

國立臺灣大學生物資源暨農學院

植物病理與微生物學系

碩士論文

Department of Plant Pathology and Microbiology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

兩種仙人掌 X 病毒感染性選殖株之研究與

紅龍果原生質體系統之建立

Study of two *Cactus virus X* infectious clones and
establishment of pitaya protoplast system

張佑瑋

Yu-Wei Chang

指導教授：張雅君 博士

Advisor: Ya-Chun Chang, Ph.D.

中華民國 106 年 6 月

June 2017



國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書



兩種仙人掌 X 病毒感染性選殖株之研究與紅龍果原生
質體系統之建立

Study of two *Cactus virus X* infectious clones and
establishment of pitaya protoplast system

本論文係張佑璋君 (R02633014) 在國立臺灣大學植物病理與微生物學系完成之碩士學位論文，於民國一零六年六月二十三日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

張雅君

(簽名)

(指導教授)

洪挺軒

胡仲祺

系主任、所長

沈偉強

(簽名)

誌謝

到此刻才發現，曾經朝思暮想的誌謝文比論文內的其他任何一個章節都還難下筆。在 403 實驗室的這幾年，從初來乍到的陌生與害怕，到如今一踏進實驗室便是再熟悉不過的安全感，需要銘謝的人事物實在太多。

感謝我的指導教授張雅君老師，在研究上的循循善誘及放手讓我們大膽地嘗試，在生活上溫和寬厚的關心、建議及鼓勵，讓我體認到自己的不足卻仍充滿信心。感謝劉瑞芬老師在分子生物學知識上的傳授及實驗設計上的指導。還要感謝胡仲祺老師與洪挺軒老師，為本論文細心簽正並提供寶貴的意見。

研究所期間，更不能忘記所有共事過的學長姊與學弟妹。儘管生活多充塞大量的實驗失敗與挫折，但還好有你們，把枯燥的時刻調劑出一些趣味。

更重要的是，要將論文獻給我的家人，是他們給予我最毫不保留的支持，讓我知道即便在徬徨無措的時候，永遠有一個溫暖的地方。

最後，相信研究所這段時光中所有的美好跟粗鄙醜陋，在未來回首時，都會是不虛此行的收穫，感謝一切!

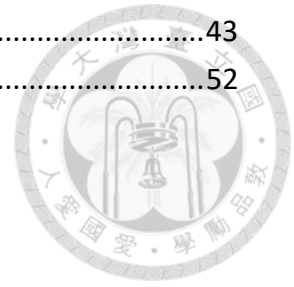


目錄



摘要.....	I
Abstract.....	III
壹、前言.....	1
一、紅龍果.....	1
二、Potexvirus 之基本特性.....	2
三、仙人掌 X 病毒(<i>Cactus virus X</i> , CVX).....	4
四、植物原生質體(protoplast).....	5
五、研究動機.....	7
貳、材料與方法.....	9
一、田間紅龍果受 CVX 感染情形之調查.....	9
二、CVX 感染性選殖株及重組病毒之構築.....	10
三、CVX 全長度選殖株之序列比對及親緣演化分析.....	13
四、35S 啟動子驅動之 CVX 全長度選殖株之感染力分析.....	14
五、西方墨點分析(Western blot analysis).....	14
六、間接型酵素連結抗體免疫吸附分析(indirect enzyme-linked immunosorbent assay, indirect ELISA).....	16
七、生體外轉錄反應(<i>in vitro</i> transcription)製備病毒全長轉錄體.....	16
八、菸草原生質體之製備及轉染.....	19
九、紅龍果原生質體系統之建立.....	21
十、北方墨點分析(Northern blot analysis).....	23
十一、即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (quantitative real-time reverse transcription-PCR, RT-qPCR).....	25
參、結果.....	27
一、田間紅龍果受 CVX 感染情形之調查.....	27
二、CVX 全長度選殖株之序列比對及親緣分析.....	27
三、CVX 全長度選殖株之感染性測試.....	29
四、兩種 CVX 選殖株在菸草原生質體中之 RNA 累積量差異測試.....	30
五、CVX 分離株重組病毒株及之感染性與 RNA 累積量差異測試.....	30
六、CVX-N015 與 CVX-H015 之交互作用.....	32
七、紅龍果原生質體製備之最適化條件測試結果.....	32
八、紅龍果原生質體之培養與病毒轉錄體接種.....	33
肆、討論.....	35
一、CVX-N015 與 CVX-H015 的特性分析.....	35
二、CVX-N015 與 CVX-H015 的交互作用.....	39
三、紅龍果原生質體系統之建立.....	40


伍、參考文獻43
陸、圖表集52



摘要



紅龍果(*Hylocereus* spp.)為臺灣近年新興之熱帶水果，其於田間受三種 *Potexvirus* 屬病毒--仙人掌 X 病毒(*Cactus virus X*, CVX)、紅龍果 X 病毒(*Pitaya virus X*, PiVX)與蟹爪蘭 X 病毒(*Zygocactus virus X*, ZyVX)--單獨或複合感染甚為普遍。其中 CVX 自 2001 年首次報導感染紅龍果以來，國內已發表 CVX-Hu 及 CVX-NTU 兩個全長基因體序列具一定程度差異的分離株。本研究首先設計可區分上述兩個 CVX 分離株之專一性引子對，針對臺東池上、屏東佳冬及萬丹等三處果園進行檢測，發現整體受 CVX 感染比率極高，且植株受 CVX 分離株複合感染率至少達 73%。為了進一步分析兩種 CVX 分離株的分子與感染特性，以及彼此間潛在的交互作用，我們利用採集自臺中霧峰及南投集集之罹病紅龍果枝條，從中選殖並構築出兩個 CVX 感染性選殖株--H015 及 N015，兩者的核酸及胺基酸序列分別與 CVX-Hu、CVX-NTU 有極高相同度，且與其他 *Potexvirus* 屬病毒進行親緣演化樹分析，皆分支於感染仙人掌科植物之一群。將 CVX-N015 與 CVX-H015 分別接種於白藜(*Chenopodium quinoa*)植株，可見感染 CVX-N015 的接種葉會有褪綠黃斑的形成，CVX-H015 則未產生顯著病徵，但以間接型酵素連結抗體免疫吸附分析(indirect enzyme-linked immunosorbent assay, indirect ELISA)接種葉，並未有明顯的病毒累積量差異。進一步於圓葉菸草(*Nicotiana benthamiana*)原生質體接種兩個選殖株的轉錄體，以北方墨點(Northern blot)分析顯示 CVX-N015 的 RNA 累積量遠較 CVX-H015 為佳。為了探究影響兩個選殖株 RNA 累積能力的因子，進一步針對兩者的 RNA 複製酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)及鞘蛋白(coat protein, CP)基因進行置換分析，發現以 CVX-N015 為基礎，置換上 CVX-H015 的 RdRP 或 CP 基因，其在菸草原生質體中的病毒 RNA 累積量皆顯著下降；反之，



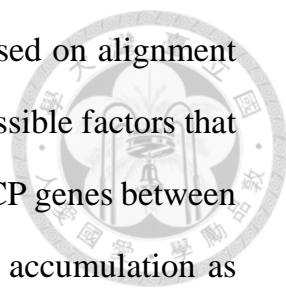
保留 CVX-H015 為骨架而置換 CVX-N015 的 RdRP 或 CP 基因之重組病毒，其病毒 RNA 累積量皆有所上升；顯示兩個選殖株於 RdRP 及 CP 基因的差異，對彼此 RNA 累積能力的不同扮演重要角色。此外，RdRP 似乎是 CVX 選殖株在白藜上產生黃斑病徵的決定因子。針對 RdRP 胺基酸序列進行分析，介於 methyltransferase domain 與 RNA helicase domain 間的非保守序列，其存在 CVX-N015 與 CVX-H015 最主要的差異區塊，可能是造成上述病徵及 RNA 累積差異的重要因子。另外，將兩個選殖株轉錄體共同接種於菸草原生質體，利用即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (quantitative real-time reverse transcription-PCR, RT-qPCR) 分析，發現兩者的 RNA 累積量皆較單獨感染時高，似乎有互惠的效果。最後，本研究亦嘗試建立紅龍果原生質體系統，測試結果顯示同時使用 1% 纖維酶(cellulase)、1% 離析酶(macerzyme)及 1% 蝸牛酶(snailase)，搭配 0.7 M 的甘露醇(mannitol)溶液、甘胺酸(glycine)溶液及蔗糖(sucrose)溶液，可獲得最佳產量。綜合以上成果，期望本研究中對 CVX 分子特性的探討與紅龍果原生質體系統的建立，對於未來紅龍果病毒病害之研究提供有用的資訊與研究平台。

關鍵詞：紅龍果、仙人掌 X 病毒、RdRP 複製酶、原生質體

Abstract



Pitaya (*Hylocereus* spp.), an emerging fruit crop in Taiwan, has been found to be infected singly or mixedly with *Cactus virus X* (CVX), *Pitaya virus X* (PiVX), and *Zygocactus virus X* (ZyVX), all of which belong to the genus *Potexvirus*. In Taiwan, since the first report of CVX infection on pitaya in 2001, there has been two published CVX isolates, Hu and NTU, of which complete genomes had been sequenced and shown to be notably different in nucleotide and amino acid sequences. We developed isolate-specific primer pairs according to genome sequences of the two isolates, and found high incidence of CVX infection in pitaya fields and that mixed infection was common as at least 73% of pitaya samples collected from three orchards in Pintung and Taitung were positive for both isolates. To further investigate the characteristics of CVX isolates and possible interaction between them, we constructed two CVX cDNA infectious clones, H015 and N015, whose level of complete nucleotide sequence identity are about 97-98% with CVX-Hu and CVX-NTU, respectively. Phylogenetic analyses also show that CVX-H015 and -N015 are classified into the cluster of cactus-infecting potexviruses. When *Chenopodium quinoa* plants were mechanically inoculated with the infectious clones, chlorotic spots in the inoculated leaves treated with CVX-N015 were observed; meanwhile, those treated with CVX-H015 appeared no apparent symptom. The inoculated leaves were further analyzed by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) but showed no significant difference in virus accumulation. Moreover, Northern blot revealed much higher viral RNA accumulation of CVX-N015 than that of CVX-H015 by inoculating *Nicotiana benthamiana* protoplasts with viral transcripts. In view of this, we chose RNA-dependent RNA polymerase (RdRP)



and coat protein (CP) genes to perform swapping analyses based on alignment and comparison of amino acid sequences in order to dissect possible factors that affect viral replication. As a result, the differences in RdRP or CP genes between CVX-N015 and CVX-H015 do play vital roles in viral RNA accumulation as RNA accumulation of chimeric CVX-N015 significantly reduced, while increase in RNA accumulation of chimeric CVX-H015 was observed. Besides, the RdRP genes seem to be involved in the determination of chlorotic spot symptom in *C. quinoa*. Additionally, after *N. benthamiana* protoplasts were inoculated with CVX-N015 and/or CVX-H015, mutual benefit in viral RNA accumulation were observed by quantitative real-time reverse transcription-PCR (RT-qPCR). Lastly, we tried to establish a pitaya protoplast preparation system, in which the combination of the enzyme system containing 1% cellulase, 1% macerozyme, and 1% snailase as well as 0.7 M solution of mannitol, glycine, or sucrose was found most effective. As a whole, this research in construction and characterization of CVX infectious clones and pitaya protoplast preparation system is expected to be useful for further study in viral diseases of pitaya.

Keywords: pitaya, *Cactus virus X*, RNA-dependent RNA polymerase, protoplast

壹、前言



一、紅龍果

(一) 簡介

紅龍果為我國新興栽培果樹，泛指仙人掌科(Cactaceae)三角柱屬(*Hylocereus* spp.)或西施仙人掌屬(*Selenicereus* spp.)之多年生、攀緣性肉質植物，其原生於墨西哥與中南美洲的熱帶雨林(劉, 2010)，果實風味特殊且富營養價值(Wu et al., 2006; Wichienchot et al., 2010)，除了作為鮮果食用，亦供天然色素提煉之用，應用於工業或食品加工時使用(Azwanida et al., 2015; Woo et al., 2011)。紅龍果傳入亞洲可追溯至 17 世紀時荷蘭人與法國人於亞洲殖民之故，然直至 19 世紀中晚期法國人殖民越南時引入自花親和性品種，才促成當地將紅龍果視為經濟果樹而大規模栽培之(Mizrahi et al., 1997)，使越南成為現今紅龍果之出口大宗國，時至今日，中南美洲之尼加拉瓜、哥倫比亞及厄瓜多，以及亞洲之中國、菲律賓、緬甸、馬來西亞、泰國、以色列及臺灣等地區，皆投入商業生產紅龍果之行列(Merten, 2003; Nerd et al., 2002)。其中臺灣雖自 1645 年荷蘭殖民時期即有紅龍果引進之記錄，但因其自花不親和性所致，自然產果不易，當時僅多作為觀賞植物栽培；直自 1983 年起從越南及中南美洲引進可自花授粉之品種，其豐碩且富甜度的果實才開啟我國紅龍果果樹栽培的濫觴(劉, 2010)。目前市面上常見果實為紅皮白肉[*H. undatus* (Haworth) Britton & Rose]及紅皮紅肉[*H. polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton&Rose]品種，且隨農民雜交育種的興盛而品系繁多，另有少量黃皮白肉種(*S. megalenthus* Britton & Rose)於市面可見(劉, 2010)。臺灣現今紅龍果主要栽培區位於彰化、屏東及南投等地，據農糧署於民國 103 年的統計，紅龍果種植面積達 1,676 公頃，產量達 38,965 公噸，產值為 27.13 億元，整體規模快速上升，亦寄望拓展外銷市場以提升產值，避免產銷失衡的窘況(余, 2016; 陳等, 2016)。

(二) 台灣常見紅龍果病害

關於紅龍果田間病害的報導，主要以真菌與病毒病原危害較普遍。常見真菌病害多可於莖條或果實觀察得明顯之病徵或病兆，最終直接影響產果效率或使果實失去商品價值，如 *Neoscytalidium dimidiatum* 造成的莖潰瘍病(Chuang et al., 2012)，*Rhizopus stolonifera* 造成的濕腐病(葉等, 2016)，*Colletotrichum* spp. 所致的炭疽病(蔡等, 2013)，及眾多病原如 *Bipolaris cactivora*, *Phomopsis* spp.、*Alternaria alternata*、*Penicillium citrinum*、*Lasiodiplodia theobromae*、*Fusarium* spp. 及 *Colletotrichum* spp. 造成的果腐病(蔡等, 2013)。而已知病毒病害則由三種 potexvirus --仙人掌 X 病毒(*Cactus virus X*, CVX) (呂, 2007; Liou et al., 2001)、紅龍果 X 病毒(*Pitaya virus X*, PiVX) (毛, 2008; 李, 2010) 及蟹爪蘭 X 病毒(*Zygocactus virus X*, ZyVX) (毛, 2008)--所危害。根據前人調查顯示，台灣田間紅龍果受單一病毒感染或複合感染甚為普遍，此可能因田間多採無性扦插的方式繁殖，若使用帶毒母株進行栽種，伴隨生長期間枝桠修剪頻繁，便使植株大規模的受害(郭, 2015)。受感染植株雖不致快速死亡，且看似不會造成嚴重的經濟損失，但對果實的影響仍有待評估(劉, 2010)。此外，臺灣另有仙人掌胞囊線蟲(*Cactodera cacti*) 感染紅龍果之報導，但於寄主地上部未觀察得病徵(詹, 2012)。而在墨西哥與馬來西亞則皆曾報導由 *Enterobacter* spp. 造成的細菌性軟腐病，但在臺灣尚未有正式報導(Masyahit et al., 2009; Valencia-Botín et al., 2013)。

二、Potexvirus 之基本特性

Potexvirus 為 Alphaflexiviridae 科下之一屬，目前共 35 種，以馬鈴薯 X 病毒 (*Potato virus X*, PVX) 為模式種。病毒體呈彎曲絲狀，長度介於 470-580 nm，直徑介於 11-15 nm (Verchot-Lubicz & Baulcombe, 2011)。基因體為正意單股 RNA，大小約 5.9-7 kb，其 5' 端具備端帽(cap)構造，3' 端則具有多腺核苷酸尾(poly-A tail) (Adams et al., 2004)。基因體上帶有五個典型的開放閱讀框(open reading frame, ORF)。ORF1 編碼 150-181 kDa 的蛋白，為與基因體複製相關的複製酶(replicase)，

其上含 N-terminal methyltransferase domain、NTP binding/helicase-like domain 與 C-terminal RNA-dependent RNA (RdRP) polymerase 三個保守功能區塊(Batten et al., 2003)。ORF2-4 合稱三重疊基因區(triple gene block, TGB)，依序編碼出蛋白 TGB1-3，TGB1 及 TGB2 是以次基因體的形式表現，另以核糖體漏掃描(leaky scanning)的方式表現 TGB3，三種蛋白為病毒於細胞間轉移相關之移動蛋白(Park et al., 2014)。其中帶有典型 NTPase/helicase domain 的 TGB1，在某些 potexvirus 中被認為具有抑制植物抵抗病毒感染的 RNA 靜默(RNA silencing)之功能(Aguilar et al., 2015; Verchot-Lubicz, 2005)。ORF5 則同樣以次基因體的形式表現出 18-27 kDa 的外鞘蛋白(coat protein, CP)，除了包被基因體 RNA 形成病毒體外，亦與 TGB 蛋白共同參與於植物細胞間的移動作用(Park et al., 2014; Verchot-Lubicz, 2005)。

有關 potexvirus 基因體複製的機制，已知複製酶自病毒進入宿主細胞脫鞘後即直接自正股 RNA 基因體被轉譯產生，複製酶、病毒基因體及宿主蛋白結合形成複製複合物(viral replication complex, VRC)，負責負股基因體的產生，並以負股基因體為模板進行正股基因體的大量複製及次基因體(subgenome)的大量產生(Batten et al., 2003)。而有關 potexvirus 於寄主細胞間移動的分子機制，奠基於 PVX 的相關研究已發現病毒會形成核糖核蛋白複合物[ribonucleoprotein (RNP) complex]，其形式有兩種，一種為病毒 RNA 先行被 CP 部分包被，而 TGB1 再與 5' 部分包被處結合(TGB1-CP-vRNA) (Lough et al., 2000)；另一種為 TGB1 直接與完整病毒體結合(TGB1-virion) (Santa Cruz et al., 1998)。此外，TGB2 及 TGB3 座落於內質網上，兩者與 VRC 在內質網靠近原生質絲(plasmodesmata)處結合形成“cap”構造，當 RNP 複合物於“cap”處形成時，由 TGB1 引領將其帶入原生質絲通道中(Park et al., 2014)。



三、仙人掌X病毒(*Cactus virus X*, CVX)

(一) 簡介

CVX最早是由德國學者Amelunxen於單刺仙人掌(*Opuntia monacantha*)發現而提出，病毒體長約520 nm、寬13 nm， CVX現今分布範圍可能已廣布世界各地的栽培仙人掌(Zhang et al., 2016)，主要藉機械接種傳播，無媒介昆蟲或種子傳播的報導。CVX寄主範圍涵蓋許多仙人掌科植物，包括仙人掌屬 (*Opuntia* spp.)、圓筒仙人掌屬(*Austrocylindropuntia* spp.)、葉仙人掌屬(*Pereskia* spp.)、蟹爪蘭屬(*Schlumbergera* spp.)、強刺屬(*Ferocactus* spp.)、鹿角掌屬(*Echinocereus* spp.)、曇花屬(*Epiphyllum* spp.)、仙人柱屬(*Cereus* spp.)、大棱柱屬(*Echinopsis* spp.)、巨人柱屬(*Carnegiea* spp.)及三角柱屬(*Hylocereus* spp.)，但多無造成明顯之病徵(Milbrath, 1971)；惟於受CVX感染的強刺球仙人掌(*F. acanthodes*)觀察得刺座扭曲、畸形刺、壞疽及系統性嵌紋之病徵。此外，將純化之病毒接種於尾穗莧(*Amaranthus caudatus*)，可於表皮細胞見得紡錘狀內含體(Attathom et al., 1978)。

(二) CVX感染紅龍果之研究報導

有關CVX感染紅龍果之研究，由劉氏等人於新竹關西的白肉紅龍果枝條觀察得黃綠相間的斑駁病徵，以疑似罹病組織之汁液接種於紅藜(*Chenopodium amaranticolor*)產生之局部性壞疽病斑行三次單斑分離，得到病毒分離株Hu；將其回接至紅龍果實生苗可見相似之斑駁病徵，接種於白藜(*C. quinoa*)則會造成局部性黃斑病徵；另輔以電子顯微鏡觀察病毒外型與血清學方法測試下，證實分離株Hu為CVX，此也是紅龍果的首次病毒病害報導(劉等, 2004; Liou et al., 2001)。隨後利用分段式選殖策略針對CVX-Hu進行全長度核酸定序，結果顯示基因體長約6.6 kb，且組成符合potexvirus之特性(Liou et al., 2004)。而後廖氏等人(2003)針對臺灣各地的紅龍果進行調查，發現疑似病毒病害之病徵甚為常見，病徵大致包括斑駁、褪綠斑點、壞疽及黃化等四種；自出現斑駁病徵之枝條分離出一個CVX分離株EL1，其與CVX-Hu的鞘蛋白核酸與胺基酸序列相同度達95.3%與92.8%。

利用對應於CVX-EL1的專一性抗體對宜蘭、台中、南投、彰化、屏東、金門等地紅龍果樣品進行間接式酵素連結免疫分析(indirect ELISA)，發現CVX最低發生率者為金門的52.5%，而最高發生率的地區為屏東的91.6% (廖等, 2003)。爾後本實驗室於2007年發表之CVX分離株NTU，在千日紅(*Gomphrena globosa*)葉片形成壞疽紅斑及葉片捲曲，並於紅藜與白藜葉片上造成褪綠斑點，此病徵不僅與CVX-Hu有差異，經全長度核酸定序亦發現兩者RNA複製酶與鞘蛋白胺基酸序列相同度僅85%與86%，因此推論NTU可能是CVX的一個新系統(strain) (呂, 2007)。而除了臺灣，其它地區亦陸續有CVX感染紅龍果的報導。於南韓濟州島的白肉紅龍果分離出之CVX分離株dragonfruit，其在紅藜與白藜葉片上會形成黃斑及壞疽病徵，在千日紅葉片上則形成帶紅色邊緣的壞疽病斑，經全長度核酸定序發現CVX-dragonfruit與CVX-Hu存在高度同源性(Kim et al., 2016)。另外，於中國海南島之出現黃暈或黃斑病徵的紅肉紅龍果枝條中，以針對TGB3至CP區域之CVX專一性引子進行偵測，並將擴增出之條帶進行選殖與定序，得到兩個選殖株，其與CVX-Hu的核酸序列相同度皆為97%，與CVX-dragonfruit的CP胺基酸序列相同度為97.1%與99.1%，唯獨與CVX-NTU存在較低同源性(Peng et al., 2016)。

四、植物原生質體(protoplast)

過去研究植物病毒的增殖情形時，若採用寄主植株作為實驗系統，往往面臨數個阻礙，一來難以確切定量實際接種的植物細胞數，二來難以確保欲接種的組織部位之細胞皆受到同步感染(synchronous infection)，三來後續分析時難以排除病毒細胞間移動的影響(Aoki & Takebe, 1969; Rao, 2007)。雖有前人嘗試以癒傷組織培養而來之懸浮細胞進行病毒接種，然懸浮培養期間存在的細胞聚集之情況，仍難以免除病毒胞間移動對結果之干擾(Aoki & Takebe, 1969)。然而，若採用植物原生質體作為實驗系統，則不受前述限制影響(Rao, 2007)。自首次報導利用真菌纖維素酶從番茄根尖組織分離出原生質體(Cocking, 1960)，及前人首次利用菸草(*Nicotiana tabacum* var. Bright Yellow)葉肉原生質體接種Tobacco mosaic virus

(TMV)核酸以來(Aoki & Takebe, 1969)，許多不同單子葉及雙子葉植物之特定組織的原生質體製備系統已被建立，因原生質體可能具有的分化全能性(totipotency)及體細胞變異(somaclonal variation)，原生質體不僅是研究植物病原或其與寄主植物相互作用的良好工具，更被應用於植物生理、遺傳等研究範疇，提供作物育種、性狀改良一個有效平台，相關技術如原生質體融合(protoplast fusion)或其轉殖作用(transfection)已為現今廣泛利用(Davey et al., 2005)。

製備原生質體最為普遍的方法為酵素分解法，因應植物初生細胞壁中含量豐富的纖維素(cellulose)、半纖維素(hemicellulose)及果膠(pectin) (Cosgrove, 2005)，一般多使用纖維素酶(cellulase)輔以果膠酶(pectinase) (Davey et al., 2005)。將酵素溶於含有合適滲壓劑(osmoticum)的溶劑，而目前最廣為使用的滲壓劑為甘露醇(mannitol)，因其無法被植物代謝利用而分解(Evans & Bravo, 1983)。使用的植物材料可能為植株的部分組織或由癒傷組織所得之懸浮細胞。其中許多因子都可能影響原生質體的分離效率與存活率，如作用溫度及時間、酵素濃度、溶液pH值及滲透壓、震盪處理與否以及是否預先質膜分離(plasmolysis)處理(Davey et al., 2005)。另外亦有機械性分離原生質體的方式，然此類的方式多限於細胞較大之生物，及對原生質體產量要求不高時使用，如浸泡於海水中的羽藻(*Bryopsis plumosa*)組織經擠壓後釋出原生質體，經10-30分鐘的靜置後，可進一步蒐集匯聚的原生質體(Zhou et al., 2003)。而Binder等人(2003)則針對囊狀法囊藻(*Valonia utricularis*) 短暫風乾使其細胞質膜分離，再以剪刀分割組織並小心擠壓之，使原生質體流出；且有趣的是，作者發現以此法或以酵素分解法所得者之原生質體膜電壓不同，顯示分離方法對膜上離子通道特性可能具有影響。

然而，有許多與大多數高等植物細胞壁組成不盡相同的物種，以仙人掌植物為例，豐富的黏質物(mucilage)是仙人掌科植物的顯著特徵，其由許多不同醣類經由支鏈連結而成，形成分子龐大且組成複雜的纖維狀多醣(fibrous polysaccharide) (Gibson & Nobel, 1990)。有關仙人掌科植物之原生質體製備的報導甚少，且尚未見得直接採用植物組織行原生質體分離的方法。Seeni及Gnanam

(1980)以小仙人鞭(*Echinopsis chamaecereus*, 原*Chamaecereus sylvestrii*)之葉、子葉及下胚軸之癒傷組織所培養而得之懸浮細胞, 利用2%纖維素酶及0.5%離析酶(macerozyme)分離出原生質體, 但並未進行後續培養或使其再生為正常細胞。而Llamoca-Zárate等人(2004)使用刺梨(*Opuntia ficus-indica* cv. Gigante)為材料, 同樣以實生苗子葉進行組織培養得癒傷組織, 以其再行懸浮細胞培養, 搭配1%纖維素酶及0.5%果膠酶分離得原生質體並成功培養之, 觀察得細胞分裂及細胞壁回復之現象。然而, 以同樣富含多醣而具黏性的藻類而言, 其在分解細胞壁的酵素選擇上則有所不同。以製備微藻類(microalga)原生質體為例, 裂殖壺菌(*Schizochytrium* sp.)、渦鞭毛藻(*Symbiodinium microadriaticum*)及小球藻(*Chlorella vulgaris*)皆有以纖維素酶與蝸牛酶(snailase)分解細胞壁之報導(Cheng et al., 2012; Chen et al., 2017; Lou et al., 2016); 另外, Lu等人(2012)則針對另一種小球藻(*Chlorella protothecoides*)測試不同酵素搭配對原生質體分離的效果, 發現以2%纖維素酶搭配1%蝸牛酶可得最高原生質體產量, 次佳者為單獨使用1%蝸牛酶處理, 且效果皆遠較2%纖維素酶合併使用1%果膠酶或1%離析酶為佳。而自大型藻類分離原生質體的報導中, Gupta等人(2011)發現合併使用纖維素酶、離析酶、洋菜酶(agarase)及果膠酶較其他形式的酵素組合自龍鬚菜(*Gracilaria dura* J. Agardh與*G. verrucosa* Papenfuss)得到較高產量的原生質體。Wakabayashi等人(1999)從以海藻為食的染斑海鹿(*Aplysia Juliana*)的口腔腺體及中腸腺體萃取酵素, 以之與市售纖維素酶自裙帶菜(*Undaria pinnatifida*)、荒布(*Eisenia bicyclis*)、小海帶(*Endarachne binghamiae*)及孔石蓴(*Ulva pertusa*)分離出原生質體。

五、研究動機

前人研究顯示臺灣田間紅龍果受CVX感染甚為普遍, 且存在CVX-Hu及CVX-NTU兩種核酸序列有相當程度差異的分離株, 因此我們以兩分離株的專一性引子對搭配磁性奈米粒子捕捉反轉錄聚合酶鏈鎖反應(MNC RT-PCR), 對台東池上、屏東佳冬及萬丹三處紅龍果園進行田間檢測, 發現樣品受CVX感染率甚高,

且受兩分離株複合感染亦普遍。然而，在缺乏感染性選殖株的前提下，難以針對CVX分離株之感染特性及分子特性行深入探究，因此本研究嘗試自受CVX感染的紅龍果枝條建構出序列相似於CVX-Hu及CVX-NTU的感染性選殖株，分析其感染性、引起的病徵，並於圓葉菸草(*Nicotiana benthamiana*)原生質體比較病毒RNA累積量差異及兩個選殖株潛在的交互作用。另一方面，本研究利用紅龍果實生苗為材料，寄望建立紅龍果原生質體的製備方法，提供研究紅龍果病毒病害一個奠基於田間天然寄主的實驗系統。

貳、材料與方法



一、田間紅龍果受 CVX 感染情形之調查

(一) 採樣

由本實驗室同仁於民國 103 年在台東池上、屏東佳冬及萬丹共三處紅肉種紅龍果果園採集樣本，每個果園皆逢機採樣 30 個肉質莖樣品供後續檢測分析。

(二) 磁性奈米粒子反轉錄聚合酶鏈鎖反應(magnetic nanoparticle capture reverse transcription polymerase chain reaction, MNC RT-PCR)

切取 0.03 g 的紅龍果肉質莖組織搭配 1.5 mL GE buffer [10 mM sodium sulfite、2% polyvinyl pyrrolidone (PVP)、0.2% powdered egg albumin (grade II)、2% Tween-20 於 1× PBST (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₄、2 mM KH₂PO₄ 及 0.05% Tween-20, pH 7.4) 中] 進行研磨，將研磨所得汁液移至 1.5 mL 微量離心管內，以 13,000 rpm 離心(Heraeus™ Pico™ 17 Microcentrifuge, Thermo Scientific, Osterode, Germany) 5 分鐘，取其 100 μL 上清液加入已含有 5 μL TANBead® USPIO-102 磁性奈米粒子(Taiwan Advanced Nanotech, Taiwan)的 0.2 mL PCR 反應管中，室溫下震盪 30 分鐘，將 PCR 反應管固定於磁座上以使 MNP 被集中吸附於管壁上，吸除管內液體後加入 10 μL 的反應溶液，內含 0.5 μM CVX-NTU-R2 引子及 0.5 μM CVX-Hu-R3 引子(表一)，於 96°C 下作用 5 分鐘，置於冰上 5 分鐘，以磁座吸附 MNP，保留管內澄清液體供後續反轉錄反應時使用。

反轉錄反應中，在 10 μL 的反應體積裡內含 5 μL 的前述反應液體；1× AMV Reverse Transcriptase Reaction Buffer；0.5 mM dNTPs；0.8 U/μL RNasin ribonuclease inhibitor (Promega, Madison, WI, USA)；0.4 U/μL AMV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)，在 42°C 下作用 60 分鐘。

PCR 反應中，在 20 μL 的反應總體積中，內含 2 μL 已完成之前述反轉錄反

應物；1× Optimized DyNAzyme buffer；0.4 mM dNTPs；0.2 μM 引子對 CVX-NTU-F2/CVX-NTU-R2(表一)；0.3 μM 引子對 CVX-Hu-F2/CVX-Hu-R3(表一)；0.04 U/μL DyNAzyme II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, LT, USA)，PCR 之進行於熱循環反應儀(T-Gradient, Biometra, Goettingen, Germany)中，設定反應程序為 94°C 下變性 2 分鐘；之後進行 30 個 PCR 循環反應：94°C 下變性 30 秒鐘，54°C 下鍊合 30 秒鐘，72°C 聚合 20 秒鐘，最後以 72°C 聚合反應 10 分鐘。PCR 產物以 1.5% 瓊脂膠體電泳分析，膠體經溴化乙錠(ethidium bromide, EtBr)染色後，利用 BioDoc-It System Bio-imaging System 照膠器(UVP, Upland, CA, USA)觀察結果並紀錄影像，預計擴增出的 CVX-NTU 及 CVX-Hu 專一性條帶大小分別為 500 bp 及 289 bp。

二、CVX 感染性選殖株及重組病毒之構築

(一) 建構以 35S 啟動子驅動之全長度 CVX cDNA 選殖株

本研究使用採集自南投集集的紅龍果枝條為材料，先利用 CVX 分離株專一性引子對測試，僅擴增出對應為 NTU 之 500 bp 條帶的前提下，以此材料採用兩階段式選殖策略(two-step cloning)進行全長度選殖株之建構。首先利用套組 Plant Total RNA Extraction Miniprep System (Viogene, Sunnyvale, CA, USA)萃取植物總體 RNA，遵循 SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)的使用說明，搭配引子 NTU-dT-R(表一)進行反轉錄反應，以合成第一股 cDNA。第一階段的選殖中，以前述 cDNA 作為 PCR 的模板，使用 Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)搭配引子對 Farm-F/Farm-R4 及 Farm-F5/NTU-dT-R(表一)進行擴增，PCR 之進行皆於熱循環反應儀中，設定反應程序為 98°C 下變性 1 分鐘；之後進行 35 個 PCR 循環反應：98°C 下變性 10 秒鐘，56°C 下鍊合 30 秒鐘，72°C 聚合 1 分 15 秒鐘；最後以 72°C 聚合反應 10 分鐘，預計皆擴增出約 4.6 kb 的 CVX 病毒 5'端及 3'端核酸片段。PCR 擴增子(amplicon)經 1% 瓊脂膠體電泳分析後，以 QIAEX® II Gel Extraction


Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)純化目標 DNA。將由 p35S-GFP (Clontech, Palo Alto, CA, USA)改造而來之 p35S-D20 載體以 *StuI* 與 *SmaI* 進行限制酶截切，再以 antarctic phosphatase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)處理，以此載體與經 T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)處理的 CVX 5'端片段進行平頭式接合，篩選其 5'端及 3'端分別朝 *StuI* 及 *SmaI* 切口接合的質體，得到 p35S-CVX-N-5'；3'端片段以 *BamHI* 作用及 T4 polynucleotide kinase 處理後，與已經過 *StuI* 與 *BamHI* 限制酶截切的 p35S-D20 載體進行定位接合，得到 p35S-CVX-N-3'。第二階段的選殖中，p35S-CVX-N-5'及 p35S-CVX-N-3'皆以兩者帶有的單一切位 *SbfI* 與 *HpaI* 截切，回收 p35S-CVX-N-3'被截切後約 7.4 kb 的 DNA 片段(涵蓋 NOS)作為載體，並回收 p35S-CVX-N-5'被截切後約 3 kb 的 DNA 片段(涵蓋 35S 啟動子)，以之與載體接合，得到以 35S 啟動子驅動之 CVX 全長度 cDNA 選植株；經核酸定序分析後，命名為 CVX-N015(圖一 a)。

另一方面，使用霧峰農試所提供的紅龍果枝條為材料，當利用兩種 CVX 分離株專一性引子對檢測時，僅擴增出對應為 Hu 之 289 bp 條帶的前提下，同樣採用兩階段式選殖策略進行選植株的構築。以同前述的套組及試劑萃取植物總體 RNA 及進行 RT-PCR，唯合成第一股 cDNA 時所搭配之引子為 CVX-Hu-dT-R(表一)，並且採用引子對 CVX-F/CVX-R2 及 CVX-F2/CVX-Hu-dT-R(表一)進行 PCR，反應條件如下：98°C 下變性 1 分鐘；之後進行 35 個 PCR 循環反應：98°C 下變性 10 秒鐘，56°C 下鍊合 30 秒鐘，72°C 聚合 1 分鐘；最後以 72°C 聚合反應 10 分鐘，分別擴增出約 3.5 kb 的 5'端片段及 4.2 kb 的 3'端片段。純化目標 DNA 後，將經過 *StuI* 與 *SmaI* 限制酶截切的 p35S-D20 載體以 antarctic phosphatase 處理，以此載體與經 T4 polynucleotide kinase 處理過的 5'端片段進行平頭式接合，篩選其 5'端及 3'端分別朝 *StuI* 及 *SmaI* 切口接合的質體，得到 p35S-CVX-H-5'；3'端片段以 *XmaI* 作用及 T4 polynucleotide kinase 處理後，與經 *StuI* 與 *XmaI* 限制酶截切的 p35S-D20 載體進行定位接合，得到 p35S-CVX-H-3'，完成以上步驟第一階段的選殖。第二階段的選殖中，p35S-CVX-H-5'及 p35S-CVX-H-3'皆以 *SacII* 與

EcoRV 截切，回收 p35S-CVX-H-3' 被截切後約 7.5 kb 的 DNA 片段(涵蓋 NOS)作為載體，並回收 p35S-CVX-H-5' 被截切後約 2.9 kb 的 DNA 片段(涵蓋 35S 啟動子)，以之與載體接合，得到另一個以 35S 啟動子驅動之 CVX 全長度 cDNA 選殖株；經核酸定序分析後，命名為 CVX-H015(圖一 b)。

(二) 建構以 35S 啟動子驅動之 CVX 重組病毒(chimeric virus)

選擇 RdRP 與 CP 兩個轉譯架構(open reading frame, ORF)作為 CVX 兩個分離株的置換目標，以建構重組病毒。利用 Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase 進行以下的 PCR 反應，使用質體 p35S-CVX-N015 與 p35S-CVX-H015 為模板，分別搭配引子對 NH015-RdRP-F/N015-RdRP-R 與 NH015-RdRP-F/H015-RdRP-R(表一)，反應條件如下：98°C 下變性 1 分鐘；之後進行 30 個 PCR 循環反應：98°C 下變性 10 秒鐘，56°C 下鍊合 30 秒鐘，72°C 聚合 1 分 15 秒鐘；最後以 72°C 聚合反應 10 分鐘，預計皆擴增出約 4.6 kb、帶有完整 RdRP 轉譯架構擴增子；載體的製備中，使用質體 p35S-CVX-N015 與 p35S-CVX-H015 為模板，分別搭配引子對 inverseN-RdRP-F/inverseN-RdRP-R 與 inverseH-RdRP-F/inverseH-RdRP-R(表一)，反應條件如下：98°C 下變性 1 分鐘；之後進行 30 個 PCR 循環反應：98°C 下變性 10 秒鐘，54°C 下鍊合 30 秒鐘，72°C 聚合 1 分 30 秒鐘；最後以 72°C 聚合反應 10 分鐘，預計皆擴增出約 5.8 kb 的 DNA 片段；其中涵蓋 N015 或 H015 序列者，分別作為與前述擴增出 H015 RdRP 及 N015 RdRP 轉譯架構的 PCR 產物接合的載體。將上述所有 PCR 產物經 1% 瓊脂膠體電泳分析後回收目標 DNA，載體以 antarctic phosphatase 處理，各 DNA 插入子(insert)則以 T4 polynucleotide kinase 處理，將各載體與對應的目標插入子進行平頭式接合，篩選 RdRP 轉譯架構接合方向正確之質體，得到以 35S 啟動子驅動之重組病毒--以 N015 為骨架、置換上 H015 RdRP 轉譯架構的 p35S-CVX-N015-HRdRP，以及以 H015 為骨架、置換上 N015 RdRP 轉譯架構的 p35S-CVX-H015-NRdRP(圖二)。所得之選殖株皆經定序確認核酸序列正確無誤。



帶有重組 CP 基因的 CVX 之建構，同樣使用質體 p35S-CVX-N015 與 p35S-CVX-H015 為模板，分別搭配引子對 N015-CP-F/N015-CP-R2 與 H015-CP-F/H015-CP-R2(表一)，反應條件如下：98°C 下變性 1 分鐘；之後進行 30 個 PCR 循環反應：98°C 下變性 10 秒鐘，56°C 下鍊合 30 秒鐘，72°C 聚合 15 秒鐘；最後以 72°C 聚合反應 10 分鐘，預計皆擴增出約 0.7 kb 帶有完整 CP 轉譯架構之擴增子。載體的製備中，使用質體 p35S-CVX-N015 與 p35S-CVX-H015 為模板，分別搭配引子對 inverseN-CP-F/inverseN-CP-R 與 inverseH-CP-F/inverseH-CP-R(表一)，反應條件如下：98°C 下變性 1 分鐘；之後進行 30 個 PCR 循環反應：98°C 下變性 10 秒鐘，56°C 下鍊合 30 秒鐘，72°C 聚合 2 分 30 秒鐘；最後以 72°C 聚合反應 10 分鐘，預計皆擴增出約 9.8 kb 的 DNA 片段；其中涵蓋 N015 或 H015 序列者，分別作為與前述擴增出 H015 CP 及 N015 CP 轉譯架構的 PCR 產物接合的載體。將上述 PCR 產物經 1% 瓊脂膠體電泳分析後回收目標 DNA，載體以 antarctic phosphatase 處理，各 DNA 插入子則以 T4 polynucleotide kinase 處理，將各載體與對應的目標插入子進行平頭式接合，篩選 CP 轉譯架構正確的接合方向之質體，得到以 35S 啟動子驅動之重組病毒--以 N015 為骨架、置換上 H015 CP 轉譯架構的 p35S-CVX-N015-HCP，以及以 H015 為骨架、置換上 N015 CP 轉譯架構的 p35S-CVX-H015-NCP(圖二)。所得之選殖株皆經定序確認核酸序列正確無誤。

三、CVX 全長度選殖株之序列比對及親緣演化分析

將 CVX-N015 及 CVX-H015 定序完成之結果，以 Vector-NTI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)預測基因體上之轉譯架構，並與其它已知 CVX 分離株之全長度序列以 BioEdit (Hall, 1999)之 optimal global alignment 進行兩兩序列比對，比較序列相同度(identity)。針對從核酸序列推測得之 ORF 胺基酸序列，利用 InterPro (Hunter et al., 2011)資料庫進行 domain 分析。而親緣演化之分析，是利用 ClustalW (Thompson et al., 1994)預設之突變矩陣 BLOSUM (blocks substitution matrix)，將 CVX 分離株的 RdRP、TGB1、TGB2、TGB3 及 CP 五個轉譯架構之胺基酸序列

與 GenBank 資料庫上其它的 potexvirus 進行多序列比對，再以 MEGA6 (Tamura et al., 2013)之 Neighbor-joining (NJ)法，利用拔靴法(bootstrap method)進行 1,000 次的重複計算以評估各樹狀圖的統計支持度。



四、35S 啟動子驅動之 CVX 全長度選殖株之感染力分析

(一) 供試植物之栽培

將泥炭土(Bas van Buuren, Maasland, Holland)及根基旺 3 號(根基旺綠化園藝，台北市，臺灣)以 10 目篩網過濾後，以等比例混合作為播種介質；將白藜 (*Chenopodium quinoa*)種子播撒於其上並維持介質濕潤，約 4-5 天後，將子葉展開的幼苗移植到 3 吋黑色軟盆中，使用的栽培介質同樣為等比例混合的泥炭土與根基旺，澆水保持介質濕潤；每週施用液體肥料 Jack's Fertilizer 20-20-20 (JR Peters, Allentown, PA, USA)兩次，生長期間之環境溫度為 26°C，每日光照時數 16 小時，光強度約為 3000 Lux。

(二) 於白藜植株接種 CVX 全長度選殖株

選用 4-5 週大、長出約十片本葉的白藜植株，選擇頂部完全展開的三片葉片為接種葉，拭除葉表蠟質並灑上適量的 400 目金鋼砂。將 35S 啟動子驅動之感染性質體調整為 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，取其以指腹輕抹過全葉葉表，每葉約接種 10 μg 。將接種完畢之白藜置於同植株栽培的環境下，觀察病徵變化並進行後續分析。

五、西方墨點分析(Western blot analysis)

十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)之膠體配置方法如下：將已經 75% 酒精擦拭後之鋁片、玻璃片與間隔條組裝成穩固之鑄膠卡匣，於其中注入 12.5% 分離膠體 (separating gel) [0.375 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 12.5% acrylamide, 0.3% bisacrylamide, 0.1% tetramethylethylenediamine (TEMED) 及 0.1% ammonium

persulfate (APS)]，利用 95% 酒精壓平膠體上緣，待膠體凝固後除去酒精，注入 5% 集膠膠體(stacking gel) [0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS, 5% acrylamide, 0.1% bisacrylamide, 0.1% TEMED 及 0.16% APS]，插上齒梳後待其凝固。

切取植物組織並秤重，在研鉢中以液態氮磨碎，加入兩倍重量體積的 GUS buffer (10 mM EDTA、0.1% Triton X-100、10 mM β -mercaptoethanol、0.1% SDS、24 mM NaH_2PO_4 及 54 mM Na_2HPO_4)，待其液化後移至 1.5 mL 微量離心管中，4°C 下以 12,000 rpm 離心(Z 216 MK, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany) 10 分鐘；取適量上清液與 4× sample buffer [200 mM Tris-HCl (pH 6.8)、8% SDS、40% glycerol、4% β -mercaptoethanol、50 mM EDTA 及 0.08% bromophenol blue]混合，置於 96°C 下加熱 10 分鐘；另取 5 μL Prestained Protein Ladder (Bioman, Taipei, Taiwan)，一同進行 SDS-PAGE，使用 Mighty Small SE250 電泳槽(Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA)，以 15 V、400 mA 進行電泳至追蹤染劑達合適位置。

完成電泳的膠體經移除集膠膠體後，將其移至 CAPS buffer [10 mM N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid (CAPS)、0.05% dithiothreitol (DTT)及 10% methanol]中，室溫下浸泡 10 分鐘，隨後進行轉漬。首先備齊與膠體同等面積大小的 0.45 μm Immobilon[®]-P PVDF Membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)與 3 mm 濾紙，前者經甲醇破除疏水性後與後者皆以 CAPS buffer 保持濕潤，接著依序以濾紙、PVDF、膠體、濾紙的順序緊密堆疊，利用 Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell 半乾式電泳轉漬槽(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)，以 15 V、400 mA 作用 30 分鐘。將轉漬完成的 PVDF 移到 5% skim milk 中，室溫下震盪處理 1 小時，接著將浸泡溶液置換成以 1% skim milk 進行 1,000 倍稀釋的 CVX 抗血清(劉等, 2004)，37°C 下震盪處理 1 小時，之後以 PBST 於室溫下漂洗三次，每次 15 分鐘，接著將浸泡溶液置換成以 1% skim milk 進行 10,000 倍稀釋的 goat anti-rabbit IgG/HRP (ICN/Cappel, Aurora, OH, USA)，37°C 下震盪處理 1 小時，反應完成後再次重複前述 PBST 漂洗的步驟。最後將 PVDF 放置透明塑膠膜中，加入適

量的冷光試劑 Immobilon® Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Bedford, MA, USA), 立即以底片 (Super RX-N, FUJIFILM, Tokyo, Japan) 接收訊號, 經沖洗底片後分析結果。



六、間接型酵素連結抗體免疫吸附分析(indirect enzyme-linked immunosorbent assay, indirect ELISA)

秤取待測的植物組織, 將其置於研鉢中, 加入 15 倍重量體積的 coating buffer (15 mM Na₂CO₃ 及 35 mM NaHCO₃, pH 9.6) 進行研磨, 取 1.5 mL 研磨均勻之汁液到 1.5 mL 微量離心管中, 以 10,000 g 離心 3 分鐘, 取其 100 μL 上清液加入微量 96 孔盤中, 每個樣品進行三重複處理, 置於 37°C 下 1 小時, 以進行抗原的吸附作用。反應完成後加入 150 μL 的 PBST, 反覆清洗九次, 接著加入 100 μL blocking solution (2% skim milk 於 1X PBST 中), 置於 37°C 下 1 小時以進行封閉作用。重複前述以 PBST 清洗的步驟後, 加入 100 μL 以 ECI buffer [2% PVP-40、0.2% bovine serum albumin (BSA) 於 1X PBST 中] 配置 1,000 倍稀釋的 CVX 抗血清, 置於 37°C 下作用 1 小時, 重複以 PBST 清洗的步驟, 加入 100 μL 以 ECI buffer 進行 10,000 倍稀釋的 AP-conjugated goat anti-rabbit antibody (QED Bioscience, San Diego, CA, USA), 置於 37°C 下作用 1 小時。重複以 PBST 清洗的步驟後, 加入 150 μL 以 p-nitrophenyl phosphate (pNPP) buffer (9.7% diethanolamine 及 0.5 mM MgCl₂, pH 9.8) 溶解 pNPP (Amresco, Solon, Ohio, USA) 終濃度為 1 mg/mL 的基質溶液, 避光處理等待反應, 每 15 分鐘利用酵素免疫分析儀 (Spectra MAX 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 偵測波長 405 nm 下之吸光值。

七、生體外轉錄反應(*in vitro* transcription)製備病毒全長轉錄體

(一) 建構以 T7 啟動子驅動之 CVX 及其重組病毒選殖株

使用質體 p35S-CVX-N015、p35S-CVX-H015、p35S-CVX-N015-HRdRP、

p35S-CVX-N015-HCP、p35S-CVX-H015-NRdRP 及 p35S-CVX-H015-NCP 為模板，分別依序搭配引子對 T7-Farm-F/NTU-dT-R、T7-CVX-F/CVX-Hu-dT-R、T7-Farm-F/NTU-dT-R、T7-Farm-F/NTU-dT-R、T7-CVX-F/NTU-dT-R 及 T7-CVX-F/NTU-dT-R(表一)，使用 Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase 進行 PCR，反應條件如下，98°C 下變性 1 分鐘；之後進行 35 個 PCR 循環反應：98°C 下變性 10 秒鐘，56°C 下鍊合 30 秒鐘，72°C 聚合 1 分 45 秒鐘；最後以 72°C 聚合反應 10 分鐘。擴增出 5'端含有 T7 啟動子且涵蓋病毒全長序列約 6.8 kb 的 DNA 片段。經 1% 瓊脂膠體電泳分析後，以 QIAEX[®] Gel Extraction Kit 回收目標核酸，其中涵蓋 N015、N015-HRdRP 或 N015-HCP 序列的 DNA 片段以 *Bam*HI 截切；涵蓋 H015、H015-NRdRP 或 H015-NCP 序列的 DNA 片段則以 T4 polynucleotide kinase 處理。載體的製備中，pUC119 以 *Bam*HI 截切後，以 antarctic phosphatase 處理，以之作為與帶有 N015、N015-HRdRP 或 N015-HCP 序列的 DNA 片段接合的載體；pUC119 以 *Sma*I 截切後，以 antarctic phosphatase 處理，以之作為與帶有 H015、H015-NRdRP 或 H015-NCP 序列的 DNA 片段接合的載體。完成各載體與對應插入子的接合反應，得到以 T7 啟動子驅動之 CVX cDNA 全長選殖株--pT7-CVX-N015、pT7-CVX-H015、pT7-CVX-N015-HRdRP、pT7-CVX-N015-HCP、pT7-CVX-H015-NRdRP 及 pT7-CVX-H015-NCP。各質體皆經核酸定序確認序列無誤。

(二) 質體直線化

利用 *Bam*HI 對質體 pT7-CVX-N015、pT7-CVX-N015-HRdRP、pT7-CVX-N015-HCP、pT7-CVX-H015-NRdRP 及 pT7-CVX-H015-NCP 進行截切；質體 pT7-CVX-H015 則以 *Xma*I 截切。待限制酶切割反應完成後，利用二氧化矽核酸純化法 (silicon dioxide matrix protocol) (Li et al., 2010) 回收已直線化的質體 DNA，方法如下：在 DNA 溶液中加入三倍體積的 6 M NaI 以及適量的 10% SiO₂ (10 μL/μg DNA)，混合均勻後置於室溫下 5 分鐘，以 13,000 rpm 離心 (Heraeus™ Pico™ 17 Microcentrifuge) 30 秒，去除上清液；加入 500 μL wash buffer [50% ethanol、10

mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl 及 1 mM EDTA]並混合均勻，以 13,000 rpm 離心 30 秒，去除上清液；再次重複加入緩衝液之清洗與離心步驟，去除上清液後，置於室溫下 5-10 分鐘風乾沉澱物；加入適量的 DEPC-ddH₂O 懸浮沉澱物，置於 65°C 下 5 分鐘，最後以 13,000 rpm 離心 2 分鐘，收集上清液；內含純化後之直線化質體，供後續生體外轉錄反應時使用。

(三) 生體外轉錄反應

反應溶液中內含 40 ng/μL 已直線化的質體 DNA；1× T7 RNA polymerase reaction buffer；5 mM DTT；0.25 mM m7G(5')ppp(5')G RNA cap structure analog (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)；各 1 mM 的 ATP、CTP 與 UTP；0.1 mM GTP；0.8 U/μL RNasin[®] ribonuclease inhibitor (Promega, Madison, WI, USA)；2 U/μL T7 RNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)，於 37°C 下作用 15 分鐘，接著將 GTP 濃度提高至 1 mM，在 37°C 下作用 90 分鐘。

(四) 轉錄體之純化與定量

生體外轉錄反應完成後，在其中加入 0.2 U/μL 的 DNase I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)，37°C 下作用 15 分鐘以去除 DNA 模板。反應完成後，利用 ddH₂O 調整反應物總體積至 100 μL，加入 100 μL 的 PCI [50% phenol (pH 7.9), 48% chloroform 及 2% isoamyl alcohol]，震盪混勻溶液，以 14,000 rpm 於 4°C 下離心(Z 216 MK) 5 分鐘，分離位在上層之水層溶液並保存。加入等體積之 DEPC-ddH₂O 至剩餘之交界層及有機層溶液進行反萃取，震盪混合液體後，以 12,000 rpm 於 4°C 下離心 3 分鐘，保留上層之水溶液。收集上述兩次離心步驟後所得之上層液，加入等體積之 CI (96% chloroform 及 4% isoamyl alcohol)，震盪混勻溶液，以 14,000 rpm 於室溫下離心 5 分鐘，分離出上層液；加入 0.1 倍體積之 3 M NaOAc (pH 5.2) 及 2.5 倍體積之絕對酒精，置於 -20°C 下作用以沉澱 RNA。隔日待 RNA 沉澱完成，以 14,000 rpm 於 4°C 下離心 10 分鐘，除去上清液；加

入 500 μ L 70% 酒精，以 14,000 rpm 於 4°C 下離心 5 分鐘，除去上清液後風乾 RNA 沉澱物，最後以適量 ddH₂O 回溶之。純化後的轉錄體利用超微量分光光度計(NanoDrop 1000 spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)測量濃度。

八、菸草原生質體之製備及轉染


(一) 供試植物之栽培

將圓葉菸草(*Nicotiana benthamiana*)種子播撒於經 10 目篩網過濾的泥炭土上，等待約十天，期間維持土壤濕潤，之後將子葉展開的幼苗移植到 3 吋黑色軟盆中，使用的栽培介質組成比例為泥炭土：根基旺=2：1，澆水保持介質濕潤，每週施用液體肥料 Jack's Fertilizer 20-20-20 兩次，生長期間之環境溫度為 26°C，每日光照時數 16 小時，光強度約為 3000 Lux。

(二) 菸草原生質體之製備

採用約 5-6 週大且經黑暗處理兩天的菸草植株為材料，秤取葉片 8 公克後將其浸泡於 2% Clorox[®] Liquid Bleach (Clorox Co., Oakland, CA, USA)進行表面消毒 2 分鐘，以 ddH₂O 漂洗三次，接著以擦手紙吸乾葉片表面殘餘之水分。利用解剖刀片將葉片中肋剔除後一分為二，堆疊其中一半的葉片，縱切後再次堆疊，並以每 2 mm 進行橫切，接著將所得之兩份處理好的葉片組織各自移至一培養皿中，每皿培養皿中皆加入以 0.22 μ m Millex[®] GP Syringe Driven Filter Unit (Millipore, Billerica, MA, USA) 過濾之 12.5 mL digestion solution [1.2% 纖維素酶 (cellulase“Onozuka” R-10) (Yakult Pharmaceutical, Tokyo, Japan)、0.06% 離析酶 (macerozyme R-10) (Yakult Pharmaceutical, Tokyo, Japan)及 0.1% BSA 於 0.55 M mannitol-0.1% 4-Morpholineethanesulfonic acid (MES) (pH 5.7)中]，置於 25°C 下，避光反應 16 小時。

待前述反應完成後，將兩培養皿內容物以 150 目尼龍膜過濾，平均分裝至四



支 12 cm × 1.5 cm 玻璃試管中，在離心機中(Model 2010, Kubota, Tokyo, Japan)以 300 rpm 離心 7 分鐘。除去上清液後，於每管緩慢加入 2 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES，輕拍試管懸浮底部的原生質體，再次以 300 rpm 離心 5 分鐘後除去上清液，加入 2 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES 後懸浮原生質體；將吸取有 0.55 M sucrose 的玻璃滴管伸至試管底部，使其緩慢釋出並聚積於底部直至 0.55 M sucrose 與 0.55 M mannitol-0.1% MES 約為等體積，以 300 rpm 離心 5 分鐘，吸取位於交界層之原生質體至一乾淨的玻璃試管內；加入 5 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES 混合均勻，以 300 rpm 離心 5 分鐘，除去上清液，加入 2 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES 混合均勻，再以 300 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液；最後將各管原生質體懸浮於 1 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES 並集中於同一試管內。

(三) 菸草原生質體活性測試及定量

以丙酮(acetone)溶解二乙酸螢光素酯(fluorescein diacetate, FDA) (Sigma, St. Louis, MO, USA)粉末的終濃度為 0.5 mg/mL，取其 20 倍稀釋於前述原生質體懸浮液中，在 Leica DMLB 螢光顯微鏡(Leica, Wetzlar, Germany)下輔以 A 濾鏡組(帶通波長 340-380 nm，低通波長 425 nm)觀察細胞活性，利用血球計數器(Marienfeld GmbH, Marienfeld, Germany)計算原生質體產量。

(四) 接種病毒轉錄體於菸草原生質體

取用約 4×10^5 顆原生質體至一管 7.5 cm × 1 cm 玻璃試管內，以轉速 300 rpm 離心 5 分鐘，除去上清液，餘約 80 μ L 的溶液體積，加入製備好之病毒轉錄體，輕拍混勻內容物；接著加入 150 μ L PEG solution [40% polyethylene glycol (PEG)-1450、0.5% MES 及 3 mM CaCl_2]，穩定以每秒輕拍 2 下試管的速率、共拍擊 40 下，使溶液混合均勻。接著立即加入 500 μ L 0.55 M mannitol-0.1% MES，在 20 秒中輕拍試管 40 下，再次重複此加入 0.55 M mannitol-0.1% MES 及混勻液體的步驟兩次，之後將試管插置於冰上 10 分鐘；然後以轉速 300 rpm 離心 5 分鐘，除

去上清液，加入 2 mL 0.55 M mannitol-0.1% MES 混勻清洗，以轉速 300 rpm 離心 5 分鐘後除去上清液，懸浮原生質體於 750 μ L culture medium (13.2 mM CaCl_2 、0.16 μ M CuSO_4 、1 μ M KI、2 mM MgSO_4 、0.2 mM KH_2PO_4 、1 mM KNO_3 、10 ppm gentamicin sulfate 於 0.55 M mannitol-0.1% MES 中) (Rao, 2007) 中；以石蠟膜封口，置於 25°C 的光照環境下培養。

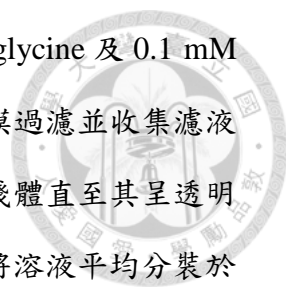
九、紅龍果原生質體系統之建立

(一) 供試植物之栽培

選用白肉紅龍果(*Hylocereus undatus*)實生苗作為試驗材料，種子的來源為市售紅龍果果實，將果肉磨碎後收集種子，包覆其於紗布內，於水中反覆搓揉以去除殘餘之果肉，將種子風乾後置於 4°C 保存。將由泥炭土與根基旺等比例混合而成的栽培介質裝填於 4 吋黑色軟盆中，每盆播撒 20 顆種子，並維持介質濕潤。自播種起三週後每週施用液體肥料 Jack's Fertilizer 20-20-20 兩次，生長期間之環境溫度為 26°C，每日光照時數 16 小時，光強度約為 3000 Lux。

(二) 紅龍果原生質體之分離與純化

三種市售的細胞壁分解酵素--纖維素酶"Onozuka" R-10、離析酶 R-10 及蝸牛酶(金田，福建，中國)--被用以配置 pitaya digestion solution，透過不同酵素之組合測試分離原生質體最佳之酵素條件。紅龍果原生質體的分離方式如下：選取約 12 週大小之紅龍果實生苗，自莖基部截取共 10 公克之植物組織，將其浸泡於 2% Clorox[®] Liquid Bleach 進行表面消毒 2 分鐘，再以 ddH₂O 漂洗三次，接著以擦手紙吸乾植株表面之水分。以解剖刀片沿實生苗縱切剖半，再以每 2 mm 進行橫切。將每 5 公克處理好的植物組織移到一皿培養皿中，加入以 0.22 μ m Millex[®] GP Syringe Driven Filter Unit 過濾之 15 mL pitaya digestion solution [1% 細胞壁分解酵素、0.1% BSA、0.1 mM CaCl_2 於 0.7 M mannitol-0.1% MES (pH 5.7) 中](表十四)。各處理置於 25°C 下，避光反應 16 小時。



取一個 500 mL 燒杯加入約 50 mL washing medium (0.7 M glycine 及 0.1 mM CaCl₂)，待原生質體分離反應完成後，將內容物以 150 目尼龍膜過濾並收集濾液於前述燒杯中，過濾過程中以 washing medium 小心沖洗植物殘體直至其呈透明狀，最後持續加入 washing medium 至濾液總體積達 300 mL。將溶液平均分裝於 6 隻 50 mL Falcon™ 離心管(Thermo Fisher Scientific, Chicago, IL, USA) 中，以 300 rpm 離心(Model Z383K, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany) 8 分鐘，除去上清液後，再次加入 washing medium 至溶液體積達 50 mL 並混勻；如此反覆清洗及離心，直至溶液不再有黏稠狀物質。離心後將大部分上清液移除，留下約 3 mL 的液體，將底部的原生質體輕拍懸浮，收集每三管的原生質體懸浮液至一 12 cm × 1.5 cm 玻璃試管內，以 300 rpm 離心 5 分鐘後除去上清液，緩緩加入 2 mL 0.7 M mannitol-0.1% MES，輕拍懸浮原生質體；再以玻璃滴管吸取 0.7 M sucrose 伸到試管底部使其緩慢釋出約 2 mL，以 300 rpm 離心 5 分鐘，此時會在交界處形成綠色條帶；以滴管吸取位於交界層之原生質體至一乾淨的玻璃試管內，加入 5 mL 0.7 M mannitol-0.1% MES 混合均勻，以 300 rpm 離心 5 分鐘，移除上清液；再次加入 2 mL 0.7 M mannitol-0.1% MES，與管底的原生質體混合均勻，以 300 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液；最後將各管原生質體懸浮於 1 mL 0.7 M mannitol-0.1% MES 並集中於一試管內。

(三) 最佳化紅龍果原生質體之分離條件

為了挑選出分離紅龍果原生質體時最佳的溶液滲透壓，針對前述溶液中的 mannitol、glycine 及 sucrose 的濃度，配製成 0.4 M、0.5 M、0.6 M、0.7 M 及 0.8 M，搭配共同使用之纖維素酶、離析酶及蝸牛酶，以進行滲透壓測試。

(四) 紅龍果原生質體活性測試及定量

方法同菸草原生質體之活性測試及定量，另以 N2.1 濾鏡組 (帶通波長 515-560 nm，低通波長 590 nm) 觀察細胞葉綠體。於顯微鏡下觀察得之影像以單眼相

機(EOS 550D, Canon, Tokyo, Japan)紀錄。



(五) 接種病毒轉錄體於紅龍果原生質體

方法同菸草原生質體之接種及培養。

十、北方墨點分析(Northern blot analysis)

(一) DNA 探針之製備

以 p35S-CVX-N015 或 p35S-CVX-H015 為模板，利用 PCR 製備專一性辨識兩種分離株 CP 之 digoxigenin (DIG)標定探針。在 50 μ L 的反應總體積中，內含 5 ng 模板 DNA；1 \times Optimized DyNAzyme buffer；1 \times PCR DIG-11-dUTP labeling mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)；0.5 μ M 正反向引子對；0.02 U/ μ L DyNAzyme II DNA Polymerase。其中製備 CVX-N015 CP 探針使用之引子對為 N015-CP-F/N015-CP-R(表一)，其黏合至病毒基因體的位置分別為 5837-5856 nt 與 6277-6296 nt；製備 CVX-H015 CP 探針使用之引子對為 H015-CP-F/H015-CP-R(表一)，其黏合至病毒基因體的位置分別為 5837-5860 nt 與 6279-6296 nt。PCR 之反應程序為 94 $^{\circ}$ C 下變性 2 分鐘；之後進行 30 個 PCR 循環反應：94 $^{\circ}$ C 下變性 1 分鐘，55 $^{\circ}$ C 下鍊合 30 秒鐘，72 $^{\circ}$ C 聚合 20 秒鐘，最後以 72 $^{\circ}$ C 聚合反應 10 分鐘。PCR 產物以 1% 瓊脂膠體電泳分析確認無誤後，取適量分裝並置於-20 $^{\circ}$ C 下保存。

(二) 北方墨點法

取適量的 RNA 樣品與 2 \times RNA loading dye (95% formamide、0.025% SDS、0.025% bromophenol blue、0.025% xylene cyanol FF 及 0.5 mM EDTA)混合，於 70 $^{\circ}$ C 下加熱 10 分鐘，隨後立刻置於冰上降溫。接著以 1% 瓊脂膠體/1 \times TAE 進行電泳分析，完成的膠體利用毛細管轉移法進行轉漬作用，方法如下：取一器皿裝盛適量的 20 \times SSC buffer (Amresco, Solon, OH, USA)，上方橫置玻璃板，將作為

鹽橋的長條濾紙以 20× SSC buffer 潤濕後鋪於玻璃板上，並維持濾紙兩端浸於 20× SSC buffer 中；接著將膠體正面朝下置於鹽橋上，再依序疊上與膠體等面積大小之 HybondTM-N⁺尼龍膜(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)與兩張濾紙(尼龍膜需先以 ddH₂O 去除疏水性後，連同濾紙皆以 20× SSC buffer 保持濕潤)，確認各層間緊密堆疊、無氣泡後疊上擦手紙，最後壓上重物，並以保鮮膜阻絕底部 20× SSC buffer 之水分自容器或鹽橋直接蒸發到四周環境中，於室溫下靜置 12-16 小時。

將轉漬完成的尼龍膜以 2× SSC buffer 潤洗，趁其濕潤時以核酸交聯固定設備(UV-Stratalinker[®] 1800, Stratagene, La Jolla, CA, USA)進行紫外光鏈結反應(crosslinking)；完成後以 ddH₂O 潤洗尼龍膜，並置於室溫下略為風乾，將之移至裝有 hybridization solution [50% formamide、5× SSC、0.1% N-lauroylsarcosine、0.02% SDS 及 2% blocking reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)] 的雜合管中，於 50°C 下以轉速 10 rpm 預雜合至少 30 分鐘。待預雜合反應完成，取已經 95°C 處理 10 分鐘、置冰上 5 分鐘的探針加入 hybridization solution 中，於 50°C 下以轉速 10 rpm 隔夜作用。

隔日雜合反應完畢後，取出尼龍膜進行後雜合處理。首先將之浸泡於 low stringency buffer (2× SSC 及 0.1% SDS) 中，室溫下以 50 rpm 震盪漂洗兩次，每次 10 分鐘；接著將溶液置換成已預熱為 65°C 的 high stringency buffer (0.1× SSC 及 0.1% SDS)，65°C 下以 80 rpm 震盪漂洗兩次，每次 15 分鐘；再利用 washing buffer (0.1 M maleic acid、0.15 M NaCl 及 0.3% Tween-20，pH 7.5) 於室溫下潤洗尼龍膜 2 分鐘，完成後將溶液置換成 1% blocking reagent，室溫下以 50 rpm 震盪處理 30 分鐘；接著將溶液置換成 antibody solution [75 mU/mL anti-DIG-AP (Roche, Branchburg, New Jersey, USA) 於 1% blocking reagent 中]，室溫下以 50 rpm 震盪處理 30 分鐘；完成後以 washing buffer 於室溫下浸洗尼龍膜兩次，每次 15 分鐘；最後將尼龍膜移至透明塑膠膜中，加入適量 CDP-Star[®] Nucleic Acid Chemiluminescence Reagent (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA)，避光處理 15 分鐘，

刮除塑膠膜中的液體後，利用底片接收訊號，沖洗底片後分析結果。



十一、即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (quantitative real-time reverse transcription-PCR, RT-qPCR)

(一) 樣品 RNA 之 cDNA 製備

將前述接種完成之原生質體移至 1.5 mL 離心管中，以 13,000 rpm 離心 (Heraeus™ Pico™ 17 Microcentrifuge) 20 秒，除去上清液後，保留沉積於底部的原生質體，利用套組 Plant Total RNA Extraction Miniprep System 抽取總體 RNA。所得之樣品 RNA 先以 DNase I 處理，以除去殘餘之 DNA；再以同前述之 phenol-chloroform 核酸萃取法及酒精沉澱法純化 RNA。接著使用 SuperScript™ III First-Strand Synthesis System 合成第一股 cDNA，在總反應體積 13 μ L 中，內含 1 μ g 總體 RNA、1 μ L 10 mM dNTP 及 1 μ L 50 μ M dTVN 引子(表一)，置於 65°C 下 5 分鐘，隨後移至冰上 1 分鐘；接著加入 4 μ L 5X first-strand buffer、1 μ L 0.1 M dithiothreitol、1 μ L 40 U/ μ L RNasin® ribonuclease inhibitor 及 1 μ L 200 U/ μ L SuperScript™ III reverse transcriptase，使反應總體積為 20 μ L，置於 50°C 下反應 60 分鐘，最後以 70°C 作用 15 分鐘去除酵素活性。

(二) 即時定量聚合酶連鎖反應

即時定量聚合酶連鎖反應是使用 StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 進行反應與分析。在 20 μ L 的反應總體積中，內含 1 μ L 前述之 cDNA、1 \times Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 及 250 nM 引子對。其中以引子對 qNb-PP2A-F1/qNb-PP2A-R1 (表一) 擴增菸草基因組核酸中 protein phosphatase 2A 之片段(Liu et al., 2012)，以作為實驗的內控制組判讀；以引子對 qNH015-F2/ qNH015-R2 (表一) 同時對 CVX-N015 或 CVX-H015 的 RdRP 基因進行片段擴增；以引子對 qN015-F1/ qN015-R1 及 qH015-F4/ qH015-R1 (表一) 分別對 CVX-N015 及 CVX-H015 的

RdRP 基因進行片段擴增，藉此於兩病毒複合感染時專一性的針對其一偵測。PCR 反應程序為 95°C 下 10 分鐘；40 個循環反應：95°C 下 15 秒鐘，60°C 下 1 分鐘；最後進行 60°C 至 95°C 的 DNA 解離曲線分析，以確認 PCR 產物之單一性。每個樣品之標的增幅皆三重複處理。由系統判定之循環閾值(threshold cycle, Ct)，利用相對定量法之公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 進行計算，推算病毒與基準點間之倍數變化。

參、結果



一、田間紅龍果受 CVX 感染情形之調查

採集自臺東池上、屏東佳冬及萬丹之紅龍果肉質莖樣品共計 90 個，每處果園各 30 個樣品，利用 MNC RT-PCR 搭配 CVX 分離株專一性引子對的檢測結果如表三。紅肉種紅龍果整體受 CVX 感染情形非常普遍，採集自池上及萬丹果園的樣本全部皆可偵測到病毒感染，來自佳冬的樣本亦達 96.7% 的感染率。此外，比較 CVX-NTU 與-Hu 分離株的分布狀況，單獨感染單一種 CVX 分離株在三處果園的樣品皆為零星發生，池上、佳冬、萬丹果園單獨受 CVX-NTU 感染比率依序為 10%、13.3% 及 10%，單獨受 CVX-Hu 感染比率依序則為 0%、10% 及 3.3%；相比之下，受 CVX-Hu 與 CVX-NTU 複合感染的樣品佔大宗，於池上、萬丹及佳冬的複合感染率依序為 90%、86.7% 和 73.3%。

二、CVX 全長度選殖株之序列比對及親緣分析

有鑑於田間調查顯示紅龍果受 CVX 感染情形之普遍，加之兩種 CVX 分離株的高度複合感染率，建構 CVX 感染性選殖株將有助於對此病毒的特性分析。因 CVX 基因體長度達約 6.7 kb，為了易於操作，本研究採用兩階段式策略進行構築，設計將病毒基因體選殖入帶有 *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S 啟動子及 nopaline synthase (NOS) 終止子的載體中。我們首先自南投集集與臺中霧峰採集的紅龍果枝條中，先以 CVX 分離株專一性引子對偵測得其各自單獨受 CVX-NTU 與 CVX-Hu 之感染後，抽取紅龍果樣品總體 RNA，以帶有 oligo (dT) 的 NTU 與 Hu 引子分別進行反轉錄反應，獲得第一股 cDNA。進入第一階段的建構程序，利用合適引子各自擴增出靠近基因體 5' 端及 3' 端的兩個片段，在此兩片段重疊區域間帶有一個單一限制酶辨識位(於載體上已知無此切位)，將此兩片段各自接合到 p35S 載體上，得到 p35S-CVX-N-5'、p35S-CVX-N-3' (圖一 a) 及 p35S-CVX-

H -5'、p35S-CVX-H-3' (圖一 b)。接著進入第二階段的建構程序，將前一階段中構築的質體皆以共有的兩個單一限制酶辨識位進行截切，其中一切位約位在 35S 啟動子序列上，另一切位則為前述座落於病毒基因體上的兩片段重疊區，之後將從 p35S-CVX-N-5' 及 p35S-CVX-H-5' 獲得之涵蓋 35S 啟動子的片段分別置換入從 p35S-CVX-N-3' 及 p35S-CVX-H-3' 獲得之涵蓋 NOS 片段，得到全長度選殖株 (圖一)。自南投集集或臺中霧峰的紅龍果枝條以上述方法獲得的 CVX 全長度選殖株，分別命名為 p35S-CVX-N015 及 p35S-CVX-H015。

經全長度核酸定序，不含 poly(A) tail 在內，CVX-N015 的核酸總長為 6627 nt，以 Vector-NTI 預測其基因體結構包含初始 84 nt 的 5' UTR，接續五個轉譯架構：RdRP (85-4713 nt, 1542 aa)、TGB1 (4713-5402 nt, 229 aa)、TGB2 (5365-5697 nt, 110 aa)、TGB3 (5627-5818 nt, 63 aa) 及 CP (5837-6523 nt, 228 aa)，以及末端 107 nt 的 3' UTR (6521-6627 nt) (圖二)。而 CVX-H015 的核酸總長為 6619 nt，預測基因體結構，其涵蓋 84 nt 的 5' UTR，五個轉譯架構：RdRP (85-4713 nt, 1542 aa)、TGB1 (4713-5402 nt, 229 aa)、TGB2 (5365-5697 nt, 110 aa)、TGB3 (5627-5821 nt, 64 aa) 及 CP (5837-6514 nt, 225 aa)，以及末端 108 nt 的 3' UTR (6512-6619 nt) (圖二)。


與其它已發表之全長度 CVX 分離株 Hu、NTU 和 dragonfruit 進行序列比對，CVX-N015 與 CVX-NTU 的核酸總長與轉譯架構座落之位置完全吻合，兩者全長核酸序列相同度為 97.78% (表四)，各基因胺基酸序列相同度皆達 96% 以上 (表五-九)；CVX-H015 則與 CVX-Hu 和 CVX-dragonfruit 的核酸總長與轉譯架構座落之位置相符，惟 CVX-dragonfruit 於 3' UTR 最末端缺少一個鳥嘌呤核苷酸 (guanine)；CVX-H015 與 CVX-Hu 和 CVX-dragonfruit 的全長核酸序列相同度各為 97.21% 及 96.2% (表四)，與 CVX-Hu 或 CVX-dragonfruit 各基因的胺基酸序列相同度皆至少達 93% (表五-九)。然而比對 CVX-N015 與 CVX-Hu、-H015 及 -dragonfruit，或者比較 CVX-H015 與 CVX-NTU 及 -N015，皆存在相當的差異性，全長度核酸相同度僅約 78-79% (表四)；RdRP、TGB1、TGB2、TGB3 及 CP 的

胺基酸相同度依序約分布於 86%-88%、91%-92%、74%-78%、82%-86%及 90%-93% (表五-九)。

上述 CVX 分離株的序列相同度差異亦呼應於以各基因的胺基酸序列與其它已發表全長核酸序列及轉譯架構的 potexvirus 所進行的親緣演化分析，可觀察到各基因的演化樹中，天然寄主為仙人掌科植物的 CVX、OpVX、PiVX、SchVX 和 ZyVX 皆可被共同追溯到同一支(clade)；自其往下的 CVX 分群中，CVX-NTU 與 -N015 以及 CVX-Hu、-H015 與-dragonfruit 被分於兩個分支(圖三-七)。輔以比較 CVX 分離株與其它感染仙人掌科植物之 potexvirus 的各基因胺基酸序列相同度，可見 TGB2 及 TGB3 存在較低保守度；而相較 OpVX，兩種 CVX 分離株與 PiVX、SchVX 及 ZyVX 於各基因有較高胺基酸序列相同度，且針對 RdRP 及 CP 比較，CVX-N015、CVX-H015 都與 ZyVX 存在最高相同度，達約 81-83% (表十、表十一)。

三、CVX 全長度選殖株之感染性測試

為了比較 CVX-N015 與-H015 的感染能力，利用 35S 啟動子驅動的全長度選殖株搭配金鋼砂機械接種於白藜葉片，觀察病徵進程以及病毒累積量之差異。接種後約 7 天，接種 CVX-N015 的接種葉已可見微小的黃色斑點；待約接種後 10 天，接種葉已佈滿清晰之褪綠黃斑，之後黃斑逐漸擴大，並癒合成較大面積的褪綠區塊；至接種後約 20 天，接種葉全葉幾乎已呈白黃化，並且布有壞疽斑點(圖八 a)。然而接種 CVX-H015 的接種葉直到接種後約兩周仍未見病徵，外觀上與接種 ddH₂O 的對照組葉片無明顯差異；直到接種後約 20 天，感染有 CVX-H015 的接種葉才顯得略為褪綠(圖八 a)。收取接種後 10 天之接種葉，以專一性辨識 CVX 鞘蛋白的 CVX 抗血清進行西方墨漬法分析，結果顯示接種 CVX-N015 或 CVX-H015 的樣品接可偵測得約 25 kDa 的條帶(圖八 b)。而觀察系統葉的病徵，接種後約 20 天，接種 CVX-N015 者已可見斑駁夾帶壞疽病徵；但於接種 CVX-H015 的植株，則難以觀察到與健康對照組具有差異外觀的系統葉(圖八 a)。



進一步利用 ELISA 分析接種葉的病毒累積量，收取接種後 7 天、10 天及 12 天的白藜葉片，亦即對應於上述 CVX-N015 之病徵進程，以比較兩分離株的病毒累積量是否存在明顯差異。結果顯示，在三個時間點中，儘管 CVX-N015 造成的病徵漸趨嚴重，而接種 CVX-H015 者則與健康對照組的外觀無異(圖九 a)；但兩個 CVX 分離株的累積趨勢一致(圖九 b)；比較各個時間點的數值，CVX-H015 與 CVX-N015 的累積量大致無太大差異；但在數次重複實驗中，接種 CVX-H015 之處理偶爾較接種 CVX-N015 之處理略低。另一方面，於接種後 28 天，收取接種 CVX-N015、已出現病徵的系統葉，以及因無明顯系統性病徵，而隨機收取接種 CVX-H015 的系統葉，將之同樣進行 ELISA 分析，皆可偵測得病毒累積(資料未出示)。

四、兩種 CVX 選殖株在菸草原生質體中之 RNA 累積量差異測試

從前述結果已知 CVX-N015 與 CVX-H015 兩個全長度選殖株確實具有感染性，接續分析兩個 CVX 分離株的複製效率或 RNA 累積量是否存在差異，因此我們嘗試將病毒基因體置換至以 T7 啟動子驅動之載體上，藉胞外轉錄反應製作病毒轉錄體，以其接種於菸草原生質體，並收取總體 RNA 進行北方墨點分析，期望在單細胞層次比較病毒的 RNA 累積量。結果顯示，收取接種後 24 小時的樣品 RNA 分析，已可偵測到顯著的 CVX-N015 RNA 累積，CVX-H015 在相同的曝光時間所成影像中，僅可見微弱的次基因體 CP 條帶；至接種後 48 小時，雖可見得 CVX-H015 RNA 累積，但同時 CVX-N015 RNA 累積量仍遠較 CVX-H015 明顯，即便只加入五分之一接種 CVX-N015 的樣品 RNA，兩病毒分離株的 RNA 累積量差異依然顯著(圖十)。

五、CVX 分離株重組病毒株及之感染性與 RNA 累積量差異測試

為了進一步分析影響 CVX-N015 與 CVX-H015 於菸草原生質體中 RNA 累積量差異巨大之可能因子，我們首先將可能性假定為反式作用因子(trans-acting

element)之影響，選擇了兩種分離株中胺基酸相同度僅 77%、76%的 RdRP 與 CP 基因，進行重組病毒的建構。利用 p35S-CVX-N015 與 p35S-CVX-H015 為模板，以 PCR 直接擴增出 RdRP、CP 的轉譯架構，並直接擴增轉譯架構外的完整區域為載體，以對應的插入子與載體接合得到以 35S 啟動子驅動的建構株：以分離株 N015 為骨架，置換上分離株 H015 的 RdRP 或 CP 轉譯架構之 CVX-N015-HRdRP 與 CVX-N015-HCP；以分離株 H015 為骨架，置換上分離株 N015 的 RdRP 或 CP 轉譯架構之 CVX-H015-NRdRP 與 CVX-H015-NCP (圖二)。

首先進行重組病毒的感染性測試，將 35S 啟動子驅動的 CVX 分離株及其重組病毒，搭配金鋼砂同樣機械接種至白藜葉片。觀察接種葉發現，於接種後 10 天，僅接種 CVX-N015、CVX-N015-HCP 或 CVX-H015-NRdRP 的葉片中可見到褪綠黃斑病徵，其中 CVX-N015 及 CVX-N015-HCP 造成的病徵較為顯著、病斑邊緣清晰，而 CVX-H015-NRdRP 造成之病斑則較為微弱且邊緣暈散；而接種 CVX-N015-HRdRP 或 CVX-H015-NCP 的處理，則與接種 CVX-H015 者相似，接種葉難見明顯病徵(圖十一 a)。進一步收取此時間點的葉片進行 ELISA 分析，經四次重複實驗搭配 one-way ANOVA 統計分析顯示，當信賴區間為 95% 時，CVX-N015-HRdRP 的病毒累積量恆常低於另外五個病毒株而有顯著差異(圖十一 b)；而此五個病毒株間則無明顯累積差異，惟 CVX-H015 或 CVX-H015-NRdRP 偶爾較 CVX-N015、CVX-N015-HCP 及 CVX-H015-NCP 略低，但仍較 CVX-N015-HRdRP 有較高病毒累積量。將收取樣品時間點提前移至各處理皆較無明顯病徵的接種後七天，CVX-N015-HRdRP 的病毒累積量依然顯著是六個病毒株中最低者(資料未出示)。

為了比較兩個 CVX 分離株經置換彼此的 RdRP 及 CP 基因後 RNA 的累積能力差異，同樣將重組病毒基因體換至以 T7 啟動子驅動之載體上，進行胞外轉錄，將產生之病毒轉錄體接種至於草原生質體，接種後 48 小時收取總體 RNA 進行北方墨點分析，結果可見 CVX-N015 經置換上 CVX-H015 的 RdRP 或 CP 基因，其 RNA 累積量皆顯著下降；CVX-H015 經置換上 CVX-N015 的 RdRP 或 CP 基

因，其 RNA 累積量皆上升(圖十二)。經重複數次實驗綜合比較六個病毒株，CVX-N015 RNA 累積量明顯較另外五者高，其次為 CVX-N015-HCP、CVX-H015-NRdRP 及 CVX-H015-NCP；RNA 累積量最低者為 CVX-H015 或 CVX-N015-HRdRP (圖十二)。為了有效量化各處理間的差異，進一步以 RT-qPCR 分析本實驗，結果顯示雖然 CVX-N015 或 CVX-H015 與其自身為骨架的重組病毒間，病毒 RNA 累積量之趨勢依然與上述北方墨點分析相似，然因重複實驗間之倍率差異過大，經統計後無顯著差異(表十二；圖十三)。

六、CVX-N015 與 CVX-H015 之交互作用

有鑑於前述田間調查發現紅龍果受 CVX-NTU 及 CVX-Hu 複合感染甚為普遍，因此我們懷疑兩種分離株於植株體內也許存在某些交互作用，以助於單方或彼此之生存或感染優勢。我們利用序列相似於 CVX-NTU 的 CVX-N015 及序列相似於 CVX-Hu 的 CVX-H015，將兩者轉錄體單獨或複合接種於菸草原生質體，收取總體 RNA 後，以 oligo(dT)引子反轉錄第一股 cDNA，搭配分離株專一性引子對進行 qPCR 分析，比較兩種分離株在單獨或複合感染時的 RNA 累積量是否存在差異。結果發現，無論是 CVX-N015 或 CVX-H015，在複合感染時的 RNA 累積量皆比自身單獨感染時多，以 Student's *t*-test 統計於 95%信賴區間時，皆亦呈現顯著差異；且 CVX-H015 在複合感染時，RNA 累積量上升的幅度似乎較 CVX-N015 在複合感染時為高(表十三；圖十四)。

七、紅龍果原生質體製備之最適化條件測試結果

考量紅龍果細胞壁組成中含量相對豐富的多醣類黏性物質，本試驗選用不同的細胞壁分解酵素進行原生質體的誘導。結果顯示共同使用 1%纖維素酶、1%離析酶及 1%蝸牛酶時，具活性的原生質體產量最高，達 $9.95 \pm 0.64 \times 10^5$ cells/mL；效果次佳者為複合使用 1%纖維素酶與 1%蝸牛酶，產量濃度達 $2.27 \pm 0.53 \times 10^5$ cells/mL，但僅為共同使用 1%纖維素酶、1%離析酶及 1%蝸牛酶約兩成的產量；

複合使用 1%纖維素酶及 1%離析酶產量僅 $1.58 \pm 0.37 \times 10^5$ cells/mL(表十四)。當利用 FDA 對原生質體進行膜完整性的活性測試，於螢光顯微鏡下可見呈綠色螢光的活細胞(圖十五)，而以上處理獲得之原生質體存活率皆達 90%以上(表十四)。然而，單獨使用 1%蝸牛酶的處理中，以尼龍膜過濾植物殘體時，僅見些微綠色組織脫落，至以 0.7 M mannitol-0.1%MES 與 0.7 M sucrose 篩選活細胞時，已無原生質體聚集於交界處，因此無法獲得紅龍果原生質體(表十四)。此外，觀察過濾完原生質體後殘存的植物組織，共同使用三種酵素者可見其已近乎呈半透明略帶黃色，可知有最好的細胞壁分解效果；複合使用兩種酵素或單獨使用蝸牛酶者，植物組織殘渣皆呈顯著的綠色(圖十六)。以上可知同時使用 1%纖維素酶、1%離析酶及 1%蝸牛酶為獲取紅龍果原生質體的最佳酵素條件。

為了進一步找出原生質體製備過程中最恰當的溶液濃度，以提供原生質體最合適的滲透壓，我們固定使用 1%纖維素酶、1%離析酶及 1%蝸牛酶作為酵素組合，並針對 mannitol-0.1%MES、sucrose 及 washing medium 三種溶液，配置成 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M, 0.7 M 及 0.8 M 共五個濃度進行測試；結果以 0.7 M 的溶液濃度獲得的原生質體產量為最佳，達約 1×10^6 cells/mL；效果次佳者為使用 0.6 M 與 0.8 M 溶液濃度，產量介於約 $6-8 \times 10^5$ cells/mL；使用 0.4 M 或 0.5 M 溶液則僅有約 3×10^5 cells/mL 的產量(圖十七)。由此可見，溶液濃度對紅龍果原生質體之產量有顯著之影響。

八、紅龍果原生質體之培養與病毒轉錄體接種

為了測試分離出的原生質體是否可培養數日以利後續紅龍果病毒之研究，我們將原生質體置換於 culture medium 中，置於 25°C 光照環境下培養，待一天及兩天後觀察得細胞仍呈綠色而未白化，抽取其 RNA 並以瓊脂膠體電泳分析，可見 RNA 雖稍有拖尾(smearing)，但仍清晰可見 ribosomal RNA 的條帶(圖十八)。

進一步嘗試接種 CVX-N015 及 CVX-H015 轉錄體至紅龍果原生質體中，待 48 小時後萃取總體 RNA 進行北方墨點分析，可見病毒基因體與次基因體 RNA

之表現，顯示 CVX 分離株確實可於此原生質體系統中複製累積，而且 CVX-N015 的 RNA 累積量顯著較 CVX-H015 高(圖十九)。



肆、討論



一、CVX-N015 與 CVX-H015 的特性分析

CVX 為第一個被報導的紅龍果病毒，於臺灣紅龍果田間分布廣遍，且已有自紅龍果分離之不同 CVX 分離株之研究。然儘管前人已採用分段式選殖策略而得知分離株 NTU 及 Hu 全長度核酸序列(呂, 2007; Liou et al., 2004)，卻缺乏感染性選殖株以進一步探索病毒特性。本研究利用 CVX-NTU 及 CVX-Hu 的專一性引子對，自紅龍果枝條中選殖並建構出全長度 cDNA 選殖株 CVX-N015 與 CVX-H015。經定序結果與已知全長度序列的 CVX 分離株比對，奠基於核酸序列相同度，可大略將其分成兩群，一群為彼此相同度為 97.21% 的 CVX-NTU 及 CVX-N015，另一群則為彼此相同度約 96-97% 的 CVX-Hu、CVX-H015 與南韓發表之 CVX-dragonfruit(表四)。此兩群間的全長度核酸序列相同度僅約 78-79% (表四)，而作為 *Potexvirus* 屬種間分類重要依據的 RdRP 及 CP，前者於兩群間的核酸、胺基酸序列相同度約落在 77-78% 及 86-88% (表五)，後者核酸、胺基酸序列相同度也僅約 77-78% 及 90-93% (表九)。對於這樣的序列差異與感染力、病徵表現或 RNA 複製效率之關聯，我們使用白藜植株及菸草原生質體為實驗系統進行探討。

利用 35S 啟動子驅動的 CVX 全長度質體機械接種在白藜的實驗中，觀察接種葉病徵可見明顯差異，CVX-H015 幾乎未造成明顯病徵，直到接種後 20 天才可見葉片輕微黃化，此時接種 CVX-N015 的葉片病徵已從初期的褪綠斑癒合成大面積黃化，進而全葉接近白化且帶有壞疽斑(圖八 a)；另外，儘管 CVX-H015 與分離株 Hu、dragonfruit 有高度序列相同度，但前人研究皆指出分離株 Hu 及分離株 dragonfruit 會於白藜接種葉形成黃斑病徵(劉等, 2004; Kim et al., 2016)。據廖氏(2000)研究 BaMV 分離株於白藜上形成局部病斑之能力，與 poly(A)的長度有關；同時作者針對兩個核酸序列相同度達 98.46% 的 BaMV 分離株，當 poly(A)長度相同時，於靠近基因體 3' 端的五個胺基酸差異，影響病徵形成之能力。前人

亦發現 BaMV 之 CP，其 N 端 35 個富含甘胺酸(glycine)的區域影響病毒於白藜上造成壞疽或黃斑之能力(Lan et al., 2010)。前人研究中，分離株 Hu 及 dragonfruit 是以植物汁液繼代接種觀察病徵，無從與本研究中以質體為接種源，在同一基準點比較 poly(A)長度對病徵的影響。但從各基因的胺基酸序列中尋找線索，可發現 CVX-Hu、CVX-dragonfruit 相同，並與 CVX-H015 不相同的胺基酸位點有以下七個，包含 CVX-H015 之 RdRP 的 S⁴⁸⁴、N⁵⁰²、F⁵²⁷、H⁵³⁰ 及 S⁵⁶⁰，TGB1 上的 I⁵，TGB3 上的 T²⁶，以上七個胺基酸位點也許隱藏著病徵影響因子。

另一方面，比較 CVX-H015、CVX-N015 的序列與病徵的關係，本研究中建構之包含重組病毒在內的 CVX 全長度選殖株皆於 3' UTR 後帶有約 25 個 A 鹼基，在 poly(A)長度相同的前提下，選殖株 N015 及 H015 仍存在明顯病徵差異；加上 CVX-H015 的接種葉於接種 10 天後仍無病徵，理論上此時植物體內應已充斥病毒本身複製數代之子代，而非僅倚賴由 35S 啟動子表現之病毒基因體，顯示是由基因體上的其他區域左右著病徵表現。而在後續的實驗中，我們將 CVX-N015、CVX-H015 置換上彼此的 RdRP 及 CP 轉譯架構形成重組病毒，同樣以 35S 啟動子驅動的重組病毒全長度質體機械接種至白藜植株，發現僅帶有選殖株 N015 的 RdRP 基因者，意即 CVX-N015、CVX-N015-HCP 及 CVX-H015-NRdRP，才會在接種葉形成黃斑病徵(圖十一 a)。因此我們推測 RdRP 可能具有病徵決定因子(symptom determinant)之區塊。但值得注意的是，CVX-H015-NRdRP 造成的黃斑邊緣較為暈散，不如 CVX-N015 或 CVX-N015-HCP 之輪廓完整，顯示仍有其它因子掌控病徵表現。

除了病徵的觀察，進一步收取白藜接種葉進行 ELISA 測試，結果可見受 CVX-N015 感染的葉片，其外觀由未出現明顯病徵(接種後 7 天)轉為產生大量黃斑(接種後 10 天)，再轉為黃斑擴大且開始癒合(接種後 12 天)(圖九 a)；而受 CVX-H015 感染的葉片在以上相同的時間點雖然未顯現病徵，但兩者病毒的 CP 累積量在三個時間點並無太大差異，且維持相同的上升趨勢(圖九 b)；除此之外，以 ELISA 分析接種後 10 天感染有 CVX-N015、CVX-H015 或重組病毒的接種葉，

發現整體而言，造成病徵的 CVX-N015、CVX-N015-HCP 及 CVX-H015-NRdRP，與沒有病徵顯現的 CVX-H015、CVX-H015-NCP，以上五個病毒株的 CP 累積量並無明顯差異，可知病徵的差異與病毒量並無絕對的關聯。然而特別的是，CVX-N015-HRdRP 在接種後 7 天(資料未出示)及 10 天時穩定而明顯地較其它五個病毒株呈較低累積量(圖十一 b)；因本實驗是以白藜植株為實驗系統，對於這樣的現象到底是病毒複製效率較低還是移動能力受阻所致，還有待進一步探討。

而在以菸草原生質體為實驗系統的測試中，我們採用以胞外轉錄反應產生的病毒轉錄體為接種源，嘗試於單細胞的層次比較病毒 RNA 的累積能力，屏除病毒移動之變因。從北方墨點分析的結果可知，CVX-N015 的 RNA 累積量遠比 CVX-H015 還高(圖十)。為了剖析兩者 RNA 複製效率差異極大的可能原因，我們以 RdRP 或 CP 基因為目標建構的 CVX 重組病毒進行測試，並預期僅有 RdRP 基因的置換病毒株可觀察得與野生型病毒株間的 RNA 累積差異。但意外地，結果顯示 RdRP 和 CP 兩個基因都對病毒 RNA 累積有相當程度的參與：CVX-N015 經置換上 CVX-H015 的 RdRP 或 CP 基因，RNA 累積量顯著下降；CVX-H015 經置換上 CVX-N015 的 RdRP 或 CP 基因，病毒 RNA 累積量皆有所上升，其中以 CVX-H015-NCP 之上升幅度較為顯著(圖十二)。

分析 RdRP 基因中可能的影響因子，我們將 CVX-N015 與 CVX-H015 的 RdRP 胺基酸序列進行比對，可見相同度僅 88% 的兩者，絕大部分之差異是集中在 methyltransferase (MT) domain 與 RNA helicase domain 兩個保守區塊之間(圖二十)，是否為此區間的胺基酸差異造成 CVX-N015、CVX-H015 的 RdRP 具有功能上的差異值得進一步探討。且前述提及 CVX-H015 與 CVX-Hu、CVX-dragonfruit 在 RdRP 上不同的五個胺基酸位點，皆座落在此變異性較大的序列區段上。值得注意的是，CVX-H015 置換上 CVX-N015 的 RdRP 基因，其 RNA 累積量雖有所上升，卻仍然不及 CVX-N015，顯示還有其它因子影響此兩個 CVX 選植株的複製能力。另外有趣的是，將此 MT domain 與 RNA helicase domain 間的胺基酸序列以 InterPro 資料庫分析，可預測得 Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase

(AlkB-like) domain (圖二十一)；AlkB 本身於大腸桿菌(*Escherichia coli*)上被認為具有修復因烷化作用而受損之 DNA 的功能(Falnes et al., 2002)。且針對其它感染仙人掌科的 potexvirus 之 RdRP 進行功能區塊分析，亦都可在 MT domain 與 RNA helicase domain 間預測得 AlkB-like domain，讓我們好奇 AlkB-like domain 是否對 potexvirus 感染仙人掌科植物扮演某種角色。

而分析 CP 基因如何影響 CVX-N015 與 CVX-H015 在菸草原生質體的 RNA 累積，根據前人研究，potexvirus 的 CP 並未直接參與在病毒基因體複製過程，但根據 Lee 等人(2011)對 BaMV 的研究中，對 CP 進行缺失突變會大幅降低 BaMV 基因體與次基因體在菸草原生質體中的累積，但詳細機制並不清楚；同時作者也發現 CP 會與 RdRP 中的 helicase-like domain 產生交互作用，雖然經 CP 點突變削弱此交互作用僅發現病毒細胞間移動受阻，但並未影響病毒 RNA 累積。但這樣的發現仍讓我們好奇是否 CVX 的 CP 也與病毒的其他蛋白或順式作用因子(cis-acting element)有交互作用，直接或間接影響病毒的複製的可能，而本研究中的 CP 基因重組病毒可能改變了這樣的交互作用；對於這樣的疑問，在未來可以針對 CVX-N015 及 CVX-H015 進行更大的基因體片段或多個轉譯架構的置換，亦或採用酵母菌雙雜合系統(yeast two-hybrid system)尋找與 CP 有交互作用的病毒蛋白，以探究可能的機制。

綜合比較 CVX-N015、CVX-H015 與其重組病毒在以上兩個植物實驗系統中的結果並無法吻合解釋：一來，在菸草原生質體中病毒 RNA 累積量明顯高於其他病毒株的 CVX-N015，其在白藜的 CP 累積量並沒有特別突出；二來，在菸草原生質體中病毒 RNA 累積量尚且高過 CVX-H015 的 CVX-N015-HR，其在白藜的 CP 累積量卻穩定的敬陪末座。對於這樣的現象，推測主要的原因可能為寄主差異所致，加上以植株為實驗系統尚需考量病毒移動能力之影響。若之後能採用白藜原生質體作為實驗系統，將更有機會對比出合理的解釋。



二、CVX-N015 與 CVX-H015 的交互作用

有關植物病毒間協力作用之研究多為兩個不同屬的病毒，特別是 potyvirus 與它屬病毒的搭配，經典的例子如 *Potato virus Y* (PVY) 與 *Potexvirus* 屬的 PVX 複合感染菸草時，造成嚴重的葉脈壞死，並可測得 PVX 的大量累積(Bance, 1991; Damirdagh & Ross, 1967)；*Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) 與 *Cucumovirus* 屬的 *Cucumber mosaic virus* (CMV) 複合感染瓜類作物時，造成明顯的嵌紋、葉畸形與矮化，最終植株萎凋而死亡，在過程中亦測得 CMV 較自身單獨感染時更高的病毒累積(Wang et al., 2002)。相較之下，屬於同屬病毒間的協力作用報導極少。皆屬 *Begomovirus* 屬的 *African cassava mosaic virus* (ACMV) 和 *East African cassava mosaic virus* (EACMV)，兩者複合感染木薯時會造成較嚴重的嵌紋、黃化病徵，而致使落葉，且兩個病毒的累積量皆較單獨感染時高(Fondong et al., 2000)。然而，尚未見得有關同種病毒之不同系統株或分離株間的協力作用的報導。本研究中將 CVX-N015 與 CVX-H015 單獨或共同接種在菸草原生質體中，利用 RT-qPCR 觀察得當複合感染時，兩個病毒株的 RNA 累積量皆較單獨感染有所提升(表十三；圖十四)，此現象使我們初步猜測也許 CVX 複合感染同一細胞是互惠彼此的田間生存策略。但根據前人研究，親緣關係相近之病毒在植物組織內的分布往往是獨立而分開的，如學者 Dietrich1 與 Maiss (2003) 利用帶有 GFP 或 DsRed 螢光蛋白標籤的三種 potyvirus，*Plum pox virus* (PPV)、*Tobacco vein mottling virus* (TVMV) 及 *Clover yellow vein virus* (CIYVV)，將兩兩病毒複合接種於菸草，皆觀察到不同螢光的獨立分布，僅在交界處有些微螢光重疊；反之將其中任一種 potyvirus 與同樣帶螢光標籤的 PVX 接種於菸草，可見明顯紅綠螢光的交疊。因此在後續實驗中，仍需先確定 CVX-N015 與 CVX-H015 在寄主植株的空間分布狀況。

另一方面，有關同種病毒之不同系統株或分離株間的交互作用，反而多見於交互保護(cross protection)之研究，即藉由溫和型病毒株先行於植株感染，進而減輕後續嚴重型病毒株之危害，如學者 McKinney 在菸草接種會造成淡綠嵌紋病徵的 *Tobacco mosaic virus* (TMV) 後，再接種理應會造成嚴重白色嵌紋的 TMV 病毒

株，結果卻不見淡綠嵌紋病徵之改變或加劇(Bennett, 1953)。就以 CVX-N015 與 CVX-H015 在白藜植株上的病徵而言，在兩者累積量差異不大的前提下，CVX-H015 卻未見明顯病徵，對於是否可將 CVX-H015 視為溫和型病毒株，並應用於交互保護防治 CVX-N015，也是未來值得探討的問題。

三、紅龍果原生質體系統之建立

紅龍果作為 CVX 的田間天然寄主，若能利用紅龍果製備成原生質體作為研究此病毒的單細胞實驗系統，勢必更有助於我們對 CVX 或其他感染紅龍果病毒特性的了解。但就如同其他仙人掌科作物的特性，其細胞壁組成較一般高等植物富含由種類複雜的醣類鍵結成的多醣，分子龐大且極具黏性，這可能也說明了為數不多的仙人掌科植物原生質體製備的報導中，皆採用癒傷組織進行細胞懸浮培養，再以之分解細胞壁製備原生質體(Liamoca Zarate et al., 2004; Seeni & Gnanam, 1980)。然而，參考同樣是細胞壁組成與一般高等植物略有不同、且富含黏性的藻類原生質體之製備方法(Cheng et al., 2012; Chen et al., 2017; Demuez et al., 2015; Gupta et al., 2011; Lu et al., 2012; Lou et al., 2016; Ma & Lin, 2014)，其除了採用一般製備原生質體常見的纖維素酶及果膠酶或離析酶，亦加入不同酵素，包括本研究中使用的蝸牛酶。本研究中發現，當複合使用 1% 纖維素酶、1% 離析酶及 1% 蝸牛酶有最高的原生質體產量，次佳者為使用 1% 纖維素酶搭配 1% 蝸牛酶，而使用 1% 纖維素酶與 1% 離析酶的效果又較 1% 纖維素酶搭配 1% 蝸牛酶略差(表十四)。輔以觀察紅龍果經細胞壁分解酵素作用過後之組織，顯示三種酵素複合使用確實最有助細胞壁的分解，以其處理過的植物組織幾乎未見綠色組織的殘留(圖十六)，且細胞壁分解反應完成後的液體黏性亦最低。但特別的是，雖然使用 1% 纖維素酶搭配 1% 蝸牛酶處理過的殘餘組織，其綠色組織殘留比使用 1% 纖維素酶與 1% 離析酶的處理組還深(圖十六)，但原生質體的產量卻是使用前者酵素組合為高(表十四)。對此現象，我認為 1% 纖維素酶與 1% 離析酶雖然確實使較多細胞脫落，但後續溶液的黏稠度卻較使用 1% 纖維素酶搭配 1% 蝸牛酶為高，因此

在後續不斷重複稀釋、清洗及除去黏稠物的過程中，也隨之流失較多細胞。而對於蝸牛酶扮演的角色，依據廠商說明，其自蝸牛的嚙囊和消化道分離而得，含有纖維素酶、果膠酶、澱粉酶、蛋白酶等多達 20 多種酵素，雖然未透露確切的酵素組成及其反應受質，但其多樣的酵素種類中，確實含有助於分解紅龍果細胞壁的成分。然而，儘管蝸牛酶宣稱本身就含有纖維素酶及果膠酶活性，但單獨使用 1% 蝸牛酶進行細胞壁分解，卻難以見得綠色組織脫落，且至原生質體活性分層的步驟時，已經沒有活細胞的聚集。對此，猜測是使用 1% 的蝸牛酶時，真正有效分解紅龍果細胞壁的各项酵素濃度過低所致。

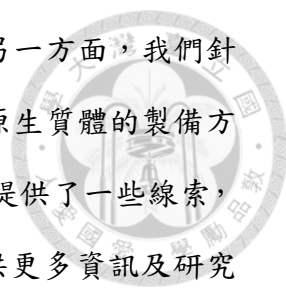
除此之外，在已知最適合的細胞壁分解酵素組合的前提下，我們針對使用到的溶液進行濃度測試，以求找到最合適的原生質體滲透壓。結果顯示溶液濃度為 0.7 M 時有最高的原生質體產量(圖十七)，此濃度顯然較分離一般植物，如菸草、阿拉伯芥的原生質體時採用的濃度(0.5-0.6 M)較高，此可能與仙人掌科植物細胞中含量較豐的有機酸及離子有關(Cheffings et al., 1997; Liamoca Zarate et al., 2004)。

對於此紅龍果原生質體之製備系統，未來仍有改進之處，以細胞壁分解酵素而言，雖然目前發現複合使用纖維素酶、離析酶及蝸牛酶可最有效降低容易黏稠度，但溶液依然存在一定的黏性，可見尚有未被分解之多醣於液體中。近年來紅龍果應用廣泛，諸如食品加工或特殊成分萃取，隨之產生的廢棄果皮、果肉處理亦成一大難題，因此有不少研究針對其細胞壁組成進行分析(Ramírez-Truque et al., 2011; Montoya-Arroyo et al., 2014)，雖非以紅龍果枝條為分析對象，但也許可作為未來嘗試不同酵素的參考依據。此外，溶液 pH 值、細胞壁分解酵素的作用時間及作用時是否震盪處理等，都可從中測試並調整出最適化條件。

四、結語

綜觀本研究，我們建構了 CVX-N015 與 CVX-H015 兩個序列呈相當程度差異的選殖株，且兩者在白藜植株上產生的病徵以及在菸草原生質體中的 RNA 累積能力皆有明顯差異。目前發現此差異與兩個病毒株的 RdRP 基因可能有密切的

關聯，且 CP 基因似乎也在病毒 RNA 累積上扮演某種角色。另一方面，我們針對細胞壁分解酵素及溶液滲透壓進行測試，建立紅龍果實生苗原生質體的製備方法。結合以上的成果，本研究為將來進一步探討 CVX 分子特性提供了一些線索，並可望為紅龍果病毒性病害或其它感染仙人掌植物的病毒提供更多資訊及研究平台。



伍、參考文獻



- 毛青樺。(2008)。蟹爪蘭X病毒與紅龍果X病毒之分子特性與偵測。國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。
- 余建美。(2016)。臺灣紅龍果產業發展現況。臺中區農業改良場特刊 **131**: 1-12。
- 呂有其。(2007)。仙人掌病毒X新分離株之特性分析與感染性選殖株之構築。國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。
- 李勇賜。(2010)。紅龍果X病毒之特性分析、感染性選殖株構築與抗血清製備。國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。
- 郭庭禕。(2015)。紅龍果potexviruses病毒快速檢測方法與磁性奈米粒子療法之開發與應用。國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。
- 陳盟松、郭建志、許榮華。(2016)。紅龍果日本消費市場及越南產銷現況參訪分享。臺中區農業改良場特刊 **131**: 13-28。
- 葉士財、尤澤森、謝慶昌。(2016)。紅龍果濕腐病及煤煙病之發生與預防。臺中區農業改良場特刊 **131**: 71-88。
- 詹修語。(2012)。台灣火龍果胞囊線蟲之發生、鑑定及生態學研究。國立中興大學植物病理研究所碩士論文。
- 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。植物病理學會刊 **12**: 225-234.
- 廖家德。(2000)。竹嵌紋病毒病徵表現之遺傳分析及載體構築。國立中興大學農業生物科技學研究所博士論文。
- 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。植物病理學會刊 **13**: 27-34.
- 劉碧鵬。(2010)。台灣紅龍果的栽培。農業試驗所特刊(144)。行政院農業委員會農業試驗所。

蔡志濃、林筑蘋、安寶貞、鄧汀欽、廖吉彥、倪蕙芳、楊宏仁。(2013)。紅龍果的重要病害及其防治(下)。農業試驗所技術服務 96: 4-7。

Adams, M.J., Antoniw, J.F., Bar-Joseph, M., Brunt, A.A., Candresse, T., Foster, G.D., Martelli, G.P., Milne, R.G., and Fauquet, C.M. (2004). Virology Division News: The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. Arch. Virol. **149**: 1045–1060.

Aguilar, E., Almendral, D., Allende, L., Pacheco, R., Chung, B.N., Canto, T., and Tenllado, F. (2015). The P25 protein of *Potato virus X* (PVX) is the main pathogenicity determinant responsible for systemic necrosis in PVX-associated synergisms. J. Virol. **89**: 2090–2103.

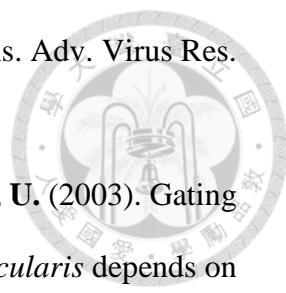
Aoki, S. and Takebe, I. (1969). Infection of tobacco mesophyll protoplasts by *Tobacco mosaic virus* ribonucleic acid. Virology **39**: 439–448.

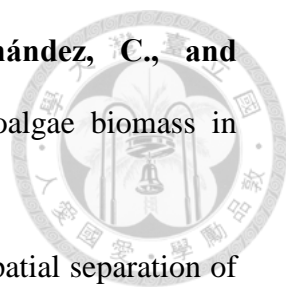
Attathom, S., Weathers, L.G., and Gumpf, D.J. (1978). Identification and characterization of a protovirus from California Barrel Cactus. Phytopathology **68**: 1401–1406.

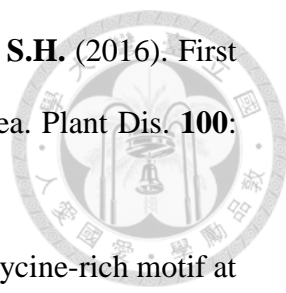
Azwanida, N.N., Hui, M.S., Afandi, A., Mohamed, S., AK, Z., Ayob, A., Rusli, N., Rasat, M.S.M., and Mohamed, M. (2015). Color stability evaluation of pigment extracted from *Hylocereus polyrhizus*, *Clitorea ternatae* and *Pandanus amaryllifolius* as cosmetic colorants and premarket survey on customer acceptance on natural cosmetic product. J. Trop. Resour. Sustain. Sci **3**: 61–67.

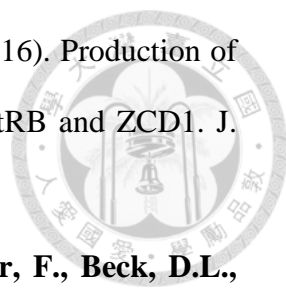
Bance, V.B. (1991). Replication of *Potato virus X* RNA is altered in coinfections with potato virus Y. Virology **182**: 486–494.

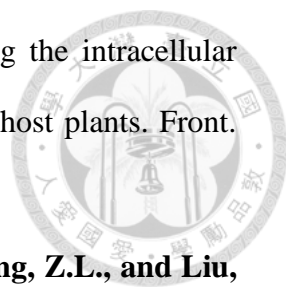
Batten, J.S., Yoshinari, S., and Hemenway, C. (2003). *Potato virus X*: a model system for virus replication, movement and gene expression. Mol. Plant Pathol. **4**: 125–131.

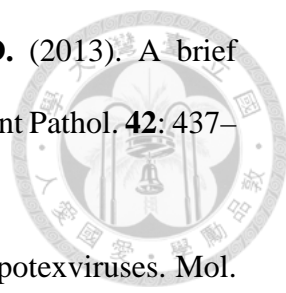
- 
- Bennett, C.W.** (1953). Interactions between viruses and virus strains. *Adv. Virus Res.* **1**: 39–67.
- Binder, K.-A., Wegner, L.H., Heidecker, M., and Zimmermann, U.** (2003). Gating of Cl-currents in protoplasts from the marine alga *Valonia utricularis* depends on the transmembrane Cl-gradient and is affected by enzymatic cell wall degradation. *J. Membr. Biol.* **191**: 165–178.
- Cheffings, C.M., Pantoja, O., Ashcroft, F.M., and Smith, J.A.C.** (1997). Malate transport and vacuolar ion channels in CAM plants. *J. Exp. Bot.* **48**: 623–631.
- Chen, J.E., Cui, G., and Lastra, M.A.** (2017). The genetic intractability of *Symbiodinium microadriaticum* to standard algal transformation methods. bioRxiv: 140616.
- Cheng, R., Ma, R., Li, K., Rong, H., Lin, X., Wang, Z., Yang, S., and Ma, Y.** (2012). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of marine microalgae *Schizochytrium*. *Microbiol. Res.* **167**: 179–186.
- Chuang, M.F., Ni, H.F., Yang, H.R., Shu, S.L., Lai, S.Y., and Jiang, Y.L.** (2012). First report of stem canker disease of pitaya (*Hylocereus undatus* and *H. polyrhizus*) Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan. *Plant Dis.* **96**: 906.
- Cocking, E.C.** (1960). A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* **187**: 962–963.
- Cosgrove, D.J.** (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 850–861.
- Damirdagh, I.S. and Ross, A.F.** (1967). A marked synergistic interaction of *Potato viruses X* and *Y* in inoculated leaves of tobacco. *Virology* **31**: 296–307.
- Davey, M.R., Anthony, P., Power, J.B., and Lowe, K.C.** (2005). Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnol. Adv.* **23**: 131–171.

- 
- Demuez, M., Mahdy, A., Tomás-Pejó, E., González-Fernández, C., and Ballesteros, M.** (2015). Enzymatic cell disruption of microalgae biomass in biorefinery processes. *Biotechnol. Bioeng.* **112**: 1955–1966.
- Dietrich, C. and Maiss, E.** (2003). Fluorescent labelling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. *J. Gen. Virol.* **84**: 2871–2876.
- Evans, D.A. and Bravo, J.E.** (1983). Plant protoplast isolation and culture. Plant protoplasts. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* **16**: 33–53.
- Falnes, P.Ø., Johansen, R.F., and Seeberg, E.** (2002). AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature* **419**: 178–182.
- Fondong, V.N., Pita, J.S., Rey, M.E.C., DeKochko, A., Beachy, R.N., and Fauquet, C.M.** (2000). Evidence of synergism between *African cassava mosaic virus* and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. *J. Gen. Virol.* **81**: 287–297.
- Gibson, A.C. and Nobel, P.S.** (1990). *The cactus primer*. Harvard University Press.
- Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C.R.K., and Jha, B.** (2011). Optimization of protoplast yields from the red algae *Gracilaria dura* (C. Agardh) *J. Agardh* and *G. verrucosa* (Huds.) Papenfuss. *J. Appl. Phycol.* **23**: 209–218.
- Hall, T. A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* **41**: 95–98.
- Hunter, S., Jones, P., Mitchell, A., Apweiler, R., Attwood, T.K., Bateman, A., Bernard, T., Binns, D., Bork, P., and Burge, S.** (2011). InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Res.:* gkr948.

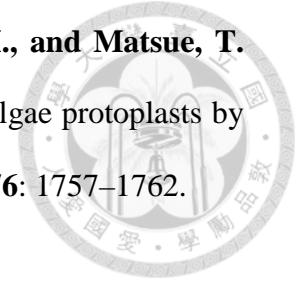
- 
- Kim, J.S., Park, C.Y., Nam, M., Lee, J.S., Kim, H.G., and Lee, S.H.** (2016). First report of *Cactus virus X* infecting *Hylocereus undatus* in Korea. *Plant Dis.* **100**: 2544.
- Lan, P., Yeh, W.B., Tsai, C.W., and Lin, N.S.** (2010). A unique glycine-rich motif at the N-terminal region of *Bamboo mosaic virus* coat protein is required for symptom expression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**: 903–914.
- Lee, C.C., Ho, Y.N., Hu, R.H., Yen, Y.T., Wang, Z.C., Lee, Y.C., Hsu, Y.H., and Meng, M.** (2011). The interaction between *Bamboo mosaic virus* replication protein and coat protein is critical for virus movement in plant hosts. *J. Virol.* **85**: 12022–12031.
- Li, J.-F., Li, L., and Sheen, J.** (2010). Protocol: a rapid and economical procedure for purification of plasmid or plant DNA with diverse applications in plant biology. *Plant Methods* **6**: 1.
- Liamoca Zarate, R.M., Landsann, J., and Campos, F.A.P.** (2004). Isolation and culture of protoplasts from cell suspensions of cactus pear (*Opuntia ficus-indica* Mill.). V International Congress on Cactus Pear and Cochineal **728**: 93–96.
- 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.* **149**: 1037–1043.
- 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.
- Liu, D., Shi, L., Han, C., Yu, J., Li, D., and Zhang, Y.** (2012). Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using quantitative real-time PCR. *PLoS One* **7**: e46451.

- 
- Lou, S., Wang, L., He, L., Wang, Z., Wang, G., and Lin, X.** (2016). Production of crocetin in transgenic *Chlorella vulgaris* expressing genes crtRB and ZCD1. *J. Appl. Phycol.* **28**: 1657–1665.
- Lough, T.J., Netzler, N.E., Emerson, S.J., Sutherland, P., Carr, F., Beck, D.L., Lucas, W.J., and Forster, R.L.S.** (2000). Cell-to-cell movement of potexviruses: evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 962–974.
- Lu, Y., Kong, R., and Hu, L.** (2012). Preparation of protoplasts from *Chlorella protothecoides*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 1827–1830.
- Ma, R. and Lin, X.** (2014). *Vitreoscilla* hemoglobin gene (vgb) improves lutein production in *Chlorella vulgaris*. *Chinese J. Oceanol. Limnol.* **32**: 390–396.
- Masyahit, M., Sijam, K., Awang, Y., and Ghazali, M.** (2009). First report on bacterial soft rot disease on dragon fruit (*Hylocereus* spp.) caused by *Enterobacter cloacae* in Peninsular Malaysia. *Int J Agric Biol* **11**: 659–666.
- Merten, S.** (2003). A review of *Hylocereus* production in the United States. *J PACD* **5**: 98–105.
- Milbrath, G.M.** (1971). Etiology and epidemiology of viruses of native cactus species in Arizona. PhD dissertation. The University of Arizona: Plant Pathology.
- Mizrahi, Y., Nerd, A., and Nobel, P.S.** (1997). Cacti as crops. *Hort. Rev* **18**: 291–319.
- Montoya-Arroyo, A., Schweiggert, R.M., Pineda-Castro, M.L., Sramek, M., Kohlus, R., Carle, R., and Esquivel, P.** (2014). Characterization of cell wall polysaccharides of purple pitaya (*Hylocereus* sp.) pericarp. *Food Hydrocoll.* **35**: 557–564.
- Nerd, A., Tel-Zur, N., and Mizrahi, Y.** (2002). Fruits of vine and columnar cacti. University of California Press.

- 
- Park, M.R., Jeong, R.D., and Kim, K.H.** (2014). Understanding the intracellular trafficking and intercellular transport of potexviruses in their host plants. *Front. Plant Sci.* **5**.
- Peng, C., Yu, N.T., Luo, Z.W., Fan, H.Y., He, F., Li, X.H., Zhang, Z.L., and Liu, Z.X.** (2016). Molecular Identification of *Cactus virus X* infecting *Hylocereus polyrhizus* (Cactaceae) in Hainan Island, China. *Plant Dis.* **100**: 1956.
- Ramírez-Truque, C., Esquivel, P., and Carle, R.** (2011). Neutral sugar profile of cell wall polysaccharides of pitaya (*Hylocereus* sp.) fruits. *Carbohydr. Polym.* **83**: 1134–1138.
- Rao, A.L.N.** (2007). Preparation and inoculation of mesophyll protoplasts from monocotyledenous and dicotyledenous hosts. *Curr. Protoc. Microbiol.* 16D. 2.1-16D. 2.8.
- Santa Cruz, S., Roberts, A.G., Prior, D.A.M., Chapman, S., and Oparka, K.J.** (1998). Cell-to-cell and phloem-mediated transport of *Potato virus X*: the role of virions. *Plant Cell* **10**: 495–510.
- Seeni, S. and Gnanam, A.** (1980). Photosynthesis in cell suspension cultures of the CAM plant *Chamaecereus sylvestrii* (Cactaceae). *Physiol. Plant.* **49**: 465–472.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S.** (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725–2729.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673–4680.

- 
- Valencia-Botín, A.J., Kokubu, H., and Ortíz-Hernández, Y.D.** (2013). A brief overview on pitahaya (*Hylocereus* spp.) diseases. *Australas. Plant Pathol.* **42**: 437–440.
- Verchot-Lubicz, J.** (2005). A new cell-to-cell transport model for potexviruses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**: 283–290.
- Verchot-Lubicz, J. and Baulcombe, D.C.** (2011). Potexvirus. *The Springer Index of Viruses*. Tidona, C.A., ed. Springer: New York. pp. 505–515.
- Wakabayashi, T., Kuboi, T., Tuboi, T., Kaji, M., and Hara, M.** (1999). Preparation of high yields of algal protoplasts using buccal juice of sea hare and commercial cellulase. *Mar. Biotechnol.* **1**: 407–410.
- Wang, Y., Gaba, V., Yang, J., Palukaitis, P., and Gal-On, A.** (2002). Characterization of synergy between *Cucumber mosaic virus* and potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathology* **92**: 51–58.
- Wichienchot, S., Jatupornpipat, M., and Rastall, R.A.** (2010). Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chem.* **120**: 850–857.
- Woo, K.K., Ngou, F.H., Ngo, L.S., Soong, W.K., and Tang, P.Y.** (2011). Stability of betalain pigment from red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *Am. J. Food Technol.* **6**: 140–148.
- Wu, L., Hsu, H.-W., Chen, Y.-C., Chiu, C.-C., Lin, Y.-I., and Ho, J.A.** (2006). Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chem.* **95**: 319–327.
- Zhang, Y., Liu, Z., Huang, Q., Luo, Y., Pennerman, K.K., Lai, D., Bai, H., Lin, Y., and Yin, G.** (2016). Rapid detection of *Cactus virus x* in pitaya by efficient reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Austin J. Biotechnol. Bioeng.* **3**: 1–6.

Zhou, H., Kasai, S., Noda, H., Ohya-Nishiguchi, H., Shiku, H., and Matsue, T.
(2003). Characterization of the peroxidase activity of single algae protoplasts by
scanning electrochemical microscopy. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **76**: 1757–1762.



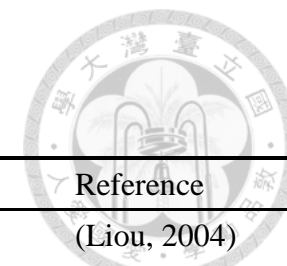


陸、圖表集

表一、本研究中使用之引子

Table 1. List of primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')	Reference
CVX-F	GAA AAC CAA CCC AAC ACC AAA CC	(Liou, 2004)
CVX-F2	ACA CCA GTC CAA AGA ATG GCT TGA GAG	(Liou, 2004)
CVX-R2	CTG AAA CCA TCG CTA GTG TGA AAG AGT	(Liou, 2004)
CVX-Hu-dT-R	CGT ACC CGG GTT TTT TTT TTT TTT TTT TTC TGA AAC TTG CAT TAA AAC	This study
CVX-Hu-F2	CCT CAC ATA CAA AGT CCA ATC C	This study
CVX-Hu-R3	CTC AGT GAA GTT CCT TTG TTC CGC A	This study
CVX-NTU-F2	ACC TGA TCC AAC AAA GGT AG	This study
CVX-NTU-R2	GGG GAC CCG GGC ACT GGA T	This study
dTVN	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVN	This study
Farm-F	GGA AAA CCA ACC CCA ACC CAA ACC AAC TCA C	(呂, 2007)
Farm-F5	ATC CAA CCA GGC TCC ATC ATT ACC	(呂, 2007)
Farm-R4	CAG TGC ATC CTT GTG TTG GTA A	(呂, 2007)
H015-CP-F	ATG TCT ACT ACT GGA GTC CAG TCT	This study
H015-CP-R	AGA AGT CGA AGG CAG CAA	This study
H015-CP-R2	CTA CTC AGG GCC TGG GAG AAA T	This study
H015-RdRP-R	TCA GTC AAA AGT TGA GAA AAC ACG GCC TCC A	This study
inverseH-CP-F	TTT AGA GAT GAA CAA GGC TCC CGC AGT A	This study
inverseH-CP-R	GAT TAG TTT TGA TTT TCA CAA TTT GTT GAA ACT T	This study
inverseH-RdRP-F	TGG AGA CGC TAA TTG CCC TAC T	This study
inverseH-RdRP-R	CCC ACA GAA TAT ATA CCG GTA AC	This study



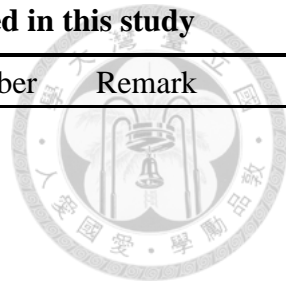
inverseN-CP-F	ACT AAC ATT TCA AAG GCT CTA GCA GTA GC	This study
inverseN-CP-R	GGT GTA GGT TAG TTT TCA CTA TGG	This study
inverseN-RdRP-F	TGG AAA CTC TTA CAG CAC TAC	This study
inverseN-RdRP-R	CCC TCA GAA AAT ATA CCA GTA ACG	This study
NTU-dT-R	CGT AGG ATC CTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTC TGA AAC TTG CAT TAA AAC	(呂, 2007)
N015-CP-F	ATG TCT ACC ACA GGA GTT CA	This study
N015-CP-R	AGG CAG CGA ACT TCT GCT CA	This study
N015-CP-R2	TTA TTC AGG ACC TGG CAG GA	This study
NH015-RdRP-F	ATG GCT CGT GTG CGT GAA GT	This study
N015-RdRP-R	TCA GTC AAA GGT TGC GAA AAC AC	This study
T7-CVX-F	<u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG</u> GAA AAC CAA CCC AAC ACC AAA CC	(呂, 2007)
T7-Farm-F	CGA TGG ATC CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGA AAA CCA ACC CCA ACC CAA ACC	(呂, 2007)
qNb-PP2A-F1	GAC CCT GAT GTT GAT GTT CGC T	(Liu et al., 2012)
qNb-PP2A-R1	GAG GGA TTT GAA GAG AGA TTT C	(Liu et al., 2012)
qH015-F4	TCC CCT TGA GAA CAA GTC TA	This study
qH015-R1	AAA CTT TGT GTG GGG TGA A	This study
qN015-F1	GCG CCC AAC CAG ACT GAG ACA A	This study
qN015-R1	CCG GGA CTT TTA ATG TGT GGT GA	This study
qNH015-F2	CAC TGC AGA TAC TAC CTC AAT	This study
qNH015-R2	GTT TCT TGA ACA TGG ATG GGA	This study

- a. Sequences of restriction site are designated in boldface.
- b. T7 promoter sequence is designated in underline.
- c. V indicates A, C, or G; N indicates any base.

表二、本研究中納入序列分析之 potexvirus 及其 GenBank accession numbers

Table 2. GenBank accession numbers for the sequences of potexviruses used in this study

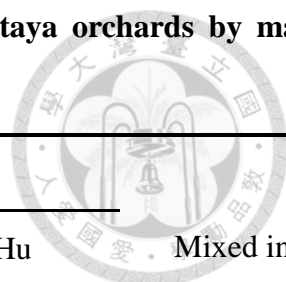
Virus species	Abbreviation	GenBank accession number	Remark
<i>Alstroemeria virus X</i>	AlsVX	AB206396.1	
<i>Alternanthera mosaic virus</i>	AltMV	FJ822136.1	
<i>Allium virus X</i>	AIVX	NC_012211.2	
<i>Asparagus virus 3</i>	AV-3	AB304848.1	
<i>Bamboo mosaic virus</i>	BaMV	D26017.1	
<i>Clover yellow mosaic virus</i>	CIYMV	NC_001753.1	
<i>Cassava common mosaic virus</i>	CsCMV	U23414.1	
<i>Cactus virus X</i>	CVX	NC_002815.2	Isolate Hu
		JF937699.1	Isolate NTU
		LC128411.1	Isolate dragonfruit
<i>Cymbidium mosaic virus</i>	CymMV	U62963.1	
<i>Foxtail mosaic virus</i>	FoMV	M62730.1	
<i>Hydrangea ringspot virus</i>	HdRSV	AY707100.1	
<i>Hosta virus X</i>	HVX	AJ620114.1	
<i>Lettuce virus X</i>	LeVX	AM745758.1	
<i>Lily virus X</i>	LVX	AJ633822.2	
<i>Malva mosaic virus</i>	MaMV	DQ660333.1	
<i>Mint virus X</i>	MVX	AY789138.1	
<i>Nandina mosaic virus</i>	NaMV	AY800279.1	
<i>Narcissus mosaic virus</i>	NMV	D13747.1	
<i>Nerine virus X</i>	NVX	AB219105.1	
<i>Opuntia virus X</i>	OpVX	AY366209.1	
<i>Potato aucuba mosaic virus</i>	PAMV	S73580.1	
<i>Papaya mosaic virus</i>	PapMV	D13957.1	
<i>Pepino mosaic virus</i>	PepMV	AF484251.1	
<i>Phaius virus X</i>	PhaVX	AB353071.1	
<i>Pitaya virus X</i>	PiVX	JF930327.1	
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>	PIAMV	Z21647.1	
<i>Potato virus X</i>	PVX	M63141.1	
<i>Scallion virus X</i>	ScaVX	AJ316085.1	
<i>Schlumbergera virus X</i>	SchVX	AY366207.2	
<i>Strawberry mild yellow edge virus</i>	SMYEV	KR350470.1	
<i>Tamus red mosaic virus</i>	TRMV	JN389521.1	
<i>Tulip virus X</i>	TVX	AB066288.1	
<i>White clover mosaic virus</i>	WCIMV	X06728.1	
<i>Zygocactus virus X</i>	ZyVX	AY366208.1	Isolate B1
		JF930326.1	Isolate P39



表三、以磁性奈米粒子反轉錄聚合酶鏈鎖反應調查田間紅龍果受 CVX 感染之情形

Table 3. Survey of CVX infection by NTU and Hu isolates in three pitaya orchards by magnetic nanoparticle capture RT-PCR (MNC RT-PCR)

Locality	CVX infection	Single infection		Mixed infection
		NTU	Hu	
Chishang, Taitung (臺東池上)	30/30 (100%)	3/30 (10%)	0/30 (0%)	27/30 (90%)
Jiadong, Pintung (屏東佳冬)	29/30 (96.7%)	4/30 (13.3%)	3/30 (10%)	22/30 (73.3%)
Wandang, Pintung (屏東萬丹)	30/30 (100%)	3/30 (10%)	1/30 (3.3%)	26/30 (86.7%)



表四、比較 CVX 分離株之全長度核酸序列相同度(%)

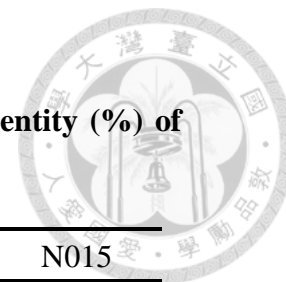


Table 4. Comparison of the full-length nucleotide sequence identity (%) of

CVX isolates

	dragonfruit	Hu	H015	NTU	N015
dragonfruit	-	-	-	-	-
Hu	96.51	-	-	-	-
H015	96.92	97.21	-	-	-
NTU	78.39	78.05	78.32	-	-
N015	78.37	78.13	78.40	97.78	-

表五、比較 CVX 分離株之 RdRP 核酸與胺基酸序列相同度(%)

Table 5. Comparison of the nucleotide and amino acid sequence identity (%)

of the RdRP gene of CVX isolates

	dragonfruit	Hu	H015	NTU	N015
dragonfruit	-	97.15	98.51	87.56	87.95
Hu	96.39	-	97.60	86.59	86.98
H015	96.69	97.02	-	87.89	88.28
NTU	78.15	77.76	78.10	-	98.83
N015	78.19	77.91	78.24	97.75	-

- a. The top half (above the diagonal) of the table shows amino acid identity; the bottom half shows the nucleotide sequence identity.

表六、比較 CVX 分離株之 TGB1 核酸與胺基酸序列相同度(%)

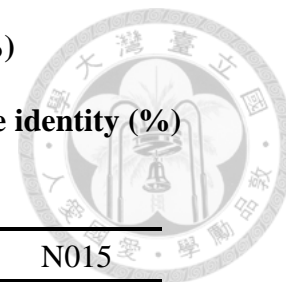


Table 6. Comparison of the nucleotide and amino acid sequence identity (%) of the TGB1 gene of CVX isolates

	dragonfruit	Hu	H015	NTU	N015
dragonfruit	-	99.13	98.25	91.27	91.27
Hu	96.81	-	99.13	92.14	92.14
H015	97.39	97.68	-	91.27	91.27
NTU	78.29	78.29	78.44	-	100
N015	77.60	78.47	78.03	97.54	-

- a. The top half (above the diagonal) of the table shows amino acid identity; the bottom half shows the nucleotide sequence identity.

表七、比較 CVX 分離株之 TGB2 核酸與胺基酸序列相同度(%)

Table 7. Comparison of the nucleotide and amino acid sequence identity (%) of the TGB2 gene of CVX isolates

	dragonfruit	Hu	H015	NTU	N015
dragonfruit	-	94.59	97.27	78.18	78.18
Hu	97.00	-	95.50	73.87	74.11
H015	97.90	97.90	-	78.18	77.27
NTU	81.25	79.12	80.30	-	99.09
N015	80.90	79.12	80.00	99.70	-

- a. The top half (above the diagonal) of the table shows amino acid identity; the bottom half shows the nucleotide sequence identity.

表八、比較 CVX 分離株之 TGB3 核酸與胺基酸序列相同度(%)

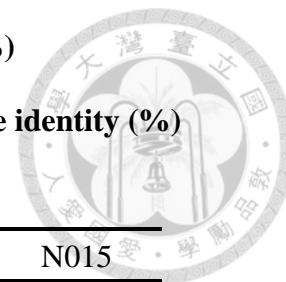


Table 8. Comparison of the nucleotide and amino acid sequence identity (%) of the TGB3 gene of CVX isolates

	dragonfruit	Hu	H015	NTU	N015
dragonfruit	-	95.38	95.31	82.81	82.81
Hu	95.90	-	93.85	83.08	83.08
H015	95.90	95.90	-	85.94	85.94
NTU	80.00	80.51	80.51	-	100
N015	80.51	80.00	81.03	98.44	-

a. The top half (above the diagonal) of the table shows amino acid identity; the bottom half shows the nucleotide sequence identity.

表九、比較 CVX 分離株之 CP 核酸與胺基酸序列相同度(%)

Table 9. Comparison of the nucleotide and amino acid sequence identity (%) of the CP gene of CVX isolates

	dragonfruit	Hu	H015	NTU	N015
dragonfruit	-	98.67	99.11	90.35	91.67
Hu	97.05	-	99.56	90.79	92.11
H015	97.94	97.94	-	91.23	92.54
NTU	76.96	77.50	76.92	-	96.93
N015	77.13	77.10	77.10	96.94	-

a. The top half (above the diagonal) of the table shows amino acid identity; the bottom half shows the nucleotide sequence identity.

表十、比較 CVX-N015 及其它感染仙人掌科植物之 potexviruses 的 RdRP、TGB1、TGB2、TGB3 與 CP 胺基酸序列相同度(%)

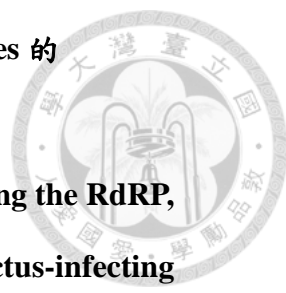


Table 10. Comparison of amino acid sequence identity (%) among the RdRP, TGB1, TGB2, TGB3, and CP genes of CVX-N015 and other cactus-infecting potexviruses

	RdRP	TGB1	TGB2	TGB3	CP
OpVX	67.44	65.22	57.27	41.27	60.17
PiVX	76.28	79.91	63.64	44.78	77.19
SchVX	74.39	79.48	63.64	52.38	77.63
ZyVX-B1	82.64	79.04	65.49	65.08	81.22
ZyVX-P39	82.84	78.60	66.37	65.63	82.53

表十一、比較 CVX-H015 及其它感染仙人掌科植物之 potexviruses 的 RdRP、TGB1、TGB2、TGB3 與 CP 胺基酸序列相同度(%)

Table 11. Comparison of amino acid sequence identity (%) among the RdRP, TGB1, TGB2, TGB3, and CP genes of CVX-H015 and other cactus-infecting potexviruses

	RdRP	TGB1	TGB2	TGB3	CP
OpVX	67.46	66.96	57.27	42.19	59.57
PiVX	76.07	79.04	60.00	47.76	78.22
SchVX	74.36	79.48	63.64	50.00	79.11
ZyVX-B1	82.60	80.79	68.14	59.38	82.30
ZyVX-P39	82.66	80.35	69.03	62.50	81.86

表十二、以即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應分析感染 CVX-N015、CVX-H015 或其重組病毒轉錄體的圓葉菸草原生質體之病毒 RNA 累積量之 Ct 值

Table 12. Ct values for the quantification of viral RNA accumulation in *N. benthamiana* protoplasts transfected with transcripts of CVX-N015, CVX-H015, or their chimeric viruses by quantitative real-time reverse transcription-PCR

Hours post-inoculation	Replicate	Sample	<i>RdRP</i> (Ct)	<i>PP2A</i> (Ct)	Δ Ct (<i>RdRP/PP2A</i>) ^a
24	1	N015	22.569 ± 0.005	22.153 ± 0.067	-0.416
		H015	22.875 ± 0.086	25.156 ± 0.125	2.281
		N015-HRdRP	21.947 ± 0.015	25.289 ± 0.099	3.342
		N015-HCP	22.335 ± 0.103	22.822 ± 0.036	0.487
		H015-NRdRP	22.205 ± 0.088	22.006 ± 0.019	-0.199
		H015-NCP	21.922 ± 0.060	22.286 ± 0.048	0.364
	2	N015	21.784 ± 0.010	16.672 ± 0.022	-5.112
		H015	21.565 ± 0.074	20.931 ± 0.070	-0.634
		N015-HRdRP	21.576 ± 0.059	19.863 ± 0.073	-1.712
		N015-HCP	21.443 ± 0.055	19.702 ± 0.086	-1.741
		H015-NRdRP	21.454 ± 0.029	19.656 ± 0.072	-1.798
		H015-NCP	21.515 ± 0.017	18.522 ± 0.024	-2.993
	3	N015	20.939 ± 0.037	17.777 ± 0.037	-3.162
		H015	21.049 ± 0.074	24.330 ± 0.021	3.282
		N015-HRdRP	21.708 ± 0.021	19.688 ± 0.040	-2.02
		N015-HCP	20.902 ± 0.044	20.074 ± 0.044	-0.828
		H015-NRdRP	20.936 ± 0.024	19.007 ± 0.054	-1.929
		H015-NCP	21.864 ± 0.070	21.644 ± 0.361	-0.22
48	1	N015	22.557 ± 0.026	21.804 ± 0.036	-0.753
		H015	21.998 ± 0.075	22.944 ± 0.027	0.947
		N015-HRdRP	23.502 ± 0.036	27.183 ± 0.093	3.681
		N015-HCP	22.365 ± 0.004	22.705 ± 0.046	0.34
		H015-NRdRP	24.064 ± 0.027	23.340 ± 0.118	-0.725
		H015-NCP	22.220 ± 0.105	20.963 ± 0.014	-1.257
	2	N015	20.883 ± 0.088	16.583 ± 0.025	-4.3
		H015	20.786 ± 0.070	18.883 ± 0.105	-1.903
		N015-HRdRP	20.501 ± 0.069	17.665 ± 0.081	-2.836
		N015-HCP	20.772 ± 0.088	16.874 ± 0.055	-3.898
		H015-NRdRP	20.652 ± 0.027	15.831 ± 0.033	-4.82
		H015-NCP	20.651 ± 0.050	17.326 ± 0.015	-3.325

3	N015	20.693 ± 0.065	17.160 ± 0.040	-3.533
	H015	20.841 ± 0.052	25.369 ± 0.082	4.528
	N015-HRdRP	20.646 ± 0.033	19.815 ± 0.044	-0.832
	N015-HCP	20.749 ± 0.071	19.972 ± 0.008	-0.777
	H015-NRdRP	21.086 ± 0.005	20.462 ± 0.030	-0.624
	H015-NCP	20.691 ± 0.035	21.031 ± 0.052	0.34

a. $\Delta Ct (RdRP/PP2A) = (Ct \text{ value of } RdRP) - (Ct \text{ value of } PP2A)$

表十三、以即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應分析單獨或複合感染 CVX-N015、CVX-H015 轉錄體的圓葉菸草原生質體之病毒 RNA 累積量之 Ct 值

Table 13. Ct values for the quantification of viral RNA accumulation in *N. benthamiana* protoplasts transfected with transcripts of CVX-N015 and/or CVX-H015 by quantitative real-time reverse transcription-PCR

Replicate	Sample	<i>N015-RdRP</i> (Ct)	<i>H015-RdRP</i> (Ct)	<i>PP2A</i> (Ct)	$\Delta\text{Ct} (N015\text{-}RdRP/PP2A)$	$\Delta\text{Ct} (H015\text{-}RdRP/PP2A)$	$\Delta\Delta\text{Ct}^a$
1	N015	16.948 ± 0.036	--	21.784 ± 0.010	-4.837	--	-1.491
	H015	--	19.841 ± 0.024	21.565 ± 0.074	--	-1.724	-3.709
	Mixed	15.400 ± 0.016	16.293 ± 0.033	21.726 ± 0.054	-6.328	-5.433	--
2	N015	17.690 ± 0.022	--	20.538 ± 0.054	-2.848	--	-1.517
	H015	--	20.802 ± 0.024	20.489 ± 0.051	--	0.313	-2.004
	Mixed	16.324 ± 0.037	18.998 ± 0.018	20.689 ± 0.041	-4.365	-1.691	--
3	N015	18.825 ± 0.055	--	20.939 ± 0.037	-2.114	--	-0.956
	H015	--	23.807 ± 0.037	21.049 ± 0.074	--	2.758	-3.783
	Mixed	17.913 ± 0.085	19.958 ± 0.078	20.983 ± 0.041	-3.070	-1.025	--

a. $\Delta\text{Ct} (RdRP/PP2A) = (\text{Ct value of } RdRP) - (\text{Ct value of } PP2A)$

b. $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (N015\text{-}RdRP/PP2A)$ of mixed infection - $\Delta\text{Ct} (N015\text{-}RdRP/PP2A)$ of single infection; $\Delta\text{Ct} (H015\text{-}RdRP/PP2A)$ of mixed infection - $\Delta\text{Ct} (H015\text{-}RdRP/PP2A)$ of single infection

表十四、使用不同組合細胞壁分解酵素對紅龍果原生質體產量之影響

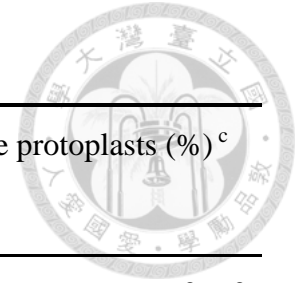
Table 14. The yield data of pitaya protoplasts prepared from different combinations of cell-wall-degrading enzymes

Enzyme solution	Protoplast density ($\times 10^5$ cells/mL) ^a		Percentage of viable protoplasts (%) ^c
	Bright-field microscopy	Fluorescence microscopy ^b	
1% snailase	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
1% cellulase + 1% macerozyme	1.74 \pm 0.33	1.58 \pm 0.37	90.26 \pm 4.72
1% cellulase + 1% snailase	2.53 \pm 0.63	2.27 \pm 0.53	90.26 \pm 1.86
1% cellulase + 1% snailase + 1% macerozyme	10.68 \pm 0.46	9.95 \pm 0.64	93.13 \pm 2.15

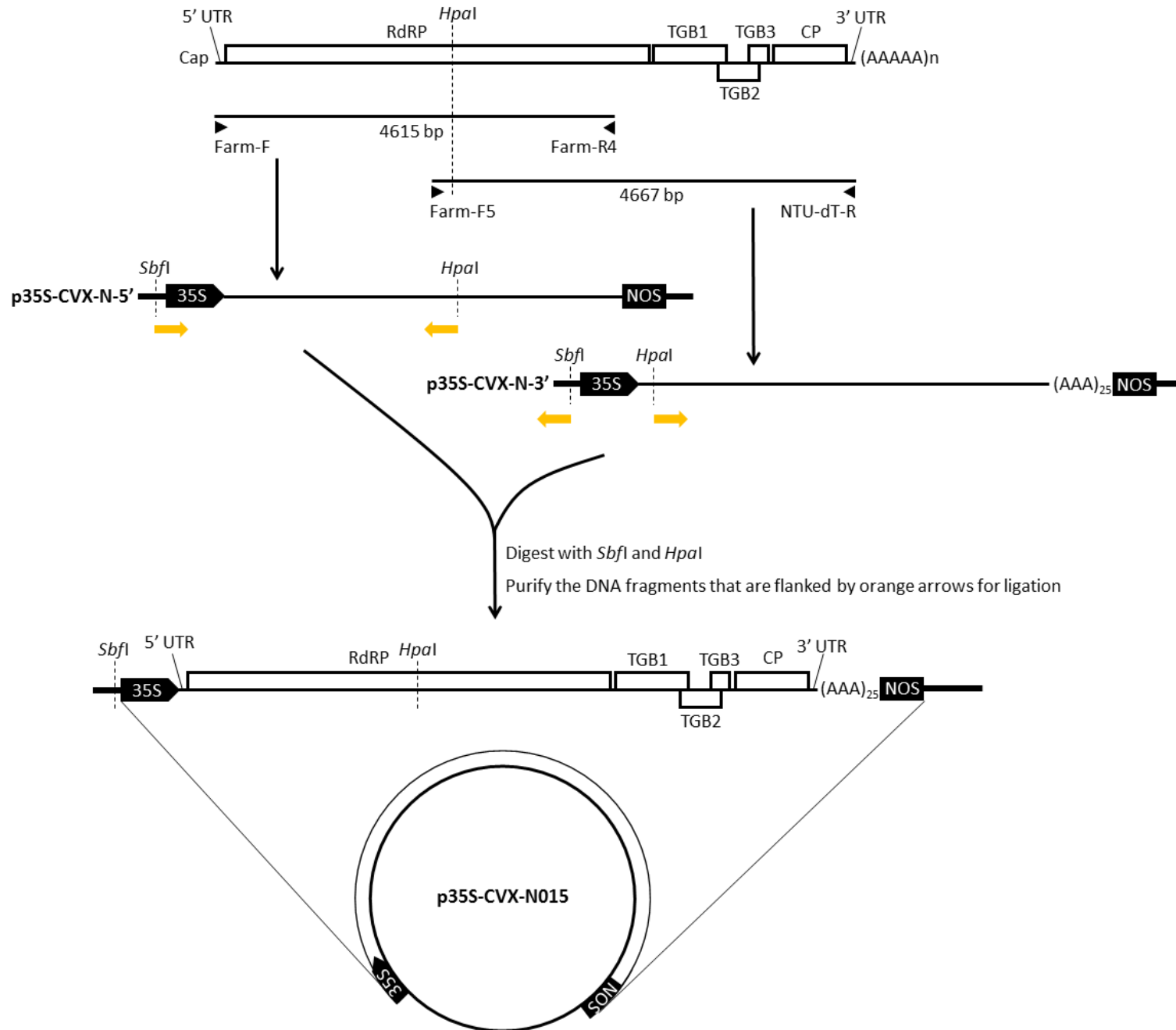
a. Average \pm SE from triplicate experiments.

b. Protoplast suspension was treated with fluorescein diacetate (FDA), which stains viable cells, right before observation.

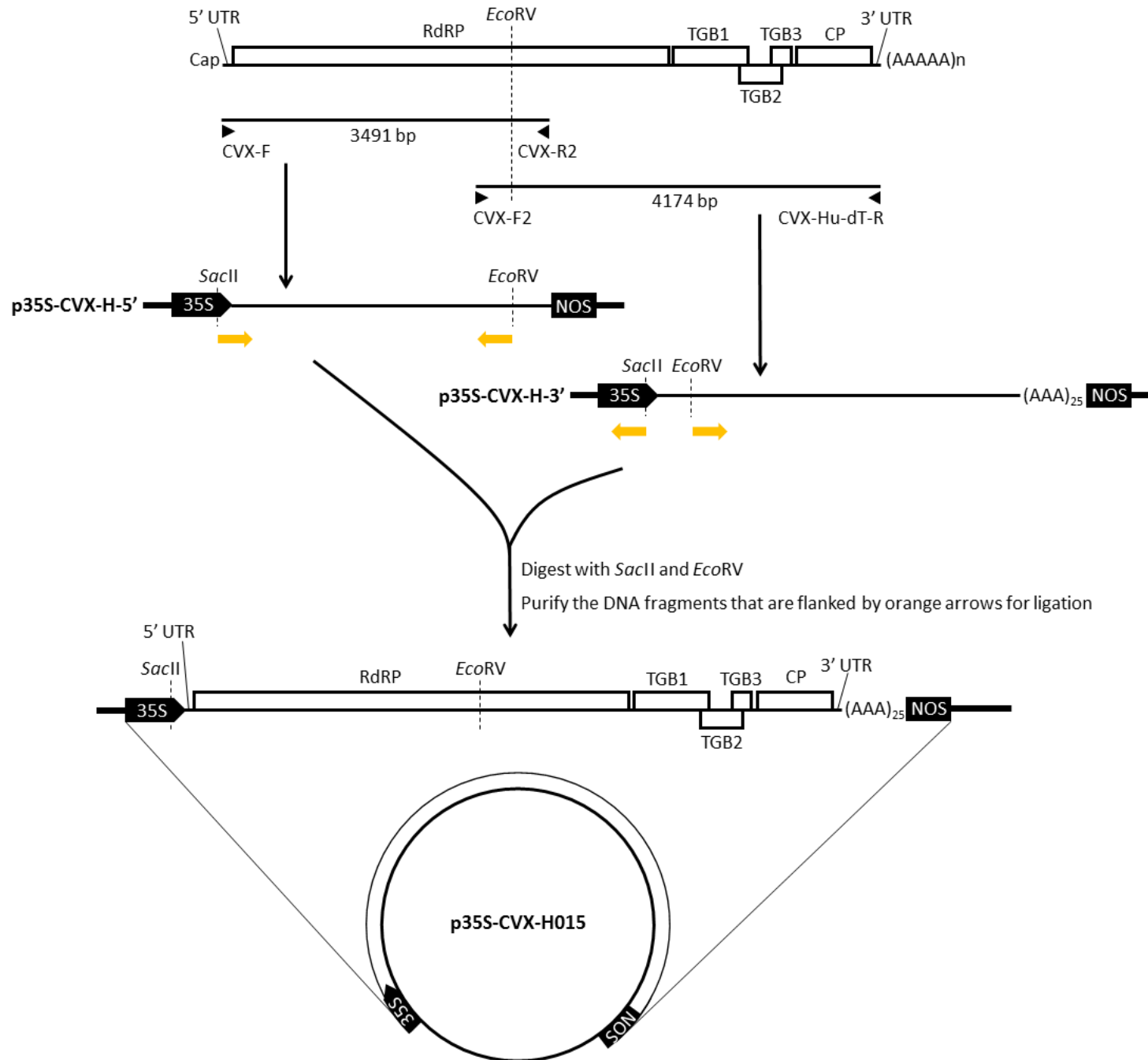
c. Defined as a percentage of the number of protoplast density assessed using fluorescence microscope of the number of protoplast density assessed using bright-field microscopy.



(a)

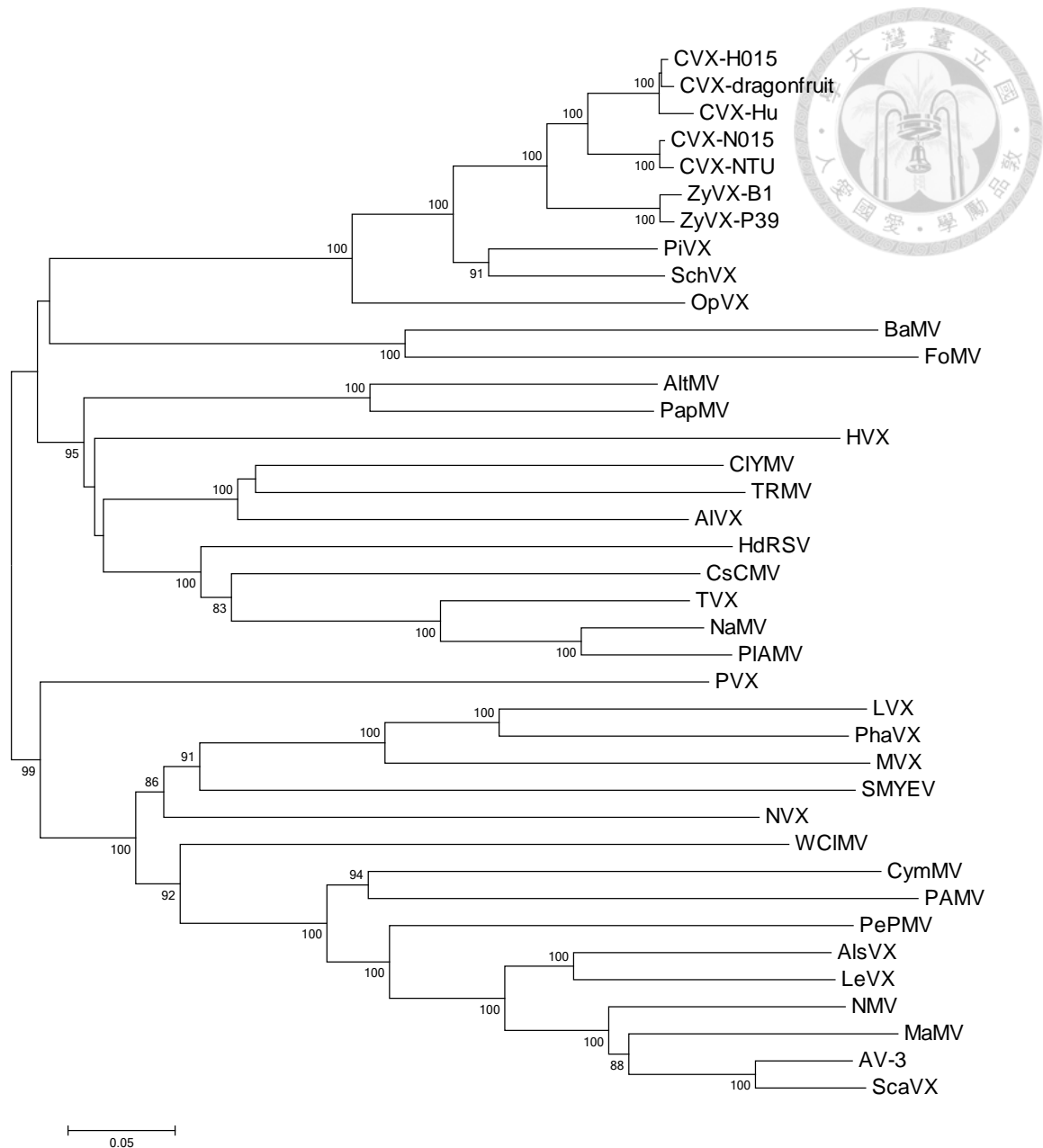


(b)



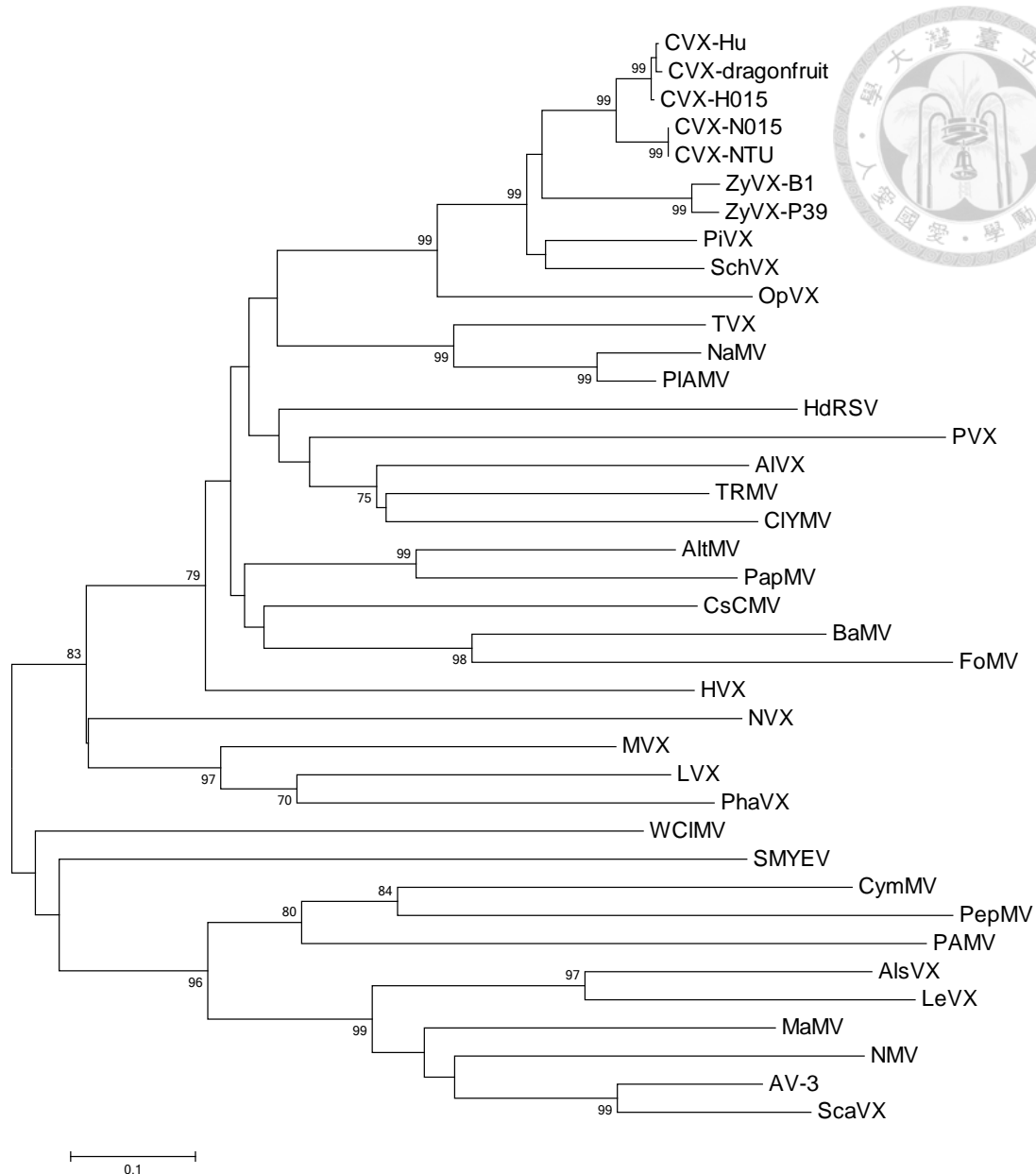
圖一、建構以 35S 啟動子驅動的 CVX-N015 及 CVX-H015 的全長度 cDNA 選殖株之選殖策略

Figure 1. Strategies for constructing the 35S promoter-driven full-length cDNA clones of CVX. (a) Two-step cloning method for generating p35S-CVX-N015. The 5' and 3' fragments of CVX-N015 genome, which share a unique restriction site of *HpaI* in their overlapping region, were separately cloned into p35S vectors to attain p35S-CVX-N-5' and p35S-CVX-N-3'. After treating both constructs with *SbfI* and *HpaI*, the smaller fragment (flanked by orange arrows) generated from digested p35S-CVX-N-5' was ligated into the larger *HpaI-SbfI* fragment (flanked by orange arrows) generated from digested p35S-CVX-N-3' to create a full-length cDNA clone, p35S-CVX-N015. (b) Two-step cloning method for generating p35S-CVX-H015. As with the strategy in (a), the 5' and 3' fragments of CVX-H015 genome, which share a unique restriction site of *EcoRV* in their overlapping region, were separately cloned into p35S vectors to attain p35S-CVX-H-5' and p35S-CVX-H-3'. Subsequently, the smaller *EcoRV-SacII* fragment (flanked by orange arrows) generated from p35S-CVX-H-5' was ligated into the larger *SacII-EcoRV* fragment (flanked by orange arrows) generated from p35S-CVX-H-3' to create a full-length cDNA clone, p35S-CVX-H015. 35S, *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promoter; NOS, nopaline synthase terminator.



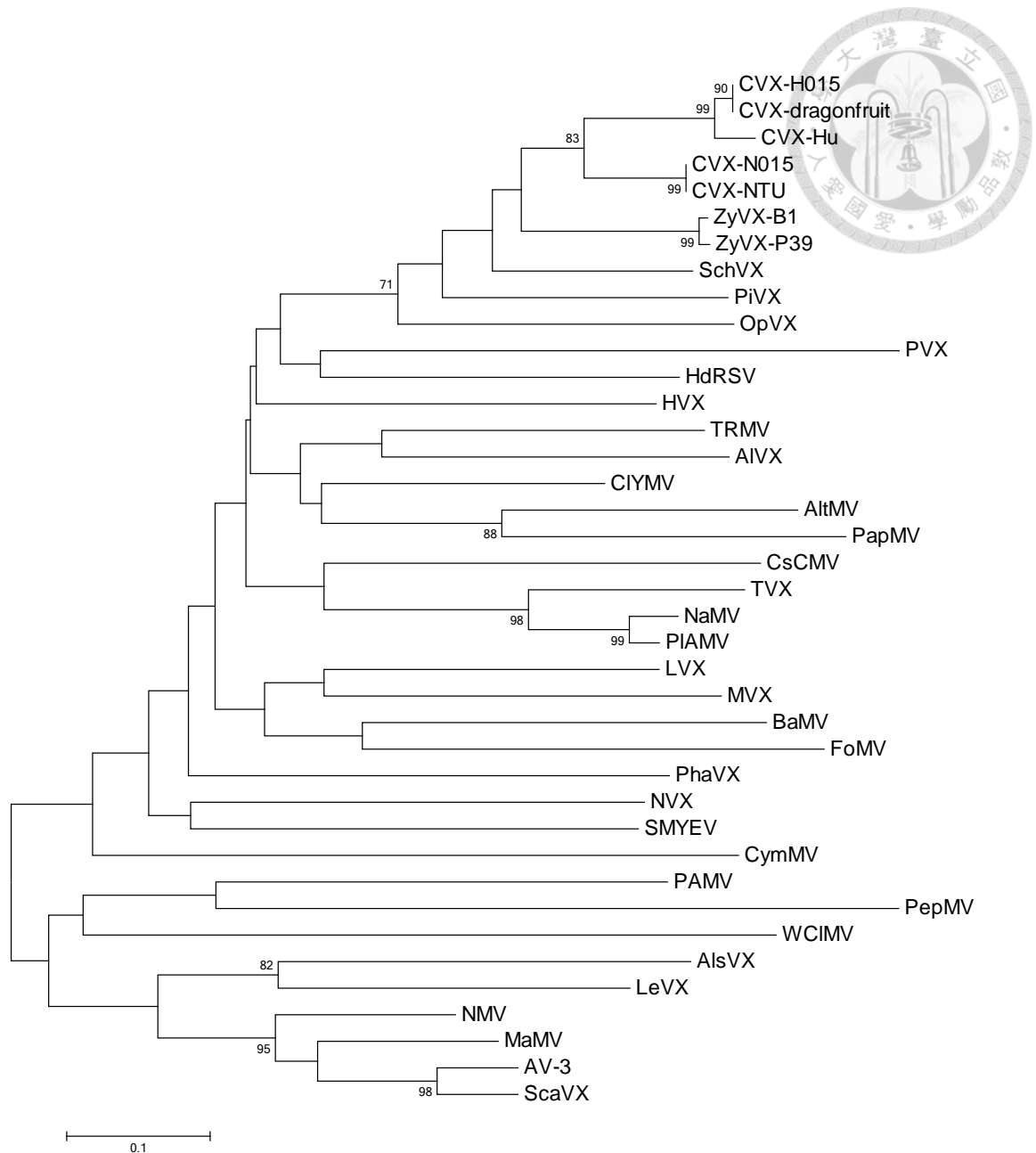
圖三、以 CVX-N015 與-H015 及其他 potexvirus 的 RdRP 胺基酸序列進行親緣演化分析

Figure 3. Phylogenetic analysis of CVX-N015 and -H015 and published potexvirus RdRP amino acid sequences. The neighbor-joining method of MEGA was used to construct the phylogenetic tree. The bootstrap values with 1,000 replicates are indicated at each node. The vertical lengths are arbitrary; the horizontal lengths are proportional to the amino acid differences of the sequences. Support values lower than 70% were not included in the tree. Scale bar, 0.05 substitutions per site.



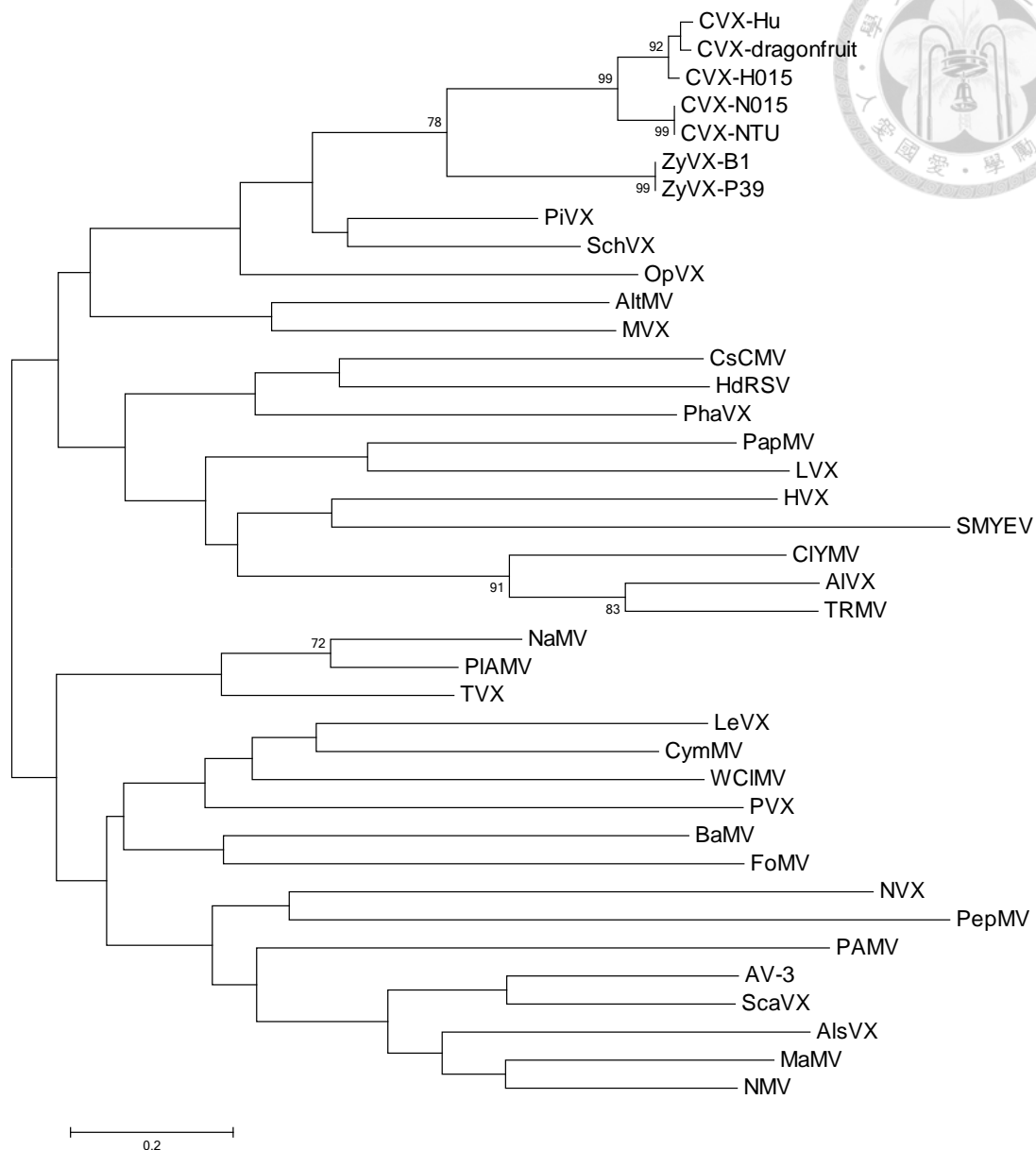
圖四、以 CVX-N015 與-H015 及其他 potexvirus 的 TGB1 胺基酸序列進行親緣演化分析

Figure 4. Phylogenetic analysis of CVX-N015 and -H015 and published potexvirus TGB1 amino acid sequences. The neighbor-joining method of MEGA was used to construct the phylogenetic tree. The bootstrap values with 1,000 replicates are indicated at each node. The vertical lengths are arbitrary; the horizontal lengths are proportional to the amino acid differences of the sequences. Support values lower than 70% were not included in the tree. Scale bar, 0.1 substitutions per site.



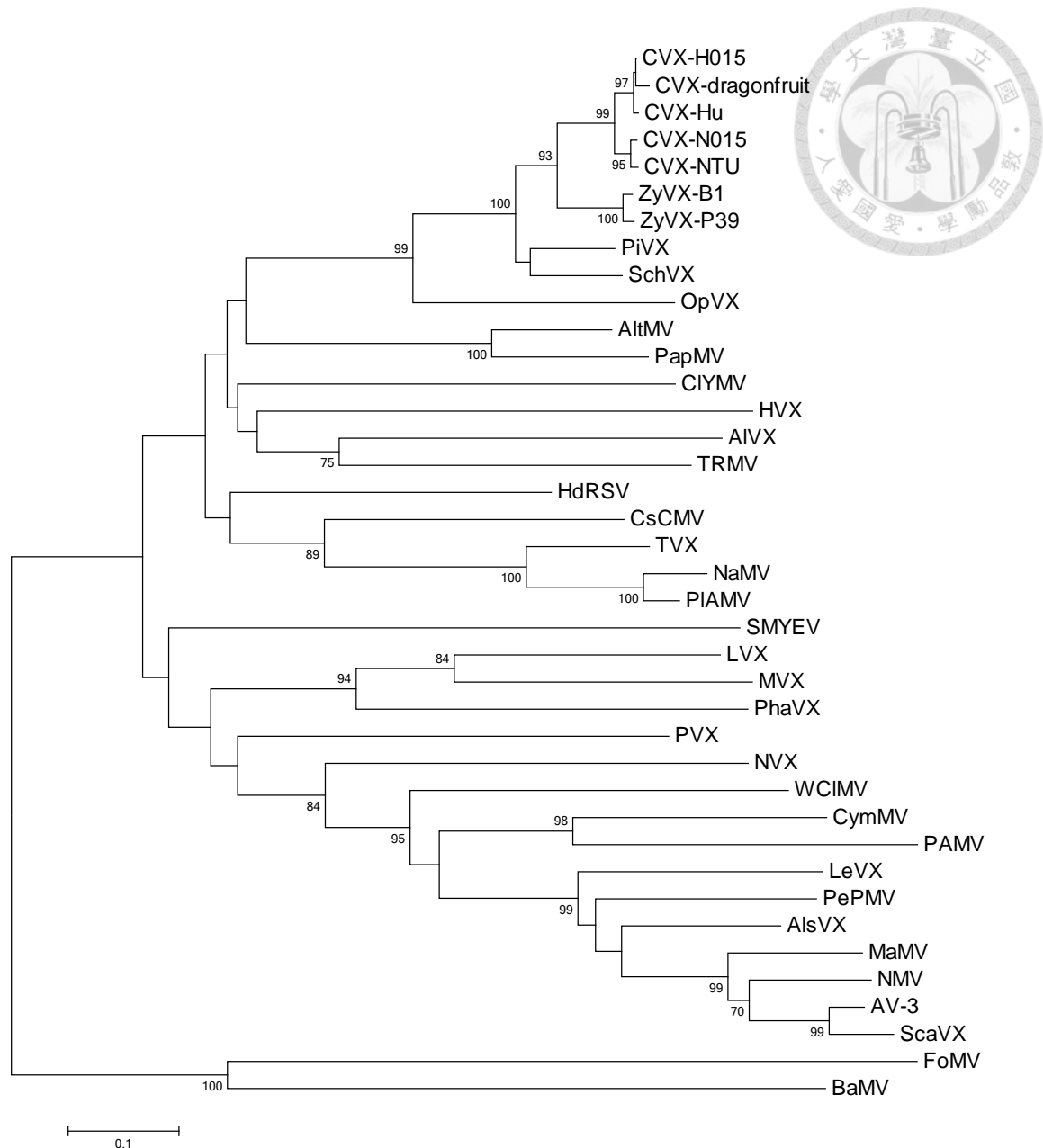
圖五、以 CVX-N015 與-H015 及其他 potexvirus 的 TGB2 胺基酸序列進行親緣演化分析

Figure 5. Phylogenetic analysis of CVX-N015 and -H015 and published potexvirus TGB2 amino acid sequences. The neighbor-joining method of MEGA was used to construct the phylogenetic tree. The bootstrap values with 1,000 replicates are indicated at each node. The vertical lengths are arbitrary; the horizontal lengths are proportional to the amino acid differences of the sequences. Support values lower than 70% were not included in the tree. Scale bar, 0.1 substitutions per site.



圖六、以 CVX-N015 與-H015 及其他 potexvirus 的 TGB3 胺基酸序列進行親緣演化分析

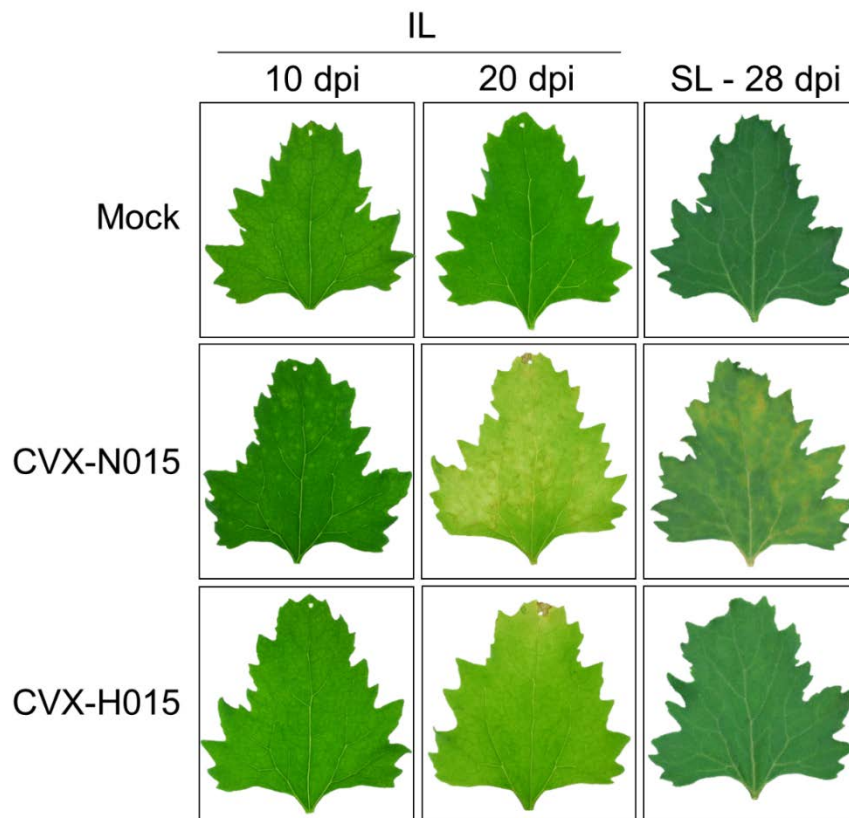
Figure 6. Phylogenetic analysis of CVX-N015 and -H015 and published potexvirus TGB3 amino acid sequences. The neighbor-joining method of MEGA was used to construct the phylogenetic tree. The bootstrap values with 1,000 replicates are indicated at each node. The vertical lengths are arbitrary; the horizontal lengths are proportional to the amino acid differences of the sequences. Support values lower than 70% were not included in the tree. Scale bar, 0.2 substitutions per site.



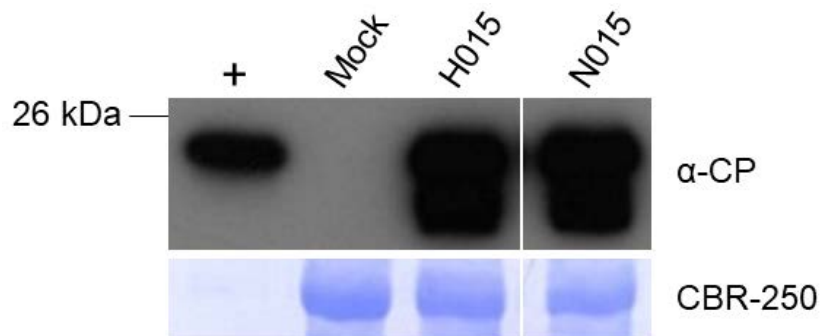
圖七、以 CVX-N015 與-H015 及其他 potexvirus 的 CP 胺基酸序列進行親緣演化分析

Figure 7. Phylogenetic analysis of CVX-N015 and -H015 and published potexvirus CP amino acid sequences. The neighbor-joining method of MEGA was used to construct the phylogenetic tree. The bootstrap values with 1,000 replicates are indicated at each node. The vertical lengths are arbitrary; the horizontal lengths are proportional to the amino acid differences of the sequences. Support values lower than 70% were not included in the tree. Scale bar, 0.1 substitutions per site.

(a)



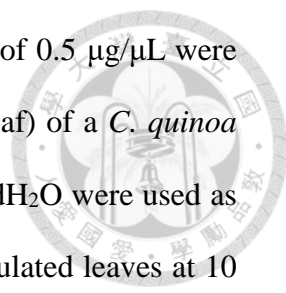
(b)

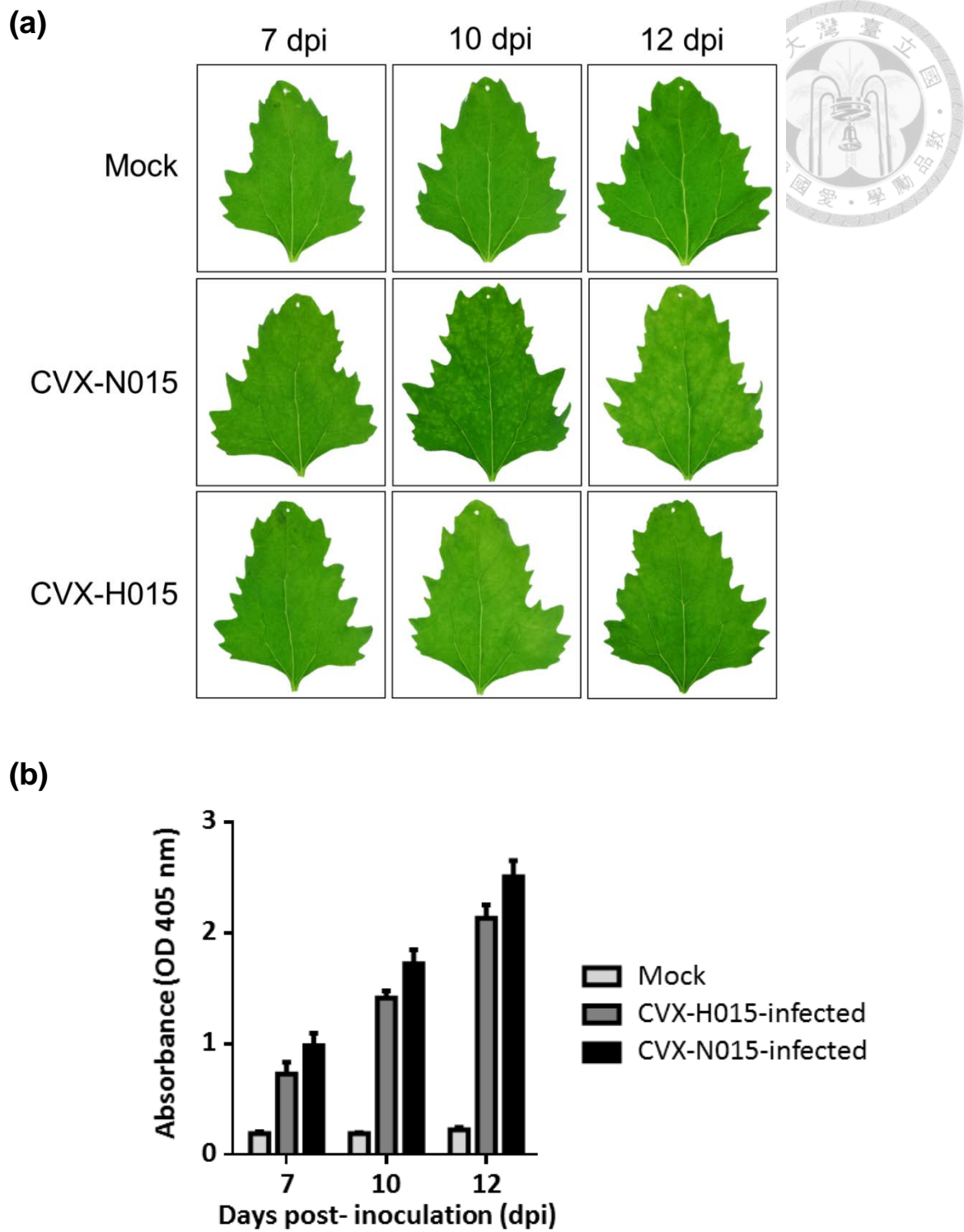


圖八、於白藜上確認 35S 啟動子驅動之 CVX-N015 及 CVX-H015 質體的感染能力

Figure 8. Confirmation of p35S-CVX-N015 or p35S-CVX-H015 infection in *Chenopodium quinoa* plants. (a) Photographs of symptoms on inoculated (IL) and systemic leaves (SL) taken at indicated days post-inoculation (dpi). p35S-CVX-H015

or p35S-CVX-N015 plasmids that were fixed at the concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ were rub-inoculated onto top three leaves (final quantity of 10 μg per leaf) of a *C. quinoa* plant which was at the ten-true-leaf stage. Plants inoculated with ddH₂O were used as the mock treatment. **(b)** Western blot detection of CVX CP in inoculated leaves at 10 dpi. Five ng of CVX particles were loaded as positive (indicated as "+") control. The lower panel shows the Coomassie brilliant blue R250 (CBR-250)-stained loading controls.



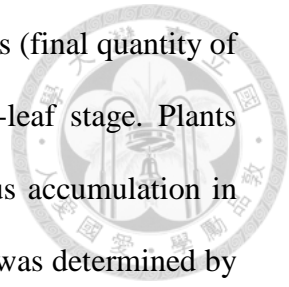


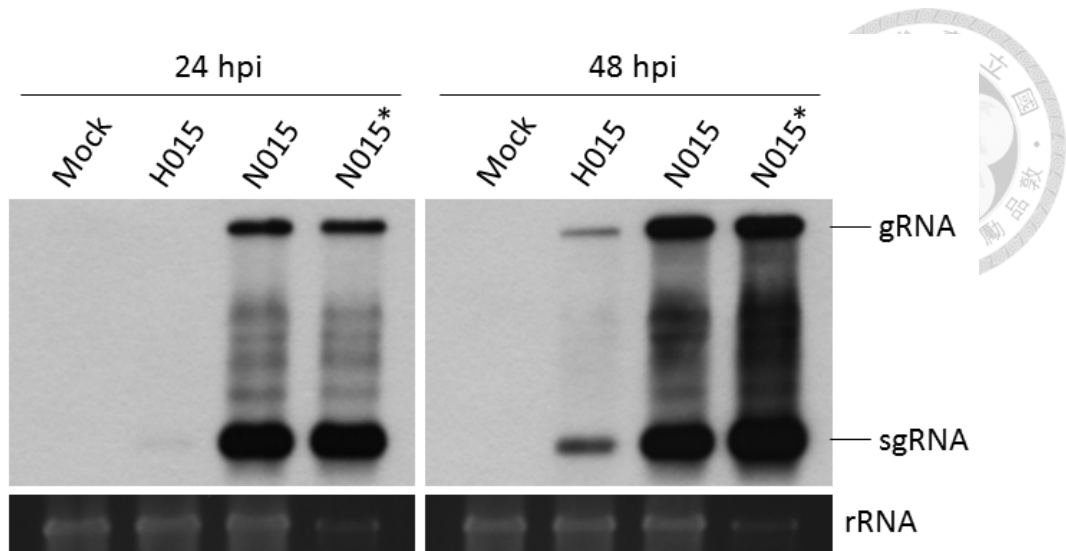
圖九、於白藜上比較 CVX-N015 及 CVX-H015 的感染力

Figure 9. Infectivity assay of CVX-N015 and CVX-H015 in *C. quinoa* plants. (a)

Photographs of local symptoms on leaves inoculated with p35S-CVX-H015 or p35S-CVX-N015. p35S-CVX-H015 or p35S-CVX-N015 plasmids that were fixed at the

concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ were rub-inoculated onto top three leaves (final quantity of 10 μg per leaf) of a *C. quinoa* plant which was at the ten-true-leaf stage. Plants inoculated with ddH₂O were used as the mock treatment. **(b)** Virus accumulation in inoculated leaves, of which symptoms had been recorded as in (a), was determined by indirect enzyme-linked immune sorbent assay (indirect ELISA). The three inoculated leaves of a plant were collected together as an individual sample. Bars represent average values and standard deviations from three different plants of a representative experiment.



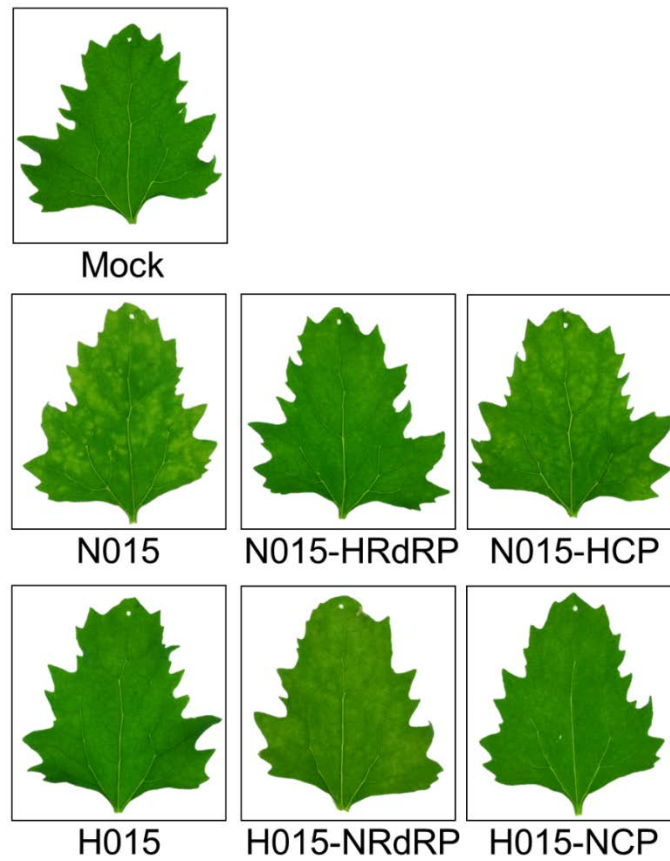


圖十、以北方墨點法分析感染 CVX-N015 或 CVX-H015 轉錄體的圓葉菸草原生質體之總體 RNA

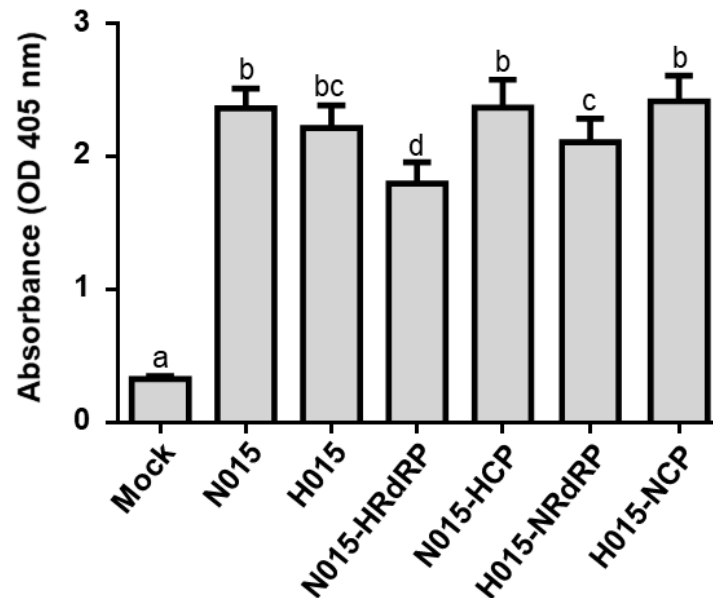
Figure 10. Northern blot of total RNA extracted from *Nicotiana benthamiana* protoplasts transfected with transcripts of CVX-N015 or CVX-H015. After transfected with 10 µg viral transcripts of CVX-N015 or -H015, total cellular RNA was extracted at 24 hours post-inoculation (hpi) and 48 hpi, electrophoresed in an agarose gel, and blotted onto a nylon membrane that were then probed with DIG-labeled cDNA probes corresponding to CVX CP gene. Protoplasts transfected with ddH₂O were used as the mock treatment. Lane N015* contained 1/5 amount of total RNA of lane N015. The lower panel shows the EtBr-stained loading controls.



(a)

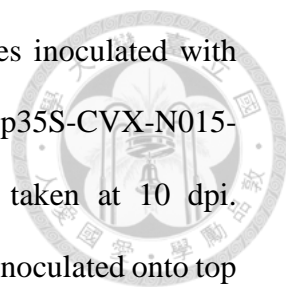


(b)

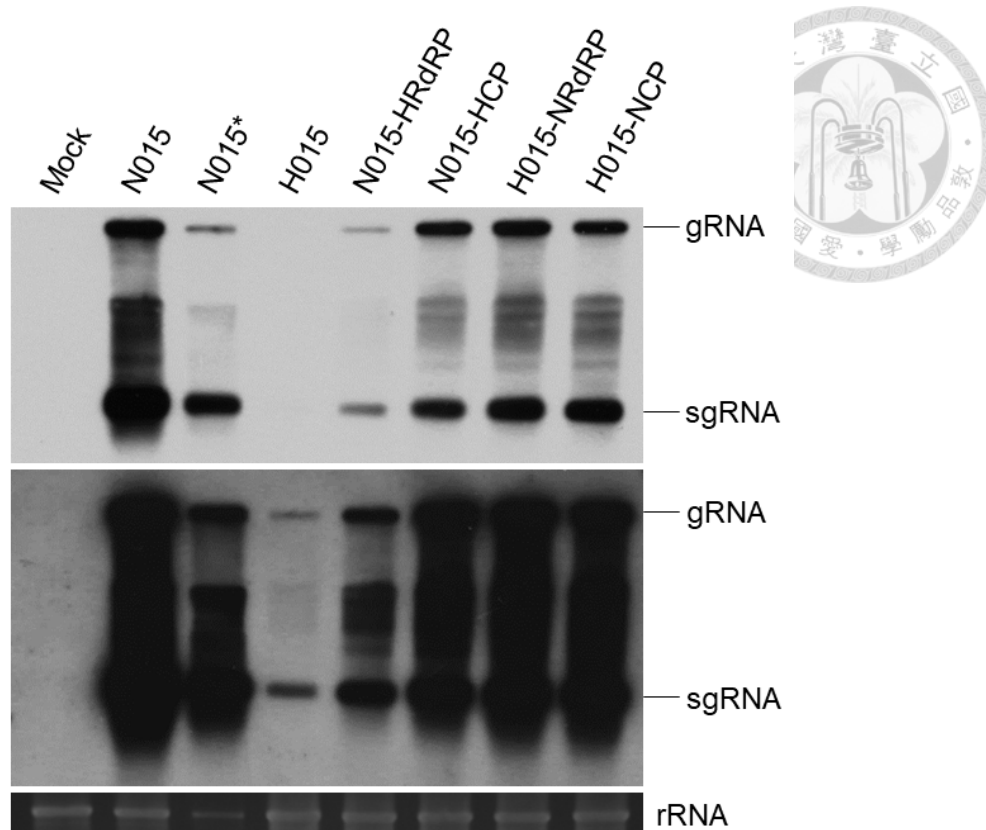


圖十一、於白藜上比較 CVX-N015、CVX-H015 及其重組病毒的感染力

Figure 11. Infectivity assay of CVX-N015, CVX-H015, and their chimeric viruses

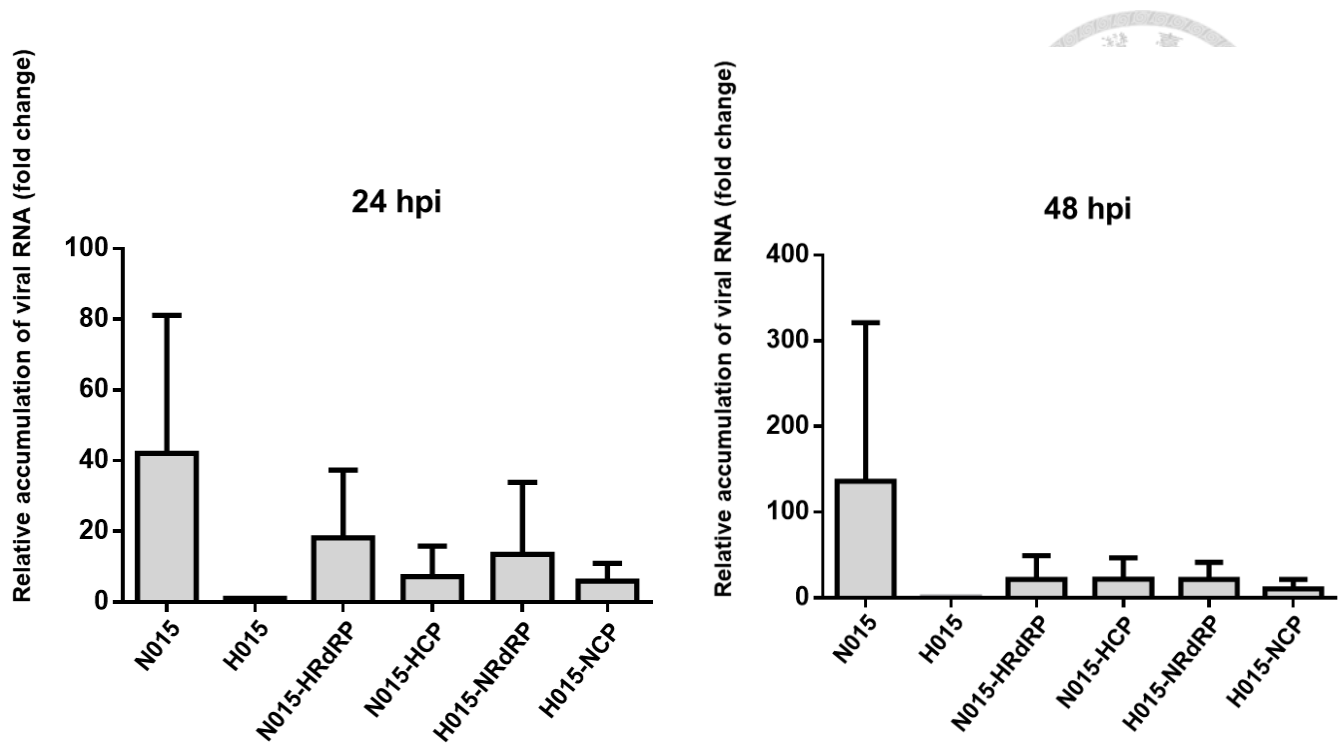


in *C. quinoa* plants. (a) Photographs of local symptoms on leaves inoculated with p35S-CVX-H015, p35S-CVX-N015, p35S-CVX-N015-HRdRP, p35S-CVX-N015-HCP, p35S-CVX-H015-NRdRP, or p35S-CVX-H015-NCP were taken at 10 dpi. Plasmids that were fixed at the concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ were rub-inoculated onto top three leaves (final quantity of 10 μg per leaf) of a *C. quinoa* plant which was at the ten-true-leaf stage. Plants inoculated with ddH₂O were used as the mock treatment. (b) Virus accumulation in inoculated leaves, of which symptoms had been recorded as in (a), was determined by indirect ELISA. The three inoculated leaves of a plant were collected together as an individual sample. ELISA experiments were repeated three times, and bars represent average values and standard deviations obtained from triplicate samples of a representative experiment. Different letters above bars indicate a significant difference among the means of the treatments ($P \leq 0.05$) according to one-way ANOVA.



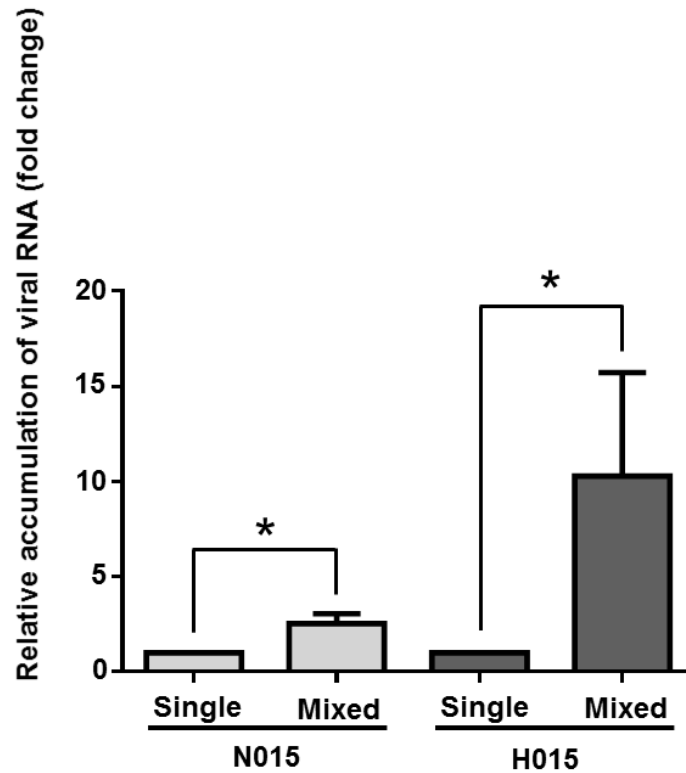
圖十二、以北方墨點法分析感染 CVX-N015、CVX-H015 或其重組病毒轉錄體的圓葉菸草原生質體之總體 RNA

Figure 12. Northern blot of total RNA extracted from *N. benthamiana* protoplasts transfected with transcripts of CVX-N015, CVX-H015, or their chimeric viruses. After transfected with 10 μ g viral transcripts of CVX-N015, CVX-H015, or their chimeric viruses, total cellular RNA was extracted at 48 hpi, electrophoresed in an agarose gel, and blotted onto a nylon membrane that were then probed with DIG-labeled cDNA probes corresponding to CVX CP genes. Protoplasts transfected with ddH₂O were used as the mock treatment. Lane N015* contained 1/10 amount of total RNA of lane N015. The middle panel (5-min exposure) shows longer exposure of the upper panel (15-sec exposure). The lower panel shows the EtBr-stained loading controls.



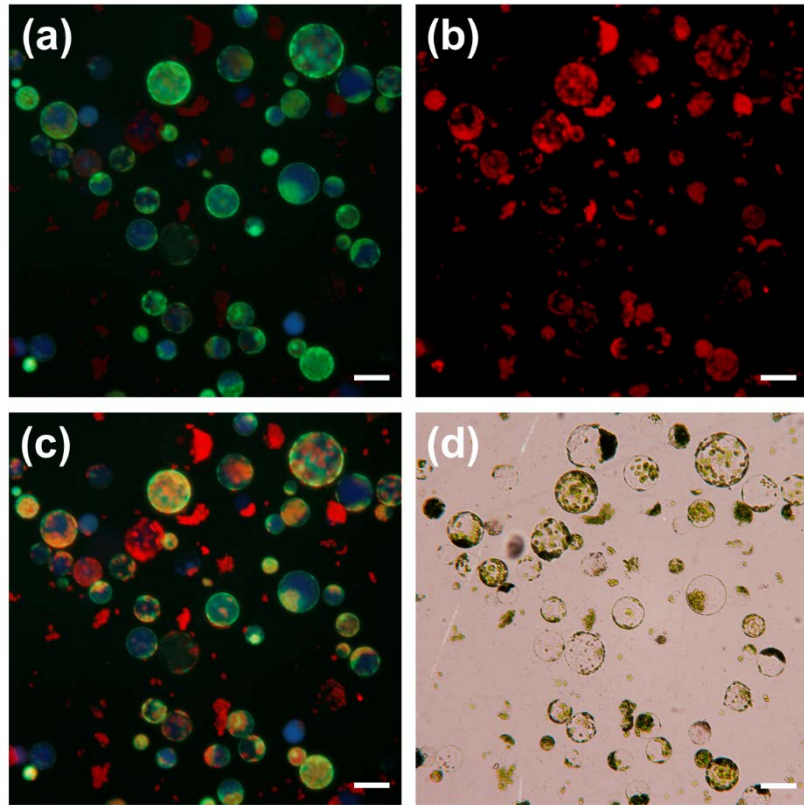
圖十三、以即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應分析感染 CVX-N015、CVX-H015 或其重組病毒轉錄體的圓葉菸草原生質體之病毒 RNA 累積量

Figure 13. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of viral RNA accumulation in *N. benthamiana* protoplasts transfected with transcripts of CVX-N015, CVX-H015, or their chimeric viruses. After transfected with 10 µg viral transcripts of CVX-N015, CVX-H015, or their chimeric viruses, total cellular RNA was extracted at 24 hpi and 48 hpi, followed by DNase I treatment and phenol-chloroform extraction, and then reversely transcribed with oligo(dT) primer. A primer set that targets conserved region of CVX RdRP genes was used in RT-qPCR. The data were normalized to tobacco endogenous gene PP2A and represented as fold-change that is relative to CVX-H015-transfected treatment. Means and standard deviations of three independent experiments are shown.



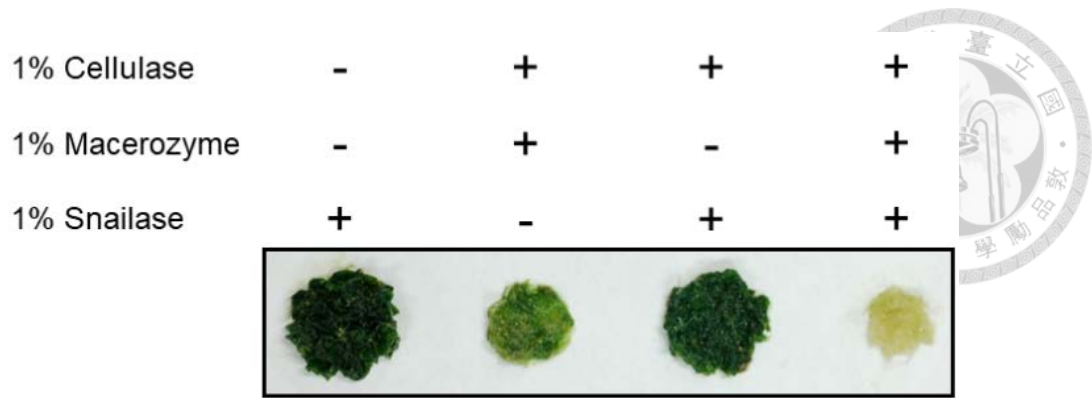
圖十四、以即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應分析單獨或複合感染 CVX-N015、CVX-H015 轉錄體的圓葉菸草原生質體之病毒 RNA 累積量

Figure 14. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of viral RNA accumulation in *N. benthamiana* protoplasts transfected with transcripts of CVX-N015 and/or CVX-H015. After transfected with 10 μ g each viral transcripts of CVX-N015 and/or CVX-H015, total cellular RNA was extracted at 24 hpi, followed by DNase I treatment and phenol-chloroform extraction, and then reversely transcribed with oligo(dT) primer. Isolate-specific primers that target CVX RdRP gene was used in RT-qPCR. The data of mixed transfection were normalized to tobacco endogenous gene PP2A and represented as fold-change that is relative to the values obtained from single virus-transfected treatment. Means and standard deviations of three independent experiments are shown. Star signs above bars indicate a significant difference among the means of the treatments ($P \leq 0.05$) according to Student's *t*-test.



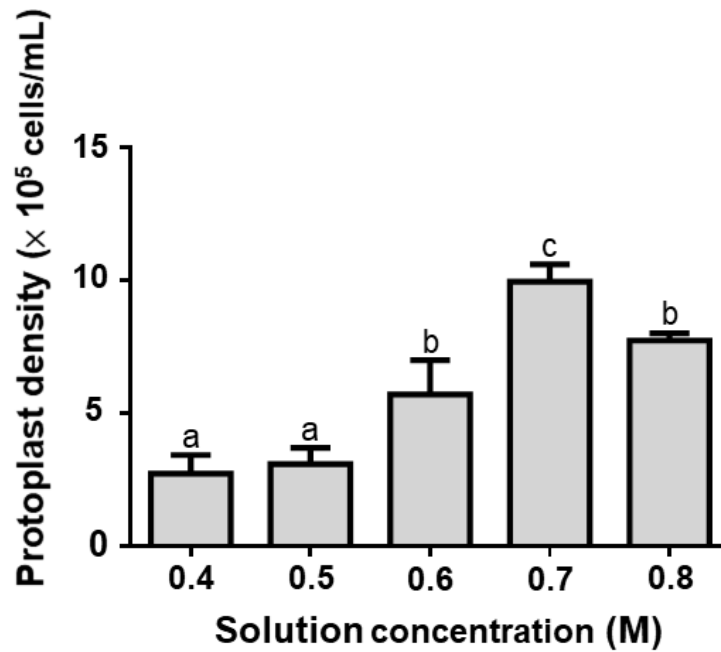
圖十五、紅龍果原生質體之顯微影像

Figure 15. Microscopic pictures of isolated pitaya protoplasts. (a) Green fluorescence of viable pitaya protoplasts after FDA staining; red ones were considered to be dead. (b) Autofluorescence of chloroplasts. (c) Merged images of (a) and (b). (d) Bright field images. Scale bars = 50 μm .



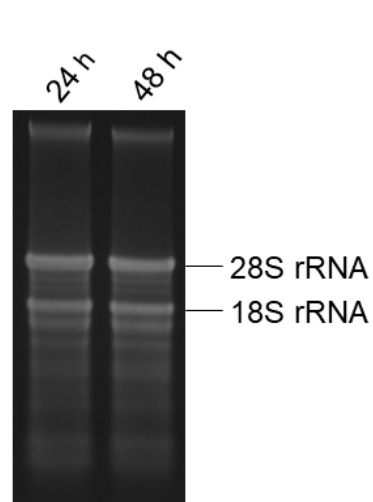
圖十六、紅龍果實生苗經不同組合的細胞壁分解酵素作用後殘餘組織之外觀

Figure 16. Remaining pitaya tissues that had been treated with different combinations of cell-wall-degrading enzymes. All treatments were incubated for 16 hours in dark at 25°C for enzymatic digestion, and then the pitaya tissues were harvested and kept being washed with washing medium until no more release of protoplasts. The presence and absence of certain enzymes are indicated as "+" and "-" respectively.



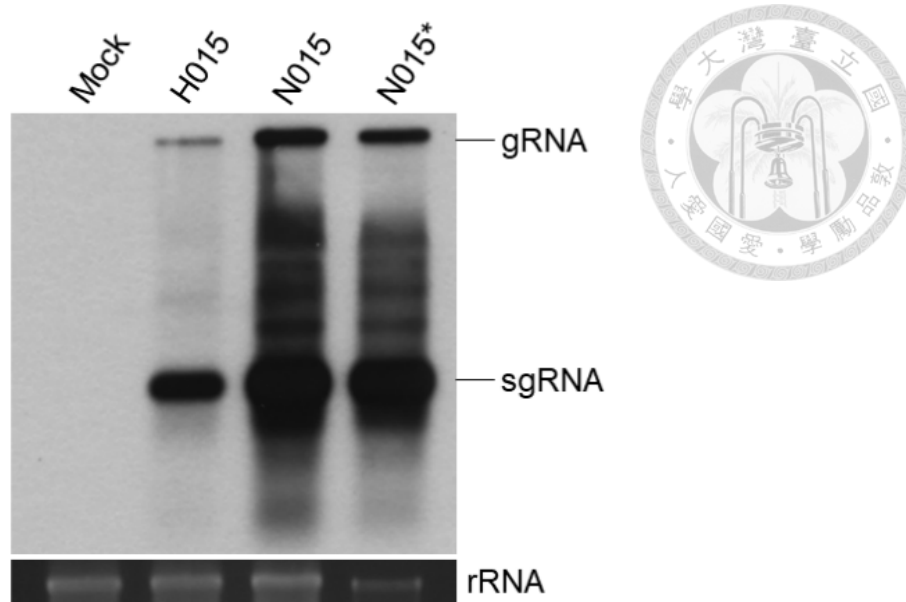
圖十七、溶液濃度對紅龍果原生質體產量之影響

Figure 17. Effect of solution concentration on pitaya protoplast yield. The ideal concentration of solution (mannitol solution, washing medium, and sucrose solution) was determined by estimation of protoplast yield with cell-wall-degrading enzyme mixture composed of cellulase, macerozyme, and snailase. Error bars show standard deviations for changes calculated from triplicate experiments. Different letters above bars indicate a significant difference among the means of the treatments ($P \leq 0.05$) according to one-way ANOVA.



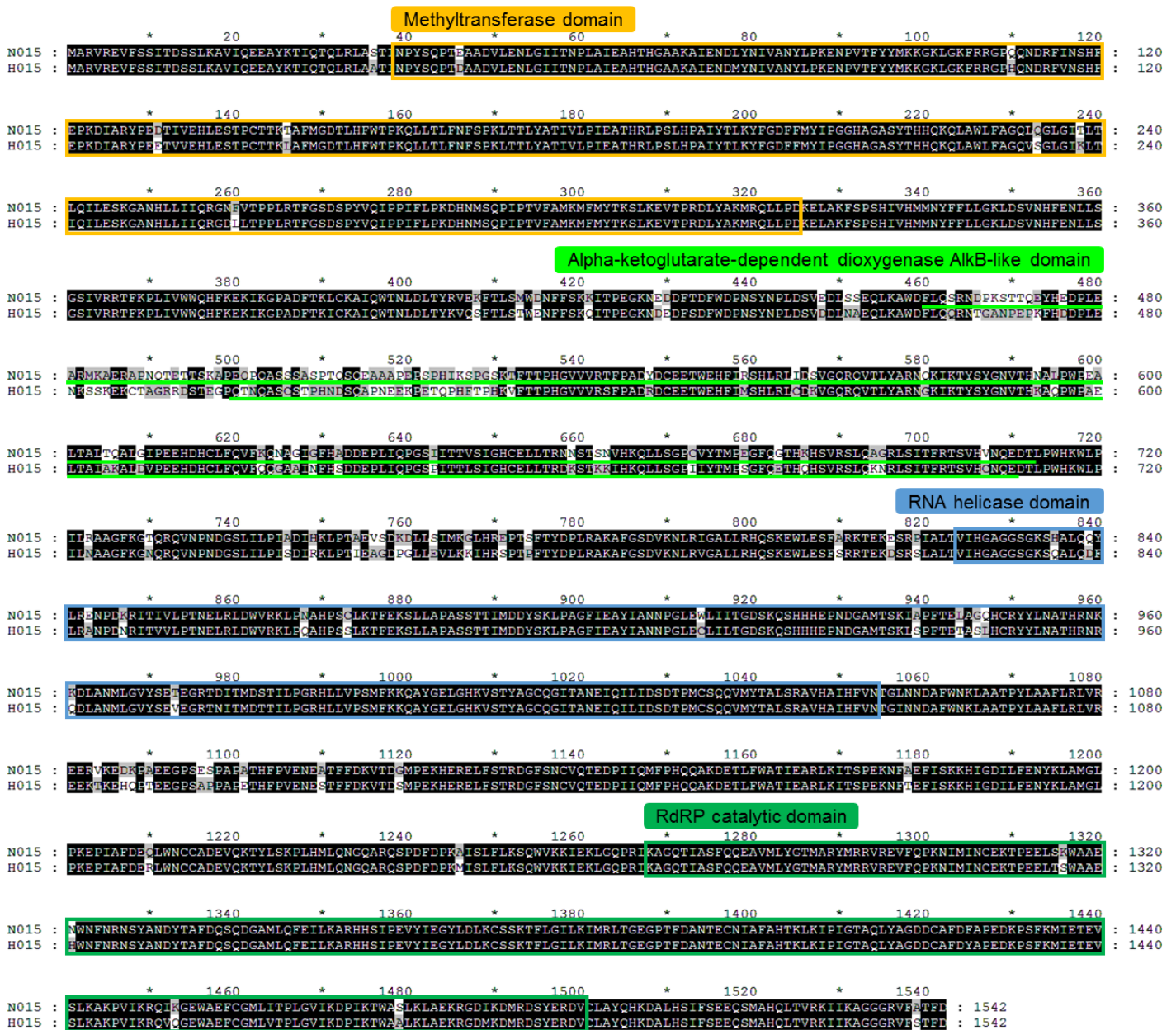
圖十八、以瓊脂膠體電泳分析紅龍果原生質體之 RNA 品質

Figure 18. RNA analysis of pitaya protoplasts by agarose gel electrophoresis. After 24- and 48-hour incubation in culture media, protoplasts were collected for RNA extraction. The 28S and 18S rRNA bands are indicated.



圖十九、以北方墨點法分析感染 CVX-N015 或 CVX-H015 轉錄體的紅龍果原生質體之總體 RNA

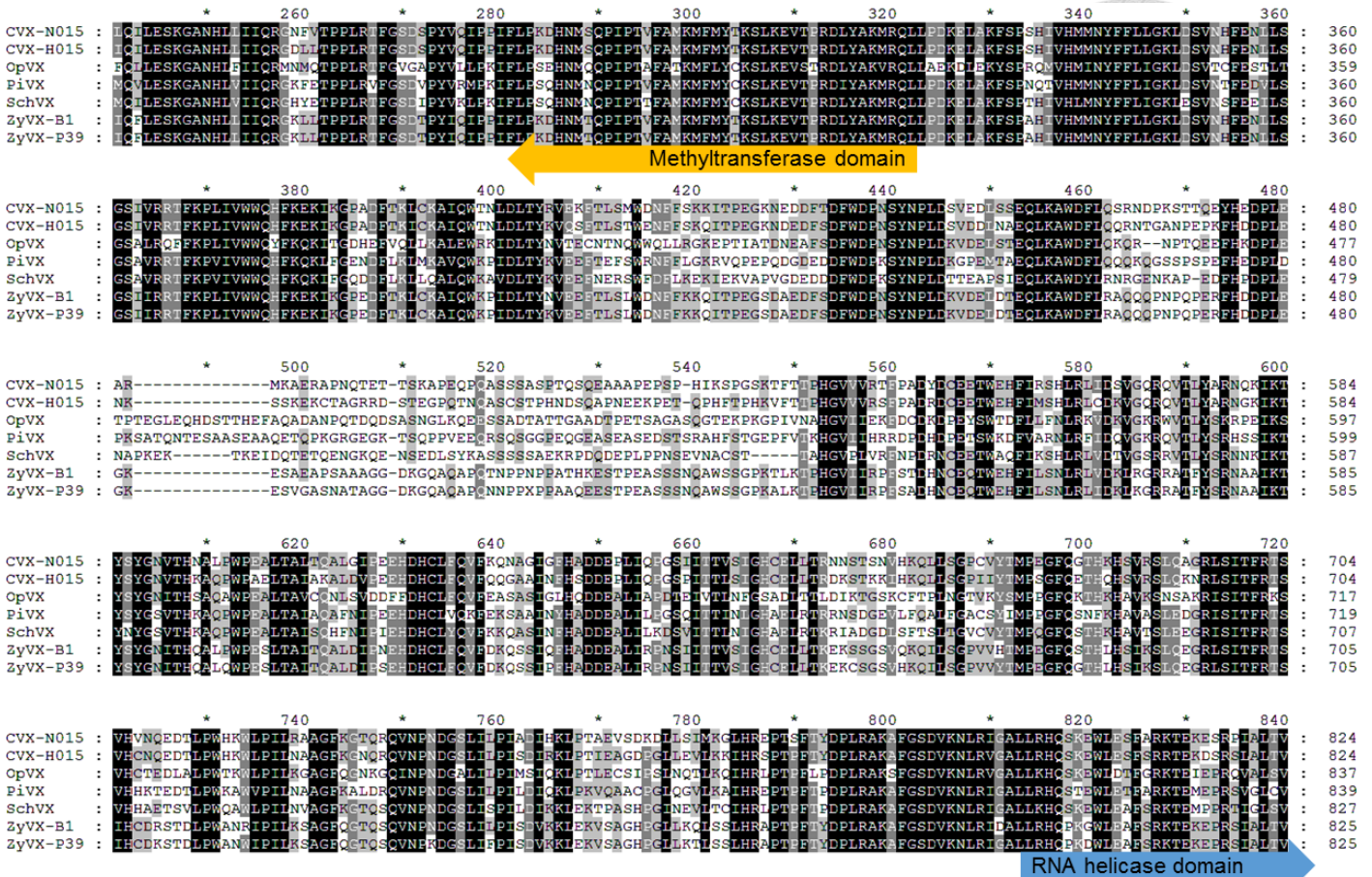
Figure 19. Northern blot of total RNA extracted from pitaya protoplasts transfected with CVX-N015 or CVX-H015 transcripts. After transfected with 10 μ g viral transcripts of CVX-N015 or CVX-H015, total cellular RNA was extracted at 48 hpi, electrophoresed in an agarose gel, and blotted onto a nylon membrane that were then probed with DIG-labeled cDNA probes corresponding to CVX CP genes. Protoplasts transfected with ddH₂O were used as the mock treatment. Lane N015* contained 1/5 amount of total RNA of lane N015. The lower panel shows the EtBr-stained loading controls.



圖二十、CVX-N015 與 CVX-H015 之 RdRP 胺基酸序列比對

Figure 20. Amino acid sequence alignment of CVX-N015 and -H015 RdRPs. Sequence alignment was done by BioEdit; domain prediction was done by InterPro.

(a)



(b)



圖二十一、感染仙人掌科植物之 potexvirus 之 RdRP 部分胺基酸序列比對及功能性區塊預測

Figure 21. Alignment and domain prediction of partial RdRP amino acid sequence of cactus-infecting potexviruses. (a) Multiple sequence alignment was done by ClustalW. The result of domain prediction as shown in (b) was done by InterPro.

