

抗玉米丝黑穗病转基因株系的分子检测及抗病株系选育

杜建中¹, 孙毅¹, 郝曜山¹, 刘俊玲²

(1. 山西省农业生物技术研究中心, 山西 太原 030031;

2. 清徐县农业局, 山西 清徐 030400)

摘要: 采用花粉介导方法将质粒 pGL II_{RC}1 导入玉米自交系海 92_1 中, 获得了 T₀ 种子 128 粒, 种子经潮霉素抗性筛选得到抗潮霉素植株 16 株。对抗性植株分离的统计分析表明, 多数情况下几丁质酶基因以单拷贝形式导入转基因植株, 后代分离比约为 3:1。抗性苗移栽到大田后, 5~6 叶期取样进行 PCR 扩增、PCR Southern blot 杂交分析, 对 T₁ 的分析结果表明, 几丁质酶基因已导入转基因植物细胞中。对 T₂、T₃ 植株的检测结果显示, 目的基因已整合到转化植株基因组中并可随植株世代稳定遗传。田间抗病鉴定结果表明, 转基因植株及后代的玉米丝黑穗病发病率明显比对照降低。根据分子检测及田间抗病鉴定结果, 得到 GH05024、GH05028 2 个抗丝黑穗病的纯合转基因株系。

关键词: 玉米; 几丁质酶基因; 转基因; 丝黑穗病; 选育

中图分类号: S435.131.4⁺2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)05-0099-06

Molecular Check and Measure of Transgenic Maize Lines Resistancing to Maize Head Smut and Breeding Selection for Transgenic Lines Resistancing to Disease

DU Jian_zhong¹, SUN Yi¹, HAO Yao_shan¹, LIU Jun_ling²

(1. The Agri_Biotechnology Research Center of Shanxi Province, Taiyuan 030031, China;

2. Bureau of Agriculture of Qing_xu County, Qingxu 030400, China)

Abstract: In this study 128 transgenic maize seeds that were obtained from transgenic plants transformed by pollen-mediated approach on maize (*Zea mays* L.) inbred line Hai 92_1, the vector was plasmid pGL II_{RC}1. The result of seeds selected by hygromycin screening had proved that 16 plants was hygromycin-resistant plants. Statistics analysis for the hygromycin-resistant plants suggested that single copy of the chitinase gene was transferred into the cell of majority of T₀ transgenic plants, segregation ratio of the progeny of transgenic plants for hygromycin resistant and susceptible was about 3:1, $P < 0.01$. The results of detecting to T₁ transgenic plants by PCR amplification and PCR Southern blot hybridization showed that chitinase gene was transferred into the cells of transgenic plants. The same methods detected to T₂ and T₃, their results indicated that chitinase gene was integrated into the genome of transgenic plants and stable inheritance in transgenic plants and their progeny. The results of Bioassay for head smut resistance activity indicated that the disease incidence of transgenic plants and their progeny was lower than that of control plants. Based on the results above, GH05024 and GH05028, 2 transgenic maize lines that resisted to maize head smut were obtained by breeding selection.

Key words: Maize; Chitinase gene; Transgene; Maize head smut; Breeding selection

玉米丝黑穗病 (Maize head smut) 是由丝轴黑粉菌 (*Sphacelotheca reiliana*) 浸染玉米而引起的一种重

收稿日期: 2006-05-16

基金项目: 国家“863”计划项目 (2001AA212131)

作者简介: 杜建中 (1960-), 男, 山西芮城人, 副研究员, 主要从事分子生物学研究工作; 孙毅为通讯作者。

要病害, 世界各国均有不同程度发生, 巴西 1995–1996 年种植的玉米感病率为 0.082 % (先锋 3069) 到 46.16 % (Colorado 6255)^[1]。在我国, 这种病害也广泛分布, 病害爆发区或爆发时, 可造成减产 30% ~ 50%, 严重时颗粒无收。仅春玉米区, 每年因丝黑穗病为害就减产玉米 30 万 t 左右。玉米丝黑穗病已成为各国玉米生产的重要病害之一。

用药物防治玉米丝黑穗病由于投入大量的人力、物力以及病原菌对药物产生的适应抗性, 使防治工作非常烦琐和复杂, 加之对环境的严重污染, 已引起各界的极度担忧, 因而使抗病育种工作显得更加迫切和重要。但常规育种工作由于技术及抗病资源缺乏等原因, 虽投入很大, 但收效甚微。

植物基因工程的诞生, 拓宽了植物可利用的基因库, 为创造新种质资源、培育植物新物种开辟了新的技术路线^[2]。自 1986 年 Powell Abel 等首次通过基因工程将烟草花叶病毒(TMV)外壳蛋白基因转入烟草并获得抗 TMV 的烟草植株以来, 植物抗病基因工程取得了很大进展。美国科学家 Broglie K J 等^[3]从菜豆中分离到几丁质酶基因, 并用来转化烟草, 使烟草获得了对真菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的抗性。我国将合成的天蚕抗菌肽基因导入马铃薯, 获得高抗青枯病的转基因株系; 将克隆和修饰的植物源几丁质酶基因和葡萄糖氧化酶基因导入棉花, 获得抗黄萎病和枯萎病的转基因棉花^[4]。郝转芳等^[5]将几丁质酶基因导入玉米, 并认为转基因玉米具有抗真菌病害的效果。

虽然植物抗病基因工程研究在一些作物上取得了相当的成就, 但目前有关用几丁质酶基因转化玉米, 进而对其开展系统的抗病害研究的报道还不多。

本研究采用花粉介导法^[6]成功将几丁质酶基因首次导入玉米自交系海 92_1, 并获得转基因株系。在其后的 3 年中, 通过田间抗病鉴定试验、筛选以及系列的分子检测等系统的工作, 得到了外源基因能稳定遗传、表达、高抗病和农艺性状优良的转基因株系。本研究取得如下成果: 首次运用花粉介导法将植物来源的几丁质酶基因导入玉米自交系海 92_1, 并获得转几丁质酶基因玉米的种子; 通过系统研究, 即通过对转基因植株及其后代进行分子检测、田间抗病鉴定和筛选, 获得了目的基因能稳定遗传、表达且抗病的转基因株系。本研究结果不仅可为抗病转基因工程育种提供抗性资源及科学依据, 而且具有重要的学术价值和重大的实践意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料及抗体来源 玉米自交系海 92_1 因其配合力好, 能抗矮化叶病、青枯病等多种病害, 遗传性稳定等, 目前在生产玉米杂交种时还得到应用, 但因其易感玉米丝黑穗病而使其应用范围受到限制, 造成资源浪费。本研究是以向玉米植株导入几丁质酶基因筛选抗玉米丝黑穗病的转基因株系, 因而选用海 92_1 作本研究的材料, 由山西省农科院作物所段运平提供。抗病鉴定所用病菌采自发病的田间植株, 由山西省农业生物技术研究中心实验室保存。

1.1.2 用作构建几丁质酶基因的质粒 用于转化玉米自交系海 92_1 的质粒是 pGLII-RC_1, 由美国堪萨斯州立大学 S. Muthkrishnan 教授提供, 质粒带有几丁质酶基因和潮霉素基因。质粒 pGLII-RC_1 的物理图谱见图 1。

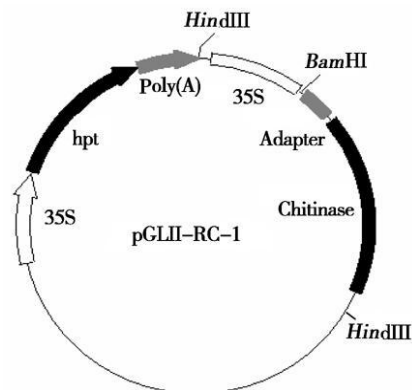


图1 质粒 pGLII-RC_1 的物理图谱

Fig. 1 The physical map of plasmid pGLII-RC_1

1.2 方法

1.2.1 转化方法 海 92_1 种子于 5 月初播种, 7 月上中旬开花。雌穗抽丝前采集约 0.3 g 的新鲜花粉, 与 10 μ g 质粒 DNA 混合于 20 mL 的 5%^[6]蔗糖溶液中(质粒 DNA 与花粉的质量比为 1: 30 000)。在加入质粒 DNA 前后, 用超声波处理含花粉的蔗糖溶液, 参数是: 超声波强度 300 W, 处理 8 次, 每次 5 s, 间隔 10 s^[6]。处理后的花粉授粉于预先用剪刀切剪过的花丝上。收获 T₀ 种子。

1.2.2 抗病株系的选育 将 T₀ 种子通过潮霉素抗性筛选得到的抗性苗移栽到大田, 移栽时用 1% 丝轴黑粉菌菌土覆盖种子, 进行接菌抗病鉴定。于 5 ~ 6 叶期取幼嫩叶片提取植物总 DNA, 以质粒 DNA 为阳性对照, 非转化植株为阴性对照, 进行 PCR 检

测和 PCR_Southern blot 分析。经 PCR 检测、PCR_Southern blot 分析, 含有目的基因(有特异扩增带和特异杂交带)的植株自交授粉, 收获自交 T_1 种子。根据田间抗病鉴定的结果, 选择发病率低的 T_1 种子播种。同时, 对 T_2 植株进行田间抗病鉴定、PCR 检测和 PCR_Southern blot 分析, 根据试验结果, 选择含有目的基因的疑似纯合体和部分其他转基因株系套袋自交, 收获 T_2 种子。再次根据 T_2 田间抗病鉴定结果, 将疑似纯合体和部分发病率低的其他转基因植株种子播种, T_3 植株同样进行抗病鉴定、PCR 检测和 PCR_Southern blot 分析, 为筛选到农艺性状优良、目的基因能稳定遗传和表达的纯合体转基因株系提供依据。

1.2.3 潮霉素抗性筛选 将自交套袋收获的 T_0 种子用 0.1% 氯化汞溶液表面消毒 13 min, 无菌水漂洗 3~5 次, 播种在含潮霉素(15 mg/L)的无菌沙土中发芽。隔一天浇一次含有 15 mg/L 潮霉素的水溶液, 14 d 后观察并记录观察结果。然后将生长健壮、根系良好的植株移栽到大田。

1.2.4 PCR 检测 T_1 , T_2 , T_3 转基因植株以及阴性对照植株, 于 5~6 叶期取幼嫩叶片, 按 CTAB 方法提取植物总 DNA, 同时用碱解法提取质粒 DNA。田间随机取样, 取样量达 20% (取样株数占该株系植株总数的百分数)。PCR 反应体积为 10 μ L, 基因组 DNA 用量为 0.05 μ g。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 0.5 min, 50 $^{\circ}$ C 0.5 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物于 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳分离, 观察扩增结果。

几丁质酶基因的 PCR 检测所用引物编号是 49040/49041, 引物序列分别为 5'-GCTCCACCTCCGATTACTGC-3' 和 5'-GCGTTGCCGTTGTTCTCCTC-3'。由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物扩增出的目标 DNA 带大小为 376 bp。

1.2.5 PCR Southern blot 分析 对照、质粒及 PCR 检测呈阳性的样品的 DNA 提取方法同 1.2.3。按 1.2.3 方法对转基因样品、阳性对照、阴性对照、空白对照进行 PCR 扩增, 扩增完成后, 取少量 5 μ L PCR 反应液于 1% 琼脂糖凝胶上电泳验证扩增结果。然后将剩余 PCR 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 电泳完毕后进行碱变性并将扩增产物转移到尼龙膜上, 与 Dig_dUTP 标记的 Chitinase 基因探针杂交。Chitinase 基因探针制备方法如下: 提取质粒 DNA, 按 1.2.3 中的方法扩增 Chitinase 基因片段作

为探针。不同的是, 在扩增 Chitinase 基因片段时, 按 Dig DNA Labeling and Detection Kit 厂商说明用(Dig)_dUTP 进行标记。转移膜与标记探针杂交, 然后用 CSPD 染色检测杂交结果并做 X 胶片照相。

1.2.6 田间抗病鉴定 山西省农业生物技术研究中心保存的丝轴黑粉菌与土按 1% (w/w) 比例充分混匀, 并均匀覆盖在开沟点种的种子上面, 然后覆土踩实。玉米成熟期调查发病植株数。发病率= 发病植株数/植株总数 \times 100%。以下列标准确定株系的感病程度:

高抗(HR), 病株为 0~5%; 抗病(R), 病株为 6%~15%; 中抗(MR), 病株为 16%~25%; 感病(S), 病株为 26%~40%; 高感(HS), 病株为 >40%。

2 结果与分析

2.1 蔗糖缓冲溶液及超声波处理

由于渗透压原因, 花粉与质粒 DNA 溶液直接混合会导致花粉吸胀爆裂。为维持花粉的完整性并有利于花粉的萌发, 不同植物来源的花粉对溶液中溶质含量有不同要求^[7]。所以既要选择合适的溶质, 又要选择研究材料所需的最佳溶质浓度。

根据 WANG Jing_xue 等^[6] 人的研究结果, 本研究选用 5% 的蔗糖溶液作为自交系海 92_1 的花粉介导转化的处理缓冲液。

超声波处理参数参考 WANG Jing_xue 等^[6] 的研究结果。处理后的花粉授粉于预先用剪刀剪过的花丝上, 成熟期收获 T_0 种子。以此法共处理玉米植株 85 株, 得到 128 粒种子, 为进一步研究提供了材料。

2.2 转化植株的鉴定

2.2.1 潮霉素抗性筛选 用上述方法转化的植株套袋自交, 共收获种子 128 粒。这些种子进行潮霉素抗性筛选, 结果为: 128 粒种子中有 21 粒种子出苗, 未萌发或萌发但很快死亡的种子判定为非转化体。在 21 棵出苗的植株中, 4 株为非绿色苗, 1 株是绿色但根系细弱的苗, 其余 16 株叶片绿色、根系发达的苗。被认为是携带有潮霉素基因和几丁质酶基因的质粒导入玉米植株中。16 株健壮苗移栽到大田, 做进一步研究。对上述结果按一对基因的遗传分离比 3:1 进行统计分析, 结果列于表 1(非转化体除外)。

查 χ^2 表, 自由度为 1 时, $\chi^2 = 2.04$, 统计结果 χ^2 值的 P 为 0.75 ~ 0.25, 说明观察值与理论数间无显

著差异。符合一对基因分离的预期比例。这与林良斌等^[8]在油菜转基因研究中的结果类似。

表 1 潮霉素抗性筛选结果的 χ^2 分析

Tab. 1 χ^2 analysis for the results of hygromycin_resistant test to transgenic maize plants				
性状 Traits	观察值(a) Observed value	理论数(t) Expectable value	a - t	(a - t) ² /t
非正常苗 Unmatural	5	5.25	- 0.25	0.012
正常苗 Natural	16	15.75	0.25	0.004
χ^2				0.016**

注: ** 表示 χ^2 检测结果观察值与理论数之间无显著差异
Notes: ** means that there is no significantly difference between observed value and expectable value

2.2.2 PCR 检测 T_1 植株 PCR 检测的结果为, 16 株材料中有 13 株含有几丁质酶基因的特异扩增条带。 T_2 每个株系取样 10 株, 130 份材料中, PCR 检测结果显示特异扩增带的样品有 118 份, 占取样总量的 90.8%, 其中 10 个样品全为阳性反应的株系占总株系数的 15.4%(2/13)。 T_3 时随机取样 200 份, 其中 PCR 检测结果 195 个样品存在特异扩增条带, 对 T_2 时的 2 个疑似纯合系各取样 10 株, PCR 检测结果都含有特异扩增条带。以上 PCR 检测和潮霉素抗性筛选结果显示, 目的基因和标记基因一起导入到玉米植株中, 并能通过世代遗传下来。而且在第 3 代时外源基因已经稳定, 分离现象不再存在, 即使有个别转基因植株 PCR 检测结果不含有特异扩增条带, 也可能是外源基因在世代传递过程中丢失所致(图 2)。

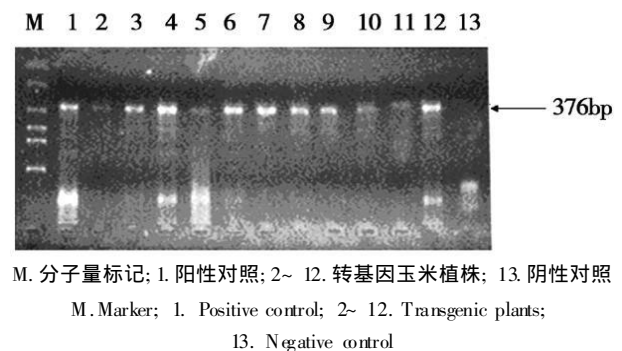


图 2 转基因株系 PCR 检测结果

Fig. 2 The results of transgenic plant detection by PCR

2.2.3 PCR Southern blot 分析 T_1 转基因植株测试植株 13 株, PCR_Southern 分析呈阳性反应的有 9 株; T_2 转基因植株测试植株 48 株, 呈阳性反应的有 43 株; T_3 转基因植株测试植株 48 株, 全部呈阳性反应。

从 PCR_Southern 分析结果来看, 目的基因已整合到植物基因组中并稳定遗传(图 3)。

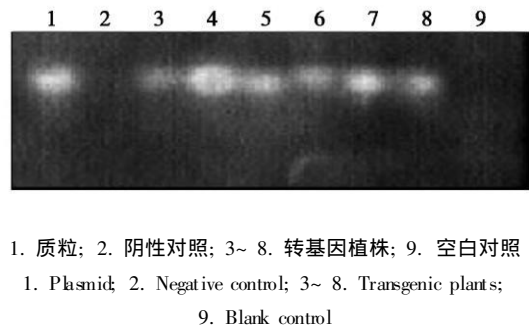


图 3 转基因植株的 PCR_Southern 检测结果
Fig. 3 The result of transgenic plants detected by PCR_Southern analysis

2.3 田间抗病鉴定

大田转基因玉米植株的抗丝黑穗病鉴定结果列于表 2。从表 2 可以看出, T_1 植株中, 抗病植株占总植株数的 49.4%, 其中高抗植株占 10.4%, 所有对照植株皆为高感; T_2 植株中, 抗病植株占总株数的 61.5%, 其中高抗植株占 20.6%, 所有对照均为高感; T_3 植株中, 抗病植株占总株数的 60.2%, 同时相应对照表现为敏感。从转基因植株抗病性比相应对照高这个结果看, 几丁质酶基因的导入确实赋予转基因植物对玉米丝黑穗病的抗性, 说明利用几丁质酶基因转化玉米海 92_1, 通过仔细分析和筛选是可能得到抗玉米丝黑穗病的转基因后代植株的。同时我们还发现, 一些经分子检测证实为转基因植株的材料, 田间抗病鉴定的结果却不抗病, 如 GH202, GH208 等株系, 分子检测结果, 目的基因已经导入并得到整合, 但却属于丝黑穗病敏感材料, 其可能的原因将在讨论中叙述。

2.4 抗病株系的选育

根据分子检测、田间抗病鉴定的结果以及转基因植株的农艺性状, 2002 年, 我们从 14 个转几丁质酶基因的海 92_1 株系中获得了 3 个抗性比对照降低 30% 的转基因株系为 GH 02004, GH 02005 和 GH 02006。从 2003 年开始连续 3 代选择得到 2 个抗玉米丝黑穗病的玉米品系为 GH 05024 和 GH 05028。其选育过程如下: 2003 年播种这 3 个转基因株系, 经抗病鉴定和分子检测得到 11 个优良株系, 结合农艺性状的筛选, 最后得到 GH 03028 和 GH 03029 等 2 个优良株系。2004 年播种这 2 个株系, 经抗病鉴定、分子检测和农艺性状筛选, 得到 GH 04032, GH 04035 和 GH 04051 等 3 个优良株系; 2005 年对这 3 个株系进一步筛选, 最后得到 2 个高抗玉米丝黑

穗病的转基因品系 GH 05024 和 GH 05028。其玉米丝黑穗病的发病率均为 0, 其中 GH 05028 连续 2 年发病率为 0。这 2 个转基因株系的抗病性比对照提高 3~ 4 级。

在筛选过程中, 对转基因植株, 除抗病鉴定和分子检测外, 我们还考虑到以下几个农艺性状: 穗长、穗位和株高等。其中转基因株系的穗长比对照增加 20% 以上, 株高和穗位高也比对照植株略有增加。

表 2 转基因玉米植株抗丝黑穗鉴定结果

Tab. 2 The disease resistant result of transgenic maize plants

代数 Number of generation	样品编号 Number of samples	总植株数 Total number of plants	发病率(%) Incidence of disease	对照平均发病率(%) Average disease incidence of ck	发病率比对照降低(%) Reduction of disease incidence compaed to ck	抗病等级 Grade of disease resistant activity of transgenic plants	对照抗性 Disease resistant activity of ck
T ₁	GH001	43	0	56.5	56.5	HR	HS
	GH002	40	32.5	56.5	24.0	S	HS
	GH003	41	9.8	56.5	46.7	R	HS
	GH004	45	35.6	56.5	20.9	S	HS
	GH005	41	12.4	56.5	44.1	R	HS
	GH006	43	37.2	56.5	19.3	S	HS
	GH007	38	13.2	56.5	43.3	R	HS
	GH008	42	26.2	56.5	29.3	S	HS
	GH009	40	15.0	56.5	41.5	R	HS
	GH010	42	33.3	56.5	23.2	S	HS
T ₂	GH101	45	28.5	53.3	24.8	S	HS
	GH102	43	0	53.3	53.3	HR	HS
	GH103	37	29.8	53.3	23.5	S	HS
	GH104	41	17.0	53.3	36.3	R	HS
	GH105	41	16.6	53.3	36.7	MR	HS
	GH106	39	28.2	53.3	25.1	S	HS
	GH107	41	7.3	53.3	46.0	R	HS
	GH108	40	27.5	53.3	25.8	S	HS
	GH109	48	6.3	53.3	47.0	R	HS
	GH110	43	0	53.3	53.3	HR	HS
T ₃	GH201	36	22.2	39.4	39.4	R	S
	GH202	33	36.4	39.4	3.0	S	S
	GH203	42	0.4	39.4	39.0	HR	S
	GH204	40	10.0	39.4	29.4	R	S
	GH205	41	29.4	39.4	10.0	S	S
	GH206	39	2.6	39.4	36.8	HR	S
	GH207	41	17.0	39.4	22.4	MR	S
	GH208	42	35.7	39.4	3.7	S	S
	GH209	39	15.4	39.4	24.0	MR	S
	GH210	41	26.8	39.4	12.6	S	S

3 讨论

植物基因工程技术是常规育种技术的技术后盾, 两者紧密结合才能体现出植物基因工程技术的先进性和创新性^[9]。目前转基因技术在 120 多种植物上获得成功, 有 3 000 多种例转基因植物进入田间试验阶段^[10]。植物的转化首先是高效遗传转化体系的建立, 本研究所选用的花粉介导方法, 其转化率还是比较高的, 达 5% 左右。其次是针对某个性状选择目的基因进行转化, 最后是转化植株的鉴定及后代植株的选育。

本研究成功地将几丁质酶基因导入玉米自交

系, 获得转基因植株, 并通过系列分子检测手段和田间抗病鉴定, 选育出了外源基因可高效表达、稳定遗传、抗病性能好、农艺性状优良的转基因株系。应该肯定的是, 应用植物基因工程技术可获得期望效能的转基因植株。但研究过程中也发现, 虽然外源基因导入玉米植株, 其后代 PCR 检测结果有 90% 以上转基因植株存在特异扩增条带, 但田间抗病鉴定结果显示, 不同转基因植株间, 抗病能力存在较大差异。这种结果在其他一些转基因植物中也可观察到^[11, 12]。总体印象是, 经分子检测部分带有外源基因、甚至外源基因已经整合到转基因植株的染色体上的转基因植株, 外源基因却不表达。造成这种现

象的原因可能与外源基因整合位点与整合后的修饰有关^[13]。Matzke J M 等^[14]和 Diegue M J 等^[15]研究表明,胞嘧啶甲基化导致外源基因在转基因植株中沉默(Gene silence),这是不同转化株系间外源基因表达差异的原因之一。本研究中,3 年的连续检测结果证明外源基因在传递过程中也可能存在此类甲基化现象。如果外源基因不表达,就会出现外源基因导入且整合但转化植株不具备目的基因效能的情况。转基因植株只有在证明其所转化目的基因得到稳定表达,才能具备目的基因的效能,而且研究证明这种效能与目的基因的表达量显著相关。当然病原菌在这个过程中的适应变异也是可能的。总之,转基因植株所表现出的抗病与否,情况是复杂的,不过近来科学家已经发现外源基因在受体植物中失活(Inactivation)的机制有多种,并提出了解决此类问题的对应策略^[10]。

有关海 92_1 转基因植株在世代传递过程中的丢失、沉默或者修饰问题,以及对转基因植株感染丝黑穗病菌的早期鉴定还需做进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] 王振华,姜艳喜,王立丰,等. 玉米丝黑穗病的研究进展[J]. 玉米科学, 2002, 10(4): 61– 64.
- [2] 侯文邦,朱文文,马占强. 植物基因工程在作物育种中的应用与展望[J]. 中国农学通讯, 2005, 21(1): 128– 132.
- [3] Broglie K J, Chet L, Holliday M, *et al.* Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia*[J]. American Association for the Advancement of Science, 1991, 254(5035): 1194– 1197.
- [4] 杨崇良,路兴波,张君亭. 世界农业转基因生物、产品研发及其安全性监管[J]. 山东农业科学, 2005, (2): 66– 68.
- [5] 郝转芳,毛 雪,李润植. 转基因改良植物抗真菌病害的策略及其进展[J]. 生物技术通报, 2001, (6): 9– 11.
- [6] WANG Jing_xue, SUN Yi, CUI Guimei, *et al.* Transgenic maize plants obtained by pollen-mediated transformation[J]. Acta Botanica Sinica, 2001, 43(3): 275– 279.
- [7] 胡适宜. 植物胚胎学实验方法(一): 花粉生活力的测定[J]. 植物学通报, 1993, 10(2): 60– 62.
- [8] 林良斌,官春云,周小云,等. 转基因抗虫油菜中 Bt 杀虫蛋白基因稳定遗传和高效表达及抗虫性研究[J]. 作物学报, 2002, 28(2): 175– 178.
- [9] 杨立国,石太渊,林 风,等. 生物技术在玉米育种中的应用[J]. 辽宁农业科学, 2000, (4): 28– 29.
- [10] Maliga P, Graham I. Plants biotechnology: Molecular farming and metabolic engineering promise a new generation of high-tech crops[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2004, 7(2): 149– 153.
- [11] LI X B, Mao H Z, BAI Y Y. Transgenic plants of rutabgzg (*Brassica Napobrassica*) tolerant to pest insects[J]. Plant Cell Reports, 1995, 15(1– 2): 97– 101.
- [12] 毛慧珠,唐 惕,曹湘玲,等. 抗虫转基因甘蓝及后代的研究[J]. 中国科学, C 辑: 生命科学, 1996, 26(4): 339– 347.
- [13] 李学宝,秦明辉,施荣华,等. 芥菜型油菜抗虫转基因植株及其后代株系的研究[J]. 生物工程学报, 15(4): 482– 488.
- [14] Matzke J M, Matzke A M. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes[J]. Current Opinion in Plant Biology, 1998, 1(2): 142– 148.
- [15] Diegue M J, Vaucheret H, Paszkowski H J, *et al.* Cytosine methylation at CG and CNG sites is not a prerequisite for the initiation of transcriptional gene silencing in plants, but it is required for its maintenance[J]. Molecular & General Genetics, 1998, 259(2): 207– 215.