

水稻品种日本晴梗稻组培培养基的筛选 及转稻瘟菌蛋白激发子基因植株的获得 *

毛建军, 杨秀芬, 曾洪梅, 袁京京, 邱德文 **

(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 100081)

摘要:采用 B6、MS 和 NB 3 种培养基, 以梗稻(*Oryza sativa ssp. japonica*)品种日本晴的成熟胚为受体材料进行组织培养, 比较了 3 种培养基的效果。结果表明, 在 3 种培养基中, NB 培养基对愈伤组织的诱导效果最好, 转化效率最高, 最适合于日本晴成熟胚的组织培养。在此基础上, 通过根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导转化法将稻瘟菌蛋白激发子基因 *pemG1* 导入日本晴基因组, 获得了转基因水稻植株。PCR、Northern blot 和 Western blot 分别证实了 *pemG1* 基因的整合、转录和表达。遗传分析表明, 外源基因在转基因日本晴后代中的分离符合 3:1 的理论比例。

关键词:培养基; 日本晴; 成熟胚; 根癌农杆菌; 组织培养; 蛋白激发子; 转基因

中图分类号: S188, S184 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-1304(2008)05-0824-07

Medium Selection for Tissue Culture of japonica Rice Cultivar Nipponbare and Obtainment of Transgenic Plants with an Elicitor-coding Gene from *Magnaporthe grisea*

MAO Jian-jun, YANG Xiu-fen, ZENG Hong-mei, YUAN Jing-jing, QIU De-wen**

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: N6, MS and BN mediums were adopted for tissue culture of Nipponbare (*japonica*) scutellum, and the effects of the three mediums on the culture were compared. Results indicated that, among the three kinds of culture mediums, NB medium worked best in the calli induction and gene transformation and was most suitable for tissue culture of Nipponbare scutellum. Based on this result, elicitor-encoding gene *pemG1* from *Magnaporthe grisea* was introduced into the genome of Nipponbare via *Agrobacterium*-mediated method. And transgenic rice plants were obtained. The integration, transcription and expression of *pemG1* in rice were confirmed by PCR, Northern blot and Western blot, respectively. Genetic analysis showed that the transgenes were segregated normally in the progenies.

Key words: medium; Nipponbare; scutellum; *Agrobacterium*; tissue culture; protein elicitor; transgene

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的转化系统是对天然载体转化系统的一种模仿(Hiei et al., 1997), 已在水稻转基因育种及功能基因组研究中被广泛应用(Pritilata et al., 1997; Nishizawa et al., 1999; Fu et al., 2001; Moreno et al., 2005; Patkar et al., 2006; Coca et al., 2004)。为提高农杆菌介导的转化体系的效率, 前人在培养基的成分, 培养条件,

农杆菌菌株的改造, 表达载体的构建及外植体的选择上做了大量的研究工作(Komari et al., 1998; Hiei et al., 1994; Toki et al., 1997; Vinod et al., 2004; Toki et al., 2006)。

目前在根癌农杆菌介导的水稻转化体系中, N6、MS 和 NB 培养基是最常用的基本培养基(Chang et al., 1992; Rashid et al., 1996; Raineri et al.,

* 基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(No.2003CB114204)和国家高技术研究与发展计划(863)项目(No.2006AA10A210)资助。

** 通讯作者。Author of correspondence. 研究员, 博士, 主要从事蛋白质农药的研究与利用。Tel: 010-62139620; Fax: 010-62139620;

E-mail: <dewenqiu@hotmail.com>.

收稿日期: 2008-1-26 接受日期: 2008-02-28

1990; Hiei *et al.*, 1997), 成熟胚是应用最多的外植体 (Liu *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1996; Sivamani *et al.*, 1996)。梗稻品种日本晴(Nipponbare)是单子叶植物基因组学遗传和功能研究的模式植物, 其重要性不可替代。当不同的培养基用于成熟胚的愈伤组织培养时, 愈伤组织的诱导率 and 外源基因的转化效率都存在差异, 但哪一种培养基更适合于日本晴成熟胚的愈伤组织培养, 尚没有相关的报道。

蛋白激发子是病原菌 - 植物相互识别的重要信号分子, 其与植物的受体蛋白结合后, 使相关的抗病基因表达, 从而诱发防御反应 (Baillieul *et al.*, 1995; Ebel *et al.*, 1998)。在当前化学防治造成严重生态危害的情况下, 蛋白激发子可能成为农业生态系统中病害控制的新思路。

来源于稻瘟菌 (*Magnaporthe grisea*) 的蛋白激发子基因 *pemG1* 编码的 PemG1 蛋白激发子可促进作物的种子萌发和幼苗生长, 增强抗逆性 (邱德文 2004; 邱德文等, 2005; 徐 锋等, 2006)。蛋白激发子的转基因研究已有报道, 邵 敏等(2004)将来自水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv.*oryzae*) 的 *hrfAXoo* 基因转化梗稻 R109, 在转基因系中水稻白叶枯病菌的生长明显受到抑制。

本研究比较了 N6、MS 和 NB 培养基在日本晴成熟胚组织培养中的效果, 以确定哪种培养基更适合于日本晴成熟胚的组织培养。以此为基础, 通过根癌农杆菌介导转化法将稻瘟菌蛋白激发子基因 *pemG1* 转化日本晴, 用分子生物学方法验证了外源基因在受体基因组中的整合, 转录和表达, 为稻瘟菌蛋白激发子基因的作用机制研究和抗病育种提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 水稻受体品种、菌株、质粒和目的基因

水稻受体品种为梗稻(*Oryza sativa* ssp.*japonica*) 品种日本晴, 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 AGL-1 以及植物表达载体 pCAMBIA-A2300-Ubi-Ocs 均由中国科学院遗传与发育生物学

研究所储成才研究员提供, 载体 T-DNA 区含有卡那霉素抗性基因 *ntp II*。目的基因 *pemG1* 为从 *Magnaporthe grisea* 克隆的稻瘟菌蛋白激发子基因 (GenBank 登录号:EF062504), 其编码蛋白能促进作物生长, 增强抗逆性 (徐 锋等, 2006)。构建好的植物双元表达载体 pCAMBIA2300-Ubi-*pemG1*-Ocs 的 T-DNA 结构如图 1。

1.2 水稻组织培养

设 N6 培养基、MS 培养基和 NB 培养基 3 个处理, 每个处理诱导 100 粒成熟种子。组织培养过程参考 Toki *et al.*(2006)的方法, 实验所用培养基的成分为: N6 培养基的诱导培养基: N6 盐分及维生素, 0.3 g/L 水解酪蛋白, 0.5 g/L 脯氨酸, 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L 蔗糖, 3.75 g/L Phytigel, pH 5.8; 共培养基: N6 盐分及维生素, 0.3 g/L 水解酪蛋白, 0.5 g/L 脯氨酸, 30 g/L 蔗糖, 10 mg/L 乙酰丁香酮, 10 g/L 葡萄糖, 3.75 g/L Phytigel, pH5.8; 筛选培养基: N6 盐分及维生素, 0.3 g/L 水解酪蛋白, 0.5 g/L 脯氨酸, 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L 蔗糖, 120 mg/L 卡那霉素, 500 mg/L 头孢霉素, 3.75 g/L Phytigel, pH 5.8; 分化培养基: N6 盐分及维生素, 0.3 g/L 水解酪蛋白, 0.5 g/L 脯氨酸, 30 g/L 蔗糖, 2 mg/L KT, 0.2 mg/L NAA, 100 mg/L 卡那霉素, 250 mg/L 头孢霉素, 3.75 g/L Phytigel, pH 5.8。

MS 培养基的诱导培养基: MS 盐分及维生素, 0.3 g/L 水解酪蛋白, 0.5 g/L 脯氨酸, 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L 蔗糖, 3.75 g/L Phytigel, pH 5.8; 共培养基: MS 盐分及维生素, 0.3 g/L 水解酪蛋白, 0.5 g/L 脯氨酸, 30 g/L 蔗糖, 10 mg/L 乙酰丁香酮, 10 g/L 葡萄糖, 3.75 g/L Phytigel, pH 5.8; 筛选培养基: MS 盐分及维生素, 0.3 g/L 水解酪蛋白, 0.5 g/L 脯氨酸, 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L 蔗糖, 120 mg/L 卡那霉素, 500 mg/L 头孢霉素, 3.75 g/L Phytigel, pH 5.8; 分化培养基: MS 盐分及维生素, 0.3 g/L 水解酪蛋白, 0.5 g/L 脯氨酸, 30 g/L 蔗糖, 2 mg/L KT, 0.2 mg/L NAA, 100 mg/L 卡那霉素, 250 mg/L 头孢霉素, 3.75 g/L Phytigel, pH 5.8。

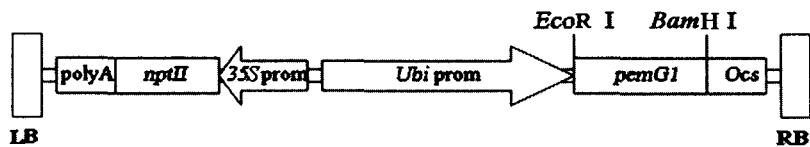


图 1. 植物表达载体 pCAMBIA2300-Ubi-*pemG1*-Ocs 的 T-DNA 结构图
Fig.1. Structure of T-DNA region in plant binary vector of pCAMBIA2300-Ubi-*pemG1*-Ocs

NB 培养基的诱导培养基: N6 大量元素, B5 微量元素和维生素, MS 铁盐, 0.3 g/L 水解酪蛋白, 0.5 g/L 脯氨酸, 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L 蔗糖, 3.75 g/L Phytagel, pH 5.8; 共培养基: N6 大量元素, B5 微量元素和维生素, MS 铁盐, 0.3 g/L 水解酪蛋白, 0.5 g/L 脯氨酸, 30 g/L 蔗糖, 10 mg/L 乙酰丁香酮, 10 g/L 葡萄糖, 3.75 g/L Phytagel, pH 5.8; 筛选培养基: N6 大量元素, B5 微量元素和维生素, MS 铁盐, 0.3 g/L 水解酪蛋白, 0.5 g/L 脯氨酸, 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L 蔗糖, 120 mg/L 卡那霉素, 500 mg/L 头孢霉素, 3.75 g/L Phytagel, pH 5.8; 分化培养基: N6 大量元素, B5 微量元素和维生素, MS 铁盐, 0.3 g/L 水解酪蛋白, 0.5 g/L 脯氨酸, 30 g/L 蔗糖, 2 mg/L KT, 0.2 mg/L NAA, 100 mg/L 卡那霉素, 250 mg/L 头孢霉素, 3.75 g/L Phytagel, pH 5.8。

生根培养基: 1/2 MS 培养基 + 0.5 mg/L NAA, 3.75 g/L Phytagel, pH 5.8。

YEB 培养基: 5 g/L 胰蛋白胨, 1 g/L 酵母提取物, 5 g/L 牛肉膏, 5 g/L 蔗糖, 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4。

1.2.1 诱导 将成熟种子去掉颖壳, 用 75% 乙醇灭菌 3 min, 用无菌水冲洗 3 次。再用 0.1% 的升汞处理 8 min, 用无菌水冲洗 5 次后用无菌滤纸吸干水分。于 3 种诱导培养基上 32 °C 下光照培养 6 d。

1.2.2 根癌农杆菌的培养 将根癌农杆菌(含植物双元表达载体)接种到 10 mL 液体 YEB 培养基(含 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 利福平), 28 °C 摇床上 180 r/min 培养约 36 h。吸取适量菌液到无菌离心管, 5 000 r/min 离心 3 min, 弃上清, 将沉淀重悬后转移到 3 种液体共培养基(不含 Phytagel 的共培养基), 28 °C 摇床上 180 r/min 培养 2~3 h。

1.2.3 侵染和共培养 挑选淡黄色, 紧凑的愈伤组织装入无菌三角瓶中, 将培养好的农杆菌液倒入瓶内将愈伤组织淹没, 28 °C 摇床上 100 r/min 摇动 20 min, 然后室温下静置 10 min。倒掉菌液, 用无菌滤纸吸去愈伤组织表面多余的菌液, 将愈伤组织转移到各自的共培养基培养基上, 24 °C 暗培养 3 d。

1.2.4 筛选 将共培养 3 d 后的愈伤组织转移到一个无菌三角瓶中, 用含有 500 mg/L 头孢霉素的无菌水冲洗 3 次, 再用无菌水洗 1 次, 用无菌滤纸吸去水分后将愈伤组织转移到各自的筛选培养基上, 32 °C 下光照培养 15 d。

1.2.5 分化 筛选培养结束后, 将愈伤组织转移到各自的分化培养基。28 °C 光照培养 14 h, 24 °C 黑暗培养 10 h。培养 25 d 左右分化出小苗后, 转移到生

根培养基。生根后将苗移栽到温室, 繁殖到 T_2 代。

1.3 转基因水稻的分子鉴定

1.3.1 PCR 鉴定 采用北京天根生化科技有限公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒, 从 3 个处理的 T_0 代、 T_1 代和 T_2 代叶片中提取总 DNA。设计合成两对引物验证 T-DNA 的整合。

Primer1(5'- ACCCTGTTGTTTGGTGTTACTT -3');

primer2(5'- GGCGTCTCGCATATCTCAT -3')。

扩增 *pemG1* 序列, 片段长 1 190 bp。

Primer3(5'-AGTCTAACGGACACCAAC-3');

primer4(5'-AAAGATGACCCGACAAAC-3')。

扩增 *Ubiquitin* 启动子序列, 片段长 723 bp。引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.3.2 RNA 提取及 Northern 杂交鉴定 参考 Invitrogen 公司的 Trizol 法 RNA 提取步骤, 从 T_2 代水稻叶片中提取总 RNA。用 Northern 杂交检测 PCR 阳性植株 *pemG1* 基因的转录, 以未经过转基因处理的日本晴作对照。以地高辛标记的 *pemG1* 片段为探针, 按照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche) 说明书并参考 Coca *et al.* (2006) 的方法进行 Northern 杂交分析。

1.3.3 Western blot 鉴定 从稻瘟菌中分离蛋白激发子 PemG1 作为抗原, 注射新西兰大白兔制备抗体。随机挑选三个有 *pemG1* 基因 mRNA 积累的株系, 用磷酸缓冲液从 T_2 代叶片中提取蛋白, 用 12% SDS-PAGE 分离后进行免疫杂交, 抗体的制备和免疫杂交过程参考 Coca *et al.* (2006) 的方法。

1.4 转基因日本晴后代的遗传分析

转基因日本晴后代的遗传分析参照奚亚军等 (2002) 的方法并作修改。将 3 个 T_0 代植株上收获的种子(T_1 代)各取 50 粒, 除去颖壳, 先用 75% 乙醇灭菌 3 min, 用无菌水冲洗 3 次。再用 0.1% 的升汞浸泡 8 min, 用无菌水冲洗 5 次, 用无菌滤纸吸干水分。于筛选液(含 100 mg/L 卡那霉素的 1/2MS 液体培养基)中浸种 24 h 后催芽。定期补充相同浓度的筛选液, 每天 28 °C 下光照培养 14 h, 培养 15 d 后调查成苗数。同时结合 PCR 检测进行分析。

2 结果和分析

2.1 转基因水稻的获得及不同培养基在组织培养中的效果比较

成熟胚诱导 6 d 后已分化出淡黄色的愈伤组织。将这些愈伤组织用农杆菌浸染后共培养 3 d, 再用选择培养基培养 15 d 后再转移到分化培养基。分化培养 8 d 后愈伤组织开始现绿, 25 d 后即可得到

抗卡那霉素的小苗(图 2, A)。将小苗转移到生根培养基进行生根培养(图 2, B),生根后再移栽到温室(图 2, C),即可得到正常可育的转基因植株。

经观察发现,NB 培养基的诱导效果明显优于 N6 培养基和 MS 培养基,NB 培养基诱导得到的愈伤组织体积大而紧凑。N6 培养基和 MS 培养基诱导所得的愈伤组织体积明显偏小而且较松散(图 3, A)。用 NB、N6 和 MS 3 种诱导培养基各诱导 100 粒成熟胚,愈伤组织诱导率分别为 91%、78%和 69%。

三种筛选培养基上的愈伤组织生长状况也有明显的差异。NB 筛选培养基上的愈伤组织基本上没有变褐的现象,而 N6 和 MS 两种筛选培养基上的愈伤组织随着培养的进行而逐渐变褐(图 3, B)。转移到分化培养基后的第 8 天,NB 分化培养基上的愈伤组织现绿(图 3, C),而 N6 和 MS 分化培养基上的愈伤组织都在第 10 天才出现现绿的迹象。到分化培养第 25 天时,NB、N6 和 MS 分化培养基上分化出苗的愈伤组织分别为 77、52 和 43 个。可见 NB 培养基的愈伤组织

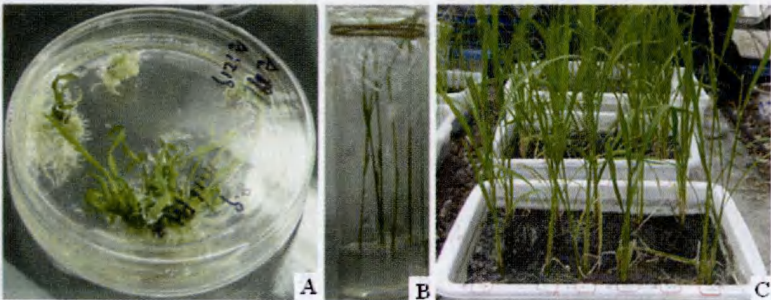


图 2. 转基因水稻植株

Fig. 2. Obtainment of transgenic rice plants

A.抗性苗长出;B.抗性苗生根;C.抗性苗定植。

A. The growth of resistant shoots; B. The rooting of resistant seeding; C.The resistant seeding transplanted to soil.

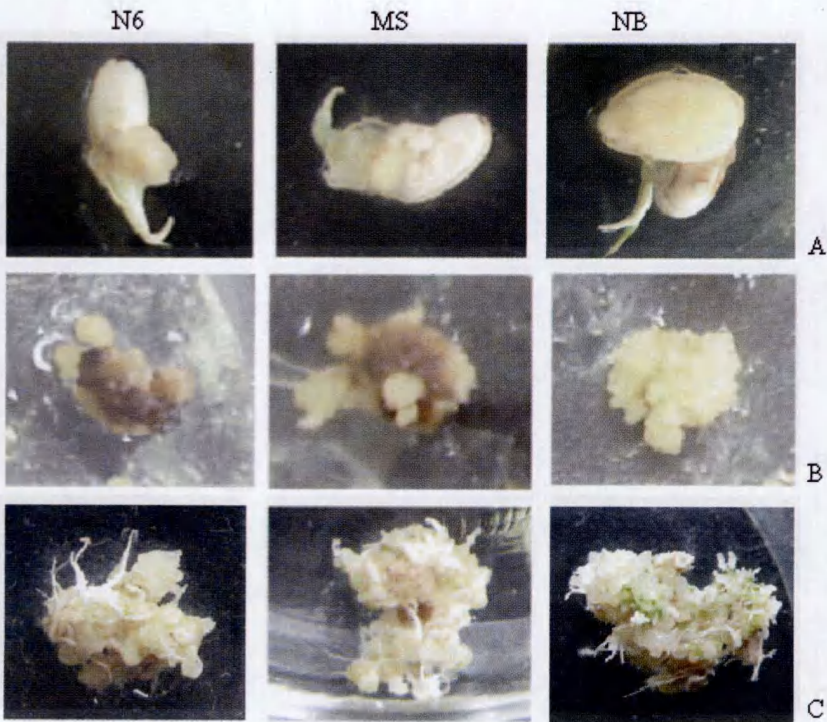


图 3. N6,MS 和 NB 培养基的组织培养效果比较

Fig.3. Effect comparison of N6,MS and NB medium

A.诱导培养第 7 天愈伤组织的生长状况;B. 筛选培养第 10 天愈伤组织的生长状况;C. 分化培养第 8 天愈伤组织的生长状况。

A. Growth of calli at the sixth day of induction; B. Growth of calli at the tenth day of selection; C. Growth of calli at the eighth day of regeneration.

诱导率,具卡那霉素抗性的愈伤组织比率(出苗率)都明显高于 N6 和 MS 培养基(表 1)。

表 1 不同培养基的效果比较

Table 1 Effect comparison of different mediums

培养基	愈伤组织	抗卡那霉素的	T-DNA
Mediums	诱导率 /%	愈伤组织比率 /%	整合率 /%
	Calli induction	Rate of Kan-	T-DNA
	rate	resistant calli	integration rate
N6	78.0	66.7	42.3
MS	69.0	63.2	39.5
NB	91.0	84.6	62.3

2.2 转基因植株的 PCR 鉴定结果

primer1 和 primer2 可扩增出 1 190 bp 的目的片段(图 4, A), primer3 和 primer4 可扩增出 723 bp 的目的片段(图 4, B)。两对引物在 T₀ 代, T₁ 代和 T₂ 代苗中均扩增到预期大小的片段, 而在非转基因对照中没有扩增带, 说明 *pemG1* 已整合入水稻基因组并能够稳定地遗传给后代。在 NB, N6 和 MS 分化培养基上分化出的 T₀ 代抗卡那霉素的转基因苗中, 分别有 44 棵, 21 棵, 17 棵含 T-DNA。NB 分化培养基上分化所得的 T₀ 代转基因苗的 T-DNA 整合率最高(表 2)。

2.3 转基因植株的 Northern blot 鉴定

蛋白激发子基因特异的探针杂交结果表明, 在不同的转基因水稻植株中均检测到预期的杂交条带, 但目的基因 mRNA 积累的水平有高低。而在

PCR 阴性植株中没有检测到 mRNA 的积累(图 5)。

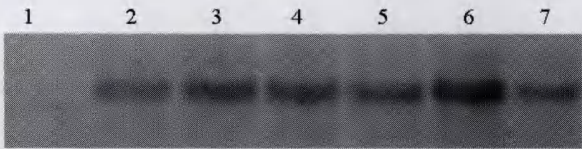


图 5. 转基因水稻植株的 Northern 分析
Fig.5. Northern blotting analysis of transgenic plants
1, 非转基因水稻植株; 2~7, 转基因水稻植株。
1, non-transgenic rice plants; 2~7, transgenic rice plants.

2.4 转基因植株的 Western blot 鉴定

在供试的 3 个转基因株系中, 均检测到抗原和抗体特异的 40 kD 的杂交带, 而在非转基因对照中没有检测到杂交信号。表明 *pemG1* 已整合到水稻基因组并进行正确的表达(图 6)。

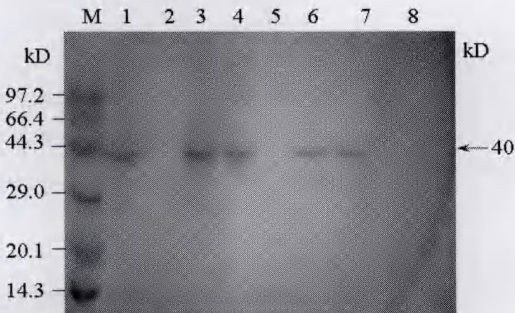


图 6. 转基因水稻植株的 Western 分析
Fig.6. Western blotting analysis of transgenic rice plants
M, 蛋白质分子量标准; 1、3、4、6 和 7, 转基因植株;
2、5 和 8, 非转基因植株。
M, protein molecular weight marker; 1, 3, 4, 6 and 7, transgenic rice
plants; 2, 5 and 8, non-transgenic rice plants.

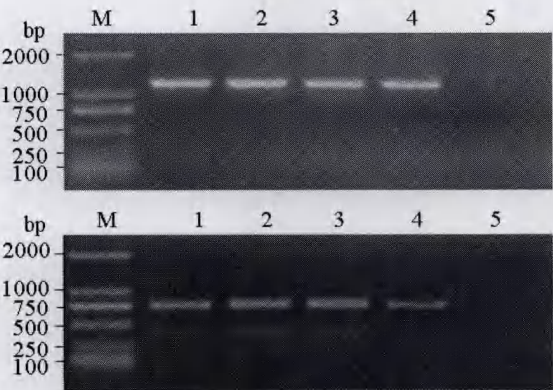


图 4. 转基因水稻植株的 PCR 分析
Fig.4. PCR analysis of transgenic rice plants
A.Primer1 和 primer2 的扩增结果; B.Primer3 和 primer4 的扩增结果。M, DL2000 分子量标准; 1~4, 转基因植株; 5, 未转化植株。
A. PCR analysis with primer1 and primer2; B.PCR analysis with primer3 and primer4. M, DL2000 marker; 1~4, transgenic plants; 5, non-transgenic plant.

2.5 转基因日本晴后代的遗传分析

将 3 个转基因株系的 T₁ 种子用筛选液进行催芽处理, 发芽种子的比率分别为 74%, 78% 和 72%, 说明 3 个转基因株系的 T₁ 代都发生了对卡那霉素的抗性分离, 抗和不抗的比值符合 3:1 的理论比率。T₁ 代转基因苗 PCR 结果表明, 在部分苗的 DNA 中扩增不到目标条带, PCR 阳性株和阴性株的数量比同样符合 3:1 的比率。

3 讨论

目前根癌农杆菌介导的水稻转化体系中, 所用的外植体主要是成熟胚, 所用的培养基主要有 N6, MS 和 NB 培养基 (Chang et al., 1992; Rashid et al.,

1996; Raineri *et al.*, 1990; Hiei *et al.*, 1997)。在本实验中,用 N6, MS 和 NB 培养基进行日本晴成熟胚的愈伤组织培养,实验结果表明, NB 培养基的愈伤组织诱导率,出苗率和 T-DNA 整合率都明显高于 N6 和 MS 培养基,最适合于日本晴成熟胚的愈伤组织培养。

N6, B5 和 MS 培养基是目前植物组织培养中应用最多的 3 种基本培养基。而在水稻成熟胚愈伤组织培养中, N6 培养基和 MS 培养基的应用又比 B5 培养基要多。事实上,在水稻成熟胚愈伤组织培养中,培养基种类并不只这 3 种。早就有将不同基本培养基的大量元素和微量元素混合使用的报道, NB 培养基就是一个很好的例子,其实质就是 N6 培养基大量元素和 B5 培养基微量元素的混合使用。一般认为 N6 培养基诱导的愈伤组织质量较好,但分化时 MS 培养基效果较好。所以也有将不同的培养基体系中的诱导培养基,筛选培养基,分化培养基搭配使用的报道。Datta *et al.* (1998) 先用 N6 诱导培养基用于愈伤组织的诱导,用 MS 分化培养基进行愈伤组织的分化,得到了转基因水稻植株, Pons *et al.* (2000) 也将 MS 培养基和 N6 培养基混合使用,同样得到了转基因水稻植株。通过不同基本培养基的大量元素和微量元素的混合使用,以及将不同的基本培养基体系中的诱导培养基,筛选培养基,分化培养基的搭配使用,可能筛选出更适合于水稻成熟胚愈伤组织培养的培养基种类。如何解决基因型的局限

性问题,如何提高诱导和分化频率,如何提高转化效率,缩短组织培养的时间,建立高效的转化系统还有待于进一步的研究。

稻瘟病是全世界水稻生产中的最重要的病害,转基因技术是水稻抗稻瘟病育种的新手段。Nishizawa *et al.* (1999) 将几丁质酶基因转化水稻,表达几丁质酶的水稻植株对稻瘟病的抗性增强了。Gandikota *et al.* (2001) 发现,表达玉米花青素基因的水稻也能提高对稻瘟病的抗性。Coca *et al.* (2004; 2006) 和 Moreno *et al.* (2005) 先后进行了抗真菌蛋白 (antifungal protein) 方面的研究,发现表达 *afp* 的水稻植株对稻瘟病的抗性明显提高。但目前有关蛋白激发子转基因研究的报道较少。在本实验中,通过根癌农杆菌介导转化法将稻瘟菌蛋白激发子基因 *pemG1* 转化日本晴,使 *pemG1* 基因在转基因植株中表达并稳定遗传。

蛋白激发子在体外不表现杀菌作用,仅通过启动植物体内的防御机制,诱发系统获得抗性而在抗病性中发挥作用,可能成为农业系统中病虫害控制的新思路 and 21 世纪农药发展的重要方向。本研究室从灰霉菌 (*Botrytis cineres*)、交链孢菌 (*Alternaria spp.*) 等多种病原真菌中分离纯化得到相似的蛋白激发子。它们不引起过敏反应,具有热稳定性,能诱发非寄主产生防御反应并促进作物生长。通过蛋白激发子基因的表达来提高转基因作物的抗逆性,这是今后的研究方向。

参 考 文 献

- Baillieul F, Genet I, Kopp M, Saindrenan P, Fritig B and Kaufmann S. A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: A fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defense genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance (J). *The Plant Journal*, 1995, 8 (4): 551~560
- Chang M T. Transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* (J). *Plant Cell Physiology*, 1992, 33 (5): 577~583
- Coca M, Bortolotti C, Rufat M, Penas G, Eritja R, Tharreau D, Pozo A M, Messeguer J and Segundo B S. Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* (J). *Plant Molecular Biology*, 2004, 54: 245~259
- Coca M, Peñas G, Gómez J, Campo S, Bortolotti C, Messeguer J and Segundo B S. Enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* conferred by expression of a cecropin gene in transgenic rice (J). *Planta*, 2006, 223: 392~406
- Datta K, Vasquez A, Tu J, Torrizo L, Alam M F, Oliva N, Abrego E, Khush G S and Datta S K. Constitutive and tissue-specific differential expression of the *cryIA (b)* gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest (J). *Theoretical Applied Genetics*, 1998, 97: 20~30
- Ebel J. Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense (J). *BioEssays*, 1998, 20 (7): 569~576
- Fu X D, Duraialagaraja S, Peng J R, Donald E, Paul C and Nicholas P H. Expression of arabidopsis GAI in transgenic rice represses multiple gibberellin responses (J). *The Plant Cell*, 2001, 13: 1791~1802
- Gandikota M, Kochko A, Chen L, Ithal N, Fauquet C and Reddy A R. Development of transgenic rice plants expressing maize anthocyanin genes and increased blast resistance (J). *Molecu-*

- lar Breeding, 2001, 7: 73~83
- Hiei Y, Komari T and Kubo T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens* (J). *Plant Molecular Biology*, 1997, 35: 205~218
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kamashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA (J). *Plant Journal*, 1994, 6(2): 271~282
- Komari T, Hiei Y, Ishida Y, Kumashiro T and Kubo T. Advances in cereal gene transfer (J). *Plant Biology*, 1998, 1: 161~165
- Liu C N, Li X P and Gelvin S B. Multiple copies of virG enhance the transient transformation of celery, carrot and rice tissues by *Agrobacterium tumefaciens* (J). *Plant Molecular Biology*, 1992, 20: 1071~1087
- Moreno A B, Penas G, Rufat M, Bravo J M, Estopa M, Messeguer J and Segundo B S. Pathogen-Induced production of the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* confers resistance to the blast fungus *Magnaporthe grisea* in transgenic rice (J). *Molecular Plant-microbe Interaction*, 2005, 18(9): 960~972
- Nishizawa Y, Nishio Z, Nakazono K, Soma M, Nakajima E, Ugaki M and Hibi T. Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic japonica rice by constitutive expression of rice chitinase (J). *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 99: 383~390
- Park S H, Pinson S R M and Smith R H. T-DNA integration into genomic DNA of rice following *Agrobacterium* inoculation of isolated shoot apices (J). *Plant Molecular Biology*, 1996, 32: 1135~1148
- Patkar R N and Chattoo B B. Transgenic indica rice expressing ns-LTP-like protein shows enhanced resistance to both fungal and bacterial pathogens (J). *Molecular Breeding*, 2006, 17: 159~171
- Pons M J, Marfà V, Melé E and Messeguer J. Regeneration and genetic transformation of spanish rice cultivars using mature embryos (J). *Euphytica*, 2000, 114: 117~122
- Pritilata N, Debabrata B, Sampa D, Asitava B, Dipankar G, Neeliyath A, Maloy G and Soumitra K S. Transgenic elite indica rice plants expressing CryIaC-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*) (J). *Proceedings of the national academy of sciences of the USA*, 1997, 94: 2111~2116
- Qiu D W (邱德文). Microbe protein pesticide and its prospect (J). *Chinese Journal of Biological Control* (中国生物防治), 2004, 20 (2): 91~94 (in Chinese with English abstract)
- Qiu D W (邱德文), Xiao Y L (肖友伦), Li L (李丽), Yao Q (姚庆) and Liu Z (刘峥). Effect of activator protein on cucumber growth and the activities of dehydrogenase, peroxidase and phenylalanine ammonia lyase (J). *Chinese Journal of Biological control* (中国生物防治), 2005, 21 (1): 41~44 (in Chinese with English abstract)
- Raineri D M, Bottino P, Gordon M P and Nester E W. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.) (J). *Bio/Techology*, 1990, 8: 33~38
- Rashid H, Yokoi S, Toriyama K and Hinata K. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in indica rice (J). *Plant Cell Reports*, 1996, 15: 727~730
- Shao M (邵敏) and Wang J S (王金生). Transformation of rice with *hrfAxoo* gene and resistance of the transgenic plant to bacterial leaf blight (J). *Journal of Nanjing Agricultural University* (南京农业大学学报), 2004, 27: 36~40 (in Chinese with English abstract)
- Sivamani E, Shen P, Opalka N, Beachy R N and Fauquet C M. Selection of large quantities of embryogenic calli from indica rice seeds for production of fertile transgenic plants using the biolistic method (J). *Plant Cell Reports*, 1996, 15: 322~327
- Toki S, Hara N, Ono K, Onodera H, Tagiri A, Oka S and Tanaka H. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice (J). *The Plant Journal*, 2006, 47: 969~976
- Toki S. Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice (J). *Plant Molecular Biology Reports*, 1997, 15: 16~21
- Vinod S, Ram C Y and Yadav K R. Studies on improved *Agrobacterium*-mediated transformation in two indica rice (*Oryza sativa* L.) (J). *African Journal of Biotechnology*, 2004, 3: 572~575
- Xi Y J (奚亚军), Hou W S (候文胜), Zhang Q F (张启发) and Lu M (路明). Application of kanamycin in the selection of transgenic wheat progeny (J). *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica* (西北农业学报), 2002, 11 (3): 17~20 (in Chinese with English abstract)
- Xu F (徐锋), Yang Y (杨勇), Xie F J (谢馥交), Liu Z (刘峥), Qiu D W (邱德文) and Yang X F (杨秀芬). Effect of the activator protein from *Magnaporthe grisea* on plant growth and physiological activities (J). *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* (华北农学报), 2006, 21 (5): 1~5 (in Chinese with English abstract)