紅龍果病毒病的研究現況

國立臺灣大學植物病理與微生物學系　張雅君、毛青樺、呂有其、李勇賜

摘 要

紅龍果(*Hylocereus spp.*)英文為pitaya、pitahaya或dragon fruit，為仙人掌科(Cactaceae)三角柱屬之多年生攀緣性植物，原產於墨西哥及中南美洲熱帶雨林，喜高溫多濕之氣候，為近年來發展迅速之高價熱帶水果。目前商業栽培的紅龍果主要是以肉質狀三角莖進行無性扦插繁殖，雖可提供大量、品質一致、性狀穩定的種苗，但若繁殖用的母本遭受病毒為害，新繁殖的種苗也會帶有病毒。本系劉瑞芬教授研究室首先於2001年發表報告證實紅龍果遭受*Potexvirus*屬之仙人掌X病毒(*Cactus virus X*, CVX)所為害，並利用所獲得的CVX-Hu病毒分離株製備出抗血清，應用於DAS-ELISA檢測，同時完成CVX-Hu全長基因體之選殖與解序。農試所廖吉彥等人的調查指出，CVX普遍存在於台灣與金門田間栽種的紅龍果植株中，依地區不同感染率在50~90%之間。

我們實驗室於2005年從臺大園藝分場的紅龍果病株中分離出CVX-NTU病毒分離株，並完成全長基因體之選殖與解序工作。2006年至2008年間我們從陽明山採集的紅龍果樣品分離並鑑定出台灣首次報導之蟹爪蘭X病毒(*Zygocactus virus X,* ZyVX)，此亦為ZyVX感染紅龍果之世界新記錄。此外，也從這批樣品中發現並鑑定出一種新potexvirus，將其命名為紅龍果X病毒(Pitaya virus X, PiVX)。將ZyVX-P39病毒分離株、PiVX-P37病毒分離株，與其它已知序列的*Potexvirus*屬病毒進行序列比對及類緣分析，結果顯示感染仙人掌科植物的*potexvirus*都屬同一個分群中，代表彼此的類緣關係較密切。為了解這三種病毒在紅龍果的感染情況，我們研發出多引子反轉錄聚合酶鏈鎖反應(multiplex RT-PCR)，對台灣各地區種植的紅龍果進行檢測。研究結果再次證實台灣紅龍果普遍受到CVX危害；而ZyVX除了中部地區的台中和彰化之外，其他地區皆被檢出ZyVX；新發現的PiVX則存在台北、宜蘭、彰化以及台東的紅龍果園。若能利用我們新研發的multiplex RT-PCR協助篩檢紅龍果繁殖材料，將可建立無病毒紅龍果種苗生產體系，提供果農健康高品質的紅龍果種苗。

關鍵字：病毒病、健康種苗、紅龍果

前　言

仙人掌科(Cactaceae)三角柱屬之紅龍果(*Hylocereus spp.*)英文為pitaya、pitahaya或dragon fruit，為多年生攀緣性植物，夏季開花後結果，從肉質狀三角莖長出圓形或橢圓形果實，主要有紅、白果肉之分，果實營養價值極高，為近年來發展迅速之高價熱帶水果。紅龍果原產於墨西哥及中南美洲熱帶雨林，故喜高溫多濕之氣候。台灣最早之栽種記錄為1645年由荷蘭人所引進，但直到1980年代從越南和中南美洲引入可自花授粉之大果品種，並選育出質量均佳的品系之後，才成為廣受歡迎的經濟果樹。目前全國紅龍果栽種面積將近1千公頃，主要集中於中部地區，其中又以彰化二林最具規模，其他包括台中、南投、台南，此外澎湖、金門等亦有專區種植。

商業栽培的紅龍果主要是以肉質狀三角莖進行無性扦插繁殖，可提供大量、品質一致、性狀穩定的種苗。因病毒感染紅龍果植株時會擴散至整株植物，所以繁殖用的母本遭受病毒為害時，新繁殖的種苗也會帶有病毒，因而造成大面積的感染。除此之外，在日常管理中修剪紅龍果枝芽和採收果實常使用剪刀器具，亦有可能因此傳播病毒。

紅龍果病毒病的研究現況

病毒引起之紅龍果病害只有Potexvirus屬的仙人掌X病毒(*Cactus virus X*, CVX)曾被正式報導，而且CVX已經普遍感染存在於紅龍果植株中。本系劉瑞芬教授及其研究生於1999年在新竹縣關西地區發現紅龍果三角莖出現斑駁病徵，經研究證實為仙人掌X病毒(*Cactus virus X*, CVX)所造成；他們將病株汁液接種於紅藜，進行三次單斑分離，獲得CVX-Hu病毒分離株；然後以純化的CVX-Hu病毒顆粒製備出CVX抗血清，將其應用於雙抗體三明治-酵素連結抗體免疫吸附法(DAS-ELISA)，可快速大量檢測紅龍果樣品。此外，劉教授的研究團隊也完成CVX-Hu全長基因體之選殖與解序，並將序列登錄在GenBank中。CVX研究成果分別於2001年與2004年發表，這是台灣最早發現且有正式報告之紅龍果病毒。

農業試驗所廖吉彥等人2003年發表的文獻指出，CVX普遍存在於臺灣與金門田間栽種的紅龍果植株中，以屏東地區91.6%最高，金門縣發生率52.5%最低，而宜蘭、台中、南投和彰化地區感染率在65~75%。此研究並從宜蘭採集的罹病株分離出CVX-EL1病毒分離株，同樣以純化的病毒顆粒製備出CVX

抗血清，也選殖了CVX-EL1的3'端約1.2 kb之基因體片段，並加以解序，其中鞘蛋白(capsid protein, CP)的全長序列也已經登錄在GenBank中。廖等人將田間紅龍果的病徵分為斑點、斑駁、壞疽及黃化等四型，發現以斑駁病徵最普遍。當以間接式酵素連結抗體免疫吸附法(I-ELISA)分析CVX在紅龍果不同部位的存在情形，結果發現三角莖、果皮、果肉和新生側芽皆可測得病毒，可見CVX確實分布於整株紅龍果植株。此外，他們也觀察到發病植株的生長及果實質量都受到明顯影響。

我們實驗室於2005年從台大園藝分場採集紅龍果病株，同樣將病株汁液接種在紅藜，進行三次單斑分離，獲得一病毒分離株，命名為CVX-NTU。之後完成CVX-NTU寄主範圍之分析，以及全長基因體之選殖與解序工作，也已將此序列登錄在GenBank。我們利用專一性的引子對配合RT-PCR方法於2006年間進行田間調查，結果顯示採集自台北陽明山紅龍果園中的樣品有高達95%感染CVX-NTU，而CVX-Hu則佔40%，且都是複合感染。可見此地區的CVX以NTU分離株佔絕大多數，但其生物意義仍需後續研究闡明。

而2006年至2008年間我們從陽明山採集的紅龍果樣品中，以奎藜植株進行三次單斑分離，利用所分離到的P39病毒分離株進行基因選殖與定序，結果鑑定出P39分離株為Potexvirus屬的蟹爪蘭X病毒(*Zygocactus virus* X, ZyVX)。這是台灣首次發現ZyVX之報導，亦為ZyVX感染紅龍果之世界新記錄。我們也將這批樣品接種於紅藜植株，進行三次單斑分離實驗，將獲得的P37病毒分離株進行基因選殖與定序，結果鑑定出一種未曾被發現的新potexvirus，將其命名為紅龍果X病毒(*Pitaya virus X*, PiVX)。目前已完成ZyVX-P39與PiVX-P37病毒分離株的全長基因體之選殖與解序工作，也將兩者的序列登錄在GenBank中。當我們將ZyVX-P39、PiVX-P37，與其它已知序列的*Potexvirus*屬病毒進行序列比對及類緣分析，結果顯示感染仙人掌科植物的potexvirus都屬同一個分群中，代表彼此的類緣關係較密切，與其他potexvirus的關係則較疏遠。

根據我們的觀察，單獨或複合感染CVX、ZyVX和PiVX病毒的紅龍果植株，其三角莖常呈現褪色斑點、斑駁等病徵(圖1)，很難以病徵加以診斷鑑定。為了解這三種病毒在紅龍果的感染情況，我們依據所獲得的CVX-NTU、ZyVX-P39與PiVX-P37序列，分別設計各病毒的專一性引子對，加上可擴增植物粒線體mRNA序列的引子對，研發出多引子反轉錄聚合酶鏈鎖反應(multiplex RT-PCR)，對台灣各地區種植的紅龍果進行檢測。調查結果再次證

實臺灣田間紅龍果植株普遍受到CVX危害；而ZyVX除了中部地區的台中和彰化之外，其他地區皆被檢出ZyVX；新發現的PiVX則存在臺北、宜蘭、彰化以及台東的紅龍果園。田間所採集的樣品，除少數單獨感染CVX之外，多數樣品都有一種以上病毒複合感染(圖2)。

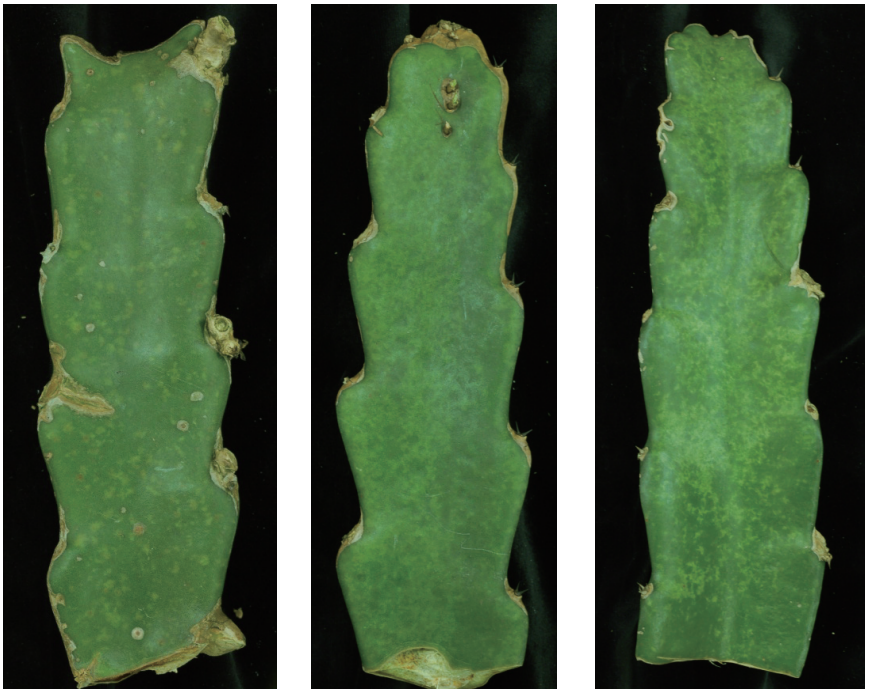


圖1、遭受病毒感染之紅龍果植株三角莖呈現褪色斑點、斑駁等病徵。(左)單獨感染仙人掌X病毒(*Cactus virus* X, CVX)之植株。(中)複合感染CVX與蟹爪蘭X病毒(Zygocactus virus X, ZyVX)之植株。(右)複合感染CVX與紅龍果X病毒(Pitaya virus X, PiVX)之植株。

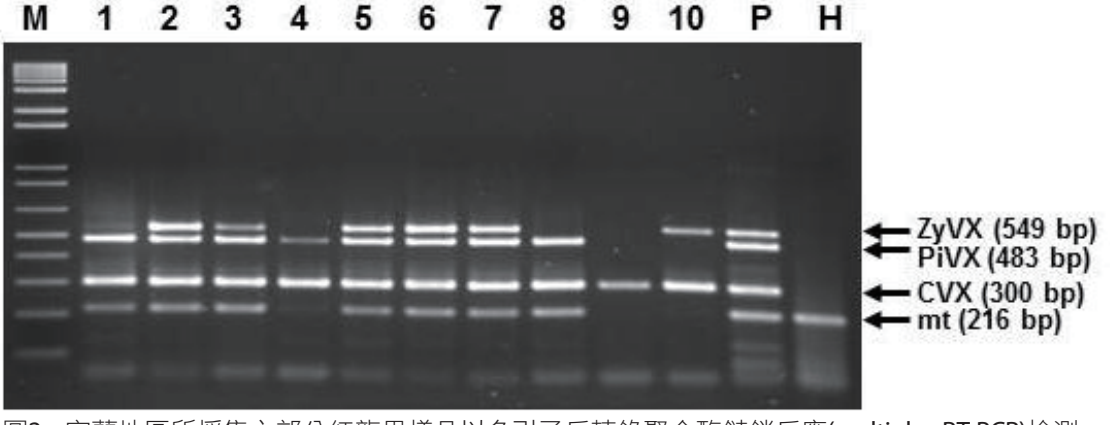


圖2、宜蘭地區所採集之部分紅龍果樣品以多引子反轉錄聚合酶鏈鎖反應(multiplex RT-PCR)檢測之結果。電泳結果顯示，所有紅龍果樣品皆檢測出CVX，樣品2、3、5、6、7和10被測出含有ZyVX，而樣品1至8則有PiVX感染。由此可知，除了樣品9單獨感染CVX之外，其餘樣品都有一種以上病毒複合感染。

結　語

從我們的調查研究結果顯示，台灣各地的紅龍果植株已經被*Potexvirus*屬的CVX、ZyVX和PiVX病毒所感染，其中以CVX最為普遍，而且常發現一種以上病毒同時感染的情況。但單獨或複合感染的紅龍果植株很難以病徵加以區分，而我們所研發的multiplex RT-PCR則能清楚地判別樣品受到哪幾種病毒感染。此外，若能利用我們所研發的multiplex RT-PCR協助農業試驗單位或種苗業者篩檢紅龍果繁殖材料，將可建立無病毒紅龍果種苗生產體系，提供果農健康高品質的紅龍果種苗。

參考文獻

1.毛青樺、呂有其、張雅君。2007。感染紅龍果之蟹爪蘭X病毒之特性分析與田間調查。植病會刊 17: 97-98。

2.廖吉彥、張清安、顏昌瑞、陳昱初、鄧汀欽。2003。感染紅龍果之仙人掌病毒X之鑑定與分佈調查。植病會刊12: 225-234。

3.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.

4.Li, Y.-S., Mao, C.-H., and Chang, Y.-C. 2010. Characterization of a new pitaya-infecting potexvirus and the construction of its infectious cDNA clone. 2009 Annual Meeting of Phytopathological Society of the Republic of China.

5.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*. Archives of Virology 149:1037-1043.

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

Current studies in pitaya viral diseases

Chang, Y.-C., Mao, C.-H., Lu, Y.-C., and Li, Y.-S.

Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University

Abstract

Pitaya (*Hylocereus* spp.), also known as pitahaya or dragon fruit, is a perennial climbing epiphytic plant in the family of Cactaceae. This cactus plant is native to the forests of Mexico, Central and South America and is becoming a high-value tropical fruit crop in Taiwan. Commercially cultivated pitayas are mainly propagated from cuttings. If mother plants are infected with viruses, diseases can be spread easily. In 2001, the research team of Professor Ruey-Fen Liou at National Taiwan University (NTU) published the first paper of pitaya-infecting virus, *Cactus virus X* (CVX) which is a member of the genus *Potexvirus*, in Taiwan. They purified a CVX-Hu isolate, prepared its antiserum and developed the DAS-ELISA for CVX detection. In addition, they cloned and completely sequenced the CVX-Hu isolate. Liao *et al*. at Taiwan Agriculture Research Institute performed a pitaya disease survey and the result indicated that CVX was widespread in the pitayas and the infection incidence ranged 50%~90% in different areas of Taiwan and Kinman.

In 2005, we isolated a new NTU strain of CVX from the pitayas grown in the experimental farm at NTU, and obtained the complete genomic sequence of CVX-NTU. During 2006 to 2008, one potexvirus, *Zygocactus virus* X (ZyVX), was isolated and identified by our laboratory in the pitaya samples collected from the Yanmingshan orchard. This is the first report of ZyVX in Taiwan and also the first record of pitaya-infecting ZyMV. In addition, another potexvirus was isolated from the same batch of pitaya samples, and it was identified to be a new species of the genus *Potexvirus*. Because this new potexvirus was originally found in pitaya and thus named as Pitaya virus X (PiVX). The results of phylogenetic analyses on the full-length genomes of CVX, ZyVX-P39, PiVX-P37 and other published potexviruses demonstrated that all Cactaceae-infecting potexviruses belong to the same cluster. To study the distribution of CVX, ZyVX and PiVX in the

pitaya field, we developed a multiplex RT-PCR method for field survey. Pitayas sampled from several production areas in Taiwan were investigated for the infection rate and distribution of potexviruses. The field survey results showed that CVX was indeed widespread; ZyVX was not present in Taichung and Changhua; PiVX existed in Taipei, Ilan, Taitung and Changhua. If we can use this multiplex RT-PCR to screen pitaya propagation materials, a certification program for virus-free pitayas can be established to provide high quality pitaya seedlings for farmers.