

水稻无选择标记 *Xa21* 转基因系 CX8621 的获得与遗传分析

夏志辉^{1,2, #} 刘鹏程^{1, #} 高利芬¹ 刘栋峰¹ 姜丽¹ 江光怀¹ 郭乐群¹ 翟文学^{1, *}

(¹中国科学院 遗传与发育生物学研究所, 北京 100101; ²海南省热带生物资源可持续利用重点实验室/海南大学 农学院, 海口 570228; # 共同第一作者; * 通讯联系人, E-mail: wxzhai@genetics.ac.cn)

Generation and Genetic Analysis of *Xa21* Transgenic Rice Line CX8621 Without Selectable Markers

XIA Zhi-hui^{1,2, #}, LIU Peng-cheng^{1, #}, GAO Li-fen¹, LIU Dong-feng¹, JIANG Li¹, JIANG Guang-huai¹, GUO Le-qun¹, ZHAI Wen-xue^{1, *}

(¹ Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; ² Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources/College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China;

These authors contributed equally to this work; * Corresponding author, E-mail: wxzhai@genetics.ac.cn)

XIA Zhihui, LIU Pengcheng, GAO Lifan, et al. Generation and genetic analysis of *Xa21* transgenic rice line CX8621 without selectable markers. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30(1): 10–16.

Abstract: Selectable marker-free and stable inheritance are the basic requirements for safe application of transgenic crops. Following the regulations approved by the National Committee for Transgenic Biosafety, the wide spectrum bacterial blight resistance gene *Xa21* was transferred into a widely used restorer line Minghui 86 by using a double right-borders T-DNA vector through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated system. The transgene *Xa21* was confirmed by resistance identification, PCR analysis and Southern blot in the progenies. The single-copy homozygous transgenic line CX8621 without selectable marker and vector backbone sequences was obtained from T₃ generation. The transgenic restorer line CX8621 has stable bacterial blight resistance with years of observation and identification. Up to now, CX8621 has self-fertilized to 16th generation with stable inheritance of transgene *Xa21* and passed the bio-safety evaluation of small and large scale of field tests (environmental release and productive test).

Key words: transgenic rice; bacterial blight; *Xa21*; selectable marker-free; stable inheritance

夏志辉, 刘鹏程, 高利芬, 等. 水稻无选择标记 *Xa21* 转基因系 CX8621 的获得与遗传分析. 中国水稻科学, 2016, 30(1): 10–16.

摘要: 无选择标记和转基因稳定遗传是转基因作物安全应用的基本要求。按照我国转基因作物安全评价指南, 利用双右边界 T-DNA 载体系统将广谱抗白叶枯病基因 *Xa21* 转入水稻恢复系明恢 86。通过抗性鉴定、PCR 分析和 Southern 杂交, 跟踪了外源 *Xa21* 基因在转基因后代植株的遗传, 并在 T₃ 代获得了无选择标记和载体骨架序列的单拷贝抗病纯合系 CX8621。多年的观察和鉴定表明转基因恢复系 CX8621 具有稳定的白叶枯病抗性。目前 CX8621 已经稳定遗传至 T₁₆, 并已通过小规模田间试验(环境释放)和大规模的田间试验(生产性试验)的安全评价。

关键词: 转基因水稻; 白叶枯病; *Xa21*; 无选择标记; 稳定遗传

中图分类号: Q755; S11.032

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2016)01-0010-07

水稻是世界上最主要的粮食作物, 为全球一半以上的人口提供食物^[1]; 它作为我国第一大粮食作物, 更是占我国粮食总产量的 40%^[2]。伴随着转基因技术的快速发展, 兼之水稻的重要战略地位, 我国在转基因水稻的研发和培育方面取得了巨大进展^[3]。目前已经培育出抗虫^[4-5]、抗病^[6]、抗除草

剂^[7]以及具有优良品质^[8-9]的转基因水稻, 其中转基因抗虫水稻“华恢 1 号”和“Bt 汕优 63”于 2009 年获得生产应用安全证书^[10]。此外, 还有多项转基因水稻获准进行生产性试验^[11]。我国转基因作物的安全评价依据是《农业转基因生物安全评价管理办法》; 评价过程包括试验研究、中间试验、环境释放、

收稿日期: 2015-09-07; 修改稿收到日期: 2015-10-16。

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(2008/2014ZX08001-002); 中国科学院知识创新方向项目(KSCX2-EWN-01)。

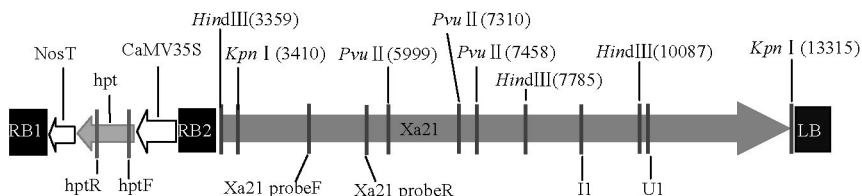


图 1 简化的 pBXa21 线性结构与酶切图谱

Fig. 1. Simplified linear structure and enzyme pattern of pBXa21.

生产性试验及最后的生产应用安全证书^[12]。外源基因在转基因作物的整合情况鉴定及遗传稳定性分析结果是转基因安全评价的必备技术资料^[13]。迄今为止,严格按照转基因安全评价的要求,对外源基因遗传稳定性多代分析的研究资料报道甚少。本研究重点阐述转 *Xa21* 基因抗白叶枯病恢复 CX8621 的获得流程、稳定整合与遗传、抗病能力及其分子鉴定,以期为其他开展转基因作物工作的同仁提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

受体材料明恢 86 为杂交水稻育种中广泛应用的籼稻恢复系。抗性鉴定所用到的供试菌株为来源于菲律宾的白叶枯病鉴别小种,包括 PXO61 (P1)、PXO86 (P2)、PXO79 (P3)、PXO71 (P4)、PXO99 (P6)、PXO145 (P7)、PXO280 (P8)、PXO339 (P9)、PXO124 (P10),由中国农业科学院作物科学研究所提供,本实验室保存。

1.2 转基因载体与转化

在前期工作中,我们已将广谱显性抗白叶枯病基因 *Xa21* 构建到能去除标记基因的双右边界双元载体 pBXa21 上,并利用该载体成功获得了无标记的转 *Xa21* 基因水稻(图 1)^[6,14-15]。pBXa21 的细菌选择标记为壮观霉素抗性基因(*spectinomycin resistant gene, specR*),转化选择标记为潮霉素 B 磷酸转移酶基因(*hygromycin B phosphotransferase gene, hpt*)。籼稻明恢 86 转化方法参照文献^[6]和^[16]。

1.3 转基因植株的种植管理

转基因植株的种植管理,严格按照《农业转基因生物安全评价管理办法》、《转基因植物安全评价指南》与《农业转基因生物安全管理条例》的要求进行,在温室转基因作物种植区和设有隔离带的田间种

植。2004 年获得转基因 T_0 植株,以后每年在北京或海南种植转基因后代植株,先后进行了中间试验、环境释放和生产性试验各阶段的安全评估。目前已繁殖至 T_{16} 代。

1.4 转基因植株的抗性鉴定

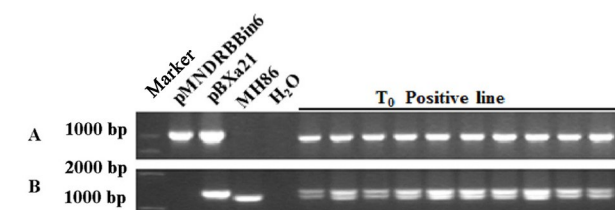
转基因水稻对白叶枯病的抗性鉴定参照国家标准《转基因植物及其产品环境安全检测——抗病水稻》第一部分对靶标病害的抗性(农业部 953 号公告-9.1-2007)进行。

1.5 目的基因在植物基因组中的整合及遗传分析

根据农业部《转基因植物安全评价指南》对申请转化体安全证书的要求,对不同世代的转基因株系进行了 PCR 鉴定和 Southern 杂交分析,以明确外源基因的整合情况和遗传稳定性。

在进行 PCR 鉴定时,目的基因 *Xa21* 的检测使用的是 UI/I1 引物对,由王国梁等根据 *Xa21* 基因激酶区序列设计^[17],在转基因植株中能扩增出 1377 bp 和 1248 bp 两条带,而在非转基因对照中只能扩出 1248 bp 一条条带。鉴定标记基因 *hpt* 使用的引物为 hpt-F/R,在转基因植株中扩增产物为 1035 bp,对照和非转基因植株中无扩增。左边界引物为 LB-F/R,在转基因植株中产物为 339 bp,对照和非转基因植株中无扩增。具体序列参考夏志辉等无选择标记和载体骨干序列的 *Xa21* 转基因水稻的获得^[6]。

在 Southern 杂交分析时,用限制性内切酶(T_0 代和 T_1 代分析用的 *Pvu* II、 T_{11} 代分析用 *Kpn* I、*Pvu* II、*Hind* III) 37℃ 酶切过夜;0.8% 的琼脂糖凝胶电泳,转移到尼龙膜上用于分子杂交。分子杂交使用的是北京美莱博生物技术有限公司的 Hyb 高效杂交液,*Xa21* 杂交探针使用的是引物 *Xa21*-PF/PR 扩增的片段,标记基因 *hpt* 以及左边界 LB 分析所用的探针与 PCR 鉴定时扩增的产物相同。探针具体位置与酶切图谱见图 1。

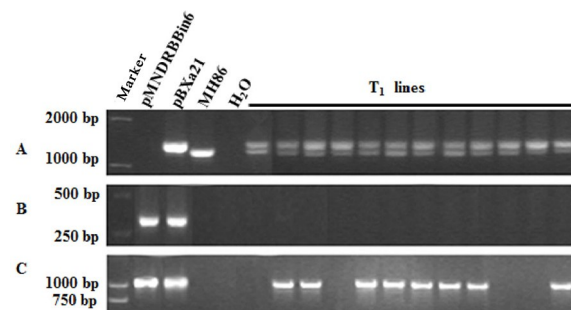


A—*hpt* 基因的 PCR 分析; B—*Xa21* 基因的 PCR 分析。pMNDRBBin6—不含 *Xa21* 的空载体; pBXa21—以 pMNDRBBin6 为骨架构建的含 *Xa21* 的载体; MH86—非转基因对照明恢 86。

A, PCR analysis of *hpt*; B, PCR analysis of *Xa21*. pMNDRBBin6, Vector without *Xa21*; pBXa21, Vector with *Xa21*; MH86, Non-transgenic control Minghui 86.

图 2 T_0 阳性植株 PCR 分析结果

Fig. 2. PCR analysis of transgenic positive T_0 plants.

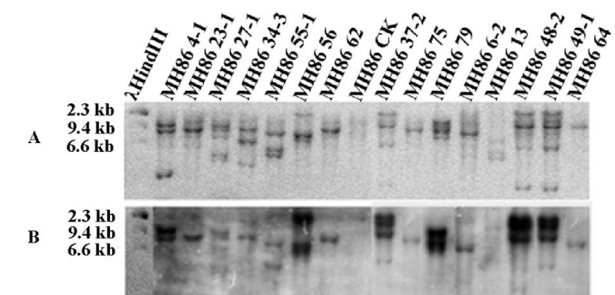


A—*Xa21* 的 PCR 检测; B—左边界侧翼序列的 PCR 检测; C—*hpt* 基因的 PCR 检测。

A, PCR analysis of *Xa21*; B, PCR analysis of left border; C, PCR analysis of *hpt*.

图 4 CX86 34-3 株系 T_1 代 PCR 分子鉴定

Fig. 4. PCR analysis of transgenic T_1 plants of CX86 34-3.



A—*Xa21* 基因的 Southern 杂交; B—*hpt* 基因的 Southern 杂交。

A, Southern blot analysis of *Xa21*; B, Southern blot analysis of *hpt*.

图 3 T_0 代部分转基因株系的 Southern 杂交分析

Fig. 3. Southern blot hybridization analysis of T_0 plants.

2 结果与分析

2.1 转基因植株 T_0 代中外源插入片段的整合分析

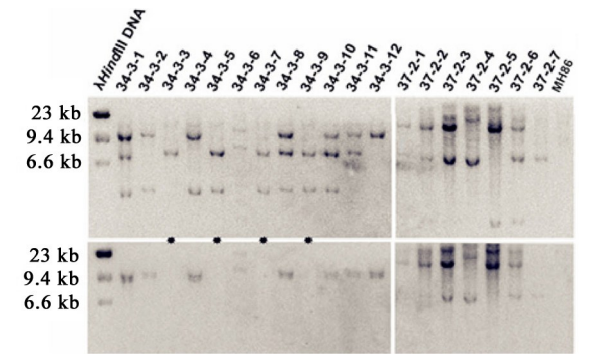
用构建的 pBXa21 载体转化明恢 86, T_0 代共获得转基因株系 94 个。对既能够扩增出潮霉素基因特异的 1035 bp, 也能够扩增出 *Xa21* 基因特异的 1377 bp 条带的 T_0 代转基因植株(图 2)进行田间接种 P6 鉴定, 得到阳性株系 49 个。根据 pBXa21 载体的结构和 T-DNA 整合原理^[6,15], 阳性植株中可筛选到不同的整合类型(图 3)。在 Southern 分析中显示出的不同带型, 不仅能区分插入片段是单拷贝还是多拷贝, 还可分辨出 *Xa21* 与 *hpt* 的串联整合与分离整合。在 Southern 杂交中, *Xa21* 基因有比 *hpt* 基因多出的条带, 则表明 *Xa21* 基因与 *hpt* 基因是分离整合; 在此类型的分离后代中即可筛选出无选择标记的 *Xa21* 转基因植株, 如 T_0 代植株

CX86 34-3。

2.2 转基因植株 T_1 代中外源插入片段的遗传分析

T_1 代植株分蘖盛期对各株系单株接种 P6 菌株进行抗病性鉴定, 大多数转基因植株在 T_1 代表现出抗感分离。对接种鉴定后的抗病植株, 分别进行 *Xa21* 基因、潮霉素 *hpt* 基因以及载体左边界侧翼骨架序列的 PCR 鉴定(由于潮霉素基因位于右边界, 所以不再对更右侧的载体骨架序列进行单独检测), 从中筛选不含选择标记和载体左边界侧翼骨架序列而只含有 *Xa21* 基因的抗病转基因植株。在此, 我们以 CX86 34-3 T_1 代转基因单株为例, 展示其整合及遗传规律。PCR 鉴定结果显示(图 4), 在其抗病转基因分离后代中能筛选出标记基因(*hpt*)和载体左边界侧翼骨架序列检测均为阴性, 而 *Xa21* 基因为阳性的单株。

接着对 CX86 34-3 的 T_1 代转基因单株进行 Southern 杂交分析, 图 5 显示了部分单株的分析结果。结果表明 *Xa21* 与 *hpt* 以及不同拷贝之间发生分离。不同的转基因单株中 *Xa21* 有单拷贝、双拷贝和三拷贝, 有 *hpt* 和无 *hpt*。如 CX86 34-3-3 植株为单拷贝无选择标记而只含有 *Xa21* 基因单株。同时利用左边界 LB 序列作探针的分子杂交可以显示转基因植株有无左边界载体骨架序列(数据未列出)。多拷贝的转基因植株后代可以继续分离, 在分离后代中获得单拷贝的转基因植株。对各植株套袋自交繁殖 T_2 代和 T_3 代, 进一步筛选和验证, 在 T_3 代获得了无选择标记和载体骨架序列的单拷贝 *Xa21* 转基因纯合系。纯合系植株生长整齐一致, 所有植



A—*Xa21* 基因 Southern 杂交分析;B—*hpt* 基因 Southern 杂交分析。无选择标记 *Xa21* 阳性植株用星号(*)标出。
A, Southern blot analysis of *Xa21*; B,Southern blot analysis of *hpt*. Selectable marker-free transgenic plants are makered as *.

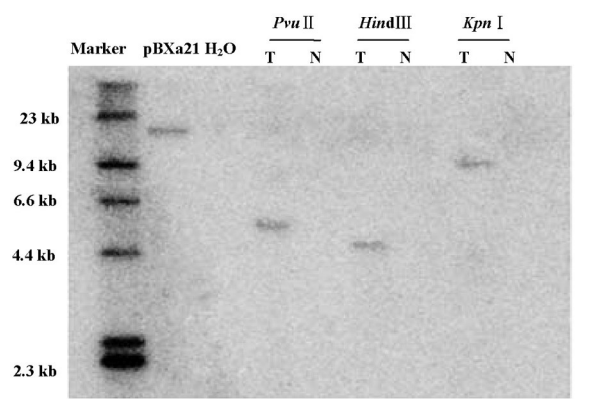
图 5 T₁ 株系 CX86 34-3 Southern 杂交分析

Fig. 5. Southern blot hybridization analysis of T₁ plants CX86 34-3.

株都表现对 P6 的高度抗性,没有抗感分离。将无选择标记的单拷贝 *Xa21* 转基因纯合系命名为 CX8621,进行后续的研究。

2.3 转基因系 CX8621 的稳定遗传与精细杂交指纹图谱

由于转基因作物在申请安全证书时,不仅要明确外源片段(如转化载体骨架、目的基因和标记基因等)整合拷贝数,还需要具有转化事件特异性的分子杂交图谱。因此,我们对转基因系 CX8621 的 T₁₁ 代植株提取基因组 DNA,参考 pBXa21 线性图谱(图 1),用 3 种限制性内切酶 *Pvu* II、*Hind* III 和 *Kpn* I 酶切后,用 1139 bp *Xa21* 基因特异的探针进行了 Southern 杂交分析,获得了该转基因系特异的杂交指纹图谱(图 6)。*Kpn* I 酶切得到了 9.9 kb 片段,即全长 *Xa21* 基因插入片段,说明 *Xa21* 基因完整插入到水稻染色体,在后续继代过程中没有片段丢



T—CX8621; N—明恢 86。
T—CX8621; N—Minghui 86.

图 6 转基因株系 CX8621 第 T₁₁ 代 Southern 杂交

Fig. 6. Southern blot hybridization analysis of T₁₁ plants from CX8621.

失。*Hind* III 酶切得到长为 4.4 kb 的片段,与预期的片段大小一致,说明在继代繁殖过程中转基因 *Xa21* 基因内部也没有发生缺失。*Pvu* II 酶切得到长约 5.0 kb 左右的特异性片段,根据 *Xa21* 基因内切酶图谱判断,该片段的一个酶切位点位于整合位点的侧翼序列,因此 5.0 kb 片段可以作为 CX8621 转基因系特异的鉴定标记。

2.4 转基因系 CX8621 的抗谱鉴定以及病情指数分析

在分蘖盛期,对明恢 86、CX8621 接种 9 个来自菲律宾的生理小种进行抗谱鉴定,并按照表 1 的病情分级标准,计算了病情指数:病情指数(%) = Σ(各病级病叶数×各级代表数值)/(调查总叶数×发病最重级的代表数值)× 100%。发病最重的病情指数是 100%,完全无病是 0%,数值的高低表示发病的轻重。根据接种鉴定的结果,CX8621 对 8 个菲律宾生理小种的抗性达到了高抗(表 2)。相比对照

表 1 水稻白叶枯病病情分级标准

Table 1. Classification standard for rice bacterial blight disease.

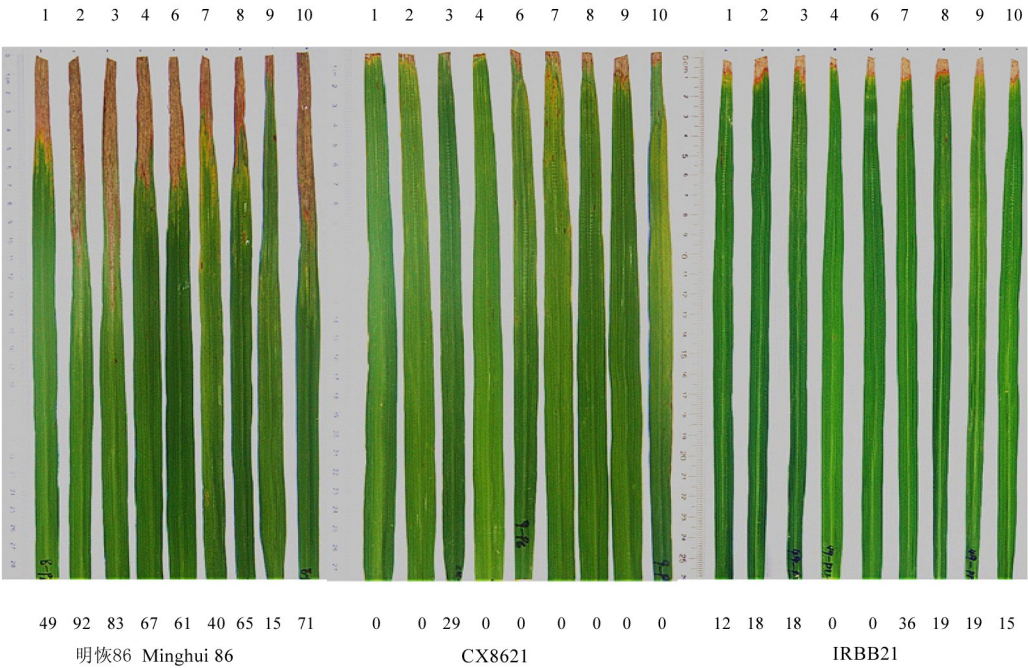
病级 Level	抗性反应 Description	抗性评价 Identification
0	病斑长度小于接种叶片剩余长度 5.0%;或病斑面积小于 5.0%。	高抗 HR
1	病斑长度占接种叶片剩余长度 5.1%~12.0%;或病斑面积占叶面积 5.1%~12.0%。	抗 R
3	病斑长度占接种叶片剩余长度 12.1%~25.0%;或病斑面积占叶面积 12.1%~25.0%。	中抗 MR
5	病斑长度占接种叶片剩余长度 25.1%~50.0%;或病斑面积占叶面积 25.1%~50.0%。	中感 MS
7	病斑长度占接种叶片剩余长度 50.1%~75.0%;或病斑面积占叶面积 50.1%~75.0%。	感 S
9	病斑长度大于接种叶片剩余长度 75.1%;或病斑面积大于叶面积 75.1%。	高感 HS

HR, Highly resistant; R, Resistant; MR, Moderately resistant; MS, Moderately sensitive; S, Sensitive; HS, Highly sensitive. The same as below.

表 2 明恢 86 和 CX8621 对白叶枯病菌的抗性鉴定结果

Table 2. Resistance analysis of Minghui 86 and CX8621.

材料 Material	P1	P2	P3	P4	P6	P7	P8	P9	P10
明恢 86 Minghui 86	MS	HS	S	S	S	MS	MS	MR	S
CX8621	HR	HR	R	HR	HR	HR	HR	HR	HR



1—10 表示白叶枯菌小种 P1~P10;图下数字表示平均病情指数,单位为%。
1—10, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* P1 to P10, respectively; Number below the figure stands for the average disease index(%).

图 7 明恢 86、CX8621 和 IRBB21 的抗谱鉴定以及病情指数

Fig.7. Spectrum identification and resistance index of Minghui 86, CX8621 and IRBB21.

明恢 86 以及 IRBB21,抗性有显著增强,抗谱也有扩宽(图 7)。

3 讨论

无论转基因粮食作物还是转基因非粮食作物,外源基因在受体中的整合与遗传分析是开展安全评价的基本条件,标准都是一致的^[18]。而对转基因作物的环境与食用安全评价的标准,则依据受体种类和外源基因的来源,需要个案对待^[19]。为提高转化效率,富集转基因阳性植株,在遗传转化时常引入标记基因进行共转化;使用较多的是抗生素和抗除草剂标记^[20]。然而在获得目标转基因株系后,这些标记就变成了冗余基因,它们的存在可能带来潜在的安全威胁^[21]。此外,对携带选择标记基因的转基因生物体,在安全评价过程中还需要对标记的环境安

全和食用安全进行评价,将大大增加转基因安全评价的项目内容与成本^[22]。无选择标记将是转基因作物申请安全证书的基本要求。

对于得到的转基因株系,由于作物本身的多态性,对转基因工程体的检测是一项十分巨大的工作,尤其是在区分杂合状态下的转基因材料与分子标记辅助育种材料^[23]。为了便于监管,我们用 3 种限制性内切酶绘制了转基因株系 CX8621 的杂交指纹图谱,其中 *Pvu* II 的一个酶切位点位于整合位点的侧翼序列,因此所获得的 5.0 kb 的片段可以作为此基因工程体特异的检测标记,便于日后对转基因材料的监管。

外源基因引入到植物体后要经历复杂的有性繁殖,尤其是减数分裂过程中的同源重组和交叉互换,这对转基因的遗传稳定性提出了挑战^[24]。我们对

CX8621 进行了长达 16 代的跟踪研究,不仅在抗病性上没有发现分离;整合片段也没有发生丢失和改变,说明了 *Xa21* 在 CX8621 中能稳定遗传,对 CX8621 的利用可以有效改良水稻对白叶枯病的抗性。

谢辞:感谢中国农业科学院作物科学研究所周永力研究员提供白叶枯病鉴定菌株;感谢转基因生物新品种培育重大专项抗病转基因水稻新品种培育课题主持单位中国水稻研究所对本研究的支持。

参考文献:

- [1] Lu B R, Snow A A. Gene flow from genetically modified rice and its environmental consequences. *BioScience*, 2005, 55 (8): 669-678.
- [2] 程式华,胡培松.中国水稻科技发展战略.中国水稻科学,2008, 22(3):223-226.
Chen S Y, Hu P S. Development strategy of rice science and technology in China. *Chin J Rice Sci*, 2008, 22(3):223-226. (in Chinese with English abstract)
- [3] 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(18):2699-2717.
Chen H, Lin Y J, Zhang Q F. Review and prospect of transgenic rice research. *Chin Sci Bull*, 2009, 54: 2699-2717. (in Chinese with English abstract)
- [4] Tang W, Chen H, Xu C, et al. Development of insect-resistant transgenic indica rice with a synthetic *cry1C*⁺ gene. *Mol Breeding*, 2006, 18(1): 1-10.
- [5] 尚玉花,李莉,陆徐忠,等.利用 Cre/loxP 系统删除转 *Bt* 基因水稻中的选择标记基因.生物学杂志,2011,28(2):5-8.
Shang Y H, Li L, Lu X Z, et al. Using Cre/loxP system to excise marker gene in Bt-transgenic rice. *J Biol*, 2011, 28(2): 5-8. (in Chinese with English abstract)
- [6] 夏志辉,李晓兵,陈彩艳,等.无选择标记和载体骨干序列的 *Xa21* 转基因水稻的获得.生物工程学报,2006,22(2):204-210.
Xia Z H, Li X B, Chen C Y, et al. Generation of selectable marker-free and vector backbone sequence-free *Xa21* transgenic rice. *Chin J Biotech*, 2006, 22(2): 204-210. (in Chinese with English abstract)
- [7] 吴爱忠,唐克轩,潘俊松,等.转基因培育抗除草剂水稻.遗传学报,2000,27(11):992-998.
Wu A Z, Tang K X, Pan J S, et al. Production of herbicide-resistant rice with transforming heterogene. *Acta Gene Sin*, 2000, 27(11): 992-998. (in Chinese with English abstract)
- [8] 于恒秀,刘巧泉,陈秀花,等.根癌农杆菌介导的水稻转化体系的优化及转反义 *Wx* 基因植株的获得.中国水稻科学,2002, 16(4):304-310.
Yu H X, Liu Q Q, Chen X H, et al. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation of rice and regeneration of transgenic plants with antisense *Wx* gene. *Chin J Rice Sci*, 2002, 16(4): 304-310. (in Chinese with English abstract)
- [9] 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(5): 506-511.
- [10] 朱祯.转基因水稻研发进展.中国农业科技导报,2010,12(2):9-16.
Zhu Z. Progress in research and development of transgenic rice. *J Agric Sci Tech*, 2010, 12(2): 9-16. (in Chinese with English abstract)
- [11] 李黎红,叶卫军,郭龙彪.我国转基因水稻研究进展和商业化前景分析.中国稻米,2012,18(6):1-4.
Li L H, Ye W J, Guo L B. Research progress and commercialization prospect of transgenic rice in China. *China Rice*, 2012, 18(6): 1-4. (in Chinese with English abstract)
- [12] 农业部.农业转基因生物安全评价管理办法.中华人民共和国国务院公报,2002,35:28-33.
China Ministry of Agriculture. Measures for the safety assessment of agricultural genetically modified organisms. Gazette of the State Council of the People's Republic of China, 2002, 35: 28-33. (in Chinese)
- [13] Maqbool S B, Christou P. Multiple traits of agronomic importance in transgenic indica rice plants: Analysis of transgene integration patterns, expression levels and stability. *Mol Breeding*, 1999, 5(5): 471-480.
- [14] Song W Y, Wang G L, Chen L L, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 1995, 270(5243): 1804-1806.
- [15] Gao L F, Xia Z H, Jiang G H, et al. Generation of marker-free, bacterial blight-resistant transgenic sterile line and hybrid rice with *Xa21*. *Plant Breeding*, 2011, 130(4):438-443.
- [16] 翟文学,周永力.由农杆菌介导将白叶枯病抗性基因 *Xa21* 转入我国的 5 个水稻品种.中国科学: C 辑,2000,30(2):200-206.
Zhai W X, Zhou Y L. The rice bacterial blight resistance gene *Xa21* was transferred into 5 rice varieties in China. *Sci China: Series C*, 2000, 30(2): 200-206. (in Chinese with English abstract)
- [17] Wang G L, Song W Y, Ruan D L, et al. The cloned gene, *Xa21*, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates in transgenic plants. *Mol Plant Microbe In*, 1996, 9(9): 850-855.
- [18] 武小霞,张彬彬,王志坤,等.转基因作物的生物安全性管理及安全评价.作物杂志,2010,4(1):1-4.
Wu X X, Zhang B B, Wang Z K, et al. Safety management and assessment of genetically modified organisms. *Crops*, 2010, 4(1): 1-4. (in Chinese with English abstract)
- [19] 何礼健,周玉婷,左婷.转基因生物技术在农业领域的发展现状分析.安徽农业科学,2011,39(1):66-68.

- He L J, Zhou Y T, Zuo T. Analysis on the development status of transgenic biotechnology in agricultural field. *J Anhui Agri Sci*, 2011, 39(1): 66-68. (in Chinese with English abstract)
- [20] 陈松彪, 李旭刚, 王锋, 等. 无选择标记转基因植物的培育. 中国生物工程杂志, 2005, 25(2): 1-7.
- Chen S B, Li X G, Wang F, et al. Culturing maker-free transgenic plants. *China Biotechnol*, 2005, 35(2): 1-7. (in Chinese with English abstract)
- [21] 于恒秀, 刘巧泉, 徐丽, 等. 无抗性选择标记转基因软米和糯稻新品系的选育及中间试验. 作物学报, 2009, 35(6): 967-973.
- Yu H X, Liu Q Q, Xu L, et al. Breeding and field performance of novel soft and waxy transgenic rice lines without selectable markers. *Acta Agron Sin*, 2009, 35(6): 967-973. (in Chinese with English abstract)
- [22] Yoder J I, Goldsbrough A P. Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. *Biotechnology*, 1994, 12(3): 263-267.
- [23] 李晓飞, 谭小力, 李俊, 等. 转基因水稻检测用阳性质粒分子的构建及应用. 生物技术通报, 2013, 7: 71-77.
- Li X F, Tan X L, Li J, et al. Construction and application of a plasmid reference molecule for detecting transgenic rice. *Biotechnol Bull*, 2013, 7: 71-77. (in Chinese with English abstract)
- [24] 金万梅, 潘青华, 尹淑萍, 等. 外源基因在转基因植物中的遗传稳定性及其转育研究进展. 分子植物育种, 2005, 3(6): 112-116.
- Jin W M, Pan Q H, Yin S P, et al. Progress of the genetic stability and breeding behavior of foreign gene in genetically modified plants. *Mol Plant Breeding*, 2005, 3(6): 112-116. (in Chinese with English abstract)