

光质对离体诱导棕色棉纤维基因表达影响的 cDNA-SRAP 分析

陈沙沙¹, 樊洪泓¹, 关蕾¹, 林毅^{1*}, 蔡永萍¹, 钱森和^{1,2}, 孙旭¹

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036; 2. 安徽工程大学, 安徽 芜湖 241000)

摘要: 以离体培养棕色棉纤维(暗培养 10 d)为材料, 分别用红、黄、蓝、白光进行处理, 在 24 h 光照条件下培养 10 d 后, 利用 cDNA-SRAP 技术对其基因表达进行分析。对其中 16 个差异片段测序后进行同源性比对和功能分析表明: 2 个序列功能与植物抗逆性有关(CNGC5 类似蛋白基因、(+)- δ -杜松烯合成酶); 3 个序列与生物代谢相关(β -1,3-葡聚糖酶 13 基因、质膜胆碱转运蛋白基因、tau 类谷胱甘肽转移酶基因)。其中, 谷胱甘肽转移酶基因与原花青素合成前体物质的转运有关, 光质可能通过影响谷胱甘肽转移酶基因进而对原花青素的合成产生影响。

关键词: 离体培养; cDNA-SRAP; 谷胱甘肽转移酶; 植物抗逆性

中图分类号: S652.035.3 **文献标志码:** A

文章编号: 1002-7807(2014)01-0034-07

Differential Expression Analysis of the Effect of Light Quality on Tissue Culture of Brown Cotton Fiber by cDNA-SRAP

Chen Shasha, Fan Honghong, Guan Lei, Lin Yi, Cai Yongping, Qian Senhe, Sun Xu

(1. Life Science School, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China; 2. Anhui Polytechnic University, Wuhu, Anhui 241000, China)

Abstract: Fibers of brown cotton were treated with different light qualities (red, yellow, blue, and white) for 10 days in 24-h light conditions, after which their gene expressions were analyzed using the cDNA-SRAP technique. The biological functions of 16 differentially expressed genes were predicted and characterized. The results showed that two fragments had high sequence similarity with resistance genes (CNGC5-like protein gene, (+)- δ -cadinene synthase (cdn1-C6) pseudogene), 3 sequences related to biological metabolism (sugar transporter/spinner transmembrane protein (PtrOATP2)), β -1,3-glucanase 13 (B13G_13) mRNA, and tau class glutathione transferase GSTU43). Among them, the glutathione transferase was associated with the synthesis of proanthocyanidins. Light quality may affect glutathione transferase, thereby affecting the synthesis of proanthocyanidins.

Key words: *In vitro* culture; cDNA-SRAP; glutathione transferase; stress in plants

棕色棉是一种纤维本身呈棕色的彩色棉, 目前棕色棉色素成分尚不清楚。肖月华等^[1]利用 cDNA-AFLP (cDNA-amplified fragment length polymorphism) 的方法分离得到一个黄酮类基因片段, 又根据植物黄酮类物质代谢过程中一些重要的酶基因的保守序列, 从彩色棉中分离到 4 个黄酮类基因, 共获得了 5 个色素合成相关基因 *GhCHI*、*GhF3H*、*GhDFR*、*GhANS*、*GhANR*, 推测棕色棉中的色素物质可能是原花青素。詹少华等^[2-3]研究认为缩合单宁很可能是棕色棉色素的合成前

体, 且在未发育成棉纤维的种皮细胞中合成。

原花青素合成与花青素合成属于植物黄酮类化合物的生物合成的一部分。无色花青素及花青素在无色花青素还原酶(Leucoanthocyanidin reductase, LAR)和花青素还原酶(Anthocyanidin reductase, ANR)的作用下, 能够分别合成儿茶素和表儿茶素, 儿茶素和表儿茶素再进一步缩合生成原花青素。植物花青素积累是一个复杂的过程, 除受到多基因的控制外, 还受到各种环境因素, 如光、温度、糖、激素等的影响, 其中, 光是影响花

收稿日期: 2013-04-08

作者简介: 陈沙沙, 女, 硕士研究生, chenshasha118@163.com; * 通讯作者, yjsc01@ahau.edu.cn

基金项目: 安徽省教育厅重点项目(KJ2011A103); 安徽省棉花产业创新体系

青素积累主要的外界环境因素之一,光可通过调控花青素合成途径中相关酶基因的表达而影响花的着色^[4]。

汪森等^[5-6]研究了光质对棕色棉纤维品质及纤维合成相关酶活性的影响。结果表明光质可以通过对纤维合成相关酶活性的调控来影响棕色棉纤维的品质。不同光质对棕色棉不同发育阶段的纤维合成代谢产生了不同的生理生化效应。

研究表明,棕色棉纤维颜色的呈现与光照有关,但关于纤维色素合成过程中是否存在光质调控尚不清楚,纤维色素合成和积累与光照是否存在一定关系仍需进一步研究。目前对棕色棉色素的研究多在野外复杂环境下生长的植株上进行。在野外条件下,水分,光照,温度等的变化是不可控制的,这样的研究条件和结果是高度可变的。2001年由 Li 和 Quiros^[7]提出一种基于 PCR 的新型分子标记技术——相关序列扩增多态性(Sequence-related amplified polymorphism, SRAP)。目前该技术已经在水稻、甘蓝、梨、玉米等植物上得到应用^[8]。因此,本实验以不同光质处理的离体培养的棕色棉纤维为材料,利用 cDNA-SRAP 技术对其基因表达进行分析,以期对棕色棉色素合成相关基因的光响应特性进行一定的阐述,希望为进一步明确原花色色素与纤维色素的关系,解决棕色棉纤维色素颜色不纯正、色素分布不均匀的问题提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料选用陆地棉品种百泉棕絮,棉絮为棕色,引自中棉所。大田种植,常规管理。于 2012 年 7—8 月早上 9 点左右对当日花挂牌,并于两日后采集,装入冰盒带回实验室。

1.2 方法

1.2.1 胚珠离体培养。培养所用器皿统一为 100 mL 三角瓶。每瓶装 30 mL 培养基,高温高压灭菌。以 BT 培养基^[9]为基础,添加 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ 和 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA。将当天采集的幼铃,剥去苞片、花冠及雄蕊,75% 酒精消毒 1 min 后再用 0.1% 氯化汞浸泡 15 min。在超净工作台中剥取胚珠,接种于培养基上。每瓶接种同一个子房的胚珠约 20

粒。置于 $(31 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下暗培养。

1.2.2 离体培养胚珠光质处理。选取胚珠(暗培养 10 d)长势基本一致的培养基分别用红、黄、蓝、白(透明)四种颜色的滤光膜(上海伟康厂)进行套袋,于光照培养箱 $((31 \pm 1)^\circ\text{C}, 24 \text{ h})$,光照强度为 $45 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 中培养 10 d 后,液氮冷冻并保存于 -80°C 冰箱中备用。以相同光照及温度条件下暗培养 20 d 胚珠为对照。

1.2.3 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链合成。棉花纤维总 RNA 的提取采用改良的 CTAB-PVP 法^[10],用紫外分光光度计和 1% 的琼脂糖凝胶电泳对总 RNA 进行定量和质量分析。于室温下风干,加入 $20 \sim 30 \mu\text{L}$ DEPC 水溶解, -80°C 保存备用。cDNA 第一链合成根据试剂盒(Takara Prime script first strand cDNA synthesis kit)说明书操作。

1.2.4 cDNA-SRAP 扩增反应。实验中使用的 SRAP 引物序列见表 1,8 个正向引物和 10 个反向引物配对共计 80 个引物组合。PCR 扩增反应体系包括 $2.5 \mu\text{L}$ 10×PCR 缓冲液、 $2.0 \mu\text{L}$ dNTPs、正向引物和反向引物各 $1.5 \mu\text{L}$ 、 $0.25 \mu\text{L}$ Taq 酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、 $1.5 \mu\text{L}$ cDNA 模板,补水至总体积 $25 \mu\text{L}$ 。其扩增程序为: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 35°C 1 min, 72°C 1 min, 5 个循环; 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 7 min。

表 1 试验所用引物的序列

Table 1 Sequences of primes used in this study

上游引物序列(5' - 3')	下游引物序列(5' - 3')
Upstream primer sequence	Downstream primer sequence
me1 TGAGTCCAAACCGGATA	em2 GACTGCGTACGAATTTGC
me2 TGAGTCCAAACCGGAGC	em3 GACTGCGTACGAATTGAC
me3 TGAGTCCAAACCGGAAT	em4GACTGCGTACGAATTTGA
me4 TGAGTCCAAACCGGACC	em5GACTGCGTACGAATTAAC
me5 TGAGTCCAAACCGGAAG	em6GACTGCGTACGAATTGCA
me6 TGAGTCCAAACCGGTAG	em14 GACTGCGTACGAATTCAG
me7 TGAGTCCAAACCGGTTG	em15 GACTGCGTACGAATTCTG
me8 TGAGTCCAAACCGGTGT	em16GACTGCGTACGAATTCGG
em1 GACTGCGTACGAATTAAT	em17 GACTGCGTACGAATTCCA
em7 GACTGCGTACGAATTCAG	

注: me1- me5,em1-em6 参考文献 [7] 报道的序列合成;me6-me8, em14-em17 参考文献[11]报道的序列合成。

Note: Synthesis of me1- me5 and em1-em6 were a reference to literature 8; Synthesis of me6- me8 and em14-em17 were a reference to literature 9.

1.2.5 SRAP 扩增产物的电泳检测。选择性扩增产物用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离。电泳缓冲液为 $1\times$ TBE, 预电泳 30 min 后, 将扩增产物与上样缓冲液 (4% 蔗糖, 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青) 按 5:1 混匀, 取 $10\ \mu\text{L}$ 上样, 80 W 恒定功率电泳约 1.5 h, 二甲苯青 FF 至胶板 2/3 处。电泳后银染^[12]。

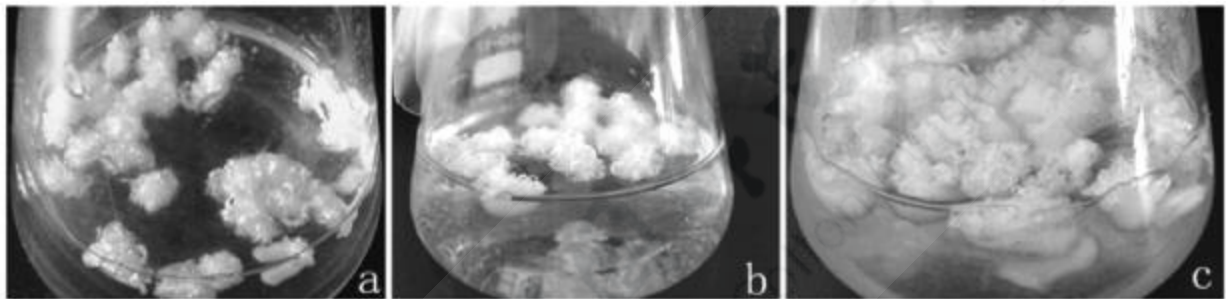
1.2.6 差异条带回收、再扩增及再回收测序分析。回收差异片段, 用相应的引物、反应体系和程序进行二次 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。其扩增产物经胶回收纯化试剂盒回收, pMD18-T 连接, 转入感受态细胞中经蓝白斑

筛选挑取阳性克隆, 上海生工生物工程公司进行测序。在 NCBI 上用 Blast 工具分析测序片段的核酸序列同源性, 并提交 NCBI 网站 Gen Bank 数据库。胶回收试剂盒购于上海生工生物工程有限公司, pMD18-T 载体购于 TaKaRa 公司。

2 结果与分析

2.1 棕色棉胚珠离体培养及光处理

在 Beasley 和 Ting 方法^[9]的基础上, 初步建立棕色棉胚珠离体培养体系。培养结果见图 1。光照对胚珠表皮细胞特化产生棉纤维的过程起到明显的抑制作用, 这与蒋淑丽等^[13]报道的完全一致。



a 为培养 10 d 胚珠; b 为培养 15 d 胚珠; c 为培养 20 d 胚珠。a: 10 DAC ovules; b: 15 DAC ovules; c: 20 DAC ovules

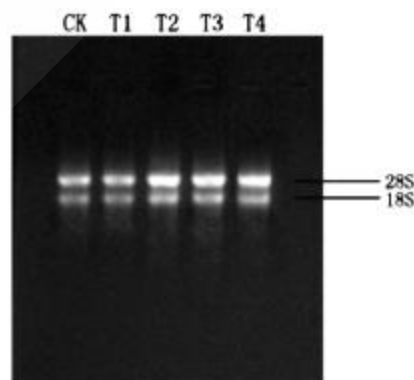
图 1 棕色棉胚珠暗培养 10 d、15 d、20 d 结果

Fig.1 The brown cotton ovules under dark culture conditions for 10 days, 15 days and 20 days

2.2 总 RNA 电泳检测

试验采用改良的 CTAB-PVP 法^[10]提取棉纤维总 RNA, 并利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 质量的检测。从图 2 中可以看出, 5 个样品的 RNA 经电泳后点样孔无残留, 泳道无拖带现

象。28 sRNA 与 18 sRNA 条带分离明显, 且 28 s 的亮度明显高于 18 s, 说明 RNA 的完整性较好, 质量较高, 没有发生降解和 DNA 的污染, 可以满足试验中反转录的要求。



CK: 对照 (暗培养 20 d); T1: 红光处理; T2: 黄光处理; T3: 蓝光处理; T4: 白光处理。

CK: Control (20 day after culture under dark treatment); T1: Brown cotton ovules under red light treatment; T2: Brown cotton ovules under yellow light treatment; T3: Brown cotton ovules under blue light treatment

T4: Brown cotton ovules under white light treatment.

图 2 棉纤维 RNA 电泳图

Fig. 2 Agarosegel electrophoresis of RNA from cotton fiber

2.3 cDNA-SRAP 扩增结果

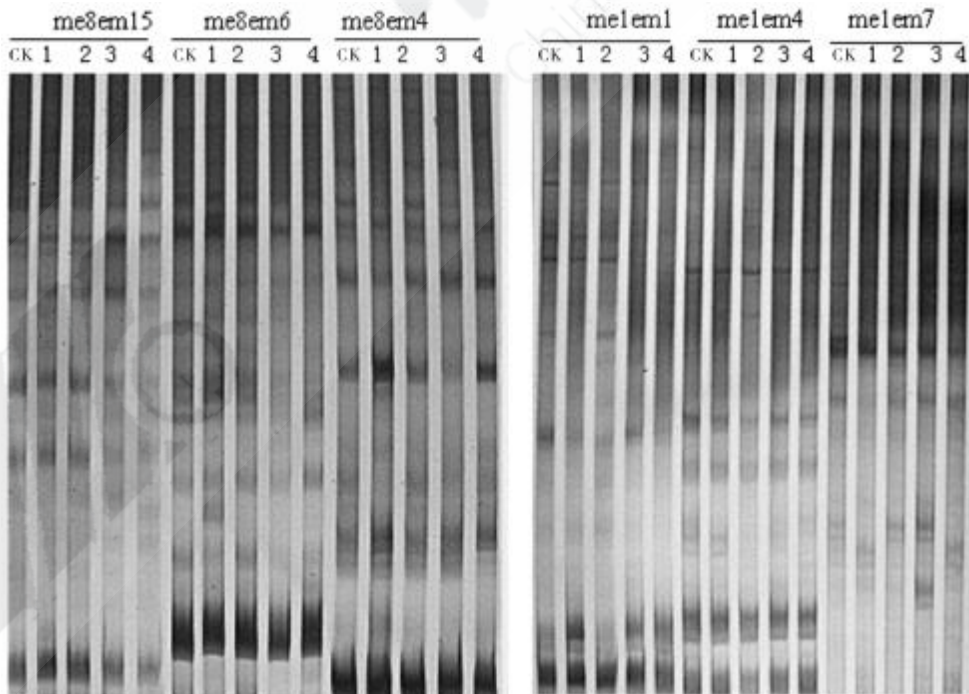
试验中,从 80 个引物组合中,筛选出 28 个重复性好、扩增条带清晰且多态性丰富的引物组合,进行 cDNA-SRAP 扩增及数据分析(表 2)。28

个引物组合共产生 401 条清晰条带,平均每个引物产生 14 条。其中,多态性条带 58 条,占总条带数 14.46%, 平均每对引物组合得到 2.07 条多态性条带。代表性带谱见图 3。

表 2 28 对 SRAP 引物组合的扩增结果

Table 2 Primer combinations and number of bands of cDNA-SRAP markers

引物组合 Primer combinations	总带数 The total number of bands	多态性条带数 The number of polymorphic bands	引物组合 Primer combinations	总带数 The total number of bands	多态性条带数 The number of polymorphic bands
me1em1	16	4	me6em4	14	1
me1em4	14	4	me6em6	19	2
me1em7	14	2	me7em1	20	2
me1em15	9	2	me7em4	14	2
me1em16	13	4	me7em15	16	4
me1em14	8	2	me7em16	13	1
me1em17	6	1	me8em2	16	2
me2em1	17	3	me8em3	15	1
me2em3	13	2	me8em4	14	2
me2em4	15	1	me8em6	15	1
me2em7	15	2	me8em15	19	2
me2em15	11	3	me8em16	19	1
me2em16	14	2	me8em17	14	2
me6em2	12	1	me6em3	16	2



CK: 对照(暗培养 20 d); 1: 红光处理; 2: 黄光处理; 3: 蓝光处理; 4: 白光处理。

CK: Control (20 day after culture under dark treatment); 1: Brown cotton ovules under red light treatment;

2: Brown cotton ovules under yellow light treatment; 3: Brown cotton ovules under blue light treatment

4: Brown cotton ovules under white light treatment.

图 3 部分引物组合的扩增图

Fig. 3 Amplification profile for several primer combinations

2.4 差异片段的同源性比对和功能分析

选择重复扩增稳定表现的差异片段进行测序,在NCBI上进行同源性比对和功能分析,结果表明,与已知基因同源性较高的序列有16条(表3,表4),包括假定蛋白(Gb-5、Gb-10)、功能基因

(Gb-1、Gb-3、Gb-7、Gb-8、Gb-13、Gb-14、Gb-15、Gb-16)、叶绿体基因(Gb-11)、原花青素合成相关基因(Gb-4)、棉纤维发育相关基因(Gb-2、Gb-6)和植物抗逆性相关基因(Gb-9、Gb-12)等。

表3 差异cDNA片段序列同源性分析

Table 3 Sequence identity analysis of differential cDNA fragments

序列编号 cDNA-SRAP fragment	大小 Length / bp	同源性 Homology	E 值 Blast score	相似性 Similarity
Gb-1	302	陆地棉 cDNA 克隆, mRNA 序列 DT464590.1 GH_CHX15021.r GH_CHX <i>Gossypium hirsutum</i> cDNA clone GH_CHX15021 3', mRNA sequence	2e-73	86%
Gb-2	275	海岛棉纤维均一化 cDNA 文库 cDNA 克隆, mRNA 序列 GR709358.1 <i>Gossypium barbadense</i> L. line 3-79 fiber normalized cDNA library <i>Gossypium barbadense</i> cDNA clone 10-J19 5', mRNA sequence	4e-77	86%
Gb-3	239	陆地棉顶端分生组织, 蓓蕾和花 cDNA, mRNA 序列 HO107217.1 cotton shoot apical meristems, buds and flowers <i>Gossypium hirsutum</i> cDNA 3', mRNA sequence	9e-40	83%
Gb-4	208	毛果杨 tau 类谷胱甘肽转移酶 GSTU43ADB11369.1 <i>Populus tri-</i> <i>chocarpa</i> tau class glutathione transferase GSTU43	1e-15	62%
Gb-5	212	毛果杨假定蛋白, mRNA XM_002315092.1 <i>Populus trichocarpa</i> predicted protein, mRNA	0.002	75%
Gb-6	218	马铃薯 β -1,3-葡聚糖酶 13 (B13G_13) mRNA JX838867.1 <i>Solanum</i> <i>tuberosum</i> beta-1,3-glucanase 13(B13G_13)mRNA, complete cds	3.8	80%
Gb-7	249	苜蓿胆碱转运蛋白 mRNA XM_003637379.1 <i>Medicago truncatula</i> Choline transporter-like protein (MTR_085s0030) mRNA, complete cds	4e-07	83%
Gb-8	228	陆地棉克隆, 完整序列 AC243156.1 <i>Gossypium hirsutum</i> clone MX119B12-jot, complete sequence	2e-04	80%
Gb-9	180	天蓝苜蓿 CNGC5 类似蛋白基因 DQ662640.1 <i>Medicago lupulina</i> CNGC5-like protein gene, partial cds	0.070	83%
Gb-10	154	蓖麻保守的假定蛋白, mRNA XM_002512032.1 <i>Ricinus commu-</i> <i>nis</i> conserved hypothetical protein, mRNA	4e-10	76%
Gb-11	145	棉花叶绿体, 完整序列 JF317355 <i>Gossypium stocksii</i> chloroplast, complete genome	2e-45	98%
Gb-12	173	陆地棉(+)- δ -杜松烯合成酶的假基因, 完整序列 AY800006.1 <i>Gossypium hir-</i> <i>sutum</i> (+)-delta-cadinene synthase (cdn1-C6)pseudogene, complete sequence	7e-08	72%
Gb-13	166	陆地棉克隆, 完整序列 AC243162.1 <i>Gossypium hirsutum</i> clone MX169F24-jhp, complete sequence	3e-50	89%
Gb-14	180	陆地棉克隆, 完整序列 AC243143.1 <i>Gossypium hirsutum</i> clone MX055E05-jos, complete sequence	3e-13	80%
Gb-15	152	苜蓿细胞核酸结合蛋白 XP_003637905.1 <i>Medicago truncatula</i> Cellular nucleic acid-binding protein	8e-06	70%
Gb-16	192	陆地棉克隆, 完整序列 AC243134.1 <i>Gossypium hirsutum</i> clone MX018L03-joq, complete sequence	7e-09	72%

表 4 cDNA-SRAP 差异条带的分布

Table 4 Distribution of differential bands by cDNA-SRAP analysis

序列编号 cDNA-SRAP fragment	引物组合 Primer combinations	差异片段分布 Distribution of differential bands					序列编号 cDNA-SRAP fragment	引物组合 Primer combinations	差异片段分布 Distribution of differential bands				
		CK	T1	T2	T3	T4			CK	T1	T2	T3	T4
		Gb-1	me6em15	+	+	+			-	+	Gb-9	me7em15	-
Gb-2	me8em15	+	+	+	-	+	Gb-10	me7em15	-	+	-	-	-
Gb-3	me8em4	+	-	+	+	-	Gb-11	me2em1	-	+	+	+	+
Gb-4	me8em2	-	+	+	+	-	Gb-12	me1em7	-	-	-	+	-
Gb-5	me6em3	+	-	+	-	-	Gb-13	me6em15	+	+	+	-	+
Gb-6	me2em7	+	+	+	-	+	Gb-14	me1em1	+	+	+	+	-
Gb-7	me2em1	-	+	-	-	-	Gb-15	me7em1	+	+	+	-	+
Gb-8	me1em16	+	+	-	-	-	Gb-16	me8em17	+	+	-	+	+

注:CK 为对照。T1、T2、T3、T4 分别表示红光处理、黄光处理、蓝光处理和白光处理。“+”表示存在该条带;“-”表示该片段缺失。

Note: CK was the control. T1: Brown cotton ovules under red light treatment. T2: Brown cotton ovules under yellow light treatment. T3: Brown cotton ovules under blue light treatment; T4: Brown cotton ovules under white light treatment. “+” shown a band appeared in the gel. “-” represented the absence of the band in the gel.

3 讨论

本研究采用 cDNA-SRAP 技术,以离体培养的棕色棉纤维为试材研究不同光质处理对其基因表达的影响,最终获得与已知功能序列同源性较高的序列 16 条。其中 1 条特异表达片段与谷胱甘肽转移酶同源性较高,该片段与原花青素合成有关。有多条与植物抗逆性相关。

编号为 Gb-12 的序列仅在白光处理的棕色棉胚珠中表达,其与陆地棉(+)- δ -杜松烯合成酶基因具有较高同源性。杜松烯合成酶催化(E,E)-法呢基焦磷酸(Farnesyl pyrophosphate, FPP)环化形成(+)- δ -杜松烯,(+)- δ -杜松烯是所有棉酚及其衍生物的共同前体物质^[14]。以棉酚为代表的酚性倍半萜衍生物是棉花防御机制的重要组成部分^[15],由此推测,白光处理可能激发了棕色棉胚珠的抗逆反应。

编号为 Gb-9 的序列与环核苷酸门控离子通道(Cyclic nucleotide-gated channels, CNGC)类似蛋白基因具有较高的同源性。近年来的研究表明,环核苷酸门控离子通道(CNGC)在植物生长发育、细胞的离子转运及逆境胁迫等方面均具有重要的作用^[16]。但是,迄今为止,植物 CNGC 功能的详细研究较少,其在植物生长发育以及生物、非

生物胁迫中的具体功能仍未确定。

目前,有关结构基因在植物类黄酮代谢中的作用已研究较为清楚,但是,对不同花青素运输机制及类黄酮物质的转运与积累相关转运蛋白的研究还不是十分明确。在拟南芥中的研究表明,原花青素前体物质首先在细胞质中合成,而后运输到液泡中,最后由氧化酶类将其缩合成不同聚合度的原花青素。拟南芥 TT19 基因编码谷胱甘肽-S-转移酶(Glutathione S-transferases, GST)-like 蛋白,它与原花青素的积累相关。拟南芥透明种皮(TT)突变体 TT19 可能有一个 5'GSH-结合结构域,它可以同时影响花青素和原花青素的积累,而 3' 结构域影响原花青素的积累^[17]。Kitamura 等^[18]研究表明,TT19 与原花青素(Proanthocyanidins, PAs)前体物质,如表儿茶素和糖基化的表儿茶素,在细胞质中的积累有关。Azum^[19]等利用 qRT-PCR 分析温度和光照对离体葡萄浆果黄酮类化合物生物合成的影响,其中, GST 的表达水平在 15℃/光照的条件下最高。

本试验中,在黄光、蓝光和白光处理的棕色棉纤维中特异表达的片段与谷胱甘肽转移酶基因 GSTU43 具有很高的同源性。由此推测,光质可能通过影响谷胱甘肽转移酶基因进而对原花

青素的积累产生影响。

综上所述,本试验初步获得了与光处理相关的差异表达片段,有关这些片段在棕色棉离体纤维响应光调控过程中的具体作用仍需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] Xiao Yuehua, Zhang Zhengsheng, Yin Menghui, et al. Cotton flavonoid structural genes related to the pigmentation in brown fibers[J]. BBRC, 2007, 358(1): 73-78.
- [2] 詹少华, 林毅, 蔡永萍, 等. 天然棕色棉色素提取、纯化及其UV光谱研究[J]. 激光生物学报, 2004, 13(5): 324-328.
- Zhan Shaohua, Lin Yi, Cai Yongping, et al. Extraction and purification of the pigment of natural brown cotton and its UV spectral properties[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2004, 13(5): 324-328.
- [3] 詹少华, 林毅, 蔡永萍, 等. 缩合单宁与天然棕色棉纤维色素合成的关系[J]. 棉花学报, 2007, 19(3): 183-188.
- Zhan Shaohua, Lin Yi, Cai Yongping, et al. Relationship between the pigment in natural brown cotton fiber and the condensed Tannin[J]. Cotton Science, 2007, 19(3): 183-188.
- [4] 程龙军, 郭得平, 张建华, 等. 高等植物花生长和花色素苷生物合成的信号调控[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(2): 175-179.
- Cheng Longjun, Guo Deping, Zhang Jianhua, et al. Signal control of flower growth and anthocyanin biosynthesis in higher plants[J]. Plant Physiology Communications, 2002, 38(2): 175-179.
- [5] 汪淼, 吴小虎, 李廷春, 等. 光质对棕色棉铃铃发育及纤维品质形成的影响[J]. 棉花学报, 2011, 23(5): 422-426.
- Wang Miao, Wu Xiaohu, Li Tingchun, et al. Effect of light quality on boll development and fiber quality in brown cotton [J]. Cotton Science, 2011, 23(5): 422-426.
- [6] 汪淼, 陈沙沙, 蔡永萍, 等. 光质对棕色棉纤维色素形成的影响[J]. 棉花学报, 2013, 25(4): 329-333.
- Wang Miao, Chen Shasha, Cai Yongping, et al. Effect of light quality on pigment formation in brown cotton fiber[J]. Cotton Science, 2013, 25(4): 329-333.
- [7] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction; Its application to mapping and gene tagging in *Brassica*[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103 (2/3): 455-461.
- [8] 桂琴, 王嘉璐, 伍晓明, 等. SRAP-cDNA 方法在植物基因差异表达分析中的应用[J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(4): 497-502.
- Gui Qin, Wang Jialu, Wu Xiaoming, et al. Application of SRAP-cDNA method in analysis of differential gene expression in plants[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2007, 29(4): 497-502.
- [9] Beasley C A, Irwin P T. Effects of plant growth substances on in vitro fiber development from unfertilized cotton ovules[J]. Ame J Bot, 1974, 61(2): 188-194.
- [10] 刘洋, 何心尧, 马红波, 等. 用CTAB-PVP法提取棉花各组织总RNA的研究[J]. 中国农业大学学报, 2006, 11(1): 53-56.
- Liu Yang, He Xinyao, Ma Hongbo, et al. Extraction of total RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) tissues with CTAB-PVP method [J]. Journal of China Agricultural University, 2006, 11(1): 53-56.
- [11] 林忠旭, 张献龙, 聂以春, 等. 棉花 SRAP 遗传连锁图构建[J]. 科学通报, 2003, 48(15): 1676-1679.
- Lin Zhongxu, Zhang Xianlong, Nie Yichun, et al. The construction of cotton SRAP genetic linkage map[J]. Chinese Science Bulletin, 2003, 48(15): 1676-1679.
- [12] Sanguinetti C J, Dias N E, Simpson A J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels[J]. Biotechniques, 1994, 17(5): 914-921.
- [13] 蒋淑丽, 洪彩霞, 郑泗军, 等. 光照对棉花胚珠纤维离体发育的影响[J]. 棉花学报, 1999, 11 (5): 255-258.
- Jiang Shuli, Hong Caixia, Zheng Sijun, et al. Effects of light on fiber development from cotton ovules *in vitro*[J]. Cotton Science, 1999, 11 (5): 255-258.
- [14] Larkin P, Harrigan G G. Opportunities and surprises in crops modified by transgenic technology: metabolic engineering of benzylisoquinoline alkaloid, gossypol and lysine biosynthetic pathways[J]. Metabolomics, 2007, 3(3): 371-382.
- [15] Bell A A, Stipanovic R D. The chemical composition, biological activity, and genetics of pigment glands in cotton[C]. Proc Beltwide Cotton Prod Res Conf, 1977: 244-258.
- [16] 吴巨友, 薛亚男, 张绍铃. 植物环核苷酸门控离子通道基因的功能及其调控[J]. 西北植物学报, 2010, 30(8): 1716-172.
- Wu Juyou, Xue Ya'nan, Zhang Shaoling. Function and modulation of plant cyclic nucleotide-gated channels[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2010, 30(8): 1716-172.
- [17] Li Xiang, Gao Peng, Cui Dejun, et al. The *Arabidopsis* tt19-4 mutant differentially accumulates proanthocyanidin and anthocyanin through a 3' amino acid substitution in glutathione S-transferase[J]. Plant, Cell & Environment, 2011, 3(34): 374-388.
- [18] Kitamura S, Matsuda F, Tohge T, et al. Metabolic profiling and cytological analysis of proanthocyanidins in immature seeds of *Arabidopsis thaliana* flavonoid accumulation mutants [J]. The Plant Journal, 2010, 62(4): 549-559.
- [19] Aauma A, Yakushiji H, Koshita Y, et al. Flavonoid biosynthesis-related genes in grape skin are differentially regulated by temperature and light conditions[J]. Planta, 2012, 236(4): 1067-1080.