

喜姆比蘭嵌紋病毒台灣系統基因序列譯讀與分析

王惠亮^{1,2} 林偉志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：中華民國 93 年 2 月 25 日

摘 要

王惠亮、林偉志. 2004. 喜姆比蘭嵌紋病毒台灣系統基因序列譯讀與分析. 植病會刊 13: 61-68.

喜姆比蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*, CymMV)，是感染蘭科植物最重要的病毒，在分類上屬於馬鈴薯 X 屬 (genus *Potexvirus*)，為一種長絲狀的病毒，其顆粒大小約為 13 X 490 nm。由蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis*) 獲得之分離株 (CymMV-TW) 經病毒純化，病毒核酸萃取後，以 RT-PCR 選殖，經核苷酸序列譯讀後得到 CymMV-TW 全長度核苷酸序列 6227 個核苷酸 (accession number: AY571289)，其中 RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) 基因 4254 個核苷酸，可轉譯成 1417 個胺基酸，分子量為 159,956 Da、TGB1 (triple-gene-block 1) 基因 690 個核苷酸，可轉譯成 229 個胺基酸，分子量為 25,863 Da、TGB2 (triple-gene-block 2) 基因 339 個核苷酸，可轉譯成 112 個胺基酸，分子量為 12,474 Da、TGB3 (triple-gene-block 3) 基因 276 個核苷酸，可轉譯成 91 個胺基酸，分子量為 9,682 Da、CP (coat protein) 基因 672 個核苷酸，可轉譯成 223 個胺基酸，分子量為 23,808 Da、5' 端非轉譯區 73 個核苷酸和 3' 端非轉譯區 74 個核苷酸。CymMV-TW (台灣系統) 與 CymMV-K2 (韓國系統) 及 CymMV-S1 (新加坡系統) 作全長度核苷酸序列及五個基因核苷酸、胺基酸序列比對，結果顯示三種系統間各基因的比較結果，除了 TGB1 為 88% 相同度，其他基因都達到 90% 以上相同度，顯示三者為同種病毒之不同系統。但是泰國與法國系統的 CP 基因核苷酸序列，和上述三個系統及馬來西亞系統之比較只有 49~53% 相同度。

關鍵詞：喜姆比蘭嵌紋病毒、開放轉譯架構、核苷酸序列

緒 言

蘭花屬於蘭科植物 (*Orchidaceae*) 是國內重要的觀賞花卉之一。其種類繁多，估計有 800-900 屬 25000 種以上，是植物界中僅次豆科及菊科的大家族。台灣的氣候很適合熱帶型及溫帶型蘭花的成長，因此台灣蘭屬植物之人工栽培，早在清代即有記載。台灣蘭花的一般栽培方式都是在取得蘭花優良品系之種子或分生芽後，先以組織培養方式育成小苗，再藉著分株、切割等方法進行大量的繁殖，然後再將瓶苗移至溫室中作大規模的栽培⁽²⁾。全世界發現之蘭花病毒記載至少有 25 種，國內已發現的有喜姆比蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*, CymMV)、齒舌蘭輪斑病毒 (*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 以及一種未定名的槍彈形病毒 (*Rhabdovirus*) 等 4 種，在這 4 種之中，為害最普遍的屬 CymMV 和 ORSV 兩種，且 CymMV 比 ORSV 發生之病害更為嚴重^(2, 10, 14, 16)，感染 CymMV 對蘭花植株的影響相當的大^(2, 3, 7, 8, 9, 11, 15)。自 1960 年起，喜姆

比蘭嵌紋病毒更被公認是影響蘭花植株生長最嚴重的病毒，因為受感染的蘭花都會出現壞疽斑，導致花朵栽培品質降低⁽²¹⁾。CymMV 的寄主侷限於蘭科植物，感染後病毒會分佈全株，但種子並不帶病毒⁽²⁰⁾。國外發表報告之喜姆比蘭嵌紋病毒 (新加坡系統, CymMV-S1；韓國系統, CymMV-K2)^(13, 19) 基因和其他馬鈴薯 X 屬病毒相似，整個基因組中存在五個開放轉譯架構 (open reading frames；ORFs)，分別為 RdRp (RNA-dependent RNA polymerase)、TGB1、TGB2、TGB3 (triple-gene-block) 以及 CP (coat protein) 基因，加上 5' 端非轉譯區 (5' non-translated region, 5' NTR) 和 3' 端非轉譯區 (3' non-translated region, 3' NTR)，其全長核苷酸序列目前已知為 6227 nt，屬正股核糖核酸 (RNA)。CymMV 5' NTR 之長度是所有馬鈴薯 X 屬病毒中最短的。

CP 基因及 3' NTR 之核苷酸序列在病毒分類上具有重要參考意義^(5, 6, 12, 18)，因此比較 CymMV 不同系統之 RdRp、TGB1、TGB2、TGB3 和 CP 基因之核苷酸和胺基

酸序列及 3' NTR 之核苷酸序列，可作為判斷遺傳上歧異度之參考。本實驗的目的在於萃取喜姆比蘭嵌紋病毒台灣系統 (CymMV-TW) 之病毒 RNA，設計專一性的引子，經由 RT-PCR 增幅後，譯讀全長度核苷酸序列，分析病毒基因，並與已報告之 CymMV-K2 (韓國) 及 CymMV-S1 (新加坡) 兩個系統作全長度核苷酸和胺基酸序列比對與分析不同系統間在演化上的親緣關係。為了發展有效對抗 CymMV 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有其必要性。

材料與方法

病毒來源與病毒核酸之萃取

病毒來源：本實驗中所使用之喜姆比蘭嵌紋病毒 (*Cymbidium mosaic virus*, CymMV) 係由台糖研究所位國慶先生提供感染喜姆比蘭嵌紋病毒之蝴蝶蘭病葉，於本實驗室接種於健康之紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 幼苗葉片上，經過三次單斑接種分離後，將病毒回接至蝴蝶蘭上，再從確定感染喜姆比蘭嵌紋病毒之蝴蝶蘭病葉上將病毒純化，作為本病毒核酸萃取之材料⁽¹⁾。

病毒核酸之萃取：取純化之 CymMV 病毒 0.3 ml (0.775 mg/ml) 加入 0.3 ml 之解離緩衝液 (digestion buffer) 振盪使其均勻後，加入 1.5 μ l 之 proteinase K (10 μ g/ml) 並置於 37 °C 水浴槽中，水浴 30 分鐘後加入同體積之 phenol/ chloroform /isoamyl alcohol (25 : 24 : 1, pH 5.2) 之混合液，並劇烈震盪使其乳化後，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 μ g/ μ l，最後置於 -70 °C 下保存之⁽⁴⁾。

病毒核酸之電泳膠體分析：為確定所萃取出之病毒 RNA 之完整性，且估算其分子量大小，乃將萃取所得之病毒 RNA 進行水平膠體電泳以分析之。取 4 μ l 乙二醛承載緩衝液 (glyoxal loading buffer) 和 2 μ l 萃取的病毒 RNA (1 μ g/ μ l) 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, BRL) 比對，估算 CymMV-TW 病毒 RNA 分子量大小⁽⁴⁾。

病毒基因核苷酸序列之選殖

由 3' NTR 序列開始到至 5' NTR 序列，其中包括 CymMV-TW 整個基因組中 RdRp、TGB1、TGB2、TGB3、CP 等共五個開放轉譯架構。CymMV-TW 基因序列選殖所用 RT-PCR 引子之設計 (表一)，是以 CymMV-S1 (accession number : NC_001812)⁽¹⁹⁾ 之病毒核苷酸序列作為參考序列，再視核苷酸序列之特性約 700-900 bp 大小之間設計出一組引子，各組引子間所涵蓋之基因序列有重複序列 (約 60-80 mers) 以便用於日後定序、比對及組合序列工作。反轉錄聚合甘連鎖反應 (RT-PCR)，從 3' NTR 序列開始到至 5' NTR 序列，使用所設計之引子，利用 EZ rTth RNA PCR Kit (PE Applied biosystems, USA) 和 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, USA)，將萃取的 CymMV-TW 之病毒 RNA 定量後，取 1 μ l (1 μ g) 進行 RT-PCR 反應，增幅條件依使用說明指示進行，增幅作用於自動溫度循環控制器 GeneAmp PCR system 2400 (Applied Biosystems, USA) 及 RoboCycle GRADIENT 96 (STRATAGENE, USA) 中進行。

病毒 3' NTR 核苷酸序列之選殖

以 Poly 2A 引子 (表一)，利用 MMLV Reverse Transcriptase Kit (Tested User Friendly™) 合成第一股 cDNA 包含 3' NTR 及 Poly (A) 序列，之後再進行 PCR 增幅出特定大小之 cDNA 片段。第一股 cDNA 之增幅條件依使用說明指示進行。將已增幅的第一股 cDNA 作為模板，Poly 2A 和 CymMV-3N 引子再利用 AmpliTaq DNA polymerase Kit (Applied Biosystems, USA) 進行 PCR 增幅反應。

病毒 5' NTR 核苷酸序列之選殖

以 3' 端引子 CyMV-5N (對應 CymMV-S1 全長度核苷酸之 199 至 220 位置，表一)，利用 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA)，合成第一股 cDNA 包含 5' NTR 序列。第一股 cDNA 之增幅條件依使用說明指示進行。再以包含 5' NTR 之第一股 cDNA 作模板，5' 端引子 Smart 2A (對應 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 提供之 5' 端引子位置，表一) 和 3' 端引子 CyMV-5N 再利用 AmpliTaq DNA polymerase Kit (Applied Biosystems, USA) 進行 PCR 增幅反應。

RT-PCR 和 PCR 產物之電泳膠體分析

將上述之產物經由 1.5% 洋菜水平膠體及 0.5X TAE 緩衝系統進行電泳分析，經 ethidium bromide 染色後與 DNA markers (0.05-2 kb, Novagen, Germany; 0.1-1.5 kb, Promega, USA) 比對，並估算其產物分子量大小。

病毒 RNA 核苷酸序列之譯讀

表一、喜姆比蘭嵌紋病毒台灣系統 (CymMV-TW) 之 PCR 與 RT-PCR 基因序列合成引子序列表

Table 1. Synthetic primers used in PCR and RT-PCR reactions for amplifying viral genes of CymMV-TW

Primers	Sense/antisense (+/-)	Corresponding position ¹	Sequence	Target genes
CymMV-F1	+	5465-5488	5' A5' TAATTTGAAATAATCATGGGAGA 3'	CP
CymMV-R1	-	6204-6227	5' ATTTATCTGGCTAAACTTATTATG 3'	CP
CymMV-F2	+	4770-4789	5' TGATTACGCTGATCCTTTTG 3'	TGB1 TGB2 TGB3 CP
CymMV-R2	-	5627-5646	5' CAAGGTTGTTAACCCACAAT 3'	TGB1 TGB2 TGB3 CP
CymMV-F3a	+	3870-3889	5' CCCTGAGAAGAAGAGCTTCA 3'	RdRP TGB1
CymMV-R3	-	4839-4858	5' CTGGAACCTGTTGAGAGACA 3'	RdRP TGB1
CymMV-F3b	+	4183-4202	5' CTGCATCAACAAGATGTGCT 3'	RdRP TGB1
CymMV-R3	-	4839-4858	5' CTGGAACCTGTTGAGAGACA 3'	RdRP TGB1
CymMV-F4	+	3240-3259	5' CGAAGTGCAGAACACATACC 3'	RdRP
CymMV-R4	-	3938-3957	5' CCAGTCTCCAGGTTTTTGCT 3'	RdRP
CymMV-F5	+	2560-2579	5' ATTCTGGTACCCTCTAGAAT 3'	RdRP
CymMV-R5	-	3316-3335	5' AAGGCTATTTTATTGGCTGG 3'	RdRP
CymMV-F6	+	1909-1928	5' ATGCTCAGTTCTCGAGCTTC 3'	RdRP
CymMV-R6	-	2612-2631	5' ACCGGCATAAGTCATGCAAC 3'	RdRP
CymMV-F7	+	1291-1310	5' CCAGTAGAGACCATCCATAC 3'	RdRP
CymMV-R7	-	1981-2000	5' GCTTTCCAGGGCATGTTTCAT 3'	RdRP
CymMV-F8	+	614-633	5' TCCATAGGCACCCATCTCTT 3'	RdRP
CymMV-R8	-	1343-1362	5' TAGGTCTCTGCACATGCGAA 3'	RdRP
CymMV-F9	+	1-20	5' GAAAACCAAACCTCACGTCT 3'	RdRP
CymMV-R9	-	671-690	5' GCCGGGTATATATTCAAAGC 3'	RdRP
CymMV-5N ²	-	199-220	5' AGTCGGCCTCTTCCTCGGTCAA 3'	5'NTR
Smart 2A ³	+		5' CAGTGGTATCAACGCAGAGT 3'	5'NTR
Poly 2A ²	-		5'TGGTCATGTAGACAGCAGAC TTTTTTTTTTTTTTT 3'	3'NTR
CymMV-3N ²	+	5474-5497	5' ATAATTTGAAATAATCATGGGAGA 3'	3'NTR

¹. Corresponding positions referred to that of CymMV-S1 (Acc. No. NC_001812)⁽¹⁸⁾.

². Primers CymMV-5N, CymMV-3N and Poly 2A were used for first-strand cDNA synthesis.

³. Smart 2A was the part of SMART II oligo sequence (SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit Clontech, USA).

序列之譯讀是根據 Sanger (1977) 之雙股去氧核糖核酸鏈終止 (dideoxy chain termination) 方法⁽¹⁷⁾，使用 ABI PRISMTM 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苷酸序列之譯讀，再利用 Hitachi software DNASIS for Windows (version 2.1 DNASIS, Hitachi Software Engineering America Ltd. USA) 軟體分析系統的序列功能進一步合成核苷酸序列。

病毒 RNA 核苷酸序列之分析與比對

將 CymMV-TW 整個基因組中所包含 RdRp、TGB1、TGB2、TGB3、CP 等五個開放轉譯架構之基因序列，利用上述軟體分析系統的功能，分別進行 A、T、G、C 含量分析，轉譯成胺基酸序列，並與 CymMV-S1 及 CymMV-K2 之 RdRp、TGB1、TGB2、TGB3 和 CP 等五個開放轉譯架構之基因核苷酸、胺基酸序列及 5' 至 3' NTR 全長核苷酸序列，進行多重序列比對 (multiple sequence)，分析不同系統間核苷酸序列相同度、胺基酸序

列相似度和 5' 和 3' NTR 核苷酸序列的相同度及親緣關係。

結 果

病毒核酸之萃取及電泳膠體分析

喜姆比蘭嵌紋病毒台灣系統 CymMV-TW 之 RNA 分子經萃取後，以 1.5% 洋菜水平膠體電泳分析之結果顯示，電泳僅出現單一分子片段，該片段與 0.24~9.5 kb 之 RNA markers (Sigma, USA) 比對之後，估算其 RNA 分子量大小約為 6.2 kb。

病毒基因核苷酸序列之電泳膠體分析

從 3' 至 5' NTR 序列進行 RT-PCR 反應，共增幅出十段特定大小之片段，並將產物進行 1.5% 洋菜水平膠體電泳分析，經與 0.05-2 kb 或 0.1-1.5 kb DNA makers 比對之後，其產物分別為 0.76、0.88、0.98、0.68、0.72、0.78、

1 GGAAACCAAACTCAGCTCTACTCCGCTATCCGAGCGAAATAGCAGCCCCAGCATAGGCAATATCCGCTCC 73

74 ATGGCCCCGAGTACGTGATACCCCTTGACAGGCTCCGCTGATCCGTCGGTCTTACCTCAATT 133

1 M A R V R D T L D R L R D P S V L T S I 20

↑ **RdRp**

134 AACGAGGAAGCCACCGACATATCCGCCCTGTCTTGCCTCGGCACTCGTAAACTGCCCT 193

21 N E E A H R H I R P V L A S A L V N C P 40

194 TACGCGTTGACCGAGGAAGAGCGGACTGTCTCGAAAACTCGCGGTGACAGTCAATCCC 253

41 Y A L T E E E A D C L E N L G V T V N P 60

254 TTCGCCATCCAAACGCATACATGCTGCAGCTAAACTGTTGAAAAACCGCATGTTGGAA 313

61 F A I Q T H T H A A A K T V E N R M L E 80

314 ATTGTTGGCACCCACCTTCTTAAAGACCCCTCCACCTTCATATTCTTAAAGCGGAGCAAG 373

81 I V G T H L P K E P S T F I F L K R S K 100

374 CTTCGTTACTACGACGCGCCCAACAAACAAAGACATATTTCAAAAACCAACATTTGAG 433

101 L R Y L R R A A N N K D I F Q N Q H I E 120

434 CCTAAAGACTTATTCGCTTACGATGACGAGTCTTGTGAAGTAATGCCAAGATGCTCCACA 493

121 P K D L L R Y D D E S C E V M P E C S T 140

494 AGCACAGCCTACATCAGCGATGCTCTCCATTTCCTTGAGCTACGCTAGCTTGGGAAATA 553

141 S T A Y I S D A L H F L S Y A Q L G K I 160

554 TTCCAGGATTCTCCCAAGCTGAAAAATTCTGCTGGCAACCCCTGGTCTCCCGTGGAGGCC 613

161 F Q D S P K L K I L L A T L V L P V E A 180

614 CTCCATAGGCACCCATCTCTTACCTGCCATCTATCTTGAACCTACCATAAAGAGGCG 673

181 L H R H P S L Y P A I Y T L N Y H K E G 200

674 TTTGAATATATACCGGCAATCAGCGGAGGTGCTACTTCCAGGATGCTCCACTCTG 733

201 F E Y I P G N H A G G A Y F H E Y S T L 220

734 CAGTGGTTGACTCTCGGAACTAATTATCAACGATCCTTTGAAAGTAAAGAGCCCTT 793

221 Q W L T L G K L I I N D P L K V K K P L 240

794 ACTCTTACTGTACAGCTAATAGAAAGTCTAGGGGCCAACCATCTTTTACTTATCACCCGA 853

241 T L T V Q L I E S L G A N H L L L I T R 260

854 GGGGATCTTCGCACACCCAACTGCGGACATTCGCTAAAGATACCCATGTTCTACTACCA 913

261 G D L R T P K L R T F A K D T H V L L P 280

914 CAAATATTCCATCTTAAGGGTATGAATGCGAAACAAACCATTTTCCAAACGTAGAGCTATG 973

281 Q I F H P K G M N A N K P L S K R R A M 300

974 CAGTTGTGGCTCTACGCCAAATCTGTTAAAGAGGTGAGCGAAACGGGATCTTTATGCTAAG 1033

301 Q L W L Y A K S V K E V S E R D L Y A K 320

1034 GTGAGGCAATTGATCCGCACTCTGAGTTAGACCTTTTGAACCTGTGGAGGTGACCCAC 1093

321 V R Q L I P T S E L D L F D P V E V T H 340

1094 TTGGTCAATTACTTACTAATTGTTCAGTACCTTTCTCCGATATCTTCGATGACGACATC 1153

341 L V N Y L L F V S H L S S V S S Y D I 360

1154 TTGTGCTTAATATATTCCAACTTTTACCAATCAAGAAACAAAGATACGGGAATTG 1213

361 L S S N I F Q H F T I P I K N K I R E L 380

1214 GTCCAGCTATTACCGGAGCGGACCAATTTAATCAACTGCTCAAGAGCTCTCGACTGGCAA 1273

381 V Q L F T G A D Q F N Q L L K A L D W Q 400

1274 ACAATTTCGTACTCTATGCCAGTAGAGACCATCCATACAGTCCGCGCAATTTATCAAGTC 1333

401 T F S Y S M P V E T I H T R A A N Y Q V 420

1334 GCTAAACCGCTTCGATGTGACAGACCTACCATGCGATGAATATGATGCTGTAAAGGAT 1393

421 A K T L R M C R D L P C D E Y D R V K D 440

1394 GTCCCTCAGACAGCTCCCTGACGGAGTACGTTGTTTGAAGAAACGACGAACAGATCCC 1453

441 V R Q L P D G V T L F E E N D K Q D P 460

1454 TCAAGCCCTGAAGCCGAGGACTCTGAGGATGACACTGACTCCGTCGACTTTAACCTTCCC 1513

461 S S P E A E D S E D D T D S V D F N L P 480

1514 CCCACTGACTTGGCCCCAACTTTGATCTCTAGACAAGGTAAGGCCATTATCGTT 1573

481 P T H D L P P N F P L D K G F K A I V 500

1574 GACACTGGCAACCCCTCAACTTCTACGCGACCTGCCGTCACTTTTGTGCGCGTATCAAC 1633

501 D T G N P S T S T A P A V T F A A G I N 520

1634 TCCTCAGCTCCACAAATATTTTCATTTGGAAGCTTCAACCTGAGGCTGAGGCCACCC 1693

521 S S A S T N I S F T P E A E A T P 540

1694 CCTCTCCCATGGAAAGTTACCATGGGATCTTTGGATTCCCTACTGGAACAACATGGC 1753

541 P P P M E K L P W D L W I P L L E Q H G 560

1754 TTTAAAGGAAAGAGCAAGCTGTACAAGCCACGGGTGAACATATTCGCCCATTAACGTAA 1813

561 F K G K S K L Y K P T G T E L I C P I T E 580

1814 ATCAAAACAGTTTCCCACTGCCCTTTCCCGATAAAGTCCAGGATGCGTGTGTGCTGCG 1873

581 I K T V P H C P F P D K V Q D G C V L A 600

1874 CTAAATCTATTAAAGCGTTTCGCCCAAAAAATGACTATGCTCAGTTCTCGAGCTTCTGCC 1933

601 L K S I K R F A T K M T M L S S R A S A 620

1934 TACACTTCTGACATTAAGAAATTTGAGGACTGGGAAACTCTACCCGCCATGAACATGGCC 1993

621 Y T S D I K N C R T G K L L P A M N M P 640

1994 TGGAAAGCCTCTCTCGCTATGTCACTCAACATGTTGACAGAGAAATTCCTGGCGTGTG 2053

641 W K A S L A Y V T Q H G D R E I P G V V 660

2054 ATCCATGGTGCCGTGTGTGGCAATCTTATGCTATCCAAAAATGGTTGAGAAGCTGC 2113

661 I H G A G G C G K S Y A I Q K A W L R S C 680

2114 TCTGATCTTGTGACGACTGTGTGTATGCCAACTCTAGAAGTACGTAATGACTGGCTC 2173

681 S D P C A A T V V C P T L E L R N D W L 700

2174 AACAGATCGGAAGCTACGAACAAACGAATATCAAACTTTCGAGAAAGCTTTAATTCAG 2233

701 N K I G S Y E Q T N I K T F E K A L I Q 720

2234 CCAGTCAACAACGTAGTTATCTTTGATGACTACACCAAGCTACCCCTGGGTACATCGAG 2293

721 P V N N V V I F D D Y T K L P P G Y I E 740

2294 ACCATGGTGTACCATCACCAACCTCGACCTGATCATCTAACTGGGGATCTATGCGAG 2353

741 T M V Y H H H N L D L I I L T G D P M Q 760

2354 AGTGCTACCATGAAACTAACAGGGATGCCTATATCTCTTTAATACCTGATGCTCTGCC 2413

761 S A Y H E T N R D A Y I S L I P D A S A 780

2414 ATTTTGTAGTACTGTGAGTTCAACATCAACGCCACCCACCGTAATGTGGTGAACCT 2473

781 I F S E Y C E F N I N A T H R N V A E L 800

2474 GCTTGCCTCTCGCGGTCTATTCCGAACGCCAAGGCAAACTCACTGTTTCTTCCAGCACA 2533

801 A C L L G V Y S E R Q G K L T V S F S T 820

2534 GCGCCACTTCTAAAGGTAAAGTACCCATTCTGGTACCTCCAGAATGAAACAGAGGCT 2593

821 A P L S K G K V P I L V P S R M K Q E A 840

2594 TTTGCTGATGTGGCAACCGTGTGATGACTTATGCGGTTGCCAGGGTCTCACTGCCCT 2653

841 F A D V G N R C M T Y A G C Q G L T A P 860

2654 AAAATCCAAATTTTGATAGACAACCACTGCTTCTGCTCGAACAAACATTTATCACT 2713

861 K I Q I L I D N H T A F C S E Q T L Y T 880

2714 TGTCTATCAGGAGCTGTGGACCAATCCACTTCAATTAACACTGGTCCCACTCGCAGGCT 2773

881 C L S R A V D Q I H F I N T G P N S Q A 900

2774 TTTGAGCTAAATTTGAATCAACGCCATACCTAAAAGCTTTCCTCGATAATTACCGCGAG 2833

901 F W T K L E S T P Y L K A F L D N Y R E 920

2834 GAACAACTGAACGGCTAACATCTACCGCCCCAGAGCTGAAGTCCGTGAGCCAGCGGCC 2893

921 E Q T E R L T S T A P E P E V R E P A A 940

2894 CCAAAACGCATCTCCCTGTGCAAAATACATCTGGCTTACGTATTTCTGCACTTGATCTG 2953

941 P K T H I P V E N T S G K A F L D N L 960

2954 CCGGAAAAGCACTCTCGGAGATTTTAAACAGGCGCATGGCTTTTCCAATGCTATTTCAG 3013

961 P E K H S R E I F N K A H G F S N A I Q 980

3014 GGAGATGGCGTAGTCCCATGTTCCAGCATCAACAGGCAAGGCAAAACCCCTTTTCAAG 3073

981 G D G V A P M F Q H Q Q A K D E T L K 1000

3074 GCTACCATAGACGTAGACTCTCTATAACACATCCCGATGAAATAAAGAGAGATTGTC 3133

1001 A T I D A R L S I T H P D E N K R E F A 1020

3134 ATGAAGAAAGACACTGGGAGCGCTCTTTTGTCAATTACAAAGCTAATGAATCTACCT 3193

1021 M K K D T G D V L F V N Y K A I M N L P 1040

3194 CATGAGCTGTCTCTTTTGAACCTCGTCTCTGGAACCTTCTGCAAAAGTGGAGCGAGAAC 3253

1041 H E P V P F E P R L W N I C K A E V Q N 1060

3254 ACATACCTAGCCAAACCAATTTGCAATCTTATCAATGGTACCTTAAGGCAATCACTGAT 3313

1061 T Y L A K P I A N L I N G T L R Q S P D 1080

3314 TTTCCAGCAATAAAATAGCCTTATCTGAAATCGCAATGGGTAAAGAAATTTGAGAAA 3373

1081 F P A N K I A L F L K S Q W V V K K I E K 1100

3374 ATTGGAGCCATACCGATTAAACCCGACAGACTATTGATCAATTTATGCAAGAGACTGTT 3433

1101 I G A I P V K P G Q T I A S F M Q E T V 1120

3434 ATGCTGTATGGCACCATGGCAGCTACCTCCGTAAGATGCGGCAAGATTAACACCCGCA 3493

1121 M L Y K T M A R Y L R K M R Q R Y Q P A 1140

3494 CATATATTTATCAATTTGTAAGAGCTCCGAGGAGCTTCAATAAATTCATCTTGAACAC 3553

1141 H I F I N C E K T P E D F N K F I L E H 1160

3554 TGGTCACACAAGCAAGTTGCTCACACTAACGATTTTACTGCTTTTGAACAGTCAAGAT 3613

1161 W S H Y K Q V A H T N D F T A F D Q S Q D 1180

3614 GCTGCCATGCTCCAATTTGAAGTCAATCAAGCTAGGTACTTCAATATCCCCGAGGATGTT 3673

1181 A A M L Q F E V I K A R Y F N I P E D V 1200

3674 ATAGAAGGATACATCAAAATTAAGCTACTGCTGAAATCTTCTCCGGACACTTTCCATC 3733

1201 I E G Y I Q I K L T A E I F L G T L S I 1220

3734 ATGCGCTACTGCTGGTGAAGGCGGACCTTCGACGCCAATCTGAATGCTCTATTGCTAC 3793

1221 M R L S G E G P T F D A N T E C S I A Y 1240

3794 AACGCCACAGATACCATATTAATGAAGACGCTCACCAAGTATACCGCGGTGACGACATG 3853

1241 N A T R Y H I N E D V T Q V Y A G D D M 1260

3854 GCTATGGACCATGTGTGCTGAGAGAGAGGCTTCAAGCTTTGAAAAAGAACTGAAA 3913

1261 A M D H V C P E K K S F K A L E K K L K 1280

3914 TTGACCTCAAACCTCTCTATCCAAAGCAAAACCTGGAGACTGGCGGATTTCTGCGGC 3973

1281 L T S K P L Y P K Q K P G D W A D F C G 1300

3974 TGGACTATAACCGCTTATGGCATCATTAAAGATCTTAAGAACTTGTGATGCTGCTACAA 4033

1301 W T I T P Y G I I K N P K K L D A C L Q 1320

4034 TTGCACCCCACTGGGCGATGCCGATAAAGTCCGTAGTATACGCACTCGATGCCAAA 4093

1321 L H T Q L G D A D K V A R S Y A L D A K 1340

4094 TATGCTTATGATCTGGGCGATGCGATTCATGAGGTTCTGAATGCTGATGAAATGACCAG 4153

1341 Y A Y D L G D R I H E V L N A D E M T S 1360

4154 CACTTCAATGTTATAAGACAGTTGCACAACTGCATCAACAGATGTGCTGGTCCCACCC 4213

1361 H F N V I R Q L H K L H Q Q D V L V P P 1380

4214 GAGACTACCGTAGCCACAGCGGTAAGTCTCAACQDGCATTAAGACCTGTGGCTCCGT 4273

1381 E T T V A T A V K S Q P D I N A D E M T S 1400

4274 GCGCTTAGCTTCCAGATTGGACGAGCCGCGCCCACTTTTAAACGGGGTTAATTTCTG 4333

1401 A L S F P D W T D R A Q L L K R G * 1418

↑ **RdRp**

4334 ATGGAGCTAGCGTACTTGTAGACTATTAGAGCATAATAAGTTTCGAGCGCACTAATCTG 4393

1 M E L A Y L V R L L E H N K F E R T N L 20

↑ **TGB1**


```

4394 CCTCTTTCTCACCTCTCGTTGTGCCAGGAATCGCCGCGAGTGGTAAATCCACCATCTG 4453
21 P L S S P L V V H G I A G S G K S T I L 40
4454 ACCACCTTCCACCATCTACCCAGCTTACCCATATTCTCACATAGCCCTACCTTGCTT 4513
41 T T F H H H Y P A Y P I F S H S P T L L 60
4514 GACCTAGCAACCGCATCTTCCAACAGTGCATCACCACCGATTCTGTGCCAGACGGCGCT 4573
61 D P S N R I F Q Q C I T T D S V P D G A 80
4574 ATAGTCGACGAGTATAATTAACAACCTCTAACTACTCCGCTGCTAGCTCTCTTCGGT 4633
81 I V D E Y N Y K P L N Y S R C L A L F G 100
4634 GACCTCTTTCAGCTTCCGATTCTCCAGCCCATTTACTACTCCAGCCGACGACCCG 4693
101 D P L Q L P H S L Q P H Y Y S S R T H R 120
4694 TACGGGCTAACTAACCGCCCTACTCAACAACCTCTTTCACCTTTTCATCACCTCTCTC 4753
121 Y G P K L T A L L N N L F H L F I T S L 140
4754 GCTCTGTGACAGCCTAGAAATACGCTGACCCCTTTGCTGGCGATCCCTCTGGATTACC 4813
141 A P V D S L E Y A D P F A G D P S G F T 160
4814 ATGTGTCGACGAGGAGGTGTACAACCTTTGTCTCTCAGCAGGTTCCCGGCACCTTTGTGCG 4873
161 I A D E E V Y N F V S Q Q V P G T L L P 180
4874 CTCGATACTGTAGGTTTGAATATTCTAGTGTAGCTTTTACTGCGAGTGATCTCCGACGC 4933
181 L D T V G L E Y S S V S F Y C S D L R R 200
4934 TGTGTGCTACTAAGGCCACTCAGCAGCCTTCATCGCTCTCACCCGCGCAAGGGCAACCT 4993
201 C V V L R P L S S L H R S H P R Q G Q P 220
4994 CACCATCTTCGATTCAATGCCAGGTTTAGTTCACCACTGACCACTCCAAGTCACTCT 5053
221 H H L R F Q C Q V * ← TGB1 23
1 TGB3→ M P L V P P P D H S K S L 1
5054 TCGTCTTGCTATTGGTATAACTGTGGTCTCCGCAATTATTGTGCTGAAGTCCACACTT 5113
15 F V L A I G I T V V S A L F V L K S H T 34
5114 TTCCGATTGCGAGGACAAATATTACCGCTTCCCTCCGCGGCCAATAAAGACGGTA 5173
35 F P I A G D N I H R F P S G G Q Y K D G 54
5174 CTAAGCAGATAAACTACTGTCCACCTACTCATGCTAGGTACCCGAAATATCTTGACTACA 5233
1 TGB2→ M L G T R N I L T T 10
55 T K Q I N Y C P P T H A R Y P K Y P D Y 74
5234 AGTGGCTTGCCGCTACCGCGGCCATCGTCACCTCTCTGCCTATATATTTCCTACCATC 5293
11 S G L P L P P S S L S A Y I F P T I 30
75 K W L A A T A A I V I P L C L Y I S Y H 94
5294 CTGGCAATAATATTGCGGTAATTGCGCTTGTGCAATACATATCAACCCCTGAGCCC 5353
31 L A I I F A V F A L V A I H I T T P E P 50
95 P G N N I R R I C P C C N T Y H H P * 112
1 TGB3→
5354 TTCTGTACCATACATAGACGGGGCGTCTATTACTATCACTAACTGCCCCGATCCTGCA 5413
51 F C T I H I D G A S I T I T N C P D P A 70
5414 GCTATATTAATAAGTAGCATAGGCCCTTGGCGAGGTTAAGTTACCAATAATTTTG 5473
71 A I L N K V A I G P W R G L S Y H N N L 90
5474 AAATAATCATGGGAGAGCCACTCCAACCTCCAGCTGCCACTTACTCCACTGCGGACCCCA 5533
91 K * M G E P T P T P A A T Y S T A D P 17
1 TGB2→ CP
5534 CTCTGCAACCAAGTTTGCGCGACCTGGCTGCGCATTAAGTACTCACTGTACCTCTCTCCA 5593
18 T S A P K L A D L A A I K Y S P V T S S 37
5594 TCGCCACCCCGAAGAAATCAAGGCCATAACCAATTGTGGTTAACAACCTTGGCTCC 5653
38 I A T P E E I K A I T Q L W V N L V L G 57
5654 CCGCCGACACAGTACGTACCGCGGCTCGACCTTGCGCGCGCTACGCTGACGTGCGGG 5713
58 P A D T V G T A A I D L A R A Y A D V G 77
5714 CGTCAAGAGTGCTACCTGCTCGGTTTCTGCCCTACGAAACCTGATGTCCGTGCGCGCG 5773
78 A S K S A T L L G F C P T K P D V R R A 97
5774 CTCTTGCCGCGCAGATCTTCTGTGGCCAACGTACCCCCGCGAGTTTTCGCTTACTACG 5833
98 A L A A Q I F V A N V T P R Q F C A Y Y 117
5834 CGAAAGTGGTGTGAATCTGATGCTGGCCACTAACGATCCGCCGCCAAGTGGGCCAAG 5893
118 A K V V W N L M L A T N D P P A N W A K 137
5894 CTGGTTTCCAGGAGTACTCGGTTTGGCGCTTTGACTTCTTCGATGCCGTGAGATTCCA 5953
138 A F Q E D T R F A A F D F D A V S 157
5954 CTGCCGCGTGGAACCTGCTGAATGGCAGCGCCGCCCTACTGACCGTGAAGTGTCTGCGC 6013
158 T A A L E P A E W Q R R P T D R E R A A 177
6014 ACTCGATCGGGAAGTACGGCGCTCTTGCCCGTCAGCGTATCCAAAACGCAACCTCATCA 6073
178 H S I G K Y G A L A R Q R I Q N G N L I 197
6074 CCAACATTGCCGAGGTACCAAGGGCCATCTTGGCTCCACCACTCTCTATGCTCTGC 6133
198 T N I A E V T K G H L G S T N T L Y A L 217
6134 CTGCACCCCTACTGAATAACGCCAACTTAATAAGCGGTGTGGTTTCTAAAGTTTGT 6193
218 P A P P T E *
CP →
6194 TCCACTACTGGCATATATATTAGCCAGATTATT 6227

```

圖一、喜姆比蘭嵌紋病毒台灣系統 (CymMV-TW) (accession number:AY571289) 全長度核苷酸序列

Fig. 1. The full-length cDNA nucleotide and amino acid sequences of CymMV-TW RNA (accession number:AY571289). RdRp、TGB and CP represent RNA-dependent RNA polymerase, triple-gene-block, and coat protein, respectively. Arrows indicate the start and stop positions of each region.

0.72、0.71、0.75 和 0.69 kb。

病毒 5' 和 3' NTR 核苷酸序列之電泳膠體分析

5' 及 3' NTR 序列，利用 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA) 及 MMLV cDNA Amplification Kit 合成第一股 cDNA 當模板，進行 PCR 增幅反應後，將產物進行 1.5% 洋菜水平膠體電泳分析，經與 0.05-2 kb 或 0.1-1.5 kb DNA makers 比對之後，其產物分別為 0.22 和 0.29 kb。

病毒 RNA 核苷酸序列之譯讀分析

喜姆比蘭嵌紋病毒台灣系統 (CymMV-TW) 之譯讀分析，完成 3' 到 5' NTR 之全長度核苷酸序列，共 6227 個核苷酸 (圖一)，其中包含 RdRp、TGB1、TGB2、TGB3 和 CP 基因。5' 和 3' NTR 分別有 73 與 74 個核苷酸；其尾端 poly(A) 之核苷酸序列確定至少有 22 個 A。在五個開放轉譯架構中，RdRp 基因共有 4254 個核苷酸，轉譯成 1417 個胺基酸；TGB1 基因共有 690 個核苷酸，轉譯成 229 個胺基酸；TGB2 基因共有 339 個核苷酸，轉譯成 112 個胺基酸；TGB3 基因共有 276 個核苷酸，轉譯成 91 個胺基酸；CP 基因共有 672 個核苷酸，轉譯成 223 個胺基酸 (表二)，而 TGB1、TGB2、TGB3 三個基因核苷酸序列是呈現重疊狀態 (overlapping)，所以 TGB1、TGB2、TGB3 三個基因、在進行蛋白質合成時，部份核苷酸序列是共用狀態 (圖二)。

病毒基因序列與國外同種病毒之比較

利用套裝軟體 Hitachi software of the DNASIS for windows (version 2.1 DNASIS)，比較 CymMV-TW、-S1 和 -K2 三種系統之全長核苷酸序列，RdRp、TGB1、TGB2、TGB3 和 CP 基因的核苷酸、胺基酸序列及 5' 和 3' NTR 核苷酸序列。結果顯示三者之全長核苷酸序列相同度最高達 97%；RdRp 基因核苷酸相同度最高達 97.9%，胺基酸相似度最高達 98.3%；TGB1 基因核苷酸相同度最高達 88%，胺基酸相似度最高達 93.9%；TGB2 基因核苷酸相同度最高達 97.9%，胺基酸相似度最高達 100%；TGB3 基因核苷酸相同度最高達 99.6%，胺基酸相似度最

表二、喜姆比蘭嵌紋病毒三個系統之基因序列核苷酸與胺基酸數目之比較

Table 2. Lengths in nucleotide (nt) and amino acid (aa) of genomic regions of *Cymbidium mosaic virus* (CymMV)

Fragments	Strains ¹	Genomic regions ²						
		5' NTR	RdRp	TGB1	TGB2	TGB3	CP	3' NTR
nt	TW	73	4254	690	339	276	672	74
	S1	72	4254	690	339	276	672	75
	K2	73	4254	702	339	276	672	77
aa	TW		1417	229	112	91	223	
	S1		1417	229	112	91	223	
	K2		1417	233	112	91	223	

¹ TW: Taiwan strain (Acc. No. AY 571289); K2: Korean strain (Acc. No. AF_016914); S1: Singapore strain (Acc. No. NC_001812).

² NTR: non-translated region; RdRp: RNA-dependent RNA polymerase; TGB: triple-gene-block; CP: coat protein.

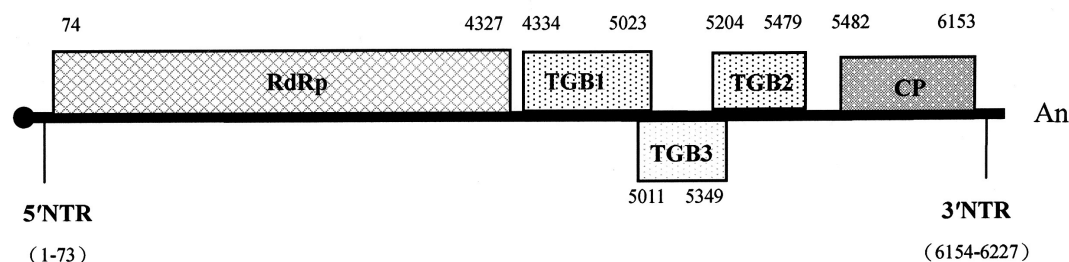
表三、喜姆比蘭嵌紋病毒台灣系統 (CymMV-TW) 基因核苷酸相同度與其他五種不同系統之比較

Table 3. Nucleotide identity (%) of genes between CymMV-TW and other CymMV strains

Strains ¹	Full-length	RdRp	TGB1	TGB2	TGB3	CP
K2	97.0	97.9	88.0	97.9	98.0	98.2
S1	97.0	97.2	87.3	97.1	99.6	97.0
MS	- ²	-	-	-	-	96.0
FR	-	-	-	-	-	51.0
TH	-	-	-	-	-	49.0

¹ K2: Korean strain (Acc. No. AF_016914); S1: Singapore strain (Acc. No. NC_001812); MS: Malaysia strain (Acc. No. AJ_428273); FR: France strain (Acc. No. AJ_311913); TH: Thailand strain (Acc. No. AY_376393)

² No available sequence data in GeneBank.



圖二、喜姆比蘭嵌紋病毒台灣系統之基因體示意圖

Fig. 2. Genome organization of *Cymbidium mosaic virus* Taiwan strain (CymMV-TW). NTR、RdRp、TGB、CP and An represent the non-translated region, RNA-dependent RNA polymerase, triple-gene-block, coat protein, and poly(A), respectively. Numbers indicate the start and stop positions of each region.

高達 100%；CP 基因核苷酸相同度最高達 98.2%，胺基酸相似度最高達 98.2%；5' NTR 核苷酸相同度則最高達 93%；3' NTR 核苷酸相同度則最高達 93% (表三)。

討 論

萃取所得之 RNA 進行水平膠體電泳分析。結果經過與 0.24~9.5 kb 之 RNA markers 比對之後，得知其分子量大小約為 6.2 kb，其大小和其他 potexviruses 之 RNA 相近。

喜姆比蘭嵌紋病毒台灣系統之全長度核苷酸序列如圖三所示，從 3' NTR 開始到 5' NTR 包含 RdRp、TGB1、TGB2、TGB3 和 CP 五個基因，其核苷酸序列長度和基因

組之轉譯架構模式，和其它 potexviruses 相似，在 RdRp 基因與 TGB1 基因間，TGB3 基因與 CP 基因間，共有兩段作用子間隙 (intercistron) 是屬於非轉譯區核苷酸序列。而 TGB1、TGB2、TGB3 三個基因核苷酸序列是呈現重疊狀態 (overlapping)。整體而言，喜姆比蘭嵌紋病毒台灣系統 (CymMV-TW) 之開放轉譯架構共有五個，有別於馬鈴薯 Y 屬 (genus *Potyvirus*) 病毒只存單一個開放轉譯架構，且每一段開放轉譯架構的特性為，起始碼均為 ATG，轉錄出的第一個胺基酸必定為甲硫胺酸 (Met)，到最後末端停止密碼子 (stop codon) 為止。

馬鈴薯 X 屬的病毒中，喜姆比蘭嵌紋病毒 (CymMV) 具有最短的 5' NTR 核苷酸序列。根據已發表的資料顯示，喜姆比蘭嵌紋病毒韓國系統 (CymMV-K2)⁽¹³⁾，其完整

基因組全長共有 6227 個核苷酸序列，5' NTR 有 73 個核苷酸，是以 GGAAAA 作為序列起始，而喜姆比蘭嵌紋病毒台灣系統 (CymMV-TW) 也是以 GGAAAA 作為序列起始，有別於其他馬鈴薯 X 屬的病毒，如喜姆比蘭嵌紋病毒新加坡系統 (CymMV-S1)⁽¹⁹⁾，是以 GAAAA 作為序列起始，而台灣系統和韓國系統卻均以 GGAAAA 作為序列起始，其中的差異是否與 SMART RACE cDNA 合成技術有無使用有關，則有待進一步證實。喜姆比蘭嵌紋病毒台灣系統之 3' NTR 核苷酸序列，係本實驗室自行設計引子，經由 MMLV cDNA 合成技術完成定序，可確認其尾端至少具有 22 個 Adenine 核苷酸序列。當喜姆比蘭嵌紋病毒台灣系統 (CymMV-TW) 與韓國系統 (CymMV-K2) 作比對時，韓國系統病毒的基因組中共有 171 個核苷酸序列發現有替代現象(substitution)，核苷酸序列發生替代現象(substitution) 的頻率，在 TGB1、TGB2、TGB3 基因相互重疊(overlapping) 的區域較高，而在 RdRp 基因、5' NTR 和 3' NTR 較低。除核苷酸序列有替代現象外，在 RdRp 基因與 TGB1 基因之間，以及 TGB1 基因之中，也發現各刪減(deletion) 一個核苷酸。發生在 TGB1 基因之中的核苷酸刪減導致了架構移動(frameshift)，結果改變了此移動蛋白質 C 端的領域。在韓國系統 (CymMV-K2) 病毒的 TGB2 及 TGB3 基因組中，由於基因之中的核苷酸刪減，導致四處架構移動(frameshift)，致使與台灣系統作比對時產生部份差異，有趣的是架構移動(frameshift) 並未導致原本製造移動蛋白核苷酸序列的改變，只是重建界限版圖⁽¹³⁾。分別比對台灣系統及新加坡系統在 TGB1、TGB2、TGB3 基因的差異，並未發現上述情況。

由比較同種不同系統 CymMV-TW、-S1 和 -K2 之 RdRp，TGB1，TGB2，TGB3，CP 基因、胺基酸序列及 3' NTR 之核苷酸序列，了解三種不同系統之 CymMV 各段基因的差異度，此結果可作為判斷遺傳上歧異度之參考。而 CP 基因及 3' NTR 之核苷酸序列通常是病毒分類上具有參考意義的區域^(5, 6, 12, 18)。根據喜姆比蘭嵌紋病毒台灣系統 (CymMV-TW) 全長基因核苷酸序列之定序與比對，由全長基因核苷酸序列、RdRp、TGB2、TGB3 和 CP 基因的核苷酸和胺基酸序列等比對之結果可知，CymMV-TW 與 -K2、-S1 彼此緣關係極為接近，彼此間之相同度皆大於 90% 以上，三種病毒確定為相同病毒之不同系統(表三)。

因病毒之防治策略已朝分子層次上發展，為了發展有效對抗 CymMV 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有其必要性。而核苷酸序列之譯讀分析，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，希望藉由對基因的了解，能提供蘭花病害防治管理良好之策略，並對基礎研究能產生預期效益目標。

引用文獻

1. 王惠亮、王熾婷、廖麗貞. 2000. 核酸探針雜合反應或反轉錄聚合甘連鎖反應偵測喜姆比蘭嵌紋病毒之比較. 植物保護學會會刊 42: 25-42。
2. 張清安. 1996. 蘭花病毒病之特性及其防治. 農業世界 137: 14-20。
3. 謝式坤鈺、韓又新. 1975. 台灣發生之喜姆比蘭毒素嵌紋病. 中國園藝 21: 292-298。
4. 陳許玉玲、王惠亮. 2001. 黑眼豇豆嵌紋病毒鞘蛋白質基因與 3' 端非轉譯區之序列譯讀與分析. 植病會刊 10: 165-172。
5. 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.
6. Bousalem, M., Douzery, E. J. P., and Fargette, D. 2000. High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of *Yam mosaic virus*: a contribution to understanding potyvirus evolution. J. Gen. Virol. 81: 243-255.
7. Brown, P. 1985. Viruses—A serious problem for orchid growers. Green-Thumb Denver 42: 117-119.
8. Faccioli, G., and Marani, F. 1979. Cymbidium mosaic virus associated with flower necrosis in *Cattleya* orchids. Phytopath. Medit. 18: 21-25.
9. Hsu, H. T., Vongasitorn, D., and Lawson, R. H. 1992. An improved method for serological detection of cymbidium mosaic potyvirus infection in orchids. Phytopathology 82: 491-495.
10. Ishii, M. 1973. Control of powdery mildew of *Cassia occidentalis* in relation to bioassay of cymbidium mosaic virus. Plant Dis. Rep. 57: 475-477.
11. Jensen, D. D. 1951. Mosaic or black streak disease of cymbidium orchids. Phytopathology 41: 401-414.
12. Kekarainen, T., Merits, A., Oruetebarria, I., Rajamaki, M. L., and Valkonen, J. P. T. 1999. Comparison of the complete sequences of five different isolates of *Potato virus A* (PVA), genus Potyvirus. Arch. Virol. 144: 2355-2366.
13. Kim, J. D., Koo, Y. B., and Chang, M. U. 1998. Genome characterization of a Korean isolate of cymbidium mosaic virus. Mol. Cells 8: 181-188.
14. Kom, N. J., Zettler, F. W., and Edwardson, J. R. 1988.

- Immunocytochemical identification of cymbidium mosaic and odontoglossum ringspot viruses in orchid tissue. *Acta. Hort.* 234: 229-306.
15. Lawson, R. H., and Hearon, S. S. 1973. Symptomatology of cattleya mericlones infected with cymbidium mosaic virus. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 42: 1071-1074.
 16. Pearson, M. N., and Cole, J. S. 1986. The effect of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus on the growth of cymbidium orchids. *J. Phytopathol.* 117: 193-197.
 17. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467.
 18. Shukla, D. D., and Ward, C. W. 1989. Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. *Arch. Virol.* 106: 171-200.
 19. Wong, S. M., Mahtani, P. H., Lee, K. C., Yu, H. H., Tan, Y., Neo, K. K., Chan, Y., Wu, M., and Chng, C. G. 1997. Cymbidium mosaic potexvirus RNA: complete nucleotide sequence and phylogenetic analysis. *Arch. Virol.* 142: 383-391.
 20. Yuen, C. K. K. H., Kamemoto, H., and Ishii, M. 1979. Transmission of Cymbidium mosaic virus through seed propagation in *Dendrobium*. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 48: 1245-1248.
 21. Zettler, F. W., Ko, N. J., Wisler, G. C., Elliott, M. S., and Wong, S. M. 1990. Viruses of orchids and their control. *Plant Dis.* 74: 621-626.

ABSTRACT

Wang, H. L.^{1,2}, and Lin, W. C.¹ 2004. Molecular sequencing and analysis of the viral genome of *Cymbidium mosaic virus* Taiwan strain. *Plant Pathol. Bull.* 13: 61-68. (¹Graduate Institute of Biological Science, National Kaohsiung Normal University, Kaohsiung, 800, Taiwan; ²Corresponding author, E-mail: hlwang@nknuc.nknu.edu.tw; Fax: +886-7-7169030)

Cymbidium mosaic virus (CymMV) is a member of genus *Potexvirus* in the family *Potexviridae*. The purpose of this study was to sequence the genomic regions of a domestic CymMV strain (CymMV-TW), and compare its nucleotide and amino acid sequences with those of two reported strains, K2 from Korea and S1 from Singapore, of CymMV. Full-length nucleotide sequences obtained from cDNA clones of CymMV-TW genomic RNA (accession number:AY571289) indicate the number of nucleotide in CymMV-TW genome was 6227 and was highly homologous (97%) to that of two reported strains. No significant differences were observed in the length and sequence of the RNA of the three CymMV strains. All comprise of a 5'-NTR, 5 ORFs, and a 3' NTR. The RNA molecules contain identical nucleotide numbers in the ORFs of their RdRp, TGB2, TGB3 and CP genes, but vary in length in their TGB1 ORF and NTRs which indicated that all three are different strains of the same virus. The comparison of multiple alignments of nucleotide and amino acid sequences among CymMV strains displayed high identities in intraspecies. Phylogenetic analysis revealed that CymMV-TW was more related to CymMV-S1 than to CymMV-K2.

Key words : *Cymbidium mosaic virus*, open reading frame, nucleotide sequences