

黑眼豇豆嵌紋病毒台灣分離株鞘蛋白基因與 3' 端非轉譯區序列之解讀與分析

陳許玉鈴¹ 王惠亮^{1,2}

1 高雄市 國立高雄師範大學生物科學研究所

2 聯絡作者, 電子郵件: hlwang@nknuc.nknu.edu.tw, 傳真: 07-7169030

接受日期: 中華民國 90 年 10 月 9 日

摘要

陳許玉鈴、王惠亮. 2001. 黑眼豇豆嵌紋病毒台灣分離株鞘蛋白基因與 3' 端非轉譯區序列之解讀與分析. 植病會刊 10:165-172.

黑眼豇豆嵌紋病毒 (*Blackeye cowpea mosaic virus*, BICMV), 屬於長絲狀的馬鈴薯 Y 病毒屬 (*Potyvirus*) 病毒, 為豆科作物最重要病毒之一。利用反轉錄聚合連鎖反應選殖黑眼豇豆嵌紋病毒之 3' 端區域, 經譯讀後顯示其鞘蛋白基因共有 861 個核酸, 可轉譯成 287 個胺基酸, 3' 端非轉譯區部分則具有 251 個核酸。由於鞘蛋白基因及 3' 端非轉譯區序列可作為 *Potyvirus* 屬鑑別與分類之標準, 故本研究之主要目的為, 藉分子層次上之比對, 以明瞭 BICMV 與幾種已發表的 bean common mosaic subgroup 病毒間之親緣性。比對結果顯示, 台灣本地之 BICMV-TW 分離株與國外報告之 BICMV-F (佛羅里達)、BICMV-W、CABMV-TH (泰國)、AzMV-H (日本)、PStV-ChinaG (中國)、PStV-B (美國)、BCMV-NY15 (美國)、BCMV-NL1 及 BCMV-NL4 彼此緣關係極為接近, 彼此間之相同度皆大於 90%。因此這些不同地區報告之病毒應屬於同一病毒 (BICMV) 的不同品系。其中台灣本地之 BICMV-TW 鞘蛋白基因序列與 BICMV-F 及 CABMV-TH 具較高之相同度, 與 PStV-B 及 PStV-ChinaG 具較低之相同度。而 BICMV 之 3' 端非轉譯區則與 BICMV-W 具有較高之相同度, 與 PStV-B 具較低之相同度。

關鍵詞: 黑眼豇豆嵌紋病毒、鞘蛋白基因、核酸序列

緒言

黑眼豇豆嵌紋病毒 (*Blackeye cowpea mosaic virus*, BICMV), 屬於長絲狀的馬鈴薯 Y 病毒屬 (*Potyvirus*) 病毒, 長度約為 700-800 nm, 最早在 1955 年由 Anderson 於佛羅里達所分離得到⁽²⁾; 在台灣, BICMV 主要寄主為豆科植物, 其可感染長豇豆 (*Vigna sesquipedalis*)、紅豆 (*Vigna angularis*)、綠豆 (*Vigna radiata*)、豇豆 (*Vigna unguiculata*) 及大豆 (*Glycine max*)⁽⁵⁾。感染 BICMV 之長豇豆及紅豆植株主要病徵為葉部品係性嵌紋或斑紋, 有時沿葉脈產生深綠色條斑, 稱之為脈綠嵌紋 (vein banding mosaic)。然而, 植株若只單獨感染 BICMV, 則其產生的病徵往往較為輕微; 若 BICMV 與胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 發生複合感染 (dual infection), 所造成之病徵則會由嵌紋轉為皺葉嵌紋, 葉片變形縮小, 植株生長停頓, 豆莢扭曲變形, 甚而出現壞疽^(1,5)。BICMV 主要是藉由種子帶毒之方式傳播^(1,2,5)。除此之外, BICMV 亦可經由蚜蟲以非永續性之方式傳播, 在台灣, 能傳播 BICMV 的蚜蟲主要有棉蚜 (*Aphis gossypii*) 及桃蚜 (*Myzus persicae*)。

目前全世界至少有 15 種不同之 potyviruses 可自然地感染豆科植物, 包括有花生條斑病毒 (*Peanut stripe virus*, PStV)、紅豆嵌紋病毒 (*Azuki bean mosaic virus*, AzMV)、黑眼豇豆嵌紋病毒 (*Blackeye cowpea mosaic virus*, BICMV)、苜蓿葉脈黃化病毒 (*Clover yellow vein virus*, CIYVV)、大豆嵌紋病毒 (*Soybean mosaic virus*, SbMV) 等, 而感染豆科之 potyvirus 病毒彼此間親緣關係接近⁽⁹⁾, 包括 AzMV、BICMV、PStV 等病毒因其親緣關係與 *bean yellow mosaic virus* 相近, 故其組成了 bean common mosaic subgroup⁽⁶⁾。近年來雖然學者們根據血清學反應, 或是鞘蛋白先經酵素 (tryptic digests) 處理、再經高壓液相層析法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 之蛋白質分析, 或是分子層次上之定序比對^(3,6,7,8,9), 探討豆科病毒彼此間之親緣關係, 但對於 BICMV、豇豆蚜媒嵌紋病毒 (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*; CABMV)、AzMV、PStV 及 BCMV 此些病毒之鑑別與分類尚有待釐清之部分。故本研究之主要目的為, 藉分子層次上之鞘蛋白基因核酸序列, 胺基酸序列

和 3' 端非轉譯區序列之解讀與分析比對，以明瞭 BICMV-TW 與幾種已發表的 bean common mosaic subgroup 病毒間之親緣性。

材料與方法

病毒來源與病毒核酸之萃取

病毒來源：本實驗中所使用之病毒來源係採集於高雄縣大社鄉葉片呈現嵌紋病徵之豇豆植株，經過三次奎藜 (*Chenopodium quinoa*) 單斑分離後，回接於豇豆，並經 BICMV 免疫球蛋白 (immunoglobulin G, IgG) (農委會農業試驗所張清安博士提供) 以間接式酵素連結抗體檢定法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 檢定為正反應者，做為本實驗之病毒材料，並定名為 BICMV-TW。

病毒純化：依據 Wang 等人⁽¹³⁾ 的方法來純化病毒。取已知感染 BICMV-TW 之豇豆病葉，加入 0.25 M 磷酸鉀緩衝液 (potassium phosphate buffer, pH 7.5)，內含 0.01 M Na₂EDTA 和 0.1% Na₂SO₃，以均質機均勻打碎後，再以 CCl₄ / CHCl₃ 混合液萃取，經 PEG 濃縮，最後以硫酸銨 (Cs₂SO₄)，在 6 °C 下以 38,000 rpm 超高速離心 22 小時 (P90AT rotor: Hitachi, Japan)。純化後之病毒以分光光度計 (Pharmacia ultrospec-2000 spectrophotometer) 由波長 320 nm 掃描至 220 nm，並記錄其吸收光度的曲線及其吸收值。由紫外光的吸收值中，取出最高 (A_{max}) 和最低 (A_{min}) 及波長為 280 nm (A₂₈₀) 和 260 nm (A₂₆₀) 之吸收值，並計算 A_{max}/A_{min} 及 A₂₈₀/A₂₆₀ 之比值，估算出病毒的濃度與純度，再將此病毒濃度稀釋成為 1 mg/ml，保存於 -70 °C 備用。

病毒核酸之萃取：取純化之 BICMV-TW 病毒 1 ml (1 mg/ml)，加入同體積的 2X 解離緩衝液 (80 mM Tris-HCl pH 8.0; 40 mM NaCl; 20 mM EDTA pH 8.0; 2% SDS)，將微量離心管加以上下翻轉。再加入蛋白質分解酵素 K (proteinase K，最後濃度為 10 µg/ml)，37 °C 水浴 15 分鐘。之後加入同體積的 phenol / chloroform / isoamyl alcohol (25 : 24 : 1, pH 5.2) 之混合液，並劇烈震盪之。於室溫下以 14,000 rpm (Jouan, A14, Italy) 離心 10 分鐘；取上層液，加入同體積之 chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1) 溶液，劇烈震盪之，於室溫下以 14,000 rpm 離心 5 分鐘；取上層液，加入 1/10 體積之 3 M 醋酸鈉 (sodium acetate, pH 5.2)，最後再加入 2 倍體積之 100% 酒精；置於 -20 °C 下，進行隔夜靜置。靜置完後，將樣品置於 4 °C 下，以 14,000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C, Germany) 離心 30 分鐘，小心吸掉上清液，之後以 70% 酒精清洗沉澱物，再於 4 °C 下，以 14,000 rpm 離心 2 分鐘，吸掉上清液。以真空濃縮乾燥器 (Eyela CVE-100 centrifugal vaporizer, Japan) 乾燥，再回溶於適量以焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate,

DEPC) 處理過的無菌水中。以分光光度計測其在波長 260 nm 時之吸收值，藉以計算其濃度，並以 DEPC 處理過的無菌水將其濃度調整為 1 µg / µl，最後置於 -70 °C 下保存之。

病毒核酸之電泳膠體分析：分別取 BICMV-TW 之 RNA (1 µg / µl) 及 RNA 分子標記 (RNA marker; 0.2-10.0 kb, Sigma) 各 1 µl，與 6 µl 乙二醛承載緩衝液 (glyoxal loading buffer: 30% Glyoxal 1.2 µl; DMSO 3.2 µl; 5X TAE 0.6 µl; loading dye 1.0 µl) 均勻混合，之後於 1% 洋菜水平膠體與 0.5X TAE 緩衝品係 (50 伏特 5 分鐘, 100 伏特 30 分鐘) 下，進行電泳分析，經溴化乙錠 (ethidium bromide) 染色後，利用與 RNA 分子標記 (RNA marker) 比對，估算 BICMV-TW RNA 分子之大小。

鞘蛋白基因及 3' 端非轉譯區之定序與分析

反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)：利用 GeneAmp EZ *rTth* RNA PCR kit (Applied Biosystems, U.S.A.) 進行 BICMV-TW 之反轉錄聚合酶連鎖反應。於薄壁離心管中加入 BICMV-TW RNA (0.2 µg / µl) 1 µl、DEPC 處理過的無菌水 23 µl、5X EZ buffer 10 µl、10 mM dNTP 6 µl、反轉錄酶 (*rTth* DNA polymerase, Applied Biosystems) 2 µl 及兩端引子 BI-3 (GCGGA GAATCTGTGCACCTA; 59-78)⁽⁸⁾ 與 BI-5 (TTTTTTTTTAACAACAACATTGCCGTAG CT; 233-254)⁽⁸⁾，將薄壁離心管置於自動溫度循環控制器 GeneAmp PCR system 2400 (Applied Biosystems, U.S.A.) 中，進行 RT-PCR 反應。增幅條件為：反轉錄部分是 56 °C 30 分鐘、94 °C 1 分鐘；而 PCR 之增幅條件則是 94 °C 15 秒、55 °C 30 秒、60 °C 7 分鐘。

反轉錄聚合酶連鎖反應產物之電泳膠體分析：取 RT-PCR 所合成之 cDNA 5 µl 與 1 µl 6X loading dye 混合均勻，之後於 1% 洋菜水平膠體與 0.5X TAE 緩衝品係 (50 伏特 5 分鐘, 100 伏特 20 分鐘) 下，進行電泳分析，經溴化乙錠染色後，與 DNA 分子標記 (DNA marker; 0.05-2kb, Novagen) 比對，估算 cDNA 分子大小。

鞘蛋白基因及 3' 端非轉譯區核酸序列之譯讀：序列之解讀是根據 Sanger⁽¹⁰⁾ 之雙股去氧核糖核酸鏈終止 (dideoxy chain termination) 方法，使用 ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 及 ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, U.S.A.) 核酸自動定序儀進行核酸序列之解讀。

鞘蛋白基因及 3' 端非轉譯區核酸序列之分析與比對：利用 Hitachi software DNASIS for Windows (version 2.0 DNASIS) 程式進行序列之分析。使用程式中反轉 (reverse) 與互補 (complement) 之功能，將下游引子譯讀出之反向序列轉成正向序列；之後再利用功能鍵的比對

(compare : maximum matching), 找出兩端引子所譯讀出之正向序列的重疊部份, 進一步將兩序列組合成完整的序列。可再利用程式中的 translation 功能將核酸序列轉譯成胺基酸序列。所得到的 BICMV-TW 之鞘蛋白基因核放酸序列、胺基酸序列及 3' 端非轉譯區核放酸序列置於 National Center for Biotechnology Information (NCBI, 網址: www.ncbi.nlm.nih.gov) 中的 BLAST 程式下, 進行相似序列搜尋, 再將所搜尋到的序列轉成序列檔 (*.seq, *.ami) 及純文字檔 (*.txt)。之後利用國家衛生研究所提供之巨分子序列分析服務 (GCG Command Mode, telnet: gcg.nhri.org.tw), 於多序列比較程式 (multiple comparison: PileUp、Pretty) 下分析 BICMV-TW 與其他國外已發表的 bean common mosaic subgroup 病毒間序列差異性, 並根據 Olddistances 程式, 計算 BICMV-TW 與其他國外已發表的 bean common mosaic subgroup 病毒間之相同度 (identity)。

結果

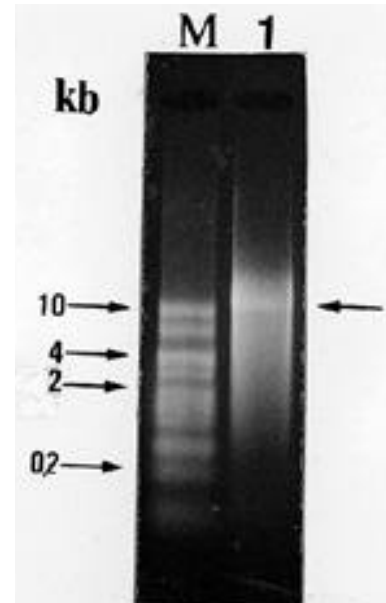
病毒純化與核酸之萃取

病毒純化: 純化之含病毒溶液以分光光度計由波長 320 nm 掃描至 220 nm, 並以自動記錄器記錄其吸收光度的曲線及其吸光值。結果顯示, 紫外光的吸光值呈現一具有高峰之曲線, 其於 260 nm 處出現 A_{max} , 於 246 nm 處出現 A_{min} , 顯示其為典型之 potyvirus 的吸收光譜。由吸光值中取出 A_{max} 、 A_{min} 、 A_{280} 和 A_{260} , 並計算 A_{max}/A_{min} 及 A_{280}/A_{260} 之比值, 結果顯示 BICMV-TW A_{max}/A_{min} 之比值為 1.12, A_{280}/A_{260} 之比值為 0.83, 根據換算 potyvirus 濃度之係數值 2.4 為定量標準, 每 100 g 之豇豆病葉中可獲得之病毒量為 8.7mg。

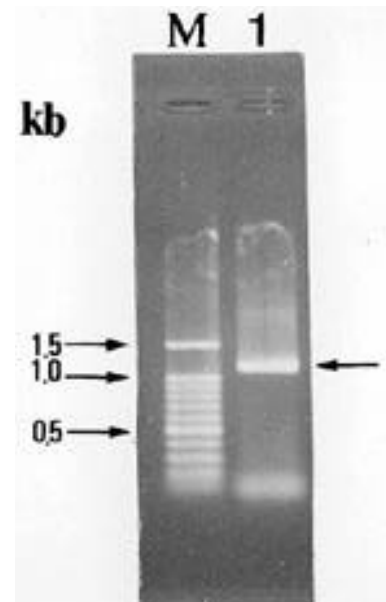
病毒核酸之萃取及電泳膠體分析: BICMV-TW 之 RNA 分子經 1% 洋菜水平膠體電泳, 並與 RNA 分子標記比對後, 結果顯示 BICMV-TW 之 RNA 分子量約略大於 10 kb (圖二)。

鞘蛋白基因及 3' 端非轉譯區之定序與分析

鞘蛋白基因及 3' 端非轉譯區 RT-PCR 反應與序列解讀: 以 BI-3 (GCGGAGAATC TGTGCACCTA) 及 BI-5 (TTTTTTTTA ACAACAAACATTGCCGTAGCT) 為引子, 進行 RT-PCR 增幅放大後, 所得到之 cDNA 大小約為 1.1 kb (圖二), 此 cDNA 經序列解讀後包含部分核內含體蛋白 b (nucleic inclusion b, NIb) 基因、完整的鞘蛋白 (coat protein, CP) 基因及 3' 端非轉譯區 (3' non-translated region, 3' NTR)。而 BICMV-TW 鞘蛋白基因共有 861 個核放酸, 可轉譯成 287 個胺基酸; BICMV-TW 3' 端非轉譯區部分則有 251 個核放酸 (圖三)。



圖一、黑眼豇豆嵌紋病毒台灣分離株 (*Blackeye cowpea mosaic virus* Taiwan strain, BICMV-TW) 核酸電泳分析圖
Fig. 1. Electrophoretic analysis of *Blackeye cowpea mosaic virus* Taiwan strain (BICMV-TW) RNAs in a 1% agarose gel. Lane M: 0.2-10.0 kb RNA marker (Sigma). Lane 1: RNA of BICMV-TW.



圖二、黑眼豇豆嵌紋病毒台灣分離株 (*Blackeye cowpea mosaic virus* Taiwan strain, BICMV-TW) 反轉錄聚合連鎖反應產物之電泳分析圖。
Fig. 2. Electrophoretic analysis of RT-PCR products of *Blackeye cowpea mosaic virus* Taiwan strain (BICMV-TW) in a 1% agarose gel. Lane M: 0.05-2 kb DNA marker (Novagen). Lane 1: RT-PCR product of BICMV-TW.

1	ETACGGACTTGGCCAGGCGCAACCCACCAATACGTCGATGTCGCTGCTGCAATGCAATGCAAAAGCA	81
	L S C T Q C P Q F P I N D A G V D A Q R E	80
	↓ Protein start	
81	AGGAG	120
	L I R R P H A N R G K D P E G E E G S V N N	40
121	AAUUG	160
	K R Q A G E S T M H H H E D V N A A S K Q	60
181	AAATTTGTT	240
	K V V P R L Q K I T K R R V L P H V R G	80
241	AAATGTT	300
	N V I L N L D H L L D V R P E Q I D L F	100
361	AACATGAT	360
	N V R A I K R Q P R H V Y W A V R Q E Y	120
421	GAAATGAT	420
	S I D D A C M S I V M R G P R V V C I D	140
481	AAATGAT	480
	M G T S P D V R Q T W V M M D Q D E Q V	160
601	AAATGAT	600
	R Y W L R F M V R H A S P T E R Q I M N	180
661	GAATTTGTT	660
	U F S D A A E A V I R M R N S E S P T R	200
721	CTTACGTT	720
	P F S Q L L R H L R D K R L A R C A P H	220
781	TTCTATGAT	780
	F S S V T G R T S D R A S E A V V Q M K	240
841	CCATGAT	840
	A A A L S S V S S X L D G L D C V V A P	260
901	ACATGAT	900
	S S S N T E R H I L R D V N Q P V S T L	280
961	CTTACGTT	960
	L C R G S P Q *	300
1021	AGCTGAT	1020
	ACU T T G S P T A C T A T T G S A T A G G T G T T T A G C C A A C C A C A T A T T G T G O O T A C T T P A T	1020
1081	CTTACGTT	1080
	CTTACGTT	1080
1141	TTTCTGAT	1140
	TTTCTGAT	1140

圖三、黑眼豇豆嵌紋病毒台灣分離株 (*Blackeye cowpea mosaic virus* Taiwan strain, BICMV-TW) 鞘蛋白基因核酸、胺基酸序列及 3' 端非轉譯區核酸序列。

Fig. 3. The nucleotide and amino acid sequences of the CP gene, and nucleotide sequence of 3' non-translated region of *Blackeye cowpea mosaic virus* Taiwan strain (BICMV-TW). "*" indicates the end of translation.

鞘蛋白基因及 3' 端非轉譯區核啟酸序列之分析與比對：將所得到的 BICMV-TW 之鞘蛋白基因核啟酸、胺基酸序列及 3' 端非轉譯區核啟酸序列置於 NCBI 中的 BLAST 程式下，進行相似序列搜尋，於比對的結果中選定 BICMV-F (佛羅里達)、BICMV-W、CAbMV-TH (泰國)、AzMV-H (日本)、PStV-ChinaG (中國)、PStV-B (美國)、BCMV-NY15 (美國)、BCMV-NL1 及 BCMV-NL4。此些病毒雖不是相同病毒，但皆為血清學上親緣關係相近之重要豆科病毒，且均屬於 *Potyvirus*⁽⁹⁾。所選定之比較序列其於 NCBI GeneBank 中的 accession number 以及作者如表一所示。利用國家衛生研究院所提供的巨分子序列分析服務 (GCG Command Mode)，分析 BICMV-TW 以及此些病毒彼此間的鞘蛋白基因核啟酸、胺基酸及 3' 端非轉譯區核啟酸序列之序列相同度 (identity) (表二、三和四)。結果顯示 BICMV-TW 的鞘蛋白基因之核啟酸序列與 BICMV-F (佛羅里達) 鞘蛋白基因核啟酸序列具有較高的相同度 (99.31%)，而 BICMV-TW 鞘蛋白基因之核啟酸序列與 PStV-B 鞘蛋白基因之核啟酸序列的相同度 (88.15%) 較低。而鞘蛋白基因之胺基酸序列相同度比對的結果顯示，BICMV-TW 鞘蛋白基因之胺基酸序列與 BICMV-F (佛羅里達) 及 CAbMV-TH (泰國) 之鞘蛋白基因胺基酸序列的相同度高達 98.95%，而與 PStV-ChinaG (中國) 及 PStV-B (美國) 之鞘蛋白基因胺基酸序列的相同度 (92.68%) 較低。BICMV-TW 的 3' 端非轉譯區之核啟酸序列與 BICMV-W 的 3' 端非轉譯區核啟酸序列具有較高的相同度 (98.82%)，而與 PStV-B 3' 端非轉譯區之核啟酸序列的相同度 (90.55%) 較低；由於 BICMV-F 發表於 NCBI 中的序列並無包括 3' 端非轉譯區，且 PStV-ChinaG (中國) 發表於 NCBI 中之 3'

端非轉譯區核啟酸序列並不完整，故此處 BICMV-TW 的 3' 端非轉譯區核啟酸序列之比較並未包括 BICMV-F 及 PStV-ChinaG (中國) 在內。

討 論

BICMV-TW RNA 萃取後，先經水平電泳分析確定萃取所得為完整片段之 RNA 分子，結果顯示，電泳僅出現一分子片段，經與 0.24-9.5 kb 之 RNA 分子標誌比對之後，計算其分子量大小略大於 10 kb (圖一)，是一般 potyvirus RNA 的長度⁽¹⁵⁾。BICMV-TW 鞘蛋白基因核啟酸序列解讀共有 861 個核啟酸，可轉譯成 287 個胺基酸 (圖三)，Wu 等人⁽¹⁵⁾ 報告利用蚜蟲作為傳播方式的 *Potyvirus* 屬病毒，在 CP 的 N 端具有一個高度保留的 Asp-Ala-Gly (DAG) 結構，能與 HC-Pro (help component protein) 作用，參與蚜蟲的傳播病毒過程，而 BICMV-TW 鞘蛋白胺基酸位於第 12-14 胺基酸位置，具有 DAG 結構，因此 BICMV 可經由蚜蟲傳播⁽¹⁾ 應與此結構有關。

Dijkstra 及 Khan⁽⁶⁾ 根據寄主範圍、血清學證據、藉由高壓液相層析法所分析蛋白質等實驗之結果，認為 BICMV-F (佛羅里達)、BICMV-W 為相同病毒之不同品系，且 BCMV-NY15 與 BICMV-W 亦是屬於相同病毒之不同品系。Mckern 等人⁽⁹⁾ 亦是藉由先將鞘蛋白經 tryptic digests 處理，之後再經高壓液相層析法分析蛋白質，探討幾種豆科病毒之親緣關係，認定 PStV、AzMV、BICMV 及 soybean isolate 為同一 potyvirus 之不同品系，並發現 PStV 與 BICMV 有著強烈的血清親緣關係存在，且 AzMV 與 BICMV-F (佛羅里達) 在血清學上難以區分。Khan 等人

表一、與黑眼豇豆嵌紋病毒台灣分離株 (*Blackeye cowpea mosaic virus* Taiwan strain, BICMV-TW) 作比對之國外 bean common mosaic subgroup 中各病毒比對表

Table 1. List of reported viruses in bean common mosaic subgroup used for comparison with *Blackeye cowpea mosaic virus* Taiwan strain (BICMV-TW)

Viruses ¹	Areas (strains)	Literature cited	Database accession number
BICMV-F	USA (Florida)	van Boxtel <i>et al.</i> , 2000 ⁽³⁾	Y17823 (02-MAR-2000)
BICMV-W	(W)	Khan <i>et al.</i> , 1993 ⁽⁸⁾	S66253 (09-DEC-1993)
CAbMV-TH	Thailand	Sae-ung <i>et al.</i> (Unpublished)	U72204 (21-OCT-1996)
AzMV-H	Japan (H)	Uyeda and Takahashi (Direct submission)	AB012663 (08-APR-1998)
PStV-B	USA (blotch)	Cassidy <i>et al.</i> , 1993 ⁽⁴⁾	NC-001723 (03-APR-2000)
PStV-China G	China (China G)	Higgins <i>et al.</i> (Unpublished)	AJ132143 (11-JAN-2000)
BCMV-NY15	USA (NY15)	Collmer and Jahn (Unpublished)	AF083559 (23-SEP-1998)
BCMV-NL1	(NL1)	Wyatt and Berger (Unpublished)	L15331 (19-MAR-1996)
BCMV-NL4	(NL4)	Wyatt and Berger (Unpublished)	L21766 (18-MAR-1996)

¹. BICMV-F and BICMV-W represent Florida and W strain of *Blackeye cowpea mosaic virus*, respectively. CAbMV-TH represents Thailand strain of *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. AzMV-H represents *Azuki bean mosaic virus*. PStV-B and - China G represent blotch and China G strain of *Peanut stripe virus*, respectively. BCMV-NY15, -NL1 and - NL4 represent NY15, -NL1 and - NL4 strain of *Bean common mosaic virus*, respectively.

表二、黑眼豇豆嵌紋病毒台灣分離株 (BICMV-TW) 與國外發表的 BICMV-F、BICMV-W、CAbMV-TH、AzMV-H、PStV-B、PStV-ChinaG、BCMV-NY15、BCMV-NL1 及 BCMV-NL4 之鞘蛋白基因核酸序列相同度比較

Table 2. Comparison of nucleotide identities (%) of the CP gene of BICMV-TW with reported BICMV-F, BICMV-W, CAbMV-TH, AzMV-H, PStV-B, PStV-ChinaG, BCMV-NY15, BCMV-NL1 and BCMV-NL4 in bean common mosaic virus subgroup

Viruses / strains ¹	BICMV-TW	BICMV-F	BICMV-W	CAbMV-TH	AzMV-H	PStV-B	PStV-ChinaG	BCMV-NY15	BCMV-NL1	BCMV-NL4
BICMV-TW	100.00	99.31	97.45	96.05	90.39	88.15	88.19	92.36	91.75	89.20
BICMV-F		100.00	97.45	95.82	90.28	88.04	88.08	92.36	91.75	89.20
BICMV-W			100.00	94.08	88.42	87.22	86.70	91.17	91.17	88.27
CAbMV-TH				100.00	89.43	87.92	88.04	91.99	91.41	88.62
AzMV-H					100.00	89.08	89.02	85.34	91.41	90.24
PStV-B						100.00	99.42	88.27	88.62	88.39
PStV-ChinaG							100.00	87.81	88.97	88.50
BCMV-NY15								100.00	98.26	91.29
BCMV-NL1									100.00	90.82
BCMV-NL4										100.00

¹. BICMV-TW, -F and -W represent Taiwan, Florida and W strain of *Blackeye cowpea mosaic virus*, respectively. CAbMV-TH represents Thailand strain of *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. AzMV-H represents *Azuki bean mosaic virus*. PStV-B and -China G represent blotch and China G strain of *Peanut stripe virus*, respectively. BCMV-NY15, -NL1 and -NL4 represent NY15, -NL1 and -NL4 strain of *Bean common mosaic virus*, respectively.

表三、黑眼豇豆嵌紋病毒台灣分離株 (BICMV-TW) 與國外發表的 BICMV-F、BICMV-W、CAbMV-TH、AzMV-H、PStV-B、PStV-ChinaG、BCMV-NY15、BCMV-NL1 及 BCMV-NL4 之鞘蛋白基因胺基酸序列相同度比較

Table 3. Comparison of amino acid identities (%) of the CP gene of BICMV-TW with reported BICMV-F, BICMV-W, CAbMV-TH, AzMV-H, PStV-B, PStV-ChinaG, BCMV-NY15, BCMV-NL1 and BCMV-NL4 in bean common mosaic virus subgroup

Viruses / strains ¹	BICMV-TW	BICMV-F	BICMV-W	CAbMV-TH	AzMV-H	PStV-B	PStV-ChinaG	BCMV-NY15	BCMV-NL1	BCMV-NL4
BICMV-TW	100.00	98.95	98.61	98.95	93.73	92.68	92.68	96.17	95.12	93.38
BICMV-F		100.00	98.26	98.26	93.38	92.33	92.33	95.82	94.77	92.68
BICMV-W			100.00	97.91	93.73	92.68	92.68	96.17	95.12	93.03
CAbMV-TH				100.00	93.73	93.03	93.03	96.17	95.12	93.73
AzMV-H					100.00	93.38	93.38	92.33	92.33	91.29
PStV-B						100.00	100.00	91.64	91.64	93.03
PStV-ChinaG							100.00	91.64	91.64	93.03
BCMV-NY15								100.00	97.21	93.38
BCMV-NL1									100.00	92.33
BCMV-NL4										100.00

¹. BICMV-TW, -F and -W represent Taiwan, Florida and W strain of *Blackeye cowpea mosaic virus*, respectively. CAbMV-TH represents Thailand strain of *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. AzMV-H represents *Azuki bean mosaic virus*. PStV-B and -China G represent blotch and China G strain of *Peanut stripe virus*, respectively. BCMV-NY15, -NL1 and -NL4 represent NY15, -NL1 and -NL4 strain of *Bean common mosaic virus*, respectively.

⁽⁸⁾ 從 BCMV-NY15、BCMV-NL1 及 BICMV-W 之鞘蛋白基因與 3' 端非轉譯區序列比對結果中發現，BCMV-NY15、BCMV-NL1 及 BICMV-W 有著相同的鞘蛋白胺基酸數目，且保留度高，3' 端非轉譯區之核酸數目與序列亦為相似，故認為 BCMV-NY15、BCMV-NL1 及 BICMV-W 該是同一

potyvirus 之不同品系。CAbMV 與 BICMV 有著相似的物理特性，且誘發了相似之病徵。Huguenot 等人⁽⁷⁾ 根據血清學證據、鞘蛋白之分子量差異、藉由先將鞘蛋白經 tryptic digests 處理，之後再經高壓液相層析法分析蛋白質，判定 CAbMV 與 BICMV 為兩種不同之 potyvirus 病

表四、黑眼豇豆嵌紋病毒台灣分離株 (BICMV-TW) 與國外發表的 BICMV-W、CAbMV-TH、AzMV-H、PStV-B、PStV-ChinaG、BCMV-NY15、BCMV-NL1 及 BCMV-NL4 之 3' 非轉譯區核酸序列相同度比較

Table 4. Comparison of nucleotide identities (%) of the 3' non-translated region of reported BICMV-TW with BICMV-W、CAbMV-TH、AzMV-H、PStV-B、BCMV-NY15、BCMV-NL1 and BCMV-NL4 in bean common mosaic virus subgroup

Viruses / strains ¹	BICMV-TW	BICMV-W	CAbMV-TH	AzMV-H	PStV-B	BCMV-NY15	BCMV-NL1	BCMV-NL4
BICMV-TW	100.00	98.82	93.85	90.77	90.55	94.82	95.26	96.54
BICMV-W		100.00	93.31	94.09	90.16	94.82	95.26	96.06
CAbMV-TH			100.00	84.98	88.58	92.43	93.68	93.85
AzMV-H				100.00	91.34	96.02	96.44	93.08
PStV-B					100.00	89.64	90.91	91.34
BCMV-NY15						100.00	98.80	97.61
BCMV-NL1							100.00	98.81
BCMV-NL4								100.00

¹. BICMV-TW, -F and -W represent Taiwan, Florida and W strain of *Blackeye cowpea mosaic virus*, respectively. CAbMV-TH represents Thailand strain of *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. AzMV-H represents *Azuki bean mosaic virus*. PStV-B and -China G represent blotch and China G strain of *Peanut stripe virus*, respectively. BCMV-NY15, -NL1 and -NL4 represent NY15, -NL1 and -NL4 strain of *Bean common mosaic virus*, respectively.

毒。Boxtel 等人⁽³⁾從分子層次上分析豆科病毒之相同度，藉以釐清彼此間的分類關係，認為 CAbMV 與 BICMV 為 bean common mosaic subgroup 中之兩種不同的病毒，但其中 CAbMV-TH (泰國) 與 BICMV-F (佛羅里達)、BICMV-W 之鞘蛋白胺基酸序列與 3' 端非轉譯區核酸序列相同度高達 97% 以上，故 Boxtel 等人認為 CAbMV-TH 與 BICMV-F、BICMV-W 應為相同病毒之不同品系。本試驗進行台灣本地之分離株 BICMV-TW 鞘蛋白基因及 3' 端非轉譯區之定序與比對，根據鞘蛋白基因核酸序列，胺基酸序列和 3' 端非轉譯區序列之比對結果 (表二、三和四) 顯示，台灣本地之分離株 BICMV-TW 與 BICMV-F (佛羅里達)、BICMV-W、CAbMV-TH (泰國)、AzMV-H (日本)、PStV-ChinaG (中國)、PStV-B (美國)、BCMV-NY15 (美國)、BCMV-NL1 及 BCMV-NL4 彼此親緣關係極為接近，相同度皆大於 90%，由此結果顯示，上述之幾種不同名稱之病毒應該為相同病毒之不同品系。由親緣關係分析發現，序列之相同度與病毒之地域性間無相互關係，此結果支持了這些豆科病毒因其主要藉由種子傳播而使得其散播變得廣闊之觀點⁽³⁾。

傳統的 potyvirus 研究常利用病毒鞘蛋白基因進行不同病毒或品系間的鑑定與分類。因為不同種的 potyvirus 其鞘蛋白基因並不具有明顯的同源性 (homology)；不同種病毒之鞘蛋白基因相同度幾乎皆在 38-71% 之間 (平均 54%)，而同種病毒之不同品系的鞘蛋白基因同源性高達 90-99%。除相同度外，不同種病毒的鞘蛋白基因之 N 端核酸或胺基酸序列歧異度較高，相同度皆較鞘蛋白基因的核心 (core) 區域及 C 端低；反之，同種病毒之不同品系鞘蛋白基因 N 端相同度較高。由於鞘蛋白是病毒主要的基因產物，鞘蛋白佔整個病毒分子的 95%，故利用血清學

所做的病毒種系間之鑑定與分類大多亦是利用鞘蛋白之抗血清來進行，血清學反應了鞘蛋白的結構。根據上述之理由可知 potyvirus 的鞘蛋白比其他特性更方便用來作為 potyvirus 鑑定與分類之標準^(11,12,14)。

引用文獻

1. 張清安、林俊義、楊佐琦、詹竹明. 1993. 無病毒豇豆種子之生產與應用. 蔬菜保護研討會專刊 83-93. 台中台灣.
2. Albersio, J., Lima, A., Purcifull, D. E. and Hiebert, E. 1979. Purification, partial characterization, and serology of *Blackeye cowpea mosaic virus*. *Phytopathology* 69:1252-1258.
3. Boxtel, J. V., Thomas, C. L. and Maule, A. J. 2000. Phylogenetic analysis of two potyvirus pathogens of commercial cowpea lines: Implications for obtaining pathogen-derived resistance. *Virus Genes* 20:71-77.
4. Cassidy, B., Sherwood, J. L. and Nelson, R. S. 1993. Cloning of the capsid protein gene from a blotch isolate of *Peanut stripe virus*. *Arch. Virol.* 128:287-297.
5. Chang, C. A. 1992. Viruses of legume crops in Taiwan. Pages 193-212 in *Proceedings of the Symposium on Plant Virus and Virus-like Diseases*. Taichung, December 23-24, 2001.
6. Dijkstra, J. and Khan, J. A. 1992. A proposal for a bean common mosaic subgroup of potyviruses. *Arch. Virol., Suppl.* 5:389-395.
7. Huguenot, C., Furneaux, M. T. and Hamilton, R. I. 1994. Capsid protein properties of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* and *Blackeye cowpea mosaic virus* confirm the existence of two major subgroups of aphid-transmitted, legume-infecting potyviruses. *J. Gen. Virol.* 75:3555-3560.

8. Khan, J. A., Lohuis, D., Goldbach, R. and Dijkstra, J. 1993. Sequence data to settle the taxonomic position of *Bean common mosaic virus* and *Blackeye cowpea mosaic virus* isolates. *J. Gen. Virol.* 74:2243-2249.
9. McKern, N. M., Shukla, D. D., Barnett, O. W., Vetten, H. J., Dijkstra, J., Whittaker, L. W. and Ward, C. W. 1992. Coat protein properties suggest that *Azuki bean mosaic virus*, *Blackeye cowpea mosaic virus*, *Peanut stripe virus*, and three isolates from soybean are all strains of the same potyvirus. *Intervirology* 33:121-134.
10. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5463-5467.
11. Shukla, D. D., Frenkel, M. J. and Ward, C. W. 1991. Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. *Can. J. Plant Pathol.* 13:178-191.
12. Shukla, D. D. and Ward, C. W. 1988. Amino acid sequence homology of coat proteins as basis for identification and classification of the potyvirus group. *J. Gen. Virol.* 69:2703-2710.
13. Wang, H. L., Gonsalves, D., Provvidenti, R. and Zitter, T. A. 1992. Comparative biological and serological properties of four strains of zucchini yellow mosaic virus. *Plant Dis.* 76:530-535.
14. Ward, C. W. and Shukla, D. D. 1991. Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. *Intervirology* 32:269-296.
15. Wu, M. F. and Wang, H. L. 1999. Analysis of the sequence diversity of the coat protein genes of different turnip mosaic virus strains. *Plant Pathol. Bull.* 8:133-142.

ABSTRACT

Chen-Hsu, Y. L.¹ and Wang, H. L.^{1,2} 2001. Analysis of the sequence of coat protein gene of *Blackeye cowpea mosaic virus* in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 165-172. (¹. Institute of Biological Science, National Kaohsiung Normal University, Kaohsiung, 800, Taiwan, R.O.C. ; ². Corresponding author, Email: hlwang@nknuc.nknu.edu.tw; Fax: +886-7-7169030)

Blackeye cowpea mosaic virus (BICMV) is a member of the genus *Potyvirus* and is one of the most important virus infecting leguminaceous crops. In this study, the cDNAs of the 3'-terminal regions of BICMV-TW was amplified by RT-PCR and cloned. The nucleotide and amino acid sequences of coat protein (CP) gene and 3' non-translated region (NTR) of BICMV-TW was analyzed and compared with other reported members of bean common mosaic virus subgroup (BICMV-F, BICMV-W, CAbMV-TH, AzMV-H, PStV-China G, PStV-B, BCMV-NY15, BCMV-NL1 and BCMV-NL4) from different geographic areas. The results showed that the sequence of 1112 bp located in the 3'-terminal regions of BICMV-TW including 861 nucleotides of CP gene encoding a 287 amino acid which was followed by a non-translated region of 251 nucleotides and a 3' poly(A) tail. Comparison of BICMV-TW with other reported members of bean common mosaic virus subgroup indicated that they are all the same virus but different strains. The results also showed that CP gene of BICMV-TW had a higher identity with BICMV-F and CAbMV-TH, and a lower identity with PStV-B and PStV-China G. The 3' non-translated region of BICMV-TW has a higher identity with BICMV-W, and a lower identity with PStV-B.

Key words : *Blackeye cowpea mosaic virus*, coat protein gene, nucleotides sequence