

T-DNA 标签在转基因水稻基因组中的整合特点*

李述田^{1, 2)} 田颖川¹⁾ 何朝族¹⁾**

(¹⁾中国科学院微生物研究所, 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100080; ²⁾中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 利用热不对称交错 PCR (TAIL-PCR), 对 200 个含 T-DNA 插入的转基因水稻株系进行分析, 获得了 159 个 T-DNA 右边界侧翼序列. 其中, 92 个序列含有 T-DNA 右边界和侧邻的水稻基因组序列, 78 个序列与已公布的水稻 BAC/PAC 克隆有 97% ~ 100% 的同源性, 从而可作为 T-DNA 标签定位在水稻的 12 条染色体上. 结合先前定位的 169 个 T-DNA 标签, 对 T-DNA 在水稻基因组中的整合特点进行了分析. 结果发现, 在 T-DNA 右边界和侧邻的水稻基因组序列的连接处, 14.6% 的 T-DNA 标签含有 3 ~ 74bp 的填充序列. 在不含填充序列的连接处, 21.3% 的 T-DNA 标签, 在整合后的 T-DNA 右边界与侧翼的水稻基因组序列之间显示出 3 ~ 5 bp 的微同源性. 填充序列和微同源性的存在, 揭示了 T-DNA 在水稻基因组中的整合既存在双链断裂修补机制, 又存在单链裂缝修补机制. T-DNA 倾向于整合到富含 A/T 核苷酸的基因组区域, 即主要在基因的 5' 和 3' 端调控区以及内含子中.

关键词 水稻 (*Oryza sativa* L.) 基因组, T-DNA 标签, 整合特点

学科分类号 Q7

根癌农杆菌转移 DNA (*Agrobacterium tumefaciens* transfer DNA 或 T-DNA) 在植物基因组中的整合属于非正常重组 (illegitimate recombination)^[1]. 目前, 解释 T-DNA 非正常重组的模型有两种, 即单链裂缝修补和双链断裂修补^[2]. 前者是指整合位点侧翼基因组序列与 T-DNA 的 T 链两末端存在 3 ~ 5 bp 的微同源性, 正是这种微同源性引发了单链 T-DNA 的整合. 后者又叫非同源的末端连接 (nonhomologous end joining, NHEJ), 是指 T-DNA 以双链的形式整合到植物基因组中的双链断裂 (double-stranded break, DSB) 位点, 不依赖 T-DNA 与植物基因组之间序列的同源性, 可以解释复杂的整合方式以及 T-DNA 插入位点填充序列的存在.

T-DNA 是植物基因工程和创造植物插入突变库的有效工具. 然而, T-DNA 在植物基因组中的整合特点、整合机制以及二者之间的关系, 还不十分清楚, 而且研究结果主要是在双子叶植物上取得的. Feldmann 等^[3]发现 T-DNA 更倾向整合在拟南芥等双子叶植物编码蛋白的基因内. Szabados 等^[4]表明 T-DNA 倾向插入到拟南芥基因的 5' 端和 3' 端调控区以及内含子中. Alonso 等^[5]揭示了 T-DNA 倾向整合到拟南芥基因的 5' 端和 3' 端不翻译区 (untranslated regions, UTRs) 以及启动子区中. Wang 等^[6]和 Khurstaleva 等^[7]分别在矮牵牛和洋葱中也得出了与上述相似的结论. Brunaud 等^[8]分析了 9 000 个拟南芥 T-DNA 标签, 发现整合后的

T-DNA 左右边界与侧翼拟南芥基因组序列存在 3 ~ 5 bp 的微同源性, 从而暗示了单链裂缝修补机制在 T-DNA 整合到拟南芥基因组中起主要作用. Tzfira 等^[9]利用识别 18 个核苷酸的核酸内切酶 I - *Sce* I, 在烟草基因组中产生 DSB 位点以诱导 T-DNA 位点特异性的整合, 结果发现, T-DNA 整合到 DSB 位点的频率为 2.58%, 远远高于在该位点 4×10^{-9} 的随机整合频率. Chilton 等^[10]也用类似的方法, 证明 T-DNA 是通过 NHEJ 以双链的形式整合到烟草基因组中的 DSB 位点处. X 射线可诱导植物基因组产生 DSB 位点, 烟草、矮牵牛、豇豆和黑芥的原生质体经 X 射线辐射后, 其转化频率增加 3 ~ 6 倍, 则是外源 DNA 分子整合到 DSB 位点的另一例证^[11]. 连接酶 IV 突变体不能进行双链断裂修补, 虽然拟南芥连接酶 IV 突变体的 T-DNA 转化频率明显降低, 但仍有一定比率的转化植株出现, 暗示了 T-DNA 在拟南芥基因组中的整合还存在其他的机制^[12].

近年来, 国内外已经创建了几个水稻 T-DNA 插入突变体库, 这必将有助于揭示 T-DNA 在水稻甚至单子叶植物基因组中的整合特点、整合机制以

* 国家高技术“863”计划资助项目 (2001AA225012) 和国家重点基础研究发展规划项目 (973) (TG2000016203).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62642536, Fax: 010-62548243

E-mail: hecz@im.ac.cn

收稿日期: 2004-05-13, 接受日期: 2004-06-18

及二者之间的关系. 本文通过对 247 个 T-DNA 标签在水稻基因组中整合特点的分析, 揭示了 T-DNA 倾向插入到富含 A/T 核苷酸的基因调控区和内含子内, 并且暗示了在水稻基因组中存在着两种不同的 T-DNA 整合机制.

1 材料和方法

1.1 材料

水稻 T-DNA 标签系的遗传背景为粳稻品种日本晴 (Nipponbare). 将 T-DNA 标签载体 pCambia1301 (<http://www.cambia.org.au/>) 经电激法导入根癌农杆菌菌株 EHA105, 并按照 Yin 等^[13]的方法获得水稻转化植株.

1.2 TAIL-PCR 扩增 T-DNA 右边界侧翼序列

TAIL-PCR 参考 Liu 等^[14]提供的方法. 位于右边界附近的嵌套式靶特异性引物为: SP1 (5' GGTGACCAGCTCGAATTTCCC 3'), SP2 (5' TGAA-TCCTGTTGCCGGTCTTG 3') 和 SP3 (5' GCCGC-CGGTGTCTATCTATGT 3'). 任意简并引物为: AD4, 5'-TG (A/T) GNAG (A/T) ANCA (G/C) AGA-3'; AD8, 5'-(G/C) TTGNTA (G/C) TNCTNTGC-3'; 和 AD9, 5'-(A/T)CAGNTG (A/T) TNGTNTCTG-3'. 应用 Gel Extraction Kit (ENZA 公司, USA) 从琼脂糖凝胶中回收 TAIL-PCR 三级反应产物并克隆到 pGEM-T Easy Vector (Promega 公司, USA), 用于序列测定.

1.3 序列比较与分析

侧翼序列之间以及侧翼序列与标签载体序列之间的比较使用 Dnastar 软件中的 MegAlign. 将 T-DNA 侧翼的水稻基因组序列在数据库 Gramene (<http://www.gramene.org/gramene/searches/blast>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), Sygenta (<http://www.tmri.org/index.html>) 和 TIGR (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osal/BACmapping/description.shtml>) 中进行 BLASTN 核酸序列同源性搜索, 以找到相应的水稻 BAC/PAC 克隆. 利用日本水稻基因组计划 (RGP) 水稻基因组自动注释系统 (RiceGAAS, <http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/>) 确定 T-DNA 的插入位置是位于编码序列内还是非编码序列内. 采用 247 个以 T-DNA 插入位点为中心且长度为 500 bp 的水稻基因组序列, 以及随机选取同等数目和长度的水稻基因组序列, 以计算并比较 A/T 核苷酸的平均含量.

2 结果

2.1 T-DNA 右边界侧翼序列的扩增与分析

通过根癌农杆菌介导的方法转化水稻胚性愈伤, 共获得约 7 000 个水稻 T-DNA 标签系. 利用 TAIL-PCR 技术, 从 200 个标签系中获得 159 个 T-DNA 右边界侧翼序列. 其中, 显示长 T-DNA 插入^[14,15]和复杂整合方式^[13]的序列分别为 45 和 22 个, 剩余的 92 个序列表现为典型的 T-DNA 整合方式, 即含有 T-DNA 右边界和侧邻的水稻基因组序列. 将典型 T-DNA 整合方式的侧翼水稻序列进行 BLASTN 核酸序列同源性搜索, 结果表明, 78 个序列与已公布的水稻 BAC/PAC 克隆有 97% ~ 100% 的同源性, 从而可作为 T-DNA 标签定位于水稻的染色体上 (表 1).

在 Sha 等^[15]获得的 361 个 T-DNA 右边界侧翼序列中, 显示长 T-DNA 插入、复杂整合方式以及典型的 T-DNA 整合方式的序列分别为 92、55 和 214 个, 并且已将显示典型的 T-DNA 整合方式的 169 个序列作为 T-DNA 标签定位到水稻的 12 条染色体上. 在上述已定位的 247 个 T-DNA 标签中, 在 T-DNA 右边界和侧邻的水稻基因组序列的连接处, 14.6% (36 个) 含有由 3 ~ 74 bp 组成的填充序列, 显示 T-DNA 在水稻基因组中的整合, 与整合到双子叶植物中一样也存在双链断裂修补机制.

为了调查 T-DNA 在水稻基因组中的整合是否存在单链裂缝修补机制, 进一步分析了不含填充序列的 T-DNA 标签的连接处, 以寻找 T-DNA 右边界和侧翼水稻基因组序列的微同源性. 在其他 211 个 T-DNA 右边界和侧邻的水稻基因组序列的连接处, 约 21.3% (45 个) 显示出 3 ~ 5 bp 的微同源性, 表示 T-DNA 在水稻基因组中的整合同样存在单链裂缝修补机制. 图 1 出示了在水稻基因组中几个整合位置不同的 T-DNA 右边界与侧翼水稻基因组序列的微同源性.

2.2 T-DNA 标签在水稻基因组不同区域的分布

为了确定 T-DNA 标签密度, 将 247 个 T-DNA 标签在水稻 12 条染色体上的分布情况概括在表 1 中. 可以看出, 第 1 ~ 3 号和第 10 号染色体的标签密度较高, 占标签总数的 54.3%. 然而, 第 11 号染色体的标签密度较低.

Table 1 Distribution of 247 T-DNA tags on 12 rice chromosomes

Chromosome No.	Predicted chromosome size/Mb ¹⁾	No. of T-DNA inserts ²⁾	Average inserts density (T-DNA inserts per Mb) ³⁾	Ratio /% ⁴⁾
1	45.2	47 (12)	1.04	19.0
2	38.7	32 (9)	0.83	13.0
3	39.3	33 (13)	0.84	13.4
4	36.0	14 (5)	0.39	5.7
5	31.8	15 (4)	0.47	6.1
6	34.3	21 (6)	0.61	8.5
7	31.2	19 (5)	0.61	7.7
8	30.7	19 (5)	0.62	7.7
9	24.6	9 (7)	0.37	3.6
10	23.8	22 (6)	0.92	8.9
11	32.2	7 (4)	0.22	2.8
12	30.5	9 (2)	0.30	3.6
Total	398.3	247 (78)	0.62	100

¹⁾ Predicted chromosome size (Mb) (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/statusdb/irgsp-status.cgi>). ²⁾ Numbers in parentheses indicates the newly located T-DNA tags. ³⁾ Number of T-DNA inserts/total length of predicted chromosome. ⁴⁾ T-DNA inserts/total inserts.



Fig. 1 Microhomology between flanking rice sequences and nicked T-DNA right borders

Capital and italic letters indicate the right border sequence. The letters in lower case indicate T-DNA sequences immediately next to the right border. Underlined letters in lower case indicate the flanking rice sequences. Homologous base pairs are highlighted in gray boxes. A, B, C and D indicate 3 to 5 bp of microhomology, respectively.

利用 RGP RiceGAAS 将 247 个 T-DNA 标签在水稻基因组不同区域的分布进行了分析 (表 2). 对于编码序列和非编码序列, T-DNA 整合的频率分别为 58.7% (145 个) 和 41.3% (102 个), 与二者所占基因组大小 (分别为 57.8% 和 42.2%) 的比率相一致. 在编码区内, T-DNA 插入到内含子中的几率为 81.4%, 明显高于整合到外显子 (18.6%) 的频率. 在分布于非编码序列的 102 个标签中, 位于起始密码子上游 500 bp 和终止密码子下游 500 bp 范围内的分别为 13.8% (34 个) 和 11.7% (29 个). 在起始密码子上游和终止密码子下游各 500bp 的范围内, T-DNA 标签的密度分别为 1.35 ~ 2.13 个/Mb 和 1.15 ~ 1.82 个/Mb, 明显高于平均的 T-DNA 插入密度 (0.59 个/Mb).

水稻 1 号染色体含有较多的 T-DNA 标签, 而

且其编码序列和非编码序列的大小已公布, 因而可以进一步分析 T-DNA 标签在该染色体不同区域的分布 (表 3). 对于 1 号染色体的编码序列和非编码序列, T-DNA 整合的频率分别为 51.1% (24 个) 和 48.9% (23 个), 与二者所占基因组大小 (分别为 53.1% 和 46.9%) 的比率相一致. 而且, T-DNA 标签在内含子的密度约是外显子的 2 倍. 在 5' 和 3' 端基因调控区各 500 bp 的范围内, T-DNA 标签的密度 (分别为 2.94 个/Mb 和 1.76 个/Mb) 分别约是平均 T-DNA 插入密度 (1.09 个/Mb) 的 2.7 倍和 1.6 倍.

以上结果表明, T-DNA 在水稻基因组中的整合并非随机的, 而是具有选择性, 即倾向整合到基因的 5' 和 3' 端调控区以及内含子中.

Table 2 Distribution of 247 T-DNA tags in the rice genome

Distribution of T-DNA tags	No. of T-DNA inserts	Frequency of T-DNA tags in different regions/%	Ratio of different regions in the rice genome/% ¹⁾	Density of T-DNA tags (tags per Mb)
Coding sequences (exons & introns) ²⁾	145	58.7	57.8	0.60
Exon	27 (18.6%)	10.9		
Intron	118 (81.4%)	47.8		
Non-coding sequences	102	41.3	42.2	0.58
Intergenic region	39	15.8	36.2~38.4	0.24~0.26
5'Upstream-500 bp ³⁾	34	13.8	3.8~6.0	1.35~2.13
3'Downstream + 500 bp ³⁾	29	11.7	3.8~6.0	1.15~1.82
Total	247	100.0	100.0	0.59

¹⁾ Ratio of different regions in the rice genome is based on the assumption that rice has a genome size of 420 Mb and 32 000 ~ 50 000 genes and non-coding sequences account for 42.2%^[16,17]. ²⁾ Coding sequences indicate the genomic sequences between the start and stop codons of the predicted gene. ³⁾ Upstream and downstream regions of the start and stop codons refer to the sequences at a window size of 500 bp.

Table 3 Distribution of 47 T-DNA tags on rice chromosome 1

Distribution of T-DNA Tags	No. of T-DNA inserts	Frequency of T-DNA tags in different regions/%	Size of different regions/Mp ¹⁾	Ratio of different regions/% ¹⁾	Density of T-DNA tags (tags per Mb)
Coding sequences (exons & introns)	24	51.1	23.0	53.1	1.04
Exon	5	10.6	7.4	17.1	0.68
Intron	19	40.4	15.5	35.8	1.23
Non-coding sequences	23	48.9	20.3	46.9	1.13
Intergenic region	7	14.9	13.5	31.3	0.52
5'Upstream-500 bp	10	21.3	3.4	7.8	2.94
3'Downstream + 500 bp	6	12.8	3.4	7.8	1.76
Total	47	100.0	43.3	100.0	1.09

¹⁾ Size and ratio of different regions on chromosome 1 are calculated based on the reported data^[17].

2.3 T-DNA 插入位点附近 A/T 核苷酸含量的分析

对于每个 T-DNA 标签，以其 T-DNA 插入位点为中心，取 500 bp 的水稻基因组序列，统计整合位点附近的 A/T 核苷酸平均含量。同时，随机选取 247 个长为 500 bp 的水稻基因组序列，以计算其 A/T 核苷酸平均含量。如图 2 所示，对于随机抽取的水稻基因组序列，其 A/T 核苷酸平均含量为 55.7%，与全基因组 (56.0%)^[17]、1 号染色体 (56.2%)^[18] 以及 4 号染色体 (55.8%)^[19] 的 A/T 核苷酸含量相符。然而，插入位点侧翼基因组序列的 A/T 核苷酸平均含量为 61.2% (图 2)，而且高达 85.0% 的侧翼序列其 A/T 核苷酸含量处在 56.3% ~ 66.7% 之间 (数据未出示)。可见，T-DNA 倾向整合到富含 A/T 核苷酸的水稻基因组区域。

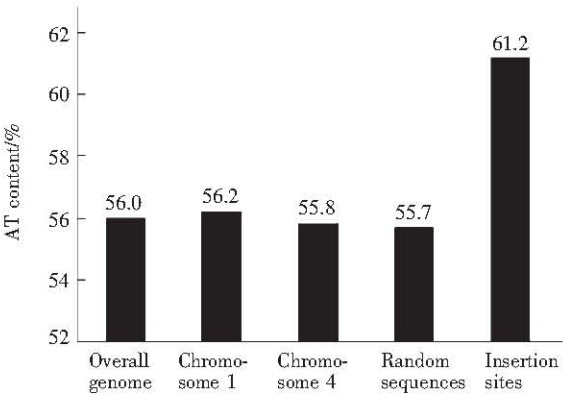


Fig. 2 Comparison of A/T content among overall genome, chromosome 1, chromosome 4 247 randomly selected genomic sequences of 500 bp segments, and the same number of genomic sequences of T-DNA insertion sites of 500 bp flanking segments.

3 讨 论

在水稻转化系中, Jeon 等^[20]检测到填充序列以及复杂的整合方式, 揭示了 T-DNA 在水稻基因组中的整合存在着双链断裂修补机制. 本研究表明, T-DNA 可能是以两种不同的机制整合到单子叶植物水稻中去的. 以单链裂缝修补机制进行整合的频率约为 8.7%, 而以双链断裂修补机制进行整合的频率至少为 21.7% (显示填充序列与复杂整合方式的频率之和). 由于发生双链断裂修补后的整合位点, 有时并不显示填充序列和复杂的整合方式, 因而在不含填充序列的连接处, T-DNA 右边界与侧翼水稻序列未显示微同源性的整合频率 (31.9%) 也应归于双链断裂修补机制. 可见, 如同转化双子叶植物, T-DNA 转化单子叶植物也可能采取两种不同的机制.

前人的研究指出, T-DNA 优先整合到水稻基因组潜在或真正的转录活跃区, 因为该区域的染色体呈相对开放状态, 有利于 T-DNA 的高频率整合^[15,21]. 本研究进一步发现, T-DNA 插入位点的 A/T 核苷酸含量较高, 并且约 73.3% 的 T-DNA 标签位于富含 A/T 核苷酸的基因调控区和内含子内, 这与 Chen 等^[22]的研究结果相似. 由于富含 A/T 核苷酸的基因组区域, 双螺旋稳定性低, 双链易于解开或形成 DSB 位点, 从而 T-DNA 以单链裂缝修补或双链断裂修补机制优先整合到这些区域.

参 考 文 献

- Gheysen G, Villarroel R, van Montagu M. Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes Dev*, 1991, **5** (2): 287 ~ 297
- Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Nawrath C, et al. T-DNA integration: a model of illegitimate recombination in plants. *EMBO J*, 1991, **10** (3): 697 ~ 704
- Feldmann K A. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*-mutational spectrum. *Plant J*, 1991, **1**: 71 ~ 82
- Szabados L, Kovacs I, Oberschall A, et al. Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the *Arabidopsis* genome. *Plant J*, 2002, **32** (2): 233 ~ 242
- Alonso J M, Stepanova A N, Leisse T J, et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 2003, **301** (5633): 653 ~ 657
- Wang J, Lewis M E, Whallon J H, et al. Chromosomal mapping of T-DNA inserts in transgenic petunia by *in situ* hybridization. *Transgenic Res*, 1995, **4** (1): 241 ~ 246
- Khrustaleva L I, Kik C. Localization of single-copy T-DNA insertion in transgenic shallots (*Allium cepa*) by using ultra-sensitive FISH with tyramide signal amplification. *Plant J*, 2001, **25** (6): 699 ~ 707
- Brunaud V, Balzergue S, Dubreucq B, et al. T-DNA integration into the *Arabidopsis* genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO Rep*, 2002, **3** (12): 1152 ~ 1157
- Tzfira T, Frankman L R, Vaidya M, et al. Site-specific integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA via double stranded intermediates. *Plant Physiol*, 2003, **133** (3): 1011 ~ 1023
- Chilton M D, Que Q. Targeted integration of T-DNA into the tobacco genome at double-stranded breaks: new insights on the mechanism of T-DNA integration. *Plant Physiol*, 2003, **133** (3): 956 ~ 965
- Kohler F, Cardon G, Pohlman M, et al. Enhancement of transformation rates in higher plants by low-dose irradiation: Are DNA repair systems involved in the incorporation of exogenous DNA into the plant genome? *Plant Mol Biol*, 1989, **12** (2): 189 ~ 199
- Friesner J, Britt A B. Ku80- and ligase IV-deficient plants are sensitive to ionizing radiation and defective in T-DNA integration. *Plant J*, 2003, **34** (4): 427 ~ 440
- Yin Z, Wang G L. Evidence of multiple complex patterns of T-DNA integration into the rice genome. *Theor Appl Genet*, 2000, **100** (3 ~ 4): 461 ~ 470
- 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 J*, 1995, **8** (4): 457 ~ 463
- Sha Y B, Li S T, Pei Z Y, et al. Generation and flanking sequence analysis of a rice T-DNA tagged population. *Theor Appl Genet*, 2004, **108** (2): 306 ~ 314
- Yu J, Hu S, Wang J, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, 2002, **296** (5565): 79 ~ 91
- Goff S A, Ricke D, Lan T H, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*, 2002, **296** (5565): 92 ~ 100
- Sasaki T, Matsumoto T, Yamamoto K, et al. The genome sequence and structure of rice chromosome 1. *Nature*, 2002, **420** (6913): 312 ~ 316
- Feng Q, Zhang Y, Hao P, et al. Sequence and analysis of rice chromosome 4. *Nature*, 2002, **420** (6913): 316 ~ 320
- Jeon J S, Lee S, Jung K H, et al. T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant J*, 2000, **22** (6): 561 ~ 570
- Barakat A, Gallois P, Raynal M, et al. The distribution of T-DNA in the genomes of transgenic *Arabidopsis* and rice. *FEBS Lett*, 2000, **471** (4): 161 ~ 164
- Chen S, Jin W, Wang M, et al. Distribution and characterization of over 1000 T-DNA tags in rice genome. *Plant J*, 2003, **36** (1): 105 ~ 113

Integration Patterns of T-DNA in Rice Genome*

LI Shu-Tian^{1,2)}, TIAN Ying-Chuan¹⁾, HE Chao-Zu¹⁾**

(¹⁾ National Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

²⁾ Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract A T-DNA tagged rice population was generated for functional genomic analysis. Using thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR), 159 sequences flanking the right border of T-DNA were obtained. Among them, 92 sequences contained the right border of T-DNA and flanking rice sequences, and 78 flanking rice sequences were mapped as T-DNA tags on 12 rice chromosomes. Integration patterns of T-DNA tags in rice genome were further analyzed using the 78 T-DNA tags and 169 ones reported previously. At junctions of the right border and flanking rice sequences, 14.6% of T-DNA tags (36) showed 3 ~ 74 bp of filler sequences. For the T-DNA tags without filler sequences, 21.3% (45) displayed 3 ~ 5 bp of microhomology between the nicked T-DNA right border and flanking rice sequences. Filler sequences and microhomology revealed that both double-stranded break and single-stranded gap repair mechanisms played a critical role in the integration of T-DNA into the rice genome. T-DNA integration preferentially occurred in the A/T-rich regions, mainly in the 5'- and 3'-regulatory regions outside the coding regions and in introns of genes.

Key words rice (*Oryza sativa* L.) genome, T-DNA tag, integration pattern

* This work was supported by grants from The State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA225012) and The Special Funds for Major State Basic Research of China (TG2000016203).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62642536, Fax: 86-10-62548243, E-mail: hecz@im.ac.cn

Received: May 13, 2004 Accepted: June 18, 2004