

利用 dsRNA 干涉方法研究水稻 WRKY 转录因子的抗病性

郭亚文^{1,2} 谢科¹ 李靖¹ 于永红² 胡国成² 傅亚萍² 斯华敏² 窦彩虹¹
郭泽建^{3,*} 孙宗修^{2,*}

(¹浙江大学 农业与生物技术学院, 浙江 杭州 310029; ²中国水稻研究所 水稻生物学国家重点实验室, 浙江 杭州 310006; ³中国农业大学 植物病理系, 北京 100094; * 通讯联系人)

Study on Pathogen Resistance of OsWRKY Transcription Factor by dsRNA Interference Method

WU Ya-wen^{1,2}, XIE Ke¹, LI Jing¹, YU Yong-hong², HU Guo-cheng², FU Ya-ping², SI Hua-min², DOU Cai-hong¹,
GUO Ze-jian^{3,*}, SUN Zong-xiu^{2,*}

(¹College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; ²State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; ³Department of Plant Pathogens, China Agricultural University, Beijing 100094, China; * Corresponding authors)

Abstract: To study the functions of the WRKY superfamily of transcription factors in rice, a hairpin dsRNA interference vector involving in a sequence of conserved WRKY domain, constituted by about 60 amino acid residues, were constructed. The vector was transformed into the embryos of wild parent Zhonghua 11 by *Agrobacterium*-mediated co-cultivation method. A total of nine transgenic lines with interference phenotypes were identified from 65 independent transgenic rice plants. PCR and Southern blotting analysis indicated that the foreign DNA had been integrated into rice genome of Zhonghua 11, and most of them were single copy. The three selected interference lines showed more resistant to rice blast (*Magnaporthe grisea*) and bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) than WRKY T-DNA insertion mutant T456 and Zhonghua 11, and T456 was slightly more resistant to these two diseases than Zhonghua 11, suggesting that dsRNA interference was successful and it might have suppressed some OsWRKY transcription factors which were highly associated with regulating pathogen genes.

Key words: rice (*Oryza sativa*); T-DNA insertion; transcription factor; RNA interference; *Magnaporthe grisea*; *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

摘要: 为了研究植物 WRKY 基因编码的转录因子在水稻上的功能, 构建了包含 WRKY 保守结构域的 dsRNA 发夹结构干涉载体, 用农杆菌介导法转基因水稻中花 11, 得到 9 个有干涉表型的株系。PCR 和 Southern 结果表明 dsRNA 已整合入中花 11 的基因组中, 且多数为单拷贝。结合 T-DNA 插入的 WRKY 突变体植株 T456, 研究了其中的 3 个干涉苗和 T456 对稻瘟病和白叶枯病的抗性, 发现 3 个干涉苗对这两种水稻主要病害的抗性均明显强于 T456 和中花 11, 且 T456 比中花 11 略抗稻瘟病和白叶枯病, 表明 dsRNA 干涉是成功的, 它可能干涉或抑制了某些 OsWRKY 家族中负向调控抗病基因的成员。

关键词: 水稻; T-DNA 插入; 转录因子; RNA 干涉; 稻瘟病; 白叶枯病

中图分类号: Q943.2; S432.2; S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2005)06-0489-06

生物体内普遍存在一种保守的基因转录后沉默机制(post-transcriptional gene silencing, PTGS), 由外源或内源的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 降解为 21~25 碱基的干扰性 RNA (small interference RNA, siRNA), 从而引发生物体细胞内同源 mRNA 的特异性降解, 这种 PTGS 称为 RNA 干涉(RNA interference, RNAi)。尽管 RNA 干涉技术的出现时间较短, 但由于它在植物中具有可以按孟德尔方式遗传和对目的基因的序列特异性干扰等优点而受到关注和重视, 它比反义核酸技术有效, 比基因敲除简单, 已成为当前探索植物基因功能的一个有力的工具^[1]。

转录因子在真核生物的发育和代谢过程中起着

关键的调控作用。根据大多数转录因子的 DNA 结合域的结合特性, 可将转录因子划分为几个不同的家族, WRKY 蛋白家族就是其中之一。据报道, 在拟南芥中的 WRKY 家族成员超过 70 个^[2], 在水稻中已有 102 个之多^[3]。而且在非植物性真核生物中也发现有 WRKY 基因存在^[3,4], 说明这个基因的古老起源。而在此之前, 这一家族一直被认为是

收稿日期: 2005-05-30; **修改稿收到日期:** 2005-08-28。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471122, 30370139); 浙江省自然科学基金资助项目(Y304210); 水稻生物学国家重点实验室创新引导项目。

第一作者简介: 郭亚文(1973—), 女, 助理研究员, 在职硕士研究生。

植物中特有的^[2]。WRKY 基因的名字来源于这类蛋白中含有 1 个或 2 个保守的大约有 60 个氨基酸的 WRKY 结构域。在 WRKY 结构域中有一个保守的 WRKYGQK 七序列,之后接一个 C₂H₂ 或 C₂HC 型的锌指基序(motif)。大多数 WRKY 蛋白对(T)(T)TGAC(C/T)顺式作用元件(称为 W 盒)具有结合特性。WRKY 蛋白主要存在于根、叶、花序、种子和维管束组织中,在植物发育和生理中承担多种功能。有关这个超基因家族功能报道最多的是参与水杨酸(SA)和抗病反应。此外,还参与伤害、氧化胁迫,耐干旱、盐碱、冷、热等生理过程,许多 WRKY 基因还调控胚胎发生、种皮和毛状体发育、衰老等。花青素、淀粉、倍半萜烯的生物合成也依赖于 WRKY 蛋白,因此,WRKY 是一类非常重要的转录因子。然而,在水稻上,有关这个家族的功能研究的报道很少。

我们从含有 45 000 个 T-DNA 插入转基因株系的水稻突变体库^[5]中分离到一个迟熟突变体 T456。该突变体在成株期表现为植株矮化、叶角变大、叶色变深、根长变短、根系发达,抽穗比野生型迟 30 d 左右,发芽率和发芽势均较差。突变表型与 *bar* 基因共分离。通过 Tail-PCR 技术扩增该 T-DNA 突变体的旁侧序列,已克隆到一个 WRKY 转录因子基因(另文发表),经与 NCBI 数据库比对,发现其位于第 1 染色体上,命名为 *OsWRKY10*^[3]。有关这个基因的功能还未见注释。我们构建了 1 个包含 WRKY 保守结构域的 dsRNA 干扰载体,并结合 T-DNA 突变体来研究该基因及这个家族的其他同源基因的功能。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂

试验所用的水稻材料野生型亲本中花 11(*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*), T-DNA 插入突变体 T456,均由中国水稻研究所提供。

载体 pUCm-T 由本实验室保存。*Taq* DNA 聚合酶、内切酶 *Hind* III 为 Takara 公司产品; Hybond-N⁺ 尼龙膜购自 Amersham Pharmacia; ECL 试剂盒购自 Amersham Bioscience 公司; X-Gluc 购自北京经科生物工程公司;所有引物合成和基因测序由上海华纳生物工程公司完成。

1.2 方法

1.2.1 dsRNA 干扰表达载体的构建

采用玉米 Ubiquitin 基因中的一个 1 kb 左右内

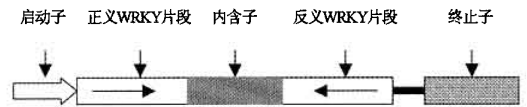


图 1 含内含子的 RNA 干扰表达载体

Fig. 1. Structure of RNA interference vector involving in intron.

含子插入到反向重复序列中,形成发夹结构^[6]。反向重复序列 cDNA 片段长 813 bp,扩增自经 Elicitin 诱导的 IR72 的 cDNA 文库(正向引物 W1: 5'-TTT CCA CAC ATA AGC TAG CTC C-3',反向引物 W3: 5'-CCC TTC GTA CGT GGT GAT-3'),连接于 pUCm-T 载体,载体含潮霉素抗性基因(*hpt*)、抗 Basta 基因 *bar* 和报告基因 *Gus*。具体构建方法见文献^[7]。含内含子的 dsRNA 干涉的表达载体的结构如图 1。

1.2.2 转化水稻

采用农杆菌介导的方法,具体步骤参照 Hiei 等^[8]。所用根癌农杆菌为 EHA105。将含内含子的 dsRNA 干涉表达载体导入野生型亲本中花 11 的幼胚愈伤组织中,愈伤组织经潮霉素(50 mg/L)抗性筛选、再生成株后,转基因苗种植于中国水稻研究所的网室内。

1.2.3 PCR 反应

以潮霉素抗性基因 *hpt* 为检测对象。正向引物 5'-GGA GCA TAT ACG CCC GGA GT-3',反向引物 5'-GTT TAT CGG CAG TTT GCA TG-3'。扩增反应体系为 25 μ L,包括 2.5 μ L 10 \times buffer, 0.8 μ L 2.5 mmol/L Mg²⁺, 0.4 μ L 2.5 mmol/L dNTPs, 0.1 μ L *Taq* 酶(1 U),正反向引物各 0.2 μ L,模板 DNA 1 μ L, ddH₂O 19.8 μ L。扩增反应条件为:94 $^{\circ}$ C 下先预变性 4 min,然后 94 $^{\circ}$ C 下变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 下退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 下延伸 90 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min。0.8% 琼脂糖凝胶检测 PCR 产物,凝胶成像仪 GDS-7600(UVP)上成像并拍照。

1.2.4 Southern 杂交

参照卢扬江等^[9]的方法提取水稻基因组 DNA,用内切酶 *Hind* III 酶切过夜。以质粒 Hpt 引物扩增条带作为探针,正向引物 5'-GGA GCA TAT ACG CCC GGA GT-3',反向引物 5'-GTT TAT CGG CAG TTT GCA TG-3',扩增产物片段长度约 800 bp。探针标记及 Southern 杂交、显影按

Amersham Bioscience 公司的 ECL 试剂盒说明书进行。

1.2.5 GUS 染色

GUS 染色参照 Jefferson 等^[10]方法。将 1~2 cm 的稻根放入装有 GUS 染色液的 1.5 mL 离心管中,于 37℃ 培养箱中反应 24 h,用 75% 酒精脱色后在 LEICA MZ95 体视镜下观察,用 LEICA DC300 摄像头拍照。

1.2.6 稻瘟病接种

中花 11、T456 和 RNA 干涉后代 W21、W28、W34 的种子经消毒、浸种、催芽后播于浙江省农业科学院稻瘟病接种室内,待苗长至 3 叶期(约 3 周)时喷雾接种稻瘟病 E 型小种中 11-1,孢子悬浮液浓度为 1×10^5 个/mL,以喷清水为对照。具体方法参照文献^[11]。接种后 7 d,根据 IRRI 的分级标准^[12]调查稻瘟病发病情况,同时记载每叶最长病斑长度和每叶病斑数,每份材料随机调查 10 株。

1.2.7 白叶枯病接种

参照文献^[13]的方法。于水稻孕穗期,分别在温室和大田剪叶接种白叶枯病混合菌株,菌液浓度为 1×10^9 个/mL。在晴天的下午 17:00 开始接种,每个株系随机取 10 株,每株剪叶接种 10 张叶片以上,以剪叶接种清水为对照。接种 21 d 后逐株逐叶调查叶长和病斑长度,根据 IRRI^[12]标准统计对白叶枯病的抗感程度。

2 结果与分析

2.1 干涉苗的获得及表型和遗传分析

转 dsRNA 干涉载体的中花 11 的愈伤组织经根瘤农杆菌介导、潮霉素抗性筛选、再生后共获得 65 株转基因苗。T₁ 代转基因后代中有 9 个株系出现明显的干涉效果,干涉率为 13.8%。干涉植株的表型与野生型水稻中花 11 相比,主要表现为植株矮

化、叶色变深、根系变短、浅层根量增加、生育期延迟,总体表现与 T-DNA 插入突变体 T456 相似,但没有发现叶角比 T456 大的干涉植株(图 2)。

2.2 干涉苗的 PCR 和 Southern、GUS 检测

随机挑选 12 株 T₁ 代中无干涉表型的转基因植株和 8 株有干涉表型的转基因植株进行 PCR 验证,以中花 11 为阴性对照,质粒为阳性对照,结果表明无干涉表型的转基因植株中有部分也转入了干涉载体,而所有的有干涉表型的转基因植株中都转入了干涉载体(图 3)。以其中的有干涉表型的 W21、W25、W28、W34、W37 和无干涉表型的 W2 为材料进行 Southern 杂交(图 4),结果表明,W21、W25、W28、W37 和 T456 都有杂交信号,而阴性干涉对照 W2 和野生型中花 11 都无杂交信号,提示目的 dsRNA 可能已整合入水稻基因组中并传给了后代。其中的 W21、W25、W28、T456 为单拷贝插入,W37 为多拷贝插入,W21 和 W25 可能插入同一点位。W34 虽没有潮霉素基因的杂交信号,但经 GUS 对



图 2 T₁ 代干涉苗、T456 和中花 11 的成株期表型
Fig. 2. Phenotypic performance of RNA interference plants in T₁ generation, T456 and their wild parent Zhonghua 11.

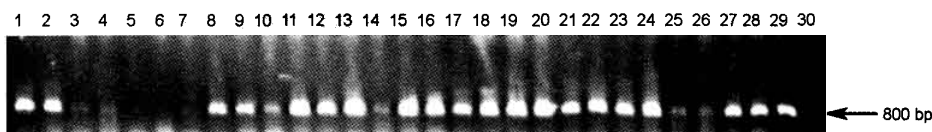


图 3 T₁ 代转基因植株的 PCR 结果
Fig. 3. PCR results of RNA interference plants in T₁ generation.

1-质粒(阳性对照);7-中花 11(阴性对照);8-T456;12-W37;13-W35;14-W34;15-W32;16-W28;17-W25;18-W23;19-W22;20-W21;30-空白对照。其余均为无干涉表型的转基因后代。
Lane 1, Plasmid (positive check); Lane 7, Zhonghua 11 (negative check); Lane 8, T456; Lane 12, W37; Lane 13, W35; Lane 14, W34; Lane 15, W32; Lane 16, W28; Lane 17, W25; Lane 18, W23; Lane 19, W22; Lane 20, W21; Lane 30, Control check; Other lanes are transgenic plants without interference phenotypes.

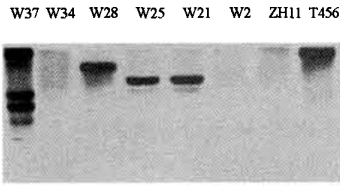


图 4 T₁代 dsRNA 干涉植株、突变体和野生型水稻的 Southern 分析

Fig. 4. Southern analysis of dsRNA interference plants in T₁ generation, T456 and Zhonghua 11.

W37、W34、W28、W25 和 W21 为 T₁代 RNA 干涉苗有表型变异的植株;W2 为 T₁代 RNA 干涉苗无表型变异的植株(阴性对照);ZH11 为野生型中花 11(阴性对照);T456 为 T-DNA 突变体。内切酶为 Hind III。

W37、W34、W28、W25 和 W21 represent RNA interference plants; W2 represents transgenic plant without RNA interference phenotype; ZH11, Zhonghua 11 (wild plant). The restriction endonuclease is Hind III.

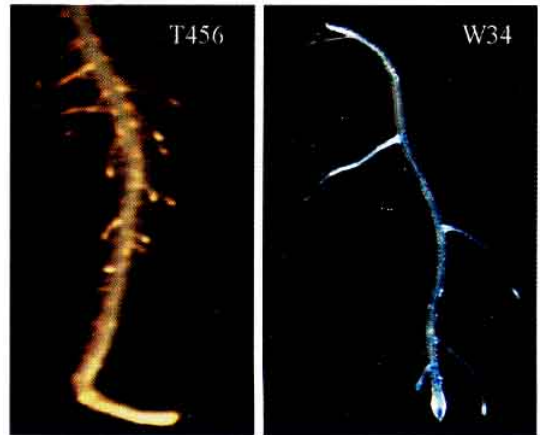


图 5 T456 和 W34 的 GUS 染色结果

Fig. 5. GUS stained result of T456 and W34.



图 6 稻瘟病接种后 dsRNA 干涉株系的发病情况

Fig. 6. Resistance result of dsRNA interference plants to rice blast.

其根部进行染色,发现根尖、根毛和维管束部分均能被染成蓝色,而对照 T456 不能被染色(图 5),且其表型与 W21、W28 等干涉植株很接近(图 2),因此也被认为是 RNA 干涉植株,推测可能的原因是潮霉素片段在转基因后代中丢失所致。W37 由于植株太矮(成株期株高为 20~30 cm)和基本不结实等原因而没有作进一步研究。

2.3 dsRNA 干涉株系的稻瘟病抗性

由表 1 和图 6 可知,3 个干涉株系 W21、W28、



图 7 白叶枯病接种后 dsRNA 干涉株系的发病情况

Fig. 7. Resistance result of dsRNA interference plants to rice bacterial blight.

W34 的稻瘟病抗性均强于中花 11 和 T456, T456 又比中花 11 抗稻瘟病,病级由中花 11 的 6.3 级上升到 T456 的 4.1 级和干涉苗的 1.4~2.4 级,由感病上升为抗病,说明 WRKY 转录因子可能调控稻瘟病的抗性,OsWRKY10 基因也可能与稻瘟病抗性有关。干涉苗 W28 比 W21 和 W34 略微感病,但差异不显著,其平均每片叶中病斑数明显比 W21 和 W34 要多,说明稻瘟病抗性与干涉载体的插入位点有一定的关系。

表 1 dsRNA 干涉株系对稻瘟病的抗性

Table 1. Resistance of dsRNA interference plants to rice blast.

材料 Material	最长病斑长 Longest lesion/cm	平均每叶病斑数 No. of lesions per leaf	病级 Disease grade	抗性 Resistance
中花 11 Zhonghua 11	6.9±2.9	8.1±2.0	6.3±1.3	感 S
W21	1.7±1.5	1.8±1.6	1.4±1.0	抗 R
W28	2.0±1.0	6.6±5.2	2.4±0.5	抗 R
W34	2.3±2.4	2.1±2.0	1.5±1.1	抗 R
T456	4.4±3.2	7.5±4.4	4.1±1.2	中感 MS

S, Susceptible; R, Resistant; MS, Moderately susceptible.

表 2 dsRNA 干涉株系对白叶枯病的抗性

Table 2. Resistance of dsRNA interference plants to rice bacterial blight.

材料 Material	叶长 Leaf length /cm	病斑长 Lesion length /cm	病斑长占叶长比例 Percentage of lesion length to leaf length /%	抗性级别 Disease grade	抗性 Resistance
中花 11 Zhonghua 11	26.27±3.15	5.06±3.38	19.11±12.57	4.4±1.8	中感 MS
W21	18.01±4.74	0.72±0.44	4.00±2.30	1.2±0.6	抗 R
W28	26.23±7.07	1.50±0.90	5.97±3.46	1.6±0.9	抗 R
W34	21.30±4.43	0.93±0.31	4.53±1.82	1.3±0.7	抗 R
T456	24.25±3.23	2.68±0.67	9.07±3.29	2.6±1.7	中抗 MR

S, Susceptible; R, Resistant; MS, Moderately susceptible; MR, Moderately resistant.

2.4 dsRNA 干涉株系对白叶枯病的抗性

对白叶枯病接种后的 dsRNA 干涉株系发病情况调查显示(表 2, 图 7), 中花 11 和 T456 对白叶枯病混合菌株的反应分别为中感和中抗, T456 的抗性比中花 11 略有提高, 而 3 个干涉株系 W21、W28 和 W34 的抗性级别分别为 1.2、1.6 和 1.3 级, 达到了抗级水平, 明显比中花 11 抗白叶枯病。W28 比 W21 和 W34 略为感病, 但差异不明显, 这与稻瘟病接种后的表现趋势一致, 说明 WRKY 转录因子和 *OsWRKY10* 基因还可能参与调控白叶枯病抗性基因。WRKY 转录因子既参与稻瘟病的抗性调控, 又与抗白叶枯病有关, 说明这一家族中与 *OsWRKY10* 同源的基因很可能参与了抗性基因的调控。

3 讨论

dsRNA 在线虫、果蝇等动物的研究中主要采用微注射法, 而在拟南芥、水稻、大麦等植物的研究中主要是构建干涉载体, 然后通过农杆菌介导等方法整合到目的植物的基因组中。dsRNA 干涉应用于植物功能基因研究和作物性状改良的报道已非常多^[13~16]。Schweizer 等^[17]曾利用 dsRNA 干涉技术沉默大麦中的一个小种非特异性抗白粉病基因的负调控因子, 增加了细胞对白粉病的抗性。而运用 dsRNA 干涉来研究 WRKY 转录因子的还未见报

道。我们用农杆菌介导方法转化包含 WRKY 保守域的 dsRNA 干涉载体, 获得了有干涉表型的转基因后代, 经接种稻瘟病和白叶枯病, 发现干涉苗比 T-DNA 插入突变体和野生型亲本的抗性都要强, 而插入突变体又比野生型亲本抗病。干涉植株比插入突变更抗病, 可能是由于我们设计的干涉载体中包含了 WRKY 的保守结构域, 它抑制了这个大家族中其他的与 *OsWRKY10* 同源的基因, 而这些同源基因中的很多可能与水稻抗病性有关。而事实上, 水稻 WRKY 家族中的很多成员与抗病性有关^[18,19]。同时也说明了 *OsWRKY10* 可能负向调控抗性基因。干涉植株和 T-DNA 插入突变体既抗稻瘟病又抗白叶枯病, 说明与 *OsWRKY10* 同源的转录因子可能调控的是一个具有广谱抗性的基因。

Stoutjesdijk 等^[20]利用发夹型 RNA 介导了一种能在拟南芥种子中表达的内源基因沉默, 发现沉默性状能稳定遗传 5 代以上。也有实验证明, 转基因性状繁殖几代后会逐渐丧失, 这被认为与启动子的甲基化有关。我们研究发现, 干涉苗出现的干涉表型, 如生育期延迟和植株矮化的性状, 在 T₁ 代最明显, 随着世代的推进, 逐代弱化, 越来越趋向野生型亲本的性状, 如 W28 这个株系, 至 T₃ 代时从表型上已很难与野生型亲本相区分, 但通过 GUS 染色或分子杂交分析, 仍能证明 dsRNA 整合在目的水

稻基因组中。这种转基因性状的丧失在不同干涉株系之间有差异。

传统的基因敲除技术一次只能改变一个基因, RNAi 技术利用同一个基因家族内不同基因具有一段同源性很高的保守序列来设计 dsRNA 分子, 一次可以抑制一个基因家族的多个基因。我们利用 WRKY 转录因子家族中高度保守的 WRKY 结构域设计包含玉米 Ubiquitin 内含子的 dsRNA 干涉载体, 研究结果初步证明这种方法是可行的。利用 RNA 干涉针对某一个特定的外显子设计 dsRNA 的序列, 还能够避免可变剪接对基因功能研究的干涉。由于多基因家族内的启动子序列通常比编码区差别大, 利用 RNA 干涉也可用于沉默启动子。启动子区 RNA 干涉技术可将多基因家族的各个成员区分来研究, 而将编码区和启动子区 RNA 干涉技术的信息综合起来便可更全面地了解多基因家族各个成员的功能。另外, 还可通过反向 Northern 方法来进一步确证同一家族中有哪些基因被抑制了。有关实验正在进行中。

当然, RNA 干涉可能对某些目的基因无效, 如那些在神经细胞和精细胞中发挥功能的基因。经典正向遗传能产生稳定的突变系, 其中包括一些抗 RNA 干涉的基因。一些由正向遗传分离的突变是功能获得突变, 这是 RNA 干涉不可能产生的。因此, 让正向遗传分析与 RNA 干涉互补长短, 结合两者的优点将使功能基因组研究取得更快的发展, 这也是本实验尝试将 T-DNA 插入突变和 RNA 干涉结合起来研究的原因之一。另外, 一些基因可能只产生观察不到的细微的或条件性的表型, 但是可以预想将来用特殊分析技术来进行 RNA 干涉筛选就能发现更多基因的表型, 从而提高对生物的认识。

谢辞: 浙江省农业科学院柴荣耀副研究员在稻瘟病接种中提供菌株和大量帮助; 中国水稻研究所庄杰云研究员和王艳丽博士分别在 Southern 杂交和白叶枯病接种中提供大量帮助, 特致谢忱。

参考文献:

- 1 王雷, 种康, 许智宏. 植物功能基因组学研究的有效工具——RNAi 技术. 植物生理与分子生物学, 2003, 39(6): 705—710.
- 2 Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 491—497.
- 3 Wu K L, Guo Z J, Wang H H, et al. The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins. *DNA*

- Res*, 2005, 12: 9—26.
- 4 Xie Z, Zhang Z L, Zou X L, et al. Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiol*, 2005, 137: 176—189.
- 5 朱正歌, 肖晗, 傅亚萍, 等. 水稻转座子突变体库的构建及突变类型的遗传分析. 生物工程学报, 2001, 17: 288—292.
- 6 Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J*, 2001, 27: 581—590.
- 7 李靖. OsddWRKY 基因克隆及水稻基因组 WRKY 家族分析 [学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2002.
- 8 Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, 6(2): 271—282.
- 9 卢扬江, 郑康乐. 提取水稻 DNA 的一种简易方法. 中国水稻科学, 1992, 6(1): 47—48.
- 10 Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W, et al. GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plant. *EMBO J*, 1987, 6: 3901—3907.
- 11 饶志明, 董海涛, 庄杰云, 等. 水稻稻瘟病菌胁迫应答 cDNA 片段的表达及定位. 中国水稻科学, 2003, 17(2): 105—108.
- 12 IRRI (International Rice Research Institute). Standard Evaluation System for Rice. 3rd ed. Manila: IRRI, 1988.
- 13 杨长登, 王兴春, 李西明, 等. 水稻品种五丰占 2 号的白叶枯病抗性遗传分析. 中国水稻科学, 2004, 18(2): 99—103.
- 14 Zentella R, Yamauchi D, Ho T H. Molecular dissection of the gibberellin/abscisic acid signaling pathways by transiently expressed RNA interference in barley aleurone cells. *Plant Cell*, 2002, 14: 2289—2301.
- 15 Alabadi D, Yanovsky M J, Mas P, et al. Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2002, 12: 757—761.
- 16 Gong D M, Zhang C Q, Chen X Y, et al. Constitutive activation and transgenic evaluation of the function of an *Arabidopsis* PKS protein kinase. *J Biol Chem*, 2002, 277(44): 42088—42096.
- 17 Schweizer P, Pokorný J, Lefert P S, et al. Double-stranded RNA interference with gene function at the single-cell level in cereals. *Plant J*, 2000, 24(6): 895—903.
- 18 Guo Z J, Kan Y C, Chen X J, et al. Characterization a rice WRKY gene whose expression is induced upon pathogen attack and mechanical wounding. *Acta Bot Sin*, 2004, 46: 955—964.
- 19 Chen C, Chen Z. Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol*, 2002, 129: 706—716.
- 20 Stoutijesdijk P A, Singh S P, Liu Q, et al. hpRNA-mediated targeting of the *Arabidopsis* FAD2 gene gives highly efficient and stable silencing. *Plant Physiol*, 2002, 129(4): 1723—1731.