

## 转 harpin<sub>Xooc</sub> 蛋白编码基因 *hrf2* 对油菜抗菌核病的影响

马玲莉, 霍 蓉, 高学文, 何 丹, 邵 敏, 王 琦

(南京农业大学植物保护学院/农业部病虫害监测与治理重点开放实验室, 南京 210095)

**摘要:**【目的】尝试利用转基因方法提高油菜抗病性。【方法】将来自水稻细菌性条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*) 编码 harpin<sub>Xooc</sub> 蛋白的 *hrf2* 基因插入植物表达载体 pCAMBIA1301 中, 构建了植物重组表达质粒 pCAMBIA1301-*hrf2*。由根癌农杆菌 LBA4404 介导, 将重组表达质粒 pCAMBIA1301-*hrf2* 转化甘蓝型油菜杨油 4 号子叶节。【结果】获得了抗潮霉素的再生转基因油菜植株, 经 PCR, RT-PCR 和 GUS 染色检测证明 *hrf2* 基因已整合到油菜基因组中。抗病性鉴定结果表明, 转基因油菜对油菜菌核病有较好的抗性, 在转基因植株叶片上油菜菌核病菌菌丝的生长受到明显抑制。【结论】利用农杆菌转化法可将 *hrf2* 基因导入油菜基因组中, 并使转基因油菜对菌核病的抗性提高。

**关键词:** *hrf2* 基因; 农杆菌介导转化法; 转基因油菜; 抗病性

## Transgenic Rape with *hrf2* Gene Encoding harpin<sub>Xooc</sub> Resistant to *Sclerotinia Sclerotinorium*

MA Ling-li, HUO Rong, GAO Xue-wen, HE Dan, SHAO Min, WANG Qi

(Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Disease and Insect, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract:** 【Objective】The objective of this study was to improve the resistance of rape using the method of transformation. 【Method】The gene *hrf2* derived from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* encoding harpin<sub>Xooc</sub> protein was inserted into transgenic vector pCAMBIA1301. The cotyledonal petiole segments from rapeseed variety Yangyou 4 were infected by *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404/pCAMBIA1301-*hrf2*. 【Result】Hygromycin-resistant green shoots were obtained. PCR, RT-PCR and GUS analyses have confirmed successful integration of the foreign gene into the genome of the rapeseed variety Yangyou 4. Disease bioassays of transgenic plants revealed that the transgenic plants with resistance to Rape sclerotiniosis was obtained. 【Conclusion】The *hrf2* gene can be transferred into rape using the method of *Agrobacterium*-mediated transformation, which improved the resistance to *S. sclerotinorium* in the transgenic plant.

**Key words:** *hrf2* gene; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation; Transgenic oilseed rape; Resistance

### 0 引言

【研究意义】油菜是中国主要的油料作物, 其产量和品质受到真菌病害尤其是油菜菌核病的严重影响, 因此, 育种专家们一直在努力寻找改良油菜品质和提高油菜抗病性的方法。近年来, 随着基因工程技术的发展以及油菜转化体系的建立, 人们愈来愈倾向于通过基因工程的手段改良油菜的产量、品质及抗逆

性<sup>[1~3]</sup>。【前人研究进展】Grison 等<sup>[4]</sup>利用组成型表达的几丁质酶基因转化油菜, 使其对一些真菌性病害的抗性增强。田颖川等<sup>[5]</sup>利用农杆菌介导的转化方法将抗真菌病害的  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因导入双低油菜品种 H165 中, 得到了部分转基因油菜植株。革兰氏阴性植物病原细菌中存在着 *hrp* 基因簇, 该基因簇决定病原细菌在寄主上的寄生性和致病性以及非寄主上的过敏反应<sup>[6]</sup>。*hrp* 基因簇中特定基因的编码产物 harpins

收稿日期: 2007-04-04; 接受日期: 2007-05-23

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(2006AA10Z172); 国家植物转基因专项(JY03B1202)

作者简介: 马玲莉(1983-), 女, 上海人, 硕士研究生, 研究方向为植物转基因。E-mail: mllshan@yahoo.com.cn。通讯作者高学文(1965-), 男, 黑龙江依兰人, 教授, 研究方向为分子植物病理学和植物病害生物防治。Tel: 025-84395268; E-mail: gaowx@njau.edu.cn

是非专化性蛋白质激发子, 可以激发烟草过敏性细胞坏死 (hypersensitive cell death, HCD), 诱导植物抗病、抗虫, 促进植物生长<sup>[7~12]</sup>。【本研究切入点】南京农业大学农业部病虫害监测与消费品理重点开放实验室从水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 和水稻细菌性条斑病菌 (*X. o. pv. oryzaicola*) 中分别克隆了编码 harpin<sub>Xoo</sub> 的 *hrf1*, *hrf3* 基因和编码 harpin<sub>Xooc</sub> 的 *hrf2* 基因, *hrf1*, *hrf2* 和 *hrf3* 在大肠杆菌 (BI21) 中的表达产物 (Harpins) 在烟草上均能激发过敏反应和诱导抗病性, 其生物活性从大到小依次为 Hrf2, Hrf1 和 Hrf3<sup>[9~11]</sup>。笔者将 harpin<sub>Xoo</sub> 蛋白编码基因转化水稻<sup>[12]</sup>, 获得了对 ZC<sub>3</sub>、ZD<sub>1</sub>、ZG<sub>1</sub> 和 ZB<sub>13</sub> 4 个稻瘟病菌优势小种高抗且能够稳定遗传的转基因水稻品系。【拟解决的关键问题】笔者将 harpin<sub>Xooc</sub> 蛋白编码基因 *hrf2* 转化油菜, 研究转 *hrf2* 基因对油菜菌核病抗病性的影响, 为基因工程培育抗病油菜品种打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

用于遗传转化的甘蓝型油菜品种杨油 4 号购于江苏明天种业科技有限公司。水稻细菌性条斑病菌 (*X. o. pv. oryzaicola*) RS105 菌株、根癌农杆菌 (*A. tumefaciens*) LBA4404 菌株和植物表达载体 pBI121、pCAMBIA1301 由南京农业大学农业部病虫害监测与治理重点开放实验室保存。

### 1.2 培养基

(1) 预培养基: MS<sup>[13]</sup>+4 mg·L<sup>-1</sup> BA, pH 5.8。(2) 共培养基: MS+3 mg·L<sup>-1</sup> BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA, pH 5.8。(3) 筛选培养基: MS+3 mg·L<sup>-1</sup> BA +0.25 mg·L<sup>-1</sup> NAA +5 mg·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>+12.5 mg·L<sup>-1</sup> Hyg+500 mg·L<sup>-1</sup> Crb, pH 5.8。(4) 生根培养基: MS+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA+5 mg·L<sup>-1</sup> Hyg+200 mg·L<sup>-1</sup> Crb, pH 5.8。

### 1.3 酶与试剂

Taq DNA 聚合酶和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司。Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 购自 Roche 公司, TRIZOL Reagent、ThermoScript RT-PCR System 购自 Invitrogen 公司。卡那霉素 (Kanamycin)、羧苄青霉素 (Carbenicillin)、利福平 (Rifampicin)、潮霉素 (Hygromycin) 购自南京博全科技有限公司, X-gluc 购自南京生兴生物技术有限公司。

### 1.4 植物重组表达质粒的构建

利用 PCR 方法, 从水稻细菌性条斑病菌 *X. o. pv. oryzaicola* RS105 菌株中扩增出 *hrf2* 基因, 利用基因两端携带的限制性酶切位点 *Bam*H I 和 *Sac* I, 将其克隆到植物表达载体 pBI121 中, 构建 pBI121-*hrf2* 重组质粒; 然后用 *Hind*III, *Eco*R I 从 pBI121-*hrf2* 上将 *hrf2* 连同启动子和终止子一起切下, 连接到植物表达载体 pCAMBIA1301 上, 构建好植物重组表达质粒 pCAMBIA1301-*hrf2*。将该重组质粒转化农杆菌菌株 LBA4404, 于-70℃下保存, 用于油菜的转化。

### 1.5 农杆菌介导的遗传转化

取油菜带柄子叶节作为转化受体, 在预培养基中预培养 2~3 d 后浸入备好的农杆菌菌液感染 30 min, 然后放在共培养基上黑暗中共培养 2 d。共培养结束后, 将子叶节接入筛选培养基中 (25℃, 光照 16 h/d), 2 周继代 1 次。1~2 周后即有愈伤组织的形成和芽的分化。待绿芽长到 2~3 cm 高后, 切下绿芽转入含 5 mg·L<sup>-1</sup> 潮霉素的生根培养基中, 当根系发达成为完整的植株, 经炼苗后移栽至土钵中。待苗长至 20 cm 左右移至大田<sup>[14]</sup>。

### 1.6 转基因油菜的 PCR 检测

植物总 DNA 提取采用 CTAB 提取法<sup>[15]</sup>: 取 50~200 ng 总 DNA 为模板。根据 *hrf2* 基因序列设计引物: 5'端引物: 5'-TTTGGAGAGAACACGGGGGA-3'; 3'端引物: 5'-TGATGCGCTGTCGTTTCGAGA-3', 引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。目标扩增产物为 414 bp。扩增条件为: 95℃预变性 5 min; 94℃变性 45 s, 56℃退火 30 s, 72℃延伸 50 s, 35 个循环; 72℃再延伸 10 min。

### 1.7 转基因油菜的 RT-PCR 检测

使用 TRIZOL Reagent (Invitrogen) 提取油菜叶片 RNA, 反转录采用 ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen)。PCR 反应体系与扩增程序同常规 PCR, 参见 1.6, 对 RT-PCR 产物进行凝胶电泳分析。

### 1.8 转基因油菜的 GUS 检测

对潮霉素抗性植株进行 GUS 染色检测, 分析标记基因 *gus* 能否正常表达。采用 Jefferson<sup>[16]</sup>的染色方法, 将剪成小圆片的油菜叶片浸泡在 200 μl 染色液中, 于 37℃中保温 20 h。然后, 转入 70%乙醇中脱色 2~3 次, 阳性显蓝色, 阴性样品无色或白色。

### 1.9 油菜抗菌核病菌鉴定

油菜抗菌核病菌接种鉴定采用离体叶菌丝体接种鉴定, 具体方法参照董祥柏的<sup>[17]</sup>方法。每株取 3 片叶片, 每片叶片放两个菌丝块, 以接种 48 h 后病斑直径

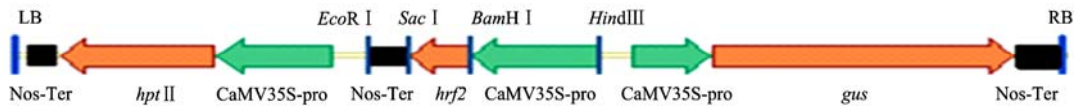
作为抗感反应的指标。用直尺测量病斑直径(不含外侧的一轮黄晕),按垂直方向取两次,取平均值作为最后读数。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物重组表达质粒 pCAMBIA1301-*hrf2* 的构建

本研究将来自水稻细菌性条斑病菌(*X. o. pv. oryzae*)编码 *harpin*<sub>Xoo</sub> 蛋白的 *hrf2* 基因插入植物

表达载体 pCAMBIA1301 中,构建植物重组表达质粒 pCAMBIA1301-*hrf2*。该载体含有“CaMV 35S 启动子-*hrf2* 基因-NOS 终止子”,“CaMV 35S 启动子-*hpt II* 基因-NOS 终止子”和“CaMV 35S 启动子-*gus* 基因-NOS 终止子”3 个表达框,其中 *hrf2* 基因的大小为 414 bp, *hpt II* 基因的大小为 643 bp, *gus* 基因的大小为 2 053 bp。这 3 种基因在植物中同时表达, pCAMBIA1301-*hrf2* 的结构如图 1 所示。



LB: 左边界; RB: 右边界; *hpt II*: 潮霉素磷酸转移酶基因; Pro: 启动子; Ter: 终止子; *gus*:  $\beta$ -半乳糖醛酸酶  
LB: left border; RB: right border; *hpt II*: hygromycin phosphotransferase II gene; Pro: promoter; Ter: terminator; *gus*:  $\beta$ -glucuronidase gene

图 1 植物重组表达质粒 pCAMBIA1301-*hrf2* 构建图谱

Fig. 1 Schematic construction of plant expression vector pCAMBIA1301-*hrf2*

### 2.2 农杆菌介导的 pCAMBIA1301-*hrf2* 的油菜转化及抗潮霉素再生苗的获得

构建的植物重组表达载体经农杆菌介导法转化油菜杨油 4 号子叶节。当子叶节与根癌农杆菌黑暗共培养 2 d 后,将其转入含羧卞青霉素( $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )和潮霉素( $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的筛选培养基上,1~2 周左右开始出现抗性愈伤组织,然后逐渐分化出抗性芽。待芽长到 2~3 cm 左右时,切下并置于生根培养基中进行生根培养。转化小苗根系发育良好后,打开组培瓶盖子炼苗 2 d,然后移栽于温室中进行常规管理。最终从 1 500 多个外植体中获得了 26 株绿苗。

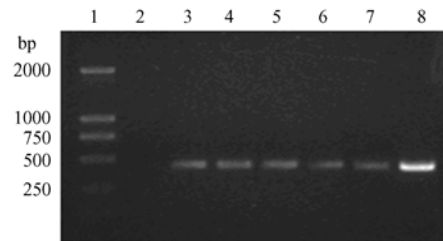
### 2.3 转 *hrf2* 基因油菜抗潮霉素再生苗的 PCR 检测

对经过潮霉素筛选获得的抗性植株进行 PCR 检测,在所检测的 26 个植株中,85% 都获得了特异扩增带(图 2)。回收特异性条带测序,经 Blast 比对,发现其与目的基因 *hrf2* 的同源性为 100%,初步表明目的基因 *hrf2* 已整合到油菜的基因组中。

### 2.4 转基因油菜的 RT-PCR 检测

使用 *hrf2* 基因引物对 PCR 阳性植株和非转基因油菜进行 RT-PCR 检测,抗性植株总 RNA 反转录后经 PCR 扩增得到 414 bp(经测序得知 PCR 扩增产物为 414 bp,与目的基因 *hrf2* 的同源性为 100%)的 DNA 片段,与阳性质粒的扩增结果一致,阴性对照没有特异性扩增产物,说明 *hrf2* 基因已在油菜基因组中得到表达(图 3)。

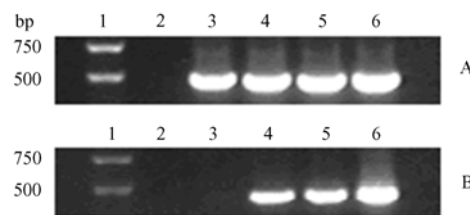
### 2.5 *gus* 基因表达检测



1: 分子量标记(DNA Marker DL2000); 2: 阴性对照:未转化油菜; 3~7: 潮霉素抗性植株 6、10、13、18、23, 目标带为 414 bp; 8: 阳性对照:表达载体,目标带为 414 bp  
1: Molecular marker (DNA Marker DL2000); 2: Negative control, DNA of Non-transgenic plant; 3-7: Amplification band of DNA of anti-hygromycin plants 6, 10, 13, 18, 23 by PCR respectively; 8: Positive control, amplification band of the plasmid pCAMBIA1301-*hrf2* with *hrf2* gene by PCR

图 2 转基因植株 PCR 检测结果

Fig. 2 The result of analyzing transgenic plants by PCR

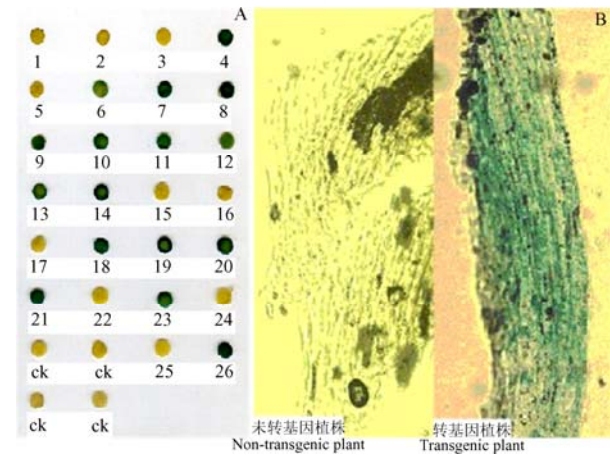


1: 分子量标记(DNA Marker DL2000); 2: 清水对照; 3: 阴性对照,未转化植株; 4、5: 潮霉素抗性植株 6、23; 6: 阳性对照(在 A 图中为烟草对照,在 B 图中为质粒 pCAMBIA1301-*hrf2*)  
1: Molecular marker (DNA Marker DL2000); 2: Negative control, double distilled water; 3: Negative control, Non-transgenic plant; 4, 5: anti-hygromycin plants 6, 23; 6: Positive control, the plasmid pCAMBIA1301-*hrf2*

图 3 转基因油菜的 *EF-1 $\alpha$*  基因(A)和 *hrf2* 基因(B)的 RT-PCR 分析

Fig. 3 RT-PCR analysis of *EF-1 $\alpha$*  gene(A) and *hrf2* gene(B)

植物重组表达质粒 pCAMBIA1301-*hrf2* 中 *gus* 基因编码序列被置于 CaMV 35S 启动子基因之下，能在油菜细胞中得到表达。用 X-Gluc 溶液对油菜叶片进行组织化学染色分析，26 株抗性植株中有 16 株叶片显蓝色，10 株叶片不显蓝色；而 4 株未转化植株叶片皆不显蓝色（图 4-A）。将抗性植株和未转化植株叶片制成切片，在显微镜下观察，得到同样结果（图 4-B）。说明 *gus* 报告基因和目的基因已转入植株并得到表达。



A. 叶片 GUS 染色 B. GUS 染色显微观察  
A. The GUS analysis of leaves B. GUS analysis by microscope

1~26: 潮霉素抗性植株; CK: 阴性对照, 未转化油菜  
1-26: Anti-hygromycin plants; CK: Negative control, non-transgenic plant

图 4 转基因植株 GUS 染色结果

Fig. 4 The GUS analysis of transgenic plants

### 2.6 转 *hrf2* 基因对油菜菌核病的抗性

根据 GUS 染色结果选择阳性单株，进行了离体叶接种菌核病菌，对照进行同样处理。发现 GUS 染色阳性单株 6、13 和 23 发病比对照迟。在离体叶片接种 48 h 后，可以观察到这 3 株的病斑大小与对照有显著差异（图 5、图 6）；其余 13 株 GUS 染色阳性单株几乎与对照同时发病，其病斑大小与对照相比无显著差异。此外，笔者发现接种后 48 h 内，对照逐渐褪色，而转基因植株依然鲜绿（图 5）。

## 3 讨论

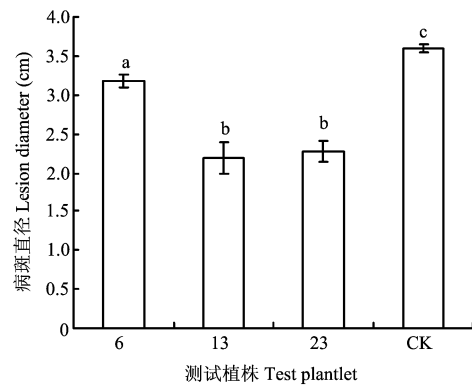
甘蓝型油菜农杆菌介导法高效转化体系的建立，受许多因素的影响，如外植体高效再生体系的建立、基因型差异、外植体类型、预培养时间与条件、农杆菌菌液浓度与侵染时间、共培养时间、筛选抗生素以及抑菌抗生素等。尽管农杆菌介导法甘蓝型油菜的转



左: 未转基因植株叶片; 右: 转基因植株叶片  
Left: Non-transgenic control leaves; Right: Transgenic plant leaves

图 5 离体叶片接种核盘菌鉴定转基因植株

Fig. 5 The detached leave of transgenic plants with *Sclerotinia* inoculation



不同字母表示在 0.05 水平上差异显著  
The different letters mean significant differences at 0.05 level

图 6 转基因油菜离体叶菌核病接种 48 h 后病斑直径差异比较

Fig. 6 Difference in lesion diameter of transgenic rapeseed by detached leaves with mycelia of *S. Sclerotinorium*

化已经取得了较大的进展。但研究表明农杆菌介导法油菜的转化效率仍较低，转化效率最高的为 55%<sup>[18]</sup>，最低的只有 0.5%<sup>[19]</sup>。在本研究条件下，农杆菌介导法转化效率较低。通过潮霉素抗性筛选共获得再生植株 26 株，其中 16 株为转基因植株。为了获得尽可能多的抗病植株，在抗生素筛选初期采用 12.5 mg·L<sup>-1</sup> 的潮霉素来减少假阳性植株的频率，待有绿芽分化出时，再转移至含 5 mg·L<sup>-1</sup> 的潮霉素培养基中继代壮苗以利于绿苗的生长。此外，外植体与农杆菌的共培养，是获得转化植株的主要途径，选择合适的外植体和高效

的组培技术对于油菜的转化是非常重要的。

本研究中对于转基因油菜的菌核病抗性鉴定采用苗期离体叶接种方法。该方法的优点是实验环境条件如温度、湿度和光照等因素可人为控制, 结果易重复。缺点是方法繁琐, 有时接种前操作时间过长, 易引起叶片萎焉失水, 影响接种结果的准确性。本试验中发现离体叶接种重复性较好, 即连续 3 次接种重复中, 同一单株叶片表现了基本一致的抗性, 相同叶片接上的多个菌丝块也表现了较好的重复性。另外, 通过离体叶接种试验, 可尽早掌握转基因植株的抗病情况<sup>[20]</sup>。试验中不同转基因植株对油菜菌核病表现了不同的抗性, 其中 6、13、23 表现出较好的抗性, 而其它植株没有表现出明显的抗性, 这可能是外源基因的拷贝数不同, 插入染色体中的位点不同引起的, 也有可能与植株的生育期, 温度, 营养条件等有关<sup>[21]</sup>。

油菜是一种适应性强、用途广、经济价值高、发展潜力大的油料作物。harpin<sub>Xoo</sub> 蛋白具备 harpins 的生物学特性, 用 harpin<sub>Xoo</sub> 处理植物可诱导植物对病害产生系统抗性<sup>[22]</sup>。转 harpin 编码基因的拟南芥提高了对 *Erwinia carotovora* 的抗性<sup>[23]</sup>。此外, 将 harpin 分别转化烟草<sup>[24]</sup>, 水稻<sup>[25]</sup>, 梨树<sup>[26]</sup>, 都不同程度地提高了转基因植株的抗性。本研究将编码 harpin<sub>Xoo</sub> 的基因 *hrf2* 转化油菜, 提高了转基因油菜对菌核病的抗性。这表明 *hrf2* 基因在油菜体内表达, 与 harpin<sub>Xoo</sub> 体外处理油菜一样可以诱导植物产生抗病性<sup>[9]</sup>。因此, 对感病油菜品种, 可以通过基因工程进行抗性改良, 同时, 也可以将本研究中获得的抗性油菜作为抗源, 通过常规育种获得新的抗病株系。

## 4 结论

本研究利用农杆菌转化法, 将编码 harpin<sub>Xoo</sub> 蛋白的 *hrf2* 基因导入甘蓝型油菜杨油 4 号, 分子检测证明了外源基因的整合和表达。菌核病抗性分析表明, 转化 CaMV 35S 启动子驱动下的 *hrf2* 基因可以提高油菜对菌核病的抗性, 为油菜的抗病性改良提供了新材料。

致谢: 南京农业大学农学院管荣展博士在实验过程中给予了指导, 在此表示感谢!

## References

[1] Ponstein A S, Bade J B, Verwoerd T C, Molendijk L, Storms J, Beudeker R F, Pen J. Stable expression of Phytase (*phyA*) in canola (*Brassica napus*) seeds: towards a commercial product. *Molecular*

*Breeding*, 2002, 10: 31-44.

[2] 张琦, 李明春, 蔡易, 苗翠苹, 李绍兰, 陈有为, 邢来君. 少根根霉 $\Delta$ -脂肪酸脱氢酶基因在转基因油菜中的表达. *中国农业科学*, 2006, 39: 463-469.

Zhang Q, Li M C, Chai Y, Miao C P, Li S L, Chen Y W, Xing L J. Expression of *Rhizopus arrhizus*  $\Delta$ -6-fatty acid desaturase gene in transgenic rapeseed. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39: 463-469. (in Chinese)

[3] Halfhill M D, Millwood R J, Raymer P L, Stewart C N. *Bt*-transgenic oilseed rape hybridization with its weedy relative, *Brassica rapa*. *Environmental Biosafety Research*, 2002, 1: 19-28.

[4] Grison R, Grezes-Besset B, Schneider M, Lucante N, Olsen L, Jean-Jacques L, Toppan A. Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. *Nature Biotechnology*, 1996, 14(5): 643-646.

[5] 蓝海燕, 王长海, 陈正华, 田颖川. 农杆菌介导法将  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因导入油菜的研究初报. *中国油料作物学报*, 2000, 22(1): 6-10.

Lan H Y, Wang C H, Chen Z H, Tian Y C. A preliminary studies on transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) plants of  $\beta$ -1, 3-glucanase gene by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2000, 22 (1): 6-10. (in Chinese)

[6] Lindgren P B. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interaction. *Annual Review Phytopathology*, 1997, 35: 129-152.

[7] Wei Z M, Laby R J, Zumoff C H, Bauer D W, He S Y, Beer S V. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 1992, 257(5066): 85-88.

[8] He S Y, Huang H C, Collmer A. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin<sub>PS</sub>: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*, 1993, 73: 1255-1266.

[9] 闻伟刚, 邵敏, 陈功友, 王金生. 水稻白叶枯病蛋白激酶子 Harpin<sub>Xoo</sub> 诱导植物的防卫反应. *农业生物技术学报*, 2003, 11(2): 192-197.

Wen W G, Shao M, Chen G Y, Wang J S. Defense response in plants induced by Harpin<sub>Xoo</sub>, an elicitor of hypersensitive response from *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2003, 11(2): 192-197. (in Chinese)

[10] 陆徐忠, 邵敏, 闻伟刚, 王金生. 水稻条斑病细菌类 Harpin 蛋白的纯化与特性研究. *植物病理学报*, 2004, 34(1): 43-48.

Lu X Z, Shao M, Wen W G, Wang J S. Purification and characteristics of a harpin-like protein from *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2004, 34(1): 43-48. (in Chinese)

[11] Li P, Lu X Z, Shao M, Long J Y, Wang J S. Genetic diversity of

- Harpins from *Xanthomonas oryzae* and their activity to induce hypersensitive response and disease resistance in tobacco. *Science in China Series C-Life Sciences*, 2004, 47(5): 461-469.
- [12] 邵 敏, 王金生. 转 *hrfA<sub>Xoo</sub>* 基因水稻对白叶枯病的抗性. 南京农业大学学报, 2004, 27(4): 36-40.
- Shao M, Wang J S. Transformation of rice with *hrfA<sub>Xoo</sub>* gene and resistance of transgenic plants to bacterial leaf blight. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2004, 27(4): 36-40. (in Chinese)
- [13] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15: 473-497.
- [14] Melander M, Kamnert I, Happstadius I, Liljeroth E, Bryngelsson T. Stability of transgene integration and expression in subsequent generations of doubled haploid oilseed rape transformed with chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase genes in a double-gene construct. *Plant Cell Reports*, 2006, 25: 942-952.
- [15] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (3rd ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [16] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the *gus* gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, 5: 387-405.
- [17] 董祥柏. 葡萄糖氧化酶基因和草酸氧化酶基因在甘蓝型油菜中的表达研究. 中国农业科学院硕士学位论文, 2004.
- Dong X B. Expression of glucose oxidase gene and oxalate oxidase gene in oilseed rape (*Brassica Napus* L.). Master Degree of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2004. (in Chinese)
- [18] Monlony M M, Walker J M, Sharma K K. High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Reports*, 1989, 8: 238-242.
- [19] Charest P J, Holbrook L A, Gabard J, Iyer V N, Miki B L. *Agrobacterium*-mediated transformation of thin cell layer explants from *Brassica napus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 1988, 75: 438-445.
- [20] 陈 雁, 饶勇强, 孟金陵. 转双价广谱抗病基因创造甘蓝型油菜抗茵核病新品种的研究. 分子植物育种, 2003, 1(4): 457-463.
- Chen Y, Rao Y Q, Meng J L. Creating new variety with *Sclerotinia sclerotiorum* resistance by transforming two broad-spectrum antifungal genes into *Brassica napus* L. *Molecular Plant Breeding*, 2003, 1(4): 457-463. (in Chinese)
- [21] 饶雪琴, 李华平. 转基因番木瓜研究进展. 中国生物工程杂志, 2004, 24(6): 38-42.
- Rao X Q, Li H P. Progress in transgenic papaya. *China Biotechnology*, 2004, 24(6): 38-42. (in Chinese)
- [22] 赵梅勤, 王 磊, 张 兵, 王金生, 陈功友. 植物抗病激活蛋白 *harpin<sub>Xoo</sub>* 防治水稻病害的研究. 中国生物防治, 2006, 22(4): 283-289.
- Zhao M Q, Wang L, Zhang B, Wang J S, Chen G Y. Harpin<sub>Xoo</sub>, a proteinaceous elicitor of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, triggering hypersensitive response in tobacco and inducing disease resistance in rice. *Chinese Journal of Biological Control*, 2006, 22(4): 283-289. (in Chinese)
- [23] Pandey A K, Ger M J, Huang H E, Yip M K, Zeng J Q, Feng T Y. Expression of the hypersensitive response-assisting protein in *Arabidopsis* results in harpin-dependent hypersensitive cell death in response to *Erwinia carotovora*. *Plant Molecular Biology*, 2005, 59: 771-780.
- [24] Peng J L, Bao Z L, Ren H Y, Wang J S, Dong H S. Expression of harpin in transgenic tobacco induces pathogen defense in the absence of hypersensitive cell death. *Phytopathology*, 2004, 94: 1048-1055.
- [25] 邵 敏, 李 林, 穆东升, 肖姗姗, 杨秀玲, 王宏乐, 刘新民, 王金生. Harpin<sub>Xoo</sub> 在水稻中表达提高对白叶枯病不同小种抗性. 中国生物防治, 2006, 22(2): 133-136.
- Shao M, Lin L, Mu D S, Xiao S S, Yang X L, Wang H L, Liu X M, Wang J S. Harpin<sub>Xoo</sub> expression in transgenic rice plants enhances resistance to bacterial leaf blight. *Chinese Journal of Biological Control*, 2006, 22(2): 133-136. (in Chinese)
- [26] Malnoy M, Venisse J S, Chevreau E. Expression of a bacterial effector, harpin N, causes increased resistance to fire blight in *Pyrus communis*. *Tree Genetics and Genomes*, 2005, 1(2): 41-49.

(责任编辑 赵利辉, 毕京翠)