

# 引起紅龍果斑駁病徵之 *Cactus virus X* 的鑑定與免疫檢測

劉命如 洪建龍 劉瑞芬<sup>1</sup>

台北市 國立台灣大學植物病理與微生物學系

1 連絡作者：電子郵件 rliou@ntu.edu.tw，傳真：+886-2-23620271

接受日期：中華民國 92 年 12 月 25 日

## 摘要

劉命如、洪建龍、劉瑞芬. 2004. 引起紅龍果斑駁病徵之 *Cactus virus X* 的鑑定與免疫檢測 植病會刊 13: 27-34.

紅龍果 (*Hylocereus undatus* Britt. & Rose) 為仙人掌科多年生攀緣性肉質植物，所結果實汁多味美、營養豐富，是近年來相當受重視的新興熱帶栽培果樹。本研究於 1999 年在新竹縣關西鎮發現紅龍果三角莖上有黃綠參雜之斑駁病徵，初步以電子顯微鏡觀察，發現有絲狀病毒粒子存在。為了確認病毒種類，先以汁液接種法接種至紅藜，並經三次單斑分離後得到一病毒分離株。進一步進行指示植物接種、病毒粒子純化及雙向免疫擴散反應之分析結果顯示，引發紅龍果產生斑駁病徵之病原應為仙人掌病毒 X (*Cactus virus X*, CVX) 之一分離株，其屬於 *Potexvirus* 屬，可感染多種仙人掌科植物。由於紅龍果主要以扦插繁殖，病毒很容易藉此途徑傳播開來，本研究針對自紅龍果所分離之 CVX-Hu 製備抗血清，並建立夾層酵素聯結免疫分析技術，以其具有操作簡易快速及可同時檢測大量樣本之優點，將是進行紅龍果 CVX 檢測及無毒扦插繁殖體篩選最適合之技術。

關鍵詞：紅龍果、仙人掌病毒 X、夾層酵素聯結免疫反應、病毒檢測、CVX 抗血清

## 緒言

紅龍果 (*Hylocereus undatus* Britt. & Rose) 屬於仙人掌科 (Cactaceae)、三角柱屬 (*Hylocereus*) 之多年生攀緣性肉質植物，可攀附在牆壁或棚架上生長，於盛夏高溫時開花結果，果實為長橢圓或卵形，表面具有鮮紅色或黃色的肉質葉狀鱗片，果肉白色或紅色，種子為黑色，小且多，於果肉中呈不均勻分佈。其原產於南墨西哥及太平洋邊之美洲諸國，於十七世紀中期首度由荷蘭人引進台灣，二十世紀中後期再由波多黎各引入，常見於台灣山村野地及沿海沙丘<sup>(1,2)</sup>。早期引進之紅龍果具自交不親和性，主要可分為兩個品種：一為完全不結果，一般做為庭園綠美化及砧木使用；二為具有著果能力，但果實小、略有甜度，並不具經濟生產價值。近年來，國人育種改良紅龍果，培育出大果、高甜度且自交親和之品種，並經由農業推廣中心輔導農民栽植<sup>(4)</sup>。由於紅龍果具有栽培方式簡單、耐病蟲害及不良環境等特性，再加上果實蘊含維他命及天然纖維素等多種營養物質，是極具經濟價值之新興熱帶栽培果樹<sup>(1,4)</sup>。根據行政院農業委員會中部辦公室之資料統計，1999 年台灣紅龍果栽培面積共 380 公頃，總產量為 4,008

公噸，主要栽培區位於南投、彰化及台南等地，在台北、新竹、宜蘭及屏東地區也有零星栽植，且每年栽培面積及總產量皆有持續增加之趨勢，至 2002 年紅龍果栽培面積已達 905 公頃，總產量也提高為 20,826 公噸。本研究於 1999 年首次在新竹縣關西地區，發現紅龍果植株之三角莖有黃綠相間且著色不均之斑駁病徵，懷疑可能為病毒所感染，初步以紅龍果三角莖之粗汁液做電子顯微鏡觀察，發現確實有絲狀病毒存在<sup>(14)</sup>。為了鑑定病毒種類，我們自紅龍果罹病植株分離病毒株，經病毒粒子型態觀察、指示植物接種試驗及血清學研究確定引起紅龍果斑駁病害之病毒為 *Cactus virus X* (CVX)，其為 *Potexvirus* 屬之一員，可感染多種仙人掌科植物，但一般不會造成明顯病徵<sup>(7)</sup>；此外，我們也應用所製備之病毒抗血清建立夾層酵素聯結免疫分析技術 (DAS-ELISA)，可用於檢測紅龍果 CVX。

## 材料與方法

### 病毒來源

本研究所使用之紅龍果罹病組織，採自新竹縣關西

鎮；以無菌刀片切取具有斑駁病徵之紅龍果肉質莖表皮置於研鉢中，加入 0.02 M potassium phosphate buffer (pH 7.1) 以杵研磨，用棉花棒沾取汁液接種於灑有金鋼砂之紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 葉片後，放置於溫度設定為 28°C 之溫室觀察病徵表現情形。待局部性病斑出現後，進行三次單斑分離，再以此病毒分離株 (以下稱為 Hu) 為接種源接種至奎藜葉片 (*C. quinoa*)；接種後 7 天，採收具有局部性黃色病斑之奎藜病葉，保存於 -80°C 冷凍櫃，即可作為指示植物接種試驗之接種源及病毒純化之材料。

### 指示植物接種試驗

取奎藜病葉，加入 0.02 M potassium phosphate buffer (pH 7.1) 研磨，以汁液接種法接種於 6 科 19 種指示植物 (表一)，包括莧科 (*Amaranthaceae*)、鳳仙花科 (*Balsaminaceae*)、仙人掌科 (*Cactaceae*)、葫蘆科 (*Cucurbitaceae*)、豆科 (*Leguminosae*) 及茄科 (*Solanaceae*)，並回接至健康之紅龍果實生苗 (由屏東科技大學顏昌瑞教授提供)。接種植物放置於溫度設定為 28°C 之溫室生長，並觀察及紀錄病徵發生情形。

### 電子顯微鏡觀察

陰染 (negative staining) 係根據 Christie *et al.* (10) 之方法進行。取具有斑駁病徵之紅龍果肉質莖及奎藜病葉，加入 0.02 M potassium phosphate buffer (pH 7.1) 研磨後，吸取適量罹病組織汁液滴於銅網 (grid)，靜置 5 分鐘後，以去離子水沖除組織液，經 2% uranyl acetate 陰染後，以穿透式電子顯微鏡 (JOEL JEM-1200 EX III) 觀察病毒粒子之型態；自奎藜純化所得之病毒也參照同樣步驟進行陰染及電子顯微鏡觀察。

### 病毒純化

病毒純化主要參考 Attathom *et al.* (5) 之方法進行。取 100 g 奎藜病葉，加液態氮研磨成粉末狀，加入兩倍體積 sodium citrate buffer (0.5 M sodium citrate, pH 7.0, 內含 11.4 mM ascorbic acid, 15.8 mM sodium sulfite, 及 1%  $\beta$ -mercaptoethanol) 混合均勻後，以四層紗布過濾。於所收集之濾液加入 6% *n*-butanol 混合均勻，再經 12,000 g 離心 20 分鐘後，收集上清液並放置於 4°C 過夜。隔天將此溶液以 12,000 g 離心 20 分鐘，收集上清液，加入 4% polyethylene glycol (PEG 8000) 及 3% NaCl 以玻棒攪拌後，以 10,000 g 離心 15 分鐘。沉澱物以含有 0.5 M 尿素之 0.02 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) 懸浮之，再經一次離心 (11,000 g, 15 分鐘)，所得上清液即為初步純化病毒。將初步純化病毒注入預先準備好之蔗糖梯度 (10~40%)，以 75,000 g 離心 1.5 小時後，收集病毒條帶，並

以 0.02 M potassium phosphate buffer 進行透析，即可得到純化病毒。

### 雙向免疫擴散反應 (Immunodiffusion)

免疫擴散反應主要參照 Dijkstra and Jagar (12) 之方法進行；以 1X phosphate-buffered saline (2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl; PBS) 配製 1% 瓊脂，倒入直徑 9 cm 之培養皿使凝結形成瓊脂平板，再以直徑 0.6 cm 之打孔器打洞 (中心一，外圍等距六個洞)。進行實驗時，於中央孔洞加入以 1X PBS 研磨製備之奎藜病葉粗汁液，外圍孔洞則分別加入針對竹嵌紋病毒 (*Bamboo mosaic virus*, BaMV, 由中興大學徐堯輝教授提供)、CVX (由中央研究院植物研究所林納生博士提供)、木瓜嵌紋病毒 (*Papaya mosaic virus*, PapMV; provided by Dr. G. A. Mackie, University of British Columbia, Canada) 及紅龍果病毒分離株 Hu 所製備之抗血清後，放置於室溫進行擴散反應，並觀察白色沉澱帶之形成情形。

### 紅龍果病毒分離株 Hu 抗血清之製備

以 1 ml 注射針筒吸取 100  $\mu$ l 乳化劑 (TiterMax<sup>®</sup>, CytRx<sup>®</sup> Corporation, California, USA) 及 100  $\mu$ l 病毒懸浮液 (1 mg/ml)，藉由重複擠壓使其乳化均勻後，施打於紐西蘭大白兔大腿內側，每兩星期施打一次，共兩次。施打後兩星期進行耳朵採血，以奎藜病葉之粗汁液進行環形界面試驗 (ring interface test)，以了解抗體產生情形，並於心臟全採血前一星期追加一劑，以提昇抗血清之力價。採血後，先將全血放置於 37 °C 30 分鐘，再移置於室溫過夜；隔天以 10,000 g 離心 15 分鐘，所收集之上清液即為紅龍果病毒分離株 Hu 之抗血清，後續 Hu 抗體 (免疫球蛋白) 之純化主要參考 Lister (18) 之方法進行。

### 紅龍果病毒分離株 Hu 抗體-鹼性去磷酸酶 (alkaline phosphatase) 結合體之製備

取 0.9 ml CVX-Hu 病毒株抗體，加入 0.1 ml 鹼性去磷酸酶溶液 (Roche, Germany) 後，在室溫以 1 X PBS 透析三次，每次 4 小時。之後，加入 60  $\mu$ l 25% glutaraldehyde，並以 0.5X PBS 於室溫透析五次，每次 2~4 小時，最後加入 1% Bovie Serum Albumin (BSA) 懸浮均勻後，即可獲得 Hu 抗體-鹼性去磷酸酶結合體，可保存於 4°C 供後續試驗之用。

### SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) 與西方轉漬分析 (Western blot analysis)

SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳分析主要係參照 Laemmli (15) 之方法，所使用之電泳裝置為 Mighty Small II

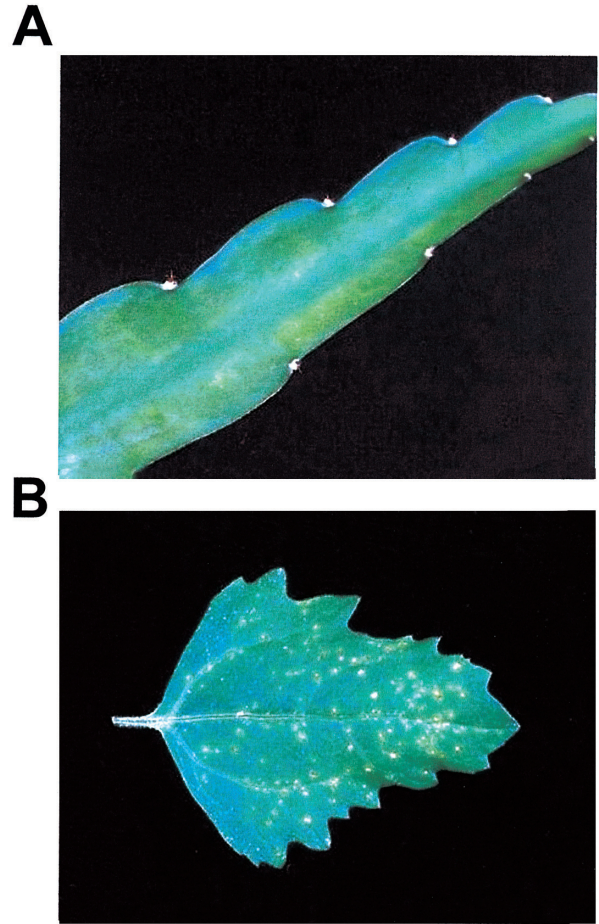
SE 250 (Amersham Biosciences)。SDS-PAGE (含 5% stacking gel 及 12% separating gel) 以 40 V 預跑 10 分鐘後，加入病毒蛋白樣本先以 60 V 跑 15 分鐘，待樣本進入 separating gel，即將電壓調高為 120 V 再跑 80 分鐘；蛋白質條帶依標準程序以 coomassie blue 進行染色。要製備病毒蛋白樣本時，取 20  $\mu$ l 純化病毒溶液，加入 5  $\mu$ l sample buffer (50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol)，於 100°C 加熱 5 分鐘，即可進行電泳分析。

西方轉漬分析主要參考 Gooderham<sup>(13)</sup>之方法。完成 SDS-PAGE 分析後，先應用 Multiphor II Electrophoresis Unit (Amersham Biosciences) 將凝膠上之病毒蛋白以 semi-dry 方式轉漬於 PVDF 濾膜 (Micron Separations Inc., Massachusetts, USA)。之後加入以 TBST (20 mM Tris-Cl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.05% Tween-20) 稀釋 2,000 倍之 Hu 抗體-鹼性去磷酸酶結合體作用 2 小時，並以 4-nitroblue tetrazolium chloride (NBT)/ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) (Roche, Germany) 進行呈色反應。

### 夾層酵素聯結免疫分析 (DAS-ELISA)

DAS-ELISA 之步驟主要參考 Clark and Adams<sup>(11)</sup>。CVX-Hu 病毒株抗體以 coating buffer (15 mM sodium carbonate, 35 mM sodium bicarbonate, 3 mM sodium azide, pH 9.6) 稀釋 2,000 倍後，取 100  $\mu$ l 分裝於 96 穴微量盤，放置於 4°C 過夜。隔天將待測樣品之葉片秤重後裝入塑膠袋，加入 10 倍體積之 extraction buffer (10.3 mM sodium sulfite, 2% polyvinylpyrrolidone (MW 24-40,000), 3 mM sodium azide, 0.2% powdered egg albumin, 2% Tween-20 in 1X PBS) 研磨均勻後，以 5,000g 離心 5 分鐘，取其上清液，作為 DAS-ELISA 之抗原。在覆被抗原之前，先去除微量盤內之抗體稀釋液，並以 PBST 清洗數次，之後再將前述抗原上清液分裝於微量盤 (每穴 100  $\mu$ l，每個樣本重複 3 次)，放置 37°C 作用 2 小時。此外，另以健康組織研磨液與萃取緩衝液作為負對照組。作用完畢後，依上述步驟清洗微量盤，並加入以 ECI 緩衝液 (0.2% BSA, 2% polyvinylpyrrolidone (MW 24-40,000), 3 mM sodium azide in 1X PBST) 稀釋 2,000 倍之抗體-鹼性去磷酸酶結合體 (每穴 100  $\mu$ l)，放置於 37°C 作用 2 小時。最後再依前述步驟清洗微量盤後，每穴加入 100  $\mu$ l 酵素基質溶液 (nitrophenyl phosphate, 1mg/ml) 放置於 37°C 避光作用適當時間，並以酵素免疫分析自動判讀儀 (Spectra MAX 340, Molecular Devices Co., California, USA) 測量 405 nm 之吸光值。

## 結 果



圖一、紅龍果病毒 Hu 分離株在紅龍果及紅藜所產生之病徵。(A) 紅龍果三角莖斑駁病徵、(B) 紅藜葉片之局部性病斑。

Fig. 1. Symptoms caused by Hu isolate of *Cactus virus X* on *Hylocereus undatus* and *Chenopodium amaranticolor*. A: mottle symptom on a trigonal stem of *H. undatus*, B: local lesions developed on an inoculated *C. amaranticolor* leaf.

### 紅龍果病徵與指示植物接種試驗

在新竹縣關西鎮所採得之紅龍果病株，三角莖出現著色不均、黃綠相間之斑駁病徵 (圖一、A)，以電子顯微鏡檢視罹病組織之粗汁液時，發現有絲狀病毒粒子存在，顯示此病徵很可能是由病毒所引起。為了進一步鑑定病毒種類，我們以汁液接種法將紅龍果病株三角莖之病毒接種至紅藜，7 天後可在紅藜葉片發現局部性黃色凹陷壞疽病斑 (圖一、B)。以紅藜進行三次單斑分離後，所得到之病毒 Hu 分離株續以奎藜進行繁殖，以便作為後續接種試驗之接種源；Hu 分離株在奎藜葉片所造成之病徵為局部性黃色病斑。指示植物接種試驗結果 (表一) 顯示，除了紅藜及奎藜，Hu 分離株還可感染雞冠花及千日紅；接種後大約 10 天，雞冠花葉片會有局部性灰色病斑產生，而且會造成系統性感染，到第 21 天，新長出之葉片會有捲曲及生長不良之現象；接種後 7 天，千日紅葉片上會有環狀壞

表一、紅龍果病毒分離株 Hu 之指示植物接種反應

Table 1. Symptoms on indicator plants after inoculation of the virus strain Hu isolated from *Hylocereus undatus*

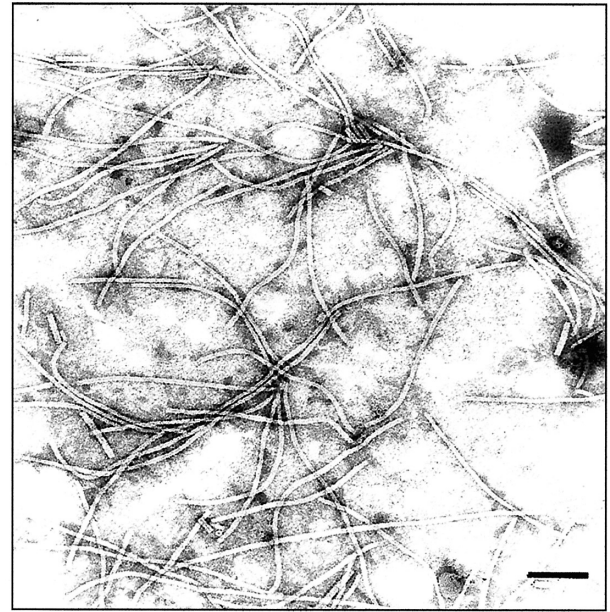
Indicator plants	Symptom <sup>1</sup>
Amaranthaceae	
<i>Celosia cristata</i>	L, S
<i>Gomphrena globosa</i>	L
Balsaminaceae	
<i>Impatiens balsamina</i>	—
Chenopodiaceae	
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	L
<i>Chenopodium quinoa</i>	L
Cucurbitaceae	
<i>Cucumis sativus</i>	—
Cactaceae	
<i>Epiphyllum oxypetalum</i>	—
<i>Hylocereus undatus</i>	M
<i>Opuntia ficus-indica</i>	—
<i>Zygocactus truncates</i>	—
Leguminosae	
<i>Cassia occidentalis</i>	—
<i>Phaseolus vulgaris</i>	—
Solanaceae	
<i>Datura suaveolens</i>	—
<i>Nicotiana benthamiana</i>	—
<i>Nicotiana debneyii</i>	—
<i>Nicotiana glutinosa</i>	—
<i>Nicotiana rustica</i>	—
<i>Nicotiana tabacum var. barley</i>	—
<i>Nicotiana tabacum var. samsum</i>	—
<i>Nicotiana tabacum var. TT5</i>	—
<i>Solanum lycopersicon</i>	—

<sup>1</sup> L: local lesion, M: mottle, S: systemic infection, —: symptomless.

痘病斑，但在其他接種植物，包括仙人掌科之曇花 (*Epiphyllum oxypetalum*)、印度榕果仙人掌 (*Opuntia ficus-indica*) 及螃蟹蘭 (*Zygocactus truncates*) 則在接種 14 天後仍觀察不到病徵。不過，以汁液接種法將取自奎黎病葉的病毒接種源回接至健康之紅龍果實生苗時，在接種後 14 天可在紅龍果三角莖觀察到先前發現之斑駁病徵。因此，病毒 Hu 分離株應是造成紅龍果三角莖斑駁病徵之病原。

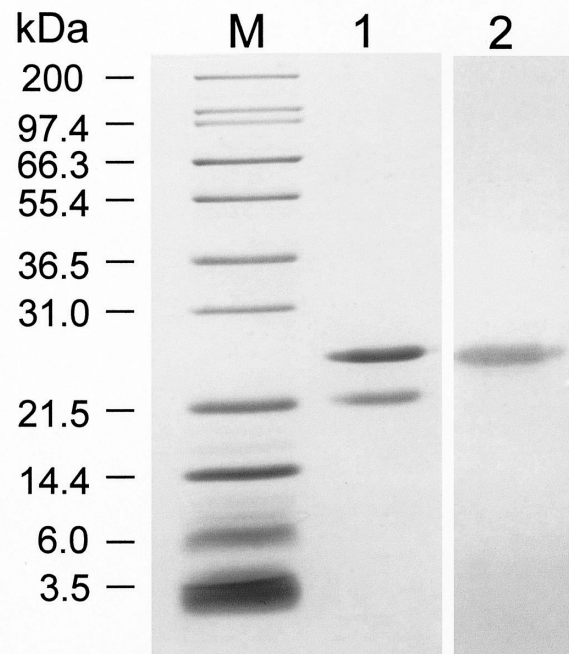
### 病毒純化與電子顯微鏡觀察

將病毒 Hu 分離株接種至奎黎大量增殖，再經蔗糖梯度離心純化所得到的病毒，以電子顯微鏡觀察時，可看到大量絲狀病毒粒子 (圖二)，測量其中 100 條病毒粒子之長度的結果顯示，其長度主要集中於 480~520 nm 之間，與 *Potexvirus* 屬病毒粒子之長度相當符合<sup>(20)</sup>。以分光光度計測量純化病毒在波長 190-320 nm 間之吸光光譜，發現在



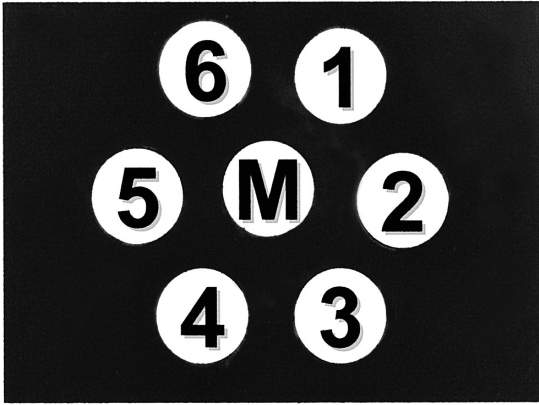
圖二、以穿透式電子顯微鏡觀察純化之紅龍果病毒 Hu 分離株病毒粒子。線條：125 nm。

Fig. 2. Electron micrograph of purified particles of Hu isolate of *Cactus virus X* stained with 2 % uranyl acetate. Bar: 125 nm.

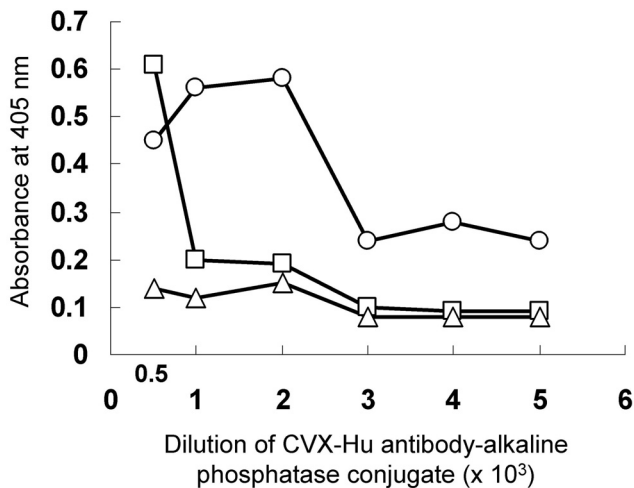


圖三、SDS- 聚丙烯醯胺凝膠電泳及西方轉漬分析紅龍果病毒 Hu 分離株之鞘蛋白。

Fig. 3. Analysis of the viral coat protein prepared from the purified virus particles of Hu isolate of *Cactus virus X* by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by coomassie blue staining (lane 1), and western blot analysis (lane 2). M: protein molecular weight markers.



圖四、應用雙向免疫擴散反應分析紅龍果病毒 Hu 分離株與其他 *Potexvirus* 屬病毒之血清學關係。以自奎藜病葉所純化之 Hu 病毒粒子 (M) 分別對下列病毒之抗血清進行雙向免疫擴散反應：Hu (編號 1 與 2), CVX (3), BaMV (4), 及 PapMV (5)；(6) 為施打抗原前自兔子所採得之血清。  
**Fig. 4.** Serological analysis of the viral isolate obtained from *Hylocereus undatus* by double immunodiffusion test. Virus particles purified from *Chenopodium quinoa* (M) was tested with antisera raised against the following viruses: CVX-Hu (No. 1 and 2), CVX (3), BaMV (4), and PapMV (5); (6): the pre-immune serum from rabbit.



圖五、以夾層酵素聯結免疫分析檢測仙人掌病毒 X。以罹病紅龍果粗汁液 (○) 或健康紅龍果粗汁液 (□) 為抗原，應用 Hu 抗體 (稀釋倍數 1: 2000) 及 Hu 抗體-鹼性去磷酸酶結合體 (稀釋倍數 1: 500, 1000, 2000, 3000, 4000 或 5000) 進行夾層酵素連結免疫反應；(△)：以萃取緩衝液所進行之反應。

**Fig. 5.** Detection of CVX by DAS-ELISA. Samples extracted from diseased (○) or healthy (□) *Hylocereus undatus* were analyzed by DAS-ELISA, using CVX-Hu antibodies (dilution at 1:2000) and CVX-Hu antibody-alkaline phosphatase conjugates (dilution at 1: 500, 1000, 2000, 3000, 4000, or 5000); (△): reaction with extraction buffer alone.

260 nm 及 240 nm 分別出現最大 ( $A_{max}$ ) 及最小吸光值 ( $A_{min}$ )，且  $A_{260}$  及  $A_{280}$  之比值為 1.20，此與 *Potato virus X* (1.20) 及 CVX (1.26) 之  $A_{260}/A_{280}$  比值極為相近<sup>(5, 12)</sup>。

### 病毒鞘蛋白分子量測定與西方轉漬分析

自純化病毒所萃取之蛋白以 SDS-PAGE 進行分析，再經 coomassie blue 染色後可觀察到二條蛋白條帶，相對分子量分別為 26 及 22 kDa (圖三、lane 1)，但以 Hu 分離株抗體進行西方轉漬分析時只偵測到相對分子量為 26 kDa 之蛋白條帶 (圖三、lane 2)，其應為病毒 Hu 分離株之鞘蛋白。

### 雙向免疫擴散反應

雙向免疫擴散反應之實驗結果顯示，擴散作用進行 16 小時後，紅龍果病毒 Hu 分離株與 BaMV 抗血清、PapMV 抗血清及未施打抗原前之兔血清都不會反應，但相對的，可與 Hu 分離株抗血清及 CVX 抗血清產生白色沉澱帶，而且這兩條白色沉澱帶平滑相連 (圖四)，顯示自紅龍果所分離之 Hu 病毒株與 CVX 之血清類緣關係極為相近。

### 夾層酵素聯結免疫分析 (DAS-ELISA)

為建立 DAS-ELISA 技術，將 Hu 分離株抗體及抗體-鹼性去磷酸酶結合體分別稀釋 500X、1000X、2000X、3000X、4000X 及 5000X 後相互配對進行夾層酵素聯結免疫反應，圖五所示為其中一組實驗之實驗結果；以不同稀釋倍數之 Hu 抗體-鹼性去磷酸酶結合體分別針對固定濃度之 Hu 抗體 (稀釋 2000 倍) 進行 DAS-ELISA 時，當前者之稀釋倍數為 2000 時所獲得的檢測效果最佳。以此條件進行 DAS-ELISA 以便檢測 CVX 存在情形時，單以萃取緩衝液或健康植株粗抽液進行反應所測得之平均吸光值分別為 0.145 及 0.19，檢測紅龍果罹病株所測得之平均吸光值 0.575，與健康植株或萃取緩衝液所測得之吸光值呈現顯著差異，因此這一項技術應可用於檢測引起紅龍果斑駁病徵之 CVX 病毒。

## 討 論

紅龍果是極具經濟價值的熱帶栽培果樹，但國內外均缺乏紅龍果病毒病害的相關研究資料，本研究自罹病紅龍果三角莖分離病毒株 (Hu) 進行指示植物接種試驗，發現其可感染紅藜、奎藜、千日紅與雞冠花，與 Attathom *et al.*<sup>(5)</sup> 就 CVX 所進行之病毒接種試驗結果相當一致，惟病徵之發生情形呈現些微差異，這可能是因為自不同寄主所分離之 CVX 分離株彼此間仍存在某種程度之變異所致。此外，雖然根據文獻記載<sup>(7)</sup>，CVX 之天然寄主包括

*Opuntia vulgaris*、曇花屬 (*Epiphyllum* spp.) 及蟹足蘭屬 (*Zygocactus* spp.) 等仙人掌科植物，我們以曇花、印度榕果仙人掌及螃蟹蘭進行接種試驗之結果發現，在接種後14天仍不見病徵，進一步以接種植物進行 DAS-ELISA 的結果也發現其吸光值均與健康植株所呈現者近似 (data not shown)。這究竟是因為觀察時間不夠長，以致病毒量太低無法測得，抑或由於曇花、印度榕果仙人掌及螃蟹蘭其實並非 CVX 之寄主，仍待進一步確認。

將取自奎藜病葉之病毒接種源回接至紅龍果實生苗時，可觀察到在田間所發現之斑駁病徵，確定 Hu 分離株應為造成紅龍果斑駁病徵之病原。進一步以電子顯微鏡觀察病毒粒子型態、測量純化病毒粒子之長度及吸光值，並進行血清學分析之結果顯示，病毒分離株 Hu 為 *Potexvirus* 屬之一員，而且是 CVX 之一 strain。Attathom *et al.*<sup>(5)</sup> 以 SDS-PAGE 所進行的分析顯示，CVX 鞘蛋白之相對分子量為 22 kDa，與本研究所估算之 26 kDa 略有差距；事實上，根據 CVX-Hu 核酸序列<sup>(16)</sup> 所進行之估算，CVX 鞘蛋白之相對分子量應為 24 kDa，因此不論估算值為 22 或 26 kDa 應該都在實驗誤差可容許之範圍內。不過，以 SDS-PAGE 分析病毒蛋白時，除了病毒鞘蛋白外，還出現另一個蛋白條帶，其量較少且在以 Hu 分離株抗體進行西方轉漬分析時並不會被偵測到，應不是病毒鞘蛋白之分解產物，而比較可能是病毒純化過程殘存之植物成分。

根據 ICTV 的資料記載，在仙人掌科植物所發現之病毒主要包括 *Cactus virus 2*<sup>(6)</sup>、*Cactus virus X*<sup>(8)</sup>、*Saguaro cactus virus*<sup>(19, 21)</sup> 及 *Zygocactus symptomless virus*<sup>(9)</sup>，其一般並不會在被感染之仙人掌造成明顯病徵，但 Attathom *et al.*<sup>(5)</sup> 在強刺仙人球所發現的 CVX 病毒，發生嚴重時會引發葉脈扭曲、畸形、壞疽及系統性斑駁等病徵。CVX 會在紅龍果造成斑駁病徵應是首度被發現<sup>(17)</sup>，至於感染 CVX 是否會造成紅龍果植株衰弱、果實減產，乃至於果實品質變差等問題，仍待進一步研究。

CVX 可經由機械、嫁接及植物與植物之間相互接觸而傳播，而紅龍果主要以扦插繁殖，病毒很容易被傳播開來，近年來廖等人<sup>(3)</sup> 所進行的調查即顯示，台灣各地紅龍果園之 CVX 發生率約為 60~70%，而在屏東縣更高達 90% 以上。本研究針對 CVX-Hu 製備多元抗體，其對於 Hu 鞘蛋白具有良好之辨識作用，以 CVX-Hu 抗體所建立之夾層酵素聯結免疫分析技術具有操作簡易快速及可同時檢測大量樣本之優點，將是進行紅龍果 CVX 病毒檢測及無毒扦插繁殖體篩選最適用之工具。

## 參考文獻

1. 張鳳如、顏昌瑞. 1997. 仙人掌果之開花及果實生長. 中國園藝 43: 314-321。

2. 楊恭毅. 1984. 楊氏園藝植物大名典 I-XI. 中國花卉雜誌社. 7183頁。

3. 廖吉彥、張清安、顏昌瑞、陳昱初、鄧汀欽. 2002. 紅龍果感染仙人掌病毒 X 的偵測與調查. (*Abs.*) 植保會刊 44: 362-3。

4. 顏昌瑞. 1997. 新興果樹栽培. 國立屏東技術學院農業推廣委員會編印. 29 頁。

5. Attathom, S., Weathers, L. G., and Gumpf, D. J. 1978. Identification and characterization of a potexvirus from California barrel cactus. *Phytopathology* 68: 1401-1406.

6. Brandes, J., and Wetter, C. 1959. Cactus virus 2. *Virology* 8: 99.

7. Buchen-Osmond C. (2003). The Universal Virus Database ICTVdB. *Computing in Science & Engineering* 5: 16-25.

8. Casper, R., and Brandes, J. 1969. A new cactus virus. *J. Gen. Virol.* 5: 155-156.

9. Chessin, M., and Giri, L. 1975. *Zygocactus virus X*. *Phytopath. Z.* 83: 40-48.

10. Christie, S. R., Purcifull, D. E., Crawford, W. E., and Ahmed, N. A. 1985. Electron microscopy of negatively stained clarified viral concentrates obtained from small tissue samples with appendices on negative staining techniques. *Fla. Agr. Sta. Bull. No. 872*. 45pp.

11. Clark, M. F., and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.

12. Dijkstra, J., and de Jager, C. P. 1998. *Practical plant virology- protocols and exercises*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 458 pp.

13. Gooderham, K. 1984. Transfer techniques in protein blotting. Pages 165-178 in: *Molecular Biology*, J. M. Walker ed. Royal Society of Chemistry, London, UK.

14. Hung, C. L., Liou, M. R., and Liou, R. F. 1999. Identification and characterization of a potexvirus on pitaya (*Hylocereus undatus*). (*Abs.*) *Plant Pathol. Bull.* 8: 177.

15. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* 227: 680-685.

16. Liou, M. R., Chen, Y. R., and Liou, R. F. 2004. Complete nucleotide sequence and genome organization of a *Cactus Virus X* strain from *Hylocereus undatus* (Cactaceae). *Arch. Virol.* (in press)

17. Liou, M. R., Hung, C. L., and Liou, R. F. 2001. First report of *Cactus virus X* on *Hylocereus undatus* (Cactaceae) in Taiwan. *Plant Dis.* 85: 229.

18. Lister, R. M. 1979. ELISA as used for plant virus detection and assay. (monograph, unpublished). Dept. Bot. Plant Pathol. Purdue Univ. West Lafayette, Indiana, USA, 8 pp.
19. Milbrath, G. M., and Nelson, M. R. 1972. Isolation and characterization of a virus from saguaro cactus. *Phytopathology* 62: 739-742.
20. Murphy, F. A., Fauquent, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., and Summers, M. D. 1995. *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses VI*. Springer-Verlag Wien New York. 586 pp.
21. Nelson, M. R., and Tremaine, J. H. 1975. Physicochemical and serological properties of virus from saguaro cactus. *Phytopathology* 65: 309-319.

### 誌 謝

我們感謝顏昌瑞教授提供紅龍果實生苗，徐堯輝教授、林納生博士及 Dr. G. A. Mackie 提供病毒抗血清。

## ABSTRACT

Liou, M. R., Hung, C. L., and Liou, R. F.<sup>1</sup>. 2004. Characterization of a *Cactus virus X* infecting *Hylocereus undatus* and its detection by DAS-ELISA. *Plant Pathol. Bull.* 13: 27-34. (Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan; <sup>1</sup>Corresponding author, E-mail: rliou@ntu.edu.tw, Fax: +886-2-2362-0271)

*Hylocereus undatus* Britt. & Rose belongs to Cactaceae. It produces delicious fruits and has recently become a fruit crop of economic importance in Taiwan. In 1999, *H. undatus* grown in Kuan Shi (Hsin Chu, Taiwan) was found to display systemic mild mottlings on the trigonal stems. Preliminary analysis by electron microscopy of the sap prepared from diseased plants revealed the presence of flexuous rod-shaped virus particles. A viral strain was isolated from diseased *H. undatus* and established by three successive single lesion transfers on leaves of *C. amaranticolor*. Host range studies and serological analysis of purified virus indicate that the pathogen causing mottle disease on *Hylocereus undatus* is a strain of *Cactus virus X* (CVX). A procedure using antisera prepared against virus was established for detection of CVX by DAS-ELISA. Since *H. undatus* reproduces asexually, rapid and specific detection of the virus by DAS-ELISA will help to implement a sound control of the disease caused by CVX in *H. undatus*.

Key words : *Cactus virus X*, CVX antiserum, DAS-ELISA, *Hylocereus undatus*, viral detection