

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00367

35S 驱动 *Pib* 基因启动区和编码区的转基因初步分析

周明, 杨世湖, 兰莹, 晋玉宽, 万建民

南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095

摘要: 将包含 *Pib* 基因启动区及下游完整编码区的 9.9 kb DNA 片段克隆到双元载体 pPZP2Ha3(+)中, 构建了 35S 驱动的正义表达载体 pNAR701(20.3 kb); 同时将 *Pib* 基因编码区 6 986~9 392 bp 之间的 DNA 片段, 克隆到双元载体 pPZP2Ha3(-)中, 构建了 35S 驱动的反义表达载体 pNAR703(12.8 kb); 用农杆菌介导法转入中感稻瘟病水稻品种 R109 中。PCR、Southern blot 鉴定以及转基因 T₀ 代种子的潮霉素抗性鉴定证明, 目的基因已经整合到 R109 基因组中, 并能在后代稳定遗传。Northern blot 分析表明含有启动区及下游完整编码的 *Pib* 基因片段在 35S 驱动下能够在转基因后代中表达。对 T₁ 代苗期转基因植株和分蘖期离体叶片进行抗稻瘟病初步分析, 结果显示 pNAR701 转基因植株对稻瘟病生理小种 ZD₁ 和 ZG₁ 的抗性较对照增强, 而转反义片段的 pNAR703 转基因植株对稻瘟病的抗性较对照减弱。

关键词: 水稻; 转基因; 稻瘟病; *Pib* 基因

Initial functional analysis of the promoter region and coding region of *Pib* gene in transgenic rice

ZHOU Ming, YANG Shi-Hu, LAN Ying, JIN Yu-Kuan, WAN Jian-Min

National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: The promoter region and intact coding region of *Pib* gene (9.9 kb) was inserted into the downstream of CaMV 35S promoter in a binary vector pPZP2Ha3(+), resulting a plasmid pNAR701. And a fragment of *Pib* gene from 6 986 to 9 392 bp was placed into pPZP2Ha3(-) under the control of CaMV 35S promoter, producing an antisense expression vector pNAR703. These two recombined vectors were transferred into a blast medium susceptible rice cultivar R109 by an *Agrobacterium*-mediated method. Tests of PCR and Southern blotting for transgenic plants as well as the segregation of hygromycin resistance in T₁ generation confirmed that the target DNA fragments were integrated into genome of R109 and heritable. Northern blotting analysis showed the coding region of *Pib* gene double driven by 35S and its native promoter was able to transcript in T₁ transgenic plants. Rice blast resistance test for T₁ transgenic seedlings of 3–4 leaves stage and *in vitro* leaves in tillering stage showed that transgenic plants of pNAR701 were more resistant to blast race ZD₁ and ZG₁ than the wild type plants, but the resistance of antisense transgenic plants from pNAR703 was decreased compared to the controls.

Keywords: rice (*Oryza sativa*); transgene; rice blast; *Pib* gene

收稿日期: 2007-08-17; 修回日期: 2007-10-10

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30571044), 江苏省高科技项目(编号: BG2001305) 和长江学者和创新团队发展计划资助[Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30571044) and Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University and High Technology Research Program of Jiangsu Province (No. BG2001305)]

作者简介: 周明(1980-), 男, 硕士, 专业方向: 植物基因工程。

通讯作者: 杨世湖(1946-), 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物基因工程。Tel: 025-84396516; E-mail: shyang@njau.edu.cn

致谢: 日本国立农业生物资源研究所 Masahiro Yano 教授惠赠含 *Pib* 基因的 10.3 kb 克隆片段和双元表达载体 pPZP2Ha3(+/-)。稻瘟病生理小种 ZD₁ 和 ZG₁ 由江苏省农科院植保所周益军研究员惠赠。

由子囊菌 *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr 引起的稻瘟病是世界性的水稻真菌病害 [1], 严重影响水稻产量。稻瘟病抗性基因的克隆及结构功能分析是植物抗病基因工程研究的热点 [2]。到目前为止, 水稻中已克隆了 6 个稻瘟病抗性基因 [3]。Pib 基因是水稻中第一个通过图位克隆得到的稻瘟病抗性基因, 属于 NBS-LRR 抗病基因家族。该基因编码的蛋白包含抗病基因共有的保守结构域, 如核苷酸结合位点 (nucleotide-binding site, NBS) 和亮氨酸富集区 (leucine-rich repeats, LRRs) 等。Pib 基因的克隆为在分子水平研究稻瘟病抗性基因结构和功能之间的关系, 利用基因工程技术改良水稻的稻瘟病抗性提供了分子材料。

Wang 等 [4] 报道: 将携带 Pib 基因的 10.3 kb 的基因组 DNA 片段在未做任何修饰的情况下, 用 PEG 法直接转入水稻品种日本晴中, 抗瘟性鉴定发现转基因后代与该基因供体水稻品种表现出一致抗性。杨慧等 [5] 将 Pib 基因结构区不同缺失片段转入日本晴中, 对 T₀ 代转基因植株叶片进行离体抗病鉴定, 发现转基因植株对稻瘟病不同生理小种的抗性高于对照日本晴; 但对 T₁ 代转基因植株进行苗期鉴定发现抗性低于对照。李婵娟等 [6] 利用 GUS 报告基因分析 Pib 基因启动区的活性, 表明 Pib 基因启动子是一个诱导型启动子, 表达活性具有组织特异性, 在根里活性最高; 并且用软件在 Pib 基因结构区也搜索到一些启动元件。为进一步研究 Pib 基因结构与抗病功能之间的关系, 探索 ATG 上游启动元件信号在抗病性中的作用, 本研究将包含 Pib 基因诱导型启动区及下游完整编码区的 9.9 kb DNA 片段置于 35S 驱动下, 转入中感稻瘟病水稻品种 R109 中; 同时将包含 NBS 和 LRR 结构域的编码区第 3 个外显子的反义构建也转入 R109 中, 用转基因植株来分析抗病基因结构对水稻抗瘟性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

含 Pib 基因 (GenBank No. AB013448) 10.3 kb 克隆片段的 pBluescript SK(+) 载体以及双元表达载体 pPZP2Ha3(+/-) 由日本国立农业生物资源研究所 Masahiro Yano 教授惠赠。中感稻瘟病水稻品种 R109 由江苏省太湖地区农科所惠赠。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、农杆菌菌株 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 为本实验室保存材料。

限制性内切酶、DNA Maker、T4 DNA 连接酶、pMD18-T 载体、Taq 酶等购自大连宝生物公司。潮霉素及 DIG High Primer Labeling and Detection Starter Kit 试剂盒购自 Roche 公司。RNA 提取试剂 Trizol 购自北京鼎国生物有限公司。其他试剂为国产分析纯。

稻瘟病病原菌生理小种 ZD₁ 和 ZG₁ 由江苏省农业科学院植物保护研究所提供。

1.2 载体构建

用限制性内切酶 *Bgl* 和 *Sal* 酶切包含 Pib 基因的 pBluescript(+) 载体, 获得 Pib 基因 477~10 322 bp 之间包含启动区及下游完整编码区 9.9 kb 的 DNA 片段; 同时用 *Bam*H 和 *Sal* 消化双元表达载体 pPZP2Ha3(+)(10.4 kb)。回收上述酶切产物, 用 T4 DNA 连接酶进行连接, 得到重组双元表达载体, 命名为 pNAR701(20.3 kb)。

根据 Pib 基因序列设计引物扩增编码区的第 3 外显子 (6 986~9 392 bp), 引物序列如下:

F1: 5'-ACGGATCCGATGGTATTTGAGGAG-GCT-3

R1: 5'-ACGTCGACGATGAATGGGAGACTT-GGAT-3

下划线部分是为附加酶切位点 *Bam*H 和 *Sal*。以包含 Pib 基因的 pBluescript SK(+) 载体为模板进行 PCR 扩增, 反应程序为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 2 min 30 s, 30 个循环; 最后再 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物克隆到 pMD18-T 载体中, 经测序确认后, 用 *Bam*H 和 *Sal* 酶切, 回收产物, 连进 pPZP2Ha3(-) 相应酶切位点, 得到反义表达载体, 命名为 pNAR703(12.8 kb)。

1.3 水稻的转基因

R109 干种子人工去壳后, 用“84 消毒液”溶液表面灭菌 [7], N6 培养基 (2,4-D 2 mg/L) 诱导愈伤。农杆菌介导的转化, 转化子的筛选和植株再生等过程参照文献 [6, 8]。

1.4 转基因水稻的 PCR 检测

SDS 微量法 [9] 提取 T₀ 代转基因植株叶片 DNA, 进行 PCR 检测。

hpt 基因引物: F2: 5'-ACACAGCCATCGGTC-CAGAC-3; R2: 5'-ATCTTAGCCAGACGAGCGG-G-3。

反应程序: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 56℃复性 30 s, 72℃延伸 30 s, 35 个循环; 最后再 72℃延伸 10 min。

Pib 基因引物: F3: 5'-ATTGCCAACCATTGCTCAG-3'; R3: 5'-CACCAAACGCCTTCGACTA-3'。反应程序: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 56℃复性 30 s, 72℃延伸 1 min, 35 个循环; 最后再 72℃延伸 10 min。

1.5 转基因植株的 Southern blot 检测

随机挑选 6 株 PCR 鉴定为阳性的 T_0 代转基因植株用 CTAB 法^[10]提取基因组 DNA, 每株 20 μg 样品用 *Hind* III 酶切, 1.0% 琼脂糖胶电泳分离 DNA。常规方法将 DNA 转移至带正电荷尼龙膜^[11], 经紫外线交联后与地高辛标记的 *hpt* 探针(由引物 F2、R2 扩增质粒 pPZP2Ha3(+))获得)杂交, 最后显色照相。探针的标记、杂交及显色均按 Roche 公司试剂盒说明书进行。

1.6 T_0 代转基因植株种子的潮霉素抗性筛选

选结实较多的转基因株系, 随机挑选 100 粒饱满的 T_0 代转基因植株种子, 表面灭菌后, 放入含有 50 mg/L 潮霉素的培养皿中(25℃, 16 h 光照)培养, 10 d 后统计发芽率。

1.7 T_1 代转基因植株的 Northern blot 检测

选择抗潮霉素发芽的 T_1 代转基因小苗, 用 Trigol 试剂提取叶片总 RNA。取 15~20 μg 样品用甲醛变性胶电泳 4 h, 过夜转膜, 经紫外线交联后与地高辛标记的 *Pib* 基因片段(7 908~8 652 bp, *Hind* 酶切获得)探针杂交。探针的标记、洗膜、显色等过程均与 Southern blot 相同。

1.8 T_1 代转基因植株的苗期及分蘖期离体叶片的抗病性鉴定

pNAR701 T_0 代转基因种子经潮霉素溶液(50 mg/L)筛选 1 w, 选取抗潮霉素发芽的壮苗, 清水洗净后, 与浸种 3 d 的对照 R109 分区播种于秧盘, 以高感稻瘟病品种苏御糯作为检测稻瘟病菌株活力的对照。3~4 叶期时, 喷雾接种稻瘟病生理小种 ZD₁ 和 ZG₁。黑暗条件下, 保湿箱 28℃ 保湿 24 h。次日移入田间, 定时喷水保湿。1 w 后观察发病情况。每个小种 2 次重复。按 Standard Evaluation System for Rice(IRRI, 1996)的分级标准进行稻瘟病抗性分级, 记录发病级别及发病苗数, 计算抗病指数。抗病指数 = $100 \times \sum (\text{各级发病苗数} \times \text{各级代表值}) / (\text{调查总苗}$

数 \times 最高发病级别)。

T_1 代转基因植株生长至分蘖盛期, 取新抽出嫩叶进行离体抗瘟性鉴定, 方法参照文献^[5]。

2 结果与分析

2.1 转化载体的构建及鉴定

通过酶切、连接构建的表达载体 pNAR701(20.3 kb)(图 1), 用限制性内切酶 *Kpn* 和 *Sal* 酶切, 可以切出 3.4 kb 和 6.5 kb 两条预期条带(图 3A), 表明 9.9 kb 的目的片段正确连入了 pPZP2Ha3(+)载体; pNAR703(12.8 kb)(图 2)经限制性内切酶 *Bam*H 和 *Sal* 酶切, 可以切出 2.4 kb 的目的条带(图 3B), 与预期值符合。

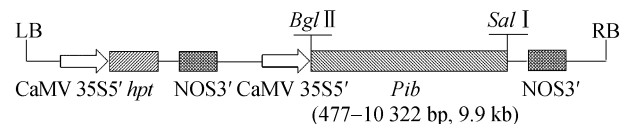


图 1 重组质粒 pNAR701 的 T-DNA 区
Fig. 1 T-DNA region of recombinated plasmid pNAR701

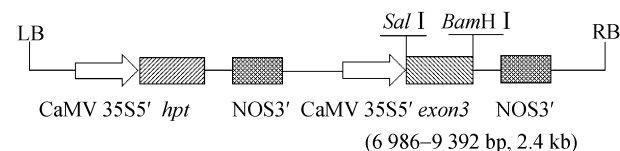


图 2 重组质粒 pNAR703 的 T-DNA 区
Fig. 2 T-DNA region of recombinated plasmid pNAR703

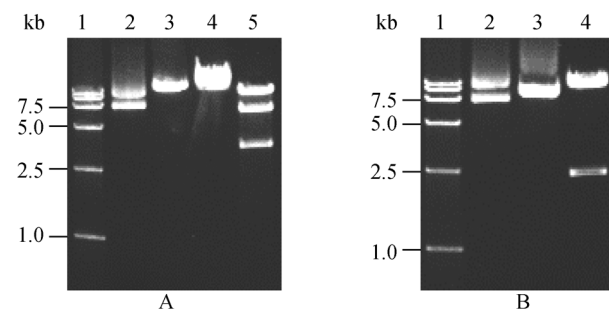


图 3 pNAR701(A)和 pNAR703(B)酶切验证
Fig. 3 Verification of RE digest for pNAR701 (A) and pNAR703 (B)
A: 1: 15.0 kb ladder; 2: pPZP2Ha3(+); 3: pNAR701; 4: *Sal* I; 5: *Kpn* I/*Sal* I. B: 1: 15.0 kb ladder; 2: pPZP2Ha3(-); 3: pNAR703; 4: *Bam*H I/*Sal* I.

2.2 农杆菌介导的转基因植株的获得

用农杆菌介导的方法将 pNAR701(20.3 kb)和 pNAR703(12.8 kb)转入中感稻瘟病水稻品种 R109 的

愈伤组织, 经潮霉素筛选(50 mg/L), 获得抗性愈伤; 随后, 经分化、生根和壮苗培养, 共获得 pNAR701 转化植株 16 株, pNAR703 转化植株 5 株, 移栽大田, 成熟后收取 T_0 代种子。

2.3 转基因植株的 PCR 及 Southern blot 分析

以 T_0 代转基因植株基因组 DNA 为模板, 一对 *hpt* 基因引物进行 PCR 扩增, 结果发现绝大多数转基因植株可以扩出 589 bp 的特异性条带, 非转基因对照不能扩出该条带(图 4A)。再用一对 *Pib* 基因引物进行 PCR 检测, *hpt* 基因引物检测为阳性的转基因植株都可以扩出 721 bp 的预期条带(图 4B)。经检测, 16 株 pNAR701 再生植株中共有 13 株呈阳性, 阳性率为 81.25%; 5 株 pNAR703 再生植株中有 4 株呈阳性, 阳性率为 80%。上述结果表明 *hpt* 基因和 *Pib* 基因均整合到了 R109 基因组中。

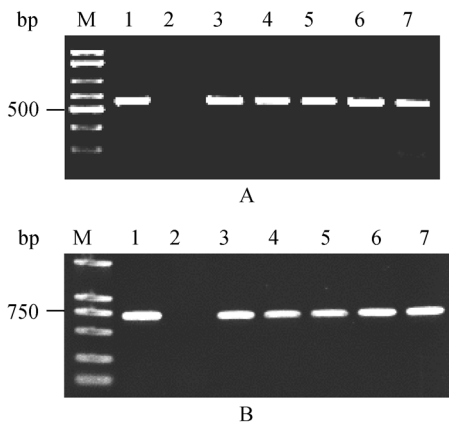


图 4 转基因植株的 PCR 检测

Fig. 4 PCR analysis of transgenic plants

A: PCR with *hpt* primers; M: 2.0 kb ladder; 1: pNAR701; 2: R109; 3: 701-1; 4: 701-4; 5: 701-5; 6: 701-11; 7: 701-12. B: PCR with *Pib* primers; M: 2.0 kb ladder; 1: pNAR701; 2: R109; 3: 701-1; 4: 701-4; 5: 701-5; 6: 701-11; 7: 701-12. 701-1, 701-4, 701-5 were different individual transgenic plants of pNAR701.

挑选 6 株 PCR 检测为阳性的 T_0 代转基因植株及对照 R109, 提取 DNA, 以地高辛标记的 *hpt* 探针进行 Southern blot 分析。结果显示: 6 株转基因植株均有杂交信号, 其中 4 株为单拷贝, 另外 2 株为多拷贝(图 5), 非转基因植株无杂交信号, 进一步确认 PCR 结果。

2.4 转基因植株 T_0 代种子的潮霉素抗性分析

取 100 粒转基因植株 T_0 代种子进行潮霉素抗性检测, 发现转基因植株 T_0 代种子对潮霉素的抗性出

现分离(表 1)。其中, 转基因株系 701-4、701-5、701-8、701-9、701-10、701-11 和 703-3 呈现 3:1 分离; 株系 703-4, 703-5 抗、感分离比高于 3:1。这表明潮霉素基因在转基因后代中能够稳定遗传。

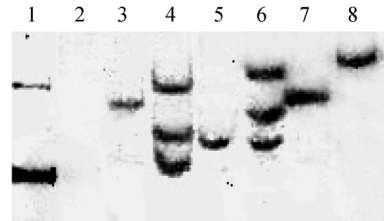


图 5 转基因植株的 Southern blot 析

Fig. 5 Southern blotting analysis of transgenic plants

1: pNAR701; 2: R109; 3: 701-4; 4: 701-5; 5: 701-12; 6: 701-13; 7: 701-8; 8: 701-9.

表 1 转基因植株后代潮霉素抗性遗传分离情况

Table 1 Segregation of hygromycin resistance in T_1 transgenic plants

转基因株系 Line	抗潮霉素发芽率 Germination rate (%)	χ^2	P P value
701-4	81	1.77	>10%
701-5	76	0.09	>75%
701-8	69	1.77	>10%
701-9	74	0.04	>75%
701-10	73	0.17	>50%
701-11	67	3.21	>5%
703-3	78	0.57	>25%
703-4	86	6.76	—
703-5	84	4.57	—

2.5 T_1 代转基因植株的 Northern blot 分析

为检测包含 *Pib* 基因诱导型启动区及其下游完整编码区的 9.9 kb DNA 片段在 35S 驱动下能否在转基因植株中表达, 选择经潮霉素检测后的 pNAR701 T_1 代转基因植株, 提取总 RNA, 以 *Pib* 基因 DNA 片段为探针进行 Northern blot 分析。结果显示, 5 株 pNAR701 T_1 代转基因植株中都可以检测到杂交信号, 在非转基因对照植株中没有检测到信号(图 6)。但不同的转基因植株之间基因表达水平差异很大, 说明在 35S 驱动下 *Pib* 基因在不同转基因单株中的表达程度不同; 同时, 由于转基因 T_1 代材料是一个分离世代, 经潮霉素筛选后, 不同单株的基因型仍有差异, 即存在纯合型和杂合型的区别, 这可能也是不同转基因植株之间杂交信号强度差异的原因之一。

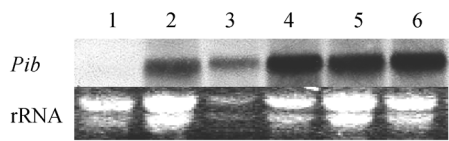


图 6 转基因植株的 Northern blot 分析
Fig. 6 Northern blot analysis of transgenic plants
1: R109; 2: 701-4; 3: 701-5; 4: 701-11; 5: 701-12; 6: 701-13.

2.6 T₁ 代转基因植株苗期的抗瘟性分析

选用江苏省稻瘟病优势生理小种 ZD₁ 和 ZG₁, 以 R109 为对照, 对经潮霉素筛选的 pNAR701 和 pNAR703 T₁ 代转基因植株进行苗期的抗瘟性鉴定。结果显示: pNAR701 T₁ 代 6 个不同转基因株系对稻瘟病生理小种 ZD₁ 的平均病情指数为 40.03, 低于对照 R109 的 53.38; 对 ZG₁ 的平均病情指数为 21.54, 低于对照的 27.66(图 7)。反义片段的 pNAR703 T₁ 代 3 个不同转基因株系对生理小种 ZD₁ 和 ZG₁ 的平均病情指数分别为 62.54 和 28.37, 均高

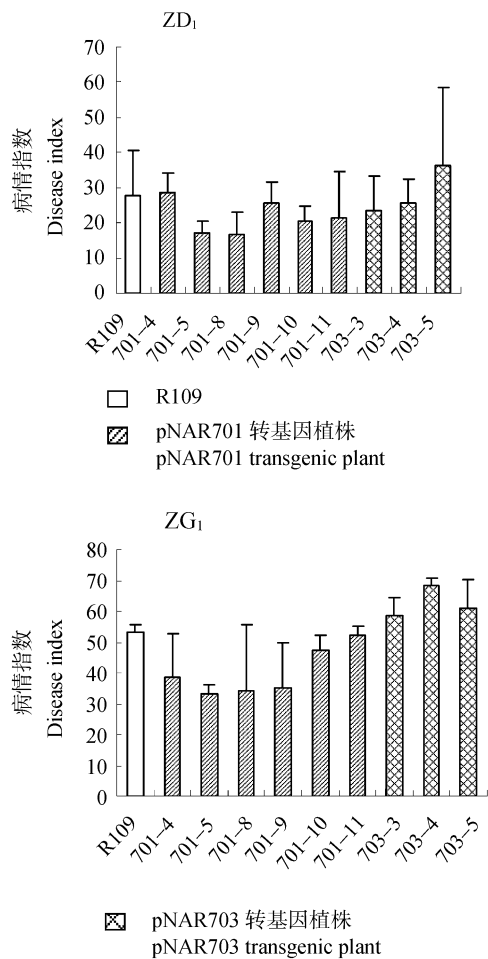


图 7 T₁ 代转基因植株对 ZD₁ 和 ZG₁ 的苗期抗瘟性鉴定
Fig. 7 Rice blast resistance to race ZD₁ and ZG₁ of T₁ transgenic plants

于对照 R109(图 7)。上述结果表明, *Pib* 基因诱导型启动区及下游完整编码区 DNA 片段在 35S 驱动下, 可以在一定程度上提高感病水稻品种对稻瘟病不同生理小种的抗性。不同转基因植株的抗病表现差异较大, 这可能与转基因植株基因型以及抗病基因的表达程度不同有关。反义片段减弱了 R109 的抗病性从另一个侧面证明 *Pib* 基因是一个抗病基因。

对 T₁ 代转基因植株分蘖期新抽出叶片做离体抗瘟性鉴定, 结果与苗期鉴定类似, pNAR701 T₁ 代转基因植株对稻瘟病生理小种 ZD₁ 和 ZG₁ 的抗性较对照增强, pNAR703 T₁ 代转基因植株则较对照更加感病(表 2)。

表 2 T₁ 代转基因植株离体叶片稻瘟病抗性鉴定
Table 2 Rice blast resistance for *in vitro* leaves of T₁ transgenic plants

生理小种 Race	R109 Variety	T ₁ 代转基因品系 T ₁ transgenic line	
		pNAR701	pNAR703
ZD ₁	R (10%)	R (5%)	S (25%)
ZG ₁	MS (30%)	R (10%)	HS (40%)

R: 抗病; S: 感病; MS: 中感; HS: 高感; 括号中数值为病斑面积。
R: Resistant; S: Susceptible; MS: Moderate susceptible; HS: High susceptible; the data in brackets mean lesions of leaves *in vitro*.

3 讨论

稻瘟病是我国水稻三大病害之一, 严重影响水稻产量, 重灾时甚至绝收。控制这种病害的有效方法是培育抗性品种。常规育种比较费时, 通过基因工程的方法将抗病基因导入感病水稻品种中, 不仅有十分重要的理论意义还有非常重要的应用价值。

Wang等 [12]曾报道, *Pib*基因的表达不受病原菌诱导, 而是受到环境因素和一些化学物质的诱导, *Pib*基因这种独特的表达方式是其他抗病基因所没有的。杨慧等 [5]对*Pib*基因结构区不同酶切片段进行转基因功能分析, 发现转基因植株在苗期和抽穗期对稻瘟病生理小种的抗性表现不同。李婵娟等 [6]对*Pib*基因启动区进行分析, 发现*Pib*基因启动区受黑暗等环境因素、SA等化学因素的诱导; 表达活性具有组织特异性, 在根中表达量最高, 进一步证实*Pib*基因独特的表达方式; 更有意思的是在*Pib*基因编码区也搜索到一些启动元件。那么, *Pib*基因诱导型启动区序列是否还有其他功能, 其与编码区一起在 35S驱动下会有什么样的表现, 尚未见报道。本研究将*Pib*基因诱导型启动区及下游完整编码区的 9.9 kb DNA片段(477~10 322 bp)置于 35S驱动下, 转入中感稻瘟病水稻品种R109 中。稻瘟病抗性鉴定发现,

无论是苗期的活体鉴定还是分蘖期的离体鉴定,转基因植株的抗性均较对照提高。这表明:*Pib*基因诱导型启动区连同其下游的编码区在 35S 启动子驱动下,仍表现出抗病功能,35S 和 *Pib* 基因诱导型启动子之间没有负效应,据此可推测 *Pib* 基因启动区很可能也有一些尚未被人们认知的抗病元件。同时,由于 T_1 代转基因材料是一个分离世代,经潮霉素筛选后,获得的是纯合型和杂合型的转基因植株,这可能是 pNAR701 T_1 代 6 个转基因株系抗瘟性表现不同的原因之一。此外,结合 Northern blot 分析和抗病鉴定结果来看,不同转基因单株中 *Pib* 基因的表达程度不同,其抗病性也不尽相同(图 6, 图 7),这可能与转基因植株中基因表达的剂量效应有关^[13,14]。因此,对纯合的高世代转基因材料做进一步的抗病性分析更能揭示 *Pib* 基因的功能,但这需要长期的选择之后才能进行。

R109 是中感稻瘟病水稻品种,具有一定的抗病性。转入的 *Pib* 基因编码区反义片段(6 986~9 392 bp)包含抗病基因中保守的 NBS 和 LRR 结构域。抗病鉴定发现转基因植株苗期和分蘖期离体叶片的抗瘟性均较对照减弱,推测 R109 中可能存在其他一些与 *Pib* 基因有相同结构域的微弱抗性基因^[15],转入反义片段可能会使这些微弱抗性基因活性受到干扰,致使转基因植株稻瘟病抗性减弱。

Pib 基因是 *Pib* 基因家族中的一员,单一的转基因事件增加了抗病基因的表达,使得转基因植株的稻瘟病抗性有一定程度的提高,但抗病基因的转入也可能导致其他一些基因的表达受到影响。在我们的研究中,同一转基因事件的不同单株中 *Pib* 基因的表达量呈现较大差别,说明对于植物抗病性这样一个复杂性状而言,转基因必须结合选择才有可能获得具有实用价值的转基因抗性植株。

参考文献(References):

- [1] Baker B, Zambryski P, Staskawicz BJ, Dinesh-Kumar SP. Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, 1997, 276: 726-733. [\[DOI\]](#)
- [2] Eills J, Dodds P, Pryor T. Structure function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3: 278-284. [\[DOI\]](#)
- [3] DAI Liang-Ying, LIU Xiong-Lun, XIAO Ying-Hui, WANG Guo-Liang. Recent advances in cloning and characterization of disease resistance genes in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, 49: 112-119. [\[DOI\]](#)
- [4] WANG Zi-Xuan, Yano M, Yamanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Katayose Y, Sasaki T. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J*, 1999, 19: 55-64.
- [5] YANG Hui, YANG Shi-Hu, WANG Qing, ZHOU Tong, WAN Jian-Min. Initial determination of function for *Pib* gene ORF region by rice transformation. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2006, 29: 1-5.
杨慧, 杨世湖, 王庆, 周彤, 万建民. *Pib* 基因编码区功能的转基因初步鉴定. 南京农业大学学报, 2006, 29(3): 1-5.
- [6] LI Chan-Juan, YANG Shi-Hu, WU Liang, WAN Jian-Min. The induction activation of the promoter of *pib* gene. *Hereditas(Beijing)*, 2006, 28: 689-694.
李婵娟, 杨世湖, 武亮, 万建民. *pib* 基因启动子及其诱导启动性初探. 遗传, 2006, 28(6): 689-694.
- [7] NI Dan, YANG Shi-Hu, XU Shi-Qing, WAN Jian-Min. Optimizing for tissue culture and *in vitro* multiplication technique of *Gerbera*. *Journal of Cell Biology (China)*, 2002, 24: 316-319.
倪丹, 杨世湖, 徐士清, 万建民. 非洲菊组培快繁技术的优化. 细胞生物学杂志, 2002, 24(5): 316-319.
- [8] Bu QY, Wu L, Yang SH, Wan JM. Cloning of a potato proteinase inhibitor gene PINII-2X from diploid potato (*Solanum phureja*) and functional study in transgenic rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2006, 48: 732-739. [\[DOI\]](#)
- [9] Dellaporta SL, Wood T, Hicks TB. A plant DNA mini preparation: version II. *Plant Mol Bio Rep*, 1983, 1: 19-21.
- [10] Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8: 4321-4325. [\[DOI\]](#)
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning — A Laboratory Manual (3rd Edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- [12] Wang ZX, Yanamouchi U, Katayose Y, Sasaki T, Yano M. Expression of the *Pib* rice blast resistance gene family is up-regulated by environmental conditions favoring infection and by chemical signals that trigger secondary plant defenses. *Plant Mol Biol*, 2001, 47: 653-661. [\[DOI\]](#)
- [13] Chern MS, Fitzgerald HA, Yadev RC, Canlas PE, Dong X, Ronald PC. Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2001, 27: 101-113. [\[DOI\]](#)
- [14] MAO Bi-Zeng, LI De-Bao, LI Qun, HE Zu-Hua. Transgenic rice with double defense genes exhibiting resistance to sheath blight (*Rhizoctonia solani* Kuhn.). *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2003, 29: 322-326.
毛碧增, 李德葆, 李群, 何祖华. 转化双价防卫基因获得抗纹枯病水稻. 植物生理与分子生物学报, 2003, 29(4): 322-326.
- [15] McDonald BA, Linde C. Pathogen population genetics evolutionary potential and durable resistance. *Annu Rev Phytopathol*, 2002, 40: 349-379. [\[DOI\]](#)