园　艺　学　报　2012，39（7）：1285－1292　　http: // www. ahs. ac. cn
Acta Horticulturae Sinica　　E-mail: yuanyixuebao@126.com

Cry2Aa2 和 *PamPAP* 双价表达载体的构建及其对辣椒的遗传转化

高玉尧[1]，陈长明[1]，陈国菊[1]，曹必好[1]，雷建军[1,2,*]

（[1]华南农业大学园艺学院，广州 510642；[2]国家航天育种工程研究中心，广州 510642）

摘　要：为了获得既抗虫又抗病毒病，又对人体和环境安全的转基因辣椒（*Capsicum annuum* L.）材料，将启动子 CaMV35S、终止子 Nos-ter 及缺失无毒型商陆抗病毒蛋白基因 *PamPAP* 一起插入到植物表达载体 pCAMBIA1301-Cry2Aa2-PMI 的多克隆位点上，构建双价表达载体，采用农杆菌介导法将其转入辣椒中，并用 PMI/甘露糖筛选体系对转化植株筛选。经 PCR 扩增和 Southern 杂交检测，结果表明 *Cry2Aa2* 和 *PamPAP* 已经整合到辣椒基因组中。进一步经 RT-PCR 分析，证实 *Cry2Aa2* 和 *PamPAP* 在 T_0 代转基因辣椒植株中共表达。经抗虫性、抗病毒病表型鉴定：T_0 代转基因辣椒植株对黄瓜花叶病毒（CMV）和斜纹夜蛾幼虫的抗性均显著高于非转基因植株。

关键词：辣椒；PMI/甘露糖筛选体系；*Cry2Aa2*；*PamPAP*；遗传转化；抗病毒；抗虫害

中图分类号：S 641.3　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0513-353X（2012）07-1285-08

Construction of Binary Expression Vector Containing *Cry2Aa2* and *PamPAP* and Its Transfer to Pepper

GAO Yu-yao[1]，CHEN Chang-ming[1]，CHEN Guo-ju[1]，CAO Bi-hao[1]，and LEI Jian-jun[1,2,*]

（[1]*College of Horticulture*，*South China Agricultural University*，*Guangzhou* 510642，*China*；[2]*National Engineering Research Center for Space Breeding*，*Guangzhou* 510642，*China*）

Abstract：The aim of this study was to obtain transgenic pepper plants with double resistances to virus and insect that could be used in developing new pepper variety. The non-virulent defective PAP gene（*PamPAP*），CaMV35S promoter and Nos terminal were inserted into MCS of pCAMBIA1301-Cry2Aa2-PMI. *Cry2Aa2* and *PamPAP* were transferred into pepper（*Capsicum annuum* L.）mediated by *Agrobacterium tumefaciens* with PMI/Man selection system. The results of PCR and Southern blot indicated that *Cry2Aa2* and *PamPAP* had been integrated into the pepper genome. RT-PCR analysis further showed that the *Cry2Aa2* and *PamPAP* had been expressed simultaneously. In addition，resistances to virus and insect were assayed，and the results showed that the positive transgenic pepper plants had higher degree of resistances to CMV and *Prodenia litura* larva than the non-transgenic plants. This suggested that transgenic pepper plants with double resistances to virus and insect could be obtained by transferring *Cry2Aa2* and *PamPAP*.

收稿日期：2012－02－20；**修回日期**：2012－06－15

基金项目：国家‘863’计划项目（2009AA10Z104）；广东省重大科技专项（2010A020102001）

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

Key words：pepper；PMI/Man system；*Cry2Aa2*；*PamPAP*；genetic transformation；resistance to virus；resistance to insect

辣椒（*Capsicum annuum* L.）的病虫害常给生产造成重大的经济损失（马艳青，1998；谭洁和巩振辉，2008）。分子育种为防治病虫害开辟了新途径。

商陆抗病毒蛋白（pokeweed antiviral proteins，PAP）是商陆属（*Phytolacca*）植物的不同组织不同生长阶段合成的一类具有酶功能的碱性蛋白，属于Ⅰ型核糖体失活蛋白（Irivin，1975），能够抑制蛋白合成，对动物和植物均有广谱的抗病毒作用（Zarling et al.，1990；Chen et al.，1991）。研究最多的是利用 C－端缺失的 PAP 基因来培育抗病品种（Tumer et al.，1997）。Lodge 等（1993）将 C－端缺失一部分的 PAP 基因转入烟草时发现对黄瓜花叶病毒（CMV）、烟草花叶病毒（TMV）、马铃薯 X 病毒（PVX）、马铃薯 Y 病毒（PVY）等病毒具有明显的抗性，且植株能生长正常。据报道，目前已经在马铃薯（Moon et al.，1997）、百合（王进忠 等，2005）、烟草（王燕萍 等，2006）、芥菜（赵爽 等，2008）、辣椒（陈国菊 等，2008）等植物中转入了缺失无毒型的 PAP 基因，并且都获得了对病毒病具有明显抗性的转基因植株。

苏云金芽孢杆菌在芽孢形成过程中会产生晶体蛋白，常被称为杀虫晶体蛋白（ICP）、δ－内毒素或苏云金芽孢杆菌毒蛋白（Bt toxic protein）。这种蛋白对鳞翅目、鞘翅目等多种农作物害虫具有特异性的毒杀作用，而对人、畜等无害（罗科 等，1995）。Bt 基因是目前应用最广泛的抗虫基因，已成功用于各种蔬菜的抗虫研究，主要有茄子（Chen et al.，1995）、花椰菜（Kuvshinov et al.，2001）、甘蓝（Cao et al.，2005）、洋葱（Zheng et al.，2005）、青花菜（李汉霞 等，2010）等，但是将 Bt 基因和无毒型 PAP 基因同时转入辣椒的研究还没有报道。

本研究中将缺失无毒型商陆抗病毒蛋白基因 *PamPAP* 克隆到含有 Bt 抗虫基因 *Cry2Aa2* 和对生物安全的非抗性筛选基因 *pmi* 的植物表达载体上，利用农杆菌介导法将其转入辣椒中，以期利用双价基因产物的协同作用克服单基因在育种中的缺点，从而获得抗虫、抗病毒病，同时又对人体和环境安全的转基因辣椒材料。

1 材料与方法

1.1 材料

美洲商陆和辣椒品种Ⅰ、Ⅱ（分别是‘华椒 5 号’的母本和父本）均由本实验室保存；试验于 2010 年 3 月—2012 年 1 月期间在华南农业大学园艺学院生物技术实验室完成；大肠杆菌 DH5α（*Escherichia coli*）、农杆菌 EHA105（*Agrobacterium tumefaciens*）及植物表达载体 pCAMBIA1301-Cry2Aa2-PMI 和 pBI121-PamPAP 均由本实验室保存；黄瓜花叶病毒（CMV）和斜纹夜蛾幼虫均由华南农业大学资源环境学院提供；*Taq*DNA 聚合酶、dNTP、DNA Marker、各种限制性内切酶、RNA 酶、pMD19-T 连接试剂盒购自 TaKaRa 公司；质粒提取试剂盒、DNA 回收试剂盒购自上海生物工程技术有限公司。

1.2 引物的设计及双价表达载体的构建

根据 Lin 等（1991）文献发表的 *PamPAP* cDNA 序列，设计 N、C 端缺失型 PAP 基因特异引物，并在引物两端分别引入 *Xba*Ⅰ和 *Bam*HⅠ的酶切位点，该引物序列由上海生物工程有限公司合成。正向引物 P1：5′-CCTCTAGAGTGAATACAATCATCTACAA-3′；反向引物 P2：5′-AAGGATCCTCACCACTTGGCACCACTGG-3′。在 GenBank 中检索已发表的 *Cry2Aa2* 序列，设计特异性引物，由上海

生物工程有限公司合成。正向引物 C1：5′-CATGCCATGGAACTAGATATTTAAGGAGG-3′；反向引物 C2：5′-CGGGTTACCTTAATAAAGTGGTGGAAGA-3′。

用 *Eco*RⅠ和 *Hin*dⅢ同时对载体 pBI121-PamPAP 和 pCAMBIA1301-Cry2Aa2-PMI 进行双酶切，分别回收后进行连接、转化及菌落 PCR 检测，然后再用 *Eco*RⅠ和 *Hin*dⅢ及 *Bam*HⅠ和 *Xba*Ⅰ两组限制性内切酶分别进行双酶切鉴定，获得的阳性转化子即为最终的植物双价表达载体。

最后将双价表达载体转化到感受态根癌农杆菌菌株 EHA105 中，并涂布在含有链霉素和卡那霉素的 YEB 平板上，待单菌落长出后，挑取单菌落进行 PCR 初步检测。然后再抽提重组质粒，再次对目的基因进行 PCR 鉴定，将获得的阳性克隆保存在－70 ℃下，准备用于下一步对辣椒的遗传转化。

1.3　农杆菌介导的辣椒遗传转化

用播种后 9 ~ 12 d 的辣椒无菌苗制备外植体（将无菌苗的一侧子叶从叶柄基部连同顶芽及周围分生组织全部切去，只留一侧子叶）。首先将外植体在黑暗中预培养 2 ~ 3 d，预培养基为 MS + 6-BA 5.0 mg · L^{-1} + IAA 1.0 mg · L^{-1} + GA_3 0.5 mg · L^{-1} + $AgNO_3$ 5.0 mg · L^{-1} + 蔗糖 30 g · L^{-1}。接着将外植体放入 OD_{600} 值为 0.4 ~ 0.8 的农杆菌菌液中浸染 12 min，共培养 2 ~ 3 d 后将其转入抑菌培养基（预培养基 + Cef 200 mg · L^{-1}）。抑菌 4 ~ 5 d 后转接入分化筛选培养基（MS + 6-BA 5.0 mg · L^{-1} + IAA 1.0 mg · L^{-1} + Cef 200 mg · L^{-1} + 甘露糖 18 g · L^{-1} + 蔗糖 12 g · L^{-1} + $AgNO_3$ 5.0 mg · L^{-1} + 椰乳 5%），每两周继代 1 次。然后将外植体转接到伸长培养基（MS + ZT 1.0 mg · L^{-1} + IAA 1.0 mg · L^{-1} + Cef 200 mg · L^{-1} + 甘露糖 18 g · L^{-1} + 蔗糖 12 g · L^{-1} + $AgNO_3$ 3.0 mg · L^{-1} + GA_3 1.5 mg · L^{-1} + 椰乳 5%），每两周继代 1 次。继代 2 次后将长达 1.5 cm 以上的不定芽从外植体上切下，插入生根培养基（MS + NAA 0.2 mg · L^{-1} + IAA 0.1 mg · L^{-1} + Cef 200 mg · L^{-1} + 甘露糖 18 g · L^{-1} + 蔗糖 12 g · L^{-1}）。当根长至 1.5 cm 左右、数量达到 4 ~ 5 根时，开瓶盖炼苗 2 ~ 3 d，最后移至装有高压灭菌的珍珠岩和泥炭土混合营养钵或花盆中。

1.4　T_0 代转基因植株的分子检测

提取Ⅰ和Ⅱ两个品种的 T_0 代转基因植株叶片基因组 DNA，以质粒 DNA 为阳性对照，未转化的再生植株叶片 DNA 为阴性对照，用 *PamPAP* 和 *Cry2Aa2* 的特异性引物分别进行 PCR 检测。

用 *Eco*RⅠ限制性内切酶对 PCR 检测呈阳性植株的基因组 DNA 进行酶切、电泳、转膜，并以 *pmi* 为探针，采用特异引物法标记进行 Southern 杂交，洗膜后进行曝光、显影和定影。

提取 PCR 检测呈阳性植株的 RNA，进一步对目的基因 *PamPAP* 和 *Cry2Aa2* 进行 RT-PCR 检测，根据扩增的目的条带来判断外源基因在转录水平上的表达情况。

1.5　T_0 代转基因植株的抗病毒性检测和抗虫活性检测

取表现出明显 CMV 症状的香蕉叶片 1 g，用研钵捣碎，加入 10 mL 接种缓冲液，4 000 r · min^{-1} 离心 5 min，取上清液，采用摩擦接种法接种于Ⅰ和Ⅱ两个品种的 T_0 代幼苗顶部 2 片平展叶片上，以非转基因植株作为对照。为防止接种造成的误差，首次接种 3 d 后进行第 2 次接种。接种后放在温度为 25 ℃左右的防虫网室中培养，调查 50 d 内植株病毒病的发病情况并进行单株病情分级（李树德，1995）。

将Ⅰ和Ⅱ两个品种的 T_0 代植株叶片和对照植株叶片放入平皿中，并用挡板隔开，叶柄基部用湿润棉球包好，保持叶片青鲜。每片叶放入 8 头 3 龄斜纹夜蛾幼虫（平均单虫质量为 26.28 mg），用胶布将平皿封好防止幼虫爬失，置于室温 28 ℃条件下。重复 3 次，统计 5 d 内幼虫死亡及活虫体重变化情况。校正幼虫死亡率（%）=（处理死亡率－对照死亡率）/（1－对照死亡率）× 100。叶片损

害程度分级：Ⅰ级，叶片受损面积 < 10%；Ⅱ级，叶片受损面积 10% ~ 25%；Ⅲ级，叶片受损面积 25% ~ 50%；Ⅳ级，叶片受损面积 > 50%；

2　结果与分析

2.1　双价表达载体的构建

用 *Eco*RⅠ和 *Hin*d Ⅲ同时对载体 pBI121-PamPAP 和 pCAMBIA1301-Cry2Aa2-PMI 进行酶切，分别回收后进行连接、转化。待菌落长出后，对目的基因 *PamPAP* 进行菌液 PCR 检测，结果扩增出预期大小的目的条带，约为 750 bp（图 1，A）。提取重组质粒进一步用 *Hin*d Ⅲ和 *Eco*RⅠ及 *Bam*HⅠ和 *Xba*Ⅰ两组酶进行双酶切鉴定，分别得到了约 750 bp（图 1，B）和 3 000 bp（图 1，C）的目的片段。送去测序并在 NCBI 上进行 BLAST 比对，结果与 Lin 等（1991）发表的 *PamPAP* cDNA 序列同源率达到 99%，说明含有目的基因 *PamPAP* 的表达盒已成功插入到 pCAMBIA1301-Cry2Aa2-PMI 中，将其命名为 pCAMBIA1301-Cry2Aa2-PamPAP-PMI。

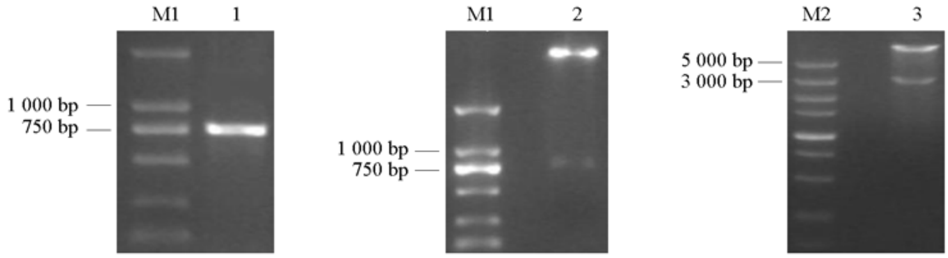

图 1　*PamPAP* 的 PCR 扩增及表达载体的酶切鉴定

M1：DL2000 plus marker；M2：DL5000 plus marker；1：*PamPAP* 的 PCR 扩增产物；

2：*Bam*HⅠ和 *Xba*Ⅰ双酶切表达载体；3：*Hin*d Ⅲ和 *Eco*RⅠ双酶切表达载体。

Fig. 1　PCR amplification for *PamPAP* and identification of expression vector by digestion

M1：DL2000 plus marker；M2：DL5000 plus marker；1：The amplicons of *PamPAP*；

2：Expression vector digested with *Bam*HⅠand *Xba*Ⅰ；3：Expression vector digested with *Hin*d Ⅲ and *Eco*RⅠ.

2.2　转基因植株的获得

用 *PamPAP* 和 *Cry2Aa2* 的特异性引物对 60 株通过 PMI/甘露糖筛选体系获得的转基因植株进行 PCR 检测，结果有 10 株（序号 1 ~ 5 为品种Ⅰ；6 ~ 10 为品种Ⅱ）能同时扩增出约为 750 bp（图 2，A）和 1 900 bp（图 2，B）的目的条带，PCR 检测阳性率为 16.7%。

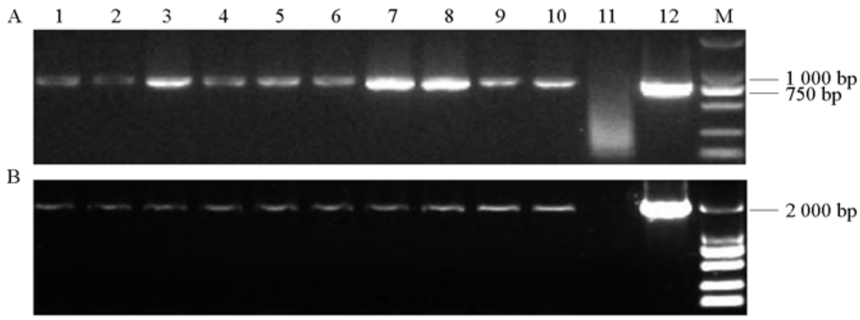

图 2　转基因植株 *PamPAP*（A）和 *Cry2Aa2*（B）的 PCR 检测

M：DL2000 plus marker；1 ~ 10：转基因植株；11：阴性对照；12：阳性对照。

Fig. 2　PCR amplification for *PamPAP*（A）and *Cry2Aa2*（B）from transgenic plants

M：DL2000 plus marker；1 – 10：Transgenic plants；11：Negative control；12：Positive control.

以 *pmi* 为探针，以质粒 DNA 为阳性对照，以非转化植株作为阴性对照，对 PCR 检测呈阳性的部分植株进行 Southern 杂交检测，结果检测的转基因植株（序号 1 为品种Ⅰ；2 为品种Ⅱ）均有明显的杂交信号（图 3）。这说明 *PamPAP* 和 *Cry2Aa2* 已经成功整合到辣椒植株的基因组 DNA 中。

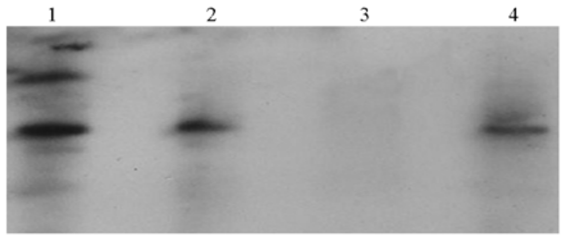

图 3　Southern 杂交检测

1、2：PCR 检测为阳性的转化体植株；3：阴性对照；4：阳性对照。

Fig. 3　Southern blotting

1，2：PCR positive transgenic plants；3：Negative control；4：Positive control.

再对 PCR 检测呈阳性的辣椒植株进行 RT-PCR 检测，结果 10 株（序号 1 ~ 5 为品种Ⅰ；6 ~ 10 为品种Ⅱ）均能扩增出约为 750 bp（图 4，A）和 1 900 bp 目的条带（图 4，B），说明外源基因 *PamPAP* 和 *Cry2Aa2* 在转录水平上发生了共表达。

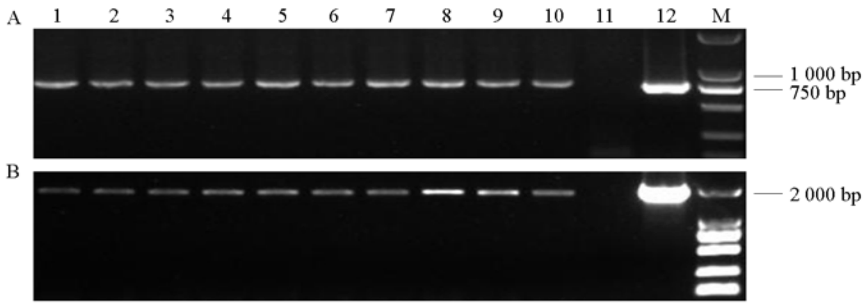

图 4　转基因植株 *PamPAP*（A）和 *Cry2Aa2*（B）的 RT-PCR 检测

M：DL2000 plus marker；1 ~ 10：转基因植株；11：阴性对照；12：阳性对照。

Fig. 4　RT-PCR amplification for *PamPAP*（A）and *Cry2Aa2*（B）from transgenic plants

M：DL2000 plus marker；1 – 10：Transgenic plants；11：Negative control；12：Positive control.

2.3　T_0 代转基因植株对病毒的抗性

对 RT-PCR 检测呈阳性的 10 株（品种Ⅰ和Ⅱ分别为 5 株）T_0 代转基因植株进行人工接种 CMV。接种 10 d 后，非转基因植株嫩叶出现轻微花叶（图 5，A）；转基因植株叶片正常（图 5，B）；30 d 时，非转基因植株中上部叶片出现花叶，部分叶片变形或明显皱缩（图 5，C），植株矮化（图 5，D）；部分转基因植株嫩叶开始有轻微花叶症状（图 5，E）；50 d 时，非转基因植株花叶严重（图 5，H），出现畸形、蕨叶、反卷（图 5，I），植株严重矮化（图 5，F）；部分转基因植株上部叶片出现花叶，但植株生长正常（图 5，G）。未接种 CMV 的非转基因植株生长正常。

统计 50 d 时植株的发病情况（表 1）：品种Ⅰ和Ⅱ中，接种 CMV 的转基因植株发病株数分别为 3 株和 2 株；而接种 CMV 的非转基因植株全部发病；未接种 CMV 的非转基因植株无发病症状。品种Ⅰ和Ⅱ中接种 CMV 的转基因植株病情指数分别为 15.6 和 13.3；而接种 CMV 的非转基因植株病情指数分别为 82.2 和 86.7。这初步表明转基因植株对 CMV 具有明显的抗性，抗病类型表现为抗病。

图 5 非转基因植株（A、C、D、F、H、I）和转基因植株（B、E、G）接种 CMV 的抗病情况

Fig. 5 Non-transgenic plants（A，C，D，F，H，I）and transgenic plants（B，E，G）resistant to CMV

表 1 转基因植株对 CMV 的抗性分析（50 d）

Table 1 CMV resistance analysis of transgenic plants（50 d）

品种 Variety	处理 Treatment		总株数（病株数） Total number（Disease）	病情指数 Disease index	抗病类型 Resistance type
	CMV	转基因 Transgenic			
Ⅰ	接种 Inoculation	转基因 Transgenic	5（3）	15.6	抗病 Resistance
	接种 Inoculation	非转基因 Non-transgenic	5（5）	82.2	感病 Susceptible
	未接种 Without inoculation	非转基因 Non-transgenic	5（0）	0	–
Ⅱ	接种 Inoculation	转基因 Transgenic	5（2）	13.3	抗病 Resistance
	接种 Inoculation	非转基因 Non-transgenic	5（5）	86.7	感病 Susceptible
	未接种 Without inoculation	非转基因 Non-transgenic	5（0）	0	–

2.4 T_0 代转基因植株抗虫性检测

用 RT-PCR 检测呈阳性的 10 株（序号 1 ~ 5 为品种Ⅰ；6 ~ 10 为品种Ⅱ）T_0 代转基因植株叶片进行抗虫试验，非转基因植株叶片作为阴性对照。统计 5 d 内植株的抗虫情况（表 2）：斜纹夜蛾幼虫对非转基因植株叶片取食量大，活虫平均质量在明显上升，叶片受损程度严重（图 6）；而对转基因植株叶片表现出拒食现象，活虫平均质量明显下降，校正死亡率最高超过 86.9%，叶片受损程度较轻（图 6），最高为Ⅱ级。结果说明：所获得的大部分 T_0 代转基因植株对斜纹夜蛾幼虫具有明显的抗性，其中 2 株（序号 2、9）表现出极高抗性。

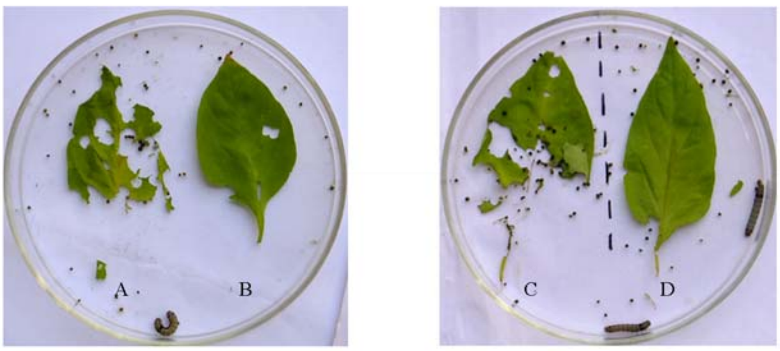

图 6 斜纹夜蛾幼虫取食非转基因（A、C）和转基因（B、D）植株叶片情况

Fig. 6 Symptoms of non-transgenic leaves（A，C）and transgenic leaves（B，D）by *Prodenia litura* larva feeding

表 2　转基因植株叶片的抗虫性分析

Table 2　Insect resistance tests of leaves from transgenic plant

植株编号 No. of lines	校正死亡率/% Corrected mortality	活虫平均质量/mg Average weight of survived larva	叶片受损程度 Damage of leaves
1	56.6 ± 3.62 b	22.07	Ⅰ
2	86.9 ± 0.60 c	18.14	Ⅰ
3	65.5 ± 7.81 b	20.61	Ⅰ
4	51.8 ± 5.74 b	23.23	Ⅱ
5	56.6 ± 3.62 b	21.84	Ⅰ
6	51.8 ± 5.74 b	23.72	Ⅱ
7	57.1 ± 7.14 b	21.21	Ⅰ
8	34.5 ± 2.98 a	25.06	Ⅱ
9	82.7 ± 3.90 c	19.20	Ⅰ
10	56.6 ± 3.62 b	21.93	Ⅰ
非转基因（对照）　Non-transgenic（control）	0	29.98	Ⅳ

注：不同字母表示在 0.05 水平差异显著。

Note：Within the same column followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$ level.

3　讨论

PMI/甘露糖筛选体系是以大肠杆菌磷酸甘露糖异构酶基因 *pmi* 作为筛选基因，甘露糖为筛选剂进行筛选的。与除草剂及抗生素抗性基因相比，这一新型的筛选系统对人体和环境安全（Reed et al.，2001），筛选试剂价格低廉，不影响转化植株的生长发育，而且鉴定方法快速简便，筛选效率较高。目前该体系已成功用于甜橙、拟南芥、玉米、小麦、水稻、木薯等植物的遗传转化（Bříza et al.，2008）。

本研究中将含有 *PamPAP* 和 *Cry2Aa2* 的植物双价表达载体转化辣椒后，利用 PMI/甘露糖筛选体系进行筛选，获得了 60 株转基因植株。但是在 PCR 检测时发现约 40%为 *Cry2Aa2* 阳性植株，同时含有 *Cry2Aa2* 和 *PamPAP* 的阳性植株仅有 10 株。推测可能是携带双基因的 T-DNA 片段整合进入辣椒基因组时，*PamPAP* 被剪切或发生了重组，具体原因仍在分析之中。另外，PCR 检测的转基因植株中，阳性植株较少，而假阳性植株较多。推测可能是利用 PMI/甘露糖筛选体系筛选转基因植株时，每一个辣椒品种或者是同一个辣椒品种不同类型外植体对甘露糖与蔗糖的筛选浓度（18 $g \cdot L^{-1}$: 12 $g \cdot L^{-1}$）要求不同。Kim 等（2002）研究表明，即使是同一辣椒品种不同基因型的甘露糖筛选浓度的差别也比较大。因此，选择合适的甘露糖与蔗糖的筛选浓度是十分重要的，不仅可以提高筛选阳性植株的比率，加快试验进度，还可以节省经费，减少工作量。

References

Bříza J，Pavingerová D，Přikrylová P，Gazdova J，Vlasak J，Niedermeierova H. 2008. Use of phosphomannose isomerase-based selection system for *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato and potato. Biologia Plantarum，52：453－461.

Cao J，Shelton A M，Earle E D. 2005. Development of transgenic collards expressing a *Cry*I Ac or *Cry*I C Bt gene for control of the diamondback moth. Crop Protection，(24)：804－813.

Chen Guo-ju，Shi Li，Lei Jian-jun，Cao Bi-hao，Zeng Guo-ping. 2008. Cloning of pokeweed antiviral protein gene from *Phytolacca acinosa* and its transfer to pepper（*Capsicum annuum* L.）. Acta Horticulturae Sinica，35 (6)：847－852. (in Chinese)

陈国菊，石　丽，雷建军，曹必好，曾国平. 2008. 中国商陆抗病毒蛋白基因的克隆及其转化辣椒. 园艺学报，35 (6)：847－852.

Chen Q，Jelenkovic G，Chin C K，Billings S，Eherhardt J，Goffreda J C. 1995. Transfer and transcriptional expression of coleopteran *cryIIIB* endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* in eggplant. Joumal of the American Society for Horticultural Science，120 (6)：921－927.

Chen Z C，White R F，Antoniw J F，Lin Q. 1991. Effect of pokeweed antiviral protein（PAP）on the infection of plant virus. Plant Pathology，40：612－620.

Irivin J D. 1975. Purification and patial charatcterization of the antiviral protein from *Phytoacca americana* which inhibits eukaryotic protein synthesis. Arch Biochem Biophys，169：522 – 528.

Kim J Y，Min J，Kim H S，Lee Y H，Choi S H，Lim Y P，Min B W，Yang S G，Harn C H. 2002. A new selection system for pepper regeneration by mannose. Plant Biotechnology，4：129 – 134.

Kuvshinov V，Koivu K，Karnerva A. 2001. Transgenic crop plants expressing synthetic *cry*9Ab gene are protected against insect damage. Plant Science，(160)：341 – 353.

Li Han-xia，Zhang Xiao-hui，Fu Xue-lin，Zhang Yu-yang，Zhang Jun-hong，Wang Tao-tao，Ye Zhi-biao. 2010. Two different *Bacillus thuringiensis* toxin genes confer resistance to diamondback moth and cabbage worm in transgenic broccoli. Journal of Agricultural Biotechnology，(4)：654 – 662. (in Chinese)

李汉霞，张晓辉，付雪林，张余洋，张俊红，王涛涛，叶志彪. 2010. 双 Bt 基因提高青花菜对菜粉蝶和小菜蛾抗性. 农业生物技术学报，(4)：654 – 662.

Li Shu-de. 1995. Advances in main vegetable crops breeding for diseases resistance in China. Beijing：Science Press：514 – 518，559 – 560. (in Chinese)

李树德. 1995. 中国主要蔬菜抗病育种进展. 北京：科学出版社：514 – 518，559 – 560.

Lin Q，Chen Z C，Antoniw J F，White R F. 1991. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the antiviral protein from *Phytolacca americana*. Plant Mol Biol，17：609 – 614.

Lodge J K，Kaniewski W K，Tumer N E. 1993. Broad spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. Proc Natl Acad Sci USA，90：7089 – 7093.

Luo Ke，Zhang Qing-wen，Cai Qing-nian. 1995. A review in Bacwus thringiensis insecticidal crystal protein：Gene property，diversity and regulation. Journal of Agricultural Biotechnology，3 (3)：15 – 24. (in Chinese)

罗 科，张青文，蔡青年. 1995. 苏云金杆菌的杀虫蛋白质和基因的结构、特点、分化及调控的研究进展. 农业生物技术学报，3 (3)：15 – 24.

Ma Yan-qing. 1998. Prospect and advance on the breeding of pepper in China. Journal of Changjiang Vegetables，(3)：1 – 4. (in Chinese)

马艳青. 1998. 我国辣椒育种进展与前景. 长江蔬菜，(3)：1 – 4.

Moon Y H，Song S K，Choi K W. 1997. Expression of a cDNA encoding *Phytolacca* insularis antiviral protein confers virus resistance on transgenic potato plants. Mol Cells，7：807 – 815.

Reed J，Privalle L，Powell M L，Meghji M，Dawson J，Dunder E，Suttie J，Wenck A，Launis K，Kramer C，Chang Yin-Fu，Hansen G，Eright M. 2001. Phosphomannose isomerase：An efficient selectable marker for plant transformation. In Vitro Cell Dev Boil Plant，37：127 – 132.

Tan Jie，Gong Zhen-hui. 2008. The genetic transformation of *Capsicum annuum* L. with the Nicotiana Protein Kinase（NPKI）. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica，17 (3)：267 – 270. (in Chinese)

谭 洁，巩振辉. 2008. 农杆菌介导的 NPKI 基因转化辣椒的研究. 西北农业学报，17 (3)：267 – 270.

Tumer N E，Hwang D J，Bonness M. 1997. C-terminal deletion mutant of pokeweed antiviral protein inhibit viral infection but does not depurinate host ribosomes. Proc Natl Sci USA，94：3866 – 3871.

Wang Jin-zhong，Wang Yan-jun，Wang Xi-feng，Zhang Min-zhao，Gao Xia-hong，Sun Shu-ling，Zhou Guang-he. 2005. Expression of pokeweed antiviral protein gene in the callus of *Lilium longiflorum* by *Agrobacterium*-mediated transformation. Acta Agriculturae Boreali Sinica，20 (6)：77 – 79. (in Chinese)

王进忠，王彦珺，王锡锋，张民照，高遐虹，孙淑玲，周广和. 2005. 商陆抗病毒蛋白基因在麝香百合中的转化和表达. 华北农学报，20 (6)：77 – 79.

Wang Yan-ping，Cao Jun-jian，Liu Hai-jiao，Cui Hong. 2006. The cDNA cloning of pokeweed antiviral protein gene and research on gene-transforming tobacco. Journal of Henan Agricultural University，40 (2)：130 – 132，141. (in Chinese)

王燕萍，曹俊剑，刘海礁，崔 红. 2006. PAP 基因 cDNA 克隆及烟草转基因研究. 河南农业大学学报，40 (2)：130 – 132，141.

Zarling J M，Moran P A，HaffarO Sias J，Ledbetter J，Uckun F. 1990. Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to $CD4^+$ cells by monoclonal antibodies. Nature，347：92 – 95.

Zhao Shuang，Lei Jian-jun，Chen Guo-ju，Cao Bi-hao. 2008. Obtainment of transgenic mustard（*Brassica juncea* Coss.）with pokeweed antiviral protein gene and its resistance to TuMV. Journal of Agricultural Biotechnology，16 (6)：971 – 976. (in Chinese)

赵 爽，雷建军，陈国菊，曹必好. 2008. 商陆抗病毒蛋白基因转化芥菜的获得及抗性研究. 农业生物技术学报，16 (6)：971 – 976.

Zheng S J，Henken B，Maagd R，Purwito A，Krens F，Kik C. 2005. Two different *Bacillus thuringiensis* toxin genes confer resistance to beet armyworm（*Spodoptera exigua* Hubner）in transgenic *Bt*-shallots（*Allium cepa* L.）. Transgenic Research，14 (3)：261 – 272.