

②  
6-10  
香蕉花叶病病原病毒及其卫星 RNA 的研究\*

Studies on the Viruses and Its Satellite RNA from  
the Plants Infected with Banana Mosaic Disease

朱西儒 张海保 张云开  
Zhu Xiru Zhang Haibao Zhang Yunkai

覃秉益 张秀华  
Qin Bingyi Zhang Xiuhua

S436.68

(中国科学院华南植物研究所 广州 510650) (中国科学院微生物研究所 北京 100080)  
(South China Institute of Botany, (Biological Institute, Academia  
Academia Sinica, Guangzhou, 510650) Sinica, Beijing, 100080)

摘要 进一步证明,我国华南地区香蕉花叶病的病原病毒种类主要是由黄瓜花叶病毒 (CMV) 引起的,在广西部分地区发现有烟草花叶病毒 (TMV) 的新株系感染香蕉,分离得到 CMV 的卫星 RNA。

关键词 香蕉 (*Musa acuminata*, AAA) 花叶病 卫星 RNA

中图法分类号 S 432.1

病原病毒  
Abstract The species of viruses from banana plants infected with mosaic symptom in the field of south China were studied. The results showed that it was mainly induced by a strain of cucumber mosaic virus (CMV). A strain of tobacco mosaic virus (TMV) was found in some parts of Guangxi region. The CMV's satellite RNA was isolated.

Key words banana (*Musa acuminata*, AAA), mosaic, satellite RNA

香蕉 (*Musa acuminata*) 是我国重要的热带亚热带经济作物,还可以出口港澳地区等<sup>[1,2]</sup>,其市场需求量大,植蕉比种水稻效益高 3 倍。我国是世界主产蕉国之一,1993 年 19.6 万公顷,总产达到 270.1 万吨,远不如巴西 (1986 年为 756.3 万吨)<sup>[3,4]</sup>。

利用组织培养技术进行快速繁殖,既可以脱除原材料潜伏侵染的病毒<sup>[2]</sup>,又能够整齐一致地进行工厂化生产,大大提高繁殖指数。以新的生物技术代替传统的吸芽繁殖方法,效益倍增,也利于新品种的迅速推广。果实品质好,产量高。所以,中国科学院华南植物研究所率先发展香蕉试管苗,引进澳大利亚“威廉斯 (Williams)”品种,迄今已得到普遍应用至广东、广西、海南及福建等地<sup>[1,3]</sup>。

然而,由于品种的感病性不同,或者个别脱毒不彻底,或者漏检未查出带毒外植体,香蕉花叶病病原病毒随试管苗更快速地扩大传染,常常给生产带来惨重损失,成为尚待解决的问题。

1998-10-14 收稿。

\* 国家自然科学基金资助项目。

题<sup>[5,6]</sup>。1974年,在广东省东莞市首先发现此病,3年后有1.3 hm<sup>2</sup>发病率为40%~50%。1981年,扩大蔓延至10市(县),1986年更为严重,发病率达到24%以上。因此,我们对香蕉花叶病病原进行了调查研究,建立了快速、灵敏、专一性病毒检验技术已被广泛应用<sup>[5,7]</sup>。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

病样采自广东省广州市番禺和花都,以及东莞、高州、遂溪、廉江和肇庆市,广西的南宁市、合浦县和灵山县等地,共计138份。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 生物学鉴定

按常规摩擦接种和蚜虫接种法,将每个病样接种与鉴别寄主植物<sup>[8]</sup>。用1/15 mol·L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(PB) pH值7.0(1:2 W/V)提取病汁,每个样接种3~5株,试验重复3次。

#### 1.2.2 病原病毒分离纯化

(1)将接种三生烟(*Nicotiana tabacum* var. *xanthi*, NN)的病叶碾磨榨取汁,经过90℃水浴处理5 min,迅速冷却后再接种健康三生烟,反复多次直至不表现花叶症,只要接种叶出现枯斑症状反应,则单为TMV。最后,经过单斑分离、接种“黄苗榆”烟草,表现花叶皱缩症;(2)如上所述,若在三生烟上没有枯斑反应,只表现系统花叶症状,再转接病毒寄主绿豆(*Phaseolus aureus*)产生枯斑,则为CMV。经过单斑分离、接种繁殖寄主,同时,以蚜虫接种方法<sup>[9]</sup>,接种香蕉体细胞无病毒试管苗植株<sup>[9]</sup>保存。

#### 1.2.3 电镜观察

(1)病组织用5%戊二醛固定,按常规超薄切片方法脱水、包埋、切片<sup>[8]</sup>。用病汁点样法,染色使用2%醋酸氧铀或磷钨酸染液;(2)电镜观察:用透射电子显微镜进行观察。

#### 1.2.4 病毒提纯和血清学鉴定及交互保护试验

将从香蕉病样分离出的病原病毒参照文献<sup>[7]</sup>进行提纯,制备抗血清。同时,用同源抗血清(农业部植物检疫实验总所张成良研究员惠赠),进行琼脂扩散法试验。按常规方法<sup>[8]</sup>用纯化的分离物接种烟草,然后再接种来自番茄、烟草的同类株系,观察有无交互保护作用。每个样接种5~10株,试验重复3次。

#### 1.2.5 CMV卫星RNA电泳分析

(1)总核酸的提取:用接种有CMV的三生烟草为材料,接种后10 d~12 d收集5 g病叶,提取病毒总核酸;(2)纤维素柱层析:用10 mL GPS缓冲液(0.2 mol·L<sup>-1</sup>甘氨酸,0.1 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.6 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, pH值9.5)悬浮上述核酸提取物。加入0.1 mol·L<sup>-1</sup> 2-巯基乙醇和1.8 mL无水乙醇(最终浓度15%)。混匀后,再加入2 g未经处理的微晶型纤维素(E. Merck公司产)。在4℃条件下,混合吸附,过夜。装柱后用150 mL含15%乙醇的STE缓冲液(0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 0.05 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 0.01 mol·L<sup>-1</sup> NaEDTA, pH值7.0)洗柱,弃去洗液。接着用不含乙醇的STE缓冲液洗,弃去开始流出的2 mL洗脱液,再收集约20 mL洗脱液(ds-RNA)。加入1/19体积4 mol·L<sup>-1</sup> NaAc和3倍体积冷乙醇,在-20℃下放置过夜。4℃下离心10 000 rpm, 15 min,弃去上清液。沉淀物用70%乙醇洗1次,离心,冷冻干燥。最后,悬浮在0.5 mL~0.6 mL TAE缓冲液(40 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl,

20 mmol · L<sup>-1</sup> NaAc, 2 mmol · L<sup>-1</sup> Na-EDTA, pH 值 7.8) 中即可。取 20 mL 该提取物稀释 100 倍, 用紫外分光光度计测定核酸含量; (3) 用 TAE 电泳缓冲液系统, 按常规方法制胶, 将待测样和标准 ds-RNA 分别加入同一平版的不同样孔内。电泳条件, (30~40) mA/100V, 指示剂为溴酚兰。染色用硝酸银 (AgNO<sub>3</sub>) 作染料。

## 2 试验结果

### 2.1 生物鉴定结果

接种鉴别寄主, 试验结果表明: 来

自广西的样品有部分在三生烟、心叶烟上表现接种叶为局部枯斑 (LN), 新生叶为花叶 (M), 而在绿豆上形成褐色坏死斑。这就初步证明它是 TMV 和 CMV 复合侵染所引致, 占样品的 20% 左右。凡是皆无枯斑反映, 只是在新生叶上表现系统花叶的, 说明只有 CMV 单独侵染 (表 1), 占总样品 80%。可是, 来自广东的样品全部为 CMV 所致 (图 1, 2)。

表 1 香蕉花叶病原病毒在不同鉴别寄主上的症状反应

鉴别寄主	TMV	CMV
心叶烟 ( <i>Nicotiana glutinosa</i> L)	LN	CM
三生烟 ( <i>N. tabacum</i> var. <i>santha</i> , NN)	M	
黄苗烟 ( <i>N. tabacum</i> )	M	CM
白花烟 ( <i>N. tabacum</i> var. <i>whitehily</i> )	M	M
琨诺阿黎 ( <i>Chenopodium quinoa</i> )	M	N
苞色藜 ( <i>C. amaranthifolium</i> )	LN	N
千日红 ( <i>Gomphrena globosa</i> )	LN	N
绿豆 ( <i>Phaseolus aurens</i> )	LN	CM / MM
洋酸浆 ( <i>Physalis floridana</i> )	M	N
辣椒 ( <i> Capsicum annuum</i> )	M	CM/MM
曼陀罗 ( <i>Datura stramonium</i> )	LN, SM	CM
番茄 ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	M	CM
豇豆 ( <i>Vigna unguis</i> )	M	N

M: 花叶; LN: 局部坏死; N: 坏死; CM: 皱缩花叶; SM: 系统花叶; MM: 轻花叶。

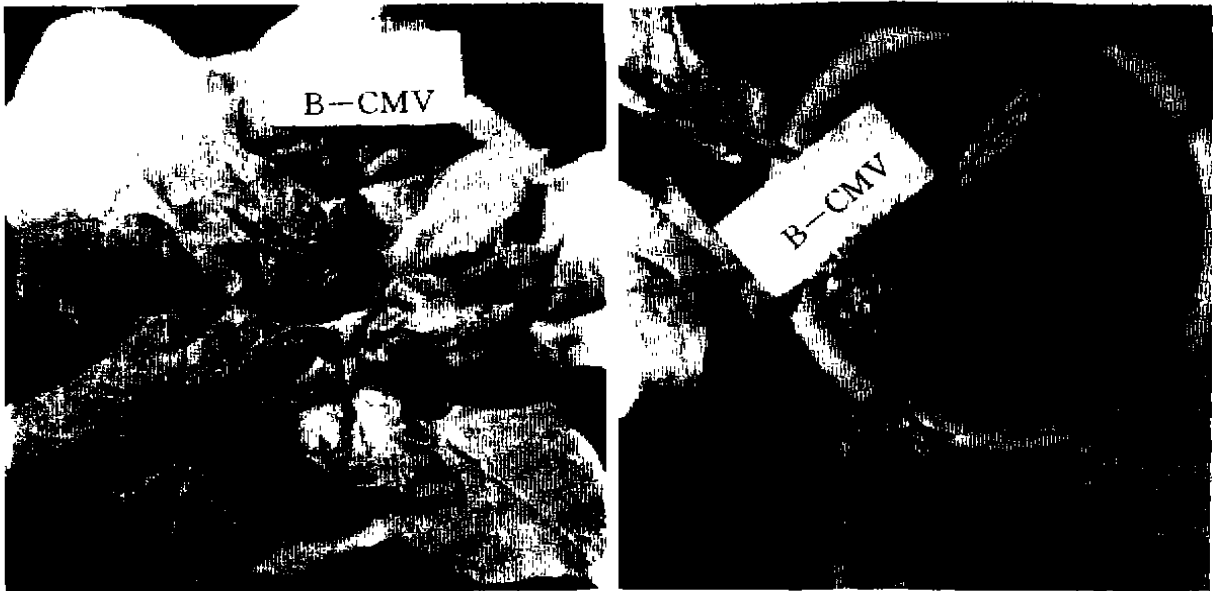


图 1 香蕉花叶病的 CMV 分离物鉴别寄主症状反应

a. 心叶烟; b. 琨诺阿黎。

### 2.2 电镜观察

电镜观察结果, 香蕉的 CMV 株系病毒粒子直径为 28 nm (图 3), 香蕉 TMV 株系粒子为杆状, 大小约 (300~320) × 15 nm。

### 2.3 血清学鉴定

试验结果表明, CMV 与同源 CMV 的抗血清有反应, 阳性。而 TMV 只与同源 TMV 株

系的抗血清有反应,其余均为阴性反应。

### 2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

电泳结果(图 4)香蕉 CMV 株系的一个分离物有卫星 RNA,另一个分离物则只有病毒基因组的 dsRNA。从电泳图谱看出,分子量越大,相对迁移位置越小;与国外发表的同类病毒卫星 RNA 相比较,本研究获得的卫星分子量稍大一点。

### 3 讨论

根据现有资料和研究结果,本文认为引起香蕉产生花叶病的病原病毒除黄瓜花叶病毒的

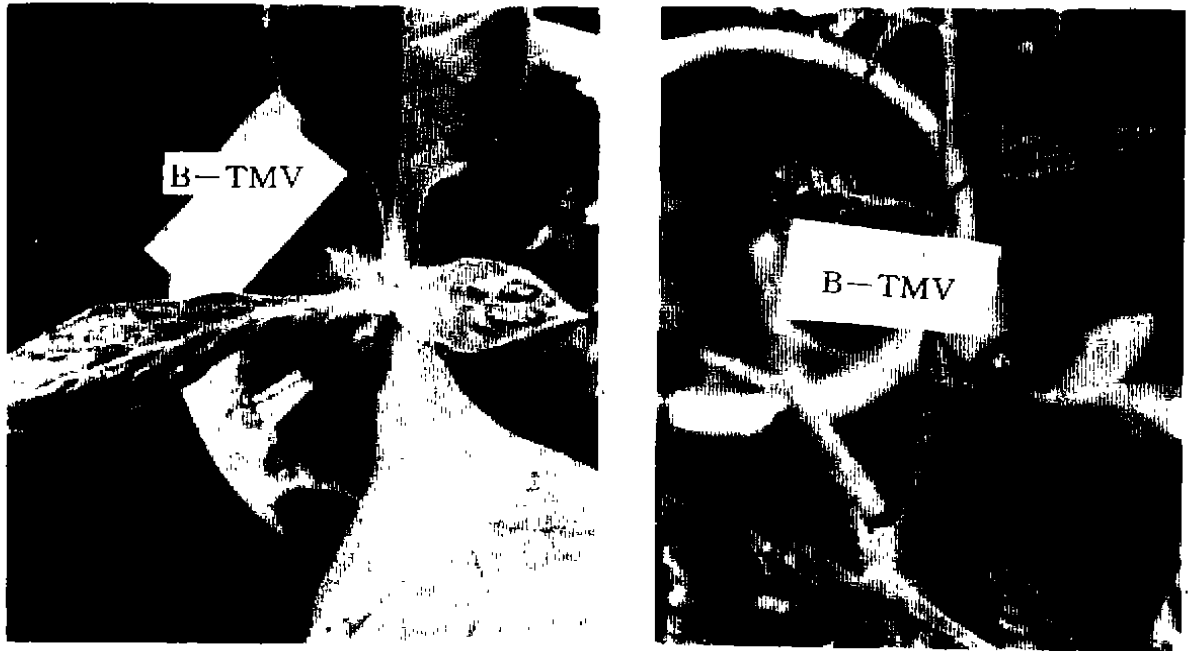


图 2 香蕉花叶病的 TMV 分离物鉴别寄主症状反应

a. 三牛烟; b. 番茄。

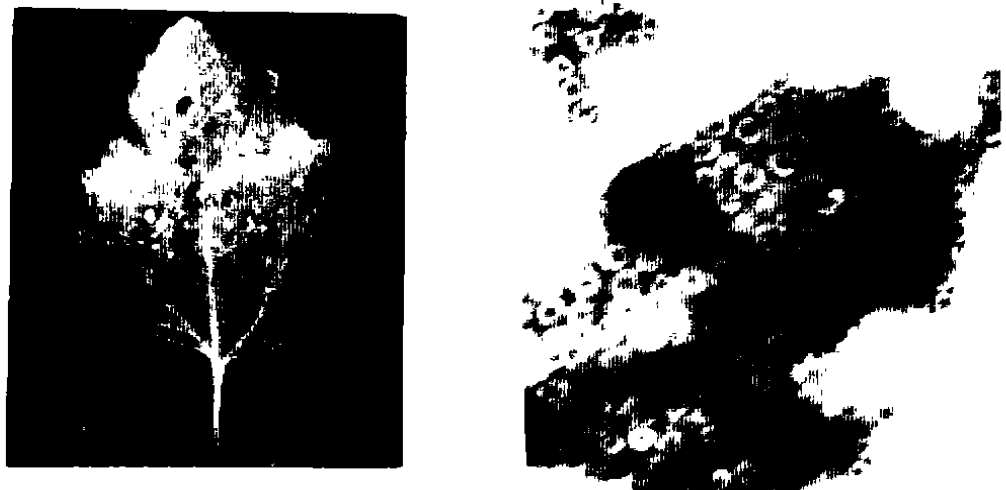


图 3 香蕉 CMV 分离物病毒粒子的电镜观察

株系<sup>[10]</sup>以外,少数地区还有烟草花叶病毒的株系存在,常混合侵染,占总样品20%,这一点已有类似结论<sup>[11]</sup>。香蕉TMV株系经过交叉保护试验<sup>[16]</sup>,证明与来自番茄、烟草等其他株系并无亲缘关系,而与它们的血清学关系则为阳性反应。

试验表明,香蕉CMV株系的卫星RNA之发现,尚属首次报道。这将对深入研究和利用、筛选香蕉的CMV株系抗病毒疫苗,解决生产上的防治问题是具有重要意义的。特别是香蕉的组织、细胞和原生质体的愈伤组织的形成<sup>[12]</sup>、人工离体培养<sup>[9]</sup>、体细胞胚悬浮培养<sup>[9,14]</sup>、再生植株的诱导、移栽成活<sup>[6,9,12,14]</sup>,以及CMV<sup>[15]</sup>和TMV<sup>[13]</sup>抗病毒外壳蛋白(cp)基因转化在许多作物上应用等,预示转卫星RNA<sup>[16]</sup>香蕉植株的成功,培育抗病良种为期不会很远了。

S52 52S S1 S1s 881 881s CK

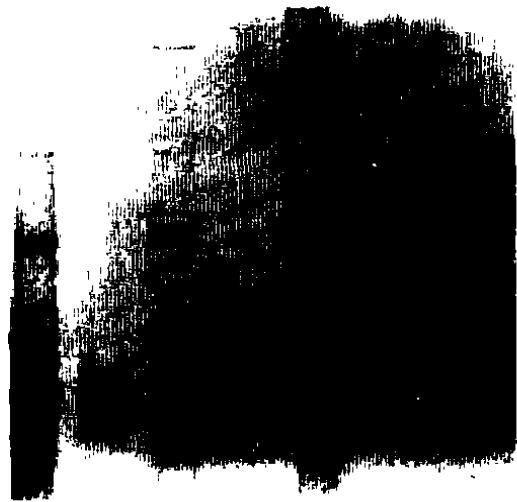


图4 香蕉CMV分离物CMV卫星RNA的电泳凝胶图谱  
(S52,52S:番茄CMV的卫星RNA;S1,S1s:来自美国的CMV卫星RNA;881,881s:香蕉中分离出的卫星RNA;CK:牛血清蛋白样品。

#### 参考文献

- 程汝抱,周晓洪,龚子同主编.香蕉高产与土壤环境.见:中国名特优农产品的土宜.长春:吉林人民出版社,1994.115~118.
- 黄中雄,宾士益.香蕉试管苗大棚假植育苗.广西热带作物科技,1996,(4):32~34.
- 沈兆敏,李银国.我国香蕉生产现状及其持续发展对策.农牧产品开发,1995,(3):26~29.
- 张慧坚.香蕉的科研及产销动态.热带农业信息,1994,(2):1~3.
- 朱西儒,何荣,蔡建和.发展香蕉试管苗应注意的问题.科学研究管理,1994,(6):28~29.
- Drew R A, Smith M K. Field evaluation of tissue cultured bananas in south-eastern Queensland. Australian Journal of Experimental Agriculture, 1990, 30: 569~574.
- 张海保,朱西儒,张云开等.香蕉花叶病的酶联免疫检测技术研究.植物病理学报,1994,24(4):323~327.
- 田波,裴美云.植物病毒研究方法.北京:科学出版社,1987.153~193.
- Dhed'a O. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. "Bluggoe" (*Musa* spp. AAB group) Fruits, 1991, 46: 125~135.
- 浙江农业大学.香蕉花叶心腐病.见:果树病理学.上海:上海科学技术出版社,1979.218~219.
- 徐绍华.香蕉束顶病及其防治的研究I:病原物的电子显微镜观察及束顶病的诊断型治疗.微生物学报,1992,33(1):58~61.
- Megia R. Callus formation from banana (*Musa* spp) protoplast. Plant Breeding Rev, 1992, 7: 135~155.
- Powell A P. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science, 232: 738~743.
- Novak F J. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (AAB) bananas (*Musa* spp.). Bio/Technology, 1989, 7: 154~159.
- Quemada H. Expression of coat protein gene cucumber mosaic virus strain-C in tobacco protection against by CMV strains transmitted mechanically or by aphids. Phytopathology, 1991, 81: 794~802.
- Beachy R N. Coat protein-mediated resistance against virus infection. Ann Rev Phytopathol, 1990, 28: 451~474.

(责任编辑:邓大玉)