

文章编号:1003-8701(2013)02-0036-06

作物抗逆转基因工程研究进展

孙 卉^{1,2}, 韦正乙², 邢少辰^{2*}

(1. 吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118; 2. 吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 长春 130033)

摘 要: 由于植物本身不能自主移动, 受此限制, 在其生长发育过程中, 周围环境的逆境条件常常会对其生存造成不利影响。通常所说的逆境是指非生物逆境和生物逆境。前者包括干旱、盐碱、极端温度(如高温和低温)、有害化学物质等, 后者包括病害(如病毒病、细菌病、真菌病等)和虫害等。增强作物抵御逆境能力一直是科技工作者研究的重点领域, 而通过转基因手段提高作物抗逆水平是一条行之有效的途径。本文收集整理了此领域最新的研究进展, 选择其中具有代表性的突出事例, 分非生物逆境和生物逆境两个方面做一简要综述, 以期为推动作物抗逆领域的科学研究提供有益信息。

关键词: 作物; 基因工程; 抗逆; 生物胁迫; 非生物胁迫

中图分类号: Q789

文献标识码: A

Advances in Genetically Improving Resistance to Environmental Stress of Crops

SUN Hui^{1,2}, WEI Zheng-yi², XING Shao-chen²

(1. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118;

2. Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences,
Changchun 130033, China)

Abstract: During its complete life cycle, plant is more vulnerable to natural environment because it unable to move initiatively. Environmental stress generally were classified into two groups which are abiotic like drought, salinity, extreme temperature, poison chemicals, and biotic like disease and insect. It has been a key challenge for the scientists to enhance the ability of resistance to environmental stress and transgenic engineering no doubt is a potential means to achieve this goal. The latest advances of researches including abiotic and biotic stress accordingly were reviewed in the paper in order to provide researchers informative insights and push forward the study of stress resistance in crops.

Keywords: Crops; Gene engineering; Stress resistance; Biotic stress; Abiotic stress

植物的整个生长周期可能会遇到如温度骤变、干旱、病虫害侵袭等各种各样不良的环境条件, 因此极易受到这些不利因素的影响。通常情况下, 这些生物和非生物逆境往往会导致作物产量降低、品质下降等一系列不良后果。目前, 全球约

有 150 种大规模生产的农作物, 90% 以上的产量来自其中的 82 种^[1]。随着全球人口的不断增加, 对各种作物产品的需求, 特别是粮食需求越来越大。为了收获更多的作物产品, 进行抗逆育种, 提高作物抵御逆境的能力显得非常必要和迫切。转基因技术可以将很多优良的抗性基因异源表达, 使受体植物获得相应的抗性, 创制具有特定性状的新种质, 拓宽遗传资源, 为培育转基因作物新品种提供基础材料。从第一株转基因植物诞生以来, 植物转基因技术取得了飞速的发展。截止到 2011 年, 全球转基因作物种植面积达到了 1.6 亿 hm², 相当于我国耕地面积的 1.3 倍, 总产值超过 1700

收稿日期: 2013-01-10

基金项目: 吉林省科技发展规划项目(20076021); 吉林省科技厅国际科技合作项目(20110753)

作者简介: 孙 卉(1987-), 女, 在读硕士, 主要从事植物分子生物学与基因工程研究。

通讯作者: 邢少辰, 男, 研究员, 博士,

E-mail: xingsc64@yahoo.com.cn

亿美元,转基因作物种植国家总数达 29 个。从一个方面证明转基因在生物技术领域具有广阔的发展前景,是当前条件下一个有效且不可替代的途径。本文收集整理了近年来作物抗逆转基因领域的研究进展,结合自身的研究工作进行了总结。

1 非生物逆境方面的研究

1.1 耐低温

低温(包括冷害和冻害)是影响作物生长的重要不利因素,它可以降低作物产量,严重的低温甚至造成作物死亡,因而如何利用转基因手段提高作物的耐低温能力越来越受到重视。作物可以通过冷驯化刺激特定基因的表达,提高其耐低温能力,这些特定的基因包括非调控基因和调控基因。

非调控基因是一类功能性基因,可以通过发挥其活性产物的功能而直接提高植物的抗寒性。抗冻蛋白(Antifreeze protein, AFP)能在不影响有机体熔点的情况下降低水溶液的冰点,使它们之间产生差值,从而增加有机体的抵抗低温胁迫的能力。动物来源的 AFP 基因导入玉米^[2]、番茄^[3]、烟草^[4]等植物,显示 AFP 的表达量和植物抗寒性呈正相关。将从小胸鳖甲中克隆的抗冻蛋白基因 *MPAFP149* 转入烟草中,经 -1°C 处理 2 d,转基因植株可以恢复正常生长,而非转基因植株则受到了不可逆的低温冻害伤害^[5]。热击蛋白(Heat shock protein, HSP)在植物抗冷中也能发挥重要作用。植物在非生物逆境中,热击蛋白能够起到维持蛋白结构稳定的作用。Li 等^[6]将甜辣椒中的 *CaHSP26* 基因导入烟草中,提高烟草的抗寒性。

与非调控基因不同,调控基因可以控制低温信号的传导、基因的表达以及合成蛋白的活性。CBF(CRT/DRE-binding factor)蛋白是在植物耐低温中的重要转录因子。从耐低温的北高丛蓝莓蓝丰中克隆一个 CBF 编码基因 *BB-CBF*,将其转入低温敏感型的南高丛蓝莓中,可以提高其耐低温的水平^[7]。不同来源的 *CBF1* 基因还被转入到番茄^[8]、烟草和油菜^[9]等植物中,发现获得的这些转基因植株中,过氧化氢酶的活性显著提高,同时脯氨酸含量明显增加,而转基因植物的抗寒能力也得到明显增强。外源 *CBF3* 转化水稻^[10],*CBF4* 转化辣椒^[11]都证明 CBF 基因可以明显提高转基因植株耐低温胁迫的能力。

1.2 抗旱

随着人类活动的增加,加剧了全球气候的异常变化,而干旱则是诸多因素中的最突出一个,应

对干旱威胁是农业生产中面临的严峻挑战。因此,利用转基因技术将与干旱有关的基因导入作物,进而培育抗旱品种,是植物转基因研究的热点之一。Dong 等^[12]把 6-磷酸海藻糖合成酶(trehalose-6-phosphate synthase, *TPS*)基因转入玉米,田间实验的结果显示,转基因玉米的抗旱性得到了提高。另一个研究表明,在棉花中表达来源于拟南芥的 *AtSAP5* 基因,当受到干旱胁迫时,转基因棉花可以更好地渡过幼苗期和叶片发育时期,原因可能是干旱处理后,转基因植株的光系统 II 复合物能够被完整地保护起来,使其在中午时分免受光损伤,而野生型对照则下降了 20%。*AtSAP5* 基因是一个与胁迫有关的基因,其序列含 A20/AN1 锌指结构^[13]。

前人已有大量的研究证明,在非生物逆境条件下,植物做出的应答反应是一个非常复杂的调控网络,其中 DREB (dehydration resistance element binding protein)转录因子在此调控网络中起重要作用。最新的研究结果再次说明 DREB 转录因子在抗旱研究中的明显效果,如 Sarah 等^[14]在小麦和大麦中过表达 *TaDREB2* 和 *TaDREB3* 基因,在干旱胁迫的条件下,证明转基因植株比非转基因植株表现出更强的生存能力,且具有明显的抗寒性。Takuma 等^[15]将源于拟南芥的 *AtDREB1C* 在水稻 *lip9* 启动子的驱动下转入水稻,在中度和重度干旱条件下,转基因后代比非转基因植株均表现出更好的生长状态。说明此转录因子在逆境调控机制中起到的多样化作用。

1.3 耐盐碱

全球盐碱地分布非常广泛,遍及六大洲 30 多个国家,总面积约 9.56 亿 hm^2 。尽管盐碱地治理是一个世界性难题,但是人们在盐碱地的改良上一直也没有停止探索。从另一个角度看,盐碱地治理是一方面,我们也可以提高植物适应盐碱环境的能力,从而提高盐碱地的利用率。随着生物技术的深入发展和手段的不断完善,利用转基因技术培育耐盐碱作物新品种成为可能并在未来发挥作用。

植物在受到盐胁迫时,植物体内会积累甜菜碱来减缓逆境胁迫造成的伤害,而甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, *BADH*)是甜菜碱生物合成过程中的关键酶。最近的研究表明,将该基因转入马铃薯^[16]中,增加了转基因植株的耐盐性。山菠菜 *AhBADH* 基因导入水稻^[17]和棉花^[18]中,在盐胁迫下转基因植株比非转基因植株的细胞膜

结构更加稳定,表现出明显的耐盐性。将其他来源的 *BADH* 基因转入花生^[19]、棉花^[20]和苜蓿^[21]中,转基因植株在 NaCl 胁迫条件下仍生长良好,而非转基因植株则最终死亡。除了细胞核转化之外,将 *BADH* 基因转入植物叶绿体中也有令人瞩目的表现。Shashi 等^[22]把 *BADH* 基因转入胡萝卜叶绿体,转基因植株即使在高达 400 mM 的 NaCl 条件下仍能正常生长,是目前转基因植物中耐 NaCl 水平最高的文献报道。

植物体内的液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 (Na^+/H^+ antiporter or exchanger, NHX) 在植物耐盐生理中发挥重要作用^[23]。Li 等^[24]把从耐盐植物苏打猪毛菜中分离的 *SsNHX1* 基因转入紫花苜蓿中,获得的转基因苜蓿也可以在高达 400 mM 的 NaCl 条件下生存 50 d 以上。从碱蓬^[25]中克隆的 *ScNHX1* 基因和 *ScVP* 基因共同转入紫花苜蓿中,与野生型对照比较,由于转基因植株叶片和根中积累了更多的 Na^+ 离子,因此在 300 mM 或 200 mM 的 NaCl 和 100 mM 的 NaHCO_3 共同处理条件下,表现出较好的抗性。在西红柿表达小麦来源的 *TaNHX2* 基因,当用 100 mM 或 150 mM 的 NaCl 胁迫处理后,转基因植株比野生型生长得更好,表现在可以保持较高的相对含水量,叶绿素含量下降的更少,种子发芽率更高^[26]。同样的基因导入紫花苜蓿中表达时,也表现出类似的效果,而且发现转基因材料中依赖 ATP 的质子泵活性比野生型高^[27]。

Zahra^[28]将可以产生植物激素的 AUX 基因与 GUS 报告基因融合,用源于发根农杆菌的 Ri 质粒导入烟草中,在 300 mM 的 NaCl 胁迫条件下,转基因烟草比野生型有更好的耐受性,原因可能是由于转基因烟草产生的大量发状根过量表达 AUX 基因所致。

1.4 抗除草剂

草害严重影响农业生产。有数据表明,约 10%~20% 农作物经济损失是由杂草造成的,所以预防和治理杂草是农业生产中一个不可忽视的问题。实践证明,与机械除草相比,施用除草剂具有省时、高效等优点,但目前由于技术本身的局限性,田间施用除草剂除了灭杀杂草之外,对农作物同样会造成伤害,因此培育抗除草剂转基因作物势在必行。最新的统计表明,截止到 2011 年,抗除草剂转基因作物的种植面积占转基因植物种植总面积的 59%,在农业生产中发挥了巨大作用,产生了显著的经济效益^[29]。

草丁膦(又名草铵膦, PPT)是广谱灭杀性除草剂,它通过抑制谷氨酰胺合成酶的活性达到除草效果。PPT 乙酰转移酶基因 *bar* 源于链霉菌,通过乙酰化 PPT 而使其毒性解除。此基因目前作为标记基因,被广泛应用于植物转基因领域。另一种广谱性除草剂是草甘膦,施用量很大,它能竞争性抑制 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合成酶 EPSPS 的活性,此酶是植物体内芳香族氨基酸生物合成过程中的关键酶。孟山都公司将 *epsps* 基因导入紫花苜蓿中,表现出了对除草剂草甘膦的良好抗性^[30],目前此转基因紫花苜蓿已经被批准商业化生产。

在所有抗除草剂的转基因作物中,抗草甘膦大豆一直占据主要地位,其次为转基因玉米、油菜和棉花。涉及的除草剂种类主要有草丁膦、草甘膦、莠去津、溴苯氟、2,4-D、咪唑啉酮和磺酰脲类等 10 个类别。现在还出现了同时抗多种除草剂的转基因作物,如具有麦草畏和草丁膦双抗性的转基因棉花和兼抗草甘膦和草丁膦的转基因玉米^[31]。

高浓度的 2,4-D 是非常有效的除草剂,但稀释后的 2,4-D 则能成为促进植物生长的激素,因此针对该除草剂的研究不是很多。1994 年,我国获得的第一株转基因抗除草剂棉花就是将 2,4-D 单氧化酶(*tfdA*)基因导入棉花中,药效试验表明,子代棉株对 2,4-D 的抗药性良好,获得可遗传的抗 2,4-D 植株。

2 生物逆境方面的研究

2.1 抗病

病虫害是严重危害农业生产的自然灾害之一,也是农作物生产主要的限制因素。仅病害而言,有数据表明全世界的粮食和棉花生产因病害常年损失在 10% 以上。病害不仅影响农作物产量,在一定程度上还威胁到农产品质量安全。病害发生的原因,是由于农业生产中常常大面积连片种植某个单一作物品种,人为降低了物种多样性,增加了同种作物在时间和空间上的连续性,这就为病原物的积累和发展提供了客观条件。转基因技术为提高作物的抗病性奠定了基础。

几丁质是构成大多数真菌细胞壁的主要成分,但是在植物细胞中不存在。几丁质酶可以水解几丁质,从而抑制真菌生长和繁殖,在植物中可显著抵抗植物真菌病害。有关转化几丁质酶在提高植物抗病性的研究有了最新进展。Jia 等^[32]从球状白僵菌中分离出几丁质酶基因(*Bbchit1*) 然后用农杆菌介导法导入毛白杨基因组中,使转基因毛白杨

对金黄壳囊孢菌的抗性得到提高。在番茄中分别表达水稻几丁质酶基因 (*CHI*)、苜蓿防卫素基因(*al-fAFP*)和融合基因(*CHI-AFP*) 转基因番茄对灰霉病的抗病性得到增强。其中转入融合基因 *CHI-AFP* 的转基因植株表现出最强的抗病能力^[33]。在小麦中表达哈茨木霉几丁质酶和脱乙酰壳多糖酶, 转基因小麦提高了抗白粉病的能力^[34]。上述表明, 几丁质酶基因可以有效的提高转基因植株的抗病性, 是今后转基因研究的重要目标基因。

植物病毒病也严重危害农作物生产, 已报道的关于抗病毒转基因的分子机制主要有三种: 抑制病毒增殖、阻止病毒移动和 RNA 沉默介导的植物抗病毒机制^[35]。

通过导入植物病毒外壳蛋白的反向重复序列, 实现 RNA 沉默介导以增强植物体的抗病能力是目前植物抗病毒病转基因研究最常用的方法。将玉米矮花叶病毒 (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV) 外壳蛋白的反向重复序列通过农杆菌介导法导入玉米中, 通过潮霉素筛选出抗性植株。田间试验表明转基因植株抗玉米矮花叶病毒的能力明显强于非转基因植株^[36]。使用同样原理转化的抗花叶病毒的大豆^[37]、番茄^[38], 抗莴苣巨脉病毒 (*Mirafiori lettuce virus*, MiLV) 的莴苣^[39], 抗大豆矮缩病毒 (*Soybean dwarf virus*, SbDV) 的大豆^[40], 抗大麦矮黄病毒 (*barley yellow dwarf virus*, BYDV) 的大麦^[41]以及抗马铃薯 Y 病毒的马铃薯^[42]等, 都得到了具有明显抗病性的植株。这些实验结果都证实, 利用 RNA 沉默介导的植物抗病毒机制提升植物抗病性的方法是有效的, 且一些无选择标记基因的应用降低了转基因安全的风 险。

2.2 抗虫

利用转基因技术提高作物的抗虫性研究, 苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是必须要重点强调的。Bt 是世界上目前产量最大、应用最广的微生物杀虫剂, 也是公认的无公害生物农药。1901 年, 日本学者石渡首次从染病的家蚕中分离出该菌, 并证明它对部分鳞翅目昆虫有杀虫活性。1915 年, Berliner 再次发现并依其发明地点德国苏云金省而定名并于 1938 年在法国正式成为商品。而将其导入作物中提高抗虫性是目 前转基因研究的最多的领域。

苏云金芽孢杆菌在孢芽形成时会生成一类毒性蛋白, 称为 Bt 毒蛋白。编码 Bt 毒蛋白的 Cry 基因家族是第一类应用到植物转基因中的抗虫基因。将 *cryIEc* 导入蓖麻中, 获得的转基因植株对

斜纹夜蛾和蓖麻夜蛾两种食叶害虫都表现出明显的抗性^[43]。*cry2A* 基因转入镇稻 88 中, 转基因植株有明显的抗虫效果^[44]。和传统的品种种植一样, 转基因作物长时间大面积的种植, 使害虫产生抗性, 导致抗性效果下降。除了利用“避难所”措施延缓害虫过快产生抗性之外, 多基因转化和叶绿体遗传转化, 进一步提高抗性并保持抗性的持久有效是今后转基因研究的一个趋势, 同时叶绿体转化也可以最大限度地降低生态环境和生物多样性的风险。将 *cry2Aa2* 基因转入烟草叶绿体中, 用三种害虫进行抗性实验, 结果表明转基因烟草抗虫效率是 100%^[45], 显示了叶绿体转化研究领域的巨大潜力。

3 存在的问题和展望

自转基因作物商业化种植以来, 在美国注册的 Bt 转基因作物共有 32 种, 其中含两种 Bt 基因甚至更多的作物有 10 种, 几个主要的外国公司掌握了全世界 70% 以上的 Bt 基因专利^[46], 被批准商业化的基因几乎全被这些公司掌控, 而且很多公司在中国国内也申请了专利保护, 这对国内 Bt 基因的研究和推广造成了很大阻碍。因此, 充分利用我们自身的资源优势, 发掘、保护新的 Bt 基因, 并尽快应用到抗虫的研究和育种实践中, 摆脱国外公司的专利限制, 是我国科研人员面临的严峻挑战。

从另外一个方面看, 近年来随着国家转基因研究经费投入的不断 增加和我国科学家的不懈努力, 我们在多方面还是取得了一些可喜进展, 已经获得了多种作物表现优异的转基因新材料, 为后续的品种培育奠定了基础。尤其是 2009 年 8 月发放了转植酸酶基因玉米 BVLA430101、转基因抗虫水稻“华恢 1 号”及杂交种“Bt 汕优 63”的生产应用安全证书, 是我国在转基因产品产业化推进方面迈出的重要一步。但是也必须承认, 我们目前的水平, 无论数量还是质量方面, 与国外先进产品比较, 还存在较大差距。

多年的实践证明, 在大批量转基因后代中, 目的基因的表达效果往往不尽如人意, 不同转化事件之间差异明显。诸如转化率低、表达水平低、基因沉默甚至丢失、遗传不稳定等一系列困难几乎不可避免。同时, 由于外源基因的插入扰乱了原有基因的排列顺序, 进而可能影响到某些控制重要性状的基因功能, 导致优良性状的消失, 生长发育受阻, 甚至出现返祖现象, 丧失了 在农业生产中的

应用价值。基于这些现状,人们一直在探索其它的转化技术,包括微注射、超声波处理花粉技术、芽尖转化等。本课题组利用改良的超声波处理玉米花粉转化是一个行之有效的途径^[47]。

转基因产品的环境安全和食品安全一直是公众关注的焦点问题。除了加强转基因生物安全的科普宣传,提高公众的认知度之外,从技术层面消除隐患是一个关键措施。如在转基因材料中删除抗生素标记,获得无标记转基因材料就是很好的手段。获得无标记的转基因材料有四种主要途径,包括共转化、基于转座子的删除、位点特异性重组和同源序列重组^[48-49]。同时,做好转基因产品的风险评估是保障安全、消除公众疑虑最基本和最重要的措施。

由于干旱、盐碱等性状属于多基因控制的原因,所以提高作物抗逆水平一直是转基因研究领域的重点和难点。有报道称,孟山都公司将推出具有抗旱能力的转基因玉米品种,但一直未见报道。有科学家称这些新品种只是适合特定的干旱区域,而在大旱大年份,抗旱转基因玉米会和普通玉米一样枯死,可见其机理的复杂性。但是随着转基因研究的不断深入,我们相信终有一天会取得突破性进展。

参考文献:

- [1] Robert P - A, Christine P - A. How Many Plants Feed the World[J]. Conservation Biology, 1990(4): 365-374.
- [2] Georges F, Saleem M, Cutler A J. Design and Cloning of a Synthesis Gene for the Flounder Antifreeze Protein and Its Expression in Plant Cells[J]. Gene, 1990, 91(2): 159-165.
- [3] 朱晔荣,达来. 抗冻蛋白基因转化植物的研究展望[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2003, 34(1): 97-101.
- [4] Holmberg N. Targeted Expression of a Synthetic Codon Optimized Gene, Encoding the Spruce Budworm Antifreeze Protein, Leads to Accumulation of Antifreeze Activity in the Apoplasts of Transgenic Tobacco[J]. Gene, 2001, 275(1): 115-124.
- [5] Wang Yan, Qiu Li-ming, Xie Wen-juan, et al. Cold Tolerance of Transgenic Tobacco Carrying Gene Encoding Insect Antifreeze Protein[J]. Acta Agronomica Sinica, 2008, 34(3): 397-402.
- [6] Li Mei-fang, Ji Lu-sha, Yang Xing-hong, et al. The Protective Mechanisms of CaHSP26 in Transgenic Tobacco to Alleviate Photoinhibition of PSII During Chilling Stress[J]. Plant Cell Reports, 2012(31):1969-1979.
- [7] Aaron E W, Lisa J R, James J P, et al. Overexpression of a Blueberry-derived CBF Gene Enhances Cold Tolerance in a Southern Highbush Blueberry Cultivar [J]. Mol Breeding, 2012(30):1313-1323.
- [8] Hsieh T H, Lee J T, Yang P T, et al. Heterology Expression of the Arabidopsis C-repeat/dehydration Response Element Binding Factor 1 Gene Confers Elevated Tolerance to Chilling and Oxidative Stresses in Transgenic Tomato [J]. Plant Physiol, 2002(129): 1086-1094.
- [9] 甄伟,陈溪,孙思洋,等. 冷诱导基因的转录因子 CBF1 转化油菜和烟草及抗寒性鉴定 [J]. 自然科学进展, 2000, 10(12): 1104-1108.
- [10] 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 [J]. Plant Physiol, 2005(138): 341-351.
- [11] 王兴娥. 冷诱导基因 CBF4 在辣椒中的遗传转化及抗寒性分析[D]. 西北农林科技大学, 2009.
- [12] Dong Chun-lin, Zhang Ming-yi, Zhang Yan-qin, et al. Transformation of Trehalose Synthase Gene (TPS Gene) into Corn Inbred Line and Identification of Drought Tolerance [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(68): 15253-15258.
- [13] Moh'd H, Haggag A, Joohyun L, et al. Expression of AtSAP5 in Cotton up-regulate Sputative Stress-responsive Genes and Improves the Tolerance to Rapidly Developing Water Deficit and Moderate Heat Stress[J]. Journal of Plant Physiology, 2012, 169(13): 1261-1270.
- [14] Sarah M, Omid E, Tatiana P, et al. Improvement of Stress Tolerance of Wheat and Barley by Modulation of Expression of DREB/CBF Factors [J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(2): 230-249.
- [15] Takuma I, Kyonoshin M, Mitsuhiro O, et al. Expression of Arabidopsis DREB1C Improves Survival, Growth, and Yield of Upland New Rice for Africa (NERICA) under Drought [J]. Mol Breeding, 2012, sep 14th, Springer online. DOI 10.1007/s11032-012-9785-9.
- [16] Zhang Ning, Si Huai-jun, Wen Gang, et al. Enhanced Drought and Salinity Tolerance in Transgenic Potato Plants with a BADH Gene from Spinach [J]. Plant Biotechnology Reports, 2011, 5(1): 71-77.
- [17] Jin Xi, Luo Bo-xiang, Chen Shou-yi, et al. Breeding and Traits Evaluation of BADH and Bar Gene Transgenic Rice [J]. Life Science Research, 2011, 15(3): 209-217.
- [18] 朱玉庆,罗振,张慧军,等. 转 AhCMO 基因棉花苗期对干旱胁迫的生理反应[J]. 棉花学报, 2010, 22(5): 443-447.
- [19] 宗自卫,杨旭. 转 BADH 基因和 mtID 基因花生幼苗抗盐性研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(22): 13288-13289.
- [20] 严建萍,梁燕,谭湘陵. 水淹胁迫对棉花幼根 ADHa 与 BADH 表达的影响[J]. 中国棉花, 2011(10): 22-24.
- [21] Yan L P, Liu C L, Liang H M, et al. Physiological Responses to Salt Stress of T2 Alfalfa Progenies Carrying a Transgene for Betaine Aldehyde Dehydrogenase [J]. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 2012, 108(2): 191-199.
- [22] Shashi K, Amit D, Henry D. Plastid-Expressed Betaine Aldehyde Dehydrogenase Gene in Carrot Cultured Cells, Roots, and Leaves Confers Enhanced Salt Tolerance [J]. Plant Physiology, 2004(136): 2843-2854.
- [23] Eckardt N A, Berkowitz G A. Functional Analysis of Ara-

- bidopsis NHX Antiporters: the Role of the Vacuole in Cellular Turgor and Growth [J]. The Plant Cell, 2011, 23 (9): 3087-3088.
- [24] Li W F, Wang D L, Jin T C, et al. The Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiporter Gene SsNHX1 from the Halophyte *Salsola soda* Confers Salt Tolerance in Transgenic Alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2011, 29(2): 278-290.
- [25] Liu L, Fan X D, Wang F W, et al. Coexpression of *ScNHX1* and *ScVP* in Transgenic Hybrids Improves Salt and Saline-alkali Tolerance in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Journal of Plant Growth Regulation, DOI 10.1007/s00344-012-9270-z.
- [26] Yarra R, He Si-Jie, Abbagani S, Biao Ma, et al. Overexpression of a Wheat Na⁺/H⁺ Antiporter Gene (TaNHX2) Enhances Tolerance to Salt Stress in Transgenic Tomato Plants (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2012(111): 49-57.
- [27] Zhang Y M, Liu Z H, Wen Z Y, et al. The Vacuolar Na⁺-H⁺ Antiport Gene *TaNHX2* Confers Salt Tolerance on Transgenic Alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Functional Plant Biology, 2012, 39(8): 708-716.
- [28] Zahra Z, Ali A E. Assessment of Salt Tolerance in Transgenic Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Plants Expressing the AUX Gene [J]. Progress in Biological Sciences, 2011, 1(1): 17-23.
- [29] James C. 2011 年全球生物技术 / 转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(1): 1-14.
- [30] Kristina H, Neva H. Confronting Coexistence in the United States: Organic Agriculture, Genetic Engineering, and the Case of Roundup Ready Alfalfa [J]. Agric Hum Values, 2012, DOI 10.1007/s10460-012-9394-6.
- [31] 邱 龙, 马崇烈, 刘博林, 等. 耐除草剂转基因作物研究现状及发展前景[J]. 中国农业科学, 2012, 45(12): 2357-2363.
- [32] Jia Zhi-chun, Sun Yi-min, Yuan Li, et al. The Chitinase Gene (Bbchit1) from *Beauveria Bassiana* Enhances Resistance to *Cytospora Chrysosperma* in *Populus Tomentosa* Carr [J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(9): 1317-1324.
- [33] Chen SC, Liu AR, Wang FH, et al. Combined Overexpression of Chitinase and Defensin Genes in Transgenic Tomato Enhances Resistance to *Botrytis Cinerea* [J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(20): 5182-5188.
- [34] Iqar A R, Horst L, Wilhelm S, et al. Over Expression of Chitinase and Chitosanase Genes from *Trichoderma harzianum* under Constitutive and Inducible Promoters in order to Increase Disease Resistance in Wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Molecular Plant Breeding, 2012, 3(4): 37-49.
- [35] 侯 静, 刘青青, 徐明良. 植物抗病毒侵染的分子机制[J]. 作物学报, 2012, 38(5): 761-772.
- [36] Zhang Zhi-yong, Fu Feng-ling, Gou Lin, et al. RNA Interference-Based Transgenic Maize Resistant to Maize Dwarf Mosaic Virus [J]. Journal of Plant Biology, 2010, 53(4): 297-305.
- [37] Zhang Xiu-chun, Sato S, Ye Xiao-hong, et al. Robust RNAi-Based Resistance to Mixed Infection of Three Viruses in Soybean Plants Expressing Separate Short Hairpins from a Single Transgene [J]. Phytopathology, 2011(101): 1264-1269.
- [38] Zhang Xiao-hui, Li Han-xia, Zhang Jun-hong, et al. Expression of artificial microRNAs in tomato confers efficient and stable virus resistance in a cell-autonomous manner [J]. Transgenic Research, 2011, 20(3): 569-581.
- [39] Yoichi Kawazu, Ryoi Fujiyama, Yuji Noguchi, et al. Detailed Characterization of Mirafiori Lettuce Virus-Resistant Transgenic Lettuce [J]. Transgenic Research, 2010, 19(2): 211-220.
- [40] Tougou M. Production of Soybean Dwarf Virus-Resistant Transgenic Soybeans [R]. Bulletin of the National Agricultural Research Center for Tohoku Region, 2009(110): 199-224.
- [41] Wang M B, Abbott D C, Waterhouse P M. A Single Copy of a Virus-derived Transgene Encoding Hairpin RNA Gives Immunity to Barley Yellow Dwarf Virus [J]. Mol Plant Pathol, 2000(1): 347-356.
- [42] Jason C, Kari W P, Stewart M G, et al. Engineering Virus Resistance Using a Modified Potato Gene [J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(9): 1014-1021.
- [43] Sujatha M, Lakshminarayana M, Tarakeswari M, et al. Expression of the cry1EC Gene in Castor (*Ricinus communis* L.) Confers Field Resistance to Tobacco Caterpillar (*Spodoptera litura* Fabr) and Castor Semilooper (*Achoea janata* L.) [J]. Plant Cell Rep, 2009, 28(6): 935-946.
- [44] 吴振映, 柳 絮, 王文英, 等. 利用农杆菌介导法获得转 cry2A 抗虫基因水稻的研究[J]. 山东农业科学, 2011(5): 1-3, 7.
- [45] Brandy D C, William M, Seung-Bum L, et al. Overexpression of the Bt cry2Aa2 Operon in Chloroplasts Leads to Formation of Insecticidal Crystals [J]. Nature Biotechnology, 2001(19): 71-74.
- [46] 张 杰, 束长龙, 张春鸽. Bt 杀虫基因专利保护现状与趋势 [J]. 植物保护, 2011, 37(3): 1-6.
- [47] 宋鉴达, 林春晶, 韦正乙, 等. 利用超声波处理玉米花粉转化法获得玉米转基因新材料[J]. 玉米科学, 2012, 20(2): 48-51, 55.
- [48] Wei Z Y, Wang X Z, Xing S C. Current Progress of Biosafe Selectable Markers in Plant Transformation [J]. Journal of Plant Breeding and Crop Science, 2012, 4(1): 1-8.
- [49] Day A, Goldschmidt-Clermon M. The Chloroplast Transformation Toolbox: Selectable Markers and Marker Removal [J]. Plant Biotechnology Journal, 2011(9): 540-553.