

# 无选择标记的植物转基因方法研究技术进展

叶凌凤 王映皓 贺舒雅 郭二艳 康定明\*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

**摘要** 植物遗传转化中,标记基因起着非常重要的作用。目前使用的抗性标记基因大多数是抗生素或除草剂抗性基因,其引发的转基因植物安全性问题越来越受重视。笔者综述了近年来发展的各种无选择标记转基因植物方法及其在转基因植物中的应用,主要有共转化法、位点特异性重组系统、转座子系统、同源重组法和多元自主转化载体系统。通过评述各种方法的优缺点,以期推动安全型转基因植物培育和转基因植物产业化进程。

**关键词** 转基因植物; 选择标记; 共转化; 位点特异性重组; 转座子

**中图分类号** Q 943; S 033

**文章编号** 1007-4333(2012)02-0001-07

**文献标志码** A

## Research progress of marker-free transgenic plants

YE Ling-feng, WANG Ying-hao, HE Shu-ya, GUO Er-yan, KANG Ding-ming\*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** Selectable marker genes have been extraordinarily useful in genetic transformation of plants. Currently, the most frequently used selectable marker genes are antibiotic or herbicide resistance genes, which are being increasingly concerned on the safety issues of transgenic plants. In this paper, methods and applications for the cultivation of marker-free transgenic plants were reviewed, including co-transformation, site-specific recombination, transposable system, homologous recombination and multi-auto transformation system. The “pros” and “cons” of these approaches were also discussed with a view to promote the industrialization process of transgenic plants.

**Key words** transgenic plants; selectable marker genes; co-transformation; site-specific recombination; transposition

选择标记基因在植物的遗传转化中起着关键作用,通过标记基因筛选和鉴定出含有目的基因的转化体并获得遗传改良的转基因植株<sup>[1]</sup>。目前使用的抗性标记基因大多数是抗生素或除草剂抗性基因,筛选结束后,抗性标记基因仍存在于植物基因组中,且会随着转基因植物的繁育而遗传给子代,从而引发有关转基因植物安全的许多问题。一般来说,标记基因的安全风险主要体现在以下 2 个方面:一是抗生素类基因编码产物对人类或者牲畜可能具有潜在毒性及致敏性,标记基因可能被转移到人或动物的肠道微生物中,使其产生耐药性,从而降低抗生素在临床治疗中的有效性;二是标记基因有可能会通

过基因漂移传播到其他生物体中,威胁生态环境<sup>[2]</sup>。此外,选择标记基因的存在还限制了转基因作物的进一步改良,当转基因植物中已存在某一选择标记基因时,该基因在随后的再次转化中就不能再作为选择标记。而由于目前可供利用的选择标记基因为数甚少,不可能每次转化都更换新的选择标记基因,因此重复转化将难以实现<sup>[3]</sup>。

随着转基因技术的不断发展,越来越多转基因优良品种将会被批准商业化种植,转基因生物中抗性标记的安全性问题迫切需要解决。因此,培育无选择标记的转基因植物无论是从安全性考虑,还是从转基因技术本身考虑均具有重要意义。目前,培

收稿日期: 2011-09-22

基金项目: 农业部转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08015-003A)

第一作者: 叶凌凤,博士研究生,E-mail: ylf@cau.edu.cn

通讯作者: 康定明,教授,博士生导师,主要从事转基因生物工程研究,E-mail: kdm@pku.edu.cn

育无选择标记转基因植株的方法主要有共转化法、位点特异性重组系统、转座子系统、同源重组法和多

元自主转化载体系统<sup>[4]</sup>,这些方法近10年来在转基因植物上的应用情况总结为表1。

表1 2001—2011年无选择标记转基因植物的主要研究报道

Table 1 Research reports on marker-free transgenic plants between 2001 and 2011

标记基因剔除方法	转基因植物	标记基因	参考文献
共转化法	高粱 <i>Sorghum bicolor</i>	<i>bar hpt</i>	Zhao et al. 2003 <sup>[5]</sup> Nguyen et al. 2007 <sup>[6]</sup>
	苜蓿 <i>Medicago sativa</i> Linn	<i>nptII</i>	Ferradini et al. 2011 <sup>[7]</sup>
	水稻 <i>Oryza sativa</i>	<i>hpt bar</i>	于恒秀等, 2009 <sup>[8]</sup> Afolabi et al. 2005 <sup>[9]</sup>
	玉米 <i>Zea mays</i>	<i>bar nptII</i>	Miller et al. 2002 <sup>[10]</sup> Shiva et al. 2009 <sup>[11]</sup>
	大豆 <i>Glycine max</i>	<i>bar</i>	张秀春等, 2006 <sup>[12]</sup>
	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	<i>nptII</i>	Zhou et al. 2003 <sup>[13]</sup>
	位点特异重组系统	玉米 <i>Zea mays</i>	<i>nptII</i>
油菜 <i>Brassica napus</i>		<i>bar</i>	Kopertekh et al. 2009 <sup>[15]</sup>
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>		<i>nptII</i>	Wang et al. 2005 <sup>[16]</sup> Mlynarova et al. 2006 <sup>[17]</sup>
黑杨 <i>Populus</i>		<i>nptII</i>	周洁等, 2011 <sup>[18]</sup>
水稻 <i>Oryza sativa</i>		<i>hpt</i>	Sreekala et al. 2005 <sup>[19]</sup> Song et al. 2008 <sup>[20]</sup>
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>		<i>nptII</i>	Zhang et al. 2006 <sup>[21]</sup> Jia et al. 2006 <sup>[22]</sup>
转座子系统		水稻 <i>Oryza sativa</i>	<i>hpt</i>
	大豆 <i>Glycine max</i>	<i>aadA</i>	Dufourmantel et al. 2007 <sup>[26]</sup>
同源重组法	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	<i>aadA</i>	Dufourmantel et al. 2007 <sup>[26]</sup>
	矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i>	<i>ipt</i>	Khan et al. 2010 <sup>[27]</sup>
多元自主转化载体系统	水稻 <i>Oryza sativa</i>	<i>ipt</i>	Endo et al. 2002 <sup>[28]</sup>
	白杨 <i>Salix babylonica</i>	<i>ipt</i>	Zuo et al. 2001 <sup>[29]</sup> Matsunaga et al. 2002 <sup>[30]</sup>
	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	<i>ipt</i>	Zuo et al. 2001 <sup>[29]</sup>
	柑橘 <i>Citrus reticulata</i>	<i>ipt</i>	Ballester et al. 2007 <sup>[31]</sup>

## 1 共转化法

共转化法是指将目的基因和选择标记基因分别

构建到不同载体或同一载体的不同区域,将多种载体同时转化同一受体植物,通过有性杂交,使目的基因与标记基因在后代发生分离,进而筛选出共转化

植株的方法。目前共转化的途径有2个 T-DNA/2个质粒/2个菌株途径,把目的基因和标记基因分别装载到2个不同菌株的2个 Ti 质粒上进行转化;2个 T-DNA/2个质粒/1个菌株途径,即把目的基因和标记基因分别装载到1个菌株的2个不同 Ti 质粒上进行转化;以及2个 T-DNA/1个质粒/1个菌株途径,即“双 T-DNA 法”,在1个质粒上构建2个不同的 T-DNA 区,然后把目的基因和标记基因分别装载到这2个不同的 T-DNA 上进行转化。

共转化系统不能用于无性繁殖的植物,并且要求共转化的 DNA 在受体细胞中处于不连锁状态。2个质粒/2个菌株和2个质粒/1个菌株的方法操作繁琐,需要进行2次质粒的构建和2次向农杆菌的转化。目前,共转化途径主要采用“双 T-DNA 法”并且已经在转基因花生<sup>[32]</sup>、水稻<sup>[8-9]</sup>、玉米<sup>[10]</sup>。双 T-DNA 载体的大小是影响转化效率的一个重要因素,一般质粒较小转化效率会较高, Lu 等<sup>[33]</sup>构建的双右边界载体,由于少了 T-DNA 的一个左侧边界,质粒小,便于基因克隆,在进行水稻的共转化试验中,约 36%~64%的共转化植株在后代发生了分离。叶兴国等<sup>[34]</sup>构建了包含3段 T-DNA 的双元表达载体,其中的1段 T-DNA 区域含标记基因,另外2段 T-DNA 区域含目标基因,用其转化大豆,68%的植株后代发生了分离。

但是“双 T-DNA 法”转化植物仍有很多要解决的问题,如2个 T-DNA 长度比或两者之间距离对转化率的影响,以及目的基因在受体中表达量低等等。McCormac<sup>[35]</sup>等用“双 T-DNA 法”转化烟草的研究发现,当含标记基因的 T-DNA 和含目的基因 T-DNA 长度比值为0.46时,转化率小于20%,比值为1.6时,转化率为48%,而当比值为2.4时,转化率为96%,其原因至今不知。关于目的基因在受体中表达量低,可以用核基质结合区(matrix attachment regions, MARs)是提高目的基因稳定高效表达, MARs 是与核骨架相结合的染色质上的一段 DNA 序列,其长度一般为300~1 000 bp,可以把 MARs 构建到目的基因的两侧,来提高其表达量。

## 2 位点特异重组系统

位点特异性重组是指在重组酶介导下,在特异的重组位点间发生重组,导致重组位点间交互交换的一种精确重组形式。位点特异性重组系统由于其精确性和较高的重组频率,在无标记转化方面的应

用越来越受到重视。目前应用较多的位点特异重组系统主要有3类: Cre/loxP、FLP/FRT 和 R/Rs,其中 Cre/loxP 系统研究最广泛、也最深入<sup>[36]</sup>。

Cre/loxP 重组系统来源于大肠杆菌噬菌体 P1,系统由重组酶 Cre 及其识别位点 loxP 组成<sup>[37]</sup>。Cre 酶识别的 loxP 序列基本结构长为34 bp,中间是8 bp 的核心序列,两边是13 bp 的反向重复序列。当 Cre 重组酶识别 loxP 位点后,可以在该位置切断 DNA,并在断端形成中间体,此后在 Cre 重组酶催化下可重组连接。因此,同一条 DNA 分子上若有2个 loxP 位点,如果顺序相同,重组后则可能出现 loxP 位点间核酸序列被特异性删除,仅留下一个 loxP 位点。通常情况下,在构建表达载体时,将标记基因定位在同向的2个 loxP 位点之间,通过 Cre 重组酶的引入剔除 loxP 位点之间的基因。

FLP/FRT 系统来自酿酒酵母细胞核内 2 μm 质粒<sup>[38]</sup>。FLP 是 2 μm 质粒编码的特异性重组酶,其识别序列 FRT 结构与 loxP 相似,为一段34 bp 的 DNA 序列,所不同的是野生型的 FLP 基因在34 bp 的 DNA 序列侧翼还有一段13 bp 的反向重复序列,该序列可以增强 FLP 介导的重组反应,在体外它可以影响重组过程中的切口形成和链交换<sup>[39]</sup>。

R/Rs 系统来源于接合酵母的 SR1 质粒<sup>[40]</sup>,包括重组酶 R 和2个重组酶识别位点 Rs。Rs 是一段31 bp 的 DNA 序列,由2个12 bp 的反向重复序列和1个7 bp 的不对称间隔序列组成。在重组酶 R 的作用下,特异位点 Rs 发生同源重组,可切除2个 Rs 位点间的核酸序列。

除了以上3种常用的重组酶外,许多的重组酶也陆续被证实可用于植物位点特异性重组,比如来自于噬菌体 Mu 的 Gin 重组酶、来源于酿脓链球菌的广寄主范围的质粒 pSM-19035 的 β/six 重组系统、来自于链霉菌属噬菌体的 phiC31 整合酶、来自于细菌质粒 RK2 和 RP4 的 ParA/MRS 系统<sup>[36]</sup>。

目前,位点特异重组系统用于培育无选择标记转基因植物主要有3种方式。

1) 利用二次转化或杂交的方式剔除选择标记基因。

Li 等<sup>[18]</sup>利用 Cre/loxP 位点特异性重组系统通过可转化人工染色体实现了10个外源基因的同时转化,并且应用在转基因水稻上,杂交后代成功剔除了 *hpt* 标记基因。Chakrabort 等<sup>[40]</sup>将具有杀虫活性的大蒜叶凝集素基因(ASAL)和选择标记基因置

于两个 loxP 位点间转化烟草,通过与含 Cre 酶基因的转基因烟草杂交,19.2%的杂交后代标记基因被删除,且抗虫性增强。Song 等<sup>[20]</sup>利用 Cre/loxP 位点特异性重组系统转化烟草,导入 Cre 重组酶基因后剔除了筛选标记基因,通过植株开花后自交又使重组酶发生分离而获得无选择标记基因的植株。

2) 利用诱导型启动子剔除标记基因。

重组酶需要通过不同的诱导启动子启动而发挥作用,常用的诱导方法有热激诱导、化学方法等。

利用热激蛋白启动子启动 Cre 酶基因的表达,分别在玉米<sup>[14]</sup>、烟草<sup>[16,41]</sup>、拟南芥<sup>[42]</sup>、马铃薯<sup>[43]</sup>和番茄<sup>[21]</sup>等作物中都成功地删除了标记基因。

Sugita 等<sup>[44]</sup>利用 R/RS 位点特异重组系统将重组酶 R 与化学诱导表达子 GST-II-27 融合,以来源于农杆菌的异戊烯基转移酶基因(*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植株。Woo 等<sup>[45]</sup>利用胁迫诱导的过氧化物酶基因启动子驱动重组酶 FLP 系统转化烟草,在附加有过氧化氢的培养基中,13%~41%的再生植株都成功地删除 *FLP* 和 *hpt* 基因。Ma 等<sup>[46]</sup>利用水杨酸诱导的 Cre/loxP 重组系统培育出无选择标记的番茄。

3) 利用组织特异性启动子删除标记基因。

Mlynarova 等<sup>[17]</sup>利用含有小孢子特异性启动子的特异位点重组系统有效地删除了烟草花粉中的筛选标记基因。Kopertekh 等<sup>[15]</sup>利用种子特异性启动子进行油菜的转化,删除了 Cre 酶基因和标记基因。该系统不需要任何诱导剂即可完成标记基因的组织特异性删除。

### 3 转座子系统

植物的转座子由自主转座元件和非自主转座元件组成。当自主转座元件自身编码的转座酶存在时,非自主转座元件可被激活并发生转座,转座后的新座位有一半的机率与原来的遗传座位不连锁。将标记基因置于编码转座酶基因与非自主转座元件之间,标记基因随转座作用的发生与目的基因分离而丢失。常用的转座子主要是来源于玉米的 *Ac/Ds* 转座子系统。Goldsbrough 等<sup>[47]</sup>和 Ebinuma 等<sup>[48]</sup>利用 *Ac/Ds* 转座子系统获得了无选择标记的转基因番茄和烟草。目前,通过 *Ac/Ds* 转座子系统已获

得了无选择标记的转基因梗稻和籼稻<sup>[23-25]</sup>。

转座子系统中转座元件重新插入植物染色体其他位置频率低,而且有性繁殖分离目的基因与选择标记基因的过程复杂,耗时费力。另外,异源转座元件的存在可能引起转基因植物的基因组不稳定。由于上述原因,目前较少利用这种方法去除转基因植物的选择标记基因。

### 4 同源重组法

只要 2 条 DNA 序列相同或相近,重组就可以在此序列中的任何一点发生。重组以后,同源序列间的 DNA 片段可以被切除。把标记基因放在 2 个 DNA 同源序列之间,发生同源重组后,标记基因即被去除,这样的细胞经过诱导再生植株,可得到无选择标记转基因植物。Zubko 等<sup>[49]</sup>将来源于  $\lambda$  噬菌体的 *attP* 同源序列构建在包括选择标记基因 *nptII* 在内的一个 5.9 kb 片断两侧。在转基因烟草中,通过 *attP* 同源序列介导的染色体内同源重组,实现了对选择标记基因的剔除。

植物细胞核中同源重组发生的频率很低,在转基因植物的组织培养时期利用同源重组切除核基因组中的标记基因,需要经过两轮连续的筛选,且效率不足 1%<sup>[50]</sup>。但叶绿体中同源重组频率比较高,因此同源序列重组在叶绿体转基因去除标记基因方面有很大的应用潜力,所以这一方法已被用于从叶绿体基因组中切除标记基因<sup>[26]</sup>。

### 5 多元自主转化载体系统

多元自主转化 (multi-auto transformation, MAT) 载体系统是采用选择标记基因与玉米 *Ac/Ds* 转座系统或位点特异性重组 R/RS 系统结合,在转化后删除标记基因,它无需二次转化或有性杂交,可应用于多年生和无性繁殖的植物。目前已报道两种 MAT 载体, *ipt* 型 MAT 载体和 *rol* 型 MAT 载体。标记基因的 *ipt* 基因编码异戊烯基转移酶,该酶催化细胞分裂素合成,引起转化细胞的增值及不定芽分化。标记基因的 *rol* 基因通过增加植株对生长素的敏感性引起毛状根的增殖,会引起转基因植株表型异常<sup>[50]</sup>。MAT 载体系统已经在烟草、杂交白杨<sup>[29]</sup>和水稻<sup>[28]</sup>等转基因植物中成功删除了标记基因。

表2 无选择标记转基因方法比较

Table 2 Compare of some marker-free techniques

标记基因剔除方法	优点	缺点
共转化法	方法简单,操作容易,不需要构建复杂的载体系统	转化频率较低,而且目的基因和选择标记基因在转化细胞中要处于不连锁的状态,耗时长,不适合无性繁殖植物的转化
位点特异性重组系统	系统中的元件序列均不存留在无选择标记转基因植物中,目的基因的表达稳定	需要进行二次转化或杂交,费时,工作量大
转座子系统	比较方便直接地获得无选择标记的转基因植株	被修饰的转座子在被切除后往往会重新插入到基因组中的其他位置,引起其他基因的插入突变,耗时长,效率低
同源重组法	对序列特异性没有要求,同源序列之间严格地配对即可	重组频率低,耗时长,工作量大
多元自主转化载体系统	避免了有性杂交或二次转化的过程,两步再生法即可产生无标记基因的转化植株,染色体内重组不受杂交条件限制,省时省力	较长的世代交替影响遗传重组和后代分析

## 6 小结与展望

转基因生物技术发展到今天,已在社会经济发展中产生了不可忽视的作用,但其可能存在的潜在生物安全风险,影响转基因生物技术的推广作用<sup>[51-52]</sup>。特别是遗传转化时,用以筛选转基因植株的标记基因,大多是合成抗生素或除草剂等用量少、而使植物生长发育明显受阻的化学物质,在转基因植物与非转基因植物的区分筛选上敏感方便,在转基因植物的研究发展过程中,曾经起到了不可替代的作用。但是,随着转基因植物的广泛应用,人们对随目的基因一同转入植物的抗生素标记愈加担心和忌讳。尽管抗生素标记并不会随转基因产品在体内表达,对人体使用抗生素产生抗性,但人们总是担心食入人体所不需要的附带品,为此标记基因的存在成为转基因技术推广应用的障碍之一。

解决标记基因的安全性问题主要有2种策略:一是利用转基因植株后代遗传重组使选择标记与目的基因分离,或利用位点特异性酶将标记基因切除而获得无选择标记的转基因植株;二是使用生物安全标记基因替代抗生素标记或抗除草剂标记基因,主要为糖代谢、氨基酸代谢和抗逆基因等<sup>[53]</sup>。但是安全标记基因解决不了标记基因本身难以重复转化的问题。因此,培育无选择标记的转基因植物无论是从安全性考虑,还是从转基因技术本身考虑均具有重要意义。总结已报道的无标记转基因植物技

术,可以发现不同培育无选择标记转基因植物的方法也有着各自的优缺点。其中同源重组法具有明显的优势,缺点是重组率太低,目前的突破口是寻找能够提高重组率的因子或技术策略,将其发展成为一个很有希望的无标记转化技术平台。共转化法经过多年的发展,技术比较成熟,是使用最广泛的无标记技术。位点特异性重组系统由于其精确性和较高的重组频率,在无标记转化方面的应用越来越受到重视。MAT载体系统是新兴的比较理想的选择标记基因消除体系。

转基因植物中选择标记基因的剔除,不但可以省去费时、费力的选择标记基因的安全性评价过程,而且也从根本上解决了人们对选择标记基因的担心。我国作为农业和资源大国,也是粮食、蔬菜和水果等农产品的消费大国,安全转基因技术的开发和应用,对未来粮食安全有着重要的意义。无选择标记转基因技术无疑有着巨大的潜力和广阔的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] 李俊,刘翠琼,尹伟伦,等.转基因植物中标记基因研究概况[J].植物学报,2009,44(4):497-505
- [2] 陈松彪,李旭刚,王锋,等.无选择标记转基因植物的培育[J].中国生物工程,2005,25(2):1-7
- [3] Yoder J I, Goldsbrough A P. Transformation system for generating marker-free transgenic plants[J]. Biotechnology,

- 1994,12;263-267
- [4] Upadiyaya C P, Nookaraju A, Gururani M A, et al. An update on the progress towards the development of marker-free transgenic plants[J]. Botanical Studies, 2010, 51: 277-292
- [5] Zhao Z Y, Glassman K, Sewalt V, et al. Nutritionally improved transgenic sorghum[C]// Vasil I K. Plant biotechnology 2002 and beyond. Proceedings of the 10th IAPTC & B Congress. Kluwer Academic Publishers, 2003: 413-416
- [6] Nguyen T V, Thu T T, Claeys M, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum using an improved in vitro regeneration system[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2007, 91: 155-164
- [7] Ferradini N, Nicolia A, Capomaccio S, et al. Assessment of simple marker-free genetic transformation techniques in alfalfa [J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(11): 1991-2000
- [8] 于恒秀, 陆美芳, 陈秀花, 等. 不同转化方法培育无抗性选择标记转基因水稻效率的比较[J]. 中国水稻科学, 2009, 23(2): 120-126
- [9] Afolabi A S, Worland B, Snape J, et al. Multiple T-DNA co-cultivation as a method of producing marker-free (clean gene) transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plant[J]. African Journal of Biotechnology, 2005, 4: 531-540
- [10] Miller M, Tagliani L, Wang N, et al. High efficiency transgene segregation in co-transformed maize plants using an *Agrobacterium tumefaciens* 2 T-DNA binary system [J]. Transgenic Research, 2002, 11: 381-396
- [11] Shiva P N, Bhojaraja R, Shivbanchan S K, et al. Marker-free transgenic corn plant production through co-bombardment[J]. Plant Cell Reports, 2009, 28: 1655-1668
- [12] 张秀春, 彭明, 吴坤鑫, 等. 利用双 T-DNA 载体系统培育无选择标记转基因大豆[J]. 大豆科学, 2006, 25(4): 369-372
- [13] Zhou H Y, Chen S B, Li X G, et al. Generating marker-free transgenic tobacco plants by *Agrobacterium*-mediated transformation with double T-DNA binary vector [J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(9): 1103-1108
- [14] Zhang W, Subbarao S, Addae P, et al. Cre/lox mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107: 1157-1168
- [15] Kopertekh L, Broer I, Schiemann J. Developmentally regulated site-specific marker gene excision in transgenic *B. napus* plants [J]. Plant Cell Report, 2009, 28: 1075-1083
- [16] Wang Y, Chen B, Hu Y, et al. Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the Cre/lox site-specific recombination system[J]. Transgenic Research, 2005, 14(5): 605-614
- [17] Mlynarova L, Conner A J, Nap J P. Directed microspore specific recombination of transgenic alleles to prevent pollen mediated transmission of transgenes [J]. Plant Biotechnology Journal, 2006, 4: 445-452
- [18] 周洁, 陶玉峰, 府健, 等. 杨树无选择标记转基因体系的建立 [J]. 分子植物育种, 2011, 9(2): 230-237
- [19] Sreekala C, Wu L, Gu K, et al. Excision of a selectable marker in transgenic rice (*Oryzasativa* L.) using a chemically regulated Cre/loxP system [J]. Plant Cell Reports, 2005, 24: 86-94
- [20] Song H Y, Ren X S, Jun S I, et al. Construction of marker-free GFP transgenic tobacco by Cre/lox site-specific recombination system [J]. Agriculture Science of China, 2008, 7: 1061-1070
- [21] Zhang Y, Li H, Yang B, et al. Chemical induced auto excision of selectable markers in elite tomato plants transformed with a gene conferring resistance to lepidopteran insects [J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(16): 1247-1253
- [22] Jia H, Pang Y, Chen X, et al. Removal of the selectable marker gene from transgenic tobacco plants by expression of Cre recombinase from a Tobacco Mosaic Virus vector through *Agrobacterium* infection [J]. Transgenic Research, 2006, 15: 375-384
- [23] Cotsaftis O, Sallaud C, Breitler J C, et al. Transposon-mediated generation of T-DNA and marker-free rice plants expressing a Bt endotoxin gene [J]. Molecular Breeding, 2002, 10: 165-180
- [24] Chang Y C, Li K T, Tai H K, et al. An inducible transposon system to terminate the function of a selectable marker in transgenic plants [J]. Molecular Breeding, 2008, 21: 359-368
- [25] 金维正, 段瑞君, 张帆, 等. 利用 Ac/Ds 转座子系统在水稻中获得无选择标记转基因植株的方法 [J]. 生物工程学报, 2003, 19(6): 668-673
- [26] Dufourmantel N, Dubald M, Matringe M, et al. Generation and characterization of soybean and marker-free tobacco plastid transformants over-expressing a bacterial 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase which provides strong herbicide tolerance [J]. Plant Biotechnology, 2007, 5: 118-133
- [27] Khan R S, Nakamura I, Mii M. Production and selection of marker-free transgenic plants of *Petunia hybrida* using site-specific recombination [J]. Biologia Plantarum, 2010, 54(2): 265-271
- [28] Endo S, Sugita K, Sakai M, et al. Single-step transformation for generating marker-free transgenic rice using the *ipt*-type MAT vector system [J]. Plant Journal, 2002, 30: 115-122
- [29] Zuo J, Niu Q W, Moller S G, et al. Chemical regulated site-specific DNA excision in transgenic plants [J]. Nature Biotechnology, 2001, 19: 157-161
- [30] Matsunaga E, Sugita K, Ebinuma H. Asexual production of selectable-marker free transgenic woody plants, vegetatively propagated species [J]. Molecular Breeding, 2002, 10: 95-106
- [31] Ballester R, Cervera M, Peña L. Efficient production of transgenic citrus plants using isopentenyl transferase positive selection and removal of the marker gene by site specific recombination [J]. Plant Cell Reports, 2007, 26: 39-45
- [32] Bhatnagar M, Prasad K, Mathur P B, et al. An efficient method for the production of marker-free transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Plant Cell Reports, 2010, 29: 495-502

- [33] Lu H, Zhou X, Gong Z. Generation of selectable marker-free transgenic rice using double right-border (DBR) binary vectors [J]. *Plant Physiology*, 2001, 28: 241-248
- [34] 叶兴国, 秦华. 通过构建三段 T-DNA 载体高频率获得无标记转基因大豆植株的研究[J]. *生物工程学报*, 2007, 23(1): 138-144
- [35] McCormac A C, Wu H X, Bao M Z, et al. The use of visual marker genes as cell-specific reporters of *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery to wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Euphytica*, 1998, 99(1): 17-25
- [36] 刘香利, 赵惠贤, 郭嵩光. 位点特异性重组及其在剔除植物筛选标记基因中的应用[J]. *农业生物技术学报*, 2010, 18(3): 597-603
- [37] Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, 85: 5166-5170
- [38] Broach J R, Guarascio V R, Jayaram M. Recombination within the yeast plasmid 2 $\mu$ m circle is site-specific[J]. *Cell*, 1982, 29: 227-234
- [39] Jayaram M. Holliday junctions in FLP recombination: resolution by step-arrest mutants of FLP protein [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985, 82: 5875-5879
- [40] Araki H, Jeampipatkul A, Tatsumi H, et al. Molecular and functional organization of yeast plasmid pSRI [J]. *Journal Molecular Biology*, 1985, 182: 191-203
- [41] Chakraborti D, Sarkar A, Mondal H A. Cre/lox system to develop selectable marker-free transgenic tobacco plants conferring resistance against sap sucking homopteran insect [J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(10): 1623-1633
- [42] Hoff T, Schnorr K M, Mundy J. A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic plants[J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 45: 41-49
- [43] Cuellar W, Gaudin A, Solorzano D. Self-excision of the antibiotic resistance gene *npt II* using a heat inducible Cre/loxP system from transgenic potato [J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 162: 71-82
- [44] Sugita K, Kasahara T, Matsunaga E. A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency [J]. *Plant Journal*, 2000, 22: 461-469
- [45] Woo H J, Cho H S, Lim S H, et al. Auto-excision of selectable marker genes from transgenic tobacco via a stress inducible FLP/FRT site-specific recombination system [J]. *Transgenic Research*, 2009, 18: 455-465
- [46] Ma B G, Duan X Y, Niu J X, et al. Expression of stilbene synthase gene in transgenic tomato using salicylic acid-inducible Cre/loxP recombination system with self-excision of selectable marker [J]. *Biotechnology Letters*, 2009, 31: 163-169
- [47] Goldsbrough A P, Lastrella C N, Yoder J I. Transposition mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato [J]. *Biotechnology*, 1993, 11: 1286-1292
- [48] Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, et al. Selection of marker-free transgenic plants using the iso-pentenyl transferase gene [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94: 2117-2121
- [49] Zubko E, Scutt C, Meyer P. Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes [J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18: 442-445
- [50] Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E. Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker [J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20: 383-392
- [51] 曲瑛德, 陈源泉, 侯云鹏, 等. 我国转基因生物安全调查 I. 公众对转基因生物安全与风险的认知 [J]. *中国农业大学学报*, 2011, 16(6): 1-10
- [52] 曲瑛德, 陈源泉, 侯云鹏, 等. 我国转基因生物安全调查 II. 转基因生物风险交流的途径与优先内容 [J]. *中国农业大学学报*, 2011, 16(6): 11-19
- [53] 符勇耀, 杨迎伍, 邓伟, 等. 安全标记基因在转基因植物中的应用 [J]. *生物技术通报*, 2008, 6: 24-29

责任编辑: 袁文业