

转蚕丝心蛋白基因改良了棉花纤维品质

李飞飞*, 吴慎杰*, 吕芬妮, 陈天子, 琚铭, 王海波, 蒋彦婕, 张洁, 郭旺珍, 张天真†

南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095

* 同等贡献

† 联系人, E-mail: cotton@njau.edu.cn

2008-11-21 收稿, 2009-01-18 接受

国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA100105)、江苏省科技支撑计划(批准号: BE2008310)及高等学校学科创新引智计划(批准号: B08025)资助项目

Li F F, Wu S J, Lv F N, et al. Modified fiber qualities of the transgenic cotton expressing a silkworm *fibroin* gene. Chinese Science Bulletin, 2009, 54(7): 1210—1216, doi: 10.1007/s11434-009-0142-2

摘要 利用农杆菌介导法将蚕丝心蛋白基因(*fibroin*)导入陆地棉品系 WC, 共获得了 9 块愈伤组织系的 30 株再生植株. PCR 检测、卡那霉素抗性筛选和 GUS 组织化学分析均为阳性的有 17 株. 经连续 4 代的卡那霉素抗性筛选和 PCR 检测, 在 T₃ 代获得了 6 个转化事件的转基因纯系. Southern blot 和 Northern blot 结果表明, *fibroin* 已整合到 6 个纯合株系基因组, 且能稳定遗传和表达. 扫描电子显微镜和纤维品质检测结果显示, 所有转基因纯合株系棉纤维的转曲数和纤维伸长率比对照明显增加, 部分株系比强度提高, 说明蚕丝心蛋白基因在棉纤维中特异表达影响了棉纤维的结构和品质, 可以获得纤维品质改良的株系, 有望在生产上得到应用.

关键词

陆地棉

蚕丝心蛋白基因

农杆菌介导法遗传转化

棉纤维表面结构

纤维品质

棉纤维作为最主要的天然纺织材料, 几千年来一直用于满足人类的穿衣需求, 在全球经济和社会发展中起着重要作用. 但是随着合成纤维工业的发展, 其地位也受到了挑战, 改良棉纤维的品质成为迫切的需要. 随着分子生物学和植物遗传转化技术的不断深入和发展, 基因工程为通过外源基因改良棉花纤维品质提供了一条新的途径. 将有益的外源基因导入棉花并使其稳定表达, 会有效缩短育种周期和引入新的性状. 农杆菌介导法转化效率高, 且 T-DNA 插入相对稳定^[1], 容易获得导入基因稳定表达和表型正常的植株^[2], 一直是产生转基因棉花的主流技术. 近年来, 通过转基因来提高纤维强度和长度、增强纤维保暖性和改变纤维颜色等方面已有许多报道^[3-10].

丝心蛋白是家蚕茧丝的最重要蛋白, 是一种无生理活性的天然角蛋白. 丝心蛋白在结构上属于典型的反平行式 β -折叠片, 丝心蛋白中甘氨酸、丝氨酸和丙氨酸的含量高达 85%. 其主链具有特殊的氨基

酸序列, 即每隔一个氨基酸就有一个甘氨酸, 使得丝心蛋白具有抗张强度高、质地柔软的特性, 但不能拉伸; 还有一些大的侧链氨基酸残基, 如酪氨酸、缬氨酸和脯氨酸等, 由它们构成的区域是无规则的非晶状区, 分子中有序的晶状和无序的非晶状区交替出现. 无序区的存在赋予丝心蛋白以一定的伸张度^[11,12].

本研究将纤维特异表达启动子 GAE6-3A^[13]驱动的蚕丝心蛋白基因导入陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.). 通过对转*fibroin*纯合株系进行的 Southern blot 检测、表达分析、扫描电子显微镜以及纤维品质检测等手段分析导入蚕丝心蛋白基因对棉纤维的作用, 获得纤维品质改良的转基因棉花, 为生产和育种提供新的种质材料.

1 材料和方法

() 材料. 受体为陆地棉品系 WC; 农杆菌工程菌株为 LBA4404. 蚕丝心蛋白基因(*fibroin*)由中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所陈

晓亚课题组克隆, 并构建植物表达载体pHAN. pHAN的T-DNA区包含棉纤维特异表达启动子GAE6-3A^[13]驱动的*fibroin*基因和35S启动子驱动的卡那霉素筛选标记基因*npt*及报告基因*gus*.

() 培养基. 基本培养基(MSB): MS培养基的无机盐 + B5培养基的有机物; 无菌苗培养基: 1/2 MS无机盐 + 6.5 g/L琼脂; 共培养培养基: MSB+0.1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L KT+30 g/L葡萄糖 + 6.5 g/L琼脂; 抗性愈伤组织诱导培养基: MSB + 0.1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L KT + 50 mg/L Km + 500 mg/L Cef + 30 g/L葡萄糖 + 2.0 g/L phytagel + 1.1 g/L MgCl₂; 胚性愈伤组织诱导培养基: MSB + 1.9 mg/L KNO₃ + 30 g/L葡萄糖 + 2.5 g/L phytagel + 1.1 g/L MgCl₂; 分化培养基: MSB-NH₄NO₃ + 0.5 mg/L 天冬酰胺 + 1.0 mg/L 谷氨酰胺 + 30 g/L葡萄糖 + 2.5 g/L phytagel + 1.1 g/L MgCl₂; 所有培养基用KOH调pH 6.5, 灭菌后pH为5.6~5.9.

() 遗传转化. 经28暗培养3 d, 然后取在3000~5000 lx光照下培养3 d的无菌苗的下胚轴作为外植体. 携带pHAN质粒载体的农杆菌菌株28悬浮培养16~24 h后, 以肉眼观察到利福平的红色刚好完全褪去为准, 离心后用液体共培养培养基重悬并稀释至A值为0.8, 侵染下胚轴切段8~10 min, 用灭菌滤纸吸干下胚轴段菌液, 在铺滤纸的共培养培养基上暗培养48 h, 再继代至抗性愈伤组织诱导培养基上, 每30~35 d继代一次; 切段两端愈伤组织长到直径大约0.5~1.0 cm, 将其切下来单独继代, 愈伤组织增殖到直径2 cm左右, 转到胚性愈伤组织诱导培养基上, 直到出现胚性愈伤组织; 挑出胚性愈伤组织继代在分化培养基上, 发育成胚状体到成苗^[14,15], 长出真叶的再生小植株单独转移到胚性愈伤诱导培养基中, 小苗长出3~4片展开叶时于超净台取1~2片提取DNA进行PCR, 阳性植株继续长至5~6 cm用以嫁接^[16].

() PCR检测. CTAB法提取棉花叶片基因组DNA^[17], 对*npt*, *gus*和*fibroin*基因的PCR扩增. *npt*

引物序列为5'-GAGGCTATTCGGCTATGAC-TG-3'(F)和5'-TAGAAGGCGATGCGCTGCGA-3'(R), 扩增片段长720 bp; *gus*引物序列5'-GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG-3'(F)和5'-GTTTACGCGTTGCTT-CCGCA-3'(R), 扩增片段长1200 bp; *fibroin*基因是根据启动子序列和基因序列设计1对引物, 序列为

5'-CACCATTACCACTTGCTC-3'(F)和5'-GTTGTTGCTTTGGCTGTTGC-3'(R), 扩增片段长730 bp. PCR扩增程序均为95 预变性5 min; 94 变性30 s, 56 退火1 min, 72 延伸1 min, 35个循环.

() GUS组织化学分析和卡那霉素抗性检测. 胚性愈伤组织分散平铺, 随机选择10处, 每处点2 μL GUS染液(过滤灭菌), 28 过夜, 观察胚性愈伤组织颜色的变化. 叶片切成小块转到0.5 mL无菌离心管中, 加20 μL GUS染色液于37 过夜, 用70%酒精脱色, 观察叶片颜色. GUS染色液组成: 50 mmol/L磷酸钠缓冲液(pH 7.0), 5 mmol/L K₄Fe(CN)₆, 5 mmol/L K₃Fe(CN)₆, 10 mmol/L EDTA, 0.1% TritonX-100, 1.0 mg/mL X-Gluc, 用0.45 μm滤器过滤除菌^[18].

棉球蘸取1000 mg/L卡那霉素溶液点在T₀植株和其衍生后代植株叶片上^[19], 7 d后观察, 叶色正常为卡那霉素抗性植株, 叶片点涂部位出现黄斑为卡那霉素敏感植株.

() Southern blot和Northern blot检测. 提取6个纯合株系叶片的DNA (40 μg)^[20], 质粒和基因组DNA均使用NEB公司的Hind 酶切. 用DIG标记从*fibroin*基因扩增片段作为探针进行杂交, 扩增片段长521 bp, 引物是5'-GCGACATTGATGGAAAA- 3'(F)和5'-GTTGTTGCTTTGGCTGTTGC-3'(R).按Roche公司的地高辛试剂盒(DIG DNA Labeling and Detection Kit)说明进行具体操作.

7月初, 在6个T₃代纯合株系和对照开花当天挂牌, 连续挂1周, 开花当天记为0 d. 取开花后15 d纤维, 用热硼酸法提取RNA (约30 μg)^[21]. 按Roche公司的地高辛试剂盒(DIG DNA Labeling and Detection Kit)说明进行Northern blot分析操作. 所用的探针和Southern blot一致.

() 扫描电子显微镜分析. 取T₃代纯合株系成熟纤维进行扫描电子显微镜观察. 将纤维烘干, 用双面胶将其粘于样品台上, 样品转入离子溅射仪喷金(E-1010/E-1020 Ion Sputter); 在Model S-3000N (Hitachi, Japan) 扫描电子显微镜下观察并照相. 测量了每个株系的纤维螺距(即是纤维扭曲360°的距离), 重复5次.

() 纤维品质检测分析. 2007年10月在江浦农场按行收获T₃代纯合株系吐絮期中部铃籽棉样品以及对照, 压花后, 皮棉进行纤维品质HVI900 (ICC标准)测试, 每样品重复5次.

2 结果与讨论

2.1 转化

() 胚性愈伤组织的获得. 从诱导胚性愈伤组织开始, 凝固剂从原来的 2.0 g/L 增加为 2.5 g/L, 限制初生愈伤组织的增殖速度, 促进其分化出胚性愈伤组织. 最早的胚性愈伤组织一般出现在初生愈伤组织的底部和培养基表面之间或初生愈伤组织的外缘(图 1(a)~(d)), 应及时挑出, 否则易重新逆转为非胚性愈伤组织或因为营养不足而老化; 数量较少和形态尚不明显的胚性愈伤组织在分化培养基上培养 10~30 d, 即可增殖出大量胚性愈伤组织或直接形成胚状体. 一些初生愈伤组织在胚性愈伤组织诱导培养基上不出现明显的胚性愈伤组织形态而直接观察到有胚状体的形成, 这些胚状体继代到分化培养基上不易再生成正常植株; 但足以证明此块初生愈伤组织是能分化的愈伤组织, 继续继代会分化出胚性愈伤组织.

另外, WC品系愈伤组织的分化形态主要是从绿色非栓质化或绿白相间半栓质化硬块的初生愈伤组织上分化出胚性愈伤组织(图 1(a)~(d)), 这不同于已有报道的其他陆地棉品种(系)^[3,22-25]. 可分为 4 种形态: 发红的粗颗粒(图 1(a)); 黄绿色的细颗粒(图 1(b)); 灰白色的粗颗粒(图 1(c)); 灰绿色的细颗粒(图 1(d)). 其中(b)和(d)胚性愈伤组织可以快速增殖, 形成球形胚、子叶胚等胚状体; (a)和(c)要经过长时间继代才可成为小植株或只停留在胚性愈伤组织状态.

当胚性愈伤组织增殖足够多时(图 1(e)), 将进行改良的 GUS 化学组织分析, 如图 1(f)所示, 变蓝处有

gus 基因的表达. 淘汰变蓝的地方少于 3 或 3 处以下的胚性愈伤组织, 即淘汰部分嵌合有较多非转化组织的愈伤组织系, 减少继代工作量, 提高转化效率.

() 胚状体的发育和正常植株再生. 胚性愈伤组织在分化培养基继代 1 次(20 d/次)后, 转到表面铺滤纸和瓶口包棉塞的分化培养基, 50 mL 培养瓶约 0.1 g, 尽量分散, 1~2 次继代(15~20 d/次)后, 出现球形胚、心形胚和子叶胚等胚状体(图 1(g)), 尽可能将胚状体从胚性愈伤组织剥离挑出继代, 每瓶分散接种 15~20 粒, 10~20 d 左右会有部分发育成具有两片小子叶和根的小植株(图 1(h)), 将它们接种到胚性愈伤组织诱导培养基里, 不断挑选长出真叶的小植株单独继代到一个培养瓶直至长大(图 1(i)).

2.2 PCR 检测、卡那霉素抗性检测、GUS 组织化学分析和后代纯合选育

对得到的 9 个愈伤组织系的 30 株再生植株进行 *npt*, *fibroin* 和 *gus* 基因 PCR 扩增、GUS 组织化学分析和卡那霉素抗性检测, 结果显示, 植株 1-1, 4-3, 4-4, 6-4, 8-2 和 9-3 均能被扩增出这 3 个基因, 但没有检测到 GUS 活性; 植株 1-3 (泳道 1)只有 *gus* 基因没有到; 植株 2-4, 8-1 和 8-3 只检测到 *npt*; 植株 7-1 (泳道 7), 7-2 和 7-3 没有检测到任何基因; 其余 17 株各种检测均为阳性(图 2 和表 1).

T₀代植株收获种子后, 经连续 2~3 代的卡那霉素抗性筛选、PCR 检测和系统选择, 在 T₃ 代选育出了 6 个转化事件的纯合株系, 即 2-1-a, 3-2-b, 4-1-c, 5-1-d, 6-3-e 和 9-2-f. 与受体对照相比, 转基因植株的株型没有明显差异.

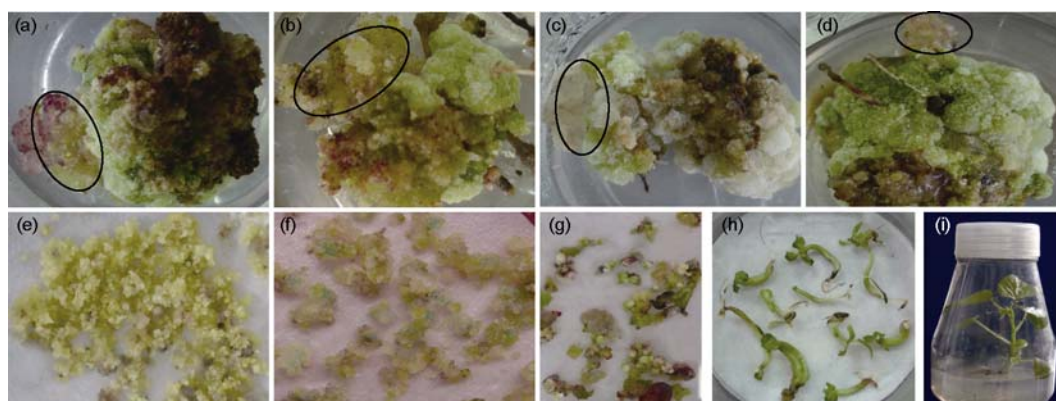


图 1 分化出 4 种形态的胚性愈伤组织和植株再生

(a)~(d) 绿色非栓质化或绿白相间半栓质化硬块的初生愈伤组织分化出 4 种胚性愈伤组织, 圆圈内为胚性愈伤组织;
(e) 增殖的胚性愈伤组织; (f) 胚性愈伤组织的 GUS 化学组织分析; (g) 胚性愈伤组织中出现胚状体; (h) 具有小子叶的生根小植株; (i) 用于检测后嫁接的正常小植株

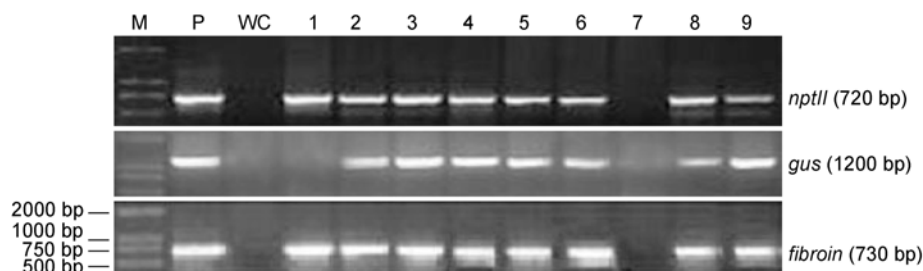


图 2 部分 T₀ 代再生株的 PCR 检测

M, DL2000; P, 质粒阳性对照; WC, 受体阴性对照; 1~9, T₀ 代转基因再生株, 分别是单株 1-3, 2-1, 3-2, 4-1, 5-1, 6-3, 7-1, 8-2 及 9-2

表 1 T₀ 代转基因再生株的检测分析^{a)}

单株号	PCR 检测			卡那霉素 抗性检测	GUS 组织 化学分析
	<i>npt</i>	<i>gus</i>	<i>fibroin</i>		
1-1	+	+	+	+	-
1-2	+	+	+	+	+
1-3	+	-	+	+	-
2-1	+	+	+	+	+
2-2	+	+	+	+	+
2-3	+	+	+	+	+
2-4	+	-	-	+	-
3-1	+	+	+	+	+
3-2	+	+	+	+	+
3-3	+	+	+	+	+
4-1	+	+	+	+	+
4-2	+	+	+	+	+
4-3	+	+	+	+	-
4-4	+	+	+	+	-
5-1	+	+	+	+	+
5-2	+	+	+	+	+
5-3	+	+	+	+	+
6-1	+	+	+	+	+
6-2	+	+	+	+	+
6-3	+	+	+	+	+
6-4	+	+	+	+	-
7-1	-	-	-	-	-
7-2	-	-	-	-	-
7-3	-	-	-	-	-
8-1	+	-	-	+	-
8-2	+	+	+	+	-
8-3	+	-	-	+	-
9-1	+	+	+	+	+
9-2	+	+	+	+	+
9-3	+	+	+	+	-

a) “+”代表检测阳性;“-”代表检测阴性

2.3 纯合株系的 Southern blot 和 Northern blot 检测

以 *fibroin* 基因 PCR 扩增片段作探针的 Southern 杂交结果(图 3)表明, 除受体对照外, 6 个转基因株系均有杂交信号; 除株系 9-2-f 是 2 个拷贝插入, 其余均是单拷贝插入, 说明 *fibroin* 基因已经整合到陆地棉的基因组中, 且可以稳定遗传。

GAE6-3A 启动子在开花后 15~20 d 的纤维优势

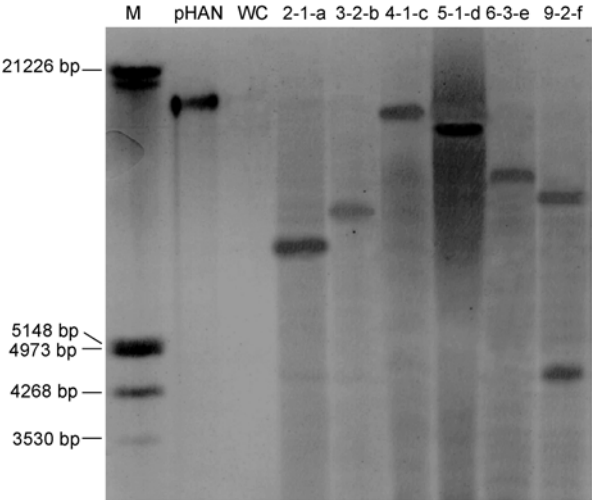


图 3 纯合株系的 Southern blot 检测

M, 分子量 Marker; WC, 受体阴性对照; pHAN, 质粒阳性对照; 2-1-a, 3-2-b, 4-1-c, 5-1-d, 6-3-e 及 9-2-f 为 T₃ 纯合株系

表达^[26], 提取 6 个转基因纯合株系开花后 15 d 纤维的总 RNA 进行 Northern 杂交, 结果证明, 6 个转基因株系均有强的杂交信号, 而转基因受体品系 WC 没有杂交信号。这表明 *fibroin* 在转基因纯系的纤维中得到了表达, 在株系 2-1-a 的表达量最高(图 4)。

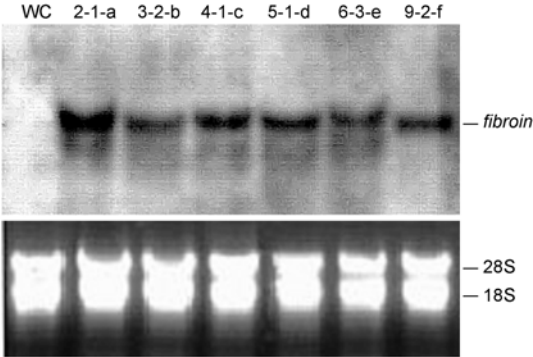


图 4 6 个纯合株系的 Northern blot 检测

2-1-a, 3-2-b, 4-1-c, 5-1-d, 6-3-e 及 9-2-f 为 T₃ 纯合株系。WC, 受体阴性对照

2.4 T₃代纯合株系成熟纤维扫描电子显微镜分析和纤维品质检测分析

取 6 个纯合株系和对照中部发育良好的成熟纤维在扫描电子显微镜下放大 400 倍和 1000 倍观察棉纤维表面结构. 和对照相比, 所有转基因株系棉纤维的卷曲度增加, 单位长度的扭曲数增加(图 5). 对各纯系的纤维螺距进行测量并进行多重比较表明: 所有转基因纯合株系的螺距显著比对照变短, 螺距在株系 2-1-a, 3-2-b, 4-1-c, 5-1-d 和 6-3-e 之间无差异, 而株系 9-2-f 螺距与它们相比显著变短(表 2).

取 6 个纯合株系以及受体对照棉纤维样品进行 HVI900 (ICC 标准)品质检测, 结果表明, 转基因棉花纤维的伸长率比对照均有明显提高(表 2), 其中 9-2-f 株系提高了 28.36%; 2-1-a, 3-2-b, 9-2-f 这 3 个株系的比强度显著增加, 分别增加了 5.32%, 6.41%和 8.32%; 3-2-b 和 9-2-f 纤维长度分别减少了 4.51%和 9.42%. 其他指标与对照相比没有差异. 可见, *fibroin* 基因对

棉花纤维品质的影响主要体现在伸长率的增加, 同时可以引起比强度和长度的改变.

棉花纤维品质改良多基于传统的育种手段, 然而由于种间隔离障碍以及某些特殊性状的缺乏, 纤维品质的进一步提高受到了制约. 随着分子生物学技术研究的深入和植物转基因技术的逐渐成熟, 将纤维品质性状基因导入棉花基因组已经成为培育优质棉的一种重要的有效的手段. 张震林等人^[7]利用花粉管通道技术, 将蚕丝心蛋白基因导入陆地棉品种泗棉 3 号, 获得 1 株阳性株, 纤维比强度在 T₁ 和 T₂ 代较对照有提高, 转基因植株仅有 PCR 分子检测的结果, 没有选育到纯合株系, 纤维品质分析没有给出伸长率的数值. 上官小霞等人^[9]利用农杆菌介导法, 将蚕丝心蛋白基因转入陆地棉 R15 中, 在 T₃ 代的 4 个株系中有 3 个株系的纤维比强度提高, T₃ 代材料的阳性率 80%, 显然没有获得纯合, 也没有转基因棉纤维的表面显微结构的研究. 本实验利用农杆菌介导

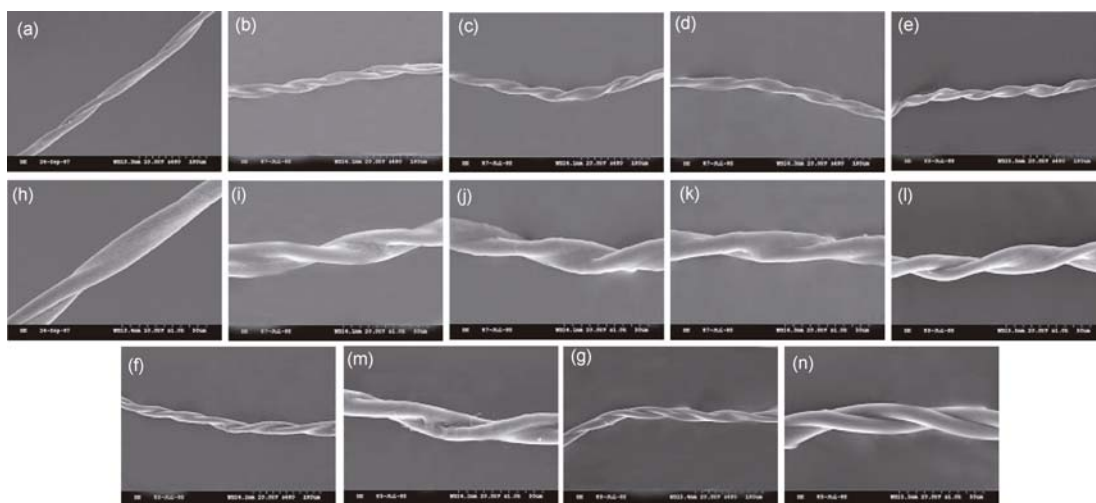


图 5 转基因和对照棉纤维放大 400 倍和 1000 倍的表面结构扭曲变化

(a)~(g)分别是株系 WC, 2-1-a, 3-2-b, 4-1-c, 5-1-d, 6-3-e 和 9-2-f 放大 400 倍的棉纤维表面; (h)~(n)分别对应的是(a)~(g)放大 2.5 倍的棉纤维. 与对照相比, 转基因棉纤维明显转曲

表 2 不同株系转基因棉花纤维品质检测和纤维螺距测量结果^{a)}

纤维样品	长度/mm	比强度/cN tex-1	马克隆值	伸长率(%)	螺距/ μ m
2-1-a	28.30 $\pm$ 0.76a	29.1 $\pm$ 0.14**A	5.90 $\pm$ 0.14	6.00 $\pm$ 0.14*a	122.18 $\pm$ 2.72**B
3-2-b	26.05 $\pm$ 0.94*b	29.40 $\pm$ 1.45*a	5.77 $\pm$ 0.25	6.23 $\pm$ 0.15*a	125.73 $\pm$ 10.34**B
4-1-c	26.61 $\pm$ 0.74a	27.13 $\pm$ 1.32b	6.03 $\pm$ 0.17	6.13 $\pm$ 0.62*a	140.29 $\pm$ 6.81**B
5-1-d	27.53 $\pm$ 1.27a	27.34 $\pm$ 2.36b	5.92 $\pm$ 0.16	6.36 $\pm$ 0.69*a	125.32 $\pm$ 0.55**B
6-3-e	27.71 $\pm$ 0.85a	28.28 $\pm$ 1.79b	5.90 $\pm$ 0.10	6.14 $\pm$ 0.15*a	140.29 $\pm$ 10.90**B
9-2-f	24.71 $\pm$ 0.93*b	29.93 $\pm$ 1.18**A	6.07 $\pm$ 0.21	6.97 $\pm$ 0.57*a	100.89 $\pm$ 4.74**C
WC (CK)	27.28 $\pm$ 0.56a	27.63 $\pm$ 0.55b	5.88 $\pm$ 0.12	5.43 $\pm$ 0.24b	402.47 $\pm$ 17.91A

a) 不同字母代表新复极差测验的显著性差异, 小写字母表示达到 0.05 显著水平, 大写字母表示达到 0.01 显著水平. *, 与受体品种相比达到 0.05 显著水平; **, 与受体品种相比达到 0.01 显著水平

法将蚕丝心蛋白基因导入陆地棉品系 WC, 获得 6 个纯合株系, Southern blot 表明 *fibroin* 基因整合到了棉花基因组中, Northern blot 显示其在纯系的棉纤维中得到了表达. 扫描电子显微镜观察到转基因棉纤维的卷曲度增加; 纤维检测结果显示转基因导致了纤维伸长率普遍增加和部分纯系比强度的增强. 本研究和他的共同之处是转 *fibroin* 基因棉花的比强度有所提高; 本研究利用高世代的 6 个纯合株系进行研究, 可靠性更好; 进一步发现了棉纤维卷曲度和伸长率比对照明显增加是 6 个纯合株系的共性, 这二者的关系可类比为弹簧卷曲度和可拉伸性. 转 *fibroin* 影

响棉纤维品质的可能机制是, 丝心蛋白是一种 β -角蛋白, 角蛋白是属于中间纤维的一种纤维蛋白; 中间纤维是细胞骨架的重要成分, 在植物细胞中细胞骨架指导着细胞壁的合成, 而成熟的棉纤维实质就是纤维细胞的细胞壁. 转基因棉花植株中 *fibroin* 基因在棉纤维中特异表达, 它的 β -折叠构象可能改变了棉纤维细胞的骨架, 进而影响了纤维细胞壁的合成, 导致了棉纤维卷曲度和纤维伸长率的增加. 可见, *fibroin* 表达的主要效应可能是纤维卷曲度和纤维伸长率的增加, 从而增加棉纤维的比强度. 基本上揭示了转 *fibroin* 基因改良棉纤维比强度的遗传和分子机理.

致谢 感谢中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所陈晓亚院士提供蚕丝心蛋白基因.

参考文献

- 1 Park J, Lee Y K, Kang B K, et al. Co-transformation using a negative selectable marker gene for the production of selectable marker gene-free transgenic plants. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 1562—1567 [DOI]
- 2 Vidal J R, Kikkert J R, Wallace P G, et al. High-efficiency biolistic co-transformation and regeneration of 'Chardonnay' (*Vitis vinifera* L.) containing npt-II and antimicrobial peptide genes. *Plant Cell Rep*, 2003, 22: 252—260 [DOI]
- 3 Firoozabady E, DeBoer D, Merlo D J, et al. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants. *Plant Mol Biol*, 1987, 10: 105—116 [DOI]
- 4 John M E, Keller G. Metabolic pathway engineering in cotton: Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(23): 12768—12773 [DOI]
- 5 Richter D. Genetic engineering of cotton to increase fiber strength, water absorption and dye binding. San Diego: Proceedings Belt-wide Cotton Conferences, 1998. 595—598
- 6 May O L, Wofford T J. Breeding transformed cotton expressing enhanced fiber strength. *J New Seed*, 2000, 2(1): 1—13 [DOI]
- 7 张震林, 陈松, 刘正奎, 等. 转蚕丝心蛋白基因获得高强纤维棉花植株. *江西农业学报*, 2004, 16(1): 15—19
- 8 Li X, Wang X D, Zhao X, et al. Improvement of cotton fiber quality by transforming the *acsA* and *acsB* genes into *Gossypium hirsutum* L. by means of vacuum infiltration. *Plant Cell Rep*, 2004, 22: 691—697 [DOI]
- 9 上官小霞, 王凌健, 李燕娥, 等. 对转蚕丝心蛋白轻链基因棉花的分析. *作物学报*, 2007, 33(5): 697—702
- 10 秦永华, 乔志新, 刘进元. 转基因技术在棉花育种中的应用. *棉花学报*, 2007, 19(6): 482—488
- 11 陈华, 朱良均, 闵思佳. 家蚕丝素基因研究进展. *科技通报*, 2003, 19(3): 260—263
- 12 沈同, 王镜岩, 主编. *生物化学* (第二版). 北京: 高等教育出版社, 1990
- 13 于晓红, 朱勇清, 陈晓亚, 等. 种子特异表达 *ipt* 转基因棉花根和纤维的改变. *植物生理学报*, 2000, 26(2): 143—147
- 14 陈志贤, Llewellyn D J, 范云六, 等. 利用农杆菌介导法转移 *ttdA* 基因获得可遗传的抗 2,4-D 棉花. *中国农业科学*, 1994, 27(2): 31—37
- 15 吴慎杰, 李飞飞, 陈天子, 等. 农杆菌介导法转化泗棉 3 号的研究. *作物学报*, 2007, 33(4): 632—638
- 16 吴慎杰, 李飞飞, 张天真. 插皮接技术在棉花再生植株嫁接中的应用. *棉花学报*, 2006, 18(6): 347—351
- 17 Paterson A H, Brubaker C L, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, 11(2): 122—127 [DOI]
- 18 Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS fusion system. *Plant Mol Biol Rep*, 1987, 5: 387—405 [DOI]
- 19 孙敬, 唐灿明, 袁小玲, 等. 利用卡那霉素间接鉴定法进行大规模的棉花转基因育种技术. *棉花学报*, 2000, 12 (5): 270—276
- 20 Wayne-Hughes D, Galau G. Preparation of RNA from cotton leaves and pollen. *Plant Mole Biology Rep*, 1988, 6: 253-257 [DOI]
- 21 Wan C Y, Wilkins T A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Anal Biochem*, 1994, 223: 7—12 [DOI]
- 22 Finer J J. Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep*, 1988, 7: 399—402
- 23 Gawel N J, Rao A P, Robacker C D. Somatic embryogenesis from leaf and petiole callus cultures of *Gossypium hirsutum*. *Plant Cell Rep*, 1986, 5: 457—459 [DOI]
- 24 Shoemaker R C, Couche L J, Galbraith D W. Characterization of somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant cell Rep*, 1986, 5: 178—181 [DOI]
- 25 Trolinder N L, Goodin J R. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*) I. Effects of source of explants and hormone regime. *Plant Cell Tiss Org*, 1988, 12: 31—42 [DOI]
- 26 John M E, Crow L J. Gene expression in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fiber: Cloning of the mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 5769—5773 [DOI]