

转葡聚糖酶和防御素基因的番茄植株 及其对番茄灰霉病的抗性

陈双臣^{1,2} 刘爱荣^{1,3} 邹志荣^{2*}

(1. 河南科技大学林学院, 洛阳 471003; 2. 西北农林科技大学园艺学院, 陕西 杨凌 712100;
3. 浙江大学农业与生物技术学院植物保护系, 杭州 310029)

摘要: 用根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导法, 将烟草 β -1, 3-葡聚糖酶 *Glucanase* 基因、苜蓿防御素 *alfAFP* 基因及二者双价基因导入番茄 Micro-Tom 中, 以期获得抗灰霉病的转基因株系, 并比较验证双价基因是否具有协同作用。绿色荧光蛋白基因 (GFP) 活性检测、PCR 和 Southern 杂交检测表明, 外源基因分别以 1~4 个拷贝整合到番茄基因组中。对 T_1 代植株进行接种鉴定表明, 转基因植株对灰霉病侵染的抵抗能力较对照明显增强, 各株系的抗病能力与外源基因的表达相关, 且葡聚糖酶基因和防御素基因对抗灰霉菌表现一定的协同作用。 T_2 株系田间抗病鉴定结果表明, 转基因株发病程度不同, 病情指数在 19~28 之间, 抗病性均高于对照。所得到的稳定表达的株系可作为抗病育种材料进一步研究。

关键词: 转基因番茄; 葡聚糖酶基因; 苜蓿防御素基因; 灰霉病

Transgenic tomato plants expressing glucanase and defensin genes and their resistance to *Botrytis cinerea*

CHEN Shuang-chen^{1,2} LIU Ai-rong^{1,3} ZOU Zhi-rong^{2*}

(1. College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan Province
China; 2. College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi
Province, China; 3. Department of Plant Protection, College of Agricultural and
Biological Technology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The tobacco β -1, 3-*Glucanase* gene, the alfalfa defensin gene *alfAFP* and their bivalent gene *GLU-AFP* were introduced into tomato line Micro-Tom via *Agrobacterium*-mediated method. The aim is to gain transgenic lines resistant to *Botrytis cinerea*, and test the synergistical effects of bivalent gene. Transgenic lines carrying each of the transgenes were confirmed for integration into the tomato genome using GFP, PCR and Southern blot hybridization. One to four copies of the transgene were integrated into the tomato genome. Performance test of resistance analyses to *B. cinerea* with T_1 generation transgenic tomato lines showed the transgenic lines exhibited higher resistance to the pathogens infected than that of the non-transgenic plants, and resistance levels were related to expression levels of the transgene, showing dosage-effect. The transgenic tomato harboring *GLU-AFP* cassette showed the highest disease resistance. It suggested that the *alfAFP* and *Glucanase* gene have some synergistical effects on the resistance to *B. cinerea*. Performance test of resistance of T_2 families with *GLU-AFP* gene showed that M_3 , M_8 and M_{20} had a resistance index of 19 to 22, which showed a high resistance level. Some independent lines with high

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2001AA247010)

作者简介: 陈双臣, 男, 1978 年生, 博士, 主要从事植物细胞工程与基因工程研究, email: chen_shuangchen@126.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), email: lamont@126.com; 收稿日期: 2005-12-11

disease resistance, low variability and stable expression of transgenes could be selected for the further studies and molecular breeding.

Key words: Transgenic tomato; tobacco glucanase gene; alfalfa defensin gene; *Botrytis cinerea*

番茄灰霉病是一种世界性重要病害,该病主要危害果实造成烂果,对保护地番茄生产构成极大威胁^[1]。20 世纪 80 年代开始在我国发生蔓延,现已成为设施番茄生产的限制性障碍。国外以栽培防治(主要调控温室的温、湿度)为主的策略在我国现有条件下难以实施^[1]。目前化学防治是常用手段,由于频繁施用杀菌剂,病菌抗药性严重,并且施药时以果实为主要目标,造成了一定的农药污染。在病害防治措施中,抗性品种的应用是最为经济有效的方法,但灰霉病抗源的匮乏,限制了抗性品种的选育。利用基因工程技术将外源抗真菌病基因导入番茄,为抗性育种提供了新途径,已有研究表明转化抗病基因可增强作物对灰霉病的抗性^[2]。

β -1,3-葡聚糖是大多数真菌细胞壁的主要成分,可被 β -1,3-葡聚糖酶水解,将这种酶的基因导入烟草等作物中均表现出较强的抗真菌性^[3]。Nakamura 等^[3]把来自大豆的 β -1,3-葡聚糖酶基因导入猕猴桃,转基因植株能有效抵抗赤星病菌和黑胫病菌的侵染。防御素的抗性谱十分广泛,对细菌、真菌

和被膜病毒有广谱的毒杀效应,在植物抗病基因工程中可用于抗真菌和细菌病害^[4]。有研究表明同时表达多个防卫基因可以获得更强的抗病性,通过转基因已获得烟草、胡萝卜抗灰霉病材料^[5],但存在外源基因在受体植株中不稳定、抗病效果不明显的缺点^[6-8],且有关 β -1,3-葡聚糖酶与防御素的协同抗病的研究还未见报道。作者通过农杆菌介导法将葡聚糖酶和防御素基因及二者双价基因导入番茄,获得了抗灰霉病的转基因株系,丰富了番茄抗灰霉病育种的基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料 番茄受体材料为 Micro-Tom *Lycopersicon esculentum*。所用农杆菌菌株为 EHA105,质粒载体为 pZ100。质粒载体分别为 pAFP-Glu、pGlu、pAFP,均由本实验室构建保存(图 1,以 pAFP-Glu 为例)。灰霉病病菌 *Botrytis cinerea* Pers. 由浙江大学植物保护系惠赠。

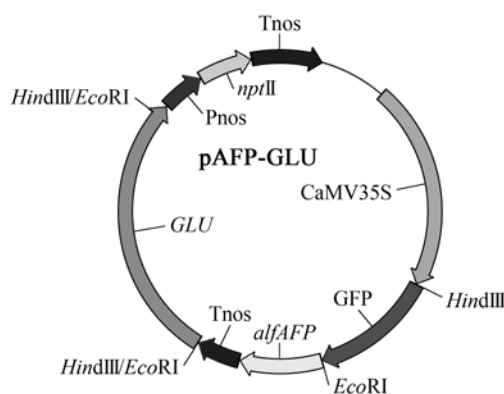


图 1 双价抗病基因表达载体 pAFP-Glu 的 T-DNA 区结构图

Fig. 1 Schematic diagram of the T-DNA region of the binary vector pAFP-Glu

注: Tnos: 章鱼碱合成酶基因终止子; Pnos: 章鱼碱合成酶基因启动子; CaMV35S: 花椰菜病毒 35S 启动子。

Note: Tnos: Nopaline synthase gene terminator; Pnos: Nopaline synthase gene promoter; CaMV35S: Cauliflower mosaic virus 35S promoter.

1.2 农杆菌介导的番茄遗传转化 参照 Fillati 等^[9]农杆菌介导的番茄遗传转化方法,用叶盘法将质粒 pAFP-Glu、pGlu、pAFP 分别导入 Micro-Tom。将无菌番茄子叶切去叶尖和基端,切成 0.5 cm^2 的小块,正面朝下置于 M_1 培养基上 ($\text{MS} + 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ZT} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IAA} + 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{乙酰丁香酮} + 15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{蔗糖} + 0.5\% \text{ agar 琼脂}$), 28°C 暗培养 2 天。之

后将预培养的外植体浸入用 MS 液体培养基稀释的根癌农杆菌悬浮液中 10 min,用无菌滤纸吸去外植体表面多余菌液,在 M_1 上共培养 2 天。转移至筛选培养基 M_2 上 ($\text{MS} + 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ZT} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IAA} + 100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \text{卡那霉素} + 500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \text{噻孢霉素} + 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{蔗糖} + 0.5\% \text{ 琼脂}$) 筛选分化芽。转化的抗性芽长至 $1.5 \sim 2.0 \text{ cm}$ 时,将芽切下放入

M₃ 培养基 (MS + 2.0 mg · L⁻¹ IAA + 100 mg · mL⁻¹ 卡那霉素 + 150 mg · mL⁻¹ 噻孢霉素 + 20 g · L⁻¹ 蔗糖 + 0.5% 琼脂) 中诱导生根。将生根的 T₀ 代小植株直接移入装有草炭和蛭石的营养钵中, 遮荫保湿炼苗 3~5 天, 在温室自然光照下生长。

1.3 绿色荧光蛋白表达检测 在 Leica MPS 60 荧光显微镜下观察 T₀ 代抗性株不同组织部位的 GFP 绿色荧光, 检测 GFP 基因的表达情况。选用 BP355 激发滤光片, 用 Leica DMRA2 自动成像系统拍照。

1.4 T₀ 代转基因植株的 PCR 和 Southern 检测

以 CTAB 法提取对照和 GFP 基因表达的番茄转化株叶片中总 DNA^[10]。根据目的基因 *Glucanase* 和 *alfAFP* 两端序列设计两对引物, 以质粒作阳性对照, 未转化再生植株的 DNA 作阴性对照。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 2.5 min, 94℃ 变性 1 min, 56℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增片段在 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。用限制性内切酶 *Hind* III 完全酶切 20 μg 总 DNA, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 用毛细管转移法将凝胶中的 DNA 片段转移至尼龙膜 (HyBond N⁺, Amersham Pharmacia) 上, 80℃ 烘干。预杂交、杂交均用 7% SDS 磷酸缓冲液。所用探针为 *nptII* 基因扩增产物, 用 ³²P-dCTP 标记探针, 37℃ 保温 1 h, 热变性后加入杂交液, 55℃ 杂交 16 h。杂交膜用洗膜液 I (1 × SSC, 0.1% SDS), 室温洗膜 2 次, 每次 10 min, 洗膜液 II (0.5 × SSC, 0.1% SDS), 60℃ 洗膜 2 次, 每次 10 min。

1.5 T₁ 代转基因植株的 Northern 检测 用 Trizol 试剂 (GIBCO/BRL) 抽提总 RNA。RNA 沉淀经适度干燥后, 用无 RNase 的水溶解。取 30 μg RNA 加入 5 × 甲醛凝胶电泳缓冲液 4.0 μL、37% 甲醛 3.6 μL、甲酰胺 10 μL, 65℃ 温育 30 min 后, 在琼脂糖凝胶中电泳, 用毛细管转移法将凝胶中的 RNA 片段转移至尼龙膜上, 80℃ 烘干。分别与 ³²P-dCTP 标记的 *GLU* 和 *AFP* 探针杂交。

1.6 转基因植株对灰霉病的抗性鉴定 采用离体叶片接种法^[2,11]。将转基因番茄 T₀ 代、T₁ 代收获的种子与非转基因番茄种子播种在消毒的土壤中, 当幼苗长至 4~5 片真叶时, 剪取叶龄相同及大小适中的叶片, 叶柄以湿润无菌脱脂棉包裹, 用移液枪取 20 μL 灰霉菌 (*B. cinerea*) 的孢子悬浮液 (10⁶ cfu · mL⁻¹) 点于叶正面, 在光周期 12 h/12 h, 温度 20℃ 左右条件下培养。以无菌的 1% 葡萄糖溶液接种为对

照。分别在接种后 4、6、8 天调查发病情况。灰霉病分级标准参照 Bi 等^[8]。病情指数计算参照方中达^[12]的方法。每个处理取 10 片叶, 重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 番茄的遗传转化与植株再生

预培养 2 天的番茄子叶用工程菌液侵染后, 转接到芽分化培养基上, 培养 2 天后, 转移到选择性芽分化培养基上, 经过选择培养后, 部分子叶黄化或褐化, 逐渐死亡。部分子叶伤口的基部分化出黄绿色的愈伤组织, 约 10 天后分化出绿色芽点。待芽长到 2~3 cm 时, 切下转入生根培养基。将经抗性筛选的小苗诱导生根后转入土壤中, 能正常开花结果。

2.2 外源基因整合及表达检测

2.2.1 GFP 在 T₀ 代转基因植株不同组织中的表达: 在 Leica MPS 60 荧光显微镜下观察 T₀ 代抗性愈伤组织和抗性株不同部位的 GFP 绿色荧光, 选用 BP355 激发滤光片, 用 Leica DMRA2 自动成像系统拍照。在蓝光照射下愈伤组织和转基因植株的不同部位均观察到较强的绿色荧光, 而对照则发出黄色荧光 (图 2), 表明 GFP 基因已经整合到番茄的基因组中。大约 90% 生根良好的抗性苗根尖呈绿色荧光, 在果实成熟时, 检测根系 GFP 阳性植株, 结果表明, 茎和果实均有不同程度 GFP 基因表达。对 112 株转化株的叶片进行检测, 34.8% 的转基因株有 GFP 表达。

2.2.2 目的基因的 PCR 检测: 为证明目的基因已整合到番茄基因组中, 以 GFP 检测为阳性的 T₀ 代转基因植株的总 DNA 为模板, 根据目的基因 *Glucanase* 和 *alfAFP* 两端序列设计引物进行 PCR 扩增。结果表明: 转基因植株均扩出与阳性对照相同的目的片段 (图 3): 980 bp (*Glucanase*) 和 280 bp (*alfAFP*), 而未转化植株的基因组 DNA 未扩增出任何条带。初步确定 β-1,3-葡聚糖酶基因和苜蓿防御素基因已整合到番茄基因组中。

2.2.3 转化双价基因 T₀ 代植株的 Southern 杂交分析: 提取 T₀ 代植株 PCR 检测呈阳性的 9 个株系的 DNA, 利用 *nptII* 基因的 PCR 扩增片段作探针与酶切后的转基因番茄基因组 DNA 杂交分析。结果显示, 外源基因以单拷贝或低拷贝的形式整合入番茄基因组中, 而未转化植株无杂交带 (图 4)。进一步确认外源基因已整合到所转化的番茄基因组中。

2.2.4 T₁ 代植株转基因表达检测: 为了确证外源基

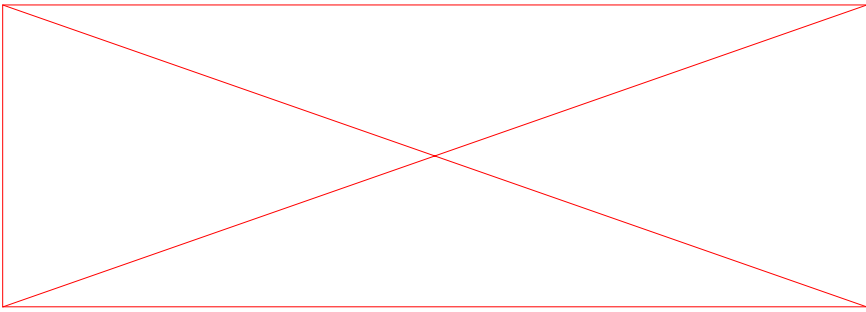


图2 GFP 在 T_0 代转基因番茄不同组织部位中的表达

Fig. 2 Expression of GFP in different parts of T_0 transgenic tomato plant

注: 1. 愈伤组织; 2. 叶; 3. 茎; 4. 花; 5. 果实; 6. 种子; 7. 非转基因植株叶片。

Note: 1. calli; 2. leaf; 3. stem; 4. flower; 5. fruit; 6. seed; 7. leaf of non-transgenic.

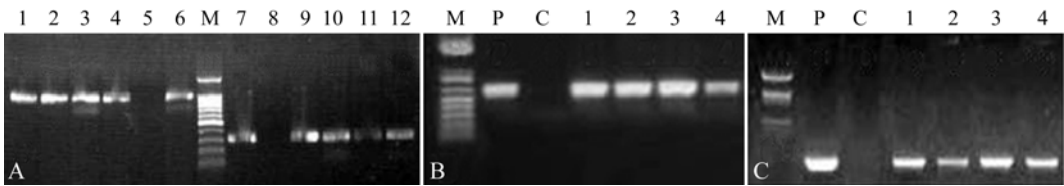


图3 T_0 代转基因植株目的基因的 PCR 检测

Fig. 3 Detection of *alfAFP* gene, *Glucanase* gene and *GLU-AFP* gene in T_0 transgenic tomato by PCR

注: M: DNA 分子量标记; A: 1~4: 转基因株系(检测 *Glucanase* gene); 5, 8: 非转基因植株; 6, 7: 质粒; 9~12: 转基因株系(检测 *alfAFP* gene); B 和 C: 泳道 P: 质粒; 泳道 C: 非转基因植株; 泳道 1~4: 转基因植株(B, C 分别检测 *Glucanase*, *alfAFP* gene)。Note: M: DNA ladder marker; A: 1~4: independent transgenic lines (detection of *Glucanase* gene); 5, 8: non-transformed plants; 6, 7: plasmids; 9~12: independent transgenic line (detection of *alfAFP* gene). B and C: lane P: plasmids; lane C: non-transformed plants; lanes 1~4: independent transgenic (B: detection of *Glucanase* gene; C: detection of *alfAFP* gene).

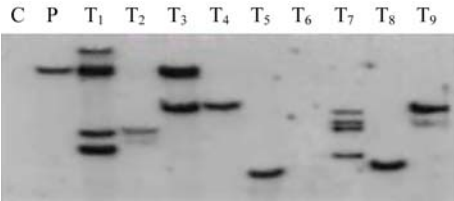


图4 T_0 代转基因番茄植株 Southern 杂交分析

Fig. 4 Southern blot analysis of PCR-positive T_0 transformed plants with *GLU-AFP* gene

注: 泳道 C: 非转基因植株; 泳道 P: 质粒 pAFP-Glu; 泳道 $T_1 \sim T_9$: 转基因植株(T_0 株系)。Note: Lane C: DNA from non-transformed plant; Lane P: Plasmid pAFP-Glu; Lanes $T_1 \sim T_9$: DNA from transformed plants.

因在番茄基因组中的表达,提取 PCR 阳性 T_1 代植株的 RNA,进行转基因表达水平检测,以 *Glucanase*、*alfAFP* 基因为探针进行 Northern 杂交(图 5)。结果表明,*GLU* 和 *AFP* 基因在转基因植株中都有不同程度的表达,表达水平在各株系间有所差异。*GLU* 和 *AFP* 基因的表达水平在株系 M_1 、 M_3 中较为一致。

2.3 转基因植株 T_1 代的抗病性检测

分别取 PCR 反应为阳性的转 *GLU*、*AFP* 的株系和转 *GLU-AFP* 基因株系的 T_1 代植株各 50 株,进行灰霉病菌接种鉴定,设 3 次重复。分别于接种后 4

天、8 天调查发病情况。结果表明,不同转基因的株系抗病性有所差异,但均高于对照(图 6)。转基因株发病时间比对照不仅推迟,而且对灰霉病菌有抑制作用。其中 M_1 病情指数最高为 22.78,而 CK 高达 87.67,这表明转基因番茄的抗灰霉病性状已得以表达。由图 6 还可看出,转 *GLU-AFP* 基因株系(M_1 , M_3 , M_4 , M_{18})的抗病效果要好于转 *GLU* 或 *AFP* 的植株,且差异显著,表明 *GLU*、*AFP* 基因对抗灰霉病菌表现出一定的协同作用。单价转基因植株间抗性差异不明显。

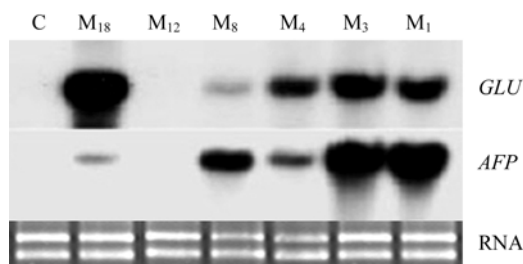


图5 T_1 代转基因番茄植株 Northern 杂交结果

Fig. 5 Autoradiographs of Northern blot with total RNA extracted from leaves of T_1 transgenic plants with *GLU*-*AFP* gene (M_{18} , M_{12} , M_8 , M_4 , M_3 , M_1) and non-transformed control plant (C)

注: 以 32 P-dCTP 标记的 *GLU* 和 *AFP* 探针杂交。Note: The blot was hybridised with 32 P-labelled DNA fragments encoding tobacco β -1,3-*Glucanase* gene, alfalfa defensin gene *alfAFP*.

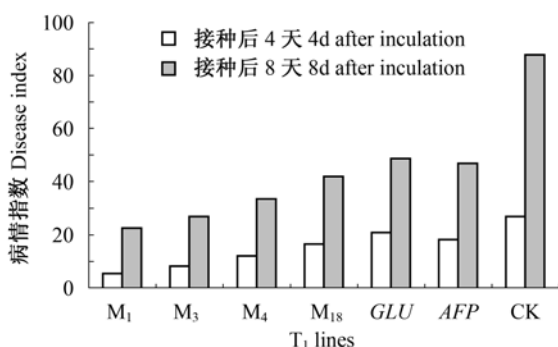


图6 T_1 代转基因植株对灰霉病的抗性

Fig. 6 Resistance to *Botrytis cinerea* of T_1 transgenic lines

2.4 转基因植株 T_2 代的遗传及抗病性分析

对转基因植株 T_2 代株系的叶片进行 GFP 检测。结果表明, M_8 、 M_{20} 满足 1 对基因的遗传分离, 验证了 Southern 杂交结果, 即这 3 个转基因株系均是插入 1 个外源基因的拷贝。对 T_2 代株系苗期进行人工接种鉴定及田间抗病性鉴定。结果表明: 转基因株呈现不同程度的发病状况, 其抗病性均明显高于对照(表 1)。

3 讨论

通过转基因操作获得抗灰霉病材料已在天竺葵、烟草、胡萝卜、番茄等作物上有所应用^[13,14], 主要是转化几丁质酶基因^[2,10]和病原相关蛋白质, 如多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 (PGIP)^[13]和抗菌肽 *Ace-AMP1*^[8]。植物产生的病程相关蛋白 (pathogenesis-related protein, PR) 通常具有几丁质酶或 β -1,3-葡聚糖酶活性, 属内源水解酶, 目前已从烟草、马铃薯、水稻、菜豆等作物中克隆了编码 PR 蛋白的基因。1990 年 Roby 等^[15]报道了转菜豆几丁质酶基因烟草可增强植株对立枯丝核菌和枯萎菌的抗性。Alexander 等^[16]获得了组成型表达的转 PR-1a 基因

烟草, 转基因烟草对黑胥病和霜霉病均表现高水平抗性。Carstens 等^[17]将几丁质酶基因 *CTS1* 转化到烟草植株并得以稳定表达, 试验表明转基因植株叶片浸提物可显著抑制孢子的萌发和菌丝的生长, 对 F_1 代的部分株系进行叶片接种试验表明, 转基因植株较非转基因植株病害程度降低 50%~70%。Kishimoto 等^[18]利用转化几丁质酶基因 (*CHI2*) 的黄瓜进行灰霉病接种抗性鉴定, 表明转基因植株对灰霉病抗性及其叶片中几丁质酶活性较非转基因植株增强, 但 *CHI2* 的表达不稳定, 随接种时间延长而抗性降低。类似研究在马铃薯、番茄、甜菜及莴苣等作物中也获得了成功, 但大都存在抗病基因单一、外源基因在受体植株中不稳定、抗病效果不明显的缺点^[10,19]。寻找抗真菌病害能力强的其它基因, 优化与其它病程相关蛋白基因的组合, 建立在抗真菌蛋白基因基础上的防御体制, 不失为解决植物真菌病害的一条有效途径。本研究将烟草 β -1,3-葡聚糖酶 *Glucanase* 基因、苜蓿防御素 *alfAFP* 基因及二者双价基因导入番茄 Micro-Tom 中, 获得转基因植株, 接种灰霉病后, *Glucanase* 基因和 *alfAFP* 基因表现出协同作用效果, 转基因株系的抗性均比对照有明显提高, 所得到的稳定表达的株系对于番茄灰霉病防治有实际应用价值。

各转基因株系间抗病性有所差异, 已有研究表明抗性的强弱与基因表达水平间存在相关性^[13,16]。但也有研究表明, 抗性的强弱与基因表达水平间的相关性存在争议^[20]。本研究对 T_1 代植株转基因表达和抗病性分析表明, *GLU* 和 *AFP* 基因的表达水平一致的株系 M_1 、 M_3 抗病性较强, 而 *AFP* 基因表达较弱的 M_{18} 抗病性较差。表明各株系的抗病能力与外源基因的表达相关。本研究中 M_8 、 M_{18} 株系 *GLU* 和

表 1 转 *GLU-AFP* 基因植株 T₂ 代分离情况Table 1 Segregation and disease resistance of T₂ generation of transgenic plants with *GLU-AFP* gene

株系 Line	GFP 阳性株数 No. of GFP positive	GFP 阴性株数 No. of GFP negative	χ^2	分离比 $\chi^2_{0.05} = 3.84$	苗期病情指数 Disease index at seedling stage	田间病情指数 Disease index in field
M ₃	54	14	1.470	2.4:1	22.8	19.4
M ₈	64	16	0.817	3.0:1	35.7	29.8
M ₂₀	65	27	0.710	3.0:1	28.6	23.5
CK	—	—	—	—	85.8	75.3

AFP 基因的表达水平有较大差异,可能与双基因转化时相互影响有关^[21]。进一步分析表明,外源基因的表达水平与外源基因的插入拷贝数无直接关系,这与前人结果相一致^[22]。

参 考 文 献 (References)

- Morgan W M. The effect of night temperature and glasshouse ventilation on the incidence of *Botrytis cinerea* in a late-planted tomato crop. *Crop Protection*, 1984, 3(2): 243–251
- Tabei Y, Kitade S, Nishizawa Y, *et al.* Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Cell Reports*, 1998, 17(3): 159–164
- Nakamura Y, Sawada H, Kobayashi S, *et al.* Expression of soybean beta-1,3-endoglucanase cDNA and effect on disease tolerance in kiwifruit plants. *Plant Cell Reports*, 1999, 18(7–8): 527–532
- 张秀海, 郭殿京, 张利明, 等. 兔防御素 NP-1 基因在转基因番茄中表达的初步研究. *遗传学报*, 2000, 27(11): 953–958
- Punja Z K, Raharjo S H T. Response of transgenic cucumber and carrot plants expressing different chitinase enzymes to inoculation with fungal pathogens. *Plant Disease*, 1996, 80(9): 999–1005
- Wang Y, Kausch A P, Chandless J M, *et al.* Co-transfer and expression of chitinase, glucanase, and bar genes in creeping bentgrass for conferring fungal disease resistance. *Plant Science*, 2003, 165(3): 497–506
- Schaefer S C, Gasic K, Cammue B, *et al.* Enhanced resistance to early blight in transgenic tomato lines expressing heterologous plant defense genes. *Planta*, 2005, 222(5): 858–866
- Bi Y M, Cammue B P A, Goodwin P H, *et al.* Resistance to *Botrytis cinerea* in scented geranium transformed with a gene encoding the antimicrobial protein Ace-AMP1. *Plant Cell Reports*, 1999, 18(10): 835–840
- Fillatti J J, Kiser J, Rose R, *et al.* Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Biotechnology*, 1987, 5(7): 726–730
- 颜子颖, 王海林译 (F. 奥斯伯, R. 布伦特, R. E. 金斯顿, 等著). 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998, p. 39
- 罗小英, 曾雪嘉, 肖月华, 等. 抗菌肽和几丁质酶基因提高烟草对黑痣病菌和赤星病菌的抗性研究. *植物病理学报*, 2005, 35(3): 249–255
- 方中达. 植病研究方法 (第 3 版). 北京: 中国农业出版社, 1998, p. 11
- Powell A L T, van Kan J, ten Have A, Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Molecular Plant Microbe Interact*, 2000, 13(9): 942–950
- Renault A S, Deloire A, Letinois I, *et al.* β -1, 3-glucanase gene expression in grapevine leaves as a response to infection with *Botrytis cinerea*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2000, 51(1): 81–87
- Roby D, Broglie K, Cressman R, *et al.* Activation of a bean chitinase promoter in transgenic tobacco plants by phytopathogenic fungi. *Plant Cell*, 1990, 2(10): 999–1007
- Alexander D, Goodman R M, Gut-Rella M, *et al.* Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, 90, 7327–7331
- Carstens M, Vivier M A, Pretorius I S. The *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, encoded by the *CTSI-2* gene, confers antifungal activity against *Botrytis cinerea* to transgenic tobacco. *Transgenic Research*, 2003, 12(4): 497–508
- Kishimoto K, Nishizawa Y, Tabei Y, *et al.* Transgenic cucumber expressing an endogenous class III chitinase gene has reduced symptoms from *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*, 2004, 70(6): 314–320
- 毛碧增, 李德葆, 李群, 等. 转化双价防卫基因获得抗纹枯病水稻. *植物生理与分子生物学学报*, 2003, 29(4): 322–326
- Park S M, Lee J S, Jegal S, *et al.* Transgenic watermelon rootstock resistant to CGMMV (cucumber green mottle mosaic virus) infection. *Plant Cell Reports*, 2005, 24(6): 350–356
- Fagard M, Vaucheret H. Systemic silencing signal(s). *Plant Molecular Biology*, 2000, 43(2–3): 285–293
- Moravcikova J, Matusikova I, Libantova J, *et al.* Expression of a cucumber class III chitinase and *Nicotiana plumbaginifolia* class I glucanase genes in transgenic potato plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, 79(2): 161–168