

生物技术与我国烟草农业^{*}

赵百东

摘 要

烟草是最早应用于分子生物学和基因工程研究的植物之一,作为模式植物,对烟草的遗传性状、外源基因的合成和导入途径、载体的构建、基因的整合和表达、转化细胞的培养和植株再生以及优良株系的选育等,已经形成一整套较为成熟的技术流程,获得了一大批抗病、抗虫转基因烟草品种(系)。我国利用基因工程技术也已成功地培育出了抗 TMV、CMV、PVY 的烤烟和香料烟品种(系)。但是,由于多方面原因,转基因烟草在全球范围内一直未能像玉米、大豆等作物一样,在生产上获得推广应用。我国转基因烟草的研究工作目前也仅限于在实验室或严格控制的小环境下进行。21 世纪生物技术发展将会更加迅猛,前景极为广阔。我国烟草生物技术研究和应用,将会对我国烟叶生产水平的提高做出积极的贡献。

关键词:烟草 生物技术 育种

1 我国烟草农业生产中急需解决的一些问题

我国是世界上最大的烟草生产国,目前全国有 22 个省(市、区)的 614 个县级单位种植烤烟,种烟农户有 568 万,涉及人口 2219 万,占全国农村人口的 2.4%^[1]。1999 年全国烤烟种植面积为 1 030 000hm²,占全国耕地面积的 1%左右。

随着我国烟叶生产的基础地位逐步得到加强,“计划种植、主攻质量、提高单产、增加效益”的烟叶生产指导方针得到了深入贯彻落实。烟叶生产总体上稳定发展,基本上保证了卷烟工业生产发展和烟叶出口的需要。通过推广“三化”生产技术,使烟叶质量不断提高,我国主要产烟区普遍存在的“烟叶营养不良、发育不全、采收不熟、烘烤不当”的问题已逐步得到解决。烟草品种的多、乱、差现象也有所改善,全国良种面积达 95%以上。烟叶生产区域得到了调整,并逐步向最适宜区转移。包衣种子,双层施肥,三段式烘烤等技术的应用,以及病虫害综合防治等方面,都取得了一定成果。我国烟叶不仅内在品质有明显提高,而且等级结构也趋于优化。

但是,我国烟叶水平与美国、巴西和津巴布韦等世界优质烟叶生产国家相比,还存在相当大的差距。除了地理、气候等环境因素和栽培调制技术等不同外,病虫害也是制约我国烟草农业发展和烟叶质量提高的重

要因素之一。每年因病虫害造成的损失都在 15%左右。据 1989~1991 年侵染性病害调查结果,全国因病害造成的减产超过 22 500 000kg,损失约 7 亿元人民币^[2]。因此,做好病虫害的防治工作,对烟草生产和烟叶质量提高起着重要的作用。

目前我国烟叶生产中大面积推广的品种很大一部分是从国外引进的,尽管近年来国内选育的烟草品种种植面积有所扩大,但是还远远比不上美国引进品种。1999 年种植的 1 030 000hm² 的烤烟中,美国引进品种 K326 占 41.17%、NC89 占 17.11%、K346 占 5.23%,而我国育成品种云烟 85 占 9.49%、红花大金元占 6.72%。这些品种对生产上流行的主要病害如病毒病、赤星病、黑胫病、青枯病、根结线虫病等缺乏多抗性,即抗一种而不抗另一种病害,目前尚缺乏切实有效的防治措施。害虫的防治也存在同样的问题,传统的防治方法中采用的化学杀虫剂,其主要成分多为有机磷和除虫菊酯类化合物。由于其作用方式没有特异性,在杀灭害虫的同时,益虫也在劫难逃;同时,随着害虫抗药性的形成,杀虫剂的使用剂量也不断提高,造成生产成本逐年增加;而且化学杀虫剂的长期使用,危害了环境,破坏了生物资源和生态平衡,对人、畜有严重危害。

随着分子生物技术的迅速发展,基因工程方法已经越来越多地应用于品种改良,使作物的抗病、抗虫、抗逆和品质性状得到改良。从 1983 年第一株转基因烟草获得以来^[3],已经有一大批抗病、抗虫转基因烟草品种(系)被相继育成^[4 5 6 7]。我国转基因烟草的

^{*}赵百东,男,36岁,博士,国家烟草专卖局科技教育司,北京,100053

收稿日期:1999-12-26

研究工作目前虽然仅限于在实验室或严格控制的小环境下进行,但是已经获得了高抗 TMV、CMV 和 PVY 的优质烟草品系^[8,9,10,11,12],为进一步深入开展烟草生物技术的研究和应用奠定了基础,增强了技术储备。

2 国内外烟草生物技术研究概况

目前,农业生物技术还处于较为简单的发展过程中,所以有人曾将其描述为未来农业生物技术革命的前奏。例如,转基因作物品种是将某种细菌或病毒的基因导入作物而获得的,作为第一代遗传作物,其功能主要是增强抗虫、抗病、抗除草剂能力。植物生物学家正设法往植物里导入更多的基因,以期重绘作物的遗传蓝图,改变作物代谢途径,培育出的新作物不仅能够生产粮食,而且还能生产药物、化学产品等。

作为分子生物学研究和基因工程研究的模式植物,烟草为基因工程的研究和应用提供了理想的研究材料,为生物技术的发展立下汗马功劳,与此同时一大批转基因烟草品种(系)也相继培育成功。但是,由于目前尚无法确定转基因作物对人类和环境将产生何种影响,加上“吸烟与健康”所造成的负面影响,使转基因烟草一直不能应用于大田生产。

2.1 抗性基因工程研究

抗性基因工程研究较多的是抗虫基因工程,利用基因工程方法,将抗虫基因转入到烟草中,使其稳定遗传和表达杀虫活性,培育出抗虫烟草品系,具有以下优点:一是时间上有连续性,可控制任何时期发生的虫害。二是作用方式有特异性,只杀灭相关的害虫。三是抗虫物质只在体内产生,不存在环境污染问题。四是经济、有效。

目前,烟草生物技术研究中最常使用的抗虫基因主要是苏芸金杆菌(*Bacillus thuringiensis* Bt)毒蛋白基因^[13]。1987年,比利时植物遗传系统公司首次将 Bt 毒蛋白基因导入烟草,并获得表达,培育成能够有效地抵抗一龄烟草夜蛾(*Manduca sexta*)幼虫侵害的转基因烟草^[14]。无疑,Bt 毒蛋白基因在抗虫基因工程中具有突出地位,但应用中的潜在问题不可忽视:Bt 毒蛋白基因的抗虫谱较窄,虽然已经分离了众多的 Bt 毒蛋白基因,抗虫谱几乎覆盖所有鳞翅目害虫,但具体对每一种来说,其抗虫谱却十分有限;而且更为严重的是昆虫对于杀虫晶体蛋白(ICP)的耐受性问题,昆虫可能通过改变肠道中 pH 以降低 ICP 的溶解度和蛋白酶水解活性,以达到减少 ICP 活性的浓度和抗

ICP 的目的。

针对上述问题,较为有效的办法是同时使用两个以上的 Bt 毒蛋白基因,或联合使用 Bt 毒蛋白基因与其它类型的抗虫基因转化植物,以防止或延缓害虫耐受性的产生;再者利用损伤诱导表达启动子和其它组织特异性启动子,使 Bt 毒蛋白基因只在害虫侵害时,只在受伤部位高效表达。当然最重要的是寻找新的更为有效的抗虫基因,目前研究较多的是蛋白酶抑制剂基因(proteinase inhibitor, PI)、淀粉酶抑制剂基因(α -Amylase inhibitor, aAI)、外源凝集素基因(lectin)和几丁质酶(chitinase)基因等。与 Bt 毒蛋白基因相比,这些基因不仅具有较广的抗虫谱,而且它作用于昆虫消化酶的活性中心,是酶的最保守部位,可以排除昆虫通过突变产生抗性的可能;再者蛋白酶抑制剂基因来源于植物本身,更易于被公众所接受。目前存在的问题是如何提高蛋白酶抑制剂基因的表达水平,以获得理想的抗虫效果。较为成功的例子是将豇豆胰蛋白酶抑制剂(CpTI)基因导入烟草^[15],Hilder^[16]等及刘明春等于1987年成功获得了 CpTI 基因烟草植株,对烟草夜蛾幼虫表现了明显的抗性。1995年 Hilder^[17]等将从雪莲分离出来的 lectin 基因转移到烟草,获得了抗蚜虫(*Myzus persicae*)的后代植株。范云六等则将 Bt 毒蛋白基因和 CpTI 基因同时导入烟草,成功地获得了高抗虫转双基因烟草,有望解决害虫对抗虫植物产生的抗性问题^[14]。

另外一项研究较多的内容是抗除草剂转基因工程,1988年 Haughn 等从 *Arabidopsis* 中分离出一个对磺酰脲类除草剂具有抗性的突变基因 *csr1-1*,并将其导入加拿大烤烟品种 Delgold,并获得了两个抗性品系^[4,18,19]。1994年法国科学家 Delon 等将控制溴氧化物类除草剂降解的基因导入烟草,获得的转基因植株不仅抗此类除草剂,而且其他农艺性状都与正常品种一样^[20]。所育成的品种当时曾经通过法国国家品种审定^[21],到目前为止还没有关于该品种种植方面的报道。另外还关于通过控制转移酶活性的基因,而获得抗除草剂转基因植株的^[22]。由于目前我国烟草种植中多采用人工除草,所以此方面的研究开展的很少,今后有必要增加。

烟草的抗病基因工程研究主要集中在烟草抗病毒育种,常用的方法是将某一病毒的外壳(CP)蛋白基因导入烟草。1986年 Powell-Abel 等首次将烟草花叶病毒(TMV)外壳蛋白基因成功导入烟草^[23],获得抗

TMV 的转基因烟草植株。另外还有一些其他的途径,如将 CMV 的卫星 RNA 导入烟草,培育表达卫星 RNA 的工程植株,将 TMV U1 株系的复制酶基因(54K 蛋白)导入烟草,获得对 TMV 侵染具有免疫抗性的转基因植株。目前,除 TMV 病毒外壳蛋白基因外,还发现了其他很多病毒外壳蛋白基因对病毒具有抗性,如烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus)^[24]、马铃薯 Y 病毒(potato virus Y)和马铃薯 X 病毒(potato virus X)^[25]、番茄叶斑病毒(tomato spotted wilt virus)^[26]、烟草线条病毒(tobacco streak virus)^[24]等病毒蛋白基因等。同时也有将这些基因转入烟草,获得具有抗性的转基因后代的报道。田波、陈章良等获得的转基因烤烟和香料烟品种,都不同程度地表现了对花叶病毒的抗性。中国科学院微生物研究所还将 CMV 卫星 RNA 基因和 CMV 外壳蛋白基因同时成功地导入烟草,获得了对 CMV 侵染具有高度抗性的转基因植株。吴元华等成功地将 PVY 复制酶(PVY-N Ib)基因和 PVY 外壳蛋白(PVY-CP)基因导入烟草品种 NC89 和 K326,获得了品质相当而抗病能力增强的品系^[8,9,10]。

相对于抗虫和抗病毒病研究,抗细菌和真菌性病害的研究则落后得多。主要原因是植物病原细菌和真菌具有细胞结构,且侵染致病机制也较复杂,因而给利用生物技术防治这类的病害带来了一定的困难。已经获得的这类转基因烟草包括抗野火病,立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)等的植株。1995 年 Thilmony 等将抗抗野火病原菌 *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* 的基因导入烟草,获得抗野火病植株^[27]。1991 年 Broglie 等将几丁质酶(chitinase)基因转入烟草,获得抗病转基因烟草植株^[28]。之后又有将蔗糖酶(glucanase)和几丁质酶同时导入烟草,获得既抗烟草立枯病^[29],又抗蛙眼病(*Cerospora nicotinae*)^[30]的转基因烟草植株。时焦等将几丁质酶基因转入烟草,获得了对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)引起的烟草立枯病有一定抗性的转基因烟草植株^[31,32]。1993 年 Alexander^[33]等将表达与发病机理有关的基因(pathogenesis related gene la)转入烟草,获得对霜霉病(*Peronospora tabacina*)和黑胫病(*Phytophthora parasitica*)的转基因烟草。

除了抗虫、抗除草剂、抗病烟草基因工程的研究之外,抗逆性研究也收到一定的重视。环境物理因素对于烟草生长至关重要,寒冷、干旱、盐胁迫等不良环境

是影响烟草产量和品质的重要因素。人们长期以来致力于培育耐寒、耐旱、耐盐碱的烟草品种,但由于作物的抗逆性状一般受多基因控制,而且与品质低劣性状紧密连锁,因此通过常规育种方式很难获得优良的高抗逆性品种。而植物基因工程的发展,为这一育种目标提供了新的有效途径。另外,在抗根结线虫^[34,35]、抗重金属^[19,36,37]等方面,国外也开展了较多的研究。

2.2 品质改良研究

通过调节植物的代谢过程提高蛋白质含量,改变氨基酸、淀粉、糖类、脂类的组成成份,以达到改良作物营养价值的目的。是目前植物基因工程研究中又一热门领域。虽然抗性植物基因工程的研究成果可以直接应用于烟草的抗性育种,而品质改良的基因工程研究成果大多数对烟草的品质育种意义不大,主要是因为烟草多作为模式植物而不是目的植物。迄今为止,针对烟草品质改良的基因工程研究远远落后于其它作物。有报道说美国路易斯安那州立大学的科学家曾将编码高含量氨基酸的基因 HEAAE-II 成功导入烟草,使其得以表达,结果烟草叶片中的必需氨基酸含量比对照品种提高 150%。

导致对改良烟草品质的基因工程研究较少的原因主要是目前对烟草自身生理代谢的分子机制还缺乏深入的研究;另外还有一个重要的原因,即烟草不同于小麦、水稻以及其它粮食作物,其品质的优劣主要决定于烟叶的色、香、味及焦油量,而这又取决于烟草内糖、酸、醇、酯、烟碱、色素、无机物等多种类型物质的含量及彼此间的平衡关系,与某一种蛋白质、淀粉或脂肪的含量、组成关系不大。烟草品质改良的基因工程有一定的特殊性,急需做进一步深入的研究。例如用基因工程的手段,将编码烟碱合成的限速酶或具有调解功能的酶的基因导入烟草中,培育烟碱含量可控的烟草品种;又如将编码大马酮、氧化异佛尔酮、紫罗兰酮等香气物质合成的限速酶或具有调解功能的酶的基因导入烟草中,增加烟草的香气;另外,利用基因工程的手段培育富钾烟草品种,可以提高烟叶的可燃烧性,在不影响烟碱含量的前提下降低焦油量;通过调节过氧化酶和多酚氧化酶的活性,控制在烘烤过程中烟叶内部进行的酶促棕色化反应的程度,从而避免烟叶丧失本色而棕化、褐化,保证理想色泽。总之,烟草品质改良的基因工程虽然仍处于起始阶段,但前景广阔,可以为当前烟草生产中所面临的许多问题提供新的解决途径。

2.3 生物反应器系统的研究

近年来,人们在利用基因工程改良植物本身性状的同时,正试图将转基因植物作为有效的表达系统,生产人们所需要的各种物质。如研究者们正设法往植物里导入更多的基因,以期重绘作物的遗传蓝图,改变作物代谢途径,培育出的新作物不仅能够生产粮食,而且还能生产药物、化学产品,如生产塑料的作物、果实含疫苗的作物以及有天然色彩的棉花等。

转基因植物作为生物反应器具有许多微生物、动物细胞发酵系统所不具备的优点:它可以对真核蛋白进行正确的翻译后加工,形成有活性的分子,不需要发酵产物后加工过程;可以利用自身丰富的底物进行生物合成,生产成本相对低廉;而且不涉及公众普遍关心的有关转基因动物伦理道德问题,因此转基因植物将成为一种潜力巨大的新型生物反应器,被用来造福人类。迄今为止,已有许多利用植物生产和“加工”碳水化合物、脂类、次生代谢物质、疫苗、抗体的研究报道。例如将聚羟基丁酸脂(PHB)合成的关键酶基因转入植物,生产生物降解塑料,解决“白色污染”问题;将乙肝表面抗原(HBsAg)基因、热不稳定肠毒素B亚单位(LT-B)基因、链球菌属突变株表面蛋白(spaA)基因导入植物中进行表达,生产口服疫苗;将抗体基因导入植物,生产植物抗体等等。

烟草是转基因研究的典型模式植物,许多基因如烟草花叶病毒外壳蛋白(TMV-CP)、黄瓜花叶病毒外壳蛋白(CMV-CP)、烟草花叶病毒54KD蛋白、天花粉蛋白等,都相继成功地转入烟草,并获得能够高效表达外源基因,而且稳定遗传的转基因烟草植株。比利时科学家曾将一个神经肽编码基因转入烟草中表达,结果所获得植株的种子中神经肽含量高达200mmol/粒;美国科学家将克隆后的抗体重链和轻链基因分别导入烟草,再将两种转基因烟草杂交,其子代烟草叶片中产生大量的单克隆抗体,其表达水平达到叶片总蛋白的1.3%。按照这种水平推算,美国只需要其目前种植烟草所用土地面积的1%(约400hm²)来种植转基因烟草,一年内可生产270kg的抗体,足以保证27万癌症患者一年的治疗需要^[14]。此外,也有关于表达二氢吡啶合成酶、血清白蛋白、白细胞介素等药用蛋白转基因烟草的成功事例的报道。

除了表达外源蛋白以外,调节烟草自身的代谢途径以生产某种所需产物,也极有开发前景。烟草次生代谢过程中产生了许多重要物质,这些物质往往商用、

医用经济价值很高,但由于合成量极少,提取费用昂贵,无法利用。用基因工程的方法,将编码限速酶或具有调解功能的酶的基因导入烟草中,可以提高次生代谢中某一物质的含量,达到便于提取利用的目的。目前已有成功的例子,日本研究人员将莨菪胺(scopolamine)合成的关键酶—莨菪胺6 β -羧化酶基因导入颠茄,利用其丰富的天仙子胺,大量合成抗胆碱药物莨菪胺。类萜及衍生物是烟草中的重要成分,有关类萜代谢的一系列合成酶、环化酶已被分离、纯化、克隆,其晶体结构的资料最近也有报道。这些研究成果,将有助于了解植物和昆虫、病原间的作用机制,进而推动植物防御基因工程的进展;而且也将使利用生物技术,大规模地生产天然药物、生化试剂、植物香精以及食品添加剂等成为可能。

3 烟草生物技术研究和应用展望

应用生物技术对作物进行改良,将会使人类有目的地应用多种性状基因,改善包括产量、品质、抗逆性在内的植物性状。可以克服常规育种技术的不足,打破物种之间存在的天然屏障,实现基因在动物、植物、微生物之间的转移。因此,生物技术尤其是基因工程技术的发展,对农业生产具有深远的意义。随着生物技术的日臻完善,大批转基因作物相继育成并得以推广,且种植面积在迅速增加。种植转基因作物的国家也由1992年的1个,增加到1998年的10个^[3]。种植面积也急剧增加,1997年全球转基因作物种植面积为11 000 000hm²,1998年为29 000 000hm²,占当年全球作物种植总面积的3%。在美国,35%的玉米,50%的棉花和55%的大豆是转基因的^[38]。

由于种种原因,如来自消费者的阻力和出于经济贸易方面的考虑等,烟草生物技术成果的应用举步维艰。别说大面积种植,就是田间试验都有一定的困难。有报道说,为了避免遭反对转基因技术激进分子的破坏,美国一家种子子公司曾经将转基因烟草品种的田间试验转移到南美某国家秘密进行。根据Ahl Goy^[3]等的报道,1994年全球转基因烟草田间试验面积占当年所有转基因作物田间试验面积的12.5%,而几年前是25%。关于目前转基因烟草的田间试验和种植情况,还没有准确的数字。我国在90年代中后期曾有部分转基因烟草的试种,但是由于不客观的对外宣传报道,一度影响了我国烟叶的出口。为此,国家烟草专卖局于1998年制定了《转基因烟草管理办法》,提出了“积

极研究,增强储备,严格管理,慎重应用”的方针,使转基因烟草的研究工作仅限于严格控制的小环境内进行。虽然培育出了优质抗病新品种,但限制种植。随着时间的推移和人们对转基因作物认识的改变,这些基因烟草品种必将会在生产上得到应用。

目前有关基因工程安全性问题的争论主要围绕重组基因在自然界释放的可能性,抗菌素抗性基因转移的可能性,通过农用杆菌释放基因的可能性,基因产物通过花蜜对人类造成危害的可能性,转基因植物成为野生的可能性,等等。由于烟草的特殊用途,转基因烟草除了具备上述可能性危害之外,还存在吸食过程中对人体的可能性危害。毫无疑问,安全性无疑是基因工程基础研究的重要课题,随着基因结构、功能和表达、调控的深入研究,将有可能构建具有精细调控机制的安全无害的目的基因。所以,不可因噎废食,抱着传统的思想停滞不前,而应适当扶持和发展转基因烟草的开发和研究。

因此,根据国内外基因工程研究发展的趋势,结合我国烟草生产的实际情况,我们应该在如下几个方面开展烟草生物技术的研究工作。第一,继续加强基础研究工作。烟草作为遗传理论和生物技术研究的经典模式植物,很多基础理论已经相当完备。我国烟草行业也有大批科研人员能够熟练运用基因操作技术,进行基因克隆和转移工作。但是,由于可供利用的基因数量非常有限,因而转基因育种工作只是针对很少几种病虫害而开展。今后应该加强基因筛选工作,充分利用我国丰富的生物资源,为将来培育可供生产上使用的优质、多抗品种打下基础。第二,坚持基因工程育种和常规杂交育种相结合。生物技术的发展使人类有目的地、快速地改变植物性状成为可能,但是很多情况下,通过基因工程途径所获得的材料,离生产应用还有一段距离。这些材料中的很大一部分仅仅是丰富了种质资源,其有效利用与常规杂交育种是分不开的。只有两者合理结合,才能加快育种步伐,达到综合性状的全面改良。第三,加强转基因品种的检测 and 安全性评估工作。目前转基因作物的检测技术已经基本成熟^[39],我国在转基因烟草检测方面处于世界领先地位^[40]。但是我们在转基因烟草的安全性评估方面的工作却做的很少,今后有必要对安全性评估的技术与方法进行研究,从而为优质抗病转基因烟草品种的推广应用提供科学依据。

参考文献

- 1 赵兴. 面向二十一世纪的中国烟叶. 国际烟草研讨会, 香港, 1999.
- 2 孔凡玉, 等. 烟草有害生物可持续治理的策略与建议. 跨世纪烟草农业科技展望和持续发展战略研讨会论文集. 中国商业出版社, 1999.
- 3 Ahl Goy P, Duesing J H. From pots to plots; genetically modified plants on trial. *Bio/ Tech.*, 1995, 13: 454 ~ 459.
- 4 Brandle J D, Bai D. Biotechnology: uses and application in tobacco improvement. In: Davis D L, Nielsen M T (eds). *Tobacco: Production, Chemistry and Technology*, Blackwell Science Ltd., Oxford UK, 1999, 49 ~ 65.
- 5 Gadami F et al. Tobacco: a tool for plant genetic engineering research and molecular farming, Part I. *Agro Food Ind. Hi-Tech.*, 1995, 6: 19 ~ 24.
- 6 James C. Global review of commercialized transgenic crops. 1998 ISAAA Brief No. 8, The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. Ithaca, NY, 1998.
- 7 Tso T C. Production physiology and biochemistry of tobacco plant. *Ideals Inc.*, Beltsville MD, 1990.
- 8 吴元华, 等. 烤烟抗病毒基因工程育种——高抗马铃薯 Y 病毒 NC89 的选育. 烟草农业专题讨论会论文集, 1998.
- 9 Anonymous. Genetically Modified Plants for Food Use. Report of the Royal Society of Great Britain, 7 September 1998 UK.
- 10 Koller D. Genetics and the future of tobacco: issues and research. *Proceedings 53rd Tobacco Science Research Conference (TSRC)*, 13-15 September 1999, Montreal, Canada.
- 11 Wu Y et al. Changes of the activities of some enzymes in tobacco leaves infected with potato Y-vein virus necrosis strain. Paper presented to the joint meeting of the CORESTA agronomy and phytopathology study groups. 10-14 October 1999, Suzhou, China.
- 12 Wu Y et al. Techniques of breeding a new transgenic tobacco line and a G28 mutant resistant to potato Y-vein virus necrosis strain. Paper presented to the joint meeting of the CORESTA agronomy and phytopathology study groups. 10-14 October 1999, Suzhou, China.
- 13 Delannay X et al. Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein. *Biotechnology*, 1989, 7: 1265 ~ 1269.
- 14 任民, 郭文生. 烟草科学与技术. 北京: 中国农业科技出版社, 1997.
- 15 Hoffmann M P et al. Field evaluation of transgenic tobacco containing genes encoding *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin or cowpea trypsin inhibitor efficacy against *Helicoverpa*

- zea (Lepidoptera Noctuidae). J. Econ. Entomol., 1992, 85: 2516 ~ 2522.
- 16 Hilder V A et al. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature, 1987, 380: 12 ~ 18.
- 17 Hilder V A et al. Expression of snow drop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. Trans. Res., 1995, 4: 18 ~ 25.
- 18 Haughn G W et al. Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistance to sulfonylurea herbicides. Mol. Gen. Genet., 1988, 211: 266 ~ 271.
- 19 Brandle J E, Miki B L. Agronomic performance of flue-cured tobacco grown under field conditions. Crop Sci., 1993, 33: 847 ~ 852.
- 20 Delon R et al. Transgenic tobacco resistant to oxynil herbicides. Annales du Tabac (SEITA), 1994, 25(2): 17 ~ 26.
- 21 Freyssin G, Deroose R T. Development of genetically modified crops resistant to herbicides and pests. Agro-Food Ind. Hi-Tech., 1994, 5: 3 ~ 7.
- 22 DeBlock M et al. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. EMBO J., 1987, 6: 2513 ~ 2518.
- 23 Powell-Abel P et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus gene. Science, 1986, 232: 738 ~ 743.
- 24 van Dunn C M P, Bol. J F. Transgenic tobacco plants accumulating tobacco rattle virus coat protein resist infection with tobacco rattle virus and pea early browning virus. Virol., 1988, 167: 649 ~ 652.
- 25 Kaniewski W et al. Field resistance of transgenic Russet Burbank potato to effects of infection by potato virus X and potato virus Y. Bio/ Tech., 1990, 8: 750 ~ 754.
- 26 MacKenzie D J and Ellis P J. Resistance to tomato spotted wilt virus infection in transgenic tobacco expressing the viral nucleocapsid gene. Mol. Plant Microbe Interact., 1992, 5: 34 ~ 40.
- 27 Thilmony R L et al. Expression of the tobacco Pto gene in tobacco enhances resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* expressing avrPto. Plant Cell, 1995, 7: 1529 ~ 1536.
- 28 Broglie K et al. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. Science, 1991, 254: 1194 ~ 1197.
- 29 Jach G et al. Enhanced quantitative resistance against disease by combinational expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. Plant J., 1995, 8: 97 ~ 109.
- 30 Zhou Q et al. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. Bio/ Tech., 1994, 12: 807 ~ 812.
- 31 时焦, 等. 几丁质酶基因在烟草栽培品种中表达及其对病毒和昆虫的作用研究. 跨世纪烟草农业科技展望和持续发展战略研讨会论文集. 北京: 中国商业出版社, 1999.
- 32 Shi J et al. Enzyme activity assay and fungal resistance evaluation of chitinase expressing tobacco. Paper presented to the 53rd Tobacco Science Research Conference (TSRC), 13-15 September 1999, Montreal, Canada.
- 33 Alexander D et al. Increased tolerance to two oomycete pathogens expressing pathogenesis related protein 1 a. Proc. Natl. Acad. Sci. 1993, 90: 7327 ~ 7331.
- 34 Rosso M N et al. Expression and functional characterization of a single chain Fv antibody directed against secretions involved in plant nematode infection process. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1996, 220: 256 ~ 263.
- 35 Williamson V M and Hussey R S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. Plant Cell, 1996, 8: 1735 ~ 1745.
- 36 Brandle J E et al. Field performance and heavy metal concentration of transgenic flue-cured tobacco expressing a mammalian metallothionein-beta glucuronidase gene fusion. Genome, 1993, 36: 255 ~ 260.
- 37 Elmayan T, Teptier M. Synthesis of a bifunctional metallothionein-beta glucuronidase fusion protein in transgenic tobacco plants as a means of reducing leaf cadmium levels. Plant J., 1994, 6: 433 ~ 441.
- 38 Brandle J E et al. Resistance to the sulfonylurea herbicide chlorsulfuron, anodosulfuron and DPX R967 in transgenic flue-cured tobacco. Crop Sci., 1992, 32: 1443 ~ 1445.
- 39 Gadani F et al. The application of polymerase chain reaction (PCR) technology to the detection, identification and quantification of genetically modified organism (GMOs): current approaches. Paper presented to the joint meeting of the CORESTA agronomy and phytopathology study groups. 10-14 October 1999, Suzhou, China.
- 40 郭兆奎, 等. 适于 PCR 分析的烤后烟叶 DNA 提取方法的研究. 中国烟草科学, 1999, 20(4): 5 ~ 8.