

研究报告

A Letter

转 *il-4* 基因大白菜(*Brassica Pekinensis* Rupr.) 分子检测及遗传和表达研究

张作青[✉], 张玮滢[✉], 于丽杰[✉]

黑龙江省普通高等学校植物生物学重点实验室, 哈尔滨师范大学, 哈尔滨, 150025

✉ 通讯作者: yulijie1961@126.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 42 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0042

收稿日期: 2011 年 02 月 16 日

接受日期: 2011 年 03 月 28 日

发表日期: 2011 年 04 月 12 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

张作青等, 2011, 转 *il-4* 基因大白菜(*Brassica Pekinensis* Rupr.) 分子检测及遗传和表达研究, 分子植物育种 Vol.9 No.42 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0042)

摘要 以花粉管通道法转化得到的转 *il-4* 基因大白菜哈白二号、潍白六号和新世纪三个品种为试验材料, 通过 PPT 抗性筛选、PCR 扩增、PCR-Southern 杂交和 Western 杂交等技术, 对转 *il-4* 基因大白菜后代进行分子检测, 并研究了 *il-4* 基因在 T₆ 代自交大白菜中的传递规律及对 T₆ 代植株表型、抗病性进行了调查。经检测共得到 22 个株系的 63 株阳性植株, 其中 *il-4* 基因的抗性分离情况均不符合“抗性植株:非抗性植株=3:1”的孟德尔分离规律。与非转基因大白菜相比, 转 *il-4* 基因阳性植株生长势较弱, 抗病性较差。统计分析显示, 通过花粉管通道法对三个品种的大白菜进行遗传转化, 在相同的转化处理时机, 三个品种间的转化率差异不显著。结果证实通过花粉管通道法介导的 *il-4* 基因可以在大白菜中遗传并表达。

关键词 大白菜; 白细胞介素 4; 分子检测; 遗传表达

Study on Genetic Expression and Molecular Detection of Transgenic Chinese Cabbage (*Brassica Pekinensis* Rupr.) with Interleukin-4 Gene

Zhang Zuoqing[✉], Zhang Weiyong[✉], Yu Lijie[✉]

Key Laboratory of Plant biology, College of Heilongjiang Province, Harbin Normal University, Harbin, 150025, P.R. China

✉ Corresponding author, yulijie1961@126.com; ✉ Authors

Abstract In present research, we molecularly detected and genetically analyzed the three candidate transgenic Chinese cabbage varieties (named Habai2, Weibai6 and Xinshiji), which was harbored with interleukin-4 (*il-4*) gene transferred by pollen-tube pathway. The results appeared that the segregation ratio in transgenic Chinese cabbage was not consistent with Mendelian inheritance. Compared with control plants, transgenic plants showed significantly decreased growth vigor and disease resistance. In the same treatment combinations of transformation, the transfer ratio is not significantly different in different varieties. Analysis also indicated that *il-4* gene can be inherited and expressed in Chinese cabbage.

Keywords Chinese cabbage; Interleukin-4; Molecular detection; Genetic expression

研究背景

大白菜(*B. pekinensis* Rupr.)又名结球白菜, 原产我国, 是十字花科芸薹属两年生草本植物, 在我国栽培广泛, 是重要的蔬菜作物之一。大白菜营养丰富, 并且具有一定的药用价值。20 世纪 80 年代, 随着大白菜组织培养与高频植株再生体系的逐步建立, 在此基础上国内外学者进行了大量的转基因研究, 已经由大白菜真叶(成细华, 2001)、子叶(王洋, 2005)、下胚轴(卢永恩, 2003)、花药(Sylvie, 2004)及小孢子(申书兴, 2006)等外植体得到了再生植株。目前, 随着对转基因蔬菜的研究不断深入, 转基因

大白菜在抗虫(谢建坤, 2001)、抗病(杨广东, 2002)、抗除草剂(王雷, 2006)等方面的相关分子标记与检测不断成熟, 利用转基因技术及其分子检测与标记在其它作物如番茄(及晓宇, 2009)、甘蓝(吕俊, 2001)、甘蓝型油菜等(Londo, 2011)也取得了一定进展。

人白细胞介素 4 (Interleukin, IL-4), 是由 T 细胞产生的细胞因子, 分子量为 15KD, 结构复杂, 功能广泛。IL-4 能调节 B 细胞的生长分化及其对抗原刺激的应答、防止 T 淋巴细胞凋亡、促进巨噬细胞提呈抗原、刺激肥大细胞的增殖。其中最主要的

功能是增强 B 细胞对 T 细胞的相互作用及促进 IgE 介导的免疫应答反应。另外, IL-4 在过敏性和感染性及自身免疫性疾病、肿瘤等方面都具有重要的医疗价值。

本实验室利用花粉管通道法将 *il-4* 基因转入大白菜中, 对其自交后代 T₆ 代植株进行分子生物学活性检测和遗传表达研究。试图为今后进一步利用转 *il-4* 基因大白菜提供参考。

1 结果与分析

1.1 转 *il-4* 基因大白菜 T₆ 代幼苗的 PPT 抗性筛选

按照品种的不同, 对 T₅ 代种子 4℃ 春化处理 30 d 后, 播于温室 288 孔育苗盘中, 共播 T₅ 代种子 1413 粒, 获得 T₆ 代幼苗 935 株; 经 PPT 抗性筛选, 反应 10 d 左右后淘汰叶片枯黄死亡的植株(图 1), 共

获得具 PPT 抗性阳性植株 588 株(表 1)。

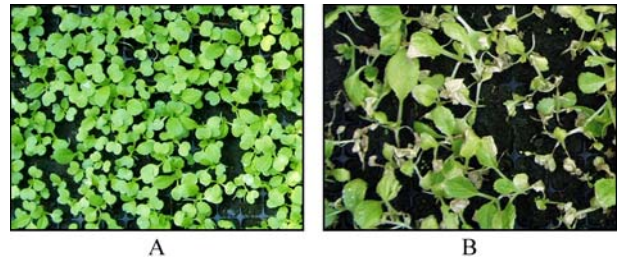


图1 转 *il-4* 基因大白菜 T₆ 代幼苗的 PPT 抗性筛选

注: A: 喷洒 PPT 之前; B: 喷洒 PPT 10 天后

Figure 1 PPT resistance selections of *il-4* transgenic Chinese cabbage (T₆ generation)

Note: A: Before spraying PPT; B: After spraying PPT for ten days

表1 转基因大白菜 T₆ 代检测结果

Table 1 Examination results of transgenic plants in T₆ generation

品种 Variety	转化处理组合 Treatment combination	待测株数 Numbers of detection	PPT 筛选 PPT Selection		<i>il-4</i> 扩增 <i>il-4</i> gene Detection	
			阳性株数 Numbers of Resistant plants	阳性率(%) Positive rate of plants (%)	阳性株数 Numbers of positive plants	阳性率(%) Positive rate of plants (%)
			H2	AH	187	100
	BH	148	92	62.16	2	1.35
XSJ	BL	179	116	64.80	1	0.56
W6	AH	421	280	66.51	26	6.18
总计 Numbers of total		935	588	62.89	45	4.81

1.2 转 *il-4* 基因大白菜 T₆ 代幼苗的 PCR 检测

分别以 *rbcl* 和 *il-4* 基因特异性引物对 T₆ 代大白菜幼苗进行内对照和 *il-4* PCR 检测, 分别得到了大小为 433 bp 和 243 bp 的特异性条带(图 2), 共获得 *il-4* 阳性植株 45 株(表 1)。阳性率仅为 4.81%, 远远低于孟德尔定律理论值 75%。

1.3 转 *il-4* 基因大白菜的 PCR-Southern 杂交

PCR-Southern 杂交结果表明, 阳性对照(质粒)与 7 个 PCR 三次阳性样品中的 6 个出现杂交信号, 1 号空白和 10 号阴性对照没有条带。PCR 检测结果无污染, 初步证明 *il-4* 基因已经整合到大白菜基因组

中(图 3)。

1.4 转 *il-4* 基因大白菜的 Western 杂交

为进一步确证 *il-4* 基因在大白菜中的表达, 对部分 PCR-Southern 杂交呈阳性的样品进行 Western 杂交, 结果在 PVDF 膜上出现杂交条带(图 4), 大小与 IL-4 标准蛋白一致(约 15 KD), 阴性对照样品无杂交条带。通过 Western 杂交结果, 进一步验证了上述 PCR、PCR-Southern 杂交结果的可靠性。同时证明 *il-4* 基因能够在转基因大白菜中正常表达。

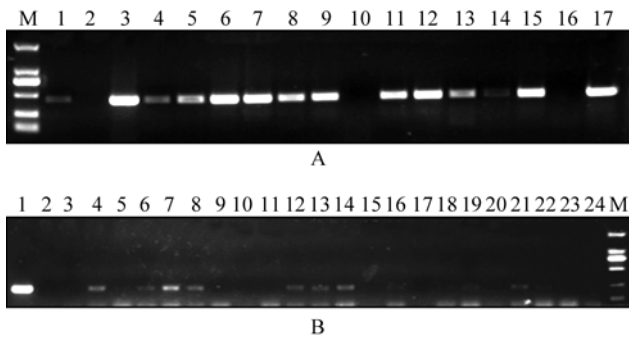


图2 转基因大白菜内对照及*il-4*基因的PCR扩增
注: A: *rbcl* 基因扩增; 1-15: 转基因大白菜; 16: 空白对照; 17: 非转基因材料阴性对照; B: *il-4* 基因扩增; 1: 阳性对照(质粒); 2: 阴性对照(非转基因材料); 3: 空白对照(水); 4-24: *il-4*阳性植株; M: DL2000 marker

Figure 2 PCR amplification of *il-4* and *rbcl* gene in transgenic Chinese cabbage

Note: A: PCR amplification of *rbcl* gene; 1~15: Transgenic plants with *il-4*; 16: Blank control; 17: Non-transgenic plants. B: PCR amplification of *il-4*gene; 1: Positive control (Plasmid); 2: Negative control (Non-transgenic plants); 3: Blank control (Water); 4~24: Transgenic plants with *il-4*; M: DL2000 marker

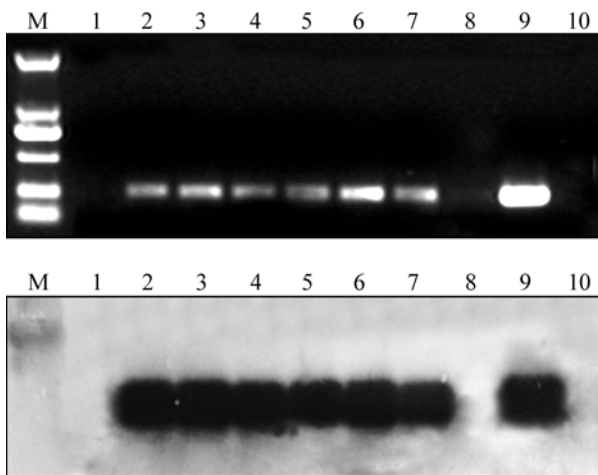


图3 转*il-4*基因大白菜的PCR扩增、PCR-Southern杂交结果
注: 1: 空白对照(水); 2~8: *il-4* 阳性植株; 9: 阳性对照(质粒); 10: 阴性对照(非转基因材料); M: DL2000 marker

Figure 3 PCR amplification and PCR-Southern detection of *il-4* transgenic Chinese cabbage

Note: 1: Blank control; 2~8: Positive plants of *il-4*; 9: Positive control; 10: Negative control; M: DL2000 marker

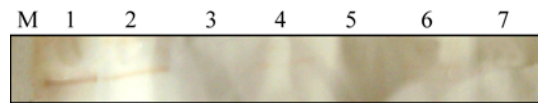


图4 转*il-4*基因大白菜的Western杂交结果
注: M: 蛋白分子量marker; 1: *il-4*标准品; 2~6: 转基因植株; 7: 非转基因材料阴性对照

Figure 4 Western blotting of transgenic Chinese cabbage with *il-4*

Note: M: Protein molecular weight marker; 1: *il-4* standard; 2~6: Transgenic plants; 7: Non-transgenic control

1.5转*il-4*基因大白菜的生长势与抗病性调查

通过田间调查表明, 与非转基因植株相比, 转*il-4*基因阳性大白菜植株的生长势变弱、个体矮小、抗病性下降(图5)。

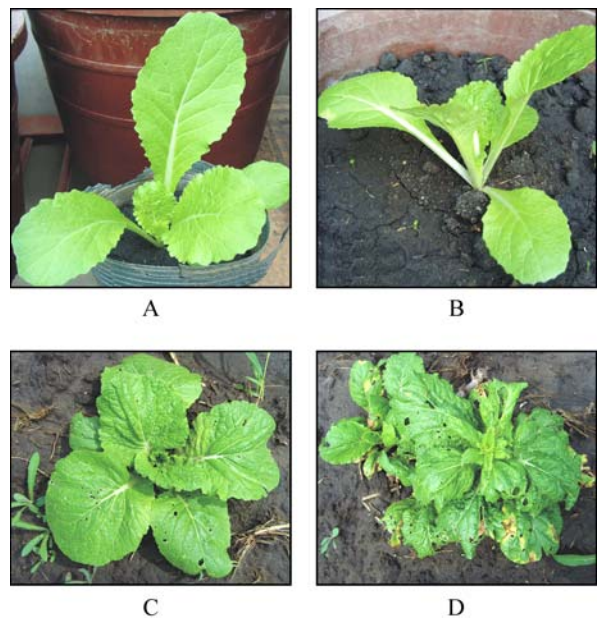


图5 转*il-4*基因大白菜的生长势与抗病性
注: A, C: 阴性对照植株; B, D: *il-4*阳性植株

Figure 5 Growth vigor and disease resistance of transgenic Chinese cabbage with *il-4*

Note: A, C: Negative control plant; B, D: Positive plants of *il-4*

1.6不同转化时机对*il-4*转化率的影响

将哈白二号在花期不同时机授粉的 *il-4* 阳性率进行 χ^2 独立性检验(表 2)。统计结果表明, 在花期进行人工授粉后 24 h 左右进行转化操作(AH)的 *il-4* 转化率显著高于 12 h 左右进行转化操作(BH)。

表2 不同转化处理对阳性率的影响

Table 2 Different treatment combination effects on positive rate

品种 Variety	转化处理组合 Treatment combination	il-4 阳性株数 Numbers of positive plants with il-4	阴性株数 Numbers of negative plants	总数 Numbers of total	阳性率(%) Positive rate of Plants (%)
H2	AH	16	171	187	8.56
H2	BH	2	146	148	1.35
总数 Numbers of total		18	317	335	$\chi^2=8.627$

注: $\chi^2_{1,0.05}=3.841$; $\chi^2_{1,0.01}=6.635$

Note: $\chi^2_{1,0.05}=3.841$; $\chi^2_{1,0.01}=6.63$

1.7 不同品种对il-4转化率的影响

将哈白二号与潍白六号在相同转化处理时期的il-4阳性率统计并进行 χ^2 独立性检验(表3)。结果表

明, 在AH转化处理下, 哈白二号与潍白六号的阳性率差异不显著, 其中哈白二号的阳性率较高, 为8.56%。

表3 不同品种对阳性率的影响

Table 3 Different varieties effects on positive rate

品种 Variety	转化处理组合 Treatment combination	il-4 阳性株数 Numbers of positive plants with il-4	阴性株数 Numbers of negative plants	总数 Numbers of total	阳性率(%) Positive rate of plants (%)
H2	AH	16	171	187	8.56
W6	AH	26	395	421	6.18
总数 Numbers of total		42	566	608	$\chi^2=1.138$

注: $\chi^2_{1,0.05}=3.841$; $\chi^2_{1,0.01}=6.635$

Note: $\chi^2_{1,0.05}=3.841$; $\chi^2_{1,0.01}=6.635$

2 讨论

2.1 关于 *il-4* 基因在大白菜后代传递规律的讨论

在本试验中, T₆代大白菜的 *il-4* 基因分离情况严重偏离 3:1 的孟德尔遗传定律, 很可能是转基因的失活、纯合体致死效应及一些未知的因素, 导致在自交高世代中也往往得不到纯合体或者无法得到纯合体(Budar, 1986)。其次, 外源基因在自交传递过程中的丢失与外源基因不能通过花粉有效传递也可能造成非孟德尔遗传现象, 丢失的原因可能是转育过程中, 由于基因互作, 导致基因片断丢失, 也可能是 *il-4* 基因在转化时未整合到大白菜的基因组中, 在生殖细胞形成过程中, *il-4* 基因可能没有正常分配给雌雄配子, 造成基因丢失(华志华等, 2003; Huaijun, 2005)。

近年来, 转基因工程发展迅速, 许多植物的遗传转化相继获得成功。但也有研究表明, 在高等植物中, 30%的转基因实验都发现了基因沉默现象。引起基因沉默的原因很多, 转基因的拷贝数和构型、在植物上的整合位点、转录水平等都与沉默有关, 外界环境如温度过高、光照过强也会增加基因沉默发生的几率和产生时间(吴迪, 2002)。除此以外, 一些人为因素也可能导致实际观察到的比例值偏低, 如PPT抗性筛选时, 对植株叶面直接喷洒筛选剂的方法简单且易于操作, 但是可能造成敏感植株的死亡, 很难准确揭示遗传规律的真实性。

2.2 *il-4*基因在大白菜后代中表达讨论

外源基因能否在受体植株内表达并最终合成目的蛋白是转基因技术的直接目标。检测整合的基

因是否表达, 通常会用到的方法有定量的ELISA检测及定性的Western杂交等(及晓宇等, 2009)。本试验中对五株PCR-Southern杂交呈阳性的样品进行Western杂交, 结果三株出现杂交条带, 基本证明了*il-4*基因已经成功转入大白菜并表达。其余未出现杂交带的可能是表达量过低所致。IL-4在总可溶性蛋白中的表达量相对较低可能有如下几方面原因: 首先, 细胞中存在大量的蛋白酶, 可能会降解外源基因的表达产物, 从而使目的蛋白不能在植物细胞中有效累积。其次, 本试验中的转基因大白菜是由花粉管通道法介导的遗传转化得到的, *il-4*基因可能整合到异染色质上, 而这些异染色质的转录活性低, 甲基化程度高, 导致*il-4*不能正常表达。最后, 植物对密码子有一定的偏爱性, 本试验中植物表达载体采用35S启动子, 并添加2倍增强子序列, 但*il-4*可能不符合大白菜对密码子的偏爱性, 从而影响IL-4表达量和mRNA的稳定性(Wally et al., 2008)。

2.3关于不同转化处理对IL-4阳性率的影响的讨论

不同转化时机对 *il-4* 转化率有影响, 统计分析显示哈白二号在花期进行人工授粉后 24 小时左右进行转化操作(AH)的 *il-4* 阳性率显著高于 12 小时左右进行的转化操作(BH), 根据花粉管通道法的转化机理, 在花期授粉后 12-24 小时进行转化操作时的转化率差异不大(彭杰, 2004)。本试验中, 哈白二号 BH 处理组合阳性率偏低, 可能是由于 PPT 抗性筛选或 PCR 检测中出现假阴性, 导致阳性个体太少, 转化率偏低。

2.4关于不同品种对il-4转化率影响的讨论

统计分析发现, 在转化处理组合相同且为AH时, 哈白二号的*il-4*阳性率比潍白六号高, 但两个品种差异不显著。原因可能是*il-4*整合到大白菜基因组中没有品种特异性, 在后代的遗传中可能以相似的规律分离(王雷等, 2006)。

2.5关于大白菜自交不亲和性的讨论

自交不亲和现象在被子植物中广泛存在, 特别是十字花科最为普遍, 大白菜为十字花科异花授粉植物, 其原种经多代自交以后, 一般会引起生活力衰退, 表现出生长势差、抗病力减弱、结实率降低等, 这样必然会影响到育种等相关研究。本试验也

基本证实了这一现象: 大白菜自交高世代T₆代阳性率低, 田间调查显示, 与非转基因植株相比, 转*il-4*基因大白菜生长势减弱、植株矮小、抗病性下降。吕俊等利用蛋白激酶抑制剂(槲皮素)和蛋白激酶激活剂(佛波酯)分别对甘蓝自交不亲和系与自交亲和系花蕾进行田间处理, 结果自交不亲和系的自交亲和指数与对照相比有所提高, 甚至转变为自交亲和系(吕俊等, 2001)。除了利用激素等化学方法抑制植物的自交不亲和性外, 一些生物学方法如延迟授粉、染色体加倍等也可以克服自交不亲和性(赵军良, 2006)。

近年来, 随着转基因技术日渐成熟, 利用基因工程技术培育抗虫抗病新品种是将来农业发展的一个重要方向, 建立高效稳定的遗传转化体系对大白菜的品种改良和增强抗虫抗病能力显得尤为重要。另外, 利用大白菜的杂种优势, 对已经检测的转基因阳性植株不同品种、株系间进行杂交, 避免自交衰退, 试图选育出高表达植株, 用于药用蛋白的生产, 这也将是我们今后对转基因大白菜研究的一个趋势。

3 实验材料与方法

3.1 供试材料

供试材料为大白菜三个品种: 哈白二号(代号 H2)、潍白六号(代号 W6)、新世纪(代号 XSJ), 其原种由哈尔滨市农业科学院提供。进行分子检测的材料为经 PPT 筛选的大白菜 T₆ 代自交株系植株幼苗; 携带 *il-4* 基因的大白菜通过花粉管通道法介导转化而来, 转化质粒为 P4IL4, 该质粒的部分图谱见图 6。

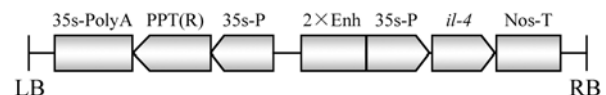


图 6 P4IL4 质粒部分图谱

Figure 6 part of P4IL4 plasmid map

3.2 方法

3.2.1 转 *il-4* 基因大白菜的春化与授粉

将大白菜种子充分湿润后在 25℃ 恒温培养箱中浸种 12 h 左右, 待大部分种子露白时, 将种子用厚毛巾包好放入 4℃ 冰箱中春化处理 30 d。春化处

理时要注意始终保持种子湿润, 但也要注意温度不能过低, 以免冻坏种子, 待大白菜生长至抽薹开花期, 进行人工自交授粉。

3.2.2 转 *il-4* 基因大白菜的 PPT 抗性筛选

待大白菜长出两片真叶时, 用 300 mg/L~350 mg/L 的 PPT(爱诺园草净)喷洒叶面, 并且加入 0.1% 吐温-20 以增加试剂在叶片的附着力。强日照条件下反应 10 d, 淘汰枯黄死亡的植株。

3.2.3 转 *il-4* 基因大白菜基因组 DNA 的制备

以 CTAB 法(凌春莹等, 2005)提取筛选得到的

大白菜 T₆ 代 PPT 抗性植株的基因组 DNA。

3.2.4 转 *il-4* 基因大白菜的 PCR 检测

为了检测模板 DNA 质量, 排除由模板中杂质影响而造成的假阴性结果, 以待测大白菜总 DNA 为模板, 进行内对照 PCR。阳性对照、阴性对照、空白对照分别为 P4IL4 质粒、非转基因大白菜和水。之后对 T₆ 代大白菜进行 *il-4* 基因的 PCR 检测。内对照引物和 *il-4* 基因引物的扩增产物长度分别为 433 bp 和 243 bp。内对照与 *il-4* PCR 的反应体系见表 4, 反应条件见图 7。

表 4 内对照、*il-4* PCR 反应体系

Table 4 PCR reaction system of *rbcl* and *il-4* gene

药品(试剂) Reagent	体积 Volume
10×PCR 缓冲液(TAKARA 产品)	1.0 μL
10×PCR Buffer (TAKARA products)	
dNTP 混合物(各浓度为 2.0 mmol/L, TAKARA 产品)	1.0 μL
dNTP mixture (Each concentration was 2.0 mmol/L, TAKARA products)	
F (上游)引物 (浓度为 20 μmol/L)	0.1 μL
F (Upstream) primer (Concentration 20 μmol/L)	
R (下游)引物(浓度为 20 μmol/L)	0.1 μL
R (Downstream) primer (Concentration 20 μmol/L)	
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.08 μL
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/μL)	
模板 DNA	1.0 μL
Template DNA	
无菌去离子水	补至终体积 10.0 μL
Sterile deionized water	Supplement to a final volume of 10.0 μL

94°C	3 min	} 35个循环 35Cycle
94°C	46 s	
53.5°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
4°C 保温		
4°C Insulation		

图 7 内对照、*il-4* PCR 反应条件

Figure 7 PCR reaction conditions of *rbcl* and *il-4* gene

用 1~1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测结果。将三次均扩增出 *il-4* 基因特异性条带的植株视为阳性株。

3.2.5 转 *il-4* 基因大白菜的 PCR-Southern 杂交

以 PCR 扩增得到的 T₆ 代大白菜 *il-4* 阳性植株的基因组 DNA 为待测样品, 进行 PCR-Southern 杂

交, 对照组的设置与 PCR 检测相同。操作步骤参照《DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I》(Roche 公司)。

3.2.6 转 *il-4* 基因大白菜的 Western 杂交

为了进一步确定 *il-4* 基因在转基因植株中是否表达, 对经 PCR、PCR-Southern 检测的部分 *il-4* 阳性植株进行 Western 杂交。按直接提取法提取转基因大白菜蛋白粗提液, 参照《分子克隆实验指南》对转 *il-4* 基因大白菜进行 Western 杂交(J. 萨姆布鲁克, 1992)。

3.2.7 转 *il-4* 基因大白菜的生长势与抗病性调查

将转 *il-4* 基因大白菜植株和非转基因植株均定

植于哈师大标本园, 常规露地田间管理, 对植株生长势、抗病性进行调查。

3.2.8 试验数据的统计分析

对不同品种、不同转化处理对*il-4*转化率的影
响, 采用 χ^2 独立性检验进行统计分析。

作者贡献

张作青是本研究的实验设计和实验研究的执行人, 并且完成数据分析、论文初稿的写作, 张玮滢参与实验设计试验结果分析, 于丽杰是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 结果分析, 论文写作与修改。全体作者同意并阅读最终的文本。

致谢

本研究由黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力资助计划、黑龙江省自然科学基金(C0014)、哈尔滨市学科后备带头人基金(0071007002)提供资助。

参考文献

Budar F., Thia-Toong L., Van Montagr M., and Hernalsteens J.P., 1986, Agrobacterium-mediated gene transfer results mainly in transgenic plants transmitting T-DNA as a single Mendelian factor, *Genetics*, 114(1): 303-313

Cheng X.H., Dai D.P., Liu F., and Yao L., 2001, True leaf tissue culture and plant regeneration of chinese cabbage, *Zhiwu Shenglixue Tongxun (Plant Physiology Communications)*, 37(4): 310-311 (成细华, 戴大鹏, 刘凡, 姚磊, 2001, 大白菜真叶的组织培养及植株再生, *植物生理学通讯*, 37(4): 310-311)

Devos S., Vissenberg K., Verbelen J.P., and Prinsen E., 2004, Infection of chinese cabbage by *Plasmiodiophora brassicae* leads to a stimulation of plant growth: impacts on cell wall metabolism and hormone balance, *New Phytologist*, 241-249

Hua Z.H., Zhu X.F., Wu G.M., Yu Y.C., Zhao Y., Gao Z.Y., Yan M.X., Qian Q., and Huang D.N., 2003, Inheritance of foreign genes integrated into the rice genomes, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 29(1): 44-48 (华志华, 朱雪峰, 吴明国等, 于彦春, 赵艳, 高振宇, 颜美仙, 钱前, 黄大年, 2003, 水稻转基因整合模式中外源基因的遗传规律, *作物学报*, 29(1): 44-48)

Ji X.Y., Yu L.J., Wang C.L., and Peng H.Y., 2009, Molecular detection and field analysis of transgenic tomato with interleukin-4 gene, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 7(3): 1-5 (及晓宇, 于丽杰, 汪春蕾, 彭洪雨, 2009, 转 *il-4* 基因番茄的分子检测及田间分析,

分子植物育种, 7(3): 1-5)

Li H.M., Rotter D., Bonos S.A., Meyer W.A., and Belanger F.C., 2005, Identification of a gene in the process of being lost from the genus *agrostis*, *Plant Physiology*, 138(4): 2386-2395

Ling C.Y., Yu L.J., and Tao L., 2005, A method of abstracting DNA from transgenic Chinese cabbage, *Mudanjiang Shifan Xueyuan Xuebao (Journal of Mudanjiang Teachers College)*, 2: 19-20 (凌春莹, 于丽杰, 陶雷, 2005, 适于转基因大白菜检测的 DNA 高效提取方法, *牡丹江师范学院学报*, 2: 19-20)

Londo J.P., Bollman M.A., Sagers C.L., Lee E.H., and Watrud L.S., 2011, Changes in fitness-associated traits due to the stacking of transgenic glyph sate resistance and insect resistance in *Brassica napus* L., *Heredity*, 3: 1038-1045

Lu Y.E., Li H.X., and Ye Z.B., 2003, Hormones to promote chinese cabbage TDZ next hypocotyls change after treatment in vitro shoots regeneration effect analysis, *Huazhong Nongye Daxue Xuebao (Journal of Huazhong Agricultural University)*, 22(6): 591-594 (卢永恩, 李汉霞, 叶志彪, 2003, 激素 TDZ 对促进白菜下胚轴不定芽再生的效应分析, *华中农业大学学报*, 22(6): 591-594)

Lv J., Zhu L.Q., and Wang X.J., 2001, Use protein kinase inhibitors and activators regulation cabbage selfing not affinity, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 28(3): 235-239 (吕俊, 朱利泉, 王小佳, 2001, 利用蛋白激酶抑制剂和激活剂调控甘蓝自交不亲和性, *园艺学报*, 28(3): 235-239)

Peng J., 2004, Study on the process of fertilization and its duration of each stage in *Brassica pekinensis*, Thesis for Master Degree, Harbin Normal University, Supervisor: Shen J.H., pp.11-17 (彭杰, 2004, 大白菜受精过程及其各阶段持续时间的研究, 硕士学位论文, 哈尔滨师范大学, 导师: 申家恒, pp.11-17)


Sambrook J., Frisch E.F., and Maniatis T., eds., Jin D.Y., and Li M.F., trans., 1992, *Molecular cloning*, science press, Beijing, China, pp.19-22

Shen S.X., Hou X.L., and Zhang C.H., 2006, Using the isolated microspore culture create Chinese cabbage primary 3 body of research, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 33(6): 1209-1214 (申书兴, 侯喜林, 张成合, 2006, 利用小孢子培养创建大白菜初级三体的研究, *园艺学报*, 33(6): 1209-1214)

Wally O., Jayaraman J., and Punja Z.K., 2008, Comparative expression of β -glucuronidase with five different promoters in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) root and

leaf tissues, *Plant Cell Rep.*, 27(2): 279-287

- Wang L., Yu L.J., Ling C.Y., and Li R.H., 2006, Primary study on transgenic chinese cabbage with Interleukin-4 gene via pollen-tube pathway, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 4(6): 805-810 (王雷, 于丽杰, 凌春莹, 李然红, 2006, 花粉管通道法介导*il-4*基因转化大白菜(*Brassica pekinensis* Rupr.)的研究初探, *分子植物育种*, 4(6): 805-810)
- Wang Y., Cui J.Z., and Li C.L., 2005, High-frequency regeneration system establishment and strategy of chinese cabbage, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 32(4): 701-703 (王洋, 崔继哲, 李翠玲, 2005, 大白菜高频再生体系的建立及策略, *园艺学报*, 32(4): 701-703)
- Wu D., and Zhu Y.M., 2002, The reasons of plant transgenic silence and the countermeasures, *Shengwu Jishu Tongxun (Letters in Biotechnology)*, 13(3): 228-231 (吴迪, 朱延明, 2002, 转基因植物中外源基因沉默机制及防止对策, *生物技术通讯*, 13(3): 228-231)
- Xie J.K., Cui H.R., Shu Q.Y., Xia Y.W., and Shou S.Y., 2001, Cabbage insect-resistant genes into receptor system is established, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 28(2): 175-176 (谢建坤, 崔海瑞, 舒庆尧, 夏英武, 寿森炎, 2001, 白菜抗虫基因转化受体体系的建立, *园艺学报*, 28(2): 175-176)
- Yang G.D., Zhu Z., Li Y.E., Zhu Z.J., Xiao G.F., and Wei X.L., 2002, Chinese cabbage turns modified cowpea pancreatic protein inhibitors genes get insect resistance plants, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 29(3): 224-228 (杨广东, 朱祯, 李燕娥, 朱祝军, 肖桂芳, 魏晓丽, 2002, 大白菜转修饰豇豆胰蛋白酶抑制剂基因获得抗虫植株, *园艺学报*, 29(3): 224-228)
- Zhao J.L., 2006, Improvement of insect-resistance and disease-resistance of chinese cabbage by genetic engineering, Thesis for Dr. Degree, Shanxi University, Supervisor: Liang A.H., pp.20-25 (赵军良, 2006, 基因工程改良大白菜的抗虫抗病性研究, 博士学位论文, 山西大学, 导师: 梁爱华, pp.20-25)



5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>