

# 香蕉束顶病毒基因附加组分的克隆及序列分析\*

阮小蕾<sup>1</sup> 李海辉<sup>2</sup> 李华平<sup>1\* \*</sup>

1. 华南农业大学植物病毒研究室, 广州 510642 2. 广州起义烈士陵园, 广州 510080

**摘要** 采用 PCR 的方法分别克隆了香蕉束顶病毒(BBTV)广东分离物 NS 株系和 NSP 株系的附加组分, 将之命名为 BT-NS 和 BT-NSP。序列分析发现, 2 个附加组分基因全长均为 1 094 nt, 其核苷酸的同源率为 97.3%, 编码氨基酸的同源率为 98.4%; 与 BBTV 台湾分离物附加组分 S1、S2 和越南分离物附加组分 S3 相比, BT-NS/NSP 与 S1 的氨基酸序列相似率最高, 与 S2 的相似率最低。每一附加组分的 ORF 均含有推导的与脱氧核苷酸结合的基序, 具有潜在的复制酶活性。通过对 BBTV 编码复制酶基因组分的进化树分析发现, BT-NS/NSP 与 BBTV 台湾附加组分 S1 的亲缘关系最近, 与广东分离物 NSP 株系 DNA 组分 1 的亲缘关系较远。

**关键词** 香蕉束顶病毒; 附加组分; 序列分析

**中图分类号** S 432.4<sup>+</sup>1; S 668.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)04-0421-06

香蕉束顶病毒(banana bunchy top virus, BBTV)是香蕉束顶病的病原。根据 10 个国家和地区已克隆的 BBTV 组分 1 的核苷酸序列及由此推导出的氨基酸序列之间差异和进化树分析的结果, 可将 BBTV 划分为 2 个大组<sup>[1]</sup>, 即南太平洋组(澳大利亚、埃及、布隆迪、斐济、汤加、印度、西萨摩亚)和亚洲组(菲律宾、中国、越南)。根据寄主范围和分子生物学方面的差异, 可将 BBTV 广东分离物分为 2 个株系, 即侵染香蕉(*Musa nana*)、大蕉(*M. sapientum*)、粉蕉(*M. pisangawake*)的 NSP 株系和只侵染香蕉、大蕉而不侵染粉蕉的 NS 株系<sup>[2]</sup>。

BBTV 基因组是由至少 6 个环状单链 DNA 组成, 且这 6 个组分是 BBTV 所有分离物基因组必不可少的组分<sup>[3-4]</sup>。每一组分大小约 1.1 kb, 均有 1 个较保守茎环结构, 在茎环结构的 3' 端有 TATA 盒, 在基因的有义区至少有 1 个主要的带 poly A 尾的基因, 均有转录活性<sup>[3,5-6]</sup>。将 BBTV 6 个组分的茎环结构区(CR-SL)进行比较, 发现环的部分同源率至少有 62%; 在其 5' 端的 65~111 个核苷酸中, 组分间同源率至少有 61%<sup>[3]</sup>。

BBTV 的附加组分首先从 BBTV 台湾分离物中克隆得到, 这是 1 个含有 1 095 nt 的 ssDNA, 命名为 BBTV DNA 组分 2<sup>[7]</sup>。除台湾地区外, 国内对 BBTV 附加组分的研究未见有报道。华南农业

大学植物病毒研究室对 BBTV 的生物学、基因组分组的克隆、序列分析和功能研究等方面作了大量的工作, 已完成了对广东 BBTV 分离物的株系鉴定和其基因组 6 个组分的克隆及序列分析<sup>[8-10]</sup>。笔者从广东 BBTV 的 NSP 株系和 NS 株系中克隆了附加组分, 并对其进行了序列分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试感染香蕉束顶病毒的病株分别采自华南农业大学植物病毒研究室和广东省高州市。

*EcoR* I 等限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、*ExTaq* DNA 聚合酶和 pMD18-T 载体等均购自大连宝生物工程有限公司。DL 2000 DNA Marker 购自天为时代生物有限公司。其他常规分析纯试剂购自广州试剂厂。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.2 BBTV NS 和 NSP 株系的分子生物学鉴定

分别从感染 BBTV 的香蕉病株中抽提总 DNA 作为模板, 经 BBTV 组分 1 的特异性引物进行 PCR 扩增。回收 PCR 产物, 用 *EcoR* I 酶切鉴定 BBTV 的株系。

1) 病株总 DNA 的提取。取供试植株的幼嫩叶脉 0.1 g 进行抽提, 其余步骤参照 Xie 等<sup>[11]</sup>的方法

收稿日期: 2009-10-15; 修回日期: 2010-01-18

\* 国家自然科学基金项目(30671358)和公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx 07-029)资助

\* \* 通讯作者。E-mail: huaping@scau.edu.cn

阮小蕾, 女, 1973 年生, 博士, 讲师。研究方向: 植物病理学。E-mail: ruanxl@scau.edu.cn

进行。

2)BBTV 组分 1 的获得。根据 Harding 等<sup>[4]</sup>发表的 BBTV 组分 1 的序列,设计 1 对相邻反向引物(P<sub>11</sub>和 P<sub>12</sub>),用以扩增广州和高州病株中 BBTV 组分 1 的全序列。引物序列为

P<sub>11</sub>: 5'-GGC GAA TTC TAT AAA TAG ACC TCC C-3';

P<sub>12</sub>: 5'-GGC AAG CTT GCA AAT GTC CCG TCC CG-3'。

反应体系:病株总 DNA 0.02 μg,10×Taq Buffer 2.5 μL,dNTPs(10 mmol/L)2.5 μL,P<sub>11</sub>、P<sub>12</sub>(0.5 μmol/L)各 1 μL,Taq 酶(5 U/μL)0.1 μL,补充灭菌双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)至 25 μL。

反应循环:94℃预变性 4 min;94℃变性 1 min,58℃退火 2 min,72℃延伸 3 min,35 个循环;72℃最终延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物在 0.8%的琼脂糖凝胶上电泳,检查 PCR 结果。

3)BBTV 组分 1 的 PCR 产物的回收。取上述 PCR 产物各 75 μL,置于 1.5 mL 的离心管中,补足 TE 至 50 μL,用氯仿抽提 1 次,取上清液,加入 2 倍体积的无水乙醇,过夜沉淀,12 000 r/min 离心 10 min,70%乙醇洗 1 次,最后用 75 μL 的灭菌 ddH<sub>2</sub>O 溶解,置于-20℃贮存备用。

4)EcoR I 酶切分析。用限制性内切酶 EcoR I 对上述回收的 PCR 产物进行酶切,反应体系:10×H Buffer 3.0 μL,BSA(10 μg/μL)0.3 μL,PCR 产物 20 μL(约 200 ng),EcoR I (15 U/μL)0.5 μL,加灭菌 ddH<sub>2</sub>O 至终体积 30 μL。将离心管置于 37℃孵育过夜。酶切结束后,取 15 μL 酶切产物在 1.0%的琼脂糖凝胶上电泳,根据电泳结果确定所采的香蕉病株中的 BBTV 所属的株系。

### 1.3 NS 和 NSP 2 个株系附加组分 1 的 PCR 扩增

在 EcoR I 酶切鉴定 NS 株系和 NSP 株系的基础上,分别选取这 2 个株系检测为阳性病株的总核酸为模板,对 2 个株系的附加组分 1 分别进行 PCR 克隆。

根据发表的 BBTV DNA-Y 全序列<sup>[7]</sup>,设计 1 对特异性的相邻反向引物 SF1 和 SR1。其序列为 SF1: 5'-GATGATCGAAGCATCATCTGGG-3'; SR1:5'-GGGTTCTCGTTCAATTGCCT-3'。

PCR 反应体系:病株总核酸 1 μL,10×Taq Buffer 2.5 μL,dNTPs(10 mmol/L)2.5 μL,SF1、SR1(0.5 μmol/μL)各 1 μL,ExTaq 酶(5 U/μL)

0.1 μL,补充灭菌 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL。

反应条件:94℃预变性 4 min;94℃变性 1 min,55℃退火 1 min,72℃延伸 2 min,30 个循环;72℃最终延伸 10 min。反应结束后,在 1.0%的凝胶电泳检测 PCR 产物片段的大小及浓度。

1.4 NS 和 NSP 2 个株系附加组分 1 的克隆及测序  
回收 PCR 扩增产物,将其分别克隆于 pMD-18 T 载体上。经 PCR 和酶切鉴定,得到阳性重组质粒后再送往联合基因公司(上海)进行测序。

### 1.5 NS 和 NSP 2 个株系附加组分 1 的序列分析

对测序结果利用 NCBI(National Center for Biotechnology Information,NCBI)(www.ncbi.nlm.nih.gov)的 BLAST 和 DNAMAN(5.0)以及 DNASTAR(5.0)软件进行分析。

## 2 结果与分析

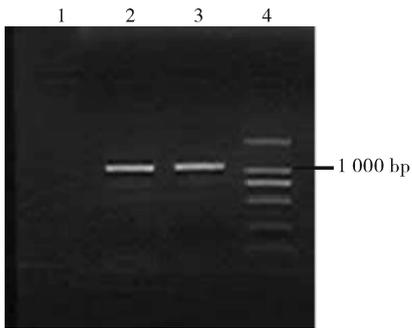
### 2.1 NS 和 NSP 2 个株系的鉴定

分别以采自高州和广州天河病株的总 DNA 为模板,用特异性引物 P<sub>11</sub>、P<sub>12</sub>进行扩增,得到组分 1 的 PCR 产物,回收后用 EcoR I 酶切。结果表明,采自高州的病株组分 1 的 PCR 产物能被 EcoR I 切成大小为 300 bp 和 700 bp 的 2 个片段,而采自广州天河病株组分 1 的 PCR 产物不能被 EcoR I 酶切。由此可证实,采自高州的病株中含有 BBTV NS 株系,采自广州天河的病株中含有 BBTV NSP 株系。

### 2.2 NS 和 NSP 2 个株系附加组分的序列分析

分别以含有 NS 株系和 NSP 株系病株的总 DNA 为模板,以 SF1、SR1 为引物,经 PCR 反应扩增,各得到约 1 kb 左右的特异性条带(图 1、图 2)。将扩增片段回收,分别克隆于 pMD18-T 载体上。经 PCR 和酶切鉴定获得了阳性重组子后,再进行序列测定。

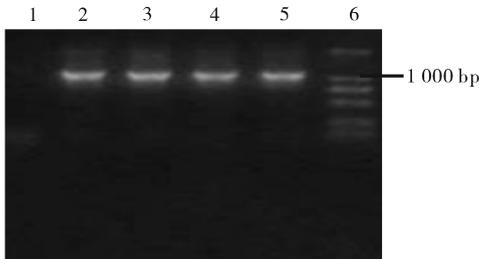
结果表明,来自 2 个分离物的扩增片段大小均为 1 094 bp。将来源于 BBTV NSP 株系的附加组分命名为:BT-NSP(GenBank 的登录号为 GU074392),将来源于 BBTV NS 株系的附加组分命名为 BT-NS(GenBank 的登录号为 GU074391)。序列分析表明:BT-NSP 有 2 个相连的起始密码子位于第 59 nt 处,终止密码子位于 914~916 nt;其 ORF(open reading frame)全长 858 nt,编码 285 个氨基酸。BT-NS 的起始密码子始于第 63 nt 处,在 808~810 nt 处有终止密码子信号 TAA,使得其 ORF 只有 747 nt,编码 248 个氨基酸,比 NSP 株系



1. 阴性对照 Negative control; 2~3. BBTV NS 株系附加组分 Additional component of BBTV NS; 4. Marker DL 2 000.

图1 BBTV NS 株系附加组分的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Electrophoresis analysis of PCR products of the additional component of BBTV NS



1. 阴性对照 Negative control; 2~5. BBTV NSP 株系附加组分 Additional component of BBTV NSP; 6. Marker DL 2 000.

图2 BBTV NSP 株系附加组分 1 的 PCR 扩增结果

Fig. 2 Electrophoresis analysis of PCR products of the additional component of BBTV NSP

少了 37 个氨基酸。BLAST 分析显示:2 个序列的核苷酸和氨基酸相应区段的相似率分别为 97.3% 和 98.4%。其核苷酸序列在某些区域高度保守,都有 2 个 GC 富含区、TATA 盒和 CR-SL 区。除 NSP 株系在序列中缺失 1 个 C 外,其余都完全相同,并均含有推导的与脱氧核苷酸结合的氨基酸基序“GNEGKS”。

### 2.3 BT-NS、BT-NSP 与 BBTV 其他组分的比较

将 BT-NS、BT-NSP 与 BBTV 台湾分离物附加组分 S1、S2 (GenBank 登录号为 AF216221、AF216222) 及越南分离物 S3 (GenBank 登录号为 AF416471) 的序列进行比对分析,结果发现:5 个基因的核苷酸序列中都含有共同的 TAGTATTACC 序列;poly A 信号尾 AATAAA 都处在终止密码子前相同的位置;有相同的 GC 富含区:GGGC-CGCAGGCC;TATA 盒都位于 CR-SL 的 5' 端;每一附加组分的 ORF 均含有推导的与脱氧核苷酸结

合的基序,具有潜在的复制酶活性。这 5 个基因编码的氨基酸数目不一。S1 ORF 含 855 nt, 编码 284 个氨基酸;S2 ORF 含 858 nt, 编码 285 个氨基酸;S3 ORF 含 852 nt, 编码 283 个氨基酸。分析各组分编码的氨基酸的相似性,结果发现:BT-NS 和 BT-NSP 与 S1 的相似性最高,同源率分别为 91.1% 和 91.2%;与 S2 的相似性最低,同源率分别为 68.2% 和 68.4%;与越南分离物 S3 的相似性介于两者之间。

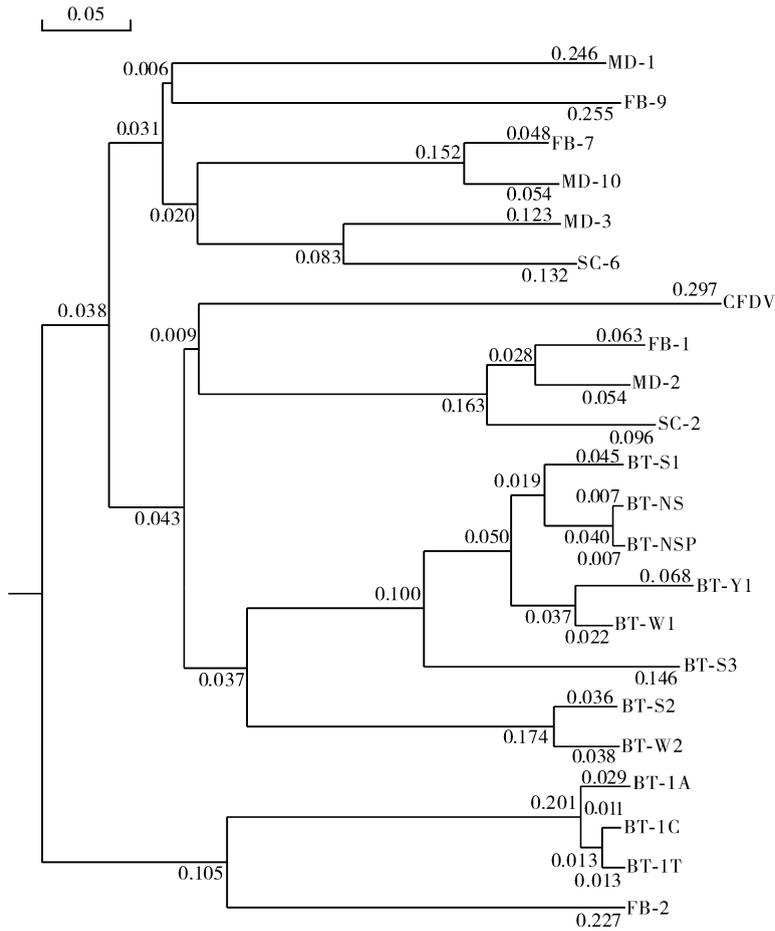
利用 DNAMAN 软件对在 GenBank 上登录的 BBTV 附加组分、广东分离物 NSP 株系编码复制酶的 DNA 组分 1 和矮缩病毒属 (*Nanovirus*) 病毒具有潜在编码复制酶活性的组分等作进化树分析,其中包括本试验的 BT-NS 和 BT-NSP;BBTV 台湾分离物 S1、S2 和越南分离物 S3;BBTV 广东分离物 NSP 株系编码复制酶的 DNA 组分 1;三叶草矮化病毒 (subterranean clover stunt virus, SCSV) 的 2 个推导编码复制酶的组分;蚕豆坏死黄化病毒 (faba bean necrotic yellows virus, FBNYV) 和豌豆矮化病毒 (milk vetch dwarf virus, MDV) 的各 4 个推导编码复制酶的组分;椰子叶片衰退病毒 (coco-nut foliar decay virus, CFDV) 编码复制酶的组分。

由图 3 可看出:BT-NS/NSP 株系聚在姐妹枝上,后与 BBTV S1 聚类;比起 BBTV S3 来,2 个基因离 BBTV S2 稍远,但这几个附加组分最后聚在一大枝上,表明这些 BBTV 的附加组分在进化过程中亲缘关系较近。

有趣的是,作为编码 BBTV 复制酶的广东分离物 NSP 株系 DNA 组分 1 与 FB-2 聚在姐妹枝,而远离 BBTV NS/NSP 株系附加组分。这表明 BBTV NS/NSP 株系附加组分与 NSP 株系 DNA 组分 1 进化过程中亲缘关系较远,是附加的潜在编码复制酶的组分。BBTV 附加组分与 FB-1/MD-2、SC-2 聚类汇成一大枝,MD-1/FB-9、FB-7/MD-10 和 MD-3/SC-6 聚类汇成一大枝,这表明并非同一病毒潜在编码复制酶组分的亲缘关系最近。

## 3 讨论

BBTV 基因组的 6 个组分已在遍布世界各个国家和地区的 BBTV 病株上先后被分离到<sup>[3-4,7-10]</sup>,但是还没有证实这些组分是否是 BBTV 完整的侵染单元。在 BBTV 台湾分离物中除分离了基因组的 6 个组分外,还得到了 5 个 ssDNA 附加组分,分别为



BT-NS/NSP: NS 和 NSP 附加组分 Additional component of BBTV; CFDV:CFDV 复制酶(M29963) Replicase of coconut foliar decay virus; BT-1A,1C,1T: BBTV 澳大利亚、广东 NSP 株系和台湾分离物的 DNA 1 组分的复制酶 (AR010225、AF110266、AR010233) Replicase of Australia, NSP strains of Guangdong and Taiwanese isolate of BBTV; BT-S1, Y1, W1, S2, W2: BBTV 台湾附加组分 (AF216221, U02312, L32166, AF216222, L32167) The additional component of Taiwanese isolate of BBTV; BT-S3: 越南附加组分 (AF416471) Additional component of Vietnam isolate; FB-1, 2, 7, 9: 分别为的编码 FBNYV 复制酶的基因组内的 1, 2, 7, 9 组分 (X80879, Y11405, AJ005964, AJ005966) The 1, 2, 7, 9 component that encode the replicase of FBNYV; SC-2, 6: 编码 SCSV 复制酶的第 2, 6 组分 (U16731, U16736) The 2, 6 component that encode the replicase of SCSV; MD-1, 2, 3, 10: 编码 MDV 复制酶的第 1 组分 (AB000920, AB000921, AB000922, AB000947) The 1, 2, 3, 10 component that encode the replicase of MDV.

图 3 BBTV 附加组分和几种矮缩病毒属 (*Nanovirus*) 病毒潜在复制酶组分进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of additional component of BBTV and the region of putated encoding replicase of some *Nanovirus*

BBTV-Y, W1, W2, S1 和 S2, 其中 Y/W1, S2/W2 这 2 组的核苷酸和氨基酸序列的同源率都在 90% 以上, 被认为是彼此的变异体<sup>[12]</sup>, 也就是说在 BBTV 台湾分离物中至少存在 3 个附加组分。Bell 等<sup>[13]</sup> 用 Horser 等<sup>[12]</sup> 研究中所用的 BBTV-S1 探针在 BBTV 越南分离物也分离到了 1 个附加组分 S3。

本研究以广东 BBTV 分离物为供试材料, 从 NSP 株系和 NS 株系中均克隆到 1 个附加组分。这些附加组分和 BBTV DNA 组分 1 相同, 都潜在编

码复制酶。从附加组分的核苷酸和氨基酸相应区段相似性的比较来看, BBTV NSP/NS 与 S1 的同源性最高。从 NSP/NS 株系氨基酸序列的比较来看, 2 个株系相应区段保守性强, 相似率为 98.3%, 功能基序“GNEGKS”处在相同位置, 但 NS 株系 ORF 提前出现终止密码子信号 TAA, 这使得 NS 株系比 NSP 株系少了 37 个氨基酸; 郑耘<sup>[10]</sup> 在 BBTV NSP/NS 株系 DNA 组分序列分析中也发现组分 5 变异较大, NS 株系比 NSP 株系少了 15 个氨基酸,

这表明这些差异对BBTV株系分化有一定的影响。

FBNYV、MDV、SCSV、CFDV和BBTV一样,同属矮缩病毒属(*Nanovirus*),基因组都由1个或多个大小约1 kb的ssDNA组成,病毒由昆虫介体传播。FBNYV基因组包含有11个ssDNA,其中有4个组分潜在编码复制酶,FB-2已被证实是主效的复制酶,不仅能启动自身复制,而且能启动其他非编码复制酶组分的复制<sup>[14]</sup>。而BT-1C早被证实编码BBTV复制酶,这就不难解释BT-1C与FB-2同在一姐妹枝上。MDV基因组也是多组分的,10个组分已被分离,其中组分1、2、3、10编码4个显著不同的复制酶,但没有充分的证据证明其中某一组分是主效的复制酶,MD-10与FB-7氨基酸同源率为89.8%<sup>[15]</sup>。在进化树上也能看到MD-10与FB-7在姐妹枝上。SCSV基因组含有7个cssDNA,组分2、6被证实编码复制酶,两者氨基酸同源率只有40%,也没有研究证实2个组分谁为主效复制酶<sup>[16]</sup>,SC-6与MD-3同聚在一枝上,SC-2与BBTV附加组分聚在一大枝上。从复制酶比较的角度来说,SC-2与SC-6、BBTV附加组分相比,与BBTV亲缘关系更近。CFDV基因组不同于FBNYV、MDV、SCSV和BBTV,只有1个大小约1.2 kb的cssDNA,包含有6个ORF,其中1个ORF推导编码33.4 ku的复制酶<sup>[17]</sup>,与FB-1/MD-2、SC-2聚在一大枝再和BBTV附加组分聚类。这些分析结果能进一步证实BBTV NSP/NS株系附加组分1是BBTV附加的潜在编码复制酶组分,同时,还可说明存在附加的编码复制酶的组分是矮缩病毒属的一大特征。

Hughes<sup>[18]</sup>从生物进化的角度对同属矮缩病毒属的FBNYV、MDV、SCSV和BBTV的关系进行了研究,表明这个多组分病毒家族是通过复制酶组分的不断复制及随后的复制酶组分的丢失而进化的,这类似真核生物中的多基因家族的细胞凋亡进化过程。Horser等<sup>[12]</sup>认为这些附加组分并不是BBTV基因组必不可少的,通过Southern杂交检测发现,这些附加组分在BBTV亚洲组中普遍存在,在南太平洋组中只有汤加和萨摩亚分离物中有信号。迄今为止从BBTV台湾分离物分离到3个附加组分,亚洲组的其他分离物是否也应该有3个类似的附加组分?另外,是否还有亚洲组内丢失而南太平洋组存在但又没被分离的复制酶组分?这些问题还有待研究。Timchenko等<sup>[14]</sup>研究表明,FB-2不

仅能启动自身复制,而且能启动其他非编码复制酶组分的复制,但别的附加组分只能启动自身复制。BBTV是不是也类似FBNYV,其附加组分只能自身复制?对病毒侵染是不是必要的?病毒的复制所需要的组分有哪些?这些问题的解决可以进一步明确BBTV的复制机理,对香蕉束顶病毒及其他植物病毒病的防治有重要的现实意义。

## 参 考 文 献

- [1] KARAN M, HARDING R, DALE J, et al. Evidence for two groups of banana bunchy top virus isolates[J]. *Journal of General Virology*, 1994, 75: 3541-3546.
- [2] 何自福, 肖火根, 李华平, 等. 香蕉束顶病毒株系的生物学特性研究[J]. *植物病理学报*, 2000, 31(1): 50-55.
- [3] BURNS T M, HARDING R M, DALE J L, et al. The genome organization of banana bunchy top virus: analysis of six ssDNA components[J]. *Journal of General Virology*, 1995, 76: 1471-1482.
- [4] HARDING R M, BURNS T M, HANFER G, et al. Nucleotide sequence of one component of the banana bunchy top virus genome contains a putative replicase gene[J]. *Journal of General Virology*, 1993, 74(3): 323-328.
- [5] BEETHAM P R, HAFNER G J, HARDING R M, et al. Two mRNAs are transcribed from banana bunchy top virus DNA-1[J]. *Journal of General Virology*, 1997, 78: 229-236.
- [6] BEETHAM P R, HARDING R M, DALE J L, et al. Banana bunchy top virus DNA-2 to 6 are monocistronic[J]. *Archives of Virology*, 1999, 144(1): 105-128.
- [7] YE H H, SU H J, CHAO Y C, et al. Genome characterization and identification of viral-associated dsDNA component of banana bunchy top virus[J]. *Virology*, 1994, 198(2): 645-652.
- [8] 何自福. 香蕉束顶病毒株系鉴定及衣壳蛋白基因在大肠杆菌中的表达[D]. 广州: 华南农业大学资源环境学院, 1999.
- [9] 徐春香. 香蕉束顶病毒基因克隆及转化体系的建立[D]. 广州: 华南农业大学资源环境学院, 2001.
- [10] 郑耘. 香蕉束顶病毒基因分析及基因转化载体构建[D]. 广州: 华南农业大学资源环境学院, 2003.
- [11] XIE Q, SUAREZ-LOPEZ P. Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication[J]. *The EMBO Journal*, 1995, 4: 4073-4082.
- [12] HORSER C L, KARAN M, HARDING R M, et al. Additional Rep-encoding DNAs associated with banana bunchy top virus[J]. *Archives of Virology*, 2001, 146: 71-86.
- [13] BELL K E, DALE J L, HA C V, et al. Characterisation of Rep-encoding components associated with banana bunchy top nanovirus in Vietnam[J]. *Archives of Virology*, 2002, 147: 695-707.
- [14] TIMCHENKO T, KOUCHKOVSKY F, KATUL L, et al. A single Rep initiates replication of multiple genome components

- of faba bean necrotic yellows virus a single-stranded DNA virus plants[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(12):10173-10182.
- [15] SANO Y, WADA M, HASHIMOTO Y, et al. Sequences of ten circular ssDNA components virus genome[J]. *Journal of General Virology*, 1998, 79:3111-3118.
- [16] BOEVINK P, CHU P W, KEESE P. Sequence of subterranean clover stunt virus DNA affinities with the geminiviruses[J]. *Virology*, 1995, 1207(2):354-361.
- [17] ROHDE W, RANGLES J W, LANGIDGE P, et al. Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus[J]. *Virology*, 1990, 176(2):648-651.
- [18] HUGHESA L. Birth-and-death evolution of protein-coding regions and concerted evolution of non-coding regions in the multi-component genomes of nanoviruses[J]. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 2004, 30(2):287-294.

## Cloning and Sequence Analysis of Additional Component Associated with Banana Bunchy Top Virus(BBTV)

RUAN Xiao-lei<sup>1</sup> LI Hai-hui<sup>2</sup> LI Hua-ping<sup>1</sup>

1. *Laboratory of Plant Virology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;*  
2. *Guangzhou Uprising Martyrs Park, Guangzhou 510080, China*

**Abstract** The additional components of NS and NSP strains of Guangdong isolate of banana bunchy top virus(BBTV) were cloned by polymerase chain reaction(PCR) and sequenced. They were denoted BT-NS and BT-NSP respectively. The length of both BT-NS and BT-NSP was 1 094 nucleotides. DNA and amino acids sequences deduced from the DNA fragments were analyzed by basic local alignment search tool(BLAST), the homologies shared 97.3% and 98.4% respectively. However, genome organization of the two additional components genome organization had familiar with regions, putative encoding replication initiation proteins motif. The replicase amino acid sequences associated with BBTV were analyzed by phylogenetic tree. The additional component BBTV NS/NSP isolate and BBTV-S1 were grouped together, while BBTV DNA in Guangdong isolate was outgrouped to BBTV NS/NSP strains additional component.

**Key words** banana bunchy top virus(BBTV); additional component; sequence analysis

(责任编辑:陈红叶)