

三个方便实用的植物表达载体构建与验证

殷桂香^{1,2}, 赵佩², 郝浩楠³, 李捷琳², 杜丽璞², 张平治¹, 余茂云¹, 叶兴国²

(¹安徽省农业科学院作物研究所, 合肥 230031; ²中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与基因

改良国家重大科学工程, 北京 100081; ³长江大学农学院, 荆州 434023)

摘要:为满足植物功能基因组学研究及转基因安全性需要, 本研究根据一些国内外引进或商业化的植物表达载体及其相关元件, 构建了3个适合于植物, 尤其是单子叶植物转化的表达载体, 即 pAH006、pWMB022 和 pWMB025。pAH006 载体包含由玉米泛素 *ubi* 启动子调控的 *GUS* 基因和 *bar* 基因的完整 T-DNA 区域, 此区段能够被酶切回收, 可用于单子叶植物农杆菌介导转化效率评价及基因枪介导线状 DNA 转化效果研究; pWMB022 载体携带由双 35S 启动子调控的玉米色素基因 *Lc* 和 *C1*, 可用作基因枪介导的共转化筛选标记, 直观筛选含目标基因转基因材料; pWMB025 载体携带由 *ubi* 启动子调控的、商业化转基因植物中广泛利用的 *EPSPS* 基因, 可用于禾谷类作物农杆菌或基因枪介导的遗传转化, 载体多克隆位点可通过酶切方式更换目标基因。酶切鉴定结合农杆菌或基因枪介导的小麦幼胚愈伤组织或叶片转化验证此3个载体表明, 载体构建正确, 其标记基因、可视化基因和报告基因均能正常表达。这3个载体的构建对于小麦等植物转化效率提升、安全型转基因作物获得和植物功能基因组学研究等具有重要意义。

关键词:植物表达载体; 遗传转化; 标记基因; 生物安全

Construction and Validation of Three Convenient and Practical Constructs for Plant Transformation

YIN Gui-xiang^{1,2}, ZHAO Pei², HAO Hao-nan³, LI Jie-lin², DU Li-pu²,

ZHANG Ping-zhi¹, SHE Mao-yun¹, YE Xing-guo²

(¹Crop Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of

Agricultural Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement,

Beijing 100081; ³Agronomy College of Yangtze University, Jingzhou 434023)

Abstract: To enrich tools for plant functional genomics and to develop marker-free transgenic plants, three plasmid vectors, pAH006, pWMB022 and pWMB025, ideal for cereal transformation, were constructed in this study by using some publically available plasmids. The vector pAH006 could be used to improve the *Agrobacterium* mediated transformation system on monocot plants and to evaluate the biolistic particle mediated transformation efficiency of linear transgene expression cassette on which both *GUS* and *bar* genes were controlled by the *ubi* promoters. The intact T-DNA region could be easily recovered by enzyme digestion. The vector pWMB022 carried maize pigment regulatory genes *Lc* and *C1* under the control of double 35S promoters, which could be used to visually screen positive calli or shoots when co-bombarded with other expression vectors containing genes of interest. The vector pWMB025 carried the glyphosate-resistant gene *EPSPS* regulated by the *ubi* promoter and could be used in *Agrobacterium*- or biolistic-mediated transformation of cereal plants to generate bio-safely transgenic materials. Genes of interest could be easily cloned into the multiple cloning site (MCS) between the *ubi* promoter and the *nos* termina-

收稿日期: 2014-06-28 修回日期: 2014-08-02 网络出版日期: 2014-10-13

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20141013.2026.010.html>

基金项目:农业部“948”项目(2013-S3); 安徽省农业科学院科技创新团队项目(13C0202); 安徽省种子工程项目(14D0202)

第一作者主要从事植物遗传转化研究。E-mail: guixiangyin@126.com; 赵佩为共同第一作者

通信作者: 余茂云, 主要从事作物营养代谢与逆境胁迫分子机理研究。E-mail: ahxiaoshe@126.com

叶兴国, 主要从事小麦生物技术育种研究。E-mail: yexingguo@caas.cn

tor on pWMB025 by enzyme digestion. All three vectors were confirmed by enzyme digestion and then tested in *Agrobacterium*-or biolistic-mediated transformation by using wheat immature embryos derived calli or leaves as explants. It was showed that all three vectors were constructed successfully, and the selectable reporter/visual genes worked efficiently. Construction of these three expression vectors would be important for the improvement of transformation efficiency of some recalcitrant cereals such as wheat, development of bio-safely transgenic crop varieties, and plant functional genomics.

Key words: plant expression vector; genetic transformation; marker gene; biosafety

粮食是人类生存的基本保障,利用转基因手段培育农作物新品种是现代农业发展的必然选择。尽管目前已有一些转基因植物得到审批和大规模种植,但转基因植物的食用安全性和环境安全性依然存在争议^[1]。另外,主要粮食作物如小麦等的转化效率还比较低,一定程度上限制了转基因品种的研发。因此,亟待构建一些无选择标记、携带安全型选择标记和目标基因高效表达的载体,提升转基因作物的安全性^[2]。

利用位点特异性重组技术^[3]、转座子介导的剔除^[4]和共转化后分离技术^[5]可去除筛选标记基因。然而,这些技术与方法或因操作困难,或因效率较低,很难在植物转基因研究中得到广泛应用。有报道利用 Cre/loxP 系统和热激处理技术成功从一些转基因植物后代中剔除了选择标记基因^[6-7]。这 2 种方法具有操作简单和剔除效率高等特性,如在 Cre/loxP 系统中,仅在培养基中添加 β -雌二醇,29% 的转基因水稻植株呈现无选择标记和单一整合位点特性,降低了基因组重排及产生表型异常植株的风险^[6],有助于外源基因高效表达^[8]。Y. Wang 等^[7]研究发现,利用自我切除系统,经过 3 次 42 °C 热激处理烟草叶片 2 h 可有效去除转基因烟草中的选择标记基因,该技术具有很好的应用前景。然而,目前在主要粮食作物如小麦、水稻及玉米中,鲜有采用叶片获得遗传转化成功的报道,因此,该技术能否成功运用于粮食作物值得进一步研究。

在水稻、小麦等作物中,有报道利用基因枪介导的线性表达框技术获得无载体骨架序列转基因植株^[9-11]。然而,线性 DNA 片段转入植物细胞后,所携带的目标基因能否正常表达缺乏直接的证据。另外,目前所用的绝大多数载体,包括一些商品化的载体如 pCambia 载体系列 (<http://www.cambia.org/>),很难利用酶切方式回收目的基因表达盒,不利于转基因植物中非目标载体片段去除。可视化报告基因在农杆菌介导转化小麦和大麦中已有成功的报道^[12]。但对于一些禾本科谷类作物而言,基因枪

介导是更为常用的转化方法^[11,13-14],然而目前还没有适用于基因枪转化的、带有可视化报告基因的表达载体。此外,安全型筛选标记已用于植物转基因研究,如利用磷酸甘露糖异构酶编码基因 (pmi, phosphomannose isomerase) 作为筛选标记,不仅获得了硬粒小麦 (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) 转基因植株,而且筛选率高达 90%^[15]。水稻方面,利用控制水稻组织培养再生性能的水稻铁氧还蛋白亚硝酸盐还原酶 (Nir, ferredoxin-nitrite reductase) 作为筛选标记基因,根据转基因后代组织培养再生性能差异成功筛选到转基因水稻植株^[16]。同时,利用植物源乙酰乳酸合成酶 (ALS, acetolactate synthase) 突变体作为筛选标记提高了转基因水稻对双草醚 (bispribac sodium)、嘧草硫醚 (pyrithiobac sodium)、嘧草醚 (pyriminobac) 耐性,分别达到非转基因水稻的 1.6 万倍、9100 倍及 1.3 万倍^[17-18]。研究表明,植物来源的 5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶 (EPSPS, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) 也具有筛选功能,其原理是通过补偿被草甘膦破坏的植物内源 EPSPS 酶而表现抗草甘膦毒性^[19],该酶已在烟草、油菜等转基因研究中成功应用^[20-22]。然而,在小麦等较难转化植物中的研究还比较少,缺乏适宜的表达载体是其原因之一。因此,利用植物源筛选标记进行转基因植物筛选,将在未来的转基因研究中得到重视。

本研究根据已有的载体骨架、报告基因、标记基因成功构建了 pAH006、pWMB022 和 pWMB025 3 个植物表达载体,这些载体在转基因技术体系改进和获得安全型转基因植物方面将具有很好的应用前景,对促进主要农作物转基因品种研发和安全性提升具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 受体材料和质粒载体

受体材料为小麦品种科农 199 (*Triticum aestivum* cv. Kenong199),由本实验室保存,主要取其叶

片和幼胚来源的愈伤组织用于基因枪或农杆菌介导的转化,验证载体基因表达。

pBECKS. red 载体^[12] (本研究载体改造过程利用其色素合成调控基因 *Lc* 和 *Cl*) 由南京农业大学陈佩度教授提供; pTCK303 载体^[23] (本研究载体改造过程利用其 *ubi-nos* 空表达盒构建 pWMB003 和 pWMB017) 由山东农业大学张宪省教授提供; pZP201^[24] (本研究载体改造过程利用其完整骨架)、pPTN290^[25] (本研究载体改造过程利用其 *GUS* 基因) 由美国内布拉斯加州大学 Tom Clemente 教授提供; pUC18 (本研究载体改造过程利用其完整骨架) 购自大连宝生物公司; pBluescriptII KS(-) (本研究载体改造过程利用多克隆位点) 由中国农业科学院作物科学研究所徐兆师博士提供; *EPSPS* 基因序列由吉林农科院生物技术中心马瑞研究员提供; pCAMBIA3301 (本研究载体改造过程利用其 *bar* 基因)、pWMB003 (本研究载体改造过程利用其 *ubi* 启动子和 *nos* 终止子)、pWMB017 (本研究载体改造过程利用其完整骨架) 和 pWMB021 (本研究载体改造过程利用其 *Lc* 完整表达盒) 载体由本实验室构建或保存。Trans-T simple 测序载体和大肠杆菌菌株 DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司, 各种限制性内切酶购自大连宝生物公司, 其他国产分析纯生化试剂购自北京拜尔迪生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 pAH006 构建流程 为方便验证单子叶植物基因枪及农杆菌介导的遗传转化效率, 将来自 pPTN290 载体的 *GUS* 报告基因及 pCAMBIA3301 载体的 *bar* 筛选标记分别构建到 pWMB003 载体上 *ubi* 驱动的表达框中, 然后将 2 个表达盒串联, 并在两端添加用于农杆菌介导转化的必要元件 LB (left border) 和 RB (right border), 并在 LB 的 5' 端和 RB 的 3' 端分别添加 *EcoRI* 和 *NotI* 酶切位点后, 最后连接到 pUC18 载体上, 具体构建流程如下。

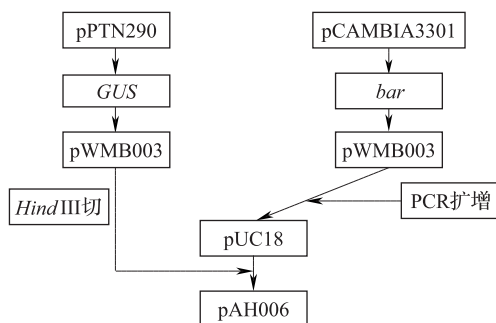


图1 pAH006 构建流程

Fig. 1 Procedures for the construction of pAH006

1.2.2 pWMB022 构建流程 基于携带玉米色素调控基因 *Lc* 和 *Cl* 的 pBECKS. red 植物表达载体, 将花青素 *Lc* 基因连入 pUC18 载体, 命名为 pWMB021, 再将 *Cl* 连入, 产生 pWMB022 载体, 用于基因枪共转化单子叶植物, 构建流程如下。

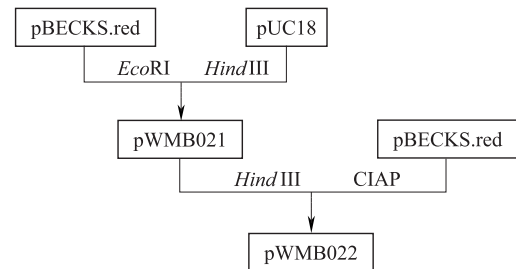


图2 pWMB022 构建流程

Fig. 2 Procedures for the construction of pWMB022

1.2.3 pWMB025 构建流程 鉴于转基因植物安全性的考虑, 利用来源于植物的 *EPSPS* 基因, 构建用于基因枪共转化植物的 pWMB025 载体, 为了验证该载体的转化效果, 将 *GUS* 基因连入, 产生 pWMB025, 构建步骤如下。

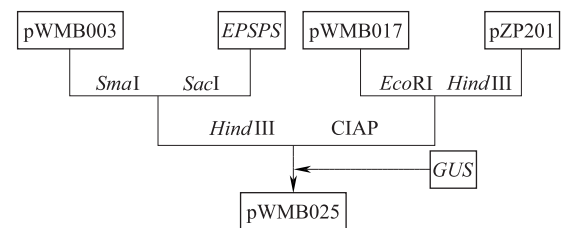


图3 pWMB025 构建流程

Fig. 3 Procedures for the construction of pWMB025

1.2.4 载体的转化验证 小麦幼胚愈伤组织诱导。取小麦开花后 13 ~ 14 d 未成熟子粒, 用 70% 乙醇灭菌 1 ~ 2 min, 15% NaClO 灭菌 15 min, 无菌水冲洗 3 ~ 4 次, 取其幼胚, 盾片向上接种到 SD₂ 培养基上^[14], 25 °C 暗培养 1 周后转移到高渗培养基 (SD₂ 培养基添加山梨醇和甘露醇各 36.5 g/L) 上处理 4 ~ 6 h 后基因枪轰击。

转化小麦叶片制备。取小麦旗叶, 洗净处理后平摊于 SD₂ 培养基上, 基因枪直接轰击。采用 PDS-1000/He 基因枪转化系统 (Bio-Rad, USA), 压力为 1100 psi (pressure square inch), 轰击距离 6 cm, DNA 浓度 1 μg/μL。

GUS 基因瞬时表达分析。取基因枪转化后、暗培养 24 h 左右的愈伤组织, 放入预先加入 500 μL X-Gluc 染色液的 1.5 mL 离心管中, 37 °C 温育 12 ~

因的 pWMB022 载体(图 6),其上的 *Lc* 和 *Cl* 基因均由 CaMV35S 启动子调控,适用于基因枪介导与目标功能基因共转化,*Hind*III 和 *Eco*RI 酶切验证该载体构建正确(图 7a)。利用基因枪将 pWMB022 载体转化小麦幼胚愈伤组织及旗叶,发现转化后在小麦幼胚和叶片中均可观察到花青素的明显积累(图 7b 和 7d),图 7c 为与图 7b 生理状态一致的愈伤组织,表明 pWMB022 载体上的 *Lc* 及 *Cl* 基因已在小麦组织中正常表达,即 pWMB022 载体上的 *Lc* 和 *Cl* 基因及其调控元件完整,可用于基因枪介导的共转化研究,直观筛选转化的愈伤组织或植株。

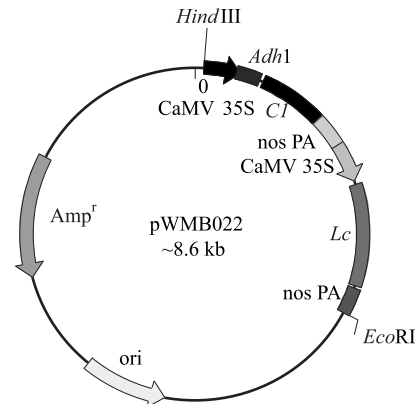
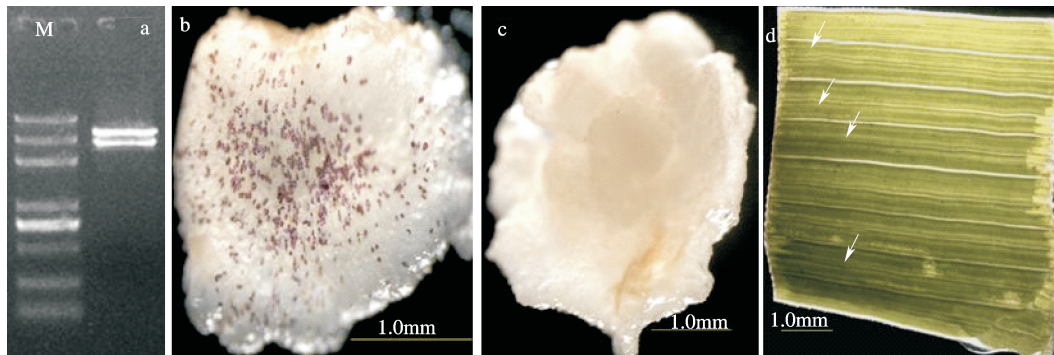


图 6 pWMB022 载体构造

Fig. 6 Construct map of pWMB022 vector



a:*Hind*III 和 *Eco*RI 酶切检测;M;Trans2000 Plus DNA ladder;

b:pWMB022 转化小麦幼胚表型;c:未转化小麦幼胚对照;d:转 pWMB022 载体小麦叶片

a:pWMB022 digested by *Hind*III and *Eco*RI, M:Trans2000 Plus DNA ladder, b:The expression of pWMB022 in transformed wheat immature embryos, c:Untransformed wheat immature embryos, d:The expression of pWMB022 on the transformed wheat leaf

图 7 pWMB022 载体酶切检测及转化验证

Fig. 7 Validation of the pWMB022 construct using enzyme digestion and transformation approaches

2.3 pWMB025 载体的构建及转基因验证

将 *EPSPS* 基因的 ORF (open reading fragment) 连接到 pWMB003 载体 *ubi* 启动子下游构成完整表达盒,再将该表达盒插入到改造的 pZP201 上 (T-DNA 区域含有多克隆位点,多克隆位点处插入了 *ubi* 启动子和 *nos* 终止子构成的空表达盒),可方便将目标基因插入到 *ubi-nos* 的空表达盒中,实现筛选标记与目标基因同处于一个 T-DNA 区段。为了验证 *ubi* 启动子调控的 *EPSPS* 基因的表达效果,将 *GUS* 基因 *ubi-nos* 的空表达盒中,构建了表达载体 pWMB025 (图 8),*Hind*III 酶切验证该载体构建正确 (图 9a)。利用基因枪和农杆菌介导法将 pWMB025 载体转化小麦幼胚愈伤组织。组织化学染色结果表明,pWMB025 载体上的 *GUS* 基因能够正常表达 (图 9b 及 9c),证明 pWMB025 载体可以用于小麦等植物转基因研究。进一步将转化后的小麦幼胚愈伤组织放在含有草甘膦的筛选培养基上培养,一些愈伤

组织对草甘膦表现抗性并进一步分化绿芽,而另一些愈伤组织对草甘膦没有抗性而趋于死亡 (图 9d),证明 pWMB025 载体上的 *EPSPS* 基因表达盒能够正常工作。

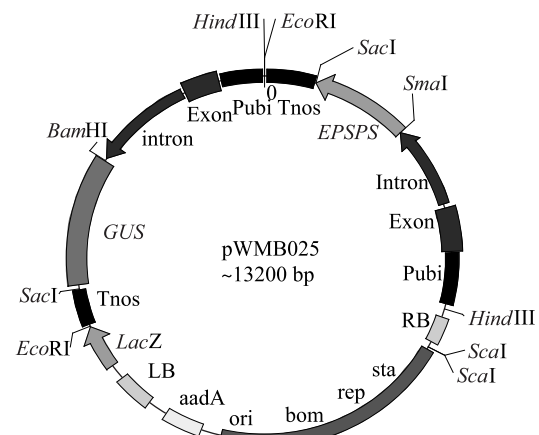
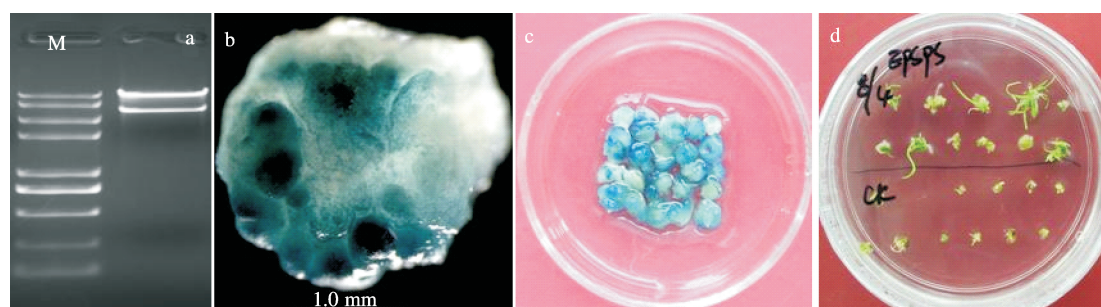


图 8 pWMB025 载体构造

Fig. 8 Construct map of pWMB025 vector



a: *Hind*III 酶切检测; M: Trans2000 Plus II DNA ladder; b: 基因枪介导转化小麦幼胚 *GUS* 染色; c: 农杆菌介导转化小麦幼胚 *GUS* 染色; d: 农杆菌介导转化小麦幼胚后草甘膦筛选

a: pWMB022 digested by *Hind*III, M: Trans2000 Plus II DNA ladder, b: *GUS* staining of wheat immature embryos subjected to biolistic-mediated transformation, c: *GUS* staining of wheat immature embryos subjected to *Agrobacterium*-mediated transformation, d: Glyphosate-based screening of putative transgenic plants by *Agrobacterium*-mediated transformation

图 9 pWMB025 载体酶切检测及转化验证

Fig. 9 Validation of the pWMB025 construct using enzyme digestion and transformation approaches

3 讨论

随着转基因技术的快速发展及其在很多作物上的成功运用,公众对转基因作物的食用安全性和环境安全性提出更高要求。然而,在目前获得的大部分转基因材料中,目的基因和细菌来源的选择标记基因共存,为进一步安全评价和商业化种植带来隐患,势必提升对转基因过程的安全性要求。

不论是农杆菌介导,还是基因枪介导的遗传转化,早期的研究都是将标记基因和目标基因或完整质粒直接转入受体植物,从而出现植物表达载体中无关片段整合到受体植物基因组,影响转基因植物的食用安全性。因此,尽可能减少表达载体上无关片段整合的发生是提升转基因安全性的一个重要方面^[26]。基因枪介导的线性片段转化无疑是提升转基因安全性的一个重要策略。然而,目前大部分植物转化载体很难满足这一要求,即很难通过酶切方法将目的基因与载体其他部分有效分离。另一方面,鉴于菌源筛选标记基因对于转基因安全性的弊端,挖掘植物源的筛选标记或报告基因进行转基因后代筛选,也是增加转基因安全性的一个重要策略。为此,本研究构建了 3 个植物表达载体: pAH006、pWMB022 和 pWMB025,在目标基因表达盒分离和转基因植株快速、安全筛选方面具有独特优势,对于未来植物遗传转化,特别是单子叶植物转化,具有操作简单、筛选方便、表达高效等特点。

可视化标记基因易于在转化后的较早时期直接对转化效果进行评价,对转入目标基因的愈伤组织或再生芽进行直观筛选^[12]。常用的可视化标记基

因主要有 *GUS*^[27]、*CI/Lc*(与植物体内花青素累积有关)和 *GFP*^[28](*Aequorea victoria* L.)。 *GUS* 基因尽管在检测上十分方便,也无需复杂操作和昂贵设备,但来源于菌类的 *GUS* 基因,对于转基因植物安全性来说仍然具有争议。 *GFP* 基因虽然也具有很好的可视化效果,但肉眼难以确认,必须借助共聚焦及其他荧光显微镜方可观察。相比之下,与植物花青素合成或体内累积有关的基因,如 *CI/Lc*、*MYB10*^[29]和 *PAP/MYB75*^[30]等,由于完全来源于植物自身,且含花青素的植物对人体健康有利,具有一定抗癌作用^[31],因而备受关注。研究表明, *CI* 及 *Bperu* 基因能调控花青素基因在小麦及小黑麦中的积累,且在无筛选压力的情况下,这两种作物的转化效率分别达 1.55% 和 0.93%,且花青素在转基因后代中积累少,因而不会产生不利表型^[32]。 A. Kortstee 等^[29]发现,花青素积累与转基因阳性植株存在必然性,即存在花青素积累的转基因植株必然是阳性的,但阳性转基因植株后代未必一定存在花青素累积,原因是随着转化后培养时间的延长,植物色素的积累逐渐降低。因此,本研究构建的含 *Lc* 和 *CI* 色素基因的 pWMB022 载体,可利用基因枪与其他含目标基因的载体共转化获得转基因植株, *T₁* 或更高世代中色素基因将与目标基因分离,可获得只含有目标基因而不含色素基因的转基因植株,排除了获得“彩色”转基因植物的顾虑。

从转基因安全角度看,菌类来源的抗性基因需要与目的基因分开整合到植物基因组中,有利于从转基因后代中筛选出无筛选标记基因的转基因植株。然而,这种分开整合方式会导致大量含目的基

因但不含筛选标记基因的阳性植株在早期被淘汰,影响最终的转化效率,造成财力、物力及人力浪费。相比之下,植物来源的抗性标记基因较容易被公众接受。草甘膦抗性转基因作物已得到商业化生产,包括抗草甘膦油菜、玉米、大豆及棉花^[33]。在小麦中,*gox* (glyphosate oxido reductase) 和 *cp4epsps* 共转化赋予小麦草甘膦抗性^[34]。同时,研究发现,*gox* 单独作为植物筛选标记利用时,虽然也能获得抗性再生植株,但筛选效率不高^[35]。因此,既能减少载体上不必要的基因,又可获得理想的筛选效果,对于转化效率提高和转基因安全性评价的顺利通过具有重要意义。本研究构建了来源于植物的抗草甘膦 *EP-SPS* 基因枪共转化载体,以小麦幼胚为材料初步验证了转化效果,认为该载体可用于基因枪转化小麦研究。

参考文献

- [1] König A. A framework for designing transgenic crops-science, safety and citizen's concerns [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21: 1274-1279
- [2] Bhalla P L. Genetic engineering of wheat-current challenges and opportunities[J]. Trends Biotechnol, 2006, 24: 305-311
- [3] Srivastava V, Ow D W. Marker-free site-specific gene integration in plants[J]. Trends Biotechnol, 2004, 22: 627-629
- [4] 高翔, 别晓敏, 余茂云, 等. 安全型转基因植物培育技术研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(4): 607-612
- [5] Puchta H. Marker-free transgenic plants[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2003, 74: 123-134
- [6] Sreekala C, Wu L, Gu K, et al. Excision of a selectable marker in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using a chemically regulated Cre/loxP system[J]. Plant Cell Rep, 2005, 24: 86-94
- [7] Wang Y, Chen B, Hu Y, et al. Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the Cre/lox site-specific recombination system[J]. Transgenic Res, 2005, 14: 605-614
- [8] Coppoolse E R, de Vroomen M J, Roelofs D, et al. Cre recombinase expression can result in phenotypic aberrations in plants [J]. Plant Mol Biol, 2003, 51: 263-279
- [9] 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[J]. Mol Breed, 2002, 9: 231-244
- [10] Shi N N, He G Y, Li K X, et al. Transferring a gene expression cassette lacking the vector backbone sequences of the *Lx1* high molecular weight glutenin subunit into two Chinese hexaploid wheat genotypes[J]. J Integr Agric, 2007, 6: 381-390
- [11] 肖乐乐, 杜丽璞, 王珂, 等. 基因枪转化小麦主要影响因素细述[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(4): 850-858
- [12] McCormac A C, Wu H, Bao M, et al. The use of visual marker genes as cell-specific reporters of *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery to wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Euphytica, 1998, 99: 17-25
- [13] 叶兴国, 陈明, 杜丽璞, 等. 小麦转基因方法及其评述[J]. 遗传, 2011, 33(5): 422-430
- [14] 徐惠君, 庞俊兰, 叶兴国, 等. 基因枪法向小麦导入 *Nib8* 黄花叶病毒复制酶基因的研究[J]. 作物学报, 2001, 27(6): 688-693
- [15] Gadaleta A, Giancaspro A, Blechl A, et al. Phosphomannose isomerase, *pmi*, as a selectable marker gene for durum wheat transformation[J]. J Cereal Sci, 2006, 43: 31-37
- [16] Ozawa K, Kawahigashi H. Positional cloning of the nitrite reductase gene associated with good growth and regeneration ability of calli and establishment of a new selection system for *Agrobacterium*-mediated transformation in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Sci, 2006, 170: 384-393
- [17] Ogawa T, Kawahigashi H, Toki S, et al. Efficient transformation of wheat by using a mutated rice acetolactate synthase gene as a selectable marker[J]. Plant Cell Rep, 2008, 27: 1325-1331
- [18] Okuzaki A, Shimizu T, Kaku K, et al. A novel mutated acetolactate synthase gene conferring specific resistance to pyrimidinyl carboxy herbicides in rice[J]. Plant Mol Biol, 2007, 64: 219-224
- [19] 李欣, 杜丽璞, 殷桂香, 等. 转 *bar* 基因小麦和非转基因小麦抗除草剂鉴定方法比较[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(4): 596-600
- [20] Wang H Y, Li Y F, Xie L X, et al. Expression of a bacterial *aroA* mutant, *aroA-M1*, encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase for the production of glyphosate-resistant tobacco plants [J]. J Plant Res, 2003, 116: 455-460
- [21] Wang J X, Li Y H, Liang C. Recovery of transgenic plants by pollen-mediated transformation in *Brassica juncea* [J]. Transgenic Res, 2008, 17: 417-424
- [22] Bruggeman A J, Kuehler D, Weeks D P. Evaluation of three herbicide resistance genes for use in genetic transformations and for potential crop protection in algae production[J]. Plant Biotechnol J, 2014, doi:10.1111/pbi.12192
- [23] Wang Z, Chen C B, Xu Y Y, et al. A practical vector for efficient knockdown of gene expression in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Mol Biol Rep, 2004, 22: 409-417
- [24] Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation[J]. Plant Mol Biol, 1994, 25: 989-994
- [25] Howe A, Sato S, Dweikat I, et al. Rapid and reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum[J]. Plant Cell Rep, 2006, 25: 784-791
- [26] 董志峰, 马荣才, 彭于发, 等. 转基因植物中外源非目的基因片段的生物安全研究进展[J]. 植物学报, 2001, 43(7): 661-672
- [27] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the gene fusion system[J]. Plant Mol Biol Rep, 1987, 5: 387-405
- [28] Chiu W L, Niwa Y, Zeng W, et al. Engineered *GFP* as a vital reporter in plants[J]. Curr Biol, 1996, 6: 325-330
- [29] Kortstee A, Khan S, Helderma C, et al. Anthocyanin production as a potential visual selection marker during plant transformation [J]. Transgenic Res, 2011, 20: 1253-1264
- [30] Zhou L L, Zeng H N, Shi M Z, et al. Development of tobacco callus cultures over expressing *Arabidopsis PAP/MYB75* transcription factor and characterization of anthocyanin biosynthesis[J]. Planta, 2008, 229: 37-51
- [31] Butelli E, Titta L, Giorgio M, et al. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors[J]. Nat Biotechnol, 2008, 26: 1301-1308
- [32] Doshi K M, Eudes F, Laroche A, et al. Anthocyanin expression in marker free transgenic wheat and triticale embryos [J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 2007, 43: 429-435
- [33] Miki B, McHugh S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety[J]. J Biotechnol, 2004, 107: 193-232
- [34] Zhou H, Arrowsmith J W, Fromm M E, et al. Glyphosate-tolerant *CP4* and *GOX* genes as a selectable marker in wheat transformation[J]. Plant Cell Rep, 1995, 15: 159-163
- [35] Howe A R, Gasser C S, Brown S M, et al. Glyphosate as a selective agent for the production of fertile transgenic maize (*Zea mays* L.) plants[J]. Mol Breed, 2002, 10: 153-164