



棉花生殖器官发育的分子生物学研究进展

周 焱, 张 锐, 孟志刚, 孙国清, 孙书琦, 郭三堆*

(中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要:棉花生殖器官发育与棉花的经济价值紧密相关,因此一直以来都是研究热点。随着棉花三系育种体系的应用推广,棉纤维发育相关基因的克隆、棉花生殖器官高效表达启动子的克隆和应用,棉花生殖器官发育的分子生物学研究的重要性也日益凸显。为方便相关研究人员了解该领域的最新进展,就国内外在棉花核质互作雄性不育、核不育、棉纤维发育以及棉花生殖器官特异型启动子等方面取得的分子生物学研究进展作了详细介绍,并对以上各方面的研究趋势进行了展望。

关键词:棉花;生殖器官发育;分子生物学;克隆;基因

中图分类号:S562.032 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2008)03-0223-08

Molecular Biology Research Advance on Cotton Reproductive Organ Development

ZHOU Tao, ZHANG Rui, MENG Zhi-gang, SUN Guo-qing, SUN Shu-qi, GUO San-dui*

(Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Cotton reproductive organ development is correlative with cotton economic value tightly, it's always the focus of cotton molecular biology research. Research in this field by molecular biology, is not only helping us understand cotton reproductive organ development mechanism, but also can be applied in cotton production. At present, researchers have made great progress in this field. For example, researchers get more information about cotton cytoplasmic male sterility (CMS) and genome male sterility (GMS), restorer fertility gene 1 (Rf_1) had been located in two BAC clones spanning an interval of approximately 100 kb, Rf_2 gene had been located in a genetic map with 9 markers in a genetic distance of 2.9 cM; cotton GMS line with yellow bud marker had been found. On the other hand, cotton fiber development related genes had been mapped by quantitative trait loci (QTL); by studying the transcriptome and regulation of cotton fiber development, some cotton fiber elongation related genes had been cloned; furthermore, some cotton reproductive organ specific promoters had been cloned. It's hoped that the review could provide reference for further research and application the research results on breeding high quality, high yield and high resistance cotton varieties.

Key words: cotton; reproductive development; molecular biology; clone; gene

棉花是重要的战略经济作物,在国民经济发展中占有举足轻重的地位。然而有限的耕地面积和对优质棉花日益增长的需求始终制约着我国棉

花产业的发展。棉花的经济价值主要通过其生殖器官的发育来体现,因此,利用分子生物学手段对棉花生殖器官发育进行研究,对培育优质高产高

抗的棉花新品种,缓解土地资源紧张和棉花供不应求的矛盾以及促进我国棉花产业可持续发展具有重要的意义。目前国内外对棉花生殖器官发育的分子生物学研究主要集中在核质互作雄性不育、核不育、纤维发育和生殖器官特异型启动子等方面。本文对国内外在这几个方面的研究进展进行了综述。

1 棉花核质互作雄性不育体系

细胞质雄性不育(Cytoplasmic male sterility, CMS)是伴随母本细胞质的一种遗传性状,表现为花粉在发育过程中产生败育,导致育性丧失。CMS现象广泛存在于高等植物中,迄今为止在包括重要农作物的超过200个物种中发现了CMS。CMS在作物生产中应用非常广泛,利用其核质互作的特点构建的三系育种体系可以使作物的杂种优势得到充分利用,从而培育出高产高抗、性状优良的作物新品种。目前我国已在水稻、玉米、油菜、大豆和棉花五大主要作物中实现了三系配套。

1.1 棉花核质互作雄性不育及育性恢复的机理

大部分植物产生CMS是由结构上产生改变的异常线粒体基因所导致^[1]。刘少林和王学德利用RAPD技术,Feng Chun-da等和黄晋玲利用RFLP技术先后对棉花CMS的不育系和保持系线粒体基因组进行过比较研究^[2-5],结果均表明棉花不育系与保持系的线粒体基因组存在明显差异,一致支持上述观点。不同植物的恢复机理有所不同,但不少植物CMS系统的育性恢复机理是由于恢复系细胞核基因组中育性恢复基因(Restorer fertility gene, *Rf*)的编码产物改变了引起CMS的相关基因的转录本,使其失去了导致不育的功能^[6]。王学德等研究发现细胞质同样来自哈克尼西棉的恢复系比不育系在线粒体中多了一个31 kDa的蛋白质^[7],说明棉花CMS育性的恢复有可能与上述机理相同。

1.2 棉花CMS体系恢复基因

棉花CMS依据其不育系细胞质的来源可分为数种,比较有应用价值且研究得比较多的主要是细胞质来源于哈克尼西棉(*G. harknessii* Brandg)的 D_{2-2} 型CMS和细胞质来源于三裂棉[*G. trilobum* (DC.) Skov]的 D_8 型CMS。

目前在棉花CMS恢复系的核基因组中发现

有两种不同恢复机制的育性恢复基因,分别是 Rf_1 和 Rf_2 。但由于目前仍未克隆到这两个恢复基因,因此对棉花CMS育性恢复的分子机理认识仍然有限。Weaver等和Zhang等研究认为棉花的恢复基因是部分显性基因,存在于核基因组中^[8-9]。王学德等通过对我国7个棉花细胞质雄性不育系研究,认为 Rf_1 为完全显性, Rf_2 为部分显性, Rf_1 的恢复效应大于 Rf_2 ,且棉花育性恢复可能还受到一个育性增强基因的促进^[10]。Zhang等研究表明 D_{2-2} 型CMS的恢复基因 Rf_1 可以恢复CMS- D_{2-2} 和CMS- D_8 不育系的育性,而 D_8 型CMS的 Rf_2 基因却只能恢复CMS- D_8 不育系的育性^[11]。这主要是因为这两种基因的作用机理不同, Rf_1 基因是在孢子体世代通过其编码产物恢复育性,而 Rf_2 基因则是在配子体世代通过其编码产物恢复育性^[12]。在CMS- D_8 - Rf_2 恢复系统中只有含 Rf_2 等位基因的花粉具有受精能力,而含 Rf_2 等位基因的花粉是败育的,因此其 F_2 代表现为全部可育^[13]。此外,由于 D_{2-2} 型CMS不育系育性恢复是环境敏感型,导致其 F_1 代散粉率较低,因此其 F_2 代的分离率相对孟德尔分离定律有所偏差^[11,14]。Zhang等通过遗传分析发现 Rf_1 和 Rf_2 基因紧密连锁,其平均遗传距离为0.93 cM^[11]。尽管 Rf_1 和 Rf_2 基因紧密连锁,但是两者互为相斥相^[12]。

Liu等利用1025个随机引物和282对简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR)开发出了与 Rf_1 基因连锁的2个RAPD标记和3个SSR标记,且将 Rf_1 基因定位在4号染色体的长臂上^[14]。Baral等通过对 $[(Rf_1 \cdot Rf_2)F_1 \cdot Rf_1]$ 群体研究,发现2个序列标签位点(Sequence-tagged site, STS)在包含 Rf_1 基因的可育株系中与 Rf_1 基因相连锁,但是在包含 Rf_2 基因的不育株系中却缺失^[15]。Feng等通过遗传分析,鉴定出3个与 Rf_1 基因共分离的RAPD标记,加上以前研究过的1个RAPD标记,转化成4个STS标记^[12]。Yin等在0.9 cM的遗传距离内筛选到了13个与 Rf_1 基因紧密连锁的分子标记,并通过BAC文库进行筛选,将 Rf_1 基因锁定在2个BAC克隆约100 kb范围内^[16]。

Zhang等通过遗传分析,鉴定出2个与 Rf_2 基因相连锁的RAPD标记,其中1个与 Rf_2 基因的遗传距离为2.9 cM。此外还揭示了 Rf_2 基因

是从 D_8 型 CMS 的基因组渗透到四倍体棉花基因组中去的^[17]。Wang 等针对 Rf_2 基因新鉴定了 3 个 RAPD 标记, 2 个 AFLP 标记和 1 个 SSR 标记。此外, 基于其它物种恢复基因 PPR (Pentatripeptide repeat) 基序的保守区域设计了 PPR 基序的扩增引物, 将其与 AFLP 引物结合检测作图群体, 获得了 1 个 PPR-AFLP 分子标记, 结合 Zhang 等^[17] 获得的 2 个 RAPD 标记, 构建了包含 9 个分子标记的 Rf_2 基因连锁图谱^[18]。

2 棉花核不育体系的相关研究进展

植物核不育 (Genome male sterility, GMS) 是由细胞核内染色体上的不育基因所决定的雄性不育。核不育的遗传基础简单, 通常受 1~2 对显隐性基因控制, 且还可能受一些修饰基因的调节。迄今为止, 在棉花中至少发现了 19 种核不育基因, 现将这 19 种核不育基因统计于表 1。

表 1 棉花核不育基因

Table 1 The genome male sterility genes of cotton

基因编号	来源	显隐性	连锁群	遗传特性	出处
ms_1	陆地棉	隐性	/	单隐性基因遗传	Justus 和 Leinweber, 1960
ms_2	陆地棉	隐性	/	单隐性基因遗传	Richmond 和 Kohel, 1961
ms_3	陆地棉	隐性	III	单隐性基因遗传	Justus 等, 1963
MS_4	陆地棉	显性	/	显性遗传	Allison 和 Fisher, 1964
ms_5	陆地棉	隐性	V	重叠隐性基因遗传	Weaver, 1968
ms_6	陆地棉	隐性	IX	重叠隐性基因遗传	Weaver, 1968
MS_7	陆地棉	显性	/	显性遗传	Weaver 和 Ashley, 1971
ms_8	陆地棉	隐性	V	重叠隐性基因遗传	Rhyne, 1971
ms_9	陆地棉	隐性	IX	重叠隐性基因遗传	Rhyne, 1971
MS_{10}	陆地棉	显性	/	显性遗传	Bowman 等, 1979
MS_{11}	海岛棉	显性	/	显性遗传	Turcotte 和 Feaster, 1979
MS_{12}	海岛棉	显性	/	显性遗传	Turcotte 和 Feaster, 1985
ms_{13}	海岛棉	隐性	/	单隐性基因遗传	Percy 和 Turcotte, 1991
ms_{14}	陆地棉	隐性	/	单隐性基因遗传	张天真等, 1992 ^[19]
ms_{15}	陆地棉	隐性	/	单隐性基因遗传	张天真等, 1992 ^[19]
ms_{16}	陆地棉	隐性	/	单隐性基因遗传	张天真等, 1992 ^[19]
MS_{17}	陆地棉	显性	/	显性遗传	张天真等, 1992 ^[19]
MS_{18}	海岛棉	显性	/	显性遗传	张天真等, 1992 ^[19]
MS_{19}	海岛棉	显性	/	显性遗传	张天真等, 1992 ^[19]

2.1 带芽黄标记的核不育系

张天真等对冯福祯发现的带芽黄标记性状的单隐性核不育系 81A 研究证明, 81A 雄性不育性可能由一对隐性不育基因控制, 将其编号为 ms_{16} , 并认为芽黄性状和雄性不育同为隐性基因所控制, 且两者表现出紧密连锁或完全连锁或一因多效^[20-21]。迄今为止, 在异源四倍体棉种中共鉴定出 22 个芽黄突变体, 涉及到 26 个芽黄突变基因。潘家驹等对带芽黄标记的棉种进行研究, 发现 V10、V15 和 V20 陆地棉芽黄突变系对其轮回亲本的经济性状无不良影响, 同时与陆地棉栽培品种杂种组合的 F_1 和 F_2 代均表现出一定的杂种优势, 而且可以在苗期鉴别不育株和可育株。因此, 在杂交棉制种中具有一定的应用价值^[22]。

2.2 核不育的分子生物学

侯磊等应用 cDNA-AFLP 技术, 对棉花“洞

A”雄性不育和可育材料研究, 发现在花粉发育早期即花粉母细胞的减数分裂期, 不育棉株中基因的表达有减少的趋势, 而且有些带虽未消失, 但在表达量上有所下降^[23]。随着花粉花药的发育, 不育棉株与可育棉株在花药表型上的差异越来越明显, 以致在花粉成熟期, 产生花药中无花粉的现象。这可能是由于在棉花花药发育过程中, 某个关键的基因发生了突变, 导致下游一系列基因的表达发生异常。

3 棉花纤维发育的相关研究进展

棉纤维是高等植物中最长的单细胞, 它的伸长率和最终长度都远远超过了其它普通植物细胞^[24]。对棉纤维发育过程进行研究, 一方面可以鉴定影响棉纤维质量和产量的靶基因, 对其进行遗传操作以改善棉纤维的品质, 提高棉纤维的产

量;另一方面,棉纤维也是一种很好的研究细胞分化和伸长的模式细胞,对其进行研究有助于阐明细胞分化和伸长的机理,而不必考虑复杂的细胞分裂和多细胞发育^[25]。

棉花纤维是由棉花的生殖器官——胚珠的表皮细胞发育而来。在棉花花期中,将近30%的胚珠表皮细胞会伸长并发育成单细胞的棉纤维。棉纤维发育是一个高度调控过程,主要可分为以下四个连续时期:棉纤维发育起始期、初生细胞壁形成期、次生细胞壁形成期及成熟期^[26]。

3.1 棉纤维发育相关基因的遗传作图

纤维长度是数量性状,因此纤维的发育过程比较复杂,牵涉的基因比较多。目前,采用构建遗传图谱以及数量性状定位(Quantitative trait loci, QTL)对纤维发育相关基因进行研究是比较常见的技术策略。Park等采用微卫星分子标记(Microsatellite markers)对 *Gossypium hirsutum* L. cv. TM1 × *Gossypium barbadense* L. Pima 3-79 杂交后代的183个重组自交系(Recombinant inbred lines, RILs)进行遗传作图,通过对1557个SSR标记和5794个复杂重复序列(Complex sequence repeat, CSR)进行筛选,获得了121个与纤维发育相关的全新标记,经初步QTL分析表明纤维发育相关基因主要分布在2,3,15和18号染色体上^[27]。Frelichowski利用棉花BAC末端序列和1316对PCR引物构建了一个遗传物理图谱,经过QTL分析表明纤维发育相关基因分布于2,3,12,15和18号染色体上,其结果与Park等的基本一致^[28]。这些遗传图谱将会促进纤维发育相关基因的图位克隆,加强纤维质量的分子标记辅助育种(Marker-assisted selection, MAS)。

3.2 棉纤维发育的转录组

棉纤维发育是一个复杂的过程,牵涉到很多不同基因的共同作用,这些基因在不同发育时期表达的上调和下调控制着纤维的发育,因此对棉纤维发育转录组的研究显得尤为重要。由于具有高通量、高灵敏度的优点,基因芯片技术被应用于棉纤维发育的转录组研究。Udall等根据来自GenBank、TIGR和Chen实验室与棉纤维发育相关基因的EST序列,设计22787个寡核苷酸探针构建了寡核苷酸芯片,用于棉纤维及棉花其它组织转录组的研究^[29-30]。Tu等从海岛棉Pima3-79标准系的棉纤维cDNA文库中随机挑取9126个

克隆用来构建cDNA芯片,对5个不同棉纤维发育时期的棉纤维RNA进行筛选,对在不同时期表现出转录差异的929个克隆进行测序,获得了887个高质量EST序列;将这些EST序列与开花后0 d、5 d、10 d、15 d、20 d棉纤维RNA及非纤维组织RNA进行分析,阐明了7种类型的表达谱。此外,结果还显示激素在棉纤维发育过程中起着很重要的作用^[31]。Hovav等采用由13178个探针所构建的寡核苷酸芯片对棉纤维发育全过程的转录组进行研究,结果表明在棉纤维各个不同发育阶段转录基因占全部基因组的75%~94%。同时与标样相比,有超过一半的基因表达量上调,尤其是涉及囊泡转运的相关基因在纤维发育全过程中高效表达,预示着这些基因对支持棉纤维细胞快速生长具有重要意义^[32]。

3.3 纤维发育相关基因的克隆

目前已有多个与纤维发育相关的基因被克隆出来。Humphries等从棉花中克隆了4个与拟南芥毛状体发育相关基因TTG1同源的基因,它们均分布在棉花的D染色体上,能在棉花的胚珠和纤维中表达。经功能验证,其中2个基因能恢复拟南芥ttg1突变体毛状体的形成。因拟南芥毛状体与棉纤维发育非常相似,因此推断这2个基因与棉纤维发育有关^[33]。Li等从棉花中获得了肌动蛋白GhACT1的cDNA,通过Northern和荧光实时定量RT-PCR分析发现该基因在纤维细胞中呈优势表达。构建RNAi载体导入棉花对GhACT1进行沉默,发现该基因的mRNA和蛋白水平急剧下降,并扰乱了纤维细胞骨架正常形成,抑制了纤维伸长。因此推断GhACT1基因在纤维伸长中起着至关重要的作用^[34]。Wang等克隆了棉花肌动蛋白GhPFN1,经研究推断该基因能促进肌动蛋白聚合,在棉纤维的快速伸长过程中扮演着很重要的角色^[35]。孙杰采用mRNA荧光差异显示结合cDNA末端快速扩增技术,克隆到1个在棉纤维细胞中特异表达全长为622 bp的cDNA,将其命名为GhF1。通过Northern杂交分析表明该基因转录产物的积累主要发生在纤维细胞发育的早期阶段,虽然暂未发现该基因与已知基因有任何同源性,但其分布的组织特异性和发育阶段性暗示该基因在纤维伸长中起作用^[36]。郭嫫从棉纤维混合cDNA文库中获得1个全长为1274 bp的完整cDNA,通过RT-PCR分析表明该基因在不同发育时期的纤维细胞中特

异表达,且在纤维伸长期的表达量最高。虽然在构建的酵母表达载体中未发现该基因对酵母细胞的伸长和细胞壁加厚有显著影响,但已经构建好了该基因的正义和反义表达载体,正通过农杆菌介导转化棉花以进一步研究^[37]。

3.4 棉纤维发育的调控

棉纤维发育的调控非常复杂,其中还牵涉到激素的调控,例如赤霉素和生长素能促进棉纤维发育的起始和伸长,芸苔素甾类化合物(BR, Brassinosteroids)和乙烯可以调控棉纤维的伸长^[38-41]。因此,细胞信号转导对纤维发育的调控机理也是一大研究热点。Li 等克隆了棉花的受体激酶基因 *GhRLK1*。该基因在棉纤维细胞次生壁的合成过程中受到诱导而表达,其表达产物在细胞膜中具有丝氨酸/苏氨酸激酶和酪氨酸激酶的双重活性。这表明该基因可能在棉纤维发育过程中,在诱导和维持棉纤维次生壁形成的信号转导途径中起着重要作用^[42]。*BIN2* 基因编码一种蛋白激酶,该酶在拟南芥中是 BR 信号转导途径中的负调节因子。Sun 等发现棉花基因组中包含 4 个与拟南芥 *BIN2* 高度相似的同源基因,将这些基因导入拟南芥中发现其生长减慢,表型与拟南芥的半显性 *BIN2* 突变体非常相似。这表明棉花 *BIN2* 基因的编码产物同样能够对 BR 的调控起抑制作用^[40]。BL (Brassinosteroid brassinolide) 是一种芸苔素甾类化合物,Brz (Brassinazole) 则是芸苔素合成的抑制剂。Sun 分别用外源的 BL 和 Brz 对棉花进行处理,发现 BL 能促进纤维伸长,而 Brz 则抑制其伸长,此外对棉花花芽用 Brz 处理发现完全没有棉纤维分化。这表明 BR 对棉纤维的分化和伸长同样重要。棉纤维发育相关基因经 BL 处理后在胚珠中的表达量明显上升,而经 Brz 处理则表达受到抑制^[41]。Shi 等研究发现,对乙烯合成起重要作用的 *ACO1-3* 基因在生长期中的表达量非常高,而乙烯的释放量与胚珠中 *ACO1-3* 的表达相关,直接影响纤维生长率。且乙烯处理对纤维发育的影响比 BR 更加强,它甚至能够消除 Brz 对纤维伸长的抑制作用。乙烯主要是通过促进蔗糖合酶、微管蛋白和扩张蛋白基因的表达而促进纤维细胞的伸长^[39]。

4 棉花生殖器官特异型启动子研究

基因的差异表达主要受基因的启动子控制。

启动子控制着基因在特定组织、特定发育阶段以及特定环境条件下的表达。如花器官特异型启动子,只在花中驱动下游基因表达,而在根、茎、叶中该启动子处于关闭状态,致使下游基因不能表达。对生殖器官特异型启动子的研究不仅可以为外源基因在棉花生殖器官中高效表达提供有用的调控元件,而且可以为分子设计棉花生殖器官的性状提供有用的分子工具。

转基因抗虫棉的成功研制和广泛应用,是中国棉花生产的一个里程碑。为了解决传统 CaMV35S 启动子驱动的杀虫蛋白在棉花受害最重的生殖器官中表达不足的缺陷,任茂智运用反向 PCR 技术从陆地棉中分离到一个棉花生殖器官优势表达基因——腺苷酸糖基化作用因子 1 (*arf1*) 基因的启动子序列。通过构建四个启动子缺失突变体,定向替换植物表达载体 pBI121 上的 CaMV35S 启动子,与 *GUS* 基因融合,构建了 4 个植物表达载体。其转基因棉花后代的 *GUS* 染色和荧光定量分析结果表明:*arf1* 启动子是一个典型的棉花生殖器官优势表达启动子^[43-44]。该启动子为棉花生殖器官性状的分子设计和抗虫棉的再创新提供了有用的工具。

植物中参与细胞壁生化合成的可逆糖基化多肽(RGPs)可介导单个糖基由核糖核苷酸转移至受体分子^[45]。该基因在包括棉花在内的多个物种中均已克隆得到且在各物种中均为时空特异型表达,推测该基因可能参与重要器官的发育调控^[46]。经研究发现棉花 *RGP* 基因在纤维早期发育阶段的纤维细胞中优势表达^[47-48]。Wu 等利用基于 PCR 的染色体步移技术分离了 *GhRGP1* 基因上游一段 624 bp 的启动子序列,将这段启动子与 *GUS* 基因融合并转入烟草,经检测发现 *GUS* 基因在柱头、花柱、花药等部位具有相当高的表达活性^[49]。这一结果更加丰富了棉花生殖器官特异型启动子。

棉花的 *GhGal1* 基因是一种 β -半乳糖苷酶,属于植物中广泛分布的糖基水解酶家族,被认为与细胞壁多糖代谢有关,该基因转录本在棉纤维伸长阶段丰度很高。Wu 通过农杆菌介导法,将 *GhGal1* 基因的启动子与 *GUS* 基因融合后导入烟草,结果显示 *GUS* 在根部分身组织、子叶、维管组织、果实和毛状体中得到高效表达^[50]。另外对启动子序列分析表明里面含有几个保守的基序与前人报道过的果实和种子特异元件相似,并均与毛

状态表达有关。这揭示了 *GhGal1* 启动子的时空表达特性,并为探索 *GhGal1* 在棉花纤维发育中的作用打下了基础。

棉花的 *ACTIN1* 基因是棉花肌动蛋白基因家族中的一员。Li 等利用 Northern 和荧光实时定量 RT-PCR 技术检测,发现该基因在棉纤维伸长期纤维细胞中的 mRNA 丰度明显高于其它组织。将该基因的启动子与 *GUS* 基因融合后利用农杆菌介导法导入棉花,发现 *GUS* 基因在纤维细胞发育幼期活性明显高于其它组织和时期^[34]。

棉花脂质转运蛋白基因 *FStp1* 在棉纤维中特异表达。Delaney 等通过构建不同的启动子缺失 *GUS* 融合载体,将其转入烟草表达,结果显示 *GUS* 在转基因烟草的叶毛状体中强烈表达。且鉴定出启动子中一段 84 bp 富含 AT 的序列是保证基因在纤维细胞中特异转录的顺式作用元件^[51]。

5 展望

棉花生殖器官发育的分子生物学研究是目前棉花研究的一大热点。国内外在棉花核质互作雄性不育、核不育、不育基因、恢复基因、棉纤维发育和生殖器官特异型启动子等方面都取得了很大进展,然而以上进展在棉花生产中的直接应用仍然有限。为了使棉花生殖器官的分子生物学研究进展与棉花生产更加紧密地结合,培育出优质高抗高产的优秀新品种,则还应在以下方面取得更大突破。

5.1 棉花核质互作雄性不育体系

2005 年我国转抗虫基因三系杂交棉分子育种的成功展示了棉花杂交育种的美好前景。虽然目前三系杂交棉已获得实际应用,还构建了包含多个分子标记的 Rf_1 和 Rf_2 基因遗传图谱,但仍未获得恢复基因的克隆,且还不能确定各恢复基因的恢复效力,尤其是在棉花三系育种体系的实际应用中不同恢复系存在恢复效力不一致的现象,还存在着产量、品质下降等问题。此外,育性增强基因也只是通过遗传学分析证实其可能存在,而并未对其进行分子生物学研究。因此,今后在棉花核质互作雄性不育体系方面的研究重点仍将集中在对棉花不育基因和恢复基因的克隆、不育及育性恢复的相关机理等方面,而对育性恢复效力、育性增强基因的研究也应得到重视。

5.2 棉花核不育体系

棉花 GMS 不育性不稳定,不育性的保持比

较复杂,不育株的鉴定及筛选麻烦,需要耗费大量人力,制种效率较低,因此棉花 GMS 在杂交棉制种上的利用不如 CMS。可产生 GMS 的不育基因种类较多,对棉花 GMS 的分子生物学研究相对落后。今后应将研究方向主要集中在增强 GMS 不育性的稳定性,改善不育性的保持方法,简化鉴别不育株与可育株的方法,提高制种效率,开发高效的筛选标记,克隆有利用价值的 GMS 不育基因。张慧军等通过将 *barnase* 基因导入棉花,获得了雄性不育的转基因棉花,这为棉花核不育的应用提供了新的思路^[52]。

5.3 棉花纤维发育

目前对棉花纤维的研究不仅是将影响纤维发育的基因做了遗传图谱和 QTL,利用基因芯片技术对棉纤维发育过程中的转录组进行研究,也克隆到了不少相关基因,并对纤维发育调控做了比较细致的研究。值得一提的是已有研究人员尝试将外源基因转入棉花以提高棉纤维的产量或品质。例如张震林将兔角蛋白基因转入棉花,所获得的转基因棉花纤维品质有所提高,尤其是比强度有较大幅度提高^[53]。但对棉纤维整个发育过程还不甚了解,如参与棉纤维发育的各个基因究竟是如何相互作用的;激素是如何通过细胞内信号转导途径来调控各个基因的表达从而使纤维细胞得以分化、伸长并最终形成纤维的;究竟哪些基因是直接影响纤维产量和品质的,探索这些问题不仅能提高人们对植物细胞伸长过程的认识,也有助于棉花的增产和品质改良。

5.4 棉花生殖器官特异型启动子

病虫害对棉花的危害主要作用在棉花生殖发育时期的生殖器官,造成棉花落蕾、落铃乃至减产。利用生殖器官中特异表达的启动子特别是在棉铃壳中特异表达的启动子与抗虫、抗病基因构建成融合基因导入棉花,将进一步提高棉铃的抗虫、抗病能力。但目前国内外所研究的大部分棉花生殖器官特异型启动子大多在纤维发育时期的纤维细胞中表达。

参考文献:

- [1] HANSON M R. Plant mitochondrial mutations and male sterility[J]. Annual Rev Genet, 1991, 25: 461-486.
- [2] 刘少林,靖深荣,郭立平. 棉花线粒体基因组和叶绿体基因组与细胞质雄性不育关系的 RAPD 研究

- [M]// 李竞雄,周洪生. 作物雄性不育及杂种优势研究进展. 北京:中国农业出版社,1996.
- [3] 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.
- [4] FENG Chun-da, Guo Jie-hua, Nie Yi-chun, et al. Cytoplasmic nuclear male sterility in cotton; comparative RFLP analysis of mitochondrial DNA[C]// Proceedings of the 2000 Beltwide Cotton Conference. San Antonio, TX: National Cotton Council of America, 2000: 511-512.
- [5] 黄晋玲. 棉花晋 A 细胞质雄性不育系的遗传研究[D]. 太原:山西农业大学,2003.
- [6] SCHNABLE P S, Wise R P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration[J]. Trends in Plant Science, 1998, 3(5): 175-180.
- [7] 王学德. 细胞质雄性不育棉花线粒体蛋白质和 DNA 的分析[J]. 作物学报,2000,26(1):35-39.
- [8] WEAVER D B, Weaver J B. Inheritance of pollen fertility restoration in Cytoplasmic male-sterile upland cotton[J]. Crop Science, 1977, 17: 197-199.
- [9] ZHANG Jin-fa, Stewart J M. CMS-D₈ restoration in cotton is conditioned by one dominant gene[J]. Crop Science,2001, 41: 283-288.
- [10] 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[J]. 遗传学报,1997(3):271-277.
- [11] ZHANG Jin-fa, Stewart J M. Inheritance and genetic relationships of the D₈ and D₂₋₂ restorer genes for cotton cytoplasmic male sterility[J]. Crop Science, 2001, 41: 289-294.
- [12] FENG Chun-da, Stewart J M, Zhang Jin-fa. STS markers linked to the Rf₁ fertility restorer gene of cotton[J]. Theor Appl Genet, 2005, 110(2): 237-243.
- [13] ZHANG Jin-fa, Stewart J M, Wang Tong-hui. Linkage analysis between gametophytic restorer Rf₂ gene and genetic markers in cotton[J]. Crop Science, 2005, 45(1): 147-156.
- [14] LIU Li-wang, Guo Wang-zhen, Zhu Xie-fei, et al. Inheritance and fine mapping of fertility restoration for cytoplasmic male sterility in *Gossypium hirsutum* L. [J]. Theor Appl Genet, 2003, 106(3): 461-469.
- [15] BARAL J B, Lu Ying-zhi, Zhang Jin-fa, et al. High resolution mapping of fertility restorer genes for cytoplasmic male sterility in cotton[C]// Proceedings of the 2004 Beltwide Cotton Conference. San Antonio, TX: National Cotton Council of America, 2004:1057-1060.
- [16] YIN Jian-mei, Guo Wang-zhen, Yang Lu-ming, et al. Physical mapping of the Rf₁ fertility-restoring gene to a 100 kb region in cotton[J]. Theor Appl Genet, 2006, 112(7): 1318-1325.
- [17] ZHANG Jin-fa, Stewart J M. Identification of molecular markers linked to the fertility restorer genes for CMS-D₈ in cotton[J]. Crop Science, 2004, 44(4): 1209-1217.
- [18] WANG Fei, Stewart J M, Zhang Jin-fa, Molecular markers linked to the Rf₂ fertility restorer gene in cotton[J]. Genome, 2007, 50(9): 818-824.
- [19] 张天真,潘家驹,冯福祯. 一个有芽黄标记的棉花核雄性不育系的遗传鉴定[J]. 中国农业科学,1989,22(4):17-20.
- [20] 张天真,冯义军,潘家驹. 我国发现的四个棉花核不育系的遗传分析[J]. 棉花学报,1992,4(1):1-8.
- [21] 冯福祯. 棉花雄性不育种质简介[J]. 中国棉花, 1988,15(3):15-16.
- [22] 潘家驹,阎留芳,刘 康. 陆地棉芽黄基因应用于杂种棉的研究[J]. 南京农业大学学报,1998,21(3):7-14.
- [23] 侯 磊,肖月华,李先碧,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.
- [24] COSGROVE D J. Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement[J]. Plant Cell, 1997, (9): 1031-1041
- [25] SSRUAN Y L, Llewellyn D J, Furbank R T. The control of single-celled cotton fiber elongation by developmentally reversible gating of plasmodesmata and coordinated expression of sucrose and Kt transporters and expansin[J]. Plant Cell, 2001, (13): 47-63.
- [26] BASRA A S, Malik C P. Development of the cotton fiber[J]. Int Rev Cytol, 1984, 89: 65-113.
- [27] PARK Y H, Alabady M S, Ulloa M, et al. Genetic mapping of new cotton fiber loci using EST-derived microsatellites in an interspecific recombinant inbred line cotton population[J]. Mol Genet Genomics, 2005, 274(4): 428-441.
- [28] FRELICHOWSKI J E, Jr, Palmer M B, Main D, et al. Cotton genome mapping with new microsatellites from Acala 'Maxxa' BAC-ends[J]. Mol Genet Genomics, 2006, 275(5): 479-491.
- [29] UDALL J A, Fligel L E, Cheung F, et al. Spotted cotton oligonucleotide microarrays for gene expression analysis[J]. BMC Genomics, 2007, 8: 81-88.
- [30] WANG Jian-lin, Lee Jinsuk-J, Tian Lu, et al. Methods for genome-wide analysis of gene expression changes in polyploids[J]. Methods in Enzy-

- mology, 2005, 395: 570-596.
- [31] TU Li-li, Zhang Xian-long, Liang Shao-guang, et al. Genes expression analyses of sea-island cotton (*Gossypium barbadense* L.) during fiber development[J]. Plant Cell Rep, 2007, 26(8): 1309-1320.
- [32] HOVAV R, Udall J A, Hovav E, et al. A majority of cotton genes are expressed in single-celled fiber [J]. Planta, 2008, 227(1): 319-329.
- [33] HUMPHRIES J A, Walker A R, Timmis J N, et al. Two WD-repeat genes from cotton are functional homologues of the *Arabidopsis thaliana* TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (*TTG1*) gene [J]. Plant Mol Biol, 2005, 57(1): 67-81.
- [34] LI Xue-bao, Fan Xiao-ping, Wang Xiu-lan, et al. The cotton *ACTIN1* gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation [J]. Plant Cell, 2005, 17(3): 859-875.
- [35] WANG Hai-yun, Yu Yi, Chen Zhi-ling, et al. Functional characterization of *Gossypium hirsutum* profilin 1 gene (*GhPFN1*) in tobacco suspension cells. Characterization of in vivo functions of a cotton profilin gene [J]. Planta, 2005, 222(4): 594-603.
- [36] 孙杰, 李艳军, 李园莉, 等. 棉花纤维特异表达基因 *GhF1* 的分离及鉴定 [J]. 棉花学报, 2005, 17(5): 259-263.
- [37] 郭 斌, 郭旺珍, 张天真. 一个新的棉纤维表达蛋白 cDNA 的克隆、表达及功能初步分析 [J]. 棉花学报, 2006, 18(2): 67-73.
- [38] SAMUEL Y S, Cheung F, Lee J J, et al. Accumulation of genome-specific transcripts, transcription factors and phytohormonal regulators during early stages of fiber cell development in allotetraploid cotton [J]. Plant J, 2006, 47(5): 761-775.
- [39] SHI Yong-hui, Zhu Sheng-wei, Mao Xi-zeng, et al. Transcriptome profiling, molecular biological, and physiological studies reveal a major role for ethylene in cotton fiber cell elongation [J]. Plant Cell, 2006, 18(3): 651-664.
- [40] SUN Yan, Allen R D. Functional analysis of the *BIN 2* genes of cotton [J]. Mol Genet Genomics, 2005, 274(1): 51-59.
- [41] SUN Yan, Veerabomma S, Abdel-Mageed H A, et al. Brassinosteroid regulates fiber development on cultured cotton ovules [J]. Plant Cell Physiol, 2005, 46(8): 1384-1391.
- [42] LI Yuan-li, Sun Jie, Xia Gui-xian. Cloning and characterization of a gene for an LRR receptor-like protein kinase associated with cotton fiber development [J]. Mol Genet Genomics, 2005, 273(3): 217-224.
- [43] 任茂智. 棉花 nodulin-like 和 *arf1* 基因及其启动子的分离和功能分析 [D]. 北京: 中国农业科学院生物技术研究所, 2004.
- [44] 任茂智, 陈全家, 李 丽, 等. 一个棉花生殖器官优势表达基因的启动子功能分析 [J]. 中国科学: C 辑, 2005(1): 22-28.
- [45] SAXENA I, Brown J R. Are the reversibly glycosylated polypeptides implicated in plant cell wall biosynthesis of nonprocessive b-glycosyltransferases? [J]. Trends Plant Sci, 1999 (4): 6-7.
- [46] ZHAO Guang-rong, Liu Jin-yuan. Solation of a cotton *RGP* gene: a homolog of reversibly glycosylated polypeptide highly expressed during fiber development [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1574: 370-374.
- [47] ZHAO Guang-rong, Liu Jin-yuan, Du Xiong-ming. Molecular cloning and characterization of cotton cDNAs expressed in developing fiber cells [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65(12): 2789-2793.
- [48] JI Sheng-jian, Lu Ying-chun, Feng Jian-xun, et al. Isolation and analyses of genes preferentially expressed during early cotton fiber development by subtractive PCR and cDNA array [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(10): 2534-2543.
- [49] WU Ai-min, Ling Chen, Liu Jin-yuan. Isolation of a cotton reversibly glycosylated polypeptide (*GhRGP1*) promoter and its expression activity in transgenic tobacco [J]. J Plant Physiol, 2006, 163(4): 426-435.
- [50] WU Ai-min, Liu Jin-yuan. Isolation of the promoter of a cotton beta-galactosidase gene (*GhGal1*) and its expression in transgenic tobacco plants [J]. Sci in China: C Life Sci, 2006, 49(2): 105-114.
- [51] DELANEY, S K, Orford S J, Martin-Harris M. et al. The fiber specificity of the cotton *FS1tp4* gene promoter is regulated by an AT-Rich promoter region and the AT-Hook transcription factor *GhAT1* [J]. Plant Cell Physiol, 2007, 48(10): 1426-1437.
- [52] 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.
- [53] 张震林, 刘正奎, 周宝良, 等. 转兔角蛋白基因改良棉纤维品质研究 [J]. 棉花学报, 2004, 16(2): 72-76.