

新型抗除草剂棉花不育系 Yu98-8A1 的培育及鉴定

杨晓杰¹, 谢德意¹, 赵元明¹, 李 武¹, 赵付安¹, 段铮铮¹, 祝水金², 房卫平¹

(¹河南省农业科学院经济作物研究所, 郑州 450002; ²浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310058)

摘要:通过连续回交, 将抗除草剂基因 *EPSPS-G6* 转育花粉败育彻底(无微量花粉, 不育度达 100%) 的棉花单基因隐性控制的核不育系 Yu98-8A, 进而培育成抗除草剂核不育系 Yu98-8A1。对该转育不育系花冠表型测量观察表明, 与同质系正常可育株比较, 不育株花冠较小, 不育株子房直径略大于可育株, 花柱长和花柱外露长度均明显高于同质系正常可育株, 花柱头外露为其最显著的表型特征; 显微观察显示, 不育系 Yu98-8A1 小孢子败育主要是在四分体形成后的小孢子发育期。小孢子败育特征表现为花粉粒无内含物、无刺突产生, 最后解体、退化。PCR 分子鉴定表明, 抗除草剂基因 *EPSPS-G6* 转育入 Yu98-8A, 除草剂抗性试验表明, 该转育不育系可抗质量百分比浓度达 0.3% 的草甘膦。该抗除草剂核不育系的培育在棉花杂种优势利用方面有重大利用价值。

关键词: 陆地棉; 抗除草剂不育系 Yu98-8A1; 培育及分子鉴定

Breeding and Identification of Herbicide-resistant Genic Male-sterile Line Yu98-8A1 of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)

YANG Xiao-jie¹, XIE De-yi¹, ZHAO Yuan-ming¹, LI Wu¹,

ZHAO Fu-an¹, DUAN Zheng-zheng¹, ZHU Shui-jin², FANG Wei-ping¹

(¹Economic Crop Research Institute of Henan Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450002;

²College of Agricultural & Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

Abstract: Yu98-8A1, a herbicide-resistant cotton genic male-sterile line, was developed from a genic male-sterile line Yu98-8A by successive backcrossing cotton line EHC09-002 which possessed the herbicide-resistant gene *EPSPS-G6*. Compared with homogeneity normal fertile plants, its significant characteristics included smaller corolla, bigger Ovary diameter, style length, and exposed stigmas by corolla phenotype observation. Among theses characteristics, exposed stigmas was the most significant one. Cytological observation showed that the anther abortion of Yu98-8A1 occurred during the stage of microspore development, which displayed without inclusion in pollen grain and spinescent protuberance on the pollen wall, and the microspore appeared abnormal and break down gradually. PCR identification and glyphosate resistance test indicated that herbicide-resistant gene *EPSPS-G6* had been successfully aggregated into Yu98-8A, and the anti-herbicide concentration reached up to 0.3%. The cultivation of herbicide-resistant sterile line made Yu98-8A1 have significant value in the utilization of cotton heterosis.

Key words: *Gossypium hirsutum* L.; herbicide-resistant genic sterile line Yu98-8A1; cultivation and molecular identification

我国是全球最大的棉花生产国, 也是全球最大的棉花消费国和原棉进口国, 供需矛盾十分突出。因而, 在今后较长时间内, 棉花育种的主要目标之一仍然是选配具有强优势、多抗、优质、易于制种的棉

花杂交种。在棉花杂种优势利用中, 挖掘和培育新类型的雄性不育系具有重要的意义。与细胞质雄性不育系相比, 隐性单基因控制的棉花雄性核不育材料具有育性位点纯合, 与杂合“近等基因系”杂交后

收稿日期: 2012-10-14 修回日期: 2012-12-13 网络出版日期: 2013-06-07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130607.1739.012.html>

基金项目: 河南省科技攻关项目(122102110057); 国家转基因重大专项(2011ZX08005-005-006); 国家“863”项目(2012AA101108-02)

第一作者研究方向为棉花抗病分子育种。E-mail: yyxjj7910@sina.com

通信作者: 房卫平, 博士, 研究员, 棉花遗传育种。E-mail: Fangweiping@371.net

代不育与可育呈现 1:1 分离,且具有育性恢复源广泛,容易配制强优势组合的特点。目前,我国棉花雄性核不育系已被广泛应用于杂种优势利用研究与杂交棉生产实践中^[1]。

棉花隐性单基因控制的核不育系豫 98-8A 是从河南省农业科学院棉花育种研究室选育的转基因抗虫棉后代中选获的新核不育系,其花粉败育彻底(无微量花粉,不育度达 100%)^[2]。由于该核不育系不仅抗虫,且一般配合力高,组配优势组合的机率高,本研究进一步以该材料为母本,通过连续回交,将抗除草剂基因聚合到该不育系,并将其命名为 Yu98-8A1,主要通过该不育系的表型及显微观察、抗除草剂表型鉴定及分子检测等来阐明该不育系的特征特性,旨在为 Yu98-8A1 不育系在棉花杂种优势利用方面提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

棉花隐性单基因控制的核不育系 Yu98-8A 和转基因抗除草剂株系 EHC09-002 均由河南省农科院育种研究室选育,非转基因材料中棉所 24 由中棉所种质资源室提供。所有材料均种植于河南原阳,常规栽培管理。

1.2 形态学观察与测量

在开花期,对每个单株分上、中、下 3 个部位取样,每个样 3~5 朵花,对柱头外露、花丝长度、花药形态、开裂及散粉情况进行观察,同时用卡诺氏固定液固定花药并在显微镜下观察拍照。

1.3 细胞学观察

取植株各发育时期幼蕾于改良卡诺氏固定液中固定 12~24 h 后,于 70% 的乙醇中保存备用。采用标准的铁-醋酸洋红染色制永久压片^[3]。采用常规石蜡切片法制片,系列浓度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片厚度 8 μm ,铁矾-苏木精染色,树胶封片,Olympus 倒置显微镜观察并拍照。

1.4 除草剂抗性鉴定

于 3~4 真叶期用 0.3% 质量浓度的草甘膦均匀喷撒棉花植株,2 周后观察叶面反应。叶片无任何反应的植株定性为抗,有褐色焦斑点状的植株定性为不抗。

1.5 分子鉴定

取抗除草剂供体材料 EHC09-002、不育系 Yu98-A1 及非转基因材料中棉所 24 幼嫩叶片,采用改良的 CTAB 法小量提取棉花基因组 DNA^[4]。以

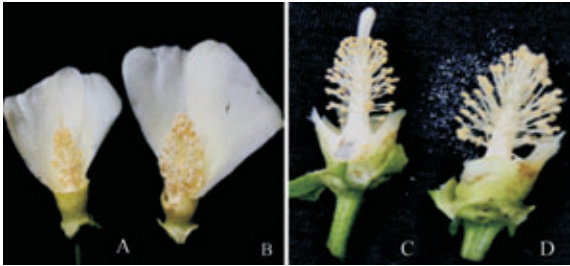
非转基因材料中棉所 24 基因组 DNA 为阴性对照,对不育系 Yu98-A1 基因组 DNA 进行 PCR 检测。根据抗草甘膦基因 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶 (*EPSPS*, 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase)^[5] (GenBank: EU169459.1),利用软件 Primer 5.0 设计 PCR 检测引物对 (EF: 5'-GCAAGCTGACCGCCACCA-3', ER: 5'-TCGGCCATCACCTGAATC-3')。按以下成分配制 PCR 反应体系 (20 μL): 模板 DNA 1.0 μL (50 ng), 10 \times Buffer (Mg^{2+} Plus) 2.0 μL , 10 mmol/L dNTP 2.0 μL , EF 和 ER (20 mol/L) 各 0.5 μL , 5 U/ DNA 聚合酶 0.2 μL , 无菌 ddH₂O 13.8 μL 。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳,紫外凝胶成像系统拍照。

2 结果与分析

2.1 不育系花器表型

整个生育期中,与同质系正常可育株比较,不育株棉花株型、株高虽然一致,但花冠相对较小(图 1)。2012 年 9 月,在盛花期对不育株和可育株分别随机选择 20 朵花,对其子房直径、花柱长、花柱外露长度、花药数分别测量。结果表明,每朵花的花药数量在不育株和正常可育株之间没有差异,均为 125 个左右。不育株子房直径略大于可育株,其花柱长和花柱外露长度均明显高于同质系正常可育株(图 1 和表 1),花柱头外露及无微量花粉是该不育材料最显著的表型特征。

除质核互作雄性不育外,核不育系已被成功用于水稻、小麦、棉花、大豆、麻类等作物的杂种优势利用中^[6-7]。与杂交棉品种选育“三系法”中细胞质雄性不育系相比,隐性单基因控制的核雄性不育材料具有育性位点杂合,后代呈现不育与可育 1:1 分离,且育性恢复容易,容易配制强优势组合的特点,应用潜力大^[8]。核雄性不育性在棉花中已被应用于遗传改良研究^[9]。“两系法”杂种优势利用不受恢保关系制约,恢复材料来源相对广泛,配组自由度大,选配到强优势组合的机率高,并且可避免不育细胞质对杂种优势的负效应。在棉花杂交种制种方面,利用“两系法”育种策略,四川省农科院以洞 A 为基础,先后选育出 473A 等核不育两用系,进而选配的杂交种,如川杂 11 号取得了可观的经济效益^[10]。最近,四川省农科院又选育出川杂 22 号,同样具有较好的应用前景^[11]。



A:不育花花冠;B:可育花花冠;
C:不育花雄蕊及花柱;D:可育花雄蕊及花柱

A and B:The corolla of sterile and fertile flower, respectively,
C and D:The androecium and style of sterile
and fertile flower, respectively

图 1 不育花和可育花的花冠、雄蕊及花柱
Fig. 1 Corolla, androecium, and style of
sterile and fertile flower

表 1 棉花不育株和可育株花器形态特征

Table 1 Morphological characteristics of cotton sterile and fertile flowers

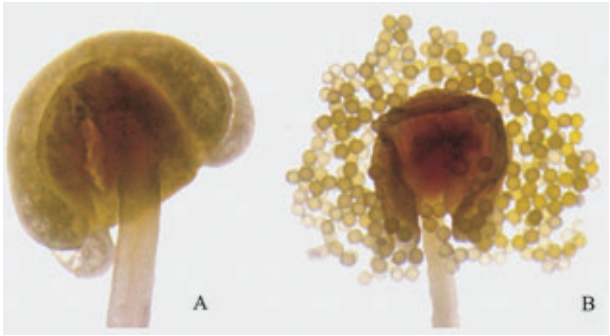
类型 Flower type	子房直径(mm) Ovary diameter	花柱长(mm) Style length	柱头外露长(mm) Length of exposed stigmas	花药数 No. of anthers
可育花 Fertile flower	7.51 ± 0.31	20.83 ± 1.93	-1.21 ± 1.37	125 ± 8.44
不育花 Sterile flower	7.58 ± 0.33	22.11 ± 1.47	3.46 ± 1.47	125 ± 8.18

作物不育系柱头明显外露现象在红麻质核互作不育材料中也有发现^[12],该特征为异花授粉提供了天然的便利条件。然而,迄今报道的棉花核不育系在育性败育彻底性方面或多或少存在不足之处,如:473A(洞 A 衍生系)、闽 A 在一定的气候条件下,会产生微量花粉并自交成铃^[13-14],从而在一定程度上限制了此类核不育材料在棉花杂种优势的应用。目前,中国在众多核不育基因中,已投入生产使用的仍主要是洞 A 型(ms14)、ms5ms6 以及在此基础上培育的一系列衍生系,而其他核不育类型由于或花粉败育不彻底、或配合力低、或综合性状差等原因,目前尚难以在生产中广泛应用^[9]。相对而言,仅就育性败育彻底性和柱头外露的特点,该不育材料具备一定的杂种利用优势。

2.2 不育系花药发育特征

分别取 Yu98-8A1 不育花和正常姊妹系可育花花药,在显微镜下观察,不育系花药均表现为只有花药壁,而正常可育花花药则包含众多的花粉粒(图 2)。该结果显示,不育系 Yu98-8A1 不育花花粉粒

在成熟前或发育过程中已经完全退化消失。



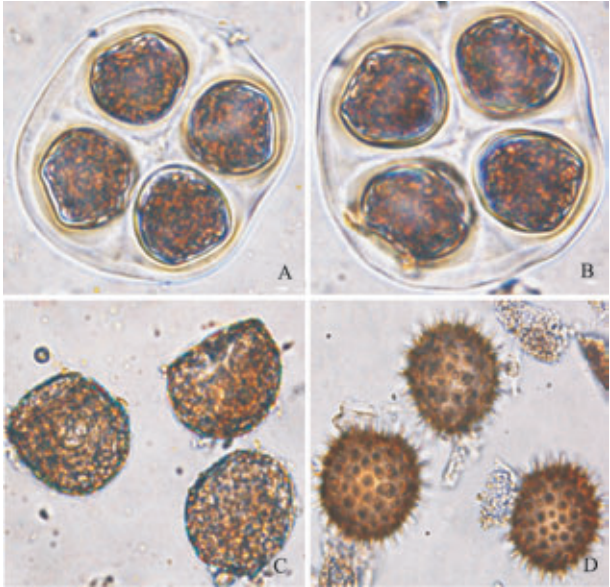
A:不育花花药;B:可育花花药及花粉粒

A: Anther of sterile flower, B: Anther and pollen of fertile flower

图 2 不育花和可育花的花药与花粉粒

Fig. 2 Anther and pollen of sterile and fertile flower

显微观察表明,同正常可育株类似,不育花药花粉母细胞在四分体时期无显著差异,均表现为正常,而在四分体分离后小孢子发育过程中,花粉粒干瘪,且无刺突产生,最后,花粉粒退化消失,仅仅形成空花药壳(图 2、图 3)。



A:不育株四分体;B:可育株四分体;C:不育株花粉粒;D:可育株花粉粒

A and C:Tetrad and pollen of sterile flower, respectively,
B and D:Tetrad and pollen of fertile flower, respectively

图 3 不育株和可育株的小孢子发育显微观察

Fig. 3 Microscopical observation of microspore
development of sterile and fertile flower

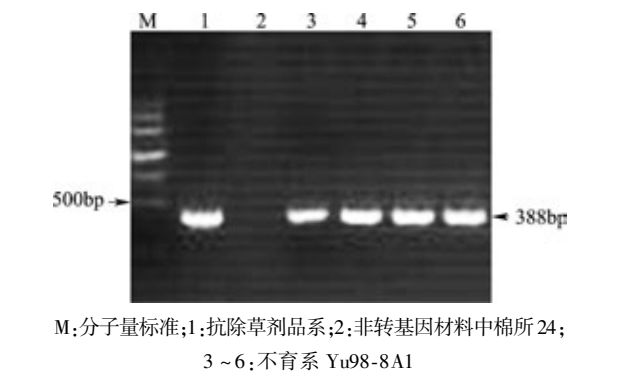
有研究指出,从造孢细胞形成开始至花粉粒成熟,均有不同的棉花雄性不育材料出现败育。棉花晋 A 胞质雄性不育系败育主要是在造孢细胞增殖及小孢子母细胞的形成时期^[15];而湘远 4A 等不育系在减数分裂时期败育^[16]。虽然小孢子母细胞形

成期和小孢子分离至成熟期都有败育现象,特棉 S-1 败育则主要发生在四分体形成期^[17-18]。但小孢子母细胞形成期败育细胞毕竟为少数,小孢子分离至成熟期的败育则可能是四分体期败育的直接结果。而陆地棉 1335A 不育系的败育则发生在四分体孢子散开后的小孢子(花粉粒)发育的单核至双核期^[19],与此类似,本研究抗除草剂不育系 Yu98-8A1 小孢子败育主要发生在四分体形成后的小孢子发育期,表现为花粉粒无内含物、无刺突产生,最后解体、退化。

从育种应用上讲,虽然获得遗传稳定、花粉败育彻底的棉花不育材料是杂种优势利用的前提条件,本研究仍然认为,除了进一步与其他不育基因的等位性、经济性状的配合力等进行全面分析外,亦需要首先从花药败育细胞形态学^[17,20]、生理生化代谢特征等层面进行深入的研究,以明确该不育材料败育过程特有的显著特征^[18,21-23]。

2.3 不育系的抗除草剂鉴定

根据抗草甘膦基因 *EPSPS-G6* 设计引物对,分别对不育系 Yu98-8A1、抗除草剂株系 EHC09-002 及非转基因材料中棉所 24 基因组进行扩增。PCR 产物凝胶电泳结果表明,不育系 Yu98-8A1 及阳性对照抗除草剂株系基因组 DNA 均能扩增出 *EPSPS* 基因目的条带,而非转基因材料则未能扩增出预期条带(图 4)。该结果表明,不育系 Yu98-8A1 聚合了抗除草剂基因 *EPSPS-G6*。



M: Molecular marker, 1: Glyphosate resistant line EHC09-002, 2: Non-transgenic line Zhongmiansuo 24, 3-6: Sterile line Yu98-8A1

图 4 抗除草剂基因 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR identification of *EPSPS-G6* gene

在 3~5 片真叶期,用质量浓度为 0.3% 草甘膦均匀喷洒植株,2 周后观察表型表明,抗除草剂不育系 Yu98-8A1,真叶及生长点均生长良好,无明显变化,而对照不育系 Yu-98A(未转育抗草甘膦基因 *EPSPS-G6*)真叶出现褐色斑点,生长点受到抑制,显

现轻微枯萎状(图 5)。该结果表明,不育系 Yu98-8A1 对草甘膦表现为抗。



A: Plant of sterile line Yu98-8A, B: Glyphosate resistant sterile line Yu98-8A1

图 5 草甘膦除草剂抗性表型

Fig. 5 Phenotype identification of glyphosate resistance

以棉花核不育系为材料,通过转育进而获得具有特色性状的衍生系,在棉花育种中也得到广泛的研究。如张超等^[24]以棉花不育系转育的抗虫不育系生产的杂种 F₁ 群体的抗虫性好、产量高、品质优,在生产上具有较好的应用前景。

3 讨论

随着作物育种目标不断提高,通过基因导入、杂交及回交转育等方法,培育具备多种优良性状的新型核不育系一直是杂种优势利用的重要内容。本研究采用抗除草剂供体株系 EHC09-002 为轮回亲本,转育核不育系 Yu-98A,通过杂交、自交及回交等常规育种手段,最终转育成抗除草剂核不育系 Yu-98A1。该不育系可以直接应用于杂交制种,同时亦可在该材料基础上,进一步培育一系列优质、多抗不育系。

如前文所述,隐性核不育具有恢复源广泛、容易配制强优势组合等特点;但隐性核不育系材料的应用均面临制种时需要拔除 50% 可育株的问题。虽然外源基因分子标记可以作为鉴定不育系的重要策略,但由于外源基因均为显性基因,因而,对于杂交制种时纯合不育株和杂合不育株的分离依旧无法有效区分。针对上述问题,我国育种工作者注重不育系连锁标记性状的开发与利用研究。例如,冯辉等^[25]采用连续回交转育及测交筛选基因型的方法,育成了单隐性基因控制的无蜡粉型青梗菜雄性不育系;刘国民等^[26]将具有黄单隐性基因控制的绿色叶片性状突变体转育成带有标记性状实用型籼稻不育

系,这些隐性单基因控制表型性状的开发使杂交制种时苗期鉴定不育株、直接拔除杂合可育株成为现实。目前,分子标记已用于作物不育系的鉴定与选育,例如,曹香霞^[27]开发的 SCAR 标记用于棉花不育系的鉴定;于娜娜等^[28]则利用 SCAR 标记完成了大白菜雄性不育系的定向转育。当然,与表型标记类似,采用更加直接和准确的分子标记来区分杂交制种时纯合不育株和杂合不育株需要被选用的分子标记呈共显性或隐性特征。

所以,对隐性基因控制的核不育系的杂种优势利用而言,除了抗病虫等优良性状的转育外,应着力于隐性基因控制的表型性状及呈共显性或隐性分子标记的开发利用研究及相应的核不育系转育。这也是隐性核不育系杂交制种中,苗期鉴定不育株、提高制种产量的有效手段。

参考文献

[1] 蓝家样,詹先进,张兴中,等. 棉花雄性核不育系的培育与利用研究进展[J]. 中国农学通报,2006,22(12):152-156

[2] 赵元明,杨晓杰,房卫平,等. 新型棉花核不育系豫 98-8A 育性遗传分析[J]. 中国农学通报,2012,28(33):98-102

[3] Zhou Z H, Yu P, Liu G H, et al. Morphological and molecular characterization of two *G. somalense* monosomic alien addition lines(MAALS)[J]. Chinese Sci Bull,2004,49(9):910-914

[4] 宋国立,崔荣霞,王坤波,等. 改良 CTAB 法快速提取棉花基因组 DNA[J]. 棉花学报,1998,10(5):215-217

[5] 燕树锋,陈进红,梅磊,等. 市售草甘膦除草剂对转基因抗草甘膦棉花幼苗生长的影响[J]. 棉花学报,2011,23(5):408-413

[6] 卢庆善,孙毅,华泽田. 农作物杂种优势[M]. 北京:中国农业出版社,2001:90-98

[7] 陈富成,祁建民,陶爱芬,等. 棉麻纤维作物雄性不育研究进展及展望[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(2):197-202

[8] 冯雪梅,刘峰,刘玉栋,等. 陆地棉新型核雄性不育系 21A 的初步研究[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(4):433-438

[9] 姜家生,何金铃,蔡永萍,等. 棉花核雄性不育系研究进展及

应用[J]. 安徽农业大学学报,2011,38(5):775-782

[10] 张相琼,周宏俊,王均明,等. 优质丰产抗病高优势杂交棉川杂 11 号[J]. 中国棉花,2000(7):28

[11] 李琼英,叶鹏盛,曾华兰,等. 棉花高产核不育杂交新品种川杂棉 22 的选育[J]. 中国种业,2009(12):50

[12] 赵合明,周瑞阳,刘恒蔚,等. 红麻花柱外露突变体的特征特性鉴定[J]. 作物学报,2005,31(5):658-661

[13] 唐雯. 陆地棉隐性核不育系花器官发育的形态解剖特征及生理生化特性研究[D]. 雅安:四川农业大学,2008

[14] 王国英,郭小平,张献龙. 4 个陆地棉雄性核不育系育性稳定性观察[J]. 华中农业大学学报,2006,25(4):351-354

[15] 黄晋玲,李炳林,安泽伟,等. 棉花晋 A 细胞质雄性不育系的细胞形态学观察[J]. 植物遗传资源科学,2001,2(3):28-31

[16] 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[J]. 中国农业科学,1998,31(2):70-75

[17] 周仲华,陈金湘,刘爱玉,等. 棉花温敏雄性不育系特棉 S-1 的形态学和细胞学特征研究[J]. 棉花学报,2008,20(6):408-413

[18] 豆丽萍,王庆亚,唐灿明. 陆地棉双隐性雄性核不育系 ms₅ms₆ 花药发育过程的研究[J]. 棉花学报,2009,21(4):265-270

[19] 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

[20] 刘金兰,聂以春,黄观武,等. 棉花洞 A 型核雄性不育材料花粉不同发育时期的超微结构观察[J]. 棉花学报,1994,6(4):193-195

[21] 宋宪亮,孙学振,王洪刚. 棉花洞 A 型核雄性不育系花药败育过程中的生化变化[J]. 西北植物学报,2004,24(2):243-247

[22] 周仲华. 棉花温敏雄性不育的细胞学特征、生化基础及其分子标记的研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2006

[23] 张东铭,张相琼,周宏俊. 棉花抗枯萎核不育两用系抗 A1 的选育[J]. 中国棉花,1995,22(3):11-12

[24] 张超,毛正轩,牟方生,等. 几个棉花核不育抗虫杂交种(F₁)的抗虫性及经济性状分析[J]. 植物遗传资源学报,2006,7(1):31-34

[25] 冯辉,杨晓飞,辛彬,等. 无蜡粉型青梗菜核基因雄性不育系转育研究[J]. 沈阳农业大学学报,2010,41(2):142-146

[26] 刘国民,高必军,文绍山,等. 具有黄绿叶标记的香型籼稻不育系选育研究[J]. 中国农业科学,2010,43(4):855-861

[27] 曹香霞. 哈克尼西棉细胞质雄性不育恢复基因 SSR 标记及定位及利用[D]. 北京:中国农业科学院,2012

[28] 于娜娜,张鲁刚,孙希禄,等. SCAR 标记辅助的大白菜雄性不育系定向转育[J]. 西北农业学报,2011,20(7):98-105