

侵染朱槿的木尔坦棉花曲叶病毒 V2 蛋白的亚细胞定位特征分析

陈思敏^{1,*}, 季英华^{2,*}, 吴根土¹, 赵文浩², 吴淑华², 肖留斌², 孙现超¹,
周益军^{2,**}, 青玲^{1,**}

(¹西南大学植物保护学院, 植物病害生物学重庆市高校级重点实验室, 重庆 400716; ²江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏省食品质量安全重点实验室—省部共建国家重点实验室培养基地, 南京 210014)

摘要: 木尔坦棉花曲叶病毒 (*Cotton leaf curl Multan virus*, CLCuMuV) 2006 年在中国首次报道, 并呈逐年扩散蔓延, 给园艺和经济作物造成了严重损失。选择 2012 年采自江苏南京的 CLCuMuV 朱槿 (*Hibiscus rosa-sinensis*) 分离物作为研究对象, 对其 V2 蛋白基因进行了扩增及克隆, 并构建了 V2-YFP 融合表达载体, 利用农杆菌浸润法接种本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*)。激光共聚焦显微镜观察结果显示浸润处理后本氏烟叶片细胞的细胞质和细胞核周都有较强的绿色荧光信号, 同时细胞质中还分布有点状的荧光信号。反转录 PCR (RT-PCR) 及蛋白质免疫印迹 (Western blot) 结果显示带荧光标签的 V2 在本氏烟叶片中转录和表达正常。这些结果说明 CLCuMuV 编码的 V2 蛋白主要分布在细胞质和细胞核周, 同时在细胞质中还会形成小聚合体。

关键词: 朱槿; 木尔坦棉花曲叶病毒; V2 蛋白; 亚细胞定位

中图分类号: S 685.22

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 12-2417-10

Characterization and Subcellular Localization of V2 Protein Encoded by *Cotton leaf curl Multan virus* Infecting *Hibiscus rosa-sinensis*

CHEN Simin^{1,*}, JI Yinghua^{2,*}, WU Gentu¹, ZHAO Wenhao², WU Shuhua², XIAO Liubin², SUN Xianchao¹, ZHOU Yijun^{2,**}, and QING Ling^{1,**}

(¹College of Plant Protection, Southwest University/Chongqing Key Laboratory of Plant Disease Biology, Chongqing 400716, China; ²Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Lab of Food Quality and Safety of Jiangsu Province-State Key Laboratory Breeding Base, Nanjing 210014, China)

Abstract: *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMuV), an important whitefly-transmitted geminivirus, was first reported in China in 2006 and the epidemics of the virus caused devastating losses to local horticultural and economical crops in recent years. As V2 was reported essential for virus infection for many begomoviruses, to clarify the subcellular localization of V2 encoded by CLCuMuV, the V2 gene of a Jiangsu isolate of CLCuMuV from the *Hibiscus rosa-sinensis*, was amplified and cloned. Subsequently

收稿日期: 2018-07-25; **修回日期:** 2018-12-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31572074, 31770168); 中央高校基本科研业务费“创新团队”专项 (XDJK2017A006); 江苏省农业科学院基金项目 (6111614); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-15-18)

* 共同第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: qling@swu.edu.cn, yjzhou@jaas.ac.cn)

V2 was cloned into a 35S:YFP vector to obtain YFP tagged V2 (V2-YFP) and transiently expressed in the *Nicotiana benthamiana* leaves by *Agrobacterium* infiltration. The subcellular localization of V2 was observed by confocal laser scanning microscope and the result showed that there was relatively strong GFP fluorescence signal around the nucleus and at the cell periphery (cytoplasm), and some punctate fluorescent bodies were also observed in the cytoplasm. The expression of V2 protein (fused with YFP) in the infiltrated *N. benthamiana* leaves was confirmed by RT-PCR and Western blotting. These results demonstrated that the V2 protein encoded by CLCuMuV was localized around the nucleus and at the cell periphery (cytoplasm), and V2 protein could form aggregates in the cytoplasm as well.

Keywords: *Hibiscus rosa-sinensis*; *Cotton leaf curl Multan virus*; V2 protein; subcellular localization

木尔坦棉花曲叶病毒 (*Cotton leaf curl Multan virus*, CLCuMuV) 是双生病毒科 (*Geminiviridae*) 菜豆金色花叶病毒属 (*Begomovirus*) 的单组分双生病毒, 主要由烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 以持久循环方式传播 (Harrison et al., 1997), 危害多种作物。CLCuMuV 最早在巴基斯坦木尔坦地区发现, 之后巴基斯坦其他地区及印度等地有发生, 给当地的棉花等作物生产造成了惨重的损失 (Briddon & Markham, 2000; Briddon, 2010; Sattar et al., 2013)。2006 年中国首次报道了 CLCuMuV 在广东朱槿上发生为害 (毛明杰 等, 2008), 之后陆续在广西 (林林 等, 2011)、福建 (章松柏 等, 2013)、江苏 (张晖 等, 2015)、海南 (汤亚飞 等, 2015) 等地发生, 成为朱槿 (毛明杰 等, 2008; 林林 等, 2011; 张晖 等, 2015)、黄秋葵 (董迪 等, 2010, 2012; Xie et al., 2011)、红麻 (汤亚飞 等, 2015)、垂花悬铃花 (汤亚飞 等, 2013)、棉花 (Cai et al., 2010) 等多种植物的重大病害风险因子之一 (何自福 等, 2012)。

CLCuMuV 病毒粒体为典型的孪生颗粒状, 大小 18~20 nm × 30 nm, 基因组为单链环状 DNA (circular single-stranded DNA, cssDNA), 含有 1 个 DNA-A 组分, 同时伴随 1 个 β 卫星分子 (Mansoor et al., 2003)。DNA-A 组分大小 2.7~2.8 kb, 含有 6 个 ORF, 分别编码 V1、V2、C1、C2、C3 和 C4 蛋白, β 卫星大小约 1.3 kb, 含有 1 个 ORF, 编码 βC1 蛋白 (Zhou et al., 1998; Mansoor et al., 2003)。

在 CLCuMuV 编码的 6 个蛋白中, 关于 V2 蛋白功能研究还相对较少。Amin 等 (2011a, 2011b) 在研究 CLCuMuV 巴基斯坦分离物 (AJ496287、AJ496461) 时发现其编码的 V2 蛋白是一个基因沉默抑制子, 可以抑制寄主的 PTGS, 同时 V2 还是一个致病相关因子, 在寄主植物中过量表达会引起叶片卷曲等症状, 并伴有坏死反应, 而对于其亚细胞定位特征, 目前尚未见报道。

很多研究结果显示蛋白的功能与其亚细胞分布特征密切相关, 研究蛋白的亚细胞定位特征一方面有利于解析蛋白的作用方式, 同时也有利于发现蛋白的新功能。如东非木薯花叶喀麦隆病毒 (*East African cassava mosaic Cameroon virus*, EACMCV) 编码的 AV2 蛋白主要分布在细胞质, 而在无胞间连丝的保卫细胞中没有分布, 说明 AV2 蛋白可能通过胞间连丝进入细胞中, 推测 AV2 蛋白可能参与了病毒的胞间运动 (Chowda-Reddy et al., 2008); Yang 等 (2007) 在研究番茄金色花叶病毒 (*Tomato golden mosaic virus*, TGMV) 编码的 AL2 蛋白功能时发现 AL2 在细胞质和细胞核均有分布, 在细胞核内主要负责激活病毒转录, 在细胞质内主要参与抑制寄主的基因沉默。目前已有很多研究结果显示双生病毒编码的 V2 蛋白具有多种功能, 在病毒侵染和致病过程中起着重要作用, 如在 CLCuMuV 的近缘病毒 Kokhran 棉花曲叶病毒 (*Cotton leaf curl Kokhran virus*, CLCuKoV) 的研究中发现, V2 突变后会导致病毒的侵染效率下降, 在寄主植物体内的积累量降低, 植株不表现症状

(Iqbal et al., 2012)。V2 还参与了病毒的运动 (Priyadarshini et al., 2011; Guha et al., 2013)、致病 (Mubin et al., 2010)、抑制寄主的 PTGS (Saeed et al., 2015) 等一系列过程。这些结果暗示 CLCuMuV 编码的 V2 可能也是一个多功能蛋白, 对病毒侵染和致病起着重要作用。

本研究中选择在中国发生的 CLCuMuV 朱槿分离物 (张晖 等, 2015) 作为研究对象, 通过基因克隆和生物信息学分析, 对 CLCuMuV 编码的 V2 蛋白氨基酸序列进行了分析, 构建 V2-YFP 融合表达载体, 对 V2 蛋白的亚细胞定位特征进行了研究, 以明确 V2 蛋白亚细胞定位特征, 为进一步解析 CLCuMuV 编码的 V2 蛋白功能及 CLCuMuV 致病机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

CLCuMuV 毒源为本实验室保存的 2012 年采自江苏省南京市发病朱槿样品 (张晖 等, 2015); 所用荧光标签载体 35S:YFP 由南京农业大学陶小荣教授惠赠。大肠杆菌感受态 Trans10 购自北京全式金生物公司; 农杆菌菌株 GV3101 由本实验室保存; 本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 植株培养于温度为 26 °C、光照周期为 14 h 光照/10 h 黑暗的光照培养箱中。

1.2 CLCuMuV V2 基因的扩增及序列分析

参照 Xie 等 (2002) 的方法, 用碱裂解法提取病样总 DNA。根据 CLCuMuV 基因组序列 (JX914662) 设计 CLCuMuV V2 基因全长扩增引物 MAV2_bgF: 5'-GAAGATCTATGTGGGATCCATTGT TAAACG-3' 和 MAV2_bgR: 5'-GAAGATCTCAACCCTTTGGAACATpCCGG-3' (下划线为 *Bgl* II 酶切位点)。以提取病样总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系: DNA 模板 2 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 各 2 μ L, 10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ plus) 5 μ L, dNTP Mixture 4 μ L, TaKaRa *Taq* (5 U \cdot μ L⁻¹) 0.25 μ L, 加入 ddH₂O 使反应液定容至 50 μ L, 离心混匀后进行 PCR。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 51 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 40 s, 33 个循环; 72 °C 充分延伸 10 min; 4 °C 保存。经 1% 琼脂糖凝胶, 0.5 \times TAE 缓冲液和 150 V 电压下电泳, 0.5 μ g \cdot mL⁻¹ 溴化乙锭 (EB) 染色 15 min 后于凝胶成像系统中观察。将扩增所得的目的片段进行割胶回收操作, DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段后, 连接至 pMD18-T 载体, 连接体系: 4.5 μ L 目的片段回收产物, 5 μ L Solution I, 0.5 μ L pMD18-T Vector, 16 °C 连接过夜, 将连接产物通过热击转化法转入大肠杆菌感受态 Trans10, 涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上, 37 °C 恒温培养箱中倒置过夜培养, 挑取单菌落进行 PCR 检测, 筛选出阳性克隆委托南京金斯瑞生物公司进行测序。序列分析利用 NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 BLAST 在线分析工具及本地 ClustalX、BioEdit、DNASTar 等软件完成。

1.3 CLCuMuV V2-YFP 融合表达载体的构建

将测序验证无误且读码框正确的阳性克隆提取质粒后用 *Bgl* II 进行单酶切, 对目的条带进行切割回收, 纯化后的目的条带通过 T4 连接酶连接经 *Bam* III 单酶切的 35S:YFP 载体, 连接体系: 目的片段回收产物 7 μ L, 1 μ L T4 DNA Ligase (350 U \cdot μ L⁻¹), 1 μ L 10 \times T4 DNA Ligase Buffer, 1 μ L 线性化 (经过 *Bam* III 单酶切) 35S:YFP 载体, 16 °C 连接过夜, 连接产物通过热击法转入大肠杆菌感受态 Trans10, 涂布于含硫酸卡那霉素的 LB 平板上, 于 37 °C 恒温培养箱中倒置过夜培养, PCR 筛选阳性克隆并进行序列测定, 测序验证无误后获得重组质粒 V2-YFP。

1.4 CLCuMuV V2 蛋白的亚细胞定位

电击转化参照王碧（2015）的方法将重组质粒 V2-YFP 及 35S:YFP 空载体质粒转化农杆菌 GV3101，涂布于含利福平及硫酸卡那霉素的 LB 平板上，28 °C 恒温培养箱中倒置培养 48 h。挑取单菌落进行 PCR 检测，筛选阳性克隆。

瞬时表达参照邱初等（2009）的方法，28 °C 摇床过夜培养至 OD₆₀₀ 为 0.8 时收集菌体，用新鲜配置的浸润液 MMA（10 mmol · L⁻¹ MgCl₂；10 mmol · L⁻¹ MES 以及 0.1 mmol · L⁻¹ AS）重悬菌体，调 OD₆₀₀ 为 0.5，室温静置 2 h。选取 4~6 叶期健康的本氏烟幼苗，用去除针头的无菌注射器浸润处理本氏烟叶片。进行 3 次生物学重复，每次生物学重复浸润 8~10 株，每株浸润 3 片叶片，每片叶均有两个浸润点。浸润后的本氏烟置于 25 °C 培养箱培养。40 h 后切取叶片浸润区制作临时玻片，于激光共聚焦显微镜（ZEISS LSM710）488 nm 激发光下观察上皮细胞中目标蛋白的表达情况及其亚细胞定位特征。核定位观察时用 DAPI（4',6'-diamidino-2-phenylindole）标记细胞核：先取观察样品用 DAPI 染色，10 min 后洗脱染色液，于激光共聚焦显微镜下观察荧光。

1.5 CLCuMuV V2 转录产物的 RT-PCR 检测

为了验证 V2-YFP 在本氏烟叶片细胞中是否正常转录，称取浸润处理的本氏烟叶片组织 0.1 g 在液氮中充分研磨，参照郭思瑶等（2015）的方法，用 TRIzol[®] Reagents 提取总 RNA，根据 PrimeScript[™] RT reagent 试剂盒方法合成 cDNA。以上述 cDNA 为模板，利用 V2 全长扩增的上游引物（MAV2_bgF）和位于 YFP N 端的引物（EGFP-N）进行 PCR 检测。

1.6 CLCuMuV V2 蛋白的 Western blot 分析

称取 0.4 g 浸润处理（40 hpi）的本氏烟叶片，用蛋白抽提液（100 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0；6% SDS；2% β-巯基乙醇）进行总蛋白抽提，95 °C 变性 10 min，冰浴 5 min，12 000 r · min⁻¹ 离心 5 min，取上清液，即为 Western blot 试验蛋白样品。取适量蛋白样品于 12% SDS-PAGE 胶上进行电泳（80 V，1 h；130 V，1 h）。将聚偏二氟乙烯（PVDF）膜在甲醇中浸润 20 s 激活，在电转缓冲液中通过湿转膜仪将凝胶转移到膜上（260 mA，1 h）。取出 PVDF 膜，用 1× PBST 清洗 3 次，加入封闭液（利用 1× PBST 配制的 5% 脱脂奶粉），室温 120 r · min⁻¹ 振荡 1 h，用 1× PBST 清洗 3 次；加入 GFP 抗体，4 °C 孵育过夜后用 1× PBST 清洗 3 次；加入二抗（羊抗兔），室温 120 r · min⁻¹ 振荡孵育 1 h，再用 1× PBST 清洗 3 次。参照 ECL Western Blotting Substrate 显色试剂盒避光显色 5 min。在天能 Tanon 5200 Multi 全自动荧光/化学发光成像分析系统下进行观察。

2 结果与分析

2.1 CLCuMuV V2 基因克隆

鉴于 CLCuMuV 编码的 V2 基因本身含有 BamH I 酶切位点，本研究中采用的 35S:YFP 载体的多克隆位点只有一个 BamIII，因此在设计 V2 基因全长扩增引物时引入了 BglII 酶切位点（兼容 BamIII）。利用该引物，以病样 DNA 为模板进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳结果显示扩增到一条约 400 bp 的特异条带，与 CLCuMuV 编码的 V2 基因（366 bp）大小一致。回收该片段，连接克隆载体 pMD18-T，转化大肠杆菌，菌落 PCR 筛选阳性克隆，经测序验证无误后获得重组质粒 pMD18T-V2。

2.2 CLCuMuV V2 蛋白的氨基酸序列特征分析

CLCuMuV 江苏分离物 V2 基因核苷酸序列全长 366 bp, 编码一个含有 121 个氨基酸约 14 kD 的蛋白, 该蛋白与之前报道的江苏分离物 (JX914662) 编码的 V2 蛋白氨基酸序列完全一致。

除江苏分离物外, 对已报道的 CLCuMuV 其他分离物编码的 V2 蛋白氨基酸序列也进行了分析, 结果 (图 1) 发现各分离物编码的 V2 氨基酸序列非常保守。本研究获得的 V2 氨基酸序列除与广东 (HQ455353、HQ455363)、广西 (JQ317603) 部分分离物存在一个氨基酸突变外, 与海南 (KF766955、KF766953、KF444948)、福建 (JX861210)、云南 (KF766947) 及广东 (KF766951、KF766949、KF766945、HQ455361、JN968573、HQ455349、HQ455348)、广西 (HQ455357、HQ455356、HQ455355、GU574208、GQ924756、GQ503175) 其他分离物的氨基酸序列完全一致。CLCuMuV 中国分离物编码的 V2 氨基酸序列与巴基斯坦及印度等分离物 V2 氨基酸序列差异较大。

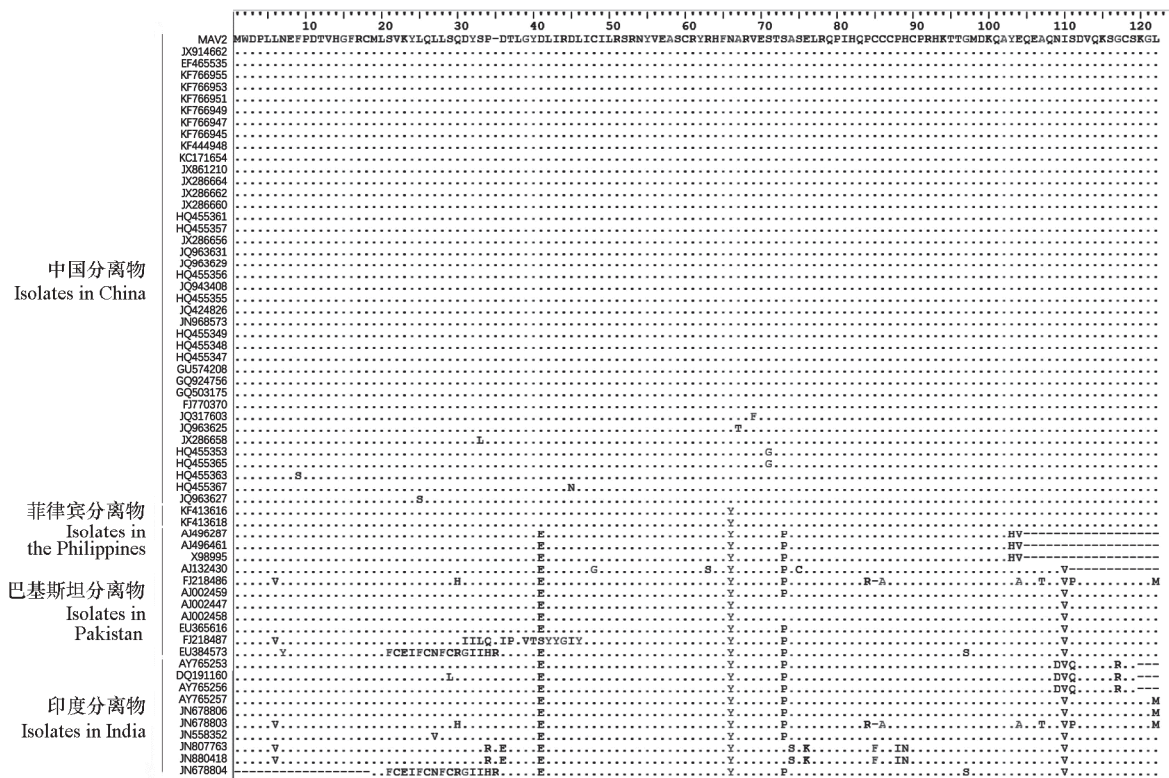


图 1 已报道的 CLCuMuV 分离物 V2 蛋白的氨基酸序列比较

Fig. 1 Amino acid sequence comparison of reported CLCuMuV isolates V2 protein

2.3 CLCuMuV V2-YFP 融合表达载体的构建

鉴于克隆 V2 基因时分别在基因的两端引入了 *Bgl* II 酶切位点, 因此通过 *Bgl* II 酶切 pMD18T-V2 获得了 V2 基因。在利用琼脂糖凝胶电泳分析 pMD18T-V2 经 *Bgl* II 酶切产物时发现两条片段。其中一条大小在 2 000 ~ 3 000 bp 之间, 与 pMD18-T 大小一致。另一条大小约 400 bp, 与 366 bp 的 V2 大小一致。回收大小约 400 bp 的目的片段, 通过 T4 连接酶将其连接经 *Bam*H I (与 *Bgl* II 酶切位点兼容) 处理后纯化回收的 YFP 空载体质粒, 转化 Trans10 感受态细胞, 利用载体引物 35SF 和 EGFP-N 经 PCR 进行阳性克隆筛选 (图 2, A)。

鉴于 V2 基因是经单酶切后插入 35S:YFP 载体, 因此 V2 可以正向插入, 亦可反向插入, 为了保证插入方向正确, 对筛选到的阳性克隆进一步利用引物 35SF 和 MAV2_bgR 进行菌落 PCR 筛选 (图 2, B), 并进一步测序进行验证, 测序结果正确的阳性克隆命名为 V2-YFP, 从而获得带有 YFP 标签的 V2 重组表达载体。

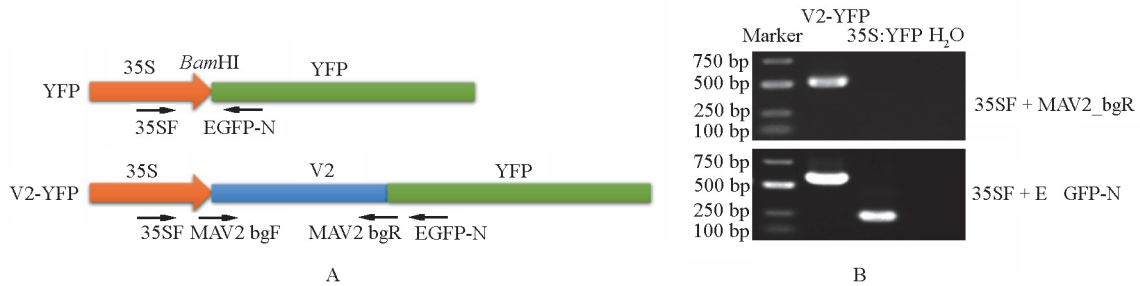


图 2 CLCuMuV V2-YFP 载体构建

A: YFP 及 V2-YFP 载体图谱; B: PCR 筛选 V2-YFP 重组阳性克隆。

Fig. 2 Construction of CLCuMuV V2-YFP vector

A: Diagram of YFP and V2-YFP; B: Detection and confirmation of the recombinant V2-YFP vector by PCR.

2.4 CLCuMuV V2 蛋白亚细胞定位特征分析

将瞬时表达载体 V2-YFP 通过电击法转化农杆菌, 选取 4~6 叶期健康的本氏烟幼苗, 利用农杆菌浸润液处理本氏烟叶片, 于激光共聚焦显微镜下观察叶片表皮细胞中的绿色荧光信号, 结果 (图 3) 发现浸润 V2-YFP 的本氏烟叶片细胞中都有明显的绿色荧光信号, 在细胞质分布的绿色荧光信号会形成小的聚合体, 在细胞核周区域也疑似有分布。

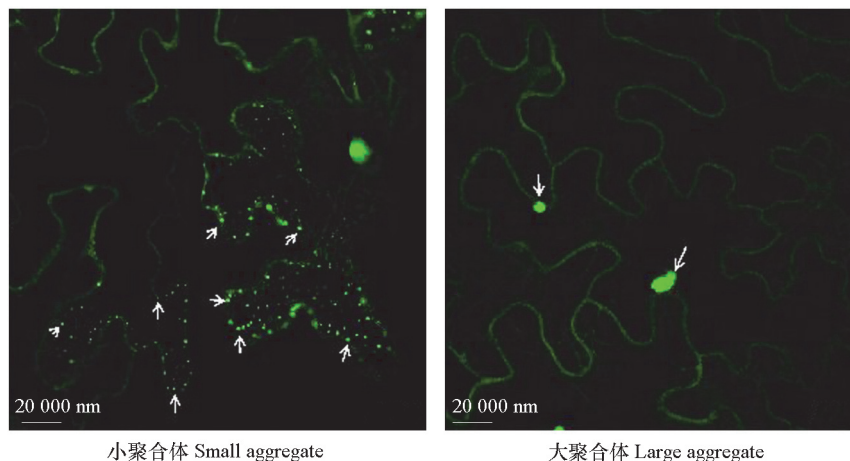


图 3 V2 在本氏烟表皮细胞细胞质形成的聚合体

箭头指示聚合体。

Fig. 3 V2 aggregates in the cytoplasm of the epidermal cells of *Nicotiana benthamiana* leaves

Arrows pointed to the position of V2 aggregates in the cytoplasm.

为了进一步印证其在细胞核周区域的分布, 采用 DAPI 处理细胞核后进行观察, 结果发现荧光信号主要分布在细胞核周 (图 4), 而 YFP 空载体浸润处理的叶片的细胞质和细胞核均能观察到明显的绿色荧光信号, 但在细胞质中没有绿色荧光的点状聚集。重复 3 次, 结果均一致。表明 V2 在

本氏烟表皮细胞的细胞质及细胞核周均有分布, 同时在细胞质中会形成聚合的小体。

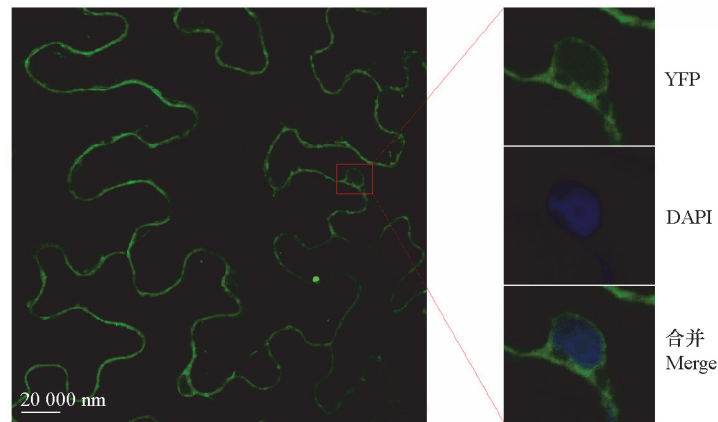


图 4 V2 在本氏烟叶片表皮细胞中的亚细胞定位

红框所示区域为细胞核。

Fig. 4 Subcellular localization of V2 in the epidermal cells of *Nicotiana benthamiana* leaves

The nucleus of *N. benthamiana* is marked with red box.

2.5 V2-YFP 的转录及表达检测

浸润 V2-YFP 的本氏烟样品中均可以扩增出 1 条约 400 bp 的特异性条带, 而空载体对照无对应条带 (图 5, A), 表明 V2-YFP 转录正常。

Western blot 检测, 结果 (图 5, B) 显示在浸润 V2-YFP 的本氏烟样品中检测到约 40 kD 的特异性条带, 与预期的 V2-YFP 融合蛋白大小相近; 而接种 YFP 的本氏烟样品在 27 kD 处有明显条带, 与 YFP 大小一致。这些结果表明 V2-YFP 在本氏烟叶片细胞中的转录和表达均正常。

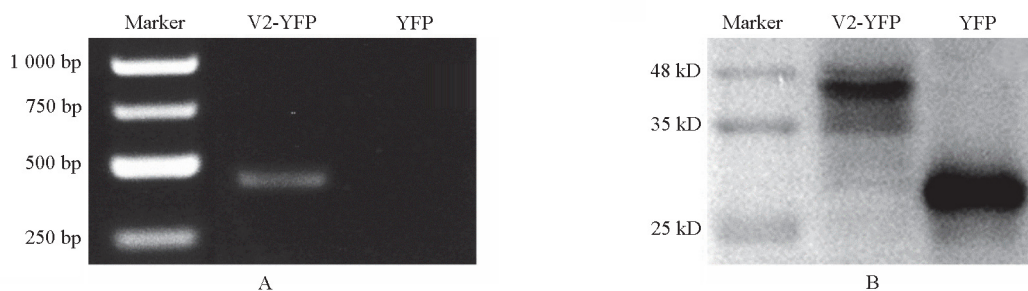


图 5 V2-YFP 在本氏烟细胞中的转录及表达检测

Fig. 5 Detection of transcription and expression of V2-YFP in *Nicotiana benthamiana*

A: RT-PCR; B: Western blot.

3 讨论

本研究中选择 CLCuMuV 朱槿分离物为研究对象, 对其 V2 基因进行了克隆及序列测定。构建了带有 YFP 荧光标签的重组表达载体 V2-YFP, 转化农杆菌后浸润接种本氏烟。结果发现在本氏烟表皮细胞中, V2 蛋白在细胞质及细胞核周均有分布, 同时细胞质中伴有小聚合体形成, 这是

CLCuMuV 编码的 V2 蛋白亚细胞定位特征的首次报道, 为进一步研究其功能奠定了基础。

多项研究证实, 对病毒蛋白的亚细胞定位进行观察与分析是揭示其功能特征快速而有效的方法 (Maroniche et al., 2012), 因此研究蛋白的亚细胞定位特征有利于推动蛋白功能的解析。在本研究中, 发现 CLCuMuV 编码的 V2 在细胞质及细胞核周均有分布, 同时在细胞质会形成小聚合体, 这些特征可能与其功能密切相关。许多植物病毒和动物病毒编码的蛋白都能在寄(宿)主细胞中形成小聚合体, 这些小聚合体可能与病毒的定位和生物学功能相关 (Gorovits et al., 2013)。Gorovits 等 (2016) 在研究 TYLCV 编码的 V2 蛋白时也发现其在侵染的植物细胞中形成聚合体, 并推测这种聚合体在 TYLCV 侵染过程中起着重要作用。而作者在观察 CLCuMuV 编码的 V2 蛋白亚细胞定位特征时也发现 V2 会在细胞质形成聚合体, 推测可能与 V2 在病毒侵染过程中的角色相关。除在细胞质形成聚合体外, CLCuMuV 编码的 V2 蛋白在细胞核周也有分布。由于双生病毒的复制是在细胞核内完成的, 而其转录场所是在细胞质, 因此病毒的基因组在复制完成后需要由细胞核转运到细胞质才能完成其生活史 (Gafni & Epel, 2002; Hanley-Bowdoin et al., 2013), Rojas 等 (2001) 在研究 TYLCV 编码的 V2 蛋白在病毒运动中的功能时发现 V2 在细胞核周有分布, 并能够增强病毒基因组 DNA 的出核能力, 推测其参与了病毒基因组 DNA 的核质转运过程, 而 CLCuMuV 编码的 V2 在细胞核周也有分布, 推测这种核周分布的特征可能与其在病毒基因组核质转运中的作用密切相关。

中国报道的 CLCuMuV 各分离物之间核苷酸序列高度同源 (> 99%) (Du et al., 2015)。本研究在分析 CLCuMuV 编码的 V2 蛋白氨基酸序列时也发现: CLCuMuV 江苏分离物的 V2 蛋白氨基酸序列与我国已报道的 39 个 CLCuMuV 分离物中的 31 个序列完全一致, 而与剩余的 8 个分离物 (JQ317603、JQ963625、JX286658、HQ455353、HQ455365、HQ455363、HQ455367、JQ963627) 之间仅存在一个氨基酸突变。说明中国各 CLCuMuV 分离物编码的 V2 蛋白非常保守。目前双生病毒编码的 V2 蛋白功能已有很多报道, 但 CLCuMuV 编码的 V2 蛋白功能方面的报道还相对较少, 已报道的两个巴基斯坦分离物 (AJ496287、AJ496461) 与中国发生的 CLCuMuV 虽然都属于同一个种, 但二者之间的序列差异相对较大, 与我国分离物相比较, 巴基斯坦分离物编码的 V2 蛋白序列不仅存在多个 (5 个) 氨基酸位点突变, C 端还缺失了 18 个氨基酸。本研究中选择 CLCuMuV 朱槿分离物编码的 V2 蛋白为研究对象, 明确其亚细胞定位特征, 为进一步解析 CLCuMuV 编码的 V2 蛋白功能及 CLCuMuV 的致病机理提供了前期的研究基础。

References

- Amin I, Hussain K, Akbergenov R, Yadav J S, Qazi J, Mansoor S, Hohn T, Fauquet C M, Briddon R W. 2011a. Suppressors of RNA silencing encoded by the components of the cotton leaf curl begomovirus-betasatellite complex. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24 (8): 973 - 983.
- Amin I, Patil B L, Briddon R W, Mansoor S, Fauquet C M. 2011b. Comparison of phenotypes produced in response to transient expression of genes encoded by four distinct begomoviruses in *Nicotiana benthamiana* and their correlation with the levels of developmental miRNAs. *Virology Journal*, 8: 238.
- Briddon R W. 2010. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology*, 4 (6): 427 - 434.
- Briddon R W, Markham P G. 2000. Cotton leaf curl virus disease. *Virus Research*, 71 (1 - 2): 151 - 159.
- Cai J H, Xie K, Lin L, Qin B X, Chen B S, Meng J R, Liu Y L. 2010. *Cotton leaf curl Multan virus* newly reported to be associated with cotton leaf curl disease in China. *Plant Pathology*, 59 (4): 794 - 795.
- Chowda-Reddy R V, Achenjang F, Felton C, Etarock M T, Anangfac M-T, Nugent P, Fondong V N. 2008. Role of a geminivirus AV2 protein putative protein kinase C motif on subcellular localization and pathogenicity. *Virus Research*, 135 (1): 115 - 124.
- Dong Di, He Zi-fu, Chai Zhao-xiang. 2010. Detection of whitefly-transmitted geminivirus associated with the okra yellow vein leaf curl disease in

- Guangdong. *Plant Protection*, 36 (1): 65 - 68. (in Chinese)
- 董迪, 何自福, 柴兆祥. 2010. 广东黄秋葵黄脉曲叶病样中检测到烟粉虱传双生病毒. *植物保护*, 36 (1): 65 - 68.
- Dong Di, Zhu Yan-hua, He Zi-fu, Chai Zhao-xiang, She Xiao-man, Luo Fang-fang. 2012. Molecular characterization of *Cotton leaf curl Multan virus* and the associated satellite DNA infecting okra in Guangdong. *Journal of South China Agricultural University*, 33 (1): 33 - 39. (in Chinese)
- 董迪, 朱艳华, 何自福, 柴兆祥, 余小漫, 罗芳芳. 2012. 侵染广东黄秋葵的木尔坦棉花曲叶病毒及伴随卫星 DNA 的分子特征. *华南农业大学学报*, 33 (1): 33 - 39.
- Du Z, Tang Y, He Z, She X. 2015. High genetic homogeneity points to a single introduction event responsible for invasion of *Cotton leaf curl Multan virus* and its associated betasatellite into China. *Virology Journal*, 12: 163.
- Gafni Y, Epel B L. 2002. The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60 (5): 231 - 241.
- Gorovits R, Fridman L, Kolot M, Rotem O, Ghanim M, Shriki O, Czosnek H. 2016. *Tomato yellow leaf curl virus* confronts host degradation by sheltering in small/midsized protein aggregates. *Virus Research*, 213: 304 - 313.
- Gorovits R, Moshe A, Kolot M, Sobol I, Czosnek H. 2013. Progressive aggregation of *Tomato yellow leaf curl virus* coat protein in systemically infected tomato plants, susceptible and resistant to the virus. *Virus Research*, 171 (1): 33 - 43.
- Guha D, Priyadarshini C P, Purakayastha A, Thippeswamy R, Lakshmikanth M, Savithri H S. 2013. Biochemical characterization of C4 protein of *Cotton leaf curl Kokhran Virus-Dabawali*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -General Subjects*, 1830 (6): 3734 - 3744.
- Guo Si-yao, Tong Yan, Huang Ya, Luo Xin-fu, Qing Ling. 2015. Preliminary identification and analyses of viruses causing pepper virus disease in Chongqing, China. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (2): 263 - 270. (in Chinese)
- 郭思瑶, 童艳, 黄娅, 罗信福, 青玲. 2015. 重庆辣椒病毒病原初步鉴定和分析. *园艺学报*, 42 (2): 263 - 270.
- Hanley-Bowdoin L, Bejarano E R, Robertson D, Mansoor S. 2013. Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nat Rev Microbiol*, 11 (11): 777 - 788.
- Harrison B D, Liu Y L, Khalid S, Hameed S, Otim-Nape G W, Robinson D J. 1997. Detection and relationships of *Cotton leaf curl virus* and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan. *Annals of Applied Biology*, 130 (1): 61 - 75.
- He Zi-fu, She Xiao-man, Tang Ya-fei. 2012. *Cotton leaf curl Multan virus* invading China and its damage potential. *Journal of Biosafety*, 21 (2): 87 - 92. (in Chinese)
- 何自福, 余小漫, 汤亚飞. 2012. 入侵我国的木尔坦棉花曲叶病毒及其为害. *生物安全学报*, 21 (2): 87 - 92.
- Iqbal Z, Sattar M N, Kvarnheden A, Mansoor S, Briddon R W. 2012. Effects of the mutation of selected genes of *Cotton leaf curl Kokhran virus* on infectivity, symptoms and the maintenance of cotton leaf curl Multan betasatellite. *Virus Research*, 169 (1): 107 - 116.
- Lin Lin, Cai Jian-he, Luo En-bo, Qin Bi-xia, Hu Dong-mei, Meng Jiao-rong, Chen Bao-shan, Nong Heng-zhi. 2011. Molecular identification and host range of a geminivirus infecting *Hibiscus* in Nanning City. *Plant Protection*, 37 (4): 44 - 47. (in Chinese)
- 林林, 蔡健和, 罗恩波, 秦碧霞, 胡冬梅, 蒙姣荣, 陈保善, 农恒志. 2011. 南宁市朱槿曲叶病毒病原分子鉴定和寄主范围研究. *植物保护*, 37 (4): 44 - 47.
- Mansoor S, Briddon R W, Bull SE, Bedford I D, Bashir A, Hussain M, Saeed M, Zafar Y, Malik K A, Fauquet C, Markham P G. 2003. Cotton leaf curl disease is associated with multiple monopartite begomoviruses supported by single DNA β . *Archives of Virology*, 148 (10): 1969 - 1986.
- Mao Ming-jie, He Zi-fu, Yu Hao, Li Hua-ping. 2008. Molecular characterization of *Cotton leaf curl Multan virus* and its satellite DNA that infects *Hibiscus rosa-sinensis*. *Chinese Journal of Virology*, 24 (1): 64 - 68. (in Chinese)
- 毛明杰, 何自福, 虞皓, 李华平. 2008. 侵染朱槿的木尔坦棉花曲叶病毒及其卫星 DNA 全基因组结构特征. *病毒学报*, 24 (1): 64 - 68.
- Maroniche G A, Mongelli V C, Llauger G, Alfonso V, Taboga O, Vas M D. 2012. *In vivo* subcellular localization of *Mal de Rio Cuarto virus* (MRCV) non-structural proteins in insect cells reveals their putative functions. *Virology*, 430 (2): 81 - 89.
- Mubin M, Amin I, Amrao L, Briddon R W, Mansoor S. 2010. The hypersensitive response induced by the V2 protein of a monopartite begomovirus

- is countered by the C2 protein. *Molecular Plant Pathology*, 11 (2): 245 - 254.
- Priyadarshini C P, Ambika M V, Tippetwamy R, Savithri H S. 2011. Functional characterization of coat protein and V2 involved in cell to cell movement of *Cotton leaf curl Kokhran virus-Dabawali*. *PLoS ONE*, 6 (11): e26929.
- Qiu Reng, Tao Gang, Li Qi-ke, Qiu You-bin, Liu Zuo-yi. 2009. Transient gene expression mediated by agroinfiltration and its application. *Molecular Plant Breeding*, 7 (5): 1032 - 1039. (in Chinese)
- 邱 勃, 陶刚, 李奇科, 邱又彬, 刘作易. 2009. 农杆菌渗入法介导的基因瞬时表达技术及应用. *分子植物育种*, 7 (5): 1032 - 1039.
- Rojas M R, Jiang H, Salati R, Xoconostle-Cázares B, Sudarshana M R, Lucas W J, Gilbertson R L. 2001. Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, *Tomato yellow leaf curl virus*. *Virology*, 291 (1): 110 - 125.
- Saeed M, Briddon R W, Dalakouras A, Krczal G, Wassenegger M. 2015. Functional analysis of *Cotton leaf curl Kokhran virus*/cotton leaf curl Multan betasatellite RNA silencing suppressors. *Biology*, 4 (4): 697 - 714.
- Sattar M N, Kvarnheden A, Saeed M, Briddon R W. 2013. Cotton leaf curl disease—An emerging threat to cotton production worldwide. *Journal of General Virology*, 94 (4): 695 - 710.
- Tang Ya-fei, He Zi-fu, Du Zhen-guo, Han Li-fang, She Xiao-man, Luo Fang-fang. 2013. Molecular characterization of the *Cotton leaf curl Multan virus* infecting *Malvastrum arboreum*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 43 (2): 120 - 127. (in Chinese)
- 汤亚飞, 何自福, 杜振国, 韩利芳, 余小漫, 罗方芳. 2013. 侵染垂花悬铃花的木尔坦棉花曲叶病毒分子特征研究. *植物病理学报*, 43 (2): 120 - 127.
- Tang Ya-fei, He Zi-fu, Du Zhen-guo, She Xiao-man, Lan Guo-bing. 2015. Detection and identification of the pathogen causing kenaf (*Hibiscus cannabinus*) leaf curl disease in Hainan Province of China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 45 (6): 561 - 568. (in Chinese)
- 汤亚飞, 何自福, 杜振国, 余小漫, 蓝国兵. 2015. 海南红麻曲叶病的病原检测与鉴定. *植物病理学报*, 45 (6): 561 - 568.
- Wang Bi. 2015. Studies of suppression of transcriptional gene silencing by the *Tomato yellow leaf curl virus* encoded V2 protein [Ph. D. Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University. (in Chinese)
- 王 碧. 2015. 番茄黄化曲叶病毒编码的 V2 蛋白抑制转录水平基因沉默研究 [博士论文]. 杭州: 浙江大学.
- Xie K, Cai J H, Hu D M, Wei X, Jia Q, Qin B X, Chen B S, Meng J R, Liu Y L. 2011. First report of okra leaf curl disease in China. *Journal of Plant Pathology*, 92 (4): S109.
- Xie Y, Zhou X, Zhang Z, Qi Y. 2002. *Tobacco curly shoot virus* isolated in Yunnan is a distinct species of Begomovirus. *Chinese Science Bulletin*, 47 (3): 199 - 201.
- Yang X, Baliji S, Buchmann R C, Wang H, Lindbo J A, Sunter G, Bisaro D M. 2007. Functional modulation of the geminivirus AL2 transcription factor and silencing suppressor by self-interaction. *Journal of Virology*, 81 (21): 11972 - 11981.
- Zhang Hui, Ji Ying-hua, Wu Shu-hua, Zhao Wen-hao, Zhou Tong, Zhou Yi-jun. 2015. Identification and characterization of *Cotton leaf curl Multan virus* from *Hibiscus rosa-sinensis* in Jiangsu. *Acta Phytopathologica Sinica*, 45 (4): 361 - 369. (in Chinese)
- 张 晖, 季英华, 吴淑华, 赵文浩, 周 彤, 周益军. 2015. 江苏朱槿上分离到的木尔坦棉花曲叶病毒基因组结构特征分析. *植物病理学报*, 45 (4): 361 - 369.
- Zhang Song-bai, Xia Xuan-xi, Zhang Jie, Zhang You-jun, Wu Zu-jian. 2013. A leaf curl disease on *Hibiscus rosa-sinensis* in Fuzhou caused by *Cotton leaf curl Multan virus*. *Plant Protection*, 39 (2): 196 - 200. (in Chinese)
- 章松柏, 夏宣喜, 张 洁, 张友军, 吴祖建. 2013. 福州市发生由木尔坦棉花曲叶病毒引起的朱槿曲叶病. *植物保护*, 39 (2): 196 - 200.
- Zhou X, Liu Y, Robinson D J, Harrison B D. 1998. Four DNA-A variants among Pakistani isolates of *Cotton leaf curl virus* and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra. *Journal of General Virology*, 79 (4): 915 - 923.