



转基因水稻研究的回顾与展望

陈浩, 林拥军, 张启发*

武汉华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

* 联系人, E-mail: qifazh@mail.hzau.edu.cn

2009-07-30 收稿, 2009-08-26 接受

摘要 水稻作为世界上超过一半人口的主食, 是最重要的粮食作物之一。在过去的半个多世纪里, 水稻育种取得了巨大的成功。水稻的单位产量实现了翻番, 部分地方甚至提高至 3 倍, 这为保障世界粮食安全作出了巨大的贡献。但近十几年来水稻的产量停滞不前, 这一方面是由于在育种技术上没有新的突破以及遗传多样性在栽培品种中的逐步变窄, 另一方面也是因为频繁发生的病虫害以及旱灾等自然灾害使得水稻生产损失惨重。然而, 世界人口的持续增长以及社会经济的快速发展导致对粮食的需求不断增加。针对这些问题, 我国学者提出了培育绿色超级稻的设想, 围绕水稻抗病虫、抗旱、营养高效利用、优质、高产等五大重要性状, 对水稻品种进行全面改良以实现农业的可持续发展。而转基因技术作为一种新兴的育种手段, 在实现绿色超级稻目标上将发挥重要作用。水稻的转基因研究始于 20 世纪 80 年代末期, 迄今已有大量的转基因水稻研究被报道, 其中大部分的研究内容与绿色超级稻所要实现的目标一致。本文首先回顾水稻遗传转化技术的发展, 再以抗病虫、抗旱、营养高效利用、优质、高产、外加抗除草剂等几大主要性状为主线对转基因水稻取得的主要研究成果进行逐一阐述, 最后对转基因水稻的发展进行展望。

关键词

水稻
转基因水稻
绿色超级稻

水稻是最重要的粮食作物之一, 是世界上超过一半人口的主食。在过去的半个多世纪中, 水稻育种取得了丰硕的成果, 实现了两次比较大的突破: 第一次是 20 世纪 60 年代开始的矮秆品种的培育和应用, 提高了收获指数, 大幅增加了产量潜力; 第二次是 20 世纪 70 年代开始的杂交稻的培育与推广, 使产量在矮秆良种的基础上又大幅度增长。然而在新的世纪里, 水稻的生产仍然面临着巨大的挑战。比如, 世界人口的不断增长和耕地面积的减少对水稻产量构成持续压力。而自 20 世纪 90 年代以来水稻单产徘徊不前, 其中主要原因是栽培品种的遗传多样性变窄、生产上日益严重的病虫害使水稻的产量损失严重、水资源的短缺和频繁发生的旱灾使水稻大幅减产等, 同时过量使用的农药和化肥还导致了环境污染和生

态破坏。此外, 随着人们生活水平的提高以及社会经济的发展, 人们对稻米品质的要求也越来越高。

针对上述水稻生产所面临的挑战, 张启发^[1]提出了开展“绿色超级稻”培育的构想, 重点围绕水稻抗病虫、抗旱、营养高效利用、优质、高产等五大重要性状进行改良, 使水稻生产实现“少打农药、少施化肥、节水抗旱、优质高产”。在实现途径上, 他提出要在充分利用水稻种质资源的基础上, 采用常规育种、分子标记辅助选择和转基因技术相结合的策略。转基因技术可以打破物种生殖隔离, 实现种间遗传物质自由交流, 为新的育种技术发展提供了可能。回顾转基因水稻 20 多年的发展历史, 不难发现转基因水稻的主要研究方向与“绿色超级稻”的培育目标是一致的。本文首先回顾水稻遗传转化技术的发展历史,

引用格式: 陈浩, 林拥军, 张启发. 转基因水稻研究的回顾与展望. 科学通报, 2009, 54: 2699~2717

Chen H, Lin Y J, Zhang Q F, et al. Review and prospect of transgenic rice research. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0645-x

再逐一阐述转基因技术在水稻抗病虫、抗旱、营养高效利用、优质、高产以及抗除草剂等几大重要性状改良方面应用的情况,最后对转基因水稻的发展进行展望。

1 水稻的遗传转化

20世纪80年代末,水稻的遗传转化首获成功。1988年,3个不同的研究小组以水稻原生质体为受体,采用“电击法”或“PEG介导法”等方法将外源基因导入到水稻中并获得再生植株^[2-4]。1991年,基因枪转化的方法在水稻中获得成功^[5],随后成为水稻遗传转化的常用方法之一。1993年,Chan等人^[6]首先采用农杆菌介导的方法获得了转基因水稻。Hiei等人^[7]以水稻成熟种子诱导的愈伤为受体,建立了农杆菌介导的粳稻高效转化体系,使得农杆菌介导法逐渐成为了水稻转化最常用的方法。此后,粳稻的转化方法被进一步优化,使粳稻的遗传转化周期大幅缩短^[8]。虽然Hiei等^[7]建立的农杆菌介导的转化体系使得粳稻的转化不再困难,但是许多籼稻的转化依然存在障碍,主要是转化效率低下。因此,一些研究者对籼稻的转化体系进行了一些优化,使得籼稻的转化效率得到了一定的提高^[9,10]。最近,Hiei和Komari^[11]发表了一个粳稻和籼稻均适用的农杆菌高效转化的方法。根据他们的结果,采用幼胚作为外植体,籼稻的转化可以在两个半月内完成,且转化效率非常高(一个幼胚可以得到5~13个独立的转化植株)。该转化体系的主要缺点是对于籼稻品种必须以幼胚为受体材料,而幼胚的采集和分离比较麻烦,且受生长季节的限制。

随着水稻转基因技术的成熟,人们不再仅仅满足于将外源基因导入到生物体基因组中。根据不同的实验目的,一些特殊的转基因技术被逐步发展起来。下面对一些比较特殊的转基因技术进行简单的介绍。

1.1 多基因转化

多基因转化主要在两个方面的应用具有重要意义。一是在进行经典的基因图位克隆时,最关键的一步就是需要通过遗传转化来确定候选基因片段。当一次可转化的基因数目越多,则转化所需总的工作量就越小,此时多基因转化技术就显得非常重要。

此外,多基因转化在水稻的转基因育种上也具有重要的意义。目前已经实现商品化的转基因作物

中,被导入的外源基因通常都是单个的基因,控制单个的性状,比如抗虫、抗病、抗除草剂等。然而在作物中,有许多性状是由多个基因控制的。为了改良这些性状,就需要把多个基因同时转入同一种作物中去。此外,为了快速聚合多个质量性状或将由多个基因控制的新代谢途径引入到转基因作物中去,都需要采用多基因转化的方法。比较著名一个多基因转化的例子就是金色稻米(golden rice),它是通过转入两个新的基因而在水稻的胚乳中建立了 β -胡萝卜素的合成途径^[12]。多基因转化一般可以采用两个策略:一是将不同的外源基因构建到不同的载体上进行转化。这种策略可通过共转化、重复转化或分别转化获得转基因植株后再杂交等等不同的方法实现多基因的聚合。前面提到的金色稻米就是采用共转化策略获得的。另一种策略就是将多个基因构建到同一个载体上,通过一次转化而将多个基因一起导入到受体植物中去^[13]。很显然,与第一个策略相比,使用一个载体的策略不仅更容易操作,而且省时、省钱。但是,这个策略需要克服的困难就是大片段DNA克隆的问题。目前植物遗传转化常用的二元Ti载体,如pCAMBIA系列载体等,携带的是质粒载体的复制元件,克隆外源片段的能力比较有限。通常来说,普通的二元Ti载体最大可以容纳的外源基因片段小于20 kb。这个大小大概只能同时装载2~3个植物基因,难以满足多基因转化的需要。为了提高转化载体的克隆能力,人们构建了一些特殊的转化载体。这些特殊的载体可以大大提高转化载体的克隆能力,从而实现大片段DNA的转化。目前,可进行大片段转化的载体主要有两种:基于细菌人工染色体改造的二元BAC载体BIBAC(binary BAC)^[14]以及基于P1人工染色体改造的可转化人工染色体TAC(transformation-competent artificial chromosome)^[15]。这两个载体理论上均可以转化大于100 kb的DNA片段。目前,这两种载体均在水稻中成功实现了转化^[16,17]。随着利用这两种载体转化水稻技术的逐步成熟,多基因转化技术将在未来水稻的转基因育种上具有广阔的应用前景。

1.2 组织特异性/诱导性表达

目前转基因育种中使用最多的就是组成型高效表达的CaMV 35S启动子或玉米Ubiquitin启动子。使用组成型启动子会使外源基因在转基因植物的全组织

全生育表达, 往往会带来一系列的问题。比如, 增加了转基因植物的代谢负担; 外源基因在食用部位的积累会带给人们对食用安全的担忧; 此外一些优良基因如抗逆基因为转录因子类基因, 组成型表达还会引起植物生长发育的异常。因此, 组织特异性或诱导性地表达外源基因对于转基因育种也是至关重要的。组织特异性或诱导性表达一般需要通过使用特异性的启动子来实现。

转 *Bt* 基因抗虫水稻是目前研究最成熟和最接近商品化的转基因水稻品种之一。但是, 公众对 *Bt* 蛋白食用安全性的担忧是阻碍其商品化的主要原因之一。Ye 等人^[18]采用根癌农杆菌介导将绿色组织特异性表达的 *rbcs* 基因启动子驱动下的 *cry1C** 基因导入粳稻品种中花 11, 获得了高效抗虫且 *Bt* 蛋白仅在绿色组织中高效表达的转基因株系。在这种转基因植株中, *Bt* 蛋白仅在害虫攻击的绿色组织部位如茎秆和叶片中高效表达, 保护水稻不受害虫伤害; 而在水稻的食用部位胚乳中几乎不表达。与 Tang 等人^[19]的结果相比, 使用 *rbcs* 启动子, *Bt* 蛋白在叶片里的表达量是玉米 Ubiquitin 启动子的 3 倍, 而在胚乳中的表达量不到 Ubiquitin 启动子的千分之一^[18]。这种绿色组织特异性表达的 *Bt* 水稻显然更易被消费者接受, 更具商业化的前景。

1.3 叶绿体转化技术

叶绿体转化一般通过基因枪等方法将携带有外源基因的载体质粒发送到叶绿体内。外源基因的两侧带有叶绿体基因组的同源序列, 可以通过同源重组的方式整合到叶绿体的基因组中。与普遍采用的细胞核遗传转化技术相比, 叶绿体转化具有两个突出的优点。首先, 转入的外源基因拷贝数多, 外源基因表达效率高。一般一个植物细胞中含有 10~100 个叶绿体, 每个叶绿体又携带 10~100 个拷贝的环状叶绿体基因 DNA。因此, 理论上一个植物细胞的叶绿体中可携带的外源基因拷贝数可以达到 10000 个, 这个数量要远远高于细胞核转化中外源基因整合的拷贝数。因此, 叶绿体转化的外源基因的表达效率要高于细胞核转化。目前报道的叶绿体转化可以积累的外源蛋白含量可以占到植物总可溶蛋白的 47%^[20]。其次, 整合到叶绿体上的外源基因的遗传方式是母系遗传。也就是说, 外源基因不会随着转基因植物的花粉向非转基因品种或野生近缘种漂移。因此, 通过叶绿体转化进行转基因植物的田间试验或商品化生

产时, 其环境风险更小, 更加安全。此外, 叶绿体转化技术还具有其他的一些优点。比如, 外源基因通过同源重组整合, 整合位点比较明确, 外源基因的表达没有整合的位点效应, 不同转化子中外源基因表达的水平基本一致; 叶绿体基因组中许多基因都是以操纵子(operon)的形式存在的, 即一个启动子可以调控多个基因以多顺反子(polycistron)的方式表达, 因而使得多基因的转化更加便利; 另外, 与细胞核转化技术相反, 叶绿体转化尚未发现有转基因沉默的现象^[20]。

虽然叶绿体转化具有以上诸多的优点, 是一种非常希望的转化技术, 但是, 由于该方法的研究起步相对较晚, 在技术上还不够成熟, 目前的应用范围远没有细胞核转化那么广泛。目前仅有十多种植物成功实现了叶绿体的转化, 在水稻上仅有为数不多的报道^[21~24]。

2 转基因抗虫水稻

虫害是造成水稻减产的主要因素之一, 每年因此造成的产量损失约为 10%。目前生产上对害虫的防治主要是依靠化学杀虫剂。化学杀虫剂的大量使用不仅增加了生产成本, 而且还造成了环境污染, 威胁人类健康。通过培育抗虫品种, 提高水稻自身抗性是一种更经济更环保的策略。但是, 常规育种技术培育抗虫新品种不仅需要较长的时间, 而且对于水稻最主要的害虫——螟虫(二化螟、三化螟、稻纵卷叶螟等)在水稻中尚未发现有效的抗性种质资源。目前, 最有希望和前途的方法就是利用转基因技术把外源抗虫基因引入水稻中创造出新的抗虫品种。迄今为止, 人们在植物、动物甚至微生物中已鉴定并克隆了许多有用的抗虫基因。一些抗虫基因已转入水稻获得了转基因抗虫品系, 而且有一些已进行了大田实验, 展现出美好的应用前景。

2.1 转 *Bt* 基因水稻

来自于苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, *Bt*)的 *Bt* 毒蛋白基因是目前世界上应用最为广泛的抗虫基因之一。大多数 *Bt* 菌在芽胞形成过程中会产生伴胞晶体。这种伴胞晶体是一种具特异杀虫活性的蛋白质, 称为 *Bt* 毒蛋白或杀虫晶体蛋白。通过将 *Bt* 菌来源的 *Bt* 毒蛋白基因导入到植物中就可以在植物中表达并积累 *Bt* 毒蛋白, 从而使转基因植物获得抗虫性。目前, *Bt* 基因已经被转入包括水稻在内的多种作

物中并得到表达. 其中, 转 *Bt* 基因的抗虫棉花、玉米、马铃薯等已经实现了商品化生产, 并创造了可观的经济效益^[25].

人们已从不同 *Bt* 菌的亚种中分离出对不同昆虫(如鳞翅目、鞘翅目和双翅目等)和无脊椎动物(如螨类、寄生线虫和原生动物等)有特异毒杀作用的杀虫晶体蛋白. 至今克隆的 *Bt* 杀虫晶体蛋白基因已超过 400 多个 (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html). 虽然已发现了如此多的 *Bt* 基因, 但是仅仅只有很少的一部分被导入转基因植物中进行过杀虫性实验. 其中, 转 *Bt* 基因水稻使用较多的主要是 *cryIA* 基因, 如 *cryIAb*^[26-35], *cryIAc*^[30,36-39]以及 *cryIAb/Ac* 融合基因^[40,41], 也有少量使用其他 *Bt* 基因的报道^[19,42-47]. 这些转 *Bt* 基因水稻大多都表现对二化螟、三化螟和稻纵卷叶螟高度的杀虫活性.

Tu 等人^[40]对转 *cryIAb/Ac* 融合基因水稻进行了大规模的田间实验. 在大田种植全生育期不喷施杀虫剂的条件下, 转 *cryIAb/Ac* 明恢 63 及其所配杂种 Bt 汕优 63 表现出了极高的抗虫性, 表明 *Bt* 水稻在生产上具有极大的应用价值.

与使用化学杀虫剂或抗虫作物品种一样, *Bt* 作物主要的潜在风险之一就是可能导致昆虫对其产生抗性, 从而影响 *Bt* 作物的持续利用. 虽然目前在自然条件下, 田间还没有进化出对 *Bt* 作物具有抗性的昆虫群体, 但是一些昆虫已经对喷洒的 *Bt* 制剂产生了抗性. 而且在温室和实验室内经过多代选择也发现了多种抗 *Bt* 毒素的抗性虫系, 有的抗性虫系甚至能在 *Bt* 作物上生存^[48]. 这些都说明了昆虫在田间产生抗性群体的风险是存在的.

使用双价 *Bt* 水稻是延缓昆虫抗性产生, 提高 *Bt* 水稻使用寿命的一种重要策略^[49]. 所谓双价 *Bt* 水稻, 即在同一水稻品种中转入两个不同的 *Bt* 基因. 理论上, 昆虫同时对两种不同的 *Bt* 基因产生抗性的几率大大低于对单 *Bt* 基因产生抗性的几率. 因此, 双价的 *Bt* 水稻可以大大延缓昆虫产生抗性的时间, 从而提高其使用寿命. 需要注意的是, 双价 *Bt* 水稻使用的两种 *Bt* 毒蛋白在昆虫肠壁细胞上的识别位点必须存在较大差异, 即不会产生“交叉抗性”. 如前所述, 在前期的 *Bt* 水稻研究中, 使用较多的是 *cryIAb*, *cryIAc* 或者是融合的 *cryIAb/c* 等 *cryIA* 类基因. 它们表达的 *Bt* 蛋白之间的氨基酸序列同源性很高, 昆虫容易对其产生交叉抗性, 因而不适合用于生产双价

Bt 水稻. Chen 等人^[47]和 Tang 等人^[19]分别培育了转人工合成的 *cry2A**和 *cryIC**基因的水稻. 田间实验表明, 转 *cry2A**和 *cryIC**基因的水稻表现出了对螟虫的高度抗性. 同时, 转 *cry2A**和 *cryIC**基因的水稻还为发展双价 *Bt* 水稻提供了新的种质资源材料.

一些学者的研究研究表明, *cryIA* 与 *cryIC* 和 *cry2A* 等 *Bt* 基因间的同源性较低, 不易产生交叉抗性, 适合于联合使用^[50,51]. 杨宙等人(杨宙和林拥军, 未发表数据)用分别转 *cryIAb* (命名为 1Ab), *cryIAc* (命名为 1Ac), *cryIC** (命名为 1C)和 *cry2A** (命名为 2A) 4 个单价基因的抗虫明恢 63 株系作为亲本, 以 5 种组合方式 (1Ab+1C, 1Ab+2A, 1Ac+1C, 1Ac+2A, 1C+2A) 分别正反交, 将不同的 *Bt* 基因两两聚合在一起, 获得 10 种双价 *Bt* 株系 1Ab/1C, 1C/1Ab, 1Ab/2A, 2A/1Ab, 1Ac/1C, 1C/1Ac, 1Ac/2A, 2A/1Ac, 1C/2A 和 2A/1C (1Ab/1C 表示双价 *Bt* 水稻的母本为 1Ab, 父本为 1C; 而 1C/1Ab 则反之, 其余类推). 实验室抗虫性鉴定表明, 大部分双价 *Bt* 基因组合有协同效应, 其抗虫性明显高于转单价 *Bt* 基因水稻.

Bt 基因是水稻上应用最成功的抗虫基因, 它可以有效控制水稻鳞翅目昆虫的危害(图 1(a)和(b)). 2005 年 *Bt* 水稻曾在伊朗实现过商品化. 我国的转 *Bt* 基因水稻的研究在技术上已经成熟, 在政策允许的条件下可以迅速实现商品化.

2.2 转植物或动物来源抗虫基因水稻

植物来源的抗虫基因主要有植物凝集素基因和蛋白酶抑制剂基因等. 凝集素基因是抗虫效果相对较好的植物来源的基因, 其中雪花莲凝集素(*Galanthus Nivalis* agglutinin, GNA)基因是使用比较广泛的一种抗虫基因. 使用 GNA 基因最大的优点在于, GNA 对 *Bt* 蛋白不能控制的刺吸式(同翅目)害虫如稻飞虱有一定的抗虫效果. Sun 等人^[52]通过基因枪转化的方法将 GNA 基因转入到水稻中, 并获得了纯合的转基因水稻家系. 通过褐飞虱生物鉴定和喂养实验表明, 转基因纯合家系可以显著降低褐飞虱的存活率和繁殖力、延缓褐飞虱发育进度并减少褐飞虱进食量. 此外, 还有多个报道也证实了转 GNA 水稻对稻飞虱、叶蝉以及蚜虫均有一定的抗虫效果^[38,43,52-59]. 但是, GNA 对刺吸式害虫的抗性不像 *Bt* 蛋白对水稻螟虫的抗性那么有效, GNA 主要表现出对害虫的生长、发育以及生殖能力造成负面的影响. 此外, 还有使用其他来源如大

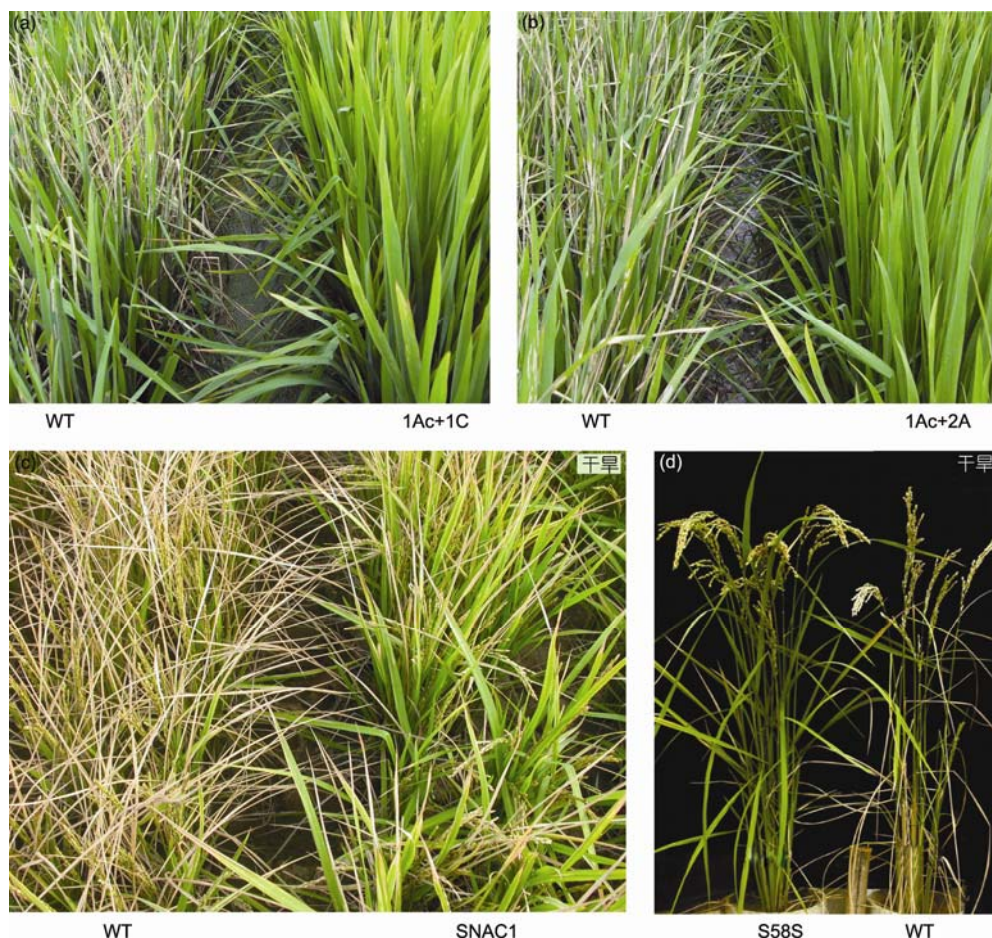


图1 转基因抗虫水稻((a)和(b))与转基因抗旱水稻((c)和(d))

(a) WT, 野生型明恢 63 对照; 1Ac+1C, 双价转 Bt 基因明恢 63 (1Ac+1C 组合). (b) WT, 野生型明恢 63 对照; 1Ac+2A, 双价转 Bt 基因明恢 63 (1Ac+2A 组合). (c) WT, 野生型日本晴对照; SNAC1, 过量表达 SNAC1 基因的转基因日本晴. (d) WT, 野生型中花 11 对照; S58S, 过量表达 OsSKIPa 基因的转基因中花 11

蒜叶片凝集素(*Allium sativum* agglutinin from leaf, ASAL)的报道. Saha 等人^[60]将 ASAL 基因导入到水稻中, 获得的转基因水稻增强了对褐飞虱和叶蝉的抗性. 此外, 转 ASAL 基因的水稻还表现出对“tungro”病害显著增强的抗性. Tungro 病是由以叶蝉为传播载体的两种水稻病毒(tungro bacilliform virus 和 tungro spherical virus)同时侵染水稻造成的.

除了植物凝集素基因外, 蛋白酶抑制剂基因是另一大类常用的植物来源抗虫蛋白. 已导入水稻的蛋白酶抑制剂基因有马铃薯蛋白酶抑制剂基因 *pin II*^[61,62]、豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 *CpTI*^[63]、大豆胰蛋白酶抑制剂基因 *SKTI*^[64]、玉米巯基蛋白酶抑制剂基因^[65]、水稻巯基蛋白酶抑制剂基因^[66]和大麦胰蛋白酶抑制剂基因 *BTI-Cme*^[67]等. 这些转基因植株对褐飞虱、二化螟、稻

纵卷叶螟以及线虫等有一定抗性.

使用植物来源的抗虫基因有其独特的优点, 比如抗谱较广, 特别是凝集素类基因 *GNA*, 对 *Bt* 基因不能毒杀的同翅目害虫具有一定的抗性. 然而, 由于植物来源的抗虫基因的抗虫效果比较有限, 因而限制了其在转基因植物上的应用.

动物来源的抗虫基因在转基因植物中应用的不多. Huang 等人^[68]报道了将蜘蛛来源的杀虫基因 *Spl* 转入水稻品种秀水 11 (Xiushui11)和春江 11 (Chunjiang 11)中, 获得的转基因植株对二化螟、稻纵卷叶螟具有抗性.

上述转基因抗虫水稻都是通过转基因植物中直接表达具有杀虫活性的蛋白来控制害虫. 目前, 一种新的策略即利用昆虫自身基因片段, 通过 RNA 干涉

(RNA interference, RNAi)抑制昆虫体内的生长发育或生化代谢中关键基因的表达来间接控制害虫,已经在转基因抗虫玉米^[69]和棉花^[70]的培育上获得了成功.该策略可能会成为转基因抗虫植物研究的一个新趋势.但是,需要注意的是,利用 RNAi 的策略必须要找到目标昆虫特异性的基因作为靶标,以确保转基因植物对其他物种特别是人类的安全.

3 转基因抗病水稻

细菌性病害白叶枯病(bacterial blight)以及真菌性病害稻瘟病(blast)和纹枯病(sheath blight)是水稻生产上常见的三大病害.白叶枯病由白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, Xoo)引起,是世界水稻生产中最严重的细菌性病害^[71].水稻遭受白叶枯病危害后,一般减产 20%~30%,严重时甚至绝收.稻瘟病由稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)引起,可发生在水稻的各生育期和各个部位.纹枯病由纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)引起.水稻纹枯病可造成水稻白穗,结实率下降,粒重减轻,一般减产 10%~30%,发生严重时可减产 50%以上.

目前水稻中共鉴定了大约 30 多个抗白叶枯病主效基因(又称 R 基因),其中 6 个抗病基因(*Xa1*, *Xa3/26*, *xa5*, *xa13*, *Xa21* 和 *Xa27*)已经被克隆,另外多个抗病基因(*Xa4*, *Xa7*, *Xa10*, *Xa22(t)*, *Xa23*, *xa24*, *Xa25(t)*, *Xa31(t)*)被精细定位^[72,73].在生产上,由于主效抗病基因的应用和抗性品种的推广,白叶枯病得到了较好的控制.在转基因抗白叶枯病育种上,直接转化主效抗病基因是比较快捷和有效的办法.Zhang 等人^[74]利用基因枪的方法将广谱抗白叶枯病主效基因 *Xa21* 转入到籼稻恢系明恢 63 中获得了抗 Xoo 的明恢 63.吴家道等人^[75]利用基因枪的方法将 *Xa21* 转入到籼稻恢系明恢 63 和保持系统 B 中获得了无选择标记的转基因抗白叶枯病水稻,其所配的杂交组合对白叶枯病的抗性也显著增强了.

目前在水稻中已鉴定了 60 多个抗稻瘟病主效基因^[76],其中 10 个基因(*Pib*, *Pi-d2*, *Pikm*, *Pi-ta*, *Pizt*, *Pi2*, *Pi5*, *Pi9*, *Pi36*, *Pi37*)已被分离克隆^[77].由于稻瘟病菌生理小种多且容易变异,生产上使用的抗性品种一般 3~5 年后就可能丧失抗性.而对于水稻纹枯病,目前水稻中还没有鉴定出主效抗病基因.

转基因抗真菌病害通常采用的策略是在水稻中过量表达病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins,

PRs)(常见的包括几丁质酶(chitinases), β -1,3-葡聚糖酶(β -1,3-galactanase)以及类甜蛋白(thaumatin-like protein)等)和其他来源的抗真菌蛋白.PR 蛋白是由寄主植物编码、病原微生物侵染特异性诱导的一类蛋白质,许多病原相关蛋白都具有体外抗真菌的活性^[78].一些报道已经证实,在转基因水稻中过量表达几丁质酶可以增强其对 *M. grisea*^[79-82]和 *R. solani*^[83]的抗性.Nishizawa 等人^[84]报道了过量表达 β -1,3-葡聚糖酶可以增强转基因水稻对 *M. grisea* 的抗性;Datta 等人^[85]发现过量表达类甜蛋白可以增强转基因水稻对 *R. solani* 的抗性.除了单独使用 PR 基因外,联合使用多个 PR 基因的策略也比较常见.如联合几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶可以提高转基因水稻对稻瘟病的抗性^[86-88].联合几丁质酶基因和类甜蛋白基因^[89]或核糖体失活蛋白基因(ribosome inactivating protein, RIP)^[90]可以增强转基因水稻对纹枯病的抗性.此外,还有一些研究尝试通过表达植物或微生物来源的具有抗真菌活性的蛋白质、多肽等来增强转基因水稻对真菌病害的抗性^[91-94],也取得了一定的效果.

在植物体内表达病原物来源的蛋白激发子,诱导植物产生系统获得性抗性(system acquired resistance, SAR),从而使植物获得广谱性抗性也是一种培育转基因抗病品种的策略. Shao 等人^[95]报道了通过在水稻中表达 Xoo 来源的蛋白激发子 harpin 蛋白,从而使得转基因水稻获得了对多种 *M. grisea* 小种的广谱性抗性.

在抗病育种研究上除了抗病主效基因外,近年来对数量抗性基因(抗病 QTL)的研究也值得注意.与主效抗病基因相比,单个数量抗性基因的抗病效果比较有限,但是其具有广谱性和持久性的优点.此外,有些水稻病害如水稻纹枯病、稻曲病和细菌性条斑病,还未在水稻中发现抵抗这些病害的主效基因,抗病 QTL 的研究对于培育抵抗这些病害的品种是非常重要的.

研究表明,虽然大部分的抗病 QTL 的抗病作用比较有限,但是过量表达一些抗病 QTL 也可以得到较好的抗病效果. Qiu 等人^[96]利用玉米 Ubiquitin 启动子在感病水稻中过量表达一个抗病 QTL 基因 *OsWRKY13*,所获得的转基因水稻对白叶枯病菌的抗性显著增强. Xiao 等人^[97]利用 RNAi 抑制一个抗病相关 QTL 基因 *OsDR10* 的表达,转基因水稻与未转基因

的对照相比, 对不同白叶枯病菌株的抗性显著增强。值得注意的是, 这些抗病 QTL 调控的抗病反应是病原种类或病原生理小种非特异性的, 因而是一种广谱性的基础抗性。虽然它们的抗性水平不如抗病主效基因调控的质量抗性的水平高, 但是其抗谱广、抗性持久, 也是值得充分发掘和利用的。

4 转基因抗旱水稻

长期以来干旱是导致水稻减产的重要因素, 且由于世界气候变化而呈日益加剧的趋势。水稻生产耗水量巨大, 占我国农业生产用水的 70%; 而我国又是一个淡水资源缺乏的国家, 人均淡水资源只有世界平均水平的 1/4。因此, 培育节水抗旱水稻, 减少水稻生产的用水量, 对于提高水稻产量, 保障我国的粮食安全具有重要意义。

植物和动物相比一个最大的特点在于植物不能“移动”。因此, 植物进化出了一套复杂的生物学机制来抵御外界各种各样恶劣环境的胁迫。当植物遭遇到干旱等逆境胁迫时, 外界信号被植物细胞内的信号受体(包括离子通道蛋白、组氨酸激酶和 G 蛋白偶联受体等)识别, 进而产生能在细胞内传递的第二信使(如 Ca^{2+} 、活性氧物质和二酰甘油等); 然后第二信使介导下游的蛋白质磷酸化串联物, 如 Ca^{2+} 依赖型蛋白质激酶(Ca^{2+} -dependent protein kinase, CDPK)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)等的磷酸化反应激活下游一系列的转录因子(transcription factor); 这些转录因子又可以特异性地激活一批下游的结构基因或功能基因(如 LEA 类蛋白、渗透调节物质催化酶、抗冻蛋白和通道蛋白等), 来帮助植物基因重新建立离子平衡、清除有害物质并保护和修补因胁迫而受破坏的蛋白质和膜系统^[98~100]。

由于抗旱机制的复杂性, 完全依赖常规的育种手段难以培育抗旱品种。目前转基因技术已被广泛应用于抗旱水稻的培育, 通常所采用的策略就是在转基因水稻中表达干旱诱导或抗旱相关基因。表 1 列举了近年来一些有代表性的转基因抗旱水稻的实验。根据转入基因功能的不同, 转基因抗旱水稻所使用的外源基因可以大致的分为两个大类: 一类是结构基因或功能基因, 包括 LEA 蛋白基因(late embryogenesis abundant, LEA)、通道蛋白基因、渗透调节物质(如脯氨酸、海藻糖、甜菜碱、聚胺等)催化酶、解毒

酶类(如 superoxide dismutase, SOD)等。这是初期人们常用的抗旱基因, 因为这类基因的作用机理相对比较简单。另一类是调节类基因, 这些基因常常处于植物抗旱反应信号传导途径的上游。这类基因包括 CDPKs, CBL 互作蛋白激酶(calcineurin B-like protein-interacting protein kinases, CIPKs), MAPKs 以及转录因子。这些调节类基因表达量的改变, 往往会导致一大批下游基因表达水平的变化。由于抗旱机制的复杂性, 目前认为应用调节类基因的抗旱效果要好于应用那些作用模式相对简单的结构基因或功能基因。

Hu 等人^[128]报道了一个在抗旱性改良上具有较大应用潜力的基因 *SNAC1*。*SNAC1* 是属于 NAM, ATAF 和 CUC (NAC)家族的一个转录因子, 在脱水胁迫下 *SNAC1* 基因在叶片保卫细胞中特异性表达。超量表达 *SNAC1* 基因可显著提高转基因水稻成株期在大田重度干旱胁迫条件下的抗旱性(结实率比对照高 22%~34%), 而其他农艺性状和产量与对照无明显差异。与对照相比, 转基因植株对 ABA 表现出更高的敏感性, 能够关闭更多气孔从而减慢水分丧失的速度, 并能在更低的相对含水量下维持细胞膨压^[128]。转基因水稻在营养生殖期的抗旱性和耐盐性也得到了显著增强(具有比对照高出 80% 的存活率)(图 1(c))。DNA 芯片分析的结果表明, 在 *SNAC1* 超量表达的植株中有 150 多个基因上升表达。

Hou 等人^[129]最近发表的一个调控抗旱性的基因 *OsSKIPa*。在水稻中超量表达 *OsSKIPa* 使转基因植株在成株期对干旱胁迫的耐受性比对照增强 2~4 倍(图 1(d))。通过对超氧化物歧化酶(SOD)比活力和丙二醛(monodehydroascorbate, MDA)含量的测定, 发现 *OsSKIPa* 超量表达可以提高转基因水稻对活性氧的清除能力。干旱胁迫后, *OsSKIPa* 超量表达转基因植株中一些抗逆相关基因的表达量上升显著高于相同处理条件下的野生型对照。

虽然转基因抗旱水稻的实验已有不少报道(表 1), 但这些研究主要是基于温室盆栽种植的数据, 真正在大田条件下对转基因水稻的抗旱性进行研究的报道还比较少。Xiao 等人^[134]将 7 个已知的抗旱基因 *CBF3*, *SOS2*, *NCED2*, *NPK1*, *LOS5*, *ZAT10* 和 *NHX1* 分别用组成型启动子 *Actin1* 和水稻 *HVA22* 同源基因的逆境诱导型启动子驱动, 构建成表达载体并转化水稻品种中花 11, 然后对转基因水稻在大田条件下的

表 1 近年来的转基因抗旱水稻实验

外源基因	基因类型/功能	基因来源	基因效果	参考文献
<i>P5CS</i>	促进脯氨酸合成	蚕豆 <i>Mothbean</i>	脯氨酸含量上升; 耐旱和盐胁迫	[101,102]
<i>TPSP</i>	促进海藻糖合成	大肠杆菌	海藻糖含量上升; 耐旱、盐、冷	[103,104]
<i>CodA</i>	促进甜菜碱合成	球形节杆菌(<i>Arthrobacter globiformis</i>)	甜菜碱含量上升; 耐旱	[105]
<i>adc</i>	聚胺合成	燕麦、曼陀罗(<i>Datura stramonium</i>)	腐胺含量上升; 耐旱	[106,107]
<i>HAV 1</i>	LEA 蛋白	大麦	耐旱、盐	[108~110]
<i>PMA80, PMA1959</i>	LEA 蛋白	小麦	耐旱、盐	[111]
<i>OsLEA3-1</i>	LEA 蛋白	水稻	耐旱	[112]
<i>sHSP17.7</i>	热激蛋白	水稻	耐旱	[113]
<i>MnSOD</i>	解毒酶类	豌豆	耐旱	[114]
<i>Sod1</i>	解毒酶类	海榄雌(<i>Avicennia marina</i>)	耐旱、盐	[115]
<i>RWC3</i>	水通道蛋白	水稻	耐旱	[116]
<i>OsCDPK7</i>	Ca ²⁺ 依赖型蛋白质激酶	水稻	耐旱、盐、冷	[117]
<i>OsMAPK5</i>	丝裂原活化蛋白	水稻	耐旱、盐、冷	[118]
<i>OsCIPK 12</i>	CBL 互作蛋白激酶	水稻	耐旱	[119]
<i>CBF3</i>	转录因子	拟南芥	耐旱、盐、冷	[120]
<i>ABF3</i>	转录因子	拟南芥	耐旱	[120]
<i>OsDREB1A, 1B; DREB1A, 1B, 1C</i>	转录因子	水稻和拟南芥	耐旱、盐、冷; 生长延迟	[121]
<i>OsDREB1F</i>	转录因子	水稻	耐旱、盐、冷	[122]
<i>ZFP25</i>	转录因子	水稻	耐旱、盐	[123]
<i>OsDREBs</i>	转录因子	水稻	耐旱	[124]
<i>OsWRKY11</i>	转录因子	水稻	耐旱、热	[125]
<i>OsZIP23</i>	转录因子	水稻	耐旱、盐	[126]
<i>SNAC1</i>	转录因子	水稻	耐旱、盐	[127]
<i>OsSKIPa</i>	SKI 同源蛋白	水稻	耐旱、盐	[128]
<i>OsiSAP8</i>	胁迫诱导蛋白	水稻	耐旱、盐、冷	[129]
<i>OCPII</i>	蛋白酶抑制剂	水稻	耐旱	[130]
<i>ZFP177</i>	A20/AN1 锌指蛋白	水稻	耐旱	[131]
<i>OsMT1a</i>	金属硫蛋白 1 型	水稻	耐旱	[132]
<i>OsCOIN</i>	低温诱导锌指蛋白	水稻	耐旱、盐、冷	[133]

抗旱性进行检测。研究发现, 8 个启动子-基因组组合的转基因家系(*HVA22P:CBF3*, *HVA22P:NPK1*, *Actin1:LOS5*, *HVA22P:LOS5*, *Actin1:ZAT10*, *HVA22P:ZAT10*, *Actin1:NHX1* 和 *HVA22P:NHX1*)无论是在大田条件下还是在 PVC 管中都比野生型具有更高的相对产量。10 个启动子-基因组组合的转基因家系(*HVA22P:SOS2*, *Actin1:ZAT10* 以及分别由两个启动子驱动的 *CBF3*, *LOS5*, *ZAT10* 和 *NHX1*)在 PVC 管中的相对结实率高于野生型。对 T₂ 和 T₃ 转基因家系进行的田间抗旱测验发现, 7 个启动子-基因组组合的转基因家系(*HVA22P:CBF3*, *Actin1:NPK1*, *HVA22P:NPK1*, *Actin1:LOS5*, *HVA22P:LOS5*, *Actin1:ZAT10* 和 *HVA22P:ZAT10*)的单株产量明显高于野生型, 9 个启动子-基因组组合的转基因家系(*Actin1:CBF3*, *HVA22P:CBF3*, *HVA22P:SOS2*,

HVA22P:NPK1, *Actin1:LOS5*, *HVA22P:LOS5*, *Actin1:ZAT10*, *HVA22P:ZAT10* 和 *Actin1:NHX1*)与野生型相比具有更高的结实率。总体说来, *LOS5* 和 *ZAT10* 相对于其他 5 个基因来说, 在增强大田条件下转基因水稻的抗旱性方面表现出了更好的效果。由于该研究获得的结果主要是基于大田实验, 因此对于培育具有实用价值的转基因抗旱水稻具有较大的参考价值。

比较理想的抗旱水稻品种应该是在大田水分充足的条件下可以优质高产; 在大田水分不足或干旱时产量显著高于目前的高产品种。虽然, 水稻转基因抗旱育种已经取得了一定的进展, 但是离培育真正在生产上可以实用的抗旱品种尚有一定的距离。由于抗旱本身分子机理的复杂性, 通过转基因技术、分子标记辅助选择和常规育种相结合的策略将各种各

样的抗旱基因聚合起来, 对于培育抗旱品种是至关重要的。

5 转基因营养高效利用水稻

化肥是现代农业的基础, 化肥的使用为提高粮食产量, 确保粮食安全作出了巨大的贡献。在过去的 40 多年间由于绿色革命的作用粮食作物的产量实现了翻番, 而氮肥的用量随之增加了大约 7 倍^[135]。这种靠高投入获得高产出的生产模式是难以持续的。近 10 年来化肥用量持续增加, 但粮食增产却不明显。化肥的大量使用还导致了一系列的环境问题, 如水体富营养化、地下水污染与土壤酸化等。此外, 磷是不可再生的矿产资源, 世界上的磷矿资源难以维持到本世纪末^[136]。这些问题不仅严重威胁着生态安全, 而且还影响了农业的可持续发展。研究和培育营养高效利用的水稻品种, 配合科学的施肥方法和田间栽培管理措施, 在不减少产量的前提下大幅降低肥料的投入, 对确保粮食安全和实现农业的可持续发展具有重要意义。

5.1 氮高效利用

氮是作物生长发育需求量最大的营养元素, 也是作物产量最主要的限制因素。 NO_3^- 和 NH_4^+ 是农业土壤中无机氮存在的两种主要形式。 NO_3^- 被植物吸收后首先被两种还原酶硝酸还原酶(nitrate reductase)和亚硝酸还原酶(nitrite reductase)还原为 NH_4^+ 。 NH_4^+ 通过谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)与谷氨酸合成酶(glutamate synthase, GOGAT)共同形成的 GS/GOGAT 循环转化为 Gln 和 Glu。Glu 又可以被进一步转化为许多其他的氨基酸。 NH_4^+ 是水稻更偏爱的无机氮源。土壤中的 NH_4^+ 可以被水稻根系中的各种铵盐转运子(ammonium transporter)主动吸收, 然后在根部被 GS 和 GOGAT 同化^[137]。

GS 具有组织和细胞表达特异性。GS1 更多地存在于种子、根、根瘤、花以及茎的韧皮部等非绿色组织细胞中, 它被淹水、病菌、衰老等因素诱导, 与植物体内含氮化合物的合成和运输有关。GS2 更多的存在于叶片中, 主要对叶绿体中的氨进行同化和对光呼吸过程中释放的氨进行再利用^[138]。在水稻中存在 4 种 GS 基因: 一种编码叶绿体型 GS2 基因, 其表达主要存在于叶肉细胞内; 3 种编码胞质型 GS1 基因, 其表达主要存在于根部(GS1;2)、茎部(GS1;1)和小穗(GS1;3)^[138,139]。

Yamaya 等人^[140]发现, 在籼稻品种 Kasalath 中表达粳稻品种 Sasanishiki 来源的 NADH 依赖的谷氨酰胺合成酶(NADH dependent glutamate synthase, NADH-GOGAT)基因片段时, 转基因 Kasalath 的粒重与非转基因对照相比显著提高(最大增加了 80%)。该结果证明了 NADH-GOGAT 对于氮的利用和谷粒充实度至关重要。

Cai 等人^[141]用 CaMV 35S 启动子在粳稻品种中花 11 中超量表达籼稻品种明恢 63 来源的 GS1;1, GS1;2 和大肠杆菌谷氨酰胺合成酶基因 *glnA*。实验结果表明, 超量表达 GS1;1, GS1;2 和 *glnA* 的转基因植株的 GS 活性、整株的蛋白质含量、氨基酸含量以及总氮量均高于非转基因植株。但是, 在低氮条件下, 田间种植的转基因植株的产量以及种子中的氨基酸含量相对非转基因原品种反而降低了。

铵盐转运子对于植物根系吸收土壤中的 NH_4^+ 是至关重要的。水稻中共发现了 10 个铵盐转运子基因, 其中 *OsAMT1;1*, *OsAMT1;2* 和 *OsAMT1;3* 属于 AMT1 亚家族, 其余 7 个铵盐转运子(*OsAMT2;1*, *OsAMT2;2*, *OsAMT2;3*, *OsAMT3;1*, *OsAMT3;2*, *OsAMT3;3* 和 *OsAMT4*)属于 AMT2 亚家族。Kumar 等人^[142]在水稻中超量表达 *OsAMT1;1*, 发现转基因植株中的 $^{15}\text{NH}_4^+$ 流发生改变, 同时发现生物学产量比对照降低了。Hoque 等人^[143]发现, 超量表达 *OsAMT1;1* 的转基因水稻与野生型对照相比, 在营养生长阶段的生物学产量下降。进一步研究发现, 转基因植株根部铵吸收能力增加, 植株体内铵离子浓度也增加了。由此推测转基因植株生物学产量下降原因可能是转基因植株铵盐浓度过高而产生了毒害作用。

一些研究者也尝试通过过量表达某些氨基酸转氨酶来改变植物体内氨基酸合成和氮代谢的水平, 以期增强转基因水稻中氮利用的效率。Shrawat 等人^[144]在水稻的根中特异性表达大麦来源的丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, AlaAT)。结果表明, 转基因水稻的生物学产量和谷粒产量均和非转基因的对照相比显著增加了。此外, 转基因植株中一些重要氨基酸, 如谷氨酰胺和谷氨酸以及总氮的含量均比对照显著提高, 显示出转基因植株氮代谢能力增强了。Zhou 等人^[145]利用 CaMV 35S 启动子驱动, 对水稻中所有 3 个天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AAT)基因 *OsAAT1-3* 以及大肠杆菌来源的 AAT 基因 *EcAAT* 分别进行超量表达。在超量表达 *OsAAT1*,

OsAAT2, EcAAT 的转基因植株中 ATT 活性以及谷粒中蛋白质和氨基酸含量均显著高于对照; 而超量表达 OsAAT3 的转基因植株中, ATT 活性和谷粒中蛋白质和氨基酸含量与野生型对照相比没有显著变化. 农艺性状考察结果表明, 超量表达 OsAAT1, OsAAT2, OsAAT3 和 EcAAT 转基因水稻在主要农艺性状和单株产量上与野生型对照相比没有显著变化.

5.2 磷高效利用

磷也是植物生长发育必不可少的大量元素之一. 土壤中总磷含量比较丰富, 但由于其在土壤中可溶性低, 吸附能力强, 有效磷浓度较低, 通常为 10 $\mu\text{mol/L}$ 或更少^[136,146]. 因此, 提高作物活化和利用土壤中大量固定的磷是培育磷营养高效利用品种的主要目标.

Yi 等人^[147]在磷高效利用水稻品种 Kasalath 中鉴定出了一个磷缺乏诱导的转录因子 OsPTF1. 在低磷敏感水稻品种日本晴中过量表达 *OsPTF1* 基因可以显著增强磷利用效率. 在低磷水培条件下, 转基因植株的分蘖能力、根部和茎叶的生物学产量及总磷含量均显著高于野生型对照 30% 以上. 在盆栽和大田实验, 低磷处理条件下, 转基因植株的分蘖数、穗重以及总磷含量均显著高于野生型对照 20% 以上. 此外, 在低磷条件下, 转基因植株的根长、根的表面积以及磷的吸收速率也显著高于对照.

植物在吸收磷酸盐的时候, 土壤中磷酸盐首先进入根表皮和皮层的质外体, 在磷酸盐转运子(phosphorus transporters, PTs)的作用下跨膜进入共质体, 再经木质部输送到地上部, 从而分配到不同器官^[148]. 许多植物磷酸盐转运子基因的表达都集中在根部, 且受外界低磷条件诱导, 表明磷酸盐转运子与低磷条件下磷的吸收有关. Seo 等人^[149]鉴定出了一个水稻磷酸盐转运子基因 *OsPT1*, 该基因在水稻根和叶中高水平表达, 且表达水平不受外界磷离子浓度影响. 在不同的施肥条件下, 过量表达 *OsPT1* 的转基因水稻中磷的含量几乎都是野生型对照的两倍. 此外, 转基因植株显示出了更多的分蘖和更好的根部生长. 但是转基因植株的株高与野生型对照相比显著下降 30% 左右, 其可能的原因是转基因植株增强的磷吸收能力而导致其他营养元素如氮和钾的相对不足.

6 转基因优质水稻

近年来, 随着人们生活水平的提高, 稻米品质越

来越受到重视与关注. 优质稻米的理化指标一般包括加工品质、外观品质、蒸煮食味品质和营养品质等 4 个主要方面^[150]. 目前, 几个控制稻米品质的重要基因, 如稻米粒长基因 *GS3*^[151]、粒宽基因 *GW2*^[152]、糊化温度基因 *Alk*^[153] 以及淀粉含量基因 *Wx*^[154] 等都被克隆, 同时一些与水稻品质相关的基因也均已定位. 这些研究为分子标记辅助选择或转基因技术改良稻米品质提供了极大的便利.

在转基因优质水稻研究上, 利用转基因技术改良稻米营养品质的研究相对较多, 如高蛋白含量转基因水稻的研究. 稻米除了提供热量外, 也是蛋白质的一个重要来源. 周丽慧等人^[155]对 351 份不同类型水稻品种(系)糙米中的蛋白质含量进行了测定, 结果显示粗蛋白含量在 9.3%~17.7% 之间, 平均为 12.4%; 籼稻平均蛋白质含量为 13.2%, 比粳稻高约 1 个百分点. 通过转基因方法提高稻米中蛋白质特别是人体必需氨基酸如赖氨酸的含量可增加其营养价值. 常用的策略就是直接在转基因水稻中表达富含赖氨酸的外源蛋白. 如 Gao 等人^[156]通过基因枪法将四棱豆来源的高赖氨酸蛋白基因导入水稻, 转基因水稻种子的赖氨酸含量提高了 16.04%. 唐俐等人^[157]通过农杆菌介导法将四棱豆来源的高赖氨酸蛋白基因转入水稻中获得了无选择标记且种子的赖氨酸含量有一定提高的转基因水稻. 王为民等人^[158]将来源于马铃薯花粉的高赖氨酸蛋白质基因(*sb401*)导入籼稻品种龙特甫. 转基因水稻种子蛋白质的含量平均提高了 18.7%, 赖氨酸的含量平均提高了 10%, 其他一些人体必需氨基酸的含量也有不同程度的提高. 李科等人^[159]将 *sb401* 导入粳稻品种日本晴, 转基因水稻种子中蛋白质、赖氨酸和其他人体必需氨基酸的含量都有所提高. 但是, 过高的蛋白质含量会影响稻米的口感, 降低其食味品质, 这是应该注意的.

此外, 还有一些研究通过转基因方法提高水稻微量元素, 如 β -胡萝卜素、铁、锌等的含量. 比较著名的例子是金色稻米. 所谓金色稻米就是一种富含 β -胡萝卜素的稻米. 这种稻米的产生是通过转基因的方法将水仙花来源的八氢番茄红素合成酶(phytoene synthase)和细菌来源的八氢番茄红素去饱和酶(phytoene desaturase)导入到水稻中去, 在水稻胚乳中建立原本没有的 β -胡萝卜素的合成途径^[12,160]. β -胡萝卜素是维生素 A 的前体, 食用金色稻米预期可以大大缓解生活在贫困地区的人们由于维生素 A 缺乏而

导致的失明、免疫力下降、儿童死亡率上升等一系列的健康问题。

除了金色稻米外,还有一种高铁含量的转基因水稻。Goto 等人^[161]在水稻胚乳中特异性的表达大豆来源的铁贮存蛋白基因(*ferritin*),可以将稻米中铁的含量提高 2~3 倍。其他的研究小组也尝试了类似的策略,得到结果基本与 Goto 等人的报道一致^[162~165]。食用这种转基因稻米期望可以缓解生活在贫困地区的人们特别是妇女和儿童由于铁元素缺乏而导致贫血等一系列的症状。

7 转基因高产水稻

转基因高产水稻的培育主要是集中于 C4 水稻的研究上。众所周知,根据光合作用碳同化途径中 CO₂ 固定的最初光合产物的不同,高等植物可分成 C3、C4 和景天酸植物。C4 植物是从 C3 植物进化而来的一种高光效种类。与 C3 植物相比, C4 植物在光合效率、抗逆境胁迫方面都具有优势。遗憾的是许多主要作物如水稻、小麦、大麦、和大豆都是 C3 植物。长期以来,许多植物学家和育种家都希望能将 C3 作物改良为 C4 作物,而转基因技术的兴起也为 C3 作物改良为 C4 作物带来了希望。

目前转基因 C4 水稻的研究策略以转入 C4 植物来源的 C4 光合作用途径相关基因为主,也有过量表达 C3 来源的 C4 循环相关基因的报道。Ku 等人^[166]首先把玉米磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)转入到水稻中。转基因植株呈现出某些 C4 植物的特征。与野生型对照相比,氧气对转基因植株光合作用的抑制下降了 20%。随后,几个与 C4 光合作用相关的基因都被一一转入到了水稻进行过实验。比较常见的有 PEPC^[166~171]、丙酮酸正磷酸双激酶(pyruvate, orthophosphate dikinase, PPK)基因^[171,172]、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)基因^[169,173]、依赖 NADP 的苹果酸酶(NADP-malic enzyme, ME)基因^[171,174,175]、依赖 NADP 的苹果酸酶脱氢酶(NADP-malate dehydrogenase, MDH)基因^[176]等。导入这些 C4 基因的效果各不相同,但整体上离大幅提高产量的目标还有比较大的差距,甚至过量表达某些 C4 基因会导致严重的负面效果,如转基因水稻过量表达玉米来源的 ME 会导致植株矮化、叶片褪色、光抑制增强^[171,174,175]。人们也尝试同时转入多个 C4 基因期望多个 C4 基因的联合作用可以获得

更好的效果。Taniguchi 等人^[171]将 4 个不同来源的 C4 基因(玉米来源的 PEPC 和 PPK, 高粱来源的 MDH 以及水稻来源的 ME)同时导入到水稻中,希望可以在水稻叶肉细胞中建立类-C4 光合作用循环的途径。与野生型对照相比,转基因水稻仅仅显示了轻微的光合作用的改善,且转基因植株出现轻微的生长发育延迟。当然,也有研究结果比较令人乐观。如 Jiao 等人^[167]报道了在转基因水稻中联合表达 C4 植物来源的 PEPC 和 PPK 基因使转基因水稻的产量上升了 22%~24%。

C4 水稻无疑是转基因水稻研究中最具挑战性的课题之一。由于 C3 和 C4 植物在解剖结构和遗传基础上均存在较大差异, C4 水稻研究所面临的困难是巨大的。但是, C4 水稻的研究作为改变目前水稻产量长期徘徊不前现状的一种尝试是值得肯定的。

8 转基因抗除草剂水稻

自 1996 年转基因作物实现商品化种植以来,转基因抗除草剂作物的种植面积一直都是最大的。发展转基因抗除草剂作物通常采用两个策略:(i)修饰除草剂作用的靶蛋白基因,通过降低靶蛋白的敏感性或提高其表达水平来获得对除草剂的抗性;(ii)通过转基因技术引入新的酶系统来提高植物对除草剂的代谢能力从而达到抗除草剂的效果。转基因抗除草剂水稻主要有 3 个用途:可以使用化学除草剂进行田间除草,降低成本,增产增收;在杂交水稻生产上可以用于去除假杂种,提高种子纯度;抗除草剂基因本身还可以作为筛选标记用于转基因水稻的培育。

来自吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)的 *bar* 基因是转基因抗除草剂水稻最早,也是最常用的一个抗除草剂基因。导入 *bar* 基因可以使转基因植物特异性地获得对草丁膦(phosphinothricin, PPT)的抗性。PPT 是一种非选择性的广谱除草剂,其商品名又叫 Liberty, Finale, Basta 等。PPT 可以通过抑制植物细胞内谷氨酰胺合成酶的活性而导致植物细胞内氨的积累,从而致使植株死亡。*Bar* 基因编码 PPT 乙酰转移酶,因而可以解除 PPT 的活性。目前,转 *bar* 基因的抗除草剂水稻的研究已有较多的报道^[176~178]。中国科学院华南植物园利用已获得的转 *bar* 基因的明恢 86B,与不育系杂交选配了抗除草剂的杂交新组合——II 优 86B 和特优 86B。明恢 86B 及其选配的新组合已经通过了中间实验和环境实验,2005 年进入了

生产性实验^[179].

草甘膦(Glyphosate)是孟山都公司除草剂农达的有效成分,由于其具有高效、低毒和广谱等特点,已经成为世界上使用面积最大的除草剂品种.草甘膦作用的靶酶是 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合成酶(5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase, EPSP).EPSP 是细菌和植物体内芳香氨基酸合成过程中的一个关键酶.草甘膦就是通过抑制 EPSP 的活性来抑制植物体内芳香族氨基酸的合成从而使植物死亡.抗草甘膦基因工程主要的策略是通过修饰 EPSP 而使其对草甘膦不敏感.胡利华等人^[180]以一个改造合成的 EPSP 基因作为筛选标记,将一个细菌来源的柠檬酸合成酶基因 *CS* 转入到水稻中,所获得的转基因水稻对农达有显著抗性.苏军等人^[181]利用 error-prone PCR 的方法获得了一个 EPSP 的突变基因,将该突变基因导入到水稻中可显著提高水稻对草甘膦的抗性.

细胞色素 P450 单加氧酶(cytochrome P450 monooxygenases)是广泛存在于所有生物体内的一类酶,细胞色素 P450 单加氧酶对于代谢生物体内疏水性的有毒化学物质起关键性作用^[182].因此,植物体内过量表达细胞色素 P450 单加氧酶可以提高植物对除草剂的抗性,且这种抗性是广谱性的,即可对多种不同作用机理的除草剂产生抗性.日本学者在这方面做了比较多的研究,他们将哺乳动物甚至人类来源的 P450 单加氧酶导入水稻中获得了抗除草剂水稻^[183-188].这种过量表达 P450 单加氧酶的水稻除了可以抗除草剂外,还可以清除环境中的杀虫剂或其他有害有机物质的残留^[186,187,189,190].需要注意的是,当植物体内的 P450 单加氧酶活性发生变化时,会造成植物体内次生代谢物组分的变化,这些变化是否会对环境或人类健康带来不利影响,还需要进行充分的研究.

除了上述介绍的几类抗除草剂水稻外,还有其他的一些类型的抗除草剂水稻,如抗以原卟啉原氧化酶(protoporphyrinogen oxidase, Protox)为靶标的除草剂^[191-193]和抗以乙酰乳酸合成酶(acetolactate synthase)为靶标的除草剂^[194].这些转基因水稻都是通过导入修饰过的除草剂靶蛋白基因来获得抗性的.

9 展望

在过去的 20 多年里,转基因水稻的研究取得了巨大的进步,不仅建立了成熟的遗传转化体系,而且

获得一大批有应用潜力的转基因材料.此外,随着拟南芥、水稻等模式植物功能基因组研究的全面展开,一大批具有重要功能的基因被发现和克隆,极大地丰富了转基因水稻研究可以利用的基因资源.但是,转基因水稻的研究在许多方面上还有待进一步的发展.首先,在遗传转化技术上,大片段转化和叶绿体转化有着巨大的应用前景,但是技术上还不够成熟,尚未实现广泛的应用.其次,在转基因水稻研究上,可用的基因资源相对缺乏仍然是一个比较突出的问题.比如在转基因抗虫水稻性状改良方面,缺乏可以有效控制稻飞虱的抗性基因.虽然水稻中已经发现和鉴定了 19 个抗褐飞虱的基因^[1],但是由于褐飞虱有多个生物型且易产生变异,抗性品种往往推广数年后就会失去抗性.如何通过转基因手段来培育对稻飞虱具有持久抗性的品种是一个亟待解决的问题.在水稻病害方面,还缺乏抗水稻纹枯病的主效基因;在水稻营养高效利用特别是氮高效利用方面也尚未发现好的主效基因或 QTL 等等.基因资源的缺乏在很大程度上限制了转基因水稻新品种的培育.再次,转基因技术对于改良复杂性状还受到很大的限制.比如抗旱和 C4 水稻的培育,虽然导入个别的外源基因可以看到一定的效果,但是目前取得的进展离理想的目标尚有一定的距离.

我们需要看到的是,虽然转基因大豆、棉花、玉米等主要农作物在 10 多年前就实现了商品化,转基因水稻的商品化目前依然困难重重.其中一个最主要的原因就是作为主食作物,人们对转基因水稻的安全性存在较大顾虑.如果转基因水稻不能最终实现商品化应用于生产,那么再好的研究成果也没有任何应用价值.

针对以上问题,一方面需要大力开展功能基因组的研究,大量挖掘和分离具有实用价值的功能基因.同时,还需要对控制相关性状的生物学机理进行深入的研究.只有充分理解这些性状背后的生物学机理,才可能更好地对其进行改良.另一方面,科学家在进行转基因研究的同时,还要积极加强科普宣传,提高人们对转基因技术的认识,消除公众对转基因技术的偏见和疑虑.最后,只有将转基因技术与常规育种、分子标记辅助选择等多种技术相结合,才能充分发挥转基因育种的优势,培育出更多更好的新品种.

参考文献

- 1 Zhang Q. Strategies for developing green super rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 16402—16409
- 2 Toriyama K, Arimoto Y, Uchimiyaa H, et al. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *Bio/Technology*, 1988, 6: 1072—1074
- 3 Zhang H M, Yang H, Rech E L. Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. *Plant Cell Rep*, 1988, 7: 379—384
- 4 Zhang W, Wu R. Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. *Theor Appl Genet*, 1988, 76: 835—840
- 5 Christou P, Ford T, Kofron M. Production of transgenic Rice (*Oryza Sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology*, 1991, 9: 957—962
- 6 Chan M T, Chang H H, Ho S L, et al. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha-amylase promoter/beta-glucuronidase gene. *Plant Mol Biol*, 1993, 22: 491—506
- 7 Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, 6: 271—282
- 8 Toki S, Hara N, Ono K, et al. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J*, 2006, 47: 969—976
- 9 Lin Y J, Zhang Q. Optimizing the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice. *Plant Cell Rep*, 2005, 23: 540—547
- 10 Hiei Y, Komari T. Improved protocols for transformation of indica rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2006, 85: 271—283
- 11 Hiei Y, Komari T. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nat Protoc*, 2008, 3: 824—834
- 12 Ye X, Al-Babili S, Kloti A, et al. Engineering the pro-Vitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 2000, 287: 303—305
- 13 Daniell H, Dhingra A. Multigene engineering: dawn of an exciting new era in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13: 136—141
- 14 Hamilton C M, Frary A, Lewis C, et al. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 9975—9979
- 15 Liu Y G, Shirano Y, Fukaki H, et al. Complementation of plant mutant with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 6535—6540
- 16 周玲艳, 姜大刚, 吴豪, 等. 基于 TAC 载体的水稻转化系统的建立. *遗传学报*, 2005, 32: 514—518
- 17 何瑞锋, 王媛媛, 杜波, 等. 水稻双元细菌人工染色体系统转化体系的建立. *遗传学报*, 2006, 33: 269—276
- 18 Ye R, Huang H, Zhou Y, et al. Development of insect-resistant transgenic rice with Cry1C*-free endosperm. *Pest Manag Sci*, 2009, 65: 1015—20
- 19 Tang W, Chen H, Xu C G, et al. Development of insect-resistant transgenic indica rice with a synthetic *cry1C** gene. *Mol Breed*, 2006, 18: 1—10
- 20 Daniell H, Muhammad S, Allison K L. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci*, 2002, 7: 84—91
- 21 Lee S M, Kang K, Chung H et al. Plastid transformation in the monocotyledonous cereal crop, rice (*Oryza sativa*) and transmission of transgenes to their progeny. *Mol Cells*, 2006, 21: 401—410
- 22 苏宁, 孙萌, 杨波, 等. 双价抗虫基因叶绿体共转化植株抗虫性及其后代表现型分析. *遗传*, 2002, 24: 288—292
- 23 李轶女, 孙丙耀, 苏宁, 等. 水稻叶绿体表达体系的建立及抗 PPT 叶绿体转化植株的获得. *中国农业科学*, 2007, 40: 1849—1855
- 24 钱雪艳, 杨向东, 郭东全, 等. 植物叶绿体遗传转化及研究进展. *分子植物育种*, 2008, 6: 959—966
- 25 James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2008. ISAAA Brief No. 39. Ithaca, NY: ISAAA, 2008
- 26 Fujimoto H, Itoh K, Yamamoto M, et al. Insect resistant rice generated by introduction of a modified delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, 1993, 11: 1151—1155
- 27 Wünn J, Kloti A, Burkhardt P K, et al. Transgenic indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic *cry1A(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. *Bio/Technology*, 1996, 14: 171—176
- 28 Ghareyazie B, Alinia F, Menguito C A, et al. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic

- cryIA(b)* gene. Mol Breed, 1997, 3: 401—414
- 29 Wu C, Fan Y, Zhang C, et al. Transgenic fertile japonica rice plants expressing a modified *cryIA(b)* gene resistant to yellow stem borer. Plant Cell Rep, 1997, 17: 129—132
 - 30 Cheng X, Sardana R, Kaplan H, et al. *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 2767—2772
 - 31 Datta K, Vasquez A, Tu J, et al. Constitutive and tissue specific differential expression of the *cryIA(b)* gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. Theor Appl Genet, 1998, 97: 20—30
 - 32 舒庆尧, 叶恭银, 崔海瑞, 等. 转基因水稻“克螟稻”选育. 浙江农业大学学报, 1998, 24: 579—580
 - 33 Alam M F, Datta K, Abrigo E, et al. Transgenic insect resistant maintainer line (IR68899B) for improvement of hybrid rice. Plant Cell Rep, 1999, 18: 572—575
 - 34 Ye G Y, Shu Q Y, Yao H W, et al. Field evaluation of resistance of transgenic rice containing a synthetic cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to two stem borers. J Econ Entomol, 2001, 94: 271—276
 - 35 Wu G, Cui H, Ye G, et al. Inheritance and expression of the cry1Ab gene in Bt (*Bacillus thuringiensis*) transgenic rice. Theor Appl Genet, 2002, 104: 727—734
 - 36 Nayak P, Basu D, Das S, et al. 1997. Transgenic elite indica rice plants expressing CryIAC delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 2111—2116
 - 37 Khanna H K, Raina S K. Elite Indica transgenic rice plants expressing modified Cry1Ac endotoxin of *Bacillus thuringiensis* show enhanced resistance to yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). Transgenic Re, 2002, 11: 411—423
 - 38 Loc N T, Tinjuangun P, Gatehouse A M R, et al. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate transgenic rice plants which accumulate higher levels of proteins conferring insect resistance. Mol Breed, 2002, 9: 231—244
 - 39 曾千春, 吴茜, 周开达, 等. 修饰的 *cry1Ac* 基因导入籼稻明恢 81 获得抗虫纯合系. 遗传学报, 2002, 29: 519—524
 - 40 Tu J, Zhang G, Datta K, et al. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Nat Biotechnol, 2000, 18: 1101—1104
 - 41 Ramesh S, Nagadhara D, Pasalu I C, et al. Development of stem borer resistant transgenic parental lines involved in the production of hybrid rice. J Biotechnol, 2004, 111: 131—141
 - 42 Maqbool S B, Husnain T, Riazuddin S et al. Effective control of yellow stem borer and rice leaf folder in transgenic rice indica varieties Basmati 370 and M7 using the novel δ -endotoxin cryIIA *Bacillus thuringiensis* gene. Mol Breed, 1998, 4: 1—7
 - 43 Maqbool S B, Riazuddin S, Loc N T, et al. Expression of multiple insecticidal genes confers broad resistance against a range of different rice pests. Mol Breed, 2001, 7: 85—93
 - 44 Breitler J C, Marfa V, Royer M, et al. Expression of a *Bacillus thuringiensis* cry1B synthetic gene protects Mediterranean rice against the striped stem borer. Plant Cell Rep, 2000, 19: 1195—1202
 - 45 Breitler J C, Cordero M J, Royer M, et al. The -689/+197 region of the maize protease inhibitor gene directs high level, wound-inducible expression of the *cry1B* gene which protects transgenic rice plants from stemborer attack. Mol Breed, 2001, 7: 259—274
 - 46 Gahakwa D, Maqbool S B, Fu X, et al. Transgenic rice as a system to study the stability of transgene expression: multiple heterologous transgenes show similar behaviour in diverse genetic backgrounds. Theor Appl Genet, 2000, 101: 388—399
 - 47 Chen H, Tang W, Xu C G, et al. Transgenic indica rice plants harboring a synthetic *cry2A** gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against lepidopteran rice pests. Theor Appl Genet, 2005, 111: 1330—1337
 - 48 Bates S, Zhao J, Roush R, et al. Insect resistance management in GM crops: Past, present and future. Nature Biotechnol, 2005, 23: 57—62
 - 49 High S M, Cohen M B, Shu Q Y, et al. Achieving successful deployment of Bt rice. Trends Plant Sci, 2004, 9: 286—292
 - 50 Karim S, Dean D H. Toxicity and receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to the midgut brush border membrane vesicles of the rice leaf folders, *Cnaphalocrocis medinalis* and *Marasmia patnalis*. Curr Microbiol, 2000, 41: 276—283
 - 51 Alcantara E P, Aguda R M, Curtiss A, et al. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin binding to brush border membrane vesicles of rice stem borers. Arch Insect Biochem Physiol, 2004, 55: 169—177
 - 52 孙小芬, 唐克轩, 万丙良, 等. 表达雪花莲凝集素(GNA)的转基因水稻纯系抗褐飞虱. 科学通报, 2001, 46: 1108—1113
 - 53 Rao K V, Rathore K S, Hodges T K, et al. Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. Plant J, 1998, 15: 469—477
 - 54 Tang K, Tinjuangun P, Xu Y, et al. Particle-bombardment-mediated co-transformation of elite Chinese rice cultivars with genes conferring resistance to bacterial blight and sap-sucking insect pests. Planta, 1999, 208: 552—563
 - 55 Foissac X, Loc N T, Christou P, et al. Resistance to green leafhopper (*Nephotettix virescens*) and brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice expressing snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA). J Insect Physiol, 2000, 46: 573—583

- 56 Sun X, Wu A, Tang K. Transgenic rice lines with enhanced resistance to the small brown plant hopper. *Crop Prot*, 2002, 21: 511—514
- 57 Nagadhara D, Ramesh S, Pasalu I C, et al. Transgenic indica rice plants resistant to sap-sucking insects. *Plant Biotechnol J*, 2003, 1: 231—240
- 58 Nagadhara D, Ramesh S, Pasalu I C, et al. Transgenic rice plants expressing the snowdrop lectin gene (gna) exhibit high-level resistance to the whitebacked planthopper (*Sogatella furcifera*). *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 1399—1405
- 59 Tinjuangjun P, Loc N T, Gatehouse A M R, et al. Enhanced insect resistance in Thai rice varieties generated by particle bombardment. *Mol Breed*, 2000, 6: 391—399
- 60 Saha P, Majumder P, Dutta I, et al. Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf lectin with enhanced resistance against sap-sucking insect pests. *Planta*, 2006, 223: 1329—1343
- 61 Duan X, Li X, Xue Q et al. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Bio/Technology*, 1996, 14: 494—498
- 62 丁玉梅, 曾黎琼, 程在全, 等. 高效抗虫基因 *pin II* 转化水稻的研究. *西南农业学报*, 2003, 16: 27—32
- 63 Xu D, Xue Q, McElroy D. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, CpTi, in transgenic rice plants confers resistance to two major rice insect pests. *Mol Breeding*, 1996, 2: 167—173
- 64 Lee S I, Lee S H, Koo J C, et al. Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confers resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) in transgenic rice. *Mol Breed*, 1999, 5: 1—9
- 65 Irie K, Hosoyama H, Takeuchi T, et al. Transgenic rice established to express corn cystatin exhibits strong inhibitory activity against insect gut proteinases. *Plant Mol Biol*, 1996, 30: 149—157
- 66 Vain P, Worland B, Clarke M C, et al. Expression of an engineered cysteine proteinase inhibitor for nematode resistance in transgenic rice plants. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 266—271
- 67 Alfonso-Rubi J, Ortego F, Castanera P, et al. Transgenic expression of trypsin inhibitor CMe from barley in indica and japonica rice, confers resistance to the rice weevil *Sitophilus oryzae*. *Transgenic Res*, 2003, 12: 23—31
- 68 Huang J Q, Wel Z M, An H L, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of rice with the spider insecticidal gene conferring resistance to leafhopper and striped stem borer. *Cell Res*, 2001, 11: 149—55
- 69 James A B, Thierry B, William C, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotech*, 2007, 10: 1038—1359
- 70 Mao Y B, Cai W J, Wang J W, et al. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat Biotech*, 2007, 25: 1307—1313
- 71 过崇俭. 水稻白叶枯病. 见: 中国农业科学院植物保护研究所, 主编. 中国农作物病虫害. 北京: 中国农业出版社, 1995. 14—24
- 72 Wu X, Li X, Xu C, et al. Fine genetic mapping of xa24, a recessive gene for resistance against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Theor Appl Genet*, 2008, 118: 185—191
- 73 Wang C T, Wen G S, Lin X H, et al. Identification and fine mapping of the new bacterial blight resistance gene, *Xa31(t)*, in rice. *Eur J Plant Pathol*, 2009, 123: 235—240
- 74 Zhang S P, Song W Y, Chen L L, et al. Transgenic elite indica rice varieties, resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Mol Breed*, 1998, 4: 551—558
- 75 吴家道, 杨剑波, 许传万, 等. 水稻抗白叶枯病基因 *Xa21* 转基因水稻及其杂交稻研究. *作物学报*, 2001, 27: 29—34
- 76 鄂志国, 张丽靖, 焦桂爱, 等. 稻瘟病抗性基因的鉴定及利用进展. *中国水稻科学*, 2008, 22: 533—540
- 77 Lee S K, Song M Y, Seo Y S, et al. Rice Pi5-mediated resistance to *Magnaporthe oryzae* requires the presence of two coiled-coil-nucleotide-binding-leucine-rich repeat genes. *Genetics*, 2009, 181: 1627—1638
- 78 Van Loon L C, Van Sterin E A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1999, 55: 85—97
- 79 Lin W, Anuratha C S, Datta K, et al. Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Bio/Technology*, 1995, 13: 686—691
- 80 Datta K, Baisakh N, Thet K M, et al. Pyramiding transgenes for multiple resistance in rice against bacterial blight, yellow stem borer and sheath blight. *Theor Appl Genet*, 2002, 106: 1—8
- 81 Datta K, Koukolikova-Nicola Z, Baisakh N, et al. *Agrobacterium*-mediated engineering for sheath blight resistance of indica rice cultivars from different ecosystems. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 832—839
- 82 Nandakumar R, Babu S, Kalpana K, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice with chitinase gene for enhanced sheath blight resistance. *Biol Plantarum*, 2007, 51: 142—148
- 83 Nishizawa Y, Nishio Z, Nakazono K, et al. Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 383—390
- 84 Nishizawa Y, Saruta M, Nakazono K, et al. Characterization of transgenic rice plants over-expressing the stress-inducible

- beta-glucanase gene Gns1. Plant Mol Biol, 2003, 51: 143—152
- 85 Datta K, Velazhahan R, Oliva N, et al. Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmental friendly resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease. Theor Appl Genet, 1999, 98: 1138—1145
- 86 冯道荣, 许新萍, 卫剑文, 等. 使用双抗真菌蛋白基因提高水稻抗病性的研究. 植物学报, 1999, 41: 1187—1191
- 87 许明辉, 唐祚舜, 谭亚玲, 等. 几丁质酶 E 葡聚糖酶双价基因导入滇型杂交稻恢复系提高稻瘟病抗性的研究. 遗传学报, 2003, 30: 330—334
- 88 杨祁云, 许新萍, 朱小源, 等. 转基因水稻对稻瘟病的抗性研究. 植物病理学报, 2003, 33: 162—166
- 89 Maruthasalam S, Kalpana K, Kumar K K, et al. Pyramiding transgenic resistance in elite indica rice cultivars against the sheath blight and bacterial blight. Plant Cell Rep, 2007 26: 791—804
- 90 Kim J K, Jang I C, Wu R, et al. Co-expression of a modified maize ribosome inactivating protein and a rice basic chitinase gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to sheath blight. Transgenic Res, 2003, 12: 475—484
- 91 Schaffrath U, Mauch F, Freydl E, et al. Constitutive expression of the defense-related *Rir1b* gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Plant Mol Biol, 2000, 43: 59—66
- 92 Krishnamurthy K, Balconi C, Sherwood J E, et al. Wheat puroindolines enhance fungal disease resistance in transgenic rice. Mol Plant-Microbe Interact, 2001, 14: 1255—1260
- 93 Kanzaki H, Nirasawa S, Saitoh H, et al. Overexpression of the wasabi defensin gene confers enhanced resistance to blast fungus (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice. Theor Appl Genet, 2002, 105: 809—814
- 94 Coca M, Bortolotti C, Rufat M, et al. Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Plant Mol Biol, 2004, 54: 245—259
- 95 Shao M, Wang J, Dean R A, et al. Expression of a harpin-encoding gene in rice confers durable nonspecific resistance to *Magnaporthe grisea*. Plant Biotechnol J, 2008, 6: 73—81
- 96 Qiu D, Xiao J, Ding X, Xiong M, et al. OsWRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate- and jasmonate-dependent signaling. Mol Plant Microbe Interact, 2007, 20: 492—499
- 97 Xiao W, Liu H, Li Y, et al. A rice gene of de novo origin negatively regulates pathogen-induced defense response. PLoS ONE, 2009, 4: e4603
- 98 Xiong L, Schumaker K S, Zhu J K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. Plant Cell, 2002, 14: S165—S183
- 99 Vinocur B, Altman A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. Curr Opin Biotech, 2005, 16: 123—132
- 100 Gao J, Chao D, Lin H. Toward understanding molecular mechanisms of abiotic stress responses in rice. Rice, 2008, 1: 36—51
- 101 Zhu B, Su J, Chang M, et al. Overexpression of a $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice. Plant Sci, 1998, 139: 41—48
- 102 Su J, Wu R. Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. Plant Sci, 2004, 166: 941—948
- 103 Garg A K, Kim J K, Owens T G, et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 15898—15903
- 104 Jang I C, Oh S J, Seo J S, et al. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. Plant Physiol, 2003, 131: 516-524
- 105 Sawahel W. Improved performance of transgenic glycinebetaine-accumulating rice plants under drought stress. Biol Plantarum, 2003, 47: 39—44
- 106 Noury M, Bassie L, Lepri O, et al. A transgenic rice cell lineage expressing the oat arginine decarboxylase (adc) cDNA constitutively accumulates putrescine in callus and seeds but not in vegetative tissues. Plant Mol Biol, 2000, 43: 537—544
- 107 Capell T, Bassie L, Christou P. Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 9909—9914
- 108 Xu D, Duan X, Wang B, et al. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. Plant Physiol, 1996, 110: 249—257
- 109 Rohila J S, Jain R K, Wu R. Genetic improvement of *Basmati* rice for salt and drought tolerance by regulated expression of a barley Hva1 cDNA. Plant Sci, 2002, 163: 525—532
- 110 Babu R C, Zhang J X, Blum A, et al. *HVA1*, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. Plant Sci, 2004, 166: 855—862
- 111 Cheng Z Q, Targolli J, Huang X Q, et al. Wheat *LEA* genes, *PMA80* and *PMA1959*, enhance dehydration tolerance of transgenic rice

- (*Oryza sativa* L.). Mol Breeding, 2002, 10: 71—82
- 112 Xiao B, Huang Y, Tang N, et al. Overexpression of a *LEA* gene in rice improves drought resistance under the field conditions. Theor Appl Genet, 2007, 115: 36—45
 - 113 Sato Y, Yokoya S. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. Plant Cell Rep, 2008, 27: 329—334
 - 114 Wang F Z, Wang Q B, Kwon S Y, et al. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. J Plant Physiol, 2005, 162: 465—472
 - 115 Prashanth S R, Sadhasivam V, Parida A. Over expression of cytosolic copper/zinc superoxide dismutase from a mangrove plant *Avicennia marina* in indica Rice var Pusa Basmati-1 confers abiotic stress tolerance. Transgenic Res, 2008, 17: 281—291
 - 116 Lian H L, Yu X, Ye Q, et al. The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. Plant Cell Physiol, 2004, 45: 481—489
 - 117 Saijo Y, Hata S, Kyozuka J, et al. Overexpression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. Plant J, 2000, 23: 319—327
 - 118 Xiong L Z, Yang Y N. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. Plant Cell, 2003, 15: 745—759
 - 119 Xiang Y, Huang Y, Xiong L. Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement. Plant Physiol, 2007, 144: 1416—1428
 - 120 Oh S J, Song S I, Kim Y S, et al. *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. Plant Physiol, 2005, 138: 341—351
 - 121 Ito Y, Katsura K, Maruyama K, et al. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. Plant Cell Physiol, 2006, 47: 141—153
 - 122 Wang Q Y, Guan Y C, Wu Y R, et al. Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. Plant Mol Biol, 2008, 67: 589—602
 - 123 Xu D Q, Huang J, Guo S Q, et al. Overexpression of a TFIIIA-type zinc finger protein gene ZFP252 enhances drought and salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). Febs Lett, 2008, 582: 1037—1043
 - 124 Chen J Q, Meng X P, Zhang Y et al. Over-expression of *OsDREB* genes lead to enhanced drought tolerance in rice. Biotechnol Lett, 2008, 30: 2191—2198
 - 125 Wu X, Shiroto Y, Kishitani S, et al. Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. Plant Cell Rep, 2009, 28: 21—30
 - 126 Xiang Y, Tang N, Du H, et al. Characterization of OsbZIP23 as a key player of bZIP transcription factor family for conferring ABA sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. Plant Physiol, 2008, 148: 1938—1952
 - 127 Hu H, Dai M, Yao J, et al. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 12987—12992
 - 128 Hou X, Xie K, Yao J, et al. Homolog of human ski-interacting protein in rice positively regulates cell viability and stress tolerance. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106: 6410—6415
 - 129 Kanneganti V, Gupta A K. Overexpression of OsSAP8, a member of stress associated protein (SAP) gene family of rice confers tolerance to salt, drought and cold stress in transgenic tobacco and rice. Plant Mol Biol, 2008, 66: 445—462
 - 130 Huang Y, Xiao B, Xiong L. Characterization of a stress responsive proteinase inhibitor gene with positive effect in improving drought resistance in rice. Planta, 2007, 226: 73—85
 - 131 Huang J, Wang M M, Jiang Y, et al. Expression analysis of rice A20/AN1-type zinc finger genes and characterization of ZFP177 that contributes to temperature stress tolerance. Gene, 2008, 420: 135—144
 - 132 Yang Z, Wu Y, Li Y, et al. OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. Plant Mol Biol, 2009, 70: 219—229
 - 133 Liu K, Wang L, Xu Y, et al. Overexpression of OsCOIN, a putative cold inducible zinc finger protein, increased tolerance to chilling, salt and drought, and enhanced proline level in rice. Planta, 2007, 226: 1007—1016
 - 134 Xiao B, Chen X, Xiang C, et al. Evaluation of seven function-known candidate genes for their effects on improving drought resistance of transgenic rice under the field conditions. Mol Plant, 2009, 2: 73—83
 - 135 Hirel B, Gouis J L, Ney B et al. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: Towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. J Exp Bot, 2007, 58: 2369—2387
 - 136 Vance C P, Uhde-Stone C, Allan D L. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. New Phytol, 2003, 157: 423—447
 - 137 Tabuchi M, Abiko T, Yamaya T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). J Exp Bot, 2007, 58: 2319—2327
 - 138 Lam H M, Coschigano K T, Oliveira I C, et al. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants.

- Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996, 47: 569—593
- 139 Ishiyama K, Inoue E, Tabuchi M, et al. Biochemical background and compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. Plant Cell Physiol, 2004, 45: 1640—1647
- 140 Yamaya T, Obara M, Nakajima H, et al. Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. J Exp Bot, 2002, 53: 917—925
- 141 Cai H M, Zhou Y, Xiao J H, et al. Overexpressed glutamine synthetase gene modifies nitrogen metabolism and abiotic stress responses in rice. Plant Cell Reports, 2009, 28: 527—537
- 142 Kumar A, Kaiser B N, Siddiqi M Y, et al. Functional characterisation of OsAMT1.1 overexpression lines of rice, *Oryza sativa*. Funct Plant Biol, 2006, 33: 339—346
- 143 Hoque M, Masle J, Udvardi M, et al. Over-expression of the rice *OsAMT1*; 1 gene increases ammonium uptake and content, but impairs growth and development of plants under high ammonium nutrition. Funct Plant Biol, 2006, 33: 153—63
- 144 Shrawat A K, Carroll R T, DePauw M, et al. Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue-specific expression of alanine aminotransferase. Plant Biotechnol J, 2008, 6: 722—732
- 145 Zhou Y, Cai H, Xiao J, et al. Over-expression of aspartate aminotransferase genes in rice resulted in altered nitrogen metabolism and increased amino acid content in seeds. Theor Appl Genet, 2009, 118: 1381—1390
- 146 Raghothama K G. Phosphate transport and signaling. Curr Opin Plant Biol, 2000, 3: 182—187
- 147 Yi K, Wu Z, Zhou J, et al. OsPTF1, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice. Plant Physiol, 2005, 138: 2087—2096[doi]
- 148 Smith F W. The phosphate uptake mechanism. Plant Sci, 2002, 245: 105—114
- 149 Seo H, Jung Y, Song S, et al. Increased expression of OsPT1, a high-affinity phosphate transporter, enhances phosphate acquisition in rice. Biotechnol Lett, 2008, 30: 1833—1838[doi]
- 150 Juliano B O. Rice Chemistry and Technology. 2nd. American Association of Cereal Chemists, Incorporated Saint Paul, Minnesota, USA, 1985
- 151 Fan C, Xing Y, Mao H, et al. GS3, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. Theor Appl Genet, 2006, 112: 1164—1171[doi]
- 152 Song X J, Huang W, Shi M, et al. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. Nat Genet, 2007, 39: 623—630[doi]
- 153 高振宇, 曾大力, 崔霞, 等. 水稻稻米糊化温度控制基因 ALK 的图位克隆及其序列分析. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2003, 33: 481—487
- 154 Wang Z Y, Wu Z L, Xing Y Y, et al. Nucleotide sequence of rice Waxy gene. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 5898
- 155 周丽慧, 刘巧泉, 张昌泉, 等. 水稻种子蛋白质含量及组分在品种间的变异与分布. 作物学报, 2009, 35: 884—891
- 156 Gao Y F, Jing Y X, Shen S H, et al. Transfer of lysine-rich protein gene into rice and production of fertile transgenic plants. Acta Bot Sin, 2001, 43: 506—511
- 157 唐俐, 刘巧泉, 邓晓湘, 等. 无抗性选择标记的转高赖氨酸蛋白(LRP)基因籼稻恢复系的获得. 作物学报, 2006, 32: 1248—1251
- 158 王为民, 赵倩, 余静娟, 等. 水稻转高赖氨酸蛋白质基因(*sb40l*)植株的获得及种子中蛋白质和氨基酸的含量分析. 作物学报, 2005, 31: 603—607
- 159 李科, 王世全, 吴发强, 等. 农杆菌介导的转高赖氨酸蛋白基因(*sb40l*)水稻 T4 代分析. 中国水稻科学, 2008, 22: 131—136
- 160 Paine J A, Shipton C A, Chaggar S, et al. A new version of Golden Rice with increased pro-Vitamin A content. Nat Biotechnol, 2005, 23: 482—487
- 161 Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, et al. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. Nat Biotechnol, 1999, 17: 282—286[doi]
- 162 Lucca P, Hurrell R, Potrykus I. Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. Theor Appl Genet, 2001, 102: 392—397[doi]
- 163 Vasconcelos M, Datta K, Oliva N, et al. Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the *ferritin* gene. Plant Sci, 2003, 164: 371—378[doi]
- 164 刘巧泉, 姚泉洪, 王红梅, 等. 转基因水稻胚乳中表达铁结合蛋白提高稻米铁含量. 遗传学报, 2004, 31: 518—524
- 165 Qu L Q, Yoshihara T, Ooyama A, et al. Iron accumulation does not parallel the high expression level of ferritin in transgenic rice seeds. Planta, 2005, 222: 225—233[doi]
- 166 Ku M S B, Agarie S, Nomura M, et al. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. Nat Biotechnol, 1999, 17: 76—80[doi]
- 167 Jiao D, Huang X, Li X, et al. Photosynthetic characteristics and tolerance to photo-oxidation of transgenic rice expressing C4 photo-

- synthesis enzymes. *Photosynth Res*, 2002, 72: 85—93[[doi](#)]
- 168 Fukayama H, Hatch M D, Tamai T, et al. Activity regulation and physiological impacts of the maize C4-specific phosphoenolpyruvate carboxylase overproduced in transgenic rice plants. *Photosynth Res*, 2003, 77: 227—239[[doi](#)]
- 169 Suzuki S, Murai N, Kasaoka K, et al. Carbon metabolism in transgenic rice plants that express phosphoenolpyruvate carboxylase and/or phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Plant Sci*, 2006, 170: 1010—1019[[doi](#)]
- 170 Bandyopadhyay A, Datta K, Zhang J, et al. Enhanced photosynthesis rate in genetically engineered indica rice expressing *pepc* gene cloned from maize. *Plant Sci*, 2007, 172: 1204—1209[[doi](#)]
- 171 Taniguchi Y, Ohkawa H, Masumoto C, et al. Overproduction of C4 photosynthetic enzymes in transgenic rice plants: an approach to introduce the C4-like photosynthetic pathway into rice. *J Exp Bot*, 2008, 59: 1799-1809[[doi](#)]
- 172 Fukayama H, Tsuchida H, Agarie S, et al. Significant accumulation of C4-specific pyruvate, orthophosphate dikinase in a C3 plant, rice. *Plant Physiol*, 2001, 127: 1136—1146[[doi](#)]
- 173 Suzuki S, Murai N, Burnell J N, et al. Changes in photosynthetic carbon flow in transgenic rice plants that express C4-type phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Urochloa panicoides*. *Plant Physiol*, 2000, 124: 163—172[[doi](#)]
- 174 Takeuchi Y, Akagi H, Kamasawa N, et al. Aberrant chloroplasts in transgenic rice plants expressing a high level of maize NADP-dependent malic enzyme. *Planta*, 2000, 211: 265—274[[doi](#)]
- 175 Tsuchida H, Tamai T, Fukayama H, et al. High level expression of C4-specific NADP-malic enzyme in leaves and impairment of photoautotrophic growth of a C3 plant, rice. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42: 138—145[[doi](#)]
- 176 Datta S K, Datta K, Soltanifar N, et al. Herbicide resistant indica rice plants from IRRI breeding line IR72 after PEG-mediated transformation of protoplasts. *Plant Mol Biol*, 1992, 20: 619—629[[doi](#)]
- 177 Oard J H, Linscombe S D, Braverman M P, et al. Development, field evaluation and agronomic performance of transgenic herbicide resistant rice. *Mol Breed*, 1996, 2: 359—368[[doi](#)]
- 178 朱冰, 黄大年, 杨炜, 等. 利用基因枪法获得可遗传的抗除草剂转基因水稻植株. *中国农业科学杂志*, 1996, 29: 15—20
- 179 吴发强, 王世全, 李双成, 等. 抗除草剂转基因水稻的研究进展及其安全性问题. *分子植物育种*, 2006, 4: 846—852
- 180 胡利华, 吴慧敏, 周泽民, 等. 利用农杆菌介导法将柠檬酸合成酶基因(CS)导入籼稻品种明恢 86. *分子植物育种*, 2006, 4: 160—166
- 181 苏军, 陈建民, 田大刚, 等. Error-prone PCR 获得 EPSP 酶突变基因提高水稻的草甘膦抗性. *分子植物育种*, 2008, 6: 830—836
- 182 Ohkawa H, Tsujii H, Ohkawa Y. The use of cytochrome P450 genes to introduce herbicide tolerance in crops: a review. *Pesticide Sci*, 1999, 55: 867—874[[doi](#)]
- 183 Inui H, Shiota N, Ido Y, et al. Herbicide metabolism and tolerance in the transgenic rice plants expressing human CYP2C9 and CYP2C19. *Pestic Biochem Physiol*, 2001, 71: 156—169[[doi](#)]
- 184 Kawahigashi H, Hirose S, Hayashi E, et al. Enhanced herbicide cross-tolerance in transgenic rice plants co-expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19. *Plant Sci*, 2005, 168: 773—781[[doi](#)]
- 185 Kawahigashi H, Hirose S, Ozawa K, et al. Analysis of substrate specificity of pig CYP2B22 and CYP2C49 towards herbicides by transgenic rice plants. *Transgenic Res*, 2005, 14: 907—917[[doi](#)]
- 186 Kawahigashi H, Hirose S, Ohkawa H, et al. Phytoremediation of the herbicides atrazine and metolachlor by transgenic rice plants expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 2985—2991[[doi](#)]
- 187 Kawahigashi H, Hirose S, Ohkawa H, et al. Herbicide resistance of transgenic rice plants expressing human CYP1A1. *Biotechnol Adv*, 2007, 25: 75—84[[doi](#)]
- 188 Hirose S, Kawahigashi H, Ozawa K, et al. Transgenic rice containing human CYP2B6 detoxifies various classes of herbicides. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 3461—3467[[doi](#)]
- 189 Inui H, Ohkawa H. Herbicide resistance in transgenic plants with mammalian P450 monooxygenase genes. *Pest Manag Sci*, 2005, 61: 286—291[[doi](#)]
- 190 Kawahigashi H, Hirose S, Ohkawa H, et al. Phytoremediation of metolachlor by transgenic rice plants expressing human CYP2B6. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 9155—9160[[doi](#)]
- 191 Lee H J, Lee S B, Chung J S, et al. Transgenic rice plants expressing a *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene are resistant to diphenyl ether herbicide oxyfluorfen. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41: 743—749
- 192 Jung S, Back K. Herbicidal and antioxidant responses of transgenic rice overexpressing *Myxococcus xanthus* protoporphyrinogen oxidase. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43: 423—430[[doi](#)]
- 193 Jung S, Lee Y, Yang K, et al. Dual targeting of *Myxococcus xanthus* protoporphyrinogen oxidase into chloroplasts and mitochondria and high level oxyfluorfen resistance. *Plant Cell Environ*, 2004, 27: 1436—1446[[doi](#)]
- 194 Endo M, Osakabe K, Ono K, et al. Molecular breeding of a novel herbicide-tolerant rice by gene targeting. *Plant J*, 2007, 52: 157—166[[doi](#)]