

超量表达益母草种子抗菌蛋白 提高番茄的抗病性

李先碧 杨星勇 李德谋 郭绍辉 裴 炎*

(农业部生物技术与作物品质改良重点开放实验室,重庆市农业生物技术
重点实验室,西南大学生物技术研究中心,重庆 400716)

摘要: 为了验证来自益母草 *Leonums japonicus* Houtt 种子的抗菌蛋白基因 *LjAMP₁* 和 *LjAMP₂* 对植物病害的广谱抗性,用根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导法,将其分别转入台湾圣女番茄品种。结果显示,利用黄萎病菌毒素浸泡番茄离体枝条,处理 24 h,空载转基因对照和非转基因再生植株枝条全部萎蔫,而 *LjAMP₁* 和 *LjAMP₂* 转基因番茄 T₀ 代枝条未出现萎蔫的株系比率分别为 11.11% 和 6.25%;用离体叶片接种菌块,分别对 T₀ 代抗或耐黄萎病菌毒素的 T₁ 代株系接种早疫病菌,接种 10 天,空载转基因对照和非转基因再生植株的病情指数达到 100,而 *LjAMP₁* 和 *LjAMP₂* 转基因番茄病情指数最低的株系分别为 17.5 和 10.0,表明转基因番茄能同时提高对黄萎病菌毒素和早疫病的抗性;进而用叶盘法检测转基因植株对番茄青枯病菌的抑制作用,结果显示对真菌病害抗性强的转基因植株叶片对青枯病菌的抑菌圈更大。转基因番茄抗病鉴定结果表明,来自益母草种子的 *LjAMP₁* 和 *LjAMP₂* 基因对植物病害具有广谱抗性。

关键词: 益母草种子; 抗菌蛋白; 转基因; 抗病性

Enhancing disease resistance in transgenic tomato over-expressing antimicrobial proteins, *LjAMP₁* and *LjAMP₂* from motherwort seeds

Li Xianbi Yang Xingyong Li Demou Guo Shaohui Pei Yan*

(Key Laboratory of Biotechnology and Crop Quality Improvement of Agriculture Ministry, Chongqing
Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Biotechnology Research Center of
Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: To confirm the antimicrobial protein function of *LjAMP₁* and *LjAMP₂* genes cloned from motherwort, these two genes were introduced into tomato (cv. Taiwan shenlu) by *Agrobacterium tumefaciens* transformation method. *In vitro* assessment of the resistance against *Verticillium* wilt by dipping plant branches into the toxin preparation of *Verticillium dahliae*, indicated that the rate of showing no wilting symptom in transgenic tomato lines over-expressing *LjAMP₁* and *LjAMP₂* is 11.11% and 6.25% respectively, while the wild type and the transgenic plants holding empty construction branches were 100% severely wilted. To further investigate the resistance against *Alternaria solani* Jones et Grout, detached leaves were inoculated with the pathogen. In T₁ progeny transgenic tomato lines over-expressing *LjAMP₁* and *LjAMP₂*, those showing resistance or tolerance to *Verticillium* wilt toxin preparation, also exhibited resistance to

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30671327),重庆市教委资助项目(KJ060318)

作者简介:李先碧,女,助理研究员,从事植物抗病分子育种研究, email: lxianbi@126.com

* 通讯作者(Author for correspondence), email: peiyan3@swu.edu.cn, Tel: 023-68250515

收稿日期:2007-04-13

A. solani. The lowest disease index of *LjAMP₁* and *LjAMP₂* T₁ progeny transgenic lines was 17.5 and 10.0 respectively, while the disease index of wild type and transgenic plants holding empty construction are 100. Analysis of leaf discs inhibition zone to *Ralstonia solanacearum* revealed that in transgenic lines those exhibiting resistance to fungal pathogens also showed resistance to the bacterial pathogen, confirming the broad-spectrum resistances of *LjAMP₁* and *LjAMP₂*.

Key words: motherwort seed; antimicrobial protein; transgene; disease resistance

植物病害严重影响植物生产和产品品质,而栽培抗病植物品种是防治植物病害最经济有效的途径。随着植物基因工程的不断发展,广泛利用不同来源的抗病基因创造抗病植物品种已成现实。开展植物抗病基因工程,关键是寻找具有持久和广谱抗性的抗病基因。抗菌蛋白或多肽(antimicrobial protein or peptide, AMP)是一类由生物产生的具有抗菌活性的蛋白或多肽,广泛分布于植物、动物和微生物中,具有抗菌谱广、抗菌活性高和抗性持久等特点。已经发现的来源于植物具有抗菌活性的蛋白或多肽主要包括:作用于微生物细胞壁的几丁质结合蛋白^[1]、几丁质酶^[2]和 β -1,3 葡聚糖酶^[3];作用于微生物细胞膜的脂转移蛋白^[4]、植物防御素^[5]和硫堇^[6];作用于微生物细胞内受体的糖体失活蛋白^[7]等。这些抗菌蛋白或多肽在植物抗病过程中起着重要作用。研究表明,在植物中表达植物来源的抗菌蛋白或多肽能增强植物的抗病性^[8-10]。

植物种子富含营养,常常散播于病原微生物丰富的土壤中,种皮和种子外壳是抵御病菌入侵的机械屏障,在种子萌发过程中,种皮和种壳的破裂使其容易招受病原菌的入侵。但在自然条件下,植物种子在萌发过程中很少受到病原微生物的侵染。在种子的抗病机制中,抗菌蛋白或多肽起着重要作用。为了获得具有广谱抗病作用的蛋白,作者从益母草种子中纯化了抗菌蛋白 *LjAMP₁* 和 *LjAMP₂*,体外抑菌研究表明,这两种蛋白具有抗菌活性。进而经氨基酸测序-基因克隆等,获得了两个来自益母草种子的抗菌蛋白基因 *LjAMP₁* 和 *LjAMP₂*^[11-12]。利用番茄具有易于转化、易诱导发病等优点,作者将这两个基因分别转入番茄基因组,以验证这两个基因在植物体中的抗病效果。

1 材料与方法

1.1 材料

番茄品种为台湾圣女。黄萎病菌 *Verticillium dahliae* 分离于田间发病棉花植株。番茄早疫病菌 *Alternaria solani* Jones et Grouet 和番茄青枯病菌 *Ral-*

stonia solanacearum 分离于田间发病的番茄植株。植物表达载体 *pLjAMP₁* 和 *pLjAMP₂* 为本实验室构建。*NPT II* (neomycin phosphotransferase II,新霉素磷酸转移酶)基因作为筛选标记基因,赋予转基因植株 Kan (kanamycin,卡那霉素)抗性。*GUS* (β -Glucuronidase, β -葡萄糖苷酸酶)基因作为报告基因。外源基因的启动均为 CaMV35S(*Cauliflower mosaic virus* 35S promoter,花椰菜花叶病毒 35S 启动子)。农杆菌菌株为 LBA4404,由本实验室保存。

1.2 番茄的遗传转化

参考 Cortina 等^[13]的方法,以生长 7~9 天无菌苗的子叶为外植体,利用根癌农杆菌介导法进行遗传转化。

1.3 植物病原菌的培养及接种源的获得

1.3.1 黄萎病菌毒素的获得

黄萎病菌单孢菌落接种于 PDA 平板,26℃ 暗培养 7 天,切取黄萎病菌菌块接种于附加 200 mg/L 头孢霉素的 PD 液体培养基,26℃、180 r/min 振荡培养 20 天,培养液 10 000 r/min、室温离心 10 min,上清液即为黄萎病菌毒素粗提液。

1.3.2 番茄早疫病菌的培养

早疫病菌单孢菌落接种于 PDA 平板,26℃ 暗培养 7 天,用 9 mm 无菌打孔器切取菌丝生长边缘的菌块,分别接种于 PDA 平板中央,26℃ 暗培养 10 天,然后于菌丝生长边缘取菌块供接种。

1.3.3 青枯病菌的获得

采用划线法获得番茄青枯病菌单菌落,挑取单菌落接种于 PD 液体培养基,28℃、180 r/min 振荡培养 16 h 左右,以 OD₆₀₀ 约为 1 的菌液作为接种的致病菌。

1.4 转基因番茄的抗病鉴定

1.4.1 T₀ 代转基因番茄对黄萎病菌毒素的抗性鉴定

剪取生长相对一致、具 3~5 片叶的番茄枝条,剪切口浸没于黄萎病菌毒素粗提液中,20~26℃ 保湿光照培养 24 h,统计每次重复试验都未发生萎蔫的植株比率。以野生型和空载转基因植株为对照,每个株系取 4 个枝条进行检测,重复 3 次。

1.4.2 转基因番茄 T_1 代对番茄早疫病抗性鉴定

参考 Emami 等^[14]的方法,利用离体叶片对转基因番茄 T_1 代进行早疫病抗性检测。4~6 片真叶的 T_1 代 GUS 阳性植株,剪取顶部完全展开幼叶,于每叶片顶部 3 个小叶的中部叶脉处接种早疫病致病菌株,接种后 26℃ 保湿培养 10 天,参照谈文等^[15]烟草赤星病的分级标准统计叶片的发病率和病情指数。每植株剪取顶部 1 片叶,每株系检测 10 株,以野生型和空载转基因植株为对照,试验重复 3 次。

1.4.3 转基因番茄对青枯病的抗性鉴定

参照 Ponti 等^[16]的方法,取 T_0 代和 T_1 代转基因番茄顶部完全展开的幼叶,用 9 mm 打孔器于靠近主叶脉处切取叶盘,立即将叶盘接种于含青枯病菌的 PDA 平板,28℃ 暗培养 12 h,测定叶盘周围产生的抑菌圈。以野生型和空载转基因植株为对照,每片叶切取 3 个叶圆片。

1.5 转基因番茄的分子生物学鉴定

参考 Jefferson^[17]的方法,对幼叶进行 GUS 组织化学染色,初步确定转基因植株。植株成苗后对所有 GUS 染色表现阳性的植株进行 PCR 验证,以确定外源基因是否已整合入番茄基因组。PCR 验证参照王关林等^[18]的方法进行。PCR 引物: $LjAMP_1$: P1: 5'-ATG GCT GCC TTG ATC AAG TT-3'; P2: 5'-TCA GCC GGA GTA CGA CTT GGC AA-3'。 $LjAMP_2$:

P1: 5'-CGC AGT CAA ATG CTG CAG GGT-3'; P2: 5'-GCC GAT AGG CCT TAA TCA TC-3'。

PCR 反应总体积 25 μ L, 包括 1 $\times$ PCR buffer, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dNTPs, 上下游引物均为 0.2 μ mol/L, 25 ng Template DNA, 1U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 反应参数: 94℃ 预扩增 5 min, 然后 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 90 s, 35 个循环, 最后 72℃ 充分延伸 10 min。扩增产物 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 转基因番茄的分子生物学验证

植物表达载体中含有 GUS 报告基因, 因此可利用 GUS 组织化学染色法对转基因植株进行快速检测。所有 T_0 代 Kan 抗性植株取叶片进行 GUS 组织化学检测, 淘汰 GUS 染色为阴性的植株, 并以同样的方式对 T_1 代所有植株进行 GUS 检测。结果显示, 转基因植株叶片切口和叶脉染成了蓝色, 说明 GUS 基因已整合进番茄基因组。进一步对 GUS 阳性植株进行目标基因的 PCR 检测, 部分 PCR 检测结果见图 1。结果表明, 空载转基因植株和野生型对照均没有扩增出特异带, 而 GUS 阳性植株均扩增出了与质粒相同的约 348 bp 或 288 bp 的特异带, 说明 $LjAMP_1$ 和 $LjAMP_2$ 两个目标基因已整合进番茄基因组。

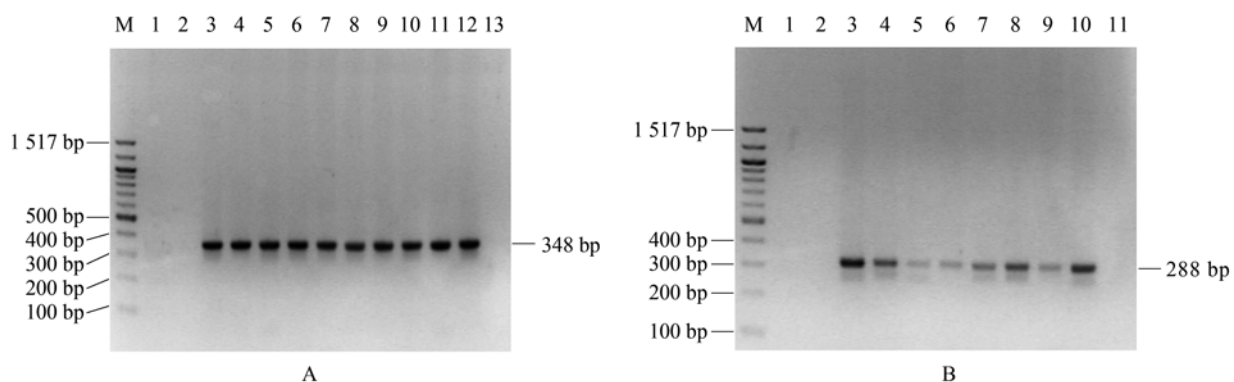


图 1 转基因植株 $LjAMP_1$ 和 $LjAMP_2$ 基因的 PCR 检测

Fig. 1 PCR analysis of $LjAMP_1$ and $LjAMP_2$ gene in transgenic plants

注: A: 转基因番茄中 $LjAMP_1$ 基因的 PCR 检测。M: marker; 1: 空载转基因植株; 2: 非转基因植株; 3: 阳性质粒; 4~12: 转基因植株; 13: 水。B: 转基因番茄中 $LjAMP_2$ 基因的 PCR 检测。M: marker; 1: 空载转基因植株; 2: 非转基因植株; 3: 阳性质粒; 4~10: 转基因植株; 11: 水。
Note: A: PCR analysis of $LjAMP_1$ gene in transgenic plants. M: marker; 1: transgenic plant holding empty construction; 2: non-transgenic plant; 3: plasmid p $LjAMP_1$; 4~12: transgenic plants expressing $LjAMP_1$; 13: water. B: PCR analysis of $LjAMP_2$ gene in transgenic plants. M: marker; 1: transgenic plant holding empty construction; 2: non-transgenic plant; 3: plasmid p $LjAMP_2$; 4~10: transgenic plants expressing $LjAMP_2$; 11: water.

2.2 T_0 代转基因番茄对黄萎病菌毒素的抗性

用黄萎病菌毒素粗提物处理转基因番茄枝条 24

h, 超量表达 $LjAMP_1$ 和 $LjAMP_2$ 的转基因番茄分别有 2 个和 1 个株系的枝条未发生萎蔫, 株系编号分别为

LjAMP₁-21、LjAMP₁-31、LjAMP₂-10。此外,LjAMP₁ 转基因番茄有 5 个株系枝条出现轻度萎蔫;LjAMP₂ 转基因番茄有 6 个株系枝条出现轻度萎蔫。其余转基因植株的枝条萎蔫严重,与野生型和空载转基因对照比较没有明显的差异。转基因株系 3 次重复均未发

生萎蔫的株系比率:LjAMP₁ 为 11.11%,LjAMP₂ 为 6.25%;轻度萎蔫的株系比率:LjAMP₁ 为 27.77%,LjAMP₂ 为 37.50%;野生型植株和空载转基因对照则 100% 发生严重萎蔫(表 1)。

表 1 LjAMP₁ 和 LjAMP₂ 转基因番茄 T₀ 代对黄萎病菌毒素的抗性分析
Table 1 The resistance analysis to *Verticillium dahliae* toxin preparation with T₀ transgenic lines over-expressing LjAMP₁ and LjAMP₂

外源基因 Foreign gene	处理株系数量(个) Numbers of the lines	未萎蔫株系比率(%) The rate of the transgenic lines showing no wilting symptom	轻度萎蔫株系比率(%) The rate of the transgenic lines showing moderate wilting symptom
CK ₁ (空载转基因植株 Transgenic plant holding empty construction)	10	0.00	0.00
CK ₂ (野生型植株 Wild type plant)	5	0.00	0.00
LjAMP ₁	18	11.11	27.77
LjAMP ₂	16	6.25	37.50

2.3 T₁ 代转基因番茄对早疫病的抗性

根据 T₀ 代对黄萎病菌毒素抗性表现,分别选取下列株系进行抗旱疫病检测:对黄萎病菌毒素敏感的 LjAMP₁-25 和 LjAMP₂-8;对黄萎病菌毒素中度敏感的

LjAMP₁-18;抗黄萎病菌毒素的 LjAMP₁-21、LjAMP₁-31 和 LjAMP₂-10。离体叶片接种 10 天的发病率和病情指数见图 2。

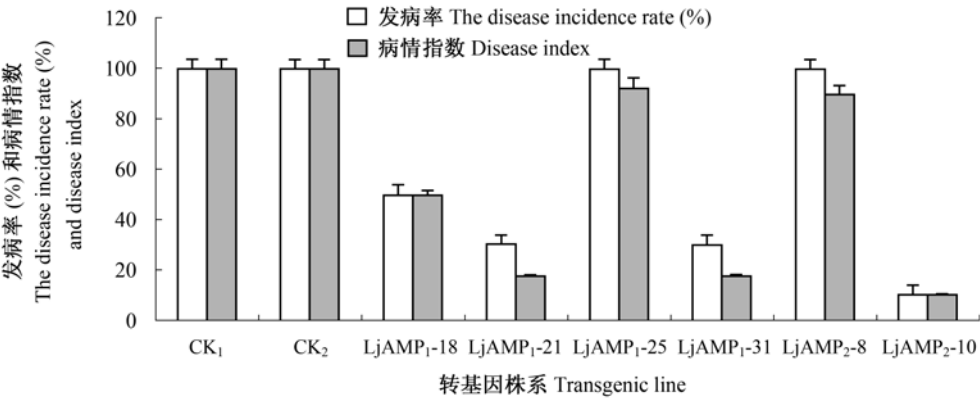


图 2 超量表达 LjAMP₁ 和 LjAMP₂ 的转基因番茄 T₁ 代株系接种早疫病菌 10 天的发病率和病情指数
Fig. 2 The disease incidence rate and disease index of T₁ transgenic lines over-expressing LjAMP₁ and LjAMP₂ at 10 d post-inoculation *Alternaria solani*

注:CK₁:空载转基因番茄;CK₂:野生型植株;LjAMP₁-18、LjAMP₁-21、LjAMP₁-25 和 LjAMP₁-31 为超量表达 LjAMP₁ 的转基因株系;LjAMP₂-8 和 LjAMP₂-10 为超量表达 LjAMP₂ 的转基因株系。Note: CK₁: transgenic plants holding empty construction; CK₂: wild type plants; LjAMP₁-18, LjAMP₁-21, LjAMP₁-25, LjAMP₁-31: transgenic lines over-expressing LjAMP₁; LjAMP₂-8, LjAMP₂-10: transgenic lines over-expressing LjAMP₂.

转基因番茄离体叶片接种早疫病菌块,5 天开始出现病症,7 天对早疫病没有抗性的植株叶片大面积出现病症,接种 10~15 天,抗旱疫病植株的叶片既不失绿变黄,也没有褐色病斑出现。结果显示,接种早疫病菌 10 天,T₀ 代对黄萎病菌毒素表现抗性的株系

后代发病率和病情指数为:LjAMP₁-21:30.00% 和 17.5; LjAMP₁-31:30.00% 和 17.5;LjAMP₂-10:10.00% 和 10.0。对黄萎病菌毒素中度敏感的株系后代发病率和病情指数为:LjAMP₁-18:50.00% 和 50.0;对黄萎病菌毒素敏感的株系与野生型和空载转基因对照的

发病率和病情指数没有明显的差别,几乎都为100%和100。 t 测验结果表明,抗病株系的发病率和病情指数与对照相比,差异极显著($P < 0.01$)。 T_0 代和 T_1 代抗病鉴定结果表明,转基因番茄能同时提高对黄萎病菌毒素和早疫病的抗性。

2.4 转基因番茄对青枯病的抗性

为了进一步检测 *LjAMP₁* 和 *LjAMP₂* 转基因番茄是否具有广谱抗性,分别对 T_0 代以及进行早疫病抗性鉴定的 T_1 代材料进行青枯病抗性鉴定。叶盘抑菌圈测定结果表明, *LjAMP₁* 转基因番茄 T_0 代的18个株系中有5个株系对青枯病有抗性,产生了明显的抑菌圈,占检测材料的27.78%, T_1 代检测的4个株系中有3个株系对青枯病有抗性; *LjAMP₂* 转基因番茄 T_0 代的16个株系中有4个株系对青枯病有抗性,产生了明显的抑菌圈,占检测材料的25.00%, T_1 代检测的2个株系中有1个株系对青枯病有抗性。而野生型和空载转基因对照均没有明显的抑菌圈产生。叶盘抑菌圈测定结果还显示,对黄萎病和早疫病抗性越强的转基因番茄,叶盘产生的抑菌圈也越大。

3 讨论

黄萎病菌寄主广泛,来自棉花的黄萎病菌能感染番茄^[19]。本研究利用棉花植株上分离的黄萎病菌检测转基因番茄对黄萎病的抗性。黄萎病引起植株萎蔫的原因很多,顾本康等^[20]研究表明主要是因为黄萎病菌产生的毒素使寄主细胞中毒而萎蔫或死亡。番茄易产生分枝,因此可利用番茄枝条结合黄萎病菌毒素对番茄的抗病性进行离体检测。本研究结果显示,将黄萎病菌毒素处理后产生萎蔫的枝条分别扦插至清水,大约12 h后,多数轻度萎蔫的转基因材料与自然萎蔫的枝条都能恢复正常,而重度萎蔫的转基因材料和野生型材料无法恢复正常,始终处于萎蔫状态。这说明用黄萎病菌毒素处理番茄枝条能有效检测转基因番茄对黄萎病的抗性。

郭毅斌等^[21]研究表明,多肽 MP-1 能抵抗脂多糖内毒素(LPS)对小鼠的攻击,起到显著的保护作用,其机制可能是 MP-1 对 LPS 具有亲和力及中和作用,阻断了 LPS 与其受体的结合。棉花黄萎病菌毒素主要是酸性蛋白-脂多糖复合物^[20]。*LjAMP₁* 和 *LjAMP₂* 提高了转基因棉花对黄萎病毒毒素的抗性,可能与抗菌蛋白的保护作用有关,其作用机制有待进一步研究。

Osusky 等^[22]研究表明,植物中表达抗菌肽能增强植物的广谱抗性,转基因植株不仅对真菌病害抗性增强,而且也提高了对细菌病害的抗性。本研究结果显示,对真菌病害抗性提高的转基因番茄对细菌病害青枯病的抗性也提高了。表明来自益母草种子的抗菌蛋白 *LjAMP₁* 和 *LjAMP₂* 不仅能提高植物对真菌病害的抗性,同时也能提高植物对细菌病害的抗性。

对转基因番茄 T_0 代和 T_1 植株生长观察表明,超量表达 *LjAMP₁* 和 *LjAMP₂* 的转基因番茄植株生长正常,一般都能开花结实。转基因植株、非转基因的再生植株和空载转基因植株形态等没有明显的差异。对 T_1 代植株的 GUS 分离比例检测结果还显示,转基因植株中外源基因的拷贝数中部分植株为单拷贝,部分植株为两个拷贝。*LjAMP₁* 和 *LjAMP₂* 两个基因既能有效提高植物对细菌和真菌病害的抗性,又不影响植株的正常生长和发育。因此,作者认为来自益母草种子的抗菌蛋白基因 *LjAMP₁* 和 *LjAMP₂* 可以作为植物抗病基因工程的目的基因。

参 考 文 献(References)

- 1 Nielsen K K, Nielsen J E, Madrid S M, et al. Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves. *Plant Physiology*, 1997, 113 (1): 83-91
- 2 Collinge D B, Kragh K M, Mikkelsen J D, et al. Plant chitinases. *Plant Journal*, 1993, 3 (1): 31-40
- 3 Buchner P, Rochat C, Wuilleme S, et al. Characterization of a tissue-specific and developmentally regulated beta-1,3-glucanase gene in pea (*Pisum sativum*). *Plant Molecular Biology*, 2002, 49 (2): 171-186
- 4 Kristensen A K, Brunstedt J, Nielsen K K, et al. Characterization of a new antifungal non-specific lipid transfer protein (nsLTP) from sugar beet leaves. *Plant Science*, 2000, 155 (1): 31-40
- 5 Almeida M S, Cabral K M, Zingali R B, et al. Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. *Archives Biochemistry and Biophysics*, 2000, 378 (2): 278-286
- 6 Bohlmann H, Clausen S, Behnke S, et al. Leaf-specific thionins of barley - a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defense mechanism of plants. *European Molecular Biology Organization Journal*, 1988, 7: 1559-1565
- 7 Vivanco J M, Savary B J, Flores H E. Characterization of two novel type I ribosome-inactivating proteins from the storage roots of the andean crop *Mirabilis expansa*. *Plant Physiology*, 1999, 119 (4): 1447-1456
- 8 Eppele P, Apel K, Bohlmann H. Overexpression of an endogenous

- thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell*, 1997, 9 (4): 509 – 520
- 9 Gao A G, Hakimi S M, Mittanck C A, et al. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology*, 2000, 18 (12): 1307 – 1310
- 10 Schaefer S C, Gasic K, Cammue B, et al. Enhanced resistance to early blight in transgenic tomato lines expressing heterologous plant defense genes. *Planta*, 2005, 222 (5): 858 – 866
- 11 Yang X Y, Li J, Li X B, et al. Peptides, isolation and characterization of a novel thermostable non-specific lipid transfer protein-like antimicrobial protein from motherwort (*Leonurus japonicus* Houtt) seeds. *Peptides*, 2006, 27(12): 3122 – 3128
- 12 Yang X Y, Xiao Y H, Wang X W, et al. Expression of a novel small antimicrobial protein from the seeds of motherwort (*Leonurus japonicus*) confers disease resistance in tobacco. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (3): 939 – 946
- 13 Cortina C, Culiáñez-Macià F A. Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, 76(3): 269 – 275
- 14 Emani C, Garcia J M, Lopata-Finch E, et al. Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. *Plant Biotechnology Journal*, 2003, 1 (5): 321 – 336
- 15 谈文, 吴元华. 烟草病害调查的一般方法. 烟草病理. 北京: 中国农业出版社, 2003: 388 – 390
- 16 Ponti D, Mangoni M L, Mignogna G, et al. An amphibian antimicrobial peptide variant expressed in *Nicotiana tabacum* confers resistance to phytopathogens1. *The Biochemical Journal*, 2003, 370 (1): 121 – 127
- 17 Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, 5 (4): 387 – 405
- 18 王关林, 方宏筠. 植物基因工程. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002: 757 – 758
- 19 Subbarao K V, Chassot A, Gordon T R, et al. Genetic relationships and cross pathogenicities of *Verticillium dahliae* isolates from cauliflower and other crops. *Phytopathology*, 1995, 85 (10): 1105 – 1112
- 20 顾本康, 马存. 中国棉花抗病育种. 南京: 江苏科学技术出版社, 1996: 11 – 15
- 21 郭毅斌, 郑江, 吕根法, 等. 阳离子多肽 MP-1 拮抗内毒素/脂多糖活性的实验研究. *中华烧伤杂志*, 2005, 21(3): 189 – 192
- 22 Osusky M, Zhou G Q, Osuska L, et al. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature Biotechnology*, 2000, 18 (11): 1162 – 1166