

## 研究论文

### A Letter

# 蛋白激发子 PeaT1 转化水稻恢复系多系一号的研究

盛德鹏<sup>✉</sup>, 玉山江麦麦提<sup>✉</sup>, 郭立华<sup>✉</sup>, 曾洪梅<sup>✉</sup>, 杨秀芬<sup>✉</sup>, 袁京京<sup>✉</sup>, 邱德文<sup>✉</sup>

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

✉ 通讯作者: [qiudewen@caas.net.cn](mailto:qiudewen@caas.net.cn) ✉ 作者

分子植物育种, 2011年, 第9卷, 第61篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0061

收稿日期: 2011年03月07日

接受日期: 2011年04月28日

发表日期: 2011年05月19日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

盛德鹏等, 2011, 蛋白激发子 PeaT1 转化水稻恢复系多系一号的研究, 分子植物育种 Vol.9 No.61 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0061)

**摘要** 来源于极细链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)的蛋白激发子 PeaT1, 具有促进植物生长、提高植物的抗旱能力和诱导植物广谱抗病性等功能。为了实现蛋白激发子 PeaT1 在水稻中的表达并进一步研究其功能, 通过比较 N6、MS、NB 培养基对于水稻恢复系多系一号成熟胚愈伤组织的诱导效果, 证实 N6 培养基较适合多系一号成熟胚的组织培养。在此基础上, 通过根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导转化法将极细链格孢菌蛋白激发子基因 *peaT1* 导入多系一号基因组, PCR、Northern blot 和 Western blot 分别证实了 *peaT1* 基因的整合、转录和表达, 获得了转 *peaT1* 水稻恢复系多系一号植株。此研究为蛋白激发子基因 *peaT1* 在水稻抗病、抗逆育种中的应用奠定基础。

**关键词** 多系一号; 蛋白激发子; PeaT1; 诱导; 愈伤组织

## Transfer of The Protein Elicitor Gene *peaT1* into Duoxi 1

Sheng Depeng<sup>✉</sup>, Yushanjiang Maimaiti<sup>✉</sup>, Guo Lihua<sup>✉</sup>, Zeng Hongmei<sup>✉</sup>, Yang Xiufen<sup>✉</sup>, Yuan Jingjing<sup>✉</sup>, Qiu Dewen<sup>✉</sup>

Key Laboratory for Biological Control, Ministry of Agriculture, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081, P.R. China

✉ Corresponding author, [qiudewen@caas.net.cn](mailto:qiudewen@caas.net.cn); ✉ Authors

**Abstract** PeaT1, a protein elicitor, which can promotes plant growth, improves drought resistance, and induces broad-spectrum disease resistance is derived from fungus, *Alternaria tenuissima*. The transformation system of elicitor-coding gene *peaT1* in rice was developed to study its function. N6, MS and NB mediums were adopted for tissue culture of Duoxi 1 scutellum, and the effects of the three mediums on the tissue culture were compared and N6 medium worked best in the Duoxi 1 scutellum culture. Based on this result, elicitor-encoding gene *peaT1* from *Alternaria tenuissima* was introduced into the genome of Duoxi 1 by *Agrobacterium*-mediated method. And we confirmed the integration, transcription and expression of *peaT1* by PCR, RT-PCR, Southern blot and Western blot in transgenic rice. This work lay the foundation of applying the protein elicitor gene in rice for disease and stress resistance.

**Keywords** Duoxi 1; Tissue culture; Callus; Protein elicitor; PeaT1

### 研究背景

利用转基因技术将外源基因导入水稻基因组, 打破物种间的生殖隔离, 改良水稻的抗性和农艺性状, 是获得抗病虫、抗逆、高产、优质水稻新品种的有效途径。研究中所采用的根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的转化系统是对天然转化系统的一种模仿(Hiei et al., 1994), 具有转化频率高、导入基因拷贝数低、导入植物的片段精确、以及技术简单、成本低(Hiei et al., 1997)的优点, 通过改良培养条件、改造农杆菌菌株和表达载体, 已

在多种水稻品种上获得了成功应用(Upadhyaya et al., 2000; Saharan et al., 2004; Yimian et al., 2009; Kenjirou, 2010)。

来源于极细链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)的蛋白激发子 PeaT1 对病原菌没有直接的毒杀作用, 而是激发水杨酸、乙烯等信号传导途径, 诱导植物植保素和病程相关蛋白等的产生, 提高植物的抗病、抗旱能力, 促进植物生长和种子发芽(Yang et al., 2009a; Mao et al., 2010)。国内的邱德文等将来源不同的蛋白激发子转化到水稻、油菜、烟草等作物中,

转基因作物均表现出了相应的抗性(Qiu et al., 2009; 邵敏和王金生, 2004), 表明通过转蛋白激酶子基因提高植物的抗性是可行的。

籼稻、粳稻和爪哇稻是水稻的三个亚种, 其中籼稻产量最大, 但是在转基因技术研究中籼稻愈伤组织的诱导、继代和植株的再生都较困难, 而且品种间差异较大。杂交水稻的抗性主要决定于父本恢复系(刘殊等, 2002), 通过转化杂交籼稻的恢复系获得转基因籼稻是解决这一难题的有效途径。多系一号是目前水稻育种中常用的杂交籼稻的恢复系, 作为父本培育出了多种优质高产杂交籼稻品种。本研究通过比较三种水稻组培常用的N6、MS、NB培养基(Chan et al., 1992)对多系一号成熟胚愈伤组织的诱导效果, 获得适合多系一号成熟胚愈伤组织诱导的培养体系, 在此基础上将*peaT1*转化多系一号, 通过分子生物学方法验证了外源基因在水稻中的整合、转录和表达, 获得转*peaT1*水稻恢复系多系一号。

## 1 结果和分析

### 1.1 表达载体的构建

植物表达载体pCAMBIA2300-35S-*peaT1*-OCS的酶切、测序结果和语气完全吻合, 用*Xba* I 和*Pst* I 双酶切所得到的片段大小与理论值一致(图1), 测序结果同样表明载体中含有目的基因*peaT1*并且插入位点正确。

### 1.2 不同培养基对多系一号愈伤组织诱导效果比较

经试验发现, N6培养基对于多系一号愈伤组织的诱导效果明显优于NB和MS培养基。诱导25 d后, N6培养基可以诱导出大量淡黄色、生理状态好的愈

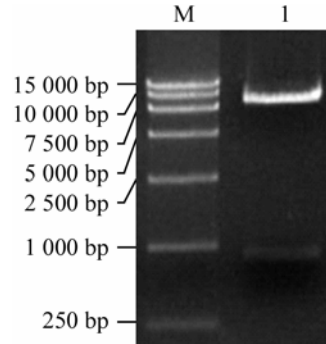


图1 植物表达载体pCAMBIA2300-35S-*peaT1*-OCS的酶切注: M: DL15000核酸marker; I: *Pst* I 和*Xba* I 对植物表达载体pCAMBIA2300-35S-*peaT1*-OCS进行双酶切的结果

Figure 1 Restriction enzymes digestion of the plant expression vector pCAMBIA2300-35S-*peaT1*-OCS

Note: M: DL15000 marker; I: Recombinant plasmid digested with *Xba* I + *Pst* I

伤组织, 而NB和MS培养基诱导出的愈伤组织量小、较松散, 部分愈伤组织还出现褐化(图2)。

### 1.3 转基因植株的再生

将诱导得到的生理状态好的愈伤组织侵染后共培养2 d, 然后在筛选培养基上培养30 d后转移到分化培养基, 大约30 d后出现抗性小苗。将小苗小心移栽到生根培养基, 生根后移栽到温室得到T<sub>0</sub>代的转基因植株(图3), T<sub>0</sub>代转化植株收获种子后并繁育到T<sub>2</sub>代。

### 1.4 转基因植株的PCR和RT-PCR检测结果

T<sub>0</sub>代转化水稻植株经过PCR初步筛选, 引物1和引物2均为阳性的转基因水稻植株30株(图4)。经过RT-PCR鉴定阳性植株27株(图5)。这说明RT-PCR

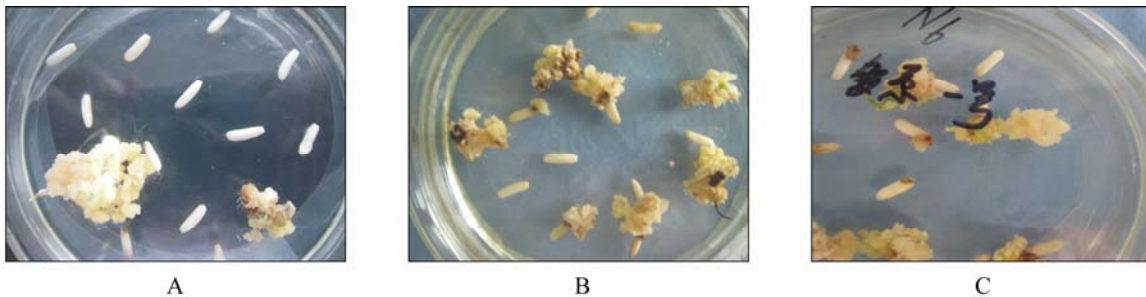


图2 NB, MS, N6培养基对多系一号愈伤组织诱导的效果比较注: A: NB培养基; B: MS培养基; C: N 6培养基

Figure 2 Performance comparison of N6, MS and NB medium

Notes: A: NB medium; B: MS medium; C: N6 medium



图3 转基因水稻的再生

注: A: 愈伤组织的诱导; B: 根癌农杆菌侵染; C: 抗性苗的分化; D: 抗性苗生根

Figure 3 Construction of transgenic rice plants

Notes: A: Induction of calli; B: Infection with *Agrobacterium*; C: kanamycin-resistant plant regeneration; D: Rooting of kanamycin-resistant rice

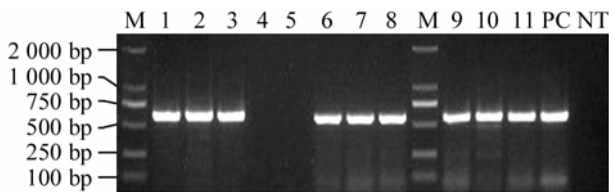


图4 水稻再生植株的PCR检测

注: 图示为引物F2的扩增结果; M: DL2000; 1~11 PCR转化植株; PC: 阳性对照; NT: 非转基因水稻

Figure 4 PCR identification of regenerate rice plants

Notes: PCR analysis with primer F2; M: DL2000 mark; 1~11: Transformed rice; PC: Positive control; NT: Non-transformed rice

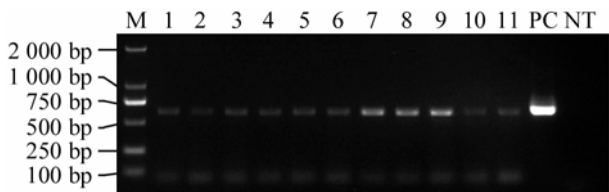


图5 转基因水稻的RT-PCR检测

注: M: DL2000 marker; 1~25PCR鉴定阳性植株; PC: 阳性对照; NT: 非转基因水稻

Figure 5 RT-PCR detection of transgenic rice plants

Notes: M: DL2000 marker; 1~25: lines of Transformed rice; PC: Positive control; NT: Non-transformed rice

和PCR的结果基本吻合。 $T_1$ 、 $T_2$ 代转化水稻植株PCR和RT-PCR结果也基本一致(未显示)。

### 1.5转基因植株的Southern blot分析

对RT-PCR鉴定为阳性的部分 $T_2$ 代植株进行Southern杂交, 结果如图所示(图6): 在转基因植株检测到了明显的杂交信号, 转基因植株的拷贝数都

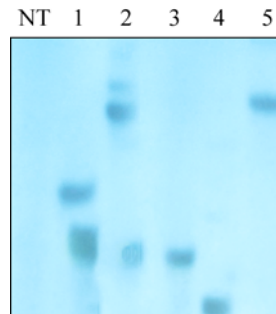


图6 转基因水稻的Southern blot分析

注: NT为非转基因植株对照; 1~5为转基因水稻植株

Figure 6 Southern blot analysis of transgenic rice plants

Notes: NT: Non-transformed rice plants; 1~5: lines of Transformed rice plants

在3个以下, 有两株为单拷贝, 而非转基因植株没有出现杂交信号, 这说明 $peaT1$ 基因已经整合到了转基因水稻基因组中。

### 1.6转基因植株的Western blot分析

选取经Southern blot鉴定阳性的4株 $T_2$ 代转基因水稻植株进行了Western blot分析, 结果如图所示(图7), 在四株 $T_2$ 代转基因水稻中均检测到了大小约35 kD的特异性杂交条带, 设置的非转基因对照植株没有检测到杂交信号, 再一次表明 $T_2$ 代水稻基因组中含有目的基因 $peaT1$ 并得到表达。

## 2讨论

水稻成熟胚愈伤组织诱导是根癌农杆菌介导的水稻转化体系中的关键步骤, 在本实验中用N6、MS和NB培养基进行多系一号成熟胚的愈伤组织诱导, 结果表明, N6培养基诱导愈伤组织数量和质量

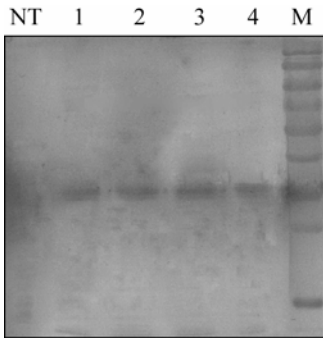


图7 转基因水稻的western blot检测

注: NT: 非转基因植株对照; 1~4为转基因水稻植株; M: 蛋白marker

Figure 7 Western blot analysis of transgenic rice plants

Notes: NT: Non-transformed plants; M: Protein molecular weight marker; 1~4: lines of Transformed rice plant

都明显高于其他两种培养基, 更适合于多系一号成熟胚的愈伤组织诱导。在此基础上成功的将 $peaT1$ 基因转入多系一号, 通过Southern杂交鉴定获得了单拷贝的转基因植株, 能够较好的为育种提供中间选育材料。但是相对于日本晴等其他粳稻品种, 多系一号还是受到诱导频率低、诱导时间长和愈伤组织生理状态不够理想的限制, 对后期的转化效率造成了直接的影响。通过不同培养基大量元素和微量元素的混合使用以及各成分之间比例系数的调配, 可能能够筛选到更适合于多系一号成熟胚愈伤组织诱导的培养基种类。

随着社会的发展和科技的进步, 农药残留成为了农业生产中的一个突出问题, 生物农药的出现对于缓解这一问题起到了关键的作用。蛋白激发子本身不具备杀菌作用, 通过启动植物体内的防御机制是植物获得系统抗性, 无污染、无残留, 已经成为新型生物农药发展的重要方向。蛋白激发子PeaT1

具有热稳定性便于规模化生产提纯, 不引起过敏反应还能够促进植物生长和诱导植物产生抗病虫性, 而且不会导致病虫害产生抗药性(Mao et al., 2009), 应用前景广阔。目前利用基因工程手段, 通过导入直接杀害或制约病虫害发展的基因, 已经获得了大量高产、优质、抗病虫的农作物, 这些转基因作物大多具有一类病原物或病虫害的抗性, 很少具有广谱抗性。而蛋白激发子PeaT1是通过诱导植物产生免疫反应产生对病虫害的抗性, 具有广谱性, 对于培养广谱抗性的优质品种具有重要的意义。

### 3材料与方法

#### 3.1植物材料、农杆菌菌株、培养基和转化载体

恢复系多系一号的成熟种子由中国水稻研究所黄世文老师赠送; 蛋白激发子基因 $peaT1$ 本实验室从极细链格孢菌克隆得到; 试验菌株LBA4404, 由本实验室保存; N6、MS、NB培养基基本成分如下表所示(表1); 转化载体pCMBIA2300-35S-OCS由本实验室保存, 该二元表达载体序列总长度为9.5 kb, 插入 $peaT1$ 后其T-DNA结构区如图所示(图8)。

#### 3.2表达载体的构建

根据 $peaT1$ 基因序列设计特异引物1 (表2), 分别

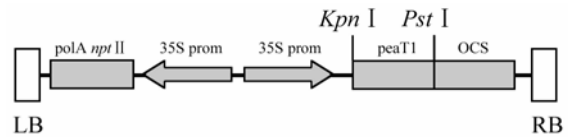


图8 植物表达载体pCAMBIA2300-35S-peaT1-OCS的T-DNA结构示意图

Figure 8 Structure of T-DNA region in plant binary vector of pCAMBIA2300-35S-peaT1-OCS

表1 水稻组培培养基基本成分

Table 1 Basic components of rice culture mediums used in the study

培养基名称 Medium	组分及含量 Composition
N6	N6 盐分及维生素, 30 g/L 蔗糖, 3.75 g/L 植物凝胶, pH 5.8 N6 salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 3.75 g/L Phytigel
MS	MS 盐分及维生素, 30 g/L 蔗糖, 3.75 g/L 植物凝胶; pH 5.8 MS salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 3.75 g/L Phytigel
NB	N6 大量元素, B5 微量元素和维生素, 30 g/L 蔗糖, MS 铁盐, 3.75 g/L Phytigel, pH 5.8 N6 major element, B5 minor element and vitamins, 30 g/L sucrose, 3.75 g/L Phytigel

表 2 实验所用引物序列

Table 2 Primers used in this research

引物名称	引物序列
Primer Name	Primer Sequence
F1	5'-TACTGCAGATGGCCAACCCCGCATT GAAGAG-3'
F2	5'-AGCCCGAGAAGAAGAACGTCCAGAT -3'
F3	5'-CGCTCAGAAGAACTCGTCA-3'
F4	5'-ATGGCCAACCCCGCATTGAAGAG-3'
R1	5'-CGTCATGACTATATGCTCAGCGCCATG ATGGA-3'
R2	5'-CTATATGCTCAGCGCCATGATGGAG-3'
R3	5'-TCTCCTGTCATCTCACCTTG-3'
R4	5'-CTATATGCTCAGCGCCATGATGGA-3'

带有 *Pst* I 和 *Xba* I 的酶切位点, 以极细链格孢菌基因组 DNA 为模板扩增 *peaT1* 基因, PCR 扩增反应条件为 94°C 预变性 5 min, 然后 94°C 40 s, 58°C 35 s, 72°C 1 min, 35 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物纯化后连接到 pMD18-T 载体。pMD18-T-*peaT1* 用 *Pst* I 和 *Xba* I 进行双酶切, 将切下的片段连接到经 *Pst* I 和 *Xba* I 双酶切的 pCMBIA2300-35S-OCS 载体。将构建好的 pCMBIA2300-35S-*peaT1*-Ocs 载体用热激转化法转化到农杆菌 LBA4404。

### 3.3 多系一号愈伤组织的诱导

将成熟的多系一号种子剥去颖壳, 用 75% 的酒精浸泡 1 min, 无菌水清洗两次; 再用 2% 的次氯酸钠处理 30 min, 无菌水冲洗至少 3 次, 用无菌吸水纸吸干多余的液体。无菌种子转移到添加 2.5 mg/L 2,4-D (2,4-二氯苯氧乙酸) 和 0.5 g/L 水解酪蛋白的 N6、MS、NB 培养基, 组织培养过程采用 Toki 等的方法 (Toki et al., 2006), 筛选适合诱导多系一号成熟胚愈伤组织的培养基。

### 3.4 农杆菌介导的转化体系的建立

#### 3.4.1 根癌农杆菌的制备

农杆菌接种于 2 mL YEB 液体培养基中, 加入相应种类和浓度的抗生素, 本实验所用卡那霉素和利福平的浓度均为 50 mg/L, 28°C、180 r/min 培养过夜。菌液 5 000 r/min 离心 3 min, 倒掉上清液, 菌体重悬后加入 N6-As 液体培养基中, As (乙酰丁香酮) 的浓度为 200 mg/L。测定菌体浓度,  $OD_{600}$  在 0.4~0.6 之间。

#### 3.4.2 农杆菌侵染愈伤组织

选取淡黄色、紧凑的愈伤组织放入无菌的 50 mL 离心管, 将制备好的农杆菌菌液倒入离心管内, 完全浸过愈伤组织, 轻轻摇动 10 min。倒掉菌液, 用无菌吸水纸完全吸干愈伤组织表面残留的菌液, 然后将愈伤组织转移到 N6-As 共培培养基上, 22°C 黑暗条件下共培养 48 h。

#### 3.4.3 筛选

共培养后的愈伤组织转移到无菌的 50 mL 离心管中, 用含有 500 mg/L 卡那霉素的无菌水冲洗三次, 每次轻轻摇动 3 min, 再用含有 600 mg/L 卡那霉素的无菌水清洗一次, 倒掉无菌水, 用无菌吸水纸吸干愈伤组织表面多余的液体。然后转移到含有 500 mg/L 卡那霉素和 0.5 g/L 水解酪蛋白的 N6 筛选培养基, 25°C 光照培养 15 d 后更换一次培养基。

#### 3.4.4 分化

筛选培养 30 d 后, 将愈伤组织转移到含有 0.1 mg/L KT (激动素) 和 0.1 mg/L NAA ( $\alpha$ -萘乙酸) 的 N6 分化培养基, 28°C 光照培养 14 h, 25°C 暗培养 10 h。30 d 左右分化出小苗后, 转移到含有 1/2 MS 和 0.5 mg/L NAA 的固体培养基生根, 根系发达后移栽到温室培养。

### 3.5 转基因水稻的鉴定

#### 3.5.1 PCR 和 RT-PCR 检测

基因组 DNA 提取采用北京全式金公司的植物基因组 DNA 小提试剂盒, RNA 提取采用 OMEGA 公司的植物 RNA 小量提取试剂盒, 从转化获得的 T<sub>0</sub>、T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 代水稻植株叶片中提取基因组 DNA 和总 RNA。设计合成两对引物 2 和 3 (表 2), 通过 RT-PCR 验证 T-DNA 的整合, 引物由 Invitrogen 公司合成。PCR 反应条件为 94°C 预变性 5 min, 随之 94°C 40 s, 55°C 40 s, 72°C 1 min 30 s, 35 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。RT-PCR 按照北京全式金技术有限公司两步法 RT-PCR 试剂盒说明书的方法。

#### 3.5.2 转基因植株 Southern blot 检测

经 PCR 鉴定阳性的 T<sub>2</sub> 代转基因植株每株取 4 g 叶片用 CTAB 法提取基因组 DNA, 用 *Eco*R V 酶切。标记探针合成使用 PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche), 以含有 *peaT1* 基因的质粒为模板, 引物为

根据*peaT1*基因序列设计的特异引物4 (表2), 反应条件为94℃预变性5 min, 94℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 1 min 30 s, 35个循环, 最后72℃延伸10 min。DNA分子杂交按照罗氏地高辛检测试剂盒(II)说明书的方法。

### 3.5.3转基因植株的Western blot检测

选取Southern检测阳性的T<sub>2</sub>代转基因植株叶片提取总蛋白, 参照Coca等的方法进行Western blot杂交鉴定(Coca et al., 2006)。抗体以本实验室从极细链格孢菌中纯化的蛋白激发子PeaT1为抗原制备。

### 作者贡献

盛德鹏、玉山江、买买提和郭丽华是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 盛德鹏、郭丽华和曾红梅完成数据分析, 论文初稿的写作; 曾红梅、杨秀芬和袁京京参与实验设计, 试验结果分析; 邱德文是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 论文写作和修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08001-018B)资助。感谢中国水稻研究所黄世文副研究员赠送水稻种子和在实验中提供的帮助。

### 参考文献

Chan M.T., Lee. T.M., and Chang H.H., 1992, Transformation of Indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Cell Physiology*, 33(5): 577-583

Coca M., Peñas G., Gómez J., Campo S., Bortolotti C., Messeguer J., and Segundo B.S., 2006, Enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* conferred by expression of a cecropin A gene in transgenic rice, *Planta*, 223(3): 392-406

Hiei Y., Komari T., Kubo T., and Tomoaki K., 1997, Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant molecular Biology*, 35(1-2): 205-218

Hiei Y., Ohta S., Komari T., and Kumashiro T., 1994, Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA, *Plant Journal*, 6(2): 271-282

Kenjirou Ozawa., 2010, Establishment of a high efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Science*, 176(4): 522-527

Liu S., Cheng H., Wang F., and Zhu Y., 2002, DNA

polymorphism of main restorer lines of hybrid rice in China, *Zhongguo Shuidao Kexue* (Chinese Journal of Rice Science), 16(1): 1-5 (刘殊, 程慧, 王飞, 朱英国, 2002, 我国杂交水稻主要恢复系的DNA多态性研究, *中国水稻科学*, 16(1): 1-5

Mao J., Liu Q., Yang X., Long C., Zhao M., Zeng H., Liu H., Yuan J., and Qiu D., 2010, Purification and expression of a protein elicitor from *Alternaria tenuissima* and elicitor-mediated defense responses in tobacco, *Annals of Applied Biology*, 156(3): 411-420

Qiu D., Mao J., Yang X., and Zeng H., 2009, Expression of an elicitor-encoding gene from *Magnaporthe grisea* enhances resistance against blast disease in transgenic rice, *Plant Cell Reports*, 28(6): 925-933

Saharan V., Yadav R.C., Yadav N.R., and Ram K., 2004, Studies on improved *Agrobacterium*-mediated transformation in two indica rice (*Oryza sativa* L.), *African Journal of Biotechnology*, 3(11): 572-575

Shao M., and Wang J.S., 2004, Transformation of rice with *hrfAxoo* gene and resistance of the transgenic plant to bacterial leaf blight, *Nanjing Nongye Daxue Xuebao* (Journal of Nanjing Agricultural University), 27(4): 36-40 (邵敏, 王金生, 2004, 转*HrfAXoo*基因水稻对白叶枯病的抗性, *南京农业大学学报*, 27(4): 36-40)

Toki S., Hara N., Ono K., Onodera H., Tagiri A., Oka S., and Tanaka H., 2006, Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice, *The Plant Journal*, 47(6): 969-976

Upadhyaya N.M., Surin B., Ramm K., Gaudron J., Schünmann P.H.D., Taylor W., Waterhouse P.M., and Wang M.B., 2000, *Agrobacterium*-mediated transformation of Australian rice cultivars Jarrah and Amaroo using modified promoters and selectable markers, *Australian Journal of Plant Physiology*, 27(3): 201-210

Yang X.F., Qiu D.W., Zeng H.M., Yuan J.J., Mao J.J., 2009a, Purification and characterization of a glycoprotein elicitor from *Alternaria tenuissima*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11): 2035-2042

Yimian M., Luo L., Chengguang Z., Changhui S., Bo X., Jun F., Jiuyou T., Anding L., Shouyun C., Gupo L., Qian Q., Yongbiao X., and Chengcai C., 2009, Molecular analysis of rice plants harboring a multi-functional T-DNA tagging system, *Journal of Genetics and Genomics*, 36(5): 267-276