

斯里兰卡木薯花叶病毒 AC2 与拟南芥 SGS3 蛋白互作研究

刘雪婷^{1,2}, 谢秋贤^{1,2}, 刘琳玉^{1,2}, 符艳^{1,2}, 张秀春^{2*}, 任艳利^{1*}

1. 伊犁师范大学生物科学与技术学院, 新疆伊宁 835000; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101

摘要: 木薯花叶病毒病 (cassava mosaic disease, CMD) 对我国和世界木薯生产造成严重威胁和危害, 目前尚无有效防治方法且缺乏抗性材料, 造成严重经济损失, 被认为是最有威胁性的病毒病之一, 斯里兰卡木薯花叶病毒 (*Sri Lankan cassava mosaic virus*, SLCMV) 是引起木薯花叶病的主要病原之一。RNA 沉默是植物和动物先天性的一种抗病毒免疫反应机制, 寄主转录后基因沉默 (post transcriptional gene silencing, PTGS) 是真核生物中一种保守的基因表达调控机制, 也是重要的抗病毒免疫机制之一。寄主基因沉默抑制子 (suppressor of gene silencing 3, SGS3) 是 PTGS 通路的关键蛋白, 在寄主抵御病毒侵染中发挥着关键作用。为抵御宿主这种免疫反应, 病毒通常编码病毒沉默抑制子 (viral suppressors of RNA silencing, VSRs) 来抵御寄主 PTGS 的病毒防御机制, 与寄主蛋白互作是沉默抑制子发挥作用的主要作用机制之一。为探究 SLCMV AC2 是否通过与 AtSGS3 互作而抑制寄主 PTGS 的免疫功能, 本研究采用酵母双杂交技术 (yeast two hybrid system, Y2H) 和双分子荧光互补技术 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 分析 SLCMV AC2 与 AtSGS3 之间的相互作用。结果表明: SLCMV AC2 与 AtSGS3 蛋白在酵母细胞和植物体内均存在相互作用的关系。亚细胞共定位研究进一步证明 SLCMV AC2 在与 AtSGS3 互作后, 可与 AtSGS3 形成 siRNA-body 的 RDR6 发生共定位。这些结果表明 SLCMV AC2 可能通过与 siRNA-body 互作而影响寄主自身免疫机制, 提高病毒致病性, SLCMV AC2 与 AtSGS3 的互作可能是 SLCMV 侵染木薯导致花叶症状发生的分子基础。该研究结果为后续深入解析 SLCMV 致病机理提供新的理论依据。

关键词: 斯里兰卡木薯花叶病毒; SLCMV AC2; AtSGS3; 蛋白互作

中图分类号: Q71 文献标志码: A

Interactions Between *Sri Lankan cassava mosaic virus* AC2 and AtSGS3 Proteins

LIU Xueting^{1,2}, XIE Qiuxian^{1,2}, LIU Linyu^{1,2}, FU Yan^{1,2}, ZHANG Xiuchun^{2*}, REN Yanli^{1*}

1. School of Biological and Geographical Sciences, Yili Normal University, Yining, Xinjiang 835000, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: Cassava mosaic disease (CMD) poses a serious threat and danger to cassava production in China and the world, and there is no effective control method and lack of resistant materials, causing serious economic losses, and is considered one of the most threatening viral diseases. *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) is one of the major pathogens causing cassava mosaic disease. RNA silencing is an innate antiviral immune response mechanism in plants and animals, and post transcriptional gene silencing (PTGS) is a conserved gene expression regulatory mechanism in eukaryotes, and is one of the important antiviral immune mechanisms. Suppressor of gene silencing 3 (SGS3) is a key protein of the PTGS pathway and plays a critical role in host defense against viral invasion. To counteract this host immune response, viruses usually encode viral suppressors of RNA silencing (VSRs) to counteract the viral defense mechanism of host PTGS, and interaction with host proteins is one of the main mechanisms of action for the silencing suppressors to function. In order to investigate whether SLCMV AC2 inhibits the immune function of host PTGS by

收稿日期 2023-05-10; 修回日期 2023-11-10

基金项目 伊犁师范大学提升学科综合实力专项项目 (No. 22XKZY15)。

作者简介 刘雪婷 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物病毒致病机制。*通信作者 (Corresponding author): 张秀春 (ZHANG Xiuchun), E-mail: zhangxiuchun@itbb.org.cn; 任艳利 (REN Yanli), E-mail: 864672445@qq.com。

interacting with AtSGS3, we analyzed the immune function of host PTGS by using yeast two-hybrid (Y2H) system and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) experiments, to analyze the interaction between AtSGS3 and SLCMV AC2. The results showed that SLCMV AC2 interacted with AtSGS3 protein in both yeast cells and plants. In subcellular co-localization experimental studies, we further demonstrated that SLCMV AC2 could co-localize with AtRDR6, a close partner of AtSGS3, after interacting with AtSGS3. The data suggest that SLCMV AC2 may affect the host autoimmune mechanism and enhance viral pathogenicity by interacting with siRNA-body, and that the interaction between SLCMV AC2 and AtSGS3 may be the molecular basis for the development of foliar symptoms in SLCMV-infected cassava, and the results of this study would provide a new theoretical basis for the subsequent in-depth analysis of the pathogenicity mechanism of SLCMV.

Keywords: Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV); SLCMV AC2; AtSGS3; protein interaction

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.07.003

RNA 沉默, 又被称为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是生物进化过程中由双链 RNA 诱发的、高度保守的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象。寄主转录后基因沉默 (post transcriptional gene silencing, PTGS) 是真核生物中一种保守的基因表达调控机制, 在很多生物学过程中发挥重要作用。植物通过 PTGS 增强寄主的防卫反应, 减少病毒的积累, 从而减缓病毒的系统侵染, 因此 PTGS 也是重要的抗病毒免疫机制之一^[1-4]。在植物体内, PTGS 包括起始阶段、效应阶段和扩增阶段^[5]。PTGS 的起始阶段是来源不同的双链 RNA (double-stranded RNAs, dsRNA) 或者内部折叠形成的局部 dsRNA 经核酸酶 RNase-Ⅲ 家族的 Dicer-like (简称 DCL) 切割产生 19~25 nucleotide (nt) 长的双链小 RNA (siRNA)。效应阶段则是产生的初级 sRNA 被 Argonaute (AGO) 蛋白结合形成 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC), 并指导 AGO 蛋白专一地识别与其互补的 RNA 或 DNA 序列进行切割或修饰。在效应阶段由 AGOs 切割产生的单链 RNA 会在植物体内依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RNA dependent RNA polymerases, RDRs) 的作用下转变为 dsRNA, 由 DCL 切割成双链 siRNAs, 将沉默信号进行放大则称为扩增阶段。

研究表明, 依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 6 (RNA dependent RNA polymerase 6, RDR6) 是合成 dsRNA 的关键酶, 对多种病毒具有抗性。RDR6 的沉默会导致中国小麦花叶病毒 (Chinese wheat mosaic virus, CWMV) 等多种病毒 RNA 的积累^[6-9], 因此在抗病毒沉默途径中起着重要作用。基因沉默抑制子 3 (suppressor of gene silencing 3, SGS3) 在 PTGS 中的功能大多都与 RDR6 一同被鉴定出来, 作为 RDR6 的辅助因子 SGS3 本身无法合成

dsRNA, 但当与 RDR6 在细胞质中形成小的、较为分散的焦点状, 被称为 siRNA-body 的颗粒, 可将植物体内的单链小 RNA (single stranded small RNA, ssRNA) 招募到 RDR6 上, 使其进行 dsRNA 的合成。因此在植物的抗病毒沉默途径中同样起着重要作用, 然而二者之间的动态平衡往往是由植物病毒或其他植物组分所操控的。例如, 甘薯褪绿矮化病毒 (Sweet potato chlorotic stunt virus, SPCSV) 所编码的 RNase3 能够与 siRNA-body 产生共定位, 抑制 RNAi 及削弱植物的抗病毒防御^[10], 莴苣坏死黄色病毒 (Lettuce necrotic yellows virus, LNYV) 所编码的 P 蛋白可通过在细胞质中与 siRNA-body 发生相互作用从而抑制 RNAi 扩增^[11], 车前草花叶病毒 (Plantago asiatica mosaic virus, PIAMV) 则通过编码的 TGBp1 蛋白与 siRNA-body 发生互作从而抑制 dsRNA 和 ta-siRNA 的合成^[12]。

斯里兰卡木薯花叶病毒 (Sri Lankan cassava mosaic virus, SLCMV) 是双生病毒科 (Geminiviridae) 菜豆金黄花叶病毒属 (Begomovirus) 木薯双生病毒 (Cassava mosaic virus, CMV) 的一个株系, 是引发木薯花叶病 (cassava mosaic disease, CMD) 的主要病原物之一^[13]。SLCMV 基因组由 DNA-A [包含 6 个基因: AV1 (CP)、AV2、AC1、AC2、AC3、AC4] 和 DNA-B (包含 2 个基因: BV1、BC1) 2 个环状单链 DNA 组分组成, 是一个典型的双组分单链 DNA 病毒, SLCMV 编码的 AC2 蛋白则是由 DNA-A 组分反义链编码的转录激活因子^[13-14]。病毒是专性寄生生物, 拥有极小的基因组, 因此编码的蛋白大多数是多功能蛋白, 研究表明东非木薯花叶喀麦隆病毒 (East African cassava mosaic Cameroon virus, EACMCV) 编码的 AC2 蛋白不仅对基因的转录激活有着高度保守

的作用，而且还是沉默抑制子，在病毒侵染过程中发挥着重要作用^[15]。然而，SLCMV AC2 是否通过与寄主 PTGS 沉默抑制通路的关键蛋白 SGS3 互作进而抵御寄主的自身免疫功能还未见相关报道。为研究 SLCMV 是否可能通过 AC2 蛋白与寄主因子 SGS3 和 RDR6 相互作用，而抑制寄主 RNA 沉默功能导致病毒致病性增强，本研究利用酵母双杂交（yeast two-hybrid, Y2H）、双分子荧光互补（bimolecular fluorescence complementation, BiFC）和亚细胞共定位实验，对 SLCMV AC2 蛋白与拟南芥 SGS3（AtSGS3）之间的相互作用进行研究，研究结果将为阐明木薯花叶病毒是如何调控 RNA 沉默的抗病毒防御功能的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本氏烟草（*Nicotiana benthamiana*）种子、酵母表达载体 pGADT7、pGBKT7、AD-T、BD-53、AD-PARN^[16]、BD-SGS3^[17]、植物表达载体 pG1300-YN1、YC-SGS3、pZP-P19^[17]和 RDR6-RFP 均为本实验室保存。

限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I 等工具酶购于宝日生物技术（北京）有限公司（TaKaRa）；高效无缝克隆试剂盒购于莫纳生物科技有限公司；琼脂糖凝胶 DNA 试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购于上海易汇生物科技有限公司（OMEGA）；大肠杆菌 DH5 α 、酵母感受态 AH109 和农杆菌感受态 GV3101 均购于上海唯地生物技术有限公司；质粒小提中量试剂盒和 DNA Marker 购于天根生化科技（北京）有限公司；LB 培养基购于生工生物工程（上海）股份有限公司；SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基均购于北京泛基诺科技有限公司；3-氨基-1,2,4-三唑（3-AT）购于北京启研生物科技有限公司；卡那霉素（kanamycin）、利福平（rifampicin）购于北京索宝来科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 酵母表达载体 BD-AC2 的构建 为构建 SLCMV AC2 蛋白含结合域的酵母表达载体 BD-AC2，参考已报道的 SLACMV 序列（GenBank: KT861468.1），人工合成两端分别添加酵母猎物载体 pGBKT7 限制性核酸内切酶 *Eco*R I 和 *Bam*H I 位点两侧序列的目的片段 Y2H-AC2。参照无缝克

隆试剂盒说明书，将人工合成片段 Y2H-AC2 与经限制性核酸内切酶 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切后的 pGBKT7 载体连接，连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中，并涂布到含有 50 ng/L 卡那霉素的 LB 培养基中，将平板倒置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 12 h。挑取 3~5 个单菌落，使用通用引物 pGBKT7-F 和 pGBKT7-R（表 1）进行菌落 PCR 鉴定。PCR 反应体系：引物（10 μ mol/L）各 1 μ L，2 $\times$ Magic Green *Taq* SuperMix 10 μ L，用 ddH₂O 补充到 20 μ L。PCR 反应条件为：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min，94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，56 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min，循环 35 次；最后 72 $^{\circ}$ C 彻底延伸 10 min。挑取 2 个经菌落 PCR 鉴定的阳性克隆，委托华大基因科技有限公司进行测序鉴定。

1.2.2 荧光双分子互补表达载体 YN-AC2 的构建 为构建 SLCMV AC2 蛋白含绿色荧光蛋白 N 端序列的 BiFC 载体 YN-AC2，参考已报道的 SLACMV 序列（GenBank: KT861468.1），人工合成两端分别添加表达载体 pG1300-YN1^[17]限制性核酸内切酶 *Mlu* I 和 *Kpn* I 位点两侧序列的目的片段 BiFC-AC2。参照无缝克隆试剂盒说明书将目的片段 BiFC-AC2 与经限制性核酸内切酶 *Mlu* I 和 *Kpn* I 进行双酶切后的 pG1300-YN1 进行连接反应，连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中，并涂布到含有 50 ng/L 卡那霉素的 LB 培养基中，将平板倒置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 12 h。挑取 3~5 个单菌落进行 PCR 检测，使用 AC2 特异引物 AC2-1F 和 AC2-390R（表 1）进行扩增。PCR 反应体系与反应条件与 1.2.1 中一致，挑取经 PCR 鉴定为阳性的克隆委托深圳华大基因科技有限公司完成测序鉴定。

表 1 本研究所用引物	
Tab. 1 Primers used in this study	
引物名称 Primer name	引物序列（5'-3'） Primer sequence (5'-3')
pGBKT7-F	TAATACGACTCACTATAGGGC
pGBKT7-R	TTTTCGTTTAAACCTAAGAGT
AC2-1F	ATGCGACCTTCATCTCCCTC
AC2-390R	CGCCAGGTCTGAGGCTGTAAG

1.2.3 酵母自激活性鉴定 参照产品说明书将构建成功的 AC2 酵母诱饵载体与酵母激活域表达载体 pGADT7 共同转化 AH109 酵母感受态细胞，涂布于 SD/-Leu/-Trp（SD-LW）培养基上，28 $^{\circ}$ C

恒温培养箱倒置培养 48~96 h, 挑取经 PCR 鉴定阳性的单克隆菌落于 25 μ L 无菌水中, 重悬制成悬浮菌液, 使用无菌水梯度稀释成 10 倍、100 倍、1000 倍, 各吸取 2 μ L 接种于 SD-LW 培养基和 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade (SD-LWHA) 缺陷培养基中, 分别以 AD-T 与 BD-Lam 和 AD-T 与 BD-53 共转化的酵母为阴性对照和阳性对照。共转化成功的酵母单菌落进行梯度稀释后接种于固体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱倒置培养 3 d 观察并记录生长情况。若酵母菌落仅在 SD-LW 培养基中能正常生长, 而在 SD-LWHA 培养基中无法生长, 则说明质粒无自激活活性; 若酵母菌落在 SD-LW 培养基和 SD-LWHA 培养基中均能正常生长, 说明该酵母诱饵表达载体具有自激活活性。若有自激活活性, 则采取在 SD-LWHA 缺陷型培养基中添加 3-AT 的方法进行抑制, 逐步增加 3-AT 的浓度, 直至其在添加了该浓度 3-AT 的 SD-LWHA 培养基中菌落无法正常生长, 则说明在该浓度的 3-AT 条件下 BD-AC2 自激活活性基本抑制, 可作于后续点板 3-AT 添加的浓度。

1.2.4 酵母双杂交研究 SLCMV AC2 与 AtSGS3 蛋白互作 参照 AH109 Chemically Competent Cell 产品说明书将 SLCMV AC2 的诱饵质粒和 AtSGS3 的激活域载体 AD-SGS3 共转化到感受态酵母细胞中, 重悬后的细胞悬液均匀涂布到 SD-LW 培养基中, 倒置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 48~96 h, 待菌落长出后, 挑取单克隆菌落分别使用诱饵载体和激活域载体的通用引物 pGBKT7-F/pGBKT7-R 和 pGADT7-F/pGADT7-R 进行 PCR 鉴定。鉴定正确的菌落梯度稀释后各取 2 μ L 不同浓度稀释的菌液分别接种于 SD-LW 培养基和 SD-LWHA 培养基, 置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱, 倒置培养 3~5 d, 观察并记录 SLCMV AC2 与 AtSGS3 是否互作。

1.2.5 荧光双分子互补实验验证 SLCMV AC2 与 AtSGS3 蛋白互作 参照 GV3101 Chemically Competent Cell 产品说明书将植物表达载体 YN-AC2、YN-SGS3 和 pG1300-YN1 转化农杆菌 GV3101 感受态细胞, 转化后的农杆菌均匀涂布到含有相应抗性的 LB 固体培养基上, 28 $^{\circ}$ C 倒置培养 72~90 h。使用枪头挑取经菌落 PCR 鉴定为阳性的单菌落到 5 mL 含有相应抗生素的 LB 液体培养基中, 置于 28 $^{\circ}$ C 200 r/min 恒温摇床震荡培养过夜。菌液 7000 r/min 离心 15 min 后弃上清, 并使用

5 mL 注射缓冲液重悬沉淀, 充分旋涡震荡均匀后将菌液浓度均稀释至 OD₆₀₀ 为 0.5。注射缓冲液配置: 分别取 2 mL 1 mol/L 的 MgCl₂, 2 mL 1 mol/L 的 2-吗啉乙磺酸 (MES) 和 200 μ L 100 mg/ml 的乙酰丁香酮 (AS), 最后用超纯水定容到 200 mL。稀释后的菌液在室温放置 2~3 h 后, 等体积混匀用于注射生长旺盛的 5~7 叶期本生烟叶片。每个组合 3 个重复, 注射后的本生烟避光处理过夜, 然后在正常条件下培养。2~3 d 后, 每个样品取约 1~2 cm² 使用激光共聚焦显微镜 (Olympus FV3000) 进行观察烟草细胞荧光情况并拍照, GFP 激发光为 488 nm。

1.2.6 SLCMV AC2 与 AtSGS3 形成的复合物和 AtRDR6 的亚细胞共定位 参照 1.2.5 中的实验方法将重组质粒 YN-AC2、YC-SGS3、RDR6-RFP 与 pZP-P19 分别转化农杆菌感受态, 挑取经 PCR 鉴定为阳性的单克隆菌落到含有相应抗生素的培养基中培养。参照 1.2.5 中的配方配置注射缓冲液, 使用注射缓冲液将菌液重悬并将 OD₆₀₀ 的值均一到 0.5, 将菌液 OD₆₀₀ 均为 0.5 的 YN-AC2、YC-SGS3、RDR6-RFP 与 pZP-P19 四种农杆菌菌液以 1:1:1:1 的比例混匀, 室温静置 2~3 h 后注射本生烟, 至少注射 3 片烟草叶片, 避光条件下处理 24 h, 然后在正常条件下处理 2~3 d。使用荧光共聚焦显微镜对烟草细胞荧光表达情况进行观察并拍照记录, GFP 激发光为 488 nm, RFP 激发光为 546 nm。

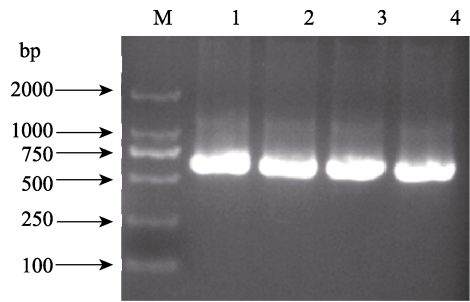
2 结果与分析

2.1 酵母表达载体 BD-AC2 的构建

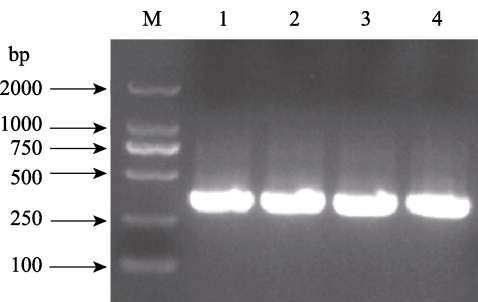
使用 pGBKT7 载体通用引物对选取的 4 个大肠杆菌单克隆菌落进行 PCR 扩增, 扩增产物电泳检测结果如图 1 所示。不同 BD-AC2 单克隆菌落 PCR 产物的片段大小均在 500~750 bp 之间, 与预期目的基因片段大小一致, 4 个菌落均为阳性克隆, 其中 2 个阳性克隆的测序序列比对正确, 表明酵母诱饵表达载体 BD-AC2 构建成功。

2.2 荧光双分子表达载体 YN-AC2 的构建

使用 SLCMV AC2 特异引物对选取的 4 个大肠杆菌单克隆菌落进行扩增, 扩增产物电泳结果如图 2 所示。不同 YN-AC2 单克隆菌落 PCR 产物片段大小均约为 250~500 bp, 与预期目的基因片段大小一致, 4 个菌落均为阳性克隆, 其中 2 个阳性克隆的测序序列比对正确, 表明荧光双分子



M: DL2000 DNA marker.
图 1 酵母 BD-AC2 PCR 扩增产物
Fig. 1 Yeast colony BD-AC2 PCR validation



M: DL 2000 DNA marker.
图 2 菌落 YN-AC2 扩增产物
Fig. 2 PCR validation of YN-AC2 colonies

表达载体 YN-AC2 构建成功。

2.3 酵母自激活鉴定

酵母自激活验证结果如图 3 所示，可以观察到阳性对照在 SD-LW 二缺培养基和 SD-LWHA 四缺培养基中均能正常生长形成菌落，而阴性对照仅在 SD-LW 培养基中正常生长，表明该酵母双杂交系统能有效检验蛋白之间的互作。BD-AC2 与 pGADT7 共转化的菌株在 SD-LW 和 SD-LWHA 缺陷型培养基中均能正常生长，但在添加 4 mmol/L 3-AT 的 SD-LWHA 缺陷型培养基不能正常生长。

该结果表明 BD-AC2 质粒具有自激活活性，即不与其他蛋白相互作用的条件下可激活下游基因的转录表达，但 4 mmol/L 3-AT 可有效抑制 BD-AC2 的自激活活性。AD-SGS3 与 BD 共转化的酵母菌株仅在 SD-LW 二缺培养基中正常生长，在 SD-LWHA 四缺培养基中则无法正常生长，表明 AD-SGS3 质粒不存在自激活活性，可直接用于后续酵母双杂交实验。

2.4 SLCMV AC2 与 AtSGS3 互作的酵母双杂交验证

SLCMV AC2 与 AtSGS3 互作的酵母双杂交验证结果如图 4 所示，所有共转化的酵母在 SD-LW 缺陷型培养基中均能正常生长，但在添加 4 mmol/L 3-AT 的 SD-LWHA 缺陷型培养基中仅阳性对照及共转化 BD-AC2 与 AD-SGS3 的酵母可正常生长，阴性对照及共转化 BD-AC2 与 AD-PARN 的酵母无法正常生长。结果表明 BD-AC2 与 AD-SGS3 之间存在相互作用。

2.5 BiFC 验证 SLCMV AC2 与 AtSGS3 相互作用

剪取不同处理的本生烟叶片在激发光为 488 nm 条件下的激光共聚焦显微镜下观察，观察结果表明：YN-AC2 与 YC-SGS3 共注射本生烟叶片可在激发光 488 nm 下恢复绿色荧光，而空载 pG1300-YN1 与 YC-SGS3 共同注射未见荧光恢复（图 5），进一步验证了斯里兰卡木薯花叶病毒 AC2 与 AtSGS3 之间的相互作用。

2.6 SLCMV AC2 与 AtSGS3 形成的复合物和 RDR6 的亚细胞共定位

为研究 SLCMV AC2 与 AtSGS3 形成的复合物是否 与 AtRDR6 在细胞内共定位，将 YN-AC2、

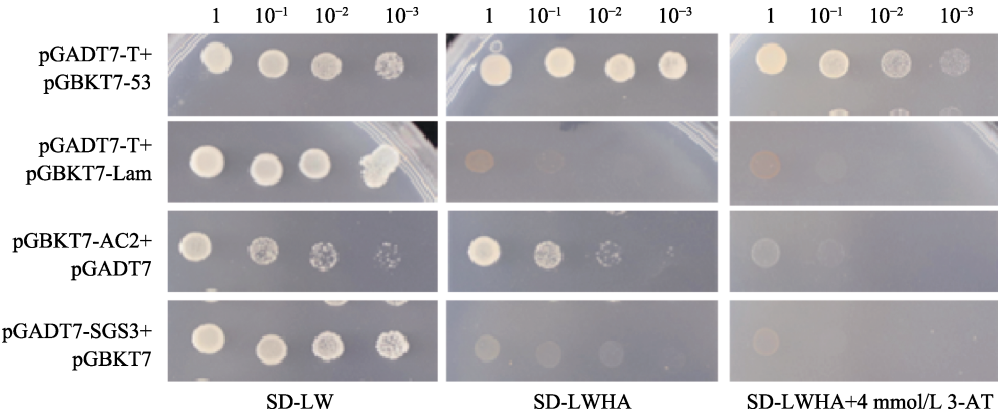


图 3 pGBKT7-AC2 和 pGADT7-SGS3 酵母自激活验证
Fig. 3 Validation of yeast self-activation of pGBKT7-AC2 and pGADT7-SGS3

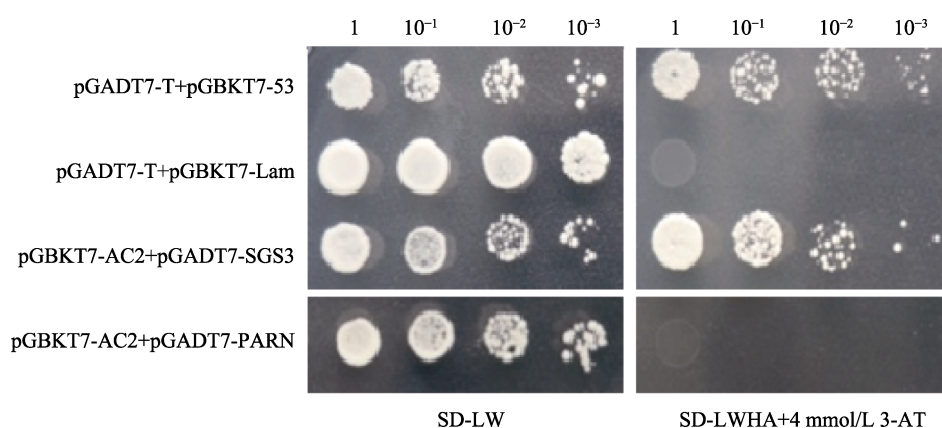


图 4 pGBKT7-AC2 和 pGADT7-SGS3 酵母互作

Fig. 4 pGBKT7-AC2 and pGADT7-SGS3 yeast two-hybrid interaction

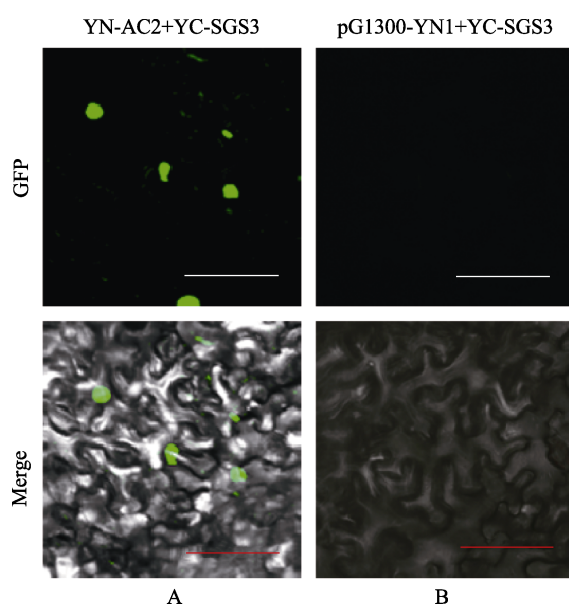


图 5 BiFC 验证 SLCMV AC2 蛋白与 SGS3 蛋白在烟草中相互作用

Fig. 5 BiFC assay for protein-protein interactions between SLCMV AC2 and SGS3 in *Nicotiana benthamiana*

YC-SGS3 与携带 RFP 标签的重组质粒 RDR6-RFP 和 pZP-P19 共注射本生烟。结果如图 6 所示，与 BiFC 结果相同，SLCMV AC2 与 AtSGS3 在激发光 488 nm 下恢复绿色荧光，并且与激发光 546 nm

条件下 RDR6-RFP 表达的红色荧光发生重合。该研究结果表明 SLCMV AC2 与 AtSGS3 形成的复合物和 AtRDR6 在本生烟表皮细胞中共定位。

3 讨论

重组是许多病毒进化的关键过程，尤其是对于基因组高度压缩的双生病毒，这导致病毒快速变异^[18]，木薯花叶病是一种高度复杂的疾病，这与木薯花叶病毒是典型的双组分双生病毒息息相关。PTGS 是植物抗病毒防御天然机制，为了成功建立感染，在复制和基因表达过程中利用 RNA 的病毒必须克服宿主抗病毒沉默反应。

病毒编码的蛋白大多数是多功能蛋白，研究表明双生病毒编码的 AC2 蛋白不仅对基因的转录激活有着高度保守的作用，并且可能在病毒侵染过程中发挥着重要作用。SUNTER 等^[19]研究表明，双生病毒编码的 AC2 蛋白是反式激活晚期病毒基因 AV1 和 BV1 的病毒转录激活因子，近期也有研究表明 ACMV 的 AC2 反式激活几个植物基因^[20-21]。VANITHARANI 等^[15]研究表明印度木薯花叶病毒 (*Indian cassava mosaic virus*) 编码的 AC2 蛋白是病毒沉默抑制子，能抑制寄主

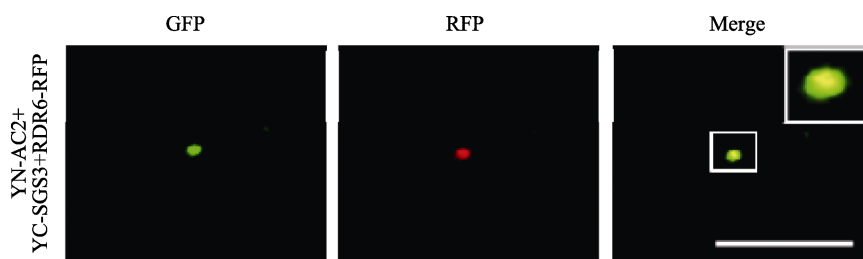


图 6 亚细胞共定位实验验证 SLCMV AC2 和 SGS3 与 RDR6 在烟草细胞核中的共定位

Fig. 6 Subcellular co-localization experiment to verify the co-localization of SLCMV AC2 and SGS3 with RDR6 in tobacco nucleus

PTGS 对病毒的降解, 提高病毒复制量和致病性; 研究还发现 EACMCV 编码的 AC2 与协同基因非洲木薯花叶病毒喀麦隆株 (*African cassava mosaic virus*, ACMV-[CM]) 编码的 AC4 共同作用能够抑制 GFP 诱导的 PTGS, 并消除与 PTGS 相关的 siRNA, 同时增加 GFP mRNA 积累。SGS3 不仅调控植物生长发育, 还参与次级 siRNA 的产生并放大 PTGS 的沉默效应, 在抗病毒过程中发挥重要作用, 是寄主 PTGS 通路的关键蛋白。在抗病毒防御中 SGS3 的作用因病毒而异, 如寄主 SGS3 被沉默或敲除后, 马铃薯 A 病毒 (*Potato virus A*, PVA)、油菜花叶病毒 (*Oilseed rape mosaic virus*, ORMV)、芜菁花叶病毒 (*Turnip mosaic virus*, TuMV) 等的病毒积累量也随之降低; 而黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 则在 SGS3 被敲除后积累量大幅提高; 芜菁清脉病毒 (*Turnip vein clearing virus*, TVCV) 则基本不受 SGS3 表达量的影响^[22]。研究报道, 多种病毒的 VSR 已经进化出不同的机制来抑制 SGS3 的功能^[23], 如番茄黄叶卷曲病毒 (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) 编码的 V2 蛋白通过直接竞争 SGS3 底物来抑制 SGS3 的 RNA 结合活性^[24], 车前草花叶病毒 (*Plantago asiatica mosaic virus*, PIAMV) TGBp1 蛋白直接通过与 SGS3/RDR6 相互作用并共同聚集来干扰 dsRNA 的合成^[12]。然而长期以来的研究表明, 与 SGS3 互作或促进 SGS3 降解而抑制寄主 PTGS 的抗病毒免疫功能很可能是一种普遍存在的植物病毒侵染机制^[23, 25-26], 如 NbCaM 可与 NbSGS3 相互作用并通过自噬介导 NbSGS3 蛋白水平降解, 从而起到 RNA 沉默抑制因子的作用并增强病毒感染^[27]; 水稻条纹花叶病毒 (*Rice stripe mosaic virus*, RSMV) 编码的 P4 可以与水稻内源基因沉默抑制因子 3 (OsSGS3) 相互作用, 并通过泛素化和自噬通路促进 OsSGS3 的降解^[28]。然而 SLCMV AC2 是否通过与寄主 PTGS 沉默抑制通路的关键蛋白 SGS3 互作进而抵御寄主的自身免疫功能尚无相关报道, 为探讨 SLCMV 的植物病毒侵染机制, 首先构建 BD-AC2 酵母表达载体, 与 AD-SGS3 共转化酵母感受态, 酵母双杂交技术发现 SLCMV AC2 蛋白能与 SGS3 发生蛋白的相互作用; 然后本研究构建 YN-AC2 荧光双分子表达载体, 与 YC-SGS3 表达载体的农杆菌共注射并在烟草叶片中瞬时表达, 荧光双分子实验中也验证了二者之间的互作。作为 RDR6 的

辅助因子, SGS3 在 PTGS 中的所有功能几乎都是与 RDR6 一起被鉴定出来的, 如 *rdr6* 或 *sgs3* 突变体对 CMV 的侵染超级敏感性并且能够抑制 GUS 转基因诱导的 s-PTGS、*rdr6* 或 *sgs3* 突变体能够抑制双生病毒诱导的基因沉默等; *rdr6* 或 *sgs3* 突变体表现的发育畸形是由于抑制了 TAS3 的合成等。已有研究表明 SGS3/RDR6 介导的病毒 siRNA 扩增在几种病毒中发挥重要的抗病毒作用, 如芜菁皱缩病毒 (*Turnip crinkle virus*, TCV)^[17], 马铃薯 A 病毒 (*Potato virus A*, PVA)^[25]、番茄带状斑点病毒 (*Tomato zonate spot virus*, TZSV)^[29] 等。本研究结果表明 SLCMV AC2 不仅与 AtSGS3 互作, 并且形成的复合物与 AtSGS3 形成 siRNA-body 的 RDR6 发生共定位, 因此推测 AC2 蛋白可能通过与 AtSGS3 互作影响 siRNA-body 的形成从而抑制寄主 PTGS 功能导致病毒致病性增强。

迄今, 已从几乎所有的真核生物病毒属中鉴定出至少一种 VSRs, 通过干扰 PTGS 的各个步骤劫持或抑制抗病毒 PTGS。已有研究表明 SLCMV AC4 是病毒基因沉默的强抑制子, 可通过抑制寄主 RNA 沉默诱导的 PTGS 通路提高致病性^[15], 在本研究中发现 SLCMV AC2 可与 AtSGS3 存在相互作用, 然而 SLCMV AC2 是否发挥沉默抑制子的功能? SLCMV AC2 是否通过与寄主 SGS3 互作来对寄主行使 PTGS 病毒调控机制起负调控作用? 以及具体相互作用机理尚不明确, 这些问题还有待进一步研究。

参考文献

- [1] MUHAMMAD T, ZHANG F, ZHANG Y, LIANG Y. RNA interference: a natural immune system of plants to counteract biotic stressors[J]. *Cells*, 2019, 8(1): 38.
- [2] GUO Z X, LI Y, DING S W. Small RNA-based antimicrobial immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2019, 19(1): 31-44.
- [3] YANG Z R, LI Y. Dissection of RNAi-based antiviral immunity in plants[J]. *Current Opinion in Virology*, 2018, 32: 88-99.
- [4] JIN Y, ZHAO J H, GUO H S. Recent advances in understanding plant antiviral RNAi and viral suppressors of RNAi[J]. *Current Opinion in Virology*, 2021, 46: 65-72.
- [5] ROSA C, KUO Y W, WURIYANGHAN H, FALK B W. RNA interference mechanisms and applications in plant pathology[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2018, 56(1):

- 581-610.
- [6] WANG M, LI S W, YANG H F, GAO Z, WU C G, GUO X Q. Characterization and functional analysis of *GhRDR6*, a novel *RDR6* gene from cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. Bioscience Reports, 2012, 32(2): 139-151.
 - [7] ANDIKA I B, SUN L Y, XIANG R, LI J M, CHEN J P. Root-specific role for *Nicotiana benthamiana* *RDR6* in the inhibition of *Chinese wheat mosaic virus* accumulation at higher temperatures[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions®, 2013, 26(10): 1165-1175.
 - [8] HONG W, QIAN D, SUN R H, JIANG L, WANG Y, WEI C H, ZHANG Z K, LI Y. *OsRDR6* plays role in host defense against double-stranded RNA virus, *Rice dwarf phytoevirus*[J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 11324.
 - [9] QU F, YE X H, HOU G C, SATO S, CLEMENTE T E, MORRIS T J. *RDR6* Has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*[J]. Journal of Virology, 2005, 79(24): 15209-15217.
 - [10] WEINHEIMER I, HAIKONEN T, ALA-POIKELA M, MOSER M, STRENG J, RAJAMÄKI M L, VALKONEN J P T, RUI L. Viral RNase3 co-localizes and interacts with the antiviral defense protein *SGS3* in plant cells[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0159080.
 - [11] MANN K S, JOHNSON K N, CARROLL B J, DIETZGEN R G. Cytorhabdovirus P protein suppresses RISC-mediated cleavage and RNA silencing amplification in planta[J]. Virology, 2016, 490: 27-40.
 - [12] OKANO Y, SENSU H, HASHIMOTO M, NERIYA Y, NETSU O, MINATO N, YOSHIDA T, MAEJIMA K, OSHIMA K, KOMATSU K, YAMAJI Y, NAMBA S. In planta recognition of a double-stranded RNA synthesis protein complex by a potyviral RNA silencing suppressor[J]. The Plant Cell, 2014, 26(5): 2168-2183.
 - [13] PATIL B L, FAUQUET C M. Cassava mosaic geminiviruses: actual knowledge and perspectives[J]. Molecular Plant Pathology, 2009, 10(5): 685-701.
 - [14] REY C, VANDERSCHUREN H. Cassava mosaic and brown streak diseases: current perspectives and beyond[J]. Annual Review of Virology, 2017, 4(1): 429-452.
 - [15] VANITHARANI R, CHELLAPPAN P, PITA J S, FAUQUET C M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing[J]. Journal of Virology, 2004, 78(17): 9487-9498.
 - [16] 刘琳玉, 赵平娟, 符艳, 刘志昕, 任艳利, 张秀春. 木薯花叶病毒 AC4 蛋白与 AtPARN 互作研究[J]. 热带作物学报, 2024, 45(1): 197-204.
 - LIU L Y, ZHAO P J, FU Y, LIU Z X, REN Y L, ZHANG X C. The interaction between cassava mosaic virus AC4 protein and AtPARN[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(1): 197-204. (in Chinese)
 - [17] LIU L Y, WANG H Y, FU Y, TANG W, ZHAO P J, REN Y L, LIU Z X, WU K X, ZHANG X C. Turnip crinkle virus-encoded suppressor of RNA silencing interacts with *Arabidopsis* *SGS3* to enhance virus infection[J]. Molecular Plant Pathology, 2023, 24(2): 154-166.
 - [18] 周雪平, 崔晓峰, 陶小荣. 双生病毒——一类值得重视的植物病毒[J]. 植物病理学报, 2003(6): 487-492.
 - ZHOU X P, CUI X F, TAO X R. Geminiviruses——an emerging threat for crop production[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003(6): 487-492. (in Chinese)
 - [19] SUNTER G, BISARO D M. Transactivation of geminivirus AR1 and BRI gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription[J]. The Plant Cell, 1992, 4: 1321-1331.
 - [20] TRINKS D, RAJESWARAN R, SHIVAPRASAD P V, AKBERGENOV R, OAKELEY E J, VELUTHAMBI K, HOHN T, POOGGIN M M. Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes[J]. Journal of Virology, 2005, 79(4): 2517.
 - [21] LACATUS G, SUNTER G. Functional analysis of bipartite begomovirus coat protein promoter sequences[J]. Virology, 2008, 376(1): 79-89.
 - [22] CHEN Q, WANG J, HOU M S, LIU S Y, HUANG J Y, CAI L. *BnSGS3* has differential effects on the accumulation of CMV, ORMV and TuMV in oilseed rape[J]. Viruses, 2015, 7(8): 4169-4185.
 - [23] CHENG X F, WANG A M. The potyvirus silencing suppressor protein VPg mediates degradation of *SGS3* via ubiquitination and autophagy pathways[J]. Journal of Virology, 2017, 91(1): e01478-16.
 - [24] FUKUNAGA R, DOUDNA J A. dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants[J]. The EMBO Journal, 2009, 28(5): 545-555.
 - [25] RAJAMÄKI M L, STRENG J, VALKONEN J P T. Silencing suppressor protein VPg of a potyvirus interacts with the plant silencing-related protein *SGS3*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions®, 2014, 27(11): 1199-1210.
 - [26] DU Z G, XIAO D L, WU J G, JIA D S, YUAN Z J, LIU Y, HU L Y, HAN Z, WEI T Y, LIN Q Y, WU Z J, XIE L H. p2 of *Rice stripe virus* (RSV) interacts with *OsSGS3* and is a silencing suppressor: p2 of rice stripe virus is a silencing suppressor interacting with *OsSGS3*[J]. Molecular Plant Pathology, 2011, 12(8): 808-814.

- [27] LI F F, ZHAO N, LI Z H, XU X B, WANG Y Q, YANG X L, LIU S S, WANG A M, ZHOU X P. A calmodulin-like protein suppresses RNA silencing and promotes geminivirus infection by degrading SGS3 via the autophagy pathway in *Nicotiana benthamiana*[J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(2): e1006213.
- [28] ZHANG C, CHEN D, YANG G Y, YU X Y, WU J G. Rice stripe mosaic virus-encoded P4 Is a weak suppressor of viral RNA silencing and is required for disease symptom development[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions®, 2020, 33(3): 412-422.
- [29] CHEN J B, ZHENG L M, SHI X B, ZHANG S B, TAN X Q, ZHAO X Y, LU B X, YE Q, MIAO S Y, LIU Y, ZHANG D Y. The nonstructural protein NSs encoded by *Tomato zongata spot virus* suppresses RNA silencing by interacting with NbSGS3[J]. Molecular Plant Pathology, 2022, 23(5): 707-719.