

甜菜(*Beta Vulgaris* L)叶绿体转化体系建立及抗虫和抗除草剂植株的获得*

崔杰¹⁾ 李滨胜^{1,2)} 杨谦^{3)**} 程大友¹⁾

(1) 哈尔滨工业大学食品科学与工程学院 哈尔滨 150090;

2) 黑龙江省森林植物园 哈尔滨 150040; 3) 哈尔滨工业大学生命科学与工程系 哈尔滨 150001)

摘要 为建立外源基因甜菜叶绿体转化体系,利用分子生物学方法构建了包含有编码苏云金芽孢杆菌晶体蛋白基因 *Bt cry1Ac* 和编码膦丝菌素乙酰转移酶 *bar* 基因的甜菜叶绿体转化载体 pSKARBt/*bar*,以甜菜叶绿体基因组中 *atpB/rbcL* 做同源片段,以甜菜叶绿体 16S 启动子和终止子为调控基因,以 *bar* 基因为筛选标记基因. 基因枪法转化甜菜叶柄,经筛选获得抗性转基因植株. 对转基因植株进行外源基因 *Bt cry1Ac* 和 *bar* 的 PCR 检测、Southern blot 分析,结果表明:外源基因 *Bt cry1Ac* 和 *bar* 确已导入到甜菜叶绿体基因组中. 转基因植株除草剂抗性鉴定及其离体叶片虫试鉴定结果表明:转基因植株具有较强的杀虫活性和抗除草剂特性,表达了相应的蛋白. 研究结果还表明:*bar* 基因在植物叶绿体转化中,既可以用作抗性基因,又可用于转化体筛选的标记基因. 建立了甜菜叶绿体转化体系.

关键词 甜菜; 叶绿体转化; *Bt* 基因; *bar* 基因; 同质化

学科分类号 Q78 Q81

甜菜是我国重要的糖料作物,近年来在大面积生产中常常遭受虫害和草害的威胁,严重影响甜菜产量和质量. 2000年因草害造成东北甜菜主产区减产达10%以上^[1];虫害威胁更为严重,有时是灾难性的,因此,迫切需要选育抗虫、草甜菜新品种. 采用常规育种手段因抗性种质资源匮乏难以解决此问题,基因工程技术与常规育种方法相结合选育抗除草剂、抗虫甜菜新品种切实可行,具有重要的现实意义和商业价值.

草丁膦(glyphosate)是非选择性、广谱除草剂Liberty的活性成分,属于有机磷类除草剂,商业用名还有 Basta、PPT等. L-草丁膦能强烈抑制细菌和植物的谷氨酰胺合成酶(GS)活性,导致细胞内氨含量迅速积累,直接抑制光系统及其反应,减少跨膜pH梯度,使光合磷酸化解偶联,叶绿体结构解体,最后整个植物体死亡. 将编码膦丝菌素乙酰转移酶(PAT)的*bar*基因转化植物,PAT使PPT的自由氨基乙酰化,从而对PPT解毒,使之不能抑制GS的活性,转化植株可正常生长. 此外,有研究证实,*bar*基因在植物基因工程研究中也可用作筛选标记基因,如周钟信等^[2]、Kerry等^[3]、Maughan等^[4]的研究分别成功地获得了转基因的烟草和水稻.

在基因工程研究中,以高效、无毒的非抗生素抗性基因作为筛选标记基因进行叶绿体转化,可以解除目前人们对食用转基因食品带来的安全性问题以及对环境带来潜在的威胁的担忧. 叶绿体转化体系的优势是通过来源于叶绿体的同源片段将外源基因定点整合到植物的叶绿体基因组中,通过叶绿体的多拷贝性实现外源基因的高效表达,通过母系遗传方式将外源基因传给子代,具有环境安全性等.

*Bt*基因是研究最深入、应用最广泛的基因,目前已在烟草、水稻、棉花和玉米等多种作物上转化并获得

*黑龙江省科技攻关重点项目(GB05B104)和国家自然科学基金(30771373)资助项目

**通讯联系人.

Tel: 0451-86412952, Email: yangq@hit.edu.cn

收稿日期: 2008-06-11 接受日期: 2008-10-20

成功^[5-8]。在甜菜上, 国外也有将抗虫基因*Bt*及抗除草剂基因*EPSPS*分别转入甜菜, 获得抗虫或抗除草剂转基因植株的报道^[9-11], 其转化方式均为细胞核转化。而关于抗虫基因*Bt*及抗除草剂基因 *bar*甜菜叶绿体转化研究尚未见报道。本研究针对甜菜生产实际, 构建了同时含有抗虫*Bt*基因*cry1Ac*和抗除草剂基因*bar*两个抗性基因的甜菜叶绿体转化载体, 基因枪法转化甜菜, 经抗性筛选鉴定, 首次获得了抗除草剂和抗虫双抗性转基因甜菜植株, 并以*bar*基因作筛选标记基因, 建立了甜菜叶绿体转化体系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 糖用甜菜二倍体品系72-204由哈尔滨工业大学食品科学与工程学院提供。

1.1.2 菌株与质粒 大肠杆菌DH5 α 由本室保存, 载体质粒pSKARBt (含*Bt*基因表达盒)和pSKARbar (含*bar*基因表达盒)由本研究室构建^[12, 13], 甜菜叶绿体16S启动子和终止子为调控基因。

1.1.3 试剂 各种限制性内切酶、Klenow 酶、T4 DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶和 dNTPs 等购自美国 Promega 公司; Vent DNA 聚合酶购自 Biolabs 公司; DNA 回收试剂盒购自原平皓生物技术有限公司; 探针标记试剂盒为 Roche 公司的 DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I; 硝酸纤维素膜为 Amershan 公司产品; 其它试剂为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 甜菜叶绿体转化载体构建 载体pSKARBt/*bar*的构建过程为将载体pSKARbar, 用*Spe*I酶切、补平、回收大小约为1.2kb包括*bar*基因在内的表达盒片段; 用*Not*I酶切载体pSKARBt, 补平、回收后与前面的片段连接, 筛选重组子, 酶切鉴定获得正确的转化载体pSKARBt/*bar* (图1)。

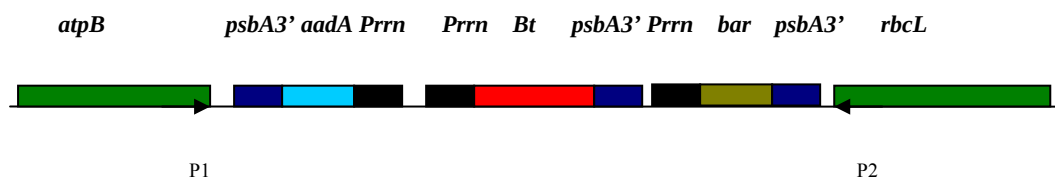


Fig. 1 Schematic diagram of sugar beet chloroplast expression vector pSKARBt/*bar*

1.2.2 基因枪转化 参照Gordon Kamm^[14]方法制备金粉/载体DNA子弹; 采用美国Bio-Rad公司制造的PDS-1000/He基因枪轰击, 参数为: 真空度25 inches-Hg, 轰击距离为9 cm, 可裂膜为1100 psi, 金粉颗粒直径1.0 μ m. 转化步骤: 取生长于MS培养基中的无菌苗叶柄切段 (大小约1 cm) 作为外植体, 紧密摆放于盛有MS培养基的平皿中央, 轰击后, 将平皿置于光照培养箱(25 $^{\circ}$ C) 中培养2 d, 移入选择分化培养基(MS + 6BA 1.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 壮观霉素Spc 20 mg/L)上培养, 待分化出绿芽后, 将其转入壮苗培养基 (MS + 6BA 0.5 mg/L + NAA 1.0 mg/L + Spc 20 mg/L) 或 (MS + 6BA 0.5mg/L + NAA 1.0 mg/L + PPT 10 mg/L) 中培养, 每隔三周继代一次 (即将绿芽转入相同培养基上继续培养, 每转一次培养基为1次继代), 之后将壮苗移入生根培养基 (MS + NAA 0.5 mg/L + Spc 20 mg/L) 或 (MS + NAA 0.5 mg/L + PPT 10 mg/L) 中培养, 待再生出小植株后, 移入花盆。

1.2.3 转基因植株的 PCR 检测 以转基因甜菜叶绿体 DNA 为模板, 提取方法参照崔杰等^[15]方法, 利用下表引物分别扩增目的片段以验证目的基因是否整合到甜菜叶绿体基因组中及转基因植株的同质化程度。引物合成由上海博亚生物技术有限公司北京分公司完成。

反应体系均为 50 μ L. 即 10 $\times$ PCR buffer 5 μ L; 4 $\times$ dNTP (各 12.5mM) 1 μ L; 5'端引物 (12.5 μ M) 1 μ L; 3'端引物 (12.5 μ M) 1 μ L; 模板 DNA 1 μ L; Taq 酶 (3U/ μ L) 1 μ L; H₂O 40 μ L)。

Table 1 The list of primers, sequences and DNA fragments

primers	sequences	DNA fragments (kb)
homologous fragment primers in Fig. 1	P1:5'-TCACTCGAGAAGTAGTAGGATTG-3' P2:5'-GCGATATCCAACACTTGCTTTAG-3'	7.0
<i>Bt cry1Ac</i> gene primers	P3:5'-GACCATGGATAACAATCCGAACATCAATG-3' P4:5'-GAGGTCGACGTATGTATTACTAGAAAATAACATAG-3'	3.5
<i>bar</i> gene primers	P5:5'-TTAGGAAGTAACCATGAGCCC-3' P6:5'-ACGGATCAGATCTCGGTGAC-3'	0.6

反应程序:

同质化鉴定: 95℃ 5min; 之后, 先进行 10 个循环, 即: 95℃ 1min, 51℃ 2min, 72℃ 2min, 然后进行下面 20 个循环, 即: 95℃ 1min, 51℃ 2min, 72℃ 2min, 10 个循环; 95℃ 1min, 41℃ 2min, 72℃ 2min30sec, 10 个循环; 72℃ 10min, 4℃ 10min.

Bt cry1Ac 基因: 95℃ 5min, 95℃ 1min, 55℃ 1min30sec, 72℃ 2 min; 30 个循环, 72℃ 10min, 4℃ 10min.

bar 基因: 95℃ 5min; 95℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 2 min; 30 个循环, 72℃ 10min, 4℃ 10min.

1.2.4 转基因植株的Southern blot检测 分别以*Bt cry1Ac*基因片段及*bar*基因为探针进行Southern杂交. 探针标记按Roche公司的DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I的说明书进行操作. 由于在*Bt cry1Ac*基因内部包含一个726 bp的*EcoR* I 酶切片段, 故首先对该基因进行*EcoR* I 酶切, 回收726 bp片段作探针并标记, 同样对提取的转基因植株叶绿体DNA进行*EcoR* I 酶切, 用于检测*Bt cry1Ac*基因. 而用于检测*bar*基因的转基因植株叶绿体DNA进行*Bam*HI、*Hind*III双酶切. 电泳, 转膜采用Bio-Rad Model 785 Vacuum blotter system于5 inches·Hg 压力下转移30 min. 预杂交、杂交等参见文献^[16].

1.2.5 转基因植株的生物杀虫试验 参照侯丙凯等^[17]方法, 用转基因甜菜叶片饲喂2龄末甘蓝夜蛾(*Barathra brassicae*), 以野生型甜菜为对照, 每个叶片(次新叶)为一个处理, 每个处理饲喂5条幼虫(即将5条幼虫放在装有叶片的直径为10 cm培养皿中, 扣上盖, 室温条件下喂养, 光/暗16 h/8 h), 每个植株3次重复, 从接种试虫后第2天开始, 隔天记录昆虫生长发育状况, 直至第6天为止, 统计死亡率并对存活幼虫称重.

1.2.6 转基因植株的除草剂抗性试验 参照陈游等^[18]方法, 用毛笔蘸取浓度为100 mg/L的PPT, 在转基因甜菜植株叶片(刚刚长出的新叶除外)表面(正反面)涂抹3次, 以野生型甜菜为对照, 室温条件下, 培养室内光/暗16 h/8 h, 观察叶片的变化情况.

2 结果与分析

2.1 甜菜转基因再生植株的获得

采用基因枪法以制备的质粒pSKARBt/*bar*金粉子弹轰击甜菜叶柄, 转化后的叶柄在含Spc的选择分化培养基中培养(抗性筛选), 约3周后, 在叶柄段上及切口处长出绿色小芽, 待绿芽长大后切下, 移入含Spc的壮苗培养基中继代一次, 再转入含PPT的壮苗培养基中经多次继代培养后, 移入生根培养基中, 10天左右即可生根, 炼苗后, 移入花盆中, 共获得32株抗性再生植株, 其中部分抗性植株进行了PPT筛选剂的2轮筛选(选用抗性植株的叶柄切段在选择分化培养基上重新进行绿芽分化即为1轮)与多次继代.

2.2 转基因植株PCR检测

分别利用引物P3、P4及P5、P6对上述32株T0代抗性植株进行PCR扩增，以未转化的甜菜植株为阴性对照，以载体质粒为阳性对照。结果有27株获得与预计大小相符的目的条带（图2A、B），说明这27株中均整合了外源基因。

利用引物 P1、P2 对 32 株 T0 代抗性植株进行 PCR 扩增，以验证不同继代植株的同质化程度。如果扩增产物是一条 7.0 kb 的条带，则说明 *Bt* 基因 *cry1Ac* 及 *bar* 基因已定点整合到叶绿体基因组中，并达到完全同质化，如果扩增产物为一条 0.8 kb 条带，则说明 *Bt* 基因 *cry1Ac*、*bar* 基因未整合到叶绿体基因组中。电泳结果：其中同上的 27 株中有 20 株（1 轮筛选 3-5 次继代）同时扩增出 0.8 kb 和 7.0 kb 两条带（图 2C，2-4 泳道），有 7 株（2 轮筛选 6-8 次继代）只扩增出 7.0 kb 的条带（图 2C，5 泳道），而另外的 5 株及对照株均只扩增出一条 0.8 kb 的条带。说明在这些转基因植株的叶绿体内，转化型基因组随分化继代次数增加逐渐替代未转化的基因组，在 2 轮筛选 6-8 次继代后可达到完全同质化；而另外的 5 株为假阳性，其抗性可能是在转化与筛选过程中受体材料基因突变形成的。

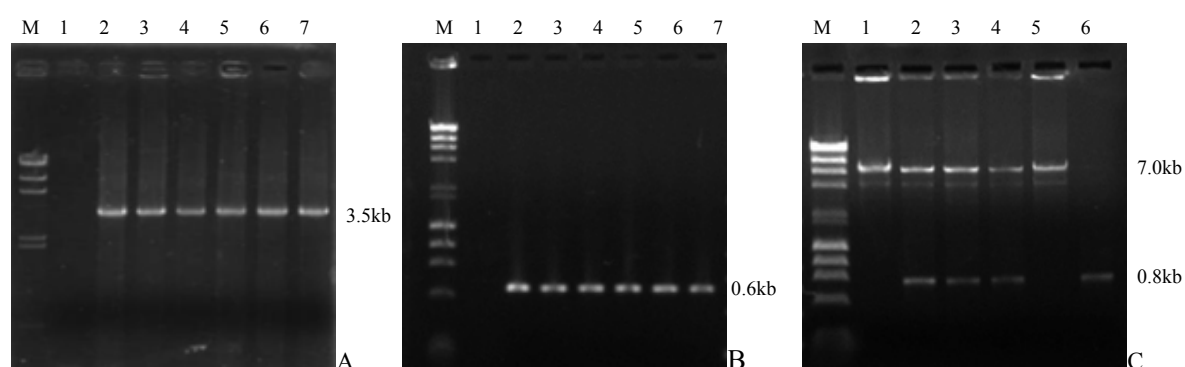


Fig. 2 The PCR analysis of transgenic sugar beet plants

A. *Bt* gene; B. *bar* gene; M, marker λ DNA/*Hind*III; 1, Negative control: chloroplast DNA from untransformed wild type sugar beet; 2, Positive control: DNA from plasmid pSKAR*Bt*/*bar*; 3-7: transgenic plants

C. DNA fragments in Fig.1 P1, P2 middle; M, marker λ DNA/*Hind*III; 1, Positive control: DNA from plasmid pSKAR*Bt*/*bar*; 2-5: transgenic plants; 6, Negative control: chloroplast DNA from untransformed wild type sugar beet

2.3 转基因植株Southern blot检测

为进一步证明PCR检测结果的正确性，对PCR检测呈阳性的转基因植株进行了Southern blot检测，以载体质粒pSAR*Bt*/*bar*为阳性对照，以未转化的甜菜植株为阴性对照。结果表明：所有检测植株均有杂交信号，*Bt cry1Ac*及*bar*基因杂交结果均与预计（约0.7kb和0.6kb）完全相符（图3）。证实了转基因植株PCR检测结果的正确性，说明*Bt cry1Ac*基因、*bar*基因确实已整合入叶绿体基因组中。

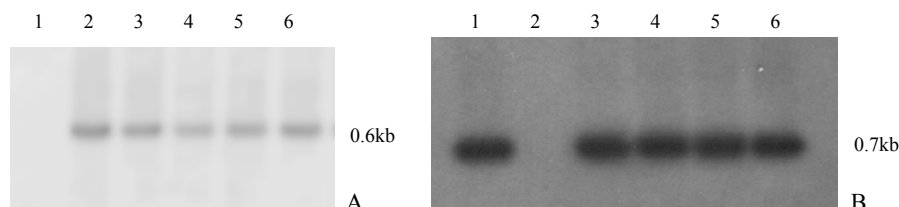


Fig. 3 PCR-Southern blot analysis of chloroplast DNA isolated from the transgenic plants

A. *Bt* gene; 1, Negative control: chloroplast DNA from untransformed wild type sugar beet; 2, Positive control: DNA from plasmid pSKAR*Bt*/*bar*; 3-6: transgenic plants B. *bar* gene; 1, Positive control: DNA from plasmid pSKAR*Bt*/*bar*; 2, Negative control: chloroplast DNA from untransformed wild type sugar beet; 3-6: transgenic plants

2.4 转基因甜菜抗虫性测试

选取部分经上述检测均呈阳性的转基因植株叶片进行生物杀虫试验, 其中BTB2、BTB5、BTB32为经2轮筛选的转基因植株, 其余为经1轮筛选的转基因植株, 以未转基因甜菜植株为对照, 每个处理饲喂5条2龄末甘蓝夜蛾, 每株做3次重复(图4, 表2)。从表中可看出: 转基因植株均具有杀虫性, 但有差异, 经2轮筛选的转基因植株如BTB5(BTB4的对应株)及BTB2(BTB1的对应株)杀虫性明显高于经1轮筛选的转基因植株; 此外, 不同继代次数杀虫效果也不同, 之所以存在差异, 可能与叶绿体转化的同质化程度不同有关。有报道认为: 每个叶肉细胞含有数十个甚至数百个叶绿体, 如果被整合外源基因的叶绿体数量越多, 则其外源基因表达量越高, 杀虫性越好^[17]。本研究结果说明导入的*Bt*基因*cry1Ac*在转基因植株叶绿体中得到表达。

Table 2 Bioassay of transgenic sugar beet leaves resistance to *Barathra brassicae*

Lines*	Insects gross	Insects died	Average weight(mg)	Lethal rate(%)
BTB1 (5)	15	7	45	46.7
BTB2 (6)	15	10	38	66.7
BTB4 (3)	15	5	52	33.3
BTB5 (6)	15	12	20	80.0
BTB7 (5)	15	9	32	60.0
BTB9 (5)	15	10	37	66.7
BTB10 (5)	15	10	37	66.7
BTB13 (4)	15	9	30	60.0
BTB16 (5)	15	9	31	60.0
BTB20 (3)	15	7	28	46.7
BTB21 (3)	15	7	29	46.7
BTB24 (4)	15	8	30	53.3
BTB30 (5)	15	9	29	60.0
BTB32 (5)	15	11	36	66.7
CK	15	0	87	0

*: number in bracket is times of subculture explants on MS medium containing 10 mg/L PPT

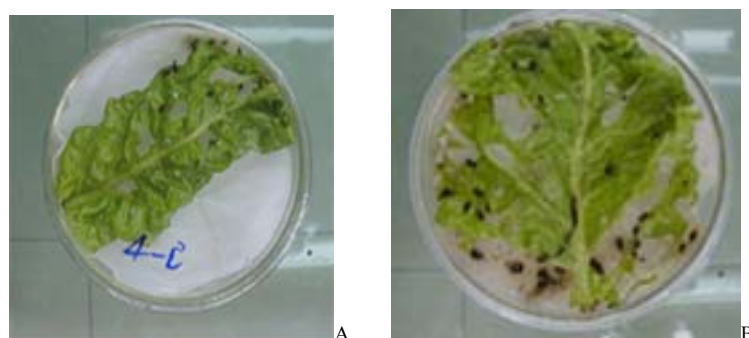


Fig. 4 Bioassay of transgenic sugar beet leaves resistance to *Barathra brassicae*

A, Transgenic plant; B, Negative control: wild type sugar beet

2.5 转基因植株除草剂抗性测试

叶片涂抹 PPT 的植株, 三天后观察结果(图 5), 其中对照株明显表现为对除草剂敏感, 叶片失水、变薄,

而后干枯，一周后逐渐枯死；而经过分子检测证明已经整合有 *bar* 基因的转基因植株则表现为对除草剂的抗性，叶片生长正常，说明导入的 *bar* 基因在转基因植株叶绿体中得到表达。



Fig. 5 Resistance test to PPT of transgenic sugar beet plants

A. Negative control: wild type sugar beet (nearside: undaubed PPT; starboard: 3 days after daubed PPT); B. Transgenic sugar beet plant (6 days after daubed PPT)

3 讨论

叶绿体转化技术的诸多优势使得该技术在植物基因工程中备受关注，已在外源基因的导入、整合与表达、转基因植株的筛选及标记基因的删除等方面获得了长足的发展。到目前为止，在烟草、拟南芥、马铃薯、番茄、水稻、油菜、棉花、大豆、莴苣等多种作物中进行了叶绿体转化研究并获得成功。但所获得的转化体多为异质体（即转化的叶绿体与未转化的叶绿体同时存在），完全同质化的叶绿体转基因植株只在模式植物烟草中获得，并多以 *aadA* 基因作筛选标记基因^[19]。本研究尝试以高浓度的PPT做筛选剂，并通过多次继代筛选和二次分化（2轮筛选）与多次继代筛选相结合的方法来提高同质化程度，PCR检测结果表明，转化体的同质化程度随分化、继代次数增加而提高，在2轮筛选6次继代的转化植株中已看不到野生型条带，此结果初步说明转化体已达到完全同质化。2轮筛选与多次继代结合实现甜菜叶绿体转化体同质化的进一步验证工作正在进行中。目前，提高叶绿体转基因植株同质化程度的最有效方法，就是本研究应用的在高浓度选择压力下对转化细胞进行多轮次抗性筛选。

尽管叶绿体转化技术应用的受体植物范围在不断扩大，但由于大多数植物叶绿体基因组全序列未知，使得该技术的广泛应用受到了限制，因此，目前植物叶绿体转化研究还多集中在体系建立上。甜菜同样为叶绿体基因组全序列未知的植物，同时又是较难再生的植物之一。本课题组通过对甜菜再生体系的优化，研究建立了甜菜叶柄高效再生体系，同时对甜菜叶柄进行了多种抗生素（如卡那霉素、壮观霉素等）及草丁膦敏感性筛选试验，确定了适宜筛选剂及使用浓度（筛选数据未列出），本研究是在此基础上进行的。以草丁膦作为筛选剂，采用基因枪转化方法进行了以甜菜叶柄为外植体的叶绿体转化草丁膦筛选体系的研究，摸索了本实验条件下基因枪转化甜菜叶绿体的各项技术参数，得到了较为合理的转化方案，经转化、诱导、筛选及检测，获得了甜菜转基因植株，从而建立了甜菜叶绿体遗传转化体系。这一体系的建立不仅为今后继续进行其他重要功能基因甜菜叶绿体遗传转化提供了保证，同时也为其它叶绿体基因组全序列未知的植物进行叶绿体转化研究提供理论依据，还拓展了叶绿体遗传转化的受体植物范围。

基于 *bar* 基因具有诸多优势，本研究尝试以 *bar* 基因作为筛选标记基因，但在研究中同时又加入了另外一

个筛选标记*aadA*基因,在转化后的选择分化培养及绿芽初次继代培养时以Spc筛选,之后再以PPT筛选. A.Kerry等研究认为*bar*基因在叶绿体中直接筛选不能获得转化体,只有拷贝数多时才可以,他们在含PPT的培养基上直接筛选出了抗PPT的核转化烟草植株,最高抗性达100 mg/l,但对于进行叶绿体转化的植株来说,直接筛选却无法获得阳性植株,他们认为这是由于位于叶绿体中的GS2含量相对于位于细胞质中的GS1含量较少,但当随着含有*bar*基因的叶绿体基因组拷贝数增多时,这种直接筛选便可以达到^[3]. 我们的研究结果与之吻合. 本研究中,以*bar*基因作筛选标记其筛选效率高于以*aadA*基因作筛选标记,假阳性比率小.

尽管*bar*基因作为抗性筛选标记有其独特的优点,但由于这方面研究较将其作为目的基因进行转化开展的晚,且各种作物对PPT的抗性存在差异,因此,今后有必要进行深入研究,使得*bar*基因在作为筛选标记方面有更广泛的应用.

参 考 文 献

- 1 夏树有, 毕景春. 几种常用化学除草剂对甜菜的危害. 中国甜菜糖业, 2001, 3: 47~48
Xia S Y, Bi J C. Injury of Some common chemical herbicides to Sugar beet. China Beet Sugar, 2001, 3: 47~48
- 2 周钟信, 李明, 王英超, 等. 烟草*Bar*基因的转化及其转化体快速检测方法的研制. 天津农学院学报, 2003, 10(4): 5~12
Zhou Z X, Li M, Wang Y C, et al. Tobacco *bar* Gene Transformation and New Method of Mini-trans-*bar*-genic bud or Explant Assay. Journal of Tianjin Agricultural Cole, 2003, 10(4): 5~12
- 3 Kerry Lutz A, Jane Knapp E, Maliga P. Expression of *bar* in the plastid genome confers herbicide resistance. Plant Physiology, 2001, 125: 1585~1590
- 4 Maughan S C, Cobbett C S. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, *CpTi*, in transgenic rice plants confers resistance to two major rice insect pests. Mol Breeding, 1996, 2: 167~173
- 5 张中林, 任延国, 沈燕新, 等. 苏云金芽孢杆菌 (Bt) 晶体毒蛋白基因在烟草叶绿体中的表达. 遗传学报, 2000, 27(3): 270~277
Zhang Z L, Ren Y G, Shen Y X, et al. Expression of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Crystal Toxin Gene in the Chloroplast of tobacco. Journal of Genetics and Genomics, 2000, 27(3): 270~277
- 6 林秀峰, 刘志铭, 刘德璞, 等. *Cry1Ac(a)-pta* 双价抗虫基因转化粳稻及二代螟抗性评估. 分子植物育种, 2006, 4(3): 345~350
Lin X F, Liu Z M, Liu D P, et al. Introduction Double Insect Resistance Genes *cry1Ac(a)-pta* to Japonica Rice and Assessment of Resistance to Rice Stem Borer. Molecular Plant Breeding, 2006, 4(3): 345~350
- 7 夏兰芹, 郭三堆. 高温对转基因抗虫棉中 *Bt* 杀虫基因表达的影响. 中国农业科学, 2004, 37(11): 1733~1737
Xia L Q, Guo S D. The Expression of *Bt* Toxin Gene Under Different Thermal Treatments. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(11): 1733~1737
- 8 李葱葱, 刘娜, 康岭生, 等. 转基因抗虫玉米 *Bt* 蛋白表达量的研究. 玉米科学, 2006, 14(3): 40~41
Li C C, Liu N, Kang L S, et al. Study on the Expression of *Bt* Insecticidal Protein of the Transgenic Insect-resistant Corn. Journal of Maize Sciences, 2006, 14(3): 40~41
- 9 島本義也, 前堂友子. ICP 遺傳子導入テンサイのヨトウガ幼蟲耐性[J]. てん菜研究会報, 1999, 41: 90~98
- 10 木本裕, 島本義也. *cryIC* 導入テンサイのヨトウガ幼蟲耐性[J]. てん菜研究会報, 2000, 42: 8~12
- 11 Glick H L. Herbicide tolerant crops: a review of agronomic, economic and environmental impacts. The BCPC conference-weeds. 2001, 1: 359~366
- 12 Cui J, Sun J H, Li B S. *bar* gene clone and transformation into chloroplast genome of Sugar beet. Proceedings of International Symposium on Chloroplast Genomics and genetic Engineering, Changchun, china, 2007

- 13 崔杰, 杨谦, 徐德昌. *Bt* 基因甜菜叶绿体转化载体构建及毒蛋白表达. 细胞生物学杂志, 2006, 28(3): 486~490
- Cui J, Yang Q, Xu D C. Vector Construction with *Bt* Gene for Sugar beet Chloroplast Transformation and Expression Toxin-protein. Chinese Journal of Cell Biology, 2006, 28(3): 486~490
- 14 Gordon_Kamm W J, Spencer T M, Mangano M L, *et al.* Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. Plant Cell, 1990, 2: 603~618
- 15 崔杰, 李滨胜, 杨谦. 甜菜叶绿体 DNA 分离纯化方法. 中国糖料, 2005, 3: 29~31
- Cui J, Li B S, Yang Q. Method for ctDNA Isolation and Purification of Sugar beet. Sugar Crops of China, 2005, 3: 29~31
- 16 Ausubel F M. Short protocols in Molecular Biology, 3rd ed, New York: John Wiley
- 17 侯丙凯, 胡赞民, 党本元, 等. 定点整合抗虫基因到油菜叶绿体基因组并获得转基因植株. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28(3): 187~192
- Hou B K, Hu Z M, Dang B Y, *et al.* Site-specific integration of insect resistant gene into chloroplast genome of Oilseed Rape and acquisition of transgenic plants. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2002, 28(3): 187~192
- 18 陈游, 程世军, 王江, 等. 检测转基因水稻中 PPT 抗性表达的快速简便方法. 植物生理学通讯, 2000, 36(1): 50~52
- Chen Y, Cheng S J, Wang J, *et al.* A Rapid and Simple Method for Assaying PPT Resistance in Transgenic Rice Plants. Plant Physiology communications, 2000, 36(1): 50~52
- 19 张中林, 钱凯先, 沈桂芳. 同质化叶绿体转基因植株的获得. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(6): 620~626
- Zang Z L, Qian K X, Shen G F. Transplastomic plants homoplasmic for foreign transgenes. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2000, 32(6): 620~626

Establishment of a gene efficient transformation system in chloroplast Sugar beet(*Beta Vulgaris L*) and obtainment of insect and herbicide resistant Sugar beet plants*

CUI Jie¹⁾, LI Bin-Sheng^{1,2)}, YANG Qian^{3)**}, CHENG Da-You¹⁾

(¹⁾Food science and engineering college, Harbin Institute of Technology, Harbin, 150086, China; (²⁾ Forest botanical garden Heilongjiang, Harbin, 150040, China; (³⁾Department of Bioscience and Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin, 150001, China)

Abstract: Insects pests and weeds are the main factors that reduce the yield of sugar beet. Genetic engineering breeding is a effective method to breed insect-resisitant and herbicide-resisitant sugar beet. The aim of this study was to establish an transformation system for alien genes in Sugar beet chloroplast in order to solve those problems. The chloroplast transformation vector pSKARBt/bar, which carries *Bt cry1Ac gene* and *bar gene* expression cassettes, was constructed by using molecular method. The *Bt* gene expression cassette contained the 3.5 kb *Bt cry1Ac gene* from wild type under the control of the strong light-induced *psbA* promoter and terminator from Sugar beet chloroplast, The *bar* gene expression cassette contained the *bar gene* under the control of 16S promoter and terminator from Sugar beet chloroplast, the *atpB* and *rbcL* gene from chloroplast genome Sugar beet as the homologous fragment, the *bar* gene as the selective marker. Plasmid pSKARBt/bar were transformed into petioles of sugar beet with particle bombardment method. The petioles first of all were selected on MS medium by adding spectinomycin(20mg/L) and plant growth regulators 6BA 1.5mg/L and NAA 0.2mg/L. When new buds appeared, the new buds were transfered on MS subculture medium by adding spectinomycin(20mg/L) and plant growth regulators 6BA 0.5mg/L and NAA 1.0mg/L one time, and then were transfered on MS subculture medium

with herbicide (PPT 10mg/L) for several times. The seedlings were transferred on MS rhizogenesis medium supplemented with herbicide (PPT 10mg/L) and transgenic plants were obtained at last. The integration of *Bt* and *bar* gene were confirmed by PCR and Southern blotting analysis, transgenic plants showed that the *Bt* and *bar* gene were transferred and integrated stably into the chloroplast genome of Sugar beet. Transgenic plants with tolerance to both PPT and the pest by bioassays were demonstrated, expressed insecticidal activity (the mortality of larvae was 33%~80%) and herbicide resistant and it indicated that the relevant protein had been expressed already. That the *bar* gene can be also used as an efficient selective marker gene besides antibiotic resistant markers in plant transformation. Efficient transformation system in Sugar beet chloroplast had been established and in our experiment.

Key words: Sugar beet, Chloroplast transformation, *Bt* gene, *bar* gene, homoplastome

*This work was supported by grants from Key Sci-technology Project of Heilongjiang Province (GB05B104) and The National Natural Science Foundation of China (30771373)

**Corresponding author.

Tel: 0451-86412952, Email: yangq@hit.edu.cn

Received: May 5, 2008 Accepted: October 20, 2008

Available online: November 3, 2008