

# 转基因植物抗病毒策略及其风险分析

王平安<sup>1</sup>, 吴刘记<sup>1</sup>, 杨艳坤<sup>2</sup>, 吴连成<sup>1</sup>, 库丽霞<sup>1</sup>, 陈彦惠<sup>1\*</sup>

(1. 河南农业大学 农学院, 河南 郑州 450002; 2. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450052)

**摘要:** 简要讨论了近年来植物抗病毒基因工程的几种策略, 主要有: 外壳蛋白介导的抗性策略、复制酶介导的抗性策略、运动蛋白介导的抗性策略、RNA 干扰介导的抗性策略。分析了几种抗病毒策略可能存在的潜在风险, 主要包括: 异源包壳、重组、协生、RNA 干扰介导的抗性被含有沉默抑制子的病毒侵染后攻破等, 并根据风险产生的机制分析了各种风险产生的原因, 提出一些减少风险的方法。

**关键词:** 植物病毒; 基因工程; 抗病毒策略; 潜在风险

**中图分类号:** Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)02-0019-06

## The Antivirus Strategies and Potential Risks of Virus-resistant Transgenic Plants

WANG Ping-an<sup>1</sup>, WU Liu-ji<sup>1</sup>, YANG Yan-kun<sup>2</sup>, WU Lian-cheng<sup>1</sup>, KU Li-xia<sup>1</sup>, CHEN Yan-hui<sup>1\*</sup>

(1. Agronomy College of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Bioengineering Department, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

**Abstract:** The strategies of plant anti-virus genetic engineering in recent years were briefly discussed. These strategies mainly include coat protein-mediated resistance strategy, replicase-mediated resistance strategy, movement protein-mediated resistance strategy and RNA interference-mediated resistance strategy. In addition, the potential risks of these strategies were also analyzed, mainly including heterologous encapsidation, recombination, synergism, and broking of RNA interference by virus-encoded RNA silencing suppressor. Based on the mechanisms of risk production, the reasons were analyzed and several effective methods were also developed to reduce the risks.

**Key words:** Plant virus; Genetic engineering; Virus-resistant strategies; Potential risk

植物病毒病是农业生产上最严重的病害之一, 有“植物癌症”之称。近年来, 作物病毒病发生的面积和种类不断扩大增多, 给农业生产造成了巨大损失, 传统的防治方法已无法从根本上解决病毒病的危害问题<sup>[1]</sup>。随着基因工程的发展, 植物转基因技术也日益成熟, 为防治病毒病开辟了新的途径<sup>[2]</sup>。目前, 人们已经发现和提出许多转基因抗病毒策略,

主要包括利用病毒外壳蛋白介导的抗性途径、利用病毒复制酶介导的抗性途径、利用运动蛋白介导的抗性途径和利用 RNA 干扰介导的抗性途径, 并把这些策略应用于改善植物的抗病性, 取得了明显成效。例如, 针对玉米矮花叶病毒(MDMV)培育的转基因玉米植株或品系均表现出明显的抗病性<sup>[3]</sup>; 美国批准在夏威夷商业化种植的抗番木瓜环斑病毒

收稿日期: 2010-09-25

基金项目: 国家转基因重大专项(2008ZX08003-001)

作者简介: 王平安(1984-), 男, 河南兰考人, 在读硕士研究生, 研究方向: 玉米遗传育种及作物分子生物学。

E-mail: Pinganwang001@163.com

\*通讯作者: 陈彦惠(1958-), 男, 河南南阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事作物遗传育种教学与研究。

E-mail: chy989@sohu.com

(PRSV)的转基因番木瓜,解决了长期困扰番木瓜生产的环境病毒病问题,给农业生产带来了一定的经济效益和社会效益<sup>[4]</sup>。

然而,就在转基因抗病毒展现出诱人的前景时,人们对抗病毒转基因植物释放的安全性问题的关注也越来越多。鉴此,就当前常用的主要转基因抗病毒途径作一介绍,并对抗病毒转基因植物可能存在的潜在风险进行探讨。

## 1 植物抗病毒基因工程的主要方法

### 1.1 利用病毒外壳蛋白介导的抗性

利用病毒外壳蛋白介导的抗性途径是研究最早,也是目前比较成熟的抗病毒途径。该途径主要是通过体外克隆病毒的外壳蛋白(coat protein, CP)基因,体外重组并构建表达载体,然后将重组的 CP 基因转化到植物细胞内,使其在植物体内表达,当入侵病毒的裸露核酸进入植物体后,它们立即被植物细胞中的自由 CP 重新包裹,阻止了入侵病毒核酸的翻译和复制,从而使转基因植物获得抗病毒的能力。典型的转基因抗病毒例子就是转化烟草花叶病毒(TMV)外壳蛋白基因诱导植物抗病毒的试验,该研究首次成功将 TMV 的 CP 基因导入烟草,培育出能稳定遗传的抗 TMV 烟草植株,开创了植物抗病育种的新领域<sup>[5]</sup>。此后,这一策略被广泛应用于其他众多的转基因植物。

田间试验证明,转外壳蛋白基因的植物从不感病到推迟和延缓症状的产生,表现出不同程度的抗病性。在某些情况下,转化一种病毒的外壳蛋白基因可以抵抗不同菌株以及近缘病毒的侵染<sup>[6]</sup>。这种策略的抗性机制,可能是转基因外壳蛋白和侵染病毒外壳蛋白之间发生相互作用:①转 TMV 外壳蛋白基因的植物对病毒粒子的侵染表现高抗,但是对病毒 RNA 或萃取过的病毒没有抗性<sup>[7]</sup>;②转外壳蛋白基因的植物介导对亲缘关系近的疾病抗性比亲缘关系远的病毒抗性强<sup>[8]</sup>;③转外壳蛋白突变体基因影响蛋白二级结构间的静电相互作用力,表明改良外壳蛋白产生的抗性需依照它们自身的组装能力<sup>[9]</sup>。Asurmendi 等<sup>[10]</sup>认为,外壳蛋白介导的抗性水平与外壳蛋白的聚集状态有关,受蛋白四级结构而不是二级结构的调节。

虽然目前对外壳蛋白介导的抗性机制仍不完全清楚,但人们已成功把这种途径应用于多种植物的抗病性研究。Murry 等<sup>[11]</sup>将 MDMV 的 CP 基因导入玉米,获得了抗 MDMV 的转基因玉米。杨荣昌等<sup>[12]</sup>通过农杆菌介导法获得了 42 株转黄瓜花叶病

毒(CMV)CP 基因的番茄植株,通过苗期人工接种 CMV 鉴定,转基因植株表现出一定的抗性。

### 1.2 利用复制酶介导的抗性

病毒复制酶是指由病毒编码的能特异合成病毒正负链 RNA 的 RNA 聚合酶(RdRp),其核心功能是合成全长的病毒基因组 RNA,一般是在病毒核酸进入寄主细胞并结合到寄主核糖体之后形成。复制酶介导的抗性可能是由于转基因植株所表达的复制酶反向调控了病毒的复制,使复制率降低,或转基因植株表达突变或缺失的复制酶与野生型的病毒复制酶产生竞争而干扰病毒的复制。1990 年, Golembooki 等<sup>[13]</sup>首次将 TMV 54 kD 蛋白基因转入烟草,发现转基因烟草对 TMV 表现极强的抗性。此后,通过复制酶介导从而使转基因植物获得对病毒抗性的方法便被广泛应用于植物抗病毒基因工程研究中。

对于这种抗性的机制, Lomonossoff 等<sup>[6]</sup>认为是转入的 mRNA 与病毒的复制酶进行无效结合抑制了复制酶的正常功能,或者是 mRNA 诱导了植物的自然抗病性。Carr 等<sup>[14]</sup>认为,转基因植物表达的复制酶蛋白在病毒的侵染过程中作为一种调节蛋白发挥正常功能,打破了正、负链复制的平衡,或者干扰了控制复制酶活性的反馈抑制途径,影响了复制酶复合体的装配。

复制酶介导的抗性涉及 RNA 水平和蛋白表达水平,显示了其抗病机制的复杂性,还需进一步的研究,但通过这种途径获得对病毒的抗性已经在许多病毒上得到了验证。Braun 等<sup>[15]</sup>通过将 RdRp 基因在转基因植物体内表达诱导了烟草对马铃薯 X 病毒(PVX)的抗性。雷海英等<sup>[16]</sup>将 MDMV 复制酶基因通过花粉介导法转化玉米成功获得了抗矮花叶病的玉米株系。

### 1.3 利用运动蛋白介导的抗性

运动蛋白介导的抗性,是指人们应用转基因技术将功能异常的运动蛋白(movement protein, MP)转入植物后,植物对病毒表现出广谱抗性的现象。病毒在植物体内细胞间的移动和扩散依赖于运动蛋白与胞间连丝的结合,如果能够干扰或阻遏运动蛋白与胞间连丝的结合,就可以阻止病毒的转移,将已经侵入植物体内的病毒局限在最初的侵染部位,从而达到抗病毒的目的。

Cooper 等<sup>[17]</sup>将缺失突变的 TMV MP 基因转入烟草,转化植株不仅对 TMV 具有较高抗性,而且对多种不相关病毒也都表现抗性,由此认为这种抗性机制是由于突变 MP 占据了植物病毒正常 MP 与寄生细胞胞间连丝的结合位点,干扰了 TMV 正常

MP 的活性,从而使植物获得了对病毒的广谱抗性。Malyshenko 等<sup>[18]</sup>在烟草中表达雀麦花叶病毒(BMV)的MP,也能获得对TMV的抗性,可能是由于烟草并不是BMV的宿主,转入的BMV MP在烟草中的功能是异常的,干扰了TMV的正常转移,从而使烟草产生抗性。

#### 1.4 利用RNA干扰介导的抗性

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是指双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)在细胞内特异性地诱导与之同源互补的mRNA降解,使相应基因的表达关闭,从而引发转录后水平基因沉默的现象。植物中RNA沉默是植物抵抗外来核酸(病毒)入侵,并保护基因组完整性的一种防御机制。植物病毒主要依赖于寄主的复制转录体系完成自身的繁殖和侵染,导致植物感病。在相对中性的自然界中,植物体天然的RNAi系统不能起到完全或较高水平的抵御某种病毒侵染的作用,而如果人为地将某种病毒的某一序列设计成双链结构,导入植物体内,使之表达可诱发RNAi的dsRNA,通过诱导的RNAi强化植物体内天然的RNAi抗病毒机制,就有可能获得较高抗性的转基因植物,从而达到延迟和减轻病毒病害的目的。

人们在研究蛋白介导抗性时发现,植物对病毒的抗性与转基因编码的病毒蛋白的表达没有必然的联系,即使在病毒蛋白表达量很低甚至不能检测到的情况下对病毒抗性仍然很强,后来研究发现,这是一种在转录水平上专一性敲除RNA序列的抗病毒新方法,即RNA干扰或RNA沉默<sup>[19]</sup>。基于这种RNA序列专一性降解理念,Lindbo等<sup>[20]</sup>提出了RNA介导的抗病模型,认为转基因RNA专一性诱导病毒基因组中与自身序列相同的病毒RNA降解,从而使植物表现出对病毒的抗性。此后,Hamilton等<sup>[21]</sup>证实并补充了这种模型,认为转基因后产生的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)是促使病毒RNA序列专一性降解的决定因素。Smith等<sup>[22]</sup>研究发现,相比于单链正义或反义RNA,双链RNA尤其是发夹式结构的RNA(hpRNA)对RNA沉默的效率有非常显著的提高。如果在反向重复序列间加入一段非编码序列如内含子,转录后形成含有内含子的长双链RNA发夹结构,其在植物体内Dicer酶作用下被切割成21~23个核苷酸的特殊小双链RNA,更能有效地引发RNAi反应。

基于RNA干扰技术的原理,人们将病毒的某一序列设计成双链结构导入植物体内使之表达,通过RNA干扰机制对病毒基因组的特异性切割降

解,有效地提高了植物的抗病毒能力。马中良等<sup>[23]</sup>根据水稻矮缩病毒(RDV)序列,构建了相关的RNAi载体,导入水稻中,发现转化植株对RDV有很高的抗性。赵明敏等<sup>[24]</sup>以TMV CP基因为靶位,设计合成干扰序列结构导入烟草中,结果表明,干扰序列对TMV有明显的抑制作用。

综上4种转基因抗病毒途径可以看出,在一定时期内它们在改良植物病毒抗性方面都发挥了重要作用,呈现出了传统抗病毒方法无法比拟的优越性。然而,随着更为深入的研究发现,不同的方法均有一定的优点和不足。Register等<sup>[7]</sup>研究表明,外壳蛋白介导的抗性主要是在侵染发病早期起作用且只是推迟发病,对于反复感染的田间作物以及多年生植物不能有效地控制病毒病,对于高剂量的接种病毒以及裸露的RNA病毒不起作用。Malyshenko等<sup>[18]</sup>研究表明,复制酶介导的抗性能抵抗高剂量的接种病毒及裸露的病毒RNA且具有持久性,但作用范围相对较窄,具有明显的株系特异性。Lapidot等<sup>[25]</sup>研究表明,运动蛋白介导的抗性表现在病毒侵染的中晚期,其不干扰病毒的早期侵染,并且只有缺陷型或异源的MP才能介导植物对病毒的抗性,功能完整的MP不但对病毒侵染不起作用,甚至还提高对病毒的敏感性。相对于以上3种抗病毒途径,RNA干扰介导的抗病毒策略是最近发现的一种新策略,它不但具有抗病能力强,抗性不易被高剂量的接种病毒攻破等优点,而且转基因后不在植物体内产生蛋白质,从而避免了外源蛋白在植物体内的积累,减少了异质壳体化的潜在风险且抗病性持久,抗性一旦获得,可终身保持并可稳定遗传<sup>[26]</sup>。

## 2 植物抗病毒转基因研究和应用中的安全问题

自20世纪80年代以来,植物抗病毒基因工程研究不论在深度上还是广度上都进展非常迅速,其应用前景十分引人注目,然而就在它诱人的前景初见端倪时,人们对抗病毒转基因植物释放的安全性问题的关注也越来越多。目前,已有很多研究提出抗病毒转基因植物释放可能对生态环境存在着潜在风险,主要集中在异源包壳、重组、协生、RNA干扰介导的抗性能被含有病毒抑制子的病毒侵染所攻破等几个方面。

### 2.1 异源包壳

异源包壳是指一种病毒的基因组在装配成粒子的过程中被其他病毒的外壳蛋白包裹的现象,其潜在的风险是可能会导致病毒由新的传播方式或新的

传播介体传播。Chen 等<sup>[27]</sup>曾报道 CMV 的外壳蛋白包装 TMV 的基因组,结果原先不能被昆虫传播的 TMV 可以被昆虫传播,引起烟草花叶病发生。Jarvis 等<sup>[28]</sup>报道,含一种马铃薯 Y 病毒组病毒外壳蛋白基因的转基因烟草被另一种马铃薯 Y 病毒组病毒感染后,转基因植物上除了出现正常的感染病毒外,还有一种由转基因植物合成的外壳蛋白包装的病毒。然而,有研究表明,由于转基因表达的 CP 量很低,侵染病毒本身的 CP 量却很高,因而病毒基因组通常包裹在自身的 CP 内,异源包壳发生的概率极小,即使侵染的病毒获得了转化 CP 的特性,因异源包壳的病毒只能被新的介体传播一次,可能的危害也是很低的<sup>[29]</sup>。

## 2.2 重组

病毒之间的重组或相似核苷酸之间的交换,都可导致新病毒产生。大多数植物病毒是单链 RNA 病毒,虽然很少发生 RNA-RNA 之间的重组,但并非不能发生。在抗病毒转基因植株中,转入的病毒 CP 基因与感染病毒基因的相关核苷酸之间会发生重组,可能产生新的病毒。Greene 等<sup>[30]</sup>报道,将豇豆褪绿花叶斑驳病毒(CCMV)的 CP 基因部分序列转化本氏烟(*N. benthamiana*)后再接种 CCMV 的缺失突变体(该突变体不能在本氏烟上产生系统侵染),突变体病毒能重组而恢复其功能。Borja 等<sup>[31]</sup>发现,番茄丛矮病毒(TBSV)CP 突变体和转基因 CP 之间由于发生了重组而导致野生型病毒的再生。然而,Falk 等<sup>[32]</sup>认为,转基因植株中的 RNA 与野生病毒 RNA 基因组之间重组率很低,即使发生了重组,新的重组病毒在整个病毒侵染周期的一系列过程中,也不会有更高的生活力,抗病毒转基因植物中,发现有重组产生的几乎都是运用病毒的部分缺失突变体接种转基因植物而产生的,这很可能是由于过高的选择压力造成的。

## 2.3 协生

病毒的协生作用是指病毒复合侵染后能引起病害症状加重,并导致至少一种病毒在植物中的浓度增加。Talian sky 等<sup>[33]</sup>报道,番茄不育病毒(TAV)单独侵染黄瓜时仅局限在接种的叶片,但和 CMV 共同侵染时就能够变成系统侵染,认为造成这种现象的原因是病毒的协生作用。协生作用可使转基因植物成为病毒的系统寄主,或使病毒在转基因植物组织中的浓度增高,加重病毒病的症状。通常认为协生作用的分子基础是互补,但最近有研究表明,某些协生作用的分子基础不是互补。Pruss 等<sup>[34]</sup>发现,表达马铃薯 Y 病毒属病毒 P1/HC-Pro 的烟草

接种 PVX、CMV 或 TMV 也能产生协生作用,并证明这种协生作用是由于 RNA 沉默机制受到抑制造成的。从生物安全性考虑,由这种协生作用引起的风险可通过不用病毒的沉默抑制子基因而避免。

## 2.4 RNA 干扰介导的抗病性被攻破

植物病毒为克服 RNA 沉默实现成功侵染,能够编码一些具有沉默抑制功能的蛋白质,称为 RNA 沉默抑制子。RNA 沉默抑制子能够影响 siRNA 的代谢或影响沉默信号的系统性传播,进而抑制 RNA 干扰介导的抗病性。Savenkov 等<sup>[35]</sup>用含有 RNA 沉默抑制子的病毒侵染由 RNA 沉默机制介导的抗病转基因植物,结果该病毒对 RNA 沉默产生了抑制作用,导致转基因 mRNA 的积累增加,抗病性丧失。Guo 等<sup>[36]</sup>研究发现,CMV 编码的 2b 蛋白能够通过阻断 RNA 沉默信号的传递而抑制沉默的扩散。还有研究表明,甜菜黄化病毒(BYV)的 p21 蛋白和番茄丛矮病毒的 p19 蛋白能够结合并灭活 siRNA,进而抑制 RNA 干扰<sup>[37]</sup>。因此,在应用 RNA 干扰介导的抗病毒策略时应充分考虑病毒的特性,在某一种植区内如有与转基因植物共存的含有沉默抑制子的病毒,可通过构建抗侵染病毒和沉默抑制子病毒的双抗载体转化植物,以避免转基因植物大田释放后,沉默抑制子抑制 RNA 干扰的成效,降低植物的抗病性<sup>[38]</sup>。

## 3 转基因抗病毒工程的发展前景与展望

通过众多科学家多年的努力,植物抗病毒研究已经取得了长足的进展,尤其是近年来 RNA 干扰介导抗病毒方法的应用更加促进了抗病毒转基因工程的发展。目前,人们通过应用各种抗病毒策略,成功获得了很多不同程度抗病性的转基因植株,有的已进入了商业化阶段。植物抗病毒基因工程已成为改良植物病毒抗性的重要手段,给农业生产注入了新的活力,其应用前景十分引人注目。但是现在转基因抗病毒工程还有许多问题需要解决,比如,各种抗病毒策略的抗病机制还不是十分清楚,目前人们对转基因抗病毒的研究多在实验室,抗病植株的大田抗性尚待观测。此外,弄清楚各种抗病毒方法的局限性和潜在的风险,尤其是 RNA 介导的病毒抗性被病毒编码的沉默抑制子攻破的机制和沉默抑制子的应用等研究方向上更是给科学家提供了更多的研究空间。

针对目前抗病毒转基因作物的研究现状,应加强开展各种抗病毒策略的基础研究,探讨抗性机制,

以求更准确有效地导入合适的外源基因,以及应用于病毒侵染早期的 CP 基因介导的抗病性、广谱的运动蛋白介导的抗病性与作用于侵染后期的复制酶基因介导的抗病性相结合的方法来获得广谱的、高度的抗性,和为克服 RNA 干扰介导的抗病性抗病谱窄的缺点,挖掘抗病毒新方法,如将不同种类的病毒不同长度的基因片段连接在一起共同转化植物或将不同种类的病毒构建到一个发夹结构中转化植物。大力发展能够快速准确检测抗病毒转基因作物释放的生态风险的新方法和新技术,建立抗病毒转基因作物的安全性评价技术体系,构建严密的、科学的、合理的风险评估试验设计和试验程序,对抗病毒转基因作物的商业化大面积释放可能存在的潜在风险进行长期的监测监控研究,为抗病毒转基因作物的研究开发和控制商业化释放等方面积累足够充分的数据和资料。

总之,只要加大抗病毒转基因方法研究的广度和深度,加强风险监管和监控,完全可以控制抗病毒转基因技术可能带来的负面影响,使抗病毒转基因工程更好地应用于农业生产和服务人类。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 张德福, 蔡丽, 王书丽, 等. 植物抗病毒机制及抗病毒基因工程策略研究进展[ J ]. 河南农业科学, 2008( 11 ): 18-24.
- [ 2 ] 张振臣, 吕国强. 河南省植物病毒病发生情况及防治建议[ J ]. 河南农业科学, 2002( 11 ): 23-25.
- [ 3 ] 陈谷, 叶长明, 李宝健, 等. 植物抗病毒基因工程的研究进展[ J ]. 生物技术通报, 1999, 15( 6 ): 17-22.
- [ 4 ] Fuchs M, Gonsalves D. Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: Lessons from realistic field risk assessment studies[ J ]. Annu Rev Phytopathol, 2007, 45: 173-202.
- [ 5 ] Abel P, Nelson R S, Hoffmann N, *et al.* Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene[ J ]. Science, 1986, 232: 738-743.
- [ 6 ] Lomonosoff G P. Pathogen-derived resistance to plant viruses[ J ]. Ann Rev Phytopathol, 1995, 33: 323-343.
- [ 7 ] Register J C, Beachy R N. Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection[ J ]. Virology, 1988, 166: 524-532.
- [ 8 ] Nejdat A, Beachy R N. Transgenic tobacco plants expressing coat protein gene of tobacco mosaic virus are resistant to some other tobamoviruses[ J ]. Mol Plant-Microbe Interact, 1990, 3: 247-251.
- [ 9 ] Bendahmane M, Fitchen J H, Zhang G, *et al.* Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic tobamovirus: correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance[ J ]. Virology, 1997, 71: 7942-7950.
- [ 10 ] Asurmendi S, Berga R H, Smitha T J, *et al.* Aggregation of TMV CP plays a role in CP functions and in coat-protein mediated resistance[ J ]. Virology, 2007, 366: 98-106.
- [ 11 ] Murry L E, Elliott L G, Capitant S A, *et al.* Transgenic corn plants expressing M DMV strain B coat protein are resistant to mixed infectious of maize dwarf mosaic virus and maize chlorotic mottle virus[ J ]. Bio Technology, 1993, 11( 13 ): 1559-1564.
- [ 12 ] 杨荣昌, 徐鹤林, 龙明生, 等. 表达黄瓜花叶病毒外壳蛋白的转基因番茄及其对 CMV 的抗性[ J ]. 江苏农业学报, 1995, 11( 1 ): 40-44.
- [ 13 ] Golemboski D B, Lomonosoff G P, Zaitlin M. Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus[ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 6311-6315.
- [ 14 ] Carr J P, Gal-on A, Palukaitis P, *et al.* Replicase-mediated resistance to cucumbr mosaic virus in transgenic plants involves suppression of both virus replication in the inoculated leaves and long distance-movement[ J ]. Virology, 1994, 199: 439-447.
- [ 15 ] Braun C, Hemenway C. Expression of amino-terminal portions or full length viral replicase genes in transgenic plants confers resistance to potato virus X infection[ J ]. Plant Cell, 1992, 4: 735-744.
- [ 16 ] 雷海英, 孙毅, 王志军, 等. 病毒复制酶基因介导玉米抗矮花叶病的研究[ J ]. 华北农学报, 2008, 23( 5 ): 114-117.
- [ 17 ] Cooper B, Lapidot M, Heick J A, *et al.* A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility[ J ]. Virology, 1995, 206: 307-313.
- [ 18 ] Malyshenko S L, Kondakova O A, Nazarova J V, *et al.* Reduction of tobacco mosaic virus accumulation in transgenic plants producing non-functional viral transport proteins[ J ]. J Gen Virol, 1993, 74: 1149-1156.
- [ 19 ] Ding S W, Voinnet O. Antiviral immunity directed by small RNA[ J ]. Cell, 2007, 130: 413-426.
- [ 20 ] Lindbo J A, Silva-Rosales L, Proebsting W M, *et al.* Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance[ J ]. Plant Cell, 1993, 5: 1749-1759.
- [ 21 ] Hamilton A J, Baulcombe D C. A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants[ J ]. Science, 1999, 286: 950-952.

- [ 22 ] Smith N A, Singh S P, Wang M B. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs[ J ]. *Nature*, 2000, 407: 319-320.
- [ 23 ] 马中良, 杨怀义, 王荣, 等. 利用转 hpRNA 基因水稻抗水稻矮缩病毒[ J ]. *植物学报*, 2004, 46(3): 332-336.
- [ 24 ] 赵明敏, 安德荣, 黄广华, 等. 瞬时表达靶向 TMV 外壳蛋白基因的 siRNA 能干扰病毒侵染[ J ]. *植物病理学报*, 2006, 36(1): 35-40.
- [ 25 ] Lapidot M, Gafny R, Ding B *et al.* A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants[ J ]. *Plant J*, 1993, 4: 959-970.
- [ 26 ] Zrachya A, Kumar P P, Ramakrishnan U, *et al.* Production of siRNA targeted against TYLCV coat protein transcripts leads to silencing of its expression and resistance to the virus[ J ]. *Transgenic Res*, 2007, 16: 385-398.
- [ 27 ] Chen B, Francki R I B. Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the coat protein[ J ]. *J Gen Virol*, 1990, 71: 939-944.
- [ 28 ] Jarvis T C, Kirkegaard K. Poliovirus RNA recombination: mechanistic studies in the absence of selection[ J ]. *EMBO J*, 1992, 11: 3135-3145.
- [ 29 ] Miller A W, Koev G, Mohan B R. Are there risks associated with transgenic resistance to luteoviruses? [ J ]. *Plant Disease*, 1997, 81(7): 700-710.
- [ 30 ] Greene A E, Allison R F. Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts[ J ]. *Science*, 1994, 263(5152): 1423-1425.
- [ 31 ] Borja M, Rubio T, Scholhof H B, *et al.* Restoration of wild-type virus by double recombination of tombusvirus mutants with a host transgene[ J ]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1999, 12: 153-162.
- [ 32 ] Falk B W, Bruening G. Will transgenic crops generate new viruses and new diseases? [ J ]. *Science*, 1994, 163: 1395-1396.
- [ 33 ] Talianky M E, Garcia-Arenal F. Role of cucumovirus capsid protein in long-distance movement within the infected plant[ J ]. *Journal of Virology*, 1995, 69: 916-922.
- [ 34 ] Pruss G, Ge X, Shi X M, *et al.* Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses[ J ]. *Plant Cell*, 1997, 9: 859-868.
- [ 35 ] Savenkov E I, Valkonen J P. Coat protein gene-mediated resistance to *Potato virus A* in transgenic plants is suppressed following infection with another potyvirus[ J ]. *J Gen Virol*, 2001, 2: 2275-2278.
- [ 36 ] Guo H S, Ding S W. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal[ J ]. *EMBO J*, 2002, 21: 398-407.
- [ 37 ] Chapman E J, Prokhnovsky A I, Gopinath K, *et al.* Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step[ J ]. *Gen Dev*, 2004, 18: 1179-1186.
- [ 38 ] 牛颜冰, 青玲, 王德富, 等. 植物病毒抑制子抑制 RNA 沉默的机制及生物学应用[ J ]. *分子植物育种*, 2009, 7(1): 137-142.

## (上接第 18 页)

- [ 10 ] 赵铭钦, 董顺德, 于建军, 等. 香料烟浸膏对烤烟烟叶品质效应的影响[ J ]. *河南农业大学学报*, 1999, 33(3): 73-75, 79.
- [ 11 ] 杨叶昆, 李雪梅, 周瑾, 等. 超临界流体萃取树苔净油研究[ J ]. *烟草科技*, 2004(2): 23-26.
- [ 12 ] 李雪梅, 杨叶昆, 徐若飞, 等. 利用超临界流体萃取技术制备烟草净油的研究[ J ]. *中国烟草学报*, 2004, 10(3): 1-6.
- [ 13 ] Edward D L, Frederique B, Jed E R. The use of flavor in cigarette substitutes[ J ]. *Drug and Alcohol Dependence*, 1990, 26(2): 155-160.
- [ 14 ] 刘鑫, 董世良, 谭烨. 烟用苹果酐剂的制备、成分分析及其在烟草香精中的应用[ J ]. *中国烟草科学*, 2009, 30(4): 59-61.
- [ 15 ] Huang L F, Wu M J, Zhong K J, *et al.* Fingerprint developing of coffee flavor by gas chromatography-mass spectrometry and combined chemometrics methods[ J ]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 588(2): 216-223.
- [ 16 ] 罗浪峰. 烯醛乙二醇缩醛的合成及其在卷烟中的应用[ D ]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [ 17 ] 杨述元. 大环内酯类前体的合成及在卷烟加香中的应用[ J ]. *烟草科技*, 2004(2): 26-28.
- [ 18 ] 郑庚修, 王秋芬, 张传景. 乳酸薄荷酯的合成及应用[ J ]. *山东化工*, 1994(1): 7-8.
- [ 19 ] 程传玲, 刘艳芳, 曾振强. 碳酸薄荷酯的合成及其在卷烟中的应用[ J ]. *郑州轻工业学院学报*, 2007, 22(4): 17-19.
- [ 20 ] 李广良. 含呋喃环醇酯类的合成[ J ]. *河南科技*, 1997(2): 20.
- [ 21 ] 聂鹏. 定向美拉德产物 2, 5-二甲基-3-烯丙基吡嗪的制备及其在卷烟中的应用[ D ]. 无锡: 江南大学, 2007.
- [ 22 ] 黎艳玲, 杨华武, 陈雄, 等. 2, 6-脱氧果糖嗪的分离提纯及其向烟气释放致香成分的研究[ J ]. *中国烟草学报*, 2007, 13(3): 32-35.