

抗病基因 *VpPR10* 转化‘砀山酥梨’及转化条件的优化

孟颖光^{1,2,3,4}, 张朝红^{1,2,3}, 王跃进^{1,2,3,*}

(¹西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100; ²农业部西北园艺植物种质资源利用重点开放实验室, 陕西杨凌 712100; ³陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西杨凌 712100; ⁴河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002)

摘要: 将源自中国野生华东葡萄的抗病基因——病程相关蛋白基因导入‘砀山酥梨’, 并对转化系统条件进行优化。首先将 *VpPR10* 基因重组于中间表达载体 pWR-II, 得到重组质粒 pWR-II-*VpPR10*; 继而以改进冻融法将其导入根癌农杆菌 EHA105, 再利用根癌农杆菌介导的叶盘转化法进行遗传转化。根癌农杆菌浓度 $OD_{600} = 0.5$, 离体叶片侵染 5 min, 在含有 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮的培养基中暗处共培养 48 h 有利于砀山酥梨的遗传转化; 经 PCR 分析、Southern blot 和 RT-PCR 检测, 证明目的基因 *VpPR10* 已导入并整合到砀山酥梨基因组中; 转化率为 1.08%。

关键词: 梨; 抗病基因; 农杆菌介导; 病程相关蛋白基因 (*VpPR10*); 条件优化

中图分类号: S 661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2010) 10-1567-08

Transforming Diseases-resistant Gene *VpPR10* into Pear ‘Dangshan Suli’ and Optimization of the Transformation System

MENG Hao-guang^{1,2,3,4}, ZHANG Chao-hong^{1,2,3}, and WANG Yue-jin^{1,2,3,*}

(¹College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; ²Key Laboratory of Horticultural Plant Germplasm Resources Utilization in Northwest China, Ministry of Agriculture of China, Yangling, Shaanxi 712100, China; ³Shaanxi Key Laboratory for Molecular Biology of Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China; ⁴College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To provide the basis for increasing the genetic transformation efficiency of *Pyrus bretshneideri* ‘Dangshan Suli’, the *VpPR10* gene, cloned from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata* W. T. Wang, was introduced into pear genome and the optimum conditions of the genetic transformation system were also examined. The *VpPR10* gene was constructed into the plant expression vector pWR-II and the recombinant plasmid pWR-II-*VpPR10* was obtained; Then the pWR-II-*VpPR10* was introduced into the *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 by improved freeze-thaw method, and was transformed into leaf disc explants of Dangshan Suli via an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated system. The results showed that the suitable transformation conditions were 5 min infection time, 0.5 bacterium concentration (OD_{600}), $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Acetosyringone (AS), and 48 h co-cultivation in dark. The PCR, Southern blot and RT-PCR analysis results revealed that *VpPR10* gene was successfully recombined into the genome of

收稿日期: 2010-05-26; 修回日期: 2010-08-03

基金项目: 国家‘863’计划项目 (2007AA10Z182); 陕西省重大科技专项 (2006kz05-G4)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wangyj@nwsuaf.edu.cn)

Dangshan Suli, and the rate of genetic transformation was 1.08%.

Key words: *Pyrus bretschneideri* Rehd.; disease-resistant gene; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated; pathogenesis-related protein gene (*VpPR10*); optimization

梨属植物由于童期长、遗传背景复杂等原因,传统的抗病育种效率较低(Matsuda et al., 2005)。梨黑星病(*Venturia pirina*)是一种世界性病害,在我国危害尤为严重(赵宗方 等, 1997; 刘成 等, 2009)。近年来植物分子育种技术日新月异,通过基因工程进行品种改良已成为推进常规育种进程的重要手段(王关林和方宏筠, 2002)。相对其它果树,梨属植物的遗传转化比较滞后,主要原因是再生困难、转化效率较低。Mourgues 等(1996)首次用农杆菌介导法对西洋梨进行遗传转化并获得转基因植株。随后在西洋梨的遗传转化(Reynoird et al., 1999; Malnoy et al., 2003; Gao et al., 2007)方面国内外学者相继取得一定进展。赵瑞华等(2004)将抗真菌 γ -硫堇蛋白Rs-*afp1*基因导入丰产梨,汤绍虎等(2007)将*CryIAC*基因转入‘雪青’梨,孙清荣等(2008)将*gus*基因导入‘Old Home’梨。与之相比,白梨品种,特别是砀山酥梨(*Pyrus bretschneideri* Rehd. ‘Dangshan Suli’)的遗传转化至今仍未有报道。鉴于‘砀山酥梨’在我国梨产业中占据重要地位,拟通过根癌农杆菌介导法,将中国野生华东葡萄病程相关蛋白基因(*VpPR10*)导入砀山酥梨离体叶片,以期建立稳定高效的砀山酥梨遗传转化体系,定向改良砀山酥梨的遗传性状,获得优质抗病新品系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于2007年4月至2009年12月在陕西省农业分子生物学重点实验室进行。砀山酥梨当年生枝条取自西北农林科技大学园艺学院眉县果树实验站,经单芽茎段培养,建立试管苗无性繁殖系。含有中国野生华东葡萄病程相关蛋白基因(*VpPR10*)的质粒pGEM-Teasy-*VpPR10*、中间表达载体pWR-II、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株EHA105均由农业部西北园艺植物种质资源利用重点开放实验室构建并保存。大肠杆菌(*E. coli*)感受态菌株Top10购于天根生物工程公司。

1.2 植物表达载体的构建与农杆菌转化

分别提取质粒 pGEM-Teasy-*VpPR10* 和 pWR-II, 用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切, 凝胶电泳后回收目的基因和 pWR-II 的大片段, T4 连接酶连接。以连接产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞。挑选 LB (Kan 60 mg · L⁻¹) 平板上的抗性菌落, 提取质粒进行 PCR 反应、酶切检测, 验证筛选阳性克隆。

采用改进冻融法(徐伟荣 等, 2005)将重组质粒导入根癌农杆菌 EHA105; 提取重组质粒, 以高保真 *Taq* 酶进行 PCR 检测, 并回收扩增产物测序鉴定。

1.3 农杆菌介导的梨遗传转化

挑取农杆菌单菌落接种于含有 Kan (60 mg · L⁻¹) 和 Gent (50 mg · L⁻¹) 的 LB 液体培养基中过夜培养 (20 mL, 28 °C, 200 r · min⁻¹), 然后 5 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清液, 用液体再生培养基重悬。取继代培养 25 d 的无菌苗叶片, 垂直叶片中脉横切 2 刀 (不伤及叶缘) 得到 3 个 (0.5 ~ 1.0) cm × (0.5 ~ 1.0) cm 的外植体。调整重悬菌液浓度, 将外植体在重悬菌液中侵染后取出, 置于无菌吸水纸上去除多余菌液。把外植体接种到附加乙酰丁香酮 (AS) 不含抗生素的再生培养基 (NN₆₉ + 3.0 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.2 mg · L⁻¹ IBA + 0.5 mg · L⁻¹ AgNO₃) 上共培养, 再转入含 300 mg · L⁻¹ 的 Cef、3.0 mg · L⁻¹ 的 Hyg 的再生培养基上继续培养。

1.3.1 农杆菌菌液浓度和侵染时间对再生的影响试验 调节农杆菌菌液 OD_{600} 值分别为 0.3、0.5、0.7, 侵染时间分别设为 3、5、7 min, 进行交叉组合, 共 9 种处理, 外植体侵染后在共培养基上共培养 48 h, 4 周后统计再生率。

1.3.2 共培养时间对转化的影响试验 外植体在 $OD_{600} = 0.5$ 的菌液中侵染 5 min 后进行共培养, 共培养时间分别设置为 24、48、72、96 h, 共培养基中附加 AS ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 4 周后统计再生率。

1.3.3 乙酰丁香酮 (AS) 对转化的影响试验 外植体在 $OD_{600} = 0.5$ 的菌液中侵染 5 min 后进行共培养 48 h, 在共培养基的培养基中加入 AS, 浓度分别设置为 50、100、200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 以不加 AS 作为对照, 4 周后统计再生率。

1.4 转基因植株的分子检测

分别取经抗生素筛选的抗性植株和非转化植株的叶片, 采用 CTAB 法提取基因组 DNA, 以目的基因 *VpPR10* 的特异引物: P1 5' GCGGATCCATGGGTGTTTTCA 3', P2 5' GCGTCGACTTAATAGGC ATCAGGG 3' 进行 PCR 扩增检测。

从 PCR 阳性株系和非转化植株提取基因组 DNA, 经过 *Hind*III 酶切, 用 DIG 标记的 *VpPR10* 基因全长序列作为探针。以 Roche 公司的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒进行 Southern blotting 杂交检测。

按照 SDS/酚法分别提取 Southern 杂交阳性株系和非转化植株叶片的 RNA。使用 TaKaRa 公司的反转录酶 (M-MLV) 及 Olig (dT), 反转录合成 cDNA 第一链, 然后以此为模板, 进行 PCR 检测 (具体操作参考 M-MLV 反转录酶说明书进行, PCR 所用引物同前)。

1.5 转基因砀山酥梨的生根和移栽

试管苗长 2~3 cm 时 (分子检测仍为阳性的转基因植株), 将其转移到生根培养基 (ASH + 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 间苯三酚 + 15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖) 上; 待根长到 2~3 cm 时将三角瓶放置在温室向阳的窗台边炼苗 7 d, 移栽前 2 d 打开封口膜, 使试管苗逐渐增强对周围环境的适应能力, 移栽时先用无菌水洗掉根部的培养基然后移栽到无菌基质 (珍珠岩: 草炭: 园土 = 4:1:1) 内, 上覆倒扣的透明塑料杯保湿, 10 d 后移除塑料杯进行正常培养。

1.6 数据调查及统计分析

再生率 (%) = 再生不定芽外植体数/接种外植体数 $\times 100$ 。

菌液浓度、侵染时间、共培养时间和乙酰丁香酮浓度等因子的筛选试验都完全随机重复 3 次, 试验结果采用 DPSv7.55 版软件进行统计分析, 方差分析前将百分数数值进行反正弦平方根转换。

2 结果与分析

2.1 抗病基因病程相关蛋白基因 (*VpPR10*) 植物表达载体的构建

从 pGEM-Teasy-*VpPR10* 中切下目的基因克隆于 pWR-II, 获得重组质粒, 然后进行 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切的电泳检测, 得到了与预期大小一致的片段 (480 bp) (图 1)。从含有 pWR-II-*VpPR10* 质粒的农杆菌 EHA105 中提取重组质粒, 进行 PCR 鉴定 (扩增时用高保真 *Taq* 酶), 得到一条 480 bp 的目的片段 (图 2)。回收测序该目的片段, 结果显示该片段的碱基序列与 *VpPR10* 基因序列一致, 无移码或突变发生。此结果表明携带目的基因的重组质粒 pWR-II-*VpPR10* (图 3) 已成功转入农杆菌 EHA105 中, 该菌株可以用于后续遗传转化。

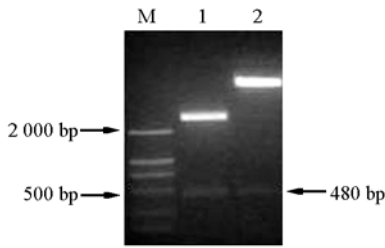


图 1 抗病中国野葡萄病程相关蛋白基因 (*VpPR10*)
植物表达载体构建

M. Marker; 1. 质粒 pGEM-T-VpPR10 的 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切;
2. 植物表达载体 pWR-II-VpPR10 的 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切。

Fig. 1 Construction of plant expression vector of *VpPR10* gene
from diseases-resistant Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*

M. Marker; 1. Recombinant plasmid pGEM-T-VpPR10 digested with
*Bam*H I and *Sal* I; 2. Plant expression vector pWR-II-VpPR10
digested with *Bam*H I and *Sal* I.

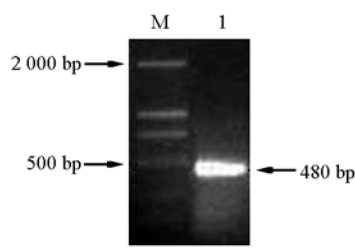


图 2 植物表达载体 pWR-II-VpPR10 转化根癌
农杆菌 EHA105 的 PCR 鉴定

M. DL2000 marker; 1. 含有目的片段的根癌农杆菌
EHA105 质粒的 PCR 产物。

Fig. 2 PCR identification of *Agrobacterium tumefaciens* strain
EHA105 harboring plant expression vector pWR-II-VpPR10

M. DL2000 DNA marker; 1. PCR product of *Agrobacterium*
tumefaciens strain EHA105 harboring target plasmid.

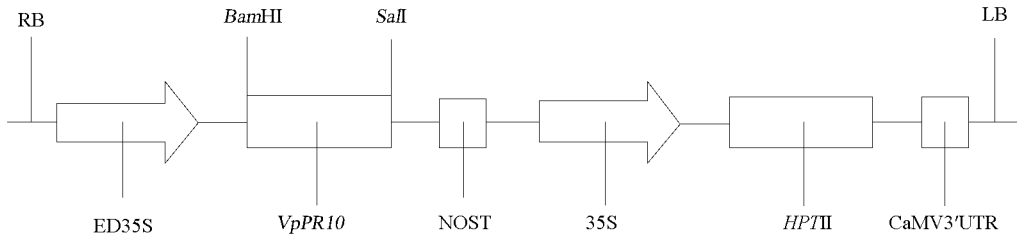


图 3 重组质粒 pWR-II-VpPR10 的构建

Fig. 3 Construction of recombinant plasmid pWR-II-VpPR10

2.2 菌液浓度和侵染时间对转化的影响

砀山酥梨离体叶片的外植体经过不同浓度的菌液浸染不同的时间，然后在含 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AS 的培养基上共培养48 h后，再进行选择培养。

表 1 菌液浓度和侵染时间对砀山酥梨叶片再生不定芽的影响

Table 1 Effects of Bacterial concentration and infection time on adventitious bud regeneration from
leaf explants of *Pyrus bretschneideri* Rehd. 'Dangshan Suli'

菌液浓度/ OD_{600} Bacterial concentration	侵染时 间/min Infection time	外植体数 Number of explants			再生外植体数 Number of regeneration explants			平均再生频率/% Average regenera- tion frequency
		重复 I Repeat I	重复 II Repeat II	重复 III Repeat III	重复 I Repeat I	重复 II Repeat II	重复 III Repeat III	
0.3	3	121	124	119	4	5	4	3.57 ± 0.6 eE
0.3	5	122	120	126	7	8	13	7.61 ± 2.6 dD
0.3	7	118	116	122	13	13	15	11.52 ± 0.6 cC
0.5	3	123	125	126	16	19	21	14.97 ± 1.5 b BC
0.5	5	128	124	120	23	25	23	19.09 ± 0.8 aA
0.5	7	119	123	124	18	21	18	15.57 ± 1.0 bAB
0.7	3	122	123	118	14	16	15	12.40 ± 0.7 cBC
0.7	5	120	124	123	9	10	12	8.45 ± 1.2 dD
0.7	7	121	124	126	5	6	6	4.58 ± 0.5 eE

注：小写字母为显著水平 ($P < 0.05$)，大写字母为极显著水平 ($P < 0.01$)。下同。

Note: Data with small letters ($P < 0.05$) and data with capital letters ($P < 0.01$). The same below.

结果（表 1）表明：当 $OD_{600} = 0.5$ ，侵染时间为 5 min 时，再生频率达到 19.09%，方差分析的结果表明在 0.05 水平上该处理组合与其它处理组合的再生频率差异显著，有利于砀山酥梨离体叶片外植体的转化。

2.3 共培养时间对转化的影响

共培养时间的长短对转化影响很大，共培养时间过短，根癌农杆菌生长量不足可导致再生频率低下；而共培养时间过长，根癌农杆菌则生长过度，抗生素很难再抑制其生长从而影响不定芽再生。砀山酥梨离体叶片外植体用 $OD_{600} = 0.5$ 的农杆菌浸染 5 min，然后在附加 $100\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS 的培养基上共培养，结果（表 2）表明，共培养 48 h 时的再生频率较高；72 h 以后，由于菌体生长旺盛，Cef 很难抑制农杆菌的过度生长，继而导致外植体逐渐褐化死亡；共培养 96 h 时再生频率只有 5.99%。故在进行砀山酥梨叶片遗传转化时，共培养时间以 48 h 为宜。

表 2 共培养时间对砀山酥梨叶片再生不定芽的影响

共培养时间/h Co-cultivation time	外植体数 Number of explants			再生外植体数 Number of regeneration explants			平均再生频率/% Average regeneration frequency
	重复 I Repeat I	重复 II Repeat II	重复 III Repeat III	重复 I Repeat I	重复 II Repeat II	重复 III Repeat III	
24	122	124	121	15	13	16	$11.99 \pm 1.2\ \text{bB}$
48	128	124	120	23	25	23	$19.09 \pm 0.8\ \text{aA}$
72	119	124	120	10	12	16	$10.47 \pm 2.4\ \text{bB}$
96	123	124	120	7	9	6	$5.99 \pm 1.4\ \text{cC}$

2.4 乙酰丁香酮（AS）对转化的影响

砀山酥梨离体叶片外植体用 $OD_{600} = 0.5$ 的农杆菌浸染 5 min，共培养 48 h 后进行选择培养。试验表明（表 3）当在共培养基中添加不同浓度的 AS 时，其再生频率较对照处理显著提高；而当 AS 浓度为 $100\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，再生频率最高。因此，本研究确定砀山酥梨叶片遗传转化体系中较佳 AS 浓度为 $100\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 3 乙酰丁香酮浓度对砀山酥梨叶片再生不定芽的影响

乙酰丁香酮浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) AS concentration	外植体数 Number of explants			再生外植体数 Number of regeneration explants			平均再生频率/% Average regeneration frequency
	重复 I Repeat I	重复 II Repeat II	重复 III Repeat III	重复 I Repeat I	重复 II Repeat II	重复 III Repeat III	
0	120	124	126	7	8	10	$6.76 \pm 1.2\ \text{cC}$
50	118	122	121	14	17	10	$11.36 \pm 2.7\ \text{bB}$
100	128	124	120	23	25	23	$19.09 \pm 0.8\ \text{aA}$
200	126	128	120	18	17	15	$13.37 \pm 0.8\ \text{bB}$

2.5 抗性植株的分子检测

在本试验所优化的遗传转化条件下，用农杆菌介导法对 372 个砀山酥梨的叶片外植体进行转化，得到了 71 个经潮霉素初步筛选具有抗性的独立转化株系，对其进行 PCR 检测。以含有目的基因（*VpPR10*）的质粒作为阳性对照，未转化植株作为阴性对照。结果（图 4）显示有 4 株遗传转化植株具有与阳性对照相同的 480 bp 左右的目的条带，而非转化植株则没有扩增产物，这初步证明 *VpPR10* 基因已转入砀山酥梨的基因组内。

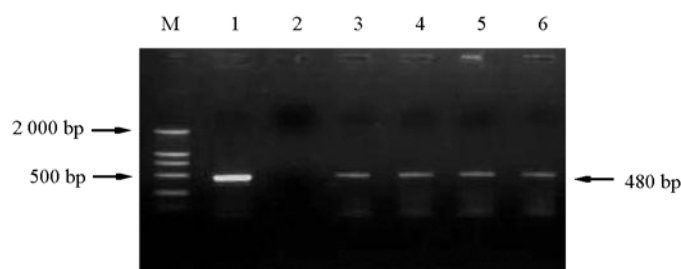


图 4 砀山酥梨转基因植株的 PCR 检测

M. DNA marker (DL2000); 1. 阳性对照; 2. 未转化植株; 3~6. 不同的转基因株系。

Fig. 4 PCR analysis of transformed 'Dangshan Suli' with *VpPR10* gene from disease-resistant Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*

M. DL2000 DNA marker; 1. Plasmid; 2. Non-transformed plant; 3-6. Four different transformed line.

对 PCR 检测阳性的转基因株系进行 Southern 杂交分析 (图 5) 显示, 4 个株系都具有阳性杂交信号, 杂交片段大小在 23.1 kb 和 9.4 kb 之间, 而未转化植株则没有杂交信号。该结果进一步表明外源 *VpPR10* 基因已整合到砀山酥梨的基因组内, 遗传转化率为 1.08%。

抗性植株的 RT-PCR 分析结果见图 6, 从 4 株转基因植株的 RNA 反转录合成的 cDNA 中都扩增出 480 bp 左右的目的条带, 而未转化植株没有扩增出相应的条带, 说明外源 *VpPR10* 基因在转基因植株中实现了转录, 进一步的证明了目的基因已经整合进了砀山酥梨的基因组中。

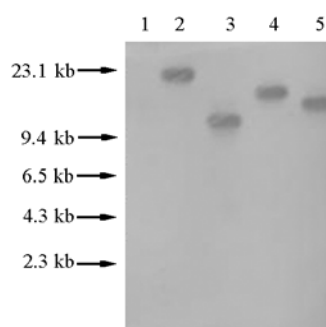


图 5 砀山酥梨阳性转基因植株的 Southern 杂交检测

1. 未转化植株; 2. 转基因植株。

Fig. 5 Southern blotting analysis of the transgenic 'Dangshan Suli' plant

1. Non-transformed plant; 2. Transformed line.

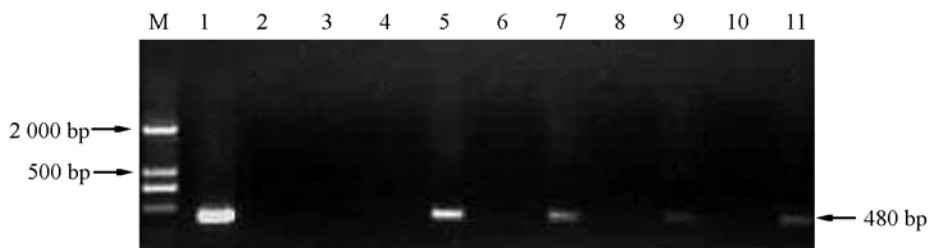


图 6 砀山酥梨阳性转基因植株的 RT-PCR 检测

M. DNA marker (DL2000); 1. 阳性对照; 2. 未转基因植株; 3. H₂O 对照;
4, 6, 8, 10. 未加反转录酶对照; 5, 7, 9, 11. 不同的转基因株系。

Fig. 6 RT-PCR analysis of the transgenic 'Dangshan Suli' plant

M. DNA marker (DL2000); 1. Positive control; 2. Non-transformed plant; 3. H₂O control;
4, 6, 8, 10. Non-M-MLV control; 5, 7, 9, 11. Different transformed lines.

2.6 试管苗的生根与移栽

砀山酥梨转基因试管苗 (图 7, a, b) 在生根培养基上经过 4~5 周可诱导生根 (图 7, c), 待根长至 2~3 cm 时, 经炼苗后移栽到基质中 (图 7, d)。

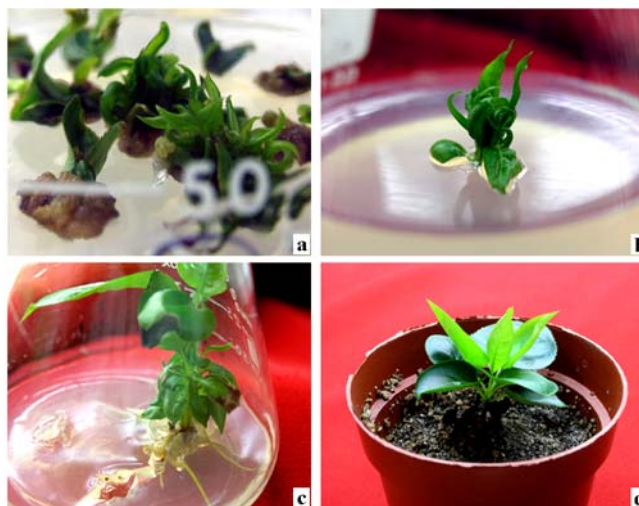


图 7 砀山酥梨转基因植株的生根和移栽

a. 转基因丛生芽; b. 单个转基因不定芽; c. 转基因不定芽生根; d. 转基因植株移栽。

Fig. 7 Rooting and transplanting of the transgenic ‘Dangshan Suli’ plant

a. Transgenic shoot cluster; b. Single transgenic shoot; c. Rooting of adventitious bud; d. Transplanting of transgenic plants.

3 讨论

影响砀山酥梨遗传转化的因素主要有菌液浓度 (OD_{600} 值)、侵染处理和共培养时间以及培养基中 AS 浓度。菌液浓度、侵染时间这两个因素具有一定的相关性。菌液浓度越高, 侵染时间越长, 农杆菌侵入并吸附在细胞上的数量越多。本研究确定菌株浓度 OD_{600} 为 0.5, 此时菌株正处于对数生长中期, 农杆菌的活性最强 (李文霞 等, 2008)。农杆菌附着、T-DNA 的转移及整合均在共培养时期完成 (谢秀祯 等, 2006), 共培养时间过短, 外源基因不能完全有效的在植物基因组中整合, 转化率低; 共培养时间过长, 农杆菌生长过于旺盛, 可导致植物外植体褐化而失去脱分化能力。

共培养基中加入一定浓度的 AS 能够提高遗传转化效率 (Men et al., 2003)。AS 是一种酚类化合物, Stachel 等 (1985) 的研究表明 AS 是 *vir* 天然的诱导剂, 它可诱发农杆菌内 Ti 质粒 DNA 上的 *Vir* 区基因的活化和高效表达, 促进农杆菌 T-DNA 向宿主细胞核转移, 从而提高遗传转化效率。

病程相关蛋白是植物被病原菌侵染后诱导表达的基因产物, 参与植物的防御反应。Schaffrath 等 (2000) 利用水稻的一个 PR 蛋白基因 (*Rir1b*), 转化对稻瘟病敏感的水稻品种, 结果转基因植株表现出一定的抗病性。中国野生华东葡萄 (*Vitis pseudoreticulata* W.T.Wang) 的株系 (白河-35-1) 对多种真菌病害具有高度抗性, 本研究首次将野生葡萄白河-35-1 上克隆的病程相关蛋白基因 (*VpPR10*) 构建到植物表达载体上, 利用农杆菌介导的叶盘转化法对砀山酥梨进行遗传转化, 并获得了经分子检测证实的转基因植株。砀山酥梨转基因植株的田间生物学和抗病性鉴定正在进行中。

References

- Gao M, Matsuta N, Murayama H, Toyomasu T, Mitsuhashi W, Dandekar A M, Tao R, Nishimura K. 2007. Gene expression and ethylene production in transgenic pear (*Pyrus communis* cv. ‘La France’) with sense or antisense cDNA encoding ACC oxidase. *Plant Science*, 173 (1): 32 – 42.
- Li Wen-xia, Ning Hai-long, Lü Wen-he, Li Wen-bin. 2008. Optimization of the *Agrobacterium*-mediated transformation systems of soybean cotyledonary node. *Scientia Agricultura Sinica*, 41 (4): 971 – 977. (in Chinese)
- 李文霞, 宁海龙, 吕文河, 李文滨. 2008. 农杆菌介导大豆子叶节转化系统的优化. *中国农业科学*, 41 (4): 971 – 977.
- Liu Cheng, Li Jun-cai, Xu Xue-feng, Wang Yi, Li Tian-zhong, Han Zhen-hai. 2009. Studies on Scab-resistance and its mechanism in pears. *Journal*

- of Fruit Science, 26 (1): 209 – 212. (in Chinese)
- 刘 成, 李俊才, 许雪峰, 王 忆, 李天忠, 韩振海. 2009. 梨对黑星病的抗病性及其机理研究进展. 果树学报, 26 (1): 209 – 212.
- Malnoy M, Venisse J S, Brisset M N, Chevreau E. 2003. Expression of bovine lactoferrin cDNA confers resistance to *Erwinia amylovora* in transgenic pear. Molecular Breeding, 12: 231 – 244.
- Matsuda N, Gao M, Isuzugawa K, Takashina T, Nishimura K. 2005. Development of an *Agrobacterium*-mediated transformation method for pear (*Pyrus communis* L.) with leaf-section and axillary shoot-meristem explants. Plant Cell Reports, 24: 45 – 51.
- Men S Z, Ming X T, Liu R W, Wei C H, Li Y. 2003. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 75: 63 – 71.
- Mourgues F, Chevreau E, Lambert C, de Bondt A. 1996. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.). Plant Cell Reports, 16: 245 – 249.
- Reynold J P, Mourgues F, Norelli J, Aldwinckle H S, Brisset M N, Chevreau E. 1999. First evidence for improved resistance to fire blight in transgenic pear expressing the *attacin E* gene from *Hyalophora cecropia*. Plant Science, 149: 23 – 31.
- Schaffrath U, Mauch F, Freydl E, Schweizer P, Dudler R. 2000. Constitutive expression of the defense-related *Rir1b* gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Plant Molecular Biology, 43: 59 – 66.
- Stachel S E, Messens E, Van Montagu M, Zambryski P. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. Nature, 318: 624 – 629.
- Sun Qing-rong, Sun Hong-yan, Zhao Yan, Hammond R, Davis R E. 2008. Transgene expression in pear (*Pyrus communis* L.) driven by phloem-specific promoter AtSUC2. Acta Horticulturae Sinica, 35 (4): 487 – 492. (in Chinese)
- 孙清荣, 孙洪雁, 赵 衍, 茹斯·海门得, 罗伯特·戴维斯. 2008. 梨韧皮部特异表达启动子 AtSUC2 驱动下的 *GUS* 基因的转化和表达. 园艺学报, 35 (4): 487 – 492.
- Tang Shao-hu, Sun Min, Liao Zhi-hua, Zhou Qi-gui, Li Dao-gao. 2007. Obtainment of transgenic ‘Xueqing’ pear plants with a synthetic *CryIAC* gene mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Acta Horticulturae Sinica, 34 (1): 59 – 62. (in Chinese)
- 汤绍虎, 孙 敏, 廖志华, 周启贵, 李道高. 2007. 根癌农杆菌介导 *CryIAC* 基因转化 ‘雪青’ 梨获得转基因植株. 园艺学报, 34 (1): 59 – 62.
- Wang Guan-lin, Fang Hong-jun. 2002. Plants gene engineering. 2nd. Beijing: Science Press: 699. (in Chinese)
- 王关林, 方宏筠. 2002. 植物基因工程. 第二版. 北京: 科学出版社: 699.
- Xie Xiu-zhen, Lin Qiao-hui, Guo Cheng-shuan, Guo Yong. 2006. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of roselle cell. Journal of South China University of Technology: Natural Science Edition, 34 (5): 43 – 48. (in Chinese)
- 谢秀祯, 林俏慧, 郭成栓, 郭 勇. 2006. 根癌农杆菌介导的玫瑰茄细胞遗传转化. 华南理工大学学报: 自然科学版, 34 (5): 43 – 48.
- Xu Wei-rong, Wang Yue-jin, Wang Xi-ping, Hao Wei, Sun Ma. 2005. Construction of the plant expression vectors carrying resistant genes to powdery mildew and adversities in wild species of *Vitis* in China. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 25 (5): 851 – 857. (in Chinese)
- 徐伟荣, 王跃进, 王西平, 郝 伟, 孙 马. 2005. 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. 西北植物学报, 25 (5): 851 – 857.
- Zhang Zhen-ming, Shi Ze-bin, Zhang Shao-ling, Qiao Yong-jin, Tao Shu-tian. 2007. Bagging at different developmental stages on sclereid formation in ‘Dangshansu’ pear fruit. Acta Horticulturae Sinica, 34 (3): 565 – 568. (in Chinese)
- 张振铭, 施泽斌, 张绍铃, 乔勇进, 陶书田. 2007. 砀山酥梨不同发育时期套袋对石细胞发育的影响. 园艺学报, 34 (3): 565 – 568.
- Zhao Rui-hua, Liu Qing-zhong, Sun Qing-rong, Zhang Xian-sheng. 2004. Obtaining transgenic fertility pear (*Pyrus communis* L.) plants with antifungal γ -thionin *Rs-afp₁* gene. Journal of Agricultural Biotechnology, 12 (6): 729 – 730. (in Chinese)
- 赵瑞华, 刘庆忠, 孙清荣, 张宪省. 2004. 抗真菌 γ -硫基蛋白 *Rs-afp₁* 基因导入丰产梨获得转基因植株. 农业生物技术学报, 12 (6): 729 – 730.
- Zhao Zong-fang, Wu Gui-fa, Xu Fu-zheng. 1997. Prediction of the severity of pear scab *Venturia Nashicola* during early stage in eastern region along Yangtze River and its control. Acta Phytopythologica Sinica, 24 (3): 249 – 253. (in Chinese)
- 赵宗方, 吴桂法, 许福政. 1997. 长江中下游梨黑星病前期发病程度预测及防治. 植物保护学报, 24 (3): 249 – 253.