哈克尼西棉细胞质雄性不育的细胞质效应研究

左志丹¹, 张学贤¹, 郭立平¹, 戚廷香¹, 唐会妮¹, 李永旗², 冯娟娟¹, 李婷³, 陈亮亮¹, 张永杰³, 王海林¹, 乔秀琴¹, 张兵兵¹, 张梦^{1*}, 吴建勇^{1,3*}, 邢朝柱^{1*}

1. 中国农业科学院棉花研究所, 棉花生物学国家重点实验室/农业农村部棉花生物学与遗传育种重点实验室, 安阳 455000;

2. 江西省棉花研究所, 九江 332000;

3. 郑州大学农学院, 棉花生物学国家重点实验室郑州基地, 郑州 450000

* 联系人, E-mail: zhangmeng03@caas.cn; dr.wujianyong@live.cn; chaozhuxing@126.com

收稿日期: 2021-08-06; 接受日期: 2021-11-17; 网络版发表日期: 2022-04-01

国家重点研发计划(批准号: 2016YFD0101400)和国家自然科学基金(批准号: 31871679)资助

摘要 本研究选用2套同核异质的哈克尼西棉恢复基因近等基因系为实验材料, 分别种植于黄河流域(河南安阳)和长江流域(江西九江)棉区, 对苗期生长性状、全生育期叶片光合生理参数、花药发育状况、产量及其构成因素以及纤维品质性状进行比较分析, 以期阐明哈克尼西棉细胞质雄性不育的细胞质效应。结果显示, (i) 不育胞质对棉花苗期生长和大多数纤维品质性状无明显不利影响; (ii) 不育胞质恢复系净光合速率在苗期显著高于可育胞质恢复系, 到花铃期以后则出现相反的趋势; (iii) 不育胞质恢复系在高温胁迫下花药育性均显著低于可育胞质恢复系, 主要表现在花粉量明显减少、花粉活性和活力显著降低; (iv) 不育胞质对产量性状具有显著的负效应, 主要表现为单株铃数明显减少和衣分显著降低; (v) 总体上来说, 不育胞质对净光合速率、花药发育和产量等性状的负效应在夏季温度较高的长江流域棉区表现更为明显。本文系统探讨了哈克尼西棉不育型细胞质对陆地棉主要性状的影响, 研究结果对棉花胞质不育“三系”杂交种选育和改良具有重要的指导意义。

关键词 哈克尼西棉细胞质雄性不育, 细胞质效应, 生长, 光合特性, 育性, 产量, 纤维品质

利用杂种优势可以大幅度提高棉花产量, 改善纤维品质及增强抗逆性^[1-3]。目前我国生产上大面积推广的棉花杂交种大多数是人工去雄授粉的杂交制种, 但是繁琐的人工去雄制种方式和逐年提升的劳动力成本严重阻碍了我国杂交棉种植的进一步推广^[1,2]。棉花“三系”法制种不仅省工省时、成本低廉, 而且制种纯度高, 因此备受育种家和种子公司推荐^[4,5]。随着棉花不育系、保持系和恢复系的成功改良和“三系”配

套^[6-8], 近年来我国在胞质不育“三系”杂交棉基础研究以及育种应用领域均走在了世界的前列^[9-11], 至今国内已成功培育出了一系列“三系”杂交棉新品种, 如国审棉邯杂301^[12]、中棉所99^[13]和鲁杂2138^[14]等。但“三系”杂交棉受生态适应性影响, 目前尚不能在夏季温度较高的长江流域棉区推广应用。在“三系”杂交棉性状研究方面, 国内外已有不少学者就不育胞质的细胞质遗传效应以及棉花“三系”杂交种性状优势表现等方面

引用格式: 左志丹, 张学贤, 郭立平, 等. 哈克尼西棉细胞质雄性不育的细胞质效应研究. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 499-509

Zuo Z D, Zhang X X, Guo L P, et al. Cytoplasmic effects of CMS-D2 in upland cotton (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 499-509, doi: 10.1360/SSV-2021-0288

进行了初步研究和探索^[15-22]。

有研究报道, 胞质遗传效应直接关系到哈克尼西棉不育胞质能否在棉花杂种优势育种上大面积推广和应用^[16]。因此, 哈克尼西棉胞质不育系自问世以来, 关于胞质“三系”杂交种的细胞质遗传效应始终是育种家关注的焦点^[15]。但是前人的研究大多集中在不育胞质对产量和品质等主要经济性状的影响上^[16,17,23], 而且未排除细胞核效应、核质互作效应及环境因子效应等其他效应^[19], 故不能有效明确哈克尼西棉不育胞质在棉花“三系”杂交种遗传改良中的利用规律。因此, 本研究选取2个哈克尼西棉不育胞质恢复系及其同核异质陆地棉可育胞质恢复系, 系统研究不育胞质在不同生态环境下对棉花苗期生长性状、全生育期主茎功能叶光合生理指标、高温胁迫下花药发育状况、产量及纤维品质性状的影响, 旨在明确哈克尼西棉胞质雄性不育的细胞质效应, 为寻求“三系”育种上的对策提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本课题组前期采用基因型为N(rr)的保持系ZB为轮回父本, 经过10代回交, 创制出与ZB核基因高度一致的哈克尼西棉恢复基因近等基因系: 基因型为S(RR)的ZBR/SR以及基因型为S(rr)的不育系ZBA^[24,25]。本研究以ZB为母本与父本ZBR反交后得到基因型为N(Rr)的单株, 再自交, 后代通过与恢复基因紧密连锁的分子标记Indel-1892检测, 得到基因型为N(RR)的陆地棉可育胞质纯合恢复系NR, NR和SR自交繁殖。ZB与NR杂交得到基因型为N(Rr)的陆地棉可育胞质杂合恢复系NH, ZBA与NR杂交得到基因型为S(Rr)的哈克尼西棉不育胞质杂合恢复系SH, 最终成功创制出2套同核异质的哈克尼西棉恢复基因近等基因系材料NH和SH以及NR和SR, 其核遗传背景均来自保持系ZB。

1.2 实验设计

上述4个参试材料于2020年4月下旬分别种植于黄河流域棉区河南安阳中国农业科学院棉花研究所东场实验基地(36°10'N, 114°35'E)和长江流域棉区江西九江江西省棉花研究所实验基地(29°26'N, 115°25'E)。其中, 安阳试点采用直播方式, 棉花行距80 cm, 株距

23.8 cm, 密度3000株/亩, 小区面积28.8 m²。九江试点采用营养钵育苗移栽方式, 棉花行距100 cm, 株距37.0 cm, 密度1500株/亩, 小区面积34 m²。本实验采用随机区组设计, 3次生物学重复, 共12个小区, 四周均设保护行, 田间管理措施参照当地普通农田。

1.3 测定指标及方法

(1) 苗期生长参数。设置苗圃, 分别在安阳和九江将4个参试材料按1行区3个重复播种, 每行30株。在苗期(大约5叶期), 先用直尺测量所有植株高度, 然后拔出棉株用电子天平测定植株鲜重, 并将棉株样品在恒温箱中105℃杀青1 h, 再于80℃烘干, 称量其干物质重, 计算单株平均值。

(2) 叶片光合作用参数。2020年6月~10月, 在九江和安阳, 分别在苗期、蕾期、花铃期和吐絮期, 采用美国LI-COR公司生产的便携式LI-6800型光合测定仪, 在田间测定棉花主茎功能叶(选取相同部位完全展开的倒3叶)净光合速率(A)、气孔导度(GSW)、蒸腾速率(E)和胞间CO₂浓度(Ci)等光合参数。测定时间在晴天上午9:00~11:00, 设定CO₂浓度400 μmol/(m² s), 流量700 μmol/s。为消除由于光强变化造成的影响(如阴天或多云天气), 测定时的光强采用仪器配备的内置人工光源, 光照强度为1000 μmol/(m² s), 相对湿度为60%~80%。每个参试材料设定3个生物学重复(小区), 每个小区随机选取长势一致连续10株棉花, 取其平均值作为该材料的光合作用参数。

(3) 花药育性。在盛花期, 分别在黄河流域棉区安阳点的相对高温期(7月22日~26日)以及长江流域棉区九江点相对高温期(7月2日~6日)对花药发育状况进行集中田间调查和室内测定, 主要指标包括花粉量、花粉活性和花粉活力, 分别用多粉花率、可育花粉率和花粉体外萌发率来表示。其中, 各参试材料花朵花药散粉情况调查标准及多粉花率统计方法参照本实验室前期的研究^[20,26]。在相对高温期上午9:30~10:30, 随机选取当天即将开放的花朵, 迅速放入冰盒带回实验室, 立即进行花粉活性和花粉活力测定。采用联苯胺-甲萘酚染色法测定花粉活性, 具体操作步骤和可育花粉率统计方法参照李雪等人^[27]的研究。采用液体培养基方法进行花粉体外萌发实验, 液体培养基配制、培养方法和花粉体外萌发统计标准参照前人^[28,29]的研究。每朵花随机选取中部花药5~7粒涂1个载玻片(置于培养

皿中), 每个参试材料进行5次生物学重复. 培养后在体视显微镜SZX16(奥林巴斯, 日本)下进行观察和拍照记录, 计算每个视野中花粉的萌发率. 每个培养皿随机观察3个视野, 并最终统计平均花粉萌发率.

(4) 产量及纤维品质性状. 9月中下旬于吐絮期前, 分别对安阳和九江试点每个小区参试材料进行株数和铃数调查, 其中铃数以是否出苞叶作为计数标准, 单株铃数=总铃数/株数. 10~11月于吐絮期从每个小区棉株中部随机取50个完全吐絮的铃(一株一铃)统一晒干后, 测单铃重、衣分及纤维品质. 最后收获自然铃, 计算实收小区籽棉产量. 根据小区籽棉产量和衣分计算小区皮棉产量=小区籽棉产量×衣分, 最后按小区面积折算成每公顷籽棉和皮棉产量.

纤维品质性状由农业部棉花品质监督检验测试中心(中国农业科学院棉花研究所, 河南安阳)测定, 使用HVI900检测仪检测纤维品质5项指标: 纤维上半部平均长度、整齐度指数、断裂比强度、马克隆值和伸长率.

1.4 统计分析

本实验数据用Microsoft Excel整理、制表和绘图, 利用IBM SPSS statistics 25.0软件进行方差分析, 并采用LSD法进行平均数差异的显著性检验.

2 结果

2.1 不育胞质对棉花苗期生长性状的影响

棉花苗期主要以营养生长为主, 在研究中, 通常用株高、棉株干重和鲜重作为苗期营养生长重要参考指标. 实验数据表明, 哈克尼西棉不育胞质对苗期生长性状无显著影响(图1). 在黄河流域棉区安阳点和长江流域棉区九江点, 不育胞质恢复系SH相比于陆地棉可育胞质恢复系NH的苗期株高均表现出升高的趋势, 分别在安阳点和九江点增加了约9.86%和7.39%, 但差异不显著; SR与NR之间株高无显著性差异. 九江点各参试材料株高普遍高于安阳点(图1A).

不同胞质类型的恢复系材料单株平均鲜重和干物质重在两试点表现基本一致(图1B和C). 总体来说, SH单株平均鲜重和干物质重在两试点均高于NH, 但差异不显著; SR和NR之间鲜重和干重则无显著差异, 说明哈克尼西棉不育胞质对棉花苗期生长及生物量积累无明显影响.

图1 不同胞质恢复系间苗期株高(A)、鲜重(B)和干物质重(C)比较. 不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著

Figure 1 Comparisons of plant height (A), fresh weight (B) and dry matter weight (C) among different cytoplasmic restorer lines at the seedling stage. Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$)

2.2 不育胞质对棉花全生育期主茎功能叶光合生理指标的影响

哈克尼西棉不育胞质对棉花不同发育时期主茎功能叶蒸腾速率、净光合速率、胞间 CO_2 浓度、气孔导度等光合特性具有一定的影响. 无论在黄河流域棉区安阳点还是在长江流域棉区九江点, 不同胞质恢复系主茎功能叶净光合速率在整个生育期均呈现出先增加后降低的趋势, 其中在苗期和吐絮期净光合速率较低, 在花铃期达到峰值; 而蒸腾速率、胞间 CO_2 浓度、气孔导度等其他光合生理指标在两大棉区则呈现出不同

的变化趋势(表1).

在安阳点和九江点, 苗期SH净光合速率均极显著高于NH($P<0.001$), SR净光合速率均极显著高于NR($P<0.01$). 在蕾期, SH净光合速率在两大棉区仍极显著高于NH($P<0.001$), 而SR净光合速率仅在九江点极显

著高于NR($P<0.01$). 当棉花处于花铃期时, 各材料净光合速率均达到最大值, 其中SH净光合速率极显著低于NH($P<0.001$), SR净光合速率低于NR但差异不显著. 在吐絮期, 不同胞质恢复系净光合速率均有所下降; 其中SH净光合速率在两大棉区均极显著低于NH

表 1 不同胞质恢复系间主茎功能叶光合特性比较

Table 1 Comparisons of photosynthetic characteristics of main-stem functional leaves among different cytoplasmic restorer lines

地点	生育期	材料	蒸腾速率($\text{mmol}/(\text{m}^2 \text{ s})^{\text{a)}$	净光合速率($\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s})^{\text{a)}$	胞间 CO_2 浓度($\mu\text{mol}/\text{m})^{\text{a)}$	气孔导度($\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s})^{\text{a)}$
安阳	苗期	NH	3.65±0.76a	17.17±0.91b	197.65±18.52b	0.20±0.04a
		SH	4.26±1.94a	20.56±0.45a	235.03±28.48a	0.26±0.13a
		NR	3.78±1.12a	14.58±0.67c	190.18±29.99b	0.21±0.28a
		SR	4.22±0.61a	17.42±1.69b	190.61±35.54b	0.22±0.05a
	蕾期	NH	4.17±1.12c	22.02±1.27b	231.35±51.30b	0.28±0.10b
		SH	3.90±0.79c	24.65±0.70a	235.32±2.19b	0.28±0.08b
		NR	9.01±1.83a	24.75±1.40a	273.09±16.17a	0.41±0.11a
		SR	7.77±1.05b	24.12±0.72a	279.82±1.29a	0.44±0.12a
	花铃期	NH	1.50±0.18a	29.85±0.61a	97.74±12.24bc	0.12±0.02b
		SH	1.61±0.10a	26.60±0.11c	82.22±14.47c	0.14±0.01a
		NR	1.42±0.13b	29.03±1.20ab	123.64±27.63a	0.13±0.01a
		SR	1.49±0.06ab	27.80±1.41bc	112.58±24.39ab	0.13±0.01a
	吐絮期	NH	4.15±0.51a	15.21±1.24ab	246.59±15.14a	0.41±0.05a
		SH	2.90±0.49b	13.75±0.91c	195.38±28.72b	0.28±0.08b
		NR	3.98±0.30a	15.80±1.00a	235.67±18.20a	0.39±0.06a
		SR	4.30±0.36a	14.32±0.74bc	249.11±13.58a	0.43±0.06a
九江	苗期	NH	15.45±1.18b	18.69±1.21d	302.11±5.45c	0.91±0.13b
		SH	16.46±0.46a	22.46±0.85b	331.22±3.43a	0.95±0.05ab
		NR	15.92±0.36ab	20.87±0.78c	324.94±4.36b	1.03±0.07a
		SR	16.73±0.51a	24.41±1.38a	331.12±5.74a	0.99±0.06ab
	蕾期	NH	6.81±0.72b	25.78±1.12b	265.40±11.73a	0.36±0.05b
		SH	7.56±0.52b	28.44±0.57a	277.02±7.02a	0.42±0.03b
		NR	9.12±0.63a	25.12±0.73b	281.87±9.02a	0.50±0.06a
		SR	7.61±1.30b	27.67±1.21a	270.77±12.09a	0.41±0.09b
	花铃期	NH	4.37±0.49a	34.06±0.85a	297.04±5.52a	0.63±0.10a
		SH	3.66±0.56b	30.03±1.32c	279.48±24.20a	0.51±0.10b
		NR	4.05±0.53ab	33.51±1.09ab	283.32±18.83a	0.54±0.10ab
		SR	3.68±0.53b	32.83±0.88b	279.73±25.98a	0.51±0.11b
	吐絮期	NH	2.02±0.17a	18.29±0.85a	107.36±6.22ab	0.20±0.02a
		SH	1.96±0.09a	16.24±1.02b	123.77±11.98a	0.20±0.02a
		NR	1.42±0.09b	17.87±0.84a	90.24±10.68b	0.17±0.01b
		SR	1.53±0.28b	18.34±1.72a	102.62±33.95b	0.16±0.02b

a) 不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著

($P < 0.01$), SR净光合速率仅在安阳点极显著低于NR ($P < 0.01$)(表1). 同一生育期, 不同胞质恢复系SH与NH、SR与NR间蒸腾速率、胞间 CO_2 浓度、气孔导度的变化趋势基本与净光合速率基本一致(表1).

2.3 不育胞质对高温胁迫下棉花花药发育状况的影响

在安阳点和九江点, 高温胁迫下哈克尼西棉不育胞质对恢复系花药发育均具有显著的不利影响(图2). 同一棉区, 各参试恢复系材料在高温胁迫下均表现出不同程度的少花粉现象(图2A). 不同胞质恢复系SH与NH、SR与NR之间多花粉率、可育花粉率和花粉体外萌发率差异均达到极显著水平($P < 0.01$), 其中SH极显著低于NH, SR极显著低于NR. 九江点哈克尼西棉不育胞质恢复系SH和SR多花粉率、可育花粉率和花粉体外萌发率均显著低于安阳点, 而陆地棉可育胞质恢复系NH和NR在两大棉区则无显著差异(图2). 说明在高温胁迫下, 哈克尼西棉不育胞质恢复系相比其同核异质陆地棉可育胞质恢复系, 花粉量明显减少、花粉活性和活力显著降低, 并且不育胞质对恢复系花药发育的负效应尤其在夏季温度更高的长江流域棉区九江点表现更为明显.

2.4 不育胞质对棉花产量及其构成因素的影响

哈克尼西棉不育胞质对恢复系的单株铃数和衣分性状均有显著的负面效应, 而对单铃重的影响则不显著(表2). 在黄河流域棉区安阳点, 不同胞质恢复系SH与NH、SR与NR之间单株铃数差异均达到显著水平, 其中SH极显著少于NH($P < 0.001$), SR显著少于NR ($P < 0.05$). SH衣分显著低于NH($P < 0.05$), SR衣分低于NR, 但差异不显著(表2). 在长江流域棉区九江点, SH单株铃数极显著少于NH($P < 0.001$), SR极显著少于NR ($P < 0.01$). 不同胞质恢复系SH与NH、SR与NR之间衣分差异均达到极显著水平($P < 0.01$), 其中SH极显著低于NH, SR极显著低于NR(表2).

对于籽棉和皮棉产量, 不育胞质恢复系相比可育胞质恢复系来说, 在安阳点均表现出显著降低的趋势($P < 0.05$), 其中SH较NH分别减产约12.90%和16.01%, SR较NR分别减产约9.64%和10.62%. 在九江点, 不同胞质恢复系SH与NH、SR与NR之间籽棉和皮棉产量差异均达到极显著水平($P < 0.01$), 其中

图2 高温胁迫下不同胞质恢复系间多花粉率(A)、可育花粉率(B)和花粉体外萌发率(C)比较. 不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著

Figure 2 Comparisons of multi-pollen rate (A), fertile pollen rate (B) and pollen germination rate *in vitro* (C) among different cytoplasmic restorer lines under high-temperature stress. Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

SH籽棉和皮棉产量相比NH来说分别下降约28.88%和33.44%, SR较NR分别下降约14.20%和19.20%(表2). 这说明哈克尼西棉不育胞质对棉花产量性状具有显著的负效应, 尤其在长江流域棉区九江点表现更加显著.

2.5 不育胞质对棉花纤维品质的影响

在安阳点, 不育胞质恢复系SH与可育胞质恢复系NH相比, 纤维上半部平均长度和断裂比强度分别增加

表 2 不同胞质恢复系间产量及产量性状比较

Table 2 Comparisons of cotton yield and yield traits among different cytoplasmic restorer lines

地点	材料	单铃重(g) ^{a)}	单株铃数	衣分(%) ^{a)}	籽棉产量(kg/hm ²) ^{a)}	皮棉产量(kg/hm ²) ^{a)}
安阳	NH	6.09±0.15a	22.67±0.58a	45.58±0.19a	2642.94±156.47ab	1204.83±75.50ab
	SH	6.23±0.28a	18.00±1.00c	43.97±0.40b	2302.08±132.07c	1011.89±51.47c
	NR	6.34±0.14a	21.67±0.58a	45.26±1.04ab	2802.66±101.56a	1268.43±57.11a
	SR	6.19±0.32a	20.33±0.58b	44.74±1.18ab	2532.41±109.56bc	1133.72±76.65bc
九江	NH	4.78±0.25a	41.50±1.30a	42.93±0.91a	3902.35±171.06a	1674.17±45.99a
	SH	4.51±0.29a	24.33±1.14c	40.15±0.13b	2775.36±92.19c	1114.26±34.25c
	NR	4.52±0.05a	40.67±1.33a	43.47±1.06a	3736.46±124.66a	1624.46±72.46a
	SR	4.59±0.28a	35.73±1.50b	40.97±0.74b	3205.97±202.78b	1312.54±60.91b

a) 不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著

约2.79%和7.55%，但差异均不显著。整齐度指数、伸长率在不同胞质恢复系间并无显著差异。在九江点，除SR马克隆值显著低于NH外($P<0.05$)，SH与NH、SR与NR间其他纤维品质性状均无显著性差异(表3)。在两大棉区，哈克尼西棉不育胞质恢复系相比其同核异质陆地棉可育胞质恢复系，马克隆值均表现出降低的趋势，但差异不显著(表3)。总体来讲，哈克尼西棉不育胞质对棉花各纤维品质性状没有明显的不利影响。

3 讨论

3.1 不育胞质对棉花光合作用与产量形成关系的影响

光合作用是植物生长发育和产量形成的基础，棉花产量的提高与净光合速率密切相关^[30]。本研究发现，不同胞质恢复系全生育期主茎功能叶的净光合速率均呈现出先增加后降低的趋势，这与前人的研究基本一致^[30,31]。哈克尼西棉不育型细胞质可以显著提高棉花苗期叶片净光合速率，尤其在长江流域棉区九江点表现更为明显(表1)。这可能是由于在棉花生长早期为补偿胞质不育基因所产生的某种不利影响，叶片光合作用显著增强，从理论上来讲这有利于光合产物的积累。然而进入花铃期以后，不育胞质对棉花光合作用的负效应开始突显，主要表现为不育胞质恢复系在花铃期和吐絮期叶片净光合速率显著低于陆地棉可育胞质恢复系(表1)。有研究报道，有效花铃期是棉花干物质生产量最多的时期，占总干物质重的65.0%~70.0%^[32]。本研究发现，哈克尼西棉不育胞质对棉花产量及其构成

因素具有显著的不利影响(表2)。这是由于一方面不育胞质恢复系在花铃期以后叶片净光合速率显著降低，不利于叶片光合产物的合成，导致产量“源”显著降低；另一方面在单铃重变化较小的前提下，不育胞质恢复系单株铃数显著减少(表2)，会造成产量“库”容明显降低，这严重影响光合产物由源器官(叶片)向库器官(棉铃)转运，最终影响棉花产量形成。由此说明，较高的净光合速率和协调的“源-库”关系对提高棉花产量至关重要^[30]。

3.2 不育胞质对高温胁迫下棉花花药发育与产量形成关系的影响

棉花花药发育过程易受夏季持续高温胁迫影响，主要表现为花药不开裂、花粉完全败育或活性降低^[33,34]。哈克尼西棉不育胞质恢复系恢复能力不仅与恢复基因和育性增强基因有关^[6,35]，还易受不同遗传背景和外界环境条件如高温胁迫影响^[26,36,37]。前人对此也做了不少研究。例如，王学德^[5]认为，哈克尼西棉不育胞质对棉花花粉育性具有负效应，能引起雄性败育和损伤雌配子育性。张学贤等人^[20]发现，可育胞质型恢复系在高温胁迫下多粉花率均显著高于哈克尼西棉不育胞质型恢复系，并且认为籽棉产量与多粉花率直接相关。本研究发现，在高温胁迫下，不育胞质恢复系的多粉花率、可育花粉率和花粉体外萌发率均极显著低于可育胞质恢复系，尤其在长江流域棉区表现更为显著(图2)。这主要是因为九江点与安阳点相比夏季温度更高，不育胞质对盛花期发药发育的负效应更加明显^[20,26]。

表 3 不同胞质恢复系间纤维品质性状比较

Table 3 Comparisons of fiber quality traits among different cytoplasmic restorer lines

地点	材料	上半部平均长度 (mm)	整齐度指数(%)	断裂比强度(cN/ tex) ^{a)}	马克隆值 ^{a)}	伸长率(%)
安阳	NH	28.67±0.46	85.17±0.80	28.33±0.97ab	5.33±0.15a	6.63±0.06
	SH	29.47±0.06	85.83±0.80	30.47±2.48a	5.17±0.15ab	6.73±0.06
	NR	29.60±0.26	84.87±0.75	27.57±0.72b	5.37±0.12a	6.67±0.06
	SR	29.43±1.34	84.67±1.56	28.00±1.35ab	4.90±0.20b	6.63±0.12
九江	NH	28.73±0.42	86.73±0.59	31.13±0.87	5.90±0.17a	6.70±0.00
	SH	28.70±0.30	86.60±0.79	29.80±0.20	5.70±0.20ab	6.60±0.00
	NR	29.30±0.50	87.53±0.45	30.90±1.68	5.57±0.25ab	6.70±0.10
	SR	29.13±0.68	86.97±0.51	29.40±1.23	5.40±0.17b	6.60±0.10

a) 不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著

在本研究中, 不育胞质恢复系与可育胞质恢复系相比单株铃数明显减少, 衣分显著降低(表2)。有研究表明, 不育胞质对 F_1 代产量性状的影响主要表现在结铃性差及雄性败育等方面^[38]。由此推测, 哈克尼西棉不育胞质对棉花产量的负效应主要是由于单株铃数显著减少, 这与刘耀斌等人^[17]的研究结果一致。这是由于不育胞质材料花药发育过程易受夏季高温胁迫影响, 盛花期高温胁迫会导致花粉量明显减少、花粉活力显著降低(图2), 最终表现为棉花授粉受精能力下降, 棉铃结实率降低。因此, 从外观形态上来看, 不育胞质棉花营养生长旺盛, 具有更大的营养体及较多的枝叶, 现蕾较多但成铃较少, 蕾铃脱落严重, 导致单株有效铃数显著减少, 最终造成棉花产量锐减^[15]。在高温胁迫下花药发育状况及产量性状方面, 不育胞质对杂合和纯合恢复系的影响也有一定差异(表2, 图2), 这可能是恢复基因存在剂量效应^[39]以及核质互作效应^[40]所导致。温度是如何调控不育胞质对花药发育的细胞质效应进而影响产量形成, 关于这些问题还需要进一步实验探究。

3.3 哈克尼西棉不育胞质“三系”杂交种应用前景探讨

目前棉花细胞质雄性不育系主要有哈克尼西棉^[24,41,42]、三裂棉^[18,43,44]、陆地棉^[19,45]和异常棉^[46]等类型, 其中哈克尼西棉胞质是目前市场上推广种植的棉花胞质不育“三系”杂交种的主要胞质来源^[10]。早期国内外学者关于不育胞质对棉花产量性状影响的研究

结果分歧较大^[23,47], 后续研究基本一致认为, 不育胞质对产量具有不利影响^[16,17,21], 利用其配制的 F_1 代一般平均减产5%~8%^[17]。本研究基于对不同生态环境下哈克尼西棉不育胞质恢复系的细胞质效应研究, 发现不育胞质对产量性状的负效应确实存在, 但在黄河流域棉区显著小于长江流域棉区(表2), 这与目前生产上棉花胞质不育“三系”杂交种仅在黄河流域棉区种植而不能在夏季温度相对较高的长江流域棉区推广应用相一致。因此, 通过引入耐高温种质资源对“三系”杂交种双亲(不育系和恢复系)核遗传背景进行回交转育改良和多年多环境交叉选择, 尽量减少甚至消除不育胞质对棉花主要性状的负面影响, 进而选育出适宜在黄河流域棉区大面积推广种植的胞质“三系”杂交种是切实可行的。近年来, 在黄河流域棉区国内育种家已陆续培育出一系列性状表现较好的国审“三系”杂交棉品种^[12~14], 但是选育适宜在长江流域棉区推广种植的胞质“三系”杂交种目前还比较困难。这是由于我国南方夏季极端高温天气频繁, 不育胞质对棉花花药发育等具有更显著的不利影响, 进而造成籽棉和皮棉产量锐减(表2, 图2)。因此, 明确哈克尼西棉胞质雄性不育的细胞质效应及其影响因素, 可为未来棉花胞质不育“三系”杂交种选育与改良提供重要的理论依据。

4 结论

哈克尼西棉不育胞质对棉花苗期营养生长和纤维品质性状无明显不利影响。不育胞质能显著促进棉花

苗期光合作用,而在花铃期以后对光合作用具有显著的抑制作用,这间接影响棉花产量形成。不育胞质对高温胁迫下棉花花药发育和产量性状具有显著的负效应;不育胞质恢复系在高温胁迫下花粉育性显著降低,导致单株铃数明显减少,直接造成棉花产量锐减。总体来说,哈克尼西棉不育胞质对棉花主要性状的负效应在夏季温度较高的长江流域棉区表现更加显著。本

研究结果对未来明确哈克尼西棉不育胞质在棉花遗传改良中的利用规律和寻求“三系”育种对策具有重要实践意义。由于本文仅从细胞质效应的角度初步探究了哈克尼西棉不育胞质对棉花主要性状的影响,而它们之间的关系可能还受到核育性恢复基因的调控,如恢复基因的剂量效应和核质互作效应,对这些问题还需要进一步的实验验证。

参考文献

- 1 Xing C Z, Guo L P, Li W, et al. Ten-year achievements and future development of cotton heterosis utilization (in Chinese). *Cotton Sci*, 2017, 29: 28–36 [邢朝柱, 郭立平, 李威, 等. 棉花杂种优势利用研究十年成就和未来发展. *棉花学报*, 2017, 29: 28–36]
- 2 Xing C Z, Jing S R, Xing Y H. Review and prospect on cotton heterosis utilization and study in China (in Chinese). *Cotton Sci*, 2007, 19: 337–345 [邢朝柱, 靖深蓉, 邢以华. 中国棉花杂种优势利用研究回顾和展望. *棉花学报*, 2007, 19: 337–345]
- 3 Shahzad K, Li X, Qi T, et al. Genetic analysis of yield and fiber quality traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivated in different ecological regions of China. *J Cotton Res*, 2019, 2: 14
- 4 Qin Z Y. The necessity and possibility of development of sterile line of three-line hybrid cotton (in Chinese). *China Seed Ind*, 2010, 8: 45–46 [秦志勇. 发展杂交棉三系不育系的必要性和可能性. *中国种业*, 2010, 45–46]
- 5 Wang X D. Overview of the study and application of cytoplasmic male sterility in cotton (in Chinese). *Sci Agric Sin*, 2019, 52: 1341–1354 [王学德. 棉花细胞质雄性不育的研究与利用. *中国农业科学*, 2019, 52: 1341–1354]
- 6 Sheetz R H, Weaver Jr J B. Inheritance of a fertility enhancer factor from pima cotton when transferred into upland cotton with *Gossypium Harknessii* brandege cytoplasm. *Crop Sci*, 1980, 20: 272–275
- 7 Meyer V G. Registration of DES-146-C cotton germplasm (Reg. No. GP 155). *Crop Sci*, 1980, 20: 417
- 8 Weaver J B. Registration of fertility restorer demeter II cotton germplasms (Reg. No. GP 144). *Crop Sci*, 1980, 20: 290
- 9 Han Z F, Wang J H, Shen G F, et al. Research and application of cytoplasmic-nuclear male sterility and fertility restoration in cotton (in Chinese). *J China Agric Univ*, 2011, 16: 36–41 [韩宗福, 王景会, 申贵芳, 等. 棉花质核互作雄性不育与育性恢复的研究及利用现状. *中国农业大学学报*, 2011, 16: 36–41]
- 10 Shi Y L, Zhang R, Ren M Z, et al. Advanced study on the male sterility of cotton (in Chinese). *Adv Biotechnol*, 2013, 3: 328–335 [石雅丽, 张锐, 任茂智, 等. 棉花雄性不育的研究进展. *生物技术进展*, 2013, 3: 328–335]
- 11 Guo S D, Zhang R, Wang Y. Research progress on genetic basis and breeding of three-line hybrid cotton (in Chinese). *Bull Agric Sci Technol*, 2007, 12: 11–12 [郭三堆, 张锐, 王远. 三系棉遗传基础研究及育种进展. *农业科技通讯*, 2007, 12: 11–12]
- 12 Ma W J, Ren A M. The breeding and cultivation techniques of transgenic insect-resistance hybrid cotton, Ganza 301 (in Chinese). *China Cotton*, 2010, 37: 30 [马维军, 任爱民. 转基因抗虫三系杂交棉邯杂301的选育及其栽培技术. *中国棉花*, 2010, 37: 30]
- 13 Xing C Z, Guo L P, Wu J Y, et al. A transgenic insect-resistant cotton hybrid bred by cytoplasmic male-sterility system, CCRI 99 (in Chinese). *China Cotton*, 2017, 44: 25–26 [邢朝柱, 郭立平, 吴建勇, 等. 转基因抗虫三系杂交种——中棉所99. *中国棉花*, 2017, 44: 25–26]
- 14 Li R Z, Han Z F, Wang Z W, et al. A transgenic insect-resistant three-line hybrid cotton variety, Luza 2138 (in Chinese). *China Cotton*, 2017, 44: 25–26 [李汝忠, 韩宗福, 王宗文, 等. 转基因抗虫三系杂交棉新品种——鲁杂2138. *中国棉花*, 2017, 44: 25–26]
- 15 Feng Y J, Zhang T Z, Pan J J. The effect of the cytoplasm from *G. harknessii* to certain physiological and biochemical characteristics of the F1 hybrid in cotton (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 1993, 1: 17–22 [冯义军, 张天真, 潘家驹. 哈克尼西棉雄性不育细胞质对杂种一代某些生理生化指标的影响. *作物学报*, 1993, 1: 17–22]
- 16 Wei Z G, Li Z Y, Yi X D, et al. Studies on effects of the male-sterile cytoplasm of *G. harknessii* (in Chinese). *Acta Gossypii Sin*, 1995, 7: 76–81 [韦贞国, 李宗友, 易先达, 等. 哈克尼西棉雄性不育胞质的遗传效应. *棉花学报*, 1995, 7: 76–81]
- 17 Liu Y B, Jing Y L, Fan W F, et al. Effects of *Gossypium harknessii* cytoplasm on main economic characters of upland cotton (in Chinese). *Acta Agric Boreali-occident Sin*, 1996, 5: 49–52 [刘耀斌, 景忆莲, 范万法, 等. 哈克尼西棉细胞质对陆地棉主要经济性状的的影响. *西北农业学报*, 1996, 5: 49–52]

- 18 Wang J L, Hu Z G, Guo X P, et al. Research for cytoplasm effects of new type CMS-D8 on cotton (in Chinese). *Cotton Sci*, 2008, 20: 83–87 [王江林, 胡征国, 郭小平, 等. 棉花新型D8胞质雄性不育的细胞质效应研究. *棉花学报*, 2008, 20: 83–87]
- 19 Zhao C P, Wang Z X, Wang K H, et al. Effect of cytoplasmic male sterility on main characters of cotton (in Chinese). *Chin Bull Bot*, 2017, 52: 560–567 [赵存鹏, 王兆晓, 王凯辉, 等. 胞质雄性不育系冀2658A细胞质对陆地棉主要性状的影响. *植物学报*, 2017, 52: 560–567]
- 20 Zhang X X, Guo L P, Wu J Y, et al. Effects of high temperature stress on anther dispersal and yield of cotton restorer lines with different cytoplasmic types (in Chinese). *China Cotton*, 2018, 45: 28–30 [张学贤, 郭立平, 吴建勇, 等. 高温胁迫对棉花不同胞质类型恢复系花药散粉和产量的影响. *中国棉花*, 2018, 45: 28–30]
- 21 Zhang J, Abdelraheem A, Stewart J M D. A comparative analysis of cytoplasmic effects on lint yield and fiber quality between CMS-D2 and CMS-D8 systems in upland cotton. *Crop Sci*, 2019, 59: 624–631
- 22 Cui Y L, Guo L P, Xing C Z, et al. Genetic effects and heterosis of three-line hybrid cotton in different ecological environments (in Chinese). *Cotton Sci*, 2014, 26: 1–9 [崔艳利, 郭立平, 邢朝柱, 等. 棉花三系杂交种不同生态区遗传效应及优势表现. *棉花学报*, 2014, 26: 1–9]
- 23 Wei Z G, Hua J P. Three line hybrid vigor and cytoplasmic inheritance efficiency of upland cotton (in Chinese). *Hubei Agric Sci*, 1992, 8: 1–5 [韦贞国, 华金平. 陆地棉三系杂种优势及胞质遗传效应研究. *湖北农业科学*, 1992, 8: 1–5]
- 24 Wu J, Cao X, Guo L, et al. Development of a candidate gene marker for R_f based on a PPR gene in cytoplasmic male sterile CMS-D2 upland cotton. *Mol Breeding*, 2014, 34: 231–240
- 25 Wu J, Zhang M, Zhang B, et al. Genome-wide comparative transcriptome analysis of CMS-D2 and its maintainer and restorer lines in upland cotton. *BMC Genomics*, 2017, 18: 454
- 26 Cui Y L, Guo L P, Qi T X, et al. Effects of temperature and genetic background on the restoring ability of restorer of three-line hybrid cotton (in Chinese). *Cotton Sci*, 2016, 28: 242–249 [崔艳利, 郭立平, 戚廷香, 等. 温度及遗传背景对棉花恢复系恢复能力的影响. *棉花学报*, 2016, 28: 242–249]
- 27 Li Xue, Guo L P, Liu H L, et al. Study on the relationship between pollen fertility and yield, fiber quality of “Three-Line” cotton F1 hybrid (in Chinese). *China Cotton*, 2018, 45: 20–24+36 [李雪, 郭立平, 刘华林, 等. “三系”杂交棉组合F1花粉育性与产量和品质的相关性研究. *中国棉花*, 2018, 45: 20–24+36]
- 28 Hu Q R, Song G C, Wang X J, et al. Effects of high temperature on pollen germination and boll development in upland cotton (in Chinese). *J Xinjiang Agric Univ*, 2017, 40: 1–7 [胡启瑞, 宋桂成, 王雪蛟, 等. 高温对陆地棉花花粉萌发及棉铃发育的影响. *新疆农业大学学报*, 2017, 40: 1–7]
- 29 Kakani V G, Prasad P V V, Craufurd P Q, et al. Response of *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes to temperature. *Plant Cell Environ*, 2002, 25: 1651–1661
- 30 Zhang L, Zhao Y, Zhang J L, et al. Analysis on photosynthetic characteristic differences of functional leaves of cotton with different leaf-type (in Chinese). *J Shanxi Agric Sci*, 2020, 48: 172–176 [张丽, 赵岩, 张晋龙, 等. 不同叶型棉花功能叶片光合特性差异分析. *山西农业科学*, 2020, 48: 172–176]
- 31 Tian Y S, Fan S L, Pang C Y, et al. Effects of drought stress in the whole period on cotton morphology, physiology, photosynthesis and yield (in Chinese). *Acta Agric Boreali-Sin*, 2017, 32: 224–231 [田又升, 范术丽, 庞朝友, 等. 全生育期干旱胁迫对棉花形态、生理、光合作用和产量的影响. *华北农学报*, 2017, 32: 224–231]
- 32 Dai Y N, Ma Y X, Chen J X, et al. Dry matter accumulation and its influencing factors in cotton (in Chinese). *J Anhui Agric Sci*, 2015, 43: 6–7+10 [代英男, 马一学, 陈金湘, 等. 棉花干物质积累特征及其影响因素. *安徽农业科学*, 2015, 43: 6–7+10]
- 33 Singh R P, Prasad P V, Sunita K, et al. Influence of high temperature and breeding for heat tolerance in cotton: a review. In: *Advances in Agronomy*. New York: Academic Press, 2007. 313–385
- 34 Min L, Li Y, Hu Q, et al. Sugar and auxin signaling pathways respond to high-temperature stress during anther development as revealed by transcript profiling analysis in cotton. *Plant Physiol*, 2014, 164: 1293–1308
- 35 Meyer V G. Male sterility from *Gossypium harknessii*. *J Heredity*, 1975, 66: 23–27
- 36 Zhang M, Zhang X, Guo L, et al. Single-base resolution methylome of cotton cytoplasmic male sterility system reveals epigenomic changes in response to high-temperature stress during anther development. *J Exp Bot*, 2020, 71: 951–969
- 37 Ni M, Wang X D, Zhang Z W, et al. Reaction of pollen fertility to high or low temperature stresses in CMS-Based hybrid cotton (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2009, 35: 2085–2090 [倪密, 王学德, 张昭伟, 等. 三系杂交棉花花粉育性对高温和低温胁迫的反应. *作物学报*, 2009, 35: 2085–2090]

- 38 Wang X D, Zhang T Z, Pan J J. Cytological observation of microsporogenesis and RAPD analysis of mitochondrial DNAs for cytoplasmic male-sterile cotton lines (in Chinese). *Sci Agric Sin*, 1998, 31: 2 [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RAPD分析. *中国农业科学*, 1998, 31: 2]
- 39 Wang X D, Zhang T Z, Pan J J. Genetic basis of fertility restoration to cytoplasmic male sterile lines available in upland cotton I. Restorer genes and their effects (in Chinese). *Sci Agric Sin*, 1996, 5: 33–41 [王学德, 张天真, 潘家驹. 棉花细胞质雄性不育系育性恢复的遗传基础 I. 恢复基因及其遗传效应. *中国农业科学*, 1996, 5: 33–41]
- 40 Wang X D, Pan J J. Genetic basis of fertility restoration of cytoplasmic male sterile lines available in China in upland cotton II. Interactive effect between restorer genes and fertility enhancer gene (in Chinese). *J Genetics Genomics*, 1997, 24: 271–277 [王学德, 潘家驹. 我国棉花细胞质雄性不育系育性恢复的遗传基础 II. 恢复基因与育性增强基因间的互作效应. *遗传学报*, 1997, 24: 271–277]
- 41 Wu J, Gong Y, Cui M, et al. Molecular characterization of cytoplasmic male sterility conditioned by *Gossypium harknessii* cytoplasm (CMS-D2) in upland cotton. *Euphytica*, 2011, 181: 17–29
- 42 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 upland cotton. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 6070
- 43 Feng J, Zhu H, Zhang M, et al. Development and utilization of an InDel marker linked to the fertility restorer genes of CMS-D8 and CMS-D2 in cotton. *Mol Biol Rep*, 2020, 47: 1275–1282
- 44 Yang L, Wu Y, Zhang M, et al. Transcriptome, cytological and biochemical analysis of cytoplasmic male sterility and maintainer line in CMS-D8 cotton. *Plant Mol Biol*, 2018, 97: 537–551
- 45 Zhang X, Meng Z, Zhou T, et al. Mitochondrial SCAR and SSR markers for distinguishing cytoplasmic male sterile lines from their isogenic maintainer lines in cotton. *Plant Breeding*, 2012, 131: 563–570
- 46 Hua J P, Zhang C, Yi X D, et al. Breeding and breeding use of cotton distant nucleo-cytoplasmic hybrid (in Chinese). *Hubei Agric Sci*, 2003, 4: 25–28 [华金平, 张成, 易先达, 等. 棉花远缘核质杂种的培育与育种应用. *湖北农业科学*, 2003, 4: 25–28]
- 47 Meyer V G. A study of reciprocal hybrids between upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and experimental lines with cytoplasms from seven other species. *Crop Sci*, 1973, 13: 439–444

Cytoplasmic effects of CMS-D2 in upland cotton

ZUO ZhiDan¹, ZHANG XueXian¹, GUO LiPing¹, QI TingXiang¹, TANG HuiNi¹, LI YongQi²,
FENG JuanJuan¹, LI Ting³, CHEN LiangLiang¹, ZHANG YongJie³, WANG HaiLin¹,
QIAO XiuQin¹, ZHANG BingBing¹, ZHANG Meng^{1*}, WU JianYong^{1,3} & XING ChaoZhu¹

¹ State Key Laboratory of Cotton Biology, Institute of Cotton Research of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory for Cotton Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Anyang 455000, China;

² Cotton Research Institute of Jiangxi Province, Jiujiang 332000, China;

³ Zhengzhou Research Base, State Key Laboratory of Cotton Biology, College of Agronomy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

Two sets of isonuclear alloplasmic near-isogenic restorer lines of *Gossypium harknessii* were planted in cotton production areas of the Yellow River (Anyang, Henan) and Yangtze River (Jiujiang, Jiangxi) basins, and comparative analyses of seedling growth, leaf photosynthetic parameters, anther development, cotton yield as well as its constituent factors, and fiber quality traits were performed to clarify the cytoplasmic effects of CMS-D2 in upland cotton. The results are as follows: (i) sterile cytoplasm did not affect cotton seedling growth and most fiber quality traits. (ii) The net photosynthetic rate of the sterile cytoplasmic restorer lines was significantly higher at the seedling stage but lower after the blooming stage when compared to the fertile cytoplasmic restorer lines. (iii) The anther fertility of the sterile cytoplasmic restorer lines under high-temperature stress was significantly lower than that of the fertile cytoplasmic restorer lines, which was mainly manifested in a significant reduction in pollen amount, pollen activity and vitality. (iv) The sterile cytoplasm negatively affected yield traits, which was mainly manifested in a significant reduction in boll number per plant and lint percentage. (v) In general, the negative effects of sterile cytoplasm on net photosynthetic rate, anther development and cotton yield were more obvious in cotton production area of the Yangtze River basin where summer temperatures are higher. This paper systematically explored the effects of CMS-D2 cytoplasm on the main traits of upland cotton, and the results of this study are of great significance for the breeding and improvement of cytoplasmic sterile “three-line” hybrid cotton.

CMS-D2, cytoplasmic effect, growth, photosynthetic characteristics, fertility, yield, fiber quality

doi: [10.1360/SSV-2021-0288](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0288)