

利用 *Ac/Ds* 转座子系统在水稻中获得无选择标记转基因植株的方法

金维正 段瑞君 张 帆 陈双燕 吴运荣 吴 平*

(浙江大学生命科学学院 植物生理学与生物化学国家重点实验室, 杭州 310029)

摘 要 获得无选择标记转基因植株是进行重复转基因及消除转基因植株中标记基因潜在危害性的关键。实验采用了 *Ac/Ds* 转座子系统在水稻 (*Oryza sativa* L.) 中进行无 *hpt* 选择标记的转基因。将含有目的基因 *bar* 的 *Ds* 元件和 *hpt* 标记基因置于同一个 T-DNA 中, 通过农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 介导将 *Ac*-T-DNA 及 *Ds*-T-DNA 分别转入到不同的水稻植株, 再将单拷贝的 *Ac*-T-DNA 植株与单拷贝的 *Ds*-T-DNA 植株杂交得到同时含有 *Ac* 和 *Ds* 元件的 F_1 植株, F_1 自交产生 F_2 后代, F_2 植株中转座后的 *Ds* 元件与 T-DNA 独立分离, 在总共 100 株 F_2 水稻植株中筛选得到 2 株只含有 *Ds* 元件插入而无 *hpt* 标记基因的转基因水稻植株。结果表明, 利用 *Ac/Ds* 转座子系统在水稻中获得无选择标记的转基因植株是可行的。

关键词 水稻, *Ac/Ds*, 无标记基因

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-306X(2003)06-0668-06

转基因技术已经越来越多地被应用到植物育种之中。通常的转基因方法是将标记基因与目的基因串联在一起, 然后导入到细胞中, 通过对标记基因的选择而获得目的基因。常用的选择标记主要为抗生素抗性基因或者除草剂抗性基因, 由于可以利用的标记基因非常少, 少数几次转基因后就无法再找到合适的标记基因。其次, 带有标记基因的转基因农作物大面积栽培, 有可能使标记基因通过基因漂移的方式转移到病菌、害虫或杂草的基因组中, 使之对农药、抗生素或除草剂产生抗性, 对生态效益和公众的身体健康产生不良影响。

获得无选择标记基因的转基因植物是消除上述潜在不利因素的关键。通过以下方法可以获得无选择标记的转基因植物: 1) 共转化法^[1], 将标记基因与目的基因分别构建到独立的双元载体中或者同一载体两个独立的 T-DNA 元件, 因为 T-DNA 在导入细胞的过程中会以多个拷贝的方式导入, 通过对标记基因的选择可能同时获得含有目的基因的转基因植物; 通过后代的分离而获得只含有目的基因的转基因植物。2) 位点特异重组系统^[2], 细菌噬菌体 P1 重组系统 *Cre/lox* 包含重组酶 *Cre* 和重组酶识别位点 *loxP* 两个元件, 将选择标记构建到两个 *loxP* 位点之

间, 目的基因置于 *loxP* 位点之外, 然后分别将 *Cre* 元件和 *loxP* 元件导入到同一植物之中, 通过 *Cre* 重组酶将选择标记基因从目的基因边上割离, 在后代中筛选只含有目的基因而不含 *Cre* 元件及标记基因的转基因植株。3) MAT 载体系统^[3,4], 利用异戊烯基转移酶基因 *ipt* (Isopentenyl transferase) 或者发根农杆菌中的 *rol* 基因作为正向选择标记, 结合位点特异重组系统, 在不加细胞分裂素的分化培养基中获得正常形态的不定芽, 再鉴定获得无标记转基因植株。4) 玉米 *Ac/Ds* 转座子系统, 它是利用 *Ds* 元件能从染色体的一个位点转移到另一个位点, 然后在后代中通过自交分离获得不含有标记基因的转基因植株。

Ac/Ds 转座子系统已经在转基因番茄研究^[5]中取得成功, 但在其它农作物中鲜有报道。我们在利用 *Ac/Ds* 系统构建水稻 *Ds* 插入突变体库的时候发现这一系统在水稻中进行无选择标记转基因同样有效。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻 (*Oryza sativa* L.) 中花 11 号, 灌浆期种子的

收稿日期 2003-04-07, 修回日期 2003-06-17。

基金项目 国家 863 专项基金 (No. 2002AA2Z1003)。

* 通讯作者。Tel: 86-571-86971130; Fax: 86-571-86971323; E-mail: docpwu@cls.zju.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

幼胚用作诱导愈伤组织并进行转基因的材料。

二元载体 pDsE 和 pAc 线性示意图如图 1 所示，载体的骨架来自于 pCambia1300(GenBank 登录号 AF234296)。农杆菌菌株用 *Agrobacterium* EHA105^[6]。

1.2 方法

1.2.1 水稻转基因 水稻转基因采用 Hiei 报道的方法^[7]。用潮霉素磷酸转移酶(Hygromycin phospho-

transferase , HPT)基因 *hpt* 作为选择标记基因 ,选择与分化培养基中加入 50mg/L 潮霉素 ,再生植株在长到高约 20cm 时转移到溶液培养 ,10 天后转移到土壤中自然生长。

1.2.2 F₂ 群体的发展 :含有单拷贝 *Ac* 的转基因水稻作父本 ,与单拷贝 *Ds* 作母本的转基因水稻杂交得 F₁ ,F₁ 自交得 F₂。

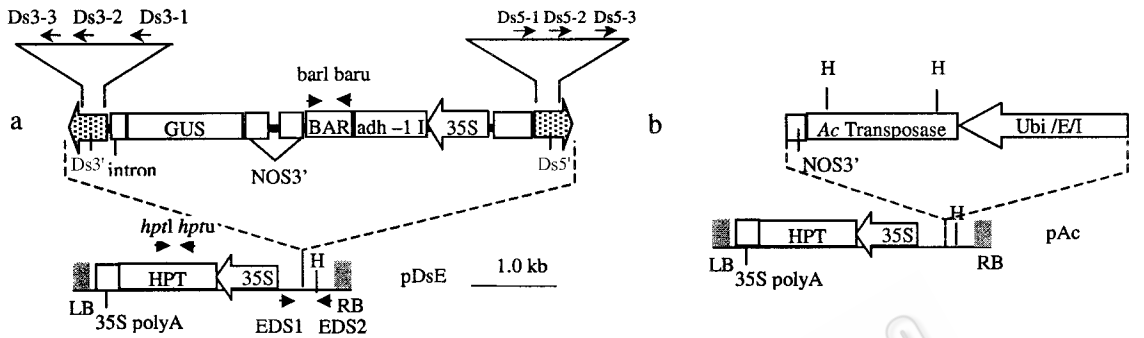


图 1 *Ds*-T-DNA (a) 和 *Ac*-T-DNA (b) 及其组件示意图

Fig. 1 Schematic representation of the *Ds*-T-DNA (a) and *Ac*-T-DNA (b) as well as selectable markers associated with each. These two vectors are based on pCambia1300. Abbreviations : LB , T-DNA left border ; RB , T-DNA right border ; HPT , hygromycin phosphotransferase ; BAR , phosphinothricin acetyltransferase gene ; 35S , CaMV35S promoter ; NOS3' , 3'-end signal of nopaline synthase ; GUS , β -glucuronidase ; 35S polyA , CaMV35S polyA signal ; *Ds*5' , 5' termini of dissociation from maize , *Ds*3' , 3' termini of dissociation from maize , Δ 35S , CaMV 35S mini promoter ; Ubi/E/I , maize ubi-1 promoter/Exon/Intron ; *Ac* transposase , transposase of activator from maize . *bar*1 , *bar*2 , *hpt*1 , *hpt*u , EDS1 , EDS2 and *Ds*3-1 , 2 , 3 and *Ds*5-1 , 2 , 3 are primers used for PCR analysis and TAIL-PCR .

1.2.3 小量 DNA 的提取 取 20 d 苗龄的水稻叶片 3 ~ 4 cm ,剪成小片段 ,放入 1.5 mL 离心管中 ,加液氮磨碎 ,加入 500 μ L DNA 提取液(100 mmol/L Tris-HCl pH8.0 , 20 mmol/L EDTA , 500 mmol/L NaCl , 1.5 % SDS)短暂振荡使提取液与粉末混匀 ,65 $^{\circ}$ C 水浴放置 20min ,加等体积的氯仿/乙醇/戊醇(20 : 4 : 1)振荡混匀 10 s ,12 000 r/min 离心 5 min ,取 500 μ L 上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中 ,加 1 mL - 20 $^{\circ}$ C 的无水乙醇 ,混匀 ,室温下置 5 min ,12 000 r/min 离心 5 min ,去上清 ,加 1 mL 70 % 乙醇洗涤 ,倒扣置于吸水纸上自然晾干 ,加入 100 μ L 含有 0.1 mg/mL RNaseA 的 TE (pH8.0)溶解 ,作为 PCR 反应的模板。

1.2.4 PCR 检测 检测 *Ds* 在 F₂ 代中的跳跃。根据载体的构建 ,设计引物 EDS1 (5'-atgcttcgggctcg-tatgttggt-3') 和 EDS2 (5'-aagcgtgaaggtatatttgaagta-3') 扩增 *Ds* 跳跃后的空供体位点 EDS (Empty donor site) ,引物 EDS1 和 *Ds*3-1 (5'-gggtccgcgtcgatttgact-3') 扩增完整供体位点 FDS (Full donor site)。为减少 PCR 反应数量 ,将三条引物 (EDS1 , EDS2 , *Ds*3-1) 同时置于一个反应管 ,根据设计 ,EDS 的扩增片段大小为 516bp ,FDS 为 287bp。

检测 *hpt* 基因的引物为 *hpt*u (5'-cggctcgcggaggc-tatggatg-3') 和 *hpt*l (5'-gcttctgcggcgatttggtga-3') ,扩增产物大小为 599bp。检测 *bar* 基因(phosphinothricin acetyltransferase) 的引物为 *bar*1 (5'-atgagc-ccagaacgacgccc-3') 和 *bar*2 (5'-tcagatctcggtgacgggca-3') ,扩增片段大小为 354bp。

1.2.5 Southern 杂交分析 :水稻总 DNA 的大量提取按本实验室的方法 ,5 μ g 总 DNA 用 *Hind* III 酶切完全 ,在 0.7 % 的琼脂糖凝胶中电泳分离 ,转移到带正电的尼龙膜(Hybond-N + , Amersham)上 ,用 ³²P 放射性同位素标记的 *hpt* 基因或 *bar* 基因片段作探针。*Hind* III 在载体上的分布如图 1 所示 ,在 *hpt* 基因和 *Ds* 元件上没有 *Hind* III 的酶切位点 ,杂交的条带数反映 T-DNA 或 *Ds* 的拷贝数。

1.2.6 *bar* 基因的功能验证 :采用 3mg/L 的磷丝菌素(Phosphinothricin) PPT 水溶液喷洒到 F₂ 水稻植株上来检测 *bar* 基因 ,一个星期后观察拍照。

1.2.7 *Ds* 旁邻序列的扩增、克隆、测序与分析 :用 TAIL-PCR 的方法^[8]扩增 *Ds* 插入位点两侧的水稻基因 DNA。*Ds*3' 端的特异引物采用 *Ds*3-1 : 5'-gggttc-cgcgttcgatttgact-3' , *Ds*3-2 : 5'-cgattacggtattatccgttc-3' ,

*Ds*3-3 5'-tcgtttccgtcccgcaagt-3'。 *Ds*5'端的特异引物采用 *Ds*5-1 :5'-acggtcgggaaactagctctac-3' ,*Ds*5-2 :5'-tcggttcggttttcgttttttac-3' ,*Ds*5-3 :5'-cggtcggtagcgggattttcc-3'。 采用的随机引物及反应条件参照 Liu 等^[9]的方法进行。 特异扩增得到的第三轮 PCR 产物经凝胶电泳回收后克隆到 pUC-T 载体中 ,用 M13 测序引物及发玛西亚测序试剂盒 (DYEnamic ET dye terminator kit) 作反应 ,在 MEGABASE1000 测序仪上测序。 序列在 GenBank 中作 BLASTN 搜索以确定 *Ds* 在水稻基因组中的插入位置 ,序列分析在软件 DNASTAR (version 5.0)中进行。

2 结果

2.1 *F*₂ 群体的发展

通过农杆菌介导的 T-DNA 转基因分别获得含 *Ac*-T-DNA 和 *Ds*-T-DNA 的转基因植株。 在杂交之前 先对 *Ac* 和 *Ds* 亲本植株进行 Southern 杂交确定拷贝数。 根据我们已经得到的结果 ,在本研究中 ,采用了一株单拷贝的 *Ds* 植株 CE68 作母本与一株单拷贝的 *Ac* 植株 CAc46(图 2)作父本杂交得 *F*₁ ,*F*₁ 自交得 *F*₂。

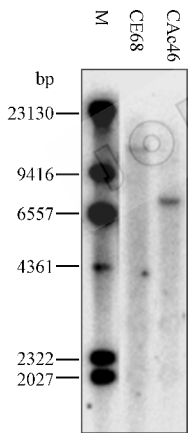


图 2 *Ac*-T-DNA 和 *Ds*-T-DNA 亲本植株的 Southern 杂交分析
Fig. 2 Southern blot analysis of *Ac*-T-DNA and *Ds*-T-DNA parent plants

2.2 *Ds* 元件在 *F*₂ 中的跳跃

要在 *F*₂ 代植株中获得无 *hpt* 标记基因的 *Ds* 插入植株 ,首先要确定 *Ds* 在 *F*₂ 代中的跳跃。 对 100 株 CE68 × CAc46 *F*₂ 植株进行三引物 (EDS1 ,EDS2 和 *Ds*3-1) 的 PCR 检测 ,结果出现与预期一致的 4 种条带模式(图 3) ,分别为 EDS⁺ FDS⁺ (No. 4) \ EDS⁺ FDS⁻ (No. 12) \ EDS⁻ FDS⁺ (No. 1、3、6、7、8、9、10、11、13、14、15) \ EDS⁻ FDS⁻ (No. 2、5) 。 扩增到 516bp 的

空供体位点(empty donor site)EDS 片段说明这些植株 *Ds* 发生了跳跃 ,扩增到 287bp 的完整供体位点 (full donor site)FDS 片段说明这些植株的 *Ds* 不发生跳跃 ,总共有 25 株 *F*₂ 植株(EDS⁺ FDS⁺ 植株和 EDS⁺ FDS⁻ 植株之和)中检测到有 EDS 片段 ,*Ds* 在 *F*₂ 代中的跳跃频率为 25/100(25%)。

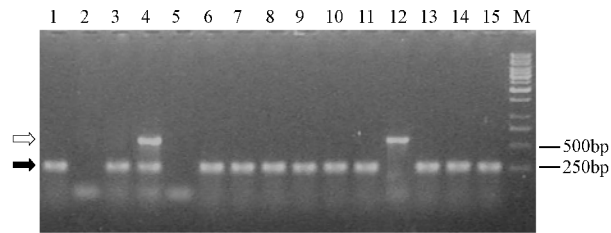


图 3 *F*₂ 植株 *Ds* 跳跃的 PCR 分析

Fig.3 PCR analysis of excision events of

Ds elements in *F*₂ progeny

◇ :Bands of empty donor site (EDS) ,

➔ : Bands of full donor site (FDS)

2.3 HPT⁻ BAR⁺ 植株的筛选

无 *hpt* 基因的 *Ds* 插入植株一定出现在 EDS⁻ FDS⁻ 转基因植株中 ,因为只含有 *Ds* 插入的植株用三引物是扩增不到任何产物的(参考图 1) 。 对 27 株 EDS⁻ FDS⁻ 植株进行 *hpt* 基因的 PCR 扩增检测 ,结果在 17 株中扩增到 *hpt* 片段(图 4) ,扩增得到的 *hpt* 片段来自 *Ac*-T-DNA ,剩下 10 株植株没有扩增得到 *hpt* 基因片段。 对 10 株 HPT⁻ 植株进行 *bar* 基因片段的扩增 ,其中有 2 株扩增得到 *bar* 基因片段(图 5) ,这两株 *F*₂ 植株就是无 *hpt* 标记基因的 *Ds* 插入植株。

Ds 跳跃的三引物扩增、*hpt* 基因检测、*bar* 基因检测的 PCR 结果统计于表 1。

表 1 *F*₂ 植株 PCR 分析

Table 1 PCR analysis of *F*₂ plants

<i>F</i> ₂ plants	EDS ⁺ FDS ⁺ EDS ⁺ FDS ⁻ EDS ⁻ FDS ⁺ EDS ⁻ FDS ⁻					
	HPT ⁻ BAR ⁺		HPT ⁻ BAR ⁺		HPT ⁺	
100	6	19	48	2	8	17

EDS :empty donor site ; FDS : full donor site .

2.4 HPT⁻ BAR⁺ 植株的 Southern 杂交验证

为确证用 PCR 方法筛选得到的两株 HPT⁻ BAR⁺ *F*₂ 植株含有 *Ds* 转座子插入 ,用 *bar* 基因片段作探针与 *Hind*Ⅲ 酶切的 No.2 和 No.5 植株的基因组 DNA 杂交 ,得到与亲本 CE68(图 2)不同位置的单一条带(图 6a) ,说明筛选得到的两个植株确实是 *Ds* 插入植株。 杂交条带在不同的位置表明 *Ds* 插入发

生在水稻基因组 DNA 的不同部位。用 *hpt* 基因片段作探针杂交则得不到任何信号(图 6b),说明在这两株水稻植株中已经不存在 *hpt* 基因了。

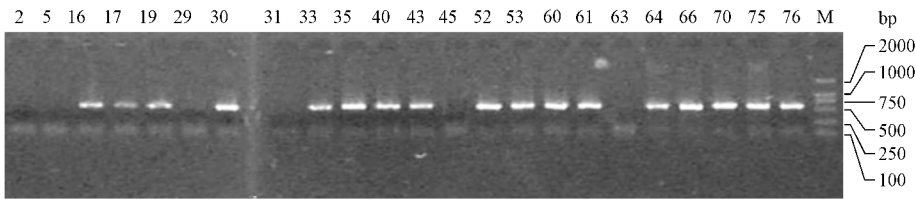


图 4 EDS⁻ FDS⁻ 植株 *hpt* 基因的 PCR 分析

Fig. 4 PCR analysis of *hpt* gene of EDS⁻ FDS⁻ plants

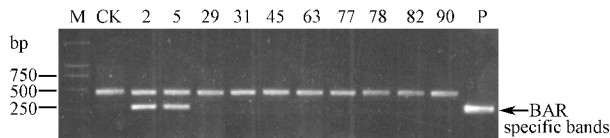


图 5 HPT⁻ 植株 *bar* 基因的 PCR 分析

Fig. 5 PCR analysis of *bar* gene of HPT⁻ plants

CK : Zhonghua-11 as negative control ; 2-90.

HPT⁻ F₂ plants ; P. plasmid pDsE as positive control.

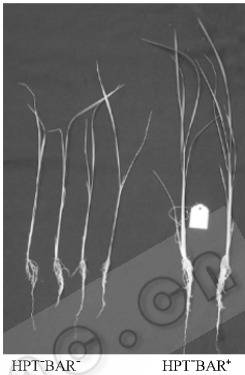


图 7 HPT⁻ BAR⁺ 和 HPT⁻ BAR⁻ 植株 PPT 抗性分析

Fig. 7 PPT resistance analysis of HPT⁻ BAR⁺ and HPT⁻ BAR⁻ plants

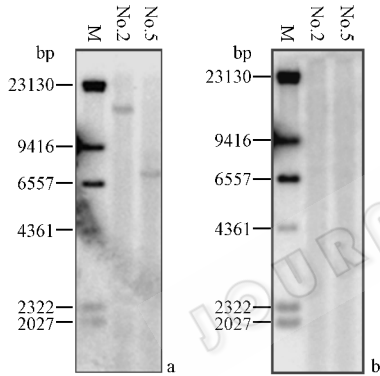


图 6 HPT⁻ BAR⁺(只含有 *Ds*)F₂ 植株的 Southern 杂交分析

Fig. 6 Southern blot analysis of HPT⁻ BAR⁺(*Ds* only)

F₂ plants

a was probed by *bar* gene fragment ;

b was probed by *hpt* gene fragment.

2.5 HPT⁻ BAR⁺ 植株的 *bar* 基因功能验证

将筛选得到的 HPT⁻ BAR⁺ 及 HPT⁻ BAR⁻ 植株喷洒 PPT 对 *bar* 基因进行功能验证,喷洒后一个星期 HPT⁻ BAR⁺ 及 HPT⁻ BAR⁻ 植株症状如图 7 所示, HPT⁻ BAR⁺ 植株的叶片保持绿色,生长正常;而 HPT⁻ BAR⁻ 植株的叶片变黄、枯萎以至死亡。这说明用 PCR 方法筛选得到的无 *hpt* 转基因水稻是可信的。

2.6 *Ds* 元件在水稻基因组中插入位置的分析

采用 TAIL-PCR 的方法,对 2 株 HPT⁻ BAR⁺ 植株 *Ds* 元件插入处的水稻 DNA 进行扩展。序列分析表

明 No. 2 植株的 *Ds* 元件插入在水稻第 7 条染色体 OJ1339_F05 克隆(GenBank 登录号为 AP004009)的第 23394bp 这一位置 ;No. 5 植株的 *Ds* 元件插入在水稻第 7 条染色体 OJ1136_D11 克隆(GenBank 登录号为 AP003749)的第 107794bp 这一位置(图 8)。 *Ds* 元件在水稻基因组中的插入位置引起典型的 8 个碱基的正向重复,这一结果与 Izawa 等^[9]报道的一致。
No. 1 GCATCTGAAGGACTGAAG [*DS*] GACTGAAGCACT-TCGTTT AP04009

OJ1339_F05 23394bp

No. 2 ACAATTGGTCTGAGCAGT [*DS*] TGAGCAGTTGGGCT-TCCC AP003749

OJ1136_D11 107798bp

图 8 HPT⁻ BAR⁺ F₂ 植株 *Ds* 元件在水稻基因组中的插入位置

Fig. 8 *Ds* insertion position of HPT⁻ BAR⁺ F₂ plants in rice genome

Ds insertion position was at 23394bp of BAC clone OJ1339_F05 (GenBank accession AP004009) in No. 2 plant. *Ds* insertion position was at 107798bp of BAC clone OJ1136_D11 (GenBank accession AP003749) in No. 5 plant.

3 讨 论

Ac/Ds 系统作为无标记转基因的载体是利用 *Ds* 元件能从染色体的原初位点跳跃整合到另一个位点的特性,再通过后代重组自交与原初位点上的标记基因及 *Ac* 元件分离而得到只含有 *Ds* 元件的转基因植株。在不同的 *Ac/Ds* 系统中,*Ds* 发生跳跃的频率是不一样的,只有跳跃频率达到一定的数值时,才有可能筛选到只含有 *Ds* 的转基因植株。在本研究中,在 100 株 F_2 植株中检测到有 25 株 *Ds* 是发生跳跃的(表 1, $EDS^+ FDS^+$ 与 $EDS^+ FDS^-$ 植株之和),跳跃频率为 25%。如果考虑到在 F_2 植株中有 1/4(按孟德尔定律)是不带有 *Ds* 元件的,则实际发生 *Ds* 的跳跃频率为 25/75(33%)。标记基因 *hpt* 分别来源于 *Ac*-T-DNA 与 *Ds*-T-DNA 元件,在 F_2 代中,理论上只有 1/16 的植株是不带有 *hpt* 基因的。如果跳跃发生在不同的染色体之间,那么在我们的系统中 1/16 的 F_2 植株之中有 25% 的植株可能含有 *Ds* 插入子,理论上筛选 64 株 F_2 植株就能筛选得到 1 株无 *hpt* 标记基因的 *Ds* 插入植株。在我们的研究中,在 100 株 F_2 植株中筛选到 2 株,这一结果与理论值非常接近。

如果 *Ds* 插入在供体位点的附近或同一染色体上,则筛选得到无 *hpt* 基因的 *Ds* 插入植株几率将大大下降,在不同的 *Ac/Ds* 系统中,*Ds* 插入的位置变化很大,*Ds* 插入发生在供体位点的不同染色体上对于选择到无 *hpt* 基因的 *Ds* 插入植株非常有利。通过对 No.2 和 No.5 两植株 *Ds* 元件两侧的水稻 DNA 序列分析,发现 *Ds* 插入位点在水稻第 7 条染色体上,而 *Ds*-T-DNA 的供体位点在第 12 条染色体(未发表结果)上,*Ds* 插入发生在不同染色体上也正是我们能在 100 株 F_2 水稻植株中能筛选到 2 株只含有 *Ds* 植株的原因。

Ac 元件与 *Ds* 元件构建在同一个 T-DNA 中能增加筛选的效率,并且能够缩短筛选的时间。Goldbrough 等^[5]将 *Ac* 与 *Ds* 构建在同一个 T-DNA 中对番茄进行转基因,在 2 个 T1 群体中,分别得到 2.3%(2/87)和 6.6%(7/106)只含有 *Ds* 而无新霉素磷酸转移酶(Neomycin phosphotransferase II)*npt II* 标记基因的植株。但是这种将 *Ac* 与 *Ds* 置于同一载体中进

行转基因,无法控制 T-DNA 的拷贝数,如果要获得较多的无标记转基因植株则要做很多的原始转基因材料,并且由于转基因材料之间的差异,获得无标记转基因植株的频率可能不稳定。而将 *Ac* 与 *Ds* 分别导入不同的植株,然后通过杂交的方式则可以由研究者任意控制 *Ac* 与 *Ds* 的拷贝数及相互的配对,同时也容易获得大量的 F_1 以备稳定地筛选大量只含 *Ds* 插入子的植株。

在实验中,我们采用 PCR 的方法筛选到 2 株只含有 *Ds* 元件插入子的转基因水稻。通过 Southern 和 *bar* 基因的功能分析表明 PCR 筛选方法是可靠的。如果在 *Ds* 元件中加入其它目的基因而不是 *bar* 基因一类的抗除草剂基因,同样也可以按照我们设计的 PCR 筛选方法来获得无标记基因的转基因植株。

REFERENCES(参考文献)

- [1] 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 Journal*, 1996, **10**: 165 - 174
- [2] Gleave A P, Mitra D S, Mudge S R *et al.* Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. *Plant Molecular Biology*, 1999, **40**: 223 - 235
- [3] Endo S, Sugita K, Sakai M *et al.* Single-step transformation for generating marker-free transgenic rice using the ipt-type MAT vector system. *Plant Journal*, 2002, **30**: 115 - 122
- [4] 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 Reports*, 2001, **20**: 383 - 392
- [5] Goldsbrough A P, Lastrella C N, Yoder J I. Transposition mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato. *Biotechnology*, 1993, **11**: 1286 - 1292
- [6] Hood E E, Gelvin S B, Melchers L S *et al.* New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research*, 1993, **2**: 208 - 218
- [7] 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 Journal*, 1994, **6**: 271 - 282
- [8] Liu Y G, Mitsukawa N, Oosumi T *et al.* Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant Journal*, 1995, **8**: 457 - 463
- [9] Izawa T, Ohnishi T, Nakano T *et al.* Transposon tagging in rice. *Plant Molecular Biology*, 1997, **35**: 219 - 229

Application of *Ac/Ds* Transposon System to Genetate Marker Gene Free Transgenic Plants in Rice

JIN Wei-Zheng DUAN Rui-Jun ZHANG Fan CHEN Shuang-Yan WU Yun-Rong WU Ping*

(State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry , College of Life Sciences , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China)

Abstract It is critical to generate marker gene free transgenic plants for retransforming or eliminating the potential harmfulness of marker gene and its product. In this study , *Ac/Ds* transposon system was developed for removal of *hpt* selection marker gene to obtain marker-free transgenic plants in rice(*Oryza sativa* L.). *Ds* element containing the interesting gene *bar* was constructed next to the selection marker gene *hpt* to get *Ds*-T-DNA. Rice plants were transformed by *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 containing *Ac*-T-DNA and *Ds*-T-DNA respectively. Rice plant containing single copy *Ac*-T-DNA was crossed with plant containing single copy *Ds*-T-DNA to obtain the F₁ plant containing both *Ac* and *Ds* elements. F₁ plant was self-crossed to produce F₂ progeny in which T-DNA insert and transposed *Ds* element segregated independently. Two plants contained *Ds* element but no *hpt* marker gene in total 100 F₂ plants. The result indicated that *Ac/Ds* transposon system could be used as a vector system for generating marker gene free transgenic plants in rice.

Key words rice(*Oryza sativa* L.); *Ac/Ds* ; marker gene free

Received : 04-07-2003

This work was supported by Grant from the Special Foundation of National " 863 " Program(No.2002AA2Z1003).

* Corresponding author. Tel : 86-571-86971130 ; Fax : 86-571-86971323 ; E-mail : docpwu@cls.zju.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>