

假马鞭曲叶病毒和中国胜红蓟黄脉病毒 C4 蛋白 是 RNA 沉默的抑制子

熊 庆, 周雪平*

(浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)

摘 要: 为了研究中国胜红蓟黄脉病毒 (*Ageratum yellow vein China virus*, AYVCNV) 和假马鞭曲叶病毒 (*Stachytarpheta leaf curl virus*, StaLCV) C4 蛋白的功能, 利用烟草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV) 载体在本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 中分别表达了这两种病毒的 C4 蛋白。结果发现它们均能在本氏烟中引起类似于病毒侵染的症状, 推测 AYVCNV 和 StaLCV 的 C4 蛋白是病毒的致病因子; 在 RNA 沉默的抑制试验中, AYVCNV 和 StaLCV 的 C4 蛋白均能够在表达 *gfp* 基因的转基因本氏烟(16c)上抑制由 *gfp* 基因正义链引起的基因沉默的建立, 证明它们都是 RNA 沉默的抑制子。

关键词: 双生病毒; 中国胜红蓟黄脉病毒; 假马鞭曲叶病毒; 抑制子; RNA 沉默

中图分类号: S432 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0039-05

RNA 沉默 (RNA silencing) 是真核生物中一种高度保守和序列特异的 RNA 降解现象。RNA 沉默具有二类生物学效应: 对内源 RNA 转录和翻译的调控; 对外源核酸序列特异性的降解。在 RNA 沉默中, 双链 RNA (dsRNA) 是一个关键的起始分子^[1, 2], 双链 RNA 被一种类似于 RNase III 家族成员的 Dicer 酶作用切割加工成 21 ~ 24 个核苷酸的小干扰型 RNA (siRNA)^[3, 4], 这类 siRNA 随即整合进入 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC) 中, 指导其特异性地切割与 siRNA 具有相似序列的细胞内 mRNA^[5, 6]。RNA 沉默在植物中具有防卫反应的作用, 植物通过 RNA 沉默抑制外源核酸侵入, 因而能够阻止病毒等的侵染, 而病毒为了能够对抗这种防卫反应, 采取了相对策略, 即许多病毒编码抑制沉默的蛋白 (沉默抑制子), 在 RNA 沉默的不同阶段对其进行抑制^[7]。

双生病毒作为一种植物病毒, 同样在进化过程中发展出了抵御植物抗病毒防卫反应的机制, 双生病毒通过编码 RNA 沉默的抑制子来实现对寄主植物的成功侵染。已有研究证明一些双生病毒编码的 AC2/C2 蛋白和 AC4/C4 蛋白是 RNA 沉默的抑制子^[8-10], 而现已报道的 RNA 沉默抑制子几乎都是致病因子。中国胜红蓟黄脉病毒 (*Ageratum yellow vein China virus*, AYVCNV) 和假马鞭曲叶病毒 (*Stachytarpheta leaf curl virus*, StaLCV) 是本实验室在

我国发现的双生病毒新种。本研究对 AYVCNV 和 StaLCV 的 C4 基因与致病性的相关性进行了研究, 证明这两种病毒的 C4 蛋白既是致病因子也是 RNA 沉默的抑制子。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料: 本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 由本实验室提供, 转 *gfp* 基因本氏烟株系 16C 由英国 John Innes 中心 Davaid Baulcombe 教授提供。

1.1.2 质粒和菌株: 农杆菌 C₅₈ C₁、烟草脆裂病毒 (*Tobacco rattle virus*, TRV) 植物表达载体和 pRTL2 瞬时表达载体、含黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 2b 基因的植物表达载体 pBin-2b 由 David Baulcombe 教授惠赠, 含烟草蚀纹病毒 (*Tobacco etch virus*, TEV) HC-Pro 基因的植物表达载体 pSLJ-0027 由美国 Oregon 州立大学 James Carrington 教授惠赠, 含 *gfp* 基因的植物表达载体 pBin-m GFP5-ER 由英国剑桥大学植物科学系 Jim Haseloff 教授惠赠。质粒 pGEM-T Vector 购自 Promega 公司。

1.1.3 试剂: TRIzol 购自 Invitrogen 公司, RNAase-free DNAase 及反转录酶 (superscript reverse transcriptase) 购自 Promega 公司, PCR 试剂盒及限制性内切酶购自 TaKaRa 公司, 各种抗生素购自 Sigma 公司。

基金项目: 教育部科技创新工程重大项目培育资金 (705025); 国家自然科学基金 (30530520)

* 通讯作者。Tel/Fax 571-86971680; E-mail: zzhou@zju.edu.cn

作者简介: 熊庆 (1977 -) 男, 贵州遵义人, 博士, 主要从事植物病毒分子生物学研究。

收稿日期: 2006-04-25; 接受日期: 2006-08-21; 修回日期: 2006-09-11

1.2 载体构建

根据测定的 AYVCNV Hn2 和 StaLCV Hn5 分离物的全长基因组序列(基因库登录号 AJ495813 和 AJ495814)设计两对特异性引物 Hn5C4 F/Hn5C4 R、Hn2C4 F/Hn2C4 R(表 1),分别以 AYVCNV Hn2 和 StaLCV Hn5 分离物的全基因组为模板进行 PCR 扩增,将 PCR 产物割胶纯化回收并与 pGEM-T Vector 连接,得到克隆 pGEMT-Hn5C4 和 pGEMT-Hn2C4,对这两个克隆进行序列测定,以保证所克隆基因序列的正确。以 *Sac* I 和 *Bam* H I 分别对 pGEMT-Hn2C4、pGEMT-Hn5C4 进行酶切,酶切产物经纯化回收后插入到经同样酶消化后的中间表达载体 pRTL2 中,得到克隆 pRTL2-Hn2C4 和 pRTL2-Hn5C4,再以 *Hind* III 对 pRTL2-Hn2C4 和 pRTL2-Hn5C4 进行单酶切,将酶切产物纯化回收后插入到经 *Hind* III 消化后的 TRV 的 RNA2^[10] 载体中,最后得到克隆 TRV-AYVCNV4 和 TRV-StaLCVC4。将 pRTL2-Hn2C4 和 pRTL2-Hn5C4 经 *Hind* III 酶切后的酶切片段与双元表达载体 pBinPLUS^[11] 相连接,从而获得 AYVCNV 和 StaLCV 的瞬时表达载体 pBin-AYVCNV4 和 pBin-StaLCVC4。以 *Hind* III 酶切没有插入 C4 基因的 pRTL2 载体的酶切片段与经 *Hind* III 消化的 TRV RNA2(PTV00)或 pBinPLUS 载体相连接作为实验中所用对照载体。

表 1 载体构建及半定量 RT-PCR 所用的特异性引物

Primer	Nucleotide sequences (5'→3')	Restriction sites
Hn5C4 F	ACAGAGCTCATGGGAGCCCTCATAT	<i>Sac</i> I
Hn5C4 R	CACGGATGCTTACATTAAGAGCCTC	<i>Bam</i> H I
Hn2C4 F	ATAGAGCTCATGAAGATGGGACTCC	<i>Sac</i> I
Hn2C4 R	CGCGGATGCTTAATATATTTGAGGGC	<i>Bam</i> H I
mGFP5-ER F	ACCCAGATCATATGAAGAGG	—
mGFP5-ER R	TTGGGATCTTTCGAAAGGGC	—

1.3 农杆菌浸润接种

构建的载体 TRV-AYVCNV4、TRV-StaLCVC4、pBin-AYVCNV4 和 pBin-StaLCVC4 通过电击转化的方式导入农杆菌 *C₅₈ C₁*。挑取含有重组质粒的农杆菌于含抗生素(Km + Rif, 100 μg/mL)的 LB 液体培养基中振荡培养 24h,离心收集菌体,用含有终浓度为 10mmol/L MgCl₂, 10mmol/L MES(pH 5.6) 和 150 μmol/L 乙酰丁香酮的无菌水溶液重新悬浮,调整菌液浓度使其 OD₆₀₀ 约为 1.5 左右,室温下放置 2h;用 1mL 注射器针头在供试植物叶片背部刺 2~3 小孔,一手按住叶面小孔处,一手用无针头的针管将菌液沿小孔

慢慢注入叶片组织空隙中。TRV 载体接种时,将含 C4 基因的 RNA2 载体(TRV-AYVCNV4、TRV-StaLCVC4)的农杆菌与含有 RNA1 的农杆菌等量混合并在室温下放置 1~2h 后进行接种。接种植物置于 25℃ 培养,观察 TRV-AYVCNV4、TRV-StaLCVC4 接种 *N. benthamiana* 后产生的症状,并在 UV 灯下观察 16c 转基因株系接种 pBin-AYVCNV4 和 pBin-StaLCVC4 后 GFP 的表达情况。

1.4 GFP 荧光观察和拍照

农杆菌浸润接种后不同时间利用手提式长波长紫外灯(254nm, 100W Black Ray model B 100 AP, UVP, Upland, CA)在暗室中对转基因本氏烟的 GFP 荧光进行检测,用带有 UV 镜和黄色滤光片的 Nikon 5000 数码相机进行 GFP 荧光拍照。

1.5 RNA 的提取

TRV-AYVCNV4 或 TRV-StaLCVC4 浸润接种 *N. benthamiana* 14d 后采收植株的新叶, pBin-AYVCNV4 和 pBin-StaLCVC4 浸润接种转基因本氏烟 6~8d 后剪取叶片的浸润部分,采集材料采用 TRIzol 一步法提取植物总 RNA。

1.6 RT-PCR 及半定量 PCR 检测

抽提的植物总 RNA 加入 5 μL DTT、2 μL 2mol/L MgCl₂ 和 1 μL RNAase-free DNAase 37℃ 处理 2h,处理完后用酚/氯仿回收纯化,然后取 2 μg RNA 加入 oligo d(T) 引物和反转录酶进行 cDNA 第一链的合成。再以 cDNA 为模板,利用特异性引物(表 1)对其进行 PCR 扩增,在半定量 PCR 中以延长因子-1-α(Elongation factor 1-alpha 1 gene, *EF-1-α*)作为半定量 RT-PCR 的内参。分别在 15、18、21、24、27 和 30 个 PCR 循环时取出 7 μL PCR 反应产物。

2 结果

2.1 AYVCNV 和 StaLCV 的 C4 基因是致病的关键因子

为了明确 C4 基因是否是一个致病决定因子,我们分别构建了 TRV 表达 AYVCNV 和 StaLCV C4 基因的载体。经过改造后的 TRV 载体仅能在植株上引起轻微的症状并能够侵染植物的分生组织^[12],因此本研究选用 TRV 作为表达 C4 基因的病毒载体。将含有 TRV-AYVCNV4 或 TRV-StaLCVC4 载体的农杆菌浸润接种本氏烟,10d 后接种植株都出现了叶片卷曲、叶片皱缩、畸形等类似于病毒侵染所产生的症状,15d 后接种植株的叶片出现坏死斑同时伴随有部分叶脉的坏死,而在接种了对照空载体的

植株中,除了 TRV 病毒载体本身所引起的轻微症状外,没有表现出任何明显的症状(图 1)。同时发现植株在接种后所产生的症状是系统性的,即症状不仅局限于接种叶片,在植株的新叶上也能观察到,这表明即使 C4 基因单独进行表达也能对植株的生长发育造成明显的影响。

为了分析浸润接种的植株中 C4 基因的表达情况,在接种 14d 后,对表现出症状的植株以及对照植株分别提取了植物总 RNA,并以 AYVCNV 和 StaLCV 的特异性引物作了反转录 PCR (RT-PCR) 扩增,结果在表现症状的植株中,都能扩增到一条 300bp 大小的特异性条带,而在对照植株中则没有扩增到条带(结果未显示),因此证明 AYVCNV 和 StaLCV C4 基因都在植株中得到了表达。

图 1 表达 AYVCNV 和 StaLCV C4 的 TRV 病毒载体接种本氏烟后诱导产生的症状

Fig.1 Symptoms of *N. benthamiana* plants infected with TRV constructs expressing C4 gene of AYVCNV or StaLCV. A: From left to right, *N. benthamiana* plants infected with TRV-StaLCVC4, TRV-AYVCNV4 and control vector; B: From left to right, *N. benthamiana* leaves inoculated with TRV-StaLCVC4, TRV-AYVCNV4 and control vector.

2.2 Hn5-4 C4 和 Hn2 C4 是 RNA 沉默的抑制子

为了确定 AYVCNV 和 StaLCV C4 基因能否抑制 RNA 沉默,我们又构建了表达 C4 基因的瞬时表达载体 pBin-AYVCNV4 和 pBin-StaLCVC4。将 AYVCNV 和 StaLCV C4 的瞬时表达载体与 35S 启动子驱动的 *gfp* 正义链表达载体(pBin-mGFP5-ER)共同浸润转 *gfp* 基因的本氏烟,由于外源 *gfp* 基因的引入将引起转基因植株内的 *gfp* 基因发生沉默,因此浸润区将在紫外灯下发出红光,但如果与之共浸润的基因具有 RNA 沉默的抑制功能,植株的浸润区在紫外灯下仍将保持 GFP 所特有的绿色荧光。浸润 6~7d 后,以对照载体与 pBin-mGFP5-ER 共浸润的浸润区由于 GFP 的 mRNA 被降解在紫外灯下呈

现红色;而以 pBin-AYVCNV4 或 pBin-StaLCVC4 与 pBin-mGFP5-ER 共浸润后,浸润区在紫外灯下能观察到类似 CMV 2b 基因及 TEV HC-Pro 基因的农杆菌与 pBin-mGFP5-ER 共浸润后发出的绿色荧光(图 2)。这些结果表明,AYVCNV 和 StaLCV C4 蛋白是由 *gfp* 正义链引起的基因沉默的抑制子。

图 2 StaLCV 和 AYVCNV 编码的 C4 蛋白抑制 *gfp* 基因的局部沉默

Fig.2 Suppression of *gfp* local silencing by C4 protein of StaLCV and AYVCNV. The leaves of *gfp* transgenic 16c plants were co-infiltrated with C4 suppressor constructs and 35S::GFP construct, the TEV HC-Pro and CMV 2b suppressor constructs were used as controls. The photographs were taken at 7 days post-infiltration.

利用半定量 PCR 对浸润区 GFP 的 mRNA 水平进行了检测,结果发现对照载体与 pBin-mGFP5-ER 共浸润后,浸润区 GFP 的 mRNA 水平明显比 pBin-AYVCNV4 或 pBin-StaLCVC4 与 pBin-mGFP5-ER 共浸润后的浸润区 GFP mRNA 的积累水平要低,而作为 RNA 定量标准的内参基因 *EF-1- α* 的 mRNA 水平在不同浸润组合的植株中都是相同的(图 3)。

3 讨论

AC4 基因在双组份双生病毒中的功能具有多样性,即在不同的双生病毒中,AC4 基因很可能具有不

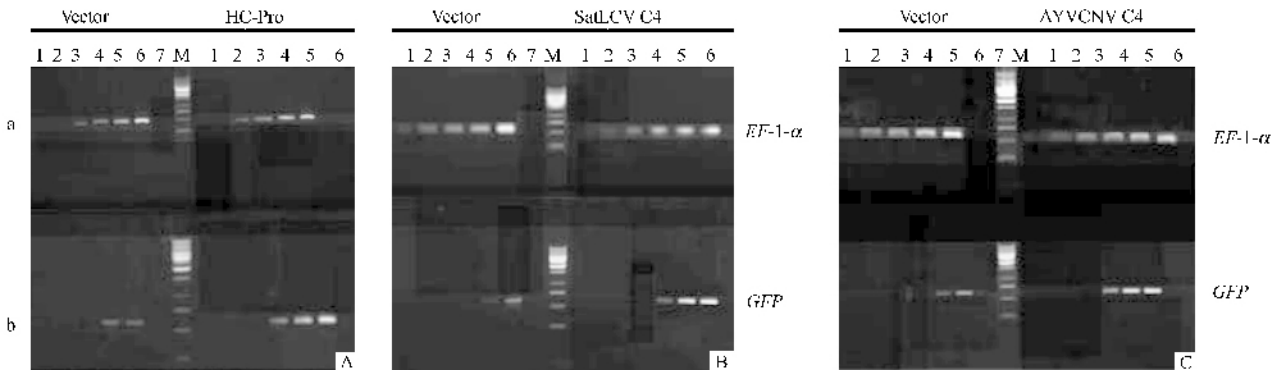


图3 TEV HC-Pro (I)、StaLCV C4 (II) 和 AYVCNV C4 (III) 抑制 *gfp* 基因沉默的本氏烟植物的半定量 RT-PCR 检测

Fig.3 Semi-quantitative RT-PCR analysis showing the effect of suppression of *gfp* silencing with TEV HC-Pro (A), StaLCV C4 (B) and AYVCNV C4 (C) in *N. benthamiana*. (a) PCR products for elongation factor 1-alpha (*EF-1- α*) derived from *N. benthamiana* leaves agro-infiltrated with pBin-mGFP5-ER and the control vector (left) or with pBin-mGFP5-ER and TEV HC-Pro (A, right), pBin-mGFP5-ER and StaLCV C4 (B, right) or pBin-mGFP5-ER and AYVCNV C4 (C, right). Gene *EF-1- α* served as an internal control for RNA quantity in RT-PCR; (b) PCR products of *gfp* gene from silenced *N. benthamiana* leaves agro-infiltrated with pBin-mGFP5-ER and the control vector (left) or non-silenced *N. benthamiana* leaves agro-infiltrated with TEV HC-Pro (A, right), pBin-mGFP5-ER and StaLCV C4 (B, right) or pBin-mGFP5-ER and AYVCNV C4 (C, right). Lanes 1 ~ 6 correspond to products from PCR cycle numbers 15, 18, 21, 24, 27 and 30. Lane 7 represents the negative control. Lane M represents molecular mass marker.

同的功能,迄今为止,AC4 基因的功能还不是很明确^[10]。但在多数单组份双生病毒中,C4 基因是一类主要的致病因子。在转基因植物中表达烟草曲叶病毒(*Tobacco leaf curl virus*, ToLCV)的 C4 基因可以诱导植物产生类似病毒侵染的症状^[13],番茄黄曲叶病毒(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)的 C4 基因则与病毒在寄主植物中的移动有关^[14]。由于本研究中所采用的两种病毒 AYVCNV[△]和 StaLCV^[15] 都已被证实是单组份病毒,因此为了确定病毒的 C4 基因是否与致病有关,我们对 AYVCNV 和 StaLCV C4 的基因功能进行了研究,在寄主植物中单独对上述两种病毒的 C4 基因进行表达都能诱导植物产生相应的症状。浸润接种 AYVCNV 或 StaLCV C4 基因的本氏烟产生的症状极其相似,都表现为叶片卷曲、畸形、叶片坏死,这与已报道的甜菜曲顶病毒(*Beet curly top virus*, BCTV) C4 基因^[16]的功能类似,因此 AYVCNV 或 StaLCV 的 C4 基因很可能也参与了寄主植物细胞分裂的调控。TRV 病毒载体可以在寄主中高水平表达 AYVCNV 或 StaLCV 的 C4 基因,而在正常情况下 C4 基因的表达会受到病毒基因组中其它基因的调控^[17],因此单独在植物中表达 C4 基因引起的症状较严重。对 AYVCNV 或 StaLCV C4 蛋白的氨基酸序列进行比较发现,它们之间的同源性很低,但是它们在功能上却具有趋同性,与此相反的是番茄曲叶病毒(*Tomato leaf curl virus*, TLCV)的 C4 基因

与 TYLCCNV 的 C4 基因具有极高的同源性,但它们却表现出不同的功能,在植物中表达 TLCV 的 C4 基因可以引起植物叶片皱缩、畸形,而表达 TYLCCNV 的 C4 基因却不能影响植物细胞周期的调控,在本氏烟中以 PVX 载体表达 TYLCCNV 的 C4 基因并不能引起明显症状^[18]。

为了证明 AYVCNV 和 StaLCV C4 蛋白是否是 RNA 沉默的抑制子,我们对它们作了沉默抑制分析,表达 AYVCNV 或 StaLCV C4 基因的瞬时表达载体都能抑制 *gfp* 基因的局部 RNA 沉默,使浸润区在紫外灯下仍保持 GFP 蛋白所特有的绿色荧光。利用 RT-PCR 对浸润区 GFP 蛋白 mRNA 进行的检测表明 AYVCNV 和 StaLCV C4 蛋白均能阻止沉默中 GFP 蛋白 mRNA 的降解,根据以上结果,我们认为 AYVCNV 和 StaLCV 的 C4 蛋白是 RNA 沉默的抑制子。

RNA 沉默在植物与病毒的进化过程中具有十分重要的作用,作为植物来说,它需要一种机制来保护自身不受病毒侵染,病毒为了成功侵染寄主,相应的也需要一种机制来对抗寄主植物的防卫反应,因此在 RNA 沉默与沉默的抑制间存在着一种平衡,这种平衡极大地影响了病毒与寄主间的互作^[19]。对沉默以及沉默抑制机制的了解具有极其重要的意义,因此为了更好地了解及应用 RNA 的沉默与沉默抑制,我们必须对病毒的致病机理及病毒与植物间的互作展开深入研究。

参 考 文 献

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, **391**(6669): 806 – 811.
- [2] Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, *et al.* Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J*, 2001, **27**(6): 581 – 590.
- [3] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Gene Dev*, 2001, **15**(2): 188 – 200.
- [4] Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 1999, **286**(5441): 950 – 952.
- [5] Hammond SM, Bernstein E, Beach D. *et al.* An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 2000, **404**(6775): 293 – 296.
- [6] Tang GL, Reinhart BJ, Bartel DP, *et al.* A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Gene Dev*, 2003, **17**(1): 49 – 63.
- [7] Moissiard G, Voinnet O. Viral suppression of RNA silencing in plants. *Mol Plant Pathol*, 2004, **5**(1): 71 – 82.
- [8] Trinks D, Rajeswaran R, Shivaprasad PV, *et al.* Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J Virol*, 2005, **79**(4): 2517 – 2527.
- [9] van Wezel R, Dong XL, Liu HT, *et al.* Mutation of three cysteine residues in Tomato yellow leaf curl virus-China C2 protein causes dysfunction in pathogenesis and posttranscriptional gene-silencing suppression. *Mol Plant Microbe Interac*, 2002, **15**(3): 203 – 208.
- [10] Vanitharani R, Chellappan P, Pita JS, *et al.* Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J Virol*, 2004, **78**(17): 9487 – 9498.
- [11] van Engelen FA, Mollhoff JW, Conner AJ, *et al.* pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Res*, 1995, **4**(2): 288 – 290.
- [12] Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J*, 2001, **25**(2): 237 – 245.
- [13] Krake LR, Rezaian MA, Dry IB. Expression of the tomato leaf curl geminivirus C4 gene produces virus-like symptoms in transgenic plants. *Mol Plant Microbe Interac*, 1998, **11**(5): 413 – 417.
- [14] Jupin I, Dekouchkovsky F, Jouanneau F, *et al.* Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): involvement of the protein encoded by ORF C4. *Virology*, 1994, **204**(1): 82 – 90.
- [15] Xiong Q, Fan S, Guo X, *et al.* *Stachytarpheta leaf curl virus* is a novel monopartite begomovirus species. *Arch Virol*, 2005, **150**(11): 2257 – 2270.
- [16] Latham JR, Saunders K, Pinner MS. *et al.* Induction of plant cell division by *Beet curly top virus* gene C4. *Plant J*, 1997, **11**(6): 1273 – 1283.
- [17] Sunter G, Hartitz MD, Bisaro DM. Tomato golden mosaic virus leftward gene expression: autoregulation of geminivirus replication protein. *Virology*, 1993, **195**(2): 275 – 280.
- [18] van Wezel R, Dong XL, Blake P, *et al.* Differential roles of geminivirus Rep and AC4 (C4) in the induction of necrosis in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Pathol*, 2002, **3**(6): 461 – 471.
- [19] Carrington JC, Whitham SA. Viral invasion and host defense: strategies and counter-strategies. *Curr Opin Plant Biol*, 1998, **1**(4): 336 – 341.

The C4 proteins of *Ageratum yellow vein China virus* and *Stachytarpheta leaf curl virus* are suppressors of RNA silencing

XIONG Qing, ZHOU Xue-ping*

(Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract RNA silencing is a highly conserved mechanism in many eukaryotic organisms that involves sequence-specific RNA degradation. One of the important roles of RNA silencing is antiviral infection. To counter this defense mechanism, many plant viruses have evolved or acquired functional proteins (suppressors) for suppression of RNA silencing. Geminiviruses are a family of small circular single-stranded DNA (ssDNA) viruses that cause severe diseases in major crop plants worldwide. AC2 (C2) and AC4 (C4) proteins of many geminiviruses were reported to be suppressors of RNA silencing. *Ageratum yellow vein China virus* (AYVCNV) and *Stachytarpheta leaf curl virus* are two distinct geminiviruses identified in China. In this study, the functions of C4 of AYVCNV and StaLCV were studied, analysis of infectivity of AYVCNV and StaLCV C4 genes using *Tobacco rattle virus* (TRV) vector were carried out in *Nicotiana benthamiana* plants, *N. benthamiana* plants expressing C4 can induce the virus-like symptoms, indicating that the C4 gene of AYVCNV or StaLCV is symptom determinant. In experiment of suppression of RNA silencing, C4 protein of AYVCNV or StaLCV can suppresses the local silencing of *gfp* in transgenic *N. benthamiana* plants (16c), suggests that both of them are suppressors of RNA silencing. The above results indicate that C4 of AYVCNV or StaLCV is a symptom determinant and suppressor of RNA silencing.

Keywords: Geminiviruses; *Ageratum yellow vein China virus*; *Stachytarpheta leaf curl virus*; Suppressor; RNA silencing

Foundation items: Cultivation Fund of the Key Scientific and Technical Innovation Project, Ministry of Education of China (705025); National Natural Science Foundation of China (30530520)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86971680; E-mail: zzhou@zju.edu.cn

Received: 25 April 2006/Accepted: 21 August 2006/Revised: 11 September 2006 © 2006 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn