

棉花遗传转化研究进展及其应用

谢德意, 房卫平, 唐中杰

(河南省农业科学院 经济作物研究所, 河南 郑州 450002)

摘要: 外源基因遗传转化技术已成为棉花突变体创造、新资源创制以及新品种选育的重要手段。目前, 常用的遗传转化方法主要有花粉管通道法、基因枪轰击法、农杆菌介导法和 PEG 介导法等。用于棉花遗传转化的外源基因有抗虫基因、抗病基因、抗逆基因、抗除草剂基因以及棉纤维品质基因等, 当前主要是抗虫基因。遗传转化的主要体系有: 以体细胞胚为受体的转化体系; 以下胚轴为受体的转化体系以及最新发展的叶绿体转化体系。转基因抗虫棉的培育成功是棉花分子育种的重大突破。2005 年, 全世界转基因抗虫棉种植面积近 1 000 万 hm^2 , 占全世界棉花总种植面积的近 30%; 我国为 420 万 hm^2 , 占我国当年棉花总面积的 73%, 转基因抗虫棉的推广应用有力地促进了棉花生产的发展。

关键词: 棉花; 外源基因; 遗传转化; 转基因抗虫棉

中图分类号: S562 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)11-0005-08

1 概述

棉花是我国的非起源作物, 我国棉花种质资源比较狭窄, 随着棉花育种向聚合多抗方向发展, 传统的纯系育种和有性杂交的方法越来越难以满足现代育种的要求。然而, 利用生物技术和基因工程技术把有用的外源基因转入到棉花中, 不仅可以有效地打破物种间的界限, 拓宽基因资源, 而且可以实现外源基因人为可控的定向转入, 大大加快育种进程。目前, 世界范围内生产上广泛种植的转基因抗虫棉就是生物技术育种的典型例证。随着新的有用外源基因的不断发现以及转基因技术的日益完善, 遗传转化技术在棉花新种质创制及新品种选育等方面将发挥越来越重要的作用。

遗传转化研究始于 20 世纪六、七十年代。1969 年, Ledoux 等用细菌 DNA 浸泡大麦的幼苗, 通过对抽提 DNA 的沉降分析, 发现转化大麦的 DNA 中存在中间密度的 DNA 带。1974 年, 他们进一步用同种细菌的 DNA 浸泡维生素 B₁ 缺陷型的拟南芥种子, 结果观察到有少数浸泡的后代植株能在缺乏维生素 B₁ 的培养基上生长。1976 年, Hess 等用人工培养萌发的花粉与外源总 DNA 溶液混合授粉, 结果在后代植株中发现了外源基因表达的性状, 并检测到外源基因表达的酶活性, 这为后来的花粉管

通道法提供了理论基础。

1983 年, 世界上第一株转基因植株 (Zambryski, 1983) 的获得标志着植物转基因时代的到来。1984 年, Paszkowski 将 NPTII 等嵌合基因克隆到 *E. coli* 质粒上, 并用 PEG 转化烟草获得成功。1985 年, Horsch 等创立了农杆菌介导的“叶盘法”转基因系统。1987 年, Jefferson 等利用 *GUS* 作为报告基因, 使转基因愈伤组织和植株检测变得方便快捷, 大大提高转基因效率。1988 年, Klein 首次将其用于植物转基因研究, 克服了当时农杆菌介导的转基因方法的受体种类和基因型的限制, 开创了植物转基因方法的新领域。1990 年, Finer 和 McMullen 用陆地棉柯字 310 的胚性悬浮系进行的基因枪转化, 获得了 10 个再生植株, 较农杆菌介导的遗传转化, 所用的再生时间较短 (5 个月)。1994 年, Hiei 等通过使用农杆菌侵染诱导剂乙酰丁香酮 (AS) 以及构建 VirG 和 VirB 高效表达的超二元载体, 高效成功地转化了水稻。利用该转基因系统, Ishida 等 (1996)、Tingay 等 (1997) 和 Cheng 等 (1997) 相继获得了玉米、大麦和小麦的转基因植株。

2 棉花遗传转化的主要方法

根据转化系统的原理大致可分为 3 类 (傅荣昭等, 1994): ① 农杆菌介导的基因转移; ② 以原生质

收稿日期: 2007-07-10

作者简介: 谢德意 (1966-), 男, 河南商城人, 副研究员, 博士, 主要从事棉花遗传改良研究。

体、细胞或组织为受体的直接转移;如电击、微注射、基因枪法、超声波法以及 PEG (聚乙二醇)介导转化原生质体等;③种质系统的基因转移(germ line transformation),如利用注射子房、种胚、体细胞胚及花粉等途径导入外源基因。按载体有无又可分为两大转化系统(王关林等,2002):(1)载体转移法(包括农杆菌介导、植物病毒介导和脂质体法的转化等);(2)无载体转化法:不用任何载体,采用物理化学方法直接将外源基因导入受体细胞的直接转化系统。如 PEG、电击法、基因枪法、显微注射法、花粉管通道法、超声波法、显微激光法、电泳法等。

目前,在棉花的遗传转化研究中,主要用到的方法有花粉管通道法、基因枪转化法和农杆菌介导法等。

2.1 花粉管通道转化法

花粉管通道法由我国学者周光宇于 20 世纪 70 年代创建的。花粉管通道转化法的基本原理是利用植物授粉后形成的花粉管通道,将外源 DNA 导入植物胚囊中而实现外源基因转移的方法。花粉管通道法有效地利用了植物自然生殖过程,避免了植株再生的难题,而且转化不受基因型控制,操作简单,转化成本也较低(Bidney 等,1992)。目前,已有多种农作物通过花粉管通道法获得成功转化,包括水稻、小麦、玉米、大豆、棉花、烟草、番茄等。该方法的不足之处在于,转化技术不太完善,对转化机制缺乏系统的研究,操作过程带有一定的盲目性,转化效率较低。

2.2 基因枪轰击法

基因枪轰击法又称为粒子轰击技术(particle bombardment)、生物发射技术(biolistics process)或高速微粒子发射技术(high-velocity microprojectile)。基因枪转化法的基本原理是利用火药爆炸、高压放电或高压气体作驱动力,将载有外源 DNA 的钨或金等金属微粒加速,射击真空室中的靶细胞或组织,达到将外源 DNA 分子导入靶细胞的目的。1987 年,美国康奈尔大学的 Sanford 等首先发明了火药型基因枪。Klein(1988)利用该基因枪将细菌氯霉素乙酰转移酶基因(Cat)转入洋葱的表皮细胞,使其表达。1990 年,Dupoint 公司发明了第一个商业化的基因枪系统 PDS-1000。基因枪转化法既可以转化植物,也可转化动物,既可转化双子叶植物,也可转化单子叶植物和裸子植物,是一种用途广泛的转化方法。利用基因枪法已成功地转化了大豆、小麦、水稻、棉花、玉米等多种重要作物(Finer

等,1990)。特别是对那些难以再生的作物,可选用幼胚、花粉细胞、茎尖分生组织等受体材料,避开再生步骤。基因枪转化法的不足之处在于其转化频率较低,而基因枪的造价较高,转化成本也高。

2.3 农杆菌介导法

自 1983 年利用根癌农杆菌 Ti 质粒转化烟草获得成功以来,到目前已获得的 200 多种转基因植物中 80% 以上是利用根癌农杆菌介导转化系统产生的。利用根癌农杆菌转化方法不仅可以转化双子叶植物,也可以转化单子叶植物(王关林等,2002)。与其他转化方法相比,农杆菌介导转化法具有许多突出的优点:(1)在所有转化系统中,农杆菌 Ti 质粒转化系统是机理研究得最清楚的,方法也最成熟;(2)Ti 质粒的 T-DNA 区可以容纳相当大的 DNA 片段插入,目前已把长达 50 kb 的异源 DNA 序列通过 T-DNA 完整地转移到植物细胞中;(3)整合进植物基因组中的 T-DNA 可根据人们的需要连接不同的启动子,使外源基因能够在再生植株的各种组织器官中特异性表达,例如在果实中、在叶片中表达,甚至仅在根中表达,即可进行人为地控制;(4)由农杆菌 Ti 质粒转化系统转化的外源基因在植物基因组中多以单拷贝存在,遗传稳定性好,并且多数符合孟德尔遗传规律。因此,转基因植株能较好地为育种提供选育材料,甚至成为优良品种直接用于生产。

3 棉花遗传转化的主要体系

3.1 以体细胞胚胎为受体的转基因体系

体细胞胚是由类似于卵细胞特性的胚性细胞发育而来,这些胚性细胞具有很强的接受外源 DNA 的能力,是理想的基因转化感受态细胞。同时胚性细胞繁殖量大、同步性好,转化后的胚性细胞即可发育成转基因的胚状体及完整的植株。而且体细胞胚胎发生多是单细胞起源,转化获得的转基因植株嵌合体少,因此,体细胞胚是理想的遗传转化受体。1993 年,McGranahan 等首次报道了美国西部核桃(*Juglans regia* L.)体细胞胚转化 NPT II 等基因获得成功,并且建立了体细胞胚转化的整套技术。Delbreil 等(1993),用石刁柏的体细胞胚也成功地进行遗传转化。吴家和等(2003)、Jin 等(2005)分别利用棉花胚性愈伤组织进行了不同外源基因的遗传转化。

该体系的最大优点是:受体材料容易大量获得,且受体的状态较为一致,容易获得再生植株。该体

系的缺点是转基因植株的结实率低, 不易获得转基因种子。

3.2 以下胚轴为受体的转基因体系

以下胚轴为受体的转基因体系是棉花遗传转化的另一重要体系。其基本方法是用农杆菌液直接浸染棉花的下胚轴, 然后, 浸染过的下胚轴经过脱分化形成抗性愈伤组织, 再生成苗, 最后获得抗性植株。吴霞等(2001)研究了农杆菌液浓度、浸染时间以及下胚轴的切口方向对转化效率的影响。焦改丽等(2002)报道了用棉花下胚轴作受体进行转 Bt 基因, 获得了转基因再生植株。到目前, 已有许多以下胚轴为受体进行遗传转化成功的报道(Jin 等, 2005)

该体系的最大优点是: 转基因植株的结实率较高, 易获得转基因种子。其缺点是不易获得转基因再生植株, 转化效率较低。

3.3 以叶绿体为受体的转基因体系

以细胞核为外源基因受体的传统植物基因工程虽已发展趋于成熟并得到广泛应用, 但仍存在一系

列难以解决的问题: 目的基因表达量不理想, 同时转入多个基因时操作步骤过于复杂, 所表达的原核基因必须经过修饰改造, 因位置效应的影响需花大量精力筛选符合要求的转基因植株, 环境安全难以保证等。叶绿体转化系统的出现为克服这些困难带来了希望。叶绿体是继核转化之后又一新的遗传转化和表达受体, 叶绿体转化体系具有可同时进行多基因转化、表达原核性、超量表达、后代遗传稳定、定点整合、不会产生基因沉默及母性遗传和安全性好等突出特点, 为植物导入外源基因提供了新途径(张景昱等, 2001)。1988 年, Klein 等人建立了叶绿体基因枪转化方法。1990 年, 外源基因首次于高等植物叶绿体中获得瞬间表达(Daniall 等, 1990)。Ye 等(1990)又对所创建的轰击转化系统进行改进, 建立了一种较为有效的叶绿体转化方法。Daniall 等经过多年研究, 于 2005 年发表了陆地棉叶绿体基因组结构图(图 1), 并较系统地研究了影响叶绿体转化效率的相关因素(Daniall 等, 2005)。

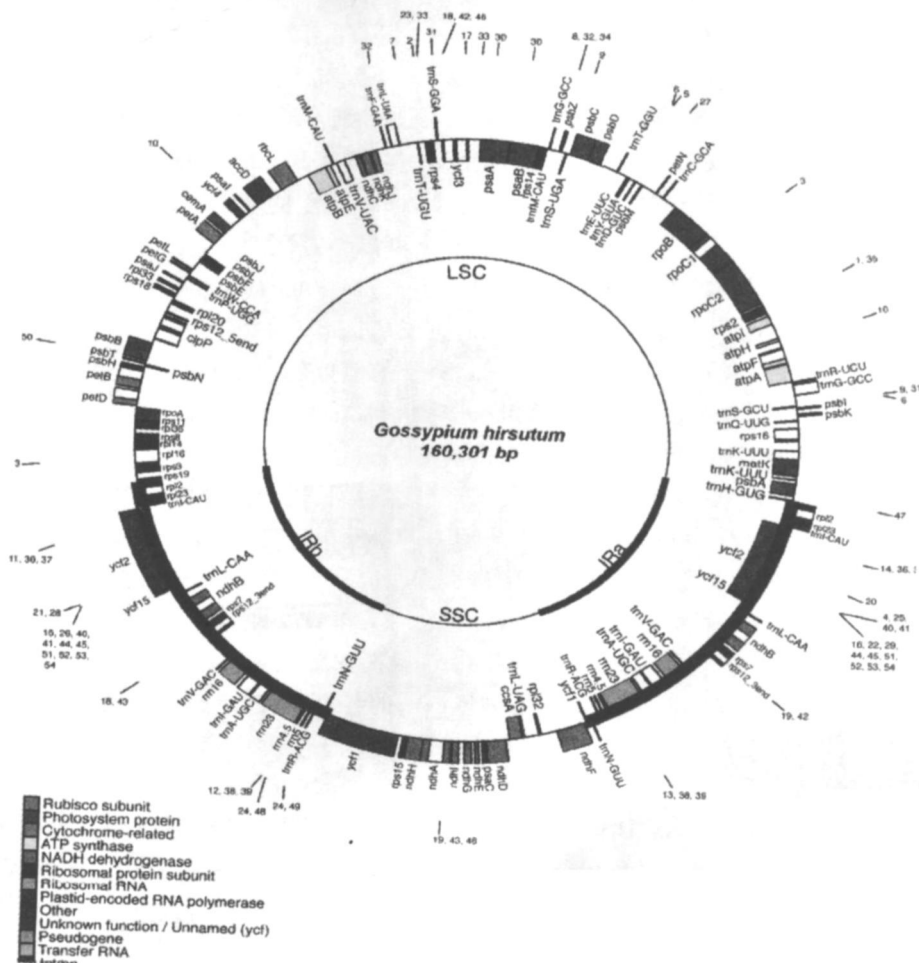


图 1 陆地棉叶绿体基因组结构

4 用于棉花遗传转化的主要外源基因

4.1 抗虫基因

自然界中存在许多天然的抗虫基因,目前已分离克隆出的抗虫基因主要包括从细菌中分离的 Bt 基因、从植物中分离的胰蛋白酶抑制剂基因(豇豆 CPTI、慈菇 API)、马铃薯蛋白酶抑制剂—II 基因、淀粉酶抑制剂基因(α -amylase inhibitor, α -AI)、外源凝集素基因、几丁质酶基因,以及昆虫神经激素基因如蝎子毒素基因和蜘蛛毒素基因以及营养杀虫蛋白基因(vegetative insecticidal protein, Vip)等。其中 Bt 主要抗鳞翅目害虫。CPTI 抗虫谱较广,能抗鳞翅目、膜翅目和鞘翅目的部分害虫,但需要达到较高的表达水平才能控制害虫。淀粉酶抑制剂基因研究较多的主要是来自菜豆(*Phaseolus vulgaris*)的 α -淀粉酶抑制剂(α AI—PV)。外源凝集素是一组广泛存在于植物组织中的蛋白成分。目前已分离出多种外源凝集素基因,可以有效地提高植物的抗虫能力(孙善君等,2005)。目前,应用于棉花的主要有豌豆外源凝集素(P—Lec)和雪花莲外源凝集素(GNA)。而当前我国棉花生产上广为种植的转基因抗虫棉所使用的基因则主要是 Bt 基因或 Bt + CPTI 基因(Perlak 等,1990;Cousins 等,1991;谢道昕等,1991;倪万潮等,1998;李燕娥等,2000)。

4.2 抗病基因

植物几丁质酶基因和葡聚糖酶基因是目前研究较多的抗病基因。现在已经从菜豆(Brogie 等,1986)、烟草(Payne 等,1990;Melchers 等,1994;David 等,1998)、水稻(Nishizawa 等,1993;Yeboah 等,1998)、番茄(Danhash 等,1993)、玉米(Wu 等,1994)、小麦(Liao 等,1994)、棉花(Hudspeth 等,1996)等数十种植物中分离克隆到上百个几丁质酶基因。植物内源葡聚糖酶可以分为三大类 β -1,3-葡聚糖酶、 β -1,3-1,4-葡聚糖酶和 β -1,4-葡聚糖酶(Ficher 1995),其中 β -1,3-葡聚糖酶在高等植物内广泛存在, β -1,3-葡聚糖酶对植物体内的许多生理过程起调控作用(Simmons 等,1992)。

张宝红和丰嵘(1992)利用外源 DNA 直接导入技术,成功地将抗病基因导入感病品种中,获得的抗黄萎病棉花新品系。乐锦华等(2002)用花粉管通道法将菜豆几丁质酶基因与烟草 β -1,3-葡聚糖酶基因双价植物表达载体 pBLGC 导入新疆棉花主栽品种,得到抗病性良好且遗传稳定的转基因棉花。

吴家和等(2004)用农杆菌介导胚性愈伤的办法将几丁质酶基因和 β -1,3-葡聚糖双价基因转入冀合 321 和中棉所 35,选择得到 7 个抗病株系。

4.3 抗除草剂基因

全世界除草剂的年产量和年销售量已跃居农药首位,目前生产上广泛使用的除草剂主要有草甘膦(glyphosate)、溴苯腈(bromoxnil)和 2,4-D 等。草甘膦(glyphosate),是一种非选择性广谱除草剂,有效成分是左旋膦丝菌素(L-PPT, L-phosphinothricin),是 L-谷氨酰胺的类似物,通过竞争性抑制使植物体内的谷氨酰胺合成酶(GS, glutamine synthetase)失活。PPT 对植物的毒害主要是通过 PAT(phosphinothricin acetyltransferase, 膦丝菌素乙酰转移酶)对其自由胺基进行乙酰化修饰而实现。目前,可以编码 PAT 的基因有两种:从 *Streptomyces hygroscopicus* 中得到克隆的 *bar* 基因(bialaphos resistance gene; Thompson 等,1987);从 *Streptomyces viridochromogenes* 中克隆得到的 *pat* 基因(phosphinothricin acetyltransferase gene; Strauch 等,1988)。通过转化 *bar* 或 *pat* 基因,可以得到抗 PPT 的各种农作物。Rathore 等(1993)用水稻原生质体为外植体转化 *bar* 基因,得到抗草丁膦的水稻。Cooley 等(1995)用基因枪对水稻进行 *bar* 基因的转化,得到抗草丁膦更强的后代。Keller 等(1997)用基因枪对幼胚转入 *bar*,再生后得到海岛棉 Pima、陆地棉 DP50, Coker 312 和 El Dorado 的抗 Basta 浓度达 15000 mg/kg 的株系。针对 *pat* 的遗传转化,有胡萝卜和烟草的成功报道(Droge 等,1992)。

2,4-D 是一种常用激素,它主要通过干扰植物生长代谢而抑制杂草生长。Lyon 等(1989)从土壤菌中克隆到 2,4-D 单氧化酶基因(*tdfA*),并转移到烟草中。Bayley 等(1992)得到可抗 0.1% 的 2,4-D 转基因棉花。溴苯腈(bromoxnil)是一种触杀型除草剂。主要由叶片吸收,通过抑制光合作用的各个过程,迅速使组织坏死。1986 年,Calgene 公司从土壤菌中克隆到其水解酶的基因 *Bxn*。Fillatti 等(1989)将该基因转入棉花的栽培品种。

4.4 棉花纤维品质基因

棉花纤维品质是由多个基因控制的数量遗传性状,双亲杂交后纤维品质一般呈中间类型,运用传统育种方法来改良品质性状往往比较困难。近年来,棉纤维品质分子遗传改良种研究正在兴起。Daniel 等(1998)将蛋白基因(PBPs)导入到棉花基因组中,

使棉纤维的弹性和强度得到改善。中科院植生所利用 PCR 技术从大白兔血细胞总 DNA 中扩增出兔角蛋白基因的编码序列,并将该基因序列与棉纤维特异表达启动子 45 连接,通过花粉管通道法转入棉花,部分转基因棉花的纤维伸长率明显增加,纤维比强度有所提高(刘方等,2002)。张震林和陈松等(2004)采用花粉管通道技术,将棉纤维细胞特异表达启动子(E6)驱动的蚕丝芯白基因导入陆地棉品种泗棉 3 号,转蚕丝芯蛋白基因棉花 T1 代纤维比强度达到 34.6cN/tex ,比未导入外源基因的泗棉 3 号提高了 21%,T2 代纤维比强度比对照平均增高 23.3%。

4.5 抗逆基因

在棉花整个生长发育进程中,除了病虫害的影响外,逆境条件如盐害、干旱、涝灾、高低温等也都会对棉花的生长发育产生显著影响。通过利用转基因技术改变棉花的抗逆性状,提高棉花的抗逆性已成为近年来棉花转基因研究的热点,其中抗衰老基因(*ipt*)的研究最多。*ipt*(异戊烯基转移酶 isopentenyl transferases)基因是编码细胞分裂素生物合成限速步骤合成酶的功能基因,首先在根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)中得到鉴定,命名为 *tmr*,后来称为 *ipt*(Chen 等,1979;Blackwell 等,1994)。董春海等(1991)把与植物生长素合成酶有关的农杆菌 *tms* 基因、*tmr* 基因导入了棉花。付永彩等(1998)利用基因枪法将抑制衰老的嵌合基因 PsAG12-*ipt* 转入水稻,观察并分析了 T₁ 代转基因植株成熟期的形态,证明了抑制衰老的自我调节系统在部分转基因水稻中表达,叶片衰老受到明显的抑制。Hu 等(2005)利用农杆菌介导法将 *ipt* 基因导入到 *Festuca arundinacea* Schreb 中发现,转基因植株中的叶绿素 a、叶绿素 b 以及细胞分裂素的含量均显著增加,同时,转基因植株的抗寒性明显增强。Luo 等(2002)将 *ipt* 基因导入油菜中获得了抗叶片衰老的转基因植株。于晓红等(2000)把种子特异蛋白表达的菜豆蛋白启动子 *ph/p-ipt* 基因导入棉花获得了根系更加发达的再生植株。而同时,抗盐、涝、高低温基因的分离、克隆和转化工作也在进行(王关林等,2002)。

5 棉花遗传转化的应用

目前,遗传转化技术已广泛用于农作物新种质创造和新品种选育中。近年来,全球转基因作物种植面积迅速发展。据统计,自 1996 年全球转基因农

作物大规模产业化以来,10 年间全球种植面积增加了 52 倍,累计种植面积 9000 万 hm^2 。种植转基因农作物的国家从最初的 6 个增加到 21 个。按种植面积大小排序,前 3 名分别是美国、阿根廷、巴西,中国排在第五位。2005 年全球转基因作物市场价值达到 52.5 亿美元,居全球种子市场的 18%。

棉花是较早开展转基因研究的作物之一,同时也是最早在生产上大面积推广应用转基因品种的几个经济作物之一。目前转基因抗虫棉已在全世界范围内大面积推广应用。2005 年,全世界棉花种植的总面积为 3400 万 hm^2 ,其中有近 30%即 1000 万 hm^2 为转基因棉花。转基因棉花的种植面积仅次于大豆(3650 万 hm^2)和玉米(1240 万 hm^2),占第三位(James 等,2005)。

我国的棉花转基因育种研究始于 20 世纪 90 年代初。1992 年,郭三堆等在国内首先人工合成了全长 1824bp 的 *Cry1Ab* 和 *Cry1Ac* 融合的 GFM *Cry1A* 基因,拥有了自己的知识产权(贾士荣等 2001),并于 1993 年采用农杆菌介导法和胚珠直接注射法成功导入中棉 12、泗棉 3 号等主栽品种,获得了高抗棉铃虫的转基因棉花株系(郭三堆等,1995 和 1995),1997 年开始了商品化。2001 年将 Bt 和 CPTI(蛋白酶抑制剂基因)两种抗虫基因同时转入棉花中育成的新品种也已开始在生产上大面积应用(贾士荣等,2001)。到 2005 年我国通过审定的转基因棉花新品种已达 70 多个。

自 1997 年转基因抗虫棉开始商品化种植以来,我国的抗虫棉种植规模年年扩大。1998 年种植面积 24 万 hm^2 ,只占棉花总种植面积的 5.4%。1999~2005 年,抗虫棉播种面积分别为 65 万 hm^2 ,100 万 hm^2 ,120 万 hm^2 ,200 万 hm^2 ,280 万 hm^2 ,370 万 hm^2 和 420 万 hm^2 ,分别占当年种植面积的 17%,31%,40%,45%,60%,70%和 73%,年均增幅超过了 10%。

同时国产抗虫棉比例不断提高。2001 年以前,我国种植的转基因抗虫棉以美国品种为主,占全国抗虫棉种植面积的 60%以上,最高年份超过了 80%。到 2002 年,国产转基因抗虫棉品种种植面积首次超过美国品种,达到 52.4%,2003 年达到 64.8%,2004 年接近 70%,2005 年达 73%。2005 年,全世界抗虫棉种植面积近 1000 万 hm^2 ,我国抗虫棉种植面积 420 万 hm^2 ,占全国棉花种植总面积的 73%,创造社会效益 150 多亿元。

6 展望

近年来,我国转基因生物技术取得了长足进步,一是获得了一批转基因农作物新品种和新材料,主要有抗虫棉花、高油油菜及抗虫玉米、抗穗发芽小麦等。二是疫苗和饲料生物制剂已经形成了产业,包括基因工程疫苗、诊断试剂盒、新型饲料蛋白、生物药物饲料添加剂等。三是技术研发不断突破,获得了水稻生长发育基因、雄性不育育性恢复基因、新型抗除草剂基因等新基因,为创造转基因植物新品种提供了基因资源。目前我国农业转基因生物研究与产业化在发展中国家处于先进水平,基因工程疫苗、转基因抗虫棉等研究达到国际先进水平。但也应看到,我国转基因产品应用范围还不是很广泛。总的来看,抗虫、抗除草剂基因工程产品开发较快,抗病基因工程的研究开发需要进一步深入,抗逆、品质改良、生长发育等基因工程还有待基础研究的新的突破。同时,尽管我国植物基因工程技术体系已经初步建立,并取得可喜的令人瞩目的进展,然而,总体研究水平,特别是基础研究与创新能力,以及加快我国转基因植物研究与产业化发展等方面还需进一步加强。就棉花遗传转化研究而言,目前大多集中在抗虫和抗除草剂基因上,而其他重要性状的功能基因如抗病、抗逆、棉纤维品质基因等研究进展较慢,因此,棉花遗传转化及其应用研究今后应重点抓好以下几方面的工作。

①继续加强棉花新的具有广谱抗性的抗虫基因发掘、克隆和遗传转化,新的抗虫基因不仅包括抗棉铃虫基因,还要包括抗蚜以及其他害虫基因。②加强棉花抗病基因的构建和遗传转化工作,尽快培育出高抗棉花枯、黄萎病的新品种,以满足生产的需要。③加强棉花其他重要功能基因如棉纤维品质基因、抗逆、抗衰老基因以及产量性状基因的研究。④加强转基因产品的安全性评价研究工作,包括转基因产品的食品安全、生态环境安全以及生物安全等。⑤加强棉花基因组研究。

棉花功能基因组及突变体库的研究必将成为今后研究的热点。一方面,通过培育棉花重要农艺性状的近等基因系及分子作图群体,开展棉花分子图谱的研究,构建大片段基因组 DNA 文库,通过分子遗传和 DNA 测序等分析,为分离相关的重要功能基因提供指导。另一方面,通过突变技术(理化诱变、插入突变及功能丧失和获得突变),大规模地鉴定棉花的遗传突变体,建立能够覆盖整个基因组的

突变体库,利用高通量基因表达分析方法(微阵列、SAGE 等),结合突变体和基因序列信息,研究棉花生长发育、代谢调控、环境应答等过程中基因表达的方式和调控机制,阐明基因作用的分子机理,对于深入开展棉花基因工程研究具有重大意义。

参考文献:

- [1] 于晓红,朱勇清,陈晓亚,等.种子特异表达 *ipt* 转基因棉花和纤维性状的改变[J].植物学报,2000,42(1):59—63.
- [2] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].北京:科学出版社,2002.
- [3] 乐锦华,祝建波,崔百明,等.用目的基因转化技术培育抗病新品种[J].石河子大学学报,2002,6(3):173—178.
- [4] 付永彩,丁月云,刘新仿.抑制衰老的嵌合基因在水稻中的转化[J].科学通报,1998,43(18):1963—1967.
- [5] 刘方,王坤波,宋国力.中国棉花转基因研究与应用[J].棉花学报,2002,14(4):249—253.
- [6] 孙善君,李仕贵,朱生伟,等.植物遗传转化方法及其在棉花品质改良育种中的应用[J].分子植物育种,2005,3(2):233—239.
- [7] 张宝红,丰嵘.棉花生物技术研究现状[J].生物工程进展,1992,12(5):18—21.
- [8] 张景昱,张中林,苏宁,等.叶绿体遗传转化:植物导入外源基因的新途径[J].植物学通报,2001,18(3):288—294.
- [9] 张震林,陈松,刘正奎,等.转蚕丝芯蛋白基因获得高强纤维棉花植株[J].江西农业学报,2004,16(1):15—19.
- [10] 吴家和,张献龙,罗晓丽.转新型双抗虫基因棉花的遗传分析[J].遗传学报,2003,30(7):631—636.
- [11] 吴家和,张献龙,罗晓丽,等.转几丁质酶和葡聚糖酶基因棉花的获得及其对黄萎病的抗性[J].遗传学报,2004,31(2):183—188.
- [12] 吴霞,上官小霞,朱祯,等.棉花下胚轴遗传转化效率研究[J].中国棉花,2001,28(4):21—22.
- [13] 李燕娥,朱祯,吴霞,等.转基因再生棉花嫁接初报[J].中国棉花,2000,27(3):25—30.
- [14] 贾士荣,郭三堆,安道昌.转基因棉花[M].北京:科学出版社,2001.
- [15] 倪万潮,黄俊麒,郭三堆,等.转基因抗虫棉的培育[J].中国农业科学,1998,31(2):8—13.
- [16] 郭三堆,倪万潮,徐琼芳.编码杀虫蛋白质融合基因和表达载体及其应用:中国,ZL95119563[P].1998—03.
- [17] 郭三堆.植物 Bt 抗虫基因工程研究进展[J].中国农业科学,1995,28(5):8—13.

- [18] 焦改丽, 李俊峰, 李燕娥. 利用新的外植体建立棉花高效转化系统的研究[J]. 棉花学报, 2002, 14(1): 22—27.
- [19] 董春海, 姚敦义. 通过根癌农杆菌将植物生长素合成酶基因导入棉花获得再生植株[J]. 自然杂志, 1991, 14(10): 798—799.
- [20] 谢道昕, 范云六, 倪万潮, 等. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白导入棉花获得转基因植株[J]. 中国科学(B辑), 1991(4): 367—373.
- [21] 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994.
- [22] Bayley C, Trolinder N, Ray C, *et al* . Engineering 2, 4—D resistance into cotton[J]. Theor Appl Genet, 1992, 83: 645—649.
- [23] Bidney D, Scelonge C, Martich J, *et al* . microprojectile bombardment of plant tissue increases transformation frequency by agrobacterium tumefaciens[J]. Plant Mol Biol, 1992, 18: 301—313.
- [24] Blackwell J. Cytokinin biosynthesis by extracts of *Zea mays*[J]. Phytochemistry, 1994, 35: 339—342.
- [25] Broglie K, Chet I, Holliday M, *et al* . Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*[J]. Science, 1991, 254: 1194—1197.
- [26] Chen C M, Melitz D K. Cytokinin biosynthesis in a cell-free system from cytokinin-autotrophic tobacco tissue cultures[J]. FEBS Lett, 1979, 107: 15—20.
- [27] Cheng M, Fry J E, Pang S Z, *et al* . Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Physiol, 1997, 115: 971—980.
- [28] Cooley J, Ford T, Christou P. Molecular and genetic characterization of elite rice plants produced by electric-discharge particle acceleration[J]. Theor Appl Genet, 1995, 90: 97—104.
- [29] Cousins Y L, Lyon B R, Llewellyn D J. Transformation of an Australian cotton cultivar: prospects for cotton improvement through genetic engineering[J]. Aust J Plant Physiol, 1991, 18: 481—494.
- [30] Danhash N, Wagemakers C A, Van Kan J A, *et al* . Molecular characterization of four chitinase cDNAs obtained from *Cladosporium fulvum*-infected tomato[J]. Plant Mol Biol, 1993, 22: 1017—1029.
- [31] Daniell H. Genetic engineering of cotton to increase fiber strength water absorption and dye binding[J]. Proceeding Bell Wide Cotton Conference, 1998, 595—598.
- [32] Daniell H, Ruiz O N, Dhingra A. Chloroplast genetic engineering to improve agronomic traits[J]. Methods Mol Biol, 2005, 286: 111—137.
- [33] David R, Itzhaki H, Ginzberg I, *et al* . Suppression of tobacco basic chitinase gene expression in response to colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *glomus intraradices*[J]. Mol Plant Microbe Interact, 1998, 11: 489—497.
- [34] Delbreil B, Guerche P, Jullien M. Agrobacterium-mediated transformation of *Asparagus officinalis* L. long-term embryogenic callus and regeneration of transgenic plants[J]. Plant Cell Rep, 1993, 12: 129—132.
- [35] Droge W, Broer I, Puhler A. Transgenic plants containing the phosphinothricin—N—acetyltransferase gene metabolize the herbicide L—phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants[J]. Planta, 1992, 187: 142—151.
- [36] Ficher G B. Molecular evolution of plant β —1, 3—glucan endohydrolases[J]. Plant J, 1995, 7: 367—379.
- [37] Fillatti J, McCall C, Comai L. Genetic engineering of cotton for herbicide and insect resistance[J]. Proc Bel Cot Prod Res Conf, 1989, 1: 17—19.
- [38] Finer J, McMullen M D. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment[J]. Plant Cell Rep, 1990, 8: 586—589.
- [39] Hess D. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA[J]. Nature, 1976, 260: 170—173.
- [40] Hiei Y, Komari K, Kubo T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Mol Biol, 1997, 35: 205—218.
- [41] Horsch R B, Fry J E, Hoffmann N L, *et al* . A simple and general method for transferring gene into plant[J]. Science, 1985, 227: 1229—1231.
- [42] Hudspeth R L, Hobbs S L, Anderson D M, *et al* . Characterization and expression of chitinase and β —1, 3—glucanase genes in cotton[J]. Plant Mol Biol, 1996, 31: 911—916.
- [43] Hu Y L, Jia W L, Wang J D, *et al* . Transgenic tall fescue containing the *Agrobacterium tumefaciens ipt* gene shows enhanced cold tolerance[J]. Plant Cell Rep, 2005, 23: 705—709.
- [44] Ishida Y, Saito H, Ohta S, *et al* . High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Nature Biotechnol, 1996, 14: 745—750.
- [45] James C. Global status of commercialized biotech[M]. GM Crops: ISAAA Briefs, 2005.
- [46] Jefferson R A, Burgess S M, Hirsh D. Gus fusions:

- β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. EMBO J, 1987, 6: 3901—3907.
- [47] Jin S X, Zhang X L, Liang S G, *et al.* Factors affecting transformation efficiency of embryogenic callus of Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2005, 81: 229—237.
- [48] Keller G, Spatola L, McCable D, *et al.* Transgenic cotton resistant to herbicide bialaphos [J]. Transgenic Res, 1997, 6: 385—392.
- [49] Klein T M, Fromm M E, Gradziel T, *et al.* Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high velocity microprojectiles [J]. Biotechnology, 1988, 6: 923—926.
- [50] Ledoux L, Huart R. Fate of exogenous deoxyribonucleic acid in barley seedlings [J]. J Mol Biol, 1969, 43: 243—262.
- [51] Liao Y C, Kreuzaler F, Fischer R, *et al.* Characterization of a wheat class b chitinase gene differentially induced in isogenic lines by infection with puccinia graminis [J]. Plant Sci, 1994, 103: 177—187.
- [52] Luo X Y, Li D M, Hou L. Expression of autoregulated ipt gene of inhibiting leaf senescence in rape seed (*Brassica napus*) [J]. J Agri Biotech, 2002, 10: 317—320.
- [53] Lyon B R, Lewellyn D L. Expression of a bacterial gene in transgenic tobacco plants confers resistance to the herbicide 2, 4—dichlorophenoxyacetic acid [J]. Plant Mol Biol, 1989, 13: 533—540.
- [54] McGranahan G H, Leslie C A, Dandekar A M, *et al.* Transformation of pecan and regeneration of transgenic plants [J]. Plant Cell Rep, 1993, 12: 634—638.
- [55] Melchers L S, Apotheker—De Groot M, Van der Knaap J A, *et al.* A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity [J]. Plant J, 1994, 5: 469—480.
- [56] Nishizawa Y, Kishimoto N, Saito A, *et al.* Sequence variation, differential expression and chromosomal location of rice chitinase genes [J]. Mol Gen Genet, 1993, 241: 1—10.
- [57] Paszkowski J, Shillito R, Saul M, *et al.* Direct gene transfer to plants [J]. EMBO J, 1984, 3: 2717—2722.
- [58] Payne G, Ahl P, Moyer M. Isolation of complementary DNA clones encoding pathogenesis related proteins P and Q two acidic chitinases from tobacco [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 98—102.
- [59] Perlak F J, Deaton R W, Armatrong T A. Insect resistance cotton plants [J]. Bio Technology, 1990, 8: 939—943.
- [60] Rathore K S, Chowdhury V K, Hodges T K. Use of bar as a selectable marker gene and for the production of herbicide-resistant rice plants from protoplasts [J]. Plant Mol Biol, 1993, 21: 871—884.
- [61] Simmons C R, Litts J C, Huang N R. Structure of a rice—1, 3—glucanase gene regulated by ethylene, cytokinin, wounding, salicylic acid and fungal elicitors [J]. Plant Mol Biol, 1992, 18: 33—45.
- [62] Strauch E, Wohlleben W, Puhler A. Cloning of a phosphinothricin N—acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu 494 and its expression in streptomyces lividans and *Escherichia coli* [J]. Gene, 1987, 63: 65—74.
- [63] Thompson C J, Movva N R, Tizard R, *et al.* Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus* [J]. EMBO J, 1987, 6: 2519—2523.
- [64] Tingay S, McElroy D, Kalla R, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation [J]. Plant J, 1997, 11: 1369—1376.
- [65] Wu S C, Kriz A L, Widholm J M. Molecular analysis of two cDNA clones encoding acidic class chitinase in maize [J]. Plant Physiol, 1994, 105: 1097—1105.
- [66] Yeboah N A, Arahira M, Nong V H, *et al.* A acidic endochitinase is specifically expressed in the developing seed of soybean (*Glycine max* L. Merr.) [J]. Plant Mol Biol, 1998, 36: 407—415.
- [67] Ye L, Li C, Song Y R. construction of plant seed-specific expression vector pSCB and pSCAB and the obtainment of transgenic *Brassica napus* H165 expression PHB synthetic genes [J]. Chin Sci Bull, 2000, 45 (5): 516—521.
- [68] Zambryski P, Joos H, Genetello C, *et al.* Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity [J]. EMBO J, 1983, 2: 2143—2150.