

葡萄糖氧化酶 (GO) 基因在番茄中的遗传转化

王全华¹ 葛晨辉² 王秀峰^{1*} 张焕春² 李素梅² 尹国香² 朱艳红¹

(¹山东农业大学园艺学院, 泰安 271018; ²烟台市农业科学研究院, 烟台 265500)

摘要: 将来自黑曲霉的葡萄糖氧化酶 (glucose oxidase, GO) 基因与病原诱导启动子 P_{pp1-1} 融合, 构建了植物表达载体 pCPGO, 该载体具有抗除草剂 PPT 选择标记。经农杆菌介导转入番茄自交系, 获得了阳性转基因植株 58 株, Southern 杂交结果表明, GO 基因已整合到番茄基因组中。通过淀粉 - KI 显色反应和定量检测, 表明 GO 基因已经表达。转基因植株花器及开花正常, 种子一旦萌发, 其生长、发育各时期均正常。但结实率有所减少, 种子萌发率有所降低。用番茄叶霉病 (*Fulvia fulva*) 病原菌 1.2.3.4 生理小种侵染 T₁ 代转基因植株, 结果显示转基因番茄植株的抗病性有不同程度的提高, 多数发病时间推迟, 病情明显减轻。经测定与抗病性相关的几个指标, 结果转基因番茄叶片中 SOD、POD、CAT 的活性和蛋白质含量均增高。

关键词: 葡萄糖氧化酶; 遗传转化; 转基因番茄; 叶霉病; 抗病性指标

中图分类号: S 641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 03-0426-07

Transformation of Glucose Oxidase Gene in Tomato

Wang Quanhua¹, Ge Chenhui², Wang Xiufeng^{1*}, Zhang Huanchun², Li Sumei², Yin Guoxiang², and Zhu Yanhong¹

(¹College of Horticulture, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; ²Yantai Academy of Agricultural Sciences, Yantai 265500, China)

Abstract: The plant expression vector pCPGO, comprising a GO gene from *Aspergillus niger* driven by pp1-1 promoter and containing a selectable marker bar gene for resistance to the herbicide phosphinothricin, was constructed. Five tomato inbred lines were transformed via *Agrobacterium tumefaciens* mediated method and 58 transgenic tomato plants were obtained. PPT resistance, PCR detection and Southern blot analysis showed that the GO gene was integrated into tomato genome. Expression of the GO gene was verified by KI-Starch staining and measurement of H₂O₂ content. The transgenic tomato flowered normally, whereas compared with wild-type plants, the seed set in transgenic tomato was fewer and the germination rate of seeds was less. After germination, the transgenic plants showed normal development. T₁ tomato plants infected with *Fulvia fulva* showed enhanced disease resistance, delayed disease symptoms and reduced leaf lesions to different extent. The activity of SOD, POD and CAT and the content of soluble protein were increased. These results indicated that overexpression of GO gene in transgenic tomato plants improved disease resistance.

Key words: Glucose oxidase; Transformation; Transgenic tomato; *Fulvia fulva*; Resistance index

植物在抵御病原侵染时产生一系列的防御反应。在病原侵染的位点上坏死斑的形成与诸如细胞壁的加固、植保素合成及病程相关蛋白的积累等防御反应相关联。在植物和病原菌的互作中, 最早响应之一是 O₂⁻ (Superoxide), OH⁻ (Hydroxy radical) 和 H₂O₂ 等活性氧类的大量急剧产生, 推测这种活性氧类的迸发是由超敏反应 (HR) 介导的^[1]。借助 HR 的诱导, 在系统获得性抗性中, H₂O₂ 曾被假设为第二信使, 对病原菌具有广谱的抗性^[2,3]。为减少过氧化氢酶的产生而作的转基因烟草与转 GO

收稿日期: 2004 - 08 - 06; 修回日期: 2004 - 10 - 08

基金项目: 山东省良种产业化开发项目 (鲁科农字 (2001) 500号)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: xfwang@sdau.edu.cn)

基因烟草有同等水平的 H_2O_2 , 进一步支持了 H_2O_2 在植物防御中的调节作用^[4,5]。

GO是一种可以催化 D -葡萄糖氧化生成 H_2O_2 的葡萄糖氧化酶。很多真菌产生 GO, 作为一种拮抗微生物用于生物防治, 是因为 H_2O_2 能有效地抑制细菌和真菌的生长^[6,7]。GO的这种特性为抗病植物的选育提供了一条新的途径^[8~10]。虽然在转基因植物中由 GO产生的 H_2O_2 是否能够诱导植物的防御体系尚不清楚, 但转基因植物显示出对病原菌的广谱抗病性已在很多试验中得到证实^[8,11~13]。为提高番茄的抗病性, 我们用黑曲霉中克隆的 GO基因构建了病原诱导启动子 P_{pp-1}驱动的植物表达载体, 并转入番茄中, 研究不同番茄自交系转基因后的表达情况, 并测定了与抗病性相关酶的活性。

1 材料与方法

1.1 材料

番茄自交系 Pr1、Pr3、Pr5、Pr6、Pr10由烟台农业科学院蔬菜研究所提供。大肠杆菌 DH5、农杆菌 LBA4404、克隆载体 pCAMP A3300-Tnos和含有病原诱导启动子 P_{pp-1}的质粒 pPRPGO均由北京大学蛋白质工程与植物基因工程国家重点实验室提供。供试番茄叶霉病菌购于中国农业科学院蔬菜花卉研究所。PCR试剂盒购自上海 Sangon公司。PCR DIG Probe Synthesis Kit、DIG-labeled Marker和 DIG Detection System Kit购自 Roche BM公司。

1.2 无菌苗的准备

先用 70%的酒精浸泡 0.5~1 min, 再用 0.7%的次氯酸钠溶液表面消毒灭菌 20 min左右, 用无菌水冲洗 3~4次, 播种在 1/2MS培养基上, 25~28℃培养 2~4 d, 种子萌发 6~10 d子叶完全展开。

1.3 GO基因植物表达载体的构建

将北京大学蛋白质与基因工程国家重点实验室提供的含黑曲霉 GO基因和病原诱导启动子的质粒 pPRPGO, 用 *Bam*H I 酶切, 切出 2.3 kb 的 P_{ppgo}小片段。插入含有 phosphinothricin抗性选择标记的克隆载体 pCAMP A3300-Tnos的 *Bam*H I 酶切位点上, 用 T4DNA Ligase连接, 通过 *Xba*I 酶切鉴定, 得到与图 1结构相同正向连接的植物表达载体, 命名为 pCAGO。通过冻融法将 pCAGO转入农杆菌 LBA4404中。

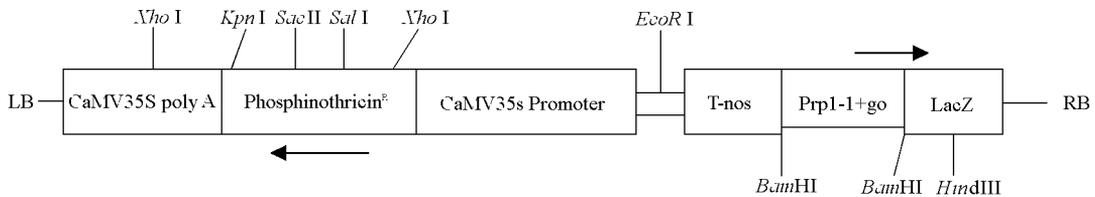


图 1 植物表达载体 pCAGO

Fig. 1 Schematic diagram of the plant expression vector pCAGO

1.4 不同番茄品系的遗传转化

用叶盘法将载有 pCAGO的农杆菌 LBA4404转化番茄。将事先培养好的番茄子叶切去叶尖和基端, 切成 0.5 cm^2 , 正面朝下置于 MS 培养基 [MS+2 mg/L ZT (玉米素) +0.5 mg/L IAA (吲哚乙酸)] 上, 28℃暗培养 2 d。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, 0.5 h后, 用无菌滤纸吸去外植体表面多余的菌液, 转回到 MS 上共培养 2~3 d。转移至筛选培养基 MS [MS+2 mg/L ZT+0.5 mg/L IAA+1 mg/L PPT (Phosphinothricin) +300 mg/L Cb (Carbenicillin)] 上筛选分化芽。20~30 d当转化的抗性芽长至 1.5~2.0 cm时, 将芽切下放入 MS 培养基 (1/2MS+0.5 mg/L IAA+1 mg/L PPT+300 mg/L Cb) 中诱导生根。35 d左右, 将再生的 T_0 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 d, 在温室自然光照下生长。收取 T_0 代种子, 进行种子结实率和萌发率测定, 同时用 CTAB法提取 DNA进行 PCR检测。

1.5 转基因番茄的 Southern杂交

用 CTAB法提取具除草剂抗性和 PCR检测阳性的部分转化植株的总 DNA。用限制性内切酶 *Hind* III

完全酶切 40 μg 总 DNA, 经 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳分离, 用 0.4 mol/L 的 NaOH 作为转移缓冲液, 用毛细管法转移到带正电荷的尼龙膜上, 用 DIG 标记的 *GO* 基因片段作为探针, 按照 DIG DNA Detection Kit 说明书进行 Southern 杂交。

1.6 转基因番茄植株中 H_2O_2 的定性及定量检测

转基因番茄叶片 H_2O_2 的检测按照 Olson 等的方法。转基因植株叶片经叶霉病菌 (*Fulvia fulva*) 1.2.3.4 号生理小种诱导后, 取没发病的叶片用打孔器打孔, 叶圆片放置在淀粉 - KI 培养基 (2.5% 淀粉、50 mmol/L KI 1% 琼脂糖) 上。置室温 (25 左右) 培养, 每隔 1 h 观察叶片颜色的变化。

H_2O_2 的定量采用超氧钛法。取 0.5 g 番茄叶片加入 2 mL 预冷的丙酮, 于研钵中研磨。过滤去碎片, 取 1 mL 溶液, 加 0.1 mL 钛试剂 (20% 四氯化钛溶于浓盐酸中), 充分混匀后加入 0.2 mL 浓氨水。10 000 $\times\text{g}$ 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀用 2 mol/L 的硫酸溶解, 测定 415 nm 下的吸收峰。同时测已知浓度的 H_2O_2 和钛试剂形成的超氧钛的 OD 值, 绘制标准曲线。

1.7 转基因番茄的抗病性鉴定

将转基因番茄 T_0 代收获的种子与对照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, 用小型喷雾器将事先制备好的叶霉病菌 (*Fulvia fulva*) 1.2.3.4 号生理小种的孢子悬浮液 (10^6 个孢子 /mL) 喷于叶背面, 保持湿度第 1 天 100%, 以后 85%~100%, 温度控制在 24 左右。14 d 后调查发病情况。叶霉病分级标准参照冯兰香等的方法^[14]。病情指数计算方法参照方中达^[15]的《植病研究方法》。

1.8 抗病性相关指标的测定

不同自交系的转基因 T_0 代和未转基因番茄植株长至 6~7 片叶时, 接种叶霉病菌 2 d 后, 取第 4 片叶进行抗性相关酶 SOD、POD 和 CAT 活性及蛋白质含量测定。SOD 采用 NBT 硝光还原法; POD 采用愈创木酚法; CAT 的活性用 H_2O_2 法; 蛋白质含量采用考马斯亮蓝法, 具体参照赵世杰等^[16]的方法。

2 结果与分析

2.1 *GO* 基因植物表达载体的构建

将 pPRPGO 用 *Bam*H I 酶切, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳回收带有病原诱导启动子的 *GO* 基因片段 (2 300 bp)。克隆到 pCAMB IA3300-Tnos 载体的 *Bam*H I 酶切位点上, 得到 pCPGO。用 *Xba*I 酶切切出 0.5 kb 和 10.5 kb 的片段, 表明连接方向正确。

2.2 番茄的遗传转化

将构建好的植物表达载体 pCPGO 经热击法转入大肠杆菌 DH5, 冻融法转入农杆菌 LBA4404。用叶盘法转化番茄自交系材料。结果见表 1, 在番茄自交系转化过程中发现, 不同自交系愈伤组织的诱导率和转化率不同, 各自交系间的差异均达到极显著水平。抗性愈伤分化芽和生根的时间明显长于已往用杂交种进行的转化。将经 PPT 抗性筛选的小苗诱导生根后转入土壤中, 能正常开花结果 (图 2)。

表 1 pCPGO 番茄的遗传转化

Table 1 Transformation of tomato inbred lines

受体品系 Inbred lines	接种外植体数 No. of explants inoculated	获得 ppt ^R 植株数 No. of ppt ^R plantlets obtained	再生植株的外植体数 No. of explants producing plantlets	生根的外植体数 No. of explants rooted	转化率 * Transformation frequency (%)
Pr1	36	21	18	10	27.78 c C
Pr3	36	10	5	5	13.89 e E
Pr5	34	28	26	13	38.24 b B
Pr6	27	15	13	13	48.15 a A
Pr10	67	38	33	12	17.91 d D

* 转化率 = (生根的外植体数 / 接种外植体数) $\times 100\%$; 不同大小写字母分别表示 0.01 和 0.05 水平显著差异。

* Transformation frequency = (No. of explants rooted / No. of explants inoculated) $\times 100\%$; Capital letter represents significant difference at the 0.01 and 0.05 level, respectively



图 2 转基因番茄植株的再生及开花结果

1. 生芽; 2. 生根; 3. 开花; 4. 结果。

Fig. 2 Regeneration, flowering and fruit setting of transgenic tomato plants

1. Shoot regeneration; 2. Rooting of transgenic tomato; 3. Florescence of transgenic tomato; 4. Fruit setting of transgenic tomato

2.3 转基因番茄的 Southern 杂交分析

经农杆菌转化和 PPT 选择共获得 58 株转基因植株, 其中 Pr1 12 株、Pr3 6 株、Pr5 15 株、Pr6 13 株、Pr10 15 株。从 58 株转基因植株叶片中提取总 DNA, PCR 均可扩增出 1.0 kb 的目的条带。随机取 5 株进行 Southern 杂交分析, 用 pCP-GO 载体上包括 GO 基因在内的 *Hind* 完全酶切, 以 DIG 标记的 1.0 kb GO 基因片段为探针进行 Southern 杂交, 受检的 5 个转基因植株中 4 株有杂交信号 (图 3)。

2.4 转基因番茄 GO 基因表达的定性和定量检测

转 GO 基因植株在病原诱导下叶片中可产生 H_2O_2 , H_2O_2 能氧化 KI 形成 I_2 , 在淀粉存在时显蓝色。据此进行 GO 基因的定性鉴定。在 5 个不同的品系中, 有一个品系 Pr5-1 叶盘放置 3 h 后出现蓝色反应 (图 4 中 e)。另一个品系 Pr3-3 于 4 h 后出现蓝色反应 (图 4 中 h)。其余 3 个品系 Pr6-6、Pr10-7、Pr1-5 于 25 h 后才有蓝色出现。随着时间的加长, 蓝色变深, 范围增大, 但对照非转基因植株 (图 4 中 a、b) 和未经病原诱导的转基因植株 (图 4 中 c) 30 h 后仍没有颜色反应。显色鉴定结果表明, 不同品系的转基因植株经同种病原诱导后, 其表达的时间和强度存在较大的差异, 而且 GO 基因的表达受到病原诱导启动子的调控。

为定量检测各转基因番茄植株叶片中的 H_2O_2 , 将各转基因植株接种叶霉病菌, 至刚发病时取未发病叶片, 采用超氧钛法进行测定。结果 (图 5) 表明 H_2O_2 含量在各转基因株间差异较大, 在 $192.00 \sim 495.08 \mu\text{mol/L}$ 之间。其中 Pr5-1 含量最高为 $495.08 \mu\text{mol/L}$, Pr3-3 为 $410 \mu\text{mol/L}$ 。比非转基因番茄提高 5 倍左右, 而其它植株 Pr1-5、Pr6-6 和 Pr10-7 均在 $200 \mu\text{mol/L}$ 左右。用 H_2O_2 在体外进行淀粉 - KI 检测试验, 结果只有当 H_2O_2 达到 $200 \mu\text{mol/L}$ 时, 方可观察到蓝色反应。因此本试验

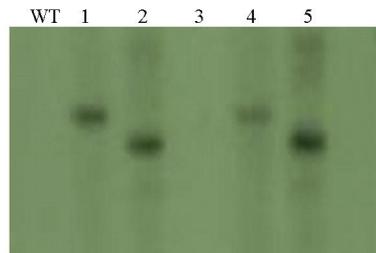


图 3 部分转基因番茄植株的 Southern 杂交分析

WT: 非转基因植株; 1~5: 转基因植株。

Fig. 3 Genomic Southern blot analysis of T_0 tomato transformants

WT: Non-transgenic tomato; 1 - 5: T_0 tomato transformants

1: Pr1-2, 2: Pr3-3, 3: Pr6-5, 4: Pr10-8, 5: Pr5-1.

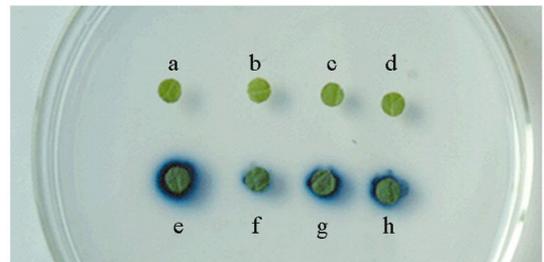


图 4 转基因番茄叶片中 H_2O_2 的定性检测

a, h 非转基因番茄叶片 (a: Pr3, Pr5); c 转基因番茄未经 *Fulvia fulva* 诱导 (c: Pr5-1); d~h 转基因番茄经 *Fulvia fulva* 诱导 (d: Pr10-7, e: Pr5-1, f: Pr6-6, g: Pr1-5, h: Pr3-3)。

Fig. 4 H_2O_2 production in leaf discs of transgenic tomato plants

a, h Non-transgenic tomato plants; c Transgenic tomato plant not induced with *Fulvia fulva*; d - h Transgenic tomato plants induced with *Fulvia fulva*

中 Pr5-1和 Pr3-3经 3~4 h出现蓝色反应, 而其他 3株 25 h才出现蓝色反应 (图 4)。这可能与基因表达量多少有关。定性和定量检测结果相一致。

2.5 结实率和种子萌发率的测定

随机选取 10株 Pr1的 T₀代番茄植株, 在自然条件下均能正常开花结实, 且花器官正常, 至种子成熟时调查其结实率。与未转基因植株 (组培苗) 相比, 所有转基因植株的结实率都有不同程度的减少。将种子播种在 MS培养基上, 28 暗培养 4周, 调查发芽率。结果 (图 6) 表明转基因番茄种子萌发率均有不同程度的降低。其它 4 个自交系也有类似的结果。其原因可能是在种子形成时葡萄糖积累, 或种子萌动时贮藏的淀粉水解为葡萄糖, 致使过量表达的 GO将更多的葡萄糖转化为 H₂O₂, H₂O₂ 量的增加反过来影响了种子形成或抑制了种子的萌发。

转基因植株 Pr1-1、Pr1-2、Pr1-3、Pr1-4、Pr1-5、Pr1-6、Pr1-7、Pr1-8、Pr1-9、Pr1-10, 结实数分别为 33、41、49、52、21、26、59、38、39、47粒, WT (未转基因植株) 为 116粒。

2.6 转基因植株的抗病性鉴定

将转基因番茄 Pr1、Pr3和 Pr5 T₀代自交后代的 5个株系接种叶霉病菌株, 15 d后每个株系调查 10株的发病情况, 结果表明, 与对照相比转基因番茄叶霉病发病症状大大推迟。对照接种 14 d在老龄叶片上, 出现明显的带有霉层的病斑, 大多数有 3个病斑以上, 以后逐渐发展至全株。而转基因

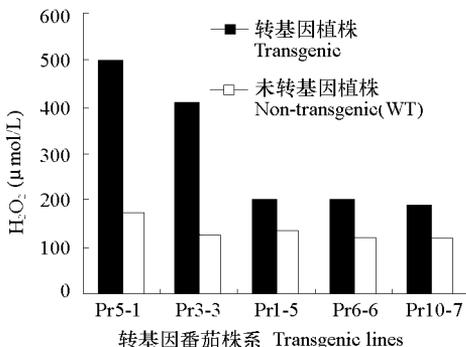


图 5 转基因番茄中 H₂O₂ 的含量

Fig 5 H₂O₂ content in transgenic and non-transgenic tomato plants

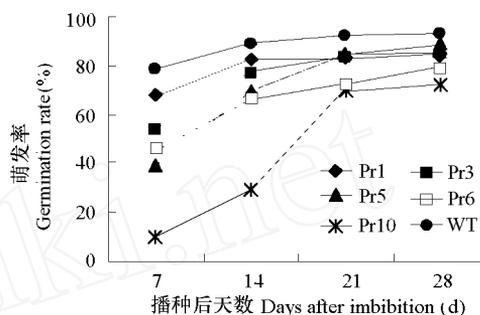


图 6 转基因番茄种子 (T₀) 萌发率

Fig 6 Germination rate of T₀ transgenic tomato plants

表 3 转基因番茄抗病性鉴定

Table 3 Resistance to Fulvia fulva of transgenic tomato lines

番茄自交系 Tomato line				番茄自交系 Tomato line				番茄自交系 Tomato line			
病情指数 Disease index											
15 d	18 d	22 d	15 d	18 d	22 d	15 d	18 d	22 d	15 d	18 d	22 d
Pr1-2	3.33	4.44	5.56	Pr3-1	5.56	7.78	7.78	Pr5-1	8.89	12.22	14.44
Pr1-3	5.56	7.78	8.89	Pr3-3	13.33	17.78	15.56	Pr5-3	17.78	18.89	22.22
Pr1-5	15.56	17.78	20.0	Pr3-5	15.56	20.00	17.78	Pr5-4	4.44	7.78	10.00
Pr1-7	7.78	8.89	10.00	Pr3-6	17.78	22.22	20.00	Pr5-8	20.00	22.22	23.33
Pr1-9	18.89	20.00	22.22	Pr3-7	20.00	22.22	20.00	Pr5-9	7.78	8.89	12.22
WT	36.67	38.89	40.00	WT	35.56	40.00	43.33	WT	37.78	40.00	44.44

WT: 未转基因植株 Non-transgenic.

植株 Pr5-4株系几乎没有发病, 只有 5株出现退绿色病斑, 其它 4个株系均发病, 但是病斑小, 且霉层明显稀疏, 再过 7~10 d霉层逐渐消失, 形成退绿色黄斑, 病斑大小不再扩展, 也不再向其它叶片侵染 (表 3)。结合定性定量结果 (图 4、图 5), 发病的轻重与 H₂O₂ 的表达量有明显的相关性 (表 4)。

表 4 抗病性与 H₂O₂ 量的相关性

Table 4 Correlation of resistance and H₂O₂ content

处理 Treatment	病情指数 Disease index			平均数 Average	H ₂ O ₂ (μmol/L)
	15 d	18 d	22 d		
Pr5-1	5.56	8.89	10.00	8.15	495.08
Pr3-3	13.33	17.78	15.56	15.56	410
Pr1-5	15.56	17.78	20.00	17.78	200.06
Pr6-6	17.78	20.00	20.00	19.26	199.69
Pr10-7	20.00	22.22	22.22	21.48	192
相关系数	-0.913*	-0.841	-0.965**		

2.7 GO 基因导入对番茄植株体内抗病性相关酶活性的影响

SOD、POD、CAT和可溶性蛋白质 (Soluble protein) 是与抗病性相关的几项指标^[19], 前3种是生物体内重要的保护酶, 对氧自由基起清除作用并防止膜质的过氧化。GO 基因转入番茄后, 在叶霉病菌的诱导下, 各转基因植株叶片中 CAT、POD、SOD 活性和可溶性蛋白含量均有较大的增加。只是不同株系增加的幅度有所不同。其中 SOD 增幅最大的是 Pr10-8, 比对照增加 160.90%, 其它 4 个株系 Pr1-2、Pr3-3、Pr5-1 和 Pr6-3 增幅在 78.79% ~ 122.30% 之间; POD、CAT 和可溶性蛋白的增幅分别在 31.06% ~ 104.15%、18.20% ~ 197.57% 和 27.91% ~ 159.52% 之间 (图 7、图 8)。

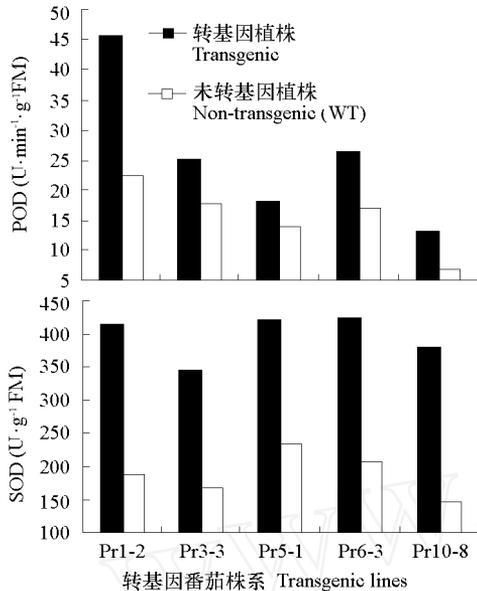


图 7 转基因番茄叶片中 SOD、POD 的活性

Fig 7 SOD, POD activity in transgenic tomato lines

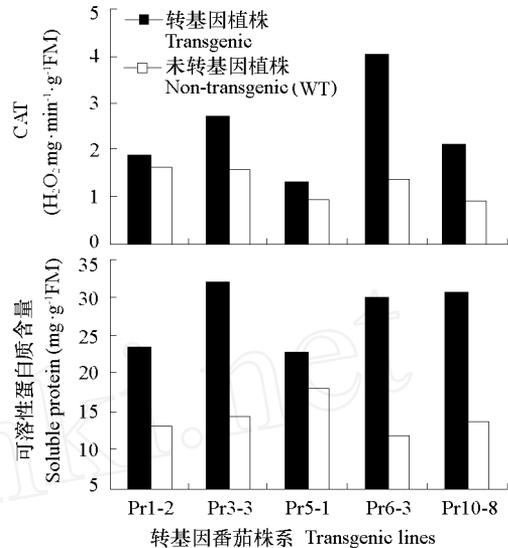


图 8 转基因番茄叶片中 CAT 的活性和可溶性蛋白质的含量

Fig 8 CAT activity and soluble protein content in transgenic tomato lines

3 讨论

本研究将带有病原诱导启动子的葡萄糖氧化酶基因转入 5 个番茄自交系材料中, 获得了 58 株转基因植株。接种叶霉病菌后, 5 个转基因自交系的抗性均比对照有较明显提高。这一结果说明能够通过转基因手段实现 H_2O_2 的产生, 从而提高植物的抗病性。但是所有转基因番茄植株的结实率和种子萌发率均有不同程度的降低, 这可能是在种子形成或种子萌动时, 过量表达的 GO 作用于葡萄糖产生较多 H_2O_2 的毒害作用, 从而限制了种子发育和胚发育^[9]。前人也有关于转 GO 基因植物发生毒害作用的报道。Lee 等^[11]的研究结果表明, 转 GO 基因的甘蓝和烟草, 当组成性表达或由具体的信号传导时, 也发生了结籽率减少, 发芽率降低的毒害作用。Doke^[17]的研究认为 H_2O_2 在细胞内可以经 Fe 离子催化生成羟基自由基, 它可能引起细胞内酶活性的降低及细胞的衰老死亡, 对植物有一定的伤害。

本试验采用农杆菌介导法侵染番茄叶盘, 结果发现, 不同番茄自交系由于遗传型的不同, 其遗传转化率存在较大差异。因此转化前一定要摸索好最佳的遗传转化条件, 特别是植物选择标记的最佳浓度。本试验采用 PPT 作为转基因植物的选择标记。与选择卡那霉素抗性的 NPT⁻ 相比, 遗传转化难度较大, 特别是不同类型的番茄自交系对 PPT 的敏感程度差异较大。因为 PPT 对番茄愈伤组织的诱导、生长分化和生根均有强烈的抑制作用, 不利于番茄的正常生长, 在高浓度下, 番茄愈伤组织诱导、生长分化以及生根完全受到抑制, 甚至死亡^[18]。但是 PPT 不存在对环境的安全释放问题, 因此国内外正利用 PPT 作为转基因植物的选择标记。

本试验接种番茄叶霉病菌的结果表明, 转基因番茄 3 个自交系的后代抗病性确实有较大的提高, 只是不同株系间抗病性差异也较大。可能是 *GO* 基因表达量的差异, 导致诱导防御基因表达的差异。我们测定了 SOD、POD、CAT 等与抗性相关的酶和可溶性蛋白质的含量, 结果当病原诱导时, 这些抗性指标都有所增加。这些结果说明利用基因工程手段使植物产生抗病性是可行的。我们已收获 T_0 代、 T_1 代、回交 BC_1 代种子, 将进一步验证其后代的抗病性、该基因的遗传规律以及抗病机理。

参考文献:

- Lamb C, Dixon R A. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 251 ~ 275
- Chen Z, Silver H, Klessig D F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 1993, 162: 1883 ~ 1886
- Alvares M, Pennell R I, Meijer M E, Alvares R I, Penne PM, Atsushi I, Richard A, Dixon, Chris Lamb. Reactive oxygen species mediated a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 1998, 92: 773 ~ 784
- Channongpol S, Willekens S, Moeder W, Qun Z, Jingping Z. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H_2O_2 in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 5818 ~ 5823
- Takahashi H, Chen Z, Du H, Li D B, Patkar R. Development of necrosis and activation of disease resistance in transgenic tobacco plants with severely reduced catalase levels. *Plant J*, 1997, 11: 993 ~ 1005
- Frederick K R, Tung J, Emerick R S, Katherine R Frederich, James Tung, Richard S Emerick, Frank R Mariarz, Scott H Chamberlain, Amit Vasavade, Steven Rosenberg. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*, Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *J Biol Chem*, 1990, 265: 3793 ~ 3802
- Kim K K, Flavel D R, Papavizas. Identification of a metabolite produced by *Talaromyces flavus* as glucose oxidase and its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 1988, 78: 488 ~ 492
- Gusui W, Barry J S, Ellen B. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H_2O_2 -generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *The Plant Cell*, 1995, 7: 1357 ~ 1368
- Kazan K, Murray F, Goulter K, Llewellyn D J, Manners J M. Induction of cell death in transgenic plants expressing a fungal glucose oxidase. *Mol Plant Microbe Interact*, 1998, 11: 555 ~ 562
- Murray F, Llewellyn D, McFadden H, David L, Elizabeth S, Dennis W. James Peacock. Expression of the *Talaromyces flavus* glucose oxidase gene in cotton and tobacco reduces fungal infection but is also Phytotoxic. *Mol Breed*, 1999, 5: 219 ~ 232
- Lee Y H, Yoon L S, Suh S C, Kim H I. Enhanced disease resistance in transgenic cabbage and tobacco expressing a glucose oxidase gene from *Aspergillus niger*. *Plant Cell Reports*, 2002, 20 (9): 857 ~ 863
- 巩万奎, 吴家和, 姚长兵, 刘方, 喻树迅, 陈志贤, 刘志红, 李燕娥. 葡萄糖氧化酶基因在棉花中的高效转化——转基因再生棉株的获得. *棉花学报*, 2002, 14 (2): 76 ~ 79
- Gong W K, Wu J H, Yao C B, Liu F, Yu S X, Chen Z X, Liu Z H, Li Y E. Establishment of effective transformation system for glucose oxidase gene in *Gossypium hirsutum* L. regeneration of plants with transgenes. *Acta Gossypii Sinica*, 2002, 14 (2): 76 ~ 79 (in Chinese)
- 彭昊, 王志兴, 窦道龙, 朱生伟, 路铁刚, 孙敬三. 由根癌农杆菌介导将葡萄糖氧化酶基因转入水稻. *农业生物技术学报*, 2003, 11 (1): 16 ~ 19
- Peng H, Wang Z X, Dong D L, Zhu S W, Lu T G, Sun J S. Introducing glucose oxidase gene into rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2003, 11 (1): 16 ~ 19 (in Chinese)
- 冯兰香, 徐玲, 刘坤. 番茄苗期对病毒病和叶霉病的多抗性鉴定方法. *中国蔬菜*, 1994, (3): 52 ~ 55
- Feng L X, Xu L, Liu K. Identification method of more resistance to *Mosaic virus* and *Fulvia fulva* in tomato seedling. *China Vegetables*, 1994, (3): 52 ~ 55 (in Chinese)
- 方中达. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社, 1998. 11
- Fang Z D. *Phytopathologica research method*. Peking: China Agriculture Publishing Company, 1998. 11 (in Chinese)
- 赵世杰, 刘华山, 董新纯. 植物生理学实验指导. 北京, 中国农业科学技术出版社, 1998. 56 ~ 124
- Zhao S J, Liu H S, Dong X C. *Phytophysiological experiment guidance*. Beijing: China Agricultural Science and Technology Publishing Company, 1998. 56 ~ 124 (in Chinese)
- Doke N. Involvement of superoxide anion generation in hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans*. *Physiol Plant Pathol*, 1983, 23: 345 ~ 347
- 罗素兰, 陈若, 长孙东亭. 茄组培苗的不同阶段对抗生素和 PPT 的抗性筛选试验. *海南大学学报 (自然科学版)*, 2003, (1): 58 ~ 64
- Luo S L, Chen R, Zhangsun D T. Screening test of resistance to antibiotics and PPT at different stages of tomato tissue culture. *Natural Science Journal of HaNan University*, 2003, 21 (1): 58 ~ 64 (in Chinese)
- 黄凤莲, 刘寿明, 曾端香, 罗赫荣, 谢丙炎. 湘研辣椒品种抗疫病筛选及抗性机制研究. *湖南农业大学学报*, 1999, 25 (4): 303 ~ 307
- Huang F L, Liu S M, Zeng R X, Luo H R, Xie B Y. Screening of phytophthora blight resistance in xiangyan capsicum varieties and its resistance mechanism. *Journal of Hunan Agricultural University*, 1999, 25 (4): 303 ~ 307 (in Chinese)