

早熟棉转基因研究进展

刘圆¹, 肖娟丽¹, 张安红^{1,2}, 王志安¹, 赵战胜³, 罗晓丽^{1,2*} (1. 山西农业大学棉花研究所, 山西运城 044000; 2. 棉花种质资源利用与分子设计育种山西省重点实验室, 山西运城 044000; 3. 新疆生产建设兵团第六师农业科学研究所, 新疆五家渠 831300)

摘要 早熟棉在我国棉花生产中占有很大的比重(75%以上), 常年连作造成了病虫害的发生和棉田杂草危害日趋严重, 通过基因工程解决这些问题迫在眉睫。根据国内近30年早熟棉体细胞再生研究和早熟棉转基因研究进展, 遴选出能够作为早熟棉转基因受体的优选品种, 从筛选早熟棉高频再生纯合系作为转基因受体和建立农杆菌介导的早熟棉高效转化体系2个方面对早熟棉转基因研究提出了展望, 为创制抗病虫、抗除草剂、抗旱和耐盐碱的早熟棉新种质奠定基础。
关键词 早熟棉; 体细胞胚胎发生; 再生纯合系; 高效转化体系
中图分类号 S562 **文献标识码** A
文章编号 0517-6611(2022)20-0001-04
doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.20.001



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Research Progress of Transgenic of Early Maturing Cotton

LIU Yuan¹, XIAO Juan-li¹, ZHANG An-hong^{1,2} et al (1. Institute of Cotton Research, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng, Shanxi 044000; 2 Shanxi Key Laboratory of Cotton Germplasm Resources Utilization and Molecular Design Breeding, Yuncheng, Shanxi 044000)

Abstract Early maturing cotton accounts for a large proportion (more than 75%) in China's cotton production, perennial continuous cropping has caused the occurrence of diseases and pests and the increasingly serious harm of weeds in cotton fields. It is urgent to solve these problems through genetic engineering. Based on the research progress of somatic cell regeneration and transgenic of early maturing cotton in China in recent 30 years, the preferred varieties that can be used as transgenic receptors for early maturing cotton were selected, the prospect of transgenic research on early maturing cotton was put forward from two aspects: screening high-frequency regenerated homozygous lines of early maturing cotton as transgenic receptors and establishing efficient transformation system of early maturing cotton mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, it lays a foundation for creating new germplasm of early maturing cotton with disease and insect resistance, herbicide resistance, drought resistance and salt tolerance.
Key words Early maturing cotton; Somatic embryogenesis; Regeneration of homozygous lines; Efficient transformation system

早熟棉是适宜缓解当前粮棉争地、植棉面积逐渐减少现状的一种棉花类型, 其最主要的特点是生育期短、适于晚春播、初夏播或夏播, 可以与冬小麦、油菜等冬季作物实现粮棉一年两熟, 提高复种指数, 在增加粮食产量、保证粮食安全的同时, 确保棉花的种植面积及产量, 为国家农业战略的实施提供坚实的基础^[1-2]。在春季气温低、秋季气温下降快、光热条件差、降水少的西北内陆地区, 丘陵、山区较多且无霜期较短的华北地区, 如辽宁、新疆、甘肃、内蒙古等地种植早熟棉还可以提高棉花的霜前花率, 改善棉花品质^[3]。尤其是新疆位于温带大陆性气候区, 夏季降水少, 多晴天, 昼夜温差大; 纬度较高, 夏季白昼较长, 光照充足; 位于塔里木盆地边缘山麓地带, 高山冰雪融水丰富, 灌溉便利; 多沙质土壤, 透气性好, 有利于棉花生长; 收获季节多晴朗天气, 有利于棉花采摘; 冬季气温低, 有利于杀死棉花病虫害。这些得天独厚的光、热资源等便利条件, 使得新疆棉花以色泽洁白、纤维品质好而深受棉纺织企业和消费者青睐。自20世纪90年代中期以来, 以新疆为主产区的西北内陆棉区成为全国优势产区, 据国家统计局数据, 2015年以来, 新疆棉花播种面积常年占全国播种面积的60%以上, 2019年达到76%, 2020年新疆

棉花产量占全国总产量的87.3%^[4-6]。新疆南北疆共有37个主要棉地, 其中北疆21个以种植早熟棉品种为主, 南疆16个以种植中早熟棉品种为主。
由于新疆地处西北内陆, 常年降雨较少, 并且耕地普遍有不同程度的沙化, 与之伴随而来的盐碱化和次生盐碱化现象较为严重; 此外常年连作造成了病虫害的发生和棉田杂草危害日趋严重, 极大地限制了新疆棉花种植业的发展。因此, 生产上急需高产优质, 同时兼具抗旱、耐盐碱和抗病虫害的早熟棉花新品种。而通过常规的育种手段在短时间内是很难实现的。因此, 培育优良的早熟棉品种, 对优化种植结构, 提高种植效益具有重要的意义。随着生物技术的快速发展, 通过基因工程手段解决上述问题成为了可能。例如, 我国在转基因棉花的研究中已经取得了较大的成绩, 转基因抗虫棉花已经得到大规模的应用^[7-14]。转基因棉花大部分为农杆菌介导转化, 这就离不开棉花的组织培养和体细胞胚胎发生, 但棉花体细胞胚胎发生受基因型限制^[15-16], 阻碍了生物技术在棉花遗传改良中的广泛应用和迅速发展。
早熟棉的体细胞胚胎发生受基因型限制尤其严重, 目前国内转基因棉花的受体亲本大部分是生育期在180 d以上的中熟棉, 具有目标性状的转基因中熟棉和优良早熟棉进行杂交转育, 存在花期不遇的现象, 如通过栽培调整花期后杂交转育成功, 则后代出现生育期延长不能在早熟棉区种植, 这种现象阻碍了生物技术在早熟棉遗传改良中的广泛应用和迅速发展, 在棉花转基因工程的研究中, 除了分离、克隆目标基因, 构建高效表达载体等技术外, 从适用于大田生产上广

基金项目 山西省科技合作交流专项(202104041101048); 运城市农业科学合作研究院科技攻关项目(2021YNGG09); 新疆生产建设兵团第六师科技局项目(1901)。
作者简介 刘圆(1989—), 女, 山西阳泉人, 研究实习员, 硕士, 从事棉花基因工程研究。*通信作者, 研究员, 从事棉花基因工程研究。
收稿日期 2022-04-27

泛使用的早熟棉中筛选体细胞能够再生的品种,通过组织培养技术和常规育种技术筛选出体细胞胚胎高频再生的受体材料,建立一套广为适用的早熟棉组织培养快速再生体系是早熟棉转基因成功的关键因素,因此相关学者在早熟棉体细胞再生方面做了大量的研究工作,并取得了可喜的成绩。但是能够体细胞再生的早熟棉种质资源很少,所以拓展早熟棉花再生基因型、筛选高频再生品(种)系或株系,对于早熟棉花基因工程具有重要意义。

该研究对我国近年来早熟棉体细胞再生和早熟棉转基因研究的进展做了总结,遴选出了能够候选为转化受体的早熟棉优良品种,并对早熟棉转基因研究提出了展望,以期为创制抗病虫、抗除草剂、抗旱和耐盐碱的早熟棉新种质奠定基础。

1 国内早熟棉体细胞再生研究进展

自张宝红等^[17]将泗棉3号进行组织培养,获得了具有高频胚胎发生的愈伤组织、胚状体和小植株后,朱生伟等^[18]以陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)新疆推广品种“新陆早4号”进行体细胞再生研究并在6~7个月获得了再生植株。于娅等^[19]以陆地棉“中棉所24”为材料进行了全固体体细胞培养,获得了愈伤组织和再生植株。王芳等^[20]对新疆2个陆地棉品种新陆早1号、新陆早7号的胚状体发生及植株再生进行研究,结果表明胚状体发生、萌发、成苗各阶段,品种间存在明显差异。正常植株率最高分别达65.7%、85.7%。周小凤等^[21]以15个新疆主栽优良品种(系)以及2个对照品种ZY-1和Y668为研究对象,利用下胚轴做外植体进行胚胎发生能力的比较研究,筛选出5个能够胚胎发生的基因型,即新陆早12、新陆早17、新陆早22、新陆早32和新陆早33,其中新陆早32和新陆早33能在3个月左右分化,且分化率较高,可达90%左右,具备作为棉花优良遗传转化受体的基本特征。

陈天子等^[22]以新疆4个主栽棉花品种新陆中20、新陆早24、新陆早33和03298为材料,通过不同浓度的激素组合成功地诱导获得了体细胞胚并在6~8个月内获得了再生植株。严勇亮等^[23]以新疆棉区的新陆中15号、新陆中18号、系9、黄河流域棉区的中棉所35号、中棉所44号及对照品种柯字312为研究对象,比较新疆和黄河流域2个生态区棉花品种的体细胞再生能力,优化棉花体细胞胚胎发生的相关条件参数,除新陆中18号外其他5个获得了再生植株,建立高效棉花体细胞再生体系,并且得出新疆棉区和黄河流域棉花品种的植株再生潜力没有明显差别,新陆中15号的愈伤组织分化率及胚胎萌发率都比较高,具备作为棉花优良遗传转化受体的基本特征,但新疆棉花品种细胞胚胎发生所需的时间长的结论。罗晓丽等^[24]以8个早熟或特早熟棉花为材料,通过不同激素组合(1.0 mg/L IBA+0.5 mg/L KT、0.1 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L KT)诱导其愈伤组织,成功使晋棉5号、中棉所27号和辽棉10号3个早熟棉品种在5~7个月内通过体细胞胚胎分化获得再生小苗。周品等^[25]以新疆陆地棉主栽品种新陆早19号和新陆早23号下胚轴为外植体,通过对再

生体系的研究,首次获得了胚性愈伤组织并在6~8个月获得了大量再生植株。刘丽等^[26]以新疆主栽品种新陆早32号、33号和对照YZ1为研究材料,通过不同浓度的激素组合成功诱导获得了体细胞胚,并在8个月内都成功得到再生苗。焦天奇等^[27]以新陆早33号为对照研究新疆主栽品种新陆早42号的体细胞胚胎发生,新陆早42号在140 d内获得了有根系发育良好的能嫁接植株(株高7~8 cm)。李鹏飞等^[28]以新疆棉区主栽品种新陆早33号和新彩棉7号为试验材料,比较不同激素组合对二者体细胞胚胎发生过程的影响,在6个月内获得再生植株。李有忠等^[29]以新疆主栽早熟棉品种新陆早13号、新陆早26号、新陆早33号为试材,通过不同质量浓度的激素组合成功诱导并获得体细胞胚,在8个月内都能成功获得再生苗。马盼盼等^[30]以模式品种Coker312为对照研究新疆主栽陆地棉品种新陆早33号的体细胞胚胎发生和植株再生,新陆早33号在180 d获得根系发育良好的再生幼苗,而Coker312完成这一过程则需要210 d。葛书娅等^[31]利用(0.1 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L KT)的激素组合成功建立了陆地棉新陆早45号的胚胎发生再生体系,150 d左右获得了再生植株。

根据国内早熟棉体细胞再生和早熟棉转基因研究现状文献报道,以及笔者对早熟棉体细胞胚胎发生和植株再生体系建立^[24]所做的研究,总结出大田生产上广泛使用并能够进行体细胞再生的早熟棉品种有新陆早1号、4号、7号、12号、13号、17号、19号、22号、23号、32号、33号、45号,中棉所16号、24号,泗棉3号,晋棉5号,辽棉10号等;中早熟棉品种能够进行体细胞再生的有新陆中15号、20号、24号、中12、中13、中17、中19、中27、中35、中44、冀棉7、冀棉11、冀棉14、冀棉19、冀棉20、冀棉27、晋棉7、晋棉12、鲁棉1号、鲁棉2号、鲁棉6号、苏棉12号等。其中获得体细胞再生植株重复报道的有新陆早33号(7次)、新陆早1号(2次)、新陆早32号(2次)、泗棉3号(2次)。

2 国内早熟棉转基因研究进展

随着转基因棉花在国内大面积的种植,在早熟棉体细胞胚胎发生和植株再生研究的基础上,以早熟棉为受体的早熟棉转基因研究也开展起来。自王伟等^[32]以新疆陆地棉栽培品种新陆早1号为转化受体,通过根农杆菌介导法成功地将修饰的豇豆胰蛋白酶抑制剂(CPTI)基因导入新陆早1号并在7~8个月获得转基因再生植株后,有关早熟棉转基因的研究便一直备受相关科研人员的重视。吴慎杰等^[33]以陆地棉泗棉3号的下胚轴为外植体,建立了高效的转化体系,得到了大量的转基因植株。中国农业科学院棉花研究所棉花生物学重点实验室以早熟棉中棉所24号为受体获得大量的转基因棉花,其中将拟南芥过表达基因*AtCIPK23*、*AtAKT1*和*AtCBL1*转入早熟棉中棉所24号中,张斌等^[34]对转基因棉花苗期耐低钾的差异及机制进行了研究。孟颢光^[35]利用根癌农杆菌介导法,将双价抗真菌病基因几丁质酶基因(*Chitinase*)和 β -1,3-葡聚糖酶基因(*Glucanase*)导入中棉所24号中,获得了抗性稳定的抗病植株;张兴华等^[36]对转双价抗病

基因(*Chi+Glu*)棉抗枯黄萎病竞争能力进行了研究;刘小玲等^[37]对转 RRM2 和 ACO2-E6 基因棉花冠层特征和光合特性与产量形成的关系进行了分析;杨作仁^[38]利用 T-DNA 激活标签转化中棉所 24 号所获得的 pagoda1 突变体为研究对象,对棉花 T-DNA 激活标签突变体 pagoda1 的分子机制进行研究并应用。山西农业大学棉花研究所的李静等^[39]为拓展可再生陆地棉的基因型,利用转基因技术直接改良已有的优良早熟棉品种,设置不同浓度的 2,4-D 和激动素(KT)4 种组合进行诱导,用 6~8 个月成功获得体细胞胚和再生植株,构建早熟棉品种“中棉所 16”再生体系,并利用该体系将 EDT1 抗旱耐盐基因成功导入“中棉所 16”基因组,获得了转基因植株。利用早熟棉体细胞胚胎发生进行外源基因转化并获得成功的有新陆早 1 号、中棉所 24 号、泗棉 3 号、中棉所 16 号等 4 个棉花品种。中国农业科学院棉花研究所分子遗传改良实验室以中棉所 24 号作为早熟棉转基因受体的模式品种建立了规模化转基因技术体系,在早熟棉种质创制和功能基因验证方面发挥了重要的作用。但是目前还没有早熟棉直接作为受体转化选育的转基因早熟棉品种用于生产。

以上早熟棉品种经体细胞再生或作为转基因受体的重复验证均获得再生植株或转基因再生植株,可根据不同早熟棉种植区的需要选择作为转基因受体的优良品种。其他已报道具备体细胞再生的早熟棉和中早熟棉作为拓展早熟棉再生基因型,经过体细胞再生试验、筛选高频再生品(种)系或株系可作为备用转化受体,这对于早熟棉花基因工程具有重要意义。

3 早熟棉转基因研究建议

农杆菌介导的早熟棉高效转化体系建立的关键是以高频(50%以上)体细胞胚胎发生和植株再生的优良早熟棉品种受体为基础,以高效的转化率(50%以上)为保障,为广泛高效的开展早熟棉转基因研究,创制生产上急需的早熟棉种质为目的。转基因早熟棉研究应将以下 2 点作为重点。

3.1 早熟棉高频再生纯合系的筛选 以该研究阐述的能够体细胞再生且品质优良的(中)早熟棉品种为候选品种,如新陆早 33 号、新陆早 32 号、新陆早 1 号、新陆早 45 号、中棉所 16 号、中棉所 24 号、泗棉 3 号等,以这些品种的脱绒种子为材料,根据文献已报道的资料和笔者长期研究总结得出的结果^[24,40],调整早熟棉体细胞再生各阶段所需培养基组成成分,培养时间及继代次数,根据早熟棉生长发育特点调整组织培养条件。

参照吴家和等^[41]的方法并做适当改进进行早熟棉高频再生纯合系筛选,将生长健壮的无菌苗(30 株)分株进行下胚轴组织培养,选择不同单株 10 个克隆的可育再生单株,收获 T0 自交单铃种子。T0 种子的无菌苗(T1)第 2 次组培,收获胚胎发生和再生周期短(150 d)的 T0 株系的再生单株自交 T1 种子。种植 T1 种子,收获农艺性状优良的 T2 自交株行种子并扩繁,获得早熟棉高频再生纯合系转化亲本。高频再生纯合系转化亲本的获得可将转基因过程缩短到 6~8 个月,筛选流程如图 1 所示。

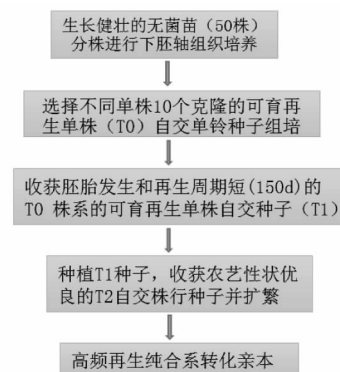


图 1 早熟棉高频再生纯合系筛选流程

Fig.1 Selection proces of high-frequency regeneration homoygous lines in early-maturing cotton

3.2 建立农杆菌介导的早熟棉高效转化体系 根据已有研究与实践结果^[42-43],要建立早熟棉高效的转化体系必须以提高菌株活力降低转化材料的泛菌率和降低转基因棉花畸形苗和不育率为前提。

3.2.1 提高菌株活力降低转化材料的泛菌率。分别挑取携带目的基因的农杆菌菌落接种于含有 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 利福平 LB 液体培养基中,菌株活力旺盛的在 28 ℃ 振荡培养 24 h 后 OD₆₀₀ 值可达到 0.5~0.7,未达到此标准的菌株不能用作转化。农杆菌介导的棉花转基因体系要随时检测菌株的活力。将培养至对数生长期的农杆菌菌液用 LB 稀释 100 倍后加入 50 mg/L 的乙酰丁香酮(AS),26~28 ℃ 振荡培养(180~200 r/min)0.5~1.0 h 浸染棉花无菌苗下胚轴外植体切段 8~10 min,浸染后吸干外植体上的菌液、低温共培(21 ℃)48 h。经共培养后的下胚轴切段转入愈伤组织诱导筛选培养基中,在常规条件下[棉花遗传转化的组织培养条件均为:温度(28±2)℃,光照长度 12 h/d,光照强度 2 000 lx],先暗培养 1 个月,然后光培养 1 个月后再转入诱导筛选培养基中,光培养 1 个月进行二次诱导筛选,愈伤组织直径达到 0.5~1.0 cm,未诱导出愈伤组织的下胚轴切段淘汰。

通过浸染液的稀释、浸染后吸干外植体上的菌液、低温共培、暗培养和二次筛选,并严格继代操作规范等可将外植体及愈伤的泛菌现象降低到 5% 以下,菌株活力的增强可使转化率提高到 50% 以上。

3.2.2 降低转基因棉花畸形苗和不育率。通过二次筛选诱导培养后将愈伤组织置入增殖培养基时即时抽掉激素;缩短胚性愈伤组织继代培养时间(10~15 d)至胚状体出现;分化的愈伤组织转入分化培养基 M5 时,用无菌透气封口膜封口、增加培养基固化剂含量(3.5 g/L Phytigel),以改善分化愈伤组织的培养条件。采取胚状体培养时降低培养基中糖含量(25 g/L 葡萄糖),成苗培养基中改变固化剂和糖分含量(3.25 g/L Phytigel,20 g/L 葡萄糖)等技术措施,可以降低棉花遗传转化过程中产生的畸形苗和玻璃化苗,使正常苗的产生率达到 90% 以上。将分化-见苗的组织培养时间控制在 90~120 d,可使转化再生株的不育率降低到 30% 以下。获得

再生植株并在嫁接前取试管苗叶片进行目标基因序列检测,嫁接阳性再生植株,这样可使转化过程缩短 2~3 个月,转化率提高到 50% 以上。

农杆菌介导的早熟棉高效转化体系建立的关键是以高频(50% 以上)体细胞胚胎发生和植株再生的优良早熟棉品种受体为基础,该研究总结并部分验证出能够体细胞再生的早熟棉品种,从中遴选出作为早熟棉转基因受体的候选品种,其中新陆早 33 号经研究人员的验证,可作为新疆早熟棉转基因受体的优选品种,另外还有新陆早 1 号和新陆早 32 号;黄淮海棉区以中棉所 24 号、中棉所 16 号为早熟棉转基因受体的优选品种;长江流域棉区以泗棉 3 号为早熟棉转基因受体的优选品种。并结合吴家和等^[41]的方法研究出高频再生纯合系的筛选技术,以农杆菌介导的中熟棉转基因体系为基础,对影响转化体系的各因子进行优化,研究出建立农杆菌介导的早熟棉高效转化体系的关键技术。以早熟棉高频再生纯合系种子为转化受体,利用高效的(转化率 50% 以上)农杆菌介导的转化体系将不同功能的目标基因直接转入早熟棉,将消除早熟棉杂交转育改良时花期不遇和改良后代生育期延长的现象,培育适宜新疆棉区、黄淮海棉区麦棉夏播套种、长江流域棉区麦和油菜后直播等一熟棉区以及轻简化种植所需的中早熟棉和早熟棉种质资源,可加快早熟棉转基因育种和基因功能分析的进程,提高棉花的综合利用价值。

参考文献

- [1] 孙璐,杨玉枫,路正营,等.国审早熟棉新品种邯 818 的选育过程和策略[J].河北农业科学,2019,23(1):71-74.
- [2] 邓艳凤,肖水平,杨秀,等.早熟棉新品种的主要性状分析与优异品系筛选[J].亚热带农业研究,2020,16(3):145-152.
- [3] 喻树迅,王寒涛,魏恒玲,等.棉花早熟性研究进展及其应用[J].棉花学报,2017,29(S1):1-10.
- [4] 中国农业科学院棉花研究所.中国棉花栽培学[M].上海:上海科学技术出版社,2013.
- [5] 田笑明.新疆棉作理论与现代植棉技术[M].北京:科学出版社,2016.
- [6] APPLAH M K, FEIKE T, WIREDU A N, et al. Cotton production, land use change and resource competition in the Aksu-Tarim River Basin, Xinjiang, China[J]. Quarterly journal of international agriculture, 2014, 53(3): 243-261.
- [7] PERLAK F J, FUCHS R L, DEAN D A, et al. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 1991, 88: 3324-3328.
- [8] THOMAS J C, ADAMS D G, KEPPELLE V D, et al. Protease inhibitors of *Manduca sexta* expressed in transgenic cotton[J]. Plant cell reports, 1995, 14(12): 758-762.
- [9] GUO H N, WU J H, CHEN X Y, et al. Cotton plants transformed with the activated chimeric *CryIAc* and *API-B* genes[J]. Acta botanica sinica, 2003, 45(1): 108-113.
- [10] CHEN Z X, LEWELLYN D J, FAN Y L, et al. 2,4-D resistant transgenic cotton plants produced by *Agrobacterium*-mediated gene transfer[J]. Scientia agriculturaria sinica, 1994, 27(2): 31-37.
- [11] NIDA D L, KOLACZ K H, BUEHLER R E, et al. Glyphosate-tolerant cotton: Genetic characterization and protein expression[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 1996, 44(7): 1960-1966.
- [12] KELLER G, SPATOLA L, MCCABE D, et al. Transgenic cotton resistant to herbicide bialaphos[J]. Transgenic research, 1997, 6(6): 385-392.
- [13] BAYLEY C, TROLINDER N, RAY C, et al. Engineering 2,4-D resistance into cotton[J]. Theoretical and applied genetics, 1992, 83(5): 645-649.
- [14] PAYTON P, ALLEN R D, TROLINDER N, et al. Over-expression of chloroplast-targeted Mn superoxide dismutase in cotton (*Gossypium hirsutum* L., cv. Coker 312) does not alter the reduction of photosynthesis after short exposures to low temperature and high light intensity[J]. Photosynthesis research, 1997, 52(3): 233-244.
- [15] 张宝红, 丰嵘, 李付广, 等. 棉花体细胞胚胎发生模式和植株再生[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(1): 44-50.
- [16] 王志才, 木合热皮亚·艾尔肯, 廖茂森, 等. 影响棉花体细胞胚胎发生和植株再生的关键因素分析[J]. 新疆农业科学, 2011, 48(1): 39-44.
- [17] 张宝红, 李秀兰, 李凤莲, 等. 棉花优良新品种泗棉 3 号高频体细胞胚胎发生和植株再生的研究[J]. 西北农业学报, 1995, 4(4): 11-16.
- [18] 朱生伟, 孙敬三. 陆地棉体细胞再生植株速成法[J]. 科学通报, 2000, 45(9): 939-942.
- [19] 于娅, 刘传亮, 马峙英, 等. 陆地棉中棉所 24 胚性愈伤组织的诱导及植株再生[J]. 西北植物学报, 2004, 24(2): 306-310.
- [20] 王芳, 刘利君, 张佩玲, 等. 新疆陆地棉胚状体发生高效再生体系的建立[J]. 新疆农业大学学报, 2004, 27(1): 29-34.
- [21] 周小凤, 张碧瑶, 刘冠泽, 等. 新疆棉花高体细胞胚胎发生能力基因型的筛选[J]. 分子植物育种, 2007, 5(6): 819-826.
- [22] 陈天子, 吴慎杰, 李飞飞, 等. 新疆棉花 4 个主栽品种的体细胞胚胎发生及植株再生[J]. 作物学报, 2008, 34(8): 1374-1380.
- [23] 严勇亮, 曲延英, 代鑫, 等. 新疆和黄河流域棉区棉花品种体细胞胚胎发生和植株再生比较研究[J]. 新疆农业科学, 2010, 47(1): 14-19.
- [24] 罗晓丽, 姜艳丽, 肖娟丽, 等. 早熟棉体细胞胚胎发生和植株再生体系的建立[J]. 西北植物学报, 2011, 31(3): 609-615.
- [25] 周晶, 张芳转, 王静, 等. 新疆棉花体细胞胚胎发生及植株再生[J]. 种子, 2011, 30(4): 1-3, 7.
- [26] 刘丽, 王娟, 王旭文, 等. 新陆早 32 号、33 号的体细胞胚胎发生和植株再生比较研究[J]. 棉花学报, 2011, 23(3): 259-264.
- [27] 焦天奇, 吴慎杰, 刘瑞娜, 等. 新陆早 42 号体细胞胚胎发生和植株再生[J]. 棉花学报, 2012, 24(3): 238-243.
- [28] 李鹏飞, 程文翰, 王凡龙, 等. 两个新疆棉花品种体细胞胚胎发生的比较研究[J]. 分子植物育种, 2013, 11(4): 525-531.
- [29] 李有忠, 谢宗铭, 董永梅, 等. 新疆早熟棉 3 个主栽品种的体细胞胚胎发生及植株再生[J]. 西北农业学报, 2013, 22(3): 70-74.
- [30] 马盼盼, 谢宗铭, 李全胜, 等. 新陆早 33 号体细胞植株再生技术研究[J]. 西北农业学报, 2014, 23(11): 57-61.
- [31] 葛书娅, 沈秋平, 何积明, 等. 陆地棉新陆早 45 号体细胞胚胎发生及再生体系的建立[J]. 棉花学报, 2018, 30(6): 492-497.
- [32] 王伟, 朱祯, 邓朝阳, 等. 陆地棉栽培品种新陆早 1 号转基因抗虫植株的获得[J]. 高技术通讯, 1998, 8(5): 1-5.
- [33] 吴慎杰, 李飞飞, 陈天子, 等. 利用农杆菌介导法转化泗棉 3 号的研究[J]. 作物学报, 2007, 33(4): 632-638.
- [34] 张斌, 刘记, 张朝军, 等. 过表达拟南芥 *AtCIPK 23*, *AtAKT 1* 和 *AtCBL 1* 基因棉花苗期耐低钾的差异及机制研究[J]. 棉花学报, 2018, 30(3): 205-214.
- [35] 孟颖光. 农杆菌介导的棉花转化体系优化与抗病基因导入[D]. 郑州: 河南农业大学, 2004.
- [36] 张兴华, 田绍仁, 朱荷琴, 等. 转双价抗病基因 (*Chi+Glu*) 棉抗枯萎病竞争能力研究[J]. 中国棉花, 2012, 39(1): 25-27.
- [37] 刘小玲, 徐道青, 王维, 等. 转 *RRM2* 和 *ACO2-E6* 基因棉花冠层特征和光合特性与产量形成的关系[J]. 棉花学报, 2016, 28(6): 628-634.
- [38] 杨作仁. 棉花 T-DNA 激活标签突变体 *pag1* 分子机制的研究与应用[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.
- [39] 李静, 张焕祥, 吴慎杰, 等. 早熟棉“中棉所 16”再生纯合系的创制及遗传转化[J]. 中国农业大学学报, 2019, 24(8): 10-18.
- [40] 罗晓丽, 王志安, 肖娟丽, 等. 不同继代时间调控棉花愈伤组织褐化死亡和植株再生效率的研究[J]. 生物技术进展, 2013, 3(3): 201-205, 235.
- [41] 吴家和, 张献龙, 罗晓丽, 等. 两个陆地棉体细胞胚胎发生新品系的选育[J]. 棉花学报, 2003, 15(4): 254-256.
- [42] 罗晓丽, 肖娟丽, 张安红, 等. 潮霉素作为选择抗生素在农杆菌介导转化中的应用[J]. 棉花学报, 2005, 17(3): 186-188.
- [43] 罗晓丽, 张安红, 肖娟丽, 等. 棉蚜腺苷三磷酸酶 E 亚基基因 RNAi 载体的构建及其抗蚜性的分析[J]. 棉花学报, 2018, 30(5): 353-362.