

# 芜菁花叶病毒 (TuMV) 特性的研究进展\*

赵建平<sup>1,4</sup> 周钗美<sup>2</sup> 陈集双<sup>3</sup> 郭得平<sup>1\* \*</sup>

(浙江大学园艺系 杭州 310029)<sup>1</sup>

(浙江大学城市学院 杭州 310015)<sup>2</sup>

(浙江理工大学生物工程研究所 杭州 310018)<sup>3</sup>

(浙江省嘉兴市农业科学研究院 嘉兴 314016)<sup>4</sup>

**摘要:** 芜菁花叶病毒 (TuMV) 是世界范围内广泛分布的重要病毒。从生物学和理化特性、基因组结构、侵染和繁殖、变异及利用转基因技术提高病毒抗性等方面对 TuMV 的国内外研究现状进行了阐述。

**关键词:** 芜菁花叶病毒, 基因组结构, 转基因抗性

**中图分类号:** S435 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 06-0100-05

## Recent Advances in Turnip Mosaic Virus\*

ZHAO Jian-Ping<sup>1,4</sup> ZHOU Chai-Mei<sup>2</sup> CHEN Ji-Shuang<sup>3</sup> GUO De-Ping<sup>1\* \*</sup>

(Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029)<sup>1</sup>

(City College, Zhejiang University, Hangzhou 310015)<sup>2</sup>

(Institute of Bioengineering, Zhejiang University of Sciences, Hangzhou 310018)<sup>3</sup>

(Jiaxing Academy of Agricultural Sciences, Jiaxing 314016)<sup>4</sup>

**Abstract:** Turnip mosaic virus (TuMV) is the most important virus and is found worldwide. This review provides advance in biological and biochemical characterization, structure of genome, viral infection of TuMV and virus resistance in transgenic plants.

**Key words:** Turnip mosaic virus, Genome, Transgenic resistance

芜菁花叶病毒 (TuMV) 是一个世界性的病原, 主要分布在温带和热带地区。自 1921 年美国病毒学家 Schultz 首次在小白菜和芜菁中发现 TuMV 以来, 已知至少 43 科 318 种双子叶植物 (包括十字花科、菊科、藜科、豆科、石竹科等) 及部分单子叶植物受到其侵染。TuMV 在 28 个国家和地区中的危害性仅次于黄瓜花叶病毒 (CMV), 是侵染蔬菜作物的第 2 大病毒<sup>[1]</sup>。

TuMV 除了侵染重要的经济作物外, 还能侵染模式植物拟南芥。利用 TuMV 与其侵染的芸苔属植物种类之间存在同线性这一特性, 许多 TuMV 抗性基因已经被确定。因此 TuMV 可作为一个优秀的模型, 从寄主和病原两方面来研究植物与病毒的相互作用。

## 1 生物学和理化特性

TuMV 属于马铃薯 Y 病毒科 (Potyviridae) 马铃薯 Y 病毒属 (Potyvirus Y), 是马铃薯 Y 病毒科中危害范围最广、危害程度最大的病毒。自然界中 TuMV 可通过至少 89 种蚜虫以非持久性方式传播, 但有极个别例外<sup>[2]</sup>。目前所知的传毒蚜虫有: 桃蚜、甘蓝蚜

\* 国家自然科学基金项目 (No. 30270908)

Chinese National Natural Science Foundation (No. 36270908)

\* 联系人 Tel: 0571-86971121, E-mail: dpguo@zju.edu.cn

收稿日期: 2004-01-05, 修回日期: 2004-02-18

等。也易经汁液接种传播，不能通过种子传毒。TuMV 的致死温度为 62℃，体外存活期约 3~4 d 天，稀释限点 (DEP) 为  $10^3 \sim 10^4$ 。TuMV 的紫外吸收特性具有典型的核蛋白紫外吸收曲线，其吸收峰的谷与峰分别在 245 nm 和 260 nm ( $A_{260}/A_{280} \approx 1.2$ )，该病毒具有较低的核酸含量。

不同的 TuMV 株系和分离物所侵染的植物症状表现有差异。如苋科的干日红和鸡冠花出现局部单斑症状，藜科的苋色藜和昆诺藜表现为系统坏死，十字花科蔬菜一般表现为系统花叶、皱缩、坏死和落叶等症状，茄科的克里芙兰烟出现系统坏死症状，假酸浆和洋酸浆出现接种叶局部斑、坏死等症状<sup>[3]</sup>。

植株感染 TuMV 后，体内会出现一系列生理生化变化：病变细胞质内分布有大量线形病毒粒子和柱状内含体。叶绿体片层结构发育差，淀粉粒积累减少，叶绿素含量、光合速率、气孔导度、蒸腾速率比对照明显降低。后期畸形肿胀，膜结构破裂直至解体，酶系活性改变，引起代谢紊乱，从而影响植物生长发育，造成作物减产<sup>[4]</sup>。

2 结构

TuMV 病毒粒子呈线形，大小约为 720 nm × 15~20 nm，由 95% 的外壳蛋白和 5% 的 RNA 构成。目前为止，在 GenBank 已登录有 30 多个不同分离物的基因组全序列。TuMV 基因组由一条正单链 RNA 分子组成，长约 9,830 个核苷酸。其 5' 末端有一个病毒编码蛋白 (VPg) 相连，编码区为单一开放阅读框架，两侧各有一段不翻译区域。在 5' 端不翻译区内有一个内切核酸酶位点。单一开放阅读框可表达产生一个多肽前体，在 3 种编码蛋白酶的作用下，共形成如下 10 种成熟蛋白：第 1 蛋白 P1 (分子量为 40 kD)，辅助蛋白酶 HC-Pro (52 kD)，第 3 蛋白 P3 (40 kD)，6K1 蛋白 (6 kD)，柱状包含体蛋白 CI (72 kD)，6K2 蛋白 (6 kD)，编码病毒基因组相关蛋白 VPg (22 kD)，小核包含体 a Nla (27 kD)，小核包含体 b Nlb (60 kD) 和外壳蛋白 CP (33 kD)<sup>[5, 6]</sup>。这些蛋白的结构和功能已经成为近年来的研究热点。



图 1 TuMV 基因组结构图

3 侵染和繁殖

TuMV 进入植物细胞内后，病毒粒子就进行脱壳和基因组复制。首先是产生负链，接着产生正链。由于寄主的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRp) 仅产生短片断的小分子，所以正链 RNA 病毒都需要编码自身的 RdRp，解旋酶活性的实现要求移除模板的二级结构，上述两个功能是分别由 Nlb 和 CI 蛋白完成的。6K2 蛋白和 VPg 蛋白也参与了胞膜上复制复合体的活动。正链 RNA 病毒基因组 3' 末端序列负责模板的特异性，阻止寄主 mRNA 在病毒中的增殖。

病毒基因组 RNA 有作为复制模板或蛋白质翻译的 mRNA 的双重作用。利用寄主的细胞器，由病毒编码的蛋白酶控制着多聚蛋白的分裂，释放出来的成熟蛋白通常具有多重功能。

开放式阅读框的第 1 个蛋白 P1 蛋白，既可以结合单链核苷酸 (RNA 或 DNA)，也

可以结合双链 RNA。因此, P1 蛋白可能是在 RNA 翻译中起某种作用, 通过改变胞间连丝允许通过物质的最大极限的大小来调节细胞间核苷酸的转运。同时, P1 蛋白也是一个蛋白酶, 能从初生蛋白多聚体的 C' 端开始, 酶切保守的核苷酸酶切位点。

开放式阅读框的第 2 个蛋白 HC-Pro 具有双重功能, 作为蚜虫传毒的辅助成分和具有蛋白酶活性。已发现了 HC-Pro 中和蚜虫传毒有关的关键核苷酸<sup>[7]</sup>。HC-Pro 还可作为一个多体参与病毒外壳蛋白和蚜虫口针的接触。HC-Pro N' 端富含半胱氨酸区域有一赖氨酸残基和另一个 HC-Pro 中的 PTK 残基是蚜虫传毒所必须的。HC-Pro 可以增加胞间连丝允许通过物质的最大极限和调节病毒 RNA 在细胞间的运动<sup>[8,9]</sup>。HC-Pro 也发挥蛋白酶的功能从蛋白多聚体 C' 端切割, 产生成熟的 HC-Pro。

第 3 个蛋白 P3 蛋白, 功能尚不明确, 和其他蛋白不同, 其序列高度可变。P3 蛋白可能与致病性及症状的决定有关<sup>[10]</sup>。

马铃薯 Y 病毒属的 6K1 蛋白的作用机理不是很清楚, 可能和 P3 蛋白活性的调节有关。

柱状包含体蛋白 CI 是被病毒感染的胞质内形成的一层层的风轮状内柱体结构。病毒分离物序列上的差异会导致柱状包含体蛋白结构形态上的差异。CI 最先在胞间连丝内形成。病毒核苷酸在细胞间的转运过程中, 胞间连丝起着重要的作用。N' 端似乎是更为保守的区域, 至少存在两个交叉反应的表位, 也包含解旋酶超家族 2 中典型的 DEXH 基序。3' -5' 解旋酶活性可以解开双链 RNA, 对病毒的复制起极其关键的作用<sup>[11]</sup>。

病毒的 6K2 蛋白功能和膜结合有关。VPg/Nia 的不完全切割会导致 VPg 重新进入复制复合体。

VPg 蛋白可通过磷酸二酯键的酪氨酸残基以共价结合的方式重新进入复制复合体, 在正链和负链中均可出现。VPg 蛋白可以激活 Nib 多聚酶, 进而参与相应链的合成。说明 VPg 在病毒 RNA 翻译中的重要地位。

第 1 个核酸内聚体蛋白 Nia 是一个半胱氨酸蛋白酶, 负责多聚蛋白体中绝大多数蛋白成分的切割, 其中 P3-6K1-CI 方向是顺式切割, CI-6K2-VPg-Nia-Nib 方向是反式切割。Nia 和 VPg 共同组成一个 49-kDa 的蛋白, 其自身是以 27-kDa 形式存在的, 缺少 C-末端时就是 25 kD 形式。Kim 等<sup>[12]</sup>根据 Nia 蛋白水解动力学和较低的适宜温度 (15℃) 认为它有高度可变的结构。Nia 蛋白大部分存在于细胞核中。

第 2 个核酸内聚体蛋白 Nib 是病毒的 RdRp, 包含 3 个高度保守区域。马铃薯 Y 病毒的 Nibs 蛋白利用 3' UTR 产生互补的 RNA。在胞膜复制时, Nib 的活性像 Nia 一样可能由聚积于核内的来调节。

外壳蛋白 (CP) 是 ORF 编码的最后一个蛋白, 它包裹着病毒的核苷酸。CP 的 N-端区域和 P1、P3 蛋白是最易变异的 3 个区域。CP 的 N-端包含一个保守的氨基酸序列 (DAG), 该 DAG 参与外壳蛋白和辅助成分 (它和蚜虫的口针结合) 的结合, 因此 CP 对蚜虫的传毒很重要。DAG 可以用血清学方法加以辨别。CP 也参与病毒在植物细胞与细胞间以及长距离的运动。另外它也能增加胞间连丝允许通过物质的最大极限的大小, 调节病毒 RNA 在细胞与细胞间的运动<sup>[8]</sup>。

#### 4 TuMV 的变异

和其它马铃薯 Y 病毒属病毒相比, 具有较宽的寄主范围是 TuMV 显著的特征之一。

它是唯一侵染芸苔属植物的马铃薯 Y 病毒属病毒。TuMV 非常容易产生变异, 具有广泛的变异类型。根据侵染植物类型或品种, TuMV 可以分成不同的株系和致病型, 但划分其株系的努力一直没有取得满意的结果。根据生物学标准, 即致病力分化的差异, 我国 TuMV 可分为 7 个株系<sup>[13]</sup>。还可以从血清学上把其划分成不同的株系, 如通过限制性酶切图谱分析和基因序列分析等方法分析 CP 基因<sup>[14]</sup>。TuMV 复杂的变异类型可能与其广泛的分布地区和较宽的寄主范围有关。

TuMV 的变异可能由点突变和重组引起<sup>[15]</sup>。RNA 聚合酶缺乏 3' -5' 核酸外切酶的阅读校正活性, 这使得在单链后代基因组上不能发生错配修复, 因而存在相对较高的错参率, 一般每个复制循环每 10 kb 分子就有 0.1 ~ 10 个发生突变。另一个可能是 TuMV 基因组的 5' 端区域内发生了复制滑动。TuMV 变异类型可能是通过复制错误和寄主基因型选择压力的平衡来维持的。

## 5 利用转基因技术提高作物的 TuMV 抗性

TuMV 基因组结构和功能关系的深入阐明有利于培育有效的抗 TuMV 作物, 促进提高 TuMV 抗性的转基因技术的发展。

在抗病毒基因工程中, 外壳蛋白 (CP) 基因策略是最早发现, 也是至今应用最为广泛的一种技术。这一策略已在 10 个属 30 余种病毒上获得成功。CP 介导的抗病性质与病毒弱株系对强株系的交互保护作用相类似。采用此方法得到的转基因植物尽管不能获得对病毒的完全抗性, 但能获得高水平的抗性。将 TuMV-CP 基因转入大白菜中, 所获得的转基因植株表现出了明显的抗性, 可延迟发病 20 ~ 30 d。转基因植株仅表现轻微花叶, 生长状况与未接种病毒的非转化植株相似, 植株体内的病毒含量也明显低于非转化植株<sup>[16]</sup>。

对于 CP 介导的抗性, 目前尚没有一个统一的模型来解释其机制。早期的研究认为病毒外壳蛋白的积累水平与抗性水平呈正相关, 因此推测转入植物的 CP 封闭了病毒基因组的脱壳过程, 使病毒基因组的 5' 端难以释出, 阻止病毒的基因表达; CP 干扰了病毒 RNA 的复制, 当入侵病毒的裸露核酸进入植物细胞后, 它们立即被细胞中的自由 CP 所重新包裹, 阻止了核酸的复制; CP 限制了病毒粒体的扩展与转运。因而使得转 CP 基因植株获得了对病毒的抗性。但随着研究的深入, 人们发现许多实验结果并不符合这一推测, 即抗性水平与病毒外壳蛋白的表达水平并无直接的线性相关性。现在认为, 在转基因植株中, 转录的 RNA 可能扮演了比 CP 更大的作用, 即 RNA 介导的抗性可能是抗病性产生的主要形式<sup>[17]</sup>。它具有抗性持久, 高抗或免疫, 生物安全性高等特点。关于对 RNA 介导病毒抗性的解释, 普遍被接受的是异常 RNA 学说, 即转基因植物中 CP 基因的表达与侵入的病毒 RNA 发生了转录后的基因沉默, 即共抑制, 从而产生了转基因植物的病毒抗性。1999 年, Fuh-Jyh 将 TuMV-CP 转入烟草中获得了抗 TuMV 的植株, 抗性机制是通过转录后基因沉默由 RNA 起作用而获得的病毒抗性。但最近也有不同的结果, 支持 CP 介导的病毒抗性, 如将 TuMV-CP 转化到油菜中, 发现含有沉默启动子而不能表达 CP 蛋白, 仅含有 RNA 的后代植株容易感染 TuMV, 而含有功能启动子可表达 CP 蛋白的后代植株对 TuMV 表现了高度抗性<sup>[18]</sup>。可见 CP 介导的抗性是非常复杂的, 可能受多基因的综合调控, 存在两条调控途径, 调控途径之间又相互影响。当一条途径受阻时, 诱导基因表达启动或加强另一条途径的调控能力, 使得转基因植株产

生对 TuMV 的抗性。

目前提高植物 TuMV 抗性的转基因技术主要是利用 CP 基因策略, 随着 TuMV 基因组结构和功能研究的深入, 有可能利用其它基因组在病毒侵染和繁殖中的作用, 达到综合提高植物 TuMV 抗性的目的, 如利用表达 P1 蛋白使得植株获得对马铃薯 Y 病毒的高度抗性等。总之, 利用现代基因工程技术获得新的抗病种质, 培育抗 TuMV 的作物品种, 已成为减轻病毒危害的有效手段。

### 参 考 文 献

- [1] Tomlinson J A. *Annals of Applied Biology*, 1987, **110**: 661 ~ 681.
- [2] 胡稳奇. 湖南师范大学自然科学学报, 1991, **14**: 13 ~ 16.
- [3] 陈集双, 张耀洲, 徐 平, 等. 中国油料, 1994, **16**: 24 ~ 28.
- [4] 洪 健, 徐 颖, 黎军英, 等. 电子显微学报, 2002, **4**: 110 ~ 113.
- [5] Walsh J A, Jenner C E. *Molecular Plant Pathology*, 2002, **3**: 289 ~ 300.
- [6] 李向东, 李怀方, 范在丰. 微生物学通报, 1999, **26**: 283-285.
- [7] Nakashima H, Sako N, Hori K. *Archives of Virology*, 1993, **131**: 17 ~ 27.
- [8] Rojas M R, Zerhini F M, Allison R F, *et al.* *Virology*, 1997, **237**: 283 ~ 295.
- [9] 郭兴启, 李学涛, 朱常香, 等. 微生物学通报, 2002, **29**: 90 ~ 94.
- [10] Dallot S, Quiot-Douine L, Saenz P, *et al.* *Phytopathology*, 2001, **91**: 159 ~ 164.
- [11] Klein P G, Klein R R, Rodriguez-Cerezo E, *et al.* *Virology*, 1994, **204**: 759 ~ 769.
- [12] Kim D H, Kang B H, Han J S, *et al.* *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1480**: 29 ~ 40.
- [13] 刘栩平, 路文长. 科学通报, 1989, **34**: 1660 ~ 1664.
- [14] Sanchez F, Wang X, Jenner C E, *et al.* *Virus Research*, 2003, **94**: 33 ~ 43.
- [15] Ohshima k, Yamaguchi Y, Hirota R, *et al.* *Journal of General Virology*, 2002, **83**: 1511 ~ 1521.
- [16] 朱常香, 宋云枝, 张 松, 等. 植物病理学报, 2001, **31**: 257 ~ 264.
- [17] Rovere C V, Vas M D, Hopp H E. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, **13**: 167 ~ 172.
- [18] Lehmann P, Jenner C E, Kozubek I E, *et al.* *Molecular Breeding*, 2003, **11**: 83 ~ 94.