

消除转基因植物中选择标记的研究进展

董文琦

(河北省农林科学院遗传生理研究所 石家庄 050051)

屈冬玉

王海波*

(中国农业科学院 北京 100081)(河北省植物基因工程中心 石家庄 050051)

摘要 从5个方面归纳了转基因植物中的选择标记可能产生的不利影响,总结分析了近年来有关去除转基因植物中选择标记的方法与原理、研究进展及存在的问题,指出建立不依赖选择标记的转基因技术更为重要,并提出具体策略。

关键词 转基因植物 去除 选择标记

Achievements on eliminating the selection marker of transgenic plant. DONG Wen-Qi(Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051), QU Dong-Yu(Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081), WANG Hai-Bo(Hebei Center of Plant Genetic Engineering, Shijiazhuang 050051), *CJEA*, 2004, 12(3):29~34

Abstract The selection marker in transgenic plant may influence gene expression, further transformation, plant characteristics, environment and public health. The ways and the principles, the research achievements and the problems on eliminating the selection marker were systematically reviewed. To establish the transformation methods without selection marker is more important than all the above.

Key words Transgenic plant, Eliminating, Selection marker

1986年PGS(Plant Genetic Systems)公司首次在美国和法国进行了转抗除草剂基因烟草田间试验^[5],此后转基因作物开始走向生产应用。据美国ISAAA公布的最新调查结果显示,截至2002年全球转基因作物种植面积约达5867万hm²,包括烟草、棉花、大豆、玉米、油菜、番茄、马铃薯和水稻等多种作物^[6]。我国是发展转基因作物较快的国家之一,目前已获得农业部批准进行商品化生产的有抗棉铃虫棉花、耐储存番茄、抗黄瓜花叶病毒番茄和甜椒、转变花色的矮牵牛等,1997年以来转Bt基因抗虫棉在华北平原大面积推广应用,大幅度减少杀虫剂施用量,节约了劳动成本,保护农田生态环境,提高了综合效益^[1]。转基因技术打破了物种间的生殖隔离,可利用来源广泛的基因定向改良目标生物,创造全新的生物品种,可开拓利用生物功能的新形式,这将大大推动农业由传统的资源依附型向智能型转变,但目前绝大多数转基因植物都是借助“筛选标记”而获得。

1 选择标记对作物、环境及人类的不利影响

目前转基因技术效率较低,外源基因整合到植物基因组中的频率通常为千分之几至百万分之几,因此目的基因的导入通常需串联易于识别的标记基因来选择,这种标记基因又称为“选择标记”或“筛选标记”^[2]。目前转基因过程中使用的“筛选标记”多为细菌编码的抗“抗生素”类基因(见表1),这些“标记”大大提高了选择转化子的准确性,但也带来(或潜伏)一系列问题,一是选择标记可能影响基因的表达,现有物种多经过千百万年的进化和自然选择、人工选择而来的,因此它们的基因组存在某种天然的合理性,虽尚无充足证据证明外源基因的进入一定会打破原有基因秩序的合理性,但这的确是不应忽略的问题。筛选标记的使用目前仅为准确地选择到转化子,转基因的目的是为把更多的有用基因转进去,而不应该让那些对植物生长发育无用的基因也带进去。大多数选择标记都是通过药物筛选发挥作用,持续的药物筛选往往会引起基因的重排,导致被改造生物的基因组发生变异。筛选标记随目的基因导入后有可能影响目的基因的表达,而转基因过

* 通讯作者

收稿日期:2003-05-08 改回日期:2003-06-20

表 1 目前植物转基因过程中普遍应用的选择标记

Tab. 1 The markers currently used in transgenic plants

类型 Types	代号 Gene	编码的酶 Gene product	作用 Function	
生长调节剂合成类	iaaM	色氨酸单氧化酶	使色氨酸转化为吲哚乙酸	
	iaaH	吲哚乙酰胺脱水酶	使色氨酸转化为吲哚乙酸	
	ipt	异戊烯基转移酶	合成异戊烯腺嘌呤	
抗“抗生素”基因类	npt	新霉素磷酸转移酶	抗卡那霉素、G418、巴龙霉素抗新霉素	
	cat	氯霉素乙酰转移酶	抗氯霉素	
	spt	链霉素磷酸转移酶	抗链霉素	
	aphIV	潮霉素磷酸转移酶	抗潮霉素	
	aacc3、aacc4	庆大霉素-3-N-乙酰转移酶	抗庆大霉素	
	ble	博来霉素抗性酶	抗博来霉素	
	bar	乙酰化酶	抗除草剂 PPT	
抗除草剂基因类	tfdA	2,4-D 单氧化酶	抗 2,4-二氯苯氧乙酸	
	aroA	EPSP 的突变体	抗 5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸	
	sul	二氢喋呤合成酶	抗磺胺类除草剂	
	csVI-1	乙酰乳酸合成酶	抗磺酰尿类除草剂	
	tdc	色氨酸脱羧酶	抗 4-甲基色氨酸	
	抗其他化学药物基因类	dhps	二氢二甲基吡啶酸合成酶	抗 S-氨乙基-L-半胱氨酸
		bxn	溴苯腈特异的水解酶	抗溴苯腈
psbA		抗莠去津 DI 蛋白	抗阿特拉律	
ak		天冬酰胺激酶	抗高浓度赖氨酸和苏氨酸	

程中常发生选择标记表达而目的基因不表达现象^[7]。二是选择标记可限制多个基因的转化,目前可有效用于转基因的筛选标记尚较少,较好效率的仅有 GUS、npt II、aphIV 和 bar 等几种。当对被改造植物进行多轮转化或同时转入多个非串联的基因时,现有的筛选标记则明显不够选用,若选用同一种筛选标记,当完成首轮转化后第 2 轮转化则无法进行,而同时进行多基因转化时则无法保证对每个基因均能有效选择;若选用多种筛选标记,则会造成不同选择标记的累加,从而产生更大的不利影响。有研究表明,外源基因不能在受体植物内稳定遗传和表达与多重转化中存在同源序列(如启动子、增强子、中止子等)有关^[3]。而人为导入许多相同的东西,往往会影响到被导入目的基因的表达或导致基因丢失。三是选择标记可能影响作物的某些性状,外源基因的插入会改变受体基因组的正常状况,若再加上一大段选择标记则更加剧此况。植物基因的表达要消耗其体内很多能量和原料,而选择标记的表达必然在一定程度上争夺能量和原料的分配,从而影响其他基因的表达。选择标记的表达产物多为蛋白质和酶类物质,既可改变植物产品的蛋白质构成,又影响植物生化合成与代谢的酶系统进而导致更复杂的物质组成变化,这些都会影响植物的生长发育,并造成许多不确定性。四是选择标记可能影响环境安全,目前应用最多的选择标记多为抗“抗生素”类基因和抗除草剂类基因,长期种植带有该种基因植物,其最大的环境不安全因素是这些基因有可能会向细菌和杂草“漂流”。来自细菌的抗“抗生素”类基因可通过自然转化(指自然条件下处于感受态的细菌吸收和整合外界环境中 DNA 的过程)转向土壤微生物,1999 年 Gebhand F. K. 等^[8]研究发现,未裂解的植物死细胞中 DNA 可保持数天自然转化活性,而活体植物中 DNA 则可在土壤中保存数月甚至 2 年转化活性,这表明转基因植物中 DNA 具有较充分的通过自然转化向土壤微生物漂流的机会,只要有自由 DNA 和感受态细菌的存在,自然转化就有可能发生,某些细菌如 *Acinetobacter* sp. BD413 pFG4Dnpt II 和 *RaLs-tonia solanacearum* pFG4Dnpt II 甚至不需特殊的感受态就能自然吸收、整合土壤中的 DNA,其发生频率估计为 $10^{-10} \sim 10^{-11}$ ^[9]。多数细菌必须在感受态时才能吸收和整合外源裸露 DNA 分子,感受态需在一定条件下诱导形成,如低温、 Ca^{2+} 等,自然条件下并不能排除存在诱导细菌达到感受态的可能性,且一同被转入植物基因组的细菌启动子、增强子和终止序列也会增加外源基因从转基因植物中转回细菌的可能性。带有抗除草剂标记的转基因植物,有可能通过花粉传播将抗除草剂特性漂流给近缘野生植物使之成为超级杂草,从而破坏生态平衡,改变自然生物种群。含有抗除草剂类基因的植物,遇到有选择压力的环境则表现出其抗性优势,目前已推广应用大量转抗除草剂基因的作

物,如2002年全世界转抗除草剂基因的玉米、大豆和棉花种植面积已达4420万 hm^2 (占转基因作物总面积的75%),这导致大量除草剂向环境中释放,为选择出通过基因漂流获得抗除草剂基因(包括抗除草剂标记)的超级杂草创造了条件。越大量使用除草剂,抗除草剂基因作为转基因标记的环境不安全性则越大,且这种基因若漂流给中介型植物则危险性更大,若侵入某种植物的起源中心就会造成种质污染。五是选择标记可能危及人身安全,转基因植株中大多数标记基因可表达相应的酶或蛋白质,这种产物参与植物产品营养成分中后究竟会对人体产生何种影响尚无安全可靠的评价,参与植物生化系统中后究竟会导致何种化学物质合成、并对人体产生何种影响尚无研究,这更增加转基因食物的不安全性。1996年美国林肯大学 Taylor S. L. 等^[10]撰文指出,美国 Pioneer Hi-Bred 种子公司的1种表达2S种子贮藏蛋白的转基因大豆可使对巴西豆过敏的人群产生过敏反应。1997年苏格兰 Rowett 研究所(RR1) Arpad Pusztai^[11]宣布,转雪花莲凝集素基因的马铃薯可延缓大鼠生长发育并破坏其免疫系统。1999年康奈尔大学 Losey J. E. 等^[12]发现,转 Bt 基因玉米花粉在实验室中可致死“君王”蝴蝶幼虫。这些结果虽针对目的基因和非相关生物,但已引起人们对标记基因会产生何作用以及外源基因会对人体有何伤害的关注。很多抗生素是人类控制疾病的重要武器,作为转基因标记的抗“抗生素”类基因若“漂流”转移到微生物(特别是病原物)中则会给人类带来巨大的负作用。因此随着转基因技术的发展,科学家们探索了有关去除选择标记的转化方法。

2 剔除选择标记的研究进展与存在问题

2.1 利用共转化系统

利用共转化系统(Co-transformation)去除选择标记,即将目的基因和选择标记分别整合于2个T-DNA,将其构建于1个载体或分别构建于2个载体以此同时转化受体植物,通过筛选获得共转化体后借助遗传分离原理从共转化体分离出仅含目的基因的后代(见图1)。1987年 McKnight T. D. 等^[13]利用2种农杆菌株(各含1个质粒载体)共转化烟草获得19%的共转化效率,有100%的共转化体可遗传分离。1991年 De Block M. 等^[14]利用同样方法共转化油菜获得10.1%~14.3%的共转化效率,有43%的共转化体可遗传分离;1996年 Komari T. 等^[15]

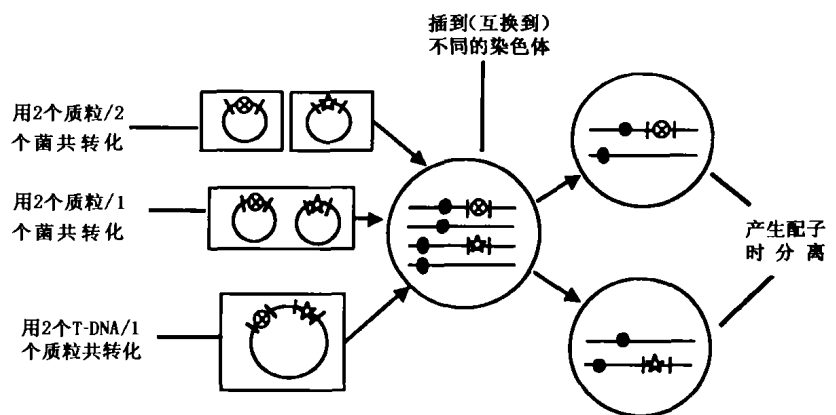


图1 共转化系统示意图*

Fig. 1 Generation of marker-free transgenic plants by the co-transformation methods

* 图中|为T-DNA边界,⊗为目的基因,☆为标记基因。

利用含1个质粒载体(2个T-DNA)的农杆菌共转化烟草和水稻,分别获得51%和47%的共转化效率,有56%和65%的共转化体可遗传分离。利用共转化系统去除转基因植物中选择标记为最早研究且最成熟的技术,目前所有可用于生产的无选择标记转基因作物多数通过共转化系统所获得。但利用共转化系统获得不含选择标记的转化后代,其前提是共转化效率高,且共转化体中2个基因可以分离,由于许多作物共转化效率较低,这极大地限制了共转化系统的应用及其效果。

2.2 利用位点特异性重组系统

位点特异性重组系统(Site-specific recombination)属独特的DNA序列,一般可将其分为重组酶基因和可将插入基因自动切除的特异性位点两部分,如噬菌体 P_1 的 Cre/lox 系统、啤酒酵母的 $2\mu\text{m}$ 质粒 FLP/FRT 系统、耐盐酵母的 $pSR1$ 质粒 R/RS 系统、 μ 噬菌体的 Gin/gix 系统等和 λ 噬菌体的 $attP$ 系统,其中 Cre/lox 系统研究较多。利用 Cre/lox 系统去除筛选标记的原理是将标记基因构建于 lox 系统的2个34bp特异序列之间(即 lox 位点),将目的基因构建于 lox 位点之外,筛选到转化子后再诱导 Cre 酶表达,将位于 lox 位点的选择标记切除(见图2)。目前有3种做法:一是先用“目的基因- lox -选择标记- lox ”结构转化受体植物,选择到转化子后再将 Cre 酶基因导入其中,通过 Cre 酶基因表达切除转化子中选择标记,然后从所得二次转化植株中分离出仅含目的基因的后代。1991年 Dale E. C. 等^[16]用此方法转化烟草,先将“ $luc-lox-hpt-lox$ ”转入烟草,再将 Cre 酶基因导入,所得二次转化植株中有90.9%为切掉 hpt 基因的植株,自交后有5.4%~

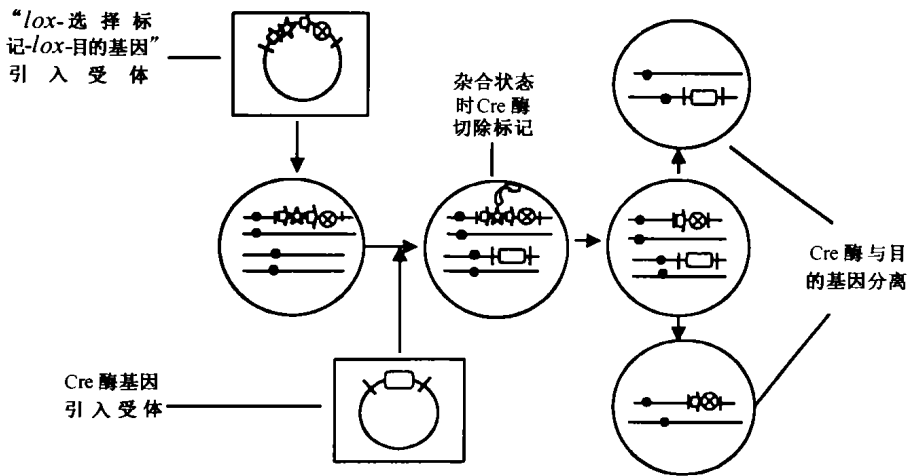


图 2 Cre/lox 系统用于切除选择标记示意图*

Fig. 2 Removal of a selectable marker gene by the Cre/lox systems

*图中|为 T-DNA 边界,⊗为目的基因,☆为标记基因,□为 Cre 酶基因,◇为 lox 位点。

选择标记连同 Cre 基因自身一同切除。2001 年 Zuo J. 等^[18]构建了此类载体——CLX 表达载体,此载体中 Cre 基因的表达受“转录活化因子 XVE”的严格控制,转录活化因子 XVE 基因的表达由 G10-90 启动子控制,而 G10-90 启动子的活性由雌激素—— β -雌二醇诱导,当 β -雌二醇不存在时 Cre 基因转录被阻遏。用此载体转化拟南芥获得转基因植株后,施以 β -雌二醇成功切除了 npt II 基因。FLP/*FRTs* 系统中 *FRTs* 是 FLP 重组酶的特异作用位点,1989 年 Cregg J. M. 和 Madden K. R.^[19]发现,将 *FRTs*-ARG4-*FRTs* 结构引入酵母 *Pichia pastoris* 的 ARG4 基因缺失型后,再用 FLP 酶基因对其进行转化获得再次缺失 ARG4 基因的转化子。1996 年 Lyznik L. A. 等^[20]用聚乙二醇介导玉米和水稻原生质体转入 *FRTs*-npt II-*FRTs* 基因,筛选出转化子后又通过二次导入 FLP 酶基因成功切除了 npt II 基因。R/*RS* 系统中重组酶 R (Recombinase gene) 表达时可在 2 个特异位点 *RS* 间发挥作用,1995 年 Onouchi H. 等^[21]用两端构建有 *RS* 位点的 GUS 基因和由 35S 启动子控制的 R 基因,分别转化拟南芥获得 2 种转基因植株并将二者杂交,借助杂合状态下 R 基因的表达,删除了转 *RS*-GUS-*RS* 基因植株中 GUS 基因。Maeser S. 等^[22]于 1991 发现 *Gin/gix* 系统重组酶 *Gin* 表达时可在 2 个特异位点 *gix* 间发挥切除作用,但因 *Gin* 基因影响植物的再生,该系统在植物中成功应用尚未见报道。而 *attP* 系统中需 *int* 和 *ihf* 2 种蛋白同时存在时才能实现基因重组,这导致该系统非常难以利用。2000 年 Zubko E. 等^[23]将 npt II 基因构建于 2 个 352bp 的 *attP* 特异序列之间后直接转化烟草,通过 Kan 筛选得到抗性愈伤组织(即含有 npt II 基因),然后在不选择条件下继代进而再生植株,发现有 13% 的植株无 npt II 基因。这说明无重组酶 *int* 和 *ihf* 时,*attP* 位点中基因也可有一定比率被切除,*attP* 位点可能有某种自我清理的作用,但其自清理时期尚不确定。特异位点重组系统表现较高的可控性,是转基因研究中较好的体系,但对以品种改良为目标的植物转基因而言则显得过于复杂。且此类系统致命弱点为无法切除特异位点,它对被改造植物而言同样是不必要的“垃圾”。

2.3 利用转座子系统

转座子系统是借助转座酶的转座作用实现基因重组,转座子由自主成员和非自主成员两部分组成,如玉米的 *Ac/Ds* 系统^[24],其自主成员 *Ac* 基因编码转座酶用于自身和非自主成员 *Ds* 基因的转座。有报道认为,非自主成员是由自主成员缺失了某些序列后所形成的,不具备合成转座酶的能力。非自主成员两端有数百个核苷酸是必需的,中间可换成或插入较大的外源基因,而插入外源基因的非自主成员仍能同自主成员一起被转座酶转移。把目的基因置于整个转座子的外部,将选择标记设于非自主成员内部,转化后植物可通过转座作用将选择标记转走(或丢失),最后分离出无标记的转基因后代。1993 年 Goldsbrough A. P. 等^[25]构建了含“*Ac*-*Ds*-GUS-*Ds*-npt II”的 T-DNA 表达载体并用于转化番茄,在转基因植株自交后代中发现有 2.3% ~ 6.6% 的植株含有 *Ds*-GUS-*Ds*、而不含 npt II。Goldsbrough A. P. 等利用转座将目标基因转至别处进而实现与选择标记的分离,此法称为转座子介导再定位的方法,但这样做其结果远不如将选择标记转走为佳,后者

16.3% 的后代与 Cre 酶基因分离,成为只含 luc 基因的植株,但该方法复杂且效率较低。二是将 Cre 酶基因单独导入受体植物作为“工具”亲本,然后与导入“目的基因-lox-选择标记-lox”的转基因植株杂交,在 F2 代选择仅含目的基因的个体。1992 年 Russell S. H. 等^[17]用“GUS-lox-ALS-lox”结构和 Cre 基因分别转化烟草,并将二者转基因植株杂交分离出不含 ALS 基因的株系,但该方法只适合于种子植物。三是将 Cre 酶基因构建于 lox 位点,并设置可人工控制的特异启动子,在选择到转化子后诱导 Cre 基因表达,将选

可提高获得只含目标基因的转基因植株频率,且不会留下 Ds 片段。单独利用 Ac 基因也可将导入基因切除。1997 年 Ebinuma H. 等^[26]将 ipt 基因(1 种使细胞分裂素过量产生的基因)插入 Ac 基因中,然后与 npt II 和 GUS 基因串联构建成 MAT 表达载体,用其转化烟草和白杨经 Kan 筛选得到二者阳性植株,在加有细胞分裂素培养基上二者阳性植株分别有 63% 和 20% 表现不正常(表明 ipt 基因存在),但经过 6 个月进一步培养后发现,分别有 4.8% 的烟草和 15% 白杨恢复正常,表明 ipt 基因转座丢失。合理利用转座子转座机制虽可将选择标记较彻底去除,但目前可利用转座子机制的作物尚较少,且许多作物中转座子活性很小,转座发生频率很低。

2.4 利用同源重组作用

同源重组(Homologous recombination)发生在 DNA 的同源序列之间,同源序列之间可较严格地配对,通过链置换和单链侵入形成异源双链,借助细胞内一些重组修复酶修复可使 2 条异源 DNA 链发生交换。在利用选择标记进行转基因后,重新导入一段与选择标记两侧 DNA 完全相同的序列,通过同源重组将含有选择标记的 DNA 片段置换,就可获得无选择标记的转基因植株,该技术又称基因打靶已较成功应用于微生物和动物,但在植物上因靶向性不强尚处于探索阶段,利用同源重组剔除选择标记,在植物细胞器 DNA 的转化已有成功报道。1996 年 Fischer N. 等^[27]将选择标记(aaDA)串联于 2 个同向重复序列之间转入烟草叶绿体基因组,在有选择压力条件下得到转化子,当去掉选择压力后发现 aaDA 基因丢失。

2.5 利用其他方法

对转基因植物中选择标记可能造成的不利影响,还可通过组织特异性表达、新型无害标记等给予一定程度控制。组织特异性表达是采用特异性表达的启动子控制基因表达,利用组织特异性表达的启动子控制选择标记表达,即使选择标记只在早期筛选时表达,而转基因植株生长过程中不表达,如采用 G10-90、AoPRL1、AFP 启动子等,该法实际只解除了标记基因表达产物的影响,并未真正消除选择标记。利用新型无害标记是用某种对植物和人有用的性状基因代替选择标记如颜色、抗旱和抗盐等,但这方面基因大都体积大且结构复杂,选择效果难以判断,目前来自这方面可用以选择标记的基因为数很少。

3 建 议

当前转基因植物的安全性倍受世人关注,消除转基因作物中选择标记已成为当务之急和转基因技术发展的重要方向。笔者认为应发展不依赖选择标记的转基因技术,其途径一是对转化效率已较高、组织培养较易的植物,可采取分割法建立不依赖选择标记的技术,笔者曾以烟草、番茄为对象建立了相应的不用选择标记转基因技术,并获得许多转基因植株。二是对转化效率较低、组织培养难度较大的植物,如禾本科作物最好以原生质体作转化对象,原生质体将再次成为解决转基因难题、发展转基因技术的途径。1991 年王海波曾提出若获得高效率、不依赖选择标记、可导入大片段的 DNA、可按人的意愿定点插入外源基因、可随意切除内源不利基因的效果,用原生质体作转化受体将成为有效技术措施。原生质体培养确实比一般组织培养困难,但 20 世纪 90 年代小麦、水稻等农作物的原生质体培养技术均已相当成功^[4]。起初人们认为农杆菌不能转化禾本科植物,曾把禾本科植物转化寄望于原生质体,基因枪技术的诞生使众多从事转基因研究工作的学者将兴趣转向基因枪法,但实施转基因过程中基因枪法弊端日趋显露。目前农杆菌技术虽已成功用于转化禾本科植物,但若实现高效率、不依赖选择标记、可导入大片段的 DNA、可按人的意愿定点插入外源基因、可随意切除内源不利基因的目标,农杆菌法同样显露不足。转基因植物虽已走向大田生产,但转基因技术的成熟与完善尚待深入研究。

参 考 文 献

- 1 雷茂良,程金根. 全球转基因植物发展现状. 生物技术通报,1998(6):30~32
- 2 侯学文,姜悦,郭勇. 转基因中的筛选标记. 生物学通报,1997,32(10):19~21
- 3 董志峰,马荣才,彭于发等. 转基因植物中外源非目的基因片段的生物安全研究进展. 植物学报,2001(7):661~672
- 4 王海波. 小麦愈伤组织状态调控及原生质体培养. 中国农业科学,1996,29(6):8~14
- 5 Clive James, Anatole F. K. Global Review of the Field Testing and Commercialization of Transgenic Plants 1986 to 1995. The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications(ISA), 1996
- 6 Clive James, Anatole F. K. The Annual Global Review of Commercialized Transgenic (GM) Crops. The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications(ISA), 2003
- 7 Kumpatla S. P., Teng W., Buchholz W. G., et al. Epigenetic transcriptional silencing and 5-azacytidine-mediated reactivation of a complex

- transgene in rice. *Plant Physiol*, 1997, 115(2):361~373
- 8 Gebhard F. K. Monitoring field release of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol*, 1999, 28:261~272
 - 9 Nielsen K. M., Elsas J. D., Smalla K. Transformation of *Acinetobacter sp.* Strain BD413(pFG4Dnpt II) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66:1237~1242
 - 10 Nordlee J. A., Taylor S. L., Townsel J. A. Investigations of the allergenicity of Brazil nut 2S seed storage protein in transgenic soybean. Paris OCED, 1996. 151~155
 - 11 Arpad Pusztai. Report of Project Coordinator on Data Produced at the Rowett Research Institute (RRI). SOAEFD Flexible Fund Project RO818, 22nd October, 1998
 - 12 Losey J. E., Rayor J. S., Carter M. E. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature(London)*, 1999. 214~399
 - 13 McKnight T. D., Lillis M. T., Simpson R. B. Segregation of genes transferred to one plant cell from two separate *Agrobacterium* strains. *Plant Mol. Biol.*, 1987, 8:439~445
 - 14 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
 - 15 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, 10:165~174
 - 16 Dale E. C., Ow D. W. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc. Natl. AcadSci USA*, 1991, 88:10558~10562
 - 17 Russell S. H., Hoopes J. L., Odell J. L. Directed excision of a transgene from the plant genome. *Mol Gen Genet*, 1992, 234:49~59
 - 18 Zuo J., Niu Q. W., Müller S. G., *et al.* Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 157~161
 - 19 Cregg J. M., Madden K. R. Use of site-specific recombination to generate selectable markers. *Mol Gen Genet*, 1989, 219:320~323
 - 20 Lyznik L. A., Mitchell J. C., Hirayama L., *et al.* Activity of yeast FLP recombinase in maize and rice protoplasts. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21:969~975
 - 21 Onouchi H., Nishihama R., Kudo M., *et al.* Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsisthaliana*. *Mol Gen. Genet*, 1995, 247:653~660
 - 22 Maeser S., Kahmann R. The Gin recombinase of phage Mu can catalyse site-specific recombination in plant protoplasts. *Mol Gen. Genet*, 1991, 230:170~176
 - 23 Zubko E., Scutt C., Meyer P. Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes. *Nat. Biotechnol*, 2000, 18:442~445
 - 24 Fedoroff N. Maize transposable elements. *American Society for Microbiology*, 1989. 375~411
 - 25 Goldsbrough A. P., Lastrella C. N., Yoder J. I. Transposition mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato. *Biotechnology*, 1993, 11:1286~1292
 - 26 Ebinuma H., Sugita K., Matsunaga E., *et al.* Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyltransferase gene as a selectable marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94:2117~2121
 - 27 Fischer N., Stampacchia O., Redding K., *et al.* Selectable marker recycling in the chloroplast. *Mol. Gen. Genet*, 1996, 251(3):373