

棉花肉桂醇脱氢酶基因在棉纤维中的表达 及其对结构组分的影响

胡文冉¹, 李晓东², 周小云¹, 杨 洋¹, 李 波¹, 李晓荣^{1*}

(1 新疆农业科学院 核技术生物技术研究所, 新疆农作物生物技术重点实验室, 乌鲁木齐 830091; 2 新疆维吾尔自治区水产科学研究所, 乌鲁木齐 830000)

摘 要: 利用农杆菌介导法获得‘新陆早 36 号’转棉花肉桂醇脱氢酶基因(*GhCAD6*)材料, 以转基因 T₆ 代植株为试材, 对 *GhCAD6* 基因在叶片基因组中的整合情况和不同发育阶段棉花纤维中的表达量进行分析, 研究该基因对棉纤维中结构多糖和苯丙烷类化合物含量及纤维中苯丙烷类结构单体的影响。结果显示: (1) *GhCAD6* 基因以单拷贝的形式整合到受体棉花基因组中。(2) 转基因植株纤维中 *GhCAD6* 基因的表达量低于相同发育阶段对照样品, 在对照样品中 *GhCAD6* 基因的表达量表现为先升高, 在 20 DPA(开花后天数)时表达量最高, 之后下降, 而在转基因植株纤维中先上升, 并于发育 15 DPA 时表达量下降, 20 DPA 时又上升至最高, 之后再次下降。(3) 成熟纤维中, 转 *GhCAD6* 基因植株纤维中苯丙烷类化合物含量低于对照, 但结构多糖含量的差别不明显。(4) 转 *GhCAD6* 基因纤维中苯丙烷类结构单体——紫丁香基木质素(S-木质素)和愈疮木基木质素(G-木质素)的比值下降。研究表明, 棉花转入 *GhCAD6* 基因后, 纤维发育(15 DPA)中 *GhCAD6* 基因的表达量变化可能导致棉花中苯丙烷类化合物含量及其结构单体比率变化, 从而造成棉花纤维品质改变。该研究结果可为深入分析 *GhCAD6* 基因在改良棉花纤维品质的作用机理提供理论依据。

关键词: 棉花纤维; 苯丙烷代谢; *GhCAD6* 基因; 纤维品质; 结构多糖; 苯丙烷类化合物

中图分类号: Q789; S562

文献标志码: A

Expression of *GhCAD6* Gene in Cotton Fiber and the Effect on Structural Components

HU Wenran¹, LI Xiaodong², ZHOU Xiaoyun¹, YANG Yang¹, LI Bo¹, LI Xiaorong^{1*}

(1 Institute of Nuclear and Biological Technologies, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Xinjiang Key Laboratory of Crop Biotechnology, Urumqi 830091, China; 2 Fisheries Science Institute of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, China)

Abstract: The material is ‘Xinluzao 36’ transformed with *GhCAD6* gene obtained by Agrobacterium-mediated transformation. In this study, the T₆ generation of the transgenic material was used as experimental material. The integration of *GhCAD6* gene in the genome of cotton, the expression in different developmental stages of cotton fiber, the content of structural polysaccharides and phenylpropanoid compounds in the cotton fiber, and the influence of the fiber in the phenylpropanoid monomer were analyzed. The results showed: (1) *GhCAD6* was integrated in the form of single copy to the recipient cotton genome. (2) The

收稿日期: 2019-04-10; 修改稿收到日期: 2019-05-31

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点实验室项目(2016D03013)

作者简介: 胡文冉(1974—), 女, 研究员, 主要从事棉花生物技术研究。E-mail: huwran@126.com

* 通信作者: 李晓荣, 副研究员, 主要从事棉花生物技术研究。E-mail: lxr73f@163.com

expression level of *GhCAD6* in the transgenic plants was lower than that in the control samples at the same developmental stage. The expression of *GhCAD6* was increased firstly, reached the highest at 20 DPA and then decreased in the control samples. While the expression decreased at 15 DPA in the transgenic plant fibers, rose to the highest level at 20 DPA, and then decreased. (3) In mature fibers, the content of phenylpropanoid compounds in the transgenic plants was lower than that in the control samples, and the content of structural polysaccharides had no significant difference. (4) The ratio of S/G decreased in cotton fiber of transgenic plants. After the *GhCAD6* gene transferred into cotton, the change of *GhCAD6* gene expression at 15 DPA may be the cause of the change of content of phenylpropanoid compounds and ratio of structural monomer, which result in the variation of cotton fiber quality. The results of this research can provide theoretical basis for further analysis of the mechanism of *GhCAD6* gene in improving cotton fiber quality.

Key words: cotton fiber; phenylpropanoid metabolism; *GhCAD6* gene; fiber quality; structural polysaccharides; phenylpropanoid compounds

棉花(*Gossypium* spp.)是重要的纤维来源,也是中国主要的经济作物之一,在国民经济中占重要地位。纺织工业技术的迅速提升使得人们对棉花纤维的品质要求也越来越高。为满足棉纺织业迅猛发展和国人生活水平提高的需求,提高棉花产量和改良棉花纤维品质,培育高品质棉花品种仍是当前棉花育种工作的重要任务。但由于亲本材料、优异种质系和创新技术的缺乏,棉花纤维品质指标改观并不十分明显,随着科技的发展,利用常规育种与生物技术相结合的方法培育优质棉花是中国棉花育种的当务之急,棉花纤维发育相关基因的克隆和功能分析是实现这一目标的基础。

棉纤维是由胚珠外珠被的一部分单个表皮细胞在受精前后经分化突起、伸长、次生壁增厚和脱水成熟而形成的^[1]。成熟棉花纤维的横切面一般呈“腰圆形”,由外到内依次为初生壁、次生壁和中腔3部分。棉纤维是单细胞结构,其细胞壁的结构物质生化组分含量必然直接关系到棉纤维的产量、品质及其利用。现有研究表明棉花纤维主要结构组分包括结构多糖和苯丙烷类化合物^[2-4]。

苯丙烷代谢途径是植物体内重要的次生代谢途径之一^[5],已有研究表明苯丙烷代谢途径是棉花纤维中仅次于糖代谢的第二大代谢,苯丙烷代谢途径中的一些关键酶基因在棉花纤维次生壁伸长长期优势表达^[2,6-7],其代谢产物苯丙烷类化合物影响着棉花纤维品质^[4,8]。肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)在苯丙烷代谢过程中具有非常关键性的作用,位于苯丙烷代谢途径最后一步反应^[9],对构成苯丙烷类化合物的愈疮木基木质素(guaiacyl lignin, G-木质素)、紫丁香基木质素(syringyl lignin, S-木质素)、对-羟基苯基木质素(H-木质素)的合成具有一定的作用^[10]。现有研究表明棉

花纤维中存在着 G-木质素和 S-木质素两种苯丙烷类结构单体^[11]。CAD 基因参与了棉纤维的发育的过程,并对棉花纤维发育起到了一定的调控作用^[12]。Fan 等^[2]从发育的棉花纤维中克隆了 2 个肉桂酸脱醇酶基因 *GhCAD1* 和 *GhCAD6* 的 cDNA 序列,发现这 2 个基因在棉花次生壁增厚期优势表达,*GhCAD1* 和 *GhCAD6* 的同源性很高,但两者由于酶的催化活性不同造成其作用底物不同,*GhCAD6* 的表达量在棉纤维次生壁形成时升高,在木质素合成过程中 *GhCAD6* 起着主要作用,*GhCAD1* 则对其具有补偿性功能。Li 等^[13]研究表明 *GhCAD6* 基因被定位在第 26 号染色体上,参与棉纤维中的苯丙烷类单元和细胞壁酚酸的代谢。棉花纤维品质和产量与纤维细胞的伸长和细胞壁的加厚密切相关^[14]。因此可以通过将 *GhCAD6* 基因导入棉花从而实现棉花纤维品质改良。

本项目组在前期研究的基础上,从发育的棉花纤维中克隆出调节细胞壁交联结构形成的相关主效基因 *GhCAD6* (GenBank 序列号为 EU281305.1)。利用农杆菌介导法将 *GhCAD6* 基因导入到‘新陆早 36 号’,获得了转化 *GhCAD6* 的阳性植株。本实验通过分析 *GhCAD6* 基因在转基因后代株系中的功能,为发掘改良棉花纤维品质的基因资源和该基因的利用提供依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料

转基因受体材料为陆地棉‘新陆早 36 号’。转基因材料为由载体质粒 pCAMBIA2300/CAD 构建、E6 启动的 *GhCAD6* 基因采用农杆菌介导法转化受体材料后,经过连续 6 代选育获得其 T₆ 代转基因植株。对照为非转基因的受体‘新陆早 36 号’(CK)。

表 1 引物信息

Table 1 Information of primers

名称 Name	引物序列 Primer sequence(5'→3')	退火温度 Annealing temperature/℃	目的片段 Target fragment length /bp
NPTⅡS	GCACAACAGACAATCGGCTGCTC	52	496
NPTⅡAS	GCCATGGGTCACGACGAGATCC	52	
GhCAD6S	TGTGCAGGGGTGACAGTTTAC	52	501
GhCAD6AS	CCCAATAAAACTCCCTGTAATCG	52	
QGhCAD6S	GTTCTGGGCATGAAGTGTT	60	
QGhCAD6AS	TGCAACATCCAACAAGACAACC	60	
GhUBQ7S	AGAGGTCGAGTCTTCGGACA	60	
GhUBQ7AS	GCTTGATCTTCTTGGGCTTG	60	

1.2 方 法

1.2.1 实验材料的种植与采样 实验材料的种植与采样参照文献[15]。再分别采摘发育 20 DPA (day post-anthesis) 的棉铃 25~30 个、30 DPA 20~25 个、40 DPA 15~20 个、50 DPA 的棉铃 10~15 个。参照文献[16]的方法获得不同发育阶段棉花纤维并进行可溶物质的清洗。

1.2.2 转基因植株的分子生物学检测 (1) 目的基因及功能片段的 PCR 检测 利用 Primer 5.0 设计抗性标记基因 *NPTⅡ* 和目的基因 *GhCAD6* 的引物(表 1)。按 Tiangen 植物基因组 DNA 提取试剂盒使用说明提取棉花幼嫩叶片中的 DNA。以 E6-pCAMBIA-2300-*GhCAD6* 质粒和受体(CK)对照组 DNA 分别作为阳性和阴性对照,PCR 扩增目的片段,扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶上电泳分析。

(2)Southern blotting 杂交 以转 *GhCAD6* 基因的后代植株叶片基因组 DNA 为模板,受体(CK)叶片基因组 DNA 为阴性对照,质粒 E6-pCAMBIA-2300-*GhCAD6* DNA 为阳性对照。用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xba* I 酶切基因组及质粒 DNA,按照地高辛标记的杂交试剂盒 I (Roche)说明书和《分子克隆实验指南(第二版)》^[17] 配制药品,进行 Southern blotting 杂交,检测目的基因在转基因后代植株基因组中的整合情况。

(3)qRT-PCR 检测 热硼酸-蛋白酶 K 法^[18] 分别提取转基因植株和受体(CK)发育 5、10、15、20、25 DPA 的棉纤维中的 RNA,将其反转录成 cDNA。设计荧光定量 PCR 的特异性引物 *AGhCAD6A*/*QGhCAD6AS*,以棉花 *GhUBQ7* 为内参基因进行 qRT-PCR 检测。采用 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪,按照 SYBR Premix ExTaqI 试剂盒说明书扩增目的序列,每个样品重复 3 次,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目

的基因的相对表达量。

1.2.3 不同发育阶段棉花纤维结构多糖和苯丙烷类化合物含量分析 用硝酸乙醇法测定不同发育阶段棉花纤维中的结构多糖含量^[19],Klason 法测定不同发育阶段棉花纤维中的苯丙烷类化合物含量^[16,20],每个处理设置 3 次重复。

1.2.4 成熟棉纤维苯丙烷类结构单体的分析 采用巯基乙酸法提取出棉花纤维中的苯丙烷类化合物,然后用衍生化后的还原裂解(DFRC, derivatization followed by reductive cleavage)法结合气相色谱(GC, gas chromatograph)对棉花纤维中的苯丙烷类单体进行测定^[11]。

1.2.5 数据处理及作图 用 Excel 2010 处理数据,GraphPad Prism5 作图。

2 结果与分析

2.1 转基因棉花 T₀ 植株分子检测

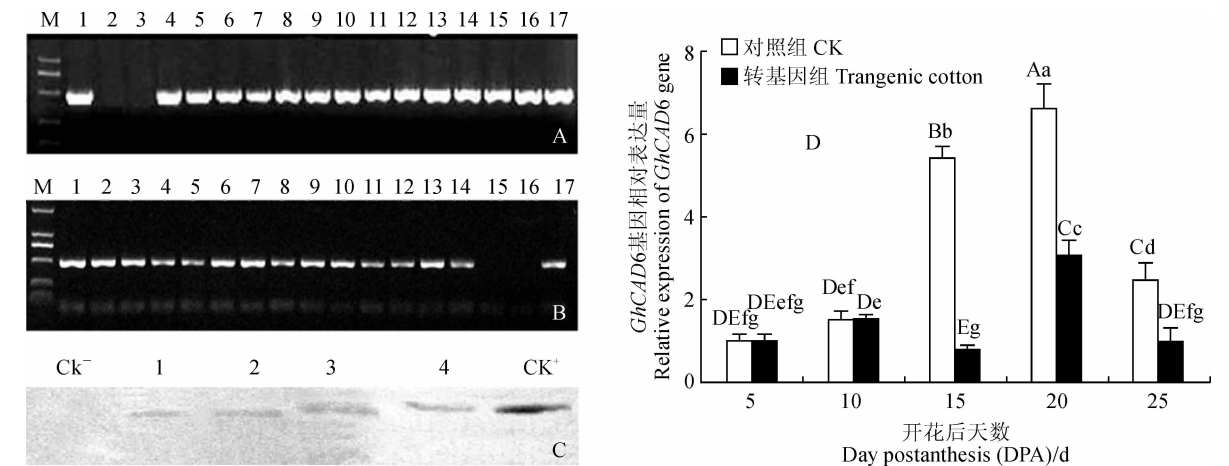
植株叶片基因组 DNA 的 PCR 检测结果显示,检测基因新霉素磷酸转移酶基因(*NPTⅡ*)特异性条带,大小为 496 bp(图 1,A);目的基因 *GhCAD6* 特异性条带,大小为 504 bp(图 1,B),与预期结果相符,结果初步说明检测基因已经转入棉花基因组中。转基因棉花 T₀ 代植株基因组 Southern 杂交检测结果表明 *GhCAD6* 基因以单拷贝的形式整合到受体棉花基因组中(图 1,C),从而说明该基因在棉花基因组中能稳定遗传。棉纤维不同发育阶段中 *GhCAD6* 基因的表达量结果见图 1,D,从图中可以看到在对照(CK)棉花纤维中 *GhCAD6* 基因的整体表达趋势是随着棉花纤维的发育先升高再降低,在 20 DPA 时 *GhCAD6* 基因的表达量达到最高,但在 25 DPA 时表达量又迅速下降,15~25 DPA 表达量与 5~10 DPA 的表达量间存在显著差异,20~25 DPA

与 15 DPA 存在显著差异,20 DPA 与 25 DPA 存在显著差异;而在转基因棉花植株,*GhCAD6* 的表达量在纤维发育 15 DPA 时出现降低趋势,其他时期的表达趋势与其对照相似,其中 10 DPA 和 20 DPA 时表达量与 5 DPA 间存在显著差异,15~20 DPA 与 10 DPA 间存在显著差异,20~25 DPA 与 15 DPA 间存在显著差异,25 DPA 与 20 DPA 间存在显著差异。而 5~20 DPA 是棉花纤维伸长的关键时期,由此说明 *GhCAD6* 基因在纤维伸长期起着十分重要的作用。从图 1,D 中可以看出转 *GhCAD6*

基因的后代材料中 *GhCAD6* 基因的表达量明显低于其对照材料,其中 15~25 DPA 时转基因材料和其对照间 *GhCAD6* 基因的表达量存在极显著差异。

2.2 相关生化结构物质含量变化的测定

棉花纤维相关结构物质含量的变化结果见图 2,从图 2,A 中可以看到在棉花纤维发育过程中苯丙烷类化合物百分含量呈下降趋势,其中在纤维发育 20~30 DPA 时转基因棉花纤维中苯丙烷类化合物含量高于其对照,在 40 DPA 时,随着棉纤维中结构多糖含量的增加,苯丙烷类化合物的积累速率急剧



A. 转基因后代 *NPTII* 引物 PCR 检测结果;M. DL2000;1. 阳性对照;2. 非转基因对照;3. 阴性对照;4~17. 转基因后代 (T_6) 棉花样品; B. 转基因后代 *GhCAD6* 引物 PCR 检测结果;M. DL2000;1~14. 转基因后代 (T_6) 棉花样品;15. 非转基因对照;16. 阴性对照;17. 阳性对照;C. 转 *GhCAD6* 基因棉花后代部分材料的 Southern blotting 杂交结果;CK⁻. 阴性对照;1~4. 转基因植株;CK⁺. 阳性对照。 D. 纤维不同发育阶段 *GhCAD6* 基因的相对表达量;不同小写字母与大写字母表示在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平上差异显著

图 1 *GhCAD6* 基因在棉花 T_6 代叶片基因组和纤维中的表达

A. PCR amplification for generation of transgenic cotton with *NPTII* primers; M. DL2000 Marker; 1. Positive control; 2. Non-transgenic control; 3. Negative control; 4-17. Generation (T_6) of transgenic cotton; B. PCR amplification of transgenic cotton with *GhCAD6* primers; M. DL2000 Marker; 1-14. Generation (T_6) of transgenic cotton; 15. Non-transgenic control; 16. Negative control; 17. Positive control; C. The southern blotting hybridization results of some *GhCAD6* transgenic cotton offspring; CK⁻. negative control; 1-4. transgenic plant; CK⁺. positive control; D. Relative expression of *GhCAD6* gene at different developmental stages of cotton fiber; Different lowercase letters and uppercase letters indicate significant differences at the $P<0.05$ and $P<0.01$ levels

Fig. 1 Expression of *GhCAD6* gene in leaf and fiber of cotton T_6 generation.

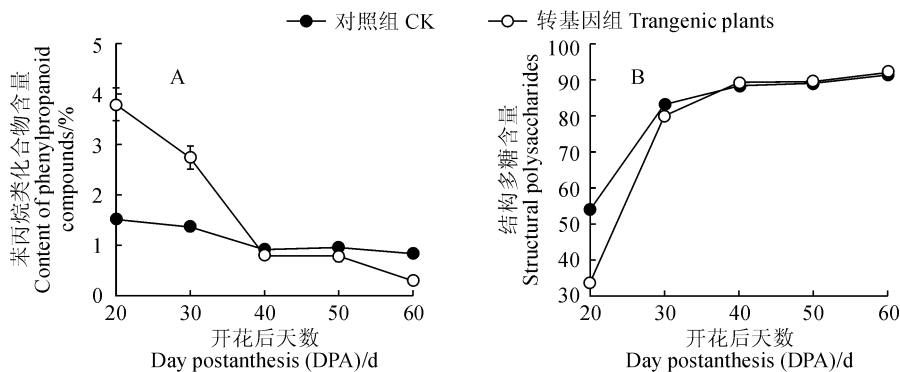
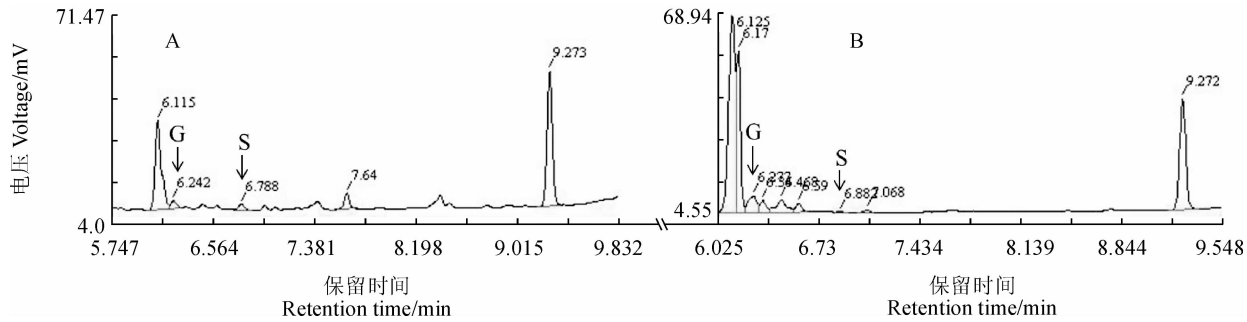


图 2 不同发育阶段棉纤维中生化结构物质含量的变化

Fig. 2 Changes in the content of biochemical structural substances in cotton fiber at different development stages



A. 对照棉纤维;B. 转 *GhCAD6* 基因棉纤维

图 3 成熟棉纤维中苯丙烷类结构单体

A. Cotton fiber of CK; B. Transgenic cotton fiber with *GhCAD6*

Fig. 3 Structural monomer of phenylpropanoid in mature cotton fiber

表 2 部分转 *GhCAD6* 基因单株纤维品质测定结果

Table 2 Results of fiber quality of partial transgenic *GhCAD6* plant

材料 Material	平均长度 Length/mm	断裂比强度 Fiber strength/(cN/tex)	整齐度指数 Uniformity index/%	马克隆值 Micronaire	伸长率 Elongation/%
新陆早 36 号 Xinluzao 36	27.72	26.1	84.40	4.62	6.70
1	31.28	31.0	85.60	4.68	6.00
2	30.99	30.4	84.90	3.93	6.20
3	31.56	31.4	86.40	4.17	5.90
4	30.78	30.8	84.90	4.47	6.00
5	30.86	30.4	85.60	4.73	6.30
6	30.83	30.2	86.30	4.45	6.20
7	30.06	28.2	85.40	4.91	6.30
8	29.96	28.8	86.70	4.79	6.00
9	30.03	29.3	86.00	4.86	6.00
10	30.15	29.1	86.30	4.76	6.10
转基因株系 Transgenic line	11	30.61	86.70	5.04	6.20
12	29.93	28.7	86.60	4.93	6.30
13	29.89	29.8	85.30	5.09	6.90
14	29.55	29.0	85.20	4.84	6.80
15	29.60	29.1	85.00	4.96	6.90
16	30.38	32.5	86.20	4.78	7.00
17	30.93	33.2	86.60	4.66	7.00
18	30.75	32.9	85.70	5.01	7.00
19	29.38	30.4	85.80	5.01	6.90
平均值 Average value	30.40	30.17	85.85	4.74	6.42

下降,转基因纤维中苯丙烷类化合物的百分含量下降速率最大,最终在纤维发育成熟后转基因棉花纤维中苯丙烷类化合物的百分含量低于对照;从图 2, B 中可以看到在棉花纤维发育过程中结构多糖百分含量呈上升趋势,对照样品中结构多糖在棉纤维发育 20 DPA 时高于转基因纤维,随着棉纤维的发育,

20~30 DPA 是棉纤维中结构多糖含量快速增加的时期,其中转基因纤维中结构多糖的积累速率高于对照,最终在纤维发育成熟后转基因纤维中的结构多糖含量稍高于对照。

2.3 结构单体的测定

采用巯基乙酸法提取出棉花纤维中的苯丙烷类

化合物,再采用 DFRC 方法降解苯丙烷类化合物的结构,结果见图 3。在保留时间 6.24 和 6.28 min 时检测出棉纤维中含 G-木质素单体,保留时间 6.79 和 6.88 min 时检测出棉纤维中含有 S-木质素,显示转基因前后棉花纤维中的结构单体均为 G 和 S 两种构型(图 3,A、B),根据其内标计算出转基因后纤维中 2 种单体的 S/G 的比值由 5.8 下降为 0.3。表明棉花纤维转 *GhCAD6* 基因后结构单体类型并没有发生改变,只是导致其比例的变化。

2.4 *GhCAD6* 基因对棉纤维品质的影响

表 2 是部分转 *GhCAD6* 基因单株纤维品质检测结果,从表中可以看出将 *GhCAD6* 基因导入棉花后,后代植株纤维上半部平均长度、比强度和整齐度都比对照有所增加;马克隆值增大;伸长率下降。其中,对照纤维长度为 27.72 mm,转基因植株纤维长度在 29.38~31.56 mm 之间,平均值为 30.40 mm,和对照相比增幅在 6.0%~13.9%之间;对照断裂比强度为 26.1 cN/tex,转基因植株纤维断裂比强度在 28.0~33.2 cN/tex 之间,平均值为 30.17 cN/tex,和对照相比增幅在 7.3%~27.2%之间;对照整齐度指数 84.40%,转基因植株整齐度指数在 84.90%~86.70%之间,和对照相比增幅在 0.59%~2.73%之间;马克隆值增大 2.61%;伸长率下降 4.16%。

3 讨 论

现有研究表明 *GhCAD6* 基因位于第 26 号染色体上,参与棉花纤维中的苯丙烷类单元和细胞壁酚酸的代谢,对棉花纤维发育起到了一定的调控作用^[11-13]。本研究结果表明 *GhCAD6* 基因导入棉花受体后,其纤维长度、比强度得到明显提高,进一步证明该基因在改良棉花纤维中的作用。在本研究中发现,转基因后代植株中 *GhCAD6* 基因的表达量在 15 DPA 时降低,20 DPA 时又表现升高趋势,而转基因植株纤维品质明显高于其对照,该结果与袁辉^[21]采用半定量 RT-PCR 法对棉花纤维发育过程中基因 *GhCADx* 进行量化分析的结果一致。已有研究表明,导入植物体内的基因可以与植物体内的

同源基因发生相互作用,从而导致该基因和宿主基因的表达量都降低^[22-24]。苯丙烷代谢是个非常复杂的代谢途径,涉及很多基因,棉花转入基因 *GhCAD6* 后,可能是纤维中相关基因之间的相互作用导致 *GhCAD6* 的表达量总体上低于对照。

纤维结构生化组分苯丙烷类化合物和结构多糖含量在转基因前后也发生了变化,主要表现为苯丙烷类化合物在纤维发育 40 DPA 前转基因纤维高于非转基因植株,40 DPA 后低于转基因植株;结构多糖含量表现为在 20 DPA 时非转基因植株纤维中积累量高于转基因植株,40 DPA 时两者含量基本持平,差别不明显,纤维发育过程中苯丙烷类化合物和结构多糖含量的相互消长可能是转 *GhCAD6* 基因造成棉花纤维品质改变的原因。棉花转 *GhCAD6* 基因后成熟纤维中苯丙烷类化合物的含量降低,苯丙烷类结构单体 S/G 的比值下降。*CAD* 基因在植物体内是以多基因家族形式存在的,可以催化多种不同的底物。棉花转入 *GhCAD6* 基因后可能导致了其他相关基因的连锁反应,*CAD* 总活性降低,因为 *CAD* 活性和木质素中 S 单体与 G 单体的比率保持一致,从而导致 S/G 的比率降低,该结果与 Baucher 等^[25]的研究结果一致,最终结果是转基因棉花后代中苯丙烷类化合物含量较对照有所降低。

综上所述,*GhCAD6* 基因通过农杆菌介导法导入‘新陆早 36 号’,经过连续 6 代的种植选育发现转基因后代材料棉花纤维品质得到明显改良,*GhCAD6* 以单拷贝的形式整合到受体棉花基因组中;转基因植株纤维中 *GhCAD6* 的表达量低于相同发育阶段对照样品。*GhCAD6* 的表达量在转基因植株和其对照在 15 DPA 时变化趋势不一致,其他时期大致相同。成熟纤维中,转 *GhCAD6* 基因植株苯丙烷类化合物含量低于对照,苯丙烷类结构单体 S/G 的比值下降,结构多糖含量差别不明显。棉花转入 *GhCAD6* 基因后,15 DPA 中 *GhCAD6* 基因的表达量的变化可能是导致棉花中苯丙烷类化合物含量及其结构单体比率变化,从而造成棉花纤维品质改变的原因。本研究结果可为深入分析 *GhCAD6* 基因在改良棉花纤维品质的作用机理提供理论依据。

参考文献:

[1] BASRA A S, MALIK C P. Development of the Cotton Fiber [M]//BASRA A S, MALIK C P. eds. International Review of Cytology. Elsevier, 1984: 65-113. DOI:10.1016/s0074-7696(08)61300-5

[2] FAN L, SHI W J, HU W R, *et al.* Molecular and biochemical evidence for phenylpropanoid synthesis and presence of wall-linked phenolics in cotton fibers[J]. *Journal of Integrative*

Plant Biology, 2009, **51**(7): 626-637.

[3] 胡文冉. 棉花纤维中苯丙烷类化合物的沉积及结构研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.

[4] HAN L B, LI Y B, WANG H Y, *et al.* The dual functions of WLIM1a in cell elongation and secondary wall formation in developing cotton fibers[J]. *The Plant Cell*, 2013, **25** (11): 4 421-4 438.

[5] BOERJAN W, RALPH J, BAUCHER M. Lignin biosynthesis[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, 54: 519-546.

[6] AL-GHAZI Y, BOUROT S, ARIOLI T, *et al.* Transcript profiling during fiber development identifies pathways in secondary metabolism and cell wall structure that may contribute to cotton fiber quality[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2009, **50** (7): 1 364-1 381.

[7] GOU J Y, WANG L J, CHEN S P, *et al.* Gene expression and metabolite profiles of cotton fiber during cell elongation and secondary cell wall synthesis[J]. *Cell Research*, 2007, **17** (5): 422-434.

[8] FENG H, LI X, CHEN H, *et al.* GhHUB2, a ubiquitin ligase, is involved in cotton fiber development via the ubiquitin-26S proteasome pathway[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, **69**(21): 5 059-5 075.

[9] WHETTEN R, SEDEROFF R. Lignin biosynthesis[J]. *The Plant Cell*, 1995, **7**(7): 1 001-1 013.

[10] MANSELL R L, GROSS G G, STÖCKIGT J, *et al.* Purification and properties of cinnamyl alcohol dehydrogenase from higher plants involved in lignin biosynthesis[J]. *Phytochemistry*, 1974, **13**(11): 2 427-2 435.

[11] 胡文冉, 范 玲, 孙 涛, 等. 棉花纤维中苯丙烷类结构单体的检测方法[J]. 棉花学报, 2016, **28**(4): 407-412.

HU W R, FAN L, SUN T, *et al.* A method for detecting phenylpropanoid monomers in cotton fiber[J]. *Cotton Science*, 2016, **28**(4): 407-412.

[12] 张经博, 李 波, 杨 洋, 等. 陆地棉 CAD 基因家族的进化与表达分析[J]. 新疆农业科学, 2016, **53**(7): 1 177-1 187.

ZHANG J B, LI B, YANG Y, *et al.* Genomi-wide investigation and expression analysis of CAD gene family in *Gossypium hirsutum*[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2016, **53** (7): 1 177-1 187.

[13] LI X M, YUAN D J, ZHANG J F, *et al.* Genetic mapping and characteristics of genes specifically or preferentially expressed during fiber development in cotton[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(1): e54444.

[14] 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 H, TANG W K, TAN X, *et al.* Progresses in the study of gene regulation of cotton fiber development[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2007, **24**(2): 127-133.

[15] 胡文冉, 李晓东, 周小云, 等. 棉花 GhCAD6 基因表达及其功能分析研究[J]. 生物技术进展, 2019, **9**(1): 46-53.

HU W R, LI X D, ZHOU X Y, *et al.* Study on expression and functional analysis of GhCAD6 gene in transgenic cotton [J]. *Current Biotechnology*, 2019, **9**(1): 46-53.

[16] 胡文冉, 范 玲, 谢丽霞, 等. 不同发育阶段棉纤维中木质素的沉积变化[J]. 新疆农业科学, 2016, **53**(3): 467-472.

HU W R, FAN L, XIE L X, *et al.* Dynamic changes of lignin deposition during cotton fiber development stage [J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2016, **53**(3): 467-472.

[17] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南(第2版)[M]. 金冬雁, 黎孟枫主译. 北京: 科学出版社, 1992: 475-782.

[18] 武耀廷, 刘进元. 一种高效提取棉花不同组织总 RNA 的热硼酸改良法[J]. 棉花学报, 2004, **16**(2): 67-71.

WU Y T, LIU J Y. A modified hot borate method for efficient isolation of total RNA from different cotton tissues[J]. *Cotton Science*, 2004, **16**(2): 67-71.

[19] 蒋淑丽, 王学德. 棉花纤维突变体胚珠发育过程中主要生化物质的积累特征[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2002, **28**(1): 16-21.

JIANG S L, WANG X D. The accumulation of biochemical components in ovule of cotton fiber mutants during the ovule development[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 2002, **28**(1): 16-21.

[20] HU W R, FAN L, TIAN X L, *et al.* Modified methods for the analysis of the lignin-like phenolic polymer contents of cotton fibers[J]. *JAPS*, 2015, **25**(3): 232-239.

[21] 袁 辉. 棉花纤维发育相关功能基因相对表达量和品质关系的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2009.

[22] NAPOLI C, LEMIEUX C, JORGENSEN R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans[J]. *The Plant Cell*, 1990, **2**(4): 279-289.

[23] VAN DER KROL A R, MUR L A, BELD M, *et al.* Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression[J]. *Plant Cell*, 1990, **2**(4): 291-299.

[24] SMITH C J S, WATSON C F, BIRD C R, *et al.* Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants[J]. *Molecular & General Genetics*, 1990, **224**(3): 477-481.

[25] BAUCHER M, BERNARD-VAILHÉ M A, CHABBERT B, *et al.* Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) and the effect on lignin composition and digestibility[J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, **39**(3): 437-447.

(编辑: 宋亚珍)