

不同蕪菁嵌紋病毒系統之鞘蛋白質基因序列之比較

吳孟芳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88年11月30日

摘 要

吳孟芳、王惠亮. 1999. 不同蕪菁嵌紋病毒系統之鞘蛋白質基因序列之比較. 植病會刊8:133-142.

蕪菁嵌紋病毒 (turnip mosaic virus ; 簡稱TuMV) 屬於Potyvirus病毒屬，可以感染許多重要的經濟作物，因此被認為是世界上感染十字花科最重要的病毒之一。將六個病毒系統 TuMV-C1、C2、C3、C4、C5和TW之芥菜病葉之萃取液，經PEG沈降及硫酸銨密度離心後可得到純化之病毒顆粒，病毒RNA萃取後經電泳顯示其長度均約10 kb。進一步以反轉錄聚合酶連鎖反應選殖六個病毒系統之鞘蛋白質基因，譯讀出其核殼酸序列，並比較六者之鞘蛋白質基因核殼酸序列、胺基酸序列與3'端非轉譯區核殼酸序列之相同度。結果顯示六者之間鞘蛋白質核殼酸相同度高達92.7-99.3%，胺基酸相同度高達93.8-99.0%，3'端非轉譯區核殼酸相同度則高達98.9-100%且含有約62%的AU。比較這六個TuMV病毒系統與國外報告之病毒系統CPP (中國大陸)，CAPP (加拿大)，CQS、NIAP (韓國)，CP、CPRN、MUT (英國) 和JAP (日本) 等，在鞘蛋白質基因之核殼酸序列、胺基酸序列與3'端非轉譯區核殼酸序列之相同度，結果顯示，TuMV-C5、TW與韓國NIAP系統較為接近。六個系統中僅TuMV-C1、C5和TW和大部分國外不同地區系統之鞘蛋白胺基酸位於第6-8胺基酸位置具有與蚜蟲傳播有關DAG結構。由於此六個TuMV系統在血清學上不易區分，為了發展有效對抗TuMV的防治策略和分子診斷技術，分析此一病毒的遺傳差異性是有其必要性。

關鍵字：蕪菁嵌紋病毒、鞘蛋白質基因、核殼酸序列

緒 言

蕪菁嵌紋病毒 (turnip mosaic virus ; 簡稱TuMV) 最早於1921年由Gardner和Kendrick在北美的蕪菁 (*Brassica rapa* L. ssp. *rapifera*) 發現此一病毒，而同年Schultz也發現被感染的白菜 (Chinese cabbage, *B. oleracea* var. *capitata*)、芥菜 (*B. juncea*, mustard) 和蕪菁 (turnip) 等十字花科蔬菜⁽¹²⁾。之後在世界各地陸續也有記載相關的病例，此一病毒在地理上的分佈更是遍及北美洲、歐洲、非洲、亞洲、澳洲及紐西蘭⁽²⁾。TuMV屬於Potyvirus屬，病毒顆粒為長絲狀，長度約720 nm⁽¹⁷⁾，可經由機械傳播及蚜蟲以非永續性的方式傳播，但不經由種子傳播⁽¹⁶⁾。本病毒具有廣泛的寄主範圍，可以感染很多重要的經濟作物，包括十字花科等43科156屬318種植物⁽¹⁾。由於對十字花科作物危害甚為嚴重，故被認為是世界上感染十字花科最重要的病毒之一⁽¹⁷⁾。在亞洲TuMV被認為是感染白菜、蘿蔔、芥菜等十字花科經濟作物最重要的病毒，更造成嚴重的產量損失⁽²⁾。作物在受到TuMV感染後會產生不同的

病徵，包括：斑駁 (mottling)、嵌紋 (mosaic)、葉子捲曲 (leaf distortion)、矮化 (stunting)。由於TuMV之自然寄主範圍廣泛，在不同之作物形成之病徵亦不相同，在甘藍、白菜、花椰菜、孢子甘藍最常產生的病徵是黑色壞疽斑和輪紋病斑⁽¹⁹⁾，而在蕪菁、瑞典蕪菁、蘿蔔、油菜、芥菜、白菜、水田芥及山葵的葉片上形成嵌紋、褪色及矮化的病徵，另外在大黃及紫羅蘭的花器上則形成斑駁及輪紋病斑⁽¹⁶⁾，因而大大地減少其在市場上的銷售性甚至減少30%的產量⁽⁹⁾，但是即使同一種作物之不同栽培品種，對TuMV之感受性亦不相同⁽¹¹⁾，所以有很多學者嘗試以寄主範圍和接種後的病徵反應作為區分TuMV各系統 (strain) 的依據。Yoshii⁽²⁰⁾將TuMV區分為ordinary strain及cabbage strain，前者可感染*B. oleracea* var. *Capitata*和*N. glutinosa*產生輕微的病徵，後者則會感染此兩種植物造成嚴重的壞疽輪斑及嵌紋病徵。McDonald and Hiebert⁽⁶⁾將會感染所有*Brassica* spp.的TuMV歸為Type I，而Jenner and Hiebert⁽³⁾將只能感染*Brassica* spp.其中一種的系統歸為Type II。目

前較為被廣泛接受的分類方法是 Provvidenti 氏所提出，他收集美國、日本及中國大陸各地之 46 個白菜栽培品種 (Chinese cabbage cultivars) 進行接種，依 TuMV 在九種白菜 (Chinese cabbage, *B. campestris* subsp. *Pekinensis*) 栽培種病徵反應之不同，區分為 TuMV-C1、C2、C3 和 C4 四個系統⁽¹¹⁾。在台灣 Green 和 Deng⁽²⁾ 選取 Tropical Delight、Crusader、PI418957、PI419105 四種白菜栽培種作為指示植物，調查台灣各地蔬菜栽培田受到 TuMV 感染狀況，把可感染 Crusader 及 PI419105 者歸為 C1 strain；只感染 Tropical Delight 歸為 C2 strain；能感染 Tropical Delight 及 Crusader 者歸為 C3 strain；可以感染 Tropical Delight、Crusader、PI419105 者歸為 C4 strain。然而，調查結果發現台灣除了 C1、C2、C3、C4 等四種系統均存在外，另有一系統，能夠感染其他四種系統均無法感染之 PI418957 栽培種，因此將它獨立為 C5 系統；至於 TW 系統係由台灣芥菜田篩選到的另一系統。這些報告只能顯示其在血清學上無法區分，而病毒的寄主範圍和生物特性又容易受到環境和人為因素的干擾，故本實驗希望由分子層面著手來探討此六種系統。

Potyvirus 屬的病毒基因組核殼酸是單一正股 RNA 長度約 10 kb，這股 RNA 本身具備訊息 RNA (messenger RNA) 之功能，可做為複製的模板。在 3' 端的尾部有 poly A，而 5' 端則和病毒基因組的蛋白質 (genome-linked viral protein: VPg) 共價鍵結⁽⁴⁾。其基因表現策略，可由數種 Potyvirus 屬病毒的基因組所解讀出的完整核殼酸序列分析得知，整個基因組僅包含一個轉譯架構 (open reading frame, ORF)，病毒表現基因時，RNA 會先轉譯出一個複合蛋白質 (polyprotein)⁽⁸⁾，而此一複合蛋白質可藉由 cis 和 trans 的方式活化病毒的 3 個蛋白質水解酵素產生至少 8 個成熟的蛋白質^(8,14)。近年來由於分子生物學的蓬勃發展，將其應用到農作物抗病改良的植物遺傳工程上已時有所聞，而在轉殖植物中由病毒衍生的抗性中最常被使用是由鞘蛋白質所調控的抗性，而在 Potyvirus 屬病毒基因組的所有基因中，鞘蛋白質基因也是最常被用來研究其遺傳的差異性。甚至鞘蛋白質序列的比較已用來將 *Potyvividae* 科的成員分類成不同的屬、種和系統。此外，Potyvirus 屬病毒基因組的 3' 端的非轉譯區也被用來作為 Potyvirus 屬病毒的鑑定和分類。所以核殼酸序列之解讀，對於基因表現的了解，以及 RNA 病毒演化之親緣關係可提供明確之資料。TuMV 的加拿大系統 (CAPP) 其全長核殼酸序列目前已解讀出，為 9830 個核殼酸，含有一個 9489 bp 的轉譯架構，此一架構能產生 3863 個胺基酸，其分子量為 358 kDa，在 5' 端的非轉譯區由 129 個核殼酸組成含有 70% 的 AU，3' 端的非轉譯區則由 209 個核殼酸組成也含有大量的 AU，其尾端具有 poly (A)；與馬鈴薯 Y 群病毒之核殼酸序列同源性相當高，證實確為馬鈴薯 Y 群病毒之一員⁽⁷⁾。TuMV 的日本系統 (JAP) 其全長核殼酸序列目前已解讀出，為 9833 個核

殼酸，含有一個 9492 bp 的轉譯架構，此一架構能產生 3164 個胺基酸，其分子量為 357.7 kDa，在 5' 端的非轉譯區由 129 個核殼酸組成，3' 端的非轉譯區則由 209 個核殼酸組成其在尾端具有 poly (A)⁽⁸⁾。而 TuMV 其鞘蛋白質包含 288 個胺基酸，鞘蛋白質的解序工作在中國大陸⁽⁵⁾ 也有報告。

為了發展有效對抗 TuMV 的防治策略和分子診斷技術，分析此一病毒的遺傳變異性是必要的。本實驗主要目的即針對六種 TuMV 系統鞘蛋白質序列的遺傳分歧程度進行比較，進一步比對彼此間鞘蛋白質基因序列的多形性 (polymorphism)。希望藉由對鞘蛋白質基因的了解能有助於基因轉殖植物之構築，並在病害管理提供一良好之策略。

材料與方法

病毒純化與病毒核殼酸之萃取

本研究之 TuMV-C1、C2、C3、C4、C5 病毒來源係由亞洲蔬菜發展研究中心 (AVRDC) Dr. Green 所提供感病之病葉；TuMV-TW 來源係由田間篩選之感病芥菜病葉以 0.1 M 磷酸緩衝液 (phosphate buffer, pH 7.0) 研磨成汁後，接種於健康之紅藜 (*Chenopodium amaranticola* L.) 上，待其病徵表現後，取其單一病斑再次接種於健康紅藜上。如此重複三次單斑接種分離後，將病毒回接至芥菜 (*B. juncea*) 感病品種鳳尾春或 MT1 的植株上做為接種源。

病毒純化是依據 Wang 等人⁽¹⁸⁾ 的方法來純化病毒。取已知感染 TuMV 之芥菜感病品種鳳尾春或 MT1 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 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 (Hitachi U-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光值。由紫外光的吸光值中，取出最高 (A_{max}) 和最低 (A_{min}) 及波長為 280 nm (A₂₈₀) 和 260 nm (A₂₆₀) 之吸光值，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 備用。

病毒全量核殼酸之萃取，取純化之 TuMV 1 ml (1 mg/ml) 加入同體積之解體緩衝液 (disruption buffer) (0.2 M Tris-HCl, pH 8.0；0.3 M NaCl；25 mM EDTA, pH 8.0；2% SDS) 振盪均勻後，加入蛋白質分解酵素 K (proteinase K) 10 µg/ml 並置於 37 水浴 30 分鐘。水浴後，以 phenol / chloroform / isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 之混合液萃取，再以 100% 酒精沈降，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 之吸光值，並以 DEPC 處理過的無菌水

將RNA的濃度調整成為 1 μ g/ μ l，再置於 -70 保存。為確定所萃取出之RNA為完整的RNA，並計算其分子大小，故以萃取得之RNA進行水平膠體電泳分析觀察。取 6 μ l 乙二醛承載緩衝液【glyoxal loading buffer (30% glyoxal 1.2 μ l, DMSO 3.2 μ l, 5X TAE 0.6 μ l, loading dye 1 μ l)】和2 μ l的萃取出RNA (1 μ g/ μ l) 混合均勻後，經由 1% 洋菜水平膠體及 0.5 X TAE緩衝液系統，於100伏特電壓下進行水平膠體電泳分析30分鐘，經溴化乙錠 (ethidium bromide) 染色後，觀察所萃取得到的 RNA 片段，與 RNA 分子標誌 (RNA markers, 0.24 - 9.5 kb, BRL) 比對後估算其大小。

鞘蛋白質基因之選殖

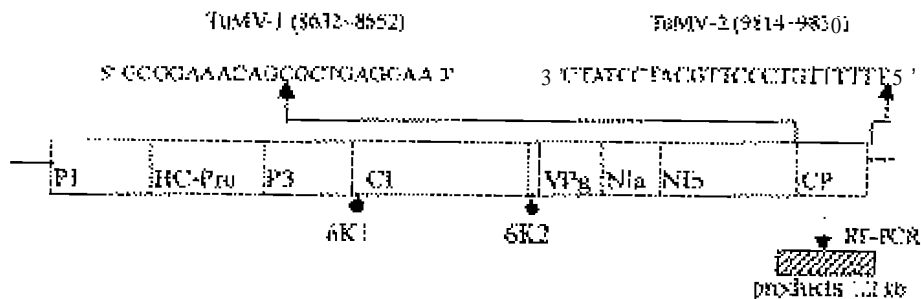
利用反轉錄聚合酵素連鎖反應 (RT-PCR) 來進行鞘蛋白質基因之選殖。將萃取得到六個 TuMV系統之RNA樣品定量後取約 1 - 2 μ g之RNA (1 μ l) 加入DEPC處理過的無菌水 23 μ l、5X EZ buffer 10 μ l、10 mM dNTP 6 μ l、反轉錄酵素 (rTth DNA Polymerase, Perkin Elmer) 2 μ l及兩端引子各 1.5 μ l (0.1 μ g/ μ l)。六個 TuMV系統鞘蛋白質基因之上游引子 (upstream primer) 使用 TuMV-1：5' GCGGAAACAGCGCTGAGGAA 3'，相對於TuMV CAPP (加拿大系統) 全長核殼酸之8632-8652位置⁽⁷⁾。六個TuMV系統鞘蛋白質之下游引子 (downstream primer) 使用TuMV-2：5' TTTTTTGTCCCTTGCATCCTATC 3'，相對於TuMV CAPP全長核殼酸之9814-9830位置。增幅作用大致分為變性、黏合與延展三個階段，於自動溫度循環控制器 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, U.S.A.) 中增幅，預計可得 1.2 Kb 大小的RT-PCR產物 (圖一)。增幅條件為：60 - 30分鐘、94 - 1分鐘、94 - 15秒、56 - 30秒、60 - 7分鐘進行35個循環。此外為了更確定鞘蛋白質 N 端的序列，在這兩端引子間還設計另一個下游引子 TuMV-3：5' ATTTAGGCAGATAATGGCCC 3' 相對於 TuMV CAPP⁽⁷⁾ 全長核殼酸之9282-9302位置，僅供鞘蛋白質核殼

酸序列譯讀之用。

為確定所合成之cDNA其分子大小，故以上述所得之 RT-PCR產物進行水平膠體電泳分析觀察。取 1 μ l 6X承載染液 (loading dye) 和5 μ l的cDNA混合均勻後，經由 1% 洋菜水平膠體及 0.5 X TAE緩衝液系統，於100伏特電壓下進行水平膠體電泳分析30分鐘，經溴化乙錠染色後，觀察所得到的cDNA片段，並與DNA 分子標誌 (DNA 1 kb marker, 0.25-12 kb, Stratagene) 比對後估算其大小。

所得到的cDNA片段，利用電泳回收裝置 (Quick-Pik Electroelution Capsule, Stratagene) 從膠體上回收。其方法如下：將蓋子充滿500 μ l 0.5 X TAE緩衝液後，把蓋子和打孔器置於 0.5 X TAE緩衝液中 10 - 15分鐘。除去蓋子和打孔器上的緩衝液，並加入 500 μ l的 0.5 X TAE沖洗蓋子上的膜 2 - 3次，接下來直到使用前都把洗好的蓋子浸泡在緩衝液中。在紫外燈下，利用打孔器開口較大的一端，從膠體上把cDNA片段切下，並把含有膠體的打孔器插入充滿 0.5 X TAE緩衝液的蓋子。再把打孔器充滿 0.5 X TAE緩衝液後，把蓋子朝向正極置於 0.5 X TAE緩衝液系統，於100伏特電壓下進行水平膠體電泳30分鐘後，反轉電極方向 10 - 20秒使膜上的DNA能解分離。關掉電源水平取出蓋子打孔器組合，並把打孔器末端多餘的 0.5 X TAE緩衝液用吸頭吸出，避免增加溶出液的體積。用吸水紙吸去蓋子打孔器組合外部多餘水分，在收集點用針刺一小洞後，再用 50 - 60 μ l的微細吸頭伸入小洞的底部把溶出 cDNA吸出。將所得的cDNA溶液加入 1/10倍體積的 3 M醋酸鈉 (pH 5.2) 和 2倍體積的 100%酒精，置於 -20 進行隔夜沈降。沈降後，於 4 下以 14,000 g離心60分鐘。倒出上清液，以 200 μ l 70%酒精清洗沈澱物並去除酒精後抽真空乾燥 5分鐘，再回溶cDNA於5 μ l無菌水，並置於 4 至少30分鐘使cDNA完全回溶。

鞘蛋白質基因之定序與分析



圖一、六個蕪菁嵌紋病毒系統之反轉錄聚合酵素連鎖反應鞘蛋白質基因產物之設計圖。
Fig. 1. The strategy for cDNA synthesis of the CP genes of six TuMV strains by RT-PCR. Two pairs of primers, TuMV-1 (8632~8652 : GCGGAAACAGCG CTGAGGAA) and TuMV-2 (9814~9830 : TTTTTTGTCCCTTGCATCCTATC), were designed to generate cDNA of TuMV by RT-PCR. Primers designed in this study are indicated with their names by arrows (). The size of the amplified fragment is indicated by a hatched box.

核啟酸序列之譯讀是以引子延伸方式，鞘蛋白基因使用TuMV-1引子進行同向解序，另使用TuMV-2引子進行反向解序。此分析乃根據Sanger (1977) 之雙股去氧核糖核啟酸鍊終止 (dideoxy chain termination) 方法，使用ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit及ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer, U.S.A.) 核啟酸自動定序儀進行之。

核啟酸及胺基酸序列之分析，將譯讀之核啟酸序列先轉成序列檔後存入電腦，再利用Hitachi software DNASIS for Windows (version 2.0 DNASIS) 軟體分析系統的序列功能譯讀出完整的序列。之後對六個 TuMV系統之鞘蛋白基因核啟酸序列進行A、T、G、C含量分析、轉譯成胺基酸序列。再從www.ncbi.nlm.nih.gov網站上查詢到的國外報告中TuMV系統的序列進行多重序列 (multiple sequences) 比對，分析不同系統間核啟酸序列、胺基酸序列和3' 端非轉譯區序列的差異性，並可進一步計算出彼此間之相同度。

結果與討論

病毒純化與病毒核啟酸之萃取

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Amax，於246 nm處出現Amin，顯示其為典型之potyvirus的吸收光譜 (Stace-Smith and Tremaine, 1970)。由吸光值中取出 Amax、Amin、A280 和A260，並計算Amax / Amin及A280 / A260之比值，結果顯示TuMV-C1 Amax / Amin之比值為1.06，A280 / A260之比值為0.93，根據換算potyvirus濃度之係數值2.4為定量標準，每100 g之芥菜感病品種病葉中可獲得之病毒量為4.7 mg。TuMV-C2 Amax / Amin之比值為1.07，A280 / A260之比值為0.88，每100 g之芥菜感病品種病葉中可獲得之病毒量為31.4 mg。TuMV-C3 Amax / Amin之比值為1.08，A280 / A260之比值為0.79，每100 g之芥菜感病品種病葉中可獲得之病毒量為26.4 mg。TuMV-C4 Amax / Amin之比值為1.05，A280 / A260之比值為0.87，每100 g之芥菜感病品種病葉中可獲得之病毒量為31.2 mg。TuMV-C5 Amax / Amin之比值為1.12，A280 / A260之比值為0.79，每100g之芥菜感病品種病葉中可獲得之病毒量47.88 mg。TuMV-TW，Amax / Amin之比值為1.10，A280 / A260之比值為0.78，每100 g之芥菜感病品種病葉中可獲得之病毒量為28.0 mg (表一)。結果顯示，TuMV-C1系統其病毒的純化量最低為4.7 mg，而TuMV-C5系統其病毒的產量最高為47.9 mg，兩者間約有10倍量的差異，這可能和TuMV不同系統間其本身的複製能力有關或是和病葉繁殖及採收的時期有關。

TuMV 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，計算其分子量大小約為10 kb (圖二)，是一般potyvirus RNA的長度。由於Potyvirus屬的病毒鞘蛋白基因變異頗大，因此鞘蛋白核啟酸序列的比對為Potyvirus屬病毒分類的重要依據⁽¹³⁾。

表一、六個蕪菁嵌紋病毒系統純化後的病毒產量和純度分析
Table 1. The yields and purity of six TuMV strains after purification

TuMV strains	Amax	Amin	A280/A260	Amax/min	Yield (mg/100 g tissues)
C1	260	246	0.93	1.06	4.7
C2	260	246	0.88	1.07	31.4
C3	260	246	0.79	1.08	26.4
C4	260	246	0.87	1.05	31.2
C5	260	246	0.79	1.12	47.9
TW	260	246	0.78	1.10	28.0

^a Potato virus Y標準值, Amax: 260 nm, Amin: 247 nm, A280/A260 = 0.83, Amax/min = 1.11. (Stace-Smith and Tremaine, 1970)

鞘蛋白基因之選殖

萃取之病毒RNA經反轉錄成為cDNA後，在TuMV-C1、C2、C3、C4、C5和TW六種系統鞘蛋白基因的選殖，皆使用相同的兩端引子對，分別進行RT-PCR增幅反應。六種TuMV系統經RT-PCR增幅放大後均產生一條約1.2 kb的產物，包含鞘蛋白與3' 端非轉譯區 (圖三)；這些放大片段分別經瓊脂電泳分離後進行回收。利用兩端引



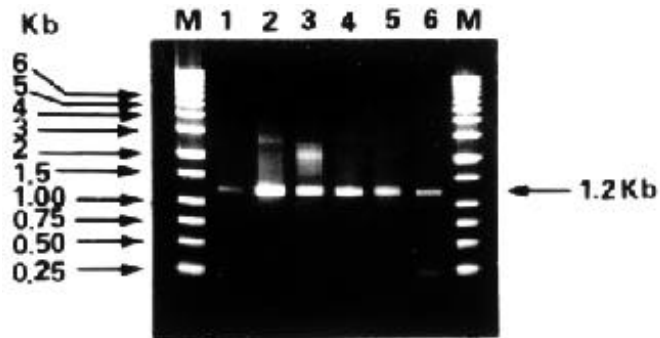
圖二、六個蕪菁嵌紋病毒系統RNA之電泳圖。
Fig. 2. Electrophoretic analysis of TuMV-C1, C2, C3, C4, C5 and TW RNA in a 1% agarose gel. Lane M : 0.24-9.49 kb RNA markers (BRL). Lanes 1-6 : TuMV-C1, C2, C3, C4, C5 and TW RNA, respectively.

子對進行鞘蛋白基因核啟酸序列之譯讀。

鞘蛋白基因核啟酸和胺基酸序列及 3' 端非轉錄區核啟酸序列之譯讀

在鞘蛋白基因部份，解讀完成 TuMV-C1、C2、C3、C4、C5和TW六個系統的鞘蛋白核啟酸、胺基酸及 3'端非轉譯區序列 (圖四和五)。TuMV-C1共有864個核啟酸序列，包含287個A、183個C、231個G、163個T，產生288個胺基酸。TuMV-C2共有864個核啟酸序列，包含279個A、177個C、239個G、169個T，產生288個胺基酸。TuMV-C3共有864個核啟酸序列，包含283個A、177個C、235個G、169個T，產生288個胺基酸。TuMV-C4共有864個核啟酸序列，包含278個A、179個C、234個G、173個T，產生288個胺基酸。TuMV-C5共有864個核啟酸序列，包含283個A、179個C、236個G、166個T，產生288個胺基酸。TuMV-TW共有864個核啟酸序列，包含287個A、180個C、230個G、167個T，產生288個胺基酸。由此一序列分析結果，不同系統之鞘蛋白基因核啟酸序列，在5'端之差異較大，而3'端序列差異較小 (圖四和五)；而3'端非轉譯區核啟酸序列差異很小，且含有約62%的AU (圖四)，此結果與Nicolas等人報告相同⁽⁷⁾。鞘蛋白基因胺基酸序列在N端亦有較大的差異，但核心區 (core region) 則相同度很高，因為鞘蛋白在折疊時會把N端和C端暴露在外面，而核心區是一團較緊密的結構，故保留性較高⁽¹³⁾。

利用DNASIS套裝軟體比較 TuMV-C1、C2、C3、C4、C5和TW六個系統的鞘蛋白基因核啟酸、胺基酸及 3'端非轉譯區核啟酸相同度。結果顯示六者之鞘蛋白核啟酸相同度高達92.7-99.3% (表二)，胺基酸相同度高達



圖三、TuMV-C1、C2、C3、C4、C5和TW的RT-PCR鞘蛋白基因與3'端非轉譯區產物電泳圖。

Fig. 3. Analysis of RT-PCR products for the CP genes and 3' non-translated regions of TuMV-C1、C2、C3、C4、C5 and TW in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. Lane M : 1 kb DNA markers (stratagene). Lanes 1-6 : products amplified by RT-PCR from TuMV-C1、C2、C3、C4、C5 and TW, respectively.

93.8-99.0% (表三)，3'端非轉譯區核啟酸相同度則高達98.9-100% (表四)。若比較鞘蛋白基因核啟酸相同度，TuMV-C1、C2、C3和C4系統之相同度為94.2-99.3%；而TuMV-C5和TW相同度為97.7%但是與其他四個系統之相同度只有92.7-95.1%。若比較胺基酸相同度，TuMV-C1、C2、C3和C4系統之相同度為95.1-99.0%，而TuMV-C5和TW相同度為97.9%但是與其他四個系統之相同度只有93.8-97.6%。若比較3'端非轉譯區核啟酸相同度TuMV-C1、TuMV-C2、TuMV-C4、TuMV-C5與TuMV-TW系統之相同度高達100%，而僅TuMV-C3系統之相同

表二、六個蕪菁嵌紋病毒分離株鞘蛋白基因核啟酸相同度之比較

Table 2. Comparison of nucleotide identities (%) of the CP genes of six TuMV isolates

Strains	TuMV-C1	TuMV-C2	TuMV-C3	TuMV-C4	TuMV-C5	TuMV-TW
TuMV-C1	100	94.9	95.3	94.2	95.1	94.7
TuMV-C2		100	99.3	98.5	93.9	93.4
TuMV-C3			100	98.7	94.2	93.8
TuMV-C4				100	93.2	92.7
TuMV-C5					100	97.7
TuMV-TW						100

表三、六個蕪菁嵌紋病毒分離株鞘蛋白基因胺基酸序列相同度之比較

Table 3. Comparison of amino acid identities (%) of the CP genes of six TuMV isolates

Strains	TuMV-C1	TuMV-C2	TuMV-C3	TuMV-C4	TuMV-C5	TuMV-TW
TuMV-C1	100	97.2	98.3	95.1	96.5	95.8
TuMV-C2		100	99.0	96.5	96.5	95.8
TuMV-C3			100	96.9	97.6	96.9
TuMV-C4				100	94.4	93.8
TuMV-C5					100	97.9
TuMV-TW						100

表四、六個蕪菁嵌紋病毒分離株3'端非轉譯區核啟酸相同度之比較

Table 4. Comparison of 3' non-coding region nucleotide identities (%) of six TuMV isolates

Strains	TuMV-C1	TuMV-C2	TuMV-C3	TuMV-C4	TuMV-C5	TuMV-TW
TuMV-C1	100	100	98.9	100	100	100
TuMV-C2		100	98.9	100	100	100
TuMV-C3			100	98.9	98.9	98.9
TuMV-C4				100	100	100
TuMV-C5					100	100
TuMV-TW						100

表六、六個蕪菁嵌紋病毒系統與國外報告蕪菁嵌紋病毒系統鞘蛋白質基因胺基酸序列相同度之比較

Table 6. Comparison of the amino acid identities (%) of the CP genes of six TuMV strains with those of other reported strains from different geographical areas

Strains	CPP	CAPP	CQS	NIAP	CP	CPRN	MUT	JAP
C1	94.4	97.6	94.4	96.5	98.3	98.6	98.3	95.8
C2	94.8	96.9	94.4	96.5	97.6	97.9	97.6	95.8
C3	95.5	97.9	95.5	97.6	98.6	99.0	98.6	96.9
C4	92.7	94.8	92.4	94.4	95.5	95.8	95.5	93.8
C5	94.1	96.9	94.8	99.3	98.3	97.9	98.3	96.2
TW	94.4	96.2	94.4	97.9	97.6	97.2	97.6	96.5
CPP	100	94.4	96.2	94.1	95.1	95.5	95.1	96.5
CAPP		100	95.1	96.9	98.6	99.0	98.6	95.8
CQS			100	94.8	95.1	95.5	95.1	96.5
NIAP				100	98.3	97.9	98.3	96.2
CP					100	99.7	100	97.2
CPRN						100	99.7	96.9
MUT							100	97.2
JAP								100

表七、六個蕪菁嵌紋病毒系統與國外報告蕪菁嵌紋病毒系統3'端非轉譯區核酸相同度之比較

Table 7. Comparison of the nucleotide identities (%) of the 3' non-coding regions of six TuMV strains with those of other reported strains from different geographical areas

Strains	CPP	CAPP	CQS	NIAP	JAP
C1	94.1	99.5	94.7	98.9	99.5
C2	94.1	99.5	94.7	98.9	99.5
C3	93.6	98.4	94.1	97.9	98.4
C4	94.1	99.5	94.7	98.9	99.5
C5	94.1	99.5	94.7	98.9	99.5
TW	94.1	99.5	94.7	98.9	99.5
CPP	100	93.6	99.5	93.0	93.6
CAPP		100	94.1	98.4	98.9
CQS			100	93.6	94.1
NIAP				100	98.4
JAP					100

- Ewardson, J. R. and Christie, R. G. 1991. The potyvirus group. Vol. IV, Fla. Agric. Exp. Stn. Monog. 16.
- Green, S. K. and Deng, T. C. 1985. Turnip mosaic virus strains in cruciferous hosts in Taiwan. *Plant Dis.* 69: 28-31.
- Jenner, C. E., and Walsh, J. A. 1996. Pathotypic variation in turnip mosaic virus with special reference to European isolates. *Plant Pathology* 45: 848-856.
- Kim, D.-H., Park, Y. S., Kim, S. S., Lew, J., Nam, H. G., and Choi, K. Y. 1995. Expression, purification, and identification of a novel self-cleavage site of the NIa C-terminal 27-KDa protease of turnip mosaic potyvirus C5.

Virology 213: 517-525.

- Kong, L. J., Fang, R. X., Chen, Z. H., and Mang, K. Q. 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of coat protein gene of turnip mosaic virus. *Nucl. Acids Res.* 18: 5555.
- McDonald, J. G., and Hiebert, E. 1975. Characterization of the capsid and cylindrical inclusion proteins of three strains of turnip mosaic virus. *Virology* 63: 295-303.
- Nicolas, O., and Laliberte, J. F. 1992. The complete nucleotide sequence of turnip mosaic virus RNA. *J. Gen. Virol.* 73: 2785-2793.
- Ohshima, K., Tanaka, M., and Sako, N. 1996. The complete nucleotide sequence of the turnip mosaic virus RNA Japanese strain. *Arch. Virol.* 141: 1997-1997.
- Pink, D. A. C., and Walkey, D. G. A. 1990. Resistance to turnip mosaic virus in white cabbage. *Euphytica* 51: 101-107.
- Provvidenti, R. 1980. Evaluation of Chinese cabbage cultivars from Japan and the People's Republic of China for resistance to turnip mosaic virus and cauliflower mosaic virus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105(4): 571-573.
- Provvidenti, R. 1980. Evaluation of Chinese cabbage cultivars from Japan and the People's Republic of China for resistance to turnip mosaic virus and cauliflower mosaic virus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105(4): 571-573.
- Shattuck, V. I. 1992. UG1 turnip germplasm possessing resistance to turnip mosaic virus. *HortScience* 27(8): 938-939.
- Shukla, D. D., Ward, C. W., and Brunt, A. A. 1994. The Potyviridae. CAB international. p.516. Cambridge.
- Spall, V. E., Shanks, M., and Lomonosoff, G. P. 1997. Polyprotein processing as a strategy for gene expression in RNA viruses. *Virology* 8: 15-23.
- Stace-Smith, R. and Tremaine, J. H. 1970. Purification and composition of potato virus Y. *Phytopathology* 60: 1785-1789.
- Tomlinson, J. A., 1970. Turnip mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. No. 8 Commonwealth Mycol. Inst., Kew, England. 4 p.
- Trembly, M.-F., Nicolas, O., Sinha, R. C., Lazure, C., and Laliberte, J.-F. 1990. Sequence of the 3'-terminal region of turnip mosaic virus RNA and the capsid protein gene. *J. gen. Virol.* 71: 2769-2772.
- 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.

19. Yoon, J. Y, Green, S. K. and Opena, R. T. 1993. Inheritance of resistance to turnip mosaic virus in Chinese cabbage. *Euphytica* 69: 103-108.
20. Yoshii, H., 1963. On the strain distribution of turnip mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 28: 221-227.

ABSTRACT

Wu, M. F. ¹ and Wang, H. L. ^{1,2} 1999. Analysis of the sequence diversity of the coat protein genes of different turnip mosaic virus strains. *Plant Pathol. Bull.* 8:133-142. (¹ Institute of Biology Science, National Kaohsiung Normal University, Kaohsiung, 802, Taiwan, R.O.C.; ² Corresponding author: E-mail: hlwang@nknuc.nknu.edu.tw; Fax: +886-7-7169030.)

TuMV is a member of the genus potyvirus. It infects many economically important crops, and is one of the most important viruses in the world affecting Brassica species. In this study virions of six TuMV strains, C1, C2, C3, C4, C5 and TW, were purified from infected leaves of mustard by polyethylene glycol precipitation followed by a Cs₂SO₄ isopycnic centrifugation. Electrophoresis revealed presence of a single RNA band about 10 kb for each strain of TuMV. The cDNAs of the coat protein (CP) genes and 3' non-translated regions of the six TuMV strains were synthesized by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Analysis of nucleotide sequences and amino acid sequences of the CP genes and the 3' non-translated regions indicated that the CP genes of TuMV-C1, C2, C3 and C4, and those of TuMV-C5 and TW share close relationships. The CP genes and 3' non-coding regions of the six TuMV strains were also compared with other reported TuMV strains of CPP (from China), CAPP (from Canada), CQS, NIAP (from Korea), CP, CPRN, MUT (from UK) and JAP (from Japan). Results showed that the CP genes of TuMV-C5 and TW have closer relationships with the NIAP strain from Korea.

Key words : turnip mosaic virus, coat protein (CP) gene, nucleotide sequences