

三个烟草防御素基因的克隆及序列分析

林世锋, 任学良, 王 轶, 王仁刚*

(贵州省烟草科学研究所, 贵阳 550081)

摘 要: 为从烟草中克隆与植物抗病虫反应相关的防御素基因, 以辣椒防御素基因为探针, 通过电子克隆的方法从烟草栽培品种 K326 中克隆到 3 个防御素基因 (*NtDEF1*、*NtDEF2* 和 *NtDEF3*), 并对其进行了序列分析。结果表明, 3 个防御素 cDNA 序列均包含完整的开放读码框, 分别编码 78、77、76 个氨基酸, 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, 成熟肽含有 γ -硫素蛋白功能结构域。通过同源比对和进化分析发现, *NtDEF1*、*NtDEF2* 和 *NtDEF3* 的氨基酸序列与辣椒的一致性最高为 50%~87%, 亲缘关系较近; 但与已报道的烟草属植物防御素的一致性仅为 33%~40%, 亲缘关系较远, 表明 *NtDEF1*、*NtDEF2* 和 *NtDEF3* 是烟草中未报道的 3 个防御素基因。

关键词: 烟草; 防御素; 克隆; 序列分析

中图分类号: S572.01

文章编号: 1007-5119 (2012) 05-0019-06

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2012.05.004

In Silicon Cloning and Sequence Analysis of Three Defensin Genes in Tobacco (*Nicotiana tabacum*)

LIN Shifeng, REN Xueliang, WANG Yi, WANG Rengang*

(Guizhou Tobacco Research Institute, Guiyang 550081, China)

Abstract: In silicon cloning, three distinct defensin genes (*NtDEF1*, *NtDEF2* and *NtDEF3*) were obtained successfully from tobacco cultivar K326 by using pepper CaDEF1 gene sequence (AF442388) to be probe. Sequence analysis showed that the in silicon cloned cDNAs had a complete open reading frame (ORF) and encoded 78, 77 and 76 amino acid residues, respectively, including a strictly conserved γ -thionin domain of eight cysteines which is characteristic in plant defensins. Multiple alignment analysis based on the deduced amino acid sequences of defensin genes from different plants indicated that *NtDEF1*, *NtDEF2* and *NtDEF3* showed high similarity with 50%-87% identities to the defensins from *Capsicum annuum*. However, with 33%-40% identities to the defensins previously reported from *Nicotiana*, the evolutionary analysis showed that *NtDEF1*, *NtDEF2* and *NtDEF3* were very far related to them. In conclusion, this is the first time that the *NtDEF1*, *NtDEF2* and *NtDEF3* genes have been reported in tobacco.

Keywords: *Nicotiana tabacum*; defensin; cloning; sequence analysis

植物防御素 (Plant defensins) 是一类富含半胱氨酸的低分子量短肽, 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^[1]。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^[2-3]和抗细菌^[4], 以及蛋白酶抑制和抗虫作用^[5-6], 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^[7]。目前, 已有不同学者分别从烟草属的普通烟草 (*Nicotiana tabacum*)^[8]、高烟草 (*N. excelsior*)^[9]、圆锥烟草 (*N. paniculata*)、

渐狭叶烟草 (*N. attenuata*)^[10]和花烟草 (*N. alata*)^[11-12]中克隆到防御素基因, 其中部分基因的功能已初步明确, 如从花烟草中获得的防御素基因具有抗真菌和抗虫双重作用。

电子克隆 (In silico cloning) 是近年来伴随着基因组计划和 EST 计划而发展起来的基因克隆新方法^[13], 它依赖于各种生物信息数据库, 利用生物软件拼接延伸 EST 序列, 获得目的基因的部分乃至全长的 cDNA 序列。本研究采用电子克隆的方法获

基金项目: 贵州省科技厅农业攻关项目 (2011-3047); 贵州省烟草专卖局资助项目 (黔烟科 2009-11); 贵州省科学技术基金资助项目 (黔科合 J 字[2012]2256 号)

作者简介: 林世锋, 男, 博士, 主要从事烟草遗传育种与分子生物学研究。E-mail: linshifeng1978@163.com。*通信作者, E-mail: rengangwang@126.com

收稿日期: 2011-12-16

修回日期: 2012-03-19

得烟草栽培品种 K326 (*N. tabacum*) 的 3 个防御素基因 cDNA 序列并进行生物信息学分析, 以期为进一步研究该类基因的进化关系和功能差异, 比较其在烟草病虫害防御反应中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 烟草防御素基因的电子克隆

以辣椒防御素 CaDEF1 基因的全长 cDNA 序列 (GenBank 登陆号: AF442388)^[7] 为信息探针, 对 GenBank 中 EST_others 数据库指定物种烟草 (*Nicotiana tabacum*) 进行 BLAST 检索, 将检索到的来自于烟草栽培品种 K326 的全部 EST 序列利用 DNAMAN 6.0 软件进行拼接, 形成重叠群 (contig)。然后用此重叠群再次进行同源检索、拼接, 重复以上过程直至没有更多烟草栽培品种 K326 的重叠 EST 检出, 最终获得烟草栽培品种 K326 防御素 cDNA 序列片段。再以此片段在 GenBank 中进行 blastx 同源搜索, 与其他物种的防御素同源蛋白进行序列比较, 进而判断拼接得到的烟草防御素基因 cDNA 的正确性及其 ORF 序列的完整性。

1.2 烟草防御素基因的生物信息学分析

利用 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 提供的 ORF finder 软件对开放阅读框进行分析并翻译成蛋白质, 通过 BlastP 程序进行序列相似性分析和氨基酸保守性预测; 利用瑞士生物信息研究所网站 (<http://www.expasy.org/tools/>) 提供的 ProtParam、SignalP 和 NetPhos 软件进行蛋白的基本特性、信号肽和磷酸化位点分析, 通过 SWISS-MODEL 和 CPHmodels 在线工具对蛋白质的三级结构进行预测; 利用 <http://www.predictprotein.org/> 网站提供的 Predict Protein 软件进行蛋白质二硫键的预测; 运用 DNAMAN 6.0、ClustalX 2.0 和 MEGA3.1 软件进行氨基酸序列比对和进化树分析。

2 结果

2.1 烟草防御素基因的电子克隆

利用已知的辣椒防御素基因的核苷酸序列对 GenBank 中烟草 EST 数据库进行 BLAST 检索分析,

发现 97 条相似性高的 EST 序列来自烟草品种 K326。对它们进行重叠群分析, 结果显示 97 条 EST 可拼接成 3 个独立的 cDNA 序列, 长度为 554 bp、496 bp 和 434 bp, 代表烟草 3 个不同的防御素基因, 分别命名为 *NtDEF1*、*NtDEF2* 和 *NtDEF3* (*Nicotiana tabacum* defensins)。经 NCBI ORF finder 分析, 三者分别包括一个长度 237 bp、234 bp 和 231 bp 的开放读码框, 依次编码由 78、77 和 76 个氨基酸组成的防御素 (图 1)。

2.2 烟草防御素的结构特征分析

将推导出的 3 个烟草防御素氨基酸序列利用 SignalP 软件进行信号肽分析, 发现 *NtDEF1* 和 *NtDEF2* 蛋白氨基端的前 20 个氨基酸, *NtDEF3* 蛋白氨基端的前 19 个氨基酸为信号肽 (图 1)。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^[14]。

用推测的氨基酸序列进行 BLASTp 比较, 发现 *NtDEF1*、*NtDEF2* 和 *NtDEF3* 均具有 γ -硫素蛋白家族 (γ -thionin family) 结构域 (图 1), 该序列编码具有杀菌功能的毒素功能结构^[14-15]。

2.3 烟草防御素的基本特性分析

利用 ProtParam 软件对 3 个烟草防御素成熟蛋白进行基本特性分析, 结果显示 *NtDEF1* 含有原子总数为 855, 分子式为 $C_{259}H_{415}N_{87}O_{84}S_{10}$, 其分子量为 6412.2 Da, 理论等电点为 8.52。在氨基酸组成上, 半胱氨酸和精氨酸相同各有 8 个, 均占 13.8%; 其次是甘氨酸和苏氨酸相同各有 6 个, 均占 10.3%。总的带正电荷和总的带负电荷的氨基酸残基数分别为 9 和 6。预测该蛋白不稳定指数为 61.06, 属于不稳定蛋白。

显示 *NtDEF2* 含有原子总数为 860, 分子式为 $C_{268}H_{414}N_{90}O_{78}S_{10}$, 其分子量为 6465.3 Da, 理论等电点为 8.95。在氨基酸组成上, 半胱氨酸含量最高有 8 个, 占 14.0%; 其次是精氨酸 7 个占 12.3%。总的带正电荷和总的带负电荷的氨基酸残基数分



图 1 烟草防御素 1 (A)、2 (B) 和 3 (C) cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the tobacco defensins

注：5' 和 3' 端非翻译区以小写字母表示，编码区以大写字母表示（上面为核苷酸序列，下面为氨基酸序列），预测的信号肽以方框标出，终止密码子以星号标识，阴影部分为 γ-硫素蛋白结构域

别为 11 和 4。预测该蛋白不稳定指数为 63.59，属于不稳定蛋白。

显示 NtDEF3 含有原子总数为 879，分子式为 C₂₇₁H₄₃₀N₉₀O₈₀S₈，其分子量为 6485.4 Da，理论等电点为 9.22。在氨基酸组成上，半胱氨酸含量最高有 8 个，占 14.0%；其次是甘氨酸和精氨酸相同各有 7 个，均占 12.3%。总的带正电荷和总的带负电荷的氨基酸残基数分别为 11 和 4。预测该蛋白不稳定指数为 28.89，属于稳定蛋白。

总平均亲水性 GRAVY (grand average of hydropathicity) 分析表明，三者 GRAVY 值分别为 -0.579、-0.523 和 -0.705，这表明三者均为亲水性蛋白。

2.4 烟草防御素的二硫键预测

NtDEF1、NtDEF2 和 NtDEF3 都含有 8 个半胱氨酸，经 PredictProtein 预测软件分析，发现 8 个半胱氨酸在烟草 3 种防御素中形成的二硫键连接方式一致，均为 Cys-1-Cys-8、Cys-2-Cys-5、Cys-3-Cys-6、Cys-4-Cys-7。其中，图 2 为 NtDEF1 二硫键预测结

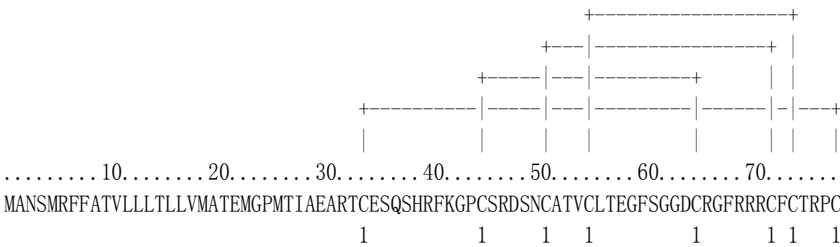


图 2 烟草防御素 NtDEF1 二硫键预测

Fig. 2 Predicted disulfide bridges in NtDEF1

果,这与典型的植物防御素二硫键结构模型相同^[14]。

2.5 烟草防御素三维结构预测

分别应用 SWISS-MODEL 和 CPHmodels 在线工具对 3 个烟草防御素进行蛋白三维结构预测,以 PDB 数据库中大麦 (*Hordeum vulgare*) 防御素 (DEF1_HORVU)^[16-17] 的三维结构 (PDB id=1gpt) 为模板,对 NtDEF1 和 NtDEF2 进行三维结构同源建模,序列一致性为 53.2%;以 PDB 数据库中小麦 (*Triticum aestivum*) 防御素 (DEF1_WHEAT)^[17-18] 的三维结构 (PDB id=1gps) 为模板,对 NtDEF3 进行三维结构同源建模,序列一致性为 46.8%。预

测结果如图 3 所示。从图中可以看出烟草三种防御素蛋白的三维结构都含有三段反向平行的 β -折叠和一段 α -螺旋,与已推导出的植物防御素蛋白结构一致。

2.6 氨基酸序列比对和同源性分析

3 个烟草防御素氨基酸序列与部分其他植物进行比对,结果显示在植物防御素中一些保守的氨基酸在烟草中同样存在 (图 4),例如:植物防御素的典型特征序列即 γ -硫素蛋白结构域在烟草中同样保守,且具有构成 4 个二硫键所需的 8 个半胱氨酸残基。利用 DNAMAN 软件对烟草 3 种防御素进行同

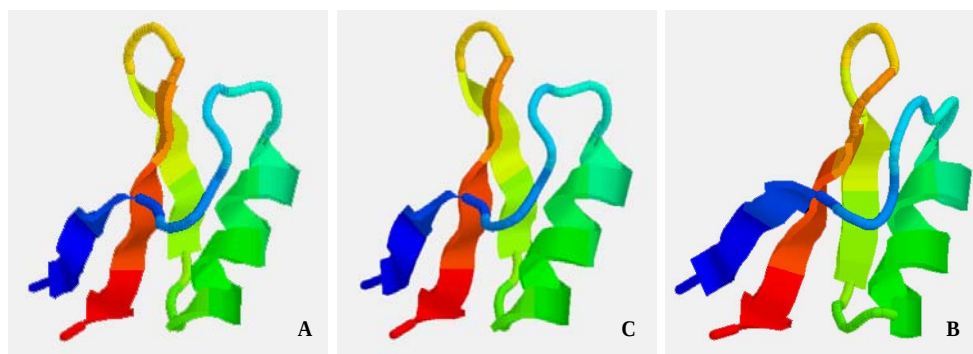


图 3 烟草防御素 1 (A)、2 (B) 和 3 (C) 的三级结构预测

Fig. 3 Tertiary structure prediction of the tobacco defensins

I	MANS	MRFFATVLL	LTLL	LV	MATE	MGPM	TI	ABAR	TCES	QSHRFK	GPCSR	DS	NCATV	CLTEG	59			
II	MAGYPKVV	ATVFL	MMML	VF	ATE	MGPM	V	ABAR	TCES	QSHRFK	GLCF	SK	NCASV	CHTEG	58			
III	..	MKHFPTT	AVLL	FL	ML	LL	SANEI	GPRK	VEAK	LCQYK	SR	TFFG	VOVS	GNTGN	QKQCGEA	57		
IV	MAHS	MRFFAI	VLL	LL	AM	LV	MATE	MGPM	RI	VEAR	TCES	QSHRFK	GVCA	SETNC	ASV	CQTEG	59	
V	MAGFSKVI	ATI	FL	MMML	VF	ATE	MG	..	MV	ABAR	TCES	QSHRFK	GLCF	SK	NCGSV	CHTEG	55	
VI	MARSLCF	MAFAI	LAMML	LV	AYE	..	..	..	..	VOAR	ECKTES	NTFP	PGI	CI	TKPP	CRKACI	SEK	53
VII	MARSLCF	MAFAI	LAMML	LV	AYE	..	..	..	..	VOAR	ECKTES	NTFP	PGI	CI	TKPP	CRKACI	SEK	53
VIII	MARSLCF	MAFAI	LAMML	LV	AYE	..	..	..	..	VOAR	ECKTES	NTFP	PGI	CI	TKPP	CRKACI	SEK	53
IX	MARSLVCF	MAFAI	LAVML	LV	AYD	..	..	..	..	VEAK	DCKTES	NTFP	PGI	CI	TKPP	CRKACI	KEK	53
X	MARSLCF	MAFAVL	LAMML	LV	AYE	..	..	..	..	VOAKS	TCKAES	NTFP	GLCI	TKPP	CRKACI	SEK	54	
XI	MARSLCF	MAFAVL	LAMML	LV	AYE	..	..	..	..	VOAKS	TCKAES	NTFEG	FCVTK	PPCRR	ACI	KEK	54	
										*		*		*		*		
I	FS	GGDC	RGFR	RR	RC	FCT	TRPC	..	..	..	..	..	..	..	..	..	78	
II	FY	GGCH	RGFR	RR	RC	FCT	TRHC	..	..	..	..	..	..	..	..	..	77	
III	FD	GC	RGH	GV	RR	RCY	CYRTC	..	..	..	..	..	..	..	..	..	76	
IV	FS	GGDC	RGFR	RR	RC	FCT	TRPC	..	..	..	..	..	..	..	..	..	78	
V	FN	GGCH	RGFR	RR	RC	FCT	TRHC	..	..	..	..	..	..	..	..	..	74	
VI	FTDGH	CSKI	LRRCL	CTK	PCV	FDEKMTKTGAEI	LAE	EAKTLAA	ALL	EEEEI	MDN	..	..	..	..	..	105	
VII	FTDGH	CSKLL	RRCL	CTK	PCV	FDEKMTKTGAEI	LAE	EAKTLAA	ALL	EEEEI	MDN	..	..	..	..	..	105	
VIII	FTDGH	CSKLL	RRCL	CAK	PCV	FDEKMTKTGAEI	LAE	EAKTLAA	ALL	EEEEI	MDN	..	..	..	..	..	105	
IX	FTDGH	CSKI	LRRCL	CTK	PCV	FDEKMTKTGAEI	LAE	EAKTLAA	ALL	EEEEI	MDN	..	..	..	..	..	105	
X	FTDGH	CSKI	LRRCL	CYK	PCV	FDEKMTKTGAEI	LAE	EAKTLAA	ALL	EEEEI	MDN	..	..	..	..	..	106	
XI	FTDGH	CSKI	LRRCL	CYK	PCV	FDEKMTKTGAEI	LAE	EAKTLAA	ALL	EEEEI	MDN	..	..	..	..	..	106	
										*		*		*		*		

图 4 不同植物防御素基因氨基酸序列同源性比较

Fig. 4 Alignment of deduced amino acid sequences of defensin genes of different plants

注: I: NtDEF1; II: NtDEF2; III: NtDEF3; IV: 辣椒 (AF442388_1); V: 辣椒 (DEF2_CAPAN); VI: 花烟草 (DEF_NICAL); VII: 普通烟草 (DEF_TOBAC); VIII: 普通烟草 (ABU40984); IX: 高烟草 (BAA21114); X: 圆锥烟草 (DEF1_NICPA); XI: 渐狭叶烟草 (AAS13436); γ -硫素蛋白结构域用下划线表示; 低复杂性区域用下划线虚线表示; 保守半胱氨酸位点用星号表示。

源性分析显示, NtDEF1 和 NtDEF2 的一致性最高为 72%, NtDEF1 和 NtDEF3 的一致性最低为 40%, NtDEF2 和 NtDEF3 的一致性为 47%。与其他物种相比较,三者均与辣椒的一致性最高,在 50%~87%。尽管在普通烟草、高烟草、圆锥烟草、渐狭叶烟草及花烟草中已有防御素基因的报道,但是与其一一致性都较低,在 33%~40%,且氨基酸 C-端不具备与其对应的低复杂性区域 (Low Complexity Region, LCR),表明 NtDEF1、NtDEF2 和 NtDEF3 是 3 个新的烟草防御素基因。

2.7 系统进化树分析

从 GenBank 上获得已知的植物防御素的氨基酸序列经 ClustalX 2.0 比对后,利用 Mega 3.1 以邻位相接 (NJ) 构建系统进化树 (图 5)。结果表明,防御素基因在烟草、辣椒、番茄、拟南芥等植物中均以多种形式存在,且序列差异较大,在系统进化树中分散在遗传距离很远的分支上。NtDEF1、NtDEF2 和 NtDEF3 处于第 I 分支的不同小分支上,而已报道的烟草属防御素基因均处于第 II 分支上,进一步证明前者是烟草 3 种新的防御素基因。

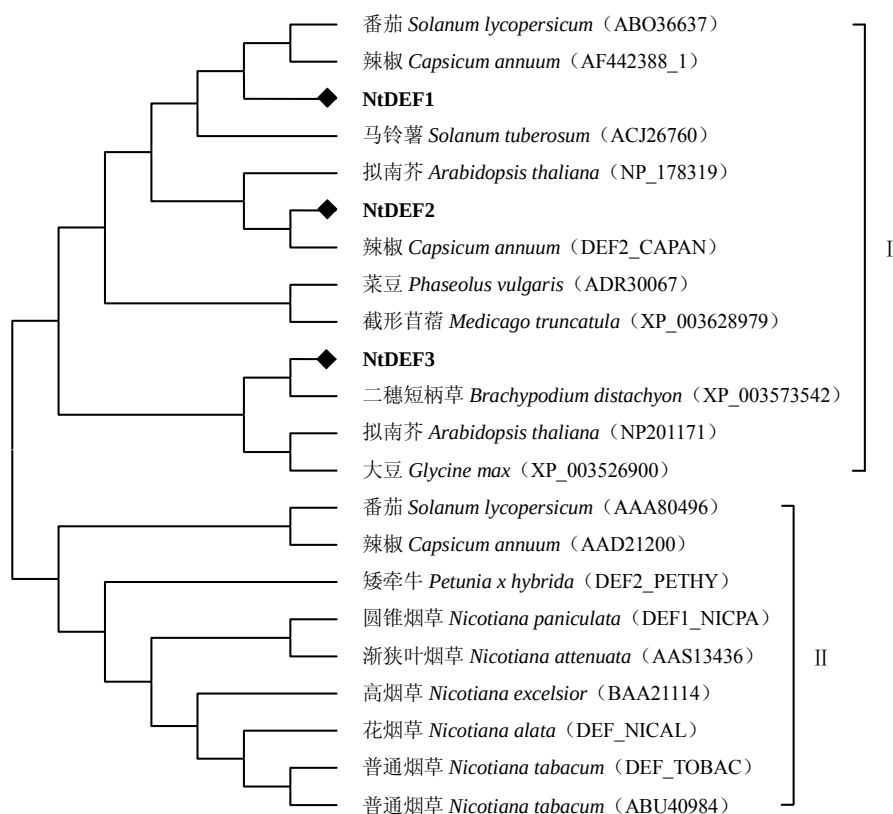


图 5 烟草与其他物种防御素同源蛋白的系统进化分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of defensin genes from tobacco and other species

3 讨 论

基于表达序列标签 (Expressed Sequence Tags, EST) 的电子克隆策略,具有简单、快速、针对性强等优点,现已成为一种广泛使用的基因克隆技术^[13]。本研究以烟草与辣椒同属茄科植物,物种间同源基因序列相对保守为切入点,以辣椒防御素 CaDEF1 基因 cDNA 序列作为探针,对烟草 EST 数

据库进行检索拼接,成功克隆到目的物种的 3 个新防御素基因序列。在电子克隆检索过程中,目标物种锁定烟草 (*Nicotiana tabacum*),全部 EST 序列来源于同一品种 K326,避免了品种间基因多态性造成序列拼接工作的复杂性,进而增加了电子克隆的准确性。同时, K326 是我国主栽烟草品种之一,对其重要功能基因的研究,势必具有重要的理论

及应用价值。

研究证实植物防御素具有抗真菌^[2-3]、抗菌^[4]和蛋白酶抑制剂^[5]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有前景^[14-15]。 γ -硫素蛋白超家族功能区具有严格保守的8个半胱氨酸残基,形成4个分子内二硫键以稳定三段反向平行的 β -折叠和一段 α -螺旋,从而形成具有复杂三维折叠结构的抗菌短肽^[14-15]。尽管本研究克隆到的3个防御素同样具备上述保守功能区,但3个防御素在氨基酸组成上存在一定的区别,如缬氨酸、赖氨酸、苏氨酸和苯丙氨酸的数目差异较显著。这些氨基酸的差异是否造成功能上的差异还需要进一步深入研究。

目前,在番茄、辣椒等茄科植物中已克隆得到多个防御素 cDNA 序列,其中辣椒防御素 CaDEF1 和 CaDEF2 的氨基酸序列一致性为 64%,它们在根、茎、叶和果实中的表达模式各不相同^[7,19]。我们利用本研究克隆的防御素基因进行 Blastn 同源检索时,在烟草的 EST 数据库中得到了数目不同且高度同源的烟草品种 K326 的防御素 EST 序列,其中以 NtDEF1 为最高。这预示着在烟草中尽管存在结构相对保守的多种防御素,但是其表达分布或者在同一组织中的表达量可能各不相同,提示它们可能在不同或相同的组织中发挥着特异的作用。

参考文献

- [1] Broekaert W F, Terras F R, Cammue B P, et al. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108: 1353-1358.
- [2] Lai F M, DeLong C, Mei K, et al. Analysis of the DRR230 family of pea defensins: gene expression pattern and evidence of broad host-range antifungal activity [J]. *Plant Sci*, 2002, 163: 855-864.
- [3] Solis J, Medrano G, Ghislain M. Inhibitory effect of a defensin gene from the Andean crop maca (*Lepidium meyenii*) against *Phytophthora infestans* [J]. *J Plant Physiol*, 2007, 164: 1071-1082.
- [4] Choi Y, Choi Y D, Lee J S. Antimicrobial activity of γ -thionin-like soybean SE60 in *E. coli* and tobacco plants [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375: 230-234.
- [5] Wijaya R, Neumann G M, Condrón R, et al. Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin [J]. *Plant Sci*, 2000, 159: 243-255.
- [6] Chen K C, Lin C Y, Kuan C C, et al. A novel defensin encoded by a mungbean cDNA exhibits insecticidal activity against bruchid [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 7258-7263.
- [7] Do H M, Lee S C, Jung H W, et al. Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (CADEF1) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum* [J]. *Plant Sci*, 2004, 166: 1297-1305.
- [8] Gu Q, Kawata E E, Morse M J, et al. A flower-specific cDNA encoding a novel thionin in tobacco [J]. *Mol Genet*, 1992, 234: 89-96.
- [9] Yamada S, Komori T, Imaseki H. cDNA cloning of γ -thionin from *Nicotiana excelsior* (Accession No. AB005266) (PGR97-131) [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115: 314.
- [10] Lou Y, Baldwin I T. Nitrogen supply influences herbivore-induced direct and indirect defenses and transcriptional responses in *Nicotiana attenuate* [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135: 496-506.
- [11] Lay F T, Brugliera F, Anderson M A. Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131: 1283-1293.
- [12] Lay F T, Schirra H J, Scanlon M J, et al. 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 [J]. *J Mol Biol*, 2003, 325: 175-188.
- [13] Gill R W, Sanseau P. Rapid in silico cloning of genes using expressed sequence tags (ESTs) [J]. *Biotechnol Annu Rev*, 2000, 5: 25-44.
- [14] Carvalho A O, Gomes V M. Plant defensins-prospects for the biological functions and biotechnological properties [J]. *Peptides*, 2009, 30: 1007-1020.
- [15] Pelegrini P B, Franco O L. Plant γ -thionins: novel insights on the mechanisms of actions of a multi-functional class of defense proteins [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37: 2239-2253.
- [16] Mendez E, Moreno A, Colilla F, et al. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, γ -hordothionin, from barley endosperm [J]. *Eur J Biochem*, 1990, 194: 533-539.
- [17] Bruix M, Jimenez M A, Santoro J, et al. Solution structure of gamma 1-H and gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by 1H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins [J]. *Biochemistry*, 1993, 32: 715-724.
- [18] Colilla F J, Rocher A, Mendez E. γ -Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm [J]. *FEBS Lett*, 1990, 270: 191-194.
- [19] Meyer B, Houlne G, Pozueta-Romero J, et al. Fruit-specific expression of a defensin-type gene family in bell pepper. Upregulation during ripening and upon wounding [J]. *Plant Physiol*, 1996, 112: 615-622.