

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.01023

蚂蚁抗菌肽 Ponericin W1 对植物病原菌的体外抑菌活性及其转基因拟南芥的抗病性

陈永芳¹, 孙朋卫^{1,2}, 唐定中¹

1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 植物细胞与染色体工程国家重点实验室, 北京 100101;
2. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 抗菌肽的抗菌谱很广, 非植物来源的抗菌肽在植物抗病基因工程方面的应用越来越受到重视。蚂蚁抗菌肽 Ponericin W1 可抑制革兰氏阴性、革兰氏阳性细菌和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的生长, 但在植物抗病方面尚无报道。文章对人工合成的 Ponericin W1 在体外进行了植物病原菌的抑制实验, 结果表明, Ponericin W1 可以抑制稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)、葡萄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)的菌丝生长, 可以抑制小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)的菌丝生长和产孢, 还可以抑制丁香假单胞杆菌番茄致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)和水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)的生长。Ponericin W1 的基因序列经密码子优化, 人工合成后构建至植物表达载体, 采用蘸花法由农杆菌介导转化拟南芥。在转基因植株中, 抗菌肽定位于细胞间隙。转基因植株接种病原真菌白粉病菌(*Golovinomyces cichoracearum*)后, 叶片上菌丝和分生孢子梗都较野生型少, 且有未萌发的孢子; 接种病原细菌丁香假单胞杆菌后, 叶片内的细菌量较野生型显著减少, 表明转基因植株的抗病性较野生型显著增强。体外的和转基因拟南芥的病原菌抗性证明, Ponericin W1 在植物抗病基因工程中有良好的应用前景。

关键词: 抗菌肽; Ponericin W1; 植物病原; 转基因

Antimicrobial activities of ant Ponericin W1 against plant pathogens *in vitro* and the disease resistance in its transgenic *Arabidopsis*

CHEN Yong-Fang¹, SUN Peng-Wei^{1,2}, TANG Ding-Zhong¹

1. State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: The antimicrobial peptides (AMPs) exhibit a broad antimicrobial spectrum. The application of AMPs from non-plant organisms attracts considerable attention in plant disease resistance engineering. Ponericin W1, isolated from the venom of ant (*Pachycondyla goeldii*), shows antimicrobial activities against Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and the budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*); however, it is not clear whether Ponericin W1 is effective against plant

收稿日期: 2013-04-01; 修回日期: 2013-05-08

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(编号 2009ZX08009-036B)资助

作者简介: 陈永芳, 博士, 助研, 研究方向: 植物与病原物的相互作用。E-mail: yfchen@genetics.ac.cn

通讯作者: 唐定中, 博士, 研究员, 研究方向: 植物与病原物的相互作用。E-mail: dztang@genetics.ac.cn

网络出版时间: 2013-5-22 10:11:14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130522.1011.001.html>

pathogens. The results of this study indicated synthesized Ponericin W1 inhibited mycelial growth of *Magnaporthe oryzae* and *Botrytis cinerea*, as well as hyphal growth and spore production of *Fusarium graminearum*. Besides, Ponericin W1 exhibited antibacterial activities against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. After codon optimization, *Ponericin W1* gene was constructed into plant expression vector, and transformed into *Arabidopsis thaliana* by floral dip method. The Ponericin W1 was located in intercellular space of the transgenic plants as expected. Compared with the wild-type plants, there were ungerminated spores and less hyphal, conidia on the leaves of transgenic plants after inoculation with the powdery mildew fungus *Golovinomyces cichoracearum*. After inoculation with the pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, the bacteria in the leaves of transgenic plants was significantly less than the wild-type plants, indicating that the transgenic plants displayed enhanced disease resistance to pathogens. These results demonstrate a potential use of Ponericin W1 in genetic engineering for broad-spectrum plant disease resistance.

Keywords: antimicrobial peptides; Ponericin W1; plant pathogen; transgenic

抗菌肽是一类存在于多种生物中的由 20 ~ 60 个氨基酸残基组成的、具有生物活性的小分子多肽,多数具有热稳定性、广谱抗菌、作用强且迅速等特点^[1,2]。目前认为,抗菌肽的作用机制是基于多肽与磷脂互作导致细胞膜破裂而引起细胞损伤,或者作用于胞内不同靶点干扰细菌生长及代谢平衡^[3~6],很少有病原菌对抗菌肽产生抗性。植物本身可产生多种抗菌肽^[7],但研究发现植物来源的抗菌肽基因的表达只对病原菌产生中等程度的抗性,这是由于经过长期的病原菌与寄主的相互作用和协同进化,植物病原菌已经对这些植物抗菌肽产生了耐受性。因此,非植物来源的抗菌肽基因在植物抗病中的应用越来越受到重视^[8,9]。

Ponericins W1 是在捕食性蚂蚁(*Pachycondyla goeldii*)的毒液中发现的由 25 个氨基酸组成的抗菌肽,对革兰氏阴性、革兰氏阳性细菌和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)具有很强的抑菌活性^[10]。迄今为止,尚无 Ponericins W1 对植物病原菌的抗性检测和用于植物抗病基因工程的报道。本研究鉴定了人工合成的抗菌肽 Ponericin W1 在体外对植物病原真菌和细菌的抑制能力。同时,还对表达 Ponericin W1 的拟南芥转基因植株的抗真菌病害和细菌病害的能力进行了鉴定,旨在探讨 Ponericin W1 应用于植物抗病基因工程的前景。

1 材料和方法

1.1 材料

植物材料为拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)生态型

Columbia-0(Col-0)。

植物病原菌包括稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*) ZB13、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)PH1、葡萄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、拟南芥白粉病菌(*Golovinomyces cichoracearum*)、丁香假单胞杆菌番茄致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pto*) DC3000 和 *Pto* DC3000 luxCDABE 水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae*pv. *oryzae*, *Xoo*)P6。

1.2 方法

1.2.1 对植物病原真菌的体外抑菌鉴定

抗菌肽 Ponericin W1 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,可溶于纯水。

对稻瘟病菌和葡萄灰霉病菌的抑制通过平板抑菌法进行鉴定。在燕麦培养基或 PDA 培养基平板中心接种 20 μ L 孢子(1×10^5 个/mL),倒置培养,待菌落直径为 2 cm 左右时,将灭菌的直径为 6 mm 的定性滤纸片放在四周,分别滴加 20 μ L Ponericin W1 水溶液(浓度为 1 mg/mL 和 10 mg/mL),以滴加 20 μ L 纯水和潮霉素为对照,待溶液完全渗入周围培养基后,继续倒置培养 24 ~ 48 h,观察抑菌情况并拍照。

对小麦赤霉病菌的抑制采用液体培养法进行鉴定。吸取 10 μ L 赤霉菌孢子(1×10^5 个/mL),分别加入 1 mL 液体培养基中(使用 CM 培养基鉴定对菌丝的抑制,使用绿豆汤培养基鉴定对产孢的抑制),加入 Ponericin W1 水溶液,使终浓度为 100 μ g/mL,摇床培养 48 h,拍照及进行孢子计数。

1.2.2 对植物病原细菌的体外抑菌鉴定

将 *Pto* DC3000 和 *Xoo* P6 稀释为 OD_{600} 吸光值为 0.005 的菌悬液, 以 100 μ L/孔加入 96 孔板中, 然后加入抗菌肽, 使终浓度分别为 100、500、1000 μ g/mL, 培养 24 h, 测定每孔中菌液的 OD_{600} 吸光值。

1.2.3 基因合成和植物表达载体构建

将抗菌肽 Ponericin W1 的基因序列经在线软件 <http://www.jcat.de/> 进行拟南芥密码子优化, 融合水稻几丁质酶基因信号肽序列(SP)、构建 gateway 系列载体所需 attB 序列以及有利于抗菌肽表达的 SD 序列和 Kozak 序列, 由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。

合成的基因经 Gateway 技术 BP 和 LR 反应构建至植物表达载体 pGWB11 和 pGWB5 中, 这两个载体携带花椰菜花叶病毒(Cauliflower mosaic virus, CaMV)35S 启动子, 能够组成型表达目的基因(图 1)。目的基因表达产物氨基酸序列为: N'-MRALAV-VVVATAFAVVAVRGWLGSALKIGAKLLPSVVGLF-KKKKQ-C', N 端 20 个氨基酸残基为信号肽序列, C 端 25 个氨基酸残基为 Ponericin W1 序列。

转化所用农杆菌为 GV3101 菌株。

1.2.4 拟南芥的转化和阳性转基因植株的鉴定

采用蘸花法转化拟南芥, 具体操作参照 Clough 等^[11]方法。T₀ 代种子播种于含 80 μ g/mL 潮霉素的 MS 培养基上, 能够萌发并生长的即阳性转化子, 再

采用 PCR 和半定量反转录 PCR(RT-PCR)方法进行进一步的鉴定, 所用引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 引物序列见表 1。

采用激光共聚焦显微镜观察选择培养基上生长 5 d 的 35S:: *SP* -*Ponericin W1* *GFP* 转基因植株的根尖, 鉴定目的基因表达后是否可以分泌至细胞间隙。所观察植株生长至 4 w 大小后, 进行抗病性鉴定(见本文 1.2.5), 以确定携带 GFP 之后抗菌肽是否具有正常功能。

1.2.5 转基因植株的抗病性鉴定

经鉴定为阳性的 T₁ 代转基因植株生长 4 w 左右, 采用注射法接种表达细菌荧光素酶基因 *luxCDABE* 的丁香假单胞杆菌 DC3000(*Pto* DC3000 *luxCDABE*)^[12], 接种浓度为 OD_{600} =0.002, 接种后 3 d 用 6 mm 直径打孔器取样, 通过 PromegaGloMax 20/20 化学发光仪, 检测病原菌的生长情况, 相对荧光强度(RLU_s)的高低与叶片中细菌的量成正相关。35S:: *SP* -*Ponericin W1* *GFP* 转基因植株 GL1 接种 *Pto* DC3000 *luxCDABE* 后 3 d, 取叶片采用活体冷光荧光影像分析系统 NightOWL II LB 983 扫描图像, 图像中每秒光子数(cps)的高低与叶片中细菌的量成正相关。采用 EXCEL 2007 进行数据整理和作图, 用 *t* 检验法进行差异显著性分析, *P*<0.05 表示差异水平显著。

此外, 对 4 w 大小的转基因植株也进行了拟南芥白粉病菌的接种, 并在接种后 8 d 进行表型观察并拍照, 选取叶片进行台盼蓝染色, 用光学显微镜观

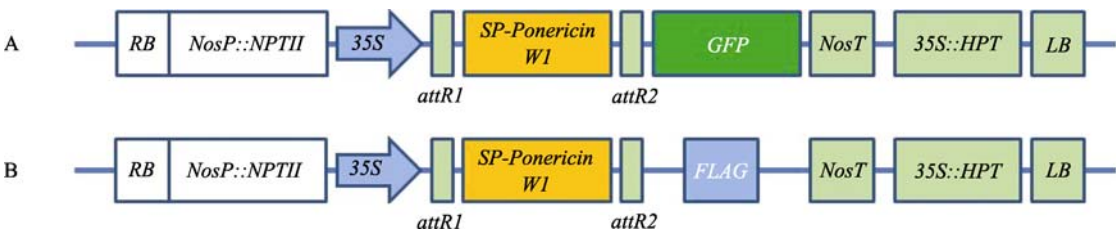


图 1 *SP*-*Ponericin W1* 基因的植物表达载体构建图谱
A : *SP*-*Ponericin W1* 基因的 pGWB5 载体构建图谱, 融合 *GFP* 基因, 用于观察转基因植株中目的基因表达后的亚细胞定位情况; B : *SP*-*Ponericin W1* 基因的 pGWB11 载体构建图谱, 携带 *FLAG* 标签, 用于转基因植株的抗病性鉴定。

表 1 转基因植株 PCR 和 RT-PCR 鉴定引物

引物名称	引物序列(5'→3')	下游引物(5'→3')	复性温度()	产物大小(bp)
PW1	ATGAGAGCGCTCGCCGTGGT	TGTCATCGTCATCCTTGTAGTC	54	159
ACT2	AGTGTCTGGATCGGTGGTTC	CCCCAGCTTTTAAAGCCTTT	54	149

察叶片上的菌丝生长和分生孢子梗的生长情况^[13]。

2 结果与分析

2.1 抗菌肽 Ponericin W1 对植物病原真菌的体外抑菌鉴定

体外抑菌实验表明, 1 mg/mL 和 10 mg/mL 的 Ponericin W1 能够抑制固体培养基平板上稻瘟病菌和葡萄灰霉病菌的菌丝生长(图 2, A 和 B); 100 μ g/mL 的 Ponericin W1 能抑制 CM 液体培养基培养的小麦赤霉病菌的菌丝生长(图 2C), 对照(CK)试管中有红色的赤霉菌菌丝的生长, 而加入 100 μ g/mL 的 Ponericin W1 与加入潮霉素的试管中相似, 几乎没有菌丝的生长; 100 μ g/mL 的 Ponericin W1 与阳性对照潮霉素作用相似, 能抑制绿豆汤培养基培养的小麦赤霉病菌的产孢(图 2D)。

2.2 抗菌肽 Ponericin W1 对植物病原细菌的体外抑菌鉴定

浓度为 100 μ g/mL 的 Ponericin W1 能够很好抑制 *Pto* DC3000 的生长(图 3A), 能够抑制 *Xoo* P6 约 50%; 而浓度为 500 μ g/mL 的 Ponericin W1 能够完全抑制 *Xoo* P6 的生长(图 3B)。

2.3 抗菌肽 Ponericin W1 转基因植株的鉴定

PCR 鉴定 Ponericin W1 转化子, L1-11 中只有 L6 无扩增产物, 为假阳性; L1-5, 7-11 均为阳性转化子(图 4A)。

RT-PCR 鉴定结果表明, L1-5, 7-11 均有目的基因的转录(图 4B), 其中 L2 和 L9 的扩增产物条带最亮, 说明 L2 和 L9 为目的基因表达量最高的植株。

对 *35S::SP-Ponericin W1-GFP* 转基因植株 GL1 的激光共聚焦显微镜观察表明, GFP 信号位于细胞

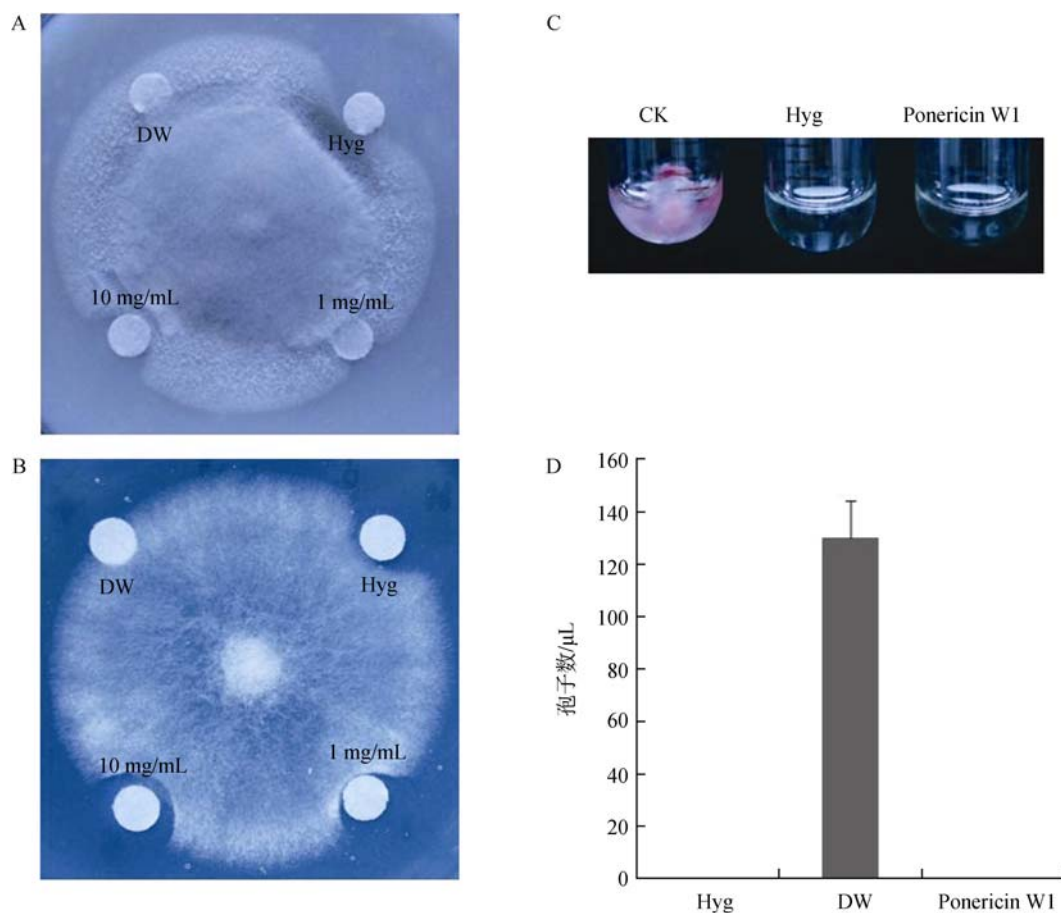


图 2 抗菌肽 Ponericin W1 对植物病原真菌的体外抑菌鉴定

A: 对稻瘟病菌菌丝的抑制; B: 对葡萄灰霉病菌菌丝的抑制; C: 对小麦赤霉病菌菌丝的抑制; D: 对小麦赤霉病菌产孢的抑制。DW 表示蒸馏水; Hyg 表示潮霉素。

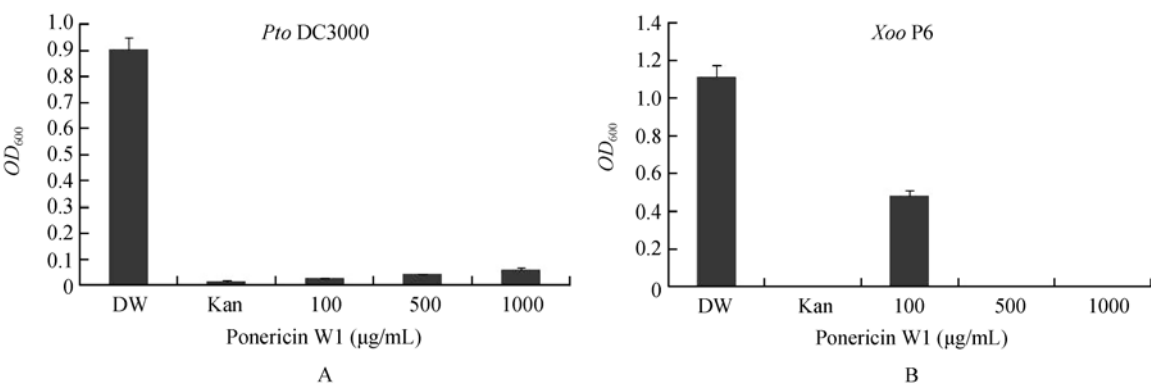


图 3 抗菌肽 Ponericin W1 对植物病原细菌的体外抑菌鉴定
A：对丁香假单胞菌的抑制；B：对水稻白叶枯病菌的抑制。DW 表示蒸馏水；Kan 表示卡那霉素。

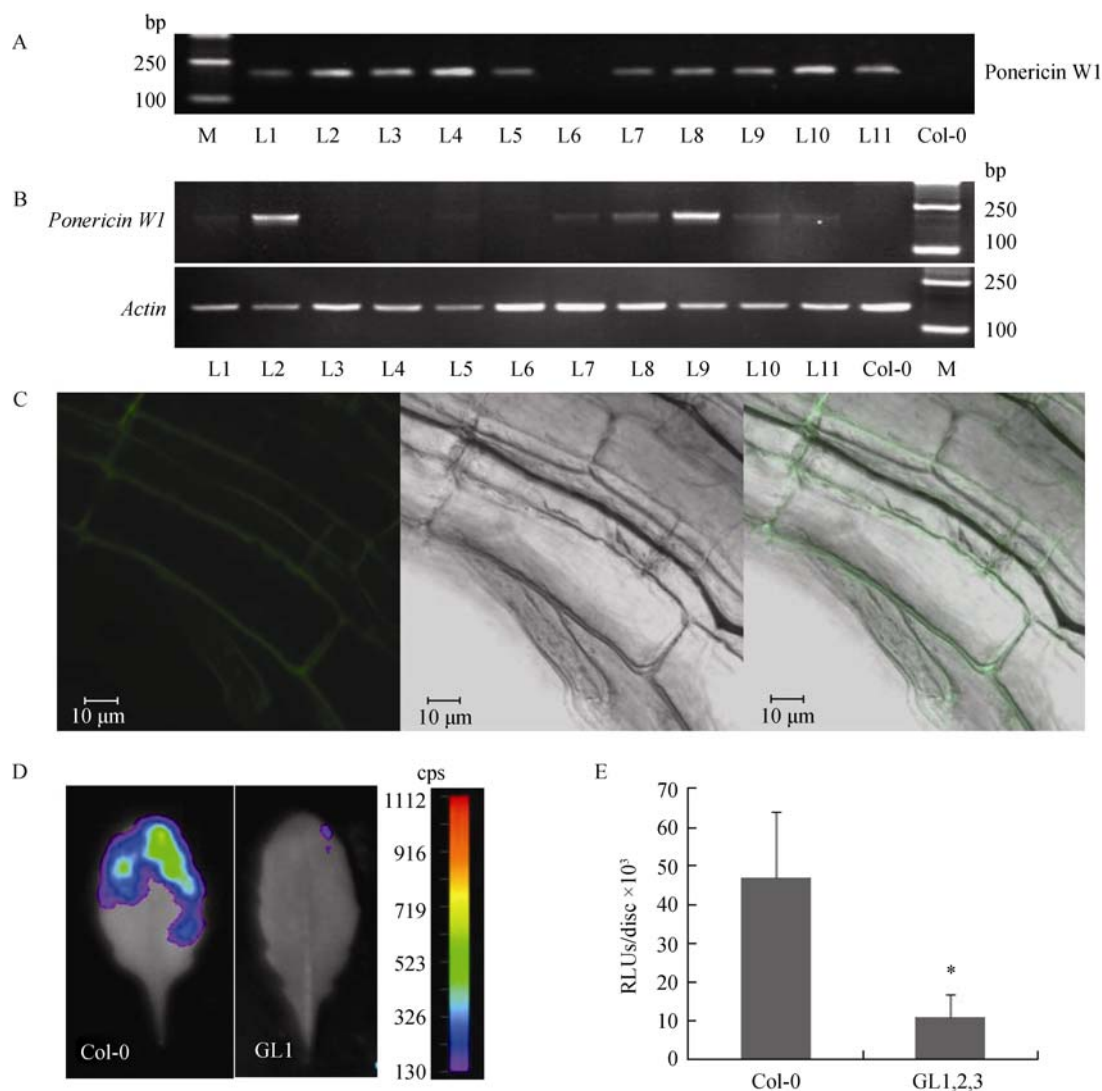


图 4 抗菌肽 Ponericin W1 转基因植株的鉴定
A :35S::SP Ponericin W1 转基因拟南芥的 PCR 检测; B :35S::SP Ponericin W1 转基因拟南芥的 RT-PCR 检测; C :35S::SP Ponericin W1 GFP 转基因植株根尖的激光共聚焦显微镜观察; D :35S::SP Ponericin W1 GFP 转基因植株 GL1 接种 *Pto* DC3000 luxCDABE 后的活体冷光荧光影像分析系统扫描图像; E :35S::SP Ponericin W1 GFP 转基因植株 GL1,2,3 对丁香假单胞菌的抗病性。M 表示 DNA 分子量标准; L1-11 表示不同的转基因植株(T₁); Col-0 为野生型拟南芥。

间隙(图 4C), 证明本研究所构建的植物表达载体在植物体内正确表达了目的蛋白, 且信号肽使所表达蛋白分泌到了细胞间隙, 可以防止细胞内的蛋白酶类对抗菌肽的降解。

35S::SP-Ponericin W1-GFP 转基因植株 GL1 接种 *Pto* DC3000 luxCDABE 后 3 d, 叶片内细菌量显著少于野生型(图 4:D 和 E), 表明转基因植株对 *Pto* 的抗性显著增强, 证明融合 GFP 后的 Ponericin W1 具有抑菌功能。

2.4 抗菌肽 Ponericin W1 转基因植株的抗病性

Ponericin W1 转基因植株在种子萌发、营养生长和生殖生长阶段与野生型相比没有差异。

接种 *Pto* DC3000 luxCDABE 后 3 d, 与野生型 Col-0 相比, 转基因植株 L1、L2、L3 叶片内的细菌量显著减少, 统计分析结果表明转基因植株抗性显著增强(图 5A), 抗性强度为 L2>L1>L3。结合 RT-PCR 结果, 转录水平为 L2>L1>L3, 表明转基因植株抗性的强弱与抗菌肽的表达量高低呈正相关。

接种白粉病菌后 8 d, 与野生型相比, 转基因植株 L9、L10、L11 叶片上的白色粉状物很少(图 5B), 叶片的台盼蓝染色显示, 野生型叶片上白粉病菌丝和分生孢子梗很多, 而转基因植株叶片上有少量菌丝和分生孢子梗, 且有一些未萌发的孢子(图 5C), 表明转基因植株对白粉病菌的抗性较野生型增强。

3 讨论

外源基因在转基因植物中的稳定表达是获得理想转基因植物的首要条件。早先用天蚕素 B 基因转化烟草没有成功地抑制病原细菌的侵染^[14], 原因是抗菌肽被植物内生的肽酶降解, 使表达水平低于足以杀死病原物的临界浓度^[15]。近几年抗菌肽的转基因植物基本都采用成熟肽编码序列与使蛋白分泌到细胞间隙的信号肽序列融合的方式, 使其最快速地被转运到胞外, 以防止在细胞内被降解, 有研究还发现信号肽的应用还可以增强天蚕素 B 的转录水平^[16]。本研究将水稻几丁质酶的信号肽与 Ponericin W1 融合并携带 GFP 标签, 转基因植物中 GFP 信号在细胞

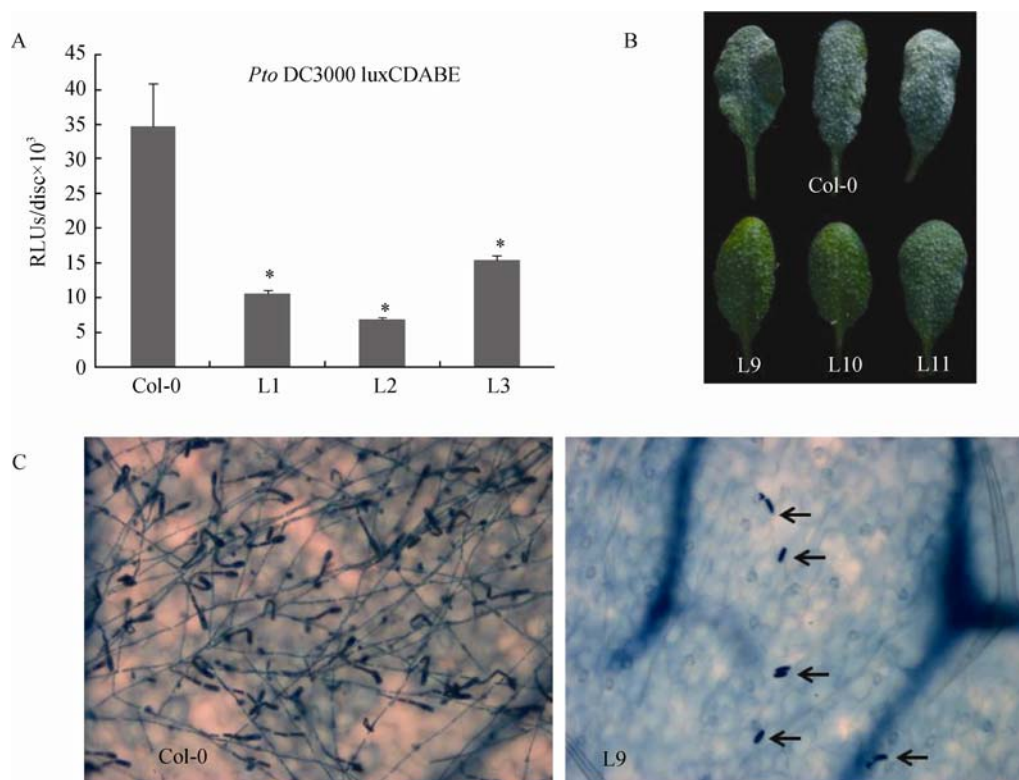


图 5 抗菌肽 Ponericin W1 转基因植株的抗病性鉴定

A: 35S::SP Ponericin W1 转基因拟南芥植株对丁香假单胞菌的抗病性; B: 35S::SP Ponericin W1 转基因拟南芥植株对白粉病菌的抗病性; C: 35S::SP Ponericin W1 转基因拟南芥植株对白粉病菌的抗病性, 箭头指示未萌发的孢子。RLUs/disc 表示相对荧光强度/6mm 直径叶片; *表示有显著差异(t 检验, $P<0.05$); L1,2,3,9,11 表示不同的转基因植株(T_1); Col-0 为野生型拟南芥。

间隙, 表明 Ponericin W1 表达后确实分泌到细胞间隙。Ponericin W1 转基因植株在生长发育性状方面与野生型相比没有差异, 其抗病性增强说明 Ponericin W1 在细胞间隙表达累积到可以有效抑制病原菌生长增值的量。有文献报道采用信号肽使抗菌肽在转基因植物的叶绿体中表达^[17], 也可以防止降解、增加表达量并有效抑菌。在将来的应用中, 应该采用融合信号肽的方式, 使抗菌肽在植物中能够避开细胞内的降解酶类, 充分发挥抑菌作用。

目前已发现昆虫抗菌肽可以抑制许多农业生产中非常重要的植物病原真菌和细菌, 通过转基因技术将抗菌肽导入植物中表达, 可使作物对植物病原产生有效抗性。在我国, 已有将抗菌肽基因在马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)^[18]、大豆(*Glycine max* L. Merr)^[19]、水稻(*Oryza sativa* L.)^[20]、油菜(*Brassica napus* L.)^[21]、番茄(*Solanum lycopersicum* L.)^[22]等植物中成功表达并获得抗病株系的报道。上述研究多针对某种植物的某种病害, 未能有效利用抗菌肽的广谱抗病性。本研究中 Ponericin W1 在体外对细菌和真菌都有很强的抑制活性, 所获得的转基因植物经鉴定, 对植物真菌病害和细菌病害的抗病性同时显著增强, 说明该抗菌肽在农作物抗病基因工程改良方面很有潜力, 可以应用到性状优良的作物中, 保证高产、稳产。

参考文献(References):

- [1] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002, 415(6870): 389–395. DOI
- [2] 金莉莉, 王秋雨. 蛙科两栖动物皮肤抗菌肽的分子多样性及功能. *遗传*, 2008, 30(10): 1241–1248. DOI
- [3] Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1462(1–2): 1–10. DOI
- [4] Yang L, Weiss TM, Lehrer RI, Huang HW. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys J*, 2000, 79(4): 2002–2009. DOI
- [5] Westerhoff HV, Juretic D, Hendler RW, Zasloff M. Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(17): 6597–6601. DOI
- [6] Melo MN, Castanho MARB. The mechanism of action of antimicrobial peptides: lipid vesicles vs. bacteria. *Front Immunol*, 2012, 3: 236. DOI
- [7] Odintsova T, Egorov T. Plant antimicrobial peptides. In: Irving HR, Gehring C, eds. *Plant Signaling Peptides*. Berlin: Springer, 2012, 16: 107–133. DOI
- [8] Montesinos E. Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microb Lett*, 2007, 270(1): 1–11. DOI
- [9] 宫霞, 乐国伟, 施用晖. 昆虫抗菌肽及其基因工程研究进展. *遗传*, 2002, 24(5): 591–594. DOI
- [10] Orivel J, Redeker V, Le Caer JP, Krier F, Revol-Junelles AM, Longeon A, Chaffotte A, Dejean A, Rossier J. Ponerinins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. *J Biol Chem*, 2001, 276(21): 17823–17829. DOI
- [11] Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1998, 16(6): 735–743. DOI
- [12] Fan J, Crooks C, Lamb C. High-throughput quantitative luminescence assay of the growth in planta of *Pseudomonas syringae* chromosomally tagged with *Photobacterium luminescens* luxCDABE. *Plant J*, 2008, 53(2): 393–399. DOI
- [13] Nie HZ, Wu YY, Yao CP, Tang DZ. Suppression of edr2-mediated powdery mildew resistance, cell death and ethylene-induced senescence by mutations in ALD1 in *Arabidopsis*. *J Genet Genomics*, 2011, 38(4): 137–148. DOI
- [14] Hightower R, Baden C, Penzes E, Dunsmuir P. The expression of cecropin peptide in transgenic tobacco does not confer resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Plant Cell Rep*, 1994, 13(5): 295–299. DOI
- [15] Owens LD, Heutte TM. A single amino acid substitution in the antimicrobial defense protein cecropin B is associated with diminished degradation by leaf intercellular fluid. *Mol Plant Microbe Interact*, 1997, 10(4): 525–528. DOI
- [16] Oard S, Enright FM. Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Cell Rep*, 2006, 25(6): 561–572. DOI
- [17] Lee SB, Li BC, Jin SX, Daniell H. Expression and characterization of antimicrobial peptides Retrocyclin-101 and Protegrin-1 in chloroplasts to control viral and bacterial infections. *Plant Biotechnol J*, 2011, 9(1): 100–115. DOI
- [18] 贾士荣, 屈贤铭, 冯兰香, 唐惕, 唐益雄, 刘坤, 赵艳丽, 白永延, 蔡敏莺. 转抗菌肽基因提高马铃薯对青枯病的抗性. *中国农业科学*, 1998, 31(3): 5–12. DOI
- [19] 李春风, 张兴政, 张洁莉, 韩阳, 宋书宏. 根癌农杆菌介导抗菌肽基因转化大豆的研究. *中国油料作物学报*, 2012, 34(4): 348–352. DOI
- [20] 黄大年, 朱冰, 杨炜, 薛锐, 肖晗, 田文忠, 李良才, 戴顺洪. 抗菌肽 B 基因导入水稻及转基因植株的鉴定. *中国科学(C 辑: 生命科学)*, 1997, 27(1): 55–62. DOI
- [21] 杨凯, 韩伟, 温莹, 刘丹丹, 薛春蕾, 逯晓萍. 转 Bt 和抗菌肽融合基因油菜植株的获得与鉴定研究. *华北农学报*, 2011, 26(2): 49–54. DOI
- [22] 田长恩, 王正询, 陈韬, 周玉萍, 黄自然, 黄亚东. 抗菌肽 D 基因导入番茄及转基因植株的鉴定. *遗传*, 2000, 22(2): 86–89. DOI