

根癌农杆菌介导的甘蔗遗传转化

吴转娣^{1,2}, 刘新龙^{1,2}, 姚丽^{1,2}, 苏火生^{1,2}, 张敏^{1,2}, 吴才文^{1,2*}

(1.云南省甘蔗遗传改良重点实验室,云南 开远 661600;2.云南省农业科学院 甘蔗研究所,云南 开远 661600)

摘要: 综述开展甘蔗基因工程育种工作 20 多年来,从最初的利用农杆菌介导法研究抗除草剂和抗虫转基因成功,到目前高转化效率的转基因方法应用过程中取得的成果,分析影响农杆菌转化甘蔗的关键因素,并对农杆菌介导的甘蔗遗传转化研究前景作了展望。

关键词: 根癌农杆菌介导法;甘蔗;遗传转化

中图分类号: S566.103.53 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)02-0150-06

Transformation of sugarcane mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

WU Zhuan-di^{1,2}, LIU Xin-long^{1,2}, YAO Li^{1,2}, SU Huo-sheng^{1,2}, ZHANG Min^{1,2}, WU Cai-wen^{1,2*}

(1.Yunnan Province Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, Kaiyuan, Yunnan 661600, China; 2.Sugarcane Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kaiyuan, Yunnan 661600, China)

Abstract: A study of sugarcane genetic engineering breeding has been made over the past twenty years, from the first primary success of herbicide resistant and insecticide resistance gene engineering of sugarcane using *Agrobacterium*-mediated approach to the use of high transgenic efficiency of sugarcane. All of these studies obtained a lot of achievements. This paper aims to analyse the impact factors of sugarcane transformation by *Agrobacterium tumefaciens*, as well as the prospect of this research.

Key words: mediated by *Agrobacterium tumefaciens*; sugarcane; transformation

自 1983 年获得第 1 例农杆菌介导的转基因烟草以来,农杆菌介导的植物遗传转化已经成为目前应用最广泛的一种遗传转化方法,约 80%的转基因植物是通过农杆菌介导法获得的。甘蔗是禾本科单子叶植物,由于单子叶植物并不是农杆菌的天然寄主,而禾本科作物一直被认为是难以应用农杆菌介导转化的物种^[1],因此农杆菌介导的甘蔗遗传转化研究曾一度落后。目前农杆菌介导的水稻转基因研究技术已经非常成熟^[2],农杆菌介导的甘蔗遗传转化研究也早在 1998 年成功地获得了转基因植株并进行了田间试验^[3],甘蔗的基因工程研究已取得了

较大的突破,现将农杆菌介导的甘蔗遗传转化研究进展综述如下。

1 农杆菌介导甘蔗遗传转化研究进展

甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)是远缘杂交种,品种间的染色体复杂多样,常见异倍体^[4-5],其基因组复杂、基因库狭窄^[6],导致甘蔗的育种周期较长。利用基因工程方法培育甘蔗新品种,能实现甘蔗优良品种的定向改良。甘蔗的基因工程育种在最近的 10 多年有了突破性进展^[3,7-17]。Bower 和 Birch 1992 年建立了基因枪法介导的甘蔗遗传转化体系^[9]。Chen 等^[18]1987 年首次以原生质体为受体,开始甘

收稿日期: 2010-05-19

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(nycytx-024-01-03); 国家科技支撑计划项目(2007BAD30B02); 农业行业专项(3-9)

作者简介: 吴转娣(1982—),女,广东江门市人,研究实习生,主要从事甘蔗基因工程育种研究, judith1123@126.com; *通信作者, gksky_wcw@163.com

蔗的遗传转化研究。Birch 和 Maretzki 1993 年采用农杆菌介导的方法对甘蔗进行遗传转化^[19],应用基因诱导剂试图增强农杆菌的浸染能力。1994 年 Chen 等尝试以甘蔗品种 F164 为材料,用原生质体再生的细胞、非形态适应的细胞悬浮培养物、绿色分生组织和幼叶外植体等作为受体,通过根癌农杆菌株系 ACH5(章鱼碱型)、T37(烟脂碱型)和工程菌 LBA4404-BIN6(携带双元载体)转化受体材料,但均未能成功^[20]。陈如凯等^[21]应用甘蔗品系福农 86-17 的幼叶切段为受体,采用 *NPT* 基因、抗菌肽 D 基因和工程菌 LBA4404 共培养法转化甘蔗,得到抗卡那霉素的愈伤组织,但在选择分化培养基上未分化出苗。

在一些禾本科植物农杆菌浸染转化方法取得进展的基础上,Arencibia 等^[22]针对存在的问题,采用相应技术初步建立起了农杆菌介导甘蔗遗传转化体系,选用双元载体 pMON18365 导入 LBA 4404 和 EHA101 菌株,与栽培种 Ja60-5 甘蔗悬浮培养愈伤组织共培养,获得 GUS 及 Southern 检测阳性植株,其转化频率达 $10^{-3} \sim 10^{-1}$ 。而 Enriquez-obregon 等^[3]采用农杆菌介导法,将携带 *bar* 基因的 C58C1 菌株感染甘蔗分生组织切片愈伤组织,获得了抗除草剂的转基因甘蔗植株,通过摸索共培养和分化条件,在商业栽培种 Ja60-5 中获得了近 35% 的转化效率,其研究表明,防止细胞对农杆菌过敏致死是获得高转化效率的关键。Arencibia 等^[22]发现,有毒杆菌会诱导甘蔗细胞的器官和胚胎的形成,因此共培养也是增强 T-DNA 插入植物基因组的关键步骤。Elliott 等^[23]将带有荧光蛋白(*GFP*)基因的 AGLO 菌株转化甘蔗胚性愈伤组织,获得了转 *GFP* 基因的甘蔗植株,他们应用 *GFP* 筛选转化细胞,可剔除高比例的非转化外植物体及细胞系,在转基因组织再生前就可大量选择。甘蔗转基因植株的获得进一步证明了农杆菌可以把 T-DNA 转移到单子叶植物细胞中。但农杆菌浸染甘蔗的转化效率不高成为该转化方法研究中的重大阻碍,其部分原因是没有应用选择标记基因去除非转基因甘蔗植株,导致转化效率低的同时大大增加了检测的工作量。Manickavasagam 等^[14]以甘蔗的腋芽作为靶组织,以

抗除草剂基因 *BASTA* 作为筛选的标记基因,利用超毒农杆菌菌株 EHA105 和 LBA4404 分别对 2 个印度甘蔗栽培种 Co92061 和 Co671 进行遗传转化,当外植体悬浮在农杆菌菌液中经真空渗透压(40.5 kPa)处理,应用 5.0 mg/L 的 PPT 对转化甘蔗进行有效的筛选,并在大田中以 60 g/L 草丁膦喷洒,选择其中没有任何受害特征的转化甘蔗作进一步的分子鉴定,获得了接近 50% 的转化率。王自章等^[24-25]采用农杆菌介导法获得了转海藻糖合酶基因的甘蔗植株,且增强了转基因甘蔗的抗渗透胁迫能力。罗敬萍等^[26]对农杆菌介导的甘蔗基因转化技术包括使用的菌种、最适宜浸染的菌液浓度、愈伤组织龄期、AS 活化时间及使用浓度等作了优化,建立起有效的农杆菌介导甘蔗遗传转化体系,农杆菌介导的甘蔗遗传转化方法已日渐成熟。于兰等^[27]提出与 Manickavasagam 相似的方法,即利用真空泵对甘蔗心叶愈伤组织施加一定的负压,可提高农杆菌介导的遗传转化效率。顾丽红等^[28]将含有经过修饰的烟草 I 型几丁质酶基因和 I 类 β -1,3-葡萄糖酶基因的双价植物表达载体 pCG-II 在农杆菌介导下转化甘蔗优良品种 ROC10 和 ROC22,获得了高转化效率的转基因甘蔗植株,且对甘蔗黑穗病具有抗性。Wang 等^[29]通过农杆菌介导法,将 *ACO* 反义基因遗传转化甘蔗良种 ROC22,获得了 PCR 阳性甘蔗植株。农杆菌介导甘蔗遗传转化体系的建立及后续的研究表明,防止农杆菌对细胞的过度浸染和使用有活力的再生能力较强的愈伤组织、选择合适的筛选标记是获得高转化效率的关键。

2 影响农杆菌转化甘蔗的关键因素

2.1 转化受体

农杆菌转化受到甘蔗受体品种的遗传背景和生理状态的影响。目前,应用于甘蔗转基因的材料一般是栽培种,不同的甘蔗栽培品种之间存在着明显的差异,这些差异表现在愈伤组织的诱导、分化能力、对农杆菌浸染和对筛选剂的敏感性等方面。

基因转化的发生在分裂的一个较短的时期内,只有处于细胞分裂的 S 期(DNA 合成期)细胞才具有

外源基因的转化能力,幼嫩组织或愈伤组织受到创伤时,受体材料将处于转化的敏感期。在甘蔗的组织快繁研究中,一般直接取甘蔗的顶端分生组织和腋芽诱导愈伤组织分化成芽^[30],也有利用成熟叶片作为快繁材料的^[31-32]。成功应用于甘蔗转基因研究的有甘蔗幼嫩顶端分生组织和侧芽诱导胚性愈伤作为受体材料^[33],也有应用活跃增殖的悬浮细胞系作为受体材料的^[34],但其诱导成苗较难,易产生变异。Priya 等认为,采用农杆菌介导法转化单子叶植物,选择处于适宜生理状态的组织十分重要,Smith 和 Hood^[35]认为,处于适宜生理状态的受体材料能够产生 *Vir* 基因活化分子,内源激素的浓度适宜,细胞分裂旺盛,DNA 大量合成,利于 T-DNA 的整合。

2.2 *Vir* 基因诱导物

农杆菌在浸染双子叶植物时,双子叶植物本身会因植物细胞受伤而分泌起诱导作用的酚类化合物,如乙酰丁香酮(As)和羟基乙酰丁香酮等,但甘蔗、水稻和小麦等单子叶植物中缺少足量的 *Vir* 基因诱导物。早期,人们多采用伤害处理^[36-38],但伤害处理对甘蔗并不适用,因为甘蔗的受伤部位容易产生木质化或硬化而不发生细胞分裂现象,严重影响愈伤组织分化,使其诱导分化率大大降低。Raineri 等^[36]利用乙酰丁香酮预处理过的农杆菌来感染受伤的水稻盾片,获得了转化的愈伤组织。随着酚类诱导物的广泛使用,采用农杆菌转化禾本科植物的研究取得了可喜的进展^[39-42]。As 被认为是至今发现的调节 *Vir* 基因表达效果最好的信号分子,研究表明,在甘蔗转化过程中加入乙酰丁香酮可以大大的提高其转化效率。

2.3 农杆菌菌株及载体系统

Enriquez 等^[3]利用 C58C1 农杆菌菌株,成功地将含有 Ti 衍生质粒 pGV2260 的双元表达载体 pGT GUSBAR 转入到甘蔗中;Mulleegadoo 和 Dookunsaumtally^[43]利用分别含有 pTO134 的 AGLO 菌株和含有 pBI121 的 LBA4404 菌株对甘蔗栽培种 M292/70 进行遗传转化,均获得转基因植株。目前用于甘蔗转化的菌株有 EHA101、EHA105、A281、AGLO 等。Manickavasagam 等^[14]应用含有质粒

pGA492 的 LBA4404 和 EHA105 的 2 个菌株对甘蔗栽培种 Co92061 和 Co671 进行遗传转化的比较,结果表明,EHA105 菌种转化效率较 LBA4404 高。Zhangsun 等^[44]利用携带有 1 个二元载体的 EHA105、A281 和 LBA4404 农杆菌菌种进行转化效率的比较试验,发现 EHA105 和 A281 成功地获得转基因甘蔗,且 EHA105 获得了较好的转化效果。EHA105 成为目前报道转化甘蔗的较为理想的菌株。

2.4 培养基与激素

Priya 等认为,在农杆菌介导的转化过程中,合适的培养条件和培养基成分是影响甘蔗遗传转化效率的一个重要因素^[45]。甘蔗材料在创伤处分泌的大量酚类物质,被氧化后对甘蔗本身存在毒性,致使甘蔗材料严重褐化而无法诱导出愈伤组织。Manickavasagam 等^[14]应用甘蔗的腋芽作为转化材料,以含有 3.0 mg/L 6-BA 的 MS 液体培养基作为诱导培养基,在恒温 25 °C、16 h、15 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 的光照下培养,3 周后,于含有 2.0 mg/L 6-BA、1.0 mg/L KT、0.5 mg/L NAA 的 MS 液体再生培养基中诱导出幼芽作为转化的材料,共培养时在 MS 固体培养基中加入 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 As,转化后的再生幼芽于 0.5 mg/L NAA 和 5.0 mg/L PPT 固体培养基中进行筛选,可获得高转化效率。顾丽红等^[28]采用含有 1 mg/L 2,4-D 的 MS 作为胚性愈伤组织的诱导培养基,在含有 150 $\mu\text{mol}/\text{L}$ As 的 MR 液体培养基中浸染 30 min,并于 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ As 的 MR 固体培养基共培养,4 d 后,在 1 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L KT 的 MS 分化培养基中进行筛选并诱导愈伤组织分化出芽,也获得了较高的转化效率。共培养阶段使用的培养基对农杆菌介导的甘蔗遗传转化效率的影响很大,有研究表明,获得 *Gus* 高效稳定表达的甘蔗愈伤组织的共培养条件,不适合于愈伤组织的分化,甚至无法获得转化苗^[45]。一般认为,转化用培养基及愈伤组织共培养用培养基以 pH5.2~5.3 为宜,非转化培养基则以 pH5.8 为宜。低温有利于诱导 *Vir* 基因的表达,农杆菌在浸染后的共培养,应低温恒温培养,以 22 °C 为宜。

2.5 载体上的部分功能元件

在载体的构建中增加一些与高效表达相关的调控序列、合适的启动子和增强子序列、正确切割和加工序列以及 PolyA 序列等,都能提高目的基因的表达。Liu D 等^[46]应用 2 个农杆菌菌株 LBA4404 和 AGL1 介导甘蔗的遗传转化,研究水稻多聚泛素化启动子 *RUBQ2* 融合 *GUS* 报告基因的瞬时表达,发现在愈伤组织中的表达比玉米 *Ubi-1* 启动子的表达量高,通过基因枪法瞬时表达研究 3 个启动子的表达量,发现水稻 *RUBQ2* 启动子的表达量十分稳定,是玉米 *Ubi-1* 启动子表达量的 1.6 倍,而在同样的条件下,花椰菜花叶病毒 *CaMV 35S* 启动子没有检测到 *GUS* 基因的表达,认为水稻多聚泛素化启动子 *RUBQ2* 在未来甘蔗基因工程研究中将起重要作用。

在甘蔗的遗传转化体系中,通常只有一小部分甘蔗细胞接受了外源 DNA,其中的很少部分细胞可能融合了外源基因,而外源基因能够表达的则是更少数数的细胞,所以在甘蔗转化过程中,必须建立能够抑制非转化细胞的生长而对转化细胞影响不大的选择系统。目前的转基因研究中构建植物表达载体时,都会插入一些筛选标记,新霉素磷酸转移酶基因(*Npt II*)可以氨基糖苷类抗生素(G418)进行筛选,这是较早使用的筛选标记。由于甘蔗对 Km 筛选压有较高天然抗性(可高达 350 mg/L),且在 Km 压力下易产生白化苗,不利于正常转化植株的获得。而来自吸水链霉菌的 *bar* 基因、潮霉素磷酸转移酶基因(*hyg*)则以其具有一定的实用性或高效性被广泛使用,研究表明,甘蔗对 PPT 敏感,临界致死浓度较低(4 mg/L),因此 *bar* 基因被认为是较为理想的选择标记^[47]。通过这些筛选标记去除大部分的非转基因植株,可大大提高转化效率。近年来,这些标记基因的安全性问题受到关注,糖类分解代谢酶基因^[48]作为一个安全的标记基因也受到青睐。另外,在遗传转化中应用的能有效介导外源基因与核基质结合而加强或稳定外源基因表达的 *Mar* 基因,在甘蔗的遗传转化研究中同样具有很大的应用潜力。

3 前景与展望

甘蔗的遗传转化方法以基因枪法介导的研究起步较早^[9],且应用较多,但农杆菌介导的遗传转化方法能获得更稳定的基因表达和导入较少的基因拷贝数,从而可以减少基因沉默^[49]。农杆菌介导的遗传转化,在提高转化效率和功能基因的开发方面还需更加深入的研究,如何通过多个基因的同时转化调节甘蔗中的整个糖转运与糖贮存通道或贮存方式、增加蔗糖从源到库的运输量^[50]、提高库的蔗糖积累能力^[51]以及将甘蔗茎中的部分淀粉转变成蔗糖的形式贮存,从而在整体上提高甘蔗的含糖量,是目前研究的重点与难点所在。另外,如何消除抗生素标记基因也将是目前和今后转基因安全性研究的一个重要突破点。

转基因甘蔗的研究都还处在初步阶段,能推广并应用于生产的转基因甘蔗品种尚未见报道,也没有一种能够做到将外源基因定点定量地导入甘蔗受体并能够达到稳定遗传和高效表达的转基因方法,甘蔗的遗传背景复杂性、染色体数量较多以及育种周期长等仍严重影响转基因技术在甘蔗研究上的推广与应用。

参考文献:

- [1] Frank K, Christian J. Genetic Modification of Plants [M]. Berlin: Springer, 2010.
- [2] 曹明霞, 卫志明, 黄健秋. 根癌农杆菌介导的水稻遗传转化[J]. 植物生理学通讯 2002, 38(5): 423-427.
- [3] Enriquez-obregon G A, Vazquez-padron R I, Prietosamsonov D L, et al. Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Planta, 1998, 205: 20-27.
- [4] Heinz D J. Sugarcane Improvement through Breeding [M]. Amsterdam: Elsevier, 1987.
- [5] Grivet L, D'Hont A, Roques D, et al. RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp.): Genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid[J]. Genetics, 1996, 142: 987-1000.
- [6] Jackson P A. Breeding for improved sugar content in sugarcane [J]. Field Crops Res, 2005, 92: 277-290.
- [7] Nickell L G. Tissue and cell cultures of sugarcane: Another research tool[J]. Hawaii Plant Rec, 1964, 57:

- 223-229 .
- [8] Heinz D J ,Mee G W P . Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species[J] . *Crop Sci* , 1969(9) : 346-348 .
- [9] Bower R , Birch R G . Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment[J] . *Plant J* , 1992(2) : 409-416 .
- [10] Gallo-Meagher M , Irvine J E . Herbicide resistant transgenic sugarcane plants containing the bar gene [J] . *Crop Sci* , 1996 , 36 : 1367-1374 .
- [11] Wilson J R . Sugarcane : Research Towards Efficient and Sustainable Production[M] . Brisbane : Division of Tropical Crops and Pastures , 1996 : 138-140 .
- [12] Keating B A , Wilson J R . Intensive Sugarcane Production : Meeting the Challenge Beyond 2000[M] . Wallingford : CAB International , 1997 : 178-188 .
- [13] Arencibia A , Vázquez R , Prieto D , et al . Transgenic sugarcane plants resistant to stem-borer attack[J] . *Mol Breed* , 1997(3) : 247-255 .
- [14] Manickavasagam M , Ganapathi A , Anbazhagan V R , et al . *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds[J] . *Plant Cell Report* , 2004 , 23(3) : 134-143 .
- [15] Zhang L , Xu J , Birch R G . Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium[J] . *Nature Biotechnol* , 1999 , 17 : 1021-1024 .
- [16] Vickers J E , Grof C P L , Bonnett G D , et al . Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic sugarcane results in darker juice and raw sugar[J] . *Crop Sci* , 2005 , 45 : 354-362 .
- [17] Vickers J E , Grof C P L , Bonnett G D , et al . Effects of tissue culture , biolistic transformation , and introduction of PPO and SPS gene constructs a performance of sugarcane clones in the field[J] . *Aust J Agric Res* , 2005 , 56 : 57-68 .
- [18] Chen W H , Cartland K M A , Davey M R , et al . Transformation of sugarcane protoplasts by direct uptake of a selectable chimaeric gene[J] . *Plant Cell Report* , 1987(6) : 297-301 .
- [19] Bajaj Y P S . Plant Protoplasts and Genetic Engineering IV[M] . Heidelberg : Springer-Verlag , 1993 .
- [20] 许丽萍 , 陈如凯 . 甘蔗遗传转化的研究进展[J] . 福建农业大学学报 , 1998 , 27(2) : 138-143 .
- [21] Chen R K , Lin J Y , Lin J F , et al . Progress on transformation of sugarcane mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J] . *Sugarcane* , 1996 , 3(3) : 1-4 .
- [22] Arencibia A , Carmona E , Tellez P , et al . An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum officinarum* L .) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J] . *Transgenic Research* , 1998(7) : 213-222 .
- [23] Elliott A R , Campbell J A , Brettel R I S , et al . *Agrobacterium*- mediated transformation of sugarcane using GRP as a screenable marker[J] . *Plant Physiology* , 1998 , 25 : 739-743 .
- [24] 王自章 , 张树珍 , 罗敬萍 , 等 . 甘蔗根癌农杆菌介导遗传转化研究[J] . 农业生物技术学报 , 2002 , 10(3) : 237-240 .
- [25] 王自章 , 张树珍 , 杨本鹏 , 等 . 甘蔗根癌农杆菌介导转化海藻糖合酶基因获得抗渗透胁迫能力增强植株[J] . 中国农业科学 , 2003 , 36(2) : 140-146 .
- [26] 罗敬萍 , 张树珍 , 杨本鹏 . 农杆菌介导甘蔗基因转化技术的优化[J] . 热带作物学报 , 2003 , 24(4) : 23-28 .
- [27] 于兰 , 秦新民 , 黄德青 , 等 . 农杆菌介导的 BT 基因导入甘蔗的研究[J] . 广西农学报 , 2007 , 22(6) : 1-4 .
- [28] 顾丽红 , 张树珍 , 杨本鹏 , 等 . 几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶基因导入甘蔗[J] . 分子植物育种 , 2008 , 6(2) : 277-280 .
- [29] Wang A Q , Dong W Q , Wei Y W , et al . Transformation of sugarcane with ACC oxidase antisense gene[J] . *Sugar Tech* , 2009 , 11 : 39-43 .
- [30] Taylor P W J , Dukic S . Development of an in vitro culture technique for conservation of *Saccharum* spp . hybrid germplasm[J] . *Plant Cell Tiss Organ Cult* , 1993 , 34 : 217-222 .
- [31] Lakshmanan P , Geijskes R J , Elliot A R , et al . A thin cell layer culture system for the rapid and high frequency direct regeneration of sugarcane and other monocot species[J] . *In Vitro Cell Dev Biol* , 2002 , 38 : 1411 .
- [32] Geijskes R J , Wan L F , Lakshmanan P , et al . Smartsette seedlings : Tissue culture seed plants for the Australian sugar industry[J] . *Sugarcane Int* , 2003 , May/ June : 13-17 .
- [33] Kole C , Hall T C . Compendium of Transgenic Crop Plants : Transgenic Sugar , Tuber and Fiber Crops[M] . Oxford : Blackwell , 2008 .
- [34] Malhotra S D . Biotechnology and sugarcane[J] . *Sugar Cane* , 1994(3) : 2-4 .
- [35] Smith R , Hood E E . *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons[J] . *Crop Sci* , 1995 :

- 35 : 301–309 .
- [36] Raineri D M , Bottino P , Gordon M P , et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.) [J] . *Bio/Technol* , 1990 , 8 : 33–38 .
- [37] Chan M T , Lee T M , Chang H H . Transformation of indica rice mediated by *agrobacterium tumefaciens*[J] . *Plant Cell Physiol* , 1992 , 33 : 577–583 .
- [38] Chan M-T , Chang H-H , Ho S-L et al. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha-amylase promoter/beta-glucuronidase gene[J] . *Plant Mol Biol* , 1993 , 22 : 491–506 .
- [39] 李宝健, 欧阳学智, 许耀. 应用农杆菌 Ti 质粒系统将外源基因转入籼稻细胞研究[J]. *中国科学(B 辑)*, 1990 (2) : 145–149 .
- [40] Li X Q , Liu C N , Richie S W , et al . Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of gus in rice[J] . *Plant Mol Biol* , 1992 , 20 : 1037–1048 .
- [41] Chan M T , Chang H H , Ho S L , et al . *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha-amylase promoter/beta-glucuronidase gene[J] . *Plant Mol Biol* , 1993 , 22 : 491–506 .
- [42] Hiei Y , Ohta S , Komari T , et al . Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L .) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. *Plant J* , 1994(6) : 271–282 .
- [43] Mulleegadoo K , Dookun-saumtally A . Genetic transformation of sugar cane mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J] . *Revue Agricoleet Sucriere* , 2001 , 80(3) : 167–170 .
- [44] Zhangsun D , Luo S , Chen R , et al . Improved *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of GNA transgenic sugarcane[J] . *Biol Bratisl* 2008 , 62 : 386–393 .
- [45] Priya J , Melisa K , Nicole T , et al . Selection system and co-cultivation medium are important determinants of *agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane[J]. *Plant Cell Rep* , 2009 , 29 : 173–183 .
- [46] Liu D , Oard S V , Oard J H . High transgene expression levels in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) driven by the rice ubiquitin promoter RUBQ2[J] . *Plant Sci* , 2003 , 165 : 743–750 .
- [47] 许丽萍, 潘大仁, 陈如凯. 基因工程甘蔗: 潜能、现状和前景[J]. *生物工程学报*, 2001, 7(4) : 371–374 .
- [48] Negrotto D , Jolley M , Beer S , et al . The use of phosphomanno seisomerase as a selectable-marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation[J] . *Plant Cell Reports* , 2000 , 19 : 798–803 .
- [49] Dai S H , Zheng P , Fauquet C . Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment[J]. *Mol Breed* , 2001(7) : 25–33 .
- [50] 吴转娣, 咎逢刚, 张树珍, 等. 蔗糖转运蛋白的调节[J]. *生物技术通报*, 2009(7) : 12–16 .
- [51] 赵丽宏, 王俊刚, 杨本鹏, 等. 甘蔗体内的蔗糖积累[J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(2) : 385–390 .

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 易来宾