

香蕉束顶病毒研究新进展

余乃通^{1,2} 刘志昕^{1*}

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 农业部热带作物生物技术重点开放实验室 海南 海口 571101)
(2. 海南大学环境与植物保护学院 海南 海口 570228)

摘要: 介绍香蕉束顶病毒从发现到诊断和检测, 从分子生物学研究到抗病毒基因工程, 探究香蕉束顶病毒 100 多年的研究历程, 为香蕉束顶病毒的深入研究和有效防治奠定了坚实的基础。

关键词: 香蕉束顶病毒, 研究进展, 生物学特征, 检测, 抗病毒基因工程

New research advance of banana bunchy top virus

YU Nai-Tong^{1,2} LIU Zhi-Xin^{1*}

(1. Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS, Haikou, Hainan 571101, China)
(2. College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: This paper describes a comprehensive from discovery to diagnosis and testing, from molecular biology to anti-viral genetic engineering of banana bunchy top virus (BBTV), and exploring history of one hundred years of BBTV. This is the bases of depth investigation and effective control of BBTV.

Keywords: BBTV, Research advance, Biological characteristics, Detection, Anti-virus genetic engineering

香蕉束顶病(Banana bunchy top disease, BBTD)的病原为香蕉束顶病毒(Banana bunchy top virus, BBTV)。1889 年, 该病首先在斐济被发现, 之后在澳大利亚、印度、巴基斯坦、印度尼西亚、中国台湾、加蓬、太平洋诸岛屿、埃及、中国大陆、刚果、菲律宾、越南等其他国家和地区陆续报道。20 世纪, 香蕉束顶病成为香蕉上重要的毁灭性病害之一, 该病威胁着亚洲、非洲和南太平洋地区共约世界 1/4 香蕉产区的生产。在中国, 早在 1900 年就有关于

BBTD 的记载。到了 20 世纪 50 年代和 90 年代, BBTD 在福建、广东、广西、云南和海南等香蕉主要产区流行, 造成重大经济损失, 严重影响了当时香蕉产业的发展。虽然通过挖除病株、防治蚜害以及栽培无病蕉苗等人工手段可很大程度上防治 BBTD, 但对管理不当或无人管理的蕉园, 该病仍具有很大的危害。为此, 本文全面介绍了香蕉束顶病毒从发现到诊断和检测, 从分子生物学研究到抗病毒基因工程进展, 探究了 BBTV 100 多年的研究历程, 为

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31070131); 中央级公益性科研院所基本科研业务费(No. ITBBZD0754)

* 通讯作者: Tel: 86-898-66890770; ✉ itbblzx@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-09-20; 接受日期: 2010-11-24

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

BBTV 的有效防治奠定了坚实的基础。

1 BBTV 生物学特征

1.1 BBTV 传播方式及寄主

国内外研究表明, BBTV 不能通过汁液摩擦或土壤传播, 植株根部自然交接和菟丝子也均不能传播, 仅由香蕉交脉蚜(*Pentalonia nigronervosa*)以持久方式传播^[1-2]。BBTV 的短距离传播靠香蕉交脉蚜传染, 而远距离传播则靠带病的繁殖材料。目前已报道的寄主有 8 种, 均属芭蕉科, 包括香蕉、大蕉、粉芭蕉、蕉麻、长梗蕉、尖苞片蕉、班克氏芭蕉、象腿蕉^[3]。

1.2 主要症状

香蕉束顶病在香蕉整个生长季节均可发生。苗期染病植株主要呈矮缩状, 新抽叶片变短变窄, 束状丛生, 叶脉上首先出现深绿色点线状的“青筋”; 中苗期染病植株新抽嫩叶初呈黄白色, 后逐渐变暗至暗色条纹, 并向主脉扩展; 孕穗后期染病, 新抽嫩叶失绿, 易脆, 抽穗停滞; 初穗期染病, 病株呈花叶状, 穗轴不再下弯, 香蕉停止生长; 抽穗后期染病, 香蕉同样停滞生长, 病株根系生长不良或烂根, 假茎基部微紫红色, 解剖假茎可见褐色条纹, 外层鞘皮随叶子干枯变褐或焦枯^[4], 少数晚期受害的则果形变细、果味变淡, 失去商品价值^[5]。

1.3 细胞形态学结构和病害生理

染病植株细胞形态变狭小, 内容物减少, 少数细胞的细胞壁留有类似于病毒侵染形成的内含体结构, 叶绿体数量明显减少, 有些细胞甚至无叶绿体。残存的叶绿体较小, 基粒进化不完整或基粒层断裂, 影响光合产物的形成, 使细胞生长异常^[6]。

研究表明 BBTV 侵染香蕉后, 首先导致过氧化物酶、多酚氧化酶和苯丙氨酸解氨酶等酚类物质代谢酶类的含量和活性迅速增加, 这对病毒在侵染前期的抑制起到一定缓解作用。由于 BBTV 的继续复制和组装, 接着内源激素代谢平衡被破坏, 细胞分裂素和赤霉素含量降低, 寄主细胞分裂减少, 细胞生长缓慢, 使细胞中叶绿体进化受到影响, 最终导致寄主的光合作用受阻, 病株生长缓慢、叶片黄化和逐渐矮缩枯死^[6-8]。此外, 染病植株的酪氨酸含量

显著低于健株^[9], 碳水化合物含量升高, 氮素含量下降, 病株 C/N 高于健株^[10], 根部的磷活性也显著低于健株^[11]。

1.4 BBTV 病害的动态研究

BBTV 侵染香蕉后, 植株上的病害潜育期长短、病害发生的轻重与品种类型、蕉苗质量、生育龄期、种植年限、蕉蚜数量、栽培管理措施、气候、土壤和地理位置有关。

香蕉束顶病流行的主要侵染源为染病植株, 粉芭蕉和大蕉上的潜育期比香蕉上的潜育期长, 在病区中的长期定殖和流行中起重要作用。BBTV 具有夏季潜育期短, 秋冬季潜育期较长的特点^[12]。在老蕉园, BBTV 的潜育期很长, 甚至在一些香蕉头上可长期潜伏, 在合适条件下, 再生吸芽后可表现典型的症状^[13]。而新蕉区侵染源多来自传入的染病苗株, 同样有香蕉交脉蚜介体也可引起病害流行。

研究发现, 不同 BBTV 株系不同香蕉品种类型之间发病的差异明显, 同一株系同类型品种间发病差异不明显^[14]。来源于斐济的 BBTV 弱毒系感染当地香蕉品种“维玛玛”(Veimama)后仅表现轻微的病症, 植株生长正常, 但产量减少 25%左右。何自福等的研究表明, 广东 BBTV 各分离物可以划分为两个株系, NSP 株系(广州天河分离物)和 NS 株系(高州分离物), NSP 株系能侵染香蕉、大蕉和粉蕉, 而 NS 株系不能侵染粉蕉^[15]。

BBTV 病害发生与各地的温度及香蕉生长季节有关。在我国福建, 一般 4-6 月为发病高峰期; 在云南, 5-7 月为发病高峰期^[16]; 在中国台湾, 7-8 月为发病高峰期^[17]。在干旱少雨季节由于香蕉交脉蚜繁殖量和有翅蚜变得较多, BBTV 发生量就大。在雨多、天气潮湿的年份和季节, 香蕉交脉蚜死亡较多, 此病发生较少。而在低温、少雨季节, 症状尚未表现, 到高温时就会表现出来。

研究表明, 染病植株在蕉园中呈现均匀的空间分布型, 病株密度愈高, 分布愈均匀, 无明显的发病中心。显症病株周围有一定数量的无症状“健株”, 这些“健株”中只有一部分是带病毒的, 而其它的则是真正的健株^[18]。这从理论上说明要通过铲除染病植株来控制病害的发生, 在铲除病株的同时, 须铲除

病株周围多少“健株”才最有效的问题^[19]。实际上,防治 BBTV 最重要的是及时和坚持不懈地铲除显症的病株,同时也要防止香蕉交脉蚜的传毒^[18]。

2 BBTV 分子生物学研究进展

香蕉束顶病毒由于寄主范围窄、只侵染香蕉韧皮部组织、病毒含量极低等特点^[20],致使提纯病毒需要大量的染病香蕉。此外,香蕉植株中含有大量的乳汁和多酚类物质,提纯难度较大。直到 1987 年 BBTV 首次提纯成功后,其后分别报道了该病毒的单克隆抗体制备^[21-22]及病毒检测方法^[22],并对其寄主^[3]、株系^[23]及流行病学^[12]进行研究,同时分子生物学相关技术的不断发现和改进也促进了 BBTV 的分子生物学研究。

2.1 BBTV 的分类地位

2005 年国际病毒分类委员会(The International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)发表的第 8 次植物病毒分类报告中,正式将 BBTV 归到新成立的矮缩病毒科(*Nanaviridae*)香蕉束顶病毒属(*Babuvirus*),该属只有 BBTV 一种病毒。

2.2 BBTV 株系分化

BBTV 在传播方式上与蕉麻束顶病毒(*Abacá bunchy top virus*, ABTV)相似,仅由香蕉交脉蚜以持久方式传播。ABTV 致使蕉麻黄化,但不侵染香蕉;而 BBTV 不仅能感染香蕉,还能感染蕉麻^[23]。系统进化分析表明,ABTV 和 BBTV 位于同一个进化支中,二者编码的外壳蛋白(Coat protein, CP)的氨基酸同源性为 79%–81%,基因组各组分之间的同源性也有 54%–76%;但是,二者在血清学上也有很大的区别,只有 20%的 BBTV 单克隆抗体能够与 ABTV 发生阳性反应^[24]。

对来自 14 个国家和地区 54 个分离物的 DNA 1 进行了系统进化树分析,结果发现:BBTV 可以分为两组,即南太平洋组(包括澳大利亚、布隆迪、埃及、斐济、印度、巴基斯坦、汤加和西萨摩亚)和亚洲组(包括中国大陆、中国台湾、菲律宾、越南和日本),组内序列差异为 0.9%–6.9%,组间序列差异大约为 10%–23.8%,编码 Rep 蛋白质的 ORF 差异约为 5%^[25-26]。澳大利亚分离物的多克隆抗体以及中

国台湾分离物的单克隆抗体都与来自澳大利亚、中国台湾、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,也表明了 BBTV 可能共有一个病原体^[27]。

2.3 BBTV 形态结构和理化特性

1987 年,BBTV 由中国台湾学者吴瑞玉首次提纯成功^[28]。之后,Iskra^[29]、Thoma 等^[30]、Harding 等^[31]、孙茂林等^[21]、刘志昕等^[32]及蔡文启等^[33]分别报道了香蕉束顶病毒粒子的提纯工作。目前一致认为,BBTV 为 18 nm–20 nm 的等轴二十面体粒子^[25],在 Cs₂SO₄ 中浮力密度为 1.28–1.29 g/mL,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值为 1.33,沉降系数为 46 S。BBTV 粒子在 1% (W/V)的乙酸双氧铀、PBS (pH 7.4)或 0.1 mol/L 磷酸钾溶液中均稳定;而在 pH 8.5、0.1 mol/L Tris-HCl 或 0.1 mol/L 硼酸中,大多数病毒粒子被破坏;在 pH 9.6、0.05 mol/L 的碳酸盐溶液中病毒粒子几乎完全被破坏。ELISA 数据表明,冷冻或抗体检测过程中,脱脂牛奶能够保护病毒颗粒的降解^[30]。

2.4 BBTV 基因组结构研究

BBTV 基因组至少由 6 个大小约 1.0–1.1 kb 的环状 ssDNA 组分组组成,分别命名为 1、2、3、4、5、6 组份^[31],都由编码区和非编码区两部分构成^[20,34-35]。在编码区内,除组分 1 编码大小 2 个 ORF (Open reading frame)外,其他组分均是单顺反子^[34]。mRNA 转录物 3'末端都有 PolyA 信号和富含 GT 区,且 GC 区有 TTG 三核苷酸序列^[35]。在非编码区有 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^[34]。主要共同区定位于茎环共同区的 5'端上游,由 66–92 个核苷酸组成,其内有一个 16 个核苷酸组成的近乎完全重复序列和一个 GC box,各组分间的同源性为 76%。CR-M 由位于 CR-M 5'端的 Domain I,位于 CR-M 3'端的 Domain III,以及位于 I 和 III 之间的 Domain II 组成。研究表明,CR-M 含有内源 ssDNA 引物的结合位点,能引发全长互补链在体外合成^[36]。CR-SL 的环上有一个高度保守的 9 核苷酸序列(5'-TANTA TTAC-3')。TATA box 是介于 CR-SL 和 ORF 间的转

录识别序列, 其一致序列为 CTATa/ta/tAt/Ta。

2.5 DNA 1-6 组分编码蛋白研究

DNA 1 是 BBTV 基因组中最早被克隆和测序的一个组分, 包含一个大的 ORF, 编码一个分子量约 33.6 kD 的复制起始蛋白(Replication initiation proteins, Rep)^[31]。分析发现 DNA 1 转录物的多聚腺苷酸信号 AATAAA 和 GT 富集区非常保守^[25,34], 与真核生物终止信号一致^[37-39]。Rep 蛋白含有一个 dNTP-结合基序(GGEGKT), 能与茎环共同区环上的 9 核苷酸序列结合^[40]。与 *Geminiviruses* 编码的 Rep 一样, 在体外表达麦芽糖结合蛋白与 Rep 的重组蛋白具有特异性切割和连接活性, 这是滚环复制起始蛋白的共性^[41]。Northern 杂交和 3'-RACE 分析证明其内部还有一个小 ORF, 但其编码框相位与 Rep 蛋白不同, 是以 a+2 编码框存在于 Rep ORF 内部, 编码分子量约为 5 kD 的未知功能蛋白^[36], 有一个相对较长的 3'非翻译区, 具有 PolyA 信号和富含 GT 区^[34,42]。

BBTV 澳大利亚 DNA 2 组分中有一个合适、保守的 TATA box 和 PolyA 信号区^[34]; 通过 3'-RACE 和 5'-RLM-RACE 发现 DNA 2 组分能够转录产生 mRNA, 3'非翻译区含有一个终止信号((C/T/A)TGTA), 5'非翻译区有一个非常保守的 TATA box (CAATAATTA)^[43]。推测其 DNA 2 编码一个功能未知、分子量约为 10 kD 的蛋白^[35]。2004 年, 田娥等克隆了 BBTV Hainan 分离物 DNA 2 组分, 并推测一个由 135 nt 组成的 ORF^[44]。2010 年, 冯团诚等克隆了 BBTV Haikou 分离物 DNA 2 组分, 并推测一个由 177 nt 组成的 ORF^[26]。

Burns 等人对 DNA 3 组分核苷酸序列进行分析, 发现其编码一个约 20 kD 的蛋白质, 推测可能为外壳蛋白^[34]。Beetham 等人通过 Northern 杂交和 3'-RACE 发现 BBTV DNA 3 组分为单顺反子, 编码一个 ORF^[35]。1997 年 Wanitchakorn 等人表达纯化了麦芽糖结合蛋白(Maltose binding protein, MBP)与 CP 的重组蛋白, 并制备了高滴度的 BBTV 特异性多克隆抗血清, 通过 Western 杂交以及核苷酸序列比较分析, 证实了 DNA 3 编码分子量为 19.3 kD 的外壳蛋白^[45]。

DNA 4 转录产物 3'端有一个 167 bp 的非翻译区^[35], 其编码蛋白的 N-末端有一小段疏水氨基酸残基的 α 折叠结构, 推测该蛋白可能为运动蛋白(Movement protein, MP)^[34]。利用绿色荧光蛋白(GFP)对 BBTV 各组分编码蛋白进行了胞内定位, DNA 4 编码蛋白定位于香蕉胚性细胞周边, DNA 4 和 6 编码蛋白协同表达后发现 DNA 4 编码的产物能够使 DNA 6 编码的产物在细胞中重新定位; DNA 4 编码产物 N-末端的 29 个疏水残基的缺失试验结果表明, N-末端 29 个疏水残基区域对细胞周边的定位是必须的^[46], 表明 DNA 4 编码蛋白对胞间运输及长距离运输是不可缺少的^[47-48]。这些结论初步证明了 DNA 4 编码的是运动蛋白, 能够把 NSP-DNA 复合物运输到细胞外围。孙德俊等也证明 DNA 4 具有编码运动蛋白的功能^[51]。

DNA 5 组分含有一个大的 ORF, 编码约 20 kD 的 Rb-结合蛋白(Rb-binding-like protein), 其 C-末端第 111-115 氨基酸残基处含有一个 LXCXE motif^[35,46]。酵母双杂交试验证明 DNA 5 编码的蛋白具有与视网膜瘤(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^[46]。Rb 结合蛋白在病毒感染早期表达, 能够改变细胞内环境以适应病毒 DNA 的复制^[50], 这一结果也支持了 DNA 5 启动子在香蕉胚性细胞内高水平表达的结论^[51]。

DNA 6 编码核穿梭蛋白(Nuclear shuttle protein, NSP)^[46]。NSP 定位于细胞质, 能与 MP 进行协同表达, 且 NSP-DNA 复合物能被 MP 运输到细胞外围^[46-47,52-53]。对双生病毒属的研究表明, NSP 还能够协同 MP 促进病毒 DNA 在细胞与细胞之间的运输^[53-54], 且 NSP 作为一种毒力因子能够抑制这些跨膜受体激酶的活性^[55], 因此, 推测 BBTV DNA 6 编码蛋白很可能具有类似的功能。

2.6 BBTV 启动子的研究进展

BBTV DNA 1-6 组分的转录产物均已被鉴定, 通过在烟草和香蕉胚性细胞中各组分启动子间的活性不同^[51], 说明 BBTV 各组分的基因间隔序列区具有启动子功能^[35,42]。DNA 1 启动子低水平表达, 说明 Rep 在整个 DNA 复制过程中处于一个相对较低

的水平,被其他调控蛋白所调控^[51]。

DNA 2 和 3 的启动子具有组织特异性, DNA 3 组分在韧皮部特异表达活性;而重组了 DNA 2 和 3 的启动子,在叶肉、叶缘及一些叶脉上检测到弱 GUS 活性,类似于在烟草中的组成型表达,说明 DNA 2 组分转录方式可能有异于 DNA 3 组分^[56]。

DNA 4 和 DNA 5 启动子启动高水平的 GFP 瞬时表达,这说明 DNA 4 和 5 编码基因是在侵染的早期表达,且 BBTV 漳州分离物 DNA 4 启动子在单子叶植物和双子叶植物中均能够驱动外源基因的表达^[49]。在转基因烟草中, DNA 6 启动子驱动组织特异的 GFP 表达,仅仅限于叶、根、气孔的韧皮部和根部分生组织。这些说明, BBTV 启动子能够适用于在未分化的细胞中高水平表达,而且呈现组织特异的表达^[51]。

对 DNA 6 启动子研究表明,其 5'端的 272 bp 有启动子活性下调作用^[42]; CR-SL 和 TATA box 之间的顺式元件 G-box 和 Ibox 在启动子活性中起抑制作用;当缺失了含有 TATA box 的 DNA 6 启动子 3'末端的 147 bp 序列,启动子活性跟背景一样;进一步研究发现, CR-SL 3'端的 56 bp 至少贡献一半的启动子活性,这个区域含有一个 10 bp 的 CATGACGTCA 序列,与 *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA 启动子中 OCS 元件(Octopine synthase, OCS)的 3'末端同源性很高。综合上述这些结果表明, CR-M 和 CR-SL 并非启动子活性所必须,而含有强启动子活性的所有元件则是位于翻译起始密码子之前的 239 bp 序列^[51]。

2.7 BBTV 沉默抑制子

近年来, RNA 沉默技术是比较热门的一个领域,而抑制 RNA 沉默的 RNA 沉默抑制子的研究更是热门领域中的翘楚,一些植物或动物病毒编码 RNA 沉默抑制子而更易实现病毒感染。到目前为止, RNA 和 DNA 病毒中已经发现超过 20 个 RNA 沉默抑制子^[57]。

BBTV DNA 1、3、4、5、6 组分研究表明, B3(DNA 3 ORF)和 B4(DNA 4 ORF)基因具有 RNA 沉默抑制子活性。B4 基因可提高瞬时和稳定的基因表达,但 B3 基因只对瞬时的基因表达起作用,它们的行为可能在 RNA 沉默途径中的不同步骤起作用^[57],是矮

缩病毒科中首次报道的 RNA 沉默抑制子,有助于更好地理解这些基因的功能和控制香蕉束顶病毒病害。

3 BBTV 检测技术

最早, BBTD 的识别仅仅依赖于肉眼的定性观察,而缺乏定量的检测方法。在局限于肉眼观察未显症状蕉苗时,高灵敏度的定量检测技术就显得十分重要。至今,已成功应用的检测方法有 ID-ELISA、DAS-ELISA、同位素/非同位素标记核酸探针的 Dot-blot 或 Southern blot、PCR 以及免疫吸附电泳法等。

吴瑞玉等^[22]用获得的中国台湾分离物提纯病毒制备了单克隆抗体,用于 ELISA 和免疫荧光检测田间病株及传毒蚜虫,并首次提出 BBTD 的诊断方法。Wu、Thomas 以及孙茂林等先后利用 BBTV 提纯物制备了多克隆抗血清和 McAb,并成功用于 BBTV 的检测^[21-22,30]。

1991 年, Harding 等首次成功应用 ³²P 标记的核酸探针 Dot-Blot 法对 BBTV 进行检测^[31]。1994 年 Xie 和 Hu 首次将 Digoxigenin 标记的 cDNA 探针应用于 BBTV 的检测^[58]。随后,孟清等^[59]也建立了 Digoxigenin 标记的核酸探针杂交检测技术,并对染病植株中不同部位的 BBTV 分布情况进行了初步研究。

PCR 检测法是植物病毒最有效和灵敏的检测方法,在实验室中已经得到广泛的应用,但不适合田间大规模检测。标准 PCR 技术能检测出仅相当于 80 ng 香蕉组织的 BBTV,也能检测单头带毒蚜虫的 BBTV^[58,60]。随后,免疫捕捉 PCR (IC-PCR)和直接结合 PCR (DB-PCR)检测方法都被成功地应用于高灵敏、专化地检测染病香蕉样品或单头带毒蚜虫,用 IC-PCR 和 DB-PCR 可分别从稀释 10^{-3} (相当于 4 μ g 的叶组织)和 10^{-1} (相当于 400 μ g 的叶组织)倍的香蕉病样粗提液中检测出 BBTV^[60-61]。

ELISA 适用于大量样品的检测,但灵敏度差;单抗制备过程复杂,且无法区分出不同的 BBTV 株系。而单克隆抗体与多克隆抗体相结合的方法对 BBTV 进行检测可大大提高其检测灵敏度^[44,62]。这

种单抗的特异性与多抗的多位点相结合的检测技术的建立与应用, 为香蕉束顶病的检疫、田间病害诊断、抗病育种和培育无毒苗等提供了快速、准确的检测手段。值得提出的是, 此法适用于检测病毒含量低、未显症的香蕉试管苗, 这对作为防治香蕉束顶病的主要措施之一的香蕉无毒试管苗的推广具有现实意义。

比较 ELISA、Dot-blot 和 PCR 法的灵敏度和适用性, 结果表明, 血清学特异性的 DAS-ELISA 检测 BBTV 的灵敏度为 1:250 (相当于 0.4 mg 叶组织), 非同位素标记的核酸探针 Dot-blot 及 Southern blot 的检测灵敏度也均达到 0.4 mg 叶组织, 同位素标记的核酸探针 Dot-blot 的检测灵敏度则能达到 0.08 mg 叶组织^[20,58], 标准 PCR 技术能检测出仅相当于 80 ng 香蕉组织的 BBTV, IC-PCR 法的灵敏度比 DAS-ELISA 高 100 倍, 而 DB-PCR 与 DAS-ELISA 相当^[60]。虽然 IC-PCR 的灵敏度比标准 PCR 稍低, 但省去了总 DNA 提取步骤, 即省时又简单方便, 还免去接触苯酚和氯仿等有毒物质, 因此, 可应用于大量样品检测。而田间病害的常规诊断则可用灵敏度稍低, 但更简单的 DAS-ELISA 方法。比较结果表明, BBTV 检测过程中, DAS-ELISA 法以及非同位素标记的核酸探针杂交检测法经济适用, 但是同位素标记的核酸探针杂交法特别是 PCR 法的检测灵敏度更高。

4 BBTV 的防治

4.1 传统防治措施

香蕉束顶病至今尚属“不治之症”, 预防至关重要。首先, 要加强蕉苗市场管理, 杜绝调运病区蕉苗, 禁止未经检疫的试管苗上市。其次, 实行稻蕉轮作, 尤其是对那些不宜水稻生长的烂泥田, 种上香蕉不但长势健, 几年之后再种水稻, 改变了以前那种秧苗生长不良的状况, 从而获得粮蕉好收成^[63]。最后, 施药防治蚜虫, 切断虫媒, 可用抗蚜威、敌杀死、氧化乐果等。

化学药物防治和加强田间管理为辅。稀土治病, 稀土加醋溶解后, 从顶心慢慢往下滴灌注入蕉杆,

病株可恢复正常生长, 防治初发症状, 尤为明显。合理施用氮、磷、钾比例, 提高抗性和免疫力, 切忌偏施氮肥; 在束顶病初发时, 施用抗病毒剂进行防治^[64]。

开展脱毒的研究。曾继吾等人用感染 BBTV 的巴西蕉离体再生和超低温保存技术, 使再生植株的 BBTV 脱除率达到 60.6%^[65]。

4.2 抗病毒基因工程

20 世纪 80 年代后期转基因技术应用以来, 抗病毒基因工程得到了迅速的发展, 抗病毒育种进入了一个全新的时代。1980 年, Hamilton 首次提出将病毒基因导入植物使植物获得抗病毒特性的建议, 迄今这种可能性已在许多病毒-植物系统中得到了证实。一般来说, 有两大类抗植物病毒的遗传工程, 第一大类是由抗性品种提供的抗性遗传工程, 第二大类是来源于病毒病原物基因的抗性遗传工程^[66]。

加强香蕉的抗性育种, 主要包括抗虫、抗病、抗寒育种的研究。从目前生物技术的研究水平来看, 可以从诱变育种、体细胞杂交、基因工程等途径开展工作。根据目前所掌握的文献来看, 对 BBTV 抗性品种的筛选还未见相关报道。可能有以下几点原因: (1) BBTV 的 6 个组份中至少 2 个组份编码沉默抑制子(DNA 2 未研究)^[57], 对香蕉寄主具有很强的致病性。(2) 至今还未发现相关抗性品种, 以及对抗 BBTV 的诱变育种等研究较少。(3) 虽然 BBTV 对寄主的致病性强, 但因其寄主范围窄、传播方式单一等特点, 可通过铲除病株和防治胶脉蚜等手段在很大程度上减少损失。

转基因抗病毒工程转入的通常是外壳蛋白基因、复制酶基因和运动蛋白基因。自从烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)外壳蛋白基因转入烟草中表达而使烟草获得一定程度的抗 TMV 特性后, 转基因植物抗病毒工程在其他植物上取得了飞快的发展。香蕉转基因研究逐渐成为国内外植物分子生物学的热点, 但目前所见的报道仍然不多。最早是以悬浮细胞或原生质体为受体材料, 电击法或基因枪法进行轰击处理, 检测到了报告基因的瞬时表达^[67-69], 如我国学者徐立新等^[70]、张银东等^[71]

以香蕉无菌苗基部新生的茎尖将 GUS 及 CMV-BH 外壳蛋白基因导入受体组织。May 等^[72]初步建立了另一种外源基因转化香蕉的体系。2001 年, Ganapathi^[73]等利用农杆菌介导法表达外源基因。

2009 年, 澳大利亚培育出转基因抗香蕉枯萎病蕉苗, 用于田间种植^[74]。以色列也成功完成了转基因香蕉抗线虫田间试验, 但是由于抗性基因漂移, 已经被世界上绝大部分国家禁止使用。在国内, 目前转基因香蕉成功率还很低, 未能达到产业化。

5 展望

从上述研究进展可以看出, 目前, BBTv 研究的热点集中在分子生物学和转基因抗病育种。国内外对 BBTv 各组分所编码蛋白功能验证及基因转录调控方面的研究相对较少。因此, BBTv 侵染性克隆验证蛋白功能, 以及各组分非编码区调控元件作用机制的研究势在必行。搞清楚这些调控元件都有哪些蛋白因子, 它们是由病毒编码, 还是由寄主编码。具体而言, 要阐明 BBTv 侵染香蕉寄主后是怎样识别进入寄主细胞、转录因子如何调控基因的表达、病毒粒子如何组装以及每个组份编码蛋白的功能作用? 鉴定以上问题至关重要, 这将是今后 BBTv 需要探讨的主要问题。

目前, 国内对 BBTv 的研究出现一个瓶颈, 即如何成功的把外源基因转到寄主香蕉中并表达。虽然澳大利亚已经成功培育出转基因香蕉, 但国内研究进展较慢, 主要存在该方法对国内的香蕉品种是否可用以及这个技术何时能引进中国等问题。总之, 我们将深入研究这些问题, 这个影响香蕉生产达一个多世纪的病害在未来几年内有可能解决。

同时还有许多问题有待于进一步澄清, 例如, BBTv 全基因组除了已报道的 6 个组分外是否还有其它组分? 虽然在国内外的一些分离物中克隆得到了其他组分^[75-76], 但是对该组分的研究尚处于起步阶段; DNA 1 小 ORF 和 DNA 2 的 ORF 是否编码蛋白以及功能分别是什么? 病毒在寄主体内复制机理? 此外, 进一步需要研究的问题还有 BBTv 与香蕉寄主相互作用的生理病理等分子机理。

参考文献

- [1] Magee CJ. Some aspects of the bunchy top disease of banana and other *Musa* spp.[J]. Journal and Proceedings of the Royal Society of New South Wales, 1953, 87: 3-18.
- [2] Kolkaila AM, Soliman AA. The bunchy top virus disease of bananas and its vector, the aphid *Pentalonia nigronervosa* coq. Soc[J]. Fouad I Entomol, 1955(38): 785-803.
- [3] Dala JL. Banana bunchy top: an economically important tropical plant virus disease[J]. Adv Virus Res, 1987, 33: 301-325.
- [4] 周仲驹, 陈启建, 林奇英, 等. 香蕉束顶病的研究 II. 病害的症状、传播及其特性[J]. 福建农学院学报: 自然科学版, 1993, 22(4): 428-432.
- [5] 伦璇, 钟毅敏, 陆东雯. 香蕉束顶病病原的电镜观察[J]. 电子显微学报, 2000, 19(3): 343-344.
- [6] 张海保, 朱西儒, 刘鸿先. 香蕉束顶病株的细胞超微结构的电镜观察[J]. 热带亚热带植物学报, 1999, 7(1): 84-86.
- [7] 张海保, 朱西儒, 刘鸿先. 香蕉束顶病毒(BBTv)侵染对寄主内源激素的影响[J]. 植物病理学报, 1997, 27(1): 79-83.
- [8] 周仲驹, 徐平东, 陈启建, 等. 香蕉束顶病毒的寄主及其在病害流行中的作用[J]. 植物病理学报, 1998, 28(1): 67-71.
- [9] Nair PKB. Effect of bunchy top virus infection on the free amino acid and amide composition of banana[J]. Agri Res J Kerala, 1970(8): 137-138.
- [10] Nair PKB, Wilson KI. Effect of bunchy top virus infection on the carbohydrate and nitrogen contents of banana leaves[J]. Agri Res J Kerala, 1972, 10(1): 38-41.
- [11] Mohan NK, Rao VNM. Distribution of P32 in healthy and bunchy top diseased 'Robusta' banana[J]. Indian J of Agric Sci, 1986, 56(7): 543-544.
- [12] 周仲驹, 林奇英, 谢联辉, 等. 香蕉束顶病的研究 I. 病害的发生、流行与分布[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 1993, 22(3): 305-310.
- [13] 周仲驹, 林奇英, 谢联辉, 等. 香蕉束顶病毒株系的研究[J]. 植物病理学报, 1996, 26(1): 63-68.
- [14] Sharma SR. Banana bunchy top virus[J]. Int J Tropical Plant Diseases, 1988(6): 19-41.
- [15] 何自福, 肖火根, 李华平, 等. 香蕉束顶病毒 NS 株系 DNA 组分 6 的克隆及序列分析[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(3): 36-39.
- [16] 孙茂林, 张云发, 华秋瑾, 等. 香蕉束顶病流行病学及

- 综合防止技术研究[J]. 西南农业学报, 1991, 4(1): 78-81.
- [17] 蔡云鹏, 程秋蓉, 江文浩, 等. 香蕉束顶病的发生及防治[J]. 广西农业科学, 1996(2): 45-47.
- [18] 周仲驹, 黄志宏, 郑国璋, 等. 香蕉束顶病的研究 V. 病株的空间分布型及其抽样[J]. 福建农业大学学报, 1997, 26(2): 177-181.
- [19] Allen RN. Further studies on epidemiological factors influencing control of banana bunchy top disease, and evaluation of control measures by computer simulation[J]. Aus J Agric Res, 1987, 38: 373-382.
- [20] Xie WS, Hu JS. Molecular cloning, sequence-analysis, and detection of banana bunchy top virus in Hawaii[J]. Phytopathology, 1995, 85: 339-347.
- [21] 孙茂林, 和春育, 庄俊英, 等. 香蕉束顶病毒单克隆抗体的制备及其应用[J]. 西南农业学报, 1992, 5(3): 75-79.
- [22] Wu RY, Su HJ. Production of monoclonal antibodies against banana bunchy top virus and their use in enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Journal of Phytopathology, 1990, 128(3): 203-208.
- [23] Simmonds NW. Bananas (2nd ed.). Longman, London and New York, 1982: 394-400.
- [24] Sharman M, Thomas JE, Skabo S, et al. Abaca bunchy top virus, a new member of the genus Babuvirus (family Nanoviridae)[J]. Arch Virol, 2008, 153(1): 135-147.
- [25] Karan M, Harding RM, Dale JL. Evidence for two groups of banana bunchy top virus isolates[J]. J Gen Virol, 1994, 75(12): 3541-3546.
- [26] 冯团诚, 王健华, 刘志昕. 香蕉束顶病毒海口分离物基因组的克隆及序列分析[J]. 植物病理学报, 2010, 40(1): 40-50.
- [27] Hu JM, Fu HC, Lin CH, et al. Reassortment and concerted evolution in banana bunchy top virus genomes[J]. J Gen Virol, 2007, 81(4): 1746-1761.
- [28] 吴瑞钰. 香蕉萎缩病病毒之特性及单元抗体[D]. 国立台湾大学植物病虫害研究所博士论文, 1987.
- [29] Iskra ML, Garnier M, Bové JM. Purification of banana bunchy top virus (BBTV)[J]. Fructs, 1989, 44: 63-66.
- [30] Thomas JE, Dietzgen RG. Purification, characterization and serological detection of virus-like particles associated with banana bunchy top disease in Australia[J]. J Gen Virol, 1991, 72(2): 217-224.
- [31] Harding RM, Burns TM, Dale JL. Virus-like particles associated with banana bunchy top disease contain small single-stranded DNA[J]. J Gen Virol, 1991, 72(Pt 2): 225-230.
- [32] 刘志昕, 郑学勤, 相宁, 等. 香蕉束顶病毒提纯研究初报[J]. 热带作物学报, 1994, 15(增刊): 37-40.
- [33] 蔡文启, 徐绍华, 陈锦云, 等. 香蕉束顶病毒的纯化及理化特性[J]. 微生物学报, 1997(4): 11-16.
- [34] Burns TM, Harding RM, Dale JL. The genome organization of banana bunchy top virus: analysis of six ssDNA components[J]. J Gen Virol, 1995, 76(6): 1471-1482.
- [35] Beetham PR, Harding RM, Dale JL. Banana bunchy top virus DNA-2 to -6 are monocistronic[J]. Arch Virol, 1999(144): 89-105.
- [36] Hafner GJ, Harding RM, Dale JL. A DNA primer associated with banana bunchy top virus[J]. Journal of General Virology, 1997, 78(Pt 2): 479-486.
- [37] Jackson RJ, Standart N. Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation[J]? Cell, 1990, 62(1): 15-24.
- [38] Joshi CP. Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis[J]. Nucleic Acids Research, 1987, 15(23): 9627-9640.
- [39] Proudfoot N. Poly(A) signals[J]. Cell, 1991, 64(4): 671-674.
- [40] Harding RM, Burns TM, Hafner G, et al. Nucleotide sequence of one component of the banana bunchy top virus genome contains a putative replicase gene[J]. J Gen Virol, 1993, 74(3): 323-328.
- [41] Baas PD, Jansz HS. Single-stranded DNA phage origins[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 1988, 136: 31-70.
- [42] Beetham PR, Hafner GJ, Harding RM, et al. Two mRNAs are transcribed from banana bunchy top virus DNA-1[J]. Journal of General Virology, 1997, 78(Pt 1): 229-236.
- [43] Herrera-Valencia VA, Dugdale B, Harding RM, et al. Mapping the 5' ends of banana bunchy top virus gene transcripts[J]. Arch Virol, 2007, 152(3): 615-620.
- [44] 田娥, 庄军, 刘志昕. 香蕉束顶病毒海南分离物 DNA 组分的克隆及序列分析[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(6): 680-684.
- [45] Wanitchakorn R, Harding RM, Dale JL. Banana bunchy top virus DNA-3 encodes the viral coat protein[J]. Archives of Virology, 1997, 142(8): 1673-1680.
- [46] Wanitchakorn R, Hafner GJ, Harding RM, et al. Function analysis of proteins encoded banana bunchy top virus DNA-4 to -6[J]. J Gen Virol, 2000(81): 299-306.
- [47] Noueiry AO, Lucas WJ, Gilbertson RL. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport[J]. Cell, 1994, 76(5): 925-932.
- [48] Sudarshana MR, Wang HL, Lucas WJ, et al. Dynamics of bean dwarf mosaic geminivirus cell-to-cell and long-distance movement in Phaseolus vulgaris revealed,

- using the green fluorescent protein[J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 1998, 11(4): 277-291.
- [49] 孙德俊, 孙卉, 魏红艳, 等. 香蕉束顶病毒中国漳州分离物 DNA4 编码区功能研究[J]. *自然科学进展*, 2002, 12(7): 708-712.
- [50] Grafi GR, Burnett RJ, Helentjaris T, et al. A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: involvement in endoduplication[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1996(93): 8962-8967.
- [51] Dugdale D, Beetham PR, Becker DK, et al. Promoter activity associated with the intergenic regions of banana bunchy top virus DNA-1 to DNA-6 in transgenic tobacco and banana cells[J]. *J Gen Virol*, 1998, 79(10): 2301-2311.
- [52] Sanderfoot AA, Lazarowitz SG. Cooperation in viral movement: the geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery[J]. *Plant Cell*, 1995, 7(8): 1185-1194.
- [53] Lazarowitz SG, Beachy RN. Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants[J]. *Plant Cell*, 1999, 11(4): 535-548.
- [54] Gafni Y, Epel BL. The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses[J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2002, 60(5): 231-241.
- [55] Fontes EPB, Santos AA, Luz DF, et al. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity[J]. *Genes & Dev*, 2004, 18(20): 2545-2556.
- [56] 庄军, 刘志昕. 香蕉束顶病毒 DNA 组分 2、3 的启动子区的组织特异性分析[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(9): 69-73.
- [57] Niu SN, Wang BS, Guo XF, et al. Identification of two RNA silencing suppressors from banana bunchy top virus[J]. *Arch Virol*, 2009, 154(11): 1775-1783.
- [58] Xie WS, Wu JS, Sether D. Molecular characterization and detection of banana bunchy top virus in Hawaii[J]. *Phytopathology*, 1994, 84: 1105.
- [59] 孟清, 曹先维, 张彤. 应用 Digoxigenin 标记的 cDNA 探针检测香蕉束顶病毒[J]. *内蒙古大学学报*, 1999, 30(3): 367-371.
- [60] 肖火根, Hu J, 李华平, 等. 香蕉束顶病毒基因克隆和序列分析[J]. *病毒学报*, 1999, 15(1): 55-63.
- [61] 管维, 杨雷亮, 邱德义, 等. 用一步 PCR 法同时检测香蕉束顶病毒和香蕉花叶心腐病毒[J]. *植物检疫*, 2008, 22(4): 213-215.
- [62] Wu RY, Su HJ. Purification and characterization of banana bunchy top virus[J]. *Journal of Photopathology*, 1990, 128(2): 153-160.
- [63] 严方明. 香蕉束顶病的发生与防治[J]. *热带农业科学*, 2006(4): 31-32.
- [64] 房锐华. 香蕉束顶病的成因及防治[J]. *农业科技通讯*, 2008(7): 190-191.
- [65] 曾继吾, 牛王翠, 黄永红, 等. 利用超低温保存方法脱除香蕉束顶病毒的研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2009, 10(3): 457-460.
- [66] 华有群. 也谈香蕉束顶病的发生和防治[J]. *植物保护*, 1989, 15(2): 39-40.
- [67] Sagi L, Remy S, Panis B, et al. Transient gene expression in electroporated banana (*Musa* spp., cv. 'Bluggoe', ABB group) protoplasts isolated from regenerable embryogenic cell suspensions[J]. *Plant Cell Reports*, 1994, 13(5): 262-266.
- [68] Sági L, Panis B, Remy S, et al. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment[J]. *Bio/ Technology*, 1995, 13(5): 481-485.
- [69] Sági L, Remy S, Verelst B, et al. Transient gene expression in transformed banana (*Musa* cv. Bluggoe) protoplast and embryogenic cell suspensions[J]. *Euphytica*, 1995, 85(1/3): 89-95.
- [70] 徐立新, 林栖凤, 李冠一, 等. 用微弹轰击法将 GUS 基因导入香蕉茎尖组织细胞[J]. *海南大学学报: 自然科学版*, 1994(4): 308-310.
- [71] 张银东, 张锡炎, 曾宪松, 等. 香蕉 CMV-BH 外壳蛋白基因转化香蕉的研究初报[J]. *热带作物学报*, 1995, 16(增刊): 19-25.
- [72] May GD, Afza R, Mason HS, et al. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. *Nature Biotechnology*, 1995, 13(5): 486-492.
- [73] Granapathi TR, Higgs NS, Balint-Kurti PJ, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cell suspensions of the banana cultivar Rasthali (AAB)[J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20(2): 157-162.
- [74] 雅阳. 澳大利亚培育出转基因抗病香蕉[J]. *中国果业信息*, 2009, 26(1): 33.
- [75] Yeh HH, Su HJ, Chao YC. Genome characterization and identification of viral-associated dsDNA component of banana bunchy top virus[J]. *Virology*, 1994, 198(2): 645-652.
- [76] 阮小蕾, 李海辉, 李华平. 香蕉束顶病毒基因附加组分的克隆及序列分析[J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(4): 421-426.