

# 抗虫相关基因 *KTI* 对青花菜的转化及其对小菜蛾抗性的分析

江汉民<sup>1</sup>, 宋文芹<sup>2</sup>, 刘莉莉<sup>1</sup>, 文正华<sup>1</sup>, 姚星伟<sup>1</sup>, 单晓政<sup>1</sup>, 孙德岭<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>天津科润蔬菜研究所, 天津 300384; <sup>2</sup>南开大学生命科学学院, 天津 300071)

**摘要:** 以青花菜 (*Brassica oleracea* L. ssp. *italica*) 下胚轴为外植体, 通过农杆菌介导的遗传转化方法将来源于杨树的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 (*KTI*) 基因导入青花菜品系 ‘09LR-11’ 中, 获得 13 株卡那霉素抗性植株。以 *KTI* 特异引物对转基因植株进行 PCR 检测, 其中 8 株为 *KTI* 阳性植株。Southern blot 分析进一步表明, 基因 *KTI* 已成功整合到青花菜基因组中。RT-PCR 检测表明, *KTI* 在转基因青花菜中已成功表达。通过室内叶片离体试验和田间观察, 初步证明转 *KTI* 青花菜对小菜蛾幼虫具有一定抗性。

**关键词:** 青花菜; *KTI* 基因; 小菜蛾; 抗性; 转基因

**中图分类号:** S 635

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2013) 03-0498-07

## Transformation of Broccoli with *KTI* Gene and the Bioassay for Diamondback Moth Resistance

JIANG Han-min<sup>1</sup>, SONG Wen-qin<sup>2</sup>, LIU Li-li<sup>1</sup>, WEN Zheng-hua<sup>1</sup>, YAO Xing-wei<sup>1</sup>, SHAN Xiao-zheng<sup>1</sup>, and SUN De-ling<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>Tianjin Kernel Vegetable Research Institute, Tianjin 300384, China; <sup>2</sup>College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** *KTI* gene was transformed into broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *italica*) genome via *Agrobacterium* mediated transformation method using broccoli lines ‘09LR-11’ as explants. Thirteen kanamycin resistant broccoli plants were obtained. PCR analysis with primers specific to *KTI* gene identified 8 *KTI* positive plants. Southern blotting analysis with *KTI* gene as probes showed that the *KTI* gene was integrated into broccoli genome. RT-PCR analysis indicated that the *KTI* gene was expressed in transgenic broccoli. Both laboratory and field tests proved that the transgenic broccoli plants were resistant to diamondback moth (*Plutella xylostella* larvae).

**Key words:** broccoli; *KTI* gene; *Plutella xylostella* larvae; insect resistance; genetic transformation

青花菜 (*Brassica oleracea* L. ssp. *italica*) 在生长及结球期间极易遭受十字花科常见害虫, 如菜粉蝶、小菜蛾、以及夜蛾类害虫等的危害, 严重影响其产量和品质 (吕玲玲, 2003; 王兆玉, 2005)。培育抗虫新品种在害虫防治中被寄予厚望。现代分子生物学特别是基因工程的迅猛发展, 为作物抗

收稿日期: 2012-11-01; 修回日期: 2013-02-04

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-25-A-13); 天津市科技支撑计划重点项目 (11ZCKFNC00600)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: cauliflower01@163.com)

性育种开辟了一条崭新而有效的途径。其中, 植物蛋白酶抑制剂 (PI) 是广泛存在于植物界的一类天然抗虫物质, 其具有抗虫谱广, 对人、畜无副作用等优点, 与抗虫基因工程关系最为密切 (王关林和方宏筠, 2002)。然而, 目前用于抗虫研究的蛋白酶抑制剂基因多分离自农作物中, 豆科、禾本科、茄科以外物种的植物蛋白酶抑制剂研究开展较晚, 报道尚不多见。在十字花科蔬菜的研究上, 国内外仍停留在利用少数几个功能明确、研究比较深入的蛋白酶抑制剂进行转化。随着已有基因应用范围的不断扩大, 经过长期的定向选择作用, 这些基因均在不同程度上引发了害虫的耐受性, 使杀虫效果大大降低。研究表明, Kunitz 型丝氨酸胰蛋白酶抑制剂 (KTI) 可抑制昆虫消化道内蛋白酶的活性, 阻碍昆虫对蛋白质的消化吸收, 对鳞翅目昆虫有较强的抑制作用 (林春晶 等, 2003; McManus et al., 2005; Macedo et al., 2011)。为此, 本研究中将来源于杨树的 Kunitz 型丝氨酸胰蛋白酶抑制剂基因 (Kunitz-type trypsin inhibitors, *KTI*) 导入青花菜, 期望获得抗虫的青花菜材料, 为青花菜抗虫育种提供新的资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验于 2010—2012 年在天津科润蔬菜研究所进行。受体材料是以小孢子培养获得的青花菜品系 ‘09LR-11’ 萌发 4~5 d 的无菌苗的下胚轴。含杨树 *KTI* 基因的植物表达载体 pX6-KTI 由本研究室构建, 其含有人工合成的 G10-90 启动子、*KTI* 目的基因和 *NPTII* 抗性标记基因。根癌农杆菌 LBA4404 由本研究室保存。

### 1.2 农杆菌介导的遗传转化

外植体的准备: 青花菜种子用含 Tween-20 的自来水震荡漂洗 30 min, 75%酒精表面消毒 1 min, 2%次氯酸钠漂洗 15 min, 无菌水漂洗 3 次, 接种于种子萌发培养基 (1/2 MS 培养基 + 0.3% 琼脂, pH 5.8) 上, 28 °C (16 h 光/8 h 暗) 培养。取播种后 4~5 d 苗龄的下胚轴, 无菌条件下切成长 0.2~0.3 cm 长的小段, 预培养基 (MS + 0.5%琼脂 + 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg · L<sup>-1</sup> NAA, pH 5.8) 中培养 2 d, 使其调整生长状态。

工程菌液的制备: 挑取含质粒 pX6-KTI 的农杆菌单菌落接种于含卡那霉素 (Kan)、链霉素 (Str) 和利福平 (Rif) 的 YEB 液体培养基中, 28 °C 振荡培养, OD<sub>600</sub> = 0.6~0.8 时, 按照 1:100 的比例将菌液接种到 100 mL 新鲜 YEB 培养基中进行扩大培养。当 OD<sub>600</sub> 再次达到 0.6~0.8 时, 于 4 °C, 5 000 r · min<sup>-1</sup>, 离心 10 min 收集菌体, 于添加 100 μmol · L<sup>-1</sup> 乙酰丁香酮的 MS 液体培养基 (pH 5.8) 中重悬菌体, 并调节 OD<sub>600</sub> 至 0.2~0.3, 侵染备用。

遗传转化及筛选: 取在预培养基上培养 2 d 的下胚轴, 将其浸入用 MS 液悬浮稀释的农杆菌悬浮液中室温下不断摇动, 使外植体与菌液充分接触 2 min。取出后, 用无菌滤纸吸去表面多余的菌液, 然后分别放入共培养培养基 (MS + 0.5%琼脂 + 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg · L<sup>-1</sup> NAA, pH 5.8) 中, 25 °C 暗培养 2~3 d, 将外植体用无菌水洗涤后转入脱菌培养基 (MS + 0.5%琼脂 + 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg · L<sup>-1</sup> NAA + 100 mg · L<sup>-1</sup> Cef, pH 5.8) 中培养 10 d, 将脱菌培养后明显分化的下胚轴转移至含有卡那霉素的筛选培养基 (MS + 0.5%琼脂 + 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg · L<sup>-1</sup> NAA + 100 mg · L<sup>-1</sup> Cef + 20 mg · L<sup>-1</sup> Kan, pH 5.8) 上筛选抗性再生芽。待抗性芽长度达到 1.5 cm 左右时从外植体上切下, 植入生根培养基 (MS + 0.5%琼脂, pH 5.8)。选取根系生长较发达的植株炼苗 1~3 d 后移栽到营养土中, 温室中继续培养。以同样培养条件下未经农杆菌转化的植株作为阴性对照。

### 1.3 转基因植株的分子生物学检测

PCR 检测: CTAB 法提取卡那霉素抗性青花菜植株基因组 DNA, 以其为模板进行 PCR 扩增。根据 *KTI* 设计 PCR 扩增引物, 其上游序列为 KTI-F: 5'-AGGGCTCTCTTCCTTCTCTTTG-3' 下游序列为 KTI-R: 5'-CATCGGTGGATTCTGTAAGTGGT-3'。PCR 反应条件为: 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 重复 30 个循环。反应结束后, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。同时以未转化青花菜 DNA 的 PCR 产物为阴性对照, 质粒 pX6-KTI 的 PCR 产物为阳性对照。

Southern blot 杂交检测: 为进一步验证 PCR 检测结果的可靠性, 将 PCR 检测呈阳性的抗性苗总 DNA 用 *Hind*III 完全酶切, 将产物转移到尼龙膜上与以 DIG 标记的 *KTI* 的特异性探针进行杂交。探针标记、预杂交、杂交以及信号检测等操作按杂交试剂盒 (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Roche Diagnostics Co.) 说明书进行, 同时设置非转化植株的阴性对照和质粒阳性对照。

RT-PCR 检测: Trizol 法提取 Southern 检测呈阳性的转基因植株总 RNA, 参照 M-MLV 反转录试剂盒 (Promega) 的说明进行 cDNA 第一链的合成。以反转录合成的 cDNA 为模板, 以引物 KTI-F 和 KTI-R 扩增 *KTI* 基因的特异序列。以青花菜  $\beta$ -*Actin* 基因的保守区域为内对照, 引物序列分别为 Actin-F: 5'-CATTCAACCAATCGTCTGT-3'; Actin-R: 5'-CTCTTGGACTGTGCTTCGT-3'。*KTI* 引物预扩增片段大小为 272 bp,  $\beta$ -*Actin* 引物的预扩增片段大小为 115 bp。RT-PCR 扩增条件与 PCR 检测中的相同。同时设置非转化植株作为阴性对照, 含有目的基因的质粒作为阳性对照, 进行 RT-PCR 分析。阳性植株用  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 17- $\beta$ -甾二醇对转化幼苗进行诱导, 得到无选择标记的转基因幼苗。

### 1.4 转基因植株的抗虫性测定

人工接虫鉴定: 取小菜蛾幼虫置于部分转基因植株的叶片上, 每片叶接 7 头小菜蛾 2 龄幼虫, 3 次重复, 2 d 后调查叶片受害程度, 每天观察幼虫的取食与存活状况。以未转基因植株的叶片饲喂害虫做对照。

田间自然发生鉴定: 青花菜整个生育期间不喷施防治鳞翅目害虫的农药, 通过调查青花菜的受害程度评价其小菜蛾的抗性程度。

## 2 结果与分析

### 2.1 转基因植株的获得

将培养 4~5 d 的青花菜下胚轴作为农杆菌侵染的受体, 转化后转至含卡那霉素  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的筛选培养基上, 大约 1 周左右, 外植体边缘开始有绿色芽点生成, 继续培养, 非转基因植株变为紫红色, 而转基因植株继续保持绿色, 将抗性芽转移至生根培养基中, 生根后的植株转入营养土中炼苗培养。共获得独立的抗卡那霉素转基因青花菜再生植株 13 株, 这些再生植株移栽至大田后, 表型与非转基因对照植株相比没有明显的性状改变。

### 2.2 转基因植株的 PCR 检测

以抗性植株、非转化植株 DNA 为模板, 使用 *KTI* 特异引物进行 PCR 扩增。PCR 产物电泳检测结果表明, 13 株抗性株中有 8 株得到了 272 bp 的特异带, 与阳性对照质粒 pX6-KTI 的扩增结果一致, 表明外源基因已经整合到这些青花菜的基因组 DNA 中, 而未转化的植株 (阴性对照) 没有产生任何条带 (图 1)。

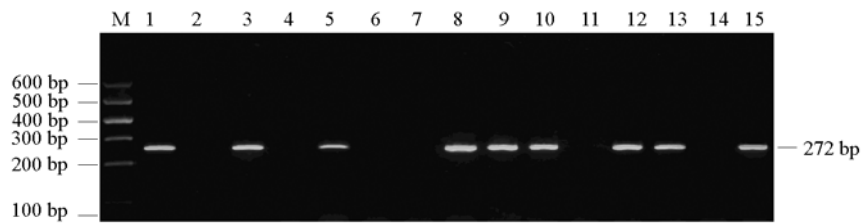


图1 转基因青花菜植株的 PCR 检测

M: DNA 分子量标准; 1: 阳性对照 (质粒); 2: 阴性对照 (非转化植株); 3~15: 抗性植株。

Fig. 1 PCR identification of transgenic broccoli plants

M: DNA marker; 1: Positive control (plasmid); 2: Negative control (nontransgenic plant);  
3 - 15: Resistant plants.

### 2.3 转基因植株的 Southern blot 检测

对 PCR 检测呈阳性的植株进行 Southern blot 分子检测, 结果表明, PCR 检测呈阳性的转化植株全部测出特异性杂交信号, 而非转化对照基因组中未出现任何杂交信号, 说明外源基因已整合到青花菜基因组中 (图 2)。

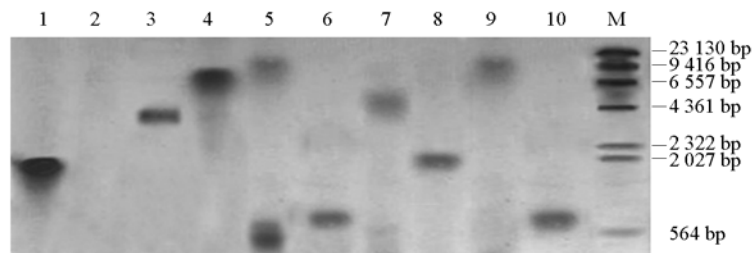


图2 转基因植株的 Southern blot 检测

1: 阳性对照 (质粒); 2: 阴性对照 (非转化植株); 3~10: PCR 检测阳性的植株; M:  $\lambda$  DNA/*Hind*III 分子量标准。

Fig. 2 Southern blot identification on transgenic plants

1: Positive control (plasmid); 2: Negative control (nontransgenic plant); 3 - 10: PCR positive plants;  
M:  $\lambda$  DNA/*Hind*III digestion.

### 2.4 转基因植株的 RT-PCR 分析

以 Southern blot 检测为阳性的植株和非转化植株 cDNA 为模板进行 *KTI* 和  $\beta$ -*Actin* 基因的 RT-PCR 扩增, 结果显示, 非转化植株和转化植株样品中均可检测到  $\beta$ -*Actin* 基因的表达, 而转基因植株还产生了与阳性对照大小一致的目的条带, 说明目的基因在转基因植株内已成功表达 (图 3)。

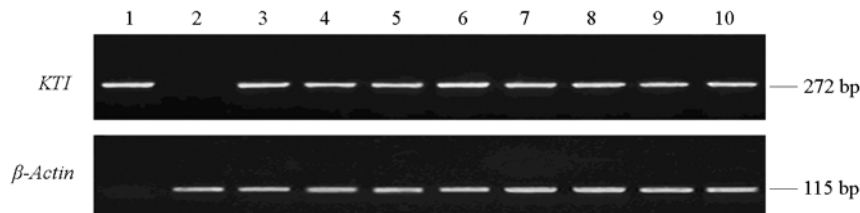


图3 *KTI* 基因的 RT-PCR 检测

1: 阳性对照 (质粒); 2: 非转基因植株; 3~10: 转基因植株。

Fig. 3 RT-PCR identification of *KTI* gene

1: Positive control (plasmid); 2: Nontransgenic plant; 3 - 10: Transgenic plants.

## 2.5 转基因植株的抗虫性检测

用转基因植株各株系的离体叶片饲喂小菜蛾幼虫, 结果表明, 转基因青花菜对小菜蛾幼虫有一定抗性。饲喂小菜蛾幼虫 2 d 后, 转基因植株叶片与非转基因对照相比, 被危害程度明显较轻 (图 4), 说明转基因植株叶片对小菜蛾的取食活动有明显抑制作用。转基因植株饲喂的幼虫与对照相比活动减缓, 体重增加缓慢, 转基因植株离体叶片饲喂的小菜蛾校正死亡率在 9.20%~26.08% (表 1)。未被杀死的幼虫生长发育受到一定的抑制, 后期化蛹比对照迟 3~4 d。

将获得的转基因植株和对照植株定植于田间, 常规肥水管理, 在不喷施防治鳞翅目害虫农药的情况下, 转基因青花菜被取食程度明显比未转基因对照植株轻 (图 5)。

上述结果表明 *KTI* 转基因青花菜对小菜蛾幼虫具有明显的抗性。



图 4 转 *KTI* 基因青花菜离体叶片对小菜蛾抗性分析  
Fig. 4 Resistance of *KTI* transgenic broccoli to *Plutella xylostella* larvae



图 5 转基因青花菜田间抗虫鉴定  
Fig. 5 Resistance analysis of the transgenic broccoli to *Plutella xylostella* larvae in the field

表 1 青花菜转基因植株离体叶片对小菜蛾的抗性分析

Table 1 Resistance evaluating of *in vitro* leaves from transgenic broccoli to *Plutella xylostella* larvae

转基因株系 Transgenic line	校正死亡率/% Corrected mortality	平均单虫质量/mg Weight of larva	叶片损伤程度 Degree of leaf area damaged
Wt		5.61 ± 0.533 a	+++++
QZ-1	17.82	3.64 ± 0.348 c	+++
QZ-2	19.21	3.90 ± 0.542 bc	++
QZ-3	14.32	4.28 ± 0.387 bc	++
QZ-4	26.08	3.56 ± 0.272 c	+
QZ-5	24.50	4.11 ± 0.238 bc	+
QZ-6	9.20	4.26 ± 0.304 bc	++++
QZ-7	14.75	4.65 ± 0.499 b	++++
QZ-8	19.98	4.14 ± 0.317 bc	++

注: a、b、和 c 表示邓肯氏新复极差法检测差异显著 ( $P < 0.05$ )。+ 表示叶片被咬食的程度, + 越多表示被咬食越严重。

Note: a, b and c indicate statistically significant difference at 0.01 level; + indicates the leaf area damage. The more + indicate that the leaf area damage are more serious.

### 3 讨论

随着转基因技术在农业上的广泛运用和人们认识的不断深入, 越来越多的科研工作者致力于分子抗性育种的研究, 大量植物抗虫相关基因已被分离和克隆, 来自木本植物的抗虫基因也开始受到重视 (Haruta et al., 2001; Major & Coustabel, 2008)。其中, Kunitz 型丝氨酸胰蛋白酶抑制剂基因被认为对鳞翅目昆虫具有一定的抗性 (Bradshaw et al., 1989; Hollick & Gordon, 1993, 1995; Tuskan et al., 2006)。迄今为止, 已从数十种植物中分离出 Kunitz 型丝氨酸胰蛋白酶抑制剂基因 (Ryan et al., 1998; Stuart et al., 2003)。KTI 通过影响昆虫对蛋白质的消化吸收, 抑制昆虫的生长发育, 从而使转基因植物对害虫表现出一定的抗性 (McManus et al., 2005; 罗玉娇 等, 2012)。本试验中通过农杆菌介导的青花菜遗传转化体系, 成功获得了转 *KTI* 基因的青花菜植株, 从分子水平上证明 *KTI* 基因已经整合到青花菜基因组中, 且在 RNA 水平上得到了表达; 抗虫性试验结果表明, 转 *KTI* 基因青花菜不仅遭受虫害的症状较轻, 而且对小菜蛾幼虫的生长发育有明显的抑制作用, 说明转基因植株对小菜蛾具有一定的抗性。

本试验中所获得的 8 个青花菜转基因株系对小菜蛾的抗性存在一定的差异, 可能是由于目的基因整合位点的随机性或拷贝数不同, 导致 *KTI* 的表达量不同。虽然所得到的转 *KTI* 青花菜对取食小菜蛾幼虫的校正死亡率不高, 但可导致其生长发育缓慢, 从而控制害虫的繁殖速度, 降低种群数量。而且有研究认为, 这样可以延缓对害虫的筛选压力, 使之不易产生耐受性, 对保护生态环境及保障人类健康具有重要的现实意义 (Yeh et al., 1997)。

本试验初步获得对小菜蛾有一定抗性的转 *KTI* 的青花菜植株, 为选育新一代绿色环保型青花菜新品种提供了新的材料和方法, 由于外源基因在受体基因组中插入位点具有随机性, *KTI* 在后代中遗传稳定性以及对青花菜品质的影响还有待于进一步的研究。

### References

- Bradshaw H D, Jr Hollick J B, Parsons T, Clarke H R G, Gordon M P. 1989. Systemically wound-responsive genes in poplar trees encode proteins similar to sweet potato sporamins and legume Kunitz trypsin inhibitors. *Plant Mol Biol*, 14 (1): 51 - 59.
- Haruta M, Major I T, Christopher M E, Patton J J, Constabel C P. 2001. A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): Cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. *Plant Molecular Biology*, 46 (3): 347 - 359.
- Hollick J B, Gordon M P. 1993. A poplar tree proteinase inhibitor-like gene promoter is responsive to wounding in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology*, 22 (4): 561 - 572.
- Hollick J B, Gordon M P. 1995. Transgenic analysis of a hybrid poplar wound-inducible promoter reveals developmental expression similar to that of

- storage protein genes. *Plant Physiology*, 109 (1): 73 - 85.
- Lin Chun-jing, Lin Xiu-feng, Dong Ying-shan, He Hong-xia, Jiang Jian. 2003. *Tid* gene transformation rice plants and the plants insect-resistant. *High Technology Letters*, 13 (5): 46 - 48. (in Chinese)
- 林春晶, 林秀峰, 董英山, 贺红霞, 姜 健. 2003. *Tid* 基因对水稻的转化及转基因植株的抗虫性. *高技术通讯*, 13 (5): 46 - 48.
- Luo Yu-jiao, Li Bin, Shu Heng-ping, Jiang Li-ping. 2012. Research advances in Kunitz trypsin inhibitor. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 33 (3): 316 - 319. (in Chinese)
- 罗玉娇, 李 滨, 舒衡平, 蒋立平. 2012. Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂的进展. *中国生化药物杂志*, 33 (3): 316 - 319.
- Lü Ling-ling. 2003. Study on transformation of cowpea trypsin inhibitor gene into cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) [M. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest University. (in Chinese)
- 吕玲玲. 2003. 豇豆胰蛋白酶抑制剂 *CpTI* 基因转化花椰菜的研究[硕士论文]. 重庆: 西南大学.
- Macedo M L, Freire M G, Franco O L, Migliolo L, de Oliveira C F. 2011. Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 158 (2): 164 - 172.
- Major I T, Constabel C P. 2008. Functional analysis of the Kunitz trypsin inhibitor family in poplar reveals biochemical diversity and multiplicity in defense against herbivores. *Plant Physiology*, 146 (3): 888 - 903.
- McManus M T, Laing W A, Watson L M, Markwick N, Voisey C R, White D W R. 2005. Expression of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor in leaves of white clover (*Trifolium repens* L). *Plant Science*, 168 (5): 1211 - 1220.
- Ryan S N, Laing W A, McManus M T. 1998. A cysteine proteinase inhibitor purified from apple fruit. *Phytochemistry*, 49 (4): 957 - 963.
- Stuart N, Michael T M, William A L. 2003. Identification and characterisation of proteinase inhibitors and their genes from seeds of apple (*Malus domestica*). *Journal of Biochemistry*, 134 (1): 31 - 42.
- Tuskan G A, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao R R, Bhalerao R P, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen G L, Cooper D, Coutinho P M, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroev S, Déjardin A, Depamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjärvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leplé JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson D R, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouzé P, Ryabov D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai C J, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D. 2006. The genome of black cottonwood *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313 (5793): 1596 - 1604.
- Wang Guan-lin, Fang Hong-jun. 2002. *Plant genetic engineering*. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 王关林, 方宏筠. 2002. *植物基因工程*. 北京: 科学出版社.
- Wang Zhao-yu. 2005. Enhancement of resistance to pests and disease by introducing snowdrop lectin gene (*GNA*) in maize elite inbred lines via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation [Ph. D. Dissertation]. Ji'nan: Shandong University. (in Chinese)
- 王兆玉. 2005. 农杆菌介导 *GNA* 基因转化玉米骨干自交系及转基因玉米的抗虫抗病性分析[博士论文]. 济南: 山东大学.
- Yeh K W, Lin M I, Tuan S J, Chen Y M, Lin C J, Kao S S. 1997. Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. *Plant Cell Reports*, 16 (10): 696 - 699.