

## 质体基因工程中选择标记基因研究进展

何勇<sup>1,2,3</sup>, 罗岸<sup>2</sup>, 母连胜<sup>2</sup>, 陈强<sup>2</sup>, 张艳<sup>2</sup>, 叶开温<sup>2</sup>, 田志宏<sup>1,2</sup>

1. 长江大学主要粮食作物产业化湖北省协同创新中心, 荆州 434025;
2. 长江大学生命科学学院, 荆州 434025;
3. 长江大学农学院, 荆州 434025

**摘要:** 与细胞核基因工程相比, 质体基因工程能更安全、精确和高效地对外源基因进行表达, 作为下一代转基因技术已广泛用于基础研究和生物技术应用领域。与细胞核基因工程一样, 质体基因工程中也需合适的选择标记基因用于转化子的筛选和同质化, 但基于质体基因组的多拷贝性和母系遗传特点, 转化子的同质化需要一个长期的筛选过程, 这就决定了质体基因工程中选择标记基因的选择标准将不同于细胞核基因工程中广泛使用的现行标准。目前, 质体基因工程的遗传转化操作中使用较多的是抗生素选择标记基因, 出于安全性考虑, 需要找到可替换、安全的选择标记基因或有效的标记基因删除方法。本文在对质体基因工程研究的相关文献分析基础之上, 对主要使用的选择标记基因及其删除体系进行了综述, 并对比了其优缺点, 同时探讨了质体基因工程中所使用的报告基因, 以期对现有选择标记基因及其删除体系的改进和开发提供一定参考, 进一步推动质体基因工程, 尤其是单子叶植物质体基因工程的发展。

**关键词:** 质体基因工程; 叶绿体基因工程; 质体遗传转化; 叶绿体遗传转化; 选择标记基因; 标记基因删除

## Advances of selectable marker genes in plastid genetic engineering

Yong He<sup>1,2,3</sup>, An Luo<sup>2</sup>, Liansheng Mu<sup>2</sup>, Qiang Chen<sup>2</sup>, Yan Zhang<sup>2</sup>, Kai-Wun Yeh<sup>2</sup>,  
Zhihong Tian<sup>1,2</sup>

1. Hubei Collaborative Innovation Center for Grain Industry, Yangtze University, Jingzhou 434025, China;
2. College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China;
3. College of Agronomy, Yangtze University, Jingzhou 434025, China

**Abstract:** Plastid genetic engineering is a safer, more precise, and more efficient transgene expression system than the nuclear genetic transformation system. It has been widely used in basic research and biotechnology applications as the next-generation transgenic technology in plants. Similar to nuclear genetic transformation, selection markers are needed in plastid genetic engineering to identify 'true' transformants and acquire homoplasmy. Because of the high copy number of plastids, maternal inheritance of the plastid genome, and the long process of homogenization of transplastomic plants, the selection markers for plastid genetic engineering are different from those used in the nu-

收稿日期: 2017-03-13; 修回日期: 2017-05-03

基金项目: 主要粮食作物产业化湖北省协同创新中心开放基金项目(编号: 2015MS006)资助[Supported by the Foundation of Hubei Collaborative Innovation Center for Grain Industry (No. 2015MS006)]

作者简介: 何勇, 博士研究生, 专业方向: 水稻遗传与分子育种。E-mail: warers@yangtzeu.edu.cn

通讯作者: 叶开温, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物分子生物学。E-mail: ykwbpp@ntu.edu.tw

田志宏, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物遗传与分子生物学。E-mail: zhtian@yangtzeu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.16-433

网络出版时间: 2017/8/10 12:39:44

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20170810.1239.003.html>

clear transformation system. At present, antibiotic resistance genes are the most commonly used selectable markers in the transplastomic selections. However for biosafety reasons, they needed to be replaced with either alternative markers or marker-free systems for the plastid genetic engineering. In this review, we have evaluated and summarized the positive and negative features of the selectable markers and marker elimination strategies commonly used in the plastid engineering research in the literature on plastid genetic engineering research. In addition, we have reviewed the features of the reporter genes used in plastid genetic engineering. We hope this review can help improving the current and developing new selectable markers and marker removal systems, and further promote the development of plastid genetic engineering, especially on the monocotyledonous plants.

**Keywords:** plastid genetic engineering; chloroplast genetic engineering; plastid transformation; chloroplast transformation; selectable marker genes; marker gene elimination

自 1988 年 Boynton 等<sup>[1]</sup>在单细胞真核生物莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)中首次成功报道叶绿体遗传转化以来,人们逐渐意识到叶绿体不仅是植物进行光合作用的重要场所,同时也具有作为植物遗传转化新工具的潜能。Svab 等<sup>[2]</sup>于 1990 年在烟草(*Nicotiana tabacum* L.)中成功实现了质体转化,首次证明质体可用于高等植物质体基因工程。源于人们对传统细胞核转化方式所创造的转基因植物环境安全性<sup>[3,4]</sup>的考虑,加之质体基因工程在高效表达外源基因方面相比细胞核基因工程更具优势,表现为外源基因表达量高<sup>[5]</sup>、基因表达无位置效应和基因沉默现象<sup>[5~7]</sup>、避免核转化系统中由于花粉逃逸所带来的环境安全性问题<sup>[8]</sup>及单次转化事件中可实现多基因同时转化与表达<sup>[9~11]</sup>,近 30 年以来质体基因工程研究备受关注,取得了一些重要进展。目前,国内外已应用质体基因工程手段将抗除草剂<sup>[12]</sup>、抗病<sup>[13]</sup>、抗虫<sup>[5,14]</sup>、抗旱<sup>[7]</sup>、耐盐渍<sup>[15]</sup>及综合抗性<sup>[16]</sup>等相关外源基因导入到烟草(*N. tabacum*)<sup>[13,16~20]</sup>、拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)<sup>[21,22]</sup>、矮牵牛(*Petunia hybrida* L.)<sup>[23]</sup>、花椰菜(*Brassica oleracea* var. *botrytis*)<sup>[24]</sup>、卷心菜(*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.)<sup>[25]</sup>、马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)<sup>[26]</sup>、莴苣(*Lactuca sativa* L.)<sup>[27~31]</sup>、番茄(*Solanum lycopersicum* L.)<sup>[32,33]</sup>、胡萝卜(*Daucus carota* L.)<sup>[15]</sup>、棉花(*Gossypium hirsutum* L.)<sup>[34]</sup>、油菜(*Brassica napus* L.)<sup>[35,36]</sup>、大豆(*Glycine max* L.)<sup>[37]</sup>、水稻(*Oryza sativa* L.)<sup>[38]</sup>和野甘草(*Scoparia dulcis* L.)<sup>[39]</sup>等 20 多种植物中,并在作物农艺性状改良和生物反应器应用方面取得了成功,但转化效率低,同质化植株难以获得,宿主范围窄,

尤其是禾谷类作物应用受限等问题一直是限制质体基因工程大规模应用的主要因素。显然,选择标记基因的合理利用将会有效解决这些问题。同时,出于环境安全和食品安全的考虑,势必要将选择标记基因在完成其选择作用后从转化子中有效删除。本文结合质体基因工程原理,主要从选择标记基因筛选及其删除两个方面对现阶段质体基因工程的发展进行了综述。

## 1 质体基因工程原理和技术

质体是植物细胞内由双层膜包裹、与碳水化合物的合成与贮藏密切相关的一类细胞器的总称,由前质体分化而来。根据所含色素的不同,质体分为叶绿体、有色体和白色体(造粉体、造蛋白体、造油体),其中作为植物光合作用重要场所的叶绿体一直以来都是人们研究质体基因工程的重点。叶绿体基因组通常由 120~220 kb 的环状双链 DNA 分子构成<sup>[40,41]</sup>,其结构具有高度保守性,大多数陆生高等植物都具有 20~30 kb 序列相同的反向重复区域(inverted repeats, IR)A 和 B(IR<sub>A</sub> 和 IR<sub>B</sub>),将叶绿体基因组的大拷贝区(large single copy region, LSC)和小拷贝区(small single copy region, SSC)隔开。

质体基因工程是利用携带外源基因载体的侧翼序列与质体 DNA(ptDNA)同源区段发生同源重组<sup>[42,43]</sup>而实现的,转化过程中外源 DNA 首先整合进一至多个质体基因组,再在适合的选择压下进行 20~30 次细胞分裂以去除未转化的质体来实现质体的同质化<sup>[42,44]</sup>。外源 DNA 进入质体基因组的实现方法包括基因枪法<sup>[13,17,27]</sup>、PEG(polyethylene glycol)介导法<sup>[45~47]</sup>、

农杆菌介导法<sup>[48]</sup>、显微注射法<sup>[49]</sup>、激光注射法<sup>[50]</sup>、花粉管导入法<sup>[51]</sup>和转运肽介导的叶绿体间接转化法<sup>[52]</sup>等。由于外源 DNA 进入叶绿体必须要突破细胞壁、原生质膜和叶绿体膜的障碍,虽然 PEG 介导法相对基因枪法要经济,但大多数植物,尤其是单子叶植物原生质体的分离和培养难度较大<sup>[53]</sup>,所以目前所进行的质体基因工程多以基因枪法为主。

## 2 选择标记基因

质体基因组的高拷贝数决定了转化过程中外源

基因不可能同时转化进入所有的质体基因组,因此,为保证整合到受体植物质体基因组中的外源基因的遗传稳定性,必须利用选择标记基因在选择培养过程中逐步去除未转化的质体基因组,以实现质体基因组的同质化。与细胞核转化的筛选系统类似,目前用于质体转化的筛选系统主要分为两大类:“正向”选择系统——有选择性地将转化细胞从非转化细胞中筛选出来并促进其生长;“负向”选择系统——抑制转化细胞的生长<sup>[54]</sup>(表 1)。由于抗生素选择标记基因对人类和环境具有潜在的威胁,科研人员也开发

表 1 质体基因工程中所使用的选择标记基因

Table 1 Selectable marker genes in plastid genetic engineering

类别	基因	编码产物	选择方法	转化材料
“正向”选择				
条件型	16S rDNA 突变	16S rRNA	壮观霉素或链霉素	烟草 <sup>[2]</sup> 、番茄 <sup>[32]</sup>
	<i>psaA</i> 、 <i>psaB</i> 突变	跨膜蛋白 PsaA、PsaB	光合自养	莱茵衣藻 <sup>[55]</sup>
	<i>rbcL</i> 突变	Rubisco 大亚基( <i>rbcL</i> )	光合自养	烟草 <sup>[56]</sup>
	<i>psbA</i> 突变	光合系统 II (PS II) 反应中心蛋白 D1	赛克嗪	莱茵衣藻 <sup>[57]</sup>
	<i>aadA</i>	氨基糖苷-3'-腺苷酸转移酶	壮观霉素或链霉素	烟草 <sup>[16, 19, 20]</sup> 、拟南芥 <sup>[21, 22]</sup> 、矮牵牛 <sup>[23]</sup> 、花椰菜 <sup>[24]</sup> 、卷心菜 <sup>[25]</sup> 、马铃薯 <sup>[26]</sup> 、莴苣 <sup>[27-31]</sup> 、番茄 <sup>[33]</sup> 、油菜 <sup>[35, 36]</sup> 、胡萝卜 <sup>[15]</sup> 、大豆 <sup>[37]</sup> 、水稻 <sup>[38]</sup> 、紫花苜蓿 <sup>[58]</sup> 、野甘草 <sup>[39]</sup>
	<i>npt II</i>	新霉素磷酸转移酶	新霉素或卡那霉素	烟草 <sup>[59]</sup> 、棉花 <sup>[34]</sup>
	<i>cat</i>	氯霉素乙酰转移酶	氯霉素	烟草 <sup>[60]</sup>
	<i>hpt</i> 或 <i>hph</i>	潮霉素 B 磷酸转移酶	潮霉素 B	水稻 <sup>[61-63]</sup>
	<i>aphA-6</i>	氨基糖苷-3'-转移酶	卡那霉素	烟草 <sup>[64]</sup> 、棉花 <sup>[34]</sup>
	<i>AHAS</i>	乳酸合成酶	噻磺隆	紫球藻 <sup>[65]</sup>
	<i>bar</i> 或 <i>pat</i>	草丁膦乙酰转移酶	草丁膦	烟草 <sup>[66]</sup> 、水稻 <sup>[67]</sup>
	<i>EPSPS</i>	5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶	草甘膦	烟草 <sup>[12, 68]</sup>
	<i>hppd</i>	4-羟基苯丙酮酸双加氧酶	磺草酮或二酮腈	烟草 <sup>[69, 70]</sup> 、大豆 <sup>[70]</sup>
	<i>badh</i>	甜菜碱醛脱氢酶	甜菜碱醛	烟草 <sup>[71]</sup> 、胡萝卜 <sup>[15]</sup>
	<i>ASA2</i>	邻氨基苯甲酸合成酶	4-甲基吡啶或 7-甲基色氨酸	烟草 <sup>[72]</sup>
	<i>dao</i>	D-氨基酸氧化酶	D-丙氨酸	烟草 <sup>[73]</sup>
	<i>dsdA</i>	D-丝氨酸脱氨酶	D-丝氨酸	烟草 <sup>[74]</sup>
	<i>aac6-aph2</i>	氨基糖苷乙酰转移酶/磷酸转移酶	妥布霉素或庆大霉素	烟草 <sup>[75]</sup>
非条件型	<i>ipt</i>	异戊烯转移酶	根发育正常与否	烟草 <sup>[76]</sup>
“负向”选择				
条件型	<i>codA</i>	胞嘧啶脱氨酶	5-氟胞嘧啶	烟草 <sup>[77]</sup>
	<i>dao</i>	D-氨基酸氧化酶	D-缬氨酸	烟草 <sup>[73]</sup>

出一系列的选择标记基因删除体系。

## 2.1 “正向”选择系统

“正向”选择系统分为条件和非条件选择系统两大类: 条件选择标记在培养物中添加对非转化细胞产生毒害或无毒害作用的代谢中间产物、抗生素、除草剂、碳源或植物激素前体<sup>[78]</sup>抑制非转化细胞生长, 从而筛选出转化细胞; 非条件选择标记不需要任何外源物促进转化细胞生长, 而是采用激活转化细胞内源性生长产生的表型作为标志。

### 2.1.1 叶绿体内源性选择标记

由于质体基因组具有原核表达特点, 所以核糖体蛋白或 rRNA 基因的突变可以赋予植物对壮观霉素、链霉素或红霉素的抗性, 叶绿体转化筛选最早也是基于此而实现的。Harris 等<sup>[79]</sup>于 1989 年发现莱茵衣藻对壮观霉素和链霉素的抗性来自其叶绿体基因组 16S rDNA 和 23S rDNA 不同位点的点突变。随后 Moll 等<sup>[80]</sup>在烟草细胞培养研究中也证实了这一点。Svab 等<sup>[2]</sup>首次将 16S rDNA 突变基因作为选择标记应用于烟草叶绿体的转化, 并成功获得了具有壮观霉素抗性的稳定转化植株, 但其转化效率并不高, 每 50 个基因枪轰击样本仅得到一个抗性植株, 与细胞核转化相比, 筛选效率降低了至少 100 倍, 推测可能是因为该选择标记是相对隐性的, 只有当叶绿体基因组同质化后才能表现出相应的表型效应, 而同质化的实现需要一个足够的时间积累。因此, 尽管核糖体突变基因来自于植物自身的突变, 其作为选择标记基因在一定程度上可降低对环境的危害, 但如何提高其筛选效率是当前应用中首要考虑的问题。

基于光合作用的原理, 人们发现编码光合作用复合体亚基的基因发生突变后, 突变株不能进行正常的光合作用, 当用野生型叶绿体基因组片段轰击时, 可恢复突变株的光合作用能力<sup>[1]</sup>。光合系统 (photosystem, PS) 缺陷的突变体对光所导致的氧化损伤极为敏感, 利用这一特性, 科研人员开发出系列编码 PS 主要亚基的叶绿体基因——*psaA*、*psaB* 和 *rbcL* 等定点突变标记<sup>[55,56]</sup>, 并配合抗生素选择标记基因 *aadA* 和 *aph-A6* 等<sup>[81]</sup>用于叶绿体转化筛选, 但需先创制突变体才能用于后续转化过程研究, 所以在一定程度上限制了此类选择标记的使用。

Przibilla 等<sup>[57]</sup>在分析莱茵衣藻光合系统 (photosystem, PS) 反应中心蛋白 D1 结构和功能时发现: *psbA* 基因的一个突变能够改变几种除草剂作用的靶位点, 可用于含赛克嗪的培养基进行转化子的直接筛选。同时, *psbA* 基因不同位点的突变可以增强转化子对赛克嗪、苯嗪草酮、莠去津、尿素衍生物和甜菜宁等除草剂的抗性。

### 2.1.2 抗生素抗性选择标记

源于叶绿体内源性选择标记的局限性, 一系列基于抗生素抗性筛选的选择标记得到广泛开发和利用。

*aadA* 编码的氨基糖苷-3'-腺苷酸转移酶 (aminoglycoside 3'-adenylyltransferase) 能够通过腺苷酰化灭活壮观霉素和链霉素, 并阻止其与核糖体结合, 从而使转化植株具有壮观霉素和链霉素抗性, 可用于绿色转化细胞和白色非转化细胞的筛选。Svab 等<sup>[19]</sup>于 1993 年将 *aadA* 作为烟草叶绿体转化的选择标记时, 发现其筛选效率要比 16S rDNA 突变基因选择标记高 100 倍, 因此在目前的质体转化研究中多使用此选择标记基因进行转化子的筛选 (表 1)。相关实验数据表明, 高等植物, 尤其是禾谷类单子叶植物虽然对链霉素具有一定敏感性<sup>[82]</sup>, 但其天然具有壮观霉素抗性<sup>[83]</sup>, 所以 *aadA* 选择标记对部分具抗生素耐性的双子叶植物和单子叶植物筛选效率低<sup>[84]</sup>, 在一定程度上限制了该选择标记的应用。

Carrer 等<sup>[59]</sup>于 1993 年在烟草叶绿体转化中首次尝试使用来自于细菌 Tn5 转座子的 *npt II(neo)* 基因 (编码新霉素磷酸转移酶并能够对新霉素和卡那霉素产生抗性) 作为选择标记并初步取得成功, 但其转化效率不理想, 他们认为可能是因为卡那霉素抑制细胞分裂引起抗性基因难以随细胞分裂扩增所导致。随后, 与 *npt II(neo)* 基因功能相似能够编码氨基糖苷-3'-转移酶并产生卡那霉素抗性的 *aphA-6* 基因在烟草中第一次得到使用并获得成功<sup>[64]</sup>, 相比 *npt II(neo)* 基因而言, 转化效率有所提升。为进一步提高转化效率, Kumar 等<sup>[34]</sup>在棉花叶绿体转化中采用 *aphA-6* 和 *npt II* 双选择标记, 在黑暗条件下, 通过 *Prn* 启动子在非绿化组织中表达 T7g10 调控元件来调节 *aphA-6* 的表达, 并通过 *psbA* 启动子在光培养条件下表达 5' 调控元件来调节 *npt II* 的表达, 发现其转化效率比单



独采用 *aphA-6* 选择标记提高了至少 8 倍。

最近, Li 等<sup>[60]</sup>利用编码氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase) *cat* 基因作为选择标记进行烟草叶绿体转化, 虽然发现其转化效率相对 *aadA* 基因要低, 但也体现出自身的优势: 不会产生自发的抗生素抗性突变; 叶绿体转化植株只需在常规筛选过程中增加一轮再生筛选即可快速得到同质化植株; 可扩大质体转化宿主范围并可应用于禾谷类作物。

潮霉素 B 是由吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)代谢产生的对原核生物和真核生物蛋白质合成具有广谱抑制活性的一种氨基糖苷类抗生素。大肠杆菌 *aphIV* 基因(*hph*、*hpt*)编码的潮霉素 B 磷酸转移酶可通过 ATP 依赖的 7-羟基磷酸化使潮霉素 B 失活, 避免对细菌、真菌和动植物细胞产生毒害作用。*hpt* 基因作为选择标记基因已在单子叶植物、双子叶植物和裸子植物<sup>[85,86]</sup>的细胞核转化中被广泛使用, 但在质体基因工程中却少有报道。基于潮霉素 B 磷酸转移酶基因(*hpt*)在细菌的原核表达可以使细菌产生潮霉素 B 抗性, Maliga 等<sup>[44]</sup>认为 *hpt* 基因应该也可用于叶绿体转化筛选, 筛选中应该注意其剂量依赖性, 当 *hpt* 基因整合进转化细胞中的少量叶绿体基因组拷贝时筛选无效, 当 *hpt* 基因整合进转化细胞中的大量叶绿体基因组拷贝时筛选才会有效, 但未见实验报道。李丁等<sup>[61,62]</sup>以 *hpt* 基因作为选择标记对水稻进行叶绿体转化研究, 在  $T_0$  代转化植株中检测到了 *hpt* 基因的表达, 但未获得同质化植株。随后, 他们利用类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)技术构建了靶向水稻叶绿体基因组的 TALENs, 通过基因枪法实现了含 *hpt* 和 *EGFP*(enhanced green fluorescent protein, 编码增强的绿色荧光蛋白)基因的叶绿体同源重组质粒向水稻的共转移, 与无 TALENs 辅助的叶绿体同源重组质粒的独立转化相比, 转化效率提高了近 2 倍<sup>[63]</sup>。

在进化过程中, 来自环境中存在的抗生素选择压力下, 细菌有可能通过基因融合事件产生几种具有两种氨基糖苷酶修饰活性的双功能酶, 比相应的单功能酶具有更高的活性。由 *aac6-aph2* 双功能抗性基因编码的氨基糖苷乙酰转移酶(6')-Ie/氨基糖苷磷酸转移酶

(2'')-Ia[aminoglycoside acetyltransferase(6'')-Ie/aminoglycoside phosphotransferase(2'')-Ia, AAC6-APH2]包含可以独立发挥作用的 N 末端 AAC(6')结构域(乙酰基转移酶结构域)和 C 末端 APH(2'')结构域(磷酸转移酶结构域), 对氨基糖苷类抗生素具有广谱抗性<sup>[87]</sup>。Tabatabaei 等<sup>[75]</sup>利用烟草质体转化实验测试了 *aac6-aph2* 双功能抗性基因作为选择标记用于叶绿体转化筛选的可行性, 结果发现: *aac6-aph2* 基因的表达能赋予转化植株较强的妥布霉素和庆大霉素抗性, 妥布霉素比庆大霉素更适合作为筛选底物; *aac6-aph2* 具有与 *aadA* 选择标记相当的筛选效率, 证明该基因可替代质体转化中常用的 *aadA* 选择标记; *aac6-aph2* 选择标记可能比 *aadA* 更具优势, 在质体转化中使用壮观霉素进行筛选常会导致抗生素抗性突变体的自发产生<sup>[2,19,88,89]</sup>, 而基于 *aac6-aph2* 选择标记的质体转化却不会出现这种现象, 在一定程度上加快转化植株的同质化进程。因此, *aac6-aph2* 选择标记的应用能够在一定程度上解决质体转化中宿主范围窄的问题, 进而推动单子叶植物尤其是禾谷类作物质体基因工程的发展。但在质体转化中应用 *aac6-aph2* 基因进行筛选时也不能忽视其缺陷, 初期选择比较耗时, 甚至会出现逃逸现象——产生无妥布霉素抗性的再生植株。

### 2.1.3 除草剂抗性选择标记

许多除草剂对植物的抑制效应具有种属特异性, 叶绿体转化中对除草剂抗性选择标记的设计也利用了这一特点。

乳酸合成酶(acetohydroxyacid synthase, AHAS)是除草剂噻磺隆(sulfometuron methyl, SMM)作用的靶标。在植物中, AHAS 的编码基因通常位于核内, 但在紫球藻(*Porphyridium*)中却位于质体基因组中。科研人员利用 AHAS 基因突变产生 SMM 抗性这一特点分离得到了一个抗 SMM 的紫球藻株系, AHAS 突变基因作为显性选择标记也已用于紫球藻叶绿体转化中转化子的筛选<sup>[65]</sup>。

细菌体内编码草丁膦(phosphinothricin, PPT)乙酰转移酶(phosphinothricin acetyltransferase, PAT)的 *bar* 基因是一种抗除草剂基因, PAT 通过乙酰化 PPT 的游离氨基使 PPT 失活, *bar* 基因作为一种优良的非抗生素选择标记已经在细胞核转化中得到了

广泛的应用。Lutz 等<sup>[66]</sup>研究发现, *bar* 基因可能不适宜直接用于质体转化的筛选, 只有通过 *aadA* 基因的前期筛选将 *bar* 基因引入到质体基因组后, *bar* 基因才能使转化子表达出草丁膦抗性, 其原因可能是 *bar* 基因编码产生的 PAT 酶的亚细胞定位受阻所致。

草甘膦通过竞争抑制细菌和植物中芳香族氨基酸生物合成途径中的 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSP)活性, 大量积累莽草酸, 进一步抑制芳香族氨基酸和次生代谢产物合成, 从而引起细胞死亡。Daniell 等<sup>[12]</sup>发现烟草叶绿体中整合了矮牵牛 *epsps* 基因后能稳定表现对草甘膦的抗性。Ye 等<sup>[68]</sup>将来自农杆菌 CP4 菌株的 *epsps* 基因导入到烟草叶绿体基因组中, 同样证实了 *epsps* 基因用于抗除草剂抗性筛选的可能。

4-羟基苯丙酮酸双加氧酶(4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, HPPD)定位于叶绿体之外, 参与醌和维生素 E 合成, 其活性通常会受到磺草酮和除草剂异恶唑酮(isoxaflutole, IFT)代谢衍生物二酮腈(diketonitrile, DKN)的抑制。为了探知 HPPD 定位于叶绿体是否能提高植物维生素 E 的合成, Falk 等<sup>[69]</sup>在烟草叶绿体中过表达了大麦(*Hordeum vulgare* L.) *hppd* 基因, 发现转化植株的叶片中  $\alpha$ -生育酚( $\alpha$ -tocopherol)和种子中  $\gamma$ -生育色满酚( $\gamma$ -tocochromanol)的含量得到有效提升, 转化植株对磺草酮表现出较强的抗性。Dufourmantel 等<sup>[70]</sup>分别在烟草和大豆叶绿体转化过程中过表达荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)的 *hppd* 基因, 转化植株内可溶性蛋白的总含量增加了近 5%, 同时比细胞核转化植株表现出更强的除草剂抗性, 但对叶片或种子中维生素 E 含量的增加并没有明显作用。同 *bar* 基因类似, *hppd* 基因多用于 *aadA* 基因删除后的二次筛选, 在烟草叶绿体转化中单独使用该基因进行筛选是无效的, 可能是因为体外实验中所使用 IFT 的代谢物 DKN 在异养条件下只让组织脱色而不影响细胞的增殖。

#### 2.1.4 非抗生素选择标记

抗生素抗性基因多来源于细菌的基因组, 为了消除人们对抗生素抗性基因使用的安全性顾虑, 关于非抗生素选择标记的研究已获得一定进展。

甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, BADH)<sup>[90,91]</sup>由细胞核基因编码并转运定位于叶绿体中的作用位点, 目前仅在少数生长于干旱和盐碱环境条件下的植物叶绿体中发现, 它可将有毒的甜菜碱醛(betaine aldehyde, BA)转化成无毒的甘氨酸甜菜碱。Daniell 等<sup>[71]</sup>将 *aadA* 和菠菜(*Spinacia oleracea* L.) *badh* 基因以多顺反子的形式应用于烟草叶绿体转化, 并对两种基因的筛选过程进行比对分析, 结果表明, 分别用 BA 和壮观霉素进行筛选, 两者的筛选效率相差了近 25 倍, 而且 BA 筛选大大提高了转化植株的再生速度, 筛选时间也相应缩短。随后, Kumar 等<sup>[15]</sup>将 *badh* 选择标记基因应用于胡萝卜(*D. carota*)叶绿体转化筛选, 进一步证实了 *badh* 作为质体基因工程选择标记基因的可行性。

邻氨基苯甲酸合成酶(anthranilate synthase, AS)是由 2 个  $\alpha$  亚基和 2 个  $\beta$  亚基组成的四聚体, 是色氨酸生物合成途径中的关键控制酶, 能将分支酸分解为邻氨基苯甲酸盐并受到色氨酸的反馈抑制。Barone 和 Widholm<sup>[92]</sup>将 AS 反馈非敏感型的  $\alpha$  亚基基因(ASA2)作为选择标记应用于烟草的细胞核转化, 分别以 4-甲基吲哚(4-methylindole, 4MI)和 7-甲基色氨酸(7-methyl-DL-tryptophan, 7MT)作为筛选底物, 发现 4MI 的筛选效率比 7MT 的高 2 倍。随后, Barone 等<sup>[72]</sup>将 ASA2 选择标记应用于烟草叶绿体转化筛选, 结果表明, 转化植株的表型和育性均正常, 对 4MI 和 7MT 的抗性遗传符合母系遗传规律, 高水平的 AS 酶活使得转化植株对色氨酸的反馈抑制并不敏感, 转化植株叶片中的游离氨基酸水平是野生型的 7 倍。因此, ASA2 选择标记的使用可在一定程度上促进天然对壮观霉素有抗性的一些重要作物, 尤其是禾谷类作物质体基因工程的发展。Zhang 等<sup>[93]</sup>则利用农杆菌介导法将 ASA2 和 AS 的  $\beta$  亚基基因的融合体作为选择标记应用于烟草细胞核转化, 以 7MT 或  $\alpha$ -甲基色氨酸为筛选底物, 发现转化植株的全酶和  $\alpha$  亚基的酶活比野生型更高, 而且转化植株的游离色氨酸水平是野生型的 9~68 倍, 比过表达 ASA2 基因植株的也更高, 表明 AS 的  $\alpha$  和  $\beta$  亚基共同表达不仅可以作为有效的细胞核转化选择标记, 同时也可以克服色氨酸的反馈抑制, 并具有获得高水平色氨酸生物合成的潜力, 但对于该选择标记是否可用于

质体转化筛选并未见报道。

氨基酸在自然界中主要以 L-氨基酸和 D-氨基酸两种形式存在,大部分生物只能利用 L-氨基酸,D-氨基酸被认为对生物是有害的。*dao* 基因目前仅在酵母和动物中发现,不存在于植物中,其编码产生 D-氨基酸氧化酶(D-amino oxidase, DAAO),可将有毒的 D-氨基酸分解为对生物无毒的物质。Gisby 等<sup>[73]</sup>在烟草叶绿体转化中采用 *dao* 基因作为选择标记,利用不同种类的 D-氨基酸对野生型植物的毒性不同这一特点进行筛选,结果表明,表达 *dao* 基因的烟草表现出对 D-丙氨酸的耐受性并受到 D-缬氨酸的抑制,证实 *dao* 基因既可作为“正向”选择标记,也可作为“负向”选择标记,用于质体基因工程中转化子的筛选。大肠杆菌来源的 *dsdA* 基因编码产生 D-丝氨酸脱氨酶(D-serine ammonialyase, DSD),能将有毒的 D-丝氨酸分解为对植物无毒的物质。最近, Li 等<sup>[74]</sup>将 *dsdA* 基因应用于烟草叶绿体转化和水稻细胞核转化筛选,证实了 *dsdA* 基因用于叶绿体转化和细胞核转化中转化子筛选的有效性。同时,与部分选择标记类似,在烟草叶绿体转化筛选过程中,基于 D-丝氨酸的直接筛选并不能有效获得抗性转化子,只有在完成基于抗生素抗性选择的第一次筛选之后, *dsdA* 基因才能在后续筛选过程中表现出其筛选的高效性。究其原因,在初级筛选阶段,可能是由于 *dsdA* 基因编码产生的 DSD 没有积累到足够的量,不足以赋予植物对 D-丝氨酸的耐受性。因此,研究者建议将 *dsdA* 选择标记基因用于叶绿体转化筛选的第二阶段,如果配合选择标记基因删除体系,可能更能体现 *dsdA* 选择标记筛选的高效性。

来自根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的 *ipt* 基因编码异戊烯基转移酶(isopentenyl transferase, *ipt*),能催化分解异戊烯基焦磷酸和单磷酸腺苷,生成细胞分裂素生物合成的前体物质异戊烯基单磷酸腺苷,进而提高植物内源性细胞分裂素的含量,可在无外源细胞分裂素的情况下促进细胞增殖和芽的分化。*ipt* 基因作为一种非条件型“正向”选择标记已在烟草<sup>[94,95]</sup>、水稻<sup>[96,97]</sup>、马铃薯<sup>[98]</sup>、木薯(*Manihot esculenta* Crantz)<sup>[99]</sup>和柑橘(*Citrus sinensis* Osbeck)<sup>[100]</sup>等植物的细胞核转化中得到成功应用。Dunne 等<sup>[76]</sup>在烟草的质体转化中比较了传统的 *aadA* 选择系统

和 *ipt* 选择系统,结果表明,在转化植株的筛选过程中,基于无外源细胞分裂素的 *ipt* 选择系统和基于壮观霉素的 *aadA* 选择系统同样有效, *kas* 基因编码的 3-酮脂酰基载体蛋白合酶 (3-ketoacyl acyl carrier protein synthase, KAS) 的表达进一步证明了 *ipt* 选择系统的可靠性。因此, *ipt* 基因具有用于单子叶植物质体转化筛选的可能,结合“负向”选择标记, *ipt* 基因也具有应用于两步选择系统以获得转化植株同质化的可能。

## 2.2 “负向”选择系统

“负向”选择系统是一个显性选择系统,也可以分为条件和非条件选择系统两类。条件“负向”选择系统通过选择标记基因的表达将正常的无毒物质分解为毒性物质,从而影响表达此类选择标记的转化细胞的生长,但对野生型细胞无毒性作用。*codA* 基因编码高等植物缺少的胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase, CD),催化无毒的 5-氟胞嘧啶(5-fluorocytosine, 5-FC)脱氨转化为 5-fluoro-dUMP 的前体物质 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU),进而引起表达 CD 的细胞死亡,其致死效应源于 5-fluoro-dUMP 所导致的胸苷酸合成酶(thymidylate synthase)不可逆转的抑制性作用<sup>[101]</sup>,目前所使用的“负向”选择系统是基于 *codA* 基因的这一特点所建立的。Serino 和 Maliga<sup>[77]</sup>首次将 *codA* 选择标记应用于烟草叶绿体转化,证实了 *codA* 基因用于叶绿体转化筛选的可行性。现阶段, *codA* 选择标记多用于验证基于 P1 噬菌体位点特异性重组酶的 CRE/*lox* 标记基因删除体系的有效性,当生长于添加了 5-FC 的培养基上时,通过 CRE/*lox* 标记基因删除体系成功删除了 *codA* 基因的叶绿体转化植株可正常生长,而 *codA* 基因未被删除的转化植株不能正常生长并死亡<sup>[102]</sup>。Gisby 等<sup>[73]</sup>在烟草叶绿体转化中已证实:以 D-丙氨酸为筛选底物, *dao* 基因可作为“正向”选择标记,有助于转化细胞的筛选;以 D-缬氨酸为筛选底物, *dao* 基因可作为“负向”选择标记,可用于控制含 *dao* 基因的转基因质体的扩散。同时,在异质化植株中, *dao* 基因的“负向”筛选可影响转化叶绿体和非转化叶绿体的分离,加快同质化实现的进程,也可以用于控制直接重复序列间选择标记基因的删除,产生无选



择标记的转化植株,甚至可用于突变筛选以鉴定影响 *dao* 基因表达和功能维持的核基因产物。目前,尚未见非条件“负向”选择系统在质体基因工程中应用的报道。

### 3 报告基因

作为选择标记体系重要辅助的报告基因常被用于共转化以确认转基因事件中可能的逃逸现象。同时,通过对转化组织的可视化检测,在利用选择压筛选转化细胞之前,就可人工筛选含转化细胞的组织。因此,报告基因有助于转基因植株再生效率的提高和转化系统的改进。

来自大肠杆菌的 *uidA* 基因编码产生葡萄糖苷酶( $\beta$ -glucuronidase, GUS),可水解 B-D-葡萄糖苷酸产生无毒的蓝色底物,通过组织化学法染色直接观察。同时,水解 B-D-葡萄糖苷酸释放出的苄基腺嘌呤可促进芽的分化。在烟草的细胞核转化中,*uidA* 基因被证实是一个有效的“正向”选择标记<sup>[103]</sup>,可作为无需额外选择标记或基因融合的可视化选择标记,也早已用于叶绿体转化中来研究叶绿体中外源基因的表达调控<sup>[104]</sup>。

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是允许荧光基因产物在活细胞中直接成像的一种可视化标记,有氧条件下,荧光基团吸收蓝光或紫外光,发生自身催化反应并发出肉眼可见绿色荧光。为提高荧光分辨率,避免 GFP 对细胞产生毒性,通常需要对野生型 GFP 进行诱变或密码子优化<sup>[105]</sup>。在质体基因工程中,GFP 已被用于基因瞬时表达<sup>[106]</sup>和稳定表达<sup>[28, 107]</sup>的检测。Khan 和 Maliga<sup>[84]</sup>将 *gfp* 和 *aadA* 基因融合,作为可视化并兼具抗生素抗性的双效选择标记成功应用于烟草和水稻叶绿体转化筛选,发现 *gfp* 和 *aadA* 双效选择标记有利于禾谷类作物胚性细胞中非绿色质体的转化筛选,在一定程度上促进了禾谷类作物质体基因工程的发展。

荧光素酶(luciferase, LUC)是通过催化特定底物荧光素(luciferin)或脂肪醛(firefly aldehyde)氧化产生生物发光的一类酶的总称,荧光发生需借助特定发光检测装置在活细胞中检出,并可通过荧光变化实时监测基因表达活性变化。目前,荧光素酶的生物来源种类多达 30 多种,但进行了深度研究的仅有 9 种<sup>[108]</sup>,作为报告基因用于叶绿体转化研究的种类则

更少。Minko 等<sup>[109]</sup>在莱茵衣藻叶绿体中成功表达了海肾荧光素酶基因(*rluc*),与萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶相比,海肾荧光素酶激发荧光除氧外不需要任何其它辅酶因子,但在不同培养基中其稳定性会有差异,在相同培养基或克隆中进行基因表达的长期监测时,每次测量前都需重新校正。Mayfield 和 Schultz<sup>[110]</sup>通过融合细菌荧光素酶的 AB 亚基并针对莱茵衣藻叶绿体密码子进行优化,开发了一种可用于叶绿体转化研究的荧光素酶报告基因(*luxCt*),在莱茵衣藻的叶绿体转化实验中分别通过 CCD 摄像机和照度计测量了 *luxCt* 基因在莱茵衣藻体内及体外的表达活性,证实了 *luxCt* 基因作为报告基因的有效性。

### 4 选择标记的删除体系

目前,选择标记在质体基因工程中转化的筛选和同质化过程上起着不可替代的作用,但使用的大多数还是抗生素抗性基因,这就引起了人们一系列的担忧:抗生素抗性基因从植物向细菌扩散的潜在风险,后续向病原菌的转移有可能会创造出对临床上所使用的抗生素具有抗性的“超级细菌”;同质化植株中抗生素抗性基因蛋白产物的高度表达可能会给植物自身代谢带来负担,生物摄入后的毒性及致敏性<sup>[111]</sup>。虽然大部分作物的叶绿体遗传遵循母系遗传规律,但选择标记基因向野生型植物<sup>[112]</sup>或微生物<sup>[113]</sup>转移的可能性也不能完全排除<sup>[114]</sup>。基于此,同细胞核转化一样,从转化的叶绿体基因组中去除抗生素抗性基因显然是最简单易行的一种方法。当前,正向重复序列介导的同源重组删除体系、噬菌体位点特异性重组酶介导的删除体系、标记基因的瞬时共整合体系和共转化分离体系已经在质体基因工程中得到发展。

#### 4.1 正向重复序列介导的同源删除体系

叶绿体基因组上的正向重复序列之间能通过同源重组<sup>[115, 116]</sup>介导重复序列之间 DNA 片段丢失已被证实,也已成功应用于莱茵衣藻<sup>[117]</sup>和烟草<sup>[118]</sup>转基因植株叶绿体基因组中 *aadA* 基因的删除(图 1A)。一旦转基因植株质体基因组的同质化完成,选择标记基因的去除将使得无 *aadA* 基因的质体基因组随时间而积累。这种选择标记基因的删除是一种自发



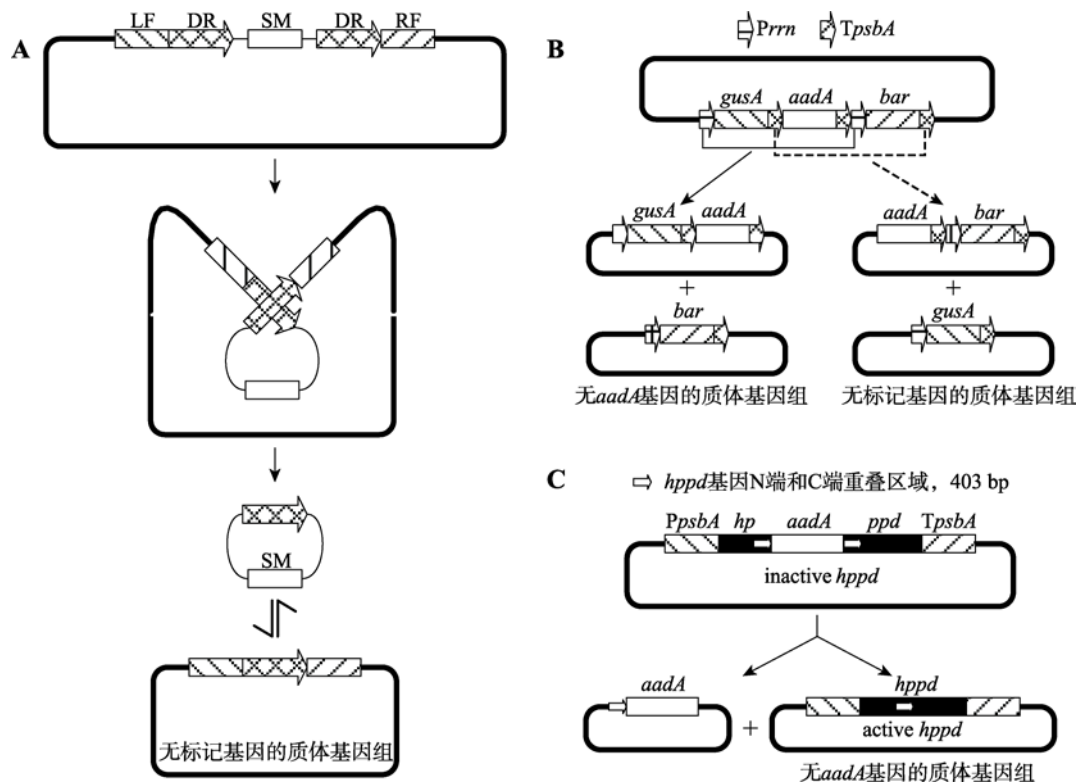


图 1 正向重复序列介导的同源删除体系和位点特异性重组酶介导的删除体系原理示意图

Fig. 1 Direct-repeat-mediated excision through homologous recombination and excision of selectable marker genes using site-specific recombinases

A: 与选择标记基因(SM)相邻的正向重复序列(DR)之间发生同源重组会切除 SM。位点特异性重组酶介导的删除体系与正向重复序列介导的同源删除体系原理相似, 区别在于位点特异性重组酶的识别序列不同。Cre 和  $\Phi$ C31 重组酶识别特定的短序列, 若序列正向重复则会切除 SM; *attB* 和 *attP* 位点序列长度不同。Cre 催化的重组事件一定程度可逆,  $\Phi$ C31 整合酶则是单向反应。B: 增加正向重复序列数目可提高选择标记基因的删除频率。两个正向重复的 *rrn* 启动子(*Prrn*, 174 bp)之间发生同源重组会删除 *aadA* 标记基因, 提高  $T_0$  代除草剂抗性植株的比例; 3 个正向重复的 3'*psbA* 非翻译区(*TpsbA*, 418)之间发生同源重组会删除 *aadA* 和 *bar* 标记基因, 在  $T_1$  代产生较高比例的无选择标记基因植株幼苗<sup>[118]</sup>。C: 通过除草剂 DKN 筛选替代基于壮观霉素的 *aadA* 初步筛选, 可去除 *aadA* 标记基因并恢复 *hppd* 基因的活性。LF: 左侧翼片段; RF: 右侧翼片段; *PpsbA*: *psbA* 基因启动子。参考文献[70, 111, 118]并修改。

的过程, 其删除效率依赖于正向重复序列的长度。在莱茵衣藻中, 483 bp 和 832 bp 的长重复序列可高效删除 *aadA* 基因, 而 100 bp 和 230 bp 的短重复序列却无效<sup>[117]</sup>。同时, 重复序列的数量也能影响选择标记基因的删除效率。在烟草中, 两个 418 bp 的重复序列不能有效删除 *aadA* 基因, 但 3 个 418 bp 和 2 个 174 bp 的重复序列结合在一起却能提高最外层 418 bp 重复序列之间发生重组的效率, 含 *gusA* 基因、无 *aadA* 选择标记基因的叶绿体转化植株高达 24%<sup>[118]</sup>(图 1B)。转化早期依次用壮观霉素和链霉素、PPT 进行筛选, 有可能促进了两个 174 bp 重复序列之间重组的发生, 进而删除 *gusA* 和 *aadA* 基因, 但在  $T_0$  代分离的 42 个再生植株中却发现了两个保

留 *bar* 基因的植株, 该结果表明, 以序列同源为基础的选择标记基因删除体系能通过一次单一的转化实验得到一批预期的结果, 所以大多情况下选择标记基因侧翼仅有一组单一的正向重复序列就可完成选择标记基因的删除。Kode 等<sup>[56]</sup>在烟草质体转化中采用 649 bp 的重复序列删除了 *aadA*、*gusA* 和质体 *rbcL* 基因, 导致 *rbcL* 基因产生不同大小的缺失片段, 使叶片中色素合成受阻, 实现了选择标记基因删除结果的可视化, 所获得的 *rbcL* 基因缺失片段的大小和数量表明, 删除的效率和花费的时间伴随着转化植株发育的全过程, 在去除抗生素以后的筛选过程中, 删除 *aadA* 基因所导致的转化植株抗生素抗性丧失得到进一步加强。但是, 伴随转化植株的生长发

育和有性杂交过程中 DNA 的转移,删除过程将变得复杂难控。因此,Dufourmantel 等<sup>[70]</sup>发展了一种通过功能获得方式促进 *aadA* 基因删除的体系,将 *aadA* 基因插入 *hppd* 基因 N 端和 C 端的编码区内,通过 N 端和 C 端重叠区域(403 bp)之间的同源重组删除 *aadA* 基因并恢复 *hppd* 基因的活性(图 1C)。这种利用质体自身同源重组途径进行的选择标记基因删除方法为选择标记基因的删除提供了一种简单有效的策略。长达 600 bp 的正向重复序列将会提高基因删除的效率,但不影响转化效率;低于 400 bp 的短正向重复序列介导的基因删除的效率可通过加入“负向”选择标记基因得到改善<sup>[77]</sup>，“负向”选择有利于失去选择标记基因的质体产生分离。

#### 4.2 位点特异性重组酶介导的删除体系

位点特异性重组酶介导的删除体系被广泛用于作物选择标记基因的删除,但需要细胞核基因编码并定位于质体的重组酶和重组酶识别的短片段 DNA 序列的参与(图 1A),目前所使用的主要有 Cre/*lox*<sup>[119]</sup>、FLP/*FRT*<sup>[120]</sup>和 R/RS<sup>[121]</sup>3 大系统。质体基因工程中使用的删除系统是基于噬菌体重组酶(Cre 和  $\Phi$ C31 噬菌体整合酶)基础建立的,以 Cre/*loxP* 和  $\Phi$ C31/*attB/attP* 为基础的选择标记基因删除载体已相继得到开发<sup>[122]</sup>。

P1 噬菌体 Cre/*loxP* 位点特异性重组系统工作时,Cre 重组酶催化 *loxP* 位点发生断裂融合,促进重组事件的发生。细胞核基因组中 *cre* 基因诱导表达的 Cre 重组酶进入叶绿体后,特异性识别整合到叶绿体基因组中的选择标记基因两侧的 *loxP*(34 bp)位点,促进 *loxP* 位点发生同源重组并删除选择标记基因,进而产生无选择标记基因的再生植株<sup>[123]</sup>。有报道称可利用花粉、种子或花特异启动子调控 Cre 重组酶的表达<sup>[124-126]</sup>,同时,如果使用农杆菌转化方法导入 *cre* 基因,含 *cre* 基因的载体 T-DNA 可以稳定整合到宿主基因组中,将增加宿主基因组发生变异的可能<sup>[54]</sup>。因此,Cre/*lox* 系统在无性繁殖的作物中使用较多。

当选择标记基因两侧结合了可被  $\Phi$ C31 噬菌体整合酶(Int)识别的噬菌体 *attP*(39 bp)和细菌 *attB*(34 bp)位点<sup>[127]</sup>时,Int 可介导 *attP* 和 *attB* 位点

之间发生重组,进而删除整合入叶绿体基因组中的选择标记基因<sup>[128]</sup>。与 Cre/*loxP* 系统相比,Int 删除系统更具优势:质体基因组中存在可被 Cre 重组酶识别的与 *loxP* 相似的 *lox* 位点,当 *loxP* 位点存在时,Cre 重组酶介导的删除也可以在 *loxP* 和 *lox-rps12* 或 *loxP* 和 *lox-psbA* 序列之间发生<sup>[129]</sup>,而质体基因组中却不存在能被 Int 识别的序列<sup>[128, 130]</sup>;Cre 重组酶的存在增强了质体基因组自身的同源重组,可能会导致一些不可预见的重组事件的发生——在 Cre 重组酶的作用下,邻近 *loxP* 位点的正向或反向重复序列都能介导选择标记基因删除<sup>[131]</sup>,这就更降低了 Cre/*loxP* 系统的稳定性,Int 介导的选择标记基因删除只发生在正向重复序列之间,在完成靶向质体 Int 的细胞核转化后,选择标记基因的删除效果就能快速呈现<sup>[128]</sup>。最近,Shao 等<sup>[132]</sup>发现来自于分枝杆菌噬菌体的 Bxb1 整合酶也可以介导 *attP* 和 *attB* 位点之间发生重组,进而删除这两个位点之间的插入序列,表明 Bxb1/*att* 系统可以用于质体基因工程中选择标记基因的删除。

#### 4.3 标记基因的瞬时共整合体系

在质体转化过程中,标记基因和目的基因通过靶向序列发生双交换共同整合到质体基因组中。当标记基因(*aphA-6*)位于靶向区域之外时,有可能只通过一条靶向序列发生单交换形成共整合结构,这种共整合结构因为带有两个相同的靶位点而不稳定,一旦去除抗生素抗性筛选,就有可能通过另一条靶向序列的单交换发生第二次重组而导致选择标记基因丢失(图 2)。如果目的基因和丧失光合作用的基因(*petA* 或 *rpoA*)结合在一起,并且转化受体也没有该基因,无标记基因的叶绿体转化植株能够通过全基因重组恢复绿色,进而可通过肉眼直接识别<sup>[114]</sup>。如果利用质体相同基因的突变型进行重复转化,则标记基因的瞬时共整合体系是十分便利的,但使用该体系的前提是需要一个用于辅助视觉互补分析的基因敲除突变体<sup>[81]</sup>,这就在一定程度上限制了该体系的应用。

#### 4.4 共转化分离体系

共转化分离体系是基于叶绿体多拷贝的特点,通过两个独立、靶向插入叶绿体基因组不同位点的

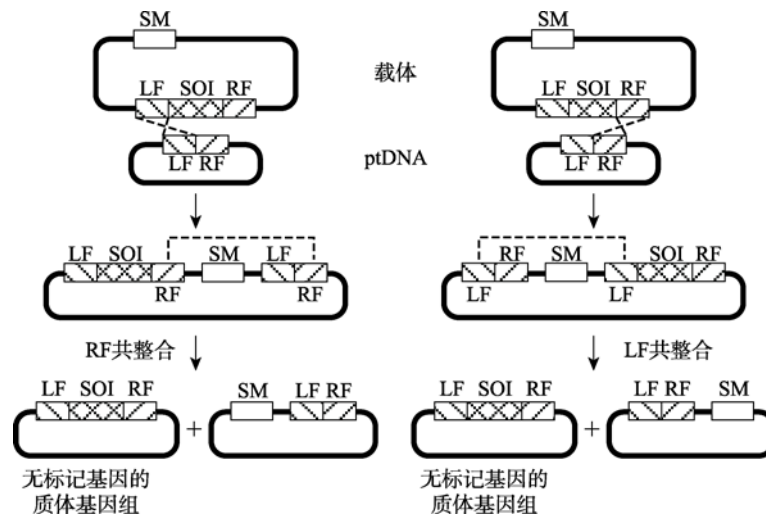


图 2 标记基因的瞬时共整合体系原理示意图

**Fig. 2** Excision of selectable marker genes using co-transformation and segregation

当 SM 位于 LF 和 RF 之外的载体骨架上时, 载体 LF 或 RF 与 ptDNA 的 LF 或 RF 以单交换形式发生同源重组形成具有重复的 LF 或 RF 的不稳定共整合体, 随后重复的 LF 或 RF 之间发生同源重组切除 SM, 产生携带目的基因(SOI)的无选择标记基因 ptDNA。参考文献[111, 114]并修改。

转化载体(一个载体携带选择标记基因, 另一个载体携带目标基因)的共转化来实现, 利用抗生素筛选同时带 2 个基因或仅有选择标记基因的转化细胞, 使转化细胞在无抗生素的培养基上产生自发分离<sup>[66,68,133]</sup> (图 3)。共转化分离体系最早在莱茵衣藻<sup>[134]</sup>中得到应用, 随后应用于烟草<sup>[68]</sup>以获得带除草剂抗性、无抗生素选择标记基因的叶绿体转化植株, 但共转化效率仅达到 20%<sup>[135]</sup>。同细胞核转化应用一样, 共转化分离体系仍存在一些不可避免的局限性, 稳定表达目的基因的叶绿体转基因株系的筛选过程耗时费力<sup>[54,136]</sup>, 共整合基因之间的连锁紧密程度限制了共转化分离的效率<sup>[136]</sup>。

## 5 展 望

与细胞核基因工程相比, 质体基因工程在创制转基因植物上所表现出的优势使得质体转化在近 30 年来成为一个极具吸引力的技术, 已广泛应用于药物、疫苗、抗原和酶的生产及作物农艺性状改良, 充分显示了质体基因工程在生物技术方面的巨大潜力, 但仍有很多问题需要进一步探讨。目前, 这些研究成果多集中在以烟草为代表的模式植物, 虽然在水稻上已有成功应用质体基因工程的报道<sup>[38,61~63,67]</sup>, 但均未获得同质化植株, 单子叶植物, 尤其是禾谷

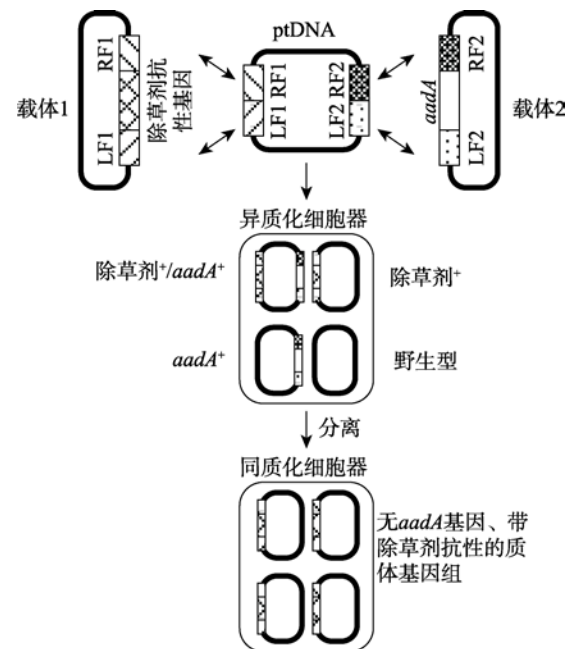


图 3 共转化分离体系原理示意图

**Fig. 3** Isolation of marker-free plants using transient co-integration of the marker gene

两个载体分别携带除草剂抗性基因和 *aadA* 标记基因, 通过两个载体共转化 ptDNA, 分别与 ptDNA 的对应同源区段发生同源重组, 通过对同时携带 2 个基因(除草剂抗性基因和 *aadA* 标记基因)或单基因(除草剂抗性基因或 *aadA* 标记基因)的异质性细胞进行抗生素筛选, 进而在无抗生素培养条件产生自发分离, 获得带除草剂抗性的无抗生素标记基因的叶绿体转化植株。参考文献[68, 111]并修改。

类作物如小麦和玉米更是鲜有成功报道。长期以来, 质体基因工程的发展受到诸多技术性因素的限制, 如禾谷类作物高效转化体系的缺乏、外源基因在非绿色质体中表达水平低、选择标记数量有限和获得完全同质化的植株所需的程序过于冗长等。其中, 选择标记基因是制约质体基因工程受体物种范围及转化子筛选和同质化的关键因素之一。自第一次报道质体转化以来的近30年中, 科研人员已经开发出多种选择标记基因, 但这些选择标记基因多是基于抗生素抗性筛选, 虽然在基础研究中显示出其高效性和便利性, 但出于安全性考虑, 抗生素抗性在转基因作物中并不是一个理想的性状, 在一些国家也禁止田间释放。

目前, 针对这一问题, 科研人员已经发展了一些抗生素抗性选择标记基因的替代方案。一种是使用基于内源性光合作用或代谢产物的选择标记基因, 如16S rDNA、*psaA*、*psaB*、*rbcL*和*psbA*突变等<sup>[2, 32, 55-57]</sup>, 其可行性在莱茵衣藻和烟草的质体转化中已经得到验证, 但这些选择标记基因的筛选不够严谨, 效率在一定程度上也不如抗生素抗性选择标记基因, 所以多与抗生素抗性选择标记基因联合使用。另一种替代方案是使用非抗生素选择标记基因, 如*badh*<sup>[15, 71]</sup>、*ASA2*<sup>[72]</sup>、*dao*<sup>[73]</sup>、*dsla*<sup>[74]</sup>和*ipt*<sup>[76]</sup>等, 但此类选择标记多数不能直接用于转化子的筛选, 必需结合抗生素抗性选择标记基因进行初期筛选, 才能在后续的筛选中发挥作用, 或是在删除转化子抗生素抗性选择标记基因之后, 用于筛选无选择标记基因的转化子。除这些结合抗生素抗性选择标记基因的组标记之外, 除草剂<sup>[12, 65-70]</sup>和毒性D-氨基酸<sup>[73, 74]</sup>抗性选择标记基因也提供了一种改善转化子筛选的严谨性, 并去除抗生素抗性选择标记基因的替代方案。

尽管如此, 目前质体基因工程中所使用的选择标记基因仍是以*aadA*为主, 其他选择标记基因仅在双子叶植物质体转化中有少量的成功报道, 也显现了其用于转化子筛选的优势, 但大多不能够直接用于质体转化的初期筛选, 必须配合*aadA*选择标记完成初期筛选, 才能在后续筛选过程中发挥作用; 而且, 单子叶植物尤其是禾谷类作物天然具有壮观霉素抗性, 所以在大多数双子叶植物上成功使用的选

择标记基因, 尤其是抗生素抗性选择标记*aadA*在单子叶植物上不能有效发挥作用, 研究者也推测这些选择标记基因有可能应用于单子叶植物的质体转化, 进而在一定程度上解决质体转化宿主范围窄的问题, 但其有效性仍有待进一步通过实验验证。同时, 为了消除人们对转基因植物安全性的顾虑, 相应的选择标记基因删除体系也得到了发展, 但在质体基因工程上的应用仍不够完善。

目前, 随着多种植物质体基因组测序的完成, 科研人员对质体基因组结构和功能有了更深入的了解, 在结合报告基因对转化子进行追踪的基础上, 可以针对性地改进转化系统, 提高质体转基因植株的再生效率。在对双子叶植物质体基因工程不断完善的基础上, 科研人员对现有选择标记基因及其删除体系加以改进并进行新的开发, 将进一步推动质体基因工程, 尤其是单子叶植物质体基因工程的发展。

## 参考文献(References):

- [1] Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*, 1988, 240(4858): 1534-1538. [DOI]
- [2] Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(21): 8526-8530. [DOI]
- [3] Kling J. Could transgenic supercrops one day breed superweeds. *Science*, 1996, 274(5285): 180-181. [DOI]
- [4] Mikkelsen TR, Andersen B, Jørgensen RB. The risk of crop transgene spread. *Nature*, 1996, 380(6569): 31. [DOI]
- [5] De Cosa B, Moar W, Lee SB, Miller M, Daniell H. Overexpression of the Bt *cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(1): 71-74. [DOI]
- [6] Dhingra A, Portis AR Jr, Daniell H. Enhanced translation of a chloroplast-expressed *RbcS* gene restores small subunit levels and photosynthesis in nuclear *RbcS* antisense plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(16): 6315-6320. [DOI]
- [7] Lee SB, Kwon HB, Kwon SJ, Park SC, Jeong MJ, Han SE, Byun MO, Daniell H. Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. *Mol Breeding*, 2003, 11(1): 1-13. [DOI]



- [8] Svab Z, Maliga P. Exceptional transmission of plastids and mitochondria from the transplastomic pollen parent and its impact on transgene containment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(17): 7003–7008. [DOI]
- [9] Daniell H, Dhingra A. Multigene engineering: dawn of an exciting new era in biotechnology. *Curr Opin Biotech*, 2002, 13(2): 136–141. [DOI]
- [10] Lössl A, Eibl C, Harloff HJ, Jung C, Koop HU. Polyester synthesis in transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. *Plant Cell Rep*, 2003, 21(9): 891–899. [DOI]
- [11] Quesada-Vargas T, Ruiz ON, Daniell H. Characterization of heterologous multigene operons in transgenic chloroplasts. Transcription, processing, and translation. *Plant Physiol*, 2005, 138(3): 1746–1762. [DOI]
- [12] Daniell H, Datta R, Varma S, Gray S, Lee SB. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(4): 345–348. [DOI]
- [13] Ruhlman TA, Rajasekaran K, Cary JW. Expression of chloroperoxidase from *Pseudomonas pyrocinia* in tobacco plastids for fungal resistance. *Plant Sci*, 2014, 228: 98–106. [DOI]
- [14] Kota M, Daniell H, Varma S, Garczynski SF, Gould F, Moar WJ. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(5): 1840–1845. [DOI]
- [15] Kumar S, Dhingra A, Daniell H. Plastid-expressed *betaine aldehyde dehydrogenase* gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol*, 2004, 136(1): 2843–2854. [DOI]
- [16] Chen PJ, Senthilkumar R, Jane WN, He Y, Tian ZH, Yeh KW. Transplastomic *Nicotiana benthamiana* plants expressing multiple defence genes encoding protease inhibitors and chitinase display broad-spectrum resistance against insects, pathogens and abiotic stresses. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12(4): 503–515. [DOI]
- [17] Okuzaki A, Kida S, Watanabe J, Hirasawa I, Tabei Y. Efficient plastid transformation in tobacco using small gold particles (0.07–0.3  $\mu\text{m}$ ). *Plant Biotechnol*, 2013, 30(1): 65–72. [DOI]
- [18] Okuzaki A, Tabei Y. Improvement of the plastid transformation protocol by modifying tissue treatment at pre- and post-bombardment in tobacco. *Plant Biotechnol*, 2012, 29(3): 307–310. [DOI]
- [19] Svab Z, Maliga P. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(3): 913–917. [DOI]
- [20] Yarbakt M, Jalali-Javaran M, Nikkhah M, Mohebodini M. Dicistronic expression of human proinsulin-protein A fusion in tobacco chloroplast. *Biotechnol Appl Bioc*, 2015, 62(1): 55–63. [DOI]
- [21] Sikdar SR, Serino G, Chaudhuri S, Maliga P. Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep*, 1998, 18(1–2): 20–24. [DOI]
- [22] Díaz AH. Regeneration and plastid transformation approaches in *Arabidopsis thaliana* and rapid-cycling *Brassica rapa*. München: Universitätsbibliothek der Ludwig-Maximilians-Universität, 2011. [DOI]
- [23] Zubko MK, Zubko EI, van Zuilen K, Meyer P, Day A. Stable transformation of petunia plastids. *Transgenic Res*, 2004, 13(6): 523–530. [DOI]
- [24] Nugent GD, Coyne S, Nguyen TT, Kavanagh TA, Dix PJ. Nuclear and plastid transformation of *Brassica oleracea* var. *botrytis* (cauliflower) using PEG-mediated uptake of DNA into protoplasts. *Plant Sci*, 2006, 170(1): 135–142. [DOI]
- [25] Liu CW, Lin CC, Chen JJW, Tseng MJ. Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) by particle bombardment. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(10): 1733–1744. [DOI]
- [26] Nguyen TT, Nugent G, Cardi T, Dix PJ. Generation of homoplasmic plastid transformants of a commercial cultivar of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Sci*, 2005, 168(6): 1495–1500. [DOI]
- [27] Harada H, Maoka T, Osawa A, Hattan J, Kanamoto H, Shindo K, Otomatsu T, Misawa N. Construction of transplastomic lettuce (*Lactuca sativa*) dominantly producing astaxanthin fatty acid esters and detailed chemical analysis of generated carotenoids. *Transgenic Res*, 2014, 23(2): 303–315. [DOI]
- [28] Lelivelt CL, McCabe MS, Newell CA, deSnoo CB, van Dun KMP, Birch-Machin I, Gray JC, Mills KHG, Nugent JM. Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Mol Biol*, 2005, 58(6): 763–774. [DOI]
- [29] Kanamoto H, Yamashita A, Asao H, Okumura S, Takase H, Hattori M, Yokota A, Tomizawa K. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic Res*, 2006, 15(2): 205–217. [DOI]
- [30] Ruhlman T, Ahangari R, Devine A, Samsam M, Daniell

- H. Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts--oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Plant Biotechnol J*, 2007, 5(4): 495–510. [DOI]
- [31] Lelivelt CL, van Dun KM, de Snoo CB, McCabe MS, Hogg BV, Nugent JM. Plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) by polyethylene glycol treatment of protoplasts. In: Maliga P, ed. *Chloroplast Biotechnology*. Totowa, NJ: Humana Press, 2014: 317–330. [DOI]
- [32] Nugent GD, ten Have M, van der Gulik A, Dix PJ, Uijtewaalt BA, Mordhorst AP. Plastid transformants of tomato selected using mutations affecting ribosome structure. *Plant Cell Rep*, 2005, 24(6): 341–349. [DOI]
- [33] Sidorov VA, Kasten D, Pang SZ, Hajdukiewicz PTJ, Staub JM, Nehra NS. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J*, 1999, 19(2): 209–216. [DOI]
- [34] Kumar S, Dhingra A, Daniell H. Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Mol Biol*, 2004, 56(2): 203–216. [DOI]
- [35] Cheng L, Li HP, Qu B, Huang T, Tu JX, Fu TD, Liao YC. Chloroplast transformation of rapeseed (*Brassica napus*) by particle bombardment of cotyledons. *Plant Cell Rep*, 2010, 29(4): 371–381. [DOI]
- [36] Hou BK, Zhou YH, Wan LH, Zhang ZL, Shen GF, Chen ZH, Hu ZM. Chloroplast transformation in oilseed rape. *Transgenic Res*, 2003, 12(1): 111–114. [DOI]
- [37] Dufourmantel N, Pelissier B, Garcon F, Peltier G, Ferullo JM, Tissot G. Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Mol Biol*, 2004, 55(4): 479–489. [DOI]
- [38] Lee SM, Kang K, Chung H, Yoo SH, Xu XM, Lee SB, Cheong JJ, Daniell H, Kim M. Plastid transformation in the monocotyledonous cereal crop, rice (*Oryza sativa*) and transmission of transgenes to their progeny. *Mol Cells*, 2006, 21(3): 401–410. [DOI]
- [39] Muralikrishna N, Srinivas K, Kumar KB, Sadanandam A. Stable plastid transformation in *Scoparia dulcis* L. *Physiol Mol Biol Plants*, 2016, 22(4): 575–581. [DOI]
- [40] Palmer JD. Comparative organization of chloroplast genomes. *Annu Rev Genet*, 1985, 19(1): 325–354. [DOI]
- [41] Lilly JW, Havey MJ, Jackson SA, Jiang J. Cytogenomic analyses reveal the structural plasticity of the chloroplast genome in higher plants. *Plant Cell*, 2001, 13(2): 245–254. [DOI]
- [42] Verma D, Daniell H. Chloroplast vector systems for biotechnology applications. *Plant Physiol*, 2007, 145(4): 1129–1143. [DOI]
- [43] Meyers B, Zaltsman A, Lacroix B, Kozlovsky SV, Krichivsky A. Nuclear and plastid genetic engineering of plants: comparison of opportunities and challenges. *Biotechnol Adv*, 2010, 28(6): 747–756. [DOI]
- [44] Maliga P. Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 289–313. [DOI]
- [45] Golds T, Maliga P, Koop HU. Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Nat Biotechnol*, 1993, 11(1): 95–97. [DOI]
- [46] O'Neill C, Horváth GV, Horváth E, Dix PJ, Medgyesy P. Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. *Plant J*, 1993, 3(5): 729–738. [DOI]
- [47] Koop HU, Steinmüller K, Wagner H, Rössler C, Eibl C, Sacher L. Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. *Planta*, 1996, 199(2): 193–201. [DOI]
- [48] Venkateswarlu K, Nazar RN. Evidence for T-DNA mediated gene targeting to tobacco chloroplasts. *Bio/Technology*, 1991, 9(11): 1103–1105. [DOI]
- [49] Knoblauch M, Hibberd JM, Gray JC, van Bel AJE. A galinstan expansion femtosyringe for microinjection of eukaryotic organelles and prokaryotes. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(9): 906–909. [DOI]
- [50] Weber G, Monajembashi S, Greulich KO, Wolfrum J. Uptake of DNA in chloroplasts of *Brassica napus* (L) facilitated by a UV laser microbeam. *Eur J Cell Biol*, 1989, 49(1): 73–79. [DOI]
- [51] Liu BL, Yue SX, Hu NB, Li XB, Zhai WX, Li N, Zhu RH, Zhu LH, Mao DZ, Zhou PZ. Transfer of atrazine-resistant gene from nightshade to soybean chloroplast genome and its expression in transgenic plants. *Chin Sci: B*, 1989, 4(7): 699–705.
- 刘博林, 岳绍先, 胡乃璧, 李小兵, 翟文学, 李诺, 朱荣焕, 朱立煌, 毛大璋, 周佩珍. 龙葵 Atrazine 抗性基因向大豆叶绿体的转移及在转基因植株中的表达. *中国科学: B 辑*, 1989, 4(7): 699–705. [DOI]
- [52] Bogorad L. Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. *Trends Biotechnol*, 2000, 18(6): 257–263. [DOI]
- [53] Díaz AH, Koop H-U. *Nicotiana tabacum*: PEG-mediated plastid transformation. In: Maliga P, ed. *Chloroplast Biotechnology*. Totowa, NJ: Humana Press, 2014: 165–175. [DOI]

- [54] Manimaran P, Ramkumar G, Sakthivel K, Sundaram RM, Madhav MS, Balachandran SM. Suitability of non-lethal marker and marker-free systems for development of transgenic crop plants: present status and future prospects. *Biotechnol Adv*, 2011, 29(6): 703–714. [DOI]
- [55] Redding K, MacMillan F, Leibl W, Brettel K, Hanley J, Rutherford AW, Breton J, Rochaix JD. A systematic survey of conserved histidines in the core subunits of Photosystem I by site-directed mutagenesis reveals the likely axial ligands of P700. *Embo J*, 1998, 17(1): 50–60. [DOI]
- [56] Kode V, Mudd EA, Iamtham S, Day A. Isolation of precise plastid deletion mutants by homology-based excision: a resource for site-directed mutagenesis, multi-gene changes and high-throughput plastid transformation. *Plant J*, 2006, 46(5): 901–909. [DOI]
- [57] Przibilla E, Heiss S, Johanningmeier U, Trebst A. Site-specific mutagenesis of the D1 subunit of photosystem II in wild-type *Chlamydomonas*. *Plant Cell*, 1991, 3(2): 169–174. [DOI]
- [58] Wei ZY, Liu YZ, Lin CJ, Wang YP, Cai QA, Dong YS, Xing SC. Transformation of alfalfa chloroplasts and expression of green fluorescent protein in a forage crop. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(12): 2487–2494. [DOI]
- [59] Carrer H, Hockenberry TN, Svab Z, Maliga P. Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. *Plant J*, 1993, 24(1–2): 49–56. [DOI]
- [60] Li WM, Ruf S, Bock R. Chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker for plastid transformation. *Plant Mol Biol*, 2011, 76(3–5): 443–451. [DOI]
- [61] Li D. Establishment of the chloroplast genetic transformation system in rice by using hygromycin B as selection pressure. Central South University, 2013.  
李丁. 以潮霉素为筛选标记的水稻叶绿体转化体系的建立[学位论文].中南大学, 2013. [DOI]
- [62] Li D, Tang N, Liu MX, Shen CX, Hu YY, Xia YM, Cao ML. Using hygromycin phosphotransferase and enhanced green fluorescent protein genes for tracking plastid transformation in rice (*Oryza sativa* L.) via gold particle bombardment. *Nanosci Nanotechnol Lett*, 2016, 8(5): 409–417. [DOI]
- [63] Li D, Tang N, Fang Z, Xia YM, Cao ML. Co-transfer of TALENs construct targeted for chloroplast genome and chloroplast transformation vector into rice using particle bombardment. *J Nanosci Nanotechnol*, 2016, 16(12): 12194–12201. [DOI]
- [64] Huang FC, Klaus S, Herz S, Zou Z, Koop HU, Golds TJ. Efficient plastid transformation in tobacco using the *aphA-6* gene and kanamycin selection. *Mol Genet Genomics*, 2002, 268(1): 19–27. [DOI]
- [65] Lapidot M, Raveh D, Sivan A, Arad SM, Shapira M. Stable chloroplast transformation of the unicellular red alga *Porphyridium* species. *Plant Physiol*, 2002, 129(1): 7–12. [DOI]
- [66] Lutz KA, Knapp JE, Maliga P. Expression of *bar* in the plastid genome confers herbicide resistance. *Plant Physiol*, 2001, 125(4): 1585–1590. [DOI]
- [67] Li YN, Sun BY, Su N, Meng XX, Zhang ZF, Shen GF. Establishment of a gene expression system in rice chloroplast and obtainment of PPT-resistant rice plants. *Scientia Agric Sinica*, 2007, 40(9): 1849–1855.  
李轶女, 孙丙耀, 苏宁, 孟祥勋, 张志芳, 沈桂芳. 水稻叶绿体表达体系的建立及抗 PPT 叶绿体转化植株的获得. 中国农业科学, 2007, 40(9): 1849–1855. [DOI]
- [68] Ye GN, Colburn SM, Xu CW, Hajdukiewicz PTJ, Staub JM. Persistence of unselected transgenic DNA during a plastid transformation and segregation approach to herbicide resistance. *Plant Physiol*, 2003, 133(1): 402–410. [DOI]
- [69] Falk J, Brosch M, Schäfer A, Braun S, Krupinska K. Characterization of transplastomic tobacco plants with a plastid localized barley 4-hydroxyphenyl-pyruvate dioxygenase. *J Plant Physiol*, 2005, 162(7): 738–742. [DOI]
- [70] Dufourmantel N, Dubald M, Matringe M, Canard H, Garcon F, Job C, Kay E, Wisniewski JP, Ferullo JM, Pellissier B, Sailland A, Tissot G. Generation and characterization of soybean and marker-free tobacco plastid transformants over-expressing a bacterial 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase which provides strong herbicide tolerance. *Plant Biotechnol J*, 2007, 5(1): 118–133. [DOI]
- [71] Daniell H, Muthukumar B, Lee SB. Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr Genet*, 2001, 39(2): 109–116. [DOI]
- [72] Barone P, Zhang XH, Widholm JM. Tobacco plastid transformation using the feedback-insensitive anthranilate synthase [ $\alpha$ ]-subunit of tobacco (ASA2) as a new selectable marker. *J Exp Bot*, 2009, 60(11): 3195–3202. [DOI]
- [73] Gisby MF, Mudd EA, Day A. Growth of transplastomic cells expressing D-amino acid oxidase in chloroplasts

- is tolerant to D-alanine and inhibited by D-valine. *Plant Physiol*, 2012, 160(4): 2219–2226. [DOI]
- [74] Li YM, Wang R, Hu ZL, Li HC, Lu SZ, Zhang JJ, Lin YJ, Zhou F. Expression of a codon-optimized *dsdA* gene in tobacco plastids and rice nucleus confers D-serine tolerance. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 640. [DOI]
- [75] Tabatabaei I, Ruf S, Bock R. A bifunctional aminoglycoside acetyltransferase/phosphotransferase conferring tobramycin resistance provides an efficient selectable marker for plastid transformation. *Plant Mol Biol*, 2017, 93(3): 269–281. [DOI]
- [76] Dunne A, Maple-Grødem J, Gargano D, Haslam RP, Napier JA, Chua NH, Russell R, Møller SG. Modifying fatty acid profiles through a new cytokinin-based plastid transformation system. *Plant J*, 2014, 80(6): 1131–1138. [DOI]
- [77] Serino G, Maliga PP. A negative selection scheme based on the expression of cytosine deaminase in plastids. *Plant J*, 1997, 12(3): 697–701. [DOI]
- [78] Miki B, McHugh S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol*, 2004, 107(3): 193–232. [DOI]
- [79] Harris EH, Burkhart BD, Gillham NW, Boynton JE. Antibiotic resistance mutations in the chloroplast 16S and 23S rRNA genes of *Chlamydomonas reinhardtii*: correlation of genetic and physical maps of the chloroplast genome. *Genetics*, 1989, 123(2): 281–292. [DOI]
- [80] Moll B, Polsby L, Maliga P. Streptomycin and lincomycin resistances are selective plastid markers in cultured *Nicotiana* cells. *Mol Genet Genomics*, 1990, 221(2): 245–250. [DOI]
- [81] Klaus SMJ, Huang FC, Eibl C, Koop HU, Golds TJ. Rapid and proven production of transplastomic tobacco plants by restoration of pigmentation and photosynthesis. *Plant J*, 2003, 35(6): 811–821. [DOI]
- [82] Ahmadabadi M, Ruf S, Bock R. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). *Transgenic Res*, 2007, 16(4): 437–448. [DOI]
- [83] Fromm H, Edelman M, Aviv D, Galun E. The molecular basis for rRNA-dependent spectinomycin resistance in *Nicotiana* chloroplasts. *Embo J*, 1987, 6(11): 3233–3237. [DOI]
- [84] Khan MS, Maliga P. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(9): 910–915. [DOI]
- [85] Tian LN, Charest PJ, Séguin A, Rutledge RG. Hygromycin resistance is an effective selectable marker for biolistic transformation of black spruce (*Picea mariana*). *Plant Cell Rep*, 2000, 19(4): 358–362. [DOI]
- [86] Ortiz JPA, Reggiardo MI, Ravizzini RA, Altabe SG, Cervigni GDL, Spitteler MA, Morata MM, Elias FE, Vallejos RH. Hygromycin resistance as an efficient selectable marker for wheat stable transformation. *Plant Cell Rep*, 1996, 15(12): 877–881. [DOI]
- [87] Frase H, Toth M, Vakulenko SB. Revisiting the nucleotide and aminoglycoside substrate specificity of the bifunctional aminoglycoside acetyltransferase(6′)-Ie/aminoglycoside phosphotransferase(2′)-Ia enzyme. *J Biol Chem*, 2012, 287(52): 43262–43269. [DOI]
- [88] Svab Z, Maliga P. Mutation proximal to the tRNA binding region of the *Nicotiana* plastid 16S rRNA confers resistance to spectinomycin. *Mol Gen Genet*, 1991, 228(1–2): 316–319. [DOI]
- [89] Bock R. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J Mol Biol*, 2001, 312(3): 425–438. [DOI]
- [90] Rathinasabapathi B, McCue KF, Gage DA, Hanson AD. Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance. *Planta*, 1994, 193(2): 155–162. [DOI]
- [91] Nuccio ML, Rhodes D, McNeil SD, Hanson AD. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, 2(2): 128–134. [DOI]
- [92] Barone P, Widholm JM. Use of 4-methylindole or 7-methyl-DL-tryptophan in a transformant selection system based on the feedback-insensitive anthranilate synthase  $\alpha$ -subunit of tobacco (ASA2). *Plant Cell Rep*, 2008, 27(3): 509–517. [DOI]
- [93] Zhang XH, Brotherton JE, Widholm JM. Co-expression of the tobacco anthranilate synthase  $\beta$  subunit with its feedback-insensitive  $\alpha$  subunit as a selectable marker that also markedly increases the free tryptophan content. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2015, 51(5): 564–570. [DOI]
- [94] Endo S, Kasahara T, Sugita K, Matsunaga E, Ebinuma H. The isopentenyl transferase gene is effective as a selectable marker gene for plant transformation in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana SRI). *Plant Cell Rep*, 2001, 20(1): 60–66. [DOI]
- [95] Kunkel T, Niu QW, Chan YS, Chua NH. Inducible isopentenyl transferase as a high-efficiency marker for plant transformation. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(9): 916–



919. [DOI]
- [96] Endo S, Sugita K, Sakai M, Tanaka H, Ebinuma H. Single-step transformation for generating marker-free transgenic rice using the *ipt*-type MAT vector system. *Plant J*, 2002, 30(1): 115–122. [DOI]
- [97] Devi S, Mishra MK, Elliott M. Regeneration of transgenic rice with bacterial *ipt* gene driven by senescence specific (*SAG12*) promoter by particle bombardment. *Trop Life Sci Res*, 2012, 23(2): 39–48. [DOI]
- [98] Khan RS, Ntui VO, Chin DP, Nakamura I, Mii M. Production of marker-free disease-resistant potato using *isopentenyl transferase* gene as a positive selection marker. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(4): 587–597. [DOI]
- [99] Zhang P, Wang WQ, Zhang GL, Kaminek M, Dobrev P, Xu J, Gruissem W. Senescence-inducible expression of isopentenyl transferase extends leaf life, increases drought stress resistance and alters cytokinin metabolism in cassava. *J Integr Plant Biol*, 2010, 52(7): 653–669. [DOI]
- [100] Zou X, Peng AH, Xu LZ, Liu XF, Lei TG, Yao LX, He YR, Chen SC. Efficient auto-excision of a selectable marker gene from transgenic citrus by combining the Cre/*loxP* system and *ipt* selection. *Plant Cell Rep*, 2013, 32(10): 1601–1613. [DOI]
- [101] Beck CF, Ingraham JL, Neuhaard J, Thomassen E. Metabolism of pyrimidines and pyrimidine nucleosides by *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 1972, 110(1): 219–228. [DOI]
- [102] Corneille S, Lutz K, Svab Z, Maliga P. Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the CRE-*lox* site-specific recombination system. *Plant J*, 2001, 27(2): 171–178. [DOI]
- [103] Joersbo M, Okkels FT. A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. *Plant Cell Rep*, 1996, 16(3–4): 219–221. [DOI]
- [104] Staub JM, Maliga P. Expression of a chimeric *uidA* gene indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids. *Plant J*, 1995, 7(5): 845–848. [DOI]
- [105] Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(6): 2122–2127. [DOI]
- [106] Hibberd JM, Linley PJ, Khan MS, Gray JC. Transient expression of green fluorescent protein in various plastid types following microprojectile bombardment. *Plant J*, 1998, 16(5): 627–632. [DOI]
- [107] Limaye A, Koya V, Samsam M, Daniell H. Receptor-mediated oral delivery of a bioencapsulated green fluorescent protein expressed in transgenic chloroplasts into the mouse circulatory system. *FASEB J*, 2006, 20(7): 959–961. [DOI]
- [108] Kaskova ZM, Tsarkova AS, Yampolsky IV. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. *Chem Soc Rev*, 2016, 45(21): 6048–6077. [DOI]
- [109] Minko I, Holloway SP, Nikaido S, Carter M, Odom OW, Johnson CH, Herrin DL. *Renilla* luciferase as a vital reporter for chloroplast gene expression in *Chlamydomonas*. *Mol Gen Genet*, 1999, 262(3): 421–425. [DOI]
- [110] Mayfield SP, Schultz J. Development of a luciferase reporter gene, *luxCt*, for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Plant J*, 2004, 37(3): 449–458. [DOI]
- [111] Day A, Goldschmidt-Clermont M. The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. *Plant Biotechnol J*, 2011, 9(5): 540–553. [DOI]
- [112] Daniell H. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(6): 581–586. [DOI]
- [113] Kay E, Vogel TM, Bertolla F, Nalin R, Simonet P. In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(7): 3345–3351. [DOI]
- [114] Klaus SMJ, Huang FC, Golds TJ, Koop HU. Generation of marker-free plastid transformants using a transiently cointegrated selection gene. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(2): 225–229. [DOI]
- [115] Cerutti H, Johnson AM, Boynton JE, Gillham NW. Inhibition of chloroplast DNA recombination and repair by dominant negative mutants of *Escherichia coli* RecA. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(6): 3003–3011. [DOI]
- [116] Künstner P, Guardiola A, Takahashi Y, Rochaix JD. A mutant strain of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking the chloroplast photosystem II *psbI* gene grows photoautotrophically. *J Biol Chem*, 1995, 270(16): 9651–9654. [DOI]
- [117] Fischer N, Stampacchia O, Redding K, Rochaix JD. Selectable marker recycling in the chloroplast. *Mol Gen Genet*, 1996, 251(3): 373–380. [DOI]
- [118] Iamtham S, Day A. Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(11): 1172–1176. [DOI]

- [119] Pradhan S, Chakraborty A, Sikdar N, Chakraborty S, Bhattacharyya J, Mitra J, Manna A, Dutta Gupta S, Sen SK. Marker-free transgenic rice expressing the vegetative insecticidal protein (Vip) of *Bacillus thuringiensis* shows broad insecticidal properties. *Planta*, 2016, 244(4): 789–804. [DOI]
- [120] Woo HJ, Qin Y, Park SY, Park SK, Cho YG, Shin KS, Lim MH, Cho HS. Development of selectable marker-free transgenic rice plants with enhanced seed tocopherol content through FLP/FRT-mediated spontaneous auto-excision. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132667. [DOI]
- [121] Toriyama K, Chiba A, Nakagawa Y. Visualization of somatic deletions mediated by R/RS site-specific recombination and induction of germinal deletions caused by callus differentiation and regeneration in rice. *Plant Cell Rep*, 2003, 21(6): 605–610. [DOI]
- [122] Lutz KA, Azhagiri AK, Tungsuchat-Huang T, Maliga P. A guide to choosing vectors for transformation of the plastid genome of higher plants. *Plant Physiol*, 2007, 145(4): 1201–1210. [DOI]
- [123] Lutz KA, Bosacchi MH, Maliga P. Plastid marker-gene excision by transiently expressed CRE recombinase. *Plant J*, 2006, 45(3): 447–456. [DOI]
- [124] Mlynárová L, Conner AJ, Nap JP. Directed microspore-specific recombination of transgenic alleles to prevent pollen-mediated transmission of transgenes. *Plant Biotechnol J*, 2006, 4(4): 445–452. [DOI]
- [125] Luo KM, Sun M, Deng W, Xu S. Excision of selectable marker gene from transgenic tobacco using the GM-gene-deletor system regulated by a heat-inducible promoter. *Biotechnol Lett*, 2008, 30(7): 1295–1302. [DOI]
- [126] Bai XQ, Wang QY, Chu CC. Excision of a selective marker in transgenic rice using a novel Cre/loxP system controlled by a floral specific promoter. *Transgenic Res*, 2008, 17(6): 1035–1043. [DOI]
- [127] Groth AC, Olivares EC, Thyagarajan B, Calos MP. A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(11): 5995–6000. [DOI]
- [128] Kittiwongwattana C, Lutz K, Clark M, Maliga P. Plastid marker gene excision by the phiC31 phage site-specific recombinase. *Plant Mol Biol*, 2007, 64(1–2): 137–143. [DOI]
- [129] Corneille S, Lutz KA, Azhagiri AK, Maliga P. Identification of functional lox sites in the plastid genome. *Plant J*, 2003, 35(6): 753–762. [DOI]
- [130] Lutz KA, Corneille S, Azhagiri AK, Svab Z, Maliga P. A novel approach to plastid transformation utilizes the phiC31 phage integrase. *Plant J*, 2004, 37(6): 906–913. [DOI]
- [131] Mlynárová L, Libantová J, Vrba L, Nap JP. The promiscuity of heterospecific lox sites increases dramatically in the presence of palindromic DNA. *Gene*, 2002, 296(1–2): 129–137. [DOI]
- [132] Shao M, Kumar S, Thomson JG. Precise excision of plastid DNA by the large serine recombinase Bxb1. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12(3): 322–329. [DOI]
- [133] Ye GN, Hajdukiewicz PTJ, Broyles D, Rodriguez D, Xu CW, Nehra N, Staub JM. Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco. *Plant J*, 2001, 25(3): 261–270. [DOI]
- [134] Kindle KL, Richards KL, Stern DB. Engineering the chloroplast genome: techniques and capabilities for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(5): 1721–1725. [DOI]
- [135] Carrer H, Maliga P. Targeted insertion of foreign genes into the tobacco plastid genome without physical linkage to the selectable marker gene. *Nat Biotechnol*, 1995, 13(8): 791–794. [DOI]
- [136] Tuteja N, Verma S, Sahoo RK, Raveendar S, Reddy INBL. Recent advances in development of marker-free transgenic plants: regulation and biosafety concern. *J Biosci*, 2012, 37(1): 167–197. [DOI]

(责任编辑: 邢永忠)