

刘悦, 金中时, 王凤良, 等. 表达 $hpa1_{Xoo}$ 基因棉花对黄萎病抗性及其农艺性状的影响[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 170-174.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.048

表达 $hpa1_{Xoo}$ 基因棉花对黄萎病抗性 及农艺性状的影响

刘悦¹, 金中时³, 王凤良³, 宋从凤², 王金生², 龚伟荣⁴, 周翔¹, 缪卫国¹

(1. 海南大学环境与植物保护学院, 海南海口 570228; 2. 南京农业大学植物保护学院, 江苏南京 210095;

3. 江苏省大丰市植保站, 江苏大丰 224100; 4. 江苏省农业委员会, 江苏南京 210000)

摘要:黄萎病是棉花生产中最具毁灭性病害之一, 种植抗病品种是控制黄萎病害最为有效途径之一。本试验通过花粉管通道法将 $hpa1_{Xoo}$ 基因导入陆地棉品系 854, 经多代选育获得了可稳定遗传表达 $hpa1_{Xoo}$ 基因且农艺性状稳定的 2 个棉花材料 854-3、854-5, 具有出苗快、长势较好、整齐度高、植株中等、株型松、茎秆毛少光滑、叶片大、叶色深绿、叶功能较好、结铃性较强、铃形较大、吐絮畅等特点。2013—2014 年 854-3、854-5 株高 98.0~114.0 cm, 单株果枝 15.60~18.10 个, 单株结铃 26.90~48.45 个, 铃质量 5.26~5.92 g, 衣分 39.54%~45.10%, 籽棉产量 3 186.45~5 023.65 kg/hm², 皮棉产量 1 437.5~1 998.45 kg/hm²。854-3、854-5 黄萎病指数分别为 4.23、2.80, 均为高抗水平。854-3、854-5 纤维上半部平均长度分别为 28.78、28.83 mm, 断裂比强度分别为 27.9、28.4 cN/tex, 马克隆值分别为 5.67、5.83, 伸长率分别为 6.3%、6.2%。854-3、854-5 纤维外观色泽洁白, 手感有弹性, 内在品质优良, 可为棉花抗病品种选育提供种质或材料。

关键词:转基因棉花; $hpa1_{Xoo}$ 基因; 抗黄萎病; 农艺性状

中图分类号: S435.621 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0170-05

在世界范围内棉花是非常重要的纤维作物, 也是食用油料来源之一。是仅次于粮食的第二大农作物^[1]。黄萎病是

收稿日期: 2015-02-06

基金项目: 教育部博士点基金(编号: 20104601110004、20124601110004);

国家自然科学基金(编号: 31160359、31360029); 国家科技部项目(编号: 2004BA901A36)。

作者简介: 刘悦(1990), 女, 黑龙江人, 硕士研究生, 从事植物病理学研究。E-mail: heizi2327@126.com。

通信作者: 缪卫国, 博士, 教授, 从事分子植物病理学研究。E-mail: weiguomiaol105@126.com。

量。对枸杞不造成危害, 因此春季使用仿生胶封园对瘿螨发生的控制效果显著。

仿生胶对枸杞蚜虫、瘿螨、锈螨、木虱等有着较强的黏附作用, 这些害虫一旦接触到仿生胶就被黏着无法挣脱, 直至死亡。因此本试验中仿生胶的大量使用会减少农药危害, 提高枸杞的品质, 是一种有效的物理防治措施, 为枸杞在探索高效、经济、安全、低残留的防治技术和方法上提供基础, 为田间调查取样提供有效样本量, 提高田间防控效果。

参考文献:

- [1] 张建萍, 邹冬冬, 鲁素玲, 等. 枸杞瘤瘿螨的发生与危害[J]. 新疆农业科学, 2000(增刊1): 130-133.
- [2] 徐常青, 余柳英. 一种利用仿生学原理防治植物病虫害的方法: 中国, CN200710030382.2[P]. 2008-03-05.
- [3] 刘晓丽, 李锋, 李晓龙, 等. 枸杞木虱种群动态及其垂直分布特征研究[J]. 北方园艺, 2013(12): 122-124.

棉花成株期危害最大的病害之一。棉花黄萎病的病原菌为大丽轮枝菌 (*Verticillium dahlia* Klebahn), 对棉花质量、皮棉产量、纤维品质影响非常严重^[2-3]。1993 年, 棉花黄萎病在我国大暴发, 发病面积达 266.67 万 hm², 损失皮棉约 1 亿 kg, 2002—2003 年黄萎病再度暴发, 棉花黄萎病已成为棉花减产的主要原因之一^[4-5]。选育高产抗病品种对有效控制该类病害尤为重要。多年来, 我国对筛选与培育新品种的方法不断更替革新, 由开始常规棉育种至现在利用转基因、分子标记与生化辅助育种等技术, 定向、高效培育出高产、抗病虫、优质的复合抗性品种^[6]。如转基因 *Bt* 抗虫棉, 不仅在抗棉铃虫方面

- [4] 时亚琴, 陆群, 陶波尔. 不同类型农药防治枸杞瘿螨的试验研究[J]. 河北农业科学, 2002, 6(1): 48-50.
- [5] 李文拴, 刘俊清. 枸杞瘿螨药剂防治研究[J]. 河套大学学报, 2007, 4(4): 22-25.
- [6] 刘彦宁. 宁夏枸杞主要害虫综合防治技术与推广[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
- [7] 容汉谄, 王华荣. 宁夏枸杞瘿螨的发生规律及新农药防治效果观察[J]. 宁夏农学院学报, 1983(2): 53-55, 112.
- [8] Iwao S. Application of the m-m method to the analysis of spatial patterns by changing the quadrat size[J]. Researches on Population Ecology, 1972, 14(1): 97-128.
- [9] Taylor L R. Aggregation, variance and the mean[J]. Nature, 1961, 189: 732-735.
- [10] 范永佳. 景泰枸杞主要害虫种群动态及无公害防治技术研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2009.
- [11] 徐林波, 段立清. 枸杞瘿螨的生物学特性及其有效积温的研究[J]. 内蒙古农业大学学报: 自然科学版, 2005, 26(2): 55-57.

有显著成效,还能够增强农业生态系统害虫自然控制的能力,世界范围内实现了大范围的推广种植^[7-8]。但至今对于抗病转基因棉的研究成效甚微,未见抗黄萎病转基因棉花大面积种植的报道,生产上大面积种植的棉花品种对棉花黄萎病的抗性仍处于抗病或耐病水平,缺乏高抗黄萎病棉花品种的报道。

Wei等首次从梨火疫病菌(*Erwinia amylovora*)中分离和鉴定了一种能够激发非寄主植物发生过敏反应(hypersensitive resistance, HR)的蛋白激发子,命名为 harpin_{Er}^[9]。目前,人们已经在 *Erwinia*、*Pseudomonas*、*Xanthomonas* 等属的多种植物病原细菌中克隆到编码 harpin 蛋白的 *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity, hrp) 基因^[10-17]。人们已经将编码 harpin 蛋白的基因成功转入到烟草、马铃薯、苹果、梨、甜菜、小麦、棉花^[18-26] 及水稻^[15,17,27-29] 等植物中,获得的转基因植物都对其主要病原菌产生了较好的复合抗性。

*hpaI*_{Xoo} 是来自水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 编码 harpin_{Xoo} 蛋白的 *hrp* 基因^[17], 笔者项目组用含农杆菌 T-DNA 区域的重组质粒,通过花粉管通道法将 *hpaI*_{Xoo} 基因导入多个陆地棉,结合常规育种获得具有多种有益表型如抗棉花黄萎病、枯萎病、棉铃虫等的后代株系^[30]。在此基础上,2008—2014 年项目组选用抗病较差但农艺性状较好的陆地棉材料 854,将 *hpaI*_{Xoo} 基因导入 854,通过系统选育获得了稳定表达的后代株系 854-3、854-5,在 2013—2014 年对 854-3、854-5 的黄萎病抗性、农艺性状等方面与泗棉 3 号、中植棉 2 号进行了比较,以期对棉花抗病品种选育及病害有效防控提供优良种质。

1 材料与与方法

1.1 材料

陆地棉材料 854-3、854-5 是以 854(江苏科腾种业有限公司提供)为转化受体的转 *hpaI*_{Xoo} 基因棉花的遗传稳定后代株系,抗性标记基因为 *npt II*^[28]。对照为中植棉 2 号(抗病)、泗棉 3 号(感病)。

1.2 试剂

卡那霉素(5 000 mg/L)、胶回收试剂盒、DNA 试剂盒与 RNA 试剂盒均购自 BIOMIGA 公司;反转录试剂盒购自 Tian-Gen 公司;GoldView DNA 染料购自北京赛百盛基因技术有限公司;引物由华大基因引物合成。DNA 测序由华大基因完成。

1.3 方法

1.3.1 卡那霉素抗性筛选 参照缪卫国的方法^[31],当棉苗长出 2~3 张真叶时,用 5 000 mg/L 浓度的卡那霉素对叶片均匀涂抹,无黄色斑痕的为卡那霉素抗性植株,以此作为阳性植株进行下一步分子筛选。

1.3.2 转基因棉抗病性考察 试验选择在江苏大丰大中镇红花村发病均匀的棉花黄萎病重病田进行,田间管理同大田常规方法。病情考察分 2 个时期进行,黄萎病第 1 发病峰在棉花蕾花期(7 月中下旬),黄萎病第 2 发病峰在棉花铃期(9 月下旬),调查发病率,计算病情指数,参照顾本康等的方法^[32]划分抗病等级。

1.3.3 农艺性状调查 棉花采用育苗移栽的方式种植,4 月

中旬播种,5 月中旬移栽。试验田采用随机区组排列,重复 3 次,小区长 8 m、宽 4 m,行距 1 m,株距 30 cm,每个区组设 1 个感病对照(泗棉 3 号)、1 个抗病对照(中植棉 2 号)。调查项目包括吐絮期株高、单株果枝数、单株铃数和吐絮个数,并考察皮棉、籽棉产量、单铃质量、衣分等指标。采集植株中部铃 50 个,称量其纤维 20~30 g 送检(中国农业科学院棉花研究所农业部棉花纤维检测中心检测)。

1.3.4 统计分析 参照顾本康等的抗病性鉴定方法^[32],抗病性指标计算公式如下:

$$\text{发病率} = (\sum \text{病株数} / \text{调查总株数}) \times 100\%$$

$$\text{病情指数} = [\sum (\text{各级病株数} \times \text{相应病级}) / (\text{调查总株数} \times 4)] \times 100\%$$

$$\text{相对抗性指数(IR)} = \text{校正系数 K} \times \text{鉴定材料病指}$$

$$\text{校正系数 K} = 50 / \text{本次鉴定感病对照病指} (50 \text{ 为感病对照标准病指})$$

比较 854-3、854-5 这 2 个株系(材料)与对照品种在 2013—2014 年的抗病性与农艺性状,对均值进行 *t* 测验,依据测验值的显著水平确定供试材料的品质优劣。

1.3.5 PCR 与 RT-PCR 检测 采用 DNA 提取试剂盒(E. Z. N. A.® HP Plant DNA Kit)提取棉花 4~5 张真叶期时的叶片总 DNA,参照缪卫国等方法^[31],用引物 *hpaI*_{Xoo} (Forward: 5' - TTCGGATCCATGAACCTCTTTGAACACACAATT - 3'; Reverse: 5' - GGTGAGCTCTTACTGCATCGATGCGCT - 3') PCR 扩增目的基因 *hpaI*_{Xoo} 全长。其程序为:95 °C 变性 5 min,然后 95 °C 变性 45 s,56 °C 复性 45 s,72 °C 延伸 1 min,此循环进行 35 次;最后 72 °C 延伸 10 min。

利用 RNA 提取试剂盒(E. Z. N. A.® Plant RNA Kit RNA)提取花铃期棉叶的 RNA,使用反转录试剂盒(Quant Reverse Transcriptase)进行 RNA 反转录。使用 *hpaI*_{Xoo} 引物(同上),以反转录后的 cDNA 为模板进行 PCR,程序同上。

2 结果与分析

2.1 转基因棉花的黄萎病抗性

2008 年,我们采用花粉管通道法结合农杆菌介导的方法,将来自水稻白叶枯病菌编码 harpin 蛋白的 *hpaI*_{Xoo} 基因导入受体陆地棉材料 854^[30],通过卡那抗性和抗病性田间筛选,结合分子验证,经单株选育,获得了 854-3、854-5,2 个农艺表型稳定的材料。2013—2014 年,继续观察 854-3、854-5 农艺性状和对黄萎病的抗病性。结果表明,在江苏大丰大中镇红花村棉花黄萎病重病田,抗病对照中植棉 2 号相对病情指数为 12.41~16.68,平均为 14.54,感病对照泗棉 3 号病情指数为 42.76~50.00,平均为 46.38,每年 3 个区组的感病对照泗棉 3 号黄萎病病情指数均在 50 左右,重复间、年度间差异不显著,表明供试黄萎病田间发病均匀,适宜做病圃开展棉花品种(材料)抗病性鉴定(表 1)。854-3、854-5 在 2013—2014 年平均病情指数分别为 4.23、2.80,最高为 6.01,最低为 2.02,分别较抗病对照中植棉 2 号相对病情指数低 70.9%、80.7%,较感病对照泗棉 3 号相对病情指数低 90.9%、94.0%,参照棉花品种抗性划分标准^[32],二者均属于高抗。

2.2 转基因棉花的主要农艺性状及经济性状

2013—2014 年抗病对照中植棉 2 号株高 102.50 cm,单

表1 转 *hpa1_{Xoo}* 棉花抗黄萎病鉴定结果

株系	发病率(%)		病情指数		相对病指			抗病类型
	2013年	2014年	2013年	2014年	2013年	2014年	平均	
854-3	30.90	9.33	8.15	3.33	6.01	2.45	4.23	HR
854-5	19.44	7.79	4.86	2.74	3.58	2.02	2.80	HR
中植棉2号	49.68	33.61	22.63	16.84	16.68	12.41	14.54	T
泗棉3号	96.42	78.57	67.85	58.03	50.00	42.76	46.38	S

株果枝数 15.90 台,单株成铃数 32.10 个,单铃质量 5.78 g,籽棉产量 3 494.40 kg/hm²,皮棉产量 1 375.95 kg/hm²,衣分 39.99%。854-3、854-5 株高分别 106.00、105.50 cm,分别比对照高 3.41%、2.92%;单株果枝数 17.05、16.85 台,分别比抗病对照高 7.23%、5.97%;单株成铃数分别 38.43、33.83 个,分别比抗病对照高 19.70%、5.37%;单铃质量 6.05、5.59 g,分别比抗病对照高 4.67%、-3.29%;籽棉产量分别

为 4 378.65、3 602.70 kg/hm²,分别比抗病对照高 25.30%、3.10%;皮棉产量分别 1 837.50、1 513.20 kg/hm²,分别比抗病对照高 33.54%、9.97%;衣分为 42.34%、42.32%,分别比抗病对照高 5.88%、5.82%(表2)。结果表明,2年 854-3、854-5 主要农艺性状均优于抗病对照中植棉2号,854-3 的单株成铃数、皮棉产量、衣分均显著高于对照,854-5 的衣分显著高于对照。

表2 转 *hpa1_{Xoo}* 棉花主要农艺性状及经济性状

品种	年份	株高 (cm)	单株果枝数 (台)	单株成铃 (个)	单铃质量 (g)	籽棉产量 (kg/hm ²)	皮棉产量 (kg/hm ²)	衣分 (%)
854-3	2013	114.00	17.50	48.45	5.53	5 023.65	1 998.45	39.78
	2014	98.00	16.60	28.40	6.57	3 733.50	1 676.40	44.90
	平均	106.00	17.05	38.43	6.05	4 378.65	1 837.50	42.34
854-5	2013	109.00	18.10	40.75	5.26	4 018.95	1 589.10	39.54
	2014	102.00	15.60	26.90	5.92	3 186.45	1 437.15	45.10
	平均	105.50	16.85	33.83	5.59	3 602.70	1 513.20	42.32
中植棉2号(CK)	2013	114.00	16.90	41.85	5.39	4 229.40	1 567.80	37.07
	2014	91.00	14.90	22.35	6.17	2 759.40	1 184.10	42.91
	平均	102.50	15.90	32.10	5.78	3 494.40	1 375.95	39.99

2.3 转基因棉花纤维品质性状

2014年,对 854-3、854-5 纤维样品进行品质检测,纤维品质性状良好,纤维长度分别为 28.78、28.83 mm,比强度分别为 27.9、28.4 cN/tex,马克隆值分别为 5.67、5.83,伸长率分别为 6.3%、6.2%,整齐度分别为 85.4%、84.7%(表3)。

表3 转基因材料纤维品质性状

样品编号	上半部平均长度 (mm)	整齐度指数 (%)	马克隆值	伸长率 (%)	断裂比强度 (cN/tex)
854-3	28.78	85.4	5.67	6.3	27.9
854-5	28.83	84.7	5.83	6.2	28.4

2.4 PCR、RT-PCR、PCR-Southern blot 检测结果

从整齐排列生长一致的株行中,分别随机选择 854-3、854-5 材料各 2 株。以叶片基因组 DNA 为模版,用 *hpa1_{Xoo}* 引物进行 PCR 扩增(图1-A)。将上述 PCR 产物电泳后,以地高辛标记的 *hpa1_{Xoo}* 全长序列为探针,进行 PCR Southern blot。以水稻白叶枯菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) PXO99 菌株的 DNA 为模板进行 PCR 的产物为阳性对照。PCR Southern blot 结果,854-3、854-5 阳性对照均在 400~500 bp 间出现了明显的阳性信号(图1-B)。RT-PCR 检测是以随机选择 854-3、854-5 2 材料各 4 株的叶片基因组 RNA 为模版,反转录后,同样以 *hpa1_{Xoo}* 引物进行 PCR 扩增(图2)。分子检测所得到的目的条带单一,测序结果为 *hpa1_{Xoo}*,表明引物特异性很高,并且经多代选育后转入的外源基因 *hpa1_{Xoo}*

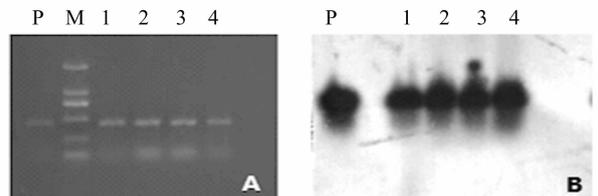


图1 854-3、854-5 的 *hpa1_{Xoo}* 基因 PCR 与 PCR Southern blot
A: M—D2000 DNA marker;P—阳性对照;1、2—854-3的2个不同株系为模板的 *hpa1_{Xoo}* 基因 PCR;3、4—854-5的2个不同株系为模板的 *hpa1_{Xoo}* 基因 PCR。B: P—阳性对照;1、2—854-3的2个不同株系为模板的 *hpa1_{Xoo}* 基因 PCR Southern blot;3、4—854-5的2个不同株系为模板的 *hpa1_{Xoo}* 基因 PCR Southern blot。

图1 854-3、854-5 的 *hpa1_{Xoo}* 基因 PCR 与 PCR Southern blot

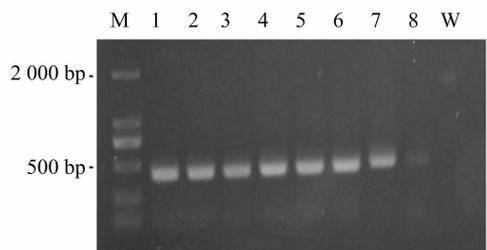


图2 854-3、854-5 的 *hpa1_{Xoo}* 基因 RT-PCR 扩增结果
M—D2000 DNA marker;1~4—854-3的4个不同株系为模板的 *hpa1_{Xoo}* 基因引物的 PCR 扩增;5~8—854-5的4个不同株系为模板的 *hpa1_{Xoo}* 基因引物的 RT-PCR 扩增;W 为空白对照

图2 854-3、854-5 的 *hpa1_{Xoo}* 基因 RT-PCR 扩增结果

仍然能够在棉花内转录表达,在世代间稳定遗传。

3 讨论

Harpin 蛋白在病原菌与植物互作过程中不仅能赋予转基因植物抗病虫性,而且能够激发一些防卫基因的表达^[31,33]。如能够诱导植物系统获得抗性^[34],能在多种植物上诱导过敏性细胞死亡^[35],并能够启动水杨酸^[36]、茉莉酸/乙烯^[37]、脱落酸^[38]等信号传导途径。不仅编码 Harpin 蛋白的基因可以作为外源基因导入,还起到抗病虫、提高品质的作用,而且在植物上的直接施用也能够赋予植物较好的抗病性^[19,39]。多年来,人们已经从多种植物病原细菌中克隆得到编码 harpin 蛋白的 *hrp* 基因,并成功将其转入到不同的作物中,使转基因植物获得了抗性,不同程度上提高了农作物的品质,例如将编码 harpin 蛋白的基因成功转入到烟草^[18-21]、马铃薯^[22]、苹果^[25]、梨^[24]、甜菜^[18]、小麦^[25]、棉花^[26]及水稻^[15,17,27-29]等植物中,获得的转基因植物都对其主要的病原菌产生了较好的复合抗性。将编码水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)编码 harpin 蛋白的 *hpa1_{Xoo}* 基因转入水稻中,使得转基因水稻获得良好的复合抗性^[15,17,27-29]。缪卫国将 *hpa1_{Xoo}* 基因导入到棉花 Z35 中,*hpa1_{Xoo}* 基因的表达可以促进防卫反应,有效降低了棉花黄萎病的发生,培育筛选过程中还发现转 *hpa1_{Xoo}* 基因棉花不仅对黄萎病有抗性,而且对枯萎病、立枯病也有很好的抗病性,对棉铃虫、棉蚜、棉大卷叶螟也有较好的抗虫性^[31],也就是说 harpin 能够赋予植物多种复合抗性。本试验中笔者选取了江苏科腾种业有限公司提供的棉花材料 854,该材料适于长江中下游种植,将 *hpa1_{Xoo}* 基因转入 854 中,经过 2008—2014 年获得了适于长江中下游种植的棉花材料 854-3、854-5,二者兼具高抗黄萎病及良好的农艺性状。

近年来,研究选育的棉花品种(材料)多为耐黄萎病品种,少部分为抗黄萎病品种,如冀杂 1 号黄萎病指数 16.3^[40],冀棉 169 黄萎病指数 12.5^[41],辽棉 20 号、辽棉 25 号、中棉 91、辽 K133 黄萎病指数分别为 16.3、13.0~18.85、24.8、20.83^[42]等,现今仍缺乏高抗黄萎病的品种(材料)。利用转基因技术培育棉花抗病品种成为目前最经济有效的方法之一。不论采用常规育种还是分子育种技术培育高抗黄萎病的棉花品种,均存在一定的瓶颈,主要体现在一是缺乏高抗黄萎病的抗源,二是棉花对黄萎病菌的抗性遗传特性还存在一些理论和技术性的问题。针对黄萎病的抗性品种育种,时常会发现某一个材料或者品系在独特年份表现出较好的抗病性,但这种抗性不像对枯萎病抗性会具有较好的持久性,在后续种植过程中会发现目标品种对黄萎病的抗性又减弱或者丢失,这是困扰抗黄萎病品种选育的一个较突出的问题。目前,我们获得的 854-3、854-5 2 个棉花材料的黄萎病指数分别为 4.23、2.80,在连续种植的 2 年中都保持着高抗黄萎病,农艺性状和经济性状优良,有望作为抗黄萎病品种培育过程中的种质或材料。

尽管转基因作物产业化发展速度快前景好,能为社会带来巨大的经济利益,但不可忽视的是转基因作物确实存在一系列潜在的安全问题。转基因作物安全性包括两方面:食品安全性问题和环境安全性问题。为能够安全持久种植利用转基因作物,在转基因作物商品化前要对其可能带来的环境生

物安全问题进行严格、充分的科学研究和评价,并进行有效的生物安全监测和管理^[43-48]。我们获得的转 *hpa1_{Xoo}* 基因棉花均规范种植,设立了隔离带,按照相关规定对转基因品种产业化采取严格谨慎的管理和审批,在尽量消除和降低安全隐患的基础上科学利用转基因技术,以促进整个社会经济的发展。

参考文献:

- [1] Song X L, Zhang T Z. Identification of quantitative trait loci controlling seed physical and nutrient traits in cotton [J]. Seed Science Research, 2007, 17(4): 243-251.
- [2] Bolek Y, El-Zik K M, Pepper A E, et al. Mapping of *Verticillium* wilt resistance genes in cotton [J]. Plant Science, 2005, 168(6): 1581-1590.
- [3] Wang Y Q, Chen D J, Wang D M, et al. Over-expression of *Gastrodia* anti-fungal protein enhances *Verticillium* wilt resistance in colored cotton [J]. Plant Breeding, 2004, 123(5): 454-459.
- [4] Wang B, Brubaker C L, Summerell B A, et al. Local origin of two vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in Australia [J]. Evolutionary Applications, 2010, 3(5/6): 505-524.
- [5] Pegg G F, Brady B L. *Verticillium* wilts [M]. New York: CABI Publishing, 2002: 552.
- [6] 郭香墨, 范术丽, 王红梅, 等. 我国棉花育种技术的创新与成就 [J]. 棉花学报, 2007, 19(5): 323-330.
- [7] James C. 2011 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势 [J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(1): 1-14.
- [8] 李文静, 陆宴辉, 吴孔明, 等. 绿盲蝽对棉蚜的捕食作用 [C]//“创新驱动与现代植保”——中国植物保护学会第十一次全国会员代表大会暨 2013 年学术年会论文集, 青岛: 中国植物保护学会, 2013: 502.
- [9] Wei Z M, Laby R J, Zumoff C H, et al. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora* [J]. Science, 1992, 257: 85-88.
- [10] 周庭辉, 戴小枫. 棉花抗黄萎病生理与生化机制研究 [J]. 分子植物育种, 2006, 4(4): 593-600.
- [11] He S Y, Huang H C, Collmer A. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants [J]. Cell, 1993, 73(7): 1255-1266.
- [12] Bauer D W, Wei Z M, Beer S V, et al. *Erwinia chrysanthemi* harpinEch: an elicitor of the hypersensitive response that contributes to soft-rot pathogenesis [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1995, 8(4): 484-491.
- [13] Preston G, Huang H C, He S Y, et al. The HrpZ proteins of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, glycinea, and tomato are encoded by an operon containing Yersinia ysc homologs and elicit the hypersensitive response in tomato but not soybean [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1995, 8(5): 717-732.
- [14] Wengelnik K, Marie C, Russel M, et al. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(4): 1061-1069.
- [15] Li P, Lu X Z, Shao M, et al. Genetic diversity of harpins from *Xanthomonas oryzae* and their activity to induce hypersensitive response

- and disease resistance in tobacco [J]. Science in China; Series C, Life Sciences, 2004, 47(5): 461–469.
- [16] Miao W G, Song C F, Wang Y, et al. HpaXm from *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* is a novel harpin with two heptads for hypersensitive response [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(1): 54–62.
- [17] 闻伟刚, 王金生. 水稻白叶枯病菌 harpin 基因的克隆与表达 [J]. 植物病理学报, 2001, 31(4): 295–300.
- [18] Pavli O I, Kelaidi G I, Tampakaki A P, et al. The *hrpZ* gene of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* enhances resistance to rhizomania disease in transgenic *Nicotiana benthamiana* and sugar beet [J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17306.
- [19] Peng J L, Bao Z L, Ren H Y, et al. Expression of *harpin*_{Xoo} in transgenic tobacco induces pathogen defense in the absence of hypersensitive cell death [J]. Phytopathology, 2004, 94(10): 1048–1055.
- [20] Belbahri L, Boucher C, Candresse T, et al. A local accumulation of the *Ralstonia solanacearum* PopA protein in transgenic tobacco renders a compatible plant–pathogen interaction incompatible [J]. The Plant Journal, 2001, 28(4): 419–430.
- [21] Sohn S I, Kim Y H, Kim B R, et al. Transgenic tobacco expressing the *hrpNEP* gene from *Erwinia pyrifoliae* triggers defense responses against botrytis cinerea [J]. Molecules and Cells, 2007, 24(2): 232–239.
- [22] Li R, Fan Y. Reduction of lesion growth rate of late blight plant disease in transgenic potato expressing harpin protein [J]. Science China; Life Sciences, 1999, 42(1): 96–101.
- [23] Borejsza W E, Kader A A, Norelli J L, et al. Effect of expressing *hrpN* in apple on resistance to *Erwinia amylovora* [J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology: Animal, 2000, 34: 1023–1033.
- [24] Malnoy M, Venisse J S, Chevreau E. Expression of a bacterial effector, harpinN, causes increased resistance to fire blight in *Pyrus communis* [J]. Tree Genet, 2005, 1(2): 41–49.
- [25] Fu M Q, Xu M Y, Zhou T, et al. Transgenic expression of a functional fragment of harpin protein HpaI in wheat induces the phloem-based defence against English grain aphid [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(6): 1439–1453.
- [26] Miao W G, Wang J S. Genetic transformation of cotton with a harpin-encoding gene *hpaXoo* confers an enhanced defense response against *Verticillium dahliae* Kleb [J]. Methods in Molecular Biology, 2013, 958: 223–246.
- [27] 邵敏, 李林, 穆东升, 等. Harpin_{Xoo} 在水稻中表达提高对白叶枯病不同小种抗性 [J]. 中国生物防治, 2006, 22(2): 133–136.
- [28] 邵敏, 肖姗姗, 李林, 等. 转 *hrfI* 基因水稻对稻瘟病多小种非专化的稳定抗性 [J]. 中国水稻科学, 2008, 22(5): 459–464.
- [29] 邵敏, 王金生. 转 *hrfA*_{Xoo} 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.
- [30] Miao W G, Wang X B, Li M, et al. Genetic transformation of cotton with a harpin-encoding gene *hpaXoo* confers an enhanced defense response against different pathogens through a priming mechanism [J]. BMC Plant Biology, 2010, 10: 67–78.
- [31] 缪卫国. 转 *hpaI*_{Xoo} 基因棉花抗病虫防卫反应与全基因组转录谱分析及棉花角斑病菌 *hpa*_{Xm} 基因的功能 [D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [32] 顾本康, 马存. 中国棉花抗病品种 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1996: 140–141.
- [33] 陈大军, 简桂良, 李仁敬, 等. 转天麻抗真菌蛋白基因彩色棉新品系抗枯萎黄萎病研究 [J]. 分子植物育种, 2003, 1(5/6): 673–676.
- [34] Murray F R, Llewellyn D J, Peacock W J, et al. Isolation of the glucose oxidase gene from *Talaromyces flavus* and characterisation of its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae* [J]. Current Genetics, 1997, 32(5): 367–375.
- [35] 刘慧君, 简桂良, 邹亚飞, 等. *GO* 基因导入对棉花农艺性状及抗病性的影响 [J]. 分子植物育种, 2003, 1(5/6): 669–672.
- [36] Wei Z M, Beer S V. Harpin from *Erwinia amylovora* induces plant disease resistance [J]. Acta Horticulturae, 1996, 411: 223–225.
- [37] Strobel N E, Ji C, Kuc J A, et al. Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 HrpZPss protein [J]. The Plant Journal, 1996, 9(4): 431–439.
- [38] Hahn M G. Microbial elicitors and their receptors in plants [J]. Annual Review of Phytopathology, 1996, 34: 387–412.
- [39] Carpenter C W. The verticillium wilt problem [J]. Phytopathology, 1914, 4: 393.
- [40] 赵贵元, 王凯辉, 郭宝生, 等. 国审抗枯萎黄萎病抗虫棉新品种冀杂1号选育研究 [J]. 河北农业科学, 2012, 16(9): 55–59.
- [41] 赵俊丽, 张寒霜, 王永强, 等. 抗病丰产棉花新品种——冀棉169 [J]. 现代农村科技, 2010(5): 12.
- [42] 高艳平, 王子胜, 王巍, 等. 辽河流域棉区抗黄萎病育种进展及新品种(系)简介 [C]//中国棉花学会2014年年会论文汇编, 2014: 141–142.
- [43] 龙丽坤, 李飞武, 李葱葱, 等. 复合性状转基因玉米外源蛋白的时空表达规律 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(12): 29–33.
- [44] 许奕, 徐碧玉, 胡伟, 等. 盐胁迫下 *MaAQPI* 转基因拟南芥幼苗的生长和生理响应 [J]. 江苏农业学报, 2014, 30(6): 1279–1285.
- [45] 卢宝荣, 夏辉. 转基因植物的环境生物安全: 转基因逃逸及其潜在生态风险的研究和评价 [J]. 生命科学, 2011, 23(2): 186–194.
- [46] 周雪, 王冀宁. 转基因食品安全监管的演化博弈分析 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 463–466.
- [47] 王宇, 沈文星. 国内外转基因作物发展状况比较分析 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(6): 6–9.
- [48] 罗丰, 孔祥义, 袁经天, 等. 转基因作物安全研究进展及南繁转基因生物安全管理对策 [J]. 分子植物育种, 2011, 9(5): 648–655.