

· 综述 ·

抗病毒蛋白抑制植物病毒的应用前景

付鸣佳^{1,2}, 谢荔岩¹, 吴祖建¹, 林奇英¹, 谢联辉¹

(1. 福建农林大学 植物病毒研究所, 中国福建 福州 350002; 2. 江西师范大学 生命科学院, 中国江西 南昌 330027)

摘要: 探索应用外源性抗植物病毒蛋白进行植物病毒病的防治, 已经取得了一定的成效; 但不同来源的抗植物病毒蛋白, 它们的作用机理是不完全一样的。根据近年的研究结果, 对这类蛋白的抗病毒作用的机理进行了综述, 并对抗病毒蛋白的应用前景进行了展望。

关键词: 植物病毒; 抗病毒蛋白; 抗植物病毒蛋白的来源; 抗病毒机理

中图分类号: Q939.46

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2005)01-0001-05

Application and Prospect of Antiviral Protein on Inhibiting Plant Virus

FU Ming-jia, XIE Li-yan, WU Zu-jian, LIN Qi-ying, XIE Lian-hui

(1. Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China;

2. Life Sciences College, Jiangxi Normal University, Nanchang 330027, Jiangxi, China)

Abstract: Some methods of successful controlling plant viral disease has been achieved because of the application of foreign antiphytoviral protein. Different sources of proteins have different antiviral mechanism. Based on recent process, the active mechanism, present application and future prospect of foreign antiphytoviral protein are reviewed.

Key words: plant virus; antivirus proteins; source of antiphytovirus proteins; antiviral mechanism

(*Life Science Research*, 2005, 9(1): 001 ~ 005)

植物病毒病是农作物的主要病害, 可对多种作物造成不同程度的危害, 对农业生产构成了严重的威胁, 目前大约 1 000 多种植物病毒病已被世人所认识。从经济角度来看, 这类病害的重要性仅次于真菌病害。由于引起作物的严重经济损失, 植物病毒病的防治早已是研究者关注和研究的重要对象。对于这类病害的防治, 已经发展了多种防治策略来控制这类病害。由于病毒在植物细胞中绝对寄生, 其复制所需的物质、能量和场所

完全依赖寄主, 且植物没有完整的免疫代谢系统, 因此迄今为止, 几乎没有能有效地从感染病毒的植株上完全除去病毒的化学药剂。此外, 采用切断病毒的感染途径、组织脱毒和抗病毒育种等传统方法都无法从根本上减轻病毒病的危害。近 20 年发展起来的抗病毒转基因植物, 在农业生产方面应用前景广阔; 其主要是将病毒的外壳蛋白基因、复制酶基因、蛋白酶基因、移动蛋白基因等导入植物体中, 对植株产生不同程度的保护作用; 但

收稿日期: 2004-09-27; 修回日期: 2004-12-25

作者简介: 付鸣佳 (1964-) 男, 江西高安市人, 江西师范大学生命科学院副教授, 博士, 主要从事植物病毒学研究, E-mail: mingjiafu@yahoo.com.cn; 林奇英, 福建莆田人, 福建农林大学教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事植物病毒学研究, Tel: +86-0591-83789345, E-mail: xielh@fjau.edu.cn.

应用病毒基因组来源的抗病毒转基因植物存在一定的环境风险。

来自植物和其它生物的多种蛋白质在防治植物病毒病的研究方面已经取得了有益的进展。应用这类蛋白质,可直接抑制植物病毒的增殖,而以这类蛋白质的基因转入植物中,在植物体中表达可抑制病毒的侵入和增殖。应用这类蛋白质的基因转化植株,不仅仅是获得了不同来源的基因,而且有植物病毒本身的基因转化植株所获得的抗病毒植株所无法取代的优点,那就是存在的环境风险要小,在环境中无病毒和所转基因的重组,显然这是一个非常值得研究和探索的抗植物病毒途径。

1 抗植物病毒蛋白的来源

植物来源的抗病毒蛋白是十分丰富的,已经从多种科属的植物中发现了抗病毒蛋白。从不同季节和植株的不同部位的美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 上可分离到数种抗病毒蛋白,即春叶上合成的 PAP (phytolacca antiviral protein, PAP)^[1], 夏叶上产生的 PAP II^[2], 以及从种子^[3]和根部^[4]分别可获得 PAP-s 和 PAP-R。从紫茉莉 (*Mirabilis jalapa*) 上可分离到一种抗病毒蛋白 MAP (mirabilis antiviral protein, MAP)^[5]。此外从康乃馨 (*Dianthus caryophyllus*)、*Dianthus barbatus*^[6]、苋色藜 (*Chenopodium amaranticolor*)^[7]、*Celosia cristata*^[8-9] 和苦郎树 (*Clerodendrum inerme*)^[10] 等植物上都发现有抗植物病毒蛋白质。Hajj 等^[11] 检测了 15 种豆类植物汁液,结果都有抗植物病毒侵染的作用,推测这类抑制物是与凝集素有关的高分子蛋白质类物质。这类蛋白从目前的报道来看,大都集中来源于数种植物。

在其它生物中也发现有限的数种抗植物病毒蛋白质,如在大型真菌子实体中^[1,12-14]以及在蜂毒中均发现有这类蛋白质^[15]。但这并不意味着这类蛋白质在其它生物中存在不多或有限,原因是在其它生物中也发现有难以计数的多种活性蛋白质。

2 抗病毒机理

2.1 抗病毒蛋白使核糖体脱嘌呤,抑制蛋白质合成,从而达到抗病毒的效果

目前研究较为详细的抗病毒机理是在美洲商陆抗病毒蛋白上。PAPs 作为一类从商陆中提取的抗病毒蛋白,实际上是一类同功酶,它们可使真核细胞核糖体活性丧失,和蓖麻毒素 A 一样属核糖体

失活蛋白 (ribosome inactivating proteins, RIPs)。RIPs 显示 N-糖苷酶活性,可特异地水解去除 28S rRNA 中一个保守环上特异位点 (4324 位) 的腺嘌呤,使核蛋白无法结合延伸因子 2 (EF-2)^[16], 因此,抑制蛋白质的合成。Watanabe 等^[17] 加 0.33 mmol/L 的 PAP 到接种有烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus, TMV) 的原生质体中,引起对 TMV 的完全抑制;同样的 PAP 浓度可抑制感染病毒的原生质体中蛋白质合成,并杀死细胞,但不影响未感染的原生质体;浓度依赖的 PAP 抑制蛋白质的合成与抑制病毒增殖有关。Ready 等^[18] 用电子显微镜研究了 PAP 抗体在美洲商陆细胞壁间的定位,表明细胞壁和细胞膜的渗漏和破裂可让 PAP 这种酶进入细胞质,并可能抑制蛋白质的合成,损伤细胞。Bonness 等^[19] 证明 PAP 可使美洲商陆核糖体失活,对美洲商陆细胞有潜在的毒性,因此以原位自杀模式 (local suicide model) 作为美洲商陆中 PAP 的抗病毒机制,同时强调了 PAP 和细胞中核糖体在空间上的分离。在对 MAP 的研究时也有类似的情况出现,当内源 MAP 通过细胞的破裂进入细胞质中时,就能关闭自身细胞的蛋白质的合成。因此推测 MAP 是通过细胞的自杀行为来诱导对病毒抗性^[20]。Taylor 等^[21] 通过比较包括 PAP 在内的几个 RIPs,推断 RIPs 抗病毒活性正是通过核糖体失活起作用。Chen 等^[22] 的研究结果也表明寄主核糖体的脱嘌呤和核糖体失活是 PAP 抑制病毒侵染的原因。

2.2 抗病毒蛋白直接作用于病毒的核酸上,导致脱嘌呤,使病毒不能正常复制

有学者研究后认为病毒中的核酸也可受到抗病毒蛋白的破坏。Rajamohan 等^[23] 采用定量高效液相色谱分析,认为 PAP I (来自春叶)、PAP II (来自早夏叶) 和 PAP III (来自晚夏叶) 能引起人 HIV- I (human immunodeficiency virus- I) 和植物 TMV 的基因组 RNA 的脱嘌呤;在抑制外周单核血细胞中 HIV- I 的复制时,它们的 IC₅₀ 分别为 17、25 和 16 nmol/L。由这一结果表明 PAPs 的抗病毒活性也包括对病毒本身 RNA 的脱嘌呤作用。

2.3 抗病毒蛋白识别加帽 RNAs 并特异地使之脱嘌呤,导致病毒核基因信息不能正常翻译

PAP 据知是通过去除大 rRNA 上 sarcin/ricin (S/R) 环的一个特异腺嘌呤而使核糖体失活,因此抑制翻译。除了以前已确定的腺嘌呤 (A4324) 以外, PAP 还去除真核细胞大 rRNA 的另一个腺

嘌呤 (A4321) 和一个鸟嘌呤 (G4323)。最近的结果表明 PAP 的抗病毒活性可能并非是由于寄主核糖体的脱嘌呤。使用不会导致烟草 rRNA 和网织红细胞 (reticulocyte lysate) rRNA 脱嘌呤的 PAP 突变体, 证明 PAP 在没有脱嘌呤的情况下, 可抑制雀麦花叶病毒 (brome mosaic virus, BMV) 和马铃薯 X 病毒 RNAs 的翻译。此外, 只有在加帽的翻译上, 如荧光素酶 (luciferase) 的转录本就可受到 PAP 的抑制, 而不加帽的翻译却并非如此。这证明 PAP 和 PAP 的突变体能够识别加帽和不加帽的转录。在预先提高帽的类似物 m7GpppG 的浓度的情况下, 可克服 PAP 对 BMV RNAs 翻译的抑制, 而 GpppG 和 GTP 无此效果, 表明 PAP 可识别帽结构。BMV RNAs 或者加帽的荧光素酶转录本同 PAP 共同孵育也可导致 RNA 脱嘌呤。相应的, 相同浓度的 PAP 在同未加帽的荧光素酶转录本孵育以后, 未脱嘌呤。这些结果证明 PAP 抑制翻译的主要机制是识别帽结构, 并使加帽 RNAs 特异地脱嘌呤, 而非使核糖体脱嘌呤^[24]。

2.4 抗病毒蛋白诱导植物病程相关蛋白的表达

Zoubenko 等^[25]在研究 PAP 及它的突变体转基因时, 发现转基因植物中 I类和 II类异构体病程相关蛋白 (pathogenesis-related proteins, PR) 过表达。在表达 PAP II的转基因系中, 也有 PRI 的构成性表达^[26]。此外, 也有学者通过研究 PAP 的一个突变体 PAP-v, 发现 PAP-v 在转基因植物中诱导表达病程相关蛋白的合成和水杨酸的微弱提高^[27]。

2.5 抗病毒蛋白诱导其它蛋白或物质的产生, 使植株产生系统抗性

在研究其它抗病毒蛋白时, 也有学者发现这些蛋白可诱导寄主的系统抗性。当 MAP 用在基部叶片上, 而后将 TMV 接种在上一叶时, 烟草可抗 TMV, 表明 MAP 可诱导系统抗性^[5]。在黄细心^[28]中所获得的抗病毒蛋白也属系统诱导抗性。在黄细心中的诱导与聚丙烯酸诱导的抗性相同, 可被放线菌素-D (Actinomycin-D) 抑制。将 *Celosia cristata* 中获得的一种抗病毒蛋白与放线菌素-D 一起应用在心叶烟叶表面上, 其抑制活性是不可逆的; 而这种抗病毒蛋白与 TMV 一起混合, 再通过超离心的方法, TMV 可恢复侵染活性, 而离心的悬浮液却无象 TMV 一样的侵染活性, 因此这种抗病毒蛋白的作用机制是干扰病毒在寄主中的重建^[8, 9]。至于在黄细心和 *Clerodendrum aculeatum* 上所获得的抗病毒蛋白据认为是诱导植物合成抗

病毒蛋白, 而本身并不具有抗病毒活性, 因此这类蛋白质也称为系统抗性诱导者 (systemic resistance inducers, SRIs)^[29]。

2.6 抗病毒蛋白作为酶抑制剂, 可特异地抑制与病毒复制相关的蛋白酶, 从而抑制病毒复制

Gutierrez-Campos 等^[30]根据马铃薯 Y 病毒属 (potyviruses) 的作用机制都涉及巯基蛋白酶这一特点, 将一水稻巯基蛋白酶抑制剂基因导入烟草中进行构成性表达, 结果发现不同的烟品种中表达这一基因时可对烟草蚀纹病毒 (*Tobacco etch virus*, TEV) 和马铃薯 Y 病毒有抗性, 但对 TMV 无抗性, 这是因为 TMV 的侵染过程不涉及巯基蛋白酶, 这一结果表明巯基蛋白酶抑制剂对马铃薯 Y 病毒属病毒有抗性, 对其它复制时涉及巯基蛋白酶的病毒也可能有抗性。

3 抗病毒蛋白在植物上的抗病毒谱

Duggar 等在 1925 年报道了美洲商陆汁液抑制黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 和烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV)。从目前的报道来看, PAPs 属于广谱性抗植物病毒蛋白。Holling (1959) 研究了商陆汁液在一些寄主上对 TMV、烟草坏死病毒 (*Tobacco necrosis virus*, TNV) 和苜蓿花叶病毒 (*Alfalfa mosaic virus*, AIMV) 的抑制作用。Wyatt 等 (1969) 指出 PAP 抗南方菜豆花叶病毒 (*Southern bean mosaic virus*, SBMV)。Tomlinson 等 (1974) 研究了 PAP 抗 CMV。Chen 等^[31]报道, 纯化自商陆叶片中的 PAP 用枯斑寄主测试时, 抗 5 种 RNA 植物病毒, 即 TMV、CMV、AIMV、马铃薯 X 病毒 (*Potato virus X*, PVX) 和马铃薯 Y 病毒 (*Potato virus Y*, PVY) 用系统寄主测试时, *mosaic virus*, CaMV) 和一种单链 DNA (ssDNA) 病毒非洲木薯花叶病毒 (*African cassava mosaic virus*, ACMV)。此外, 采用基因工程获得的转 PAP 基因植物, 所抗病毒的种类有芜菁花叶病毒 (*Turnip mosaic virus*, TuMV)^[32]、PVX、PVY 和 CMV^[33]。在紫茉莉上也存在属于 RIPs (ribosome inactivating proteins) 的抗病毒蛋白 MAP, 对机械传播的病毒如 TMV、PVY、黄瓜绿斑驳病毒 (*Cucumber green mottle virus*) 和芜菁花叶病毒^[5]有极高的抗性。在 TMV 接种前 24 h MAP 的用量达 0.8 mg/L 时, 几乎可完全抑制接种在 Xanthi nc 烟叶表面上的 TMV。而当 MAP 用量达 10 mg/L 并接种在叶下表面时, 抑制率可达 50%。Stevens 等^[34]检测了 *Momordica charantia* inhibitor (MCI)、gelonin

(来自 *Gelonium multiflorum*) 和另外 3 种毒素即 ricin、abrin 和 modeccin(分别来自 *Ricinus communis* 的种子、*Abrus precatorius* 的种子和 *Adenia digitata* 的根) 的抗 TMV 活性, 表明或多或少对 TMV 有一定的抗性。此外, 两种植物即 *Bryonia dioica* 种子和康乃馨叶片的汁液可以 100% 地抑制 TMV 的侵染。在康乃馨叶片上也分离到两个蛋白质 Dianthin30 和 Dianthin32, 当它们和 TMV 共接种在心叶烟上时, 抑制率达 100%^[35]。Cho 等^[36]检测了 6 种植物即菠菜 (*Spinacia oleracea*)、*Amaranthus lividus*、*Dianthus superbus*、*Dianthus sinensis*、*Celosia cristata*、*Oenanthe stolonifera* 的粗蛋白质在心叶烟上抗 TMV 的活性, 结果表明这 5 种植物的粗蛋白质对病毒抑制率在 70% ~ 90% 之间。这些结果表明, 植物中的抗病毒蛋白形式多样, 都具有非常好的抗病毒活性, 且许多这类蛋白质抗病毒谱都很广。

4 问题和展望

对于作物上植物病毒的危害, 目前还没有更多特别有效的防治方法。由于植物病毒生物学功能的特殊性, 带给抗病毒的研究许多困难。从目前获得的小分子类抗植物病毒剂来看, 还没有非常特效的制剂。同时这些小分子抗病毒药剂的持续能力也是有限的, 必须多次给药, 缺陷是不言而喻的。而应用病毒来源的基因转入植株, 所产生的转基因抗病毒植物, 可以说突破了传统的一些筛选抗病毒基因的方法, 在短期内可获得抗病毒转基因作物。但这种方法也存在不少问题, 一方面抗性范围比较窄, 另一方面存在一定的环境风险, 导致病毒间基因的重组等情况, 新的有害生物的产生也会给农业生产带来更严重的问题。这为我们寻找新的可用于转基因的抗病毒蛋白提出了更高的要求。

关于植物抗病毒的研究, 许多学者在多方面进行了有益的尝试和探索, 这为我们从多方面和多角度的寻求抗植物病毒途径展开了更为丰富的思路。应用抗植物病毒蛋白进行植物病毒病的防治, 通过一些学者的努力已经有所突破。从所发现的这类蛋白质来看, 大部分都具有酶的活性, 或者作为酶的抑制剂; 也有的蛋白质在进入植物体以后可以诱导其它抗性物质的产生, 显然这类蛋白质是基因的调控者, 这种结果也间接告诉我们, 植物当中本身就存在抗病毒基因, 一旦有合适的诱导蛋白存在就可导致抗性物质的产生。因此, 我们可以针对这类

作物来寻找其中的抗性基因的诱导者。

根据某些抗病毒蛋白的作用机理, 已经获得了数种抗植物病毒转基因作物^[32, 33], 但无论是应用还是理论研究, 这是远远不够的。从目前来看, 国外这方面的研究明显处于研究的前沿。无论从抗病毒蛋白的发现和纯化到抗病毒蛋白的分子生物学研究, 国外都做了较为系统而细致的工作, 而且这些工作许多都得到了延伸而进入了其它领域。如美洲商陆抗病毒蛋白的研究, 最初的发现仅是抗植物病毒活性, 但目前已经知道该蛋白质是一个核糖体失活蛋白, 具有多种生物活性, 因此在农业和医学方面都有应用。但抗病毒蛋白在实际应用方面还不够普遍。除了个别抗病毒蛋白的应用取得了一定的成功外, 许多蛋白质的研究还处于理论的研究状态。因此, 要对这类蛋白质做出一个恰如其分的评价, 还不容易做到。但是应用这类蛋白质作为转基因工程植株的材料, 无论从环境、生物的多样性以及基因资源的开发利用来看, 肯定会带来良好的前景。

参考文献(References):

- [1] IRVIN J D. Purification and partial characterization of the antiviral protein from *Phytolacca americana* which inhibits eukaryotic protein synthesis[J]. Arch Biochem Biophys, 1975, 169: 522-528.
- [2] IRVIN J D, KELLY T, ROBERTUS J D. Purification and properties of a second antiviral protein from *Phytolacca Americana* which inactivates eukaryotic ribosomes[J]. Arch Biochem Biophys, 1980, 200: 418-425.
- [3] BARBIERI L, ARON G M, IRVIN J D, et al. Purification and partial characterization of another form of the antiviral protein from the seeds of *Phytolacca americana* L. (pokeweed) [J]. Biochem J, 1982, 203(1): 55-62.
- [4] BOLOGNESI A, BARBIERI L, ABBONDANZA A, et al. Purification and properties of new ribosome inactivating proteins with RNA N-glycosidase activity[J]. Biochem Biophys Acta, 1990, 1087: 293-302.
- [5] KUBO S, IKEDA T, IMAIZUMI S, et al. A potent plant virus inhibitor found in *Mirabilis jalapa* L.[J]. Ann Phytopath Soc Japan, 1990, 56: 481-487.
- [6] TANIGUCHI T. Inhibition of plant virus infection by extracts from seeds of *Dianthus barbatus* L.[J]. Ann Phytopath Soc Japan, 1980, 46: 628-633.
- [7] TANIGUCHI T, GOTO T. Purification of an inhibitor of plant virus infection occurring in the leaves of *Chenopodium amaranticolor* [J]. Ann Phytopath Soc Japan, 1976, 42: 42-45.
- [8] BARANWAL V K, VERMA H N. Localized resistance against virus infection by leaf extract of *Celosia cristata*[J]. Plant

- Pathology, 1992, 41: 633-638.
- [9] BARANWAL V K, VERMA H N. Characteristics of a virus inhibitor from the leaf extract of *Celosia cristata*[J]. Plant Pathology, 1997, 46: 523-529.
- [10] PRASAD V, SRIVASTAVA S, VERMA H N. Two basic protein isolated from *Clerodendrum inerme* Gaertn. Are inducers of systemic antiviral resistance in susceptible plants[J]. Plant Science, 1995, 110: 73-82.
- [11] HAJ J B, STEVENS W A. The effects of legume seed extracts on plant virus infection[J]. Experientia, 1979, 35(11): 1460-1462.
- [12] HIRAMATSU A, HIRAMATSU A, AKATSUKA T. Purification and chemical properties of an inhibitor of plant virus infection from fruiting bodies of *Lentinus edodes*[J]. Agric Biol Chem, 1987, 51(3): 883-890.
- [13] HIRAMATSU A, KOBAYASHI N, NAOFUUMI O. Properties of two inhibitors of plant virus infection from fruiting bodies of *Lentinus edodes* and from leaves of *Yucca recurvifolia* Slisb[J]. Agric Biol Chem, 1987, 51(3): 897-904.
- [14] 孙慧, 吴祖建, 谢联辉, 等. 杨树菇 (*Agrocybe aegerita*) 中一种抑制 TMV 侵染的蛋白质纯化及部分特性 [J]. 生物化学与生物物理学报 (SUN Hui, WU Zu-jian, XIE Lian-hui, et al. Purification and characterization of AAVP, a protein inhibitor of TMV infection, from the edible fungus, *Agrocybe aegerita*[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica) 2001, 33(6): 351-354.
- [15] PEREZ-PAYA E, HOUGHTEN R A, BLONDELL S E. The role of amphipathicity in the folding, self-association and biological activity of multiple subunit small proteins[J]. J Biol Chem, 1995, 270: 1048-1056.
- [16] GESSNER S L, IRVIN K D. Inhibition of elongation factor 2-dependent translocation by the pokeweed antiviral protein and ricin[J]. J Biol Chem, 1980, 255: 3251-3253.
- [17] WATANABE K, KAWASAKI T, SAKO N, et al. Actions of pokeweed antiviral protein on virus-infected protoplasts[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1997, 61(6): 994-997.
- [18] READY M P, BROWN D T, ROBERTS J D. Extracellular localization of pokeweed antiviral protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 84: 5053-5056.
- [19] BONNESS M S, READY M P, IRVIN J D, et al. Pokeweed antiviral protein inactivates pokeweed ribosomes implications for the antiviral mechanism[J]. Plant J, 1994, 5(2): 173-183.
- [20] KATAOKA J, HABUKA N, MIYANO M, et al. Adenine depurination and inactivation of plant ribosomes by an antiviral protein of *Mirabilis jalapa* (MAP) [J]. Plant Mol Biol, 1992, 20: 1111-1119.
- [21] TAYLOR S, MASSIAH A, LOMONOSOFF G, et al. Correlation between the activities of five ribosome-inactivating proteins in depurination of tobacco ribosomes and inhibition of tobacco mosaic virus infection[J]. The Plant Journal, 1994, 5(6): 827-835.
- [22] CHEN Z C, ANTONIW J F, LIN Q, et al. A possible mechanism for the antiviral activity of pokeweed antiviral protein [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1993, 42(4): 249-258.
- [23] RAJAMOHAN F, VENKATACHALAM T K, IRVIN J D, et al. Pokeweed antiviral protein isoforms PAP-I, PAP-II, and PAP-III depurinate RNA of human immunodeficiency virus (HIV)-1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 260(2): 453-458.
- [24] HUDAK K A, WANG P, TUMER N E. A novel mechanism for inhibition of translation by pokeweed antiviral protein: depurination of the capped RNA template[J]. RNA, 2000, 6(3): 369-380.
- [25] ZOUBENKO O, UCKUN F, HUR Y, et al. Plant resistance to fungal infection induced by nontoxic pokeweed antiviral protein mutants[J]. Nature Biotechnology, 1997, 15(10): 992-996.
- [26] WANG P, ZOUBENKO O, TUMER N E. Reduced toxicity and broad spectrum resistance to viral and fungal infection on transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein II [J]. Plant Molecular Biology, 1998, 38: 957-964.
- [27] SMIRONOV S, SHULAEV V, TUMER N E. Expressing of pokeweed antiviral protein on transgenic plants induced virus resistance in grafted wild-type plants independently of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related protein synthesis [J]. Plant Physiol Lancaster Pa, 1997, 114(3): 1113-1121.
- [28] VERMA H N, AWASTHI L P, SAXENA K C. Isolation of the virus inhibitor from root extract of *Boerhaavia diffusa* inducing systemic resistance in plants[J]. Can J Bot, 1979, 57: 1214-1217.
- [29] VERMA H N, BARANWAL V K, SRIVASTAVA S. Antiviral substance of plant origin[A]. HADIDI A, KHTARPAL R K, KOGANEZAWA H. Plant Virus Disease Control[C]. St Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society, 1998. 684.
- [30] GUTIERREZ-CAMPOS R, TORRES-ACOSTA J A, SAUCEDO-ARIAS L J S, et al. The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17: 1223-1226.
- [31] CHEN Z C, WHITE R F, ANTONIW J F, et al. Effect of pokeweed antiviral protein on the infection of plant viruses[J]. Plant Pathol, 1991, 40: 612-620.
- [32] 张海燕, 田颖川, 周奕华, 等. 将商陆抗病毒蛋白 (PAP) cDNA 导入油菜获得抗病转基因植株 [J]. 科学通报 (ZHANG Hai-yan, TIAN Ying-chuan, ZHOU Yi-hua, et al. Antiviral transgenic plants was obtained by introducing cDNA of pokeweed antiviral protein (PAP) into *Brassica napus* L[J]. Chinese Science Bulletin), 1998, 43(23): 2534-2537.
- [33] LODGE J K, KANIEWSKI W K, TUMER N E. Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 7089-7093.
- [34] STEVENS W A, SPURDON C, ONGON L J, et al. Effect of inhibitors of protein synthesis from plants of tobacco mosaic virus infection[J]. Experientia, 1981, 37: 257-259.
- [35] STIRPE F, WILLIAMS D G, ONYON L J, et al. Dianthins, ribosome-damaging proteins with anti-viral properties from *Dianthus caryophyllus* L. (carnation) [J]. Biochem J, 1981, 195(2): 399-405.
- [36] CHO H J, LEE S J, KIM S, et al. Isolation and characterization of cDNAs encoding ribosome inactivating protein from *Dianthus sinensis* L[J]. Mol Cells, 2000, 10(2): 135-141.