

葉綠體基因組內含 *psbA* 點突變基因的轉殖菸草幼苗對三氮井系殺草劑具有耐受力

林志輝^{1, 2, 3} 曾經洲² 陳良築^{3*}

¹ 台北市 中央研究院化學研究所

² 台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所生物藥劑組

³ 台中市 中興大學分子生物學研究所

(接受日期：2005 年 5 月 17 日)

林志輝、曾經洲、陳良築* 2005 葉綠體基因組內含 *psbA* 點突變基因的轉殖菸草幼苗對三氮井系殺草劑具有耐受力 植保會刊 47 : 187 – 194

作物的種植，多有雜草伴隨叢生，造成作物栽培與管理上的困擾。目前雜草防治仍以施用殺草劑為主，但是使用不慎即會對作物產生藥害，若長期使用，將容易使雜草出現抗藥性，例如：三氮井系（triazine）殺草劑中，廣泛使用的草脫淨（atrazine）與草殺淨（ametryne）等，在長期的施用下，已發現抗藥性雜草的產生⁽⁹⁾。

三氮井系列的殺草劑作用是藉由阻礙電子傳遞鏈的進行，產生光合作用的抑制效果，達到殺草的目的。經證實其主要作用的位置在於光反應系統 II 中的一個大小約 32 kDa 的 D1 膜蛋白（或稱 Qb），D1 可與傳遞電子的 plastoquinone 結合，而接續電子傳遞的工作。三氮井系殺草劑分子與 D1 膜蛋白結合性較強，使 D1 膜蛋白失去傳遞電子的能力，造成光合作用受阻。D1 膜蛋白經證實係為葉綠體 *psbA* 基因的產物⁽¹⁾。

在具有抗藥性的莧科雜草 *Ameranthus hybridus* L. 葉綠體基因組中，發現其 *psbA* 基因密碼序列中的第 264 個胺基酸密碼子與敏感性的植株有差異，敏感性的雜草是絲胺酸（serine），而抗性雜草則多為甘胺酸（glycine），經過定序發現是單一核苷酸改變，使 AGT 變為 GGT⁽⁷⁾。此第 264 個胺基酸正位於 D1 膜蛋白立體結構上的一個凹處，推測是此凹處的絲胺酸變成甘胺酸時，因氫鍵減少，而降低三氮井系的殺草劑與 D1 膜蛋白的結合，使 plastoquinone 再度有機會將電子傳給 D1 膜蛋白，維持電子傳遞鏈的功能^(8, 17, 18)。抗性雜草陸續被發現，檢視其 *psbA*

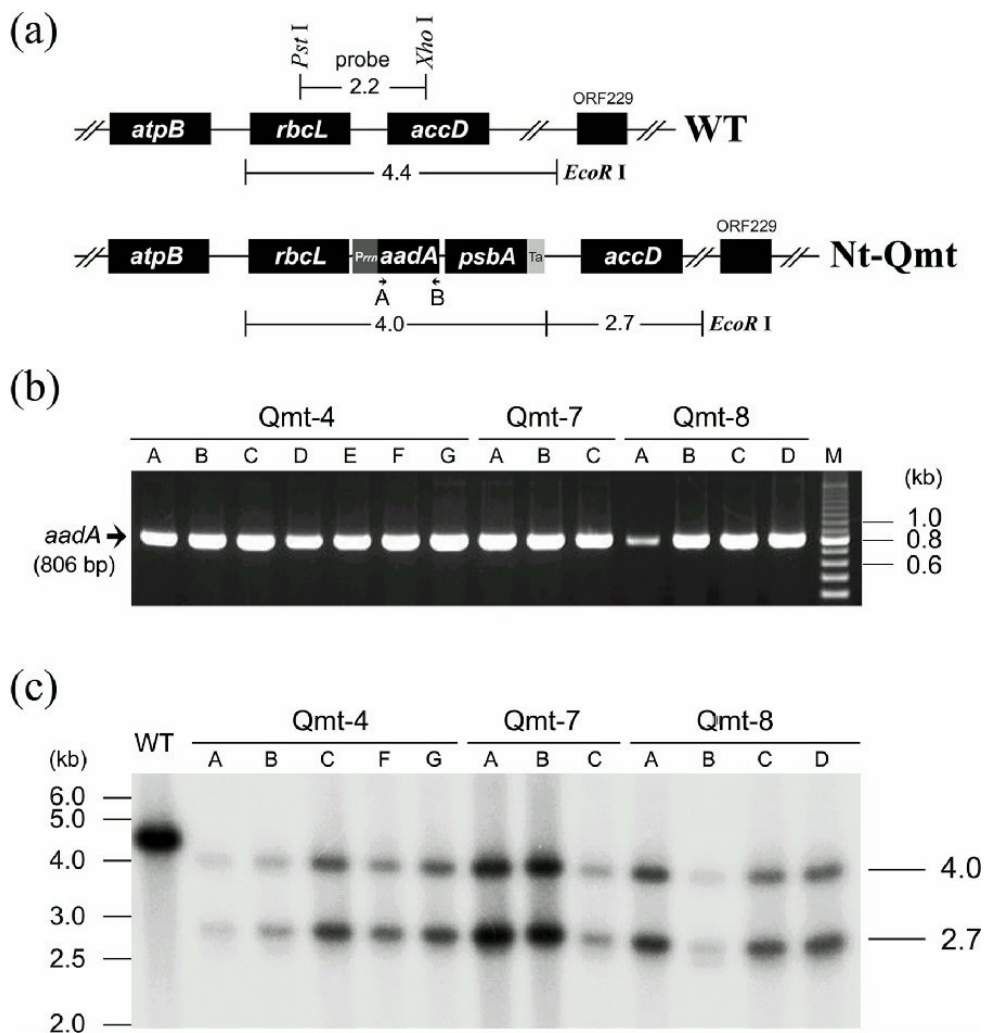
* 通訊作者。E-mail: ljchen@nchu.edu.tw

基因序列變異情形，發現其 D1 膜蛋白的第 264 個胺基酸多有變異⁽¹¹⁾。因此，推測此突變可能是造成植物抗三氮井系殺草劑的主因，但是一直缺乏「將突變的 *psbA* 基因殖入葉綠體中可直接造成植物產生抗性」的佐證。

葉綠體基因轉殖已發展十年有餘，試管內的操作在數種常見作物中已有多起成功範例^(12, 13, 16)。重組葉綠體或其他生物的基因，經過基因轉殖技術送入葉綠體，再藉由同源重組而嵌入葉綠體基因組，可使其與原生基因一同不斷地被複製與表現⁽¹⁴⁾。因此，藉由葉綠體轉殖來研究基因功能已屬可行。本研究係以菸草葉綠體基因轉殖成功的經驗為基礎⁽¹⁰⁾，利用引子 (primer) *psbA33A*: 5'-GATGGTACCATGGCTGCAATTTAGAGAGACGC-3' (ATG: 轉譯起始密碼) 與 *psbA33B*: 5'-CGCGGATCCTTATCCATTWRTAGATGGARCTTC-3' (TTA: 轉譯終止密碼反股, W=A/T, R=G/A) 進行聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR), 經由 *Nco* I、*Bam*H I, 將菸草葉綠體 *psbA* 基因選殖裝載於大腸桿菌載體 pTrc99A 上 (4,176 bp, GenBank accession number: M22744)。再經過重組聚合酶連鎖反應 (recombinant PCR), 使用互補引子 30UR: 5'-CTTCCAATATGCTGGTTTCAACAACCTCTCG-3' (GGT: 甘胺酸密碼)、30UF: 5'-CGAGAGTTGTTGAAACCAGCATATTGGAAG-3' (ACC: 甘胺酸密碼反股) 與 *psbA33A*、*psbA33B* 搭配，將 *psbA* 基因上的第 264 組密碼 AGT 修改為 GGT，經過定序確認單點變異 (A → G) 後，將此人工突變基因 *psbA* 裝載入經過修飾的 pN-IC110B 葉綠體轉殖質體，成為 pN-IC110B-Qmt 質體。

pN-IC110B (GenBank: DQ087234) 是 pN-IC101 質體 (全長 9,731 bp, GenBank: AY442171) 的衍生產物⁽¹⁰⁾，其係利用引子的設計與數次 PCR 技術，順利摘除抗生素篩選基因 *aadA* 3 端轉譯終止密碼 TAA 之後，直到下游基因 *cryIC* 的 5'-UTR (untranslated region) 之前的 *Sal* I 切位，保留 *Sal* I-*Nco* I 之間的 55 bp，總共減除 655 bp 的調控區域 (請參考 AY442171, 刪除 pN-IC101 之 2,669-3,323 區間)，改造的結果，殘餘 CGCGTACTA 等 9 個鹼基對。此被刪除之調控區域包含一個原屬於 *psbA* 基因的 3'-UTR，用來調節 *aadA* 基因的表現，以及一個協助表現 *cryIC* 基因的菠菜 *rbcL* 基因啟動子 (PLs)。減除後，使 *aadA* 與 *cryIC* 基因形成一個操作子 (operon)，統由 *Prrn* 啟動子 (16S rDNA 啟動子) 逕行轉錄，可產生一個包含兩個基因的 mRNA 產物。這樣的構築修飾後，再以人工突變的 *psbA* 基因置換 *cryIC* 基因，即構成 pN-IC110B-Qmt 質體 藉由 PDS-1000He 基因槍系統 (Bio-Rad, Hercules, CA)，將質體送入菸草葉綠體中，經過組織培養與抗生素的篩選，得到三個轉殖系 Nt-Qmt-4、-7 及-8。由於葉綠體內同源重組機制自然發生，使 *aadA* 與突變的 *psbA* 基因一齊被插入葉綠體 *rbcL* 與 *accD* 基因之間，改變了原基因組序列的限制酶圖譜 (圖一 a)。

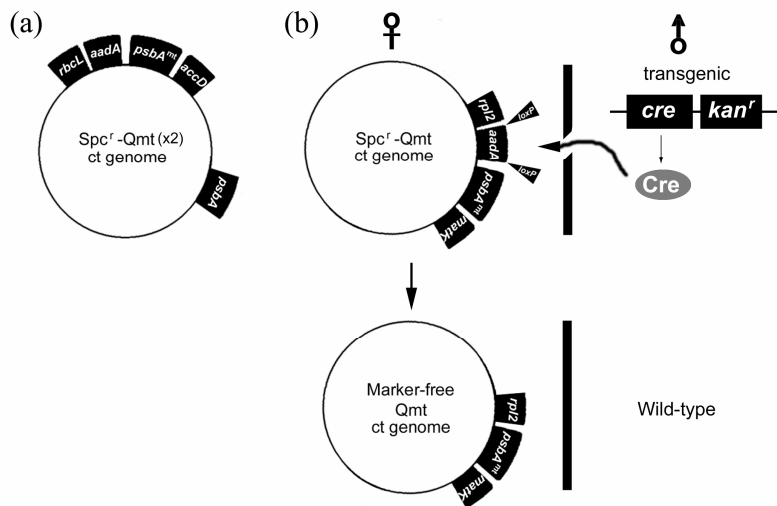
在選拔轉植株的組織培養過程中，原欲直接以三氮井系殺草劑取代抗生素篩選再生轉植株，惟經觀察，添加懸浮過濾後的殺草劑分子，易使癒傷組織 (calli) 發生類似玻璃質化 (vitrification) 的現象，不利芽體增生與再生，不能使抗性植株獲得優勢生長，故仍使用抗生素進行轉殖植株的選拔，並得到前述三個轉殖系 Nt-Qmt-4、-7 及-8。為了檢驗轉殖基因是否存在轉殖植株中，利用萃取葉片的核酸，以原設計用來選殖 *aadA* 基因用之引子 A (*aadA* N-35): 5'-CTCCCATGGCAG



圖一、葉綠體轉殖植物之確認。(a)含抗殺草劑 *psbA* 基因與野生型菸草之轉殖目標區基因分布及 *EcoRI* 限制酶圖譜之比較。*PstI-XhoI* 區域是南方墨漬法使用之探針區域，A、B 表示聚合酶連鎖反應之鑑別引子。(b)利用聚合酶連鎖反應鑑定菸草內含轉殖基因。M：100 bp ladder (Amersham Biosciences)。(c)以南方墨漬法確認葉綠體的轉殖。以 Bio-1KB DNA ladder (Protech)標示分子大小。

Fig. 1. Identification of the transplastomic tobaccos transformed with a mutated *psbA* gene in the chloroplast genome. (a) The target site in chloroplast genome before and after gene insertion is shown with its flanking region. The *EcoRI* restriction maps of the wild type (WT) and the mutated-*psbA* inserted genomes (Nt-Qmt) are indicated. The *PstI-XhoI* segment is used as the probe in Southern blotting assay. The A and B represent the primers used in PCR. (b) Identification of transgenic *aadA* gene by PCR. M: 100 bp ladder (Amersham Biosciences). (c) Identification of the transgenic gene location by Southern blotting. The molecular sizes were identified according to the Bio-1KB DNA ladder (Protech).

AAGCGGTGATCGCCGAAGTATCG-3' (ATG : 轉譯起始密碼) 與 B(*aadA* C-39): 5'-CTCGGATCCTTATTGTCGACTACCTTGGTGATCTCGCC-3' (TTA : 轉譯終止密碼反股) 進行 PCR 鑑定, 觀察再生的抗性植株是否含插入的 *aadA* 基因, 由圖一(b)顯示, 三個轉殖系 Qmt-4 (A~G, 7 株) -7 (A~C, 3 株) 及-8 (A~D, 4 株) 的核酸內均含長度為 806 bp 的 PCR 片段。進一步以南方墨漬法檢視插入片段是否如預期般, 位於葉綠體基因組的 *rbcL* 與 *accD* 基因之間。以 *EcoRI* 限制酶圖譜觀察轉殖株 (Nt-Qmt) 與未轉殖株 (WT) 的差異, 在 WT 的核酸中, *EcoRI* 將切出一個 4.4 kb 片段, 可由 *PstI-XhoI* 放射性探針 (見圖一 a) 測得, 在 Nt-Qmt 的核酸中, 插入的突變基因 *psbA* 下游所攜帶的 *E. coli* 轉錄終止子 Ta 片段, 會帶入一個 *EcoRI* 切位, 使得限制酶圖譜產生 4.0、2.7 kb 的變化。由圖一(c)的訊號顯示, 選拔出的三個轉殖系, 皆符合此次葉綠體轉殖的預期結果, 即 *aadA* 與 *psbA* 突變基因皆已插入 *rbcL* 與 *accD* 基因之間。由於葉綠體本來即含有一套 *psbA* 原型基因, 異位的基因轉殖, 使得轉殖系的葉綠體基因組 ($\text{Sp}c^r$ -Qmt (x2) ct genome) 呈現兩套 *psbA* 基因, 如圖二(a)所示: 一為原型的 *psbA*, 一為受 *Prrn* 啟動子控制的單點定位突變 *psbA* 基因 ($psbA^{mt}$)。



圖二、無抗生素篩選基因之抗殺草劑轉殖作物之育種策略。(a)表示經轉殖後, 葉綠體含有兩套 *psbA* 基因。轉殖突變的 $psbA^{mt}$ 插入 *rbcL* 與 *accD* 基因之間, *aadA* 基因產物對 spectinomycin 具有抗性 ($\text{Sp}c^r$); (b)說明利用 Cre-loxP 系統可去除抗生素篩選基因, 經過未轉殖花粉之授粉, 結果可產生細胞核與葉綠體均無抗生素篩選基因之抗殺草劑轉殖植物。

Fig. 2. Schematic diagram indicating the breeding strategy for marker-free and herbicide-resistant transgenic crops. (a) Two copies of *psbA* genes in chloroplast genome resulted from plastid transformation in this study are shown. The mutated *psbA* gene ($psbA^{mt}$) was inserted into the region between *rbcL* and *accD* genes. The co-transformed *aadA* gene confers spectinomycin resistant phenotype in this transplastomic tobacco. (b) The illustration shows that the bipartite Cre-loxP system can help to knock out the antibiotic-selective marker in chloroplast followed by crossing with the wild-type pollens, resulting in a herbicide-resistant transgenic plant free from both markers in nuclear and plastid genomes.

三個品系的轉殖植株成熟後，各選擇兩株分別進行噴灑葉面與施用土壤的抗殺草劑測試。取用草殺淨 80% 可濕性粉劑（台灣氰胺公司），稀釋 120 倍後，取約 100~150 ml 均勻噴灑於成熟葉面上或澆灌於栽培植株的盆鉢土壤上（直徑約 30 cm，高約 20 cm）。吾人發現施用於成熟葉面上的草殺淨對轉殖品系或未轉殖菸草葉面無明顯藥害，說明草殺淨的殺草功效應如藥劑包裝上的施用說明所陳，係針對萌發期的幼苗。然而接受土壤施用殺草劑的轉殖與未轉殖菸草皆於數天後相繼萎凋，疑似突變 *psbA* 基因的葉綠體性狀無法在成熟的植株上產生顯著的抗性，不若 EPSPS(5-enol pyruvyl shikimate-3-phosphate synthase) 基因轉入葉綠體，使成熟的轉殖植株產生抵抗殺草劑嘉磷塞 (glyphosate) 阻礙代謝的能力⁽⁵⁾。為了測試轉殖植株的幼苗是否呈現抗殺草劑的能力，吾人進一步收穫轉殖植株的種子，以草殺淨或草脫淨可濕性粉劑溶於無菌水 (10 mg/ml) 中，經震盪與過濾，配置出三氮井系殺草劑溶液，將種子浸潤 (imbibition) 於該溶液隔夜，以無菌水濾洗種子數次，再播撒於種盤中，以測試 *psbA* 的突變對萌發後的幼苗存活有何影響⁽²⁾，初步發現未轉殖與轉殖菸草種子的萌發，雖不因殺草劑浸種的處理而有差異，然而後續葉部生長的階段卻受到殺草劑浸種前處理的影響，其中轉殖子代的相對存活率較高 (68%)。選擇草殺淨或草脫淨並不影響浸種試驗的結果。表一所示，是以轉殖品系 Nt-Qmt-4G 的初步測試結果為代表。每項處理取用約 10³ 顆的菸草種子。由於保存期限的不同，使未轉殖菸草 (WT) 種子的萌發率 (79%) 與轉殖品系 Nt-Qmt-4G 的萌發率 (86%) 有所不同。為了方便比較，便以各自的種子萌發率做為該品系未以殺草劑浸種處理的 100% 相對存活率 (relative viability)，如表一子葉期 (Cotyledon) 項下“ - ” (未浸泡殺草劑) 所示的 100%。經過浸種處理後，WT 與 Nt-Qmt 的萌發率皆很接近未使用殺草劑浸種的處理，相對存活率分別是 92% 與 94%。於盛土的盆盤中持續觀察子葉的成長，並保持培養土的濕潤。接受殺草劑浸種的 WT，約僅 31% 持續葉部分化，其餘子葉多褪色萎凋，而含有突變 *psbA* 葉綠體性狀的轉殖 Nt-Qmt 有 68% 的子代持續葉部分化，明顯高於 WT 有兩倍之多。未受浸種處理的 WT 與 Nt-Qmt，幾乎正常持續葉部的生長與分化，分別維持 99% 與 97% 的存活率。由表一的浸種發育試驗初步顯示，突變的 *psbA* 基因在葉綠體中對維持光合作用的功能可提供一定程度的貢獻。

表一、種子經殺草劑浸泡的未轉殖與含突變 *psbA* 基因之轉殖菸草幼苗相對存活率

Table 1. Relative viability of seedlings from the wild type and *psbA*-mutated transplastomic tobacco seeds pre-incubated with *s*-triazine herbicides

| Plants | Relative viability (%) of seedlings in stages of | | | |
|-------------------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Cotyledon | | 1-2 True leaves | |
| | + ¹⁾ | - ¹⁾ | + ¹⁾ | - ¹⁾ |
| WT ²⁾ | 92 | 100 | 31 | 99 |
| Nt-Qmt-4G ³⁾ | 94 | 100 | 68 | 97 |

¹⁾ Seeds pre-incubated with (+) or without (-) 10 mg/ml *s*-triazine herbicides.

²⁾ Wild type tobacco.

³⁾ Transplastomic line with mutated *psbA*.

經由初步的葉綠體轉殖設計，我們將突變的葉綠體 *psbA* 基因轉入菸草葉綠體的 *rbcL* 與 *accD* 基因之間，藉由抗生素篩選基因 *aadA* 而得到再生的轉殖植株，其葉綠體內同時存在原型與突變的 *psbA* 基因，在基因表現的差異上，已知原型 *psbA* 基因受到光以及 mRNA 上 5'-UTR 區域（85 個核苷酸）的調節⁽¹⁵⁾，而轉殖的 *psbA* 突變基因則由 *Prrn* 啟動子穩定地表現，但是蛋白表現的調節可能會受到構築過程中短少的 5'-UTR 影響（餘 48 個核苷酸，生體外轉譯的蛋白產量會下降 20~30%）⁽⁶⁾，可能因此造成突變的抗性蛋白產量不如原型基因的產物，或者因轉譯時 5'-UTR 所具有的組織特異性等因素，使其無法如 *aadA* 基因可不受光調節等因素的影響而呈現全株明顯而穩定的生理抗性。以目前尚未去除原型 *psbA* 基因的轉殖設計來解答「抗三氮并系殺草劑的特性是否完全導因於葉綠體 *psbA* 基因突變？」的問題，著實困難，惟由表一的結果，仍可推斷突變 *psbA* 基因有成為顯性的潛勢。因此，若完全剔除原型 *psbA* 基因，以突變的 *psbA* 基因取而代之，並使突變基因不受完整的 *psbA* 5'-UTR 所導致的光調控影響，以簡化突變基因型與表現型之間的對應關係。另一方面，若順勢除去抗生素篩選基因⁽³⁾，將可使轉殖作物為社會大眾所接受，是非常值得繼續開發的題材。

由於葉綠體基因轉殖過程中，外來基因是以同源重組的方式嵌入葉綠體基因組內⁽¹⁴⁾，基於上述完全剔除原型 *psbA* 基因的考量，可藉由 PCR 技術，取得 *rpl2-psbA-matK* 之間的葉綠體核酸片段，做為構築載體時的同源重組片段（圖二 b），使 *aadA* 基因配合突變的 *psbA* 基因將原型基因置換出來。初階段由 *aadA* 基因提供組織培養的抗生素篩選，並在 *aadA* 基因兩端預先配置 15 bp 的 loxP 片段，以備刪除 *aadA* 基因之用。Cre 蛋白是一種辨識 loxP 片段的特異重組酶（recombinase），可以將 loxP 之間核酸片段剔除⁽⁴⁾，在葉綠體轉殖設計中，亦曾證實可行⁽³⁾。將帶有 loxP-*aadA*-loxP-*psbA*^{mut} 的葉綠體轉殖作物母系與細胞核轉殖帶有以葉綠體為目的地的 *cre* 基因與核轉殖篩選基因例如 *kan^r*（抗 kanamycin）的父系進行雜交，所得的子代將可使細胞核內表現的 Cre 重組酶，透過以葉綠體為傳送目標的訊號胜肽（signal peptide）而進入葉綠體，將 *aadA* 剔除。接著選拔抗 kanamycin 而不抗 spectinomycin 的子代做為母系，再與高品質農藝性狀的非轉殖作物父系雜交，即可完全剔除抗生素篩選基因（圖二 b）。新的子代中將具有單一定位突變的 *psbA* 基因與一個 15 bp 的 loxP，與非轉殖作物差異無多，若因此產生顯著的抗殺草劑生理特徵，除了未來能在田間運用，減低作物藥害外，更能協助證實 *psbA* 基因突變確實是引起作物抗殺草劑的充分且必要條件。

（關鍵字：葉綠體、*psbA*、殺草劑、*s*-triazine）

謝 辭

感謝中興大學暑期實習生農藝系許偉偉與植病系洪心惠在基因突變上的協助。

引用文獻

1. Arntzen, C. J., Pfister, K., and Steinback, K. E. 1982. The mechanism of chloroplast triazine resistance: alterations in the site of

- herbicide action, pp. 185-214. In: H. M. LeBaron & J. Gressel [eds.], Herbicide resistance in plants. John Wiley and Sons, New York, USA. 401 pp.
2. Conner, A. J., and Christey, M. C. 1997. A seed treatment for eliminating non-hybrid plants when using atrazine resistance as a genetic marker for hybrid seed production. *Annal. Bot.* 80: 561-564.
 3. Corneille, S., Lutz, K., Svab, Z., and Maliga, P. 2001. Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the CRE-lox site-specific recombination system. *Plant J.* 27: 171-178.
 4. Dale, E. C., and Ow, D. W. 1991. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10558-10562.
 5. Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Gray, S., and Lee, S. B. 1998. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nat. Biotechnol.* 16: 345-348.
 6. Hirose, T., and Sugiura, M. 1996. Cis-acting elements and trans-acting factors for accurate translation of chloroplast *psbA* mRNAs: development of an *in vitro* translation system from tobacco chloroplasts. *EMBO J.* 15: 1687-1695.
 7. Hirschberg, J., and McIntosh, L. 1983. Molecular basis of herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. *Science* 222: 1346-1349.
 8. Kleier, D. A., Andrea, T. A., Hegedus, T. K. J., Gardner, G. M., and Cohen, B. 1987. The topology of the 32 kDa herbicide binding protein of photosystem II in the thylakoid membrane. *Z. Naturforsch* 42c: 733-738.
 9. LeBaron, H. M., and Gressel, J. 1982. Herbicide resistance in plants. Wiley Intersciences, New York, USA. 401 pp.
 10. Lin, C. H., Chen, Y. Y., Tzeng, C. C., Tsay, H. S., and Chen, L. J. 2003. Expression of a *Bacillus thuringiensis cryIC* gene in plastid confers high insecticidal efficacy against tobacco cutworm - a *Spodoptera* insect. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44: 199-210.
 11. Mazur, B. J., and Falco, S. C. 1989. The development of herbicide resistant crops. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 464-470.
 12. Ruf, S., Hermann, M., Berger, I. J., Carrer, H., and Bock, R. 2001. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat. Biotechnol.* 19: 870-875.
 13. Sidorov, V. A., Kasten, D., Pang, S. Z., Hajdukiewicz, P. T., Staub, J. M., and Nehra, N. S. 1999. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J.* 19: 209-216.
 14. Staub, J. M., and Maliga, P. 1992. Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. *Plant Cell* 4: 39-45.
 15. Staub, J. M., and Maliga, P. 1993. Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the *psbA* mRNA. *EMBO J.* 12: 601-606.
 16. Svab, Z., and Maliga, P. 1993. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 913-917.
 17. Trebest, A. 1986. The topology of the

- plastoquinone and herbicide binding peptides of photosystem II in the thylakoid membrane. *Z. Naturforsch* 41c: 240-245.
18. Trebest, A. 1987. The three-dimensional structure of the herbicide binding niche on the reaction center polypeptides of photosystem II. *Z. Naturforsch* 42c: 742-750.

ABSTRACT

Lin, C. H.^{1,2,3}, Tzeng, C. C.², and Chen, L. J.^{3*} 2005. A point-mutated *psbA* gene transformed into tobacco chloroplast genome confers *s*-triazine herbicide tolerance in developing seedlings. *Plant Prot. Bull.* 47: 187-194. (¹Institute of Chemistry, Academia Sinica, Taipei 115, Taiwan (ROC); ²Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, COA, Taichung 413, Taiwan (ROC); ³Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan (ROC))

Many *s*-triazine herbicide-resistant plants have been characterized by the point mutation at the 264th amino acid of chloroplast *psbA* gene where the glycine or alanine, instead of the serine, has played as the dominant residue in the resistance. To ascertain if the specific mutation corresponds to the effect resistant to *s*-triazine herbicides, the *psbA* gene from tobacco chloroplast genome was cloned and substituted for its 264th codon from serine to glycine by using the recombinant polymerase chain reaction to implement site-directed mutagenesis. The mutated gene, as the second copy of *psbA* for chloroplast genome, was constructed in the operon co-transcribed with the upstream *aadA* gene, and integrated into the tobacco plastome via particle bombardment-mediated transformation. The plants regenerated from spectinomycin-resistant calli were assayed for the existence of transgenes by polymerase chain reaction and for the transgenes' location in chloroplast genome by Southern blotting. It appeared that the regenerated plant after maturation was still sensitive to the ametryne herbicide; however, over half (68%) of the germinating seeds preincubated with the *s*-triazine herbicides persisted a prolonged tolerance to the herbicide during the seedling development. It can be inferred that the mutation at the 264th amino acid of chloroplast *psbA* gene as a second copy is, to a certain extent, responsible for the herbicide resistance of plants. In this report, we also proposed a rational approach for breeding marker-free and herbicide-tolerant transgenic crops through the Cre-lox system and maternal genetic effect by two conventional crossings with the Cre-containing transgenic first to knock out the plastid marker, then the wild type paternal plant to remove nuclear marker.

(Key words: chloroplast, *psbA*, herbicide, *s*-triazine)

*Corresponding author. E-mail: ljchen@nchu.edu.tw