抗小麦黄花叶病毒转基因小麦的获得及病毒诱导的基因沉默

董 槿[①] 何震天[②] 韩成贵[①] 陈秀兰[②] 张凌娣[①] 刘伟华[①] 韩月澎[②] 王锦荣[②]
翟亚锋[①] 于嘉林[①*] 肖悦岩[①] 刘 仪[①]

(①中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094; ②江苏省里下河地区农业科学研究所, 扬州 225207. * 联系人, E-mail: bnyvv@public.bta.net.cn)

摘要 利用 Act1 启动子和除草剂选择标记 *bar* 基因, 构建了含有小麦黄花叶病毒外壳蛋白基因的植物表达载体, 并采用基因枪法导入小麦品系. 经 PCR 和 PCR-RFLP 对转基因小麦 T0 代及 T1 代进行检测后, 对阳性植株的后代株系(T2代)进行田间抗病性检测. 结果表明, 外源基因可以在后代中遗传, 并且其中一个转基因株系的后代(P8-T2)对小麦黄花叶病毒呈现高度抗性. 经 Western blot 和 RT-PCR 检测发现, 抗病转基因小麦体内外壳蛋白基因在病毒感染后的表达水平出现明显下降, 认为所获得转基因小麦的抗性是由病毒诱导的基因沉默引起的.

关键词 小麦黄花叶病毒 外壳蛋白基因 转基因小麦 抗病性 基因沉默

小麦黄花叶病, 亦称“梭条花叶病”, 是我国小麦生产中的一种重要病毒病害, 主要发生在长江中下游及一些分支流域(如汉水、淮河), 在渭河流域以及东部沿海地区也有发生. 该病毒病在稻麦轮作种植区的危害尤其严重, 一般减产 10% ~ 30%, 重者达 70% ~ 80%, 并呈逐年加重和蔓延的趋势. 小麦黄花叶病是由单链正义 RNA(+ssRNA)病毒——小麦黄花叶病毒(wheat yellow mosaic virus, WYMV)引起的[1], 该病毒由禾谷多黏菌(*Polymyxa graminis*)的游动孢子携带传播[2], 并可在土壤内的休眠孢子中长期存活, 防治非常困难. 同时, 因在上述地区的主栽小麦品种多对此病害表现敏感, 而对小麦生产构成严重威胁.

利用病原物介导的抗病性(pathogen derived resistance, PDR)机制来创造抗病毒转基因植物已经得到广泛研究, 并在许多作物上有成功的报道. 在所获得的转基因抗性植株中, 大致可以分为两类. 一类是由蛋白介导的抗性, 表现为发病推迟, 抗性随病毒接种量的增大而降低, 抗性范围不仅限于该病毒, 对与之相关的病毒也表现抗性. 另一类是由 RNA 介导的抗性, 转基因蛋白表达水平与抗性水平之间没有直接联系, 表现为高抗或免疫, 特异地作用于转基因植物基因供体来源的病毒, 抗性的发生依赖于基因沉默机制[3,4]. 有关基因沉默机理的研究认为, 双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)进入植物细胞后, 被 DICER (RNase Ⅲ-like enzyme)降解成约 21 个左右核苷酸的干扰性 RNA(small interference RNAs, siRNAs), siRNAs 在细胞质中可能与相关的基因产物形成复合体, 降解具有同源序列的 mRNA. siRNAs 也可能在某些基因产物, 如 RNA 聚合酶(RdRp)、解旋酶(helicase)等的参与下, 以具有同源序列的 mRNA 为模板, 形成新的 dsRNA. siRNAs 以及各种类型的 dsRNA 可能会被运输到细胞核中指导具有同源序列的 DNA 甲基化, 或作为转录后基因沉默(posttranscriptional gene silencing, PTGS)的信号, 进入其他细胞[5~7].

由于 WYMV 的复制过程存在一个 dsRNA 阶段, 利用其基因或基因片段对寄主进行遗传转化, 在病毒侵染时会诱导寄主产生基因沉默, 从而有可能获得对 WYMV 具有抗性的转基因小麦. 我们在对 WYMV 进行深入研究并完成全序列测定的基础上[8], 构建了含有 WYMV 外壳蛋白(coat protein, CP)基因的植物表达载体, 选择具有推广潜力的小麦育种品系, 利用基因枪轰击法转化小麦幼胚愈伤组织, 经室内及田间筛选获得了抗病毒转基因小麦株系, 并对其抗病机制进行了分析.

1 材料与方法

(ⅰ) 材料. 质粒 pGWY-30 为含有 WYMV 全长 *cp* 基因的重组质粒, 由本实验室构建[8]; 质粒 pAct1.cas

和 pBarGus 分别由 CAMBIA 和本实验室提供或保存.

所用引物由赛百胜生物技术公司合成, 序列如下:

WY-10: 5′-AGCAGTACTGAGCTCATGGCAGC-TGAC-3′, 与 WYMV RNA1 的 6475 ~ 6498 nt 对应, 并引入了一个 *Sca* Ⅰ位点和 ATG 翻译起始密码子.

WY-11: 5′-AGGGGAGTACTGGTTTAGGTTA-GT-3′, 与 WYMV RNA1 的 7362 ~ 7385 nt 互补, 并引入了一个 *Sca* Ⅰ位点.

WY-36: 5′-GGTTGAAGCAGATCGTGTTGAG-3′, 与 WYMV RNA1 的 6588 ~ 6609 nt 对应.

WY-37: 5′-CCTAGCGTGAACAATGAATGGG-3′, 与 WYMV RNA1 的 7062 ~ 7041 nt 互补.

工具酶、限制性内切酶及各种化学试剂主要购自 GibcoBRL, 华美和 TaKaRa 公司. WYMV 外壳蛋白基因原核表达产物的抗血清由本实验室制备. 转化所需小麦为江苏里下河地区农业科学研究所培育的小麦品系 96G25.

(ⅱ) 植物表达载体的构建. 以质粒 pGWY-30 为模板, 用引物 WY-10 和 WY-11 扩增外壳蛋白基因, 补平后, 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 插入质粒 pAct1.cas 的 *Sma* Ⅰ位点, 得到中间载体 pAcp15. 用 *Hin*dⅢ将质粒 pBarGus 中的 Bar 表达单元切下, 补平后, 插入 pAcp15 所含有的 *Xho* Ⅰ位点, 获得含有 WYMV *cp* 基因的植物表达载体 p56(图 1).

(ⅲ) 基因枪法转化小麦. 取开花后 12 d 左右的幼嫩小麦子粒, 经次氯酸钠表面消毒后, 用解剖针将幼胚挑出, 盾片面向上, 接种在含有 2 mg/L 2,4-D 的 MS 诱导培养基上. 24 ~ 27℃暗培养 5 d 左右, 至盾片周围有愈伤组织出现. 在轰击前 6 ~ 8 h 将这种幼胚转移到含有 0.4 mol/L 甘露醇的 MS 培养基上进行高渗处理. 轰击用的子弹制备方法如下: 按照 0.75 μg DNA 及 40 ~ 80 μg 金粉的比例轰击, 加入 10 倍于 DNA 体积的 2.5 mol/L $CaCl_2$, 振荡 5 min 后, 4℃下静置沉降. 弃上清液后, 加入 1 mL 70%乙醇振荡悬浮, 4℃下静置使金粒沉降, 弃上清液, 反复洗涤 3 次. 按照每次轰击 10 μL 的比例, 加入 100%乙醇, 悬浮, 备用. 选用 1100 Pa 的易裂片,在 12 cm 的轰击距离和 3.3×10^3 Pa 的真空度下, 每皿轰击两次, 具体操作参照 Bio-Rad 基因枪(Bio-Rad He-2000 型)说明书. 轰击后 18 h, 将幼胚移至 MS 诱导培养基, 暗培养 5 d. 然后, 将其转移至含 10 mg/L 玉米素的 MS 再生培养基上, 每 2 周继代 1 次, 共继代 2 次. 继代时, 将形成明显芽或芽点的愈伤组织挑选出来, 移至含 2 mg/L 玉米素, 5 mg/L PPT 的 MS 分化再生培养基. 愈伤组织在这种培养基上进行 6 ~ 7 周的筛选、分化, 中间继代 1 次. 将筛选后存活的幼芽移至含 18.5 mg/L PPT 的 1/2 MS 生根培养基. 待长出 2 ~ 3 条根后, 把再生植株移栽定植到花盆灭菌土中.

(ⅳ) 转基因植株的分子鉴定及其后代的检测. 再生苗定植成活后, 按 Dellaporta 等人[9]的方法提取总 DNA. 使用引物 WY-36 和 WY-37 对成活植株体内的 WYMV *cp* 基因进行 PCR 检测, 预计应扩增出长度为 475 bp 大小的片段. 将 PCR 产物抽提、沉淀、溶解后, 用限制性内切酶 *Xba* Ⅰ和 *Hin*dⅢ进行酶切鉴定.

(ⅴ) 转基因植株 T2 代的田间抗性鉴定. T1 代经 PCR 鉴定为阳性的植株所结种子, 播种于扬州小麦黄花叶病田中, 小麦生根时, 田间带病真菌侵染小麦根部, 自然接种, 使病毒侵染小麦. 次年春季发病高峰期对转基因后代株系进行抗病性观察, 并分级记录症状.

(ⅵ) 转基因植株 T2 代的分子检测. 裂解法提取小麦叶片的水溶性总蛋白, 经预电泳调整上样量. 电泳后, 利用 Western blot 方法和 WYMV 外壳蛋白抗血清, 对田间抗性表现不同的转基因小麦株系感染病毒前后的外壳蛋白含量进行检测. 同时, 抽取转基因株系的部分植株, 提取总 RNA 后, 用 RT-PCR 方法检测病毒感染前后的 *cp* 基因 mRNA 的水平.

2 结果与分析

2.1 T0 代转基因小麦的获得

利用含有 WYMV *cp* 基因的植物表达载体 p56,

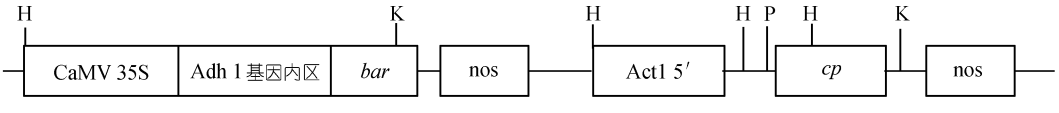

图 1 植物表达载体 p56 的基本结构

酶切位点: H 示 *Hin*dⅢ; K 示 *Kpn* Ⅰ; P 示 *Pst* Ⅰ

基因枪轰击法转化小麦品系 96G25 的幼胚愈伤组织 995 个. 移栽定植成活 26 株. 使用引物 WY-36 和 WY-37 进行 PCR 鉴定, 其中 7 株可以扩增出一个与预期长度相符的 DNA 片段(图 2), 将其分别命名为 P1-T0, P2-T0, P4-T0, P5-T0, P6-T0, P7-T0 和 P8-T0. 在进一步的 PCR-RFLP 鉴定中, 其中 6 株的 PCR 产物经 *Xba* Ⅰ酶切后, 可得到 258 和 217 bp 两条带(图 3(a)),

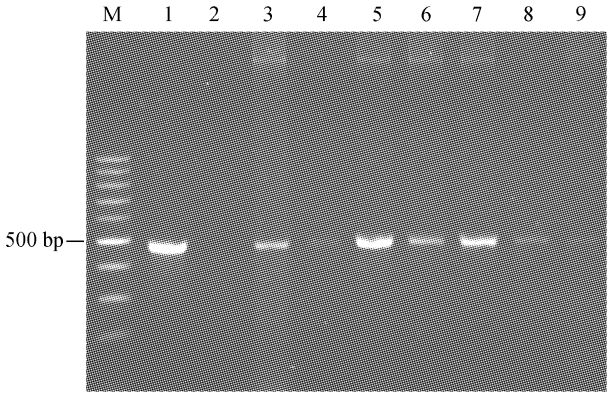

图 2 T0 代转基因小麦的 PCR 检测

M 示 0.1 kb 分子量标准(Promega), 1 示质粒 p56 扩增产物, 2 示非转基因小麦, 3 ~ 9 示 T0 代转基因苗(P1, P2, P4, P8, P6, P7 和 P5)

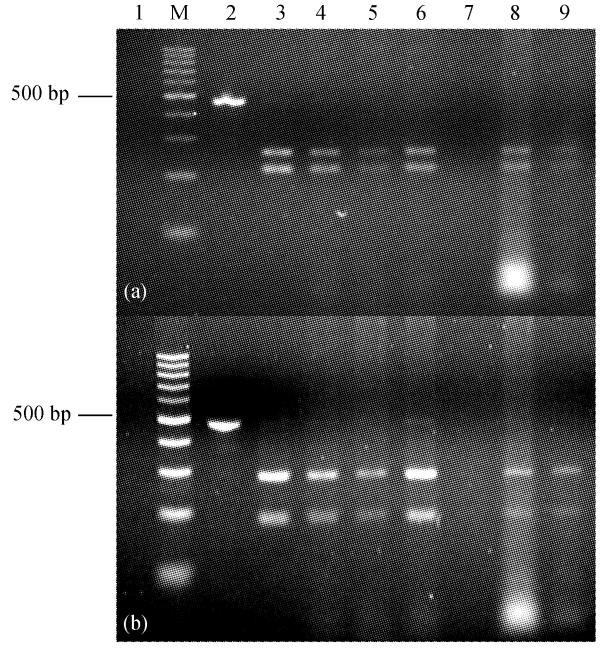

图 3 PCR 产物的酶切鉴定

(a) PCR 产物的 *Xba* Ⅰ酶切鉴定结果, (b) PCR 产物的 *Hind*Ⅲ酶切鉴定结果. M 示 0.1 kb 分子量标准(Promega), 1 示非转基因小麦, 2 示未酶切的质粒 p56 扩增产物, 3 ~ 9 示 T0 代转基因小麦 PCR 产物(P4, P8, P6, P7, P5, P1 和 P2)酶切鉴定

经 *Hind*Ⅲ酶切后, 也可得到预期的 187 和 288 bp 的两条预期谱带(图 3(b)). 而其中 P5-T0 的 PCR 产物酶切后未能得到预期大小的条带, 同时考虑到其 PCR 反应的产物量也很小(图 2, 泳道 9), 故认为 P5-T0 的 PCR 检测结果是非特异性产物, 并在以下的实验中予以淘汰. 由此, 初步确认本实验得到了 P1-T0, P2-T0, P4-T0, P6-T0, P7-T0 和 P8-T0 共 6 个 T0 代转基因植株, 转化效率为 0.6%.

2.2 T1 代转基因小麦的检测

将上述 6 株 T0 代植株(P1, P2, P4, P6, P7 和 P8)所结籽粒全部播种于温室, 得到 6 个转基因植株的 T1 代群体. 由植株的叶片中提取总 DNA 进行 PCR 检测. 由表 1 结果可以看出, 外源基因可由 T0 代传递给 T1 代, 并在后代遗传过程中发生不同程度的分离, 这与 Stoger 等人[10]的报道相符. 因受温室条件等因素的限制, 定植后成活的 T0 代再生植株大多结籽较少, 仅少数植株产生分蘖, 结籽较多.

表 1 T1 代转基因小麦 PCR 检测结果

T0 代植株代号	T1 代植株群体代号	T1 代植株总数	PCR 阳性植株数∶PCR 阴性植株数
P1-T0	P1-T1	9	5∶4
P2-T0	P2-T1	7	3∶4
P4-T0	P4-T1	32[a)]	15∶4
P6-T0	P6-T1	5	4∶1
P7-T0	P7-T1	6	4∶2
P8-T0	P8-T1	54	30∶24

a) P4 共有 32 个 T1 代植株, 仅检测了其中的 19 个植株

2.3 T2 代转基因小麦的检测

(ⅰ) 转基因植株 T2 代的田间抗性鉴定. 从 P1-T1, P2-T1, P4-T1, P6-T1 和 P7-T1 PCR 检测阳性的所有单株, 以及 P8-T1 检测阳性的 19 个单株(由 30 个单株中随机选择), 分别取其所结种子的 1/3~1/2 进行 T2 代抗性测定. 田间试验按株行播种, 每株后代视种子量多少播种 2 ~ 4 行并编号记录, 每行点播 10 ~ 20 粒, 并设置相同品系的非转基因小麦作为对照. 试验场地为扬州多年严重发病田块, 病圃内发病情况均匀, 播种位置无特定选择. 候其自然发病, 于次年春季发病期调查记录田间症状表现, 结果如表 2 所示.

对 T2 代株系的田间病毒侵染试验统计结果表明, 大部分转基因小麦对 WYMV 均表现敏感, 发病率和病情指数与非转基因对照品系 96G25 接近. 但是转

表 2 转基因植株 T2 代的田间抗性鉴定 a)

T2 代编号	株系(行)数	植株总数	发病症状等级(植株数) b)				发病率/%	病情指数/%
			0	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ		
P1-T2	5	223	1	59	95	68	99.6	67.7
P2-T2	3	155	0	48	59	48	100	66.7
P4-T2	15	617	12	341	208	56	98.1	50.0
P6-T2	4	116	3	86	22	5	97.4	41.7
P7-T2	4	130	1	85	36	8	99.2	46.4
P8-T2	19 c)	597	423	163	11	0	29.1	10.3
96G25 (CK)	–	55	0	27	28	0	100	50.3

a) 抗病性田间试验内容已通过农业生物基因工程安全评价审批(批准文号: 农基安审字 2000B-01-053). b) 0 级: 无症状; Ⅰ级: 轻度花叶, 叶片不产生梭条花纹或黄花叶症状, 植株不矮缩; Ⅱ级: 梭条或黄花叶明显, 占叶片面积的 1/2 左右, 植株出现矮化; Ⅲ级: 梭条或黄花叶严重, 症状占叶片的 3/4 或更高, 心叶扭曲, 分蘖减少, 部分叶片或整株枯死, 植株可能明显矮化. c) 其中 1 个株系(行)发病情况为 0 级, 1 株; Ⅰ级, 13 株; Ⅱ级, 10 株; Ⅲ级, 0 株

基因后代 P8-T2 的绝大多数株系却表现出突出的抗病性, 不仅发病率低, 而且发病程度也明显低于对照和其他转基因小麦株系.

(ⅱ) T2 代转基因小麦植株体内外壳蛋白含量的检测. 从病田中表现抗病的 P8-T2 植株群体和表现感病的 P4-T2 植株群体中随机选出 2 ~ 3 棵. 同时将 PCR 检测阳性的相应 T1 代种子播于温室无菌土中, 培养获得未经病毒感染的 P8-T2 和 P4-T2 植株, 经 PCR 检测后, 取阳性植株 2 ~ 3 棵. 提取上述植株叶片的总蛋白, 利用 WYMV CP 抗血清进行 Western blot 检测. 由图 4 可见, 转基因株系 P4-T2 与 P8-T2 在受到病毒感染以前, 导入的外壳蛋白基因均有表达, 二者水平接近. 然而, 在田间病毒侵染以后, 表现感病的转基因小麦 P4-T2 株系的外壳蛋白含量较感染病毒以前明显提高; 而表现抗病的转基因小麦 P8-T2 代株系, 在上样总蛋白量高于 P4-T2 的条件下, 却仍未能检测到病毒的外壳蛋白. 这种在病毒侵染前后植株体内的 WYMV 外壳蛋白水平的变化说明, 病毒的侵染对转基因小麦株系 P4-T2 与 P8-T2 产生了不同的影响. 在 P8-T2 株系中, 转化的 *cp* 基因与侵入病毒携带的 *cp* 基因之间发生了同源片段诱导的基因沉默, 从而使植株对病毒产生抗性. 而在 P4-T2 株系中, 虽然转化的 *cp* 基因同样能够表达, 但由于某种原因未能实现这一过程, 病毒仍然可以侵染致病, 并在复制过程中表达积累各种产物.

(ⅲ) T2 代转基因小麦植株体内外壳蛋白 mRNA 的 RT-PCR 检测. 按上述方法(ⅱ)取样, 分别提取各种植株的总 RNA, 利用引物 WY-36 和 WY-37 进行 RT-PCR 检测, 并设置不进行反转录的 RNA PCR 为阴性对照(RNA-PCR), 以排除可能由转基因小麦的 DNA 污染而产生 PCR 产物. 由图 5 可见, P8-T2 和 P4-T2 株系在被病毒侵染以前均有 *cp* 基因的转录. 在田间植株受到病毒感染后, P8-T2 株系植株中 CP RNA 的含量明显下降, RT-PCR 几乎不能获得扩增产物, 而 P4-T2 株系则由于病毒感染后的复制积累, 相应 RNA 的含量大大增加. 这一结果与对病毒外壳蛋白的测定结果基本一致, 说明 P8-T2 转基因小麦对于病毒的抗性是在 RNA 水平上由病毒诱导基因沉默产生的.

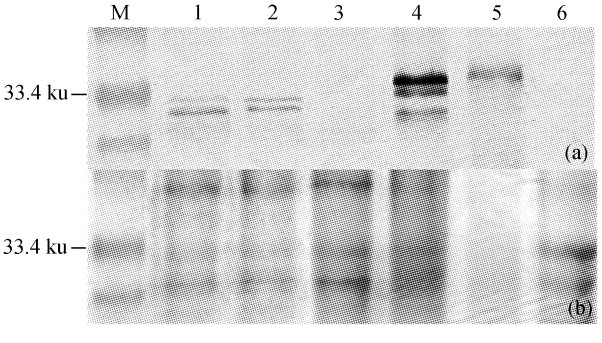

图 4 转基因小麦中外壳蛋白含量的 Western blot 检测
(a) Western blot, (b) 显示上样量的 SDS-PAGE. M 示蛋白质分子量标准(Bio-Rad), 1 示健康 P8-T2 小麦, 2 示健康 P4-T2 小麦, 3 示感染 WYMV 的 P8-T2 小麦, 4 示感染 WYMV 的 P4-T2 小麦, 5 示感染 WYMV 的非转基因小麦, 6 示健康非转基因小麦

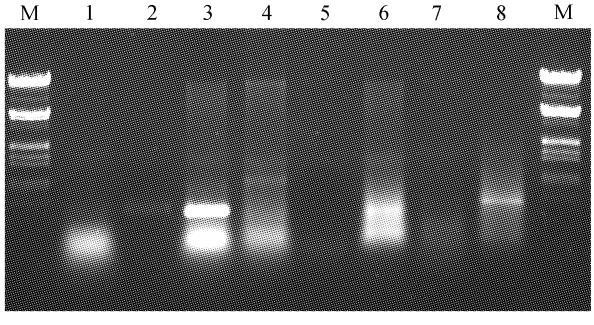

图 5 转基因植株中 *cp* RNA 的 RT-PCR 检测
M 示λ-DNA/*Hind*Ⅲ+*Eco*RⅠ, 1 示非转基因健康小麦, 2 示植物表达载体 p56, 3 示病田接种 P4-T2, 4 示病田接种 P8-T2, 5 示未接种 P8-T2, (RNA-PCR), 6 示未接种 P8-T2, 7 示未接种 P4-T2(RNA-PCR), 8 示未接种 P4-T2

3 讨论

田间接种试验中, 分属于 6 个转基因 T0 代植株的 50 个 T2 代株行, 呈现出明显的抗感病差异. 其中 P8-T2 转基因植株 19 个株行中的 18 个株行的植株高度和叶片颜色均表现正常, 与对照植株的株型矮小, 叶片黄化形成鲜明对比. 同样含有 WYMV *cp* 基因的另外 5 个转基因小麦 T2 代的 31 个株行和 P8-T2 的 1 个株行, 与相同品系的非转基因对照相比, 抗病性却无明显变化, 甚至变得更为严重. 推测这与外源基因随机整合有关—— 不同整合事件对染色体结构的影响、与内源启动子或增强子序列的距离及转录 mRNA 的结构等方面存在不同. 实验中发现, 这些差异对外源基因能否转录影响不大, 但是在病毒侵染后的寄主基因沉默机制与病毒抑制基因沉默的各种因子相互作用的过程中[11~13], 它们很可能对转基因植株是否能够发生同源诱导的基因沉默具有影响, 并最终影响到植株抗、感病性状的差异. 这也表明在病毒诱导基因沉默(virus induced gene silence, VIGS)的过程中, 除要求寄主体内的同源性片段以外, 还有其他的因素在起作用.

比较 P8-T2 群体内不同株行的表现, 发现在 19 个株行中绝大多数对 WYMV 具有抗性的同时, 有 1 个株行却呈现感病. 分析其原因, 可能是在 T1 代结实过程中, 转基因小麦的染色体继续分离, 外源基因丢失; 也可能是在 P8-T1 代检测得到 30 个阳性株中存在个别的假阳性结果(表 1), 从而导致在 T2 代中表现以上现象. 另外, 我们还对 P8-T2 各株行的栽培性状进行了初步的比较(结果未示), 发现不仅 P8-T2 与非转基因受体品系 96G25 相比在叶型、种皮颜色和子粒形状大小方面略有不同, 而且 P8-T2 不同株行之间在上述方面也有一些差异. 认为是在体细胞无性繁殖过程中某些染色体发生变异, 在后代中表现出各种不同性状的分化.

本研究还曾对在感病田种植的 P8-T2 转基因小麦进行了 Southern 检测, 但获得的杂交信号较弱. 在经 *Hin*dⅢ酶切后的 Southern 检测中, 杂交条带初步表明 *cp* 基因可能在两个位点整合进入小麦的染色体 DNA 中(结果未示). 对转基因小麦进行 Southern 检测的结果不理想, 可能是由以下一些因素造成的: 普通异源六倍体小麦基因组大, 重复序列比例高(83%), 内切酶消化时造成目的基因片段与基因组 DNA 重复序列片段的高丰度区重叠, 使得目的条带受到背景掩盖而不清晰; 由于转基因小麦中的目的片段被高度甲基化修饰, 造成所在区段的 DNA 结构发生变化, 在被甲基化的碱基密度很高时, 这种变化降低杂交过程中目的片段与探针的匹配能力(在 WYMV *cp* 基因中, 植物甲基化酶识别位点 CXG 共 51 个).

致谢 本工作为国家“八六三”计划(批准号: 101-04-01-05)和“国家转基因植物研究与产业化专项”(批准号: J2000-B-016)资助项目.

参 考 文 献

1 于嘉林, 晏立英, 冯继东, 等. 一种中国发生的真菌传小麦花叶病毒 RNA-1 3′末端核苷酸序列分析. 病毒学报, 1995, 11(3): 248~254

2 田兆丰, 陈笑瑜, 朱坤, 等. 禾谷多黏菌(*Polymyxa graminis*)侵染及传毒体系的研究. 微生物学报, 2000, 40: 352~358

3 Ruiz M T, Voinnet O, Baulcombe D C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. Plant Cell, 1998, 10: 937~946

4 Wang M B, Abbott D, Waterhouse P M. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA give immunity to barley yellow dwarf virus. Mol-Plant Pathol, 2000, 1: 347~356

5 Vance V, Vaucheret H. RNA silencing in plants——Defense and counterdefense. Nature, 2001, 292: 2277~2282

6 Matzke M, Matzke A J, Kooter J M. RNA: guiding gene silencing. Science, 2001, 293: 1080~1083

7 Waterhouse P M, Wang M B, Lough T. Gene silencing as an adaptive defense against viruses. Nature, 2001, 411: 834~842

8 于嘉林, 晏立英, 苏宁, 等. 小麦黄花叶病毒基因组核苷酸序列分析. 中国科学, C 辑, 1999, 42(5): 639~644

9 Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. A plant DNA minipreparation: version Ⅱ. Plant Mol Biol Rep, 1983, 1(4): 19~21

10 Stoger E, Williams S, Keen D, et al. Molecular characteristics of transgenic wheat and the effect on transgene express. Transgenic Research, 1998, 7: 463~471

11 Marath R, Smith T H, Anandalakshmi R, et al. Plant viral suppressors of post-transcriptional silencing do not suppress transcriptional silencing. Plant J, 2000, 22: 51~59

12 Mallory A C, Ely L, Smith T H, et al. HC-Pro suppression of gene silencing eliminates the small RNAs but not the transgene methylation or the mobile signal. Plant Cell, 2001, 13: 571~583

13 Voinnet O, Lederer C, Baulcombe D C. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. Cell, 2000, 103: 157~167

(2001-11-30 收稿, 2002-02-05 收修改稿)