

黄瓜花叶病毒致弱卫星 RNA 对辅助病毒含量的影响*

柴立红¹⁾ 陈集双²⁾** 陈子元¹⁾

(¹⁾浙江大学原子核农业科学研究所, 杭州 310029; ²⁾浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018)

摘要 为研究黄瓜花叶病毒 (CMV) 弱病毒株的基因组 RNA 和卫星 RNA 的含量变化, 将一个卫星 RNA 介导的 CMV 弱病毒株 NDM-1 与 CMV 强毒株在 4 种寄主系统上进行对照实验. 采用 RNA 点杂交方法, 检测从早期接种病毒到大田释放阶段 (病毒接种后 5 到 40 天), 寄主植物叶组织中的基因组 RNA 和卫星 RNA 的相对含量变化. 结果显示: 弱病毒株 NDM-1 基因组 RNA 和卫星 RNA 负荷量具有寄主效应和时间效应, 趋势一致但程度不同. 它们在番茄上的变化规律不同于其他寄主而且病毒的致弱效果最明显: 在接种后的 5~10 天 (生产上接种育苗的保护期), 基因组 RNA 和卫星 RNA 相对含量上升, 到 40 天 (大田释放期) 时回落至最低. 比较 NDM-1 于不同时间在各寄主上的卫星 RNA 和基因组 RNA 的相对比值: 在 40 天时, 寄主番茄上的相对比值达 15.8, 与在其他寄主上和其他时间段比较均有显著差异, 即此时卫星 RNA 达到含量优势. 说明弱病毒 NDM-1 在番茄上的致弱机制为: 卫星 RNA 的大量复制对 CMV 基因组 RNA 产生抑制作用. 此弱病毒株在烟草和心叶烟中的变化规律基本一致.

关键词 黄瓜花叶病毒, 致弱卫星 RNA, 含量变化, 寄主效应, 时间效应

学科分类号 Q785

黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV) 是典型细胞质复制的 RNA 病毒, 具有高拷贝、复制快的特点, 在寄主植物的薄壁组织上往往达到极高的病毒含量, 产生花叶症状并导致明显减产. 该病毒可经 60 多种蚜虫迅速传播, 具有广泛的寄主范围, 能够侵染 800 多种植物. 因其发生的普遍性与所引起病害的严重性, 黄瓜花叶病毒在全球范围内已经成为蔬菜、观赏植物、豆类及其他作物上危害最严重的植物病毒^[1,2], 也是目前研究最多的植物病毒之一^[3]. CMV 的卫星 RNA (satellite RNA, satRNA) 是单纯的小分子 RNA, 寄生于 CMV, 本身不具备编码外壳蛋白的功能, 而依赖于辅助病毒进行拷贝和复制^[3]. 卫星 RNA 种类繁多, 就目前所知, 卫星 RNA 参与辅助病毒症状影响的方式多表现为减轻病毒症状, 即卫星 RNA 的存在使辅助病毒的复制受抑制, 导致 CMV 对寄主的危害程度下降^[1,4~7]. 另一些卫星 RNA 则加重辅助病毒的侵染症状^[8,9], 引起寄主植物产生快速应急反应, 导致植株坏死和整株死亡^[8,10,11]. 携带卫星 RNA 的 CMV 在不同的寄主植物上表现为不同的侵染症状^[12]. 携带卫星 RNA 的病毒株在寄主植物上的表现由卫星 RNA、辅助病毒及寄主三方相互作用、共同影响决定, 成为一个复杂的互作过程^[12].

由于对植物病毒至今仍无有效的治疗方法, 而

致弱卫星 RNA 却对辅助病毒有减轻症状作用, 并可有效抑制辅助病毒的侵染, 因此致弱卫星在预防病毒侵染上具有重要的应用价值^[1,13], 并在日本、中国、意大利等一些国家取得了较好的研究进展和商业应用^[14,15]. 但是, 有关 CMV 致弱卫星 RNA、辅助病毒及寄主三者之间相互作用的关系及机制的研究鲜见报道. 我国科学家发现卫星 RNA 在体外能够有效抑制基因组 RNA 的复制^[16]. 但是, 对于致弱病毒之卫星 RNA 与辅助病毒基因组 RNA 在系统寄主中的定量规律, 至今没有研究. 另外, 同一“弱病毒株”在不同系统寄主上产生的效果不同. 理论依据的不足, 使人们对大面积释放致弱病毒产生担忧. NDM-1 是已应用于日本田间以致弱卫星 RNA 介导的一个 CMV 弱病毒株, 寄主生物学反映显示: NDM-1 在日本等国的番茄上具有明显减弱黄瓜花叶病毒侵染症状的作用, 但在其他供试茄科植物 (甜椒) 上的保护作用不明显^[17]. 这些现象都没有获得分子生物学的解释, 可能造成人们在使用卫星 RNA 介导弱病毒防治时产生新的疑惑. 本实验室在建立了对系统侵染寄主中 CMV 基因组 RNA

* 国家自然科学基金资助项目 (30270744).

** 通讯联系人.

Tel: 0571-86971586, E-mail: mmlab@zju.edu.cn

收稿日期: 2004-03-12, 接受日期: 2004-04-30

和卫星 RNA 相对含量变化研究条件的基础上^[18], 为进一步研究致弱卫星 RNA 对辅助病毒拷贝和复制的影响, 采用 NDM-1 与 4 种 CMV 常见寄主作为实验体系, 研究从早期接种到大田释放阶段几种常见的系统侵染的寄主植物中弱病毒株基因组 RNA 及其卫星 RNA 的变化规律. 同时, 以不携带卫星 RNA 的 CMV 番茄分离物 HT01C03 (简称 HC3) 和烟草花叶病毒 TMV (tomato mosaic virus) 作为两个阴性对照, 并以携带卫星的 CMV 番茄强毒株 HT01C04 (简称 HC4) 作为阳性对照进行检测.

1 材料与方法

1.1 病毒毒源

番茄弱病毒株 NDM-1 为日本 NDM 公司提供的 CMV 弱病毒株, 该分离物携带一组减弱 CMV 症状的卫星 RNA. 其余的病毒分离物均为本实验室分离或保存^[19]. HC4: 分离自番茄, 为携带一个“坏死”卫星 RNA 的 CMV 番茄强毒株; HC3: 分离自番茄, 不携带卫星 RNA; TMV: 分离自非洲食叶茄子 (*Solanum macrocarpon* L.), 接种前在烟草上活化.

1.2 病毒接种

供试病毒分离物于接种前 7 天, 分别在心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*) 上转接, 以获得高侵染力的毒源. 实验植物分别为: 番茄 (*Lycopersicon esculenta*)、烟 (*N. tabacum*)、心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*) 和葫芦 (*Cucurbita pepo*).

在防虫、控温、控光的条件下, 培养长势和大小基本一致的寄主植物, 每种处理 6 盆 (2 株/盆, 控温 18~21℃, 光照 12L:12D); 采用常规汁液摩擦方法接种病毒.

1.3 cDNA 克隆、DNA 模板的制备, 病毒侵染植株中总 RNA 的提取和点杂交反应

将弱病毒株 NDM-1 和不携带卫星的阴性对照病毒株 HC3、TMV 及带 satRNA 的阳性对照 HC4 病毒株在温室条件下接受感染, 在第 5 天、10 天和 40 天, 定量提取 0.2 g 鲜叶组织中的总 RNA, 分别用 RNA3 探针和 satRNA 探针进行点杂交^[18,20].

1.4 放射性活度测定和数据处理

用放射性成像且检测放射性活度的 FUJIFILM BAS-1800 激光磷屏分析仪, 于暗盒内将磷屏感光杂交尼龙膜 2 h, 扫描读取感光屏上所形成的杂交图像, 测定反映放射性活度的曝光黑度 photo

stimulated luminescence (PSL). 杂交膜上各斑点的曝光度 PSL 值对应于各处理的靶 RNA 相对浓度. 对不同处理组织中的 CMV 基因组 RNA 和卫星 RNA 的负荷量进行方差分析和差异显著性分析^[18,20].

2 结果与讨论

2.1 CMV-RNA3 的基因组含量变化

弱病毒株 NDM-1 和对照病毒接种 4 种不同寄主后的第 5 天、10 天和 40 天时, 寄主叶组织中病毒基因组 RNA 杂交结果见图 1a.

用激光荧屏分析仪所带的软件直接读取尼龙膜上的 PSL 值, PSL 值代表 CMV 基因组 RNA 的相对含量, 其变化趋势见图 2a.

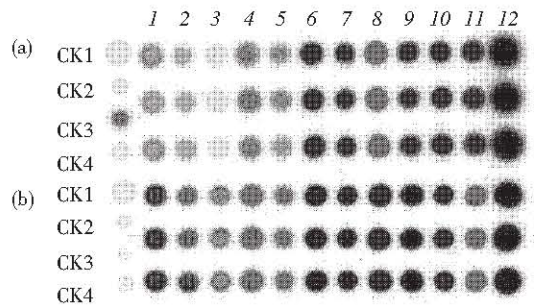


Fig. 1 Dot hybridization of NDM-1 genomic RNA (a) and satRNA (b)

1, 4, 8: *N. tabacum* 40 d, 10 d, 5 d respectively. 2, 5, 9: *N. glutinosa* 40 d, 10 d, 5 d. 3, 6, 10: tomato 40 d, 10 d, 5 d. 7: *Cucurbita pepo* 5 d. CK1, CK2: TMV on *N. tabacum* 40 d, 5 d. CK3, CK4: HC3 on tomato 40 d, 5 d. 11, 12: HC4 on tomato 40 d, 10 d.

分析图 1a 和图 2a, 阴性对照 CK1 和 CK2 明显不含 CMV RNA, 另一对照 CK3 和 CK4 为不携带卫星的 CMV 分离物 HC3, 阳性对照 11 和 12 为分离自番茄且含高拷贝卫星 RNA 的 HC4, 它在番茄上的病毒基因组 RNA 负荷量显著高于 NDM-1 对应接种时间的负荷量, 证明弱病毒致弱特性的分子机制, 即弱病毒在其主要寄主番茄叶组织中病毒负荷量保持较低. 弱病毒株 NDM-1 基因组 RNA 负荷量在不同寄主上表现不同的时间变化特点, 接种番茄的变化趋势有别于其他寄主, 从另一方面说明其寄主选择性. 其接种番茄 5 天、10 天和 40 天病毒 RNA 含量呈现为从低到高、再回落的趋势, 到第 40 天时, 在各寄主中的含量最低. 这一结果为选择番茄作为弱病毒繁殖寄主的生产实践提供了理论依据.

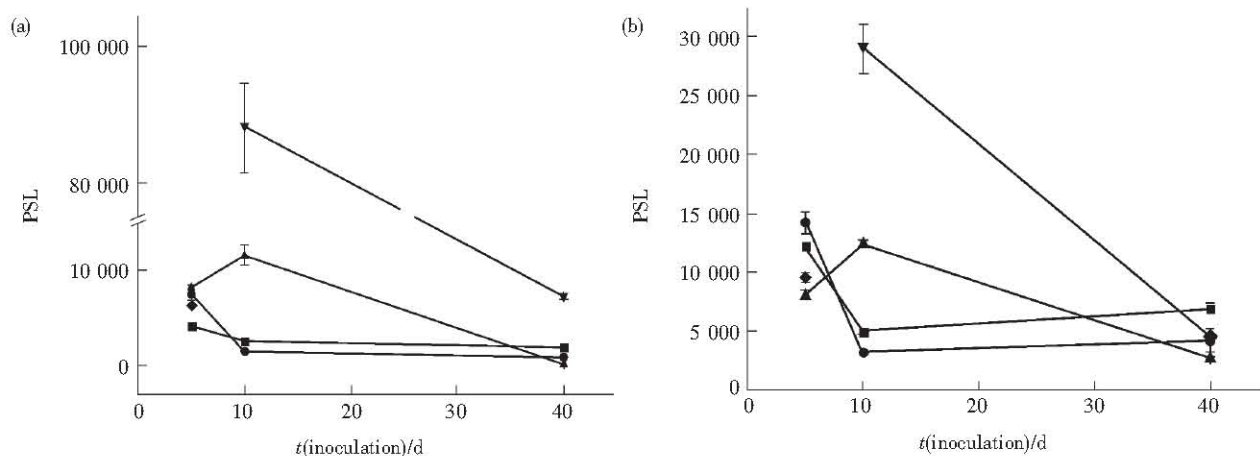


Fig. 2 Variation trend of NDM-1 genomic RNA (a) and satRNA (b)

■—■: *N. tobacum*; ●—●: *N. glutinosa*; ▲—▲: tomato; ▼—▼: HT01C04 in tomato; ◆—◆: *Cucurbita pepo*.

2.2 卫星 RNA 的含量变化

弱病毒株 NDM-1 卫星 RNA 负荷量在以上处理中显示更显著的寄主效应和时间效应, 其大致趋势与基因组 RNA 负荷量相似, 但程度不同, 如图 1b 和图 2b. 卫星 RNA 负荷量在番茄上的时间变化特点明显不同于在其他寄主上所表现的规律, 而与基因组 RNA 的变化趋势一致. 在接种 40 天即大田释放期, 番茄上的卫星 RNA 相对负荷量最低. 说明致弱卫星 RNA 与辅助病毒一样具有寄主选择性.

将弱病毒株 NDM-1 在各寄主上的卫星 RNA 负荷量与基因组 RNA 负荷量相比, 比值随寄主和接种时间的变化见图 3 所示. 同样接种番茄, NDM-1 的卫星 RNA 与基因组 RNA 相对负荷量的比值与对照强毒株 HC4 比较具有显著区别. 弱毒株在 5~10 天(生产上接种育苗的保护期)期间, 此比值基本不变, 保持在 1 倍左右, 但在 40 天(大田释放期)时, 卫星 RNA 含量与基因组 RNA 含量的相对比达 15.8 倍, 说明此时弱病毒卫星 RNA 的拷贝和复制相对基因组 RNA 剧增, 而同期对照强毒株 HC4 则仍保持 10 天时的比值, 由此说明, 弱病毒 NDM-1 的致弱机制为卫星 RNA 的拷贝和复制对基因组 RNA 的拷贝和复制具有抑制作用. 弱病毒株在接种其他寄主(如心叶烟、普通烟和葫芦等)时, 相互之间的卫星 RNA 与基因组 RNA 的比值均没有表现显著性差异, 在不同的接种时间(5 天、10 天和 40 天)之间, 其比值改变也较平缓, 与它在番茄上的表现有显著差异. 进一步说明弱病毒株 NDM-1 卫星 RNA 与辅助病毒的相对负荷量在番茄上是特例, 而在其他情况下未明显受寄主效应和时间效应的影响.

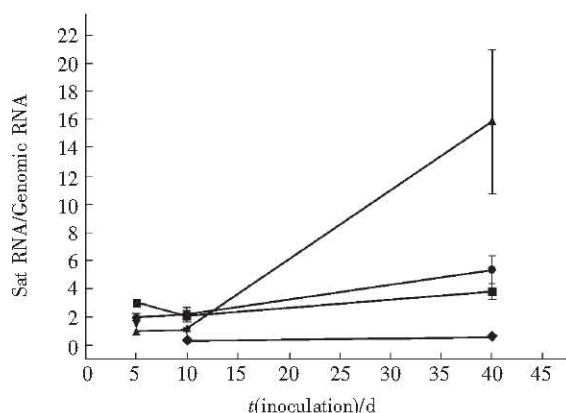


Fig. 3 Ratio variation for satRNA to genomic RNA of NDM-1

■—■: *N. tobacum*; ●—●: *N. glutinosa*; ▲—▲: tomato; ▼—▼: *Cucurbita pepo*; ◆—◆: HT01C04 in tomato.

长期以来, 人们一直希望将 CMV 弱病毒株的保护作用应用于其他茄科作物, 但目前在世界范围内, 获得长期稳定的大面积应用效果, 只有在番茄上以卫星 RNA 介导的 CMV 弱病毒株取得成效. 本研究分析结果对此提供较为合理的解释和理论依据.

参 考 文 献

- García-Arenal F, Escriu F, Aranda M A, et al. Molecular epidemiology of Cucumber mosaic virus and its satellite RNA. *Virus Research*, 2000, **71** (1~2): 1~8
- Gallitelli D. The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. *Virus Research*, 2000, **71** (1~2): 9~21
- Palukaitis P, García-Arenal F. Cucumoviruses. *Advances in virus research*, 2003, **62**: 241~323
- Gal-On A, Kaplan I, Palukaitis P. Differential effects of satellite RNA on the accumulation of cucumber mosaic virus RNAs and their encoded proteins in tobacco or zucchini squash with two strains of CMV helper virus. *Virology*, 1995, **208** (1): 58~66

- 5 Wu G, Kaper J M. Competition of viral and satellite RNAs of cucumber mosaic virus for replication *in vitro* by viral RNA-dependent RNA polymerase. *Res Virol*, 1995, **146** (1): 61 ~ 67
- 6 Yoshida K, Goto T, Lizuka N. Attenuated isolates of Cucumber mosaic virus produced by satellite RNA and cross protection between attenuated isolates and virulent ones. *Ann Phytopath Soc*, 1985, **51**: 238 ~ 242
- 7 邱井生, 王晋芳, 王小凤. 芜菁花叶病毒外壳蛋白基因的克隆和表达. *微生物学报*, 1992, **32** (2): 145 ~ 147
Qiu B S, Wang J F, Wang X F. *Acta Microbiol Sin*, 1992, **32** (2): 145 ~ 147
- 8 Kaper J M, Tousignant M E, Geletka L M. Cucumber-mosaic-virus-associated RNA-5: XII. —Symptom-modulating effect is codetermined by the helper virus satellite replication support function. *Res Virol*, 1990, **141** (5): 487 ~ 503
- 9 Waterworth H E, Kaper J M, Tousignant M E. CARANA 5, the small cucumber mosaic virus-dependent replicating RNA, regulates disease expression. *Science*, 1979, **204**: 845 ~ 847
- 10 Wu G, Kaper J M. Widely separated sequence elements within cucumber mosaic virus satellites contribute to their ability to induce lethal tomato necrosis. *J Gen Virol*, 1992, **73** (11): 2805 ~ 2812
- 11 Kaper J M, Waterworth H E. Cucumber mosaic virus-associated RNA5: causal agent for tomato necrosis. *Science*, 1977, **196**: 429 ~ 431
- 12 Wang J L, Simon A E. Symptom attenuation by a satellite RNA *in vivo* is dependent on reduced levels of virus coat protein. *Virology*, 1999, **259** (1): 234 ~ 245
- 13 Yie Y, Tien P. Plant virus satellite RNAs and their role in engineering resistance to virus diseases. *Sem Virol*, 1993, **4** (6): 363 ~ 368
- 14 Gallitelli D, Vovlas C, Martelli G P, *et al.* Satellite-mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus. II. Field test under natural epidemic condition in southern Italy. *Plant Dis*, 1991, **75** (1): 93 ~ 95
- 15 Tian P, Wu G. Satellite RNA for the biocontrol of plant disease. *Adv Virus Res*, 1991, **39**: 321 ~ 339
- 16 杨海花, 康良仪, 赵大健. 卫星 RNA 对黄瓜花叶病毒基因组 RNA 体外分离合成的影响. *中国病毒学*, 1996, **11** (4): 373 ~ 377
Yang H H, Kang L Y, Zhao D J. *Virol Sin*, 1996, **11** (4): 373 ~ 377
- 17 Sayama H, Sato T, Kominato M, *et al.* Field testing of a satellite-containing attenuated strain of cucumber mosaic virus for tomato protection in Japan. *Phytopathology*, 1993, **83** (4): 405 ~ 410
- 18 陈集双, 柴立红, 吴一平. 系统侵染寄主中黄瓜花叶病毒及其卫星 RNA 的动态变化. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (2): 285 ~ 289
Chen J S, Chai L H, Wu P. *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (2): 285 ~ 289
- 19 陈集双, 张耀洲, 冯明光. 黄瓜花叶病毒萝卜分离株卫星 RNA 的克隆及其与 12 个卫星 RNA 核苷酸序列的比较. *浙江大学学报 (农业与生命科学版)*, 2001, **27** (3): 249 ~ 254
Chen J S, Zhang Y Z, Feng M G. *J Zhejiang Univ (Agric Life Sci)*, 2001, **27** (3): 249 ~ 254
- 20 柴立红, 徐步进, 陈集双. 用杂交方法定量检测病毒 RNA 负荷量. *核农学报*, 2003, **17** (1): 62 ~ 66
Chai L H, Xu B J, Chen J S. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 2003, **17** (1): 62 ~ 66

The Effect of an Attenuated SatRNA on The Accumulations of Helper Virus In Several Symptomatic Hosts *

CHAI Li-Hong¹⁾, CHEN Ji-Shuang²⁾ **, CHEN Zi-Yuan¹⁾

⁽¹⁾ Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

⁽²⁾ College of Life Science, Zhejiang University of Sciences, Hangzhou 310018, China)

Abstract NDM-1, the cucumber mosaic virus containing a satellite RNA depresses the accumulation of helper viruses and attenuates the symptoms induced under field conditions. The kinetics of the accumulation of helper virus RNA and satRNA in infected tissues was studied in 4 different hosts. Dot blot hybridization was used in the quantitative analysis to compare the disciplinarian changing of viral RNA and satRNA at 5, 10 and 40 d after inoculation. The analyses suggest that the relative loading of genomic RNA and satRNA of the CMV-DNMI displayed a similar host- and time-effect trend but in different degree. The result in tomato plants is distinguishable from the other hosts: the loading of relative genomic RNA and satRNA ascended during the 5 d to 10 d post inoculation, and descended to the lowest at the 40 d. Also the NDM-1 in tomato tissue accumulated to the lowest levels among all the hosts.

To disclose the relationship of the sat RNA and helper virus of NDM-1, the ratios of the accumulation of satRNA and genomic RNA in 4 hosts were compared, which shows that the highest ratio is 15.8, occurred at 40 d in tomato. Analyses suggest that the mechanism of resistance to viral RNA is that the accumulation of satRNA of NDM-1 reduces the yield of the accumulated viral RNA. The changing disciplinarians of NDM-1 in other 3 hosts showed few differences.

Key words cucumber mosaic virus, attenuated satRNA, loading, host effect, inoculation-time effect

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30270744).

** Corresponding author. Tel: 86-571-86971586, E-mail: mmlab@zju.edu.cn

Received: March 12, 2004 Accepted: April 30, 2004