

框及 IS 等序列并成功转化到马铃薯栽培种中获得了抗 PLRV 植株。该文综述了近年来抗 PLRV 基因工程研究状况,以期为抗 PLRV 基因工程及抗 PLRV 育种等研究提供参考。

1 RNA 干扰

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)指在进化过程中,由双链 RNA(double strands, dsRNA)诱发的同源 mRNA 高效特异性降解的基因沉默现象^[9]。

RNAi 介导的抗病毒策略是将病原 dsRNA 投递至植物叶片引起病原 dsRNA 和同源病毒 mRNA 的降解。研究表明可以利用 RNAi 现象生产产生抗病毒的转基因动植物,使其转录产生相应病毒繁殖关键基因的 dsRNA,从而抵抗病毒入侵和繁殖^[10]。

RNAi 作用具有效率高、目的性强、简单易行等特点,可以同时抑制一个基因家族的多个基因,其应用范围极广^[11]。

1.1 影响干涉效率的因素

1.1.1 构建 RNA 干涉载体 RNA 干涉载体的构建是进行转基因的前提。针对成熟 mRNA,设计 RNA 干涉载体的靶序列应处于基因的一个外显子内,不能含有内含子、启动子或基因间序列,当靶序列位于基因中部时, RNA 干涉效率较高。Wesley 等发现大多数植物如果转入的载体 T-DNA 区在细胞内表达产生包含正反义靶基因片段的发夹结构 dsRNA,沉默效率较高;单个靶基因片段的长度在 98~853 nt,都不会对沉默效率产生明显影响;发夹结构 dsRNA 的单链环区引入内含子后,能够稳定提高沉默效率^[12];Kerschen 等发现不同 RNA 干涉植株的基因沉默效率差别很大,而 T-DNA 单拷贝插入植株的干涉效率要高于多拷贝插入的植株;强启动子驱动的 RNA 干涉效率要大大高于弱启动子驱动的 RNA 干涉系统;RNA 干涉的效果可以遗传给后代植株,但是经过数代后可能消失^[13]。周云等根据 PLRV 基因组特点构建 RNA 干涉载体,成功干扰 PLRV 的复制,机制可能是 PLRV 侵染马铃薯后,病毒复制的同时在植物体内产生特异 dsRNA,随后 dsRNA 被切割成长 21~25 bp 小干扰 RNA(siRNA),与病毒 ssRNA 结合复制,从而达到降解 PLRV RNA 的目的^[11]。另外,也可用产生 dsRNA 的质粒或病毒载体转化马铃薯,或者通过转基因及病毒感染方法在植物中过量表达 ssRNA 来引起共抑制反应引发 RNAi,从而达到

抗病毒目的^[14]。

1.1.2 RNA 干涉片段长度 RNA 干涉片段太短会造成分子操作(DNA 回收效率低等)的困难,片段太长会使其内部包含克隆所用的酶切位点被切断而达不到干涉目的。干涉片段以 400~700 bp 最佳^[11]。

1.1.3 RNA 干涉片段的保守性 RNA 干扰效应依赖于序列同源性。干涉片段的保守性越高,抗病性越强。因此选择病毒基因组中最保守序列对于植物抗病毒基因工程至关重要。其机制可能是 PLRV 的 RNA 干扰型结构导入马铃薯植株后使 PLRV 外壳蛋白(coat protein, CP)等保守序列不能翻译,规避了传统的转病毒正义、反义基因或基因片段潜在的同源重组、异源包装及协生作用的生物风险^[15]。

2 转基因

2.1 PLRV 基因片段的克隆及转化

2.1.1 ORF2a ORF2a 全长 1 920 bp,编码 70 kD 的多肽。其氨基酸序列 C 端有一个蛋白酶特征序列,其可能具有剪切核酸连接蛋白(Vpg)前体的功能。除此之外,还有一个螺旋酶的特征序列 NYVFESTA,其功能尚不清楚^[16]。

ORF2a 5'端同源性相对比 3'端的高。用 ORF2a 5'端反义 RNA 转化马铃薯,封闭 ORF2a 基因使其不能正常表达,干扰聚合酶的正常作用,从而获得抗 PLRV 的马铃薯植株^[16-17]。

2.1.2 植物抗体介导的抗性 PLRV ORF2a 编码的蛋白经切割合成 VPg,在病毒复制循环中起重要作用。构建单链可变片段抗体 scFvP1-1,将其转化到马铃薯里表达,scFvP1-1 的瞬时表达和 PLRV 抗原相互作用从而阻止 VPg 的合成,干涉 PLRV 的表达,使马铃薯表现出高水平的抗病性^[18]。

2.2 ORF2b

ORF2b 全长约 1.8 kb,编码 RNA 复制酶即依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RdRp),转译一个 69 kD 的多肽^[6]。PLRV 复制酶 N 端有一个由精氨酸、赖氨酸、组氨酸组成的碱性氨基酸区域即 KRQLRHPRRRYKP,可能有结合核酸的功能^[19]。复制酶 C 端有连续排列的(包括 GDD 在内的 8 个特征序列)氨基酸序列,具有比 N 端更高的保守性,这可能和复制酶功能有重要关系^[19]。复制酶基因 5'端核苷酸序列中,由 7 个核苷酸组成的与移码有关的滑动序列 UUU-AAAU,其下游第 6 个核苷酸后,有一个茎环结

构^[20]或“假节结构”^[21]。

在抗病毒基因工程中,虽然复制酶介导的抗 PLRV 性明显优于外壳蛋白,其介导的抗性均具有株系特异性^[22]。Kaniewski W 等用 PLRV 复制酶基因转化“Russet Burbank”,产生田间免疫水平的抗性,其抗性可能是通过在转基因植株中表达复制酶基因部分片段或不完整的复制酶基因获得的^[23]。

2.3 间隔区(IS)转化的抗病性

PLRV IS 长 197 bp,位于 ORF2b 和 ORF3 之间。具有两段保守序列:一段位于 CP 基因起读密码 AUG 上游;另一段位于 PLRV 亚基因组 RNA(sgRNA)转录起始点处,在转录起始点 5'端有 UUACAUU 序列。位于 IS 第二个保守序列中央的 PLRV sgRNA 转录起始点序列可能是 PLRV sgRNA 启动子的一部分,控制其下游基因的表达。IS 序列在不同株系间的 PLRV 的全基因组序列中相对保守,对于植物病毒的增殖具有重要作用^[24]。

IS 作为转基因片段具有如下特点:首先,IS 既不是结构基因也不是非基因结构,只是一段调控序列,易于操作;其次,其只在 RNA 水平上干扰 sgRNA 的转录和表达,在转基因植物中无需转译成表达产物;最后,用于转化的病毒基因组序列虽短,但其干扰作用并不限于一个具体结构基因产物或非结构基因产物介导的抗性,而是影响到 PLRV 基因组 3'端整个编码区 3 个编码 CP 蛋白、56 kD 蛋白、17 kD 蛋白基因的表达^[7]。因此,推测 PLRV IS 的抗病毒机制可能是转基因植株表达的反义或正义 IS RNA,通过互补碱基和其对应的病毒 mRNA 或反义 RNA 相结合,抑制 mRNA 的翻译或反义 RNA 转录为 mRNA。此外,反义 IS RNA 还可以和已产生的 sgRNA 5'端结合,封闭 PLRV IS 保守序列达到干扰其转译的目的;而正义 IS RNA 则可以和 sgRNA 竞争结合细胞中的有关转译因子干扰 sgRNA 的转译。鉴于反义 RNA 在转录和翻译两个水平上干扰病毒的复制,其所表达的转基因植株抗病性比正义 RNA 介导的转基因植株明显,其有可能成为建立抗病毒基因工程的新途径^[24]。

2.4 亚基因组(sgRNA)

PLRV sgRNA,长 2.6 kb,其转录起始点位于 CP 基因起始密码 AUG 上游 40 个核苷酸的 IS 的第 158 位核苷酸 G 处^[25]。其 5'端均有一段非常保守的序列 UUAUAUU,可能是 PLRV sgRNA 转录启动子的组成部分^[26]。

2.4.1 ORF3 和 ORF5 ORF3 长 627 bp,编码一个 23 kDa 的多肽,即外壳蛋白(Coat Protein, CP)^[27]。PLRV 编码 CP 与不具编码功能的上游先导序列相比保守性更强。PLRV CP 及其上游序列在转基因马铃薯中表达也会进一步干扰病毒 sgRNA 转录和转译,从而提高转基因马铃薯对 PLRV 的抗性^[28]。

CP 介导的抗性是一种有效的抗病毒基因工程途径,可利用病毒 CP 基因抑制病毒脱壳,从而阻断病毒的侵染^[29]。转 CP 基因植株抗性的产生既可发生在 RNA 水平上,也可发生在蛋白质水平上^[30-31]。推测 PLRV 外壳蛋白抗病机制为:(1)只需极少的外壳蛋白干扰病毒早期脱壳的过程;(2)CP RNA 与病毒 RNA 复制的模板链 RNA 结合。由 PLRVCP 基因转录的正向或反向 RNA 和病毒复制过程产生的与之相对应的正反义 RNA 链相互作用和结合,封闭病毒 RNA 或转录模板,在转录水平上干扰病毒的复制和转译;(3)蛋白质水平上的抗性:转基因植物表达的病毒 CP,干扰了病毒侵染早期的脱壳过程;(4)CP RNA 与病毒基因组 RNA 竞争结合蛋白转译因子,使病毒基因组 RNA 的转译过程不能正常进行;(5)PLRV CP 基因多拷贝引起基因沉默^[32]。

另外,CP 蛋白的结构影响病毒的稳定性。CP 蛋白表面的环对于病毒颗粒的包装、稳定以及在植物维管束中的感染和移动起关键作用^[33]。假想如果用抗生素等生物制剂破坏其结构则是马铃薯抗 PLRV 的新途径。

2.4.2 ORF4 PLRV 17k 蛋白由 ORF4 编码,长约 465 bp,起读于 CP 基因的第 26 个氨基酸,终止于 CP 基因中,读出与 CP 不同的阅读框架,具有细胞间运动蛋白(Movement protein,MP)的特性^[34]。该蛋白可促进病毒基因组通过植物韧皮部细胞特殊的胞间连丝,这可能是病毒被限制在韧皮部中的原因^[35]。

PLRV 17k 蛋白基因具高度保守性。吴克明等克隆出 PLRVCP 和一个不同于 CP 基因的 17k 蛋白阅读框架,这为将 CP 和 17k 蛋白基因共同导入马铃薯中阻断 PLRV sgRNA 的复制提供依据^[36]。

2.5 转马铃薯抗 PLRV 基因

转基因工程的前提是进行基因定位。Velasquez A C 等准确地将 Rl(adg)抗 PLRV 基因定位在高抗病的四倍体马铃薯的一个孤雌生殖种群 LOP-868 染色体 V 的上臂处^[37];Marczewski

W 和 Flis B 发现 *S. chacoense* 染色体一个主效 QTL 基因(PLRV. 1)定位在马铃薯染色体 XI 和两个微效 QTL 基因(定位在染色体 V 和 VI)^[38]。发现分离抗 PLRV 基因并将其转到马铃薯中获得抗病植株是防治 PLRV 的有效途径。

2.6 转外源抗 PLRV 基因

美洲商陆抗病毒蛋白(pokeweed antiviral protein, PAP),一种核蛋白体抑制蛋白,保护异源植物免受病毒感染。将编码此蛋白的基因转到植物中,能表达 PAP 或其双突变体衍生物,能有效防治机械和蚜虫传播的病毒。其抗性机制可能是 PAP 通过控制单个基因、抑制病毒早期复制达到抗性目的^[39]。

3 核酶

核酶(Ribozyme)是由 Thomas Cech 和 Sidney Airman 发现的一类具有生物催化剂功能的基因调控 RNA 分子^[40]。其具有酶的特性,不仅能与靶 RNA 杂交,还能特异性地切割靶 RNA 序列,核酶的这种“基因剪刀”作用广泛应用于切割动、植物病原 RNA 的研究^[41]。1990 年, Lamb J W 等设计了 2 个针对 PLRV 正链 RNA 的核酶,能体外切割 PLRV(英国苏格兰分离株)的 CP 基因和复制酶基因^[42]。而杨静华等设计合成体外切割 PLRV 负链 RNA 的核酶,达到了抗 PLRV 的目的^[43]。因此,设计切割 PLRV 的核酶基因将其转入马铃薯中,以阻断或干扰 PLRV 的复制和基因表达来达到抗病目的。

3.1 影响核酶剪切效果的因素

3.1.1 核酶酶环 核酶的酶环序列要求保守并具有特异的剪切位点。Lamb J W 和 Hay R T 将核酶酶环的 A 删除,使其锤头状结构的保守序列比野生型核酶少一个 A 残基,则突变核酶失去剪切活性^[42]。

3.1.2 核酶的两臂长度 核酶的两臂长度对于剪切效果很重要。Lamb 等体外切割 PLRV CP 和 RdRp 基因时,将核酶两臂长度分别设计为 9/10 nt 和 10/11 nt,取得了较好效果^[42];而 1992 年 Peter Steinecke 等在植物体内切割 *npt* 基因时,所设计核酶的两臂长度为 12/10 nt,也获得了切割效率较高的核酶^[44]。

核酶识别区的配对长度对核酶催化效率影响明显。核酶剪切机制可能是其通过核酸序列互补与底物结合发生切割反应,完毕后,核酶与底物解链,再去结合另一个底物 RNA 分子。所以,缩短识别区碱基配对长度能提高核酶的剪切效率。在

表达核酶的转基因马铃薯植物中,最佳的核酶识别区的配对长度尚无定论^[45]。

3.1.3 RNA 底物分子的剪切位点 选择合适的位点成为构建核酶成败的关键。一方面病毒核酸的二级结构经常会掩盖选定的剪切位点,使核酶不能与靶 RNA 结合;另一方面有些核酸具有天然结合蛋白,蛋白质的结合会限制某些位点的利用。正确的靶位点应是暴露在二级结构之外并不被蛋白质结合,而且靶位点及其附近序列应具有高度保守性^[46]。

核酶剪切序列中含有 GUC 序列特异靶 RNA,并且在选择 GUC 位点的一侧至少有 6 个碱基与靶 RNA 互补配对。Lamb J W 和 Hay R T 构建设计了 CP 和 RdRp 的核酶,发现其剪切位点分别在 GUC 的下游的 3968 和 3039 位置处^[42]。这说明核酶抗性机制可能是能在异体情况下对特异性的 RNA 序列进行剪切以阻止病毒复制防治病毒病^[43]。如果把能切割 PLRV 复制酶基因负链的核酶序列转入马铃薯,中断 PLRV 复制酶基因合成,干扰 PLRV 在马铃薯体内的复制和表达,可达到抗 PLRV 的目的^[43]。郭旭东等选择 PLRV-Ch CP 基因(全长 627 nt)从 5' 端起保守的且接近 CP 基因中心第 6 个“GUC”位点作为核酶的剪切位点^[41]。

3.1.4 RNA 底物分子的长度 被剪切的 RNA 底物分子长度影响剪切效果。RNA 分子越长剪切越困难。因为长片段形成的高级结构复杂,体外转录困难,并且剪切位点及其附近的序列易被封固^[43]。

4 基因定点突变

4.1 P0 基因的定点突变

P0 是 PLRV 基因组 ORF1 编码的蛋白,具有转录后沉默抑制子功能。Pfeffer S 等研究发现 P0 的起始密码子时常被低效率的起始密码子如 ACG、GTG 或 ATA 代替,从而可以设计引物用定点突变的方法有选择性地阻止病毒基因组 P0 过表达,减少病毒积累量以达到抗病目的^[47]。

4.2 P1 多聚蛋白基因的定点突变

P1 多聚蛋白由 ORF2a 编码,切割产生 P1-C25 和 VPg。VPg 被证明具有结合基因组的功能^[48]。P1-C25 有助于 PLRV RNA 和 VPg 之间共价键形成。P1 多聚蛋白的剪切位点有两个:一个位于丝氨酸蛋白酶功能区的下游;另一个位于丝氨酸蛋白酶功能区上游 Glu/Arg 连接处^[49]。若定点突变这两个位点,则 VPg 蛋白不能形成,

病毒不能复制包装成完整颗粒,丧失毒力达到抗病目的^[50]。

4.3 复制酶基因的定点突变

定点突变复制酶的水解蛋白酶区的丝氨酸残基,得到突变体能阻止 PLRV 的复制。但是 Sadowy E 等发现其和任何一种蛋白水解酶共转化,病毒在叶中的复制功能将恢复,表明这些突变体能彼此互补^[51]。所以,不能将复制酶基因突变体和蛋白水解酶共转化植物,否则起不到抗病目的。

4.4 亚基因组调控元件的定点突变

SgRNA 有两个调控元件即 CP 和通读蛋白区域(RTD)的编码序列。第一个调控元件是位于 CP 和 17 kD 起始密码子中间的 AAAG-GAAA,其缺失或被嘧啶代替,翻译效率将减少一半;第二个调控元件在 RTD 中,这个区域的删除使翻译效率降低 3.6 倍^[52]。

PLRV CP 与病毒颗粒的包装、稳定性以及在宿主植物内传播和移动有关。按照 CP 和/或 RTD 基因的序列特点设计定点突变引物,用限制性核酸内切酶定点诱变 CP 和 RTD 区域的核酸位点,进行 PCR 合成产物,可使 PLRV CP 不能

进行颗粒包装失去感染毒力,减少 PLRV 的积累和传播^[52-53]。所以,基因定点突变能改变病毒的稳定性和蚜虫的传播效率^[54-55]。

4.5 前导序列的定点突变

遗传分析知 PLRV 基因组和亚基因组前导序列(Lead sequence,LS)缺失不仅减少下游基因翻译也改变了合成蛋白的比例。所以可对其序列定点突变限制基因翻译的起始达到抗 PLRV 的目的^[55]。

5 抗 PLRV 杂交育种

筛选抗 PLRV 马铃薯品种,将其与马铃薯栽培种进行杂交,利用遗传规律筛选抗 PLRV 马铃薯品种。Marczewski W 等将有 PLRV 抗性的马铃薯二倍体亲本克隆 DW 91-1187 和感病植株杂交获得抗性植株^[56-57];例如:将抗 PLRV 的 *S. chacoense* 和马铃薯栽培种杂交得到 F₁,利用带有 PLRV 的蚜虫侵染并筛选抗 PLRV 马铃薯植株,并与亲代回交筛选纯合植株并保存种质资源^[58]。这对于培育抗 PLRV 的马铃薯栽培品种具有重大意义。

表 1 抗马铃薯卷叶病毒方法比较

方法	原理	优点	缺点	应用范围
RNA 干扰	双链 RNA 诱发的同源 mRNA 高效特异性降解的基因沉默现象	效率高,目的性强,简单易行等	可能阻碍除目的基因外的其它基因的表达	范围极广
转化 PLRV 基因片段	互补碱基和其各自对应的病毒 mRNA 或反义 RNA 相结合以抑制 mRNA 的翻译或反义 RNA 转录为 mRNA	需量较少,有针对性	要求病毒基因片段保守,长度合适	在茄科植物中应用较广
核酶	与靶 RNA 杂交,还能特异性地切割靶 RNA 序列	较特异	核酶易突变,对切割环境要求高	切割动、植物病原 RNA 的研究
基因定点突变	对已知基因的特定碱基进行定点改变、缺失或插入,可以改变对应的氨基酸序列和蛋白质结构,阻碍基因的表达	改造/优化基因常用的手段,具有目的性,简单易行	突变具有双向性,有可能发生回复突变	潜在应用领域很广。如蛋白质工程;药物研发、基因治疗等
抗 PLRV 育种	利用基因的显隐性或转外源抗病基因等分子辅助育种获得抗性	比普通育种获得的抗性稳定	周期长	植物育种

6 结论

PLRV 分布广泛,主要局限在植物的韧皮部,含量少,难以大量提纯,所以利用常规育种不能有效地防治 PLRV,而分子辅助育种将成为抗 PLRV 的有效途径。目前,研究主要集中在 RNA 干扰和蛋白免疫抗性技术等方面。分析 PLRV 基因组结构和编码蛋白质的功能是进行抗病基因工程的前提。随着研究的深入,PLRV 的基因组已由 6 个 ORF 框发展为 8 个,并且编码产物的功能

已基本清楚(见图 1,图 2)^[59]。首先,可设计合成与 PLRV 基因组同源保守的正义或反义 dsRNA 片段并将其转入植物中,就可以干涉病毒 ss(+)RNA 的复制,以期达到干涉效果;其次,将 PLRV 基因组片段转入马铃薯体内,使其过量表达相关蛋白,使病毒来不及复制就被 CP 包壳而达到抗病目的;再次,将带有 RolC 等强启动子的保守基因片段转入马铃薯中,以控制病毒的表达;最后,将 PLRV 非编码序列导入马铃薯内以限制下游

基因的翻译。另外,随着野生种二倍体马铃薯研究的深入,发现其具有抗 PLRV 基因,分析纯化抗病基因并将其导入马铃薯中或与栽培种杂交获得抗病植株,将是有效、简便、易行抗 PLRV 的途径。由于 PLRV 基因组结构及复制机制复杂,研究其抗病性的分子生物学手段还不成熟,所以抗病基因工程依然是马铃薯抗病毒病研究的重点。

参考文献:

- [1] 谢联辉,林奇英,吴建祖.植物病毒名称及其归属[M].北京:中国农业出版社,1999.
- [2] Matthews R E F. Classification and nomenclature of viruses[J]. Intervirology 1982,17:140-141.
- [3] van Regenmorte M H V, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. Virus taxonomy. seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses[M]. New York, San Diego: Academic Press, 2000.
- [4] Keese P, Martin R R, Kawchuk L M, et al. Nucleotide sequences of an Australian and a Canadian isolate of potato leafroll luteovirus and their relationships with two European isolates [J]. Journal of General Virology, 1990, 71: 719-724.
- [5] Mayo M A, Robinson D J, Jolly C A, et al. Nucleotide sequence of potato leafroll luteovirus RNA [J]. Journal of General Virology, 1989, 70: 1037-1051.
- [6] 董江丽, 哈斯·阿古拉, 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒基因间隔区的克隆及序列分析 [J]. 中国病毒学, 1996, 11 (2): 144-148.
- [7] van der W F, Huisman M J, Cornelissen B J, et al. Nucleotide sequence and organization of potato leafroll virus genomic RNA [J]. FEBS Lett, 1989, 245 (1/2): 51-56.
- [8] Taliansky Michael, im Sang Hyon, Mayo Mike A, et al. Barker hugh escape of a plant virus from amplicon-mediated RNA silencing is associated with biotic or abiotic stress [J]. The Plant Journal; for Cell and Molecular Biology, 2004, 39 (2): 194-205.
- [9] 周云. 马铃薯卷叶病毒双链 RNA 干扰载体构建 [D]. 西宁: 青海大学, 2007.
- [10] Lawrence R J, Pikaard C S. Transgene-induced RNA interference; a strategy for overcoming gene redundancy in polyploids to generate loss-of-function mutations [J]. The Plant Journal, 2003, 36 (1): 114-121.
- [11] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants [J]. Plant J., 2001, 27 (6): 581-590.
- [12] Kerschen A, Napoli C A, Jorgensen R A, et al. Effectiveness of RNA interference in transgenic plants [J]. FEBS Lett, 2004, 566: 223-228.
- [13] Lu R, Martin-Hernandez A M, Peart J R, et al. Virus-induced gene silencing in plants [J]. Methods, 2003, 30: 296-303.
- [14] 郭志华, 孙毅, 张效敏, 等. 马铃薯卷叶病毒 (PLRV) 内蒙古分离物基因间隔区 (IS) 的克隆与序列分析 [J]. 华北农学报, 2007, 22 (6): 19-23.
- [15] 赵国芬, 张鹤龄, 哈斯·阿古拉. 马铃薯卷叶病毒中国株 (PLRV—Ch) ORF2a 基因特征分析 [J]. 生物工程学报, 2002, 18 (6): 744-748.
- [16] Ahlquist P, Strauss E G, Rice C, et al. Sindbis virus protein nsP1 and nsP2 contain homology to nonstructural proteins from several RNA plant viruses [J]. Journal of Virology, 1985, 53: 536-542.
- [17] Nickel H, Kawchuk L, Twyman R M, et al. Plantibody-mediated inhibition of the potato leafroll virus P1 protein reduces virus accumulation Virus research [J]. 2008, 136 (1/2): 140-145.
- [18] 梁成罡, 张彤, 哈斯·阿古拉, 等. 马铃薯卷叶病毒复制酶基因 5' 端克隆及序列分析 [J]. 病毒学报, 1998, 14 (4): 377-382.
- [19] Prufer D, Tacke E, Schmitz J, et al. Ribosomal frameshifting in plants; a novel signal directs the-1 frameshifting in the synthesis of the putative viral replicase of potato leafroll luteoviruses [J]. EMBO J, 1992, 11 (3): 1111-1117.
- [20] Kujawa A B, Drugon G, Hulanicka D, et al. Structural requirement for efficient translational frameshifting in the synthesis of the putative viral RNA-dependent RNA polymerase of potato leafroll virus [J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21 (9): 2165-2171.
- [21] 张鹤龄, 梁成罡, 张彤, 等. 马铃薯卷叶病毒中国株 (PLRV—ch) 复制酶基因结构研究 [J]. 中国病毒学, 2000, 15 (3): 255-263.
- [22] Kaniewski W, Lawson C, Loveless J, et al. Expression of potato leafroll virus (PLRV) replicase genes in Russet Burbank potatoes provide field immunity to PLRV [C]. Scientific Program and Abstracts. American Society for Virology. 13th Annual Meeting, Wisconsin: Madison, 1994: 107.
- [23] 董江丽, 李天然, 哈斯·阿古拉, 等. 马铃薯卷叶病毒基因间隔区转化的马铃薯抗病性研究 [J]. 中国病毒学, 1999, 14 (1): 66-72.
- [24] Tacke E, Prufer D, Salamin F, et al. Characterization of a potato leafroll luteovirus subgenomic RNA; differential expression by internal translation initiation and UAG suppression [J]. J Gen Virol, 1990, 71: 2265-2272.
- [25] Gould A R. Studies on encapsidated viroid-like RNA II: Purification and Characterization of a viroid-like RNA associated with velvet tobacco mottle virus (VT-MOV) [J]. Virology, 1981, 108: 123-133.
- [26] 何心凤, 郭宝太, 李广存, 等. 马铃薯卷叶病毒 CP 基因的 RT-PCR 扩增 [J]. 中国马铃薯, 2007, 21 (4): 197-199.
- [27] 赵福宽, 张鹤龄, 梁成罡, 等. 马铃薯病毒中国分离株外壳蛋白基因及其上游先导序列的 cDNA 克隆和序列分析 [J]. 内蒙古大学学报, 1996, 27 (5): 689-694.
- [28] van den Elzen P J, Huisman M J, Willink D P, et al. Engineering virus resistance in agricultural crops [J]. Plant Mol Biol. 1989, 13 (3): 337-346.
- [29] Hemenway C, Fang R X, Kaniewski W K, et al. Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA [J]. EMBO J, 1988, 7: 1273-1280.
- [30] 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.
- [31] 南相日, 刘文萍, 刘琦, 等. 马铃薯卷叶病毒外壳蛋白基因克隆转化及其转基因后代的表达[J]. *中国农学通报*, 2007, 23(7): 106-109.
- [32] Lee L, Kaplan I B, Ripoll D R, et al. A surface loop of the potato leafroll virus coat protein is involved in virion assembly, systemic movement, and aphid transmission[J]. *J. Virol.* 2005, 79(2): 1207-1214.
- [33] Schmitz J, Stussi-Garaud C, Tacke E, et al. *In situ* localization of putative movement protein (p17) from Potato Leafroll Virus (PLRV) in infected and transgenic potato plants[J]. *Virology*, 1997, 235: 311-321.
- [34] Lee L, Palukaitis P, Gray S M. Host-dependent requirement for the Potato leafroll virus 17-kDa protein in virus movement[J]. *Mol Plant Microbe Interact.* 2002; 15(10): 1086-1094.
- [35] 吴志明, 朱水芳, 田文会, 等. 马铃薯卷叶病毒分离株外壳蛋白基因和 17 k 蛋白基因的克隆及序列分析[J]. *河北农业大学学报*, 2002, 25(4): 62-66.
- [36] Velasquez A C, Mihovilovich E, Bonierbale M. Genetic characterization and mapping of major gene resistance to potato leafroll virus in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*[J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 114(6): 1051-1058.
- [37] Marczewski W, Flis B, Syller J, et al. A major quantitative trait locus for resistance to Potato leafroll virus is located in a resistance hotspot of potato chromosome XI and is tightly linked to N-gene-like markers[J]. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001, 14(12): 1420-1425.
- [38] Lodge J K, Kaniewski W K, Tumer N E, et al. Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing potato leafroll antiviral protein[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 1993, 90: 7089-7093.
- [39] Koizumi M, Iwai S, Ohtsuka E. Cleavage of specific sites of RNA by designed ribozymes[J]. *FEBS Lett*, 1988, 239: 285-288.
- [40] 郭旭东, 哈斯·阿古拉, 张鹤龄. 应用核酶体外切割马铃薯卷叶病毒外壳蛋白基因的研究[J]. *中国病毒学*, 1997, 12(2): 149-154.
- [41] Lamb J W, Hay R T. Ribozymes that cleave potato leafroll virus RNA within the coat protein and polymerase genes[J]. *J Gen Virol*, 1990, 71: 2257-2264.
- [42] 杨静华, 哈斯·阿古拉, 梁成罡, 等. 特异切割马铃薯卷叶病毒复制酶基因负链的核酶研究[J]. *病毒学报*, 1998, 14(2): 158-164.
- [43] Steinecke P, Herget T, Schreier P H. Expression of a chimeric ribozyme gene results in endonucleolytic cleavage target mRNA and a concomitant reduction of gene expression *in vivo*[J]. *EMBO J*. 1992, 11(4): 1525-1530.
- [44] Perreault J P, Labuda D, Usman N, et al. Relationship between 2'-hydroxyls and magnesium binding in the hammerhead RNA domain: a model for ribozyme catalysis[J]. *Biochemistry*, 1991, 30: 4020-4025.
- [45] Cotton M, Birnstiel M L. Ribozyme mediated destruction of RNA *in vitro*[J]. *EMBO J*. 1989, 8: 3861-3866.
- [46] Pfeffer S, Dunoyer P, Heim F, et al. Ziegler-Graff V. P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing[J]. *J. Virol.* 2002, 76(13): 6815-6824.
- [47] Prufer D, Kawchuk L, Monecke M, et al. Immunological analysis of potato leafroll luteovirus (PLRV) P1 expression identifies a 25 kDa RNA-binding protein derived via P1 processing[J]. *Nucleic acids research*, 1999, 27(2): 421-425.
- [48] Li X, Ryan M D, Lamb J W. Potato leafroll virus protein P1 contains a serine proteinase domain[J]. *J. Gen. Virol.* 2000, 81(7): 1857-1864.
- [49] Sadowy E, Juszczuk M, David C, et al. Mutational analysis of the proteinase function of Potato leafroll virus[J]. *Journal of General Virology*, 2001, 82(6): 1517-1527.
- [50] Loniewska-Lwowska A, Chelstowska S, Zagorski-Ostojka W, et al. Elements regulating Potato leafroll virus sgRNA1 translation are located within the coding sequences of the coat protein and read-through domain[J]. *Acta Biochim Pol*, 2009, 56(4): 619-625.
- [51] Rouze-Jouan J, Terradot L, Pasquer F, et al. The passage of Potato leafroll virus through *Myzus persicae* gut membrane regulates transmission efficiency[J]. *J. Gen. Virol.* 2001, 82(1): 17-23.
- [52] Liang D, Gray S M, Kaplan I, et al. Site-directed mutagenesis and generation of chimeric viruses by homologous recombination in yeast to facilitate analysis of plant-virus interactions[J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2004, 17(6): 571-576.
- [53] Kaplan I B, Lee L, Ripoll D R, et al. Point mutations in the potato leafroll virus major capsid protein alter virion stability and aphid transmission[J]. *J. Gen. Virol.* 2007, 88(6): 1821-1830.
- [54] Juszczuk M, Paczkowska E, Sadowy E, et al. Effect of genomic and subgenomic leader sequences of potato leafroll virus on gene expression[J]. *FEBS Lett*, 2000, 484(1): 33-36.
- [55] Marczewski W, Flis B, Syller J, et al. Two allelic or tightly linked genetic factors at the PLRV. 4 locus on potato chromosome XI control resistance to potato leafroll virus accumulation[J]. *Theor Appl Genet.* 2004, 109(8): 1604-1609.
- [56] Novy R G, Gillen A M, Whitworth J L. Characterization of the expression and inheritance of potato leafroll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY) resistance in three generations of germplasm derived from *Solanum tuberosum*[J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 114(7): 1161-1172.
- [57] Marczewski W, Flis B, Syller B, et al. A major quantitative trait locus for resistance to *Potato leafroll virus* is located in a resistance hotspot on potato chromosome XI and is tightly linked to N-Gene-Like markers[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 11(12): 1420-1425.
- [58] Matthews R E F. Classification and nomenclature of viruses[J]. *Fourth Report of the International Committee on Nomenclature of Viruses, Intervirology*, 1982, 17: 1-199.

中国森林能源利用的意义与途径

任丽娜,高广磊,王海燕,丁国栋,乌日娜,樊文会,刘 玲

(北京林业大学 水土保持学院/水土保持与荒漠化防治教育部重点实验室,北京 100083)

摘要:发展可再生、清洁和环保的新能源是我国节能减排和可持续发展的重要任务。森林能源储量巨大,不仅是一种古老的传统能源,还是极具发展前景的可再生清洁能源,是21世纪新能源战略的重要选择之一。该文分析了开发利用森林能源在缓解全球能源危机,减缓全球气候变化进程,实现社会经济与自然资源的可持续发展等领域的重大意义;指出开发利用森林能源的主要途径有积极营造薪炭林、木质能源转化技术和开展森林健康经营等;最后提出中国森林能源开发面临和需要解决的重点问题。

关键词:能源;森林;能源危机;可持续发展

中图分类号:S727.4

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2011)09-0149-04

森林能源是指森林生态系统提供的能源原料及其转化产品,是可再生生物质能源的重要组成部分。森林能源不仅包括传统的薪柴能源,还包括各种能源植物。能源植物可转化为多种终端能源如电力、气体燃料、固体燃料和液体燃料,其中最关注的是生物质液体燃料,即生物燃油^[1]。

自20世纪70年代能源危机以来,森林能源的开发利用得到世界各国的高度重视。1986年,

诺贝尔奖获得者卡尔文博士在加州开展了大面积石油植物种植实验,取得成功,每年产出石油120~140桶·hm⁻²。2010年,美国石油速生林面积已达100多万hm²,并建立了石油植物研究基地。我国早期的森林能源研究主要集中在薪炭林领域,在“六五”期间就制定了薪炭林造林计划,建立了全国薪炭林试点县^[2]。1996年,林业部启动“森林能源工程”,计划用20a时间在我国建立0.12亿hm²森林能源基地,以彻底解决农村燃料短缺状况,初步建立起比较合理的森林结构体系和比较科学的农村能源体系。人类纪元进入新千年,以生物质能源为代表的森林能源已经成为应对价格飙升的石油能源和愈演愈烈的全球气候变化问题有力武器,成为国际政治、经济和环境领域共同关注的热点问题。

收稿日期:2011-04-27

基金项目:国家林业局林业公益性行业科研专项资助项目(200804022A,20100400201-02)

第一作者简介:任丽娜(1985-),女,山东省海阳市人,硕士,从事土壤及植物营养研究。E-mail:renlinahuiyi@163.com。

通讯作者:王海燕(1972-),女,湖北省浠水县人,博士,副教授,从事土壤及植物营养研究。E-mail:haiyanwang72@yahoo.com.cn。

Research Advances in the Gene Engineering of Potato Resistance to Leafroll Virus

LI Yun^{1,2}, LU Qi-neng¹, ZHAO Chang-ling², SHEN Chun-xiu¹

(1. Life Sciences, Resources and Environment Sciences School of Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000; 2. Agronomy and Biotechnology College of Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201)

Abstract: The research progress on resistance genetic engineering of potato leafroll virus was summarized. In resistance genetic engineering of potato leafroll virus, the scientists implied mainly RNA interference, transferring resistance genes, the genome was cut by ribozyme, gene site-directed mutagenesis and other methods to obtain anti-potato leafroll virus plants, a breakthrough has been achieved. This paper could provide a reference for breeding the potato with resistance to PLRV by analyzing genetic engineering strategy and the achievements.

Key words: potato leafroll virus; gene engineering; genetic transformation; resistance breeding