

刘亚楠, 孙 枫, 涂丽琴, 等. 本氏烟组蛋白 H4 与番茄斑驳花叶病毒外壳蛋白互作调控病毒侵染[J]. 江苏农业学报, 2023, 39( 2 ): 344-351.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.02.006

## 本氏烟组蛋白 H4 与番茄斑驳花叶病毒外壳蛋白互作调控病毒侵染

刘亚楠<sup>1</sup>, 孙 枫<sup>2</sup>, 涂丽琴<sup>2</sup>, 高丹娜<sup>2</sup>, 李 硕<sup>2</sup>, 吴淑华<sup>2</sup>, 季英华<sup>1,2</sup>, 郭青云<sup>1</sup>

(1. 青海大学农林科学院/青海省农业有害生物综合治理重点实验室/农业农村部西宁作物有害生物科学观测实验站, 青海 西宁 810000; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 以番茄斑驳花叶病毒(Tomato mottle mosaic virus, ToMMV)外壳蛋白(Coat protein, CP)为研究对象, 通过荧光素酶互补技术(Luciferase complementation imaging assay, LCI)研究 ToMMV CP 与本氏烟组蛋白 H4 在植物体内的互作情况。亚细胞共定位结果显示, ToMMV CP 定位于细胞核和细胞质中, 组蛋白 H4 定位于细胞核中, 两者共定位于细胞核中。双分子荧光互补(BiFC)试验结果表明, ToMMV CP 与组蛋白 H4 的互作位置主要在细胞核中。上述 2 种试验结果证明, 烟草花叶病毒 CP 与本氏烟组蛋白 H4 在植物体内存在互作。采用病毒诱导的基因沉默(Virus-induced gene silencing, VIGS)技术沉默本氏烟烟草中的 H4 基因, 对沉默 H4 基因的植株接种 ToMMV, 接种后第 4 d, 通过实时荧光定量 PCR 检测方法检测系统叶的病毒含量, 发现病毒含量显著低于对照组, 结果表明 H4 基因的沉默会影响 ToMMV 在植株中的复制, 组蛋白 H4 可能是 ToMMV 侵染植株的本氏烟感病因子。病毒编码的 CP 可能与寄主组蛋白 H4 在细胞核内发挥作用, 进而使病毒完成系统侵染。

**关键词:** 番茄斑驳花叶病毒; 外壳蛋白; 组蛋白; 蛋白质互作

**中图分类号:** S436.412.1<sup>+</sup>1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)02-0344-08

## Virus infection regulated by interaction between histone H4 of *Nicotiana benthamiana* and coat protein of tomato mottle mosaic virus

LIU Ya-nan<sup>1</sup>, SUN Feng<sup>2</sup>, TU Li-qin<sup>2</sup>, GAO Dan-na<sup>2</sup>, LI Shuo<sup>2</sup>, WU Shu-hua<sup>2</sup>, JI Ying-hua<sup>1,2</sup>, GUO Qing-yun<sup>1</sup>

(1. Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University/Key Laboratory of Agricultural Integrated Pest Management of Qinghai Province/Scientific Observing and Experimental Station of Crop Pest in Xining, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xining 810000, China; 2. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** The coat protein (CP) of tomato mottle mosaic virus (ToMMV) was used as the research object, and the

收稿日期: 2023-02-10

**基金项目:** 国家重点研发计划项目(2022YFD1401202); 国家自然科学基金项目(32072506); 江苏省农业科技自主创新基金项目[ CX(21)1011 ]; 现代农业产业技术体系项目(CARS-24-C-01); 沿海集团揭榜挂帅项目(2022YHTDJ03); 高端外国专家引进计划项目(G2022014073L); 江苏省农业科学院科学仪器开放共享自主研究课题[ GX(22)1001 ]

**作者简介:** 刘亚楠(1997-), 女, 河南驻马店人, 硕士研究生, 研究方向为作物病毒, (E-mail) 2228239761@qq.com。孙枫为共同第一作者。

**通讯作者:** 郭青云, (E-mail) Guoqingyunqh@163.com; 季英华, (E-mail) jiyinghua@jaas.ac.cn

interaction between CP of ToMMV and histone H4 of *Nicotiana benthamiana* was confirmed by luciferase complementation imaging assay (LCI). Subcellular localization results showed that CP of ToMMV was localized in the nucleus and cytoplasm, histone H4 was localized in the nucleus, and both were co-localized in the nucleus. In the bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay, the interaction sites between CP of ToMMV and histone H4 were mainly in the nucleus. The results of the above two experiments showed that there was an interaction between coat protein and histone H4 of *N. benthamiana* in plants.

*H4* was silenced in *N. benthamiana* by virus-induced gene silencing (VIGS). Plants with silenced *H4* were inoculated with ToMMV, and the virus content in systemic leaves was detected by real-time fluorescence quantitative PCR on the fourth day after inoculation. It was found that the virus content was significantly lower than that of the control group, indicating that the silencing of *H4* gene would affect the replication of ToMMV in plants, and histone H4 may be the cause of ToMMV-infected plants. The CP encoded by the virus may play a role in the nucleus with the host histone H4, thereby assisting the virus to complete the systemic infection.

**Key words:** tomato mottle mosaic virus; coat protein; histone; protein-protein interaction

番茄斑驳花叶病毒(Tomato mottle mosaic virus, ToMMV)主要侵染茄科和十字花科植物及部分豆科、葫芦科植物<sup>[1]</sup>。被 ToMMV 侵染后,番茄植株病叶上往往出现斑驳皱缩等症状,严重者导致番茄叶片坏死,进而影响植株发育,最终影响番茄的品质和产量<sup>[2]</sup>。

ToMMV 属帚状病毒科(Virgaviridae)、烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*)<sup>[3-5]</sup>,为正义单链 RNA(+ssRNA)病毒<sup>[6]</sup>。番茄斑驳花叶病毒基因组由 4 个开放阅读框(Open reading frame, ORF)构成,编码 4 个大小不同的蛋白质<sup>[7]</sup>,分别为相对分子质量为 29 800 的运动蛋白(Movement protein, MP)、相对分子质量为 17 700 的外壳蛋白(Coat protein, CP)<sup>[6]</sup>、相对分子质量为 183 000 的 RNA 依赖型 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)蛋白、相对分子质量为 126 000 的甲基转移酶/解旋酶蛋白(Methyltransferase/helicase)<sup>[8]</sup>。对与番茄斑驳花叶病毒同属的烟草花叶病毒属其他成员的研究发现,很多外壳蛋白作为病毒结构蛋白存在<sup>[9]</sup>,在组装病毒粒子的过程中扮演着非常重要的角色<sup>[10]</sup>。同时,CP 也参与多项生物功能的行使,如病毒运动<sup>[11]</sup>、病毒致病过程中症状的形成<sup>[12]</sup>、病毒复制酶在合成负链 RNA 过程中的位点识别<sup>[13]</sup>、病毒复制复合物(Virus replication complexes, VRC)的调控<sup>[14]</sup>等。上述研究结果显示,CP 在病毒的侵染循环中扮演着重要角色<sup>[15]</sup>。但是,目前关于 ToMMV CP 与寄主植物本氏烟间分子互作的研究还比较少。

组蛋白参与 DNA 的包装和转录调控,是染色质的主要成分<sup>[16]</sup>。组蛋白家族包括 32 个成员,分别是 6 个 H1、11 个 H2A、8 个 H2B、5 个 H3 和 2 个 H4<sup>[17]</sup>。H3、H4 组蛋白在调节染色质的结构和功能方面起着重要的作用<sup>[18-19]</sup>。在相应酶的作用下,组蛋白会发生甲基化<sup>[20]</sup>、乙酰化、磷酸化<sup>[21]</sup>、腺苷酸化、泛素化和腺苷 5'-二磷酸(ADP)核糖化等进而达

到组蛋白修饰<sup>[19,22]</sup>。修饰组蛋白会通过适配器分子、染色质修饰酶、转录因子和转录抑制因子读取等影响染色质的组装,从而对转录过程起到调控作用<sup>[23]</sup>。

本研究利用荧光素酶互补技术(Luciferase complementation imaging assay, LCI)、亚细胞共定位和双分子荧光互补技术(Bimolecular fluorescence complementation, BiFC)验证 ToMMV CP 与本氏烟 H4 蛋白的分子互作,并利用病毒诱导的基因沉默(Virus-induced gene silencing, VIGS)技术明确本氏烟 H4 蛋白在 ToMMV 侵染过程中的作用,使人们进一步了解 ToMMV 侵染植物的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

本氏烟植株种植于 25 ℃光照培养箱中,16 h/8 h 光照/黑暗交替培养。Gateway 入门载体 pDONR、荧光素酶载体(cLUC、nLUC)、亚细胞共定位载体(pHYG-YFP、pHYG-CFP)、BiFC 载体(YN、YC)、农杆菌 GV3101 感受态菌株和 ABI 感受态菌株均由笔者所在实验室保存,大肠杆菌 Trelief™5α 购自北京 Tsingke 公司。VIGS 载体 TRV<sub>1</sub>、TRV<sub>2</sub>由笔者所在实验室保存,TRV<sub>1</sub>、TRV<sub>2</sub>-*GUS*、TRV<sub>2</sub>-*PDS*、mCherry-*H2B*、农杆菌菌液由笔者所在实验室保存。

MicroElute® Gel Extraction Kit D6294 微量胶回收试剂盒、常规质粒提取试剂盒(Plasmid Mini Kit I D6943-2),购自 Omega Bio-Tek 公司;克隆载体 pMD18-T、T4 DNA 连接酶、限制性快切酶,购自宝日医生物技术(北京)有限公司。

### 1.2 基因克隆与载体的构建

以实验室保存的 ToMMV CP 和本氏烟 cDNA 为模板,设计特异性引物(表 1)进行目的基因扩增,经 BP 反应连接到 pDONR 上后转化大肠杆菌 Trelief™5α,测序正确后,提取质粒,经 LR 反应连接至终载

体 cLUC、nLUC、pHYG-YFP、pHYG-CFP、YN、YC<sup>[24]</sup>上,分别获得质粒 cLUC-*H4*、nLUC-*CP*、pHYG-YFP-*H4*、pHYG-CFP-*CP*、YN-*CP*、YC-*H4*。用构建的质粒转化农杆菌感受态后进行 PCR 检测。设计含有合适酶切位点的引物(表 1)对 *H4* 基因进行扩增,与同样经过酶切处理的 TRV<sub>2</sub> 连接,得到 TRV<sub>2</sub>-*H4* 载体,将其转入农杆菌 GV3101 中。

表 1 本试验所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')
CP-attb-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGCTTACGCTATTACTTC
CP-attb-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGGACGCTGGCGCAGAAG
H4-attb-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGCTTGGACGTGGAAAGGG
H4-attb-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCACTCCAAATCCGTACAAGG
H4-F	CTCTAGAATGCTGACGTGGAAAGGG
H4-R	CGGTACCTTAACCTCCAAATCCGTACA
H4-qPCR-F	GCGGTCAGTTTAAGCTAGGGT
H4-qPCR-R	AAGAGCGAGGATATGCAATGT
CP-qPCR-F	CCCGACTACAGCCGAAACAT
CP-qPCR-R	TCCAGGCCAACCCAGACATA
NbActin-F	CAATCCAGACACTGTACTTTCTCTC
NbActin-R	AAGCTGCAGGTATCCATGAGACTA

### 1.3 农杆菌接种本氏烟

分别将携带 nLUC-*CP*、cLUC-*H4*、YFP-*H4*、CFP-*CP*、YN-*CP*、YC-*H4*、TRV<sub>2</sub>-*H4*、TRV<sub>2</sub>-*GUS*、TRV<sub>2</sub>-*PDS*、TRV<sub>1</sub> 的农杆菌于 28 ℃ 恒温摇床内培养至  $OD_{600} \approx 0.6$ ,离心去上清后将菌体分别重悬于悬浮液(10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、50 mmol/L 2-吗啉乙磺酸 pH 5.6、100 μmol/L 乙酰丁香酮)中,使其  $OD_{600}$  为 1.0,于 28 ℃ 恒温培养箱中悬浮 1~2 h。在荧光素酶互补试验中以 nLUC-*CP*:cLUC-*H4*、nLUC-*CP*:cLUC、nLUC:*H4*-cLUC、nLUC:cLUC 分别共浸润本氏烟叶片。双分子荧光互补试验中以 YN-*CP*:YC-*H4* 共浸润本氏烟叶片。在注射 2 d 后使用化学发光/荧光图像分析系统进行观察,进行荧光素酶互补分析。在亚细胞共定位和双分子荧光互补试验中,使用激光共聚焦显微镜(ZEISS 公司产品,德国)观察注射菌液 48 h 后的本氏烟叶片。在 VIGS 试验中,分别

以 TRV<sub>1</sub>:TRV<sub>2</sub>-*H4*、TRV<sub>1</sub>:TRV<sub>2</sub>-*GUS*(阴性对照)、TRV<sub>1</sub>:TRV<sub>2</sub>-*PDS*(阳性对照)3 种组合共浸润接种本氏烟,接种后的本氏烟以 TRV-*H4* 本氏烟、TRV-*GUS* 本氏烟(阴性对照)、TRV-*PDS* 本氏烟(阳性对照)命名。每个组合接种 7 株,以待进行进一步试验。

### 1.4 实时定量 RT-PCR(qRT-PCR)

首先使用 TransZol Up Plus RNA 试剂盒提取样品 RNA,然后将 RNA 稀释至相同含量进行反转录(参照说明书),按照比例制备反应液,之后进行定量分析,每个样品设置 3 个生物学重复,设 3 个技术重复。

qPCR 反应体系(总体积 20.0 μl):10.0 μl 2×SuperFast Universal SYBR Master Mix,0.5 μl 正向引物,0.5 μl 反向引物,1.0 μl 模板 DNA,8.0 μl ddH<sub>2</sub>O。

qPCR 反应程序:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火/延伸 30 s,45 个循环。熔解曲线:95 ℃ 15 s,95 ℃ 1 min,60 ℃ 15 s。

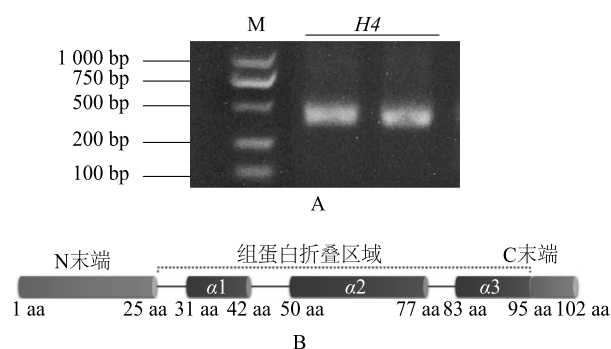
### 1.5 Western Blot

取 0.1 g 本氏烟叶片,用 200 μl 蛋白质提取缓冲液[0.125 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl),4.00%十二烷基硫酸钠(SDS),20.00%甘油(Glycerol),2.00%巯基乙醇(Mercaptoethanol),0.05%溴酚蓝(Bromophenol blue)]研磨,于 95 ℃、10 min 煮沸后置于预冷的 4 ℃ 离心机中,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液,获得蛋白质提取液,取适量蛋白质提取液,进行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(130 V,80 min),电泳结束后,电转至聚氯乙烯膜,在室温下置于自动摇床上,于 70 r/min 孵育 1 h,用磷酸盐吐温缓冲液(1×PBST)洗脱 3 次,每次 5 min。以 α-ToMMV 蛋白质抗体(由笔者所在实验室保存)作为一抗孵育 1.5 h 后,用 1×PBST 溶液洗脱 3 次,每次 5 min,用 HRP 标记二抗(碧云天公司产品,中国)于脱色摇床常温孵育 1 h 后,再用 1×PBST 溶液洗脱 3 次,每次 5 min。使用高敏型 ECL(化学发光底物)化学发光试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品)检测电转化后的聚氯乙烯膜,取 1 ml 化学发光底物(ECL)Buffer A、1 ml ECL Buffer B 液体等体积混匀后均匀滴加到电转后的聚氯乙烯膜上,在室温下孵育 1~2 min 后放在化学发光成像仪器(Tanon 5200 全自动化学发光图像分析系统)下观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 本氏烟组蛋白基因 *H4* 的克隆及组蛋白 *H4* 特征分析

*H4* 基因全长 312 bp(图 1A), 编码 1 个由 102 个氨基酸组成的蛋白质(相对分子质量为 11 400), 该蛋白质具有 1 个保守的组蛋白折叠域(HFD)<sup>[25]</sup>, 其中包含 3 个串联的  $\alpha$ -螺旋, 两端是 N 末端、C 末端, 这 2 个区段易发生转录后修饰, 对基因转录的调控作用明显<sup>[26]</sup>, 组蛋白 *H4* 的结构见图 1B。



A: 组蛋白基因 *H4* 的克隆结果; B: 组蛋白 *H4* 结构。

图 1 组蛋白基因 *H4* 的克隆和组蛋白 *H4* 结构示意图

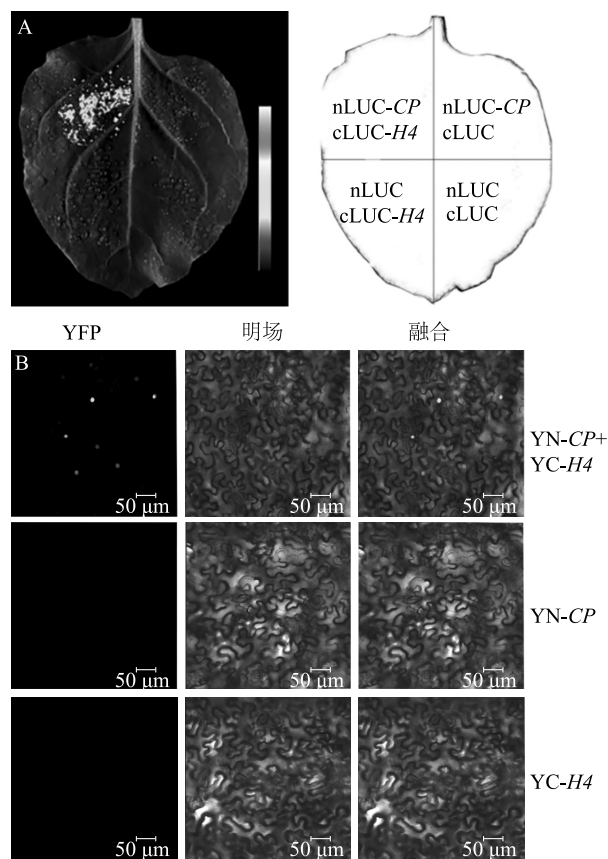
Fig.1 Cloning of histone gene *H4* and structure of histone *H4*

### 2.2 ToMMV 外壳蛋白 (CP) 与组蛋白 *H4* 的互作验证

近年来, 荧光素酶互补成像 (Luciferase complementation imaging, LCI) 技术因具有可量化、高灵敏度的特征而在蛋白质互作试验中被广泛使用<sup>[26]</sup>, 本试验拟通过此方法分析 CP 与组蛋白 *H4* 之间的互作关系。nLUC-CP 与 cLUC-*H4* 共浸润本氏烟, 2 d 后对烟草叶片喷施荧光素酶, 用化学发光成像系统观察荧光素酶的活性。如图 2A 所示, 与含有空载体的农杆菌一起被浸润的所有阴性对照中, 荧光信号都没有被检测出来, 只有共表达的 nLUC-CP + cLUC-*H4* 试验组能检测到明显的荧光信号。上述结果表明, ToMMV CP 与组蛋白 *H4* 能在烟草细胞中发生相互作用。

为了进一步验证 CP 与组蛋白 *H4* 在植物体内的互作情况, 笔者将 CP 基因、*H4* 基因分别连入双分子荧光互补 (BiFC) 载体 YN、YC 中, 用农杆菌浸润烟草叶片 2 d 后, 通过激光共聚焦观察本氏烟细胞内的黄色荧光。BiFC 结果表明, YN-CP 和 YC-*H4*

共浸润烟草叶片后可以在细胞核位置观察到点状 YFP 荧光, 表明 ToMMV CP 和组蛋白 *H4* 能够在烟草叶片细胞中互作, 其他组合均未观察到荧光(图 2B)。



A: 荧光素酶互补成像试验验证 ToMMV CP 与本氏烟组蛋白 *H4* 的互作关系 (左侧为荧光图, 右侧为叶片不同区域菌液组合的示意图); B: 双分子荧光互补试验验证 ToMMV CP 与本氏烟组蛋白 *H4* 的互作关系。

图 2 番茄斑驳花叶病毒 (ToMMV) 外壳蛋白 (CP) 与本氏烟组蛋白 *H4* 互作的验证

Fig.2 Verification of interaction between coat protein and histone *H4* of *Nicotiana benthamiana* in plants

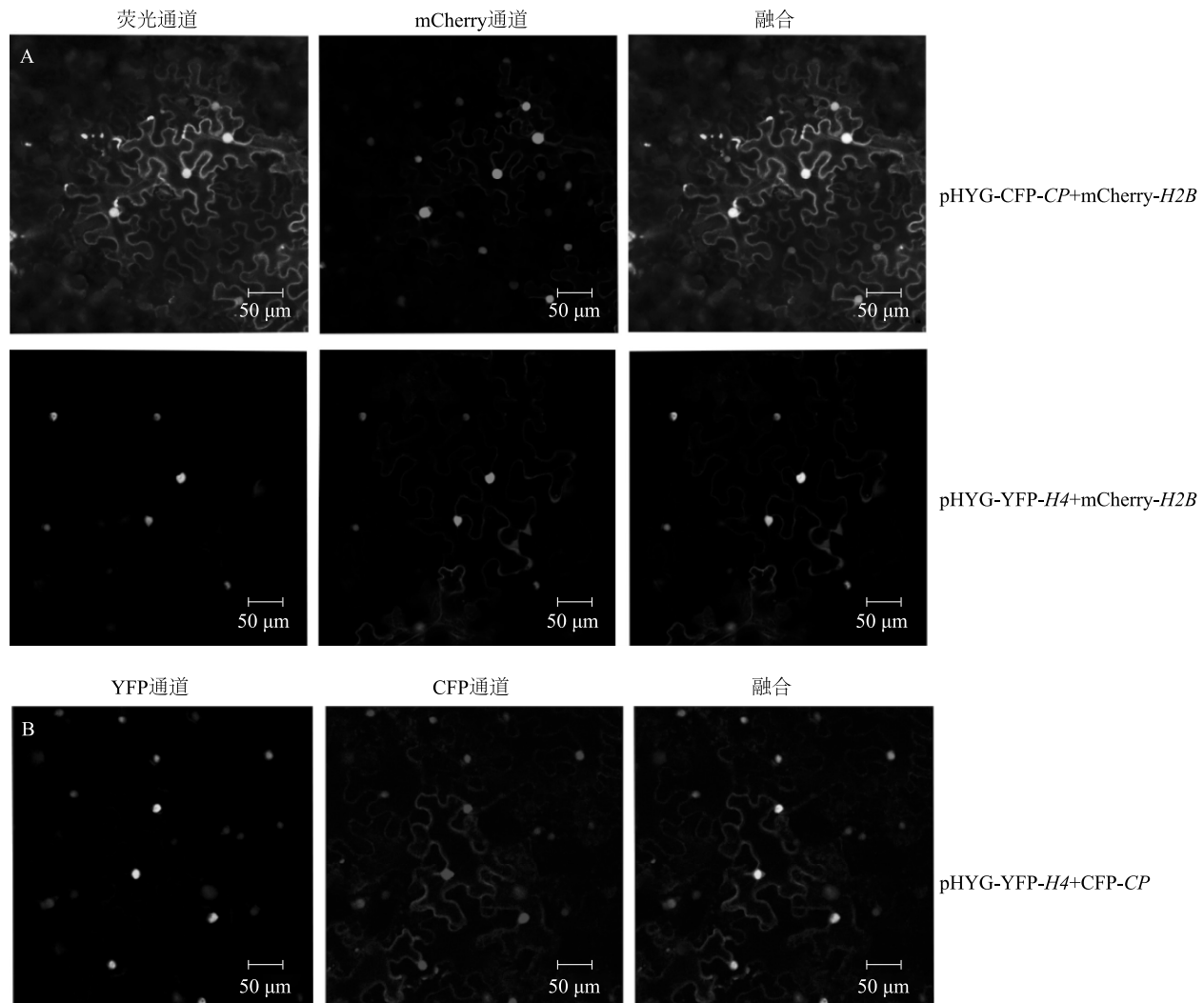
### 2.3 ToMMV CP 和本氏烟组蛋白 *H4* 的亚细胞定位

为了明确 ToMMV CP 及本氏烟组蛋白 *H4* 的亚细胞定位, 本研究分别构建 pHYG-CFP-CP、pHYG-YFP-*H4* 重组表达载体。用含有 pHYG-CFP-CP、pHYG-YFP-*H4* 质粒的农杆菌菌液和含有 mCherry-*H2B* 质粒的农杆菌菌液共浸润本氏烟叶片, 其中 mCherry-*H2B* 的主要作用为细胞核红色荧光标记,



接种后 2 d,通过激光共聚焦显微镜观察荧光。结果显示,ToMMV CP 定位于细胞核、细胞质中,组蛋白

H4 定位于细胞核中(图 3A),两者共定位于细胞核中(图 3B)。



A:ToMMV CP 与本氏烟组蛋白 H4 的亚细胞定位 B:ToMMV CP 与本氏烟组蛋白 H4 的亚细胞共定位。

图 3 番茄斑驳花叶病毒(ToMMV)外壳蛋白(CP)与本氏烟组蛋白 H4 的亚细胞定位

Fig.3 Subcellular localization of coat protein and histone H4 of *Nicotiana benthamiana*

#### 2.4 本氏烟沉默 H4 基因抑制 ToMMV 的侵染

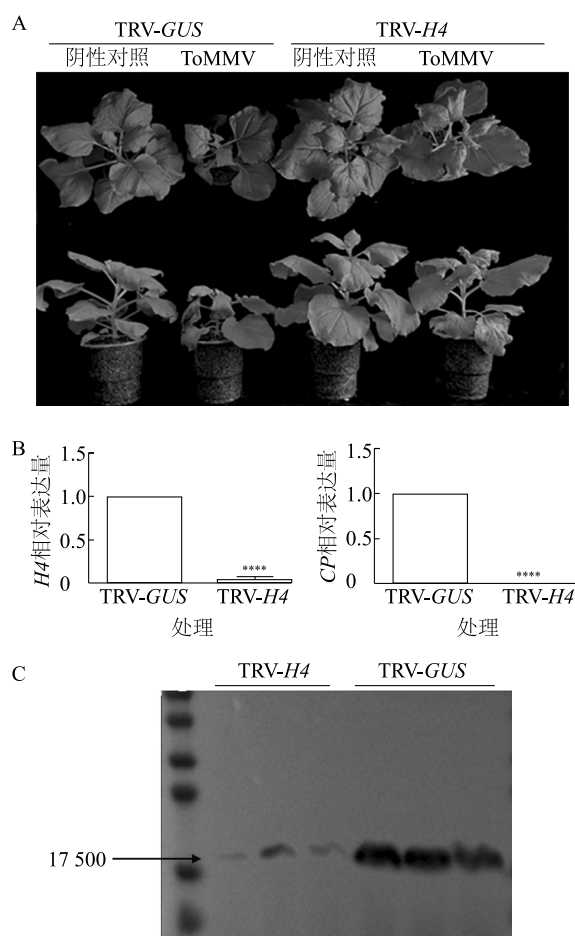
为了进一步明确组蛋白 H4 对 ToMMV 侵染植株的影响,利用 TRV 诱导的基因沉默技术沉默 H4 基因,以 TRV-GUS、TRV-PDS 为对照,TRV-H4 通过农杆菌浸润对六叶期的本氏烟进行 H4 基因沉默,相关结果见图 4。当阴性对照 TRV-PDS 出现白化症状时,取试验组的系统叶进行实时荧光定量 PCR,检测 H4 基因的沉默效率。结果显示, H4 基因的相对表达量显著下降(图 4B)。

对沉默后的植株浸润接种 ToMMV,并于接种后

第 4 d 取其系统叶进行实时荧光定量 PCR 以检测病毒含量。结果表明, H4 基因沉默后, ToMMV CP 基因在本氏烟中的积累量降低(图 4A),病毒在系统叶中的复制水平显著低于对照(图 4B),表明 H4 基因的沉默会影响 ToMMV 的侵染,组蛋白 H4 可能是 ToMMV 侵染植物的感病因子。

### 3 讨论

病毒外壳蛋白的主要功能是形成衣壳,保护病毒基因组,以防降解<sup>[27]</sup>。然而,除了结构功能外,外



A:接种病毒4 d后植株的表现;B:*H4*基因的沉默效率检测和接种病毒4 d后外壳蛋白基因(*CP*)相对表达量的检测结果(\*\*\*\*表示差异极显著, $P<0.0001$ );C:接种病毒4 d后CP的Western Blot检测结果。

图4 沉默本氏烟 *H4* 基因抑制番茄斑驳花叶病毒 (ToMMV) 侵染

Fig.4 Inhibition of tomato mottle mosaic virus infection by silencing *H4* gene in *Nicotiana benthamiana*

壳蛋白在病毒的感染周期和寄主植物对病毒感染的防御反应中还有许多其他重要功能<sup>[28]</sup>,包括参与病毒的蚜传<sup>[29]</sup>、病毒的长距离运动<sup>[30]</sup>和胞间运动<sup>[31]</sup>、病毒症状的形成等<sup>[32-33]</sup>。由此可见,CP在病毒侵染植株的过程中发挥了重要作用,因此研究CP的互作因子对了解病毒侵染过程及其致病机制有着十分重要的意义<sup>[34]</sup>。已有的研究表明,水稻矮缩病病毒外壳蛋白P2可以与植物体内恩特-贝壳杉烯氧化酶(Ent-kaurene oxidases)互作,导致水稻产生矮缩症状<sup>[35]</sup>。Li等<sup>[36]</sup>研究发现,烟草IP-L与烟草

花叶病毒(ToMV)CP间存在相互作用,ToMV CP同IP-L的互作会影响植物的光合作用,从而引起植株黄化症状。黄瓜绿斑驳花叶病毒外壳蛋白与烟草RPL14存在互作,这种互作可能会影响病毒的增殖机制<sup>[37]</sup>。本研究选择番茄斑驳花叶病毒CP作为诱饵筛,在烟草中筛选到与其互作的组蛋白H4,这是关于ToMMV CP与植物组蛋白互作的首次报道,为ToMMV CP功能的后续研究奠定了基础。

组蛋白是构成真核生物染色体的基本结构蛋白<sup>[38-39]</sup>,在某些情况下组蛋白中的特定氨基酸位点可发生甲基化、乙酰化等表观遗传学修饰<sup>[40]</sup>。在表观遗传调控中,这些不同位点的不同修饰作用是不一样的<sup>[41]</sup>。研究发现,酿酒酵母组蛋白H4 K16位点与酵母乙酸耐受性相关<sup>[42]</sup>。对拟南芥的研究发现,通过减少开花抑制因子FLC的组蛋白H4赖氨酸5(H4K5ace)的乙酰化,会使植物提前开花<sup>[43-44]</sup>。此外,组蛋白H4的乙酰化是基因表达激活的标志,这些标志在动物病毒基因组特别是动物病毒基因激活和再激活的调控区域的富集,是病毒从感染潜伏状态到烈性感染状态转变的重要因素<sup>[45]</sup>。本研究在沉默本氏烟*H4*后发现,ToMMV的侵染能力下降,表明*H4*在ToMMV与寄主互作的过程中发挥重要作用,由此笔者推测,病毒编码的CP在细胞核内通过影响组蛋白的修饰等,进而使病毒完成系统侵染。

## 参考文献:

- [1] 李月月,周文鹏,路思倩,等. 番茄斑驳花叶病毒在我国茄科作物上的发生及生物学特性[J]. 中国农业科学, 2020, 53(3): 539-550.
- [2] AMBRÓS S, MARTÍNEZ F A, IVARS P, et al. Molecular and biological characterization of an isolate of Tomato mottle mosaic virus (ToMMV) infecting tomato and other experimental hosts in eastern Spain[J]. European Journal of Plant Pathology, 2017, 149(2): 261-268.
- [3] 金凤媚,薛俊,孙海波,等. 基于小RNA技术的天津地区番茄花叶病毒分子检测与基因组部分序列分析[J]. 华北农学报, 2021, 36(5): 176-183.
- [4] 隋雪莲. 美国三种新兴蔬菜病毒病特性研究及其检测方法的建立[D]. 福州: 福建农林大学, 2017.
- [5] 中国检验检疫科学研究院, 中华人民共和国天津出入境检验检疫局, 中华人民共和国甘肃出入境检验检疫局. 番茄花叶病毒检测鉴定方法: GB/T 36771—2018[S]. 北京: 国家市场监督管理总局, 中国国家标准化管理委员会, 2018: 24.
- [6] ISHIKAWA M, OKADA Y. Replication of tobamovirus RNA[J].

- Proceedings of the Japan Academy, Series B, 2004, 80(5): 215-224.
- [7] 杨作坤. 柑橘衰退病毒与寄主蛋白互作的生物学功能及其 vsRNA 靶向寄主基因的鉴定 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
  - [8] 涂丽琴, 干射香, 吴淑华, 等. 瓜类褪绿黄化病毒编码的 P6 蛋白亚细胞定位及致病特征分析 [J]. 园艺学报, 2021, 48(8): 1531-1540.
  - [9] 范小燕, 杨 柳, 季英华, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒 CP 基因克隆及亚细胞定位 [J]. 江苏农业学报, 2018, 34(2): 281-287.
  - [10] 郑肖娟. 传染性法氏囊病毒感染细胞的差异蛋白质组学研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
  - [11] BENDAHDANE M, SZÉCSI J, CHEN I, et al. Characterization of mutant tobacco mosaic virus coat protein that interferes with virus cell-to-cell movement [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99: 3645-3650.
  - [12] BANERJEE N, WANG J Y, ZAITLIN M. A single nucleotide change in the coat protein gene of tobacco mosaic virus is involved in the induction of severe chlorosis [J]. Virology, 1995, 207(1): 234-239.
  - [13] GALLIE D R, WALBOT V J G. RNA pseudoknot domain of tobacco mosaic virus can functionally substitute for a poly(A) tail in plant and animal cells [J]. Genes & Development, 1990, 4(7): 1149-1157.
  - [14] ASURMENDI S, BERG R H, KOO J C, et al. Coat protein regulates formation of replication complexes during tobacco mosaic virus infection [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(5): 1415-1420.
  - [15] 何晓娟. 核盘菌 GATA 转录因子 SsAREA 和 SsSRE 的功能研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2021.
  - [16] OKADA T, ENDO M, SINGH M B, et al. Analysis of the histone H3 gene family in Arabidopsis and identification of the male-gamete-specific variant AtMGH3 [J]. Plant J, 2005, 44(4): 557-568.
  - [17] YANG H, YANG N, WANG T. Proteomic analysis reveals the differential histone programs between male germline cells and vegetative cells in *Lilium davidii* [J]. Plant J, 2016, 85(5): 660-674.
  - [18] TALASZ H, LINDNER H H, SARG B, et al. Histone H4-lysine 20 monomethylation is increased in promoter and coding regions of active genes and correlates with hyperacetylation [J]. J Biol Chem, 2005, 280(46): 38814-38822.
  - [19] 李 霞. 水稻 OsH4a 基因的克隆与抗逆性分析 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2018.
  - [20] 李咏欣. 基于多肽化学反应的荧光探针的设计、合成与生物应用 [D]. 兰州: 兰州大学, 2021.
  - [21] WANG Z, CASAS-MOLLANO J A, XU J P, et al. Osmotic stress induces phosphorylation of histone H3 at threonine 3 in pericentromeric regions of *Arabidopsis thaliana* [J]. PNAS, 2015, 112(27): 8487-8492.
  - [22] MESSNER S, HOTTIGER M O. Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription [J]. Trends Cell Biol, 2011, 21(9): 534-542.
  - [23] WON J, KIM T K. Histone modifications and transcription factor binding on chromatin ChIP-PCR assays [J]. Methods Mol Biol, 2006, 325: 273-283.
  - [24] 李 阳, 谢 理, 祝建烜, 等. 水稻条纹病毒 p2 与本氏烟柯浩体蛋白互作 [J]. 病毒学报, 2021, 37(6): 1476-1483.
  - [25] 徐美玲, 孙健英, 李宗芸. 植物着丝粒组成和功能的研究进展 [J]. 生命科学, 2022, 34(3): 285-293.
  - [26] 徐东亮, 刘 永, 张 炜, 等. 核因子  $\kappa$ B 诱骗剂处理的树突状细胞延长小鼠移植心脏存活时间 [J]. 中华器官移植杂志, 2007, 28(9): 525-529.
  - [27] 郭嘉媛, 洪永河, 黄健强, 等. 稻瘟病菌无毒效应因子 Avr-PikD 与水稻蛋白 OsDjA9 的互作鉴定 [J]. 福建农业学报, 2022, 37(5): 668-674.
  - [28] MAKAROV V V, KALININA N O. Structure and noncanonical activities of coat proteins of helical plant viruses [J]. Biochemistry (Mosc), 2016, 81(1): 1-18.
  - [29] 苗艳梅, 赵 敏. 马铃薯 Y 病毒属病毒外壳蛋白功能 [J]. 黑龙江农业科学, 2019(3): 165-168.
  - [30] TAKAMATSU N, ISHIKAWA M, MESHI T, et al. Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA [J]. Embo J, 1987, 6(2): 307-311.
  - [31] HAMEED A, TAHIR M N, ASAD S, et al. RNAi-mediated simultaneous resistance against three RNA viruses in potato [J]. Mol Biotechnol, 2017, 59(2/3): 73-83.
  - [32] 王继伟, 雷新云, 严衍录, 等. 感染烟草花叶病毒 (TMV) 的烟叶在显症前的荧光光谱变化 [J]. 植物保护学报, 1995(3): 269-274.
  - [33] ABBINK T E M, PEART J R, MOS T N M, et al. Silencing of a gene encoding a protein component of the oxygen-evolving complex of photosystem II enhances virus replication in plants [J]. Virology, 2002, 295(2): 307-319.
  - [34] 谢联辉, 林奇英. 植物病毒学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
  - [35] ZHU S F, GAO F, CAO X S, et al. The rice dwarf virus P2 protein interacts with *ent*-kaurene oxidases *in vivo*, leading to reduced biosynthesis of gibberellins and rice dwarf symptoms [J]. Plant Physiol, 2005, 139(4): 1935-1945.
  - [36] LI Y, WU M Y, SONG H H, et al. Identification of a tobacco protein interacting with tomato mosaic virus coat protein and facilitating long-distance movement of virus [J]. Arch Virol, 2005, 150(10): 1993-2008.
  - [37] 郑海刚. 黄瓜绿斑驳花叶病毒外壳蛋白与寄主烟草蛋白间的互作 [D]. 福州: 福建农林大学, 2011.
  - [38] 王宏鑫, 王 萌, 张煜伟, 等. 胞外组蛋白与急性器官损伤的关系 [J]. 武警医学, 2019, 30(5): 441-444.
  - [39] 顾 欢. 大豆和苜蓿水平转移基因的鉴定与功能分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
  - [40] TESSARZ P, KOUZARIDES T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(11): 703-708.

- [41] 李霞,张玉军. 组蛋白 H4 的共价修饰在表观遗传调控中的作用研究进展[J]. 山东医药, 2013, 53(15): 91-93.
- [42] LIU X Y, ZHANG X H, ZHANG Z J. Point mutation of H3/H4 histones affects acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Biotechnology, 2014, 187: 116-123.
- [43] KIM W H, LATRASSE D, SERVET C, et al. *Arabidopsis* histone deacetylase HDA9 regulates flowering time through repression of AGL19[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 432(2): 394-398.
- [44] XIAO J, ZHANG H, XING L J, et al. Requirement of histone acetyltransferases HAM1 and HAM2 for epigenetic modification of FLC in regulating flowering in *Arabidopsis* [J]. Journal of Plant Physiology, 2013, 170(4): 444-451.
- [45] 苗蒙. RNA 病毒与宿主蛋白相互作用机制的研究[D]. 武汉:武汉大学, 2019.

(责任编辑:徐 艳)