

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

竹嵌紋病毒缺失 RNA 之研究(2/3)

Studies of defective RNAs of bamboo mosaic virus

計畫編號：NSC88-2311-B-002-007-B11

執行期限：87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日

主持人：張雅君 執行單位：國立台灣大學植物病理學系

一、中文摘要

為了探討竹嵌紋病毒(*Bamboo mosaic virus*, 簡稱 BaMV)的缺失性 RNA 之性質, 去年度我們從含有缺失性 RNA 之 BaMV 病毒顆粒中, 選殖出 35 個含有 0.7-1.3 kb DNA 片段的 cDNA 株, 並且完成 9 個 cDNA 株的核酸定序與序列分析, 証實皆為 BaMV 缺失性 RNA。為分析那一株缺失性 RNA 具有生物活性(即能被 BaMV RNA 所增殖), 將 BaMV 與 9 株缺失性 RNA 之生體外轉錄體同時接種至菸草原生質體, 經 24 小時光照培養後, 抽取 RNA, 以非放射性的 BaMV 5'端 cDNA 探針進行北方雜配反應, 結果發現至少有 6 株缺失性 RNA 具有被增殖的能力, 且皆不具干擾 BaMV 複製的能力。同屬於 potexvirus 的三葉草黃化嵌紋病毒(*Clover yellow mosaic virus*, 簡稱 CIYMV)之缺失性 RNA, 其基因體皆具有由複製酵素基因 5'端與鞘蛋白基因 3'端合併形成之融合轉譯架, 若破壞其鞘蛋白基因原有之轉譯架, 則該缺失性 RNA 會喪失增殖能力。相反地, 目前我們所選殖到具有增殖能力的六株 BaMV 缺失性 RNA, 只有 D52 具有此特殊之融合轉譯架; 故鞘蛋白基因轉譯架之維持, 對於 BaMV 缺失性 RNA 的增殖並非必要。為了測試複製酵素基因轉譯架之存在是否會影響 BaMV 缺失性 RNA 的增殖能力, 因此我們根據菸草原生質體接種實驗結果, 選擇增殖能力最佳的 D20 作為野生株, 利用人為突變的方法構築出兩種突變株 D20-pml 和 D20-spe; 其中 D20-pml 的複製酵素基因的起始碼被破壞, 而 D20-spe 只能轉譯出五個氨基酸。經菸草原生質體接種實驗證實, 上述兩種突變株皆不具生物活性, 此結果顯示複製酵素基因轉譯架之存在對 BaMV 缺失性 RNA 的增殖極為重要。由上述實驗結果可知, BaMV 和 CIYMV 的缺失性 RNA 的性質不同, 因此轉譯架對 BaMV 缺失性 RNA 之意義與影響, 仍有待進一步的研究。

關鍵詞：竹嵌紋病、竹嵌紋病毒、缺失性 RNA

Abstract

In order to study the defective RNAs (D RNAs) of *Bamboo mosaic virus* (BaMV), 35 cDNA clones were obtained from D RNA-containing BaMV virions, nine of them were sequenced and proved to be BaMV D RNAs. A protoplast infection assay was used to evaluate the biological activity of cloned D RNAs. By co-inoculating the RNA transcripts of BaMV and D RNAs into tobacco protoplasts, the accumulation of D RNAs was analyzed after

24 hours. The results indicated that at least six clones of BaMV D RNAs were infectious but none could interfere with the replication of BaMV. The D RNAs of *Clover yellow mosaic virus* (CIYMV) were reported to contain a fusion open reading frame (ORF) of replicase and coat protein genes, which was essential for their infectivity. On the contrary, D52 was the only infectious clone of BaMV D RNAs containing the in-frame fusion ORF. Therefore, the maintenance of the reading frame of coat protein gene in the fusion ORF was not required for the amplification of BaMV D RNAs *in vivo*. To test whether the ORF of replicase gene is important for the biological activity of BaMV D RNAs, two mutants were constructed from D20, which had the highest level of accumulation than other clones in protoplast assay. D20-pml was a mutant whose original start codon was destroyed. D20-spe was a frame-shift mutant with only five amino acid residues translated. Both mutants could not maintain the original ORF and were nonviable when assayed in tobacco protoplasts. The results suggested that the maintenance of the replicase ORF is crucial for the accumulation of BaMV D RNAs *in vivo*. From the above results, the characters of BaMV D RNAs are different from those of CIYMV D RNAs. The significance and influence of ORF on BaMV D RNAs needs further study.

Keywords: Bamboo Mosaic, BaMV, Defective RNA

二、計畫緣由與目的

竹類為本省重要林產之一，近年來普遍受病毒為害，根據林等(1979)及陳、盧(1995)的研究結果顯示，本省竹類的病毒病害主要是由竹嵌紋病毒(*Bamboo mosaic virus*, 簡稱 BaMV)所引起。竹嵌紋病自從 1970 年代被發現報導之後(Lin *et al.*, 1977; 林等, 1979), 目前已知可感染至少 4 屬 14 種竹類(Lin *et al.*, 1993; 1995; 陳、盧, 1995), 罹病竹株除了葉片出現黃綠相間之條紋型嵌紋外，竹筍及竹桿亦會出現褐色條斑，發筍率銳減，竹筍木質化，粗硬難食，失去商品價值(陳, 1985; Lin and Chen, 1991)。從 1989 到 1992 年之調查顯示，本省竹專業栽培區多處罹病率高達 80%以上(Yeh *et al.*, 1993)。由此可知，竹嵌紋病是台灣竹類作物最嚴重且急需解決的問題。

BaMV 為長絲狀、單鏈正股之 RNA 病毒，其蛋白質外鞘由許多 28 kDa 的鞘蛋白螺旋排列而成，隸屬於 *Potexvirus* 屬(Lin *et al.*, 1992)。BaMV 的核酸序列已全部被解出(Lin *et al.*, 1994)，其基因體(genome)含有五個轉譯架(open reading frame, 簡稱 ORF)，與其他 potexvirus 相似。由於 BaMV 是台灣特有又極具經濟重要性之植物病毒，在林納生及徐堯輝實驗室多年來的共同努力下，已有相當傑出的研究成果，其中包括具感染力的全長 BaMV cDNA 株已成功地被選殖出來，此 cDNA 株的取得對於 BaMV 分子生物學之研究將有極大的助益。

病毒在寄主細胞內增殖時，由於複製過程發生錯誤，部分核酸序列未被複製或某些序列被重組(White and Morris, 1994)，使得一部分新產生的病毒喪失獨立複製的能力

。這些有缺失的病毒往往要依賴正常的親源病毒(parental virus)或輔助病毒(helper virus)提供複製所需的酵素，才得以增殖(Morris and Knorr, 1990)。有缺失的病毒與正常病毒之間的競爭，常常會干擾後者的正常增殖(Schlesinger, 1988)。因此這些有缺失且具干擾能力之病毒，被稱為缺失干擾性病毒(defective interfering virus, 簡稱 DI) (Huang and Baltimore, 1970)。若是這些有缺失的病毒不具干擾能力，則被稱為缺失性病毒(defective virus)。但對植物 RNA 病毒而言，這類核酸分子則較常被稱為缺失干擾性 RNA (defective interfering RNA, 簡稱 DI RNA) (Hillman *et al.*, 1987)或缺失性 RNA (defective RNA, 簡稱 D RNA) (White *et al.*, 1991)。理論上，每一種植物 RNA 病毒都可利用基因重組方式構築出自己特有的缺失性 RNA，若能篩選出干擾效果較佳的缺失性 RNA，即所謂的 DI RNA，則可將 DI RNA 轉殖至寄主植物上。此類經 DI RNA 基因體轉殖的植物，當正常親源病毒侵入時，轉基因植物體內原有的 DI RNA 立即大量增殖，干擾正常病毒的複製，進而減輕病徵。目前已有將 DI RNA 轉殖至菸草而防治喜姆比蘭輪點病毒(*Cymbidium ringspot virus*, 簡稱 CymRSV)的例子(Kollar *et al.*, 1993)。利用遺傳工程技術將 DI RNA 基因體轉殖至植株的新型防治方式，未來應有相當大的發展潛力。

兩年前林納生實驗室純化 BaMV RNA 時，發現疑似缺失性 RNA 之分子，經選殖、核酸定序後，確定其所獲得之 cDNA 株來自 BaMV 的缺失性 RNA，其核酸序列之特性與三葉草黃化嵌紋病毒(*Clover yellow mosaic virus*, 簡稱 CIYMV)之缺失性 RNA (White *et al.*, 1991) 組成相似，含有一融合轉譯架(fusion open reading frame)，具有合成 29.7 kDa 蛋白之能力，唯生物活性尚待證實。

本計劃為一整合型三年計劃之子計劃，主要之目的是選殖、定序及分析 BaMV 缺失性 RNA 之分子，並測定其生物活性。然後利用所獲得之缺失性 RNA 為研究工具，以了解缺失性 RNA 自然產生之機制，同時鑑定缺失性 RNA 複製、被病毒鞘蛋白包被，或在植物體內系統性移動時所必須具備的核酸序列，由此可進一步推論 BaMV 病毒之相關核酸序列。此外，探討其融合轉譯架對 BaMV 缺失性 RNA 之義意及重要性；若此缺失性 RNA 有干擾 BaMV 增殖之現象，則可對所謂的缺失干擾性 RNA 的干擾機制作深入研究。上述基本資料的了解將有助於構築出能干擾 BaMV 複製、包被或系統性移動之核酸序列，用以轉殖竹株，以達成防治竹嵌紋病之目的。

三、結果與討論

去年度我們從含有缺失性 RNA 之 BaMV 病毒顆粒中，利用 RT-PCR 與 TA-cloning 的方法，選殖出 35 個含有 0.7-1.3 kb DNA 片段的 cDNA 株，並且完成其中 9 個 cDNA 株的核酸定序與序列分析，証實皆為 BaMV 缺失性 RNA。將 BaMV 與 9 株缺失性 RNA 之生體外轉錄體同時接種至菸草原生質體，經 24 小時光照培養後，抽取 RNA，以非放射性的 BaMV 5'端 cDNA 探針進行北方雜配反應(Northern hybridization)，結果發現至少有 6 株缺失性 RNA 具有被增殖的能力，但因其不具干擾 BaMV 複製的能力，故稱為天然缺失性 RNA (naturally occurring D RNA)。序列分析顯示這些自然產生的 BaMV 缺失性 RNA 是由來自 BaMV 基因體之 5'端約 474-868 個核苷酸及 3'端約 252-382 核苷酸(不

含 poly(A)尾端)所組成，其核酸序列主要差異在於 3'端接合區的序列起始點不同。同屬於 potexvirus 的 CIYMV 缺失性 RNA，其基因體皆具有由複製酵素基因 5'端與鞘蛋白基因 3'端合併形成之融合轉譯架，若破壞其鞘蛋白基因原有之轉譯架，則該缺失性 RNA 會喪失增殖能力。由此可推測 CIYMV 缺失性 RNA 之轉譯作用可能影響複製反應，但其對應的融合蛋白質產物是否存在或扮演之角色仍不明白(White *et al.*, 1991, 1992)。相反地，目前我們所選殖到具有增殖能力的六株 BaMV 缺失性 RNA，只有 D52 具有此特殊之融合轉譯架；故鞘蛋白基因轉譯架之維持，對於 BaMV 缺失性 RNA 的增殖並非必要。為了測試複製酵素基因轉譯架之存在是否會影響 BaMV 缺失性 RNA 的增殖能力，因此我們根據菸草原生質體接種實驗結果，選擇增殖能力最佳的 D20 作為野生株，利用人為突變的方法構築出兩種突變株 D20-pml 和 D20-spe；其中 D20-pml 的複製酵素基因的起始碼(start codon)被破壞，而 D20-spe 只能轉譯出五個氨基酸。經菸草原生質體接種實驗證實，上述兩種突變株皆不具生物活性，此結果顯示複製酵素基因轉譯架之存在對 BaMV 缺失性 RNA 的增殖極為重要。此外，D20 一系列的連續刪除突變株已構築完成，目前已篩選出十種以上長短不同的突變株，藉由接種菸草原生質體，可分析出對 BaMV 缺失性 RNA 增殖時必須具備的核酸序列。由上述實驗結果可知，BaMV 和 CIYMV 的缺失性 RNA 的性質不同，因此轉譯架對 BaMV 缺失性 RNA 之意義與影響，仍有待進一步的研究。

四、計畫成果自評

本計畫主要目的為選殖、定序及分析 BaMV 的缺失性 RNA，利用所獲得之缺失性 RNA 為研究工具，以了解缺失性 RNA 自然產生之機制，同時鑑定缺失性 RNA 複製、被病毒鞘蛋白包被，或在植物體內系統性移動時所必須具備的核酸序列。目前已選殖出 35 株 BaMV 缺失性 RNA，且菸草原生質體接種實驗證實至少有 6 株具有生物活性；加上以前所構築並篩選之具生物活性的人為缺失性 RNA，可藉由對這兩種 RNA 之分子特性的研究，進一步推論 BaMV 病毒之相關分子特性。我們所選殖的具有生物活性之 BaMV 缺失性 RNA 的性質和 CIYMV 不同，其增殖能力與鞘蛋白基因轉譯架之維持無關，這在 potexvirus 是首次報導。此外，當選擇增殖能力最佳的 D20 作為野生株，與人為構築的突變株 D20-pml 和 D20-spe，同時比較在菸草原生質體的增殖情形，結果顯示複製酵素基因轉譯架之存在對 BaMV 缺失性 RNA 的增殖具有決定性的影響。因此本計畫之研究成果除了有學術價值可發表在學術期刊外，所獲得之基本資料未來可應用於構築以缺失性 RNA 為基礎之載體，以轉殖竹株而防治竹嵌紋病。

五、參考文獻

林納生、陳脈紀、江濤、林維治。1979。台灣竹類嵌紋病之初步研究。台灣林試所試驗報告第 317 號。

- 陳滄海。1985。竹類嵌紋病病原病毒之鑑定。植保會刊 27:111-116。
- 陳滄海、盧耀村。1995。台灣竹嵌紋病病毒特性及生態學之探討。植病會刊 4:83-90。
- Hillman, B. I., Carrington, J. C., and Morris, T. J. 1987. A defective interfering RNA that contains a mosaic of a plant virus genome. *Cell* 51:427-433.
- Huang, A. S., and Baltimore, D. 1970. Defective viral particles and viral disease processes. *Nature* 226:325-327.
- Kollar, A., Dalmay, T., and Burgyan, J. 1993. Defective interfering RNA-mediated resistance against cymbidium ringspot tobravirus in transgenic plants. *Virology* 193:313-318.
- Lin, M. T., Kitajima, E. W., Cupertino, F. P., and Costa, C. L. 1977. Partial purification and some properties of bamboo mosaic virus. *Phytopathology* 67:1439-1443.
- Lin, N.-S., Chai, Y.-J., Huang, T.-Y., Chang, T.-Y., and Hsu, Y.-H. 1993. Incidence of bamboo mosaic potexvirus in Taiwan. *Plant Dis.* 77:448-450.
- Lin, N.-S., and Chen, C.-C. 1991. Association of bamboo mosaic virus (BoMV) and BoMV-specific electron-dense crystalline bodies with chloroplasts. *Phytopathology* 81:1551-1555.
- Lin, N.-S., Lin, B.-Y., Lo, N.-W., Hu, C.-C., Chow, T.-Y., and Hsu, Y.-H. 1994. Nucleotide sequence of the genomic RNA of bamboo mosaic potexvirus. *J. Gen. Viol.* 75:2513-1518.
- Lin, N.-S., Lin, B.-Y., Yeh, T.-Y., and Hsu, Y.-H. 1995. First report of bamboo mosaic virus and its associated satellite RNA on bamboo in the U. S. *Plant Dis.* 79:1249.
- Lin, N.-S., Lin, F.-Z., Huang, T.-Y., and Hsu, Y.-H. 1992. Genome properties of bamboo mosaic virus. *Phytopathology* 82:731-734.
- Morris, T. J., and Knorr, D. A. 1990. Defective interfering RNAs associated with plant virus infections. In "New Aspects of Positive-Strand RNA Viruses" (M. A. Brinton and F. X. Heinz, eds.), pp. 123-127. Amer. Soc. Microbiol., Washington, D.C.
- Schlesinger, S. 1988. The generation and amplification of defective interfering RNAs. In "RNA Genetics. Retroviruses, Viroids and RNA Recombination" (E. Domingo, J. J. Holland and P. Ahlquist, eds.), Vol. 2, pp. 167-185. CRC Press, Boca Raton, FL.

White, K. A., Bancroft, J. B., and Mackie, G. A. 1991. Defective RNAs of clover yellow mosaic virus encode nonstructural/coat protein fusion products. *Virology* 183:479-486.

White, K. A., Bancroft, J. B., and Mackie, G. A. 1992a. Coding capacity determines in vivo accumulation of defective RNA of clover yellow mosaic virus. *J. Virol.* 66:3069-3076.

White, K. A., Bancroft, J. B., and Mackie, G. A. 1992b. Mutagenesis of a hexanucleotide sequence conserved in potexvirus RNAs. *Virology* 189:817-820.

White, K. A., and Morris, T. J. 1994. Nonhomologous RNA recombination in tombusviruses: Generation and evolution of defective interfering RNAs by stepwise deletions. *J. Virol.* 68: 14-24.

Yeh, C.-C., Cheng, A.-H., and Hwang, H.-Y. 1993. Indexing of bamboo mosaic virus and propagation of virus-free bamboo. In "Proceedings of the Symposium on Plant Virus and Virus-like Diseases, Council of Agriculture, Plant Protection Series No. 1." (R.-J. Chiu and Y. Yeh, eds). pp. 275-281. Council of Agriculture, Taiwan.