

# 辣椒 *CaSn* 基因超表达增强转基因烟草对南方根结线虫的抗性

张文玥<sup>1</sup>, 茆振川<sup>1,\*</sup>, 沈宝明<sup>1,2</sup>, 王 刚<sup>1</sup>, 姚玉荣<sup>1</sup>, 冯东昕<sup>1</sup>, 谢丙炎<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100081; <sup>2</sup>湖南农业大学植物保护学院, 长沙 410007)

**摘 要:** *CaSn* 基因是在辣椒 (*Capsicum annuum*) ‘Santaka’ 中发现的新型抗菌肽 Snakin 家族基因。通过 RT-PCR, 将 *CaSn* 基因从辣椒中分离并构建到 pBI-121 植物表达载体, 通过农杆菌 EHA105 介导转化白肋烟 (*Nicotiana tabacum* ‘White burley’), 筛选到 10 个独立的转基因株系, 并对 T1 代植株进行抗南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*) 鉴定及靶标基因表达分析。结果表明 *CaSn* 已转入白肋烟, 能够进行超量表达, 并且转 *CaSn* 基因白肋烟上的根结数量比转空载体对照和非转基因对照减少 70%, 同时不同转基因烟草株系间对南方根结线虫的抗性也存在一定差别。通过试验证明了辣椒中的抗菌肽基因 *CaSn* 具有抗南方根结线虫作用, 对于植物抗线虫资源的挖掘及利用提供了重要理论依据。

**关键词:** 辣椒; Snakin; 转基因超表达; 南方根结线虫; 抗性鉴定

**中图分类号:** S 641.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2014) 01-0080-09

## Overexpression of Pepper *CaSn* Gene Enhances Resistance to *Meloidogyne incognita* in Transgenic Plants

ZHANG Wen-yue<sup>1</sup>, MAO Zhen-chuan<sup>1,\*</sup>, SHEN Bao-ming<sup>1,2</sup>, WANG Gang<sup>1</sup>, YAO Yu-rong<sup>1</sup>, FENG Dong-xin<sup>1</sup>, and XIE Bing-yan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Horticultural Crops Biology and Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; <sup>2</sup>Hunan Agricultural University, Changsha 410007, China)

**Abstract:** The *CaSn* gene is a small cysteine-rich antimicrobial peptide encoding gene and belongs to the snakin family. The gene was cloned from pepper (*Capsicum annuum* ‘Santaka’) by RT-PCR and constructed to the plant expression vector pBI-121, and transformed into burley tobacco via agrobacterium mediated method. The *CaSn* transgenic plants were selected by PCR and GUS staining analyses, and ten independent transgenic tobacco plants had been obtained. The *CaSn* gene was stably inherited and overexpressed in transgenic T1 generation plants by RT-qPCR detection. Compared to the empty vector control and non-transgenic control plants, the number of the root-knots in the transgenic plants was reduced by 70%. Meanwhile, difference was also shown in 10 independent transgenic lines in terms of

**收稿日期:** 2013-07-09; **修回日期:** 2013-11-18

**基金项目:** 国家重点基础研究发展计划项目 (2009CB119000); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201103018); 国家自然科学基金项目 (30971905); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-25-B01)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: maozhenchuan@caas.cn)

their resistance to root-knot nematodes. This study indicated that the *CaSn* participated in defense against root-knot nematodes, and had an important role in excavating and utilization of nematodes-resistant germplasms of plants.

**Key words:** pepper; Snakin; transgenic overexpression; *Meloidogyne incognita*; resistance identification

采用抗根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 基因是防治植物寄生性线虫根结线虫的高效措施, 但是面临着线虫毒性种群分化导致抗性极易丧失等问题。现在抗 *Mi* 及 *Me* 基因的毒性线虫已经在世界范围内有报道 (Eddaoudi et al., 1997; 刘维志和段玉玺, 2000; Ornat et al., 2001; Abad et al., 2008)。

植物为了自我保护, 自身进化出许多防卫反应的机制, 其中就有合成具有抗真菌活性的低分子量的肽段 (Selitrennikoff, 2001)。现已发现了超过 500 种抗菌肽 (Antimicrobial protein AMP), 它们在抵抗病原体侵染中起到了重要作用 (Lopez-Solanilla et al., 2003)。在茄科的多种植物中常发现高水平的蛋白抑制剂 (Kim et al., 2009), 这些蛋白抑制剂包括硫堇类物质 (thionons)、脂质转移蛋白 (lipid transfer proteins)、Snakins (Silverstein et al., 2007)。其中 Snakin 家族是一个新的 AMP 家族, 根据其氨基酸结构, Snakin 家族分为 I、II、III 亚家族 (Berrocal-Lobo et al., 2002)。其中从马铃薯中分离出的 Snakin-1 (SN1) 和 Snakin-2 (SN2) 都属于 Snakin 家族 (Almasia et al., 2008), 并具有抗细菌和真菌的活性 (Segura et al., 1999; Almasia et al., 2008)。CaSnakin 蛋白是在抗性辣椒 (*Capsicum annuum*) ‘Santaka’ 中发现的一段富含半胱氨酸的短肽, 含有 6 个二硫键稳定其结构, 符合 Snakin 家族的分子结构特征 (Berrocal-Lobo et al., 2002)。VIGS 试验证实通过敲除抗根结线虫辣椒中的 *CaSn* 基因, 根结线虫的数量显著增加 (Mao et al., 2011)。基于辣椒 *CaSn* 基因, 作者分离并构建了该基因的表达载体 pBI-CaSn, 通过农杆菌介导转入到白肋烟中, 获得超表达 *CaSn* 株系, 并对转基因烟草进行抗南方根结线虫鉴定, 以验证 *CaSn* 基因功能, 并为新型转基因抗线虫新品种培育提供重要的基因来源和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

辣椒 (*Capsicum annuum*) 抗线虫品种 ‘Santaka’, 含有抗线虫基因 *N* 基因, 由中国农业科学院蔬菜花卉研究所辣椒组惠赠。南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*), 白肋烟 (*Nicotiana tabacum* ‘White burley’), 保存于中国农业科学院蔬菜花卉研究所病害组。南方根结线虫为生理小种 1, 利用单卵块繁殖方式在温室的 ‘茄门’ 甜椒 (*Capsicum annuum* L.) 上扩繁, 挑取成熟线虫卵块在无菌水中 28 °C 条件下孵化, 收集 2 龄幼虫 (茆振川 等, 2007), 调整线虫悬浮液浓度至 1 000 条 · mL<sup>-1</sup>, 用于对线虫的抗性鉴定。

### 1.2 *CaSn* 基因的克隆及超表达载体的构建

采用 Trizol (Invitrogen) 法提取 ‘Santaka’ 辣椒叶片组织的总 RNA, 采用 Trans Script II One-Step gDNA Removal 和 cDNA Synthesis SuperMix 进行反转录合成 cDNA (Transgen)。根据辣椒 *CaSn* 基因序列设计特异引物 GSP1、GSP2 (Mao et al., 2011) (表 1), 从抗根结线虫辣椒 ‘Santaka’ 中克隆到 *CaSn* 基因 cDNA 水平上的 ORF, 并进行测序检测验证。设计两端带有 *Xba* I, *Sma* I 酶切位点的特异引物 CasneF、CasneR (表 1), 通过该引物克隆到 pBI-121 表达载体上, 构建 PBI-CaSn 双元表达载体, 电击转化到农杆菌 EHA105 菌株。

表 1 本试验中所用的引物序列

Table 1 Some primer sequences in experiments

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence (5' - 3')
GSP1	TGCGTCTGTTGCCGTGAGTA
GSP2	TCAGCGAGGTGCCGATTA
CasneF	GACTCTAG <u>A</u> ATGGCCATCTCTAAAGC
CasneR	CCACCCGGGATT <u>T</u> TAAGGGCATTTCG
NPT II F	ATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGG
NPT II R	TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGAT
Casn-F	CATGTTGCCAGCAATGCTA
GUS-R	AGTCTGCCAGTTCAGTTCGT
SG-F	ATGACTACTCACGGCAACAG
SG-R	CCGCATAATTACGAATACTG
actin-F	CTTAACCCAAAGGCT AATCGTG
actin-R	GCCTGCCAAGTCAAGACGG

注：表中的横线分别代表 CasneF 和 CasneR 引物中的 *Xba* I，*Sma* I 酶切位点。

Note: The restriction sites *Xba* I and *Sma* I in CasneF and CasneR, respectively, are shown with underlines.

### 1.3 转基因烟草植株的获得

用农杆菌介导法将 PBI-CaSn 进行烟草遗传转化，首先将白肋烟种子进行表面消毒，在 1/2MS 培养基上培育健康的无菌苗，当叶片生长到直径约 5 cm 时将叶片剪切为 0.5 ~ 1.0 cm 的碎片，用筛选到的阳性农杆菌菌液浸润烟草叶片。经过共培养，筛选培养，20 d 左右获得抗性芽，转移到 1/2MS 培养基进行生根，获得 T0 代转基因烟草（林国平等，2005）。当根系发育比较发达时，逐渐打开封口膜，炼苗 5 ~ 6 d 后移苗。从组培室移入温室进行正常的栽培管理，以获得转基因的烟草种子（T1）。设置转 pBI-121 空载体的烟草为阴性对照。

### 1.4 转基因烟草植株的检测

#### 1.4.1 PCR 检测

选取 T0 代烟草植株叶片为材料，采用 SDS 法提取总 DNA，进行转基因植株 PCR 检测。以 pBI-121 在载体中的 *NPT* II 基因序列设计引物 NPT II F、NPT II R，并以目的基因 *CaSn* 片段设计上游特异引物 Casn-F，载体上含有的 GUS 基因设计下游特异引物 GUS-R（表 1），检测阳性植株。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 4min；94 °C 变性 40 s，62 °C 退火 30 s，72 °C 分别延伸 50 s、30 s，共 35 个循环；72 °C 延伸 10 min。PCR 产物在 1% 凝胶电泳进行检测，确定阳性植株。

#### 1.4.2 GUS 染色

取转入空载体和转入 PBI-CaSn 质粒的 T0 代烟草的根部，进行 GUS 染色，以正常的非转基因烟草作为空白对照，参照 GUS 染色液说明书（北京奥博来），37 °C 温育过夜，用 75% 的乙醇脱色，直至阴性对照为白色，观察各组织的染色情况。

#### 1.4.3 RT-qPCR

选取 *CaSn* T1 代转基因植株、空载体植株和非转基因植株的新鲜叶片进行取样，每个转基因株系分别随机取 10 株，将样品等量混合均匀，并重复 3 次取样。用 Trizol 法（Invitrogen）分别提取样品的总 RNA，采用 TransScript II One-Step gDNA Removal 和 cDNA Synthesis SuperMix 进行反转录合成第一链 cDNA（Transgen）。以 actin-F、actin-R 为内参引物，利用 *CaSn* 基因下游序列，*GUS* 基因上游序列设计特异引物引物 SG-F、SG-R（表 1），以反转录的 cDNA 为模板，每个样本重复 4 次，根据荧光定量试剂盒 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 说明书进行操作（TaKaRa）。利用 CFX Manager 软

件以及 Excel 软件进行 *CaSn* 基因的表达量分析。反应程序为 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 58 °C 退火 30 s, 40 个循环。

### 1.5 转基因烟草植株抗根结线虫鉴定

将获得的 T1 代种子进行正常播种育苗, 在温室中生长 3~4 周时移苗, 生长至 6 片真叶时接种南方根结线虫 2 龄幼虫, 每株接种 1 000 条, 每个株系调查 10 株, 3 次重复, 共 10 个株系。以相同的方法对转入空载体的 T1 代和正常的非转基因烟草作为对照。接种 6 周后统计根结数量。采用 SAS9.1 统计分析根结数量差异显著性及效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 *CaSn* 基因克隆及表达载体 PBI-*CaSn* 构建

通过 GSP1, GSP2 引物, 以抗性辣椒 cDNA 为模板进行 PCR, 获得了 *CaSn* 基因的 ORF, 通过测序得知该 ORF 长度为 315 bp, 编码具有 104 个氨基酸的小分子蛋白, 其核酸序列及编码蛋白质序列均与 *CaSn* 蛋白完全相同, 说明克隆到的 ORF 为 *CaSn* 基因, 基因克隆正确。

以 *CaSn* ORF 质粒为模板, 利用带有酶切接头的引物 *CasneF*、*CasneR* 进行 PCR, 用 *Xba* I 和 *Sma* I 克隆到 pBI-121 表达载体 (图 1) 上, 命名为 PBI-*CaSn*。将重组质粒 PBI-*CaSn* 转化到感受态 DH5a 中。摇菌后提取质粒酶切鉴定, 酶切下的小片段长度为 315 bp, 将该片段回收后送测序公司测序检测, 其碱基序列与 *CaSn* 基因完全相同, 说明 *CaSn* 基因已连接到 pBI-121 表达载体上。将 PBI-*CaSn* 质粒电击转化到农杆菌 EHA105 菌株, 并以转 pBI-121 空载体的农杆菌作为阴性对照。

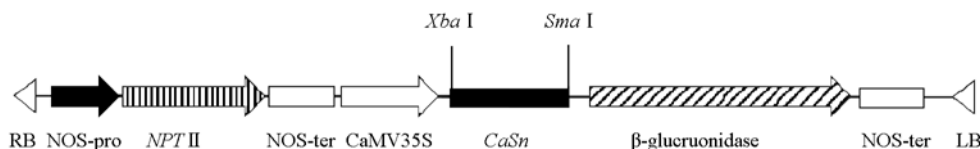


图 1 PBI-*CaSn* 重组质粒 T-DNA 区域结构图

RB: 右边界; LB: 左边界; NOS-pro: NOS 启动子; *NPTII*: 卡那霉素抗性基因;  
CaMV35S: 花椰菜花叶病毒 35S 启动子;  $\beta$ -glucuronidase: GUS 基因;  
NOS-ter: NOS 终止子; *CaSn*: 辣椒中抗菌蛋白基因。

Fig. 1 Schematic diagram of the T-DNA region of the binary vector PBI-*CaSn*

RB: Right border; LB: Left border; NOS-pro: NOS promoter; *NPTII*: Neomycin phosphotransferase gene;  
CaMV35S: Cauliflower mosaic virus 35S promoter;  $\beta$ -glucuronidase: GUS gene;  
NOS-ter: NOS terminal; *CaSn*: The *CaSn* gene.

### 2.2 转基因烟草的获得和 PCR 鉴定

利用农杆菌介导的方法侵染烟草叶片, 经筛选培养后愈伤组织上形成抗性芽 (图 2, A), 待抗性芽 2~3 cm 时转移到生根培养基上生根培养 (图 2, B), 获得 T0 代转基因株系 (图 2, C~E)。

随机选取 T0 代烟草 10 株 Sn1~Sn10, 筛选阳性植株。通过 *NPTII*F/*NPTII*R, *Casn*-F/*GUS*-R 引物进行 PCR 检测 (图 3), 可以看到转 *CaSn* 基因的烟草分别扩增出 682 bp、792 bp 的片段, 说明外源基因已整合到烟草基因组中, 而转入空载体的片段仅扩增出 792 bp 片段 (图 3, B 中 11 泳道), 说明 pBI-121 空载体也已整合到烟草基因组中, 而非转基因烟草没有扩增出片段 (图 3, A 和 B 中 12 泳道)。

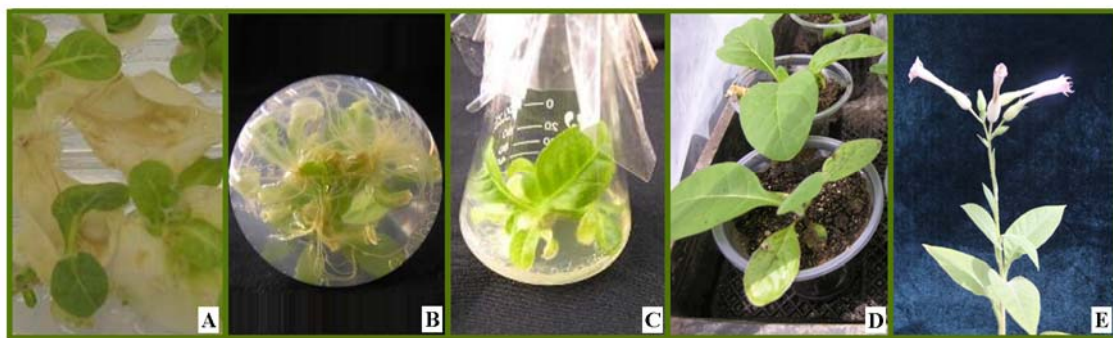


图2 植物表达载体 PBI-CaSn 转化烟草

A: 筛选培养; B: 生根培养; C: 炼苗; D~E: 再生植株。

Fig. 2 The regeneration processing of independent transgenic tobacco plants with PBI-CaSn

A: Screening culture; B: Rooting culture; C: Hardening plantlets; D-E: Regenerated plants.

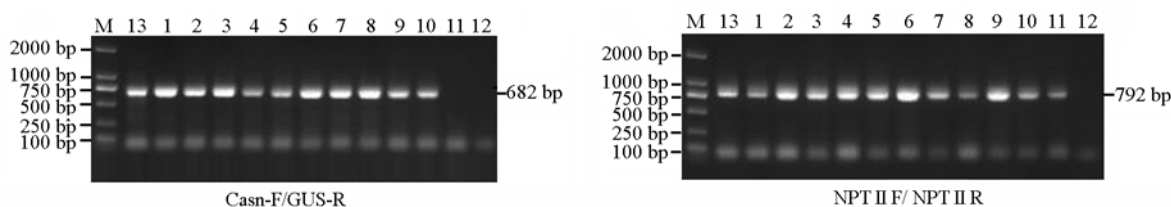


图3 转基因烟草 PCR 验证结果

M: DL2000; 1~10: 转基因植株 Sn1~Sn10; 11: 转空载体烟草; 12: 非转基因烟草; 13: PBI-CaSn 质粒。

Fig. 3 PCR analysis of transgenic tobacco plants

M: DL2000; 1-10: Transgenic line Sn1-Sn10; 11: pBI-121 transgenic tobacco;

12: Wild-type tobacco; 13: PBI-CaSn transformation vector.

### 2.3 转基因烟草 GUS 染色分析

通过 GUS 组织染色可以看到 (图 4), 转空载体及目的基因的株系根部经组织染色后均呈现蓝色, 说明 pBI-121 空载体以及 PBI-CaSn 表达载体已成功整合到烟草组织中并表达, 而非转基因的烟草根部没有颜色变化。



图4 转基因烟草根部 GUS 染色检测

1~10: 转基因植株 Sn1~Sn10; 11: 转空载体烟草; 12: 非转基因烟草。

Fig. 4 The GUS test with transgenic tobacco plant roots

1-10: Transgenic line Sn1-Sn10; 11: pBI-121 transgenic tobacco; 12: Wild-type tobacco.

## 2.4 T1 代转基因烟草的 RT-PCR 表达分析

通过 RT-qPCR 体系分别检测 10 个独立的 T1 代株系。提取 T1 转基因植株 RNA, 反转录成 cDNA 后进行检测, 以确定在基因组中及转录水平上的表达情况。通过数据分析 (图 5) 发现 *CaSn* 基因在转基因烟草中都有表达, 相对于内参基因, 在 Sn7 中表达量最高为 16.11, 而在 Sn1 中表达量最低为 1.34, 其中 Sn7 的表达量是 Sn1 的 12 倍。Sn2, Sn5, Sn6 的表达量较高, 是 Sn1 的 8 ~ 10 倍。而 Sn3, Sn4, Sn8, Sn9, Sn10 的表达量较低, 是 Sn1 的 1 ~ 5 倍。非转基因野生型烟草及转空载体烟草中表达量接近于 0。表明 *CaSn* 基因已在转录水平上得到表达。

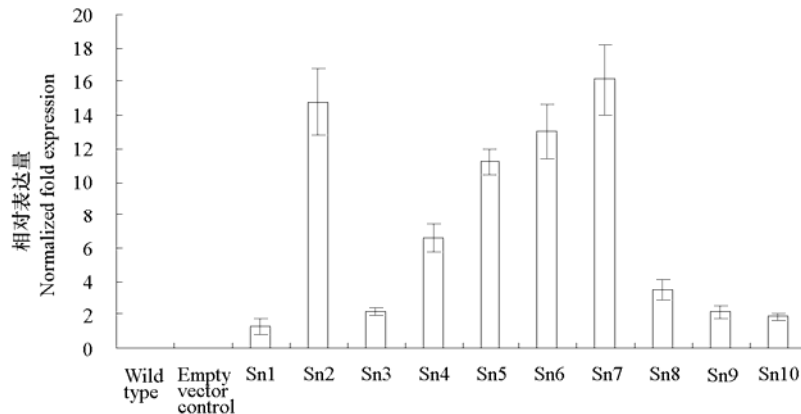


图 5 T1 代转基因烟草 Sn1 ~ Sn10 株系 RT-qPCR 分析

Fig. 5 *CaSn* gene RT-qPCR analysis of Sn1 ~ Sn10 transgenic tobacco lines

## 2.5 T1 代转基因烟草的抗病性鉴定

在接种根结线虫 6 周后检测植株上的根结情况, 发现转 *CaSn* 基因植株比对照植株根结少 (图 6)。转基因植株中根结数量平均为 22.68 个, 空载体及未转基因的对照中根结数量平均为 69.85 个, 转基因植株的根结数为对照的 1/2 ~ 1/3。

从表 2 可以看出非转基因野生型烟草与转空载体烟草间根结数量差异不显著, 而 Sn1 ~ Sn10 根

表 2 不同转基因烟草株系的根结数显著性分析

Table 2 Significant analysis of root knots of different transgenic tobacco lines

转基因株系 Transformant	根结数 Root-knot number	减少率/ % Decrease ratio
非转基因野生型 Wild type	69.2 ± 1.2 a	-
转空载体烟草 Empty vector control	70.5 ± 1.3 a	-
Sn1	29.4 ± 1.1 c	57.91
Sn2	16.2 ± 1.3 gh	76.81
Sn3	34.2 ± 1.1 b	51.04
Sn4	25.5 ± 1.3 d	63.49
Sn5	24.7 ± 2.0 d	64.64
Sn6	18.1 ± 0.7 fg	74.09
Sn7	21.9 ± 1.2 e	68.65
Sn8	21.7 ± 2.0 e	68.93
Sn9	15.2 ± 1.7 h	78.24
Sn10	19.9 ± 1.0 ef	71.51

注: 同列数字后不同字母表示在 0.05 水平上差异显著; 减少率: 不同株系相对于非转基因野生型与转空载体烟草平均数的根结减少率。

Note: Within the same column followed by different letters are significantly different at  $P < 0.05$  level. Decrease ratio: Disease ratio represents the reduce percentage of treatment plants compared to the average of wild type and empty vector control.



结数量均显著低于这两个对照, 10 个株系间也有显著性差异, Sn1 抗线虫效果显著低于 Sn2, 却显著高于 Sn3。说明 *CaSn* 基因可以显著增强寄主对根结线虫的抗性。而不同株系间存在的抗性差异可能与转基因插入的拷贝数量不同相关。

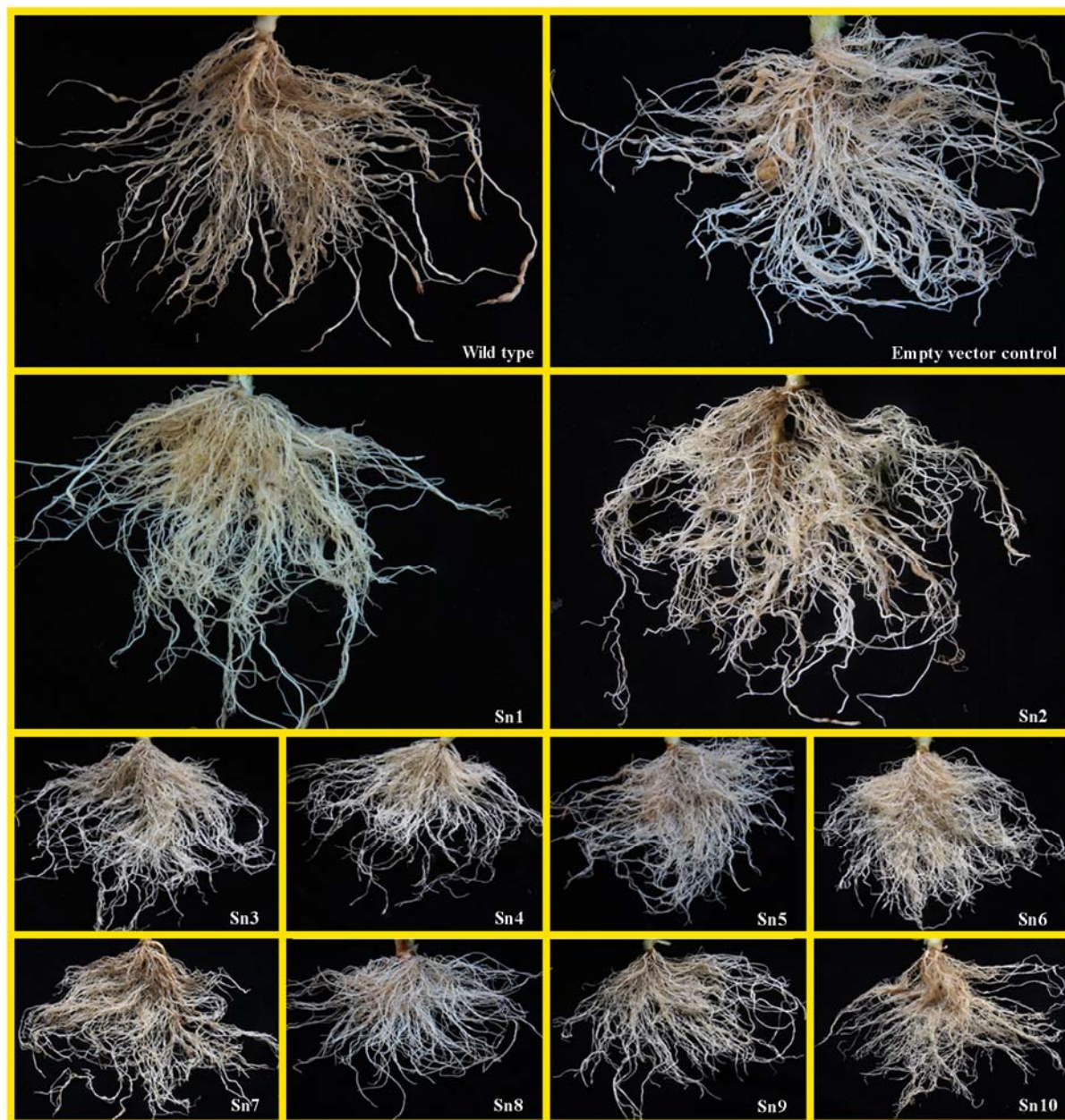


图 6 转基因烟草株系 Sn1 ~ Sn10 对南方根结线虫的抗性

Fig. 6 Resistance identification of Sn1 ~ Sn10 transgenic tobacco plants to *Meloidogyne incognita*

### 3 讨论

*CaSn* 基因属于 Snakin 基因家族, 其编码的 CaSnakin 蛋白是在辣椒中发现的一段富含半胱氨酸的短肽, 属于新型的抗菌肽。Mao 等 (2011) 等通过 VIGS, 证实敲除抗根结线虫辣椒中的 *CaSn* 基

因以后, 根结线虫的数量显著增加, 初步证实了 *CaSn* 基因具有防御根结线虫的作用, 能提高植物对南方根结线虫的抗性。通过原核过表达体系, 将 *CaSn* 基因编码的蛋白 *CaSnakin* 进行分离纯化, 发现该蛋白对根结线虫则表现出高效的杀线虫功能。在本研究中通过在感病白肋烟中超表达 *CaSn* 基因, 筛选到 10 个独立的转基因株系, 发现转 *CaSn* 基因白肋烟上的根结数量显著减少, 只有转空载体对照和非转基因烟草的 30%, 同时不同转基因烟草株系对南方根结线虫的抗性也存在着一定差别。说明辣椒中的抗菌肽基因 *CaSn* 对南方根结根结线虫具有防御作用。由于 *Snakin* 基因来源于茄科, 在马铃薯和辣椒中均有报道 (Segura et al., 1999; Almasia et al., 2008; Mao et al., 2011), 因此, 在利用 *CaSn* 基因进行抗根结线虫转基因具有生物安全性。植物寄生性线虫通过口针从特定的植物细胞中吸收营养, 根结线虫可以吸收 43 kD 的蛋白质 (Urwin et al., 1997; Wei et al., 2003)。由于 *CaSnakin* 蛋白分子质量较小, 成熟的蛋白只有 7.03 kD, 因此在防治根结线虫中具有突出的利用优势。同时, 由于其分子量小可以其他类型的抗菌肽联合应用, 而起到叠加抗性的作用, 如已经报道的马铃薯 *Snakin* 基因 (*SN1*) 与防御素基因 (*PTI1*) 的重组蛋白超表达后的抗菌作用 (Kovalskaya & Hammond, 2009)。

*Snakin* 家族基因按照表达特点分为两类, *SN1* 为植物本身组成型表达的一个防御蛋白, 而 *SN2* 是被生物及非生物因素诱导表达的蛋白。无论是离体还是活体条件下 *SN1* 和 *SN2* 都具有抗菌活性, 例如抗细菌 (*Clavibacter michiganensis*) 及真菌 (*Fusarium solani*, *Fusarium culmorum*, *Bipolaris maydis* 和 *Botrytis cinerea*) 作用 (Almasia et al., 2008)。辣椒中的 *CaSn* 基因属于 *Snakin* 家族中的 II 型亚家族, 并且与马铃薯中的 *Snakin2* (*SN2*) 高度同源, 因此, 辣椒中的 *CaSn* 是否具有抗细菌、真菌的功能还有待进一步研究。

## References

- Abad P, Gouzy J, Aury J M, Castagnone-Sereno P, Danchin E G J, Deleury E, Perfus-Barbeoch L, Anthouard V, Artiguenave F, Blok V C, Caillaud M C, Coutinho P M, Dasilva C, Luca F D, Deau F, Esquibet M, Flutre T, Goldstone J V, Hamamouch N, Hewezi T, Jaillon O, Jubin C, Leonetti P, Magliano M, Maier T R, Markov G V, McVeigh P, Pesole G, Poulain J, Robinson-Rechavi M, Sallet E, Segurens B, Steinbach D, Tytgat T, Ugarte E, Ghelder C, Veronico P, Baum T J, Blaxter M, Bleve-Zacheo T, Davis E L, Ewbank J J, Favory B, Grenier E, Henrissat B, Jones J T, Laudet V, Maule A G, Quesneville H, Rosso M N, Schiex T, Smant G, Weissenbach J, Wincker P. 2008. Genome sequence of the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology*, 26 (8): 909 - 915.
- Almasia N I, Bazzini A A, Hopp H E, Vazquez-Rovere C. 2008. Overexpression of *snakin-1* gene enhances resistance to *Rhizoctonia solani* and *Erwinia carotovora* in transgenic potato plants. *Molecular Plant Pathology*, 9 (3): 329 - 338.
- Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, López G, García-Olmedo F, Molina A. 2002. *Snakin-2*, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiology*, 128 (3): 951 - 961.
- Eddaoudi M, Ammati M, Rammah A. 1997. Identification of resistance breaking populations of *Meloidogyne* on tomatoes in Morocco and their effect on new sources of resistance. *Fundam Appl Nematol*, 20 (3): 285 - 289.
- Kim J Y, Park S C, Hwang I, Cheong H, Nah J W, Hahm K S, Park Y. 2009. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 2860 - 2872.
- Kovalskaya N, Hammond R W. 2009. Expression and functional characterization of the plant antimicrobial *snakin-1* and defensin recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 63 (1): 12 - 17.
- Lin Guo-ping, Qi Hua-xiong, Zha Zhong-ping, Wang Yi, Xiao Zong-you, Zhou Yong-bi, Huang Wen-chang. 2005. Burley tobacco transgenic breeding research. *Hubei Agricultural Sciences*, 6: 14 - 16. (in Chinese)
- 林国平, 戚华雄, 查中萍, 王毅, 肖宗友, 周永碧, 黄文昌. 2005. 白肋烟转基因育种研究. *湖北农业科学*, 6: 14 - 16.
- Liu Wei-zhi, Duan Yu-xi. 2000. *Plant nematology*. Beijing: China Agricultural Press: 213 - 281. (in Chinese)
- 刘维志, 段玉玺. 2000. *植物病原线虫学*. 北京: 中国农业出版社: 213 - 281.



- Lopez-Solanilla E, Gonzalez-Zorn B, Novella S, Vazquez-Boland J A, Rodriguez-Palenzuela P. 2003. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* to antimicrobial peptides. *FEMS Microbiology Letters*, 226 (1): 101 - 105.
- Mao Zhen-chuan, Xie Bing-yan, Yang Yu-hong, Feng Dong-xin, Feng Lan-xiang, Yang Zhi-wei. 2007. Analysis of pepper *Me3* gene resistance to root knot nematodes by SSH. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (6): 1453 - 1458. (in Chinese)
- 茆振川, 谢丙炎, 杨宇红, 冯东昕, 冯兰香, 杨之为. 2007. 辣椒 *Me3* 基因介导抗根结线虫相关基因的 SSH 分析. *园艺学报*, 34 (6): 1453 - 1458.
- Mao Z C, Zheng J Y, Wang Y S, Chen G H, Yang Y H, Feng D X, Xie B Y. 2011. The new *CaSn* gene belonging to the snakins family induces resistance against root-knot nematode infection in pepper. *Phytoparasitica*, 39 (2): 151 - 164.
- Ornat C, Verdejo-Lucas S, Sorribas F J. 2001. A population of *Meloidogyne javanica* from Spain virulent to the *Mi* resistance gene in tomato. *Plant Disease*, 85: 271 - 276.
- Segura A, Moreno M, Madueno F, Molina A, Garcia-Olmedo F. 1999. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12 (1): 16 - 23.
- Selitreffnikoff C P. 2001. Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 2883 - 2894.
- Silverstein K A, Moskal W A, Wu H C, Underwood B A, Graham M A, Town C D, VandenBosch K A. 2007. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *The Plant Journal*, 51 (2): 262 - 280.
- Urwin P E, Lilley C J, McPherson M J, Atkinson H J. 1997. Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *The Plant Journal*, 12 (2): 455 - 461.
- Wei J Z, Hale K, Carta L, Platzer E, Wong C, Fang S C, Aroian R V. 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (5): 2760 - 2765.

## 征 订

## 欢迎订阅《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会和中国农业科学院蔬菜花卉研究所主办的学术期刊,创刊于1962年,刊载有关果树、蔬菜、观赏植物、茶及药用植物等方面的学术论文、研究报告、专题文献综述、问题与讨论、新技术新品种以及园艺研究动态与信息,适合园艺科研人员、大专院校师生及农业技术推广部门专业技术人员阅读参考。

《园艺学报》是中文核心期刊,中国科技核心期刊;被英国《CAB文摘数据库》、美国CA化学文摘、日本CBST科学技术文献速报、俄罗斯AJ文摘杂志、CSCD中国科学引文数据库等多家数据库收录。《园艺学报》荣获“第三届国家期刊奖”及“新中国60年有影响力的期刊”、“中国国际影响力优秀学术期刊”、“百种中国杰出学术期刊”、“中国权威学术期刊”、“中国精品科技期刊”等称号。

《中国学术期刊影响因子年报》2013年公布的《园艺学报》复合总被引频次为11 071,复合影响因子为1.734;期刊总被引频次为5 146,期刊影响因子为1.112。

《中国科技期刊引证报告》2013年公布的《园艺学报》扩展总被引频次为6 106,扩展影响因子为1.333;核心总被引频次为4 328,核心影响因子为1.047;在中国科技核心期刊综合评价总分排名中居第29位。

《园艺学报》为月刊,每月25日出版。每期定价40元,全年480元。国内外公开发售,全国各地邮局办理订阅,国内邮发代号82-471,国外发行由中国国际图书贸易总公司承办,代号M448。漏订者可直接寄款至编辑部订购。

编辑部地址:北京市海淀区中关村南大街12号中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部。

邮政编码:100081;电话:(010) 82109523。

E-mail: yuanyixuebao@126.com。

网址: <http://www.ahs.ac.cn>。