

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.09.004

陈琪, 颜复林, 姜俊遥, 等. CTV 强弱毒分离株中 p20 的表达特征及其对 SA 通路相关基因的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(8): 45-54.

CTV 强弱毒分离株中 p20 的表达特征及其对 SA 通路相关基因的影响

陈琪¹, 颜复林¹, 姜俊遥¹, 王洪苏^{1,2},
陈静¹, 刘露勤¹, 梁佳梅¹, 刘金香¹

1. 西南大学 柑桔研究所, 重庆 400712; 2. 四川省中医药科学院, 成都 610041

摘要: 为明确柑橘衰退病毒(CTV)强弱毒分离株中沉默抑制子 p20 的表达特性及其对 SA 通路关键基因的转录水平, 采用 RT-PCR、cDNA 克隆及基因组测序等技术获得 p20 基因序列, 运用 MEGA7 和 DNAMAN 软件对 CTV 强弱毒分离株的 p20 氨基酸序列进行系统进化树构建和比对分析. 结果表明, 中国弱毒分离株 CTLJ 与 T30, T358 之间的亲缘关系最近, 同源率为 98.35%. 进一步通过 Western blot 分析表明, CTV 强分离株 CT14A 在甜橙嫩皮中 p20 的表达水平显著高于弱毒分离株 CTLJ, 然后探究了这两种强弱毒株间 p20 的沉默抑制能力是否有差异, 结果表明强毒分离株 CT14A 和弱毒分离株 CTLJ 的 p20 蛋白均具有沉默抑制子活性, 但是二者沉默抑制活性无显著差异. 最后, RT-qPCR 技术定量分析结果表明, 烟草中瞬时表达 p20 会诱导 SA 信号通路关键基因 *PR1*, *PR1a* 和 *NPR1* 的转录水平发生变化.

关键词: 柑橘衰退病毒; p20 蛋白; 沉默抑制子; 水杨酸

中图分类号: S436.66

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2024)09-0045-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Expression Characteristics p20 of the Severe and Mild Strains of CTV and Its Effect on SA Pathway Related Genes

CHEN Qi¹, YAN Fulin¹, JIANG Junyao¹, WANG Hongsu^{1,2},
CHEN Jing¹, LIU Luqin¹, LIANG Jiamei¹, LIU Jinxiang¹

1. Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China;

2. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China

收稿日期: 2023-12-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31972237); 国家重点研发计划项目(2021YFD1400800).

作者简介: 陈琪, 硕士研究生, 主要从事柑橘衰退病毒研究.

通信作者: 刘金香, 研究员.

Abstract: To elucidate the expression characteristics of silencing suppressor p20 of severe and mild isolates of citrus tristeza virus (CTV), and its effect on the transcription level of key genes in SA pathway, the techniques of RT-PCR, cDNA cloning and genomic sequencing were used to obtain p20 gene sequence. The p20 amino acid sequences of CTV severe and mild isolates were analyzed by software DNAMAN and MEGA7. The results showed that the mild strain CTLJ had the closest genetic relationship with T30 and T358, with a homology of 98.35%. Furthermore, Western blot analysis showed that the expression level of p20 protein of CT14A of severe CTV isolate in tender bark of sweet orange was significantly higher than that of CTLJ of mild CTV isolate. The difference on silencing inhibition ability of p20 between the two isolates was explored. The results showed that both severe isolate CT14A and mild isolate CTLJ had silencing inhibitor activity, but there was no significant difference between them. Finally, plant transient expression vector was constructed and transformed to *Nicotiana benthamiana* by *Agrobacterium tumefaciens*. The RT-qPCR was used to analyze the transcriptional levels of key genes in SA pathway. The result showed that transient expression of p20 in *N. benthamiana* caused changes in the transcriptional levels of *PR1*, *PR1a* and *NPR1*.

Key words: citrus tristeza virus (CTV); p20 protein; silencing suppressor; salicylic acid

造成柑橘产业重大经济损失的柑橘衰退病是由柑橘衰退病毒(citrus tristeza virus, CTV)引起的^[1-2]. CTV 编码的 RNA 沉默抑制子包括 p23, p20 和 p25, 其中 p20 蛋白聚集在无定形的包涵体中, 细胞内和细胞间沉默的发生也能被 p20 蛋白同时抑制^[3-4]. CTV 编码的这 3 个 VSR 对柑橘的抗性有显著影响, 其中 p20 的甲基化与 CTV 的致病机制可能有关联^[5]. CTV 也会强烈影响柑橘体内激素代谢的途径, 有研究表明柑橘受到 CTV 的侵染后, GA 调节通路的有些相关基因表达会被显著诱导^[6]. 因此研究 CTV 强弱分离株中 p20 的表达特征, 分析对 SA 通路关键基因表达的影响, 对于解析 CTV 致病机理及柑橘衰退病的预防有重要理论和实践意义.

CTV 在柑橘中主要引起速衰型(QD)、茎陷点型(SP)和苗黄型(SY)3 种类型的症状, 不同的 CTV 分离株, 致病力强弱有所差异^[7-8]. CTV 属于长线形病毒属(*Closterovirus*), 是正单链 RNA 病毒, 约是 19.3 kb, 含有 12 个开放阅读框, 能够编码 19 种以上分子量不同的蛋白产物^[1, 9]. RNA 沉默(VSR)的病毒抑制因子在病毒成功入侵植物中起着重要作用, 作为一种反防御策略, 大多数植物病毒已经进化出 RNA 沉默(VSR)的病毒抑制因子及靶向植物抗病毒沉默反应的路径^[10-11]. 通过干扰 miRNA 途径、siRNA 的积累或 miRNA* 的特异性积累等方式 RNA 沉默抑制因子可抑制寄主的基因沉默, 进而影响病毒在植株中的复制及病毒致病性^[12-13]. p20 转基因沉默植株增强了寄主对 CTV 的抗病性, 表明 p20 与 CTV 的致病性密切相关^[14-15]. 王亚飞等^[16]发现 CTV 甜橙 p20 的种群结构很复杂, 种群变异水平更高; 而基因沉默抑制子的关键氨基酸位点变异对病害症状有一定影响, 茉莉 H 病毒(jasmine virus H, JaVH)的 CP 蛋白的 13 个氨基酸位点(Trp 28, Arg 40, Arg 58, Gly 75, Ile 83, Thr84, Val 108, Phe 111, Ser 115, Lys 123, Tyr 124, Arg 132 和 Lys 200)主要影响该蛋白的 VSR 功能^[17]. 甘蔗黄叶病毒(sugarcane yellow leaf virus, SCYLV)的 RNA 沉默抑制子 P0 蛋白的保守区域(N 端 15 个氨基酸和 C 端 102 个氨基酸)是 P0 发挥沉默抑制子功能所必需的, 这些氨基酸位点正向突变会影响病毒的致病性^[18]. CTV p23 几个氨基酸位点变异会影响基因沉默活性^[19].

越来越多的研究表明, SA 通路 PR 蛋白在植物对病原体感染的反应中起着关键作用, 它们可以在植物中被激活以响应病原体的攻击, *PR1* 基因转录本的表达水平是许多植物病原体系统中植物防御反应的最佳表征指标之一^[20-22]. *NPR1* 是 SA 信号通路的主要调节因子, 控制包括 SAR 在内的多种免疫反应, 在 SA 信号转导中, SAR 相关基因的上调表达导致植物抗病性增加^[23]. 当 CTV 侵染时水杨酸(SA)介导的信

号转导网络会激活寄主植物对入侵病原体的防御反应, 途径上相关基因的转录水平也会发生相应的变化. 黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)侵染改变了寄主的 SA 代谢途径^[24], 花椰菜花叶病毒(cauliflower mosaic virus, CaMV)沉默抑制子 P6 烟草中瞬时表达及转基因植物改变了该病毒诱导的 SA 信号通路关键基因 *PR-1* 的转录水平^[25].

p20 蛋白是 CTV 编码的 3 个 RNA 沉默抑制子之一, 对致病性具有重要的作用. 明确强弱毒分离株中沉默抑制子 p20 的表达特性, 通过在烟草中瞬时表达 p20 基因, 分析 p20 沉默抑制子活性及其对 SA 信号通路关键基因 *PR1*, *PR1a* 和 *NPR1* 的影响表达水平, 旨在为深入开展柑橘衰退病的预防研究提供依据.

1 材料与方法

试验于 2021—2023 年在西南大学柑桔研究所脱毒中心实验室完成.

1.1 材料

1.1.1 试验材料

本研究所用的主要试验材料为西南大学柑桔研究所脱毒中心接毒 1 年以上的柑橘衰退病毒源植株强毒株 CT14A 和弱毒株 CT11A, CT16-2 及 CTLJ; 其次是用于 p20 变异分析的从 NCBI 中选用已确定强弱的 9 个 CTV 分离株. 具体信息见表 1. 另外, 还有用于遗传转化的 T-CT14A p20 载体及本实验室保存的 16c 烟草(转 GFP 基因本氏烟 16c 株系)和本氏烟(*Nicotiana benthamiana*).

表 1 从 NCBI 中选用已确定强弱 CTV 分离株

分离株代号	NCBI 登录号	地理来源	症状特征	发表者及年份
T30	AF260651.1	美国	弱毒株	Alblach-marti et al., 2000
HA16-5	GQ454870	美国	弱毒株	Melzer et al., 2009
HA18-9	GQ454869	美国	弱毒株	Melzer et al., 2009
CT11A	JQ911664	中国	弱毒株	Wang et al., 2012
T385	Y18420	西班牙	弱毒株	Vives et al., 1999
CT14A	JQ911663	中国	强毒株	Wang et al., 2012
T318A	DQ151548	西班牙	茎险点型强毒株	Ruiz-Ruiz et al., 2006
T36	U16304	美国	速衰型强毒株	Karasev et al., 1995
VT	U56902.1	以色列	茎险点型强毒株	Mawassi et al., 1996

1.1.2 试剂、克隆载体及菌株

RNAios Plus 试剂、2×PrimeSTAR © Max DNA Polymerase、DL2000 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司, NovoScript © Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix 反转录酶试剂盒购自 Novoprotein 公司, PGEM-T Easy Vector System I 购自 Promega 公司, EasyPure Quick Gel Extraction Kit 试剂盒购自 全式金公司, All-in-One 5xRT MasterMix (G592)、BlasTaq™ 2xqPCR MasterMix (G891)购于镇江爱必梦(ABM)生物科技有限公司, 质粒小提试剂盒购自 Tiangen 公司, 植物蛋白提取试剂盒购自 Solarbio Life Sciences 公司, anti-GFP 购自 Proteintech, PGEM-T Easy Vector System I 购自 Promega 公司, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)DH5α 和农杆菌 GV3101 感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司. 所用引物由北京擎科生物科技有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 柑桔叶片总 RNA 的提取

称取 0.1 g 左右的柑桔叶片主脉及附近叶肉, 经液氮速冻后用冷冻磨样机充分研磨后加入 1 mL

RNAios Plus 提取液,充分振荡混匀.后续步骤按照 RNAios Plus 说明书进行.

1.2.2 *p20* 基因扩增及纯化

本试验中克隆、测序了 CT16-2 和 CTLJ 2 个分离株的 *p20* 基因.以毒源 CT16-2 和 CTLJ 柑橘叶片的总 RNA 为模板,采用反转录试剂盒(Novoprotein 公司)合成 cDNA,随即用特异性引物 kz CT14Ap20-TF (5'aagcgatccagattccttc-3')和 kz CT14Ap20-TR(5'-gtttgtccgctagtatcg-3')进行 PCR 扩增.反应条件:98 ℃ 预变性 3 min;然后 98 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,34 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min.为了确保 PCR 的准确性,反应体系中应用了 2×PrimeSTAR © Max DNA Polymerase(TaKaRa 公司).PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,按全式金胶回收试剂盒说明书纯化回收目的片段.

1.2.3 *p20* 克隆与氨基酸序列分析

将纯化回收的目的 DNA 片段通过 pGEM-T Easy Vector(Promega 公司)连接,转化 *E. coli* DH5 α ,菌液 PCR 筛选阳性克隆 T-CT16-2 *p20* 和 T-CTLJ *p20*,随机挑选 4 个阳性克隆送北京擎科生物技术有限公司测序.将测序正确的 CT16-2 *p20* 和 CTLJ *p20* 氨基酸序列与从 NCBI 上下载已确定强弱 CTV 分离株的 *p20* 氨基酸序列通过 DNAMAN 和 MEGA7 软件进行序列比对分析和构建系统发育树.

1.2.4 植物表达载体的构建及农杆菌转化

用 *Sal* I 和 *Kpn* I 双酶切 T-CTLJ *p20* 和 T-CT14A *p20*,回收目的片段,与双元表达载体 pCHF3 用双酶切法连接,转化大肠杆菌 DH5 α 并筛选阳性克隆.测序验证重组植物表达载体 pCHF3-CT14A *p20* 和 pCHF3-CTLJ *p20* 携带的 *p20* 基因序列正确后,再用热激法转化农杆菌 GV3101.

1.2.5 本氏烟瞬时表达 *p20*

pCHF3 空载体为对照,将携带 pCHF3-CT14A *p20* 和 pCHF3-CTLJ *p20* 植物表达载体的农杆菌 GV3101 浸润于本氏烟中.将农杆菌在 LB 液体培养基中 28 ℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8,离心收集菌体,重悬至 OD₆₀₀ 为 1.0.室温下黑暗静置 2 h 后,使用无针头的注射器将重悬液注射到 4~6 叶龄的本氏烟叶背.

1.2.6 沉默抑制子活性鉴定

以 TBSV 的 P19 为阳性对照,pCHF3 为阴性对照.将不同构建体组合转化的农杆菌和携带 GFP 基因的农杆菌等比例混合,分区共浸润本氏烟和 16c 烟草中,浸润 4 d 后,在暗室用手持紫外灯对侵染烟草叶片的 GFP 荧光表达情况进行观察.

利用植物总蛋白提取试剂盒(Solarbio LifeSciences)提取了瞬时表达的本氏烟叶片的总蛋白,用 anti-GFP(Proteintech)进行 Western blot, β -Actin 蛋白作为内参基因.用 Image J 软件测量各蛋白条带的灰度值,试验重复 3 次.

1.2.7 Western blot 检测 *p20* 表达特性

应用 TCA-丙酮沉淀法提取其总蛋白.经 SDS-PAGE 电泳,转 PVDF 膜,用实验室保存的 CTV *p20* 蛋白多克隆抗体进行 Western blot,用 Image J 软件测量各蛋白条带的灰度值.用 β -Actin 蛋白作为内参基因,以 *p20* 蛋白条带灰度值/ β -Actin 蛋白条带灰度值作为相对表达量,试验重复 3 次.

2 结果与分析

2.1 *p20* 氨基酸在强弱毒分离株间的变异位点分析

CTV *p20* 的 549 个核苷酸编码 182 个氨基酸,11 个分离株共有 25 个变异位点.弱毒株 CTLJ 有 9 个位点发生变异,是 11 个分离株中变异位点最多的.第 12 和 122 位氨基酸发生的变异为 S→T,第 19 位氨基酸发生的变异为 A→S,第 29 位氨基酸发生的变异为 V→I,第 94 和 138 位氨基酸发生的变异为 D→E,第 105 和 110 位氨基酸发生的变异为 M→V,第 142 位氨基酸发生的变异为 A→T.其中第 19 和 142 位氨基酸极性也发生了变化,并且第 12 和 29 位变异位点是 CTLJ 特有的,其余 7 个位点氨基酸在其他分离株

也发生了变异, 强毒株 CT14A p20 的氨基酸序列只有 3 个变异位点, 第 87 位氨基酸发生的变异为 V→I, 第 118 位氨基酸发生的变异为 T→I, 第 165 位氨基酸发生的变异为 A→S, 并且 CTV14A 毒株 p20 的氨基酸变异位点与 CTLJ 毒株 p20 的氨基酸变异位点均不相同(图 1)。

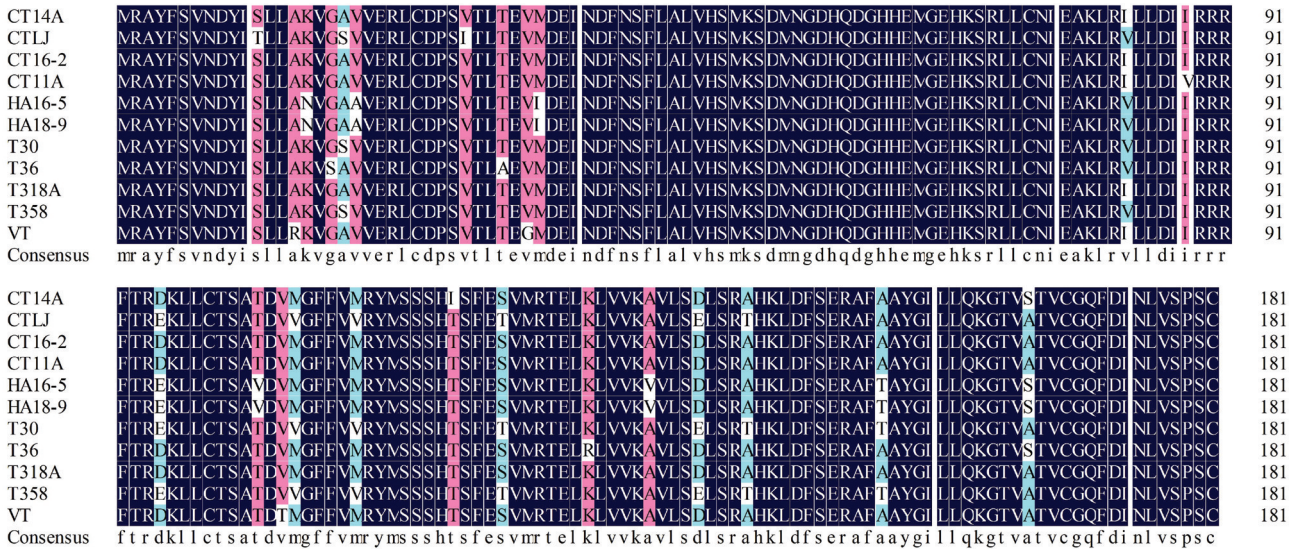
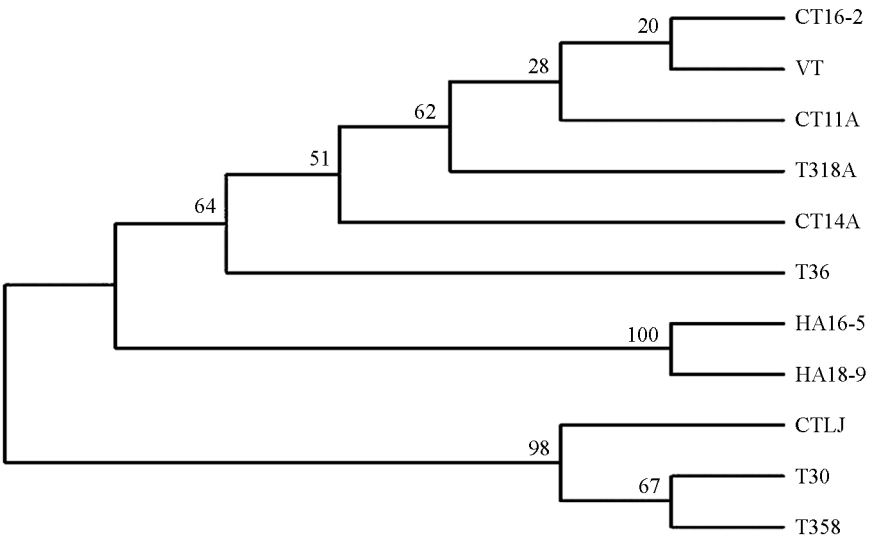


图 1 CTV 的 11 个分离株 p20 氨基酸序列比对

2.2 p20 氨基酸序列同源性分析

将从 NCBI 上选用已确定 CTV 强弱株系的 9 个分离株与中国的强毒株 CTA14 及弱毒株 CT11A, CT16-2 和 CTLJ 分离株 p20 的氨基酸序列一起通过软件 MEGA7 进行分析。系统进化树分析表明, 弱毒株 CTLJ 与弱毒分离株 T30, T385 聚为一簇, 亲缘关系最近, 同源性达到 98.35%。中国其他 3 个分离株 (CTA14, CT11A, CT16-2) 与 VT 和 T318A 聚为一簇。CTLJ 与其他 8 个株系间的同源性为 91.76%~94.51%, 是差异较大的一个株系(图 2)。

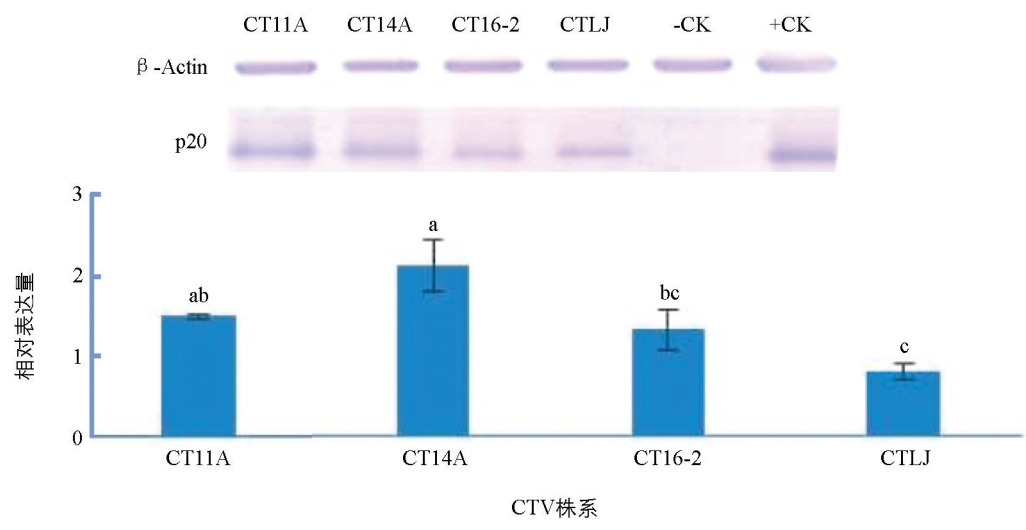


采用邻接法制作进化树, 自展值(Bootstrap)=2 000。

图 2 CTV 的 11 个分离株 p20 氨基酸序列系统进化树

2.3 p20 在强弱毒分离株间的表达差异分析

Western blot 分析了感染中国 CTV 强毒株 CT14A 和弱毒株 CT11A, CT16-2, CTLJ 的甜橙嫩皮中 p20 表达差异。强毒分离株 CT14A 侵染甜橙中的相对表达量均显著高于 CT16-2 和 CTLJ, 虽然比弱毒株 CT11A 的表达量高, 但二者差异不显著, 同时发现 CT14A 和 CTLJ 之间 p20 蛋白表达量的差异是最大的(图 3)。



误差棒相同字母不同表示误差有统计学意义($p < 0.05$).

图 3 不同 CTV 甜橙毒源嫩皮中 p20 蛋白相对表达量检测及分析

2.4 强弱毒分离株间的 p20 沉默抑制活性比较

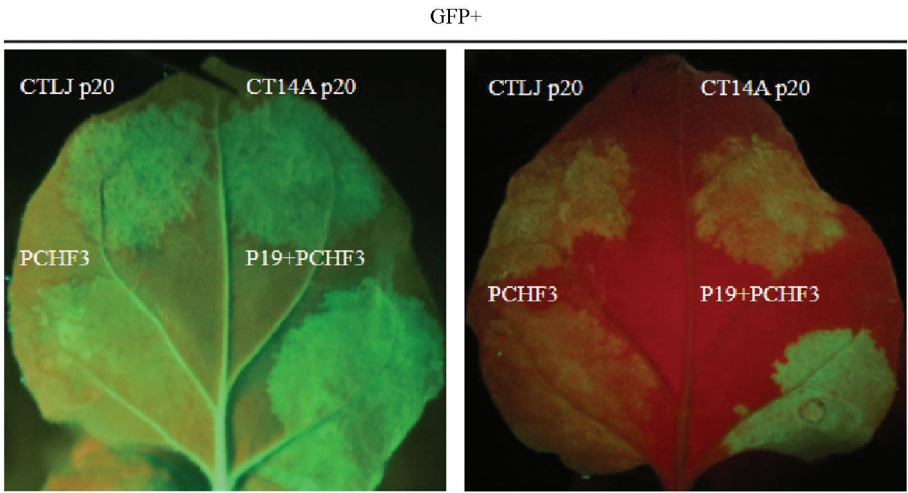
前面试验发现 CT14A 和 CTLJ 两种毒株的 p20 蛋白在甜橙嫩皮中的表达差异较大, 因此接下来探究了两种强弱毒株间 p20 的沉默抑制能力是否有差异, 构建强毒分离株 CT14A 和弱毒分离株 CTLJ p20 表达载体, 将 GFP 分别与 pCHF3-CT14A p20, pCHF3-CTLJ p20, P19/pCHF3(阳性对照), pCHF3(阴性对照)的农杆菌液等体积混合, 注射 16c 和本氏烟, 4 dpi 后, 在共渗表达 GFP+CT14A p20/CTLJ p20 和阳性对照(GFP+P19)的 16c 叶片中观察到 GFP 荧光, 而共渗表达 GFP+pCHF3 在 4 dpi 后只有微弱 GFP 荧光, 并且在本氏烟及 16c 烟草中 CT14A p20 和 CTLJ p20 浸润区域的 GFP 荧光信号均没有明显差异(图 4a). 使用 anti-GFP 抗体进行 Western blot 检测(图 4b), 结果表明 CT14A p20 和 CTLJ p20 表达时对应的 GFP 蛋白的表达量没有明显差异, 这与荧光观察的结果一致. 这一结果再次证明了 p20 具有沉默抑制能力, 但在强毒株 CT14A 和弱毒株 CTLJ 间其沉默抑制活性没有明显差异.

2.5 p20 改变 SA 信号途径基因的表达水平

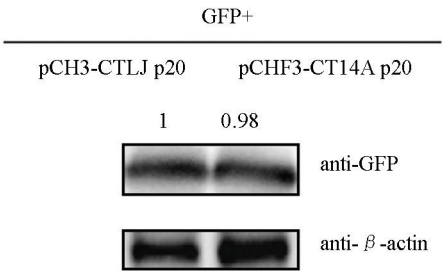
通过表达载体 pCHF3 将 CT14A p20 和 CTLJ p20 在本氏烟中瞬时表达. 农杆菌浸润 72 h 后, 检测了 p20 的表达水平以及 SA 信号通路关键基因 *PR1*, *PR1a* 和 *NPR1* 的转录水平, 结果表明在瞬时表达弱毒分离株 p20 烟草中 *PR1*, *PR1a* 和 *NPR1* 的表达水平均显著上升. 然而, 弱毒分离株 CTLJ p20 诱导的 *PR1a* 和 *NPR1* 的转录水平显著高于强毒株 CT14A p20, 暗示了植物对弱毒株病毒 p20 蛋白的响应强于强毒株(图 5).

3 讨论

防御病毒攻击可以通过植物拥有的 RNA 沉默机制来实现^[26], 为了抵消宿主先天免疫反应, 病毒可以通过表达 RNA 沉默抑制子(VRS)来破解宿主 RNA 沉默, 从而加强自身对宿主的侵染能力^[27]. 沉默抑制子中的某些氨基酸序列位点对其沉默活性及病毒致病力有着重要影响, 烟草曲茎病毒(tobacco curly shoot virus, TbCSV)V2 蛋白中保守的碱性氨基酸和环结构氨基酸是其抑制活性的关键, 其中 1~92 位氨基酸序列是局部 RNA 沉默抑制所必需的^[28]. Pazhouhandeh 等^[29]研究证明甜菜西方黄化病毒(beet western yellows virus, BWYV)P0 蛋白含有最小 F-box 基序, 定点突变 F-box 基序内的某个氨基酸能够导致病毒致病力降低和 P0 沉默抑制子功能减弱. CTV 沉默抑制子 p23 的第 93, 143 及 144 位的变异会降低基因沉默活性, 而第 175 位和第 182 位氨基酸变异不影响沉默抑制活性^[19]. 本研究发现中国弱毒分离株 CTLJ 与其他分离株 p20 氨基酸序列差异较大, 有 9 个氨基酸位点发生变异, 其中 2 个变异位点是 CTLJ 特有的, 并发现 CTLJ 和中国强毒分离株 CT14A 的 p20 沉默活性没有明显差异, 初步表明 CTLJ 沉默抑制子 p20



a. CT14A p20和CTLJ p20在16c烟草(左)和本氏烟草(右)植株的沉默抑制活性



b. 使用anti-GFP检测烟草叶片GFP的表达, β -actin作为内参

图 4 CT14A p20 和 CTLJ p20 的沉默抑制活性

的第 12 位和第 29 位氨基酸变异位点不影响沉默抑制活性, 这与前人研究出 CTV 沉默抑制子 p23 的第 175 位和第 182 位氨基酸变异不影响 p23 的沉默抑制活性结果类似, 说明第 12 位和第 29 位氨基酸基酸位点可能不是发挥 p20 沉默抑制功能的关键位点.

4 结论

有些氨基酸位点对蛋白的稳定性和表达水平有重要影响, 木尔坦棉花曲叶病毒(cotton leaf curl mul-tan virus, CLCuMuV)编码的沉默抑制子 V2 蛋白在 N 端第 4 位脯氨酸对蛋白功能影响很大^[30], CTV p23 中氨基酸 E95V96 和 M99L100 的变异改变了蛋白稳定性和转录水平^[19]. 印度番茄曲叶病毒(tomato leaf curl India virus, ToLCINV)和新竹番茄曲叶病毒(tomato leaf curl Hsinchu virus, ToLCHsV) AV2 蛋白氨基酸突变(前者 C84S、C86S, 后者 C89S)后可通过降低病毒积累量从而减弱病毒症状^[31-32]. 本研究发现强毒分离株 CT14A 与弱毒分离株 CTLJ 的氨基酸变异位点有所不同, CT14A 的 p20 在第 118 和 165 位发生变异, 而中国弱毒分离株在这些位点没有变异. p20 蛋白在强毒分离株 CT14A 感染的植株中相对表达量显著高于弱毒株 CT11A, CT16-2 和 CTLJ, 暗示了 p20 表达水平与 CTV 分离株的致病能力有关, 推测 CTV p20 蛋白不同株系间的变异位点也可能会影响 p20 蛋白的表达水平进而影响病毒的积累量. 对于植物病毒的侵染除了 RNA 沉默, 许多植物病毒还刺激宿主的其他基本防御反应, 如水杨酸(SA)防御反应等, SA 信号途径中 NPR1 的激活可以诱导病程相关(PR)蛋白的积累, 用以抵抗病毒的入侵^[33]. 番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus, TSWV)侵染提高了植物体内 SA 含量, 诱导了 SA 调控基因的表达^[34]; 一些基因沉默抑制子参与了病毒对 SA 通路的影响, 黄瓜花叶病毒(CMV)沉默抑制子 2b 在病毒诱导 SA 合成中发挥重要作用, 促进了 PR-1 转录水平, 这意味着 RNA 沉默与 SA 和 JA 之间可能存在联系^[24, 35]; 烟草脉带花叶病毒(tobacco vein banding mosaic virus, TVBMV)的沉默抑制子 HC-Pro 激活了寄主的 SA 信号通

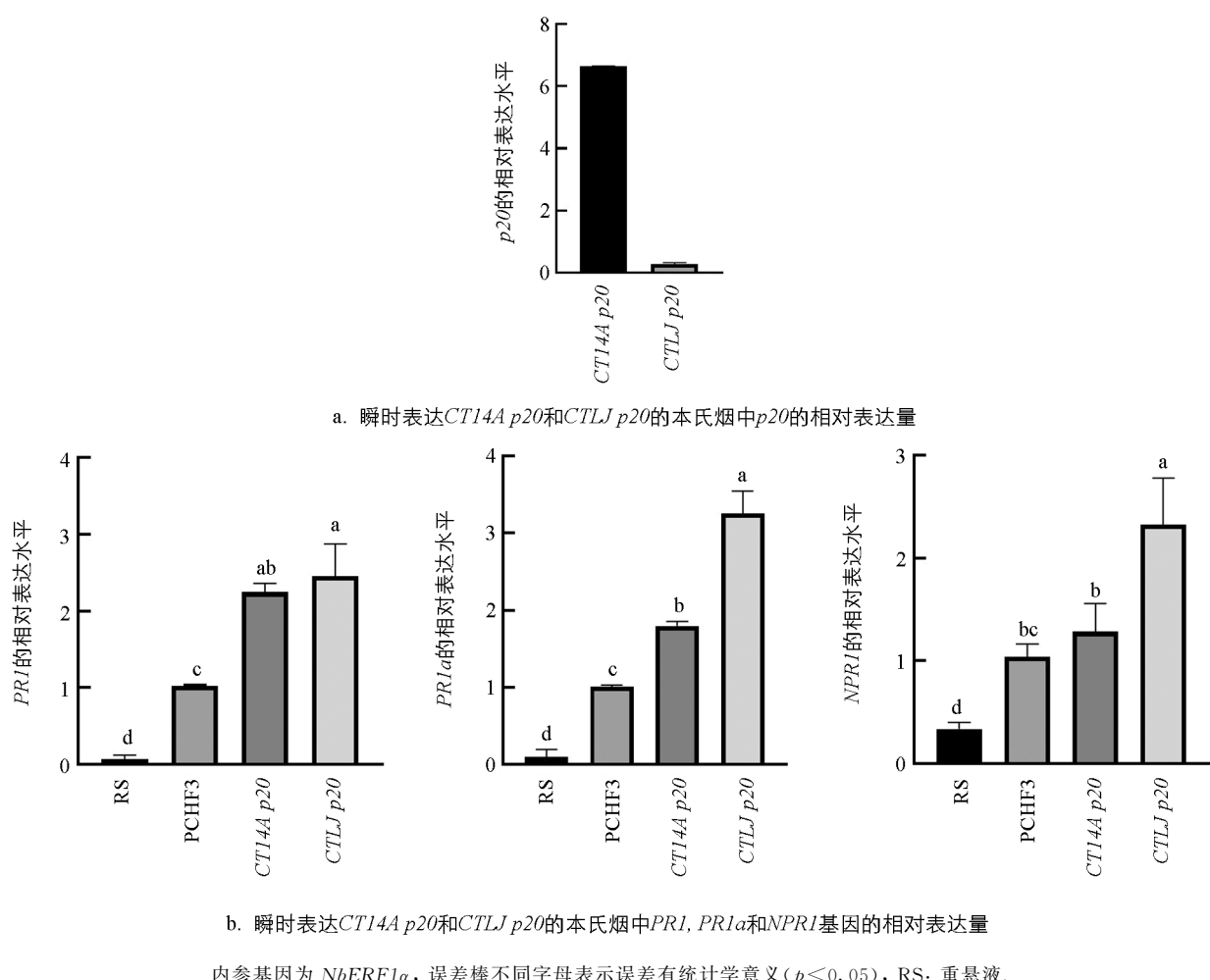


图 5 p20 对本氏烟中 SA 信号通路相关基因的表达

路^[36]。本研究中瞬时表达 p20 显著提高了强弱毒分离株中 SA 信号通路关键基因 *PR1*，*PR1a* 和 *NPR1* 表达水平，并且弱毒分离株 CTLJ 的 p20 的 SA 信号途径基因 *PR1a* 和 *NPR1* 表达水平显著高于强毒分离株 CT14A，表明 CTV 沉默抑制子 p20 会激活 SA 途径，并诱导相关的防御基因表达。这些研究为解析 CTV 致病机理及柑橘衰退病的预防奠定了良好基础。

中国弱毒分离株 CTLJ 氨基酸序列中有 9 个位点发生变异，其中 2 个氨基酸位点是该分离株所特有的；CTV 沉默抑制子 p20 在强弱毒分离株侵染的甜橙中表达水平存在显著差异，强毒分离株的表达水平显著高于弱毒分离株，p20 不仅改变了寄主中 SA 信号通路关键基因 *PR1*，*PR1a* 和 *NPR1* 的转录水平，而且弱毒分离株 CTLJ 中的 SA 信号途径基因 *PR1a* 和 *NPR1* 表达水平显著高于强毒分离株 CT14A，暗示了弱毒分离株对 SA 响应可能强于强毒分离株。本研究为解析 CTV 致病机理及柑橘衰退病的预防奠定了良好基础。

参考文献：

[1] 刘金香, 王欢欢, 王洪苏, 等. 橘蚜传播率不同的柑橘衰退病毒分离株 CPm 的表达特性和分子特征 [J]. 园艺学报, 2021, 48(5): 1023-1030.

[2] ROISTACHER C N. Should We Introduce Protective Isolates of Citrus Tristeza Virus [J]. Citrograph, 1992, 77(2): 5-9.

[3] GOWDA S, SATYANARAYANA T, DAVIS C L, et al. The P20 Gene Product of Citrus Tristeza Virus Accumulates in the Amorphous Inclusion Bodies [J]. Virology, 2000, 274(2): 246-254.

- [4] LU R, FOLIMONOV A, SHINTAKU M, et al. Three Distinct Suppressors of RNA Silencing Encoded by a 20-Kb Viral RNA Genome [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(44): 15742-15747.
- [5] FANELLI V, DE GIOVANNI C, SAPONARI M, et al. A Possible Role of CTV. 20 Gene Methylation in Response to Citrus Tristeza Virus Infection [J]. European Journal of Plant Pathology, 2018, 150(2): 527-532.
- [6] CHENG C Z, ZHANG Y Y, ZHONG Y, et al. Gene Expression Changes in Leaves of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Infected by Citrus tristeza Virus [J]. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2016, 91(5): 466-475.
- [7] POWELL C A, PELOSI R R, RUNDELL P A, et al. Breakdown of Cross-Protection of Grapefruit from Decline-Inducing Isolates of Citrus Tristeza Virus Following Introduction of the Brown Citrus Aphid [J]. Plant Disease, 2003, 87(9): 1116-1118.
- [8] LEE R F, KEREMANE M L. Mild Strain Cross Protection of Tristeza: a Review of Research to Protect Against Decline on Sour Orange in Florida [J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 259.
- [9] KARASEV A V, HILF M E, GARNSEY S M, et al. Transcriptional Strategy of Closteroviruses: Mapping the 5' Termini of the Citrus Tristeza Virus Subgenomic RNAs [J]. Journal of Virology, 1997, 71(8): 6233-6236.
- [10] PUMPLIN N, VOINET O. RNA Silencing Suppression by Plant Pathogens: Defence, Counter-Defence and Counter-Counter-Defence [J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(11): 745-760.
- [11] WU Q F, WANG X B, DING S W. Viral Suppressors of RNA-Based Viral Immunity: Host Targets [J]. Cell Host & Microbe, 2010, 8(1): 12-15.
- [12] CHAPMAN E J, PROKHNEVSKY A I, GOPINATH K, et al. Viral RNA Silencing Suppressors Inhibit the microRNA Pathway at an Intermediate Step [J]. Genes & Development, 2004, 18(10): 1179-1186.
- [13] PANTALEO V, SZITTYA G, BURGÁN J. Molecular Bases of Viral RNA Targeting by Viral Small Interfering RNA-Programmed RISC [J]. Journal of Virology, 2007, 81(8): 3797-3806.
- [14] TATINENI S, ROBERTSON C J, GARNSEY S M, et al. Three Genes of Citrus Tristeza Virus are Dispensable for Infection and Movement Throughout some Varieties of Citrus Trees [J]. Virology, 2008, 376(2): 297-307.
- [15] CHENG C Z, YANG J W, YAN H B, et al. Expressing P20 Hairpin RNA of Citrus Tristeza Virus Confers Citrus Aurantium with Tolerance/Resistance Against Stem Pitting and Seedling Yellow CTV Strains [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14(9): 1767-1777.
- [16] 王亚飞, 阮涛, 周彦, 等. 甜橙和柚中 CTV 强弱毒株系 p20 的遗传变异 [J]. 中国农业科学, 2017, 50(7): 1343-1350.
- [17] 朱丽娟, 张崇涛, 王耀伟, 等. 影响茉莉 H 病毒沉默抑制子功能关键氨基酸的鉴定 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2022, 51(1): 27-32.
- [18] 林艺华, 肖胜华, 刘营航, 等. 甘蔗黄叶病毒 P0 蛋白分子特性及其抑制 RNA 沉默活性 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(23): 4627-4636.
- [19] LI Z R, HE Y Z, LUO T, et al. Identification of Key Residues Required for RNA Silencing Suppressor Activity of P23 Protein from a Mild Strain of Citrus Tristeza Virus [J]. Viruses, 2019, 11(9): 782.
- [20] VAN LOON L C, REP M, PIETERSE C M J. Significance of Inducible Defense-Related Proteins in Infected Plants [J]. Annual Review of Phytopathology, 2006, 44: 135-162.
- [21] VLOT A C, DEMPSEY D A, KLESSIG D F. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease [J]. Annual Review of Phytopathology, 2009, 47: 177-206.
- [22] LIU R, LU J, XING J Y, et al. Characterization and Functional Analyses of Wheat *TaPR1* Genes in Response to Stripe Rust Fungal Infection [J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 3362.
- [23] ZHOU G H, SHABBIR R, SUN Z H, et al. Transcriptomic Analysis Reveals Candidate Genes in Response to Sorghum Mosaic Virus and Salicylic Acid in Sugarcane [J]. Plants, 2024, 13(2): 234.
- [24] MAUCK K E, DE MORAES C M, MESCHER M C. Biochemical and Physiological Mechanisms Underlying Effects of Cucumber Mosaic Virus on Host-Plant Traits that Mediate Transmission by Aphid Vectors [J]. Plant, Cell & Environment, 2014, 37(6): 1427-1439.

- [25] LOVE A J, GERI C, LAIRD J, et al. Cauliflower Mosaic Virus Protein P6 Inhibits Signaling Responses to Salicylic Acid and Regulates Innate Immunity [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47535.
- [26] GROENENBOOM M A C, HOGEWEG P. Modelling the Dynamics of Viral Suppressors of RNA Silencing [J]. Journal of the Royal Society, Interface, 2012, 9(68): 436-447.
- [27] GILLET F X, CATTONI D I, PETIOT-BÉCARD S, et al. The RYMV-Encoded Viral Suppressor of RNA Silencing P1 is a Zinc-Binding Protein with Redox-Dependent Flexibility [J]. Journal of Molecular Biology, 2013, 425(14): 2423-2435.
- [28] LI M J, LI C C, JIANG K R, et al. Characterization of Pathogenicity-Associated V2 Protein of Tobacco Curly Shoot Virus [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(2): 923.
- [29] PAZHOUHANDEH M, DIETERLE M, MARROCCO K, et al. F-Box-Like Domain in the Polerovirus Protein P0 is Required for Silencing Suppressor Function [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(6): 1994-1999.
- [30] 尚鹏祥, 张洁, 张琦, 等. 木尔坦棉花曲叶病毒 V2 蛋白 N 端保守脯氨酸对病毒致病性的影响 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2023, 52(4): 450-456.
- [31] PADIDAM M, BEACHY R N, FAUQUET C M. The Role of AV2 (“Precoat”) and Coat Protein in Viral Replication and Movement in Tomato Leaf Curl Geminivirus [J]. Virology, 1996, 224(2): 390-404.
- [32] 刘顺民. 新竹番茄曲叶病毒 AV2 功能研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2019.
- [33] PRUSS G J, LAWRENCE C B, BASS T, et al. The Potyviral Suppressor of RNA Silencing Confers Enhanced Resistance to Multiple Pathogens [J]. Virology, 2004, 320(1): 107-120.
- [34] ABE H, TOMITAKA Y, SHIMODA T, et al. Antagonistic Plant Defense System Regulated by Phytohormones Assists Interactions among Vector Insect, Thrips and a Tospovirus [J]. Plant & Cell Physiology, 2012, 53(1): 204-212.
- [35] ZHOU T, MURPHY A M, LEWSEY M G, et al. Domains of the Cucumber Mosaic Virus 2b Silencing Suppressor Protein Affecting Inhibition of Salicylic Acid-Induced Resistance and Priming of Salicylic Acid Accumulation during Infection [J]. The Journal of General Virology, 2014, 95(Pt 6): 1408-1413.
- [36] YANG L P, XU Y N, LIU Y Q, et al. HC-Pro Viral Suppressor from Tobacco Vein Banding Mosaic Virus Interferes with DNA Methylation and Activates the Salicylic Acid Pathway [J]. Virology, 2016, 497: 244-250.

责任编辑 王新娟