

β -1, 3- 葡聚糖酶在植物抗真菌病基因工程中的研究进展

余贤美¹, 郑服丛¹, 艾呈祥², 许桂莺³

(1. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 中国海南 儋州 571737; 2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所 热带作物生物技术国家重点实验室, 中国海南 海口 571101; 3. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 中国海南 儋州 571737)

摘要: β -1, 3- 葡聚糖酶是植物抗真菌病的重要抗性物质之一, 植物 β -1, 3- 葡聚糖酶可由病原物 (如 *Mg*) 化学因子 (如水杨酸、乙烯、赤霉素) 或物理因子 (如紫外线照射、机械损伤) 等多种生物因子和非生物因子诱导产生。将外源 β -1, 3- 葡聚糖酶基因导入植物, 可提高植物的抗真菌病害的能力; 而将 β -1, 3- 葡聚糖酶基因与其他防卫蛋白基因同时导入植物, 将更大程度的提高植物的抗真菌病能力, 是植物抗真菌病防治的有效新途径。文章中主要对 β -1, 3- 葡聚糖酶的生物学特性、植物 β -1, 3- 葡聚糖酶基因在转基因植株中的独立表达及其与其他抗真菌病基因的协同表达等进行了综述。

关键词: β -1, 3- 葡聚糖酶; 植物; 抗真菌病害; 基因工程

中图分类号: Q7; Q81; S4

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2004)S1-0053-05

The Development of the Utilization of β -1, 3-glucanase in Transgenic Plant Resistant to Fungal Pathogens

YU Xian-mei¹, ZHENG Fu-cong¹, AI Cheng-xiang², XU Gui-ying³

(1. The Institute of Environment and Plant Protection, China Academy of Tropical Agriculture Science (CATAS), Danzhou Hainan 571737; 2. Institute of Bioscience and Biotechnology, National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, CATAS, Haikou Hainan, 571101; 3. Tropical Crops Genetic Resources Institute, CATAS, Danzhou 571737, Hainan, China)

Abstract: β -1, 3-glucanase (β -Glu) is an important resistant matter in the anti-fungi of plant. Plant β -Glu can be induced by biotic factors, such as pathogene (*Mg* etc.) and abiotic factors, such as chemical factors (salicylic acid, ethylene, gibberellin etc.) or physical factors (ultraviolet radiation, mechanical damage etc.) Resistance to fungal pathogens of the plant would increase after being introduced the gene encoding β -1, β -glucanase, and it will increase much more when introduced the β -1, 3-glucanase gene simultaneously with other genes encoding plant protection proteins, so it was a effective way to control fungal pathogens by developing transgenic plant. Following contents were primarily reviewed in the paper: the biological character of

收稿日期: 2004-08-09; 修回日期: 2004-10-11

基金项目: 中国热带农业科学院科技基金资助

作者简介: 余贤美 (1976-) 女, 福建浦城人, 助理研究员, 硕士, 主要从事植物基因工程及植物抗病育种研究, Tel: +86-0898-23300141, yuxianmei95@163.com; 郑服丛 (1956-), 广东汕头人, 中国热带农业科学院研究员, 主要从事植物病理学研究, Tel: +86-0898-23300141,

β -1, 3-glucanase, the expressing of the plant β -1, 3-glucanase gene and its co-expressing with other anti-fungal genes in transgenic plants.

Key words: β -1, 3-glucanase; plant; resistance to fungal disease; genetic engineering

(*Life Science Research*, 2004, 8(4): 053 ~ 057)

在农业生产上, 植物病害的防治一直是一个非常重要的环节, 尤其对于由真菌引起的病害. 多数病害的防治主要依赖于化学农药的使用和抗病育种, 但传统育种费事费力, 而化学农药的使用易对环境造成污染, 危害人类、牲畜的健康. 所以, 人们考虑应用生物技术来防治植物病害. 利用生物技术防治植物病害, 主要涉及植物抗性基因和病原菌无毒基因的分离和克隆、对病原菌代谢过程中产生的酶的抑制剂及抗菌蛋白的研究. 在抗真菌蛋白中研究最多的是几丁质酶和葡聚糖酶. 将外源 β -1, 3-葡聚糖酶基因导入植物, 可以增强植物的抗病能力, 它即能独立发挥作用, 也可以与其他抗真菌蛋白协同作用. 因此被认为是植物有价值的抗真菌物质.

1 β -1, 3-葡聚糖酶的生物学特性

β -1, 3-葡聚糖多聚体是大多数植物病原真菌细胞壁的主要成份之一, 而 β -1, 3-葡聚糖酶 (β -1, 3-*Glu*) 通过催化 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. 迄今为止, 至少已从 9 个植物品种中分离纯化得到了 26 种 β -1, 3-葡聚糖酶和它们的 cDNA 克隆, 一些蛋白质的氨基酸序列及其基因的核苷酸序列也被测出. 这些 β -1, 3-葡聚糖酶至少可分为 3 个结构上不同的类型. 第一类包括 4 个碱性异构体, 它们在氨基酸序列上的同源性很高, 仅有 1% 的差异. 第二类包括 6 种异构体, 4 种是酸性的, 它们在氨基酸序列上有 18% 的不同. 第一、第二两类之间的氨基酸序列有 48.4% 的差别. 第三类中只含有一种, 是酸性蛋白质, 它和第一第二两类之间氨基酸序列的差异是 43%. 该酶的催化活性依赖于其结构中的天冬酰胺和谷氨酰胺以及色氨酸和酪氨酸残基.

植物 β -1, 3-葡聚糖酶可由病原物 (如 *Mg*, *Magnaporthe grisea*) 化学 (如水杨酸、乙烯、赤霉素) 或物理因子 (如紫外线照射、机械损伤) 等多种生物因子和非生物因子诱导产生, 其活性也受到这些因子的影响.

3-葡聚糖酶活性都会增加. 稻瘟菌孢子感染或菌丝培养液处理后, 水稻的 β -1, 3-葡聚糖酶的活力被诱导提高 3 ~ 5 倍^[1]. 小麦受到褐斑病侵染后诱导合成的病原相关蛋白中, 有 7 种是 β -1, 3-葡聚糖酶 (PR-2), 4 种是几丁质酶 (PR-3), 1 种为 PR-1 蛋白, 均属非特异性的抗性反应^[2]. 黄瓜子叶受到烟草坏死病毒 (Tobacco necrosis virus, TNV) 侵染后, 其 β -1, 3-葡聚糖酶活性提高了 6 倍^[3]. 陈坚等^[4]用新疆甜瓜疫霉菌毒素作为诱导因子, 研究了新疆甜瓜黄化苗中 β -1, 3-葡聚糖酶和几丁质酶对诱导作用的反应, 结果表明, 75% 的粗毒素对 β -1, 3-葡聚糖酶、内切和外切几丁质酶都有较好的诱导作用; 在一定浓度范围内 (<75%), 随着毒素浓度的提高, 酶活性也随之提高, 并且 β -1, 3-葡聚糖酶的相对活性远高于几丁质酶.

葛秀春等^[5]分析了苯并噻二唑 (Benzthiadiazole, BTH) 诱导水稻对稻瘟病抗性中 β -1, 3-葡聚糖酶等活性的变化, 结果表明, BTH 诱导处理亲和性水稻品种第 3 叶后提高了处理叶及其上位第 4 叶中 β -1, 3-葡聚糖酶和肉桂醇脱氢酶 (Cinnamic alcohol dehydrogenases, CAD) 等的活性; 经 BTH 处理的幼苗接种稻瘟菌后, 处理叶和其上位叶中 β -1, 3-葡聚糖酶和 CAD 等活性快速增加, 且增长速度均显著大于对照. 郝变青等^[6]研究了沤肥浸渍液对青椒、番茄 β -1, 3-葡聚糖酶活性的影响, 结果表明, 畜粪 (猪粪、马粪、牛粪) 沤肥浸渍液处理青椒、番茄后, 植株体内 β -1, 3-葡聚糖酶活性均有不同程度的提高. 李颖章等^[7]研究了水杨酸和萎蔫病菌毒素处理对棉花愈伤组织 β -1, 3-葡聚糖酶和几丁质酶活性的影响, 结果表明, 不同品种棉花愈伤组织对萎蔫病菌毒素粗提物的抗性与体内 β -1, 3-葡聚糖酶和几丁质酶活性水平有关; 在毒素处理下, 抗性品种比感性品种酶活性增加的幅度大、时间早; 外源水杨酸 (Salicylic acid, SA) 处理后, 棉花愈伤组织中的 β -1, 3-葡聚糖酶和几丁质酶活性增加. 另外, 蔗糖也能诱导植物体内 β -1, 3-葡聚糖酶的表达. Thibaud MC 等^[8]研究了含糖 (蔗糖或葡萄糖) 液体培养基中, 拟南芥 PR (pathogenesis related) 蛋白的表达, 结果表明, PR

蛋白在含糖液体培养基中快速积累, 并从培养基中纯化到了两种主要蛋白, 发现它们与拟南芥 PR-2 蛋白 (酸性 β -1, 3- 葡聚糖酶) 和 PR-5 蛋白 (奇异果甜蛋白类似的 PR 蛋白) 同源。

法国大豆叶片受到紫外 (UV-B; 280 ~ 320 nm) 照射后, β -1, 3- 葡聚糖酶被强烈诱导; 短波 ($\lambda < 295$ nm) 紫外照射对 β -1, 3- 葡聚糖酶的诱导是最有效的, 但类似于自然辐射条件下的长波 ($\lambda > 295$ nm) 紫外照射也有一定的效果^[9]。Wu CT 等^[10]的研究结果表明, 番茄种子和叶子中 β -1, 3- 葡聚糖酶 (GluB) 及 I 类几丁质酶 (Chi9) 不同程度的受到机械损伤、甲基茉莉酮酸酯 (methyl jasmonate, MeJA) 乙烯及赤霉素 (gibberellic acid, GA) 的调节; 在 GA 缺陷型变异种子 (gib-1) 中, GluB 和 Chi9 的 mRNA 有蛋白表达依赖于 GA; GA 缺陷型变异种子中, MeJA 和机械损伤只诱导了低水平的 GluB 的表达; 而在叶子中, MeJA、机械损伤和乙烯诱导了 GluB 和 Chi9 这两种基因的表达; GluB 和 Chi9 这两种基因显著受到激素及机械损伤的诱导并组织特异性地表达。

上述研究结果表明, β -1, 3- 葡聚糖酶可被多种生物因子和非生物因子诱导产生, 是植物抵抗病原真菌侵染的主要防卫反应之一。

2 β -1, 3- 葡聚糖酶的独立抗病性

正常情况下, β -1, 3- 葡聚糖酶在植物体内只有低水平的组成型表达。植物在病原真菌入侵后, β -1, 3- 葡聚糖酶及几丁质酶防卫蛋白在细胞内积累增加, 而这些蛋白往往表达量不够, 或表达期太晚, 或由于病原真菌分泌蛋白对内源 β -1, 3- 葡聚糖酶的抑制等, 以致不能使植物体免受病害。将外源 β -1, 3- 葡聚糖酶基因导入植物, 可提高植物对病原真菌的抗性。转基因植物体内超常表达 β -1, 3- 葡聚糖酶增强了植株抵御真菌病害的能力。

β -1, 3- 葡聚糖酶在体外对病原菌有较强的抑制作用。Canhos Y. 等 (1995)^[11] 研究表明, 从 *Arthrobacter* 中提取的 β -1, 3- 葡聚糖酶在体外对莴苣霜霉菌萌发具有很高的抑制效应, 认为细菌的 β -1, 3- 葡聚糖酶可用于莴苣抗霜霉病的基因工程中。李继红等^[12] 对经过修饰的烟草 β -1, 3- 葡聚糖酶和烟草 I 类几丁质酶 cDNA 分别构建了原核表达载体, 并转化大肠杆菌 BL21, 这两个片段在 BL21 中得到了表达。用表达产物进行了

对病原真菌尖孢镰刀菌的两个专化型的抑菌试验, 结果显示, 两种表达产物在体外均表现出较强的抑病原真菌活性。

将外源 β -1, 3- 葡聚糖酶基因导入植物体内可诱导植物抗病性, 关于这方面的研究已有较多的报道。Yoshikawa 等 (1993)^[13] 将来自大豆的 β -1, 3- 葡聚糖酶基因导入烟草中, 获得了高效表达, 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 *Phytophthora parasitica* 和 *Alteria altenata* 的良好抗性。研究结果显示 β -1, 3- 葡聚糖酶活性与抗病性之间存在很高的相关性。Herbers 等 (1996)^[14] 将来源于 *Ruminococcus flavefaciens* 的 β -1, 3- 葡聚糖酶基因导入烟草, 获得了高活性葡聚糖酶在蛋白质水平上表达的转基因烟草。迟彦^[15] 构建了大豆 β -1, 3- 葡聚糖酶基因的植物表达载体 pBI12 1-glu, 并通过根癌农杆菌介导法转入烟草, 获得了大量再生的转基因烟草, 转基因植株苗期抗立枯病实验表明, 转化 β -1, 3- 葡聚糖酶基因的工程烟草对立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 表现出不同程度的抗性提高。上述研究表明, β -1, 3- 葡聚糖酶基因可在植物抗病反应中独立地发挥作用。

3 β -1, 3- 葡聚糖酶与其它防卫蛋白的协同抗病作用

外源 β -1, 3- 葡聚糖酶既可单独地被导入植物发挥作用, 又可与其它防卫蛋白一起转入植物协同表达。 β -1, 3- 葡聚糖酶经常与几丁质酶和其他病原体相关保护蛋白协同表达。由于真菌成熟细胞菌丝体结构成分的复杂性, 单一的 β -1, 3- 葡聚糖酶或几丁质酶抑菌活性较弱, 离体生物检测得知, β -1, 3- 葡聚糖酶或几丁质酶与核糖体失活蛋白具有很强的协同作用。在抗病基因工程中, 可以将 β -1, 3- 葡聚糖酶基因或几丁质酶基因同核糖体失活蛋白基因协同在转基因植株中表达。

目前, β -1, 3- 葡聚糖酶与几丁质酶、核糖体失活蛋白 (ribosome inactive protein, RIP) 等防卫蛋白的协同表达在抗真菌基因工程中的应用已有较多的尝试, 也取得了一些预期效果。1994年, Zhu 等^[16] 首次证明转双基因 (水稻几丁质酶和苜蓿葡聚糖酶) 的烟草植株比转其中任何一种单基因的烟草植株对真菌有更强的抑菌作用。Jach G 等^[17] 也证明共表达大麦几丁质酶和 β -1, 3- 葡聚糖酶基因或共表达大麦几丁质酶和大麦核糖体失活蛋白基

因的烟草植株比表达其中任何一种单基因的烟草植株有更强的抗菌能力, 并且其抗性有了数量性的提高. 更多相关报道详见表 1.

4 展望

作为内源植物蛋白的 β -1, 3-葡聚糖酶是植物抗真菌病中重要的抗病性物质之一. 植物的 β -1, 3-葡聚糖酶一方面和几丁质酶等协同作用抑制真菌生长, 另一方面, 可以寄主或病原物细胞壁中的葡聚糖作为信号分子激发寄主的防卫反应. β -1, 3-葡聚糖酶的抗病作用除了破坏病原菌细胞壁外, 还通过从病原菌细胞壁中释放激发子诱导植株产生系统抗性. 将其应用于植物抗真菌病基因工程中, 外源 β -1, 3-葡聚糖酶既可单独地被导入植物发挥作用, 又可与其它防卫蛋白一起转入植物协同表达, 增强植物的抗病性. β -1, 3-葡聚糖酶在转基因植物的安全性方面更有其利用价值. 为了证明葡聚糖酶制剂在使用上是安全的, Elvig SG

等^[28]通过一系列毒物学试验对葡聚糖酶制剂的安全性进行了研究, 结果表明, 给小白鼠连续口服 13 周剂量高达 10 ml/kg bw/day (相当于体重比固体剂量为 1258 mg/kg bw/day 或者葡聚糖酶剂量为 1882 BGXU/kg bw/day) 的葡聚糖酶制剂后, 不会引起任何不良反应; 在细菌反向突变分析试验中发现, 该葡聚糖酶制剂不会引起有机体突变; 也不会引起人工培养的人淋巴细胞的染色体失常, 这证明了葡聚糖酶对小白鼠、对人体等有机体是安全的. 因此, 选择抑菌活性强的 β -1, 3-葡聚糖酶类型, 或者对其基因进行必要的修饰、改造; 将 β -1, 3-葡聚糖酶基因与几丁质酶基因、核糖体失活蛋白或抗菌肽基因等构建成双价或多价基因表达载体, 并将其导入更多的植物, 将有利于降低环境污染, 提高作物抗真菌病害特性, 拓宽植物病害抗性谱, 改良作物品种, 拓宽作物的种质资源.

表 1 β -1, 3-葡聚糖酶基因与其他抗真菌病基因协同表达诱导的植物抗病性

Table 1 The plant disease-resistance reduced by co-expression of β -1, 3-glucanase gene with other anti-fungal genes

葡聚糖酶基因/ The glucanase gene	植物表达载体/ Plant expression vector	载体中含有的 协同表达的基因/ The co-expression genes includ- ed in the vector	宿主植物/ Host plant	植物抗病性/ The plant disease resistance	参考文献/ References
苜蓿 β -Glu	pGB12	水稻碱性 Chi (RC24) 和苜蓿 β -Glu	水稻“七丝软占”	对稻瘟病及水稻纹枯病抗 性的提高	冯道荣等, 1999 ^[18]
苜蓿 β -Glu	pGB12	水稻碱性 Chi (RC24) 和苜蓿 β -Glu	水稻“七丝软占”	对稻瘟病菌抗性不同程度 的提高	冯道荣等, 1999 ^[19]
	pRC24/B-RIP	大麦核糖体失活蛋白 (B-RIP) 基因	甘蓝型油菜 H165	对油菜菌核病较强的抗性	蓝海燕等, 2000 ^[20]
烟草 β -Glu	pBLGC	烟草碱性 β -Glu, 菜豆碱性 Chi	烟草 (K326)	对烟草赤星病较强的抗性	蓝海燕等, 2000 ^[21]
烟草 β -Glu	pBLGC	烟草碱性 β -Glu, 菜豆碱性 Chi	水稻 (中花 8 号)		
苜蓿 β -Glu	pAAC89	苜蓿 β -Glu		对稻瘟病和水稻纹枯病较 强的抗性	冯道荣等, 2001 ^[22]
	pGB12H	水稻碱性 Chi (RC24), 苜蓿 β -Glu			
	pBAB3H	两个水稻碱性 Chi (RC24, RCH10), 一水稻酸性 Chi (RAC22)		对烟草炭疽病和黑胫病较 强的抗性	黎定军等, 2002 ^[23]
橡胶 β -Glu	pBj47	芥菜 Chi 和橡胶 β -Glu	烟草 (K326)	对枯萎病较强的抗性	欧阳波等, 2003 ^[24]
烟草 β -Glu	pHBC39	烟草 β -Glu, 菜豆 Chi	番茄 (A53)	对油菜菌核病 (核盘菌引 起) 较强的抗性	陈雁等, 2003 ^[25]
烟草 β -Glu	AP24-Glu	烟草 β -Glu, 烟草植物蛋白 AP24	甘蓝型油菜 6203		
苜蓿 β -Glu	pZ100	水稻 Chi (RCH10), 苜蓿 β -Glu	粳稻台北 309	对水稻纹枯病较强的抗性	毛碧增等, 2003 ^[26]
烟草 β -Glu	pBLGC	烟草 β -Glu, 菜豆 Chi	滇型杂交稻恢复系“南 29”	对水稻稻瘟病较强的抗性	许明辉等, 2003 ^[27]

注: Chi: 几丁质酶基因; β -Glu: β -1, 3-葡聚糖酶基因.

Notes: Chi: chitinase gene; β -Glu: β -1, 3-glucanase gene.

参考文献 (References)

- [1] 杜良成. 稻瘟病诱导的水稻几丁质酶、 β -1, 3- 葡聚糖酶活性及分布[J]. 植物生理学报, 1992, 18 (1) : 29-36.
- [2] 郑用琏. 小麦与褐斑病之间的分子互作[J]. 华中农业大学学报, 1994, 13 (4) : 332-338.
- [3] REPKA V, TAMAS L, FISCHEROVA I, *et al.* Identification and partial characterization of beta-1, 3-glucanase from virus-infected cucumber cotyledons[J]. Acta Virol, 1997 Feb; 41(1): 35-39.
- [4] 陈坚, 李冠, 王锐萍. 新疆甜瓜疫霉菌毒素对新疆甜瓜黄化苗中 β -1, 3- 葡聚糖酶和几丁质酶活性的诱导 (简报) [J]. 植物生理学通讯, 1998, 34 (1) : 28-31.
- [5] 葛秀春, 宋凤鸣, 陈永叶, 等. 苯并噻二唑诱发水稻对稻瘟病抗性中防卫相关酶活性的变化[J]. 中国水稻科学, 2002, 16 (2) : 171-175.
- [6] 郝变青, 高芬, 马利平, 等. 畜粪沤肥浸渍液对青椒和番茄 β -1, 3- 葡聚糖酶活性的影响[J]. 山西农业科学, 2000, 28 (3) : 43-45.
- [7] 李颖章, 郑晓华, 唐海林, 等. 水杨酸和黄萎病菌毒素处理棉花愈伤组织使 β -1, 3- 葡聚糖酶和几丁质酶的活性增加[J]. 植物学报, 2003, 45 (7) : 802-808.
- [8] THIBAUD M C, GINESTE S, NUSSAUME L, *et al.* Sucrose increases pathogenesis-related PR-2 gene expression in *Arabidopsis thaliana* through an SA-dependent but NPR1-independent signaling pathway[J]. Plant Physiol Biochem, 2004, 42(1): 81-88.
- [9] KUCERA B, LEUBNER-METZGER G, WELLMANN E. Distinct ultraviolet-signaling pathways in bean leaves. DNA damage is associated with beta-1, 3-glucanase gene induction, but not with flavonoid formation[J]. Plant Physiol, 2003, 133 (4): 1445-1452.
- [10] WU C T, BRADFORD K J. Class I chitinase and beta-1, 3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves[J]. Plant Physiol, 2003, 133(1): 263-273.
- [11] CANIHOS Y. *In vitro* effect of a bacterial β -1, 3-glucanase expressed in streptomyces lividans on *Bremia actuae*[J]. Journal of Turkish Phytopathology, 1995, 24(3): 15-20.
- [12] 李继红, 邵寒霜, 郑学勤. 烟草 I 类几丁质酶和 β -1, 3- 葡聚糖酶 cDNA 在大肠杆菌中的表达[J]. 生物工程学报, 1998, 14 (2) : 309-313.
- [13] YOSHIKAWA M, TSUDA M, TAKEUCHI Y. Resistance to fungal disease in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, beta-1, 3-glucanase from soybean[J]. Naturwissenschaften, 1993, 80(9): 417-420.
- [14] HERBERS K, FLINT H J, SONNE W U. Apoplastic expression of the xylanase and beta (1, 3, 4)-glucanase domains of the xynD gene from *Ruminococcus flavefaciens* leads to functional polypeptides in transgenic tobacco plants[J]. Molecular-Breeding, 1996, 2(1): 81-87.
- [15] 迟彦. 大豆 β -1, 3- 葡聚糖酶基因转化烟草及抗病性的研究[J]. 大连大学学报, 2001, 22 (6) : 37-41.
- [16] ZHU Q, ERLEEN A M, SAMEER M, *et al.* Enhanced protection against fungal attack by constitutive coexpression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco[J]. B Technology, 1994 (2) : 807-812.
- [17] JACH G, MUNDY J, GORNHARDT B, *et al.* Enhanced quantitative resistance fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco [J]. Plant J, 1995 (8) : 97-109.
- [18] 冯道荣, 许新萍, 卫剑文, 等. 使用双抗真菌蛋白基因提高水稻抗病性的研究[J]. 植物学报, 1999, 41 (11) : 1187-1191.
- [19] 冯道荣, 卫剑文, 许新萍, 等. 转多个抗真菌蛋白基因水稻植株的获得及其抗稻瘟病菌的初步研究 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1999, 38 (4) : 62-66.
- [20] 蓝海燕, 王长海, 张丽华, 等. 导入 β -1, 3- 葡聚糖酶和几丁质酶基因的转基因可育油菜及其抗菌核病的研究 [J]. 生物工程学报, 2000, 16 (2) : 142-146.
- [21] 蓝海燕, 田颖川, 王长海, 等. 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 [J]. 遗传学报, 2000, 27(1): 70-77.
- [22] 冯道荣, 许新萍, 范钦, 等. 获得抗稻瘟病和纹枯病的转多基因水稻[J]. 作物学报, 2001, 27 (3) : 293-300.
- [23] 黎定军, 赵开军, 周清明, 等. 转几丁质酶基因和 β -1, 3- 葡聚糖酶基因烟草的研究[J]. 湖南农业大学学报 (自然科学版), 2002, 28 (3) : 211-213.
- [24] 欧阳波, 李汉霞, 叶志彪. 转双价水解酶基因番茄植株对枯萎病抗性的提高[J]. 植物生理与分子生物学报, 2003, 29 (3) : 179-184.
- [25] 陈雁, 饶勇强, 孟金陵. 转双价广谱抗病基因创造甘蓝型油菜抗菌核病新品种的研究[J]. 分子植物育种, 2003, 1 (4) : 457-463.
- [26] 毛碧增, 李德葆, 李群, 等. 转化双价防卫基因获得抗纹枯病水稻[J]. 植物生理与分子生物学报, 2003, 29 (4) : 322-326.
- [27] 许明辉, 唐祚舜, 谭亚玲, 等. 几丁质酶-葡聚糖酶双价基因导入溲型杂交稻恢复系提高稻瘟病抗性的研究 [J]. 遗传学报, 2003, 30 (4) : 330-334.
- [28] ELYIHG S G, PEDERSEN P B. Safety evaluation of a glucanase preparation intended for use in food including a sub-chronic study in rats and mutagenicity studies[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2003, 37(1): 11-19.