

1 株抗草甘膦棉花突变体草甘膦抗性的初步鉴定

巩元勇¹, 郭书巧¹, 束红梅¹, 何林池², 倪万潮^{1*}

(1. 江苏省农业科学院经济作物研究所 / 农业部长江下游棉花和油菜重点实验室, 江苏 南京 210014;

2. 江苏沿江地区农业科学研究所, 江苏 如皋 226541)

摘要: 目的在于探明 1 株新的草甘膦抗性棉花突变体是否能用于发掘新的草甘膦抗性基因以及在农业生产中作为抗草甘膦种质的选育和利用的潜在价值。本文采用 PCR 的方法, 在基因组和转录水平上排除了 CP4-EPSPS 基因对该突变棉株的污染; 通过测定莽草酸含量, 鉴定了该突变体草甘膦抗性的典型生理特征; 通过盆栽试验研究了该突变体苗期对草甘膦抗性的表型。结果显示: 不论草甘膦处理与否, 突变棉株莽草酸的含量都没有显著的积累, 在生理水平上显示出草甘膦抗性植株的显著特点; 2 叶期时草甘膦处理结果显示, 突变棉株的草甘膦抗性表型同孟山都的品种对草甘膦的抗性表型基本一致。在基因组和转录水平的 PCR 检测结果都排除了突变棉株草甘膦抗性的获得是 CP4-EPSPS 基因污染造成的。结合对其他已报道的草甘膦抗性基因的类似排除, 说明该抗性突变存在着自身特有的分子机理。

关键词: 棉花; 草甘膦抗性; CP4-EPSPS 基因

中图分类号: S562.01 **文献标志码:** A

文章编号: 1002-7807(2014)01-0018-07

Preliminary Identification of Glyphosate Resistance of a New Cotton Mutant

Gong Yuanyong¹, Guo Shuqiao¹, Shu Hongmei¹, He Linchi², Ni Wanchao^{1*}

(1. Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Cotton and Rapeseed, Ministry of Agriculture, China, Nanjing, Jiangsu 210014, China; 2. Institute of Agricultural Sciences of Jiangsu Changjiang River Bank District, Rugao, Jiangsu 226541, China)

Abstract: The purpose of this paper was to identify the potential value of a novel glyphosate-resistant cotton mutant comprising a new glyphosate resistance gene and to evaluate its agricultural production as glyphosate-resistant germplasm for breeding and utilization. At genomic and transcriptional levels, polymerase chain reaction (PCR) assay was used to exclude possible contamination by the CP4-EPSPS gene in this mutant cotton. The relative content of shikimic acid was determined to evaluate the typical physical characteristics of glyphosate resistance of this mutant. The phenotype of this cotton mutant under glyphosate treatment was observed at the seedling stage in pot cultures. No significant accumulation of shikimic acid was detected with different concentration or without glyphosate treatment in the mutant treated leaves, which indicated the typical physical characteristic of glyphosate resistance. The glyphosate-resistant phenotype of this cotton mutant was consistent with glyphosate-resistant cotton of Monsanto at the two-leave stage during glyphosate treatment. PCR showed that the CP4-EPSPS gene was not present in the genomic DNA or RNA of this mutant; thus, the glyphosate resistance of this mutant was not caused by the CP4-EPSPS gene. The results of similar exclusion tests for other reported glyphosate-resistant genes, indicated a new molecular mechanism existed in this mutant cotton.

Key words: cotton; glyphosate resistance; CP4-EPSPS gene

收稿日期: 2013-06-25

作者简介: 巩元勇 (1982-), 男, 博士, 助研, gongyuanyong1982@163.com; * 通讯作者, nwchao2002@aliyun.com

基金项目: 江苏省博士后科研资助计划 (1201031B); 国家自然科学基金 (31301682); 江苏省农业科技自主创新基金 (CX (12)3068); 江苏省自然科学基金 (BK2010465); 国家转基因重大专项 (2011ZX08005-001)

1996 年全球转基因作物种植面积只有 170 万 hm^2 , 在全球转基因作物种植面积持续增长的态势下,16 年后的 2012 年这个数字增长了 100 倍, 达到 1.7 亿 hm^2 [1]。2012 年有 28 个国家的 1730 万农民从转基因作物中获益, 不仅如此, 转基因作物还在社会经济和环境效益方面发挥着越来越重要的作用 [1]。转基因作物中不管是单一性状, 还是复合性状, 耐除草剂始终是主要性状, 约有 80% 的转基因作物具有草甘膦抗性 [2]。当前用于商品化抗草甘膦转基因作物的基因主要有 2 种: 一种是美国孟山都公司拥有自主知识产权的来自农杆菌菌株 CP4 (*Agrobacterium* sp. CP4) 的 *EPSPS* 基因, 包括 1996 年上市的抗草甘膦大豆、油菜和棉花, 2001 年上市的抗草甘膦玉米, 2005 年和 2006 年上市的抗草甘膦苜蓿和棉花, 都有 CP4-*EPSPS* 基因的插入; 另一种是美国迪卡 (Dekalb) 遗传公司的修饰过的玉米 *EPSPS* 基因, 1998 年上市的抗草甘膦玉米便是插入该基因产生的抗性 [3]。

近几年, 我国抗草甘膦作物研发也有了一些进展。何鸣等通过基因优化技术获得草甘膦抗性基因 *aroAM*₂ [4]。随后的相关研究表明, 该基因在转入烟草 [5]、甘蓝型油菜湘汕 15 号 [6] 和棉花品种石远 321 [7] 中都能稳定表达, 并且都表现出对草甘膦很强的抗性。朱玉从受草甘膦污染土壤的自然环境中筛选的荧光假单胞菌 G2 (*Pseudomonas fluorescens* G2) 中克隆获得 *EPSPS* 酶的 *aroA*_{G2} 基因, 该基因的草甘膦耐受浓度最大可达 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其推导出的氨基酸序列与 Class-I 的 *EPSPS* 酶同源性约为 30%, 与 Class-II 的 *EPSPS* 酶同源性低于 25%, 和孟山都公司的 CP4-*EPSPS* 酶同源性仅为 24.5%, 显示出较好的开发应用潜力 [8]。刘锡娟等将 *aroA*_{G2} 基因通过双子叶植物偏爱密码子进行人工改造为 *EPSPS* 酶的 *aroA*_{G2M} 基因, 将改造后的基因分别转入烟草和棉花, 得到的转基因植株具有良好的草甘膦抗性 [9]。赫福霞等同样将 *aroA*_{G2} 基因经植物偏爱密码子优化后改造为 *2mG2-epsps* 基因, 将该基因转入玉米, 获得了玉米转化系, 表现出较好的草甘膦抗性 [10]; 2009 年, 将该基因转入烟草并成功表达, 转化后的烟草表现出具有较高的草甘膦耐受性 [11]。Lin

等从假单胞杆菌 (*Pseudomonas putida*) 中克隆了抗草甘膦的 *EPSPS-G6* 基因 [12], 该基因随后被转入水稻和棉花中, 在 2011 年的抗性验证中都显示出很好的草甘膦抗性 [13-14]。

此外, 还有一些研究人员通过非转基因的方法获得抗草甘膦作物。早在 1995 年, 中国科学院上海植物生理研究所通过辐射育种的方法, 获得了 1 个耐草甘膦的棉花种质系, 其抗草甘膦能力达到田间用药浓度的 90% [15], 不过之后再也没有关于该材料的后续报道。浙江大学的祝水金等采用体细胞连续定向筛选技术, 结合体细胞诱变技术, 获得 1 个高抗草甘膦的棉花突变体 -R1098; 研究发现, R1098 植株抗草甘膦性状稳定, 其抗性为单基因显性遗传, 杂种 F_1 仍具有草甘膦抗性且表现有较强的杂种优势, 对于杂交棉制种和生产应用具有重要的利用价值 [16]。

前期研究中, 江苏沿江地区农业科学研究所的研究人员在棉田偶然发现 1 株高抗草甘膦自然突变棉株, 经过继代培养均表现出稳定的草甘膦抗性, 该突变棉株被命名为 TRC98-33; 后续的遗传试验结果表明, 该突变体的草甘膦抗性由一对显性基因控制, 无细胞质效应。本论文通过对该突变体棉株 CP4-*EPSPS* 基因的排除、生理水平莽草酸含量的测定以及苗期植株抗性表型做初步研究, 以期新的抗草甘膦基因的发掘及该草甘膦抗性棉株的生产应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 棉花种子。 陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 品种苏棉 18 (Sumian18) 和草甘膦抗性棉花突变体 TRC98-33 由江苏沿江地区农业科学研究所何林池研究员提供, 草甘膦抗性棉花 DP555 为孟山都品种, 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂。 一般化学试剂购自南京化学试剂有限公司, 为分析纯级别; 95% 草甘膦原粉购于成都格雷西亚化学技术有限公司; BU-SuperScript RT KIT (Biouniquer) 和 DNA Marker 购自南京天为生物科技有限公司; EasyTaq DNA 聚合酶是北京全式金生物技术有限公司产品; 引物合成在英潍捷基 (上海) 贸易有限公司 (Invitrogen) 完成。

1.2 实验方法

1.2.1 植物培养及处理。棉花的催芽和育苗按照巩元勇等^[17]的操作过程进行,分别将小苗移到 Hoagland 营养液和塑料花盆(长×宽×高=10 cm×10 cm×12 cm)中培养,每3 d 更换一次新的营养液,待棉苗生长至2叶期时,不同浓度草甘膦(0, 5, 10, 20, 40 mmol·L⁻¹) 处理第二片真叶,72 h 后收取被处理的叶片测定莽草酸的相对含量;盆栽棉苗生长到两叶期时,分别对2片真叶涂抹10 mmol·L⁻¹的草甘膦,处理10 d 后观察棉苗的生长情况,测量株高,观察分析叶片受胁迫反应(每个处理设置3~4个重复)。

1.2.2 基因组 DNA 提取、总 RNA 提取及反转录合成 cDNA 第一链。基因组 DNA 提取采用孙志栋等^[18]改良的 CTAB 法,从棉花新鲜的幼嫩叶片中提取 DNA;总 RNA 提取运用胡根海等^[19]的方法,同样从棉花新鲜的幼嫩叶片中提取获得;cDNA 第一链合成操作步骤按照 BU-SuperScript RT KIT 说明书进行,反应结束后的终产物稀释5倍用于后续的扩增模板。

1.2.3 CP4-EPSPS 基因的扩增。根据已公布的 CP4-EPSPS 基因序列 (GeneBank 登录号: AF464188), 用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物 CP4-EPSPS-F (CCTTCATGTTTCGGCGGTCTCG) 和 CP4-EPSPS-R (GCGTCATGATCGGCTC-GATG) 用于对基因组 DNA 和 cDNA 中 CP4-EPSPS 基因的扩增。棉花 *GhHis3* 作为内参基因,所用引物是 *GhHis3*-F (TCAAGACTGATTTGCGTTTCCA) 和 *GhHis3*-R (GCGCAAAGGTTGGTGTC TTC)。用 *EasyTaq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,94 °C 预变性 3 min 后,按以下程序进行 PCR 扩增,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 33 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

1.2.4 莽草酸的提取及测定。莽草酸的提取按照 Pline 等^[20]方法,稍加改进。在研钵中用液氮充分研磨植物样品,称取 0.2 g 样品加入 2 mL eppendorf 管中;每管加入 800 μL 0.01 mol·L⁻¹ H₂SO₄,在摇床中混匀 60 min;加入 250 μL 0.4 mol·L⁻¹ Na₂CO₃,用 1.2×10⁴g 在 4 °C 下离心 10 min;吸取

上清液,可直接检测,也可在-30 °C 中保存直到检测。莽草酸的测定采用分光光度法^[21]。取 50 μL 提取液,加入 500 μL 1% (W/V) 高碘酸反应 3 h;加入 500 μL 1 mol·L⁻¹ NaOH,然后迅速加入 300 μL 0.1 mol·L⁻¹ 甘氨酸用于颜色固定;用分光光度计在 380 nm 检测吸光值。

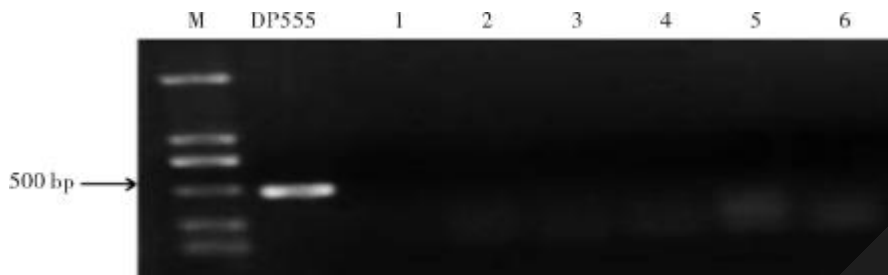
2 结果与分析

2.1 TRC98-33 草甘膦抗性棉花突变体 CP4-EPSPS 基因的排除

用根据已公布的 CP4-EPSPS 基因序列设计的特异引物 CP4-EPSPS-F 和 CP4-EPSPS-R,分别在基因组层面和转录水平对草甘膦抗性棉花突变体 TRC98-33 进行 PCR 扩增,以确定该突变体所具有的草甘膦抗性不是 CP4-EPSPS 基因污染所致。选取 6 株 TRC98-33 棉株分别提取基因组 DNA 作为模板,以 DP555 的基因组作为阳性对照模板,检测结果如图 1 所示,DP555 在 500 bp 附近有 PCR 产物出现,而 TRC98-33 的 6 个棉株都没有可见 PCR 产物,由此表明 TRC98-33 的基因组不存在 CP4-EPSPS 基因。分别提取 4 株 TRC98-33 棉株的 RNA,以反转录后的 cDNA 为模板,以 DP555 作为阳性对照,检测结果如图 2 所示,DP555 的泳道有产物,而 4 个来源 TRC98-33 的泳道没有条带,因此在转录水平的结果进一步验证了 TRC98-33 棉株不存在 CP4-EPSPS 基因。

2.2 草甘膦处理叶片莽草酸含量的测定

草甘膦处理后,短期内植物体是否有莽草酸积累,是判断植物是否具有草甘膦抗性的重要生理指标。营养液培养棉花幼苗至2叶期时,不同浓度草甘膦处理第二片真叶72 h,检测该处理叶片莽草酸含量变化。如图3所示,经不同浓度草甘膦处理后,TRC98-33 的真叶内莽草酸含量没有变化,同 DP555 变化趋势一致;而 Sumian 18 因不具有草甘膦抗性,莽草酸含量在 10 mmol·L⁻¹ 草甘膦处理下达到未经草甘膦处理时的 5 倍左右。该结果表明,TRC98-33 品系在生理层面上也具备草甘膦抗性的典型特征。

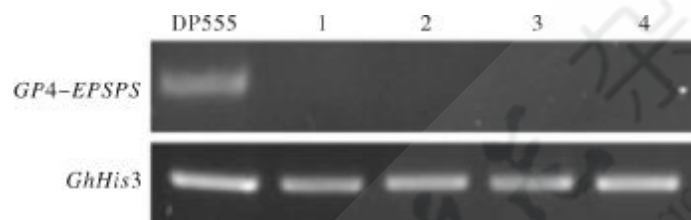


M; DL2000 marker; DP555: 阳性对照; 1-6: TRC98-33 突变棉株。

M: DL2000 marker; DP555: Positive control; 1-6: TRC98-33 mutant cotton.

图 1 *CP4-EPSPS* 基因基因组 PCR 扩增结果

Fig. 1 Genomic PCR amplification result of *CP4-EPSPS* gene



DP555: 阳性对照; 1-4: TRC98-33 突变棉株。

DP555: Positive control; 1-4: TRC98-33 mutant cotton.

图 2 转录水平 *CP4-EPSPS* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification result of *CP4-EPSPS* gene at transcriptional level

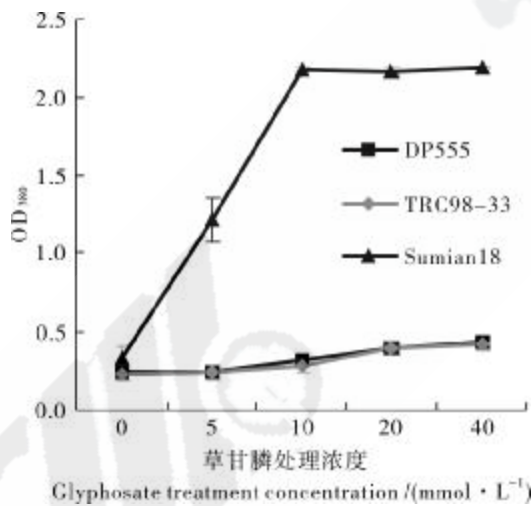


图 3 不同浓度草甘膦处理棉花叶片莽草酸相对含量变化趋势

Fig. 3 The changing trend of the relative contents of shikimic acid in cotton leaves by different concentrations of glyphosate treatment

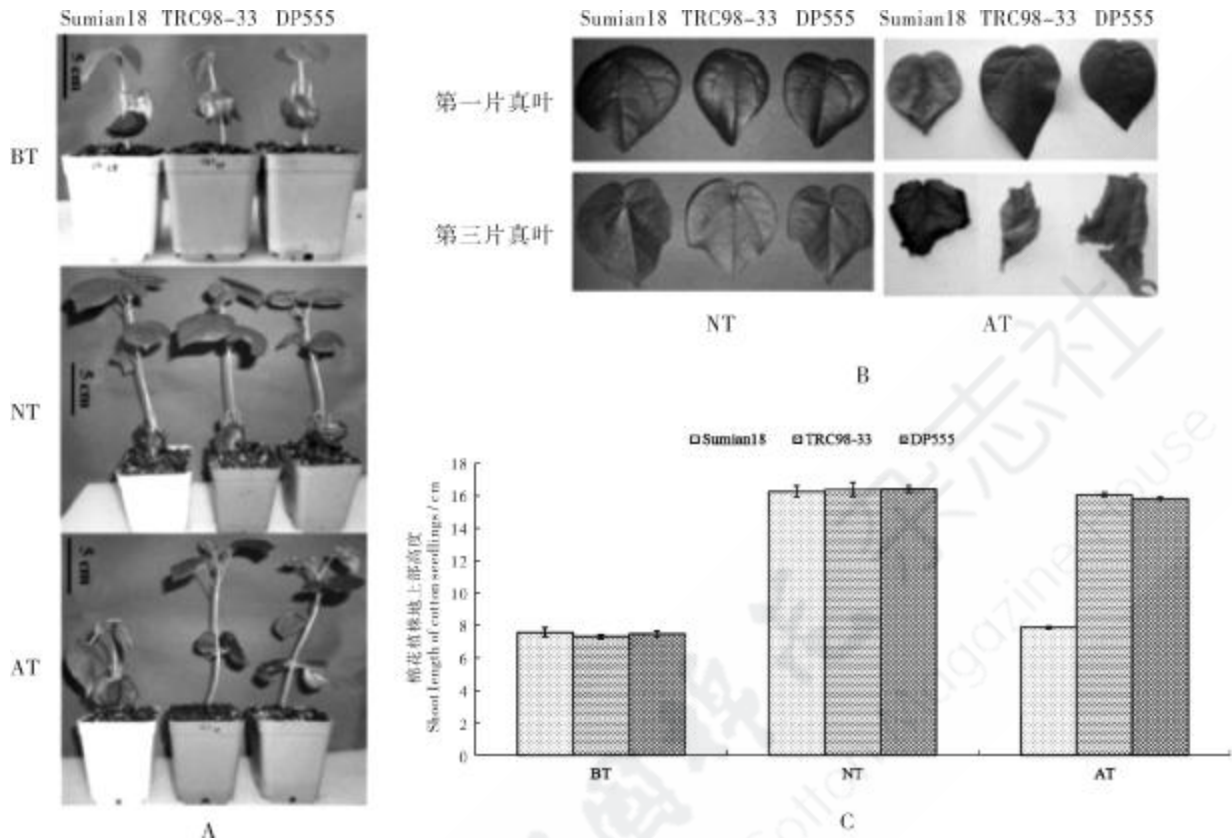
2.3 棉花苗期草甘膦抗性鉴定

为了进一步研究 TRC98-33 品系在草甘膦抗性方面的表现,本文通过盆栽实验分析了该突变体苗期对草甘膦的抗性。同样以 Sumian 18 和 DP555 为对照,在棉苗生长到两叶期时,对 2 片

真叶用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 草甘膦处理,处理 10 d 后观察棉苗的生长情况。结果(图 4):Sumian 18 第一、二片真叶出现黄化,伴随萎蔫,叶片边缘有坏死,而 TRC98-33 的这 2 片真叶同未处理的棉苗的表现一样,生长正常,这也同 DP555 处理的叶片表现一致(图 4-B);Sumian 18 第三片真叶出现萎蔫和坏死更为严重,几乎停止生长,而 TRC98-33 同 DP555 第三片真叶表现一样,没有萎蔫和坏死,叶片表现为边缘向中间卷曲(图 4-B);Sumian18 的茎端生长点完全坏死,停止生长,表现为株高不再增加,而 TRC98-33 同 DP555 一样,植株生长高度同未处理的棉株没有差异(图 4-A、图 4-C)。由此表明,TRC98-33 品系在苗期对草甘膦的抗性表现同 DP555 一致,为更深入地研究该突变体在全生育期对草甘膦的抗性提供了依据。

3 讨论

已经商业化并在全球种植最广的抗草甘膦棉花品种是孟山都的 MON1445 和 MON88913^[3]。MON1445 是第一个商业化具有草甘膦抗性的棉花品种,该品种的抗性来自一个 *CP4-EPSPS* 基



BT: 处理前, Before treatment; NT: 未处理, No treatment; AT: 处理后, After treatment.

图4 草甘膦处理对不同棉株的影响

Fig. 4 Effects of glyphosate treatment on different cotton seedlings

因,驱动该基因表达的 CoMVB 启动子来源于修饰过的 FMV 和拟南芥的 CTP2 转运肽^[3]; CP4-EPSPS 基因在发育的花粉和绒毡层缺乏有效的表达^[22],限制了草甘膦在该生长期的喷施。MON88913 含有 2 个 CP4-EPSPS 基因,用嵌合启动子驱动该基因在 4-12 叶营养生长期以及敏感的生殖组织中能够更强的表达;这 2 个 CP4-EPSPS 基因分属于 2 个不同的 DNA 组件,第一个 CP4-EPSPS 基因由拟南芥的 *tsf1* 启动子和 FMV 35S 启动子的增强子序列构成的 FMV/TSF1 嵌合启动子调控基因的表达,第二个 CP4-EPSPS 基因由拟南芥的 *ac8* 基因启动子和 CaMV 35S 启动子构成的 CaMV 35S/ACT8 嵌合启动子调控基因表达^[22]。因在喷施草甘膦时 MON88913 表现出更强的安全性和稳定性,所以一上市就被广大的种植户所接受^[3]。本研究所用的阳性对照材料 DP555 就是孟山都的 MON88913 品种。排除 TRC98-33 对草甘膦的抗性不是由已知的抗性基因,尤其是 CP4-EPSPS 基因的污染而获得,成为深入研究该

突变体抗性机理的前提。本论文的研究结果以及 southern 和 northern 的检测结果(将另文发表)在基因组和转录水平都排除了 CP4-EPSPS 基因的干扰,且对其他已报道的草甘膦抗性基因也进行了类似的排除(本文结果中未显示),这为发掘新的草甘膦抗性基因提供了可能。

5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合成酶(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase, EPSPS)是植物和微生物芳香族氨基酸生物合成重要途径——莽草酸途径中催化磷酸烯醇式丙酮酸(Phosphoenol pyruvate, PEP)和 3-磷酸莽草酸(3-Phosphoshikimate, S3P)合成 5-烯醇式丙酮酸-3-磷酸莽草酸(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate, EPSP)的关键酶^[23],草甘膦的作用方式是通过竞争性抑制 PEP 与 EPSPS 结合,从而阻断 PEP 与 S3P 反应生成 EPSP^[24],其最直接的结果是导致莽草酸的积累。因此,在草甘膦处理时,检测莽草酸是否积累是鉴定植物是否具有草甘膦抗性的重要生理指标^[20]。在草甘膦处理后,叶片莽草

酸含量不存在积累,在生理层面上显示出草甘膦抗性植株所具有的显著特征。另外,在苗期草甘膦处理后,TRC98-33 的表型同 DP555 基本一致,这为整个生育期的田间观察研究提供了基础,同时也为 TRC98-33 突变体在农业生产中作为抗草甘膦种质的选育和利用提供重要的依据。

参考文献:

- [1] James C. 2012 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(2): 1-8.
James C. 2012 global biotech / GM crops commercialized development trend[J]. China Biotechnology, 2013, 33(2): 1-8.
- [2] Service R F. A growing threat down on the farm [J]. Science, 2007, 316: 1114-1117.
- [3] Green J M. Evolution of glyphosate-resistant crop technology[J]. Weed Science, 2009, 57: 108-117.
- [4] 何鸣, 曾海燕, 徐培林, 等. *aroA* 基因的克隆和优化[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2002, 41(2): 76-79.
He Ming, Zeng Haiyan, Xu Peilin, et al. Cloning and mutagenesis of the *aroA* gene[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2002, 41(2): 76-79.
- [5] 谢龙旭, 徐培林, 聂燕芳, 等. 抗草甘膦抗虫植物表达载体的构建及其转基因烟草的分析 [J]. 生物工程学报, 2003, 19(5): 545-550.
Xie Longxu, Xu Peilin, Nie Yanfang, et al. Construction of a vector conferring herbicide and pest resistance in tobacco plant [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2003, 19(5): 545-550.
- [6] 王景雪, 赵福永, 徐培林, 等. 油菜转抗草甘膦、抗虫基因获得双抗植株[J]. 遗传学报, 2005, 32(12): 1293-1300.
Wang Jingfu, Zhao Fuyong, Xu Peilin, et al. Development of transgenic oilseed plants resistant to glyphosate and insects [J]. Acta Genetica Sinica, 2005, 32(12): 1293-1300.
- [7] 赵福永, 谢龙旭, 田颖川, 等. 抗草甘膦基因 *aroAM2* 及抗虫基因 *Bt5lm* 的转基因棉株[J]. 作物学报, 2005, 31(1): 108-113.
Zhao Fuyong, Xie Longxu, Tian Yingchuan, et al. Glyphosate-resistant and bollworm-resistant transgenic cotton plants with the *aroAM2* and *Bt5lm* genes[J]. Acta Agronomica Sinica, 2005, 31(1): 108-113.
- [8] 朱玉. 极端污染环境草甘膦耐受菌株荧光假单胞菌 G2 的鉴定及其 *EPSP* 合成酶基因的克隆[D]. 北京: 中国农业科学院, 2002.
Zhu Yu. Identification of glyphosate-tolerant *Pseudomonas fluorescens* strain G2 from extremely polluted environment and cloning of its *EPSP* synthase gene[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2002.
- [9] 刘锡娟, 刘昱辉, 王志兴, 等. 转 5- 烯醇式丙酮酰莽草酸 -3- 磷酸合酶(*EPSPS*)基因抗草甘膦烟草和棉花的获得[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(6): 958-963.
Liu Xijuan, Liu Yuhui, Wang Zhixing, et al. Generation of glyphosate-tolerant transgenic tobacco and cotton by transformation with a 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (*EPSPS*) gene [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2007, 15(6): 958-963.
- [10] 赫福霞, 郎志宏, 陆伟, 等. 以耐草甘膦 *2mG2-epsps* 基因为选择标记的玉米转化体系的建立 [J]. 生物技术通报, 2008(5): 92-97.
He Fuxia, Lang Zhihong, Lu Wei, et al. The establishment of maize transformation system with a glyphosate-tolerant *2mG2-epsps* gene as a selectable marker[J]. Biotechnology Bulletin, 2008(5): 92-97.
- [11] 孙鹤, 郎志宏, 陆伟, 等. 转 *2mG2-epsps* 基因烟草的草甘膦耐受性分析[J]. 中国农业科技导报, 2009(4): 100-106.
Sun He, Lang Zhihong, Lu Wei, et al. Analysis of glyphosate tolerance in transgenic tobacco with *2mG2-epsps* gene[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2009(4): 100-106.
- [12] Lin Chao, Fang Junxu, Zhao Xiaoli, et al. A built-in strategy for containment of transgenic plants: creation of selectively terminable transgenic rice[J]. PLoS ONE, 2008, 3(3): e1818.
- [13] 燕树锋, 陈进红, 梅磊, 等. 市售草甘膦除草剂对转基因抗草甘膦棉花幼苗生长的影响[J]. 棉花学报, 2011, 23(5): 408-413.
Yan Shufeng, Chen Jinhong, Mei Lei, et al. The effects of commercial glyphosate herbicide on the seedlings of transgenic cotton with glyphosate resistance[J]. Cotton Science, 2011, 23(5): 408-413.
- [14] Zhao Te, Lin Chaoyang, Shen Zhicheng. Development of transgenic glyphosate-resistant rice with G6 gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase [J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10(9): 1307-1312.
- [15] 何卓培, 周庆祺. 耐受草甘膦抗枯萎病棉花新种质 PI3910[J]. 作物品种资源, 1995(4): 26.
He Zhuopei, Zhou Qingqi. New germplasm with glyphosate resistance and resistance to fusarium wilt of cotton PI3910 [J]. Crop Germplasm Resources, 1995(4): 26.
- [16] 祝水金, 汪静儿, 俞志华, 等. 棉花抗草甘膦突变体筛选及其在杂种优势利用中的应用[J]. 棉花学报, 2003, 15(4): 227-230.
Zhu Shuijin, Wang Jinger, Yu Zhihua, et al. A cotton mutant resist to glyphosate and its utilization in cotton heterosis[J]. Cotton Science, 2003, 15(4): 227-230.
- [17] 巩元勇, 郭书巧, 束红梅, 等. 陆地棉水通道蛋白 *GhNIP6.1* 基因的克隆及表达分析[J]. 棉花学报, 2013, 25(1): 1-8.
Gong Yuanyong, Guo Shuqiao, Shu Hongmei, et al. Cloning of aquaporin gene *GhNIP6.1* from the upland cotton and its expression in different cotton tissues[J]. Cotton Science, 2013, 25(1): 1-8.

- [18] 孙志栋,王学德,倪西源,等.棉花 DNA 提取方法的探讨[J].浙江农业学报,2004,16(4):177-181.
Sun Zhidong, Wang Xuede, Ni Xiyuan, et al. Primarily study on isolation of genomic DNA from cotton [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2004, 16(4): 177-181.
- [19] 胡根海,喻树迅.利用改良的 CTAB 法提取棉花叶片总 RNA [J].棉花学报,2007,19(1): 69-70.
Hu Genhai, Yu Shuxun. Extraction of high-quality total RNA n cotton leaf with improved CTAB method [J]. Cotton Science, 2007, 19(1): 69-70.
- [20] Pline W A, Wilcut J W, Duke S O, et al. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and nonglyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(3): 506-512.
- [21] Tong X H, Daud M K, Sun Y Q, et al. Physiological and molecular mechanisms of glyphosate tolerance in an *in vitro* selected cotton mutant [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2009, 94(2/3): 100-106.
- [22] Dill G M, Cajacob C A, Padgett S R. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations[J]. Pest Management Science, 2008, 64: 326-331.
- [23] Hermann K M, Weaver L M. The shikimate pathway[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1999, 50: 473-503.
- [24] Schonbrunn E, Eschenburg S, Shuttleworth W A, et al. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase in atomic detail[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98: 1376-1380. ●

中國棉花
China Cotton Magazine

