

# 翻译后修饰可能影响黄瓜花叶病毒 2b 蛋白抑制子活性及稳定性

李沫<sup>1,3</sup>, 贾燕涛<sup>1,2</sup>, 方荣祥<sup>1,2</sup>

1 中国科学院微生物研究所 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101

2 国家植物基因研究中心, 北京 100101

3 中国科学院研究生院, 北京 100049

**摘要:** 黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 编码的 2b 蛋白具有 RNA 沉默抑制子功能, 为了研究翻译后修饰对 2b 功能的影响, 利用反向 PCR 定点突变方法对 CMV-Q 株系 2b 蛋白的 1 个预测的磷酸化位点 (S40) 和 2 个预测的泛素化/SUMO 化位点 (K22, K39) 进行了点突变, 同时将点突变体插入植物表达载体。通过农杆菌共注射法对 3 个 2b 突变体的抑制子活性进行了分析, 结果证明, 当 S40 突变为 A (2b<sup>S40A</sup>) 后, 2b 抑制局部和系统沉默的活性均大幅降低; 当 K22 突变为 R (2b<sup>K22R</sup>) 后, 2b 的抑制子活性无明显变化; 而将 K22 和 K39 均突变为 R (2b<sup>K22R/K39R</sup>) 后, 2b 抑制系统沉默的活性则大幅减弱。对叶片中 2b 突变体的蛋白含量的 Western blotting 检测表明, 与野生型 2b 蛋白相比, 2b<sup>K22R</sup> 在植物中积累水平变化不大, 而 2b<sup>S40A</sup> 和 2b<sup>K22R/K39R</sup> 的蛋白积累量则明显降低, 说明 K39 和 S40 位点在维持 2b 蛋白的抑制子活性及其在植物细胞中的稳定性方面起重要作用。

**关键词:** 黄瓜花叶病毒, 2b 蛋白, 翻译后修饰, 抑制子活性, 蛋白稳定性

## Implication of post-translational modifications in suppressor activity and stability of the *Cucumber mosaic virus* 2b protein

Mo Li<sup>1,3</sup>, Yantao Jia<sup>1,2</sup>, and Rongxiang Fang<sup>1,2</sup>

1 State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 National Center for Plant Gene Research, Beijing 100101, China

3 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** To gain insights into the function of potential post-translational modifications on the activity of the *Cucumber mosaic virus* (CMV)-encoded silencing suppressor protein 2b, one predicted phosphorylation site (S40) and two predicted ubiquitination/sumoylation sites (K22 and K39) in CMV-Q2b protein were individually or simultaneously mutated by site-directed

**Received:** June 22, 2010; **Accepted:** August 10, 2010

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30530500), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2006CB101906).

**Corresponding author:** Rongxiang Fang. Tel/Fax: +86-10-64858245; E-mail: fangrx@im.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 30530500), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2006CB101906) 资助。

mutagenesis methods. These Q2b mutants were inserted into plant expression vectors, expressed in plant leaves, and then analyzed for their silencing suppressor activities. The results showed that S40A mutation greatly impaired both the local and systemic silencing suppressor activity, and the K22R mutation has no significant effect on the suppressor activity, while the K22R/K39R double mutation reduced the systemic silencing suppressor activity. To test if the decrease of suppressor activity were due to protein accumulation changes, western blot were performed to monitor the protein level of Q2b mutants. The results indicated that mutations of both K22 and K39 to R or S40 to A all significantly reduced the accumulation of the Q2b protein in plants, while the single mutation of K22 to R did not alter the accumulation of Q2b protein, suggesting that two potential post-translational modification sites, K39 and S40, contribute to the suppressor activity and stability of 2b protein in plant cells.

**Keywords:** *Cucumber mosaic virus*, 2b protein, post-translational modifications, suppressor activity, protein stability

黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 是雀麦花叶病毒科黄瓜花叶病毒属的典型成员, 为单链正义三分体 RNA 病毒<sup>[1-2]</sup>, 是寄主种类最多、分布最广、对农作物危害最为严重的植物病毒之一。CMV RNA2 编码的 2b 蛋白通过 RNA2 产生的亚基因组 RNA4A 表达<sup>[3]</sup>。RNA 沉默系统是植物重要的抗病毒防御机制, 针对这套防御机制, 病毒进化出抑制子蛋白来帮助自身成功侵染寄主。2b 是 CMV 的 RNA 沉默抑制子<sup>[4]</sup>, 可以抑制寄主 RNA 沉默系统对病毒 RNA 的降解, 促进病毒在寄主植物内的长距离运动<sup>[5]</sup>和细胞间运动<sup>[6]</sup>, 还可抑制水杨酸介导的病毒抗性<sup>[7]</sup>, 干扰 RNA 引发的 DNA 甲基化<sup>[8]</sup>。据文献报道 2b 可以通过与 AGO1 蛋白相互作用抑制其对 RNA 剪切来行使抑制子功能<sup>[9]</sup>, 或结合小分子 RNA<sup>[10-11]</sup>和 AGO4 蛋白<sup>[12]</sup>从而抑制 RNA 沉默。这些研究为阐明 2b 的功能机理提供了证据。

研究发现, 2b 蛋白序列中的一些关键结构域和氨基酸位点能够影响 2b 的活性。将 CMV Q 株系 2b (Q2b) 中 <sup>22</sup>KRRRRR<sup>27</sup> 序列全部用 A 替换, 则抑制系统沉默的活性丧失<sup>[13]</sup>; 将 CMV Fny 株系 2b (Fny2b) 序列中 <sup>22</sup>KKQRRR<sup>27</sup>、<sup>33</sup>RRER<sup>36</sup> 和 <sup>39</sup>KSPSE<sup>43</sup> 中的任一区段缺失, 突变体均不能抑制局部沉默, 并且结合 siRNA 能力减弱<sup>[12]</sup>; CMV SD 株系 2b (SD2b) 缺失 <sup>64</sup>ELIEMYHH<sup>71</sup> 区段后, 抑制子活性仅为缺失前的 1/18<sup>[14]</sup>; 将 CMV CM95R 株系编码的 2b 蛋白序列中 R46 突变为 C 后, 抑制子活性减弱, 结合 siRNA 能力减弱<sup>[11]</sup>。抑制子活性减弱往往伴随结

合 siRNA 能力的减弱, 由此可见, 与 siRNA 结合是 2b 行使抑制子功能的一个重要途径。

Q2b 是比较弱的 RNA 沉默抑制子。Q2b 蛋白序列中的 <sup>39</sup>KSPSE<sup>43</sup> 区段是一个保守的 CK II 磷酸化识别基序<sup>[13]</sup>, 在几乎所有 2b 蛋白序列中都存在, 预测 S40 位点可能为磷酸化修饰位点。磷酸化是植物蛋白最主要的翻译后修饰, 在防御信号级联反应中起重要作用。Q2b 中仅含 2 个赖氨酸残基 (K22, K39), 分别位于核定位信号区<sup>[13,15]</sup>和磷酸化区<sup>[13]</sup>。赖氨酸往往是泛素化或 SUMO 化等翻译后修饰位点, 被修饰蛋白的功能活性常常通过亚细胞定位改变或蛋白降解等过程得以调控。为了研究植物翻译后修饰系统是否通过针对 2b 的修饰而抑制 2b 活性、保护自身不被病毒感染, 或者 CMV 是否利用寄主植物的翻译后修饰系统激活 2b 的活性帮助病毒感染, 将上述 S40、K22 和 K39 位点分别突变, 并对突变体的功能活性进行检测分析。结果显示, 这些潜在翻译后修饰位点参与调控 Q2b 的抑制子活性及蛋白稳定性。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

本名烟 *Nicotiana benthamiana* 种子为本实验室保存, GFP 转基因本名烟株系 16c 种子为英国剑桥大学植物学系 Dr. David Baulcombe 惠赠。所有植物都在土中萌发, 之后移入小盆, 在温室中培养, 温度 25 °C, 16 h 光照, 8 h 黑暗。待生长有 5~6 片成熟叶片时即可用于农杆菌注射。

## 1.2 质粒载体与菌株

含 Q2b 表达框的载体 p35S-Q2b-3HA 为本实验室构建。二元载体 pCAMBIA1300 和含有 GFP 表达框 (35S:GFP) 的二元载体 pCAMBIA1302 为 Dr. R. Jefferson 惠赠。大肠杆菌菌株 *E. coli* JM109、XL-BLUE 和农杆菌菌株 *A. tumefaciens* EHA105 为本实验室保存。

## 1.3 Q2b 定点突变体表达载体的构建

基因定点突变试剂盒购自 STRATAGENE。按使用说明设计引物, 以 p35S-Q2b-3HA 为模板进行反向 PCR, 反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 10 min, 24 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 5 min。所得产物用 *Dpn* I 消化, 37 °C 1 h, 转化 XL-BLUE 感受态细胞, 在含氨苄青霉素 (100 µg/mL) 的 LB 平板上筛选阳性克隆, 测序确定是否正确突变。

从正确克隆提取质粒, 用 *Hind* III 消化, 从琼脂糖凝胶中回收含 C 末端 3HA 标签的 Q2b 及其突变体表达框片段, 与用 *Hind* III 消化的 pCAMBIA1300 载体连接, 转化 JM109 感受态细胞, 在含卡那霉素 (50 µg/mL) 的 LB 平板上筛选阳性克隆, 菌落 PCR 并提质粒 *Hind* III 酶切鉴定其是否正确。正确克隆即为 C 末端含有 3HA 标签的 Q2b 及其定点突变体的植物表达载体。本文中所指的 Q2b 及其突变体蛋白均含有 C 末端 3HA 标签。

## 1.4 农杆菌注射及 GFP 观察记录

用重组植物表达载体转化根癌农杆菌 EHA105 感受态细胞, 在含利福平 (30 µg/mL) 和卡那霉素 (50 µg/mL) 的 LB 平板上筛选转化子, 菌落 PCR 鉴定正确后, 转入含利福平 (30 µg/mL) 和卡那霉素 (50 µg/mL) 的液体 LB 培养基, 28 °C、220 r/min 振荡培养 24 h。取 20 µL 转入 3 mL 新鲜液体 LB 培养基 (含卡那霉素 50 µg/mL, MES 10 mmol/L, 乙酰丁香酮 20 µmol/L), 28 °C、220 r/min 振荡培养 12 h。3 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用接种缓冲液 (10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L MES pH 5.6, 100 µmol/L 乙酰丁香酮) 重悬, 调整菌液浓度至

$OD_{600}$  为 1.0。25 °C 静置 3 h 后注射叶片。选择本名烟或 16c 植物顶端第 2 片和第 3 片平展的叶片, 用无针头的针管将菌液注入叶片背面表皮。注射后的植物继续在 25 °C、16 h 光照、8 h 黑暗条件下培养。用 100 W 的手提长波长紫外灯 (CA Black Ray model B 100AP) 于暗处照射注射叶片和整株植物, 观测 GFP 的绿色荧光。使用 Canon EOS400D 数码相机拍照, 镜头加 UV 镜和黄色滤光片。

## 1.5 Western blotting 分析

提取叶片总蛋白, 用 10% Bis-Tris-聚丙烯酰胺凝胶在 MES-SDS 电泳缓冲液中进行电泳分离, 将胶内蛋白湿法转至 PVDF 膜 (Millipore) 上, 条件为恒压 80 V, 100 min。用抗 GFP 的兔来源多克隆抗体或抗 HA 的鼠来源单克隆抗体孵育, 再用碱性磷酸酶标记的羊抗兔或羊抗鼠抗体 (Promega) 孵育。用 BCIP/NBT 系统 (Promega) 显色。每组实验均重复 5 次以上, 选择其中最显著的效果图。

# 2 结果

## 2.1 S40 位点突变后 Q2b 抑制子活性下降

通过农杆菌共注射将 GFP 和 Q2b 或 Q2b<sup>S40A</sup> 在野生型本名烟叶片中共表达, 3 d 后在紫外光下拍照记录注射叶片中 GFP 的表达情况以检测 Q2b 及 Q2b<sup>S40A</sup> 抑制局部沉默的活性<sup>[4,16]</sup>, 并通过 Western blotting 检测叶片浸润部位中的 GFP 表达量。结果显示, 当 S40 突变为 A 后, Q2b<sup>S40A</sup> 抑制局部沉默的活性大幅削弱 (图 1)。与单独表达 GFP 的叶片相比, 与 Q2b 共表达的 GFP 荧光明显更强, 说明野生型 Q2b 具有抑制子活性。而与 Q2b<sup>S40A</sup> 共表达的 GFP 荧光和与 Q2b 共表达的 GFP 荧光相比减弱许多, 接近于单独表达的 GFP 荧光 (图 1A)。同时, Western blotting 结果也同样显示, 与 Q2b<sup>S40A</sup> 共表达的 GFP 蛋白积累量明显少于与 Q2b 共表达的 GFP 蛋白 (图 1B)。其中野生型本名烟叶片被用作阴性对照 (CK-), 转 GFP 基因本名烟株系 16c 叶片被用作阳性对照 (16c)。

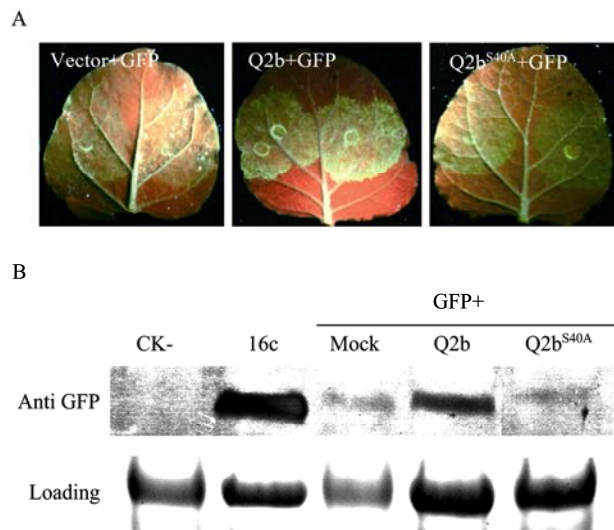


图 1 S40 位点是 Q2b 局部沉默抑制子活性所必需

Fig. 1 S40 is essential for the local silencing suppressor activity of Q2b. (A) GFP fluorescence co-expressed with Q2b<sup>S40A</sup> is weaker than that co-expressed with Q2b. (B) Accumulation level of GFP co-expressed with Q2b or Q2b<sup>S40A</sup> in *Nicotiana benthamiana* leaves.

通过农杆菌共注射将 GFP 和 Q2b 或 Q2b<sup>S40A</sup> 在 16c 植物叶片中共表达, 每组 6~10 株植物, 取 8 dpi、10 dpi 和 12 dpi 这 3 个时间点记录注射后 16c 植株上系统沉默的发生情况, 平行重复 3 次, 计算沉默率以反映 Q2b 或 Q2b<sup>S40A</sup> 抑制系统沉默的活性<sup>[16]</sup>, 在 10 dpi 于紫外光下拍照记录两组共注射植株发生系统沉默的情况。结果显示, 在 8 dpi 时 Q2b 抑制沉默效率接近 100%, 与之共表达的 GFP 仅使 3% 的 16c 植株发生 GFP 系统沉默, 而此时 Q2b<sup>S40A</sup> 抑制沉默效率只有 48%, 即与之共表达的 GFP 使 52% 的 16c 植株发生 GFP 系统沉默; 在 10 dpi 时, Q2b<sup>S40A</sup> 几乎不能抑制 GFP 系统沉默, 抑制沉默效率降为 19%, 而此时 Q2b 仍有 88% 的抑制沉默效率, 只有 12% 的 16c 植株发生 GFP 系统沉默 (图 2A)。此外, 在 10 dpi 时 Q2b<sup>S40A</sup> 与 GFP 共注射的 16c 植株顶部新生叶片叶脉呈红色, 显示该处 GFP 发生系统沉默, 而 Q2b 与 GFP 共注射的 16c 植株顶部新生叶片叶脉呈绿色, 表明 GFP 未发生系统沉默 (图 2B)。

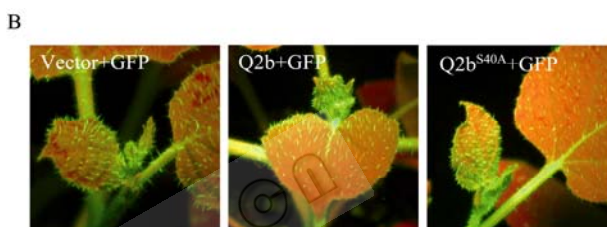
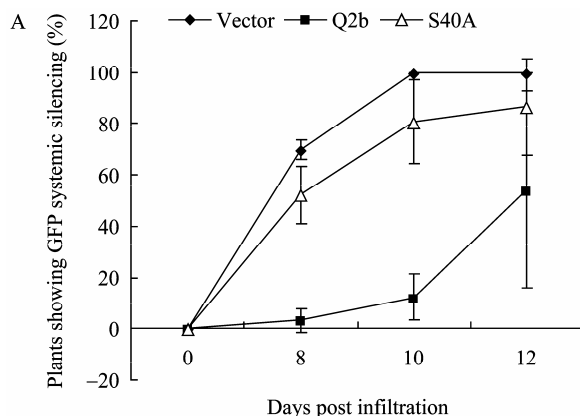


图 2 S40 位点是 Q2b 抑制系统沉默所必需

Fig. 2 S40 is essential for Q2b suppression of systemic silencing. (A) S40A mutation reduces the Q2b's ability to suppress systemic silencing. (B) Q2b S40A mutant can not suppress systemic silencing of GFP.

综合以上结果可知, S40 位点对于 Q2b 的抑制子活性是必需的, 将 S40 突变为 A 后, Q2b 抑制局部沉默和系统沉默的活性均大幅减弱。丝氨酸是潜在的磷酸化修饰位点, 但是, 是否是由于该位点的磷酸化修饰影响了 Q2b 的抑制子活性还需要进一步的实验证据。

## 2.2 K39 位点突变后 Q2b 抑制系统沉默活性下降

利用同样的方法, 分别检测 Q2b<sup>K22R</sup> 和 Q2b<sup>K22R/K39R</sup> 突变体抑制植物局部沉默和系统沉默的活性, 与 Q2b 的抑制子活性进行比较。

局部沉默活性检测发现, 当 K22 突变为 R 后, 与 Q2b<sup>K22R</sup> 共表达的 GFP 荧光和与 Q2b 共表达的 GFP 荧光相比差异不明显, 而当 K22 和 K39 均突变为 R 后, 与 Q2b<sup>K22R/K39R</sup> 共表达的 GFP 荧光和与 Q2b 共表达的 GFP 荧光相比明显增强。同时, 提取叶片浸润部位总蛋白, 用 GFP 抗体作 Western blotting 检测 GFP 表达量, 计算 4 组样品 5 次实验的 GFP 表达量平均值。

统计数据显示, Q2b<sup>K22R</sup> 抑制局部沉默的效果和 Q2b 相比没有特别明显的差异, 而 Q2b<sup>K22R/K39R</sup> 抑制局部沉默的效果则要好于前两者, 与之共表达的 GFP 增加了约一倍 (图 3)。这与观察到的 GFP 荧光结果接近, 暗示 K39 位点可能对 Q2b 抑制局部沉默活性有负调控作用。

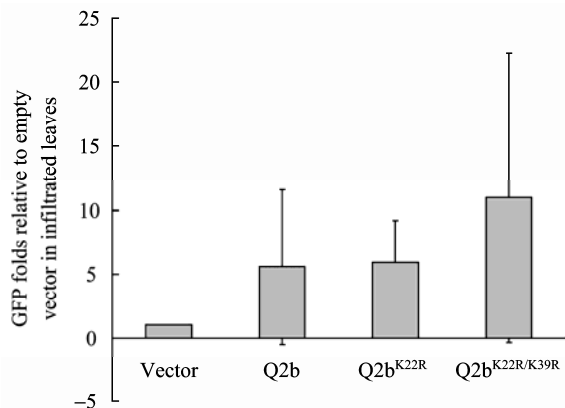


图3 K22R 与 K39R 突变对 Q2b 抑制局部沉默活性的影响  
Fig. 3 Influence of K22R and K39R mutation on the local silencing suppressor activity of Q2b. Q2b, Q2b<sup>K22R</sup> and Q2b<sup>K22R/K39R</sup> all differentially increased the accumulation levels of the co-expressed GFP proteins.

系统沉默抑制活性检测结果比较复杂。从共注射植物沉默率统计结果中可以看到, K22R 和 K22R/K39R 两种突变都使得 Q2b 抑制 GFP 系统沉默活性下降, 沉默率在 10 dpi 时均超过 50% (图 4B)。但是, 和 Q2b 一样, Q2b<sup>K22R</sup> 仍可抑制顶部新叶中 GFP 的沉默, 使 GFP 沉默局限在部分叶片的叶脉部位, 整株植物在紫外光下呈绿色; 而 Q2b<sup>K22R/K39R</sup> 则不能抑制顶部新叶中 GFP 的沉默, 整株植物在紫外光下呈红色 (图 4A)。因此, K39 位点是 Q2b 抑制系统沉默所必需的。我们推测该位点潜在的翻译后修饰对 Q2b 抑制系统沉默有重要作用, 但是 K39 位点单突变的影响还需进一步的试验证明。

### 2.3 K39 和 S40 位点突变影响 Q2b 在植物中的积累量

用农杆菌注射法将 Q2b 及其突变体的植物表达载体转入本名烟叶片, 3 d 后, 提取叶片浸润部位总蛋白, 通过 Western blotting 检测在叶片中表达的

Q2b、Q2b<sup>K22R</sup>、Q2b<sup>K22R/K39R</sup>、Q2b<sup>S40A</sup> 四种蛋白的积累量, 结果显示, 在浸润叶片中, Q2b<sup>K22R</sup> 和 Q2b 相比没有变化, 均可以被检测到, 而 Q2b<sup>K22R/K39R</sup> 和 Q2b<sup>S40A</sup> 则不能被检测到 (图 5)。这一结果暗示, K39 和 S40 这 2 个潜在翻译后修饰位点对 Q2b 蛋白的积累量起关键作用, 有可能影响 Q2b 在植物中的稳定性。

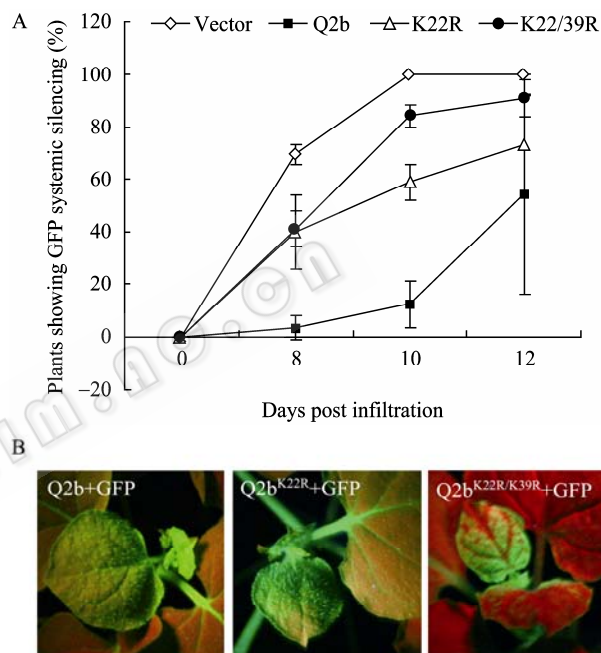


图4 K39 位点是 Q2b 抑制系统沉默所必需

Fig. 4 K39 is essential for Q2b suppression of systemic silencing. (A) K39R mutation reduces the Q2b's ability to suppress systemic silencing of GFP. (B) K22R and K22R/K39R mutants of Q2b exhibit reduced ability to suppress systemic silencing.

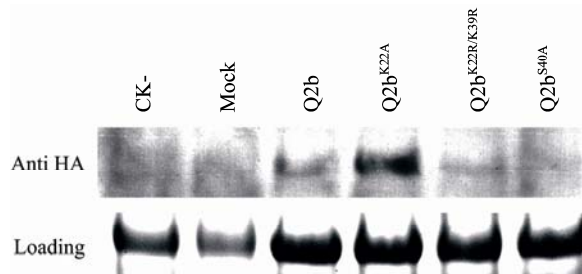


图5 K39 和 S40 位点是 Q2b 在植物中稳定表达所必需

Fig. 5 K39 and S40 residues are essential for stable expression of the Q2b protein in plants. Accumulation level of Q2b, Q2b<sup>K22R</sup>, Q2b<sup>K22R/K39R</sup> and Q2b<sup>S40A</sup> in *Nicotiana benthamiana* leaves.

### 3 讨论

目前 CMV 编码的 2b 蛋白作为 RNA 沉默抑制子已研究得较为深入, 其行使功能的部分机理包括与 AGO 蛋白结合及 siRNA 结合等功能也得到揭示, 但是在蛋白质翻译后修饰对其功能影响方面的研究还很少。本研究着重对 2b 蛋白的潜在翻译后修饰位点进行了分析, 发现了 2 个位点对 2b 蛋白的沉默抑制子功能至关重要。其中, S40 位点对 Q2b 抑制局部沉默和系统沉默的活性都很重要, 将其变为 A 后, Q2b<sup>S40A</sup> 抑制子活性大幅下降; 另外, K39 位点对 Q2b 抑制系统沉默活性也很重要, 将其变为 R 后, Q2b 抑制系统沉默活性基本丧失。

丝氨酸是常见的磷酸化修饰位点, 将丝氨酸突变为丙氨酸可以阻断该位点的磷酸化修饰。磷酸化对于植物病毒运动蛋白在细胞间运动是必要的<sup>[17]</sup>, Q2b 也被认为具有部分运动蛋白的功能<sup>[5-6]</sup>, 因此, Q2b<sup>S40A</sup> 减弱的抑制子活性可能是因为磷酸化修饰被阻断影响 2b 蛋白在细胞间运动所造成的结果。而赖氨酸是泛素化或 SUMO 化等翻译后修饰发生的位点, 将赖氨酸替换为结构类似的精氨酸后并不会很大程度上影响蛋白质的二级和三级结构, 但是其泛素化或 SUMO 化等翻译后修饰则被阻断。若该位点的赖氨酸为多聚泛素化修饰位点, 突变为精氨酸后会导致蛋白不能被泛素-蛋白酶体途径降解, 积累量将提高; 若该位点的赖氨酸为单泛素化修饰位点, 则突变为精氨酸后会改变蛋白的定位或活性。在我们的研究结果中, K39 突变为 R 后, 2b 蛋白积累量下降, 因此推测该突变可能阻断了单泛素化或 SUMO 化修饰, 引发 Q2b 的蛋白定位或活性发生改变, 使 Q2b 抑制系统沉默的活性减弱。

本研究结果证明, Q2b 的潜在翻译后修饰位点对其抑制子活性非常重要。其中一种可能性是影响其在植物中的积累水平。因为当将 S40 变为 A 或 K39 变为 R 后, 通过 Western blotting 在叶片中均检测不

到 Q2b 蛋白的存在。此前有文献报道, 将 CMV Fny 株系编码的 2b 蛋白序列中潜在磷酸化区<sup>39KSPSE</sup><sup>43</sup> 整体缺失后, 2b 蛋白在植物中的积累量下降, 而只将 S40 变为 A, 2b 仍然能够正常积累, 相应地, 2b 抑制局部沉默的活性与其在植物中的积累量相关<sup>[12]</sup>。在本实验中, S40 位点变为 A 后, Q2b 在植物中的积累量下降, 抑制子活性也减弱; K39 位点变为 R 后, Q2b 在植物中的积累量下降, 但只有抑制系统沉默的活性减弱, 抑制局部沉默的活性似乎还有增强。这就说明除了蛋白积累量之外还有其他因素在影响 Q2b 的抑制子活性, 我们推测该突变可能改变 Q2b 的翻译后修饰状态, 有利其与 RNA 沉默效应元件作用, 从而增强其抑制局部沉默的活性。

CMV 2b 蛋白的稳定性较差, 无论在体内还是体外都不容易检测纯化, 这给针对它的研究工作带来不少困难, 全长 2b 蛋白的晶体结构至今未能被解出。我们的工作立足于蛋白质翻译后修饰, 在找出对 2b 功能有影响的潜在翻译后修饰位点后, 最终的目标是明确 2b 蛋白在植物中的翻译后修饰状态。目前, 检测 2b 蛋白翻译后修饰状态的有效方法仍在探索中, 我们期待今后能够在这方面有所突破, 从而揭示翻译后修饰调控 2b 功能活性的分子机理。

### REFERENCES

- [1] Peden KWC, Symons RH. Cucumber mosaic virus contains a functionally divided genome. *Virology*, 1973, 53(2): 487-492.
- [2] Lot H, Marchoux G, Marrow J. Evidence for three functional RNA species in several strains of cucumber mosaic virus. *J Gen Virol*, 1974, 22(1): 81-93.
- [3] Ding SW, Anderson BJ, Haase HR, et al. New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology*, 1994, 198(1): 593-601.
- [4] Brigneti G, Voinnet O, Li WX, et al. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J*, 1998, 17(22): 6739-6746.



- [5] Ding SW, Li WX, Symons RH. A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO J*, 1995, 14(23): 5762–5772.
- [6] Shi BJ, Miller J, Symons RH, et al. The 2b protein of cucumoviruses has a role in promoting the cell-to-cell movement of pseudorecombinant viruses. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, 16(3): 261–267.
- [7] Ji LH, Ding SW. The suppressor of transgene RNA silencing encoded by *cucumber mosaic virus* interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Mol Plant Microbe Interact*, 2001, 14(6): 715–724.
- [8] Guo HS, Ding SW. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J*, 2002, 21(3): 398–407.
- [9] Zhang XR, Yuan YR, Pei Y, et al. *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev*, 2006, 20(23): 3255–3268.
- [10] Li F, Ding SW. Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu Rev Microbiol*, 2006, 60: 503–531.
- [11] Goto K, Kobori T, Kosaka Y, et al. Characterization of silencing suppressor 2b of cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(7): 1050–60.
- [12] González I, Martine L, Rakitina DV, et al. *Cucumber mosaic virus* 2b protein subcellular targets and interactions: their significance to RNA silencing suppressor activity. *Mol Plant Microbe Interact*, 2010, 23(3): 294–303.
- [13] Lucy AP, Guo HS, Li WX, et al. Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J*, 2000, 19(7): 1672–1680.
- [14] Ye J, Qu J, Zhang J, et al. A critical domain of the *Cucumber mosaic virus* 2b protein for RNA silencing suppressor activity. *FEBS Lett*, 2009, 583(1): 101–106.
- [15] Wang Y, Tzfira T, Gaba V, et al. Functional analysis of the *Cucumber mosaic virus* 2b protein: pathogenicity and nuclear localization. *J Gen Virol*, 2004, 85(10): 3135–3147.
- [16] Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, et al. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J*, 2002, 21(17): 4671–4679.
- [17] Ding B, Li QB, Nguyen L, et al. Cucumber mosaic virus 3a protein potentiates cell-to-cell trafficking of CMV RNA in tobacco plants. *Virology*, 1995, 207(2): 345–353.