第 49 卷 第 11 期
2013 年 11 月

林　业　科　学
SCIENTIA SILVAE SINICAE

Vol. 49，No. 11
Nov.，2013

doi:10.11707/j.1001-7488.20131108

欧美杨 107 杨 β－1，3－葡聚糖酶（BG_2）基因遗传转化及对溃疡病的抗性分析*

牛庆霖[1]　王　迎[2]　罗　磊[2]　黄艳艳[2]　刘　静[2]　冯殿齐[1,2]　曹帮华[1]

（1. 山东农业大学农业生态与环境重点实验室　泰安 271018；2. 泰安市泰山林业科学研究院　泰安 271000）

摘　要：　以欧美杨 107 杨为受体材料，利用根癌农杆菌介导法转化 β－1，3－葡聚糖酶基因（BG_2），经卡那霉素筛选，PCR 和 Southern 检测显示有 4 个转基因阳性株系，初步证明外源目的基因已整合到 107 杨基因组中。离体抑菌试验表明转基因 107 杨（T-107 杨）细胞粗提液的抑菌能力明显强于未转基因对照 107 杨（C-107 杨）。在接种杨树溃疡病菌的培养基上培养，T-107 杨长势明显强于 C-107 杨；T-107 杨可明显抑制丙二醛（MDA）在植物体内的快速积累，其苯丙氨酸解氨酶（PAL）含量也明显高于 C-107 杨，PAL 含量 T-107 杨和 C-107 杨都有先升后降的趋势；15 天后 C-107 杨完全死亡，T-107 杨仍能生存。试验结果表明 BG_2 基因的表达提高了 107 杨对杨树溃疡病的抗性。

关键词：　欧美杨 107 杨；根癌农杆菌；BG_2 基因；基因转化；溃疡病

中图分类号：S718.46　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1001－7488（2013）11－0060－07

Transformation of *BG_2* Gene into *Populus* × *euramericana* cv. 'Neva' and Resistance of the Transgenic Poplar to Canker Disease

Niu Qinglin[1]　Wang Ying[2]　Luo Lei[2]　Huang Yanyan[2]　Liu Jing[2]　Feng Dianqi[1,2]　Cao Banghua[1]

（1. *Key Laboratory of Agricultural Ecology and Environment*，*Shandong Agricultural University*　*Tai'an* 271018；
2. *Taishan Institute of Forestry Science*　*Tai'an* 271000）

Abstract:　The BG_2 gene was transformed into *Populus* × *euramericana* cv. 'Neva' via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation method. Four transgenic lines were obtained through selection of kanamycin resistance，PCR and Southern analyses. These analyses suggested that the BG_2 gene was integrated into the plant genome. Then，the transgenic plants were tested for resistance to the fungal pathogen *Cytospora chrysosperma*. Crude extracts of the transgenic T-107 plants exhibited in vitro inhibitory activity against the fungal pathogen. When inoculated with *Populus* × *euramericana* canker disease，the T-107 plants grew better than the C-107 plants. The MDA levels of T-107 were lower than that in C-107. The PAL contents of both transgenic and control plants were firstly increased obviously then decreased；However，the PAL content of T-107 plants was always higher than that in C-107 plants. After 15 days，all the C-107 plants dead，but the T-107 was still alive. These results indicated that the transformed BG_2 gene could improve the resistance of T-107 plants to canker disease.

Key words:　*Populus* × *euramericana* cv. 'Neva'；*Agrobacterium tumefaciens*；BG_2 gene；gene transformation；canker disease

杨树在我国分布广泛且有大面积种植，人工林总面积超过 700 万 hm^2，天然林总面积超过 300 万 hm^2，中国现已成为全球杨树种植面积最大的国家。世界上天然杨树种类 100 多种，仅中国就有 53 种，其中欧美杨 107 杨（*Populus* × *euramericana* cv. 'Neva'）是中国林业科学研究院选育并重点推广的速生杨树优良品种，适合我国黄淮河流域及辽河以南流域广泛栽植，在新疆、内蒙古、陕西、宁夏、甘肃、重庆等地亦有引种。由于 107 杨具有速生、丰产的优点，现已在山东、河南、天津等地得到迅速推广。

收稿日期：2013－06－06；修回日期：2013－08－08。

基金项目：山东省科技发展计划重点项目（2009GG10009002）。

* 冯殿齐为通讯作者。

107 杨不仅丰富了我国森林资源，为国家生态环境建设、国民经济创收做出了重要贡献，而且已经成为发展农村经济的一项支柱产业。

杨树溃疡病一直是杨树枝干上的重大病害，是影响杨树产业规模化发展的重要限制因素。2007 年山东兖州和河南濮阳 107 杨遭受特大溃疡病病害，严重林地发病率在 70% 以上。随着 107 杨的大面积种植，由于树种结构的单一，杨树溃疡病越来越严重，解决 107 杨抗溃疡病的问题成了当务之急。传统育种和农药防治方法不能从根本上解决溃疡病对 107 杨的危害，相反在长时间的化学防治下，大大提高了病原菌对化学试剂的抗性，而且伴有大量的化学农药进入环境不断积累，危害人类生存环境（赵鑫等，2004）。利用转基因技术提高木本植物抗性（Song *et al.*，2013），是当前抗性育种研究的热点问题。由于 107 杨树具有易于无性繁殖、基因组小、转化率相比其他树种较高等特点，因此，利用抗病基因的遗传转化培育抗溃疡病杨树新品种是一种可行的选择。

β－1，3－葡聚糖酶是一种抗真菌蛋白，是植物受到病原菌侵染、细胞发生程序性死亡时自身释放出的一种有害物质（Josen *et al.*，1996），能催化真菌细胞壁中 β－1，3－葡聚糖多聚体的水解，将其降解为葡萄糖，从而抑制真菌的生长及增殖。Yoshikawa 等（1997）将 β－1，3－葡聚糖酶基因（BG_2）导入烟草（*Nicotiana tabacum*）中，其 β－1，3－葡聚糖酶活性高达非转基因烟草植株中的 4 倍，转基因烟草表现出对烟草黑胫病（*Phytophthora parasitica*）和烟草青枯病（*Ralstonia solanacearum*）的良好抗性；蓝海燕等（2000）将 BG_2 转入甘蓝型油菜（*Brassica napus*）中，获得的转基因甘蓝型油菜显示出较高的抗性。本研究的目的就是通过根癌农杆菌介导方法将 BG_2 基因导入欧美杨 107 杨，培育出抗溃疡病的 107 杨改良品系，为进一步的品种选育奠定基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

表达载体 pATC940 的 5′端经过 *Xba* Ⅰ 酶切，测序正确的目的基因 PCR 产物 5′端经过 *Spe* Ⅰ 酶切后，二者的酶切末端互为黏性末端。表达载体和目的基因 3′端均用 *Not* Ⅰ 酶切，二者经过 T4 DNA 酶连接，形成表达载体 pATCBG_2（图 1）。含植物抗病基因 BG_2 表达载体的根癌农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）LBA4404 由中国科学院遗传与发育生物学研究所王斌研究员提供；遗传转化中所用植物材料欧美杨 107 杨组培苗为本实验室保存；杨树溃疡病菌种（*Dothichiza populea*）由山东农业大学刘会香教授惠赠。

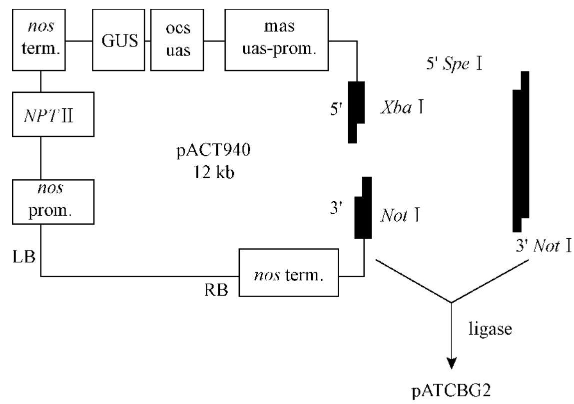

图 1　植物表达载体 pATCBG_2 的构建

Fig. 1　Construction of plant expression vector of pATCBG_2

1.2　方法步骤

1.2.1　含 BG_2 基因的农杆菌 LBA4404 的活化与培养　用接种环挑取保存在 YEP 固体培养基上含有 BG_2 基因的 LBA4404 单菌落，接种到 YEP 液体培养基中，28 ℃，150 r·min^{-1}过夜振荡培养约 12 h，待 OD_{600}值在 0.6～0.7 时，作为转化侵染时的菌液备用（刘静等，2011）。

1.2.2　农杆菌介导法转化　分别取生长健壮的 107 杨组培苗的叶片、茎段和叶柄为试验材料，浸染一定时间（梯度为 10，15，20 min），然后将材料取出，置于带无菌滤纸的培养皿上吸干多余菌液，接入培养基后和对照避光共培养 2 天（赵华燕等，2001）。之后，转入含有卡那霉素（50 mg·L^{-1}）和头孢霉素（400 mg·L^{-1}）的培养基上生长，用作分子检测和扩繁的材料。

1.2.3　转基因植株的 PCR 检测　按 CTAB 法提取转化植株和未转化植株的基因组 DNA，常规方法提取含 BG_2 基因的农杆菌质粒 DNA 作为阳性对照。BG_2 特异引物序列如下，

引物 1：5′-TATGCTACGGGATGCTAGGC-3′；

引物 2：3′-TCATACTAGACTGTCAGTC-5′。

PCR 扩增的反应体系为 25 μL：2.5 μL 10 × Buffer，0.4 mmol·L^{-1}dNTP，2 mmol·L^{-1} $MgCl_2$，1 U *Taq* DNA polymerase，1 μL 引物 1，1 μL 引物 2，1 μL模板 DNA，ddH_2O 加至终体积 25 μL。反应条件为：94 ℃预变性 4 min；94 ℃变性 45 s，55 ℃复性 45 s，72 ℃延伸 1 min，35 个循环；最后 72 ℃延伸 5 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖胶电泳，EB 染色，紫外下观察扩增结果。

1.2.4　转基因植株的 Southern 检测　对 PCR 检测结果阳性的转基因植株和未转基因的对照植株同时送到北京美莱博医学科技有限公司生物技术服务部采用 PCR 标记法进行 Southern 检测。具体方法：用 *Not* Ⅰ 和 *Sac* Ⅰ 双酶切 pATC*BG*$_2$ 质粒 DNA，DIG-dUTP 标记（地高辛杂交检测试剂盒），得到 800 bp 的片段为标记探针；取 10.0 mL Hyb 高效杂交液（Hyb-100），加入杂交管中，60 ℃杂交炉中预杂交 2 h；探针在 PCR 仪中 100 ℃变性 10 min，立即放冰水浴冷却 5 min；排尽预杂交液，在 10.0 mL Hyb 高效杂交液（Hyb-100）加入 4.0 μL 新变性好的探针，混匀，60 ℃杂交仪中杂交过夜；使用美莱博 DIGD-110“地高辛杂交检测试剂盒 Ⅱ（化学发光法）”（Sambrook *et al.*，1989）进行洗膜、信号检测。

1.2.5　转基因植株的离体抑菌试验　按照王玲等（2000）方法有改进。选取生长状态一致的转基因 107 杨树（以下简称 T-107 杨）及未转基因的对照 107 杨树（以下简称 C-107 杨），用 TES 缓冲液（100 mmol·L^{-1} Tris-Cl，0.1 mmol·L^{-1} EDTA，30 mmol·L^{-1}NaCl，pH 调至 7.0）提取其细胞粗体液备用；打孔器取 6 mm 滤纸浸泡细胞粗提液 20～40 min 后，平铺在接种了杨树溃疡病病菌的 PDA 培养基平板上，28 ℃继续培养 2～4 天后观察杨树溃疡病病菌的生长情况。

1.2.6　转基因植株组培苗感菌试验及 MDA 与 PAL 的变化测定　将生长培养基感染杨树溃疡病病原真菌，选取长势一致的多代筛选后 T-107 杨及 C-107 杨组培苗接种于上，光照培养观察。培养条件：温度（25±2）℃，光照强度约为 2 000 lx，光周期为每天 12 h。在培养 2，4，6，8，10，12 天时分别采 T-107 杨及 C-107 杨组培苗叶片，进行生理试验测定，同时每隔 3 天调查感病情况。

MDA 的测定参照高俊凤（2000）的方法；称取 0.5 g（3 个重复）鲜质量叶片，加入 1 mL 磷酸缓冲液（pH 7.8，0.05 mol·L^{-1}），冰浴研磨，研磨后再加入 4 mL 磷酸缓冲液。将研磨液倒入离心管中，平衡。低温（0～4 ℃）离心 20 min，离心后冷藏保存。取上清液 1 mL（对照加 1 mL 水），加 2 mL TBA，封口沸水浴 15 min，迅速冷却（用冷水冲泡），倒入离心管中，4 000 r·min^{-1} 下离心 20 min，取上清液于 600，532，450 nm 比色测定。MDA（mmol·g^{-1} FW）＝$[6.452\times(D_{532}-D_{600})-0.559\times D_{450}]\ V_t/V_s\cdot W$，式中：$D$ 为各个波长下吸光值，V_t 为提取液总体积（mL），V_s 为测定所用提取液体积（mL），W 为样品鲜质量（g）。

PAL 的测定参照胡景江等（1992）所述方法。取待测样品（3 个重复）1 g 鲜质量，经 －15 ℃冷冻固定后，加 4 倍质量预冷的 0.2 mol·L^{-1} 硼酸缓冲液（pH 8.8，含 8 mmol·L^{-1} 巯基乙醇）在冰浴中研磨匀浆，4 ℃下 10 000 g 离心 30 min，上清液用于酶活性的检测。酶检测反应液组成：硼酸缓冲液（pH 8.8）3 mL，L－苯丙氨酸（80 mmol·L^{-1}）1 mL，酶液 1 mL。35 ℃下反应 60 min，6 mol·L^{-1} HCl 终止酶活性。290 nm 处测 OD 值，以 OD 值变化 0.01 为 1 个酶活性单位。

2　结果与分析

2.1　转基因植株的 PCR 检测

选取经 50 mg·L^{-1} Kan 筛选出的 T-107 杨和未转基因的 C-107 杨对照组培苗为材料，取 2～3 片幼嫩的新叶提取基因组 DNA，以 T-107 杨基因组 DNA、载体质粒 DNA 以及 C-107 杨的基因组 DNA 为模板，用 *BG*$_2$ 基因特异 PCR 引物进行 PCR 扩增。结果表明：检测过的 8 个转基因植株中有 6 个与载体质粒一样产生了 1 条 800 bp 的明显的特异扩增片段，而对照植株未扩增出此特异条带（图 2）。

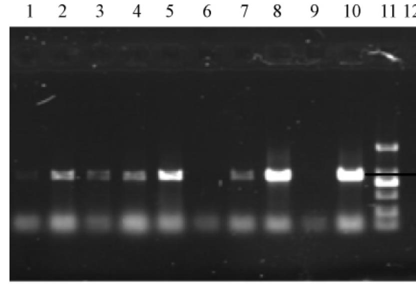

图 2　*BG*$_2$ 转基因植株的 PCR 检测

Fig. 2　PCR identification of the transgenic plants

1－8：T-107（转基因植株 Transgenic plants）；9：C-107（未转基因植株 Untransformed plant）；10：阳性对照，质粒 DNA Positive control，plasmid DNA；11：DNA marker DL2000；12：水 Water（阴性对照 Negative control）.

2.2　转基因植株的 Southern 检测

将 PCR 扩增产物电泳后印迹于硝酸纤维素膜上，用 *Not* Ⅰ 和 *Sac* Ⅰ 双酶切阳性质粒得到 800 bp 的片段，以其回收产物为模板合成探针，进行 Southern 杂交检测。结果表明：这 6 个转基因植株中有 4 个显示出较强的杂交信号，而非转基因的 C-107 杨（泳道 7）无杂交信号（图 3）。

2.3　转基因植株 T-107 杨提取物的离体抑菌试验

为了验证转基因植株 T-107 杨是否对杨树溃

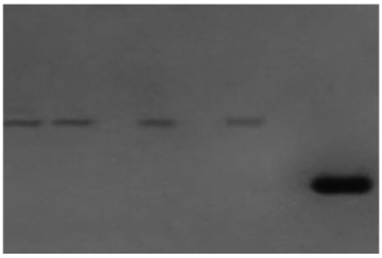

图 3　BG_2 转基因植株的 Southern 检测

Fig. 3　Southern assay of the transgenic plants

1－6：T-107（转基因植株 Transgenic plants）；

7：C-107（未转基因植株 Untransformed plant）；

8：PCR 对照 PCR control.

疡病菌具有一定的抗性，将打孔器打取的 6 mm 滤纸片在 T-107 杨的提取液中浸泡 20～40 min 后，然后平铺在涂有杨树溃疡病菌液的 PDA 培养基上进行抑菌试验。结果发现：经未转基因的 C-107 杨细胞粗提液和无菌水浸泡过的滤纸片对杨树溃疡病菌没有抑制作用，抑菌率为 0，滤纸片被生长的菌丝覆盖；而在 T-107 杨细胞粗提液浸泡过的滤纸片抑菌率达到 45%，周围形成了明显的抑菌圈（图 4），滤纸片上没有长出菌丝。这说明转基因植株T-107杨的细胞粗提液对杨树溃疡病病原菌具有一定的抑制作用。

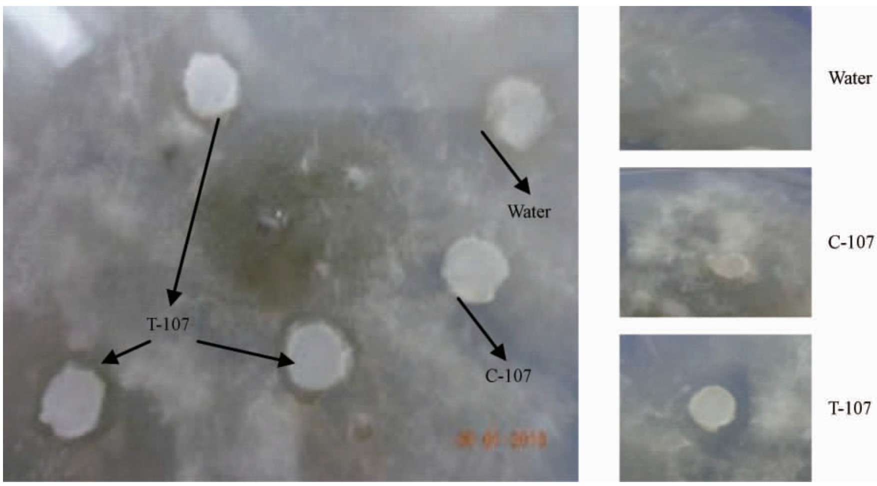

图 4　转基因植株提取液的体外抑菌分析

Fig. 4　Inhibition of fungal growth by the cell extracts from transgenic plants in vitro

2.4　转基因植株组培苗感菌试验

将杨树组培苗生长培养基感染杨树溃疡病病原真菌，然后选取长势相近的转基因 T-107 杨与对照 C-107 杨的组培苗在上面培养，生长情况见表 1、图 5。在 3～6 天内，杨树溃疡病菌生长缓慢，杨树组培苗都能正常生长，C-107 只有 10% 叶片出现病状；6 天后，杨树溃疡病菌丝开始迅速生长，C-107 杨组培苗茎叶开始被大量菌丝包裹，叶片出现黄化现象，但 T-107 杨长势基本正常，叶片感病率仅为 5%，显著低于对照 C-107杨（30%）；9 天时 C-107 杨叶片污染率达到 60%；12 天时 T-107 杨叶片感病率为 30%，但植株仍能生长，而 C-107 杨叶片被大量菌丝覆盖，茎叶枯黄，感病率达到 100%，逐渐死亡；15 天时 C-107 杨完全死亡，而 T-107 杨仍能生存。试验结果说明转 BG_2 基因 T-107 杨组培苗能够抑制溃疡病菌丝的生长，对杨树溃疡病具有一定的抗性。

表 1　叶片感病率①

Tab. 1　Fungal contaminated rate on leaves

材料 Material	接种株数 Inoculated plant number	叶片感病率 Fungal contaminated rate on leaves（%）			
		3 d	6 d	9 d	12 d
C-107	20	10 a	30 a	60 a	100 a
T-107	20	0 a	5 b	10 b	30 b

①同列不同字母表示差异显著（$P<0.05$）。The different letters in the same column mean significant difference（$P<0.05$）.

2.5　转基因植株组培苗 MDA 与 PAL 的变化

MDA 是植物体细胞膜脂过氧化反应的主要产物之一，其含量的增加过程是细胞内有毒性物质的积累过程，因此 MDA 含量增加是植物细胞损伤的直接原因。从图 6A 可以看出：T-107 杨与 C-107 杨在感染杨树溃疡病病原真菌的生长培养基上培养，体内 MDA 含量始终在积累，T-107 杨 MDA 总体含量明显低于 C-107 杨；在 4～8 天时 C-107 杨 MDA 含量急剧增加 1.07 倍，说明这期间植物体细胞内有害物质迅速积累，细胞膜受到严重的损伤，这与组培苗抗菌试验第 9 天 C-107 杨出现大量菌丝叶片枯黄相吻合（图 5C）；而 T-107 细胞内的 MDA 缓慢积

累，直至第 10 天才有显著增长趋势。

苯丙氨酸解氨酶（PAL）是苯丙烷类代谢途径的起始酶，研究认为它是植物的防御酶之一。从图 6B 可以看出：在培养过程中 T-107 杨与 C-107 杨的 PAL 活性的变化趋势基本一致，均为单峰曲线，且在第 8 天时都达到峰值，但 T-107 杨的 PAL 活性始终强于 C-107 杨，其 PAL 峰值比 C-107 杨高出 59.7%。

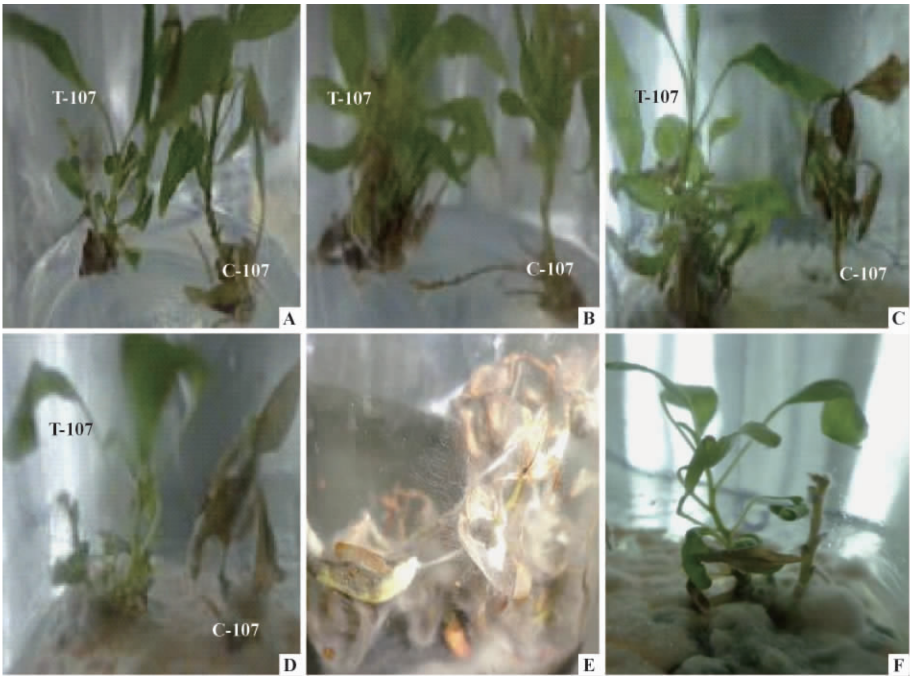

图 5 转 BG_2 基因植株抗溃疡病分析

Fig. 5 Anti-fungal assay of transgenic plants

A，B，C，D：T-107 与 C-107 分别共培养 3，6，9，12 天；E：C-107 培养 15 天；F：T-107 培养 15 天。

A，B，C，D：T-107 and C-107 co-culture for 3，6，9，12 days，respectively；E：C-107 co-culture for 15 days；F：T-107 co-culture for 15 days.

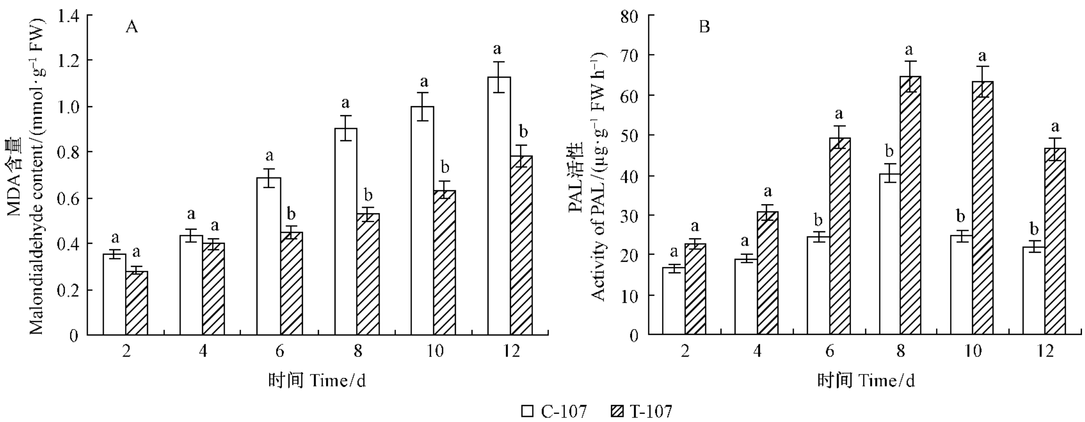

图 6 转基因植株组培苗 MDA 与 PAL 的变化

Fig. 6 Changes of MDA and PAL contents of the transgenic plants

3 结论与讨论

杨树抗菌基因工程的研究早在 1987 就有报道（李少锋等，2011）。近年来，杨树真菌病害不断发生，人们在杨树抗真菌基因工程上展开不同方向的研究，其热点主要集中在几丁质酶基因、病原相关蛋白基因、多聚半乳糖醛酸抑制蛋白基因（Rose *et al.*，2002）。Doan 等（1993）研究发现杨树在受到机械损伤后，产生了 3 种新的转录子 mRNA，其中 2 个转录物 Wni6 和 Wins 编码几丁质酶，而几丁质酶可以降解侵染杨树的真菌或细菌的细胞壁；Nieoleseu 等（1996）将矮牵牛（*Petunia hybrida*）黄酮合成酶（CHSA）基因导入杨树，提高了杨树的抗病性；Liang 等（2001）将小麦（*Triticum aestivum*）的草酸氧

化酶基因导入杨树,提高了转基因植株的抗真菌能力; 樊军锋等(2002)将 MtlD/gutD 双价基因成功转化美洲黑杨(*Populus deltoides*) × 青杨(*Populus cathayana*)并对转基因植株进行了检测; 孟亮等(2004)利用几丁质酶转化美洲黑杨成功; 邹维华等(2006)将反义磷脂酶 PLDγ 基因与几丁质酶基因共同转化美洲黑杨并对其抗病性进行了研究; 贾之春等(2011)超量表达益母草(*Leonurus japonicus*)抗菌肽基因 LJAMP2 能显著提高毛白杨(*Populus tomentosa*)对溃疡病的抗性。然而在植物的抗菌过程中,β－1,3－葡聚糖酶同样扮演着重要角色,对 β－1,3－葡聚糖酶基因的转化研究报道较少(蔡应繁等, 2001)。

Kim 等(2000)研究证明,真菌细胞壁主要由几丁质和 β－1,3－葡聚糖组成,几丁质在细胞壁的内部,而葡聚糖在细胞壁内部外部均有。而 β－1,3－葡聚糖酶可以水解 β－1,3－葡聚糖破坏真菌细胞壁,因此对真菌病原的侵染有一定的防护作用。当植物体受到真菌病原菌的侵染后,植物体内 β－1,3－葡聚糖酶对暴露在细胞壁最外层的多糖具有水解作用,使得菌丝体细胞壁变薄,菌内膨压和细胞伸缩张力不平衡,菌丝体顶端细胞最终破碎死亡。Klarzynski 等(2000)研究发现,在此水解过程中产生的寡糖又作为植物超敏反应(Hypersensitive Response,HR)中的激发子,进一步诱导植物的防御反应。韩琳娜等(2004)将 BG_2 转入到黑杨(*Populus*),并建立了黑杨的转化体系; 白靖(2008)将 BG_2 转入到南瓜(*Cucurbita*)中。上述二者都得到了转基因植株,但并未对转基因植株的抗病性做进一步研究。

本研究通过根癌农杆菌介导法将 BG_2 基因导入 107 杨中,经过抗菌素筛选、PCR 和 Southern 检测,得到了 4 个阳性株系。对转基因植株的 PCR 和 Southern 鉴定表明: BG_2 基因已经整合到受体植株基因组 DNA 中。并进一步对转基因植株进行了离体抑菌试验和组培苗感病试验。感病试验采取培养基接种感病、与植物体共培养的方法,使转基因植物体与对照处在相同环境下,模拟大田感病过程,更有力地说明转基因植物的抗病能力。试验结果表明,转基因植株 T-107 杨的细胞粗提液能够抑制杨树溃疡病病原菌丝的生长(图 4),T-107 杨组培苗对杨树溃疡病具有较强的抵抗能力,可在长有病原菌的培养基上生长 15 天以上(图 5)。

由于病原菌入侵使得细胞内的活性氧代谢平衡被破坏,有利于活性氧或超氧化物自由基的产生,使得植物细胞膜脂发生过氧化反应。王玲平(2007)在黄瓜(*Cucumis sativus*)上接种枯萎病,试验发现抗病品种可以自身调节,维持 MDA 含量的相对平衡,减少对膜的损害; 毕咏梅等(1990)研究证明水稻(*Oryza sativa*)受到不同病原体感染后 PAL 活性均有升高的现象,因为 PAL 活性的升高往往与植保素、木质素等抗性物质的产生和积累呈正相关; 刘学敏等(2003)将烟草感染赤星病菌(*Alternaria alternata*)后,抗病品种 CV87 的 PAL 活性升高,感病品种 NC89 的 PAL 活性降低,PAL 活性与烟草抗赤星病呈正相关。本研究选取 MDA 与 PAL 作为评价转基因植株 T-107 杨组培苗抗菌能力高低的重要指标,结果显示,在受到杨树溃疡病感染时 T-107 杨组培苗细胞内 MDA 含量缓慢升高,PAL 活性第 4 天后迅速增强,这可能是由于导入的 BG_2 基因的表达提高了植物体抗病能力,诱导调整体内代谢途径,阻止 MDA 在体内的迅速积累降低细胞膜的损伤,同时提高 PAL 活性,产生大量防御酶,从而提高植物体对外界病原菌的抵抗能力。本研究仅对转基因植株 T-107杨组培苗进行了分子检测和抗病试验研究,下一步将在大田试验中进一步筛选优良的抗病株系; 此外 BG_2 基因是否对 107 杨上其他真菌病害有抵抗作用,也将作更进一步的研究。

参　考　文　献

白　靖. 2008. 农杆菌介导 β－1,3－葡聚糖酶(BG_2)基因转化南瓜的研究. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文.

毕咏梅,欧阳光察. 1990. 稻瘟病菌诱导物对水稻苯丙烷类途径酶系和绿原酸的诱导作用. 植物生理学通讯,(3):18－20.

蔡应繁,叶鹏盛, 张　利,等. 2001. β－1,3－葡聚糖酶及其在植物抗真菌病基因工程中的应用. 西南农业学报, 14(2): 78－81.

樊军锋,韩一凡,李　玲,等. 2002. MtlD/gutD 双价基因转化美洲黑杨×青杨的研究. 林业科学,38(6): 30－35.

高俊凤. 2000. 植物生理学实验技术. 西安: 世界图书出版西安公司.

韩琳娜,周春江,崔德才,等. 2004. 转 BG_2 基因黑杨植株的获得. 山东农业大学学报: 自然科学版,35(3):375－378.

胡景江,文建雷,景　耀,等. 1992. 杨树体内苯丙烷代谢与其对溃疡病抗性的关系. 植物病理学报, 22(2):185－188.

贾之春,孙一铭,秦志超,等. 2011. 转抗菌肽基因毛白杨的培育及其对溃疡病的抗性. 林业科学,47(7):123－127.

蓝海燕,田颖川,王长海,等. 2000. 表达 β－1,3－葡聚糖酶及几丁质酶基因的转基因烟草及其抗真菌病的研究. 遗传学报, 27(1): 70－77.

李少锋,苏晓华,张冰玉. 2011. 林木基因克隆研究进展. 植物学报, 46 (1): 99－107.

刘　静,黄艳艳,翁曼丽,等. 2011. *TCS* 基因转化泡桐的遗传表达及抗病能力研究. 林业科学,47(5): 171－176.

刘学敏,陈宇飞,董长军. 2003. 烟草对赤星病的抗性与其防御酶系活性的关系. 烟草科技, 186(1): 43－46.

孟 亮，崔德才. 2004. 转几丁质酶基因黑杨的获得. 生物技术通报，(3):48 - 51.

王玲平. 2007. 黄瓜感染枯萎病菌后生理生化变化及其与抗病性关系的研究. 山西农业大学硕士学位论文.

王 玲，张富宝. 2000. 中药大黄提取色素的抑菌作用研究. 食品工业科技，(6): 27 - 28.

赵华燕，卢善发，晁瑞堂. 2001. 杨树的组织培养及其基因工程研究. 植物学通报，18(2): 169 - 176.

赵 鑫，詹立平，刘桂丰. 2004. 杨树基因工程抗性育种研究进展. 东北林业大学学报，32(6): 76 - 78.

邹维华，赵 强，崔德才. 2006. 反义磷脂酶 *Dγ* 基因与几丁质酶基因转化美洲黑杨 G2. 林业科学，42(1): 37 - 42.

Doan D N P, Høj P B, Collins A, *et al*. 1993. Post-translational processing of barley β-glucan endohydrolases in the baculovirus-insect cell expression system. DNA and Cell Biology, 12(1): 97 - 105.

Josen L G, Olsen O, Kops O, *et al*. 1996. Transgenic barley expressing a protein-engineered thermostable (1, 3-1, 4)-beta-1, 3-glucanase during germination. Proceedings of Nation Academy of Sciences of the United States of America, 93(8): 3487 - 3491.

Klarzynski O, Plesse B, Joubert J M, *et al*. 2000. Linear β-1, 3-glucans are elicitors of defense responses in tobacco. Plant Physiol, 12(4): 1027 - 1037.

Kim Y J, Hwang B K. 2000. Isolation of a basic 34kiloDalton β-1, 3-glucanase with inhibitory activity against *Phytophthora capsici* from pepper stems. Physiol Mol Plant Pathol, 50(2): 103 - 115.

Liang Haiying, Maynard C A, Allen R D, *et al*. 2001. Increased *Septoria musiva* resistance in transgenic hybrid poplar leaves expressing a wheat oxalate oxidase gene. Plant Mol Biol, 45(6): 619 - 629.

Nieoleseu C, Snader C, Jounain L, *et al*. 1996. Genetic engineering on phenolic metabolism in *Populus deltoides* with resistance against pathogens. Aeta Bot Galliea, 14(3): 539 - 546.

Rose J K C, Ham K, Darvil A G, *et al*. 2002. Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins. Plant Cell, 1(4): 1329 - 1345.

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 19(2): 93 - 95.

Song J, Liu J, Weng M L, *et al*. 2013. Cloning of galactinol synthase gene from *Ammopiptanthus mongolicus* and its expression in transgenic *Photinia serrulata* plants. Gene, 513(1): 118 - 127.

Yoshikawa M, Dai Y, Shimada H T, *et al*. 1997. Studies on the saponin constituents from the fruits of Chinese *Kochia scoparia* (Chenopodiaceae): chemical structures of kochiano-sides I, II, III and IV. Chem Pharm Bullv, 4(5): 1052 - 1055.

（责任编辑 徐 红）