

基于抗草甘膦基因的棉花茎尖农杆菌介导转化方法的研究

欧 婷, 何秋伶, 陈进红, 祝水金*

(浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310058)

摘要:以中棉所 49、珂字棉 201 和 YZ-1 为受体材料,通过对培养基草甘膦浓度、农杆菌侵染时间和浓度、共培养时间以及恢复培养条件等因素的优化,建立了基于抗草甘膦基因的棉花茎尖农杆菌转化技术体系,并将抗草甘膦基因(*EPSPS-G6*)导入 3 个受体材料,获得转基因抗草甘膦棉花植株。研究表明,适合于棉花茎尖农杆菌介导的草甘膦筛选浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 茎尖转化体系为农杆菌菌液 OD_{600} 为 0.9~1.0, 侵染时间为 20 min, 共培养时间为 48 h, 选用 SH 培养基并加入适量活性炭($0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)作为恢复培养基。用本研究创制的转化技术体系,转化处理 3 个陆地棉受体 360 个茎尖,共获得 60 株抗性再生植株,经 PCR 检测,获得阳性抗性植株 26 株,移栽成活 23 株。以茎尖外植体数计算,本体系的转化成功率 6.4%。该转化体系适合于转化抗草甘膦基因或以抗草甘膦基因为筛选基因的外源基因,具有转化频率高、嵌合体少、转化周期短等优点。

关键词:农杆菌;棉花;茎尖;转化;草甘膦

中图分类号:S562.035.3 **文献标志码:**A

文章编号:1002-7807(2013)05-0410-07

Studies on the Genetic Transformation Method by Cotton Shoot Tip-*Agrobacterium* Medium Using the Glyphosate Resistant Gene

OU Ting, HE Qiu-ling, CHEN Jin-hong, ZHU Shui-jin*

(College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: A genetic transformation system via cotton shoot tip-*agrobacterium* medium based on a glyphosate resistant gene was established through the optimization of the glyphosate concentration during screening, infection period and infection concentration of the *agrobacterium*, period of co-culture with the *agrobacterium*, and the conditions of recover culture etc., used CCRI 49, Coker 201, and YZ-1 as the materials, and their transgenic herbicide resistant cotton plants with *EPSPS-G6* were obtained as well. As the results showed that, the optimal glyphosate concentration for screening transgenic cotton shoot tips was $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the optimal *agrobacterium* density was 0.9-1.0 in OD_{600} ; the infection period was about 20 min; the co-culture period with *agrobacterium* was 48 hours; and SH medium containing $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ activated carbon was the best recovery medium for the transgenic shoot tip to grow. Using this transformation system, 60 glyphosate resistant plantlets were obtained from the 360 cotton shoot tips of three upland cotton cultivar or germplasms. From them, 26 plantlets were transgenic according to the PCR products, and 23 plants with the glyphosate resistant gene survived after transplanting. Based on explant numbers, the success rate of transformation in this experiment was 6.4%. The presented transformation system is an excellent method to transform the glyphosate gene, or an exogenous gene with glyphosate as a screening gene, with the advantages of high transformation rate, less chimera, and short transformation period etc.

Key words: *agrobacterium*; cotton; shoot tip; transgenic; glyphosate

棉花是重要的经济作物,在我国国民经济发展中占有重要的地位。自 1987 年 Umbec 等^[1]首次报道将 *nptII* 基因和 *CAT* 基因导入陆地棉品

种珂 201 和珂 312 以来,棉花转基因技术飞速发展。目前棉花转基因方法主要有农杆菌介导法^[2-3]、基因枪法^[4]及花粉管通道法^[5-6]。农杆菌介导法具

收稿日期:2012-11-05 作者简介:欧 婷(1987-),女,硕士研究生;* 通讯作者,shjzhu@zju.edu.cn

基金项目:国家 973 计划项目(2009CB117305);国家 863 重大专项(2011AA10A102);转基因生物新品种培育重大专项(2012ZX08005-005)

有转化效率高、单拷贝、稳定性好等特点,被广泛应用。但传统的农杆菌介导法受到棉花基因型限制,仅有部分品种可以成功地获得再生植株,且培养程序较复杂、再生周期较长。花粉管通道法,虽然不受基因型依赖,操作方法简单,但是其转化机理研究尚未明确,并受操作经验和生长季节的限制。而基因枪法因转化率低、多拷贝和嵌合体比例高等原因在棉花上的成功应用报道较少。1988年, Gould 等^[7]建立了农杆菌介导的茎尖转化法,打破了农杆菌介导遗传转化的受体基因型限制,缩短了植株再生周期,而受到国内外很多学者的青睐。然而,该方法由于筛选剂效果等问题而常出现转化效率低和嵌合体多等局限^[8-10]。

草甘膦 (Glyphosate, N- 膦羧基甲基甘氨酸) 是目前广泛应用的广谱性除草剂。美国孟山都公司已从土壤微生物中克隆抗除草甘膦基因,育成的转基因抗草甘膦棉花品种于 1994 年通过转基因作物环境释放许可^[11],国内浙江大学沈志成实验室克隆的具有自主知识产权的自假单胞杆菌的抗草甘膦的 *EPSPS-G6* 基因 (专利号: ZL2006100525734) 为国内棉花转基因抗草甘膦育种提供了研究基础。本研究拟利用该基因为目标基因,在已现有的棉花茎尖农杆菌介导遗传转化方法^[11]的基础上,建立适合于抗草甘膦基因的棉花茎尖农杆菌介导的遗传转化体系,为棉花抗草甘膦种质的创制及以抗草甘膦基因为筛选标记的棉花转基因转化提供技术平台。

1 材料和方法

本试验于 2011—2012 年在浙江大学农业与生物技术学院浙江省作物种质资源重点实验室进行。

1.1 试验材料

1.1.1 棉花材料。本试验供试材料为陆地棉 (*G. hirsutum* L.) 品种中棉所 49, 以及陆地棉种质系珂字棉 201 和 YZ-1。其中中棉所 49 是目前推广面积最大的非转基因品种, 珂字棉 201 和 YZ-1 是易再生的陆地棉种质系, 常用于体细胞培养。

1.1.2 菌种与质粒。转化菌株及载体: 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404。Ti 质粒结构见图 1。

1.1.3 主要试剂与药品。乙酰丁香酮、植物凝胶 (Phytigel)、植物生长调节剂 (购自生工生物工程有限公司)、草甘膦 (购自 Sigma 公司)。

PCR 引物主要由生工生物工程有限公司合成。

主要培养基为 MS 基本培养基和 B5 有机物, 药品购自生工生物工程有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 农杆菌菌液的制备。挑取单克隆于 5 mL 液体培养基中, 置于摇床中 28 °C, 230 r·min⁻¹ 过夜, 吸取适量菌液于 50 mL 培养基中培养至试验所需菌液 OD 值, 后离心, 弃上清液, 用等体积悬浮液将农杆菌均匀悬浮, 同时加入 200 μmol 乙酰丁香酮 (Acetosyringone, AS), 混匀, 备用。

1.2.2 培养基。培养基成分见表 1。



CaMV35S: 组成型启动子; CsvMv promoter: 组成型启动子; 1174AALdico: 草甘膦抗性基因 (*EPSPS-G6*)。

CsvMv and CaMV35S: promoter; 1174AALdico: glyphosate-resistant gene, *EPSPS-G6*。

图 1 转化用的 Ti 质粒载体结构图

Fig. 1 The structural map of vector used in transformation

表 1 试验所用的培养基

Table 1 The media used in the experiment

培养基种类 Medium	培养基配方 Prescription of the medium	pH
无菌苗 Aseptic seedling	MSB5 medium+30 g Sucrose+2.5 g Phytigel	5.8
共培养 Co-culture	MSB5 medium+0.1 mg·L ⁻¹ IBA+200 μmol AS+30 g Glucose+2.5 g Phytigel	5.4
筛选培养 Screening of culture	MSB5 medium+0.1 mg·L ⁻¹ IBA+200 mg·L ⁻¹ cef+10 mg·L ⁻¹ Glyphosate+30 g Glucose+2.5 g Phytigel	5.8
恢复培养 Recovery training	SH medium+30 g Glucose+0.5 g·L ⁻¹ Activated Carbon+3 g Phytigel	5.8
YEB	5 g Beef extract+1 g Yeast Extract+5 g Peptone+5 g Sucrose+0.5 g MgSO ₄ ·H ₂ O	7.0

1.2.3 无菌苗培养。取受体材料的棉子进行浓硫酸脱绒和剥壳。剥壳后的棉仁在超净工作台上用0.1%升汞消毒5 min,用无菌水清洗3次,加入适量无菌水,置摇床(160 r·min⁻¹,28℃)24 h吸胀,置于无菌苗培养基上,28℃下暗培养7 d。

1.2.4 草甘膦筛选浓度试验。配制不同草甘膦浓度的筛选培养基,培养基中的草甘膦浓度分别为0 mg·L⁻¹、5 mg·L⁻¹、10 mg·L⁻¹、15 mg·L⁻¹和20 mg·L⁻¹。取不同受体的无菌苗茎尖插入培养基进行培养,每个培养皿置11个茎尖,每个浓度4次重复,28℃光照条件下培养14 d。

1.2.5 转化与再生体系优化。(1)农杆菌菌液浓度及侵染时间:将准备好的茎尖切断分别用OD₆₀₀值为0.4~1.2的农杆菌菌液进行梯度试验,侵染时间设为20 min。侵染后的茎尖经共培养后在草甘膦筛选培养基上培养20 d后,观察茎尖生长情况。

(2)共培养时间:将经过侵染的茎尖切断的菌液吸干,移入共培养基中,分别在28℃下黑暗培养36 h、48 h、60 h和72 h,在筛选培养基上培养20 d后观察茎尖生长情况。

(3)活性炭对成苗的影响:经过草甘膦筛选后获得的茎尖再生植株分别移入加有0.1 g·L⁻¹、0.5 g·L⁻¹、1.0 g·L⁻¹和2.0 g·L⁻¹活性炭的成苗培养基上,培养20 d后观察根系和试验苗生长情况。

1.2.6 棉花茎尖转化过程。取生长良好的各受体的棉花无菌苗,在超净工作台上用解剖刀将其子叶和下胚轴切除,用解剖刀把茎尖轻轻划伤后将其移至悬浮好的农杆菌菌液中,置于28℃下、160 r·min⁻¹摇床侵染20 min。用移液枪吸出剩余农杆菌菌液后,将侵染过的茎尖平铺于共培养基培

养基上,28℃下暗培养48 h,再置于含头孢霉素的草甘膦筛选培养基,30 d后挑选长势较好的茎尖移至恢复培养基中进行培养。

1.2.7 转化试管苗的移栽。转化植株在恢复培养基生长至瓶口时,取掉封口膜,在培养箱中进行适应锻炼1~2 d。然后将再生苗放入清水中于28℃、光照条件下炼苗2~4 d,将其移入蛭石和营养土(1:1)中,在培养箱中28℃、光照下培养7 d,浇灌清水。待室外温度适宜后,白天将再生苗搬至室外,遮阳;晚上搬回培养箱中。反复锻炼14 d后,可逐渐将再生苗移至室外,待再生苗长势较好时,将其移至较大的花盆进行培养。

1.2.8 转化植株的PCR检测。取再生植株幼嫩叶片,采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法进行植株总DNA的提取,并利用目的基因特异性引物进行扩增。扩增引物为:P-F:GTCCACCGCTCCTCTTAGACAGACA; P-R:GGTGAGCGAAGAACTGAGGGTAGGAC。反应体系为20 μL体系,包括10×buffer、dNTP、MgCl₂、P-F引物、P-R引物、taq酶、模板DNA和ddH₂O。反应程序为:95℃预变性3 min,94℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸2 min;循环30次。最后72℃延伸7 min,4℃保存。PCR(Polymerase chain reaction)扩增产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,并在凝胶成像系统中观察拍照。

2 结果与分析

2.1 棉花茎尖对草甘膦的敏感性

棉花茎尖在不同浓度的草甘膦培养基上筛选培养14 d,3个棉花受体材料茎尖对草甘膦的敏感性基本相同(图2)。



A. 0 mg·L⁻¹ 草甘膦; B. 5 mg·L⁻¹ 草甘膦; C. 10 mg·L⁻¹ 草甘膦; D. 15 mg·L⁻¹ 草甘膦; E. 20 mg·L⁻¹ 草甘膦。

A. 0 mg·L⁻¹ Glyphosate; B. 5 mg·L⁻¹ Glyphosate; C. 10 mg·L⁻¹ Glyphosate; D. 15 mg·L⁻¹ Glyphosate; E. 20 mg·L⁻¹ Glyphosate.

图2 棉花茎尖对草甘膦敏感性

Fig. 2 Sensitivity of cotton shoot tips to glyphosate

在不含草甘膦的培养基上,各材料的茎尖组织生长良好,生根和叶片生长正常(图 2-A)。随着草甘膦浓度的提高,茎尖生长受到不同程度的抑制,草甘膦浓度为 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,各品种茎尖生长受到较大抑制,表现为其叶片再生缓慢,根系发育较差(图 2-B);当草甘膦浓度增至 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的时候,其茎秆虽然还呈绿色,但棉花茎尖焦枯,无叶片和根系再生,茎尖生长已经被完全抑制(图 2-C);当草甘膦浓度增至 $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,茎秆呈灰白色,棉花茎尖全部枯死(图 2-D);草甘膦浓度增加到 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,茎尖培养 5 d 即完全枯死(图 2-E)。研究结果表明,供试材料之间对草甘膦的敏感性无明显差异,当草甘膦浓度为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,所有材料的茎尖生长被完全抑制。因此,棉花农杆菌茎尖转化的草甘膦筛选浓度应为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2 转化和再生条件的优化

2.2.1 农杆菌菌液浓度及侵染时间。农杆菌菌液的侵染时间长短对于植株再生和转化有较大的影响。外植体长时间浸泡在菌液中,易造成缺氧,导致外植体后期再生困难等问题^[2]。因此,本试验选用的侵染时间为 20 min。同时,为防止缺氧问题,在进行侵染时采用摇床进行辅助培养,侵染培养条件为 $160 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。经草甘膦筛选,发现农杆菌菌液 OD_{600} 在 0.9~1.0 是最适浓度。菌液浓度 OD_{600} 小于 0.6 或大于 1.2 时的转化效率较低。

2.2.2 共培养时间。Sunilkumar 等^[3]认为共培养时间在 2~3 d,如果低于 36 h 则转化效率较低,36 h 可能是农杆菌侵入棉花细胞的临界时间。本试验结果表明,棉花农杆菌茎尖转化的共培养时间 48 h 为宜。共培养时间少于 36 h 或超过 60 h 时,转化效率低,且部分茎尖伤口处及下胚轴切口处均呈深褐色,茎尖长势较差。

2.2.3 活性炭。成苗培养基中加入适量活性炭,可以有效地吸附离体茎尖生长过程中分泌的有害物质,减轻根系的褐化。试验结果表明,加入 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭可以较好地减轻根系褐化,生根正常。加 $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭时,虽生根量较多,但是由于吸附效果较差,根部仍呈浅褐色。而当活性炭浓度大于 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,许多营养物质被活性炭所吸附,不能满足茎尖生长和再生的需要,其根系

生长速度较慢。

2.3 转基因棉花植株的获得

无菌条件下切除棉花无菌苗片子叶及下胚轴,再将茎尖组织划伤,放入备好的重悬液中,在摇床上($160 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)侵染 20 min,平铺于培养基中暗室培养 48 h 后,插入筛选培养基中进行筛选培养 20 d 即可明显看出转化效果(图 3-C),表现为抗性植株生长情况较好,叶片展开,茎尖再生出新的叶片,根系再生和伸长正常;非抗性植株生长状况较差,顶端叶片停止生长或者生长缓慢,根系未再生或伸长较短,颜色发黑,然后停止生长并死亡。本试验经过草甘膦的筛选,共获得 60 株抗性转化植株,其中受体为中棉所 49 的为 24 株,受体为珂字棉 201 的为 18 株,受体为 YZ-1 的有 18 株。将抗性转化植株移入恢复培养基中进行恢复培养,20 d 后,经 PCR 扩增含有抗草甘膦基因,且生长状况较好的转化植株 26 株,其中受体为中棉所 49 的 9 株,受体为珂字棉 201 共 9 株,受体为 YZ-1 的 8 株。转基因幼苗表现为叶片分生较多,根系伸长良好。将抗性试管苗的封口膜揭开(图 3-E),适应锻炼 1~2 d 后,再将幼苗根部冲洗干净,移入清水中锻炼 3~4 d(图 3-F),然后将其移入营养土和蛭石 1:1 进行混合的钵钵中(图 3-G),在培养箱中 $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 光照下培养 7 d,浇灌清水。待室外温度适宜后,白天将再生苗搬至室外(遮阴),晚上搬回培养箱中。反复锻炼 14 d 后,可逐渐将再生苗移至室外。待再生苗长势较好时,将其移至较大的花盆进行培养(图 3-H)。共移栽 26 株转化植株,最终成活 23 株,移栽成活率为 88.46%。其中受体为中棉所 49 的为 9 株,受体为珂字棉 201 的为 7 株,受体为 YZ-1 的 7 株,移栽成活率分别为 100%、77.8% 和 87.5%。

2.4 转化植株 PCR 检测

经过草甘膦筛选出的 60 株抗性植株进行总 DNA 的提取后,对部分转化再生棉株进行特异 PCR 扩增,其中 26 株出现目的基因条带(680 bp,与质粒 DNA 迁移片段相同(图 4),则为目的条带)。检测结果说明转化植株为阳性植株,含有抗草甘膦基因的 DNA 序列。

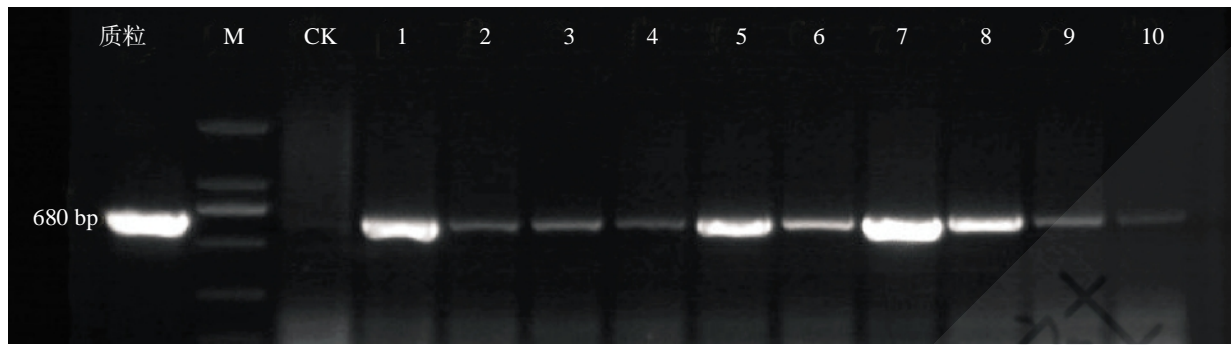


A.共培养; B.草甘膦筛选; C.草甘膦初步筛选结果; D.恢复成苗; E.揭膜锻炼; F.清水锻炼;G.移入花盆;H.移入温室;I.转基因植株与对照。

A. Co-culture; B. Glyphosate screening; C. Results of screening; D. Recovery cultivation; E. Adaptation culture without cover; F. Seedling strengthen in water; G. Transplanting; H. In Greenhouse; I. CK and transgenic plants.

图3 棉花农杆菌茎尖转化植株再生过程

Fig. 3 The procedure of genetic transformation via cotton shoot tip-agrobacterium medium



M: 标准 DNA 分子;CK 为阴性对照;质粒为阳性对照;泳道 1~10 分别为部分抗性植株 PCR 结果。

M: Standard DNA molecular; CK: Negative control; Plasmid: Positive control; 1~10: Transgenic plants.

图 4 部分转化植株的 PCR 检测结果

Fig. 4 PCR result of some transgenic plants

根据本试验结果,侵染 20 min、暗室共培养 48 h、 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的草甘膦筛选条件下,茎尖平均再生率为 16.7%,再生植株的阳性率为 43.3%,移栽成活率为 88.5%。以接种外植体(茎尖)数为

基数,最终成苗的转化率为 6.4%(表 2)。受体品种之间的转化率有一定的差异,但差异不显著。转化植株生长正常,当年即能开花、结铃和吐絮。

表 2 棉花茎尖农杆菌介导法转化抗草甘膦基因的效果

Table 2 Results of transformation for *EPSP-G6* via cotton shoot tip-*agrobacterium* medium

材料 Materials	筛选培养 Screening culture			PCR 鉴别 PCR test			移栽 Transplant			转化率 Transformation rate/%
	茎尖数 Shoot tip No	再生数 Regeneration No	再生率 Regeneration rate / %	再生苗数 Regeneration plant No	阳性植株数 PCR(+) No	阳性率 PCR(+) / %	移栽苗数 Transplant No	成活苗数 Survived No	成活率 Survive rate / %	
CCRI 49	120	24	20.0	24	9	37.5	9	9	100.0	7.5
Coker201	120	18	15.0	18	9	50.0	9	7	77.8	5.8
YZ-1	120	18	15.0	18	8	44.4	8	7	87.5	5.8
合计 Total	360	60	16.7	60	26	43.3	26	23	88.5	6.4

3 讨论

草甘膦属于内吸传导型除草剂,它的致毒机理主要是竞争性抑制莽草酸途径中催化磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和 3-磷酸莽草酸(S3P)合成 5-烯醇式丙酮酸-3-磷酸莽草酸(EPSP)EPSP 合成酶^[14-16]。由于 EPSPS 受抑制,从而阻断了芳香族氨基酸和一些芳香化合物的生物合成,影响植物细胞分裂、叶绿素合成、蒸腾、呼吸以及蛋白质等代谢过程而导致植物死亡。因此,以抗草甘膦基因作为筛选基因可直接在茎尖分化生长过程中以培养基的形式进行筛选,节省了大量人力物力,减少了假阳性和嵌合植株的产生,提升了筛选效率。本研究以本校沈志成教授实验室克隆构建的具有自主

知识产权的抗草甘膦基因为筛选基因,通过对培养基草甘膦浓度的筛选,农杆菌侵染时间和浓度、共培养时间和恢复培养条件等因素的优化,建立了基于抗草甘膦基因的棉花茎尖农杆菌转化技术体系,以外植体为基数的转化成功率达 6.4%,并获得了 23 株转 *EPSPS-G6* 基因的抗草甘膦棉花植株。该法转化周期较短,据统计从无菌苗培养至获得再生试管苗的时间仅需 60 d 左右;将其移至温室后,2 个月左右即能开花,2 个月后即可获得 T_1 代种子,即年初开始转化,当年可获得 T_1 种子。经该法获得的草甘膦抗性基因后代植株除抗性外,其生长状态、生长周期、株高及结铃等田间农艺性状与对照受体材料相比,均无明显差异(图 3-I),说明该转化技术体系具有较好

的实用价值, 适宜于抗草甘膦基因及以抗草甘膦基因为筛选基因的外源基因的转化。

参考文献:

- [1] UMBECK P, Johnson G, Barton K, et al. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants [J]. *Biotechnology*, 1987(5): 263-266.
- [2] FIROOZABABY E, DeBoer D L, Merlo D J, et al. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants [J]. *Plant Molecular Biology*, 1987, 10(2): 105-116.
- [3] ZAPATA C, Park H S, El-Zik M K. Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and shoot apex[J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98(2): 252-256.
- [4] FINER J J, McMullen M D. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment [J]. *Plant Cell Report*, 1990, 8(10): 586-589.
- [5] 刘冬梅, 武芝霞, 刘传亮, 等. 花粉管通道法获得棉花转基因株系主要农艺性状变异分析 [J]. *棉花学报*, 2007, 19(6): 450-454.
- LIU Dong-mei, Wu Zhi-xia, Liu Chuan-liang, et al. Variations of main agronomic traits in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) lines transformed by pollen-tube pathway method [J]. *Cotton Science*, 2007, 19(6): 450-454.
- [6] 马盾, 周小云, 黄乐平. 花粉管通道法转基因棉花后代的遗传特性[J]. *西北农业学报*, 2008, 17(3): 147-149.
- MA Dun, Zhou Xiao-yun, Huang Le-ping. Genetic characters on the future generations of transgenic cotton obtained by pollen tube pathway [J]. *Acta Agriculturae Borealioccidentalis Sinica*, 2008, 17(3): 147-149.
- [7] GOULD J, Smith R. Shoot tip culture as a potential transformation system [J]. *Proc Beltwide Cotton Production Conferences, National Cotton Council*, 1988, 91: 113-114.
- [8] ULIAN E C, Smith R H, Gould J H, et al. Transformation of plants via the shoot apex [J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 1988: 24(9): 951-954.
- [9] LUO J H, Gould J H. *In vitro* shoot-tip grafting improves recovery of cotton plants from culture [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, 57(3): 211-213.
- [10] 吕素莲, 尹小燕, 张可炜, 等. 农杆菌介导的棉花茎尖遗传转化及转 *betA* 植株的产生 [J]. *高技术通讯*, 2004, 14(11): 20-25.
- LYU Su-lian, Yin Xiao-yan, Zhang Ke-wei, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of shoot apex of cotton and production of transgenic plants carrying *BetA* gene [J]. *High Technology Letters*, 2004, 14(11): 20-25.
- [11] 刘明月, 左开井. 农杆菌介导的棉花茎尖遗传转化体系优化 [J]. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2011, 29(2): 25-31.
- LIU Ming-yue, Zuo Kai-jing. Optimization of *agrobacterium*-mediated transformation system of shoot apex [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science*, 2011, 29(2): 25-31.
- [12] 王美林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- WANG Guan-lin, Fang Hong-jun. The principle and technology of plant gene engineering [M]. Beijing: Science Press, 1998.
- [13] GANESAN S, Keerti S. Rathore transgenic cotton; factors influencing *agrobacterium*-mediated transformation and regeneration [J]. *Molecul Breed*, 2001.8(1): 37-52.
- [14] AMRHEIN N, Schab J, Steinrücken H C. The mode of action of the herbicide glyphosate [J]. *Naturwissenschaften*, 1980, 67(7): 356-357.
- [15] STEINRUCKEN H C, Amrhein N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate acid-3-phosphate synthase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1980, 94(4): 1207-1212.
- [16] DAVID M M, John R C. Purification and properties of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase from seedlings of *Pisum Sativum* L. [J]. *Planta*, 1984, 160(1): 78-83. ●