

# *Bt-Cry5Aa* 基因转化棉花及其抗虫性鉴定

王 峰, 张秋平, 陈金湘, 周仲华, 李 博, 贺 文, 张 昊, 李瑞莲

(湖南农业大学棉花研究所, 长沙 410128)

**摘要:** 我国棉花抗虫基因大都为 *Cry1Ab/c*, 抗性风险日趋增加。本研究依据棉花密码子偏好, 人工合成 *Bt-Cry5Aa* 抗虫基因, 通过花粉管通道法转入棉花, 并通过卡那霉素法及 PCR 方法对不同世代转化株进行鉴定, 同时进行了抗虫性测试。结果表明, 通过花粉管通道法成功获得转 *Bt-Cry5Aa* 基因植株, 通过田间卡那霉素鉴定, 阳性株率  $T_1$  为 7.76%,  $T_2$  为 73.1%,  $T_3$  为 95.5%; PCR 检测显示,  $T_1$  阳性率为 2.35%,  $T_2$  为 55.8%,  $T_3$  为 94.5%; 田间抗性试验分析, 转 *Bt-Cry5Aa* 株系对第 2、3、4 代棉铃虫校正死亡率分别达到 85.42%、75.35% 和 62.79%, 其抗虫性与 GK19 相比差异不显著; *Bt-Cry5Aa* 能够部分替代目前主流鳞翅目抗虫基因, 是棉铃虫的新抗源。

**关键词:** 棉花; 花粉管通道法; *Bt-Cry5Aa* 基因; 棉铃虫; 抗虫性

## Transformation of *Bt-Cry5Aa* in Cotton and Identification of its Insect-resistant

WANG Feng, ZHANG Qiu-ping, CHEN Jin-xiang, ZHOU Zhong-hua,

LI Bo, HE Wen, ZHANG Hao, LI Rui-lian

(Cotton Research Institute, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

**Abstract:** Almost all insect-resistant genes applied in China is *Cry1Ab/c* and the resistance risk is increasing. *Bt-Cry5Aa* insect-resistant gene was synthesized according to the codon preference of cotton, it was transformed through pollen tube pathway into cotton plants, and identified through Kanamycin test, PCR and insect resistance test for different generation in the paper. The main results were shown as following. Firstly, transgenic plants of *Bt-Cry5Aa* were obtained by pollen tube pathway method, and gene transformation efficiency of  $T_1$  generation,  $T_2$  generation, and  $T_3$  generation was 7.76%, 73.1%, and 95.5%, respectively. Secondly, results of PCR identification showed that the positive rate of transgenic plants in  $T_1$  generation,  $T_2$  generation, and  $T_3$  generation was 2.35%, 55.8%, and 94.5%, respectively. Thirdly, corrected mortality rates of second, third and fourth generation of cotton bollworm for these transgenic plants was 85.42%, 75.35%, and 62.79%, respectively, and the difference between these *Bt-Cry5Aa* insect-resistant transgenic plants and GK19 was not significant. Lastly, all above results indicated that *Bt-Cry5Aa* could replace the current insect-resistant genes, and it would be an ideal source for bollworm resistance.

**Key words:** cotton; pollen tube pathway, *Bt-Cry5Aa* gene; bollworm; insect resistance

转基因抗虫棉在我国已经大面积的推广和应用, 并且取得了良好的经济和社会效益。但是, 目前

收稿日期: 2013-11-13 修回日期: 2014-01-12 网络出版日期: 2014-06-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140609.1433.030.html>

基金项目: 国家转基因重大专项(2009ZX08005-2); “十二五”支撑计划(2011BAD35B05-2); 湖南省教育厅一般项目(12CC0190); 湖南省棉花产业技术体系项目(湘农业联[2012]278号)

第一作者研究方向为棉花育种。E-mail: wangfenghifi@126.com

通信作者: 陈金湘, 研究方向为棉花育种。E-mail: Jinxiangc@163.com

周仲华, 研究方向为棉花分子育种。E-mail: zhouzhonghua1976@hotmail.com

在我国生产上大面积种植的仍是单 *Bt* (*CryIAb/Ac*) 基因抗虫棉,虽然可以有效的控制棉铃虫的种群数量<sup>[1-3]</sup>,但是随着种植面积和种植时间的增长,在高选择压力下,会增加害虫对 *Bt* 毒蛋白产生抗性的风险<sup>[4-5]</sup>,我国目前缺乏的是成熟的替代技术,应在这个方面做出努力<sup>[6-7]</sup>。将不同类型的抗虫基因同时转入棉花,使其在植株中得到高效表达,可以缓解害虫对转基因抗虫棉产生的抗性,并延长转基因抗虫棉的使用寿命。

目前,我国应用于转基因抗虫棉的抗虫基因主要为 *BT* (*CryIAb/Ac*)、*CPTI*、蛋白酶抑制素基因、*GNA* 基因等<sup>[6]</sup>,希望寻找一种广谱、高效的抗虫基因,*Bt-Cry5Aa* 基因是 *BT* 家族中的一员,其表达蛋白对根结线虫及部分鳞翅目害虫均具有高毒力,之前美国等国家应用于玉米转基因抗线虫研究,在国内则将其转入马铃薯以提高抗线虫能力,鉴于该基因对鳞翅目害虫具有较好的毒杀效果<sup>[8-9]</sup>,本研究旨在将含有 *Bt-Cry5Aa* 新型 *Bt* 抗虫基因的重组质粒利用花粉管通道法转入棉花,对所获得的后代进行筛选及鉴定,利用分子生物学的方法印证 *Bt-Cry5Aa* 基因的转入情况,并对其在棉花中的表达情况做进一步的分析,为棉花转基因抗虫提供一个新的探索,同时为新抗虫种质资源的创制打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

转化所用的非转基因棉花品系晋 1 由湖南农业大学棉花研究所提供。所用的表达载体质粒为 pRI101-AN,该质粒包含 *Bt-Cry5Aa* 基因 (GenBank: EU822809.1),由湖南农业大学棉花研究所提供。质粒图谱如下,采用酶切组合 *HindIII* + *SphI* 位点插入。

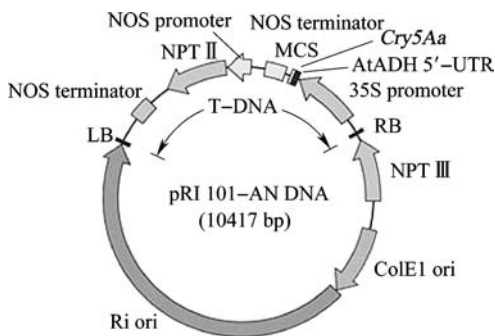


图 1 *Bt-Cry5Aa* 质粒图谱

Fig. 1 *Bt-Cry5Aa* plasmid profile

### 1.2 试验方法

**1.2.1 花粉管通道法进行转化** 采用周光宇等<sup>[10]</sup>的方法,将质粒 DNA 提取纯化后 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),注射进授粉 20 h 左右的棉花子房内。注射采用 50  $\mu\text{L}$  微量注射器,沿子房的顶端花柱处进针至幼铃长约 1/3 处注入质粒,每个子房注射 5  $\mu\text{L}$ 。

**1.2.2 棉花卡那霉素鉴定**  $T_0$  的种子收获后,于 2011 年 11 月在海南三亚进行播种。采用棉花水浮育苗<sup>[11]</sup>方式进行育苗,待 3 叶 1 心时移栽至大田,用 1600  $\text{mg}/\text{L}$  的卡那霉素涂抹至真叶上,3 d 后观察幼苗叶片涂抹的部位失绿情况。

**1.2.3 棉花总 DNA 的提取及目的基因 PCR 分析** 参考 CTAB 法并加以改良<sup>[12]</sup>,提取棉花总 DNA,采用 *Bt-Cry5Aa* 基因设计扩增引物:5'-GCCATCCAG-GTTGCTATCT-3', 5'-GCTGACGAAAGAATGCTGA-3' 对目的基因进行扩增,目的片段大小为 697 bp,PCR 反应体系总体积为 20  $\mu\text{L}$ ,经测定模板 DNA 浓度为 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ,反应体系中模板 DNA 含量为 20 ng,加入  $10 \times \text{Taq}$  Buffer (含 20  $\text{mM}$   $\text{Mg}^{2+}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ,扩增程序为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s,58  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s,40 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min;4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

**1.2.4 不同器官、组织中毒蛋白含量分析** 根据特异肽段序列 CNPNQPKDDLDRV,委托南京金斯瑞生物工程有限公司制备特异抗体,经检测,抗体 *Bt-Cry5Aa* IgG 效价达 512000:1,纯度为 92.1%,采用 TCA-丙酮沉淀法<sup>[13]</sup>提取转 *Bt-Cry5Aa* 基因棉花品系不同时期组织器官总蛋白,以纯化 *Bt-Cry5Aa* 晶体蛋白作为抗原的标准曲线,采用 PBST 缓冲液按 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0  $\text{ng}/\text{L}$  浓度稀释,PBST 缓冲液作空白对照,建立标准曲线。通过双抗夹心 ELISA 检测法<sup>[14]</sup>测定得到转 *Bt-Cry5Aa* 基因棉不同器官、组织中毒蛋白含量 OD 值。经标准曲线回归方程换算,从而得到不同棉器官、组织中毒蛋白的含量。

**1.2.5 抗虫性检验** 对晋 1  $T_3$  PCR 检测呈阳性的株系 JX0010 植株进行棉铃虫抗性检验,以转基因抗虫棉品种 GK19 为对照,在棉花生长的盛蕾期、盛花期和结铃盛期随机采取棉株倒 3 叶,按照国家标准<sup>[15]</sup>进行室内生物测定试验。

## 2 结果与分析

### 2.1 花粉管通道法转化棉花

通过花粉管通道法将含有 *Bt-Cry5Aa* 基因的质

粒注射到棉花幼铃中,并结合喷施 600 mg/L 赤霉素用于保铃,平均成铃率达 73.3%,通过花粉管通道法,最终共获得 2529 粒种子。

## 2.2 棉花卡那霉素与 PCR 鉴定

2010 年种子收获后于当年冬季种植在海南三亚湖南农业大学科研基地,其中正常发芽获得 1829 株幼苗,其余的无发芽能力或未能成活,棉苗 3 叶期用 1600 mg/L 的卡那霉素溶液点涂叶片,点涂部分未失绿的植株有 142 株,卡那霉素检测阳性株率为 7.76%,同时对 T<sub>1</sub> 所有植株提取总 DNA 进行 PCR 鉴定,出现阳性条带的为 140 株,PCR 阳性株率为

表 1 晋 1 不同世代卡那霉素与 PCR 检测结果

Table 1 Kanamycin and PCR direction of *Bt-Cry5Aa* transgenic plants for different generations

| 转基因棉世代<br>Generation of<br>transgenic cotton | 幼苗株数<br>The number of plants | 卡那霉素检测 Kanamycin detection               |   | PCR 检测 PCR detection                     |   |
|--|------------------------------|--|---|--|---|
|  |                              | 阳性株数<br>The number of<br>positive plants | 阳性株率 (%)<br>The positive rate<br>of plant | 阳性株数<br>The number of<br>positive plants | 阳性株率 (%)<br>The positive rate<br>of plant |
| T <sub>1</sub>                               | 1829                         | 142                                      | 7.76                                      | 140                                      | 7.40                                      |
| T <sub>2</sub>                               | 845                          | 618                                      | 73.10                                     | 621                                      | 73.45                                     |
| T <sub>3</sub>                               | 377                          | 360                                      | 95.50                                     | 360                                      | 95.50                                     |

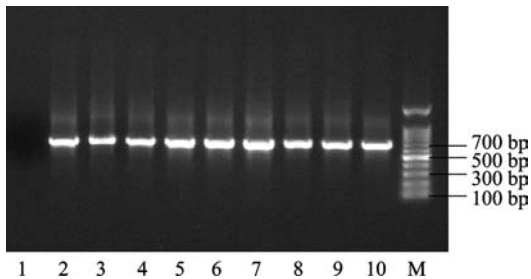


图 2 T<sub>1</sub> 转 *Bt-Cry5Aa* 基因植株 PCR 检测结果  
M: DNA 标记; 1: 阴性对照; 10: 阳性对照; 2-9: T<sub>1</sub> 转基因植株  
M: DNA Marker, 1: Non-transformed control,  
10: Positive control, 2-9: T<sub>1</sub> transformed plants

图 2 T<sub>1</sub> 转 *Bt-Cry5Aa* 基因植株 PCR 检测结果  
Fig. 2 PCR analysis of *Bt-Cry5Aa* transgenic plants for T<sub>1</sub> generation

## 2.3 *Bt-Cry5Aa* 基因的表达

由于 *Bt-Cry5Aa* 基因为新利用的 *BT* 基因,国内尚没有统一的检测方法,其毒蛋白的表达量也无对照可循,因此,将合成的 *Bt-Cry5Aa* 基因表达毒蛋白特异抗体采用双夹心 ELISA 法,对 T<sub>3</sub> 的代表品系 JX0010 各个器官、不同时期的毒蛋白表达量进行了测定。

以纯化 *Bt-Cry5Aa* 晶体蛋白作为抗原的标准曲线,采用 PBST 缓冲液按 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 ng/mL

7.76%。二者无显著差异。

将 T<sub>1</sub> PCR 检测阳性株自交种子,于当年在湖南农业大学棉花基地种植共获得 T<sub>2</sub> 植株共 845 株,经卡那霉素点涂叶片,未出现黄色斑点的阳性植株有 618 株(表 1,图 2),阳性株率为 73.1%,植株经 PCR 检测阳性株率为 73.45%。

T<sub>2</sub> PCR 检测阳性株自交种子,经种植共获得 T<sub>3</sub> 植株 377 株,经卡那霉素点涂叶片,未出现黄色斑点的阳性株有 360 株(表 1),其阳性株率达 95.5%,PCR 检测结果为 95.5%,与田间检测一致。

浓度稀释,PBST 缓冲液作空白对照。

从图 3 中可知,Cry5A 晶体蛋白作为抗原的标准曲线回归方程为  $Y = 0.4093x + 0.1496$ ,相关系数  $R^2 = 0.998$ ,OD 值与 *Bt-Cry5Aa* 标准蛋白含量显著相关,表明可用来定量测定转 *Bt-Cry5Aa* 棉花不同组织、器官毒蛋白含量可靠性较高。

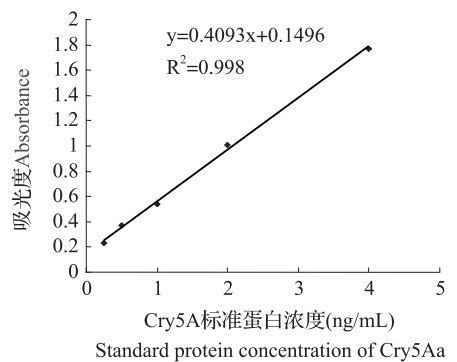


图 3 ELISA 法 *Bt-Cry5Aa* 蛋白标准曲线  
Fig. 3 The protein concentration results of *Bt-Cry5Aa* by ELISA assay

通过总蛋白的 ELISA 检测,各时期及器官蛋白表达量见表 2,表达量最高为蕾期叶片 1131.59 ng/g,最低是铃期小铃表达量为 526.45 ng/g,时间分布以蕾期表达最高,空间分布以叶片为最高。

表 2 Bt-Cry5Aa 毒蛋白表达特性检测

Table 2 Toxic protein expression of Bt-Cry5Aa gene

| 品种<br>Varieties | Bt 杀虫蛋白表达量 (ng/g 鲜重) Expression of Bt insecticidal protein |                                 |                                    |                                 |                                    |                                |                                     |
|-----------------|--|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
|                 | 苗期叶片<br>Seedling leaves                                    | 蕾期叶片<br>Leaves in<br>bud period | 花期叶片<br>Leaves in<br>flower period | 铃期叶片<br>Leaves in<br>boll stage | 蕾期小蕾<br>Small bud in<br>bud period | 花期花瓣<br>Petal in<br>boll stage | 铃期小铃<br>Small boll<br>in boll stage |
| JX0010          | 993.30 ± 40.95   | 1131.59 ± 40.39                 | 843.37 ± 55.78                     | 728.39 ± 51.83                  | 700.38 ± 38.21                     | 657.50 ± 25.09                 | 526.45 ± 52.51                      |

## 2.4 转基因植株的抗虫性测定

对 T<sub>2</sub> PCR 检测呈阳性的植株进行棉铃虫抗性测试(表 3),结果表明,在 2、3、4 代棉铃虫发生盛期, T<sub>2</sub> 叶片对棉铃虫抗性的校正死亡率分别为 85.42%、75.35%、62.79%,与对照 GK19 相比,对 2、3、4 代棉铃虫抗性的校正死亡率分别高 2.43%、高 1.79%、低 0.80%,均无显著差异,结果显示抗性明显。

表 3 T<sub>2</sub>转基因棉花的棉铃虫抗性测定结果Table 3 The bollworm larva resistance of T<sub>2</sub> transgenic cotton

| 棉铃虫代别<br>Cotton bollworm<br>generations | 校正死亡率(%)<br>Corrected mortality |                    |       |
|---|---------------------------------|--------------------|-------|
|   | GK19                            | T <sub>2</sub> 晋 1 | ± (%) |
| 2                                       | 82.99 ± 0.70Aa                  | 85.42 ± 1.22Aa     | 2.43  |
| 3                                       | 73.56 ± 0.95Aa                  | 75.35 ± 2.70Aa     | 1.79  |
| 4                                       | 63.59 ± 1.75Aa                  | 62.79 ± 1.20Aa     | -0.80 |
| 平均值 Average                             | 73.38 ± 1.13                    | 74.52 ± 6.55       | 1.14  |

大、小写字母分别代表 0.01、0.05 差异水平

Lowercase or uppercase letters represent significant difference at 0.05 or at 0.01 levels, respectively

## 3 讨论

目前应用于我国抗虫棉的抗虫基因主要有 BT (*CryIAb/Ac*)、CPTI、蛋白酶抑制素基因、GNA 基因等<sup>[6]</sup>,室内抗性筛选证明:连续的高选择压力将提高靶害虫的抗性,最终导致抗性消失,因此,一般转基因作物的安全应用期为 15~20 年,目前生产上应用最广泛的 *CryIaA* 基因应用已超过 20 年,生态风险日益增加。本课题组通过对 *Bt-Cry5Aa* 基因的抗谱研究,发现其对鳞翅目的棉铃虫有较高抗性,将为棉花抗虫研究提供一个抗虫基因替代来源,目前本课题组已对该基因进行了安全评价相关试验,包含抗虫性、食品安全性、基因漂移、非靶标害虫影响等,正积极申报该基因的安全证书。

花粉管通道法最早由我国科学家周光宇于 20 世纪 70 年代提出,并在棉花、小麦、大豆等作物上得到验证<sup>[16-17]</sup>。该方法最大的优点是转化速度快,不受棉花基因型控制<sup>[18]</sup>。应用花粉管通道法技术关键是掌握受体植物的花器结构和其开花习性,应用花粉管通道法的适宜时期为棉花授粉后的 18~48 h<sup>[19]</sup>。由于果枝可提供充足的养分给第 3~5 朵花,可作为注射对象,比较适合做转化<sup>[20-21]</sup>。虽然花粉管通道法具有一些优势,但其采用的注射法无可避免的伤害了柱头及子房,导致幼铃脱落。转化过程中发现,在湖南的气候条件下,适当推迟注射转化时间到 8 月上旬,同时选择气温较低的时段并配合赤霉素喷施能够显著降低幼铃脱落,能够在低转化率情况下获得阳性转化苗。

通过对晋 1 的卡那霉素抗性检测及 *Bt-Cry5Aa* 基因 PCR 检测的结果对比发现, *Bt-Cry5Aa* 基因的 PCR 检测阳性率与卡那霉素抗性筛选率无显著差异,这表明卡那霉素抗性检测的方法在田间进行阳性植株的筛选时是可靠的,这在转基因后代筛选过程中通过田间点涂卡那霉素溶液可以大大减轻后代筛选工作量,同时高浓度的卡那霉素能够显著提高检测的准确性。

转基因棉花的生物学鉴定是通过棉铃虫等棉花害虫在一定的生态条件下的反应及群体的变化来实现,这种检测方法能够比较直观的反应抗虫棉的抗虫性。有关研究报道称, *Bt* 基因抗虫棉在不同的生育时期对棉铃虫的杀虫效果有明显变化,其抗虫性有随棉株的生长发育而呈现降低的趋势<sup>[22-24]</sup>。本试验中也可以看出, T<sub>2</sub> 植株的抗虫性,随着植株的生长出现降低的趋势,与前人研究相符。其原因可能由于棉株本身的生长发育特性引起的,由于后期生长中心的转移,叶片中的 Bt 杀虫蛋白含量下降,抗虫性也逐渐降低。

## 参考文献

- [1] Gujar G T, Kalia V, Kumari A, et al. *Helicoverpa armigera* base-line susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins and resistance management for Bt cotton in India [J]. *J Invertebr Pathol*, 2007, 95(3):214-219
- [2] Gao Y L, Feng H Q, Wu K M. Regulation of the seasonal population patterns of *Helicoverpa armigera* moths by Bt cotton planting [J]. *Transgenic Res*, 2010, 19(4):557-562
- [3] 李瑞奇, 马峙英, 王勤英, 等. 转 *Bt/CpTI* 基因棉花抗虫性鉴定与筛选[J]. *植物遗传资源学报*, 2005, 6(4):409-413
- [4] Bates S L, Zhao J, Roush R T, et al. Insect resistance management in GM crops: past, present and future [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(7):57-62
- [5] Gassmann A J, Carriere Y, Tabashnik B E. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* [J]. *Annu Rev Entomol*, 2009, 54:147-163
- [6] 李汝忠. 转基因棉花的研究进展与发展前景[J]. *科技创新与品牌*, 2009(6):72-73
- [7] 孙志新, 崔金杰, 陈海燕, 等. 棉铃虫对 Bt 棉的抗性及其机理研究进展[J]. *江西棉花*, 2008, 30(2):3-7
- [8] Douches D S, Visiting S, Zarka K, et al. Development of *Bt-cry5* insect-resistant potato lines' Spunta-G2' and' Spunta-G3' [J]. *HortScience*, 2002, 37(7):1103-1107
- [9] Mohammed A, Douches D S, Pett W, et al. Evaluation of Potato Tuber Moth (Lepidoptera: Gelechiidae) Resistance in Tubers of *Bt-cry5* Transgenic Potato Lines [J]. *J Econ Entomol*, 2000, 93(2):472-476
- [10] 周光宇, 翁坚, 龚蓁蓁, 等. 农业分子育种-授粉后外源 DNA 导入植物的技术[J]. *中国农业科学*, 1988, 21(3):1-6
- [11] 陈金湘, 熊格生, 刘海荷, 等. 棉花水浮育苗技术的研究 [C]//中国棉花学会 2006 年年会论文集. 安阳: 中国棉花杂志社, 2006:191-195
- [12] 沈法富, 于元杰. 棉花核 DNA 的提取及其 RAPD 分析[J]. *棉花学报*, 1996, 8(5):246-249
- [13] 郭忠军, 陈全家, 许春华, 等. 棉花叶片蛋白质组双向电泳技术的优化[J]. *棉花学报*, 2012, 24(5):468-472
- [14] Chen S, Wu J Y, Cheng D R, et al. On the enzyme-linked immunosorbent assay of *bacillus thuringiensis* insecticidal protein expressed in transgenic cotton [J]. *Acta Gossypii Sin*, 1999, 11(5):259-267
- [15] 中华人民共和国农业部. 转基因植物及其环境安全检测抗虫棉花第 1 部分: 对靶标害虫的抗性 农业部 953 号公告-12. 1-2007[S]. 北京: 中华人民共和国农业部, 2007
- [16] 周仲华, 陈金湘. 棉花基因组 DNA 的提取及 RAPD 反应组成优化探讨[J]. *中国棉花*, 2004, 31(9):20-21
- [17] Paterson A H, Brubaker C L, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, 11(2):122-127
- [18] 沈法富, 于元杰. 棉花核 DNA 的提取及其 RAPD 分析[J]. *棉花学报*, 1996, 8(5):246-249
- [19] 中国农科院棉花所. 中国棉花遗传育种学[M]. 济南: 山东科技出版社, 2003:372-373
- [20] 杨书华, 倪万潮, 葛才林, 等. 陆地棉花花粉管通道形成时期的研究[J]. *扬州大学学报*, 2006, 27(1):62-65
- [21] 马盾, 黄乐平, 黄全生, 等. 花粉管通道法在棉花转基因上的应用[J]. *新疆农业科学*, 2004, 41(1):29-30
- [22] 马盾, 黄乐平, 黄全生, 等. 提高棉花花粉管通道法转化率的研究[J]. *西北农业学报*, 2005, 14(1):10-12
- [23] 赵建周, 赵奎军, 卢美光, 等. 华北地区棉铃虫与转 Bt 杀虫蛋白基因棉花间的互作研究[J]. *中国农业科学*, 1998, 31(5):1-6
- [24] 夏敬源, 崔金杰, 马丽华, 等. 转 Bt 基因抗虫棉在害虫综合治理中的作用研究[J]. *棉花学报*, 1999, 11(2):57-64