

无选择标记和载体骨干序列的 *Xa21* 转基因水稻的获得 Generation of Selectable Marker-free and Vector Backbone Sequence-free *Xa21* Transgenic Rice

夏志辉[†], 李晓兵[†], 陈彩艳, 范海阔, 江光怀, 朱立煌, 翟文学*

XIA Zhi-Hui[†], LI Xiao-Bing[†], CHEN Cai-Yan, FAN Hai-Kuo, JIANG Guang-Huai, ZHU Li-Huang and ZHAI Wen-Xue*

中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101

Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101, China

摘 要 利用双右边界 T-DNA 载体通过根癌农杆菌介导法将水稻白叶枯病广谱抗性基因 *Xa21* 导入杂交稻重要恢复系 C418 中。T₀ 代共获得 27 个独立转基因株系, 通过田间抗性鉴定与 PCR 分析, 有 17 个株系的 *Xa21* 基因分子鉴定为阳性, 且对白叶枯病原菌 P6 生理小种具有抗性。通过对 17 个株系的后代植株进行田间抗性鉴定, 分子标记辅助选择及 Southern 杂交分析, 结果显示 4 个株系的 T₁ 代植株中能分离出无潮霉素标记基因的 *Xa21* 转基因植株。无选择标记 *Xa21* 转基因株系的获得率为 15%。PCR 检测还表明, 这些无选择标记的 *Xa21* 转基因植株不带有载体骨架序列。通过对转基因后代进一步的抗性鉴定与 PCR 辅助选择, 获得了无选择标记和载体骨架序列的转基因 *Xa21* 纯合的抗白叶枯病水稻。

关键词 转基因水稻, *Xa21*, 白叶枯病抗性, 无选择标记, 无载体骨干, 双右边界 T-DNA 载体

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)02-0204-07

Abstract The dominant gene *Xa21* with broad-spectrum and high resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) was transferred into C418, an important restorer line of *japonica* hybrid rice in China using double right-border (DRB) T-DNA binary vector through *Agrobacterium*-mediated transformation. 17 transgenic lines were *Xa21*-positive with high resistance to the race P6 of *Xoo* through PCR analysis and resistance identification, among the total 27 independent primary transformants (T₀) obtained. The subsequent analysis of the T₁ progenies of these 17 T₀ lines through PCR-assisted selection and resistance investigation showed that four *Xa21* transgenic T₀ lines could produce selectable marker-free (SMF) progenies. The frequency of primary transformants producing SMF progenies was 15%. In addition, PCR analysis also revealed these SMF progenies did not contain vector backbone sequence, and they were named as SMF and vector backbone sequence-free (SMF-VBSF) *Xa21* transgenic plants. The further molecular and phenotypic analysis of the T₂ and T₃ progenies testified the homozygous SMF-VBSF *Xa21* transgenic plants were obtained with high resistance to *Xoo*.

Key words transgenic rice, *Xa21*, bacterium blight resistance, selectable marker-free, vector backbone sequence-free, double right-border T-DNA vector

Received: November 8, 2005; Accepted: November 28, 2005.

This work was supported by the grants from the National High Technology and Development (863) Program (No. 2002AA212131) and the National Natural Science Foundation of China (No. 30270857).

* Corresponding author. Tel: 86-10-64838773; Fax: 86-10-64873428; E-mail: wxzhai@genetics.ac.cn

[†]: They are co-first authors.

国家高技术研究发展计划项目 (No. 2002AA212131) 和国家自然科学基金项目 (No. 30270857) 资助
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

水稻是我国的主要粮食作物,然而病虫害一直是制约水稻产量的重要因素,其中白叶枯病就是导致水稻严重减产的主要病害之一。利用水稻本身的抗病基因是防治白叶枯病的有效手段,因此白叶枯病抗性基因的研究与利用一直是水稻育种的热点。国际上已经先后成功克隆了 *Xa21*^[1], *Xa1*^[2], *Xa26*^[3], *Xa27*^[4]和 *xa5*(本实验室已克隆),从而促进了水稻转基因抗白叶枯病育种。目前研究最多的是具有重要育种价值的显性广谱抗白叶枯病基因 *Xa21*,通过基因工程转化,*Xa21* 基因已被转入多个水稻育种材料^[5-6]。在不同的遗传背景下 *Xa21* 均显示出对白叶枯病的高度抗性^[5-7]。可是,由于先前获得的转 *Xa21* 基因的水稻都含有标记基因,这极大地限制了转基因水稻的推广应用。

转基因植物的安全性是生物安全的重要内容,近年来已引起了各国政府和科研工作者的广泛关注。转基因植物的安全性主要集中在标记基因、启动子、终止子和双元载体 T-DNA 边界以外的 DNA 序列(即载体骨架序列)^[8-9,10,11]。对转基因植物中标记基因的安全性前人做了很多的研究,并成功建立了一些去除标记基因的转化策略,如位点特异性重组^[12,13,14]、双 T-DNA 载体^[15]、转座子系统^[16]、双右边界 T-DNA 载体^[17]及共转化法^[18]等。对转基因植物中载体骨架序列的检测在拟南芥与烟草等模式植

物中已有报道^[19,20],但是在有实用价值的转基因粮食作物中同类研究还比较少。

本研究利用能去除标记基因的双右边界载体系统(double right-border, DRB)将有实用价值的抗白叶枯病基因 *Xa21* 转入水稻重要育种材料 C418 中。从转基因植株分离后代中,得到了无标记基因与载体骨架序列的转基因 *Xa21* 纯合的抗白叶枯病水稻。

1 材料与方法

1.1 植物材料和转化载体的构建

本研究使用的受体材料为杂交水稻育种中重要恢复系 C418^[21]。*Kpn* I 酶切载体 pCXK130^[22],回收 9.6kb 的片段,将其连接到 *Kpn* I 酶切过的双右边界双元载体 pMNDRBBIN6 载体^[17]上,构建成包含 *Xa21* 基因的双右边界双元载体 pBXA21(图 1)。在 pBXA21 载体中 *Xa21* 基因位于相邻的两个左右边界之间,标记基因位于两个右边界之间,pBXA21 载体在转化过程中,形成 3 种可能的 T-DNA 类型(图 1):A 类型含有 *hpt* 基因与 *Xa21* 基因(RB1 到 LB),B 类型只含有 *Xa21* 基因(RB2 到 LB),C 类型则只含有 *hpt* 基因。通过电激将质粒 pBXA21 导入根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)LBA4404 中,用于遗传转化。

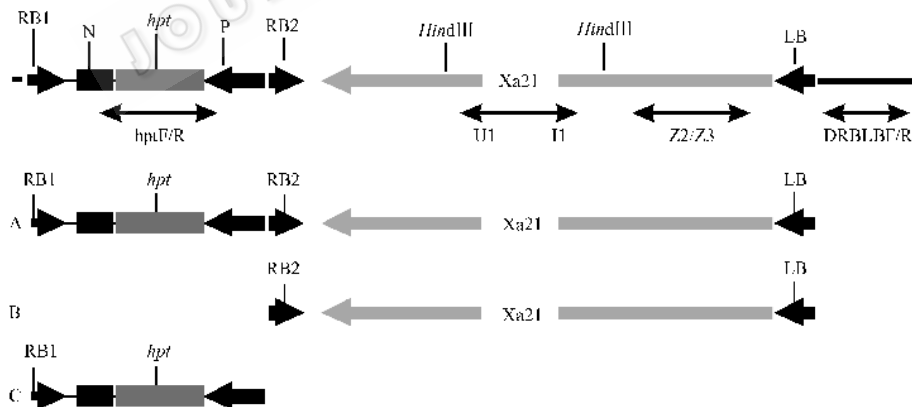


图 1 pBXA21 质粒结构图及三种可能产生的 T-DNA

Fig.1 Diagram of plasmid pBXA21 and three possibly generated T-DNAs

RB1: the right border 1 of T-DNA; *hpt*: hygromycin phosphotransferase gene; N: terminator of nos gene; P: CMV35S promoter; RB2: the right border 2 of T-DNA; *Xa21*: the *Xa21* gene; LB: the left border of T-DNA; A, B and C: three possibly generated T-DNAs during transformation. The probes in this study were also donated in the diagram.

1.2 农杆菌介导法转化水稻

参照 Zhai 等的转化方法^[5]并进行了改进。取成熟种子,剥去颖壳,用 70%乙醇浸泡 30s,再用 1g/L 的 $HgCl_2$ 溶液消毒 10min,随后转入 13g/L 的次氯酸钠溶液中浸泡 30min,然后用无菌水漂洗干净,置于

无菌滤纸上,接种到诱导培养基(MS + 2mg/L 2,4-D)上 26℃培养 12d 左右,然后剥离盾片产生的愈伤组织,继代两三次后,选择致密的愈伤组织用于转化。

带有 pBXA21 的农杆菌在的 YEP 培养基(添加利福平 20mg/L,壮观霉素 50mg/L)中培养 24 h 至

OD_{600} 为 0.6。离心收集农杆菌细胞,用 AAM 培养基洗涤一次,再悬浮在 AAM 中至 OD_{600} 为 0.2。

将预培养过的胚性愈伤放入 AAM 农杆菌悬浮液中浸泡 30min,然后置于无菌滤纸上吸干多余菌液后转移到共培养固体培养基上,24~25℃暗培养 2~3d 后将愈伤组织置于筛选培养基(诱导培养基 + 50mg/L 潮霉素 + 250mg/L 羧苄青霉素 + 250mg/L 头孢霉素)上每隔 20d 更换一次培养基,筛选 2~3 次,然后将抗性愈伤组织转移到预分化培养基(MS + 2mg/L 6-BA + 1mg/L NAA + 2mg/L ABA)培养 10d,再转入分化培养基(MS 盐 + MS 有机元素 + 30g/L 麦芽糖 + 2mg/L 6-BA + 2mg/L KT + 0.2mg/L NAA + 0.2mg/L IAA + 30mg/L 潮霉素),4 周左右得到再生植株,将再生幼苗置于壮苗生根培养基(1/2MS 盐 + 20g/L 蔗糖 + 0.2mg/L NAA + 30mg/L 潮霉素)培养至幼苗长到 10cm 左右,打开试管封口,加入清水,温室中炼苗 3d,即可将植株移栽到田间。

1.3 转基因植株的分子鉴定

DNA 的提取参照 Zhai 等人的方法进行^[5]。鉴定 *Xa21* 基因的引物为 U1 (CGATCGGTATAACAGCAAAAC) 和 U2 (ATAGCAACTGATTGCTTGG) 和引物 Z₂ (ATTGAATAATTCAGTGGTATTGG) 和 Z₃ (GTCTTCCTTGCCTTCTGCACGA),引物 U1, U2 在转基因水稻中的扩增产物为 1400bp 与 1300bp 两条 DNA 片段,而未转基因对照只能扩增出一条 1300bp 的 DNA 片段,引物 Z₂、Z₃ 只能在转基因水稻中能扩增出 1400bp 的片段,未转基因对照中不能扩增出任何片段。鉴定 *hpt* (hygromycin phosphotransferase) 基因引物为 *hpt*F (TAGGAGGGCCGTGGATATGTC) 和 *hpt*R (TACACAGCCATCGGTCCA GA),此对引物的扩增片段长度为 1100bp。检测载体左边界侧翼序列引物 DRBLBF (GCTCGGCACAAAATCACCCT) 与 DRBLBR (TTCCTCAGCGGCTTTATCCAG),扩增片段长度为 339bp,5 μ g 水稻基因组 DNA 用 *Hind* III 内切酶酶解,经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳后转移到硝酸纤维素膜上,用 ³²P-dCTP 标记的探针进行 Southern 杂交,所用探针分别为 PCR 产物 Z₂/Z₃、*hpt*F/R 及 DRBLBF/R 和 pMNDRBBIN6 载体 DNA。

1.4 转基因水稻的田间抗病鉴定

转基因植株或转基因后代在分蘖盛期,通过剪叶法^[23]对充分伸展的叶片接种白叶枯病原菌 P6 生理小种(*Xa21* 基因鉴别小种)。接种病原菌在 PSA

培养基(马铃薯 300g/L, Ca(NO₃)₂·4H₂O 0.5g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 2.0g/L, 蔗糖 15g/L, 琼脂粉 15g/L) 上于 28℃ 培养 72h,调节浓度至 10⁹ CFU/mL,接种 15d 左右当病斑长度明显而稳定时进行调查,每一植株测量三片叶,将病斑长度与叶片总长度百分比平均值作为抗性指标对其抗病情况进行分析。

1.5 无选择标记且无载体骨架序列的转 *Xa21* 导入基因纯合系的获得

利用双右边界载体将 *Xa21* 到水稻愈伤组织中,经过潮霉素 B 的抗性筛选后,可以得到 6 种转基因初级转化体 T₀: A (只整合 A 型 T-DNA), C (只整合 C 型 T-DNA), A + C (整合 A 和 C 两种类型 T-DNA), A + B (整合 A 和 B 两种类型 T-DNA), B + C (整合 B 和 C 两种类型 T-DNA), A + B + C (整合三种类型 T-DNA)。只有整合在不同位点的 A + B、B + C 和 A + B + C 转基因植株后代可以分离得到无标记基因 *Xa21* 转基因植株(图 2)。将 T₀ 代植株种植于试验田,通过 PCR 分子鉴定与田间接种病原菌 P6 生理小种进行抗性鉴定,单株套袋收获 *Xa21* 分子鉴定为阳性且对白叶枯菌 P6 抗病的植株的种子(T₁ 代)。将同一 T₀ 植株来源的 T₁ 代种植于田间,分别独立编号,在分蘖盛期进行接种病原菌抗性鉴定,然后取抗病植株叶片提 DNA 进行 PCR 分子鉴定,单株套袋收获 *Xa21* 分子鉴定为阳性 *hpt* 基因和左边界侧翼序列分子鉴定为阴性的植株种子(T₂ 代)。再将同一 T₁ 植株来源的 T₂ 代作为一个独立株系种植于田间,经分子鉴定和接种验证后,收获转基因

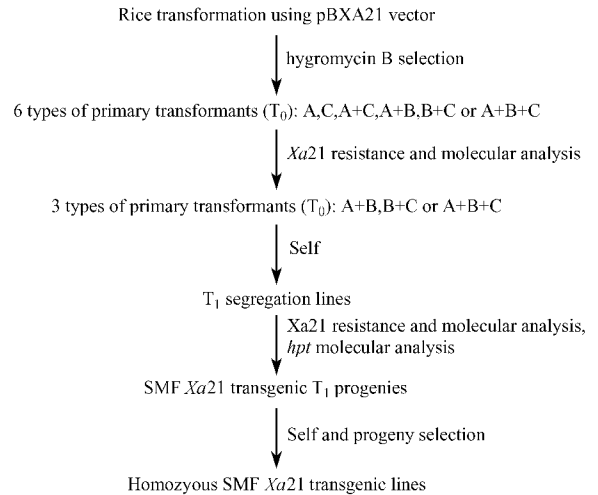


图 2 获得无标记 *Xa21* 转基因纯合系的技术路线

Fig. 2 The strategy for obtaining homozygous

maker-free *Xa21* transgenic lines

Xa21 纯合的 T_2 代植株的种子 (T_3 代), 即 *Xa21* 转基因纯合系。

2 结果和分析

2.1 *Xa21* 转基因水稻的获得与鉴定

用农杆菌介导法将 *Xa21* 基因导入粳稻 C418 中, 共获得 27 个 T_0 代转基因株系。对 27 个 T_0 代转基因植株分别用两对引物 (U1, I1 和 *hptF*, *hptR*) 对 *Xa21* 基因与 *hpt* 基因进行了 PCR 分子鉴定, 并在分蘖盛期接种 P6 生理小种进行了抗性鉴定 (表 1)。

在所获得的 27 个株系中有 17 个株系既能扩增出 1400bp 的 *Xa21* 基因的特异性片段, 也能扩增出 1100bp 的 *hpt* 基因特异性片段, 且田间接种 P6 小种表现为抗病, 表明这些转基因植株整合了完整的 *Xa21* 基因的。成熟时对这 17 个 *Xa21* 转基因植株进行单株收获 T_1 代种子。在 27 个转基因株系中另外的 10 个株系只扩增出 1100bp 的 *hpt* 基因的片段, 没有扩增出 *Xa21* 基因的特异性片段, 且在田间对 P6 生理小种表现为感病, 表明没有整合 *Xa21* 基因。对于这些植株不再进行后代分析。

表 1 T_0 代转基因株系 PCR 分子检测及白叶枯抗性鉴定
Table 1 PCR analysis and resistance identification of T_0 transgenic lines

Transgenic line T_0	<i>hpt</i>	<i>Xa21</i>	Resistant or susceptible to P6	Transgenic line T_0	<i>hpt</i>	<i>Xa21</i>	Resistant or susceptible to P6
1	+	-	S	15	+	+	R
2	+	-	S	16	+	+	R
3	+	-	S	17	+	-	S
4	+	-	S	18	+	-	S
5	+	-	S	19	+	+	R
6	+	+	R	20	+	+	R
7	+	+	R	21	+	+	R
8	+	-	S	22	+	+	R
9	+	+	R	23	+	+	R
10	+	-	S	24	+	+	R
11	+	+	R	25	+	+	R
12	+	+	R	26	+	+	R
13	+	-	S	27	+	+	R
14	+	+	R				

hpt: PCR test of *hpt* gene; *Xa21*: PCR test of *Xa21* gene; +: positive; -: negative; S: The lesion area was more than 20% of the whole leaves inoculated; R: The lesion area was less than 15% of the whole leaves inoculated.

2.2 无标记基因和载体骨架序列的 *Xa21* 转基因植株的筛选

将从 17 个 *Xa21* 转基因 T_0 代植株收获的 T_1 代群体种植于田间, 在分蘖盛期接种白叶枯菌进行抗性鉴定。转基因 T_1 代植株抗性表型明显, 大多数 T_1 代群体出现抗感分离, 有些群体抗感分离比为 3:1 (资料未显示)。取抗病植株的叶片提取 DNA, 分别进行 *Xa21* 基因、*hpt* 基因及载体骨架序列的 PCR 鉴

定, 从抗病植株中筛选无标记基因和载体骨架序列的 *Xa21* 转基因植株 (图 3(a), 图 3(b), 载体左边界侧翼序列扩增图 3(c) 省略)。 *Xa21* 检测为阳性、*hpt* 基因及载体骨架序列检测均为阴性的植株即为无标记基因和载体骨架序列的 *Xa21* 转基因植株。通过分析, 从 6 号、7 号、20 号和 21 号 4 个 T_0 植株的抗病后代中分别获得 8 株、1 株、2 株和 2 株无标记基因和载体骨架序列的 *Xa21* 转基因植株 (表 2, 图

表 2 无选择标记与无载体骨架序列 T_1 代抗病植株统计

Table 2 Statistic of SMF-VBSF T_1 progenies

T_0 line	$P6^R$ T_1 progenies Numbers	$P6^S$ T_1 progenies Numbers	<i>Xa21</i> + Numbers	<i>hpt</i> + Numbers	<i>hpt</i> - Numbers	DRBLB- Numbers	<i>Xa21</i> + <i>hpt</i> -DRBLB- Numbers
6	41	8	41	33	8	41	8
7	5	2	5	4	1	5	1
20	15	4	15	13	2	15	2
21	9	0	9	7	2	9	2

$P6^R$: resistance to P6; *hpt* +: *hpt* gene positive; *hpt* -: *hpt* gene negative; DRBLB-: flank sequence of left border negative; *Xa21* + *hpt*-DRBLB-: *Xa21* gene positive, *hpt* gene negative and flank sequence of left border negative.

4)。另外 13 个 T_0 代株系的后代抗病植株都能同时扩增出 $Xa21$ 基因和 hpt 基因的特异片段,没有筛选到无标记基因和载体骨架序列的 $Xa21$ 转基因植株。因此在 27 个转基因 T_0 株系中,无标记基因和

载体骨架序列的 $Xa21$ 转基因植株的获得率为 15%。对从 4 个 T_0 株系抗病后代中获得的 13 株无标记基因和载体骨架序列的 $Xa21$ 转基因 T_1 植株单株套袋收种,用于进一步分析。

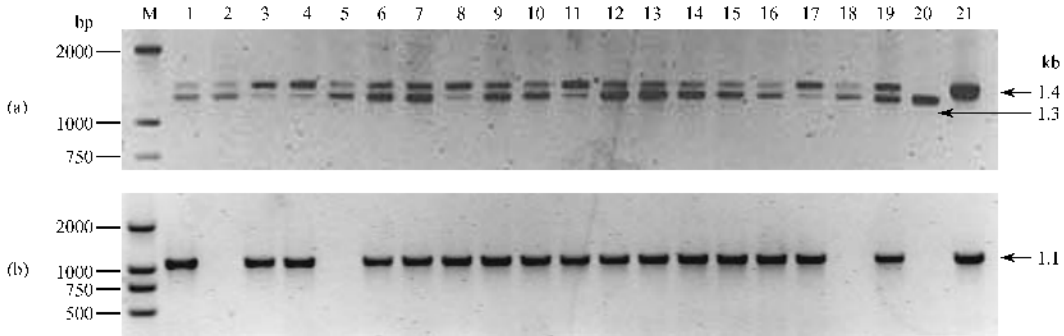


图 3 T_1 代部分转基因植株的 PCR 鉴定

Fig.3 PCR analysis of partial T_1 progenies

(a) PCR analysis of gene $Xa21$; (b) PCR analysis of gene hpt ; M: DL2000 marker; 1-19: resistance progenies; 20: non-transgenic control plant; 21: plasmid positive control.



图 4 无标记基因和载体骨架序列的 $Xa21$ 转基因 T_1 代植株对白叶枯病抗性

Fig.4 Resistance reaction of SMF-VBSF $Xa21$ transgenic T_1 plants

6-2, 7-2, 20-10, 21-2: $Xa21$ transgenic plants; CK: nontransgenic plants.

2.3 无选择标记和载体骨架序列的 $Xa21$ 转基因纯合系的获得与验证

将上述获得的 13 个无标记基因和载体骨架序列的 $Xa21$ 转基因株系的 T_2 代种植于田间,在分蘖盛期接种 P6 菌株进行抗性分析和 PCR 检测。抗性分析表明 6 号 T_0 植株来源的 8 个株系、7 号 T_0 植株来源的 1 个株系和 21 号 T_0 植株来源的 2 个株系的 T_2 代植株全部表现为抗病。PCR 检测这些株系都能扩出 1400bp 的 $Xa21$ 特异性片段,不能扩出 hpt

基因与载体骨架序列的片段(表 3),因此这 11 个株系是可能的无选择标记和载体骨架序列的 $Xa21$ 转基因纯合系。20 号 T_0 植株来源的 2 个株系的 T_2 代有抗感分离,表明转基因 $Xa21$ 尚未纯合。

表 3 无标记基因和载体骨架序列的 $Xa21$ 转基因 T_2 代植株抗性鉴定与 PCR 分析

Table 3 PCR and resistance analysis of T_2 progenies of SMF-VBSF

Serial number of T_1	Total numbers of T_2	T_2 代 P6 ^R (株)	T_2 代 P6 ^S (株)	$hpt +$	$Xa21 +$
6-2	43	43	0	0	43
6-5	22	22	0	0	22
6-27	50	50	0	0	50
6-28	50	50	0	0	50
6-36	50	50	0	0	50
6-38	20	20	0	0	20
6-43	49	49	0	0	49
6-48	50	50	0	0	50
7-2	50	50	0	0	50
20-10	50	35	15		
20-13	50	37	13		
21-2	16	16	0	0	16
21-9	50	50	0	0	50

P6^R: resistance to Xoo race P6, P6^S: susceptible to Xoo race P6, $hpt +$: hpt gene positive, $Xa21 +$: $Xa21$ gene positive.

为了进一步验证无选择标记和载体骨架序列的 $Xa21$ 转基因纯合系,将上述 11 个株系的 T_3 代部分种子种植于田间进行抗性分析和分子检测。 T_3 代植株生长整齐一致,所有植株都表现为对白叶枯病原菌 P6 生理小种的高度抗性,没有抗感分离,其它

农艺性状也没有变化。所有植株都能扩出 *Xa21* 基因的特异片段,不能扩增出 *hpt* 基因及载体骨架的片段。Southern 杂交显示与 PCR 分析一致的结果(图 5) 6-2 株系的 7 个转基因 T_3 植株均能显示出 9.5Kb 的转基因 *Xa21* 特异的杂交带(图 5(a)) 而与 *hpt* 基因和载体骨架序列杂交时均没有杂交带(图 5(b))。这些结果表明我们获得了无选择标记和载体骨架序列的 *Xa21* 转基因纯合系。

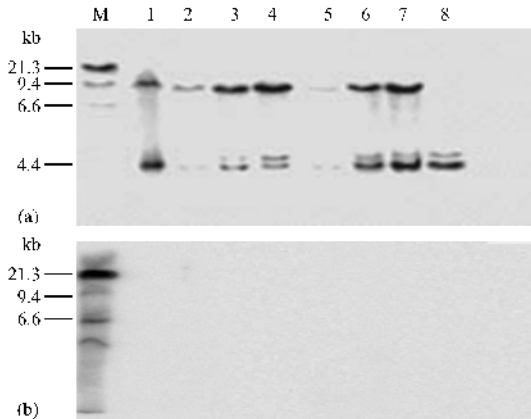


图 5 6-2 株系 T_3 代转基因植株 Southern blot 分析

Fig.5 Southern blot analysis of T_3 progenies of 6-2 line

Southern blot analysis of gene *Xa21*; Southern blot analysis of gene *hpt* and backbone sequence of vector; M: λ /HindIII DNA marker; 1-7: *Xa21* transgenic plants; 8: non-transgenic negative control.

3 讨论

双右边界载体系统是可以去除选择标记的转化系统之一。Lu 等用这一系统转化水稻品种秀水和 Jarrah, 36% ~ 64% 的转基因株系能分离产生无选择标记转基因后代^[17]。本研究中标记基因转基因株系获得率明显偏低,为 15%,可能是受体品种 C418 较难转化造成的。C418 品种转化效率偏低,不容易产生多拷贝的转基因株系。秀水和 Jarrah 两个受体品种比较容易转化,容易产生多拷贝的转基因株系。另外目标基因 *Xa21* 插入片段大可能也是一个影响因素。这些因素可能还造成了只含两个右边界之间的标记基因的转基因植株的增多,在本研究中 27 个 T_0 转基因株系中有 10 个株系只含有 *hpt* 标记基因而不含有 *Xa21* 基因。本研究证实对于难转化的水稻品种双右边界载体系统也是一个成功的转化系统。

在农杆菌介导的基因转化过程中,转移的基因片段理论上是在左右边界之间的序列^[24],但有研究表明左右边界之外的载体骨架序列也时常共同转

移^[7, 19, 20]。载体骨架序列带有细菌复制与抗性筛选的序列,可能对植物生长、生态环境和人类健康带来危害^[11],因此检测转基因植株中是否含有载体骨架序列很有必要。本研究通过检测 *hpt* 基因既排除了选择标记基因又排除了 T-DNA 右边界外侧的载体序列,通过左边界外侧相邻序列的特异检测排除了 T-DNA 左边界外侧的载体序列。

与其它植物基因工程载体不同,本研究获得的 *Xa21* 转基因水稻具有明显的生物安全性。一方面转基因 *Xa21* 不是来源于其它生物或人工合成的基因,而是来源于水稻基因组的一个完整基因^[1],包含有自身的启动子、完整的开放阅读框和终止子,该基因已在用于传统水稻育种中。另一方面本研究通过双右边界 T-DNA 载体,获得无标记基因和载体骨架序列的转基因纯合系,彻底消除了标记基因与载体骨架序列带来的潜在危害。因此本研究获得的无选择标记和载体骨架序列的 *Xa21* 转基因纯合系可以安全地用于水稻育种。

致谢 感谢 Narayana M. Upadhyaya 博士提供双元载体 pMNDRBBIN6 杨振玉教授提供水稻材料 C418, 中国农科院作物科学研究所周永力博士提供白叶枯病原小种,石桂丽,赵显峰和郭官强协助水稻转化和材料种植。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Song WY, Wang GL, Chen LL *et al.* A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 1995, **270**: 1804 - 1806
- [2] Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y. Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 1663 - 1668
- [3] Sun X, Cao Y, Yang Z *et al.* *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. *Plant J*, 2004, **37**: 517 - 527
- [4] Gu K, Yang B, Tian D *et al.* R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*, 2005, **435**: 1122 - 1125
- [5] Zhai WX, Li XB, Tian WZ. Introduction of a blight resistance gene, *Xa21*, into five Chinese rice Varieties through an Agrobacterium-mediated system. *Science in China (Series C)*, 2000, **43**: 361 - 368
- [6] Li XB (李晓兵), Yi CD (裔传灯), Zhai WX (翟文学) *et al.* A Genetically Modified Japonica Restorer Line, C418-*Xa21*, and its hybrid rice with bacterial blight resistance. *Chinese Journal of*

- [7] Zhai W, Chen C, Zhu X *et al.* Analysis of T-DNA-Xa21 loci and bacterial blight resistance effects of the transgene Xa21 in transgenic rice. *Theor Appl Genet*, 2004, **109** :534 – 542
- [8] Cummins J, Ho MW, Ryan A. Hazardous CaMV promoter? *Nat Biotechnol*, 2000, **18** :363
- [9] Kohli A, Griffiths S, Palacios N *et al.* Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. *Plant J*, 1999, **17** :591 – 601
- [10] Miki B, McHugh S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol*, 2004, **107** :193 – 232
- [11] Wang LH(王利华), Su Q(苏乔), Bao YM(包永明). Biosafety issues and management of vector backbone in transgenic plant. *China Biotechnology(中国生物工程杂志)* 2004 **24** :38 – 42
- [12] Chen SB(陈松彪), Liu X(刘翔), Peng HY(彭海英). Cre/lox-mediated marker gene excision in elite indica rice plants transformed with genes conferring resistance to lepidopteran insects. *Acta Botanica Sinica(植物学报)*. 2004 **46** :1416 – 1423
- [13] Gleave AP, Mitra DS, Mudge SR *et al.* Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. *Plant Mol Biol*, 1999, **40** :223 – 235
- [14] 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. *Plant Cell Rep*, 2005, **24** :86 – 94
- [15] Komari T, Hiei Y, Saito Y *et al.* Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J*, 1996, **10** :165 – 174
- [16] Goldsbrough AP, Lastrella CN, Yoder JL. Transposition mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato. *Bio/technology*, 1993, **11** :1286 – 1292
- [17] Lu HJ, Zhou XR, Gong ZX *et al.* Generation of selectable marker-free transgenic rice using double right-border (DRB) binary vectors. *Aust. J Plant Physiol*, 2001, **28** :241 – 248
- [18] Li JY(李建粤), Mao WX(毛万霞), Yang LJ(杨丽君) *et al.* Introducing antisense waxy gene into rice seeds reduces grain amylose contents using a safe transgenic technique. *Chinese Science Bulletin(科学通报)*, 2005 **50** :139 – 144
- [19] Wenck A, Czako M, Kanevski I *et al.* Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium* mediated transformation. *Plant Mol Biol*, 1997, **34** :913 – 922
- [20] Kononov ME, Bassuner B, Gelvin SB. Integration of T-DNA binary vector "backbone" sequence into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant J*, 1997, **11** :945 – 957
- [21] Yang ZY, Zhang ZX, Wei YL *et al.* Breeding and characteristic of japonica type wide compatibility line C418. *Hybrid Rice*, 1998, **13** :31 – 32
- [22] Zhai WX, Wang WM, Zhou YL *et al.* Breeding bacterial blight-resistant hybrid rice with the cloned bacterial blight resistance gene Xa21. *Molecular Breeding*, 2001, **8** :285 – 293
- [23] Huang N, Augetes ER, Domingo J *et al.* Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theor Appl Genet*, 1997, **95** :313 – 320
- [24] Tinland B, Hohn B, Puchta H. *Agrobacterium tumefaciens* transfers single-stranded transferred DNA (T-DNA) into the plant cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** :8000 – 8004