

问题讨论 Discussion

转基因植物选择标记基因及其安全性问题

王永飞^{1,*} 马三梅¹ 亦如瀚²

暨南大学¹生物工程学系, ²环境工程系, 广州 510632

The Selectable Marker Genes in Transgenic Plant and Their Bio-safety

WANG Yong-Fei^{1,*}, MA San-Mei¹, YI Ru-Han²

¹Department of Bioengineering, ²Department of Environment Bioengineering, Jinan University, Guangzhou 510632

提要 就目前使用的选择标记基因和提高选择标记基因安全性的策略进行了评述。

关键词 转基因植物; 选择标记基因; 生物安全性

自从1983年世界上首次获得转基因植物以来, 植物转基因技术已得到了飞速的发展。目前, 全球抗虫、抗病、抗除草剂和品质改良等的转基因植物已达120多种, 2001年的种植面积已达5260多万公顷^[1]。在遗传转化过程中一般使用选择标记基因来鉴别转化的细胞、组织或植株。但随着转基因植物种类和种植面积的迅猛增加, 转基因植物中选择标记基因的生物安全性已成为人们普遍关注的问题之一^[2]。本文主要就目前使用的选择标记基因和提高选择标记基因安全性的策略作评述。

1 目前所使用的选择标记基因

在植物遗传转化所利用的表达载体中, 除含有目的基因和各种表达调控元件外, 一般情况下还插入了供选择用的标记基因^[3]。经过遗传转化, 表达载体上所有的插入序列一同整合到受体植物染色体基因组中。选择标记基因(selectable marker gene)的主要功能是: 此种基因的产物赋予转化细胞产生一种选择压力, 致使未转化的细胞在施加选择剂条件下不能生长、发育和分化。而转化细胞对该选择剂具有抗性, 可以继续存活, 因而有利于从大量的细胞或组织中筛选出转化细胞及植株^[4]。此方法已成为植物遗传转化一种较为方便、快捷的转基因植物鉴定方法^[5]。

植物基因工程所应用的选择性标记基因都具有以下4个特征^[3]: (1) 编码一种正常植物细胞中不存在的产物, 例如酶和蛋白质等; (2) 基因较小, 易构成嵌合基因; (3) 能在转化体中得到充分表达; (4) 容易检测, 并能定量分析。早期研究中,

常用的选择标记基因主要有两大类^[6]。一类是编码抗生素抗性的基因, 例如, 新霉素磷酸转移酶(neomycin phosphotransferase)基因II (*npt* II)、潮霉素磷酸转移酶(hygromycin phosphotransferase)基因(*hpt*)和二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase)基因(*dhfr*)等; 另一类是编码除草剂抗性的基因, 例如, 草丁膦乙酰转移酶(phosphinothricin acetyltransferase)基因(*bar*)、5-烯醇丙酮酰草酸-3-磷酸合成酶(5-enolpyruvate shikimate-3-phosphate)基因(*epsps*)等。目前在转基因植物所使用的抗性选择标记基因来源及其编码的基因产物和使用的选择试剂见表1。

2 选择标记基因的安全性问题

利用选择标记基因进行筛选确实为植物的遗传转化提供了便利。但是, 一旦完成筛选而得到所需要的转化植株之后, 选择标记基因就变成不需要的和多余的, 甚至是有害的^[4]。选择标记基因的潜在危险性主要包括以下几个方面: (1) 转基因作物本身可能变为杂草^[10]; (2) 选择标记基因通过花粉和种子等途径在种群之间扩散, 可能转移到杂草, 产生抗除草剂的“超级杂草”; 或者向其它植物中转移, 从而对生态环境和生物多样性产生潜在的危害^[11]; (3) 在健康领域, 人们担心转

收稿 2003-12-24 修定 2004-02-12

资助 暨南大学引进人才启动基金(692017和692016)、广东省重点科技攻关项目(2002A2070605)和广东省自然科学基金(2000162)。

*E-mail: tmsm@jnu.edu.cn, Tel: 020-85228476

表1 转基因植物早期研究中使用的主要选择标记基因^[3-9]

基因	基因编码的产物	选择试剂	基因来源
<i>nptII/aphII/neo</i>	新霉素磷酸转移酶II, 或称为氨基葡萄糖苷磷酸转移酶II	卡那霉素、新霉素、Geneticin(G418)、巴龙霉素、氨基羟丁基卡那霉素A(即BBK8)、氨基葡萄糖苷	大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)、转座子Tn5
<i>bar/pat</i>	草丁膦乙酰转移酶	草甘膦、草丁膦、双丙氨膦	链霉菌(<i>Streptomyces hygroscopicus</i>)、 <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
<i>bla</i>	β -内酰胺酶	青霉素、氨苄青霉素	大肠杆菌
<i>aadA</i>	氨基葡萄糖苷腺苷转移酶	链霉素、壮观霉素	<i>Shigella flexneri</i>
<i>hpt</i>	潮霉素磷酸转移酶	潮霉素B	大肠杆菌
<i>nptIII</i>	新霉素磷酸转移酶III	氨基羟丁基卡那霉素A(即BBK8)、卡那霉素、新霉素、Geneticin(G418)、巴龙霉素	<i>Streptococcus faecalis</i> 的R质粒
<i>epsps/aroA</i>	5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸	草甘膦	农杆菌CP4(<i>Agrobacterium</i> CP4)、玉米(<i>Zea mays</i>)、矮牵牛(<i>Petunia hybrida</i>)
<i>gox</i>	草甘膦氧化还原酶	草甘膦	<i>Achromobacter</i> LBAA
<i>bxn</i>	溴苯腈水解酶	溴苯腈	肺炎克雷伯氏菌(<i>Klebsiella pneumoniae</i> var. <i>iozaenae</i>)
<i>als</i>	乙酰乳糖合成酶	磺酰脲类除草剂、咪唑啉酮	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)、烟草(<i>Nicotiana tabacum</i>)、甘蓝型油菜(<i>Brassica napus</i>)
<i>cat</i>	氯霉素乙酰转移酶	氯霉素	转座子Tn9、噬菌体P1
<i>tdc</i>	色氨酸脱羧酶	4-甲基色氨酸	<i>Catharanthus roseus</i>
<i>uidA/gus</i>	β -葡糖苷酸酶	葡糖苷酸	大肠杆菌
<i>nptI</i>	新霉素磷酸转移酶I	卡那霉素、新霉素、Geneticin(G418)、氨基葡萄糖苷	转座子Tn601、大肠杆菌
<i>gent</i>	庆大霉素乙酰转移酶	庆大霉素	细菌
<i>strI/spc/spt</i>	链霉素磷酸转移酶	链霉素	转座子Tn5
<i>dhfr</i>	二氢叶酸还原酶	氨甲喋呤	细菌质粒pR67

基因食品的标记基因及其产物可能对人或动物健康有害^[8]; (4) 标记基因可能被转移到人或动物肠道微生物或上皮细胞, 从而降低抗生素在临床治疗中的有效性^[12]。另外, 由于转基因植物中标记基因的存在, 若要对该植物进行多次遗传操作则会受到一定的限制^[3]; 若标记基因与目的基因由同一启动子驱动, 还可能造成目的基因的失活^[13]。目前, 虽然有的抗生素抗性基因如 *npt II* 已通过安全性评价^[14], 但还是不能彻底消除人们对转基因植物的担忧, 从而影响了大众对转基因植物的接受。

3 提高标记基因安全性的策略

解决选择标记基因的生物安全性问题主要有3种途径: 一是利用无争议的生物安全标记基因; 二是在转化时仍使用标记基因, 但获得转基因植株后再将其去除; 三是利用无选择标记基因的转化系统。

3.1 利用无争议的生物安全标记基因 提高标记基

因的安全性最为有效的办法就是利用无争议的生物安全标记基因。目前发现的生物安全标记基因主要有绿色荧光蛋白基因、甜菜醛脱氢酶基因、6-磷酸甘露糖异构酶基因、木糖异构酶基因、核糖醇操纵子、谷氨酸-1-半醛转氨酶基因、异戊烯基转移酶基因、吡啶-3-乙酰胺水解酶等。与常规标记基因不同, 这些标记基因没有抗生素或除草剂抗性, 相对来说对生物是安全的, 因此称之为生物安全标记基因^[12]。

3.1.1 绿色荧光蛋白基因 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是从维多利亚水母(*Aequorea victoria*)中分离纯化出的一种可以发出绿色荧光的物质^[15]。与其他选择标记相比, GFP的检测具有不需要添加任何底物或辅助因子, 不使用同位素, 也不需要测定酶的活性等优点。同时, GFP生色基团的形成无种属特异性, 在原核和真核细胞中都能表达, 其表达产物对细胞没有毒害作用, 并且不影响细胞的正常生长和功能。所以,

利用 *gfp* 作为选择标记基因, 可以很方便地从大量的细胞或组织中筛选出转化细胞和植株, 并且可用来追踪外源基因的分离情况。因此, *gfp* 已在烟草^[16]、水稻^[17]等植物中得到了应用。

3.1.2 甜菜醛脱氢酶基因 利用植物本身就具有的基因作为选择标记基因, 也可以减轻大众对转基因作物的担心。例如Daniell等^[18]用菠菜的甜菜醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, BADH)基因作为烟草叶绿体转化的筛选标记基因, 在筛选过程中BADH可以把毒性的甜菜醛(betaine aldehyde, BA)转化为没有毒性的甘氨酸甜菜碱(glycinebetaine, GA)。运用BA作为选择标记比传统的选择标记的转化效率明显提高; 并且GA作为一种渗透保护剂, 还可以提高转基因植株的再生率。例如在BA选择下, 12 d内有80%的转化叶盘出现转化芽, 每个叶盘平均达到23个转化芽; 而用壮观霉素选择, 45 d内只有15%的转化叶盘出现转化芽, 每个叶盘平均只有1~2个芽^[18]。

3.1.3 与糖代谢途径相关的基因 离体培养的细胞不能进行光合作用, 必须在培养基中添加一定浓度的碳源(如蔗糖、麦芽糖、葡萄糖等)后细胞才能进行正常的生长分化。近年来, 正是利用这一点产生了3种非抗生素标记基因, 即: 6-磷酸甘露糖异构酶(6-phosphomannose isomerase, PMI)基因(*pmi*)、木糖异构酶(xylose isomerase, XYL)基因(*xyIA*)和核糖醇操纵子(ribitol operon)。它们能分别使转化细胞利用6-磷酸甘露糖、木糖和核糖醇为碳源, 而非转化细胞由于不具有这些基因, 会产生碳饥饿而不能正常生长, 从而达到高效选择的目的。

*pmi*基因编码的6-磷酸甘露糖转移酶(mannose-6-phosphotransferase)可催化6-磷酸甘露糖(mannose-6-phosphate, M-6-P)转变为6-磷酸果糖(fructose-6-phosphate, F-6-P)。在含甘露糖的培养基上, 植物内源己糖激酶(hexokinase)催化甘露糖磷酸化为M-6-P, 消耗ATP, 非转化细胞由于不能利用M-6-P, 造成M-6-P积累并大量消耗ATP, 长期处于饥饿状态, 生长处于停滞; 而整合了外源*pmi*基因的转化细胞则能将M-6-P转变为细胞可以利用的F-6-P, 这就避免了M-6-P的大量积累并产生ATP, 为细胞正常生长提供能量^[19]。因此,

在含有甘露糖的培养基上只有转化细胞能正常生长, 而非转化细胞将被淘汰。目前, *pmi*基因已广泛用于水稻^[20]、玉米^[21~23]、小麦^[23]和甜菜^[24, 25]等植物的转化系统。

许多植物细胞不能利用木糖。然而在XYL的催化下能将木糖转变成木酮糖(xylulose), 再经过磷酸戊糖途径分解代谢, 为细胞生长所利用。在以木糖为主要碳源的培养基上, 转化细胞因能利用木糖而呈现优势生长, 非转化细胞则因碳源供应不足而使生长受到抑制^[26]。Haldrup等^[27]将*xyIA*分别转化到马铃薯、烟草和番茄愈伤组织后, 再将愈伤组织置于木糖的培养基上进行筛选, 得到了能够在该培养基上正常生长的转基因植株。以木糖作为筛选标记, 具有更高的转化效率, 比卡那霉素筛选系统高10倍左右。

一般生物细胞不能利用核糖醇作为碳源。而大肠杆菌C菌株却能在以核糖醇为碳源的培养基上生长。这是因为C菌株中有两个紧紧串联的操纵子, 即*atl*和*rtl*^[28]。大肠杆菌B菌株和K-12菌株是生物工程中最常用的菌株, 但由于缺少这两个操纵子而不能分解代谢核糖醇。Reiner^[29]发现, 当把*atl*和*rtl*从C菌株分别转到B菌株和K-12两菌株中后, 两菌株都能在以核糖醇为碳源的培养基上正常生长。因此认为核糖醇操纵子(ribitol operon)可以作为一种非抗生素选择标记应用于植物遗传转化。

3.1.4 谷氨酸-1-半醛转氨酶基因 在叶绿素生物合成的第一阶段, 谷氨酸首先在谷氨酸-1-半醛转氨酶(glutamic acid-1-semialdehyde-aminotransferase, GSA-AT)的催化转化为 δ -氨基乙酰丙酮(5-aminolaevulinic acid, ALA)。3-氨基-2, 3-二氢苯甲酸(3-amino-2, 3-dihydrobenzoic acid, gabaculine)是一种植物毒素, 它能强烈抑制GSA-AT活性, 使ALA不能合成, 从而导致叶绿素的生物合成中断。到目前为止, 已经分离出了许多抗Gabaculine的突变体^[30]。其中有一个命名为GR6的突变体携带有*hemL*基因^[31]。*hemL*作为一种选择标记基因与抗生素或除草剂抗性基因的选择原理相似, 都是利用一种抗性基因使转化细胞基因获得某种抗性, 从而能够在含有该选择剂的培养基上正常生长, 而非转化细胞由于缺少此种抗性, 生长即受

到抑制甚至死亡^[32]。所不同的是, *hemL* 不具有抗生素或除草剂抗性, 这样就避免了由于抗生素或除草剂基因在转基因植物中的存在而引起的争论。

3.1.5 与激素代谢途径相关的基因 与激素代谢途径相关的基因包括异戊烯基转移酶(isopentenyl transferase, IPT)基因(*ipt*)、吲哚-3-乙酰胺水解酶(indole-3-acetamide hydrolyse, IAAH)基因(*iaah*)及β-葡糖苷酸酶(β-glucuronidase, GUS)基因(*gus*)。

ipt 基因从农杆菌的T-DNA中克隆而来, 编码IPT, 参与植物吲哚乙酸(indole acetic acid, IAA)的合成, IAA可以促进器官发生, 因此转化的细胞在未加IAA的培养基上能继续生长, 可形成不定芽。相反, 未转化的细胞在不含IAA的培养基中不能正常生长和分化而死亡^[33]。进一步的研究发现, 在烟草和莴苣中, 采用*ipt*的选择效果优于卡那霉素抗性基因^[34]。

*iaah*是另外一种与激素代谢相关的安全的选择标记基因, 也是通过调节植物体内激素代谢而使转化细胞与非转化细胞的生长与分化造成一定的差异, 从而达到筛选出转化细胞的目的^[35]。

*gus*基因在一定条件下也有与*ipt*基因的相似效果。在培养基中添加葡萄糖苷酸, 含有*gus*基因的转化细胞因子能在GUS的作用下进行水解, 释放出激动素(kinetin), 从而促进转化细胞的生长, 未转化细胞则逐步死亡^[36]。

此外, 用基因枪方法将花色素苷基因*b*和*c1*转入小麦24h以后, 转化细胞中即有红/紫色色素形成。花色素苷基因能够在种子的子房和果皮中表达。因此用花色素苷编码基因作为转基因后代的选择标记也可避免使用抗生素基因或抗除草剂基因作为选择标记基因^[37]。

3.2 用标记基因获得转基因植株后的去除 目前, 去除转基因植物中标记基因主要采用共转化、位点特异重组酶系统、转座子和同源重组等方法。

3.2.1 共转化法去除标记基因 共转化的原理是将目的基因和选择标记基因分别组装在两个不同质粒上, 同时转化目标细胞。由于两个质粒载体可同时整合到细胞的不同染色体上。转化植株的后代经过遗传分离, 便可获得仅含有目的基因的转基因植株^[38]。这种方法比较简单, 适用于多种转化

体系。但此法必须保证具有较高的共转化频率, 同时还应保证标记基因和目的基因共整合到受体基因组的位点。虽然经过对各个转化参数的优化, 在有些植物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^[39], 但在实际上应用中, 由于位于不同转化质粒载体中的转基因共整合频率往往较低, 并且常常整合在受体基因组的同一位点上^[40], 这就使共转化和遗传分离策略的应用受到了限制。

为了克服共转化的缺点, 可以将选择标记基因和目的基因分别插入到同一质粒中两个相互独立的T-DNA区内, 构建成含有两个T-DNA的农杆菌超级二元载体(super binary vector, SBV)。例如Komari等^[41]将卡那霉素的抗性基因*npt II*或潮霉素抗性基因*hpt II*和*gus*基因构建成农杆菌SBV, 分别转化烟草和水稻, 结果在转基因植株中的标记基因和报道基因共整合频率约为50%。分析转基因植株F₁代的结果表明, 60%以上的株系可获得无标记基因的*gus*转基因植株。在Komari工作的基础上, Lu等^[42]对质粒的构建方法作了进一步改进, 他们将两个独立的T-DNA序列改建成含1个左边界T-DNA和2个右边界T-DNA的序列。目的基因位于左边界T-DNA和右边界T-DNA之间, 而标记基因在两个T-DNA右边界之间。用含该T-DNA的质粒转化水稻, 其中35%~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。不过, 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, 而且也无法应用于无性繁殖的植物。

3.2.2 位点特异重组酶系统去除标记基因 位点特异的重组(site specific recombination)系统是由重组酶和其识别的位点组成。在重组酶的介导下, 在两个识别位点之间的DNA片段并不是转移到基因组的其它地方, 而是在识别位点上被切除掉, 或发生倒置^[43]。因此, 利用位点特异重组酶系统可以去除转基因植物的选择标记基因。具体方法: 是在最初设计转化载体时, 在标记基因的两端加上重组酶识别序列; 在得到转化植株后, 再将重组酶基因通过转化或有性杂交的方式导入植物体,

重组酶基因表达后就把可以标记基因去除掉^[44]。但此法程序繁琐, 应用中受到很大的限制。

为了加快去除标记基因的进程, 可以将重组酶基因与标记基因连接到同一载体上。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, 就可以将标记基因去除。这就是所谓的多基因自动转化(multi-auto-transformation, MAT)载体系统。Sugita等^[45]

采用 MAT 载体系统, 将重组酶与化学诱导表达的谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST)启动子 GST-27 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。MAT 载体系统可以免去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以营养器官繁殖的植物遗传转化。

表2 4个位点特异重组系统的特性^[43, 44, 46]

系统	来源	重组酶及其大小	识别位点及其大小
Cre/lox	噬菌体 P1	Cre: 38.5 kD	loxP: 34 bp
FLP/FRT	酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)的2 μ质粒	FLP: 48 kD	FRT: 34 bp
R/RS	接合酵母(<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>)的pSR质粒	R: 56 kD	RS: ≤58 bp
Gin/gix	噬菌体 Mu	Gin: 21.7 kD	gix: 34 bp

目前已发现了 Cre/lox、FLP/FRT、R/RS 和 Gin/gix 4个位点特异重组系统, 它们的重组酶和其识别位点及大小归纳见表 2。

3.2.3 转座子去除标记基因 转座子(transposon)是指一段可在染色体组内移动的特定的 DNA 序列, 可将其从一个位点切除下来, 插入到一个新的位点上。它一般通过特定的酶识别某一种 DNA 序列, 识别插入到另外位点上去的 DNA 片段。例如, 玉米中的 Ac/Ds 转座子, 可以把特定重复 DNA 之间的基因切除下来, 在 Ac 转座酶的作用下将其转移到另一位置上^[47]。有时转座作用并不伴随再次插入而是该转座子丢失。基于这一原理, 采用转座子系统也可以将选择标记基因去除。具体的方法有以下 2 种: (1) 将标记基因置于转座子与重复序列 Ds 之间, 转座作用发生后, 标记基因随转座作用而与目的基因分离或丢失。例如, Ebinuma 和 Komamine^[35] 采用这种途径, 将 *ipt* 基因置于 Ds 之间, 再用 MAT 载体系统得到了高转化频率且仅含有目的基因的转基因烟草。(2) 将目的基因置于 Ds 之间, 目的基因即随转座作用的发生而与选择标记基因分离。Goldsbrough等^[48] 采用 *npt II* 为选择标记基因, 以 *gus* 基因作为报告基因转化番茄, 结果在转基因植株后代中发现 *npt II* 和 DS-*gus*-DS 结构的重组分离现象。

3.2.4 同源重组去除标记基因 两个同源序列之间分生的染色体内重组(intrachromosomal homo-

gous recombination)可以诱导DNA片段缺失^[5]。方法是把标记基因放在两个 DNA 同源序列之间, 发生同源重组后, 标记基因即被去除, 这样的细胞经过再生, 可得到无标记基因的植株。例如, Fischer 等^[49] 采用同源重组的原理, 在 *addA* 基因两端加上重复序列(direct repeats), 经过几代的细胞分裂后 *addA* 基因即可从叶绿体中除去。Lamthan和Day^[7] 及 Maliga^[50] 采用同样的方法也曾获得了只含有目的基因的转基因烟草。

3.3 无选择标记基因的转化系统 如果在遗传转化过程中, 不使用选择标记基因就能获得只含有目的基因的转基因植株, 这应该是最经济和最有效的方法。de Vetten等^[51] 的研究结果即是这方面的成功事例。据他们报道, 利用致病性强的农杆菌菌株 AGLO 转化外植体, 可用 PCR 分析方法选择转化细胞, 而不必用选择标记基因。此法的具体步骤是: 在构建表达载体时, 只将目的基因和启动子及终止子插入在 T-DNA 的左边界和右边界之间。然后用农杆菌菌株 AGLO 浸染马铃薯外植体。由于 AGL0 菌株含有超强致病力(supervirulent)的农杆菌 A281 质粒 pTiBo542Ti^[52] 的致病区域序列, 所以 AGL0 菌株的转化效率较高。共侵染之后, 每个外植体可以产生 1~2 个再生芽。再生芽培养成小植株后用特异的引物进行 PCR 检测, 结果发现 5 次转化实验的转化频率在 1.3%~5.6% 之间, 平均为 4.5%。经 PCR 检测为

阳性的转基因植株, 有45%的在表型上出现所需的性状。这个系统不需要经过遗传分离或位点特异重组酶系统去除标记基因, 因此该系统尤其是为营养繁殖的植物(如马铃薯和木薯)提供了一种有效的产生无标记基因的转基因植株方法。

4 结论和展望

在解决选择标记基因的生物安全性问题的3种途径中, 去除选择标记基因的研究虽然取得了很大进展, 但还存在选择效率低和步骤繁琐等问题, 到目前为止尚未建立起一套高效的去除选择标记基因的系统。而无选择标记基因转化系统的研究才刚刚起步, 其在其它转基因植物中的应用还待进一步验证。采用无争议的生物安全标记基因可以排除人们对标记基因安全性的担心。相信随着功能基因组学和蛋白质组学的进展, 植物转基因技术必将不断合理化和精确化, 最终采用无争议的生物安全标记基因研究解决有关生物安全性的问题。

参考文献

- Nap J-P, Metz PLJ, Escaler M et al. The release of genetically modified crops into the environment. *Plant J*, 2003, 33: 1~18
- 钱迎倩. 转基因作物的利弊分析. *生物技术通报*, 1999, 15(5): 7~11
- 闫新甫. 转基因植物. 北京: 科学出版社, 2003. 214~238
- 王关林, 方宏筠. 植物基因工程. 第2版. 北京: 科学出版社, 2002. 112~226
- Hare PD, Chua NH. Excision of selectable marker genes from transgenic plants. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 575~580
- Daniell H, Khan MS, Allison L. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci*, 2001, 7: 84~91
- Lamthan S, Day A. Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 1172~1176
- Kuiper HA, Kleter GA, Noteborn HP et al. Assessment of food safety issues related to genetically modified foods. *Plant J*, 2001, 27: 503~528
- Goddijn OJM, Schouten PMV, Schilperoort RA et al. A chimeric tryptophan decarboxylase gene as a novel selectable marker in plant cells. *Plant Mol Biol*, 1993, 22: 907~913
- 吴志平, 徐步进. 转基因植物释放后在环境中成为杂草的风险性. *生物工程进展*, 1999, 19(1): 9~13
- 冯英, 薛庆中. 作物抗虫基因工程及其安全性. *遗传*, 2001, 23(6): 571~576
- 王兴春, 杨长登. 转基因植物生物安全性标记基因. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(4): 19~22
- 李晓兵, 陈彩艳, 翟文学. 培育具有安全性选择标记基因或无选择标记基因的转基因植物. *遗传*, 2003, 25(3): 345~349
- Fuchs RL, Ream JE, Hammond BJ et al. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (nptII) protein. *Bio/Technol*, 1993, 11: 1543~1547
- Ma B, Mayfield MB, Gold MH. The green fluorescent protein gene functions as a reporter of gene expression in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(2): 948~955
- 朱生伟, 秦红敏, 孙敬三等. 绿色荧光蛋白基因(GFP)在抗虫转基因植物中的应用. *植物学报*, 2003, 45(6): 654~658
- Chung BC, Kim JK, Nahm BH. In plants visual monitoring of green fluorescent protein in transgenic rice plants. *Mol Cell*, 2000, 10: 411~414
- Daniell H, Muthukumar B, Lee SB. Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr Genet*, 2001, 39: 109~116
- Weisser P, Kramer R, Sprenger GA. Expression of the *Escherichia coli pmi* gene, encoding phosphomannose isomerase in *Zymomonas mobilis*, leads to utilization of mannose as a novel growth substrate, which can be used as a selective marker. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(11): 4155~4161
- Luca P, Ye X, Potrykus I. Effective selective and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent. *Mol Breed*, 2001, 7(1): 43~49
- Wang AS, Evans RA, Altendorf PR. A mannose selection system for production of fertile transgenic maize plants from protoplasts. *Plant Cell Rep*, 2000, 19: 654~660
- Negrotto D, Jolley M, Beer S. The use of phosphomannose isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep*, 2000, 19: 798~803
- Wright M, Dawson J, Dunder E. Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L) and wheat (*Triticum aestivum* L) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable markers. *Plant Cell Rep*, 2001, 20: 429~436
- Joersbo M, Petersen SG, Okkels SG. Parameters interacting with mannose selection employed for the production of transgenic sugar beet. *Physiol Plant*, 1999, 105: 109~115
- Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol Breed*, 1998, 4: 111~117
- Vieille C, Hess JM, Kelly RM et al. *xyIA* cloning and sequencing and biochemical characterization of xylose isomerase from *Thermotoga neapolitana*. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(5): 1867~1875
- Haldrup A, Petersen SG, Okkels FT. Positive selection: a

- plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry. *Plant Cell Rep*, 1998, 18: 76~81
- 28 LaFayette PR, Parrott WA. A non-antibiotic marker for amplification of plant transformation vectors in *E. coli*. *Plant Cell Rep*, 2001, 20: 338~342
- 29 Reiner G. Genes for ribitol and D-arabitol catabolism in *Escherichia coli*: their loci in C strains and absence in K-12 and B strains. *J Bacteriol*, 1975, 123: 530~536
- 30 Kahn A, Kannagara G. Gabaculine resistance mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* with elevated GSA-AT activity. *Carlsberg Res Commun*, 1987, 52: 73~81
- 31 Allison G, Gough K, Rogers L. A suicide vector for allelic recombination involving in the *Cyanobacterium synechococcus* PCC6301. *Mol Gen Genet*, 1997, 255 : 392~399
- 32 Gough KC, Hawes WS, Kilpatrick J. Cyanobacterial GR6 glutamate-semialdehyde aminotransferase: a novel enzyme-based selectable marker for plant transformation. *Plant Cell Rep*, 2001, 20: 296~300
- 33 Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E et al. Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyltransferase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 2117~2121
- 34 Joersbo M. Advances in the selection markers from transgenic plants. *Physiol Plant*, 2001, 111: 269~272
- 35 Ebinuma H, Komamine A. MAT (Multi-Auto-Transformation) vector system, the oncogenes of *Agrobacterium* as positive markers for regeneration and selection of mark-free transgenic plants. *In Vitro Cell Dev—Pl*, 2001, 37: 103~113
- 36 Okkels FT, Wars J, Joersbo M. Synthesis of cytokinin glucuronides for the selection of transgenic plant cells. *Phytochem*, 1997, 46: 801~804
- 37 Chawla HS. Expression of anthocyanin pigmentation in wheat tissue transformed with anthocyanin regulatory genes. *Curr Sci*, 1999, 76(10): 1365~1370
- 38 Yoder JI, Goldsbrough AP. Transformation systems for generation marker-free transgenic plants. *Bio/Technol*, 1994, 12: 263~267
- 39 Daley M, Knauf VC, Summerfelt KR. Co-transformation with *Agrobacterium tumefaciens* strains containing two binary plasmids as a methods for producing marker-free transgenic plants. *Plant Cell Rep*, 1998, 17: 489~496
- 40 De Block M, Debrouwer D. Two T-DNAs co-transformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium tumefaciens* infection are mainly integrated at the same locus. *Theor Appl Genet*, 1991, 82: 257~263
- 41 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 J*, 1996, 10(1): 165~174
- 42 Lu HJ, Zhou XR, Gong ZX et al. Generation of selectable marker-free transgenic rice using double right-borders (DRB) binary vectors. *Aust J Plant Physiol*, 2001, 28: 241~248
- 43 林忠平, 胡鸢雷, 李雷等. 定位重组系统在外来基因活性调控中的作用. 见: 林忠平编著. 走向21世纪的植物分子生物学. 北京: 科学出版社, 2000. 66~71
- 44 Dale EC, Ow DW. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 10558~10562
- 45 Sugita K, Kasahara T, Matsunaga E et al. A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency. *Plant J*, 2000, 22: 461~469
- 46 Puchta H. Removing selectable marker genes: taking shortcut. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(7): 273~274
- 47 Hohn B, Levy A, Puchta H. Elimination of selection markers from transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, 12(2): 139~143
- 48 Goldsbrough AP, Lastrella CN, Yolder I. Transposition mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato. *Bio/Technol*, 1993, 11: 1286~1292
- 49 Fischer N, Stampacchia O, Kevin R et al. Selectable marker recycling in the chloroplast. *Mol Gen Genet*, 1996, 251: 373~380
- 50 Maliga P. Engineering the plastid genome of higher plants. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 5: 164~172
- 51 de Vetten N, Wolters A-M, Raemakers K et al. A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 439~442
- 52 Hood EE, Helmer GL, Fraley RT et al. The hyper-virulent of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside the T-DNA. *J Bacteriol*, 1986, 168: 1291~1304