维普资讯 http://www.cqvip.com

103—109 15963(2)

第11卷第2期 中国病毒学 Vol.11 No.2
1996年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 1996

番木瓜环斑病毒株系、分子生物学及其防治研究进展

肖火根 范怀忠
(华南农业大学植物病毒研究室,广州 510642)

S432.41
S436.68

Advances of Research on the Strains, Molecular Biology and Control of Papaya Ringspot Virus

Xiao Huogen Faan Hweichung
(*Lab. of Plant Virology, South China Agricultural University, Guangzhou* 510642)

关键词 番木瓜环斑病毒,株系,分子生物学,病毒检测,病害防治 番木瓜环斑病
Key words Papaya ringspot virus, Strain, Molecular biology, Virus detection, Disease control

番木瓜环斑病(Papaya Ringspot Virus, PRV)是热带、亚热带地区番木瓜生产上的主要限制因素[1]。我国广东、广西、海南、福建、台湾和云南都严重发生流行[2,3]。

PRV是马铃薯Y病毒组(Potyviruses)的成员之一,大多数PRV株系都属于亲缘关系十分密切的两大类型的株系[1]之一。P型株系(PRV-P)给番木瓜生产带来严重危害,也发生在葫芦科作物上[1]。W型株系(PRV-W)(即西瓜花叶病毒一号)是葫芦科作物上的主要病原,虽然和PRV-P型株系血清学密切相关,但不侵染番木瓜[1]。近年来,有关PRV-P型株系的分子生物学及其所引起的番木瓜环斑病的防治研究的所报道很多。叶锡东等对利用弱株系交互保护作用防治PRV作了较多的综述报道[4,5],本文则比较全面地综述了近年来对PRV-P型株系的研究进展。

1 PRV株系研究

PRV-P类型的株系或分离物,国内外迄今报道的约有36个:在华南地区,吴方诚等[2]、蔡健和和范怀忠等[3]分别报道1个分离物和4个株系;在我国台湾张清安、叶锡东等和苏鸿基等分别报道2、7和3个株系[3];在日本、尼日利亚、美国夏威夷和澳大利亚分别报道了5、4、2和2个株系[3,6,7];在美国佛罗里达、厄瓜多尔、巴西、越南、斯里兰卡和泰国各报道1个株系[3,5,7]。

PRV有16个株系或分离物已报道进行了外壳蛋白(CP)基因核苷酸序列分析,其中P型13个[7-13],W型3个[7,8,14]。核苷酸序列分析比较发现,来自世界不同地区的PRV株系CP基因序列有很大的差异。Bateson等(1994)[7]报道PRV亚洲株系之间,以及亚洲株系与澳大利亚或美国株系之间有高达12%的核苷酸序列差异,澳大利亚株系比亚洲株系更像美国株

本文于1995年7月5日收到,9月25日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

系。叶长明等(1991)[10]和刘俊君等(1991)[11]报道我国华南株系与美国株系之间也有高达10～12%的核苷酸序列差异。有趣的是,这种差异与株系类型不相关。澳大利亚的P型株系和W型株系的CP基因序列是很相似的,同源率高达98%以上[7];美国的P型株系和W型株系的CP基因序列也是很相似的,同源率高达98%以上[8]。但是这种差异的确与地理位置相关。6个PRV澳大利亚株系间没有重要的差异,同源率都在98%以上[7],而澳大利亚W型和P型株系与美国的W型和P型株系是密切相关的,同源率在96.5%以上[7]。华南P型株系Ys、Sm和G的亲缘关系较密切,同源率在95.7～96.1%之间[15],而与亚洲其它国家或地区,如斯里兰卡、越南、泰国和台湾等的P型株系的亲缘关系较远,同源率在89～94%(叶长明和肖火根等,未发表)。

PRV-W型株系在澳大利亚已报道有近20年,而PRV-P型株系是在1991年才由Thomas, J. E. 和 Dodman, R. L. 首次报道的[7]。Bateson等(1994)[7]报道认为,在澳大利亚的PRV-P是由PRV-W突变而来的,而不是从外面引进来的。他们企图比较来自东南亚国家的P型和W型株系CP基因核苷酸序列,来证实这个结论。

2 PRV基因组全长核苷酸序列和基因组成

Yeh等(1992)[18]通过直接的病毒RNA序列测定,从四个重叠(overlapping)的cDNA克隆中解读了PRV夏威夷株系HA RNA基因组的全部核苷酸序列,共有10326个核苷酸(不包括3′端的poly A尾端)。这和已测出序列的potyviruses中的烟草蚀纹病毒(TEV,9496个核苷酸)、烟草脉斑驳病毒(TVMV,9472)、李痘病毒(PPV,9741)、马铃薯Y病毒(PVY,9740)、豌豆种传病毒(PSbMV,9924)、大豆花叶病毒(SMV,9588)和辣椒斑驳病毒(PeMV,9640)相比较为最长者。PRV-HA RNA的碱基组成为A 31.2%、U 27.0%、G 23.0%、C 18.0%和其它Potyviruses相似。PRV-HA RNA 5′端含85个核苷酸,比其它Potyviruses的要短46～121个核苷酸。PRV-HA RNA 3′端非编码区含209个核苷酸,与其它Potyviruses的相似。PRV-HA RNA在3′端的保守序列NAAAUAAAACANNUCAANACAACAUAA与另外7个Potyviruses的有75%的同源率,表明这个区域在Potyviruses中起着共同的重要作用。PRV-HA RNA只含有一个阅读框架(Open Reading Frame),其阅读的起始点在第86～88核苷酸处,终止点在10118～10120核苷酸处。此阅读框架可编码一个有3344个氨基酸的复合蛋白,其分子量为381088(381k),大于已知其它Potyviruses之复合蛋白。

PRV复合蛋白的裂解过程由病毒编码的三种蛋白酶执行,其中NT(N-terminal)蛋白酶及HC-Pro(Helper Component-Proteinase)蛋白酶分别自行酶解其C端,而NIa (Nuclear Inclusion a)蛋白酶以顺反方式酶解复合蛋白产生CI(Cylindrical Inclusion)、P5、NIa、NIb(Nuclear Inclusion b)及CP等蛋白[16]。所有Potyviruses经比较显示,NIa蛋白中有一个内含切位可分解其为VPg(*genome-linked protein*)和蛋白酶二蛋白[16]。

关于CP和NIb之间蛋白酶的切割位点,目前有不同的看法。Guemada等人(1990)[8]提出位于VFHQ/SKNE(3054～3061氨基酸残基处),这个切割位点产生的CP为33 kDa,比早期测定的CP分子量36 kDa[17]要小。后来Yeh等(1992)[16]发现切割位点很可能是位于VYHE/SRGT(3034～3042),这个位点在VFHQ/SKNE位点上游20个氨基酸处,产生一个35 kDa的CP;同时认为也可能存在VFHQ/SKNE位点[13]。但刘俊君等(1993)[18]则认为以

维普资讯 http://www.cqvip.com

Guemada 等人早年提出的 VFHQ/SKNE 位点更为可能。

PRV RNA 的基因组组成暂时推测为 VP-5′leader-63k NT (N 端蛋白)(P1)-52k HC-Pro (辅助成分-蛋白酶)-46k(P3)-72k CI(柱状内含体蛋白)-6k(P5)-21k NIa(核内含体 a 蛋白)-VP-27k NIa-Pro-59k NIb(核内含体 b 蛋白)-35k CP (外壳蛋白)-3′端非编码区-poly A(多聚腺苷酸)[16]。

PRV 和已发表的 Potyviruses TEV、TVMV、PVY、PSbMV 和 PPV 相比较,其复合蛋白裂解产生的蛋白与这些病毒的相似,但与这些病毒所产生的蛋白的同源性都低于 60.9%,表明 PRV 不同于 TEV、TVMV、PVY、PPV 和 PSbMV[16]。其复合蛋白所产生的 NT 蛋白的分子量为 63k,较其他 Potyviruses 的 NT 蛋白大 18～34k,同源率仅为 10.4～18.6%[16]。NT 蛋白是 Potyviruses 中最具变异性之蛋白,可作为鉴定区别不同 Potyviruses 之用。而最具共同性的蛋白则为有复制酶功能的 NIb 蛋白,与其它 Potyviruses 的 NIb 有 56.2～60.9%的同源率[16]。NIb 相对较高程度的保守性表明 Potyviruses 有相似的 RNA 复制过程。PRV HC-Pro 蛋白、CIP 蛋白、NIa-VPg 蛋白、NIa-Pro 蛋白和 CP 蛋白与其它 Potyviruses 蛋白分别有 45.1～51.8%,50.1～59.0%,45.3～54.4%,39.4～47.1%和 50.6～56.6%的同源率[16]。HC-Pro 蛋白和 CP 蛋白的变异幅度分别低于 6.7%和 6.0%,相对小于其它蛋白,表明蚜传特性、风轮状内含体的产生、VPg 蛋白的功能、NIa 蛋白酶的酶解过程和粒体的装配等在 Potyviruses 中是相当保守的。PRV P3 (46k)蛋白和 P5(6k)蛋白与其它 Potyviruses 蛋白相比有较低的同源率,分别只有 25.7～33.0%和 31.6～42.1%[16],这表明此两种蛋白的功能有较大的病毒专化性。

PRV 复合蛋白之裂解蛋白的功能,与其它 Potyviruses 蛋白是相似的。而有关 Potyviruses 基因产物功能的综述文章较多[19],在此不再赘述。

3 检测方法研究

在病毒检测上,已发展有快速、方便、灵敏和可靠的 ELISA 法和 cDNA 分子探针法,这对 PRV 的进一步研究,如田间分离物的鉴定,PRV 株系的鉴定、分类及其亲缘关系的分析,弱株系筛选,无毒苗木和抗病品种的筛选及检测,以及 PRV 的田间流行病学分析等带来很大方便。

自八十年代以来,已相继用完整的 PRV 病毒粒子[17]、十二烷基磺酸钠(SDS)降解的 PRV CP[17]和 PRV 圆柱状内含体蛋白[20]等免疫家兔获得了多抗血清。林壁润和范怀忠等(1989)[21]制备了 PRV 单克隆抗体,把广州地区的 4 个 PRV 分离物分为 3 个血清型。迄今已成功应用 SDS-免疫双扩散[17]、双抗体夹心 ELISA 法[17]、常规间接 ELISA 法[20,22]和 Dot-ELISA 法[22,23]等进行了病毒检测[17,22,23]、分离物鉴定[8]、株系亲缘关系分析[20,24]。但是不管用哪一种方法,要得到满意的结果,首先要用恰当的制备粗汁液的缓冲液[17,22]。用不同的 ELISA 方法检测不同寄主植物的 PRV,所用的制备粗汁液的缓冲液是不同的[22]。

陈枝楠等(1993)[23]建立了 PRV-RNA cDNA 分子探针检测技术,检测灵敏度达 pg 水平。已利用它在 PRV 侵染番木瓜原生质体的行为动态方面作了初步的探索[25]。

4 防治研究

近二十年来,为了解决生产上番木瓜环斑病毒病的防治问题,从各方面进行了不少研究,并取得了相当大的进展。

维普资讯 http://www.cqvip.com

4.1 番木瓜抗病育种和组织培养研究

抗病品种是解决病毒病防治问题最经济而有效的措施之一。近二十多年来的抗性鉴定结果表明,在番木瓜种内没有抗病品种,但有些野生种如 *Carica cauliflora* 和 *C. stipulata* 是免疫的,*C. cardomercensis* 是较耐病的[26]。可是利用种属间远缘杂交获得抗、耐病品种的企图迄今没有成功[27]。在番木瓜种内选育耐病品种虽有一些成功的报道,例如我国台湾省选育出一个耐病品种台龙5号,但果实体积大,风味差。我们正通过钴60辐射处理,来选育耐病的植株,初步结果表明是有希望的。

番木瓜是异花授粉作物,即使通过杂交手段能够选育出较理想的抗病品种,其后代的性状必然严重分离,很难保持其抗病等优良性状不变,因此较可行的措施是采用人工种子等无性繁殖技术。也就是说,只要能得到一株抗病、耐病、优质、高产的番木瓜植株,通过工厂化的组组培养就可以供应生产用苗。

已报道从不同的外植体如番木瓜茎尖、幼苗叶柄、胚珠、子叶、根尖和未成熟胚的愈伤组织再生植株成功[28-30]。这为抗病材料在生产上的应用初步奠定了基础。

4.2 弱株系的研究和利用

植物病毒株间的交互保护作用是当植物系统感染了病毒的某一个株系后可以免受同种病毒其它株系侵染的现象。在生产实践上,弱株系的交互保护作用已用于防治番茄花叶病和柑桔衰退病[31]。

弱株系在PRV的防治上也得到了较成功的应用。Yeh 和 Gonsalves(1984)[6]利用亚硝酸诱变获得了PRV HA_{5-1}弱株系。从1984年开始,应用HA_{5-1}弱株系在台湾已成为防治PRV的一个常规措施。至1991年,受到保护的番木瓜园已达1722 hm^2,将近350万番木瓜苗已得到的弱株系保护[5]。

但是PRV弱株系的应用也存在一些问题[31,32],其中最主要的是弱株系的保护作用具有株系转化性[4]。HA_{5-1}弱株系对夏威夷野生株系的保护作用比对台湾株系的要强,对泰国株系没有保护作用[4,33],对墨西哥株系也没有保护作用[33],对我国华南地区PRV株系的保护作用很差,只能保护1~2个月[32]。Tennat(1994)[33]报道,HA_{5-1}弱株系对来自夏威夷三个株系中的两个有高度的保护作用,但对来自其它不同国家或地区的11株系只有较低的、甚至没有保护作用。进一步研究表明PRV株系间的交互保护作用程度与株系间的亲缘关系呈正相关[32]。因此,各个国家和地区要利用弱株系来防治番木瓜环斑病,必须从当地的PRV株系中选择一个优势株系来进行诱变筛选弱株系[31,32]。

4.3 基因工程抗病性

由CP基因介导的抗病性已在苜蓿花叶病毒、黄瓜花叶病毒、PVY等30多种病毒上得到证明[34]。

PRV CP基因的构建与表达也取得了较大进展。Nagel 等(1985)[35]合成并克隆了PRV-W RNA 3′端cDNA,根据体外翻译结果及其与Potyviruses其它成员的研究结果比较,推测PRV CP基因位于病毒RNA 3′端。Quemada 等(1990)[8]合成并克隆了PRV HA_{5-1}RNA 3′端cDNA,得出CP基因序列,其长度为864碱基。

国外率先进行了番木瓜的转基因和PRV CP基因介导抗病性的研究。由于番木瓜叶片再生尚未成功,所以在双子叶植物基因转化上普遍采用的叶盘共培养法不适用于番木瓜转化。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Ling 等(1991)[36]将 CP 基因通过叶盘感染法转化了烟草,表达 PRV-HA_{5-1} CP 基因的烟草对 TEV、PVY 有程度不同的抗性。

应用基因枪法和农杆菌共培养法成功地将 CP 基因导入番木瓜植株。Fitch 等(1993)[37]首先建立了以番木瓜胚性愈伤组织为受体的共培养转化体系,并通过体胚发生途径获得了 2 株表达 HA_{5-1} 株系 CP 转基因番木瓜,再通过微繁扩增成为两个品系。Fitch 等(1990,1992)[38,39]用基因枪法将构建在 pGA482GG 的 HA_{5-1} CP 嵌合基因导入番木瓜,获得 5 个转基因品系。但是,可能的转基因番木瓜组织再生所需的时间在这两个转化系统中是不同的。胚性愈伤组织和体胚在和农杆菌共培养 6~9 个月后出现可能的转基因胚[37],而通过基因枪法则仅用 4 个月[38,39]。但是,农杆菌共培养转化系统的转化效率高,而基因枪系统的转化效率低,虽然由农杆菌共培养转化系统获得的转基因品系少,但 GUS 在所有 13 个体胚品系、以及由这 13 个体胚品系再生的 5 个植株品系都有表达[37]。相反在基因枪转化系统中只有 1/3 的品系表达 GUS[38,39]。

Fitch 等(1990,1992)[38,39]用基因枪法获得 5 个转基因品系中的一个品系(55-1)高抗 PRV 夏威夷株系 HA(HA_{5-1}是由 HA 通过化学诱变产生出来的弱株系),在田间种植两年仍不发病。Tennat 等(1994)[33]测定了从 55-1 品系发展出的 R1 代植株对来自各地区的 13 株系的抗病性,结果和传统的交互保护作用相一致,即对严重株系 HA 有高度抗性,而对来自墨西哥、Bahama 群岛、佛罗里达的株系只有中度抗性,对来自澳大利亚、巴西、中国、厄瓜多尔、关岛、牙买加和泰国的株系却几乎没有抗性。Yeh 等(1994)[13]获得了 YK CP 转基因番木瓜品系,对 YK 和台湾省其它花叶型株系抗病,但对 HA 株系只有中度抗性甚至不抗病。这表明各个国家或地区都要进行自己的基因工程,并且要选用病毒在当地的优势株系的外壳蛋白基因,这样获得的工程植株一般会有较理想的抗病效果[31,33]。

在华南地区 PRV CP 基因的构建和番木瓜的转基因研究工作也正在进行。叶长明等(1991)[10],刘俊军等(1991)[11]和龚洁敏等(1993)[12]分别构建了 PRV 华南地区优势株系 Ys、Sm 株系和海南分离物的 CP 基因;周鹏和刘俊君等(1993)通过农杆菌介导获得了表达 Sm 株系 CP 基因的番木瓜;叶长明和范怀忠等(1994)[15]建立了以胚性愈伤组织为受体的共培养转化体系,并通过体胚发生途径获得了 2 株表达 Ys CP 基因的转基因植株,但还未进行抗病性鉴定工作。

5 结束语

由 PRV-P 型株系引起的番木瓜环斑病是一种难防治的世界性病害,目前进行的有关研究为最终解决番木瓜环斑病的危害问题奠定了十分重要的基础。

已报道有 3 个 Potyviruses 病毒:TVMV,PPV 和 ZYMV 成功地构建了有侵染性的体外转录体,PRV 分子生物学研究的最新进展为构建 HA 和 HA_{5-1} 株系侵染性转录体奠定了坚实的基础。对弱株系 HA_{5-1} 弱毒机理的阐明,为在 cDNA 水平上通过修饰病毒来构建非致病的突变株成为可能。利用重组 DNA 技术通过缺失致病因子而得到的弱株系,可避免传统的用亚硝酸诱变产生的弱株系所存在的潜在不足。这种方法可以得到更加稳定和可预期的弱株系,用于交互保护作用来防治病毒病。

PRV-CP 基因工程植株在生产上能否推广应用还有待时间的检验。人们正在着手构建病

维普资讯 http://www.cqvip.com

毒核酸复制酶基因、抗体基因和核酶基因等可能更有希望的基因。刘俊君等(1994)[40]以PRV华南地区强株系Sm为材料,克隆了PRV的复制酶基因,并完成了其全序列测定和植物表达载体的构建,为探索PRV复制酶基因介导的抗病性打下了基础。因此可以预计在近期内将会出现更切实可行的方法来防治番木瓜环斑病。

参 考 文 献

1 Purcifull D E, Edwardson J R, Hiebert E, *et* al. Papaya ringspot virus, CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, 1984:292

2 吴方城,徐绍华,彭学贤.华南PRV的鉴定、提纯与性质的初步研究.植物病理学报,1983;13(3):21～27

3 蔡健和,范怀忠.华南番木瓜病毒种类调查鉴定.华南农业大学学报,1994;15(4):13～17

4 Yeh S D. Control of ringspot diseases of papaya by induced mild virus strains. Acta Horticulture, 1990;275:753～760

5 Yeh S D, Gonsalves D. Practices and perspective of control of papaya ringspot virus by protection, In: Advances in Disease Vector Research, Vol 10. Springer－Verlag, New York, Inc. 1994:237～257

6 Yeh S D, Gonsalves D. Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection. Phytopathology, 1984;74:1086～1091

7 Bateson M F, Henderson J, Ohallepron W, *et al*. Papaya ringspot potyvirus: isolate variability and origin of PRSV type P (Australia). J Gen Virol, 1994;75:3547～3553

8 Quemada H, L'Hostis B, Gonsalves D, *et al*. The nuoleotide sequences of the 3′-terminal regions of papaya ringspot virus strain W and P. J Gen Virol, 1990;71:203－210

9 Wang C H, Yeh S D. Nucleotide sequence comparison of the 3′-terminal regions of severe, mild and non-papaya infecting strains of papaya ringspot virus. Archives of Virology, 1992;127:345－354

10 叶长明、叶寅,骆学海,等.番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因的构建.植物病理学报,1991;21(3):161～164

11 刘俊君,彭学贤,莽克强.番木瓜环斑病毒分离物(Sm)外壳蛋白基因克隆及序列分析.微生物学通报,1991;18(6):350～351

12 龚洁敏,郑学勤,潘乃,等.番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因的cDNA克隆和全序列测定比较.植物学报,1993;35:416～421

13 Wang C H, Bau H J, Yeh S D. Comparison of the nuclear inclusion b protein and coat protein genes of five papaya ringspot virus strains distinct in geographic origin and pathogenicity. Phytopathology, 1994;84:1205－1210

14 Bateson M F, Dale J. The nucleotide sequence of the coat protein gene and 3′ untranslated region of papaya ringspot virus type W(Aust). Archives of Virology, 1992;123:101－109

15 叶长明.番木瓜环斑病毒外壳蛋白基因的克隆、测序及在大肠杆菌和转基因番木瓜中表达.[博士学位论文].广州:华南农业大学植保系,1994

16 Yeh S D, Jan F J, Chiang C H, *et al*. Complete nucleotide sequence and genetic organization of papaya ringspot virus RNA. J Gen Virol, 1992;73:2531－2541

17 Gonsalves D, Ishu M. Purification and serology of papaya ringspot virus. Phytopathology, 1980;70:1028－1032

18 刘俊君、彭学贤,莽克强.番木瓜环斑病毒华南强株系cDNA文库的构建及其基因组3′端区域结构的研究.病毒学报,1993;9(3):246－253

19 Dougherty W G, Carrington J C. Expression and function of potyviral gene products. Ann Rev Phytopathol, 1988;26:123－143

20 Yeh S D, Gonsalves D. Purification and immunological analyses of Cylindrical-inclusion protein induced by papaya ringspot virus and watermelon mosaic virus 1. Phytopathology, 1984;74:1273－1278

21 林壁润,李英杰,范怀忠,等.番木瓜环斑病毒单克隆抗体的制备及在病毒分型上的初步应用。病毒学杂志,1989;(2):172－175

22 肖火根,范怀忠.植物组织粗汁液里的番木瓜环斑病毒DAC-ELISA检测技术研究.中国病毒学,1994;9(3):249－255

维普资讯 http://www.cqvip.com

23 陈枝楠,林孔勋,范怀忠.番木瓜环斑病毒检测技术研究.中国病毒学,1993;8(1):263~270

24 肖火根,范怀忠.番木瓜环斑病毒的生物学和血清学研究.华南农业大学学报,1994;15(3):50~54

25 陈枝楠,郑冠标,范怀忠.番木瓜环斑病毒在番木瓜原生质体中复制的研究.中国病毒学,1993;8(2):263~270

26 Conover R A, Litz R E. Progress in breeding papayas with tolerance to papaya ringspot virus. Proc Fla State Hortic Soc, 91:182~184

27 Manshardt R M, Wenslaff T F. Zygotic polyebryony in interspecific hybrids of *Carica papaya* and *C. cauliflora*. J Am Soc Hort Sci, 114:684~689

28 朱西儒,范怀忠.番木瓜茎尖和侧芽的离体培养.植物生理学通讯,1989;(5):49~54

29 Fitch M M M, Manshardt R M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.) Plant Cell Rep, 1990;9:320~324

30 叶克难,马雷,李宝健.番木瓜悬浮培养的体胚发生与植株再生.植物学报,1991;33:565~568

31 肖火根,范怀忠.交互保护作用及其在植物病毒病防治上的应用.中国病毒学,1994;9(1):1~6

32 肖火根,范怀忠.番木瓜环斑病毒株系间交互保护作用研究.病毒学报,1994;10(2):164~171

33 Tennant P, Gonsalves C, Ling K S, *et al*. Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. Phytopathology, 1994;84:1359~1366

34 Beachy R. Virus resistance through expression of coat protein genes. In: Biotechnology in Plant Disease Control. New York: Wiley Liss, Inc, 1993. 89~104

35 Nagel J, Hiebert E. Complementary DNA cloning and expressing of the papaya ringspot potyvirus sequences encoding capsid protein and a nuclear inclusion-like protein in *Escherichia coli*. Virology, 1985;143:435~441

36 Ling K, Namba S, Gonsalves C, *et al*. Protection against detrimental effects of potyvirus infection in transgenic tobacco plants expresing the papaya ringspot virus coat protein gene. Bio/Technology, 1991;9:752~758

37 Fitch M M M, Manshardt R M, Gonsalves D, *et al*. Transgenic papaya plants from Agrobacterium-mediated transformation of somatic embryoes. Plant Cell Rep, 1993;12:245~249

38 Fitch M M M, Manshardt R M, Gonsalves D, *et al*. Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment Plant Cell Rep, 1990;9:189~194

39 Fitch M M M, Manshardt R M, Gonsalves D, *et al*. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the CP gene of PRV. Bio/Technology, 1992;10:1466~1472

40 刘俊君,彭学贤,莽克强.番木瓜环斑病毒复制酶(亚基)基因的克隆、序列分析及其植物表达载体的构建.生物工程学报,1994;10(3):283~287