

两株黄瓜花叶病毒卫星 RNA 的竞争与共存研究

金 波^{1,2} 陈集双^{1*}

(¹浙江理工大学生物工程研究所 杭州 310018)

(²浙江大学微生物研究所 杭州 310029)

摘 要 通过体外转录方法,将大小分别为 369nt 和 385nt 的 2 个黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)的卫星 RNA Y_i 和 Y_{ns} 共同与不含卫星的辅助病毒株 CMV-CNa 进行假重组,接种 CMV 系统寄主心叶烟。结果表明,在接种 5d 的接种叶上同时检测到卫星 RNA- Y_i 和卫星 RNA- Y_{ns} ;在系统叶上,接种 5d 和 10d 亦可同时检测到 2 株卫星,但接种 15d,在系统叶组织中只检测到卫星 RNA- Y_i 。再将接种 5d 的接种叶扩大接种到几种不同的指示植物后,经 dsRNA 抽提,也只获得 1 条与卫星 RNA- Y_i 大小相符的条带。通过假重组病毒株中分别获得卫星 RNA 并测序,确定 2 个卫星 RNA 的序列没有变化。卫星 RNA- Y_{ns} 和 Y_i 在辅助病毒 CMV-CNa 作用下,表现出明显的竞争性,它们在辅助病毒中不能形成稳定的共存关系。

关键词 黄瓜花叶病毒,卫星 RNA,假重组,竞争与共存

中图分类号 S436.421 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2005)02-0209-04

黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)的卫星 RNA 是伴随该病毒复制的一种亚病毒 RNA 遗传因子,是线性单链 RNA,其大小为 330 ~ 405nt^[1]。CMV 卫星 RNA 不编码任何蛋白质,其复制、包裹和扩散完全依赖于辅助病毒;但卫星 RNA 对于 CMV 的复制、细胞间扩散和稳定性却不是必要的,其存在可能影响 CMV 的复制及其与寄主相互作用等。

现有研究已经阐明:一些 CMV 分离物分别携带几个不同的卫星 RNA,序列相同的卫星 RNA 也可能存在于不同的辅助病毒中,并引起不同的症状反应^[2];另外携带卫星 RNA 的同一病毒在不同的寄主里可引起不同的症状^[3]。自 1986 年人们利用卫星 RNA 制备生物防制剂控制 CMV 以来,对其防制效果一直存在着疑虑^[4~6]。外来的 CMV 卫星 RNA 是否与新的 CMV 基因组进行假重组和出现新的弱病毒株或强病毒株?不同来源的卫星 RNA 在同一辅助病毒中是不是存在竞争与共存关系?在 CMV 基因组中人为添加卫星 RNA 并检验其稳定性和相互作用是回答以上问题的基础。因此,本研究以两种自然存在的卫星 RNA 作为材料,研究其在同一 CMV 中的竞争与共存关系。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

T7 体外转录试剂盒(Riboprobe System-T7), pGEM-T easy Vector 试剂盒均购自美国 Promega 公司,RT-PCR(CMV)试剂盒购自 TaKaRa 公司。寡聚核苷酸引物由 TaKaRa 公司合成。

1.2 卫星 RNA 的 cDNA 克隆和病毒分离物

卫星 RNA- Y_i :分离自十字花科萝卜植株,大小 369 nt,含有其 cDNA 的克隆 p Y_i 为本实验室保存^[8]。卫星 RNA- Y_{ns} :分离自十字花科小青菜植株,大小 385 nt,含有其 cDNA 的克隆 p Y_{ns} 为本实验室保存。CMV-CNa:分离自葫芦科南瓜植株,不携带卫星 RNA,病毒株接种保存在心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)上,在进行假重组前 6 d 转接心叶烟进行毒源扩繁。

寄主植物分别为心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)、西葫芦(*Cucurbita pepo*,新早青一代品种)、番茄(*Lycopersicon esculenta*,江蔬一号品种),供试寄主植物在 26℃ 恒温室培养,光照 12000 lux,14 h/d。

1.3 体外转录

1.3.1 DNA 模板的制备:根据 T7 启动子序列和卫星 RNA 的 cDNA 全长序列设计合成两端引物。上游引物 T7-Fsat:5'-TAAGCTTAATACGACTCATATAG

基金项目 国家自然科学基金(30270744)

* 通讯作者。Tel 86-571-86843200, E-mail: chenjs@zjst.edu.cn

作者简介 金 波(1974-),女,浙江嵊州人,硕士,微生物分子生物学研究方向。E-mail: jinbont@sina.com

收稿日期 2004-07-05,修回日期 2004-11-22

GTTTTGTTTGTGGAG-3'; 下游引物 *R_{sat}*: 5'-GGGCTCTGTAGAGGAATGTG-3', 上游引物 5' 端为 T7 启动子结构。

以卫星 RNA 的 cDNA 克隆为模板, 进行常规 PCR 反应。反应体系 (100 μ L): 10 \times PCR buffer 10 μ L, MgCl₂ (25mmol/L) 8 μ L, 引物 T7-Fsat 和引物 *R_{sat}* (20 pmol/ μ L) 各 1 μ L, dNTP (10mmol/L) 1 μ L, 卫星 RNA 的 cDNA 克隆质粒 2 μ L (5ng/mL), *Taq* 聚合酶 (5 U/ μ L) 5U。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 20s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5min。反应产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用回收试剂盒从凝胶中回收 PCR 扩增产物, 溶解于 10 μ L DEPC-H₂O 中。

1.3.2 体外转录获得全长卫星 RNA 按照试剂盒要求进行转录, 反应总体积为 20 μ L, 配制如下: 5 \times Transcript Buffer 4 μ L, DTT 2 μ L, RNase inhibitor (40U/ μ L) 0.5 μ L, NTP (2.5mmol/L) 4 μ L, PCR 产物 0.8 μ g, T7 RNA Polymerase 1 μ L 37 $^{\circ}$ C 下反应 90min。

1.4 卫星 RNA 与 CMV 的假重组

采用接种 4~6d 的 CMV-CNa 的心叶烟叶组织 0.1g, 用 TRIzol (MBI) 试剂法提取其总 RNA, 悬浮于无 RNase 的 PBS 缓冲液中, 取 20 μ L, 将其按等体积与卫星 RNA 转录产物混匀, 摩擦接种于 4~6 叶期的心叶烟上进行人工假重组。植株于 26 $^{\circ}$ C 温室培养。接种 48h 取接种叶, 用汁液摩擦接种方法转接至新的系统寄主植株; 接种 5d 后, 取系统发病叶提取病毒 dsRNA 或总 RNA 确定卫星 RNA 的重组结果。

1.5 假重组病毒株的寄主反应测定

用汁液摩擦接种方法将各待测病毒分离物分别接种葫芦科西葫芦、茄科的心叶烟和假酸浆 3 种供试植物上, 用缓冲液接种作为阴性对照, 观察接种植株的症状发生情况, 接种试验重复两次。每种植株重复 6 株。接种 5d 提取叶组织中的 dsRNA, 分析重组结果。

1.6 卫星 RNA 的 RT-PCR 检测

RT-PCR 上游引物 (*F_{sat}*) 序列为: 5'-CCTCTAGA GGCCTGTTTGTGGAG-3'。卫星 RNA 的 5' 端和 3' 端序列非常保守, 卫星 RNA 之间的差异主要在于中间序列和序列的长度, 因而本研究使用相同的引物扩增卫星 RNA 的全长序列, 以序列长度来区分卫星 RNA。

取接种后的心叶烟系统叶组织 0.1g, 抽提总 RNA, 为 RT-PCR 模板, 用 CMV 卫星 RNA 反向引物 (*R_{sat}*) 为引物进行 cDNA 第一链的合成, 随后加入上

游引物 *F_{sat}* 进行 PCR 扩增。反应体系 (100 μ L): 10 \times PCR buffer 10 μ L, MgCl₂ (25mmol/L) 8 μ L, 引物 *F_{sat}* 和引物 *R_{sat}* (20pmol/ μ L) 各 1 μ L, dNTP (10mmol/L) 1 μ L, cDNA 第一链合成产物 10 μ L 及 *Taq* 聚合酶 (5U/ μ L) 5U。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 20s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5min。用 3.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。PCR 产物经割胶回收连接于 pGEM-T easy Vector, 并克隆测序。

1.7 CMV dsRNA 提取分析

取接种 5~20d 的新鲜感病叶组织, 按常规方法提纯病毒 dsRNA^[7], 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测病毒基因组大小和确定假重组情况。

2 结果和分析

2.1 RT-PCR 扩增

为了检测两种卫星 RNA 于无卫星的 CMV-CNa 中的共存情况, 我们对接种不同假重组组合的系统叶, 采用卫星 RNA 引物进行 RT-PCR 扩增, 其结果如图 1 所示。接种后 5d 的接种叶和系统叶可扩增出两条条带, 其大小分别与 satRNA-Yns 和 satRNA-Yi 大小相符; 接种后 10d 的系统叶也扩增出两条分别与 satRNA-Yns 和 satRNA-Yi 大小相符的条带, 但是 satRNA-Yi 对应的亮度要明显高于 satRNA-Yns; 接种后 15d 和 20d 的系统叶 RT-PCR 只扩增出一条与 satRNA-Yi 大小相符的条带, CK1 扩增出 satRNA-Yi 的条带, CK2 扩增出 satRNA-Yns 的条带, 而 MOCK 没有与卫星相符的条带。

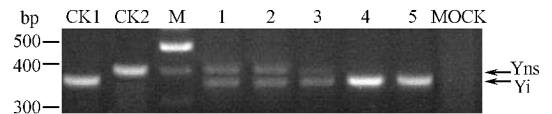


图 1 两个卫星 RNA 假重组后的 RT-PCR 检测结果

Fig.1 Results of RT-PCR detection after pseudo-recombination of two satellite RNAs with CMV-CNa genome

M 200bp DNA Marker; CK1: Pseudo-recombination of satellite RNA-Yi with CMV-CNa; CK2: Pseudo-recombination of satellite RNA-Yns with CMV-CNa; 1~5: Pseudo-recombination of two satellite RNAs with CMV-CNa. 1. Inoculated leaves of 5 days post-inoculation (dpi); 2~5. Different inoculated time for systemic leaves (2. 5 dpi; 3. 10 dpi; 4. 15 dpi; 5. 20 dpi); MOCK: CMV-CNa.

2.2 dsRNA 检测

对于同时重组两个卫星 RNA 并通过 RT-PCR 检测为阳性的处理, 取病叶, 抽提总 RNA 后扩大接种至健康的心叶烟, 接种 5d 提取 dsRNA, 并进行电泳分析 (图 2)。经过转接寄主植物后, 原来含有两个

卫星 RNA 的重组子仅检测到一个卫星 RNA 的 dsRNA 条带 ,CK1 ,CK2 均有相应的 dsRNA 卫星条带 ,MOCK 则无卫星 RNA 对应的 dsRNA 条带。

由于卫星 RNA 的 dsRNA 在总 dsRNA 的含量很高 ,以及 16bp 的 dsRNA 长度在 1% 琼脂糖凝胶中电泳分辨率较低 ,CK1 和 CK2 之间的差异非常细微 ,故图中 3 者的差异不明显。

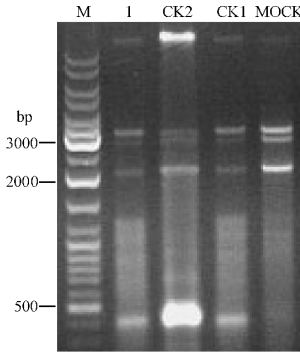


图 2 两个卫星假重组扩大接种后提取 dsRNA 的电泳结果

Fig.2 Results of dsRNA analysis for systemic leaves of pseudo-recombination

M :10kb DNA Marker ; 1 :Sample of transferred inoculation from systemic leaves after 5 days ; CK2 :Pseudo-recombination of satellite RNA-Yns with CMV-CNa ; CK1 :Pseudo-recombination of satellite RNA-Yi with CMV-CNa ; MOCK :CMV-CNa.

2.3 寄主反应

两个卫星 RNA 重组与否在 3 种供试寄主植物的症状表现没有明显的差异 :接种后第 5 d 提取 dsRNA 并进行电泳比较的结果显示 ,它们均只携带 satRNA-Yi 且在寄主植物中得到高于 CMV 基因组的含量 ,而 satRNA-Yns 则表现出无法与 satRNA-Yi 竞争共存(图 3)。以接种烟草的自然携带卫星 RNA-Yi (图 3 中的泳道 1)的 CMV 分离物为对照 ,可发现重组毒株(图 3 中的泳道 3)与自然分离物的 dsRNA 并无明显差异。

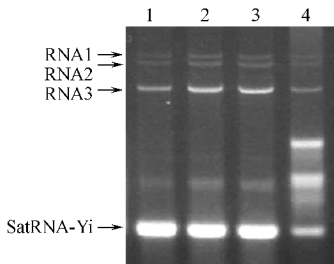


图 3 假重组后新毒株在不同寄主植物中的 dsRNA 分析结果

Fig.3 Results of dsRNA analysis of new CMV strain on different host plant after pseudo-recombination

1. CK-Tobacco ; 2. Tomato ; 3. Tobacco ; 4. Zucchini.

2.4 混合接种

为进一步确证两个卫星 RNA 之间的共存与竞争关系 ,将两个重组有单个卫星 RNA 的 CMV ,CK1 和 CK2 ,混合接种寄主植物烟草上 ,接种 2 ~ 5d 后提取 dsRNA ,电泳分析如图 4 所示。混合接种 2d 和接种 5d 的烟草上均只检测到卫星 RNA-Yi 的条带。同时利用 RT-PCR 检测发现接种 2d 的系统叶上可发现 Yns 和 Yi 2 条卫星 RNA 条带 ,而接种 5d 的系统叶就仅只有卫星 RNA-Yi 的条带(未显示结果)。

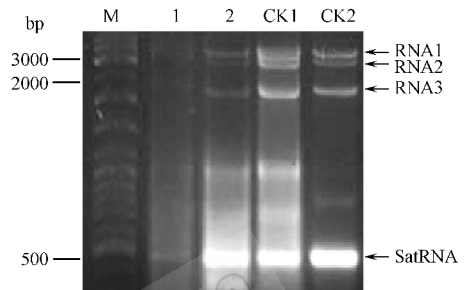


图 4 假重组毒株 CK1 和 CK2 混合接种烟草的 dsRNA 分析结果

Fig.4 Results of dsRNA analysis of co-inoculation of CK1 with CK2 on tobacco

M :10kb DNA Marker ; 1 :Systemic leaves of 2 dpi ; 2 :Systemic leaves of 5dpi ; CK1 :Pseudo-recombination of satellite RNA-Yi with CMV-CNa ; CK2 :Pseudo-recombination of satellite RNA-Yns with CMV-CNa.

2.5 序列分析

对上述 RT-PCR 扩增得到的卫星 RNA 目的条带进行克隆 ,每个卫星挑取 8 个阳性克隆进行测序 ,发现两个卫星 RNA 在进行假重组前后均没有发生序列变化 ,两个卫星 RNA 之间也没有发生重组和序列交换现象。

3 讨论

卫星 RNA-Yi 和 Yns 的核酸序列同源性为 85.4% ,单独与 CMV-CNa 进行人工重组均可以达到高拷贝复制 ,经传代实验稳定存在于 CMV 毒株中。当两个卫星 RNA 同时接种在 CMV-CNa 中则显示出明显的竞争性。在本研究中 satRNA-Yi 逐渐成为优势种 ,最终单独存在于 CMV 中 ,而且两个卫星 RNA 之间不发生任何的重组变异现象。

由于 RT-PCR 的检测方法检测灵敏度高 ,而 dsRNA 检测分辨率相对较弱 ,对于 16bp 差异的结果显示没有前者明显。在 RT-PCR 检测具有 2 个卫星 RNA 同时共存的叶片中 ,dsRNA 仅显示一个卫星 RNA 的条带 ,推测可能由于 2 个卫星 RNA 的复制率相差明显 ,其中 1 个卫星 RNA 的复制量要大大超过

另一个, 即其 dsRNA 的量明显优于后者。对于二者之间复制量的区别以及它们之间的关系, 进一步的研究正在进行中, 多种现代检测技术的共同使用将有利于结果的获得。

有关卫星 RNA 复制的研究已经较多^[8-10], 但是利用体外重组系统进行卫星 RNA 之间的竞争关系研究还未见报道。卫星 RNA 的复制完全依赖于 CMV, 当两个卫星 RNA 与 CMV 基因组 RNA 同时竞争辅助病毒 RNA 聚合酶时, 卫星 RNA 与病毒基因组 RNA 也形成竞争, 同时卫星之间还会存在竞争外壳蛋白的机制。以上竞争与保留关系的形成由什么机制决定, 还不能简单解释。根据本文结果, 两个卫星 RNA 在同一 CMV 中的共存只是暂时性现象, 两个卫星 RNA 竞争的结果会有一个被淘汰, 剩下一个卫星 RNA。在不同的 CMV-卫星 RNA 组合中究竟会是怎样的卫星 RNA 最后与 CMV 形成共存, 尚待作进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Roossinck M J, Sleat D, Palukaitis P. Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. *Microbiol Rev*, 1992, **56** (2): 265 - 279.

[2] Collmer C W, Howell S H. Role of satellite RNA in the expression of symptoms caused by plant viruses. *Annu Rev Phytopathol*, 1992, **30**: 419 - 422.

[3] Rasochova L, Passmore B K, Falk B W, et al. The satellite RNA of barley yellow dwarf virus-RPV is supported by Beet western yellows virus in Dicotyleconous protoplasts and plants. *Virology*, 1997, **231**: 182 - 191.

[4] Palukaitis P, Roossinck M J. Spontaneous change of a benign satellite RNA of cucumber mosaic virus to a pathogenic variant. *Nature Biotech*, 1996, **14**: 1264 - 1268.

[5] Tepfer M. Viral genes and transgenic plants. What are the potential environmental risks? *Bio Technol*, 1993, **11**: 1125 - 1132.

[6] 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. *MPMI*, 2003, **16** (6): 467 - 476.

[7] 陈集双, 冯明光, 张耀洲. 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.

[8] 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**: 61 - 67.

[9] 杨海花, 赵大健. 卫星 RNA 对黄瓜花叶病毒基因组 RNA 体外合成的影响. *中国病毒学*, 1996, **11** (4): 373 - 377.

[10] 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**: 234 - 245.

Coexistence and competition of two satellite RNAs of *Cucumber mosaic virus* in systemic hosts

JIN Bo^{1,2} CHEN Ji-shuang^{1*}

(¹ Institute of Bioengineering, Zhejiang University of Sciences, Hangzhou 310018, China)

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

Abstract: Two *Cucumber mosaic virus* (CMV) satellite RNAs, namely Yns and Yi and of 385nt and 369nt respectively, were introduced to systemic host plants with a satellite RNA-free isolate of CMV (CNa), after *in vitro* transcription of satellite RNAs from cDNA clones and by co-inoculation with CMV genomic RNAs. The competition and coexistence of the two satellite RNAs were studied by RT-PCR detection, double-stranded RNA analysis and sequencing comparison. The results showed that, in the inoculated leaves of *Nicotiana glutinosa*, both satellite RNA presented together after inoculated 5 days after pseudo-recombination. In the systemic leaves of *N. glutinosa*, both satellite RNAs were detected at 5 days and 10 days post first inoculation, however, only the 369nt satellite (Yi) was recovered at 15 days post first inoculation and second inoculation transferred from the pseudo-recombination plants. Comparison of full sequences of the satellite RNAs obtained by RT-PCR from pseudo-recombinant virus showed that no mutation and mutual exchange of the satellite genome has been found. The results indicate that both 369nt satellite RNA and 385nt satellite RNA can be introduced to CMV-CNa with *in vitro* transcription products and both replicated to a high level depending on the helper virus. But after transferring to new systemic plants, only one satellite of 369nt can be kept as co-infection for long with the helper CMV. Co-existence and competition are found between different satellite RNAs in the same plant.

Key words: *Cucumber mosaic virus*, Satellite RNAs, Pseudo-recombination, Co-existence and competition