

## 標誌基因與無篩選標誌基因之轉殖植物

紀 科 衡<sup>1)</sup>

關鍵字：標誌基因、無篩選標誌基因轉殖植物

**摘要：**標誌基因可以輔助植物基因轉殖提昇轉殖效率，其作用包括協助轉殖培養體進行篩選或挑選出成功轉殖細胞，並進一步再生成轉殖植株。標誌基因依造成篩選壓力之有無可區分為篩選標誌基因(selectable marker genes, SMGs)和報導基因(reporter genes, RGs)，篩選基因可再區分為二類，可讓轉殖細胞或植株生長者為正篩選基因(positive selectable genes)，另類會導致轉殖細胞無法生長或存活者稱為負篩選基因(negative selectable genes)。正篩選基因需要配合篩選試劑以提供篩選壓力者為有條件(conditional)正篩選基因，例如抗抗生素、抗除草劑基因等；而不需篩選試劑參與者為無條件(non-conditional)正篩選基因，例如具有提供培養基中缺乏的植物生長物質之合成能力者。負篩選基因係以逆向篩選導致具有此基因的細胞或植株無法存活，常應用在去除未剔除抗生素或除草劑篩選基因的培養體或植株。因應對於生物安全性的要求，利用剔除篩選標誌基因技術可降低抗抗生素和抗除草劑篩選基因對生態環境可能產生的風險，在轉殖階段容許利用篩選基因進行有效篩選以提高轉殖效率，後續再將篩選基因從轉殖植物剔除，移除標誌基因的方法包括利用共轉型(co-transformation)剔除、重組酶剔除和轉位子(transposon)剔除技術。本文將對標誌基因及無篩選基因轉殖植物之應用技術進行探討。

### 前 言

標誌基因(marker genes, MGs)的目的是藉由與目標基因共同轉殖，以提供判斷目標基因是否成功導入寄主植物或整併至基因組。基因轉殖技術受限於轉殖效率，僅少數細胞成功轉殖而攜帶目標基因，因此，標誌基因有助於提昇植物基因轉殖的效率。超過 50 種標誌基因應用在細胞核或葉綠體基因轉殖，許多源自細菌、真菌、植物和動物的基因具標誌基因的特性，選擇適當的標誌基因可依其表現型特徵及其對寄主植物影響進行評估。篩選

---

1) 國立中興大學園藝學系博士班學生，通訊作者。

標誌基因可協助篩選和改善轉殖效率，報導標誌基因則可便於判別其表現的細胞或組織。標誌基因與目標基因共同轉殖，它們和目標基因連結，因此保留在轉殖細胞，然而，一旦基因轉殖細胞被確認，並再生成完整植株，標記基因將不再需要。再者，基因轉殖作物中的篩選標誌基因，包括抗生素或除草劑的抗性基因，可能轉移至雜草或土壤及腸胃道中的病原微生物，甚或經由有性繁殖傳遞至未轉殖植物及相關物種，因此，基於生物安全性及對於基改作物接受度考量，於成功轉殖植物剔除篩選標誌基因或利用無標誌基因轉殖技術可降低標誌基因對生物環境安全的衝擊。

## 標誌基因種類

標誌基因經由與外源基因共同導入目標植物基因組，可協助挑選導入外源基因的細胞，目前已有許多標誌基因應用於植物基因轉殖，依有無提供篩選壓力可區分為：(1) 篩選標誌基因(selectable marker genes, SMGs)，對於轉殖細胞的繁殖與再生提供篩選壓力。例如 *nptII* 基因編碼新徽素磷酸轉移酶(neomycin phosphotransferase)，可以抗生素 kanamycin 或 neomycin 進行篩選；*hph* 基因編碼潮霉素磷酸轉移酶(hygromycin phosphotransferase)，以 hygromycin 進行篩選、*bar* 基因編碼磷絲菌素 N-乙醯轉移酶(phosphinothricin acetyltransferase, PAT)，以固殺草(glufosinate)進行篩選。(2) 報導基因(reporter genes, RGs)，無需篩選試劑參與，可提供轉殖細胞與植物產生明顯可區別的表現型，但不具有篩選壓力。例如 *uidA* 基因編碼 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶( $\beta$ -glucuronidase, GUS)，可將基因轉殖組織以 X-Gluc 進行呈色反應、水母綠色螢光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因和螢火蟲螢光素酵素(luciferase, LUC)基因，GFP 和 LUC 基因轉殖培植體可利用特定波長螢光光源觀察。

### 一、篩選標誌基因

基因轉殖方法係將外源基因導入目標作物基因組，但可能僅有少部分培植體細胞帶有轉殖基因，其餘大部分培植體細胞並不具有轉殖基因，有效的篩選策略必須挑選出少數的轉殖細胞或植株。篩選標誌基因可歸納為二類：(1) 正篩選標誌基因(positive selectable marker genes)，可協助攜帶有此類基因的轉殖細胞或植株對抗生素、除草劑、代謝類似物等毒性物質產生抗性而正常生長；或提供基因轉殖細胞在缺乏生長物質培養基中生長與分化；(2) 負篩選標誌基因(negative selectable marker genes)，則是逆向篩選導致具有此基因的細胞或植株無法存活，負篩選系統可以應用在去除未剔除抗生素標誌基因的培植體或植株。

#### (一) 正篩選標誌基因

正篩選系統係指可讓植物基因轉殖細胞生長者，可再區分為有條件(conditional)和無條件(non-conditional)正篩選標誌基因。

##### 1. 需篩選試劑(有條件)之正篩選標誌基因

"有條件"係指須配合生長抑制物或篩選試劑之正篩選標誌基因，本文介紹抗抗生素基因、抗除草劑基因和轉換植物或非植物代謝物基因。

(1) 抗氨基糖苷類抗生素基因

篩選標誌基因在植物基因轉殖的應用以對氨基糖苷類(amino glycoside)抗生素的修飾酵素最為廣泛，可區分為三大類，包括氨基糖苷-O-磷酸轉移酶(aminoglycoside-O-phosphotransferases)、氨基糖苷-N-乙酰轉移酶(aminoglycoside-N-acetyltransferases)和氨基糖苷-O-核苷轉移酶(aminoglycoside-O-nucleotidyltransferases)。這些氨基糖苷類修飾酵素提供對抗生素的抗性。

i. 新黴素磷酸轉移酶(neomycin phosphotransferase II)

新黴素磷酸轉移酶(NPTII)即 aminoglycoside 3'-phosphotransferase II (APH(3')-II, E.C. 2.7.1.95)，源自大腸桿菌 K12 株的 TN5 轉座子(transposon Tn5) (Garfinkel *et al.*, 1981)，是植物首先採用的篩選標誌基因，也是目前植物最常使用的篩選標記基因。對 neomycin、kanamycin、geneticin (G418)和巴龍黴素(paramomycin)等抗生素氨基己糖部分的 3' 羥基進行磷酸化，防止此類抗生素對核糖體蛋白轉譯作用的抑制。*nptII* 可以有效應用在單子葉或雙子葉植物，包括阿拉伯芥、菸草、水稻或玉米等。於 *nptII* 基因序列中插入馬鈴薯 *ST-LSI* 基因的内含子 intron 2，使其僅能在雙子葉及單子葉植物才能表現這個基因(Libiakova, 2001)，可以避免抗生素抗性基因從轉殖植物水平漂移至細菌的潛在風險。或在 *nptII* 基因序列插入玉米 *Shrunken 1 (Sh 1)* 基因的内含子 intron 1 (Maas *et al.*, 1997)，可限縮 *nptII* 僅能在單子葉植物表現。

ii. 潮黴素磷酸轉移酶(hygromycin phosphotransferase)

Hygromycin B 可廣泛抑制原核生物和真核生物蛋白質合成，對植物具有高毒性，*E. coli* 的 *aphIV (hph, hpt)* 基因編碼 hygromycin B phosphotransferase (HPT, E.C. 2.7.1.119)，經由對 hygromycin B 的 7" 羥基進行磷酸化，提供解毒作用。選殖潮黴素磷酸轉移酶(*hph*) 基因所開發的載體可以廣泛適用於雙子葉、單子葉和裸子植物(Tian *et al.*, 2000)。hygromycin B 是僅次於 kanamycin 最常用在植物基因轉殖的篩選抗生素，但相較於 kanamycin，hygromycin B 更具毒性，因此可以更快速殺死對其敏感的細胞。雖然它不易使用，對於單子葉植物的篩選 hygromycin 是首選的抗生素抗性標記。因其具有毒性，可以經由吸入、皮膚接觸和吞食，當操作 hygromycin B 時需要特別小心。

iii. 氨基糖苷 3"-腺苷轉移酶(aminoglycoside-3"-adenyltransferase)

*aadA* 基因分離自革蘭氏陰性菌志賀氏菌(*Shigella sp.*)，編碼氨基糖苷 3"-腺苷轉移酶(aminoglycoside-3"-adenyltransferase)，可作為對 spectinomycin 和 streptomycin 的抗性基因，*aadA* 酵素經由將腺嘌呤基(adenyl group)自 ATP 轉移至抗生素進行解毒，使抗生素失去活性。使用 *aadA* 作為抗抗生素篩選基因，其篩選的判斷不以目標組織或植株的存活與否為主要標準，而改以目標組織是否為綠色、黃化或白化為篩選依據。*aadA* 成功轉殖培植體經篩選可以有正常的葉綠素和生長速度，未轉殖者經篩選則培植體或植株呈白化且生長延

遲。streptomycin 雖然在高濃度會降低芽體再生(Petri *et al.*, 2005)，但不具致死植物毒性，因此，*aadA* 可作為非致死篩選標誌基因。此類基因不能廣泛應用於植物細胞核基因轉殖，但在葉綠體基因轉殖是最常使用的篩選標誌基因。因為 16S rRNA 突變體對 spectinomycin 具抗性且可再生形成芽體，須改以 streptomycin 作為 *aadA* 之篩選抗生素。

### (2) 源自植物之抗抗生素基因(*At-WBC19*)

對於抗抗生素篩選標誌基因(antibiotic resistance marker genes, ARMGs)的使用，考量源自微生物的抗抗生素基因對作物及環境可能存在的風險，源自植物基因的抗抗生素基因可避免經由對於細菌的平行基因轉移(horizontal gene transfer, HGT)而產生抗藥性。

阿拉伯芥的 *Atwbc19* 基因編碼白褐複合體蛋白(white-brown complex, WBC)屬於 ABC 轉運蛋白(ATP-binding cassette transporter)，可藉由將 kanamycin 轉運至液胞的解毒機制，提供植物 kanamycin 抗性。相較於微生物的抗抗生素基因對生態環境安全的風險，*Atwbc19* 的優勢包括：(1) *Atwbc19* 為 2.2 kb 是 *nptII* 的 2.75 倍，較不易整併至細菌基因組；(2) *Atwbc19* 為植物密碼使用偏好(codon usage)，會降低其在細菌的表現量。菸草的 *Atwbc19* 轉殖植株，僅能抗 kanamycin，但在 *Atwbc19* 基因轉殖白楊，可抗另三種氨基糖苷類抗生素，包括 neomycin、geneticin 和 paromomycin (Kang *et al.*, 2010)。*Atwbc19* 為植物特有，利用 *Atwbc19* 作為植物篩選標誌基因，可消除對基改作物採用非植物的異源基因所產生的疑慮，並降低轉殖基因在轉殖植物和土壤微生物或動物腸道細菌間平行轉移所造成的生態衝擊。

### (3) 抗除草劑基因

抗除草劑基因系統的優點是抗除草劑基因的利用除了可做為開發期間的篩選標誌基因，亦可做為目標基因以符合田間管理所需求的特性。1992 至 2012 年全球商業核准基改植物有 196 筆具抗除草劑篩選標誌基因，佔所有基改植物商業核准的 61.4% (Breyer *et al.*, 2014)。抗除草劑基因篩選系統的使用可能造成抗性雜草產生，因此，抗除草劑篩選標誌基因的應用須考量對生態環境所產生的潛在問題。

#### i. 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合酶和草甘磷氧化酶(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSPS)

植物 EPSPS 酵素由細胞核編碼，但作用在質體(plastid)，參與質體內莽草酸途徑(shikimate pathway)合成芳香族氨基酸，為最常用的抗除草劑篩選標誌基因。廣效性除草劑嘉磷塞(Glyphosate, N-phosphonomethylglycine)其作用機制為抑制植物質體的 EPSP synthase (E.C. 2.5.1.19)，glyphosate 是 EPSPS 酵素受質磷烯醇丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)的競爭型抑制物。從高度抗嘉磷塞的牛筋草(*Eleusine indica*)族群中之個體鑑定出 EPSPS 發生二個氨基酸置換(T102I + P106S [TIPS])，TIPS 突變體對嘉磷塞的抗性較野生型高出 180 倍，較 P106S 突變體高出 32 倍(Yu *et al.*, 2015)。商業抗嘉磷塞作物的抗性基因 EPSPS 來源包括：(1) 農桿菌 CP4 菌株(*Agrobacterium* sp. Strain CP4)的 *cp4-epsps*；(2) TIPS 突變體。*TIPS EPSPS* 基因轉殖已生產嘉磷塞耐受性(GT)玉米(event GA21)。印度型水稻 IR64 利用農桿菌轉殖 *mCP4-EPSPS*，所產生的 T0、T1 和 T2 植株可抗 1 % Roundup

(Chhapekar *et al.*, 2015), 顯示 *mCP4-EPSPS* 可應用在雙元載體作為有效篩選標誌基因。

ii. 磷絲菌素 N-乙醯轉移酶(phosphinothricin N-acetyltransferase, PAT)

草銨磷(phosphinothricin, PPT, glufosinate ammonium)是廣效性非選擇性除草劑固殺草(Glufosinate)的有效成分, PPT 是穀氨醯胺合成酶( glutamine synthetase, GS)受質 L-麩氨酸(L-glutamic acid)的競爭型抑制物, GS 是植物氮同化作用酵素, GS 受抑制導致植物體內氮累積產生毒害。源自細菌的二個抗 PPT 基因 *pat* 和 *bar*, 可編碼磷絲菌素 N-乙醯轉移酶(phosphinothricin N-acetyltransferase, PAT), 其作用係將 PPT 乙醯化, *bar* 源自吸水鏈黴菌(*S. hygrosopicus*), *pat* 源自產綠色鏈黴菌(*S. viridochromogenes*)。PAT 利用乙醯輔酶 A (acetyl-CoA)作為輔因子(cofactor)催化 L-PPT 的游離氨基(free amino groups)進行乙醯化, 乙醯化的 L-PPT 無法結合 GS 及抑制其功能。番茄栽培種 Micro-tom 利用 *bar* 基因作為篩選標誌基因, 以除草劑 glufosinate/Basta 進行篩選, 依據免疫分析、南方墨點分析和外表型分析顯示對 15 mg/l glufosinate ammonium 具 100%抗性的 T0 植株為轉殖植株, 一週大的 T1 轉殖幼苗以 75 mg/l Basta 噴灑處理可以和未轉殖對照組明顯區別(Khuong *et al.*, 2015), 使用 *bar* 作為篩選標誌基因具有便宜、方便使用、快速和可進行大規模篩選等優點, 包括在組織培養或土壤栽培條件下使用。

(4) 轉換植物或非植物代謝物基因

利用植物代謝途徑的特性, 選擇特定植物或非植物代謝途徑之酵素作為篩選標誌基因, 篩選藥劑則包括: (1) 需經篩選基因轉化才能產生對植物不具毒性或植物所能利用的代謝物; (2) 可誘導植物產生危害生長但可被篩選基因轉化成不具危害性的物質。運用此類標誌基因有助於避免因使用抗抗生素或抗除草劑基因作為篩選標誌基因所產生的生物安全性問題。

i. 非源自植物之代謝基因—磷酸甘露糖異構酶(phosphomannose isomerase)

植物缺乏甘露糖(mannose)的代謝酵素, 將甘露糖轉化為甘露糖-6-磷酸(mannose-6-phosphate), 就不再被植物所利用, 甘露糖-6-磷酸累積伴隨消耗細胞無機磷和 ATP, 植物細胞在以甘露糖為唯一碳源的培養基中無法存活。*pmi* (或 *manA*)源自 *E. coli* 編碼磷酸甘露糖異構酶(phosphomannose isomerase), 可將甘露糖-6-磷酸轉化為果糖-6-磷酸, 可為植物所利用而進入解糖途徑(glycolytic pathway)。豆科植物百脈根(*Lotus corniculatus* L. cultivar Leo)子葉在 20 g/L sucrose 存在下, 可在含低濃度 mannose (0-15 g/L)培養基中生長, 但在高濃度 mannose (20-30 g/L)則無芽體再生, 利用 *PMI* 作為篩選標誌基因, 經農桿菌轉殖, 採用 20 g/L mannose 和 20 g/L sucrose 組合下進行篩選, 可達到 16.2 %轉殖效率(Guo *et al.*, 2015)。*pmi* 篩選系統, 在墨西哥、澳洲、日本、加拿大和美國的相關部門已核准在環境、食品和飼料上容許存在於轉基因玉米中(Kraus, 2010)。*PMI*/mannose 篩選系統以 mannose 作為篩選試劑, 因其不具毒性符合健康和環境安全要求, 且具易溶解於培養基和可被植物吸收的優點。

ii. 源自植物之代謝基因—甲硫胺酸硫氧化物還原酶(methionine sulfoxide reductase, MSR)

當植物發生氧化逆境時，活性氧(reactive oxygen species, ROS)會將甲硫胺酸(Met)氧化為甲硫胺酸硫氧化物(Met sulfoxide, MetO)，進而干擾細胞中酵素或蛋白的功能及結構穩定性。甲硫胺酸硫氧化物還原酶(methionine sulfoxide reductase, MSR)屬氧化逆境之蛋白修復系統，包括 MsrA 和 MsrB，可經由催化逆轉 MetO 的 S 型-和 R 型-非鏡像異構物(diastereoisomers, S-MetO 和 R-MetO)，回復為還原態的甲硫胺酸(Met)。利用 *CaMV 35S* 啟動子過度表現源自阿拉伯芥的 methionine sulfoxide reductase B (MsrB) 基因 *AtMsrB7* 作為篩選標誌基因，轉殖至阿拉伯芥可獲得 1.9% 篩選效率；應用於番茄基因轉殖，並以 12.5  $\mu$ M 甲基紫精(methyl viologen, MV)誘導氧化逆境進行篩選，可成功獲得轉殖植株(Li *et al.*, 2013)。*MsrB* 源自於植物，且篩選藥劑 MV 價格便宜，可提供除了抗抗生素或抗除草劑篩選標誌基因以外的另一種選擇。

## 2. 無需篩選試劑(無條件)之正篩選標誌基因

“無條件”係指無需生長抑制物或篩選試劑參與之正篩選標誌基因。

### (1) 異戊烯轉移酶(isopentenyl transferase)

異戊烯轉移酶基因(*isopentenyl transferase, ipt*)在不需處理外加篩選物質之條件下可作為篩選標誌基因，*ipt* 源自農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的 Ti 質體，其所編碼的酵素催化植物荷爾蒙細胞分裂素(cytokinin)生物合成的第一個步驟，合成其前驅物異戊-腺苷-5' 單磷酸(isopentyl-adenosine-5' monophosphate)，可使轉殖細胞中的 cytokinin 濃度增加，提高 cytokinin/auxin 比例，促進轉殖細胞再生芽體形成。但因過度表現造成轉殖植物型態異常，包括轉殖的芽體失去頂芽優勢、發根的能力或多芽體表現型(extreme shooty phenotype, ESP)，阻礙 *ipt* 實際應用為篩選標誌基因。為回復轉殖植物正常型態，可配合標誌基因剔除技術或誘導表現系統。血橙 Tarocco 以 *ipt* 為正篩選基因，轉殖抗菌肽基因 *AATCB* 加強抗柑橘潰瘍病，可獲得 21.4 % 轉殖效率，配合 *Cre/loxP* 重組系統剔除 *ipt* 基因，74.8 % 的再生轉殖芽體可逐漸形成正常型態的新芽(Peng *et al.*, 2015)。*ipt* 不能如同傳統使用的抗抗生素或除草劑篩選標誌基因可在轉殖植物中持續表現，但當使用抗抗生素或除草劑基因作為篩選標誌基因可能產生環境及生物安全性問題時，*ipt* 基因配合重組酶剔除系統可提供另一種選擇，亦可改善某些物種或培植體再生不易的問題。

### (二) 負篩選標誌基因

負篩選標誌基因係指會使具有此基因的轉殖細胞無法生長或存活性，亦可再區分為有條件(conditional)和無條件(non-conditional)負篩選標誌基因。有條件負篩選標誌基因在轉殖細胞中可將無毒的物質轉換為對植物具毒性的物質，對轉殖細胞造成致死效應，因需添加可供轉換的毒性物質前驅物參與篩選故稱“有條件”；無條件負篩選標誌基因則無需添加毒性物質的前驅物即能抑制轉殖細胞生長，故稱“無條件”，例如綠豆黃化嵌紋病毒轉錄活化蛋白(MYMV TrAP)基因(Rajeswaran *et al.*, 2007)。負篩選系統可以殺死轉殖細胞，因此，轉殖載體 T-DNA 上加入剔除系統與負篩選標記基因的設計，可以減少含有載體骨架 DNA 的植物產生。

### 1. D 型氨基酸氧化酶(D-amino acid oxidase)

生物通常利用 L 型氨基酸，而 D 型氨基酸對生物造成毒害，D-amino acid oxidase (DAAO)的編碼基因 *dao1* 存在於酵母菌和動物，但未在植物發現。以 *dao1* 作為標記基因，在培養基中依處理所加入的 D 型氨基酸種類，可以作為正篩選或負篩選標記基因。D-丙氨酸(D-alanine)和 D-絲氨酸(D-serine)對植物具有毒性，但可經 DAAO 代謝為無毒產物；然而 D-異白氨酸(D-isoleucine)和 D-纈氨酸(D-valine)雖僅有低的毒性，但經 DAAO 代謝後則產生毒性產物。因此，同一個標誌基因可進行正篩選或負篩選。以源自粟酒裂殖酵母菌 (*Schizosaccharomyces pombe*)的 *dao* 基因進行菸草葉綠體基因轉殖，相較於未轉殖培植體再生和種子發芽受 D-Ala 抑制、但可在 D-Val 培養基中生長；*dao* 轉殖培植體和種子可在 D-Ala 培養基再生與發芽，此為正篩選機制，在 D-Val 培養基則受抑制而呈現負篩選機制 (Gisby *et al.*, 2015)。應用 clean vector technology 進行同源基因轉殖(cisgenic)以生產具黑星病(scab)抗性基因 *Rvi6* 的蘋果(Würdig *et al.*, 2015)，*Rvi6* 為同源基因位於蘋果第一條連鎖群(linkage group 1, LG1)，利用 *dao1* 作為篩選標誌基因，以 20 mM D-serine 進行"正篩選"選拔出具轉殖同源基因 *Rvi6* 的芽體；經 Flp/*FRT* 重組酶剔除系統剔除轉殖載體 T-DNA 上非必要序列，包括篩選基因及其啟動子和終結子，以 10 mM D-isoleucine 進行"負篩選"，目的為淘汰未剔除篩選基因之轉植株，因其在含 D-isoleucine 培養基中無法產生再生芽體。

### 2. 胞嘧啶脫氨酶(cytosine deaminase)

源自 *E. coli* 的 *codA*，可以編碼胞嘧啶脫氨酶(cytosine deaminase)，催化 cytosine 經脫氨作用成為尿嘧啶(uracil)，是最常用的負篩選標記基因，屬於受質依賴型的有條件負篩選標記基因(substrate-dependent conditional negative SMG)。以 *codA* 作為有條件毒性基因已被應用在植物基因轉殖，經轉殖 *codA* 的植物細胞，會將無毒性的五氟胞嘧啶(5-fluorocytosine, 5-FC)轉變為高度細胞毒性的五氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)。未轉殖 *codA* 的大豆種子在 200 µg/mL 5-FC 下可正常發芽，而 *codA* 轉殖種子下胚軸和主根的生長則受抑制，側根的發育亦明顯受抑制(Shao *et al.*, 2015)。負篩選標誌基因對轉殖植物造成致死表現型，可應用在產生無篩選標誌基因轉殖作物，蘋果和梨以 *codA-nptII* 融合蛋白形成雙功能篩選基因，配合地塞米松(dexamethasone, DEX)化學誘導 R/Rs 重組酶剔除系統，農桿菌感染後的再生芽體先以 100 mg/l kanamycin 進行正篩選，經 PCR 確認轉殖芽體葉片以 DEX 誘導 R 重組酶表現進行剔除 *codA-nptII* 基因，於芽體再生過程中再以 5-FC 進行負篩選，將仍具有 *codA-nptII* 者淘汰(Righetti *et al.*, 2014)。在此系統中 *codA* 和正篩選標誌 *nptII* 是可誘導剔除載體 DNA 的一部分，一起位於 *RS* 序列間，當 *RS* 卡匣經誘導剔除後，無標誌基因再生植株可經由生長在含 5-FC 的培養基進行確認。

## 二、報導標誌基因

報導基因(reporter gene, RG)編碼可偵測的蛋白，在適當的條件下，可以產生可見的色素、螢光或其它表現型修飾。藉由報導基因表現除了可在生物體外定量分析其所編碼的蛋

白活性，對基因轉殖植物所產生的表現型改變亦可直接經由目視辨識。報導基因編碼蛋白可供直接辨識者，例如 GFP；或者經由催化特定反應所得之產物可供辨識者，例如 GUS。某些報導基因可在活細胞中進行目視觀察(vital RGs)，某些則僅能在經細胞活力破壞下觀察(non vital RGs)。

報導標誌基因種類包括綠色螢光蛋白基因(green fluorescent protein, *gfp*)和紅色螢光蛋白基因(red fluorescent protein, *rfp*)其所編碼的蛋白可釋放螢光、 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶基因( $\beta$ -glucuronidase, *uidA* (*gusA*))和半乳糖苷酶基因(galactosidase, *lacZ*)其基因編碼的酵素能催化特定顏色反應、螢光素酶基因(luciferase, *luc*)其基因產物為酵素可催化特定受質釋放螢光。

報導基因的應用包括：(1) 報導基因可結合篩選標誌基因以改善獲得基因轉殖植株的效率，尤其當鄰近基因轉殖細胞周圍之未轉殖細胞於篩選時產生脫逃現象而形成芽體時，可利用報導基因將其排除。(2) 將可觀察標誌基因整合在載體的 T-DNA 邊界外，常運用在鑑定載體骨架序列，以篩選存有多餘載體骨架 DNA 的轉殖細胞。(3) 利用 fluorescence accumulating seed technology (FAST)技術，以種子特異表現啟動子，例如油體蛋白(*oleosin*)基因 *OLE1* 啟動子，在特定器官(乾燥種子)及特定時間(種子休眠期間)表現 GFP 或 RFP 螢光蛋白基因，利用螢光顯微鏡在種子階段觀察有無螢光表現即可鑑定 T1 族群的異型結合轉殖個體(heterozygous)及藉由強螢光表現鑑定 T2 族群的同型結合轉殖個體(homozygous)。阿拉伯芥以 *OLE1* 啟動子表現 *OLE1-GFP* 融合蛋白基因，以 *OLE1-GFP* 作為共顯性(co-dominant)標記基因在 T2 種子時期可鑑定同型結合轉殖個體，並將時程由 7.5 個月縮減為 4 個月(Shimada *et al.*, 2010)。

## 剔除篩選標誌基因

基因轉殖植物僅具有目標基因，而不包括篩選基因甚或其它轉殖載體骨架 DNA 是目前對於生物安全性的要求，剔除篩選標誌基因技術容許在轉殖階段利用篩選基因進行有效篩選以提高轉殖效率，後續再將篩選基因從轉殖植物剔除。移除標記基因的方法包括(1) 經由子代分離移除，例如共轉型(co-transformation)技術；(2) 篩選後以分子操作方式剔除，例如重組酶系統、轉位子(transposon)的利用。

### 一、共轉型(co-transformation)剔除法

共轉型(co-transformation)係將分別位於二個 T-DNA 的目標基因和標誌基因同時進行轉殖，目標基因和標誌基因分別整併至植物基因組的不同基因座，轉殖植物經有性繁殖的重組和分離，可在子代中選取具目標基因但無標誌基因的個體。共轉型是剔除篩選標誌基因的技術中最簡單的一種，導入基因策略包括：(1) 二個各具 T-DNA (一個攜帶標記基因，另一個攜帶目標基因)的雙元載體分別在二個農桿菌株；(2) 二個各具 T-DNA 的雙元載體



同時在一個農桿菌株；(3) 單一具有二個 T-DNA 的雙元載體存在一個農桿菌株。

進行共轉型必須要有高的共轉型效率且子代必須也要有高的分離效率，依所選擇的共轉型系統，混合菌株法降低共轉型效率，但加強了將二個基因分別整併至不同基因座；而單一具二組 T-DNA 的載體系統加強共轉型效率，但明顯降低分離效率(Kraus, 2010)。大麥以二組 T-DNA (*phpt::gfp*、*pgus*)及二個農桿菌株(AGL-1、LBA4404)產生 14 種混合比列及組合進行共轉型比較，T0 共轉型效率以單一農桿菌株 LBA4404 攜帶二個各具 T-DNA 的雙元載體組合為最高 2.2%，且 100 個轉殖培植體有 1.5 株不具標誌基因 *hpt::gfp* 而僅有目標基因 *gus* 的轉殖植株，將共轉型轉殖品系之 T1 小孢子進行單倍體倍加，249 株中可獲得 31 株為 *gus* 同型結合而不具 *hpt* 個體，相較傳統 T1 有性繁殖後 T2 子代分離，1,348 個 T2 組群中僅 13 株 *gus* 同型結合且具 *hpt* 個體(Kapusi *et al.*, 2013)，此法可提高共轉型剔除效率和縮短育種時程。

應用共轉型技術剔除標誌基因時須考慮：(1) 此法適用於有性繁殖植物，不適用於營養繁殖的栽培作物，或是世代相當長的植物。(2) 章魚鹼型(octopine)農桿菌較胭脂鹼型(nopaline)不易造成共轉型基因間連鎖(De Block and Debrouwer, 1991)。(3) 轉殖植物的生理與勝任性。(4) Ti 載體大小與複雜度。(5) 轉殖時，攜帶篩選標誌基因載體與目標基因載體的混合比率。

## 二、特定序列重組酶剔除(site-specific recombinase-mediated excision)

應用特定序列重組酶是最常用的標誌基因剔除法，此方法須搭配一個重組酶和二個可供重組酶辨識及進行重組的短 DNA 序列，經由重組酶作用，二個短 DNA 序列重組後，可將位於短 DNA 序列間的標誌基因移除。產生無標誌基因轉殖植物的重組酶系統包括：(1) 源自 *E. coli* 的 P1 噬菌體的 Cre/*loxP* 系統；(2) 源自酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) 2- $\mu$ m 質體的 FLP/*FRT* 系統；(3) 源自酵母菌(*Zygosaccharomyces rouxii*) SR1 質體的 R/RS 系統。*loxP*、*FRT* 和 *RS* 長度為 34 或 31 bp，前後段為 12-13 bp 的對稱逆向重復可形成迴紋結構(palindrom)，中間以 7-8 bp 連接，迴紋結構為重組酶辨識區，中間連接區為重組酶切位。但是利用特定序列重組酶系統所產生無標誌基因之基因轉殖作物，仍會殘留不必要的 DNA 序列，例如重組酶的辨識序列。

### (一) Cre/*loxP* 系統

重組位置專一性的重組酶剔除系統可以切除篩選標誌基因產生無標記基因(marker free)轉殖植物，Cre/*loxP* 是最常用的重組系統，為了調控重組酶基因在寄主植物中表現，尚可配合可誘導系統於篩選後剔除篩選標誌基因，包括：(1) 利用化學藥劑誘導調控，葡萄或杏樹利用 XVE-Cre/*loxP* 系統，以 O<sub>LexA-46</sub> 作為重組酶 cre-int 的啟動子，唯有當外加雌二醇( $\beta$ -estradiol)進行誘導時，XVE 將結合至 LexA 操縱子(operator)使 RNA polymerase II 可以結合至 CaMV 35S 啟動子，活化 *cre* 轉錄作用的進行以剔除抗抗生素篩選標誌基因 *nptII* (Costa *et al.*, 2010; Petri *et al.*, 2012)。(2) 利用熱休克啟動子調控 *Cre* 表現，香蕉分別以熱休克誘導啟動子，包括大豆 *Gmhspl7.6-L* 或阿拉伯芥 *HSP18.2*，於篩選後間隔 16 小

時進行二次 42°C 熱休克處理，對於標誌基因的剔除率分別為 59.7 和 40.0%，可成功剔除篩選基因 *hpt* 和 *codA* (Chong-Pérez *et al.*, 2012)。(3) 利用低溫誘導啟動子調控，小麥抗凍蛋白 WCS120 在低溫下會大量累積，以 *wcs120* 啟動子調控 *cre* 重組酶基因，配合突變重組序列 *lox66* 和 *lox71*，春小麥 1.5 mm 子葉盤(scutella)經由 PDS-1000/He 基因槍法(particle gun)進行轉殖，在 4°C 低溫、20  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  低光照處理二週誘導 *cre* 表現，於 T0 和 T1 可分別獲得 44 和 51 % 剔除率，將篩選基因 *bar* 和 *cre* 移除(Mészáros *et al.*, 2015)。上述可誘導的 Cre 重組酶系統可應用在無性繁殖作物，無須經由再轉殖或雜交導入 Cre 基因。

### (二) FLP/FRT 系統

FLP/FRT 是另一個特定序列重組系統(site-specific recombination system, SSR)，可和 Cre/lox 組合成二組重組酶系統。二組重組酶系統亦可應用在阻遏轉殖基因藉由花粉漂散所造成的垂直轉移，將 CRE/loxP 以大豆熱休克基因 *HSP6871* 啟動子調控，FLP/*frt* 以花特異表現基因 *CGPDHC* (cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 啟動子調控，FLP 基因與其啟動子以 CRE 隔開，當以熱休克誘導 CRE 表現，位於 CRE 兩側的 loxP 序列進行重組並將 CRE 剔除後，FLP 可與其 CGPDHC 啟動子結合，於開花時 FLP 進行表現，位於外源 DNA 兩端的 *frt* 序列重組並將外源 DNA 剔除，此時花粉不再帶有轉殖基因，此法應用於已轉殖 *HSP::AtFT* 之早開花白楊樹品系(Hoenicka *et al.*, 2015)，白楊樹本身仍可表現目標基因(*GUS* 和 *hpt*)而達成分子育種目標，且其花粉不會帶有轉殖基因，避免轉殖作物花粉所產生的基因流佈現象。

## 三、轉位子剔除法(tranposition-mediated elimination)

### (一) Ac/Ds 轉位子

最常用的轉位子系統是 Ac/Ds 轉位子，1993 年 Goldsborough 等首次利用 Ac/Ds 轉位子系統剔除標記基因 *NptII*。Ac/Ds 轉位系統包括 Ac 轉位酶(AcTPase)和 Ds 轉位子，AC 轉位酶(Ac transposase)可以改變位於 Ds 序列間的標記基因或目標基因的位置。水稻農桿菌轉殖載體將 3' Ds 和 5' Ds 轉位序列構築於目標基因兩側，使其區隔包括標誌基因(*HPT* 和 *GFP*)及轉位酶基因 *AcTPase* 等其餘 T-DNA 序列，目標基因於 T0 經轉位作用整併至不同基因組位置，經子代分離於 T1 以 PCR 檢測可獲得 26.1% 無標誌基因(Marker-free)或無 T-DNA 骨架(T-DNA-free)植株(Gao *et al.*, 2015)。此法亦可將標誌基因以 Ds 包圍，經有性繁殖及子代分離將標誌基因剔除。

然而利用 Ac/Ds 轉位子(transposable element)剔除標誌基因可能產生的問題包括：(1) 轉位後於原位置並不會精確切除，而殘留足跡(Footprint)；(2) 在異源寄主中其轉位效率較低；(3) 會因再轉位及再併入基因組其它位置，降低產生無標基因轉殖植物效率。

### (三) piggyBac 轉位子

另一個 piggyBac 轉位子(transposon)系統源自鱗翅目的甘藍擬尺蠖(cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*)，包括轉位酶(piggyBac transposase, hyPBase)和位於轉位酶基因兩側末端的反向重複轉位子序列(inverted-repeat transposable element, IVR)。水稻利用同源重組

(homologous recombination, HR)進行基因定位轉殖(gene targeting, GT)，將點突變修飾的抗除草劑基因乙醯乳酸合成酶(acetolactate synthase, *ALS*)取代原基因，配合正負雙篩選(positive-negative selection, PNS)，轉殖後以正篩選基因 *hpt* 進行篩選，同時因負篩選基因白喉毒素 A 鏈(diphtheria toxin A subunit, *DT-A*)位於同源重組序列外側，因此不會整併至寄主基因組，可除去未同源重組個體或同源重組後帶有 *DT-A* 殘餘序列個體，因為 *hpt* 兩側有轉位子 IVR 序列且位於 *ALS* 基因中間，當再導入 *hyPBase* 基因，*hpt* 被剔除，且被 *hpt* 分隔的二部分 *ALS* 整合成具抗除草劑性狀的功能基因(Nishizawa-Yokoi *et al.*, 2015)。*piggyBac* 轉位子經由其轉位酶可精確和有效剔除篩選標誌基因，不會在寄主基因組上殘留足跡序列。

## 結 論

有效率使用標誌基因有助於提高植物基因轉殖效率，目前已有很多新的標記基因被嘗試使用，但僅有少數被廣泛使用，且仍然只有少數被許可應用在食品和飼料上。轉殖細胞在篩選培養階段，不同的篩選標誌基因對於不同物種或品種有不同的適當性及有效性。不同的植物採用不同的篩選系統是必要的，因為沒有一個標記基因可以適用所有情況。抗抗生素及抗除草劑基因仍是目前最常使用的篩選標誌基因，包括 *nptII*、*hpt*、*mCP4-EPSPS* 和 *bar* 等，*uidA* 和 *GFP* 為植物常用的報導基因。標誌基因除了少部分源自植物外，大部分源自細菌、病毒和昆蟲。採用植物內源性的標誌基因可以降低生物安全性的風險，例如 *Atwbc19* 和 *AtmsrB7*。對於基因轉殖植物而言，為避免標誌基因對植物生理代謝所造成的不良影響，及消除標誌基因對消費者健康可能疑慮，和減少對生態環境可能造成衝擊，標誌基因於完成基因轉殖作物之篩選後，即可將其從植物移除，特別是對於生產基改食品或飼料的基改作物。無篩選標誌基因轉殖作物已是目前對於符合生物安全性要求的趨勢，建立篩選標誌基因剔除系統可以產生無篩選標誌基因轉殖植物，共轉型系統的技術簡單，但需要高的轉殖效率，且此技術通常不適用於營養繁殖作物。特定序列重組酶系統和轉位子剔除系統，通常結合可誘導啟動子、報導標誌基因或負篩選標誌系統。此外，無篩選標誌基因轉殖作物的獲得可以經由直接轉殖僅含目標基因而不含篩選標誌基因的轉殖系統，但易有嵌合個體發生。1992 至 2012 年總計有 319 件核准商品化的基改植物，其中有五件無標誌基因轉殖作物，包括利用共轉型-分離剔除法和 *Cre-lox* 特定序列重組酶剔除法(Breyer *et al.*, 2014)。植物基因轉殖過程利用標誌基因可以協助轉殖細胞的鑑定與篩選，選擇合適的標誌基因可以提高基因轉殖效率，應用標誌基因剔除法產生無標誌基因轉殖植物則可減少標誌基因對生態環境安全的衝擊。

## 参 考 文 献

- Ballester, A., M. Cervera, and L. Peña. 2010. Selectable marker-free transgenic orange plants recovered under non-selective conditions and through PCR analysis of all regenerants. *Plant Cell Tiss. Org.* 102: 329-336.
- Breyer, D., L. Kopertekh, and D. Reheul. 2014. Alternatives to antibiotic resistance marker genes for in vitro selection of genetically modified plants - scientific developments, current use, operational access and biosafety considerations. *Crit. Rev. Plant Sci.* 33: 286-330.
- Burris, K., A. Mentewab, S. Ripp, and C. N. Stewart Jr. 2008. An *Arabidopsis thaliana* ABC transporter that confers kanamycin resistance in transgenic plants does not endow resistance to *Escherichia coli*. *Microb. Biotechnol.* 1: 191-195.
- Chhapekar, S., S. Raghavendrarao, G. Pavan, C. Ramakrishna, V. K. Singh, M. L. V. Phanindra, G. Dhandapani, R. Sreevathsa, and P. A. Kumar. 2015. Transgenic rice expressing a codon-modified synthetic CP4-EPSPS confers tolerance to broad-spectrum herbicide, glyphosate. *Plant Cell Rep.* 34: 721-731.
- Chong-Pérez, B., R. G. Koskya, M. Reyesa, L. Rojasa, B. Ocaña, M. Tejedaa, B. Pérez, and G. Angenon. 2012. Heat shock induced excision of selectable marker genes in transgenic banana by the *Cre-lox* site-specific recombination system. *J. Biotechnol.* 159: 265-273.
- Costa, L. D., M. Mandolini, V. Poletti, and L. Martinelli. 2010. Comparing 17- $\beta$ -estradiol supply strategies for applying the XVE-*Cre/loxP* system in grape gene transfer (*Vitis vinifera* L.) *Vitis* 49(4): 201-208.
- De Block, and M., D. Debrouwer. 1991. Two T-DNAs co-transformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium* infection are mainly integrated at the same locus. *Theor. Appl. Genet.* 82: 257-263.
- Deng, W., K. Luo, Z. Li, and Y. Yang. 2009. A novel method for induction of plant regeneration via somatic embryogenesis. *Plant Sci.* 177: 43-48.
- Gao, X., J. Zhou, J. Li, X. Zou, J. Zhao, Q. Li, R. Xia, R. Yang, D. Wang, Z. Zuo, J. Tu, Y. Tao, X. Chen, Q. Xie, Z. Zhu, and S. Qu. 2015. Efficient generation of marker-free transgenic rice plants using an improved transposon-mediated transgene reintegration strategy. *Plant Physiol.* 167: 11-24.
- Garfinkel, D. J., R. B. Simpson, L. W. Ream, F. F. White, M. P. Gordon, and E. W. Nester. 1981. Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *Cell* 27: 143-153.
- Gisby, M. F., E. A. Mudd, and A. Day. 2012. Growth of transplastomic cells expressing D-amino acid oxidase in chloroplasts is tolerant to D-alanine and inhibited by D-valine.

- Plant Physiol. 160: 2219-2226.
- Guo, Q., J. Ma, B. Yuan, M. Zhou, and Y. Wu. 2015. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lotus corniculatus* L. using phosphomannose isomerase positive selection. *Plant Cell Tiss. Org.* 121: 413-422.
- Hoenicka, H., D. Lehnhardt, S. Nunna, R. Reinhardt, A. Jeltsch, V. Briones, and M. Fladung. 2015. Level of tissue differentiation influences the activation of a heatinducible flower-specific system for genetic containment in poplar (*Populus tremula* L.). *Plant Cell Rep.* DOI 10.1007/s00299-015-1890-x.
- Kang, B., X. Ye, L. D. Osburn, C. N. Stewart Jr, and Z.-M. Cheng. 2010. Transgenic hybrid aspen overexpressing the *Atwbc19* gene encoding an ATP-binding cassette transporter confers resistance to four aminoglycoside antibiotics. *Plant Cell Rep.* 29: 643-650.
- Kapusi, E., G. Hensel, M. Coronado, S. Broeders, C. Marthe, I. Otto, and J. Kumlehn. 2013. The elimination of a selectable marker gene in the doubled haploid progeny of co-transformed barley plants. *Plant Mol. Biol.* 81: 149-160.
- Khuong, T. T. H., P. Crété, C. Robaglia, and S. Caffarri. 2013. Optimisation of tomato Micro-tom regeneration and selection on glufosinate/Basta and dependency of gene silencing on transgene copy number. *Plant Cell Rep.* 32: 1441-1454.
- Kraus, J. 2010. Concepts of marker genes for plants. In: *Genetic Modification of Plants*. Kempken, F. and C. Jung, Eds. Springer Berlin Heidelberg. pp. 39-60.
- Li, C. W., S. H. Lee, and M. T. Chan. 2013. Utilization of the plant methionine *sulfoxide reductase B* genes as selectable markers in *Arabidopsis* and tomato transformation. *Plant Cell Tiss Organ. Cult.* 113: 555-563.
- Libiakova, G., B. Jørgensen, G. Palmgren, P. Ulvskov, and E. Johansen. 2001. Efficacy of an intron containing kanamycin resistance gene as selectable marker in plant transformation. *Plant Cell Rep.* 20: 610-615.
- Maas, C., C. G. Simpsons, P. Eckes, H. Schickler, J. W. S. Brown, B. Reiss, K. Salchert, I. Chet, J. Schell, and C. Reichel. 1997. Expression of intron-modified NPT II genes in monocotyledonous and dicotyledonous plant cells. *Mol. Breed.* 3: 15-28.
- Malnoy, M., E. E. Boresjza-Wysocka, J. L. Norelli, M. A. Flaishman, D. Gidoni, and H. S. Aldwinckle. 2010. Genetic transformation of apple (*Malus × domestica*) without use of a selectable marker gene. *Tree Genet. Genomes* 6: 423-433.
- Mészáros, K., C. Éva, T. Kiss, J. Bányai, E. Kiss, F. Téglás, L. Láng, I. Karsai, and L. Tamás. 2015. Generating marker-free transgenic wheat using minimal gene cassette and cold-inducible Cre/Lox system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 33: 1221-1231.
- Nishizawa-Yokoi, A., M. Endo, N. Ohtsuki, H. Saika, and S. Toki. 2015. Precision genome

- editing in plants via gene targeting and piggyBac-mediated marker excision. *Plant J.* 81: 160-168.
- Peng, A., L. Xu, Y. He, T. Lei, L. Yao, S. Chen, and X. Zou. 2015. Efficient production of marker-free transgenic 'Tarocco' blood orange (*Citrus sinensis* Osbeck) with enhanced resistance to citrus canker using a Cre/*loxP* site-recombination system. *Plant Cell Tiss. Org.* 123: 1-13.
- Petri, C., J. M. Hily, C. Vann, C. Dardick, and R. Scorza. 2011. A high-throughput transformation system allows the regeneration of marker-free plum plants (*Prunus domestica*). *Ann. Appl. Biol.* 159: 302-315.
- Petri, C., S. López-Noguera, H. Wang, C. García-Almodóvar, N. Alburquerque, and L. Burgos. 2012. A chemical-inducible Cre-*LoxP* system allows for elimination of selection marker genes in transgenic apricot. *Plant Cell Tiss. Org.* 110: 337-346.
- Petri, N. and B. L. Alburquerque. 2005. The effect of aminoglycoside antibiotics on the adventitious regeneration from apricot leaves and selection of nptII-transformed leaf tissues. *Plant Cell Tiss. Org.* 80: 271-6.
- Rajeswaran, R., S. Sunitha, P. V. Shivaprasad, M. M. Pooggin, T. Hohn, and K. Veluthambi. 2007. The mungbean yellow mosaic begomovirus transcriptional activator protein transactivates the viral promoter-driven transgene and causes toxicity in transgenic tobacco. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 20: 1545-1554.
- Richardson, T., J. Thistleton, T. J. Higgins, C. Howitt, and M. Ayliffe. 2014. Efficient *Agrobacterium* transformation of elite wheat germplasm without selection. *Plant Cell Tiss. Org.* 119: 647-659.
- Righetti, L., S. Djennane, P. Berthelot, R. Cournol, N. Wilmot, K. Loridon, E. Vergne, and E. Chevreau. 2014. Elimination of the *nptII* marker gene in transgenic apple and pear with a chemically inducible R/Rs recombinase. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 117: 335-348.
- Shao, M., J. M. Michno, S. K. Hotton, A. Blechl, and J. Thomson. 2015. A bacterial gene *codA* encoding cytosine deaminase is an effective conditional negative selectable marker in *Glycine max*. *Plant Cell Rep.* 34: 1707-1716.
- Shimada, T. L., T. Shimada, and I. Hara-Nishimura. 2010. A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 61: 519-528.
- Tian, L. N., P. J. Charest, A. Seguin, and R. G. Rutledge. 2000. Hygromycin resistance is an effective selectable marker for biolistic transformation of black spruce (*Picea mariana*). *Plant Cell. Rep.* 19: 358-362.
- Würdig, J., H. Flachowsky, A. Saß, A. Peil, and M. V. Hanke. 2015. Improving resistance of

different apple cultivars using the Rvi6 scab resistance gene in a cisgenic approach based on the Flp/*FRT* recombinase system. *Mol. Breed.* 35(3): 1-18.

Yu, Q., A. Jalaludin, H. Han, M. Chen, R. D. Sammons, and S. B. Powles. 2015. Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in eleusine indica conferring high-level glyphosate resistance. *Plant Physiol.* 167: 1440-1447.

## Marker Gene and Marker-Free Transgenic Plant

Ke-Heng Chi <sup>1)</sup>

Key Word: Marker gene, Marker-free transgenic plant

### Summary

Marker gene can assist plant transgenic processing by enhance transformation efficiency. The effect includes to screen or select transgenic cells successfully from explant, and then regenerate into transgenic plants, or via screening of seed germination to find out the seeds with target gene. Depending on whether make the selection pressure, marker genes can be divided selectable marker genes and reporter genes. Selectable marker genes can be further divided into two categories. Which can enable transgenic cells or plant growing called positive selectable marker genes, another can cause transgenic cells fail to grow or survive called negative selection marker genes. Negative selection marker gene causing cells or plants with the gene will not survive, often used to exclude the explant or plant which not yet removing antibiotic resistance or herbicide resistance selectable marker gene. In response to bio-safety requirements, using the technology of removing selectable marker genes can reduce the risk of antibiotic resistance and herbicide tolerance selectable marker genes may arise on the ecological environment. In transformation stage allow the use of selectable marker gene for effective screening to improve transformation efficiency. Subsequently, removing the selectable marker gene from transgenic plant. Methods for removing marker genes include co-transformation-segregation method, site-specific recombination-mediated marker excision and transposon-based marker gene removal. This paper will introduce marker genes and explore the technology of marker-free transgenic plant.

---

1) Student in Ph.D. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.  
Corresponding author.