

棉花雄性不育的研究进展

石雅丽, 张锐, 任茂智, 孟志刚, 周焘, 孙国清, 孟钊红, 郭三堆*

中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

摘要: 棉花在产量、品质、生理生化特性等不同的性状上均具有明显的杂种优势。棉花雄性不育在棉花杂种优势的利用上具有重要作用, 棉花雄性不育可以突破传统人工去雄杂交育种的瓶颈, 为棉花杂交种制种的商业化推广展现了光明的前景。综合目前棉花雄性不育的研究成果, 本文介绍了棉花雄性不育系的类型, 综述了其细胞学特征、分子机理, 以及相应培育方法, 同时分析了目前存在的问题, 并对雄性不育系的应用前景进行了展望。

关键词: 棉花; 雄性不育; 杂种优势

DOI: 10.3969/j.issn.2095-2341.2013.05.04

Advanced Study on the Male Sterility of Cotton

SHI Ya-li, ZHANG Rui, MENG Zhi-gang, ZHOU Tao, SUN Guo-qing, MENG Zhao-hong, GUO San-dui*

Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: There is fully apparent heterosis in cotton, showing on the production, quality and physiological characteristics of cotton. The male sterility on cotton has played an important role in heterosis usage in cotton. Utilization of the male sterile system have made a breakthrough in conquering breeding bottleneck by artificial emasculation and unfolded a bright outlook for promoting commercial production of hybrid seed. This paper reviewed the major advances of biological research on the male sterility in cotton in the past decade; focused on the types, cytological features, mechanisms and breeding method of male sterile cotton; analyzed the existed problems; and maked prospects of male sterility applications.

Key words: cotton; male sterility; heterosis

棉花是一种重要的天然纤维作物, 而棉铃则是体现其经济价值的重要器官, 因此对棉花的生殖发育机制进行研究, 特别是对雄蕊的发育机制的研究, 对培育棉花新品种、促进棉花产业更快发展都具有非常重要的意义。

目前, 杂交棉的种植面积逐年递增。据统计^[1], 20世纪90年代初杂交棉种植面积仅占全国棉花种植面积的0.3%, 到90年代末为10.8%, 到2006年全国杂交棉种植面积达179万hm², 占棉花播种面积的33.2%。杂交棉现已成为生产中的主要棉花品种, 在我国长江流域棉区已基本普及, 黄河流域及新疆棉区正在大力发展。在应用杂交棉进行杂交制种方面, 棉花雄性不育系具有很强的应用价值。这是因为雄性不育杂交种的推

广有很多优势, 如: 省去人工去雄和降低制种成本。但目前, 由于高优势组合较少, 制约着不育系在生产上的大面积应用。因而, 深入研究雄性不育的分子机理以及杂种优势的形成机制, 可促进棉花雄性不育杂交种的大面积应用。

1 棉花雄性不育的主要类型

植物雄性不育是指两性花植物的雄蕊丧失功能的现象, 主要特征为雄蕊不能产生可育的花粉, 而雌蕊发育正常, 可以通过授粉结实。雄性不育的性状有些是由遗传因素控制的, 包括细胞核雄性不育和细胞质雄性不育两类; 有些是由外界环境因素(如光、温度、化学试剂等)导致的。

收稿日期: 2013-07-25; 接受日期: 2013-09-10

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08005-004)资助。

作者简介: 石雅丽, 博士, 研究方向为植物基因工程。E-mail: shiyali2006@126.com。* 通信作者: 郭三堆, 研究员, 从事棉花基因工程研究。E-mail: guosandui@caas.cn

1.1 细胞核雄性不育 (genome male sterility, GMS)

植物核雄性不育是由细胞核内染色体上的不育基因所决定的雄性不育,其遗传方式遵循孟德尔遗传规律。核雄性不育系由核基因控制,有隐性和显性两种,主要为单基因控制。目前已发现17种不同基因类型的核雄性不育系^[2]。

1.2 细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS)

植物胞质雄性不育是由胞质基因和核基因共同控制的不育类型,因而又称为核质互作雄性不育。根据胞质来源不同,细胞质雄性不育系的类型主要有哈克尼西棉胞质不育系(D₂₋₂)、亚洲棉(A₂)胞质不育系、异常棉(B₁)胞质不育系、三裂棉胞质不育系(D₈)、陆地棉(AD₁)胞质不育系和海岛棉胞质不育系(AD₂)。目前,已育成的不育系有:哈克尼西棉胞质不育系 DES-HAms16 和 DES-HAms277^[3];亚洲棉胞质不育系 P24-6A^[4];三裂棉胞质不育系 D8ms^[5];陆地棉胞质不育系晋 A^[6] 和 104-7A^[7,8];海岛棉胞质不育系湘远 A^[9] 等。

1.3 生态敏感型雄性不育

生态敏感型雄性不育是指花粉育性受环境控制。根据对光、温反映的不同还可划分为3种类型:温敏型、光敏型和温光互作型。其中,以温度影响最为显著。由于生态敏感型雄性不育受环境和遗传双因素控制,其分子机理很复杂,因此有关生态敏感型雄性不育的相关报道较少。

2 棉花雄性不育的细胞学特征

2.1 核雄性不育系中的小孢子败育

小孢子的发育过程要经过复杂的生理生化变化,在这个过程中,不同发育时期伴随着不同基因的时空表达差异,而这个过程中的任何一个相关基因的突变,都会直接或间接影响小孢子的发育。因此,对于棉花核雄性不育系,小孢子败育会发生在小孢子发育的整个过程,败育时期和特征的差别仅仅因材料而不同。

已报道过的棉花核雄性不育系中小孢子败育的时期和特征主要有4种类型:①造孢细胞时期:核仁增大、胞质液化、细胞形态畸形。②花粉母细

胞时期:核仁穿壁,花粉母细胞中有多个核仁,在减数分裂前期 I 后就退化解体,小孢子母细胞呈半月形,如 *ms8ms9* 的败育现象^[10]。③单核期:胼胝质壁在减数分裂期后就溶解,小孢子外壁不出现刺突,原生质体质壁分离,随后核膜溶解,细胞质和核质解体,如陆地棉 1355A (*ms2*)^[11] 和 473A(*ms14*)^[12] 不育系。④双核期:小孢子产生的生殖细胞紧贴于小孢子内壁,产生的营养细胞与花粉粒原生质体一起皱缩,随后两种细胞都解体,如:*ms5ms6* 不育系^[13]。

2.2 细胞质雄性不育系中的小孢子败育

姚长兵等^[14]对哈克尼西棉细胞质雄性不育系的小孢子母细胞发育过程进行了细胞学研究,发现其可以形成正常的孢原细胞、造孢细胞以及小孢子母细胞,药壁分化正常,但在减数分裂前期,绒毡层提前解体,小孢子母细胞随即退化。由于绒毡层是小孢母细胞的营养源,所以推测棉花细胞质雄性不育系中小孢子母细胞败育可能与绒毡层的提前解体有关。黄晋玲等^[15]发现晋 A 细胞质雄性不育系败育的主要时期是在造孢细胞增殖期,即小孢子母细胞形成时期,其主要细胞学特征是:造孢细胞胞内常有多个微核,不能进行正常的有丝分裂,小孢子母细胞细胞质液泡化,最终造孢细胞和小孢子母细胞提前退化,因此推测小孢子母细胞的败育与绒毡层的退化密切相关。武小平^[16]对 104-7A 起源的细胞质雄性不育系 P30A 小孢子发育进行细胞形态学观察,发现 P30A 败育主要发生在花粉母细胞形成阶段,其主要的细胞学特征是:孢原细胞分化正常,有大量的初期花粉母细胞产生,但随后花粉母细胞细胞质液泡化,原生质紧缩,核仁消失,最后细胞解体,同时在花药发育的过程中没有明显的绒毡层细胞形成,成熟花药的药室全部充满了破裂的花粉母细胞内含物以及药室内壁物质。上述研究均证明花粉败育与绒毡层细胞发育异常有关。

综合以上研究结果,细胞质雄性不育的败育时期多集中在早期,主要是造孢细胞时期和减数分裂时期,造孢细胞时期特征为有丝分裂异常;减数分裂时期特征为花粉母细胞胞质液泡化,随即解体。同时在多个细胞质不育系中观察到绒毡层较早退化,绒毡层作为小孢子发育的营养源,其较早解体必将导致小孢子发育异常。因此,胞质不育较彻底可能与绒毡层提前退化密切相关。

3 棉花雄性不育的分子机理

3.1 核雄性不育的分子机理研究

3.1.1 核雄性不育的基因表达差异分析 比较雄性不育与可育的基因表达差异,是研究核雄性不育分子机理的重要方面。Ma 等^[17]对比了棉花 *ms5ms6* 双隐性核雄性不育的可育株和不育株的花粉发育过程,发现造孢细胞时期、小孢子母细胞时期和花粉粒时期有 17 个差异表达片段,分属 11 种表达模式,可能参与信号转导与能量代谢等相关过程。侯磊等^[18]对洞 A 雄性不育和可育棉花中花粉发育相关基因的表达进行分析,发现不育和可育花粉 cDNA-AFLP 的谱带在单核期的差异大于减数分裂期,而在花粉发育早期即花粉母细胞的减数分裂期,不育株中基因的表达减少,而且有些条带虽未消失,但表达量下降了;与可育株相比,随着花粉花药的发育,不育株在花药表型上的异常越来越明显;在花粉成熟期,产生花药中无花粉的现象。

3.1.2 核雄性不育相关基因 根据遗传学和细胞学试验,张天真等^[19]发现陆地棉核不育系 1355A 的不育性状是 *ms2* 单基因控制的,因此 1355A 是研究核不育的重要材料。随后,王国英等^[20]以 1355A 为材料,在 F₂ 群体中分别构建了可育系与不育系的 DNA 池,获得了 40 对(32 对 SSR、8 个 SRAP 组合)多态性引物。连锁分析显示,3 个 SSR 标记(4 个多态性位点)与雄性不育基因紧密连锁。标记 BNL3932₈₀₀ 和 BNL3932₈₇₀ 距离 *ms2* 分别为 1.56 cM 和 2.08 cM,位于 *ms2* 另一端的 BNL236 和 CIR295 遗传距离分别是 3.23 cM 和 4.76 cM。根据棉花基因组图谱将该基因定位在 14 号染色体上,从而实现了陆地棉雄性核不育基因 *ms2* 的首次精细定位。

目前,已克隆到多个参与棉花雄蕊发育或雄蕊特异性表达的核基因。例如, MADS-Box 蛋白基因是一类转录因子,在棉花花分化早中期参与雄蕊发育,包括 *GhMADS1*^[21]、*GhMADS3*^[22] 和 *GhMADS-13*^[23] 等,其中 *GhMADS1* 编码 236 个氨基酸,在陆地棉的花瓣、雄蕊、胚珠和纤维中表达,而在根、茎、叶等营养器官和棉花同源异型突变体 CHV1(所有花器官均变为苞叶状叶性器官)的变异花蕾中不表达;*GhMADS3* 主要在棉花的雄蕊和

心皮中表达;*GhMADS-13* 在棉花花发育早中期表达量逐步增加,后期有下降趋势,同时在雌蕊和雄蕊中表达量较高,推测 *GhMADS-13* 可能在开花诱导和花器官发育过程中起着重要作用。2009 年, Wang 等^[24]通过荧光定量 PCR 和 Northern 杂交实验发现酰基辅酶 A 合成酶 1 基因(*GhACS1*) 在棉花雄蕊分化的整个过程都有表达,在花药尤其是绒毡层分化中优势表达,原位杂交实验表明 *GhACS1* 在初生造孢细胞、花粉母细胞、小孢子母细胞和绒毡层细胞中表达,*GhACS1* 的活性对于初生造孢细胞、花粉母细胞、小孢子母细胞和绒毡层细胞中脂肪酸代谢起重要作用,抑制该基因的表达会在花药发育早期影响绒毡层发育,进而导致雄性不育,因此 *GhACS1* 基因在棉花花药发育早期的小孢子发生过程中起作用,而且可能参与小孢子正常分化与发育。在成熟花粉中还发现特异表达的基因还有多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, PG) 和第三类过氧化物酶(peroxidase, POD) 基因。John 等^[25]研究发现 PG 基因在棉花花药发育后期开始表达,到成熟花粉粒时达到最大量,并且为花粉特异表达基因,表明该基因参与花药发育后期事件,与花粉成熟密切相关。研究还发现棉花中的一个花特异 POD 基因在花粉中优势表达,可能参与被子植物的雄蕊发育;同时一些棉花中的 Class III 过氧化物酶基因只在花粉中表达,表明它是棉花雄性生殖发育中的胁迫应答因子^[26]。

综上所述,花粉发育的过程中表达的基因参与了多个生理生化反应,如激素调节、能量变化和代谢调控等。这些基因的表达具有时空性,有些基因则具有特异性。

3.2 胞质雄性不育的分子机理研究

3.2.1 胞质雄性不育分子机理及应用 根据现有研究结果,目前公认的胞质不育形成机制为:一方面胞质中线粒体或叶绿体基因组中的基因发生了突变或分子重排,导致该基因编码的蛋白质不能发挥功能,造成植物不育;另一方面是胞质线粒体基因发生分子重排,其产物影响了线粒体的正常功能,进而花粉发育受阻,最终导致雄性不育。王学德等^[10]以哈克尼西棉细胞质雄性不育系和保持系为研究对象,发现不育系中缺少一条分子质量约为 31 kDa 的多肽片段,线粒体 DNA 缺少 1 条 1.9 kb 的片段,该片段与 *COX1* 基因具有同源

序列,推测胞质雄性不育可能是由于线粒体基因组发生突变或重排,造成 *COX1* 基因的变异引起的。黄晋玲^[27]以陆地棉晋 A 胞质雄性不育系和保持系为研究对象,也发现在线粒体基因 *atp6* 和 *COX1* 基因的杂交带中,不育系分别缺少 5.7 kb 和 4.2 kb 的强杂交带。同时,Christine^[28]发现目前至少有 14 个线粒体基因与胞质不育有关,它们的共同特征是基因的开放阅读框由已知线粒体基因的编码序列、已知基因的侧翼序列和未知区域的序列共同组成。蒋培东^[29]研究了哈克尼西棉胞质雄性不育的机理,推测线粒体中 *cox III* 基因的突变和线粒体结构异常,导致线粒体呼吸链异常,活性氧清除酶活性和抗氧化酶降低,从而使花药中积累大量的应激活性氧,对细胞发育产生了毒害。黄晋玲^[27]在酶切基因组 DNA 后发现二者有 8 个多态性的叶绿体 CAPS 标记。2009 年,马勇等^[30]以哈克尼西棉胞质雄性不育系的败育高峰期——花粉母细胞减数分裂之前的花药和同型保持系相同时期的花药为材料,利用 cDNA-AFLP 技术进行差异片段分析,其中差异片段有在不育系中上调(或特异)表达的基因,也有在保持系中上调(或特异)表达的基因,这些差异基因主要参与信号转导、转录、能量代谢、RNA 编辑、细胞程序化死亡和雄配子发育等相关过程。因此,通过研究不育系和保持系在叶绿体和线粒体基因组结构、转录和翻译产物方面的差异,证实棉花胞质雄性不育系的形成原因可能存在于线粒体和叶绿体的遗传系统中,尤其是线粒体。

由此,张晓等^[31]开发出可鉴定棉花可育胞质与不育胞质的 3 个分子标记,分别是 SSR160、SCAR515 和 SCAR555。其中 SSR160 是线粒体基因 *atpA* RFLP 片段 3'端的一个 SSR 位点,在可育胞质中为 (TAA)₇(TA)₆,在哈克尼西棉 CMS 系 (CMS-D2)、陆地棉和海岛棉的不育胞质中是 (TAA)₃(TA)₂,而在三裂棉 CMS 系 (CMS-D8) 胞质中是 (TAA)₄(TA)₃; SCAR515 和 SCAR555 是 *atpA* 截短型拷贝 RFLP 片段上可育胞质与不育胞质中分别存在一段 515bp 和 555bp 的差异序列,而且这两条差异序列完全不同。由于三裂棉 CMS 系 (CMS-D8) 胞质与其他 CMS 系的差异,张晓等^[31]根据 SNP 位点,开发出 CMS-D8 特异分子标记 SCARD8。

3.2.2 育性恢复机理研究 研究胞质雄性不

育系机理的目的,除了寻找不育基因外,还为了研究恢复基因对育性的调控。一般认为,雄性不育系的细胞质中存在不育基因 S,而核内则有相对应的一对或一对以上的隐性基因 *rff*。而恢复系核中的恢复基因 (restorer of fertility, *Rf*) 能抑制 CMS 的表型,具有使不育恢复为可育的功能。以基因型表示为:不育系为 S (*rff*),保持系为 N (*rff*),恢复系为 S (*RfRf*) 或 N (*RfRf*)。关于棉花胞质雄性不育的育性恢复机理已取得了一些初步的研究进展。目前,主要通过图位法或者差异分析法进行研究。

图位法即通过构建遗传图谱和物理图谱克隆恢复基因。2006 年,Yin 等^[32]报道通过构建与恢复基因连锁的遗传图谱和物理图谱,将恢复基因定位在第 19 号染色体上,物理定位于 2 个基因组 BAC 克隆 100kb 的重叠区域中。2008 年,侯思宇^[33]在(不育系 P30A×恢复系 Y18R)×保持系 P30B 回交群体中发现,子代育性分离比 1:1(不育:可育),符合孟德尔遗传规律,这表明育性恢复性状是由一对显性基因控制的;随后以恢复系 Y18R 为材料构建了与恢复基因连锁的遗传图谱,在图距总长为 13.2 cM 中,STS147 标记与恢复基因的遗传距离为 0.1 cM,同时发现了一个与恢复基因遗传距离为 2.4 cM 的新标记 MGHES28。

以棉花三系为研究材料,也可以通过花发育基因的表达差异分析育性恢复机理。Zhang 等^[34]以棉花 D8 胞质雄性不育系的杂合体(携带有恢复基因)和正常可育(不含有恢复基因)保持系的花药组织为研究对象,使用差异显示技术,发现了一些上调或者下调的基因,推断它们与花药发育相关,并指出恢复基因不是一个花粉特异表达的基因。

综上所述,胞质雄性不育与恢复的机理可归纳为:①不育系线粒体的 CMS 基因改变了线粒体的一些代谢与能量状态,包括呼吸链的改变;②恢复基因对 CMS 基因的功能具有抑制作用;③不育胞质线粒体的状态对其细胞核发出信号,使该不育胞质的细胞核内与雄蕊发育的相关基因表达异常,激活、抑制或进入程序性死亡,在线粒体与细胞核内参与信号传递作用的系统可能有活性氧、磷酸化、钙等信号系统;而细胞核内决定花器官形成的 MADS-box 转录因子或参与程序性死亡的蛋白质则被认为是 CMS 基因作用的靶蛋白^[35]。

4 棉花雄性不育的应用

4.1 核雄性不育系的培育方法与应用

4.1.1 核雄性不育系的创造 棉花的核雄性系主要来源于自然突变体、人工转育以及基因工程创造。如国内的洞 A,其原始不育系就是一株天然雄性不育株。靖深蓉等^[36]利用人工转育,将双隐性核雄性不育系 *ms5ms6* 不育基因转育到高产、耐黄萎病品种中棉所 12,育成了同质异核不育系和异质同核不育系,改良了的双隐性核不育系并保持了原 *ms5ms6* 的不育性稳定而且彻底的特点,同时还去除了原双隐性不育系的缺陷,如不抗风暴等。

目前,利用植物基因工程和细胞工程的手段培育雄性不育系已逐渐成为主要的研究方法。Aarts 等^[37]从拟南芥中克隆了雄性不育基因,再通过遗传工程法改造花药绒毡层的遗传组成,创造了棉花等农作物的核雄性不育系。张慧军等^[38]利用 TA29、A6、A9 三个启动子的功能区与 Barnase 基因融合构建表达载体,用农杆菌介导法对棉花下胚轴进行了遗传转化,获得了带有 Barnase 不育基因的 120 株转基因再生植株。同时利用基因工程技术在载体中加入了 *bxn* 基因,以赋予转基因植株抗溴苯腈的能力,从而通过喷施溴苯腈杀死育性恢复植株,使不育材料得到保持。2010 年,张玉芹等^[39]利用农杆菌介导 T-DNA 插入得到棉花雄性不育突变体,这为利用 T-DNA 标签法进行雄性不育有关基因的克隆奠定了基础。

4.1.2 核雄性不育系的应用 我国是以核雄性不育系“一系两用法”利用棉花杂种优势较早、推广面积较大的国家之一。目前,国内已培育出洞 A、川 A、无 62-1A 等多个棉花核雄性不育系。其中,4 个陆地棉核雄性不育系洞 A、81A、1355A 和闽 A 都是单基因隐性遗传,而在核雄性不育系育成的杂交品种中,利用 *ms5ms6* 选育的品种有南农 98-4、中棉所 38 和印度的 Suganan 等,其他品种主要是利用 *ms14* 选育的。由于其他核不育本身存在显性遗传和部分不育等缺陷,不利于生产中应用,因此目前常用的核雄性不育基因型主要为上述几种。

国内选育并且利用较早也较多的单隐性核雄

性不育两用系主要有洞 A 和芽黄 81A。目前,利用洞 A 种质已转育成功 751A、473A、83-IA、抗 A1、抗 A2、GA5 和 33A 等衍生不育系,以及抗虫两用系抗 A3 和 GA18 等。利用洞 A 种质转育的两用系先后选育出川杂一号、川杂四号、川杂六号、鲁棉八号等高优势组合。除此之外,现在已培育了核雄性不育杂种棉组合几十个,到 20 世纪 90 年代末,核不育系在杂交棉上得到了大面积应用。

与此同时,国内外对双隐性核不育也进行了研究与应用。其中,我国利用新双隐性核不育系与自主构建和转育的 Bt 抗虫基因品系杂交选育出了抗虫杂交棉中抗杂 A (中棉所 38 号),是国内首个通过国家审定的拥有自主知识产权的抗虫杂交棉。南京农业大学利用 *msc5msc6* 双隐性核不育基因培育出了南农 6 号^[40]、南农 9 号^[41] 和 98-4^[42] 等抗虫核不育杂交品种。

4.1.3 标记核不育系的研究 标记核不育系是通过指示性状在苗期就可分辨出不育株和可育株,可提高制种效率,更有利于生产中的应用。81A(*ms16*)就是带芽黄标记性状的单隐性核不育系^[43]。

4.2 胞质雄性不育系的培育与应用

20 世纪 60 年代,Meyer 等^[3]育成了具有哈克尼西棉胞质 (*G. harknessii* Brandegee) 的 DES-HAMS277 和 DES-HAMS16 不育系 (D_{2-2}) 及其保持系和恢复系,实现了三系配套。90 年代,Stewart 等^[5]育成了具有三裂棉细胞质的不育系 (D_8ms) 及相应保持系和恢复系 (D_8mf)。国内湖南省棉花所于 1979 年通过海岛棉×陆地棉×瑟伯氏棉 (*G. thurberi* Tod) 杂交,选育出海岛棉胞质雄性不育系湘远 A。贾占昌等^[7,8]以陆地棉 (石短 5 号) 为母本,海岛棉 (军海棉) 为父本,经多代杂交,选育出具有陆地棉 (AD_1) 胞质的新型不育系 104-7A。1996 年,山西农业大学和山西农科院通过种间复式杂交的方法,从 (陆地棉×瑟伯氏棉) × (亚洲棉×陆地棉) 的杂交后代中选育出新的细胞质雄性不育系,名为晋 A 胞质雄性不育系,它具有二倍体亚洲棉和野生棉的遗传背景^[6]。2000 年,李蒙恩等^[44]以哈克尼西棉胞质不育系 DES-HAMS277 育成了中 A 和 PA 等 4 个优良的不育系。

根据现有报道,目前已有哈克尼西棉、三裂

棉、异常棉、亚洲棉和陆地棉胞质雄性不育系,其中只有哈克尼西棉、三裂棉和陆地棉的不育系实现了三系配套。

目前国内也已培育出多个优良的恢复系。王学德^[45]将一个具有抗逆性能的谷胱甘肽 S 转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 基因导入恢复系 DES-HAF277 中,培育出“浙大强恢”。与 DES-HAF277 相比,“浙大强恢”对不育系的恢复力提高了 25.8%,从而使杂种 F₁ 单株结铃数平均多 3.6 个,不孕籽率降低了 10.1%,皮棉产量提高了 10.6%。华金平等^[46]采用远缘杂交的手段,利用来源于异常棉的恢复基因,育成了陆地棉×异常棉杂种后代恢复系,该恢复源自身育性好,花粉充足,而且可完全恢复哈克尼西棉胞质不育系的育性。2005 年,采用基因工程技术培育的“银棉 2 号”^[47],是我国第一个国家审定的三系杂交抗虫棉新品种,它在生产上不但解决了棉铃虫的危害,而且比常规抗虫棉增产 26.4%。该品种突破了以往三系杂交棉无产量优势或产量优势不明显的瓶颈,在技术上处于国际领先水平,同时使棉花产量大幅度提高。“银棉 2 号”的母本为不育率和不育度均达 100% 的棉花胞质雄性不育系 P30A,其遗传起源为我国研制的陆地棉胞质不育系 104-7A,;恢复系 Y18R 遗传起源于引入恢复系 0-613-2R,并聚合了我国陆地棉的品种中的恢复加强基因,其杂种一代的恢复度达到 100%。2008 年,转抗虫基因中熟三系杂交品种“银棉 8 号”又取得农业转基因生物生产应用安全证书(转基因生物名称为 SGKz34-3),符合国家棉花品种审定标准,通过审定。

5 存在的问题及解决方法

5.1 有关棉花雄性不育的分子机理研究滞后

有关棉花雄性不育的分子机理,尤其是胞质不育的机理,尚缺乏足够的分子生物学证据。目前对哈克尼西棉胞质、三裂棉胞质和陆地棉胞质的雄性不育的机理有一定的了解,但还不够深入,而对于海岛棉胞质的雄性不育得机理则知之甚少。一方面,雄性不育的机理,尤其是胞质不育,可能情况较为复杂;另一方面,棉花基因组很大,从分子水平上研究也存在很多困难,这两方面导致胞质不育的分子生物学研究滞后。随着新的研

究技术和方法的不断出现,这为加快研究提供了条件。比如,针对棉花基因组较大的特点,可以构建 BAC 文库或 TAC 文库,再利用分子标签筛选目的基因。

5.2 现有雄性不育系在生产应用上存在的缺陷

生产中应用的不育系主要有核不育系和胞质不育系两种类型,但都存在一定缺陷。核雄性不育系主要是育性不够稳定,而且保持不育难,生产上能够应用的品种较少;同时,虽然可以一系两用,但必须拔除一半的可育株,这会影响杂交种制种产量。对于胞质雄性不育系,由于其胞质含有产量不利因子,因而育性较难恢复,恢复源狭窄,而且杂种优势不够强。

对于目前雄性不育存在的缺点,可通过以下方法解决:鉴于现有核不育的育性不稳定的现象,可运用转基因工程技术,将构建的嵌合基因转化植株,培育新的雄性不育材料。例如,用花粉特异启动子驱动细胞毒素基因表达,细胞毒素能选择性地破坏与花药发育相关的器官或组织,从而获得不育材料;还可以通过 RNA 干扰技术阻断与花粉发育相关基因的表达以获得雄性不育材料。对于胞质不育,胞质对杂种 F₁ 代的产量和早熟性等性状造成的影响,以及恢复源狭窄和恢复力弱的缺点,可以运用基因工程手段和传统育种互补的方法,转入有益基因或远缘杂交来丰富亲本的种质基础,增强高产、抗病、抗虫耐盐碱等特性,同时选育优良的不育系和恢复系,来提高恢复系的恢复力,如恢复系 Y18,对 26A 来源的所有不育系可 100% 恢复。

6 展望

棉花雄性不育在生产上有很多优势,如用工少,制种成本低,制种效率高等,而且杂种一代可以复合抗病、高产等多个优良品质于一体,因而棉花雄性不育系在生产上有着很高的应用价值。同时,由于雄性不育的分子机理对培育棉花新品种和改良棉花品质都具有重要的意义,因此对于雄性不育分子机理的研究已成为一个热点。

在对雄性不育系的研究方面,突破点是弄清雄性不育的分子生物学基础,研究其不育机理和选育利用工作。目前,克隆不育基因或恢复基因多从基因组水平加以研究,今后还可以尝试从转

录水平或翻译水平入手。同时在不育系育种方面,通过利用现有不育系的基础上,努力创造更加优良的不育系类型。

缺乏强优势组合是制约棉花杂种优势利用的重要因素。解决这一问题的主要途径有:①筛选强优势组合亲本。今后要加强向优良亲本材料转育抗病、抗虫、高强纤维、耐旱碱等性状,以培育出优质、高产和高抗的特色品种;②利用雄性不育系杂交制种;③在技术上可选择常规品种选育与杂种优势利用相结合的方法,同时,利用现代先进的育种手段加速对优良品种培育的进程。

参 考 文 献

- [1] 毛树春. 中国棉花生产景气报告 2006 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007, 18-19.
- [2] 周焘, 张锐, 郭三堆, 等. 棉花生殖器官发育的分子生物学研究进展 [J]. 棉花学报, 2008, 20(3): 223-230.
- [3] Meyer V G. Male sterility from *G. harknessii* [J]. Heredity, 1975, 66: 23-27.
- [4] 韦贞国, 刘素纹, 舒金树, 等. 中棉胞质和陆地棉核雄性不育系研究初报 [J]. 棉花学报, 1999, 11(3): 12-15.
- [5] Steward J M C D. A new sterility from *G. trilobdu* [M]. Proceedings of Beltwide Cotton Conference, 1992, 610.
- [6] 袁钧, 潘转霞, 李成奇, 等. 晋 A 棉花质核不育系的特色与优势 [J]. 中国棉花, 1999, 26(9): 6-8.
- [7] 贾贞昌, 马维军. 棉花雄性不育系 lo4-7A 的选育 [J]. 作物杂志, 1990, 3: 2-3.
- [8] 贾占昌. 棉花雄性不育系 1A 的选育与三系配套 [J]. 中国棉花, 1990, 17(16): 11.
- [9] 朱春生, 吴佶膺, 周德桂, 等. 棉花胞质不育系“湘远 A”的选育与初步利用 [A]. 见: 中国棉花学会 2013 年年会论文集 [C]. 2013, 176.
- [10] 王学德, 张天真, 潘家驹. 细胞质雄性不育棉花小孢子发生的细胞学观察和线粒体 DNA 的 RFLP 分析 [J]. 中国农业科学, 1998, 31(2): 70-75.
- [11] 张天真, 陆地棉 1355A 和 104-7A 不育系的细胞学研究 [J]. 棉花学报, 1995, 7(2): 73-75.
- [12] 张天真, 潘家驹. 陆地棉 473A 核雄性不育系小孢子败育的细胞学研究 [J]. 南京农业大学学报, 1991, 14(3): 7-11.
- [13] 豆丽萍, 王庆明, 汤灿明. 陆地棉双隐性核雄性不育系 *ms5ms6* 花药发育过程的研究 [J]. 棉花学报, 2009, 21(4): 265-270.
- [14] 姚长兵, 胡绍安. 棉花细胞质雄性不育小孢子母细胞败育的细胞学研究 [J]. 棉花学报, 1994, 10: 25-27.
- [15] 黄晋玲, 杨鹏, 李炳林, 等. 棉花晋 A 细胞质雄性不育系小孢子发生的显微和超微结构观察 [J]. 棉花学报, 2001, 13(5): 259-263.
- [16] 吴小平. 转基因抗虫陆地棉雄性不育系的细胞形态学及其杂种优势的研究 [D]. 山西 太谷: 山西农业大学, 硕士学位论文, 2007.
- [17] Ma X D, Xing C Z, Guo L P, et al.. Analysis of differentially expressed genes in genic male sterility cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using cDNA-AFLP [J]. J. Genet. Genomics, 2007, 34(6): 536-543.
- [18] 侯磊, 肖月华, 裴炎, 等. 棉花洞 A 雄性不育系花药发育的 mRNA 差别显示 [J]. 遗传学报, 2002, 29(4): 359-363.
- [19] 张天真, 冯义军, 潘家驹. 我国发现的 4 个棉花核雄性不育系的遗传分析 [J]. 棉花学报, 1992, 4(1): 1-8.
- [20] 王国英. 4 个陆地棉核不育系的育性稳定性观察和 1355A 核不育基因定位 [D]. 武汉: 华中农业大学, 硕士学位论文, 2007.
- [21] 郑尚永, 郭余龙, 肖月华, 等. 棉花 MADS 框蛋白基因 (*GhMADS1*) 的克隆 [J]. 遗传学报, 2004, 31(10): 1136-1141.
- [22] Guo Y L, Zhu Q L, Zheng S Y, et al.. Cloning of a MADS box gene (*GhMADS3*) from cotton and analysis of its homeotic role in transgenic tobacco [J]. J. Genet. Genomics, 2007, 34(6): 527-535.
- [23] 吴东, 喻树迅, 范术丽, 等. 棉花 MADS-box 蛋白基因 (*GhMADS-13*) 的克隆和表达分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(2): 223-228.
- [24] Wang X L, Li X B. The *GhACS1* gene encodes an acyl-CoA synthetase which is essential for normal microsporogenesis in early anther development of cotton [J]. The Plant J., 2009, 57: 473 - 486.
- [25] John M E, Petersen M W. Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) pollen-specific polygalacturonase mRNA: tissue and temporal specificity of its promoter in transgenic tobacco [J]. Plant Mol. Biol., 1994, 26(6): 1989-1993.
- [26] Delannoy E, Marney P, Jalloul A, et al.. Molecular analysis of class III peroxidases from cotton [J]. J. Cotton Sci., 2006, 10: 53 - 60.
- [27] 黄晋玲. 棉花晋 A 细胞质雄性不育系的遗传研究 [D]. 山西 太谷: 山西农业大学, 博士学位论文, 2003.
- [28] Christine D C. Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial nuclear interactions [J]. Trends Genetics, 2007, 23(2): 81-90.
- [29] 蒋培东. 棉花细胞质雄性不育机理的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 博士学位论文, 2007.
- [30] 马勇, 吴建勇, 邢朝柱, 等. 克尼西棉细胞质雄性不育系和保持系差异表达基因分析 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(10): 3706-3712.
- [31] 张晓. 棉花胞质雄性不育系与保持系线粒体基因组差异研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 博士学位论文, 2011.
- [32] Yin J M, Guo W Z, Yang L M, et al.. Physical mapping of the *Rf1* fertility-restoring gene to a 100 kb region in cotton [J]. Theor. Appl. Genet., 2006, 112: 1318-1325.
- [33] 侯思宇. 陆地棉细胞质雄性不育恢复基因的遗传定位及 *GhPG2* 基因的克隆与表达分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 博士学位论文, 2009.

- [34] Zhang J F, Turley R B, Stewart J M. Comparative analysis of gene expression between CMS-D8 restored plants and normal non-restoring fertile plants in cotton by differential display [J]. *Plant Cell. Rep.*, 2008, 27: 553-561.
- [35] 李茂峰,徐奇,刘康,等.棉花细胞质雄性不育与恢复特性的 cDNA-AFLP 分析[J]. *江苏农业学报*, 2010, 26(5): 914-919.
- [36] 靖深蓉,邢朝柱,袁有禄,等.棉花核不育系的培育研究[J]. *中国农业科学*, 1998, 31(1): 84-86.
- [37] Aarts M G, Dirkse W G, Stiekema W J, et al.. Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 1993, 363(6431): 715-717.
- [38] 张慧军,王寰宇,石跃进,等.雄性不育基因对棉花的遗传转化[J]. *棉花学报*, 2007, 19(4): 261-266.
- [39] 张玉芹,高俊平,张晋,等.棉花 T-DNA 标签雄性不育突变体的遗传分析[J]. *山东农业科学*, 2010, 1: 22-25.
- [40] 张天真,朱协飞.南农 6 号的选育及栽培技术要点[J]. *中国棉花*, 2004, 8: 18-19.
- [41] 张天真,朱协飞.南农 9 号杂交棉的选育及栽培技术要点[J]. *中国棉花*, 2005, 8: 19.
- [42] 张天真,朱协飞.“南农 98-4”杂交种的选育[J]. *中国棉花*, 2002, 9: 30.
- [43] 冯福祯.棉花雄性不育种质简介[J]. *中国棉花*, 1988, 15(3): 15-16.
- [44] 李蒙恩,郑重.棉花三系杂种的研究和利用[J]. *石河子大学学报:自然科学版*, 2000, 4(1): 1-8.
- [45] 王学德,李悦有.细胞质雄性不育棉花的转基因恢复系的选育[J]. *中国农业科学*, 2002, 35(2): 137-141.
- [46] 华金平,张成,易先达.棉花远缘核质杂种的培育与育种应用[J]. *湖北农业科学*, 2003, 4: 25-28.
- [47] 郭三堆,张锐,王远.三系棉遗传基础研究及育种进展[J]. *农业科技通讯*, 2007, 12: 11-12.