

转中国对虾抗菌肽基因水稻抗白叶枯病效应初析

王 维^{1, #} 吴 超^{1, #} 刘 梅² 刘旭日¹ 胡国成¹ 斯华敏¹ 孙宗修¹ 刘文真^{1, *}
付亚萍^{1, *}

(¹中国水稻研究所 水稻生物学国家重点实验室, 浙江 杭州 310006; ²中国科学院 海洋研究所 海洋生物技术研发中心, 山东 青岛 266071;
共同第一作者; * 通讯联系人, E-mail: lwzzju@163.com; cnrrifuyp@hotmail.com)

Resistance of Antimicrobial Peptide Genes Transgenic Rice to Bacterial Blight

WANG Wei^{1, #}, WU Chao^{1, #}, LIU Mei², LIU Xu-ri¹, HU Guo-cheng¹, Si Hua-min¹, SUN Zong-xiu¹, LIU Wen-zhen^{1, *},
FU Ya-ping^{1, *}

(¹State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; ²R & D Center of Marine Bio-
technology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; # These authors contributed equally to this pa-
per; * Corresponding author, E-mail: lwzzju@163.com; cnrrifuyp@hotmail.com)

WANG Wei, WU Chao, LIU Mei, et al. Resistance of antimicrobial peptide genes transgenic rice to bacterial blight. *Chin J Rice Sci*, 2010, 24(4): 335-340.
Abstract: Antimicrobial peptides (AMP) is a polypeptide with antimicrobial activity. The antimicrobial peptide genes *np3* and *np5* from Chinese shrimp were integrated into *Oryza sativa* L. subsp. *japonica*. cv. Aichi ashahi by *Agrobacterium* mediated transformation system. PCR analysis showed that the positive ratios of *np3* and *np5* were 36% and 45% in T₀ generation, respectively. RT-PCR analysis showed that the antimicrobial peptide genes were expressed in T₁ generation and there was no obvious difference in agronomic traits between transgenic plants and non-transgenic plants. Four *np3* and *np5* transgenic lines in T₁ generation were inoculated with the strain CR4 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(*Xoo*), and the results indicated that all the transgenic lines had a significantly enhanced resistance to bacterial blight caused by the *Xoo* strain CR4. The *np5* transgenic lines also conferred higher resistance to bacterial blight caused by the *Xoo* strains JS97-2, ZHE173 and OS-225. It is suggested that transgenic lines with *np5* gene might possess a broad spectrum resistance to rice bacterial blight.
Key words: rice; antimicrobial peptides; bacterial blight; resistance

王 维, 吴 超, 刘 梅, 等. 转中国对虾抗菌肽基因水稻抗白叶枯病效应初析. 中国水稻科学, 2010, 24(4): 335-340.
摘 要: 抗菌肽是一类具有抗菌活性的多肽类物质。利用农杆菌介导法将中国对虾抗菌肽基因 *np3* 和 *np5* 分别导入梗稻品种爱知旭中, PCR 检测显示, T₀ 代转 *np3* 基因和 *np5* 基因水稻植株的阳性率分别为 36% 和 45%。RT-PCR 检测 T₁ 代转基因水稻, 结果表明抗菌肽基因在 RNA 水平上得到表达, 而抗菌肽的表达对农艺性状未产生显著影响。用白叶枯病菌小种 CR4 分别对 4 个 T₁ 代转 *np3* 基因和 *np5* 基因株系进行接种, 所有转基因株系均表现出比对照更高水平的抗性。为了验证抗菌肽基因的广谱抗性, 进一步检测了 *np5* 转基因株系对 3 个菌株 JS97-2、ZHE173 和 OS-225 的抗性, 发现中国对虾抗菌肽基因 *np5* 对白叶枯病菌可能具有较广谱的抗性。
关键词: 水稻; 抗菌肽; 白叶枯病; 抗性
中图分类号: Q943.1; S435.111.4⁺7; S511.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-7216(2010)04-0335-06

水稻白叶枯病是由 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*)引起的一种世界性水稻细菌性病害, 该病对热带和亚热带地区水稻生产的危害尤为严重^[1-2], 是制约水稻高产的重要因素^[3]。多年来, 人们采用不同的化学农药来防治白叶枯病, 但收效甚微, 并且造成严重的环境污染^[4]。实践证明, 培育和利用优良的抗病品种是控制白叶枯病发生最为经济、有效和环保的途径。

长期以来, 常规育种是水稻抗病育种最主要的手段。水稻转基因技术的日臻成熟, 使来源于不同物种甚至人工合成基因转入水稻并高效表达成为可

能。这也为培育水稻新品种提供了新的手段。与常规育种技术相比, 转基因育种不仅能缩短育种周期, 而且能充分利用自然界丰富的抗源, 在短期内实现不同来源抗病基因的聚合。

目前, 已鉴定的水稻白叶枯病抗性基因有 30 多个, 其中有些基因的抗谱较窄, 只对一个或几个生理小种具有抗性, 另一些基因虽具有较广谱的抗性, 但

收稿日期: 2009-05-25; 修改稿收到日期: 2010-01-09。
基金项目: 国家转基因生物新品种培育科技重大专项资助项目 (2008ZX08010-004)

是也不宜长期集中利用, *Xa4* 和 *Xa3* 就因为连续大面积推广而导致携带这些基因的品种抗性丧失^[5-6]。因此,在挖掘栽培稻和野生稻中抗病基因的同时,积极探索利用其他外源基因来改良水稻的抗病性显得很有意义。目前,诸如诱导水稻防卫反应基因、降解酶类基因(主要是几丁质酶基因)和抗菌肽基因这三类外源抗病基因已经用于转化水稻,并取得一定成效^[7-9]。

与诱导防卫反应基因和降解酶类基因相比,抗菌肽具有抗菌谱广、低浓度就能产生作用等特点,应用抗菌肽的广谱抗菌性可以显著提高植物的抗病能力^[10-11]。黄大年等^[12]利用基因枪法将抗菌肽 *Cecropin B* 基因转入水稻品种,检测到转基因植株对水稻白叶枯病和细菌性条斑病存在一定的抗性。Patkar 等^[13]在籼稻中表达来自洋葱的乙酰抗菌肽,对稻瘟病、纹枯病和白叶枯病的抗病力分别提高了 86%、67%和 82%。本研究利用来自海洋无脊椎生物的抗菌肽基因进行水稻转基因抗病研究,这类抗菌肽具有以下抗菌特性:1)杀菌活力高,致死浓度均在 $\mu\text{mol/L}$ 级;2)作用迅速,往往在几秒或几分钟内可将 99%以上的菌杀灭;3)对真核生物细胞无毒性;4)活性稳定,较耐热,100℃下处理 30 min 不会丧失抗菌活性;5)在高盐环境下,许多海洋抗菌肽同样具有抗菌活性^[14-15]。抗菌肽基因 *np3* 和 *np5* 均克隆于中国对虾,体外抗菌活性分析证明 *np5* 抗菌肽在低浓度下对细菌和真菌的生长均具有抑制作用^[16-17]。

本研究将中国对虾的抗菌肽基因 *np3* 和 *np5* 构建到植物表达载体中,转化水稻,探索中国对虾抗菌肽能否增强水稻对白叶枯病的抗性,为提高水稻的抗病能力提供新基因源。

1 材料与方法

1.1 供试水稻品种和白叶枯病菌种

感白叶枯病品种爱知旭(Aichi ashahi)种子由本实验室保存。白叶枯病菌菌株 CR4(即病原型 IV)由中国水稻研究所黄世文博士提供,白叶枯病菌株 JS97-2(病原型 I)、ZHE173(病原型 IV)和 OS-225(病原型 VII)由中国水稻研究所吴建利博士提供。

1.2 植物表达载体构建

中国对虾抗菌肽基因 *np3* 的编码序列经酶切后连接于启动子 35S 和终止子 Nos 之间,然后插入到 pCambia1305.2 的多克隆位点,获得植物表达载体 *nph3*(图 1)。植物表达载体 *nph5* 在 *nph3* 的

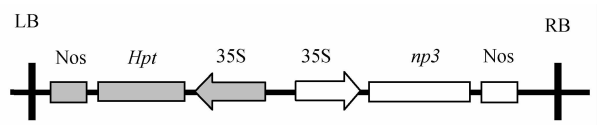


图 1 植物表达载体 *nph3* 的结构
Fig. 1. Schematic diagram of plant expression vector *nph3*.
35S—启动子; *np3*—中国对虾抗菌肽基因; Nos—终止子。
35S, 35S promoter; *np3*, Antimicrobial peptide gene; Nos, Nos terminator.

结构基础上将目的基因 *np3* 替换成 *np5*。重组质粒鉴定后转化农杆菌 EHA105。

1.3 农杆菌转化水稻

基因转化参照 Hiei 等^[18]的方法并加以修改。取开花后 12~15 d 的稻穗脱粒,表面灭菌后接种在愈伤组织诱导培养基上,26℃下暗培养诱导愈伤组织。约 5~7 d 后取愈伤组织在相同条件下继代培养,培养 5 d 后的愈伤用于共培养。农杆菌于含 50 mg/L 卡那霉素(Kan)的 YM 平板上划线,28℃下暗培养 3 d,用金属匙收集农杆菌菌体,悬浮于基本培养基,调整菌体浓度至 OD₆₀₀ 为 0.3~0.5,加入乙酰丁香酮(AS,终浓度为 100 mmol/L),即为共培养转化水稻用的农杆菌悬浮液。将继代培养 4 d 后的愈伤组织浸于此菌液中,20 min 后取出并用无菌滤纸吸去多余菌液,随即转入覆有无菌滤纸的固体培养基上,于 26℃下暗培养 2~3 d。共培养后的愈伤组织在含 50 mg/L 潮霉素的筛选培养基上,26℃下暗培养 14 d,再转至配制的新鲜筛选培养基上继续筛选 14 d。然后选择生长旺盛的抗性愈伤组织转移至含有 50 mg/L 潮霉素的分化培养基上,暗培养 3 d 后转至 12 h 光照/12 h 黑暗、26℃条件下培养,再生的小苗在 1/2MS 培养基上生根壮苗 14 d 左右。选择高约 10 cm、根系发达的小苗,按编号移栽入土。

1.4 转基因植株的分子检测

1.4.1 转基因植株的 PCR 分析

转基因植株基因组 DNA 的提取按卢扬江等^[19]的方法进行。用于检测目的基因 *np3* 和 *np5* 的引物分别为 P3 和 P5。P3 的正向引物序列为 5'-AGCCTCACCTGCAGAGACCG-3',反向引物序列为 5'-ATCAGGCAATCATGGAAAAATCTT-3';P5 的正向引物序列为 5'-GGTCATGCGCCTCG TGGTC-3',反向引物序列为 5'-AGGTCGCCGTC TCTTCATCTAT-3'。

PCR 反应体系共 15 μL ,包含 10×buffer 1.5

μL (含 20 mmol/L Mg^{2+}), 2.5 mmol/L dNTP 1 μL , 5 $\mu\text{mol/L}$ 的引物各 1 μL , 2.5 U/ μL Taq 酶 0.2 μL , ddH₂O 8.3 μL , 50 ng/ μL 模板 DNA 2 μL 。

ABI 9600 PCR 仪上进行 PCR 扩增, 反应条件为: 94℃下预变性 4 min; 94℃下变性 30 s, 56℃下退火 30 s, 72℃下延伸 1 min, 29 个循环; 循环结束后 72℃下延伸 10 min。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后在 AlphaImage EP 自动凝胶成像仪上拍照。

1.4.2 T₁代转基因植株的 RT-PCR 分析

按照 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂盒的方法提取叶片总 RNA, 并用 TaKaRa 的 RNase-Free 的 DNase I 去除总 RNA 中的 DNA。用 TaKaRa cDNA 合成试剂盒反转录合成 cDNA 的第一链, 以 cDNA 第一链为模板对内参基因 *Actin* 和目的基因进行 PCR 扩增, 操作体系和程序同上。抗菌肽基因 *np3* 和 *np5* 的引物分别为 P3 和 P5。

内参基因 *Actin* 的引物序列: ActinP1, 5'-GGC TGTTCCTTTCCCTCTATGC-3'; ActinP2, 5'-TT GCTGTTTCAAGTTCTTGTT-3'。

1.5 T₁代植株农艺性状的考查

大田种植的 T₁代水稻成熟时, 每个株系随机挑选 5 个 PCR 检测呈阳性的植株测量株高, 考查有效穗数、每穗实粒数、总粒数和千粒重, 计算理论产量, 并进行统计分析。

1.6 抗病性鉴定

转基因阳性的 T₁代和 T₂代孕穗期植株参照 华志华等^[20]方法用 4 个白叶枯病菌菌株进行剪叶接种, 每株植株接种最上面的 2~3 片叶, 接种部位距叶尖约 1/10, 20 d 后观察发病情况, 测量各个株系的病斑长度, 并根据“病斑长度/总叶长×100%”计算病斑比值, 判定感病或抗病程度。

2 结果与分析

2.1 T₀代转基因植株的获得和检测

植物表达载体 *nph3* 和 *nph5* 分别转化爱知旭, 获得 150 株转 *np3* 基因苗和 145 株转 *np5* 基因苗。用引物 P3 和 P5 分别对 50 株转 *np3* 基因苗和 20 株转 *np5* 基因苗进行 PCR 检测, 结果显示, 18 株转 *np3* 基因植株检测到 420 bp 的目的条带, 转基因苗阳性率为 36%; 9 株转 *np5* 基因苗检测到 310 bp 的目的条带, 转基因阳性率为 45%。

2.2 转基因植株 T₁代的分子检测结果

2.2.1 T₁代植株 PCR 检测

对 T₁代转基因株系的单株进行 PCR 检测, 在

检测的 18 个 T₁代转基因株系中有转 *np3* 基因株系 11 个, 转 *np5* 基因株系 7 个, 每个株系各检测 30 株, 统计分析目的基因在 T₁代的分离情况, 共有 11 个转基因株系的阳性株和阴性株分离比符合 3:1, 其中 7 个为转 *np3* 基因株系, 4 个为转 *np5* 基因株系。T₁代转基因株系 8034 和 8049 部分植株的 PCR 扩增结果如图 2 和图 3 所示。

2.2.2 T₁代植株 RNA 表达分析

以水稻基因组为模板, *Actin* 为引物预计可扩增出 412 bp 的特异条带; 而以水稻 cDNA 为模板, *Actin* 为引物预计可扩增出 280 bp 的特异条带。获得转基因植株和阴性对照的总 RNA 后, 用 DNase I 去除 RNA 中的 DNA, 然后反转录为 cDNA, 利用 *Actin* 引物进行 PCR 检测, 结果显示, 所有 cDNA 样品只能扩增出 280 bp 的目的条带 (图 4), 说明 cDNA 模板完整, 无残留 DNA。以目的基因引物 P3 和 P5 进行 PCR 扩增, 转 *np3* 基因植株和转 *np5* 基因植株的样品分别获得了 420 bp 和 310 bp 的特异条带, 而非转基因对照未扩增出目的条带 (图 5), 说明抗菌肽基因在 RNA 水平上得到表达。

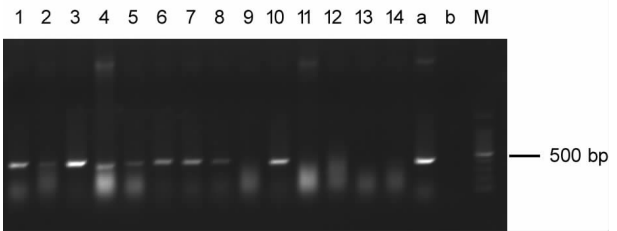


图2 *np3* 转基因株系 8034 的 PCR 扩增
Fig. 2. PCR amplification of *np3* transgenic line 8034.
1~14—*np3* 转基因植株; a—阳性对照; b—阴性对照; M—Marker。
Lanes 1 to 14, *np3* transgenic plants; Lane a, Positive control; Lane b, Negative control; M, Marker.

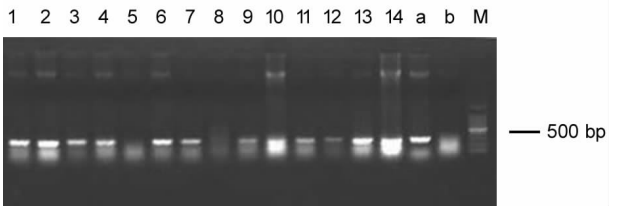


图3 *np5* 转基因株系 8049 的 PCR 扩增
Fig. 3. PCR amplification of *np5* transgenic line 8049.
1~14—*np5* 转基因植株; a—阳性对照; b—阴性对照; M—Marker。
Lanes 1 to 14, *np5* transgenic plants; Lane a, Positive control; Lane b, Negative control; M, Marker.

表 1 转基因 T₁ 代株系的农艺性状

Table 1. Agronomic traits of transgenic lines in T₁ generation.

株系 Line	转化基因 Gene transformed	株高 Plant height /cm	单株有效穗数 No. of productive panicles per plant	每穗总粒数 No. of grains per panicle	每穗实粒数 No. of filled grains per panicle	千粒重 1000-grain weight/g	单株理论产量 Theoretical yield per plant/g
8033	<i>np3</i>	103.0 fg	17.7	93.4 bc	88.1	28.2	45.4
8034	<i>np3</i>	102.6 g	17.3	107.2 ab	99.0	28.4	49.3
8035	<i>np3</i>	107.3 def	18.6	105.9 abc	90.5	27.0	45.6
8036	<i>np3</i>	112.8 bc	22.0	104.6 abc	90.7	27.5	55.1
8037	<i>np3</i>	105.7 efg	19.8	92.2 bc	86.6	28.1	47.1
8038	<i>np3</i>	108.2 cdef	21.4	90.9 c	83.9	27.7	49.0
8039	<i>np3</i>	101.8 gh	16.6	89.7 c	74.0	30.0	39.3
8040	<i>np3</i>	97.0 h	16.3	88.7 c	73.6	26.3	31.5
8041	<i>np3</i>	110.0 cd	17.2	100.0 bc	90.1	28.5	44.1
8042	<i>np3</i>	109.1 cdef	17.6	90.4 c	84.0	29.5	43.6
8043	<i>np3</i>	118.2 a	17.0	120.3 a	95.6	25.9	42.1
8044	无 None	115.9 ab	21.3	94.4 bc	76.0	25.7	41.5
8046	<i>np5</i>	106.1 efg	16.4	86.2 c	81.6	29.2	39.0
8049	<i>np5</i>	109.6 cde	18.0	95.5 bc	77.3	27.8	38.7
8052	<i>np5</i>	116.8 a	18.2	121.1 a	93.8	26.5	45.3
<i>F</i> (14,60)		13.62 *	1.086	1.97 *	1.24	1.40	1.09

$F_{0.05}(14,60)=1.86$ 。
同一列数据后跟相同小写字母者表示在 0.05 水平上差异不显著。
Data followed by the common lowercase letters are not significantly different at 0.05 level.

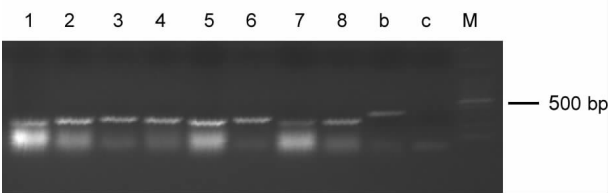


图 4 内参基因 *Actin* 的表达分析
Fig. 4. Expression analysis of internal control gene *Actin*.
1~3-*np3* 转基因植株; 4-转基因阴性对照; 5~8-*np5* 转基因植株; c-空白对照; b-基因组 DNA 模板; M-Marker。
Lanes 1 to 3, *np3* transgenic plants; Lanes 5 to 8, *np5* transgenic plants; Lane 4, Negative plant; Lane c, Blank control; Lane b, DNA template; M, Marker.

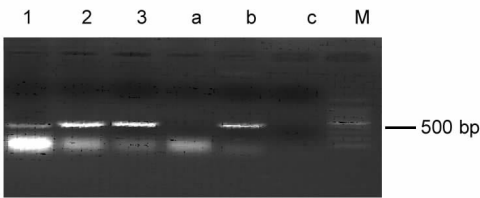


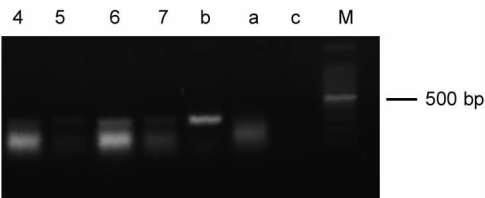
图 5 *np3* 和 *np5* 的表达分析
Fig. 5. Expression analysis of *np3* and *np5*.
1~3-*np3* 转基因植株; 4~7-*np5* 转基因植株; a-阴性对照; b-阳性对照; c-空白对照; M-Marker。
Lanes 1 to 3, *np3* transgenic plants; Lanes 4 to 7, *np5* transgenic plants; Lane a, Negative plant; Lane b, DNA template; Lane c, Blank control; M, Marker.

2.3 T₁ 代植株的农艺性状

在大田调查了各转基因株系和对照株系的株高、分蘖数、有效穗数和结实率等性状,并计算每株理论产量(表 1)。对所得各个农艺性状的数据进行方差分析,经统计分析可知,虽然株高和每穗总粒数差异显著,但转抗菌肽的植株在穗数、实粒数、千粒重和产量方面差异不显著,说明本研究的抗菌肽在水稻植株内的表达没有造成不良影响。

2.4 转基因植株的水稻白叶枯病抗性分析

选择 T₁ 代分离比符合 3 : 1 的 4 个转基因株系(*np3* 和 *np5* 各 2 个)接种白叶枯病生理小种Ⅳ的代表菌株 CR4。7 d 后发现非转基因阴性对照植株已



出现明显病斑,而转基因植株症状不明显,直到第 10 天转基因植株才开始出现病斑。20 d 后测量病斑长度,结果显示除株系 8034 中有 2 株转基因植株的病斑比值在 11%~20%,其余转基因植株的病斑比值均在 1%~10%,而非转基因水稻大部分植株的病斑比值都>11%,甚至有 1 株植株病斑比值在 61%~70%(表 2 和图 6)。表明中国对虾抗菌肽基因 *np3*、*np5* 均能提高水稻对白叶枯病菌 CR4 的抗性。

此外,用 3 个菌株(JS97-2、OS-225 和 ZHE173)接种 T₂代转 *np5* 基因株系。20 d 后测量病斑长度,结果显示,转基因株系 8049 对 JS97-2 和 ZHE173 的抗性明显提高,但对 OS-225 的抗性与非转基因植株相似。而转基因株系 8052 对 3 个菌株均表现出强抗性,全部检测植株的病斑比值均在 1%~10%(表 3)。

3 讨论

本研究利用中国对虾的抗菌肽基因 *np3* 和 *np5* 转化水稻品种爱知旭,研究 *np3* 和 *np5* 是否能增强水稻对白叶枯病菌的抗性。采用 35S 启动子高效地



图 6 白叶枯病菌 CR4 接种 20 d 后转基因植株叶片表型
Fig. 6 . Phenotype of leaves from transgenic plants at 20 days after inoculation with the *Xoo* strain CR4.

8044—非转基因植株;8034 和 8038—转 *np3* 基因植株;8049 和 8052—转 *np5* 基因植株。
8044, Leaves from the nontransgenic plant; 8034 and 8038, Leaves from the *np3* transgenic plant;8049 and 8052, Leaves from the *np5* transgenic plant.

启动目的基因的表达,通过 RT-PCR 的检测观察到了转基因植株 cDNA 的扩增条带,说明两个基因在 mRNA 水平得到表达。采用强致病力菌株 CR4 对

表 2 *np3* 或 *np5* 转基因水稻植株对水稻白叶枯病菌株 CR4 的抗性反应
Table 2. Resistance reaction of transgenic plants with *np3* or *np5* to the *Xoo* strain CR4.

病斑比值 Ratio of lesion	对照 Control	转 <i>np3</i> 基因植株 Transgenic plants with <i>np3</i>		转 <i>np5</i> 基因植株 Transgenic plants with <i>np5</i>	
		8034	8038	8049	8052
1%~10%	12	18	26	34	18
11%~20%	5	2	0	0	0
21%~30%	7	0	0	0	0
31%~40%	2	0	0	1	0
41%~50%	3	0	0	0	0
51%~60%	1	0	0	0	0
61%~70%	1	0	0	0	0
总株数 Number of plants	31	20	26	35	18

表 3 转 *np5* 基因水稻植株对白叶枯病菌 3 个菌株 JS97-2、OS-225 和 ZHE173 的抗性反应
Table 3. Resistance reaction of transgenic plants with *np5* to the *Xoo* strains JS97-2, OS-225 and ZHE173.

病斑比值 Ratio of lesion	JS97-2			OS-225			ZHE173		
	对照 Control	8049	8052	对照 Control	8049	8052	对照 Control	8049	8052
1%~10%	18	28	18	20	28	18	13	19	18
11%~20%	7	0	0	2	3	0	12	4	0
21%~30%	0	0	0	0	0	0	2	1	0
31%~40%	0	0	0	0	0	0	1	0	0
41%~50%	0	0	0	0	0	0	2	0	0
51%~60%	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61%~70%	0	0	0	0	0	0	0	0	0
总株数 Number of plants	25	28	18	22	31	18	30	24	18

转基因水稻植株进行抗病性检测,发现非转基因阴性对照植株在第 7 天的时候就出现明显的病斑,转基因阳性植株则在第 10 天开始出现病斑,而且多数农艺性状与转基因阴性对照不存在显著差异,说明中国对虾抗菌肽基因对转基因植株的形态和结实率没有影响。同时,与对照相比,转基因水稻对白叶枯病菌的抗性明显增强,抗菌肽基因 *np3* 和 *np5* 有望成为新的抗病基因源。

抗菌肽具有抗菌谱广、分子量小、热稳定性高和低浓度就能起作用等特点。体外抑菌试验表明低浓度的抗菌肽 *np5* 不仅能抑制革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的生长,而且还对大部分真菌具有强杀伤力^[17]。本研究初步测试了 2 个转 *np5* 基因株系对水稻白叶枯病菌 3 个生理小种的抗性,结果显示其中转基因株系 8052 对所测的 3 个生理小种均具有高水平抗性,这与体外抑菌试验证明的 *np5* 具有广谱抗性一致,然而另一个转基因株系 8049 对菌株 OS-225 的抗性并不明显,并且对 CR4 和 ZHE173 抗性也不如转基因株系 8052。这可能与 *np5* 在水稻中的整合位点有关,另外也可能是转基因过程中水稻基因组自身一些抗病相关基因发生遗传变异引起的,同时也不能排除在转基因阳性植株中混杂了一些假阳性植株。

理论上,转 *np5* 基因水稻不仅能提高水稻对白叶枯病的抗性,还能提高水稻对其他病害的抵抗力。未来我们还需要增加更多白叶枯病菌生理小种的代表菌株进一步验证转基因株系 8052 的抗谱,明确该基因的表达和抗性之间的对应关系;另一方面,我们将检测该转基因株系对其他水稻病害特别是纹枯病和稻瘟病的抗性,明确转 *np5* 基因水稻对不同病害的抗菌谱。

参考文献:

[1] Mew T M. Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice. *Ann Rev Phytopathol*, 1987, 25: 359-382.

[2] Nino-Liu D O, Darnielle L, Bogdanove A J. A simple method of mass inoculation of rice effective for both pathovars of *Xanthomonas oryzae*, and the construction of comparable sets of host cDNA libraries spanning early stages of bacterial leaf blight and bacterial leaf streak. *J Phytopathol*, 2005, 153: 500-504.

[3] Xu S J, Cao Y L, Li X H, et al. Expressional and biochemical characterization of rice disease resistance gene *Xa3/Xa26* family. *J Integr Plant Biol*, 2007, 49: 852-862.

[4] Babu R M, Sajeena A, Samundeeswari A V, et al. Induction of bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) resistance in rice by treatment with acibenzolar-S-methyl. *Ann Appl Biol*, 2003, 143: 333-340.

[5] 章琦. 水稻白叶枯病抗性的遗传及改良. 北京, 科学出版社, 2007: 130-177.

[6] 章琦. 中国杂交水稻白叶枯病抗性的遗传改良. 中国水稻科学, 2009, 23(2): 111-119.

[7] Shah J M, Raghupathy V, Veluthambi K. Enhanced sheath blight resistance in transgenic rice expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. *Biotechnol Lett*, 2009, 31: 239-244.

[8] Takakura Y, Che F S, Ishida Y, et al. Expression of a bacterial flagellin gene triggers plant immune responses and confers disease resistance in transgenic rice plants. *Mol Plant Pathol*, 2008, 9: 525-529.

[9] Coca M, Penas G, Gomez J, et al. Enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* conferred by expression of a *cecropin A* gene in transgenic rice. *Planta*, 2006, 223: 392-406.

[10] Jenssen H, Hamill P, Hancock R E. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19: 491-511.

[11] Gennaro R, Zanetti M, Benincasa M, et al. Pro-rich antimicrobial peptides from animals: structure, biological functions and mechanism of action. *Curr Pharm Des*, 2002, 8: 763-778.

[12] 黄大年, 朱冰, 杨炜, 等. 抗菌肽 B 基因导入水稻及转基因植株的鉴定. 中国科学: C 辑, 1997, 27(1): 55-62.

[13] Patkar R N, Chattoo B B. Transgenic *indica* rice expressing ns-LTP-like protein shows enhanced resistance to both fungal and bacterial pathogens. *Mol Breeding*, 2006, 17: 159-171.

[14] Cuthbertson B J, Bullesbach E E, Gross P S. Discovery of synthetic penaeidin activity against antibiotic-resistant fungi. *Chem Biol Drug Des*, 2006, 68: 120-127.

[15] Destoumieux D, Munoz M, Bulet P, et al. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57: 1260-1271.

[16] Kang C J, Wang J X. Molecular cloning and expression analysis of Ch-penaeidin, an antimicrobial peptide from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16: 513-525.

[17] Kang C J, Xue J F. Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol Immunol*, 2007, 44: 1535-1543.

[18] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, 6: 271-282.

[19] 卢扬江, 郑康乐. 提取水稻 DNA 的一种简易方法. 中国水稻科学, 1992, 6(1): 47-48.

[20] 华志华, 汪晓玲, 薛锐, 等. Cecropin B 转基因水稻及其后代抗白叶枯病研究初报. 中国水稻科学, 1999, 13(2): 114-116.