

评述与展望

Review and Progress

甘露糖安全选择体系在观赏植物转基因中的应用

孙佳琦[✉], 张启翔[✉]

北京林业大学园林学院, 国家花卉工程技术研究中心, 北京, 100083

✉ 通讯作者: zqx@bjfu.edu.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 4 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0004

收稿日期: 2011 年 12 月 29 日

接受日期: 2012 年 02 月 21 日

发表日期: 2012 年 02 月 24 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。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

孙佳琦, 张启翔, 2012, 甘露糖安全选择体系在观赏植物转基因中的应用, 分子植物育种(online) Vol.10 No.4 pp.1025-1031 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0004)

引用格式(英文):

Sun J.Q., and Zhang Q.X., 2012, Application of mannose safety selection system in transgenic ornamental plants, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.4 pp.1025-1031 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0004)

摘要 本文从已应用甘露糖安全选择体系的园艺植物种类、临界筛选浓度及影响该系统转化效率的因素等三个方面, 探讨了该体系在观赏植物转基因中的应用; 从甘露糖对人体和环境的安全性评价、甘露糖与其他筛选剂的价格比较和转化效率等三个角度讨论了甘露糖安全选择体系的应用前景; 同时, 从原理和应用两个角度探讨了该系统存在的问题: 该体系的作用原理使之不适用于少数内源 PMI 活性较高的植物种类, 而应用方面甘露糖筛选的临界浓度及转化效率存在较大差异。

关键词 甘露糖选择体系; *pmi* 基因; 安全转基因; 转基因观赏植物

Application of Mannose Safety Selection System in Transgenic Ornamental Plants

Sun Jiaqi[✉], Zhang Qixiang[✉]

College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, China National Engineering Research Center for Floriculture, Beijing, 100083

✉ Corresponding author, zqx@bjfu.edu.cn; ✉ Authors

Abstract In this review, we investigated the application of mannose safety selection system in transgenic ornamental plants from three aspects, including species of horticultural plants, critical selection concentration, and the factors affecting the transgenic efficiency. We also discussed the prospects for the application of mannose selection system from the following facets: human and environmental safety evaluations, the price comparisons between mannose and other safety selection systems, as well as the transgenic efficiency. Additionally, we examined the potential problems for the mannose safety selection system from both the principles and the application aspects. According to the principles of the system, the system does not apply to a small number of plant species with higher endogenous PMI activities. As for the application aspect, the critical selective concentration and transgenic efficiency was found to be quite different.

Keywords Mannose safety selection system; *pmi* gene; Safety transgene; Transgenic ornamental plants

研究背景

转基因技术于上世纪 80 年代问世以来已经有了长足的发展, 但是其安全性也引起了科学家和大众的普遍关注, 除了目的基因的安全性之外, 标记基因的安全性也遭到了强烈质疑。而利用安全标记基因是解决选择标记基因的生物安全性问题中一条简单有效的途径(王彩芬等, 2007)。

甘露糖安全选择体系, 是丹麦科学家 Morten Joersbo 在 1996 年首次报道。该体系以 *E.coli* 中的 *pmi* 基因, 即 6-磷酸甘露糖异构酶基因(6-phospho-mannose isomerase gene)为选择标记基因, 采用 D-甘露糖为选

择剂筛选转化苗与非转化苗(Joersbo and Okkels, 1996)。

甘露糖安全选择系统的作用机理为: 使用对人体和环境安全的 D-甘露糖代替抗生素和除草剂等作为选择剂, 由于缺少内源的磷酸甘露糖异构酶或活性很低, 绝大多数植物的细胞不能直接利用 D-甘露糖作为碳源, 只能在内源己糖激酶的作用下, 将甘露糖转化为 6-磷酸甘露糖。而转入 *pmi* 基因的转化苗, 可以在 *pmi* 的编码产物磷酸甘露糖异构酶(PMI) 的作用下, 将 6-磷酸甘露糖继续催化为 6-磷酸果糖(Joersbo et al., 1999) (图 1)。

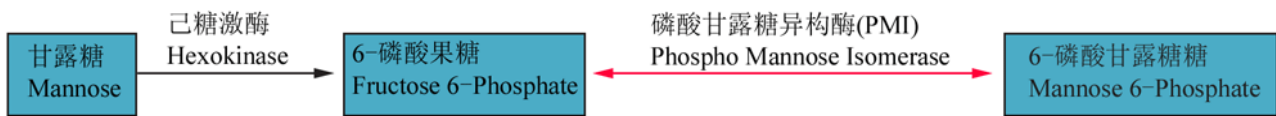


图1 甘露糖代谢
Figure 1 The metabolism of mannose

这样在含 D-甘露糖的选择培养基上, 转化细胞能够在 PMI 的催化下使甘露糖以 6-磷酸果糖的形式进入糖酵解途径, 将 D-甘露糖转化为可利用的碳源, 为细胞代谢提供能量, 从而促进转化苗的生长和增殖; 而非转化细胞由于缺失 PMI 基因而不能将 6-磷酸甘露糖转变成 6-磷酸果糖, 导致在细胞不断积累 6-磷酸甘露糖。6-磷酸甘露糖会与 6-磷酸果糖形成底物竞争关系, 使糖酵解途径受到抑制, 从而造成非转化苗的生长也受到抑制。因此, 转化细胞相对于非转化细胞就获得了竞争优势; 未转化细胞不会立即死亡, 而是处于碳饥饿状态, 因而也被称为阳性/正选择选择系统 (Joersbo et al., 1998; Joersbo and Okkels, 1996)。

近年来, 甘露糖安全选择系统发展较快, 已经有了一些该系统在水稻(杨莉等, 2005), 果树(王鸿和郝燕, 2011)等植物转基因中应用的阶段性综述, 但是其在观赏植物转基因中的应用进展却未见报道, 遂成本文。

1 甘露糖安全选择体系在观赏植物转基因中的应用

1.1 已应用甘露糖安全选择体系的园艺植物种类

自 1996 年创立以来, 甘露糖安全选择体系不断被各国科学家完善, 应用范围逐步扩大, 目前不仅在大田作物中得到了比较成熟的应用, 如水稻 (Ding et al., 2006), 玉米 (Negrotto et al., 2000), 小麦 (Gadaleta et al., 2006), 小米 (*Pennisetum glaucum*) (O'Kennedy et al., 2004), 油菜 (Wallbraun et al., 2009) 等, 而且在园艺作物中得到了一定程度的发展。从表 1 中可以看出, 甘露糖安全选择体系以在蔬菜作物中的发展较快; 而在园林植物中应用尚少, 仅在 7 种植物中初有尝试, 但是草本和木本植物却均有报道。

笔者注意到研究者们正为在更多的观赏植物中应用甘露糖安全选择体系而做准备。如日本香川

大学农学院的 Da Silva 利用薄层细胞培养(TCL)再生法, 评价了除蔗糖之外的 14 种碳源作为转基因菊花正选择剂的潜力; 其实验结果显示, 虽然在不定芽的再生过程中有观察到异形不定芽形成的现象, 但是甘露糖、木糖、乳糖和纤维素均可以作为转基因菊花的正选择剂 (Da Silva, 2004)。

1.2 甘露糖安全选择体系的临界筛选浓度

由于在培养基中添加蔗糖可以缓解甘露糖对植物细胞生长的抑制作用, 因此在用 *pmi* 基因作为选择标记基因进行筛选时, 培养基中通常添加蔗糖和甘露糖两种碳源。不同的植物种类适应不同的蔗糖甘露糖比, 即需要确定临界筛选浓度。Ku 等人在实验中将临界筛选浓度定义为, 甘露糖浓度再高不定芽就不再分化的浓度 (Ku et al., 2006)。Jain 等利用两步筛选来区分转化和非转化叶盘, 先添加低浓度 (1.5 g/L) 甘露糖, 使叶盘生根成活, 再提高浓度 (3 g/L) 选择三周, 以减少选择逃逸数量 (Jain et al., 2007)。而笔者根据实验 (数据未发表), 更推荐两步筛选确定最佳筛选浓度的实验设计方法, 既可以保证转化细胞的成活, 又可以有效的减少后期鉴定转化株的工作量。

不同植物的临界筛选浓度差别很大。较低的如甜菜, 为 1.5 g/L 甘露糖, 白菜型冬油菜为 7 g/L 甘露糖和 2% 蔗糖 (Min et al., 2007), 较高的如鹰嘴豆 (*Cicer arietinum* L.) 为 20 g/L 甘露糖初选, 随后生根培养基为 15 g/L 甘露糖 (Patil et al., 2009), 又如更高的甜橙为 25 g/L 甘露糖和 5 g/L 蔗糖 (曾黎辉等, 2008)。

1.3 影响甘露糖安全选择体系转化效率的因素

Joersbo 等研究认为有三个因素对甘露糖选择体系转化效率的影响起到关键性作用, 即选择培养基中添加的碳源种类、浓度, 以及磷酸盐, 而受体植物的基因型和光强等因素对转化率的影响不大 (Joersbo et al., 1999)。

表 1 甘露糖安全选择体系在观赏植物中的应用

Table 1 The application of mannose safety selection system in ornamental plants

类别	名称	参考文献	文献年份	
Category	Name	Reference	Published year	
蔬菜	甜菜	Joersbo and Okkels	1996	
	<i>Beta vulgaris</i>			
	木薯	Zhang et al.	2000	
	<i>Manihot esculenta</i>			
	西瓜	Reed et al.	2001	
	<i>Citrullus lanatus</i>			
	辣椒	Min et al.	2002	
Vegetables	<i>Capsicum annuum</i>			
	番茄	王仁厚和王兴智	2003	
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Wang R.H. and Wang X.Z.		
	洋葱	Aswath et al.	2006	
	<i>Allium cepa</i>			
	园林植物	NL-895 杨	续晨	2005
	Landscape plants	<i>NL-895 Populus</i>	Xu C.	
枫香		乔桂荣	2007; 2010	
<i>Liquidambar formosana</i>		Qiao G.R.		
夏堇		Li et al.	2007	
<i>Torenia fournieri</i>				
一球悬铃木		孙月华	2008	
<i>Platanus occidentalis</i>		Sun et al.		
长寿花		Ilczuk et al.	2009	
<i>Kalanchoe blossfeldiana</i>				
甘蔗		高世武等	2010	
<i>Saccharum L.</i>	Gao et al.			
菊花	于立刚等	2011		
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Yu et al.			

在转基因甜菜的甘露糖安全选择体系中, 几种不同的碳源都可以明显解除甘露糖的毒害作用, 解毒能力的大小依次为葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和果糖。其中, 当葡萄糖与甘露糖的浓度比达到 15 至 25 倍时, 可以完全消除甘露糖对甜菜细胞的毒害作用 (Joersbo et al., 1999)。高浓度的磷酸根离子能够减轻甘露糖对甜菜细胞的毒害作用, 而且转化率与培养基中磷酸根离子浓度呈显著的正相关(王彩芬等, 2007)。

近年的研究结果显示, 甘露糖系统的转化率在不同植物中存在较大差异, 但偶有近似, 这与当年 Joersbo 认为基因型影响较小的观点并不一致。如,

Lamblin 等(2007)转化亚麻的转化率最高为 6.4%, Ilczuk 等(2009)转化长寿花的转化率最高为 15%, Jain (2007)转化甘蔗时转化率高达 56%; Wallbraun 等(2009)转化油菜转化率最高为 24%, 这与 Degenhardt 等(2006)转化苹果时 24%的转化率近似。

即使是同一种系的不同品种也有很大差别, 并且不同的转化方式也对转化率存在很大影响(杨彩云等, 2009)。如在转基因甜橙中, 曾黎辉(2008)等构建的两种载体的转化率差异显著: pCAMB IA13-01PMI 载体的转化率为 27.7%, pBIPMI 载体的转化率仅为 12.7%, 而 Boscarior 等(2003)的转化率为 3%~23.8%。又如在转基因拟南芥中, 杨彩云等的阳

性筛选率高达 54%~60% (杨彩云等, 2009), 而 Todd 和 Tague (2001)的转化效率仅为 2.5%。

2 甘露糖安全选择体系的应用前景

2.1 对动物和环境安全

对一种选择体系进行生物安全评估包括对转基因植株的农艺性状分析、对生态环境的安全性分析、对标记或选择基因所编码的蛋白进行过敏性分析、毒性检测以及与食物中其它成分相互作用分析(王彩芬等, 2007)。

Privalle等(2002)安全评价研究的结果显示, PMI蛋白可以被完全消化, 并且对动物无毒也不会产生过敏反应。对植物来讲, PMI蛋白也无毒副作用, 不影响转基因植株的营养指标和农艺性状, 对环境安全(Reed et al., 2001)。而且, 欧盟食品安全局转基因生物专家组在对含有 *pmi* 基因的转基因玉米 MIR604, 进行有关 PMI 蛋白的安全性评价时, 也得出了

与 Reed 等人一直的检测结果(王鸿和郝燕, 2011)。

实际上, 虽然 *pmi* 基因只存在于少数几种植物中, 但是 *pmi* 基因却广泛分布于所有哺乳动物体内。因此, 以 *pmi* 基因为选择标记的转基因植物, 所产生的磷酸甘露糖异构酶(PMI)并不是一种新蛋白, 而是存在于几乎所有生物体中的天然物质(Patil et al., 2009)。

因此, 使用 *pmi* 基因作为选择标记的确是一种安全转基因的手段, 并能够缩短费时费力的转基因植物安全评价环节, 十分利于其大田推广和商品化应用。

2.2 筛选试剂价格低廉

由表 2 可以看出, 相同货源的情况下, 使用甘露糖作为筛选剂, 与常用的潮霉素和卡那霉素, 每 100 g 分别可以节省 ¥109 320.00 元和 ¥2 920.00 元, 极大的降低了转基因研究的经济成本。

表 2 北京地区相同货源的成本比较

Table 2 The cost comparison from same suppliers in Beijing

比较项目	潮霉素	卡那霉素	甘露糖
Items compared	Hygromycin	Kanamycin	Mannose
报价(¥/元)	1100/1g	180/5g	680/100g
Quotation price (¥/Yuan)			
价格差	162 倍	5.29 倍	-
Price margin	162 times	5.29 times	
节省(¥/元)	109320/100g	2920/100g	-
Amount saved			

2.3 转化效率高

如在转基因甜菜中, 用 PMI 选择系统的转化频率是传统的卡那霉素筛选体系的 10 倍(Joersbo et al., 1998), 同时, 转基因不定芽的生根频率也大大提高。

因为正选择剂对细胞不但没有毒害作用, 而且能够利用正选择标记基因的编码产物赋予转化细胞代谢上的优势, 从而促进转化细胞的再生; 非转化细胞不会被杀死, 只是生长受到抑制, 从而减少死亡的非转化细胞释放的毒素, 减少其对转化细胞的毒害, 所以可以大幅度提高转化效率。

综合考虑上述多种优势, 甘露糖选择系统在植物安全转基因的研究中, 必将具有较高的实用价值和广阔的应用前景。

3 甘露糖安全选择体系存在的问题

3.1 原理局限

根据该体系的作用原理, 对于少数内源 PMI 活性较高的种类, 如肉桂(*Cinnamomum cassia*) (杨彩云等, 2009)和大豆(Privalle et al., 2000)等, *pmi* 基因不能用于此类植物的安全转基因选择标记。

3.2 应用问题

3.2.1 甘露糖培养基的灭菌方法

建议在配置含甘露糖的筛选培养基时, 在高压灭菌之后温度下降到 50°~40°时, 再用过滤灭菌的方式将 D-甘露糖加入培养基中。因为笔者注意到不论是国内的全国优秀硕士论文还是期刊上的文章, 都没有对这个问题做明确的说明, 所以特此指出希望后来的研究者可以注意。

3.2.2 甘露糖筛选的敏感性问题

在细胞代谢的过程中, 6-磷酸甘露糖的积累, 磷酸根离子和 ATP 的消耗等问题会导致培养基的酸化。同时, 还有细胞内其他糖类代谢等生理因素的影响, 会使得外植体对甘露糖的敏感性有所下降。

另外, 笔者认为植物对甘露糖的敏感性与外植体的生理状况密切相关。如笔者在实验中发现, 菊花的零代组培苗与高代组培苗对甘露糖的敏感度存在较大差异: 以叶盘分化率作为拐点, 零代组培苗的临界筛选浓度为 8 g/L 甘露糖, 而高代组培苗临界筛选浓度仅为 4 g/L。

3.3.3 甘露糖的临界筛选浓度差别较大&筛选时间问题

在不同的植物种类中, 甘露糖的临界筛选浓度一致性不高且差别很大。如仅在建立了甘露糖选择体系的植物种类中, 就可在甜菜中 1.5 g/L (Joersbo et al., 1998)至甜橙中 25 g/L(曾黎辉等, 2008)的大范围内浮动, 相差 16.67 倍之多。因此, 在新的植物种类中开发甘露糖选择体系时, 需要设置跨越范围较大的梯度实验来摸索最佳的临界筛选浓度。

除了甘露糖筛选浓度和多步筛选以外, 杨彩云等在实验中还注意到了最佳筛选时间的问题, 如时间长了即使是长势好的外植体也会慢慢出现黄化。这是因为刚开始在筛选压下, 即使是阳性植株也不可能完全抵抗甘露糖, 只有经过几轮的筛选得到纯合体, 才能真正成为抗性苗(杨彩云等, 2009)。笔者认为这是一个值得注意的问题, 但是在已应用甘露糖筛选系统的转基因报道中, 筛选时间的问题并没有得到充分的认识。

3.3.4 甘露糖筛选的假阳性比例较大

在对甘露糖敏感的植物中, 与卡那霉素选择体系相比, 甘露糖安全选择体系的转化效率要高出数十倍, 但同时也增加了假阳性的比例。根据曾黎辉(2008)等的雪柑实验, 生长健壮的转化苗周围分化出的丛生芽有很高的假阳性比例。

台湾研究者 Chen 等(2010)曾在尝试将赖氨酸作为转基因筛选剂的文章中提到, 对新的转基因选择体系来说, 生根的植株很有可能不是假阳性, 而是真的转化苗。因为在外植体的接种、分化不定芽和生根的几个阶段里, 生根很可能个决定因素。

笔者认为, 对甘露糖选择体系来说, 可以综合利用形态、生化鉴定和分子鉴定的方法来提高转基因阳性苗的鉴定效率: 选取筛选培养基上的生根

苗, 先做氯酚红的生化反应鉴定, 然后取 pH 值有所下降的转化苗做分子鉴定, PCR 或 Southern 等方法均可。鉴定完成之后, 可以继续做表达分析, 如表达部位的确定, 实时表达量分析, 以及 PMI 蛋白含量测定等工作, 来解决 *pmi* 基因在哪里表达, 何时表达, 表达了多少等问题。

作者贡献

第一作者孙佳琦在对转基因菊花的甘露糖安全筛选的实验基础上, 完成文献的查阅、分析、比较和总结, 并负责论文的写作与修改。本文通讯作者为张启翔。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家 863 计划(2011AA100208)资助。

参考文献

- Aswath C.R., Mo S.Y., Kim D.H., and Park S.W., 2006, *Agrobacterium* and biolistic transformation of onion using non-antibiotic selection marker phosphomannose isomerase Vol. 25, Springer, pp. 92-99.
- Boscariol R.L., Almeida W.A.B., Derbyshire M., Mourao F.A.A., and Mendes B.M.J., 2003, The use of the PMI/mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Vol. 22, Springer, pp.122-128
- Chen I-Chieh, Thiruvengadam V., Lin W.D., Chang H.H., and Hsu W.H., 2010, Lysine racemase: a novel non-antibiotic selectable marker for plant transformation, *Plant Mol Biol.*, 72: 153-169
- Da Silva J.A.T., 2004, Evaluation of carbon sources as positive selection agents for chrysanthemum (*Dendranthema x grandiflorum*) transformation, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 32: 55-67
- Degenhardt J., Poppe A., Montag J., and Szankowski I., 2006, The use of the phosphomannose-isomerase/mannose selection system to recover transgenic apple plants, *Plant Cell Reports*, 25: 1149-1156
- Ding Z.S., Zhao M., Jing Y.X., Li L.B., and Kuang T.Y., 2006, Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of rice by phosphomannose isomerase/mannose selection, *Plant Molecular Biology Reporter*, 24: 295-303
- Gadaleta A., Giancaspro A., Blechl A., and Blanco A., 2006, Phosphomannose isomerase, *pmi*, as a selectable marker gene for durum wheat transformation Vol. 43, Elsevier, pp.31-37

- Gao SW., Que Y.X., Guo J.L., Xu L.P., and Chen R.K., 2010, Establishment of a novel selection system by mannose and its application in sugarcane transformation, *Redai Zuowu Xuebao* (Chinese Journal of Tropical Crops), 31(05): 789-796 (高世武, 阙友雄, 郭晋隆, 许莉萍, 陈如凯. 2010, 甘露糖筛选系统的建立及在甘蔗转基因中的应用, Academy of Agricultural Sciences, Supervisor: Wu Y.M. (郭倩倩, 2011, PMI筛选体系的建立及MHA-MLTB融合基因在百脉根中的表达, 硕士, 中国农业科学院, 导师: 吴燕民)
- Ilczuk A., Mibus H., Schmidt M., and Serek M., 2009, Use of the pmi/mannose selection system for genetic transformation of *kalanchoe blossfeldiana poelln*, *Propagation of Ornamental Plants*, 9: 207-215
- Jain M., Chengalrayan K., Abouzid A., and Gallo M., 2007, Prospecting the utility of a PMI/mannose selection system for the recovery of transgenic sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) plants, *Plant cell reports*, 26: 581-590
- 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: 111-117
- Joersbo M., Petersen S.G., and Okkels F.T., 1999, Parameters interacting with mannose selection employed for the production of transgenic sugar beet, *Physiologia Plantarum*, 105: 109-115
- Joersbo M., and Okkels F.T., 1996, A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection, *Plant Cell Reports*, 16: 219-221
- Ku J.J., Park Y., and Park Y.D., 2006, A non-antibiotic selection system uses the phosphomannose-isomerase (PMI) gene for *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese cabbage, *Journal of Plant Biology*, 49: 115-122
- Lamblin F., Aimé A., Hano C., Roussy I., Domon J.M., Van Droogenbroeck B., and Lainé E., 2007, The use of the phosphomannose isomerase gene as alternative selectable marker for *Agrobacterium*-mediated transformation of flax (*Linum usitatissimum*), *Plant Cell Reports*, 26: 765-772
- Li H.Q., Kang P.J., Li M.L., and Li M.R., 2007, Genetic transformation of *Torenia fournieri* using the PMI/mannose selection system, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90: 103-109
- McCue K.F., and Hanson A.D., 1990, Drought and salt tolerance: towards understanding and application Vol. 8, Elsevier, pp.358-362
- Min B.W., Yang S.G., and Ham C.H., 2002, A new selection system for pepper regeneration by mannose, *Plant Biotechnology*, 4: 129-134
- 热带作物学报, 31(05): 789-796
- Guo Q.Q., 2011, Influenza virus Hemagglutinin fused with *Escherichia. Coli* heat-labile enterotoxin B subunit expressed in *Lotus corniculatus* using Phosphomannose Isomerase as a selection marker, Thesis for M.S., Chinese
- Min B.W., Cho Y.N., Song M.J., Noh T.K., Kim B.K., Chae W.K., Park Y.S., Choi Y.D., and Harn C.H., 2007, Successful genetic transformation of Chinese cabbage using phosphomannose isomerase as a selection marker, *Plant Cell Reports*, 26: 337-344
- 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
- O'Kennedy M.M., Burger J.T., and Botha F.C., 2004, Pearl millet transformation system using the positive selectable marker gene phosphomannose isomerase, *Plant Cell Reports*, 22: 684-690
- Patil G., Deokar A., Jain P.K., Thengane R.J., and Srinivasan R., 2009, Development of a phosphomannose isomerase-based *Agrobacterium*-mediated transformation system for chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Plant Cell Reports*, 28: 1669-1676
- Privalle L.S., Wright M., Reed J., Hansen G., Dawson J., Dunder E.M., Chang Y.F., Powell M.L., and Meghji M., eds., 2000, Phosphomannose isomerase, a novel selectable plant selection system: mode of action and safety assessment, *Proceeding of the 6th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms*, University Extension Press, Saskatoon, Canada, pp.171-178
- Qiao G.R., 2008, Salt-tolerance transformation of *Liquidambar formosana* L. mediated by *Agrobacterium* with a positive selection system, Thesis for M.S., Chinese Academy of Forestry Sciences, Supervisor: Jiang J.M. (乔桂荣, 2008, 利用安全选择标记系统进行枫香耐盐转基因研究, 硕士, 中国林业科学研究院, 导师: 姜景名)
- Qiao G., Zhou J., Jiang J., Sun Y., Pan L., Song H., Jiang J., Zhuo R., Wang X., and Sun Z., 2010, Transformation of *Liquidambar formosana* L. via *Agrobacterium tumefaciens* using a mannose selection system and recovery of salt tolerant lines, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102: 163-170.
- Reed J., Privalle L., Powell M., Meghji M., Dawson J., Dunder E., Sutthé J., Wenck A., Launis K., Kramer C., Chang Y.F., Hansen G., and Wright M., 2001, Phosphomannose isomerase: An efficient selectable marker for plant

- transformation, *In Vitro Cellular & Developmental Biology -Plant*, 37: 127-132
- Sun Y.H., 2008, Tissue culture of *Plantanus occidentalis* L. and salt tolerant gene transformation with safe selection system, Thesis for M.S., Lanzhou University, Supervisor: Wang X.J. (孙月华, 2008, 北美一球悬铃木组织培养及利用安全筛选标记基因进行耐盐转基因研究, 硕士, 兰州大学, 导师: 王晓娟)
- Todd R., and Tague B.W., 2001, Phosphomannose isomerase: a versatile selectable marker for *Arabidopsis thaliana* germ-line transformation Vol. 19, Springer, pp.307-319
- Wallbraun M., Sonntag K., Eisenhauer C., Krzcal G., and Wang Y., 2009, Phosphomannose-isomerase (*pmi*) gene as a selectable marker for *Agrobacterium*-mediated transformation of rapeseed, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99: 345-351
- Wang C.F., Fu Y.C., Zhu Z.F., Xu J., Ge Z.Y., and Sun C.Q., A Security Selection System for Rice Transformation by Mannose, 2007, A security selection system for rice transformation by mannose, *Xibei Nongye Xuebao (Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica)*. 16(2): 41-45 (王彩芬, 付永彩, 朱作峰, 徐杰, 葛占宇, 孙传清, 2007, 水稻遗传转化甘露糖安全筛选体系的建立, *西北农业学报*, 16(2): 41-45)
- Wang H., and Hao Y., 2011, Application Progress of Safe Marker Gene *pmi* for Fruit Tree Transformation, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 38(05): 997-1002 (王鸿, 郝燕, 2011, 安全标记基因*pmi*在果树转基因研究中的应用进展, *园艺学报*, 38(05): 997-1002)
- Wang J., 2010, The Use of the PMI/Mannose selection system to recover transgenic *Chrysanthemum Morifolium* with PtDHAR gene, Thesis for M.S., Northeast Forestry University, Supervisor: Li Y.H. (王江, 2010, 以PMI基因为选择标记露地菊转PtDHAR基因体系的建立, 硕士, 东北林业大学, 导师: 李玉花)
- Wang R.H., and Wang X.Z., 2003, The expression of human acid fibroblast growth factor (aFGF) in transgenic tomato, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 1(03): 425-426 (王仁厚和王兴智, 2003, 利用转基因番茄表达人酸性成纤维细胞生长因子(aFGF), *分子植物育种*, 1(03): 425-426)
- Wang T., Li J.Y., Wu Y.M., and Liu J.X., 2008, Establishment of a positive selection system via mannose and application on genetic transformation of alfalfa, In: Liu J.X., ed., Tenth symposium of animal nutrition branch of Chinese association of animal science and veterinary medicine, China Technology and Science Publishing House Hangzhou, China, pp.257 (王婷, 李进军, 吴跃明, 刘建新, 2008, 甘露糖阳性选择系统的建立及在紫花苜蓿转基因中的应用, 见: 刘建新, 编著, 中国畜牧兽医学动物营养学分会第十次学术研讨会论文集, 中国农业科学技术出版社, 中国, 杭州, pp.257)
- Yang C.Y., Yin W.L., and Xia X.L., 2009, Establishment of positive selection system of mannose and application of genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 7(06): 1120-1129 (杨彩云, 尹伟伦, 夏新莉, 2009, 甘露糖正向筛选体系的建立及在拟南芥遗传转化中的应用, *分子植物育种*, 7(06): 1120-1129)
- Yang L., Xu C.J., and Chen K.S., 2005, Application of PMI/Mannose selective system in plant genetic transformation, *Linye Kexue (Scientia Silvae Sinicae)*, 41(03): 137-141 (杨莉, 徐昌杰, 陈昆松, 2005, PMI/甘露糖筛选体系在植物转基因中的应用, *林业科学*, 41(03): 137-141)
- Yu L.G., Xie L.N., Wang J., Zhang Y., and Li Y.H., 2011, Phosphomannose isomerase/mannose selection system to screen Lc14-3-3 transgenic chrysanthemum plants, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 06: 1139-1146 (于利刚, 解莉楠, 王江, 张旸, 李玉花, 2011, 以PMI为选择标记的露地菊转Lc-14-3-3基因体系的建立及功能鉴定, *园艺学报*, 06: 1139-1146)
- Zeng L.H., Xu H.F., Wang H.Q., Wu S.H., and Zhu Y.X., 2008, Construction of plant expression vectors with *Pmi* gene as selection marker and their utilization in transformation of *Citrus sinensis*, *Nongye Shengwu Jishu Xuebao (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 16(05): 858-864 (曾黎辉, 徐海峰, 王会全, 吴少华, 朱艺萱, 2008, *Pmi*基因作为选择标记的植物表达载体构建及其在雪柑转基因中的应用, *农业生物技术学报*, 16(05): 858-864)
- Zhang P., Potrykus I., and Puonti-Kaerlas J., 2000, Efficient production of transgenic cassava using negative and positive selection, *Transgenic Research*, 9: 405-415
- Zhang X.Y., Liang C., Wang G.P., Luo Y., and Wang W., 2010, The protection of wheat plasma membrane under cold stress by glycine betaine overproduction, *Biologia Plantarum*, 54: 83-88