

关于二羧酸-三羧酸盐载体蛋白负调控 黄瓜花叶病毒积累的初步研究

高双玉,杜志游

(浙江理工大学生命科学学院,杭州 310018)

摘要: 黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)的复制场所位于液泡膜,但是参与调控 CMV 复制的寄主蛋白因子有待进一步研究。植物二羧酸-三羧酸盐载体蛋白(Dicarboxylate-tricarboxylate carrier, DTC)为线粒体膜和液泡膜定位的跨膜蛋白,参与二羧酸盐和三羧酸盐的跨膜转运。为了探索 DTC 在 CMV 复制中的调控作用,通过基于烟草脆裂病毒(*Tobacco rattle virus*, TRV)的基因载体下调本氏烟体内 *DTC2(NbDTC2)* 的 mRNA 水平,并通过 GFP 荧光和 Western blot 分析 *DTC2* 下调表达后对 CMV Δ 2b-eGFP 积累量的影响,发现 *NbDTC2* 的下调表达增加 CMV 的积累水平;同时分析本氏烟 *DTC2* 的瞬时过表达对 CMV Δ CP-eGFP 积累的影响,通过观察 eGFP 荧光和 Western blot 检测,发现 *NbDTC2* 的过表达在一定程度上抑制病毒的积累。以上结果表明:DTC2 负调控 CMV 的积累,可能参与植物对病毒的防御。

关键词: 黄瓜花叶病毒;复制;二羧酸-三羧酸盐载体蛋白

中图分类号: Q933

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2018) 09-0613-06

0 引言

黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)是属于黄瓜花叶病毒属(*Cucumovirus*)的典型成员,作为模式病毒已用于病毒致病性、病毒与寄主互动和病毒进化等方面的研究^[1]。CMV 是一种经济型重要的植物病毒,能侵染近 1000 种植物^[2-3]。CMV 是一种正义单链 RNA 病毒,其基因组是由三条正义单链 RNA 组成,按照大小依次命名为 RNA1、RNA2 和 RNA3。CMV 基因组每条 RNA 链的 5'-端均具有帽子结构,且 3'-端具有类似 tRNA 的结构(tRNA-like structure, TLS)^[4-5]。RNA1 是单顺反子,编码具有甲基转移酶结构域和解旋酶结构域的 1a 蛋白。RNA2 编码含 RNA 聚合酶活性的 2a 蛋白,并通过其亚基因组 RNA4A 编码具有沉默抑制作用的 2b 蛋白^[6-7]。CMV 1a 和 2a 蛋白负责 CMV 的复制。免疫组化实验显示 CMV

1a 和 2a 蛋白定位于植物的液泡膜,由此推断 CMV 的复制场所为液泡膜^[8]。RNA3 编码两个开放阅读框(Open reading frame, ORF),其 5'端 ORF 编码移动蛋白(Movement protein, MP),负责病毒的胞间移动和长距离移动^[9]。第二个 ORF 则通过其亚基因组 RNA4 编码外壳蛋白(Coat protein, CP),负责病毒基因组的包装和参与病毒的长距离移动^[10-11]。

植物内源的二羧酸-三羧酸盐载体蛋白(Dicarboxylate-tricarboxylate carrier, DTC)定位于线粒体膜和液泡膜,负责二羧酸盐和三羧酸盐的跨膜转运^[12],参与氨基酸的初步合成、脂肪酸的代谢和类异戊二烯的生物合成等代谢途径^[13-15]。拟南芥仅编码 1 个 *DTC* 基因,而烟草则编码 4 个 *DTC* 基因,分别为 *NtDTC1*、*NtDTC2*、*NtDTC3* 和 *NtDTC4*^[16]。目前关于 DTC 蛋白的功能研究较少,尚未见有关该蛋白参与生物胁迫的报道。为了探索 DTC 蛋白在病毒侵染方面的是否具有一定作用,本文通过烟

收稿日期: 2018-05-11 网络出版日期: 2018-05-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31470007)

作者简介: 高双玉(1993-),女,安徽阜阳,硕士研究生,主要从事植物病理方面的研究。

通信作者: 杜志游, E-mail: duzy@zstu.edu.cn

草脆裂病毒(*Tobacco rattle virus*, TRV)诱导的基因沉默和植物中瞬时过表达方法,分析本氏烟中 *NtDTC2* 下调表达与过表达对 CMV 编码蛋白的积累量影响,初步确定 *NtDTC2* 在 CMV 侵染寄主中的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂

Q5 超保真 DNA 聚合酶购于 New England BioLabs 公司、限制性内切酶购于 Thermo Fisher Scientific 公司、凝胶回收试剂盒及质粒小提试剂盒购于 Axygen 公司、RT-PCR 试剂盒购于天根生物科技有限公司、eGFP 抗体购于 Santa Cruz biotechnology 公司,常规生化试剂购于上海生工生物技术有限公司和 Sigma 贸易有限公司。

1.2 材料

本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)幼苗于植物生长室中恒温培养,温度为 25 °C,光周期为 16 h/8 h(光照/黑暗),待幼苗培养至两周以上用于农杆菌浸润。

CMV 基因组 RNA1、RNA2、RNA3 的侵染性克隆 pCB301-R1、pCB301-R2 和 pCB301-R3 为实验室前期构建和保存,构建方法参考文献[17]。增强型绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein, eGFP)替换 2b ORF 的侵染性克隆 pCB301-R2-eGFP 和 eGFP 替换 CP ORF 的侵染性克隆 pCB301-R3-eGFP,由本实验室构建和保存。病毒诱导的基因沉默载体 pTRV-RNA1(TRV1)、pTRV-RNA2(TRV2)由清华大学刘玉乐教授实验室提供。

1.3 植物总 RNA 提取

利用液氮将 0.1 g 叶组织研磨粉碎,然后加入 1.0 mL RNA 提取溶液(50 mmol/L pH 值 5.2 NaAC,10 mmol/L pH 值 8.0 EDTA 和 1% SDS),继续研磨至匀浆。吸取匀浆至 RNase-free 的 1.5 mL 离心管中,加入等量的水饱和酚,涡旋混匀;在 4 °C,12000 r/min 条件下离心 6 min。之后吸取上清,按照 3:2 的比例加入苯酚/氯仿混合液(1:1 混合),涡旋混匀;在 4 °C,12000 r/min 条件下离心 6 min 后,吸取上清,然后用 3 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 3 mol/L NaAC (pH 值 5.2)沉淀 RNA。最后,用 DEPC 水溶解 RNA,利用 Nanodrop 测定所提 RNA 的浓度和纯度。

1.4 质粒的构建

通过常规的克隆方法构建 DTC2 的 VIGS 沉默质粒。实验方法为:利用 oligo(dT)₁₂ 作为反转录引物,逆转录合成本氏烟总 RNA 的 cDNA,并用特异

的引物进行 PCR 扩增。RT-PCR 具体步骤根据天根生物科技有限公司 RT-PCR 试剂盒提供的说明。以合成的 cDNA 作为模板,利用 VIGS 引物对 VIGS Nb-Dtc2 F/VIGS Nb-Dtc2 R(表 1)扩增片段 DTC2 VIGS,经过 *Bam*H I 和 *Sma* I 消化后克隆至预先用相同限制性内切酶处理的载体 pTRV2,经挑取单斑鉴定后提取质粒 pTRV2-DTC2。构建瞬时过表达本氏烟 DTC2 的质粒 p35S-DTC2。具体构建方法为:以本氏烟 cDNA 为模板,利用引物对 Dtc2-OE-F/Dtc2-OE-R(表 1)扩增 DTC2 全长编码序列,经 *Eco*R I 和 *Bam*H I 消化后克隆至预先用相同限制性内切酶处理的质粒 p35S-Flag-HA,获得重组克隆质粒 p35S-DTC2。所有质粒需经序列测定以保证序列的准确性。质粒转化农杆菌,挑斑鉴定后,保存于-80 °C。

表 1 构建质粒的引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
VIGS Nb-Dtc2 F	AAGGATCCTTATGTGGTCTTACTGCTGG
VIGS Nb-Dtc2 R	AACCCGGGTACTACTGTAGCAGCCTACCCAA
Dtc2-OE F	AGAATTCGGCTGCTGAAGTAGAATAC
Dtc2-OE R	AAGGATCCTCCCTCACGACGTCCA

1.5 农杆菌浸润接种

取 50 μ L 保存于-80 °C 的农杆菌(含相应的质粒)于含有抗生素利福平(30 mg/L)、庆大霉素(50 mg/L)和卡那霉素(50 mg/L)的 5 mL 的 LB 液体培养基中,于 28 °C 摇床,220 r/min 的条件下培养 16 h 对菌种进行菌种活化和扩大培养,离心收集各个农杆菌的菌体,最后将菌液悬浮于浸润缓冲液(10 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L MES 和 200 mmol/L 乙酰丁香酮)中。利用分光光度计测量菌液在 600 nm 下的 OD 值,调整 TRV1、TRV2-DTC2、TRV2 菌液 OD 值为 0.2,调整 35S-DTC2、35S-Flag-HA、pCB301-R1、pCB301-R2、pCB301-R3、pCB301-R2-eGFP 以及 pCB301-R3-eGFP 菌液 OD 值为 0.5。按照 TRV1 与 TRV2-DTC2、TRV1 与 TRV2 的组合将菌液等体积混合。混合后的菌液于暗处放置 2~3 h,通过注射器接种于 4~5 叶期本氏烟。CMV 注射后 5 d,在紫外灯下观察 GFP 荧光,并拍照保存。

1.6 本氏烟总蛋白提取及 Western blot 检测

从 0.2 g 叶组织中提取植物总蛋白,具体操作方法参考文献[18]。蛋白样品需经酶标仪定量后,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。利用转膜仪,在电压 100 V 的条件下转膜 1 h,将蛋白质转移至硝酸纤维素膜。为了分析 CMV 编码的 eGFP 的积累量,利用 eGFP 多克隆抗体进行蛋白杂交检测。结

合一抗和二抗后,分别在 TBST 中洗膜三次,每次 10 min,之后在 TBS 中洗膜 10 min。利用 ECL 检测膜并通过 X 射线胶片的放射自显影来显现蛋白的特异性条带。

2 结果与分析

2.1 pTRV2-DTC2 重组克隆的构建

从本氏烟中提取植物总 RNA,通过反转录得到本氏烟的 cDNA,以 cDNA 为模板,利用 VIGS Nb-

Dtc2 F/VIGS Nb-Dtc2 R 引物对扩增 DTC2 VIGS 的 DNA 片段,片段预期大小约 300 bp。PCR 产物的电泳结果如图 1(a)所示,PCR 产物的扩增片段位于略高于 250 bp 条带的位置处,其大小与预期片段大小相符。将 PCR 扩增获得的目的 DNA 片段经 *Bam*H I 和 *Sma* I 酶切,克隆至 pTRV2 载体,获得 pTRV2-DTC2 重组质粒,其电泳结果如图 1(b)所示。重组质粒经 PCR 鉴定和测序,确定重组质粒含有目的片段的插入,且序列未见任何的突变。

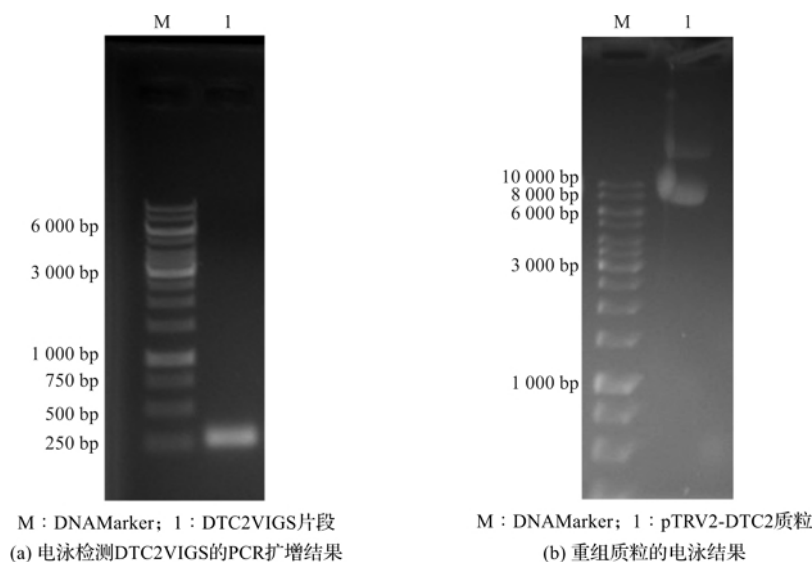


图 1 pTRV2-DTC2 质粒的构建

2.2 pDTC2-OE 质粒的构建

以本氏烟的 cDNA 为模板,利用 Dtc2-OE-F/Dtc2-OE-R 引物对扩增 DTC2 的全长 cDNA,片段大小约 800 bp,PCR 产物的电泳结果如图 2(a)所示。PCR 扩增产物位于 750~1000 bp 条带之间,与预期的片段大小相符。将 PCR 扩增获得的 DTC2-

OE 片段经限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Bam*H I 消化后,克隆至载体 p35S-Flag-HA,获得过表达重组质粒 p35S-DTC2。电泳检测质粒 p35S-DTC2 如图 2(b)所示,电泳图显示质粒 p35S-DTC2 的大小与预期相符。质粒经 PCR 检测和序列测定,确定为含有目的片段的阳性克隆。

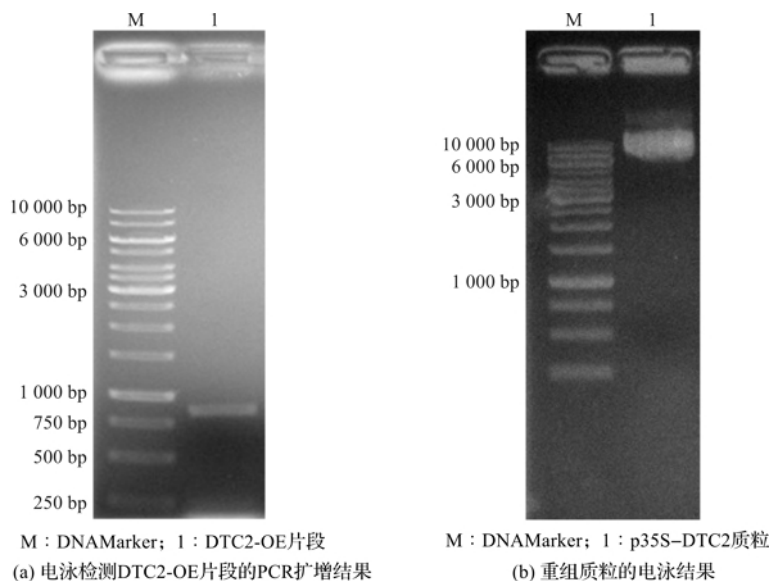
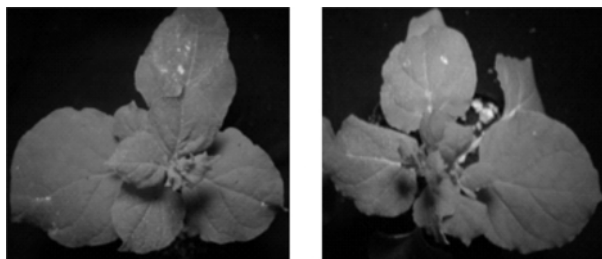


图 2 p35S-DTC2 质粒的构建

2.3 TRV下调的 *DTC2* mRNA 对 CMV 积累的影响

为了沉默本氏烟体内的 *DTC2* mRNA, 将 TRV1 和 TRV2-*DTC2* 混合注射入本氏烟叶片, 并以混合注射 TRV1 和 TRV2 作为阴性对照。注射后 12 d, 在注射叶的上部叶片接种 CMV Δ 2b-eGFP。接种病毒 5 d 后, 在紫外灯下观察各个处理的绿色荧光, 结果如图 3 所示。与阴性对照组 TRV2 处理的植株相比, CMV Δ 2b-eGFP 在 TRV2-*DTC2* 处理的叶组织中呈现更强的绿色荧光。在接种病毒后 5 d, 采取病毒接种叶, 并提取其总蛋白; 以 Rubisco 为二磷酸核酮糖羧合酶, 作为植物内参蛋白用于确定蛋白的上样量, 通过 Western blot 检测接种叶中 eGFP 的积累量, 结果显示: eGFP 的积累量在 TRV2-*DTC2* 处理的叶组织中比对照组提高 48% (图 4), 因此 *DTC2* 的下调表达促进 CMV 携带的 eGFP 蛋白的积累, 初步说明 *DTC2* 对 CMV 侵染本氏烟具有负调控作用。



(a) 对照组的 GFP 荧光 (b) *DTC2* 下调后的 GFP 荧光

图 3 紫外灯下观察 *DTC2* 下调后 CMV Δ 2b-eGFP 病毒产生的 GFP 荧光

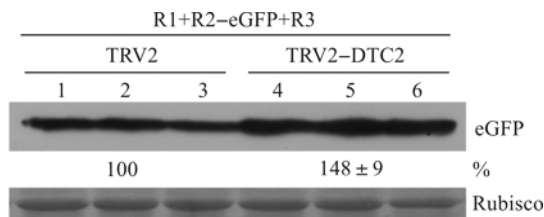


图 4 Western 杂交检测 *DTC2* 下调对后 CMV Δ 2b-eGFP 病毒蛋白积累量

2.4 *DTC2* 的过量表达对 CMV 积累的影响

为了进一步分析 *DTC2* 对 CMV 积累的负调控作用, 本文通过农杆菌介导的瞬时过表达方法, 测定 *DTC2* 的过表达对 CMV 积累的影响。在同一叶片上注射 3 个浸润斑, 分别为 Mock (只接种浸润缓冲液)、Vector (35S-Flag-HA) 和 35S-*DTC2*。浸润 3 d 后, 在原来的浸润斑的位置接种 CMV Δ CP-eGFP, Mock 组仍只接种浸润缓冲液。病毒接种 3 d 后, 在紫外灯下观察绿色荧光的强度, 结果如图 5 所示。在 Vector 和 35S-*DTC2* 处理的区域均出现明显的 GFP 绿色荧光, 表明 CMV Δ CP-eGFP 接种区域已

有效地复制和翻译。与对照 Vector 相比, 过量表达 *DTC2* 蛋白的注射斑的绿色荧光相对较弱。病毒接种 3 d 后分别采取每个注射斑的叶片样品, 利用 Western blot 检测 eGFP 的积累量。结果显示, 本氏烟中过量表达 *DTC2* 蛋白后, CMV 携带的 eGFP 的积累量与对照组相比减少 24% (图 6), 这表明 *DTC2* 对 CMV 确实具有一定的影响, 进一步说明 *DTC2* 对 CMV 有一定的负调控作用。

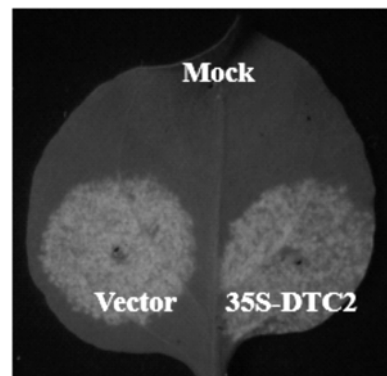


图 5 紫外灯下观察 *DTC2* 过表达对 CMV Δ CP-eGFP 产生 GFP 荧光的影响

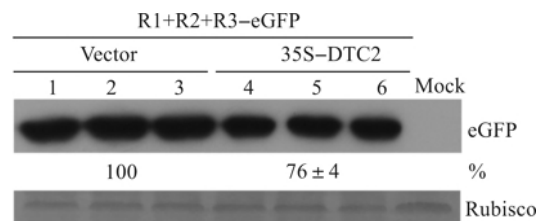


图 6 Western 杂交检测 *DTC2* 过表达对 CMV Δ CP-eGFP 产生的 GFP 蛋白积累量的影响

3 讨论

就 DTC 蛋白的功能而言, 除了跨膜转运二羧酸盐和三羧酸盐的功能之外^[15], 尚未有其它功能的报道。本文通过基因沉默和过表达本氏烟 *DTC2*, 初步确定 *DTC2* 负调控 CMV 的积累。寄主因子负调控病毒积累的途径包括降低病毒 RNA 的翻译和复制效率以及降低病毒 RNA 的体内稳定性。拟南芥编码的 RNA 结合蛋白 APUM5 通过结合 CMV RNA 的 3'UTR, 抑制病毒 RNA 的翻译, 从而负调控病毒的积累^[19]。siRNA 介导的抗病毒沉默是降低 CMV RNA 稳定性的主要途径, 但是, CMV 通过其编码的 RNA 沉默抑制子 2b 蛋白竞争性地结合 siRNA, 能有效地抑制寄主的抗病毒 RNA 沉默^[20-21]。由于本氏烟 *DTC2* 与 CMV 的复制场所均位于液泡膜, 本氏烟 *DTC2* 可能参与调控 CMV 的翻译或复制。除了寄主的蛋白因子之外, 膜脂质也参与病毒的复制, 并扮演重要的角色。磷脂酰乙醇

胺 (Phosphatidyl ethanolamine, PE) 和卵磷脂 (Phosphatidylcholine, PC) 分别正调控番茄丛矮病毒 (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV) 和雀麦花叶病毒 (*Brome mosaic virus*, BMV) 的复制^[22-23]。DTC 介导的二羧酸盐和三羧酸盐的跨膜转运能够参与脂肪酸的代谢途径^[14-15]。因此, 本氏烟 DTC2 的下调表达或过表达有可能影响植物体内脂质的合成代谢, 从而间接地影响 CMV 的积累, 关于 DTC2 调控 CMV 积累的分子机制仍有待进一步的研究。

4 结 论

本文通过构建 DTC2 的沉默载体以及过表达载体, 在本氏烟中下调表达或过表达 DTC2 后, Western blot 分析 CMV 编码的 GFP 量的变化, 主要结论如下:

a) 本氏烟 DTC2 下调表达促进 CMV Δ 2b-eGFP 的积累;

b) 本氏烟 DTC2 过表达抑制 CMV Δ CP-eGFP 的积累。

基于以上结果, 初步确定本氏烟 DTC2 蛋白在植物中负调控 CMV 的积累, DTC2 调控 CMV 侵染寄主植物的分子机制有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Jacquemond M. *Cucumber Mosaic Virus* [J]. *Advances in Virus Research*, 2012, 84(1): 439-504.
- [2] Palukaitis P, Garcia-Arenal F. *Cucumoviruses* [J]. *Advances in Virus Research*, 2003, 62(1): 241-323.
- [3] Mochizuki T, Ohki S T. *Cucumber mosaic virus*: Viral genes as virulence determinants [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(3): 217-225.
- [4] Ahlquist P, Dasgupta R, Kaesberg P. Near identity of 3-RNA secondary structure in *Bromoviruses* and *Cucumber mosaic virus* [J]. *Cell*, 1981, 23(1): 183-189.
- [5] Perret V, Florentz C, Dreher T, et al. Structural analogies between the 3' tRNA-like structure of *Brome mosaic virus* RNA and yeast tRNA^{Tyr} revealed by protection studies with yeast tyrosyl-tRNA synthetase [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1989, 185(2): 331-339.
- [6] Zhang X P, Liu D S, Yan T et al. *Cucumber mosaic virus* coat protein modulates the accumulation of 2b protein and antiviral silencing that causes symptom recovery in planta [J]. *PLoS Pathogen*, 2017, 13(7): e1006522.
- [7] Du Z Y, Chen A Z, Chen W H, et al. Nuclear-cytoplasmic partitioning of *Cucumber mosaic virus* protein 2b determines the balance between its roles as a virulence determinant and an RNA-silencing suppressor [J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(10): 5228-5241.
- [8] Cillo F, I M R, Palukaitis P. In situ localization and tissue distribution of the replication-associated proteins of *Cucumber mosaic virus* in tobacco and cucumber [J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(21): 10654-10664.
- [9] Mise K, Ahlquist P. Host-specificity restriction by *Bromovirus* cell-to-cell movement protein occurs after initial cell-to-cell spread of infection in nonhost plants [J]. *Virology*, 1995, 206(1): 276-286.
- [10] Palukaitis P, Roossinck M J, Dietzgen R G, et al. *Cucumber mosaic virus* [J]. *Advances in Virus Research*, 1992, 41(1): 281-286.
- [11] Mochizuki T, Ohki S T. *Cucumber mosaic virus*: Viral genes as virulence determinants [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(3): 217-225.
- [12] Schmidt U G, Endler A, Schelbert S, et al. Novel tonoplast transporters identified using a proteomic approach with vacuoles isolated from cauliflower buds [J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(1): 216-229.
- [13] Vivekananda J, Beck C F, Oliver D J. Monoclonal antibodies as tools in membrane biochemistry. Identification and partial characterization of the dicarboxylate transporter from pea leaf mitochondria [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(10): 4782-4788.
- [14] Hanning I, Baumgarten K, Schott K, et al. Oxaloacetate transport into plant mitochondria [J]. *Plant Physiology*, 1999, 119(3): 1025-1032.
- [15] Picault N, Palmieri L, Pisano I, et al. Identification of a novel transporter for dicarboxylates and tricarboxylates in plant mitochondria bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(27): 24204-24211.
- [16] McIntosh C A, Oliver D J. Isolation and characterization of the tricarboxylate transporter from pea mitochondria [J]. *Plant Physiology*, 1992, 100(4): 2030-2034.
- [17] Liao Q, Tu Y, Carr J P, et al. An improved *Cucumber mosaic virus*-based vector for efficient decoying of plant microRNAs [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(13): 178-183.
- [18] Naylor M, Murphy A M, Berry J O, et al. Salicylic acid can induce resistance to plant virus movement [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1998, 11(9): 860-868.
- [19] Huh S U, Min J K, Paek K H. Arabidopsis pumilio protein APUM5 suppresses *Cucumber mosaic virus* infection via direct binding of viral RNAs [J].

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(2): 779-783.
- [20] Díazpendón J A, Ding S W. Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis[J]. Annual Review of Phytopathology, 2008, 46(46): 303-326.
- [21] Du Z, Chen A, Chen W, et al. Nuclear-cytoplasmic partitioning of *Cucumber mosaic virus* protein 2b determines the balance between its roles as a virulence determinant and an RNA-silencing suppressor[J]. Journal of Virology, 2014, 88(10): 5228-5241.
- [22] Xu K, Nagy P D. RNA virus replication depends on enrichment of phosphatidylethanolamine at replication sites in subcellular membranes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112(14): 1782-1791.
- [23] Zhang J, Zhang Z, Chukkapalli V, et al. Positive-strand RNA viruses stimulate host phosphatidylcholine synthesis at viral replication sites[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(8): 1064-1072.

Preliminary study on the negative regulation of *Cucumber mosaic virus* accumulation by dicarboxylate-tricarboxylate carrier

GAO Shuangyu, DU Zhiyou

(College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The replication site of *Cucumber mosaic virus* (CMV) is located on vacuolar membrane, but the host protein factors involved in CMV replication need further study. Plant Dicarboxylate-tricarboxylate carrier (DTC) is the transmembrane protein that locates the mitochondrial membrane and vacuole membrane, and is responsible for transportation of dicarboxylate and tricarboxylate. To investigate the regulation role of DTC in CMV replication, mRNA level of *DTC2* (*NbDTC2*) in *Nicotiana benthamiana* was lowered through the genophore of *Tobacco rattle virus* (TRV). The influence of CMV Δ 2b-eGFP accumulation after down-regulation of *DTC2* was analyzed with GFP fluorescence and Western blot. It was found that, the down-regulation of *NbDTC2* increased the accumulation level of CMV. Meanwhile, the influence of transient overexpression of *DTC2* on accumulation of CMV Δ CP-eGFP was analyzed. The results of GFP fluorescence and western blot showed that overexpression of *NbDTC2* inhibited accumulation of the virus to some extent. The above results indicate that, *DTC2* negatively regulates CMV accumulation, which may participate in the defense against CMV.

Key words: *Cucumber mosaic virus*; replication; dicarboxylate-tricarboxylate carrier

(责任编辑: 唐志荣)