

转两类抗虫基因棉花优良纯合品系的选育

吴家和^{1,3}, 田颖川², 罗晓丽¹, 郭洪年², 石跃进¹, 陈晓英²,
贾燕涛², 肖娟丽¹, 张献龙³

(¹ 山西省农业科学院棉花研究所, 运城 044000; ² 中国科学院微生物研究所, 北京 100080;

³ 华中农业大学/作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 用含合成的 *Cry1Ac* 杀虫蛋白嵌合基因(*Bt29K*)及慈菇蛋白酶抑制剂(*API-B*)基因表达框的双抗虫基因植物表达载体, 通过根癌农杆菌介导转化棉花生产品种冀合321, 获得了一批抗卡那霉素的转化再生植株。在对转化再生植株进行PCR、卡那霉素抗性和抗虫性测定的基础上, 经6代筛选培育出棉铃虫抗性90%以上且农艺性状优良的9个转双抗虫基因棉纯合品系。各纯合株系子代植株的抗虫性及部分序列检测结果进一步表明上述 *Cry1Ac* 嵌合蛋白基因是能稳定遗传的。这些品系具有很好的农艺性状, 其结铃性和纤维比强度明显高于转化受体冀合321, 这些纯合系可直接用于生产或作为双抗虫棉种质利用。

关键词: 棉花; 双抗虫基因; 转基因纯合系

Selection of Homozygous Cotton Lines Transformed with Two Types of Insect-resistant Genes

WU Jia-he^{1,3}, TIAN Ying-chuan², LUO Xiao-li¹, GUO Hong-nian², SHI Yue-jin¹, CHEN Xiao-ying²,
JIA Yan-tao², XIAO Juan-li¹, ZHANG Xian-long³

(¹ Institute of Cotton Research, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng 044000;

² Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080;

³ National Key Laboratory of Crops Improvement/ Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: A plant expression vector containing a chimeric *Bt29K* gene coding for the activated *Cry1Ac* protein and the arrowhead proteinase inhibitor gene *API-B* was introduced into an elite cotton cultivar Jihe321 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Based on the results of kanamycin resistant test, PCR detection for both foreign genes and insect bioassay using *Heliothis armigera*, nine transgenic homozygous cotton lines with insect-resistance of more than 90% and better agronomic traits were bred through six generations of selection of the original transgenic plants. Results from insect bioassay and sequence analysis of the PCR products of plants from some homozygous lines indicated that the chimeric *Bt29K* gene had been stably inherited in these transgenic cotton lines. The main agronomic characters of these homozygous lines, such as boll productivity and fibre strength, were better than that of the original cotton cv. Jihe321. These homozygous lines can be applied directly or can be used as elite germplasm in breeding of new insect-resistant cotton cultivars.

Key words: Cotton; Two types of insect-resistant genes; Transgenic homozygous lines

我国是棉花生产大国, 棉花产量占全球棉花总产量的1/4。当前, 由于生态环境的巨大变化, 全球病虫害发生越来越频繁, 加之人们长期大剂量地施用化学农药导致害虫产生了抗药性, 这是近年来棉铃虫大

收稿日期 2002-05-31

基金项目: 国家“863”计划资助项目(Z17-01-01 2001AA212071)和山西省青年基金资助项目(971035)

作者简介: 吴家和(1970-), 男, 安徽合肥人, 副研究员, 博士, 主要从事棉花遗传学研究。田颖川为通讯作者, Tel: 010-62642577; E-mail: tianyc@sun.im.ac.cn

发生、棉花产量大幅度下降的重要原因之一。20 世纪 80 年代发展起来的植物基因工程技术,以及对苏云金芽孢杆菌(*Bt*)杀虫晶体蛋白结构与功能的深入研究,使人们希望将 *Bt* 杀虫蛋白基因转入棉花等作物以获得有实用价值的抗虫转基因植物的愿望成为现实。20 世纪 90 年代以来国内外已在转 *Bt* 基因抗虫棉的研制及应用方面取得了显著的成就^[1,2]。但是仅表达 *Bt* 基因的抗虫转基因植物的大面积应用可能会像大量喷洒 *Bt* 制剂一样使目标昆虫对 *Bt* 产生耐受性^[4]。为解决这个问题,人们试图通过培育同时表达两种或多种作用机制不同的抗虫蛋白的转基因植物来防止这种情况发生^[3],因为害虫对 2 种抗虫蛋白产生抗性的机率要远远小于仅对 1 种抗虫蛋白产生抗性的机率。但对转双价抗虫基因植物的抗虫效果有不同的报道^[3],这从一个侧面反映了两种抗虫蛋白之间的相互作用可能对发挥其抗虫功能有一定影响。

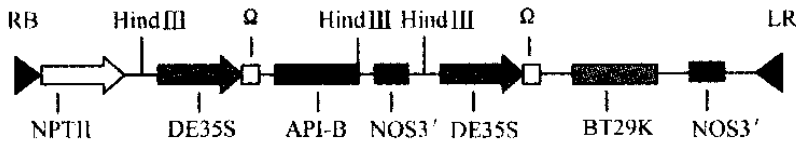


图 1 双抗虫基因表达载体 pB29K-B 的 T-DNA 区结构图

Fig.1 The T-DNA structure of plant expression vector pB29K-B harboring two insect-resistant genes

1.1.2 棉花品种 棉花(*Gossypium hirsutum*)冀合 321、冀合 713、晋棉 7 号、中棉所 35、珂字 201 为转化受体材料。以国外引进的转基因棉花 33B 为抗虫对照。以上材料由山西省农业科学院棉花研究所资源室提供。

1.2 方法

1.2.1 棉花的转化 参照已报道的根癌农杆菌介导转化棉花下胚轴法^[6-8],共培养的培养基中加入 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮。

1.2.2 卡那霉素抗性的检测 取转基因和对照棉花的种子种在加有 $750 \sim 1\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素(Kn)的种苗培养基上,培养一段时间后根据叶色判断结果,黄色为阴性、绿色为阳性。也可在棉花生长期,用卡那霉素 $3\,000 \sim 4\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度涂抹棉花顶部叶片,4~5 d 后依棉花叶片颜色判别,黄色为阴性、绿色为阳性(Kn^r)。

1.2.3 转基因植株抗虫性的检测 离体叶片虫试方法及抗虫指数(I.R.I)计算按文献^[5]进行,大田抗虫试验按王武刚等的方法进行^[9]。

1.2.4 转化再生植株的 PCR 检测 棉花 DNA 提

为了消除蛋白酶抑制剂对 *Bt* 蛋白杀虫功能可能的干扰作用,笔者首次用 1 个含有合成的编码活性杀虫蛋白 *Cry1Ac* 与内质网定位肽的嵌合基因 *Bt29K* 及慈姑蛋白酶抑制剂基因 *API-B* 的植物表达载体,经根癌农杆菌介导转化了生产品种棉花,获得了抗性高于仅转 *Cry1A* 基因的抗虫棉,且农艺性状优良的转双抗虫基因棉花纯合系。本文重点报道这些抗虫转基因纯合系的选育结果,并对其潜在应用价值进行了讨论。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种 双抗虫基因表达载体 pB29K-B 的 T-DNA 结构见图 1 所示,其构建过程见文献^[5]所述。根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株为 LBA4404。

取和转基因棉花的 PCR 检测按 Paterson AH 等所述的方法进行^[10]。扩增 *Cry1Ac* 基因片段引物为 35S 正链引物 $35\text{S}^+ 5' \text{CTGACGTAAGGGATGACGC}$ 和 *Cry1Ac* 基因负链引物 $\text{Bt}^- 5' \text{TTGAATTGAATACGCATCTCC}$,这对引物扩增所得产物应该是 495 bp。*API-B* 基因特异引物为:B1 $5' \text{GCTGAATTCGACCATGGCGGCCTCCAACGCT}$,B2 $5' \text{TAAGCTTACTGCGGTGCAGT}$ 。这对引物扩增所得产物应为 650 bp。

1.2.5 转基因的遗传稳定性分析 将上述棉花植株中 *Cry1Ac* 基因的 PCR 扩增产物经 DNA 纯化试剂盒纯化后与 pUC19mT 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。用 BamH I 酶切挑选克隆后,由上海生物工程公司进行 DNA 序列分析,以上 PCR 产物克隆按分子克隆^[11]一书所述的方法进行。

1.2.6 纯合系选育 获得抗虫可育转基因植株后,在山西省运城和海南省三亚两地轮流种植,经过 6 代的跟踪检测,结合常规选育方法,筛选农艺性状优良、抗性且抗虫基因稳定遗传的棉花纯合系。

2 结果与分析

2.1 不同棉花品种作为受体的转化比较

不同棉花品种作受体转化时,从转化到分化出愈伤组织的时间是不同的,如表 1 所示,中棉所 35 比较短,大约 20~30 d,冀合 713、冀合 321、珂字 201 一般在 40~60 d,伤愈快慢直接影响转化周期

表 1 双抗虫基因对不同棉花品种受体的转化比较

Table 1 Comparison of cotton cultivars in transformation with the two insect resistant genes

品种 Cultivars	下胚轴段数 No. of hypocotyl sections	出愈时间 Days of calli-induction	愈伤块数 No. of calli	抗性愈伤块数 No. of Kn-resistant calli	分化愈伤块数 No. of calli differentiated	再生小苗总数 No. of regenerated plantlets	存活可育株数 No. of fertile plants
冀合 713 Jihe713	737	45 ± 2.5	411	156	62	32	7
冀合 321 Jihe321	860	40 ± 3.2	596	248	97	67	35
晋棉 7 号 Jinmian7	119	50 ± 2.8	41	29	17	7	2
中棉所 35 Zhongmiansuo35	114	25 ± 1.6	37	21	8	3	1
珂字 201 Coker201	146	45 ± 3.6	130	72	62	12	8

2.2 纯合系的选育

按材料与方法 2.2 中所述,在含卡那霉素的培养基上选到转化再生植株后将其移植到花盆中,成活后再对其进行 PCR、Kn 抗性检测和室内喂虫试

的长短和转化效率。试验结果表明,冀合 713、冀合 321 愈伤组织诱导率较高,在 50% 以上,仅次于珂字 201。抗性愈伤组织能够分化获得再生苗的能力依赖于转化受体的再生性(基因型),冀合 713,虽然冀合 321 的分化率低于珂字 201,但是这 2 个品种的农艺性状较好,且易获得正常苗,所以笔者选用这 2 个品种作为大规模转基因的受体。

验,选出抗虫转基因植株,把抗虫单株进行自交,对自交后代继续进行以上筛选。各代的筛选过程和部分结果见表 2 所示,共选出抗虫纯合系 9 个。

表 2 抗虫棉纯合系的选育¹⁾

Table 2 Selection of insect-resistant homozygous cotton lines

品系号 Code of lines	T ₀		T ₁		T ₂		T ₃		T ₄		T ₅				
	PCR		Kn ^r	抗虫指数 I. R. I	Kn ^r	抗虫指数 I. R. I	Kn ^r	抗虫指数 I. R. I	Kn ^r	抗虫指数 I. R. I	抗虫指数 I. R. I	PCR		Kn ^r	抗虫指数 I. R. I
	BT	API										BT	API		
DR214	/	/	/	100	80	99	100	100	95	100	100	+	+	100	99
DR312	/	/	/	98	100	100	100	99	93	100	100	+	+	100	99
DR232	+	+	100	100	100	97	100	97	94	89	89	+	+	100	90
DR248	/	/	/	100	80	100	80	100	89	88	88	+	+	100	97
DR223	/	/	/	95	70	98	80	95	83	100	100	+	+	100	96
DR235	+	+	100	98	60	95	80	100	92	100	100	+	+	100	95
DR252	+	+	100	100	80	99	80	100	87	100	100	+	+	100	92
DR409	/	/	100	100	100	100	70	98	79	80	80	+	+	97	98
DR186	+	+	100	96	80	95	100	96	70	100	100	+	+	100	95
CK(冀合 321 Jihe321)	—	—	4.3	3	4.2	2	4	3	5	6	6	—	—	0	4
CK(33B)	+	—	86.5	96	80	94	90	95	86	85	85	+	—	87	87

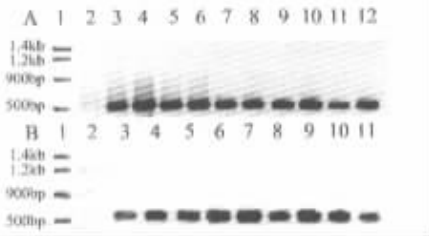
¹⁾ / “未检测” No test; Kn^r 卡那霉素 Kanamycin resistance; T₀~T₅: 转基因植株的代数 Generation number of transgenic plants; I. R. I: 抗虫指数 Insect resistant index

表 2 表明各代抗虫性数值有差异,但变异幅度不大。T₀、T₂、T₄ 和 T₁、T₃、T₅ 分别种植在山西运城和海南三亚,运城地区所测的抗虫性稍高于三亚地区的抗虫性。抗虫性和卡那霉素抗性这 2 种检测方法在数值上虽然有些差异,但趋势基本一致,表明

抗虫基因与 NPT II 基因是共分离的。到 T₅ 代时,卡那霉素抗性基本上得到稳定,不再分离,抗虫性也已稳定,这些品系的抗虫性均显著高于目前大面积推广的抗虫棉品种 33B。

取几个双价抗虫棉株系 T₅ 代植株各 15 株进行

PCR 分析 结果表明所检测植株对 2 个抗虫基因都呈阳性反应(表 2),其中部分纯合系植株的 PCR 结果见图 2。这些结果表明所选出的抗虫纯合系植株均有 *Bt29K* 基因和 *API* 基因的整合。



A: 用 35S 正链引物和 *Bt29K* 负链引物进行 PCR 后的电泳图谱。泳道 1, DNA 分子量标记; 泳道 2, 非转基因对照植株; 泳道 3~12, 分别为 pB29KB 质粒、抗虫纯合系 DR312(4, 5), DR214(6, 7), DR409(8, 9), DR186(10, 11) 及 DR325(12) 的 PCR 产物

Gel electrophoresis patterns of PCR product produced in the presence of CaMV35S promoter primer and *Bt29K* gene specific primer. Lane 1, DNA molecular weight marker; Lane 2, non-transformed plant control; Lane 3~12, pB29KB DNA, plant DNA from homozygous cotton lines DR312(4, 5), DR214(6, 7), DR409(8, 9), DR186(10, 11) and DR325(12) respectively

B: 用 *API-B* 基因特异引物进行 PCR 的结果。泳道 1~11, 与 A 中所述泳道 1~11 相同

PCR products in the presence of *API-B* gene specific primers. Lane 1~11: the same as in A

图 2 部分抗虫棉植株 PCR 检测结果

Fig. 2 PCR detection of some insect-resistant cotton plants

Table 3 Agronomic traits and insect-resistance of homozygous cotton lines

品系号 Code of lines	株型 ¹⁾ Plant model	株高 Plant height (cm)	果枝数 Branches/plant	结铃数 Bolls/plant	平均叶面积 Average leaf area (cm ²)	蕾铃危害率 Damaged rate of square and boll (%)	抗虫性 Insect resistance (%)	调查株数 No. of plants investigated
DR214	Tu	98.2	12.9	18.4*	147.5	17	99.2±2.3	30
DR223	Co	88.5	13.0	16.4	111.6**	20.1	93.8±4.6	30
DR312	To	96.2	12.4	24.2**	111.0**	15.8	98.2±3.1	30
DR235	To	96.1	12.7	19.6*	99.6**	18.6	98.3±2.9	30
DR252	Co	81.8*	13.7	23.8**	100.1**	11.8	94.2±4.8	30
DR186	Tu	92.4	11.9	18.6*	84.0**	20.2	99.7±1.2	30
DR409	To	91.6	11.6	35**	117.5*	10.8	95.0±2.1	30
DR232	Co	75.4**	11	21.4**	86.5**	16.3	90.0±5.2	30
DR248	Co	68.8**	9.4	18.2*	82.3**	13.5	97.5±2.5	30
冀合 321	Co	75.3	11.3	17.3	123.1	20.8	85±6.4	30
33B	Tu	97.1	12.4	16.6	140.0	43.4	3.3±2.1	30

¹⁾ Tu:筒形 Tube-shaped; To:塔形 Tower-shaped; Co:紧凑型 Compact-type; *: t 值为 0.05 显著水平 t value significance at 0.05 level; **: t 值为 0.01 极显著水平 t value significance at 0.01 level

收获抗虫棉纯合系纤维棉样,送交国家纤维质量监督检验测试中心进行品质检测,表 4 为这些纯合系纤维品质鉴定结果的平均值。

由表 4 可看出,转双价抗虫棉纯合系的纤维品质均符合纺织业的要求(长度大于 27 mm、比强度

2.3 抗性纯合系的形成及农艺性状的表现

抗性纯合株系通过海南加代扩繁,于 2001 年在山西升级为品系比较试验,并于 7 月中旬进行抗性检测,8 月中旬调查农艺性状和蕾铃脱落率,其结果如表 3。

表 3 进一步显示选育的抗虫纯合系抗虫性均大于抗虫棉对照 33B,因近 2 年棉铃虫在山西棉区未大量发生,又未进行田间大规模接虫试验,所以蕾铃危害率在转基因与对照株系间差异不很大,但由中国农业科学院植物保护研究所进行的抗虫性鉴定结果差异极显著(数据略),其抗虫性都达到了高抗水平。

表中所示抗虫纯合系的铃数显著高于其受体冀合 321,株型有筒形、塔形和紧凑型等多种,株高总体比受体亲本矮,但也有和其相当的,如 DR214 和 DR312 除了 DR214 的平均叶面积和转化受体亲本相当外,其它 8 个纯合系的平均叶面积显著小于受体亲本。这些性状最后反映在抗虫纯合系的籽棉产量和皮棉产量上有的高于转化受体亲本,有的低于受体亲本。衣分除了 DR223 和 DR409 外,均低于转化受体亲本,但高于 33B,抗虫纯合系成铃性明显高于转化受体(和表 3 类似),铃重分布在受体铃重左右(资料略)。

2.4 抗虫纯合系的品质性状

表 3 抗性纯合株系的虫试和农艺性状

大于 22、马克隆值在 3.5~4.9 之间),且纤维品质大部分优于其亲本冀合 321,与抗虫棉 33B 相当,特别是比强度显著高于受体材料(冀合 321)。

2.5 抗虫基因在转基因棉花子代中的稳定性

对 DR409 和 DR312 的 PCR 产物测序的结果与

表 4 转基因棉花纯合系的纤维品质鉴定结果(平均数, ICC)

Table 4 Fibre quality of transgenic cotton homozygous lines

品系号 Code of lines	长度 Length (mm)	整齐度 Tidiness degree (%)	比强度 cN/tex Strength	伸长率 Elongation rate (%)	马克隆值 Micronaire value	取样数 No. of samples
DR186	29.5 ± 0.9	47.9 ± 0.4	22.5 ± 0.9	6.7 ± 0.5	4.3 ± 0.2	7
DR214	28.5 ± 0.8	47.1 ± 0.5	23.7 ± 1.6	6.2 ± 0.3	3.6 ± 0.7	4
DR223	27.7 ± 0.9	47.2 ± 0.4	22.8 ± 1.6	5.6 ± 0.3	4.5 ± 0.4	5
DR235	28.5 ± 1.6	47.0 ± 0.7	22.8 ± 1.4	6.3 ± 0.3	4.3 ± 0.5	4
DR252	28.2 ± 0.2	46.6 ± 0.4	24.8 ± 1.5	5.6 ± 0.2	4.0 ± 0.2	3
DR312	27.9 ± 1.0	47.9 ± 0.6	22.0 ± 0.6	6.2 ± 0.3	4.5 ± 0.5	5
DR232	29.1 ± 0.8	47.0 ± 0.7	23.7 ± 1.0	6.0 ± 0.2	3.7 ± 0.4	3
DR409	29.1 ± 0.9	47.5 ± 0.8	22.4 ± 1.3	5.8 ± 0.5	4.4 ± 0.2	4
DR248	29.3 ± 0.5	47.6 ± 0.6	23.6 ± 3.4	6.5 ± 0.4	4.2 ± 0.4	5
33B	29.1 ± 0.7	48.1 ± 0.3	23.2 ± 1.5	6.4 ± 0.3	4.5 ± 0.3	3
冀合 321 Jihe321	28.2 ± 0.2	49.0 ± 0.3	20.9 ± 1.0	6.8 ± 0.3	4.3 ± 0.1	3

Bt29K 基因 5'端相应序列相比,在 ATG 到 *Bt29K* 负链引物这 326 个碱基中,棉花 PCR 产物中的序列与 *Bt29K* 除在 DR409 中有 1 个碱基不同外,其它则完全一致。这一不同的碱基可能是 PCR 引起的错误,当然也不能排除是突变的可能,在 35S 启动子和' Ω '片段部分,其序列与载体 pBin438 的相应部分序列完全一致(序列资料略)。以上结果表明,*Bt29K* 基因及其上游调控序列在整合到棉花基因组中后,经连续 6 代的遗传,其结构基本上是稳定的,起码在这 2 个株系中未发现重排或丢失现象。这一结果与纯合系抗虫性的遗传稳定性(表 2)表明,笔者获得的转双抗虫基因棉花纯合系中外源基因的结构和功能是可以稳定遗传的。

3 讨论

利用根癌农杆菌介导转化棉花,会受到基因型的很大限制,珂字棉转化系统是目前比较成熟的一个受体,但珂字棉是一个老品种已不适合种植,许多农艺性状已经退化。所以笔者选用农艺性状较好的冀合 321 作为双抗虫基因的转化受体。

每个纯合系各代的抗虫性数据存在微小波动,原因之一是各年代的棉花生长状况不同也可能是山西运城和海南三亚两地棉花的生长环境差异造成的,但抗虫性数据的变幅是一致的。

转双抗虫基因棉在结铃性上高于受体材料冀合 321,这与前人的研究是一致的^[13,14],原因可能是抗虫棉减少了棉铃虫对蕾铃的危害,从而增加了铃数;另外,外源基因的导入也有可能以某种机制影响结铃性。转基因棉花的铃重比受体亲本铃重无明显差异,抗虫纯合系的衣分有下降的趋势,但也有高衣分的品系,转双抗虫基因棉花的品质有所上升,尤其是

比强大幅度增加,但其原因还不清楚,这些性状与以前报道不一样^[13-16]。抗虫纯合系的株高大多数比转化受体矮,但并不说明转基因抗虫棉花都为矮株型,笔者所选的 9 个纯合系中就有 2 个和转化受体高度相当的;另外,笔者所获得的抗虫纯合系的平均叶面积总体上也是偏小,这与一般的报道类似,然而也选到了如 DR214 叶面积较大的转基因棉花。总的来说,笔者的研究结果揭示的只是一种趋势,而不是结论,这也是笔者和前人报道不一样的地方,如抗虫棉的株型矮、铃小、叶片小等性状的报道均只是一种趋势,而不是抗虫棉的特征。

总之,笔者所获得的几个转双抗虫基因纯合品系,抗虫性比目前推广的单基因抗虫棉 33B 要高,农艺性状符合生产要求,利用这些纯合品系已经选育出一批有苗头的高产抗虫棉品系,同时,由于在 *Bt* 基因结构和蛋白酶抑制剂基因类型方面都有别于已有的报道,这些抗虫纯合品系可作为我国特有的抗虫棉资源加以利用。

References

- [1] Perlak F J, Deaton R W, Armatrong T A, Fuchs R I, Sims S R, Greenplate J T, Fishhoff D A. Insect resistance cotton plants. *Bio/Technology*, 1990, 8: 939-943.
- [2] 郭三堆,倪万潮,徐琼芳. 编码杀虫蛋白融合基因和表达载体及其应用. 中国专利, ZL95119563.8, CN12 15/32, 1995-12-28.
Guo S D, Ni W C, Xu Q F. Fusion protein gene coding for an insecticidal protein and its expression vector as well as its application. Chinese patent ZL95119563.8, CN12 15/32, 1995-12-28. (in Chinese)
- [3] 郭三堆,崔洪志,夏兰芹,武东亮,倪万潮,张震林,张保龙,徐英俊. 双价抗虫转基因棉花的研究. 中国农业科学, 1999, 32(3): 1-7.

- Guo S D, Cui H Z, Xia L Q, Wu D L, Ni W C, Zhang Z L, Zhang B L, Xu Y J. Development of Bivalent insect-resistant transgenic cotton plants. *Scientia Agricultura Sinica*, 1999, 32(3):1-7. (in Chinese)
- [4] Santos M o, Adang M J, Al J N, Boema H R, Parrot W A. Testing transgenes for insect resistance using Arabidopsis. *Molecular Breeding*, 1997, 3:182-194.
- [5] Guo H N, Wu J H, Chen X Y, Luo X L, Shi Y J, Qin H M, Xiao J L, Tian Y C. Cotton plants transformed with the activated chimeric *CryIAc* and *ApI-B* genes. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 29(1):108-113.
- [6] 陈志贤, Liewllyn D J, 范云六, 李淑君, 郭三堆, 焦改丽, 赵俊侠. 利用农杆菌介导法转移 *tfdA* 基因获得可遗传的抗 2 *A-D* 棉株. *中国农业科学*, 1994, 27(2):31-37.
Chen Z X, Liewllyn D J, Fan Y L, Li S J, Guo S D, Jiao G L, Zhao J X. 2 *A-D* resistant transgenic cotton plants produced by agrobacterium-mediated gene transfer. *Scientia Agricultura Sinica*, 1994, 27(2):31-37. (in Chinese)
- [7] Trolinder N L, Goodin J R. Somatic embryogenesis in cotton. II. requirements for embryo development and plant regeneration. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 1988, 12(1):43-53.
- [8] Umbeck P, Johnson G, Barton K, Awain W. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Bio/Technology*, 1987, 5:263-267.
- [9] 王武刚, 姜永幸, 杨雪梅, 郭予元, 郭三堆, 倪万潮, 陈志贤, 田颖川. 转基因棉花对棉铃虫抗性鉴定及利用研究初报. *中国农业科学*, 1997, 30(1):7-12.
Wang W G, Jiang Y X, Yang X M, Guo Y Y, Guo S D, Ni W C, Chen Z X, Tian Y C. Study on Evaluation and Utilization of Bt Transgenic Cotton Resistant to Cotton Bollworm. *Scientia Agricultura Sinica*, 1997, 30(1):7-12. (in Chinese)
- [10] Paterson A H, Brubaker C T, Mendal J F. A rapid method for extraction of cotton genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1993, 11:122-127.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [12] 王功伟, 邱新平. Bt 棉抗虫性遗传研究. *湖北农业科学*, 1999, 4:14-15.
Wang G W, Qiu X P. Studies on the inheritance of insect resistance of Bt cotton. *Hubei Agricultural Sciences*, 1999, 4:14-15. (in Chinese)
- [13] 邢朝柱, 靖深蓉, 袁有禄, 郭立平, 王海林. 转 Bt 基因棉花性状表现存在问题及对策. *安徽农业科学*, 1998, 26(3):201-204.
Xing C Z, Jing S R, Yuan Y L, Guo L P, Wang L H. Manifest of cotton traits transformed with Bt gene, issue lying and countermeasure. *Anhui Agricultural Sciences*, 1998, 26(3):201-204. (in Chinese)
- [14] 靖深蓉, 邢朝柱, 袁有禄等. 抗虫杂交棉的选育与利用研究. *中国棉花*, 1997, 24(7):15-17.
Jing S R, Xing C Z, Yuan Y L. Studying on application and breeding of insect-resistant hybrid. *China Cotton*, 1997, 24(7):15-17. (in Chinese)
- [15] 唐灿明, 朱协飞, 张天真, 潘家驹, 陈安丰, 沈晋良, 孟凤霞, 周威君, 高丛芬, 吴益东, 陈进. 转 Bt 基因抗虫棉 R19 品系的棉铃虫抗性表现及抗虫性遗传研究. *农业生物技术学报*, 1997, 5(2):195-200.
Tang C M, Zhu X F, Zhang T Z, Pan J J, Chen A F, Shen J L, Meng F X, Zhou W J, Gao C F, Wu Y D, Chen J. Inheritance and resistance of transgenic Bt cotton line R19 to *helicoverpa armigera*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1997, 5(2):195-200. (in Chinese)

(责任编辑 王红艳)