

莲种子防御素基因序列分析及表达载体构建

黎茵, 张以顺, 周玉亮, 陈琛, 黄上志*

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要: 从莲种子发育中期胚 cDNA 文库中克隆得到的防御素基因 cDNA 全长 561 bp, GenBank 登录号为 EF421192。分析发现该基因 234 bp 的开放读码框编码 77 个氨基酸的多肽序列, 除信号肽序列外与其它不同来源的植物防御素基因有较高同源性, 将其命名为 *NnDefensin*。NnDefensin 蛋白带有 30 个氨基酸的信号肽, 具有 8 个半胱氨酸的高度保守结构等典型的植物防御素特征, 成熟肽部分含有 γ -硫素蛋白功能结构域。在系统进化上 NnDefensin 与单子叶植物中的粳稻和小麦的同源蛋白, 以及车前草同源蛋白亲缘关系较为接近。通过 PCR 扩增克隆莲胚防御素基因片段并连接到载体 pBI121 和带有花生油体蛋白种子特异启动子的载体 pAhOleo17.8 : GUS 中, 成功构建了 35S 启动子控制的植物表达双元载体 pBI121-NnDef 和种子特异表达双元载体 pAhOleo-NnDef, 为该基因的功能鉴定及通过基因工程方法提高转基因植物以及种子的抗病能力奠定基础。

关键词: 莲; 防御素; 载体构建; 种子特异

中图分类号: S 682.32; Q 785

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 12-1975-08

Sequence Analysis of Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) Seed Defensin Gene and Plant Expression Vector Construction

LI Yin, ZHANG Yi-shun, ZHOU Yu-Liang, CHEN Chen, and HUANG Shang-zhi*

(School of life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) seed defensin gene was identified from the lotus cDNA library of middle development stage seed embryo. The 561 bp full length cDNA have a 234 bp open reading frame which encoding a 77 amino acid peptide and was designated as *NnDefensin*. The amino acid sequence of NnDefensin showed relatively high match with other plant defensin genes and phylogeny analysis showed that NnDefensin have close relationship with defensin from *Oryza sativa japonica* group, defensin precursor from *Triticum aestivum* and defensin from *Plantago major*. NnDefensin have a strictly conserved γ -thionin domain of eight cysteine which is characteristic in plant defensin. Specific primers containing restriction enzyme site of *Sma* I and *Sac* I was used to amplify the sequence of *NnDefensin* by polymerase chain reaction (PCR). The binary expression vector pBI121 and vector pAhOleo17.8 : GUS which containing a seed specific promoter were digested by the corresponding restricted enzymes respectively, and linked with the *NnDefensin* fragment directionally. The resulting construction was obtained and named pBI121-NnDef in which *NnDefensin* was driven by 35S promoter, and pAhOleo-NnDef

收稿日期: 2010-04-29; **修回日期:** 2010-11-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370912); 广东省自然科学基金项目 (04009773)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: huangsz@mail.sysu.edu.cn)

in which *NnDefensin* was driven by seed specific promoter *AhOleo17.8* from peanut (*Arachis hypogaea* L.). The vectors could be transformed into plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* for the following up research such as gene functional identification and gene transformation for pathogen resistant improvement in transgenic plants and seeds.

Key words: *Nelumbo nucifera* Gaertn; defensin; vector construction; seed specific

植物防御素是一类低分子量短肽, 广泛分布于植物体内, 参与植物的防卫反应, 是极为重要的一种抗病因子(王汉屏, 2008)。植物防御素因种类和结构的差别具有不同作用, 包括抗真菌(Gao et al., 2000; Lai et al., 2002; Lay et al., 2003a; Solis et al., 2007; Anuradha et al., 2008; 李平等, 2009)和抗细菌(Koike et al., 2002; 李平等, 2009), 以及蛋白酶抑制和抗虫作用(Wijaya et al., 2000; Chen et al., 2002; Lay et al., 2003b), 部分研究也发现防御素可以在环境胁迫情况下对植物体起保护作用(Koike et al., 2002; Do et al., 2004)。防御素抵抗病原菌的主要作用方式是破坏病原微生物的细胞膜, 大部分植物防御素对人、动物和植物细胞无害(Carvalho & Gomes, 2009), 但也有些防御素会抑制哺乳动物细胞生长(Pelegrini & Franco, 2005)。

目前研究已证实植物防御素能提高转基因植物如拟南芥、烟草、马铃薯、水稻、哈密瓜和花生等的抗病能力(Gao et al., 2000; Francois et al., 2002; Anuradha et al., 2008; Games et al., 2008), 因此对植物防御素基因进行克隆和利用为通过基因工程技术改良作物提供了可行途径(王贺一等, 2007; Anuradha et al., 2008; Carvalho & Gomes, 2009), 但活性较强同时应用安全的植物防御素还需要更广泛的开发和研究。

莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn)为睡莲科(Nymphaeaceae)莲属(*Nelumbo* Gaertn), 在被子植物中起源较早(Chen et al., 2008), 对高温逆境和病虫害有较强耐性, 种子极耐储藏, 莲的根茎、叶、花和种子均可食用或药用。作者已开展了莲种子功能基因的研究(Chen et al., 2008; Li et al., 2009b), 构建了发育中期莲种子胚的 cDNA 文库并从中得到莲种子防御素(defensin)基因 cDNA 的序列(GenBank 登录号 EF421192)。在此基础上, 对莲种子防御素基因进行了氨基酸序列分析, 比较了莲种子防御素与其它植物防御素的同源性, 确定莲种子防御素的功能相关结构域, 并分别构建了该基因的组成型过表达载体和种子特异表达载体, 为以后的功能鉴定和在转基因植物中的应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

发育中期的莲种子 2005 年采自佛山市三水荷花世界, 品系为湘莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn ‘Xianglian’)。莲种子发育中期 cDNA 文库由本实验室构建并保存在 -80°C 。大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存。克隆载体 pMD18T vector 购自 TaKaRa 公司。带有 35S 启动子的植物表达载体 PBI121 和带有种子特异启动子的植物表达载体 pAhOleo17.8:GUS 为本实验室保存。其中 pAhOleo17.8:GUS 载体由本实验室于 2008 年构建, 所携带种子特异启动子来源于花生, 并已在转基因拟南芥中证明其高效的种子表达特异性(Li et al., 2009a)。

质粒小量提取试剂盒、DNA 片段回收试剂盒、Ex-Taq、dNTPs、DNA Marker、 T_4 DNA 聚合酶等均购自 TaKaRa 公司。引物合成由上海英骏生物技术有限公司(Invitrogen)完成, 测序由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

1.2 莲种子防御素基因的克隆

根据已登录的序列 (GenBank 登录号为 EF421192) 在开放读码框上下游设计引物, 其两端引入构建载体所需的 *Sma* I 和 *Sac* I 酶切位点及保护碱基, 引物序列分别为: P1: 5'-TTCCCGGGTCTATCGTCCAGTCTCAAT-3' (下划线部分为 *Sma* I 位点); P2: 5'-TAGAGCTCGGGACGTGTATGGTCATGG-3' (下划线部分为 *Sac* I 位点)。以莲种子发育中期 cDNA 文库菌液为模板。在 20 μ L 反应体系中加入 1 μ g cDNA 文库菌液作模板, 20 μ mol 引物 P1 和引物 P2 进行 PCR 扩增, 条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 65 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 后延伸 7 min。PCR 产物用 10% 琼脂糖凝胶进行电泳, 试剂盒回收目标条带并克隆到 pMD18-T vector, 再对克隆片段进行测序分析。

1.3 生物信息学分析

氨基酸序列分析利用 BLASTN 和 BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 比较得到其它植物防御素的同源序列。利用 DNAMAN5.22 软件对氨基酸序列进行同源性比对, 采用快速比对方法, 参数 gap penalty: 3, K-tuple: 1。系统进化树利用 mega 3.1 软件进行构建, 采用邻接法 (Neighbor Joining Method) 作图, 参数 Test of phylogeny: Bootstrap; Replications: 1000, Random seed; Gaps: Complete deletion; Model: Poisson correction。

蛋白多肽特性、功能结构域、电荷、分子量、等电点等预测分别使用 ExPASy 蛋白质组分析工具 (<http://www.expasy.ch/tools/>) 中的 ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 软件、SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 软件和 SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) 软件进行网上运行分析。

1.4 植物表达载体的构建

引入 *Sma* I 和 *Sac* I 酶切位点的正确克隆片段分别按图 1, A、B 方向插入植物双元表达载体 pBI121 和 pAhOleo:GUS17.8 (Li et al., 2009b) 的相应克隆位点, 替换原载体的 *GUS* 基因, 构建组成型表达载体和种子特异表达载体。连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒进行 PCR、双酶切和测序鉴定。

DNA 连接、质粒提取、酶切鉴定等参照试剂盒操作说明。转化参照分子克隆步骤完成 (Sambrook & Russell, 2001), 大肠杆菌转化使用氯化钙法, 正确表达载体按照电转化方法导入农杆菌 EHA105, 摇菌温度 28 $^{\circ}$ C。农杆菌通过菌液 PCR 进行鉴定。

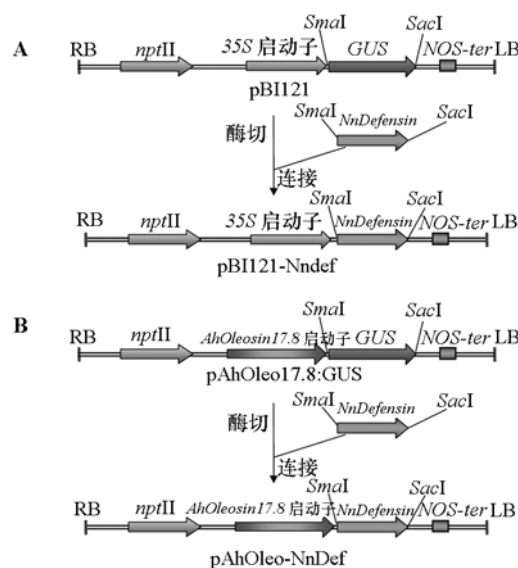


图 1 植物双元表达载体 pBI121-NnDef (A) 和 pAhOleo-NnDef (B) 的构建流程图

Fig. 1 Schematic flow of binary vector pBI121-NnDef (A) and pAhOleo-NnDef (B) construction

2 结果与分析

2.1 莲种子防御素基因及氨基酸序列分析

从莲种子发育中期胚 cDNA 文库中克隆得到防御素基因 (图 2), 全长 561 bp, GenBank 登录号为 EF421192, 命名为 *NnDefensin*, 开放读码框共 234 个碱基, 编码 77 个氨基酸残基的多肽, 该蛋

白氨基酸序列在 GenBank 上的登录号为 ABN46979。

莲种子防御素 NnDefensin 的多肽分子量为 8.36 kDa, pI 值为 8.739。NnDefensin 与目前所发现的植物防御素蛋白类似, 富含半胱氨酸 (8 个) 和精氨酸 (7 个), 呈碱性、带正电荷。使用 SignalP 软件通过神经网络算法推测出其 N 端 30 个氨基酸为信号肽序列, 剪切位点在 30 位丙氨酸和 31 位精氨酸之间, 因此预测成熟肽为 47 个氨基酸。

SOSUI 软件预测 N 端第 3 ~ 25 位为二级结构呈螺旋状的跨膜区, 说明 *NnDefensin* 基因的转录产物编码的多肽可以分为两个部分: 第一个部分是将这一多肽靶向到胞外空间的氨基酸信号肽, 另一个部分就是成熟多肽结构域。植物防御素的信号肽不仅具有帮助多肽有效靶向分泌的作用, 同时也具有缓解蛋白毒性的作用, 只在到达作用空间需要防御素发挥毒性作用的时候才将成熟多肽释放出来 (Carvalho & Gomes, 2009)。

通过 NCBI 链接 CDD 分析第 31 ~ 76 位为具有高度保守性的 γ -硫素蛋白 (γ -thionin) 超家族结构域, 该序列编码具有杀菌功能的毒素功能结构 (Pelegrini & Franco, 2005; 王汉屏, 2008; Carvalho & Gomes, 2009)。

```

1  ggccattacggccgggaagaatagatctctctctctcgctgtgtttccatatctatcgt
61  ccagtctcaatggagcgcggcatgcgtctgttttcattctctcgtcctcgtcctgtcgtt
      M E R G M R L F S S L V L V L L L
121 gtcacggccactgagatggggccaaaagtagcagaggcaaggacttgtgagtcacagagc
      V T A T E M G P K V A E A↓ R T [C] E S Q S
181 catcgttcaaggggcatgcctcagcgacaccaactgtgcattcgtctgtcaaacggag
      H R F K G A [C] L S D T N [C] A S V [C] Q T E
241 ggctttcctgcaggggattgcaaggcgcccgacgccgatgcttttgcttaaaccttgt
      G F P A G D [C] K G A R R R [C] F [C] V K P [C]
301 tagtgaatgggagaggctccatgaccatacacgtcccaggccagttaactactgctaac
      *
361 gatggtttatcggatcatcatttatcccttcagaataaaatgactcttgatgggattta
421 gtctttgttcattgactactttatgctttatcctctgatcgagttggttggtgtggtttaa
481 ttttgtgcttgacttctggttttcttggtatgataatcaagtatgtatcagccaaaaa
541 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
  
```

图 2 NnDefensin cDNA 全长与氨基酸序列分析

atg: 起始密码子; **tag:** 终止密码子; 箭头所示部位为推测的信号肽切割位点; [C]: 高度保守的 8 个半胱氨酸结构; 灰色部分示具有高度保守性的 γ -硫素蛋白 (γ -thionin) 结构域。

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences analysis of the complete cDNA of NnDefensin

atg: Start codon; **tag:** Stop codon; Arrow indicate the predicted cleavage site of signal peptide; [C]: The 8 strictly conserved cysteine residues structure; The conserved γ -thionin domain is shown in grey shade.

蛋白序列比对分析发现 (图 3), 除信号序列外, 8 种植物防御素和蛋白酶抑制剂与莲子的防御素蛋白有较高的同源性, 8 个半胱氨酸所在的位置高度保守。此外, 预测的信号肽剪切位点, 以及与半胱氨酸邻近的甘氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、谷氨酸、精氨酸、丙氨酸、天门冬酰胺等氨基酸残基的位置也非常保守。

2.2 莲种子防御素基因的克隆

以发育中期莲种子 cDNA 文库菌液为模板, 用特异引物 P1 和 P2 扩增出带有相应酶切位点的 293 bp 的 *NnDefensin* 基因片段 (图 5), 扩增产物经纯化后克隆到 pMD18-T 载体上。测序鉴定结果与设计的目的序列完全一致, 编码序列经 Blast 分析比对表明所克隆的 *NnDefensin* 基因片段与所登录的 EF421192 编码序列完全相同。

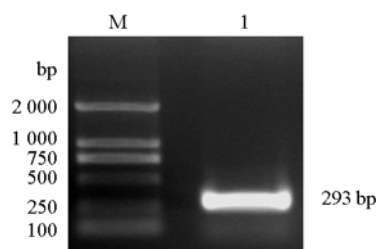


图 5 琼脂糖电泳检测 PCR 扩增产物

Fig. 5 The electrophoresis of PCR product

M: DL 2000 DNA marker.

2.3 莲种子防御素基因植物表达载体的构建

从测序正确的克隆中提取质粒, 用 *Sma* I 和 *Sac* I 切下含有编码区序列的扩增片段, 插入植物双元表达载体 pBI121 相应克隆位点成功构建组成型表达载体 pBI121-*NnDef*, 该表达载体含 35S 启动子控制目的基因、35S 启动子控制的 *Km* 筛选标记基因 (图 1, A)。

用 *Sma* I 和 *Sac* I 切下含有编码区序列的扩增片段, 插入植物双元表达载体 pAhOleo17.8 : *GUS* 相应克隆位点成功构建种子特异表达载体 pAhOleo17.8-*NnDef*, 该表达载体含 AhOleosin17.8 启动子 (Li et al., 2009a) 控制目的基因、35S 启动子控制的 *Km* 筛选标记基因 (图 1, B)。

分别挑取连接转化的克隆摇菌提取质粒, 用 P1/P2 引物 PCR 扩增。电泳检测结果表明, 阳性克隆扩增片段大小正确。分别选取 1~2 个克隆质粒进行 *Sma* I 和 *Sac* I 双酶切鉴定 (图 6), 载体 pBI121 和 pAhOleo17.8 : *GUS* 经酶切得到大小约 13 kb 的载体骨架和 1 811 bp 的 *GUS* 基因片段, 重组载体可切出 293 bp 片段, 测序检验表明 *NnDefensin* 基因片段正确插入到两个载体骨架中。分别将 pBI121-*NnDef* 和 pAhOleo17.8-*NnDef* 导入根癌农杆菌菌株 EHA105, 经 PCR 鉴定是正确的 (图 7)。

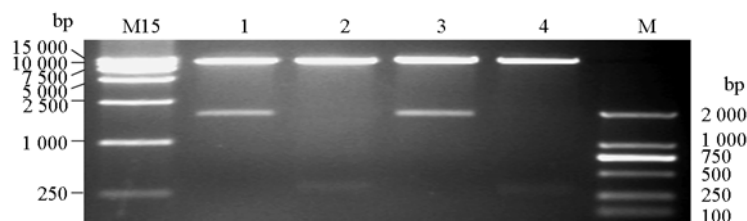


图 6 重组载体 pBI121-*NnDef* 和 pAhOleo17.8-*NnDef* 酶切鉴定结果

M15: DL 15000 DNA marker; M: DL 2000 DNA marker; 1: 载体 pBI121 *Sma* I / *Sac* I 双酶切; 2: 重组载体 pBI121-*NnDef* *Sma* I / *Sac* I 双酶切; 3: 载体 pAhOleo17.8 *Sma* I / *Sac* I 双酶切; 4: 重组载体 pAhOleo17.8-*NnDef* *Sma* I / *Sac* I 双酶切。

Fig. 6 Enzyme digestion analysis of the recombinant vectors pBI121-*NnDef* and pAhOleo17.8-*NnDef*

M15: DL 15000 DNA marker; M: DL 2000 DNA marker; 1: The enzyme digestion of pBI121 with *Sma* I / *Sac* I; 2: The enzyme digestion of pBI121-*NnDef* with *Sma* I / *Sac* I; 3: The enzyme digestion of pAhOleo17.8 with *Sma* I / *Sac* I; 4: The enzyme digestion of pAhOleo17.8-*NnDef* with *Sma* I / *Sac* I.

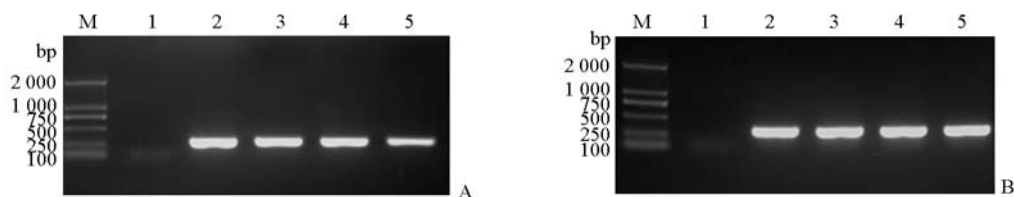


图 7 根癌农杆菌克隆 PCR 扩增检测

M: DL 2000 DNA marker; 1: 对照; A. 2~5: pBI121-*NnDef* 阳性克隆; B. 2~5: pAhOleo17.8-*NnDef* 阳性克隆。

Fig. 7 PCR identification for *A. tumefaciens* transformant

1: Negative control; A. 2~5: Positive clone containing pBI121-*NnDef*; B. 2~5: Positive clone containing AhOleo17.8-*NnDef*.

3 讨论

研究证实种子来源的防御素与其它来源的植物防御素一样具有抗细菌 (Choi et al., 2008)、抗真菌 (Finkina et al., 2008) 和蛋白酶抑制剂 (Wijiaya et al., 2000) 等生物活性, 而 γ -硫素类防御素由于其功能广泛、分子量小以及稳定等特点在植物基因工程中极具应用前景 (Pelegrini & Franco, 2005; 李鑫和侯何胜, 2008; Carvalho & Gomes, 2009)。 γ -硫素蛋白超家族毒蛋白功能区具有严格保守的 8 个半胱氨酸残基, 形成与功能相关的 4 个肽链内二硫键的三级结构, 可通过半胱氨酸分子间二硫键使肽环形成反向平行的 β 片状结构, 从而形成具有复杂三维折叠结构的抗菌短肽 (Pelegrini & Franco, 2005; Carvalho & Gomes, 2009)。 γ -硫素蛋白 C-末端的精氨酸和赖氨酸等碱性残基也是赋予其抗真菌活性的重要决定因素 (Pelegrini & Franco, 2005)。应用防御素进行植物转基因抗病已有成功的例子, 利用 35S 启动子驱动表达的山嵛菜防御素基因可使转基因马铃薯对灰霉病具有一定的抗性 (Khan et al., 2006)。Choi 等 (2008) 从未成熟大豆种子中克隆得到 γ -硫素类似基因 SE60, 将其 cDNA 与 35S 启动子连接构建植物表达载体, 转化得到转基因烟草可有效抵抗丁香假单胞菌的侵染。Anuradha 等 (2008) 将芥菜防御素基因 35S 启动子连接构建载体转化植物, 得到的转基因烟草对炭疽病和串珠镰孢霉具有明显抗性, 转基因花生对晚斑病的抗性也有所增强。

本研究中除了构建 35S 启动子驱动的 *NnDefensin* 基因的组成型表达载体外, 还构建了种子特异表达载体, Aholeosin17.8 启动子是本实验室从花生中克隆得到并已在拟南芥中证实具有很强的种子特异表达功能 (Li et al., 2009a), 利用该启动子可在转基因植物种子中高效特异地表达防御素基因。下一步试验会将 *NnDefensin* 基因转化到植物中进行表达和功能验证, 期望能够利用该基因提高转基因植物的抗病抗逆能力, 并且用于种子作物的改良, 提高种子成熟和贮藏过程的抗劣变能力, 尤其是仓储过程对霉菌和虫害的抗性。

References

- Anuradha T S, Divya K, Jami S K, Kirti P B. 2008. Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Rep*, 27: 1777 - 1786.
- Carvalho A O, Gomes V M. 2009. Plant defensins—Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, 30: 1007 - 1020.
- Chen K C, Lin C Y, Kuan C C, Sung H Y, Chen C S. 2002. A novel defensin encoded by a mungbean cDNA exhibits insecticidal activity against bruchid. *J Agri Food Chem*, 50: 7258 - 7263.
- Chen Y Y, Zhou R C, Lin X D, Wu K Q, Qian X E, Huang S Z. 2008. ISSR analysis of genetic diversity in sacred lotus cultivars. *Aquatic Botany*, 89 (3): 311 - 316.
- Choi Y, Choi Y D, Lee J S. 2008. Antimicrobial activity of c-thionin-like soybean SE60 in *E. coli* and tobacco plants. *Biochem Biophys Res Commun*, 375: 230 - 234.
- Do H M, Lee S C, Jung H W, Sohn K H, Hwang B K. 2004. Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (*CADEFI*) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. *Plant Sci*, 166: 1297 - 1305.
- Finkina E I, Shramova E I, Tagaev A A, Ovchinnikova T V. 2008. A novel defensin from the lentil *Lens culinaris* seeds. *Biochem Biophys Res Commun*, 371: 860 - 865.
- Francois I E J A, de Bolle M F C, Dwyer G, Goderis I J W M, Wouters P F J, Verhaert P D, Proost P, Schaaper W M M, Cammue B P A, Broekaert W F. 2002. Transgenic expression in *Arabidopsis* of a polypeptide construct leading to production of two different antimicrobial proteins. *Plant Physiol*, 128: 1346 - 1358.
- Games P D, dos Santos I S, Mello E O, Diz M S S, Carvalho A O, de Souza-Filho G A, Cunha M D, Vasconcelos I M, Ferreira B S, Gomes V M. 2008. Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Peptides*, 29: 2090 - 2100.

- Gao A G, Hakimi S M, Mittanck C A, Wu Y, Woerner B M, Stark D M, Shah D M, Liang J, Rommens C M T. 2000. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat Biotechnol*, 18 (12): 1307 – 1310.
- Khan R S, Nishihara M, Yamamura S, Nakamura I, Mii M. 2006. Transgenic potatoes expressing wasabi defensin peptide confer partial resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Biotech J*, 23: 179 – 183.
- Koike M, Okamoto T, Tsuda S, Imai R. 2002. A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation. *Biochem Biophys Res Commun*, 298 (1): 46 – 53.
- Lai F M, DeLong C, Mei K, Wignes T, Fobert T R. 2002. Analysis of the DRR230 family of pea defensins: Gene expression pattern and evidence of broad host-range antifungal activity. *Plant Sci*, 163: 855 – 864.
- Lay F T, Brugliera F, Anderson M A. 2003a. Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. *Plant Physiol*, 131: 1283 – 1293.
- Lay F T, Schirra H J, Scanlon M J, Anderson M A, Craik D J. 2003b. The three-dimensional solution of NaD1, a new floral defensin from *Nicotiana glauca* and its application to a homology model of the crop defense protein alfAFP. *Mol Biol*, 325: 175 – 188.
- Li C L, Wu K Q, Fu G H, Li Y, Zhong Y J, Lin X D, Zhou Y, Tian L N, Huang S Z. 2009a. Regulation of oleosin expression in developing peanut (*Arachis hypogaea* L.) embryos through nucleosome loss and histone modifications. *J Exp Bot*, 60 (15): 4371 – 4382.
- Li Ping, Sang Xian-chun, Pei Yan, He Guang-hua. 2009. Secreted expression of the recombinant defensin alfAFP (*M. sativa*) in *Pichia pastoris* and its antimicrobial activity against rice pathogens *in vitro*. *Scientia Agricultura Sinica*, 42 (3): 869 – 875. (in Chinese)
- 李 平, 桑贤春, 裴 炎, 何光华. 2009. 植物防御素基因 alfAFP (*M. sativa*) 在毕赤酵母中的分泌表达及对水稻病原菌的抑制. *中国农业科学*, 42 (3): 869 – 875.
- Li W, Qi L, Lin X D, Chen H H, Ma Z Q, Wu K Q, Huang S Z. 2009b. The expression of manganese superoxide dismutase gene from *Nelumbo nucifera* responds strongly to chilling and oxidative stresses. *J Integr Plant Biol*, 51 (3): 279 – 286.
- Li Xin, Hou He-sheng. 2008. Prediction and sequence analysis of plant defensin-like genes. *Plant Physiology Communications*, 44 (2): 229 – 234. (in Chinese)
- 李 鑫, 侯和胜. 2008. 植物类防御素基因的预测和序列分析. *植物生理学通讯*, 44 (2): 229 – 234.
- Pelegrini P B, Franco O L. 2005. Plant γ -thionins: Novel insights on the mechanisms of actions of a multi-functional class of defense proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, 37: 2239 – 2253.
- Sambrook J, Russell D W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Solis J, Medrano G, Ghislain M. 2007. Inhibitory effect of a defensin gene from the Andean crop maca (*Lepidium meyenii*) against *Phytophthora infestans*. *J Plant Physiol*, 164: 1071 – 1082.
- Wang Han-ping. 2008. Bioinformatics analysis of defensins in different plants. *Plant Physiology Communications*, 44 (1): 25 – 32. (in Chinese)
- 王汉屏. 2008. 不同植物防御素的生物信息学分析. *植物生理学通讯*, 44 (1): 25 – 32.
- Wang He-yi, Luo Qin, Wu Jun, Li Xu-feng, Yang Yi. 2007. Genetic transformation of *Sad* to rape (*Brassica napus* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Sichuan University: Natural Science Edition*, 44 (6): 1335 – 1338. (in Chinese)
- 王贺一, 罗 勤, 吴 俊, 李旭峰, 杨 毅. 2007. 农杆菌介导的白芥防御素基因对甘蓝型油菜的转化. *四川大学学报: 自然科学版*, 44 (6): 1335 – 1338.
- Wijiaya R, Neumann G M, Condon R, Hughes A B, Polya G M. 2000. Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Sci*, 159: 243 – 255.