

# 马铃薯 Y 病毒属病毒与寄主互作的分子基础\*

郭兴启 李学涛 朱常香 温孚江

(山东农业大学植物抗病毒基因工程实验室 泰安 271018)

**摘要:**近年来,分子生物学及生物技术的迅速发展,极大地促进了人们对马铃薯 Y 病毒属病毒与寄主之间,病毒与传播介体之间互作关系的研究,并取得了一些新的进展。从病毒诱导的症状,病毒的系统侵染、传播以及寄主植物抗病性等方面,对病毒与寄主互作关系的分子基础作一简述。

**关键词:**马铃薯 Y 病毒,寄主植物,传播介体,互作机制

**中图分类号:** S435 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0090-05

随着细胞生物学和分子生物学技术的快速发展和新技术方法在植物病毒研究中的不断应用,人们对植物病毒的认识进入了一个崭新的阶段。目前,对马铃薯 Y 病毒属病毒基因组进行深入研究的同时,病毒学家已把寄主与病毒之间,病毒与传播介体之间的互作机制作为对该属病毒研究的主要内容之一。从某种意义上讲,对病毒基因、基因产物、寄主细胞成分和传播介体之间的动态互作关系的研究更为重要,因为病毒是一种专性寄生物,其生活史的完成必须依赖于寄主。事实上,病毒与寄主互作研究也是病毒基因组功能研究的深入和扩展。

## 1 寄主症状的分子生物学

植物病毒病害的症状是寄主植物受到病毒的侵染后发生病理变化的一种表现,是寄主和病毒之间复杂的细胞和非细胞性物质相互作用的结果。对一个特定基因型的寄主来讲,病毒、病毒株系以及环境条件决定了该寄主的症状特点和变化类型,病毒可能通过影响寄主的生理和发育来实现症状的表达。在发生亲和性的寄主和病毒互作中,症状的严重度往往反映了病毒复制和积累的水平。

近年来许多研究表明,马铃薯 Y 病毒属病毒基因组的某些区域在症状学上有一定的作用。病毒的某一(些)基因或核苷酸片段决定或影响着寄主症状的类型。通过对来自豌豆种传花叶病毒(PSbMV)两个株系所构建的重组病毒的分析,发现 PSbMV 基因组的 NIa 和 NIb 编码区对症状的严重度有重要影响。两个独立的 TEV 基因片段,一个是 1/3 大小的 P3 编码区;另一个是 3'端的 CI, 6K<sub>2</sub> 和 5'端的 NIa 编码区,共同影响了胡椒的萎焉症状。对李痘病毒(PPV)基因组 P3-6K<sub>1</sub> 之间的切割位点序列改造所形成的突变体,其症状表现或者是减退或者是更严重。进一步研究表明,PPV 基因组 5'端非编码区中 18 个核苷酸的缺失所形成的突变体,只表现轻微症状<sup>[1]</sup>。

从某种意义上讲,我们缺乏对症状表达的理解,也反映了我们对与病毒互作的寄主植物蛋白的认识不够。目前,只有两个与病毒互作的植物蛋白被鉴定出来:(1)在

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39970485)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39970485)

山东省自然科学基金资助项目 (No. Z 2000 D 02)

收稿日期: 2001-07-30, 修回日期: 2002-02-15

芜菁花叶病毒 (TuMV) 与拟南芥植株互作中, 证明了与 TuMV 基因组中 VPg 作用的寄主因子是 eIF (iso) 4E 蛋白; (2) 利用免疫技术, 鉴定出了与 TuMV 基因组中 CP 发生相互作用的寄主因子是位于叶绿体上的 37kD 蛋白。但是, 在互作中这两种寄主蛋白对症状表达的作用目前还不清楚。

近年来, 对 HcPro 蛋白功能的研究表明, HcPro 蛋白能抑制植物中转录后基因沉默 (PTGS), 而 PTGS 是 (转基因) 植物中普遍存在的抗病毒机制<sup>[2]</sup>。因此, 能产生 HcPro 蛋白的马铃薯 Y 病毒属病毒与其它属病毒同时侵染植物时, 常常表现为协生作用。植物病毒协生作用在自然界中广泛存在, 在已知的协生现象中, 马铃薯 Y 病毒属介导的协生作用占首位, 能够与其他 8 个病毒属的成员发生协生作用。对协生作用的机制研究表明, 马铃薯 Y 病毒属病毒 (或其中的某一基因) 常作为激发病毒 (或激发因子) 促进异源病毒的复制, 或者是促进异源病毒的运输, 而本身复制水平不变或稍有降低<sup>[3]</sup>, 这在转基因植物和自然植物中都有报道。对转基因植物的研究发现, 表达 P1/HcPro 的转基因植株和报告基因 (*uidA* 和 *gfp*) 已发生 PTGS 的转基因植株进行遗传杂交时, 其后代报告基因的功能得到了恢复, 即 P1/HcPro 抑制了转基因植物中的 PTGS; 对报告基因 (*uidA* 和 *gfp*) 已发生 PTGS 的转基因植株, 用表达 HcPro 的 PVX 载体接种时, 植株内病毒积累水平明显比用野生型 PVX 接种时高, 并且恢复了已发生沉默的报告基因 (*uidA* 和 *gfp*) 的表达功能。进一步的研究表明, HcPro 中心区域介导了病毒之间的协生作用和对 PTGS 的抑制。并且, 在与 P1 蛋白共存时, HcPro 蛋白对 PTGS 的抑制作用会得到加强<sup>[4]</sup>。在自然植物中也存在着这种协生作用。马铃薯卷叶病毒 (PLRV) 是一种在寄主体内只存在于韧皮部中的病毒, 可能是寄主中类似 PTGS 的抗病机制, 限制了病毒进一步的运动。当与表达 HcPro 蛋白的 PVY 或水仙花叶病毒 (NMV) 同时侵染三生烟时, PLRV 在植株体内的浓度增加了 12 倍。当与不表达 HcPro 的苜蓿花叶病毒 (ALMV) 或烟草黑环病毒 (TBRV) 同时侵染时, 则不能改变 PLRV 在植株体内的浓度。因此, 在烟草体内 PLRV 浓度的增加, 可能是由于 PVY 或 NMV 的 HcPro 对植株中类似 PTGS 的抗病机制的抑制, 使得 PLRV 粒体能够从韧皮部扩散到叶脉以外的区域<sup>[5]</sup>。

然而, 在病毒-寄主复杂的互作关系中, 抑制 PTGS 的病毒蛋白其抑制作用有时被寄主的抗病机制所抵制。这种现象在番茄不孕病毒 (ToAV) 与烟草植株互作中得到直接证实<sup>[6]</sup>。最近 Karyeija 等<sup>[7]</sup>研究结果间接地说明了 HcPro 蛋白对 PTGS 的抑制作用被寄主所抵御。甘薯羽状斑驳病毒 (SPFMV) (*Potyvirus*) 与甘薯褪绿矮化病毒 (SPCSV) (*Crinivirus*) 同时侵染甘薯时, 表现出了异常的协生作用。因为能产生 HcPro 蛋白的 SPFMV 不是协生的激发者, 而是协生作用中的受益者。SPFMV 在寄主体内的浓度比单独侵染时高 600 倍, 而 SPCSV 的浓度则变化不大。当 SPFMV 单独侵染时, 由于寄主的抗病机制, 抵御了 HcPro 的抑制作用, SPFMV 在寄主内的浓度较低; 当 SPFMV 与 SPCSV 同时侵染时, SPCSV 可能产生了一种蛋白干扰了在寄主韧皮部传导的抗 SPFMV 的信号, 使寄主失去了对 SPFMV 的抗病性。

## 2 病毒运动的分子生物学

一般病毒在植物细胞间的运动和长距离的转运是由病毒编码的特异运动蛋白 (MP) 来完成, 而马铃薯 Y 病毒属病毒不编码这种专一性的 MP 蛋白, 病毒的运动功能是由 CP 蛋白、HcPro 蛋白、CI 蛋白和 VPg 蛋白协助完成。因此, 马铃薯 Y 病毒属病毒系统

侵染的主要环节与一般病毒存在着明显的差异。

用显微注射技术证明,菜豆普通花叶坏死病毒(BCMV)和莴苣花叶病毒(LMV)的CP和HcPro均可在细胞间进行运动,它们通过增加胞间连丝的体积排阻限度(size exclusion limit, SEL),促进病毒RNA在细胞间的运动。如果将CP的中间区域或HcPro的C端突变后,病毒就不能进行细胞间的运动。HcPro在细胞间的运动比CP更频繁,距离更远,并且能使胞间连丝SEL扩大到能让39kD F-葡聚糖通过的程度,而CP只能达到让10kD F-葡聚糖通过的程度。Roberts等<sup>[8]</sup>采用免疫金标记技术和电镜观察也证明了CI蛋白和CP蛋白对病毒胞间运动的影响。Masuta等<sup>[9]</sup>研究证明,VPg不仅在病毒复制中起重要作用,而且对PVY在细胞间的运动也有重要影响。烟草品种VAM(Virgin A Mutant)具有一个隐性基因 $va$ ,VAM对PVY不同分离物有不同程度的抗性,但对大多数PVY分离物表现高抗或耐病。组织定位及杂交分析表明,烟草品种VAM对PVY的抗性发生在病毒细胞间运动阶段上。通过进一步比较能攻破VAM抗性的突变体与最初毒株在氨基酸序列上的异同发现,VPg中一个氨基酸的替换导致了VAM抗性的丧失,这表明VPg在PVY细胞间运动中起作用。

至少有3种蛋白(CP、HcPro和VPg)参与了病毒的长距离转运过程。在TEV CP的N端或C端采用删除的方式所形成的TEV-GUS突变体,不能进行长距离的转运,证明了CP在病毒长距离转运中的作用。Kasschau等研究表明,HcPro蛋白中心区域的半胱氨酸被替换后,对病毒的胞间运动功能无明显的影响,但可以完全抑制TEV的长距离转运。该病毒突变体的长距离转运在表达HcPro基因的转基因植株内可得到恢复,这说明HcPro是影响TEV长距离转运的重要因子。通过对TEV重组体的研究表明,VPg也参与了病毒的长距离转运。

### 3 病毒传播的分子生物学

马铃薯Y病毒属病毒可以经蚜虫以非持久性的方式传播,蚜虫的口针在植物表面简单的刺吸就可以获毒并具有传毒能力。研究发现,病毒编码的CP蛋白和HcPro蛋白参与了蚜虫传毒过程,其中CP基因N端一个保守的氨基酸三联体Asp-Ala-Gly(DAG)和HcPro基因N端富含半胱氨酸保守区内的赖氨酸box(KITC)是蚜虫能否传毒的重要作用位点。另外,HcPro编码区中的PTK box也是影响蚜虫传毒的关键因子。

研究表明,蚜虫能否传毒取决于蚜虫是否提前或在摄取病毒粒体的同时获得HcPro蛋白。蚜虫不能传播缺少HcPro蛋白的突变毒株。因此人们推测,HcPro在CP蛋白和存在于介体口器中的受体之间起到了桥梁的作用。即在蚜虫传毒过程中,HcPro是一个双功能分子,一个功能区与病毒CP蛋白结合;另一个功能区与位于蚜虫口器上的受体结合。Blanc<sup>[10]</sup>等体外实验表明TVMV的HcPro能与TVMV CP中的DAG区直接相结合,而Peng等<sup>[11]</sup>则证明了HcPro与病毒粒体的结合,并且HcPro与CP或病毒粒体的结合能明显提高蚜虫的传毒效率。

在转基因植物中,由于转基因与侵入转基因植物的其他自然病毒之间发生的衣壳转移,也可能导致自然病毒由新的传播方式或新的传播介体传播。如当蚜不传的西葫芦黄花叶病毒(ZYMV)接种到表达李痘病毒(PPV)CP基因的转基因植物时,ZYMV的RNA可被PPV的衣壳蛋白所包裹,从而使ZYMV成为可蚜虫传播的病毒<sup>[3]</sup>。

马铃薯Y病毒属中有的病毒可以经种子传播。研究表明,病毒使种子带毒的方式

有两种途径：第一，病毒侵染配子，受精后带毒的配子使胚也带上病毒；第二，病毒不侵染配子，而是在植物开花受精后病毒侵染不成熟的胚，通过胚柄进入胚囊使种子带毒。该属大多数种传病毒的传毒方式是第一种途径，还有的病毒同时具有这两种途径，而大豆种传花叶病毒（PSbMV）则是第二种途径的典型代表。目前，对 PSbMV 的种传机制进行了较为深入的研究。在受 PSbMV 侵染的大豆中，有多个寄主植物的基因和多种病毒编码的成份，如 CP 蛋白和 HcPro 蛋白等参与并决定了种子传毒的能力<sup>[12]</sup>。

#### 4 植物抗病的分子生物学

植物对马铃薯 Y 病毒属病毒的侵染所表现的抗病性可分为过敏性抗性和非过敏性抗性。过敏性抗性大多数是由单一显性基因控制的，而非过敏性抗性的基因可能包括显性基因、不完全显性基因和隐性基因。在所有已知的对马铃薯 Y 病毒属病毒抗性的基因中，约 40% 是隐性基因。隐性抗病基因在植物的抗病性中发挥了重要作用。如 Caranta 等报道了胡椒植株中多个隐性基因能对马铃薯 Y 病毒属中的几种病毒产生抗性。最近，通过分析隐性抗病基因的作用机制，阐明了部分隐性基因的一些功能特性。辣椒中的隐性抗病基因  $y^2$  和  $pur^3$  分别阻止了 PVY 和胡椒斑驳病毒（PepMoV）粒体在植株体内的运动；辣椒中的隐性抗病基因  $el^2$  和  $pur1$  分别抑制了 TEV 和 PepMoV 的 RNA 复制；豌豆中的隐性抗病基因  $sbm-1$  对 PSbMV RNA 的复制也有抑制作用<sup>[13]</sup>。

与此同时，人们对植物中与显性基因有关的抗病机制也有了新的认识，特别是对马铃薯植株中的抗病基因进行了深入的研究。在带有  $Ry_{m}$  显性抗病基因的抗病马铃薯品种中，PVY 和 TEV 侵入初期，病毒粒体的运动被阻止，而且病毒初期的运动很快启动了植株的过敏性抗病反应。通过分析病毒的无毒性致病性株系之间所形成的重组杂合体，对病毒与植物抗性基因的互作研究，如 PSbMV/ $sbm-1$ ，TVMV/ $va$ ，大豆花叶病毒（SMV）/ $Rsv$  等，已取得了新的进展，鉴定出了一些与植株抗病基因相互作用的病毒作用位点。在 PSbMV 与豌豆植株抗性基因  $sbm-1$  相互作用时，攻破  $sbm-1$  抗性的病毒作用因子位于 VPg 编码区，更确切的讲是位于 VPg 中心区的 15 个氨基酸所组成的片段<sup>[13]</sup>；TVMV 与烟草抗性基因  $va$  的互作，也表明是 TVMV VPg 编码区所起的作用；Eggenberger 等<sup>[14]</sup>用重组的大豆花叶病毒接种含显性抗病基因  $Rsv$  的大豆植株，病毒攻破了  $Rsv$  的抗病性。进一步研究表明，攻破抗性的病毒作用位点是 HcPro 3' 端部分片段和 P3 编码区的 5' 端部分片段。而且，用只含有 HcPro 或 P3 编码区的重组病毒接种大豆植株时，都不能攻破  $Rsv$  的抗性。这表明只有 HcPro 和 P3 在一起时，才能攻破这种单一显性基因。

目前，对植物中自然抗病基因的克隆和利用还处于探索阶段。但是，以病毒本身的基因作为抗病资源，通过体外 DNA 重组技术，对植物进行遗传改良，赋予转基因植株病毒抗性方面的研究，已取得了很大的进展，这种病原来源的抗性（PDR）已成为植物遗传改良中较为成熟的抗病育种策略。采用该策略已成功地转化了马铃薯 Y 病毒属病毒的不同基因或核苷酸片段，如转 P1 基因、P3 基因、CI 基因、CP 基因等，并获得了多种抗病毒转基因植株。这些转基因植株对病毒的抗性表现型常常是推迟发病、减轻症状，但也有不少是高度抗病或免疫，还有的是“恢复型”。早期的研究表明，转基因植物的抗病性与转基因表达的蛋白质的量成正比，即所谓的蛋白质介导的病毒抗性。但是，随着研究的深入人们发现，有的转基因植株的抗病性并不与转基因所表达

的蛋白质成正比,有的转不可翻译的病毒基因也赋予了转基因植物高度抗病性。这类抗性就是所谓的 RNA 介导的病毒抗性<sup>[2]</sup>。RNA 介导病毒抗性具有抗性强,抗病持久,生物安全性高等特点,其抗病机制与 PTGS 相似,即转基因 mRNA 和病毒 RNA 在细胞质内被降解<sup>[15]</sup>。虽然有报道表明,这种转基因植物的抗病性与转基因的长度、转基因的拷贝数、转基因的甲基化等有关,并且提出系统信号分子可能参与了这种核酸降解过程,但启动 PTGS 的机制目前还在探讨之中。

### 参考文献

- [1] Simon-Buela L, Guo H S, Garcia J A. *Journal of General Virology*, 1997, **78**: 2691 ~ 2699.
- [2] Vicki V, Herve V. *Science*, 2001, **292**: 2277 ~ 2280.
- [3] 鲁瑞芳, 李为民, 彭学贤. *中国病毒学*, 2001, **16** (3): 195 ~ 201.
- [4] Anandalakshmi R, Pruss G J, Ge X. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 13079 ~ 13084.
- [5] Voinnet O, Pinto Y M, Baulcombe D C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 14147 ~ 14152.
- [6] Li H-W, Lucy A P, Guo H-S, *et al.* *EMBO J*, 1999, **18**: 2683 ~ 2691.
- [7] Karyeija R F, Kreuze J F, Gibson R W, *et al.* *Virology*, 2000, **269**: 26 ~ 36.
- [8] Roberts I M, Wang D, Findlay K, *et al.* *Virology*, 1998, **245**: 173 ~ 181.
- [9] Masuta C, Nishimura M, Morishita H, *et al.* *Phytopathology*, 1999, **89** (2): 118 ~ 123.
- [10] Blanc S, Lopez-Moya J J, Wang R, *et al.* *Virology*, 1997, **231**: 141 ~ 147.
- [11] Peng Y H, Kadoury D, Gal-On, *et al.* *Journal of General Virology*, 1998, **79**: 897 ~ 904.
- [12] Wang R Y, Powell G, Hardie J, *et al.* *Journal of General Virology*, 1998, **79**: 1519 ~ 1524.
- [13] Keller K E, Johansen I E, Martin R R, *et al.* *MPMI*, 1998, **11**: 124 ~ 130.
- [14] Eggenberger A L, Hill J H. *Phytopathology*, 1997, **87**: S27.
- [15] 郭兴启, 温孚江, 宋云枝, 等. *病毒学报*, 2001, **17** (4): 260 ~ 267.