

蛋白激发子基因 *peaTl* 植物表达载体的构建及其转化棉花的研究*

唐宏琨, 曾洪梅, 杨秀芬, 袁京京, 邱德文**

(中国农业科学院植物保护研究所, 农业部生物防治重点开放实验室, 北京 100081)

摘要 [目的] 构建蛋白激发子基因 *peaTl* 的植物表达载体并转化棉花品种‘CCRI24’。[方法] 设计含有 *Pst* I 和 *Xho* I 酶切位点的引物, 以质粒 pET28a-*peaTl* 为模板扩增得到 *peaTl* 序列, 将其通过中间载体 pG4AS-cup 克隆到植物表达载体 pCambia2300 上, 通过农杆菌介导法转化棉花品种‘CCRI24’, 诱导并筛选抗性愈伤和胚性愈伤, 通过 PCR, southern 杂交和 RT-PCR 检测筛选的棉株。[结果] 构建了含有增强子和多联终止子的植物表达载体 pCambia2300-*peaTl*, 获得了大量的胚状体和 4 棵再生苗并嫁接成活, 验证了蛋白激发子基因 *peaTl* 已经整合到再生苗 2 和 4 基因组当中。[结论] 本研究为进一步开展蛋白激发子基因 *peaTl* 转化棉花的研究提供了基础材料。

关键词 蛋白激发子; *peaTl*; 农杆菌; 转化; 棉花

中图分类号: S 188; Q785 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2011.03.009

Construction of plant expression vector for elicitor gene *peaTl* and its transformation into cotton

Tang Hongkun, Zeng Hongmei, Yang Xiufen, Yuan Jingjing, Qiu Dewen

(Key Laboratory for Biological Control of Ministry of Agriculture, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract [Objective] To construct the plant expression vector of the protein elicitor gene *peaTl* and transfer it into ‘CCRI24’. [Method] The *peaTl* gene was amplified with the plasmid pET28a-*peaTl* by specific primers harboring *Pst* I and *Xho* I sites. After cloned in the intermediate vector pG4AS-cup, *peaTl* was then inserted into pCambia2300 to construct the plant expression vector pCambia2300-*peaTl*. The resulting vector was transferred into CCRI24 by using Agrobacterium-mediated method, and the resistant calli and embryonic calli were induced and screened out, and the transformation of *peaTl* was confirmed by PCR, southern blot and RT-PCR. [Result] The plant expression vector pCambia2300-*peaTl* which contains enhancer and poly-terminator was constructed successfully, and a lot of embryoids and 4 regenerate seedlings were screened out from embryonic calli, and 4 regenerate seedlings were grafted on CCRI24. The result of molecular identification indicated that *peaTl* was inserted into the genome of regenerate seedling no. 2 and no. 4. [Conclusion] This study provided some fundamental materials for the further research of cotton transformation of the protein elicitor gene *peaTl*.

Key words protein elicitor; *peaTl*; agrobacterium; transformation; cotton

自 1987 年 Umbeck 首次报道通过农杆菌介导法^[1], 将卡那霉素抗性基因转入棉花以来, 棉花转基因研究迅速发展。国内外利用农杆菌介导法已将抗虫、抗除草剂等有价值的目的基因导入棉花, 得到了稳定遗传的转基因棉花。我国农业部于 1997 年批

准了转基因棉花的商业化种植, 至 2007 年转基因棉花已占棉花种植面积的 60% 以上, 产生了显著的经济、生态和社会效益。

蛋白激发子是一类能够诱导植物产生防卫反应的信号分子, 在植物与病原菌的相互识别中起重要作

收稿日期: 2010-04-07 修订日期: 2010-06-11
基金项目: 转基因重大专项(2008ZX08010-004; 2009EX08001-018B)

* 致谢: 感谢中国农业科学院棉花研究所刘传亮老师惠赠棉花品种 CCRI24, 感谢中国农业科学院生物技术研究所以郭三堆研究员提供中间载体 pG4AS-cup。

** 通信作者 Tel: 010-82105929; E-mail: dewenqiu@hotmail.com

用。其对病原菌无直接毒杀作用,通过信号传导诱导植物产生乙烯、水杨酸、吲哚乙酸、茉莉酸、植保素和病程相关蛋白等^[2-3],调节植物的新陈代谢,激活植物的免疫系统,从而促进植物生长、增强植物抵抗病原菌的能力,有效防止或减轻病害的发生。*peaT1* 是本实验室从极细链格孢(*Alternaria tenuissima*)中分离出来的蛋白激发子,具有诱导多种植物产生系统抗性、促进植物生长、改善作物品质等作用^[4-6]。*peaT1* 的编码基因已被克隆(GenBank 登录号为 EF030819),在大肠杆菌和毕赤酵母中的表达蛋白仍具有诱导植物抗旱、促进根系生长等生物活性^[7-8]。

关于蛋白激发子转基因植物的研究目前已有报道,并展现出较好的应用前景。Qiu^[9]等将蛋白激发子基因 *pemG1* 转化水稻和烟草,转基因作物表现出较好的抗病性。邵敏等^[10]将来自水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)的 *hrfAXoo* 基因转化水稻,转基因株系中水稻白叶枯病菌的生长明显受到抑制。蒋冬花等^[11]将隐地蛋白突变基因 *CryK13V* 整合到烟草基因组中,结果表明转化植株的相关抗病性均有提高。本研究利用农杆菌介导法开展激发子基因 *peaT1* 的转基因棉花研究,建立了有效的转基因植株再生体系,获得了再生苗及大量的胚状体,为进一步培育抗病虫、高产优质的棉花品种提供了基础材料。

1 材料与方法

1.1 材料

蛋白激发子基因 *peaT1* 由本实验室从极细链格孢菌克隆获得,质粒 pET28a-*peaT1* 由本实验室保存;植物表达载体 pCAMBIA2300 和农杆菌 LBA4404 由本实验室保存;中间载体 pG4AS-cup 由中国农业科学院生物技术所郭三堆研究员惠赠;受体棉花品种‘中棉 24’(‘CCRI24’)由中国农业科学院棉花科学研究所提供。

ExTaq DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶、DNA Marker、pMD18-T Simple 载体和 DNA 片段回收试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司,大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 和反转录试剂盒 EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司,质粒小提试剂盒购自天根生化科技有限公司,柱式植物 RNAout 试剂盒购自天恩泽生物公司,所用引物由英骏生物技术有限公司(Invitrogen)

合成。卡那霉素和羧苄青霉素购自 AMRESCO 公司,其他化学试剂为国产分析纯产品。

1.2 植物表达载体的构建

设计含有 *Pst* I 和 *Xho* I 酶切位点的引物 primer1 (TACTGCAGATGGCCAACCCCGCAT-TGAAGAG) 和 primer2 (CGCTCGAGCTATAT-GCTCAGCGCCATGATGGA),以质粒 pET28a-*peaT1* 为模板扩增 *peaT1* 序列,引入 *Pst* I 和 *Xho* I 酶切位点。将 PCR 产物回收后连接 pMD18-T Simple 载体,转化 DH5α 感受态细胞后提取质粒。将提取的质粒和中间载体 pG4AS-cup 分别用 *Pst* I 和 *Xho* I 双酶切,连接含有目的基因 *peaT1* 的小片段和中间载体片段,得到重组载体 pG4AS-*peaT1*。将重组载体 pG4AS-*peaT1* 和 pCAMBIA2300 分别用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切,回收目的片段经 T₄ DNA 酶连接构成植物表达载体 pCAMBIA2300-*peaT1*。构建好的植物表达载体 pCAMBIA2300-*peaT1* 热激法转化 DH5α 感受态细胞,提取质粒用 *Pst* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定目的基因 *peaT1* 是否正确插入。采用冻融法将酶切鉴定的植物表达载体 pCAMBIA2300-*peaT1* 转化农杆菌 LBA4404 菌株。

1.3 农杆菌介导法转化 CCRI24

1.3.1 菌株培养及无菌苗制备

挑取含有目的基因和选择标记基因的单菌落,接种于含 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 链霉素的 YEB 液体培养基中,28 ℃ 振荡过夜暗培养至对数生长期。用 YEB 液体培养基稀释菌液,再振荡培养 4~6 h,至 A₆₀₀ 值为 0.5 备用。‘CCRI24’棉花种子用硫酸脱绒后,自来水洗掉种子表面硫酸并晾干。70%乙醇表面消毒种子 1 min,弃去乙醇,无菌水漂洗。再用 0.1% 的 HgCl₂ 表面消毒 30 min,无菌水漂洗 4 次,种于 1/2MS 培养基上,28 ℃,2 000 lx 光照培养 7 d 备用。

1.3.2 共培养

选取发育良好的无菌苗,将其下胚轴切成 5~8 mm 长的茎段,浸泡在预先培养好的农杆菌菌液中。15 min 后取出,放置在铺有一层滤纸的含有 2, 4-D、KT 和 IAA 的 MS 培养基上,21 ℃ 共培养 48 h,然后转移到含有 50 mg/L 卡那霉素、500 mg/L 羧苄青霉素的上述培养基上,28 ℃、2 000 lx、每天光照 14 h 培养(以下培养条件相同),通过调整激素的浓度以诱导抗性愈伤组织^[12-13]。

1.3.3 胚性愈伤及胚状体的诱导

将抗性愈伤组织转移到胚性愈伤诱导培养基上 (MS+0.01 mg/L 2,4-D+0.01 mg/L KT+0.01 mg/L IAA), 45 d 左右继代 1 次。将米黄色的颗粒状胚性愈伤转移到胚状体诱导培养基上 (MS-NH₄NO₃+KNO₃ 加倍+无激素+Gln 1.0 g/L+Asn 0.5 g/L+活性炭 1.0 g/L+AgNO₃ 40 mg/L), 30 d 继代一次直到出现胚状体^[14-15]。

1.3.4 再生苗的培养及嫁接

将诱导出的胚状体转移到再生苗培养基上 (MS+IAA 0.1 mg/L+6-BA 0.1 mg/L+Gln 1.0 g/L+Asn 0.5 g/L+活性炭 1.0 g/L+AgNO₃ 40 mg/L), 30 d 左右继代一次。在装有营养土的土钵中种上普通棉花种子, 待子叶完全展开时用作砧木苗。劈接法将再生棉株嫁接到砧木苗上, 浇少量水后用透光塑料袋密封嫁接苗, 25℃ 培养 7 d 左右, 慢慢透气炼苗 2~3 d 即可移栽温室。

1.4 再生苗的分子检测

1.4.1 再生苗的 PCR 分析

取幼嫩再生棉花叶片, 参照 CTAB 法提取总 DNA, 用 primer1 和 primer2 进行 PCR 扩增, 验证外源基因的整合情况。

1.4.2 再生苗的 southern blot 分析

CTAB 法提取再生棉株 2 和 4 及 PCR 检测呈阴性的再生苗基因组 DNA, 用 *EcoR* I 充分酶切基因组 DNA 约 16 h, 40 V 电压下以 0.8% 琼脂糖凝胶 (不加染料) 电泳 10~12 h, 成像后切掉凝胶边角作为标记。参照 Southern 的方法^[16], 并结合 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) 说明书, 对经 PCR 检测呈阳性的再生苗进行 southern blot 分析, 以质粒 pCambia-2300-*peaTl* 作为阳性对照, PCR 检测呈阴性的再生苗为阴性对照。

1.4.3 再生苗的 RT-PCR 分析

参照天恩泽柱式植物 RNAout 试剂盒方法, 提取经 PCR 检测呈阳性棉花植株叶片总 RNA, 参照全式金 EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒合成 cDNA, 进行 RT-PCR 分析。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体的构建

从转化 pCambia2300-*peaTl* 的大肠杆菌 DH5α 中提取质粒, 用 *Pst* I 和 *Xho* I 双酶切, 如图 1

所示, 酶切所得片段大小与理论值 624 bp 一致, 说明 *peaTl* 插入预期位点, 载体构建成功, 该载体含有加倍增强子元件、Ω 和 Kozak 序列及多联终止密码子序列的表达盒, 可以增强目的基因的表达^[17]。

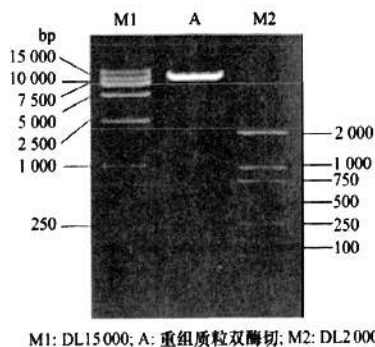


图 1 重组质粒酶切鉴定

2.2 农杆菌介导法转化 CCRI24

2.2.1 抗性愈伤的诱导

经共培养的无菌苗下胚轴切段转移到 MS 培养基上诱导愈伤组织, 抗性愈伤组织的诱导和增殖受激素种类和浓度影响比较大。如表 1 所示, 当只有 KT、IAA 时, 愈伤组织生长缓慢, 外植体长根多, 只有 KT、2,4-D 时, 愈伤生长快, 愈伤多呈绿色硬块状不利于分化。只有 2,4-D 和 IAA 时, 愈伤表面多呈白色霜状坚硬状态, 不易分化。3 种激素浓度均为 0.1 mg/L 时, 愈伤组织生长速度不是很快, 多呈黄白色疏松状态, 有利于进一步分化成胚性愈伤。

表 1 激素对抗性愈伤诱导的影响

培养基	激素类型及浓度/mg·L ⁻¹			愈伤生长状态
	IAA	KT	2,4-D	
M1	0	0.1	0.1	致密、干燥、绿白相间
M2	0.1	0	0.1	表面白霜、坚硬
M3	0.1	0.1	0	生长缓慢、根多
M4	0.1	0.1	0.1	黄白、疏松、有色泽
M5	0.2	0.2	0.2	疯长、灰白、泥状

2.2.2 胚性愈伤及胚状体的形成

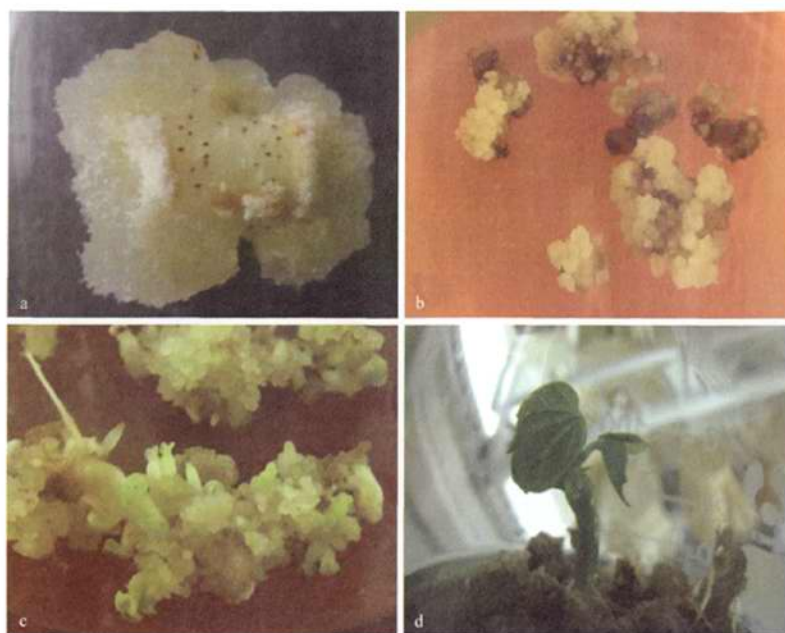
将灰白色疏松的抗性愈伤组织转移到胚性愈伤诱导培养基上, 继代 2~3 次, 可分化出米黄色的颗粒状胚性愈伤组织, 将其转移到胚状体诱导培养基上, 继代 1~2 次, 诱导出了大量不同形态的胚状体细胞, 根据其形态和生长期分为球形胚、心形胚、鱼雷胚和子叶胚。

2.2.3 转化苗的再生及嫁接

挑选子叶胚在成苗培养基上继代培养 2~3 次, 可诱导出生成苗, 如图 2 所示。由于棉花组织培养

生根比较困难,直接移栽成活率较低,本研究采用劈接法嫁接再生苗。将4棵长出4~5片叶的再生苗

嫁接到准备好的砧木上,保湿7d左右,缓慢透气炼苗3d移栽温室培养。



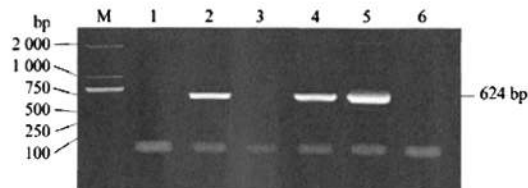
a: 抗性愈伤; b: 胚性愈伤; c: 胚状体; d: 再生苗

图2 棉花转化苗的再生

2.3 再生苗的分子检测

2.3.1 再生苗的PCR分析

以CTAB法提取的4棵再生苗的总DNA为模板,用引物 primer1 和 primer2 进行扩增,结果如图3所示。PCR检测结果初步表明,目的基因 *peaT1* 已经整合到再生棉株2和4的基因组当中。

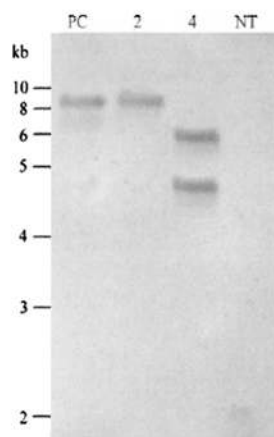


M: DL2000; 1~4: 不同的再生苗; 5: 阳性对照; 6: 空白对照

图3 棉花再生苗的PCR检测

2.3.2 再生苗的southern blot分析

从再生棉株2和4及PCR检测呈阴性的再生苗中提取DNA,进行southern杂交分析,如图4所示,质粒阳性对照及再生苗2和4均检测到杂交条带,其中再生苗4中目的基因为双拷贝插入,阴性对照没有杂交信号,表明目的基因 *peaT1* 已经整合到再生苗2和4基因组当中。



PC: 质粒阳性对照; 2: 再生苗2; 4: 再生苗4; NT: 非转化苗

图4 棉花再生苗的southern blot分析

2.3.3 再生苗的RT-PCR分析

从PCR阳性株的叶片中提取总RNA,以合成cDNA第1链为模板,primer1和primer2的PCR结果如图5所示,再生棉苗2和4均扩增到和阳性对照大小一致的条带,空白对照则没有目的条带,表明目的基因 *peaT1* 已经整合到再生苗2和4当中,并成功转录。

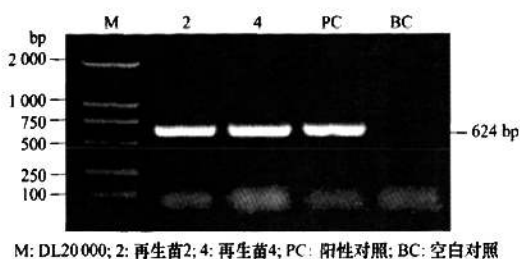


图 5 再生苗的 RT-PCR 分析

3 讨论

棉花的农杆菌转化已经开展多年,并在许多品种上取得了成功。与其他作物相比,棉花组织培养受基因型限制,周期较长,体细胞胚胎发生困难等限制了其广泛应用^[18]。组织培养中诱导出的胚性愈伤,在初次继代及随后胚状体诱导过程中会出现严重的褐化现象,导致胚性愈伤死亡。本研究中胚性愈伤继代时多伴有褐化现象,在培养基中添加活性炭和硝酸银一定程度上降低了褐化程度,需要进一步尝试更有效的办法避免或减轻褐化,以提高植株的再生率。针对棉花组织培养生根困难的问题,目前多采用嫁接法以缩短再生周期,保证再生苗的成活率。本研究采用劈接法嫁接再生苗,需要注意的是:嫁接过程中温度应控制在 23~25 °C^[19],嫁接后浇水不宜过多,否则会引起砧木苗与土壤接触部分褐腐死亡,缓慢透气使幼嫩棉苗不易失水太快而引起萎蔫死亡,能保证嫁接苗的成活。

蛋白激酶基因 *peaTl* 是通过诱导植物自身免疫,达到抗病促生的作用,其不针对某一种或某一类病害,不会产生抗药性,对环境安全,应用前景广阔^[20]。蛋白激酶基因 *peaTl* 与植物基因工程技术的广泛结合,将为培育具有广谱抗性的高产优质品种拓展更广阔的空间。

本研究采用农杆菌介导法,以棉花品种‘CCR124’为受体材料,成功转化 *peaTl* 基因并得到再生苗,经分子生物学方法检测 *peaTl* 已经整合到棉花基因组中,为开展激酶基因 *peaTl* 转化棉花的研究提供了基础材料。转 *peaTl* 基因的棉花能否产生对相关病害的抗性,表现出促进生长的功能,还需要进一步验证激酶基因 *peaTl* 在‘CCR124’中的表达,综合分析转基因棉花的农艺性状、抗病性,期望能从转基因棉花后代中筛选到优良品种。

参考文献

[1] Umbeck P, Johnson G, Barton K, et al. Genetically trans-

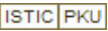
formed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants[J]. Bio Technology, 1987, 5: 263 - 266.

- [2] Okinaka Y, Yang C H, Herman E, et al. The P34 syringolide elicitor receptor interacts with a soybean photorespiration enzyme, NADH-dependent hydroxypyruvate reductase[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2002, 15(12): 1213 - 1218.
- [3] Weinberger F. Pathogen-induced defense and innate immunity in macroalgae[J]. Biological Bulletin, 2007, 213(3): 290 - 302.
- [4] 赵明治, 杨秀芬, 张明, 等. 一种促进植物根系生长的极细链格孢菌蛋白分离、纯化和生物功能[J]. 中国生物防治, 2007, 23(2): 170 - 173.
- [5] 邱德文, 杨秀芬, 刘峰, 等. 植物激活蛋白对烟草抗病促生和品质的影响[J]. 中国烟草学报, 2005, 11(6): 33 - 36.
- [6] 张志刚, 官春云, 杨晓萍, 等. 细链格孢菌蛋白激酶对棉株光合特性的影响[J]. 湖南农业大学学报, 2008, 34(1): 1 - 5.
- [7] 刘权, 李广悦, 曾洪梅, 等. 微生物蛋白激酶 *peaTl* 的获得及诱导水稻抗旱性的初步研究[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(3): 51 - 55.
- [8] 刘延锋, 曾洪梅, 玉山江, 等. 极细链格孢菌 *peaTl* 基因在毕赤酵母中的表达与功能分析[J]. 生物工程学报, 2009, 25(3): 413 - 417.
- [9] Qiu D W, Mao J J, Yang X F, et al. Expression of an elicitor-encoding gene from *Magnaporthe grisea* enhances resistance against blast disease in transgenic rice[J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(6): 925 - 933.
- [10] 邵敏, 王金生. 转 *hrfAXoo* 基因水稻对白叶枯病的抗性[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(4): 36 - 40.
- [11] 蒋冬花, 郭泽建, 郑重. 隐地蛋白(cryptogin)基因定点突变及其广谱抗病烟草转化植株的获得[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28(5): 399 - 406.
- [12] 刘传亮, 武芝霞, 张朝军, 等. 农杆菌介导棉花大规模高效转化体系的研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(5): 768 - 775.
- [13] 李燕娥, 焦改丽, 吴家和, 等. 棉花农杆菌介导高效转化体系[J]. 中国棉花, 2000, 27(5): 10 - 11.
- [14] 谢龙旭, 李云锋, 徐培林. 根瘤农杆菌介导的转 *aroAM12* 基因棉花植株的草甘膦抗性[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(2): 173 - 178.
- [15] 李宝平, 赵俊侠, 石跃进, 等. 关键因子对棉花利用农杆菌介导法导入外源基因的影响[J]. 作物学报, 2001, 27(1): 80 - 84.
- [16] Southern E M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis[J]. Journal of Molecular Biology, 1975, 98: 503 - 506.
- [17] 郭三堆, 崔洪志. 中国抗虫棉 GFMcryIA 杀虫基因的合成及表达载体构建[J]. 中国农业科技导报, 2000, 2(2): 21 - 26.
- [18] 谢德意, 金双侠, 郭小平, 等. 棉花胚性愈伤组织的转化及转基因胚状体的有效萌发与成苗技术研究[J]. 作物学报, 2007, 33(5): 751 - 756.
- [19] 李燕娥, 朱杭, 吴霞, 等. 转基因再生棉花嫁接初报[J]. 中国棉花, 2000, 27(3): 25 - 30.
- [20] 邱德文. 植物免疫与植物疫苗[M]. 北京: 科学出版社, 2008.

究

作者: [唐宏琨](#), [曾洪梅](#), [杨秀芬](#), [袁京京](#), [邱德文](#), [Tang Hongkun](#), [Zeng Hongmei](#), [Yang Xiufen](#), [Yuan Jingjing](#), [Qiu Dewen](#)

作者单位: [中国农业科学院植物保护研究所, 农业部生物防治重点开放实验室, 北京, 100081](#)

刊名: [植物保护](#) 

英文刊名: [PLANT PROTECTION](#)

年, 卷(期): 2011, 37(3)

参考文献(20条)

1. [Umbeck P;Johnson G;Barton K](#) [Genetically transformed cotton\(Gossypium hirsutum L.\)plants](#) 1987
2. [Okinaka Y;Yang CH;Herman E;Kinney A;Keen NT](#) [The P34 syringolide elicitor receptor interacts with a soybean photorespiration enzyme, NADH-dependent hydroxypyruvate reductase](#)[外文期刊] 2002(12)
3. [Weinberger F](#) [Pathogen-induced defense and innate immunity in macroalgae](#)[外文期刊] 2007(3)
4. [赵明治, 杨秀芬, 张明, 袁京京, 邱德文](#) [一种促进植物根系生长的极细链格孢菌蛋白质分离、纯化和生物功能](#)[期刊论文]-[中国生物防治](#) 2007(2)
5. [邱德文, 杨秀芬, 刘峥, 肖启明, 陈源, 于耀平, 陈梅](#) [植物激活蛋白对烟草抗病促生和品质的影响](#)[期刊论文]-[中国烟草学报](#) 2005(6)
6. [张志刚, 官春云, 邱德文, 梅正鼎, 杨晓萍, 刘开智](#) [细极链格孢菌蛋白激发子对棉株光合特性的影响](#)[期刊论文]-[湖南农业大学学报\(自然科学版\)](#) 2008(1)
7. [刘权, 李广悦, 曾洪梅, 杨秀芬, 邱德文](#) [微生物蛋白激发子PeaT1的获得及诱导水稻抗旱性的初步研究](#)[期刊论文]-[中国农业科技导报](#) 2009(3)
8. [刘延锋, 曾洪梅, 玉山江, 杨秀芬, 毛建军, 邱德文](#) [极细链格孢菌peaT1基因在毕赤酵母中的表达与功能分析](#)[期刊论文]-[生物工程学报](#) 2009(3)
9. [Qiu DeWen;Mao JianJun;Yang XiuFen;Zeng HongMei](#) [Expression of an elicitor-encoding gene from <i>Magnaporthe grisea</i> enhances resistance against blast disease in transgenic rice.](#) [外文期刊] 2009(6)
10. [邵敏, 王金生](#) [转hrfAXoo基因水稻对白叶枯病的抗性](#)[期刊论文]-[南京农业大学学报](#) 2004(4)
11. [蒋冬花, 郭泽建, 郑重](#) [隐地蛋白\(cryptogein\)基因定点突变及其广谱抗病烟草转化植株的获得](#)[期刊论文]-[植物生理与分子生物学学报](#) 2002(5)
12. [刘传亮, 武芝霞, 张朝军, 李风莲, 王玉芬, 李付广](#) [农杆菌介导棉花大规模高效转化体系的研究](#)[期刊论文]-[西北植物学报](#) 2004(5)
13. [李燕娥, 焦改丽, 吴家和, 石跃进, 吴霞, 范小平, 孟晋红, 李淑君, 陈志贤, 郭三堆, 朱祯, 田颍川](#) [棉花农杆菌介导高效转化体系](#)[期刊论文]-[中国棉花](#) 2000(5)
14. [谢龙旭, 李云锋, 徐培林](#) [根癌农杆菌介导的转aroAM12基因棉花植株的草甘膦抗性](#)[期刊论文]-[植物生理与分子生物学学报](#) 2004(2)
15. [李宝平, 赵俊侠, 石跃进, 郭三堆, 桑瑜, 齐宏立, 焦改丽, 陈志贤](#) [关键因子对棉花利用农杆菌介导法导入外源基因的影响](#)[期刊论文]-[作物学报](#) 2001(1)
16. [Southem E M](#) [Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis](#) 1975

17. [郭三堆, 崔洪志](#) [中国抗虫棉GFM Cry1A杀虫基因的合成及表达载体构建](#)[期刊论文]-[中国农业科技导报](#) 2000(2)
18. [谢德意, 金双侠, 郭小平, 张献龙](#) [棉花胚性愈伤组织的转化及转基因胚状体的有效萌发与成苗技术研究](#)[期刊论文]-[作物学报](#) 2007(5)
19. [李燕娥, 朱祯, 吴霞, 孟晋红, 范小平, 吴家和, 何鉴星, 史高川, 肖娟丽, 张换样](#) [转基因再生棉花嫁接初报](#)[期刊论文]-[中国棉花](#) 2000(3)
20. [邱德文](#) [植物免疫与植物疫苗](#) 2008

引用本文格式: [唐宏琨, 曾洪梅, 杨秀芬, 袁京京, 邱德文, Tang Hongkun, Zeng Hongmei, Yang Xiufen, Yuan Jingjing, Qiu Dewen](#) [蛋白激酶子基因peaT1植物表达载体的构建及其转化棉花的研究](#)[期刊论文]-[植物保护](#) 2011(3)