

# 学位论文摘要文集

THESIS ABSTRACTS

(XIII)



中国农业科学院研究生院

The Graduate School of Chinese  
Academy of Agricultural Sciences

1998.12

北京

## 内 容 提 要

本文集汇集了中国农业科学院学位评定委员会 1998 年授予的博士、硕士学位论文摘要 108 篇。其中,博士研究生论文 11 个专业 36 篇文章,每篇中文摘要后同时附有英文摘要;硕士研究生论文 19 个专业 49 篇文章,每篇只附英文题目;在职科技人员以研究生毕业同等学力申请硕士学位 9 个专业 23 篇文章,每篇也附英文题目。

---

**出版单位:**中国农业科学院学位评定委员会办公室

**责任编辑:**梅莲芝

# 目 录

## 博 士 研 究 生 学 位 论 文

### 作物遗传育种

- AaiT 基因在转基因植物及其后代中的表达和杀虫活性 ..... 孙 芹 (1)
- 水稻微管蛋白基因的表达调控及 poxy5 转基因烟草的培育和分析 ..... 秦小琼 (4)
- 葡萄糖氧化酶基因的克隆及其在大肠杆菌和植物中的表达 ..... 王志兴 (7)
- 甘蓝显性雄性不育基因的分子标记筛选及延长随机引物扩增 DNA 标记  
的建立 ..... 王晓武 (10)
- 小麦——黑麦易位系鉴定及抗白粉病基因定位 ..... 杨彦忠 (12)
- 抗黄矮病小麦新种质的鉴定和抗性基因定位 ..... 张增艳 (14)

### 蚕桑学

- 信号肽 BmNPV-家蚕表达系统中的作用及 BmNPV egt 基因的结构和  
功能分析 ..... 季 平 (17)
- 细纤度三眠蚕品种育成和家蚕抗性近等基因系培育及其 RAPD 分子  
标记研究 ..... 贺一原 (19)

### 生物物理学

- 核辐射促进普通小麦与窄颖赖草属间杂交的研究 ..... 李桂英 (21)
- 多粘类芽胞杆菌 WY110 对水稻病害的生物防治及其抗菌蛋白 P2 的纯化  
和特性研究 ..... 王云山 (23)
- 产酸克雷伯氏菌 SG-11 合成 IAA 的生物学特性及其吲哚-3-丙酮酸脱羧酶基因  
的克隆 ..... 吕泽勋 (25)

### 作物营养与施肥

- 长期定位施肥对土壤有机质及部分中、微量营养元素的影响 ..... 史吉平 (28)
- 长期施肥对石灰性潮土氮磷形态的影响及外源磷在土壤中的转化 ..... 梁国庆 (30)
- 氮钾营养对春玉米 (*Zea mays* L.) 源库动态与叶片衰老的影响 ..... 何 萍 (33)

### 植物病理学

- 马铃薯抗晚疫菌蛋白的分离纯化和主要特性研究 ..... 任 波 (36)
- 麦蚜传播大麦黄矮病毒的机制研究 ..... 王锡锋 (39)

### 昆虫学

- 棉铃虫标记技术研究 ..... 徐 广 (42)
- 棉花单宁-黄酮类化合物的定性定量分析及其对棉铃虫的抗性 ..... 武予清 (45)

## 农业经济及管理

二十一世纪初中国农业固定资产投资供需研究	王平生 (48)
农业产业化经济学本质与运行机制研究	夏英 (51)
贫困地区传统农业改造与政府反贫困投资政策研究	陈凡 (54)
中国农业经营规模研究	黄其正 (56)
传统村落组织与农村经济发展	李建克 (58)
中国农业保护研究	潘盛洲 (60)
吉林省玉米作物研究投资的经济分析	薛春玲 (62)
中国粮食生产的波动分析及短期预测方法	张峭 (65)
中国粮食安全预警理论研究	聂凤英 (68)

## 饲料科学

温度和水分胁迫对几种冷季型草坪生理和生长的影响	王代军 (70)
中国苜蓿地方品种遗传多样性及亲缘关系的研究	李拥军 (72)

## 动物营养学

胆碱与其它甲基供体对褐壳蛋鸡脂肪代谢的调控作用及其对生产性能的影响	王宏 (74)
果寡糖 (FOS) 对单胃动物肠道菌群的调控与营养作用的研究	吴天星 (76)
我国麦类饲料中非淀粉多糖抗营养作用机理研究	刘强 (80)
生长肥育羊瘤胃内 VFA 产生、吸收规律及模型参数研究	熊本海 (83)

## 兽医寄生虫学与寄生虫病学

伊氏锥虫抗原变异研究及二个变异表面糖蛋白基因的克隆和分析	周金林 (85)
------------------------------	----------

## 传染病学与预防兽医学

新城疫病毒基因免疫的实验研究	陈宏岩 (88)
新城疫病毒 La Sota 和 F48E9 株接种鸡 CD4 <sup>+</sup> 、CD8 <sup>+</sup> T 淋巴细胞的变化及其机理的研究	刘胜旺 (90)

# 硕士研究生学位论文

## 分子生物学

Profilin 2 启动子维管束特异表达的研究	刘昱辉 (92)
大豆脂肪氧化酶及其缺失突变基因的分子标记	伍树明 (93)
昆虫特异性神经毒素 tox 34 基因的合成及转基因烟草植株的获得	毛立群 (94)
Cry1A/GNA 及 CpTI/TfdA 双价基因植物表达载体的构建及其在烟草中的表达	王志斌 (95)
雪花莲凝集素基因韧皮部表达载体的构建及其在转基因烟草中的表达	李学勇 (96)
乙肝表面抗原 S 蛋白及其前区 S <sub>2</sub> 蛋白基因转基因番茄的培育	王跃驹 (97)
烟草叶绿体遗传转化体系的建立及丙肝病毒融合抗原基因转基因烟草的获得	山松 (98)

小麦农家品种红卷芒抗白粉病性状的遗传学分析及 Pm4a 的分子标记	
辅助选择 .....	贾帅争 (99)
小麦株高基因 <i>Rht 10/rht10</i> 的分子标记 .....	朱 聪 (100)
小麦特定染色体的标记研究及遗传效应分析 .....	徐燕吉 (101)
<b>微生物学</b>	
武夷菌素和多效霉素产生菌变种间原生质体融合 .....	张克诚 (102)
弗氏中华根瘤菌生物学特性及耐酸机理的初步研究 .....	王凤忠 (103)
<b>作物遗传育种</b>	
光敏核不育水稻短日照植株自交结实率低下原因探讨 .....	张 锐 (104)
油菜线粒体雄性不育相关基因表达载体的构建及转化 .....	李 杰 (105)
玉米转座因子 Ac 转化甘蓝型油菜及诱发突变的初步研究 .....	郭学兰 (106)
杜仲愈伤组织诱导、增殖及其含胶量的调控 .....	臧 埔 (107)
<b>蔬菜学</b>	
马铃薯离体快茎发育 .....	王大勇 (108)
大白菜雄性不育花药发育的细胞形态学和细胞化学研究 .....	郭晶心 (109)
几种青花菜新品种的耐贮性及其贮藏过程中主要生理和品质性状的研究 .....	王志平 (110)
<b>茶 学</b>	
高速逆流色谱法分离茶黄素的研究 .....	江和源 (111)
<b>蚕桑学</b>	
家蚕病原性微孢子虫的蛋白质化学性质和超微结构的研究 .....	高永珍 (112)
<b>土壤学</b>	
陕北坡耕地土壤侵蚀与土壤性质的空间变异研究 .....	夏侯国风 (114)
土壤有机金属络合物在环境中的净化功能 .....	陈世宝 (115)
<b>植物病理学</b>	
棉花黄矮病菌 gDNA 的 RAPD 分析、RG 克隆及分子生物学鉴定 .....	刘学堂 (117)
<b>昆虫学</b>	
转 Bt 基因棉对昆虫群落的影响及其作用机制 .....	崔金杰 (118)
稻褐飞虱实验种群致害性变异及其遗传分析 .....	姜人春 (120)
高效抗虫基因表达结构的构建及其在转基因烟草中表达行为的研究 .....	石春林 (121)
利用人工卵赤眼蜂蛹规模化饲养七星瓢虫技术研究 .....	孙 毅 (122)
<b>农药学</b>	
不同方式施药后, 普力克和百菌清在保护地中的分布与残留动态研究 .....	毕雯倩 (123)
苦参杀虫抑菌有效成份的分离提纯及结构鉴定 .....	郑永权 (124)
从几种植物中筛选生物活性化合物 .....	李 凯 (125)
饲料中有机磷农药多残留分析方法研究 .....	郑和辉 (126)
<b>生物物理学</b>	
冬小麦籽粒灌浆期源库调控的研究 .....	张玲娥 (127)
<b>应用气象学</b>	
旱地春玉米土壤水分平衡及模型的研究 .....	杨 平 (128)



## 农业系统工程及管理工程

- 开放结构的农业宏观决策支持系统实现方法的研究 ..... 姜 华 (129)
- 智能键及其应用研究——斑潜蝇虫害诊断系统的设计与实现 ..... 薛 领 (130)

## 农业经济及管理

- 中国小额信贷的扶贫效应分析——贵州草海保护区村基金模式研究 ..... 王 丽 (132)
- 农业项目风险分析 ..... 赵建梅 (133)
- 玉米生产要素投入结构的地区差异及其变动趋势的实证研究 ..... 李建平 (134)

## 野生动物

- 红细胞生成素乳腺特异性表达载体的构建及在大鼠乳腺中暂态表达 ..... 闫喜军 (135)

## 饲料科学

- 饲料中常用抗氧化剂检测技术的研究 ..... 秦喜斌 (136)

## 动物营养学

- 肉碱对高产期蛋鸡生理生化和生产性能的影响 ..... 索玉芳 (137)
- 饲用金霉素对肉仔鸡生产性能、肠道正常菌群及血液生化指标的影响 ..... 萨仁娜 (138)
- 日粮赖氨酸水平对母猪生产性能及血液、奶生化指标的影响 ..... 赵世明 (139)

## 动物繁殖学

- 运用奶孕酮放射免疫法监测奶牛的人工受精活动 ..... 卢雁平 (140)
- 显微注射不同浓度的外源 DNA 对小鼠原核胚体外发育能力和整合率的影响 ..... 王彦玲 (141)

## 传染病学与预防兽医学

- 口蹄疫病毒 2C 基因的克隆与表达 ..... 江鹏斐 (142)
- 伪狂犬病病毒 gE 基因的分子克隆及弱毒疫苗与野毒 PCR 鉴别诊断方法的建立 ..... 冉智光 (144)
- 火鸡疱疹病毒转移载体质粒的构建 ..... 原 野 (145)

## 在职人员同等学力硕士论文

### 作物遗传育种

- 我国烤烟品种区域化布局研究 ..... 王元英 (146)
- 烟草雄性不育系及杂种优势利用研究 ..... 冯全福 (147)
- 利用花粉化学诱变创造玉米遗传资源选育特用自交系 ..... 薛守旺 (148)
- 利用小麦 X 玉米诱导产生小麦单倍体与双单倍体的研究 ..... 陈新民 (149)
- 单拷贝 DNA 序列原位杂交技术的研究及  $\alpha$ -淀粉酶 3 基因的原位标记 ..... 苟吉庆 (151)
- 玉米雄性不育基因 ms30 的分子标记定位研究 ..... 梁业红 (152)
- 谷子及其几个近缘种的种内和种间遗传变异与遗传关系研究 ..... 黎 裕 (154)
- 通过组织培养和低能  $N^+$  离子注入诱导普通小麦-簇毛麦抗白粉病易位系及其鉴定 ..... 李 辉 (155)

## 蔬菜学

应用 RAPD 技术进行西瓜种质遗传多样性及耐冷性分子标记的研究 ..... 欧阳新星 (157)

胡萝卜栽培与贮藏过程中  $\beta$ -胡萝卜素含量的动态研究 ..... 张 平 (159)

## 果树学

软枣猕猴桃复合保健饮料研究 ..... 李继海 (160)

## 作物营养与施肥

不同地形及种植条件下土壤养分变异及合理取样研究 ..... 杨俐苹 (161)

## 植物病理学

菜豆抗锈病机制研究 ..... 冯东昕 (162)

大麦黄矮病毒的比较诊断技术与应用 ..... 杜志强 (163)

## 昆虫学

美洲斑潜蝇主要生物学、生态学特性研究 ..... 王 音 (164)

刺槐开花泌蜜与休眠期营养状况关系的研究 ..... 吴 杰 (165)

## 农药学

棉铃虫对拟除菊酯类抗药性的群体遗传和数量遗传特性研究 ..... 孟香清 (166)

## 农业经济及管理

国家农业综合开发战略分析与对策 ..... 赵晓静 (167)

中国绿色食品产业发展研究 ..... 王建平 (168)

种植业“三元结构工程”的实证研究 ..... 蒋建科 (170)

北京市蔬菜生产经济效益分析 ..... 刘瑞涵 (171)

## 传染病学与预防兽医学

我国 1993 - 1996 年口蹄疫流行毒株核酸 RNase T<sub>1</sub> 图谱分析 ..... 牟克斌 (172)

鸡后海穴接种新城疫疫苗产生免疫效果的研究 ..... 孙家发 (173)

# AaIT 基因在转基因植物及其后代中的表达和杀虫活性

博士生 孙 芹

导 师 范云六 教授 (Ph.D)

专 业 植物遗传育种

方 向 植物基因工程

1. 转昆虫特异性神经毒素 AaIT 基因杨树的获得及其抗虫性分析: 将构建在双载体 pGNY-2 上的 AaIT 基因通过农杆菌叶盘法转化杂交杨(小叶杨 X 美洲黑杨: *P. sieboldii* X *P. deltoides*) 获得 60 多株再生植株, 对其中 20 株进行 AaIT 基因的分析有 3 株 [A5, A12, A18] 呈 PCR 阳性, PCR Southern 杂交实验进一步表明 AaIT 基因已整合在杨树基因组上。杀虫实验表明, A5、A12 两株植物对一龄舞蛾 (*Lymantria dispar*) 幼虫有不同程度的抗性, A18 对一龄舞毒蛾 (*Lymantria dispar*) 幼虫抗性不明显。与对照相比, 饲喂植株 A12、A5 的幼虫死亡率显著增加, 叶片取食面积明显减小, 存活幼虫体重远远小于对照, Elisa 分析证明有 AaIT 蛋白的表达。这些结果表明 AaIT 基因在转基因杨树中得到有效表达, 表达产物具有正常的生物学活性。

2. 抗虫的转 AaIT 基因烟草植株自交后代 (T1 代) 的遗传表达分析: 抗虫转 AaIT 基因烟草植株 (R1、R2、R3、R4) 自交的 T1 后代中, 分析了 AaIT 基因与 AaIT 基因连锁的 NPTII 基因和 GUS 基因的遗传与表达。NPTII 基因在 R1、R4 两株 T1 后代中的性状分离符合孟德尔规律, 在 R2、R3 植株 T1 后代中的分离不能用孟德尔规律来解释, NPTII 基因可能发生了丢失或失活。在 R2、R3、R4 三个植株后代中, 卡那霉素抗性植株也多为 GUS 阳性, 但 R1 植株的卡那霉素抗性植株 T1 后代中几乎有一半植株呈现 GUS 阴性, GUS 活性丢失严重, 可能发生了基因失活。对 40 株 GUS 阳性和 17 株 GUS 阴性植株 T1 后代 PCR 分析 AaIT 基因的存在状况, 结果发现 GUS 阳性植株均呈现为 PCR 阳性, GUS 阴性植株中有 3 株也呈现 PCR 阳性, 这说明通过我们的基因构建获得的后代植株中 AaIT 基因的存在与否并不完全由 GUS 活性状况来说明。对其中部分植株基因组 DNA 进行 Southern 杂交分析, 在分子水平上进一步证明了 AaIT 基因整合在后代植株的基因组上。杀虫实验表明, R1、R2、R3、R4 四株的 PCR 阳性后代植株均表现出对二龄棉铃虫 (*Heliothis armigera*) 幼虫的抗性, R1、R4 两株 T1 后代的抗性程度彼此有所区别, R2、R3 两株 T1 后代的抗性程度比较相似, 用抗 AaIT 的抗体进行 Elisa 分析表明, 植株 R12、R41 的蛋白表达水平较高, 这与它们的抗虫性程度是吻合的。以上结果表明, AaIT 基因在转基因植物中可以被遗传给后代, 并能在后代中有效表达出有生物学活性的蛋白产物。

关键词: AaIT 基因 转基因植物 杀虫活性



# **Insecticidal Activity and Expression of Insect-Specific Neurotoxin AaIT Gene in Transgenic Plants and Their Progeny**

This paper mainly consists of two parts:

## **1. Production of transgenic poplar containing AaIT gene and analysis on their insecticidal activity**

AaIT gene which has been inserted into binary vector pGNY-2 was transferred into poplar (*P. sieboldii* X *P. deltoides*) by Agrobacterium-mediated leaf-disc gene transfer system. We obtained more than 60 regenerated *Populus* (*P. sieboldii* X *P. deltoides*) plants. PCR and PCR-Southern analysis showed that there were three plants containing AaIT gene integrated into poplar genome among 20 regenerated *Populus* (*P. sieboldii* X *P. deltoides*) plants. These three plants showed the toxicity to first instar larvae of *Lymantria dispar* in a varied degree, when compared with the control. Two transgenic *Populus* plants significantly reduced feeding and weight gained by the first instar larvae of *Lymantria dispar* and also increased the mortality rate of the larvae. Elisa analysis proved that the AaIT protein was expressed in these two transgenic *Populus* (*P. sieboldii* X *P. deltoides*) plants. Our results demonstrated that AaIT gene was expressed in transgenic *Populus* (*P. sieboldii* X *P. deltoides*) plants efficiently and the AaIT protein product had normal insecticidal activity.

## **2. Studies on inheritance and expression of AaIT gene in the progeny T1 of transgenic tobacco plants through self-pollination**

The inheritance and expression of AaIT gene, NPTII gene and GUS gene, which were two-linked with AaIT gene in the binary vector, have been analyzed in the progeny from four insect-resistant transgenic tobacco T0 plants. The patterns of phenotype expression of NPTII gene in the progeny from transgenic plants R1 and R4 were consistent with Mendelian inheritance patterns. In the progeny from another two transgenic plants, R2 and R3, however, it could't be interpreted by Mendelian inheritance. NPTII gene may be lost or silenced in these plants.

The progen from transgenic plants R2, R3 and R4 with kanamycin resistance also showed positive GUS activity. But nearly half of the progeny plants from transgenic plants R1 with kanamycin resistance showed that negative GUS activity. The severe loss of GUS activity in these plants may also result from gene silencing. PCR analysis showed that not only forty progeny plants exhibiting positive GUS activity contained AaIT gene, but also three GUS-negative progeny plants contained AaIT gene. Southern blot analysis of some progeny plants proved the integration of AaIT gene in tobacco genome at molecular level. In the Bioassay, compared with the control,

all progeny plants containing AaIT gene showed resistance to the second instar larvae of *Heliothis armigera* in a varied degree. The progeny plants from transgenic tobacco R1 and R4 exhibited different resistance level and those from R2 and R3 showed similar resistance to the *Heliothis armigera* larvae. Elisa analysis with antibody of AaIT protein showed that the expression levels of AaIT gene in plants R12, R14, R15, R41 and R42 were high. This was consistent with their high resistance to *Heliothis armigera* larvae. The results above indicated that AaIT gene in transgenic plants was inherited by progeny efficiently and could also confer resistance to pest larvae through expressing in these progeny plants.

**Keywords:** AaIT gene, transgenic plants, insecticidal activity

# 水稻微管蛋白基因的表达调控及 *pxy5* 转基因烟草的培育和分析

博士生 秦小琼

导师 贾士荣 辛志勇 尤崇杓

专业 作物遗传育种

方向 植物基因工程

本文首次详细地研究了水稻三种  $\alpha$  微管蛋白在籽粒不同发育阶段和不同器官中的差异性表达;研究了植物激素及抗微管药物对水稻  $\alpha$  和  $\beta$  微管蛋白 mRNA 及蛋白质积累的影响,并对其调控机制进行了探讨和分析,提出了植物微管蛋白与动物微管蛋白可能有不同调控机制的假设。*OSTubA1* 和 *OSTubA2*mRNA 与总  $\alpha$  微管蛋白 mRNA 的变化趋势一致,在籽粒发育早期大量积累,其后随着籽粒发育 mRNA 转录本的量下降;而 *OSTubA3*mRNA 则在籽粒发育过程中变化不大,在散粉期略有提高。比较幼苗、叶片、根、胚芽鞘、花、种子等不同器官中三种  $\alpha$  微管蛋白基因的转录,发现 *OSTubA3*mRNA 在根中呈明显的优势积累。

IAA 对水稻胚芽鞘的伸长有促进作用,10  $\mu\text{mol/L}$  IAA 处理 2h 后, *OSTubA3* 和总  $\alpha$ 、 $\beta$  微管蛋白 mRNA 均有所提高,相应的蛋白质积累量没有变化。ABA 抑制水稻胚芽鞘的伸长,50  $\mu\text{mol/L}$  ABA 处理 12 h 后,  $\alpha$  和  $\beta$  微管蛋白 mRNA 的积累均受到强烈抑制,但蛋白质的积累量不变。说明 IAA 及 ABA 是在转录水平上调控。除草剂 oryzalin 可与微管蛋白二聚体结合,抑制微管的聚合,从而抑制水稻胚芽鞘的伸长。1、10、50  $\mu\text{mol/L}$  oryzalin 处理 24h 强烈抑制  $\alpha$  和  $\beta$  微管蛋白的积累量,但相应的 mRNA 积累量无明显变化。说明 oryzalin 是在翻译水平上调控。植物激素 IAA、ABA 及抗微管药物 oryzalin 对微管蛋白在转录和翻译水平上的不同调控模式,以及对比动物微管蛋白经抗微管药物如秋水仙素处理后 mRNA 及蛋白质均有所降低的结果,推测植物微管蛋白与动物微管蛋白有不同的调控机制。

将 *pxy5* 基因以正义或反义方式转入烟草后,获得了 *pxy5* 转基因烟草植株,包括不同的插入位点数(1~7个),并收获了子一代的种子。比较转基因烟草插入位点数和转录水平的表达,结果显示寡位点(1~3个)插入的植株 S1、S2、S4、S13 和 S19 中, *pxy5* 基因呈中表达或高表达,而多位点(4个以上)插入的植株 S9、S10、S17 和 S20 中, *pxy5* 不表达或仅低水平表达,进一步证明了多位点插入可引起转基因沉默。在 Southern 杂交中发现,37  $^{\circ}\text{C}$  杂交时,在所有样品(包括对照)中均存在一共同带,当杂交温度提高至 42 $^{\circ}\text{C}$  时,该带消失,但其它各带均仍然存在。据此推测,这个共同带可能是烟草中的内源 annexin 序列,它与拟南芥菜中的序列同源性可能较低,烟草 annexin 基因至今仍未分离。初步的生化分析显示,高水平转录表达的 S13 和 S19 中愈创木酚过氧化物酶活性提高了约一倍。

以上结果在迄今文献中均尚未见报道。

关键词: 水稻 微管蛋白 表达 烟草 氧化逆境 *pxy5*

# Tubulin Gene Expression and Regulation in Rice and the Production, Analysis of Transgenic Tobacco Plants with a *pxy5* gene

At the early stage of rice grain development, the total  $\alpha$ -tubulin as well as *OSTubA1* and *OSTubA2* mRNA were more abundant followed by a significant decrease at later stages. However, the *OSTubA3* mRNA remained constant during rice grain development with a slight increase at the time of pollen release. Among three isotypes of  $\alpha$ -tubulin, *OSTubA3* mRNA accumulated preferentially in roots compared with that in seedlings, leaves, coleoptiles, flowers and seeds.

Plant hormone IAA promotes coleoptile elongation. When rice coleoptiles were treated with 10  $\mu\text{mol/L}$  IAA for 2h, the transcriptional accumulation of *OSTubA3* and total  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin increased. Another hormone ABA, inhibits coleoptile elongation. After 12h treatment with a concentration of 50  $\mu\text{mol/L}$  of ABA, the mRNA accumulation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin were strongly inhibited. However, both hormones had no effect on tubulin protein synthesis. These data indicated that the expression of rice tubulin gene is regulated at the transcriptional level by the IAA or ABA. Anti-microtubule herbicide oryzalin has been found to bind tubulin heterodimer and depolymerize the microtubules that resulted in inhibition of rice coleoptile elongation. Coleoptiles treated with 1, 10, 50  $\mu\text{mol/L}$  of oryzalin for 24 h caused dramatic decrease in  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin protein accumulation, but no changes were detected with their corresponding mRNA. This suggested that tubulin synthesis was modulated at the translational level by oryzalin. Taken together, in response to hormone or oryzalin treatment, the tubulin gene expression in rice was regulated at two different level, either transcriptional or translational. This is not in agreement with what has been found in animal system, where it has been well documented that tubulin synthesis is regulated in almost all animal system at post-transcriptional level due to mRNA instability, that results in the reduction of both amount of steady state of mRNA and protein. Data suggested that there might be different mechanisms in controlling plant and animal tubulin gene expression.

To the best of our knowledge, it is the first time to date that the differential expression of three isotypes of rice  $\alpha$ -tubulin gene has been studied. The effects of plant hormone and anti-microtubule drug oryzalin of rice tubulin expression lead to a hypothesis that the mechanism for regulation of tubulin gene expression in plants might be different from animals. The above two aspects have not been reported in the literature.

Transgenic tobacco plants with different insertion sites (1~7) of *pxy5* gene in its sense or antisense orientation were obtained. F1 seeds of all the transgenic plants were collected. By analyzing the number of insertion sites and the level of transcriptional expression, it was found that

the transgenic plants S1, S2, S4, S13, S19 with less insertion sites (1~3) showed middle or higher level of *paxy5* expression, while, plants S9, S10, S17, S20 with multiple-site insertion (more than 4) had no or low expression. These results further support the concept that multiple copy number may lead to gene silencing in transgenic plants.

In Southern blot analysis of *paxy5* transgenic tobacco plants, a common band was found in all samples including control plants when hybridization was performed at low stringency (37°C). It disappeared when temperature was increased to 42°C. Most likely this common band was endogenous annexin sequence in tobacco. It could be also speculated that the homology between tobacco and arabidopsis annexin was low. To date, the annexin gene has not been cloned from tobacco.

Preliminary biochemical analysis showed that guaiacol peroxidase activity was increased about 1 fold in transgenic plants S13 and S19, which had higher transcriptional expression of *paxy5* gene.

All above mentioned results have not been documented in previous literature.

**Keywords:** rice, tubulin, expression, tobacco, oxidative stress, *paxy5*

# 葡萄糖氧化酶基因的克隆及其在大肠杆菌和植物中的表达

博士生 王志兴  
导师 贾士荣 王连铮  
专业 作物遗传育种  
方向 植物基因工程

植物在受到病原物侵染后引起的超敏反应 (HR)、防卫系统基因的表达、以及最终诱导系统获得性抗性,都与植物-病原互作中早期活性氧类的快速合成有关。在氧化激增过程中产生的 AOS,如超氧离子、羟自由基、过氧化氢,不仅具有直接杀伤病原菌的作用,而且作为信号分子对激发植物的防卫系具有重要作用。

葡萄糖氧化酶 (Glucose oxidase, GO) 催化葡萄糖的氧化,生成葡萄糖酸和过氧化氢。目前已在数种细菌和真菌中检测到 GO,但在植物和动物中仍未发现。本研究通过 PCR 扩增克隆了黑曲霉的 GO 基因。构建了 GO 基因的大肠杆菌表达载体,GO 在大肠菌中的表达量占细菌总蛋白的 2.39%。经用本研究制备的兔抗 GO 血清进行 Western 分析,确证表达的蛋白为葡萄糖氧化酶。

构建了 35S 启动子驱动的 GO 基因植物表达载体,经遗传转化,获得了烟草、马铃薯、棉花的转基因植株。经 Southern 杂交证明 GO 基因已整合到烟草、马铃薯和棉花的基因组中。Northern 杂交和 Western 杂交证明 GO 基因在转基因烟草中的转录和翻译,转基因烟草中过氧化氢的含量最高可达每升 610 微摩尔,比对照提高近 5 倍。转基因烟草抗赤腥病和黑胫病的鉴定工作正在进行中。转基因马铃薯薯块的抗软腐病性得到明显提高,并已初步筛选出抗黄、枯萎病的棉花单株,分子检测呈阳性。

很多植物病害为维管束病害,用 PCR 方法从拟南芥基因组中克隆了 profilin2 维管束特异表达启动子,构建了 Profilin2/GO 基因的植物表达载体 pFGO。获得了转 pFGO 的转基因马铃薯植株, Southern 检测证明外源基因的整合。组织化学检测表明 GO 基因在维管束中特异表达,抗病性鉴定表明转基因马铃薯薯块高抗软腐病。

本工作不仅以 CaMV 35S/GO、Profilin2/GO 组成型或维管束特异表达证实了 GO 催化产生的过氧化氢可抗马铃薯软腐病,而且转 GO 基因的烟草及棉花为文献中首次报道,转基因烟草中过氧化氢的高表达及筛选出棉花抗黄、枯萎病的单株预示着转 GO 基因可能成为获得广谱抗菌性的植物基因工程路线。

关键词: 氧化激增 过氧化氢 葡萄糖氧化酶 抗病性



## Cloning fo Glucose Oxidase Gene and Its Expression in *E. coli* and Plants

In response to pathogen attack, a series of defense mechanisms in plants are triggered including hypersensitive response, expression of defense genes and finally, leading to the induction of systemic acquired resistance. All these responses are related to the rapid production of active oxygen species (AOS) during the early stage of plantpathogen interaction. The AOS, such as superoxide anion, hydroxy1 radical, and hydrogen peroxide, produced in oxidative burst, are extremely important both as microbicidal reagents to inhibit pathogen growth and as signal molecules to trigger the expression of plant defense system.

Glucose oxidase (GO) catalysis the oxidation of glucose resulting in the production of gluconic acid and hydrogen peroxide. A number of bacteria and fungi produce GO, but is has not been found in animals and plants. In the present work we have cloned the GO gene from *Aspergillus niger* through PCR amplification and constructed an *E. coli* expression vector harboring the GO gene. The expression level of GO accounts for 2.39% of the total *E. coli* soluble protein. Western analysis with rabbit anti-GO serum confirmed that the protein expressed in *E. coli* is glucose oxidase.

The plant expression vector pBGO, harboring the GO gene driven by CaMV 35S promoter, was constructed and used for transformation of tobacco, potato and cotton. Southern analysis of transgenic plants demonstrated that the GO gene was integrated into the genome of tobacco, potato and cotton. Northern and Western analysis showed that GO was expressed both at transcriptional and translational level in transgenic tobacco plants. The maximum amount of hydrogen peroxide in transgenic tobacco can be as high as 610  $\mu\text{mol/L}$ , which is about 5 times higher than that of the non-transgenic plants. While disease challenge tset of transgenic tobacco by inoculation of *Alternaria alternata* and *Phytophthora parasitica* pv *Nicotianae* are being carried out, it is evident that the soft rot-resistance in tubers of transgenic potato has been improved significantly. Cotton plants resistant to *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae* have been screened out as well.

Many plant pathogens cause vascular diseases. Therefore, a profilin2 promoter, specifically expressed in vascular bundles, was cloned through PCR amplification and was hooked to the GO gene to construct a plant expression vector pFGO. Southern analysis of transgenic potato plants showed that the GO gene was integrated into the potato genome. Histochemical assay indicated that the GO gene was specifically expressed in the vascular bundles and the tubers of transgenic potato exhibited high level of soft rot resistance.

It is concluded through our study that the hydrogen peroxide produced by GO both in constitutive expression (CaMV 35S/GO) or vascular-specific expression (Profilin2/GO), can confer soft rot resistance in transgenic potato. To the best of our knowledge the transgenic tobacco and cotton expressing GO are first reported in present work. The high level of hydrogen peroxide produced via GO expression in transgenic tobacco and the obtaining of cotton plants resistant to *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae* suggest that the introduction of GO gene into plants may become a new genetic engineering strategy for producing transgenic plants with a broad spectrum disease-resistance to a wide range of plant pathogens.

**Key words:** Oxidative burst, Hydrogen peroxide, Glucose oxidase, Disease resistance

# 甘蓝显性雄性不育基因的分子标记筛选及 延长随机引物扩增 DNA 标记的建立

博士师 王晓武

导师 方智远 研究员

专业 作物遗传育种

方向 蔬菜遗传育种

采用 BSA (Bulked Segregant Analysis, BSA) 分析方法, 筛选获得了 2 个与甘蓝显性雄性不育基因 (Ms) 连锁的 RAPD 标记, OA01<sub>700</sub> 和 OT11<sub>900</sub>。这两个标记分布在 Ms 基因两侧, OA01<sub>700</sub> 与 Ms 的连锁距离为 18.24cM; OT11<sub>900</sub> 与该基因的连锁距离在 7.48cM 以内。

通过逐步筛选 3' 端延长随机引物的方法将 OT11<sub>900</sub> 转化成了稳定性和特异性都得到增强的新标记 EP11<sub>900</sub>, 本研究将其称为延长随机引物扩增 DNA (Extended Random Primer Amplified DNA, ERPAD) 标记。这一标记具有接近 SCAR 标记的效果, 但不需要克隆和测序。该方法首先根据 OPT11 的序列合成 3' 端添架 A、T、C、G 四种碱基的四个引物, 组成 10 个引物对。以不育池为模板筛选出 OT11 - C + OT11 - G 为唯一能够扩增长度与 OT11<sub>900</sub> 相同的一个片段的引物对。在此引物对基础上, 又添加四种碱基得到 8 个新的引物, 相互组成 16 个引物对。进一步以不育池为模板筛选出 OT11 - CT + OT11 - GA, 在严格条件下, 它可特异扩增长度与 OT11<sub>900</sub> 相同的一个片段 EPT11<sub>900</sub>。通过分离群体分析证实这一片段与 OT11<sub>900</sub> 处于同一位点。

ERPAD 标记在退火温度、模板浓度、扩增体系和竞争性模板方面的稳定性显著超过相应的 RAPD 标记。对 33 个甘蓝自交系的分析发现, EPT11<sub>900</sub> 主要分布在各种早熟甘蓝中, 很少存在于鸡心型或晚熟扁圆类型甘蓝中。该结果表明, 它可用于辅助大多数鸡心型或晚熟扁圆类型甘蓝的 Ms 基因转育。EPT11<sub>900</sub> 在辅助两个甘蓝自交系回交 3 代及两个青花菜自交系回交一代的 Ms 基因转育中, 预测的准确性超过 90%。SCAR 标记分析证实, 在 ERPAD 分析中推测的碱基序列是可靠的, 这些为延长随机引物扩增 DNA 标记方法提供了理论依据。利用引物 OPA10 延长随机引物对甘蓝自交系 8020 进行了 ERPAD 标记的初步研究。利用 OPT11 的延长随机引物获得了一些在 8020 和 J341 之间表现多态性的 ERPAD 标记。这些标记为 ERPAD 标记方法应用的广泛性提供了初步证据。

**关键词:** 显性雄性不育基因 分子标记 延长随机引物扩增 DNA (ERPAD) RAPD SCAR 甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata*)