豆科基因组学与遗传学(网络版), 2011 年, 第 2 卷, 第 53-63 页
Douke Jiyinzuxue Yu Yichuanxue (online), 2011, Vol.2, 53-63
http://lgg.chinese.sophiapublisher.com

评述与展望
Progress and Review

豆科遗传转化标记基因研究进展

姚丙晨 [1], 刘春燕 [2], 韩雪 [2], 胡国华 [2,3], 陈庆山 [1]

1.东北农业大学农学院, 哈尔滨, 150030
2.黑龙江省农垦科研育种中心, 哈尔滨, 150090
3.国家大豆工程技术研究中心, 哈尔滨, 150050

通讯作者: Hugh757@vip.com, Qshchen@126.com; 作者

豆科基因组学与遗传学, 2011 年, 第 2 卷, 第 8 篇 DOI: 10.5376/lgg.cn.2011.02.0008
收稿日期: 2011 年 10 月 08 日
接受日期: 2011 年 11 月 12 日
发表日期: 2011 年 11 月 25 日

这是一篇采用《Creative Commons Attribution License》进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议引用格式:
姚丙晨等, 2011, 豆科遗传转化标记基因研究进展, 豆科基因组学与遗传学 Vol.2 No.8 (doi: 10.5376/lgg.cn.2011.02.0008)

摘 要 标记基因在植物基因工程中起着十分重要的作用，它在遗传转化中的作用是区分阳性和假阳性转化的细胞，以筛选并鉴定出阳性转化的细胞、组织和转基因植株。本文主要综述豆科牧草、作物、树木转基因植物研究中主要应用的标记基因、相应的检测方法及其现有标记基因的危害性。同时提出解决转基因植物安全性的主要策略，即删除标记基因、采用安全的标记基因以及建立无标记物载体的转化体系，并且重点介绍 5 种转基因安全标记。此外，还展望了安全标记的应用前景。

关键词 豆科; 转基因; 标记基因; 生物安全

Advances in the Study on Marker Genes in Legume Genetic Transformation

Yao Bingchen [1], Liu Chunyan [2], Han Xue [2], Hu Guohua [2,3], Chen Qingshan [1]

1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin, 150030
2. Land Reclamation Research and Breeding Centre of Heilongjiang, Harbin, 150090
3. The National Research Center of Soybean Engineering and Technology, Harbin, 150050

Corresponding author, Hugh757@vip.com, Qshchen@126.com; Authors

This paper was first published in Legume Genomics and Genetics, which redistributed in Chinese under the terms of the Creative Commons Attribution License.

Abstract Marker genes play an important role in plant genetic engineering, and it was applied to make a distinction between positive and false-positive transformed cells in genetic transformation system, and then to screen and identify the positive cells, tissues, and transgenic plants in genetic transformation system. This paper focus on reviewing the main application of the marker gene, the detection methods of corresponding marker gene and present danger of the existing marker gene in forage legumes, legumes crops, legumes trees, transgenic plant. At the same time, main strategies of the safety of transgenic plants, using removable marker genes, biosafety marker genes, and non-selective marker gene transformation system, have been proposed. And then five kinds of transgenic safety of marker gene were also introduced. Moreover, the perspectives were discussed to improve the safety of selectable marker genes in transgenic plants.

Keywords Legume, Transgenic, Maker gene, Biosafety

豆科是一个从一年生草本植物到多年生木本植物范围很大的家族，由于其具有固氮能力，因此它是在自然界和陆地生态系统中必不可少的成员。已被驯化的豆科植物在食品、饲料、纤维、工业、制药和花卉等多个方面发挥作用。模式豆科植物在试验系统中迅速发展，利用包括基因组学在内的分子生物学手段将可以解决一些重要的生物学问题。

高通量的转基因技术是功能基因组学的一个重要组成部分，利于鉴定基因功能。另一方面，转基因逐渐成为了作物改良的重要工具，其中抗除草剂大豆已占据了美国和阿根廷大豆种植的主要份额(王关林等, 2006)。转基因在理论上扩大了所要改善作物的基因来源，远远超过了有性杂交。转基因还提供了过表达或抑制者内源基因表达的办法。因

此，通过引进新的基因或者操纵内源基因的表达，生成新的表型对于作物改良和基因功能验证是非常有用的。但目前进行田间试验和被批准商业化应用的转基因豆科植物中都含有标记基因，这些传统的标记基因存在很大的弊端，因此现代育种学家发展了一些新的手段来克服这些问题，其中包括从转化植物中提取这些标记基因的方法，采用更加安全的标记基因或采用无载体、无标记的转化方法，这些标记基因的应用都对植物基因工程和遗传转化有着推动作用，本文拟对原有豆科植物转化常用的标记基因和以后的发展趋势做一综述。

1 现有的豆科植物遗传转化常用的标记基因

对于转基因作物产品的生物安全性质疑，最主要的问题是多数转基因体系用抗生素基因和抗除草剂基因等作为筛选标记。在植物遗传转化过程中，为了从大量的再生细胞中获得转化子，不得不将外源目的基因和标记基因一起转到植物细胞中，从而通过标记基因的某些抗性筛选出阳性转化子。在豆科植物转化体系中，现在常用的标记基因主要是抗卡那霉素基因，抗潮霉素基因和抗除草剂基因。

1.1 牧草转基因标记

牧草是重要的豆科植物，其中苜蓿和百脉根由于基因组简单和遗传转化简便已成了豆科基因功能研究的模式植物。Webb 等(1996)首先利用下胚轴为外植体，*aphl Ⅴ*基因为标记基因对百脉根牧草百脉根(*Lotus corniculatus*)品种 Leo 进行遗传转化，Trieu 和 Harrison (1996)第一次以子叶节为外植体，*Bar* 基因为标记基因对蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)品种 Jemalong 进行遗传转化获得成功。对于豆科牧草遗传转化很多学者在转基因标记上做出了大胆的尝试(见表 1)。

表 1 豆科牧草常用标记
Table 1 Common marker genes of legume grass

物种 Species	品种(品系) Cultivar(Line)	外植体 Explant	筛选 Selection		参考文献 References
			标记基因 Marker genes	药品 Agent	
紫云英 *Astragalus sinicus*	Japan	幼苗 Seedlings	*npt Ⅱ*	Kan	Cho et al., 1998
牧草百脉根 *Lotus corniculatus*	Leo	子叶 Leaves	*aphlⅤ*	Hyg	Webb et al., 1996
百脉根 *L. japonicus*	Gifu	下胚轴 Hypocotyls	*npt Ⅱ*, *hpt*	Kan, Hyg	Handberg and Stougaard, 1992
		幼苗 Seedlings	*npt Ⅱ*	Kan	Stiller et al., 1997
		下胚轴 Hypocotyls	*bar*	PPT	Lohar et al., 2001
蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula*	R108-1	子叶 Leaves	*npt Ⅱ*, *hph*	Kan, Hyg	Hoffmann et al., 1997
	Jemalong J5, R108-1(C3)	花器官 Floral organs	*npt Ⅱ*	Kan	Kamat éet al., 2000
	R108-1(C3)	子叶 Leaves	*bar*, *npt Ⅱ*	PPT, Kan	Scholte et al., 2002
	Jemalong	子叶节 Cotyledons	*bar*	PPT	Trieu and Harrison, 1996
	Jemalong	花，幼苗 Flowers, seedlings	*bar*	PPT	Trieu et al., 2000
红三叶 *Trifolium pratense*	NEWRC	叶柄 Petiole pieces	*npt Ⅱ*	Kan	Quesenberry et al., 1996

1.2 豆科作物主要筛选标记

豆科作物是重要的粮食和经济作物，对豆科作物的研究对改善人类的生活水平和动物的营养有很重要的意义。科学家对花生(*Arachis hypogaea*)、木豆(*Cajanus cajan* L. *Millsp.*)、鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)、瓜尔豆(*Cyamopsis tetragonoloba*)、大豆(*Glycine max*)、扁豆(*Lens culinaris Medik*)、羽扇豆(*Lupinus angustifolius*)、黄羽扇豆(*Lupinus luteus*)、宽叶菜豆(*Phaseolus acutifolius A. Gray*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、豌豆(*Pisum sativum*)、蚕豆(*Vicia faba*)、纳尔冯豆(*Vicia narbonensis*)、小豆(*Vigna angularis Willd. Ohwi/Ohashi*)、绿豆(*Vigna radiata* L. *Wilczek*)、豇豆(*Vigna sesquipedalis*)等的转基因标记基因进行了广泛的研究，主要的标记基因有 *hph* 基因、*npt II*基因、*GUS* 基因、*Bar* 基因等(见表 2)。

表 2 豆科作物常用标记基因
Table 2 Common marker genes of legume crops

物种 Species	品种(品系) Cultivar (Line)	外植体 Explant	筛选 Selection		参考文献 References
			标记基因 Marker gene	药品 Agent	
花生 *Arachis hypogaea*	Gajah, NC-7	体细胞胚 Embryogenic	*hph*	Hyg	Livingstone and Birch., 1999
	JL-24	子叶 Cotyledons	*npt II*	Kan	Sharma and Anjaiah, 2000
	AT120/VC1	体细胞胚 Embryogenic	*hph*	Hyg	Magbanua et al., 2000
	TMV-2	未成熟胚 Embryo axes non-tissue	*gusA*	Visual	Rohini and Rao, 2000
木豆 *Cajanus cajan* L. Millsp.	Hyderabad	胚轴 Embryonic axis	*npt II*	Kan	Lawrence et al., 2001
		胚轴和子叶节 Embryonic axes and cotyledary nodes	*npt II*	Kan	Satyavathi et al., 2003
鹰嘴豆 *Cicer arietinum*	PG1/PG12/Chafa/Turkey		*pat, npt II*	PPT, Kan	Krishnamurthy et al., 2000
瓜尔豆 *Cyamopsis tetragonoloba*	Lewis/Santa Cruz	胚轴 Embryonic axis	*npt II*	Kan	Joersbo et al, 1999a
大豆 *Glycine max*	Jack	子叶 Cotyledons	*hph*	Hyg	Santarem and Finer., 1999
	A3237	未成熟胚 Immature embryos	*bar*	PPT	Zhang et al., 1999
	Jack	子叶节 Cotyledonary node	*hpt*	Hyg	Yan et al., 2000
	BR-16/DokoPC/BR-19/Conquista	未成熟胚 Immature cotyledon	*ahas*	Imazapyr	Aragão et al., 2000
	Bert	胚轴 Embryonic axis	*hph*	Hyg	Olhoft et al., 2003
扁豆 *Lens culinaris Medik*	Laird/CDC599-23	子叶节 Cotyledonary node	*als*	Chlorsulfuron	Anju et al., 2002
羽扇豆 *Lupinus angustifolius*	Unicrop/Merrit	子叶节 Cotyledonary node	*bar*	PPT	Pigeaire et al., 1997

续表 2
Continuing table 2

物种 Species	品种(品系) Cultivar (Line)	外植体 Explant	筛选 Selection		参考文献 References
			标记基因 Marker gene	药品 Agent	
黄羽扇豆 *Lupinus luteus*	Wodjil/Popiel/Teo/Juno	腋芽 Axillary shoot embryonic axis	*bar*	PPT	Li et al., 2000
宽叶菜豆 *Phaseolus acutifoliusA.* Gray	NI576	顶端分生组织 Apical meristem	*npt Ⅱ*	G418	de Clercq et al., 2002
菜豆 *Phaseolus vulgaris*	Olathe/Carioca	芽外植体 Bud explants	*bar*	PPT	Aragão et al., 2002
豌豆 *Pisum sativum*	94-A26/Bolero/Hadlee/Crown/Courier/89T46.UK Laser, Heiga	胚轴 Embryonic axes	*npt Ⅱ*	Kan	Grant et al., 1998
		未成熟子叶 Immature cotyledons	*npt Ⅱ*, *Bar*	PPT, Kan	Nadolska-Orczyk and Orczyk, 2000
	Greenfeast/CDC Vienna/S2-90-25E/93-4-18G/MP1338/MP1382/AWPNZ66/AWP1512	子叶 Cotyledons	*npt Ⅱ*, *Bar*	PPT, Kan	Polowick et al., 2000
		胚轴 Embryonic axis	*als*	Chlorsulfuron	Polowick et al., 2000
蚕豆 *Vicia faba*	Mythos	胚轴 Embryonic axis	*npt Ⅱ*	Kan	Böttinger et al., 2001
纳尔冯豆 *Vicia narbonensis*	Var. narbonensis	上胚轴 Epicotyls	*npt Ⅱ*	G418	Zakharov et al，2004
小豆 *Vigna angularis* Willd. Ohwi/Ohashi	Beni-dainagon	上胚轴和茎尖 Epicotyls and shoot tips	*npt Ⅱ*	Kan	Yamada et al., 2001
绿豆 *Vigna radiata* L. Wilczek	K-851	上胚轴 Elongated epicotyls	*npt Ⅱ*	Kan	Jaiwal et al., 2001
豇豆 *Vigna sesquipedalis*	Koern	子叶节 Cotyledonary node	*bar*, *npt Ⅱ*	PPT, Kan	Ignacimuthu, 2000

1.3 豆科树种常用标记基因

Xie 和 Hong (2002)以 *npt Ⅱ*为标记基因，对马占相思(*Acacia mangium*)进行遗传转化获得成功，转化效率达到 10.2%。Han 等(1993)和 Igasaki 等(2000)分别以 *npt Ⅱ*基因和 *hpt* 基因为标记基因对刺槐(*Robinia pseudoacacia* L.)获得成功。

2 现有转基因标记面临的问题

目前绝大多数转基因标记基因仍然是抗生素和抗除草剂基因，这些基因及其对其产物对人和环境的许多方面都存在潜在的危机，受到有关专家学者的关注。现有转基因标记基因有以下不足：(1)生物安全性。第一，转基因标记是否有毒性，其编码的蛋白是否有毒性，过敏性现在我们还不能确定。第二，抗除草剂基因可通过花粉传播转移到野生近缘种体内，从而产生具有抗除草剂基因的“超级杂草”。尽管目前并没有确凿证据证明其危害性，但公众对安全性的关注大大推迟了转基因作物的商品化和市场运作(Ebinuma and Komamine, 2001; 侯爱菊等, 2003)。第三，抗生素抗性基因可能转移到消化道中的细菌中，形成“超级细菌”，虽然有的抗生素基因，如 *npt Ⅱ*虽然已经通过安全性评价，但并不能彻底消除人们对转基因植物的担心。(2)基因

堆积。目前，多数转基因作物只改变单一性状，而导入多个基因的复合育种、改良作物的复杂形状或者几个性状已成为育种学家的研究目标。由于转基因植物中存在标记基因，若要对转基因植物进行多次遗传转化将会受到一定的限制，多个同源基因的堆积会增加基因沉默的可能性(Vaucheret et al., 1998)。

3 解决转基因标记基因安全性策略

由于目前还不能对转基因产品的安全性进行准确的评估和评价，因此标记基因的安全性问题已成为国际上关注的热点问题，许多科学家正在致力于这方面的研究。现在的主要策略有：(1)删除利采用传统抗性基因获得的转基因植株中的标记基因；(2)建立无标记物载体的遗传转化体系；(3)开发生物安全性的标记基因。

3.1 转基因植物标记基因的消除

目前消除转基因植物中的传统标记基因有 4 种方法：共转化(Dale et al., 1991)、转座子介导再定位(Goldsbrough et al., 1993)、同源重组，位点特异性重组。其中，噬菌体 P1 的 Cre/Lox 体系是一个位点特异性重组体系，在多种生物种都具有活性(赵艳等, 2003; 陈颖等, 2001; 王立霞等, 2002)，应用最为广泛，缺点是 DNA 重组的几率很低，并要消耗大量的时间和精力。采用 AC/DS 转座子元件及 *attp* 位点间染色体内重组的消除过程比传统方法费时，需要进行有性杂交或者两步再生来获得理想的转基因植株。

另外，近年发展起来的双元载体和多元自主转化系统也显示了非常好的应用前景，采用这种载体不需要有性杂交过程也可能将选择标记基因消除，从而获得无标记基因的转基因植株(Ebinuma and Komamine, 2001; Xing et al., 2000)。

3.2 生物安全标记基因

在转化体系上应用这类标记基因的和传统标记基因的是不同，他并不是将非转化的细胞杀死，而是使转化的细胞处于某个有利的代谢或者发育条件下，从而筛选出转化植株。这种方法的主要优点在于选择药品无毒副作用，且在多数情况下有利于转化植株的再生，从而提高转化效率这类标记主要分为三类，即糖代谢相关基因、激素代谢相关基因和氨基酸相关代谢基因(高晓蓉, 2007; 杨英军和周鹏, 2005)。

3.2.1 糖类代谢酶标记基因

目前用于植物遗传转化的糖类代谢酶类标记基因主要有木糖异构酶基因(*xylose isomerase*, *xylA*)、核糖醇操纵子和磷酸甘露糖异构酶基因(*phosphomannse ismerase*, *pmi*) 3 种，应用木糖异构酶基因和磷酸甘露糖异构酶基因作为标记基因已有相关报道(Joersbo et al., 1999b; Paola et al., 2001)。

木糖异构酶基因能编码木糖异构酶，木糖异构酶能使 D-木糖与 D-木酮糖的可逆转变。在添加 D-木糖的筛选培养基上，转化的细胞能利用培养基中的 D-木糖而获得营养，而非转化的细胞因碳源不足而生长受到抑制。用 *xylA* 基因作为标记基因，以 *GUS* 为目的基因进行马铃薯转化，结果再生植株转化率为 32%，比利用 *npt II*作为选择基因高了 9 倍(Haldrup et al., 1998)。

D-甘露糖是由内源己糖激酶催化转化成 6-磷酸甘露糖，反应消耗能量；而磷酸甘露糖异构酶基因编码的 6-磷酸甘露糖转移酶，可使 6-磷酸甘露糖催化为 6-磷酸果糖。在添加 D-甘露糖的筛选培养基上，D-甘露糖不断被细胞转变成 6-磷酸甘露糖，但非转化的细胞将因缺乏 6-磷酸甘露糖转移酶不能继续代谢，造成 6-磷酸甘露糖的堆积，并消耗大量的 ATP，从而生长受限；但是转化的细胞则可以将 6-磷酸甘露糖催化转化为 6-磷酸果糖，继续代谢为细胞生长提供 ATP。目前，*pmi* 基因已广泛用于水稻(Paola et al, 2001)、玉米(Negrotto et al., 2000)、和甜菜(Joersbo et al., 1998)等植物的转化系统，转化水稻幼胚时，转基因植株中的标记基因 *pmi* 的转化效率为 41%，要比潮霉素抗性基因高一倍以上(Paola et al, 2001)。

核糖醇是一种广泛存在于自然界中的五碳糖之一，一般不能被细胞利用，但大肠杆菌 C 菌株却可以很好的利用它，只是因为其含有 *atl* 和 *rtl* 两个紧密串联的操纵子的结果(王兴春和杨长登, 2003)。La Fayette 和 Parrott (2001)构建成了以 *rtl* 操纵子片段为标记基因的质粒，然后将其转化到大肠杆菌 K12 菌株中，转化的菌株能在以核糖醇为碳源的培

养基上生长。虽然目前尚未见到该操纵子转化植物的报道，但受此启发，设想以 *rtl* 操纵子完全可以代替传统的标记基因作为一种生物安全标记应用于植物遗传转化中。

3.2.2 激素代谢激酶基因

这类的标记基因主要有异戊烯基转移酶(*isopentenyl trasferase*, *IPT*)基因(La Fayette and Parrott, 2001)、吲哚乙酰胺水解酶(*indole-3-acetamide hydrolase*, *iaaH*)基因(Ebinuma and Komamine, 2001)和 β-葡萄糖苷酸酶(*β-glucuronidase*, *GUS*)基因(Okkels et al, 1997)。使用这些标记基因通常会产生过量的激素，从而引起副作用，形成组织畸形，难以再生出正常形态的植株，因此最终这些标记基因均会被敲除或使其功能失活。

异戊烯基转移酶(*IPT*)基因可以编码异戊烯基转移酶，与吲哚乙酸(IAA)代谢有关。Ebinuma 等(1997)利用 35S 启动子启动该基因转化烟草时，可以使生长迟缓型的转化植株变为正常的植株，这是因为 *IPT*-Ac/Ds 的转座子作用的结果。*IPT* 基因已被广泛用作标记基因，与位点特异性重组酶系统或转座子系统向结合构建高效去除选择标记基因的安全转化系统。

3.2.3 氨基酸代谢相关基因

一些支链氨基酸的合成要经过天冬氨酸合成途径。Jaiwal 等(2002)认为合成支链氨基酸、赖氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸和异亮氨酸的天冬氨酸代谢途径中的酶可用作选择标记。其中天门冬氨酸激酶(*aspart-okinase*, *AK*)和二氢吡啶二羧酸合酶(*dihydrodipicolinate synthase*, *DHPS*)可以催化赖氨酸的合成，同时微量的赖氨酸也会对这两种酶产生反馈调节，从而起到限制赖氨酸积累的作用，最终因为甲硫氨酸消耗尽而使细胞死亡(Mills et al., 1980)。Perl 等(1992)发现源于大肠杆菌(*E. coli*)的这两种酶对赖氨酸不敏感，可作为植物遗传转化的筛选标记，转化的细胞能够在含有赖氨酸培养基中存活，而非转化的细胞则被杀死。

3.3 耐胁迫基因

这种筛选标记基因与传统抗性基因的作用原理相似，属于负筛选。标记基因的编码产物是一种酶，可以将对细胞生长有毒的化合物催化转变成无毒的化合物，从而使转化的细胞能在添加有毒化合物的培养基上进行生长，而非转化的细胞被杀死。这类标记基因的发展与对逆境的改进(或消除)有关，如今恶劣的生态环境恶化严重，其改善必然越来越受到重视。与此相关的基因主要有甜菜碱醛脱氢酶(*betaine aldehyde dehydrogenase*, *BADH*)基因(Daniell et al., 2001)，有机汞离子还原酶(*mercurius reducase*, *merA*)基因(Rugh et al., 1996)谷氨酸-1-半醛转氨酶(*glutamate-1-semialdehyde-aminotransferase*, *GSA-AT*)基因(Gough et al., 2001)。

Daniel 等在这方面进行了很多有益的尝试，以菠菜的 *BADH* 基因作为标记基因来转化烟草叶绿体基因组织，在培养基中添加甜菜碱醛提供筛选压力，与利用抗生素壮观霉素筛选相比，不仅得苗快，转化效率高，而且用 *BADH* 基因稳定整合到转基因烟草植株中，转基因植物中的甜菜碱醛脱氢酶活性比对照提高了 15~18 倍(Daniell et al., 2001)。

土壤中的一种细菌可以把甲基汞转变为离子汞，再由离子汞转变为单质汞，并把他排到体外。目前人们已经从细菌中分离出与之相关的基因 *merA* 和 *merB*，其中 *merA* 基因能够编码催化离子汞转化为单质汞的汞还原酶(*mercuric reductase*)，*merB* 基因可以编码催化甲基汞转化为离子汞的甲基汞裂解酶(*methylmercury lyase*)。两个基因先后作用就会将有机汞转化为气态的单质汞，同时单质汞的毒性很低，这样可使排放到大气中的汞降到安全的浓度。据此道理，*merA* 基因用于标记基因，在培养基中加入离子状态的汞盐作为筛选剂，转化的细胞具有转化有毒的离子汞为无毒的单质汞的能力，从而存活下来，非转化的细胞则受离子汞毒害而死，从而达到筛选的目的。Yang 等(2003)第一次用拟南芥的 Actin 启动子驱动 *merA* 基因在花生中表达，证实了 *merA* 基因可用作标记基因的可行性。

这些基因均在不同的实验中被初步验证了可以作为标记基因，显示了它们广阔的应用前景。然而，迄今为止关于甜菜碱醛脱氢酶基因与谷氨酸-1-半醛转氨酶基因作为选择标记的成功报道均来自叶绿体基因组的遗传转化研究；而叶绿体的遗传转化体系目前尚不成熟，这势必会成为进行植物转化研究的限制因素。所以，考虑通过多种途径将这两种基因转入植物体内必将会更全面且更充分地

体现它们的价值。

3.4 荧光素酶基因和绿色荧光蛋白(GFP)基因

荧光素酶(*Luciferase*)是生物体内催化荧光素或脂肪醛氧化发光的一类酶的总称。由于荧光素酶其检测简便、灵敏、快速的特点，因此目前其在基因工程方面已成为广泛使用的报告基因(张菊梅等, 2001)，也有许多采用 *GFP* 基因作为标记基因的植物转化成功的报道(杨朝辉和雷建军, 2000)。

3.5 无标记基因植物转化方法的研究

标记基因的安全性已引起世界的关注，虽然科学家也开发了一些生物安全的标记基因，但是以上所有的标记基因都存在一些缺点与不足，如转化效率有待提高、检测过程有待完善、筛选剂有待优化、应用范围有待拓宽等。如果在植物遗传转化过程中，可以不使用标记基因就能获得含目的基因的转基因植株，是最经济和最理想的方法。因此有人针对这些问题设计出了无载体、无标记基因的植物遗传转化体系。de Vetten 等(2003)利用致病性强的农杆菌 AGL10 菌株侵染马铃薯外植体，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进行 PCR 检测，从而筛选出转化植株，转化效率达到 1%~5%。PCR 检测为阳性的转化植株中 45%在表型上表现出目的基因的性状。2006 年 Ahmad 等(2008)应用无选择标记基因的转化系统也获得了成功，夏志辉等(2006)利用双边界 T-DNA 载体通过根癌农杆菌介导法将水稻白叶枯病广谱抗性基因 *Xa21* 导入杂交稻重要恢复系 C418 中，通过对转基因后代的抗性鉴定和 PCR 辅助选择，获得了无标记和载体骨架序列的转基因 *Xa21* 纯合的抗白叶病水稻。

4 展望

标记基因在植物遗传转化中起着十分重要的作用，为获得真正的转入某性状基因的转化植株提供了有利的判断依据。因此，标记基因的发展已成了植物基因工程的研究热点。目前已报道了多种标记基因，它们的优势及局限性也分别不同。因此在植物遗传转化工作中，便要根据具体要求，选择适用的标记基因，以达到事半功倍的效果。

相较而言，生物安全的标记基因大多数来自植物本身，因此不必担心“基因逃逸”和“超级杂草”的产生，并且不会破坏生态平衡等，从而避免了由于转基因标记而引起的安全争议。大量的文献也报道了这类安全标记基因的转化效率显著高于传统的抗性标记基因，并且其转化的程序类似于传统的抗性标记，同时个别标记基因还可作为目的基因而存在，因此应用安全的标记基因对植物的转化意义更大，实现了转化一次转移两个基因的目的。在豆科遗传转化过程中，已经开始应用了 IPT (Zhang et al, 2009)、GFP (李文霞等, 2008)、无载体无标记转化体系(高晓蓉, 2007)、标记删除(刘海坤, 2005,中国科学院研究生院，pp.63-81)等方法解决现有常用抗生素抗性基因和除草剂抗性基因给我们带来的困惑。我们深信随着研究的不断深入和科技的进步必定会出现更加多样性的生物安全性、非抗性标记基因，并且它们一定会在豆科遗传转化中得到更为广泛的应用。

作者贡献

姚丙晨完成本文初稿的写作；刘春燕、韩雪提供部分相关文献；陈庆山、胡国华指导本文的写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由转基因专项(2009ZX08009-013B)，现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-04-02A)资助。

参考文献

Ahmad R., Kim Y.H., Kim M.D., Phung M.N., Chung W.I., Lee H.S., Kwak S.S., and Kwon S.Y., 2008, Development of selection marker-free transgenic potato plants with enhanced tolerance to oxidative stress, Journal of Plant Biology, 51(6): 401-407

Anju G., Pat S., and Alan M., 2002, Production of fertile transgenic lentil (*Lens culinaris Medik*) plants using particle bombardment, In vitro Cellular and Developmental Biology, 38(4): 316-324

Aragão F.J.L., Sarokin L., Vianna G.R., and Rech E.L., 2000, Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean (*Glycine max* (L.) *Merril*) plants at a high frequency, Theor. Appl. Genet., 101(1-2): 1-6

Aragão F.J.L., Vianna G.R., Albino M.M.C., and Rech E.L., 2002, Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium, Crop Science, 42(4): 1298-1302

Böttinger P., Steinmetz A., Schieder O., and Pickardt T., 2001,

Agrobacterium mediated transformation of *Vicia faba*, Molecular Breeding, 8(8): 243-254

Chen X.L., Nguyen H.T., Yuan Z., Zhang J., 2009, 可提高农杆菌接到的大豆转化效率的 PSAG12-IPT 及其副作用, 第八届世界大豆会论文摘要集, 24

Chen Y., Jiang H., and Wang X.Z., 2001, Transformation systems for generating marker-free transgenic plants, Shengwu Gongcheng Jinzhan (Progress in Biotechnology), 21(2): 4-7 (陈颖, 姜鸿, 王兴智, 2001, 无选择标记基因植物转化系统研究进展, 生物工程进展, 21(2): 4-7)

Cho H.J., Widholm J.M., Tanaka N., Nakanishi Y., and Murooka Y., 1998, *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and regeneration of the legume *Astragalus sinicus* (Chinese milk vetch), Plant Science, 138(1): 53-65

Dale E.C., and Ow D.W., 1991, Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome, Proceedings of the National Academy of Sciences, 88(23): 10558-10562

Daniell H., Muthukumar B., and Lee S.B., 2001, Marker free transgenic plants: Engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection, Current Genetics, 39(2): 109-116

de Clercq J., Zambre M., van Montagu M., Dillen W., and Angenon G., 2002, An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius* A. Gray, Plant Cell Reports, 21(4): 333-340

de Vetten N., Wolters A.M., Raemakers K., Van der Meer I., Ter Stege R., Heeres E., Heeres P., and Visser R., 2003, A transformation method for obtainingmarker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop, Nature Biotechnology, 21(4): 439-442

Ebinuma H., Sugita K., Matunaga E., Endo S., and Kasahara T., 2001, Selection of marker-free transgenic plants using the oncogenes (IPT, RoLA B, C) of Agrobacterium as seleetable markers, In Molecular Biology of woody Plants, Edited by Jam S.M., Minoeha S.C., Netherl and: Kluwer Academic Publishers, pp.24-26

Ebinuma H., and Komamine A., 2001, MAT (multi-auto-trans-formation) vector system, the onocgenes of agrobacterium as positive markers for regeneration and selection of marker free transgenic plants, *In Vitro* Cellular Developmental BiologyPlant, 37(2): 103-113

Ebinuma H., Sugita K., Matsunaga E., and Yamakado M., 1997, Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene, Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(6): 2117-2121

Gao X.R., 2007, The production of vector-free and marker-free transgenic soybean expressing a phytase gene, Thesis for Ph.D., Dalian University of Technology, Supervisor: An L.J., pp.62-83 (高晓蓉, 2007, 无载体无标记转植酸酶基因大豆的获得, 博士学位论文, 大连理工大学, 导师: 安利佳, pp.61-83)

Goldsbrough A.P., Albrecht H., and Stratford R., 1993, Salicylic acid-inducible binding of a tobacco nuclear protein to a 10 bp sequence which is strongly conserved amongst stress-inducible genes, The Plant Journal, 3(4): 563-571

Gough K.C., Hawes W.S., Kilpatrick J., and Whitelam G.C., 2001, Cyanobacterial GR6 glutamate−1−semialdehyde aminotransferase: A novel enzyme-based selectable marker for plant transformation, Plant Cell Reports, 20(4): 296-300

Grant J.E., Cooper P.A., Gilpin B.J., Hoglund S.J., Reader J.K., Pither-Joyce M.D., and Timmerman-Vaughan G.M., 1998, Kanamycin is effective for selecting transformed peas, Plant Science, 139(2): 159-164

Haldrup A., Petersen S.G., and Okkels F.T., 1998, Positive selection: A plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry, Plant Cell Reports, 18(1-2): 76-81

Han K.H., Keathley D.E., Davis J.M., and Gordon M.P., 1993, Regeneration of a transgenic woody legume (*Robinia pseudoacacia* L., *black locust*) and morphological alterations induced by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation, Plant Science, 88(2): 149-157

Handberg K., and Stougaard J., 1992, *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics, The Plant Journal, 2(4): 487-496

Hoffmann B., Trinh T.H., Leung J., Kondorosi A., and Kondorosi E., 1997, A new *Medicago truncatula* line with superior *in vitro* regeneration, transformation, and symbiotic properties isolated through cell culture selection, Molecular Plant-Microbe Interactions, 10(3): 307-315

Hou A.J., Zhu Y.M., Zhang J., Li J., and Zhang B.B., 2003, Using of selective marker gene in transgenic plants and its removal, Yichuan (Hereditas (Bingjing)), 25(4): 466-470 (侯爱菊, 朱延明, 张晶, 李杰, 张彬彬, 2003, 转基因植物中筛选标记基因的利用及消除, 遗传, 25(4): 466-470)

Igasaki T., Mohri T., Ichikawa H., and Shinohara K., 2000, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Robinia pseudoacacia*, Plant Cell Reports, 19(5): 448-453

Ignacimuthu S., 2000, *Agrobacterium*-mediated transformation of *Vigna sesquipedalis* Koern (*asparagus bean*), Indian Journal of Experimental Biology, 38(5): 493-498

Jaiwal P.K., Kumari R., Ignacimuthu S., Potrykus I., and Sautter C., 2001, *Agrobacterium* tumefaciens mediated genetic transformation of mungbean (*Vigna radiata* L. *Wilczek*) - a recalcitrant grain legume, Plant Science, 161(2): 239-247

Jaiwal P.K., Sahoo L., Singh N.D., and Singh R.P., 2002, Strategies to deal with the concern about marker genes in transgenic plants: Some environment-friendly approaches, Current Science, 83(2): 128-136

Joersbo M., Brunstedt J., Marcussen J., and Okkels F.T., 1999a, Transformation of the endospermous legume guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) and analysis of transgene transmission, Molecular Breeding, 5(6): 521-529

Joersbo M., Donaldson I., Kreiberg J., Petersen S.G., Brunstedt J., and Okkels F.T., 1998, Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet, Molecular Breeding, 4(2): 111-117

Joersbo M., Peterson S.G., and Okkels F.T., 1999b, Parameters interacting with mannose selection employed for the production of transgenic sugar beet, Physiologia Plantarum, 105(1): 109-115

Kamat é K., Rodriguez-Llorente I.D., Scholte M., Durand P., Ratet P., Kondorosi E., Kondorosi A., and Trinh T.H., 2000, Transformation of floral organs with GFP in *Medicago truncatula*, Plant Cell Reports, 19(7): 647-653

Krishnamurthy K.V., Suhasini K., Sagare A.P., Meixner M., De Kathen A., Pickardt T., and Schieder O., 2000, *Agrobacterium* mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) embryo axes, Plant Cell Reports, 19: 235-240

La Fayette P.R., and Parrott W.A., 2001, A non-antibiotic marker for amplification of plant transformation vectors in *E. coil*, Plant Cell Reports, 20(4): 338-342

Lawrence P.K., and Koundal K.R., 2001, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of pigeon pea (*Cajanus cajan* L. *Millsp.*) and molecular analysis of regenerated plants, Current Science, 80(11): 1428-1432

Li H., Wylie S.J., and Jones M.G.K., 2000, Transgenic yellow lupin (*Lupinus luteus*), Plant Cell Reports, 19(6): 634-637

Li W.X., Ning H.L., Lv W.H., and Li W.B., 2008, Optimization of the Agrobacterium-mediated transformation systems of soybean cotyledonary node, Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica), 41(4): 971-977 (李文霞, 宁海龙, 吕文河, 李文滨, 2008, 农杆菌介导大豆子叶节转化系统的优化, 中国农业科学, 41(4): 971-977)

Livingstone D.M., and Birch R.G., 1999, Efficient transformation and regeneration of diverse cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by particle bombardment into embryogenic callus produced from mature seeds, Molecular Breeding, 5(1): 43-51

Lohar D.P., Schuller K., Buzas D.M., Gresshoff P.M., and Stiller J., 2001, Transformation of *Lotus japonicus* using the herbicide resistance *bar* gene as a selectable marker, Journal of Experimental Botany, 52: 1697-1702

Magbanua Z.V., Wilde H.D., Roberts J.K., Chowdhury K., Abad J., Moyer J.W., Wetzstein H.Y., and Parrott W.A., 2000, Field resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) expressing an antisense nucleocapsid gene sequence, Molecular Breeding, 6(2): 227-236

Mills W.R., Lea P.J., and Miflin B.J., 1980, Photosynthetic formation of the aspartate family of amino acids in isolated chloroplasts, Plant Physiology, 65(6): 1166-1172

Nadolska-Orczyk A., and Orczyk W., 2000, Study of the factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of pea (*Pisum sativum* L.), Molecular Breeding, 6(2): 185-194

Negrotto D., Jolley M., Beer S., Wenck A.R., and Hansen G., 2000, The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation, Plant Cell Reports, 19(8): 798-803

Okkels F.T., Ward J.L., Joersbo M., 1997, Synthesis of cytokininglucuronides for the selection of transgenic plant cells, Phytochemistry, 46: 801-804

Olhoft P.M., Flagel L.E., Donovan C.M., and Somers D.A., 2003, Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method, Planta, 216(5): 723-735

Paola L., Ye X., and Ingo P., 2001, Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent, Molecular Breeding, 7(1): 43-49

Perl A., Galili S., Shaul O., Ben-Tzvi I., and Galili G., 1992, Bacterial dihydrodipic olinate synthase and desensitied aspartate kinase: Two novel selectable markers for plant transformation, Biotechnology (NY), 11(6): 715-718

Pigeaire A., Abernethy D., Smith P.M., Simpson K., Fletcher N., Lu C.Y., Atkins C.A., and Cornish E., 1997, Transformation of a grain legume (*Lupinus anGUStifolius* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to shoot apices, Molecular Breeding, 3(5): 341-349

Polowick P.L., Quandt J., and Mahon J.D., 2000, The ability of pea transformation technology to transfer genes into peas adapted to western Canadian growing conditions, Plant

Science, 153(2): 161-170

Quesenberry K.H., Wofford D.S., Smith R.L., Krottje P.A., and Tcacenco F., 1996, Production of red clover transgenic for neomycin phosphotransferase Ⅱ using *Agrobacterium*, Crop Science, 36(4): 1045-1048

Rohini V.K., and Rao K.S., 2000, Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.): A non-tissue culture based approach for generating transgenic plants, Plant Science, 150(1): 41-49

Rugh C.L., Wilde H.D., Stack N.M., Thompson D.M., Summers A.O., and Meagher R.B., 1996, Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants epressing a modified bacterial *merA* gene, Proceedings of the National Academy of Sciences, 93(8): 3182-3187

Santarem E.R., and Finer J.J., 1999, Transformation of soybean (*Glycine max* (L.) *Merrill*.) using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium, In Vitro Cellular & Developmental Biology, 35(6): 451-455

Satyavathi V., Prasad V., Khandelwal A., Shaila M., and Sita L.G., 2003, Expression of hemagglutinin protein of Rinderpest virus in transgenic pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) *Millsp*.) plants, Plant Cell Reports, 21(7): 651-658

Scholte M., d'Erfurth I., Rippa S., Mondy S., Cosson V., Durand P., Breda C., Trinh H., Rodriguez-Llorente I., Kondorosi E., Schultze M., Kondorosi A., and Ratet P., 2002, T-DNA taging in the model legume *Medicago truncatula* allows efficient gene discovery, Molecular Breeding, 10(4): 203-215

Sharma K.K., and Anjaiah V., 2000, An efficient method for the production of transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation, Plant Science, 159(1): 7-19

Stiller J., Martirani L., Tuppale S., Chian R.J., Chiurazzi M., and Gresshoff P.M., 1997, High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicas*, Journal of Experimental Botany, 48(312): 1357-1365

Trieu A.T., and Harrison M.J., 1996, Rapid transformation of Medicago truncatula: Regeneration via shoot organogenesis, Plant Cell Reports, 16: 6-11

Trieu A.T., Burleigh S.H., Kardailsky I.V., Maldonado-Mendoza I.E., Versaw W.K., Blaylock L.A., Shin H., Chiou T.J., Katagi H., Dewbre G.R., Weigel D., and Harrison M.J., 2000, Transformation of Medicago truncatula via infiltration of seedlings or flowering plants with Agrobacterium, The Plant Journal, 22(6): 531-541

Vaucheret H., Béclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J.B., Mourrain P., Palauqui J.C., and Vernhettes S., 1998, Transgene-induced gene silencing in plants, The Plant Journal, 16(6): 651-659

Wang G.L., Sun Y.J., Na J., Li H.Y., Fang H.J., 2006, Progress and Problems of Commercial Production to Transgenic Plants in China, Scientia Agricultura Sinica, 39(7): 1328-1335 (王关林, 孙月剑, 那杰, 李洪艳, 方宏筠, 2006, 中国转基因植物产业化的研究进展及存在问题, 39(7): 1328-1335)

Wang L.X., Wang Y., Hu Y.L., Gao Y., and Lin Z.P., 2002, Progress in the study of the structure and function of *Cre* recombinase, Shengwu Gongchen Xuebao (Chinese Journal of Biotechnology), 18(5): 531-536 (王立霞, 王勇, 胡鸢雷, 高音, 林忠平, 2002, *Cre* 重组酶结构与功能的研究进展, 生物工程学报, 18(5): 531-536)

Wang X.C., and Yang C.D., 2003, Biosafe marker genes and their novel approaches, Zhongguo Shengwu Gongcheng Zazhi (Progress In Biotechnology), 23(4): 19-22 (王兴春, 杨长登, 2003, 转基因植物生物安全标记基因, 中国生物工程杂志, 23(4): 19-22)

Webb K.J., Gibbs M.J., Mizen S., Skot L., and Gatehouse J.A., 1996, Genetic transformation of *Lotus corniculatus* with *Agrobacterium tumefaciens* and the analysis of the inheritance of transgenes in the T1 generation, Transgenic Research, 5(5): 303-312

Xia Z.H., Li X.B., Chen C.Y., Fan H.K., Jiang G.H., Zhu L.H., and Zhai W.X., 2006, Generation of selectable marker-free and vector backbone sequence-free *Xa21* transgenic rice, Shengwu Gongcheng Xuebao (Chinese Journal of Biotechnology), 22(2): 204-210 (夏志辉, 李晓兵, 陈彩艳, 范海阔, 江光怀, 朱立煌, 翟文学, 2006, 无选择标记和载体骨干序列的 *Xa21* 转基因水稻的获得, 生物工程学报, 22(2): 204-210)

Xie D.Y., and Hong Y., 2002, Agrobacterium-mediated genetic transformation of Acacia mangium, Plant Cell Reports, 20(10): 917-922

Xing A.Q., Zhang Z.Y., Sato S., Staswick P., and Clemente T., 2000, The use of the two T-DNA binary system to derive marker-free transgenic soybeans, In vitro Cellular and Developmental Biology, 36(6): 456-463

Yamada T., Teraishi M., Hattori K., and Ishimoto M., 2001, Transformation of azuki bean by *Agrobacterium tumefaciens*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 64(1): 47-54

Yan B., Srinivasa Reddy M.S., Collins G.B., and Dinkins R.D., 2000, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation

of soybean (*Glycine max* (L.) *Merrill*.) using immature zygotic cotyledon explants, Plant Cell Reports, 19(11): 1090-1097

Yang C.H., and Lei J.J., 2000, Advances in the study of the green gluorescent protein gene, Shengwuxue Zazhi (Journal of Biology), 17(5): 12-14 (杨朝辉, 雷建军, 2000, 绿色荧光蛋白基因研究进展, 生物学杂志, 17(5): 12-14)

Yang H.Y., Nairn J.N., and Ozias-Akins P., 2003, Transformation of peanut using a modified bacterial mercuricion reductase gene driven by an actin promoter from *Arobidopsis thaliana*, Journal of Plant Physiology, 160(8): 945-952

Yang Y.J., and Zhou P., 2005, Advances in the study on marker genes in transgenic plants, Yichuan (Hereditas (Bingjing)), 27(3): 499-504 (杨英军, 周鹏, 2005, 转基因植物中的标记基因研究新进展, 遗传, 27(3): 499-504)

Zakharov A., Giersberg M., Hosein F., Melzer M., Muntz K., and Saalbach I., 2004, Seed-specific promoters direct gene expression in non-seed tissue, Journal of Experimental Botany, 55(402): 1463-1471

Zhang H.J., Wu Q.P., Zhou X.Y., Guo W.P., Wu H.Q., and Wang W.P., 2001, Review of luciferase, Weishegnwuxue Tongbao (Microbiology), 28(5): 98-101 (张菊梅, 吴清平, 周小燕, 郭伟鹏, 吴慧清, 王元平, 2001, 荧光素酶研究进展, 微生物学通报, 28(5): 98-101)

Zhang Z.Y., Xing A.Q., Staswick P., and Clemente T.E., 1999, The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 56(1): 37-46

Zhao Y., Wang H.Z., Yu Y.C., and Huang D.N., 2003, The new safe strategy on the marker genes in transgenic plant, Yichuan (Hereditas (Bingjing)), 25(1): 119-122 (赵艳, 王慧中, 于彦春, 黄大年, 2003, 转基因植物中标记基因的安全性新策略, 遗传, 25(1): 119-122)

BioPublisher是一个致力于发表生物科学研究论文、开放取阅的出版平台

在BioPublisher上发表论文，任何人都可以免费在线取阅您的论文

※同行评审，论文接受严格的高质量的评审
※在线发表，论文一经接受，即刻在线发表
※开放取阅，任何人都可免费取阅无限使用
※快捷搜索，涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
※论文版权，作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿：http://chinese.sophiapublisher.com