

棉花 *GhCCR4* 基因的瞬时表达研究

秦超,倪志勇,闫洪颖,吕萌,郝晓燕,范玲*

(新疆农业科学院核技术生物技术研究所,乌鲁木齐 830091)

摘要:利用棉纤维发育调控基因瞬时表达体系,分析目的基因在棉花纤维发育过程中可能存在的功能。实验构建了由 CaMV35S 启动子驱动的 pGUS-CCR4 融合瞬时表达载体,使用基因枪轰击法转化棉花胚珠,确定了转化 0 DPA 胚珠的最佳条件:轰击压力为 1350 psi,轰击距离为 9 cm,轰击次数为 2 次。GUS 组织化学染色结果表明,*GhCCR4* 基因在棉花纤维伸长期和次生壁增厚期持续表达。不同发育时期纤维长度测量结果发现,在 8 DPA 时转 *GhCCR4* 基因纤维长度和对照相比没有明显差别,但在 27 DPA 时纤维长度明显短于对照。纤维透射电镜切片观察发现,转 *GhCCR4* 基因的细胞次生壁与对照相比增厚达 17%。

关键词:瞬时表达;棉纤维;*GhCCR4*;透射电镜

中图分类号:S562.035.3 文献标识码:A

文章编号:1002-7807(2010)01-0010-07

Functional Analysis of *GhCCR4* Gene in the Epidermal Cells of Cotton Ovules

QIN Chao, NI Zhi-yong, YAN Hong-ying, LÜ Meng, HAO Xiao-yan, FAN Ling*

(Institute of Nuclear and Biological Technologies, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China)

Abstract: In this paper, the role of *GhCCR4* in cotton fiber development was examined. Because the generating of transgenic cotton needs a long period of time and the transformation efficiency is still low, transient expression assay system was chosen for test of *GhCCR4* function in cotton fibers by using cotton ovule culture and biolistic transformation techniques. Transient expression vector of cotton *GhCCR4* gene was constructed. The transient expression vector pGUS-CCR4 is driven by CaMV35S promoter with GUS reporter gene and *GhCCR4* gene. The result showed that the highest transformation efficiency of GUS was obtained when 0 day of anthesis (0 DPA) ovules were applied. The optimal conditions for bombardment include helium pressures of 1350 psi, distance of 9 cm and bomb times of twice. Histochemical staining showed that high level of *GhCCR4* gene expression was detected during the fiber rapid elongation stage and the fiber secondary wall thickening stage in cultured ovules. Measurement of fiber length in different developmental stage showed that the fiber length of the transgenic plants at the stage of 8 DPA was not different as comparing with that of the wild-type plants. However, the fiber length in the transgenic plants reduced 19% comparing with wild-type plants at the stage of 27 DPA. Transmission electron microscopy (TEM) demonstrated that the wall thickness of transgenic fiber increased by 17% of that of the wild type.

Key words: transient expression; cotton fiber; *GhCCR4*; TEM

棉花(*Gossypium hirsutum* L.)是我国乃至全世界最重要的经济作物之一^[1],是首要的纤维作物和重要的油料作物^[2]。棉纤维是由胚珠表皮细胞发育而形成的单细胞纤维,起始分化后迅速伸长,一般不再分裂,纤维细胞最终纤维长度可达其直径的数千倍^[3]。棉花纤维形成和发育过程可分为:纤维原始细胞分化和突起、初生壁伸长、次

生壁增厚和脱水成熟^[4]四个相互重叠的时期。棉花纤维发育是一个高度程序化的调控过程,纤维细胞形态结构改变伴随着细胞分化、膨胀和纤维素合成等多个生化过程,发育的各个时期都依赖一系列基因的协同表达^[5]。成熟的棉纤维由初生壁和次生壁组成,其中纤维素含量占 95%以上^[6]。因此,棉花是研究植物细胞伸长和细胞壁生长发

收稿日期:2009-03-16 作者简介:秦超(1983-),男,在读硕士研究生;*通讯作者, fanling@xaas.ac.cn.

基金项目:新疆自治区高技术研究发展计划项目(200611101),国家自然科学基金项目(30660088),国家“863”项目(2006AA10Z184)和农业部转基因重大专项课题(2009ZX08005-011B)

生的理想模型^[7]。

近年来,克隆与棉纤维次生壁加厚发育相关的基因,从分子水平改良棉纤维品质已成为主要研究方向^[8]。苯丙烷代谢途径是植物最重要的次生代谢途径之一^[9],肉桂酰辅酶 A 还原酶(Cinnamoyl-CoA Reductase, CCR)是苯丙烷代谢途径中的一个关键酶^[10],此酶可能对苯丙烷代谢途径的碳流具有潜在的调控作用^[11]。许多研究结果表明^[12-13],如果 CCR 的活性受到影响,肉桂酰辅酶 A 酯转化成相应的醛就受到影响,并影响植物形态的变化。Fan 等研究发现,在水逆境条件下,诱导 *ZmCCRs* 上调表达,加速细胞壁交联结构物质的积累,细胞壁的物理性能发生转变,强度和弹性增加^[14]。

本研究以 GUS 为报告基因^[15-16],采用棉花胚珠离体培养技术^[17]和基因枪转化法^[18],将本实验室克隆的一个 *GhCCR4* 基因(GenBank 登录号为 FJ376604)转入棉花纤维中,对棉纤维发育调控基因的瞬时表达体系进行了优化,并通过纤维长度测量和纤维透射电镜切片观察,分析了 *GhCCR4* 基因在棉花纤维细胞发育过程中的可能功能,旨在为从分子水平改良纤维品质提供候选目的基因,为研究棉花纤维发育调控的分子机理提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 植物转化受体的选择及材料预处理

植物转化受体材料为棉花品种新陆早 36 号(由石河子新疆农垦科学院棉花种质资源所提供)。以 0 DPA (day of anthesis, 开花当天) 和 2 DPA (days post anthesis, 开花后 2 天)的子房为外植体,75%乙醇表面灭菌 10 s,95%乙醇浸入处理 90 s 后,快速将子房火焰灼烧,无菌条件下剥离胚珠,分别接种于 BT (Besley & Ting) 培养基 [含 0.25% (W/V)Phytigel™] 平板上,培养皿直径 9 cm,每皿 10 个子房的胚珠(约 200 个胚珠),以供基因枪轰击用。

1.2 瞬时表达载体构建及重组质粒 DNA 的提取

实验所用瞬时表达载体 pGUS/N1a 由北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室朱玉贤教授惠赠,带有目的基因的克隆载体

pGEM-T-CCR4 为本实验室构建。

按质粒提取试剂盒(OMEGA 公司)说明书,提取含 *GhCCR4* 全长 cDNA 的 pGEM-T-CCR4 质粒。用 *Bam* HI 和 *Xba* I (NEB) 双酶切 pGEM-T-CCR4 质粒,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶回收试剂盒(TaKaRa)回收目的片段,将回收片段与相同酶切回收的 pGUS/N1a 瞬时表达载体连接。10 μ L 连接反应体系中含:5 μ L 2 倍连接反应缓冲液,2 μ L pGUS/N1a 线性载体(不超过 1 ng),2.5 μ L 插入片段(不超过 50 ng),0.5 μ L (1 μ g) T₄-DNA 连接酶(TaKaRa),置于 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α (TianGen),用氨苄青霉素筛选出白色阳性菌落,挑取 3~4 个克隆进行酶切鉴定,获得 pGUS-CCR4 瞬时表达载体。提取 pGUS-CCR4 重组质粒,用 *Bam* HI 和 *Xba* I 双酶切鉴定。用质粒提取试剂盒提取瞬时表达载体 pGUS-CCR4 质粒 DNA, -20 $^{\circ}$ C 保存,以供基因枪轰击使用。

1.3 基因枪法转化植物受体

DNA 的金粉包埋按照 Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System 的方法。取直径为 1 μ m 的金粉悬液 20 μ L (60 $g \cdot L^{-1}$),加入 6 μ L 质粒 DNA (1 $g \cdot L^{-1}$),50 μ L 无菌 CaCl₂ (2.5 $mol \cdot L^{-1}$),20 μ L 亚精胺(0.1 $mol \cdot L^{-1}$,过滤灭菌,现用现配),充分涡旋 10 min,冰上静置 1 min,12000 $r \cdot min^{-1}$,4 $^{\circ}$ C,离心 3 min,用 70%乙醇洗涤沉淀一次,无水乙醇洗涤一次,加入 60 μ L 无水乙醇,温和振荡悬浮金粉,取 10 μ L 上样轰击。

采用 Bio-Rad PDS-1000/He 基因枪进行轰击。轰击条件为:可裂膜压力分别为 1100 psi,1350 psi,轰击距离分别为 6 cm、9 cm,真空度为 28 In·Hg,轰击次数为每皿 2 次处理。每处理重复 3 次。以未轰击的材料 GUS 染色为阴性对照。

1.4 棉花胚珠的离体培养

基因枪轰击后的胚珠,样品在无菌条件下立即转入新鲜的 BT 液体培养基上(转接过程中操作要小心,使胚珠漂浮于培养基表面,尽量使胚珠被轰击面朝上)。培养基激素配比为 1 μ mol·L⁻¹ 的 GA₃ 和 5 μ mol·L⁻¹ 的 IAA,32 $^{\circ}$ C,暗培养。9 d 后,将发育正常胚珠转接到新鲜的 BT 培养基中。取培养 12 h、2 d、8 d、15 d、27 d 等不同时期的纤

维进行 GUS 组织化学染色分析。

1.5 GUS 组织化学染色

GUS 组织化学检测参照 Jefferson^[15] 和 Leslie^[16] 的方法进行。染色材料在 90% 的丙酮中固定 15~20 min。使用缓冲液(100 mmol·L⁻¹ 磷酸钠缓冲液 pH 7.0, 0.5 mmol·L⁻¹ 亚铁氰化钾, 0.5 mmol·L⁻¹ 铁氰化钾)浸泡漂洗后, 加入 GUS 染液 [100 mmol·L⁻¹ 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 10 mmol·L⁻¹ EDTA, 0.5 mmol·L⁻¹ 亚铁氰化钾, 1 mmol·L⁻¹ X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid), 0.1% Triton X-100, 0.5 mmol·L⁻¹ 铁氰化钾], 真空抽气 5 min, 于 37 °C 振荡培养 4~6 h, 4 °C 过夜培养, 在体视显微镜 (Motic DM-142) 下观察照相。

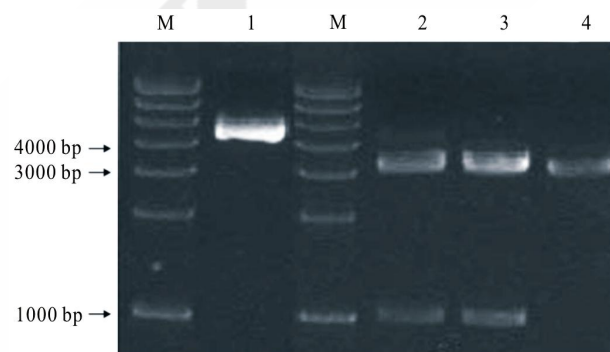
1.6 棉花纤维长度的测量

纤维长度的数字化测量: 离体胚珠在培养基中培养 27 d 后基本上停止伸长发育^[9]。将不同时期生长正常的胚珠取出, 用高压水流冲洗胚珠表面, 将纤维冲直, 拍照 (Nipon D-200) 并利用 Adobe Photoshop 图像处理软件测量纤维长度, 重复 3 次。

$$L_f(m^2) = [(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2]^{1/2} / DPC,$$

式中 $L_f(m^2)$ 表示纤维长度, (x_1, y_1) 为纤维起始端坐标, (x_2, y_2) 为纤维终点端坐标, DPC 为每厘米的像素数。

数据采用 Excel 软件进行统计分析。



M: 1 kb marker; 1: pGEM-T-CCR4; 2~3: 双酶切 pGEM-T-CCR4; 4: pGEM-T Easy.

图 1 *Bam* HI 和 *Xba* I 酶切鉴定 pGEM-T-CCR4
Fig.1 Identification of recombinant plasmid pGEM-T-CCR4 digested by restriction enzyme *Bam* HI and *Xba* I

1.7 透射电镜观察

将 GUS 染色显蓝色的 27 DPA 纤维用含 3% 戊二醛的磷酸缓冲液 (0.2 mol·L⁻¹, pH 7.2) 在 0~4 °C 固定 2 h 以上; 用磷酸缓冲液漂洗 3 次, 每次 10 min; 然后分别经 30%、50%、70%、80%、90% 的乙醇梯度脱水各 15 min, 100% 乙醇脱水 30 min; 再通过叔丁醇置换、冷冻干燥仪干燥、锇酸固定, 石英刀切片。制备好的切片在 Model S-3000N (Hitachi, Japan) 透射电镜下观察并照相, 以未轰击的材料制片为阴性对照。

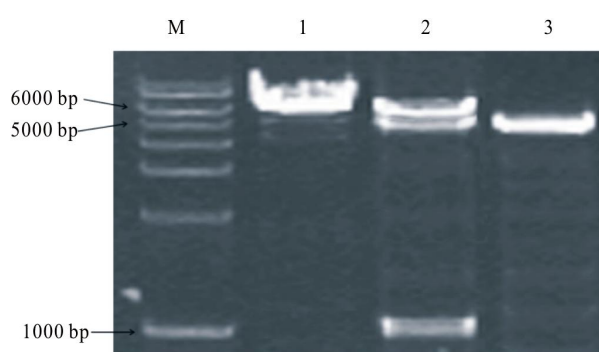
2 结果与分析

2.1 pGUS-CCR4 瞬时表达载体的构建和酶切鉴定

用 *Bam* HI 和 *Xba* I 酶切 pGEM-T-CCR4 质粒 (图 1), 酶切后产生大约 3015 bp 的 pGEM-T 载体片段和 1017 bp 的 *GhCCR4* cDNA 目的片段。凝胶回收 *GhCCR4* 目的条带, 与经相同酶切回收的 pGUS/N1a 载体连接, 获得 pGUS-CCR4 瞬时表达载体。提取 pGUS-CCR4 重组质粒, 用 *Bam* HI 和 *Xba* I 酶切鉴定。由图 2 可见, 酶切后产生 1017 bp 的 *GhCCR4* 目的片段和大约 5000 bp pGUS/N1a 载体片段, 说明 pGUS-CCR4 瞬时表达载体构建成功。

2.2 基因枪转化条件的选择

轰击开花当天的胚珠, 在培养基中培养 2 d



M: DL5000 marker; 1: pGUS-CCR4 质粒对照; 2: 双酶切 pGUS-CCR4; 3: pGUS.

图 2 *Bam* HI 和 *Xba* I 酶切鉴定 pGUS-CCR4
Fig.2 Identification of recombinant plasmid pGUS-CCR4 digested by restriction enzyme *Bam* HI and *Xba* I

后,胚珠进入纤维起始期,这时进行 GUS 组织化学染色,并计算转化率(表 1)。结果表明,分别使用轰击压力为 1100 psi 和 1350 psi 的可裂膜,在压力为 1350 psi 时的胚珠转化率较压力为 1100 psi 时明显提高(表 1)。采用不同的轰击距离试验,当轰击距离为 6 cm 时,瞬间表达蓝点数量较轰击距离为 9 cm 时明显较少(F 检验,0.05 置信区间)。综合各因素,将轰击压力设定为 1350 psi、轰击距离设定为 9 cm、轰击次数设为 2 次时转化率最高。使用基因枪转化 0 DPA 棉花胚珠的最佳条件轰击 2 DPA 的胚珠,转化量为 $0.013 \text{ 个} \cdot \text{皿}^{-1}$,转化率为 $7.1 \text{ 个} \cdot \text{胚珠}^{-1}$ 。与 0 DPA 的胚珠对

比,2 DPA 的胚珠转化率较低。

2.3 基因在棉纤维细胞中的瞬时表达

为明确 *GhCCR4* 融合的 GUS 基因在转基因胚珠中的表达状况,进一步培养胚珠,对 GUS 着色的种子进行发育后期观察。显微观察 GUS 组织化学染色结果发现,0 DPA 的胚珠在基因枪轰击后 12 h 即可检测到 GUS 表达活性(图 3B),2 d 时转化细胞数量最多(图 3C)。在随后的各个时期均可检测到 GUS 表达活性(图 3E),这些结果说明 *GhCCR4* 基因在棉花纤维伸长期和次生壁增厚期持续表达。这与 *GhCCR4* 基因在棉纤维中的表达水平分析是一致的(数据未显示)。

表 1 不同轰击压力和轰击距离对棉花纤维 GUS 表达的影响

Table 1 The effects of bombardment on GUS transient expression under various

Helium pressures and different distances

轰击压力 /psi	轰击距离 /cm	轰击胚珠数	转化胚珠个数	转化量 / (个·皿 ⁻¹)	转化率 / (个·胚珠 ⁻¹)
1100	6	117	6	0.051	2.3
1100	9	99	37	0.374	12.9
1350	6	147	7	0.047	3.0
1350	9	159	61	0.384	18.5

注:转化量 = 转化胚珠个数 / 培养皿中的胚珠总数,转化率 = 蓝色斑点数 / 一个视野内已转化胚珠数。

2.4 目的基因对纤维长度的影响

为了分析 *GhCCR4* 基因是否对棉花纤维伸长产生影响,利用图像数字化处理技术对转 *GhCCR4* 基因和未转基因的对照胚珠纤维长度进行测量,数据统计的结果表明(图 4),在 8 DPA 时,转 *GhCCR4* 基因和未转基因的对照胚珠纤维长度没有明显差别。在 27 DPA 时,未转基因的对照胚珠纤维平均长度为 0.86 cm,而转 *GhCCR4* 基因胚珠纤维平均长度为 0.70 cm,明显短于对照。显著性 F 检验表明,二者之间在 1% 水平上存在极显著差异。这个结果说明,*GhCCR4* 基因可能对棉花纤维的伸长起抑制作用,可能是由于 *GhCCR4* 基因参与细胞壁次生壁代谢途径,使次生壁增厚,进而影响了棉花纤维的伸长(注:数据和样品标准差来源于 25 个不同纤维的测量结果)。

2.5 目的基因对次生壁厚度的影响

为分析 *GhCCR4* 基因是否对细胞壁次生壁发育有影响,将有 GUS 活性的纤维制做切片观

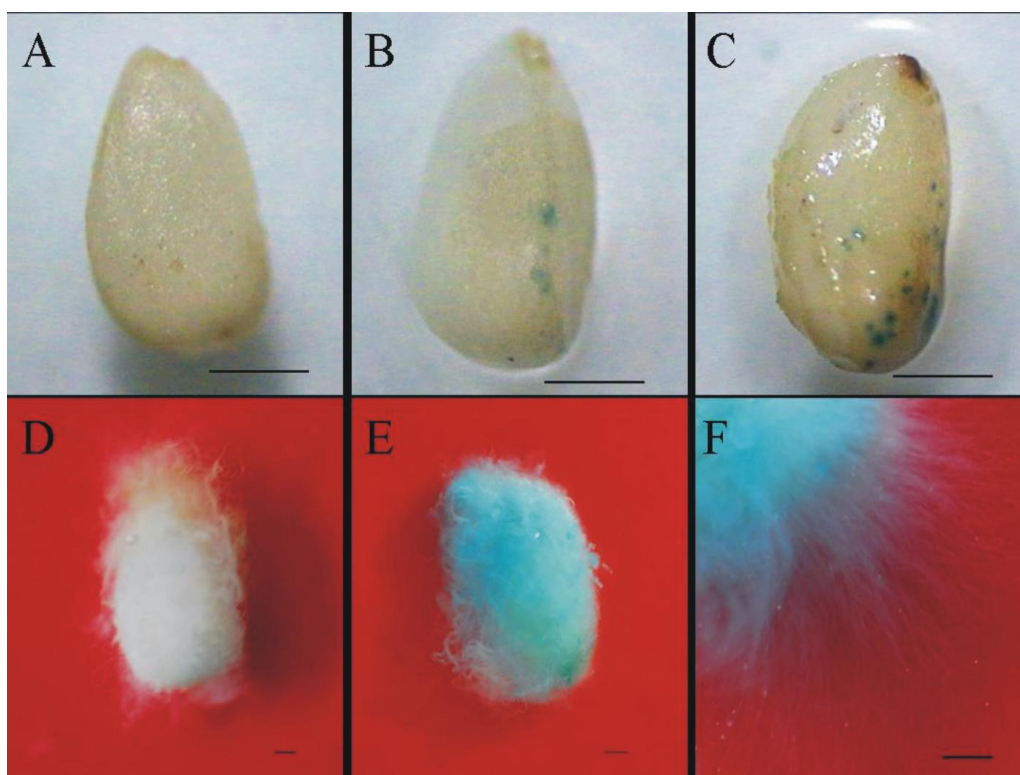
察。透射电镜观察发现,对照棉纤维细胞内只有一个大液泡,液泡化非常明显,胞质被挤向胞壁边缘,细胞几乎呈空心化状态(图 5A、6C)。而转 *GhCCR4* 基因的纤维细胞内的细胞器基本上已经消失,液泡破裂,只剩下内质网遍布于整个细胞(图 5B、5D)。27 DPA 为纤维细胞壁增厚期,正常纤维伸长期在这时才结束,而转 *GhCCR4* 基因的纤维细胞则提前结束伸长期。细胞壁厚度测量结果显示(表 2),处理的细胞壁次生壁与对照相比增厚达 17%。这些结果说明,*GhCCR4* 基因对细胞壁次生壁发育有一定影响,能够使次生壁在一定程度上增厚。

表 2 纤维细胞壁厚度测量

Table 2 Measurement of wall thickness of fibers

样品	对照	转化细胞
细胞壁厚度 / μm	2.05 ± 0.14	2.24 ± 0.14

注:使用扫描电镜测量纤维细胞壁厚度;数据和样品标准差来源于 11 个不同细胞的测量结果。



A:未轰击培养 12 h,B:轰击后 12 h,C:轰击后 2 d 纤维起始期,D:未轰击培养 27 d,E-F: 轰击后 27 d 纤维细胞壁增厚期;A、B、C 图中的标尺为 500 μm ,D、E、F 图中的标尺为 2 mm。

图 3 GUS 组织化学染色

Fig.3 Histochemical assays for GUS expression in cultured ovules bombarded by pGUS-CCR4

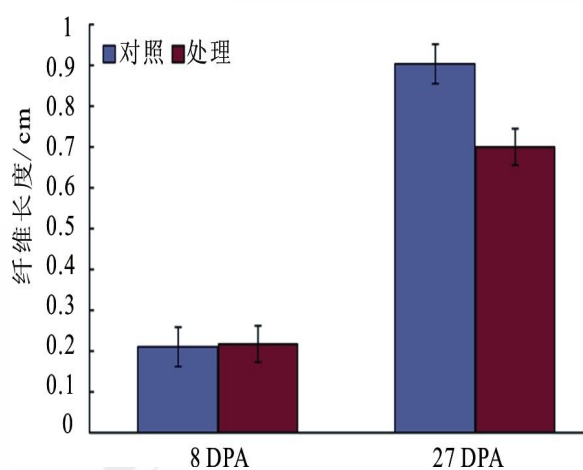
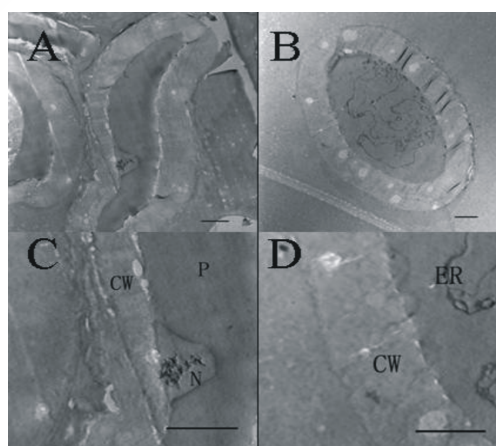


图 4 不同处理间纤维长度比较

Fig.4 Quantitative measurement of fiber length of wild-type and GhCCR4 ovules in different period



A:对照,B:转化纤维,C:对照局部,D:转化纤维局部, N:细胞核,P:液泡,CW:细胞壁,ER:内质网;图中的标尺为 2 μm 。

图 5 棉纤维细胞壁结构观察

Fig.5 Effects of the GhCCR4 on secondary wall thickness of fibers under a transmission electron microscope

3 讨论

3.1 影响基因枪转化效率的因素

基因枪转化效率主要受三方面因素的影响,即受体的生理状态、携带有目的 DNA 的微弹的性状和轰击时的物理参数^[20]。Kim^[17]和于晓玲^[21]分别独立选取不同受体材料和基因枪转化参数来提高转化效率。本研究选取不同压力(1100 psi 和 1350 psi)的可裂膜和不同的轰击距离(9 cm 和 6 cm)轰击 0 DPA 的胚珠。GUS 基因转化率分析发现,1350 psi 轰击 0 DPA 的棉花胚珠转化效率较高,这与 kim 等人的研究结果相同。轰击距离选取 9 cm 时转化效率较高,这与 kim 和于晓玲的研究结果一致。一般认为,生理活性高的组织或细胞有利于外源 DNA 的摄入与整合,选用再生能力强的外植体作为转化受体,在轰击前预培养一段时间,可明显提高转化率。胚珠的发育主要依靠的是不同激素的配比,0 DPA 和 2 DPA 的胚珠都可以漂浮在培养基表面,产生正常的纤维。本研究发现,0 DPA 的胚珠相比 2 DPA 的胚珠转化效率较高,纤维细胞后期大范围出现蓝色。轰击前预培养 1 h,转化率显著较高。质粒 DNA 的浓度越高,越容易使微弹粘结成团而降低转化率,本实验采用的 DNA 浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。综合以上因素,本研究认为,选取 1350 psi 的压力膜,轰击距离为 9 cm,轰击 2 次的 0 DPA 棉花胚珠转化效率较高。

3.2 *GhCCR4* 基因对棉花纤维伸长和次生壁发育影响的可能机制

纤维细胞的扩展是初生细胞壁结构松弛与液泡膨压相互作用的结果,这两个细胞过程涉及到许多生物合成与代谢途径。为了适应纤维细胞在膨压作用下向外扩展的需要,植物细胞中一系列与细胞壁发育相关的基因逐步得到表达,其中一些基因通过松弛或剪切棉纤维细胞中的结合物从而改变细胞壁的可伸展性,如 expansin 超基因家族^[22], β -1,4-内葡聚糖酶^[23]等;另外一些基因则参与合成大量的细胞壁结构成分。肉桂酰辅酶 A 还原酶是苯丙烷代谢途径中的关键酶类,在细胞壁次生发育阶段发挥作用^[10]。本研究发现,*Gh-*

CCR4 基因在棉花纤维伸长期和次生壁增厚期持续表达。*GhCCR4* 基因在纤维中的表达能够引起纤维细胞壁在一定程度上增厚,导致纤维伸长期提前结束,转化 *GhCCR4* 基因的纤维长度相比对照也较短。棉纤维发育的一个重要特点是纤维伸长期与次生壁增厚期存在相互重叠的区域(花后 16~20 d)。细胞伸长必需在次生壁增厚之前完成,*GhCCR4* 基因能够引起细胞壁次生壁增厚,增厚的次生壁细胞阻止纤维细胞的继续伸长。*GhCCR4* 基因在棉花纤维发育过程中的作用,仍需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] BALTAS M, Lapeyre C, Bedos-Belval F, et al. Kinetic and inhibition studies of cinnamoyl-CoA reductase 1 from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2005, 43 (8): 746-753.
- [3] BASRA A S, Malik C P. Development of cotton fiber [J]. International Review of Cytology, 1984, 89: 65-113.
- [4] 张 辉,汤文开,谭 新,等. 棉纤维发育及其相关基因表达调控研究进展[J]. 植物学通报, 2007, 24 (2): 127-133.
ZHANG Hui, Tang Wen-kai, Tan Xin, et al. Progresses in the study of gene regulation of cotton fiber development[J]. Chin Bull Bot, 2007, 24 (2): 127-133.
- [5] 郭 瑛,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.
GUO Ying, Guo Wang-zhen, Zhang Tian-zhen. Cloning and characterization of a novel cotton fiber expressed protein (*GhCFE*) cDNA[J]. Cotton Science, 2006, 18 (2): 67-73.
- [6] ITOH T. Fine structure and formation of cell wall of developing cotton fiber[J]. Wood Research, 1974, 56: 49-61.
- [7] 张燕洁,朱一超,郭旺珍,等. 棉纤维发育相关基因 *GhCHS*、*GhCPI* 的克隆与鉴定[J]. 棉花学报, 2009, 21 (1): 10-16.
ZHANG Yan-jie, Zhu Yi-chao, Guo Wang-zhen, et al. Cloning and characterization of *GhCHS* and *GhCPI* which related with fiber development in *Gossypium hirsutum* L.[J]. Cotton Science, 2009, 21 (1): 10-16.
- [8] 秦洽翔,杨佑明,张春华,等. 棉纤维次生壁增厚相关基因的 cDNA 克隆与分析[J]. 作物学报, 2003, 29 (6): 860-866.
QIN Zhi-xiang, Yang You-ming, Zhang Chun-hua, et al.

- Cloning and analysis of cDNA related to the genes of secondary wall thickening of cotton(*Gossypium hirsutum* L.) fiber[J]. Acta Agronomica Sinica, 2003, 29 (6) : 860-866.
- [9] BOB B B, Wilhelm G, Russell L J. Biochemistry and molecular biology of plants [M]. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000 : 1057-1061.
- [10] GOUJON T, Ferret V, Mila I, et al. Down-regulation of the *AtCCR1* gene in *Arabidopsis thaliana*: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability[J]. Planta, 2003, 217(2) : 218-228.
- [11] JONES L, Ennos A R, Turner S R. Cloning and characterization of irregular xylem4 (*irx4*): a severely lignin-deficient mutant of *Arabidopsis*[J]. Plant Journal, 2001, 26 (2): 205-216.
- [12] GAELLE P, Matthieu C, Catherine L, et al. Simultaneous down-regulation of caffeic/5-hydroxy ferulic acid-O-methyltransferase I and cinnamoyl co-enzyme A reductase in the progeny from a cross between tobacco lines homozygous for each transgene consequences for plant development and lignin synthesis[J]. Plant Physiology, 2001, 5(126) : 145-155.
- [13] POKE F S, Vaillancourt R E, Elliott R C, et al. Sequence variation in two lignin biosynthesis genes, cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase 2 (CAD2)[J]. Molecular Breeding, 2003, 12 : 107-118.
- [14] FAN Ling, Linker R, Gepstein S, et al. Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics[J]. Plant Physiology, 2006, 140 (2) : 603-612.
- [15] JEFFERSON R A. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1987, 5 : 387-405.
- [16] SIEBURTH L E, Meyerowitz E M. Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically[J]. Plant Cell, 1997, 9 (3) : 355-365.
- [17] KIM H J, Williams M Y, Triplett B A. A novel expression assay system for fiber-specific promoters in developing cotton fibers [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2002, 20 : 7-18.
- [18] TIWARI S C, Wilkins T A. Cotton (*Gossypium hirsutum*) seed trichomes expand via diffuse growing mechanism[J]. Canadian Journal of Botany, 1995, 73 : 746-757.
- [19] HARMER S E, Orford S J, Timmis J N. Characterisation of six alpha-expansion genes in *Gossypium hirsutum* (upland cotton) [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2002, 268(1) : 1-9.
- [20] 于 娅, 刘传亮, 马峙英, 等. 基因枪转化技术在棉花遗传转化上的应用[J]. 棉花学报, 2003, 15 (4) : 243-247.
YU Ya, Liu Chuan-liang, Ma Zhi-ying, et al. Application of particle bombardment in genetic transformation of cotton [J]. Cotton Science, 2003, 15 (4) : 243-247.
- [21] 于晓玲, 崔百明, 卫海滨, 等. 基因枪转化法在棉纤维细胞中瞬时表达外源基因的研究[J]. 棉花学报, 2007, 19(6): 419-423.
YU Xiao-ling, Cui Bai-ming, Wei Hai-bin, et al. Study on transient expression of target gene in the epidermal cells of cotton ovules via particle bombardment [J]. Cotton Science, 2007, 19 (6) : 419-423.
- [22] RUAN Y L, Llewellyn D J, Furbank R T, et al. The delayed initiation and slow elongation of fuzz-like short fibre cells in relation to altered patterns of sucrose synthase expression and plasmodesmata gating in a lintless mutant of cotton [J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56(413): 977-984.
- [23] PATTEN A M, Cardenas C L, Cochrane F C, et al. Reassessment of effects on lignification and vascular development in the *irx4 Arabidopsis* mutant[J]. Phytochemistry, 2005, 66(17):2092-2107. ●