

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202006034

草甘膦为筛选标记的水稻高效遗传转化体系的建立*

袁冰, 丁筠, 曹含章, 吕尊富, 李飞飞**
(浙江农林大学 农业与食品科学学院, 浙江 临安 311300)

摘要:【目的】建立以日本晴愈伤组织为受体、草甘膦抗性基因 *CP4* 为选择标记基因的高效水稻遗传转化体系。【方法】以粳稻日本晴的成熟胚为试验材料, 通过农杆菌介导法, 将含有草甘膦抗性基因 *CP4* 的 P1300 载体转化日本晴的愈伤组织, 分别用质量浓度为 10、20 和 40 mg/L 的草甘膦进行 3 轮抗性筛选, 诱导分化和再生成苗; 利用 1000 mg/L 草甘膦对移栽成活的阳性苗进行抗性鉴定。【结果】获得 145 株转基因幼苗, PCR 检测阳性株为 128 株, 阳性率达 88.27%; 经过 3 轮抗性筛选后, 转基因幼苗的阳性率提高; 移栽成活的 99 株阳性苗中, 65 株表现为抗性, 抗性率为 65.66%。【结论】成功建立了以草甘膦为筛选标记的水稻转基因体系, 该体系为水稻育种提供了材料, 并对以抗草甘膦基因作为筛选标记的水稻转基因和一些基因功能验证提供了技术支持。

关键词: 日本晴愈伤组织; 草甘膦抗性基因 *CP4*; 农杆菌介导法; 高效遗传转化体系

中图分类号: S 511.032 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X (2021) 04-0559-07

Establishment of an Efficient Genetic Transformation System for Rice with Glyphosate as a Selection Marker

YUAN Bing, DING Yun, CAO Hanzhang, LYU Zunfu, LI Feifei

(School of Agriculture and Food Science, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China)

Abstract: [Purpose] To establish an efficient rice genetic transformation system with Nipponbare as the receptor and glyphosate resistance gene (*CP4*) as the selection marker for transformation research. [Method] Using mature embryos of japonica rice Nipponbare as experimental materials, the P1300 vector containing the glyphosate resistance gene *CP4* was transformed into the callus of Nipponbare by *Agrobacterium*-mediated method, with a concentration of 10, 20 and 40 mg/L glyphosate were subjected to three rounds of resistance screening, differentiation induction and seedling formation. 1000 mg/L glyphosate was used to identify the resistance of the positive seedlings transplanted alive. [Result] 145 transgenic seedlings were obtained. After PCR detection, 128 positive strains were obtained, the positive rate was 88.27%. Experiments proved that after three concentration gradients screening, the positive rate of genetically modified seedlings increases. Among the 99 positive seedlings transplanted alive, 65 strains showed resistance, and the resistance rate was 65.66%.

收稿日期: 2020-06-18 修回日期: 2021-03-24 网络首发时间: 2021-08-16 13:58:27

*基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31401461); 2019 年浙江农林大学学生科研训练项目 (113-2013200134); 2018 年浙江农林大学学生科研训练项目 (KX20180017)。

作者简介: 袁冰 (2000—), 女, 浙江金华人, 在读本科生, 主要从事水稻转基因研究。

E-mail: 948224828@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 李飞飞 (1979—), 女, 山西大同人, 博士, 副教授, 主要从事植物基因工程研究。E-mail: lifei-fei@163.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20210814.1852.002.html>



[**Conclusion**] We successfully established a rice transgenic system using glyphosate as a screening marker. The system provided materials for rice breeding and provided technical support for rice transgenes using glyphosate as a screening marker and functional verification of some genes.

Keywords: callus of Nipponbare; glyphosate resistance gene *CP4*; *Agrobacterium*-mediated transformation; efficient genetic transformation system

以农杆菌介导法的水稻遗传转化技术非常成熟,在粳稻、籼稻和爪哇稻都已经建立了转基因体系^[1]。RACHMAWATI 等^[2]对爪哇稻品种 Ro-jolele 进行转化,用 50 mg/L 潮霉素筛选,转化率达 23%;林拥军等^[3]对粳稻品种牡丹江 8 号建立了农杆菌介导的转化体系,利用 50 mg/L 潮霉素进行筛选,转化率达 38.7%;LIN 等^[4]对 4 种籼稻品种进行转化,利用 60 和 50 mg/L 潮霉素筛选,得到转化率较高的明恢 63 和 W9864S 以及转化率较低的珍汕 97 和中 419;李丹丹^[5]对籼稻品种湘晚籼 17 号和 R299 进行转化,利用 50 mg/L 卡那霉素对胚性愈伤组织进行抗性筛选,转化率低于 10%。通过对转化技术的创新,以潮霉素为选择标记的转化试验也能获得 70% 以上的较高转化率^[6-8]。这些成熟体系多以潮霉素作为筛选标记,但抗生素作为筛选标记均存在抗性愈伤组织筛选不够有效灵敏和转化频率不高等问题。

除受体基因型外,水稻遗传转化技术中的筛选剂也非常重要。目前常用的筛选剂有抗生素和除草剂。相比于潮霉素和卡那霉素等抗生素而言,除草剂筛选较抗生素更为快捷和灵敏^[9-11]。草甘膦是一种非选择性、无残留和灭生性除草剂。在植物吸收后,它可以竞争性地抑制植物体内影响芳香族氨基酸生物合成的关键酶 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶 (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSPS) 的活性,使蛋白质合成受阻,导致植物死亡^[12-16]。因此,常用草甘膦 (glyphosate) 或草丁膦作为水稻遗传转化的筛选标记,利用转基因技术培育抗草甘膦水稻新品种成为一种重要的手段。常用的草甘膦抗性基因有 *CP4*、*GR79-EPSPS*、*GAT4621* 和 *GAT* 等^[17-18]。吴涛等^[19]对豫农梗和方欣 4 号进行转化,用 2 mmol/L 草甘膦筛选,PCR 阳性率分别为 75.10% 和 72.00%;王云鹏等^[20]对吉农大 878 进行转化,用含 0.5% 草甘膦培养基筛选,草甘膦抗性率为 42.56%;胡利华等^[21]对明恢 86 进行转化,用

600 mg/L 草甘膦筛选,PCR 阳性率为 45.83%。但这些以草甘膦抗性基因为筛选标记的转基因水稻转化效率普遍偏低,且还未得到一个高效的转化体系^[22-24]。

因此,本研究以粳稻日本晴胚性愈伤组织作为受体,选取 10、20 和 40 mg/L 的草甘膦对其进行抗性筛选,获得抗性愈伤组织后进行分化生根培养,最终获得抗草甘膦转基因水稻。本研究对提高以草甘膦抗性基因为选择标记的水稻遗传转化效率具有重要指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

草甘膦抗性基因 *CP4* 和具有草甘膦抗性的 P1300 载体 (图 1) 均由浙江大学张天真课题组提供;日本晴成熟胚来自中国水稻研究所;农杆菌菌株 LBA 4404 由浙江农林大学农学实验室提供;水稻组织培养的基础培养基为 NB,由 N6 培养基和维生素 B5 配制而成。试验在浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室完成。

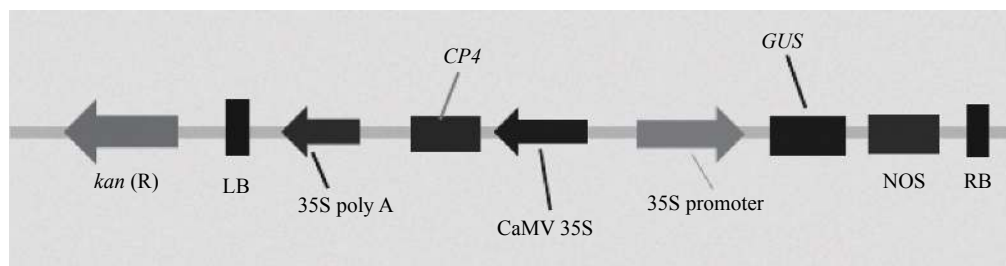
1.2 方法

1.2.1 水稻愈伤组织诱导和增殖

日本晴成熟种子去壳,用 70% 酒精消毒 1 min,30% 次氯酸钠 (NaClO) 溶液浸泡 30 min,用无菌水将种子清洗 4~5 次,在无菌水中浸泡 30 min,最后倒去无菌水,用含有 500 mg/L 头孢霉素的无菌水洗 1~2 次,将成熟胚在成熟胚诱导培养基 (NB+2.0 mg/L 2,4-D+0.5 g/L 脯氨酸+0.3 g/L 水解酪蛋白+30 g/L 蔗糖+4.0 g/L 非特胶) 上进行愈伤组织诱导。在 27 ℃ 的组培室进行培养,每 20~25 d 继代 1 次,获得的胚性愈伤组织放在培养基 R1 (NB+2.5 mg/L 2,4-D+0.5 g/L 脯氨酸+0.3 g/L 水解酪蛋白+30 g/L 蔗糖+4.0 g/L 非特胶) 上进行增殖培养,得到的大量愈伤组织用作转化受体。

1.2.2 水稻遗传转化

将含有 *CP4* 基因载体的农杆菌菌液在 28 ℃、200 r/min 的摇床上震荡培养 20~36 h,直至菌液



注: *kan* (R). 卡那霉素抗性; LB. 左边界; CaMV. 花椰菜花叶病毒; 35S poly A. CaMV35S poly A 终止子; *CP4*. 草甘膦抗性基因; 35S promoter. CaMV35S 启动子; *GUS*. β -葡萄糖苷酸酶基因; NOS. 农杆菌的胭脂碱合酶基因终止子; RB. 右边界。

Note: *kan* (R). kanamycin resistant; LB. left border; CaMV. Cauliflower mosaic virus; 35S poly A. CaMV35S poly A terminator; *CP4*. glyphosate resistance gene; 35S promoter. CaMV35S promoter; *GUS*. β -D-glucuronidase gene; NOS. nopaline synthase terminator of *Agrobacterium*; RB. right border.

图1 含有 *CP4* 基因的表达载体

Fig. 1 Expression vector map containing *CP4* gene

OD_{600} 达到约 1.0。用悬浮培养基 R2 (NB+500 mg/L 脯氨酸+300 mg/L 水解酪蛋白+30 g/L 蔗糖+20 mg/L 乙酰丁香酮) 稀释农杆菌菌液, 侵染有光泽、金黄色、疏松、小块颗粒状的愈伤组织 10 min, 期间不停摇动; 之后放在含有滤纸的空培养皿上吸干多余的菌液, 分散地放置在铺有 1 层滤纸的共培养基 R3 (NB+500 mg/L 脯氨酸+300 mg/L 水解酪蛋白+30 g/L 蔗糖+20 mg/L 乙酰丁香酮+4.0 g/L 非特胶) 上, 封口, 放在 28 °C 恒温培养箱里暗培养 2 d。培养后的愈伤组织用含有 500 mg/L 头孢霉素的无菌水洗 3~5 次, 用滤纸充分吸干后, 将这些愈伤组织每隔约 20 d 依次接种在含 10、20 和 40 mg/L 草甘膦的胚性愈伤组织诱导培养基 R4 (NB+2 mg/L 2,4-D+500 mg/L 脯氨酸+300 mg/L 水解酪蛋白+500 mg/L 谷氨酰胺+30 g/L 蔗糖+4.0 g/L 非特胶+500 mg/L 头孢霉素) 上进行 3 轮筛选。筛选过程设置 3 个重复, 每 1 个重复初始愈伤组织系均为 50 块, 3 个重复共计 150 块。观察在不同质量浓度草甘膦的分化培养基中胚性愈伤组织的增殖数量以及生长状态, 考察不同质量浓度草甘膦对水稻愈伤组织分化的影响。

经过 3 轮筛选后, 挑取生理状态良好的抗性愈伤组织转入分化培养基 R5 (NB+0.5 mg/L NAA+3 mg/L 6-BA+500 mg/L 脯氨酸+300 mg/L 水解酪蛋白+500 mg/L 谷氨酰胺+30 g/L 蔗糖+4.0 g/L 非特胶) 中, 在 27 °C 组培室培养约 25 d, 直至抗性愈伤组织出现小绿点; 继续培养约 30 d, 苗长至 7~8 cm 后, 放入生根培养基 R6 (1/2 NB+20 g/L 蔗糖+8.0 g/L 琼脂) 中壮苗 1~2 周。

1.2.3 转基因水稻的 PCR 检测和草甘膦抗性检测

利用 CTAB 法提取转基因水稻叶片的 DNA。

用 *CP4* 基因的引物 (F: 5'-ATTACATATGCTTC-ACGGTGCAAGC-3'; R: 5'-ATTACTCGAGTCA-GGCAGCCTTCGTATCG-3') 进行 PCR 检测, 扩增的目的片段大小为 580 bp。对移栽成活的抗草甘膦植株进行抗性检测, 将水稻植株的叶片进行编号, 剪取叶片后浸泡在含有 1 mg/L 6-BA 和 100 mg/L 草甘膦的水溶液中, 5~7 d 后, 观察叶片颜色的变化并进行拍照记录。叶片颜色不变, 说明其抗草甘膦; 叶片颜色发黄或变褐色, 说明其不抗草甘膦。

1.2.4 转基因水稻愈伤组织的分化率、成苗率和 PCR 阳性率的测定

经过 3 轮抗性筛选后, 统计获得抗性愈伤组织系数、分化的愈伤组织系数 (即分化绿点个数)、成苗数、阳性株数和总苗数, 并计算水稻愈伤组织的分化率、成苗率和 PCR 阳性率。

分化率=分化绿点个数/抗性愈伤组织系数×100%;

成苗率=成苗数/分化绿点个数×100%;

PCR 阳性率=阳性株数/总苗数×100%。

2 结果与分析

2.1 转基因水稻的获得

将日本晴成熟胚放在诱导培养基 R1 (图 2a) 上, 2 周后在种子的周围出现新的愈伤组织 (图 2b); 将长出的愈伤组织单独挑取出来, 放在 R1 上增殖, 2 个月后得到大量有光泽的米黄色愈伤组织 (图 2c)。CP4 基因转化水稻的愈伤组织, 共培养 2 d 后, 转接在含 10 mg/L 草甘膦的培养基 R4 上, 进行第 1 次抗性筛选, 大部分愈伤

组织发黑或褐变 (图 2d); 20 d 后全部转接在含 20 mg/L 草甘膦的培养基 R4 上, 进行第 2 次筛选, 会在褐色的愈伤组织周边长出抗性的新生愈伤组织 (图 2e); 20 d 后转接在含 40 mg/L 草甘膦

的培养基 R4 上, 进行第 3 次筛选, 会出现愈伤组织的明显增殖 (图 2f), 共得到 122 块抗性愈伤组织系 (表 1)。
抗性愈伤组织增殖足够多时, 转接到分化培



注: a) 刚接种在诱导培养基 R1 上的日本晴成熟胚; b) 日本晴成熟胚经诱导后产生的少量胚性愈伤组织; c) 胚性愈伤组织经过 3 次继代后产生的大量胚性愈伤组织; d) 经过 10 mg/L 草甘膦筛选后的胚性愈伤组织; e) 经过 20 mg/L 草甘膦筛选后的愈伤组织; f) 经过 40 mg/L 草甘膦筛选后的愈伤组织; g) 经过 3 轮筛选后, 愈伤组织在分化培养基 R5 上分化出的绿点; h) 分化的绿点长出的小苗; i) 获得大量的转基因水稻苗。

Note: a) Nipponbare mature embryo that has just been inoculated on induction medium R1; b) a small amount of embryogenic callus produced by the induction of mature embryos of Nipponbare; c) a large number of embryogenic callus were produced after 3 generations of embryogenic callus; d) the embryo callus was screened by 10 mg/L glyphosate concentration; e) the embryo callus was screened by 20 mg/L glyphosate concentration; f) the embryo callus was screened by 40 mg/L glyphosate concentration; g) after 3 rounds of screening, the callus differentiated into green spots on the differentiation medium R5; h) differentiated green spots grow seedlings; i) a large number of transgenic rice seedlings were obtained.

图 2 水稻胚性愈伤组织为受体转化到再生植株

Fig. 2 Rice embryogenic callus from transformation to regeneration

表 1 日本晴愈伤组织的分化率、成苗率和 PCR 阳性率

Tab. 1 Differentiation rate, seedling rate and PCR positive rate of callus from Nipponbare

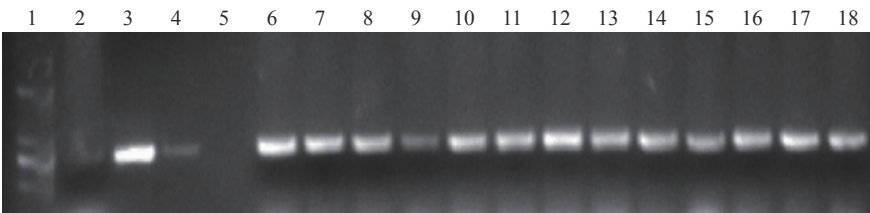
重复试验 repeated experiment	初始愈伤 组织系数数量 initial callus lines number	抗性愈伤 组织系数数量 resistant callus lines number	分化的愈伤 组织系数数量 differentiation of callus lines number	分化绿 点数 differentiated green spots	成苗数 seedling number	阳性株数 positive strain number	分化率/% regeneration rate	成苗率/% seedling rate	PCR阳性率/% transformation rate
1	50	41	35	61	48	42	85.37	78.79	87.50
2	50	38	30	58	44	39	78.95	75.86	88.64
3	50	43	32	67	53	47	74.42	79.10	88.68
总计 total	150	122	97	186	145	128	79.51	77.96	88.27

培养基 R5 进行分化诱导, 有 97 块愈伤组织系出现了 186 个绿点 (图 2g), 分化率为 79.51% (表 1); 20 d 后, 186 个绿点成功长出 145 株幼苗 (图 2h), 成苗率为 77.96% (表 1); 10 d 后, 叶片长到约 2 cm 时, 转接到生根培养基 R6 中; 40 d 后再生苗生根发育获得完整的再生植株 (图 2i)。从胚性愈伤组织进行农杆菌介导转化到获得抗性愈伤组织约 2 个月, 抗性愈伤组织分化成苗约 2 个月, 整个过程约 4 个月。

2.2 PCR 检测结果和移栽成活

对获得的 145 株转基因幼苗叶片用 CTAB 法

提取 DNA 后, 以 *CP4* 基因引物进行 PCR 扩增。经过 PCR 检测, 获得 128 株阳性植株, PCR 阳性率为 88.27% (表 1)。将得到的 128 株转基因阳性苗从培养基中取出, 用无菌水洗去幼苗根部的琼脂后移栽到有基质的花盆中, 放在温室中培养记录, 最终得到 99 株转基因植株。图 3 为随机的 15 株转基因植株检测图。泳道 5 没有扩增出目的片段, 说明检测的转基因植株中不含有抗草甘膦 *CP4* 基因, 为阴性株, 泳道 4 和 6~18 为扩增出目的片段, 表示它们对应的植株中成功转入抗草甘膦 *CP4* 基因, 为阳性株。



注: 1. 分子量标记 DL2000; 2. 未转化植株 (阴性对照); 3. 含有 *CP4* 基因的质粒 (阳性对照); 4~18. 检测的转基因植株。
Note: 1. molecular weight marker DL2000; 2. untransformed plants (negative control); 3. the plasmid containing *CP4* gene (positive control); 4-18. the transgenic plant tested.

图 3 转基因植株 *CP4* 基因的 PCR 检测图
Fig. 3 The PCR detection for *CP4* in transgenic plants

2.3 转基因水稻植株的草甘膦抗性鉴定

将 99 株转基因水稻叶片浸泡在含有 1 mg/L 6-BA 和 100 mg/L 草甘膦的水溶液 5 d 后, 叶片状态出现了明显的不同; 其中, 34 株转基因苗叶片表面出现枯黄、褐色的斑点, 表现为非抗性;

65 株转基因苗叶片表面无明显变化, 表现为抗性, 草甘膦抗性率为 65.66%。试验成功建立了以草甘膦为筛选标记的水稻转基因体系。图 4 为随机的 21 株转基因水稻植株的草甘膦抗性检测结果。



注: a) 经草甘膦抗性筛选后枯黄的转基因水稻叶片; b) 经草甘膦抗性筛选表现为抗性的转基因水稻叶片。
Note: a) the withered and yellow transgenic rice leaves after glyphosate resistance screening; b) the transgenic rice leaves showing resistance after glyphosate resistance screening.

图 4 转基因植株抗性检测
Fig. 4 Resistance testing of transgenic plants

3 讨论

3.1 草甘膦对转化率的影响

转基因水稻的获得依赖于优良的转化体系,而确定适宜的草甘膦质量浓度是建立良好的转化体系和提高转化效率的关键因素。苏军等^[25]应用农杆菌介导转化法分别将表达水稻 EPSP 酶突变基因 *epspl02* 和未经修饰的水稻 *epspl* 基因导入籼稻恢复系明辉 86 中,分别获得转基因水稻 84 和 109 个克隆,选取质量浓度梯度为 0、8.45、16.90、25.35、33.80 和 42.25 mg/L 草甘膦筛选后获得完整的再生植株,转化率分别为 7% 和 5%。何少海等^[26]用农杆菌介导法对日本晴、秀水 131 和中花 11 等 3 个水稻品种进行转化,分别选取质量浓度为 15、10 和 5 mg/L 的草丁膦进行筛选后获得完整植株,愈伤组织转化效率分别为 76.1%、44.4% 和 86.7%。王和勇^[27]以粳稻品种台北 309 愈伤组织作为受体,用农杆菌介导法进行转化后,将愈伤组织用 24、20 和 12 mg/L 草甘膦进行 3 次筛选后获得完整植株,转化率约为 26.28%。赵艳等^[28]和邓丽蝶^[29]用基因枪介导的常规转化法和优化后的方法分别对籼稻观 28 和粳稻日本晴的愈伤组织进行转化,用 0.34 g/L 草甘膦筛选后,籼稻观 28 获得 37 株抗性植株,经 PCR 检测后 31 株为阳性转基因植株,粳稻日本晴的转化效率为 17.20%。上述研究表明:选用草甘膦作为筛选标记时,对于不同的水稻品种,草甘膦的质量浓度不同,虽然有以日本晴为受体的转基因体系报道,但是阳性率低,没有确定一个高效的转化体系。本研究用农杆菌介导法对粳稻日本晴愈伤组织进行转化后,分别选择 10、20 和 40 mg/L 的草甘膦进行抗性愈伤组织的筛选,得到 122 块抗性愈伤组织,获得 145 株幼苗,其中包括 128 株阳性株,PCR 阳性率为 88.27%。最终建立了以草甘膦为筛选标记的日本晴高效转基因体系。

3.2 日本晴愈伤组织的状态对转化的影响

日本晴愈伤组织的状态是水稻转基因是否成功的关键点^[30]。何少海等^[26]将日本晴成熟胚放在诱导培养基上培养 15 d,继代 2 次,用农杆菌介导法转化后共获得 86 块抗性愈伤组织,120 株转基因苗,PCR 阳性率为 82.5%,草丁膦阳性率为 89.9%;王和勇^[27]将台北 309 成熟种子放在诱导培养基上培养 3~4 周,接种在继代培养基上,用

继代 2~3 次后的愈伤组织作为农杆菌转化的受体,获得胚性愈伤组织 156 个,仅有 41 个愈伤组织再生出植株;邓丽蝶^[29]以籼稻品种观 28 幼胚作为试验材料,将籼稻幼胚放在诱导培养基暗培养 15 d,再转接在继代培养基上继代 2 次,每次继代 15 d 后,用基因枪轰击法进行转化,7 块愈伤组织分化出 37 株绿苗,其中 31 株为阳性转基因植株,6 株为阴性转基因植株。愈伤组织继代次数太多,会变得无光泽,颜色发白,趋于老化,用这样的愈伤组织进行转化,后期容易造成农杆菌的污染,容易褐化,转化效率低,获得的转基因苗会出现较高的变异;如果愈伤组织继代 1~2 次,数量太少,也不利于转化,获得的转基因苗也少。本研究在诱导日本晴的愈伤组织时,成熟胚诱导约 1 周会出现愈伤组织,20 d 愈伤组织增多,每 20~25 d 转接 1 次,转接 2~3 次后,增殖出大量的愈伤组织,愈伤组织具有光泽,呈淡黄色、颗粒状和疏松状的状态。选取这样的愈伤组织进行转化,农杆菌污染低,褐变少,转基因苗变异率低,转化效率高。

4 结论

本研究采用草甘膦基因 *CP4* 转化日本晴的愈伤组织,再分别选取 10、20 和 40 mg/L 的草甘膦进行 3 轮抗性筛选,共获得 122 块抗性愈伤组织。分化生根后,得到 145 株转基因苗,经过 PCR 检测后有 128 株阳性植株,PCR 阳性率为 88.27%,将阳性植株移栽成活后获得 99 株完整转基因植株。用 1000 mg/L 的草甘膦进行抗性鉴定后,有 65 株转基因植株表现抗性,草甘膦阳性率为 65.66%,成功建立了以抗草甘膦基因为选择标记的高转化效率的水稻遗传转化体系。该体系为水稻育种提供了材料,并对以抗草甘膦基因作为筛选标记的水稻转基因和一些基因功能验证提供了技术支持。

[参考文献]

- [1] 许惠滨,朱永生,连玲,等.水稻遗传转化方法研究与应用进展[J].福建稻麦科技,2017,35(4):79. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9799.2017.04.027.
- [2] RACHMAWATI D, HOSAKA T, INOUE E, et al. Agrobacterium-mediated transformation of Javanica rice cv. Rojolele[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2004, 68(6): 1193. DOI: 10.1271/bbb.68.1193.

- [3] 林拥军, 陈浩, 曹应龙, 等. 农杆菌介导的牡丹江8号高效转基因体系的建立[J]. 作物学报, 2002, 28(3): 294. DOI: [10.3321/j.issn:0496-3490.2002.03.002](https://doi.org/10.3321/j.issn:0496-3490.2002.03.002).
- [4] LIN Y J, ZHANG Q F. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice[J]. Plant Cell Reports, 2005, 23(8): 540. DOI: [10.1007/s00299-004-0843-6](https://doi.org/10.1007/s00299-004-0843-6).
- [5] 李丹丹. 两个籼稻品种遗传转化体系优化的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [6] 陈惠, 赵原, 种康. 一种改进的水稻成熟胚愈伤组织高效基因转化系统[J]. 植物学通报, 2008, 25(3): 322. DOI: [10.3969/j.issn.1674-3466.2008.03.009](https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-3466.2008.03.009).
- [7] TOKI S, HARA N, ONO K, et al. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice[J]. The Plant Journal, 2006, 47(6): 969. DOI: [10.1111/j.1365-313X.2006.02836.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02836.x).
- [8] 苏益, 黄善金, 蔺万煌, 等. 根癌农杆菌介导的水稻快速转化方法研究[J]. 中国农学通报, 2008, 24(5): 83.
- [9] 梁雪莲, 王引斌, 卫建强, 等. 作物抗除草剂转基因研究进展[J]. 生物技术通报, 2001(2): 17. DOI: [10.3969/j.issn.1002-5464.2001.02.005](https://doi.org/10.3969/j.issn.1002-5464.2001.02.005).
- [10] 温莉娴, 周菲, 邹玉兰. 抗除草剂转基因水稻的研究进展[J]. 植物保护学报, 2018, 45(5): 954. DOI: [10.13802/j.cnki.zwbhxb.2018.2018925](https://doi.org/10.13802/j.cnki.zwbhxb.2018.2018925).
- [11] 苏少泉. 草甘膦与抗草甘膦作物[J]. 农药, 2008, 47(9): 631. DOI: [10.3969/j.issn.1006-0413.2008.09.003](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-0413.2008.09.003).
- [12] ZHAO T, LIN C Y, SHEN Z C. Development of transgenic glyphosate-resistant rice with *G6* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase[J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10(9): 1307. DOI: [10.1016/S1671-2927\(11\)60123-5](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(11)60123-5).
- [13] 陈世国, 强胜, 毛婵娟. 草甘膦作用机制和抗性研究进展[J]. 植物保护, 2017, 43(2): 17. DOI: [10.3969/j.issn.0529-1542.2017.02.003](https://doi.org/10.3969/j.issn.0529-1542.2017.02.003).
- [14] 程海刚. 抗草甘膦基因(*EPSPS*)的克隆与功能验证[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2007.
- [15] ZACHARA J M, FREDRICKSON J K, LI S M W, et al. Bacterial reduction of crystalline Fe^{3+} oxides in single phase suspensions and subsurface materials[J]. American Mineralogist, 1998, 83(11/12): 1426. DOI: [10.2138/am-1998-11-1232](https://doi.org/10.2138/am-1998-11-1232).
- [16] 武春媛, 李芳柏, 周顺桂, 等. 成团泛菌MFC-3的分离鉴定及其腐殖质/Fe(III)呼吸特性研究[J]. 环境科学, 2010, 31(1): 237. DOI: [10.13227/j.hjks.2010.01.033](https://doi.org/10.13227/j.hjks.2010.01.033).
- [17] 柴帅杰, 武鹏程, 荣瑞娟, 等. 转基因水稻中CP4-EPSPS蛋白质的检测及其表达特征研究[J]. 核农学报, 2017, 31(1): 44. DOI: [10.11869/j.issn.100-8551.2017.01.0044](https://doi.org/10.11869/j.issn.100-8551.2017.01.0044).
- [18] 刘健, 肖雅文, 芦佳, 等. 四个抗草甘膦基因的抗性比较[J]. 草业学报, 2015(5): 159. DOI: [10.11686/cyxb20150519](https://doi.org/10.11686/cyxb20150519).
- [19] 吴涛, 张晓丽, 童天乐, 等. Xinan I 介导的草甘膦高抗转基因水稻的研究[J]. 现代农药, 2012, 11(5): 10. DOI: [10.3969/j.issn.1671-5284.2012.05.003](https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-5284.2012.05.003).
- [20] 王云鹏, 马景勇, 马瑞, 等. 土壤宏基因组中抗草甘膦新基因的克隆与转化水稻的研究[J]. 作物学报, 2014, 40(7): 1190. DOI: [10.3724/SP.J.1006.2014.01190](https://doi.org/10.3724/SP.J.1006.2014.01190).
- [21] 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[J]. 分子植物育种, 2006, 4(2): 160. DOI: [10.3969/j.issn.1672-416X.2006.02.003](https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-416X.2006.02.003).
- [22] 苏少泉. 转基因抗草甘膦作物的新进展[J]. 现代农药, 2009, 8(6): 1. DOI: [10.3969/j.issn.1671-5284.2009.06.001](https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-5284.2009.06.001).
- [23] 吴慧敏. 抗除草剂水稻培育及应用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [24] 王慧, 闫晓红, 徐杰, 等. 我国抗草甘膦基因的发掘现状[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(1): 109. DOI: [10.3969/j.issn.1674-7968.2014.01.014](https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-7968.2014.01.014).
- [25] 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[J]. 分子植物育种, 2008, 6(5): 830. DOI: [10.3969/j.issn.1672-416X.2008.05.002](https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-416X.2008.05.002).
- [26] 何少海, 姚盛存, 丰宇凯, 等. 农杆菌介导 $\bar{bar}$ 基因转化水稻胚性愈伤组织的研究[J]. 浙江农林大学学报, 2017, 34(1): 129. DOI: [10.11833/j.issn.2095-0756.2017.01.018](https://doi.org/10.11833/j.issn.2095-0756.2017.01.018).
- [27] 王和勇. 植物转化体草甘膦筛选技术平台的建立[D]. 广州: 中山大学, 2004.
- [28] 赵艳, 邓春泉, 邓丽蝶. 洁净DNA转化获得 $2mG2-epsps$ 基因单拷贝整合的抗草甘膦水稻[J]. 中国水稻科学, 2014, 28(1): 15. DOI: [10.3969/j.issn.1001-7216.2014.01.003](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-7216.2014.01.003).
- [29] 邓丽蝶. 抗草甘膦水稻遗传转化及其非预期效应分析[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2013.
- [30] 叶胜海, 王俊梅, 翟荣荣, 等. 水稻草甘膦耐性浓度的筛选及其生理指标测定[J]. 核农学报, 2018, 32(5): 986. DOI: [10.11869/j.issn.100-8551.2018.05.0986](https://doi.org/10.11869/j.issn.100-8551.2018.05.0986).

责任编辑: 何馨成