

去除转基因植物标记基因的研究进展

马三梅, 王永飞

(暨南大学生物工程学系, 广东广州 510632)

摘要: 得到转基因植物以后, 标记基因就失去了筛选的作用。但它的存在引起公众对转基因植物的安全性以及环境效应的担心, 所以在目的基因转入后, 要去除标记基因。该文主要就利用共转化、转座子、同源重组、位点特异重组酶等去除标记基因的方法进行了总结, 并对各种方法的优缺点进行了比较, 对该技术未来的发展趋势也进行了展望。

关键词: 转基因植物; 标记基因; 位点特异重组

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)03-0270-05

The excision of marker gene in transgenic plants

MA San-mei, WANG Yong-fei

(Department of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Several methods were used to excise marker gene in transformed plants, for example co-transformation, transposable elements, homologous recombination and site-specific recombination. We place particular emphasis on a most recent development of inducible site-specific recombinase systems for efficient marker gene deletion strategies. The relative advantages or disadvantages of the excising procedures presented here are discussed. Their development is prospected.

Key words: transgenic plant; marker gene; site-specific recombination

随着植物细胞全能性的发现和转基因技术的发展, 人类已经利用基因工程改变植物的性状, 并且取得了巨大的进展。但由于转化效率不高, 在转化过程中一般使用标记基因来鉴别转化细胞、组织和植株。标记基因有的提供了对抗生素或除草剂的抗性, 有的使转化细胞具有代谢的优越性。在加入选择试剂后, 非转化细胞死亡, 转化细胞存活。为避免筛选标记基因例如抗生素基因等转移到环境, 而造成对生态环境的破坏, 减少培育转基因植物的时间, 加快转基因产品推广的速度, 省去对转基因植物的安全性评价, 降低大众对转基因植物的疑虑, 因此, 在获得转基因植株之后, 有必要将筛选标记基因去除(Peter等, 2002; 舒庆尧等, 2003)。本文主要就去

除标记基因的进展进行讨论, 对该技术未来的发展趋势进行展望。

1 去除标记基因的方法

目前, 去除转基因植物中标记基因主要采用共转化、转座子、同源重组、位点特异重组酶系统等方法。

1.1 共转化去除标记基因

共转化的原理是将目的基因和标记基因单独组装到两个质粒上, 或一个质粒的两个不同 T-DNA 区段上, 然后同时转化。由于二者可同时插入同一细胞的不同染色体上, 从而完成对转化细胞的筛选;

收稿日期: 2003-07-25 修订日期: 2003-09-21

基金项目: 暨南大学引进人才启动基金(692016)

作者简介: 马三梅(1971-), 女, 河南平顶山人, 博士, 副教授, 主要从事植物生殖生物学的研究。E-mail: tmsm@jnu.edu.cn

通过杂交使目的基因和标记基因在子代植株分离开来,从而获得仅带目的基因的转基因植株。

Mcknight 等(1987)用两个 T-DNA 载体共转化烟草,一个含有基因 *npt II*, 另一个含 *nos*(Nopaline synthase, 胭脂碱合成酶)基因,在获得的 11 株 *npt II* 阳性植株中,有 3 株也整合了 *nos* 基因。并且在 3 株共整合植株的所有后代中,两个外源基因都发生了分离,从而可以筛选出无标记基因的植株。Komari 等(1996)在研究共转化时,发现两个质粒在转化前经体外同源重组产生了一个含两套 T-DNA 的双元载体,其中一套含有选择标记基因,另一套含目的基因,该双元载体转化的植株,其后代的选择标记基因与目的基因约有 40% 能独立分离。在 Komari 等(1996)的基础上, Lu 等(2001)设计了双元载体进行共转化。该载体含有一个 T-DNA 的左边界、目的基因和两个 T-DNA 的右边界,标记基因在两个 T-DNA 右边界之间。用含该 T-DNA 的质粒转化水稻,获得转化子后,经过遗传分离,可以把两种 T-DNA 插入方式分开,一种含标记基因和目的基因,另一种只含目的基因。其中 36%~64% 的转基因后代标记基因与目的基因发生了分离。由于这种质粒比含两个独立 T-DNA 序列的质粒小,容易操作,所以转化频率相对较高。Ebinuma 和 Komamine(2001a)利用分别在 T-DNA 控制下的标记基因和目的基因进行共转化,从转基因品系的后代中筛选出不带标记基因的植株。

Depicker 等(1985)发现用农杆菌共转化的效率与单独转化的频率相同。DeBlock 和 Debbrouwer (1991)及 Mc Knight 等(1987)利用共转化也获得了较高的共转化效率,并且分别有 78% 和 100% 的共转化植株共整合在非连锁位点上。尽管他们使用的转化载体、农杆菌株系、转化程序因作物不同而不同,但说明共转化可用于产生不含有选择标记基因的转基因植物。经过对各个转化参数的优化,在某些植物中,共转化法中两个基因同时整合到受体植物的效率已能达到用单一质粒转化方法的效率(Daley 等, 1998; De Block 和 Debbrouwer, 1991; Depicker 和 Debbrouwer, 1985)。不过,选择标记基因和目的基因的遗传分离必须经过有性世代才能实现,这不仅会增加育种时间,而且无法应用于无性繁殖的植物品种。

1.2 利用转座子去除标记基因

转座子是指一段特定的 DNA 序列,它可以在

染色体组内移动,从一个位点切除,插入到一个新的位点。它一般由特定的蛋白质来识别某一种 DNA 序列,识别位点之间的 DNA 片段被插入到另外的位点上去。把标记基因或目的基因和转座子相连,在转座子和标记基因或目的基因一起移动的过程中,标记基因和目的基因分开,子代植株通过遗传分离,获得仅带目的基因的转基因植株。基于以上原理,转座子系统可被开发用于转化系统来培育安全的、无标记基因的转基因植株。例如玉米中的 Ds 转座子,可以把特定重复 DNA 之间的基因切除,在 Ac 转座酶的作用下将其转移到另一位置。将标记基因或者目的基因和 Ds 相连,转入植物中,随后往初级转化子中导入 Ac 转座酶基因,从而使目的基因和标记基因分开;通过杂交,从后代中筛选出仅有目的基因的植株。Ebinuma 等(1997)利用这种途径,把 *ipt* 基因置于 Ds 之间,利用重新整合到基因组中的失败,切除标记基因,已得到了高转化频率且是单拷贝的转基因烟草和葡萄。Goldsbrough 等(1993)以 *npt II* 为选择标记基因,以 *gus* 作报告基因转化西红柿。利用上述方法在转基因植株后代中发现无标记基因的转基因植株。

1.3 利用同源重组去除标记基因

同源重组依赖于大范围的 DNA 同源序列的联会。负责 DNA 配对和重组的蛋白质无碱基序列的特异性,只要两条 DNA 序列相同或接近,重组就可以在此序列中的任何一点发生。重组以后, DNA 同源序列间的 DNA 片段可以被切除。把标记基因放在两个 DNA 同源序列之间,发生同源重组后,标记基因可以被切除,这样的细胞经过再生,可得到无标记基因的植株。Fischer 等(1996)利用同源重组的原理,在标记基因 *aadA* 两端加上正向重复序列(Direct repeats sequence),在没有选择压的生长条件下,经过几代的细胞分裂后可以将 *aadA* 基因从叶绿体中除去。在叶绿体转化烟草中,把标记基因和重复序列相连,经过培养,标记基因也被切除(Maliga, 2002; Lamthan 和 Day, 2000)。

1.4 位点特异重组酶系统去除标记基因

位点特异重组在原核生物中最为典型。这种重组依赖于小范围同源序列的联会,重组时发生精确的切割、连接反应。目前发现 4 个位点特异重组系统: Cre/Lox, FLP/FRT, R/RS 和 Gin/gix(林忠平等, 2000)。在重组酶的介导下,在两个识别位点之间的 DNA 片段可以被切除,形成的切除环不能自

主复制,在体内迅速丢失,没有重新插入的现象(Zuo等,2001)。把标记基因放在两个识别位点之间,在重组酶的作用下,标记基因可以被切除。所以在真核生物中利用 Cre(Gleave等,1999;Hoff等,2001)、FLP(Hohn等,2001)或 R(Sugita等,2000;Ebinuma和Komamine,2001)重组酶可以将不需要的基因序列切除,从而把标记基因和目的基因分开。

Onouchi等(1995)用含 R 重组酶基因的转化植株与含标记基因位于 RS 位点间的植株进行有性杂交,获得了无标记基因而只含报告基因的拟南芥转基因植株。Dale和Ow(1991)利用该系统,先将一种筛选标记插入 *Lox* 位点之间,再与目的基因相连,转入植物细胞。在第二轮转化时,将另一种筛选标记与 *Cre* 基因连接后再转入已转化的细胞,在 *Cre* 重组酶的作用下,第一种筛选标记可被删除。挑取已失去第一筛选标记的植株,待开花结实后,从后代分离群体中挑选没有第二种筛选标记的植株,即为已完全剔除了筛选标记基因的转基因植株。Hohn等(2001)认为可直接将 *Cre* 重组酶导入植物细胞就可以使其作用于靶位点,从而达到剔除标记基因的目的。

转化植株中的标记基因,如果两端有 *lox* 位点,与表达 *Cre* 基因的转基因植物杂交,也可在后代中删除标记基因。近期已经在植物中利用农杆菌介导的转化或者受粉导入重组酶基因,诱导切除标记基因。例如 Corneille等(2001)利用 *Cre-lox* 系统把标记基因从叶绿体的基因组中去除。具体方法是在最初设计转化载体时,在标记基因的两端放入 *Lox* 序列,并在得到转化植株后,用转化植株作母本和含有 *Cre* 基因的细胞核转基因植物的花粉进行杂交,即可把标记基因去除,而细胞核的 *Cre* 基因,可望在下一代中分离而去除。Hajdukiewicz等(2001)采用同样的策略也将标记基因从叶绿体基因组中去除。

没有整合到基因组上的 *Cre* 的瞬时表达也可以将 *lox* 位点之间的标记基因切除(Gleave等,1999;Lyznik等,1996;Srivastava和Ow,2001)。把植物暂时用含重组酶基因的农杆菌处理,可以避免重组酶和宿主基因组长时间互作而产生其它不良后果,使切除机制快速作用,快速失活,省去重新导入重组酶基因所用的时间。但这种方法的缺点是效率太低,而且已经被 *Cre* 介导的基因切除,又被 *Cre* 转化的频率很高。在烟草中有 2/3 的转基因植株被重新转化(Gleave等,1999)。另外把标记基因、重组酶

基因、目的基因和重组位点相连,可以在转入外源基因的同时切除标记基因。

低水平表达的重组酶可以降低细胞的再生能力,所以把重组酶基因和它的识别位点连在一起,也使重组酶的浓度一旦达到切割所需的浓度,就直接切除重组酶基因,避免了过多重组酶的产生。但目前在几种植物中发现重组酶表达的自我消退现象,细胞的再生能力受影响不大(Zuo等,2001;Sugita等,2000;Ebinuma和Komamine,2001)。

利用位点特异重组酶切除标记基因时,往往在重组位点留下一个识别序列,经过几次去除标记基因后,基因组中就分布着多拷贝的识别序列。由于多拷贝的同一序列可使基因沉默,从而使目的基因不表达。按照顺序使用不同的重组酶或者利用特殊设计的重组酶,使重组酶仅能识别作物基因组中的一个位点(Santoro和Schultz,2002),可以避免相同重组位点的残留,从而使残存的识别序列不会发生分子内、分子间的重组,导致染色体缺失、倒位、易位(Buchholz和Stewart,2001;Scimmenti等,2001)。另外在切除标记基因后,让启动子的 TATA box 和识别序列、目的基因直接相连,可避免基因沉默,促进目的基因的表达。这是由于转录一般在 TATA box 下游大约 30 核苷酸处开始,在重组酶识别位点末端几个核苷酸的转录不会使基因沉默(Zuo等,2001)。

利用位点特异重组酶去除转基因植物的标记基因,在区分去除基因的体细胞和种系细胞时必须十分小心。因为仅一部分细胞失去了标记基因,在可再生的细胞没有去除的话,发生基因去除的转基因植株的鉴别可能有错误。大多数研究表明 CLX 系统可以确保切除标记基因的转基因品系向后代传递,在作物中应用潜力最大;而 FLP-FRT 和 R-RS 系统诱导产生的基因去除向后代传递的能力有限或者根本不传递(Zuo等,2001)。

1.5 化学诱导启动子控制位点特异重组酶的表达

为加快去除标记基因的进程,使位点特异重组酶只在进行基因切割时表达,重组酶基因还可与标记基因连接到同一载体上,构建成双元载体导入植物体中,通过化学诱导表达的启动子驱动重组酶基因,在化学诱导剂的作用下,重组酶基因表达,标记基因因其两边的同源序列重组而被剔除,这就是所谓的 MAT 载体系统。在缺少诱导剂时,重组酶不表达;在发现所有转化子后,加入诱导剂,使 *Cre* 在

特定的时间内去除标记基因,从而减少重组酶对自身 DNA 的破坏(Zuo 等,2001)。

Sugita 利用 GST-MAT 载体系统,将重组酶 R 与化学诱导表达的启动子 GST-II-27 (glutathione-S-transferase, 谷胱甘肽转移酶)融合,以 *ipt* 为选择标记基因转化烟草,在转化当代就获得了单拷贝的无选择标记基因的转化植株。在拟南芥中,把 *Cre* 放在 β -雌二醇诱导的 XVE 启动子控制下,在 *lox* 位点之间是重组酶基因和生物素抗性基因,*Cre* 的表达达到切割 DNA 所需的浓度,含有 XVE 启动子、*Cre* 和卡那霉素抗性的基因就被切去,从而激活下游 G10-90 启动子控制的绿色荧光蛋白基因的表达(Zuo 等,2001)。利用该系统,在 19 个初级转化子的标记基因被切除。玉米 GST-II-27 启动子可被除草剂 Safener 诱导,利用 GST-II-27 启动子控制 R 和 *ipt* 的表达,从而可以切除 R 和 *ipt*,得到无标记基因植株。已经利用这种方法得到无标记基因的转基因水稻、白杨、金鱼草(Ebinuma 和 Komamine, 2001)。MAT 载体系统免去了有性杂交或二次转化的过程,在转化的当代就能获得无标记基因的转化植株。因此,MAT 载体系统特别适用于树木等生育期长或以营养器官繁殖植物的遗传转化。

2 各种方法的比较

共转化方法所产生的共转化后代中只有 25% 标记基因和外源基因被分离,因此需要从大量的转基因植株中去筛选。与传统的转基因方法相比,它需要 4 倍的工作量才能获得无标记基因的转基因植株。另外,这一方法要求植物能进行有性生殖,不适合于马铃薯、甘蔗等无性繁殖植物的转化。利用基因枪进行共转化时,共转化频率很高,但获得的共转化植株中目的基因和标记基因往往表现为紧密连锁,从而较难获得分离株系。利用两个基因进行共转化时,虽然在后代中可分离出不带标记基因的植株,但由于发生共转化的频率很低、两个基因连锁的程度很难控制,其利用价值受到影响利用同源重组去除标记基因,要求两个 DNA 分子的序列同源,而且同源区越长越容易去除,同源区太短,越难去除。但同源区太长,增加了导入基因的难度;此外这个方法并不总有效;因为错误重组的发生,目的基因会发生缺失(Zubko 等,2000)。

利用转座子、位点特异重组酶系统等方法去除

转基因植物中标记基因,初级转化子一般需要通过杂交或再次转化来导入 Ac 转座酶、Cre 重组酶等基因,然后对杂交后代进行选择,从而筛选出不含标记基因的植株。杂交对于营养繁殖的作物或者生活周期很长的作物来说,是很困难的或者所需时间太长;反复进行组织培养,体细胞突变的频率提高。

从生产实践和研究看,要求切除标记基因的方法必须快速、有效、劳动量小,而且基因去除后必须向后代遗传。但从目前的研究看,上述方法都有效,而且向后代遗传,但均需要很长的时间,劳动量大。因此需要进行深入的研究,加快去除标记基因的速度,减少去除标记基因的工作量。

3 展望

虽然基因组学的发展为快速、有效的去除标记基因提供了理论基础。但去除标记基因的方法仍然需要深入的研究。例如精子细胞长期受 *Cre* 作用,可以引起染色体重排(Schmidt 等,2000)。Ow (2002)也发现含有 *Cre* 的植物,有皱叶、育性下降的现象,但这并不是遗传物质改变引起的。目前我们对 *Cre* 是否仅在细胞核中引起植物细胞染色体畸变仍不了解。所以有必要继续对去除标记基因进行深入的研究,或者在转化时,不使用标记基因,来克服去除标记基因的缺陷。一旦能够有效准确的去除标记基因,生物技术就具有更大作用。例如通过化学诱导的定位切除基因的方法可以使无组织特异启动子的基因在特定的器官中表达(Keenan 和 Stemmer,2002),使抗性基因只在非食用器官中表达,而在人类和动物食用器官中不表达。总之,在后基因组时代作物改良的限制因素不是发现基因的种类不够,而是转化方法的效率不高。一旦转化效率提高,或者使用无标记基因的转化技术,肯定可以获得更多的转基因植物,加快公众对转基因植物的接受步伐。

参考文献:

- 林忠平, 胡鸢雷, 李 雷, 等. 2000. 定位重组系统在外来基因活性调控中的作用 [A]. 见: 林忠平. 走向 21 世纪的植物分子生物学 [C]. 北京: 科学出版社, 66-71.
- 舒庆尧, 董志诚. 2003. 转基因水稻 [A]. 见: 闫新甫. 转基因植物 [C]. 北京: 科学出版社, 214-238.
- Buchholz F, Stewart AF. 2001. Alteration of Cre recombinase site specificity by substrate-linked protein evolution

- [J]. *Nat Biotechnol*, **19**: 1 047—1 052.
- Corneille S, Lutz K, Svab Z, *et al.* 2001. Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the *Cre-lox* site-specific recombination system[J]. *Plant J*, **27**: 171—178.
- Dale EC, Ow DW. 1991. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**: 10 558—10 562.
- Daley M, Knauf VC, Summerfelt KR, *et al.* 1998. Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants[J]. *Plant Cell Report*, **17**: 489—496.
- De Block M, Debrouwer D. 1991. Two T-DNA co-transformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium* infection are mainly integrated at the same locus[J]. *Theor Appl Genet*, **82**: 257—163.
- Depicker A, Herman L, Jacobs A, *et al.* 1985. Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNA and their relevance to the *Agrobacterium* plant cell interaction [J]. *Mol Gen Genet*, **201**: 477—484.
- Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, *et al.* 1997. Selection of marker-free transgenic plants using isopentenyl transferase gene[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 2 117—2 121.
- Ebinuma H, Komamine A. 2001a. MAT (Multi-Auto-Transformation) vector system, the oncogenes of *Agrobacterium* as positive markers for regeneration and selection of mark-free transgenic plants[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, **37**: 103—113.
- Ebinuma H, Komamine A. 2001b. Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker[J]. *Plant Cell Report*, **20**: 383—392.
- Fischer N, Stampacchia O, Kevin R, *et al.* 1996. Selectable marker recycling in the chloroplast[J]. *Mol Gen Genet*, **251**: 373—380.
- Gleave AP, Mitra DS, Mudge SR, *et al.* 1999. Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene[J]. *Plant Mol Biol*, **40**: 223—235.
- Goldsbrough AP, Lastrella CN, YoderJI. 1993. Transposition mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato[J]. *Biotechnology*, **11**: 1 286—1 292.
- Hajdukiewicz PTJ, Gilertson L, Staub JM. 2001. Multiple pathways for *Cre/lox*-mediated recombination in plastids [J]. *Plant J*, **27**: 161—170.
- Hoff T, Schnorr KM, Mundy J. 2001. A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic plants [J]. *Plant Mol Biol*, **45**: 41—49.
- Hohn B, Levy AA, Puchta H. 2001. Elimination of selection markers from transgenic plants[J]. *Curr Opin Biotechnol*, **12**(2): 139—143.
- Keenan RJ, Stemmer WPC. 2002. Non-transgenic crops from transgenic plants[J]. *Nat Biotechnol*, **20**: 215—216.
- Komari T, Hiei Y, Saito Y, *et al.* 1996. Vectors carrying two separate T-DNA for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers[J]. *Plant J*, **10** (1): 165—174.
- Lamthan S, Day A. 2000. Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids[J]. *Nat Biotechnol*, **18**: 1 172—1 176.
- Lu HJ, Zhou XR, Gong ZX, *et al.* 2001. Generation of selectable marker-free transgenic rice using double right-borders(DRB)binary vectors[J]. *Aust J Plant Physiol*, **28**: 241—248.
- Lyznik LA, Rao KV, Hodges TK. 1996. FLP-mediated recombination of FRT sites in the maize genome[J]. *Nucleic Acids Res*, **24**: 3 784—3 789.
- Maliga P. 2002. Engineering the plastid genome of higher plants[J]. *Curr Opin Biotechnol*, **5**: 164—172.
- Mc Knight TK, Lillis MT, Simpson RB. 1987. Segregated of genes transferred to one plant cell from two separate *Agrobacterium* strains[J]. *Plant Mol Bio*, **8**: 439—445.
- Onouchi H, Nishihama R, Kuodo M, *et al.* 1995. Visualization of site specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Mol Gen Genet*, **247**: 653—660.
- Ow DW. 2002. Recombination-directed plant transformation for the post-genomic era[J]. *Plant Mol Biol*, **48**: 183—200.
- Peter DH, Nam-Hai Chua. 2002. Excision of selectable marker genes from transgenic plants[J]. *Nat Biotechnol*, **20**: 575—580.
- Santoro SW, Schultz PG. 2002. Directed evolution of the site specificity of Cre recombinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**: 4 185—4 190.
- Schmidt EE, Taylor DS, Prigge JR, *et al.* 2000. Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**: 13 702—13 707.
- Sclimenti CR, Thayagarajan B, Calos MP. 2001. Directed evolution of a recombinase for improved genomic integration at a native human sequence[J]. *Nucl Acids Res*, **29**: 5 044

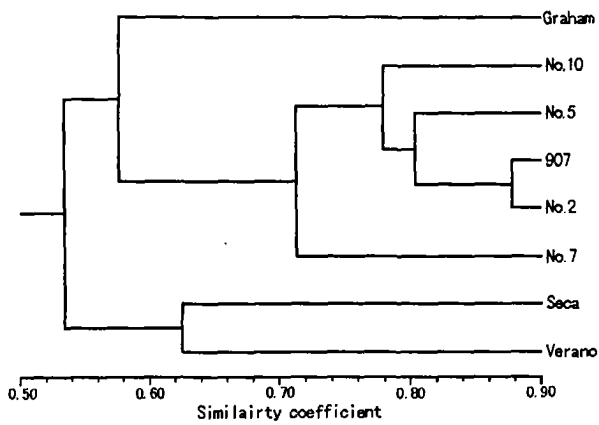


图 1 八个柱花草品种的聚类树形图

Fig. 1 Dendrogram obtained from RAPD data of eight *Stylosanthes* varieties by UPGMA

参考文献:

- Edye LA, Cameron DF. 1984. Prospects for *Stylosanthes* improvement and utilization[A]. In: Stace HM, Edye LA. The biology and agronomy of *Stylosanthes*[C]. North Ryde, NSW, Australia: Academic Press, 571-587.
- Jiang CS(蒋昌顺). 1995. Utilization and studies of *Stylosanthes* in China(我国对柱花草属不同种的研究与利用)[J].

- Tropical Crops Research* (热带作物研究), 61(3): 64-70.
- Liang YC(梁英彩), Lai ZQ(赖志强), Teng SH(腾少花), et al. 1998. Studies on breeding of stylo 907(柱花草的选育研究)[J]. *Pratacultural Science*(草业科学), 15(2): 27-29.
- Liu CJ, Musial JM. 1997. *Stylosanthes* sp. Aff. *S. scabra*: a putative diploid progenitor of *Stylosanthes scabra*(Fabaceae)[J]. *Plant Syst Evol*, 208: 99-105.
- Rohlf HJ. 1994. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system[M]. New York: Applied Biostatistica Inc., 1994.
- Weeks DP, Beerman N, Griffith OM. 1986. A small-scale 5-h procedure for isolating multiple samples of CsCl-purified DNA: applications to isolations from mammalian, insect, higher plant, algal, yeast, and bacterial sources[J]. *Anal Biochem*, 152: 376-385.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak J, et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acid Res*, 18: 6 531-6 535.
- Zou DM(邹冬梅), Jiang CS(蒋昌顺). 2002. The Present Status and Prospect of Tropical Forages Breeding in China(我国热带牧草育种的现状与前景)[J]. *Grassland of China*(中国草地), 24(5): 65-68.

(上接第 274 页 Continue from page 274)

-5 051.

- Srivastava V, Ow DW. 2001. Single-copy primary transformants of maize obtained through the co-introduction of a recombinase-expressing construct[J]. *Plant Mol Biol*, 46: 561-566.
- Sugita K, Kasahara T, Matsunaga E, et al. 2000. A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency[J]. *Plant J*, 22: 461-469.
- Zubko E, Scutt C, Meyer P. 2000. Intrachromosomal re-

- combination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes[J]. *Nat Biotechnol*, 18: 442-445.
- Zuo J, Chua NH. 2000. Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 11: 146-151.
- Zuo J, Niu QW, Moller SG, et al. 2001. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants[J]. *Nat Biotechnol*, 19: 157-161.