

Bt cry1 Ia8抗虫基因对结球甘蓝的转化及其表达

崔磊¹, 杨丽梅^{1*}, 刘楠², 郎志宏³, 刘玉梅¹, 庄木¹, 张扬勇¹,
张友军¹, 黄大^{2,3}, 方智远¹

(¹中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ²中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193; ³中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要: 以结球甘蓝 (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) 的下胚轴和具柄子叶为外植体, 通过根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导法将苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 杀虫晶体蛋白基因 *cry1 Ia8* 导入结球甘蓝中, 共获得 38 株卡那霉素抗性植株。PCR 和 Southern blot 检测证实 *cry1 Ia8* 基因已经成功导入并整合到甘蓝的基因组中; RT-PCR 和 Western blot 检测表明, *cry1 Ia8* 基因在转录和翻译水平有一定的表达; 转化植株叶片离体饲喂敏感小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 和对 Cry1Ac 蛋白表现抗性的小菜蛾的试验表明, 该基因不仅对敏感小菜蛾有很强的抗性, 对抗性小菜蛾也具有较强的抗性。

关键词: 结球甘蓝; 小菜蛾; Bt 基因; *cry1 Ia8*; 转基因; 抗性

中图分类号: S 635.1; S 436.341.2⁺4 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2009) 08-1161-08

Transformation and Expressing of Bt Gene cry1 Ia8 in Cabbage

CUI Lei¹, YANG Limei^{1*}, LU Nan², LANG Zhi-hong³, LU Yu-mei¹, ZHUANG Mu¹, ZHANG Yang-yong¹, ZHANG You-jun¹, HUANG Da-fang^{2,3}, and FANG Zhi-yuan¹

(¹ Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; ³ Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to obtain transgenic cabbage lines with insect-resistance, *cry1 Ia8* gene was transferred to cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) with the transformation of hypocotyl segments and cotyledon with petiole via *Agrobacterium tumefaciens*. Thirty-eight transformants with kanamycin-resistance were obtained. PCR and Southern blot analysis showed that *cry1 Ia8* gene was integrated into the genome of cabbage. Moreover, RT-PCR and Western blot detection demonstrated that *cry1 Ia8* gene was expressed in RNA and protein levels. The results of bioassay with the susceptible and resistant diamondback moth (DBM, *Plutella xylostella*) displayed that most of the transgenic plants were resistant to the larvae of susceptible DBM and also to the insect strain which is resistant to Cry1Ac toxin.

Key words: cabbage; *Plutella xylostella*; Bt gene; *cry1 Ia8*; transformation; resistance

结球甘蓝生产上的虫害日趋严重 (蒋杰贤等, 2002)。自 1996 年转基因作物商业化以来, 全球种植的抗虫转基因作物面积已经达到了 2 625 万 hm^2 (James, 2008)。Holbrook 和 Miki (1985) 首先对甘蓝进行转化研究, 并获得再生植株。国内外的报道表明, 转 Bt 杀虫蛋白基因 (绝大多数基因为 *cry1Ac*) 的甘蓝植株对鳞翅目害虫, 如小菜蛾和菜青虫等都有较强的抗虫效果 (Timothy et al, 1995; 毛慧珠等, 1996; 杨广东等, 2002; 李汉霞等, 2006; 李贤等, 2008)。

收稿日期: 2009 - 04 - 13; 修回日期: 2009 - 06 - 29

基金项目: 国家 '863' 计划项目 (2008AA10Z155); 北京市科委项目 (Z07070501770704)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: yanglm@mail.caas.net.cn, ylmcaas@hotmail.com)

近年来，随着 Bt 转基因作物的应用，害虫在一定程度上得到了控制。然而害虫在田间产生抗性的风险也逐年上升（Tabashnik et al，2008），鳞翅目、鞘翅目等十余种害虫对 Bt 产生了较强的抗性（Tabashnik，1994；王崇利 等，2006）。因此，采用与常用的 *cryIA* 类无交互抗性的新基因，培育新型抗虫转基因植物品种，具有重要的理论意义和实用价值（Tang et al，2001）。

本研究中采用的 *cryI la8* 基因由中国农业科学院植物保护研究所自主分离克隆，经过密码子优化，人工合成了新的序列（窦黎明 等，2007）。该基因编码的 *cryI la8* 蛋白对玉米螟、小菜蛾等具有高毒力，但与 *CryIA* 类蛋白没有交互抗性（Angamuthu et al，1998；Tounsi et al，2003；Escudero et al，2006）。通过农杆菌介导法建立结球甘蓝的转化体系，并将该基因转入甘蓝，获得抗虫转基因植株，此研究的成功将为新一代抗虫转基因蔬菜的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2007—2009 年在中国农业科学院蔬菜花卉研究所进行。甘蓝转化材料分别为 CA21-3 和 CB24-5，由中国农业科学院蔬菜花卉研究所甘蓝组提供。

转化所用到的培养基共有 5 种，详见表 1。

表 1 甘蓝遗传转化所用培养基
Table 1 Compositions of media for transformation of cabbage

培养基 Media	配方 Composition	用途 Usage
FM	MS + 1 mg · L ⁻¹ 6-BA + 0.1 mg · L ⁻¹ NAA + 28 g · L ⁻¹ Sugar + 7 g · L ⁻¹ agar, pH 5.8	预培养 / 共培养 Pre-culture / Co-culture
SM	FM + 10 mg · L ⁻¹ Kan + 500 mg · L ⁻¹ Cab, pH 5.8	选择培养 Selective culture
RM	1/2MS + 0.1 mg · L ⁻¹ NAA + 0.1 mg · L ⁻¹ BA + 20 g · L ⁻¹ Sugar + 7 g · L ⁻¹ agar, pH 5.8	生根培养 Rooting
MS ₀	Liquid MS, pH 5.8	悬浮细菌 Resuspension
YEP	Yeast extract 10 g · L ⁻¹ + Tryptone 10 g · L ⁻¹ + NaCl 5 g · L ⁻¹	细菌培养 Bacteria culture

Bt *cryI la8* 优化基因由中国农业科学院植物保护研究所提供。重组质粒载体为 pCS_{kan}（13 kb），由中国农业科学院生物技术研究所提供，含有增强子元件的 CaMV35S 启动子、*cryI la8* 目的基因（2.1 kb）和 *NPT* 选择标记基因。大肠杆菌菌株为 JM110，农杆菌菌株为 EHA105。

一抗为 Bt 毒蛋白的抗血清，由中国农业科学院植物保护研究所提供，二抗为碱性磷酸酯酶（AP）偶联的山羊抗兔 IgG，购于 Sigma 公司。

生物测定所使用的小菜蛾（*Plutella xylostella*）为对 *CryIAc* 蛋白表现敏感和抗性的种群，由中国农业科学院蔬菜花卉研究所害虫防治组提供。

1.2 转化受体和菌液准备

甘蓝种子经 75% 的酒精表面消毒 1 min，14% 的次氯酸钠灭菌 14 min，无菌水冲洗 3 次，接种于 MS 固体培养基上。切取播种 4~5 d 后的甘蓝幼苗的具柄子叶及下胚轴，并去掉上面的顶端分生组织，接种于 FM 培养基上，预培养 2 d，温度（25 ± 1），16 h/8 h 光周期。

挑取含有目的基因载体的农杆菌单菌落，置于含利福平 50 mg · L⁻¹ 和卡那霉素 100 mg · L⁻¹ 的 YEP 培养基中，在 28℃ 下，280 r · min⁻¹ 的摇床上振荡过夜培养，当 OD₆₀₀ 值达到 0.6~0.8 时，5 000 r · min⁻¹、4℃ 下离心 10 min，收集细菌，用 MS₀ 培养基悬浮。

1.3 遗传转化

取在 FM 培养基上预培养 2 d 的具柄子叶和下胚轴，将其浸入农杆菌悬浮液中，8~15 min 后取

出, 吸干多余的菌液后置于铺放一层无菌滤纸的 RM 培养基上, 25℃ 下暗培养 2 d。将外植体用 MS₀ 培养基洗涤后, 置于 SM 培养基中, 每 2 周换 1 次培养基, 培养 40~60 d。当卡那霉素抗性芽长至 1~2 cm 后切下, 转入诱导生根的 RM 培养基中直至形成完整植株。选取其中根系较发达的植株经过 1~2 d 炼苗后, 移入营养钵中, 于温室条件下生长。同样培养条件下未经农杆菌转化的甘蓝植株作为阴性对照。

1.4 转化植株检测

PCR 检测: 以甘蓝转化植株和对照植株的总 DNA 为模板, 根据 *cry1 la8* 基因设计 PCR 扩增引物, 其上游序列为 5'-AGCCGTTTGTTAGTGCCT-3', 下游序列为 5'-ACTTGGATGCGGATGGAC-3', 由上海生工公司合成, 预扩增片段大小为 769 bp; 反应程序为: 94℃ 4 min; 94℃ 60 s, 55℃ 60 s, 72℃ 90 s, 30 次循环; 72℃ 10 min。PCR 扩增产物用浓度为 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

Southern blot 检测: 试验步骤参照 Sambrook 等 (1989) 的方法。用 *Hind* III 酶切约 15 μg 左右的甘蓝基因组 DNA, 37℃ 温育过夜, 在浓度为 1% 的琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 用 20×SSC 过夜转膜, 于 120℃ 下固定 30 min, 杂交过夜, 利用地高辛试剂盒 (Roche 公司) 标记含目的基因质粒 DNA 的 PCR 产物作探针过夜杂交, 再进行洗膜、显色、定影。

RT-PCR 检测: 甘蓝转化植株总 RNA 的提取参照 TaKaRa 公司试剂盒进行。用 DNase I 处理获得的 RNA 样品逆转录合成 cDNA 的第一链, 进行 PCR 扩增。*cry1 la8* 和内对照 *-actin* 的扩增引物分别为: *cry1 la8* 上游序列: 5'-CAAAGCACTTACCGACCTC-3'; *cry1 la8* 下游序列: 5'-CATTGACAGGGT-GAGTGAGGA-3'; *-actin* 上游序列: 5'-ATCTGGCATCACACTTCTAC-3'; *-actin* 下游序列: 5'-ATCTCTTTGCTCATACGGTCT-3'。*cry1 la8* 引物预扩增片段大小为 893 bp, *-actin* 引物的预扩增片段大小为 697 bp, 逆转录合成 cDNA 样品的 PCR 扩增反应条件与 PCR 检测中的相同。

Western blot 检测: 用 Tris 缓冲液提取甘蓝转化植株和非转化植株的可溶性总蛋白进行免疫杂交。蛋白样品经 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 然后将蛋白转移至 PVDF 膜上, 用 BSA 过夜封闭, 先加入一抗 (中国农业科学院植物保护研究所提供), 工作浓度为 1:5 000, 洗膜, 再加入二抗 (购于 Sigma 公司), 工作浓度为 1:20 000, 洗膜, 最后显色, 定影。AP 的反应底物为氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 和 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸甲苯胺蓝 (BCIP)。

转基因植株的抗虫性测定: 采用室内离体叶片饲喂法, 取苗期转基因植株及对照植株相同部位的、直径为 4 cm 的叶片, 分别置于 9 cm 的培养皿中, 内放 1 张湿滤纸以保持适宜的湿度, 每个培养皿中接二龄小菜蛾幼虫 10 头, 虫体大小尽量一致, 每个植株设 3 次重复。将其置于光照培养箱中, (25±1)℃ 下, 16 h/8 h 光周期。每 3 d 更换 1 次叶片, 每天调查死虫数和活虫数, 并在第 1 天试验开始时和第 6 天试验结束时称量活虫质量, 虫体称量使用万分位电子天平, 采用差减法, 即先称取培养皿的质量 m_1 , 将幼虫放入培养皿中称取的质量为 m_2 , 每头幼虫的质量为 $m_2 - m_1$ 。

相对增长率 (%) = 终虫质量 / 初虫质量 × 100; 幼虫死亡率 (%) = 死虫数 / 接虫总数 × 100; 幼虫校正死亡率 (%) = (转化组死亡率 - 对照组死亡率) / (1 - 对照组死亡率) × 100。

2 结果与分析

2.1 甘蓝转基因植株的获得

共获得了 38 株抗卡那霉素的 T₀ 代植株, 不同时期的甘蓝转化体见图版。初步试验表明, CA21-3 的下胚轴与 CB24-5 的具柄子叶为较好的遗传转化材料, 在进行 *cry1 la8* 基因转化试验中发现, 不同材料和外植体的转化效率有明显的差异 (表 2)。对获得的甘蓝卡那霉素抗性植株进行统计, 不同材料所获得的转化频率为 2.48%~10.6%。因此, 在进行基因转化试验前, 应该先对植物不同的基因型和外植体的遗传转化能力进行筛选。

表 2 不同基因型及外植体对甘蓝转化效率的影响

Table 2 Effect of different genotypes and explants on the transformation of cabbage

基因型 Genotype	外植体类型 Type of explants	外植体数 Number of explants	再生芽数 Number of transformed shoots	转化频率 / % Transformation frequency
CA21-3	具柄子叶 Cotyledon with petiole	363	9	2.48 c
	下胚轴 Hypocotyl	268	15	5.60 b
CB24-5	具柄子叶 Cotyledon with petiole	160	17	10.63 a
	下胚轴 Hypocotyl	236	8	3.39 c

2.2 转基因植株的 PCR检测

以甘蓝转化植株的基因组 DNA 为模板，经 PCR 扩增检测，部分抗性植株得到了约 769 bp 的特异带（5~13）（图 1），与阳性对照质粒 pCS1a_N 的扩增结果一致，阴性对照没有特异性扩增条带。PCR 检测结果初步表明 *cry1Ia8* 基因已整合到受体基因组中。

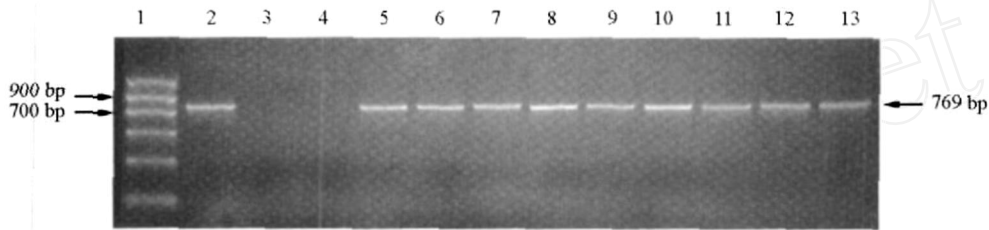


图 1 甘蓝转化植株的 PCR 检测

1. Marker; 2. 阳性对照; 3. 阴性对照; 4~13. 甘蓝转化植株。

Fig 1 PCR analysis of transgenic plants

1. Marker; 2. Plasmid DNA as positive control; 3. Negative control;
4 - 13. Transgenic plants

2.3 转基因植株的 Southern blot检测

挑选 9 株 PCR 阳性的甘蓝转化植株，提取基因组总 DNA，用地高辛试剂盒标记探针，进行 Southern blot 检测分析，结果表明，3~11 植株均出现了杂交信号，同时由杂交条带数可以看出 *cry1Ia8* 基因插入植物基因组中的拷贝数分别为 2、1、1、1、1、2、2、1、1（图 2）。

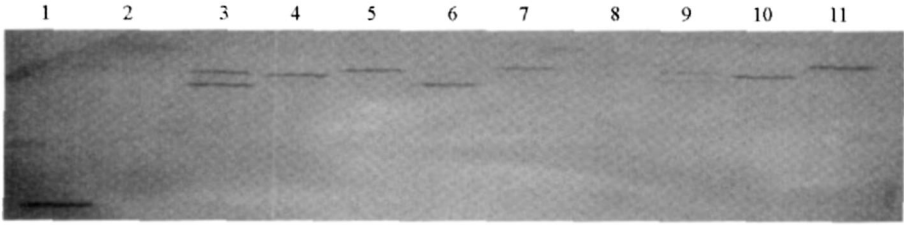


图 2 甘蓝转化植株的 Southern blot 检测

1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3~11. 甘蓝转化植株。

Fig 2 Southern blot analysis of transgenic plants

1. Positive control; 2. Negative control; 3 - 11. Transgenic plants

2.4 转基因植株的 RT-PCR 检测

取 Southern blot 为阳性的 9 株转化植株，进行 RT-PCR 检测。结果阴性对照和转化植株均有 697

bp (内对照 β -actin) 的条带产生, 而阳性对照和转化植株除具有内对照条带外还产生了 893 bp 的目的片段, 但 B17-8 却没有获得目的条带, 这可能是由于目的基因插入非表达区或因多拷贝而导致基因沉默所致。RT-PCR 检测结果表明, 目的基因在转录水平上得到了表达。

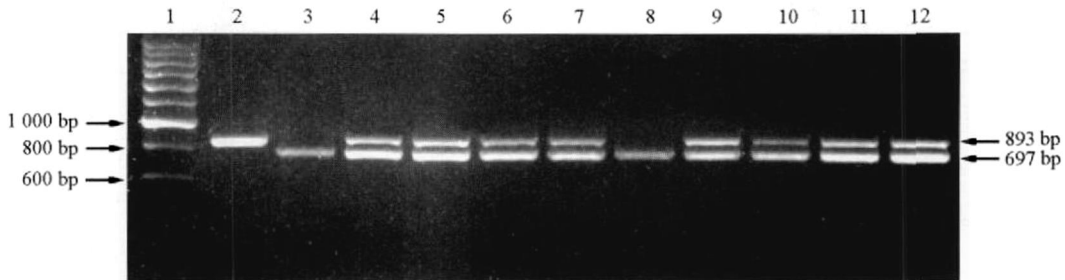


图 3 甘蓝转化植株的 RT-PCR 检测

1. Marker; 2. 阳性对照; 3. 阴性对照; 4~12. 甘蓝转化植株。

Fig. 3 RT-PCR analysis of transgenic plants

1. Marker; 2. Plasmid DNA as positive control; 3. Negative control; 4 - 12. Transgenic plants

2.5 转基因植株的 Western blot 检测

取 Southern blot 和 RT-PCR 为阳性的植株, 提取其叶片的可溶性总蛋白, 进行 Western blot 检测。结果显示转基因植株在 75 kD 处有明显的杂交条带, 而非转基因植株则没有 (图 4)。

CryI *la8* 蛋白的分子量约为 81 kD, 其在甘蓝和大肠杆菌中表达的分子量约为 75 kD, 这可能是由于 *cryI la8* 基因在 Bt 自然菌株体外表达的蛋白不能形成正确的折叠或对蛋白酶敏感而部分降解, 从而造成分子量的差异。

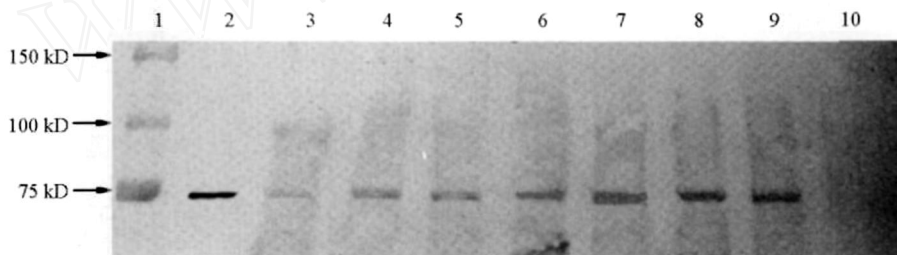


图 4 转基因甘蓝植株的 Western blot 检测

1. 预染蛋白 marker; 2. 阳性对照; 3~9. 转基因植株; 10. 阴性对照。

Fig. 4 Western blot analysis of transgenic cabbage

1. Prestained marker; 2. Positive control; 3 - 9. Transgenic plants; 10. Negative control

2.6 抗虫性鉴定

2.6.1 饲喂敏感小菜蛾结果分析

用转基因植株与对照植株的离体叶片饲喂敏感小菜蛾的二龄幼虫。发现饲喂 6 d 后, 转基因植株 A14-3、A14-5、A14-6、A14-7、A14-8、A14-9 和 A14-12 均表现出明显的抗虫性, 其叶片仅被取食几个小孔后幼虫即死亡, 受试小菜蛾幼虫的校正死亡率在 91.38% ~ 100% (表 3), 但 B17-8 却表现不抗虫, 这与其 RT-PCR 的阴性结果相对应。对照植株的叶片对小菜蛾没有抗虫作用, 试验结束时只留下叶脉和极少量的叶片 (图版,)。

2.6.2 饲喂抗性小菜蛾结果分析

用转基因植株和对照植株的离体叶片饲喂 CryI *Ac* 蛋白抗性小菜蛾的二龄幼虫, 生物测定结果表

明：取食转化植株 A14-5, A14-6, A14-12的害虫的校正死亡率为 88.89% ~ 96.30%，说明其对抗性小菜蛾具有较强的抗性；而取食转化植株 A14-10的小菜蛾的校正死亡率为 33.33%，表明其对抗性小菜蛾具有部分抗性（表 3）。而对照叶片被大量取食，显示不抗虫（图版， ）。。

表 3 甘蓝转基因植株离体叶片对小菜蛾幼虫生物测定的结果
Table 3 Bioassay results of the transgenic cabbage against *Plutella xylostella* larvae

小菜蛾种群 DBM strain	植株编号 Plant code	初始虫质量 /mg Initial weight of larvae	最终虫质量 /mg Final weight of larvae	相对增长率 /% Relative growth rate of weight	校正死亡率 /% Corrected mortality
敏感小菜蛾 DBM susceptible to Cry1Ac	CA21-3 (对照 Control)	0.84	4.70	559 a	0 a
	A14-3	0.92	-	0 b	96.55 b
	A14-5	0.74	-	0 b	100.00 b
	A14-6	0.65	-	0 b	95.69 b
	A14-7	0.59	-	0 b	100.00 b
	A14-8	0.45	-	0 b	100.00 b
	A14-9	0.71	-	0 b	91.38 b
	A14-12	0.64	-	0 b	100.00 b
	CB24-5 (对照 Control)	0.71	3.98	560 a	0 a
	B17-8	0.40	2.49	620 a	- 7.40 a
抗性小菜蛾 DBM resistant to Cry1Ac	CA21-3 (对照 Control)	0.62	3.68	594 a	0 a
	A14-5	0.75	-	0 b	88.89 c
	A14-6	0.79	-	0 b	96.30 c
	A14-10	0.86	3.85	448 a	33.33 b
	A14-12	0.52	-	0 b	92.59 c

注：同列数据后不同字母，表示邓肯氏新复极差法测验差异显著（ $P < 0.05$ ），“-”表示小菜蛾死亡，未测。
Note: Different letters in the same column indicate statistically significant difference at $P < 0.05$, ‘-’ means there is no data for the death of DBM.

3 讨论

本研究中通过农杆菌介导法建立了甘蓝遗传转化体系，并获得了 *Bt cry1 la8*基因转化甘蓝的 T_0 代植株；进行了较为系统的分子检测，从 DNA 水平证明 *cry1 la8*基因已经整合到甘蓝的基因组中，并在 RNA、蛋白质的水平上得到了表达；抗虫性试验结果表明，部分转基因植株对敏感和抗性小菜蛾都具有一定的抗性。

获得的 *cry1 la8*基因转化植株离体叶片的生物测定表明，大部分转化植株都具有较强的抗虫性，但也有部分植株的抗虫性有一定差异，与其他人的研究结果类似（Cao & Earle, 1999），这可能与外源基因整合位点的随机性以及整合后的基因沉默有关（Matzke et al, 1994）。因此部分植株虽然在 DNA 水平上整合到了基因组中，但是在 RNA 及蛋白质水平上并没有表达。

CryI Ⅰ蛋白是一组特殊的 CryI 类蛋白，分子量约为 81 kD，而一般 CryI 类蛋白的大小为 130 kD。目前已经发现了 6 种 CryI Ⅰ蛋白，分别为 CryI Ⅰa、CryI Ⅰb、CryI Ⅰc、CryI Ⅰd、CryI Ⅰe、CryI Ⅰf，而它们各自又包含多种蛋白，例如 CryI Ⅰa 含有 16 种蛋白（CryI Ⅰa1, CryI Ⅰa2, ... CryI Ⅰa8 等）（<http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil-Crickmore/Bt>）。

Cry1A 类蛋白为常用的微生物杀虫制剂，已经在实验室和田间发现小菜蛾对其产生了抗药性（Tabashnik et al, 2008）；而 Cry1 la8 蛋白与 Cry1A 类没有同源性，小菜蛾对 Cry1A 类和 Cry1 la 类蛋白没有交互抗性。蛋白杀虫活性测验表明：Cry1 la8 蛋白对玉米螟的毒性与已经商业化的转基因玉米 Cry1Ab 相当，对小菜蛾的毒性与 Cry1Ac 相近（窦黎明 等, 2007）。本试验分别对敏感小菜蛾和 Cry1Ac 抗性小菜蛾进行了离体生物测定，转基因植株不仅对敏感小菜蛾表现了高效的抗虫作用，而

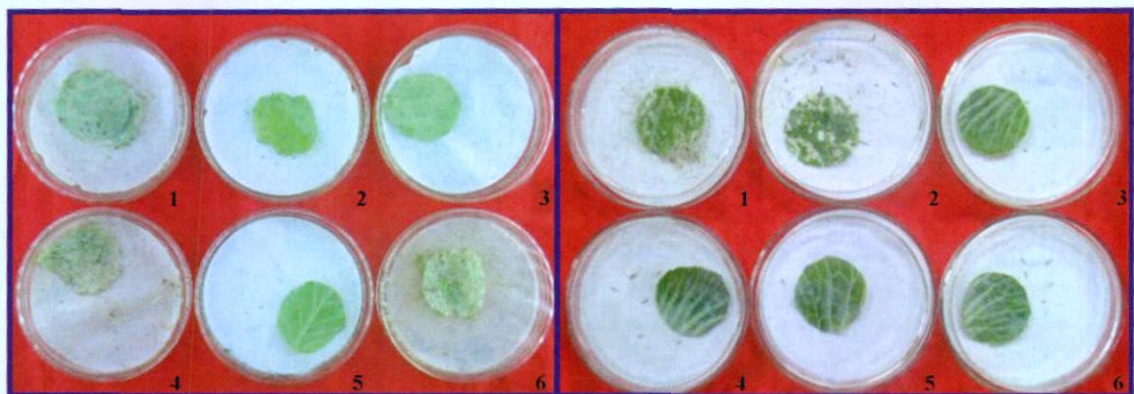
且对 *Cry1Ac* 抗性小菜蛾也有较强的抗虫性。试验还发现, *Cry1 la8* 蛋白对敏感小菜蛾和抗性小菜蛾的抗虫性有一定的差异, 饲喂的敏感小菜蛾第 2 天绝大多数出现僵化, 死亡现象, 后期全部死亡; 而饲喂的抗性小菜蛾第 2 天有少量存活, 但基本停止生长, 后期多数僵化, 死亡。因此, *cry1 la8* 基因对扩大 Bt 杀虫谱, 延缓小菜蛾等害虫抗性的产生具有重要意义。

本研究中所使用的转化受体材料为性状优良的甘蓝高代自交系, 所获得的转基因植株经自交筛选得到的抗虫材料可直接用于甘蓝抗虫品种的配制。但由于外源基因的插入位点具有随机性, *cry1 la8* 基因在后代中的表达和抗虫性还有待于进一步的研究。



图版 I 说明: 甘蓝转化体的不同时期 1. 具柄子叶抗性芽再生; 2. 下胚轴抗性芽再生; 3. 转化植株生根; 4. 转化植株移栽。

Explanation of plate I: Different stage of transformants of cabbage 1. The transformed shoots from cotyledon; 2. The transformed shoots from hypocotyl; 3. Rooting of transformed shoots; 4. Seedlings of transformants.



图版 II 说明: 饲喂小菜蛾的生物测定 左: 敏感小菜蛾, 1、4 为阴性对照, 2、3、5、6 为转化植株; 右: 抗性小菜蛾, 1 为阴性对照, 2~6 为转化植株。

Explanation of plate II: Bioassay of *cry1 la8* transgenic cabbage against *Plutella xylostella* larvae Left figure: With susceptible DBM. 1, 4. Negative control; 2, 3, 5, 6. Transformed plants; Right figure: With resistant DBM. 1. Negative control; 2-6. Transformed plants.

References

- Angamuthu S, Vanga S R, Kumar P A, Tewari K K, Bhatnagar R K. 1998. Transformation of *Nicotiana tabacum* with a native *cryIa5* gene confers complete protection against *Heliothis armigera*. *Molecular Breeding*, 4: 473 - 478.
- Cao J, Earle E D. 1999. Transgenic broccoli with high levels of *Bacillus thuringiensis* Cry1C protein control diamondback moth larvae resistant to Cry1A or Cry1C. *Molecular Breeding*, 5: 131 - 141.
- Dou Liming, Han Lan-lan, Zhang Jie, He Kang-lai, Zhao Kui-jun, Huang Da-fang, Song Fu-ping. 2007. Cloning, expression and activity of *cryIa* gene from *Bacillus thuringiensis* isolate. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 15 (6): 1053 - 1057. (in Chinese)
- 窦黎明, 韩岚岚, 张杰, 何康来, 赵奎军, 黄大, 宋福平. 2007. 苏云金芽胞杆菌 *cryIa* 基因的克隆、表达与活性研究. *农业生物技术学报*, 15 (6): 1053 - 1057.
- Escudero I R, Estela A, Porcar M, Martinez C, Oguiza J A, Escribano B, Ferre J, Caballero P. 2006. Molecular and insecticidal characterization of a Cry1I protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae and Chrysomelidae. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (7): 4796 - 4804.
- Holbrook L A, Miki B L. 1985. *Brassica* grown gall tumorigenesis and *in vitro* of transformed tissue. *Plant Cell Reports*, 4: 329 - 332.
- James C. 2008. Global status of commercialized Biotech/GM crops 2008. ISAAA Brief No. 39. Ithaca NY: ISAAA.
- Jiang Jie-xian, Wang Kui-wu, Chen Yong-nian. 2002. Studies on the yield loss of spring cabbage damaged by *Pieris rapae* and the economic thresholds. *Journal of Shanghai Jiao Tong University: Agricultural Science Edition*, 20 (1): 312 - 316. (in Chinese)
- 蒋杰贤, 王奎武, 陈永年. 2002. 菜青虫为害春甘蓝不同生育期对产量的影响及经济阈值的研究. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 20 (1): 312 - 316.
- Li Han-xia, Yin Ruo-he, Lu Ya-chun, Zhang Jun-hong. 2006. Inheritance and resistance to insect in Cry1A (c) transgenic cabbage. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 14 (4): 546 - 550. (in Chinese)
- 李汉霞, 尹若贺, 陆芽春, 张俊红. 2006. Cry1A (c) 转基因结球甘蓝的抗虫性研究. *农业生物技术学报*, 14 (4): 546 - 550.
- Li Xian, Yao Quan-hong, Peng Ri-he, Xiong Ai-sheng, Xue Yong, Jin Xiao-fen. 2008. Study on Bt transgenic cabbage with insect resistance. *Acta Agriculturae Shanghai*, 24 (3): 16 - 20. (in Chinese)
- 李贤, 姚泉洪, 彭日何, 熊爱生, 薛永, 金晓芬. 2008. Bt转基因抗虫甘蓝的研制. *上海农业学报*, 24 (3): 16 - 20.
- Matzke A J M, Neuhauser F, Park Y D, Ambros P F, Matzke M A. 1994. Homology dependent gene silencing in transgenic plants: Epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. *Molecular and General Genetics*, 244: 219 - 229.
- Mao Hui-zhu, Tang Ti, Cao Xiang-ling, Bai Yong-yan, Guo Pei-fu, Fu Wen-jun. 1996. Inheritance and resistance to insect in transgenic cabbage. *Chinese Science Bulletin: C*, 26 (4): 339 - 347. (in Chinese)
- 毛慧珠, 唐惕, 曹湘玲, 白永延, 郭培福, 符文俊. 1996. 抗虫转基因甘蓝及其后代的研究. *中国科学: C辑*, 26 (4): 339 - 347.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tabashnik B E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol*, 39: 47 - 79.
- Tabashnik B E, Gassmann A J, Crowder D W, Carrière Y. 2008. Field-evolved insect resistance to transgenic Bt crop. *ISB News Report*.
- Tang J D, Collins H L, Metz T D, Earle E D, Zhao J Z, Roush R T, Shelton A M. 2001. Greenhouse tests on resistance management of Bt transgenic plants using refuge strategies. *Journal of Economic Entomology*, 94 (1): 240 - 247.
- Timothy D M, Ram D, Elizabeth D E. 1995. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Molecular Breeding*, 15: 287 - 292.
- Tounsi S, Zouari N, Jaoua S. 2003. Cloning and study of the expression of a novel cry1Ia-type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 23 - 28.
- Wang Chong-li, Wu Shu-wen, Yang Yi-ye, Wu Yi-dong. 2006. Field-evolved resistance to Bt endotoxins and Bt formulation in *Plutella xylostella* from the Southeastern Coast Region of China. *Acta Entomologica Sinica*, 49 (1): 70 - 73. (in Chinese)
- 王崇利, 武淑文, 杨亦桢, 吴益东. 2006. 东南沿海地区小菜蛾对 Bt 内毒素和 Bt 制剂的抗性检测. *昆虫学报*, 49 (1): 70 - 73.
- Yang Guang-dong, Zhu Zhen, Li Yan-e, Zhu Zhu-jun, Xiao Gui-fang, Wei Xiao-li. 2002. Obtaining transgenic plants of chinese cabbage resistant to *Pieris rapae* L. with modified *CpTI* gene. *Acta Biologica Experimentalis Sinica*, 35 (2): 117 - 122. (in Chinese)
- 杨广东, 朱桢, 李燕娥, 朱祝军, 肖桂芳, 魏晓丽. 2002. 利用根癌农杆菌和基因枪法转化获得转抗虫融合蛋白基因 (Bt-CpTI) 甘蓝植株. *实验生物学报*, 35 (2): 117 - 122.