

几个棉花基因的过量表达对遗传转化的影响

李元宝¹, 罗晓丽², 肖娟丽², 王志安², 司怀军¹, 吴家和³

(1. 甘肃农业大学, 甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 兰州 730070; 2. 山西省农业科学院棉花研究所, 山西 运城 044000; 3. 中国科学院微生物研究所植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101)

摘要:以棉花品种冀合 713 和晋棉 14 为材料, 通过农杆菌介导法将 4 个棉花内源基因 (*GhPIP*, *GhAPX*, *GhCYP*, *GhWRKY*) 过量表达载体分别导入上述两种材料, 均成功诱导出愈伤组织, 并获得再生植株。结果表明转 4 个基因外植体的愈伤组织诱导、体细胞胚胎分化和植株再生存在着显著或极显著的差异, 但两个品种之间的差异不显著。与转对照载体 CK (pCAMBIA 2300) 相比, 转录因子 *GhWRKY* 的过量表达显著地降低了愈伤组织的诱导、胚胎发生和植株再生; 具有调控功能的蛋白酶基因 *GhCYP* 也显著地降低了愈伤组织诱导率; 而两个酶蛋白基因 *GhPIP* 和 *GhAPX* 的过量表达在各过程中均没有不利影响。PCR 鉴定结果表明获得再生植株的转化率没有明显的变化。上述结果揭示结构与功能不同的基因, 在棉花中过量表达会不同程度的影响棉花的遗传转化效率, 其中转录因子和调控蛋白的影响较大, 这也为衡量棉花遗传转化中不同基因的导入所需要的工作量和群体大小提供了一些理论基础和实际应用价值。

关键词:棉花; 不同基因; 影响; 遗传转化

doi:10.3969/j.issn.1008-0864.2011.01.02

中图分类号:S562.035.3

文献标识码:A

文章编号:1008-0864(2011)01-0009-06

Effects of Different Cotton Genes' Over-expression on Genetic Transformation

LI Yuan-bao¹, LUO Xiao-li², XIAO Juan-li², WANG Zhi-an², SI Huai-jun¹, WU Jia-he³

(1. Gansu Key Laboratory of Crop Genetic and Germplasm Enhancement, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070;

2. Institute of Cotton Research, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Shanxi Yuncheng 044000;

3. State Key Laboratory of Plant Genomic, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Four plant over-expressive vectors containing different cotton genes (*GhPIP*, *GhAPX*, *GhCYP* and *GhWRKY*) were respectively transformed into 2 cotton cultivars, Jihe 713 and Jinmian 14 mediated by *Agrobacterium*. Kanamycin-resistant callus from 2 varieties were all successfully induced, which then differentiated somatic embryo, and eventually regenerated plants. The results showed that the differences of callus induction, somatic embryo differentiation and plant regeneration were significant among the 4 kinds of vectors containing various cotton genes, but no significant differences were found between the 2 cotton genotypes. Compared with those transformed control vector pCAMBIA2300, the over-expression of transcript factor *GhWRKY* in cotton tissues significantly reduced the ratio of explants' callus induction, calli somatic embryogenesis and plant regeneration. The *GhCYP*'s over-expression also lowered the ratio of callus induction, due to its regulatory function. The over-expression of *GhPIP* and *GhAPX* had no adverse effects on the process of callus induction, embryogenesis and plant regeneration. The PCR detection results of regenerated plants showed that there were no obvious differences among the transformation rate. The above results indicated that the over-expression of genes with different structure and function could affect the efficiency of cotton genetic transformation, especially the transcript factor and regulatory protein, and will provide theoretical basis and practical value for measuring the necessary workload and population size in cotton genetic transformation of different genes.

Key words: *Gossypium hirsutum* L.; different gene; effect; genetic transformation

收稿日期:2010-10-14; 接受日期:2010-11-26

基金项目:国家转基因重大专项(2008ZX08010-004; 2009ZX08005-009B); 山西省农业科学院支撑项目(YGX0702)资助。

作者简介:李元宝, 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail:liyhb312@126.com。通讯作者:吴家和, 副研究员, 博士, 主要从事植物分子生物学与基因工程研究。E-mail:wujiahe@im.ac.cn

棉花是我国重要的经济作物,涉及到农业和纺织工业两大产业。另外,由于棉花是以利用纤维为主的农作物,在经过安全评定后推广,对环境造成的影响较低,因此转基因技术在棉花生产中具有广泛的发展前景。但植株再生困难、基因型依赖性强、转化周期长,转化效率低且不稳定等因素一直制约着棉花遗传转化的发展^[1]。而棉花遗传转化效率低除了与棉花本身再生困难有关外,是否与所转外源基因的过量表达相关,目前为止还鲜有报道。本研究利用农杆菌介导法将4个不同类型的棉花内源基因的过量表达载体及对照载体 pCAMBIA 2300 分别导入棉花品种冀合 713 和晋棉 14 中,通过比较它们在转化过程中的出愈率、愈伤分化率、再生植株数和转化率,来更深入了解结构与功能不同的基因对棉花转基因效率的影响,以期为提高棉花的遗传转化效率提供一些理论依据和新的思路。

1 材料和方法

1.1 试验材料

棉花品种冀合 713 和晋棉 14 均由山西省农业科学院棉花研究所资源室提供。

四个分别含有棉花内源基因 *GhPIP*、*GhAPX*、*GhCYP* 和 *GhWRKY* 的植物表达载体和 pCAMBIA 2300 载体及农杆菌菌株 LBA4404 均由中国科学院微生物研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体材料的获得 根据张献龙^[2]和陈

志贤等^[3]方法,并略有改动。取棉花品种冀合 713 和晋棉 14 两个品种的种子进行脱绒、消毒与无菌培养获取无菌苗后,取其下胚轴中部切段(5~7 mm)作为外植体材料。

1.2.2 农杆菌工程菌液的制备 分别挑取含有 pCAMBIA 2300 (CK)、*GhPIP*、*GhAPX*、*GhCYP* 和 *GhWRKY* 的新鲜单菌落接种于 50 mL 加有 50 mg/L 卡那霉素(Kan)和 25 mg/L 利福平的 LB 液体培养基中,于 28℃、240 r/min 避光振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.5,然后转入无菌离心管中,于 5 000 r/min 离心 6 min 收集菌体,用 1/2MS 液体培养基重新悬浮即可用于外植体材料的侵染。

1.2.3 激素组配与培养基配制 转化各阶段的培养基配制分别如表 1 所示,培养基在灭菌前,用 1 mol/L KOH 将 pH 调至 5.8,并在 121℃,107.87 kPa 压力下高温高压灭菌 15 min。

1.2.4 愈伤组织的诱导 将下胚轴切段(5~7 mm)与含不同基因的农杆菌在 MS1 培养基(本实验所用培养基配方见表 1)中共培养 48 h 后平放入愈伤组织诱导培养基 MSB1^[6~9]中,置于 28±2℃,冷光源 135 μmol/m²/s,光照 12 h 条件下进行培养。

1.2.5 愈伤组织的增殖继代 将获得抗性的愈伤组织于增殖培养基 MSB2 中继代,培养 4~8 周左右有些愈伤组织分化,出现颗粒状的胚性愈伤组织,未出现分化的愈伤组织继续在增殖培养基 MSB2 中继代培养至出现分化。

1.2.6 体细胞的成熟、萌发和植株再生 将分化的胚性愈伤组织转接至体细胞胚培养基 MSB3

表 1 转化各阶段所用的培养基配制

Table 1 A range of media used in cell culture and plant regeneration.

培养基 Media	基本成分 Basic components	激素 Phytohormone	抗生素和附加物 Antibiotics and accessories	用途 Usage
MS1	1/2 MS + 20 g/L Glucose + 2.5 g/L Phytigel			无菌苗培养 Aseptic seedlings culture
MSB1	MSB + 30 g/L Glucose + 2.5 g/L Phytigel	0.1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L KT	500 mg/L Cefotaxime + 50 mg/L Kanamycin	愈伤组织诱导 Calli induction
MSB2	MSB + 30 g/L Glucose + 2.5 g/L Phytigel			体细胞胚胎分化 Somatic embryo differentiation
MSB3	MSB + 30 g/L Glucose + 2.5 g/L Phytigel		1.0 g/L Asn + 2.0 g/L Gln	体细胞胚发育与再生 Somatic embryo development and regeneration

注:MSB 为 MS 盐 + B₅ 维生素 + 2 × KNO₃ (3.8 g/L)^[4,5]

Note: MSB means MS salt + B₅ vitamins + 2 × KNO₃ (3.8 g/L)^[4,5].

中,继代培养2~3次直至获得再生苗,待再生苗长出3~5片叶时,移栽于温室或以嫁接方式进行繁殖。

1.2.7 实验时间和观察计数 每瓶放置8个下胚轴,每个基因转化15瓶作为一个实验处理,三次重复。待外植体在MSB1中培养5周后,统计所产生的愈伤数;将所产生的愈伤组织在MSB2培养基中继代培养5次后,统计期间分化的所有愈伤组织数,并在8个月后统计所获得的总再生

苗数。采用SAS软件进行实验数据处理与统计分析。

1.2.8 PCR检测分析 用改良的CTAB法^[10,11]提取棉花基因组总DNA,进行PCR检测。为了排除扩增片段是由于植物本身的内源基因所扩增的假阳性结果,设计引物时,均在35S启动子的部分序列中选取正向引物,而在所转基因的部分序列中选取反向引物,详见表2。

表2 PCR检测时各基因的引物序列

Table 2 Primer sequences of each gene for PCR detection.

基因名称 Gene name	正向引物(F) Forward primer (F)	反向引物(R) Reverse primer (R)
<i>GhPIP</i>	5'-AGGTGGCTCTACAAATGCD-3'	5'-GGAGGTTATCCAAGCATAG-3'
<i>GhAPX</i>	5'-AGCAGGACACTCTGGTCTACT-3'	5'-AGGTGAGGTTAGGGAAGTGC-3'
<i>GhCYP</i>	5'-AGCAGGACACTCTGGTCTAC-3'	5'-CCGGTGCTTCTTGATGA-3'
<i>GhWRKY</i>	5'-AGAACTCGCCGTGAAGACTG-3'	5'-TTGTGCGTCATCCCTTACG-3'
CK	5'-AGAAGACCAAAGGGCTATTG-3'	5'-GAACATTACATTGACGCAGG-3'

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导

两个棉花品种的下胚轴外植体在MS1培养基中共培养48h后转入MSB1培养基上培养7d左右,其两端开始膨大,15d左右可以看到愈伤组织发生,25d后均产生了大量的愈伤组织,不同处理间的颜色与质地多样,主要包括淡黄色颗粒状疏松结构的愈伤组织(图1-A)、翠绿质地坚硬致密的愈伤组织(图1-B)、乳白色雪花状疏松结构的愈伤组织(图1-C)、褐化的愈伤组织(图1-D)等,这和已有文献报道的一致^[2,3,6]。但转4个基因和对照载体的外植体的出愈率存在显著和极显著的差别,由表3可以看出,转*GhPIP*和*GhWRKY*的外植体分别表现出最高和最低的出愈率,转*GhAPX*和*GhCYP*的外植体其出愈率居中,并且发现在转*GhPIP*的外植体上产生了很多雪花状生长很快的乳白色愈伤组织。

2.2 愈伤组织的分化与植株再生

2.2.1 愈伤组织的分化 将抗性愈伤组织于MSB2培养基中继代培养4~8周左右,各种愈伤组织开始呈现不同规律的分化,如:淡黄色颗粒状疏松结构的愈伤组织较易分化为胚性愈伤组织,

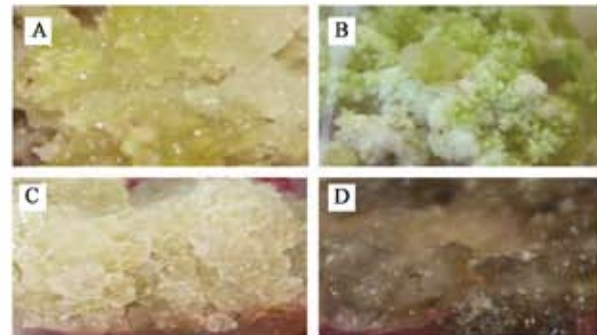


图1 诱导愈伤组织的不同特征类型

Fig. 1 The different types of callus induced from cotton hypocotyls.

A: 淡黄色、疏松颗粒状; B: 翠绿色、质地坚硬型; C: 乳白色、雪花状; D: 严重褐化型

A: Pale yellow, loosen, and granule type (PLG); B: Emerald and hard texture type (EHT); C: Ivory and snowflake type (IS); D: Deep brown callus type (DBC).

且在MSB2培养基上经继代培养较易分化成体细胞胚胎,这种分化现象在转*GhPIP*,*GhAPX*及对照载体pCAMBIA 2300的愈伤组织中比较多见;褐化的愈伤组织在转入MSB2培养基后褐化现象更严重、生长缓慢,经过长期的培养大多会死亡,仅个别会在愈伤边缘处出现绿色胚状体,这种愈伤在转*GhWRKY*的材料中较为多见;翠绿、质地坚硬致密的愈伤组织中间的疏松部分经继代培养,

表3 不同外源基因过量表达对冀合713和晋棉14愈伤组织诱导的影响
Table 3 The effects of the different cotton gene overexpression on callus induction from hypocotyls explants of Jihe713 and Jinmian 14.

品种 Cultivars	基因名称 Gene name	平均诱导愈伤组织数 Average number of induced callus	愈伤组织诱导率(%) Rate of differentiated callus(%)	愈伤组织的特征 Character of callus
冀合713 Jihe713	<i>GhPIP</i>	102	85.0*	淡黄色疏松颗粒;乳白色雪花状(PLG; IS) Pale yellow, loosen, and granule type(PLG); Ivory and snowflake type(IS)
	<i>GhAPX</i>	94	78.3	淡黄色疏松颗粒(PLG) Pale yellow, loosen, and granule type(PLG)
	<i>GhCYP</i>	58	48.3**	翠绿质地坚硬(EHT) Emerald and hard texture type(EHT)
	<i>GhWRKY</i>	27	22.5**	翠绿质地坚硬;组织褐化严重(EHT; DBC) Emerald and hard texture type(EHT); Deep brown callus type(DBC)
	CK	87	72.5	淡黄色疏松颗粒;翠绿质地坚硬(PLG; EHT) Pale yellow, loosen, and granule type(PLG); Emerald and hard texture type(EHT);
晋棉14 Jinmian14	<i>GhPIP</i>	109	90.8*	淡黄色疏松颗粒;乳白色雪花状(PLG; IS) Pale yellow, loosen, and granule type(PLG); Ivory and snowflake type(IS)
	<i>GhAPX</i>	90	75.0	淡黄色疏松颗粒(PLG) Pale yellow, loosen, and granule type(PLG)
	<i>GhCYP</i>	62	51.7**	翠绿质地坚硬(EHT) Emerald and hard texture type(EHT)
	<i>GhWRKY</i>	24	20.0**	翠绿质地坚硬;组织褐化严重(EHT; DBC) Emerald and hard texture type(EHT); Deep brown callus type(DBC)
	CK	91	75.8	淡黄色疏松颗粒;乳白色雪花状(PLG; IS) Pale yellow, loosen, and granule type(PLG); Ivory and snowflake type(IS)

注:“*”表示 $P < 0.05$ 水平下差异显著;“**”表示 $P < 0.01$ 水平下差异极显著。

Note: “*” means significant difference at $P < 0.05$ level; “**” means very significant difference at $P < 0.01$ level.

可产生大量的乳白色疏松结构的愈伤组织,但后期仍难以分化,在转 *GhCYP* 的材料中比较普遍;乳白色雪花状疏松结构的愈伤组织在转入 MSB2 培养基后,生长速度快,但却一直保持这种状态,很难分化,这种现象在转 *GhPIP* 的外植体上表现突出。因此,在实验中,应尽可能挑选较易分化的愈伤组织继续培养观察,及时淘汰不能分化的愈伤组织,以减少转化的工作量,缩短实验周期。

2.2.2 胚状体的发生和植株再生及 PCR 检测

将分化的胚性愈伤组织转入用透气膜封口的 MSB3 培养基中,继代培养 1~2 次后,部分愈伤组织能够逐渐形成球形、心形、鱼雷形等的胚状体,再经过 1~2 次继代培养后获得根、子叶、真叶

完整的再生植株;但部分胚性愈伤组织在继代培养的过程中,由于褐化严重或已分化的愈伤组织发生再愈伤化转变为愈伤组织而不能成苗,这种现象在转 *GhWRKY* 的材料中尤为严重。如表4所示,冀和713和晋棉14在转 *GhWRKY* 基因时,其愈伤组织分化率仅分别达到 22.2%、29.2%,极显著的低于转对照基因;转 *GhCYP* 基因的材料愈伤组织分化率虽高于转 *GhWRKY* 基因,但仍显著低于转对照基因;而转 *GhPIP*、*GhAPX* 基因的材料其愈伤组织分化率则与对照相当,均达 70% 左右。同时也可看出获得的独立转化体再生苗数虽然存在显著或极显著差异,但经 PCR 验证可知,转不同基因的材料其阳性率均在 75.0% 或以上

水平,不存在显著差异。

综上所述可以看出,棉花基因 *GhPIP*、*GhAPX*、*GhCYP*和 *GhWRKY* 的植物表达载体及对照载体 pCAMBIA2300 的转化效率在冀合 713 和晋棉 14 中没有明显的差异。但就各基因而言,却呈现出显著或极显著差异,其中转 *GhWRKY* 转录因子的外植体无论是愈伤组织诱导率还是愈伤组织的分化率均显著的低于转其他基因。转 *GhCYP* 的外植体出愈率及愈伤分化率虽高于转 *GhWRKY*,但较转化 *GhPIP*、*GhAPX* 基因及对照 pCAMBIA2300 仍明显偏低。85% 以上转 *GhPIP* 的外植体均能产生愈伤组织,显著高于转其他基因,但其愈伤分

化及植株再生与转 *GhAPX* 及对照载体 pCAMBIA 2300 无明显差异,这可能与转 *GhPIP* 的外植体上产生的愈伤组织有很多是后期难以分化的雪花状生长很快的乳白色愈伤组织有关。但 PCR 检测结果表明,转各个基因的阳性植株产生率均与转对照 pCAMBIA2300 相近,筛选效率基本一致。所以综合来看,不同的基因对转化效率的影响主要是在愈伤组织诱导、体细胞胚胎分化和植株再生等阶段,这可能与所转靶基因本身在棉花细胞内过量表达而影响了棉花组织培养和再生的条件有关。

表 4 冀合 713 和晋棉 14 中愈伤组织的分化、植株再生及 PCR 检测

Table 4 Callus differentiation, plants regeneration and PCR detection in Jihe713 and Jinmian14.

品种 Cultivars	基因名称 Gene name	平均分化愈伤组织数 Average number of embryogenesis callus	愈伤组织分化率(%) Differentiation rate of callus (%)	平均独立转化体苗数 Average number of transformants	PCR 阳性植株率(%) Positive ratio of regenerated plants by PCR (%)
冀合 713 Jihe713	<i>GhPIP</i>	74	72.5	69 *	79.7
	<i>GhAPX</i>	65	69.1	58	82.8
	<i>GhCYP</i>	29	50.0 *	21 **	76.2
	<i>GhWRKY</i>	6	22.2 **	4 **	75.0
	CK	56	64.4	52	80.8
晋棉 14 Jinmian14	<i>GhPIP</i>	77	70.6	72 *	84.7
	<i>GhAPX</i>	58	64.4	55	81.8
	<i>GhCYP</i>	30	48.4 *	23 **	78.2
	<i>GhWRKY</i>	7	29.2 **	4 **	75.0
	CK	57	62.6	56	82.1

注:“*”表示 $P < 0.05$ 水平下差异显著;“**”表示 $P < 0.01$ 水平下差异极显著。

Note: “*” means significant difference at $P < 0.05$ level; “**” means very significant difference at $P < 0.01$ level.

3 讨论

以往很多文献报道棉花转基因的效率与受体植物的基因型、转化所用各种培养基的激素组配及培养条件等多种因素密切相关^[1,12~15]。本研究在上述转化及培养条件一致的情况下,设置重复实验,以基因型不同的两个棉花品种冀合 713 和晋棉 14 的种子下胚轴为外植体,分别转化 4 个棉花基因 *GhPIP*、*GhAPX*、*GhCYP* 和 *GhWRKY* 的过量表达框及对照载体 pCAMBIA2300,结果均获得转基因阳性植株,两种不同棉花品种的转化效率无明显差异,没有出现体细胞胚胎发生的基因型限制^[1,9,16~18],这可能是所选的这两个棉花品种的基因型相近的缘故。

但在转化 4 个棉花内源基因的过程中,发现各个基因愈伤组织的诱导率、胚胎分化率及植株再生率存在明显的差异,且这种差异在不同的实验重复中表现出相同的规律。其中转 *GhWRKY* 的外植体无论是愈伤组织诱导率还是愈伤组织的分化率均明显的低于转其他基因,这可能由于 *GhWRKY* 是一个转录因子,在转化的过程中该基因的过量表达调控了某些不利于愈伤组织产生与分化的基因表达,进而影响愈伤组织的诱导与分化。具有调控功能的蛋白酶基因 *GhCYP* 在愈伤组织和体细胞胚胎里过量表达也影响了外植体的出愈及愈伤组织的分化,使转化效率显著的低于转空白对照载体 pCAMBIA2300。而转两个酶蛋白基因 *GhPIP* 和 *GhAPX* 对愈伤组织诱导和愈伤组织胚胎分化的影响与对照相似,甚至在愈伤组

织诱导时有正向的影响。

在转化中还发现各种类型愈伤组织的后期分化能力及植株再生能力是不同的,因此,应尽可能的挑选较易分化的愈伤组织继续培养观察,及时淘汰不能分化的愈伤组织,以减少转化量,缩短实验周期。

通过本研究可以看出,棉花遗传转化再生困难,转化效率低不仅与受体基因型及各阶段的培养条件有关,还与所转基因本身的结构与功能有关。这也将为进一步评价转基因效率和了解为何不同基因在植物中的转化效率不同提供一定的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Mishra R, Wang H Y, Yadav N R, *et al.*. Development of a highly regenerable elite Acala cotton (*Gossypium hirsutum* cv. Maxxa)-a step towards genotype independent regeneration[J]. *Plant Cell Tis. Org. Cult.*, 2003, 73(1):21-35.
- [2] 张献龙,孙济中,刘金兰,等. 陆地棉体细胞胚胎发生与植株再生[J]. *遗传学报*, 1991, 18(5):461-467.
- [3] 陈志贤,范云六,李淑君,等. 利用农杆菌介导法转移 *tfidA* 基因获得可遗传的抗 2,4-D 棉株[J]. *中国农业科学*, 1994, 27(2):31-37.
- [4] Trolinder N L, Goodin J R. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*) II. Requirements for embryo development and plant regeneration[J]. *Plant Cell Tis. Org. Cult.*, 1988, 12:43-53.
- [5] Sun Y Q, Zhang X L, Huang Chao, *et al.*. Somatic embryogenesis and regeneration from different wild diploid cotton (*Gossypium*) [J]. *Plant Cell Rep.*, 2006, 25:289-296.
- [6] 陈志贤,李淑君, Trolinder N L, 等. 棉花细胞悬浮培养胚胎发生和植株再生某些特性的研究[J]. *中国农业科学*, 1987, 20(5):6-11.
- [7] 张家明,孙济中,刘金兰,等. 陆地棉体细胞植株再生及其移栽技术研究[J]. *作物学报*, 1994, 20(2):210-216.
- [8] 汪静儿,孙玉强,燕树锋,等. 陆地棉原生质体培养与植株再生技术研究[J]. *棉花学报*, 2008, 20(6):403-407.
- [9] Trolinder N L, Goodin J R. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*) I. Effects of source of explant and hormone regime[J]. *Plant Cell Tis. Org. Cult.*, 1988, 12:31-42.
- [10] 宋国立,崔荣霞,王坤波,等. 改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA[J]. *棉花学报*, 1998, 10(5):273-275.
- [11] Zhang J F, Stewart M J. Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA[J]. *J. Cot. Sci.*, 2000, 4:193-201.
- [12] 张家明,张献龙. 陆地棉愈伤诱导及胚胎发生能力的遗传分析[J]. *中国农业科学*, 1997, 30(3):36-43.
- [13] Wu S H, Wang H H, Li F F. *et al.*. Enhanced *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calli of upland cotton via efficient selection and timely subculture of somatic embryos[J]. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 2008, 26(3):174-185.
- [14] Wu J H, Zhang X L, Nie Y C, *et al.*. Factors affecting somatic embryogenesis and plant regeneration from a range of recalcitrant genotypes of Chinese cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 2004, 40(8):371-375.
- [15] Han G Y, Wang X F, Zhang G Y, *et al.*. Somatic embryogenesis and plant regeneration of recalcitrant cottons (*Gossypium hirsutum*) [J]. *Afr. J. Biotechnol.*, 2009, 8(3):432-437.
- [16] 董合忠. 不同基因型棉花下胚轴离体培养胚状体发生的研究[J]. *莱阳农学院学报*, 1991, 97-101.
- [17] Trolinder N L, Chen Z X. Genotype specificity of the somatic embryogenesis response in cotton[J]. *Plant Cell Rep.*, 1989, 8:133-136.
- [18] Jin S, Zhang X, Nie Y, *et al.*. Identification of a novel elite genotype for *in vitro* culture and genetic transformation of cotton [J]. *Biol. Plantarum*, 2006, 50(4):519-524.