

DOI: 10.13376/j.cblls/2016164

文章编号: 1004-0374(2016)10-1268-11



林拥军, 博士, 华中农业大学生命科学技术学院教授, 博士生导师; 湖北省“抗虫水稻培育”科技创新团队负责人。

1981—1985年就读于江西农业大学农学专业, 获学士学位, 1985年7月留校执教; 1997—2001年就读于华中农业大学, 获“生化与分子生物学”博士学位; 2001年8月调入华中农业大学生命科学技术学院从事科研和教学工作。

主要研究方向为: 抗虫基因的挖掘及抗虫水稻培育、水稻转基因新方法与新技术的研发以及高光效水稻分子设计育种。先后主持“863”重点项目“重要应用价值特异与诱导性启动子的分离与鉴定”、国家公益性行业专项“水稻褐飞虱综合防控技术研究”、国家科技重大专项“抗虫转基因水稻新品种培育”和自然科学基金项目等课题研究。申报发明专利20多项, 获得发明专利15项; 发表SCI研究论文80多篇。

水稻转基因技术及新品种培育

叶荣建¹, 林拥军^{2*}

(1 中国种子集团有限公司生命科学技术中心, 武汉 430075;

2 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室及国家植物基因研究中心, 武汉 430070)

摘要: 转基因技术已广泛用于水稻遗传改良的方方面面。现综述水稻转基因技术的发展历程及其发展趋势, 同时对我国转基因水稻新品种培育及其监管审批体系进行简单介绍。

关键词: 转基因; 水稻; 新品种培育; 监管

中图分类号: Q812; S511; S399 文献标志码: A

Rice transgenic technology and transgenic rice varieties cultivation

YE Rong-Jian¹, LIN Yong-Jun^{2*}

(1 Life Science and Technology Center, China National Seed Group Company Limited, Wuhan 430075, China;

2 State Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and National Centre of Plant Gene Research, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Transgenic technology has been widely used in the genetic improvement of rice. This paper summarizes the course of development and trend of rice transgenic technology, and a brief introduction of transgenic rice cultivation and its regulatory approval system in China was made at the same time.

Key words: transgenic technology; rice; varieties cultivation; regulation

转基因技术是指利用现代分子生物学技术分离克隆研究者期望的目标性状基因, 然后通过相应的转化手段将其导入到受体生物中并且能持续稳定遗传及表达, 从而改良受体生物原有的性状或赋予其新的性状。转基因技术通常也被称之为基因转移技术、重组DNA技术、遗传转化技术、遗传工程或

基因工程^[1]。转基因技术的研究始于20世纪70年

收稿日期: 2016-07-16

基金项目: 国家重点研发计划“水稻功能基因组研究与应用”项目(2016YFD0100900); 国家转基因重大专项(2016ZX08001-001)

*通信作者: E-mail: yongjunlin@mail.hzau.edu.cn

代,首次在微生物大肠杆菌中获得成功^[2]。1983年,第一株转基因烟草的问世开创了植物转基因技术的先河^[3]。经过30余年的发展,植物转基因技术已经成为作物遗传改良最重要的方法和手段之一,它的广泛应用带来了巨大的经济效益和社会效益。国际农业生物技术应用服务组织(ISAAA)的最新报告显示:2015年,全球28个国家约1800万农民共种植了1.797亿公顷的转基因作物;2015年,转基因作物的全球市场价值为153亿美元,占全球商业种子市场总价值的34%^[4]。

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上最重要的粮食作物之一。中国是水稻的生产和消费大国,种植面积占世界水稻总种植面积的20%左右,仅次于印度;总产量占世界总产的33%左右,居世界第一位。我国每年水稻的种植面积约占我国作物总种植面积的25%,总产量约占我国粮食总产量的40%;我国从事稻作生产的农户接近农户总数的50%,全国有60%以上的人口以稻米为主食^[5]。所以,水稻的生产及其相关产业直接关系到国计民生。和我国其他农作物一样,水稻在种植生产过程中也面临着诸如农药污染严重、水资源短缺、施肥过量、耕地面积不足、土地盐碱化、单产水平徘徊不前等一系列问题。鉴于此,我国科学家于2007年提出了“绿色超级稻”培育的策略^[6]:简单来说,就是以现阶段最优良的水稻品种为起始材料,有机整合转基因技术、分子标记技术及杂交选育技术,最终培育出“少打农药、少施化肥、节水抗旱、优质高产”的水稻新品种。近年来,水稻转基因技术在实现上述育种目标的进程中发挥着重要的作用。为了让更多的读者了解这一技术,笔者在这里就水稻转基因技术及转基因水稻新品种培育这两方面内容做一简单综述。

1 水稻转基因技术

水稻转基因技术的研究始于20世纪80年代末,在20世纪90年代中后期趋于成熟。早期的研究主要集中在转化方法与体系的建立(即回答“用什么样的手段把外源基因导入到受体品种中会更优越一些”这个问题)。随着转基因技术趋于成熟,研究者不再仅仅满足于简单地将外源基因导入到受体基因组中。为了满足不同的实验需求,一些新的转基因策略、思路和方法被逐步发展起来,也使得转基因技术的外延被不断扩大,水稻转基因技术目前正朝着“多、快、好、省”的方向快速发展。简单来讲,水稻转基因技术研究早期侧重点在“转”(研发工

具阶段),而现阶段的侧重点在“基因”(利用工具阶段)。下面对它们一一简单介绍。

1.1 水稻遗传转化体系的建立

水稻转基因技术的研究始于20世纪80年代末,3个不同的科研小组在1988年同时获得了转基因水稻再生植株,它们均是以水稻原生质体为转化对象,所用转化方法为电击法和PEG法^[7-9]。Christou等^[10]以水稻的幼胚为转化对象,于1991年首先获得了由基因枪介导的转基因水稻再生植株。Chan等^[11]同样以水稻幼胚为转化对象,于1993年首先获得了由农杆菌介导的转基因水稻再生植株。Hiei等^[12]以成熟胚诱导的愈伤组织为转化对象,对农杆菌介导的粳稻遗传转化体系进行了系统的优化,使得粳稻整体转化效率大大提高。由于遗传背景的原因,籼稻转化在一段时间内一直存在障碍,因此,研究人员对农杆菌介导的籼稻遗传转化体系也进行了系统的摸索与优化,使得籼稻的转化效率也得到了一定程度的提高^[13-15]。后续一些研究在进一步提高水稻转化效率及缩短转化周期方面又做了很多系统的工作^[16-17]。截至目前,水稻遗传转化的主流方法为农杆菌介导的遗传转化法,其优点为转化效率高、转化系统稳定、外源基因拷贝数较低、整合机理相对清楚、成本相对较低以及适合大规模工厂化操作。转化所用外植体多为成熟胚诱导的愈伤组织,因为成熟种子易于获得且不受季节影响、易于长期保存和运输,愈伤组织较易获得且可以大量继代培养,一定继代次数之内的愈伤组织对转化效率影响不大。现有的水稻遗传转化平台基本上可以突破不同品种之间基因型的限制,不过在转化效率及转化周期上略有不同,整体上来看粳稻转化体系依然优于籼稻转化体系。

1.2 时空特异性表达技术

如何让外源基因在受体内高效、稳定地按照人们的设计初衷来表达,可以说是转基因技术研究的出发点和落脚点。因此,随着转化技术的日趋成熟,越来越注重通过不同类型的启动子控制目的基因的时空表达来达到相应的实验目的。从1988年人类首次得到转基因水稻植株至今,转基因水稻的研究已走过近30年的历程。从现有报道来看,研究最多的还是利用组成型启动子来驱动目的基因表达,进而达到改良水稻相应性状的目的^[18-40]。组成型启动子在水稻转基因技术及水稻功能基因组的研究中发挥着重要的作用,但是在其广泛运用的过程中也逐渐暴露了一些问题,如外源基因在整株植物中持

续而恒定的表达，产生的大量异源蛋白质或代谢产物在植物体内积累，打破了植物原有的代谢平衡，不利于产量和品质的提高；有些产物对植物并非必需，甚至有毒，因而阻碍了植物的正常生长，甚至导致死亡^[41]。组成型启动子驱动下的外源基因在食用部位同样会持续表达，因此，也引起了一些食用安全性方面的担忧。另外，重复使用同一种组成型启动子驱动两个或两个以上的外源基因表达可能会引起基因沉默或共抑制现象^[42]，也给多基因转化带来了不少麻烦。因此，组织器官特异性表达启动子或诱导型表达启动子在转基因水稻的研发中越来越受到重视。

利用组织特异表达启动子来驱动目的基因在水稻特定部位表达已有不少报道^[43-55]。限于篇幅，笔者在此仅简单介绍两个由我国科研人员完成的工作。Ye等^[45]分离克隆了水稻绿色组织特异表达的*rbcS*基因的启动子，然后将该启动子与Bt杀虫基因*cry1C**融合，最后用农杆菌介导的遗传转化法将其导入到粳稻品种中花11，最终获得了Cry1C*蛋白仅在绿色组织特异表达的抗虫水稻株系。这种转基因水稻既可以有效保护水稻不被相应害虫为害(Cry1C*蛋白在二化螟、三化螟的主要取食部位，如叶片、叶鞘处高量表达)，又可以在一定程度上消除大众对转基因水稻食用安全的担忧(Cry1C*蛋白在大米胚乳中几乎不表达)。He等^[44]分离克隆了水稻胚乳组织特异性表达启动子*Gt13a*，然后用该启动子驱动经密码子优化的人血清白蛋白基因*OsrHSA*，最后用农杆菌介导的遗传转化法将其导入粳稻品种TP309，最终获得了OsrHSA蛋白仅在胚乳组织中特异高效表达的水稻株系。每千克这种转基因水稻的种子中可以提取出2.75 g纯度大于99%的人血清白蛋白，在医学和工业上展示了很好的应用前景。

与组织特异表达目的基因的研究相比，利用诱导型表达启动子来驱动目的基因表达进而达到改良水稻相应性状的研究相对要少一些。一个比较重要的原因就是大部分诱导表达的启动子即使在受诱导的情况下，表达量仍然不能达到预期的水平，但是诱导型表达启动子可以驱动目的基因只在特异条件诱导情况下高效表达的优点，仍然为许多研究者所推崇，也有一些相应的研究报道，表现出很好的运用前景^[56-60]。

1.3 无标记(Marker-free)转基因技术

在农杆菌介导的遗传转化系统中，为了快速高

效地得到遗传稳定的转基因植株，通常会将一个选择标记基因(selectable marker gene)与目的基因共转化。这样在相应选择剂(多为抗生素或除草剂)的作用下，非转化细胞被杀死，而转化细胞由于获得选择标记基因所赋予的抗性而成活下来，进而分化形成转基因植株。目前最常用的几个选择标记基因为潮霉素磷酸转移酶基因(hygromycinphosphotransferase, *hpt*)、新霉素磷酸转移酶基因(neomycin phosphotransferase II, *nptII*)、膦丝菌素乙酰转移酶基因(phosphinothricinacetyltransferase, *bar*)及5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合成酶基因(5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase, *EPSPS*)。它们对应的筛选剂分别是潮霉素、G418、膦丝菌素(草铵膦或草丁膦)及草甘膦，这些选择标记基因均已成功地用于多个转基因水稻研究中。

随着转基因作物的大规模商业化，选择标记基因的问题被逐渐提上日程。首先，在商品化的转基因作物中，选择标记基因的存在本身就是多余的(当然，如果目标性状是耐除草剂的话，那么*bar*或者*EPSPS*基因就既是选择标记基因又是目的基因，这种情况另当别论)。其次，选择标记基因也存在着一些潜在的负面影响(尽管目前没有任何正面报道)，如一些潜在的生态风险(选择标记基因向外界环境或其他物种的水平转移会带来一些所谓的“超级杂草”和“超级细菌”的担忧)和潜在的食用安全性担忧(转基因食品的选择标记基因及其编码产物是否对人或动物的健康有害)。同时，由于选择标记基因的存在，对该转基因植物进行多次遗传操作会受到一定的限制。因此，培育无选择标记的转基因植物已经成为植物转基因技术研究的一个重要方面。

概括来讲，无标记转基因技术大致有以下几种策略^[61-64]：农杆菌介导的共转化法、位点特异性重组酶介导的标记基因的消除、转座子介导的标记基因的消除及利用遗传编辑的手段来去除标记基因。农杆菌介导的共转化法消除标记基因的原理是：通过共转化的方式，农杆菌可以将两个不同的T-DNA片段转化到同一个植物细胞中去，其中一个T-DNA片段带有目的基因，另一个带有标记基因。如果两个T-DNA片段整合到植物基因组上不同的位置，则目的基因和标记基因就可以通过有性杂交在子代分离开来。利用位点特异性重组系统(目前用于植物遗传转化的重组酶系统主要有3种：Cre/loxP、FLP/FRTs和R/Rs系统)消除标记基因通常的转化方法是

在转化载体 T-DNA 区标记基因的两侧加上特异的重组位点。首先进行正常的农杆菌转化筛选, 然后再在转化植株中引入重组酶。重组酶的引入方式一般为两种, 即再次转化或与带有重组酶的转基因植株进行杂交。重组酶的引入可使转化植株中重组位点之间发生特异重组, 从而切除标记基因。以上两种方法的最大优点就是操作相对简单, 缺点主要是工作量较大、周期长。同时, 由于它们都依赖有性杂交分离而得到无标记基因的转化植株, 因此不适合生育期较长和需要营养繁殖的植物。转座子(转座子系统包括转座酶编码基因及其作用的可移动的末端重复序列, 它几乎能在所有异源植物寄主细胞中自由转座)介导的标记基因消除的主要原理就是通过将标记基因置于两个重复序列 Ds 之间, 转座作用发生后, 标记基因即随转座作用而与目的基因分离或丢失, 进而获得无标记基因的转基因植物。由于也涉及到有性杂交分离, 所以, 此方法依然不适合于营养繁殖和生育周期较长的植物。同时, 本方法不能用于多个转基因的聚合, 因为第二次引入的外源基因及其转座酶可能会引起第一个外源基因的转移。遗传编辑技术是近几年迅猛发展的可以对基因组进行定点修饰的技术, 所以, 同样可以用于创制无选择标记基因的转基因植物。以上几种技术在无标记转基因水稻的研究中都有相应报道^[65-67]。

1.4 多基因转化技术

所谓多基因转化技术就是同时在受体生物体内导入多个外源基因的技术。植物转基因早期的研究多是单个目的基因的导入(即改良一个性状), 但随着研究的深入, 人们越来越希望可以同步改良多个性状(如孟山都公司于 2012 年就推出过同时携带 8 个外源基因的转基因玉米品种, 可以同时抵抗多种除草剂及虫害); 其次, 就是某些性状(如对生物或非生物逆境产生耐受性)同时受多基因调控, 是多个基因共同作用的结果; 还有些研究期望将某个生物代谢途径整体导入到受体生物内进行功能验证(如某些特殊次生代谢产物的表达)等等, 这些都使得多基因转化技术的重要性变得越来越突出。

多基因转化技术的策略可以简单地分为两大类。一种策略就是按照常规的方法将不同的外源基因构建到不同的载体上, 然后通过共转化、重复转化或分别转化获得转基因植株后再杂交等不同的方法实现多基因的聚合, 如黄金大米(golden rice)的培育就是通过共转化的方法将两个基因导入到水稻中, 从而在转基因水稻胚乳中建立了 β -胡萝卜素

的生物合成途径^[53]。Yang 等^[20]将 4 个转单价 Bt 杀虫基因(*cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry1C** 和 *cry2A**)的水稻材料以 5 种组合方式分别正反交, 从而得到了 10 种抗虫性明显提高的含双价 Bt 杀虫基因的转基因水稻。很显然, 这种多基因转化技术操作相对简单, 但是比较费时费力(尤其是要通过有性杂交然后再纯合这样一个比较漫长的过程)。所以, 多基因转化技术的另一种策略就是将多个基因构建到同一个载体上, 然后一次将它们一起导入到受体植物。这种策略省时省力, 但唯一需要克服的技术困难是大片段 DNA 的装载与导入, 因为目前在农杆菌介导的遗传转化体系中用的最多的双元 Ti 载体的外源 DNA 装载能力都不大(一般小于 20 kb), 难以满足多基因转化的需要。鉴于此, 研究人员开发了一些可用于大片段装载与转化的特殊载体(装载能力理论上可以超过 100 kb), 如基于细菌人工染色体(bacteria artificial chromosome, BAC)改造的双元 BAC 载体 BIBAC(binary BAC)^[68]以及基于 P1 人工染色体改造的可用于转化的人工染色体 TAC(transformation-competent artificial chromosome)^[69], 它们在水稻多基因转化技术的研究中显示了很好的应用前景。

1.5 质体转化技术

质体是绿色植物细胞所特有的细胞器, 其与碳水化合物合成与贮藏密切相关。根据色素的不同, 质体可分成叶绿体、有色体和白色体这 3 种类型。人们在进行细胞核转化技术研究的同时对质体转化技术也开展了相应的研究。Svab 等^[70]于 1990 年首次在烟草中成功进行质体转化, 截至目前, 已在将近 20 种植物中获得成功。与细胞核转化技术相比, 质体转化在以下方面有其独特的优越性: 首先就是外源基因表达效率高、表达产物易于纯化, 这主要是因为植物细胞中含有高拷贝叶绿体基因组(每个植物细胞中可高达 1 万个拷贝, 而细胞核转化中外源基因整合的拷贝数通常只有 1 到数个); 其次就是大部分高等植物叶绿体的母系遗传特性可以保证外源基因不会随着转基因植物的花粉向非转基因品种或野生近缘种扩散; 再者就是质体转化技术的理论基础是同源重组, 因此, 在载体设计的时候就已经明确知道外源基因插入的位点, 这种定点式的插入可以有效避免细胞核转化过程中可能发生的位置效应和基因沉默; 最后就是质体内的基因表达与蛋白质翻译系统和原核生物是一样的, 所以, 很多来源于原核生物的基因可以无需做密码子优化等改造

即可直接表达，同时，原核生物基因的操纵子表达模式（一个启动子可以同时调控多个基因的表达）在多基因转化方面也非常具有优势。

经过 20 多年的研究与发展，质体转基因技术的优势已逐渐被人们认识并应用，质体转化技术也已经运用到作物遗传改良的方方面面，如通过质体转化来赋予受体植物抗虫性^[71]、抗病性^[72]、抗除草剂^[73-74]，提高受体植物的光合效率^[75]及品质改良^[76]等。尽管大部分工作都是在茄科植物（如烟草、番茄及马铃薯）中完成的，但对其他作物仍有很强的指导与借鉴意义。质体转化技术在水稻中的研究相对较少^[77-78]，且这些研究中得到的转化植株均是异质体植株，尚未达到同质化，但是质体转化技术在水稻中依然表现出很诱人的应用前景。

1.6 定点转化技术及基因编辑技术

定点转化技术也叫基因打靶 (gene targeting) 技术，是 20 世纪 80 年代末发展起来的一项分子生物学技术。简单来说，就是通过外源 DNA 序列与靶细胞内染色体上同源 DNA 序列间的重组，从而将外源 DNA 定点整合入基因组上某一确定的位点，或对某一预先确定的靶位点进行定点突变，进而改变细胞遗传特性的方法。同源重组是其分子生物学基础，这项技术曾经在植物基因功能研究中发挥过重要的作用^[79-80]，但是非常低的打靶效率（尽管水稻中曾经达到过 1% 的打靶效率，不过大部分植物的效率都远低于此）限制了这项技术的广泛应用，目前基本上被近期迅猛发展的基因编辑技术所取代。

基因编辑技术是指使用序列特异性核酸酶在基因组特定位点实现 DNA 的插入、替换或删除，从而在基因组水平上对特定基因进行精确、定向修饰的一种方法。基因编辑技术是近几年分子生物学领域研究的热点，已被广泛用于作物遗传改良的方方面面^[81]。目前，用于基因组编辑的序列特异性核酸酶主要有锌指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFNs)、类转录激活子效应蛋白核酸酶 (transcription activator like effector nuclease, TALEN) 以及 CRISPR/Cas9 系统 (CRISPR/Cas9 system)。在本期杂志中另有专题文章来对遗传编辑技术进行介绍。

2 转基因水稻新品种培育

从作物育种的角度来讲，所谓“品种”是指一个种内具有共同来源和特有一致性状的一群栽培植物，其遗传性稳定，且具有较高的经济价值。所谓“新品种”是指经过人工培育的或者对发现的野生植物

加以开发，具备新颖性、特异性、一致性和稳定性并有适当命名的品种。从法律角度上来讲，一个品种或一个新品种只有通过相应机构的审定并获得授权之后才算是真正意义上的“品种”或“新品种”，并且只有真正意义上的“品种”或“新品种”才可发布广告、推广及销售。这一点在《中华人民共和国种子法》(2016 版)及《主要农作物品种审定办法》(农业部令 2013 年第 4 号)中都有明确的体现。所以严格来讲，我国目前没有转基因水稻新品种。事实上，除了伊朗在 2005 年曾经小规模种植过转基因抗虫水稻外，全世界目前都没有转基因水稻新品种。同时，由于转基因水稻涉及分子操作，所以其监管与审批流程又不同于常规的水稻品种选育。接下来笔者就转基因水稻新材料的创制及我国转基因水稻新品种培育的流程做一简单介绍。

2.1 转基因水稻新材料的研制和新品系的培育

尽管目前我国并无转基因水稻新品种，但是长期的研究已经积累了大量的转基因水稻新材料和新品系。总体来讲，这些材料所涉及的性状改良基本上覆盖了我国目前水稻生产及育种过程中所有被关注的问题，与前面提到的绿色超级稻的育种目标也是吻合的。

限于篇幅，笔者无法对所有的转基因水稻材料和新品系一一介绍，但是尽量收集了相应性状改良所涉及到的文献，读者可按自己的关注点进行追踪。可简单分为抗虫基因挖掘及其转基因水稻新材料的研制^[20,27-28,37,45,48,82-85]、抗病基因的克隆及其转基因水稻新材料的研制^[19,23,56,86-98]、抗逆基因的克隆及其转基因水稻新材料的研制^[24,99-113]、水稻营养高效利用基因的克隆及其转基因水稻新材料的研制^[21,22,114-118]、抗除草剂基因的克隆及其转基因水稻新材料的研制^[18]和水稻品质产量相关基因的克隆及其转基因水稻新材料的研制^[119-129]。

需要指出的是，我国转基因水稻研究已经达到世界先进水平，抗虫水稻的研发居于世界领先地位。由华中农业大学研发的转 Bt 杀虫基因 *cry1Ab/Ac* 的“华恢 1 号”^[37]及其杂交组合“Bt 汕优 63”在经历了 11 年的安全性评价后已获得农业部颁发的转基因水稻安全证书（这是我国农业部颁发的第一份转基因水稻安全证书，具有里程碑式的意义）。通过与全国优势育种单位的合作，利用“华恢 1 号”转育出大量的抗虫不育系、抗虫恢复系和抗虫杂交组合，具备了很好的不同生态区的品种储备。开发出 *cry1C** 和 *cry2A** 两个新型抗虫基因，并培育相应

的新型抗虫抗除草剂转基因水稻 TIC-19^[27] 和 T2A-1^[28], 目前已完成生产性试验和食品安全性相关的检测, 已经申请生产应用安全证书; 同时, 后续的聚合多个 Bt 杀虫基因的转基因水稻材料^[20] 及绿色组织特异表达 Bt 杀虫基因的转基因水稻材料^[45] 都已陆续地进入田间试验。可以说, 我国转基因水稻已初步具备了大规模产业化的条件和技术储备, 在政策允许的条件下可以迅速实现商业化。

2.2 转基因水稻新品种的监管与审批流程

从国外的研究经验来看, 开发一种转基因作物的平均成本是 1.35 亿美元, 其中 1 亿美元是技术成本, 3 500 万美元则是繁复的监管成本^[4]。这从侧面说明转基因作物新品种的监管与审批不但需要投入大量的人力、物力及财力, 而且还必须要有配套的法律法规、技术规程、管理体系与操作指南来支撑。

美国和欧盟在转基因作物的研究方面起步较早, 分析他们对转基因作物的监管思想、监管原则、监管方法及监管制度对于制定符合我国国情的转基因作物监管体系是大有裨益的。简单来讲, 美国采取的是“以产品为基础”的相对宽松的管理模式, 即对转基因作物的管理是依据其产品的用途和特性来进行。直接对转基因作物培育的各阶段进行监管的有 3 个部门, 即美国农业部 (United States Department of Agriculture, USDA)、美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 和美国国家环境保护局 (Environmental Protection Agency, EPA)。这 3 个部门按照《生物技术管理协调框架》及其他相应法规来负责转基因作物的种植安全 (USDA)、食用 (饲用) 安全 (FDA) 及环境安全 (EPA)。除此之外, 美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 负责对实验室研究进行安全管理, 职业安全与卫生管理局 (Occupational Safety and Health Administration, OSHA) 则对相关从业人员的劳动保护方面进行安全管理。与美国截然不同, 欧盟采取的是“以过程为基础”的比较严格的管理模式, 因为其管理模式是以监管外源基因的导入过程为主, 所以其极力主张“预先预防的态度”。同时, 由于其成员国家众多, 因此, 其管理体系相对复杂, 并且具有难以统一意见以及决策时间长等特点。其主要监管单位是欧盟食品安全管理局 (European Food Safety Authority, EFSA), 现行法规主要包括《关于转基因生物有益环境释放的指令》、《关于转基因微生物封闭使用的指令》、《关于转基因生物食品和

饲料条例》及《关于转基因生物的可追踪性和标识即由转基因生物制成的食品和饲料产品的可追踪性条例》等。

我国按照全球公认的评价准则, 借鉴欧美普遍做法, 同时结合我国国情, 已逐步形成了一整套适合我国国情并与国际接轨的法律法规、技术规程和管理体系, 为我国农业转基因安全管理提供了有力保障。早在 1993 年, 当时的国家科委就发布了《基因工程安全管理办法》, 规定从事基因工程实验研究的同时, 还应当进行安全性评价。1996 年, 农业部发布《农业生物基因工程安全管理实施办法》, 对农业基因工程项目的审批程序、安全评价系统以及法律责任等做了原则性规定。1997 年, 农业部成立农业生物基因工程安全委员会和农业生物基因工程安全管理办公室, 正式开始受理农业生物基因工程及其产品安全性评价申报书。2001 年, 国务院发布了《农业转基因生物安全管理条例》, 明确规定农业转基因生物需实行安全评价制度、标识管理制度、生产许可制度、经营许可制度和进口安全审批制度。在《农业转基因生物安全管理条例》发布后, 农业部和质检总局又制定了 5 个配套规章来进一步细化《农业转基因生物安全管理条例》, 它们分别是《农业转基因生物安全评价管理办法》(该办法于 2002 年 3 月开始实施, 1996 农业部发布的《农业生物基因工程安全管理实施办法》同时废止)、《农业转基因生物进口安全管理办法》、《农业转基因生物标识管理办法》、《农业转基因生物加工审批办法》和《进出境转基因产品检验检疫管理办法》。2007 年, 农业部发布了《转基因植物及其产品食用安全性评价导则》农业行业标准。2010 年, 农业部发布了《转基因植物安全评价指南》。同时, 最新版的《中华人民共和国种子法》及《主要农作物品种审定办法》也对转基因作物新品种的审定做出了相应说明。这一系列法律、法规、办法、标准与指南的发布使对转基因作物新品种的监管越来越细化, 操作性也越来越强。

具体来讲, 一个转基因作物新品种要想商业化, 必须要经历的历程是: 完成安全性评价试验并获得转基因安全证书; 进行严格的区域试验和生产试验, 达到标准后获得品种审定证书; 相关种子企业通过审核获得转基因作物种子生产许可证书和经营许可证书。其中安全性评价是第一步, 也是耗时最长的一个环节, 所谓转基因生物安全性评价就是指综合利用现阶段各种技术手段对转化受体、外源基因、

表达载体、转化方法、转基因材料的分子特征、遗传稳定性、食用(饲用)安全性及环境安全性等方面做一个综合全面的评估,并以这个评估结论作为是否颁发转基因生物安全证书的主要依据。安全性评价一共包括5个环节:实验研究阶段(时间不定)、中间试验阶段(一般1~2年或者更长)、环境释放阶段(一般1~2年)、生产性试验阶段(一般1~2年)及申请安全证书阶段(1~2年或者更长)。其中,实验室研究是指转基因材料的创制阶段;中间试验是指在控制系统内或者控制条件下进行的小规模试验;环境释放是指在自然条件下采取相应的安全措施所进行的中规模的试验;生产性试验则是指在生产或应用前进行的较大规模的试验。按照规定,一个环节完成方可进入下一个环节,其中只有实验室研究阶段这个环节并且只有生物安全等级为I级(该研究对人类、动植物、微生物和生态环境尚不存在危险)或II级(该研究对人类、动植物、微生物和生态环境具有低度危险)的农业转基因生物试验研究可以由本单位农业转基因生物安全小组批准,其余所有环节都必须向农业部农业转基因生物安全管理办公室汇报及报批。2010年,农业部发布的《转基因植物安全评价指南》对每一个环节需要提供的实验数据及检测内容都做了非常明确的要求,由于涉及的科目非常多,笔者就不一一陈述了。

从以上论述来看,我国对转基因生物的监管是非常系统并且相当严格的,因此,凡是政府经过安全性评价后审批上市的转基因食品的安全性是有保障的,可以等同于传统食品。就转基因水稻新品种培育来讲,目前推进最快的是转Bt抗虫基因的水稻(已经获得农业部颁发的转基因水稻安全证书),其余绝大部分转基因水稻新材料或新品系尚处于安全性评价各个阶段。对于已经获得转基因水稻安全证书的转基因品系来说,接下来需要做的就是申请品种审定证书及生产许可证书,在政策允许的条件下就可以迅速实现商业化。

3 结语

水稻是我国最重要的粮食作物之一,经过近30年的研究与不断探索,水稻转基因技术取得了巨大的进步。自2008年以来,政府以转基因重大专项的形式对转基因水稻的研究给予了持续有力的资金支持。在此大背景下,我国科研人员创制了大量的转基因水稻新材料和新品系。同时,配套的法律法规及监管体系日趋成熟,两个转基因水稻品系也

获得了转基因安全证书。加上中央政府对于转基因作物商业化的态度也越来越明确,因此,可以预见,转基因水稻的研发及未来的商业化种植必然会对保障我国种业安全、粮食安全及农业安全做出巨大的贡献。

[参 考 文 献]

- [1] 孙明. 基因工程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006
- [2] Jackson DA, Symons RH, Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, 1972, 69: 2904-9
- [3] Zambryski P, Joos H, Genetello C, et al. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO J, 1983, 2: 2143-50
- [4] James C. Global status of commercialized biotech/GM crops[R]: 2015. ISAAA Brief No.51. Ithaca, NY: ISAAA, 2016
- [5] [http://www.knowledgebank.irri.org/country-specific/asia/rice-knowledge-for-china\[EB/OL\]](http://www.knowledgebank.irri.org/country-specific/asia/rice-knowledge-for-china[EB/OL])
- [6] Zhang Q. Strategies for developing green super rice. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 16402-9
- [7] Toriyama K, Arimoto Y, Uchimiya H, et al. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. Nat Biotechnol, 1988, 6: 1072-4
- [8] Zhang HM, Yang H, Rech EL. Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. Plant Cell Rep, 1988, 7: 379-84
- [9] Zhang W, Wu R. Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. Theor Appl Genet, 1988, 76: 835-40
- [10] Christou P, Ford T, Kofron M. Production of transgenic Rice (*Oryza Sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. Nat Biotechnol, 1991, 9: 957-62
- [11] Chan MT, Chang HH, Ho SL, et al. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α -amylase promoter/ β -glucuronidase gene. Plant Mol Biol, 1993, 22: 491-506
- [12] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant J, 1994, 6: 271-82
- [13] Hiei Y, Komari T. Improved protocols for transformation of indica rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2006, 85: 271-83
- [14] Ge XJ, Chu ZZ, Lin YJ, et al. A tissue culture system for different germplasms of *indica* rice. Plant Cell Rep, 2005, 25: 392-402

- [15] Lin YJ, Zhang Q. Optimizing the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice. *Plant Cell Rep*, 2005, 23: 540-7
- [16] Toki S, Hara N, Ono K, et al. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J*, 2006, 47: 969-76
- [17] Hiei Y, Komari T. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nat Protoc*, 2008, 3: 824-34
- [18] Cui Y, Liu ZD, Li Y, et al. Application of a novel phosphinothricin *N*-acetyltransferase (RePAT) gene in developing glufosinate-resistant rice. *Sci Rep*, 2016, 6: 21259
- [19] Wang R, Lu LX, Pan XB, et al. Functional analysis of *OsPGIP1* in rice sheath blight resistance. *Plant Mol Biol*, 2015, 87: 181-91
- [20] Yang Z, Chen H, Tang W, et al. Development and characterization of transgenic rice expressing two *Bacillus thuringiensis* genes. *Pest Manag Sci*, 2011, 67: 414-22
- [21] Cai HM, Zhou Y, Xiao JH, et al. Overexpressed glutamine synthetase gene modifies nitrogen metabolism and abiotic stress responses in rice. *Plant Cell Rep*, 2009, 28: 527-37
- [22] Zhou Y, Cai HM, Xiao JH, et al. Over-expression of aspartate aminotransferase genes in rice resulted in altered nitrogen metabolism and increased amino acid content in seeds. *Theor Appl Genet*, 2009, 118: 1381-90
- [23] Shao M, Wan JS, Dean RA, et al. Expression of a harpin-encoding gene in rice confers durable nonspecific resistance to *Magnaporthegrisea*. *Plant Biotechnol J*, 2008, 6: 73-81
- [24] Wang QY, Guan YC, Wu YR, et al. Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. *Plant Mol Biol*, 2008, 67: 589-602
- [25] Liu KM, Wang L, Xu YY, et al. Overexpression of *OsCOIN*, a putative cold inducible zinc finger protein, increased tolerance to chilling, salt and drought, and enhanced proline level in rice. *Planta*, 2007, 226: 1007-16
- [26] Maruthasalam S, Kalpana K, Kumar KK, et al. Pyramiding transgenic resistance in elite indica rice cultivars against the sheath blight and bacterial blight. *Plant Cell Rep*, 2007, 26: 791-804
- [27] Tang W, Chen H, Xu CG, et al. Development of insect-resistant transgenic indica rice with a synthetic *cry1C** gene. *Mol Breed*, 2006, 18: 1-10
- [28] Chen H, Tang W, Xu CG, et al. Transgenic indica rice plants harboring a synthetic *cry2A** gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against rice lepidopteran pests. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1330-7
- [29] Coca M, Bortolotti C, Rufat M, et al. Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthegrisea*. *Plant Mol Biol*, 2004, 54: 245-59
- [30] Alfonso-Rubi J, Ortego F, Castanera P, et al. Transgenic expression of trypsin inhibitor CMe from barley in *indica* and *japonica* rice, confers resistance to the rice weevil *Sitophilus oryzae*. *Transgenic Res*, 2003, 12: 23-31
- [31] Jang IC, Oh SJ, Seo JS, et al. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiol*, 2003, 131: 516-24
- [32] Kim JK, Jang IC, Wu R, et al. Co-expression of a modified maize ribosome-inactivating protein and a rice basic chitinase gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to sheath blight. *Transgenic Res*, 2003, 12: 475-84
- [33] Nishizawa Y, Saruta M, Nakazono K, et al. Characterization of transgenic rice plants over-expressing the stress-inducible β -glucanase gene *Gns1*. *Plant Mol Biol*, 2003, 51: 143-52
- [34] Datta K, Koukoliková-Nicola Z, Baisakh N, et al. *Agrobacterium*-mediated engineering for sheath blight resistance of indica rice cultivars from different ecosystems. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 832-9
- [35] Saijo Y, Hata S, Kyojuka J, et al. Overexpression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J*, 2000, 23: 319-27
- [36] Schaffrath U, Mauch F, Freydl E, et al. Constitutive expression of the defense-related *Rir1b* gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthegrisea*. *Plant Mol Biol*, 2000, 43: 59-66
- [37] Tu J, Zhang G, Datta K, et al. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 1101-4
- [38] Nishizawa Y, Nishio Z, Nakazono K, et al. Enhanced resistance to blast (*Magnaporthegrisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 383-90
- [39] Datta K, Vasquez A, Tu J, et al. Constitutive and tissue-specific differential expression of the *cry1A(b)* gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 20-30
- [40] Xu DP, Duan XL, Wang BY, et al. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol*, 1996, 110: 249-57
- [41] Karlowski WM, Hirsch AM. The over-expression of an alfalfa *RING-H2* gene induces pleiotropic effects on plant growth and development. *Plant Mol Biol*, 2003, 52: 121-33
- [42] Kumpatla SP, Chandrasekharan MB, Iuer LM, et al. Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing. *Trends Plant Sci*, 1998, 3: 96-104
- [43] Li CY, Wei J, Lin YJ, et al. Gene silencing using the recessive rice bacterial blight resistance gene *xa13* as a new paradigm in plant breeding. *Plant Cell Rep*, 2012, 31: 851-62
- [44] He Y, Ning TT, Xie TT, et al. Large-scale production of

- functional human serum albumin from transgenic rice seeds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 19078-83
- [45] Ye RJ, Huang HQ, Yang Z, et al. Development of insect-resistant transgenic rice with Cry1C*-free endosperm. *Pest Manag Sci*, 2009, 65: 1015-20
- [46] Shrawat AK, Carroll RT, DePauw M, et al. Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue-specific expression of alanine aminotransferase. *Plant Biotechnol J*, 2008, 6: 722-32
- [47] Taniguchi Y, Ohkawa H, Masumoto C, et al. Overproduction of C₄ photosynthetic enzymes in transgenic rice plants: an approach to introduce the C₄-like photosynthetic pathway into rice. *J Exp Bot*, 2008, 59: 1799-809
- [48] Cai M, Wei J, Li XH, et al. A rice promoter containing both novel positive and negative *cis*-elements for regulation of green tissue-specific gene expression in transgenic plants. *Plant Biotechnol J*, 2007, 5: 664-74
- [49] Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, et al. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased provitamin A content. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 482-7
- [50] Nagadhara D, Ramesh D, Pasalu IC, et al. Transgenic rice plants expressing the snowdrop lectin gene (*gna*) exhibit high-level resistance to the whitebacked planthopper (*Sogatellafurcifera*). *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 1399-405
- [51] Nagadhara D, Ramesh S, Pasalu IC, et al. Transgenic indica rice resistant to sap-sucking insects. *Plant Biotechnol J*, 2003, 1: 231-40
- [52] Vasconcelos M, Datta K, Oliva N, et al. Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene. *Plant Sci*, 2003, 164: 371-8
- [53] Ye XD, Al-Babili S, Klöti A, et al. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 2000, 287: 303-5
- [54] Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, et al. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 282-6
- [55] Tang KX, Tinjuangjun P, Xu YN, et al. Particle-bombardment-mediated co-transformation of elite Chinese rice cultivars with genes conferring resistance to bacterial blight and sap-sucking insect pests. *Planta*, 1999, 208: 552-63
- [56] Yuan T, Li XH, Xiao JH, et al. Characterization of *Xanthomonasoryzae*-responsive *cis*-acting element in the promoter of rice race-specific susceptibility gene *Xa13*. *Mol Plant*, 2011, 4: 300-9
- [57] Liu L, Zhou Y, Szczerba MW, et al. Identification and application of a rice senescence-associated promoter. *Plant Physiol*, 2010, 153: 1239-49
- [58] Wu XL, Shiroto Y, Kishitani S, et al. Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing *OsWRKY11* under the control of *HSP101* promoter. *Plant Cell Rep*, 2009, 28: 21-30
- [59] Cai M, Qiu DY, Yuan T, et al. Identification of novel pathogen-responsive *cis*-elements and their binding proteins in the promoter of *OsWRKY13*, a gene regulating rice disease resistance. *Plant Cell Environ*, 2008, 31: 86-96
- [60] Hua HX, Lu Q, Cai M, et al. Analysis of rice genes induced by striped stemborer (*Chilosuppressalis*) attack identified a promoter fragment highly specifically responsive to insect feeding. *Plant Mol Biol*, 2007, 65: 519-30
- [61] Yau YY, Stewart CN. Less is more: strategies to remove marker genes from transgenic plants. *BMC Biotechnol*, 2013, 13: 36
- [62] Darbani B, Eimanifar A, Stewart CN, et al. Methods to produce marker-free transgenic plants. *Biotechnol J*, 2007, 2: 83-90
- [63] Miki B, McHugh S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol*, 2004, 107: 193-232
- [64] Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, et al. Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker. *Plant Cell Rep*, 2001, 20: 383-92
- [65] Oliva N, Chadha-Mohanty P, Poletti S, et al. Large-scale production and evaluation of marker-free indica rice IR64 expressing phytoferritin genes. *Mol Breed*, 2014, 33: 23-37
- [66] Bai XQ, Wang QY, Chu CC. Excision of a selective marker in transgenic rice using a novel *Cre/loxP* system controlled by a floral specific promoter. *Transgenic Res*, 2008, 17: 1035-43
- [67] Cotsaftis O, Sallaud C, Breitle JC, et al. Transposon-mediated generation of T-DNA and marker-free rice plants expressing a *Bt* endotoxin gene. *Mol Breed*, 2002, 10: 165-80
- [68] Hamilton CM, Frary A, Lewis C, et al. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 9975-9
- [69] Liu YG, Shirano Y, Fukaki H, et al. Complementation of plant mutant with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 6535-40
- [70] Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 8526-30
- [71] McBride KE, Svab Z, Schaaf DJ, et al. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Biotechnology*, 1995, 13: 362-5
- [72] Jin S, Zhang X, Daniell H. Pinelliaternata agglutinin expression in chloroplasts confers broad spectrum resistance against aphid, whitefly, Lepidopteran insects, bacterial and viral pathogens. *Plant Biotechnol J*, 2012, 10: 313-27
- [73] Ye GN, Hajdukiewicz PT, Broyles D, et al. Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco. *Plant J*, 2001, 25: 261-70
- [74] Lutz KA, Knapp JE, Maliga P. Expression of *bar* in the

- plastid genome confers herbicide resistance. *Plant Physiol*, 2001, 125: 1585-90
- [75] Whitney SM, Birch R, Kelso C, et al. Improving recombinant Rubisco biogenesis, plant photosynthesis and growth by co-expressing its ancillary *RAF1* chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 3564-9
- [76] Wurbs D, Ruf S, Bock R. Contained metabolic engineering in tomatoes by expression of carotenoid biosynthesis genes from the plastid genome. *Plant J*, 2007, 49: 276-88
- [77] Khan MS, Maliga P. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 910-5
- [78] Lee SM, Kang K, Chung H, et al. Plastid transformation in the monocotyledonous cereal crop, rice (*Oryza sativa*) and transmission of transgenes to their progeny. *Mol Cells*, 2006, 21: 401-10
- [79] Hanin M, Volrath S, Bogucki A, et al. Gene targeting in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2001, 28: 671-7
- [80] Terada R, Urawa H, Inagaki Y, et al. Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 1030-4
- [81] Chen H, Lin YJ. Promise and issues of genetically modified crops. *Curr Opin Plant Biol*, 2013, 16: 255-60
- [82] Sun X, Wu A, Tang K. Transgenic rice lines with enhanced resistance to the small brown plant hopper. *Crop Prot*, 2002, 21: 511-4
- [83] Wu G, Cui H, Ye G, et al. Inheritance and expression of the *cry1Ab* gene in Bt (*Bacillus thuringiensis*) transgenic rice. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 727-34
- [84] Huang JQ, Wei ZM, An HL, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of rice with the spider insecticidal gene conferring resistance to leafhopper and striped stem borer. *Cell Res*, 2001, 11: 149-55
- [85] Ye G Y, Shu Q Y, Yao H W, et al. Field evaluation of resistance of transgenic rice containing a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to two stem borers. *J Econ Entomol*, 2001, 94: 271-6
- [86] Xiao J, Cheng HT, Li XH, et al. Rice *WRKY13* regulates crosstalk between abiotic and biotic stress signaling pathways by selective binding to different *cis*-elements. *Plant Physiol*, 2013, 163: 1868-82
- [87] Deng HQ, Liu HB, Li XH, et al. A CCCH-type zinc finger nucleic acid-binding protein quantitatively confers resistance against rice bacterial blight disease. *Plant Physiol*, 2012, 158: 876-89
- [88] Li HJ, Li XH, Xiao JH, et al. Ortholog alleles at *Xa3/Xa26* locus confer conserved race-specific resistance against *Xanthomonas oryzae* in rice. *Mol Plant*, 2012, 5: 281-90
- [89] Liu QS, Yuan M, Zhou Y, et al. A paralog of the MtN3/saliva family recessively confers race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* in rice. *Plant Cell Environ*, 2011, 34: 1958-69
- [90] Shen XL, Liu HB, Yuan B, et al. *OsEDR1* negatively regulates rice bacterial resistance via activation of ethylene biosynthesis. *Plant Cell Environ*, 2011, 34: 179-91
- [91] Yuan M, Chu ZH, Li XH, et al. The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution. *Plant Cell*, 2010, 22: 3164-76
- [92] Zhao J, Fu J, Li XH, et al. Dissection of the factors affecting development-controlled and race-specific disease resistance conferred by leucine-rich repeat receptor kinase-type *R* genes in rice. *Theor Appl Genet*, 2009, 119: 231-9
- [93] Yuan M, Chu ZH, Li XH, et al. Pathogen-induced expressional loss of function is the key factor of race-specific bacterial resistance conferred by a recessive *R* gene *xa13* in rice. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50: 947-55
- [94] Wang CT, Wen GS, Lin XH, et al. Identification and fine mapping of the new bacterial blight resistance gene, *Xa31(t)* in rice. *Eur J Plant Pathol*, 2009, 123: 235-40
- [95] Xiao WF, Liu HB, Li Y, et al. A rice gene of *de novo* origin negatively regulates pathogen-induced defense response. *PLoS One*, 2009, 4: e4603
- [96] Wu XM, Li XH, Xu CG, et al. Fine genetic mapping of *xa24*, a recessive gene for resistance against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Theor Appl Genet*, 2008, 118: 185-91
- [97] Qiu DY, Xiao J, Ding XH, et al. *OsWRKY13* mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate and jasmonate-dependent signaling. *Mol Plant Microbe Interact*, 2007, 20: 492-9
- [98] Zhang SP, Song WY, Chen LL, et al. Transgenic elite indica rice varieties, resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Mol Breed*, 1998, 4: 551-8
- [99] Zhu XY, Xiong LZ. Putative megaenzyme *DWAI* plays essential roles in drought resistance by regulating stress-induced wax deposition in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 17790-5
- [100] Du H, Wu N, Fu J, et al. A GH3 family member, *OsGH3-2*, modulates auxin and abscisic acid levels and differentially affects drought and cold tolerance in rice. *J Exp Bot*, 2012, 63: 6467-80
- [101] Tang N, Zhang H, Li XH, et al. Constitutive activation of transcription factor *OsbZIP46* improves drought tolerance in rice. *Plant Physiol*, 2012, 158: 1755-68
- [102] Ning J, Li XH, Hicks LM, et al. A Raf-like MAPKKK gene *DSM1* mediates drought resistance through reactive oxygen species scavenging in rice. *Plant Physiol*, 2010, 152: 876-90
- [103] Hou X, Xie KB, Yao JL, et al. Homolog of human ski-interacting protein in rice positively regulates cell viability and stress tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 6410-5
- [104] Xiao BZ, Chen X, Xiang CB, et al. Evaluation of seven function-known candidate genes for their effects on improving drought resistance of transgenic rice under the field conditions. *Mol Plant*, 2009, 2: 73-83
- [105] Yang Z, Wu YR, Li Y, et al. *OsMT1a*, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. *Plant Mol Biol*, 2009, 70: 219-29
- [106] Chen JQ, Meng XP, Zhang Y et al. Over-expression of

- OsDREB* genes lead to enhanced drought tolerance in rice. *Biotechnol Lett*, 2008, 30: 2191-8
- [107] Huang J, Wang MM, Jiang Y, et al. Expression analysis of rice A20/AN1-type zinc finger genes and characterization of ZFP177 that contributes to temperature stress tolerance. *Gene*, 2008, 420: 135-44
- [108] Xiang Y, Tang N, Du H, et al. Characterization of *OsbZIP23* as a key player of bZIP transcription factor family for conferring ABA sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. *Plant Physiol*, 2008, 148: 1938-52
- [109] Xu DQ, Huang J, Guo SQ, et al. Overexpression of a TFIIIA-type zinc finger protein gene *ZFP252* enhances drought and salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Febs Lett*, 2008, 582: 1037-43
- [110] Huang YM, Xiao BZ, Xiong LZ. Characterization of a stress responsive proteinase inhibitor gene with positive effect in improving drought resistance in rice. *Planta*, 2007, 226: 73-85
- [111] Xiang Y, Huang YM, Xiong LZ. Characterization of stress-responsive *CIPK* genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiol*, 2007, 144: 1416-28
- [112] Xiao BZ, Huang YM, Tang N, et al. Overexpression of a *LEA* gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theor Appl Genet*, 2007, 115: 36-45
- [113] Hu HH, Dai MQ, Yao JL, et al. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 12987-92
- [114] Wang SK, Zhang SN, Sun CD, et al. Auxin response factor (*OsARF12*), a novel regulator for phosphate homeostasis in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol*, 2014, 201: 91-103
- [115] Dai XY, Wang YY, Yang A, et al. *OsMYB2P-1*, an *R2R3 MYB* transcription factor, is involved in the regulation of phosphate-starvation responses and root architecture in rice. *Plant Physiol*, 2012, 159: 169-83
- [116] Sun SB, Gu M, Cao Y et al. A constitutive expressed phosphate transporter, *OsPht1;1*, modulates phosphate uptake and translocation in phosphate-replete rice. *Plant Physiol*, 2012, 159: 1571-81
- [117] Wang C, Ying S, Huang HJ, et al. Involvement of *OsSPX1* in phosphate homeostasis in rice. *Plant J*, 2009, 57: 895-904
- [118] Yi KK, Wu ZC, Zhou J, et al. *OsPTF1*, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice. *Plant Physiol*, 2005, 138: 2087-96
- [119] Xu CJ, Liu Y, Li YB, et al. Differential expression of *GS5* regulates grain size in rice. *J Exp Bot*, 2015, 66: 2611-23
- [120] Li YB, Fan CC, Xing YZ, et al. *Chalk5* encodes a vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase influencing grain chalkiness in rice. *Nat Genet*, 2014, 46: 398-404
- [121] Peng B, Kong HL, Li YB, et al. *OsAAP6* functions as an important regulator of grain protein content and nutritional quality in rice. *Nat Commun*, 2014, 5: 4847
- [122] Liu TM, Liu HY, Zhang H, et al. Validation and characterization of *Ghd7.1*, a major QTL with pleiotropic effect on spikelets per panicle, plant height, and heading date in rice (*Oryza sativa* L.). *J Integr Plant Biol*, 2013, 45: 36-41
- [123] Yan WH, Liu HY, Zhou XC, et al. Natural variation in *Ghd7.1* plays important roles in grain yield and adaptation in rice. *Cell Res* 2013, 23: 969-71
- [124] Li YB, Fan CC, Xing YZ, et al. Natural variation in *GS5* plays an important role in regulating grain size and yield in rice. *Nat Genet*, 2011, 43: 1266-9
- [125] Yan WH, Wang P, Chen HX et al. A major QTL, *Ghd8*, plays pleiotropic roles in regulating grain productivity, plant height and heading date in rice. *Mol Plant*, 2011, 4: 319-30
- [126] Bai XF, Luo LJ, Yan WH, et al. Genetic dissection of rice grain shape using a recombinant inbred line population derived from two contrasting parents and fine mapping of *qGL7*. *BMC Genet*, 2010, 11: 16
- [127] Xue WY, Xing YZ, Weng XY, et al. Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nat Genet*, 2008, 40: 761-7
- [128] Song XJ, Huang W, Shi M, et al. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nat Genet*, 2007, 39: 623-30
- [129] Fan CC, Xing YZ, Mao HL, et al. *GS3*, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. *Theor Appl Genet*, 2006, 112: 1164-71