

海岛棉 *GbNPR1* 基因全长 cDNA 的克隆及其在烟草中的表达

王旭静¹, 窦道龙², 王志兴¹, 贾士荣¹

(¹中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081; ²中国矿业大学, 徐州 221008)

摘要: 【目的】为棉花抗黄萎病基因工程育种提供新的基因源。【方法】以海岛棉为材料, 利用同源序列法和 RACE 技术克隆海岛棉中 SAR 途径的主要抗病信号元件 *NPR1* (none expresser of *PR* gene) 的全长 cDNA 序列。【结果】推导的氨基酸序列与已知 *NPR1* 的同源性较低 (39%~57%), 但在功能区的同源性较高 (79.2%), *GbNPR1* 蛋白中含有 BTB 和锚蛋白重复序列结构域, 且在起始密码子上游存在 2 个 W 框。在拟南芥中, *A. tNPR1* 起始密码子上游有 3 个 W 框, 对诱导 *NPR1* 的表达和激活 *NPR1* 介导的植物防卫反应至关重要, 锚蛋白重复序列则是 *NPR1* 实现其功能必不可少的。构建了组成型植物表达载体, 通过农杆菌介导法导入烟草, 转基因植株经 PCR 和 Southern 杂交检测, 表明目的基因已整合到烟草基因组中。离体叶片接种法对转基因烟草进行抗病性鉴定, 表明对烟草赤星病菌 (*Alternaria alternata*) 的抗性有明显提高。转基因烟草经 T₁ 代遗传分析发现, 基因以单拷贝插入。【结论】本研究得到的基因为海岛棉中 *NPR1* 的同源基因。

关键词: 海岛棉; *NPR1* 基因; 转基因烟草; 赤星病; 抗病性

Cloning Full-Length cDNA of *GbNPR1* Gene from *Gossypium barbadense* and Its Expression in Transgenic Tobacco

WANG Xu-jing¹, DOU Dao-long², WANG Zhi-xing¹, JIA Shi-rong¹

(¹ Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

²China University of Mining and Technology, Xuzhou 221008)

Abstract: 【Objective】The purpose of this study is to find a new gene resource for cotton *Verticillium* wilt-resistance genetic engineering. 【Method】*G. barbadense* var. 7124 was used as a starting material to clone the full-length cDNA of *NPR1* (none expresser of *PR* gene)- *GbNPR1* which is a key regulator in SA (salicylic acid)-mediated systemic acquired resistance (SAR) by homologous cloning and RACE techniques. 【Result】In the *GbNPR1* molecule, there are two “W- boxes” in the upstream of ATG that are necessary for both induction of *NPR1* transcription and *NPR1*-mediated activation of plant defense responses. The deduced amino acid sequence of *GbNPR1* has low homology (39%-57%) to the other known *NPR1* proteins; however, they have higher homology (79.2%) in the functional domain. *GbNPR1* contains the BTB and ankyrin repeat domain that is known to be the molecular basis for *NPR1* function in *Arabidopsis*. Plant expression vector harboring *GbNPR1* gene was constructed and transferred into *Nicotiana tabacum* var. NC89 via *Agrobacterium*-mediated gene transfer. PCR and Southern-blot analysis indicated that the gene has been integrated into tobacco genome. *In vitro* leaf-disease challenge test of transgenic plants by inoculation of *Alternaria alternata* demonstrated that the transgenic plants over expressing *GbNPR1* shown enhanced resistance compared with the non-transgenic plants. Genetic analysis of transgenic T₁ indicated that inserted gene is one copy. 【Conclusion】All of the results indicated that the obtained gene is the homologous gene of *NPR1* gene in *G. barbadense*.

Key words: *Gossypium barbadense*; *NPR1* gene; Transgenic tobacco; *Alternaria alternata*; Disease resistance

收稿日期: 2005-07-14; 接受日期: 2006-02-15

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2004AA212103)

作者简介: 王旭静 (1974-), 女, 河北保定人, 助理研究员, 博士, 主要从事植物基因工程工作。Tel: 010-62133685; Fax: 010-62130148; E-mail: wxjdbq@sohu.com。通讯作者贾士荣 (1937-), 男, 江西无锡人, 研究员。研究方向为植物基因工程。Tel: 010-62130143; E-mail: jiasr@mail.caas.net.cn

0 引言

【本研究的重要意义】系统获得性抗性 (systemic acquired resistance, SAR) 的研究为抗病基因工程提供了新思路。克隆棉花 SAR 途径的主要抗病信号元件 NPR1 (none expresser of PR gene) 可以为棉花抗黄萎病的基因工程提供新的基因源, 并为探索通过 NPR1 调控 SAR 途径、培育抗黄萎病棉花品种的可行性提供依据。【前人研究进展】NPR1 最早是从拟南芥中克隆的, 研究发现它是 SAR 途径中的主要调控基因, 其功能定位在 SAR 信号转导级联反应中的水杨酸 (salicylic acid, SA) 积累和随后的 SAR 基因表达之间。NPR1 本身没有抑菌活性, 但它能诱发植物体内的多种防卫反应, 且对病原菌没有严格的种属专一性, 可使植物产生广谱抗性。研究发现, 过量表达 NPR1 能提高植物对多种病原菌的抗性, 如过量表达 NPR1 基因的转基因拟南芥对细菌 *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* es4326 和卵菌病原菌 *Peronospora parasitica* Noco 的侵染产生抗性, PR-1 等 PR(pathogenesis related) 蛋白的表达量也提高^[1]。拟南芥的 NPR1 与哺乳动物的转录调控蛋白 I-kB[I(kappa)B]具有一定的同源性和相似的结构, 均含锚蛋白重复序列 (ankyrin repeats, ANK) 和行使功能所必须的磷酸化 Ser 残基, 据此认为 NPR1 是哺乳动物 I-kB 的同源物, 推测其作用机理也类似^[2]。通过对不同植物防卫反应和突变体关系的研究, 发现 NPR1 是防卫反应下游的一个多功能调节子。NPR1 不但是 SAR 途径中的主要信号元件, 在细胞核中作为正调控因子促进依赖于 SA 的 PR 基因的表达^[3], 而且还可在细胞质中参与由茉莉酮酸和乙烯介导的诱导性系统抗性 (induced systemic resistance, ISR) 途径^[4]。【本研究切入点】海岛棉的抗病性明显优于陆地棉和中棉, 特别对黄萎病表现免疫^[5]。【拟解决的关键问题】鉴于 NPR1 在植物抗病途径中的重要性和海岛棉的高抗黄萎病性, 本研究以海岛棉 7124 为材料, 利用同源序列法和 RACE 技术克隆了海岛棉中的 *GbNPR1* 基因。构建植物表达载体, 通过农杆菌介导法转化烟草, 对海岛棉 NPR1 在抗病基因工程中应用的可能性进行了探讨。

1 材料与与方法

1.1 植物材料

海岛棉 7124 种子由本实验室保存。将种子播种于营养钵中, 当幼苗具有 2 片真叶时, 用浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

的 SA 涂抹第一真叶, 48 h 后采集非处理部位的子叶或第二真叶, 液氮速冻后置 -70°C 冰箱中储存备用。

1.2 方法

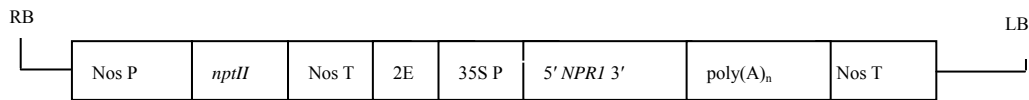
1.2.1 *GbNPR1* 基因片段的克隆 利用改良的 CTAB 法提取棉花 DNA, 同时根据已知 NPR1 的保守序列设计简并引物 p-F1 (5'-AGG CAC(T) TT(G)G AC(T)T CNG ATG ATA(G) TT(A)G A-3'), p-R1 (5'-TCC(T) C(T)TC(A, T) CG(T)C ATA(C) GCA GCA AT(T)G(A) TGA AG-3'), 通过 Touch-Down PCR 扩增基因片段。PCR 反应条件为: 94°C 变性 5 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1 min, 2 个循环; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min, 2 个循环; 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 1 min, 2 个循环; 94°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 1 min, 2 个循环; 94°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 5 min。

1.2.2 全长 *GbNPR1* cDNA 的克隆 根据得到的基因片段设计特异引物 p-F2 (5'-TAACTTTGGATGATGCTACTGCACTCCAT-3')。参考 3'RACE (TaKaRa, Japan) 试剂盒说明书, 以 3 Sites Adaptor Primer (5'-CTGATCTAGAGGTACCGG ATCC-3') 和 p-F2 为引物, 以棉花叶片 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板, PCR 扩增得到 *GbNPR1* 3'末端产物。PCR 反应条件为: 94°C 变性 5 min; 94°C 30 s, 66°C 30 s, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 延伸 5 min。同理, 根据 GeneRacerTM RACE Ready cDNA 试剂盒 (Invitrogen, USA) 说明书, 首先对叶片 RNA 进行脱磷、脱帽, 然后在 5'末端加上 GeneRacerTM RNA Oligo, 利用 SuperScriptTM 反转录酶, 以 oligo dT 为引物进行反转录, 最后以 5'RACE 引物 (5'-CGACTGGAGCAGGAGACT GA-3') 和 p-R2 (5'-TGCCTTACCATCAGAGAGAGACT-3') 和 p-R3 (5'-GGACACTGACATGGACTG AAGGAGTA-3') 和 p-R3 (5'-ACAGTGGAAAGCAA CCACGAGGAT-3') 进行嵌套 PCR 得到 5'末端产物。PCR 反应条件为: 94°C 变性 4 min; 94°C 45 s, 64°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 延伸 5 min。RACE 得到的产物连接到 pMD18T- Vector (TaKaRa, Japan) 上, 筛选鉴定阳性克隆, 并进行序列测定。用 DNAMAN 软件分析组装 5'和 3'序列以获得 *GbNPR1* 全长 cDNA。

1.2.3 植物表达载体的构建 根据获得的海岛棉 NPR1 cDNA 序列, 分别设计引物 p-F3 (5'-GGCCTCGAGATG GCTTATTTGTCTGAGCCA TCATCT-3') 和 p-R4 (5'-CGTCTCGAGTCACAATTT

CCTATACTTGTAGG-3')。为方便载体构建,在 p-F3 的 5'端和 p-R4 的 3'端引入 *XhoI* 酶切位点。以叶片 RNA 反转录得到的第一链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应条件为: 94℃ 变性 4 min; 94℃ 45 s, 62℃ 45 s, 72℃ 1.5 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。目的基因片段连接到 pMD18-T-Vector 中,获得 pMDNPR1,用 *XhoI* 酶切 pMDNPR1 质粒,回收 *GbNPR1* 基因片段备

用。用 *EcoRI/HindIII* 酶切 pBI121 和 pTΩ4A, 分别回收 12 kb 和 1.4 kb 大小的条带, 连接后构成中间载体 pB4A。用 *XhoI* 酶切此中间载体, 回收 13.4 kb 大小的条带, 与 *GbNPR1* 片段重组成植物表达载体 pFNPR1。*GbNPR1* 基因由带有两个 enhancer 的 CaMV 35S 启动子驱动, 3'末端为 poly(A)_n 尾巴和 NOS 终止子(图 1)。



Nos P: 胭脂碱合成酶基因 *Nos* 的启动子; *nptII*: 新霉素磷酸转移酶基因, 提供卡那霉素抗性; Nos T: 胭脂碱合成酶基因 *Nos* 的终止子; 2E: 两个花椰菜花叶病毒 CaMV 35S 增强子; 35S P: 花椰菜花叶病毒 CaMV 35S 启动子; RB: T-DNA 右边界; LB: T-DNA 左边界
Nos P: Nopaline synthase gene *Nos* promoter; *nptII*: coding for neomycin phosphotransferase II, as a selective marker; Nos T: Nopaline synthase gene *Nos* terminator; 2E: Two enhancers of cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S; 35S P: CaMV 35S promoter; RB: T-DNA right border; LB: T-DNA left border

图 1 植物表达载体 pFNPR1 示意图

Fig. 1 Diagram of plant expression vector pFNPR1

1.2.4 烟草的遗传转化及转基因烟草的 PCR 和 Southern blot 检测 用冻融法将 pFNPR1 导入根癌农杆菌 LBA4404, 叶盘法转化烟草品种 NC89。随机挑选再生植株, 提取基因组 DNA, 进行 PCR 和 Southern blot 检测。PCR 检测: 以 p-F3 和 p-R4 为引物, 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。取 PCR 阳性植株基因组 DNA 10 μg, 用 *XhoI* 彻底消化, 毛细管法转移到 HybondTM-N⁺膜上, 以 *GbNPR1* cDNA 为模板制备探针, 进行 Southern 杂交, 具体操作参考 Sambrook 等^[6]。

1.2.5 转基因烟草的抗病性鉴定 转基因植株的抗病性鉴定采用离体叶片接种法: (1) 烟草赤星病菌的培养: 用接种针挑取赤星病菌培养物, 重新接种于马铃薯固体培养基 (PDA 培养基: 2% 马铃薯薯块; 2% 蔗糖; 2% 琼脂) 上, 置 25℃ 培养箱中暗培养。(2) 孢子制备: 在生长 2 周的赤星病菌原菌平板上加入 2 ml 灭菌的蒸馏水, 过夜, 收集孢子, 镜检调整孢子浓度为 $5 \times 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$ 。(3) 取长势良好、均一的 15 株转基因 *GbNPR1* 的烟草植株和 10 株受体烟草 (对照) 用于检测, 摘取顶部第 3 片叶, 叶背朝上置于无菌的湿纱布上, 用石英砂制造微伤, 于伤口处接种 10 μl 孢子悬浮液, 接种 24 h 内, 保持 100% 的相对湿度。(4) 接种后 1~7 d 调查发病情况。待所选植株长出新叶后重复接菌试验, 共重复 3 次。

1.2.6 转基因烟草 T₁ 代的遗传分析 选取抗病性较好的转基因烟草 5[#] 和 8[#] 为材料进行 T₁ 代的遗传分析。

T₁ 代种子经 0.7% 次氯酸钠灭菌 10 min, 播种于 MS0 + Kan (100 mg·L⁻¹) 培养基上萌芽, 1 个月后观察植株的生长情况, 分别统计抗性和非抗性植株数, 进行卡平方测验。

2 结果与分析

2.1 海岛棉 *NPR1* 全长 cDNA 的克隆

设计简并引物进行 PCR 扩增是常用的同源序列克隆技术。目前已知的 *NPR1* 基因较少, 已报道的有拟南芥、烟草、番茄、水稻、和玉米中的 *NPR1* 基因序列。同源性比较发现, 这些基因的同源性较低。我们以拟南芥 *NPR1* 基因序列 BLAST 植物的 EST 库, 共获得 4 种不同植物的 EST 序列, 比对已知 *NPR1* 基因的核苷酸序列进行同源性分析, 发现两处高度保守。遵循 3'端变异尽量少的原则, 分别设计了正向简并引物 p-F1 和反向简并引物 p-R1, 预期 PCR 产物大小为 208 bp。

以海岛棉 7124 基因组 DNA 为模板, 采用 Touch-Down PCR 技术扩增得到了 1 条大约 200 bp 的条带, 与预期片段大小一致。将得到的 DNA 片段测序后进行同源性比较发现, 此核苷酸序列与拟南芥 *NPR1* 相应片段的同源性为 66.4%, 推导的氨基酸序列与已知 *NPR1* 蛋白的同源性也较高, 达 70% 左右, 由此可以初步认为此片段是海岛棉的 *NPR1* 基因片段。然后利用 3'RACE 和 PCR 扩增得到 1 条 1 kb 左右的条带,

5'RACE 和 PCR 扩增得到 1 条 1.4 kb 左右的条带, 测序表明它们分别是 *NPR1* 基因的 3'和 5'端序列, 经 DNAMAN 软件分析后拼接得到了 *GbNPR1* 基因的全长 cDNA 序列。

2.2 *GbNPR1* 的序列分析

本研究得到的 *GbNPR1* 基因的 cDNA 全长为 2594 bp, 其中 5'非翻译区 618 bp, 开放阅读框 1764 bp (编

码 587 个氨基酸, 分子量约为 65 kD), 终止密码子为 TGA, 3'非翻译区 213 bp (图 2)。推导的氨基酸序列与已知 *NPR1* 的同源性较低, 与拟南芥 (AAM65726)、烟草 (AF480488) 和番茄 *NPR1* (AAT57637) 的同源性分别为 39%、45%和 44%; 与水稻 (BAC10768)、玉米 (AAT24362) *NPR1* 的同源性分别为 57%和 47%。但在功能结构域部分的同

```
AAGCTTTGATCTTTTTGACAAAGTCATTTTTCTGCATCTTTATAGAGCTAATTAGTGGAATATTTATGGGTTTCTTTCTTTTAGGATCTGATTCCTGGTCTCTTTAAAACTT
TTCTTTCTCTAGTCTTTTTCTTTTTGATTTCTTTTTTCCCACTTATTATGTCATTGAAAGGTTGGAAATCAAGCAAGTTGTATTTTATGCTTTCATTATAATGT
TTCCGCCATGTGTTTAGTAAATAACTCTCTAAAAAATCAATTGGAATTTCTGTTTCCACTTGTGTTCCATAAAATTTATGATGATATCAGTCCAGAGATTCAGTTTG
AGTATTGTTGTCTGAATACTCATTTCTGAAAAGGAAAAAACCAAAATATAGGAATAATGTAGTATTGTACTTTGTTTAACAATACTATTTCGGATTGTACGCAGTT
TCTTTACATTTAGCTTCGAGATTAGTTTCTTTATGTTTTTCTGTTGGCTCAATAGCAATAAGAGTTGGATTTTGGGACCACGGTTGGATTTCTTGTTCATGAAGTAAG
CTTTTGTCAAGATTTATGGCTTATTGCTGAGCCATCATCTTCTTGTAGTTTCAAGTTTCTCTCATCTATCAAATGGCTCAATCACTCACAATATACCCCTTTTCTGTTCCT
      M A Y L S E P S S S L S F S S S S H L S N G S I T H N I P P F S V P
GAACTGGGCTAACCTGAAGCTTAAAGTTGACCAAGCTCAGCTCAGTTGGAGCAACTAATTGTTGGCAATTGCTGTTTTAGTGTATGCTGATAGTTGTTGAAGTGTGCT
E T G A N L E A L S L T K L S S S L E Q L I V G N C P V F S D A G I V V E G V A
GTCGGTTCATAGATGATTTTAGCTGTAGGAGTAAGTTTTCAATGAGTTTTTAAGGAAGGATCTGGTCTTCTGAGAAGATGGAAAGCAAGTTATAACATGCTCAGTTGTTG
V G V H R C I L A V R S K F F N E V F K E G S G S S E K D G K P S Y N M S E L L
CCTATGCAAGATTGGACTGAAGCTTTTCAGGTGTTCTTAAGTATTTGTATACTGGAAGCTCAAGCCTTCTCCTATGGAGTTTCAACTGTGTGCGATAATGTTGTCATGAT
P Y G K I G L E A F Q V F L S Y L Y T G K L K P S P M E V S T C V D N V C A H D
GCTGTGCGACCCCAATAAGTTTCGCTGTGGAGTTGATGTATGCATCATCCATATTTCAAATACTGGAGCTTGTCCACTTTTTAGCGGGGCTTCTTAECTTGTGAGAAGGCTCTC
A C R P A I S F A V E L M Y A S S I F Q I L E L V P L F Q R R L L N F V E K A L
CTAGAGGATATCATCCAATCTCGTGGTGTCTTCCACTGTCAATGCAGTCAACTAGTTTCTCAATGTGTTGATAGAGTAGCAAGTCGGATCTTGATAGCATCTGATCAGAGAAGGAG
L E D I I P I L V V A F H C Q C S Q L V S Q C V D R V A R S D L D S I C I E K E
CTTCTTATGAAGTTATGGAGAGTATTCGGTTGCTTCGCCGAAGTCTCCCTGATGGTGAAGCAATGAGGCAGTGGTGTATCCTTCGCGAGAGAAAAGAAATTCGGAGAATACATAAA
L P Y E V M E S I R L L R R K S P S D G E G N E A V V D P S R E K R I R R I H K
GCATTGGATCTGATGATGCGAAGTTGTAATACTTTAACCGAGTCTGACATAACTTTGGATGATGCTACTGCATCCATTATGCTGCAGCATTATGACCCCAAGTTGCTCTCT
A L D S D D V E L V K L L L T E S D I T L D D A T A L H Y A A A Y C D P K V V S
GAGGTTCTTGCCCTCGCCTGGCTGATGCAATCTCGGAATTTCTGTGGTTACACAGTTCTTACATAGCTGCAATGCGAAAAGAACCATCAGTGATAATGGCACTTCTAGCAAAAGGG
E V L G L R L A D V N L R N S R G Y T V L H I A A M R K E P S V I M A L L A K G
GCATCTGCTTCAACTGACATTGGATGGACAAAGTCTGTTAACACTGCGGAGGTTGACAAGCAAAAGGATTATCATGCCAAGCGAGCAAGGGAAGAAAGCAATAAAGACCGG
A S A S T L T L D G Q S A V N I C R R L T R P K D Y H A K T E Q G K E T N K D R
ATATGCATTGATATTTAGAGAGGGAAATGAGGAGAAATCCAATGGCTGGAGATGTTCTGTTGCTTCCCATGCAATGTCTGATGATCTGCATACGAGACTTCTGTACCTAGAGAATCGA
I C I D I L E R E M R R N P M A G D V S V A S H A L S D D L H T R L L Y L E N R
GTGGCATTGGCAAGTTACTTTTCCCTAGTGAAGCAAACTTGCCATTGACATAGCACATGCCAAAACCTCCGAGTTAGCTACTGCTTTCCATCAAAAGTTCAAAATAGAACTTA
V A L A R L L F P S E A K L A I D I A H A E T T S E L A T V F P S K G S N R N L
AGGCAGTTGATTGAATGAGACCCATTATGCAGAAGCAAAGACTTCTGCTAGGATGCAAGCCCTTATGAAAACAGTGGAGATGGTCCGTTGCTATTTCCTCATTGCTCAGAAGTG
R Q V D L N E T P I M Q K Q R L L A R M Q A L M K T V E M G R C Y F P H C S E V
CTCGATAAGTTTATGGAGGATGACCTTCTGATTGTCTTACCTTACCTGAGACAGGACCCCGGAAGAGCAAAAGATAGAGATCAGCTTCCAGGAGCTTAAAGGAGGACGTTCAAGGGCA
L D K F M E D D L P D L S Y L E T G T P E E Q K I E R S R F R E L K E D V Q R A
TTAAGAAGGACAAGGCCGAGTTAACCGCAACGTTTGTCTTATCATCATCGTCTCTTCTTGTGAGATGGTGGCCCTACAAGTATAGGAAATTGATTATATCGGTAAGGATT
F K K D K A E F N R N G L S S S S S S S S L R D G G P Y K Y R K L *
CTTGTGAGTAAAACCTATAACTTCTCTGCTTCTGCTACTACTGTTGCCAGGATAACTGTTTGATAACCTATCTCTGGTGATAAAGTAACCAAACCTTATACATACACCATTA
GATCTATAGGAAGTTTATGTTCTTAGTGCCTTAGAGAACTATGATAATAGAAATTTCCAAAAA
```

黑框部分为 W 框; 阴影部分为锚蛋白重复序列; 下划线部分为 BTB 结构域; 起始和终止密码子以黑体表示
Two black boxes indicate the "W-box"; Shaded frame indicates ankyrin repeat sequence; The BTB domain is underlined; ATG and TGA are bolded

图 2 海岛棉 *GbNPR1* cDNA 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of *GbNPR1* full-length cDNA and deduced amino acid sequence

GbNPR1MAYLSEFSSLSFSSSHLNSSTHNIPIPPFVETGANLEPISLTKLS	49
ArabidopsisMDITLDGPAESYEISSISFVAITNIDSSIVYLAABCVLITGPIVTHQLSNS	52
tobaccoMNSRTAFSDSNISGSSSICCGGMEFFSPETSPAETISLGHSETLES	52
TomatoMDGRTAFSDSNISGSSSICCMNES.....ETSLADVNSLGHSETLES	44
MaizeMEPSSSITFASSSSYLNSGSSPCVSLAPPFGAVAAQAAPVAAIEGGGCGCGCGSSSVEVSLNRLSANLERLLDSDCCSDAD	84
rice	MEPRAVWVIAEPSSSITFASSSSYLNSGSSPCVSLAPPFGAVAAQAAPVAAIEGGGCGCGCGSSSVEVSLNRLSANLERLLDSDCCSDAD	100
GbNPR1	SSLEQLVGNCPVSDAGIVWGVAVGVRHRCILAVRSKFFNMFVKESCSSEKDKPSYMSBELPYCKITGLEAFQVLS...NLYICKLKEPVMVETIC	146
Arabidopsis	PESVDFSPDYPYSLAKLVSDGREVSEFHRVLSAASSFPKSAALAAKKEKDNNTAAVKL...EIKELPKOYEVGSDSVIVLAVYSEFVPEPEKGVSEIC	150
tobacco	IPTDAGLPEFDYFALAKLVSGPCKEIEFVHRCILSARSFPFKNLFCKCKEKN.....SSKVEIKEMKHEVSLDAVSVLAVNLSKGVPEPEKLVVVC	145
Tomato	IPTDAGLPEFDYFALAKLVSGPCKEIEFVHRCILSARSFPFKNLFCKCKSST.....KL...EIKELPKOYEVSEDAVSVLAVNLSKGVPEPEKLVVVC	134
Maize	VDVDFGCPVPIHRCILPAASDFFTLFAARGFAAARGDAACGVAABGAASGRPRYKMELEPPACRVRGFAFCAIIG...NLYICKLKEPVMVIVVC	181
rice	VDVDFGCPVPIHRCILPAASDFFTLFAARGFGDGAAGGGGGGGGGGGERTGGPRYKMELEPPACRVRGFAFCAIIG...NLYICKLKEPVMVIVVC	197
GbNPR1	VDNVQCHDCEPAPISPAVELMVAASSTFQELIVLPLGRLLNFRVRLLELITLPLVWAFHCQCSQLVSCVLRVAASCLDSICIEKELPYVEMESIRLL	246
Arabidopsis	ADNVCCHWQCEPAPVCFVLEVIYAFPIEPEEIVILYCFELLDVVKVVLBDILVILKQANICGKACMKLLDRCKEILVKNVDVSLKSLPEELVKEILL	250
tobacco	VDNVQCHWQCEPAPVCFVLEVIYAFPIEPEEIVILYCFELLDVVKVVLBDILVILKQANICGKACMKLLDRCKEILVKNVDVSLKSLPEELVKEILL	245
Tomato	VDNVQCHWQCEPAPVCFVLEVIYAFPIEPEEIVILYCFELLDVVKVVLBDILVILKQANICGKACMKLLDRCKEILVKNVDVSLKSLPEELVKEILL	234
Maize	ADVFCHEDECPAPISPAVELMVAASSTFQELIVLPLGRLLNFRVRLLELITLPLVWAFHSLGTQVVDKICIRIARSLDDISLILKELPPFAVDEIKNL	281
rice	ADVFCHEDECPAPISPAVELMVAASSTFQELIVLPLGRLLNFRVRLLELITLPLVWAFHSELTPVLEKICIRIARSLDDVSLILKELPPFAVAVKIKET	297
GbNPR1	RRKSPDCEGNAEWLPSREKIRIRIKALFSDVEIVKLLHSESDITLDAALHVAAYYODKRVSEVILGRLEAVNLRNSRGVTLHVAAMRKEPFSV	346
Arabidopsis	DRRKEIGLQCEPNSGFPCKVW...KAVS...NVKALFSDVEIVKLLHSESDITLDAALHVAAYYONVKTATLILKLLDVAHFRNFRGVTLHVAAMRKEPFL	344
tobacco	DSRAELGLQCEPNSGFPCKVW...RIFRALSDEIVKLLHSESDITLDAALHVAAYYODKRTTAEILLDLDLADINHQNSRGVTLHVAAMRKEPFI	343
Tomato	DSRAELGLQCEPNSGFPCKVW...RIFRALSDEIVKLLHSESDITLDAALHVAAYYODKRTTAEILLDLDVAHFRNFRGVTLHVAAMRKEPFI	332
Maize	RKKSQIACDIFITSDPVH.EKR/RIFRALSDEIVKLLHSESDITLDAALHVAAYYODKRVSEVILDLAVANLNKNSRGVTLHVAAMRKEPFI	380
rice	RKKSQIACDIFITSDPVH.EKR/RIFRALSDEIVKLLHSESDITLDAALHVAAYYODKRVSEVILDLAVANLNKNSRGVTLHVAAMRKEPFI	396
GbNPR1	IMPLKAKAASSTLALGCSAMTICRILRRTKTYNKKVQCEKSNKDRICITLDREMRKVAEDVTSVPLADHHRILLLENVAAPRILPPEEA	446
Arabidopsis	IISLTKGCAASSTLALGCSAMTICRILRRTKTYNKKVQCEKSNKDRICITLDREMRKVAEDVTSVPLADHHRILLLENVAAPRILPPEEA	444
tobacco	VVSLTKGCAASSTLALGCSAMTICRILRRTKTYNKKVQCEKSNKDRICITLDREMRKVAEDVTSVPLADHHRILLLENVAAPRILPPEEA	443
Tomato	IIVSLTKGCAASSTLALGCSAMTICRILRRTKTYNKKVQCEKSNKDRICITLDREMRKVAEDVTSVPLADHHRILLLENVAAPRILPPEEA	432
Maize	IMPLKAKAASSTLALGCSAMTICRILRRTKTYNKKVQCEKSNKDRICITLDREMRKVAEDVTSVPLADHHRILLLENVAAPRILPPEEA	480
rice	IMPLKAKAASSTLALGCSAMTICRILRRTKTYNKKVQCEKSNKDRICITLDREMRKVAEDVTSVPLADHHRILLLENVAAPRILPPEEA	496
GbNPR1	ILNITLTHAEITLSELAIVFPEKSSNFRNLQVILNEITIMCKQRLLRMLALNKVBEGRYFPCSEVILKEMEDLPLDLSYLETGPE...EQLIKR	541
Arabidopsis	QANIEPEMCGEPEFIVISLEPRRLIGIKRTSPGKCIAPFRILLEHCSRLAKELKVEIKGRFFPCSEVILKEMEDLPLDLSYLETGPE...EQLIKR	544
tobacco	KVAVGLQVDCISPEPLASIGKQMANARITVILNEIEFVKKEELNRLALSRIVBCKRFFPCSEVILKEMEDLPLDLSYLETGPE...EQLIKR	542
Tomato	KVAVGLQVDCISPEPLASIGKQMANARITVILNEIEFVKKEELNRLALSRIVBCKRFFPCSEVILKEMEDLPLDLSYLETGPE...EQLIKR	531
Maize	KVAVGLQVDCISPEPLASIGKQMANARITVILNEIEFVKKEELNRLALSRIVBCKRFFPCSEVILKEMEDLPLDLSYLETGPE...EQLIKR	579
rice	KVAVGLQVDCISPEPLASIGKQMANARITVILNEIEFVKKEELNRLALSRIVBCKRFFPCSEVILKEMEDLPLDLSYLETGPE...EQLIKR	593
GbNPR1	SRFRELKEDVRAVYKDAEENRACLSSESSSSSLRDYGFVGRGL	587
Arabidopsis	YMEIQEILKAFTEDELELGNLSLITISSTKSTGCKSNRKFGR	592
tobacco	YMEIQEILKAFTEDELELGNLSLITISSTKSTGCKSNRKFGR	588
Tomato	YMEIQEILKAFTEDELELGNLSLITISSTKSTGCKSNRKFGR	576
Maize	MRFCLEKEDVRAVYKDAEENRACLSSESSSSPPCKVAKK	621
rice	MRFCLEKEDVRAVYKDAEENRACLSSESSSSPPCKVAKK	635

图 3 海岛棉、烟草(AF480488)、拟南芥(AAM65726)、玉米(AAT24362)、水稻(BAC10768)、番茄 (AAT57637) NPR1 氨基酸序列的同源性比较

Fig. 3 Comparison of amino acid sequence of GbNPR1 with tobacco (AF480488), *A. thaliana* (AAM65726), tomato (AAT57637), maize (AAT24362) and rice (BAC10768) NPR1 proteins

GbNPR1	FIRKALFSDVEIVKLLHSESDITLDAALHVAAYYODKRVSEVILGRLEAVNLRNSRGVTLHVAAMRKEPFSVIMRLLKAGASASTLITCCSAVNI	100
Arabidopsis	NVFRALSDEIVKLLHSESDITLDAALHVAAYYONVKTATLILKLLDVAHFRNFRGVTLHVAAMRKEPFLIISLTKGASASASTLITGRIDAVNI	100
tobacco	FIRKALFSDVEIVKLLHSESDITLDAALHVAAYYODKRTTAEILLDLDLADINHQNSRGVTLHVAAMRKEPFIIVSLLTKGASASASTLITGRKALCI	100
Tomato	FIRKALFSDVEIVKLLHSESDITLDAALHVAAYYODKRTTAEILLDLDLADINHQNSRGVTLHVAAMRKEPFIIVSLLTKGASASASTLITGRKALCI	100
Maize	FIRKALFSDVEIVKLLHSESDITLDAALHVAAYYODKRVSEVILDLAVANLNKNSRGVTLHVAAMRKEPFIIMRLLKAGANVSLITGRSAPICI	100
rice	FIRKALFSDVEIVKLLHSESDITLDAALHVAAYYODKRVSEVILDLAVANLNKNSRGVTLHVAAMRKEPFIIMRLLKAGANVSLITGRSAPICI	100

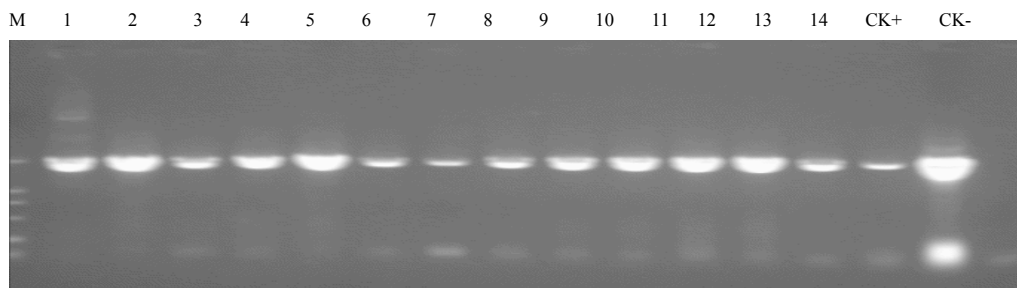
图 4 GbNPR1 与已知 NPR1 在功能域的同源性比较

Fig. 4 Homologous comparison of GbNPR1 and known NPR1 proteins at functional domain

源性较高, 达 79.2% (图 3, 4)。通过在 NCBI 中进行 rpsBLAST (reverse position specific BLAST) 发现, 在 GbNPR1 蛋白中含有 BTB/POZ(第 78~143 位氨基酸, 图 2 中以下划线表示)和锚蛋白重复序列(第 272~373 位氨基酸, 图 2 中阴影部分), 核苷酸序列分析发现在起始密码子上游存在两个 W 框(图 2 中黑框部分)。由此可以断定, 得到的基因是 *NPR1* 在海岛棉中的一个同源基因, 命名为 *GbNPR1*。

2.3 烟草的遗传转化及再生植株的分子检测

用导入植物表达载体 pFNPR1 的根癌农杆菌 LBA4404, 通过叶盘法转化烟草品种 NC89, 获得再生烟草 31 株。对转基因植株 1~14[#]进行 PCR 检测, 发现均有特异条带出现 (图 5); 随机挑选 5 株 PCR 阳性的转基因烟草单株, 提取基因组 DNA 10 μg, 转基因烟草 DNA 用 *Xho*I 彻底酶切。Southern blot 显示, 检测的转基因植株都有特异的杂交带出现 (图 6), 说明 *NPR1* 基因已整合到烟草基因组中。



M: DNA marker; 1~14: 转基因植株 1[#]~14[#]; CK+: pFNPR1 质粒 DNA 为模板; CK-: 受体 NC89 基因组 DNA 为模板
M: Molecular marker; 1-14: Transgenic plants 1[#]-14[#]; CK+: pFNPR1 plasmid DNA as a template; CK-: Genomic DNA extracted from leaf of non-transgenic control NC89

图 5 转基因烟草的 PCR 检测

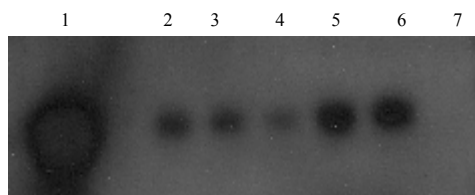
Fig. 5 PCR amplification of *GbNPR1* gene in transgenic tobacco plants

表 转基因烟草的统计分析

Table Statistic analysis of transgenic tobacco

	卡那抗性植株 Kanamycin-resistant plants	卡那非抗性植株 Non-kanamycin-resistant plants	期望分离比 Expected segregation ratio	$\chi^2_{0.05}$
5 [#]	41	12	3:1	0.44
8 [#]	21	13	3:1	3.17

$\chi^2_{0.05}=3.84$



1: Ck+: pFNPR1 plasmid DNA; 2~6: 转基因烟草植株 2[#], 5[#], 6[#], 8[#], 10[#], 1[#]; 7: Non-transgenic control NC89

1: Ck+: pFNPR1 plasmid DNA; 2-6: Transgenic plants No. 2, 5, 6, 8, 10, 1; 7: Non-transgenic control NC89

图 6 转基因烟草的 Southern blot 杂交

Fig. 6 Southern blot analysis of transgenic tobacco

2.4 转基因烟草的抗病性分析

用离体叶片法鉴定转基因烟草对烟草赤星病菌的抗性。对照组所有叶片在接种 2~3 d 后, 接种部位开始坏死, 5 d 时, 接种部位形成黑褐色病斑, 并赘生白色菌丝, 病斑周围变褐 (图 7), 表明烟草赤星病孢子萌发后, 已成功侵染到叶片组织中。供试的转基因烟草中, 5 株转基因烟草 (4[#], 5[#], 6[#], 8[#], 10[#]) 的叶片在接种后 3 d, 接种部位无明显变化, 接种后 5 d, 接种部位轻微坏死, 表现出明显的过敏性坏死反应, 病斑未见进一步扩大 (图 7), 其余 10 株转基因烟草

叶片的表现与对照组差别不明显。



a. 转基因烟草植株 6[#] 的叶片; b. 非转基因 NC89 叶片

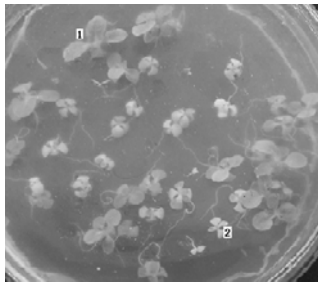
a. Leaf of transgenic tobacco plant No. 6; b. Leaf of non-transgenic control NC89

图 7 转基因烟草抗烟草赤星病菌离体叶片鉴定 (接种后 9 d)

Fig. 7 *In vitro* disease challenge test of leaves of transgenic tobacco plants with *Alternaria alternata* (9 d after inoculation)

2.5 转基因烟草的 T₁代遗传分析

利用植物表达载体上的 Kan 抗性筛选标记对转基因烟草的 T₁代进行遗传分析。在含有 100 mg·L⁻¹ 的 Kan 培养基上生长正常的为抗性植株, 植株黄化为非抗性植株 (图 8), 统计分析结果如表所示。卡平方测验表明, 5[#] 和 8[#] 株系中 Kan 抗性与非抗性植株的分离比符合 3 : 1, 由此推断, 5[#] 和 8[#] 株系中基因均以单拷贝插入。



1. 抗性植株, 生长正常; 2. 非抗性植株, 黄化
1. Kan-resistant plant, normal growth; 2. Kan-sensitive plant, etiolation

图 8 T₁代转基因烟草在 MS0+Kan 上的生长情况

Fig. 8 T₁ transgenic plants growth on MS0 + Kan medium

3 讨论

NPR1 最初是通过筛选拟南芥突变体 (SAR 途径改变) 得到的^[7]。目前已从烟草、番茄、水稻、玉米中克隆了 *NPR1* 的同源基因。经分析发现这些基因的序列同源性较低, 我们通过保守氨基酸序列设计核苷酸简并引物, 从海岛棉基因组 DNA 中克隆到了 *GbNPR1* 的基因片段, 然后利用 RACE 技术得到了全长 cDNA 序列。经比较发现, 它与已知 *NPR1* 基因之间的同源性较低 (39%~57%), 但在功能区的同源性在 70% 以上。

已知拟南芥 *NPR1* 是哺乳动物转录调控蛋白 I- κ B 的同源物, 推测具有类似的作用机理^[2]。I- κ B 是真核生物核因子 NF- κ B (nuclear factor-kappa B) 的抑制剂。I- κ B 分子含有 3~7 个锚蛋白重复序列, 每个重复序列约 33 个氨基酸残基。NF- κ B 是一类具有多功能转录调节作用的核蛋白因子, 存在于多种组织和细胞中, 具有广泛的生物学活性, 激活后参与许多基因的转录调控^[8]。在未受侵染的细胞 (resting cell) 中, NF- κ B 位于细胞质内, 与 I- κ B 单体耦联而无活性 (sequestered), 当细胞受到病原体侵染时, I- κ B 激酶被激活, 使 I- κ B

磷酸化, 随后 NF- κ B/I- κ B 耦联体解聚, NF- κ B 释放并激活防卫基因^[9]。研究发现, *NPR1* 通常位于细胞质内, 通过分子内二硫键形成寡聚体^[10], 当用 SA 处理或病原菌侵染后, 改变细胞内的还原电位 (reduction potential), 促使 *NPR1* 单体化 (mono-merization), 然后这些单体转运至细胞核中, 激活 *PR* 基因的表达^[11]。

拟南芥 *NPR1* 蛋白含 BTB/POZ (Broad-Complex, Tramtrack and Bric a brac) / (poxvirus and zinc finger) 和锚蛋白重复序列 (ANK)^[12]。BTB/POZ 结构域一般由 120 个保守的氨基酸残基组成, 主要位于锌指 DNA 结合蛋白的 N-末端, 如大约有 5%~10% 的 C2H2 型锌指转录因子中含 BTB 结构域 (<http://www.sdbonline.org/fly/newgene/broadcx2.htm>)。ANK 存在于许多蛋白质家族中, 蛋白中 ANK 重复序列的数目可介于 2 到 20 个之间。以往研究表明, BTB 和锚蛋白重复序列参与蛋白与蛋白之间的互作^[13], 推测 *NPR1* 可能通过与其它蛋白的相互作用参与调节 SA 介导的植物防卫反应。现已证明拟南芥中的一种属于 TGA 家族的蛋白质可与 *NPR1* 基因的表达产物相互作用^[14], 通过两者的结合来调节 *PR* 基因的表达。TGA 蛋白属于 bZIP (basic domain/Leu Zipper) 转录因子, 作为正负调节子介导植物的防卫反应^[3]。在拟南芥中, 在无 SA 时, TGA1 以氧化态存在, 两个保守的半胱氨酸 (Cys) 残基形成二硫键。SA 的积累使 Cys 残基被还原, 还原态的 TGA1 能与 *NPR1* 相互作用。两者之间的相互作用增强还原态的 TGA1 特异性地与许多 *PR* 基因启动子区的 SA 调控序列结合, 调控 *PR* 基因的表达^[15]。*NPR1* 除与 TGA 结合外, 还可以与转录因子 WRKY 结合。WRKY 蛋白是一类存在于高等植物中的 DNA 结合蛋白, 能识别防卫相关基因启动子区的、以 TGAC 为核心序列的 W 框^[16], 如烟草 I 型几丁质酶基因 *CHN50* 启动子区的激发子反应元件为一个 W 框, 此 W 框能被病原菌诱导的 WRKY 蛋白特异性地识别^[17]。拟南芥 *NPR1* 启动子中存在 3 个 W-框, SA 诱导表达的 WRKY 蛋白能与这些 W 框特异性结合, 在转录水平对 *NPR1* 的表达进行调控^[18]。笔者用 NCBI 中的 rpsBLAST 寻找所得基因中保守的功能结构域, 发现 *GbNPR1* 的氨基酸序列中含有 BTB/POZ 和锚蛋白重复序列, 其核苷酸序列的起始密码子上游也有 2 个 W 框 (图 2)。基于以上分析, 可以断定笔者得到的基因是 *NPR1* 在海岛棉中的同源基因, 故将其命名为 *GbNPR1*。

以往的抗病基因工程策略是过量表达一个或几个对病原菌有直接毒性作用的蛋白, 赋予植物新的抗病性状。随着对系统获得性抗性的研究, 提出了广谱抗病基因工程策略, 其理论基础是基于 HR (hyposensitive response) 和 SAR, 这一策略可以诱导植物产生多种复杂的防卫反应, 理论上应比导入单个 *R* 基因更为有效, 且能使植物对真菌、细菌、病毒等多种病原物表现抗性^[19]。

NPR1、NDR1(non disease resistance)、EDS1 (enhanced disease susceptibility)、RAR1 (required for Mla-specified resistance)、SGT1 (suppressor of G2 allele of SKP1) 及 Rac1(ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)是目前已经鉴定的几个参与植物防卫反应的信号蛋白。这些蛋白本身对病原物没有毒性或抑制作用, 但作为信号元件参与不同植物防卫反应途径的调控。在水稻中过量表达 *NPR1* 对水稻白叶枯病菌的抗性明显提高^[20]。组成型表达 *OsRac1* 的转基因水稻对水稻稻瘟病表现出很高的抗性^[21]。组成型表达海岛棉 *GbSgt1*、*GbRar1* 和 *GbRac1* 的转基因烟草对赤星病的抗性明显提高^[22, 23]。本研究将 CaMV 35S 启动子驱动的 *GbNPR1* 基因通过农杆菌介导法转入烟草, 使其在转基因烟草中组成型表达, 离体叶片抗病性鉴定表明, 转基因烟草对赤星病的抗性明显提高, 为 *GbNPR1* 在抗病基因工程中的应用提供了实验证据。

在笔者的试验中, 供抗病性鉴定的转基因烟草, 经 PCR 和 Southern 杂交检测, 证明外源基因已整合到烟草的基因组中, 但其中只有部分植株表现出抗性增强, 这可能与不同转基因植株中 *GbNPR1* 的整合位点、整合拷贝数、表达水平等多种因素有关。值得指出的是, NPR1 作为 SAR 抗性途径中的主要信号元件, 过量表达应对多种病原物产生抗性。在本研究中, 目前只对转基因植株接种了真菌病原菌, 有必要进一步研究转基因植株对细菌、真菌或病毒等多种病原物的抗性水平, 以及在病原物侵染后转基因烟草中 PR-1、PR-5 等病程相关蛋白的表达情况。此外, 还需对该基因在海岛棉中的拷贝数、以及棉花经黄萎病菌诱导前后 *GbNPR1* 的表达情况等进行深入研究。

4 结论

本研究首次利用同源序列法和 RACE 技术克隆了海岛棉中的 *GbNPR1* 基因。经农杆菌介导法转化烟草, 转基因烟草对赤星病菌的抗性明显提高, 为 NPR1 在抗病基因工程中的应用提供了新的试验证据。

References

- [1] Cao H, Li X, Dong X N. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *The Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 1998, 95: 6531-6536.
- [2] Aravind L, Koonin E V. Fold prediction and evolutionary analysis of the POZ domain: Structural and evolutionary relationship with the potassium channel tetramerization domain. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 285: 1353-1361.
- [3] Niggeweg R, Thurow C, Kegler C, Gatz C. Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of *as-1*-binding factor ASF-1 and is involved in salicylic acid- and auxin-inducible expression of *as-1*-containing target promoters. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 19897-19905.
- [4] Spoel S H, Koorneef A, Claessens S M C, Korzelius J P, Van Pelt J A, Mueller M J, Buchala A J, Métraux J P, Brown R, Kazan K, Van Loon L C, Dong X N, Pieterse C M J. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*, 2003, 15: 760-770.
- [5] 马存, 简桂良, 孙文姬. 我国棉花抗黄萎病育种现状、问题及对策. *中国农业科学*, 1997, 30(2): 58-64.
Ma C, Jian G L, Sun W J. Status quo, problem, and strategy of Chinese *Verticillium wilt* resistance breeding of cotton. *Scientia Agricultura Sinica*, 1997, 30(2): 58-64. (in Chinese)
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] Cao H, Bowling S A, Gordon A S, Dong X N. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 1994, 6: 1583-1592.
- [8] Baldwin Jr A S. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annual Review of Immunology*, 1996, 14: 649-683.
- [9] Hatada E N, Krappmann D, Scheiderei C. NF- κ B and the innate immune response. *Current Opinion in Immunology*, 2000, 12: 52-58.
- [10] Mou Z, Fan W, Dong X N. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through Redox changes. *Cell*, 2003, 113: 935-944.
- [11] Kinkema M, Fan W, Dong X N. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *The Plant Cell*, 2000, 12: 2339-2350.
- [12] Ryals J, Weymann K, Lawton K, Friedrich L, Ellis D, Steiner H Y, Johnson J, Delaney T P, Jesse T, Vos P, Uknes S. The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor

- inhibitor 1 kappa B. *The Plant Cell*, 1997, 9: 425-439.
- [13] Bork P. Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: Mobile modules that cross phyla horizontally? *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 1993, 17: 363-374.
- [14] Fan W H, Dong X N. *In vivo* interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2002, 14: 1377-1389.
- [15] Lebel E, Heifetz P, Thorne L, Uknes S, Ryals J, Ward E. Functional analysis of regulatory sequences controlling *PR-1* gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 1998, 16: 223-233.
- [16] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, Somssich I E. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 2000, 5: 199-206.
- [17] Yang P Z, Chen C H, Wang Z P, Fan B F, Chen Z X. A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *The Plant Journal*, 1999, 18: 141-149.
- [18] Yu D Q, Chen C H, Chen Z X. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. *The Plant Cell*, 2001, 13: 1527-1539.
- [19] Ryals J A, Neuenschwander U H, Willits M G, Molina A, Steiner H Y, Hunt M D. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 1996, 8: 1809-1819.
- [20] Chern M S, Fitzgerald H A, Yadav R C, Canlas P E, Dong X N, Ronald P C. Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2001, 27(2): 101-113.
- [21] Ono E, Wong H L, Kawasaki T, Hasegawa M, Kodama O, Shimamoto K. Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *The Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 2001, 98: 759-764.
- [22] Li W M, Wang Z X, Zhang Y Q, Jia S R. Over expression of *GbRar1* and *GbSgt1* gene from *Gossypium barbadense* enhances resistance of detached leaves of transgenic tobacco to *Alternaria alternata*. *Progress in Natural Sciences*, 2004, 14(4): 410-416.
- [23] 李为民, 王志兴, 贾士荣. 海岛棉 *GbRac1* 基因过量表达提高转基因烟草离体叶片对赤星病的抗性. *农业生物技术学报*, 2004, 12: 353-356.
- Li W M, Wang Z X, Jia S R. Over expression of *GbRac1* gene in transgenic tobacco enhances disease resistance to *Alternaria alternata* *in vitro*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2004, 12: 353-356. (in Chinese)

(责任编辑 孙雷心)