

# 根癌农杆菌介导的芪合酶基因转化烟草遗传体系的优化

安娜<sup>1</sup>, 陈耀锋<sup>1</sup>, 崔志刚<sup>1</sup>, 白延红<sup>2</sup>

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100; 2 杨凌职业技术学院 生物工程系, 陕西 杨凌 712100)

**[摘要]** 【目的】研究根癌农杆菌介导的芪合酶基因转化烟草遗传体系的优化条件。【方法】以“中烟 99”叶片为受体, 采用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*, GV3101)介导法, 将芪合酶基因导入烟草基因组, 并对其遗传体系进行了优化, 对筛选获得的转基因烟草植株进行检测。【结果】根癌农杆菌介导的芪合酶基因遗传转化的最佳条件为: 将预培养 2 d 的烟草外植体, 用稀释 10 倍的 GV3101 菌株菌液( $OD_{600} = 0.6$ )浸染 8 min 后, 共培养 3 d, 然后转入含卡那霉素(Km)50 mg/L 和羧苄青霉素(Cb)500 mg/L 的筛选分化培养基上诱导分化, 待抗性芽长到 2~3 cm 后, 转入含 Km 50 mg/L 和 Cb 500 mg/L 的筛选生根培养基上进行筛选, 在以上最佳遗传转化条件下, 初步筛选到 54 株转化体, 经 PCR 和 RT-PCR 检测获得 25 株转化烟草植株。【结论】经卡那霉素筛选、PCR、RT-PCR 检测后, 初步证明芪合酶基因已被整合到烟草基因组中, 并可以正常转录。

**[关键词]** 芪合酶基因; 烟草; 根癌农杆菌; 遗传转化

**[中图分类号]** S572

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2010)05-0061-07

## Study on the optimization of transferring stilbene synthase gene into tobacco mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

AN Na<sup>1</sup>, CHEN Yao-feng<sup>1</sup>, CUI Zhi-gang<sup>1</sup>, BAI Yan-hong<sup>2</sup>

(1 College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Department of Biotechnology, Yangling Vocational and Technical College, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** 【Objective】The research studied the optimization of genetic transformation with the stilbene synthase gene by *Agrobacterium* mediated. 【Method】With the sterile leaves of “Zhongyan 99”, using the *Agrobacterium* (*Agrobacterium tumefaciens*, GV3101) mediation method, the stilbene synthase gene was translated into tobacco genome, and the genetic transformation system was optimized, then the transgenic plants were detected. 【Result】The best optimum conditions of the *Agrobacterium* mediated genetic transformation were that leaves explants were immersed in the diluter 10 times *Agrobacterium bacilli* at  $OD_{600}$  of 0.6 for 8 minutes after being pre-cultured for 2 days, and then co-cultivated for 3 days. Then these explants were transferred to selected and rooting medium which contained 50 mg/L Kanamycin and 500 mg/L Carbenicillin. According to the transformation system, 54 transgenic plants were initially screened, then after PCR analysis and RT-PCR analysis 25 transgenic plants were obtained. 【Conclusion】The transformed plants were selected by Kanamycin, and PCR analysis and RT-PCR analysis preliminarily proved the stilbene synthase gene had been integrated into the tobacco genome and could transcript normally.

**Key words:** stilbene synthase gene; tobacco; *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation

\* [收稿日期] 2009-11-23

[基金项目] 陕西省“13115”科技重大专项(2008ZDKG-07)

[作者简介] 安娜(1984—), 女, 新疆博乐人, 在读硕士, 主要从事农业生物技术研究。E-mail: anna841028@126.com

[通信作者] 陈耀锋(1956—), 男, 陕西岐山人, 教授, 博士生导师, 主要从事小麦生物技术育种研究。

E-mail: chenyf3828@126.com

芪合酶(Stilbene synthase, STS)是芪类化合物合成的关键酶,它以苯乙丙烷途径中间物的辅酶 A (如香豆酰辅酶 A、肉桂酰辅酶 A 等)和丙二酰辅酶 A 为底物合成芪类化合物的分子骨架,并加以其他酶进行修饰<sup>[1]</sup>。芪类化合物是一类具有均二苯乙烯母核或其聚合物的物质的总称,多存在于植物的木质部,在植物体内起植保素作用,与植物本身的抗病性密切相关<sup>[2]</sup>。当植物受虫害或外界刺激时,芪类化合物在受激部位的含量显著增加,以防止病原菌的进一步入侵。国内外研究资料表明,一些葡萄科、豆科、松科等植物在病原菌的侵染下,能在受伤组织诱导合成、累积芪类化合物,从而抑制了病原菌的进一步蔓延,对真菌性病原菌有较强的抗性<sup>[3-5]</sup>。随着基因工程技术的建立和发展,将芪合酶基因转入植物来培育抗性植株的研究倍受关注,并已在小麦<sup>[6]</sup>、大麦<sup>[7]</sup>、玉米<sup>[8]</sup>、苜蓿<sup>[9]</sup>、番茄<sup>[10]</sup>、猕猴桃<sup>[11]</sup>等多种植物的转化中获得了重要进展。“中烟 99”适宜于在黄淮、东北烟区种植,是优质多抗的烤烟新品种,但以该品种为受体的芪合酶基因转化体系的研究尚未见报道。为了研究所构建的植物表达载体在异源植物中的表达情况,本文以“中烟 99”烟草叶片为受体,研究了根癌农杆菌 GV3101 介导的芪合酶基因的遗传转化条件,并将芪合酶基因导入烟草基因组中,旨在建立一种稳定高效的芪合酶基因遗传转化体系,以为培育烟草抗病性新品种提供新材料,并为进一步研究芪合酶基因的功能和作用机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试的烟草品种为“中烟 99”,由陕西省烟草公司唐永红研究员提供。芪合酶基因的植物表达载体为 pWR-STS(含卡那霉素标记基因和芪合酶基因),转化菌为根癌农杆菌 GV3101(含庆大霉素标记基因),均由西北农林科技大学王跃进教授馈赠。利用冻融法将 pWR-STS 导入根癌农杆菌 GV3101<sup>[12]</sup>。

### 1.2 方法

1.2.1 培养基的制备 分化培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA(6-苄基嘌呤)+0.1 mg/L NAA(萘乙酸)+30 g/L 蔗糖+5.8 g/L 琼脂粉;筛选分化培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+50 mg/L Km(卡那霉素)+500 mg/L Cb(羧苄青霉素)+30 g/L 蔗糖+5.8 g/L 琼脂粉;筛选生根培养基为 1/2 MS+0.1 mg/L NAA+50 mg/L Km+

500 mg/L Cb+30 g/L 蔗糖+5.8 g/L 琼脂粉;以上培养基 pH 值均为 5.8。YEB 液体培养基为 5.0 g/L 蛋白胨+1.0 g/L 酵母提取物+5.0 g/L 牛肉膏+2.0 mmol/L 硫酸镁;农杆菌 GV3101 生长培养基 YEB1 为 YEB 液体培养基+1.5% 琼脂+50 mg/L Km+50 mg/L Gent(庆大霉素);农杆菌 GV3101 生长培养基 YEB2 为 YEB 液体培养基+50 mg/L Km+50 mg/L Gent;农杆菌感染液为 MS 液体培养基;以上培养基 pH 值均为 7.0。培养基中的 Km、Cb、Gent 均采用过滤灭菌,其他试剂均在 121 ℃下高压灭菌。

1.2.2 烟草再生体系的建立 取生长健壮、幼嫩的烟草叶片,经常规消毒后切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块,接种于分化培养基上,于(25±2) ℃、2 000 lx 的光照条件下培养并继代获得无菌再生苗,取再生苗叶片作为转化受体。

1.2.3 农杆菌的活化和制备 取-80 ℃冰箱内保存的农杆菌 GV3101 菌液,在 YEB1 培养基上划线,于 28 ℃倒置暗培养 2 d,待平板上长出菌落后,挑取单菌落于 20 mL YEB2 液体培养基中,于 28 ℃、220 r/min 震荡培养 2 d,再取 5 mL 菌液于新鲜的 40 mL MS 液体培养基中继续培养 5~6 h,待 OD<sub>600</sub> 值为 0.6 时用于浸染。

1.2.4 烟草耐卡那霉素水平的敏感性测定 将无菌烟草叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 的小方块,分别接种到含 10,20,30,40,50 和 60 mg/L Km 的筛选分化培养基上,以不加 Km 的为对照,每处理接种 100 个外植体,3 组重复。统计外植体出愈率。培养环境条件同 1.2.2。出愈率=愈伤数/接种外植体数×100%。

1.2.5 农杆菌介导烟草叶片的遗传转化 (1)外植体预培养时间的确定。将无菌烟草叶片切成 1 cm×1 cm 的方块,接种到分化培养基上分别预培养 0,1,2,3,4 d,在相同的条件下浸染,共培养后,将叶片转移到筛选分化培养基上进行筛选培养。每处理接种 100 个外植体,3 组重复。统计外植体抗性出愈率和抗性芽分化率。培养环境条件同 1.2.2。抗性出愈率=抗性愈伤数/接种外植体数×100%,抗性芽分化率=抗性芽数/接种外植体数×100%。

(2)农杆菌菌液稀释倍数及浸染时间的确定。将 OD<sub>600</sub> 值为 0.6 的农杆菌菌液分别用 MS 培养液按体积比稀释 5,10,15,20 倍后,将预培养 2 d 后的外植体置于菌液中分别浸染 3,5,8,10 min,取出叶片,用无菌滤纸吸干叶片表面的菌液,转移至分化培

培养基上,于 25 ℃ 共培养 3 d 后,转移到筛选分化培养基上进行筛选培养。每处理接种 100 个外植体,3 组重复。统计外植体抗性芽分化率。

(3) 农杆菌和外植体共培养时间的确定。将浸染后的烟草叶片转移到分化培养基上,在 25 ℃ 下分别暗培养 1,2,3,4 d 后,转移到筛选分化培养基上进行筛选分化培养。每处理接种 100 个外植体,3 组重复。统计外植体污染率和抗性芽分化率。污染率 = 污染外植体数 / 接种外植体数 × 100%。

(4) 抑菌抗生素质量浓度的确定。将共培养 3 d 后的外植体用无菌水冲洗 3~4 次,滤纸吸干表面水分,分别转移到附加不同质量浓度 (100,200,300,400,500,600 mg/L) 羧苄青霉素 (Cb) 的筛选分化培养基上进行培养。每处理接种 100 个外植体,3 组重复。统计外植体污染率和抗性芽分化率。

待在筛选分化培养基上诱导出 2~3 cm 抗性芽时,将获得的转化芽切下,接种到筛选生根培养基上进行生根培养,当转化植株长至 5~10 cm 时可进行扩大繁殖和移栽。培养环境条件同 1.2.2。

1.2.6 转基因烟草植株的检测 (1) PCR 检测。选取卡那霉素抗性植株,用 CTAB 法提取幼嫩叶片总 DNA,以未转化植株总 DNA 为阴性对照,质粒为阳性对照。参照芪合酶基因全长序列两端的引物:引物 1 (5'-GCGGATCCATGGCTTCAGTTGAGGAAAT-3') 和引物 2 (5'-GCCTCGAGTTAATTTGTAACCATAGG-3') 进行 PCR 扩增。扩增条件为:94 ℃ 变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,66 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 2 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

(2) RT-PCR 检测。用 Trizol 试剂提取 PCR 检测呈阳性的转基因烟草植株幼嫩叶片总 RNA,反转录合成 cDNA 第一条链,以反转录产物为模板进行

PCR 扩增,以未转化植株为阴性对照,质粒为阳性对照,引物及反应条件同 1.2.6(1)。

## 2 结果与分析

### 2.1 卡那霉素质量浓度对烟草叶片出愈率的影响

由表 1 可知,不同质量浓度的卡那霉素对外植体愈伤的生成有明显影响。在不加 Km 的培养基上外植体都可以长出愈伤,出愈率可达 100%,随着 Km 质量浓度的升高,外植体的出愈率逐渐降低;当 Km 质量浓度为 20 mg/L 时,有 56.7% 的外植体长出愈伤;当 Km 质量浓度增至 40 mg/L 时,仅有不足 10% 的外植体长出愈伤;当 Km 质量浓度达到 50 mg/L 以上时,外植体不能形成愈伤并且逐渐白化死亡。

表 1 外植体对卡那霉素的敏感性

Table 1 The influence of Km on the callus growth

Km/ (mg · L <sup>-1</sup> )	接种外植体数 No. of explants	愈伤数 No. of callus	出愈率/% Rate of callus induction
0	298	298	100
10	285	235	82.5
20	291	165	56.7
30	287	78	27.2
40	289	28	9.7
50	293	0	0
60	295	0	0

### 2.2 农杆菌介导烟草叶片遗传转化体系的优化

2.2.1 外植体预培养时间对转化效率的影响 由表 2 可知,预培养时间不同,外植体抗性出愈率和抗性芽分化率也不同。预培养 2 d 的外植体抗性出愈率最高,为 33.3%,此时感受态程度较高,因而有利于农杆菌的附着和 T-DNA 的转移。而经过预培养或预培养时间为 4 d 时,抗性出愈率和抗性芽分化率均较低,同时假转化体增加。

表 2 外植体预培养时间对转化效率的影响

Table 2 Effects of pre-culture time on genetic transformation

预培养时间/d Time	接种外植体数 No. of explants	抗性愈伤数 No. of resistant callus	抗性出愈率/% Rate of resistant callus	抗性芽数 No. of resistant shoots	抗性芽分化率/% Rate of resistant shoots
0	287	32	11.1	28	9.6
1	291	67	23.0	60	20.6
2	285	95	33.3	91	31.9
3	279	54	19.4	49	17.6
4	295	28	9.5	23	7.8

2.2.2 农杆菌菌液稀释倍数和浸染时间对转化效率的影响 由表 3 可知,农杆菌菌液稀释倍数和浸染时间对转化效率的影响很大。当农杆菌菌液

OD<sub>600</sub> 值为 0.6,稀释 10 倍,浸染 8 min 时,烟草叶片的抗性芽分化率最高为 30.3%。菌液浓度过高或浸染时间过长,后续培养中很难除菌,且易导致外植

体褐变死亡,降低转化效率。反之,菌液浓度过低或效率也随之降低。浸染时间过短,降低了共培养时农杆菌的侵入,转化

表 3 农杆菌菌液稀释倍数和浸染时间对转化效率的影响

Table 3 Effects of different infection conditions on genetic transformation

浸染时间/min Dipping time	抗性芽分化率/% Rate of resistant shoots			
	5×	10×	15×	20×
3	6.7	7.3	5.8	4.5
5	12.6	18.9	15.6	13.2
8	15.7	30.3	23.7	16.7
10	8.9	11.5	13.3	15.7

2.2.3 共培养时间对转化效率的影响 由表 4 可知,外植体与农杆菌共培养时间不同,对转化效率有较大影响。当共培养时间为 3 d 时,抗性芽分化率最高,为 30.7%,外植体的污染率为 15.5%,农杆菌

可以得到有效控制,从而得到抗性植株。而延长共培养时间到 3 d 以上时,由于农杆菌的快速繁殖,在抗性抑菌培养基上农杆菌不能被有效抑制,使外植体严重污染致死,抗性芽分化率明显下降。

表 4 共培养时间对转化效率的影响

Table 4 Effects of different co-culture time on genetic transformation

共培养时间/d Co-culture time	接种外植体数 No. of explants	污染外植体数 No. of polluted explants	污染率/% Rate of polluted explants	抗性芽数 No. of resistant shoots	抗性芽分化率/% Rate of resistant shoots
1	297	0	0	25	8.3
2	289	28	9.7	57	19.7
3	290	45	15.5	89	30.7
4	285	127	44.6	19	6.7

2.2.4 抑菌抗生素质量浓度对转化效率的影响 由表 5 可知,当 Cb 质量浓度达到 500 mg/L 时,抗性芽分化率最高可达 30.6%,当 Cb 质量浓度达到 600 mg/L 时,虽然可以更好地抑制农杆菌的生长,但抗性芽分化率降低,说明高质量浓度的 Cb 对外

植体的诱导分化起抑制作用。本试验在外植体与农杆菌共培养后,为了减少农杆菌的污染,同时在尽量不影响外植体诱导分化的基础上,采取了先加 500 mg/L 的 Cb,然后在每次继代时逐渐降低其质量浓度的方法来抑菌。

表 5 不同 Cb 质量浓度对转化效率的影响

Table 5 Effects of different concentrations of Cb on genetic transformation

Cb/(mg·L <sup>-1</sup> )	接种外植体数 No. of explants	污染外植体数 No. of polluted explants	污染率/% Rate of polluted explants	抗性芽数 No. of resistant shoots	抗性芽分化率/% Rate of resistant shoots
100	287	287	100	0	0
200	292	180	61.6	23	7.9
300	285	128	44.9	35	12.3
400	289	85	29.4	56	19.4
500	291	23	7.9	89	30.6
600	295	15	5.1	75	25.4

## 2.3 转基因烟草的检测

2.3.1 转基因烟草的获得及 PCR 检测 经农杆菌浸染后的烟草叶片在筛选分化培养基上进行诱导分化,20~25 d 后外植体分化出芽体(图 1A),将出芽外植体每隔 15 d 继代 1 次,直至长出 2~3 cm 的抗性芽(图 1B),而未经转化的叶片在含卡那霉素的筛选分化培养基上黄化直至死亡(图 1C)。将筛选出

的 115 株抗性芽转接到含卡那霉素 50 mg/L 的筛选生根培养基上继续培养,其中转化植株生根较慢、根系较少(图 1D),部分转化芽变黄枯萎死亡,这些苗可能是筛选过程中逃逸的假阳性植株(图 1E)。初步筛选的生根植株有 54 株,待转化烟草生根成苗后,对其炼苗 2~3 d,最后将小苗转至培养钵中用于扩繁(图 1F)。

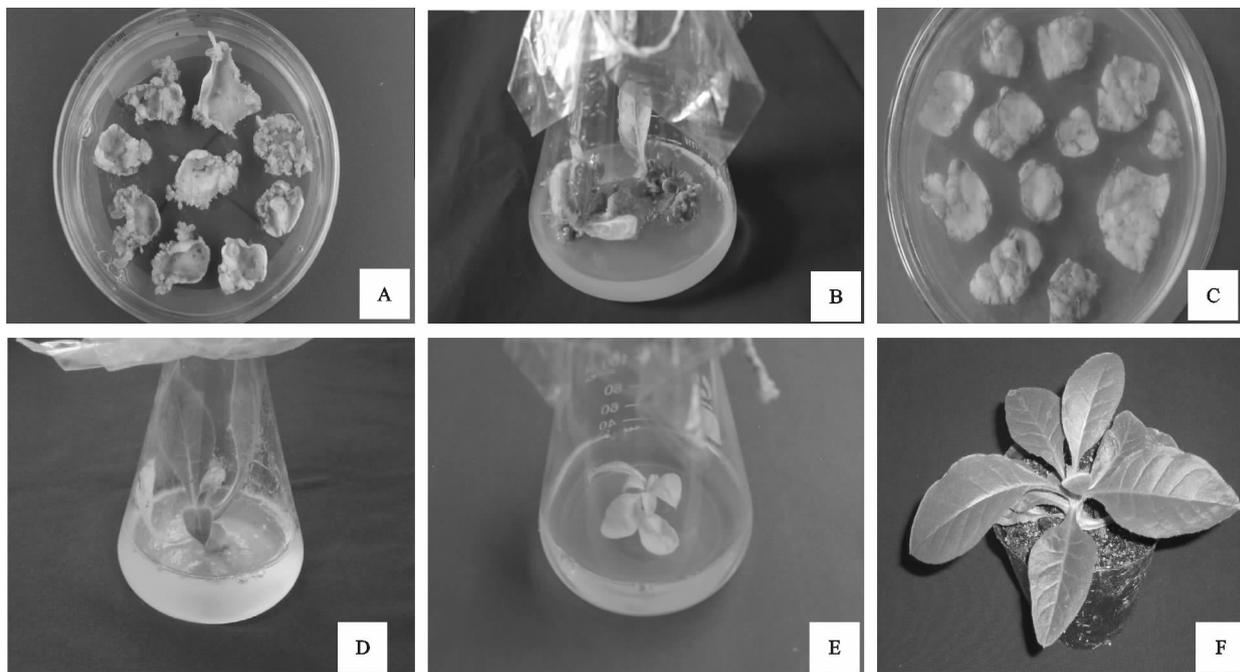


图 1 转基因烟草植株的获得

A,B. 抗性芽的再生;C. 未转化叶片;D. 抗性苗的生根;E. 白化苗;F. 转基因植株

Fig. 1 Regeneration of transgenic plants

A,B. Resistant shoots regeneration;C. Non-transgenic leaves;D. Resistant shoots rooting;E. Albino plant;F. Transgenic plant

对筛选出的 54 株转化体进行 PCR 分子检测。分别提取转化植株和未转化植株叶片(阴性对照)的总 DNA,以含目的基因的质粒作为阳性对照进行 PCR 扩增。结果表明,有 32 株抗性植株 DNA 扩增

出与质粒 DNA 相同的特异性条带,分子量约为 1 100 bp(图 2),而阴性对照植株未扩增出特异性条带,初步证明芪合酶基因已整合到烟草基因组中。

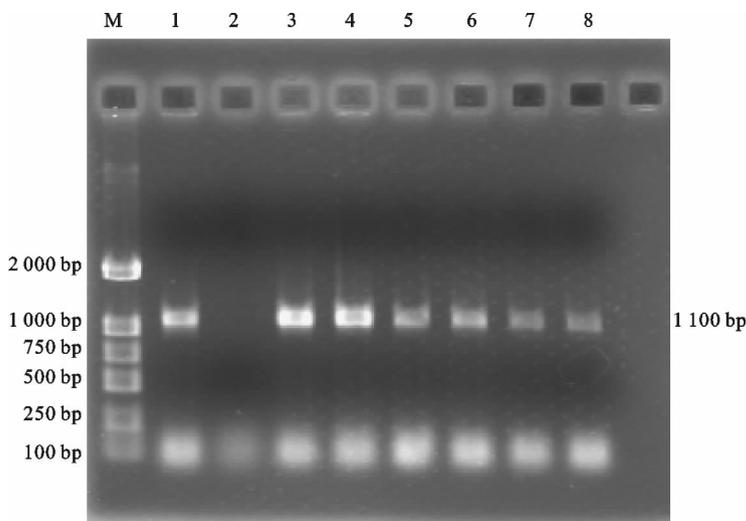


图 2 部分转基因烟草植株 PCR 检测结果

M. 标准分子质量;1. 阳性对照;2. 阴性对照;3~8. 转基因植株

Fig. 2 PCR detection of parts of transgenic plants

M. DNA Marker;1. Positive control;2. Negative control;3-8. Transformed plants

2.3.2 RT-PCR 检测 对 PCR 检测呈阳性的 32 株转基因烟草叶片提取总 RNA,以未转化植株为阴性对照,质粒为阳性对照。通过 RT-PCR 检测发

现,有 25 株扩增出了与目的片段大小一致的条带(图 3),而阴性对照植株未扩增出相应条带,证明芪合酶基因不仅整合到烟草基因组中并进行了转录。

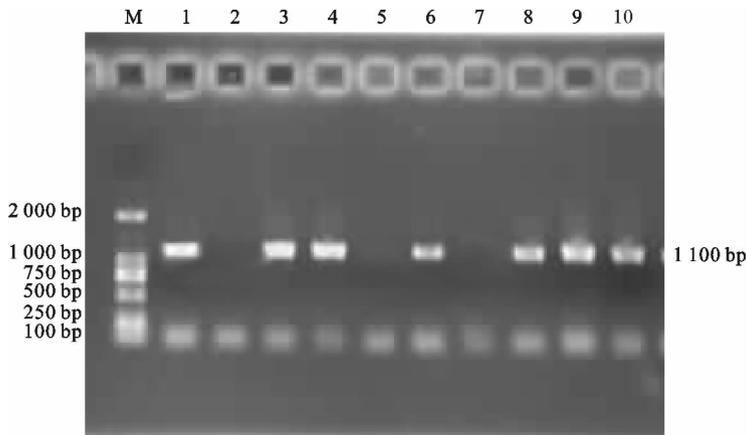


图 3 部分转基因烟草植株 RT-PCR 检测结果

M. 标准分子质量;1. 阳性对照;2. 阴性对照;3~10. 转基因植株

Fig. 3 PCR detection of parts of transgenic plants

M. DNA Marker; 1. Positive control; 2. Negative control; 3-10. Transformed plants

### 3 讨论

烟草作为植物组织培养的模式植物和转基因的良好受体被广泛应用于植物的遗传转化研究。本研究在前人研究的基础上,通过进一步优化,总结出了一套成熟高效的农杆菌介导的烟草遗传转化体系:将预培养 2 d 的烟草外植体,用稀释 10 倍的农杆菌菌液( $OD_{600} = 0.6$ )浸染 8 min 后,共培养 3 d,然后转移到含 Km 50 mg/L 和 Cb 500 mg/L 的筛选分化培养基上进行筛选,待抗性芽长到 2~3 cm 后再转入含 Km 50 mg/L 和 Cb 500 mg/L 的筛选生根培养基上进一步筛选。本研究利用这一程序,获得了经 PCR、RT-PCR 检测为阳性的 25 个转化烟草植株。

在农杆菌介导的烟草遗传转化中,筛选剂 Km 质量浓度对转基因植株的获得非常重要,合适的 Km 质量浓度既不影响转化细胞的正常生长,又能有效抑制非转化细胞的生长,并使之缓慢死亡。大多研究是将共培养后的叶片直接转入含高质量浓度 Km(100 mg/L<sup>[13-14]</sup>或 150 mg/L<sup>[15]</sup>)的培养基中筛选,也有报道将共培养后的叶片在无 Km 的培养基上诱导生芽后,再将小芽置于含 Km 的培养基上生根<sup>[16]</sup>。本研究结果表明,“中烟 99”烟草叶片的再生对 Km 很敏感,其在 Km 质量浓度 $\geq 50$  mg/L 的诱导培养基上便不能产生抗性芽。因此本试验的 Km 质量浓度为 50 mg/L。

在根癌农杆菌介导转化中,适于 T-DNA 转移的创伤反应(产生信号分子)以及感受态细胞的形成是转化的开始,也是转化成功的关键<sup>[17]</sup>。对叶盘进

行短暂的预培养能使伤口部分愈合,增强其对根癌农杆菌感染的耐受性;而预培养时间过长,伤口愈合程度过高,会导致根癌农杆菌感染困难,外源基因难以导入。本研究结果表明,烟草叶片预培养 2 d 转化效率最高。

利用对数生长期的农杆菌进行浸染转化最为有效,本研究发现,“中烟 99”较适合的条件是:用稀释 10 倍的农杆菌菌液( $OD_{600} = 0.6$ )浸泡经过预培养 2 d 的外植体 8 min,能产生相对较高的抗性出愈率和抗性芽分化率。在对农杆菌的稀释过程中发现,农杆菌浓度过高,会对叶片造成污染,致使叶片死亡;而农杆菌浓度过低,附着在植物体的农杆菌菌体过少,转化的成功率随之降低。

外植体与农杆菌的共培养是 T-DNA 转移到植物细胞的过程,共培养时间的长短直接影响到目的基因的整合及转化细胞的数量。农杆菌附着外植体后不能立即转化,附着 16 h 后才能诱发肿瘤经过“细胞调节期”,使 T-DNA 向植物细胞内发生转移<sup>[18]</sup>,因此共培养时间至少应在 1 d 以上。本研究表明,烟草转化时外植体与农杆菌共培养的时间以 3 d 为宜。

采用适当的抗性选择标记(如本试验中用到的 Km)进行筛选,能在含有选择剂的培养基上生长和分化的叶盘可初步认定为转化体,而被抑制和杀死的是未能成功转化的,将能全部抑制或杀死外植体的最小(临界)质量浓度作为选择剂的最适质量浓度。抑制农杆菌生长的抗生素的选择也是必需的,目前常用头孢霉素与羧苄青霉素抑菌,抗生素的质量浓度也因试验不同而不同,本试验使用 Cb 抑菌,

其最适质量浓度为 500 mg/L。转化的抗性苗能在含选择剂的生根培养基上生根,而未转化苗难以在含选择剂的生根培养基上生根,甚至慢慢变白直至死亡。

## [参考文献]

- [1] 张永丽,金志强,徐碧玉,等. 芪合酶基因的研究进展 [J]. 现代农业科技,2007(13):195-196.  
Zhang Y L, Jin Z Q, Xu B Y, et al. Progress of research on the stilbene synthase gene [J]. Modern Agricultural Technology, 2007(13):195-196. (in Chinese)
- [2] 胡小平,孙 卉,蔡文启,等. 植物芪类植保素研究进展 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(1):157-160.  
Hu X P, Sun H, Cai W Q, et al. Progress of research on stilbene-type phytoalexin [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2003, 31(1): 157-160. (in Chinese)
- [3] Liang H, Zhen J. A transgenic wheat with a stilbene synthase gene resistant to powdery mildew obtained by biolistic method [J]. Chinese Science Bulletin, 2000, 45(7): 634-638.
- [4] Sparvoli F, Martin C, Scienza A, et al. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.) [J]. Plant Mol Biol, 1994, 24: 743-755.
- [5] 何水林,郑金贵,林 明,等. 植物芪类次生代谢的功能、合成调控及基因工程研究进展 [J]. 农业生物技术学报,2004,12(1): 102-108.  
He S L, Zheng J G, Lin M, et al. Advance of biological function, regulatory mechanism of biosynthesis and genetic engineering of stilbenes in plant [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2004, 12(1): 102-108. (in Chinese)
- [6] Fettig S, Hess D. Expression of a chimeric stilbene synthase gene in transgenic wheat lines [J]. Transgenic Research, 1999, 8: 179-189.
- [7] Punja Z K. Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens a review of progress and future prospects [J]. Plant Pathol, 2001, 23: 216-235.
- [8] 郭志鸿,王汉宁,陶 玲,等. ubi 启动子驱动的花生芪合酶基因表达载体的构建及玉米遗传转化初报 [J]. 甘肃农业大学学报,2004,39(2):117-123.  
Guo Z H, Wang H N, Tao L, et al. Construction of ubi promoter-based plant expression vector of stilbene synthase gene and transformation of type callus of maize by particle bombardment [J]. Journal of Gansu Agriculture University, 2004, 39(2): 117-123. (in Chinese)
- [9] Hipskind J D, Paiva N L. Constitutive accumulation of resveratrol glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis* [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2000, 13(5): 551-562.
- [10] 谭 琳,康由发,马兵刚,等. 芪合酶基因转化番茄产生白藜芦醇的研究 [J]. 生命科学研究,2003,7(3):262-266.  
Tan L, Kang Y F, Ma B G, et al. Resveratrol production of tomato transformed with a *vitis* stilbene synthase gene [J]. Life Science Research, 2003, 7(3): 262-266. (in Chinese)
- [11] Kobayashi S, Ding C K, Nakamura Y, et al. Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *vitis* stilbene gene product piceid (resveratrol-glucoside) [J]. Plant Cell Reports, 2000, 19(9): 904-910.
- [12] 徐伟荣,王跃进,王西平,等. 中国葡萄属野生种抗白粉病抗逆基因植物表达载体的构建 [J]. 西北植物学报,2005,25(5): 851-857.  
Xu W R, Wang Y J, Wang X P, et al. Construction of the plant expression vectors carrying resistant genes to powdery mildew and adversities in wild species of *vitis* in China [J]. Acta Bot Boreo-Occident Sin, 2005, 25(5): 851-857. (in Chinese)
- [13] 李永华,尚玉萍,杨芳绒,等. 小麦甜菜碱醛脱氢酶基因在烟草中的转化及表达 [J]. 河南农业大学学报,2007,41(1):12-14, 20.  
Li Y H, Shang Y P, Yang F R, et al. Transformation and expression of *Nicotiana glauca* L. with a gene encoding for the betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) from *Triticum aestivum* L. [J]. Journal of Henan Agriculture University, 2007, 41(1): 12-14, 20. (in Chinese)
- [14] 郭丽红,陈善娜,龚 明. 根癌农杆菌法转化烟草的条件探索 [J]. 云南大学学报:自然科学版,2003,25(2):148-152.  
Guo L H, Chen S N, Gong M. Study on the condition of transgenic tobacco system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Journal of Yunnan University: Natural Science Edition, 2003, 25(2): 148-152. (in Chinese)
- [15] 吴元华,郑云泽,贝纳新,等. 转马铃薯 Y 病毒复制酶基因烟草的获得及抗病性分析 [J]. 中国烟草科学,1997(3):23-26.  
Wu Y H, Zheng Y Z, Bei N X, et al. Resistance to necrotic strain of potato virus Y infection in transgenic flue-cured tobacco plants of full-length PVY replicase gene [J]. Chinese Journal of Tobacco Science, 1997(3): 23-26. (in Chinese)
- [16] 时 焦. 几丁质酶基因在烟草栽培品种中的表达 [J]. 中国烟草科学,1997(4):47-50.  
Shi J. The expression of a baculovirus derived chitinase gene in flue-cured and oriental tobacco varieties [J]. Chinese Journal of Tobacco Science, 1997(4): 47-50. (in Chinese)
- [17] Groot M J A, Bundock P, Hooykaas P J J, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi [J]. Nature Biotechnology, 1998, 16: 839-842.
- [18] 王关林,方宏筠. 植物基因工程 [M]. 2 版. 北京:科学出版社,2002:393.  
Wang G L, Fang H J. Plant genetic engineering [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2002: 393. (in Chinese)