

CP 基因 3' 端短片段介导的对马铃薯 Y 病毒的抗性

竺晓平¹, 朱常香², 宋云枝², 温孚江¹, 刘红梅², 李向东¹

(¹山东农业大学植物保护学院; ²山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018)

摘要: 【目的】探明马铃薯 Y 病毒脉坏死株系 (PVY^N) CP 基因 3' 端序列短片段的不同结构转基因诱导转基因植物产生 RNA 介导抗性的有效性。【方法】以 PVY^N 的 CP 基因 cDNA 3' 端 202 bp 片段构建非翻译的正向重复和反向重复结构的植物表达载体转化烟草。【结果】攻毒试验表明前者没有一例转基因植株表现为抗病, 而转化反向重复结构的转基因植株 82.8% 表现近似免疫的高度抗病型, Southern 印迹杂交证明目的基因已整合到烟草基因组, Northern 印迹杂交结果显示反向重复结构转基因植物的抗病性与 RNA 的表达量呈现负相关。【结论】抗病性是 RNA 介导的病毒抗性。3' 端短片段诱导产生的转基因抗病株比例比 5' 端短片段诱导产生的高。

关键词: 马铃薯 Y 病毒; RNA 介导的病毒抗性; DsRNA; RNA 沉默

Resistance to Potato virus Y Mediated by the 3'end Segments of Coat Protein Gene in the Transgenic Tobacco Plants

ZHU Xiao-ping¹, ZHU Chang-xiang², SONG Yun-zhi², WEN Fu-jiang¹, LIU Hong-mei², LI Xiang-dong¹

(¹College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018; ²College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian 271018)

Abstract: 【Objective】To determine and compare the induction efficiency of RNA silencing triggered by different construction transgene of 3' -terminal segment derived from the Potato virus Y (veinal necrosis strain, PVY^N) coat protein gene. 【Method】Transgenic tobacco plants expressing untranslated direct repeats (DR) and inverted repeats (IR) of 3' -terminal 202bp of the PVY^N coat protein gene were obtained via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system. 【Result】Resistance assay of the transgenic plants indicated that none of the DR-transgenic plants are resistant to PVY, but 82.8% of IR-transgenic plants showed high resistance. Northern blot analysis revealed an inverse correlation between transgene transcript accumulation and virus resistance. 【Conclusion】These results showed that the resistance was RNA-mediated. The proportion of the resistant transgenic plants induced by 3' -terminal segment transgene of PVY^N is higher than that induced by 5' -terminal segment.

Key words: Potato virus Y; RNA-mediated virus resistance; Ds RNA; RNA silencing

0 引言

【本研究的重要意义】用来源于病毒本身的基因转化植物来获得抗病毒的工程植株 (pathogen-derived resistance, PDR), 已成为抗病毒基因工程的重要措施^[1]。近年的研究表明 PDR 是由于入侵病毒的 RNA 发生沉默 (RNA silencing) 而导致的。对不同的病毒, 用作转基因的核酸片段在病毒基因组中的位置、长短和不同排列结构对 RNA 沉默诱导的有效性和效率均

有影响^[2-4], 明确这些因素的影响效果对培育抗病毒转基因植物具有重要意义。【前人研究进展】由于 RNA 沉默发生在转录后阶段又称为转录后基因沉默 (post transcriptional gene silencing, PTGS)^[5], 由此导致的抗病性称为 RNA 介导抗性^[6-8]。通过 RNA 沉默获得的对病毒的抗性具有抗性强, 抗性持久, 安全性高等特点^[6-8]。研究表明双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 分子是 RNA 沉默的有效诱导因子, 并在沉默的起始、维持、信号传导等方面担负着重要作用,

收稿日期: 2005-12-12; 接受日期: 2006-04-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471139,30100117), 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目(2004BS02006,2005BS02007)

作者简介: 竺晓平 (1966-), 男, 江苏六合人, 副教授, 博士, 研究方向为植物病理学。Tel:0538-8242523; E-mail:zhuxp@sdau.edu.cn。通讯作者
温孚江 (1955-), 男, 山东龙口人, 教授, 研究方向为植物抗病毒基因工程。Tel:0538-8241245; E-mail:fjwen@sdau.edu.cn

反向重复序列转基因可以通过转录产生互补的 dsRNA 或发卡结构 RNA (hair-pin RNA, hp RNA), 从而有效引发转基因植物中的 RNA 沉默, 赋予转基因植物 RNA 介导抗性^[2,3,8]。【本研究的切入点】用病毒基因上下游不同位置的核酸片段构建反向重复结构转基因, 并比较它们诱导 RNA 沉默的效果与差异的文献较少。【拟解决的关键问题】笔者已用 PVY^N 外壳蛋白基因上游 5' 端 202 bp 的序列构建反向重复结构作为转基因获得了高度抗病的转基因植物^[9]。本试验试图用该基因 3' 端同样长度的序列构建反向重复结构转基因, 通过转化烟草研究 PVY^N 外壳蛋白基因不同位置序列片段对 RNA 介导抗性诱导的差异。

1 材料与方法

1.1 材料

转化受体植物烟草 NC89, 大肠杆菌菌株 DH5 α , 马铃薯 Y 病毒坏死株系 (PVY^N), 农杆菌菌株 LBA4404, 带有 PVY^N 外壳蛋白基因的 pUCY 质粒及植物表达载体 pROK II 由本研究室提供。DNA 分子量标准及合成的及引物来自上海生工公司, 内切酶等其他分子生物学试剂购自大连宝生物公司, 同位素 [α -³²P]dCTP 购自北京福瑞公司, 核酸杂交试剂盒为 Promega 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 含正向重复和反向重复转基因植物表达载体的构建 参照 PVY^N CP 基因全长 cDNA (共 804 个碱基, 已克隆到质粒 pUCY 中) 的序列设计 3 组引物 (表 1), 第 1 组扩增 CP 全长 cDNA 下游 553~804 位碱基之间的序列, 产物为 252 bp 的片段 1, 上游引物在起始密码子后直接连接终止密码子使其不翻译表达。上下游引物的 5' 端分别引入 *Xba*I 和 *Bam*HI 内切酶识别序列 (下划线); 第 2 组引物扩增 553~754 位碱基之间的序列, 产物是片段 1 上游 202 bp 的部分称为片段 2, 上下游引物分别引入 *Bam*HI 和 *Kpn*I 识别序列; 第 3 组引物与第 2 组除上下游引入的内切酶序列正好对调, 其它序列完全一致, 扩增产物也是 202 bp 为片段

3 (所有引物均在 5' 端带有 4 个保护碱基 GCGC)。

将纯化的片段 1 的 PCR 产物用 *Xba*I 和 *Bam*HI 酶解后与同样酶解的 pROK II 植物表达质粒连接得到重组质粒, 然后用 *Bam*HI 和 *Kpn*I 酶解片段 2 并插入到重组质粒中片段 1 的下游, 由于片段 1 有 202 bp 与片段 2 完全重复, 这样在重组载体中两个片段形成正向重复结构, 重组的植物表达载体命名为 pRDR202 (图 1-A), 重复区间隔为片段 1 比片段 2 多出的 50 bp 的序列。同样如果在片段 1 的下游插入片段 3, 由于片段 3 两端的内切酶识别序列与片段 2 位置对调, 就形成了含反向重复结构 (转录产物互补形成发卡结构, 图 1-C) 的载体, 命名为 pRIR202 (图 1-B)。

1.2.2 转基因植株的获得和扩繁 参考文献[10]的方法进行基因转化和再生。来自于一个转化事件的转基因植株称为一个单株, 转化 pRDR202 的单株简称为 DRn, 转化 pRIR202 的单株为 Irn (n 为转基因株编号)。为了在同一遗传背景下对转基因植物进行多项分析对每一单株进行无性扩繁, 其扩繁的办法是将所获得的单株在接种病毒前取其幼叶进行组织培养。

1.2.3 植物总 DNA 的提取和 Southern blot 分析 植物总 DNA 的提取参考文献[10]的方法。30 μ g 植物总 DNA 用 *Kpn*I 酶切过夜, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 再碱法转移到带正电荷的尼龙膜。探针合成采取随机引物法, 以 PVY^N CP 的 cDNA 为模板, 用 [α -³²P]dCTP 标记。杂交后置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中放射自显影。

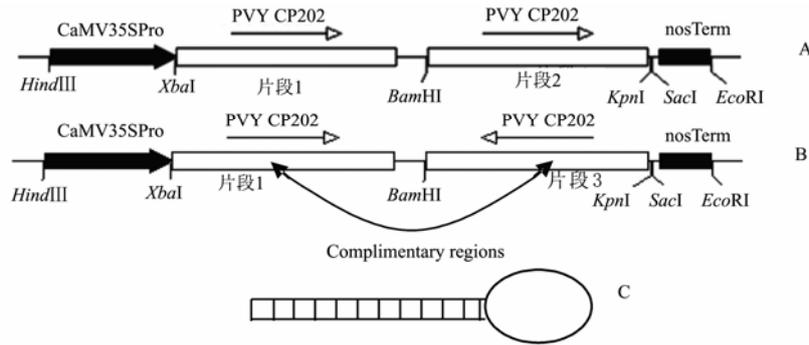
1.2.4 植物总 RNA 的提取和 Northern blot 分析 参考文献[11]用异硫氰酸胍法提取转基因植株及对照株的总 RNA。将 20 μ g 总 RNA 进行甲醛变性电泳, 然后转移到尼龙膜上进行杂交试验分析, 探针制备同 Southern blot 实验。

1.2.5 转基因烟草的攻毒试验及 ELISA 检测 取 PVY^N 病叶, 按 1:10 (W/V) 比例用磷酸缓冲液研磨, 低速离心后取上清液为接种物。常规摩擦接种, 每株接种量为 300 μ l, 置温室中定期记录症状表现, 并定期对转基因植株采用间接法进行 ELISA 检测, 一抗为 PVY^N 特异抗体, 二抗为碱性磷酸酶标记羊抗兔。

表 1 用于基因扩增的引物序列

Table1 Primers for gene amplification

引物组合 Primer group	上游引物序列 Forward primer sequences(5'→3')	下游引物序列 Reverse primer sequences (5'→3')	引入的内切酶 Restriction enzyme
1	gcgctctagatgtaaggtttaattcgaatctgcggg	gcgcgatccctcacatgttcttgactccaagtag	<i>Xba</i> I, <i>Bam</i> HI
2	gcgcgatccggtttaattcgaatctgcggg	gcgcggtaccgggtgtgtgcctctctgtg	<i>Bam</i> HI, <i>Kpn</i> I
3	gcgcggtaccggtttaattcgaatctgcggg	gcgcgatccgggtgtgtgcctctctgtg	<i>Kpn</i> I, <i>Bam</i> HI



A. pRDR202 的表达盒结构； B. pRIR202 的表达盒结构； C. 反向重复区转录产物推导的发卡结构
A. Expression cassette of pRDR202; B. Expression cassette of pRIR202; C. Hair-pin construct predicted to form in IR mRNA

图 1 植物表达载体 pRDR202 和 pRIR202 的表达盒结构

Fig.1 Construction of plant expression vectors pRDR202 and pRIR202

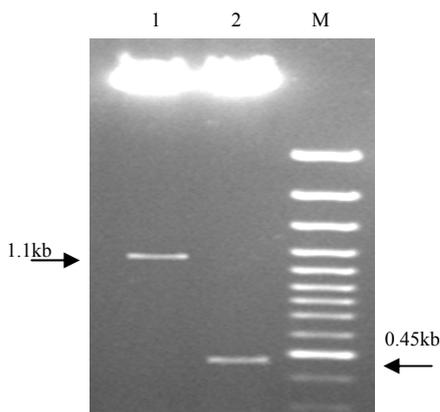
2 结果与分析

2.1 植物表达载体的构建

重组质粒 pRIR202 和 pRDR202 的酶切鉴定如图 2 和图 3 所示，用 *Xba*I+*Kpn*I 双酶切两个质粒均能释放大小 450 bp 左右的片段。用 *Hind*III+*Bam*HI 双酶切 pRIR202 释放出 1.1 kb 左右的片段（250 bp+859 bp 的 35S 启动子）；用 *Eco*RI+*Hind*III 双酶切 pRDR202 释放出 1.6 kb 左右的片段（450 bp+265 bp 的 NOS 终止子 +859 bp 的 35S 启动子），显示重组质粒构建成功。

2.2 T₀代转基因植株的筛选和扩繁

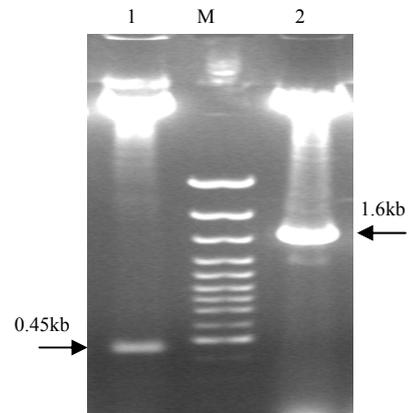
以烟草栽培品种 NC89 为转化植物，共获得转化 pRIR202 的再生烟草植株 227 株，转化 pRDR202 的再



1: pRIR202/ *Hind*III +*Bam*HI; 2: pRIR202/*Xba*I+*Kpn*I
M: GeneRuler100bp DNA ladder plus

图 2 重组质粒 pRIR202 的鉴定

Fig.2 Analysis of recombinant pRIR202



1: pRDR202/*Xba*I+*Kpn*I; 2: pRDR202/*Eco*RI+*Hind*III
M: GeneRuler100bp DNA ladder plus

图 3 重组质粒 pRDR202 的鉴定

Fig.3 Analysis of recombinant pRDR202

生烟草植株 247 株。经过再次在含有 100 mg·L⁻¹ 卡那霉素的培养基上生长筛选，只出现少数白化苗，两者的阳性率分别为 87%、89%。即共获得转化 pRIR202 和 pRDR202 的 T₀代转基因烟草 198 株和 220 株。转基因植株的生长、结实正常。

2.3 T₀代转基因植株的抗病性分析

从每一转基因植株上取少量叶片进行无性扩繁，用 PVY^N 的病汁液对无性扩繁苗攻毒，采用 ELISA 间接法对所有的已接种 PVY^N 的 T₀代转基因植株定期进行检测，转化 pRDR202 的 T₀代转基因植株 100% 表现为感病，其中仅少数表现延迟发病（6%）；然而 82.8% 转化 pRIR202 的转基因植株表现为近似免疫的抗病表现，感病植株的数量仅占 17.2%（表 2）。

表 2 两种转基因植株接种 PVY^N 后的抗病性反应Table 2 Response of two transgenic lines after inoculation with PVY^N

转基因植物类型 Types of transgenic plant	转基因植物总数 Total number of transgenic plants	抗病株 Resistant		感病株 Susceptible	
		数目 Number	百分比 Percentage (%)	数目 Number	百分比 Percentage (%)
IR	198	164	82.8	34	17.2
DR	220	-	-	220	100
非转基因植株对照 Nontransgenic plant CK	64	-	-	64	100

为确保抗病性测试的可靠, 用病汁液攻毒测试共进行了 3 次, 间隔为 15 d, 转化 pRIR202 的抗病株其抗病性一直持续到开花结实, 转化 pRDR202 的植株在第 2 次接种后全部发病。

部分代表植株的 ELISA 检测结果表明, 转化

pRIR202 的高度抗病植株的 3 次检测值均为阴性, 而对照和转化 pRDR202 的植株的测试值均为阳性。接种病毒后 10 d, 感病植株的病毒含量已达到阳性指标, ELISA 测试结果与抗病性表型的症状观察结果是一致的 (表 3)。

表 3 转基因植株 ELISA 抗病检测结果

Table 3 ELISA Determination of resistance in transgenic lines

转基因植株 Transgenic plant lines	抗病表现型 Resistance phenotype	接种 N 天后 OD ₄₁₀ 平均值 (N=10,25,40) Average value of OD ₄₁₀		
		接种后 10 d 10dpi	接种后 25 d 25dpi	接种后 40 d 40dpi
IR23	抗病 Resistant	0.068	0.078	0.113
IR84	抗病 Resistant	0.075	0.070	0.106
IR88	抗病 Resistant	0.072	0.081	0.115
IR187	抗病 Resistant	0.047	0.052	0.107
DR15	感病 Susceptible	0.187	0.195	0.234
DR51	感病 Susceptible	0.183	0.218	0.275
DR79	感病 Susceptible	0.202	0.214	0.280
DR193	感病 Susceptible	0.195	0.200	0.286
CK(-)	-	0.065	0.082	0.074
CK(+)	感病 Susceptible	0.266	0.249	0.276

CK(-): 转化 pROKII 空质粒的转基因植物 (未接种病毒); CK(+): 转化 pROKII 空质粒的转基因植物 (接种 PVY^N)

CK(-): pROKII transformed plants without inoculation; CK(+): pROKII transformed plants inoculated with PVY^N

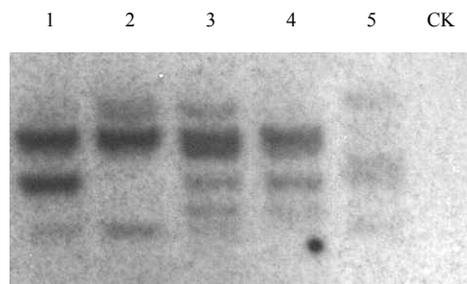
对高度抗病的转基因植株进一步用马铃薯 Y 病毒的普通株系 (Potato virus Y common train, PVY⁰) 的病汁液进行接种, 其抗病表型与用坏死株系所作试验结果相一致。进一步用两个株系的提纯病毒作梯度稀释后接种高抗转基因植株, 同样表现为抗病, 表明抗性 与接种物类型和剂量无关。

2.4 T₀代转基因植株的 Southern blot 分析

将提纯的转基因植物的总 DNA 分别用 *KpnI* 酶切过夜, 然后电泳、转膜、杂交。用 PVY CP 的特异探针酶解 DNA 进行杂交的结果证明目的基因在转基因烟草植株中得到整合, 抗病植株中转基因的拷贝数均为多拷贝整合, 不同转基因植株的拷贝数不同 (图 4)。

2.5 T₀代转基因植株的 Northern blot 分析

每个测试均选取 15 颗典型植株作为代表, 采用酸性酚-异硫氰酸胍法提取转基因植株的总 RNA, 转

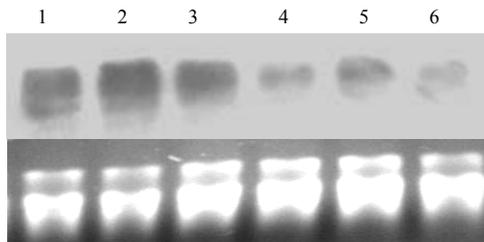


1,2. 抗病的 IR 转基因植物的总 DNA; 3,4. 感病的 IR 转基因植物的总 DNA; 5. DR 转基因植物的总 DNA; CK. 未转基因植物的总 DNA
1,2. DNA from resistant transgenic plants of IR; 3,4. DNA from susceptible transgenic plants of IR; 5. DNA from transgenic plant of DR; CK. DNA from nontransgenic plant

图 4 T₀代转基因植物基因组 DNA 的 southern blot 分析

Fig. 4 Southern blot analysis of genomic DNA from T₀ progeny transgenic plants

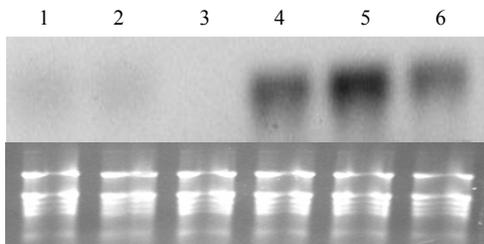
膜后用 PVY^N CP 基因 3'端序列的特异探针进行杂交。转化 pRIR202 的高度抗病和感病的转基因代表植株的 Northern blot 结果如图 5 所示,高抗植株的 RNA 表达水平明显比转入相同基因的感病植株要低,证明抗病性与 RNA 的表达水平呈负相关,在抗病转基因植株中发生了 RNA 的特异降解,抗性是由 RNA 介导的。同时对转化 pRIR202 抗病株和转化 pRDR202 的转基因植株的 RNA 表达水平进行了比较,如图 6 所示抗病性也与 RNA 表达水平呈负相关。



1~3.感病植株的总 RNA; 4~6.抗病植株的总 RNA; 杂交结果(上); RNA 上样量对照(下)
1-3.RNA from susceptible plants; 4-6.RNA from resistant plant; Results of Northern blot(upper); Equalized RNA in each lane (20 μ g/lane) (below)

图 5 IR 转基因植物的 Northern blot 分析

Fig.5 Northern blot analysis of transgenic plants transformed with pRIR202



1~3.抗病的 IR 转基因植株总 RNA; 4~6.DR 转基因植株总 RNA; 杂交结果(上); RNA 上样量对照(下)
1-3.RNA from resistant IR transgenic plants; 4-6. RNA from DR transgenic plants; Results of Northern blot(upper); Equalized RNA in each lane (20 μ g/lane) (below)

图 6 IR 和 DR 转基因植物的 Northern blot 分析比较

Fig.6 Comparison of the RNA express level between transgenic plants of IR and DR

3 讨论

3.1 单片段和反向重复结构转基因诱导的 RNA 沉默的差异

近年的研究表明, dsRNA 是引起 RNA 沉默的原因^[3~6,8]。反向重复结构在植物体内可以形成 dsRNA,在 RNA 沉默相关酶作用下产生小分子干扰 RNA (siRNA),指导针对同源 RNA 的序列特异性的降解,并在依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)的作用下放大沉默的信号,从而引发高效的 RNA 降解^[12,13]。在以前的报道中,单片段转基因植物抗病株仅占转基因植株群体的 10%左右^[4,14~16],而且大多是用全长的基因作为转基因材料,而用反向重复序列转基因却能大幅度提高转基因植株的抗病株比例,Waterhouse 等证明这是由于 IR 结构在植物中有更多机会可以转录形成发卡结构的 dsRNA (hpRNA),从而诱发 RNA 沉默的产生^[3,4]。对于单片段转基因诱发的 RNA 沉默, Vaucheret 等认为单片段转基因诱发的 RNA 沉默主要是通过转录后形成异常 RNA (Aberrant RNA, abRNA)然后在 RdRp 和解旋酶等的作用下形成 dsRNA 从而诱导 RNA 沉默^[15~17]。转化 pRIR202 的植株的抗病表现与病毒 RNA 表达水平负相关,符合 RNA 沉默的特征。同时转化 pRDR202 的植株没有抗病性表现,更加证明反向重复序列转基因结构对 RNA 介导抗病性的有效诱导。

Waterhouse 等发现如果反向重复转基因的重复间隔区序列越短则转基因植物发生 RNA 沉默的比例越高,如果间隔区为内含子序列,则发生基因沉默的转基因植物几乎达到 100%的比例^[3],认为是转录后 mRNA 前体在修饰过程中将内含子剪切掉,从而使互补的转录产物在空间上更容易退火形成 dsRNA,导致转基因植物发生沉默的比例显著增加。本研究中反向重复间隔区的序列为 50 bp,比较文献中常用的非内含子间隔区的长度(多为 300~800 bp)短很多^[3,4],因此可能是抗病转基因植株比例达到 80%的原因之一(一般非内含子间隔区的转基因植物发生沉默的比例在 60%左右^[3])。

3.2 PVY CP 基因的上下游序列转基因诱导的 RNA 介导抗病性差异

笔者在前面的研究中已探明用 PVY^N 上游序列的 202 bp 片段构建的 IR 结构转基因可以诱导 60%的转基因烟草产生抗病性^[9]。本研究发现同样长度的 PVY^N 下游序列的 IR 结构转基因能诱导 82.8%的转基因植株获得近似免疫的抗病性,效率明显比上游序列高,说明基因的不同部位诱导的 RNA 介导抗性的强弱是有差异的,与早先发表结果一致^[14],推测可能由于 RdRp 具有 5'端到 3'端方向的 RNA 合成酶活性,可以使下

游序列的 dsRNA 沿着病毒 CP 的 RNA 模板向上游延伸扩大了 dsRNA 双链区的范围从而提高了其对沉默诱导的效率。明确基因的不同位置序列作为转基因对 RNA 介导抗病性诱导效果的差异,可以为基于 PDR 策略的抗病转基因工程提供理论依据。

虽然前后两个研究中均表明反向重复与正向重复结构转基因诱导 RNA 抗性差异较大,但本研究中正向重复转基因植物无一例表现高度抗病性,似乎说明下游序列单片段转基因形成异常 RNA 的效率较低。

针对正向重复转基因植物的感病株和发病延迟株的 Northern blot 测试显示 RNA 表达量没有差异,延迟发病不是由于病毒的 RNA 降解引起的。Southern blot 测试结果表明,抗病和感病植株中转基因均是多拷贝整合,加上早先发表的结果^[9,14],显示拷贝数与抗病性不存在规律性的联系,也与 Waterhouse 等的研究结果相一致^[6]。

4 结 论

4.1 PVY^N CP 基因 3'端 202 bp 片段的反向重复结构转基因可以使转基因烟草获得近似免疫的 RNA 介导抗性。以 PVY^N 的 CP 基因 3' 端 202 bp 片段的 IR 结构为转基因获得的转基因烟草,82.8%表现近似免疫的抗病型,而转化 DR 结构的植株没有抗病表现。Northern 印迹杂交结果显示 IR 结构转基因植物的抗病性是 RNA 介导的病毒抗性。

4.2 PVY^N CP 基因 3'端片段和 5'端片段的反向重复结构转基因对转基因烟草 RNA 介导病毒抗性的诱导效率存在差异。用 PVY^N CP 基因下游的 202 bp 片段构建的 IR 结构转基因可以诱导 82.8%的转基因烟草产生抗病性,高于同样长度的上游序列的 IR 结构转基因诱导的 60%的比例。说明 PVY^N CP 基因的不同部位作为转基因对转基因植物 RNA 介导抗性的诱导效率有一定差异。

References

- [1] Baulcombe D C. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell*, 1996, 8: 1833-1844.
- [2] Waterhouse P M, Graham M W, Wang M B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95:13959-13964.
- [3] Smith N A, Singh S P, Wang M B, Stoutjesdijk P A, Green A G, Waterhouse P M. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, 2000, 407:319-320.
- [4] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, Wang M B, Rouse D T, Liu Q,

- Gooding P S, Singh S P, Abbott D, Stoutjesdijk P A, Robinson S P, Gleave A P, Green A G, Waterhouse P M. Constructs for efficient, effective and high throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal*, 2001, 27: 581-590.
- [5] Baulcombe D C. RNA silencing. *Current Biology*, 2002, 12: 82-84.
- [6] Waterhouse P M, Wang M B, Lough T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, 2001, 411: 834-842.
- [7] Prins M, Goldbach R. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants. *Archives of Virology*, 1996, 141: 2259-2276.
- [8] Wang M B, Metzclaff M. RNA silencing and antiviral defense in plants. *Current Opinion on Plant Biology*, 2005, 8: 216-222.
- [9] 朱俊华, 朱常香, 温孚江, 宋云枝. 正向和反向重复 RNA 介导的抗马铃薯 Y 病毒基因工程比较研究. *植物病理学报*, 2004, 34(2): 133-140.
- Zhu J H, Zhu C X, Wen F J, Song Y Z. Comparison of resistance to Potato Virus Y mediated by direct and inverted repeats of the coat protein gene segments in transgenic tobacco plants. *Acta Phytopathology Sinica*, 2004, 34(2): 133-140. (in Chinese)
- [10] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程. 北京: 科学出版社, 2002: 750-795.
- Wang G L, Fang H J. *Plant Gene Engineering*. Beijing: China Science Press, 2002: 750-795. (in Chinese)
- [11] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 黄培堂译. 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社, 2002:549-551.
- Sambrook J, Russell D W. Translated by Huang P T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Beijing: China Science Press, 2002: 549-551. (in Chinese)
- [12] Di Serio F, Schob H, Iglesias A, Tarina C, Bouldoires E, Meins F Jr. Sense and antisense mediated gene silencing in tobacco is inhibited by the same viral suppressors and is associated with accumulation of small RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98: 6506-6510.
- [13] Voinnet O, Baulcombe D C. Systemic signalling in gene silencing. *Nature*, 1997, 2389: 553.
- [14] 朱俊华, 竺晓平, 温孚江, 白庆荣, 朱常香, 宋云枝. 马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因不同长度片段对 RNA 介导抗性的影响. *中国科学(C 辑)*, 2004, 34(1): 23-30.
- Zhu J H, Zhu X P, Wen F J, Bai Q R, Zhu C X, Song Y Z. Effect of cDNA fragments in different length derived from Potato Virus Y coat protein gene on the induction of RNA-mediated virus resistance. *Science in China (Series C)*, 2004, 47: 382-388.
- [15] Jorgensen R A. Sense cosuppression in plants: past, present and future. In: *RNAi: a Guide to Gene Silencing*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003: 5-21.
- [16] Vaucheret H, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel J B, Mourrain P, Palauqui J C, Vernhettes S. Transgene-induced gene silencing in plants. *The Plant Journal*, 1998, 16: 651-659.
- [17] Vicki L C, Herve V. Gene active and gene silencing. *Plant Physiology*, 2001, 125: 145-148.