

香蕉束顶病毒研究进展

赵焕阁 牛胜鸟 华元刚 邱世明 王达新 刘志昕*

(中国热带农业科学院热带作物生物技术研究所热带作物生物技术国家重点实验室 海口 571101)

摘要: 香蕉束顶病毒 (Banana bunchy top virus, BBTV) 是引起香蕉束顶病害 (Banana bunchy top disease, BBTD) 的病毒, 它严重地危害了香蕉的生产。综述了近年来香蕉束顶病毒的分离提纯方法, 株系划分以及分类地位, 较为全面的介绍了 BBTV 病毒基因组分结构和各组分编码蛋白的功能等, 并提出了目前需要进一步澄清的问题。

关键词: 香蕉束顶病毒, 基因组结构, 编码蛋白

中图分类号: S432.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0154-04

The Advance in Research of Banana Bunchy Top Virus

ZHAO Huan-Ge NIU Sheng-Niao HUA Yuan-Gang QIU Shi-Ming
WANG Da-Xin LIU Zhi-Xin*

(Institute of Biotechnology Research for Tropical Crops/National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, CATAS, Haikou 571101)

Abstract: Banana bunchy top virus (BBTV) is the pathogen of banana bunchy top disease (BBTD); it seriously disservices the banana production. This paper reviewed the separation and purification methods, classifying and taxonomy status of BBTV; the genome structure and function of each encode protein of the virus; and the present problems that should be further clarified.

Key words: BBTV, Genome structure, Encode protein

香蕉束顶病 (Banana bunchy top disease, BBTD) 是香蕉上的一种重要病害, 它威胁着包括亚洲、非洲和南太平洋地区约世界四分之一的香蕉生产^[1], 它是由香蕉束顶病毒 (Banana bunchy top virus, BBTV) 引起的^[2]。由于香蕉汁液中含有大量单宁和酚类物质, 使得香蕉束顶病毒提纯非常困难, 直到 1987 年才被提纯成功^[3], 此后, 香蕉束顶病毒各方面的研究才有了较大的进展。本文着重从香蕉束顶病毒基因组分结构和各组分编码蛋白功能等方面进行综述。

1 香蕉束顶病毒的研究概况

香蕉束顶病毒 (BBTV) 严重危害世界各地香蕉产区的产量, 在我国广东、广西、福建、云南等省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^[4]。香蕉束顶病毒 (BBTV) 是靠香蕉交脉蚜 (*Pentalonia nigronervosa*) 以持久性方式传播, 机械摩擦不能传毒, 其寄主植物仅限于 6 种, 其中芭蕉属中的所有种、栽培种或型都是易感的^[2]。1991 年, 澳大利亚 Thomas 和 Harding 报道, 用台湾制备的单克隆抗体和他们制备的多克隆抗体能检测到世界几个香蕉束顶病主要病区的感病植株^[5]。1992 年孙茂林等利用云南香蕉束顶病株分离物制备了单克隆抗体, 并用于香蕉束顶病

* 通讯作者 Tel: (0898) 66895003, E-mail: ibttlzx@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-12-30, 修回日期: 2006-02-20

的诊断和病毒研究^[6]。1994年刘志昕等^[7]人以海南分离物为材料提纯出BBTV病毒颗粒,1997年蔡文启等人以漳州分离物为材料从具有典型香蕉束顶病病状的香蕉病组织中提纯了香蕉束顶病毒粒子,并对其理化特性进行了分析^[8]。1995年国际病毒分类委员会(ICTV)正式将BBTV归属于环状DNA病毒科(Circoviridae)矮缩病毒属(Nanovirus)。这一新病毒还可能包括地下三叶草矮化病毒(Subterran clover stunt virus, SCSV)、椰子叶腐病毒(Coxsart foliar decay virus, CFDV)、紫云英矮缩病毒(Milk vetch dwarf virus, MDV)、菜豆坏死黄花病毒(Faba bean necrotic yellow virus, FBNYV)。

Karan等^[9]对10个国家或地区11个BBTV分离物的DNA组分进行了克隆和序列分析,结果表明各BBTV分离物似乎可划分为两个大组,既南太平洋组(包括澳大利亚、布隆迪、埃及、斐济、一度、汤加和西萨摩亚)和亚洲组(包括菲律宾、越南和我国台湾),组内序列的差异为1.9%~3.0%,而组间序列的差异大约为10%左右,且序列的某些部分差异更大,但编码蛋白质(复制酶)的ORF差异约为5%。根据在香蕉品种台湾蕉和Williams上的反应、香蕉交脉蚜的传病率、毒株类型之间的交叉保护和血清学测定结果等,把香蕉束顶病毒区分为BBTV-S(重型)和BBTV-M(轻型)两个株系^[10]。两者均能引起香蕉叶片上的青筋症状且在血清学上也有密切的关系。根据寄主范围的差异,何自福等^[11]人初步认为广东BBTV存在2个株系即株系NSP(广州天河分离物)和株系NS(高州分离物),株系NSP能侵染香蕉(*Musnana*)、大蕉(*M. sapientum*)和粉蕉(*M. pisang-awake*),而株系NS(高州分离物)只能侵染前两者而不能侵染后者。

2 BBTV基因组DNA的组分结构

目前世界上对BBTV的认识基本趋于一致,即病毒为18nm~20nm的等径颗粒,基因组至少由6个大小约1.0~1.1kb的环状ssDNA组分所组成,分别命名为1、2、3、4、5、6。除组分1外,其他组分都是单顺反子,mRNA转录物3'末端都有PolyA信号和富含GT区,除BBTV DNA-2外,每个组分都有一个大的ORF(Open reading frame)。每个组分都由编码区和非编码区两部分组成。BBTV DNA组分非编码区有3个同源序列,即主要共同区(CR-M)、茎环共同区(CR-SL)和潜在的TATA box。主要共同区定位于茎环共同区的5'端,由66~92个核苷酸组成,在BBTV的主要共同区有一个16个核苷酸组成的近乎完全重复的序列和一个GC box,各组分间的同源性为76%。BBTV主要共同区由3部分组成:位于CR-M 5'端的Domain I,除DNA-1组分126个核苷酸缺失,其他组分间的同源性是80%,位于CR-M 3'端的Domain III由18个核苷酸组成,组分间的同源性是94%,Domain II位于1和3之间,由19个核苷酸组成,组分间的同源性是26%。BBTV各组分茎环共有区由69个核苷酸组成,组分间的同源性是62%。潜在的TATA box;一致序列为CTATA/TA/TAT/TA。

近来从台湾感病植物上又发现另外两类新的与BBTV相关的ssDNA组分,即1109个核苷酸组成的BBTV-S1和1095个核苷酸组成的BBTV-S2^[12],这两个组分与DNA1-6组分不同,其分布在不同的亚组中变化很大,尚未在欧洲分离物中分离到。Cathryn等人已证明BBTV的最小复制单位是由DNA1组成的,BBTV-S1和BBTV-S2可能与BBTV编码复制起始蛋白有关^[13]。它们不是BBTV的内在小基因,从分布情况和基因组结构来看,S1和S2可能是卫星DNA。

3 BBTV 各组分编码蛋白的功能

目前 BBTV 基因组 DNA1-6 组分的核苷酸序列已经测定, 并且各组分所编码蛋白的功能也有了进一步的阐明, 普遍认为 DNA1 编码复制起始蛋白, DNA3 编码外壳蛋白, DNA4 编码运动蛋白, DNA5 编码类 Rb 结合蛋白, DNA6 编码穿梭蛋白, DNA2 是否编码蛋白目前还不是很清楚。

Harding 等^[1]对澳大利亚分离物的一个组分进行克隆和序列分析, 获得含 1, 111nt 的环状 ssDNA, 并把它称为 BBTV DNA-1 组分。Burns 等人根据其序列推测 BBTV DNA-1 中存在一个小 ORF, 有 PolyA 信号和富含 GT 区; Beetham 等人^[14]通过 Northern 杂交和 3' RACE 分析证明 BBTV DNA1 中有两个 ORF, 大的 ORF 编码复制起始蛋白^[1]。小 ORF 完全在大 ORF 的编码框架内, 但相位不同, 编码分子量约为 5kD 的功能未知蛋白。

以前的研究认为 BBTV DNA-2 组分中没有合适的 TATA box 和 PolyA 信号, 因此认为 BBTV DNA-2 的 ORF 不能转录。Burns 等通过研究发现 BBTV DNA-2 组分中有一个合适、保守的 TATA box 和 PolyA 信号区, 但没有提出 DNA-2 中有 ORF; Beetham 等^[14]人通过 Northern 杂交和 3' RACE 发现 BBTV DNA-2 组分有转录的 RNA, 推测 DNA-2 组分的 ORF 可能是内部起始的, 而不同于 BBTV 的其它组分, 根据试验结果, Beetham 推测 BBTV DNA-2 可能是一个功能未知、分子量约为 10kD 的蛋白。同时人们发现 BBTV DNA-2 含有 110 个碱基的非翻译区, 推测这么长不翻译片段的功能可能是有利于自身的稳定, 且与其特定功能有关。2002 年, 徐春香等人对香蕉束顶病毒 DNA 组分 2 进行克隆和序列分析, 认为澳大利亚和夏威夷分离物中茎环结构共有区内所缺失的 15 个碱基, 在广东 2 个株系中却保持完整并高度保守^[15]。2004 年, 本实验室田娥等以海南分离物为材料对 BBTV DNA 序列进行了克隆和序列分析, 在海南分离物 DNA2 中发现了 135nt 的 ORF, 根据其上下游的特征推测这可能为海南分离物 DNA2 中一个正确的阅读框^[16]。

Burns 等人根据纯化的 DNA3 组分的核苷酸序列长度推测它可能编码外壳蛋白, 1997 年 Wanitchakorn 等人利用 BBTV 特异的单克隆抗体, 通过 Western 杂交以及核苷酸序列比较分析证实了 DNA3 编码分子量为 19. 6kD 的外壳蛋白^[17]。

包括 BBTV 的矮缩病毒属和双联体病毒属的病毒在胞间、胞内运动及长距离运输方面有共性, 双生病毒属中存在编码对胞间运动及长距离运输所不可缺少的蛋白 BC1 和 BV1。1995 年, Burns 等人发现 BBTV DNA4 组分编码蛋白的 N-末端有一小段疏水氨基酸残基, 据此推测它可能是病毒的运动蛋白。2000 年, Wanitchakorn 等^[18]首次利用绿色荧光蛋白 (GFP) 对 BBTV 的组分进行了细胞内的定位工作, 结果显示 BBTV DNA3、BBTV DNA6 分别定位于细胞核和细胞质, BBTV DNA4 定位于香蕉胚性细胞周边, 他们分别把 DNA3 和 DNA6 所编码的蛋白和 DNA4 编码的蛋白进行协同表达, 发现 DNA4 编码的产物能够使 BBTV DNA6 编码的产物在细胞中重新定位。BBTV DNA4 和 DNA6 编码蛋白的特征和 BC1、BV1 类似。这些结论初步证明了 DNA4 编码的是运动蛋白, DNA6 编码的是核穿梭蛋白, DNA4 编码的蛋白则是把 NSP-DNA 复合物运输到细胞外围。同时 Wanitchakorn 等人也对 BBTV DNA4 编码产物 N-末端的 29 个疏水残基的缺失做了 GFP 标记试验, 试验结果表明 N-末端 29 个疏水残基区域对细胞周边的定位是必须

的。2002年,孙德等人对BBTV中国漳州分离物DNA4编码区功能进行了研究,也推测DNA4具有编码运动蛋白的功能^[19]。

与BBTV同属一个科的蚕豆坏死黄化病毒(FBNTV)证明能编码一种叫Clink的蛋白,它能结合人类成视网膜细胞瘤蛋白(Rb蛋白)且在共侵染时,能增强FBNTV编码Rep蛋白基因的复制能力,由于BBTV DNA5与FBNTV的NA10具有相似的序列,二者的基因产物具有相似的功能。Rb蛋白在动物病毒中存在一个保守的基元序列LXCXE,2000年,Wanitchakorn等人发现BBTV DNA5编码蛋白的C-末端的第111~115氨基酸残基处为LYCDE^[18],同时也发现在其他矮缩病毒属病毒中也有相似的基序。Raltham等人通过酵母双杂交试验证明BBTV DNA5的编码蛋白有与成视网膜瘤(Rb)蛋白结合的活性,这一活性依赖于完整的LXCXE基序,C残基或E残基的缺失就会使其完全失去结合Rb蛋白的活性^[18]。2005年,郑耘等^[20]对克隆到的BBTV NSP株系DNA-5的基因进行了序列比较和分析,发现NSP组分5含有序列LYCDE,并对其蛋白质二级结构和性质进行了预测。这些结果显示BBTV DNA5的基因产物是类似Rb蛋白并且可能对细胞寄主细胞分裂的操纵起重要作用。

4 小结

近年来随着对香蕉束顶病毒及各组分编码蛋白功能的研究进一步加深,世界上对香蕉束顶病毒的认识也逐渐趋于一致,但仍然有许多问题有待进一步澄清。例如BBTV全基因组除了已报道的6个组分外,是否还有其他组分?组分2和组分6的具体功能是什么?BBTV DNA组分编码产物在病毒侵染及传播过程中的作用?香蕉束顶病毒是如何与寄主相互作用从而影响植株的正常生长和发育?这些问题都有待进一步解决。

参考文献

- [1] Dale J L. *Advances in Virus Research*, 1987, **33**: 301~325.
- [2] Harding R M, Burns T M, Hafner G J, *et al.* *Journal of General Virology*, 1993, **74**: 323~328.
- [3] Su H J. *Journal of Physiopathology*, 1990, **128**: 203~2083.
- [4] 徐邵华, 蔡文启. *微生物学报*, 1993, **33** (1): 158~161.
- [5] Eand Dietzen R G. *Journal of General Virology*, 1991, **72**: 2731~2244.
- [6] 孙茂林, 庄俊英. *西南农业学报*, 1992, **5** (3): 75~79.
- [7] 刘志昕, 郑学勤. *热带作物学报*, 1994, **15** (5): 37~40.
- [8] 蔡文启, 宋春华. *微生物学通报*, 1997, **37** (4): 252~257.
- [9] Karan M, Harding R M, Dale J L, *et al.* *J Gen Virol*, 1994, **75** (12): 3541~3546.
- [10] Katul L, Vetten H J. *Ann Appl Biol*, 1993, **123** (3): 629~647.
- [11] 何自福, 李华平, 肖火根, 等. *植物病理学报*, 2001, **31** (1): 50~55.
- [12] Horser C L, Karan M, Harding R M, *et al.* *Archives of Virology*, 2000, **145**: 1~6.
- [13] Cathryn L, Horser C L, Robert M L. *Journal of General Virology*, 1982. 459~465.
- [14] Beetham P R, Hafner G J, Harding R M, *et al.* *J Gen Virol*, 1997, **78**: 229~236.
- [15] 徐春香, 肖火根, 李华平, 等. *植物病理学报*, 2002, **32** (2): 189~190.
- [16] 田 娥, 庄 军, 刘志昕. *农业生物技术学报*, 2004, **12** (6): 680~684.
- [17] Wanitchkorn R, Harding R M, Dale J L. *Arch Virol*, 1997, **142**: 1673~1680.
- [18] Wanitchkorn R, Harding R M. *Journal of General Virology*, 2000, **81**: 299~306.
- [19] 孙德俊, 孙 卉, 魏红艳, 等. *自然科学进展*, 2002, **7**: 708~712.
- [20] 郑耘, 阮小蕾, 李华平, 等. *中国病毒学*, 2005, **20** (3): 311~314.