植物病理學會刊　12:225-234, 2003

感染紅龍果之仙人掌病毒X之鑑定與分佈調查

廖吉彥[1]　張清安[1]　顏昌瑞[2]　陳昱初[3]　鄧汀欽[1,4]

1 台中縣霧峰鄉 行政院農委會農業試驗所植病組
2 國立屏東科技大學園藝系
3 行政院農委會農業高雄區農業改良場
4 聯絡作者：電子郵件 tcde@wufeng.tari.gov.tw，傳眞：+886-4-23338162
接受日期：中華民國92年9月12日

摘　要

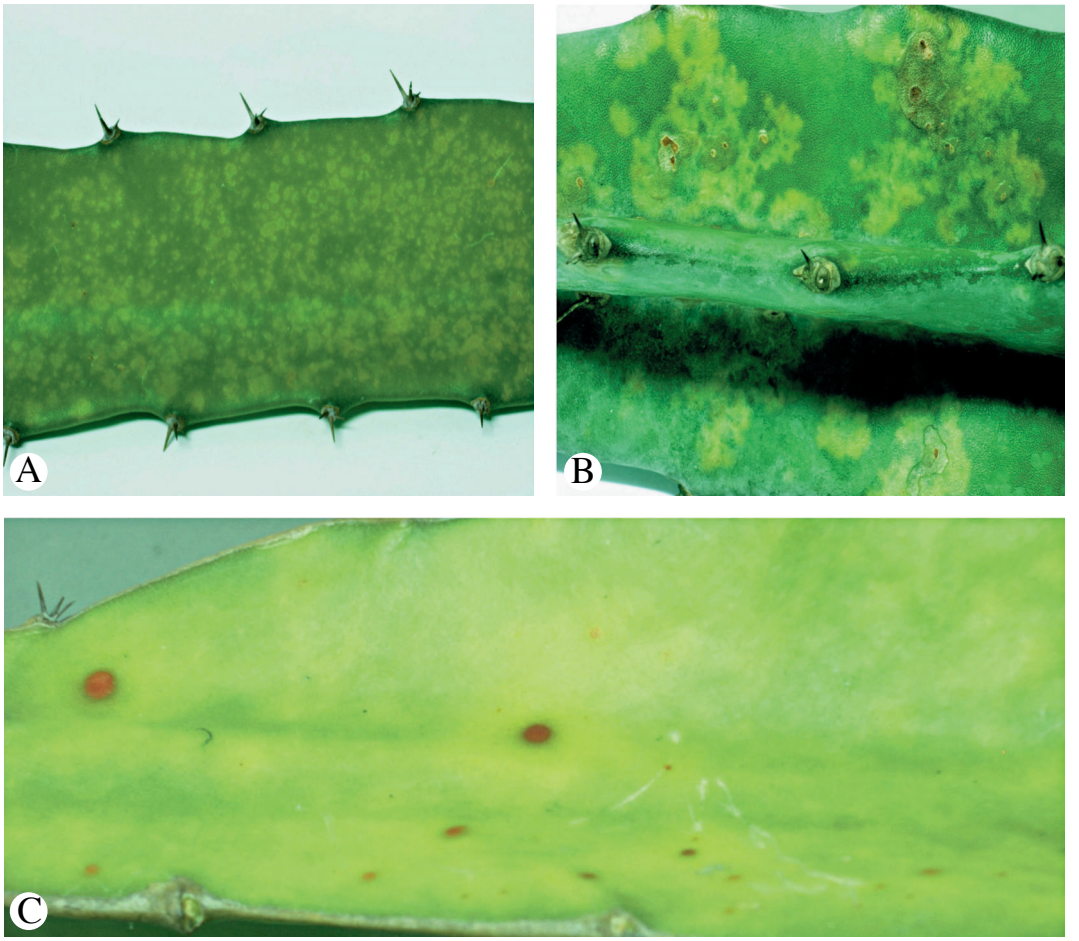
廖吉彥、張清安、顏昌瑞、陳昱初、鄧汀欽. 2003. 感染紅龍果之仙人掌病毒 X 之鑑定與分佈調查. 植病會刊12:225-234.

紅龍果(*Hylocereus undatus* Britt. & Rose) 爲近年自國外引進而逐漸風行全台之醬肉果樹，目前只有報告仙人掌病毒X (*Cactus virus X*, CVX) 可以感染紅龍果。本研究調查台灣各地及金門地區紅龍果園，發現有疑似病毒感染病徵之植株分佈頗爲普遍，依病徵型態可歸納爲退綠斑點型、斑駁型、壞疽型及黃化型等四型。其中以斑駁型發生較廣。本研究由宜蘭所獲得之斑駁型紅龍果罹病株上經單斑分離獲得一病毒分離株(EL1)，以機械接種方式EL1 可感染雞冠花造成系統性黃化斑點，於千日紅、綠藜、奎藜及紅藜則產生局部壞疽病斑。電子顯微鏡觀察EL1 病毒顆粒爲長絲狀，大小約490-510×13 nm。將EL1 繁殖於奎藜，利用硫酸銫等密度平衡離心可獲得純化之病毒顆粒，並用以作爲免疫用抗原製備出專一性抗血清。以電泳分析(SDS-PAGE) 純化之病毒顆粒，其鞘蛋白基本單位(subunit protein) 分子量約爲30 kDa。所製備之抗血清於西方轉漬、SDS-免疫擴散反應及間接型酵素連接抗體法等免疫分析反應中均與其同源抗原產生明顯反應，而不與健康對照抗原反應。爲釐清EL1 與CVX 之關係，根據已知之CVX 鞘蛋白核甘酸序列設計引子對，利用反轉錄聚合酵素(RT-PCR) 可由EL1 組織所抽取之全量RNA 中增幅出預期之1.2 kbp 之DNA 片段。此片段經選殖與解序後證實屬於CVX 3' 端基因體序列，包括部分ORF2、ORF3、ORF4 及ORF5 (coat protein)。取其中部分ORF4及完整ORF5 片段共864 個核甘酸(對應288 個氨基酸，Access No. AY241392) 與CVX (Access No. AF308158) 相比對，分析發現EL1 鞘蛋白基因之核甘酸序列與CVX 相同度達95.3%，而兩者氨基酸相似度爲92.8%。經上述各項特性之比對，證實EL1 係CVX 之一種系統。依罹病株不同部位及不同病徵組織，以間接法酵素連接免疫分析(ELISA) 偵測，得知新生側芽及初期病徵(退綠斑點及斑駁)，可測得較高ELISA 反應值。經各地調查及採樣偵測，屏東縣紅龍果園CVX 發生率約90% 以上，金門縣約50%，其餘地區約60-70%。紅龍果品種保存園中CVX 普查結果，國姓黃皮(A13) 等20 個品種植株仍未被CVX 所感染，標示爲健康母本，進而加以隔離，以供日後發展健康種苗繁殖體系之用。

關鍵詞：紅龍果、仙人掌病毒X、病徵、抗血清、比對、調查

緒　言

紅龍果(*Hylocereus undatus* Britt. & Rose) 爲仙人掌科(*Cactaceae*) 植物，英文俗名爲pitaya，因種籽內富含不飽和脂肪酸、抗氧化物質及各種酶等營養素，因而喝了除可消暑解渴並能促進女性乳腺發達，可當保健、美容、養顏之聖品[(1)]，其果實可供生食又可製成花茶、果醬、果汁、冰品、醋及果凍等加工品，爲近年來新興果樹。目前我國所栽培之紅龍果品種多數由越南引進，其中以白肉品種栽培最廣，晚近亦有紅肉品系出現且頗受歡迎，面積有逐年增加趨勢。目前全省各地均有紅龍果之栽培，但以高屏地區較爲集中，金門外島亦有少量栽植。紅龍果引進我國時間尚短，栽培技術仍處於摸索改良階段，有關病蟲害之種類與發生情形，亦尚未建立完整之資訊。然而隨著種植面積逐年增加，病蟲害所衍生之問題已漸受重視。本所即經常接到果農委託之病害鑑定，其中疑似病毒感染之系統性斑點、斑駁、黃化甚至壞疽等病徵頗爲常見(圖一)，田間



圖一、仙人掌病毒 X 感染紅龍果所呈現之病徵：(A) 莖部退綠斑點，(B) 斑點逐漸融合形成壞疽情形，(C) 感染嚴重之紅龍果呈現莖部全面黃化現象。

Fig. 1. Symptoms of pitaya infected by *Cactus virus X*: (A) chlorotic spots on stem; (B) chlorotic spots merged together causing necrosis; (C) chlorosis on whole stem of severely infected pitaya.

觀察這些發病植株之生育及果實之質量均已受明顯之影響。目前屬於 *Potexvirus* 屬之仙人掌病毒 (*Cactus virus* X, CVX)[3,4] 乃唯一已知感染紅龍果的病毒[15,16]，機械傷口爲其主要傳播途徑[5]，加上紅龍果採無性扦插方式繁殖[12]，因此病毒也極容易經由感病母株所繁殖之種苗散佈。本試驗之目的在於就全國各地所發生之不同病徵型植株進行病毒種類之鑑定，探討其與已見於報告之仙人掌 CVX 間之關係，並釐清是否有其他病毒涉及之狀況，以擬定適合之防治策略。

材料與方法

病毒之來源與寄主範圍測定

本研究供試病毒來源涵蓋宜蘭、台中、南投、彰化、屏東及金門等地所採集的各種不同疑似病毒感染之系統性病徵植株。但用以進行後續純化、血清學比較及核酸序列分析之分離珠 (EL1) 係採自宜蘭縣莖部呈現斑駁病徵之紅龍果罹病株。首先以 10 倍量的 0.05 M 的磷酸緩衝液 (PH 7.2) 淬取莖部汁液，磨擦法接種於撒有 400 目金剛砂之奎藜 (*Chenopodium quinoa*) 葉片，待 7-10 天接種葉出現局部病斑後，挑取單一病斑重複接種於奎藜，重複三次後，再大量繁殖於奎藜上保存，並作爲後續試驗之接種源。寄主範圍測定時乃將 EL1 分離株機械接種於紅龍果、千日紅 (*Gomphrena globosa*)、紅藜 (*C. amaranticolor*)、綠藜 (*C. murale*)、煙草 (*Nicotiana tabacum* var 萬國士)、豌豆 (*Pisum sativum*)、胡瓜 (*Cucumis sativus*) 及雞冠花 (*Celosia argentea*) 等植物葉片上，於網室中觀察至少一個月。

電子顯微鏡觀察

進行病毒顆粒之電子顯微鏡觀察乃以陰染法[7,10,11] 爲之，切取接種 EL1 後具局部病斑之奎藜葉片及採自各地不同病徵之紅龍果莖部組織，壓取粗汁液以等量 2% 磷鎢酸 (Phosphotungstic acid; PTA) 行陰染後，以 Hitach 7000 電子顯微鏡進行觀察。進行免疫電子顯微鏡觀察時，則仿照

Milne [17] 所述之程序，先以 IgG 覆膜處理 (coating) 於銅網 (grid) 上，再與罹病粗汁液反應以吸附病毒，爾後仿前述陰染過程後，再行鏡檢。

病毒純化與抗體製備

以接種 EL1 九天後收集之奎藜局部病斑葉，先以 1.5 倍量的 0.5 M 磷酸緩衝液 (pH 8.5) 內含 0.01 M Na_2-EDTA 萃取汁液。再於 4℃ 下加入萃取汁液量 15%(v/v) chloroform 攪拌 4 分鐘後，經 8000 rpm (Hitachi CR20B2) 離心 20 分鐘，取上澄液，以 5 ml 20% 蔗糖當墊底 (cushion) 的方式，經 28000 rpm (Hitachi SCP70G) 離心 2.5 小時沉降濃縮病毒，再以 0.05 M 硼酸緩衝液 (borate buffer、pH 8.2) 內含 0.01 M Na_2-EDTA 懸浮沉澱物成爲初步純化試料。進一步純化則利用等密度平衡離心法 [13]，將試料在 30% Cs_2SO_4 中經 38000 rpm (Hitachi RP65T) 離心 23 小時後，可在距離心管口 4.1 cm 處形成一蛋白光帶。抽取純化的病毒帶，以 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 充分透析並離心去除雜質後，成爲純化病毒試料。經紫外光吸收光譜分析決定病毒純度及濃度後，定量 (1 mg/ml) 分裝並加以冷凍保存供後續試驗。進行病毒抗體之製備乃將此純化病毒試料 1 mg/ml 加等量之完全補助劑充分乳化，於家兔後腿行肌肉注射，以後每隔七天追加注射則以不完全補助劑乳化等量純化病毒試料，總共追加注射三次。最後一次注射後第七天起每星期自家兔耳部行靜脈採血，所採集之抗血清，分裝後置於 -75℃ 下冷凍保存。免疫球蛋白 IgG 之純化則根據 Clark and Adams [8] 所述之方法爲之。

病毒鞘蛋白分子量與西方轉漬分析

純化之病毒試液經 SDS-PAGE 電泳分離後，取下膠體，其中一片膠體放入轉漬槽內，以 100 V 通電 1.5 小時將蛋白轉漬於硝化纖維膜上 [14]，再以各種供試之病毒抗體反應，然後以鹼性磷酸酵素標定之山羊抗兔免疫球蛋白 (Sigma A8233) 反應，最後以NBT (nitroblue tetrazolium) 及 BCIP (bromochloroindoyl phosphate)基質進行呈色。另一片膠體則以 0.025% Coomassie blue R250 (CBR250) 染色後觀察蛋白帶數目及移動距離，據以計算病毒鞘蛋白之分子量之大小。

間接法酵素連結免疫分析 (Indirect ELISA)

爲瞭解我國各地所發生之紅龍果病毒病害與本研究所分離之 EL1 間血清學之相關性，故利用所製備對應 EL1 之專一性抗體進行 Indirect ELISA 分析。所採用之 Indirect ELISA 流程如同前人報告所述 [8]。將不同地區所採集之紅龍果病株依其所表現之病徵歸納爲輕微斑點、斑駁、壞疽及黃化等四種不同類型進行分析比較。

病毒核酸分析

(一) 反轉錄-聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)：

由於 Liou et al. 報告由台灣紅龍果上曾經分離到 CVX [16]，因此爲釐清本研究由宜蘭紅龍果所分離之 EL1 與 CVX 之關係，故根據 Liou 等發表之 CVX 核甘酸序列 (Access No. AF308158) 設計一組專一性引子對 (CVX-F:5'-GCGTCACACAAAAGAACTCC，CVX-R:5'-GTTAAGCAGGATAGGCACAG)，進行 RT-PCR 反應以比較兩者之異同。取約 0.1 克之 EL1 紅龍果病組織，利用全量 RNA 純化試劑 (Qiagen QIAamp Viral RNA Mini Kit)，抽取其全量 RNA。利用反轉錄試劑組 (Stratagene Inc., La Jolla , CA) 合成第一股 cDNA。進行 PCR 反應時，於每一 50 μl 反應中分別加入 3 μl 之 cDNA、5 μl 之 10x PCR buffer、4 μ 之1 2.5 mM NTP、0.1 U 之 Ex-Taq Polymerase (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan)、及各 2.5 μl 之 20 m M CVX-F 及 CVX-R 引子對，於熱循環反應儀 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Norwalk, CT) 中進行 30 個 PCR 循環反應。反應程序爲 94℃ 下變性 1 分鐘，55℃ 下黏合 1 分鐘，70℃ 下聚合 1.5 分鐘，最後一個循環中之 72℃ 下聚合延長 8 分鐘。此反應預估可增幅出大小約 1.2 K bp 之核酸產物，反應結果以電泳進行分析。

(二) 核酸片段選殖和序列分析：

經上述 RT-PCR 增幅所得大小約 1.2 K bp 之 DNA 片段，以 EcoRI 切割後構築於 pCRII 載體上 (Invitrogen Carlsbad, CA)，經由轉形作用送入 *E.coli* DH5 α 宿主，利用藍白菌落反應初步選出可能含有嵌入序列之菌株，後經微量質體純化分析，進一步選出確定之轉型菌株。再以 ABI PRISM 377-96 DNA 序列分析儀 (Perkin-Elmer,CA,USA) 及其配用之放射性標識反應試劑組 (ABI PRISM BioDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) 進行核甘酸序列分析，將此所得序列利用 GCG WISCONSIN PACKAGE 與GenBank 上已正式登錄之核甘酸序列進行分析比對。

結　果

紅龍果病毒之調查與病徵之分類

本研究總共調查宜蘭、台中、南投、彰化、屏東及金門等地之紅龍果園，採集疑似病毒感染之材料，依其病徵可歸納爲退綠斑點型 (chlorotic spot)、斑駁型 (mottle)、壞疽型 (necrosis) 及黃化型 (chlorosis) 等四種不同類型 (表一)，其中以表現斑駁型病徵之植株分佈最多。因此取宜蘭地區所得之斑駁型病株經由單斑重複接種分離程序獲得 EL1 分離株，作爲本試驗研究之標準分離株。將EL1汁液接種回接至健康之紅龍果上，經 21 天後，亦可表現出與田間植株相同之斑駁型病徵。

表一、仙人掌病毒 X 感染紅龍果，不同病徵的莖部組織所測得之免疫酵素分析值

Table 1. ELISA values of *Cactus virus X* in stem tissues with various symptoms of infected pitaya

病徵 (Symptom)	ELISA value (Absorbance at 405nm) [1]
黃斑 chlorotic spots	1.55
斑駁 mottling	1.24
壞疽 necrosis	0.93
黃化 yellowing	0.73
健全 health (c.k.)	0.034

[1] Data are means of 3 replicates.

寄主範圍測定

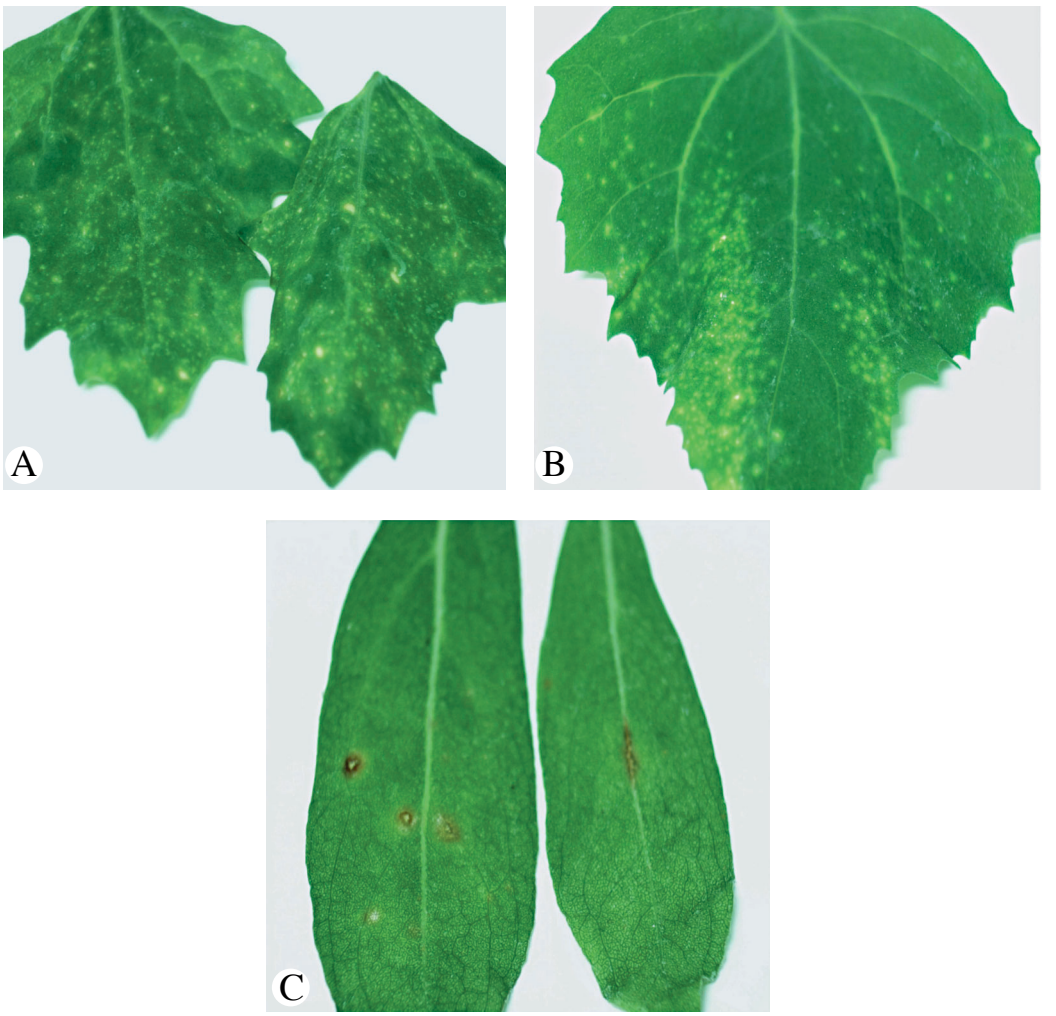
本試驗總共將 EL1 分離株接種於 5 科 8 種不同供試植物，其中共有 2 科 5 種出現病徵，除在雞冠花上有系統性退綠斑點外，其餘皆僅產生局部壞疽病斑 (necrotic spots)。即綠藜、奎藜及紅藜接種葉於第 8 天後出現約 0.3 mm 大小之黃暈斑點。千日紅上則於接種第 15 天後出現約 0.5 mm 褐色病斑 (圖二)。其餘煙草、豌豆、胡瓜等則未出現任何病徵。

病毒純化

如方法所述，純化所得的病毒核蛋白在 260 nm 波長吸收值測得爲 3.04，A260/A280 比值爲 1.025，依 Dijkstra and De Jager [9] 估算病毒收量爲每 100 公克奎藜材料約可純化 4.097 mg 病毒，將病毒汁液回接原寄主紅龍果及判別植物，結果發現與上述寄主反應相同。

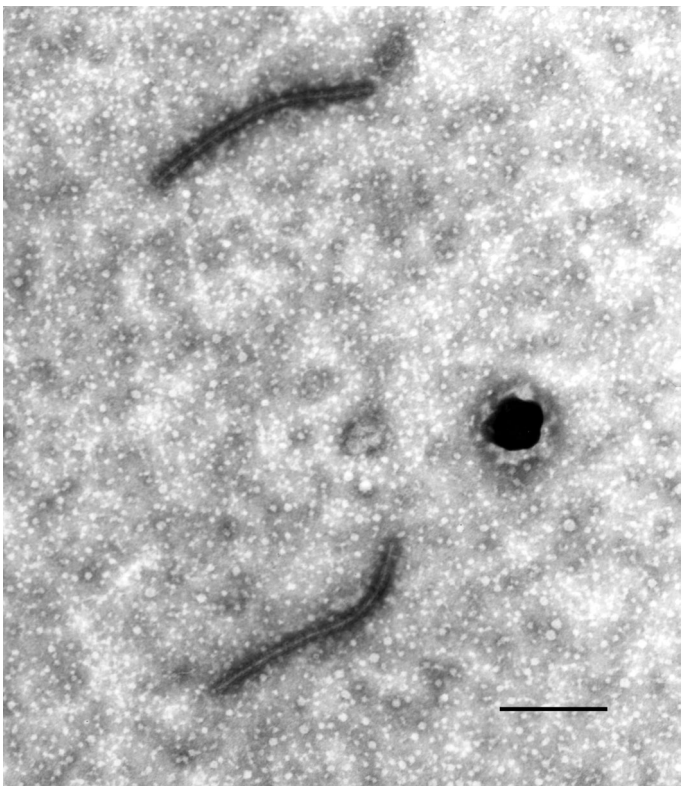
電子顯微鏡觀察

從所接種奎藜病斑組織經 2% PTA 陰染，所觀察到的病毒顆粒大小約 490-510 ×13 nm 長絲狀顆粒 (圖三)。



圖二、仙人掌病毒 X EL1 分離株接種至指示植物所形成之局部病斑：(A) 奎藜，(B) 紅藜，(C) 千日紅。

Fig. 2. Local lesions on indicator plants inoculated with *Cactus virus X*: EL1 isolate (A) on *Chenopodium quinoa*, (B) on *Chenopodium amaranticor*, (C) on *Gomphrena globosa*.



圖三、仙人掌病毒X EL1 分離株之電子顯微照片。
Fig. 3. Virus particles of *Cactus virus X* EL1 isolate observed by electron microscope. (The bar represent 200 nm)

免疫電子顯微鏡觀察

病毒顆粒經抗體吸附反應後，在電子顯微鏡下觀察由於病毒粒子表面抗原及抗體反應，發現病毒顆粒周圍被修飾一層 (decoration) 反應膜(圖四)。

鞘蛋白分子量與西方轉漬反應

將純化的病毒鞘蛋白以 12% SDS 解離，再經膠體電泳分析，並與標記蛋白比對結果，其單一主要次蛋白分子量約爲 30 kDa (圖五A)，且在轉漬於硝化纖維膜後，再與本病毒抗體及來自台大劉瑞芬教授之抗 CVX 血清反應，在 30 kDa 處產生紫色之反應帶 (圖五B)。

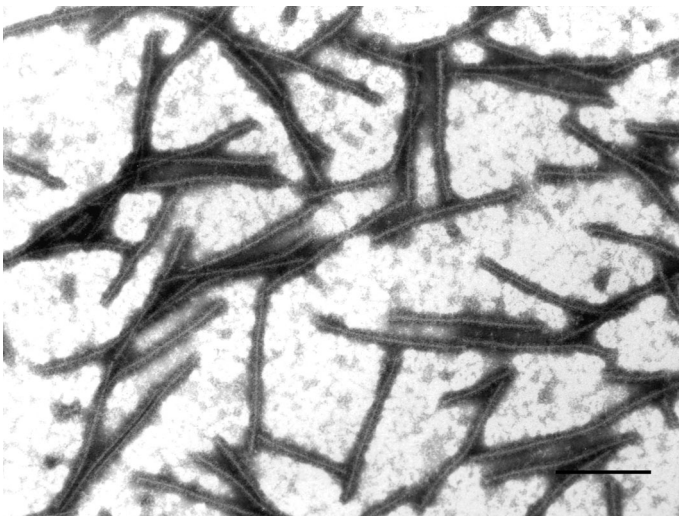
核酸分析

(一) 反轉錄-聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)：

以 CVX-F:5' 及 CVX-R:5' 爲專一引子對，預估可於 RT-PCR 後獲得一約 1.2K bp 之 DNA 產物，結果證實以病毒 RNA 爲模版，獲得一與預估值相符之 DNA 片段 (圖六A)。

(二) 核酸片段選殖和核酸序列分析：

選出可能含有嵌入序列之選殖菌株 3 個，經電泳分析



圖四、仙人掌病毒X EL1 分離株顆粒經同源抗體反應被捕住修飾後，以電子顯微鏡觀察之粒子形態。
Fig. 4. Virions of *Cactus virus X* EL1 isolate trapped and decorated by homologous antibody and observed by electron microscope. (The bar represent 200 nm)

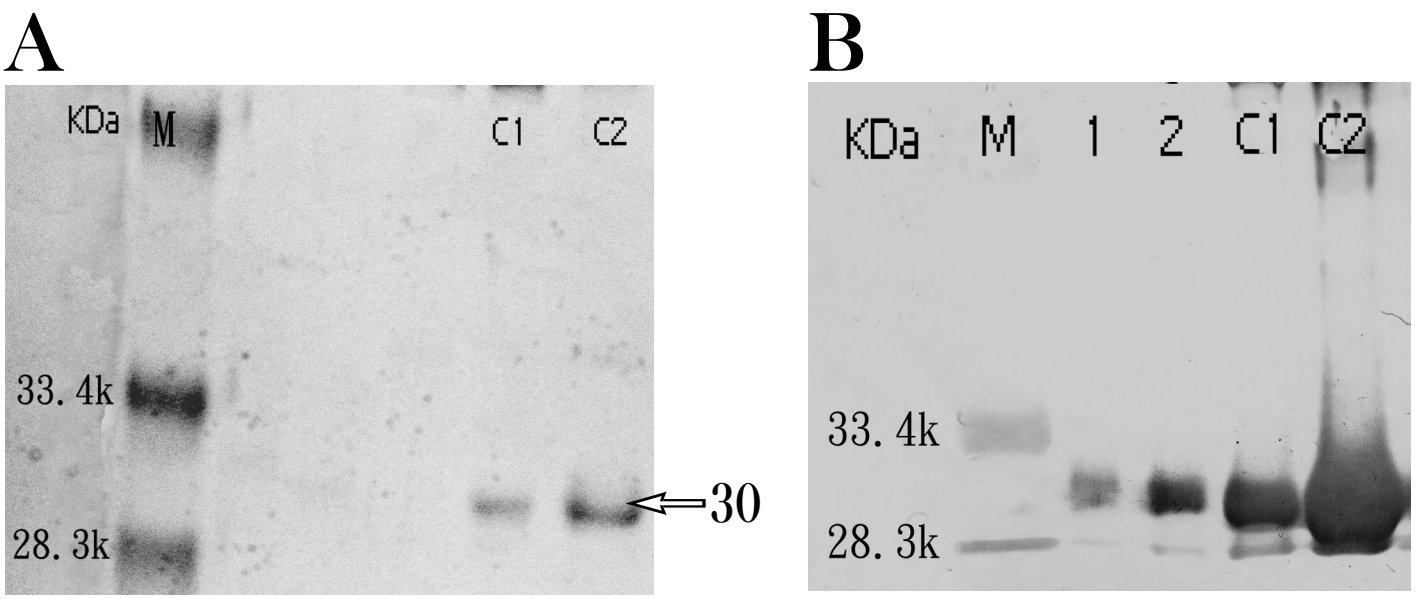
之結果如圖六B 所示。將此序列 (Access No. AY241392) 利用 GCG WISCONSIN PACKAGE 的 Blast 及 FastA 程式，與 GenBank 上已正式登錄之核甘酸序列進行相同性百分率之比對，得知與 *Cactus virus X* (Access No.AF308158, complete genome) 的鞘蛋白基因之核甘酸之相同度高達95.3%，而其胺基酸相似度爲 92.8%，再以其中的核酸、胺基酸序列分析程式 Pileup 及 prettybox 進行差異性之比對(圖七、圖八)，可以顯示出兩者之間在 CP gene 差異之所在，主要在有小一段胺基酸序列不同。

間接法酵素連結免疫分析偵測

經間接法酵素連結免疫測試得知 CVX 所感染紅龍果，造成莖部輕微斑點及斑駁病徵者其 ELISA 讀值最高，壞疽病徵其次，黃化病徵最低 (表一)；然而再以病株上不同部位組織加以測試，結果以新生側芽讀值最高，其次是果肉，果皮(表二)。

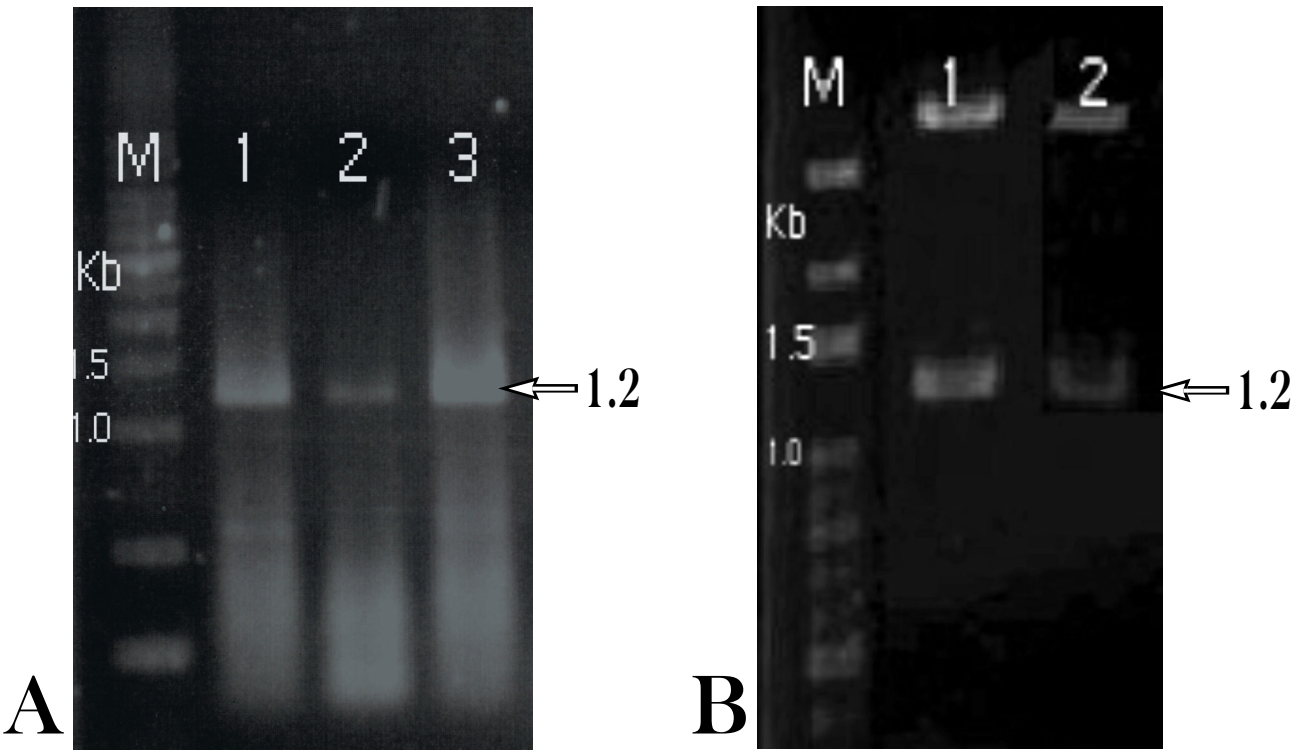
CVX 感染紅龍果的發生調查

採自宜蘭縣、台中縣、南投縣、彰化縣、屏東縣、金門等地區之疑似罹病紅龍果莖部組織爲材料，並經1 比10 稀釋進行間接法酵素連結免疫分析得知，各地區的樣品，皆 100% 感染 CVX 陽性反應出現。若以病徵觀查，金門地區得病率約 50%，其餘地區發病率約 60-70% 之間，而屏東地區之得病率最高在 90% 以上(表三)。



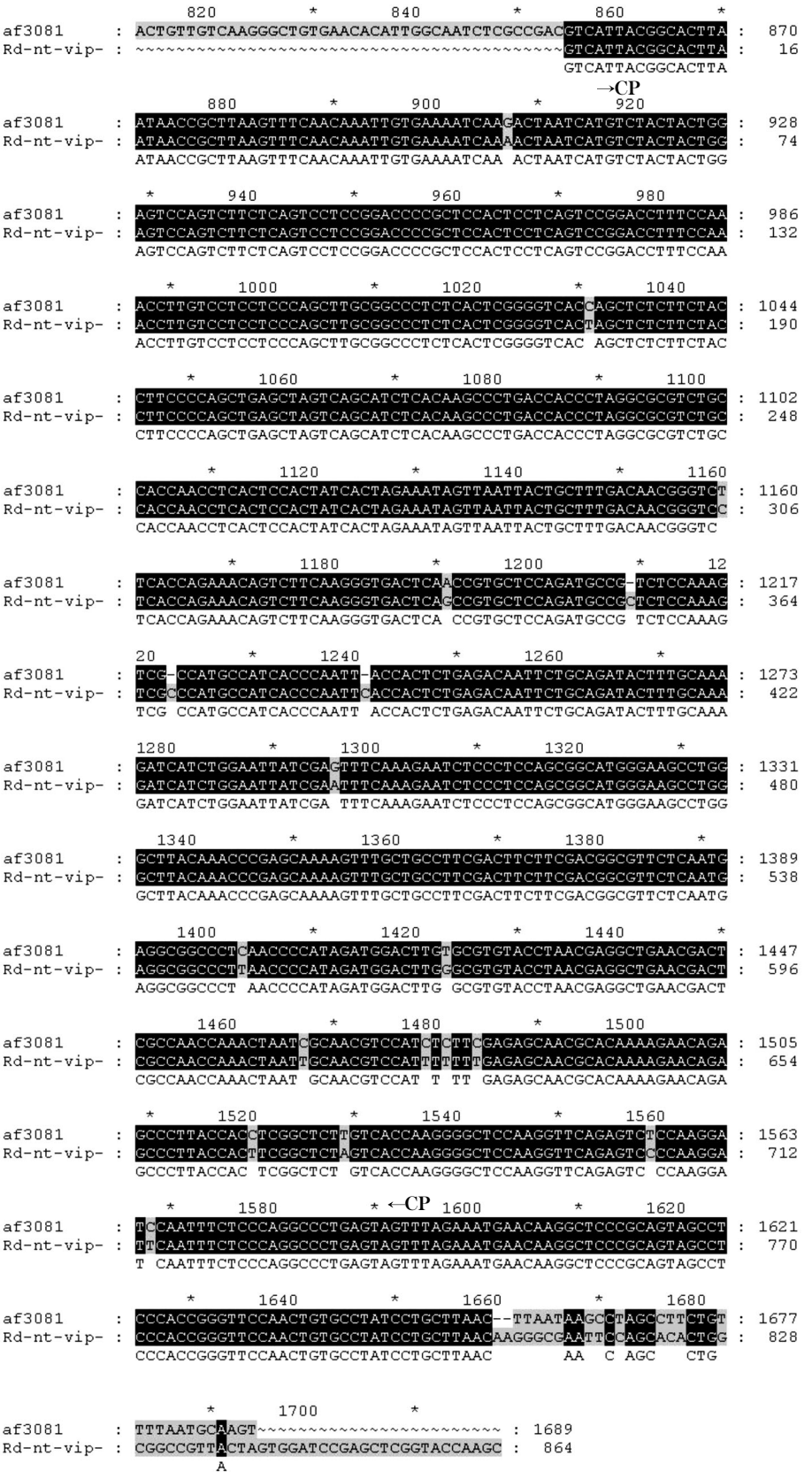
圖五、應用 (A) SDS-PAGE 及 (B) 西方轉漬法分析仙人掌病毒 X (CVX) EL1 分離株鞘蛋白分子量與血清學性質。M：分子量標示蛋白；1 及 2：CVX 感染之紅龍果材料；C1 及 C2：部分純化病毒試料。箭頭所指即病毒鞘蛋白基本單位所在位置。西方轉漬法以同源 CVX 抗體反應。

Fig. 5. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of capsid protein of *Cactus virus X* (CVX) EL1 isolate (A) and Western blotting (B). Line M is standard markers for molecular weights, lines 1 and 2 are CVX infected tissue of pitaya, lines C1 and C2 are partially purified samples of CVX EL1 isolate. The arrow indicates the location of capsid protein subunit. In Western blotting, the homogenous antibody against CVX was used.



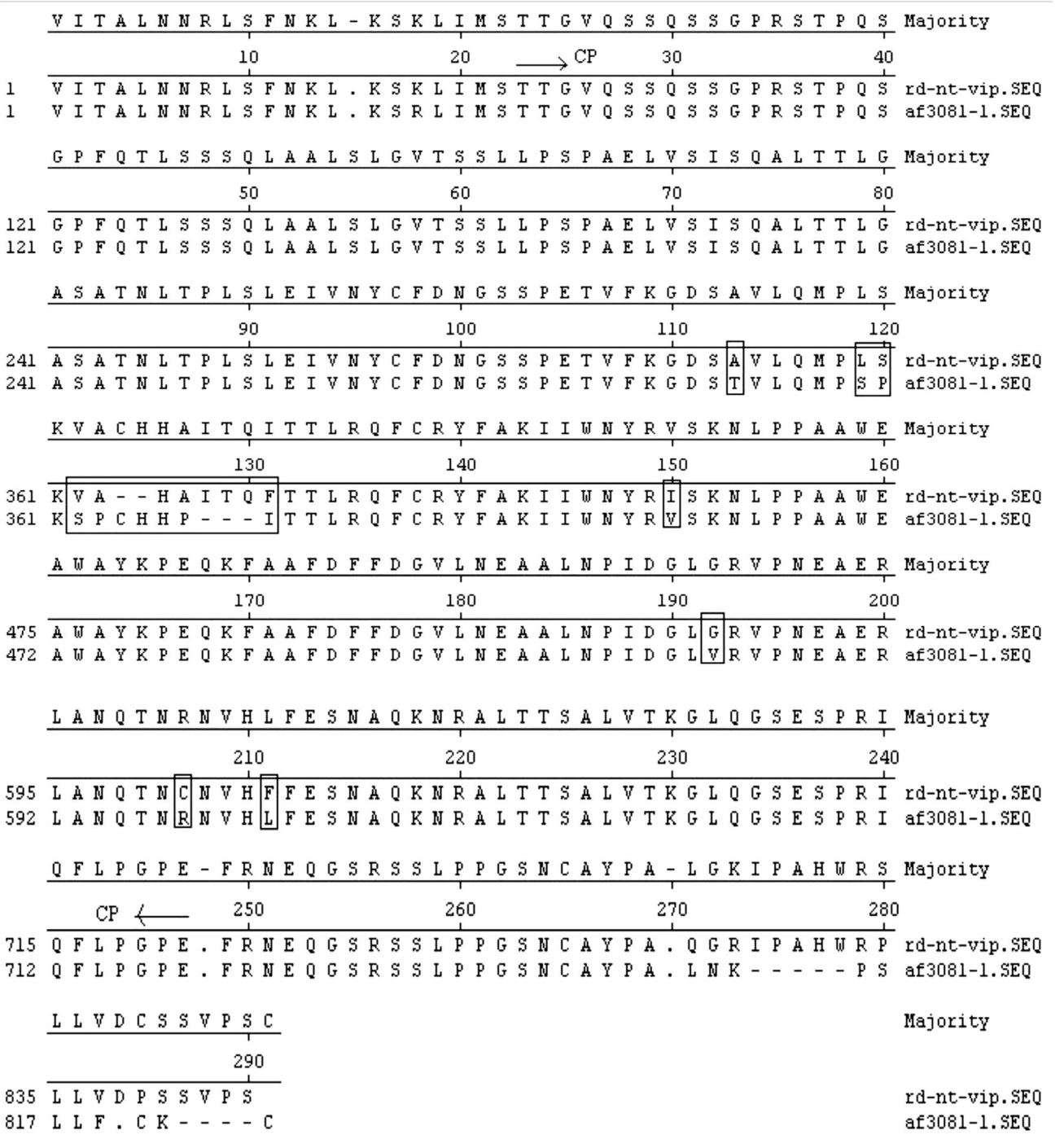
圖六、仙人掌病毒 X EL1 分離株以專一性引子對 (CVX-F, CVX-R) 進行鞘蛋白基因核甘酸序列反轉錄聚合酶鏈鎖反應。(A) 其合成之核酸經電泳分析結果，大小約 1.2 kb (箭頭所指)，1、2 及 3：CVX EL1 分離株感染紅龍果之莖部，(B) 1 及 2 分別爲含有嵌入序列之選殖菌體，經質體純化之電泳分析結果。

Fig. 6. Electrophoreses of nucleic acids of *Cactus virus X* EL1 isolate produced by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using specific primer (CVX-F, CVX-R) for amplification of capsid protein gene: (A) products of CVX capsid protein gene, size about 1.2 kb (arrow indicated), lines 1,2 and 3 are CVX infected stem of pitaya (B) lines 1 and 2 represent products of isolated plasmid of selected colony.



圖七、仙人掌病毒 X EL1 分離株之核甘酸序列與 *Cactus virus X* (accession No. AF308158) 比對之結果。

Fig. 7. Comparison of nucleotide sequence between CVX EL1 isolate infectiong pitaya with CVX sequence obtained from GenBank (accession No.AF308158).



圖八、仙人掌病毒 X EL1 分離株之胺基酸序列與 *Cactus virus X* (accession No.AF308158) 比對之結果。

Fig. 8. The comparison of amino acid sequence between CVX EL1 isolate infecting pitaya and CVX registered with accession No.AF308158.

表二、仙人掌病毒 X 感染紅龍果，在不同部位組織所測得之免疫酵素分析值

Table 2. ELISA values of *Cactus virus X* in different parts of infected pitaya tissues

組織 (Tissue)	ELISA value (Absorbance at 405nm) [1]
peel	0.73
pulp	0.52
shoot	1.24
Health (c.k.)	0.034

[1.] Data are means of 3 replicates.

表三、紅龍果感染仙人掌病毒X，在宜蘭縣、台中縣、南投縣、彰化縣、屏東縣及金門縣之發生率

Table 3. Incidence of *Cactus virus X* infecting pitaya in different counties of Ilan, Taichung, Nantow, Changhua, Pingtung and Chinmen in Taiwan area

地區 (Location)	取樣數 (Sample number)	CVX 發生率 [1] (Incidence)
宜蘭縣 Ilan	90	65.6
台中縣 Taichung	90	68.5
南投縣 Nantow	90	70.0
彰化縣 Changhua	90	73.5
屏東縣 Pingtung	90	91.6
金門縣 Chinmen	90	52.5

[1.] 間接法酵素連結免疫分析
Indirect ELISA

討　論

紅龍果病毒分離株EL1 經寄主範圍測定、電子顯微鏡觀察、免疫電子顯微鏡觀察及電泳分析病毒鞘蛋白、西方轉漬反應及核酸與胺基酸序列比較，可以確定所分離的病毒係 CVX。但根據劉氏之報告 (15,16)，感染臺灣紅龍果的 CVX 之鞘蛋白單一主要次蛋白分子量約爲26 kDa，與本報告中之 30 kDa 略有差異。再經核酸解序比較，本試驗之 CVX 鞘蛋白基因核甘酸與 *Cactus virus X* (Access No. AF308158) 鞘蛋白基因核甘酸之相同度高達95.3%，而其胺基酸相似度爲 92.8%，主要在有一小段胺基酸序列不相同，除此之外兩者應是 CVX 相同病原。

由 CVX 在病組織分佈情形得知，初長出的側芽相對病毒濃度較高，可能由於病毒在肉質多的紅龍果莖部，經由薄壁細胞傳遞至導管距離短，藉由維管束運送至新生組織較快，加上新生組織代謝旺盛，較果皮及果肉上之病毒之增殖快所以濃度高。而在其他不同病徵測得之反應值亦相似，即初期病徵 (退綠斑點或斑駁病徵)，可測到較高的病毒濃度，而在後期病徵 (壞疽及黃化病徵) 則所測到的病毒濃度較低，由此而知將來檢測時這些取樣的因素會影響到CVX 被偵測檢出的正確性。

紅龍果病毒病害係近年來逐年發生的病毒病害 (15,16)，首先是2000 年發生在彰化縣，但早在1982 年陳氏即已報告CVX 感染仙人掌 (2,6)。經我們調查各地紅龍果栽植區，都有發生CVX 疫情，主要是因苗株帶有病毒，經由銷售管道傳播至各地新園，導致疫情蔓延甚至包括金門，造成境內轉出金門的典型病例。然而由於 CVX 的傳播路徑只是機械接觸傳播，如能發展健康種苗，加上田間衛生管理，要防治此病害因無昆蟲媒介存在，所以應無困難。

紅龍果品種保存園中之各個品種並非由種子發育而成之實生苗，係由機械分株，再經扦插繁殖培育而成，生長在相同之環境及相同的農具操作下，有些品種植株內病毒濃度較低，認爲各品種間對CVX 抗性有所差異，也可能其來源即是一株健康母樹。經追蹤調查擴大蒐尋健康母株園，或利用現有這些無病毒反映出現者爲材料隔離栽植，即可發展成健康種苗圃，進而發展健康種苗繁殖體系，逐步更新疫區的紅龍果園，就能避免本病毒的危害，提昇本省紅龍果栽培品質。

謝　辭

本研究承蒙蔡錦惠、蔡惠婷小姐協助試驗工作之進行，謹此表達由衷謝意。

引用文獻

1. 楊文乾. 1998. 奇草藥大圖鑑. 林鬱文化事業有限公司出版. 台北市. 410 pp。
2. 陳脈紀、王雙明. 1982. Cactus virus X, 仙人掌X 病毒. 植保會刊24:283 (摘要)。
3. Attathom. S., Weathers, L. G., and Gumpf, D. J. 1976. Identification and characterization of a potexvirus from California barrel cactus in. Proc. Am. Phytopathol. Soc. 3: 315 (abstract).
4. Attathom. S., Weathers, L. G., and Gumpf, D. J. 1978. A virus-induced disease of barrel cactus in California. Plant Dis. 62: 228.
5. Bercks, R. 1971. Cactus virus X. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No58.
6. Chessin, M., and Lesemann, D. 1972. Distribution of cactus viruses in wild plants. Phytopathology 62:97-99.
7. Christie, S. R., Edwardson, J. R., and Zettler, F. W. 1968. Characterizaton and electron microscopy of a virus isolated from *Bidens* and *Lepidium*. Pl. Dis. Reptr. 52: 763-768.
8. Clark, M. F., and Adams, A. N. 1977. Characteristic of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. J. Gen. Virol. 34: 475-483.
9. Dijkstra, J., and de Jager, C. P. 1998. Practical Plant Virology: Protocols and Exercises. P277-284. Springer-

Verlag Berlin; Heidelberg.
10. Hall, C. E., Jakus, M.A., and Marchant, J. C. 1945. The structure of certain muscle fibrils as revealed by the use of electron stains. J. Appl. Phys. 16:459-465
11. Hall, C. E. 1962. Electron microscopy: principles and application to virus research. In CORBETT and SISLER (1964), P 253.
12. Hartmann, H. T., and Kester, D. E. 1975. Plant propagation: Principles and Practices, 3rd ed. Englewood Cliffs, N. J.:Prentice-Hall.
13. Huang, C. H., Hseu, S. H., and Chao, Y. J. 1986. Purification and serology of an isolate of zucchini yellow mosaic virus. J. of Agri. Res. of China 34: 495-503.
14. Gooderham, K. 1984. Transfer techniques in protein blotting. pp. 165-178. In Methods in Molecular Biology Vol. 1. Protein.
15. Liou, M. R., Chen, Y. R., and Liou, R. F. 2000. Complete nucleotide sequence of Cactus virus X isolated from pitaya. Plant pathol. Bull. 9(4): 200.(abstract)
16. 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(2): 229.(abstract)
17. Milne, R. G., and Luisoni, E. 1977. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. Method Virol 6:265-281.

ABSTRACT

Liao, J. Y. [1], Chang,C. A. [1],Yan, C. R., Chen, Y. C. and Deng, T. C. [1,4] 2003. Detection and incidence of *Cactus virus X* on pitaya in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 12:225-234. ([1.] Department of Plant Pathology Taiwan Agriculture Research Institute, Wufeng, Taiwan, R.O.C., [2.] Department of Horticulture, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung Taiwan, R.O.C., [3.] Kaohsiung District Agricultual Improvement Station, Pingtung, Taiwan, R.O.C., [4.] Corresponding author. E-mail:tcde@wufeng.tari.gov.tw)

Pitaya (*Hylocereus undatus*) plants showing viral symptoms of chlorotic spots, mottling, necrosis and yellowing were found in orchards around Taiwan. From diseased pitaya plant which a virus isolate was obtained through series of single lesion isolation. By host range test, electron microscope observation, immunosorbent electron microscopy, coat protein electrophoresis, Western blotting, and RNA sequencing, the virus was identified as an isolate of *Cactus virus X* (CVX). The virus systemically infected *Celosia argentea* and caused chlorotic spots, but locally infected *Gomphrena globosa*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *C. murale* caused necrotic lesions. Electron microscopy of diseased tissue showed filamentous virus particles with 490-510 × 13 nm. The virus was purified from inoculated leaves of *C. quinoa* by isopycnic centrifugation in cesium sulfate and injected in rabbit for antiserum production. In SDS-PAGE, the virus was found consisting of one species of coat protein subunit and its molecular weight was estimated to be 30 kDa. In SDS-immunodiffusion, indirect ELISA and Western blot, the antiserum was found to specifically with its homologous antigen. Total of 864 nucleotides from the 3'-end region of this virus were sequenced and compared with the Cactus virus X from in GenBank (Access No. AF308158) showing the nucleotide identity index of the whole CP to be 95.3% , and the amino acid similarity index to be 92.8%. Using indirect ELISA to detect the CVX on different tissues of pitaya revealed that virus titers are higher in young shoots or parts with initial symptoms (chlorotic spots and/or mottling) than any other tissues tested. The incidence of CVX occurrence on pitaya orchard was surveyed around the Taiwan area and was found to be above 90% in Pintung , 50% in Kinman and from 60-70% in other areas. To find the CVX-free materials, a census was conducted to examine all the plants preserved in pitaya variety collection orchard located in National Pingtung University of Science and Technology. From this orchard a total of 77 samples were indexed out of which only 20 pitaya plants of 20 varieties were considered to be healthy. All of the healthy plants were separately multiplied for setting up the healthy pitaya seedling propagation system.

Key word: Pitaya, *Cactus virus X*, symptom, indirect ELISA, incidence