

台灣山藥上分離的蠶豆萎凋病毒 2 兩個株系之比較鑑定

鄧汀欽^{1,*} 林羿廷² 蔡錦慧² 廖吉彥³ 高瑞隆⁴

摘要

鄧汀欽、林羿廷、蔡錦慧、廖吉彥、高瑞隆。2014。台灣山藥上分離的蠶豆萎凋病毒 2 兩個株系之比較鑑定。台灣農業研究 63(4):282–290。

採集畸形嵌紋的「台農 1 號」山藥病株及黃化嵌紋病徵的日本山藥病株，接種奎藜經單斑分離後分別得到病毒分離株“YA3”與“Yam-7”。陰染法電子顯微鏡觀察，均為球形病毒。兩者都可被蠶豆萎凋病毒 2 (*Broad bean wilt virus 2*; BBWV-2) 抗體檢出。接種後潛伏感染山藥品種(系)，翌年才在山藥新葉出現病徵且可檢測到病原。以豆類病毒屬 (*Fabavirus*) 廣效性引子對 Fab5'R1F/Fab5'R1R 進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)，兩者都增幅得到一 390 bp 的 DNA 產物，此段核苷酸序列 YA3 與 Yam-7 相同度為 94.1%，與中國北柴胡 BBWV-2 分離株相同度為 93.1%。再以 BBWV-2 專一性引子對 BBWVSSP/BBWVKMRM 進行 RT-PCR，YA3 與 Yam-7 各增幅得一 320 bp 的 DNA 產物，此段核苷酸序列 YA3 與 Yam-7 的相同度為 88.1%，與日本的長形山藥 BBWV-2 分離株相同度為 86.3%，但 Yam-7 與此日本分離株相同度為 96.5%。親緣分析圖也顯示 YA3 與 Yam-7 兩株病毒都屬於一種 BBWV-2，而異於其他同屬的病毒種。這是 BBWV-2 在台灣感染山藥的首發報告。

關鍵詞：豆類病毒屬、引子對、反轉錄聚合酶鏈式反應、核苷酸序列、親緣分析。

前言

山藥 (yam) 屬於薯蕷科 (*Dioscoreaceae*) 薯蕷屬 (*Dioscorea*) 多年生蔓性植物，主要採食部位為塊莖 (tubers) 及部份零餘子 (bulbils)，富含澱粉及蛋白質為非洲地區主要糧食作物之一。另含有薯蕷皂素 (diosgenin)，為合成類固醇荷爾蒙 (steroid hormones) 的先驅物，中國自古以來即為上品藥材，今為台灣流行的保健食品。台灣本土產有野生山藥，自早即有零星人工栽培山藥，在 1980 年代大規模集約化栽培後，種植區域達全島南北兩端，國家型農業生物技術計畫中，曾把山藥列為重點發展的項目之一。台灣的山藥主要栽培品種有白肉系之田薯或大薯 (*Dioscorea alata* L.)，皮

下紅肉之大紅與二紅等紅薯 [*Dioscoreaalata* var. *purpurea* (Roxb.) M. Pouch.]，「花蓮 3 號」等長形山藥 (*Dioscorea batatas* Decne)，基隆原生山藥 [*Dioscorea japonica* Thunb. var. *psellidojaponica* (Hay.) Yamamoto]，及恆春原生山藥 (*Dioscorea doryophora* Hance) 等 (Liu *et al.* 1995)。山藥也是政策上作為水田轉作作物之一，2003 年全國總種植面積達 993 ha，至 2011 年仍有 490 ha。

少數山藥種類可開花結籽，但經濟栽培是以無性繁殖為主，主要繁殖器官為其地下塊莖或氣生的零餘子。營養繁殖的結果，母株上所有系統性感染的病害都會繼代傳染到子苗，長期下來造成類似品種退化的現象。台灣早年在馴化培育原生種或積極自國外引種的過程中，

投稿日期：2014 年 8 月 7 日；接受日期：2014 年 9 月 10 日。

* 通訊作者：tcde@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所植物病理組前助理研究員。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所生物技術組前助理研究員。台灣 台中市。

未曾顧及適當的檢疫措施，近年來在栽培區已陸續發現病毒病的發生 (Deng *et al.* 2004)。其中病毒複合感染 (mixed infection)，多種病毒繼代傳染累積於塊莖上，造成新苗病徵嚴重的現象逐漸出現，本文即是根據調查與鑑定的結果所做的報告之一。

材料與方法

病毒分離及寄主範圍接種試驗

2002 年至 2007 年在台灣各山藥產區採集疑似病毒病徵之罹病株進行接種試驗，具病徵之山藥葉片加入 10 倍量 (W/V) 之 0.1 M、pH 7.1 磷酸緩衝液 (phosphate buffer) 研磨淬取後接種至紅藜 (*Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn)、綠藜 (*C. murale* L.)、奎藜 (*C. quinoa* Willd.)、千日紅 (*Gomphrena globosa* L.)、及圓葉菸 (*Nicotiana benthamiana* L.) 等指示植物，以探討可能發生之病毒種類。其中，可在奎藜上形成局部病斑的樣本，則以單斑分離來獲得純系病毒分離株 (isolates)，並進一步接種番杏 [*Tetragonia tetragonioides* (Pall.) Kuntze]、番茄 (*Solanum lycopersicum* L.)、大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.]、Takii 早生種蠶豆 (*Vicia faba* L.)、芝麻 (*Sesamum indicum* L.) 等進行寄主範圍試驗，並回接山藥 (*Dioscorea* spp.) 各品種 (系)。所有病毒分離株分別繼代接種保存於奎藜，作為以下試驗的病毒來源。

電子顯微鏡觀察

從保存病毒分離株的奎藜上取有病斑的葉片，切取汁液以等量 2% 磷鎢酸 (Phosphotungstic acid; PTA) 進行陰染後，以 Hitach 7000 電子顯微鏡進行觀察。

酶聯抗體免疫分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)

所有病毒分離株取部份葉部組織利用購自 DSMZ (Braunschweig, Germany) 的蠶豆萎凋病毒 1 (*Broad bean wilt virus 1*; BBWV-1)、蠶豆萎凋病毒 2 (*Broad bean wilt virus 2*; BBWV-2)、山藥嵌紋病毒 (*Yam mosaic virus*;

YMV) 及 potyviruses 廣效性免疫試劑等，依使用說明進行酶聯抗體免疫分析 (ELISA)，另以自製的胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV) 抗體同時進行間接法 (indirect) ELISA (Clark & Adams 1977)。

反轉錄 – 聚合酶連鎖反應 (Reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR)

供試材料包括各分離株及山藥零餘子、葉、芽及塊莖等。取 100 mg 供試材料，利用全量 RNA 純化試劑組 (Plant Total RNA Extraction Miniprep System; Viogene, CA, USA)，進行 RNA 之萃取純化。再以病毒 RNA 為模版 (template)，利用 Ferrer *et al.* (2007) 所發表豆類病毒屬 (*Fabavirus*) 病毒間廣效性引子對：Fab5'R1F (5'-AAATATTA-AAACAAACAGCTTTCGTT-3') 及 Fab5'R1R (5'-TTCAAAGCTCGTGCCATNTYATTKGC-3', N = A, T, C, or G; Y = T or C; K = T or G) 及反轉錄 – 聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 試劑 (AccuPower RT/PCR Premix; Bioneer, Daejeon, Korea) 進行 RT-PCR。分別取 1 μ L RNA、2 μ L 0.5 μ M 引子 (Fab5'R1F/Fab5'R1R) 及 15 μ L DEPC-DW 加入 AccuPower RT/PCR Premix tube 中混合均勻後，將反應液置於 MultiGene TC-9600 Thermo Cycler (Labnet, Edison, NJ, USA) 中進行增幅反應，反應溫度及時間如下：先於 70°C 反應 5 min，10°C 反應 10 min，42°C 反應 60 min，94°C 反應 2 min，之後再進行 94°C 反應 30 s，反應 55 s，70°C 反應 60 s，共 35 個循環，最後一個循環中 70°C 下聚合 10 min。反應結果的 DNA 產物以電泳進行分析，預估可增幅出 354–356 bp (BBWV-1) 或 386–391 bp (BBWV-2) 的核酸片段。

另利用 Kondo *et al.* 2005 報告感染山藥的 BBWV-2 專一性引子對：BBWV-2SSP (5'-GT-BTCDAGTGCTYTDGAAGG-3', B = C, G, or T; D = A, G, or T; Y = C or T) 及 BBWV-2MRM (5'-TDGWDCCATCVAGICKCATTTT-3', W = A or T; V = A, C, or G; I = Inosine; K = G

or T)，進行上述 RT-PCR，預估可增幅得到一 322 bp 的 DNA 產物。

病毒核酸解序與親緣分析

經上述 RT-PCR 增幅所得之 DNA 片段，以小量膠體 DNA 回收組 (Gel Advanced Extraction Miniprep System; Viogene, CA, USA) 進行 DNA 回收及純化，再以 yT&A 載體及 ECOS101 勝任細胞 (competent cell) (Yeastern Biotech, 台北市, 台灣) 進行選殖，取轉型株質體經電泳分析確認嵌入片段之大小，委由明欣生物科技公司 (台北市, 台灣) 進行核苷酸序列分析。利用 ClustalX2 (<http://www.clustal.org/>) 進行 alignment，與 GenBank 資料庫中同屬的病毒種/株相對應之基因序列比較，再

以 MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (<http://www.megasoftware.net/>) 之 Neighborhood-joining 作成親緣關係樹狀圖。

結果

病毒分離接種鑑定

所有供試樣本以葉片汁液進行接種試驗，其中一個於 2002 年春採自南投縣名間鄉葉片畸形嵌紋的「台農一號」山藥 (*D. alata*) (圖 1A)，另一個於 2007 年秋採自台南縣將軍鄉葉片黃化嵌紋的日本山藥 (*D. batatas*) (圖 1B)，都可在 *C. quinoa* 形成局部病斑，經單斑分離後獲得病毒純系的分離株，分別命名為“YA3”與“Yam-7”，兩者的寄主範圍試驗結果相同，

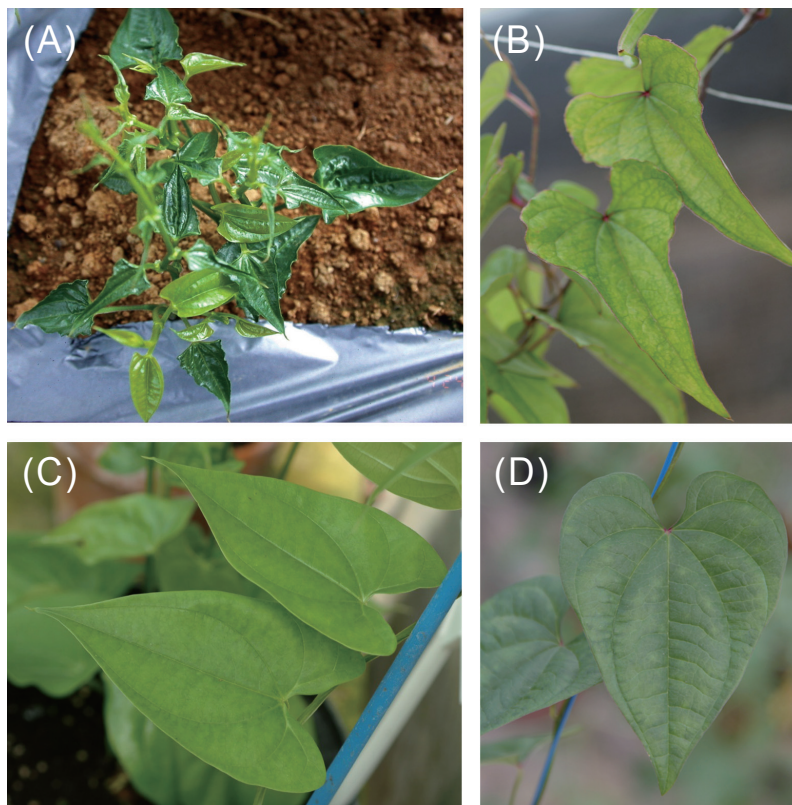


圖 1. 病毒在山藥植株造成的病徵。(A) 葉片畸形嵌紋的「台農一號」山藥；(B) 葉片黃化嵌紋的日本長形山藥；(C) YA3 接種後感染大汕山藥葉片的輕微嵌紋病徵；(D) YA3 接種後感染鐵棍山藥葉片的黃斑病徵。

Fig. 1. Symptoms shown on yam plants caused by virus infection. (A) Mosaic and malformation on leaves of *Dioscorea alata* cv. 'Tainong No. 1.'; (B) Yellowing and mosaic symptoms of leaves of *Dioscorea batatas*; (C) Mild mosaic symptom showed on leaf of *Dioscorea alata* inoculated with YA3; and (D) Chlorotic spots showed on leaf of *Dioscorea opposita* inoculated with YA3.

都僅感染紅藜、綠藜、奎藜及番杏，不感染圓葉菸、番茄、大豆、蠶豆及芝麻。兩者感染山藥各品種(系)都不顯示病徵，待翌年發芽後才出現部份病徵，且經 ELISA 檢測結果確定病毒感染。其中 YA3 感染的山藥有：屬於 *D. alata* 的「台農一號」、「台農二號」、「大汕」、「非洲山藥」、「牛腿」、「二荊」、「紅皮削」及「無柄罐型薯」等；屬於 *D. alata* var. *purpurea* 的「二紅」、「玉血薯」及「名間長紅」等；屬於 *D. japonica* var. *pselldojaponica* Thunb. 的「基隆山藥」；屬於 *D. persimilis* Prain & Burkill 的「人蔘味山藥」；與屬於 *D. opposite* Thunb. 的「鐵棍山藥」。接種後感染「大汕山藥」及「鐵棍山藥」的病徵分別如圖 1C 和圖 1D。

病毒形態與抗體反應

以電子顯微鏡觀察病毒純系分離株，YA3 與 Yam-7 都僅發現直徑約 26 nm 的球形病毒顆粒，未發現絲狀病毒顆粒。兩株病毒與 BBWV-1、BBWV-2、CMV、YMV 及 potyviruses 廣效性免疫試劑的反應如表 1，都與 BBWV-2 有較強的血清反應，與 BBWV-1 有較弱的交互反應。

反轉錄-聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

總共 10 個供試材料，利用廣效性引子對 Fab5'R1F/Fab5'R1R 進行 RT-PCR 的結果如

圖 2。YA3、Yam-7 及 BBWV-2 sesame 分離株都增幅得到一約 390 bp 的 DNA 產物，對應於 *Fabavirus* RNA1 的 5' 端非轉譯區 (5'-non-translated region, 5' NTR) 部份核苷酸序列，或由專一性引子對 BBWVSSP/BBWVK-MRM 增幅得到一 322 bp 的 DNA 片段對應於 RNA2 的大鞘蛋白與小蛋白 (LCP + SCP) 部份核苷酸序列。

病毒核酸解序與親緣分析

由上述 RT-PCR 增幅所得 RNA1 的部份 5' NTR 之核苷酸序列進行比對，結果如表 2，YA3 與 Yam-7 序列相同度為 94.1%；與 GenBank 資料庫中已登錄豆類病毒屬病毒之相對基因進行比對，YA3 與中國北柴胡 (*Bupleurum chinense* DC.) BBWV-2 分離株 (Acc No. FJ485686) 相同度最高為 93.1%；與 BBWV-1 (Acc No. AB084450) 及龍膽嵌紋病毒 (*Gentian mosaic virus*, GeMV, Acc No. AB084452) 相同度僅分別為 62.2% 及 42.0%。此段基因序列進行 neighborhood-joining bootstrap analysis 的結果，繪成親緣關係樹狀圖則顯示於圖 3。

另由增幅所得 RNA2 的大鞘蛋白與小蛋白 (LCP + SCP) 之核苷酸序列進行比對，結果如表 3，YA3 與 Yam-7 序列相同度為 88.1%，YA3 與 BBWV-2 日本的分離株 (Acc

表 1. 山藥病毒分離株與其他寄主的病毒分離株之酶聯抗體免疫分析反應值比較^z。

Table 1. Comparative ELISA values of viruses isolated from yams and those from other hosts^z.

Isolate	Virus species	Original host	ELISA value (A405 nm) reacted with antibody to				
			BBWV-1	BBWV-2	CMV	YMV	POTY
YA3		<i>Dioscorea alata</i>	0.220	1.127	0.074	0.184	0.025
Yam 7		<i>Dioscorea batatas</i>	0.277	1.412	0.063	0.110	0.013
DS09-3	YMV	<i>D. alata</i>	0.037	0.094	0.004	0.420	0.229
CT-1	YMV	<i>D. alata</i>	0.083	0.159	0.089	0.659	0.144
Sesame	BBWV-2	Sesame	0.244	1.050	0.066	0.088	0.025
Cucumber	CMV	Cucumber	0.054	0.146	1.228	0.350	0.003
Lima	CMV	Lima bean	0.289	0.164	1.956	0.088	0.007
Safflower	CMV	Safflower	0.468	0.122	2.667	0.092	0.011
+ CK			0.324	1.196	2.340	1.092	1.179
- CK			0.046	0.079	0.045	0.047	0.022

^z BBWV-1: Broad bean wilt virus 1, BBWV-2: Broad bean wilt virus 2, CMV: Cucumber mosaic virus, YMV: Yam mosaic virus, and POTY: Potyvirus.

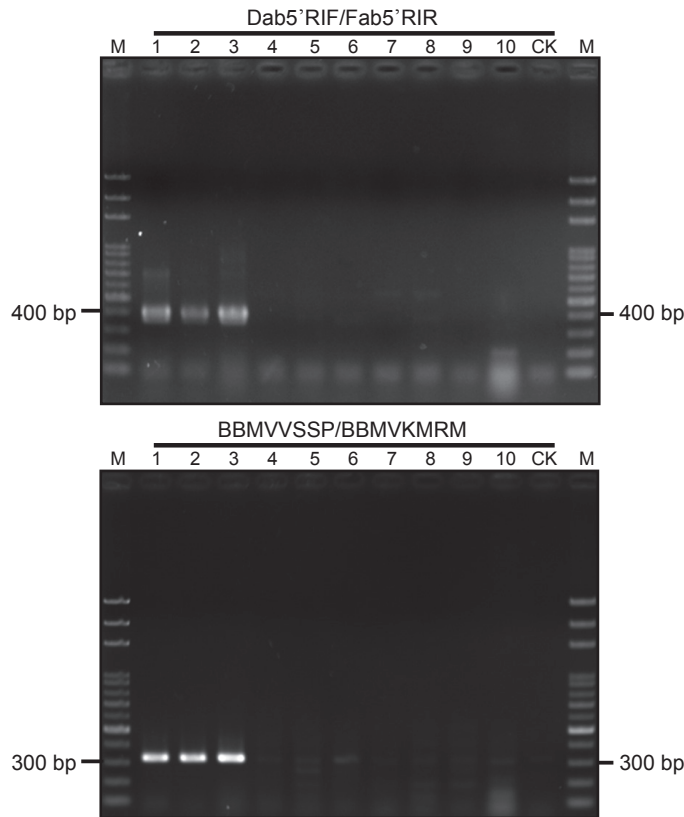


圖 2. 反轉錄-聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 的結果：以 Fab5'R1F/Fab5'R1R 做引子對所得一 390 bp 的 DNA 片段 (上)，及以 BBWVVSSP/BBWVKMRM 做引子對所得一 322 bp 的 DNA 片段 (下)。1：YA3 分離株、2：BBWV-2 sesame 分離株、3：Yam-7 分離株、4：山藥零餘子 B、5：山藥名間長紅 09-1 之葉、6：零餘子 07/11/29-7、7：二紅 07-7-1 之芽、8：二紅 07-7-1 之塊莖、9：名間長紅 05-2 之葉、10：埤頭豇豆之葉及 CK：對照組 (DDW)、M：分子量標示。

Fig. 2. A 390-bp DNA fragment was produced by using Fab5'R1F/Fab5'R1R primers (upper) and a 322-bp DNA fragment by using BBWVVSSP/BBWVKMRM primers (lower) for RT-PCR. 1: YA3 isolate, 2: BBWV-2 sesame isolate, 3: Yam-7 isolate, 4: B bulbil of yam, 5: leaf of yam 09-1, 6: bulbils of 07/11/29-7, 7: shoot of yam 07-7-1, 8: tuber of 07-7-1, 9: leaf of yam 05-2, 10: leaf of cowpea, and CK: control. M: markers for molecular weight.

表 2. 蠶豆萎凋病毒 2 之 YA3 病毒株的 RNA1 部份 5' NTR 核苷酸序列與其他豆類病毒屬病毒進行比對的相同度。

Table 2. Identities of partial polyprotein precursor (5'NTR) nucleotide sequences of RNA1 between YA3 isolate of *Broad bean wilt virus 2* and other *Fabavirus* species.

Virus species or isolates (GenBank Accession No.)	Host	Geographic origin	Identity (%)	Contributor (Literature cited)
<i>Broad bean wilt virus 2</i>				
Yam-7	Yam	Taiwan	94.1	
BC isolate (FJ485686)	<i>Bupleurum chinense</i>	China (Beijing)	93.1	Sui <i>et al.</i> 2009
XJ14-3 (FN985164)	Tomato	China (XinJiang)	92.3	Du & Huang (unpublished)
Sesame	Sesame	Taiwan	86.4	
<i>Patchouli mild mosaic virus</i> (NC_003975)	Patchouli	Philippines	92.0	Onobori <i>et al.</i> (unpublished)
<i>Broad bean wilt virus 1</i>				
AB084450 (ATCC PV132)	Spinach	USA	62.2	Kobayashi <i>et al.</i> 2003
<i>Gentian mosaic virus</i> (GeMV) (AB084452)	Gentain	Japan	42.0	Kobayashi <i>et al.</i> 2005

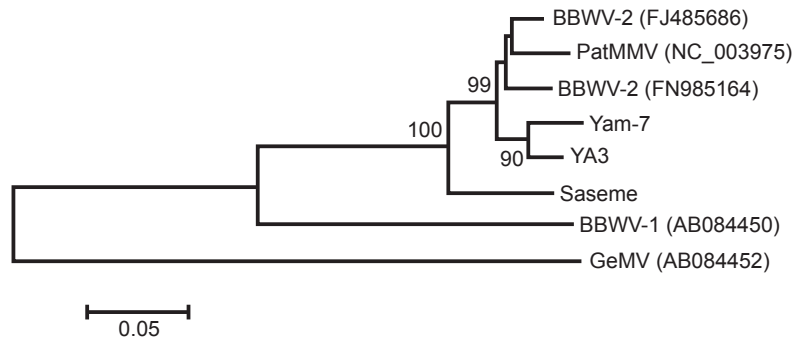


圖 3. 以 RNA1 的 5' 端非轉譯區部分核苷酸序列經親緣關係分析所作樹狀圖。

Fig. 3. Phylogenetic dendrogram of sequence of partial polyprotein precursor (5'NTR) of RNA1. The tree was generated by neighborhood-joining method (MEGA4). The numbers at the nodes indicated the levels of bootstrap support based on a neighborhood-joining bootstrap analysis of 1000 replications. FJ485686: BBWV-2, BC isolate; NC_003975: *Patchouli mild mosaic virus*, Philippines isolate; FN985164: BBWV-2, XinJiang Tomato isolate; AB084450: BBWV-1, ATCC PV132 Spinach isolate; AB084452: Gentian mosaic virus, GeMV. (Bar = 0.05 changes per nucleotide)

表 3. 蠶豆萎凋病毒 2 之 YA3 病毒株的 RNA2 部份大鞘蛋白與小蛋白核苷酸序列與其他豆類病毒屬病毒進行比對的相同度。

Table 3. Identities of partial LCP and SCP nucleotide sequences of RNA2 between YA3 isolate of *Broad bean wilt virus 2* and other *Fabavirus* species.

Virus species or isolates (GenBank Accession No.)	Host	Geographic origin	Identity (%)	Contributor (Literature cited)
<i>Broad bean wilt virus 2</i>				
Yam-7	Yam	Taiwan	88.1	
Nagaimo (AB207244)	Yam	Japan	86.3	Kondo <i>et al.</i> 2005
Fruit sage (EF392660)	Fruit sage	Taiwan	82.9	Wang & Lin (unpublished)
<i>Patchouli mild mosaic virus</i> (NC_003974)	Patchouli	Philippines	83.5	Ikegami <i>et al.</i> (unpublished)
<i>Broad bean wilt virus 1</i>				
AB084451 (ATCC PV132)	Spinach	USA	53.7	Kobayashi <i>et al.</i> 1999
<i>Gentian mosaic virus</i> (GeMV) AB084453	Gentain	Japan	53.4	Kobayashi <i>et al.</i> 2005

No. B207244) 及台灣的水果鼠尾草 (*Salvia dorisiana* Standl.) 分離株 (Acc No. F392660) 核苷酸序列相同度分別為 86.3% 及 82.9%，但 Yam-7 與 BBWV-2 日本分離株 (Acc No. B207244) 及台灣的水果鼠尾草分離株 (Acc No. F392660) 核苷酸序列相同度分別為 96.5% 及 85.4%。此段基因序列進行 neighborhood-joining bootstrap analysis 的結果，繪成親緣關係樹狀圖則顯示於圖 4。兩段親緣分析結果顯示 YA3 與 Yam-7 兩株病毒與屬於 BBWV-2 的其他病毒株分類地位較接近，而異於同屬的 BBWV-1 及 GeMV。

討論

蠶豆萎凋病毒 2 (BBWV-2) 屬於豆類病毒屬 (*Fabavirus*)，豇豆嵌紋病毒亞科 (*Comovirinae*)，植物小 RNA 病毒科 (*Secoviridae*)，小 RNA 病毒目 (*Picornavirales*)。Chen *et al.* (2001) 從洋桔梗上分離出蠶豆萎凋病毒-2，這是台灣的首發報告。後有從台灣的水果鼠尾草分離的 BBWV-2 登錄於 GenBank (Acc. No. EF392660)，但迄今未正式發表報告。早期所發現的蠶豆萎凋病毒 (*Broad bean wilt virus*) 是一種病毒，內分 BBWV-1 與 BBWV-2 兩個血清型 (serotypes) (Uyemoto & Provvidenti 1974)。1987 年國際病毒分類委員會 (Inter-

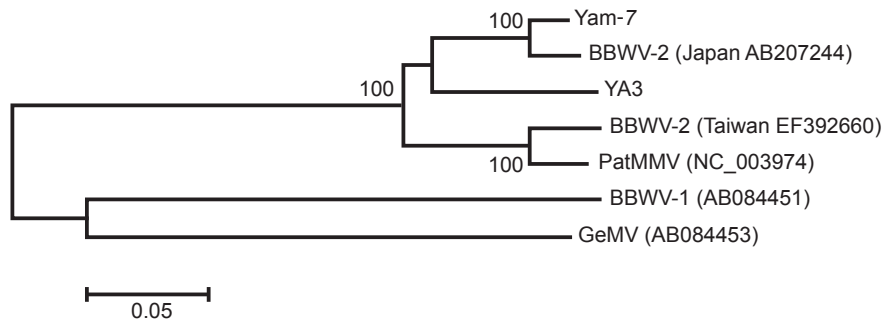


圖 4. 以 RNA2 的大鞘蛋白 (LCP) 與小鞘蛋白 (SCP) 部分核苷酸序列經親緣關係分析所作樹狀圖。

Fig. 4. Phylogenetic dendrogram of partial sequence of LCP and SCP of RNA 2. The tree was generated by neighborhood-joining method (MEGA4). The numbers at the nodes indicated the levels of bootstrap support based on a neighborhood-joining bootstrap analysis of 1000 replications. AB207244: BBWV-2, Japan Nagaimo isolate; EF392660: BBWV-2, Taiwan fruit sage isolate; NC_003974: *Patchouli mild mosaic virus*, Philippines isolate; AB084451: BBWV-1, ATCC PV132 spinach isolate; AB084453: *Gentian mosaic virus*, GeMV. (Bar = 0.05 changes per nucleotide)

national Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) 將 *Broad bean wilt virus 1* (BBWV-1) 與 *Broad bean wilt virus 2* (BBWV-2) 歸為 *Fabavirus* group 下的兩個種 (species)。由於廣藿香微嵌紋病毒 (*Patchouli mild mosaic virus*; PatMMV) 的 RNA 解序完成 (Ikegami *et al.* 1998, 2001)，從 1998 年加入為 *Fabavirus* 屬下一個新種，但 2005 年後被認為係 BBWV-2 的一株 (Fauquet *et al.* 2005)。而龍膽嵌紋病毒 (*Gentian mosaic virus*) 自 2005 年後即被認定是 *Fabavirus* 屬下的一種 (Kobayashi *et al.* 2005)。依照 ICTV 最新的分類標準，本研究中有關核酸序列比對或親緣分析的結果顯示 YA3 與 Yam-7 親緣相近，且都與屬於 BBWV-2 的其他病毒株 (包括 PatMMV) 分類地位較接近，尤其 Yam-7 與日本的山藥分離株 (Acc No.AB207244) 最接近，而大異於同屬的 BBWV-1 及 GeMV。綜合核酸系列比對、親緣分析、血清學反應、病毒型態及寄主反應等條件顯示，YA3 與 Yam-7 分類都屬 BBWV-2。

國際間山藥種原流通時，為維持種原的健康，聯合國 FAO/IBPGR 在 1989 年所提及的 10 種檢疫病蟲害中有 6 個是病毒，分別是：*Chinese yam necrotic mosaic virus* (CYNMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Dioscorea alata virus* (= Yam virus I), *Dioscorea bacilliform virus*, *Dioscorea latent virus*, *Yam mosaic*

virus (YMV) (Brunt *et al.* 1989)。其中，雖無 BBWV-2 列名，但 1985 年在日本即有 BBWV 感染山藥的報告 Ishikawa *et al.* (1985)，本研究繼 Kondo *et al.* (2005) 之後也發現 BBWV-2 感染山藥的現象，而且發現台灣現有山藥品種多數可受其感染，因此在山藥的健康種苗培育過程不應忽視 BBWV-2 的存在。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會科技計畫 100 農科-9.3.1-農-C2 計畫經費支援，謹致謝忱。

引用文獻

- Brunt, A. A., G. V. H. Jackson, and E. A. Frison. 1989. FAO/IBPGR Technical Guidelines for the Safe Movement of Yam Germplasm. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Board for Plant Genetic Resources. Rome. 20 pp.
- Chen, C. C., W. F. Ko, S. L. Taso, and C. H. Chao. 2001. Isolation and identification of a *Fabavirus* from *Lisianthus*. Bull. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Stn. 70:51-63. (in Chinese with English abstract)
- Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristic of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. J. Gen. Virol. 34:475-483.

- Deng, T. C., J. Y. Liao, C. H. Tsai, and R. L. Kao. 2004. Occurrence and identification of *Japanese yam mosaic virus* in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 13:351–352. (in Chinese)
- Fauquet, C., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball. 2005. *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press. San Diego. 1162 pp.
- Ferrer, R. M., M. Luis-Arteaga, J. Guerri, P. Moreno, and L. Rubio. 2007. Detection and identification of species of the genus *Fabavirus* by RT-PCR with a single pair of primers. *J. Virol. Methods* 144:156–160.
- Ikegami, M., H. Kawashima, T. Natsuaki, and N. Sugimura. 1998. Complete nucleotide sequence of the genome organization of RNA2 of *patchouli mild mosaic virus*, a new favavirus. *Arch. Virol.* 143:2431–2434.
- Ikegami, M., Y. Onobori, N. Sugimura, and T. Natsuaki. 2001. Complete nucleotide sequence and the genome organization of *Patchouli mild mosaic virus* RNA1. *Intervirology* 44:355–358.
- Ishikawa, R., H. Nieta, S. Namba, S. Yamashita, and Y. Doi. 1985. Purification of a small spherical virus and *Yam mosaic virus* in Chinese yam. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 51:99. (in Japanese)
- Kobayashi, Y. O., A. Kobayashi, K. Hagiwara, H. Uga, Y. Mikoshihara, T. Naito, Y. Honda, and T. Omura. 2005. *Gentian mosaic virus*: A new species in the genus *Fabavirus*. *Phytopathology* 95:192–197.
- Kobayashi, Y. O., A. Kobayashi, M. Nakano, K. Hagiwara, Y. Honda, and T. Omura. 2003. Analysis of genetic relations between *Broad bean wilt virus 1* and *Broad bean wilt virus 2*. *J. Gen. Plant Pathol.* 69:20–326.
- Kobayashi, Y. O., M. Nakano, S. Kashiwazaki, T. Naito, Y. Mikoshihara, A. Shiota, M. Kameya-Iwaki, and Y. Honda. 1999. Sequence analysis of RNA-2 of different isolates of broad bean wilt virus confirms the existence of two distinct species. *Arch. Virol.* 144:1429–1438.
- Kondo, T., S. Fuji, K. Yamashita, D. K. Kang, and M. U. Chang. 2005. *Broad bean wilt virus 2* in yams. *J. Gen. Plant Pathol.* 71:441–443.
- Liu, S. Y., J. Y. Wang, Y. T. Shyu, and L. M. Song. 1995. Studies on yams (*Dioscorea* spp.) in Taiwan. *J. Chin. Med.* 6:111–126.
- Sui, C., J. H. Wei, Q. Q. Zhan, and J. Zhang. 2009. First report of *Broad bean wilt virus 2* infecting *Bupleurum chinense* in China. *Plant Dis.* 93:844.
- Uyemoto, J. K. and R. Provvidenti. 1974. Isolation and identification of twoserotypes of broad bean wilt virus. *Phytopathology* 64:1547–1548.

Comparative Characterization of Two Isolates of *Broad bean wilt virus 2* Infecting Yams (*Dioscorea* spp.) in Taiwan

Ting-Chin Deng^{1,*}, Yi-Ting Lin², Chin-Hui Tsai², Jye-Yann Liao³, and Ruei-Lung Kao⁴

Abstract

Deng, T. C., Y. T. Lin, C. H. Tsai, J. Y. Liao, and R. L. Kao. 2014. Comparative characterization of two isolates of *Broad bean wilt virus 2* infecting yams (*Dioscorea* spp.) in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 63(4):282–290

Leaf samples with mosaic and malformation on *Dioscorea alata* and that with yellowing and mosaic symptoms on *Dioscorea alata* were collected for inoculation tests. Both of them developed local lesions on *Chenopodium quinoa*, and two virus isolates ‘YA3’ and ‘Yam-7’ were obtained through single lesion isolation. YA3 and Yam-7 both with spherical virions were observed by electron microscope and they reacted with antibody to *Broad bean wilt virus 2* (BBWV-2) were detected by ELISA. When back-inoculated to *Dioscorea* spp., tested plants of some cultigens with latent infections showed symptoms only in the following years and the virus was detected by ELISA. With *Fabavirus* common primers Fab5’R1F/Fab5’R1R, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was conducted to amplify a 390 bp DNA product from both of YA3 and Yam-7. The nucleotide sequence of this fragment sharing 94.1% identities between YA3 and Yam-7. Comparing with other isolates, YA3 shared 93.1% identities with *Bupleurum chinense* isolate of BBWV-2. Moreover, with BBWV-2 specific primers BBWVSSP/BBWVKMRM to conduct RT-PCR, both YA3 and Yam-7 obtained a 320 bp product. The identities between YA3 and Yam-7 of this nucleotide sequence fragment were only 88.1%. Comparing with other isolates, YA3 was 86.3% identical to the Japanese isolate of BBWV-2 infecting yams. However, this Japanese isolate shared 96.5% identities with Yam-7. Results of phylogenetic analysis also show that YA3 and Yam-7 are closely related and belonged to a BBWV-2, which is different from other species of fabaviruses. This is the first report of BBWV-2 infecting yams in Taiwan.

Key words: *Fabavirus*, Primer, RT-PCR, Nucleotide sequence, Phylogenetic analysis.

Received: August 7, 2014; Accepted: September 10, 2014.

* Corresponding author, e-mail: tcde@tari.gov.tw

¹ Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Research Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Former Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

⁴ Former Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.