

基因枪法获得转 *cry1Ac* 基因甘蔗的研究

高世武, 郭晋隆, 许莉萍*, 陈如凯, 傅华英

(福建农林大学, 农业部甘蔗遗传改良重点开放实验室, 福州 350002)

摘要: 根据定向克隆原则, 以 pGreen II 0229 为载体骨架, *cry1Ac* 为目的基因, *bar* 为筛选标记基因, 构建了大小为 8602 bp 的植物表达载体 pUBCG0229-*cry1Ac*。酶切结果表明, 构建的载体 pUBCG0229-*cry1Ac* 结构完全正确。用基因枪轰击法将 pUBCG0229-*cry1Ac* 质粒 DNA 转化甘蔗(*Saccharum Complex*)品种福农 95-1702 和桂糖 94-119 的胚性愈伤组织, 使用 PPT(phosphinothricin)对轰击后的材料进行继代、分化和生根筛选, 移栽成活后使用 Basta 溶液喷洒进行初步筛选, 共获得 86 株抗性植株, 通过 PCR 检测、Dot-Southern 检测及 PCR 产物测序, 证明已将 *cry1Ac* 基因整合到其中 22 株甘蔗基因组中。

关键词: 甘蔗; *cry1Ac* 基因; *bar* 基因; 遗传转化; 基因枪; 抗螟虫

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2011)02-0142-07

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.02.007

Studies on *cry1Ac* Transgenic Plants of *Saccharum Complex* by Particle Bombardment

GAO Shi-wu, GUO Jin-long, XU Li-ping*, CHEN Ru-kai, FU Hua-ying

(Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Plant expression vectors pUBCG0229-*cry1Ac* with size of 8602 bp, which had anti-insect gene and the *bar* gene as screening marker gene, was constructed. The result of restriction digestion showed that the construction of the vectors pUBCG0229-*cry1Ac* was completely correct. The embryonic callus of *Saccharum Complex* 'FN95-1702' and 'GT94-119' were transformed with the plasmid of pUBCG0229-*cry1Ac* by bombardment. After selection with PPT (Phosphinothricin) or Basta, 86 regenerated plants were obtained. After detected by PCR, Dot-Southern blotting and sequencing of PCR products from 22 transformed plants, it proved that *cry1Ac* gene had been integrated into sugarcane genome.

Key words: Sugarcane; *cry1Ac* gene; *bar* gene; Genetic transformation; Gene gun; Resistance to *Chilo* spp.

甘蔗(*Saccharum Complex*)是最主要的糖料作物, 蔗糖占世界食糖总产量的 76%, 占我国食糖总产量的 90% 以上。甘蔗还是 C₄ 高生物量和高纤维作物, 并可多年宿根^[1], 使其成为最重要的以糖质为发酵底物的第一代和以纤维质为发酵底物的第二代生物质燃料乙醇作物。

螟虫是我国蔗区发生最普遍, 危害最严重的甘蔗害虫, 具有全生长季、钻蛀性危害的特点, 苗期枯

心率一般达 10% ~ 20%, 严重的高达 60%^[2], 中后期为害造成蔗糖分显著降低, 并引起风折。目前蔗区螟虫主要有 5 种, 包括螟蛾科的条螟(*Chilo sacchariphagus*)、二点螟(*C. infuscatellus*)和白螟(*Scirpophaga nivella*), 卷叶蛾科的黄螟(*Argyroplote schistaceana*)和夜蛾科的大螟(*Sesamia inferens* Walker), 均属于鳞翅目害虫, 螟虫种类多, 世代重叠严重。由于甘蔗是高度杂合的异源多倍体和非

收稿日期: 2010-08-16

接受日期: 2010-11-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871581); 现代农业产业技术体系建设专项基金(nycytx-024); 国家 948 项目(2010-S19)资助

作者简介: 高世武, 男, 1982 年生, 研究实习生, 研究方向为植物基因工程, email: gaoshiwu2008@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, email: xlpmail@yahoo.com.cn

整倍体植物,现代杂交种的染色体数高达 100 多条^[1],遗传背景复杂,单纯依赖杂交技术培育具有高产、高糖、抗螟虫聚合基因型品种极其困难。我国长期都是采用化学防治作为主要防治手段,不少蔗区甚至采用已禁用的高毒有机磷农药——特丁硫磷,也不能实现很有效的控制,既污染环境又增加了成本。甘蔗转基因安全等级为 I 级,又是无性繁殖作物和工业原料作物,因此,转基因改良具有明显的优势。

自 1999 年 Arencibia 等^[3]最早报道转 *cry1A* 基因改良甘蔗抗螟虫性状以来,先后又报道了 3 例转 *cry1Ab*、*gna* 和 *pinII* 基因改良抗茎螟或墨西哥稻螟的抗性研究^[4-6],并获得了抗性提高的转基因系,已经进入田间安全性评价试验阶段,但至今尚未获准商业化种植,而我国还未见相关的研究报道。本研究在构建植物表达载体的基础上,进行转化甘蔗研究,以期培育抗螟虫性状改良的转基因系提供科

学参考。

1 材料和方法

1.1 材料

受体材料 用于甘蔗(*Saccharum Complex*)遗传转化的受体材料为福农 95-1702 和桂糖 94-119,由福建农林大学甘蔗综合研究所提供。

菌株及质粒 *cry1Ac* 基因由本实验室的许莉萍博士从加拿大渥太华大学 Illimar Altosaar 教授处获赠,植物表达载体 pGreen II 0229 质粒由其从英国 John Innes Centre 引进,大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株由农业部甘蔗遗传改良重点开放实验室提供。

培养基 诱导培养基 CM₁ 为 MS + 3 mg L⁻¹ 2,4-D + 30 g L⁻¹ 蔗糖 + 6 g L⁻¹ 琼脂粉, pH 5.8; 继代培养基 CM₂ 为 MS + 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 30 g L⁻¹ 蔗糖 + 6 g L⁻¹ 琼脂粉, pH 5.8; 分化培养基 CM₃ 为 MS +

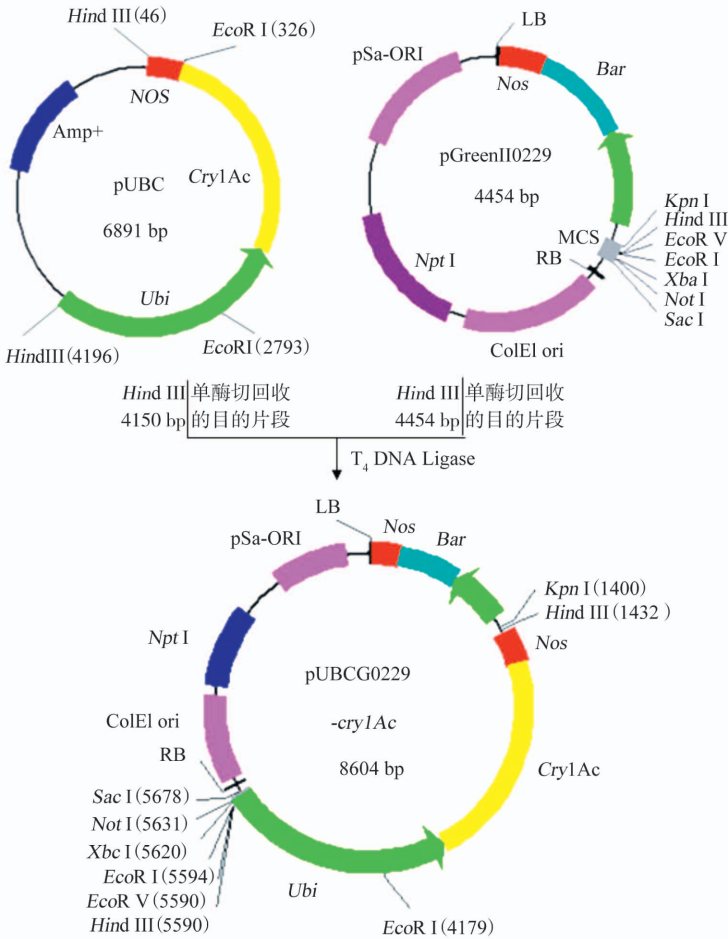


图 1 植物表达载体 pUBCG0229-*cry1Ac* 的构建

Fig. 1 Construction of the plant expression vector pUBCG0229-*cry1Ac*

2.0 mg L⁻¹ BA + 0.5 mg L⁻¹ KT + 0.2 mg L⁻¹ NAA + 30 g L⁻¹ 蔗糖 + 6 g L⁻¹ 琼脂粉, pH 5.8; 生根培养基 CM₄: 1/2MS + 0.2 mg L⁻¹ 6-BA + 3 mg L⁻¹ NAA + 60 g L⁻¹ 蔗糖 + 6 g L⁻¹ 琼脂粉, pH 5.8。

1.2 方法

表达载体 *pUBCG0229-cry1Ac* 的构建 表达载体构建流程按照图 1 设计进行, 细菌生长培养基为 LB, 质粒提取与纯化采用碱裂解法。根据定向克隆的原则, 提取克隆载体 pUBC 质粒 DNA, 用限制性内切酶 *Hind* III 酶切, 回收 Ubi-*cry1Ac*-Nos 目的片段; 同时, 提取植物表达载体 pGreen II 0229 的质粒 DNA, 用限制性内切酶 *Hind* III 进行酶切, 回收目的片段, 即含有能提供 PPT 和 Basta 抗性的标记基因(*bar* 基因)的空载体。将回收的目的片段与空载体在 T₄ DNA Ligase 的作用下进行连接, 然后转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取抗性单菌落摇菌, 提取质粒 DNA, 通过酶切电泳鉴定阳性克隆。

甘蔗胚性愈伤组织的获得 从田间选取生长健壮且无病虫害的福农 95-1702 和桂糖 94-119 甘蔗植株, 去掉梢部叶片, 用 75% 的酒精擦洗消毒, 在无菌条件下, 剥取生长点以上 10 cm 内的心叶, 将心叶切成厚度为 2 mm 左右的圆片, 接种于诱导培养基 CM₁ 上, 在 26℃ ~ 28℃ 黑暗下培养, 诱导产生愈伤组织, 然后在继代培养基 CM₂ 中继代 1 ~ 2 次, 使其产生胚性愈伤组织, 备用。

微弹的制备与基因枪轰击转化 提取植物表达载体 pUBCG0229-*cry1Ac* 的质粒 DNA 并纯化, 定量至 1 μ g μ L⁻¹。在轰击前 8 h 挑取生长旺盛的胚性愈伤组织(淡黄色, 干爽, 直径 0.3 ~ 0.5 cm), 接种于高渗透培养基(MS + 2 mg L⁻¹ 2, 4-D + 0.2 mol/L 山梨醇 + 0.2 mol/L 甘露醇 + 30 g L⁻¹ 蔗糖 + 6 g L⁻¹ 琼脂粉, pH 5.8)中, 进行预处理。轰击前 30 min 将渗透处理的胚性愈伤组织集中在培养皿的中心(Φ 2.5cm)位置。基因枪为 Bio-Rad 公司 PDS-1000/He 型, 每皿轰击 1 次。采用优化的轰击参数: 轰击距离 6 cm, 气压 1100 psi。钨粉/DNA 用量为 600 μ g μ L⁻¹, 沉淀剂用 2.5 mol/L 的 CaCl₂ 和 0.1 mol/L 的亚精胺(现配)。具体步骤按照 PDS-1000/He 型基因枪操作说明书进行。

轰击后的筛选 轰击后将愈伤组织继续渗透处理 18 h, 然后转接至继代培养基 CM₂ 中恢复培养 1 周, 继而转接到含有 PPT(草铵磷)的分化培养基 CM₃ 上进行筛选培养。当分化出的不定芽长至

4 ~ 5 cm 高时, 将其接种于含有 PPT 的生根培养基 CM₄ 中进行生根筛选培养。待根长达 2.5 cm 左右时, 移栽至 72 孔营养盘中, 成活后使用 Basta 溶液对转化苗进行喷洒筛选。为了确定适宜的筛选浓度, 设置了不同的 PPT 和 Basta 浓度梯度对甘蔗愈伤组织的耐受程度进行抗性预试验, 继代、分化和生根培养基中, PPT 浓度分别设置为 0(对照)、0.25 mg L⁻¹、0.5 mg L⁻¹、0.75 mg L⁻¹、1.0 mg L⁻¹、1.25 mg L⁻¹、1.5 mg L⁻¹、2.0 mg L⁻¹ 和 0(对照)、0.25 mg L⁻¹、0.5 mg L⁻¹、0.75 mg L⁻¹、1.0 mg L⁻¹、1.25 mg L⁻¹、1.5 mg L⁻¹, Basta 溶液喷洒浓度(v/v)梯度设置为 0(对照)、0.2‰、0.5‰、1.0‰、2.0‰、3.0‰、4.0‰、5.0‰、6.0‰。

1.3 抗性植株的分子鉴定

基因组 DNA 的提取及纯化 采用改良的 CTAB 法^[7]。

巢式 PCR 检测 提取抗性再生植株的叶片 DNA, 以 pUBCG0229-*cry1Ac* 质粒 DNA 为阳性对照, 非转化植株的组培苗和大田苗为双阴性对照, ddH₂O 为空白对照, 进行 PCR 扩增鉴定。*cry1Ac* 基因引物: 外引物 p1: 5'-TGGCTTGGAGCGTGTC-TGGG-3', p2: 5'-CATTGTTGTTCTGTGGTGGG-3'; 内引物 p3: 5'-GCTTGGAGCGTGTCTGGGGT-3', p4: 5'-TTCTGTGGTGGGATTTCGTC-3'。外引物扩增体系: 2.5 μ L 10 $\times$ PCR Buffer (Mg²⁺ Plus), 2.0 μ L dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L), 1.0 μ L 模板 DNA (50 ng μ L⁻¹), 1.0 μ L p1, 1.0 μ L p2, 0.25 μ L *rTaq* DNA Polymerase (5 U μ L⁻¹), 加 ddH₂O 补至 25 μ L。反应条件为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 45 s, 54℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 50 s, 循环 16 次; 72℃ 延伸反应 10 min。内引物扩增体系除模板用 3.0 μ L 外引物的扩增产物外, 其他同外引物扩增体系, 反应条件为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 45 s, 59℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 50 s, 循环 40 次; 72℃ 延伸反应 10 min。扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 在成像系统下拍照。

Dot-Southern 检测 用 PCR 检测呈阳性的植株基因组 DNA 作模板, 采用 DIG 标记法对探针进行标记, 按照 DIG DNA Labeling and Detection Kit 杂交试剂盒说明书进行 Dot-Southern 检测。

阳性植株 PCR 产物测序 用 Dot-Southern 检测为阳性的植株的 DNA 做巢式 PCR, 将 PCR 产物回收后连接到 T Vector 上, 然后转化大肠杆菌,

挑选阳性克隆摇菌,委托上海鼎安生物科技有限公司测序,将测序结果同 *cry1Ac* 基因序列进行同源性比对分析。

2 结果和分析

2.1 带有目的基因 *cry1Ac* 的植物表达载体的构建

构建完成的植物表达载体 pUBCG0229-*cry1Ac* 大小为 8602 bp。根据其多克隆位点进行酶切鉴定,分别用限制性内切酶 *Not* I、*Hind* III、*Hind* III + *Eco*R I 和 *Bgl* II 对所构建的载体 pUBCG0229-*cry1Ac* 进行酶切,分别产生了 1~4 条大小不等的片段,酶切产物电泳结果如图 2。

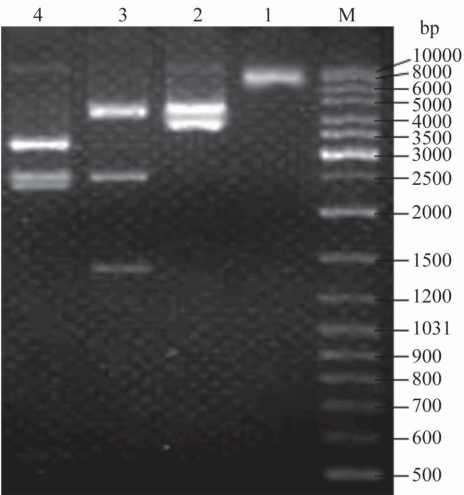


图 2 pUBCG0229-*cry1Ac* 质粒 DNA 酶切产物电泳图
Fig. 2 Electrophoresis pattern of the plasmid pUBCG0229-*cry1Ac* digested by restriction digestion
M: DNA Marker;1: *Not*I;2: *Hind* III;3: *Eco*RI 和 *Hind* III;4: *Bgl* II

从图 2 可见,*Not* I 酶切只有 1 条条带,介于 8000~10000 bp,与预期 8602 bp 相符(泳道 1);*Hind* III 酶切有 2 条条带,介于 4000~5000 bp,与预期的 4453 bp 和 4149 bp 一致(泳道 2);*Hind* III + *Eco*R I 双酶切有 5 条条带,但图中只能看到 3 条,分别在 4000~5000 bp,2000~2500 bp,1200~1500 bp(泳道 3),主要因为位于多克隆位点上的限制性酶切位点 *Hind* III (5577)与 *Eco*RI (2830、5297、5589)之间有两个核酸片段分别为 280 bp 和 12 bp,由于电泳时间较长,280 bp 的条带已经淡掉看不到,而 12 bp 的条带无法用琼脂糖凝胶检测,所看到的 3 条条带分别与预期的 4453 bp、2467 bp 和 1402 bp 相符;*Bgl* II 酶切也有 5 条条带,但图中只能看到 4 条,分别在 3000~3500 bp,2000~2500 bp,500~600 bp(泳道 4),那是因为 *Bgl* II 在多

克隆位点上有 4 个限制性酶切位点(1、2382、5567、6103、6107),其中有两个位点之间的核酸片段只有 4 bp,无法用琼脂糖凝胶检测,所看到的 4 条带分别与预期的 3185 bp、2495 bp、2382 bp 和 536 bp 相符,同样,由于低电压长时间的电泳,536 bp 较小的条带已经有些模糊。通过这些酶切结果可知,pUBCG0229-*cry1Ac* 质粒结构与预期结果完全正确。

2.2 甘蔗基因型对 PPT 及 Basta 的敏感性

愈伤组织继代培养时受到培养基中添加 PPT 的影响,愈伤组织颜色变深、生长减缓,但未出现褐化死亡现象。愈伤组织在不同 PPT 浓度培养基中的生长区别并不明显,说明愈伤组织在继代培养中对 PPT 的反应并不十分敏感。

愈伤组织分化阶段,随 PPT 浓度的提高,分化越差。桂糖 94-119 愈伤组织在 0.75 mg L⁻¹ PPT 下有 52.3% 可以分化出不定芽,而福农 95-1702 只有 42.7%,其在 0.5 mg L⁻¹ PPT 下也只有 56.1%。愈伤组织在筛选培养基中分化成不定芽的速度明显减慢,分化出的不定芽矮小瘦弱,黄叶较多。由于愈伤组织在基因枪轰击后会受到损伤,且以后的生根培养阶段和幼苗移栽还有两重筛选,故在分化阶段应适当降低选择压,分别用 0.75 mg L⁻¹ 和 0.5 mg L⁻¹ 的 PPT 对这 2 个基因型的愈伤组织进行分化筛选,以免愈伤组织再分化过程中因选择压过大而产生变异。

不定芽生根时,随着 PPT 浓度的提高,生根数明显减少,植株高度明显下降,整体长势变差,黄化现象严重。当 PPT 达到 1.0 mg L⁻¹ 或更高时,桂糖 94-119 的大多数不定芽生根困难,有少数不定芽长出了主根,但主根又细又短,不能分化出侧根,有些植株虽然长出了主根,但茎叶已经枯死。而福农 95-1702 在 PPT 达到 0.75 mg L⁻¹ 或更高时就表现出同样的现象。因此,生根筛选时,PPT 浓度以 0.75~1.0 mg L⁻¹ 为宜。

Basta 溶液对甘蔗幼苗生长有明显的抑制作用。喷洒 3 d 后,甘蔗叶片开始黄化,出现棕褐色斑点,生长明显减缓,且 Basta 浓度越高,甘蔗幼苗受影响的程度越强,福农 95-1702 和桂糖 94-119 幼苗对 Basta 的反应基本一致。当用 3.0‰ 以上的 Basta 溶液喷洒幼苗后,幼苗叶片逐渐黄化,1 周后干枯死亡,而当 Basta 浓度低于 3.0‰ 时,被喷施的植株叶片也会不同程度的黄化、干枯,但过一段时间部分叶片还会慢慢变绿,植株长出心叶,浓度越

低,幼苗受影响程度越轻,但长势明显不如对照。因此,在甘蔗品种福农 95-1702 和桂糖 94-119 遗传转化中,用 *bar* 基因作筛选标记时,在转化苗移栽成活后,可使用浓度为 3.0%(v/v)的 Basta 溶液进行喷洒,以快速剔除假阳性植株。

2.3 甘蔗遗传转化及抗性植株的获得

pUBCG0229-*cry1Ac* 质粒 DNA 包被钨粉颗粒后轰击甘蔗胚性愈伤组织,然后在 CM₂ 培养基中恢复培养 1 周,直接转接至含有 0.75 或 0.5 mg L⁻¹ PPT 的分化培养基 CM₃ 中,2~3 周后部分愈伤组织色泽正常,并逐渐分化出了抗性不定芽,而部分愈伤组织无明显生长现象,并逐渐褐化死亡(图 3A)。当抗性分化芽长至 4~5 cm 高时,接种于含有 1.0 或 0.75 mg L⁻¹ PPT 的生根培养基 CM₄ 中。在生根筛选时,部分抗性苗仍能正常生长,10 d 后即可长出主根,然后逐渐长出侧根,而部分植株不能正常生根,并且逐渐枯萎死亡(图 3B)。

将生根植株移栽至 72 孔营养盘中,幼苗成活后,用 3.0%(v/v)的 Basta 溶液喷洒,2 周后,91.2% 的植株逐渐干枯死亡(图 3C)。将存活的植株移栽至营养钵中,进而移栽到可控环境的田间种植,最后共获得 203 株抗性植株。

2.4 抗性植株的分子鉴定

提取 203 株抗性再生植株的基因组 DNA,定量至 50 ng μL⁻¹,作为模板,用巢式引物(外引物 p1、p2 和内引物 p3、p4)及优化的反应体系和循环程序进行 PCR 扩增,其中有 86 株能够扩增出与阳性质粒大小一致的条带,而水和两个阴性对照均未扩增出条带(图 4)。为了剔除假阳性的植株,对 PCR 检测呈阳性的 86 株植株做进一步的分子检测,采用 DIG 标记法,用其基因组 DNA 做 Dot-Southern 检测,其中 22 株有明显的杂交斑点(图 5),说明目的基因 *cry1Ac* 基因已经整合进其基因组 DNA 中,转化效率达 1.1%。

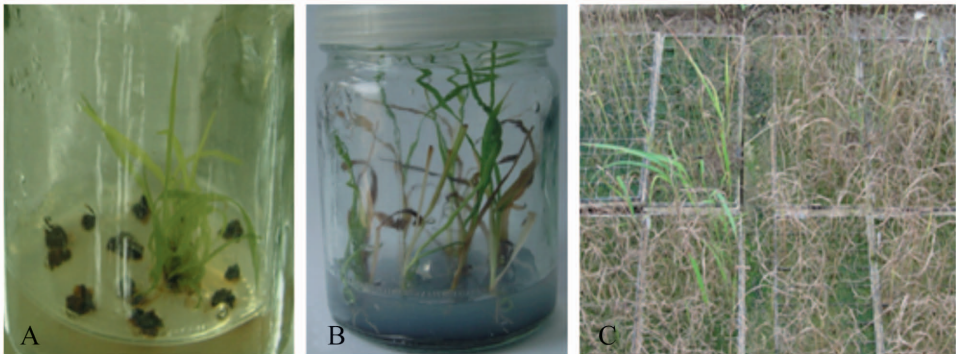


图 3 转化材料不同阶段的抗性筛选

Fig. 3 The screening of transformation materials at different stages

A: 分化成苗阶段 Differentiation stage; B: 生根阶段 Rooting stage; C: 幼苗阶段 Seedling stage

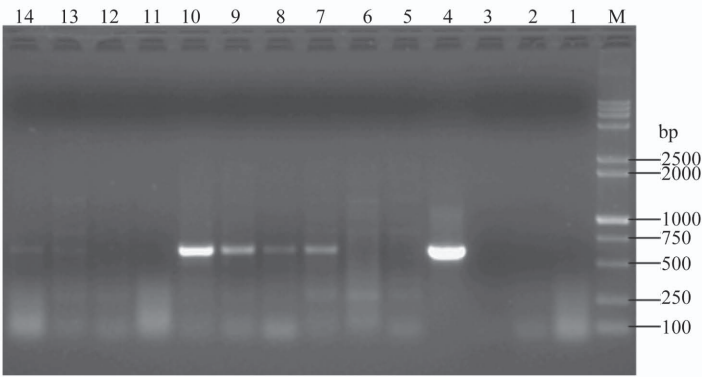


图 4 *cry1Ac* 基因片段的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 4 Electrophoresis pattern of PCR products with *cry1Ac* gene fragment

M: DNA Marker; 1: H₂O; 2: 组培苗阴性对照 Negative control of tissue culture seedling; 3: 宿根蔗阴性对照 Negative control of ratoon cane; 4: pUBCG0229 质粒 DNA 阳性对照 Positive control of pUBCG0229-*cry1Ac*; 5~14: 抗性再生植株 Resistant plantlets.

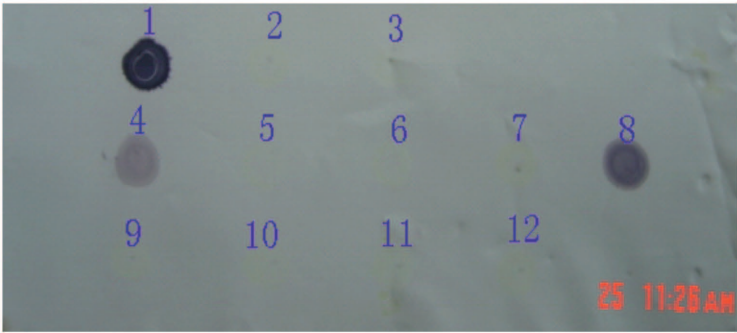


图 5 Dot-Southern 杂交检测

Fig. 5 The Dot-Southern blotting detection

1: 阳性质粒 Positive plasmid; 2: 组培苗阴性对照 Negative control of tissue culture seedling;
3: 宿根蔗阴性对照 Negative control of ratoon cane; 4~13: 阳性植株 Positive plants.

将 Dot-Southern 检测为阳性的植株进行 PCR 产物测序,将测序结果同 *cry1Ac* 基因全长序列进行同源性分析比对,结果表明,扩增片段与全长 *cry1Ac* 基因具有极高的一致性,说明 PCR 产物是 *cry1Ac* 基因中的片段,这进一步验证了外源基因 *cry1Ac* 确实整合进了甘蔗基因组 DNA 中。

3 讨论和结论

构建的植物表达载体 pUBCG0229-*cry1Ac*, 既带有 *cry1Ac* 基因,可表达对鳞翅目昆虫具有毒性的蛋白;又带有可表达抗 PPT 和 Basta 活性的 *bar* 基因。用该载体转化甘蔗时,既可以在组培阶段使用 PPT 进行抗性筛选,又可以在转化苗移栽后,使用一定浓度的 Basta 溶液喷洒筛选。因为使用一定浓度的 Basta 溶液喷洒后,转化体叶片不会枯黄,而假阳性植株会黄化并慢慢死亡,这样通过表型筛选可以在早期快速鉴定真正的转化体,并免除 PCR 鉴定的烦琐和误差^[8]。通过抗性筛选后即可获得抗螟虫的转基因甘蔗。抗性再生植株进行 PCR 检测时出现了假阳性,可能是检测过程中的非特异性扩增,因为甘蔗基因组相当庞大,易产生非特异性扩增;同时转化后产生了嵌合体,也可能造成 PCR 检测时的假阳性。

由于甘蔗对卡那霉素有较高的抗性,且在卡那霉素的选择压力下,易产生白化苗^[9],因而,我们认为新霉素磷酸转移酶基因(*NPT II*)介导的卡那霉素抗性不宜作为选择标记,不过,在强启动子下,该基因介导的 G418 抗性可以作为选择压^[10-11],但目前使用较少。迄今,在甘蔗上采用的选择标记主要有 *NPT II* 基因、潮霉素磷酸转移酶基因(*hpt*)、绿色荧光蛋白基因(*gfp*)和除草剂抗性基因(*bar*)等。*hpt* 基

因可编码抗潮霉素的产物,甘蔗对其较为敏感,是一种较好的选择标记,不过目前国家已限制使用该筛选剂的转基因植物的释放。*gfp* 基因编码的产物在蓝色波长范围的光线激发下呈绿色,可通过肉眼来判定,用其作为转基因细胞的筛选标记,特别在农杆菌转化系统优化中,具有快速、简便筛选的效果^[12],由于荧光的存在,它不适合用作生产上转基因植株的筛选。*bar* 基因编码的产物 PAT 可提供对除草剂 Basta 或膦丝菌素(PPT)的抗性,甘蔗对其敏感,是一种较为理想的选择标记。通过该筛选标记基因,已成功获得了转美洲商陆抗病毒蛋白基因、蔗糖:蔗糖果糖基转移酶基因、无机焦磷酸化酶基因等转基因甘蔗^[13-15]。因此,*bar* 基因在甘蔗基因工程中作为一个筛选标记基因将有很大的应用空间。

本研究成功构建了用于植物转化的表达载体 pUBCG0229-*cry1Ac*, 大小为 8602 bp。该载体的表达盒(cassette)是以 *ubi* 为启动子、*nos* 为终止子、*bar* 为筛选标记基因、*cry1Ac* 为目的基因,可用 PPT 作为筛选底物进行离体筛选,还可用 Basta 在种植后进行苗期筛选。在国内率先培育出同时转 *cry1Ac* 和 *bar* 基因的转基因甘蔗。

参考文献

[1] Chen R K(陈如凯). The Modern Theory and Practice of Sugarcane Breeding [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003: 1-6. (in Chinese)
[2] Huang Y K(黄应昆), Li W F(李文凤). The effective test of 5% carbosulfan G against *Sesamia inferens* Walker and *Chilo infuscatellus* Snellen [J]. Sugar Crops China(中国糖料), 2006(4): 34-35. (in Chinese)
[3] Arencibia A, Carmona E, Cornide M T, et al. Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum* hybrid) plants

- produced by cell electroporation [J]. *Transgen Res*, 1999, 8(5): 349–360.
- [4] Braga D P V, Arrigoni E D B, Silva-Filho M C, et al. Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) [J]. *New Seeds*, 2003, 5: 209–221.
- [5] Legaspi J C, Mirkov T E. Evaluation of transgenic sugarcane against stalk borers [C]// Allsopp P G, Suasa-ard W. *Proceedings of the International Society of Sugarcane Technologists Vol. 4*. Khon Kaen, Thailand: Sugarcane Entomol Workshop, 2000: 68–71.
- [6] Setamou M, Bernal J S, Legaspi J C, et al. Evaluation of lectin-expressing transgenic sugarcane against stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae): Effects on life history parameters [J]. *J Econ Entomol*, 2002, 95(2): 469–477.
- [7] Yao W(姚伟), Geng G L(耿广良), Yu A L(余爱丽), et al. An improved method for isolation of transgenic sugarcane genomic DNA [J]. *J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报)*, 2004, 12(3): 257–260.(in Chinese)
- [8] Duan F P(段发平), Liang C Y(梁承邳), Li Y Q(黎垣庆). Research advances of *Bar* gene and its transgenic crops [J]. *Guihaia(广西植物)*, 2003, 21(2): 166–172.(in Chinese)
- [9] Lin J F(林俊芳), Zhang Y D(张银东), Chen R K(陈如凯), et al. Transgenic albino sugarcane seedlings obtained by transformation of embryogenic callus via microprojectile bombardment [J]. *J Fujian Agri Univ(福建农业大学学报)*, 1997, 26(1): 18–23.(in Chinese)
- [10] Falco M C, Tulmann N A, Ulian E C. Transformation and expression of a gene for herbicide-resistance in Brazilian sugarcane [J]. *Plant Cell Rep*, 2000, 19: 1188–1194.
- [11] Liu D W, Oard S V, Oard J H. High transgene expression levels in sugarcane driven by the rice ubiquitin promoter RUBQ2 [J]. *Plant Sci*, 2003, 165: 743–750.
- [12] Elliott A R, Campbell J A, B retell R I S, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker [J]. *Austr J Plant Physiol*, 1998, 25(6): 739–743.
- [13] Luo Z X(罗遵喜), Yang Z C(杨志才), Lü S S(吕苏珊), et al. Genetic transformation of pokeweed antiviral protein gene into sugarcane [J]. *Chin J Trop Crops(热带作物学报)*, 2009, 30(11): 1646–1650.(in Chinese)
- [14] Tang J P(唐建平), Cai W W(蔡文伟), Wang J G(王俊刚), et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane for sucrose: Sucrose 1-fructosyltransferase gene [J]. *Mol Plant Breed(分子植物育种)*, 2009, 7(3): 579–582.(in Chinese)
- [15] Zhao L H(赵丽宏), Wang J G(王俊刚), Yang B P(杨本鹏), et al. Genetic transformation of inorganic pyrophosphatase gene of sugarcane [J]. *Biol Bull(生物技术通报)*, 2009, 9: 73–77.(in Chinese)