

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2008.02070

蛋白激发子基因 *pemG1* 转化三生烟及其对 TMV 抗性的提高

毛建军 邱德文* 杨秀芬 曾洪梅 袁京京

(中国农业科学院植物保护研究所 / 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100081)

摘要: 通过根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导转化法, 将含有稻瘟菌蛋白激发子基因 *pemG1* 的植物表达载体 pCAMBIA2300-*Ubi-pemG1-Ocs* 转化三生烟(*Nicotiana tobacum* cv. Samsun NN), 获得了转基因植株。用 PCR 检测抗卡那霉素烟草确认阳性转化株, 用 Southern、Northern 和 Western 杂交进一步证实了 *pemG1* 基因的整合、转录和表达。对 T₂ 代转基因阳性株进行烟草花叶病毒(Tobacco Mosaic Virus)接种试验。接种 5 d 后发现, 与非转基因对照相比, 表达 *pemG1* 的烟草叶片枯斑数量减少, 表明稻瘟菌蛋白激发子基因 *pemG1* 的表达提高了转基因烟草对 TMV 的抗性。

关键词: 蛋白激发子; *pemG1*; 烟草; 表达; 烟草花叶病毒

Expression of Protein Elicitor-Encoding Gene *pemG1* in Tobacco (*Nicotiana tobacum* cv. Samsun NN) Plants and Enhancement of Resistance to TMV

MAO Jian-Jun, QIU De-Wen*, YANG Xiu-Feng, ZENG Hong-Mei, and YUAN Jing-Jing

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests / Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Protein elicitors are important signal molecules that trigger plants disease resistance. Defence responses will be induced once the elicitors are recognized by acceptors in plants. It is revealed that elicitor protein PemG1 from *Magnaporthe grisea* is able to increase hydrogen peroxide content of tobacco suspension cells. To study PemG1's functions in plants, *pemG1* gene was transferred into tobacco in the study. For this, plant expression vector pCAMBIA2300-*Ubi-pemG1-Oc* harboring elicitor-encoding gene *pemG1* from *Magnaporthe grisea* was constructed. The maize *ubiquitin* promoter/octopine synthase terminator system and kanamycin-resistant gene *nptII* (neomycin phosphotransfers II) were used for constitutive expression systems. The vector was then introduced into *Agrobacterium tumefaciens* (strain AGL-1) by freeze-thaw method. Tobacco (*Nicotiana tobacum* cv. Samsun NN) primary transformants were produced by leaf disc transformation. The kanamycin-resistant regenerated plants were confirmed to be electropositive by PCR. Integration and expression of the *pemG1* gene were further confirmed by Southern blotting and Western blotting, respectively. Then, transgenic tobacco plants of T₂ generation were inoculated with Tobacco Mosaic Virus (TMV) at two different virus concentration. In comparison with TMV-infected wild-type SNN plants, PemG1-expressed plants displayed reduced hypersensitive-response lesions in both treatments. Furthermore, accumulation level of *pemG1* steady-state transcripts was examined at 24 h after inoculation. The results indicated that the reduction of lesions corresponded to the accumulation of *pemG1* steady-state transcripts as monitored by Northern blotting analysis. All these indicated that the expression of *pemG1* in tobacco plants improved the resistance to TMV.

Keywords: Protein elicitor; *pemG1*; Tobacco; Expression; TMV

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2003CB114204); 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA10A210)

作者简介: 毛建军(1979-), 男, 博士, 主要从事蛋白激发子的纯化及水稻和烟草的遗传转化研究。Tel: 010-68919571-3509;

E-mail: maojianjun0615@126.com

*通讯作者(Corresponding author): 邱德文, E-mail: dewenqiu@hotmail.com

Received(收稿日期): 2008-04-21; Accepted(接受日期): 2008-07-08.

植物与病原菌之间的非亲和性互作常引发植物体一系列的生理生化反应, 进一步诱发植物的抗性, 还能诱发防御反应的某种特定的微生物或植物分子即称为激发子(elicitor)^[1-3]。蛋白激发子是病原菌-植物相互识别的重要信号分子, 被激发子诱导后, 相关的植物基因可迅速表达。蛋白激发子与寄主的受体蛋白结合, 经过一系列反应可诱导程序性细胞死亡(PCD)或过敏反应(HR)和系统获得性抗性(SAR)^[2-4]。目前发现的植物蛋白激发子按照来源与特性, 分为过敏蛋白 Harpin、激发素 elicitin、无毒蛋白、病毒蛋白等^[5-11]。蛋白激发子在体外不表现杀菌作用, 仅通过启动植物体内的防御机制, 诱发系统获得抗性在抗病性中发挥作用。在当前化学防治造成严重生态恶化、抗病育种无法使抗性稳定的情况下, 利用蛋白激发子可能成为农业生态系统中病害控制的新思路^[12-15]。有关蛋白激发子对植物抗病反应的诱导, 已在拟南芥、烟草、黄瓜等多种植物中得到广泛研究^[1-3]。

邱德文等^[14-15]从多种病原真菌如稻瘟菌(*Magnaporthe grisea*)、交链孢菌(*Alternaria* spp.)、纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、黄曲霉菌(*Aspergillus* spp.)、葡萄孢菌(*Botrytis* spp.)、青霉菌(*Penicillium* spp.)、木霉菌(*Trichoderma* spp.)等分离到一系列的蛋白激发子。来源于稻瘟菌的蛋白激发子基因 *pemG1* 编码的 PemG1 蛋白激发子可明显提高丝瓜、番茄等发芽率, 促进种子萌发和幼苗生长。经 PemG1 处理水稻后, 控制稻瘟菌效果达 50.68%, 抗旱综合指数也从 55 提高到 92, 植物的纤维素酶和醇脱氢酶活性增强, 过氧化氢和脯氨酸的含量提

高^[16]。

邵敏等^[17]将来自水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)的 *hrfA_{Xoo}* 基因转化粳稻 R109, 转基因水稻的 T₀, T₁ 和 T₂ 代对水稻白叶枯病均有较好的抗性, 在转基因系中水稻白叶枯病菌的生长明显受到抑制。孟凡宏等^[18]将 *hrfA_{Xoo}* 基因转化烟草, 转基因烟草植株也表现出对烟草花叶病毒(TMV)的抗性。说明通过蛋白激发子基因的表达来提高作物的抗病性是可行的, 目前关于其他蛋白激发子的转基因报道很少。本研究通过根癌农杆菌介导转化法, 以稻瘟菌蛋白激发子基因 *pemG1* 转化三生烟, 用分子生物学方法验证了外源基因在受体烟草基因组中的整合、转录和表达。接种 TMV 检测了转基因烟草植株的抗性情况。

1 材料与与方法

1.1 植物材料、载体及菌种

用于农杆菌转化的烟草为三生烟(*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN)。所用的农杆菌菌株 AGL-1 和植物二元表达载体 pCAMBIA2300-*Ubi-Ocs* 由中国科学院遗传与发育生物学研究所储成才研究员惠赠。pCAMBIA2300-*Ubi-Ocs* 含卡那霉素抗性基因 *NptII*、启动外源基因表达的 *Ubiquitin* 启动子和来自章鱼碱合成酶基因的终止信号。目的基因 *pemG1* 由中国农业科学院植物保护研究所邱德文实验室从 *Magnaporthe grisea* 克隆得到(GenBank 登录号: EF062504), 其编码蛋白能促进作物生长, 增强抗逆性^[16]。构建了植物二元表达载体 pCAMBIA2300-*Ubi-pemG1-Ocs*(图 1)。

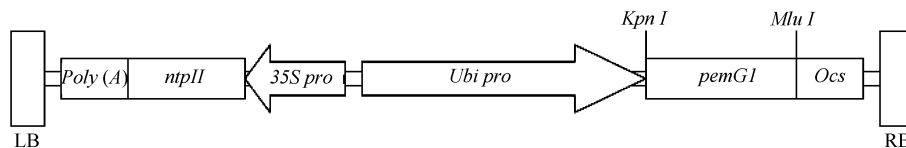


图 1 植物表达载体 pCAMBIA2300-*Ubi-pemG1-Ocs* 的结构图

Fig. 1 Structure of plant expression vector pCAMBIA2300-*Ubi-pemG1-Ocs*

1.2 酶和主要生化试剂

载体构建所用的内切酶和连接酶购自宝生物工程(中国)有限公司, PCR 试剂购自北京全式金生物技术有限公司, 用于 Southern blotting 和 Northern blotting 的地高辛试剂盒购自罗氏公司(Roche), 用于 Western blotting 的二抗购自北京鼎国生物技术有限责任公司。其他为国产分析纯试剂。

1.3 烟草的遗传转化和转基因植株的再生

先将健康烟草叶片用 0.1% 升汞灭菌, 用打孔器打孔得到叶盘用于转化。按文献^[19-23]中的方法, 适当修改后通过根癌农杆菌介导转化获得再生植株。

1.4 转化株的 DNA 检测

用 CTAB 法从转化的烟草 T₀、T₁ 和 T₂ 代的幼嫩叶片中提取 DNA, 进行 PCR 检测。用 primer 1

(5'-ACCCTGTTGTTTGGTGTACTT-3')和 primer 2 (5'-GGCGTCTCGCATATCTCAT-3')扩增 *pemG1* 整个编码区, 产物 1 168 bp。反应体系含 10 μ L PCR Mix, 0.5 μ mol L⁻¹ 引物, 1 mg L⁻¹ 模板 DNA, 加去离子水至 20 μ L。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 57.8 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min; 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。用 primer 3 (5'-AGTCTAACGGACACCAAC-3') 和 primer 4 (5'-AAAGATGACCCGACAAAC-3')扩增 *ubiquitin* 启动子区, 产物 723 bp。用同样的反应体系, 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53.6 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min; 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。

对 T₀ 代苗进行 Southern blotting 检测, 提取 20 μ g 总 DNA, 经 *EcoRI* 充分消化后用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 转膜^[24-25], 以地高辛标记的 *pemG1* 片段为探针进行杂交, 以检测外源基因的整合情况, 操作按 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter kitI (Roche) 说明书进行。

1.5 Western blotting 分析

将 T₂ 代烟草的叶片加液氮充分研磨后立即转移到磷酸缓冲液(0.025 mol L⁻¹ K₂HPO₄, 0.025 mol L⁻¹ KH₂PO₄, 2 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8.0), 充分混匀后 13 200 \times g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。将上清液冰浴 1 h 后 13 200 \times g, 4 $^{\circ}$ C 再离心 10 min。参考 Amero 等^[26]方法制备抗体。将 20 μ g 提取的蛋白用 12% SDS-PAGE 胶分离后转移到 PVDF 膜, 再参考 Kobayashi 等^[23]方法进行免疫杂交。

1.6 TMV 抗性鉴定和 RNA 检测

对 3 个经过 Western 杂交检测到 *pemG1* 表达的 T₂ 代株系进行 TMV 抗性鉴定。设 2 个接种量处理, 处理 1 每叶接种 0.2 mg, 处理 2 接种 0.5 mg, 每处理重复 3 次。每个株系设 4 株作为重复, 每株接种中部 3 片叶龄一致的叶片, 以野生型三生烟作对照。

烟苗种于温室内, 每天光照 16 h, 保持湿度 85%, 白天温度 32 $^{\circ}$ C, 夜间温度 25 $^{\circ}$ C, 生长 7 周后按 Fischer 等^[21]方法, 将病毒溶于 50 mmol L⁻¹、pH 7.5 的磷酸钾缓冲液进行 TMV 接种。接种后烟草于 28 $^{\circ}$ C 诱发过敏反应。接种 5 d 后调查叶片枯斑发生数量, 用 DPS 统计软件统计分析并计算枯斑抑制率。枯斑抑制率=[(对照平均枯斑数 - 处理平均枯斑数)/对照平均枯斑数] \times 100^[27]。

参考 Invitrogen 公司的 TRIZOL 法, TMV 接种 24 h 后从烟叶中提取总 RNA。以地高辛标记的 *pemG1* 片段为探针进行 Northern blotting 分析, 参考 Strathmann 等^[28]方法并结合 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter kitI (Roche) 说明书进行杂交, 每个样取 20 μ g 总 RNA 用于分析。用伯乐公司(Bio-Rad)的成像仪对杂交带成像, 用 Genesnap 软件(GeneSnap Image Acquisition Software)分析杂交信号强度^[21]。

2 结果与分析

2.1 转基因烟草植株的获得

对 100 个叶盘进行愈伤组织诱导, 大部分叶盘在 25 $^{\circ}$ C 下暗培养 5 d 后已开始膨大, 4 周开始有浅绿色半透明的愈伤组织形成(图 2-A), 但也有 12 个叶盘体积和颜色都没有发生变化。将愈伤组织用农杆菌浸染后转移到共培养基共培养 2 d。再转移到分化培养基中光照培养一个月, 期间有 71 个叶盘逐渐呈圆拱型, 并分化出抗卡那霉素的小芽, 逐渐分化成苗, 一个叶盘可分化出一到多个棵小苗(图 2-B)。共有 93 棵小苗被转移到生根培养基, 每天光照 16 h, 保持 28 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C。小苗逐渐长大并长出根系(图 2-C), 再将苗移栽到土壤。共有 65 棵抗卡那霉素的小苗长出发达的根系并移栽成活(图 2-D)。

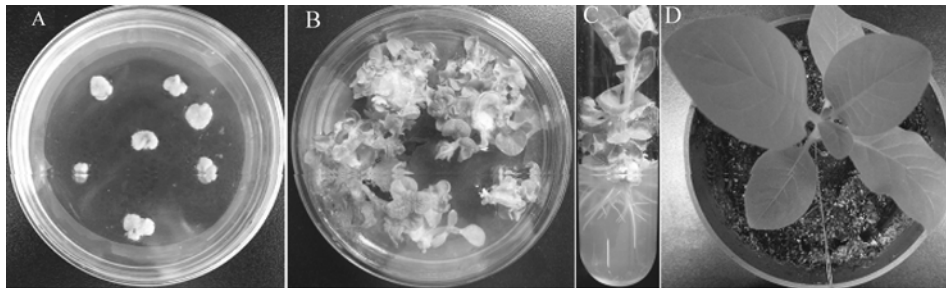


图 2 转基因烟草植株再生

Fig. 2 Regeneration of *pemG1*-transformed plantlets through culture

A: callus induction; B: growth of kanamycin-resistant shoots; C: rooting of kanamycin-resistant seedling;

D: kanamycin-resistant seedling transplanted to soil.

D: kanamycin-resistant seedling transplanted to soil.

2.2 转基因烟草的分子鉴定

2.2.1 PCR 和 Southern blotting 分析 PCR 结果表明, primer 1 和 primer 2, primer 3 和 primer 4 在 51 棵 T_0 代卡那霉素抗性烟苗中检测到目的条带, 两对引物的检测结果一致, PCR 阳性率为 78.5%。在 T_1 代转基因烟草中, PCR 阳性株和阴性株的比值符合 3 : 1 的理论比率。随机挑选的 3 个 PCR 阳性株系用于 Southern blotting, 均检测到目的基因的整合。其中两个株系只检测到一个拷贝, 一个株系检测到两个拷贝, 而在非转基因对照中没有检测到杂交条带, 说明 *pemG1* 已整合进烟草基因组(图 3)。

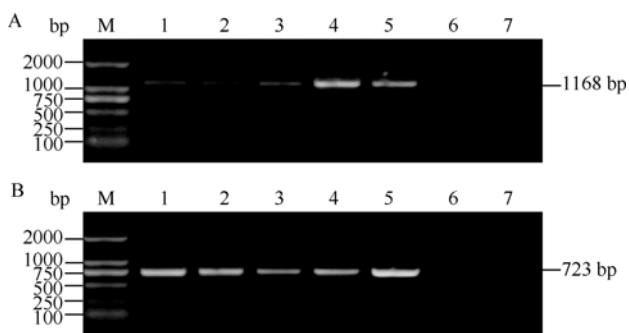


图 3 转基因烟草植株的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification of transgenic tobacco plants

A: primer 1 和 primer 2 的扩增结果; B: primer 3 和 primer 4 的扩增结果; M: DL2000 分子量标准; 1~4: 转化株; 5: 阳性对照; 6: 非转基因植株; 7: 空白对照。
A: amplification products resulting from primer 1 and primer 2; B: amplification products resulting from primer 3 and primer 4; M: DL2000 marker; 1~4: transformed plants; 5: positive control; 6: non-transformed plants; 7: blank control.

2.2.2 Western blotting 分析 在供试 3 个转基因株系中, 均检测到抗原和抗体特异的 40 kD 的杂交带, 而在非转基因对照中没有检测到杂交信号。表明 *pemG1* 已整合到烟草基因组并进行表达(图 5)。

2.3 TMV 抗性鉴定和 *pemG1* 基因 mRNA 检测

在处理 1 中, 转基因株系 2、5 和 6 所形成的枯斑数均少于非转基因对照(图 6-A), 枯斑抑制率分别为 37.4%、35.1%和 44.6%(表 1)。在处理 2 中, 3 个

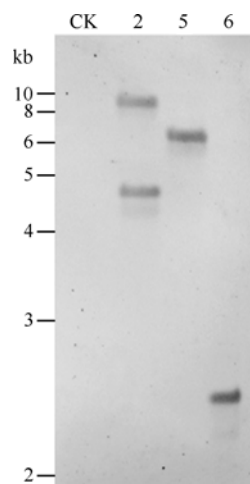


图 4 转基因烟草的 Southern blotting 分析

Fig. 4 Southern blotting of transgenic tobacco plants

CK: 非转基因对照; 2: 转基因株系 2; 5: 转基因株系 5; 6: 转基因株系 6。
CK: non-transformed plants; 2: transgenic line 2; 5: transgenic line 5; 6: transgenic line 6.

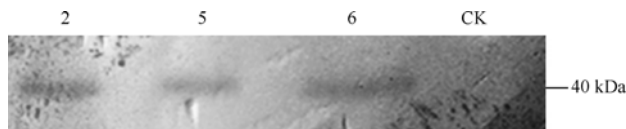


图 5 转基因植株的 Western blotting 分析

Fig. 5 Western blotting of transgenic plants

2: 转基因株系 2; 5: 转基因株系 5; 6: 转基因株系 6; CK: 非转基因对照。
2: transgenic line 2; 5: transgenic line 5; 6: transgenic line 6; CK: non-transformed plant.

转基因株系所形成的枯斑数也均少于非转基因对照(图 6-B), 枯斑抑制率分别为 38.5%、38.3%和 46.2%(表 1)。用 DPS 软件对每叶枯斑数进行统计分析, 发现在两个处理中, 3 个转基因株系与非转基因对照的差异均达到 1%极显著水平。当病毒接种量提高时, 3 个转基因株系的枯斑抑制率都略有提高。

Northern blotting 表明, 在 3 个转基因烟草株系中均检测到预期的杂交条带, 而在非转基因对照中没有检测到 *pemG1* 基因 mRNA 的积累(图 6-C)。用伯乐公司(Bio-Rad)的成像仪对杂交带成像, 用

表 1 转基因株系对 TMV 接种的反应

Table 1 Response of transgenic lines to TMV inoculation

样本 Sample	病斑数量 Average number of lesions		病斑抑制率 Inhibition rate (%)	
	处理 1 Treatment 1	处理 2 Treatment 2	处理 1 Treatment 1	处理 2 Treatment 2
非转化株 Non-transformed plants	48.3±6.2	118.6±14.6	0	0
转基因株系 2 Transgenic line 2	30.2±3.6	72.9±9.2	37.4	38.5
转基因株系 5 Transgenic line 5	31.3±4.9	73.2±10.4	35.1	38.3
转基因株系 6 Transgenic line 6	26.7±2.5	63.8±10.2	44.6	46.2

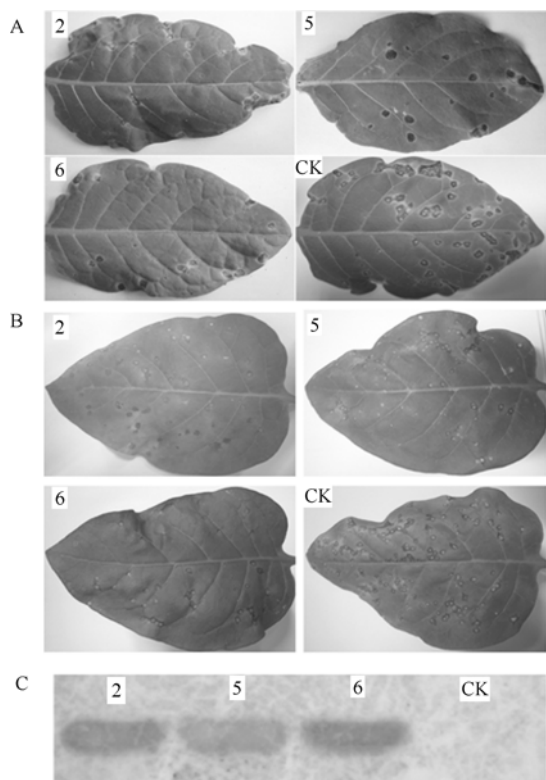


图 6 转基因烟草株系对 TMV 的抗性

Fig. 6 Resistance to TMV in transgenic lines

A: 处理 1 中转基因株系和非转基因对照的症状比较; B: 处理 2 中转基因株系和非转基因对照的症状比较; C: 转基因株系的 Northern blotting 分析; 2、5 和 6: 转基因烟草株系叶; CK: 野生型烟草株叶。

A: comparison of TMV-induced hypersensitive response (HR) lesions obtained after the inoculation of transgenic lines and wild-type plants (CK) in treatment 1; B: comparison of TMV-induced hypersensitive response (HR) lesions obtained after the inoculation of transgenic lines and wild-type plants (CK) in treatment 2; C: Northern blotting analysis of transgenic lines. Numbers indicate independent transformants. CK indicates non-transformed wild-type plants.

Genesnap 软件(GeneSnap Image Acquisition Software)对杂交信号强度进行分析,发现株系 2、5 和 6 的杂交信号强度比约为 1.0 : 0.7 : 1.2。说明 *pemG1* 基因 mRNA 积累的水平 and 枯斑抑制率的高低有明显的相关性,转基因植株内 *pemG1* 基因 mRNA 积累的水平较高时,所形成的枯斑数也相对较少,枯斑抑制率较高,对 TMV 的抗性较强。但 *pemG1* 基因 mRNA 的积累水平和枯斑抑制率的高低并不是呈现严格的正比例关系。

3 讨论

本研究说明通过蛋白激发子基因的表达来提高作物的抗病性是可行的。关于通过外源基因的表达

来提高烟草对病毒的抗性,前人做了较多的研究。如烟草乙烯应答转录因子基因,马铃薯 X 病毒的 p12 蛋白基因和番茄斑驳病毒外壳蛋白基因等^[21-23],通过不同的机制来提高对病毒的抗性。乙烯应答转录因子能够影响乙烯的形成,提高对病毒抗性的同时并不激发病程相关蛋白的表达。番茄斑驳病毒外壳蛋白通过对转基因 mRNA 转录后加工的调控来提高抗性。马铃薯 X 病毒(PVX)的 p12 蛋白的表达能诱发烟草对 PVX 的专化抗性,但抗性不是由 RNA 介导的,而且外源基因不能使烟草产生系统获得抗性(SAR)。在本试验中,*pemG1* 基因 mRNA 积累的水平和对 TMV 抗性的高低存在明显的相关性,虽然还没有证实 PemG1 的表达量和对 TMV 的抗性也存在相关性,但笔者推测,是 PemG1 而不是 mRNA 积累提高了对 TMV 的抗性。因为在以前的研究中发现,经 PemG1 处理后,作物的纤维素酶和醇脱氢酶活性增强,过氧化氢和脯氨酸的含量提高,而这些酶和活性物质在抗逆性方面都发挥重要作用。前人研究也充分证明,蛋白激发子能诱发非寄主对病原菌产生防御反应,原因是它能促进植物产生与防卫反应相关的物质如乙稀、植物保卫素及诱导病程相关蛋白(PR proteins)的表达^[1-4]。更何况 PemG1 是一个真菌源的激发子,它不是来自于病毒,所以推测 PemG1 诱发病程相关蛋白的表达,促进防卫反应相关物质的产生,从而提高了对 TMV 抗性。

在 TMV 接种试验中,当病毒的接种量增大时,转基因烟草株系的枯斑抑制率更高。我们推测,接种量增大时,对转基因烟草造成的胁迫也增强,PemG1 的表达水平随之提高,从而表现出对 TMV 更强的抗性。很可能 PemG1 的表达受到病原物侵染的诱导,但本研究中所使用的 *ubiquitin* 启动子是一个组成型启动子,要解答这个问题,或许应该换用诱导型启动子。

蛋白激发子能诱导非寄主植物发生广泛的防御反应。稻瘟菌蛋白激发子 PemG1 不仅能诱发非寄主的抗病性,而且能促进作物的生长,提高抗逆性。是否转 *pemG1* 基因的烟草也会产生同样的效应呢?是否将 *pemG1* 基因转化其他作物也能产生对相关病害的抗性呢?这些问题还需进一步的研讨。

激发子在植物病虫害生物防治中具有重要应用前景。有关蛋白激发子对植物抗病反应的诱导,已在拟南芥、烟草、西红柿、大麦、小麦、黄瓜等许多植物中得到广泛研究。1993 年美国 Eden 公司利

用 *Harpin* 基因产物开发出商品化农药 Messenger, 成功用于病虫害防治, 为激发子在农业生产中的应用提供了成功的范例。本实验室从稻瘟菌 (*Magnaporthe grisea*)、灰霉菌 (*Botrytis cineres*)、交链孢菌 (*Alternaria* spp.) 等多种病原真菌中分离纯化得到相似的蛋白激发子。它们不引起过敏反应, 具有热稳定性, 能诱发非寄主产生防御反应, 促进作物生长。激发子作为绿色农药, 可能成为农业系统中病虫害控制的新思路, 并将成为 21 世纪农药发展的重要方向。在深入了解激发子诱导植物抗病性复杂机制的基础上, 利用化学可诱导型启动子与信号蛋白基因结合, 组成融合基因, 导入植物, 实现基因适时表达的人为控制, 培育出遗传稳定、抗多种病原菌的作物品种, 是今后的研究方向。

4 结论

通过叶盘转化法以稻瘟菌蛋白激发子基因 *pemG1* 转化烟草, 获得了转基因植株, *pemG1* 的表达提高了烟草对 TMV 的抗性。以烟草为模式植物验证了蛋白激发子基因 *pemG1* 诱导植物抗病性的功能, 说明通过蛋白激发子基因的遗传转化来提高作物的抗病性是可行的。

References

- [1] Michael G H. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Ann Rev Phytopathol*, 1996, 34: 387–412
- [2] Darvill A G, Albersheim P. Phytoalexins and their elicitors—a defense against microbial infection in plants. *Annu Rev Plant Physiol*, 1984, 35: 243–293
- [3] Templeton M D, Lamb C J. Elicitors and defense gene activation. *Plant Cell Environ*, 1988, 11: 395–401
- [4] Wei Z M, Laby R J, Zumoff C H, Bauer D W, He S Y, Collmer A, Beer S V. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 1992, 257: 85–88
- [5] Baker C J, Orlandi E W, Mock N M. Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicit active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiol*, 1993, 102: 1341–1344
- [6] Ricci P, Bonnet P, Huet J C, Sallantin M, Beauvais C F, Bruneteau M, Billard V, Michel G, Pernollet J C. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem*, 1989, 183: 555–563
- [7] Baillieul F, Genet I, Kopp M, Saindrenan P, Fritig B, Kauffmann S. A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: A fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defense genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance. *Plant J*, 1995, 8: 551–560
- [8] Nespoulous C, Huet J C, Pernollet J C. Structure-function relationships of α and β elicitors signal proteins involved in the plant—*Phytophthora* interaction. *Planta*, 1992, 186: 551–557
- [9] Huet J C, Nespoulous C, Pernollet J C. Structure of elicitor isoforms secreted by *Phytophthora dreschleri*. *Phytochemistry*, 1992, 31: 1471–1476
- [10] Boissy G, De L F, Kahn R, Huet J C, Bridogne G, Pernollet J C, Brunie S. Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic protein. *Structure*, 1996, 4: 1429–1432
- [11] Ricci P, Trentin F, Bonnet P, Vemond P, Mouton-Perronet F, Bruneteau M. Differential production of parasiticein, an elicitor of necrosis and resistance in tobacco, by isolates of *Phytophthora parasitica*. *Plant Pathol*, 1992, 41: 298–307
- [12] Zhang H-M(张宏明), Cai Y-Y(蔡以滢), Chen J(陈珈). Elicitation of the hypersensitive responses in tobacco by a 10.6 kD proteinaceous elicitor from *Phytophthora palmi*. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 1999, 41(11): 1183–1186(in Chinese with English abstract)
- [13] Zhang Z-G(张正光), Wang Y-C(王源超), Zheng X-B(郑小波). Bioactivity and stability of 90 kD extracellular protein elicitor from *Phytophthora boehmeriae*. *Acta Phytopathol Sin (植物病理学报)*, 2001, 31(3): 213–218(in Chinese with English abstract)
- [14] Qiu D-W(邱德文). Microbe protein pesticide and its prospect. *Chin J Biol Control (中国生物防治)*, 2004, 20(2): 91–94(in Chinese with English abstract)
- [15] Qiu D-W(邱德文), Xiao Y-L(肖友伦), Yao Q(姚庆), Li L(李丽), Liu Z(刘铮). Effect of activator protein on cucumber growth and the activities of dehydrogenase, peroxidase and phenylalanine ammonia lyase. *Chin J Biol Control (中国生物防治)*, 2005, 21(1): 41–44(in Chinese with English abstract)
- [16] Xu F(徐锋), Yang Y(杨勇), Xie F-J(谢馥交), Liu Z(刘铮), Qiu D-W(邱德文), Yang X-F(杨秀芬). Effect of the activator protein from *magnaporthe grisea* on plant growth and physiological activities. *Acta Agric Boreali-Sin (华北农学报)*, 2006, 21(5): 1–5(in Chinese with English abstract)
- [17] Shao M(邵敏), Wang J-S(王金生). Transformation of rice with *hrfA* gene and resistance of the transgenic plant to bacterial leaf blight. *J Nanjing Agric Univ (南京农业大学学报)*,

- 2004, 27(4): 36–40 (in Chinese with English abstract)
- [18] Meng F-H(孟凡宏), Song C-F(宋从凤), Ji Z-L(纪兆林), Wang J-S(王金生). Effect of transgenic tobacco expressing Harpin_{Xoo} and its N-terminal sequence on TMV resistance. *J Nanjing Agric Univ* (南京农业大学学报), 2007, 30(3): 47–52(in Chinese with English abstract)
- [19] Horsch R B, Fry J E, Fraley R T. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 1985, 227: 1229–1231
- [20] Del P O, Lam E. Expression of the baculovirus p35 protein in tobacco affects cell death progression and compromises *N* gene-mediated disease resistance response to *Tobacco mosaic virus*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2003, 16: 485–494
- [21] Fischer U, Droge-Laser W. Overexpression of NtERF5, a new member of the tobacco ethylene response transcription factor family enhances resistance to tobacco mosaic virus. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2004, 17: 1162–1171
- [22] Sinisterra X H, Polston J E, Abouzid A M, Hiebert E. Tobacco plants transformed with a modified coat protein of tomato mottle Begomovirus show resistance to virus infection. *Phytopathology*, 1999, 89: 701–706
- [23] Kobayashi K, Cabral S, Calamante G, Maldonado S, Mentaberry A. Transgenic tobacco plants expressing the potato virus X open reading frame 3 gene develop specific resistance and necrotic ring symptoms after infection with the homologous virus. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2001, 14: 1274–1285
- [24] Southern E M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 1975, 98: 503
- [25] Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. pp 304–331
- [26] Amero S A, James T C, Elgin S C R. Production of antibodies using proteins in gel bands. In: Walker J M ed. *The Protein Protocols Handbook*, 2nd edn. New Jersey: Humana Press, 2002. pp 941–944
- [27] Wu Y-B(吴艳兵), Xie L-Y(谢荔岩), Xie L-H(谢联辉), Lin Q-Y(林奇英), Lin S-F(林诗发). A preliminary study on anti-TMV activity of polysaccharide from *Coprinus comatus*. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2007, 23(5): 338–341 (in Chinese with English abstract)
- [28] Strathmann A, Kuhlmann M, Heinekamp T, Dröge-Laser W. BZI-1 specifically heterodimerises with the tobacco bZIP transcription factors BZI-2, BZI-3/TBZF and BZI-4, and is functionally involved in flower development. *Plant J*, 2001, 28: 397–408