

1997/925/01/012/012

97-192

香蕉束顶病毒研究进展*

孟清

(内蒙古大学生物系, 呼和浩特市 010021)

曹先维

(华南农业大学园艺系, 广州 510642)

S432.41

S436.68

Research Advances of Banana Bunchy Top Virus

Meng Qing

(Biology Department, Inner Mongolia University, Huhehaote 010021)

Chao Xiewei

(Horticulture Department, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

植物病毒

关键词 香蕉束顶病, 香蕉束顶病毒, 研究进展

Key words Banana Bunchy Top Disease, Banana Bunchy Top Virus, Research advances

香蕉束顶病毒(Banana bunchy top virus, BBTV)引起的香蕉束顶病(Banana bunchy top disease)是香蕉一种严重的病毒病害。迄今此病已普遍分布在世界许多产区, 诸如: 亚洲、非洲、澳大利亚、南太平洋一些岛屿以及美国的夏威夷等地区^[1-5]。在我国广东、广西、福建、云南等省的部分产区的发病率约占 5-25% 左右, 严重地块已发展到毁灭性程度^[6]。

1987年 Dale 曾对世界香蕉种植的地理分布和 BBTV 的流行范围之间的关系、病株症状、病毒病原学、流行病学、病毒诊断方法以及病害的控制作过全面的综述^[1]。然而由于 BBTV 存在于寄主植物的韧皮部组织, 在植物体内含量很低, 加上乳胶和丹宁等物质的干扰, 纯化较难^[1,4], 因而在九十年代之前 BBTV 的研究进展缓慢, 取得突破性进展的只是近几年。本文就近几年来关于香蕉束顶病毒研究方面的重要成就综述如下。

1 香蕉束顶病的病原物

迄今此病的病原物大多数人认为是病毒, 但也有人认为是类细菌^[6]。

1986年 Dale 等从表现典型症状的病株中分离到了 ds-RNA, 在大小、数量上相似于被大麦黄矮病毒(Barly yellow dwarf virus, BYDV)或甜菜西方黄化病毒(Beet western yellow virus,

收稿日期: 1995-12-4, 修回日期: 1996-07-09

* 本课题为广东省自然科学基金资助项目部分内容

BWYV)侵染的植物中分离提取到的 ds-RNA。以同样数量的纯化 ds-RNA 接种健蕉苗,于不同温度条件下培养不同时间,病株中 ds-RNA 的含量就大不相同,表明香蕉束顶病是由病毒引起的^[7]。

Iskra 等于 1989 年在加蓬从病株中分离纯化到直径为 28 nm 的等轴甘面体病毒粒子,称其为 BBTV^[8]。Wu 和 Su 于 1990 年在我国台湾省从具有典型症状的病株中分离到直径为 20~22 nm 的等轴甘面体病毒粒子,也称其为 BBTV^[9]。1991 年 Thomas 以及 Harding 等在澳大利亚从病株中分离纯化到直径约为 18 nm 正甘面体类病毒粒子(Virus-like particles, VLPs),被纯化的 VLPs 始终如一地和此病紧密相联;在病株里始终都能发现这些 VLPs 的存在,Thomas 等也称之为 BBTV。此病毒 OD 260/280 的比值为 1.33,最大紫外吸收值在 258 nm,最小吸收值在 245 nm,在 Cs₂SO₄ 中病毒的浮力密度为 1.28~1.29 g/mL,在蔗糖密度梯度中的沉降系数为 46S^[2,3]。此病毒只存在于获毒饲养的蚜虫体内,并从显示症状的叶片中检测出 BBTV^[2]。

澳大利亚分离物的多克隆抗体以及台湾分离物的单克隆抗体都与来自澳大利亚、台湾、汤加、西萨摩亚以及夏威夷病株样品呈阳性反应,而与对照呈阴性反应,这表明上述地区的 BBTV 分离物是血清学相关的^[2],也表明 BBTV 是这些国家或地区香蕉束顶病的共同病原体。

BBTV 的寄主范围仅局限于 6 种植物,其中 5 种是芭蕉科的大蕉(*Musa paradisiaca* L.),麻蕉或称马尼拉麻(*Musa textilis* Nee),班克氏巴蕉(*Musa banksii* F. Muell),Fe'i 香蕉以及 *Ensete ventricosum* (welw)E. E. Cheesm;另一种是芋(*Colocasia esculenta*)。芋受 BBTV 侵染后无症状显示。芭蕉属中的所有种、栽培种或型都是易感的^[1]。

1993 年徐绍华等对香蕉束顶病进行了病原物的超薄切片电镜观察,在病株根部、叶片中脉的输导组织和薄壁细胞内观察到有多形态细菌状体;用电镜负染观察病株输导组织内的组织液,同样发现形态、大小均与超薄切片一致的细菌状体;经青霉素处理萎蔫的病株可使病株恢复生长;从病叶中未曾提纯到直径 20~22 nm、含 ss-DNA 的球状病毒。因而认为香蕉束顶病的病原物为类细菌生物(Bacteria-like organisms, BLO)^[6]。

我们多次提纯来自云南、广东地区的典型病株材料,都提取到直径为 18~20 nm 的正甘面体 VLPs,而从健蕉叶中未曾提取到相应的 VLPs,多次的提纯实验都未发现 BLO(待发表)。

2 病毒的基因组

近几年来人们不但普遍支持“香蕉束顶病是由病毒——BBTV 引起的”这一观点,而且还对 BBTV 基因组及结构进行了大量的研究。

Wu 和 Su 报道他们纯化的 BBTV 粒子中包含有分子量为 2.0×10^6 的 ss-RNA^[9]。然而 Thomas 等以及 Harding 等却都发现约 1 kb 的 ss-DNA 与纯化的 BBTV 紧密相连^[2,3]。Harding 等从纯化的 VLPs 中提取核酸,合成克隆了 ds-DNA,用³²P 标记制备成探针,其中的一个克隆 pBT338 与 VLPs 紧密相联的 ss-DNA 发生特异性杂交反应,也与病株汁液提取物发生杂交反应,而不与健株或受 CMV 侵染的植株汁液发生杂交反应^[3],上述结果表明 BBTV 包含有小分子的 ss-DNA 作为它的基因组核酸。1994 年 Yeh 等也报道 BBTV 的基因组为 ss-DNA^[10]。

其后,Harding 等从两个方向测定了 pBT338 克隆序列。应用来自 pBT338 克隆序列的信息合成了两个引物,这两个引物方向相反、紧密相邻、互与模板链杂交,通过聚合酶链反应

(PCR)扩增,经 PAGE 分析证明得到了大约 1.1 kb 的唯一的扩增产物^[11]。这实际上就是模板 DNA 的全长 ss-DNA 的拷贝物,这一结果还充分证明 BBTV 的基因组 ss-DNA 呈环状。测序结果还表明在 DNA 序列上有一个预示病毒粒子方向的颈环结构。

1994 年 Burns 在澳大利亚应用 BBTV DNA-1 和 DNA-2 的序列信息,合成两个引物,以纯化的 BBTV DNA 为模板,进行 PCR 扩增,经 PAGE 分析表明为 7 种浓度和大小各不相同的产物,用 6 种限制性内切酶 Acc I、Bstx I、Hinc II、Kpn I、Sac I、Xba I 对得到的 283 个克隆进行酶切分析,比较每一个克隆的酶切图谱,表明绝大多数克隆被分成 4 个不同的组:A、B、C 和 D,每一个组代表了一个单独的基因组分。应用相同的 6 种限制性内切酶分析表明 BBTV DNA-2 的酶切图谱与 A 组相似,而 BBTV DNA-1 是另一个独立的组分^[12]。这些结果表明 BBTV 的基因组至少包含有 5 种环状 ss-DNA。其后 Burns 等又将其克隆测序的 6 个基因组分分别命名为 BBTV DNA-1、DNA-2、DNA-3、DNA-4、DNA-5 和 DNA-6^[13]。上述实验结果表明 BBTV 的基因为多组分,其大小均约为 1~1.1 kb。

Yeh 等^[10]、Wu 和 You 等^[14]、Xie 和 Hu 等^[4]也分别在我国台湾省、夏威夷报道:BBTV 的基因组为多组分的 1~1.1 kb 左右的环状 ss-DNA。和 BBTV 澳大利亚分离株的 6 个 DNA 组分一样,DNA 序列上都有一个预示病毒粒子基因组分方向的颈环结构。

在已报道测序的澳大利亚分离物的 6 个 DNA 组分、夏威夷分离物的 3 个 DNA 组分、台湾分离物的 3 个 DNA 组分中,基因组 DNA 的正链上以及互补链上都存在有数量不等、大小不同的开放读框(Open reading frame, ORF)。在这些 ORFs 中,夏威夷分离物的 DNA-1、澳大利亚分离物的 DNA-1 以及台湾分离物的 DNA-2 上分别存在有一个编码复制酶的基因,编码的酶蛋白分子量分别为 33.5 kD、33.6 kD 和 32.777 kD^[4,11,14]。

3 香蕉束顶病毒检测技术

由于 BBTV 只侵染香蕉植物的韧皮部组织,病毒含量极低^[4],故建立灵敏度高的检测技术显得十分重要。迄今已用过 DAS-ELISA、免疫吸附电泳(Immunosorbent electron microscopy, ISEM)、同位素标记和非同位素标记的 Dot-blot 和 Southern blot 以及 PCR 等技术进行检测^[2-5,15-18]。

1990 至 1992 年间,Thomas、Wu 和 Su、孙茂林等先后分别制备了多克隆抗血清和 McAb,并成功地应用于 BBTV 的检测中^[2,15,18]。Thomas 将制备的多克隆抗体作为包被抗体和酶结合物,借助 DAS-ELISA 检测病株,均呈阳性反应;而不与感染 CMV 的病株发生反应,并证明病蕉叶片中脉组织中的病毒含量高于叶片的叶肉^[2]。当用多克隆抗体或抗台湾分离物的 McAb (2H6, 3D12)分别作为包被抗体和酶结合物,或是两种包被抗体和酶结合物交叉使用,所检测的病株都为阳性反应,健株都呈阴性反应。将 McAb 2H6、3D12 应用于 ISEM 中来检测部分纯化的病毒制剂,见到大量的 BBTV 粒体;用多克隆抗体作包被抗体,McAb 3D12 作为酶结合物时,用 DAS-ELISA 检测到病株汁液的稀释度达 1:128^[2]。

Harding 等首次将得到的克隆 pBT338 用³²P 标记,制备成探针,应用 Dot-blot 杂交法来进行检测。从病蕉中得到的病毒提取物、核酸提取物以及从纯化的 BBTV 中提取的核酸,均与这一探针发生特异性很强的杂交反应,而不与从健株中提取的核酸以及受 CMV 侵染的香蕉植株中提取的核酸发生杂交反应^[3]。

其后,Xie 和 Hu 比较了 ELISA、Dot-blot 杂交法以及 PCR 法检测 BBTV 的灵敏度和适用

性^[4,16]。结果表明:当包被抗体和酶标记的抗体均为来自台湾的 McAb 2H6、而测定样品均为病叶中脉时,如用 DAS-ELISA 法检测,则被检汁液的稀释度可达到 1:250,相当于 0.4 mg 蕉叶组织中的病毒含量;当 DNA 探针用地高辛(Digoxigenin, DIG)标记,测定样品同样为叶片中脉时,如用 Southern blot 以及 Dot-blot 法,检测的灵敏度均达到 0.4 mg;但探针 DNA 用³²P dCTP 标记时,用同样方法检测相同样品,灵敏度可达到 0.08 mg;用 PCR 法检测时,病株汁液稀释度可达到 1:10⁴,相当于 80 ng 蕉叶的中脉组织中的病毒含量。上述几种方法相比,PCR 法的检测灵敏度至少提高 1000 倍。从单个带毒蚜虫体内提取 BBTV-DNA,并以其作为模板进行 PCR 扩增,就可获得病毒基因组特异性的扩增产物,而用健蚜的 DNA 提取物为对照则得不到相应的产物^[4,16]。上述三种方法比较结果表明,在 BBTV 的检测中,具血清学特异性的 ELISA 法以及非同位素标记的核酸探针杂交检测法是经济适用的;而用同位素标记的核酸探针杂交法、特别是 PCR 法则可大大提高检测的灵敏度。

4 香蕉束顶病毒的可能分类地位

上面介绍过 BBTV 基因组的研究结果。这些研究结果表明 BBTV 是一种非常独特的病毒,它不同于已经描述过的植物病毒组中任何病毒的特征。

到目前为止植物病毒组中仅报道双体病毒组(Geminiviruses)的基因组为 ss-DNA^[20,21]。双体病毒组的粒子常成双存在,传播介体为叶蝉或白粉虱,病毒基因组 DNA 约 2.7 kb,外壳蛋白约 26 kD 至 34 kD,而 BBTV 却不然。BBTV 的许多特征相似于椰子叶片腐败病毒(Coconut foliar decay virus, CFDV)和地下三叶草矮化病毒(Subterranean clover stunt virus, SCSV)。SCSV 由蚜虫传播,其基因组至少由 7 个约 1 kb 的环状 ss-DNA 组成,其中 2 个 ss-DNA 组分编码复制酶,7 个组分中的每一个 ss-DNA 组分都包含有一个主要的 ORF。在这 7 个组分中有 5 个 ss-DNA 组分都存在一个相类似的非编码区和一个类似于 CFDV 以及 BBTV 各分组的颈环结构,外壳蛋白的分子量为 19 kD^[22,23]。已报道的 CFDV 的一个基因组分也为环状 ss-DNA,约 1.3 kb,含有一个主要的 ORF。此 ORF 编码复制酶(因序列中也有 dNTP 结合序列:GGDGKS)^[24,25]。上述两种病毒的粒子直径均约为 18~20 nm^[22,26]。这些研究结果表明 BBTV 包括 SCSV 以及 CFDV 属于未曾描述过的植物病毒组,有可能构成一个新的植物病毒组。

1994 年 Karan 等对来自不同地理区域的 10 个国家或地区的 11 个 BBTV 的分离物进行克隆测序分析比较。结果表明上述各 BBTV 分离物似乎可划分为两个大组,即一个是南太平洋组(South Pacific group),此组包括 Fiji、Western Samoa、Tonga、Australia、India、Burundi 和 Egypt 分离物;另一个为亚洲组(Asian group),包括 Taiwan、Philippines 和 Vietnam 分离物^[27]。

5 问题与展望

不同学者报道的 BBTV 的粒体大小存在着差异:Wu 等报道为 20~22 nm^[9],Thomas 等和 Harding 等报道为 18~20 nm^[2,3],Iskra 报道为 28 nm^[8]。我们多次提纯来自云南、广东地区的病株材料,发现有大小不同的两种病毒性粒子,小的直径平均在 18~20 nm,和 Thomas 等^[2]制备的抗血清呈阳性反应。参照 Harding 等^[11]报道的 BBTV DNA-1 的序列合成引物,以我们提纯的 18~20 nm 病毒粒子的核酸作为模板,进行 PCR 扩增,已得到约 1.1 kb 的单一扩增产物,与 Thomas、Harding 等^[2,3]报道的 BBTV 相类似(另文发表);而大的直径为 28 nm 左右的病毒粒子是否徐绍华等^[6]报道的 CMV,还是与 Iskra^[8]报道的 BBTV 相类似,还有待进一步研

究。

徐绍华等报道此病病原为 BLO^[6]。我们多次提纯两个省区不同地区的典型病株材料,始终未发现 BLO,这也有待进一步研究。

BBTV 的基因组分数量以及绝大多数 ORF 的功能仍不清楚。BBTV 澳大利亚分离物的 6 个 DNA 组分已被克隆测序,但其它 BBTV 分离物的基因组究竟包含有多少组分? 各组分在病毒的侵染、复制、蚜虫传播以及诱发香蕉束顶病的形成过程中,分别起什么作用? 是否都必不可少? 编码 CP 的基因位于哪一个组分中? 除以往报道的病毒中间寄主之外,是否仍有其它中间寄主? 它的确切分类地位究竟如何确立? 这些都有待进一步研究解决。

参 考 文 献

- 1 Dale J L. Banana bunchy top: an economically important tropical plant virus disease. *Advances in Virus Research*, 1987, 33: 301~325
- 2 Thomas J E, Dietzgen R G. Purification, characterization and serological detection of virus-like particles associated with banana bunchy top disease in Australia. *J Gen Virol*, 1991, 72:217~224
- 3 Harding R M, Burns T M, Dale J L. Virus-like particles associated with banana bunchy top disease contain small single-stranded DNA. *J Gen Virol*, 1991, 72:225~230
- 4 Xie W S, Hu J S. Molecular cloning, sequence analysis and detection of banana bunchy top virus in Hawaii. *Phytopathology*, 1995, 85:339~347
- 5 Khalid S, Soomro M H, Stover R H. First report of banana bunchy top virus in Pakistan. *Plant Dis*, 1993, 77:101
- 6 徐绍华,蔡文启,莽克强.香蕉束顶病及其防治的研究:病原物的电子显微镜观察及束顶病的诊断性治疗. *微生物学报*, 1993, 33(1):158~161
- 7 Dale J L, Phillips D A, Parry J N. Double-stranded RNA in banana plants with bunchy top disease. *J Gen Virol*, 1986, 67: 371~375
- 8 Iskra M L, Garnier M, Bove J M. Purification of banana bunchy top virus (BBTV). *Fruits*, 1989, 44:63~66
- 9 Wu R Y, Su H J. Purification and characterization of banana bunchy top virus. *Journal of Phytopathology*, 1990, 128:153~160
- 10 Yeh H H, Su H J, Chao Y C. Genome characterization and identification of viral-associated ds-DNA component of banana bunchy top virus. *Virology*, 1994, 198:645~652
- 11 Harding R M, Burns T M, Hafner G *et al.* Nucleotide sequence of one component of the banana bunchy top virus genome contains a putative replicase gene. *J Gen Virol*, 1993, 74:323~328
- 12 Burns T M, Harding R M, Dale J L. Evidence that banana bunchy top virus has a multiple component genome. *Arch Virol*, 1994, 137:371~380
- 13 Burns T M, Harding R M, Dale J L. The genome organization of banana bunchy top virus: analysis of six ss-DNA components. *J Gen Virol*, 1995, 76:1471~1482
- 14 Wu R Y, You L R, Soong T S. Nucleotide sequences of two circular single-stranded DNAs associated with banana bunchy top virus. *Phytopathology*, 1994, 84:952~958
- 15 Wu R Y, Su H J. Production of monoclonal antibodies against banana bunchy top virus and their use in enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Phytopathology*, 1990, 128:203~208
- 16 Xie W S, Hu J S, Sether D. Molecular characterization and detection of banana bunchy top virus in Hawaii. *Phytopathology*, 1994, 84:1105
- 17 Hu J S, Xu M Q, Wu Z C *et al.* Detection of banana bunchy top virus in Hawaii. *Plant Dis*, 1993, 77:952
- 18 孙茂林,和春育,庄俊英.香蕉束顶病毒单克隆抗体的制备及其应用. *西南农业学报*, 1992, 5(3):75~79

- 19 Matthews R E F. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, 1982, 17:1-199
- 20 Abouzid A M, Polston J E, Hiebert E. The nucleotide sequence of tomato virus, a new geminivirus isolated from tomatoes in Florida. *J Gen Virol*, 1992, 73:3225-3229
- 21 Dry I B, Rigden J E, Krake L R *et al*. Nucleotide sequence and genome organization of tomato leaf curl geminivirus. *J Gen Virol*, 1993, 74:147-151
- 22 Chu P W G, Helms K. Novel virus-like particles containing circular single-stranded DNA associated with subterranean clover stunt disease. *Virology*, 1988, 167:38-49
- 23 Chu P W G, Keese P, Qiu B-S *et al*. Putative full-length clones of the genomic DNA segments of subterranean clover stunt virus and identification of the segment coding for the viral coat protein. *Virus Research*, 1993, 27:161-171
- 24 Randles J W, Hanold D, Julia J F. Small circular single-stranded DNA associated with foliar decay disease of coconut palm in vanuatu. *J Gen Virol*, 1987, 68:273-280
- 25 Ronde W, Randles J W, Langridge P *et al*. Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus. *Virology*, 1990, 176:648-651
- 26 Randles J W, Hanold D. Coconut foliar decay virus particles are 20 nm icosahedra. *Intervirology*, 1989, 30:177-180
- 27 Karan M, Harding R M, Dale J L. Evidence for two groups of banana bunchy top virus isolates. *J Gen Virol*, 1994, 75:3541-3546

湖北省暨武汉微生物学会第八届会员代表大会召开

湖北省暨武汉微生物学会第八届会员代表大会和学术年会于1997年4月28日~5月2日在洋溢着改革气氛的宜昌市胜利召开。参加这次大会代表共78人,来自30多个单位,都是湖北省从事微生物学工作的著名专家、学者的代表。本次会议收到论文65篇,《中国病毒学》为会议办了一期增刊,刊登20篇论文,其余45篇编成论文摘要。会议主要内容是学术交流、改选理事。代表们首先听取、讨论并通过了七届理事会理事长何添福研究员作的“七届理事会工作报告”,讨论并通过了修改的会章。然后由八位专家作大会学术报告,报告的题目分别是“现代微生物学技术发展趋势和对策”、“杆状病毒基因组结构的研究”、“动物体内正常菌群的研究进展”、“病原真菌的形态学研究”、“苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白的研究进展”、“庚型和已型肝炎病毒的研究进展”、“蛋白质工程与分析生物技术”。与会代表一致认为通过大会报告和分组交流,彼此切磋技艺、启迪思想、诱发新的学术生长点。大会代表民主选举了新一届理事会领导班子,接着召开了八届一次理事会和常务理事会。中国科学院武汉病毒所继续作为学会挂靠单位。这次大会是一次总结会、学术交流会、深化改革会,大会圆满完成各项任务。

中国科学院武汉病毒研究所 周春莲 梁莉