

黑眼豇豆嵌紋病毒台灣系統序列之譯讀與分析

王惠亮^{1,2} 方鄒誠¹

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886-7-7169030

接受日期：93年5月2日

摘要

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.

黑眼豇豆嵌紋病毒 (*Blackeye cowpea mosaic virus*, BICMV)，屬於 *Potyviridae* 科 *Potyvirus* 屬，是感染豇豆最重要的病毒之一，可經由機械傳播、蚜蟲以非永續性的方式傳播及經由種子傳播，在地理的分佈上更是遍佈全球。將病葉萃出液經 polyethylene glycol (PEG) 沈降及硫酸鈉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。利用反轉錄聚合酶連鎖反應法來選殖分析黑眼豇豆嵌紋病毒台灣系統的基因序列，全長度基因體共含 9992 個核苷酸 (accession number : AY575773)，其大小和其它 potyviruses 相似。基因體 RNA 只含一個轉譯架構，由第 133 個核苷酸起轉譯至第 9738 止，共轉譯出一個含 3202 個胺基酸的複合蛋白。將所完成之 BICMV-TW 與國外已解讀完之 *Bean common mosaic virus* (BCMV) -Y、BCMV-R、Peanut stripe virus (PStV)、*Soybean mosaic virus* (SMV)、*Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)、*Clover yellow vein virus* (CIYVV)、*Bean yellow mosaic virus* (BYMV) 與 *Lettuce mosaic virus* (LMV) 比較各基因核苷酸和胺基酸序列相同度，結果顯示 BICMV-TW、BCMV-Y、BCMV-R 及 PStV 這四個病毒之間，除了 P1 基因外，各基因核苷酸與胺基酸序列相同度均高於 80%。此四種病毒皆保有 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酶活性部位 GDD motif。nuclear inclusion a (NIa) 蛋白經由自切在 Glu-200 與 Ser-201 產生 25 kDa 的蛋白。在 helper component protease (HC-Pro) 蛋白皆保留了 KITC 與 PTK motifs。BICMV-TW、BCMV-Y、BCMV-R 及 PStV 這四個病毒間無論是核苷酸或胺基酸序列比對皆展現了高同源性，因此 BICMV-TW 和 PStV 確實是 BCMV 的不同系統。

關鍵詞：黑眼豇豆嵌紋病毒，馬鈴薯 Y 病毒屬，核苷酸序列

緒言

豇豆 (*Asparagus bean*) 學名 [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. sp. *sesquipedalis* (L.) Verdc.] 為豆科 (Leguminosae) 一年生短期作物，為本省最具經濟重要性之三種豆類蔬菜之一，豇豆栽培期間易感染多種病害，其中以病毒病危害最為嚴重。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) 等，而感染豆科之 potyviruses 病毒彼此間親緣關係接近⁽¹⁾，其中 AzMV、BICMV、PStV 等病毒與 *Bean common mosaic virus* (BCMV) 同種異名病毒^(8, 10)。而危害本省豇豆之病

毒種類主要有三種⁽⁷⁾，即豇豆蚜媒嵌紋病毒病 (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*, CABMV)、黑眼豇豆嵌紋病毒病和胡瓜嵌紋病毒病 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)，前兩者為長絲狀的 *Potyvirus* 屬病毒⁽⁹⁾，而後者為球型的 *Cucumovirus* 屬病毒，此外 CABMV 在民國 72 年被報告後就未曾在本省的田間發現，其消失的原因不明⁽¹⁾。

黑眼豇豆嵌紋病毒屬於 *Potyviridae* 科 *Potyvirus* 屬，其病毒之外部型態為彎曲長絲狀，病毒分子大小為 700-900 nm 長、11-15 nm 寬，核酸佔組成成分之 5%，蛋白質佔 95%。*Potyvirus* 之基因組為正極性 (positive polarity) 單鏈核糖核酸 (ssRNA)^(12, 13, 16)，長度約 10 kb，基因組只包含一個單一的轉譯架構 (open reading frame, ORF)，呈螺旋狀，螺距約為 3.4 nm，此核酸具備訊息 RNA (mRNA) 之功能，如同真核生物般，在其 3' 端尾部亦具有 poly(A) tail，能轉譯出一約 340-368 kDa 大的複合蛋白 (polyprotein)。

當 RNA 分子進行轉譯之後，所產生的複合蛋白會經由 cis 及 trans 作用活化進而產生 3 個蛋白酶，之後此 3 個蛋白酶 P1、HC-Pro 及 NIa，會再對複合蛋白進行裂解⁽¹³⁾，最後將複合蛋白質分解產生至少 8 個成熟的蛋白質，這些蛋白質從 5' 端到 3' 端依序分別為 P1 (first protein)、HC-Pro (helper component protease)、P3 (third protein)、6K1、CI (cylindrical inclusion)、6K2、NIa (nuclear inclusion a)、NIb (nuclear inclusion b) 及 CP (coat protein)，而本身具有蛋白水解酶功能的 NIa 能自切成 C 端具酶功能之片段與 VPg (virus-encoded genome linked protein)^(12, 13)。P1 蛋白位於複合體蛋白的 N 端，是 potyvirus 中歧異度最高的地方，以山藥嵌紋病毒 (*Yam mosaic virus*, YMV) 為例，不同的系統 (strain) 間之 P1 只有 65 % 的相似性，但 HC-Pro 及 NIb 卻有 80 % 的相似性⁽⁵⁾。HC-Pro 是一個具有多功能的蛋白，目前發現在 *Potyvirus* 屬病毒中的 HC-Pro 至少有六個功能⁽¹⁸⁾。P3 蛋白在 *Potyvirus* 中歧異度僅次於 P1、CP 的 N 端，一般認為 P3 蛋白與病毒的增幅 (amplification) 有關⁽⁵⁾。6K1 蛋白常與 P3 蛋白結合在一起，已知複合體蛋白的 C 端區域是病徵嚴重程度的決定因子⁽¹⁵⁾，此外 6K1 的真正功能仍不清楚。近年的研究報告指出 CI 能定位原生質絲及 CP 與病毒核酸所形成的 ribonucleoprotein complex，而幫助病毒在寄主細胞間的移動⁽¹²⁾。NIa 是 potyvirus 中主要的蛋白酶，可經由 cis 及 trans 的方式將複合蛋白分解產生數個 (6K1、CI、6K2、NIb 及 CP) 具有功能性的蛋白質⁽¹³⁾。NIb 蛋白是所有的 potyvirus 蛋白中最具共同性的蛋白，NIb 具有 RNA dependent RNA polymerase (RdRp) 的活性⁽²⁰⁾。CP 的 N 端具有很大的變異性，是病毒專一性的抗原決定位 (virus-specific epitopes)，因此也被作為 *Potyvirus* 屬病毒不論在種間或種內的重要分類依據^(17, 19)。

為了發展出對抗黑眼豇豆嵌紋病毒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黑眼豇豆嵌紋病毒之核苷酸及胺基酸序列組成，由於本實驗室前人研究資料^(2, 3)，本病毒已完成 CP 基因序列之解序工作，故目標基因序列的解序工作定在 NIb 基因到 5' 端非轉譯區序列，本文之另一目的在經由比較、分析此病毒與已知會感染豆科植物的馬鈴薯 Y 群病毒，進行全長度核苷酸、蛋白質序列的比對、分析與探討親緣關係。

材料與方法

病毒來源與病毒核酸之萃取

病毒來源：本實驗所使用之黑眼豇豆嵌紋病毒 (BICMV-TW) 係採集於屏東縣里港鄉豇豆園中豇豆植株呈現嵌紋病徵之葉片，病葉先經 ELISA 檢定 (BICMV 和 CMV 免疫球蛋)，以確定只遭黑眼豇豆嵌紋病毒感染而

未被 CMV 感染後，再以 0.1 M 磷酸緩衝液 (phosphate buffer, pH 7.0) 研磨成汁，接種於健康之奎藜 (*Chenopodium quinoa* L.) 幼苗葉片上，待其病徵表現後，取其單一病斑再次接種於健康奎藜幼苗葉片。如此重複三次單斑接種分離後，將病毒經 ELISA 再次檢定後回接於豇豆，供為本實驗接種、繁殖與純化材料。

病毒純化：本實驗依據 Albersio 等人⁽⁴⁾的方法加以修正後來純化病毒。取已感染黑眼豇豆嵌紋病毒之豇豆病葉 150 g，加入 300 ml 之 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用雙層紗布過濾，所得之粗汁液緩緩加入正丁醇 (n-butanol) 使最終濃為 8 % (v/v)，於 4°C 下緩慢攪拌至隔夜，再以 11,700 g 離心 10 分鐘 (R14A3 rotor, Hitachi CR22E, Japan)，取其上層液，再依上層液體積加入 5 % 量之 PEG (M.W. 6000)，於 4°C 下緩慢攪拌 1 小時後，再以 13,200 g 離心 10 分鐘，取其將沈澱物溶於 15 ml 0.02 M 之磷酸鉀緩衝液 (pH 7.5) 中，於 4°C 下緩慢攪拌 1 小時後，再以重量百分比 (w/w) 為 30 % 之比例加入硫酸鈉 (Cs₂SO₄, Merck, Germany)，在 6°C 下以 150,000 g 超高速離心 19 小時 (P90AT rotor, Hitachi, Japan)。離心後，於聚光燈下可見一白色雲霧狀亮環，抽出此亮環後，加入適量的 0.05 M 磷酸鉀緩衝液混合均勻後，注入透析膜內，置於 4°C 下透析 (dialysis) 三次，最後以分光光度計 (Hitachi U-2000 spectrophotometer) 由波長 340 nm 掃描至 220 nm。由紫外光的吸光值中，取出最高 (A_{max})、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；由此可估算出病毒的濃度與純度，再以 0.05 M 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.5) 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 1 ml (1 mg/ml) BICMV-TW 病毒，分別加入同體積的 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。再分別加入蛋白質分解酵素 K (proteinase K) 最後濃度 10 μg/ml，37°C 水浴 15 分鐘。之後分別加入同體積的 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，並分別加入同體積之 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，分別加入 1/10 體積之 3 M 醋酸鈉 (pH 5.2)，最後再分別加入 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 (Eppendeoff 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。抽真空乾燥 (Eyela CVE-100 centrifugal vaporizer, Japan)，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 時之吸光值，藉以計算其濃度，並以 DEPC 處理過的無菌水將其濃度調整為 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，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 ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) 及 RNA 分子標誌 (RNA markers) (0.2-10.0 kb, Sigma) 各 $1 \mu\text{l}$ 與 $6 \mu\text{l}$ 乙二醛承載緩衝液 (glyoxal loading buffer : 30 % Glyoxal $1.2 \mu\text{l}$; DMSO $3.2 \mu\text{l}$; 5X TAE $0.6 \mu\text{l}$; loading dye $1 \mu\text{l}$) 均勻混合，之後於 0.8 % 洋菜水平膠體與 0.5X TAE 緩衝系統 (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 分子標誌 (RNA markers)

比對，估算 BICMV-TW RNA 分子之大小。

病毒基因之定序

BICMV-TW 解序工作已完成由 3' 端非轉譯區序列至 CP 基因⁽³⁾，故目標基因序列的解序工作是由 NIB 基因開始到 5' 端非轉譯區序列。而 BICMV-TW 基因序列引子之設計是以 PStV-B (accession number : NC_001723) 和 PStV-China G (accession number : AJ132143) 之病毒核酸序列為參考序列，序列約 500-800 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。

表一、黑眼豇豆嵌紋病毒台灣系統 (BICMV-TW) 之 PCR 與 RT-PCR 反應使用之合成引子序列表

Table 1. Synthetic primer sequences used in PCR and RT-PCR reactions for viral genes of BICMV-TW strain.

Primers	sense/antisense (+/-)	Corresponding position ¹	Sequences	Target gene
Blc-A1	+	8211-8230	5' GGTGGGTTGGTGAAGAGATG 3'	NIB, CP
Blc-B1	-	8970-8989	5' AGCATCCACACCAGCATCCA 3'	NIB, CP
Blc-A2	+	7636-7655	5' TGAGGTTTGCTATGAAGCGT 3'	NIB
Blc-B2	-	8330-8349	5' AGTGTGTTGTCCACGACTGT 3'	NIB
Blc-A3	+	7126-7145	5' GGTCTCAGTAAGTGATGGAC 3'	NIB
Blc-B3	-	7830-7849	5' CAGGTACAAGAGTCTCTCCT 3'	NIB
Blc-A4	+	6523-6542	5' CAGGCCAACACTTTTGTGTA 3'	NIa-Pro, NIB
Blc-B4	-	7241-7260	5' TCCCATGAAAGTGATTCAGC 3'	NIa-Pro, NIB
Blc-A6	+	6020-6039	5' ACATTGATTGGTGGTGGCTG 3'	6K2, NIa-VPg, NIa-Pro
Blc-B6	-	6670-6690	5' CACGAAGTCCCTTGTAATC 3'	6K2, NIa-VPg, NIa-Pro
Blc-A8	+	5405-5424	5' AAGCTGGCAATCCCATATCA 3'	CI, 6K2, NIa-VPg
Blc-B8	-	6121-6140	5' TGTCAAAAGCATCCCTGAAC 3'	CI, 6K2, NIa-VPg
Blc-A12	+	4722-4741	5' ACTTCGTACAAGCTCAAGGA 3'	CI
Blc-B8R	-	5405-5424	5' TGATATGGGATTGCCAGCTT 3'	CI
Blc-BS2 ²	-	4863-4885	5' CATCTGCATTGTCTTCCATCCA 3'	P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI
Blc-A13	+	4141-4163	5' ATGGTGAATAGACAGTTGCAGC 3'	CI
Blc-BS2	-	4863-4885	5' CATCTGCATTGTCTTCCATCCA 3'	CI
Blc-A14	+	3691-3710	5' TGTGAAGCAGGCTGAGAGAA 3'	P3, 6K1, CI
Blc-B14	-	4420-4439	5' CTCGCATTCTGAGTGTGACA 3'	P3, 6K1, CI
Blc-A15	+	2692-2711	5' TGCAAGCCAGACAATGCATG 3'	HC-Pro, P3
Blc-B15	-	3830-3849	5' GCCATCATTTCTGTGCTGT 3'	HC-Pro, P3
Blc-A17	+	2386-2405	5' TCCAATAAGAGACACCTCG 3'	HC-Pro, P3
Blc-B17	-	2853-2872	5' GAGAGCTGTCTCACATCTCA 3'	HC-Pro, P3
Blc-A19	+	1888-1907	5' AGGCTCATCAGTGAAGCAAG 3'	HC-Pro
Blc-B19	-	2591-2610	5' TCATGCATTGTGGGCCATGT 3'	HC-Pro
Blc-A20	+	1489-1508	5' CAATGGATGGCGTGACAAGT 3'	HC-Pro
Blc-B20	-	1945-1764	5' GGTTCTTCCACCATTTGTGTC 3'	HC-Pro
Blc-A21	+	854-873	5' AAGAAACGCGCTGAATTGGC 3'	P1, HC-Pro
Blc-B21	-	1561-1580	5' ACTGTCCACACTGTGCATTG 3'	P1, HC-Pro
Blc-A22	+	350-369	5' GAAGGCGATTTGAGTGCATC 3'	P1
Blc-B22	-	945-964	5' AATACTCATCGGCTCCAGCA 3'	P1
Blc-B23	-	519-538	5' TTCAGTGGCTACACATGGCA 3'	P1
Smart 2A ³	+		5' CAGTGGTATCAACGCAGAGT 3'	P1

¹ Corresponding position was referred to PStV-B (Acc. No. NC_001723).

² Primer Blc-BS2 was used for first-strand cDNA synthesis.

³ Smart 2A was referred to SMART II oligo sequence (SMART™ RACE cDNA Amplification Kit ; Clontech, USA)

反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)：從 Nib 到 HC-Pro 使用 RT-PCR 增幅出特定大小之片段再進行定序，RT-PCR 分別使用 EZ rTth RNA PCR kit (PE Applied biosystems, USA) 及 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, USA) 來進行。

引子設計及反應條件：共設計 Blc-A1 與 Blc-B1、Blc-A2 與 Blc-B2、Blc-A3 與 Blc-B3、Blc-A4 與 Blc-B4、Blc-A6 與 Blc-B6、及 Blc-A8 與 Blc-B8、Blc-A12 與 Blc-B8R、Blc-A13 與 Blc-BS2、Blc-A14 與 Blc-B14、Blc-A15 與 Blc-B15 和 Blc-A17 與 Blc-B17 共十一對引子進行 RT-PCR 增幅反應 (表一)，反轉錄及增幅條件依 EZ rTth RNA PCR Kit (PE Applied biosystems, USA)、QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, USA) 和 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA) 進行，之後將產物進行電泳膠體分析以估計其大小。

SMART cDNA 合成技術：為了合成包含完整 5' NTR 序列之 cDNA，因此利用 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA) 進行反應。從 CI 到 5'-NTR 區域，先合成出第一股 cDNA，之後設計引子進行 PCR 增幅出特定大小之片段再進行定序。

第一股 cDNA 之合成：利用上述之 Kit 合成第一股 cDNA 包含核酸之 5' 端非轉譯區序列。取 2 μ l BICMV-TW 之 RNA 試料 (1 μ g/ μ l)，加入各 1 μ l SMART II A oligo (10 μ M)、引子 Blc-BS2 (10 μ M) 與去離子水，均勻混合後在 70°C 下水浴 2 分鐘，再加入 2.0 μ l 5X First-strand buffer，各 1 μ l 的 Dithiothreitol (DTT, 20 mM) 與 dNTP Mix (10 mM) 及 1 μ l PowerScript™ Reverse Transcriptase (50 U/ μ l)，置於 42°C 下 1.5 小時，之後加入 90 μ l 的 Tricine-EDTA buffer，然後在 72°C 中 7 分鐘，最後產物再進行水平電泳膠體分析，以確定其分子量大小。

聚合酶連鎖反應 (PCR)：將第一股 cDNA 取 1 μ l 為模板，加入 10X PCR buffer 5 μ l、200 μ M dNTP Mix 1 μ l、Taq DNA Polymerase (PE Applied biosystems, USA) 0.5 μ l、兩端引子各 2 μ l (10 μ M) 及 38.5 μ l ddH₂O，總體積共 50 μ l。此外設計 Blc-A19 與 Blc-B19、Blc-A20 與 Blc-B20、Blc-A21 與 Blc-B21、Blc-A22 與 Blc-B22 和 Smart 2A 與 Blc-B23 共五對引子進行 PCR 增幅反應 (表一)，再將上述之產物進行水平電泳膠體分析，以估算其分子量大小。

核酸序列之譯讀：序列之譯讀是根據 Sanger⁽¹⁴⁾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, USA) 核酸自動定序儀進行核酸序列之譯讀。

核酸序列之分析與比對

利用 Hitachi software DNASIS (version 2.1) 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；之後再利用功能鍵之比對 (compare : maximum matching)，找出兩端引子所譯讀出之正向序列的重疊部分，進一步將兩序列組合成完整的序列。可再利用程式中的轉譯 (translation) 功能將核酸序列轉譯成胺基酸序列。所得到的 BICMV-TW 之核酸序列、胺基酸序列再置於 National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) 中的 BLAST 程式下，進行序列比對，之後，再利用國家衛生研究院所提供之巨分子序列分析 (GCG Command Mode, telnet : gcg.nhri.org.tw) 程式，分析 BICMV-TW 與其他國外已發表會感染豆科植物之八種 *Potyvirus* 屬病毒間序列之差異性和比較相同度 (identity)。

結 果

病毒核酸之萃取及電泳膠體分析

病毒在硫酸銨等密度離心純化後在離心管中距液面約 2.5 cm 處可見一清楚之白色環帶。取出純化後之病毒，以分光光度計由波長 340 nm 掃瞄至 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，其於 260 nm 處出現 A_{max}，於 246 nm 波長處出現 A_{min}，顯示其為典型之 potyviruses 的吸收光譜。由吸光值中取出最高 (A_{max})、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，結果顯示 BICMV-TW A_{max}/A_{min} 之比值為 1.12，A₂₈₀/A₂₆₀ 之比值為 0.79，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 A₂₆₀/2.4，每 100 g 之豇豆病葉中可獲得之病毒量為 4.77 mg。BICMV-TW 之 RNA 分子經 0.8% 洋菜水平膠體電泳，並與 RNA 分子標誌比對後，結果顯示 BICMV 之 RNA 分子量大小約為 10 kb。

病毒基因之定序與分析

從 CP 基因到 P3 基因之選殖與電泳膠體分析：分別使用 EZ rTth RNA PCR kit (PE Applied biosystems, USA) 及 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, USA)，以 Blc-A1 與 Blc-B1、Blc-A2 與 Blc-B2、Blc-A3 與 Blc-B3、Blc-A4 與 Blc-B4、Blc-A6 與 Blc-B6、Blc-A8 與 Blc-B8、Blc-A12 與 Blc-B8R、Blc-A13 與 Blc-BS2、Blc-A14 與 Blc-B14、Blc-A15 與 Blc-B15 及 Blc-A17 與 Blc-B17 共十一對引子進行 RT-PCR 增幅反應，並將產物進行 1.2% 水平膠體電泳分析，經與 0.05-2 kb 或 0.5-10 kb DNA markers 比對後，其產物分別為 0.8、0.75、0.75、0.75、0.75、0.75、0.75、0.75、0.75、1.1 和 0.5 kb。

CTTGGAGAATTGGGGTCTAACACAGTGAAGTTACAAGTAAGGAAGCAATGATCAAG 5892
L G E L G V L N T V R L Q S K E A M I K 1920
TTTCTAGGCATTAAGGAAAATGGGATGGAAAGTTCATGAACGATGGCCATCTGGCC 5952
F L G I K G K W D G K K F M N D A I L A 1940
GCATTCACACTACTTGGCGGTGGCTGGATGATGTTGGGAGTACTTTAGTAAGAAGATGCTG 6012
A F T L L G G G W M M W E Y F S K K M L 1960
GAGGATTTGCAACACAAAGGAAGGCGCATGATACAAAGCTTAAGTTCAGGGATGCT 6072
E D V A T Q G K K R M I Q K L K F R D A 1980
TTTGACAGAAAGTTGGCCGTGAGGTGATGCTGATGACTATACAAATGGAGCACACATTT 6132
F D R K V G R E V Y A D D Y T M E H T F 2000
GGCGAAGCATACACTAAGAAAGGCAAAAGGCAAGCAAAAACAAAGGGATGGGA 6192
G E A Y T K K G K Q K G S T K T K G M G 2020
AGAAGACAAGAACTTCATACATATGTATGGAGTCGAGCTGAGAATTATAGTATGATC 6252
R K T R N F I H M Y G V E P E N Y S M I 2040
CGTTTTGTGATCCACTCACTGGTCAACTCTGGATGAAGGCAAGAGTGGACATAAGA 6312
R F V D P L T G A T L D E G R V D I R 2060
CTTGTGCAAGGAGATTCGGCGAGATTAGGAATCGAATGATGATGAGGATGAAGTGCAT 6372
L V Q E E F G E I R N R M I D E D E L D 2080
GTGCAACTAGTCAGGAACAAACCTGGGATTCAGGCTTATTCATGGCAAGAAATGCAAAA 6432
V E L V R N K P G I Q A Y F I G K N A E 2100
GAGGCGCTTAAGGTGACTTACCCCAACATAGACCAAGCTTTTGTGCAAAAATGCAAT 6492
E A L K V D L T P H R P T L L C K N S N 2120
GCAATTCGTGGTTTTCTGAAAGAGAAGTGAAGTCAAGCAACAGGCTTCCCAACGCAC 6552
A I A G F P E R E N E L R Q T G L P T H 2140
ATCAAGAGAAGTGAAGTGCCTGAGCTAAGCAAGAGTGGCGCTGAAAGCAAGTGGATT 6612
I K R S E V P E P N E E V A V E S K S I 2160
TACAAGGACTTCGTGATATAAGCGTATCTCTAGTTGGTTCGCAACTCAAAAATATC 6672
Y K G L R D Y N G I S S L V C Q L T N I 2180
TCAGATGGCATTGTGAGACAATTTTGTATAGTTATGGTTATGGTTCATCATCACAAT 6732
S D G H C E T I F G I G Y G S Y I I T N 2200
GGCATTGTTTCAGGCGCAATAAGCGTATGCTTAATATCAAGACATGGCATGGTGAATTT 6792
G H L F R R N N G V L N I K T W H G E F 2220
GAGTAAGAATAACAACAGATCAAAATTCCTCAATTCAGGGGAGGATGCAATACTC 6852
E I K N T T Q I K I H F I E G K D A I L 2240
ATTGATGCCAAAAGCTTCCCACTTTGCAAGAAAGGCTGTTGAGCAACCAACC 6912
I R M P K D F P P P A K K S L F R P P T 2260
AAAGAGGAAGAGTGTGATGTTGGGGCAAAATTCAGGAGAAAGTCTCAGAGCAACA 6972
K E E R V C M V G T N F Q E K S L R A T 2280
GTGTCGAATCTCAATGGTGTACCTGAAGGGTGGATCTTTTGGATACATGGATC 7032
V S E S M V L P E G V G S F W I H W I 2300
ACAACGCAAGTGGGTATTGGACTGCCCTGGTTTCAGTAAATGATGGGCTCATAGTT 7092
T T Q D G Y C G L P L V S V N D G L I V 2320
GGATTTTCATGCTAACTTGAATGATCGAACAANAATTTCTTCGTGCGCTTTTGTGAG 7152
G F H G L T S N D S N K N F V P F C E 2340
GATTTTGAGAACAAGTATCTAAAATGACTCCTTTTCAAGGGCAAAACATTTGGTTT 7212
F E N K Y L K N A E S L S W D K H W F 2360
TGGCAGGACAAAATAGCATGGGCTCTCAAACTTGTAGTGTATCAACAAAAGAA 7272
W Q P D K I A W G S L N L V S D Q P K E 2380
GAATTCAAAATCTCAAAGCTCATCTCAGATCTTTTCGGTGGCACAGTGGAAACAAAGC 7332
E F K I S K L I S D L F G G T V E T Q S 2400
AAGCAACAATGGGTTTTGGAGTCAGTAGGGCAATCTCAAGCATGTGCGAAAGCTGAC 7392
K Q Q W V L E S V E G N L K A C A K A D 2420
AGCGCTTAGTGACAAAGCATGTGGTGAAGGGTAAAGTCCCATCTTTGAGCAATACTTG 7452
S A L V T K H V V K G G T C P Y F E Q Y L 2440
AGAGAGGAGGAGCAGCAGCCTTCTCAGGCTTTTGTGGTGCTTACCAACCAAGC 7512
R E R S E A A A F F R P L M G A Y Q P S 2460
AAATGAAACAAGAGGCTTCAAGAAAGATTTCTCAAGTACAACAAGTTGTAACACTG 7572
K L N K E A F K K D A F F K Y N K V V T L 2480
GGTGAAGTTGCTATGAAGCATTCGAAGCAGCCTCAATGGAGTTATAACAATGATGATA 7632
G E V C Y E A F E A A F N G V I T M M I 7590
GAACACGGTTTTCTGAGTGTCTCATGTCACAGACAGGAGAAATATACTCATCTT 2600
E H G F S E C S Y V T D P E E I Y S S L 2520
AATCTGAAGGACCGGTTGGAGCCCAACAAGGGAAGCAAGATTAATCTCTGTGGT 7752
N L K A A V G A Q Y K G K Q D Y L C G 2540
ATGGACGAATTTGACAGGAGACTCTTGTACCTGAGTTGTGAAAGGTTGTTTATGGT 7812
M D E F D K E R L L Y L S C E R L F Y G 2860
AAGAAAGGACTTGGAAATGTTCACTCAAGCAGAAATGAGACCATAGAAAAGGTTGAA 7872
K G L W N G S L K A E L R P L E K V E 2580
GCCAACAAGACACGACTTTCACAGCTGCCATCGACACACTACTAGGAGGAAAGGTT 7932
A N K T R T F T A A P M D T L L G A K V 2600
TGCGTGGATGATTTTAAACCAATTCATATGTCACCACTGGAGTTCATGGACTGTT 7992
C V D D F N Q F Y S L N L E C P W T V 2620
GGAATGACAAAATCTATGGCGGATGGGACACTCTAATGAGAAAGTTCCTGATGGATGG 8052
G M T K F Y G G W D T L M R K L P D G W 2640
ATTCACTGCCAGCAGATGTTCTCAGTTGATGATGATTAACCACTTCTACTCAAT 8112
I H C H A D G S Q F D S S L T P L L L N 2660
TCAGTGTGGAATCAGAAGATTTCTTATGGAGGATTTGGTGGTGGTGAAGAGATGCTT 8172
S V L G I R R F F M E D W W V G E E M L 2680
GAGAATTTGATGCTGAGATAGTGTACACCCATATTTGGCACCTGATGGAAAGTGT 8232
E N L Y A E I V Y T P I L A P D G T V F 2700
AAAAGTTAAGAGGAAATAATAGTGAACAACCCCTCCACAGCTGGGCAACACACTCATG 8292
K K L R G N N S G O P S T V V D N T L M 2720
GTTGTAATGTCAGTCTATTATTCATGCCACAAAGTTCGAGTGGATGATGACATACAA 8352
V V M S V Y Y S C H K V G W S D D I Q 2740
GAGCGTCTGGTTTTCTTTCGAAATGGAGATGATATCTCTCCATACAAGGCGAGAT 8412
E R L V F F A N D I I L S I Q E A D 2760
CTTGGGTTCTTGACACATTCGCTGATCGTTTGGAGGAGTGGGATGAACTCAACTTT 8472
L W V L D T F A A S F R E L G L N Y N F 2780
GATGAGGACAAAGAGAGAGACTCTGTTCACTGCGACTGTGCTATCGAAGT 8532
D E R T R K R E D L W F M S H C A I E V 2800
GCTGGAATCTACATTCCAAAGCTAGAACACAGCGTGGTGGTTCATTCAGTGGAGC 8592
D G I Y I P K L E P E R V V S I L E W D 2820
AGGAGTAAGAAATGATGACACAGAACTGAGCAATTTGGCAGCTATGATGAAGCATGG 8652
R S K E M M H R T E A I C A A M I E A W 2840
GGATTCCTGAACTGCTCAAGAGATCAGGAAGTTTATCTATGGCTGCTGAGAGGGAT 8712
G Y P E L L Q E I R K F V L W L E R D 2860

GAAGTGAAGAGATTGCAGCTAGTGGAGGAGCCCATACATAGCAGAGTGCAGCTGAAA 8772
E L K E I A A S G G A P Y I A E S A L K 2880
ACTTLYTACATAATAGGAAAACAAAGATTGAAGATGTAGCAAAATCTCGAAGTGCTT 8832
C T T T N R K T K I E E L A Y K L E V L 2900
GACTTTGACTATGATGAGGATGCGGAGAACTGTGCACTACAACAGCACTGGCGAG 8892
D F D Y D V G C G E S V H L Q S G T G Q 2920
CCGCAACCAACCAATAGTGGATGCTGGTGGATGCTGGAAAGGCAAGAGAGAGAGAAG 8952
P Q P P I V D A G V D A G K D K R E R S 2940
AATAGAGGAAAAGACCCCTGAAGGAGGAGGGTGTGATGAAACAACCAACCGTGGTCAGG 9012
N R G K D P E G R E G S V N N N R G A G 2960
GATTCACCAATGAGAGACAAGGATGTGAACGAGGCTCCAAAGGAAAAGTTGTCCCGG 9260
D S T M R D K D V N A G S K G K V V P R 2980
CTTCAAAGATCACAAGAGGATGAACCTGGCCATGGTGAAGGGAATGTTATTTAAAT 9372
L Q K I T K R M N L P M V K G N V I L N 3000
CTAGATCATCTGTTGATTAACAGGCAAGCAAACTGATCTTTTAAACAGAGACAACA 9192
L D H L L D Y K P E Q T D L F N T R A T 3020
AAGATGACGTTGAAATGGTACAATGCTGTGAAGGCGAGTGAATAGATGATGCA 9252
K M Q F E M W Y N A V K G E Y E I D D A 3040
CAGATGCTCAATGTAATGAAATGGCTTTCATGGTGTGATGAAAGGAGGCACTCAGCG 9312
Q M S I V M N G F M V W C I D N G T S P 3060
GATGTAATGGTATGAGGATGAGTGGATGAGAGTGAAGTGAATGCAACCACTCCAA 9372
D V N G T W V M M D G D E Q V E Y P L K 3080
CCAATGGTGAAGTGAAGCAACACTCCGTCATGCAACTTCTCAGATGCA 9432
P M V E N A K P T L R Q I M H F S D A 3100
GCTGAAGATACATGATGAGAGTGAAGTTCGAAACCAAGTCACTGCTAGGATCGGACTA 9492
A E A Y I E M R N S E K P Y M P R Y G L 9552
CTTCGAAATTTGAGGATAAAAACTAGCTCGTACGCTTTTGTATTTCTATGAGGTGACA 9552
L R N L R D K N L A R Y A F D F Y E V T 3140
TCCAAGCACTCGATCGAGCAGAGCAGTGAAGCAGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 9612
S K T S D R A R E A V A O M K A A A L S 3160
AACGTTGACGAAATGTTTGGACTTGTGATGTTGTTGCAACAACAGGAGAACT 9672
N V S S K L F G L D G N V A T T S E N T 3180
GAAAGGACACTGCAAGGAGGTTAACCAAAACATGACACTTTCGCTGAGGTTCC 9732
E R H T A R D V N Q M H T L L G M S 3200
CCGCAAGCAATGGGTAAGTGAACCAAGTATGATCTCCGCTGCTGAAATTTCA 9792
P Q * 3203
TATAGTAATCTTTATGTTCTCTTTAGTTTCAGTGGTGTACCACCTTTGTGTTACTA 9852
TTGTGATAGGCTGTTAGTCCCAACCAATATTTGAGTACTTTATGTTATGAGTAAGCC 9912
GGAAGAACCAATGCAATGGTGGGATGAGGAGTGTATGATCATGTGTCATGAAGTGA 9972
CTACGCAATGTTTGTGTT 9992

圖一、全長度之黑眼豇豆嵌紋病毒台灣系統(BICMV-TW)核糖核酸及胺基酸序列 (accession number : AY575773)

Fig. 1. The full-length cDNA nucleotide and amino acid sequences of BICMV-TW RNA (accession number : AY575773).

從 CI 基因到 5'-NTR 之選殖與電泳膠體分析：黑眼豇豆嵌紋病毒台灣系統 RNA 經 M-MLV Reverse Transcriptase 以 Blc-BS2 引子反轉錄為第一股 cDNA，以 0.8 % 水平膠體進行電泳分析，估算其目標產物分子大小約為 4.8 kb。之後再使用上述 BICMV-TW 之第一股 cDNA 為模板，分別使用 Blc-A19 與 Blc-B19、Blc-A20 與 Blc-B20、Blc-A21 與 Blc-B21、Blc-A22 與 Blc-B22 及 Blc-B23 與 Smart 2A 共五組引子，分別進行 PCR 增幅反應，並將產物進行 1.2 % 水平膠體電泳分析，其產物分別約為 0.75、0.5、0.75、0.6 與 0.5 kb。

黑眼豇豆病毒台灣系統基因核糖核酸序列分析：BICMV-TW (accession number : AY575773) 之 N1b 基因共有 1548 個核糖核酸，轉譯出 516 個胺基酸；N1a 基因共有 1299 個核糖核酸，轉譯出 433 個胺基酸；6K2 基因共有 159 個核糖核酸，轉譯出 53 個胺基酸；CI 基因共有 1902 個核糖核酸，轉譯出 634 個胺基酸；6K1 基因共有 156 個核糖核酸，轉譯出 52 個胺基酸；P3 基因譯讀出 1041 個核糖核酸，轉譯出 347 個胺基酸；HC-Pro 基因有 1371 個核糖核酸，轉譯出 457 個胺基酸；P1 基因譯讀出 2829 個核糖核酸，轉譯出 423 個

胺基酸，與本實驗室資料⁽²⁾合併，BICMV-TW 核酸序列共定序出 9992 個核苷酸序列，包含 3235 個 A (32.4%)、1799 個 C (18.0%)、2391 個 G (23.9%)、2567 個 T (25.7%)，轉譯出 3202 個胺基酸，其核苷酸與胺基酸序列如圖一所示。

黑眼豇豆嵌紋病毒台灣系統基因序列與國外已發表會感染豆科植物 *Potyvirus* 屬病毒之比較：以黑眼豇豆嵌紋病毒台灣系統 (BICMV-TW) 與國外發表之 BCMV-Y、BCMV-R、PStV、SMV、CAbMV、CIYVV、BYMV 與 LMV 比較各基因核苷酸相同度和蛋白質序列相似度，表二結果顯示 BICMV-TW 和國外 BCMV-Y、BCMV-R 及 PStV 這四個病毒之間各基因核苷酸與胺基酸序列相同度除 P1 基因外皆高於 80%；進一步分析 BICMV-TW 鞘蛋白基因，與 BCMV-Y、-R 和 PStV 具有相當高的核苷酸序列相同度(96%、95% 和 88%)，及胺基酸序列相似度(99%、98% 和 90%)，但是 BICMV-TW 之 P1 基因的核苷酸與蛋白質序列只與 BCMV-R 具有較高的相同、相似度(91% 和 94%)，與 BCMV-Y 和 PStV 分別只有(66% 和 71%) 和(63% 和 71%)。BICMV-TW 與其它 *Potyvirus* 屬中會感染豆科之病毒 (SMV、CAbMV、CIYVV、BYMV 與 LMV) 比較核苷酸與胺基酸序列相同度，其結果顯示各基因區核苷酸序列相同度幾乎都低於 80%，平均介於 45-55% 之間，但每種不同的病毒差異均有所不同，其中 P1 基因更是只有不到 40% 的相同、相似度。

討 論

為確定所萃取出之病毒 RNA 為完整的 RNA，故將萃取得之 RNA 進行水平膠體電泳分析，經過與 0.24-9.5

kb 之 RNA marker 比對之後，得知其分子量大小約為 10 kb，是一般 potyviruses RNA 的長度，而出核苷酸序列共譯讀出 9992 個核苷酸，包含 3235 個 A (32.4%)、1799 個 C (18.0%)、2391 個 G (23.9%)、2567 個 T (25.7%)，轉譯出 3202 個胺基酸，和其它 potyviruses 相似。

進一步以所得到的序列資料與國外發表之 BCMV-Y (英國)，BCMV-R (英國)，PStV (美國)，SMV (美國)，CAbMV (荷蘭)，CIYVV (日本)，BYMV (日本)，LMV (法國) 等八種會感染豆科之 *Potyvirus* 屬病毒在各基因之核苷酸與胺基酸序列做比較，顯示 BICMV-TW 與 BCMV-Y、BCMV-R 和 PStV 的核苷酸、胺基酸序列相同、相似度均高於 80% 以上，而與 BCMV-Y 和 BCMV-R 比較更高達 90% 以上，顯示 BICMV-TW 與 BCMV-Y、BCMV-R 和 PStV 為同一病毒之不同系統，此結果與 Mckern 等人⁽¹¹⁾ 以分析鞘蛋白基因構型的研究方式，探討幾種豆科病毒之親緣關係，結果認定 PStV、AzMV、BICMV 及 BCMV 為同一病毒之不同系統。而且依據 ICTV^{7th} (2000) 報告 PStV、AzMV、BICMV 為 *Bean common mosaic virus* 之同種病毒異名。此外 BICMV-TW 之 P1 和 BCMV-Y 與 PStV 的 P1 相較下短少了 20 個胺基酸，這是否為造成病毒之寄主範圍有所不同之因素⁽²⁰⁾，有待更進一步的研究。

病毒的基因在選汰壓力 (selection pressure) 下，通常會保留一些共同的胺基酸區域，因此藉由核苷酸序列的比較有助於瞭解同一種病毒在不同地區間演化的親緣關係，一般而言 *Potyvirus* 屬的病毒其 P1、P3 與 CP 的 N 端是變異性最高的區域⁽⁵⁾，此次分析國內 BICMV-TW 和國外的 BCMV-Y、BCMV-R 與 PStV 發現變異性較高的基因區域為 P1，其他各基因的變異相差並不大；在這四種病毒

表二、黑眼豇豆嵌紋病毒台灣系統(BICMV-TW)與其他八種會感染豆科 potyviruses 之基因核苷酸相同度(%)和氨基酸相似度(%)比較

Table 2. Nucleotide sequence identity (%) and aminoacid sequence similarity (%) of genes between Blackeye cowpea mosaic virus Taiwan strain (BICMV-TW) and other legume-infecting potyviruses

Viruses ¹	P1 ²	HC-Pro	P3	6K1	CI	6K2	VPg	NIa	NIb	CP
BCMV-Y	66/71 ³	90/97	90/95	87/98	89/95	86/92	93/96	93/99	94/98	96/99
BCMV-R	91/94	95/97	92/96	88/98	91/97	91/92	92/95	96/99	93/98	95/98
PStV	63/71	86/92	80/91	81/88	81/89	79/83	84/92	86/96	86/94	88/90
SMV	34/41	68/72	62/76	70/76	70/78	66/64	72/80	73/81	70/77	67/73
CAbMV	29/35	68/72	56/68	65/69	70/75	64/60	71/77	71/74	70/75	65/67
BYMV	20/23	50/44	39/46	50/41	57/54	49/32	52/35	52/46	58/57	57/54
CIYVV	19/24	52/44	40/48	50/41	57/56	45/26	53/35	51/48	60/58	55/52
LMV	29/0	51/45	36/37	50/44	54/51	49/37	50/26	56/51	58/60	57/57

¹ BCMV-Y (*Bean common mosaic virus* Y strain, Acc. No. AJ312438), BCMV-R (*Bean common mosaic virus* R strain, Acc. No. AJ312437); PStV (*Peanut stripe virus*, Acc. No. NC_00177523), SMV (*Soybean mosaic virus*, Acc. No. NC_002634), CAbMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*, Acc. No. AF348210), CIYVV (*Clover yellow vein virus*, Acc. No. NC_00353566), BYMV (*Bean yellow mosaic virus*, Acc. No. NC_003492), LMV (*Lettuce mosaic virus*, Acc. No. NC_003605).

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 identity (%) / amino acid sequence similarity (%).

間，雖然很多位置核苷酸被置換，然而並不影響胺基酸的序列，經由突變發生的選汰是基於完整的複合蛋白質，而非在單一蛋白質的層面，如此，形成各地病毒因地緣而演化的基礎。*Potyvirus* 屬病毒各基因蛋白質的功能通常具有多面性，且互相協同完成病毒在寄主中的活動，未轉譯區核苷酸序列雖未轉譯出蛋白質，但在病毒對宿主的感染過程中也應具有其功能性，Yeh 等人⁽²⁰⁾亦指出 potyviruses 病毒間 3' 端非轉譯區核苷酸序列的比較，在未來可能作為 potyviruses 病毒間的區分依據，然而此一方式並不適用於 potyviruses 的種內不同系統病毒之區分。此次研究應證了不同 potyviruses 其歧異度最高的區域在 P1、P3 與 CP 的 N 端之觀點，因此這三個區域可作為不同 potyviruses 的分類參考區域，且 P1 無論是核苷酸或胺基酸之相似度均小於 50 %；但是同一 potyvirus 之不同系統，各基因均呈現高度的相同性（全長度核苷酸序列的相同度大於 80 %），故歧異度不會在某個基因上有特別高的現象（P1 基因除外）（表二），且 P1 無論是核苷酸或胺基酸之相同、相似度應大於 60 %（表二）。

本結果對發生在本省的黑眼豇豆嵌紋病毒台灣系統各基因間之研究分析所得資料，期能提供作為鑑定與分類依據供做參考，並希望能更進一步應用在對抗黑眼豇豆嵌紋病毒之植物基因轉殖工作以及具感染力轉錄體之構築，以達防治病害、增加農民種植豇豆之效益，在學術上提供本省黑眼豇豆嵌紋病毒核苷酸及胺基酸序列組成以供基礎研究。

謝 辭

本研究承蒙行政院農委會農業試驗所張清安博士提供黑眼豇豆嵌紋病毒免疫球蛋白，謹此致謝。

引用文獻

- 張清安、林俊義、楊佐琦、詹竹明. 1993. 病毒豇豆種子之生產與應用. 蔬菜保護研討會專刊：83-93.
- 陳許玉鈴. 2001. 四種重要瓜類及蔬菜病毒鞘蛋白基因序列選殖譯讀與分析. 國立高雄師範大學生物科學研究所碩士論文.
- 陳許玉玲、王惠亮. 2001. 黑眼豇豆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.
- 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.
- Aleman-Verdaguer, 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.
- 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.
- Chang, C. A. 1992. *Viruses of legume crops in Taiwan*. Council of Agriculture Plant Protection Series No.1. Proceedings of the Symposium on Plant Virus and Virus-like Diseases: 193-212.
- Dijkstra, J., and Khan, J. A. 1992. A proposal for a bean common mosaic subgroup of potyviruses. *Arch. Virol. Suppl.* 5: 389-395.
- 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-translated, legume-infecting potyviruses. *J. Gen. Virol.* 75: 3555-3560.
- 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.
- 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.
- Revers, F., Gall, O. L., Candresse, T., and Maule, A. J. 1999. New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 367-376.
- Riechmann, J. L., Lain, S. and Garcia, J. A. 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.* 73: 1-16.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467.
- Sáenz, 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.
- 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.
17. 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.
 18. Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A. L., and Bernardi, F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res.* 74: 157-175.
 19. Ward, C. W., and Shukla, D. D. 1991. Taxonomy of potyviruses : current problems and some solutions. *Intervirology* 32: 269-296.
 20. 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.^{1,2}, and Fang, C. C.¹ 2004. Molecular sequencing and analysis of the viral genomic regions of *Blackeye cowpea mosaic virus* Taiwan strain. *Plant Pathol. Bull.* 13: 117-126. (¹ Institute of Biological Science, National Kaohsiung Normal University, Kaohsiung, 800, Taiwan, R.O.C. ; ² Corresponding author: E-mail: hlwang@nknuc.nknu.edu.tw; Fax: +886-7-7169030)

Blackeye cowpea mosaic virus (BICMV) is a species of *Potyvirus* genus in the family of *Potyviridae*. It is an important virus infecting asparagus bean and occurring worldwide. It is transmitted by mechanical inoculation, several species of aphids in a non-persistent manner and through seeds. Virions of BICMV-TW were purified from infected leaves of asparagus bean by polyethylene glycol precipitation followed by a Cs₂SO₄ isopycnic centrifugation. Electrophoretic analysis revealed a 10 kb of viral RNA of BICMV-TW. The cDNA fragments of BICMV-TW were obtained by using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Full length of viral genome was sequenced. The genome of BICMV-TW (accession number: AY575773) contained 9992 nucleotides including the 5' and 3' untranslated regions and 3'-terminal poly(A) tails. The genomic RNA of BICMV-TW contained an open reading frame which starts at position of 133 and terminates at position of 9738, encoding a polyprotein of 3202 amino acids. Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of genes with those of reported BCMV-Y, BCMV-R, PStV, SMV, CabMV, CIYVV, BYMV and LMV showed over 80% identities with those of BCMV-Y, BCMV-R, PStV and BICMV-TW, excluding the P1 gene. The P1, P3 and the N-terminal of CP gene are the most variable regions of potyviruses genomes. DAG motif was found in the N-terminal of CP gene of BCMV-Y, BCMV-R, PStV and BICMV-TW involving in the aphid transmission. The results also showed that the Nib gene of BCMV-Y \ BCMV-R \ PStV and BICMV-TW contained the active site of the core replicase, GDD motif. The NIa protein could cleavage itself at the position between Glu-200 and Ser-201 to produce a secondary 25 kDa proteinase. The HC-Pro gene of BCMV-Y \ BCMV-R \ PStV and BICMV-TW conserved the KITC and PTK motifs. The multiple alignments of nucleotide and amino acid sequences among BCMV-Y \ BCMV-R \ PStV and BICMV-TW displayed high identities. The result revealed that PStV and BICMV-TW are the different strains of BCMV.

Key words : *Blackeye cowpea mosaic virus*, *Potyvirus* genus, nucleotide sequences