

罗汉果转抗病基因 *NPR1* 的研究

杨 华, 李惠敏, 覃屏生, 高成伟, 秦新民*

(广西师范大学 生命科学学院, 广西 桂林 541004)

摘 要: 以罗汉果子叶为外植体,研究了影响根瘤农杆菌介导的罗汉果遗传转化的若干因素,建立了罗汉果遗传转化体系。结果表明,5 d 苗龄的子叶、预培养 1 d、侵染 20 min、共培养 4 d、共培养温度 22 ℃、AS100 $\mu\text{mol/L}$ 、Hy 浓度不定芽筛选为 10 mg/L,生根筛选为 20 mg/L 转化率最高。抗性苗经 PCR 和 Southern 印迹分析,初步证实 *NPR1* 基因已整合至罗汉果基因组中,转化率为 1.5%。

关键词: 罗汉果; 农杆菌介导; 遗传转化; *NPR1* 基因

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)02-0250-05

Transferring disease resistance gene *NPR1* into *Siraitia grosvenorii*

YANG Hua, LI Hui-Min, QIN Ping-Sheng,

GAO Cheng-Wei, QIN Xin-Min*

(College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: Using cotyledon of *Siraitia grosvenorii* as explants, an efficient and reliable transformation system was established. Several factors affecting genetic transformation of *Agrobacterium*-mediated *S. grosvenorii* were studied. The results showed that 5 days aged cotyledon using for infection explants, pre-culture 1 d, bacterial infection time 20 min, co-culture 4 d with 22 ℃, AS concentrate 100 $\mu\text{mol/L}$, 10 mg/L of hygromycin was suitable screening concentration for the differentiation of adventitious bud and root could get the better transformation efficiency under 20 mg/L of hygromycin. The transformants were confirmed by PCR and Southern blotting analysis with the transformation rate 1.5%.

Key words: *Siraitia grosvenorii*; *Agrobacterium*-mediated; genetic transformation; *NPR1* gene

罗汉果 (*Siraitia grosvenorii*) 为葫芦科 (Cucurbitaceae) 罗汉果属 (*Siraitia*) 植物, 是我国传统的药用植物, 有润肺止咳、清热凉血、生津止咳、滑肠排毒、润肺化痰等功效。同时, 其主要甜味物质罗汉果甙 V 是一种低热量高甜度的天然甜味剂, 适合糖尿病、高血压以及心血管患者食用。罗汉果中还含有大量氨基酸、果糖、维生素和矿物质, 具有很好的保健效果。因此有“东方神果”之称。作为我国传统的食药两用植物及出口创汇药材之一, 罗汉果的市场开发前景十分广阔 (李锋等, 2004; 李典鹏等, 2000)。但罗汉果在栽培过程中容易受到根结线虫

病、疱叶丛枝病、花叶病等病害的危害, 严重影响了罗汉果的产量和品质。因此, 培育高抗病品种以适应生产的需要已成为一个亟待解决的问题。

利用植物基因工程技术, 将外源抗病基因导入受体植物培育抗病品种, 是进行罗汉果抗病育种的有效途径。*NPR1* 基因是植物系统获得性抗性中的一个关键基因, 最早从拟南芥中克隆得到 (Cao 等 1994, 1997), 它可调控植物的广谱性抗性的发生, 在植物系统性抗病中起着关键作用, 人们对其结构、作用机理以及与植物抗病性的关系等方面进行了研究 (Zhang 等, 1999; Kachroo 等, 2000; Ekengren 等,

收稿日期: 2010-07-10 修回日期: 2010-11-06

基金项目: 广西自然科学基金(桂科自 0728095)[Supported by the Natural Science Foundation of Guangxi(0728095)]

作者简介: 杨华(1983-), 女, 广西灵川人, 硕士研究生, 研究方向为植物基因工程, (E-mail) yanghua518888@126.com。

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: xmqin@mailbox.gxnu.edu.cn)

2003; Lin 等, 2004;), 发现 *NPR1* 介导的抗性途径可能是多种植物共同保守的途径 (Cao 等, 1998; Chern 等, 2001)。并且, *NPR1* 在转基因植株中的过量表达可使植株表现对多种病原物的广谱持久抗性 (Fitzgerald 等, 2004)。到目前为止, 转 *NPR1* 基因的作物不多, 尚未见将该抗病基因转入罗汉果方面的报道。本研究在 *NPR1* 基因的克隆 (秦新民等, 2005) 和罗汉果子叶高效再生系统的基础上 (秦新民等, 2008), 通过对影响农杆菌介导的主要因素进行研究, 建立一个优化的罗汉果遗传转化体系, 将 *NPR1* 抗病基因导入罗汉果, 以期获得罗汉果广谱抗病新品种。

1 材料和方法

1.1 植物材料及无菌苗培养

实验采用罗汉果“青皮果”品种优质果为材料。种子用 75% 酒精消毒 30 s, 再用 0.1% HgCl_2 溶液消毒 8 min, 无菌水冲洗 4 次后, 播于 0.7% 琼脂培养基上。在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养箱中萌发, 取培养 5~6 d 的种子子叶为实验材料。

1.2 菌株及质粒

采用根癌农杆菌 LBA4404 菌株, 其中含带有 *NPR1* 基因和潮霉素磷酸转移酶基因的质粒 pCaMVNPR1, 基因表达由启动子 CaMV35S 调控。

1.3 农杆菌介导的罗汉果遗传转化

将经检测含有 *NPR1* 基因的根癌农杆菌 LBA4404 接种于含 Km 50 mg/L、Rif 50 mg/L 的 $2 \times \text{YT}$ 培养基平板上, 置于 27°C 恒温培养箱中暗培养 2 d。从平板上挑取农杆菌单菌落, 接种到含有 Km 50 mg/L、Rif 50 mg/L 的 $2 \times \text{YT}$ 液体培养基中, 于恒温摇床上, 27°C , 200 r/min, 振荡 (黑暗) 培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8 (约 12~16 h), 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 再加入含 100 $\mu\text{mol/L}$ AS 的 $2 \times \text{YT}$ 液体培养基, 重新悬浮细菌, 于 27°C , 200 r/min 培养 3 h, 作为感染转化材料的原液。

取 5~6 d 龄的罗汉果无菌苗的子叶, 接种于预培养基 (MS+6-BA1.0 mg/L+IBA0.5 mg/L+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂粉, pH6.0) 上, 光照培养 (光照强度 1 000~1 500 lx, 每天 12 h 光照, 温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$) 1 d 后, 用上述农杆菌液侵染 20 min, 然后转至共培养基上 (MS+6-BA1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L+AS100 $\mu\text{mol/L}$ +30 g/L 蔗糖+7g/L 琼脂

粉, pH5.6), 于 22°C , 黑暗培养共培养 4 d, 用无菌水洗净子叶后转至筛选培养基上 (MS+6-BA1.0 mg/L+IBA0.5 mg/L+Hy10 mg/L+Cef 500 mg/L+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂粉, pH5.8), 待抗性芽长出后, 按每一个不定芽为一个株系进行编号, 每个月在继代培养基 (MS+6-BA0.2 mg/L+Hy 10 mg/L+Cef 400 mg/L+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂粉, pH5.8) 上继代一次。不定芽长至 3~4 cm 长时, 切下生长健壮的芽苗置于生根培养基中 ($1/2\text{MS}$ +IBA1.0 mg/L+Hy20 mg/L+Cef350 mg/L+15 g/L 蔗糖, pH6.0) 进行生根筛选, 当不定根长 2~3 cm 时敞开瓶盖, 炼苗 2~3 d 后进行移栽。

1.4 转化植株的 PCR 检测

取抗性植株长出的新叶, 采用 CTAB 法提取植物总 DNA, *NPR1* 基因 PCR 扩增反应的引物为: P1: 5'-AGTTGATAAGGTCTCTTCGTTGATT-AGCAG-3'; P2: 5'-GGTACAGCAAAAATTA-CACTAAGAGGCAAG-3'。

30 μL PCR 反应体系: 模板 DNA 30 ng, 上下游引物各 0.5 μmol , 4 种 dNTP 各 100 μmol , $10 \times$ buffer 3 μL , Taq 酶 2.5 U。反应程序: 95°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 3 min (35 个循环); 72°C 延伸 10 min。PCR 反应产物进行 1% 琼脂糖电泳, EB 染色后进行观察。

1.5 Southern 杂交分析

取 20~30 μg CTAB 法提取的高质量总 DNA 经 HindIII 完全消化后, 在 0.7% 琼脂糖凝胶电泳上分离。将 DNA 转至带正电荷的尼龙膜上。探针为以 pCaMVNPR1 为模板经 PCR 扩增的 *NPR1* 基因片段 (2.2 kb), 用地高辛进行标记。预杂交、杂交、洗膜及免疫学检测依次按 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche 公司) 说明书进行。

2 结果

2.1 预培养时间对分化率的影响

实验表明, 未经预培养的外植体分化率仅为 4.42%, 可能是因为伤口处的细胞尚未进入分裂状态, 而侵染过程中农杆菌对切口产生毒性效应, 这两种因素累加导致外植体很难出芽, 转化率很低; 经预培养 1 d 的外植体感染后, 分化率明显提高, 达到 9.59% (表 1)。随着预培养时间的延长, 子叶分化

率逐渐降低,预培养4 d后子叶分化率降到5.66%。故罗汉果子叶预培养时间以1 d为宜。

表1 预培养时间对转化率的影响

Table 1 Effect of pre-cultivation days on differentiation rate of *Siraitia grosvenorii*

预培养时间 Pre-culture days (d)	外植体数 No. of explants	分化芽的外植体数 Explant number of adventitious bud	分化率 Differentiation rate (%)
0	113	5	4.42
1	146	14	9.59
2	152	14	9.21
3	137	11	8.03
4	106	6	5.66

2.2 侵染时间对分化率的影响

实验结果(表2)表明,侵染时间为5 min时,转化率很低;当侵染时间为15~20 min时,芽分化率明显提高;再延长侵染时间,在随后的培养中大部分子叶出现软化现象,分化率明显降低。因此,在其它条件相同的情况下,侵染时间以20 min为宜。

表2 侵染时间对分化率的影响

Table 2 Effect of different infection times on differentiation rate of *Siraitia grosvenorii*

侵染时间 Infection time (min)	外植体数 No. of explants	分化芽的外植体数 Explant number of adventitious bud	分化率 Differentiation rate (%)
5	187	11	5.88
10	142	10	7.04
15	119	10	8.40
20	164	17	10.37
25	173	10	5.78
30	125	3	2.40

2.3 共培养时间对转化率的影响

共培养是农杆菌遗传转化关键的步骤之一。当共培养1~2 d时,仅见少量农杆菌菌落出现;3~4 d后,在外植体的周围已可见明显菌落,抗性芽分化率也呈上升趋势;5 d后,子叶间明显可见相连的菌落,子叶分化率也随之降低;共培养7 d时,农杆菌过度繁殖生长导致叶片污染严重,变黑死亡,使转化的植物细胞很难在筛选培养基上分化成苗。因此,适宜的共培养时间为4 d(表3)。

2.4 共培养温度对分化率的影响

共培养的温度对T-DNA的转移也有一定的影响(Dillen等,1997;党尉等,2007)。本实验比较了共培养温度对农杆菌介导转化罗汉果的影响。罗汉果子叶经农杆菌感染后分别在19、22、25、28℃四种温度下共培养4 d,结果显示,22℃共培养温度条件

下获得了最高的抗性芽分化频率10.87%。当温度低于22℃时,抗性芽的数目下降,19℃时抗性芽分化率比22℃时下降了近3%。而当温度高于22℃时,抗性芽的数目也随着温度的升高而下降,28℃时的抗性芽分化率只有6.77%(表4)。这表明温度对T-DNA的转移有一定的影响。

表3 共培养时间对分化率的影响

Table 3 Effect of co-cultivation days on differentiation rate of *Siraitia grosvenorii*

共培养 Co-culture time (d)	外植体数 No. of explants	分化芽的外植体数 Explant number of adventitious bud	分化率 Differentiation rate (%)
1	146	4	2.74
2	158	7	4.43
3	163	12	7.36
4	162	15	9.26
5	139	10	7.19
6	144	4	2.78
7	161	2	1.24

表4 共培养温度对分化率的影响

Table 4 Effect of co-cultivation temperature on differentiation rate of *Siraitia grosvenorii*

共培养温度 Co-culture temperature(℃)	外植体数 No. of explants	分化芽的外植体数 Explant number of adventitious bud	分化率 Differentiation rate (%)
19	88	7	7.95
22	92	10	10.87
25	76	7	9.21
28	74	5	6.77

2.5 AS加入方式对罗汉果转化率的影响

通常进行AS处理的方法有两种,在农杆菌菌液中加入适当浓度的AS以诱导农杆菌的感染能力,或在农杆菌与植物外植体进行共培养时添加于培养基中。为了提高转化率,我们设定了四个处理比较AS对罗汉果子叶转化的影响。实验I:在工程菌菌液和共培养培养基中均不加入AS;实验II:只在工程菌菌液培养中加AS;实验III:只在共培养培养基中加AS;实验IV:在工程菌菌液和共培养培养基中都加入AS。以上4组实验AS的浓度均为100 μmol/L。结果表明,AS对罗汉果遗传转化具有促进作用,在实验I中,诱导产生的Hy抗性芽率为4.32%;实验II、实验III的Hy抗性芽率相当,分别为6.06%和6.40%;实验IV的最高为10.34%(表5)。

2.6 抗性植株的分子检测

经条件优化后,从4411个外植体获得抗性芽451个,潮霉素生根筛选后得到89株完整抗性植

株。抗性苗移栽种植高达 1 m 时, 取其新叶提取 DNA 进行 PCR 检测, PCR 检测结果表明在随机抽取的 70 个植株中有 52 株为阳性植株, PCR 阳性植株率约为 74.29%。转化率约为 1.5%。从图 1 看出: 转基因植株 DNA 扩增出的特异带与质粒 DNA 扩增出的条带处于同一位置, 大小为 2.2 kb, 为 *NPR1* 全长基因。

表 5 AS 加入方式对罗汉果分化率的影响

Table 5 Effect of AS addition scheme on differentiation rate of *Siraitia grosvenorii*

处理 Treatment	外植体数 No. of explants	分化芽的外植体数 Explant number of adventitious bud	分化率 Differentiation rate (%)
I	162	7	4.32
II	165	10	6.06
III	172	11	6.40
IV	174	18	10.34

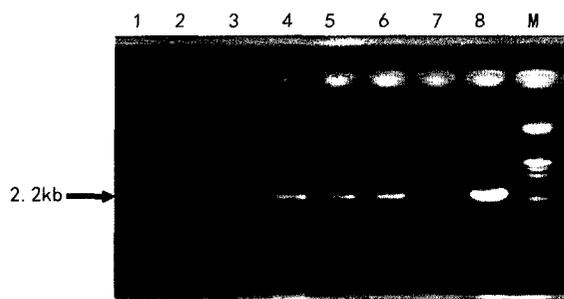


图 1 部分转基因植株的 PCR 分析
Fig. 1 PCR analysis of genomic DNA from transgenic plants

M: λ DNA/Hind III+EcoR I Marker; 1-6. 转化植株;
7: 未转化植株; 8: 质粒 DNA。

选择经 PCR 检测呈阳性的部分植株进一步做 Southern 印迹分析。结果表明, 非转化植株未显示任何杂交信号, 而转化植株都显示了杂交信号(图 2), 证明外源基因已经整合进罗汉果基因组中。

3 讨论

影响农杆菌介导的外源基因转化的因素主要有预培养时间、农杆菌感染时间, 共培养时间, 以及 Ti 质粒 *vir* 区活化等。适宜的预培养时间是提高分化率的条件之一, 外植体转化前进行预培养可以促进细胞分裂, 调整细胞状态, 使细胞更容易整合外源 DNA (An, 1985; Lin 等, 2005)。因此, 外植体预培养时间与植物转化效率有着明显的关系。但不同植

物或同一植物不同部位外植体均有其最佳的预培养时间。本实验结果表明: 罗汉果子叶预培养 1 d 可明显提高转化率。

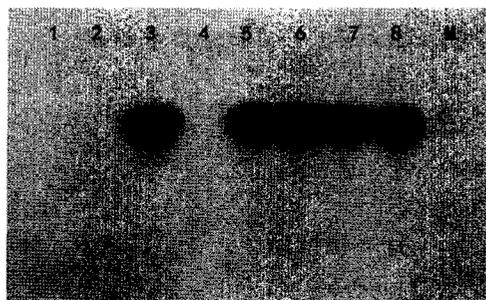


图 2 Southern 印迹分析

Fig. 2 Southern blot analysis of genomic DNA from leaves of control and transgenic plants

1, 3, 4, 5, 6: 转化植株; 2: 未转化植株。

外植体在菌液中浸泡时间直接影响农杆菌细胞的聚集和附着, 浸泡时间长短与农杆菌菌株和植物对农杆菌的敏感度有关。本实验中发现罗汉果子叶需要较长时间的浸泡, 20 min 的侵染时间对罗汉果子叶的转化效果最好。

农杆菌和外植体的共培养时间在整个转化过程中是非常重要的环节, 因为农杆菌的附着和 T-DNA 的转移及整合都是在共培养时间内完成的。而农杆菌附着后不能立即转化, 只有在创伤部位生存 16 h 之后才能诱发肿瘤。不同的植物或不同类型的外植体与农杆菌的最佳共培养时间差异很大, 范围在 2~7 d (王关林等, 2002)。本实验结果表明, 罗汉果子叶外植体农杆菌侵染的适宜的共培养时间为 4 d。随着共培养时间延长会出现农杆菌过度繁殖的现象, 外植体容易被毒害致死, 或者在芽分化培养中, 抑菌困难, 细菌代谢物对芽产生毒害作用而最终导致其褐化死亡, 转化率明显降低。

Dillen 等 (1997) 的研究表明, 共培养温度在农杆菌介导的转化过程中起重要作用, 较低的共培养温度有利于提高转化效率, 其机理可能是由于 T-DNA 转移复合体中 VirB-VirD4 部分在较低温度下能更好地发挥作用 (Fulle 等, 1996)。近年来, 在大蒜 (Kondo 等, 2000)、棉花 (Sunilkumar 等, 2001) 和大豆 (党尉等, 2007) 的转化中也获得了类似的结果。本实验研究也表明, 22 °C 的共培养温度有利于提高罗汉果的转化效率, 而高于或低于 22 °C 转化率均有不同程度下降。

AS 可有效地提高转化效率 (杨秀荣等, 2002;

黄健秋等, 2000; 刘海坤等, 2004; Sunilkumar 等, 2001), 损伤细胞渗出液中含有 $0.5 \sim 1.0 \mu\text{mol/L}$ 的 AS 即可诱导农杆菌 Vir 区基因活化。其中诱导效果最佳的是乙酰丁香酮(AS), 加入 AS 也可以显著提高农杆菌的转化率。但也有个别研究显示, AS 的加入与否对转化率的影响不大(杨广东等, 2002)。本实验研究表明, 在农杆菌培养和共培养阶段同时加入 AS, 分化率从 4.32% 提高到 10.34%, 促进作用非常明显。

目前, 本研究已获得了罗汉果转 NPR1 基因植株, 转化苗经 PCR 和 Southern blot 杂交分析, 证明外源基因已整合到罗汉果基因组中。

参考文献:

- 王关林, 方宏筠. 2002. 植物基因工程(第2版)[M]. 北京: 科学出版社: 389—394
- 李锋, 李典鹏, 蒋水元, 等. 2004. 罗汉果栽培与开发利用[M]. 北京: 中国林业出版社: 111
- An G. 1985. High efficiency transformation of cultured tobacco cells[J]. *Plant Physiol*, **79**: 568—570
- Cao H, Bowling SA, Gordon AS, et al. 1994. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance[J]. *Plant Cell*, **6**: 1 583—1 592
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, et al. 1997. The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats[J]. *Cell*, **88**: 57—63
- Cao H, Li X, Dong X. 1998. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 6 531—6 536
- Chern MS, Fitzgerald HA, Yadav RC, et al. 2001. Evidence for a disease resistance pathway in rice similar to the NPR1 mediated signaling pathway in *Arabidopsis*[J]. *Plant J*, **27**: 101—113
- Dang W(党尉), Wei ZM(卫志明). 2007. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean(根癌农杆菌介导的高效大豆遗传转化体系的建立)[J]. *J Mol Cell Biol(分子细胞生物学报)*, **40**(3): 185—195
- Dillen W, De Clercq J, Kapila J, et al. 1997. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants[J]. *Plant J*, **12**(6): 1 459—1 463
- Ekengren SK, Liu Y, Schiff M, et al. 2003. Two MAPK cascades, NPR1 and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato[J]. *Plant J*, **36**: 905—917
- Fitzgerald HA, Chern MS, Navarre R, et al. 2004. Overexpression of (*At*) NPR1 in rice leads to a BTH and environment induced lesion mimic/cell death phenotype[J]. *Mol Plant-microbe Interact*, **17**: 140—151
- Fuller KJ, Lara JC, Nester EW. 1996. Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes[J]. *Science*, **273**: 1 107—1 109
- Huang JQ(黄健秋), Wei ZM(卫志明), An HL(安海龙), et al. 2000. High efficiency of genetic transformation of rice using *Agrobacterium* mediated procedure(根癌土壤杆菌介导的水稻高效转化和转基因植株的高频再生)[J]. *Acta Bot Sin(植物学报)*, **42**(11): 1 172—1 178
- Kachroo P, Yoshioka K, Shah J, et al. 2000. Resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene and jasmonate independent[J]. *Plant Cell*, **12**(5): 677—690
- Kondo T, Hasegawa H, Suzuki M. 2000. Transformation and regeneration of garlic(*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium*-mediated gene transfer[J]. *Plant Cell Rep*, **19**: 989—993
- Li DP(李典鹏), Zhang HR(张厚瑞). 2000. Studies and uses of Chinese medicine Luohanguo —— a special local product of Guangxi(广西特产植物罗汉果的研究与应用)[J]. *Guihaia(广西植物)*, **20**(3): 270—276
- Lin WC, Lu CF, Wu JW, et al. 2004. Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis* NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases[J]. *Transgenic Research*, **13**: 567—581
- Lin YJ, Zhang QJ. 2005. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice[J]. *Plant Cell Rep*, **23**: 540—547
- Liu HK(刘海坤), Wei ZM(卫志明). 2004. Transgenic soybean obtained with *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryonic tip of soybean mature seeds(利用根癌农杆菌介导转化大豆成熟种子胚尖获得转基因植株)[J]. *J Plant Physiol Mol Biol(植物生理与分子生物学学报)*, **30**(6): 631—636
- Qin XM(秦新民), Li WL(李文兰), Zhang LZ(张丽珍), et al. 2005. Cloning and expression vector construction of *Arabidopsis* NPR1 gene(拟南芥 NPR1 基因的克隆与表达载体的构建)[J]. *Guihaia(广西植物)*, **25**(1): 58—61
- Qin XM(秦新民), Yang H(杨华), Wei SL(韦素玲). 2008. Study on the tissue culture and rapid propagation of *Siraitia grosvenorii*(罗汉果的组织培养与快速繁殖)[J]. *J Anhui Agric Sci(安徽农业科学)*, **36**(9): 3 553—3 554
- Sunilkumar G, Rathore KS. 2001. Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration[J]. *Molecular Breeding*, **8**: 37—52
- Yang GD(杨广东), Zhu Z(朱祯), Li YE(李燕娥), et al. 2002. Establishment of high-efficient genetic transformation system in Chinese Cabbage(大白菜高效遗传转化体系的建立)[J]. *J Agric Biotech(农业生物技术学报)*, **10**(2): 127—132
- Yang XR(杨秀荣), Chen YW(陈永文), Fang P(方平), et al. 2002. The effect of acetosyringone on transformation of sweet-potato by *Agrobacterium tumefaciens*(乙酰丁香酮对根癌农杆菌介导的甘薯遗传转化的影响)[J]. *J Southwest China Normal Univ; Nat Sci Edi(西南师范大学学报·自然科学版)*, **27**(5): 751—754
- Zhang Y, Fan W, Kinkema M, et al. 1999. Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene[J]. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, **96**: 6 523—6 528