

药用植物中转基因元件筛查策略研究

赵丰兰, 孙梦楚, 史梦如, 薛建平, 段永波

淮北师范大学生命科学学院, 安徽 淮北 235000

摘要: 通过对已有药用植物转基因研究文献进行总结分析, 为药用植物和中药材转基因监管提供有效策略。采用关键词检索法对中国知网和 SCI 两大数据库进行查询, 建立 48 种常用药用植物转基因研究中常用表达元件的数据库, 分析转基因元件使用情况, 并总结外源转基因的筛查策略。获得 1993 年 4 月至 2016 年 5 月的转基因研究文献 281 篇, 包括中文文献 230 篇, 英文文献 51 篇。40.4% 的中文文献和 54.9% 的英文文献研究目的为优化药用植物遗传转化体系。常用启动子包括 P-35S、P-Ubi、P-GPD 和 P-act, 其中 P-35S 的使用频率最高, 为 68.7%。常用标记基因包括 NPTII、HPT、Gent、Bar 和 aadA, 其中 NPTII 的使用频率最高, 为 37.4%。常用报告基因包括 GUS 和 GFP, GUS 使用频率达到 35.2%。常用终止子包括 T-NOS、T-35S 和 T-OCS, 其中 T-NOS 的使用频率最高, 为 58%。对各元件进行配组分析, 发现“P-35S+T-NOS+NPTII+GUS”组合筛选成功率为 86.1%, 在此基础上加入有一定使用频率的 HPT、Bar 和 GFP, 对药用植物转基因元件的筛查率达到 91.5%。对于使用同源或内源启动子、标记基因和终止子的研究, 可基于 T-DNA 边界序列进行转基因检测。

关键词: 药用植物; 转基因元件; 转化目的; 使用频率; 筛查策略

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)15-3703-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.15.033

Strategy research for screening of transgenic elements used in medicinal plants

ZHAO Feng-lan, SUN Meng-chu, SHI Meng-ru, XUE Jian-ping, DUAN Yong-bo

College of Life Sciences, Huaibei Normal University, Huaibei 235000, China

Abstract: With the increase of transgenic research literature in medicinal plants, detection and inspection of transgenic elements in medicinal drugs have been highly concerned. The aim of this study was to provide an approach for the detection of transgenic elements in medicinal materials, so as to provide the effective strategy for the transgenic supervision of medicinal plants and Chinese medicinal materials. The literatures involving transgenic research on 48 medicinal plants was retrieved from the two databases of CNKI and SCI from April 1993 to May 2016, which was used to establish a database of commonly used expression elements in transgenic medicinal plants. Totally 281 papers including 230 Chinese literatures and 51 English literatures were obtained, of which 40.4% of Chinese and 54.9% of English literatures were the researches with aim to establish transformation system. The results showed that commonly used promoter included P-35S, P-Ubi, P-GPD, and P-act, with P-35S having the highest frequency of 68.7%. Common marker genes included NPTII, HPT, Gent, Bar, and aadA, with NPTII giving the highest frequency of 37.4%. Common reporter genes were GUS and GFP, with GUS of the highest frequency of 35.2%. Common terminator included T-NOS, T-35S, and T-OCS, with T-NOS of the highest frequency of 58%. The combination “P-35S + T-NOS + NPTII + GUS” increased the screening rate to 86.1% for screening the transgenic elements used in medicinal plants. On this basis, the adding of HPT, Bar and GFP with certain frequency of use contributed to the screening rate of 91.5% in searching for transgenic elements. T-DNA border sequence can be used for the transgenic detection in the studies using homologous or endogenous promoters, marker genes, and terminators.

Key words: medicinal plant; transgenic elements; transformation purpose; frequency of use; screening strategy

药用植物在全球范围内的使用量逐年增加, 特别是发展中国家, 超过 80% 人口依靠药用植物保证健康^[1]。然而, 当前药用植物研究存在药效物质不

明、调控机制不清及野生资源过度开发等问题^[2]。挖掘药用活性物质生物合成的分子机制、培育有效成分含量高的品种用于大规模人工栽培是解决药用

收稿日期: 2018-02-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31501368); 安徽省自然科学基金项目 (1608085MC52); 安徽省高校自然科学基金项目 (KJ2016B016)

作者简介: 赵丰兰 (1979—), 女, 安徽寿县人, 实验师, 硕士, 主要从事植物生物技术研究。Tel: (0561)3802025 E-mail: zhaofenglan2004@163.com

*通信作者 段永波, 硕士生导师, 博士, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: yboduan@163.com

植物资源缺乏的有效途径。无论是药效物质分子调控研究或遗传改良研究均涉及转基因过程,以将基因导入植物细胞表达。常用的基因转化方法如农杆菌介导法和基因枪法均需要导入外源筛选标记和报告基因以筛选出含有目标基因的转化子^[3]。对于普通作物而言,转基因产品的风险包括环境安全性和食品安全性两方面^[4],而药用植物还面临外源基因的随机整合可能导致药效成分改变的问题^[5-6],给转基因药用植物的安全性提出了更高的要求。因此,对市场上药用植物或药材的转基因成分检测和监管将成为中药材流通中的重要环节。

由于目标基因和信息的未知性,发展普适性检测方法是针对市场中药材转基因成分监测的基础^[7-8]。其原理是依据前期有关转基因研究报道为基础,分析调控元件或标记基因或筛选基因的使用频率,挑选出高频率使用的几种元件作为检测靶点,以此判断所检测材料是否含有转基因成分。然而,目前有关转基因药用植物中表达元件使用总体情况尚不清晰,给其普适性检测带了困难。基于大量文献数据,本文建立了药用植物转基因研究中常用表达元件的数据库,统计转基因调控元件的使用频率和分布情况,并讨论转基因中使用的同源元件的筛查方法,以期对药用植物转基因成分的检测和监管提供有效策略。

1 研究对象

选取市场上药材用量较大的 48 种药用植物的转基因研究文献作为研究对象。所涉及药用植物包括贯叶连翘、石斛、鱼腥草、半夏、大枣、核桃、菰蓝、青蒿、甘草、银杏、绿豆、菊花、苦瓜、牡丹、夏枯草、桑葚、杜仲、灵芝、桔梗、石防风、人参、西洋参、太子参、盾叶薯蓣、丹参、地黄、荔枝龙眼、黑芝麻、草麻黄、百合、生姜、滇黄芩、芦根、赤芍、葛花、金荞麦、芦荟、枸杞、蓖麻子、虎杖、柿蒂、罗汉果、玫瑰花、山楂、槐花、红花、金银花、除虫菊。

1.2 方法

1.2.1 文献检索 在中国知网 (<http://www.cnki.net/>) 输入关键词“某药用植物+转基因”或“某药用植物+转化”搜索相关中文文献。在 SCI (Science Citation Index) 数据库输入关键词“transgenic+plant name”或“genetic transformation+plant name”搜索相关英文文献。所统计文献包括自 1993 年 4 月有转基因药用植物报道起截止至 2016 年 5 月的所有研究性论文资料。同时,对文献中提及转基因材料来源的相关文献进一步追溯统计。

1.2.2 归纳分析 对文献中转基因元件信息按照启动子、终止子、筛选标记基因、报告基因进行分类,建立转基因药用植物常用表达元件的数据库。统计文献中各类元件的具体分布,获取转基因药用植物中主要调控元件使用的数据。据此以不同元件组合对所建立数据库进行筛查,获得药用植物中转基因元件的筛查策略。

2 结果与分析

2.1 文献检索结果

在两大数据库获得 48 种常用药用植物转基因研究的相关文献 281 篇,包括中文文献 230 篇,英文文献 51 篇。在这些药用植物中,转基因研究较多的药用植物包括百合 *Lilium brownii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker (29 篇)、石斛 *Dendrobium nobile* Lindl. (28 篇)、红花 *Carthamus tinctorius* L. (20 篇)、灵芝 *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst (15 篇)、青蒿 *Artemisia carvifolia* Buch. -Ham. ex Roxb. (15 篇),而芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.、牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr.、石防风 *Peucedanum terebinthaceum* (Fisch.) Fisch. ex Turcz.、生姜 *Zingiber officinale* Roscoe 和芦根 *Phragmites communis* Trin. 的转基因报道较少。

将文献按研究目的进行分类,分为优化遗传转化体系、提高药用植物活性成分、生物反应器、抗除草剂、抗虫害、抗病毒、抗逆性、抗氧化、毛状根诱导、其他 10 种类型(表 1)。无论是中文还是英文文献,研究目的均以优化遗传转化体系较多,分别为 40.4%和 54.9%。这些研究中的转基因方法多为根癌农杆菌或发根农杆菌介导转化^[9-11],少数采用基因枪轰击法^[12]。根癌农杆菌介导的转基因研究通常需获得完整的植株,用于药用植物的抗逆性改良,如抗病虫害^[13-15]、抗除草剂^[16]、抗非生物逆境^[17-18]等。发根农杆菌介导的转化体系仅需诱导毛状根即可,可大幅缩短转基因材料获得的时间,在不需完整植株的生物反应器^[19]或次生代谢调控^[20]等研究中具备独特的优势,在药用植物研究中有广阔的发展前景。

由检索结果可知,截止 2016 年 5 月,药用植物的转基因研究大多还处于优化转化体系建立阶段,而大田作物水稻^[21]、玉米^[22]、大豆^[23]的转基因研究体系早已研发成功,并进入规模化、商业化应用阶段^[24]。表明药用植物的转基因研究远远滞后于大田作物。

表 1 文献检索结果

Table 1 Results of literature retrieval

研究目的	中文文献		英文文献	
	文献数量	比例/%	文献数量	比例/%
优化遗传转化体系	93	40.4	28	54.9
生物反应器	23	10.0	11	21.6
提高活性成分含量	18	7.8	—	—
抗除草剂	3	1.3	—	—
抗虫害	13	5.7	2	3.9
抗病毒	24	10.4	3	5.9
抗非生物逆境	25	10.9	—	—
抗氧化	1	0.4	—	—
其他	30	13.0	7	13.7

2.2 调控元件分布

尽管各研究中目标基因不尽相同，但其表达框中都有高效的启动子和终止子元件，为开展药用植物中转基因检测提供了可能。经统计，转基因药用植物研究中常用的启动子包括 P-35S、P-Ubi、P-GPD 和 P-act（表 2），其中 P-35S 启动子使用频率高达 68.7%。P-35S 启动子在不同种类植物中均能高效表达，且不具有时空特异性，在药用植物转基因研究中得到广泛应用。而 P-Ubi、P-GPD 和 P-act 等在不同物种间的表达活性差异较大，通常只用于其表达活性较高的植物。

药用植物转基因研究中常用终止子包括 T-NOS、T-35S 和 T-OCS（表 2），其中 T-NOS 的使用频率最高，在中文文献和英文文献中，其使用频率分别为 58.7%、54.9%，综合使用频率为 58.0%。

表 2 调控元件的分布

Table 2 Distribution of regulatory elements

调控元件名称		中文文献使用 频率/%	英文文献使用 频率/%	综合使用频率/%	来源及功能
启动子	P-35S	68.2	70.6	68.7	花椰菜花叶病毒（CaMV）35S 启动子 ^[25]
	P-Ubi	3.5	3.9	3.6	泛素启动子 ^[26]
	P-GPD	5.7	—	4.6	3-磷酸甘油醛脱氢酶启动子 ^[27]
	P-act	0.4	—	0.4	肌动蛋白启动子 ^[28]
	其他	15.2	25.5	17.0	—
	未知	7.0	—	5.7	—
终止子	T-NOS	58.7	54.9	58	胭脂碱合成酶 NOS 终止子 ^[29-30]
	T-35S	3.5	3.9	3.6	烟草花叶病毒 35S 终止子 ^[31]
	T-OCS	2.6	2.0	2.5	章鱼碱合成酶 OCS 终止子 ^[32]
	其他	16.5	23.5	17.8	—
	未知	18.7	15.7	18.1	—

2.3 筛选标记及报告基因

筛选标记是基因转化过程中赋予转化细胞优势生长的必要元件，以此区别转化细胞与非转化细胞，包括负向筛选体系如除草剂草丁膦、卡那霉素等，和正向筛选体系如甘露糖、木糖等^[33]。药用植物转基因研究中常用的筛选标记基因有 NPTII、HPT、Gent、Bar 和 aadA（表 3）。其中 NPTII 使用频率最高，达到 37.4%，其次为 HPT 和 Bar，这几个基因适于在不同物种中的高效表达有关。

报告基因是指表达产物容易被检测分析或观察的一类基因，用于启动子等顺式调控元件活性分析或指示转基因细胞的筛选^[34]。常用报告基因有 GUS

和 GFP，其中 GUS 的使用频率最高，在中文和英文文献中，其使用频率分别为 32.6%、47.1%，综合使用频率为 35.2%（表 3）。GFP 基因转化细胞可以进行活体检测，不影响实验材料后续使用，但其需要在较为昂贵的荧光显微镜下观察；而 GUS 基因转化细胞仅需简单化学反应即可肉眼观察。这可能导致 GUS 基因在药用植物转化中使用频率大幅高于 GFP 基因。

2.4 常用表达元件组合筛查

在对调控元件、筛选标记和报告基因统计分析的基础上，各自高频率使用元件或基因组合有 P-35S+T-NOS、P-35S+NPTII、P-35S+T-NOS+

NPTII、P-35S + T-NOS + NPTI + GUS、P-35S + T-NOS + NPTII + HPT + GUS、P-35S + T-NOS + NPTII + HPT + Bar + GUS + GFP 6 种。逐一用这些组合对药用植物转基因元件数据库进行比对分析(表 4)。药用植物转基因研究中有 78.6%使用了

P-35S + T-NOS 组合中的其中一个表达元件, 即仅检测这 2 个元件可使筛查率达到 78.6%。这与 Deboode 等^[42]关于食品和作物中转基因元件筛查分析结果类似。增加标记基因 NPTII 后, 筛查率提高到 84.3%。

表 3 筛选标记及报告基因的分布

Table 3 Distribution of screened markers and reporter genes

表达元件名称		中文文献使用频率/%	英文文献使用频率/%	综合使用频率/%	来源及功能
筛选基因	NPTII	37.8	35.3	37.4	来自 <i>Escherichia coli</i> , 编码新霉素磷酸转移酶, 卡那霉素抗性标记 ^[35]
	HPT	31.3	21.6	29.5	来自 <i>E. coli</i> , 编码潮霉素磷酸转移酶, 潮霉素抗性标记 ^[36]
	Bar	12.2	—	10.0	来自 <i>Streptomyces hygroscopicus</i> , 编码草丁膦乙酰辅酶 A 转移酶, 草丁膦抗性标记 ^[37]
	aadA	1.3	—	1.1	来自 <i>Bacteriophagum salmonallae</i> , 编码氨基葡萄糖苷腺苷转移酶, 壮观霉素抗性标记 ^[38]
	Gent	0.9	—	0.7	庆大霉素抗性标记 ^[39]
	其他	5.2	19.6	7.8	—
	未知	11.3	23.5	13.5	—
报告基因	GUS	32.6	47.1	35.2	来自 <i>E. coli</i> , 编码 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) ^[40]
	GFP	3.9	5.9	4.3	来自 <i>Aequorea victoria</i> , 编码绿色荧光蛋白 (GFP) ^[41]
	其他	0.9	3.9	1.4	—
	未知	62.6	43.1	59.1	—

表 4 药用植物中不同转基因元件组合筛查效果

Table 4 Screening effects of different transgenic elements combination in medicinal plants

不同转基因元件组合	中文文献		英文文献		综合	
	使用次数	频率/%	使用次数	频率/%	使用次数	频率/%
P-35S + T-NOS	180	78.3	41	80.4	221	78.6
P-35S + NPTII	176	76.5	38	74.5	214	76.2
P-35S + T-NOS + NPTII	194	84.3	43	84.3	237	84.3
P-35S + T-NOS + NPTII + GUS	197	85.7	45	88.2	242	86.1
P-35S + T-NOS + NPTII + HPT + GUS	204	88.7	45	88.2	249	88.6
P-35S + T-NOS + NPTII + HPT + Bar + GUS + GFP	212	92.2	45	88.2	257	91.5

由于部分药用植物的遗传转化极为困难, 可能将报告基因表达框与目标基因构建至统一载体转化以跟踪转基因效果^[43]。为了最大可能地检测到药用植物转基因事件, 在“P-35S + T-NOS + NPTII”的基础上加入报告基因 GUS, 筛选成功率可达到 86.1%。再考虑使用较广的 HPT、Bar 和 GFP 基因, 检测频率达到 91.5%。综上分析, 使用“P-35S + T-NOS + NPTII + HPT + Bar + GUS + GFP”组合对

转基因药用植物进行筛查, 能最大可能检测到药用植物转基因事件, 是转基因药用植物及中药材检测的最适组合。

2.5 同源转基因研究及检测

由于当前常用的转基因元件和筛选标记基因多来源于微生物, 在植物中异源表达引发了公众对转基因安全性的担忧^[44-45]。为此, 科学家在不同植物中发展了多种消除外源筛选标记基因的策略, 其中

以模式植物和农作物研究较多。烟草和拟南芥作为最常用的模式植物，常用于新转基因技术的验证，如 Cre/loxP 系统删除标记基因^[46]、CRISPR/Cas9^[47-49]等，其目的是为新技术在作物中的应用提供依据。对作物安全转基因技术的研究有切实的应用价值，关于其文献报道也更多，如甘露糖作为筛选标记基因^[21,50]及 CRISPR/Cas9^[51]等已经进入规模化生产阶段。由于基因转化难、关注相对较少等原因，药用植物安全转基因技术研究相对滞后。而药用植物研究常关注药用成分的次生代谢调控，只需诱导毛状根即可^[52]，不需要再生完整植株，在转化

中不需要额外筛选标记基因。这为药用植物的转基因的安全性提供了很好的思路。针对异源元件在基因转化中的应用，近年来出现了一种安全转基因策略——同源转基因技术，即利用受体植物或其近缘种的启动子、目标基因、筛选标记基因、终止子进行转基因研究(表 5)。该方法不打破物种生殖隔离、所获转基因材料不含异源基因，可视为等同于常规育种材料，但能大幅加速基因融合进程。对于此类转基因材料，农杆菌转化后 T-DNA 边界序列会残留于植物基因组，可考虑通过检测 T-DNA 边界序列进行监管。

表 5 同源转基因研究策略及检测方法

Table 5 Research strategies and detection methods of intragenesis

途径	方法	检测策略
同源启动子	利用受体植物本身或近缘种启动子驱动目标基因 ^[53-54]	利用农杆菌转化后 T-DNA 边界序列整合进
同源筛选标记基因	克隆受体植物中的筛选标记基因用于转化子筛选 ^[55]	植物基因组的特性，通过检测 T-DNA 边
同源终止子	利用受体植物本身或近缘种终止子进行遗传转化 ^[56]	界序列获知转基因信息 ^[57-58]

考虑到转化载体序列也大多来自微生物，转化后农杆菌 T-DNA 序列会整合至植物基因组，有研究尝试了在植物中筛选 T-DNA 并用于遗传转化^[59-60]。这使得转基因植物中不引入任何异源的 DNA 序列，除了比较基因组序列外难以用其他方法进行检测。但所获材料在目前转基因定义框架下应属于安全范畴，实质等同于“非转基因”，其监管也更为简易。

3 结语

随着转基因技术在药用植物遗传转化中的广泛应用^[61]，转基因植物及药材安全性给监管和检测带来了一定挑战。如何准确、快速地对药用植物进行转基因鉴定，成为当前转基因检测行业的一个重要课题^[61]。本文对贯叶连翘等 48 种常用药用植物中转基因元件进行了研究，并分析了其筛查策略。

药用植物转基因目的中，优化遗传转化体系的研究接近 50%，而大田作物转基因早已进入商业化规模化生产阶段^[24]，说明与大田作物和模式植物相比，药用植物的转基因研究相对滞后。关于建立遗传转化体系的研究，主要目标是探索如何将外源基因高效转入目标植物，对市场威胁性相对较小。筛选标记基因 NPTII 的使用频率最高，综合使用频率为 37.4%，可能与 NPTII 在筛选过程中对目标植物的伤害较小有关。早期转基因研究中多以 CaMV35S 启动子和 Nos 终止子等异源元件为主，2010 年以后，大量植物中开发的启动子和终止子被开发并用于转

基因研究^[57-59]。本文通过对中国知网和 SCI 两大数据库搜索到的 281 篇有关药用植物转基因研究中所使用的表达元件进行筛查，对常用的表达元件进行归纳总结，“P-35S+T-NOS+NPTII+GUS”组合的筛选成功率达到 86.1%。为更大限度筛选转基因元件，考虑有一定使用频率的 HPT、Bar 和 GFP，P-35S+T-NOS+NPTII+HPT+Bar+GUS+GFP 筛查成功率达到 91.5%。在此基础上，对同源转基因及其检测进行分析，提出通过 T-DNA 边界序列对同源转基因材料进行监管，通过对相关文献的分析，获得了药用植物转基因表达元件筛查策略，为今后转基因药用植物或药材监管提供一个有效策略。

根据该研究提出的筛查策略，所检测元件多来自微生物或低等生物，不同研究中使用元件 DNA 序列较为一致，适用于广谱性的基因检测。当前，农业部在各省均设立了“转基因生物产品成分监督检验测试中心”，负责作物及农产品的转基因成分检测，且育种材料在品种审定前必须提交转基因成分检测报告。关于药用植物转基因成分的筛查，可委托该中心对相应元件进行检测，或成立药用植物及中药材转基因成分检测机构承担该任务，保证中药材市场的健康有序发展。

参考文献

- [1] 李东巧, 郭文姣, 陈 芳. 转基因植物在医药领域的应用分析 [J]. 高科技与产业化, 2016(8): 98-101.

- [2] 黄鑫, 陈万生, 张汉明, 等. 生物技术在药用植物研究与开发中的应用和前景 [J]. 中草药, 2015, 46(16): 2343-2354.
- [3] 屈聪玲, 贺榆婷, 王瑞良, 等. 植物转基因技术的过去、现在和未来 [J]. 山西农业科学, 2017, 45(8): 1376-1380.
- [4] 刘涛. 转基因农作物的安全性与发展前景研究论述 [J]. 农业与技术, 2016, 36(21): 35-36.
- [5] 周联, 董燕. 转基因中药的发展及评价 [J]. 中医药管理杂志, 2007, 15(3): 173-175.
- [6] 董燕, 易浪, 朱丹丹, 等. 转基因中药前期安全性评价技术探讨 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(3): 466-470.
- [7] Holstjensen A. Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives [J]. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(6): 1071-1082.
- [8] 张丽, 武玉花, 吴刚, 等. 转基因油菜筛选检测策略研究 [J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(1): 74-81.
- [9] 宋经元, 张荫麟, 任春玲. 农杆菌介导的药用植物的转化 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(2): 73-76.
- [10] 张萌, 高伟, 王秀娟. 药用植物毛状根的诱导及其应用 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 1956-1960.
- [11] 刘彤, 杨淑慎, 方荣锋, 等. Ri 质粒介导的毛状根体系建立及其在植物次生代谢产物合成中的研究进展 [J]. 植物科学学报, 2015, 33(2): 264-270.
- [12] 董燕, 张雅明, 周联, 等. 转基因技术在药用植物中的应用 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 489-492.
- [13] 唐东芹, 钱虹妹, 唐克轩, 等. 根癌农杆菌介导半夏凝集素基因 pBIXP TA 对百合的转化 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2004, 22(2): 1352-1361.
- [14] 王贵荣, 刘敬梅, 高山林, 等. 烟草 I 类几丁质酶和 β -1,3 葡聚糖酶基因茎尖转化太子参的研究 [J]. 药物生物技术, 2006, 13(5): 334-337.
- [15] 罗青, 曲玲, 曹有龙, 等. 抗蚜虫转基因枸杞的初步研究 [J]. 宁夏农业科技, 2001(1): 1-3.
- [16] 史磊. 农杆菌介导的抗除草剂基因转化盾叶薯蓣的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [17] 杨雪飞, 王瑛, 罗建平, 等. 铁皮石斛外源 *lea3* 基因的转化及耐盐性分析 [J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(5): 622-626.
- [18] 李晋. 拟南芥抗寒基因 *ICE1* 转化丹参的研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2013.
- [19] 邱德有, 宋经元, 马小军, 等. 丹参毛状根生物反应器大规模培养的研究 [J]. 分子植物育种, 2004, 2(5): 699-703.
- [20] 刘彤, 杨淑慎, 方荣锋, 等. Ri 质粒介导的毛状根体系建立及其在植物次生代谢产物合成中的研究进展 [J]. 植物科学学报, 2015, 33(2): 264-270.
- [21] Duan Y, Zhai C, Li H, *et al.* An efficient and high-throughput protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation based on phosphomannose isomerase positive selection in *Japonica* rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(9): 1611-1624.
- [22] Zhao ZY, Gu W, Cai T, *et al.* High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, in maize [J]. *Mol Breed*, 2002, 8(4): 323-333.
- [23] Ma L P, Zheng H U, Zhang B Q, *et al.* A fast and high efficient technique for *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean (*Glycine max* L. Merrill) [J]. *Sci Agric Sin*, 2008, 41(3): 661-668.
- [24] 万建民, 黎裕. 高效、安全、规模化转基因技术: 机会与挑战 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(21): 4139-4140.
- [25] 顾治萍, 周雪荣, 熊澄. 花椰菜花叶病毒及其作为载体的应用 [J]. 中国生物工程杂志, 1989, 9(3): 42-46.
- [26] 谢伟, 乐超银. 泛素启动子在转基因植物中的应用 [J]. 三峡大学学报: 自然科学版, 2007, 29(2): 176-179.
- [27] 肖蕾, 郎文华, 何葆光. 酵母甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GPD) 基因及其启动子的分离和鉴定 [J]. 生物工程学报, 1988, 4(1): 38-43.
- [28] 刘发央, 侯路珍, 谢小冬. 启动子 Actin1 的克隆及植物表达载体的构建 [J]. 草原与草坪, 2005(3): 66-68.
- [29] 王东, 宋君, 叶先林, 等. 转基因大豆外源基因 NOS 终止子定量测定的不确定度分析 [J]. 大豆科学, 2013, 32(5): 601-605.
- [30] 王东, 宋君, 雍彬, 等. 转基因水稻外源基因 NOS 终止子定量测定的不确定度分析 [J]. 江西农业学报, 2013, 25(10): 96-99.
- [31] 朱洪庆. 长叶车前花叶病毒上海分离物 (RMVsh) 基因组全序列的测定, 侵染性克隆的构建及外源基因的表达 [D]. 上海: 复旦大学, 2000.
- [32] Duan Y, Zhao F, Li Q, *et al.* High efficiency *agrobacterium*-mediated transformation of *Pinellia ternata* using petiole explants from submerged cultures [J]. *Biologia*, 2015, 70(10): 1351-1358.
- [33] 侯爱菊, 朱延明, 张晶, 等. 转基因植物中筛选标记基因的利用及消除 [J]. 遗传, 2003, 25(4): 466-470.
- [34] 杨宇, 李江江, 王项, 等. 报告基因及其应用研究进展 [J]. 生命科学研究, 2011, 15(3): 277-282.
- [35] 徐茂军. 转基因植物中卡那霉素抗性 (Kan) 标记基因的生物安全性 [J]. 生物学通报, 2001, 36(2): 18-19.
- [36] 卢云, 许文涛, 康爱君, 等. 转基因植物中潮霉素 B 磷酸转移酶的原核表达以及致敏性评估 [J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(12): 1529.
- [37] 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(12): 1348-1350.
- [38] 肖志新, 周冀衡, 杨虹琦, 等. 转基因植物选择性标记

- 基因 [J]. 中国农业科技导报, 2004, 6(5): 19-22.
- [39] 丁玉梅, 杨正安, 周晓罡, 等. *Bt* 基因转入烟草叶绿体获得转化植株的研究 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2007(S1): 196-199.
- [40] 贺红, 韩美丽. 农杆菌介导的 *GUS* 基因在枳壳中的转移 [J]. 中草药, 2000, 31(4): 295-297.
- [41] 杨晶, 李海燕, 李校堃. 含有 *aFGF-GFP* 融合基因的植物表达载体的构建及其在红花中的瞬时表达研究 [A] // 中国药学会大会暨中国药师周大会论文集 [C]. 天津: 中国药学会, 2010.
- [42] Deboed F, Janssen E, Berben G. Development of 10 new screening PCR assays for GMO detection targeting promoters (pFMV, pNOS, pSSuAra, pTA29, pUbi, pRice actin) and terminators (t35S, tE9, tOCS, tg7) [J]. *Eur Food Res Technol*, 2013, 236(4): 659-669.
- [43] 王妍. 酸枣和西吕枣高频率不定梢诱导及酸枣遗传转化的研究 [D]. 济南: 山东农业大学, 2010.
- [44] 王利华, 苏乔, 包永明. 转基因植物中载体骨架序列的安全性隐患及解决方案 [J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(5): 38-42.
- [45] 谢杰, 余沛涛, 王全喜. 转基因植物的安全性问题及其对策 [J]. 上海农业学报, 2006, 22(1): 80-84.
- [46] 刘香利, 赵惠贤, 郭蔼光. 位点特异性重组及其在剔除植物筛选标记基因中的应用 [J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(3): 597-603.
- [47] Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, *et al.* Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 691-693.
- [48] Feng Z, Mao Y, Xu N, *et al.* Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2014, 111(12): 4632-4637.
- [49] Li J F, Norville J E, Aach J, *et al.* Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9 [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 688-691.
- [50] 张欣, 付亚萍, 周君莉, 等. 水稻规模化转基因技术体系构建与应用 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(21): 4141-4154.
- [51] Miao J, Guo D, Zhang J, *et al.* Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system [J]. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1233-1236.
- [52] 郭双, 刘佳, 卢克欢, 等. 诱导子对颠茄毛状根有效成分及代谢关键酶基因表达的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 897-902.
- [53] 宫倩红, 于文功, 戴继勋, 等. 内源 β -微管蛋白侧翼序列调控下条斑紫菜原生质体 *GUS* 基因的瞬时表达 [J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2007(2): 228-229.
- [54] Shah S, Jan S A, Ahmad N, *et al.* Use of different promoters in transgenic plant development: Current challenges and future perspectives [J]. *Am-Eurasian J Agric Environ Sci*, 2015, 15(4): 664-675.
- [55] Hu L, Li H, Qin R, *et al.* Plant phosphomannose isomerase as a selectable marker for rice transformation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25921.
- [56] 拜里, 克里什纳墨菲, 纳拉亚南, 等. 新型植物终止子序列: 中国, CN103649319 A [P]. 2014-03-19.
- [57] 曾凡锁, 詹亚光. 转基因植物中外源基因的整合特性及其研究策略 [J]. 植物学通报, 2004, 21(5): 565-577.
- [58] 王根平, 张婷, 师志刚, 等. 农杆菌 T-DNA 传递相关基因研究进展 [J]. 分子植物育种, 2017(5): 1752-1761.
- [59] 谢婷婷, 谢从华, 杨月英, 等. 马铃薯类 T-DNA 元件与同源转基因体系及其应用: 中国, CN201410800578.5 [P]. 2015-09-16.
- [60] 李东巧, 郭文姣, 陈芳. 基于专利分析的转基因药用植物技术发展趋势研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(11): 98-108.
- [61] Zel J, Cankar K, Ravnkar M, *et al.* Accreditation of GMO detection laboratories: Improving the reliability of GMO detection [J]. *Accred Qual Assur*, 2006, 10(10): 531-536.