

Cytogenetic Study on Trispecific Hybrid from *Gossypium hirsutum* L., *G. australe* and *G. capitis-viridis**

Lingjiao Li¹, Di Chen², Yuxiang Wu^{1#}

¹College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu

²Cotton Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Science, Anyang

Email: #wuyuxiang89@sina.com

Received: Sep. 11th, 2013; revised: Sep. 18th, 2013; accepted: Sep. 25th, 2013

Copyright © 2013 Lingjiao Li et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: There are rich germplasm resources in *Gossypium* and wild cotton species possess many valuable agronomic traits which cultivated cotton always lacks. In order to introgress the useful traits from wild species *G. australe* and *G. capitis-viridis* into cultivated species for improving upland cotton, tetraploid *G. hirsutum* was crossed directly with C-genome species *G. australe* as the pollen-providing parent, creating a triploid hybrid. Chromosome doubling of this triploid hybrid leads to an allohexaploid which was then crossed with B-genome wild species *G. capitis-viridis*, resulting in trispecific hybrid (*G. hirsutum*, *G. australe* and *G. capitis-viridis*). The characteristic of chromosome behavior during meiosis of trispecific hybrid F₁ was further investigated in this study. Results indicated that the meiosis of trispecific hybrid was abnormal, which mainly reflected that the chromosomes were divided unequally during the anaphase II; and many abnormal multispores appeared in the telophase II, which finally developed into abortive pollen grains, directly leading to the sterility of trispecific hybrid F₁. This study provides the main reason of sterility for this hybrid and supplies the theory basis and the effective method for restoring the fertility and further creating new cotton intermediate germplasms.

Keywords: *G. hirsutum*; *G. australe*; *G. capitis-viridis*; Trispecific Hybrid; Meiosis

陆地棉、澳洲棉和绿顶棉三元杂种的细胞遗传学研究*

李灵娇¹, 陈 弟², 吴玉香^{1#}

¹山西农业大学农学院, 太谷

²中国农业科学院棉花研究所, 安阳

Email: #wuyuxiang89@sina.com

收稿日期: 2013年9月11日; 修回日期: 2013年9月18日; 录用日期: 2013年9月25日

摘 要: 棉属有丰富的种质资源, 野生棉具有栽培种所缺乏的许多优良性状, 为了将野生澳洲棉和绿顶棉的优良性状导入陆地棉, 以期改良栽培种陆地棉。本研究通过陆地棉和 C 组野生澳洲棉远缘杂交获得杂种 F₁, 并对其染色体加倍, 将加倍成的异源六倍体与 B 组野生绿顶棉杂交, 产生陆地棉、澳洲棉、绿顶棉的三元杂种, 并对该三元杂种花粉母细胞减数分裂行为进行观察。结果表明: 三元杂种减数分裂异常, 主要表现在: 后期染色体不均等分离, 使得末期形成大量的不正常多分孢子, 其中以五分体居多, 这些多分孢子进一步发育为大量败育花粉粒, 导致该杂种高度不育。本研究不仅为该三元杂种不育提供了直接原因, 也为进一步探讨有效的育性恢复方法及棉花新种质的创制提供了理论依据和中间材料。

*资助信息: 国家自然科学基金(No.31171599)(No.31301364), 山西省科技攻关项目(20130311004-1)资助。

#通讯作者。

关键词: 陆地棉; 澳洲棉; 绿顶棉; 三元杂种; 减数分裂

1. 引言

棉花属双子叶植物(Dicotyledons)、锦葵科(Malvaceae)、棉属(*Gossypium*)。棉属有 4 个亚属, 8 个组, 9 个亚组, 51 个种, 其中 46 个为二倍体棉种($2n = 2x = 26$), 5 个为四倍体棉种($2n = 4x = 52$)^[1]。棉属有四个栽培品种即亚洲棉、草棉、陆地棉、海岛棉, 其余 47 个均为野生棉种^[2]。由于栽培棉种对病虫害及非生物胁迫较为敏感^[3], 而野生棉种中有许多优异的农艺性状和丰富的基因资源, 野生棉广泛分布在非洲、大洋洲、亚洲和南美洲等地, 由于分布区域的环境气象条件以及长期的自然选择, 赋予了野生棉种多种多样的特异性状, 如抗干旱、盐碱、抗病虫害, 抗寒, 种子无棉酚而植株具棉酚, 以及纤维品质优异等潜在特性。所以将野生棉种的优良性状导入栽培棉, 在育种工作中是非常重要的。通过远缘杂交, 将不同物种所特有的有益性状进行遗传重组, 创造出品种间杂交无法得到的种质材料, 是棉花遗传改良的重要途径^[4]。

陆地棉为四个栽培棉种之一, 是世界 90% 以上的栽培棉种, 也是最重要的纤维作物。澳洲棉和绿顶棉均为野生棉种, 具有陆地棉所缺乏的许多优良性状。如澳洲棉的抗棉蚜、红蜘蛛, 抗黄、枯萎病, 抗干旱, 抗短期低温, 能提高衣分和强力, 种子无腺体-植株有腺体等特性^[5]; 绿顶棉也具备优异的纤维品质及抗病、抗虫性等^[6]。导致栽培棉与野生棉性状的差异归因于遗传物质及调控机制的不同, 比如, 栽培种中棉酚腺体的形成主要受两个分别位于同源染色体 c12 (Ah-genome) 和 c26 (Dh-genome) 上^[7]的基因 G_1 和 G_3 的控制, 种子棉酚含量受基因 G_1 的控制^[8]; 由于该特性只存在于一些 C 组和 G 组的野生棉中, 这些澳洲野生棉在进化系统中又远离陆地棉^[9], 所以只有通过种质渗入将澳洲棉的遗传物质导入陆地棉才能使陆地棉得到改良。如早在 60 年代 Muramoto^[10]将澳洲棉和陆地棉杂交, F_1 加倍, 再对六倍体进行选择, 第四代具备比陆地棉和海岛棉更大的耐寒性, 抗根腐病菌, 且改进了纤维品质, 六倍体的纤维能纺成高强力棉纱。梁理民^[11]等人通过陆地棉和斯特提棉种间杂交育成新品种秦远号, 同时选育出抗病优质、抗病高强、抗病大铃、抗病高衣分、抗枯黄萎病新种质。迄今为止,

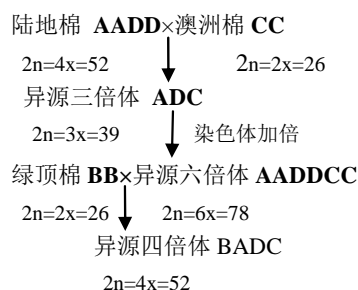
我国已获得陆地棉与 19 个野生棉种及其他栽培种的高代种间杂种(4 代以上)^[12]。

因此, 本研究通过远缘杂交试图将野生澳洲棉和绿顶棉的优良性状导入陆地棉, 用来改良栽培种陆地棉, 并通过杂种减数分裂行为来探讨其育性, 以期寻求育性恢复的有效方法, 为棉花遗传育种及新种质创新提供理论依据和中间材料。

2. 材料和方法

2.1. 实验材料

本实验所用材料有: 陆地棉(*G. hirsutum*) ($2n = 4x = 52$)、C 组野生澳洲棉(*G. australe*) ($2n = 2x = 26$)、B 组野生绿顶棉(*G. capitis-viridis*) ($2n = 2x = 26$)。野生棉材料来源于国家种质三亚野生棉圃, 三元杂种合成过程如下:



2.2. 三元杂种的花粉母细胞取材及制片

花粉母细胞减数分裂观察用的花蕾于上午 9 时前取材, 长度为 4~6 mm, 剥去花苞叶、花萼和花冠, 立即用卡诺氏固定液(95%乙醇:冰乙酸:氯仿 = 5:3:2)固定 12 h 后用 95%乙醇处理 20 min, 再转移到 70%乙醇中, 长期保存备用。用改良卡宝品红染色压片, 用临时和永久片观察计数并照相^[13]。

首先, 将花蕾从广口瓶中取出, 放于干净的滤纸上, 用镊子和解剖针轻轻将花蕾撕开; 取其中 4~6 粒花药, 放到清洗干净的载玻片上, 用镊子将其敲碎; 滴一滴卡宝品红染液后, 用镊子进一步将其敲碎, 使得花药中的花粉母细胞游离出来; 先于显微镜下看一下, 初步判定是否有花粉母细胞或花粉粒; 然后将染液中肉眼可见的杂质去掉, 盖上盖玻片, 使用两张小

滤纸，一张压住盖玻片的一个角，另一张轻压玻片并将多余染液吸去，再用带铅笔橡皮头垂直敲打玻片，制成临时或永久玻片。

2.3. 三元杂种的减数分裂行为观察

挑选各个时期分散好的片子用 OLYMPUS DP71 显微镜观察并拍照，记录实验结果：1) 花粉粒的观察与统计：选 200 个以上视野进行观察，记录杂种花粉粒中正常与各种异常花粉粒的数目，分别计算其比率；2) 小孢子发育期及分裂后期的观察：分别选取 100 个以上视野，观察减数分裂后期染色体分离状况，记录不同孢子的形态及数目，计算比率。

3. 结果与分析

3.1. 三元杂种与亲本减数分裂花粉粒的观察

三元杂种植株在自然授粉情况下不结铃，大量杂交、自交不结种子，说明三元杂种的雌雄配子均不育，导致这种不育的原因之一是性细胞减数分裂异常。所以探究其花粉母细胞的减数分裂行为将为其育性恢复提供理论依据。

正常花粉粒大小均匀，形状规则均为饱满的球形，如亲本澳洲棉花粉粒(图 1a)；三元杂种花粉粒发育不整齐，大小不一，形状各异(图 1b)。既存在发育饱满的大花粉粒，也存在极小的败育花粉粒(图 1c；

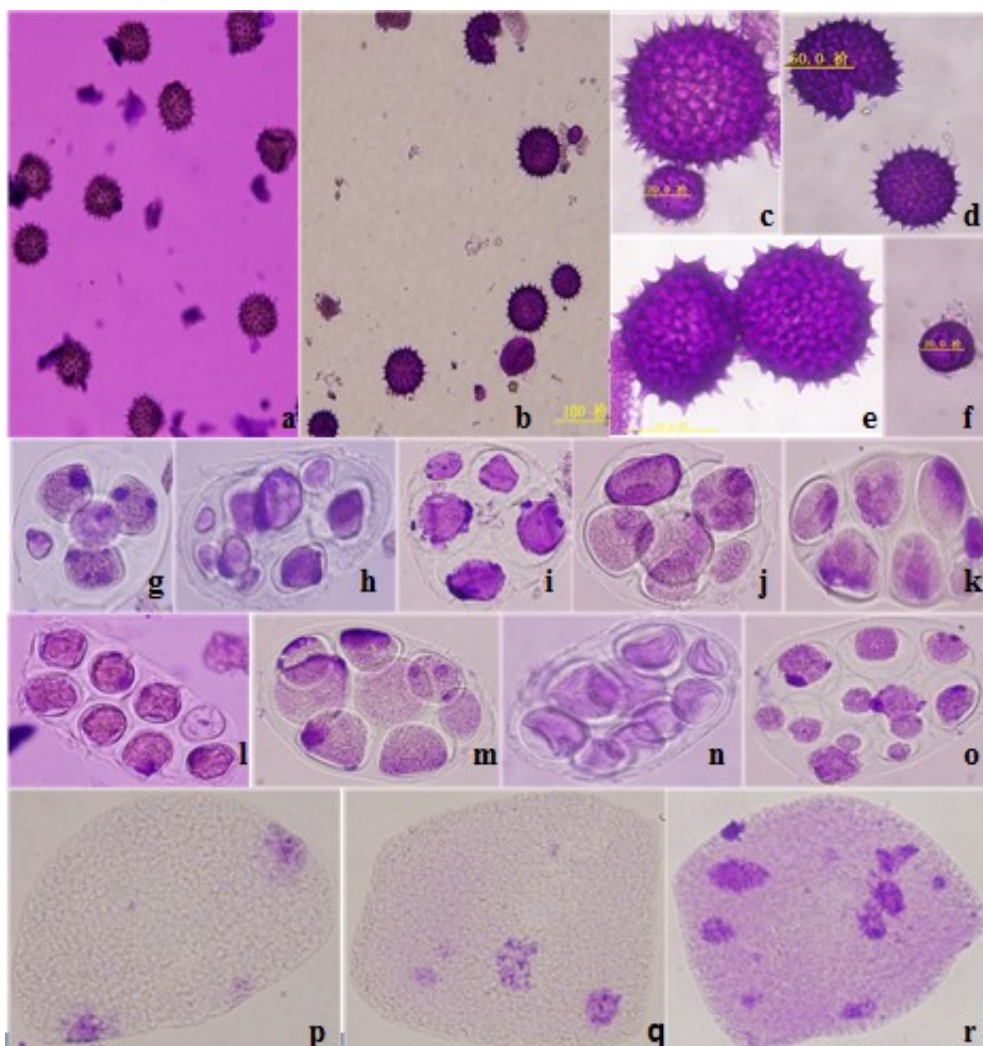


Figure 1. a-f: Pollen grains, the Pollen of *G. australe* in the figure (a), the Pollen of trispecific hybrid in the figure (b-f); g-o: Multispores, a tetrad with one microspore and with five microspores in the figure (g) and (h) respectively; other multispores with five, six, seven, eight, eight, nine, twelve microspores successively in the figure (i-o); p-r: Anaphase II, showing chromosomes unequally separated
 图 1. a~f:花粉粒，a 为亲本澳洲棉花粉粒、b-f 为杂种花粉粒；g~o: 多分体，g 为含一个微核的四分体、h 为含五个微核的四分体、i~o 依次为 5、6、7、8、8、9、12 分体；p~r: 减数第二次分裂后期，染色体不均等分离

既有完整的饱满球形花粉粒，又有不完整的破裂花粉粒(图 1d)、干瘪的椭圆状花粉粒(图 1e)及无刺突花粉粒(图 1f)。对 230 个视野中的 1214 个花粉粒的统计结果如图 2，可见三元杂种正常的花粉粒只占 38%，具有生活力的花粉粒更少，大部分为异常花粉粒。这是三元杂种不育的直接原因。

3.2. 小孢子发育期及分裂后期的观察

三元杂种的花粉母细胞，在减数第二次分裂后期，染色体向多极不均等分离，从而形成多分孢子，并观察到不同数目的微核；在统计的 130 个视野的 489 个多分孢子中，其中有 234 个之中出现微核，每个母细胞中微核数目在 1~5 不等，微核出现几率达 47.85%。

不同多分孢子的统计结果如表 1 所示，三元杂种中大部分为各种多分孢子，四分孢子仅占 30.88%；多数四分孢子含微核，出现 5~9 及 12 分孢子(图 1g~o)，其中以五分体居多，且平均孢子数为 5.11。

4. 讨论

4.1. 克服远缘杂交不亲和的方法

杂交不亲和(Incompatibility)是远缘杂交育种的首要难题。主要分为受精前障碍和受精后障碍两类^[14]。克服受精前障碍的方法有：1) 改良授粉方式，如混合授粉(Mixed pollination)、授蒙导花粉(Mentor pollen)、蕾期授粉(Bud pollination)和重复授粉(Repeated pollination)^[15]，Sundaram^[16]等探究了三叶棉、戴维逊氏棉、瑟伯氏棉、辣根棉四种野生棉在海岛棉雌蕊上的花粉管行为，认为蕾期授粉、试管内授粉可有效促进授粉成功。2) 应用激素类物质如赤霉素、萘乙酸或秋水仙素等涂抹或喷洒柱头^[15]，通过吸引花柱中促进花粉管生长的物质促进花粉管生长，抑制花的脱落，提高受精率^[17]。山西省农科院^[18]在培育特早熟抗蚜棉花新

品种晋棉 51 号过程中，对获得的陆地棉 × 异常棉的远缘杂种后代采用杂交铃喷(滴)GA₃ 和 NAA、离体培养杂交当代幼胚技术，成功克服了杂交当代不亲和性。3) 体细胞杂交技术使得不兼容物种间的基因融合以及细胞核或细胞质性状的转移成为可能^[19]，孙玉强等^[20]通过体细胞杂交技术成功地将野生三裂棉和陆地棉原生质体融合，将三裂棉优良性状转入陆地棉，杂种植株具有比双亲更强的光合能力及营养器官。4) 在授粉前对花粉、花柱进行一定的物理处理，如适当加热、电磁辐射、紫外线和 γ 射线照射等，可以提高受精率，对克服受精前障碍有积极帮助^[15]。受精后障碍的克服常采用幼胚拯救技术，包括子房培养、胚珠培养和幼胚培养，这在菊科杂交种获得成功^[21]。此外，染色体数目不同的双亲杂交，染色体数目多的一方做母本成功率较大；用多倍体做遗传桥梁，进行遗传渐渗和基因转移的研究也取得了较大的进展。多倍体起到基因转移的载体作用和基因渐渗的媒介作用，可以把野生种中简单遗传的抗病基因转移到栽培种中^[22]，Robinson 等^[23]通过六倍体做桥梁获得陆地棉、长萼棉和辣根棉三元杂种，该杂种能抗线虫，大大解弱了美国棉花受线虫的危害。本研究以染色体多的陆地棉做母本，和二倍体澳洲棉杂交制成杂种三倍体，再对

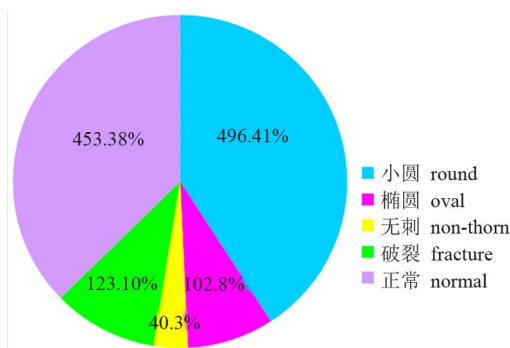


Figure 2. Types of pollens of tri-species
图 2. 三元杂种花粉类型统计

Table 1. Number of multispores in telophase II of hybrid in pollen mother cells
表 1. 杂种花粉母细胞减数分裂后期多分孢子情况

类型 shape	4	5	6	7	8	9	12	总计
数量 No.	151	169	149	8	9	2	1	489
百分数%	30.88	34.56	30.47	1.64	1.84	0.41	0.20	100
小孢子总数目 Total microspore	604	845	894	56	72	18	12	2501
平均小孢子数(小孢子/母细胞) Mean microspore(microspore/mother cell)								5.11

其进行染色体加倍, 获得了可育的异源六倍体杂种, 但该六倍体杂种与绿顶棉杂交后获得三元杂种, 不育的原因是存在大量败育花粉, 所以有待进一步寻找恢复育性的有效方法。

4.2. 三元杂种 F_1 不育原因

杂种不育在种间杂种中普遍存在, 它部分或完全阻断了不同种间遗传信息的交换。原因在于异种间遗传性的不协调, 在棉属中常见的有细胞核不育和细胞质不育。前者指的是双亲染色体结构上的差异, 染色体组型之间的不相适应, 即不具有或缺少同源性, 减数分裂时不能正常配对或配对后不能正常分裂, 产生畸形花粉粒和畸形雌雄配子, 导致杂种不育。细胞质不育性则是由于异种间的细胞质和细胞核不协调而产生^[24]。本研究中三元杂种高度不育的直接原因在于, 三元杂种减数分裂紊乱, 染色体分离不均等, 向多极移动, 最终形成的配子得不到全套染色体, 花粉粒无活力。Brown^[25]和 Beasley^[26]也曾报道过六倍体杂种花粉败育的现象, 这可能是由于减数分裂中两级纺锤丝大量出现造成的^[27]。

4.3. 杂种 F_1 育性恢复方法

三元杂种 F_1 不育性主要体现在花粉没有生活力与雌雄配子败育两个方面。有望通过以下途径加以克服: 强制自交和大量回交; 控制营养和环境条件; 药剂处理; 染色体加倍等。Benbouza 等^[28]通过远缘杂交获得雷蒙地棉、斯特提棉、陆地棉三元杂种, 通过人工授粉使三元杂种与亲本陆地棉大量回交以及自交, 成功获得了具有种子无腺体 - 植株有腺体性状的可育的稳定遗传后代。李炳林^[29]等先将亚洲棉和比克氏棉杂种染色体加倍, 恢复其育性, 再和陆地棉杂交, 但得到的三元杂种 F_1 不育, 通过大量回交及组织培养后, 培育出可育的杂种后代, 又通过株系间修饰杂交最终得到稳定的种质系。高燕会等^[30]利用强制自交使四元杂种的育性部分恢复; 王志龙等^[31]报道了采用滴加植物激素 - 离体培养 - 染色体加倍技术, 有效地克服了棉属一些棉种间的杂交不亲和性及 F_1 不育性, 取得了良好的效果。许多学者也认为经过几年良好的栽培管理对杂种育性恢复有一定的促进作用^[32], 环境温度也会显著影响种间或亚种间杂种的花粉可育性^[33]。吴玉香等^[34]采用活体保存对栽培棉种间四元杂种育

性和染色体构型的影响研究证明, 延长种间杂种植株的生长时间有利于协调不同来源的染色体组之间的关系, 使染色体组趋于平衡, 育性得到大幅度恢复。采用三元杂种与栽培棉亲本回交也可获得很好的效果^[35]。该三元杂种有望通过以上方法恢复其育性, 选育出可育的杂种遗传后代。

参考文献 (References)

- [1] P. A. Fryxell. A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (*Malvaceae*). *Phedea*, 1992, 2(2): 108-165.
- [2] 王坤波, 杜雄明, 宋国立. 棉花种质创新的现状与未来[J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5: 23-28.
- [3] Y. Q. Sun, S. M. Liu, Y. Wang, et al. An interspecific somatic hybrid between upland (*G. hirsutum* L.cv.ZDM-3) and wild diploid cotton (*G. klotzschianum* A.). *Plant Cell and Organ Culture*, 2011, 106(2): 425-433.
- [4] 梁正兰. 棉花远缘杂交的遗传与育种[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 1-2.
- [5] 梁正兰, 孙传渭. 棉花远缘杂交[M]. 北京: 科学出版社, 1982: 32.
- [6] S. S. Mehete, M. Gomes and E. Susan. RAPD and Cytomorphological Analyses of F_1 , F_2 and Amphidiploid (A_1) Generations of *Gossypium arboreum* × *Gossypium capitis-viridis*. *Cytologia*, 2004, 69(4): 367-379.
- [7] P. J. Samora, D. M. Stelly and R. J. Kohel. Localisation and mapping of the *Le1* and *gl2* loci of cotton (*Gossypium hirsutum*). *Journal of Heredity*, 1994, 85: 152-157.
- [8] S. C. McMichael. Combined effects of *glandless* genes *Gl₂* and *Gl₃* on pigment glands in the cotton plant. *Agronomy Journal*, 1960, 52: 385-386.
- [9] J. C. McCarty, P. A. Hedin and R. D. Stipanovic. Cotton *Gossypium* spp. plant gossypol contents of selected *Gl₂* and *Gl₃* alleles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44: 613-616.
- [10] H. Muramoto. Hexaploid cotton: Some plant and fiber properties. *Crop Science*, 1969, 9(1): 27.
- [11] 梁理民, 刘有良, 王增信等. 陆地棉 × 斯特提棉种间杂交创造抗枯萎病新种质[J]. 西北农业学报, 2002, 11(4): 16-18.
- [12] 庞朝友, 杜雄明, 马峙英. 具有野生棉外源基因的陆地棉特异种质创造与利用进展[J]. 棉花学报, 2005, 17(3): 171-177.
- [13] 李懋学, 张赞平. 作物染色体及其研究技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 63-66.
- [14] 邓衍明, 叶晓青, 余建明等. 植物远缘杂交育种研究进展[J]. 华北农学报, 2011, 26: 52-55.
- [15] 汤访评. 菊属与四个近缘属植物远缘杂交研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [16] S. G. Ram, V. Thiruvengadam, S. H. Ramakrishnan, et al. Investigation on pre-zygotic barriers in the interspecific crosses involving *Gossypium barbadense* and four diploid wild species. *Euphytica*, 2007, 159: 241-248.
- [17] 孟金陵. 植物生殖遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [18] 郭宝德, 黄穗兰, 冀丽霞. 抗蚜棉花新品种晋棉 51 号的选育及高产栽培技术[J]. 山西农业科学, 2011, 39(9): 933-935.
- [19] Atanassov II, S. A. Atanassova, A. I. Dragoeva, et al. A new CMS source in *Nicotiana* developed via somatic cybridization between *N. tabacum* and *N. Alata*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97: 982-985.
- [20] X. S. Yu, B. J. Chu, R. E. Liu, et al. Characteristics of fertile somatic hybrids of *G. hirsutum* L. and *G. trilobum* generated via protoplast fusion. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, 125(7): 1503-1516.

- [21] X. Cheng, S. M. Chen, F. D. Chen, et al. Interspecific hybrids between *Dendranthema morifolium* (Ramat.) Kitamura and *D. nankingense* (Nakai) Tzvel. Achieved using ovary rescue and their cold tolerance characteristics. *Euphytica*, 2010, 172: 101-108.
- [22] 孙敏红, 张蜀宁. 多倍体育种在园艺作物中的应用[J]. 江苏农业科学, 2004, 1: 68-72.
- [23] A. F. Robinson. Reniform in U.S. cotton: When, where, why, and some remedies. *Annual Review of Phytopathology*, 2007, 45: 111-125.
- [24] 中国农业科学院棉花研究所. 中国棉花遗传育种学[M]. 山东: 山东科学技术出版社, 2003: 270.
- [25] M. S. Brown, M. Y. Menzel. Polygenomic hybrids in *Gossypium* L. Cytology of hexaploids, pentaploids and hexaploid combinations. *Genetics*, 1952, 37: 242-263.
- [26] J. O. Beasley. Meiotic chromosome behavior in species, species hybrids, haploids and induced polyploids in *Gossypium*. *Genetics*, 1942, 27: 25-54.
- [27] M. Vafaie-Tabar, S. Chandrashekrana. Meiosis in a triploid hybrid of *Gossypium*: High frequency of secondary bipolar spindles at metaphase II. *Journal of Genetics*, 2007, 86: 45-49.
- [28] H. Benbouza, J. M. Lacape, J. M. Jacquemin, et al. Introgression of the *low-gossypol seed & high-gossypol plant* trait in upland cotton: Analysis of [*(Gossypium hirsutum* × *G. raimondii*)² × *G. sturtianum*] trispecific hybrid and selected derivatives using mapped SSRs. *Molecular Breeding*, 2010, 25(2): 273-286.
- [29] 张伯静, 李炳林, 祝水金等. 亚洲棉、比克氏棉和陆地棉异源四倍体的合成[J]. 棉花学报, 1993, 5(1): 15-20.
- [30] 高燕会, 祝水金, 季道藩. 四种栽培棉合成的四元杂种 F₁ 细胞遗传学研究[J]. 棉花学报, 2003, 15(5): 259-263.
- [31] 王志龙, 姜茹琴, 何鉴星等. 棉属海岛棉×拟似棉 F₁ 不育性研究[J]. 遗传学报, 1997, 24(4): 368-372.
- [32] 于卓. 几种小麦族禾草及其杂交后代农艺特性的研究[J]. 草业学报, 2003, 3(12): 83-89.
- [33] 杨杰. 温度对亚种间杂种花粉育性的影响[J]. 中国水稻科学, 2003, 17(2): 145-148.
- [34] 吴玉香, 陈崇乾, 高燕会等. 活体保存对栽培棉种间四元杂种育性和染色体构型的影响[J]. 棉花学报, 2007, 19(6): 461-466.
- [35] G. S. Newaskar, V. P. Chimote, S. Subhash, et al. Interspecific hybridization in *Gossypium* L.: Characterization of progenies with different ploidy-confirmed multigenomic backgrounds. *Plant Breeding*, 2013, 132: 211-216.