

导入反义 W_x 基因改良杂交籼稻保持系直链淀粉含量

高方远¹ 王宗阳² 李浩杰¹ 陆贤军¹ 任光俊^{1,*}

(¹四川省农业科学院作物研究所,四川成都 610066; ²中国科学院上海植物生理生态研究所,上海 200032)

摘要: 水稻胚乳中的直链淀粉含量是影响稻米蒸煮和食味品质的重要性状。本试验研究了适合水稻冈 46B 和 -32B 品种进行遗传转化的外植体、培养基及光温条件,采用遗传转化技术将反义 W_x 基因导入生产上大面积应用的籼稻保持系冈 46B 和 -32B,获得了转基因植株。PCR 检测证明,外源基因已整合进水稻的基因组。分析结果表明,纯合转基因水稻植株成熟种子直链淀粉含量发生了不同程度的变异。

关键词: 反义 W_x 基因;转基因水稻;籼稻;保持系;直链淀粉含量

中图分类号: S511

Antisense W_x Gene Insertion into Maintainer Lines of Indica Hybrid Rice Results in Amylose Content Reducing

GAO Fang-Yuan¹, WANG Zong-Yang², LI Hao-Jie¹, LU Xian-Jun¹, REN Guang-Jun^{1,*}

(¹Crop Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, Sichuan; ²Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: Amylose content of endosperm is a key determinant for edible and cooking quality in rice. And the W_x gene of rice encodes a granule-bound starch synthase (GBSS) that plays a key role in the synthesis of amylose in endosperm. With the help of *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 containing p13W4, the antisense W_x gene was transferred into mature embryos calli from *indica* maintainer lines Gang 46B and -32B. The suitable explants, medium, light and temperature for tissue culture were studied. PCR analysis verified that antisense W_x gene was transferred into the genome of the receptor varieties (Fig. 2). Furthermore, varying degrees of reduction in amylose content were found in mature seeds of transgenic lines. Compared with 26.5% of the original cultivar, in the transgenic lines of -32B, the average and the lowest amylose content were 19.8% and 8.5% respectively (Table 5). Similarly, the amylose content in the transgenic lines of G46B were 1.7% - 10.9% lower than that of control (Table 4). These results indicate that genetic manipulation of amylose content in rice is possible using antisense technique.

Key words: Antisense W_x gene; Transgenic rice; *Indica*; Maintainer line; Amylose content

育种实践证明,籼稻保持系及其不育系胚乳中直链淀粉含量偏高,将严重影响杂交稻米的蒸煮和食味品质。但是,单纯依靠传统育种方法,往往难以实现品质与产量、抗性等重要优良性状的有机结合,这也正是我国杂交籼稻品质改良进展缓慢的原因之一。而现代分子生物学手段的飞速发展,为杂交籼稻品质改良提供了新的技术途径。

已知水稻胚乳中的直链淀粉合成是由第 6 染色体上的蜡质基因(简称 W_x 基因)控制的。中国科学

院上海植物生理研究所洪孟明等成功分离、克隆了水稻的 W_x 基因,并构建了包含反义 W_x 基因的载体^[1]。已有研究证明,采用遗传转化技术将反义 W_x 基因导入水稻品种(包括籼稻和粳稻),可引起直链淀粉含量不同程度的降低,而且这些导入的外源基因以及改良的直链淀粉含量都能稳定遗传^[2~7]。

本研究通过农杆菌介导,将反义 W_x 基因导入籼稻保持系冈 46B 和 -32B 中,引起直链淀粉含量的广泛变异。

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化开发专项(JY03-B-11)和四川省应用基础科研项目。

作者简介: 高方远(1971-),女,硕士,副研究员,研究方向:分子生物学。E-mail: chaojiddo@163.net *通讯作者:任光俊。Tel:028-84794737

Received(收稿日期): 2004-07-05, Accepted(接受日期): 2004-11-19.

1 材料和方法

1.1 试验材料

选用籼稻保持系冈 46B 和 -32B 的成熟胚和幼胚作为遗传转化的受体材料。冈 46B 和 -32B 的相应不育系为我国中籼稻区和部分晚稻区的主要不育系。

1.2 农杆菌菌株及质粒

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株

EHA105 和含有反义 Wx 基因的载体 p13W4 均由中国科学院上海植物生理生态研究所王宗阳教授提供,其 T-DNA 区的结构见图 1。以特异引物 W_4P_1 : 5'-TGCCAAGAACAAGCATAGACC-3' (在反义 Wx 的 *BamH* 片段中) 和 W_4P_2 : 5'-TAACATACGCCGTGACATCG-3' (在 *GUS* 基因编码区中) 可扩增出 626 bp 的片段,被用于转基因 T_0 代及后代的遗传鉴定。

1.3 培养基

用于试验的主要培养基见表 1。

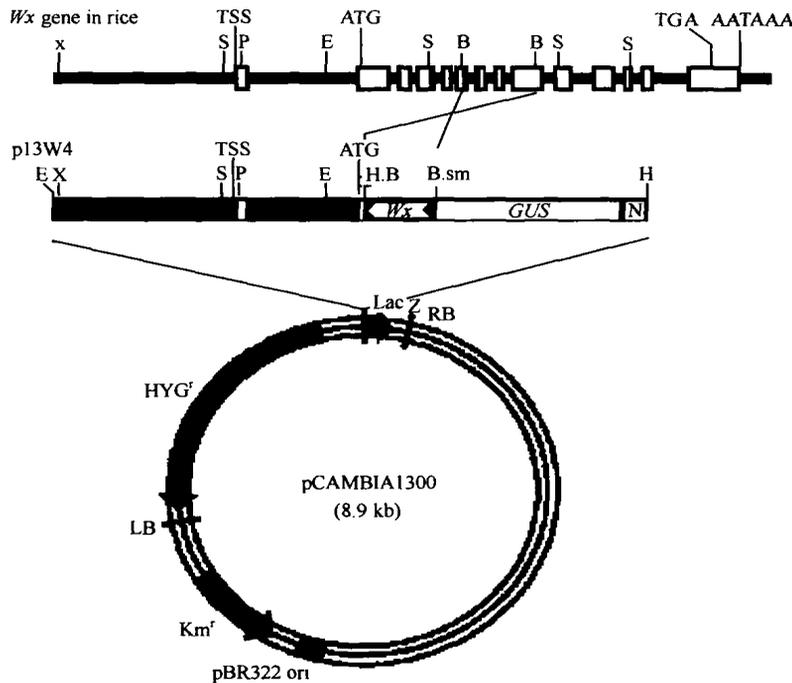


图 1 p13W4 载体的 T-DNA 区结构

Fig. 1 The structure of T-DNA region in the vector of p13W4

B: *BamH* ; E: *EcoR* ; H: *Hind* ; P: *Pst* ; S: *Sal* ; X: *Xba* ; N: *Not* ; TSS: transcription start site; ATG: translation start codon; TGA: transcription termination codon; AATAAA: polyadenylation site.

表 1 愈伤组织培养基

Table 1 Medium used for calli culture in the study

| 培养基 Medium | MS1 | AAM | MS2 | NB1 | NB2 | 1/2MS |
|------------------|-----|---------|---------|------|------|-------|
| 基本成分 Composition | MS | AA + MS | MS | NB | NB | MS |
| CH(g/L) | 500 | 500 | 500 | 1000 | 1000 | |
| 2,4-D(mg/L) | 2.0 | 2.0 | 2.0 | | | |
| KT(mg/L) | | | | 2 | 2 | |
| NAA(mg/L) | | | | 1 | 1 | |
| Hyg(mg/L) | | | 35 - 50 | 50 | 25 | |
| Cef(mg/L) | | | 250 | 250 | 200 | |
| As(μ mol/L) | | 100 | | | | |
| 蔗糖 Sucrose(g/L) | 30 | 68.5 | 30 | 30 | 30 | 15 |
| 葡萄糖 Glucose(g/L) | | 36 | | | | |
| pH | 5.8 | 5.2 | 5.8 | 5.8 | 5.8 | 5.8 |

1.4 水稻成熟胚愈伤组织的诱导

以水稻成熟种子胚、幼胚作为外植体。成熟种子去壳后用乙醇(75%)表面消毒2~3 min,洗净后再用次氯酸钠溶液(2%活性氯)浸泡30 min,无菌水冲净后置诱导培养基上。幼胚取自受精后12~15 d的幼穗,乙醇(75%)消毒后,用0.1%的升汞灭菌15~20 min,无菌水冲净后,剥离幼胚置培养基上诱导愈伤。

1.5 根癌农杆菌介导的水稻转化

将50 mL培养至对数期的农杆菌离心去上清后,再用AAM培养基(其中加100 μmol/L乙酰丁香酮)重悬,并立即浸染愈伤组织,浸泡时间为20~30 min。愈伤组织与农杆菌共培养2~3 d后,转入MS2培养基(含35 mg/L潮霉素和250 mg/L头孢)筛选2周左右。新长出的抗性愈伤组织转移至含50 mg/L潮霉素和250 mg/L头孢的MS2培养基继代2次,每次2周左右。经3次继代后的抗性愈伤组织转入NB1培养基,置暗处预分化1周,再转入NB2培养基光照培养分化幼芽,待幼芽长至2~3 cm时转入1/2 MS生根培养基,随后转入温室。

1.6 转基因水稻植株总DNA的提取及PCR分析

1.6.1 DNA的提取 参照Murray等的方法^[6],略作修改。

1.6.2 PCR分析 反应体积为25 μL,反应体系包括Tris-HCl(pH 8.3) 10 mmol/L、KCl 50 mmol/L、MgCl₂ 2.0 mmol/L、dNTP每种0.2 mmol/L、前后引物各50 ng、Taq酶1.5 U、基因组DNA 100 ng。反应程序为94 变性5 min,以后94 变性45 s,56 退火45 s,72 延伸1 min,循环45次,最后在72 延伸10 min。产物在1.2%琼脂糖凝胶上电泳,GDS Doc 1000成像系统成像,并记录结果。

1.7 转基因水稻植株后代的遗传分析

1.7.1 潮霉素抗性遗传分析 单株收取T₀、T₁代植株的套袋自交种子,消毒后接种于含50 mg/L潮霉素的1/2MS培养基上光照培养2周后,统计种子对潮霉素的抗性情况。

1.7.2 目的基因的PCR扩增及PCR-Southern分析 经潮霉素抗性筛选为阳性的转基因T₁和T₂代小苗,按单株取叶片提取DNA,进行反义W_x基因的PCR扩增,方法同1.6.2。

以质粒p13W4为模板的PCR扩增产物回收、纯化后,用作探针,按Roche公司DIG DNA Labeling and Detection Kit上的方法,对质粒DNA、未转基因植株和部分PCR阳性植株DNA的PCR扩增产物进行PCR-Southern杂交。

1.8 直链淀粉含量测定

参照中国水稻研究所的改进简化法测定样品的直链淀粉含量,2次重复。标准样品(其直链淀粉含量预先经ISO 6647-1987或GB 7648方法准确测定)购自农业部稻米及制品质量监督检验测试中心。

2 结果与分析

2.1 不同外植体和培养基对水稻愈伤组织诱导率和分化率的影响

本研究同时使用成熟胚和幼胚为接种对象,结果显示-32B和冈46B的成熟胚在2种培养基上的平均分化率略低于幼胚,但以培养率(平均出愈率×平均分化率)来衡量,成熟胚的分化效果好于幼胚。加之成熟胚操作简单,取材不受季节限制,在后续实验中,确定以成熟胚作为遗传转化的主要受体材料。

表2 不同培养基对水稻愈伤组织诱导率和分化率的影响
Table 2 Effects of medium on induction and differentiation of calli

| 外植体 Explant | 品种 Cultivar | 基本培养基 Basic medium | 诱导胚总数 Total embryo | 总愈伤数 Total callus | 分化愈伤数 Total differentiated callus | 平均出愈率 Average rate of callus induction (%) | 平均分化率 Average rate of differentiation (%) | 培养率 Average rate of culture (%) |
|-----------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------------------|---|--|------------------------------------|
| 成熟胚 Mature embryo | -32B | MS | 140 | 127 | 25 | 90.4 | 19.7 | 17.8 |
| | | NB | 157 | 132 | 37 | 84.1 | 28.0 | 23.5 |
| | Gang 46B | MS | 303 | 278 | 62 | 91.7 | 22.3 | 20.4 |
| | | NB | 233 | 192 | 50 | 82.4 | 26.0 | 21.4 |
| 幼胚 Immature embryo | -32B | MS | 210 | 150 | 33 | 71.4 | 22.0 | 15.7 |
| | | NB | 193 | 96 | 29 | 49.7 | 30.2 | 15.0 |
| | Gang 46B | MS | 116 | 71 | 20 | 61.2 | 28.2 | 17.3 |
| | | NB | 156 | 78 | 22 | 50.0 | 28.2 | 14.1 |

注:平均出愈率(%)=总愈伤数/诱导胚总数×100;平均分化率(%)=分化愈伤数/总愈伤数×100;培养率(%)=平均出愈率×平均分化率

Notes: Average rate of callus induction (%) = Total callus / Total embryo × 100; Average rate of differentiation (%) = Total differentiated callus / Total callus × 100; Average rate of culture (%) = Average rate of callus induction × Average rate of differentiation.

此外,将同一水稻品种接种在 2 种不同的培养基上,诱导和分化能力表现较大差异。由表 2 可见,两个水稻品种的幼胚和成熟胚在 MS 培养基上的平均出愈率高于在 NB 培养基上。但从平均分化率来看,NB 培养基的分化效果好于 MS 培养基。因此,本研究针对 -32B 和冈 46B 受体品种,选用 MS 作为诱导培养基,NB 作为分化培养基,将有助于水稻高效转化体系的建立。

2.2 不同光温条件对抗性愈伤分化率的影响

将 -32B 和冈 46B 来源的抗性愈伤组织置不同强度的光照和温度下分化培养,平均出苗率有很大差异。表 3 的统计结果显示,-32B 来源的抗性愈伤组织在 3 000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 和 30 条件下分化平均出苗率最高,达 34.4%,在 2 000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 条件下分化

培养,出苗率最低,仅为 24.4%。而来源于冈 46B 的抗性愈伤组织刚好相反,在 2 000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 和 26 条件下出苗率最高,在 3 000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 和 30 条件下平均出苗率最低,仅为 23.3%。由此看出,不同材料的分化条件存在很大的差异。

2.3 农杆菌介导转化及转基因植株的获得

以籼稻保持系冈 46B 和 -32B 的成熟种子和幼胚为受体材料,在 MS 和 NB 培养基上预培养 1 d 后,用农杆菌 EHA105/p13W4 转化。在 -32B 中,共转化 340 个愈伤组织,经筛选获得 103 个抗性愈伤组织,转化率为 30.3%。抗性愈伤组织在 NB1 培养基上预分化 1 周,再转入 NB2 培养基进行植株再生,最终分化绿苗 30 株。在冈 46B 中也获得了相似的转化率(28.2%),最后获得 11 个转基因植株。

表 3 不同光温条件对抗性愈伤分化率的影响

Table 3 Effects of light and temperature on regeneration of resistant calli

| 品种 Cultivar | 光照 Light ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | 温度 Temperature ($^{\circ}\text{C}$) | 抗性愈伤数 No. of resistant callus | 出苗数 No. of plantlets | 平均出苗率 Average rate of regeneration (%) |
|----------------|---|---|-------------------------------------|----------------------------|---|
| -32B | 2 000 | 26 | 45 | 11 | 24.4 |
| | 3 000 | 26 | 40 | 10 | 25.0 |
| | 2 000 | 30 | 37 | 11 | 29.7 |
| | 3 000 | 30 | 32 | 11 | 34.4 |
| 冈 46B | 2 000 | 26 | 50 | 18 | 36.0 |
| | 3 000 | 26 | 41 | 13 | 31.7 |
| | 2 000 | 30 | 30 | 8 | 26.7 |
| | 3 000 | 30 | 43 | 10 | 23.3 |

注:平均出苗率(%) = 出苗数/抗性愈伤数 $\times 100$ 。

Note: Average rate of regeneration (%) = No. of plantlets/ No. of resistant callus $\times 100$.

2.4 转基因 T₀ 代水稻植株的分子检测

提取转基因 T₀ 代植株和对照植株(未经转基因的亲本)的叶片 DNA,以 p13W4 质粒 DNA 作阳性对照,用 W₄P₁ 和 W₄P₂ 引物进行 PCR 扩增。41 个单株中有 37 株出现预期的 626 bp 的扩增片段,与阳性对照完全相同,只有 4 株与阴性对照一样,无扩增片段(图 2)。

PCR-Southern 杂交结果显示,所有 PCR 阳性植株都有杂交信号,与阳性对照相同,而未转基因植株无条带出现(图 3)。

2.5 转基因水稻后代的遗传分析

2.5.1 转基因水稻植株 T₁ 和 T₂ 代潮霉素抗性筛选
未转基因植株和 PCR 检测为阳性的 37 个 T₀ 代植株的部分套袋自交种子经潮霉素抗性筛选,结果显示,所有 T₀ 植株的自交种子都发生了对潮霉素抗性的分离,² 检验表明,抗与不抗大多符合 3:1 的分离比。推测外源基因大多以单拷贝方式插入。T₁

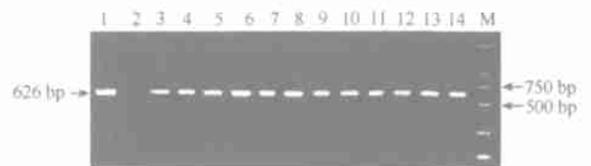


图 2 部分转反义 Wx 基因植株总 DNA 的 PCR 分析

Fig. 2 PCR analysis of total DNA in some transgenic plants

M: DNA 分子量标准;1: 质粒 p13W4;2: 未转化植株;
3~14: 转基因植株。

M: DNA marker; 1: Plasmid p13W4; 2: Non-transgenic plant;
3-14: Transgenic plants.

植株上收获的种子按相同的办法筛选潮霉素抗性,以获得对潮霉素抗性纯合的转基因株系。

2.5.2 转基因水稻植株 T₁ 和 T₂ 代 PCR 分析
经潮霉素筛选获得的抗性小苗分单株提取 DNA 用于 PCR 扩增。绝大部分单株能扩增出 626 bp 的条带,只有个别单株有潮霉素抗性而无扩增条带。两个基因连锁不稳定的原因有待进一步分析。

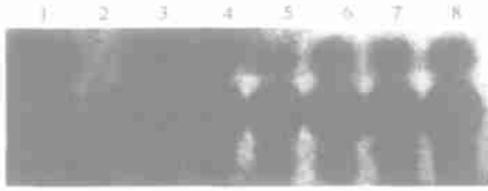


图3 部分转基因植株 PCR-Southern 分析
Fig.3 PCR Southern analysis of *Wx* gene in some transgenic plants
1:质粒 p13W4;2:未转化植株;3~8:转基因植株。
1:Plasmid p13W4;2:Non-transgenic plant;
3-8:transgenic plants.

2.6 转基因稳定株系直链淀粉含量分析

从 T_2 代纯合转基因植株和相应的未转基因植株上收获种子,用改进简化法测定直链淀粉含量。结果显示,与未转化对照相比,纯合转基因植株成熟种子直链淀粉含量均有不同程度的降低。由表5可见,对照为26.5%,最低值8.5%,平均为19.8%。由冈46B来源的纯合转基因植株成熟种子直链淀粉含量与对照相比,也出现了不同程度的降低,降低幅度在1.7%~10.9%之间(表4)。

表4 冈46B来源的纯合转基因水稻植株成熟种子的直链淀粉含量

Table 4 Amylose content in mature seeds of transgenic rice derived from Gang 46B

| 编号 Line | 直链淀粉含量 Amylose content (%) |
|------------|----------------------------------|------------|----------------------------------|------------|----------------------------------|------------|----------------------------------|
| B1-1 | 21.8 | B1-6 | 22.2 | B1-11 | 21.3 | B1-16 | 18.9 |
| B1-2 | 21.5 | B1-7 | 21.2 | B1-12 | 21.5 | B1-17 | 18.8 |
| B1-3 | 21.2 | B1-8 | 24.6 | B1-13 | 21.0 | B1-18 | 20.5 |
| B1-4 | 15.4 | B1-9 | 20.9 | B1-14 | 17.7 | Control | 26.3 |
| B1-5 | 16.3 | B1-10 | 21.2 | B1-15 | 20.1 | | |

表5 -32B来源的纯合转基因水稻植株成熟种子的直链淀粉含量

Table 5 Amylose content in mature seeds of transgenic rice derived from -32B

| 编号 Line | 直链淀粉含量 Amylose content (%) |
|------------|----------------------------------|------------|----------------------------------|------------|----------------------------------|------------|----------------------------------|
| B2-1 | 21.0 | B2-9 | 20.0 | B2-17 | 21.6 | B2-25 | 21.2 |
| B2-2 | 19.9 | B2-10 | 15.2 | B2-18 | 21.7 | B2-26 | 20.7 |
| B2-3 | 19.0 | B2-11 | 20.2 | B2-19 | 20.9 | B2-27 | 19.5 |
| B2-4 | 20.4 | B2-12 | 18.7 | B2-20 | 19.4 | B2-28 | 21.7 |
| B2-5 | 19.3 | B2-13 | 19.5 | B2-21 | 8.5 | B2-29 | 20.6 |
| B2-6 | 19.9 | B2-14 | 22.0 | B2-22 | 21.2 | B2-30 | 20.4 |
| B2-7 | 19.3 | B2-15 | 20.5 | B2-23 | 20.4 | B2-31 | 21.2 |
| B2-8 | 20.0 | B2-16 | 21.1 | B2-24 | 19.3 | Control | 26.5 |

3 讨论

3.1 遗传转化体系的优化

成功的遗传转化有赖于良好的受体系统、转化系统以及最佳的愈伤组织诱导、筛选和分化条件。选择合适的受体材料将直接影响遗传转化的效率^[4,8]。幼胚在以前的研究中被认为是一种较理想的转化受体材料,利用幼胚转化已有许多成功的报道^[2-7]。但本研究结果显示,选择成熟胚作为转化受体,同样可获得较高的出愈率和分化率,而且取材不受季节限制,操作简单、重复性好,极大方便了农杆菌介导的基因转化。

此外,培养基是愈伤组织诱导以及植株再生的营养来源,合理选择培养基同样重要。许多研究表明,以NB作为诱导愈伤组织的基本培养基,MS作为植株分化的基本培养基能获得高的遗传转化效

率^[4,8]。而国际水稻研究所Tu等则在遗传转化实验中,采用MS培养基诱导愈伤组织,NB培养基分化绿苗^[9]。本研究通过比较发现,选择后一种培养基更适合冈46B和-32B的遗传转化。这可能与不同受体材料在愈伤组织诱导或植株再生阶段所需的营养存在差异有关。

同时,植株再生的光温条件,也是影响水稻遗传转化效率的因素之一。这在以前的研究中很少报道。本研究结果显示,-32B适合在高光强(3000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)和高温(30 $^{\circ}\text{C}$)条件下分化,而冈46B则在中等光照强度(2000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)和温度(26 $^{\circ}\text{C}$)下获得最高分化率。推测光温条件选择不当,可能是一些遗传转化实验失败或植株再生频率低的主要原因。因而在对某个材料进行遗传操作以前,应首先了解它的特征、特性,再根据实际情况有针对性地选择合适的光照和温度。

3.2 反义 Wx 基因导入水稻改良稻米品质

反义 RNA 抑制法和转基因的方法是利用基因工程技术改良植物品种的常用策略和方法,目前已在改变花卉颜色、果蔬保鲜、抗病虫害等方面取得重要进展。改良稻米品质方面, Terada 等(2000)、Cheng 等(2002)、Yu 等(2002)、Liu 等(2003)先后将反义 Wx 基因导入水稻品种(包括籼稻和粳稻)中,均引起成熟种子直链淀粉含量的降低^[2-7]。这些结果证明导入反义 Wx 基因可以改变稻米直链淀粉含量。本研究通过农杆菌介导法将反义 Wx 基因转入在生产上推广应用的杂交籼稻的两个保持系冈 46B 和 -32B 中,同样引起直链淀粉含量的广泛变异,进一步验证了前人的结果。此外,从纯合转基因株系中选择直链淀粉含量中等(17%~21%),其他农艺性状接近受体亲本的材料,用基因敲除手段排除潮霉素抗性基因后,再与相应不育系回交,以获得米质改良的新不育系。这一手段为杂交籼稻优质育种目标的实现提供了新思路。

References

- [1] Wu ZL(武志亮), Wang ZY(王宗阳), Zheng FQ(郑霏琴), Guo XL(郭小丽), Hong MM(洪孟民). Molecular cloning of rice waxy gene. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1990, 6(4): 272 - 276(in Chinese with English abstract)
- [2] Terada R, Nakajima M, Isshiki M, Okagaki RJ, Wessler SR, Shramamoto K. Antisense waxy genes with highly active promoters effectively suppress waxy gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41(7): 881 - 888
- [3] Chen XH(陈秀花), Liu QQ(刘巧泉), Wang ZY(王宗阳). 反义 Wx 基因导入我国籼型杂交稻重点亲本. *Chinese Science Bulletin* (科学通报), 2002, 47(9): 684 - 688 (in Chinese)
- [4] Yu HX(于恒秀), Liu QQ(刘巧泉), Chen XH(陈秀花), Lu MF(陆美芳), Wang XW(王兴稳), Wang ZY(王宗阳), Gu MH(顾铭洪). Optimization of *Agrobacterium* mediated transformation of rice and regeneration of transgenic plants with antisense waxy gene. *Chinese J Rice Sci* (中国水稻科学), 2002, 16(4): 304 - 310(in Chinese with English abstract)
- [5] Liu Q, Wang Z, Chen X, Cai X, Tang S, Yu H, Zhang J, Hong M, Gu M. Stable inheritance of the antisense Waxy gene in transgenic rice with reduced amylose level and improved quality. *Transgenic Res*, 2003, 12(1): 71 - 82
- [6] Murray RA, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acid Res*, 1980, 8: 4 321 - 4 325
- [7] Lu MF(陆美芳), Liu QQ(刘巧泉), Chen XH(陈秀花), Yu HX(于恒秀), Wan ZY(王宗阳), Gu MH(顾铭洪). Transformation of the antisense waxy gene into the conversional indica rice varieties. *Journal of Yangzhou University* (Agricultural and Life Sciences Edition) (扬州大学学报 农业与生命科学版), 2003, 24(3): 32 - 36 (in Chinese with English abstract)
- [8] Liu QQ(刘巧泉), Zhang J-L(张景六), Wang ZY(王宗阳), Hong MM(洪孟民), Gu MH(顾铭洪). A highly efficient transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in rice. *Acta Phytophysiol Sinica* (植物生理学报), 1998, 24(3): 259 - 271 (in Chinese with English abstract)
- [9] Tu J, Ona I, Zhang Q, Mew TW, Khush GS, Datta SK. Transgenic rice variety 'IR72' with *Xa21* is resistant to bacterial blight. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 31 - 36