

DOI:CNKI:61-1390/S.20120109.1240.034

网络出版时间:2012-01-09 12:40

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120109.1240.034.html>

芪合酶基因的遗传转化及其转基因烟草 抗根黑腐病的研究

周文丽¹, 唐永红², 陈耀锋¹, 成巨龙², 王会强¹, 杨 梅¹

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100; 2 陕西省烟草研究所, 陕西 西安 710000)

[摘 要] **【目的】**利用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*, GV3101)介导法获得转芪合酶基因烟草, 改良烟草对根黑腐病的抗性。**【方法】**以普通烟草品种“97204”叶片为受体, 采用根癌农杆菌介导法, 将芪合酶基因导入烟草基因组并进行分子检测, 利用灌根法对 4 株转芪合酶基因烟草植株接种烟草根黑腐病菌, 观察烟草地上部分和根部的变化, 并测定苯丙氨酸解氨酶(PAL)、多酚氧化酶(PPO)活性。**【结果】**通过根癌农杆菌介导、抗性选择和分子检测, 获得 32 株转芪合酶基因烟草。从中选取长势一致的 4 株转基因烟草用于抗病性鉴定, 结果表明, 2 株在灌根接种后生长正常, 另外 2 株在接种第 7 天时出现轻微黄化, 3 株根部无发病症状, 另外 1 株在接种 16 d 后根部出现发黑症状, 而对照植株接种后第 3 天叶片就出现黄化及萎蔫症状, 随着接种时间的延长, 叶片黄化加剧, 到第 7 天时已出现明显的发病症状, 15 d 植株几乎死亡; 转基因烟草 PAL 及 PPO 活性本底均显著高于对照, PAL 活性在接种后 4~10 d 保持在一个较高的水平, 10 d 后又迅速下降, PPO 活性在接种 2 d 后迅速升高, 在接种 6 d 达到峰值, 之后开始缓慢下降, 而非转基因烟草 PAL、PPO 活性与转基因烟草相似, 但变化幅度较小。**【结论】**用于抗性鉴定的 4 株转芪合酶基因烟草中, 有 3 株对烟草根黑腐病的抗性较好。

[关键词] 烟草; 芪合酶基因; 遗传转化; 根黑腐病; 抗病性

[中图分类号] Q78; S572.034

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2012)02-0035-07

Genetic transformation of stilbene synthase gene and research on resistance of transgenic tobacco for *Thielaviopsis basicola* disease

ZHOU Wen-li¹, TANG Yong-hong², CHEN Yao-feng¹,
CHENG Ju-long², WANG Hui-qiang¹, YANG Mei¹

(1 College of Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Tobacco Institute of Shaanxi, Xi'an, Shaanxi 710000, China)

Abstract: **【Objective】**The study was to obtain transgenic tobacco with the stilbene synthase gene by *Agrobacterium* mediated to improve the resistance of tobacco for *Thielaviopsis basicola*. **【Method】**With the leaves of ordinary tobacco varieties “97204” as receptor, the stilbene synthase gene was transplantend into tobacco genome by *Agrobacterium*(*Agrobacterium tumefaciens*, GV3101) mediated method for molecule detection, the change of soil and root was observed and the enzymatic activity of PAL, PPO determined by irrigating root method after inoculating by *T. basicola* for 4 plants of transgenic tobacco with the stilbene synthase gene. **【Result】**By *Agrobacterium* mediated, resistance choice and molecule detection, 32

* [收稿日期] 2011-08-19

[基金项目] 国家转基因生物新品种培育项目(2008ZX08002003, 2009ZX08002008B); 陕西省科技攻关项目(2011K02-01)

[作者简介] 周文丽(1986—), 女, 云南大理人, 在读硕士, 主要从事农业生物技术研究。E-mail: zhouwenli1986@163.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: chenylf3828@126.com

transgenic tobacco with the stilbene synthase gene was obtained. Among the 4 transgenic tobacco plants, two used for resistance research grew normally, the other 2 slightly yellowed on the seventh day. The roots of 3 transgenic tobacco had no signs of disease, root of another transgenic tobacco had black coating after 16 d. The plants of construct appeared and wilting signs appeared on the third day. As time extended the plant of construct aggravated, and it showed obvious disease signs on the seventh day. The plant almost died on the fifteenth day. The enzymatic activity of transgenic tobacco of bottom PAL, PPO was significantly higher than construct. After irrigating root vaccination, PAL enzymatic activity of transgenic tobacco kept a higher enzymatic activity level in 4—10 d, 10 d enzymatic activity fell rapidly, although the construct had similar change. The rangeability was very small; PPO enzymatic activity of transgenic tobacco rose quickly two days after irrigating. On the sixth day it reached the peak, then fell slowly, but the PPO enzymatic activity of nontransgenic tobacco rose quickly two days after irrigating, then slowly fell.

【Conclusion】 Among the 4 transgenic tobaccos with the stilbene synthase gene used for resistance research, 3 plants expressed better resistance to *T. basicola*.

Key words: tobacco; stilbene synthase gene; genetic transformation; *Thielaviopsis basicola*; resistance research

由基生根串珠霉菌(*Thielaviopsis basicola*)引起的烟草根黑腐病是世界性的烟草病害之一^[1]。在我国产烟区均有发生,严重地块发病率可达 30% 以上。近年来,由于烟草种植面积的调整,耕作制度及烟草品种的变化,烟草根黑腐病有加重的趋势^[2]。

芪合酶(Stilbene synthase, STS)是芪类化合物合成的关键酶^[3],而芪类化合物在植物体内起植保素作用,与植物本身的抗病性密切相关^[4]。研究表明,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,对真菌性病原菌产生较强的抗性^[5]。白藜芦醇(3'-4' trans-resveratrol)是植物的次生代谢产物,由芪合酶催化底物丙二酰辅酶 A 和香豆酰辅酶 A 合成,具有抑制植物病原真菌菌丝生长和孢子萌发等作用^[6]。白藜芦醇对真菌、细菌等具有毒性,对子囊菌亚门和半知菌亚门近 26 种真菌具有抑菌活性,主要表现为对菌丝生长或孢子萌发的抑制作用^[6]。

栽培烟草品种含有芪合酶作用的底物丙二酰辅酶 A 和香豆酰辅酶 A^[4],但无芪合酶基因,而与植物抗病性相关的芪类化合物及抗菌化合物都需要芪合酶的催化^[5-6],因此芪合酶基因的导入能促进与植物抗病性相关的芪类化合物及抗菌化合物白藜芦醇的合成,提高植物的抗病性。目前,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^[7]、大麦^[8]、玉米^[9]、番茄^[10]、猕猴桃^[11]等多种植物的转化中获得了重要进展。本研究以普通烟草品种“97204”叶片

为受体,采用根癌农杆菌介导法,进行了农杆菌介导的芪合酶基因转化普通烟草,以及转基因烟草根黑腐病抗性研究,旨在利用转基因技术提高普通烟草抗根黑腐病特性,以期为其他作物抗真菌病转基因研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 供试的烟草品种为“97204”,由陕西省烟草研究所提供。

1.1.2 菌种和质粒 导入了芪合酶基因植物表达载体 pWR-STS(含卡那霉素标记基因和芪合酶基因)的根癌农杆菌 GV3101(含庆大霉素标记基因)、含质粒的大肠杆菌菌株,均由西北农林科技大学王跃进教授馈赠。

1.1.3 病原菌 烟草根黑腐病病原基生根串珠霉菌(*T. basicola*),由云南省农业科学院生物技术研究所提供。

1.1.4 PCR 引物 芪合酶基因引物 1: 5'-GCG-GATCCATGGCTTCAGTTGAGGAAAT-3', 引物 2: 5'-GCCTCGAGTTAATTTGTAACCATAGG-3',均由上海生工合成。

1.1.5 培养基 诱导培养基: MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+5.8 g/L 琼脂粉;诱导筛选培养基: MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+30 mg/L 卡那霉素(Km)+500 mg/L Cb+30 g/L 蔗糖+5.8 g/L 琼脂粉;筛选生根培养基: 1/2 MS+20 mg/L Km+400 mg/L Cb+30 g/L

蔗糖+5.8 g/L 琼脂粉。

1.2 质粒 DNA 的提取

挑取含质粒大肠杆菌菌株的单个菌落,于附加有 50 mg/L Km 的 YEB 液体培养液中,在 28 ℃ 培养 24 h,碱性裂解法提取质粒 DNA。

1.3 烟草的遗传转化

1.3.1 菌液的制备 根癌农杆菌 GV3101 的活化参考文献[12]的方法。将活化后的根癌农杆菌 GV3101 菌液在附加 50 mg/L Km 及 50 mg/L Gent (庆大霉素)的 YEB 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 2 mL 含有 50 mg/L Km 及 50 mg/L Gent 的 YEB 液体培养基中,在 28 ℃、210 r/min 振荡培养 1 d,将摇好的菌液于新鲜的 20 mL MS 液体培养基中继续培养 5~6 h,待 OD₆₀₀ 值为 0.6 时用于浸染。

1.3.2 烟草的转化 将 20 mL 菌液与 MS 液体培养基按体积比 1:1 混合,摇匀后放置片刻,将 7~8 叶龄烟草叶片消毒后用无菌水冲洗 4~5 遍,切成 1 cm×1cm 的小块,放入稀释好的菌液中浸染 7~9 min 后取出,用灭菌滤纸吸去叶片表面菌液;然后转移至诱导培养基上,于 26 ℃ 共培养 2 d 后用无菌水洗 4~5 次,转到 400 mg/L Cb 的 MS 液体培养基中浸泡 6~8 min 取出,无菌滤纸吸干叶片表面水分,于诱导筛选培养基上诱导分化培养;待分化的烟草幼苗长到 3 cm 左右时转到筛选生根培养基上生根。

1.4 转基因烟草植株的 PCR 及 RT-PCR 检测

(1) PCR 检测。植物总 DNA 的提取采用 CTAB 法^[13]。转基因烟草的 PCR 检测:以含目的基因的质粒为阳性对照,未转化植株为阴性对照,用芪合酶基因引物,按标准反应进行 PCR 扩增。反应条件为:94 ℃ 变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 2 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。反应总体积为 25 μL:Buffer 2.5 μL,dNTP 1.0 μL,引物 1 1.0 μL,引物 2 1.0 μL,Mg²⁺ 1.5

μL,Tag DNA 0.4 μL,ddH₂O 16.6 μL,DNA 1.0 μL。反应结束后,取 6 μL PCR 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 1.4(1)。

1.5 转基因烟草的抗根黑腐病试验

将烟草根黑腐病菌接种于 PDA 培养基(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 16 g,蒸馏水 1 000 mL)平板上,于 25 ℃ 暗培养 9 d 后,用无菌水洗脱根黑腐病菌孢子,浓度调制 2×10⁵ 个/mL 备用。从 PCR 检测呈阳性的转基因烟草中选出 4 株长势较一致,生长状态良好的植株进行烟草抗根黑腐病试验,以 3 株非转基因烟草为对照,采用灌根法^[14] 接种:取 3 mL 烟草根黑腐病菌孢子悬浮液灌根接种于烟草茎基部,将放置烟草的托盘注水,保持基质湿润。温度控制在 24~26 ℃,灌根接种后观察烟草地上部分和根部变化。

1.6 转基因烟草接种根黑腐病菌后酶活性的测定

分别于接种烟草根黑腐病菌后 0,2,4,6,8,10,12 d,取烟草叶片,用于酶活性测定。苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性测定参照王敬文等^[15] 的方法。多酚氧化酶(PPO)活性测定参照李靖等^[16] 的方法。

2 结果与分析

2.1 烟草抗性植株的获得

用农杆菌浸染后的烟草叶片经共培养、筛选分化培养基上诱导培养,12~16 d 后外植体分化出芽体(图 1a),待分化的外植体长出 3~4 cm 的抗性芽(图 1b)时转接到含 20 mg/L Km 的筛选生根培养基上培养(图 1c)。待转化烟草生根成苗后炼苗 2~3 d,最后将小苗转至营养钵中(图 1d),初步筛选得到 157 个再生抗性烟草植株。

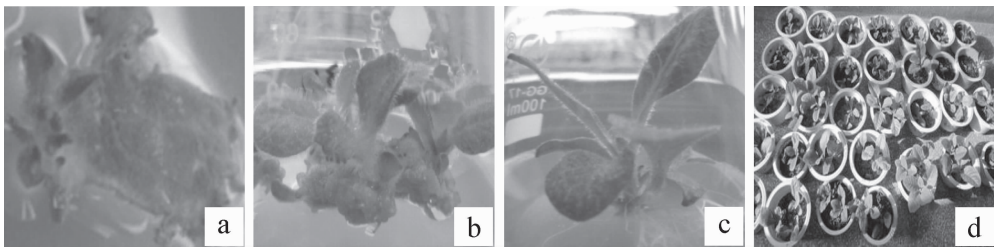


图 1 转基因烟草植株的获得

a. 外植体分化出的芽体;b. 抗性芽;c. 抗性苗的生根;d. 转基因植株

Fig. 1 Regeneration of transgenic plants

a. Explant differential buds;b. Resistant shoots;c. Resistant shoots rooting;d. Transgenic plant

2.2 烟草抗性植株的检测

2.2.1 PCR 检测 以初步筛选得到的 157 个抗性植株和未转化植株(阴性对照)叶片的总 DNA 为模板,以含目的基因的质粒为阳性对照进行 PCR 扩

增,结果表明,有 34 个抗性植株扩增出与质粒相同的特异性条带,分子质量为 1 185 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。

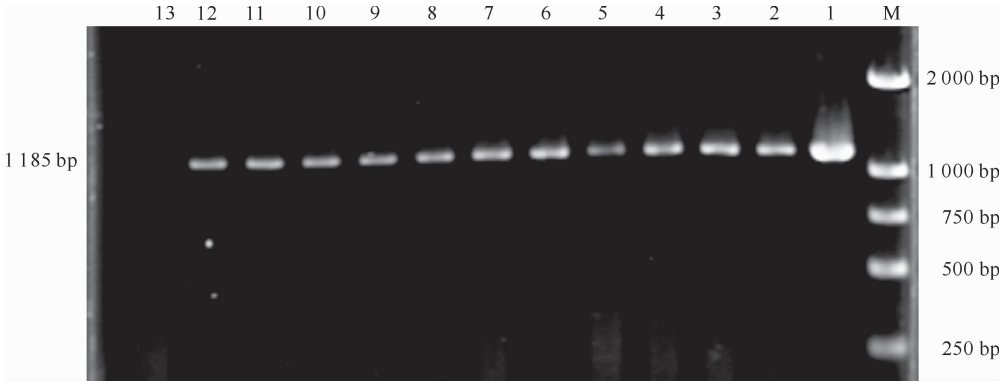


图 2 部分转基因烟草植株 PCR 检测结果
M. 标准分子质量;1. 阳性对照;2~12. 转基因植株;13. 阴性对照

Fig. 2 PCR detection of parts of transgenic plants

M. DNA Marker;1. Positive control;2—12. Transformed plants;13. Negative control

2.2.2 RT-PCR 检测 对 PCR 检测呈阳性的 34 株转基因烟草叶片提取总 RNA,以未转化植株为阴性对照,含目的基因的质粒为阳性对照,进行 RT-PCR 检测,发现有 32 株扩增出了与目的片段大小一致的条带(图 3),而对照烟草植株未扩增出相应条带,证明有 32 株在 mRNA 水平上检测到外源基

因的表达,其余 2 株没有检测到外源基因的表达,表现为基因沉默。虽然在 DNA 水平上已经确认外源基因整合到烟草植株基因组上,但转基因植物对外源基因普遍存在基因沉默的现象,这可能是烟草抵御外界干扰,维持自身生长发育稳定性的一种保护措施。

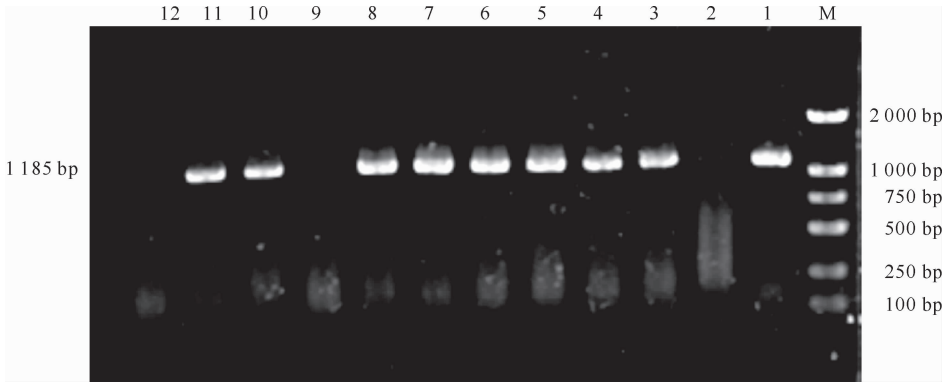


图 3 部分转基因烟草植株 RT-PCR 检测结果
M. 标准分子质量;1. 阳性对照;2~11. 转基因植株;12. 阴性对照

Fig. 3 PT-PCR detection of parts of transgenic plants

M. DNA Marker;1. Positive control;2—11. Transformed plants;12. Negative control

2.3 转基因烟草的抗根黑腐病特性

灌根接种后转基因烟草植株并无明显的黄化和萎蔫症状,接种后第 7 天时仅有 2 株转基因烟草出现轻微黄化(图 4A);而对照植株接种后第 3 天叶片就出现黄化及萎蔫症状,随着接种时间的延长,叶片黄化加剧,第 7 天时已表现出明显的发病症状(图 4B),到 15 d 时植株几乎死亡。

接种 16 d 后,4 株转基因烟草中仅有 1 株(即接种后第 7 天出现轻微黄化的植株之一)的根部出现部分变黑现象(图 5A),其他 3 株生长正常且根部没有发生病害;而相应的对照植株根部都出现严重的发黑腐烂症状(图 5B)。结果表明,芪合酶基因的导入与表达提高了烟草品种“97204”对烟草根腐病的抗性。

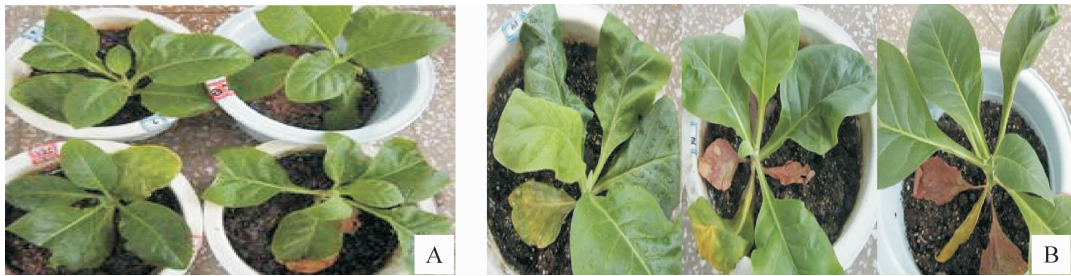


图 4 转基因烟草(A)及非转基因烟草(B)接种根黑腐病菌第 7 天时叶片的症状
Fig. 4 Symptom of transgenic tobacco (A) and nontransgenic tobacco (B) on 7th days after inoculation



图 5 转基因烟草(A)及非转基因烟草(B)在接种根黑腐病菌第 16 天后根部的症状
Fig. 5 Symptom of transgenic tobacco (A) and nontransgenic tobacco root(B) after inoculating 16th days

2.4 转基因烟草 PAL 和 PPO 活性的变化

由图 6 可以看出,在接种烟草根黑腐病菌前,转基因烟草叶片 PAL 活性高于对照,接种 2 d 后 PAL 活性开始增强,4~10 d 保持在一个较高的活性水平,10 d 后活性又迅速下降;对照烟草 PAL 活性变化趋势与转基因烟草相似,但变化幅度较小。转基因烟草叶片 PPO 活性在接种烟草根黑腐病菌前高于对照,接种 2 d 后 PPO 活性迅速升高,在接种 6 d 时达到峰值,之后开始缓慢下降;而对照烟草在接种前 2 d PPO 活性升高较快,之后缓慢升高,6~12 d

开始下降,变化趋势与转基因烟草相似,但变化幅度较小。

以上结果表明,无论转基因烟草还是非转基因烟草,在受病原菌侵染后都会通过提高与抗病性相关的酶(PAL、PPO)活性来抵抗病原菌造成的伤害。转基因烟草在接种根黑腐病菌后 PAL 及 PPO 活性升高幅度显著高于非转基因烟草,表明导入的与抗病性相关的芪合酶基因确实提高了“97204”对烟草根腐病的抗性。

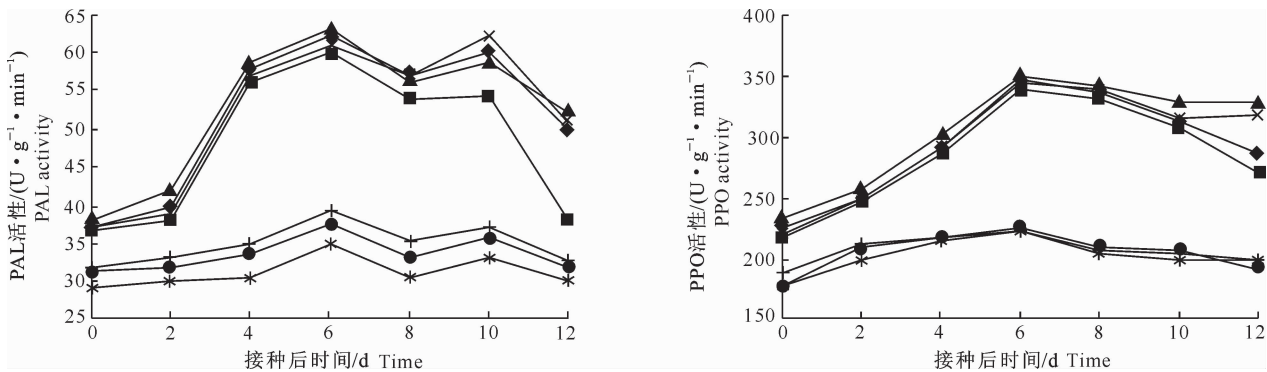


图 6 根黑腐病对转基因烟草叶片 PAL 和 PPO 活性的影响
—◆—,转基因植株 1;—■—,转基因植株 2;—▲—,转基因植株 3;—×—,转基因植株 4;—*—,CK1;—●—,CK2;—+—,CK3

Fig. 6 PAL and PPO ctivity change of transgenic tobacco leaves treated by *T. basicola*
—◆—, Transformed plant 1;—■—, Transformed plant 2;—▲—, Transformed plant 3;—×—, Transformed plant 4;
—*—, CK1;—●—, CK2;—+—, CK3

3 讨 论

培育抗病品种是目前生产上亟待解决的问题,但传统的抗病育种手段由于选育周期长、抗源匮乏及病原生理小种的变异等原因,不能很好地满足农业生产的需要。近年来,利用基因工程手段将外源抗病基因,如几丁质酶基因(chitinase gene, chi)、 β -1,3-葡聚糖酶基因(β -1,3-glucan, β -Glu)、DREB1A 基因和 ChIFN- α 基因导入烟草中,培育抗病烟草新品种^[17-18],为烟草抗病特性改良提供了一条有效的分子育种新途径。

经芪合酶合成的产物除抗子囊菌亚门重要真菌病害外,还可能抗子囊菌亚门重要真菌病害赤霉病及半知菌亚门重要真菌病害纹枯病和根腐病^[19]。本研究通过改进农杆菌介导法获得了 32 株阳性转芪合酶基因烟草,从中选出 4 株长势较一致、生长状态良好的植株,采用灌根法进行根黑腐病的抗病性鉴定,筛选出烟草抗根黑腐病特性显著提高的转基因植株 3 株,为烟草抗真菌病害育种提供了新的种质资源。

PAL 是与细胞内木质素生成和沉积有关的防御酶,当病菌入侵时,细胞受到刺激后启动 PAL 系统产生木质素并沉积在细胞壁周围,从而将病原物限制在一定的细胞范围内以防止其进一步扩散为害^[20]。研究证明,植物受到不同病原菌感染后 PAL 活性上升^[21]。陈学平^[22]研究表明,具有系统获得性抗病性(SAR)的抗性烟草品种对 TMV 表现出高的敏感性,PAL 活性在处理明显高于感病品种。

PPO 可催化酚类物质氧化成醌,具有很强的毒性,能杀死病原菌^[20]。杨建卿等^[23]研究表明,接种黑胫病后,抗病品种和感病品种的 PPO 活性均升高,且接种后的前期抗病品种的 PPO 活性高于感病品种。本研究结果表明,转基因烟草 PAL 和 PPO 活性本底均高于对照,接种根黑腐病病原菌 2 d 后,转基因烟草和对照的 PAL、PPO 活性均升高,转基因烟草 PAL、PPO 活性均显著高于对照。

[参考文献]

- [1] 朱贤朝,王彦亭,王智发. 中国烟草病害 [M]. 北京:中国农业出版社,2002.
Zhu X C, Wang Y T, Wang Z F. Chinese tobacco disease [M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2002. (in Chinese)
- [2] 易 龙,肖崇刚,马冠华,等. 拮抗放线菌 TA21 对烟草根黑腐病菌的抑制及控制作用 [J]. 中国生物防治, 2010, 26(2): 186-192.

- Yi L, Xiao C G, Ma G H, et al. Biocontrol effect and inhibition activity antagonistic actinomycetes strain TA21 against *Thielaviopsis basicola* [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(2): 186-192. (in Chinese)
- [3] 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(2): 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(2): 195-196. (in Chinese)
- [4] 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)
- [5] 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.
- [6] 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)
- [7] Fetting S, Hess D. Expression of a chimeric stilbene synthase gene in transgenic wheat lines [J]. Transgenic Research, 1999, 8: 179-189.
- [8] 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.
- [9] 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)
- [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] 安娜,陈耀锋,崔志刚,等. 根瘤农杆菌介导的芪合酶基因转化烟草遗传体系的优化 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2010, 38(5): 1-7.
An N, Chen Y F, Cui Z G, et al. Study on the optimization of transferring stilbene synthase gene into tobacco system medi-

- ated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2010, 38(5): 1-7. (in Chinese)
- [13] 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)
- [14] 龚 静, 朱玉英, 吴晓光, 等. 甘蓝黑腐病抗性材料筛选及接种方法的研究 [J]. 上海农业科技, 2001(4): 77-87.
- Gong J, Zhu Y Y, Wu X G, et al. The research about resistance materials and inoculation method of cabbage *Thelaviopsis basicola* [J]. Shanghai Agricultural Science and Technology, 2001(4): 77-87. (in Chinese)
- [15] 王敬文, 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究 [J]. 植物生理学报, 1981, 7(4): 375-379.
- Wang J W, Xue Y L. The research of phenylalanine aminolase in plants [J]. Journal of Plant Physiology, 1981, 7(4): 375-379. (in Chinese)
- [16] 李 靖, 利容千, 袁文静. 黄瓜感染霜霉病菌叶片一些酶活性的变化 [J]. 植物病理学报, 1991, 21(4): 253-256.
- Li J, Li R Q, Yuan W J. Changes of some enzyme activity in blade of cucumber after inoculating downy mildew [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1991, 21(4): 253-256. (in Chinese)
- [17] 蓝海燕, 张丽华, 王兰岚. 表达 β -1, 3-葡聚糖酶及几丁质酶基因的转基因烟草及其抗真菌病的研究 [J]. 遗传学报, 2000, 27(1): 70-77.
- Lan H Y, Zhang L H, Wang L L. Studies of transgenic tobacco plants expressing β -1, 3-glucanase and chitinase genes and their potential for fungal resistance [J]. Acta Genet Sin, 2000, 27(1): 70-77. (in Chinese)
- [18] Baumlein H, Nagy I, Villarreal R, et al. Cis- analysis of a seed-protein gene promoter: The conservative RY repeat CATGC-ATG within the legumin box is essential for tissue-specific expression of a legumin gene [J]. Plant J, 1992(2): 233-239.
- [19] 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 Boreal-Occident Sin, 2005, 25(5): 851-857. (in Chinese)
- [20] 何晨阳. 双核丝核菌诱导水稻增强广谱抗病性和防卫酶活性 [J]. 植物病理学报, 2001, 31(3): 208-212.
- He C Y. Induction of enhanced broad-spectrum resistance and defense enzyme activities in rice by binucleate *Rhizoctonia* species [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2001, 31(3): 208-212. (in Chinese)
- [21] 汤会君, 张俊华, 魏向峰. 不同抗性烟草品种感染 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 病菌后几种酶活性测定 [J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(4): 30-34.
- Tang H J, Zhang J H, Wei X F. Bioassay of different tobacco cultivars' the activity of POD, PPO and PAL in interaction with *P. syringae* [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2005, 36(4): 30-34. (in Chinese)
- [22] 陈学平. 不同烟草品种感染 TMV 病程过程中 CAT、PAL 活力变化研究 [J]. 安徽农业学报, 2002, 29(2): 103-107.
- Chen X P. Studies on the CAT and PAL vigors of various tobacco varieties response to TMV [J]. Anhui Agricultural Journal, 2002, 29(2): 103-107. (in Chinese)
- [23] 杨建卿, 许大风, 孔 俊, 等. 不同烟草品种罹黑胫病后几种酶活性的变化 [J]. 合肥工业大学学报, 2005, 28(7): 816-819.
- Yang J Q, Xu D F, Kong J, et al. Change of activities of some enzymes in different tobacco varieties infected with *Phytophthora nicotianae* [J]. Journal of Hefei University of Technology, 2005, 28(7): 816-819. (in Chinese)