

病毒的侵染策略和植物的防卫反策略*

李 凡¹ 周雪平² 陈海如¹

(云南农业大学云南省植物病理重点实验室 昆明 650201)¹

(浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)²

摘要: 病毒对植物的侵染及植物对病毒侵染的抵抗实际上是病毒与寄主植物之间相互作用的结果, 病毒和寄主植物共同参与调控植物的亲和反应及防卫反应。

关键词: 病毒, 寄主植物, 侵染, 防卫反应

中图分类号: S432.4⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 03-0083-05

植物面对病毒的侵染会表现出不同的反应, 感病植物表现出各种症状, 而非亲和植株则表现为抗病。在谈到植物对病毒侵染的敏感性或抗病性时, 常常会认为是敏感性因子 (susceptibility factor) 或抗病因子 (resistance factor) 分别调控着对病毒的抗病及感病反应。实际上植物对病毒的抗病性和感病性之间的区别并不像想象中那么明显。最近的研究表明, 病毒和寄主植物之间的互作结果决定植物抗病或感病, 病毒本身也参与调控寄主的亲和反应及防卫反应, 如病毒可以成为寄主亲和反应的启动子或寄主防卫反应的抑制子, 而植物寄主通过影响病毒基因组的复制、病毒在寄主细胞的胞间移动及长距离运输来调控病毒在植物体内的系统侵染。

1 病毒和植物寄主互作中的敏感性因子

病毒对植物寄主建立系统侵染必须在植物体内完成3个过程: 基因组复制、胞间移动及依赖于维管束系统的长距离运输^[1]。只有病毒和寄主之间的互作结果都有利于这3个过程, 植物才表现为感病。

1.1 病毒 RNA 的复制和转录必须有寄主的细胞因子参与 病毒 RNA 的复制和转录不但涉及到病毒的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶, 而且还涉及到寄主细胞的蛋白成分 (细胞因子), 这些细胞因子通过与病毒的 RNA 或聚合酶的互作形成转录或复制的核蛋白复合物, 进而影响病毒的复制或转录^[2]。

1.1.1 不含细胞蛋白成分的病毒 RNA 聚合酶通常酶活性丧失或无模板特异性: 原核生物和真核生物依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶 (DNA-dependent RNA polymerases) 通常由许多亚基组成, 核心酶并不决定合成时模板的特异性, RNA 合成的特异性由其它因子决定, 如细菌或噬菌体的 σ -因子或哺乳动物的转录因子。对于正链 RNA 病毒来说, 所有

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30060052)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 30060052)

云南省科委青年基金资助项目 (No. 2000C0013Q)

收稿日期: 2000-03-18, 修回日期: 2001-01-02

从被病毒感染的组织里纯化到的依赖于RNA的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)都包含有寄主细胞的一些蛋白成分,除去这些细胞因子将导致RdRp活性的丧失或无模板特异性。对于负链RNA病毒来说,其RdRp总是存在于病毒颗粒内,病毒颗粒的降解使得病毒RNA在体内的转录必须在一定的条件下才能得以顺利进行,但即使在这些条件控制下,病毒的复制酶及其相关蛋白并不能使病毒RNA的复制或转录完全。

1.1.2 细胞因子是病毒RdRp的一个重要组成部分:病毒依赖于RNA的RNA合成有两种模型:(1)寄主细胞的蛋白成分实际上是RdRp全酶的一个组成部分;(2)细胞因子直接与RNA模板结合而指导RdRp与模板的结合。实际上寄主细胞的一些蛋白成分可能同时具有以上两种功能,并且在病毒RdRp和病毒RNA之间起到一种中间桥梁的作用。

1.1.3 细胞因子与病毒RNA序列的顺式调控元件互作而参与病毒RNA的合成:现已证明许多细胞因子是以与病毒RNA某一区段结合而调控病毒RNA的合成,这些RNA区段包括病毒基因组或反义基因组(antigenome)启动子的3'端、5'端或中间部分。尽管也有报道说纯化的不含细胞因子的病毒RdRp也能与病毒RNA合成所必需的RNA区段结合,但这种结合无法保证RNA合成的特异性。事实上,许多病毒的RdRp并不直接与病毒RNA的某一区段或整条RNA结合,而是通过细胞因子与病毒RNA的特异区段结合来指导病毒RNA的特异合成。细胞因子与BWV或TMV的3'端序列结合后,引导病毒正链RNA合成(从5'端开始合成),而在BMV负链RNA的合成(从病毒RNA 3'端开始合成)中,细胞因子必须与病毒亚基因组RNA启动子上游的顺式作用增强子结合^[3]。

1.2 病毒在寄主体内的移动 病毒编码的与病毒在寄主细胞间移动及长距离运输有关的蛋白称为移动蛋白(movement protein, MP)。MP通过与病毒基因组或完整病毒粒子、植物寄主细胞内的运输通道以及胞间连丝的互作而影响病毒的移动。

1.2.1 RNA病毒在细胞间移动的方式:RNA病毒在胞间的移动有两种方式:(1)以TMV和红三叶草坏死花叶病毒(red clover necrotic mosaic virus)为代表,MP以陪伴蛋白(chaperone)形式与病毒RNA基因组结合并引导MP-RNA复合体向胞间连丝移动,MP与胞间连丝作用后增大了胞间连丝的最大允许通过孔径(site exclusion limits, SEL),然后病毒RNA穿过胞间连丝而到达邻近细胞^[4,5]。(2)以豇豆花叶病毒属(comoviruses)、线虫传多面体病毒属(nepoviruses)及花椰菜花叶病毒属(caulimoviruses)等病毒为代表,MP参与形成一种从叶肉细胞胞壁延伸出的独特管状结构(tubule),病毒以完整的病毒粒子或亚病毒颗粒(subviral particles)通过这种管状结构而到达邻近细胞^[6]。

1.2.2 双生病毒的胞间移动方式:双生病毒属病毒(geminivirus)是植物病毒中主要的单链DNA病毒,其中的大多数粉虱传双生病毒为双分体病毒,即含有两个单链环状DNA分子:DNA-A和DNA-B。病毒复制及颗粒包装所需蛋白由DNA-A编码,而病毒的系统传播所需蛋白由DNA-B编码。与RNA病毒不同的是,其外壳蛋白(coat protein, CP)与病毒的系统侵染无关,也就是说裸露的病毒DNA可以在植物细胞间移动和进行长距离运输。值得注意的是,病毒DNA必须在植物细胞的细胞核内进行复制,因此,

在系统侵染过程中,这一类双生病毒的移动必须越过细胞核和细胞壁双重障碍。最近的研究表明 DNA-B 编码的 BL1 和 BR1 蛋白是病毒系统侵染必须的^[7,8]。BR1 是一个位于细胞核内的 ssDNA 结合蛋白,它与病毒 ssDNA 结合后转移到细胞核进行复制,并被位于细胞质内的 BL1 识别,二者互作使 BR1 结合复制后的病毒 ssDNA 穿过核膜并移动到细胞质的边缘,最后穿过细胞壁而到达邻近细胞。因此 BR1 也被称作是一种核间穿梭蛋白 (nuclear shuttle protein),运输病毒 ssDNA 达到和离开细胞核。BR1 具有一个与 BL1 互作及细胞核定位有关的区域,此区域的 N-端是细胞核定位所必需的,而 C-端则是与 BL1 互作所必需的。BL1 与病毒的许多致病特性有关,并参与病毒的移动,即和 BR1 互作而指导 BR1-ssDNA 复合体从细胞核内穿过核膜并到达细胞质的边缘,然后引导病毒 ssDNA 通过一种管状结构移动到相邻的细胞。通过细胞免疫学发现, BL1 参与形成一种内质网来源的能穿过植物细胞壁的 40nm 宽的管状结构。这种管状结构是由于病毒侵染而诱导产生的,即只有在被病毒侵染的组织中发现,病毒未侵染的组织或 BL1 突变的病毒侵染性克隆感染的组织里并未观察到这种管状结构。研究发现 BL1 对所有的双分体双生病毒的系统侵染是非常必需的。通过化学固定后发现这种管状结构的稳定性远远超过了内质网,并且这种管状结构可以被 BL1 抗血清特异性标记,说明 BL1 是这种管状结构的一部分,而并非仅仅是管状结构的一个穿过物。

2 植物寄主对病毒的防卫反应

植物寄主对病毒的防卫反应包括系统获得性抗性 (systemic acquired resistance, SAR) 以及寄主的抗病基因 (resistance gene, R gene) 与病毒的无毒基因 (avirulence gene, Avr gene) 互作而引起的受侵染寄主细胞的过敏性反应 (hypersensitive reaction, HR)。这里想要谈的是一种新的抗病毒策略——转录后的基因沉默 (posttranscriptional gene silencing, PTGS),这是一种转录后引起的基因表达失活而产生的高度序列特异性的抗性。PTGS 发生在转录后,虽然基因被转录了,但 mRNA 被降解而不能积累^[9,10]。在转基因植物中转基因的蛋白表达水平与抗性水平之间没有相关性,有时在抗性植株中很难检测到转基因的表达产物,转基因可以高水平转录,却没有大量稳定的 RNA 积累。表达来源于病毒的某些基因的转基因植物通过基因沉默抑制了同源病毒的积累从而对病毒侵染产生抗性反应;同样的,非病毒来源的转基因也能抑制含有转基因相同序列的重组病毒的侵染。病毒还可以沉默植物寄主基因,如含有本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 来源的插入片段的重组 TMV 或 PVX 接种本氏烟时,可以引起与插入片段同源的寄主基因沉默。另外 Voinnet 等^[11]还发现在发生基因沉默现象的植物中存在一种系统信号分子可以使沉默信号从下部叶片运输到上部叶片。他们用带有绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 报告基因的农杆菌菌液浸润转化了 GFP 基因的本氏烟叶片,2d 后在浸润区域检测到了较强的绿色荧光,这些较强的荧光重叠于 GFP 转基因植物自身较微弱的荧光之上,表明带有 GFP 基因的 T-DNA 已从农杆菌转化到了烟叶细胞并进行表达。然而,在浸润区的边缘有一狭窄的区域未能检测到绿色荧光,表明 GFP 转化基因在此区域的表达发生了沉默。18d 后,在上部新生叶片中发现 GFP 转化基因发生了完全的沉默,以带有 GFP 基因的 PVX 病毒侵染发生 GFP 沉默的叶片,没有检测到病毒的积累。这种抑制是序列特异性的,因为不含 GFP 基因的 PVX 对照中 PVX 病毒可

以大量积累。由于发生沉默的上部叶片中,检测不到农杆菌或 T-DNA 的存在,推测对病毒的抗性和转基因沉默都是通过一种系统信号传导过去的,此信号可能是一种具有序列特异性的核酸因子。

病毒侵染后寄主的一种特殊抗病反应表现为最初的系统症状到最后的症状消失——“恢复”(recovery)。恢复是由外源基因与同源的内源基因发生转录后的基因沉默(也称共抑制,cosuppression)抑制了病毒的复制循环而引起的:在病毒感染初期,转基因的表达不受病毒影响,植物表现出通常的病毒病症状;到了后期,病毒系统传播到达的上部叶片则发生了转基因与同源病毒的共抑制,这些叶片含有低浓度的转基因 RNA,找不到病毒粒子或病毒粒子很少,而且可以抵抗同源或亲缘关系较近的病毒的二次感染^[12,13]。病毒诱导的转录后的基因沉默并不需要转基因的存在,而沉默反应却影响了同源的转基因的表达或激活,即病毒基因的转录后沉默导致与病毒同源的内源转基因也发生转录后的共抑制,如 CaMV 对欧洲油菜 (*Brassica napus*) 的侵染除了激发寄主沉默病毒基因外,还引起了寄主内与 CaMV RNA 序列同源的转基因(35S 启动子)的沉默^[14]。有的恢复抗性并不需要转基因的存在。在线虫传番茄黑环病毒 (tomato black ring nepovirus) W22 株系接种克氏烟 (*N. Clevelandii*) 的试验中发现烟株的接种叶及最初的系统叶表现出明显的症状,而后来发展的系统叶症状消失且病毒浓度比表现明显症状的叶片低得多即发生了恢复反应^[13]。当以 W22 株系进行挑战接种发生恢复反应的叶片时, W22 的 RNA 含量并未比第 1 次接种增加,而且叶片仍然表现为无症状,而在最初以水接种第 2 次以 W22 接种的对照中 W22 RNA 浓度则非常高。恢复抗性的发生具有株系特异性,即挑战接种的病毒必须与诱导恢复反应的病毒有非常高的同源性。当以番茄黑环病毒 BUK 株系对发生恢复反应的上部叶片进行挑战接种时, BUK RNA 的含量明显比对照低,感染了 W22 株系的烟株可以对 BUK 株系的侵染产生部分抗性反应。但最初感染了 W22 株系的烟株对线虫传番茄环斑病毒 (tomato ringspot nepovirus) 和马铃薯 X 病毒属的 PVX 都不产生抗性。在发生恢复反应的植株中,基因沉默可能被瞬时触发来限制感病部位病毒的复制程度以此来减轻症状,但却无法及时限制病毒的系统传播。自然界中线虫传多面体病毒属诱导的抗性反应机理与转基因诱导的基因沉默很相似,两者都是由病毒诱导产生,而且以同源或亲缘关系较近的 RNA 为作用对象。病毒既是基因沉默的启动子也是基因沉默的靶,依赖于同源性的基因沉默可能是一种较为普遍的抗病毒反应。这些现象表明:植物能天然利用同源或互补的核酸序列,在 DNA 或 RNA 水平上来调节基因的表达,或者可以依靠植物细胞内天然存在的一种 RNA 监视机制用以排除不必要的外源 RNA,如病毒 RNA。

3 病毒对寄主防卫反应的抵抗

对动物病毒而言,大多数动物病毒可以编码细胞凋亡 (apoptosis) 蛋白的抑制子来阻止寄主用于激活细胞程序化死亡 (programmed cell death, PCD) 的免疫信号的产生,从而达到抗寄主防卫的目的。那么植物病毒对缺乏免疫系统的植物寄主又采取什么样的策略来抵抗寄主的防卫反应呢?最近的研究表明一些植物病毒也能够采取相似的策略来阻止寄主的防卫机制或改变寄主细胞的代谢水平,从而建立起在植物体内的系统

侵染。Wang 等^[15]研究发现病毒 RNA 在植物体内的复制将会抑制寄主基因的转录及表达。他们用马铃薯 Y 病毒科的豌豆种传花叶病毒 (pea seedborne mosaic virus, PSbMV) 作为研究材料对病毒本身对寄主代谢反应的干扰机理作了研究。PSbMV 是正义 RNA 病毒, 其 RNA 复制过程中有一正义 RNA 链和负义 RNA 链结合形成双链 RNA (dsRNA) 的中间结构, 复制结束后则只剩正义 RNA 链。采用 PSbMV 的 CP 及其正义 RNA 为探针进行的细胞原位杂交发现, PSbMV 对豌豆幼胚 (未成熟胚) 的侵染是从近胚轴端向远胚轴端扩展的, 在病毒侵染区域与尚未感染区域有一明显的杂交信号的差异, 即病毒侵染区域有很强的杂交信号而未侵染区域无杂交信号。同时还发现病毒侵染前沿即有病毒颗粒, 但尚未进行 RNA 复制的区域杂交信号特强, 紧随其后的区域杂交信号稍弱, 此区域可能正是病毒 RNA 复制并形成 dsRNA 结构的区域。采用豌豆胚发育过程所需的豆类球蛋白 (legumin)、豌豆球蛋白 (vicilin) 以及淀粉合成酶 (starch synthase) 等基因或抗血清为探针进行的细胞原位杂交发现, 病毒侵染前沿正在进行 RNA 复制的区域检测不到杂交信号, 而其余区域均有很强的杂交信号, 同样未受病毒侵染的健康对照所有区域均有杂交信号。表明 PSbMV 的复制抑制了寄主基因的转录或表达。

综上所述, 在植物与病毒互作中亲和性与非亲和性的研究虽取得了一些重要进展, 但要真正了解这些作用机制从而达到控制或防治植物病毒病的目的, 仍有许多工作要做, 目前研究的阻力是缺乏能改变寄主亲和性表型的突变体及能用于相关基因分离的突变株。至少需要两种突变株用于进一步研究: (1) 敏感性获得或抗性丧失突变株, 这一突变株的获得有利于揭示在防卫反应中信号的识别、信号的传导和相关基因的分克隆。(2) 敏感性丧失突变株, 这一突变株是针对病毒与寄主的亲和性反应的, 有利于揭示病毒基因组复制和病毒移动的机制。

参 考 文 献

- [1] Carrington J C, Kasschau K D, Mahajan S K, *et al.* *Plant cell*, 1996, 8: 1669 - 1681.
- [2] Lai M M C. *Virology*, 1998, 244: 1 - 12.
- [3] Leathers V, Tanguay R, Kobayashi M, *et al.* *Mol Cell Biol*, 1993, 13: 5331 - 5347.
- [4] Deom C M, Lapidot M, Beachy R N. *Cell*, 1992, 69: 221 - 224.
- [5] Citovsky V, Knorr, D, Schuster G, *et al.* *Cell*, 1990, 60: 637 - 647.
- [6] Weiczorek A, Sanfacon H. *Virology*, 1993, 194: 734 - 742.
- [7] Noueiry A O, Lucas W J, Gilbertson R L. *Cell*, 1994, 76: 925 - 932.
- [8] Sanderfoot A A, Ingham D J, Lazarowitz S G. *Plant Physiol*, 1996, 110: 23 - 33.
- [9] Boogaart T van den, Lomonosoff G P, Davies J W. *MPMI*, 1998, 11 (7): 717 - 723.
- [10] Wassenegger M, Pelissier T. *Plant Molecular Biology*, 1998, 37: 349 - 362.
- [11] Voinnet O, Baulcombe D C. *Nature*, 1997, 389: 553.
- [12] Covey S N, Al-Kaff N S, Langara A *et al.* *Nature*, 1997, 385: 781 - 782.
- [13] Ratcliff F, Harrison B D, Baulcombe D C. *Science*, 1997, 276: 1558 - 1560.
- [14] Al-Kaff N S, Covey S N, Kreike M M, *et al.* *Science*, 1998, 279: 2113 - 2115.
- [15] Wang D, Manle A J. *Science*, 1995, 267: 229 - 231.