

农杆菌介导 *Bt* 基因遗传转化高粱

张明洲¹, 唐乔¹, 陈宗伦¹, 刘军¹, 崔海瑞², 舒庆尧², 夏英武², I. Altosaar³

1 中国计量学院生命科学院, 杭州 310018

2 浙江大学原子核农业科学研究所, 杭州 310029

3 渥太华大学生物化学系, 加拿大

摘要: 高粱是全球仅次于小麦、水稻、玉米、大豆和马铃薯等的重要作物之一。以高粱幼穗愈伤组织为转化受体, 通过农杆菌介导法和含有抗潮霉素和 *gus* 基因的双元载体将杀虫晶体蛋白基因 *cryIAb* 导入高粱品种 115、ICS21B 和 5-27, 经 Hyg 筛选共获得 21 个独立的转基因株系, 52 株转基因植株, 平均转化率为 1.9%。经 PCR、Southern 杂交和 RT-PCR 分析表明 *cryIAb* 基因已整合入高粱基因组中并得到正确转录。Bt 蛋白 Western blotting 分析和 ELISA 定量测定显示, *cryIAb* 基因在转基因高粱植株中表达, 但不同转基因植株表达量有差异。饲虫试验表明, 转基因高粱对大螟(*Sesamia inferens*)具有一定抗性。

关键词: *Bt* 基因, 农杆菌, 遗传转化, 高粱

Genetic transformation of *Bt* gene into sorghum (*Sorghum bicolor* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

Mingzhou Zhang¹, Qiao Tang¹, Zonglun Chen¹, Jun Liu¹, Hairui Cui², Qingyao Shu², Yingwu Xia², and I. Altosaar³

1 College of Life Science, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China

2 Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

3 Department of Biochemistry, University of Ottawa, Canada

Abstract: Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) was one of the most important crops in the world next to wheat, rice, maize, soybean and barley. Using the callus derived from immature inflorescence as the recipients, we efficiently transformed sorghum varieties 115, ICS21B and 5-27 with the insecticidal *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) *cryIAb* gene carried in the T-DNA of binary vectors which contained hygromycin resistance gene and *gus* gene via *Agrobacterium tumefaciens*. After gradient selection with hygromycin, a total of 21 independent transgenic plant lines, 52 transgenic plants were regenerated, and the average stably transformation efficiency was 1.9%. The integration and transcription of *cryIAb* gene in transgenic sorghum was confirmed by PCR analysis, Southern blotting and RT-PCR analysis. The Bt proteins were expressed in most transgenic plants with different level from plant to plant by Western blotting and ELISA assay. According to insect bioassay in laboratory, the transgenic plants with a relatively high level of *Bt* gene expression displayed insect-resistance to pink rice borer (*Sesamina inferens*).

Keywords: *Bt* gene, *Agrobacterium tumefaciens*, genetic transformation, sorghum

Received: October 17, 2008; **Accepted:** December 30, 2008

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30270273), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. Y304463).

Corresponding author: Hairui Cui. Tel: +86-571-86971405; Fax: +86-571-86971202; E-mail: hrcui@zju.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 30270273), 浙江省自然科学基金项目(No. Y304463)资助。

虫害一直是制约农作物高产、稳产的重要因素之一。*Bt* 抗虫基因潜在的应用价值已引起世界各国极大关注, 农作物 *Bt* 转基因技术研究已取得巨大进展, *Bt* 玉米与 *Bt* 棉花等已商业化应用; *Bt* 转基因抗虫水稻的获得也已有不少报道^[1,2]。高粱是全球仅次于小麦、水稻、玉米、大豆和马铃薯等的重要作物之一, 每年由于虫害造成的损失也很巨大, 利用转基因技术改良高粱品种已引起各国学者的广泛关注^[3,4]。然而, 大量高粱遗传转化研究工作主要为转化方法、标记基因与报告基因导入的研究, 在高粱生产上的利用价值有限^[3-10]; 仅有 1 例与高粱重要农艺性状有关外源基因基因枪法成功转化的报道, 但转化植株的抗虫性状不够明显^[11]。到目前为止, 还未见有利用农杆菌介导法将 *Bt* 基因导入高粱的研究报道。在众多植物转基因方法中, 农杆菌介导转化由于方法简单、效率高和拷贝数少等优点倍受人们关注。

本研究通过农杆菌介导法, 将杀虫晶体蛋白基因 *cryIAb* 导入高粱幼穗诱导的愈伤组织中, 获得了一批转基因植株, 对转基因高粱植株进行了 PCR 分析、Southern 杂交检测和 RT-PCR 分析, 并对部分 R_0 代转基因植株的 *cryIAb* 基因表达产物的 Western blotting、ELISA 分析和室内抗虫性测定进行了初步研究, 以期为进一步应用基因工程技术改良高粱品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

取不同基因型高粱(*Sorghum bicolor* L.)恢复系 115、5-27、9198、R011 和保持系 ICS21B、21B(由辽宁省农科院提供)的剑叶期 2~3 cm 幼穗, 诱导并筛选其胚性愈伤组织作为转化受体。

1.2 菌株与质粒

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 EHA105 为本实验室保存, 带 pKUB 质粒。pKUB 二元载体来自加拿大渥太华大学生物化学系^[2,12], 其 T-DNA 区内含玉米 *ubiquitin* 启动子驱动的 *cryIAb* 基因和胭脂碱合成酶启动子驱动的抗卡那霉素的 *nptII* 基因与 CaMV35S 启动子驱动的抗潮霉素的 *hgh* 基因和 *gus* 基因(图 1)。

1.3 方法

1.3.1 转化、筛选与再生

挑取生长良好的胚性愈伤组织, 于侵染培养基 SA-I($OD_{600}=0.7$ 的农杆菌悬浮液)中浸泡、振荡 20 min 后, 弃菌液, 用无菌滤纸吸干后接种于共培养基 SA-C 上, 25°C 避光培养 3 d; 用含有 500 mg/L 氨基青霉素无菌水洗涤数次, 用无菌滤纸吸干后于培养基 SA-P 上 25°C 避光恢复培养 1 周; 再转入选择培养基 SA-S 上筛选 3 轮, 每轮 1 周。筛选获得的抗性愈伤于选择培养基 SA-S 上 25°C、16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养 1 周后, 转入分化培养基 SA-R 上继续筛选和分化培养(25°C、16 h 光照/8 h 黑暗), 每周继代培养 1 次; 待不定芽成 3~4 cm 苗时, 转移到生根培养基上生根、状苗后, 转移到蛭石过渡培养 1~2 周, 移栽大田生长至结实。使用的培养基见文献 [13]。

1.3.2 转化植株的 PCR 检测

取对照与抗性愈伤组织再生植株(R_0 代)叶片 0.2 g, CTAB 法微量提取高粱总 DNA。用引物 *FcryIAb*: 5'-GCAACCATCAATAGCCGTTACA-3', *RcryIAb*: 5'-GTCAATGGGATTTGGGTGATT-3'扩增导入的 *cryIAb* 基因, 目标片段大小为 872 bp; 引物 *Fgus*: 5'-GGGATCCATCGGAGCGTAATG-3', *Rgus*: 5'-GC CGACAGCAGCAGTTTCATC-3'扩增 *gus* 基因, 目标

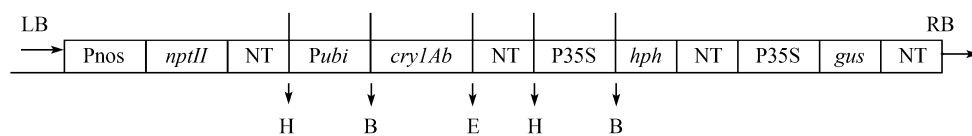


图 1 用于高粱转化的农杆菌中 pKUB 二元载体 T-DNA 区结构

Fig. 1 The T-DNA region of pKUB binary vector in *Agrobacterium* used for sorghum transformation. Pnos: nopaline synthase gene promoter; *nptII*: neomycin phosphotransferase gene, *Pubi*: maize *ubiquitin* gene promoter; *cryIAb*: coding region of *cryIAb* gene; P35S: cauliflower mosaic virus 35S promoter; *hph*: hygromycin phosphotransferase gene; *gus*: β -glucuronidase gene; LB: left border; RB: right border; H: *Hind* III; B: *Bam*H I; E: *Eco*R I.

片段大小为 563 bp。扩增程序为 94°C 4 min; 94°C 30 s, 62°C(*cryIAb*)或 61°C(*gus*)60 s, 72°C 80 s, 30 个循环; 72°C 7 min。扩增产物用 1.2% 电泳分离, 观察拍照。

1.3.3 转化植株的 Southern blotting 分析

取对照与转化植株(R₀代)叶片 1 g, CTAB 法提取高粱总基因组 DNA, 用 *Hind* III 限制性内切酶酶切, 以 ³²P 标记的 *cryIAb* 基因为探针进行 Southern blotting 分析, 探针标记采用 Amersham Pharmacia Biotech 公司生产的试剂盒方法进行。

1.3.4 转化植株的 RT-PCR 检测

取对照与转化植株(R₀代)叶片 0.1 g, Trizol 提取高粱总 RNA, DNAase 消化后, 用 Oligo-T₁₇ 为引物进行反转录; 2 μL 的反转录产物为模板, 用 PCR 检测方法扩增 *cryIAb* 基因。

1.3.5 Western blotting 分析

蛋白质提取与 Western blotting 分析按吴刚等所述方法^[14]进行。

1.3.6 转基因高粱 *cryIAb* 基因表达产物的测定

取高粱对照与转化植株(R₀代)叶片 0.2 g, 采用美国 ENVIROLOGIX 公司生产的 Cry1Ab/Cry1Ac ELISA 试剂盒方法, 定量测定 Cry1Ab 蛋白。

1.3.7 室内抗虫性离体叶片测定

以大螟(*Sesamia inferens*)为供试虫, 参照叶恭银等^[15]的方法: 取对照与转化植株 3~4 cm 叶片(倒 1 或 2 叶), 分别放入小玻管内, 叶片两端压上经保鲜液浸渍过的脱脂棉花, 并保持叶片平展; 每管接入 3 头刚孵化的蚊螟, 管口塞紧棉花, 室温放置培养;

接虫后第 2、4、6、8、10 天分别考察、统计累积食叶面积和幼虫死亡率, 每管重复 2 次。

2 结果

2.1 转 *cryIAb* 基因高粱植株的获得

生长良好的高粱幼穗诱导愈伤组织, 经农杆菌侵染后转移到恢复培养基上, 恢复培养 1 周后转入含 50 mg/L Hyg 选择培养基进行 3 轮筛选, 大部分愈伤组织生长缓慢, 颜色暗淡, 甚至变褐腐死, 少部分生长旺盛、颜色鲜嫩, 不同基因型间差异明显, 其中 21B 最少, 只有 11.5% 可产生抗性愈伤, 筛选到 115 抗性愈伤最多, 达到 37.7% (表 1 稳定转化率 A)。筛选获得的 253 块抗性愈伤经再生、生根、状苗后, 蛭石过渡培养移栽大田。最终共获得了 21 个独立的转基因细胞系, 52 株 PCR 阳性植株, 其中恢复系 5-27 获得 5 株, 115 获得 40 株, 保持系 ICS21B 获得 7 株, 平均转化率 1.9% (表 1 稳定转化率 B)。结果显示, 不同基因型高粱的转化频率存在明显差异, 这可能与不同基因型转化受体自身的生长和生理状态不同有关。

2.2 转基因植株的 PCR 分析

PCR 检测结果显示(图 2、图 3)52 株检测到 *cryIAb* 基因(目标片段大小为 872 bp), 说明外源基因 *cryIAb* 已整合入转基因高粱的基因组 DNA 中; *cryIAb* 基因 PCR 阳性植株中有 41 株检测到 *gus* 基因(目标片段大小为 563 bp), 推测处于同一 T-DNA 上的外源基因 *gus* 和 *cryIAb* 基因在某些转基因植株中可能发生重排而未同时整合。

表 1 农杆菌介导不同基因型高粱的转化效率

Table 1 Efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation for different genotypes in sorghum

Genotype	No. of total callus	No. of resistant callus	No. of transgenic cell system ^a	Transgenic plant ^b	Rate of stable transformation A (%) ^c	Rate of stable transformation B (%) ^d	
Restoring line	5-27	492	93	3	5	18.9	0.6
	115	257	97	13	40	37.7	5.1
	9198	98	13	0	0	13.3	0
Maintainer line	R011	72	11	0	0	15.3	0
	ICS21B	135	30	5	7	22.2	3.7
	21B	78	9	0	0	11.5	0
Total	1132	253	21	52	22.3	1.9	

a: number of resistant callus which could be regenerated transgenic plant; b: number of PCR positive plant; c: rate of stable transgene A(%)=(number of resistant callus/total of callus)×100%; d: rate of stable transgene B(%)=(number of resistant callus which could be regenerated transgenic plant/ total of callus)×100%.

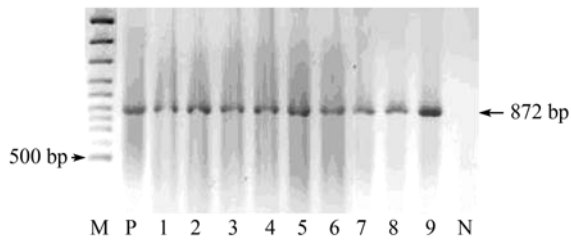


图 2 转基因植株 *cryIAb* 的 PCR 分析

Fig. 2 PCR analysis of *cryIAb* gene in different transgenic plants. M: marker; P: positive control-pKUB plasmid DNA; 1-9: transgenic plants; N: non-transgenic control plant.

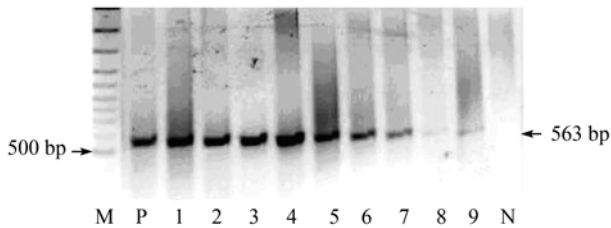


图 3 转基因植株 *gus* 的 PCR 分析(材料同上图)

Fig. 3 PCR analysis of *gus* gene in different transgenic plants. M: marker; P: positive control-pKUB plasmid DNA; 1-9: transgenic plants; N: non-transgenic control plant.

2.3 转基因植株 Southern blotting 分析

为了进一步确证 *cryIAb* 基因是否整合到高粱基因组 DNA 中, 对 115 PCR 阳性植株进行 Southern blotting 分析。转基因植株基因组 DNA 经 *Hind* III 酶切电泳, 与含 *cryIAb* 基因的探针杂交后显示了特异的 4.1 kb 阳性条带, 而未转化的对照植株无杂交信号(图 4)。结果证实 *cryIAb* 基因已整合到高粱基因组 DNA 中。

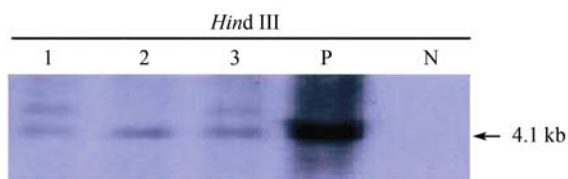


图 4 转基因高粱植株的 Southern blotting 分析

Fig. 4 Southern blotting of *cryIAb* gene in transgenic sorghum plants. 1-3: transgenic plants; P: positive control-pKUB plasmid DNA; N: non-transgenic control plant 115.

2.4 转基因植株的 RT-PCR 分析

选取高粱 115 PCR 阳性植株和对照植株, 提取叶片总 RNA 逆转录后用 PCR 检测 *cryIAb* 基因的转录。结果显示, 对照植株没有扩增到目标条带, 转基因植株都可扩增到 872 bp 目标片段, 表明导入高粱基因组中的 *cryIAb* 基因得到正确的转录(图 5)。

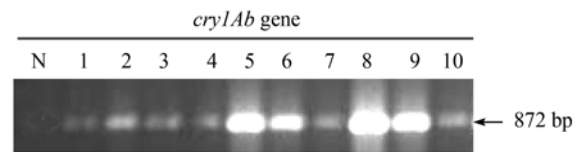


图 5 转基因高粱植株中 *cryIAb* 基因的 RT-PCR 分析

Fig. 5 RT-PCR analysis of *cryIAb* gene in transgenic sorghum plants. N: non-transgenic control plant 115; 1-10: transgenic plants.

2.5 Western blotting 分析

提取的蛋白质经 10% SDS-PAGE 电泳分离, Western blotting 后, 结果显示, 转基因植株叶片蛋白提取物在 68 kD 处产生与预期的标准 Cry1Ab 蛋白大小一致的杂交条带, 而未转化的高粱恢复系 115 叶片蛋白提取物未出现特异杂交条带, 表明 *cryIAb* 基因已在转基因高粱植株叶片中正确表达(图 6)。



图 6 转基因高粱植株 Cry1Ab 蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 6 Western blotting analysis of Cry1Ab protein in transgenic sorghum plants. M: protein marker; 1-6: transgenic plants; N: non-transgenic control plant 115; Cry1Ab: Cry1Ab standard protein.

2.6 转基因植株 Bt 蛋白含量的测定

提取转基因植株倒 2 叶叶片的 Bt 蛋白, 用 ELISA 方法对转基因植株抗虫基因 *cryIAb* 的表达产物进行了测定。在所测试的 20 株转基因植株中, 有 11 株可检测到 Bt 蛋白, 但 Bt 蛋白含量差异较大, 最高的为 SR25, 可达 0.850 $\mu\text{g/g}$, 最低的仅为 0.015 $\mu\text{g/g}$ (表 2); 而其余 9 株未检测到 Bt 蛋白的表达。结果表明 *cryIAb* 基因在所获得的一些转基因高粱中能正常表达, 但不同植株间表达量存在差异, 而另一些转基因植株中不能表达, 推测与转基因沉默有关。

2.7 转基因植株室内离体抗虫性生物测定

表 2 列出了接虫 10 d 后叶片受损情况和幼虫平均死亡率。结果表明, 转基因植株的平均累积食叶面积均低于对照; 部分转基因植株(SR16、SR20、SR22、SR25 和 SR26)对大螟表现出一定的抗性, 幼虫平均死亡率为 16.7%~40%, 此结果与 Bt 蛋白表达

表 2 转基因植株叶片的 Bt 蛋白含量及对大螟(*Sesamia inferens*)抗性的生物离体测定Table 2 Detection of the Bt toxin content and *in vitro* bioassay on the resistance to pink rice borer (*Sesamia inferens*) for transgenic sorghum leaf

Code of plants	Bt content ($\mu\text{g/g}$) ^a	Reduction in leaf feeding (%) ^b	Mean larval weight (mg)	Mean larval mortality (%)
CK	0	/	205.0 \pm 21.0	0
SR04	0.015 \pm 0.001	40.6 \pm 1.2	121.7 \pm 13.1	0
SR16	0.044 \pm 0.006	47.2 \pm 0.9	108.3 \pm 9.0	20.0 \pm 0.5
SR17	0.015 \pm 0.001	40.5 \pm 0.7	122.0 \pm 17.5	0
SR18	0.082 \pm 0.005	50.7 \pm 1.1	101.0 \pm 11.3	0
SR19	0.106 \pm 0.007	50.9 \pm 1.5	100.7 \pm 9.8	0
SR20	0.181 \pm 0.011	65.7 \pm 0.8	70.4 \pm 7.6	16.7 \pm 0.2
SR21	0.051 \pm 0.004	49.5 \pm 0.9	103.6 \pm 10.1	0
SR22	0.170 \pm 0.008	60.0 \pm 1.1	82.0 \pm 7.3	40.0 \pm 0.5
SR24	0.017 \pm 0.001	40.7 \pm 0.9	122.5 \pm 6.7	0
SR25	0.850 \pm 0.021	56.7 \pm 1.3	88.8 \pm 7.6	40.0 \pm 0.7
SR26	0.738 \pm 0.022	60.4 \pm 0.9	81.2 \pm 8.8	33.3 \pm 0.3

a: Bt content($\mu\text{g/g}$)= Bt detected value/fresh weight of leave; b: reduction in leaf feeding(%)=(leaf feeding of non-transgenic control plant-leaf feeding of transgenic plants)/leaf feeding of non-transgenic control plant \times 100%.

测定结果相一致。但总体上转基因高粱对水稻大螟的抗性还不够强,而且不同转基因高粱植株对大螟幼虫的致死率差异较大,可能与转基因 *cryIAb* 的表达水平低有关,也可能大螟或不同个体对 Bt 蛋白的敏感性存在差异有关,这方面工作及对不同靶标害虫抗性测定工作等还需做进一步深入研究。

3 讨论

在重要的禾谷类作物中,高粱是被公认为外源基因导入最难的作物之一。从为数不多的成功转化实例来看,导入的外源基因主要是报告基因如 *gus* 基因、GFP 基因,标记基因如 *bar* 基因以及几丁质酶基因等^[3-10],在高粱生产上的利用价值有限。本研究采用农杆菌介导法,以高粱幼穗诱导愈伤组织为转化受体,将 Bt 杀虫晶体蛋白质基因 *cryIAb* 导入高粱恢复系 115、5-27 和保持系 ICS21B 中,从 21 个独立转基因细胞系筛选获得了 52 株转基因植株,稳定转化频率平均为 1.9%,与 Zhao 等(2.1%)报道的农杆菌介导法类似,却高于基因枪法介导高粱遗传转化的稳定转化频率^[3,10]。但与玉米等其他重要禾谷类作物相比,高粱的稳定转化频率仍然偏低,这也是高粱遗传转化重要障碍之一。本研究获得的转抗虫基因高粱,对于丰富高粱的抗虫资源,解决高粱生产中的螟虫危害,将具有重大的意义。

植物基因型也是影响农杆菌介导高粱遗传转化成功与否的关键因素之一。在 Zhao 等的报道中,所

采用的 2 种基因型存在着差异,5890 个 P8980112 基因型未成熟胚中获得了 115 株转基因植株,平均稳定转化率为 2.0%,从 285 个 PHI391 未成熟胚中最终获得 16 株转基因植株,平均稳定转化率为 5.6%。本研究中也观察到这一现象,所采用的 6 种基因型中,仅从 115、5-27、ICS21B 中最终获得转基因植株,且它们也存在着差异(表 1)。因此,在农杆菌介导高粱的遗传转化中应注意选择基因型。

PCR 分析、Southern blotting 和 RT-PCR 检测表明, *cryIAb* 基已整合入高粱基因组中并得到正确转录。但有部分 *cryIAb* 基因 PCR 阳性植株中检测不到 *gus* 基因的整合,这与 GUS 活性的组织化学染色分析结果(另文报道)一致,这说明处于同一 T-DNA 上的 *gus* 基因、*cryIAb* 基因在某些转基因株系中并非同时整合,可能发生了 T-DNA 的不完全整合事件、重排;另外, Bt 蛋白含量的测定结果表明,转基因高粱植株中 *cryIAb* 基因表达强度上存在一定差异,而某些转基因植株(如 SR02、SR05)虽可检测到 *cryIAb* 基因的整合,但检测不到 Bt 蛋白的表达,这可能发生了转基因的沉默(Transgene silence),与 Zhu 等^[5]、Zhao 等^[3]、Girijashankar 等^[11]和 Nguyen 等^[6]观察到的基因沉默现象类似,其机理有待进一步深入研究。转基因植株离体抗虫性生物测定结果表明,部分转基因植株对大螟表现出一定的抗性,此结果与 Bt 蛋白表达测定结果是一致的。但总体上转基因高粱对水稻大螟的抗性还不够强,而且

不同转基因高粱植株对大螟幼虫的致死率差异较大, 这可能与转基因 *cryIAb* 的表达水平低或不表达有关, 也可能大螟或不同个体对 Bt 蛋白的敏感性存在差异有关。已有研究表明, 在转基因水稻中, Bt 蛋白对鳞翅目螟蛾科害虫的致死作用一般强于夜蛾科害虫, 但目前差异性机理尚不清楚^[16]。在我国主要水稻螟虫种类中, 大螟属夜蛾科害虫。本研究获得的转基因高粱对高粱主要靶标害虫及对不同螟虫抗性测定等工作还需做进一步深入研究; *cryIAb* 基因的遗传与表达特性及育种利用也有待于深入研究。

REFERENCES

- [1] De Maagd RA, Bosch D, Stiekema W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistant in plants. *Trends Plant Sci*, 1999, **4**(1): 9–3.
- [2] Cheng X, Sardana R, Kaplan H, et al. *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 2767–2772.
- [3] Zhao ZY, Cai T, Tagliani L, et al. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. *Plant Mol Biol*, 2000, **44**: 789–798.
- [4] Nguyen T-Van, Thu TT, Claeys M, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using an improved *in vitro* regeneration system. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2007, **91**(11): 155–164.
- [5] Zhu H, Muthukrishana S, Krishnaveni S, et al. Biolistic transformation of sorghum using a rice chitinase gene. *J Genet Breed*, 1998, **52**: 243–252.
- [6] Carvalho CHS, Zehr UR, Gunaratna N, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum: factors that affect transformation efficiency. *Genet Mol Biol*, 2004, **27**: 259–269.
- [7] Gao Z, Jayaraj J, Muthukrishnan S, et al. Efficient genetic transformation of sorghum using a visual screening marker. *Genome*, 2005, **48**: 321–333.
- [8] Gao Z, Xie X, Ying Y, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated sorghum transformation using a mannose selection system. *Plant Biotech J*, 2005, **3**: 591–599.
- [9] Howe A, Sato S, Dweikat I, et al. Rapid and reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum. *Plant Cell Rep*, 2006, **25**: 784–791.
- [10] Nguyen T-Van, Thu TT, Claeys M, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using an improved *in vitro* regeneration system. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2007, **91**(11): 155–164.
- [11] Girijashankar V, Sharma HC, Sharma KK, et al. Development of transgenic sorghum for insect resistance against spotted stem borer (*Chilo partellus*). *Plant Cell Rep*, 2005, **24**: 513–522.
- [12] Zhang MZ, Cui HR, Shu QY, et al. Regeneration system and influencing factors for genetic transformation of sorghum shoot apex. *J Nucl Agri Sci*, 2006, **20**(1): 23–26, 5. 张明洲, 崔海瑞, 舒庆尧, 等. 高粱茎尖再生体系及其遗传转化影响因子的研究. *核农学报*, 2006, **20**(1): 23–26, 5.
- [13] Xiang YB, Liang ZQ, Gao MW, et al. *Agrobacterium* mediated transformation of insecticidal *Bacillus thuringiensis cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes and their expression in rice. *Chin J Biotech*, 1999, **15**(4): 494–500. 项友斌, 梁竹青, 高明尉, 等. 农杆菌介导的苏云金杆菌抗虫基因 *cryIA(b)* 和 *cryIA(c)* 在水稻中的遗传转化及蛋白表达. *生物工程学报*, 1999, **15**(4): 494–500.
- [14] Wu G, Cui HR, Shu QY, et al. Inheritance stability and expression of *cryIAb* gene in progenies of the transgenic “Kemingdao”. *J Agri Biotech*, 2000, **8**(3): 253–256. 吴刚, 崔海瑞, 舒庆尧, 等. *cryIAb* 基因在转基因“克螟稻”后代中遗传稳定性及表达. *农业生物技术学报*, 2000, **8**(3): 253–256.
- [15] Ye GY, Shu QY, Yao HW, et al. Field evaluation of resistance of transgenic rice containing a synthetic *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to two stem borers. *Entomol Soc Aver*, 2001, **94**(1): 271–276.
- [16] Gao YL, Fu Q, Wang F, et al. Effects of transgenic rice harboring *cryIAc* and *Cp TI* genes on survival of *Chilo suppressalis* and *Sesamia inferens* and field composition of rice stemborers. *Chinese J Rice Sci*, 2006, **20**(5): 543–548. 高玉林, 傅强, 王锋, 等. 转 *cryIAc* 和 *Cp TI* 双基因抗虫水稻对二化螟和大螟的致死效应及田间螟虫构成的影响. *中国水稻科学*, 2006, **20**(5): 543–548.