

黄瓜花叶病毒 2b 蛋白对寄主光合速率和叶绿体结构的影响 *

陈斐斐¹⁾ 杜志游^{1,2)} 刘 歆¹⁾ 谢 礼²⁾ 陈集双^{1)**}

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

摘要 黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)2b 蛋白作为重要致病因子的角色在茄科模式植物上已为广泛描述, 但其致病机理尚未廓清. 从寄主叶绿体结构和光合特征的角度探索了病毒侵染过程中 2b 蛋白对心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)的影响. 首先利用 PCR 方法导入突变位点, 构建了 2b 蛋白不表达的人工突变体 Fny-CMVΔ2bpro, 然后通过平行接种野生型 Fny-CMV 和 Fny-CMVΔ2bpro, 分析二者侵染后心叶烟的症状表现、叶绿素含量、光合速率以及叶绿体超微结构变化. 结果显示: 接种 30 天, Fny-CMV 侵染的心叶烟表现重花叶、畸形和矮化症状, 植株的光合速率和叶绿素含量显著降低, 叶绿体形态和结构发生明显病变. 但是, Fny-CMVΔ2bpro 侵染的心叶烟植株仅表现轻微花叶或不表现明显症状, 与健康对照相比, 其光合速率和叶绿素含量没有显著差异, 叶绿体形态和结构亦未出现明显病变. 由此可见, 野生型病毒侵染导致的相对低的光合速率和叶绿素含量, 与 2b 蛋白引起的叶绿体形态和结构的破坏有一定的相关性. RNA 杂交分析结果显示: 2b 蛋白的致病性与 CMV 子代 RNA 在寄主体内的积累量有关, 不表达 2b 蛋白使得 CMV 基因组 RNA1 和 RNA2 含量显著下降, 其亚基因组 RNA4 (编码 CP 蛋白)含量降低尤为显著.

关键词 黄瓜花叶病毒, 2b 蛋白, 光合速率, 叶绿体结构, 基因组含量

学科分类号 Q78

黄瓜花叶病毒 (Cucumber mosaic virus, CMV) 是雀麦花叶病毒科 (Bromoviridae) 黄瓜花叶病毒属 (Cucumovirus) 的典型成员. 1916 年首次报道^[1,2], 随后在世界广大地区有 CMV 分布与发生的报道. 该病毒寄主范围极广, 可侵染包括茄科、十字花科、豆科及葫芦科蔬菜等重要经济作物在内的 1 000 多种双子叶和单子叶植物^[3]. CMV 是三分体 RNA 病毒, 其基因组由 3 条正义单链 RNA 组成, 分别为 RNA1、RNA2 和 RNA3^[4], 它们共编码 1a、2a、2b、3a 和 CP(外壳蛋白)5 种蛋白质. CMV 的基因组 RNA2 除编码 2a 蛋白外, 还通过亚基因组 RNA4A 编码产生 2b 蛋白, 2b ORF 位于 RNA2 的 3'端, 与 2a ORF 的 3'端部分重叠, 但并非与 2a ORF 编码相同的氨基酸序列^[5]. 文献报道显示, 2b 蛋白参与致病^[6,7]、抑制寄主的转录后基因沉默^[8,9]以及影响病毒的长距离移动^[10]. 但是, 迄今为止有关其功能的机制尚未有系统研究. 光合作用是研究植物生理机能的重要指标, 也是目前植物感染病毒后机制研究的重要内容. 病毒侵染寄主后一般会影响寄主的光合作用^[11]. 有文献报道, 病毒的侵染导致

寄主叶绿体形态功能的破坏^[12-17]和光合速率的降低^[12,18-20], 从而影响寄主的光合作用. 有关 CMV 影响寄主的光合作用报道较少, 主要集中在表观生物学的描述, 较少涉及到致病机制^[18,21,22]. 王春梅等^[18]发现 CMV 侵染后寄主光合作用受到显著影响, 且光合活性受影响程度与症状直接相关. 然而, 作为重要致病因子的 2b 蛋白对寄主的光合生理的影响却未见报道.

为研究 2b 蛋白对寄主光合速率和叶绿体结构等光合生理指标的影响, 本研究对野生型 Fny-CMV 进行改造, 构建不表达 2b 蛋白的人工突变体 Fny-CMVΔ2bpro, 并分析野生型 Fny-CMV 和突变体 Fny-CMVΔ2bpro 分别侵染指示植物后的寄主表型、光合生理和组织结构等变化差异, 为 2b 蛋白参与致病的机制提供理论依据.

*国家自然科学基金资助项目(30671361)和科技部国际合作重点项目(2004DFA05000).

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

收稿日期: 2007-01-25, 接受日期: 2007-04-02

1.3 体外转录、植物接种和病毒粒子提取

分别以经 *Pst* I 酶切呈线性和 Klenow 大片段消化呈平末端的 pF209Δ2bpro、pF109、pF209 和 pF309 质粒为模板, 用 Large-scale *in vitro* transcription kit (Promega 公司, USA) 分别体外转录合成 fRNA2Δ2bpro、fRNA1、fRNA2 和 fRNA3. 体外转录产物经 RNase-free DNase RQ1 消化、乙醇-醋酸钠沉淀和浓度测定后, 以每种 RNA 200 ng 的量混合摩擦接种心叶烟. fRNA2Δ2bpro、fRNA1 和 fRNA3 混合接种心叶烟产生不表达 2b 蛋白的 Fny-CMVΔ2bpro 突变株; fRNA1、fRNA 2 和 fRNA 3 混合接种心叶烟产生野生型的 Fny-CMV; 以磷酸缓冲液 (0.2 mol/L, pH 7.4) 接种作为空白对照 (Mock). 参考 Palukaitis 和 Zaitlin^[24]方法从感病心叶烟系统叶组织中提取病毒粒子. 用 TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司, USA) 从病毒粒子中分离病毒基因组 RNA.

1.4 植物材料

心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*) 幼苗 22~28℃ 下, 培养于 14 h 光周期的植物培养室中, 4~5 片真叶期摩擦接种病毒 RNA^[25], 每个处理 6 株, 重复 2 次. 接种 3 天开始记录发病症状.

1.5 光合速率的测定

采用便携式光合测定系统 (LCpro⁺, ADC) 在植物接种后 10、20 和 30 天, 在 26℃ 恒温条件以及 800 μmol·m⁻²·s⁻¹ 光强下, 分别测定 Mock、Fny-CMV 和 Fny-CMVΔ2bpro 侵染的心叶烟植株顶部第 2 片系统叶的净光合速率 ($P_n/(\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$) 和胞间 CO₂ 浓度 ($C_i/(\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1})$).

1.6 叶绿素含量的测定

心叶烟在接种病毒 10、20 和 30 天, 取 Mock、Fny-CMV 和 Fny-CMVΔ2bpro 接种的心叶烟系统叶组织各 0.1 g, 用 80% 丙酮提取叶绿素, 然后用分光光度计测定萃取溶液的 $A_{645\text{nm}}$ 和 $A_{663\text{nm}}$ 值, 根据 Arnon 公式计算叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量^[26].

叶绿素 a 含量 (chl a) = $(12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645})V/(1000 \text{ m})$

叶绿素 b 含量 (chl b) = $(22.9 \times A_{645} - 4.86 \times A_{663})V/(1000 \text{ m})$

1.7 电镜观察组织超微结构病变

接种 20 天, 取 Mock、Fny-CMV 和 Fny-

CMVΔ2bpro 分别接种的心叶烟系统叶组织, 按常规戊二醛-锇酸方法双固定、Epon812 (A:B=1:6) 包埋、超薄切片, 再经醋酸双氧铀及柠檬酸铅双染色后, 置电镜下观察组织病变情况^[27].

1.8 病毒基因组子代 RNA 及其亚基因组 RNA 积累量的分析

植物接种后 10、20 和 30 天, 用 TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司) 分别提取感病和 Mock 接种的心叶烟顶部往下第 2 片系统叶的组织总 RNA, RNA 变性后电泳, 参照常规模 RNA 杂交方法^[28], 用 ³²P 标记的寡聚 DNA 探针分析系统叶组织总 RNA 中病毒子代基因组 RNA 和亚基因组 RNA 的积累情况. 该探针 (5' ACTGACCATTCTTAGCCGTAAGCTGG-ATTGGACAACCCGTTC 3') 完全互补于 CMV 各基因组 RNA 3' UTR 的一段保守序列^[29].

2 结 果

2.1 2b 蛋白不表达突变体的生物学活性及其稳定性

以重组质粒 pF209Δ2bpro 为体外转录模板, 体外转录产物与 fRNA1 和 fRNA3 混合接种心叶烟, 获得 2b 蛋白不表达突变体 Fny-CMVΔ2bpro. 接种该突变体后 5~7 天, 植株表现轻花叶症状, 但随着接种时间的延长, 症状反而减轻, 20 天后很难观察到症状. 取接种 Fny-CMVΔ2bpro 14 天的系统叶组织转接心叶烟, 转接 2 次. 从扩繁后 14 天的心叶烟系统叶组织中提纯病毒粒子, 以从病毒粒子中提取的 RNA 作为模板, 用引物对 C2F1856/C123R 进行 RT-PCR 扩增, 获得与预期大小 (约 1.2 kb) 相符的条带 (结果未显示). 扩增获得的 DNA 片段经 TA 克隆和测序分析, 显示 Fny-CMVΔ2bpro RNA2 序列的人工突变位点没有出现任何变异或回复突变. 以上结果说明了本实验构建的 2b 蛋白不表达突变体 Fny-CMVΔ2bpro 具有生物学活性, 并能稳定遗传.

2.2 寄主生物学表型的差异

野生型 Fny-CMV 和 2b 蛋白不表达突变体 Fny-CMVΔ2bpro 侵染心叶烟早期均表现轻花叶症状; 随着症状发展, 前者则引起重花叶、畸形叶和严重矮化症状, 后者则仍然仅表现轻花叶症状或症状消失 (图 2).



Fig. 2 Symptoms on *Nicotiana glutinosa* inoculated with Fny-CMV and Fny-CMVΔ2bpro at 20 days post-inoculation

(a) Mock. (b) Fny-CMV. (c) Fny-CMVΔ2bpro.

2.3 光合速率的测定结果

净光合速率测定的结果显示(图 3a): 接种后 10、20 和 30 天, Fny-CMVΔ2bpro 侵染的心叶烟的净光合速率显著高于 Fny-CMV 侵染的心叶烟, 但与 Mock 相比, 在接种后 10 天和 20 天, Fny-CMVΔ2bpro 侵染的心叶烟的净光合速率略低, 在接种后 30 天, Fny-CMVΔ2bpro 侵染心叶烟的净光合速率稍高于 Mock. 统计分析净光合速率的结果

表明: Fny-CMVΔ2bpro 与 Fny-CMV 之间存在极显著差异 ($P = 0.0000$), 然而, 前者与 Mock 对照之间则不存在显著性差异 ($P = 0.5241$). 胞间 CO_2 浓度测定结果如图 3b 所示: 心叶烟植株接种后 10、20 和 30 天, Fny-CMV 侵染的心叶烟的胞间 CO_2 浓度显著低于 Mock 和 Fny-CMVΔ2bpro 接种的心叶烟植株 ($P = 0.0000$).

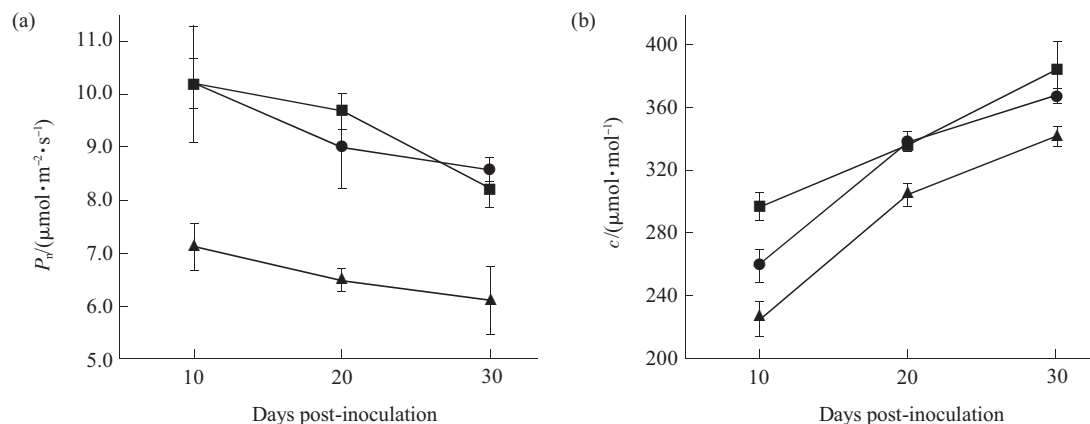


Fig. 3 Effect of virus infection on the net photosynthetic rate (a) and intercellular CO_2 concentration (b)

■—■: Mock; ●—●: Fny-CMVΔ2bpro; ▲—▲: Fny-CMV.

2.4 叶绿素含量的测定结果

在接种后 10、20 和 30 天, 对 Mock、Fny-CMV 和 Fny-CMVΔ2bpro 接种植株的叶绿素 a (chl a) 和叶绿素 b (chl b) 含量进行了测定, 并对所测得结果进行统计分析. 结果表明(图 4): chl a 和 chl b 的总变化趋势基本相似, Mock 和 Fny-CMVΔ2bpro 接种的心叶烟 chl a 和 chl b 含量均无显

著差异 ($P > 0.05$), 尽管在接种后 10 天, Mock、Fny-CMVΔ2bpro 和 Fny-CMV 三者在 chl a 和 chl b 含量上不存在显著性差异 ($P > 0.05$), 但是, 在接种后 20 天和 30 天, Fny-CMV 侵染的心叶烟 chl a 和 chl b 含量显著低于 Mock 对照和 Fny-CMVΔ2bpro 侵染的心叶烟 ($P = 0.0000$).

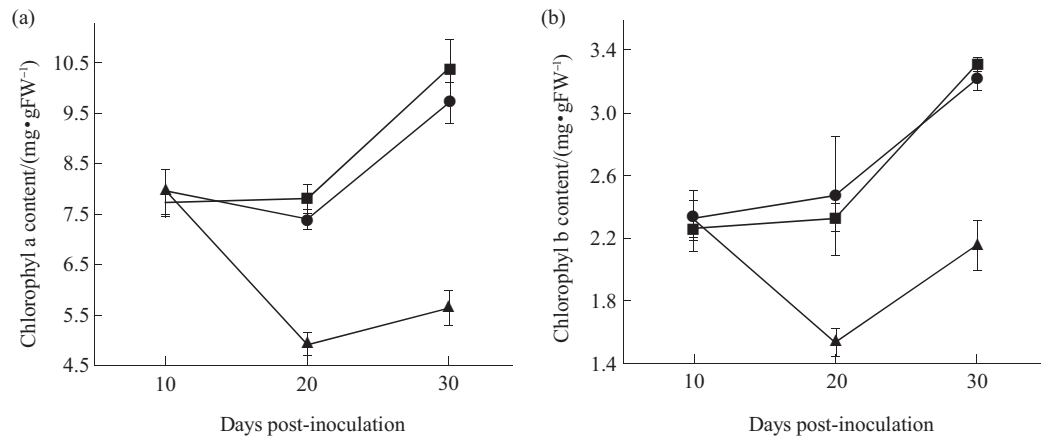


Fig. 4 Change of chlorophyll a (a) and chlorophyll b (b) contents in *Nicotiana glutinosa* plants infected with Fny-CMV and Fny-CMVΔ2bpro

■—■: Mock; ●—●: Fny-CMVΔ2bpro; ▲—▲: Fny-CMV.

2.5 电镜观察结果

电镜观察 Mock、Fny-CMV 和 Fny-CMVΔ2bpro 接种 20 天的心叶烟叶肉细胞中叶绿体形态病变情况显示(图 5): Fny-CMVΔ2bpro 侵染的

心叶烟系统叶细胞叶绿体形态基本正常, 叶绿体结构完整, 然而, 野生型 Fny-CMV 侵染的心叶烟等位细胞的叶绿体出现形态肿胀和普遍空泡化.

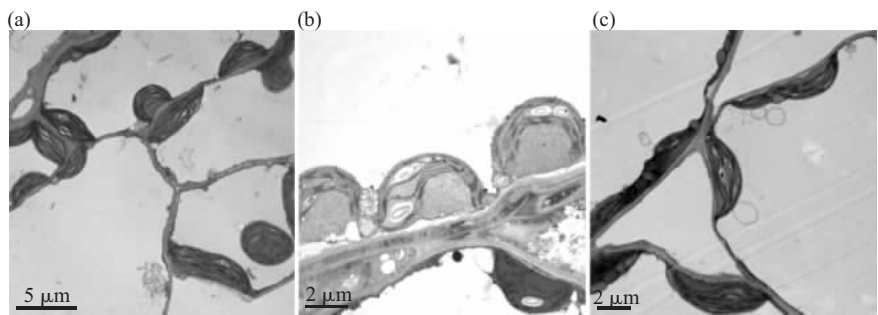


Fig. 5 Ultra-structures of chloroplasts affected by infection with Fny-CMV and Fny-CMVΔ2bpro at 20 days post-inoculation

(a) Mock. (b) Fny-CMV. (c) Fny-CMVΔ2bpro.

2.6 RNA 印迹结果

为研究 2b 基因不表达导致 Fny-CMV 在心叶烟上的高致病性消失是否与病毒子代 RNA 的积累量有关, 我们通过 RNA 印迹分析了 Fny-CMV 和 Fny-CMVΔ2bpro 病毒子代 RNA 在心叶烟系统叶组织中的积累水平. 结果显示(图 6): 在接种 10 天和 20 天, Fny-CMV 与 Fny-CMVΔ2bpro 的 RNA3 有着相似的积累量, 但是, 前者的基因组 RNA1 和 RNA2 及亚基因组 RNA4(编码 CP 蛋白)和 4A(编码

2b 蛋白)的积累量显著高于后者; 接种 30 天, 野生型 Fny-CMV 亚基因组 RNA4 和 RNA4A 的积累量显著高于 Fny-CMVΔ2bpro, 但是二者 RNA1, 2 和 3 的含量没有明显差异. 这说明了 2b 蛋白的表达与否直接影响 CMV 病毒基因组在寄主体内的积累水平, 也表明 2b 蛋白在心叶烟植株上介导的致病性(包括寄主生物学表型和细胞超微结构病变)与病毒子代 RNA 的积累量有关, 特别是 RNA4 的积累水平.

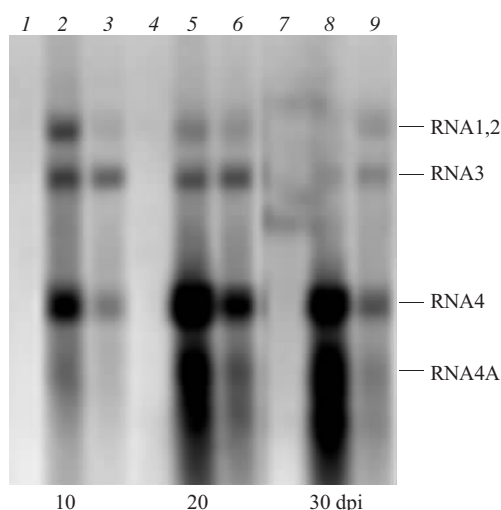


Fig. 6 Northern blotting analysis for progeny RNAs of Fny-CMV and Fny-CMVΔ2bpro in systemic leaves

Total RNAs were isolated from host seedlings at 10 days post-inoculation (dpi), 20 dpi and 30 dpi (indicated on the lower). The inocula are indicated on the upper. The positions of RNAs 1, 2, 3, 4, and 4A are indicated on the right. 1: Mock; 2: Fny-CMV; 3: Fny-CMVΔ2bpro; 4: Mock; 5: Fny-CMV; 6: Fny-CMVΔ2bpro; 7: Mock; 8: Fny-CMV; 9: Fny-CMVΔ2bpro

3 讨 论

CMV 2b 蛋白在多数茄科作物上作为重要致病因子已在模式株系 Fny-CMV 和 Q-CMV 中均得到验证^[10,30]. Ding 等^[10]在 Q-CMVΔ2b ORF 中插入终止密码子, 获得了在寄主体内不表达 2b 蛋白的 Q-CMVΔ2b 突变体, 该突变体侵染心叶烟后表现较野生型 Q-CMV 更轻微的症状. 利用同样的方法将 Fny-CMVΔ2b ORF 的第 2 个氨基酸密码子替换为终止密码子, 但是, 所构建的突变体在寄主体内会从 2b ORF 的第 8 个密码子 (AUG) 起始翻译, 产生缺失 N 端 7 个氨基酸的不完整 2b 蛋白^[31]. 由此可见, 仅仅通过碱基替换在 2b ORF 中插入终止密码子并不能阻止 Fny-CMVΔ2b 蛋白的表达. Soards 等^[30]通过删除 2b ORF 的核苷酸序列成功地构建了 Fny-CMVΔ2b 突变体, 但是, 该突变体缺失 2b ORF 的同时也缺失了 2a ORF 的 3' 端序列, 因此, 并不能排除 2a 3' 端影响致病性的可能性. 因此, 为了不影响 2a 蛋白的完整性和不明显影响 RNA2 核苷酸序列, 本研究在将 2b ORF 的第 2 个氨基酸的密码子替换成终止密码子的基础上, 突变了 2b ORF 的第 8 位和第 18 位的编码甲硫氨酸的密码子, 完全控制了 2b 蛋白的表达.

2b 蛋白在寄主体内的表达往往导致寄主出现

矮化、花叶、畸形叶等症状, 然而, 2b 蛋白的不表达则显著降低了 CMV 的致病性, 寄主生长从生物学表型上看没有受到显著影响^[10,30]. 光合作用是植物正常生长的一个必要条件. 2b 蛋白介导的高致病性是否与光合作用有着一定的相关性? 为此, 本研究从光合成速率、叶绿素 a 和 b 的含量、细胞形态和叶绿体形态与结构等方面对野生型 Fny-CMV 和 2b 蛋白不表达突变体 Fny-CMVΔ2bpro 进行了比较, 发现野生型 Fny-CMV 侵染心叶烟后导致寄主净光合速率的降低, 这与已报道的一些病毒对植物光合作用的影响相一致, 如受芜菁花叶病毒侵染的芥菜^[12]和萝卜等^[19]. 据 Farquhar 和 Sharkey^[32]指出, 胞间 CO₂ 浓度是判断光合速率变化的主要依据, 寄主受到病毒侵染胁迫后致使寄主胞间 CO₂ 浓度降低和净光合速率降低. 我们已经发现^[19]: 净光合速率降低, 核酮糖 -1,5- 二磷酸 (ribulose-1,5-bisphosphate, RuBP) 的再生速率也会受到限制, 低活性的核酮糖 -1,5- 磷酸二氢盐羧基酶、氧化酶 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBPCO) 不能满足被病毒侵染后植物高浓度的胞间 CO₂ 的吸收. 可见, 植物光合作用的净光合速率与胞间 CO₂ 浓度成反比关系, 即净光合速率降低意味着胞间 CO₂ 浓度升高. 本研究测定的野生型 Fny-CMV 侵染的心叶烟净光合速率和胞间 CO₂ 浓度之间亦呈反比关系, 与我们在十字花科寄主上发现的现象一致. 另外, 野生型 Fny-CMV 侵染心叶烟后表现的高致病性和低净光合速率, 2b 蛋白不表达的 Fny-CMVΔ2bpro 突变体侵染植物后表现与 Mock 接种植物相似的表型, 说明植物受病毒侵染后表现的症状与光合成受影响的程度相关. 王春梅等^[18]也报道了光合活性受影响的程度与症状直接相关. 以上结果也说明 2b 蛋白的表达直接或间接地降低了心叶烟植物的净光合速率.

自 Balachandran 等^[20]证实了植物感染病毒后叶绿素含量下降、光合速率降低的普遍生理现象后, 针对病毒侵染后植物细胞叶绿体的形态和功能研究成为探讨植物病生理机制的热点之一. 叶绿体病变是病毒侵染植物后细胞内组织病变的重要依据, 病毒侵染植物后会造成细胞中叶绿体数量降低、形态结构破坏、功能受损^[13,14]. 本文的研究结果显示: 野生型 Fny-CMV 侵染后心叶烟细胞叶绿体形态肿胀, 出现空泡, 然而, Fny-CMVΔ2bpro 侵染的心叶烟细胞中未见以上叶绿体结构的病变, 而与 Mock 植株相似. Jockusch 等^[15]指出, 病毒侵染导致

寄主的叶绿素含量降低是因为叶绿体结构发生破坏所致. Guo 等^[12]也指出病毒侵染后叶绿素含量明显降低. 在本研究中, Fny-CMV 侵染导致叶绿素含量显著降低, 而 Fny-CMV Δ 2bpro 侵染对寄主叶绿素含量没有明显影响.

Reinero 等^[16,17]发现, 烟草花叶病毒(TMV)的 CP 在叶绿体内的积累阻止了光合作用电子在传递链中的电子传递, 导致叶绿素降解、叶绿体结构和功能破坏. 朱水芳等^[33]检测到 CMV 的 CP 存在于感病烟草的叶绿体中, CP 的浓度与植物受病毒侵染后表现的症状呈正相关. Hsu 等^[34]发现, 强毒株 CMV 的 CP 在寄主植物中有一定的积累, 而弱毒株 CMV 的 CP 在寄主植物中没有积累. 本研究中 RNA 印迹结果显示, Fny-CMV Δ 2bpro 侵染后的子代 RNA4 的积累量(编码 CP 蛋白)明显低于野生型 Fny-CMV 侵染后的子代 RNA4 的积累量, 这说明, CP 的浓度不仅与植物受病毒侵染后症状的发生程度有关, 而且子代 CP 的高表达很可能是 2b 蛋白在心叶烟植株上介导致病性的主要原因.

总之, Fny-CMV 2b 蛋白在寄主体内的表达介导了该病毒对心叶烟的高致病性, 导致叶绿体结构的破坏, 降低了叶绿素 a 和 b 的含量, 从而抑制了植物的光合成速率. 野生型 CMV 的高致病性还与 Fny-CMV 子代 RNA 在寄主体内的高积累量有关.

参 考 文 献

- Doolittle S P. A new infectious mosaic disease of cucumber. *Phytopathology*, 1916, **6** (2):145~147
- Jagger I C. Experiments with the cucumber mosaic disease. *Phytopathology*, 1916, **6** (2):149~151
- Palukaitis P, Roossinck M J, Dietzgen R G, *et al.* Cucumber mosaic virus. *Adv Virus Res*, 1992, **41**: 281~348
- Peden K W, Symons R H. Cucumber mosaic virus contains a functionally divided genome. *Virology*, 1973, **53** (2): 487~492
- 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
- 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
- Shi B J, Palukaitis P, Symons R H. Differential virulence by strains of Cucumber mosaic virus is mediated by the 2b gene. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2002, **15** (9): 947~955
- Brigneti G, Voinnet O, Li W X, *et al.* Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana Benthamiana*. *Eur Mol Biol Organ J*, 1998, **17** (22): 6739~6746
- Guo H S, Ding S W. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *Eur Mol Biol Organ J*, 2002, **21** (3): 398~407
- 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. *Eur Mol Biol Organ J*, 1995, **14**(23): 5762~5772
- Culver J N, Lindbeck A G C, Dawson W O. Virus-host interactions: induction of chlorotic and necrotic responses in plants by tobacco mosaic virus. *Annu Rev Plant Pathol*, 1991, **29**: 193~217
- Guo D P, Guo Y P, Zhao J P, *et al.* Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after turnip mosaic virus infection. *Plant Science*, 2005, **168** (1): 57~63
- Funayama S, Sonoike K, Terashima I. Photosynthetic properties of leaves of *Eupatorium makinoi* infected by a geminivirus. *Photosynth Res*, 1997, **53** (2-3): 253~261
- 郭兴启, 李向东, 朱汉城, 等. 马铃薯 Y 病毒(PVY)的侵染对烟草叶片光合作用的影响. *植物病理学报*, 2000, **30** (1): 94~95
- Guo X Q, Li X D, Zhu H C, *et al.* *Acta Phytopathologica Sinica*, 2000, **30** (1): 94~95
- Jockush H, Jockusch B. Early cell death caused by TMV mutants with defective coat proteins. *Mol Gen Genet*, 1968, **102** (3): 204~209
- Reinero A, Beachy R N. Association of TMV coat protein with chloroplast membranes in virus-infected leaves. *Plant Mol Biol*, 1986, **6** (5): 291~301
- Reinero A, Beachy R N. Reduced photosystem II activity and accumulation of viral coat protein in chloroplasts of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Plant Physiol*, 1989, **89** (4): 111~116
- 王春梅, 施定基, 朱水芳, 等. 黄瓜花叶病毒对烟草叶片和叶绿体光合活性的影响. *植物学报*, 2000, **42** (4): 388~392
- Wang C M, Shi D J, Zhu S F, *et al.* *Acta Botan Sin*, 2000, **42** (4): 388~392
- Guo Y P, Guo D P, Peng Y, *et al.* Photosynthetic responses of radish (*Raphanus sativus* var. *longipinnatus*) plants to infection by turnip mosaic virus. *Photosynthetica*, 2005, **43** (3): 457~462
- Balachandran S, Hull R J, Martins R A, *et al.* Influence of environmental stress on biomass partitioning in transgenic tobacco plants expressing the movement protein of tobacco mosaic virus. *Plant Physiol*, 1997, **114** (2): 475~481
- Hull R. *Matthew's plant Virology*. 4th. San Diego: Academic Press, 2002. 426~436
- Balachandran S, Hurry V M, Kelley S E, *et al.* Concepts of plant biotic stress: some insights into the stress physiology of virus-infected plants from the perspective of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 1997, **100** (2): 203~213
- Rizzo T M, Palukaitis P. Construction of full-length cDNA clones of cucumber mosaic virus RNAs 1, 2 and 3: generation of infectious RNA transcripts. *Mol Gen Genet*, 1990, **222** (2-3): 249~256
- Palukaitis P, Zaitlin M. Satellite RNAs of cucumber mosaic virus: characterization of two new satellites. *Virology*, 1984, **132** (2): 426~435
- Feng J L, Chen S N, Tang X S, *et al.* Quantitative determination of cucumber mosaic virus genome RNAs in virions by real-time

- reverse transcript-polymerase chain reaction. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2006, **38** (10): 669~676
- 26 Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 1949, **24** (1): 1~15
- 27 陈集双, 周雪平. 九种 Potyviruses 柱状内含体结构的比较研究. *电子显微学报*, 1995, **14**(1): 39~46
- Chen J S, Zhou X P. *J Chin Electron Microscopy Society*, 1995, **14** (1): 39~46
- 28 Sambrook J, Russell D W. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 7.42~7.50
- 29 McGarvey P, Tousignant M, Geletka L, *et al*. The complete sequence of a cucumber mosaic virus from *Ixora* that is deficient in the replication of satellite RNAs. *J Gen Virol*, 1995, **76** (9): 2257~2270
- 30 Soards A J, Murphy A M, Palukaitis P, *et al*. Virulence and differential local and systemic spread of cucumber mosaic virus in tobacco are affected by the CMV 2b protein. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2002, **15** (7): 647~653
- 31 Palukaitis P, Garica-Arenal F. Cucumoviruses. *Adv Virus Res*, 2003, **62**: 241~323
- 32 Farquhar G D, Sharkey T D. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol*, 1982, **33**: 317~345
- 33 朱水芳, Francki R I B. 黄瓜花叶病毒衣壳蛋白存在于被侵染的烟草叶绿体中. *中国病毒学*, 1992, **7**(3): 328~333
- Zhu S F, Francki R I B. *Virol Sin*, 1992, **7**(3): 328~333
- 34 Hsu Y H, Tsai WS, Chu C L, *et al*. Association of CMV coat protein and RNA, with chloroplast in tobacco. *Proceedings of the Annual Meeting of the Amer Phytopathological Soc*, Albuquerque, NM, 1994. 6~10

Effect of Cucumber Mosaic Virus-encoded 2b Protein on Photosynthesis and Chloroplast Structure of The Host Plant*

CHEN Fei-Fei¹⁾, DU Zhi-You^{1,2)}, LIU Xin¹⁾, XIE Li²⁾, CHEN Ji-Shuang^{1)**}

¹⁾ Institute of Bioengineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

²⁾ College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract The 2b protein encoded by Cucumber mosaic virus (CMV) plays an important pathogenicity role in many solanaceous hosts, but mechanism of inducing disease is still unknown. In order to investigate virulence of the 2b protein on *Nicotiana glutinosa* plants, in terms of chloroplast structure and photosynthesis, a mutant Fny-CMVΔ2bpro, which cannot express the 2b protein, was achieved by introducing mutant sites in the 2b gene of Fny-CMV. *N. glutinosa* seedlings were inoculated with wild-type Fny-CMV and the mutant Fny-CMVΔ2bpro, and were analyzed for symptom expression, chlorophyll content, photosynthetic rate, and ultra-structural alteration of chloroplast. Up to 30 days post inoculation, wild-type Fny-CMV caused symptoms of severe mosaic, leaf deformation, and stunting, reduced photosynthetic rate and chlorophyll content, and altered the ultra-structure and morphological characters of the chloroplasts. However, host seedlings inoculated with the mutant Fny-CMVΔ2bpro expressed only slight mosaic symptom. Their photosynthetic rates and chlorophyll contents were not significantly different from those of the mock-inoculated plants, and the ultra-structure and morphological characters of their chloroplasts appeared to be normal. The observed low photosynthetic rates and chlorophyll contents were related to the breakage of the chloroplast morphology and ultra-structure. Results of Northern blotting showed that the virulence of 2b protein was associated with high accumulation level of CMV progeny RNAs in systemic leaves. Non-expression of the 2b protein reduced the accumulation levels of its genomic RNAs 1 and 2. The level of subgenomic RNA4, encoding CP protein, was found to be significantly decreased.

Key words Cucumber mosaic virus (CMV), 2b protein, photosynthetic rate, chloroplast structure, RNA accumulation

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30671361) and The National Key Research Project of International Cooperation of China (2004DFA05000).

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

Received: January 25, 2007 Accepted: April 2, 2007