

棉花纤维素合酶基因 *GhcelA1* 克隆及其载体构建

范小平^{1,2}, 范博红², 徐子勤^{1*}, 杨维才^{3*}

(1. 西北大学生命科学学院, 西安 710069; 2. 山西省农科院棉花研究所, 运城 044000;

3. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘要: 根据 GeneBank 中 *GhcelA1*(U58283) 序列, 利用 RT-PCR 技术, 从棉纤维中克隆到 *GhcelA1* cDNA 全长。运用基因重组技术, 构建 pCAM2300-35S-*GhcelA1* 过表达载体; 融合基因表达载体 pCAM2300-35S-*GhcelA1*-EGFP, 以及 pCAM2300-35S-*GhcelA1*-RNAi 载体, 这些载体均通过限制性酶切鉴定和测序验证。农杆菌介导法将融合基因转化棉花子叶, 通过激光共聚焦荧光显微镜, 在蓝色激发光下观察诱导的愈伤, 发现在转化的活体细胞核与质膜内侧有绿色荧光, 说明融合基因载体 EGFP 构建正确, 可以在棉花中正常表达。所构建的系列载体可用于转化棉花, 促进纤维素在棉纤维中合成与积累。

关键词: 棉花; 纤维素合酶; 基因克隆; 载体构建

中图分类号: S562.035.3 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2009)03-0236-07

Cloning and Construction of *GhcelA1* Gene in Cotton Fiber

FAN Xiao-ping^{1,2}, FAN Bo-hong², XU Zi-qin^{1*}, YANG Wei-cai^{3*}

(1. College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. Institute of Cotton Research, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng, Shanxi 044000, China; 3. Institute of Genetics and Developmental Biology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: *GhcelA1* cDNA full length which reported in GeneBank (U58283) was cloned from Coker 312 (*Gossypium hirsutum*) fiber at 20 DPA (days after anthesis) for the first time using RT-PCR method. A serial of plant expression vectors for over-expression, fusion gene with EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) and RNAi (interference) by recombination technology were constructed and confirmed by molecular and sequence methods. Expression of EGFP in infected cells was clearly evident in confocal microscopy (Zeiss LSM-510) experiments. This showed that the *GhcelA1*-EGFP fusion in correct construction and could express in cotton cells successfully. Clone and construction were the precondition of transformation for culture improved variety and studying on the pivotal function of cellulose synthetase in the second cell wall thicken period of cotton fiber.

Key words: cotton; cellulose synthetase; gene clone; vector construct

利用生物技术改良棉纤维品质的研究日益发展, 已有许多成功地将外源基因蔗糖磷酸合酶 (SPS)^[1]、木醋属的 *acsA* 和 *acsB*^[2] 及蚕丝蛋白 (FBN) 基因^[3] 导入棉花并且改善了棉纤维品质的报道。但是外源基因对棉花体的负面影响也随

改良研究在生产上的应用^[4]。因此, 分离真正调控细胞伸长发育及增强纤维强度表达的目标基因, 即棉花本身的基因尤为重要。棉纤维发育过程中有几千个基因表达^[5], 其相关基因的分离鉴定及调控研究进展很快。John 和 Crow 运用差异筛选方法首次报道克隆出纤维特异表达基因

收稿日期: 2008-08-15

作者简介: 范小平(1968-), 女, 助研, 博士, fanxp100@126.com; * 通讯作者

基金项目: 科技部“863”项目 (2006AA10A108)

E6^[6],已相继克隆出 20 余个棉纤维发育相关基因。但多数是在纤维伸长阶段纤维细胞中特异表达,而真正调控细胞伸长发育及增强纤维强度表达的基因尚未克隆到^[7]。棉纤维次生壁纤维素合成期与棉纤维强度形成期相吻合^[8]的实验结果说明,棉纤维中次生壁纤维素的发育、合成和沉积影响着棉花纤维品质——纤维长度和纤维强度^[9]。纤维素合酶基因 *celA* 首先在木醋杆菌 (*Acetobacter*) 中发现并做了深入研究^[10-11]。1996 年 Pear 等人通过对棉纤维次生壁加厚高峰期的纤维 cDNA 克隆随机测序,从中筛选出 2 个编码蛋白的氨基酸序列,在次生壁加厚期优势表达,其作用可能与细菌 *celA* 相同,参与纤维素合成^[12]。*GhcelA1* 基因的克隆对利用 DNA 有义和反义的操纵技术改良棉花纤维品质,具有重大的商业意义^[13]。由于纤维素合酶基因在离体条件下活性很低,操作困难,以往虽然付出许多努力克隆与应用,但都未能成功。因此,本研究运用现代分子生物学技术克隆到棉纤维合酶的基因全长,并构建其系列植物表达载体,为转化棉花改良棉纤维品质和研究棉纤维中纤维素的合成机理奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验在中国科学院遗传与发育生物研究所完成。以柯字棉 312 为材料,利用改进的 CTAB 法,提取开花后 16、18、20、25、35 d 纤维的总 RNA^[14]。消化其中残留的 DNA 后,使用大连宝生物公司的 AMV 反转录试剂盒,Oligo(dT)₁₈ 为引物,37℃ 温浴 2 h,进行 RT-PCR 扩增,获得 cDNA 第一条链。

1.2 引物设计

1.2.1 设计两对供扩增 *GhcelA1* 基因的两段 cDNA 片段的引物。根据 GeneBank 上棉花纤维次生壁中纤维素合酶基因序列 U58283,设计 *GhcelA1*-I、II 引物:*GhcelA1*-L1:5'-GGGGTACCATGATGGAATCTGGGGTTCTCTGTTT -3';*GhcelA1*-R1:5'-GTAGCCAGGTCTCTTCTCTCTAGA -3';*GhcelA1*-L2:5'-CCTCGACTGGTTTACGTCTCTAGA -3';*GhcelA1*-R2:5'-ACGCGTCGACTCAACAATCAATGGAAATGCAGCTC -3'。

1.2.2 扩增 EGFP 全长引物。根据 *GhcelA1*cDNA 与 EGFP 序列特征设计:A1-EGFP-L3:5'-ACGCGTCGACATGGTGAGCAAGGGC

GAGGA-3'; A1-EGFP-R3: 5'-AACTGCAG(TCA)TTACTTGTACAGCTCGTCCA -3'。

设计一段反向重复序列的引物,用于构建 *GhcelA1*-RNAi 的引物:A1-L4:5'-GACTAGT-GTCGACATGATGGAATCTGGGGTT -3'; A1-R4:5'-GAAGATCTTCTAGATGCTGATATGTCTTGCATG-3'。

1.3 运用 PCR 扩增 *GhcelA1*-I、II 片段

分别以 *GhcelA1*-L1,R1;*GhcelA1*-L2,R2 为引物,从 cDNA 文库中扩增基因片段,50 μL 体系包括 10 × buffer, 0.2 mmol · L⁻¹, dNTP, 1.5 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 引物 0.2 μmol · L⁻¹, 1 U Taq DNA 聚合酶(上海生工)。PCR 反应程序为:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s,60℃ 45 s,72℃ 2 min,32 个循环,72℃ 延伸 10 min。

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,用上海生物工程公司的胶回收试剂盒回收目的 DNA,连接到该实验室提供的 PGEM-T easy 载体上,酶切鉴定后送三博生物公司测序。

1.4 植物表达载体的构建

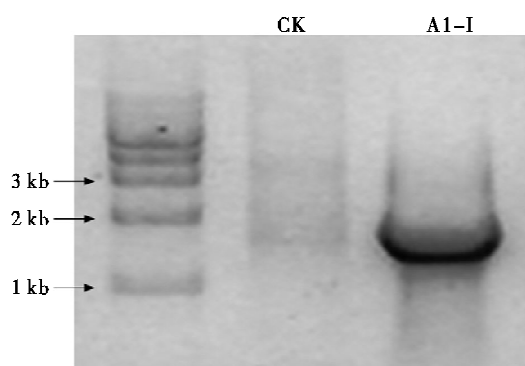
为研究与利用基因 *GhcelA1* 在棉花中的功能,将其构建在植物表达载体 pCAMB2300-35S 上。pCAMB2300-35S 为双元质粒载体,35S 启动子后没有连接目的基因,是本实验室专为连接新基因而制作的空载体。该载体在细菌与植物中的筛选标记都为 NPTII,即新霉素磷酸转移酶(Neomycin Phosphotransferase II)。

1.4.1 过表达载体的构建。将 *GhcelA1*-I、II 片段先后连接到本实验室保存的 pCAMB2300-35S 载体上,cDNA 全长酶切鉴定后送测序验证。

1.4.2 *GhcelA1*-EGFP 融合基因的构建。首先应用分别带有相同酶切位点的 EGFP 基因全长引物 A1-EGFP-L3,R3,从质粒载体 pEGFP PCR 扩增 EGFP 全长,酶切后连接到切除终止密码子 TCA,具同样酶切位点的 pCAM2300-35S-*GhcelA1* 中,获得 pCAM2300-35S-*GhcelA1*-EGFP 质粒。转化大肠杆菌 X-blu1 后,PCR 扩增 EGFP 全长鉴定连接效果。

1.4.3 EGFP 融合基因的表达。利用共聚焦荧光显微镜检测:将 pCAM2300-35S-*GhcelA1*-EGFP 转化农杆菌 AGL1,涂布于含卡那霉素和利福平抗生素的 LB 平板上,挑取单菌落至 LB 液体培养基,与棉花子叶共培养后,筛选诱导出抗卡那霉素(kanamycin)的愈伤。取少许涂在载玻片上,用

激光共聚焦荧光显微镜 (Zeiss LSM510), 在 488 nm 激发光下, 于 530 ± 30 nm 处观察 GFP 荧光。



第一泳道 CK 为无条带对照; 第二泳道 A1-I 为 *GhcelA1-I* 片段 (1289bp)。

图 1 以 cDNA 为模板 PCR 扩增 *GhcelA1-I*

Fig. 1 cDNA as template, *GhcelA1-I* fragment obtained by PCR amplifying

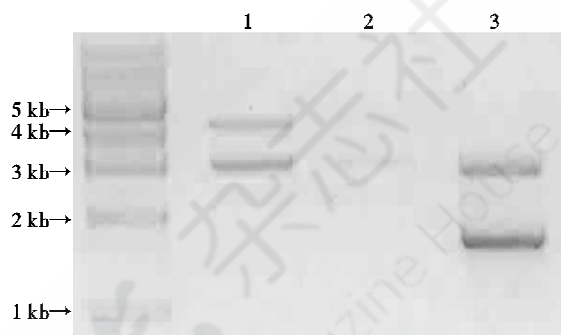
1.4.4 RNAi 载体的构建。以 A1-L4 和 A1-R4 为引物、*GhcelA1* cDNA 为模板应用 PCR 扩增, 获得一段两端分别带有中间载体 pUCCRNAi 中内外两对 *Spe* I + *Sal* I 和 *Xba* I + *Bgl* II 酶切位点的特异片段。分别双酶切扩增片段, 琼脂糖电泳回收后, 连接到用相同酶切的 pUCCRNAi 载体上的一段 199 bp 片段—马铃薯 GA20 氧化酶的第一个内含子的两端, 获得 pUCCRNAi 中间载体。然后以 *Pst* I 单酶切位点连接到 pCAMBIA2300-35S 植物表达载体上。用 *Bgl* II 和 *Xba* I 双酶切验证。

2 结果与分析

2.1 *GhcelA1* 基因全长及过表达载体的获得

分别以纤维伸长期末期及与次生壁增厚期重叠期、次生壁增厚期的 cDNA 为模板扩增 *GhcelA1-I, II*, 结果发现, 各时期材料中均能克隆到 *GhcelA1-I* 片段 (图 1), 与设计的引物所在序列的大小一致 1289 bp; 而 *GhcelA1-II* 片段仅在 18 和 20 d 的 cDNA 中扩增出来, 与 T 载体连接的质粒经 *Xba* I 与 *Sal* I 双酶切鉴定, 切割出了预期的约 1.7 kb 和

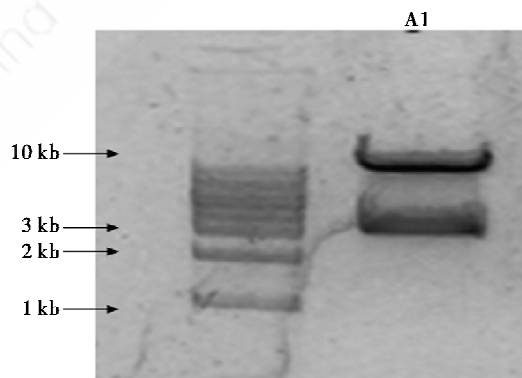
3.0 kb 两条带 (图 2)。将测序验证后的两个片段先后连接到植物表达载体 pCAMBIA2300-35S 上, 以 *Kpn* I 与 *Sal* I 双酶切鉴定, 琼脂糖凝胶电泳结果 (图 3) 显示: 与预测的两条泳带 3.07 kb 与 9.5 kb 大小相符。然后测序比对结果证明, 获得 *GhcelA1* cDNA 全长, 并且构建了 pCAMBIA2300-35S-*GhcelA1* 过表达载体 (图 4)。



泳道 3 为酶切结果大的条带是载体, 小的是 *GhcelA1-II* 片段。

图 2 *Xba* I 与 *Sal* I 双酶切验证 *GhcelA1-II* 片段连入 T-easy 载体结果

Fig. 2 Result of vector T-easy + *GhcelA1-II* digested with two enzymes *Xba* I and *Sal* I into two bands



A1: 大的条带是载体大小 9.5 kb; 小的条带是基因全长大小约 3.0 kb。

图 3 *Kpn* I、*Sal* I 双酶切过表达载体 pCAM2300-35S-*GhcelA1*, 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 3 Result of pCAM2300-35S-*GhcelA1* digested by *Kpn* I and *Sal* I

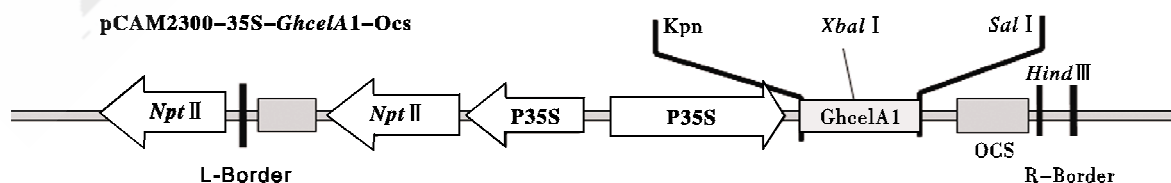


图 4 pCAM2300-35S-*GhcelA1* 载体图

Fig. 4 Map of plasmid pCAM2300-35S-*GhcelA1*

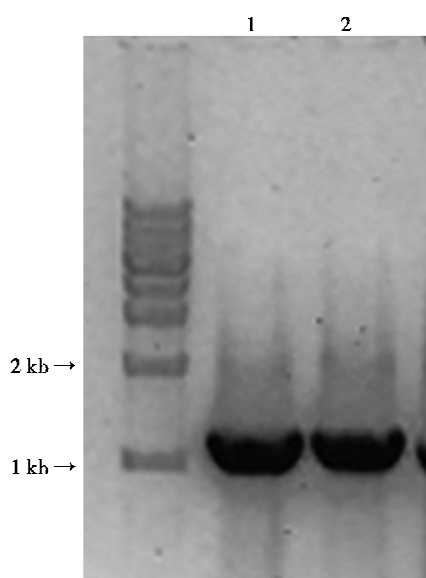


图 5 PCR 扩增获得 EGFP 片段

Fig. 5 EGFP fragment obtained by PCR amplifying

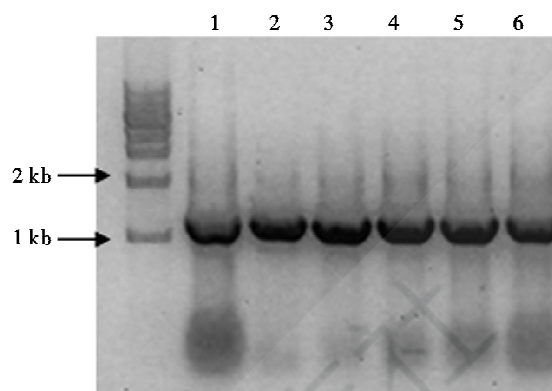
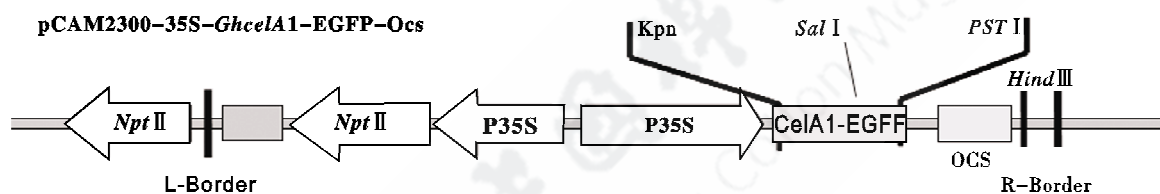
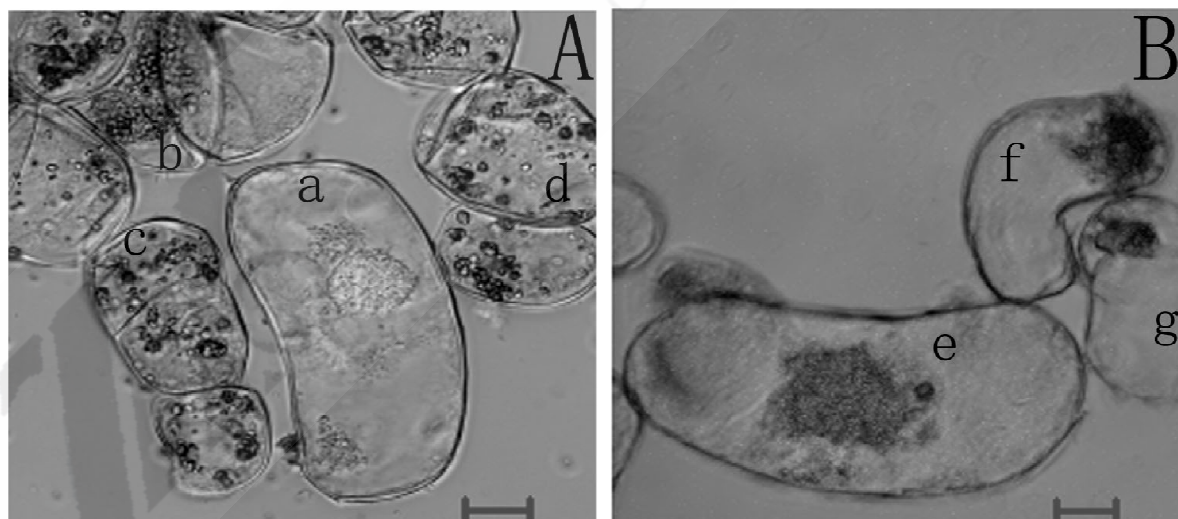


图 7 EGFP 与载体连接后的 6 个单克隆作为模板,

PCR 扩增 EGFP 片段的鉴定结果(约 1 kb)

Fig. 7 pCAM2300-35S-*GhcelA1*-EGFP as template, EGFP fragment (about 1 kb) amplified by PCR图 6 pCAM2300-35S-*GhcelA1*-EGFP 融合基因载体图谱Fig. 6 Map of pCAM2300-35S-*GhcelA1*-EGFPa, e 为有较强荧光的活细胞; b, f, g 为具较弱绿色荧光的接近死亡细胞; c, d 是没有荧光的已死亡细胞(标尺长度表示 20 μm)。图 8 pCAM2300-35S-*GhcelA1*-EGFP 融合基因载体在体细胞中的表达Fig. 8 The expression of pCAM2300-35S-*GhcelA1*-EGFP in lived somatic cell

2.2 与 EGFP 融合基因载体构建

将 PCR 扩增获得的 EGFP 片段(图 5)连入以绿色荧光蛋白为报告基因的重组表达质粒 pCAM2300-35S-*GhcelA1*-EGFP(图 6), PCR 扩

增鉴定获得约 1 kb 条带(图 7), 送测序比对结果吻合, 说明 *GhcelA1* 与 EGFP 融合基因连接无误。激光共聚焦荧光显微镜观察结果显示, 在融合基因的转化活细胞中, 在细胞核内有强绿色荧

光,近膜的内质网处有较弱表达,说明融合基因在棉花体细胞中成功整合并正确表达,荧光蛋白分布和定位在体细胞的核中及近内膜处(图 8)。

2.3 RNAi 基因功能载体构建

通过中间载体 pUCCRNAi 将棉纤维的纤维素合酶基因 cDNA 中的一段约 280 bp 长的序列(图 9)作为反向重复序列,构建基因 *GhcelA1* 干扰载体 pCAM2300-35S-*GhcelA1*-RNAi(图 10)。Big II 和 *Xba*I 双酶切结果经琼脂糖凝胶电泳证明,载体被切割为两条泳带(图 11):一条为正反义序列与 199 bp 内含子的和约 765 bp,另一条为载体大小约 9.5 kb,说明基因干扰载体构建成功,

可以继续植物转化与基因功能分析实验。

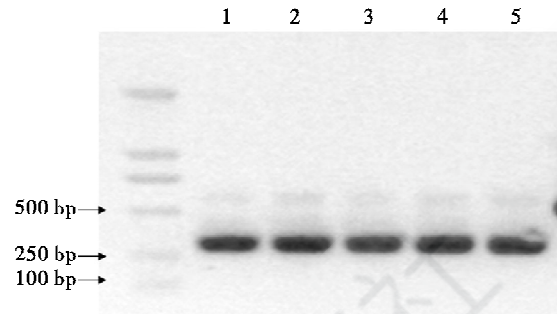


图 9 PCR 产物:用于构建 RNAi 载体的顺反重复序列(283 bp)
Fig. 9 PCR production; cis and reverse repeat sequence (283 bp) used for RNAi construction

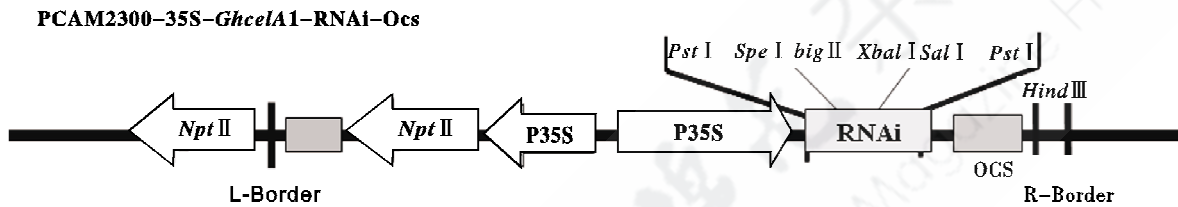
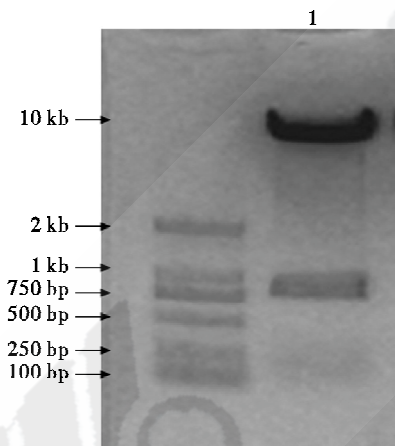


图 10 pCAM2300-35S-*GhcelA1*-RNAi 载体构建结果

Fig. 10 Map of plasmid pCAM2300-35S-*GhcelA1*-RNAi



1 中大的条带是载体大小 9.5 kb;下面小的条带是构成发卡结构的顺反重复序列 765 bp。

图 11 Big II 和 *Xba*I 双酶切
pCAM2300-35S-*GhcelA1*-RNAi 结果

Fig. 11 Result of pCAM2300-35S-*GhcelA1*-RNAi
digested by Big II and *Xba*I

3 讨论与结论

到目前为止已经成功克隆的直接调控棉纤维品质基因非常缺乏,严重限制了利用分子生物学改良棉纤维的潜力。Pear 等人的实验揭示了 *GhcelA1* 在纤维中的表达与功能推测,但是没有继续将其整合棉花基因组,为直接证明其表达与

功能提供证据。该实验利用分子克隆技术从 16、18、20、25、35 天的纤维材料中克隆 *GhcelA1* 基因的结果显示,所用材料均能克隆出 *GhcelA1*-I 片段,而 *GhcelA1*-II 仅能在 18、20 天的材料中克隆到,因此推测导致活性极低的序列可能存在于 *GhcelA1*-II 片段中,也是克隆不到 *GhcelA1* cDNA 全长的主要原因。

构建过表达载体,期望获得棉纤维中纤维素合成与积累得到改善的转基因棉花。虽然 35S 启动子是组成型表达,但 Holland 等对棉花、杨树、拟南芥及玉米的纤维素合酶进行了比较研究,结果表明,这些酶本身的某些特异性序列决定其在初生或次生细胞壁中表达,而并非单独由启动子决定^[15]。而棉纤维素合成酶基因 *GhcelA1* 在棉纤维的次生壁增厚期有强的表达,所以本实验试图通过促进纤维素合成酶基因在棉纤维中表达,能够促进纤维素的合成,从而增强纤维长度与强度,为改良棉纤维强度提供新的品质资源。

利用 EGFP 融合基因研究基因在活细胞中的定位多应用在动物、人类中^[16-17]。在棉花中这个方面的研究至今未见报道。本研究构建的 *GhcelA1*-EGFP 融合基因载体,与其它融合基因构建的要求相同,使目的基因 *GhcelA1* 与 EGFP 处在同一个表达阅读框内,并且互不影响对方的表达^[18],EGFP

的表达起到 *GhcelA1* 基因表达的定位作用。激光共聚焦荧光显微镜观察结果(图 8)显示:有活力的细胞具有绿色荧光,正常的活细胞为转化的阳性细胞具有强的表达,而逐渐衰亡与已经死亡的非转化细胞仅有较弱或没有荧光表达。因为所取材料生长在具抗生素的筛选培养基上,能够正常生长的细胞一定具有卡那抗性,同时含有绿色荧光的表达(图 8 中细胞 a 和 e),而没有转化细胞因为没有抗性逐渐死亡(细胞 b, c, d, f, g)。因此,绿色荧光可以作为判断转化与否的直观而简单方法。体细胞中绿色荧光表达在细胞核与质膜内侧,可能由于新生愈伤组织处于体细胞快速分裂,胚胎发生前未分化阶段,具有基因表达的阶段特异性。要研究基因 *GhcelA1* 在棉纤维中的定位,即组织特异性,有必要在体细胞分化后获得转基因棉株,观察与研究其纤维中荧光的分布。

另外利用 RNAi 技术研究基因功能方面的进展很快,在动植物中广泛应用,Liu 等利用 RNAi 技术下调棉花中两个主要脂肪酸脱氢酶基因的表达,说明了该基因具有降低棉子油中高油酸和高硬脂含量水平的功能^[19]。这些为利用 RNAi 技术研究调控棉纤维发育的基因功能提供了理论依据。pCAM2300-35S-*GhcelA1*-RNAi 载体的构建,希望看到由于纤维素合酶的沉默引起的纤维合成受阻,导致棉纤维伸长或增厚受抑制,纤维长度与强度降低的结果,从而说明该基因功能的重要性及特异性。Pear 等人的报道显示,celA1 特异表达在纤维伸长后期与次生壁增厚期,其它根、叶、花、果实以及纤维发育起始期和伸长前中期都没有表达。因此,将其 RNAi 载体转化棉花后,不会引起整个植株的系统性沉默,影响整个植株的正常生长发育。另外 celA1 家族基因中有 3~4 个同源基因,因此转化后有可能出现基因冗余现象,从而降低或完全弥补由于 celA1 所带来的沉默影响。

GhcelA1 的成功克隆与系列载体的构建,为改良棉纤维品质提供了新的品种资源,为深入纤维素合酶基因在棉纤维中的功能研究以及纤维素合酶三维结构模型假设^[20]的完善奠定了基础。

参考文献:

- [1] HAIGLER C H, Singh B, Zhang De-shui, et al. Transgenic cotton over-producing spinach sucrose phosphate synthase showed enhanced leaf sucrose synthesis and improved fiber quality under controlled environmental conditions [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 63:815-832.
- [2] LI Xiao, Wang Xue-de, Zhao Xiang-qian, et al. Improvement of cotton fiber quality by transforming the *acsA* and *acsB* genes into *Gossypium hirsutum* L. by means of *vacuum* infiltration [J]. *Plant Cell Rep*, 2004, 22:691-697.
- [3] 上官小霞,王凌健,李燕娥,等. 对转蚕丝芯蛋白轻链基因棉花的分析 [J]. *作物学报*, 2007, 33(5):697-702.
SHANGGUAN Xiao-xia, Wang Ling-jian, Li Yan-e, et al. Analysis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants transformed with a silkworm fibroin light chain gene[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33(5):697-702.
- [4] 张海平,王学德,邵明彦,等. 外源纤维素合酶基因对棉纤维品质的改良作用[J]. *棉花学报*, 2008, 20(2): 110-115.
ZHANG Hai-ping, Wang Xue-de, Shao Ming-yan, et al. Study on role of foreign cellulose synthase genes in improvement of cotton fiber quality [J]. *Cotton Science*, 2008, 20(2):110-115.
- [5] DELMER D P, Pear J R, Andrawis A, et al. Genes encoding small GTP-binding proteins analogous to mammalian Rac are preferentially expressed in developing cotton fibers [J]. *Mol Gen Genet*, 1995, 48:43-51.
- [6] JOHN M E, Crow L J. Gene expression in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fiber: cloning of the mRNAs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:5769-5773.
- [7] 郭旺珍,孙敬,张天真. 棉花纤维品质基因的克隆与分子育种 [J]. *科学通报*, 2003, 48(5):410-416.
GUO Wang-zhen, Sun Jing, Zhang Tian-zhen. Clone and molecular breeding of quality genes in cotton fiber [J]. *Science Bulletin*, 2003, 48(5):410-416.
- [8] HSIEH Y L, Hu X P, Wang A J. Single fiber strength variations of developing cotton fibers—strength and structure of *G. hirsutum* and *G. barbedense* [J]. *Textile Research Journal*, 2000, 70(8):682-690.
- [9] 武耀廷,张恒木,刘进元. 棉纤维细胞发育过程中纤维素的生物合成 [J]. *棉花学报*, 2003, 15(3):174-179.
WU Yao-ting, Zhang Heng-mu, Liu Jin-yuan. Cellulose biosynthesis in developing cotton fibers[J]. *Cotton Science*, 2003, 15(3):174-179.
- [10] SAXENA I M, Lin F C, Brown R M. Identification of a new gene in an operon for cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum* [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 16:947-954.
- [11] SAXENA I, Rown R M. Identification of a second

- cellulose synthase gene (*acsAII*) in *Acetobacter xylinum*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(18): 5276-5283.
- [12] PEAR J R, Kawoae Y, Schreckengost W E, et al. Higher plant contain homologs of the bacterial *celA* gene encoding the catalytic subunit of cellulose synthase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:12637-12642.
- [13] 张天真. 棉花纤维品质分子育种的现状及展望[J]. 棉花学报, 2000, 13(6):321-326.
ZHANG Tian-zhen. Present status and prospect of molecular breeding for cotton fiber qualities [J]. *Cotton Science*, 2000, 12(6):321-326.
- [14] 胡根海, 喻树迅. 利用改良的 CTAB 法提取棉花叶片总 RNA [J]. 棉花学报, 2007, 19(1):69-70.
HU Gen-hai, Yu Shu-xun. Extraction of high-quality total RNA in cotton leaf with improved CTAB method[J]. *Cotton Science*, 2007, 19(1):69-70.
- [15] HOLLAND N, Holland D, Helentjaris T, et al. A comparative analysis of the plant cellulose synthase *CesA* gene family [J]. *Plant Physiol*, 2000, 123(4): 1313-1324.
- [16] WANG Y, Wang G, Szalay A A. The *Renilla* luciferase-modified GFP fusion protein is functional in transformed cells[J]. *BioHydrogen*, 1999, 6: 493-499.
- [17] 王红, 赵蔚明, 周亚滨, 等. 人源化 *BPVL1-GFP* 融合基因的构建以及在哺乳动物细胞中的瞬时表达[J]. 山东大学学报: 医学版, 2003, 41(6):600-603.
WANG Hong, Zhao Wei-ming, Zhou Ya-bin, et al. Construction and transient expression in mammalian cells of humanized *BPVL 1-GFP* fusion gene[J]. *Journal of Shandong University: Health Sciences*, 2003, 41(6):600-603.
- [18] YU Ya, Szalay A A. A *Renilla luciferase-Aequorea GFP (ruc-gfp)* fusion gene construct permits real-time detection of promoter activation by exogenously administered mifepristone *in vivo* [J]. *Mol Genet* 2002, 268(2): 169-178.
- [19] LIU Q, Singh S, Green A. High-oleic and high-stearic cotton seed oils; nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing [J]. *Journal of the American College of Nutrition*, 2002, 21(3): 205S-211S.
- [20] DELMER D P. Cellulose biosynthesis; exciting times for a difficult field of study [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50:245-276. ●

◁235……(李汝忠,等)鲁棉研 21 号高产稳产的生物学特性研究

- KONG Fan-ling, Jiang Bao-gong, Zhang Qun-yuan, et al. Genetic improvements of cotton varieties in Huang-Huai Region in China since 1950s. I. Improvements on yield and yield components[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2000, 26(2):148-156.
- [8] BRIDGE R R, Meredith W R, Chism J F, et al. Comparative performance of obsolete varieties and current varieties of upland cotton[J]. *Crop Science*, 1971, 1: 29-32.
- [9] BRIDGE R R, Meredith W R. Comparative performance of obsolete and current cotton cultivars[J]. *Crop Science*, 1983, 23:949-952.
- [10] 谢志霞, 李存东, 孙红春, 等. 不同铃重类型棉花品种的源库特性与产量形成[J]. 棉花学报, 2007, 19(3): 189-193.
- XIE Zhi-xia, Li Cun-dong, Sun Hong-chun, et al. Relationship between yield formation and source-sink of cotton cultivars with different boll weight[J]. *Cotton Science*, 2007, 19(3):189-193.
- [11] 张永山, 郭香墨, 褚丽, 等. 转基因抗虫棉产量构成因素的研究[J]. 棉花学报, 2002, 14(4):223-226.
ZHANG Yong-shan, Guo Xiang-mo, Chu Li, et al. Studies on the component factors of yielding breeding in transgenic cotton[J]. *Cotton Science*, 2002, 14(4):223-226.
- [12] 喻树迅, 黄祯茂. 短季棉品种早熟性构成因素的遗传分析[J]. 中国农业科学, 1999, 23(6):48-54.
YU Shu-xun, Huang Zhen-mao. Inheritance analysis on earliness components of short season cotton varieties in *G. hirsutum*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1999, 23(6):48-54. ●