

转 *Pi-d2* 基因水稻对稻瘟病的抗性分析

陈德西^{1,2} 陈学伟¹ 雷财林³ 马炳田¹ 王玉平¹ 李仕贵^{1,*}

(¹四川农业大学 水稻研究所, 四川 成都 611130; ²四川省农业科学院 植物保护研究所, 四川 成都 610066; ³中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081; * 通讯联系人, E-mail: lishigui_sc@263.net)

Rice Blast Resistance of Transgenic Rice Plants with *Pi-d2* Gene

CHEN De-xi^{1,2}, CHEN Xue-wei¹, LEI Cai-lin³, MA Bing-tian¹, WANG Yu-ping¹, LI Shi-gui^{1,*}

(¹Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; ²Institute of Plant Protection, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China; ³Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; * Corresponding author, E-mail: lishigui_sc@263.net)

CHEN Dexi, CHEN Xuewei, LEI Cailin, et al. Rice blast resistance of transgenic rice plants with *Pi-d2* gene. *Chin J Rice Sci*, 2010, 24(1): 31-35.

Abstract: Transgenic rice lines harboring *Pi-d2* gene under the control of different promoters from three expression vector pCB6.3kb, pCB5.3kb and pZH01-2.72kb were tested for resistance to *Magnaporthe grisea*. The results showed that 9 stably transgenic lines had different resistances to 39 strains of *M. grisea* from Sichuan Province, China, and the highest disease-resistance frequency was 91.7%. Four early homozygous transgenic lines of *Pi-d2* gene exhibited resistance to more than 81.48% of 58 strains from Chinese Academy of Agricultural Sciences, which indicates that the transgenic rice lines possessed wide-spectrum resistance against various rice blast races. The results of transgenic embryonic callus selected by crude toxin showed that the induction rate of embryonic callus reduced by increased concentration of toxin in medium. When the toxin concentration was 40% in medium, the induction rate of embryonic callus of transgenic plant was 49.33%, while that of the receptor control was 5%. The disease incidence of neck blast were 0% to 50% in the transgenic lines under induction of rice blast disease in fields, showing the higher resistance to rice blast than that of receptor control.

Key words: transgenic rice; resistance gene; rice blast; resistance spectrum; crude toxin

陈德西, 陈学伟, 雷财林, 等. 转 *Pi-d2* 基因水稻对稻瘟病的抗性分析. 中国水稻科学, 2010, 24(1): 31-35.

摘要: 对由 pCB6.3kb, pCB5.3kb 和 pZH01-2.72kb 三个不同表达载体转化的转稻瘟病抗性基因 *Pi-d2* 水稻株系进行稻瘟病抗性分析。结果表明, 转 *Pi-d2* 基因水稻的 9 个高代株系对来自四川的 39 个稻瘟病菌株表现不同的抗性, 抗病频率最高达 91.7%; 4 个转基因早期纯合株系对来自中国农业科学院的 58 个菌株中的 81.48% 以上菌株表现抗性, 具有广谱抗性特点。稻瘟病菌粗毒素筛选结果表明, 来自转基因植株的幼胚愈伤组织诱导率随培养基中粗毒素浓度提高而降低, 粗毒素浓度达到 40% 时, 幼胚愈伤诱导率为 49.33%, 受体对照幼胚愈伤组织诱导率为 5%。田间诱发条件下, 转基因株系在大田的穗瘟发病率为 0%~50%, 抗性较受体对照大幅度提高。

关键词: 转基因水稻; 抗病基因; 稻瘟病; 抗谱; 粗毒素

中图分类号: Q943.2; S435.111.4⁺1; S511.03 **文献标识码:** A

文章编号: 1001-7216(2010)01-0031-05

由稻瘟病菌 *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr. (无性态: *Pyricularia grisea* Sacc.) 引起的稻瘟病, 是水稻生产上最具毁灭性的病害之一, 也是世界性的真菌病害^[1]。利用基因工程的方法解决稻瘟病的抗性育种问题已成为部分学者追求的目标。已有通过转导几丁质酶基因^[2]、植物抗毒素基因^[3]、几丁质酶-葡聚糖酶串联基因^[4]、天花粉蛋白基因^[5]、芥末防御素基因^[6]和水稻抗性基因 *Pi-ta*、*Pi-9*、*Pi-2* 等^[7-12] 提高水稻稻瘟病抗性的报道。*Pi-d2* 是单拷贝基因, 编码长度为 825 个氨基酸的跨膜受体蛋白激酶(RLK)。该激酶氨基端含有疏水性信号肽、B-lectin 结构域、PAN 域和 TM 域, 羧基端是典型的丝氨酸/苏氨酸激酶结构域(STK)。在水稻中尚未发现 RLK 含膜外 B-lectin 结构, 因而

Pi-d2 属于新的抗病基因类型, 其抗感差异是因一个单碱基突变造成的, 即抗病蛋白的第 441 氨基酸由异亮氨酸(I)突变为感病蛋白的甲硫氨酸(M)^[11]。本研究对由 pCB6.3kb、pCB5.3kb 和 pZH01-2.72kb 三个不同表达载体转化的转 *Pi-d2* 基因水稻株系进行稻瘟病抗性分析, 研究 *Pi-d2* 基因自身启动子驱动基因组序列和 35S 驱动的 cDNA 序列在转基因植株中的表达情况, 筛选广谱抗性转基因水稻株系, 为水稻抗病遗传育种提供基

收稿日期: 2009-05-25; 修改稿收到日期: 2009-08-31。

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET-04-0907); 教育部创新团队发展计划资助项目(IRT0453)。

第一作者简介: 陈德西(1977-), 女, 博士研究生。

础材料,并为水稻和其他禾本科作物抗病分子育种提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

所有转 *Pi-d2* 基因材料是经过分子验证为阳性, T_2 代经潮霉素抗性分析为单个潮霉素抗性位点,苗期接种鉴定为抗稻瘟病生理小种 ZB15 的株系。其中,转基因材料的目的基因 *Pi-d2* 有 3 种不同的表达载体,包括含有长为 3.2 kb 自身启动子驱动的 *Pi-d2* 基因组序列的 pCB6.3kb,含有长为 2.2 kb 自身启动子驱动的 *Pi-d2* 基因组序列的 pCB5.3kb 和 35S 驱动的 *Pi-d2* 基因全长 cDNA 序列的表达载体 pZH01-2.72kb。转基因株系编号中以 6K、5K 和 Zh01 代表所转化的载体 pCB6.3kb、pCB5.3kb 和 pZH01-2.72kb。阴性对照为 pZH01-TP309 载体转化的转基因株系台北 309。pZH01-TP309 载体的目的基因为与抗性基因 *Pi-d2* 对应的感病品种台北 309 的 *Pi-d2* cDNA 基因。

1.2 方法

1.2.1 转 *Pi-d2* 基因高代材料的抗谱测定

用于本组试验的材料有 9 个转 *Pi-d2* 基因独立转基因系(T_5 或更高代,已纯合稳定)、非转化的原种对照品种日本晴(J)、台北 309(TP309)、中花 9 号(ZH9)、感病对照品种丽江新团黑谷(LTH)和抗病对照品种地谷。所用菌株有 39 个,由四川农业大学水稻研究所保存。抗谱测定试验在四川农业大学水稻研究所的病圃进行。病圃共被划分成 114 个小区,每一材料在每一小区播 1 穴(10~20 粒),重复 3 次。待秧苗长至 3 叶 1 心时,喷雾接种。接种稻瘟病菌孢子浓度为 $2.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$ 个/mL。7 d 后调查一次病级,14 d 后重复调查一次。稻瘟病病情调查参照国际水稻研究所的病圃鉴定水稻品种抗性评价方法,共分 9 级。0 级为完全无病斑,1~3 级为抗病,4~9 级为感病。

1.2.2 转 *Pi-d2* 基因早代纯合材料的抗谱测定

选取 4 个转 *Pi-d2* 基因 T_2 代纯合株系的饱满种子,浸种至露白后,分别播入装有草炭和蛭石的育秧盘(钵)中,出苗后用木村营养液培养幼苗。稻苗在 4 叶期进行喷雾接种鉴定。喷雾接种的菌株有 58 个,由中国农业科学院收集提供。菌株的孢子液浓度为 $3.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$ 个/mL。接种后的稻苗在相对湿度 100%、温度 26~28℃ 保湿箱内保湿 24 h,然后移入由 MPC-120 型人工气候室(相对湿

度 95%、温度 26℃)内发病,通过喷水以保持稻叶持续湿润。接种后 7 d 调查病情。稻瘟病病情调查按清泽的调查标准进行,根据病斑型和病斑数目评定被测材料的发病等级,表现 HR(高抗)、R(抗)、MR(中抗)的材料(单株)归为抗病类型,表现 MS(中感)、S(感)的材料(单株)归为感病类型。

1.2.3 转基因材料的稻瘟病菌粗毒素筛选

稻瘟病菌粗毒素提取具体操作如下:用打孔器(直径 2 cm)对在平板上培养同样天数的菌株(A13、B15、E3、C15、D7、G1、H2、F1、北 007 和 Tetep)打孔定量,取下 4 片同样大小的菌片置于 60 mL NB2 培养液中,每个菌株重复 3 次;在 27~30℃ 条件下振荡(160~220 r/min)培养 20 d;用双层纱布滤出菌丝,将菌丝于研钵中研磨成浆,倒回原培养液中振荡 10 min,再用双层纱布过滤,滤液经 4000 r/min 下离心 30 min,取上清液,将 10 个菌株菌液等量混合,然后高压灭菌。冰箱中保存备用。

取授粉 14 d 左右的转基因水稻幼胚和对照材料,经过消毒,接种在分别添加 0%、10%、20%、30%、40%、50% 粗毒素的 NB2 培养基上,黑暗、25℃ 条件下培养 14 d,观察愈伤组织生长情况。

1.2.4 转基因材料的田间抗性鉴定

将苗期叶瘟鉴定中对 ZB15 具有抗性的材料,移至稻瘟病抗性鉴定点进行稻瘟病诱发鉴定,材料四周种植感病品种丽江新团黑谷或汕优 63。从播种至收获不使用任何杀菌农药,重施氮肥。于成熟期调查材料穗颈瘟的发病情况。

2 结果与分析

2.1 转基因材料的抗谱测定

2.1.1 转 *Pi-d2* 基因高代材料的抗谱测定

从表 1 和表 2 可以看出,对照丽江新团黑谷对 39 个菌株皆表现高感,说明接种试验发病充分。用 pCB6.3 kb 转入 *Pi-d2* 基因的中花 9 号株系 ZH-6K-4 对 14 个菌株感病,25 个抗病,抗病频率为 64.1%,用 pCB6.3 kb 转入 *Pi-d2* 基因的日本晴抗病频率为 87.2%,而用 pCB5.3kb 转入 *Pi-d2* 基因的转基因中花 9 号株系 ZH-6K-5 抗病频率为 61.5%,转基因日本晴株系 J-5K-8-14 抗病频率为 43.6%;转入全长 *Pi-d2* cDNA 的中花 9 号株系抗病频率为 56.4%,阳性对照转基因株系(含全长 *Pi-d2* cDNA) TP-Zh01-62-5、TP-Zh01-72-2、TP-Zh01-81-5 和 TP-Zh01-92-3 的抗病频率分别为 91.7%、79.5%、43.6% 和 60.0%。值得注意的是,来自转

表 1 转基因品系苗期稻瘟病抗性接种鉴定

Table 1. Resistance identification of transgenic lines inoculated with *M. grisea*.

菌株 Strain	ZH9	1	2	3	LTH	地谷 Digu	TP90	TP309	4	5	6	7	日本晴 Nipponbare	8	9
97-56-1	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R
8	S	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R
Tetep	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R
97-63-2	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	S	R	R
F1	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
H2	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R
91-17-2	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R
3	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R
C15	S	R	S	S	S	R	S	S	R	R	S	R	S	R	R
B29	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R
B9	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
45	S	R	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R
91-13-2	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R
47	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R
14	S	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S	R
97-28-1	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S	S
A13	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R
27	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
61-2-1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
北 007	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
62-2-1	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	S	R	R
D7	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R
11-1-3	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	S	R	R
25	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R
95-82-1	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R
G1	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R
E3	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R
12	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R
B15	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R
19	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R
11	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S	R
B3	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
B13	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S
B31	S	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R
97-51-1	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R
44-2-3	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R
12-2-2	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R
97-53-1	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R
B7	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R

1~9 分别代表转基因株系 ZH-6K-4、ZH-6K-5、ZH-Zh01-4、TP-Zh01-62-5、TP-Zh01-72-2、TP-Zh01-81-5、TP-Zh01-92-3、J-5K-8-14 和 J-6K-11，转基因株系编号中 ZH、TP 和 J 分别代表转化受体中花 9 号、台北 309 和日本晴；6K、5K 和 Zh01 分别代表转化载体 pCB6.3kb、pCB5.3kb 和 pZH01-2.72kb。ZH9，中花 9 号；LTH，丽江新团黑谷；TP90，阴性对照，pZH01-TP309 载体转化的转基因株系台北 309。

1-9 represent the transgenic rice line ZH-6K-4, ZH-6K-5, ZH-Zh01-4, TP-Zh01-62-5, TP-Zh01-72-2, TP-Zh01-81-5, TP-Zh01-92-3, J-5K-8-14 and J-6K-11, respectively. ZH, TP and J represent the receptor variety Zhonghua 9, Taipei 309 and Nipponbare, respectively. 6K, 5K and Zh01 represent the transgenic vectors pCB6.3kb, pCB5.3kb and pZH01-2.72kb, respectively. ZH9, Zhonghua 9; LTH, Lijiangxintuan-heigu; TP90, Transgenic Taipei 309 transformed with pZH01-TP309(Negative control).

台北 309 全长 *Pi-d2* cDNA 的株系发病情况较台北 309 严重。可见，抗病基因 *Pi-d2* 导入到抗病品种中，其抗病频率并未提高，而导入感病品种中，其抗病频率显著提高。

2.1.2 转 *Pi-d2* 基因早代纯合材料的抗谱测定

对转基因早代纯合株系 CH3、CH4、CH5 和 CH6(目的基因 *Pi-d2* 在 35S 驱动下表达)进行抗谱

测定(表 3)。抗病对照地谷对中国农业科学院收集的 56 个菌株全抗，总抗性频率达到 100%；受体品种 TP309 对 19 个菌株(33.93%)表现抗病；而转基因品系对 81.48%以上的菌株表现抗性，对稻瘟病的抗性较对照大幅度提高。

2.2 转基因植株的稻瘟病菌粗毒素筛选

从稻瘟病菌的粗毒素中已提纯出稻瘟病菌素、

表 2 转基因高代水稻株系的抗谱测定

Table 2. Analysis of resistance spectrum to rice blast in advanced-generation transgenic rice lines.

品系 Transgenic rice line	接种菌株数 不感染菌株数		总抗性频率 Total of resistance frequency/%
	No. of inoculated strains	No. of non- infectious strains	
ZH9(受体)	39	22	56.4
ZH9(Receptor)			
ZH-6K-4	39	25	64.1
ZH-6K-5	39	24	61.5
ZH-Zh01-4	39	22	56.4
TP309(受体)	39	0	0.0
TP309(Receptor)			
TP90(阴性对照)	39	0	0.0
TP90(Negative control)			
TP-Zh01-62-5	39	36	91.7
TP-Zh01-72-2	39	31	79.5
TP-Zh01-81-5	39	17	43.6
TP-Zh01-92-3	39	23	60.0
日本晴(受体)	39	2	5.1
Nipponbare(Receptor)			
J-5K-8-14	39	17	43.6
J-6K-11	39	34	87.2

吡啶羧酸、细交链孢菌酮酸、稻瘟醇、香豆素等 5 种毒素。粗毒素对水稻种子萌芽,胚芽、胚根的伸长有较大的抑制作用,并可作为筛选压在愈伤组织水平上筛选抗病突变体^[13]。为考证转稻瘟病抗性基因是否会提高水稻对稻瘟病粗毒素的抗性,我们选取了一个转 *Pi-d2* 基因稳定株系 TP-Zh01-62-5,进行幼胚在不同稻瘟病粗毒素筛选压下的愈伤组织诱导实验。结果表明,随稻瘟病粗毒素液浓度的提高胚性愈伤组织诱导率明显下降,当粗毒素浓度达到 50% 时,对照愈伤组织诱导率降低至零,生长完全受到抑制;此时转基因植株幼胚愈伤组织诱导率仍有 30.1%,对稻瘟病粗毒素的抗性较对照有很大提高

表 4 不同浓度的稻瘟病菌粗毒素对转基因幼胚的诱导效果

Table 4. Effects of different rice blast crude toxins on induction frequency of rice embryo of transgenic plants.

粗毒素浓度 Concentration of crude toxin in medium/%	愈伤组织生长状况 Growth of callus	
	对照 Control	转基因株系 Transformant
0(CK)	生长正常,出愈率在 90% 以上	生长正常,出愈率在 90% 以上
10	出愈率正常,生长状态与对照无明显差异	生长正常
20	出愈率正常,生长状态与对照无明显差异	生长正常
30	出愈率 60.95%,部分愈伤组织生长受到抑制,愈伤组织颜色由浅黄色变成黄色	生长状态和对照无明显差异,出愈率 71.4%
40	出愈率为 5%,大部分幼胚只长胚根	生长受到抑制,出愈率 49.33%
50	生长完全受抑制,出愈率为零	大部分生长受到抑制,出愈率为 30.1%,长出的愈伤组织生长缓慢,颜色发黄

表 3 转基因水稻纯合株系的抗谱测定

Table 3. Resistance spectrum to rice blast in homozygous transgenic rice lines.

品系 Transgenic rice line	接种菌株数 不感染菌株数		总抗性频率 Total of resistance frequency/%
	No. of inoculated strains	No. of non-infectious strains	
地谷(CH1)	56	56	100.00
TP309(CH2)	56	19	33.93
CH3	58	50	86.21
CH4	58	52	89.66
CH5	54	44	81.48
CH6	56	50	89.29

(表 4)。这为用稻瘟病粗毒素筛选抗稻瘟病突变体的可行性提供了又一证据。

2.3 转基因植株的田间抗性测定

在 3 个点(成都温江、雅安和蒲江)3 年的连续测定发现,对照感病品种严重感染穗颈瘟,穗颈瘟发病率为 100%;一些转基因植株在整个生育期表现出对稻瘟病的抗性,一些则表现为抗叶瘟、感穗瘟。但它们的发病程度较对照轻且发病延迟。这种情况也发生在转溶菌酶基因的南 29 的转基因品系中^[14]。

3 讨论

3.1 转 *Pi-d2* 基因植株的稻瘟病抗性

本研究在温室接种、稻瘟病粗毒素筛选和田间诱发发病条件下发现转 *Pi-d2* 基因水稻对稻瘟病都表现较好的抗性。不论是 *Pi-d2* 基因的基因组序列还是 cDNA,导入到感病品种丽江新团黑谷、日本晴和台北 309 后转基因植株苗期抗病性增强,叶片上病斑数量、大小都较受体下降;穗瘟发病率也相对减

少,抗病谱增加,而且以相同载体转化获得的转基因株系抗谱不同。这可能与外源基因在受体植物中整合的位点和表达量相关。外源基因整合在水稻染色体中的位置不确定,不同染色体特异区段整合对植株内源基因的时空表达产生不同的影响,即位置效应,这种情况在转几丁质酶-葡聚糖酶基因水稻稻瘟病抗谱分析中也有报道^[15]。由3个不同载体转化的转基因株系的抗谱也不同,这尚待进一步增加样本分析具体的原因。目的基因在感病植株中的表达对抗病频率的提高作用十分明显,抗病频率最高达91.7%;而在抗性品种中花9号中穗颈瘟发病率下降,但抗病谱并未增加。*Pi-d2* 基因在中花9号中的过表达对抗谱的提高作用不是很大。

3.2 启动子对外源基因表达活性的影响

启动子是决定外源基因在受体植物中表达情况的关键因子。在构建表达载体时可用组成型启动子、组织特异型启动子和诱导型启动子。水稻上常用的组成型启动子有花椰菜花叶病毒(CaMV)35S启动子、玉米乙醇脱氢酶I基因(*Adh I*)启动子、玉米泛蛋白基因(*Ubi1*)启动子、根癌农杆菌胭脂碱合成酶基因(*Pnos*)启动子、水稻肌动蛋白基因(*Act1*)启动子等。外源基因在组成型启动子驱动下在受体植物中持续地、非特异性和高效表达,结果造成浪费,并且往往在需要外源基因大量表达的时间或特定组织部位则因表达量过低而达不到预期效果。在植物抗病基因工程中最理想的启动子是天然启动子,即外源基因本身启动子。本研究中发现,*Pi-d2* 基因自身启动子与外源组成型启动子都可以驱动目的基因在受体植株中表达。这些证据提示抗病基因工程中天然启动子的广阔应用前景。

3.3 *Pi-d2* 基因在基因工程中的应用前景

根据本研究的结果,*Pi-d2* 基因是一个抗性强、抗谱较广的抗病基因。在已知克隆的10多个水稻抗性基因中,*Pi-9*、*Pi-2* 和 *Piz-t* 也是广谱抗性基因,其余几个抗性基因抗谱相对较窄,抗性机制单一,具有高度专化性,抵抗多种病原能力低,一旦稻瘟病群体结构发生变化,转基因植株抗病性就可能丧失。大量的实验证明转化多个防卫基因对提高植物的抗病性是可行的^[16-17]。根据抗性基因对稻瘟病菌的抗谱和不同的作用机制,可把不同的抗性基因构建在同一表达载体上,在水稻植株中同时表达,以获得广谱持久抗性株系,比如 *Pi-9* 与 *Pi-d2* 同时导入水稻中表达。这些都有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Qu S H. Rice diseases. 2nd edn. Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute, CABI, 1985: 109-201.
- [2] Nishizawa Y, Nishio Z, Nakazono K, et al. Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 383-390.
- [3] Stark-lorenzen P, Nelke B, Han G, et al. Transfer of a grapevine synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep*, 1997, 16: 668-673.
- [4] Feng D R, Xu X P, Wei J W, et al. Enhancement of rice disease resistance by two antifungal protein genes. *Acta Bot Sin*, 1999, 41(11): 1187-1191.
- [5] Ming X T, Wang L J, An C C, et al. Resistance to rice blast (*Pyricularia oryzae*) caused by the expression of trichosanthin gene in transgenic rice plants transferred through *Agrobacterium* method. *Chin Sci Bull*, 2000, 19: 1774-1778.
- [6] Kanzaki H, Nirasawa S, Saitoh H, et al. Overexpression of the wasabi defensin gene confers enhanced resistance to blast fungus (*Magnaporthe grisea*) in transgenic rice. *Theor Appl Genet*, 2002, 105: 809-814.
- [7] Wang Z X, Yano M, Yamanouchi U, et al. 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.
- [8] Bryan G T, Wu K S, Farrall L, et al. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell*, 2000, 12: 2033-2045.
- [9] Qu S H, Liu G F, Zhou B, et al. The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes an NBS-LRR protein and is a member of a multigene family in rice. *Genetics*, 2006, 172: 1901-1914.
- [10] Zhou B, Qu S H, Liu G F, et al. The eight amino acid differences within three leucine-rich repeats between *Pi2* and *Piz-t* resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2006, 19: 1216-1228.
- [11] Chen X W, Shang J J, Chen D X, et al. A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. *Plant J*, 2006, 46: 794-804.
- [12] Lin F, Chen S, Que Z Q, et al. Molecular cloning and characterization of the rice blast resistance gene *Pi37* in the well-known cultivar St. No. 1//Abstracts of the 4th International Rice Blast Conference. Changsha, China, October 9-14, 2007. Changsha: [s. n.], 2007.
- [13] 刘文萍, 刘丽艳, 吕晓波, 等. 稻瘟病菌粗毒素的制备及其致病力的测定. 黑龙江农业科学, 1997(6): 14-17.
- [14] 许明辉, 李成云, 李进斌, 等. 转溶菌酶基因水稻稻瘟病抗谱分析. 中国农业科学, 2003, 36(4): 387-392.
- [15] 许明辉, 李成云, 李进斌, 等. 转几丁质酶-葡聚糖酶基因水稻稻瘟病抗谱分析. 中国水稻科学, 2003, 17(4): 307-310.
- [16] Cao M X, Huang J Q, Wei Z M, et al. *Agrobacterium*-mediated multiple gene transformation in rice using a single vector. *J Integr Plant Biol*, 2005, 47(2): 233-242.
- [17] 陈红旗, 陈宗祥, 倪深, 等. 利用分子标记技术聚合3个稻瘟病基因改良金23B的稻瘟病抗性. 中国水稻科学, 2008, 12(1): 23-27.