

花生條斑病毒 Ts 系統基因序列之解讀與分析

王惠亮^{1,3} 張穎櫻¹ 張清安²

¹ 高雄市 國立高雄師範大學生物科學研究所

² 台中縣 行政院農業委員會農業試驗所植病組

³ 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 94 年 8 月 14 日

摘要

王惠亮、張穎櫻、張清安. 2005. 花生條斑病毒 Ts 系統基因序列解讀與分析. 植病會刊: 14:211-220.

在台灣田間的感病花生植株中可以分離出花生條斑病毒 (Peanut stripe virus, PStV) 嚴重型 (Ts) 和普通型 (Tc) 兩種系統。PStV-Tc 在落花生上所引起之病徵，主要為沿葉脈上出現深綠色條斑 (stripe) 或斑塊 (blotch)，感病葉片有凹凸不平現象，嚴重者扭曲變形，植株矮化，生長不良。嚴重型分離株 (PStV-Ts)，除引起上述之病徵外，葉片下表面主脈上還會出現壞疽 (necrosis) 情形，隨病勢之進展壞疽還會延伸至葉柄與莖部，感病植株極度矮化生長不良，產量損失可達 67% 以上。本研究將感染 PStV-Ts 之紅豆病葉萃出液經 polyethylene glycol (PEG) 沈降及硫酸銨等密度離心後可得純化之病毒顆粒，病毒 RNA 萃取後經電泳顯示其長度均約 10 kb。針對 Ts 系統進行基因序列之定序，近全長度基因體共含 10009 個核鹼酸 (Acc. No.: AY968604)，其大小和其它 potyviruses 相似。基因體 RNA 只含一個轉譯架構，由第 87 個核鹼酸起轉譯至第 9755 止，共轉譯出一個含 3222 個胺基酸的複合蛋白。將所完成之 PStV-Ts 近全長度核酸與本實驗室已譯讀完成之黑眼豇豆嵌紋病毒台灣系統 (Blackeye cowpea mosaic virus Taiwan strain, BICMV-TW) 及國外之花生條斑病毒 (Peanut stripe virus blotch strain, PStV-B)，菜豆普通嵌紋病毒 R 系統 (*Bean common mosaic virus* R strain, BCMV-R) 和 Y 系統 (BCMV-Y)、比較各基因核鹼酸序列與胺基酸序列相同度，各基因之核鹼酸與胺基酸除 P1、P3 及 6K2 基因外，皆高於 80%；尤其 PStV-Ts 與國外發表之 PStV-B 相同度最高，除 P1 外其餘基因的相同度都在 90% 以上。這幾種病毒皆保有 coat protein (CP) 基因 N 端與蚜蟲傳播有關的 DAG motif，在 Nib 蛋白質基因亦保留了核心複製活性部位 GDD motif。在 helper component protease (HC-Pro) 蛋白皆保留了 KITC 與 PTK motifs。比較各基因核鹼酸序列與胺基酸序列相同度，結果顯示這幾種病毒確為菜豆普通嵌紋病毒 (BCMV) 之不同系統。

關鍵詞：花生條斑病毒、開放轉譯架構、核鹼酸序列

緒言

全世界至少有 15 種不同之 potyviruses 可自然感染豆科植物，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*, SMV)、菜豆普通嵌紋病毒 (*Bean common mosaic virus*,

BCMV) 及西瓜嵌紋病毒 (*Watermelon mosaic virus*, WMV) 等，而感染豆科之 potyviruses 病毒彼此間血清類緣關係接近⁽⁸⁾，其中 AzMV、BICMV、PStV 等病毒與 BCMV 更相近⁽¹¹⁾，因此被認為同種異名病毒，故其組成了菜豆普通嵌紋亞群 (bean common mosaic subgroup)，雖然亞群 (subgroup) 之分類地位並不被 International Committee on Taxonomy of Viruses 所承認，但為了更方便探討一群親緣關係相近之病毒，菜豆普通嵌紋亞群 (bean common mosaic subgroup) 是被

公認的。

花生條斑病毒是由 Demski 等人於美國喬治亞州引自中國大陸之落花生種源上所發現而定名⁽⁹⁾。在台灣，此病毒是於 1979 年在屏東縣新園鄉的花生田中被發現⁽²⁾。除台灣以外，日本、中國大陸、泰國及馬來西亞均有類似病毒之報告⁽²⁾。在美國此病毒已成為僅次於花生斑紋病毒 (*Peanut mottle virus*, PeMoV) 之重要落花生病毒^(2,3)。

花生條斑病毒屬於馬鈴薯 Y 病毒科 (*Potyviridae*)，馬鈴薯 Y 病毒屬 (*Potyvirus*)，病毒顆粒為長絲狀，不同分離株所測得之粒子長度介於 747~760 nm 不等，病毒外鞘由 33.5~36 kDa 的病毒鞘蛋白 (coat protein, CP) 所組成。感病植株細胞質內可觀察到圓柱狀內含體 (cylindrical inclusion)，其超薄切片在電子顯微鏡下成風車狀 (pinwheel)，在光學顯微鏡下，則常呈顆粒狀聚集於細胞核附近⁽³⁾。

Chang 等人在台灣田間的感病植株中分離出兩種系統 (Ts 和 Tc)^(6,7)。系統 Tc 在落花生上所引起之病徵，主要為沿葉脈上出現深綠色條斑 (stripe) 或斑塊 (blotch)，感病葉片有凹凸不平現象，嚴重者扭曲變形，植株矮化，生長不良。嚴重型分離株 (Ts)，除引起上述之病徵外，葉片下表面主脈上還會出現壞疽 (necrosis) 情形。隨病勢之進展壞疽還會延伸至葉柄與莖部，感病植株極度矮化生長不良，產量損失可達 67% 以上⁽⁶⁾。

花生條斑病毒可藉機械接種及蚜蟲以非永續型方式媒介傳播。在台灣可傳播花生條斑病毒的蚜蟲種類已知有桃蚜 (*Myzus persicae*) 及黑豆蚜 (*Aphis craccivora*) 二種，此二種蚜蟲在台灣均有普遍發生之記錄。根據報告，桃蚜於獲毒後可維持感染能力達 12 小時之久，而黑豆蚜則只能維持 2 小時。因此桃蚜可能扮演著遠距離傳播花生條斑病毒之角色⁽³⁾。

花生條斑病毒具有很高的種子帶毒率，Demski⁽⁹⁾ 等人指出，花生條斑病毒在美國主要栽培種 Argentine 及 Florunner 上帶毒率分別為 37.6% 及 19.3%。Chang⁽⁷⁾ 等人則發現在台灣台農四號落花生品種上，可造成 12.5% 之種子帶毒，對落花生之生產具有很大的威脅性。因此，花生條斑病毒的田間初次傳染源，應該是來自於帶毒種子，感染病毒之幼苗再經由蚜蟲之媒介，便可以將病毒四處傳播，不僅危害落花生，同時也威脅其他作物之生長。

花生條斑病毒已經被證實在台灣綠豆、紅豆及大豆田中發生，因此病毒可在此類作物間相互傳染，互為因果，極具生態上之意義。每年秋冬 10~12 月為台灣乾旱季節，溫度適中，乃蚜蟲繁殖高峰期，有翅型

蚜蟲密度常居高不下，造成花生條斑病毒在這段期間內特別容易發生⁽³⁾。

花生條斑病毒之寄主範圍，以感染豆科植物為主，但目前所分離之花生條斑病毒系統均可以感染藜科之 *Chemopodium amaranticolor* 及 *C. quinoa*；茄科之 *Nictiana benthamiana* 與豆科之綠豆 *Vigna radiata*、紅豆 *V. angularis*、大豆 *Glycine max* 及黑眼豇豆 *V. unguiculata ssp. unguiculata*，但不感染豌豆 *Pisum sativum*⁽³⁾。已知的花生條斑病毒理化性質包括耐熱性 60~65、耐稀釋性 10^{-3} ~ 10^{-4} 、在 20 下粗汁液感染力可維持 3~4 天。

為了發展出對抗花生條斑病毒 Ts 系統的防治策略和分子診斷技術，分析此一病毒的全長基因序列與遺傳變異是必要的，本實驗之目的即在於瞭解台灣花生條斑病毒 Ts 系統之核殼酸及胺基酸序列組成，另一目的在經由比較、分析花生條斑病毒 Ts 系統與黑眼豇豆嵌紋病毒台灣系統 (BICMV-TW) 及國外發表的花生條斑病毒 (PStV-B)、菜豆普通嵌紋病毒 R 和 Y 系統 (BCMV-R and BCMV-Y)，進行全長度核殼酸、蛋白質序列的比對、分析與探討親緣關係之研究，希望從分子生物學的層面解決以往分類上存在之爭議，同時瞭解花生條斑病毒 Ts 系統在分類上的地位，因為在以往寄主範圍、病徵表現等分類方法除了易受環境和人為因素的干擾外，所顯示病毒種間或系統間的差異常呈現出程度或數量上連續性 (continuum) 的變化，使得分類的結果較模糊不清，而傳統血清學上的分類是利用交叉反應來反映出病毒間關係的遠近 (相似程度)，但在少數的情況下會因交互反應 (cross reaction) 的產生而有分類不周全的缺點，因此若能以血清學所得的資料配合分子生物學層次的資料兩者相互佐證，相信應可使病毒的分類更臻完善。

材料與方法

病毒之來源與分離

本實驗中所使用之花生條斑病毒 Ts 系統 (PStV-Ts) 係由行政院農委會農業試驗所植病系張清安博士提供。以 0.1M 磷酸緩衝液 (phosphate buffer, pH 7.0) 研磨成汁，接種於健康之奎藜 (*C. quinoa* L.) 及花生 (*Arachis hypogaea* L.) 葉片上，作為病毒保存、接種、繁殖與純化材料。

病毒之接種與繁殖

病毒接種源之製備係將上述新鮮病葉和 0.1 M 磷酸

緩衝液 (phosphate buffer, pH 7.0) 以 1 : 20 的比例, 加入研磨成汁後, 再接種於健康紅豆 (*V. angularis*) 之小苗上。接種時先在紅豆之小苗葉片表面灑上少量的 600 目金剛砂, 再以棉花沾取研磨之病液輕輕擦拭葉面。然後以清水沖洗整個葉片, 約 14~16 天即可顯出病徵, 此時便可採收並進行病毒之純化。

病毒之純化

取接種 PStV-Ts 之紅豆病葉 100 g, 加入萃取緩衝液 (0.25 M potassium phosphate buffer, KPB; 0.1 M EDTA; 0.1% Na₂SO₃) 200 ml, 以均質機 (Warning blender) 高低速交替均勻打碎病葉, 再緩緩加入 100 ml 氯仿 (chloroform) 及 100 ml 四氯化碳 (CCl₄) 的混合液, 以低速再混合 1~2 分鐘。將均質機內的溶液分裝於離心管, 以 5,000 rpm (R14A, Hitachi Himac CR 22E, Japan) 離心 5 分鐘, 吸取上清液, 以 8,000 rpm (R14A) 離心 15 分鐘, 取上清液並視上清液體積加入 polyethylene glycol (PEG) 6,000 (每 100 ml 加入 8 g), 於 4℃ 低速攪拌 1 小時。攪拌後的溶液, 以 10,000 g 離心 20 分鐘, 將上清液倒掉, 加入 100 ml PE 緩衝液 (0.1 M KPB, pH 7.2; 0.01 M EDTA), 用磨棒將緩衝液和沈澱物混合均勻後, 於 4℃ 低速攪拌 1 小時。攪拌後之溶液, 以 5,000 rpm (R14A) 離心 10 分鐘, 取上清液, 視上層液的體積加入 PEG 6,000 (每 100 ml 加入 5 g) 及 NaCl 至 0.3 M。然後, 於 4℃ 以低速攪拌 1 小時。攪拌後之溶液, 以 10,000 g 離心 20 分鐘, 將上層液倒掉, 加入 15 ml 0.05 M KPB 緩衝液 (pH 7.2), 用磨棒將緩衝液及沉澱物混合均勻後, 於 4℃ 以低速攪拌 1 小時。攪拌後之溶液, 加入重量百分比為 26% 之硫酸銨 (Cs₂SO₄, MERCK, Germany), 於 4℃ 以低速攪拌 40 分鐘, 使其溶解並混合均勻。在 6℃ 下, 以 38,000 rpm 超高速離心 22 小時 (P90AT-0078 rotor, Hitachi Himac CP 100 B, Japan)。將溶液中間成雲霧狀之病毒層, 於冷光燈下吸出, 之後將病毒液置於透析膜中, 4℃ 下透析, 每隔 4 小時更換 1 次透析緩衝液 (0.05 M KPB buffer, pH 7.2), 連續三次。若 38,000 rpm (P90AT-0078 rotor, Hitachi Himac CP 100 B, Japan) 超高速離心後, 發現病毒帶中含有過多植物殘渣時, 則加入等量的 0.05 M KPB 緩衝液 (pH 7.2), 以 10,000 g 離心 10 分鐘, 小心吸取上層液, 將上層液在 4℃ 下進行透析。再於 6℃ 下, 以 30,000 rpm 超高速離心 (P90AT-0078 rotor, Hitachi Himac CP 100 B, Japan) 1.5 小時濃縮病毒, 取其沉澱物, 利用 0.05 M KPB 緩衝液 (pH 7.2) 回溶。用分光光度計 (Pharmacia biotech spectrophotometer ultrospec 2000) 測定病毒的純度及濃度。並以 1 mg/ml

的濃度分裝置於 -70℃ 中保存。

病毒核酸之萃取

取純化之 PStV-Ts 病毒 250 μl (1 mg/ml) 加入等體積之解離緩衝液 (digestion buffer) (0.2 M Tris-HCl, pH 8.0; 0.3 M NaCl; 25 mM EDTA, pH 8.0; 2% SDS) 振盪使其均勻後, 加入 proteinase K 使最終濃度為 10 μg/ml, 並置於 37℃ 水浴槽中水浴 15 分鐘。水浴後, 加入同體積之 phenol / chloroform / isoamyl alcohol (25 : 24 : 1, pH 5.2) 之混合液, 並劇烈震盪 (vortex) 使其完全成乳白色狀態, 於室溫下以 14,000 rpm (Jouan, A14, Italy) 離心 10 分鐘。取上層清液, 並分別加入同體積之 chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 溶液, 劇烈震盪後, 於室溫下以 14,000 rpm 離心 5 分鐘; 取上層清液, 分別加入 1/10 體積之 3 M sodium acetate (pH 5.2) 及 2 倍體積之 100% 酒精, 進行沉降, 將沉澱物真空乾燥 (Eyela CVE-100 Centrifugal Vaporizer, Japan), 再回溶於以焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 處理過的無菌水中, 病毒 RNA 濃度調整為 1 μg/μl, 最後置於 -70℃ 下保存之。

病毒核酸電泳分析

為確定所萃取出之 RNA 為完整的 RNA, 並計算其分子量大小, 以萃取所得之 RNA 進行水平膠體電泳分析觀察。取 4 μl 乙二醛緩衝液 glyoxal loading buffer 【30% glyoxal 水溶液 1.2 μl; dimethyl sulfoxid (DMSO) 3.2 μl; 以 DEPC 處理過的 5 X TAE 0.6 μl; loading dye 1 μl】和 2 μl 的萃取 RNA (1 μg/μl) 混合均勻後, 經由 1.5% 洋菜水平膠體及 0.5 X TAE 緩衝系統, 進行水平膠體電泳分析, 經溴化乙錠 (ethidium bromide) 染色後, 與 RNA markers (0.24~9.5 kb, BioMedical Research Laboratories, Inc., BRL) 比對, 估算病毒 RNA 分子大小。

花生條斑病毒基因 PCR 選殖與定序

而 PStV-Ts 基因序列引子之設計是以 PStV-B (Acc. No. U05771)⁽¹⁰⁾ 之病毒核酸序列為參考序列, 視核酸序列特性約 700-1,000 bp 大小之間設計一組引子, 各組引子之間有重複序列 (約 20-30 mers) 以便於日後解序及比對組合序列工作。其引子序列和相對位置如表一。

MMLV reverse transcription 合成第一段 cDNA

利用 MMLV Reverse Transcriptase Tested User Friendly Tm First Strand cDNA Synthesis 技術 (USB

Co.)，合成第一股 cDNA，並包含核酸的 3' 端的非轉譯區序列。設計 3' 端引子 Poly (T)1：

TGGTCATGTAGACAGCAGACTTTTTTTTTTTTTTTT 對應病毒核酸序列的 3' 端 Poly A 位置。取 10 μ l 的 First Strand Buffer (5 X)，加入 2.5 μ l 之 dNTP Mix (10 mM each)、5 μ l 之引子 Poly (T) 1、0.5 μ l 之 ribonuclease inhibitor (25 U/ μ l)、2 μ l 之 MMLV RTase，再加入 5 μ l 之 PStV-Ts 之 RNA 試料 (2-5 μ g)，最後加入 24.5 μ l 之 DEPC 處理過的水，使總體積為 50 μ l。充分混合後放到 37 的水浴中 2 小時，之後在 70 下水浴 10 分鐘，最後將第一股 cDNA 分裝保存在 -20 下。之後便利用這種方法，持續合成第一股 cDNA 作為定序的材料。

聚合酶連鎖反應 (PCR)

將已反轉錄的 cDNA 取 2 μ l 為模板，加入 5 μ l

的 10 X PCR Buffer (TaKaRa, Japan)、4 μ l 的 dNTP Mix (2.5 mM each)、兩端引子各 2 μ l 及 0.5 μ l 的 TaKaRa *Taq*TM (5 U/ μ l) (TaKaRa, Japan)，最後加入 34.5 μ l 的 ddH₂O，總體積共 50 μ l。此外，設計 PStV-F1 與 Poly (T) 2、PStV-F2 與 PStV-R2、PStV-F3 與 PStV-R3、PStV-F4 與 PStV-R4、PStV-F5 與 PStV-R5、PStV-F6 與 PStV-R6、PStV-F7 與 PStV-R7、PStV-F8 與 PStV-R8、PStV-F9 與 PStV-R9、PStV-F10 與 PStV-R10、PStV-F11 與 PStV-R11 及 PStV-F12 與 PStV-R12 共 12 對引子 (表一) 進行 PCR 增幅反應。增幅作用大致分為反轉錄、變性、黏合與延展四個階段。增幅作用於自動溫度循環控制器 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, USA) 或 RobCycler 96 (Stratagene, USA) 中進行。

PCR 產物之電泳膠體分析

表一、花生條斑病毒 Ts 系統之 PCR 基因序列合成引子序列表

Table 1. Primer sequences used in PCR reactions for viral genes of Peanut stripe virus Ts strain

Primer no.	sense/antisense (+/-)	Corresponding position ³	Sequences	Target gene
PStV-F1	+	8211-8230	5' GGTGGGTTGGTGAAGAGATG 3'	3'-NRT, CP
Poly (T)2 ¹	-	-	5' AGCATCCACACCAGCATCCA 3'	3'-NRT, CP
PStV-F2	+	8703-8722	5' TTGAAGCATGGGGCTATCCT 3'	CP, Nib
PStV-R2	-	-	5' CTCAACCATTGGTTTAAGAGG 3'	CP, Nib
PStV-F3	+	7904-7923	5' GCAGAATTGAGGCCACTAGA 3'	Nib
PStV-R3	-	-	5' TGA CTCTGCTATGTACGGAG 3'	Nib
PStV-F4	+	7089-7108	5' GGATCACAACACAAGATGGG 3'	Nib, NIa
PStV-R4	-	-	5' CAGTCCATGGACACTCTAAG 3'	Nib, NIa
PStV-F5	+	6475-6494	5' CATTGGGAAGAATGCAGAGG 3'	6K2, NIa-VPg, NIa
PStV-R5	-	-	5' TTGCTCTGTGTTGCCACTGT 3'	6K2, NIa-VPg, NIa
PStV-F6	+	5574-5594	5' GTGATGCTGGTTTTGGAAAAC 3'	CI, 6K2, NIa-VPg
PStV-R6	-	-	5' GCCTAAGCTCATCCTCTCTT 3'	CI, 6K2, NIa-VPg
PStV-F7	+	4642-4661	5' AACACCACCAGGACGTGAAT 3'	CI
PStV-R7	-	-	5' ATGGCCTGTGATTGCAGAAC 3'	CI
PStV-F8	+	3996-4015	5' TGTTCAACACGATGGGGGAT 3'	CI
PStV-R8	-	-	5' CTCGCCACATAAACAAGCAG 3'	CI
PStV-F9	+	2591-2610	5' ACATGGCCCACAATGCATGA 3'	P3, 6K1, CI
PStV-R9	-	-	5' CACCAATCCCCAACTTAACA 3'	P3, 6K1, CI
PStV-F10	+	1802-1822	5' GCATCAATGGAGATAGCAAGA 3'	HC-Pro, P3
PStV-R10	-	-	5' TGCATTGTCTGGCTTGCATG 3'	HC-Pro, P3
PStV-F11	+	743-762	5' ATGCAGCAGAATTCTGCGCT 3'	HC-Pro, P1
PStV-R11	-	-	5' TTGCTGCAAATTGCCACAC 3'	HC-Pro, P1
PStV-F12	+	26-47	5' AACAAAGAATACAAACGCATCC 3'	P1
PStV-R12	-	-	5' CGTTCCTTTGCCTGCTCATA 3'	P1
Poly (T)1 ²	+	-	5' TGGTCATGTAGACAGCAGACT TTTTTTTTTTTTTTT 3'	3'-NTR

¹ Primer designed for 3'-NTR and PCR amplification.

² Primer Poly (T)1 was designed for MMLV reverse transcriptase cDNA synthesis.

³ Corresponding position was referred to Peanut stripe virus B strain (Acc. No. U05771).

將上述之 PCR 產物進行水平電泳膠體分析，以確定其分子量大小。取 1 μ l 6 X loading dye 和 5 μ l RT-PCR 產物混合均勻，經由 1.2% 洋菜水平膠體及 0.5 X TAE 緩衝系統，於 50 伏特電壓電泳 5 分鐘，再調成 100 伏特電泳 25 分鐘，經 ethidium bromide 染色後，於 UV 燈下觀察並與 DNA markers (100 bp, Promega, USA) 比對並估算其分子大小。

基因核酸序列之譯讀

核酸序列之譯讀是使用一組引子利用 Primer extension 方式做同向及反向譯讀解序。此乃根據 Sanger⁽¹⁵⁾之雙股去氧核糖核酸鏈終止方法 (dideoxy chain termination)。使用 ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 及 ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer, USA) 核酸自動定序儀進行，此一部分由明欣生物科技有限公司完成。

基因序列之比對

將譯讀之序列先轉成序列檔，利用 Hitachi software DNASIS for Windows (version 2.1 DNASIS) 軟體分析系統將花生條斑病毒 Ts 系統核酸序列進行 A、T、G、C 含量分析 (content : base usage)、轉譯 (translation) 成胺基酸序列，並將所得到的花生條斑病毒 Ts 系統之核酸序列、胺基酸序列，利用 DNASIS 程式分析花生條斑病毒與其它擁有全長度且具血清親源關係之 *Potyvirus* 屬病毒之序列差異性、比較相同度 (identity)，並利用 Vector NTI Suite 7 program 繪製出親緣關係圖 (phylogentic tree)。

結 果

病毒純化

病毒在硫酸銨等密度離心純化後在離心管中間處可見一清楚之白色環帶。取出純化後之病毒，以分光光度計 (Hitachi U-2000 spectrophotometer) 由波長 320 nm 掃描至 220 nm，並以自動記錄器記錄其吸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 處出現最高 (A_{max})，於 248 nm 波長處出現最低 (A_{min})，顯示其為典型之 potyviruses 的吸收光譜。由吸光值中取出 A_{max} 、 A_{min} 及波長為 280 nm (A_{280}) 和 260 nm (A_{260}) 之吸光值，並計算 A_{max}/A_{min} 及 A_{280}/A_{260} 之比值，結果顯示 PStV-Ts 5 之 A_{max}/A_{min} 之比值為 1.04， A_{280}/A_{260} 之比值為 0.81，根據換算 potyvirus 濃度之係數值 2.4 為定

量標準，計算純化所得之病毒濃度為 $A_{260}/2.4$ ，每 100 g 之紅豆病葉中可獲得之病毒量為 3.51 mg。

病毒核酸之萃取與電泳分析

花生條斑病毒 Ts 系統 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 0.2~10 kb 之 RNA markers 比對之後，估算其分子大小約為 10 kb。

病毒基因之 PCR 及 RT-PCR 選殖與定序

利用表一所列 PStV-F1 與 Poly (T) 2、PStV-F2 與 PStV-R2、PStV-F3 與 PStV-R3、PStV-F4 與 PStV-R4、PStV-F5 與 PStV-R5、PStV-F6 與 PStV-R6、PStV-F7 與 PStV-R7、PStV-F8 與 PStV-R8、PStV-F9 與 PStV-R9、PStV-F10 與 PStV-R10 及 PStV-F11 與 PStV-R11、PStV-F12 與 PStV-R12 共十二對引子進行 RT-PCR 及 PCR 增幅反應，並將產物進行 1.2% 水平膠體電泳分析，經與 100 bp DNA marker 比對後，其產物分別約為 700、900、900、900、900、1,000、1,000、1,200、600、1,100、900 和 900 bp。

花生條斑病毒 Ts 系統基因核酸序列分析

花生條斑病毒 Ts 系統共選殖 CP、NIb、NIa、VPg、6K2、CI、6K1、P3、HC-Pro、及 P1 基因，並完成序列之譯讀工作 (表二)，PStV-Ts 之 CP 基因共有 861 個核啟酸，轉譯出 287 個胺基酸；NIb 基因共有 1548 個核啟酸，轉譯出 516 個胺基酸；NIa 基因共有 729 個核啟酸，轉譯出 243 個胺基酸；VPg 基因共有 570 個核啟酸，轉譯出 190 個胺基酸；6K2 基因共有 159 個核啟酸，轉譯出 53 個胺基酸；CI 基因共有 1902 個核啟酸，轉譯出 634 個胺基酸；6K1 基因共有 156 個核啟酸，轉譯出 52 個胺基酸；P3 基因譯讀出 1041 個核啟酸，轉譯出 347 個胺基酸；HC-Pro 基因有 1371 個核啟酸，轉譯出 457 個胺基酸；P1 基因譯讀出 1329 個核啟酸，轉譯出 443 個胺基酸，PStV-Ts 核酸序列共定序出 10009 個核啟酸序列，包含 3239 個 A (32.36%)、1793 個 C (17.91%)、2390 個 G (23.87%)、2587 個 U (25.84%)，轉譯出 3222 個胺基酸。其核酸與胺基酸序列之 accession number 為 AY968604。

花生條斑病毒台灣 Ts 基因序列與黑眼豇豆嵌紋病毒台灣系統及國外已發表親緣關係相近之 *Potyvirus* 屬病毒序列之比較

以花生條斑病毒 Ts 系統的基因核啟酸及胺基酸序

表二、花生條斑病毒 Ts 系統與黑眼豇豆病毒台灣系統及國外已發表之花生條紋病毒、菜豆普通嵌紋病毒 (R 及 Y 系統) 之基因序列核酸與胺基酸數目之比較

Table 2. Numbers of nucleotide (nt) and amino acid (aa) in the genomic regions of of PStV-Ts, BICMV-TW, PStV-B, BCMV-R and BCMV-Y

Viruses ¹	Fragments	Genomic regions ²											
		5'-NTR	P1	HC-Pro	P3	6K1	CI	6K2	VPg	NIa	NIb	CP	3'-NTR
PStV-Ts	nt	86	1329	1371	1041	156	1902	159	570	729	1548	861	257
	aa		443	457	347	52	634	53	190	243	516	287	
PStV-B	nt	133	1329	1371	1041	156	1902	159	570	729	1548	861	257
	aa		443	457	347	52	634	53	190	243	516	287	
BICMV-TW	nt	132	1269	1371	1041	156	1902	159	570	729	1548	861	254
	aa		423	457	347	52	634	53	190	243	516	287	
BCMV-R	nt	130	1269	1371	1041	156	1902	159	570	729	1548	861	253
	aa		423	457	347	52	634	53	190	243	516	287	
BCMV-Y	nt	140	1329	1371	1041	156	1902	159	570	729	1548	861	253
	aa		443	457	347	52	634	53	190	243	516	287	

¹ PStV-B (Peanut stripe virus blotch strain, Acc. No. U05771), BICMV-TW (Blackeye cowpea mosaic virus Taiwan strain, Acc. No. AY575773), BCMV-R (*Bean common mosaic virus* R strain, Acc. No. AJ312437), BCMV-Y (*Bean common mosaic virus* Y strain, Acc. No. AJ312438), PStV-Ts (Peanut stripe virus Ts strain, Acc. No. AY968604).

² NTR (non-translated region), P1 (first protein), HC-Pro (helper component protease), P3 (third protein), CI (cylindrical inclusion), VPg (virus-encoded genome linked protein), NIa (nuclear inclusion a), NIb (nuclear inclusion b), CP (coat protein).

列 (Acc. No. AY968604) 與本實驗室所發表的黑眼豇豆嵌紋病毒台灣系統 (BICMV-TW)(Acc. No. AY575773) 以及國外發表之 BCMV-Y (Acc. No. AJ312348)、BCMV-R (Acc. No. AJ312437) 與 PStV-B (Acc. No. U05771) 者進行各基因核酸及胺基酸序列相同度之比較, 結果顯示 PStV-Ts 與 PStV-B 的各基因核酸序列相同度均高達 89% 以上 (89 -- 96%), 而各基因胺基酸序列相似度亦達 86% 以上 (86 -- 98%)。相對於與 PStV-B 的高類緣關係, PStV-Ts 與其他的 BCMV 亞群病毒的類緣關係則較遠, 各基因核酸序列相同度均在 86% 以下 (61 -- 86%); 而各基因胺基酸序列相似度除 HC-Pro、6K1、Nia、NIb 和 CP 等基因可達 90% 以外, 其他基因的產物相似度有低至 48% 者 (如 P1) (表三)。上述結果顯示 PStV-Ts 相較於本文所選的四種 BCMV subgroup 的病毒, 其與 PStV-B 病毒的同度最大, 除 P1 基因外其他基因的核酸與胺基酸序列相同度皆在 90% 以上。

為了瞭解這五種 BCMV 亞群的病毒彼此親緣間之關係以及在演化上的關聯, 乃進一步使用 P1、P3 與 CP 等基因之核酸序列進行分析, 並依其距離值建立演化樹狀圖以表示其親緣關係 (圖一 A-C)。由演化樹狀圖可印證得知 PStV-Ts 與 PStV-B 的 P1、P3 與 CP 基因均自成一cluster, 兩者間的演化距離較近; 而 BICMV、BCMV-Y 及 BCMV-R 三者間的演化距離較近, 又形成另一個群聚。因此由樹狀演化分析可將 BCMV 亞群的五種病毒又分成二個不同之群聚

(clusters)。

討論

將所得的花生條斑病毒 Ts 系統序列資料與本實驗室發表的 BICMV-TW 及國外發表之 BCMV-Y (英國)、BCMV-R (英國)、PStV-B (美國) 等病毒在各基因之核酸序列相同度及胺基酸序列相同度上作比較。結果發現 PStV-Ts 與 PStV-B 的同度除 P1 外皆在 90% 以上, 因此透過分子生物學的技術, 更可證明本研究的病毒確實為 PStV 之另一系統, 並且為在台灣發現之特有 PStV 系統。

P1 蛋白以 YS 切位與 HC-Pro 蛋白相連接, 經由分析比較這五種病毒後, 發現 P1 為變異度很高的區域, 在 P1 基因發現 BICMV-TW 及 BCMV-R 的序列較 PStV-Ts、PStV-B 及 BCMV-Y 短少 60 個核酸, 缺少的區域在基因的 N 端部位, Yeh⁽¹⁶⁾ 曾指出 potyviruses 在生物性狀上的最大差異在於寄主專一性的不同, 又根據 Chang⁽⁸⁾ 的研究報告指出, PStV-Ts 與多種 potyviruses 的豆科病毒具有血清類緣關係, 並且在寄主範圍亦多有重複, 其中以 PStV-Ts 和 BICMV-TW 的寄主範圍最相近, 都可感染紅豆 (adzuki bean)、長豇豆 (asparagus bean)、黑眼豇豆 (black bean)、普通豇豆 (common bean)、豇豆 (cowpea) 及大豆 (soybean), 但是 BICMV-TW 卻不能感染落花生⁽⁷⁾。P1 基因序列長度上的差異是否為造成 BICMV-TW 和 PStV-Ts 在寄主範圍

表三、花生條斑病毒 Ts 系統與黑眼豇豆病毒台灣系統及國外已發表之花生條紋病毒、菜豆普通嵌紋病毒 (R 及 Y 系統) 之基因核酸和胺基酸序列相同度 (%) 比較

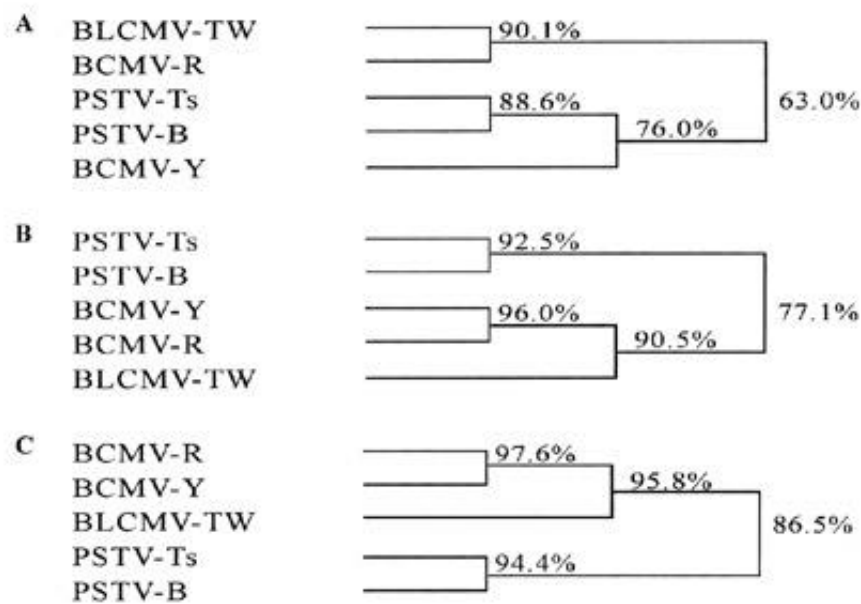
Table 3. Nucleotide and amino acid sequences identity (%) between genes of PStV-Ts and those of BICMV-TW, PStV-B, BCMV-R and BCMV-Y

Viruses ¹	P1 ²	HC-Pro	P3	6K1	CI	6K2	VPg	NIa	NIb	CP
PStV-B	89/86 ³	93/96	93/93	93/96	92/95	96/92	92/93	91/98	93/98	94/95
BICMV-TW	61/48	85/91	79/80	82/90	80/89	72/70	82/88	86/95	85/93	86/90
BCMV-R	62/49	84/90	77/79	83/92	79/88	74/70	83/86	86/95	84/93	86/90
BCMV-Y	76/68	84/91	77/79	83/92	79/88	72/71	83/88	86/95	84/94	86/91

¹ PStV-B (Peanut stripe virus blotch strain, Acc. No. U05771), BICMV-TW (Blackeye cowpea mosaic virus Taiwan strain, Acc. No. AY575773), BCMV-R (*Bean common mosaic virus* R strain, Acc. No. AJ312437), BCMV-Y (*Bean common mosaic virus* Y strain, Acc. No. AJ312438), PStV-Ts (Peanut stripe virus Ts strain, Acc. No. AY968604).

² P1 (first protein), HC-Pro (helper component protease), P3 (third protein), CI (cylindrical inclusion), VPg virus-encoded genome linked protein), NIa (nuclear inclusion a), NIb (nuclear inclusion b), CP (coat protein).

³ represented nucleotide sequence / amino acid sequence identity (%).



圖一、花生條斑病毒 Ts 系統 (PStV-Ts) 與 BICMV-TW、BCMV-Y、BCMV-R 和 PStV-B 等病毒之核酸序列演化樹狀圖。圖 A、B、C 分別為使用軟體程式 Vector NTI Suite 7 分析病毒的 P1 基因、P3 基因和 CP 基因的結果。

Fig. 1. Phylogenetic tree based on the nucleotide sequence comparisons of P1 gene (A), P3 gene (B), and CP gene (C) showing the relationships between Peanut stripe virus Ts strain (PStV-Ts, Acc. No. AY968604), Blackeye cowpea mosaic virus Taiwan strain (BICMV-TW, Acc. No. AY575773), *Bean common mosaic virus* Y strain (BCMV-Y, Acc. No. AJ312438), *Bean common mosaic virus* R strain (BCMV-R, Acc. No. AJ312437) and Peanut stripe virus blotch strain (PStV-B, Acc. No. U05771). The analysis was carried out by using the Vector NTI Suite 7 program.

不同的原因，仍待更進一步的研究。

王及方⁽¹⁾ 研究指出 BICMV-TW 在親緣上接近於 BCMV-R 而與 BCMV-Y 的親緣關係較遠，本研究顯示在 P1 基因上 BCMV-Y 的核酸序列長度是不同於 BICMV-TW 與 BCMV-R，反而較接近 PStV-Ts 及 PStV-B，因此認為這三種病毒應該是屬於相同的系統。

HC-Pro 蛋白以 GG 切位與 P3 蛋白相連接。Merits⁽¹²⁾ 等人證實，HC-Pro 蛋白的中間區域有三個 motif 分別是 IGN、CC/SC 及 PTK motif，分別和 RNA

amplification、病毒的系統性轉移及蚜蟲傳播有關，但是 IGN motif 並沒有在本病毒中發現，而且在本研究分析比較的其它四種病毒中亦無發現。

P3 蛋白以 QA 切位與 6K1 蛋白相連接，此區之分子序列歧異度高。Saenz⁽¹⁴⁾ 等人研究發現 P3-6K1 複合體蛋白的 C 端區域是病徵嚴重程度的決定因子，又 PStV-Ts 與 PStV-B 在病徵有很大的差異，除典型的條斑病徵外，PStV-Ts 還會造成落花生嚴重的壞疽病徵，發現 PStV-Ts 與 PStV-B 在 P3 基因的 C 端有較大的差

異性，認為可能和嚴重型病徵的產生有關，未來應該再將 Chang 等人所分離出 PStV-Tc 系統⁽¹⁴⁾，進行基因定序的工作，再來進一步的分析嚴重型病徵產生的原因，應可得到較明確的結論。

6K1 蛋白以 QS 切位與 CI 蛋白相連接，此蛋白質參與病毒在寄主中的複製過程。PStV-Ts 與 PStV 的核殼酸序列相同度為 92.9 %，胺基酸序列的相同度為 96.1 %。但是 PStV-Ts 與 BICMV-TW、BCMV-Y 及 BCMV-R 的核殼酸序列相同度只有 82-83 %，胺基酸序列的相同度較高大約在 90-92 % 之間。

Nib 蛋白以 QS 切位與 CP 蛋白相連接，Nib 具有 RNA dependent RNA polymerase (RdRps) 的活性，因為在 Nib 尚可找到 RdRps 的戳記 (hallmark)GDD motif (SGXXXTXXXNT-30aa-GGD)，在 PStV-Ts 及其他四種病毒的 Nib 的第 309 到 352 個胺基酸亦可找到此 motif，而且這個區域的序列相同度很高。Allison⁽⁵⁾ 等人，也找到第二個與 RdRps 有關 motif (YCHADGS)，此 motif 可在 PStV-Ts 及 PStV-B 的 Nib 的第 242 到 248 個胺基酸被找到，不過在 BICMV-TW、BCMV-R 及 BCMV-Y 其 Y 卻被 H 所取代。

一般而言 P1、P3、CP 基因及 3' 末端轉譯區被認為是 *Potyvirus* 屬病毒基因序列遺傳上歧異度最高或在分類上具有參考意義的區域⁽⁴⁾。Yeh⁽¹⁶⁾ 等人亦指出 potyviruses 病毒間 3' 端非轉譯區核殼酸序列的比較，在未來可能作為 potyviruses 病毒間的區分依據，但是比較分析 PStV-Ts 與其他四種病毒的 3' 端非轉譯區核殼酸序列，結果顯示 PStV-Ts 與其他四種病毒的歧異度並沒有很大 (87-89%)，因此並無法用來作為區分的依據。另外，有研究認為不同 potyviruses 其歧異度最高的區域在 P1、P3 與 CP 的 N 端之觀點，但是在本研究的分析結果中，只發現 P1 及 P3 的部分具有很大的歧異性，而在 CP 上這五種病毒間核殼酸序列與胺基酸序列的相同度很高，尤其是在胺基酸部分，相度皆大於 90 %。Pappu⁽¹³⁾ 等人曾分析 PStV-Ts、PStV-B 與 PStV-IB 之 CP 基因，依據這三種病毒在 CP 基因 N 端的差異性，設計出對 PStV-Ts 具有專一性的 primer，可快速診斷出這種會引起嚴重型病徵的病毒，經由分子生物學的技术，可提昇對病毒診斷的精確性。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 AzMV、BICMV、PStV 等病毒，因其在血清上的親緣關係與 *Bean common mosaic virus* 相近，故其組成了 bean common mosaic subgroup，未來應該可以應用上述的方法，透過分子生物的技术來達到病毒偵測的目的。最後，經由分子生物學的方法，可以得知儘管 PStV-Ts 與 BICMV-TW 被歸為 bean common

mosaic subgroup，而且兩者在寄主範圍上也多有重複，又不能利用血清技術來作為區分，但是利用分子生物技術分析的結果，顯示這兩者間是具有歧異性的。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. 王惠亮、方鄒誠. 2004. 黑眼豇豆嵌紋病毒台灣系統序列之譯讀與分析. 植病會刊 13: 117-126.
2. 張清安. 1980. 一種可以感染紅豆及花生之未知病毒之研究 (、). 植保會刊. 22: 36.
3. 張清安. 1996. 病毒病害. 行政院農業委員會植物保護圖鑑系列 - 落花生保護 p. 36-47.
4. Aleman-Verdagner, M. E., Goudou-Urbino, C., Dubern, J., Beachy, R. N., and Fauquet, C. 1997. Analysis of the sequence diversity of the P1, HC, P3, Nib and CP genomic regions of several yam mosaic potyvirus isolates: implications for the intraspecies molecular diversity of potyvirus. J. Gen. Virol. 78: 1253-1264.
5. Allison, R., Johnston, R. E., and Dougherty, W. G., 1986. The nucleotide sequence of the coding region of Tobacco etch virus genomic RNA evidence for the synthesis of a single polyprotein. Virology 154: 9-20.
6. Chang, C. A. 1987. Antigenic comparison of two strains of peanut stripe virus originally recognized as peanut mosaic virus in Taiwan. Plant Prot. Bull. 29: 439.
7. Chang, C. A., Purcifull, D. E., and Zettler, F. W. 1990. Comparison of two strains of Peanut stripe virus in Taiwan. Plant Dis. 74: 593-596.
8. Chang, C. A. 1993. Legume viruses in Taiwan. Plant Path. Bull. 2: 149-160.
9. Demski, J. W., Reddy, D. V. R., Sowell, G. Jr., and Bays, D. 1984. Peanut stripe virus a new seedborne potyvirus from China infecting groundnut (*Arachis hypogaea*). Ann. Appl. Biol. 105: 593-596.
10. Gunasinghe, U. B., Flasiniski, S., Nelson, R. S., and Cassidy, B. G. 1994. Nucleotide sequence and genome organization of peanut stripe potyvirus. J. Gen. Virol. 75: 2519-2525.
11. 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.
12. Merits, A., Guo, D., and Saarma, M. 1998. VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. J. Gen. Virol. 79: 3123-3127.
13. Pappu, S. S., Pappu, H. R., Chang, C. A. Culbreath, A.

- K., and Todd, J. W. 1998. Differentiation of biologically distinct peanut stripe Potyvirus strains by a nucleotide polymorphism-based assay. *Plant Dis.* 82: 1121-1125.
14. Saenz, P., Cervera, M. T., Dallot, S., Quiot, L., Quiot, J. B., Riechmann, J. L., and Garcia, J. A., 2000. Identification of a pathogenicity determinant of Plum pox virus in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K1. *J. Gen. Virol.* 81: 557-566.
15. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467.
16. Yeh, S. D., Jan, F. J., Chiang, C. H., Doong, T. J., Chen, M. C., Chung, P. H., and Bau, H. J. 1992. Complete nucleotide sequence and genetic organization of Papaya ringspot virus RNA. *J. Gen. Virol.* 73: 2531-2541.

ABSTRACT

Wang, H. L.^{1,3}, Chang, Y. Y.¹ and Chang, C. A.². 2005. Molecular sequencing and analysis of the viral genome of Peanut stripe virus Ts strain. *Plant Pathol. Bull.* 14:211-220. (¹ Graduate Institute of Biological Science, National Kaohsiung Normal University, Kaohsiung, 802, Taiwan, ² Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Taichung, 413, Taiwan, ³ Corresponding author, E-mail: hlwang@nknuc.nknu.edu.tw: Fax: +886-7-7169030)

Peanut stripe virus (PStV) is a member of genus *Potyvirus* in the family of *Potyviridae*. It is an important virus infecting peanut and legume crops in Taiwan. PStV was found in Taiwan, Japan, China, Thailand, Malaysia and America. Virions of PStV Ts strain (PStV-Ts) was purified from leaves of infected asparagus bean by polyethylene glycol precipitation followed by a Cs_2SO_4 isopycnic centrifugation. Electrophoretic analysis showed that PStV-Ts contained a 10 kb viral RNA. The cDNAs of PStV-Ts genes were synthesized by using cDNA synthesis technology and polymerase chain reaction (PCR). Nearly full length of viral genome was sequenced. PStV-Ts contained 10009 nucleotides including the 5' and 3'-nontranslated region. The base composition of PStV-Ts RNA (Acc. No. AY968604) shows similar to those of other potyviruses. The genomic RNA of PStV-Ts contains an open reading frame which starts at 87th position and terminates at 9752th position, encoding a polyprotein of 3222 amino acid residues. Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of genes with Blackeyes cowpea mosaic virus TW strain (BICMV-TW) and those reported for *Bean common mosaic virus* R strain (BCMV-R) and Y strain (BCMV-Y) and Peanut stripe virus blotch strain (PStV-B) showed that BCMV-Y, BCMV-R, PStV-B and BICMV-TW shared over 80% identities, excluding P1, P2 and 6K2 genes. Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of genes between PStV-Ts and PStV-B showed that both shared over 90 % identities, excluding the P1 gene. DAG motif involving in the aphid transmission, the conserved active site GDD motif of the core replicase, and the KITC and PTK motifs were found in the N-terminal of CP gene, the NIB gene, and the Hc-Pro gene of PStV-Ts, BCMV-Y, BCMV-R, PStV-B and BICMV-TW, respectively. The comparison of multiple alignments of nucleotide and amino acid sequences among BCMV-Y, BCMV-R, PStV-B and BICMV-TW confirmed that they are different strains of BCMV.

Key words : Peanut stripe virus, open reading frame, nucleotide sequence