

296-300

6856(2)

第11卷第4期
1996年12月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 11 No. 4
Dec. 1996

非持久性病毒传播机制的研究进展

吴云峰

(西北农业大学植物保护系, 陕西杨陵 712100)

周广和

(中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094)

S432.41

Advances in Transmission Mechanism of Nonpersistent
Viruses by Aphids

Wu Yunfeng

(Dept. of Plant Protection, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

Zhou Guanghe

(Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing 100094)

关键词 非持久性病毒, 蚜虫, 传播机制 植物病毒

Key words Nonpersistent viruses, Aphid, Transmission mechanism

蚜传病毒是一类重要的植物病毒, 广泛为害农业作物及经济作物, 并造成严重减产和巨大的经济损失, 加之介体蚜虫种类多、易爆发等原因, 使防治工作较为困难。因此, 蚜虫传毒机制历来被认为是防治蚜传病毒病的突破口。1928年 Doolittle 和 Walker^[1]用桃蚜 (*Myzus persicae*) 首次成功传播了黄瓜花叶病毒 (CMV), 并提出了口针传毒假说 (Stylet-borne hypothesis)^[2]。进入 90 年代后, 随着膜生物学、生物化学和标记技术的成熟, 蚜虫传毒机制研究取得较大进展。本文就蚜虫传毒的分子基础, 从病毒、蚜虫介体和寄主植物三个方面作一综述。

1 病毒基因及基因产物控制的蚜传特性

在黄瓜花叶病毒组 (Cucumoviruses) 和马铃薯 Y 病毒组 (Potyviruses) 已发现了外壳蛋白 (CP) 控制着蚜传特性^[3]。将黄瓜花叶病毒 (CMV) 高蚜传株系 (HAT) 的 RNA 和低蚜传株系 (PAT) 的 CP 体外组装在一起时, 桃蚜传播能力大大降低; 若用 RNA-PAT 和 CP-HAT 组合则产生了高传毒率^[4]。当给烟草花叶病毒 (TMV) 的 RNA 包被上 CP-VTAV 衣壳后, 则 TMV 也能够被蚜虫传播, 说明病毒能否经蚜虫传播取决于病毒粒子中 CP 特性。在 CMV 中, RNA-3 编码了 CP, 即 RNA-3 基因控制着 CMV 的蚜虫传播专化性^[4]。将 6 种蚜传 CMV 与 2 种非蚜传 CMV 外壳蛋白的氨基酸顺序对比分析, 发现在 CP 中第 168 位氨基酸非常重要^[3]。而烟

本文于 1996 年 1 月 15 日收到, 4 月 21 日修回

• 国家攀登计划课题资助项目

草蚀纹病毒(TEV)以及马铃薯 Y 病毒组(Potviruses)的其它成员的蚜虫传播能力,与 CP 中 N-端氨基酸有关,并发现 Asp-Ala-Gly(DAG)三联体肽段存在于 Potviruses 的蚜传病毒或株系中^[6]。李疱疹病毒(Plum pox virus)、番木瓜环斑病毒(Papaya ringspot virus)、西葫芦黄色花叶病毒(Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)、烟草脉斑驳病毒(Tobacco vein mottle virus, TVMV)和大豆花叶病毒(Soybean mosaic virus)的氨基酸顺序依次为 DAL^[7]、DTG^[8]、DTG^[9]、DAE^[10]和 DAD^[11]。由此可见,并非整个 CP 参与蚜虫传毒,而是其中部分氨基酸在获毒中发挥了作用,特别是 Potviruses 的三联体肽段的第 2 或第 3 位氨基酸影响很大。当 TVMV 的 NAT 中 DAG 的第三位氨基酸由 G 变为 E。将 DAE 的 cDNA 片段替换到 TVMV 蚜传株系(AT)的全长 cDNA 中,尽管没有影响机械摩擦传播特性,但蚜虫再无能力传播这种嵌合病毒。利用定向点突变(Site-directed mutagenesis)使病毒 DAG 中第 2 位氨基酸被替换,导致蚜传性降低;如果 D 突变为 N 蚜传性不受影响,氨基酸愈靠近外壳蛋白核心愈不容易发生变化。因此作者认为在 Potviruses 中,外壳蛋白中控制蚜传特性的三联体肽段可看作是蚜传性决定簇(Transmissibility domain)^[12]。事实上,外壳蛋白的 N-端氨基酸分布在病毒粒子的外表面,蚜虫在获毒过程中,蚜传病毒被亲合,并累积保留在介体蚜虫的食道或前肠,相反对非蚜传病毒,尽管蚜虫也能伴随取食过程而吸入病毒,但蚜虫口针无能力累积并保留病毒^[13]。推测蚜传性决定簇在蚜虫口针获毒过程中,与其口针中病毒附着位点(Viral attachment site, VAS)可能起连接或粘附作用^[14,15]。目前仅在 Potviruses 发现蚜传性决定簇,其它病毒组现在还不清楚,尚待研究。

除了病毒的 CP 决定蚜传特性外,在 Potviruses 和 Caulimoviruses 还发现了一种由病毒基因编码,于植物细胞中合成的非结构蛋白辅助成份(Helper component, HC),在 Potviruses 这种 HC 是由基因组 5'端第二个顺反子翻译的双功能蛋白,具有 HC 和蛋白酶活性,在蚜虫传毒中起重要作用。对花椰菜花叶病毒(Cauliflower mosaic virus, CaMV)蚜传株系(AT)的 HC 基因采用缺失突变分析^[16,17],然后再与非蚜传株系(NAT)进行嵌合构建^[18]研究,结果表明 CaMV 的 ORF II 能够编码一种 18 kD 的蛋白质(P18),经对感染 CaMV 的病株分析结果已确认 P18 就是 HC,而 CaMV-NAT 在受感染的植物中不产生 P18。即使 P18 产生,其第 94 位的氨基酸也发生了替换。说明 ORF II 内发生缺失就会导致蚜虫传播性的丧失及 P18 的缺失。现推测 TVMV 和 PVY 的 HC 其生物学活性基团可能是一个二聚体^[19]。通过体外转导和核苷酸序列分析,说明编码 HC-TVMV 的基因是在阅读框架 5'端第二位。HC-TVMV 的 N-端的第 248 位是一个色氨酸^[20],根据 TEV-HC 的蛋白酶(HC-PRO)对 HC 多肽的 C-端氨基酸的分析结果类推,已确定 HC-TVMV 的 C-端第 713 位为甘氨酸,根据 HC 的末端氨基酸,推出 HC-TVMV 基因由 947~2344 位核苷酸序列编码^[21]。在 Potviruses 中,马铃薯 C 病毒(Potato virus C, PVC)的一个不完整 HC 株系产生了一个多肽(HC-PVC),这个多肽的分子量和免疫学性质类似于 HC-PVY,但是它不具有 HC 功能^[21]。对 PVC 和 PVY 的 HC-PRO 区域的核苷酸和氨基酸顺序分别进行对比,结果其核苷酸同源率为 92%,所编码的氨基酸有 24 个不同。将 HC-PVC 与其它 5 个 Potviruses 的 HC 顺序对比,结果 HC-PVC 中的 2 个氨基酸变化是专一的,即存在由赖氨酸→谷氨酸,异亮氨酸→缬氨酸的情况。尽管目前人们已经知道 HC 协助了蚜虫传毒,但 HC 活性中心氨基酸的潜在功能以及通过什么样的方式影响蚜虫传毒,仍然是一个需要深入探讨的问题。可喜的是,TEV 和西瓜花叶病毒 2 号(WM-

MV-2)与HC的交互组合研究,已经发现HC能够将病毒粒子连接到蚜虫口针内持毒位点(Retention site)上,免疫荧光显微镜实验表明HC能够间接地介导病毒粒子与蚜虫介体内持毒位点间的亲合,推测作用原理类似于凝集素的亲合作用,并与HC和CP的N-端氨基酸有直接关系^[6]。

2 蚜虫介体专化性

蚜虫口器是由一对上颚口针(Mandibular stylets)和一对下颚口针(Maxillary stylets)组成,外部由口针鞘(Stylet bundle)包被。口针鞘尖端有许多刚毛,被认为是机制性感受细胞或机械性受体(Mechanoreceptor)。上颚口针尖端和食道副咽喉区分布有化学受体(Chemoreceptor),包括吸食受体(IR)、水分受体、葡糖苷受体、阴阳离子受体、营养受体(NR)等,NR主要尝试植物汁液中的氨基酸,IR和NR对化学物质均非常敏感,并能根据组织中物质浓度梯度选择取食位点,这些受体在取食中均起重要作用^[4],非持久性病毒的介体专化性不象持久性病毒那样强,目前也没有获得蚜虫介体的系统发育相关的证据,但一般观点认为蚜虫介体专化性与蚜虫行为、生物化学及生理补偿有关,蚜虫不能传播一些病毒则说明不亲合这类病毒。当蚜虫在含有生物碱的植物表面探刺,会对取食行为有很大的影响^[22]。用0.3%考马氏亮兰G-250对桃蚜分泌在植物组织中的胶状唾液(Gelling saliva)染色,观察结果表明当蚜虫选择好取食位点后,一对上颚口针和一对下颚口针便交替刺入植物组织,口针能在细胞间或细胞内移动,进入细胞间或细胞内是随机的,并证明桃蚜能够从烟草表皮和薄壁细胞分别获得CMV^[12]。看来蚜虫口针吸食-回吐过程使蚜虫传毒变得与介体细胞膜携带病毒的能力密切相关,传毒率高低取决于蚜虫口针对病毒的吸附能力,虫龄小比较活泼其传毒能力较强,而虫龄增大后,传毒能力即行下降^[23]。

3 植物的影响

寄主植物的生理和生化特性明显地影响蚜虫的取食行为。如芥属植物(*Brassicae*)的蜡质层、叶毛影响甘蓝蚜(*Brevicoryne brassicae*)的取食行为,黑芥子油苷酸钾和一种芥子油糖苷能促进取食。在田间大豆花叶病毒(Soybean mosaic virus)的传播与大豆叶片茸毛多少负相关。目前已经发现十字花科(Cruciferae)植物感染病毒后有利于蚜虫的繁殖生长。另外,还发现甜菜花叶病毒(Sugar beet mosaic virus)侵染甜菜后,促进了蚕豆蚜(*Aphis fabae*)繁殖,桃蚜也喜食甜菜黄化病毒(BYV)侵染过的植株汁液。植物除了对蚜虫生理代谢和取食行为的影响外,对病毒侵染、增殖有不同反应,表现出感病和抗病性。

4 非持久性病毒传播的新进展

很多年来,关于非持久性病毒的蚜虫传播方式与机制的假说很多,而且争议很大。不论是蚜虫口针传毒,还是唾液管传毒^[2],其基本点仍然是蚜虫伴随取食引起被动的口针污染而传播了病毒。我们让桃蚜在薄膜上刺吸TMV粒子5 min,病毒也进入下颚食管,但蚜虫无能力传染。同样方法,桃蚜取食CMV-AAT的CP个RNA-TMV的混合液,蚜虫传播了TMV^[12]。桃蚜在分别获取TEV、CMV-AT和WMMV-2后,利用免疫荧光标记法首次在桃蚜下颚口针中发现了病毒附着位点,VAS距口针尖端45~50 μm,伴刀豆球凝集素(Con A)和麦胚凝集素(WGA)对VAS的亲合性分析表明,VAS含有α-D-甘露糖基,类似昆虫凝集素,除具有病毒受体的性质外,可能还有其它功能。用脱氧胆酸钠(DOC)处理口针后,桃蚜丧失传毒能力^[24],处理麦长管蚜和麦二叉蚜,麦蚜传播大麦黄矮病毒(BYDV)的比率和专化性

发生改变。目前,对 VAS 的分子组成及结构正在加紧分离与确定。

另一方面,发现蚜虫传毒涉及病毒、蚜虫介体和植物三个方面的相互作用,较为复杂。目前,从病毒的 CP 基因及基因产物 HC 取得两个重要突破。发现了 Potyviruses 基因组 5'端和 3'端两个顺反子控制着病毒的蚜传性^[25,26]。推测蚜虫传毒是基于病毒外壳蛋白中 15~20 个氨基酸形成的蚜传簇、HC 中的 50~100 个氨基酸以及蚜虫口针中的 VAS(病毒受体)间的相互作用完成的。蚜虫的传毒过程可能为:蚜虫伴随着在病株上吸食汁液吸取了病毒,蚜虫口针中的 VAS 与 CP 中的蚜传簇(如 Potyviruses 为 DAGX)相互作用,马铃薯 Y 病毒组的成员还需要在 HC 的介导下进行^[27],当 VAS 能专一亲合并累积病毒时而获毒,待蚜虫口针回吐唾液时,唾液中的胰蛋白酶等便将病毒粒子从 CP 的 N-端 VAS 下游的胰蛋白酶切点切下,病毒与 VAS 分开,再释放入植物而传毒。

参 考 文 献

- 1 Doolittle SP, Walker MN. Aphid transmission mosaic. *Phytopathology*, 1928, 18: 143
- 2 Bradley RHE, and Ganong RY. Some effects of formaldehyde on potato are treated with formaldehyde. *Can J Microbiol*, 1955, 1: 783~793
- 3 Pirone TP. Viral genes and gene products that determine insect transmissibility, *Seminar in Virology*, 1991, 2: 81~87
- 4 吴云峰,魏宁生.非持久病毒蚜虫传播专业化研究. *西北农业学报*. 1996, 5(1): 39~42
- 5 Shuntatu M, Palkaitis P. Genetic mapping of cucumber mosaic virus, In: Pirone TP, Shaw JG. eds. *Viral gene and plant pathogenesis*. New York: Springer, 1991, 156~164
- 6 Harrison BD, Robinson DJ. Molecular variation in vector-borne plant viruses; Epidemiological significance. In: *The Epidemiology and ecology of infectious Disease Agents*. Anderson RM, Thresh JM. eds. eds. The Royal Society, London, 1988. 121~136
- 7 Maiss E, Timpe U, Briske A *et al.* The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. *J Gen Virol*, 1989, 70: 513~524
- 8 Quemada H L, Hostic B, Gonsalves D *et al.* The nucleotide sequence of the 3' - terminal of papaya ringspot virus W and P *J Gen Virol*, 1990, 70: 203~210
- 9 Gal-On A, Antignus Y, Rosner A *et al.* Nucleotide of the zucchini yellow mosaic capsid - encoding gene and its expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 1990, 87: 273~277
- 10 Atreya CD, Raocah B, Pirone TP. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology*, 1990, 178: 161~165
- 11 Jayaram C, Hill JH, Miller WA. Nucleotide sequences of coat protein genes of two aphid transmissible strains of soybean mosaic virus. *J Gen Virol*, 1991, 72: 1001~1003
- 12 吴云峰.蚜虫传毒机制研究.[博士学位论文],陕西杨陵:西北农业大学,1994.
- 13 Bergr PH, Pirone TP. The effect of helper component on the uptake and localization of potyviruses in *Myzus persicae*. *Virology*, 1986, 153: 256~261
- 14 Allison RF. Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N - terminal amino acids are located on the virion's surface. *Virology*, 1985, 147: 309~316
- 15 Shukle DD, Strike PM, Tracy SL, *et al.* The N and C terminus of the coat protein of potyviruses are surface - located and the N terminus contains the major virus - specific epitopes. *J Gen Virol*, 1989, 69: 1497~1508
- 16 Armour SL, Mefelcher V, Pirone TP *et al.* Helper component for aphid transmission encoded by region II of cauliflower mosaic virus DNA. *Virology*, 1983, 129: 25~30
- 17 Givord L, Xiong C, Gibaud M *et al.* Second cauliflower mosaic virus gene product influences the structure of the viral inclusion body. *EMBO J*, 1984, 3: 1423~1427
- 18 Woolstone CJ, Covey SM, Penswick JR. Aphid transmission and polypeptide are specified by a defined region of the cauliflower

- mosaic virus genome. *Gene*, 1983, 23:15-23
- 19 Thornbury DW, Hellann GM, Rhads RE *et al.* Purification and characterization of potyvirus helper component. *Virology*, 1985, 144:260-267
 - 20 Domier LL, Franklin KM, Shahabuddin M *et al.* The nucleotide sequence of tobacco vein mottling virus RNA. *Nucleic Acids Res*, 1986, 14:5417-5430
 - 21 Thornbury D W, Patterson C A, Dessens J T *et al.* Comparative sequence of the helper component (HC) region of potato virus Y and a HC-defective strain, potato virus C. *Virology*, 1990, 178:573-578
 - 22 Mclean DL, Kinsey MG. Comparison of salivation and ingestion in host and non-host plant leaves. *Ann Entomol Soc Am*, 1968, 61:730-739
 - 23 Pirone TP. Acquisition and release of infectious tobacco mosaic virus by aphids. *Virology*, 1967, 31:569-571
 - 24 吴云峰, 魏宁生. 桃蚜口针中病毒附着位点的免疫荧光标记定位. *西北农业大学学报*, 1995, 3(2):28-30
 - 25 Ammer E D, Jarlfors U, Pirone T P. Association of potyvirus helper component protein with virous cuticle lining the maxillary food canal and foregut of an aphid vector. *Phytopathology* 1994, 84:1054-1060
 - 26 Berger P H. The usefulness of aphid transmission as a taxonomic criterion for potyviruses. *Arch Virol*, 1992, suppl 5:251-255
 - 27 吴云峰, 魏宁生. 马铃薯 Y 病毒组二辅助成份的纯化和功能分析. *中国病毒学*, 1995, 10(3):269-270