

# Bar 基因和转 Bar 基因作物的研究进展

段发平, 梁承邺, 黎垣庆

(中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650)

**摘要:** 概述了草丁膦的毒害机理和 Bar 基因的抗性机理与表达情况。总结了转 Bar 基因作物的来源、抗性遗传特点和其对环境安全性评价等方面的研究进展。展望了 Bar 基因和转 Bar 基因作物的应用前景。

**关键词:** Bar 基因; 转基因作物; 草丁膦

**中图分类号:** Q813.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2001)02-0166-07

## Research advances of Bar gene and its transgenic crops

DUAN Fa-ping, LIANG Cheng-ye, LI Yuan-qing

(South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** Poisonous mechanism of glufosinate, resistant mechanism and expression of Bar gene were outlined. Sources, resistant genetic characters and environment safety evaluation of Bar-transgenic crops were summed up. Application prospects of Bar gene and its transgenic crops were put forward.

**Key words:** Bar gene; transgenic crop; glufosinate

抗广谱除草剂草丁膦 (glufosinate) 的 Bar 基因 (bialaphos resistance gene) 已被克隆与测序, 通过生物技术已将该基因导入 20 多种作物<sup>[1]</sup>。德国 Aventis 公司 (前身为艾格福公司—AgrEvo) 拥有 Bar 基因和相应的除草剂草丁膦。该公司已创制出的商品化抗草丁膦作物品种有大豆、玉米、油菜、甜菜、棉花、水稻等<sup>[2]</sup>。中国水稻所 1996 年首次研究出了抗除草剂转基因杂交稻; 之后, 又成功配制出抗除草剂转基因直播水稻; 1999 年 3 月它们与浙江钱江生物化学股份有限公司联合组建了浙江金穗农业基因工程有限公司, 正式拉开了将转基因水稻推向产业化的序幕; 现已开始进行大田释放和试种示范<sup>[3,4]</sup>。华南植物研究所已获得 3 个生产上广泛应用的同型抗性恢复系, 即将进行水稻超纯杂种技术试验示范; 同时在进行的有

30 多个同型优良恢复系的转育<sup>[5]</sup>。目前, 本所正拟与美国严氏抗除草剂和杂种优势公司、湖北天发集团公司、浙江农科院作物所、四川彭山冒泉科农股份有限公司联合成立中国抗除草剂杂种优势利用高科技股份有限公司。转 Bar 基因作物的获得, 不仅可以提高对施用作物的安全性, 而且可以扩大其应用范围。Bar 基因的研究及其转 Bar 基因作物的选育和应用越来越受到人们的普遍重视。

### 1 Bar 基因和转 Bar 基因作物的研究现状

#### 1.1 草丁膦的毒害机理和 Bar 基因的抗性机理

##### 1.1.1 草丁膦的毒害机理 草丁膦属有机磷类除草

收稿日期: 2000-03-27

作者简介: 段发平 (1968-), 男, 在读博士生, 讲师, 从事作物遗传育种研究工作。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39780034)

剂,是非选择性、广谱除草剂 Liberty(商业用名还有 Basta, Ignite, Challenge 及 Finale 等)的活性成份。在一些文献中常被称为 Phosphinothricin (PPT, 麟丝菌素)。Basta 于 1984 年首次在德国被注册,目前已在 50 多个国家被登记注册。Basta 包含草丁膦的 2 种同分异构体,但其中 D-草丁膦并不具有除草剂活性。L-草丁膦强烈抑制细菌和植物的氨基酸生物合成酶—谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase, GS)<sup>66</sup>。双丙氨膦(bialaphos)是由链霉菌属(*Streptomyces*)的一些小种产生的草丁膦的三肽前体,它来自于这些小种中的 2 个 L-丙氨酸残基并与 PPT 相连组成。完整的三肽不具离体抑制活性。通过植物体中的肽酶除去 2 个 L-丙氨酸残基后,在细胞内释放出的 PPT 才有活性<sup>77</sup>。

GS 在生物界中广泛存在,目前已从细菌、真菌、植物和动物中分离获得。GS 在植物氮同化及氮代谢调节中起重要作用,它是植物中唯一的解毒酶,以解除由硝酸还原作用、氨基酸降解及光呼吸中释放的氨的毒性。草丁膦通过植物的叶片或其它绿色部分快速吸收,它抑制 GS 活性,导致细胞内氨的含量迅速积累。而氨的积累直接抑制光系统 I 和光系统 II 反应,减少跨膜 pH 梯度,使光合磷酸化解偶联,随之叶绿体结构解体,最后整个植物体死亡<sup>68</sup>。

1.1.2 Bar 基因的抗性机理 (1)产生过量的靶标酶或靶标蛋白质,降低除草剂毒性。GS 有多种形式的同工酶,只有细胞质形式 GS 和 PPT 抗性有关。在紫苜蓿(*Medicago sativa* L.)—细胞系中发现其 GS 活性提高了 10 倍;将该苜蓿细胞质 GS 的 DNA 克隆并导入烟草,烟草转基因植株对除草剂 PPT 具有一定抗性,但抗性较低,这也许由于存在多个 GS 核基因的缘故<sup>92</sup>。(2)产生能修饰除草剂的酶或酶系统,在除草剂发生作用前将其降解或解毒。Glufosinate(或 bialaphos)抗性 Bar 基因,克隆来自土壤吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)。它编码麟丝菌素乙酰转移酶(phosphinothricin acetyltransferase, PAT), PAT 使 PPT 的自由氨基乙酰化从而对 PPT 解毒,使之不能抑制 GS 的活性。含有该基因的植物具有对 Liberty 的抗性<sup>11</sup>。

## 1.2 基因工程创造的转 Bar 基因作物品种

通过农杆菌介导法、基因枪法和电击法等基因转移技术将除草剂抗性基因导入作物,便有可能获得抗除草剂的作物品种。目前,对除草剂草丁膦的抗性

Bar 基因,已导入水稻、玉米、小麦、大麦、烟草、马铃薯、番茄、高粱、燕麦、甘蔗、番木瓜、菜豆、豌豆、棉花、荞麦等作物(表 1)<sup>110~431</sup>。

## 1.3 转 Bar 基因作物的抗性遗传特点

国内外研究者发现转 Bar 基因作物的抗性遗传特点一般为单个显性基因,转 Bar 基因水稻<sup>71,44,45</sup>、小麦<sup>25</sup>、烟草<sup>34</sup>、高粱<sup>33</sup>等的抗性遗传属孟德尔遗传模式。但也有研究表明 Bar 基因的遗传有的不符合 3:1 的分离比<sup>20,46,47</sup>。表明 Bar 基因整合的拷贝数和整合位置的多样性。

## 1.4 Bar 基因的表达研究

1.4.1 Bar 基因的沉默问题 随着植物基因工程研究的发展,人们在得到了大量目的基因的遗传工程植株的同时,也观察到外源基因的沉默是一个较为普遍的现象。DNA 甲基化、重复序列、反式失活和共抑制均可导致基因沉默。Kumapatla 等<sup>48</sup>在转 Bar 基因玉米植株自交后代中分离出了一些除草剂敏感株系, Southern blot 检测发现 Bar 基因的结构仍然是完整的。但其启动子区甲基化程度要比抗性植株高。在转 Bar 基因水稻中也观察到类似的现象<sup>49</sup>。此外,有研究表明,转基因水稻中, hpt(抗潮霉素)基因与 gus 报告基因共转化显著提高了 gus 基因的表达水平;华志华等<sup>50</sup>据此认为共转化基因的相互作用可能对转基因发生基因沉默也存在影响。

1.4.2 Bar 基因对农艺性状的影响 遗传背景对转 Bar 基因的表达有一定的影响<sup>91</sup>。转基因品种与原品种相比,少数品系接近或达到原品种的产量水平,个别品系甚至比原品种增产,但大部分品系与原品种相比都有不同程度减产<sup>52</sup>。黎垣庆等<sup>45</sup>指出, Bar 基因嵌入那条染色体,以及插入那条染色体那个区段又是随机发生。因而引起的效应不同,它的产量水平以及对抗性的表达水平也不同。因此要注意选择那些对产量性状或主要农艺性状没有或很少负效应而又能充分表达抗除草剂特性的工程株作为转育的供体。

## 1.5 转 Bar 基因作物对生态环境与食物安全性评价

编码 PAT 蛋白的 DNA 本身对消费者并不会增加危险性。PAT 是一种新酶,在人体内无内源的这种酶。PAT 在植物中高表达时可达总可溶性蛋白的 0.1%。用模拟的胃及小肠液已研究了蛋白水解酶对 PAT 的降解,发现几分钟内 PAT 即被降解,大或稳定的肽段已不再存在,因此用实验动物进行急性毒性试验并不能提供更多的安全性数据。PAT 与已知

表 1 基因工程创造的转 Bar 基因作物<sup>1)</sup>  
Table 1 Bar-transgenic crops created by gene engineering

品种 Varieties	转化受体 Transform receptors	共转化外 源基因 Co-transform foreign genes	转化方法 Transform methods	作者及年份 Authors and published years
水稻 <i>Oryza sativa</i> L.	原生质体 protoplasts	hph	原生质体共培养转化法 protoplasts co-transfected	Datta, <i>et al.</i> (1992)
	原生质体 protoplasts	Ubi-1	电穿孔法 electroporation	Toki, <i>et al.</i> (1992)
	悬浮培养细胞 suspension culture cells	Act1	微粒子发射技术 microprojectile bombardment	Cao, <i>et al.</i> (1992)
	原生质体 protoplasts	uidA	原生质体共培养转化法 protoplasts co-transfected	Cornejo, <i>et al.</i> (1993)
	原生质体 protoplasts	uidA	原生质体共培养转化法 protoplasts co-transfected	Rathore, <i>et al.</i> (1993)
	幼胚 immature embryos	uidA	电穿孔法 electroporation	Rao (1995)
	幼胚 immature embryos	CeropinB	粒子轰击法 particle bombardment	Huang, <i>et al.</i> (1996)
	幼苗分生组织 shoot meristem	—	农杆菌介导法 transformed using <i>Agrobacterium</i>	Park, <i>et al.</i> (1996)
	悬浮细胞、幼胚 suspension culture cells, immature embryos	—	粒子轰击法 particle bombardment	Yu, <i>et al.</i> (1996)
	原生质体 protoplasts	Ubi-1	电穿孔法 electroporation	Bhattacharjee, <i>et al.</i> (1997)
玉米 <i>Zea mays</i> L.	成熟胚盾片组织 scutellar tissue of mature embryos	NtFAD3	粒子轰击法 particle bombardment	Wakita, <i>et al.</i> (1998)
	胚性愈伤组织 embryogenic calli	cryIA(b)	粒子轰击法 particle bombardment	Xu, <i>et al.</i> (1999)
	胚性悬浮细胞 embryogenic suspension culture cells	uidA	微粒子发射技术 microprojectile bombardment	Spencer, <i>et al.</i> (1992)
	胚性悬浮细胞 embryogenic suspension culture cells	npt I	粒子轰击法 particle bombardment	Register, <i>et al.</i> (1994)
小麦 <i>Triticum aestivum</i> L.	悬浮培养细胞 suspension culture cells	gor	粒子轰击法 particle bombardment	Palmer, <i>et al.</i> (1999)
	原生质体 protoplasts	Luc	原生质体共培养转化法 protoplasts co-transfected	Yang, <i>et al.</i> (1993)
	幼胚盾片 scutellar tissue of immature embryos	uidA	粒子轰击法 particle bombardment	Becker, <i>et al.</i> (1994)
	幼胚 immature embryos	cp	粒子轰击法 particle bombardment	Karunaratne, <i>et al.</i> (1996)
大麦 <i>Hordeum vulgare</i> L.	幼胚 immature embryos	TA29-bn	粒子轰击法 particle bombardment	Fu, <i>et al.</i> (1997)
	幼胚 immature embryos	npt I	微粒子发射技术 microprojectile bombardment	Witzens, <i>et al.</i> (1998)
	悬浮培养细胞 suspension culture cells	uidA	生物发射技术 biolistic particle bombardment	Stiff, <i>et al.</i> (1995)
	幼胚 immature embryos	uidA	粒子轰击法 particle bombardment	Jensen, <i>et al.</i> (1996)
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> L.	小孢子 microspores	uidA	高速微粒子发射技术 high velocity microprojectiles	Yao, <i>et al.</i> (1997)
	幼胚 immature embryos	Wtrxb	粒子轰击法 particle bombardment	Cho, <i>et al.</i> (1999)
	叶片 leaf	—	叶盘转化法 leaf dish transformation	Padegimas, <i>et al.</i> (1994)
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i> L.	叶片 leaf	—	微粒子发射技术 microprojectile bombardment	Zhang, <i>et al.</i> (1999)
	叶片 leaf	—	叶盘转化法 leaf dish transformation	Padegimas, <i>et al.</i> (1994)
番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	叶片 leaf	hph, uidA	农杆菌介导法 transformed using <i>Agrobacterium</i>	Knapp, <i>et al.</i> (1994)

续表 1

品种 Varieties	转化受体 Transform receptors	共转化外 源基因 Co-transform foreign genes	转化方法 Transform methods	作者及年份 Authors and pub- lished years
高粱 <i>Sorghum vulgare</i> Pers.	幼胚 immature embryos	uidA	微粒子发射技术 microprojectile bombardment	Casas, <i>et al.</i> (1993)
燕麦 <i>Avena sativa</i> L.	幼胚 immature embryos	uidA	微粒子发射技术 microprojectile bombardment	Pawlowski, <i>et al.</i> (1998)
甘蔗 <i>Saccharum sinense</i> Roxb.	分生组织 meristems	uidA	农杆菌介导法 transformed using <i>Agrobacterium</i>	Enriquez-Obregon, <i>et al.</i> (1997)
番木瓜 <i>Carica papaya</i> L.	胚性愈伤组织 embryogenic calli	npt I, uidA	粒子轰击法 particle bombardment	Carera-Ponce, <i>et al.</i> (1995)
菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	种子分生组织 seed meristems	uidA	粒子轰击法 particle bombardment	Russell, <i>et al.</i> (1993)
豌豆 <i>Pisum sativum</i> L.	未成熟种子的胚轴 hypocotyl of immature embryos	npt II	农杆菌介导法 transformed using <i>Agrobacterium</i>	Schroeder, <i>et al.</i> (1993)
棉花 <i>Gossypium hirsutum</i> L.	幼胚 immature embryos	—	粒子轰击法 particle bombardment	Keller, <i>et al.</i> (1997)
荞麦 <i>Polygonum fagopyrum</i> L.	外植体 explants	—	农杆菌介导法 transformed using <i>Agrobacterium</i>	Rubstova, <i>et al.</i> (1997)

"hph-潮霉素磷酸转移酶基因(hygromycin phosphotransferase gene); Ubi-1-玉米泛素基因(ubiquitin gene); Act1-肌动蛋白基因(actin 1 gene); uidA-葡萄糖苷酸酶基因(glucuronidase gene); CeropinB-抗菌肽 B 基因; NtFAD3-烟草脂肪酸脱氢酶基因(fatty acid desaturase gene from tobacco); cryIA (b)-苏云金杆菌(B. t)杀虫晶体蛋白基因(*Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins gene); npt I -新霉素磷酸转移酶基因(neomycin phosphotransferase gene); gor-谷胱甘肽还原酶基因(glutathion reductase gene); luc-萤光素酶基因(luciferase gene); cp-外壳蛋白基因(coat protein gene); TA29-bn-雌性不育基因(TA29-barnase gene); Wtrx h-小麦硫氧还蛋白 H 基因(wheat thioredoxin h gene)。

的 120 多种人体过敏蛋白无同源性。该蛋白在植物中是否糖基化尚不清楚<sup>(53)</sup>。

FDA 已经证实 Liberty Link 谷物用于动物饲料和人类消费没有安全性的问题。日本已同意进口 AgrEvo 公司的 Liberty Link 玉米用于人类和动物消费。此外, Liberty 除草剂在土壤中易被土壤微生物快速分解, 残留期短, 半衰期只有 2~3 d。其活性成份不能或极少由根从土壤中吸收, 在植物木质部与韧皮部移动也是很有限的, 并依物种不同而有差异。它是在美国环保局食品质量保护法实行后注册的第一种新产品。Liberty 的活性成份 PPT 虽然抑制细菌、植物及哺乳动物中的 GS, 但因它不能通过血脑屏障, 并在肾中很快被清除, 因此对哺乳动物无毒性。Liberty 在注册以前进行了严格的测定, 确保遗传工程种子对人类和动物消费安全, 其营养与非转基因同类具有等同性<sup>(7, 53)</sup>。

## 2 Bar 基因在作物遗传育种上的应用和展望

### 2.1 Bar 基因可作为遗传标记基因

以往基因转化中一般采用抗生素作为筛选标记系统。由于转化细胞对抗生素的解毒作用导致的交叉保护, 高频率的未转化植株和嵌合体也通过了抗生素

筛选。Bar 基因是常用的选择标记基因之一, 将它与其它目的基因构建到同一载体上, 选择培养基中加入一定量的除草剂就能筛选到含目的基因的转化细胞。它克服了抗生素筛选的局限性, 细胞产生的假转化体很少。Xu Deping 等<sup>(54)</sup>将转化后的水稻愈伤组织, 放在加有 6 mg/LPPT 的选择培养基上选择培养 6 周, 验证了 60 多株再生植株中无一假阳性出现。

### 2.2 转 Bar 基因作物解决直播(或抛秧)田的草荒问题

Bar 基因除作为选择标记外, 还能给作物带来抗除草剂的特性。使用与抗除草剂基因相配的除草剂, 能有效除去杂草, 大大减少劳动力, 且能解决直播(或抛秧)田的草荒问题。于志华等<sup>(51)</sup>采用基因枪法获得了抗性转 Bar 基因早稻植株, 有望解决早直播稻的田间杂草问题。1996 年在美国进行抗除草剂 Liberty 转基因水稻田间鉴定试验, 转基因水稻充分表达抗除草剂的特性, 能经济有效地控制包括红稻在内的一切田间杂草<sup>(52)</sup>。

### 2.3 Bar 基因有望解决作物杂交种子的纯度

严文贵 1996 年首次产生了将抗除草剂性状应用于作物杂种优势利用中的设想, 并申请了专利“WG. Y-98”<sup>(55)</sup>。肖国樱(1997)也提出利用抗除草剂基因解决两系杂交稻在制种过程出现的纯度问题<sup>(56)</sup>。黄大

年(1998)也提出了类似的设想<sup>[57]</sup>。将转 Bar 基因恢复系与不育系组配杂交组合,秧苗喷草丁膦药剂可有效清除伪杂种,从而保证大田生产纯度<sup>[45,47]</sup>。

#### 2.4 简化作物杂交种子纯度鉴定方法

以往异地种植花费时间过长,遗传分析(如酯酶法)耗资太多。而采用抗除草剂恢复系生产的杂交种子,只需一个简单发芽试验,在苗期喷药,花费仅几元钱就能区别出真假杂种,有效地防止假冒伪劣种子坑农害农。

#### 2.5 有利于选配强优势杂交组合

主要是因为该项技术的应用可放松不育系育性的要求,将育种精力集中在农艺性状的改良上,可以重新启用曾经被摒弃的一些配合力好但育性有欠缺的不育系,利于杂交组合的自由选配和提高杂交水稻的产量;同时可防止生产上的遗传脆弱性和流行病的发生。

#### 2.6 开拓了作物杂种优势的利用途径

目前,作物杂种优势的利用途径基本上是采用不育系与恢复系配制优良杂交组合用于农业生产。但有些母本不育系往往含有微效恢复基因(如水稻不育系 I-32A,龙特甫 A 等)或不育性状不够稳定(如农垦 58S 等),用它们配制的杂交种子中常常混有一定量的母本自交种子,这对作物产量有一定的负效应。况且,有些作物(如大麦、燕麦等)至今未能找到不育系,难以在生产中大面积利用其杂种优势。若采用以下措施有望解决上述问题。(1)在转 Bar 作物恢复系组配的杂交种子上涂上草丁膦作为种衣剂或在其苗期喷施该除草剂,可以保证杂种纯度 100%。(2)对常规品种实施化学杀雄,再与转 Bar 基因恢复系杂交,有望获得大量真杂交种。此外,以往用于优势预测的材料也多为不育系配制的杂交种,而化杀可研究正常品种之间的杂种优势情况,拓宽了优势预测的选材范围<sup>[58]</sup>。

当然,在发展抗除草剂基因工程的同时,必须密切注意抗性农作物与杂草可能发生自然杂交的问题、抗性农作物的生长势、品质和产量问题,抗性作物本身成为后茬作物的田间杂草的问题,抗性基因功能持续多久和转基因作物中的病毒基因重组问题、除草剂和抗性作物的费用以及环境对选用除草剂可接受的程度等有关农业生态平衡的问题<sup>[59]</sup>。

#### 参考文献:

[1] Rathore K S, Chowdhury V K, Hodges T K. Use of bar

as a selectable marker gene and for the production of herbicide-resistant rice plants from protoplasts [J]. *Plant Mol Biol*, 1993, **21**(5): 871—884.

[2] 苏少泉. 转基因抗除草剂作物品种的现状与展望[J]. 世界农业, 1998, **8**: 21—23.

[3] 张乐. 转基因水稻从实验室走向田野[N]. 光明日报, 2000年2月12日, 第18328号(代号1-16)A1版.

[4] 冬春. 我国转基因水稻完成大田试验示范[N]. 科学时报(农业周刊), 1999年10月8日, 第3期B2版.

[5] 黎垣庆, 刘刚, 严文贵, 等. 除草剂(草丁膦)抗性基因的遗传与利用[J]. 植物学报, 1999, **41**(12): 1348—1350.

[6] Thompson C J, Movva N R, Tizard R, et al. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus* [J]. *EMBOJ*, 1987, **6**: 2519—2523.

[7] Murakami T, Anzai H, Imai S, et al. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of the gene cluster [J]. *Mol Gen Genet*, 1986, **205**: 42—50.

[8] William H A. Herbicide handbook (seventh edition) [M]. Illinois: Weed Science Society of America, 1994. 147—149.

[9] 黄大年. 农作物抗除草剂遗传工程研究进展[J]. 生物工程进展, 1997, **17**(5): 14—17.

[10] Datta SK, Datta K, Soltanifar N, et al. Herbicide-resistant Indica rice plants from IRR1 breeding line IR72 after PEG-mediated transformation of protoplasts [J]. *Plant Mol Biol*, 1992, **20**(4): 619—629.

[11] Toki S, Susumu T, Chyuhei M, et al. Expression of a maize ubiquitin gene promoter-bar chimeric gene in transgenic rice plants [J]. *Plant Physiol*, 1992, **100**(3): 1503—1507.

[12] Cao Jun, Duan Xiaolan, David M, et al. Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells [J]. *Plant Cell Rep*, 1992, **11**(11): 586—591.

[13] Cornejo M J, Luth D, Blankenship K M, et al. Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice [J]. *Plant Mol Biol*, 1993, **23**(3): 567—581.

[14] Rao K V. Transient gene expression in electroporated immature embryos of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *J Plant Physiol*, 1995, **147**(1): 71—74.

[15] 黄大年, 朱冰, 杨焯, 等. 抗菌肽 B 基因导入水稻

- 及转基因植株的鉴定[J]. 中国科学(C 辑), 1997, 27(1): 55—62.
- [16] Park S H, Pinson S R, Smith R H. T-DNA integration into genomic DNA of rice following *Agrobacterium* inoculation of isolated shoot apices[J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 32(6): 1135—1148.
- [17] 于志华, 陈敏勇, 顾红雅, 等. 抗除草剂早稻转基因植株的获得[J]. 北京大学学报(自然科学版), 1996, 32(4): 499—504.
- [18] Bhattacharjee B, Gynheung A, Gupta H S. Fertile transgenic indica rice produced by expression of maize ubiquitin promoter-bar chimaeric gene in the protoplasts[J]. *J Plant Biochem and Biotechnol*, 1997, 6(2): 69—73.
- [19] Wakita Y, Otani M, Iba K, et al. Co-integration, co-expression and co-segregation of an unlinked selectable marker gene and NtFAD3 gene in transgenic rice plants produced by particle bombardment[J]. *Genes Genet Syst*, 1998, 73(4): 219—226.
- [20] 许新萍, 卫剑平, 范云六, 等. 基因枪法转化籼稻胚性愈伤组织获得可育的转基因植株[J]. 遗传学报, 1999, 26(3): 219—227.
- [21] Spencer T M, O'Brien J V, Start W G, et al. Segregation of transgenes in maize[J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 18(2): 201—210.
- [22] Register J C, Peterson D J, Bell P J, et al. Structure and function of selectable and non-selectable transgenes in maize after introduction by particle bombardment[J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 25(6): 951—961.
- [23] Palmer K E, Thomson J A, Rybicki E P. Generation of maize cell lines containing autonomously replicating maize streak virus-based gene vectors[J]. *Arch Virol*, 1999, 144(7): 1345—1360.
- [24] 杨书礼, 曾君祉, 吴有强, 等. 抗除草剂基因和荧光素酶基因在小麦愈伤组织中的稳定表达[J]. 植物学报, 1993, 35(11): 825—830.
- [25] Becker D, Bretschneider R, Loerz H. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue[J]. *Plant J*, 1994, 5(2): 299—307.
- [26] Karunaratne S, Anke S, Aidyn M, et al. Transformation of wheat with the gene encoding the coat protein of barley yellow mosaic virus[J]. *Aus J Plant Physiol*, 1996, 23(4): 429—435.
- [27] 傅荣昭, 曹光诚, 马江生, 等. 用基因枪法将人工雄性不育基因导入小麦的研究初报[J]. 遗传学报, 1997, 24(4): 358—361.
- [28] Witrzens B, Richard I S B, Fiona R M, et al. Comparison of three selectable marker genes for transformation of wheat by microprojectile bombardment[J]. *Aus J Plant Physiol*, 1998, 25(1): 39—44.
- [29] Stiff C M, Andrzej K, Zhou H P, et al. Stable transformation of barley callus using biolistic particle bombardment and the phosphinothricin acetyltransferase (bar) gene[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1995, 40(3): 243—248.
- [30] Jensen L G, Olsen O, Kops O, et al. Transgenic barley expression a protein-engineered, thermostable (1, 3-1, 4)-beta-glucanase during germination[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(8): 3478—3491.
- [31] Yao Q A, Ecaterina S, Manilal W, et al. Biolistic transformation of haploid isolated microspores of barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Genome*, 1997, 40(4): 570—581.
- [32] Cho M J, Wong J H, Marx C, et al. Overexpression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in barley grain[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(25): 14641—14646.
- [33] Padegimas L, Shulga O A, Skriabin K G. Creation of transgenic plants *Nicotiana tabacum* and *Solanum tuberosum*, resistant to the herbicide phosphinothricin [J]. *Mol Biol (Mosk)*, 1994, 28(2): 437—443.
- [34] 张中林, 山松, 陈曦, 等. 除草剂抗性基因 Bar 导入烟草叶绿体[J]. 作物学报, 1999, 25(5): 574—578.
- [35] Knapp S, Larondelle Y, Rossberg M, et al. Transgenic tomato lines containing Ds elements at defined genomic positions as tools for targeted transposon tagging[J]. *Mol Gen Genet*, 1994, 243(6): 666—673.
- [36] Casas A M, Kononowicz A K, Zebr U B, et al. Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(23): 11212—11216.
- [37] Pawlowski W P, Torbert K A, Rines H W, et al. Irregular patterns of transgene silencing in allohexaploid oat [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 38(4): 597—607.
- [38] Enriquoz-Obregon G A, Vazquez-Padron R I, Prieto-Samsonov D L, et al. Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidant compounds[J]. *Biotechnologia Aplicada*, 1997, 14(3): 169—174.

- [39] Carera-Ponce J L, Vegas-Garcia A, Herrera-Estrella L. Herbicide resistant transgenic papays plants produced by an efficient particle bombardment transformation method [J]. *Plant Cell Rep*, 1995, 15(1-2): 97-101.
- [40] Russell D R, Wallace K M, Bathe J H, et al. Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric-discharge mediated particle acceleration [J]. *Plant Cell Rep*, 1993, 12(3): 165-169.
- [41] Schroeder H E, Andrea H S, Terese W R, et al. Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum sativum* L.) [J]. *Plant Physiol (Rockv)*, 1993, 101(3): 751-757.
- [42] Keller G, Lori S, Dennis M, et al. Transgenic cotton resistant to herbicide bialaphos [J]. *Transgenic Research*, 1997, 6(6): 385-392.
- [43] Rubstova M A, Levenko B A, Taranenko L K, et al. Transfer of gene conferring herbicide bialaphos resistance into buckwheat plants [J]. *Biopolimery I Kletka*, 1997, 13(5): 416-418.
- [44] 吴明国, 黄大年, 林建荣, 等. 抗除草剂转基因水稻稳定系 TR4 的获得及其遗传研究 [J]. *中国水稻科学*, 1999, 13(3): 173-175.
- [45] 黎垣庆, 刘刚, 严文贵, 等. 转 bar 基因水稻除草剂抗性遗传研究及其应用 [J]. *杂交水稻*, 2000, 15(1): 40-43.
- [46] Cooley J, Ford T, Christou P. Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plants produced by electric-discharge particle acceleration [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 90: 97-104.
- [47] 章善庆, 童汉华, 薛锐, 等. 利用 bar 基因导入恢复系提高杂交稻纯度的尝试 [J]. *中国农业科学*, 1998, 31(6): 33-37.
- [48] Kumpatla S P, Teng W, Buchholz W G, et al. Epigenetic transcriptional silencing and 5-azacytidine-mediated reactivation of a complex transgene in rice [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115(2): 361-373.
- [49] Kumpatla S P, Hall T C. Longevity of 5-azacytidine-mediated gene expression and re-establishment of silencing in transgenic rice [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 38(6): 1113-1122.
- [50] 华志华, 黄大年. 植物转基因沉默研究与对策 [J]. *生命科学*, 1999, 11(2): 51-53.
- [51] Oard J H, Cock K A, Gomez J H, et al. Development, field evaluation, and agronomic performance of transgenic herbicide resistant rice [J]. *Mol Breeding*, 1998, 44(1): 67-70.
- [52] Norman R J, Johnston T H. Arkansas Rice Research Studies (Research Series 456) [M]. Arkansas: Arkansas Agri. Exp Sta, 1997. 12-16.
- [53] 贾士荣. 转基因植物食品中标记基因的安全性评价 [J]. *中国农业科学*, 1997, 30(2): 1-15.
- [54] Xu Deping, Xue Qingzhong, Duan X, et al. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, CpTi, in transgenic rice plants confers resistance to two major rice insect pests [J]. *Mol Breeding*, 1996, 2: 167-173.
- [55] Yan Wengui. Crop heterosis and herbicide. U. S. [M]. Patent and Trademark Office (PTO), 1997.
- [56] 肖国樱. 作物对除草剂的抗性及其在杂种优势利用中应用策略的探讨 [J]. *杂交水稻*, 1997, 12(5): 1-3.
- [57] Huang Danian, Zhang Shanqing, Xue Rui, et al. A new method to identify and improve the purity of hybrid rice with herbicide resistant gene [J]. *Chinese Rice Res Newsletter*, 1998, 6(1):
- [58] 段发平, 梁承邨, 黎垣庆. 水稻杂种优势预测方法的现状、问题与对策. *杂交水稻* [J], 2000, 15(2): 1-3.
- [59] 钱迎倩, 魏伟, 田彦, 等. 转基因作物在生产中的应用及某些潜在问题 [J]. *应用与环境生物学报*, 1999, 5(4): 427-433.