

黄瓜花叶病毒 CB7 株系引起 心叶烟坏死反应与 RNA2 相关*

廖乾生^{1,2)} 杜志游²⁾ 张华荣²⁾ 朱丽萍²⁾ 吴鹏²⁾ 陈集双^{2)**}

(¹⁾浙江大学生命科学院, 杭州 310029; ²⁾浙江理工大学生物工程研究所, 杭州 310018)

摘要 采用 RT-PCR 获得黄瓜花叶病毒 CMV-CB7 株系全长基因组 cDNA, 经克隆测序发现该 CMV 的 RNA1、2 和 3 分别为 3 356 nt、3 045 nt 和 2 218 nt (序列登录号为: EF216866、DQ785470 和 EF216867)。CMV-CB7 基因组 cDNA 克隆体外转录 RNA 接种心叶烟引起坏死症状, 而 CMV-Fny 则产生典型花叶。由 CMV-CB7 和 CMV-Fny 基因组 RNA 相互交换而构建 6 个假重组型病毒 (C1C2F3、C1F2C3、F1C2C3、F1F2C3、F1C2F3 和 C1F2C3) 活性分析表明: CMV-CB7 基因组 RNA2 决定其在寄主上的症状反应。嵌合型 RNA2 (RNA2^{FSC3} 和 RNA2^{C3F5}) 的寄主侵染活性测定表明: 2b 基因或 RNA2 3' 端非编码序列决定 CMV-CB7 在心叶烟坏死症状。RNA 印迹分析结果显示: CMV-CB7 和 CMV-Fny^{FSC3} 引起寄主坏死与基因组 RNA 积累没有直接关系。

关键词 黄瓜花叶病毒, 心叶烟, 坏死, RNA2

学科分类号 S4

黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 为正义、单链、三分体 RNA 病毒, 其寄主范围极其广泛, 是世界性危害最严重的植物病毒之一^[1~6]。CMV 在系统性寄主上常见症状反应为花叶 (mosaic)、矮化 (stunting) 和褪绿 (chlorosis), 而这些症状往往是复合出现。随着病害的发展, CMV 侵染的寄主还出现蕨叶 (fern)、斑驳 (mottle)、明脉 (vein clearing)、暗绿 (dark green) 等不同表型。CMV 分为亚组 I A、I B 和亚组 II, 不同株系间的 CMV 致病性差异很大^[1,3,6~8]。

CMV 包含 5 个开放阅读框 (open read frame, ORF), 分布在 3 条基因组 RNA 中。RNA1 编码 1a 蛋白; RNA2 含有 2 个 ORF, 5' 端 ORF 编码 2a 蛋白, 3' 端 ORF 编码 2b 蛋白, 1a 蛋白和 2a 蛋白形成病毒复制酶复合体^[4~6,8]; RNA3 编码移动蛋白 (3a) 和外壳蛋白 (CP), 但 CP 是从 RNA3 亚基因组 (RNA4) 翻译而来^[4~6,8~10]。2b 蛋白是从 RNA2 亚基因组 (RNA4A) 翻译而来, 其大小在 11~13 ku 之间^[11~13]。

作者从杭州地区获得一株在心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*) 上产生坏死症状株系 CMV-CB7。本研究通过构建 CMV-CB7 分离物侵染性克隆以及与标准

株 CMV-Fny 进行基因组 RNA 假重组交换, 确定 RNA2 是引起心叶烟坏死症状反应的决定因子。

1 材料与方法

1.1 毒源与寄主植物

CMV-Fny 侵染性克隆 pF109、pF209 和 pF309 由苏格兰作物所 Palukaitis 提供。CMV-CB7 分离自杭州番茄, 并保存于三生烟 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc) 上。寄主植物为心叶烟 (*N. glutinosa*)。

1.2 CMV-CB7 基因组全长克隆

从 CMV-CB7 侵染三生烟组织提取 CMV-CB7 病毒粒子^[9], 按照 Trizol 使用说明书纯化病毒 RNA, 并以此为模板进行 RT-PCR, 采用 CMV12F/CMV123R 对和 CMV3F/CMV123R 对分别扩增 CMV-CB7 基因组 RNA1、2 与 RNA3 全长基因, PCR 反应参数按照文献[15]。目的 DNA 片段经回收、*Sph* I 和 *Sma* I 双酶切, 克隆至 pUC118 载体; CMV-CB7 基因组 RNA1、2 和 3 阳性克隆

*国家自然科学基金资助项目(30671361)。

**通讯联系人。Tel: 0571-86843197, E-mail: chenjs@zstu.edu.cn

收稿日期: 2007-05-07, 接受日期: 2007-06-18

(pC1、pC2 和 pC3)筛选与鉴定按照精编分子生物学实验指南^[15,16]. 经鉴定的阳性克隆(pC1、pC2 和 pC3)各取 5 个测序.

1.3 嵌合型 CMV RNA2 构建

采用表 1 引物通过 Overlapping-PCR 方法, 在 cDNA 水平上构建 CMV-CB7 RNA2 中 2b 基因及 3' 端 UTR 区与 CMV-Fny RNA2 相应部分进行互换嵌合型 RNA2. 具体构建策略如下: 以 CMV-CB7 RNA2 的 cDNA 为模板, 通过引物 CMV12F/C2b5R 扩增出 Fragment I C, 通过引物 C2bF/

CMV123R 扩增出 Fragment II C. 以 pF209 为模板通过相应引物对分别获得 Fragment I F 和 Fragment II F. 以 Fragment I C 和 Fragment II F 为混合模板, 通过引物 CMV12F/CMV123R 扩增出嵌合型 RNA2^{CSF3}, 以 Fragment I F 和 Fragment II C 为混合模板, 通过引物 CMV12F/CMV123R 扩增出嵌合型 RNA2^{FSC3}. 分别回收 RNA2^{CSF3} 和 RNA2^{FSC3} PCR 产物, 并经 *Sph* I 和 *Sma* I 双酶切, 克隆到 pUC118 载体上, 获得侵染性克隆 pRNA2^{CSF3} 和 pRNA2^{FSC3}. 嵌合型 RNA2 经测序验证.

Table 1 Primers used in this study

Primers	Primer sequence	Fragment
CMV12F	5' AATCGCATGCTAATACGACTCACTATAGGTTTATTTACAAGAGCGTAC 3' <i>Sph</i> I T7 promotor CMV12F nt 1-20	
C2b5R	5' CTTTCTTCTTCGCTGCTTAGTG 3' CB7 RNA2 nt 2391~2413	Fragment I C
C2bF	5' AGATGCGGAAGGGGAGGTT ↑ ATGGAATTGAACGCAGGCGC 3' (Fny RNA2 nt 2396~2418) (CB7 RNA2 nt 2414~2433)	
CMV123R	5' AATTGGGCCCTGGTCTCCTTTTGGAGGCC 3' <i>Sma</i> I (CMV RNA2 nt 3032~3050)	Fragment II C
CMV12F	5' AATCGCATGCTAATACGACTCACTATAGGTTTATTTACAAGAGCGTACGG 3'	Fragment I F
F2b5R	5' AATTCTTTCGCTGTTTGTGG 3'	
F2bF	5' CACTAAGCAGCGAAAGAAGAAAG ↑ ATGGAATTGAACGTAGGTGCAATG 3' (CB7 RNA2 nt 2391~2413) (Fny RNA nt 219~2442)	Fragment II F
CMV123R	5' AATTGGGCCCTGGTCTCCTTTTGGAGGCC 3'	
CMV3F	5' AATCGCATGCTAATACGACTCACTATAG GTAATCTTACCACTGTGTGTGTG 3' <i>Sph</i> I T7 promotor CMV3 nt 1~22	

1.4 CMV-CB7 和 CMV-Fny 侵染性体外转录的接种

pF109、pF209 和 pF309 克隆经 *Pst* I 酶切, 并用 Klenow 酶补平; CMV-CB7 侵染性 cDNA 克隆 pC1、pC2 和 pC3 以及嵌合体 pRNA2^{CSF3} 和 pRNA2^{FSC3} 经 *Sma* I 酶切, 获得线性化 DNA 作为体外转录模板, 进行全长 RNA 体外转录, 体外转录方法参考试剂盒使用说明书. CMV-CB7(C1C2C3) 和 CMV-Fny(F1F2F3)cDNA 克隆体外转录产物, 用 50 mmol/L pH9.2 磷酸缓冲液将转录产物稀释至 200 mg/L, 进行基因组 RNA1、2 和 3 的组合, 由此而获得 6 个假重组体病毒 C1C2F3、C1F2C3、C1F2F3、C1C2F3 和 C1F2C3. 以上转录 RNA 混和

物 5 μl, 接种于 4~5 叶期心叶烟, 重复接种一次. 接种植物在 28℃、光照 14 h 植物培养箱中培养.

1.5 RNA 印迹分析

接种 7 天, 用 4 mm 打孔器等量采集侵染 CMV-CB7、CMV-Fny、CMV-Fny^{FSC3} 和 CMV-Fny^{CSF3} 心叶烟系统叶. 用 Trizol 提取总 RNA, 测定样品 A_{260} 和 A_{280} 值, 确定样品浓度和纯度. RNA 甲醛变性电泳、转膜和 ³²P 标记探针以及杂交参考文献[16]. 所用探针为 45 nt 的 CMV 基因组 RNA1、2 和 3 共同 3' 端互补序列: 5' TGGTCTCCTTTTAGAGACCCCCACGAAAGTGGGGGGGCAC CCGTAC 3'.

2 结果与讨论

2.1 CMV-CB7 基因组全长序列及其侵染性克隆活性分析

以病毒粒子 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 扩增获得 CMV-CB7 基因组 RNA1、2 和 3 的全长 cDNA, 经克隆测序发现, 其大小分别为 3 356 nt (nucleotide, nt), 3 045 nt 和 2 218 nt (序列登录号分别为 EF216866、DQ785470 和 EF216867).



Fig. 1 Symptoms on *N. glutinosa* inoculation with transcripts RNAs from CMV-CB7 genomic RNAs at 10 days post-inoculation (dpi)

CMV-Fny 和 CMV-CB7 基因组转录 RNA 接种于心叶烟, 在接种 3~4 dpi(days post-inoculation, dpi), CMV-CB7 接种寄主新长叶出现坏死症状, CMV-Fny 在接种寄主未产生明显症状, 因此 CMV-CB7 侵染性克隆具有活性且发病更快. 7 dpi, CMV-CB7 在心叶烟上引起明显顶端坏死, 而接种 CMV-Fny 植株出现系统花叶. 10 dpi, 接种 CMV-CB7 的心叶烟出现系统性坏死, 而 CMV-Fny 在寄主上表现出重花叶症状反应 (图 1).

2.2 CMV-CB7 与 CMV-Fny 假重组毒株的症状分析

将 CMV-CB7 和 CMV-Fny 各个基因组 (C1C2C3 和 C1F2F3) 进行交换, 组成 6 个假重组型病毒: C1C2F3、C1F2C3、F1C2C3、F1F2C3、F1C2F3 和 C1F2F3, 并接种于心叶烟上. 10 dpi 各个病毒症状反应如图 2 和表 2 所示. 除 C1C2C3 引起寄主坏死症状外, C1C2F3 和 F1C2F3 同样引起



Fig. 2 Symptoms on *N. glutinosa* infected by pseudorecombinants between transcripts of CMV-CB7 and CMV-Fny at 10 dpi

Table 2 Comparison of symptoms on *N. glutinosa* by infeced pseudorecombinants between CMV-CB7 and CMV-Fny at 10 dpi

Viral strain	<i>N. glutinosa</i>
C1C2C3	Systemic necrosis
F1F2F3	Systemic mosaic
C1C2F3	Systemic necrosis
C1F2C3	Mosaic
F1C2C3	Systemic necrosis
F1F2C3	Severe mosaic
F1C2F3	Systemic necrosis
C1F2F3	Slightly mosaic

心叶烟出现顶端坏死症状. 其他假重组型病毒则表现为不同程度的花叶. 以上结果表明: CMV-CB7 基因组 RNA2 是引起心叶烟出现坏死症状的决定因子. 嵌合型 RNA2 症状反应分析结果发现, RNA2^{FSC3} 与 pF109 和 pF309 转录 RNA 混和接种 (CMV-Fny^{FSC3}) 在心叶烟上引起植株坏死, 而 RNA2^{CSF3} 与 pF109 和 pF309 转录 RNA 混和接种 (CMV-Fny^{CSF3}) 则产生重花叶症状 (图 3). 这一结果表明: RNA2 决定在心叶烟产生系统性坏死症状功能区可能位于 2b 基因或者 RNA2 的 3' 端非编码区.

2.3 系统寄主中假重组毒株基因组含量的分析

为研究 CMV-CB7 和 CMV-Fny^{FSC3} 引起心叶烟坏死反应是否因为在系统寄主中其基因组积累量高于 CMV-Fny/CMV-Fny^{CF3} 所引起, 7 dpi, CMV-CB7、CMV-Fny^{FSC3}、CMV-Fny 和 CMV-Fny^{CF3} 系统侵染寄主总 RNA 经 RNA 印迹分析发

现, CMV-CB7、CMV-Fny^{FSC3}、CMV-Fny 和 CMV-Fny^{CF3} 在心叶烟上基因组含量无明显差异(图 4)。这表明, CMV-CB7 及其假重组毒株引起心叶烟系统性坏死与其基因组含量的高低没有直接关系。



Fig. 3 Symptoms on *N. glutinosa* induced by inoculation with transcripts RNA of pF109, pF309 and chimeric RNA2 cDNA at 7 dpi

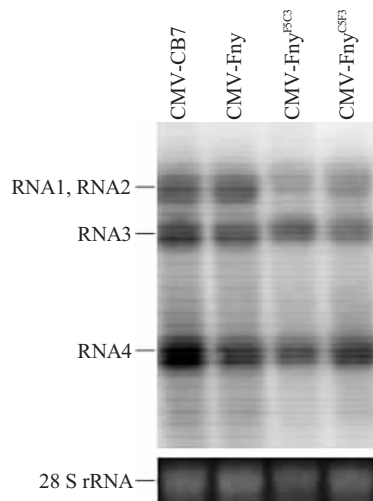


Fig. 4 Northern blotting analysis of CMV genomic RNAs in systemic leaves of *N. glutinosa*

Total RNA was extracted from equal tissue of *N. glutinosa* at 7 dpi, and 28 s rRNA was used as internal control.

CMV 在寄主上最常见症状为花叶、矮化和褪绿^[1, 3, 6~8], 在已报道 CMV 中, 目前还没有发现引起系统寄主产生坏死表型的株系. Xu 等^[17~19]发现, CMV-Fny 与 D-satRNA 混和接种于番茄上, 接种植株表现为坏死反应, 但该症状不是由 CMV-Fny 所引起, 是因为 D-satRNA 介导了番茄产生细胞程序性死反应所致. CMV 的 Y-satRNA 也引起番茄出现坏死症状^[20]. 本研究发现, CMV-CB7 在心叶烟上引起坏死, 并进一步确定其症状由基因组 RNA2 决定(图 1, 2 和表 2). 嵌合体 RNA2 侵染性分析发现, CMV-CB7 RNA2 的 2b 基因或 RNA2 的 3'端

非编码区决定其于心叶烟上表型(图 3). 尽管 CMV-CB7 和 CMV-Fny^{FSC3} 在寄主所产生症状比 CMV-Fny 和 CMV-Fny^{CF3} 重, 但是 4 个毒株在心叶烟上基因组含量相差不明显. 由此可见, CMV-CB7 在心叶烟上产生坏死反应, 并不是因为其在寄主中病毒含量高所引起(图 4). 2a 蛋白除了作为 RNA 聚合酶对病毒进行复制外, 还参与病毒对寄主的致病反应^[21, 22], CMV-Fny 在豇豆(*Vigna unguiculata*) 引起过敏性坏死反应由其 2a 蛋白决定, 其机制是由于 2a 蛋白 motif D 磷酸化作用导致病毒不能长距离运输所引起, 而与病毒复制没有关系^[23, 24]. 这一结论与本研究所取得结果相吻合。

参考文献

- 1 Edwardson J R, Christie R G. CRC Handbook of Viruses Infecting Legumes. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1991. 293~319
- 2 VanRegenmortel M H V, Fauquet C M, Bishop D H L. Virus Taxonomy-Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, California: Academic Press, 2005. 307~326
- 3 Palukaitis P, Roossinck M J, Dietzgen R G, et al. Cucumber mosaic virus. Adv Virus Res, 1992, 41: 281~348
- 4 Roossinck M J. Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution. Molecular Plant Pathology, 2001, 2 (2): 59~63
- 5 Roossinck M J, Zhang L, Hellwald K H. Rearrangements in the 5 nontranslated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three Subgroups. J Virol, 1999, 73 (8): 6752~6758
- 6 Roossinck M J. Evolutionary history of cucumber mosaic virus deduced by phylogenetic analyses. J Virol, 2002, 76 (7): 3382~3387

- 7 Gallitelli D. The ecology of cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. *Virus Res*, 2000, **71** (1): 9~21
- 8 Palukaitis P, Garcia-Arenal F. Cucumoviruses. *Adv Virus Res*, 2003, **62**: 241~323
- 9 Gal-On A, Kaplan I B, Palukaitis P. Characterization of cucumber mosaic virus. II. Identification of movement protein sequences that influence its accumulation and systemic infection in tobacco. *Virology*, 1996, **226** (2): 354~361
- 10 Kaplan I B, Gal-On A, Palukaitis P. Characterization of cucumber mosaic virus. III. Localization of sequences in the movement protein controlling systemic infection in cucurbits. *Virology*, 1997, **230** (2): 343~349
- 11 Ding S W, Anderson B J, Haase H R, *et al.* New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology*, 1994, **198** (2): 593~601
- 12 Ding S W, Li W X, Symons R H. A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO J*, 1995, **14** (23): 5762~5772
- 13 Ding S W, Shi B J, Li W X, *et al.* An interspecies hybrid RNA virus is significantly more virulent than either parental virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (15): 7470~7474
- 14 陈集双. 黄瓜花叶病毒及其卫星 RNA 的分子生态学研究: [学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2002
Chen J S. Studies on molecular ecology of cucumber mosaic virus and its satellite RNA: [Doctoral Dissertation]. Hangzhou: Zhengjiang University, 2002
- 15 Chen Y F, Chen J S, Zhang H R, *et al.* Molecular evidence and sequence analysis of a natural reassortant between Cucumber mosaic virus subgroup IA and II strains. <http://www.springerlink.com/content/v1673v2322117n33/fulltext.pdf>
- 16 Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 141~143
- 17 Xu P, Roossinck M J. Cucumber mosaic virus D satellite RNA-induced programmed cell death in tomato. *Plant Cell*, 2000, **12** (7): 1079~1092
- 18 Xu P, Blancaflor E B, Roossinck M J. In spite of induced multiple defense responses, tomato plants infected with Cucumber mosaic virus and D satellite RNA succumb to systemic necrosis. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, **16** (6): 467~476
- 19 Xu P, Rogers S J, Roossinck M J. Expression of antiapoptotic genes *bcl-xL* and *ced-9* in tomato enhances tolerance to viral-induced necrosis and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (44): 15805~15810
- 20 Wang M B, Bian X Y, Wu L M, *et al.* On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (9): 3275~3280
- 21 Wintermantel W M, Zaitlin M. Transgene translatability increases effectiveness of replicase-mediated resistance to cucumber mosaic virus. *J Gen Virol*, 2000, **81** (3): 587~595
- 22 Hwang M S, Kim S H, Lee J H, *et al.* Evidence for interaction between the 2a polymerase protein and the 3a movement protein of Cucumber mosaic virus. *J Gen Virol*, 2005, **86** (11): 3171~3177
- 23 Kim C H, Palukaitis P. The plant defense response to cucumber mosaic virus in cowpea is elicited by the viral polymerase gene and affects virus accumulation in single cells. *EMBO J*, 1997, **16** (13): 4060~4068
- 24 Kim S H, Palukaitis P, Park Y I. Phosphorylation of cucumber mosaic virus RNA polymerase 2a protein inhibits formation of replicase complex. *EMBO J*, 2002, **21** (9): 2292~2300

Necrosis Pathotype Induced on *Nicotiana glutinosa* by Infection of CMV-CB7 Related to RNA2*

LIAO Qian-Sheng¹⁾, DU Zhi-You²⁾, ZHANG Hua-Rong²⁾, ZHU Li-Ping²⁾, WU Peng²⁾, CHEN Ji-Shuang²⁾**

¹⁾ College of Life Sciences of Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

²⁾ Institute of Bioengineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract Full length cDNAs of *Cucumber mosaic virus* (CMV) CB7 strain, causing necrosis on *Nicotiana glutinosa*, were obtained by RT-PCR, using viral genomic RNAs as templates. cDNAs of CMV-CB7 genomic RNAs were cloned and sequenced and results indicated that RNA1, 2 and 3 was 3 356 nt, 3 045 nt and 2 218 nt, respectively (accordingly Accession Number EF216866, DQ785470 and EF216867). Infectious RNA transcripts from cDNA clones of CMV-CB7 were inoculated onto *N. glutinosa* and the seedlings of host plants displayed necrosis symptom, whilst that of CMV-Fny induced typical mosaic symptoms. Through pseudorecombination between CMV-CB7 and CMV-Fny genomic RNAs, the genetic determinant of necrosis phenotype was mapped to RNA2. Chimeric infectious clones consisting of partial sequences of RNA2 derived from CMV-CB7 and CMV-Fny, respectively, were obtained by Overlapping PCR. Pathogenic analysis with those chimeric RNA2 revealed that 2b gene or 3' UTR of CMV-CB7 RNA2 was responsible for the necrotic pathotype. Northern blotting analysis reflected that both necrotic and non-necrotic viruses accumulated to similar levels of genomic RNAs in host plants. Therefore, necrotic phenotype induced on *N. glutinosa* was not related to the level of accumulation of CMV genomic RNAs.

Key words *Cucumber mosaic virus*, *Nicotiana glutinosa*, necrotic pathotype, RNA2

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30671361).

**Corresponding author. Tel: 86-571-86843197, E-mail: chenjs@zstu.edu.cn

Received: May 7, 2007 Accepted: June 18, 2007