

网络出版时间:2015-09-09 15:41

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.10.010

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150909.1541.020.html>

*hrpZ*_{Psg12} 转基因烟草及其抗性评价

杨丽娜¹, 刘兴娜², 卢宝慧¹, 吴庠玉¹, 白庆荣¹, 王雪¹, 高洁¹

(1 吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118; 2 吉林省辽源市 农业技术推广总站, 吉林 辽源 136300)

【摘要】【目的】将来源于大豆细菌性斑点病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*) Psg12 菌株的 *hrpZ*_{Psg12} 基因导入烟草“云烟 87”, 对转化植株进行烟草普通花叶病毒(TMV)、烟草马铃薯 Y 病毒(PVY)和烟草野火病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*)的抗病性鉴定, 为培育多抗烟草新品系奠定基础。【方法】采用农杆菌介导法, 将 *hrpZ*_{Psg12} 基因转入烟草“云烟 87”中, 对 T₀ 和 T₁ 代转基因植株进行 PCR 检测、Southern 杂交, 并对 T₁ 代转基因植株的抗病性进行评价。【结果】*hrpZ*_{Psg12} 基因成功转入“云烟 87”中, PCR 检测表明共获得 7 株 T₀ 代阳性植株、35 株 T₁ 代阳性植株。对 T₁ 代 PCR 阳性植株进行 Southern 检测, 表明外源目的基因 *hrpZ*_{Psg12} 已经整合进烟草基因组中, 并可在转基因后代植株中稳定遗传。抗病性测定表明, T₁ 代转基因烟草对 TMV 和 PVY 表现高抗, 对烟草野火病表现中抗。【结论】获得了高抗 TMV 和 PVY 及中抗烟草野火病菌的转 *hrpZ*_{Psg12} 基因植株 20 和 15 株。

【关键词】烟草; *hrpZ*_{Psg12} 基因; 农杆菌介导法; 转基因植株

【中图分类号】 S572.034

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2015)10-0070-07

Transgenic tobacco with *hrpZ*_{Psg12} gene and evaluation of its resistance

YANG Li-na¹, LIU Xing-na², LU Bao-hui¹, WU Xiang-yu¹,
BAI Qing-rong¹, WANG Xue¹, GAO Jie¹

(1 College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun, Jinlin 130118, China;

2 Agricultural Technology Extension Station of Liaoyuan City, Liaoyuan, Jinlin 136300, China)

Abstract: 【Objective】*hrpZ*_{Psg12} gene from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* Psg12 strain was imported to tobacco variety “Yunyan 87” and the disease resistance to TMV, PVY and *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* was identified to provide reference for cultivating resistant tobacco varieties. 【Method】*hrpZ*_{Psg12} gene was transferred into “Yunyan 87” by agrobacterium-mediated transformation method. Transgenic plants of T₀ generation and T₁ generation were detected by PCR, Southern blot and resistance assay. The disease resistance of T₁ generation plants was also evaluated. 【Result】PCR detection showed that this study obtained 7 positive transgenic plant lines in T₀ generation and 35 plant lines in T₁ generation, indicating that *hrpZ*_{Psg12} gene could inherit in transgenic plants. Southern blot for T₁ generation confirmed that *hrpZ*_{Psg12} gene was integrated into tobacco. Resistance assay confirmed that T₁ generation had high resistance against TMV and PVY, and moderate resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. 【Conclusion】A total of 20 transgenic plants lines with high resistance against TMV and PVY and 15 transgenic plants lines with moderate resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* were obtained.

Key words: tobacco; *hrpZ*_{Psg12} gene; transformation; multiple resistance transgenic plants

〔收稿日期〕 2014-03-10

〔基金项目〕 吉林省科技发展规划项目(20090211); 吉林省烟草公司长春市分公司和湖南中烟工业有限责任公司联合资助项目(2012130073); 吉林农业大学青年启动基金项目(201029); 吉林农业大学博士科研启动基金项目(201106)

〔作者简介〕 杨丽娜(1981—), 女, 吉林扶余人, 实验师, 硕士, 主要从事植物病害综合治理研究。E-mail: yanglina2004@sina.com

〔通信作者〕 高洁(1965—), 女, 吉林梨树人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物病害综合治理研究。E-mail: jiegao115@126.com

hrp(Hypersensitive response and pathogenicity)基因普遍存在于革兰氏阴性病原细菌中,其编码的 Harpin 类蛋白本身不具有任何杀菌活性,但可以激活植物产生一系列抗性反应,使植物获得广谱的抗病、抗虫作用,并能促进植物生长,提高植物抗逆性,增加作物产量,在生产上具有较好的应用前景^[1-5]。国内外学者用不同来源的 *hrp* 基因转化梨树、油菜、马铃薯、大豆等植物,转基因植株都获得了不同程度的抗性^[6-11]。来源于大豆细菌性斑点病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, Psg)的 *hrpZ_{Psg12}* 基因大小为 1 026 bp,编码 431 个氨基酸,甘氨酸含量为 13.19%,编码蛋白的分子质量约为 34 ku。由 *hrpZ_{Psg12}* 基因编码的 Harpin 蛋白具有与其他 Harpins 蛋白类似的特征和功能。姜兆远等^[12]克隆到该基因,也证明该基因表达的蛋白质产物具有诱导植物产生抗病性和促进植物生长等效应^[13-15]。张云月等^[10]、尹俊琦等^[11]将 *hrpZ_{Psta}* 基因转入大豆品种中,转基因后代对大豆灰斑病的抵抗能力大幅度增强。但目前该基因在烟草抗病性改良方面的研究尚未见报道,为进一步明确该基因在烟草抗性改良中的功能,提高烟草抗病性,本研究将该基因转化到烟草中并对其进行抗病性鉴定,以期进一步验证激活 *hrpZ_{Psg12}* 基因诱导植物产生抗病性和促进植物生长的能力,为烟草抗病育种和诱导抗病机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受体材料 供试烟草品种为吉林省主栽烟草品种云烟 87,由吉林省烟叶公司提供。

1.1.2 菌株和质粒 大豆细菌性斑点病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, Psg)菌株 Psg12、农杆菌 LBA4404、烟草普通花叶病毒(TMV)、烟草马铃薯 Y 病毒(PVY)和烟草野火病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*),均由吉林农业大学植物病害综合治理实验室保存。植物表达载体 pROK II,由山东农业大学植物抗病基因工程研究室惠赠。

1.1.3 主要试剂 PCR 扩增试剂、限制性内切酶,均购自 MBI 公司;DNA Marker DL2000,购自 TaKaRa 公司;植物基因组 DNA 提取试剂盒,购自北京天根公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 植物表达载体的构建 根据 GenBank 登录

号为 FJ853143 的大豆细菌性斑点病菌 *hrpZ_{Psg12}* 基因序列设计 1 对特异性引物(P1:5'-GCTCTAG-ATGATGCAGAGTCTCAGTCTT-3'和 P2:5'-CG-AGCTCTCAGGCAGCAGCCTGGTTTT-3'),在其 5'端和 3'端分别引入 *Xba* I 和 *Sac* I 酶切位点。以大豆细菌性斑点病菌 Psg12 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增^[8]。PCR 扩增条件:94 ℃ 预变性 6 min;94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 90 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 8 min。PCR 产物与 pGM-T 连接,构建克隆质粒,转化大肠杆菌 DH5 α ,提取重组质粒,双酶切鉴定后送 TaKaRa 公司测序。用 *Xba* I 和 *Sac* I 分别对克隆载体及表达载体 pROK II 进行双酶切,回收目的片段。将目标基因与植物表达载体连接、热激法转化 DH5 α ,提取重组质粒后进行双酶切鉴定,测序。冻融法将其转入到农杆菌 LBA4404 中,用于转化烟草。

1.2.2 农杆菌介导法转化烟草 转化烟草按白庆荣等^[16]的方法进行,转基因植株种子单株收获。

1.2.3 T₀ 代和 T₁ 代植株的分子检测 1)PCR 检测。从 T₀ 和 T₁ 代转化烟草植株及对照植株中剪取叶片,CTAB 法提取植物基因组 DNA,以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增,以质粒 pROK II-*hrpZ_{Psg12}* 为阳性对照,未转化的植株为阴性对照。

2)Southern blot 检测。采用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取 PCR 检测阳性植株和对照植株的基因组 DNA,经 *Bam*H I 消化过夜,然后用 0.8% 琼脂糖凝胶进行分离,再用 20XSSC 转移到尼龙膜,80 ℃ 固定 2 h 后与探针杂交。地高辛 DNA 标记与检测试剂盒(Roche 公司)进行 Southern 杂交检测。以纯化的 *hrpZ_{Psg12}* 为模板制备探针,采用随机引物标记法进行标记,随后按照试剂盒说明书进行转膜、杂交、封闭和显色。

1.2.4 T₁ 代转基因植株的抗病性评价 (1)TMV 和 PVY 的抗性评价。病毒汁液的制备:取感染 TMV 和 PVY 的烟草叶片,用流水冲洗叶片表面,消毒滤纸擦干后剪去主脉,将叶片放入研钵中并加入等量的磷酸缓冲液,在冰上研磨,4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液至 50 mL 离心管中,按 1:5 体积比用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(含体积分数 0.1% 的巯基乙醇,pH 7.2)稀释后加入体积分数 0.05% 的 Tween-80 表面活性剂备用。

病毒接种:分别选取 5 株 7 叶期 T₁ 代转基因烟草植株和空白对照植株作为接种对象,每株接种 2 个完全展开的新生叶片。先将石英砂均匀撒在叶片

上,用灭菌毛刷蘸取病毒汁液在接种叶片上轻度摩擦,1~2 h 后用无菌水喷洗接种部位,将接种植株置 25 ℃ 温室中培养。逐天观察接种烟草叶片的症状变化,参照黄婷等^[9,17]的方法分别调查接种后 7,15 d 烟草叶片的发病情况,并对转基因烟草进行抗性评价。

(2)烟草野火病菌的抗性评价。将活化后的烟草野火病菌制成 5×10^8 CFU/mL 的菌悬液。分别选取 15 株转基因植株(7 叶期)用上述菌悬液喷雾接种,再选取 15 株非转基因健康植株用无菌水喷雾作为空白对照,套袋保湿 24 h,置 25 ℃ 温室中培养。接种后 7 d,调查发病情况,记载叶片病斑直径,计算平均病斑直径和病叶率。

烟草野火病的病级指数采用 9 级分级标准,其中 0 级:叶片无病斑;1 级:病斑占叶片面积 5% 以下;3 级:病斑占叶片面积 6%~10%;5 级:病斑占叶片面积 11%~20%;7 级:病斑占叶片面积 21%~40%;9 级:病斑占叶片面积 40% 以上。按下式计算病情指数:

病情指数 = $[(\sum \text{各级病叶数} \times \text{该病级值}) / (\text{调查总叶数} \times 9)] \times 100$ 。

按病情指数进行群体抗性分类。群体抗性分类标准为 4 级,其中免疫:病情指数等于 0,无侵染;高抗: $0 < \text{病情指数} \leq 20$;中抗: $20 < \text{病情指数} \leq 50$;感病: $50 < \text{病情指数} \leq 100$ 。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体的构建

将 PCR 扩增产物与 pGM-T 连接,构建克隆质

粒 pGM-*hrpZ*_{Psg12},转化大肠杆菌 DH5 α ,提取重组质粒。用 *Xba* I 和 *Sac* I 分别对克隆载体进行酶切,得到 1 026 bp 的片段,将该片段与相同酶切位点的植物表达载体 pROK II 进行连接,构建重组质粒 pROK II-*hrpZ*_{Psg12},PCR 和双酶切鉴定(图 1)及测序结果表明,植物表达载体构建成功。

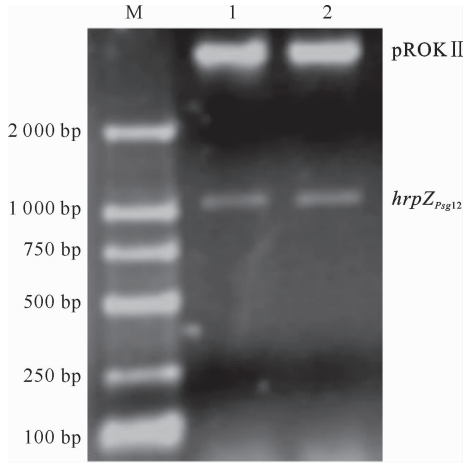


图 1 质粒 pROK II-*hrpZ*_{Psg12} 的酶切鉴定

M. DL2000 DNA Marker;1,2. pROK II-*hrpZ*_{Psg12} 质粒 *Xba* I /*Sac* I 双酶切

Fig. 1 Restriction analysis of plasmid

pROK II-*hrpZ*_{Psg12}

M. DL2000 DNA Marker;1,2. pROK II-*hrpZ*_{Psg12} plasmid digested by *Xba* I and *Sac* I

2.2 农杆菌介导的烟草的转化

将构建好的植物表达载体经冻融法转入根癌农杆菌 LBA4404 中,叶盘法转化烟草,结果获得 10 株卡那抗性植株(图 2)。

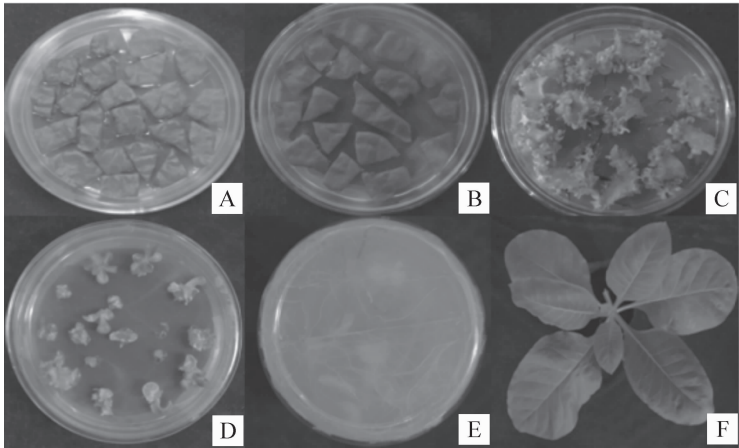


图 2 农杆菌介导的 *hrpZ*_{Psg12} 基因转化烟草

A. 预培养;B. 共培养;C. 选择培养;D. 分化芽;E. 生根培养;F. 转化植株

Fig. 2 Transformation of *hrpZ*_{Psg12} gene into tobacco via agrobacterium-mediated method

A. Pre-regeneration culture;B. Co-cultivation;C. Callus culture;D. Km resistant buds from tobacco leaf disks;E. Root-reduced culture;F. Transformation plants

2.3 转基因烟草的分子检测

2.3.1 PCR 检测 转基因植株 T₀ 代总 DNA PCR 产物的电泳检测结果(图 3)表明,从 T₀ 代植株中扩增出了与阳性对照在同一位置的特异性条带,初步证明 *hrpZ_{Psg12}* 基因成功地转入到受体烟草品种中,共获得了 7 株阳性植株。

播种 PCR 检测为阳性的 T₀ 代植株的种子,获得 T₁ 代转基因植株,将其播种于营养钵中,提取基因组 DNA,以其为模板,P1、P2 为引物进行 PCR 检测,结果(图 4)表明,外源 *hrpZ_{Psg12}* 基因在转基因后代中能够遗传,共获得了 35 株 T₁ 代转基因植株。

2.3.2 Southern 杂交 对部分 T₁ 代 PCR 检测为阳性的植株基因组 DNA 用 *Bam*H I 进行酶切,并进行 Southern 杂交分析,结果如图 5 所示。图 5 显示,PCR 检测为阳性的 T₁ 植株与阳性对照在相同

位置出现杂交条带,证明外源 *hrpZ_{Psg12}* 基因已整合到烟草基因组中并可稳定遗传。

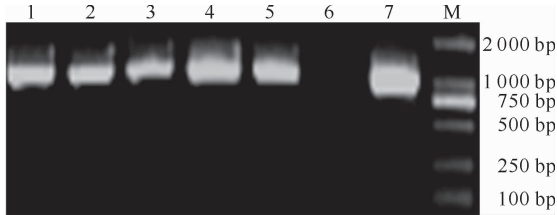


图 3 T₀ 代转基因烟草植株的 PCR 检测
1~5. 转基因植株;6. 未转化植株;7. 重组表达质粒
pROK II -*hrpZ_{Psg12}*; M. DL2000 DNA Marker
Fig. 3 PCR analysis of T₀ transgenic tobacco plants
1-5. Transgenic tobacco plants;6. Non-transgenic plant;
7. Recombined plasmid pROK II -*hrpZ_{Psg12}*;
M. DL2000 DNA Marker

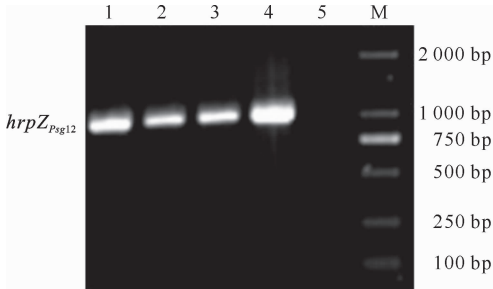


图 4 T₁ 代转基因植株的 PCR 检测
1~4. T₁ 代转基因植株;5. 未转化植株;
M. DL2000 DNA Marker
Fig. 4 PCR analysis of T₁ transgenic tobacco plants
1-4. Transgenic tobacco plants;5. Non-transgenic
plant;M. DL2000 DNA Marker

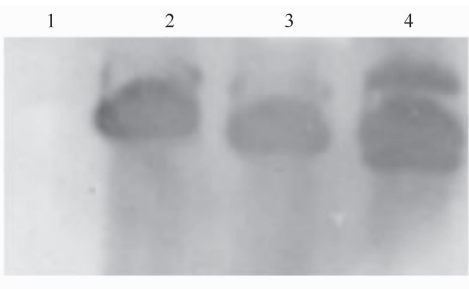


图 5 转基因烟草的 Southern blot 分析
1. 阴性对照;2. 阳性对照;3,4. 转基因阳性株系
Fig. 5 Southern blot analysis of
transgenic tobacco plants
1. Negative control;2. Positive control;
3,4. Transgenic tobacco plants

2.4 T₁ 代转基因烟草的抗病性评价

在接种 TMV 后 7 d,转基因烟草接种的 2 个叶片产生不规则的过敏性枯死斑(图 6-A),未转基因植株的叶片产生典型的 TMV 初期症状(图 6-B);在

接种后 15 d,转基因烟草植株接种的 2 个叶片枯死,上部新生叶片正常(图 6-C),而未转基因对照植株随着病程的持续,整株发病(图 6-D)。由此可以看出,转基因烟草对 TMV 具有高度抗性。

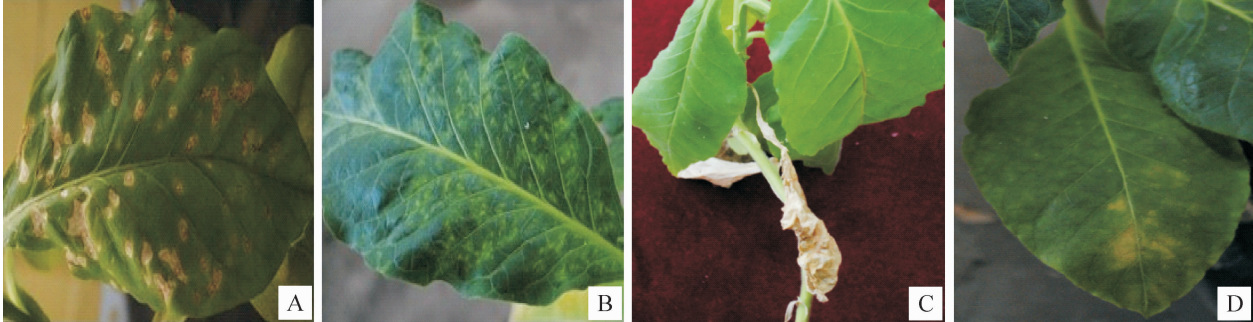


图 6 转基因烟草和非转基因烟草植株接种 TMV 后的症状
A. 接种 7 d 的转基因植株;B. 接种 7 d 的非转基因植株;C. 接种 15 d 的转基因植株;D. 接种 15 d 的非转基因植株

Fig. 6 Symptoms on leaves of transgenic plants and non-transgenic plants after inoculation with TMV respectively
A. Transgenic tobacco plants 7 d after inoculation;B. Non-transgenic plants 7 d after inoculation;
C. Transgenic tobacco plants 15 d after inoculation;D. Non-transgenic plant 15 d after inoculation

在接种 PVY 后 7 d,转基因烟草植株生长正常(图 7-A);非转基因对照植株的叶片产生典型的 PVY 症状(图 7-B)。在接种后 15 d,转基因烟草生长正常(图 7-C),而非转基因对照植株叶脉呈褐色

至黑色坏死,常延伸到中脉和茎上,造成叶片皱缩卷曲,在叶中脉或侧脉处常发生大小数目不一的褐色或白色坏死斑点(图 7-D)。由此可以看出,转基因烟草对 PVY 具有高度抗性。

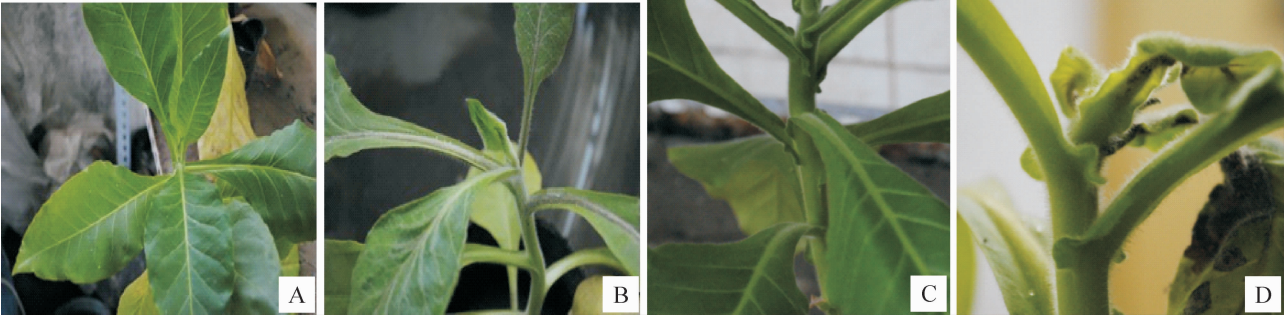


图 7 转基因烟草和非转基因烟草植株接种 PVY 后的症状

A. 接种 7 d 的转基因植株;B. 接种 7 d 的非转基因植株;C. 接种 15 d 的转基因植株;D. 接种 15 d 的非转基因植株

Fig. 7 Symptoms on leaves of transgenic plants and non-transgenic plants after inoculation with PVY

A. Transgenic tobacco plants 7 d after inoculation;B. Non-transgenic plants 7 d after inoculation;

C. Transgenic tobacco plants 15 d after inoculation;D. Non-transgenic plants 15 d after inoculation

在接种烟草野火病菌的第 4 天,转基因植株未出现发病症状(图 8-A),非转基因烟草植株出现水渍状圆形褪色的斑点(图 8-B);在接种后 13 d,转基因烟草开始有部分叶片出现水渍状圆形褪色的斑点(图 8-C),发病率为 5%,推迟发病 7~9 d。非转基因烟草发病率达到 60%,病斑扩大,中心变成褐色,周围有一圈很宽的黄绿色晕环,病斑合并扩

大,呈不规则形(图 8-D);在接种后第 21 天,转基因植株的平均病情指数为 40,而对照植株的平均病情指数为 100(表 1)。随着病程的持续,接种 30 d 时对照植株进入病情指数为 100 的平稳期,转基因植株在 30 d 时才进入病情指数为 80 平稳期。上述结果表明,所选取的 15 株转基因烟草均中抗烟草野火病菌。

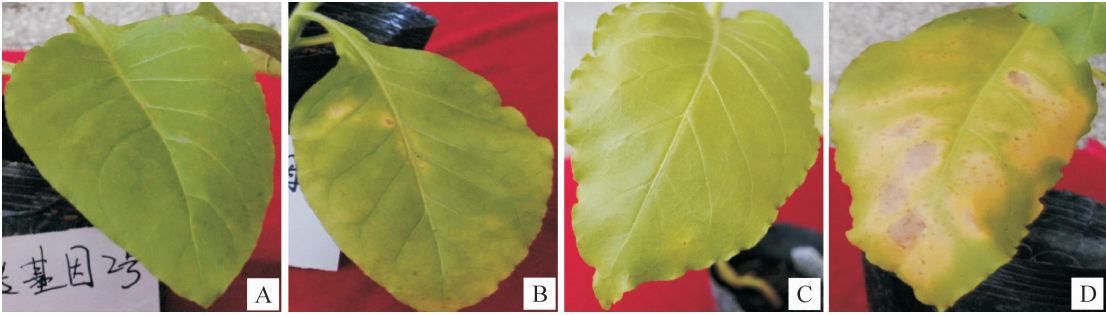


图 8 转基因烟草和非转基因烟草植株在接种烟草野火病菌后的症状

A. 接种 4 d 的转基因植株;B. 接种 4 d 的非转基因植株;C. 接种 13 d 的转基因植株;D. 接种 13 d 的非转基因植株

Fig. 8 Symptoms on leaves of transgenic and non-transgenic plants after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

A. Transgenic tobacco plants 4 d after inoculation;B. Non-transgenic plants 4 d after inoculation;

C. Transgenic tobacco plants 13 d after inoculation;D. Non-transgenic plants 13 d after inoculation

表 1 转基因烟草和非转基因烟草植株对烟草野火病菌的抗性

Table 1 Resistance of transgenic and non-transgenic plants against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

接种后时间/d Investigate time	转基因烟草 Transgenic plants		非转基因烟草 Non-transgenic plants	
	病情指数	抗病性	病情指数	抗病性
	Disease severity index	Disease grade	Disease severity index	Disease grade
4	0	免疫 Immune	32	中抗 Moderate resistance
13	11	高抗 High resistance	55	感病 Susceptible
21	40	中抗 Moderate resistance	100	感病 Susceptible
30	80	感病 Susceptible	100	感病 Susceptible

3 讨 论

hrpZ 基因编码的 Harpin 蛋白在引起植物产生过敏反应的同时,不仅可以诱导植物获得系统性抗性,还能刺激植物生长发育,诱导其他有益反应的发生^[13-16]。Harpin 蛋白的作用机理并不是直接针对目标病原菌,而是刺激植物自身产生过敏性反应(HR),从而达到抵御不利微生物侵害的目的,该反应效果已被证实能够激发并提高植物体对多种微生物病原菌的抗性,而这种自然的免疫机制可以促进植物抵抗一系列的细菌、真菌和病毒病害,赋予植物广谱抗病性。目前已经得到了高抗晚疫病转 *hrp* 基因的马铃薯,用马铃薯晚疫病菌复合生理小种挑战接种测定表明,HrpN 蛋白的转基因植株能够拮抗病原菌的侵扰^[7-8]。张云月等^[10]、尹俊琦等^[11]将 *hrpZ_{Psta}* 基因转入 2 个大豆品种中,使大豆植株对真菌类病害的抵抗能力有较显著的增强。本试验将 *hrpZ_{Psg12}* 基因通过农杆菌介导法转入烟草获得了稳定遗传 2 代的转基因植株, T_1 代转基因植株对 TMV、PVY 和烟草野火病的抗性都有所增强,且对 TMV 和 PVY 表现高抗,对烟草野火病表现中抗,以上研究结果说明,*hrp* 基因编码的 Harpin 蛋白在诱导植物获得系统性抗性上有很大的作用,但是具体对哪种病害的抵抗能力更强尚不甚明确,这有待进一步研究。

近些年,人们对转基因食品安全性的问题愈加关注。*hrpZ_{Psta}* 基因编码的 Harpin 蛋白并非是毒蛋白,不会对植物体或者食用植物的动物或人造成危害,此种蛋白的主要作用是引起植物体本身的过敏性反应,以应对病原菌的入侵并产生广谱的抗病性。因此该基因是较为安全的,不会给人们带来对转基因作物的恐慌。该基因在增强植株自身抗病性的同时,还可以提高烟草抗病性,改良烟草的品质,为进一步培育抗病转基因烟草新品系奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Galán J E, Collmer A. Type III secretion machines: Bacterial devices for protein delivery into host cells [J]. Science, 1999, 284 (21): 1322-1328.
- [2] Staskawicz B J. Genetics of plant pathogen interactions specifying plant disease resistance [J]. Plant, 2001, 25(1): 73-76.
- [3] Wei Z M, Laby R J, Zumoff C H, et al. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora* [J]. Science, 1992, 257: 85-88.
- [4] Gopalan S, He S Y. Bacterial genes involved in the elicitation of

hypersensitive response and pathogenesis [J]. Plant Disease, 1996, 80: 604-610.

- [5] 杨 军, 尹启生, 宋纪真, 等. 植物病原菌的 *hrp* 基因 [J]. 遗传, 2005, 27(5): 852-858.
Yang J, Yin Q S, Song J Z, et al. Review on *hrp* genes of plant pathogenic bacteria [J]. Hereditas, 2005, 27(5): 852-858. (in Chinese)
- [6] 赵延鹏, 姜伯乐, 何勇强, 等. 十字花科黑腐病菌 *hrpW* 基因导入油菜之研究初报 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(4): 67-70.
Zhao Y P, Jiang B L, He Y Q, et al. Preliminary report on obtaining transgenic *Brassica napus* L. Harboring *hrpW* gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(4): 67-70. (in Chinese)
- [7] 李先平, 何云昆. 通过农杆菌介导把 *HarpinEa* 基因导入马铃薯的初步研究 [J]. 云南农业大学学报, 2002, 17(3): 252-257.
Li X P, He Y K. Analysis of late blight resistance in transgenic potato expressing *HarpinEa* gene [J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2002, 17(3): 252-257. (in Chinese)
- [8] 黄先群, 蒋敏华, 陈 坚, 等. 转 *hrap* 基因马铃薯获得晚疫病抗性研究 [J]. 分子植物育种, 2011, 9(2): 218-223.
Huang X Q, Jiang M H, Chen J, et al. Integrating the *hrap* gene from sweet pepper into potato enhances resistance to *Phytophthora infestans* [J]. Molecular Plant Breeding, 2011, 9 (2): 218-223. (in Chinese)
- [9] 黄 婷, 袁治理, 成巨龙, 等. 烟草对蚀纹病毒和马铃薯 Y 病毒的抗病性鉴定 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2012, 40(6): 107-113.
Huang T, Yuan Z L, Cheng J L, et al. Identification of resistance to TEV and PVY in tobacco varieties [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2012, 40(6): 107-113. (in Chinese)
- [10] 张云月, 付永平, 王丕武, 等. 转 *hrpZ_{Psta}* 抗病基因大豆的研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2011, 39(9): 86-91.
Zhang Y Y, Fu Y P, Wang P W, et al. Study on transforming *hrpZ_{Psta}* gene into soybean [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2011, 39(9): 86-91. (in Chinese)
- [11] 尹俊琦, 王 楠, 周 莹, 等. 两个大豆品种转 *hrpZ_{Psta}* 基因后代对大豆灰斑病的抗性分析 [J]. 大豆科学, 2013, 32(2): 238-241.
Yin J Q, Wang N, Zhou Y, et al. Analysis on resistance to frog-eye leaf spot between two species of transgenic soybean progenies with *hrpZ_{Psta}* gene [J]. Soybean Science, 2013, 32 (2): 238-241. (in Chinese)
- [12] 姜兆远, 邹晓薇, 高 洁, 等. 大豆细菌性斑点病菌 harpin 编码基因的克隆与表达 [J]. 微生物学报, 2009, 49(10): 1403-1407.
Jiang Z Y, Zou X W, Gao J, et al. Cloning and expressing of a harpin-encoding gene from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(10): 1403-1407. (in Chinese)
- [13] 王金生. 植物病原细菌学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000:

258-264.

Wang J S. Plant bacteriology [M]. Beijing: Agricultrue Publishing House in China,2000:258-264. (in Chinese)

[14] 陈功友,张 兵,武晓敏,等. 大豆斑疹病菌 harpin 编码基因的克隆与特性研究 [J]. 微生物学报,2005,45(4):496-499.

Chen G Y,Zhang B,Wu X M,et al. Cloning and characterization of an harpin_encoding gene from *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* required for hypersensitive response on non-host plant tobacco [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45 (4):496-499. (in Chinese)

[15] 谭放军,徐泽安,尹文雅,等. Harpin 蛋白研究进展及其应用 [J]. 湖南农业科学,2003(6):38-40.

Tan F J,Xu Z A,Yin W Y,et al. Studies on Harpin protein and its application [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2003 (6):38-40. (in Chinese)

[16] 白庆荣,朱俊华,刘晓玲. 利用 RNA 介导的抗病性获得抗 2 种病毒的转基因烟草 [J]. 植物病理学报,2005,35(2):148-154.

Bai Q R,Zhu J H,Liu X L,et al. Production of transgenic tobacco plants resistant to two viruses via RNA-mediated virus resistance [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005, 35 (2): 148-154. (in Chinese)

[17] 黄 婷,柯美福,陈 伟,等. 烟草品种对烟草花叶病毒病和黄瓜花叶病毒病的抗性鉴定 [J]. 植物保护,2012,38(5):115-119.

Huang T,Ke M F,Chen W,et al. Identification of tobacco variety resistance to Tobacco mosaic virus and Cucumber mosaic virus [J]. Plant Protection, 2012, 38 (5): 115-119. (in Chinese)

(上接第 63 页)

[34] 方运霆,莫江明,Brown S,等. 鼎湖山自然保护区土壤有机碳贮量和分配特征 [J]. 生态学报,2004,24(1):135-142.

Fang Y T,Mo J M,Brown S,et al. Storage and distribution of soil organic carbon in Dinghushan Biosphere Reserve [J]. Acta Ecological Sinica,2004,24(1):135-142. (in Chinese)

[35] 李 忠,孙 波,林心雄. 我国东部土壤有机碳密度及转化的控制因素 [J]. 地理科学,2001,21(4):301-307.

Li Z,Sun B,Lin X X. Density of soil organic carbon and the factors controlling its turnover in east China [J]. Scientia Geographica Sinica,2001,21(4):301-307. (in Chinese)

[36] 徐秋芳,姜培坤,沈 泉. 灌木林与阔叶林土壤有机碳库的比较研究 [J]. 北京林业大学学报,2005,27(2):18-22.

Xu Q F,Jiang P K,Shen Q. Comparison of organic carbon pool of soil in bush and broad-leaved forests [J]. Journal of Beijing Forestry University,2005,27(2):18-22. (in Chinese)

(上接第 69 页)

[17] Yan T,Guo Z K,Jiang R,et al. New flavonol and diterpenoids from the endophytic fungus *Aspergillus* sp. YXF3 [J]. Planta Medica,2013,79(5):348-352.

[18] Li H Q,Li X J,Wang Y L,et al. Antifungal metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus in *Ginkgo biloba* [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2011, 39 (4/5/6): 876-879.

[19] Li X,Tian Y,Yang S X,et al. Cytotoxic azaphilone alkaloids from *Chaetomium globosum* TY1 [J]. Bioorganic Medicinal Chemistry Letters,2013,23(10):2945-2947.

[20] Liu X,Dong M,Chen X,et al. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin [J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2008,78(2):241-247.