芥胼胝质合酶(CalS1)催化亚基的 cDNA。CalS1 在 N-端包含 16 个预测的跨膜螺旋结构,与两种细胞板关联蛋白(成膜素和 UPD-葡萄糖转移酶)互作。CalS1 是一种细胞板专有酶,将该基因转入烟草能够在细胞板的形成中增强胼胝质合成,表现出较高水平的 CalS 活性。X. Dong 等^[43]克隆了 *CalS5* 基因,它编码一种胼胝质合酶,与胼胝质在性母细胞、四分体、小孢子初生细胞壁的形成有关,并且此基因的表达是花粉壁外壁建成所必需的。T-DNA 插入的 *CalS5* 突变导致育性的严重降低。*calS5* 突变体不能形成胼胝质沉积物,表明此基因在这些组织中是合成胼胝质必需的。L. Ostergaard 等^[12]发现拟南芥 *AtGsl5* (β -1,3-glucan synthase5) 基因编码一种与酵母 β -1,3-葡聚糖合成酶同源的膜蛋白。*AtGsl5* 在花中随发育进程高水平表达,与花中胼胝质在花粉沉积时具有高 β -1,3-葡聚糖合酶活性相符。另外,*AtGsl5* 可能是依赖水杨酸的 SAR 的靶物质,因为在野生型中用水杨酸能诱导 *AtGsl5* mRNA 的积累。

2.2 胼胝质降解异常

H. Fei 等^[44]发现拟南芥 *MS32* 基因影响着绒毡层细胞内质网的集聚以及胼胝质的降解。在 *ms32*

突变体中,花粉母细胞在减数分裂前表现出一些胼胝质的沉积,但其包被花粉母细胞的胼胝质壁提前降解,从而使花粉发育在减数分裂时期受到影响。这与绒毡层细胞粗面内质网的堆叠有关,推测是胼胝质酶提前合成和分泌到花粉囊,造成胼胝质的提前降解。植物 β -1,3-葡聚糖酶参与植物的防御和发育,*Osg1* 是水稻 14 个编码 β -1,3-葡聚糖酶的基因之一。L. Wan 等^[13]构建了 RNAi 载体,使 *Osg1* 基因沉默。*Osg1*-RI 植株花粉母细胞表现正常,但在小孢子早期阶段,药室中的小孢子周围的胼胝质不降解,导致小孢子释放到药室的过程被延迟。该结果证实 *Osg1* 对四分体解离过程中的胼胝质适时降解是必要的。

3 绒毡层发育异常导致的雄性不育

植物的花粉囊壁在发育初期从外到内依次是表皮、药室内壁、中层和绒毡层 4 层细胞。最内层的绒毡层包裹着小孢子母细胞,并与其发育有直接关系。绒毡层细胞中包含丰富的内质网、高尔基体、线粒体等细胞器,这些细胞器向花药内室分泌大量的碳水化合物、蛋白质和脂类等,提供胼胝质降解所需的酶类,以及花粉壁的构建和小孢子的发育所需的营养^[45-46]。绒毡层对花粉的生长发育至关重要,在花粉发育早期,绒毡层包被着花粉囊;花粉发育中、晚期,绒毡层降解,提供花粉发育所需的营养;花药成熟时,绒毡层彻底降解。任何影响绒毡层发育的突变都可能导致花粉的败育^[32-47]。

3.1 花药绒毡层形成与分化异常

R. Chaubal 等^[48]对 2 个拥有相似花粉败育模式的玉米隐性雄性不育突变体的研究表明,2 个突变体预期形成绒毡层的细胞分离为 2 层,分别叫做 t1 和 t2,t1 和 t2 都不能形成为正常的绒毡层,从而导致雄性败育。K. Nonomura 等^[8]通过研究水稻 *msp1* 突变体发现,突变体花药壁的细胞层结构异常,绒毡层完全缺失。原位杂交结果显示,*MSP1* 的表达定位于雌雄孢子母细胞周围的细胞中和一些花组织中,而不在孢子母细胞中。这一结果表明水稻中的 *MSP1* 蛋白可能在限制进入孢子发育的细胞数量和启动花药壁的建成方面起重要作用。K. H. Jung 等^[14]的研究表明,水稻 *Udt1* (undeveloped tapetum1) 基因在绒毡层发育早期起着关键作用,它的缺失会使次级壁细胞不能正常分化成为成熟的绒毡层细胞,且会影响孢子母细胞减数分裂。T-DNA 或者 TOs17 转座子插入 *Udt1* 基因可导致完全雄性不育。在 *udt1* 突变体中,花药壁细胞和性母细胞在减数分

裂的早期阶段是正常的,但在减数分裂过程中,绒毡层不能分化并且液泡化,小孢子发育受阻,花粉囊内无法形成花粉。

C. Mariani 等^[49]融合了绒毡层细胞中特异表达的启动子与细胞毒素 mRNA 酶基因,构建了转化烟草和油菜并得以表达的嵌合 mRNA 酶基因,该基因能有选择地破坏毡绒层,从而阻碍花粉的形成,导致雄性不育。这种人工核雄性不育基因对研究雄性不育现象和创制更多种类的植物雄性不育很有帮助。W. Zhang 等^[50]报道的拟南芥雄性不育基因 *DYT1* (dysfunctional tapetum1) 在绒毡层高效表达,而在性母细胞中微量表达。*dyl1* 突变体绒毡层细胞高度液泡化并缺少正常细胞质,许多基因表达量明显降低,虽然其性母细胞能正常进行减数分裂 I,但它没有胼胝质,不能完成减数分裂就解体。J. Zhu 等^[51]发现拟南芥 *tdfl* 突变体有绒毡层发育缺陷,其绒毡层结构与功能都十分紊乱。*TDF1* (defective in tapetal development and function 1) 编码一个 *R2R3 MYB* 转录因子,在花药发育过程中的绒毡层、性母细胞和小孢子中有很高的表达,是控制胼胝质分解影响绒毡层分化与功能的关键基因。X. A. Zhao 等^[15]发现,OsTDL1A 与水稻受体激酶 MSP1 的 LRR 结构域结合来限制孢子母细胞的数目,其突变体产生许多孢子母细胞而不形成绒毡层从而导致雄性不育。这与拟南芥的 *EXS/EMS1* 基因,水稻的 *TPD1* (tapetum determinant1)、*MSP1*、*MAC1* 基因功能一致。*DTM1* (defective tapetum and meiocytes 1) 是控制水稻花药早期发育的基因,它编码一个只在禾谷类作物中表达的内质网膜蛋白。T-DNA 插入该基因的突变体绒毡层结构异常,缺少细胞器特别是内质网,从而使之不能正常分化和解体,并使花药发育终止在减数分裂前期 I。RNA 原位杂交试验显示 *DTM1* 在绒毡层细胞大量表达,在花粉母细胞中适量表达,说明 *DTM1* 对早期绒毡层内质网和性母细胞发育有重要作用^[52]。*MS1* 基因在拟南芥花粉后期发育中起重要作用,T. Ito 等^[53]用 *MS1* 基因和一个转录阻遏功能域 (SRDX) 构建融合基因并导入野生型拟南芥,转基因植株显示了与 *ms1* 突变体一样的半不育表型。*ms1* 突变体和 *MS1-SRDX* 转基因拟南芥的表型分析显示,*MS1* 可能与花粉外壁的构成、花粉细胞质组成和绒毡层发育及结构有关,*MS1* 的 Leu 拉链结构和 PHD 功能域在其中起重要作用。

3.2 花药绒毡层降解异常

A. Papini 等^[54]发现绒毡层细胞降解是一个细

胞程序化死亡过程 (PCD, programmed cell death), 其细胞降解残留物对于花粉的发育是必需的。绒毡层的特异分化及其降解速度与花粉的后期发育密切相关,它的提前或延迟降解都将导致雄性不育。N. Li 等^[16]发现了 *TDR* (tapetum degeneration retardation) 基因,在绒毡层细胞程序化死亡过程中起正调控因子的作用。*tdr* 突变体的绒毡层、中层因不能及时降解,而造成程序化死亡延迟,减数分裂形成的小孢子在释放后即被降解,导致完全雄性不育。这表明 *TDR* 基因是水稻绒毡层发育和退化降解分子调节网络的重要组成部分。G. Vizcay-Barrena 等^[55]发现拟南芥 *ms1* (male sterility1) 突变体在减数分裂以及早期发育过程正常;然而小孢子释放后,绒毡层液泡化,小孢子细胞质呈异常的颗粒状,并开始退化。末端标记法染色和超微结构分析表明,野生型绒毡层细胞在小孢子有丝分裂 I 期开始程序化死亡。然而 *ms1* 突变体的绒毡层细胞中自噬体和线粒体肿胀,表明绒毡层是坏死型降解而非正常的程序性死亡。在水稻中,H. Li 等^[17]发现水稻调节器 *PTCI* (persistent tapetal cell 1), 可以调控绒毡层程序化发育和花粉的功能性建成。*PTCI* 的意义体现在与拟南芥的相应突变 *MS1* 的部分遗传互补。虽然突变体 *ptc1* 与 *ms1* 表型相似:绒毡层 DNA 片段缺失、绒毡层细胞延迟降解、花粉壁建成异常、小孢子败育。但 *ptc1* 突变体同样存在其独有的特点:绒毡层细胞不受限制的增殖与坏死样的死亡,而同一时期的野生型绒毡层细胞则表现为典型的凋亡样死亡。基因表达分析表明,2417 个在绒毡层和小孢子中表达的基因大多数与绒毡层发育和降解、花粉壁建成有关,这些基因在 *ptc1* 突变体中的表达都有所改变。这表明,在单子叶植物和双子叶植物中均存在一个控制雄蕊程序性生殖发育的开关 *PTCI/MS1*。马晓娣等^[2]发现低温可导致高粱绒毡层细胞出现明显异常,主要表现为液泡化、径向肥大和延迟退化;低温条件下早期败育的花药,造孢细胞或花粉母细胞较早出现解体,无花粉粒产生。L. Hu 等^[56]发现,在水稻雄性生殖发育过程中,*MADS3* 于花药发育后期的绒毡层和小孢子中有高表达。研究显示 *MT-1-4b* 可编码一类小型富半胱氨酸金属结合蛋白,具有清除超氧自由基和羟基自由基的活性。所以推测 *MADS3* 是通过影响 *MT-1-4b* 的启动来调控活性氧水平,进而最终控制花药发育和花粉形成。*mads3-4* 突变体在花药发育晚期会表现出氧应激表型,即 *MT-1-4b* 表达的减少可引起超氧自由基水平的增高,活性氧平衡态被打

破,从而使花药壁细胞尤其是绒毡层细胞紊乱肥大或破裂、造成小孢子早亡,最终表现为完全的雄性不育。

4 花粉壁发育异常导致的雄性不育

正常花粉的花粉壁包括外壁与内壁。花粉内壁在结构上相对简单,主要由纤维素、果胶和蛋白组成;外壁主要由脂肪族聚合物孢粉素组成,表面有特异的高度修饰,在授粉和花药萌发中起着信号识别的作用^[57]。花粉壁正常的结构与组成是可育花粉所必需的。

4.1 花粉外壁结构异常

对花粉壁发育相关基因的研究最早来自拟南芥, *CER6/POPI* 基因影响拟南芥花粉外壁的发育和含油层结构^[57]。双子叶植物拟南芥、番茄等植物中,花粉外壁发育较早,四分体时期外壁已开始形成。单子叶植物水稻花粉外壁发育起步较晚,当四分体的胼胝质壁溶解,小孢子刚产生时,看不到有壁的构造^[58]。花药表皮和小孢子外壁是雄配子体和花粉粒的保护屏障,组成它们的角质单体的生物合成是否正常直接影响着花粉的育性。H. Li 等^[18]发现一个水稻雄性不育突变体 *cyp704B2*,其孢子体绒毡层肿胀,败育花粉粒中检测不到外壁,且其花药表皮发育不完全。化学组成分析显示,突变体花药中几乎没有角质单体。这些缺陷是由于细胞色素 P450 家族基因 *CYP704B2* 的突变引起的。*CYP704B2* 在酵母中的异源表达说明 *CYP704B2* 催化了 Ω 羟化脂肪酸的产生。脂肪酸 Ω 羟化途径依赖于 *CYP704B* 家族基因,所以它对植株雄性生殖和孢子发育过程中角质和外壁的建成是必不可少的。拟南芥 *MS2* 基因在小孢子释放时期的绒毡层专一表达,预测 *MS2* 编码一个花粉壁发育所需的脂肪酸还原酶,可催化蜡脂酸形成长链醇,该酶只与特异的酯酰 CoA 共同作用催化蜡质的形成,而蜡质是花粉壁的重要成分。*ms2* 突变体产生的花粉粒因蜡质缺乏而具有非常薄而粗糙的花粉外壁,这种花粉对酸解敏感,且呈现凹陷萎缩的形态 *MS2* 绿色荧光融合蛋白试验显示,其 N 端氨基转运肽将 *MS2* 固定至原生质体,这符合虽然 *MS2* 与其他特性的脂肪酸还原酶间具有高的同源性,但 *MS2* 对棕榈酰或其他脂酰辅酶 A 却没有活性的事实。遗传互补试验显示 *MS2* 的 2 个保守结构域 NAD(P)H 结合结构域和不育结构域,是 *MS2* 影响花粉外壁发育的首要因素^[57,59-60]。J. Shi 等^[19]报告了水稻雄性不育突变体 *dpw* (defective pollen wall) 的分离和特征,包括花药发育缺陷和伴有外壁异常的花粉粒退化。化学分析

显示 *dpw* 突变体花药角质单体显著减少,可溶性脂肪酸、脂肪醇以及表皮蜡质合成异常。*DPW* 基因在花药发育期的绒毡层细胞和小孢子中表达,编码一个新的脂肪酸还原酶,并参与了一个脂肪醇合成,而脂肪醇是植物花药角质与花粉孢粉素合成所必需的。单子叶植物水稻中的 *DPW* 与双子叶植物拟南芥的 *ms2* 突变体互补说明 *DPW* 很可能与 *MS2* 直向同源。此外, *AtGPAT1* 编码一个膜结合磷酸甘油脱氢酶, T-DNA 插入该基因导致 *atgp1* 突变体绒毡层和花粉壁结构异常^[55]。C. Y. Yang 等^[61]认为拟南芥 *MS1* 基因是正常花粉形成的关键,它主要与花粉壁及其外层结构的构成有关。*MS1* 主要在四分体晚期到小孢子释放阶段的绒毡层中表达,之后其表达量迅速减少。*MS1* 的表达减少影响着绒毡层分泌物和花粉外壁结构。

4.2 花粉外壁分泌物沉积异常

蜡质在防止水分损失和病原菌入侵以及适应环境胁迫等方面有重要意义。拟南芥的 *FLP1* (faceless pollen -1)、*NEF1* (no exine formation) 和 *CER1*, 还有玉米的 *GLOSSY1* 基因都对花粉表皮的蜡类沉积有重要作用。其中 *flp1* 或 *nef1* 突变体中孢粉素能正常合成但不能积累于花粉外壁的花粉质膜上,含油层油滴小而多,外壁腔被其填满,花粉表面光滑。拟南芥中的另一个突变体 *ms33* 中,花粉内壁形成和含油层积累都不正常^[57,62-63]。D. S. Zhang 等^[20]就水稻绒毡层延迟降解基因 *TDR* 在花粉发育中对脂类代谢调控所起的作用进行研究。发现在 *tdr* 突变体中,花粉壁结构、花药的脂类组成、一些可能涉及脂类孢粉素运输和新陈代谢的基因都产生了很大改变。*TDR* 除了促进绒毡层细胞程序性死亡,还在水稻花粉发育的各个基础生物进程中扮演着重要的调控角色。可见,不管是孢粉素的合成运输还是沉积都影响着外壁的形态构成。*Wda1* (wax-deficient anther1) 参与水稻花粉壁角质和蜡质的形成,是花粉发育所必需的。蜡质缺陷的突变体 *wda1*,其花药所有药室壁细胞的超长链脂肪酸合成都出现明显缺陷,花药壁外层的角质蜡层缺失,小孢子的发育迟缓,最终导致花粉外壁的形成异常。*Wda1* 在花药表层细胞强表达,且在开花期高丰度表达,其表达下调将导致雄性不育。与其他外壁脂质分子有缺陷的雄性不育突变体相比, *wda1* 突变体绒毡层的发育缺陷出现得更早^[21]。D. Zhang 等^[64]发现 *OSC6* 在水稻减数分裂后花药和花粉壁发育过程中起重要作用。*OsC6* 是 *LTP1* 和 *LTP2* 家族成员 (*LTPs* 是小分

子富脂类转运蛋白,存在于细胞膜间转运脂类),其重组体具有油脂结合活性,在 *O_sC6* 沉默的植株中,微粒体和花粉外壁均有缺陷,从而导致育性降低。

值得注意的是,这些调控小孢子外壁或内壁发育基因的突变体,绒毡层发育大都不正常。换句话说,这些导致绒毡层发育异常的基因也会影响小孢子外壁或内壁的发育,二者紧密相关^[65]。

5 花药开裂异常导致的雄性不育

授粉受精过程的完成需要花药的适时开裂,使成熟的花粉从花药中释放出来,而花药开裂则需要隔膜和裂孔的降解。水稻和谷子等自花授粉作物,花药开裂始于中层和绒毡层的降解,接着药室内壁细胞膨大,药室内壁与连接层细胞发生纤维状沉积,到后期药室间的隔膜层降解,产生一个双药室的花药,最后连接 2 个药室的细胞降解,使花药开裂^[65]。正常授粉需要花药能适时开裂以在合适的时期释放出成熟花粉,花药迟开裂、不开裂都会对育性造成影响。

智慧等^[66]、刁现民等^[67]发现谷子 Ch 型显性雄性不育花药在发育过程中,不同药室存在可育花粉粒数目差异,分别为花粉全不育以及有较多可育花粉,观察其花药开裂情况发现,无论哪种药室,其花药均不开裂。在拟南芥 *ms35* 突变体中,花药内壁不增厚、裂孔不降解,导致花药不开裂。Sander 等用 T-DNA 插入法和 EMS 诱变法分别得到 44 个和 855 个拟南芥突变体材料。其中一些突变体在花药形态建成、小孢子发生、花粉分化和花药开裂等方面有缺陷。而其中花药缺陷又分迟开裂和不开裂,还有少花粉的花药。基因功能分析证明 *POLLENLESS3* 影响着小孢子的发生,该基因突变使花药内细胞退化,从而导致花药不开裂^[66]。

茉莉酸(JA)及其前体 *OPDA*(12-oxophytodienoic acid)均是生长调节剂,可诱导和协调花药纤维丝、花药开裂和释放花粉的分子信号,但其前体 *OPDA* 没有这些作用。A. Stintzi 等^[22]用 T-DNA 插入构建了一个 *ope3* 雄性不育突变体,突变体植株可在外源茉莉酸的作用下恢复育性,而其前体 *OPDA* 不能。研究显示,*OPR3*(12-oxophytodienoate reductase 3)基因编码一个 *OPDA* 还原酶的同工酶。将 *OPR3* 的 cDNA 转入突变体植株,可减轻所发生的各项缺陷。D. Xie 等^[23]克隆了与茉莉酸应答有关的拟南芥基因 *COI1*,它编码一个具有 16 个富亮氨酸重复和一个 Fbox 结构的蛋白,*coi1* 突变体的 Fbox 具有结构缺陷。在 *coi1* 突变体中,茉莉酸的信号转导受到了

影响,但外源茉莉酸并不能修补这一缺陷。此外,在茉莉酸合成缺陷突变体中,花粉往往也具有缺陷,这说明,茉莉酸还控制着花粉的发育。拟南芥 *dad1* 突变体具有花药开裂、花粉成熟和开花缺陷,外源的茉莉酸或亚麻酸可以修补这些缺陷,这与突变体花芽中茉莉酸缺失相吻合。

S. Steiner-Lange 等^[24]获得了一个转座子插入突变体 *myb26*,它可以产生正常可育的花粉,花药发育早期以及绒毡层和中层的降解都很正常,但药室内壁不膨大,花药不能正常开裂。*MYB26* 基因在绒毡层降解时的花芽中大量表达,但在营养器官和早期花芽中不表达。同拟南芥的 *MYB26* 基因相似,水稻的 *AIDI*(anther in dehiscence 1)基因也与花药开裂有关,在未成熟的花中表达。Q. H. Zhu 等^[25]和 Y. J. Sun 等^[57]用一个转座子插入构建了一个水稻突变体 *aid1*,该突变体部分小花显示出完全的雄性不育。基于花粉粒育性和花药开裂程度可把突变体小花分为 3 类:育性正常(20%)、淀粉积累缺陷导致的雄性不育(25%)、花粉粒可育但花药不开裂或迟开裂导致不育(55%)。*AIDI* 在野生型的花和叶中都有表达,但在突变体中不表达。水稻 *AIDI* 基因和拟南芥 *MYB26* 基因共同具有的转录水平的调控影响着花药的正常开裂。J. Murmu 等^[68]发现当拟南芥植株缺少基本的亮氨酸拉链转录因子 *TGA9* 和 *TGA10* 时,花药开裂有缺陷。在 *tga9* 和 *tga10* 突变体中,近轴的和远轴的花药裂片分别在花药发育早期和后期受到不同程度的影响。这些突变体的花药开裂过程有多种缺陷,包括花药发育各阶段的不稳定性、中层的木质化、隔膜和裂孔功能的缺陷等。拟南芥 F-box 蛋白 *COI1* 可识别 JA 信号,之后便通过 SCFCOII-26S 蛋白酶途径降解 JAZs (Jasmonate-ZIM domain proteins) 蛋白,从而调节各项 JA 控制的过程,包括雄蕊育性、根系生长、花青素积累、衰老和抗性等。S. Song 等^[69]利用酵母双杂交系统从拟南芥 cDNA 文库中筛选了 JAZ 互作蛋白 MYB21 和 MYB24,这两个 R2R3-MYB 转录因子与酵母 *JAZ1*、*JAZ8* 和 *JAZ11* 可以相互作用。遗传和生理学试验显示,*myb21*、*myb24* 双突变体在花粉成熟、花药开裂和纤维丝伸长方面有明显缺陷从而导致雄性不育。在 *coi1-1* 突变体中 *MYB21* 的转基因表达可以部分恢复雄蕊育性,但不能恢复 JA 调控的根生长抑制、花青素积累和植株抗逆性。这些结果说明 R2R3-MYB 转录因子 *MYB21* 和 *MYB24* 可直接作用于 JAZs 来专门调节雄蕊育性。笔者推测 JAZs 与

MYB2、*MYB24* 相互作用可减弱它们的转录功能。接收 JA 信号后,COI1 作用于 JAZs 使之靠近 SCF-COI1 复合体,通过一个 26S 蛋白酶使之泛素化和降解;随后 *MYB21* 和 *MYB24* 激活了各个下游基因的表达,而这些基因对 JA 调控的花药发育和纤维丝伸长是必不可少的。

茉莉酸(JA)参与花药开裂调控的过程是花药开裂研究中一个重要发现。在拟南芥和稻中花药开裂异常的突变体其 JA 合成或信号转导大多也会出现异常,表明 JA 在花药开裂中起着关键性作用。

6 其他类型的细胞核雄性不育

从最初的花形态建成到花药开裂释放花粉是一个复杂多变的过程,除前述的减数分裂、胼胝质壁、绒粘层代谢、花药开裂等异常情况外,还包括多糖、脂类和蛋白代谢的异常,其中任何一个环节发生异常,都有可能导致雄性不育。

GAMYB(gibberellin myb gene)是大麦糊粉层中赤霉素依赖的 α 淀粉酶转录正调控因子,M. Kaneko 等^[26]从许多 TOs17 转座子插入的水稻突变体中分离得到一个该基因功能缺失型突变体。用 GA 诱导该突变体,其胚乳中没有 α 淀粉酶的表达,这显示了 TOs17 插入具有 *O_sGAMYB* 敲除功能。该突变体营养生长阶段正常,然而生殖生长阶段花器官尤其是花粉发育异常。*GAMYB* 影响糊粉层和花药发育过程中 α -淀粉酶的表达,在糊粉细胞、花序顶端、雌蕊原基、绒毡层细胞中有高表达,在营养生长的器官和伸长茎中低表达。这说明 *O_sGAMYB* 不仅对糊粉粒中的 α 淀粉酶敏感,对于花器官和花粉的发育也是非常重要的。Y. J. Sun 等^[27]发现受体蛋白激酶 BAM1 和 BAM2 调控着花药早期细胞的分裂和分化,二者形成一个正负反馈调节循环,控制了花药中造孢细胞和体细胞的平衡。同时 *DYT1* 基因编码一个 *bHLH* 家族转录因子,它联系着上游调控因子和下游目的基因,这对绒毡层发育及其功能是至关重要的。S. Li 等^[70]发现,编码谷氧还蛋白 GRX 的 *ROXY1* 可调控拟南芥花瓣原基启动和花瓣的形态发生。L. L. Hong 等^[71]发现 *ELE* (elongated empty glume) 基因调控着水稻护颖的发育,*ele* 突变体的护颖变得与外稃相似,在它影响下还会产生异常的内外稃、浆片、雄蕊和柱头,从而产生不育。开花植物发育过程中糖分的分配在分子水平是如何调控的仍然未知。H. Zhang 等^[28]报告了一个水稻突变体 *csa* 的特点,*csa* 突变体叶片和茎秆中的糖含量增加,从

而减少糖分和淀粉在花器官中的分配,尤其是发育后期,花药库组织中的糖分积累减少甚至出现 C 饥饿。图位克隆显示,*CSA* 基因编码一个 R2R3 MYB 转录因子,在花药绒毡层细胞和糖分运输维管组织中优先表达,它与一个单糖转运蛋白的 *MST8* 启动子相关联。而在 *csa* 突变体中,*MST8* 的表达大大减少。研究证明 *CSA* 是水稻雄性生殖发育过程中参与糖分分配的一个关键的转录调控基因。

光温敏细胞核雄性不育(PGMS 和 TGMS)是环境条件改变导致的雄性不育,利用光敏核不育和温敏核不育系的两系法杂交水稻已广泛应用于农业生产。H. Zhou 等^[29]克隆了农垦 58 中的光敏雄性不育基因 *P/TMS12-1* (photo-or thermo-sensitive genic male sterility), 粳稻农垦 58 (NK58S) 和籼稻培矮 64S (PA64S) 均存在该不育基因。野生型等位基因 *P/TMS12-1* 的 2.4 kb 的 DNA 片段可以恢复 NK58S 和 PA64S 的花粉育性。*P/TMS12-1* 编码一个不翻译的 RNA,它可以产生一个含有 21 个核苷酸的小 RNA Osa-smR5864w。而 *p/tms12-1* 中有一个 CG 置换存在于小 RNA 中,命名为 Osa-smR5864m。*P/TMS12-1* 的 375 bp 序列在转基因农垦 58 和培矮 64 植株中超表达,同时产生正常小 RNA Osa-smR5864w 并使花粉恢复育性。结果显示 *p/tms12-1* 的点突变导致 Osa-smR5864m 的功能缺失,进而分别导致了粳稻光敏和籼稻温敏。因此,这个非编码的小 RNA 是由基因和环境共同控制的雄性发育的重要调控序列。J. H. Ding 等^[72]在水稻光敏雄性不育材料农垦 58 突变体 58S 中发现一个长度为 1236 bp 的非编码 RNA (*lncRNA*), 并称之为长日照雄性不育相关 RNA (*LDMAR*), 它调节水稻的光敏雄性不育,足够剂量的 *LDMAR* 转录物对长日照条件下植株花粉发育是必须的。该 *lncRNA* 突变产生的 SNP 导致了 *LDMAR* 二级结构的改变,使 *LDMAR* 启动区甲基化,从而使长日照下 *LDMAR* 的转录减少,最终导致花药过早地程序化死亡,产生光敏型雄性不育。事实上这两项研究克隆的是同一个基因,突变的 SNP 也完全相同。很多真核生物基因组序列可转录成长链非编码 RNA (*lncRNAs*), 然而,目前只有一小部分的 *lncRNAs* 的潜在功能被发现,该雄性不育 *lncRNAs* 的发现,更促进了我们对这类基因的认识,也说明对 *lncRNAs* 的研究还需投入更大的努力。

7 结语

从观察到雄性不育现象到雄性不育的分类和遗

传研究,再到雄性不育的分子机理分析是一个逐步深入的过程,这不仅有助于丰富植物生殖基础知识,更有助于雄性不育系的培育和杂种优势利用,提高作物产量。目前从模式植物克隆的很多雄性不育相关基因在其他物种中都有同源基因,这说明植物的花粉发育过程是相对保守的,这些基因在不同物种中可能有相同或相似的作用,这无疑将有利于我们对植物雄性不育机理的认识。同时,由于多种原因均可导致雄性不育,新的雄性不育基因在不断发现,有关研究必将进一步提升我们对雄性不育的认识,也促进雄性不育系的培育和育种利用。从目前的研究结果来看,多数研究是发现了雄性不育,首先进行遗传和基因定位与克隆,然后进行的多数是细胞学表现比较观察,实际上这些细胞学表现是一系列分子过程和网络的结果,只不过比雄性不育这个最终的表现型结果更深入,是基因变异在不同表现型水平上的结果。鉴于目前的研究水平和试验能力,我们还不能较为清楚地认识和了解这个过程中的分子机理,加强有关方面的生化研究有助于我们对这些分子过程和机理的认识。

参考文献

- [1] 刘龙龙,张丽君,范银燕,等. 燕麦雄性不育新种质在遗传改良中的应用[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(1):189-192
- [2] 马晓娣,王建书,卢彦琦,等. 不同温度条件下高粱温敏雄性不育系冀130A育性变化规律及花粉败育研究[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(2):212-218
- [3] Nonomura K I, Nakano M, Murata K, et al. An insertional mutation in the rice *PAIR2* gene, the ortholog of Arabidopsis *ASY1*, results in a defect in homologous chromosome pairing during meiosis [J]. *Mol Genet Genomics*, 2004, 271 (2) : 121-129
- [4] Nonomura K I, Nakano M, Fukuda T, et al. The novel gene *HOMOLOGOUS PAIRING ABERRATION IN RICE MEIOSIS1* of rice encodes a putative coiledcoil protein required for homologous chromosome pairing in meiosis [J]. *Plant Cell*, 2004, 16 (4) : 1008-1020
- [5] Zhou S R, Wang Y, Li W C, et al. *Pollen Semi-Sterility1* encodes a kinesin-I-like protein important for male meiosis, anther dehiscence, and fertility in rice [J]. *Plant Cell*, 2011, 23 (1) : 111-129
- [6] Wang M, Tang D, Luo Q, et al. *BRK1*, a *Bub1*-related kinase, is essential for generating proper tension between homologous kinetochores at metaphase I of rice meiosis [J]. *Plant Cell*, 2012, 24 (12) : 4961-4973
- [7] Hong L L, Tang D, Zhu K M, et al. Somatic and reproductive cell development in rice anther is regulated by a putative glutaredoxin [J]. *Plant Cell*, 2012, 24 (2) : 577-588
- [8] Nonomura K, Miyoshi K, Eiguchi M, et al. The *MSPI* gene is necessary to restrict the number of cells entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in rice [J]. *Plant Cell*, 2003, 15 (8) : 1728-1739
- [9] Pawlowski W P, Wang C J R, Golubovskaya I N, et al. Maize *AMEIOTICI1* is essential for multiple early meiotic processes and likely required for the initiation of meiosis [J]. *PNAS*, 2009, 106 : 3603-3608
- [10] Hong Z L, Delauney A J, Verma D P S. A cell plate-specific callose synthase and its interaction with phragmoplastin [J]. *Plant Cell*, 2001, 13 (4) : 755-768
- [11] Che L X, Tang D, Wang K J, et al. *OsAMI* is required for leptotene-zygotene transition in rice [J]. *Cell Res*, 2011, 21 : 654-665
- [12] Ostergaard L, Petersen M, Mattsson O, et al. An *Arabidopsis* callose synthase [J]. *Plant Mol Bio*, 2002, 49 (6) : 559-566
- [13] Wan L, Zha W, Cheng X, et al. A rice β -1,3-glucanase gene *Osg1* is required for callose degradation in pollen development [J]. *Planta*, 2011, 233 (2) : 309-323
- [14] Jung K H, Han M J, Lee Y S, et al. Rice *Undeveloped Tapetum1* is a major regulator of early tapetum development [J]. *Plant Cell*, 2005, 17 : 2705-2722
- [15] Zhao X A, de Palma J, Oane R, et al. *OsTDLIA* binds to the LRR domain of rice receptor kinase *MSPI*, and is required to limit sporocyte numbers [J]. *Plant J*, 2008, 54 (3) : 375-387
- [16] Li N, Zhang D S, Liu H S, et al. The rice *tapetum degeneration retardation* gene is required for tapetum degradation and anther development [J]. *Plant Cell*, 2006, 18 : 2999-3014
- [17] Li H, Yuan Z, Vizcay-Barrena G, et al. *PERSISTENT TAPETAL CELL1* encodes a PHD-finger protein that is required for tapetal cell death and pollen development in rice [J]. *Plant Physiol*, 2011, 156 (2) : 615-630
- [18] Li H, Pinot F, Sauveplane V, et al. Cytochrome P450 family member *CYP704B2* catalyzes the ω -hydroxylation of fatty acids and is required for anther cutin biosynthesis and pollen exine formation in rice [J]. *Plant Cell*, 2010, 22 (1) : 173-190
- [19] Shi J, Tan H, Yu X H, et al. Defective pollen wall is required for anther and microspore development in rice and encodes a fatty acyl carrier protein reductase [J]. *Plant Cell*, 2011, 23 (6) : 2225-2246
- [20] Zhang D S, Liang W Q, Yuan Z, et al. Tapetum degeneration retardation is critical for aliphatic metabolism and gene regulation during rice pollen development [J]. *Mol Plant*, 2008, 1 (4) : 599-610
- [21] Jung K H, Han M J, Lee D Y, et al. *Wax-deficient anther1* is involved in cuticle and wax production in rice anther walls and is required for pollen development [J]. *Plant Cell*, 2006, 18 : 3015-3032
- [22] Stintzi A, Browse J. The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis [J]. *PNAS*, 2000, 97 (19) : 10625-10630
- [23] Xie D, Feys B, James S, et al. *COI1*: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility [J]. *Science*, 1998, 280 : 1091-1094
- [24] Steiner-Lange S, Unte U S, Eckstein L, et al. Disruption of *Arabidopsis thaliana* *MYB26* results in male sterility due to non-dehiscent anthers [J]. *Plant J*, 2003, 34 (4) : 519-528
- [25] Zhu Q H, Ramm K, Shivakumar R, et al. The *ANTHER INDEHISCENCE1* gene encoding a single MYB domain protein is involved in anther development in rice [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135 (3) : 1514-1525
- [26] Kaneko M, Inukai Y, Ueguchi-Tanaka M, et al. Loss-of-function mutations of the rice *GAMYB* gene impair alpha-amylase expression in aleurone and flower development [J]. *Plant Cell*, 2004, 16 (1) : 33-44
- [27] Sun Y J, Hord C L H, Chen C B, et al. Regulation of *Arabidopsis* early anther development by putative cell-cell signaling molecules and transcriptional regulators [J]. *J Integr Plant Biol*, 2007, 49 (1) : 60-68
- [28] Zhang H, Liang W, Yang X, et al. Carbon starved anther encodes a MYB domain protein that regulates sugar partitioning required for rice pollen development [J]. *Plant Cell*, 2010, 22 (3) : 672-689
- [29] Zhou H, Liu Q J, Li J, et al. Photoperiod- and thermo-sensitive genetic male sterility in rice are caused by a point mutation in a novel noncoding RNA that produces a small RNA [J]. *Cell Res*, 2012, 22 : 649-660

- [30] Dawe R. Meiotic chromosome organization and segregation in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49:371-395
- [31] Chen C B, Xu Y Y, Ma H, et al. Cell biological characterization of male meiosis and pollen development in rice [J]. *J Integr Plant Biol*, 2005, 47:734-744
- [32] Bhatia A, Canales C, Dickinson H. Plant meiosis: the means to 1N [J]. *Trends Plant Sci*, 2001, 6:114-121
- [33] Nonomura K I, Nakano M, Eiguchi M, et al. PAIR2 is essential for homologous chromosome synapsis in rice meiosis I [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119:217-225
- [34] Yuan W, Li X, Chang Y, et al. Mutation of the rice gene PAIR3 results in lack of bivalent formation in meiosis [J]. *Plant J*, 2009, 59(2):303-315
- [35] Chang L, Ma H, Xue H W. Functional conservation of the meiotic genes SDS and RCK in male meiosis in the monocot rice [J]. *Cell Res*, 2009, 19(6):768-782
- [36] Zhang L, Tao J, Wang S, et al. The rice OsRad21-4, an orthologue of yeast Rec8 protein, is required for efficient meiosis [J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 60(4):533-554
- [37] Shao T, Tang D, Wang K, et al. OsREC8 is essential for chromatid cohesion and metaphase I monopolar orientation in rice meiosis [J]. *Plant Physiol*, 2011, 156(3):1386-1396
- [38] 蔺兴武, 吴建国, 石春海. 远缘杂交油菜核不育系的创建及其细胞学和形态学研究 [J]. *遗传*, 2005, 27(3):403-409
- [39] Zhao D Z, Wang G F, Speal B, et al. The *EXCESS MICROSPO-ROCUTES1* gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther [J]. *Genes Dev*, 2002, 16:2021-2031
- [40] Nonomura K I, Morohoshi A, Nakano M, et al. A germ cell specific gene of the *ARGONAUTE* family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice [J]. *Plant Cell*, 2007, 19:2583-2594
- [41] Ravi M, Marimuthu M P A, Siddiqi I. Gamete formation without meiosis in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2008, 451:1121-1124
- [42] Stieglitz H. Role of β -1,3-glucanase in postmeiotic microspore release [J]. *Dev Biol*, 1977, 57(1):87-97
- [43] Dong X, Hong Z, Sivaramakrishnan M, et al. Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*. 2005, 42(3):315-328
- [44] Fei H, Sawhney V. MS32-regulated timing of callose degradation during microsporogenesis in *Arabidopsis* is associated with the accumulation of stacked rough ER in tapetal cells [J]. *Sex Plant Reprod*, 1999, 12(3):188-193
- [45] Bedinger P. The remarkable biology of pollen [J]. *Plant Cell*, 1992, 4:879-887
- [46] Pacini E, Franchi G. Role of the tapetum in pollen and spore dispersal [J]. *Plant Syst Evol*, 1993, 7:1-11
- [47] 周时荣. 水稻花粉半不育基因 *PSSI* 的图位克隆与功能研究 [D]. 南京:南京农业大学, 2009
- [48] Chaubal R, Zanella C, Trimmell M R, et al. Two malesterile mutants of *Zea mays* (Poaceae) with an extra cell division in the anther wall [J]. *Am J Bot*, 2000, 87(8):1193-1201
- [49] Mariani C, De Beuckeleer M, Treutner J, et al. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene [J]. *Nature*, 1990, 347:737-741
- [50] Zhang W, Sun Y, Timofejeva L, et al. Regulation of *Arabidopsis* tapetum development and function by *DYSFUNCTIONAL TAPE-TUMI* (*DYT1*) encoding a putative bHLH transcription factor [J]. *Development*, 2006, 133:3085-3095
- [51] Zhu J, Chen H, Li H, et al. *Defective in Tapetal Development and Function 1* is essential for anther development and tapetal function for microspore maturation in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2008, 55(2):266-277
- [52] Yi J, Kim S R, Lee D Y, et al. The rice gene *DEFECTIVE TAPE-TUM AND MEIOCYTES 1* (*DTMI*) is required for early tapetum development and meiosis [J]. *Plant J*, 2012, 70(2):256-270
- [53] Ito T, Nagata N, Yoshida Y, et al. *Arabidopsis MALE STERILITY1* encodes a PHD-type transcription factor and regulates pollen and tapetum development [J]. *Plant Cell*, 2007, 19:3549-3562
- [54] Papini A, Mosti S, Brighigna L. Programmed-cell-death events during tapetum development of angiosperms [J]. *Protoplasma*, 1999, 207:213-221
- [55] Vizcay-Barrena G, Wilson Z A. Altered tapetal PCD and pollen wall development in the *Arabidopsis ms1* mutant [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(11):2709-2717
- [56] Hu L, Liang W, Yin C, et al. Rice MADS3 regulates ROS homeostasis during late anther development [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(2):515-533
- [57] Ma H. Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2005, 56:393-434
- [58] 谭何新, 文铁桥, 张大兵. 水稻花粉发育的分子机理 [J]. *植物学通报*, 2007, 24(3):330-339
- [59] Aarts M, Hodge R, Kalantidis K, et al. The *Arabidopsis MALE STERILITY 2* protein shares similarity with reductases in elongation/condensation complexes [J]. *Plant J*, 1997, 12(3):615-623
- [60] Chen W, Yu X H, Zhang K, et al. *Male Sterile2* encodes a plastid-localized fatty acyl carrier protein reductase required for pollen exine development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2011, 157(2):842-853
- [61] Yang C Y, Vizcay-Barrena G, Conner K, et al. *MALE STERILITY1* is required for tapetal development and pollen wall biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 2007, 19:3530-3548
- [62] 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 [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 53(1-2):107-116
- [63] Ariizumi T, Hatakeyama K, Hinata K, et al. Disruption of the novel plant protein NEF1 affects lipid accumulation in the plastids of the tapetum and exine formation of pollen, resulting in male sterility in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2004, 39(2):170-181
- [64] Zhang D, Liang W, Yin C, et al. *OsC6*, encoding a lipid transfer protein, is required for postmeiotic anther development in rice [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154(1):149-162
- [65] Sanders P, Bui A, Weterings K, et al. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants [J]. *Sex Plant Reprod*, 1999, 11(6):297-322
- [66] 智慧, 王永强, 李伟, 等. 利用野生青狗尾草的细胞质培育谷子质核互作雄性不育材料 [J]. *植物遗传资源学报*, 2007, 8(3):261-264
- [67] 刁现民, 瑞恒, 王天宇, 等. 谷子 Ch 型显性雄性核不育花药在发育的细胞形态学研究 [J]. *华北农学报*, 1991, 6(1):13-17
- [68] Murmu J, Bush M J, DeLong C, et al. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors TGA9 and TGA10 interact with floral glutaredoxins ROXY1 and ROXY2 and are redundantly required for anther development [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154:1492-1504
- [69] Song S, Qi T, Huang H, et al. The Jasmonate-ZIM Domain Proteins Interact with the R2R3-MYB Transcription Factors MYB21 and MYB24 to Affect Jasmonate-Regulated Stamen Development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(3):1000-1013
- [70] Li S, Lauri A, Ziemann M, et al. Nuclear activity of ROXY1, a glutaredoxin interacting with TGA factors, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21:429-441
- [71] Hong L L, Qian Q, Zhu K M, et al. E1E restrains empty glumes from developing into lemmas [J]. *J Genet Genomics*, 2010, 37(2):101-115
- [72] Ding J H, Lu Q, Ouyang Y, et al. A long noncoding RNA regulates photoperiod-sensitive male sterility, an essential component of hybrid rice [J]. *PNAS*, 2012, 109(7):2654-2659