

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00640

转 *Rs-AFP2* 基因小麦的分子分析及其纹枯病抗性

路妍^{1,2} 张增艳^{1,*} 任丽娟³ 刘宝业¹ 廖勇^{1,4} 徐惠君¹ 杜丽璞¹
马鸿翔³ 任正隆⁴ 井金学^{2,*} 辛志勇¹

¹ 中国农业科学院作物科学研究所 / 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081; ² 西北农林科技大学植物保护学院, 陕西杨凌 712100; ³ 江苏农业科学院生物技术研究所, 江苏南京 210014; ⁴ 四川农业大学农学院, 四川雅安 625000

摘要: *Rs-AFP2* 属于 r-硫基类抗菌肽, 主要通过形成离子通道直接破坏细胞来杀灭病原菌。本研究通过基因枪介导法结合对目标基因的分子检测, 证明已将外源 *Rs-AFP2* 基因转入小麦推广品种扬麦 12 中。通过逐株抗纹枯病接种鉴定、PCR、PCR-Southern blot、Southern blot 和 RT-PCR/荧光定量 RT-PCR(Q-RT-PCR)分析, 对转 *Rs-AFP2* 基因小麦 T₁ 至 T₄ 代植株跟踪检测。结果表明, *Rs-AFP2* 在转基因小麦中能够稳定遗传, 以单拷贝整合到小麦基因组中, 遗传方式符合孟德尔遗传规律, 并能在转录水平上表达。对转 *Rs-AFP2* 基因小麦的抗病性、主要农艺性状以及 *Rs-AFP2* 表达活性分析结果表明, 与受体扬麦 12 相比, *Rs-AFP2* 表达活性高的转基因小麦植株对纹枯病抗性有明显提高, 其抗病性可以遗传, 而主要农艺性状没有明显差异, 证明可以利用 *Rs-AFP2* 基因和基因工程途径创制抗纹枯病小麦新种质。
关键词: 抗菌肽; *Rs-AFP2*; 转基因小麦; 基因表达; 纹枯病抗性

Molecular Analyses on *Rs-AFP2* Transgenic Wheat Plants and Their Resistance to *Rhizoctonia cerealis*

LU Yan^{1,2}, ZHANG Zeng-Yan^{1,*}, REN Li-Juan³, LIU Bao-Ye¹, LIAO Yong^{1,4}, XU Hui-Jun¹, DU Li-Pu¹, MA Hong-Xiang³, REN Zheng-Long⁴, JING Jin-Xue^{2,*}, and XIN Zhi-Yong¹

¹ National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement / Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; ³ Biotechnology Research Institute, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; ⁴ College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625000, China

Abstract: In this study, the gene encoding *Rs-AFP2*, a small cyteine-rich antifungal protein from radish, was evidenced to be transformed into a wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar Yangmai 12 via bombardment of biolistic particle and PCR detection. To evaluate if expression of *Rs-AFP2* enhances the transgenic wheat resistance to *Rhizoctonia cerealis*, a major pathogen of wheat sharp eyespot, the transgenic wheat plants from T₁ to T₄ generations were subjected to *R. cerealis* inoculation and the disease resistance rating, and PCR, PCR-Southern, Southern blotting, and RT-PCR/Q-RT-PCR analyses for the *Rs-AFP2* transgene. Results showed that *Rs-AFP2* gene was integrated as a single copy into the susceptible receptor wheat cultivar Yangmai 12, inherited from T₁ to T₄, and expressed in the wheat background. The transgenic wheat plants expressing *Rs-AFP2* showed enhanced resistance to *R. cerealis* and unchanged agronomic traits compared with nontransgenic Yangmai 12. In the transgenic wheat plants, the express level of *Rs-AFP2* was associated with the disease resistance degree. These results suggested that *Rs-AFP2* gene can be useful for improving wheat resistance to *R. cerealis*.

Keywords: Antimicrobial peptides; *Rs-AFP2*; Transgenic wheat; Gene expression; Resistance to *Rhizoctonia cerealis*

小麦纹枯病(wheat sharp eyespot), 是由禾谷丝核菌(*Rhizoctonia cerealis* Vander Hoeven)或立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kuhn)引起的一种土传真菌病害^[1], 一般麦田小麦产量损失 10%~15%, 严重地

块损失 34%~40%, 甚至颗粒无收。近年来, 随着小麦生产水平不断提高, 氮肥大量施用, 以及耕作制度的改变、全球气候变暖等因素的影响, 导致土壤中纹枯病菌大量累积, 加之大面积种植感病品种,

本研究由国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2008ZX08002-001)资助。

* 通讯作者(Corresponding authors): 张增艳, E-mail: zhangzy@mail.caas.net.cn; 井金学, E-mail: jingjinxue@163.com

Received(收稿日期): 2008-10-16; Accepted(接受日期): 2008-12-04.

小麦纹枯病逐年扩展,呈加重的趋势^[2],几乎遍及世界各地温带小麦种植区。自20世纪80年代以来,小麦纹枯病已成为我国长江流域麦区、黄淮麦区的主要病害。据全国农业技术推广总站报道,2005—2008年,我国每年遭受纹枯病危害的麦田面积约670~800万公顷,经济损失在数十亿元以上^[3]。由于小麦纹枯病菌的寄主范围非常广泛,难以根治。况且小麦种质中纹枯病抗性资源极少^[4],抗病性的遗传力低,常规抗病育种难以奏效。植物基因工程的发展和一些抗真菌蛋白基因的克隆,为抗真菌病育种开辟了一条新途径^[5-10]。

抗菌肽(antimicrobial peptide, AMP)具有抗菌谱广、分子量小、基因操作容易等特点。这类蛋白主要通过形成离子通道直接破坏细胞膜以杀灭病原真菌,病原真菌很难对其产生抗性。更为重要的是抗菌肽仅作用于原核细胞和发生病变的真核细胞^[5-7]。Nordeen等^[11]研究发现,将昆虫抗菌肽基因 *Cecropin* 导入烟草,可降低烟草青枯病导致的植株死亡率,贾士荣等^[12]将 *Cecropin B* 和 *Shiva A* 导入马铃薯,增强了转基因马铃薯植株对青枯病的抗性。黄大年等^[13]将 *Cecropin B* 和 *Cecropin D* 基因通过基因枪法导入水稻幼胚,获得转基因植株,明显提高了对水稻白叶枯病菌抗性,同时也获得了兼抗水稻细菌性条斑病和水稻白叶枯病的株系。Almasia等^[14]获得了转抗菌肽 *SN1* 基因马铃薯,可提高对立枯丝核菌、软腐菌的抗性。Terras等^[15]从萝卜(*Raphanus sativus*)种子中克隆了4种 *Rs-AFPs* 的 cDNA 序列,属于 r-硫基类抗菌肽,发现其中 *Rs-AFP2* 在体外能抑制禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、粉色面包霉菌(*Neurospora crassa*)、麦类德氏霉菌(*Pyrenophora tritici-repentis*)、稻瘟菌(*Pyricularia oryzae*)的菌丝生长^[16],并将 *Rs-AFP2* 的 cDNA 导入烟草,获得高水平表达的转基因烟草植株,对赤星病菌(*Alternaria brassicola*)抗性得到显著增强^[17]。然而, *Rs-AFP2* 基因在小麦抗病基因工程应用潜力的研究还未见报道。

本课题组把人工合成的 *Rs-AFP2* 基因构建到单子叶高效组成性表达载体上,通过基因枪介导法转化到小麦幼胚中,获得了 PCR 检测阳性的转 *Rs-AFP2* 基因小麦 T₁ 代植株^[18]。本文进一步分析转基因小麦 *Rs-AFP2* 基因在 T₂ 至 T₄ 代中的遗传以及整合的拷贝数、表达水平和纹枯病抗性,以期明确转 *Rs-AFP2* 基因小麦的纹枯病抗性功能及其应用前

景。

1 材料与方 法

1.1 转基因植株获得及其 DNA 提取

转基因受体为小麦推广品种扬麦 12,由江苏里下河农业科学研究所程顺和课题组提供。从转 *Rs-AFP2* 基因 PCR 呈阳性的 T₁ 代抗病小麦植株上收获 T₂ 代种子,并单株播种(共 207 株);接着播种抗病的 T₃ 代转基因植株(共 10 个株系 117 株),单株收获 T₃ 代阳性株;再单株播种抗病的 T₄ 代转基因植株(共 8 个株系 184 株)。于中国农业科学院作物科学研究所可控温室完成转基因植株的生长、发育和抗病性鉴定。

采用改良酚-氯仿抽提法^[19],从 T₂ 至 T₄ 代植株幼苗的 3~4 cm 长叶片中提取基因组 DNA。

1.2 PCR 与 PCR-Southern

对 T₂ 至 T₄ 代转基因植株进行目标基因的 PCR 检测和遗传分析。根据 *Rs-AFP2* 基因序列设计 1 对 *Rs-AFP2* 基因特异引物 RsA-76U: 5'-ATGGTGGGAAGCACAGAAG-3', RsA-239L: 5'-CAAGGGAAATAACAGATACA-3',以转 *Rs-AFP2* 基因小麦 DNA 为模板进行 PCR 扩增检测,扩增条件为 94℃ 预变性 3 min;然后进入 94℃ 30 s, 55℃ 45 s, 72℃ 45 s, 共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。扩增产物经 1% 琼脂糖+EB 凝胶电泳分离、分析。

PCR-Southern 扩增的目的基因片段经凝胶电泳分离后,转至 Hybond-N⁺ 尼龙膜上,再用 α -³²P-dCTP 标记的 *Rs-AFP2* 基因序列为探针,参照 Southern 杂交方法^[19-20],与膜上的 PCR-DNA 印迹进行杂交并检测。

1.3 Southern 杂交

用限制性内切酶 *Bgl* I 酶切 20 μ g 基因组 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳后,将其转移到尼龙膜上,用 α -³²P-dCTP 标记的 *Rs-AFP2* 基因序列为探针进行杂交^[19-20]。

1.4 *Rs-AFP2* 基因的转录水平

用 TRIZOL 试剂(道普公司)提取叶片总 RNA,按 RNA kit ver.3.0 cDNA 合成试剂盒(TaKaRa)说明书进行第一链 cDNA 合成。以第一链 cDNA 为模板,首先用 *Actin* 基因特异引物(ACT-A: 5'-CACTGGAATGGTCA AGGCTG-3'; ACT-B: 5'-CTCCATGTCATCC CAGTTG-3')对各样本 cDNA 扩增,使各样本 cDNA 模板量均一化。然后用 *Rs-AFP2* 基因的特异引物(AFP2-R: 5'-TTGCCCAAGATGAGAGGAGTT-3'; AFP

2-F: 5'-GAGCCCACCGTTGATGATGTTAGT-3') 进行半定量 RT-PCR 表达分析。扩增条件为 94℃ 预变性 3 min; 然后进入 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。3 次独立的重复。在 ABI PRISM7000 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)上进行实时荧光定量 RT-PCR(Q-RT-PCR)分析。反应体系 25 μ L, 按照 SYBR Premix Ex *Taq* (TaKaRa)反应系统, 通过检测结合双链 DNA 的 SYBR GREEN I 强度达到检测基因表达量的目的, *Rs-AFP2* 基因的特异引物为 AFP2-R 和 AFP2-F, 以 *Actin* 为内参照(引物为 ACT-A 和 ACT-B)。反应条件为 94 预变性 1 min; 进入 94 变性 15 s, 60 退火 31 s, 45 个循环。每个反应均有 3 次独立的重复验证。

1.5 小麦纹枯病抗性鉴定

采用蔡士宾等^[21]的牙签培养法接种, 在小麦分蘖盛期, 用消毒镊子夹取长满菌丝的牙签段, 轻轻地嵌入麦苗叶鞘内, 每个叶鞘嵌入一个有菌牙签段, 至少保湿 3 d, 于小麦蜡熟期对单株进行抗病调查, 小麦植株的反应型分为 9 级^[22], 抗病程度以病情指数为基础评价, 病情指数 0 为免疫; 病情指数 <20.00% 为高抗 (HR); 病情指数 20.01%~40.00% 为抗 (R); 病情指数 40.01%~50.00% 为中抗 (MR); 病情指数 50.01%~

60.00% 为中感 (MS); 病情指数 60.01%~80.00% 为感 (S); 病情指数 80.01%~100.00% 为高感 (HS)。

其中病情指数 = (各级病株数 \times 病级) / (调查总株数 \times 最高级值) \times 100%

1.6 农艺性状调查

将 PCR 呈阳性的 T₃ 代抗病小麦 8 个 T₄ 株系 184 株的种子单株播种, 生长期调查抗病性, 收获后每个株系随机取 10 株调查 T₄ 代植株的株高、穗长、分蘖数和千粒重。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的 PCR 检测与遗传分析

对成活的 207 个 T₂ 代转基因植株进行目标基因 PCR 检测和遗传分析。在 T₁ 代纯合株系的 34 株 T₂ 代植株中均可检测到 *Rs-AFP2* 基因(图 1-A), T₂ 代转基因植株中, *Rs-AFP2* 基因阳性 148 株, 阴性 59 株, 符合 3 : 1 的分离比($\chi^2=1.258$, $\chi^2_{0.05,1}=3.84$), 说明 *Rs-AFP2* 基因已经从转基因小麦 T₁ 代传递到 T₂ 代, 可能以单拷贝形式存在。对转基因 T₃ 代植株中 *Rs-AFP2* 基因的 PCR、PCR-Southern 检测表明, 二者结果一致(图 1-B), 说明 PCR 扩增结果的可信性, 而且 *Rs-AFP2* 基因在 T₃ 代中能稳定遗传, 遗传规律与 T₂ 代吻合。进一步对 T₄ 代 8 个株系的 184 株转基因

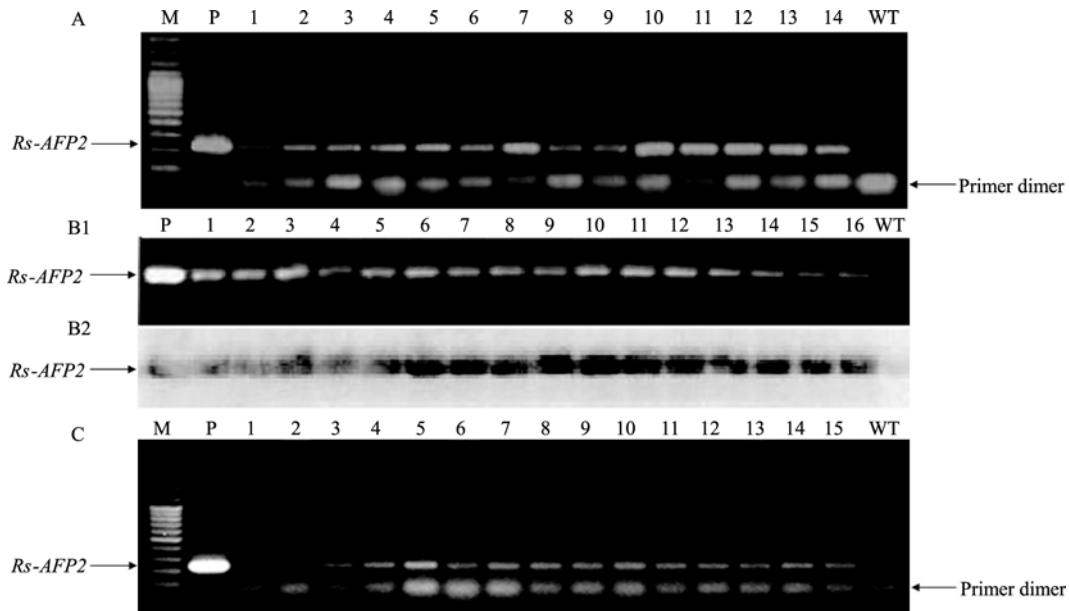


图 1 转 *Rs-AFP2* 基因小麦 T₂(A)、T₃(B)和 T₄代(C)植株的 PCR 检测

Fig. 1 PCR analyses on T₂ (A), T₃ (B), and T₄ (C) plants of *RS-AFP2* transgenic wheat

在各照片中, M 为 100 bp DNA ladder; P 为转基因载体质粒 pUAFP2; WT 为未转基因扬麦 12; 标数字的各泳道为转基因植株。照片 B 中, B1 和 B2 分别为 PCR 和 PCR-Southern blot 检测结果。

Lane "M" is 100 bp DNA ladder; lane "P" is *Rs-AFP2* transformed vector plasmid pUAFP2 as positive control; lane "WT" is wild-type Yangmai 12; other lanes marked with numbers are transgenic plants. In picture B, B1 and B2 denote PCR and PCR-Southern blot results, respectively.

因小麦中 *Rs-AFP2* 基因进行跟踪检测。结果发现, 在 6 个株系 115 株中可检测到 *Rs-AFP2* 基因为 109 株, 其他 2 个株系共 69 株均检测到 *Rs-AFP2* 基因(图 1-C), 说明 *Rs-AFP2* 在转基因小麦中能够稳定遗传, 8 个 T_4 代小麦株系中 *Rs-AFP2* 基因已基本纯合。

2.2 转基因植株的 Southern blot 分析

以 *Rs-AFP2* 基因的全长序列为探针, 对限制性内切酶 *Bgl* I 消化的转 *Rs-AFP2* 小麦的 T_3 代植株的基因组 DNA 进行 Southern 杂交结果显示, *Rs-AFP2* 基因以单拷贝的形式整合到转 *Rs-AFP2* 基因小麦株系 406-2 和 406-4 的基因组中(图 2), 验证了上述遗

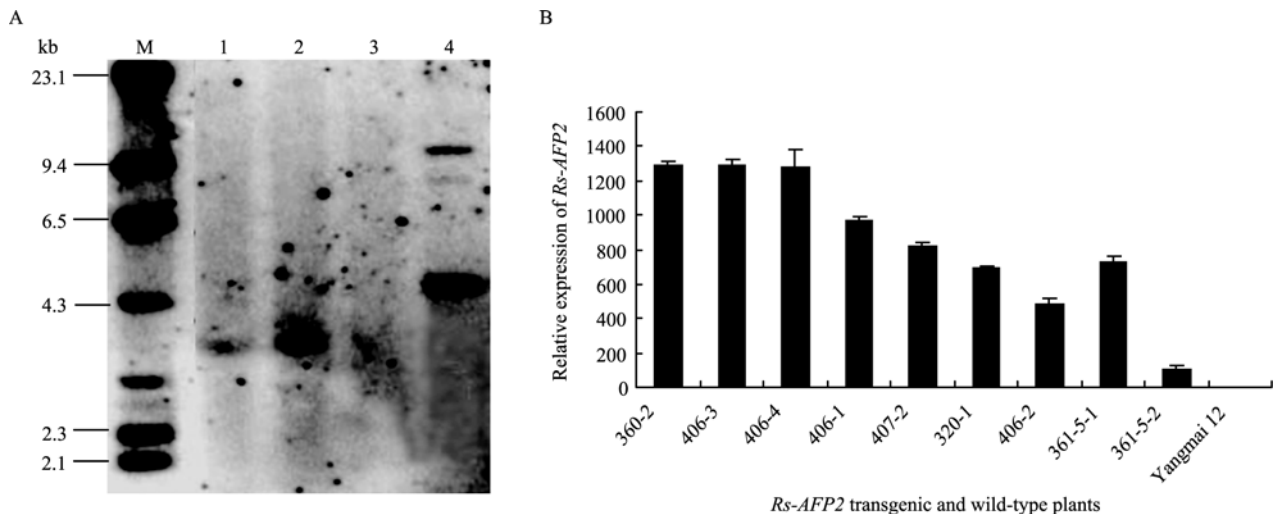


图 2 部分 T_3 代植株 *Rs-AFP2* 目的基因 Southern blot(A)和 T_4 代植株的荧光定量 RT-PCR(B)分析

Fig. 2 Southern blot (A) assay on *Rs-AFP2* gene in T_3 plants and Q-RT-PCR (B) assay in T_4 plants

M: λ DNA/*Hind* III marker; 1: 转基因株系 406-2; 2: 转基因株系 406-4; 3: 非转基因扬麦 12 (阴性对照); 4: pUAFP2 质粒(阳性对照)。

M: λ DNA/*Hind* III marker; 1: transgenic line 406-2; 2: transgenic line 406-4; 3: wild-type Yangmai 12 (negative control); 4: *Rs-AFP2* transformed vector (positive control).

传分析结果。

2.3 转基因植株中目标基因的转录水平

以半定量 RT-PCR 分析 T_3 和 T_4 代植株中 *Rs-AFP2* 的转录水平, 结果表明抗病植株中 *Rs-AFP2* 基因的转录水平高于未转基因扬麦 12 和感病株。进一步利用 Q-RT-PCR 定量分析 PCR 检测呈阳性的 T_4 代单株中 *Rs-AFP2* 表达量, 结果表明, 抗病植株 360-2、406-3、406-4、406-1、407-2、320-1、406-2 和 361-5-1 中 *Rs-AFP2* 转录水平明显高于未转基因扬麦 12 和感病植株 361-5-2, 不同植株中的表达量存在差异(图 2-B)。

2.4 转基因植株的小麦纹枯病抗性鉴定

对 PCR 检测阳性的转 *Rs-AFP2* 基因小麦 T_2 至 T_4 代植株的接种鉴定结果表明, 大多数阳性植株表现高抗, 而未转基因扬麦 12 表现高感(图 3)。在 T_4 代群体中, 未转基因扬麦 12 群体材料的病情指数为 90.45%, 转基因阳性群体材料的病情指数在 20%~43%之间(表 1), 阳性转基因植株的病情指数总体上低于未转基因植株。说明外源 *Rs-AFP2* 基因在转化小麦内的有效表达, 提高了转基因植

株对小麦纹枯病的抗性。此外, 不同株系的 *Rs-AFP2* 表达量高低与其抗性程度成正比。其中 360-2、406-3、406-4 株系对纹枯病的平均抗病级别为 1 级; 406-1、320-1 和 407-2 株系对纹枯病的平均抗病级别为 1 级或 2 级; 406-2 株系对纹枯病

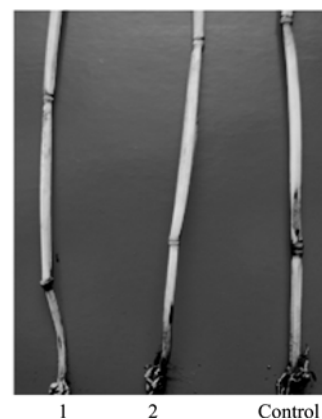


图 3 转 *Rs-AFP2* 基因 T_4 代植株的小麦纹枯病抗性
Fig. 3 Resistance of *Rs-AFP2* transgenic plants to wheat sharp eyespot in T_4 generation

1: 406-4; 2: 406-2; Control: 未转基因扬麦 12。

1: 406-4; 2: 406-2; Control: wild-type Yangmai 12.

表 1 T₄代植株小麦纹枯病抗性鉴定
Table 1 Identification of resistance to wheat sharp eyespot in T₄ plants

株系 Line	平均反应型 Average infection type	病情指数 Disease index (%)	抗性 Resistance
320-1	1.82	23.33	R
360-2	1.00	20.00	HR
361-5	3.13	32.55	R
406-1	1.27	27.27	R
406-2	2.31	43.71	MR
406-3	1.00	20.00	HR
406-4	1.09	25.46	R
407-2	1.33	28.21	R
扬麦 12 Yangmai 12	5.00	90.45	HS

HR: highly resistant; R: resistant; MR: moderately resistant; HS: highly susceptible.

的抗病级别为 2 级; 361-5 株系对纹枯病的抗病级别为 3 级, *Rs-AFP2* 表达活性低的极个别植株感染纹枯病, 如 361-5-2 是 *Rs-AFP2* 表达活性低的植株对纹枯病的反应型为 5 级, 说明转 *Rs-AFP2* 基因小麦中 *Rs-AFP2* 的表达活性是抗纹枯病的关键因素。

2.5 T₄代转基因株系的农艺性状

调查转 *Rs-AFP2* 基因 T₄代小麦植株的株高、穗长、分蘖数、千粒重、成熟期等农艺性状, 结果显示, 转 *Rs-AFP2* 基因小麦的农艺性状与未转基因小麦亲本的基本相同(表 2)。

表 2 T₄代转基因植株主要农艺性状
Table 2 Major agronomic traits of T₄ generation

株系 Line	株高 Plant height (cm)	穗长 Spike length (cm)	分蘖数 Number of tillers	千粒重 1000-grain weight (g)
扬麦 12 Yangmai 12	59.14	6.69	9	35.36
320-1	65.15	6.14	7	32.32
360-2	62.17	7.25	8	36.72
361-5	65.52	7.23	9	37.23
406-1	56.24	6.36	8	31.35
406-2	59.46	6.73	10	37.51
406-3	56.67	6.32	9	33.35
406-4	59.55	6.73	10	36.33
407-2	60.11	6.71	8	36.21

表中数据为 10 株平均值。

Values in the table are the average of 10 plants in each line.

3 讨论

随着寄主—微生物互作研究的深入, 抗病有效基因的克隆以及基因转化技术的发展, 植物抗病基因工程育种正在成为植物育种的重要途径之一。近年来, 抗菌肽因具抗菌谱广等优点受到广泛关注^[23], 关于高表达抗菌肽/蛋白的转基因植物的抗病性提高的报道日益增多^[7,14,24-27]。针对小麦纹枯病危害日趋严重, 小麦中缺乏抗病基因资源、抗纹枯病小麦常规育种进展缓慢等问题, 利用基因工程方法将 *Rs-AFP2* 基因转入小麦, 对小麦抗纹枯病育种有重

要作用和实践意义。

尽管 Terras 等^[16]发现, *Rs-AFP2* 在体外能抑制禾谷镰刀菌、粉色面包霉菌、麦类德氏霉菌、稻瘟菌的菌丝生长。但是对 *R. cerealis* 是否有抑制作用目前未见报道。笔者通过 *Rs-AFP2* 原核表达和体外抑菌实验, 证实 *Rs-AFP2* 蛋白可以通过抑制菌丝生长和菌核萌发、破坏菌丝形态结构, 阻止该病菌的侵染和扩展(待发表)。本文对转 *Rs-AFP2* 基因小麦 T₁ 至 T₄ 代植株的纹枯病抗性鉴定结果也表明, 转 *Rs-AFP2* 基因小麦植株对纹枯病的抗性得到提高。

外源 *Rs-AFP2* 基因在小麦中能够从 T₁ 代传递到

T₄代, 并转录表达。转 *Rs-AFP2* 基因小麦阳性植株的抗性程度与 *Rs-AFP2* 表达量成正比。转入的 *Rs-AFP2* 基因不仅可提高转基因小麦对纹枯病菌的抗性, 而且对赤霉病抗性也有所提高。同时转基因小麦 T₄代植株的农艺性状与未转基因小麦品种间没有明显差异, 这在生产中有重要的意义。

外源基因导入到植物基因组后, 由于植物自身防御体系的作用, 以及外源基因插入位置、拷贝数等因素的影响, 很容易发生基因丢失和基因沉默现象。王守才等^[28]、华志华等^[29]认为转基因植物中外源基因的遗传效应多种多样, 遗传行为也比较复杂^[28-29]。本研究发现, 一些转 *Rs-AFP2* 基因的小麦植株(406-2、361-5 株系部分植株)中, 虽然 PCR 为阳性, 但其抗病性并没有提高, 可能与这些植株中 *Rs-AFP2* 基因的转录表达量低、转录后沉默或基因产物 *Rs-AFP2* 被小麦内源蛋白酶降解有关。尽管存在上述种种不利的未知因素, 通过对较大群体的转基因株系以及 T₁ 至 T₄代的逐株分子检测、表达分析和抗病性选择, 仍可以选育出抗病性稳定的转基因小麦新种质。当然, *Rs-AFP2* 基因在植物抗病基因工程应用方面仍然存在一些问题, 如赋予转基因植株的抗病性水平还未达到免疫程度, 需要今后通过与其他有效抗病基因共转化、协同作用来加以解决。

4 结论

通过基因工程、分子检测和抗病性鉴定, 选育出抗纹枯病的转 *Rs-AFP2* 基因小麦新种质。*Rs-AFP2* 能从转基因小麦 T₀代传递到 T₄代, 并能转录、表达。转 *Rs-AFP2* 基因小麦阳性植株对纹枯病抗性程度与 *Rs-AFP2* 表达量成正比。

致谢: 衷心感谢中国农业科学院作物科学研究所严以萍、王小田的大力支持。

References

- [1] Chen Y-X(陈延熙), Tang W-H(唐文华), Zhang D-H(张敦华), Jian X-Y(简小鹰). A preliminary study on etiology of sharp eyespot of wheat in China. *Acta Phytophylacica Sin* (植物保护学报), 1986, 13(1): 39-44 (in Chinese with English abstract)
- [2] Shi J-R(史建荣), Wang Y-Z(王裕中), Shen S-W(沈素文), Chen H-G(陈怀谷). Pathogenicity of *Rhizoctonia cerealis* to wheat in Jiangsu province. *Jiangsu J Agric Sci* (江苏农业学报), 1997, 13(3): 188-190 (in Chinese with English abstract)
- [3] Zhao M-Q(赵美琦), Wei K-F(魏开锋), Bi K-Z(毕可政). Studies on the epidemic prediction of wheat sharp eyespot. *Acta Phytophylacica Sin* (植物保护学报), 1997, 24(4): 303-308 (in Chinese with English abstract)
- [4] Wang Y-Z(王裕中). Occurrence of wheat sharp eyespot and its controlling. *Plant Prot Technol Extension* (植保技术与推广), 2001, 21(8): 39-41 (in Chinese)
- [5] Theis T, Stahl U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61: 437-455
- [6] Gao A G, Hakimi S M, Mittanck C A, Wu Y N, Woerner B M, Stark D M, Shah D M, Hong L J, Rommens C M T. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 1307-1310
- [7] Anuradha T S, Divya K, Jami S K, Kirti P B. Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Rep*, 2008, 8: 1007-1017
- [8] Shu Q-F(舒琼芳), Sun Y-R(孙勇如). Strategies and advances in antifungi genetic engineering of plant. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1997, 39: 91-96 (in Chinese with English abstract)
- [9] Mackintosh C A, Lewis J, Radmer L E, Shin S, Heinen S J, Smith L A, Wyckoff M N, Dill-Macky R, Evans C K, Kravchenko S, Baldrige G D, Zeyen R J, Muehlbauer G J. Overexpression of defense response genes in transgenic wheat enhances resistance to *Fusarium* head blight. *Plant Cell Rep*, 2007, 26: 479-488
- [10] Margareta M, Irène K, Ingrid H, Erland L, Tomas B. Stability of transgene integration and expression in subsequent generations of doubled haploid oilseed rape transformed with chitinase and β -1,3-glucanase genes in a double-gene construct. *Plant Cell Rep*, 2005, 25: 942-952
- [11] Nordeen R O, Dwens L D. Introduction and transcription of an antibacterial cecropin gene in tobacco plants. *Plant Physiol*, 1992, 99: 47-52
- [12] Jia S-R(贾士荣), Qu X-M(屈贤铭), Feng L-X(冯兰香), Tang T(唐惕), Tang Y-X(唐益雄), Liu K(刘坤), Zhao Y-L(赵艳丽), Bai Y-Y(白永延), Cai M-Y(蔡敏莺). Development of potato clones with enhanced resistance to bacterial wilt by introducing antibacterial peptide gene. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 1998, 31(3): 5-12 (in Chinese with English abstract)
- [13] Huang D-N(黄大年), Zhu B(朱冰), Yang W(杨炜), Xue R(薛锐), Xiao H(肖晗), Tian W-Z(田文忠), Li L-C(李良材), Dai S-H(戴顺洪). Development and identification of antibacterial cecropin B transgenic rice. *Sci China (Ser C)*(中国科学·C辑), 1997, 27(1): 55-62 (in Chinese)
- [14] Almasia N I, Bazzini A A, Hopp H E, Vazquez-Rovere C. Overexpression of *snakin-1* gene enhances resistance to *Rhizoctonia solani* and *Erwinia carotovora* in transgenic potato plants. *Mol Plant Pathol*, 2008, 9: 329-338
- [15] Terras F R G, Schoofs H M E, De Bolle M F C, Leuven F V, Rees S B, Vanderleyden J, Cammue B P A, Broekaert W F. Analysis of two novel classes of antifungal proteins from radish (*Raphanus*

- sativus*) seed. *J Biol Chem*, 1992, 267: 15301–15309
- [16] Terras F R G, Goderis I J, Leuven F V, Vanderleyden J, Cammue B P A, Broekaert W F. In vitro antifungal activity of a radish (*Raphanus sativus*) seed protein homologous to nonspecific lipid transfer proteins. *Plant Physiol*, 1992, 100: 1055–1058
- [17] Terras F R G, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel N V, Osborn R W, Kester A, Rees S B, Torrekem S, Leuven F V, Vanderleyden J, Cammue B P A, Broekaert W F. Small cyteine-rich antifungal proteins from radish: Their role in host defense. *Plant Cell*, 1995, 7: 573–588
- [18] Liao Y(廖勇), Zhang Z-Y(张增艳), Xu H-J(徐惠君), Du L-P(杜丽璞), Yao W-L(姚乌兰), Xin Z-Y(辛志勇), Ren Z-L(任正隆). Transferring of an antifungal protein gene (*Rs-AFP2*) of radish into wheat mediated with biolistic particle. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2006, 26(4): 15–19 (in Chinese with English abstract)
- [19] Sharp P J, Kries M, Shewry P R, Gale M D. Location of β -amylase sequences in wheat and its relatives. *Theor Appl Genet*, 1988, 75: 286–290
- [20] Zhang Z-Y(张增艳), Xu J-S(许景升), Liu Y-G(刘耀光), Wang X-P(王晓萍), Lin Z-S(林志珊), Xin Z-Y(辛志勇). Isolation of resistance gene candidates by a resistance gene analog of *Thinopyrum intermedium* and pooled-PCR. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2004, 30(3): 189–195 (in Chinese with English abstract)
- [21] Cai S-B(蔡士宾), Ren L-J(任丽娟), Yan W(颜伟), Wu J-Z(吴纪中), Chen H-G(陈怀谷), Wu X-Y(吴小有), Zhang X-Y(张仙义). Germplasm development and mapping of resistance to sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) in wheat. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2006, 39(5): 928–934 (in Chinese with English abstract)
- [22] Huo N-X(霍纳新). QTL Analysis of Resistance to Diseases Caused by *Rhizoctonia Cerealis* & *Blumeria Graminis*. PhD Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2002 (in Chinese with English abstract)
- [23] Spelbrink R G, Dilmac N, Allen A, Smith T J, Shah D M, Hockerman G H. Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. *Plant Physiol*, 2004, 135: 2055–2067
- [24] Wang G-L(王关林), Fang H-J(方宏筠), Wang H-X(王火旭), Li H-Y(李洪艳), Wei Y-T(魏毓堂). Pathogen-resistant transgenic plant of *Brassica pekinensis* by transferring antibacterial peptide gene and its genetic stability. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2002, 44(8): 951–955 (in Chinese with English abstract)
- [25] Oard S V, Enright F M. Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Cell Rep*, 2006, 25: 561–572
- [26] Osusky M, Osuska L, Hancock R E, Kay W W, Misra S. Transgenic potatoes expressing a novel cationic peptide are resistant to late blight and pink rot. *Transgenic Res*, 2004, 13: 181–190
- [27] Rajasekaran K, Cary J W, Jaynes J M, Cleveland T E. Disease resistance conferred by the expression of a gene encoding a synthetic peptide in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Plant Biotechnol J*, 2005, 3: 545–554
- [28] Wang S-C(王守才), Wang G-Y(王国英), Ding Q-X(丁群星), Zhang H(张宏), Xie Y-J(谢友菊), Dai J-R(戴景瑞). Studies of transgene segregation and integration in maize. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1999, 26(3): 254–261 (in Chinese with English abstract)
- [29] Hua Z-H(华志华), Zhu X-F(朱雪峰), Wu M-G(吴明国), Yu Y-C(于彦春), Zhao Y(赵艳), Gao Z-Y(高振宇), Yan M-X(颜美仙), Qian Q(钱前), Huang D-N(黄大年). Inheritance of exo-genes integrated into the rice genomes. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2003, 29(1): 44–48 (in Chinese with English abstract)