

# 台灣地區柑橘黃龍病與萎縮病毒、破葉病毒 田間複合感染之研究

蔡佳欣<sup>1</sup> 蘇鴻基<sup>1</sup> 馮雅智<sup>1</sup> 洪挺軒<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 台北市 國立台灣大學植物病理與微生物學系

<sup>2</sup> 聯絡作者，電子郵件：thhung@ntu.edu.tw；傳真：+886-2-23625717

接受日期：中華民國 96 年 8 月 20 日

## 摘要

本試驗針對台灣目前各柑橘產區內之萎黃植株中，黃龍病 (Huanglongbing = HLB) 罹病率及其與柑橘萎縮病毒 (*Citrus tristeza closterovirus* = CTV)、柑橘破葉病毒 (*Citrus tatter leaf capillovirus* = CTLV) 之複合感染情形進行研究。將逢機採集之病葉以聚合酶連鎖反應 (PCR) 偵測 HLB，酵素連結分析反應 (ELISA) 檢測 CTV，反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 偵測 CTLV。結果顯示各柑橘品種之萎黃病株平均約 3 成感染黃龍病，其中屏東縣之檸檬病株感染率最高，有 52.8% 具黃龍病，當中又有近 40% 遭 CTLV 複合感染，而與 CTV 的複合感染則未發現；產於雲林縣與花蓮縣之柚類病株，則有 30~45% 感染黃龍病，當中亦約 40% 遭 CTLV 複合感染，而遭 CTV 的複合感染率則因柚類品種而異，文旦柚、白柚、西施柚之黃龍病株中僅 3~8% 有 CTV 複合感染，但雜交柚 (葡萄柚及明尼桔柚) 之黃龍病株則有 90% 以上遭 CTV 複合感染；宜蘭縣金柑之萎黃病株，感染黃龍病比率最低，僅有 10%，當中 CTLV 或 CTV 複合感染的比率皆超過 60%。故黃龍病與病毒之複合感染於各地區種植之柑橘品種間有極顯著之差異。由於田間病毒感染複雜，為瞭解黃龍病所引起之標準病徵，於無病毒紅江橙園區採集各種黃化病材料並將其分為六種病徵型，經檢測發現以第六型感染黃龍病比率最高，第一及第二型感染率最低。而由黃龍病之潛伏感染研究發現，於無黃化病徵之耐病品種檸檬與文旦中，僅約 5~6% 偵測到黃龍病原，表示潛伏感染比率不高，黃化病徵與黃龍病感染高度相關。最後本試驗尚發現少數柑植株雖呈黃化萎縮，但其葉片樣本經 PCR 並未測得黃龍病原，於電子顯微鏡下觀察其組織切片，可見韌皮部細胞內有大量似 CTV 病毒顆粒堆積之內涵體，故其病徵似為 CTV 之強烈系統所引起。

關鍵詞：黃龍病、病徵型、複合感染、柑橘品種、柑橘萎縮病毒、柑橘破葉病毒

## 緒言

柑橘為台灣重要常綠果樹，根據行政院農委會 89 年農產統計要覽，柑橘的栽種面積為果樹類第一名<sup>(1)</sup>。早年曾和鳳梨，香蕉為重要外銷三大青果。而柑橘黃龍病 (Huanglongbing = HLB) 自 1951 年在台灣北部開始發生後，迅速破壞台灣柑橘產業，並根據其危害嚴重時的病徵而稱之為立枯病<sup>(2)</sup>，之後此病迅速蔓延全台，椪柑、桶柑及甜橙普遍嚴重發生，樹齡縮短，影響產量與品質，受害植物短數年內即告死亡，為最具破壞性之病害。至 1971 年原本被視為抗病的台灣文

旦亦開始出現了黃化衰弱的病徵而被認為與 HLB<sup>(6)</sup> 或立枯病有關<sup>(20)</sup>。2006 年從未被報導在田間可自然感染 HLB 之金柑亦開始出現黃化的病徵，經嫁接傳播試驗以及 DNA 序列分析鑑定其已受 HLB 病原菌之感染<sup>(21)</sup>。早期對 HLB 之正確診斷只能依靠電子顯微鏡觀察病原菌<sup>(5)</sup>，然此法耗時且無法檢測大量材料，因此 Hung 等 (1999) 開發出專一性的核酸探針，配合應用點漬雜配法 (Dot hybridization) 始能正確且敏感的診斷此病害<sup>(7)</sup>。而後為了提高偵測敏感度，以及縮短偵測流程，更研發聚合酶連鎖反應 (PCR) 配合專一性引子對，可得穩定敏感的偵測效果<sup>(8)</sup>。然而柑橘黃龍病在台灣發生已

久，而台灣由於位處熱帶與亞熱帶地區，所栽植之柑橘品種亦多，於各品種間所造成之病徵也不盡相同，各種黃化之病徵易與其他病害混淆。由於 HLB 鑑定之困難，至今在台灣田間 HLB 之分佈以及危害情形目前則幾無實際調查報告。而另一系統性之病害柑橘萎縮病毒 (*Citrus tristeza closterovirus* = CTV) 係 2000 nm 長絲狀病毒，為世界性之嚴重病毒，也是台灣最重要的柑橘病毒，起源於中國大陸。此病毒經種苗接穗傳播到世界各地，在 1920 年代傳入南美洲及非洲後，此病毒對罹病之甜橙/酸橙砧木樹廣泛危害成災，致使巴西、阿根廷、及烏拉圭等國之柑橘產業幾乎毀滅<sup>(10, 17)</sup>。而台灣地區 CTV 早已存在，然多為無病徵帶毒樹，可感染多種柑橘品種，無明顯病徵狀態，但仍影響產量及品質，造成果實變小、果肉硬化，品質降低。由於 CTV 之系統複雜，嚴重病毒系統亦引起與 HLB 類似的葉片黃化、植株矮化的情形<sup>(18, 23)</sup>，亦易與 HLB 病徵混淆。除 CTV 之外，尚有另一柑橘破葉病病毒 (*Citrus tatter leaf capillovirus* = CTLV)，係 650 nm 絲狀病毒。此病毒可經機械傳染，而無媒介昆蟲，可用 Rusk 枳橙及白藜指示植物做生物檢定。CTLV 感染枳殼或其雜交種 (枳橙、枳柚) 為砧木之柑苗，引起顯著病徵，包括植株矮化、穗砧癒合點凹陷且含樹膠呈黃暈圈，以及瘤狀隆起<sup>(14, 15)</sup>。在其他砧木品種之柑株，呈無病徵狀態。雖無明顯病徵，然對果實品質以及植株生育之影響則未可知。由於枳殼或其雜交種 (枳橙、枳柚)，對於 HLB 耐性強<sup>(2)</sup>，且可改善果實品質，加強風味，但此病毒之危害，使得此類砧木無法在台灣使用。因此，若能去除 CTLV 之威脅，將可使之成為良好砧木。此病毒蘇等人 (1984) 曾以生物檢定法調查台灣各柑橘品種均可發現感染，尤其甜橙及金柑較多感染<sup>(19)</sup>。近來林等<sup>(12)</sup> 已發展反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 檢定法而能更敏感且準確的偵測此病原。由於各病原檢測技術之進步，本研究得以分子診斷技術取代過去之生物檢定法，大量檢定目前台灣各重要柑橘產區之黃化衰弱罹病株感染 HLB 之比率，另外亦將兩種柑橘重要病毒 (CTV, CTLV) 之複合感染情形做一調查，以作為病害綜合防治及健康種苗推行之參考。而為釐清田間各種黃化病徵與 HLB 之相關性，本次選取屏東無病毒紅江橙園區內各種黃化病徵之病株，並依病徵型分類為六型後，經 HLB-PCR 檢測後分析 HLB 與各病徵型之關係。

## 材料與方法

### 調查區域與採集品種

台灣地處熱帶與亞熱帶地區，因此政府規畫適合各地區風土之柑橘品種。目前台灣柑橘類品種繁多，全台主要品種與產地分佈為：新竹縣主要栽植椪柑及海梨柑，苗栗縣地區主要栽種桶柑以及椪柑。柳橙則主要產在嘉義與雲林縣。以文旦為主之各種柚類則主要分佈在雲林縣及花蓮縣。金柑主要種植在宜蘭縣。檸檬則主要產在屏東縣。因此本次調查之範圍涵蓋台灣全區，包含有新竹縣之新埔、關西、峨眉。苗栗縣之頭份、三灣。雲林縣之斗六、古坑。花蓮縣之吉安、瑞穗、玉里。嘉義縣之竹崎。屏東縣之里港、九如、高樹。宜蘭縣之員林、礁溪、三星。如表一，包含了目前台灣 6 類主要經濟柑橘品種。本試驗以隨機方式採集田間黃化病株共計 801 個病材料，進行 HLB、CTV 及 CTLV 之檢測。而對於各病害潛伏感染之調查亦於每塊田逢機採取 5 棵無病徵之植株進行檢測。

### 各黃化病徵型病株來源

由於田間柑橘黃化之病株甚多，病徵型變化亦多，為瞭解各黃化病徵型與 HLB 之關係，並避免各病毒對標準病徵之干擾。本次選取屏東地區一處種植 3 年之無病毒紅江橙試驗園區，採集各種不同黃化衰弱之病株共計 127 株，先檢查其無 CTV 或 CTLV 之感染後，依照不同黃化病徵類型，將其分成六種病徵類型。再統計各病徵型感染 HLB 之比率。

### HLB 核酸抽取法與 PCR

此法為少量植物總核酸抽取法，輕微修改自 Hung 等人 (1999) 發表之方法<sup>(8)</sup>，過程如下：取 0.5 g 的植物組織以液態氮於研鉢中磨碎，加入 2.7 ml 核酸萃取緩衝液【100 mM Tris-HCl；100 mM EDTA-2Na；250 mM NaCl；pH 8.0】，充分攪勻後再加入 0.3 ml 10% Sarkosyl (N-Lauroyl-sarcosine, Sigma) 充分混合均勻後，倒入 1.5 ml eppendorff tube，於 55°C 下水浴 1 hr；離心 5,000 g / 5 min，吸取 800  $\mu$ l 的上清液到 1.5 ml eppendorff tube 中，加入 100  $\mu$ l 5 M NaCl，充分混合呈乳狀後，再加入 100  $\mu$ l 10% CTAB (hexadecyl-trimethyl-ammonium-bromide) 含 0.7 M NaCl，於 65°C 下水浴 10 min；加入 600  $\mu$ l 之 CI【chloroform / isoamyl alcohol (24 : 1)】混合均勻，離心 12,000 g / 5 min，取 850  $\mu$ l 上清液加入 600  $\mu$ l 之 PCI【phenol / chloroform / isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)】劇烈混合，離心 12,000 g / 5 min；取 700  $\mu$ l 上清液加入 0.6X 體積之 isopropanol 混合均勻，4°C 下離心 12,000 g / 10 min，沉澱以 500  $\mu$ l 70% ethanol 清洗，抽氣乾燥後將沉澱溶

於 100  $\mu$ l TE buffer 【10 mM Tris-HCl ; 1 mM EDTA ; pH 8.0】作為 PCR 反應模版。PCR 反應根據 Hung 所設計之 HLB 專一性引子對 (HLB-F: 5' -CAC CGA AGA TAT GGA CAA CA, HLB-R: 5' -GAG GTT CTT GTG GTT TTT CTG), 在每一 25  $\mu$ l 反應中分別加入 2.5  $\mu$ l 之 10X PCR buffer、2  $\mu$ l 之 50 mM MgCl<sub>2</sub>、2  $\mu$ l 之 2.5 mM dNTPs、1.25 units 之 *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Calsbad, CA)、及各 0.5  $\mu$ l 之 10  $\mu$ M HLB-F 及 10  $\mu$ M HLB-R 引子對。於熱循環反應器內進行 (GeneAmp 2720, Applied Biosystem Corp., Norwalk, CT, USA)。溫度循環條件為: 94°C 進行 2 min; [94°C 作用 1 min, 60°C 作用 1 min, 72°C 作用 2 min] 共 30 cycles; 72°C 進行 10 min。此反應預估可增幅出 226 bp 之核酸產物, 最後將增幅產物以 1.4% agarose gel 進行電泳分析。

### CTLV 之核酸萃取與 RT-PCR

取 0.3 g 之柑橘葉片組織, 利用 RNA 迷你純化試劑 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), 抽取全量 RNA。並根據林所發表<sup>(12)</sup> 之 CTLV 專一性引子對, 並依照 Hung 等 (2000) 發表之單一步驟 RT-PCR 進行增幅<sup>(9)</sup>。反應在 25  $\mu$ l 的混合液中進行, 分別加入 2.5  $\mu$ l 5X 1st strand buffer (Invitrogen)、2.5  $\mu$ l 10X PCR buffer (Invitrogen)、各 0.5  $\mu$ l 之 10  $\mu$ M CTLV-F、10  $\mu$ M CTLV-R 專一性引子對、2  $\mu$ l 之 2.5 mM dNTPs、1.25  $\mu$ l 之 100 mM DTT (1,4-Dithiothreitol)、1.25  $\mu$ l 之 10 mM MgCl<sub>2</sub>、1.25 units 之 *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Calsbad, CA)、50 units 之 reverse transcriptase (Superscript™ II, Invitrogen), 最後加入 200 ng RNA template, 以水補足體積至 25  $\mu$ l。RT-PCR 反應在熱循環反應器內進行 (GeneAmp 2720, Applied Biosystem Corp., Norwalk, CT, USA)。溫度循環條件為: 50°C 作用 35 min 進行反轉錄反應; 94°C 進行 2 min; [94°C 作用 30 sec, 56°C 作用 30 sec, 68°C 作用 45 sec] 共 10 cycles; [94°C 作用 30 sec, 56°C 作用 30 sec, 68°C 作用 45 sec] 共 25 cycles (每循環增加 5 sec); 68°C 進行 7 min。最後將增幅產物以 1.4% agarose gel 進行電泳分析。

### 直接酵素連結免疫分析 (direct ELISA)

為瞭解國內各柑橘經濟品種受 CTV 感染比率, 本次實驗所使用來偵測 CTV 為 Tsai and Su 所研發之單元抗體, 編號 3E10, 為一具有共同抗原決定基 (common epitope) 可偵測所有 CTV 系統, 以 direct ELISA 分析。所採用之 direct ELISA 流程如前人所述<sup>(22, 23)</sup>, 最後

讀取 405 nm 之吸收光讀值。

### 電子顯微鏡觀察

參照 Garnier 與 Bové 描述之流程<sup>(3)</sup>, 罹病葉脈先以 4% 戊二醛及 1% 四氧化鐵做前後固定, 再以 60~100% 之不同濃度系列酒精脫水及 Epon812 resin 滲透包埋, 繼之以超薄切片機切成厚度 60~80 nm 超薄切片, 再以 2% 醋酸鈉及 0.4% 檸檬酸鉛染色, 最後以 Jeol 100CXII 電顯觀察細胞組織變異情形。

## 結 果

### HLB 之發生及其與 CTV 或 CTLV 複合感染情形

本次調查各大柑橘產區, 疑似 HLB 病徵之各品種柑橘植株, 偵測 HLB、CTV 與 CTLV 後, 結果歸納於表一, 由台灣北部新竹, 苗栗之主要椪柑及桶柑產區內共偵測 146 棵疑似 HLB 之椪柑與桶柑病株後, 發現事實上約有 30% 之病材料對 HLB-PCR 呈現陽性反應, 並且由 CTV-ELISA 檢驗可知, 感染 HLB 之植株中, HLB 與 CTV 複合感染超過 65%, 然而 HLB、CTV 與 CTLV 三者複合感染亦約有 30%, 並無單獨 HLB 感染的植株出現。表示目前新竹地區受 HLB 感染之椪柑、桶柑病株亦幾乎是 100% 受 CTV 感染, 30% 以上受 CTLV 感染。雲林縣與花蓮縣為文旦柚、白柚、西施柚、雜柚之主要產區, 統計此兩地區黃化病柚 267 棵中有 30~45% 為 HLB 感染, 而 HLB 病株與 CTV 複合感染在各品種柚類有極大的不同, 在文旦、白柚、西施柚之 CTV 複合感染率甚低只有 3~8%, 然 HLB 與 CTLV 之複合感染卻超過了 40%。在雜交柚 (葡萄柚及明尼桔柚) 之 HLB 病株則有不同的情況, HLB 與 CTV 複合感染為 60~77.8%, HLB、CTV 及 CTLV 三者共同複合感染者佔 22~30%, 因此兩者合計 HLB 雜柚病株 90~100% 受 CTV 感染。嘉義縣竹崎與雲林縣古坑鄉為台灣最大之柳橙產區, 其田間衰落黃化之柳橙病株亦約 30% 感染 HLB, 然其單獨與 CTV 複合感染者不多僅 8-10%, 但同時與 CTV、CTLV 感染者竟超過 90%, 表示本國之柳橙產區除 HLB 感染嚴重外, 其 HLB 柳橙病株竟又幾乎被兩種柑橘病毒所感染。金柑為宜蘭縣之主要經濟作物, 主要以加工外銷日本為主<sup>(11)</sup>, 過去幾無 HLB 自然感染之報告, 2006 已被證實台灣金柑亦開始遭受 HLB 侵害<sup>(21)</sup>, 其目前在田間的感染情形, 則尚無任何報告。本次採集宜蘭縣各地之主要金柑產區共 115 黃化金柑病株, 發現約 10% 可由 HLB-PCR 偵測到 HLB 原菌之存在, 其中 HLB 與

表一、各主要柑橘產區之黃化衰弱病株感染 HLB 及其與 CTV、CTLV 複合感染之比率

Table 1. Incidence of HLB and its complex infection with CTV and/or CTLV in yellow decline citrus trees

地點	品種	HLB 正反應株樹/ 檢測總株樹 (%)	HLB 與 CTV 或 CTLV 複合感染比率 (%)			
			HLB	HLB+CTV	HLB+CTLV	HLB+CTV+CTLV
1 新竹縣	椪柑	9/29 (31%)	0/9 (0%)	6/9 (66.7%)	0/9 (0%)	3/9 (33.3%)
	海梨柑	16/56 (29%)	0/16 (0%)	11/16 (68.8%)	0/16 (0%)	5/16 (31.2%)
	文旦	6/8 (75%)	4/6 (66.7%)	0/6 (0%)	2/6 (33.3%)	0/6 (0%)
2 苗栗縣	桶柑	13/49 (26.5%)	0/13 (0%)	9/13 (69.2%)	0/13 (0%)	4/13 (30.8%)
	椪柑	4/12 (33.3%)	0/4 (0%)	3/4 (75%)	0/4 (0%)	1/4 (25%)
	文旦	5/6 (83.3%)	4/5 (80%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)
3 雲林縣	文旦	25/77 (32.5%)	11/25 (44%)	2/25 (8%)	12/25 (48%)	0/25 (0%)
	白柚	15/36 (41.7%)	9/15 (60%)	0/15 (0%)	6/15 (40%)	0/15 (0%)
	西施柚	7/18 (38.9%)	4/7 (57.1%)	0/7 (0%)	3/7 (42.9%)	0/7 (0%)
	柳橙	12/42 (28.6%)	0/12 (0%)	1/12 (8.3%)	0/12 (0%)	11/12 (91.7%)
4 宜蘭縣	金柑	12/115 (10.4%)	0/12 (0%)	4/12 (33.3%)	0/12 (0%)	8/12 (66.7%)
	文旦	7/7 (100%)	5/7 (71.4%)	0/7 (0%)	2/7 (28.6%)	0/7 (0%)
5 花蓮縣	文旦	29/93 (31.2%)	16/29 (55.2%)	1/29 (3.4%)	12/29 (41.4%)	0/29 (0%)
	葡萄柚	9/20 (45%)	0/9 (0%)	7/9 (77.8%)	0/9 (0%)	2/9 (22.2%)
	明尼桔柚	10/23 (43.5%)	1/10 (10%)	6/10 (60%)	0/10 (0%)	3/10 (30%)
6 嘉義縣	柳橙	10/26 (38.5%)	0/10 (0%)	1/10 (10%)	0/10 (0%)	9/10 (90%)
	文旦	3/4 (75%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
7 屏東縣	檸檬	28/53 (52.8%)	18/28 (64.3%)	0/28 (0%)	10/28 (35.7%)	0/28 (0%)
	紅江橙	37/127 (29%)	37/37 (100%)	0/37 (0%)	0/37 (0%)	0/37 (0%)

CTV 之複合感染有 33%，HLB 單獨與 CTLV 複合感染者則無發現，但三者共同感染者高達 66.7%，因此兩者合計 CTV 感染 HLB 金柑病株達 100%，而 CTLV 感染 HLB 金柑病株亦有 60% 以上。檸檬生產地主要集中在屏東，目前在田間黃化疑似 HLB 之檸檬病株 53 棵中，經檢驗超過 50% 已感染了 HLB，完全無 CTV 複合感染的發現，但是依然有 35.7% 與 CTLV 複合感染。另外本次亦調查了位於屏東種植紅江橙無病種苗園出現黃化或衰弱之 3 年生病株共 127 株，發現亦有 29% 已受 HLB 感染，然並無發現與 CTV 或 CTLV 複合感染的情形。

### HLB 田間標準病徵型之鑑定

由表一可知柑橘黃化植株雖與 HLB 有關連性，但卻非全部都由 HLB 所引起。因田間黃化病株甚多，病徵種類亦多變，極易與 HLB 之病徵混淆。再者目前台灣田間之各品種柑橘都普遍遭受一或兩種病毒病害的侵害，而病毒之系統又相當複雜，因此為了解 HLB 於田間所引起之黃化標準病徵，本試驗選擇定植三年之無病毒紅江橙園區進行研究，以避免病毒對標準病徵之干擾，將各黃化衰弱之病株依照不同之病徵型分類以後進行 HLB 之檢測。127 個病材料皆檢測確認無 CTV 或 CTLV 感染始進行分析。其結果如表二。第一型：葉片輕度褪色(圖一1)之 37 個病材料中，僅 1 個

表二、六種柑橘葉部黃化病徵型感染 HLB 之比率

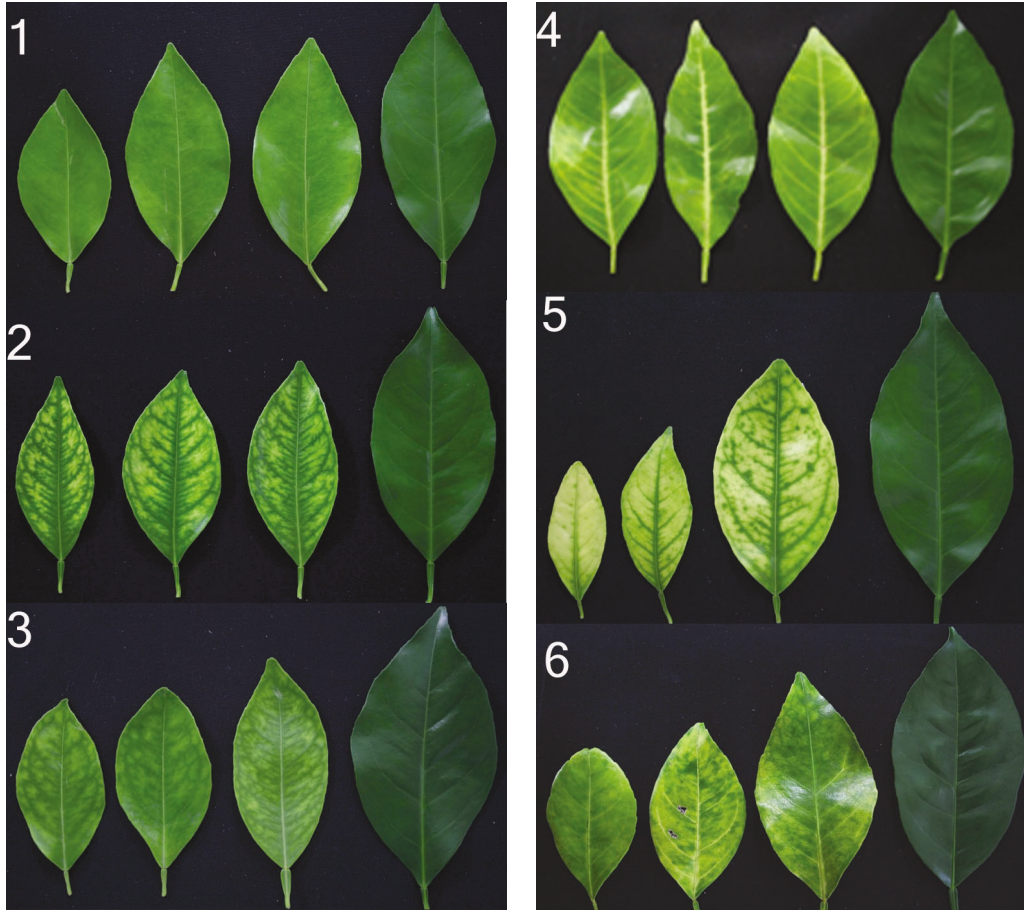
Table 2. Incidence of HLB infection within 6 types of yellow symptoms

病徵型	代表病徵	HLB 感染比率 (%)
1	輕度均勻褪色	1/37 <sup>a</sup> (2.7%)
2	似缺鋅狀	0/7 (0%)
3	似缺錳狀	3/24 (12.5%)
4	葉脈均勻黃化	3/10 (30%)
5	整葉均勻黃化	7/17 (41.2%)
6	整葉黃綠不均斑駁狀	23/32 (71.9%)

<sup>a</sup> The samples were detected by use of PCR.

(2.7%) 為 HLB 感染。第二型：成熟葉葉脈間葉肉對稱黃化(似缺鋅)(圖一2)之 7 個病材料，經檢測並無 HLB 之感染。第三型：脈間葉肉不均勻之褪色(似缺錳)(圖一3)之 24 個病材料中有 3 個(12.5%) 為 HLB 感染。第四型：葉脈均勻黃化但葉肉保持綠色或淡綠色(圖一4)，10 個樣本中有 3 個(30%) 為 HLB 感染。第五型：整片葉片均勻黃化，成熟老葉僅主脈維持綠色，年輕成熟葉變小且全黃(圖一5)，17 個病材料中 7 個(41.2%) 為 HLB 所感染。第六型：葉脈與葉肉皆呈現黃綠不均勻之斑駁狀病徵(圖一6)，32 個病株中有 23 個 HLB 感染(71.9%)，為所有病徵型中最高。

### HLB、CTV 與 CTLV 於田間各經濟柑橘品種潛伏



圖一、六種田間常見之黃化褪色病徵型。第一型：輕度均勻褪色。第二型：葉肉對稱黃化，似缺鋅狀。第三型：葉肉不均勻褪色，似缺錳狀。第四型：葉脈黃化，葉肉仍呈綠色。第五型：整葉均勻黃化。第六型：整葉黃綠不均斑駁狀。

Fig. 1. Six types of chlorosis and yellow symptoms often observed in the field. Type 1: mild chlorosis. Type 2: Zinc-deficiency like symptom showing yellow blotches in mesophyll. Type 3: Manganese-deficiency like symptom showing chlorotic blotches in mesophyll. Type 4: uniform vein-yellowing. Type 5: whole leaf yellowing. Type 6: yellow mottling.

### 感染比率

由於 HLB、CTV 與 CTLV 此三種系統性病害皆可經由接穗而傳染，農民或種苗繁殖者幾乎皆以田間生長狀似良好之植株取其芽嫁接繁殖，因此為瞭解目前於台灣田間生長良好且無病徵之柑橘植株遭此三大系統性病害潛伏感染感染比率，以進行種苗繁殖前之評估，避免遭此三系統性病害感染。因此於各柑橘品種園區皆採 5 個樣本進行偵測調查，結果歸納於表三。無病徵之各柑橘品種，感染 HLB 者甚低，感病品種如椪柑、海梨柑、桶柑、柳橙，均無 HLB 之潛伏感染，但耐病品種如文旦、檸檬有少部份 5~6% 之感染。另外金柑無病徵之植株亦無發現 HLB 之潛伏感染。雖然 HLB 於各柑橘品種之潛伏感染不高，但 CTV 之潛伏感染甚高。除檸檬與柚類外（不含雜柚），其他各柑橘品種感染 CTV 之比例幾乎皆達到了 100%，而 CTLV 之潛伏感染比例雖比 CTV 低，但 CTLV 於台灣各柑橘品

種全部皆可潛伏感染，其感染率可達 25% 以上，而其中柳橙與金柑更達 60~70%。

### 電子顯微鏡觀察似 HLB 感染之病株

本實驗中亦將各地採來病徵似 HLB 之衰弱病株，經測定無 HLB-PCR 訊號反應，亦無 CTLV-RT-PCR 訊號，但 CTV-ELISA 檢測具正反應高讀值者，且其植株外部無明顯之根腐或天牛危害之病材料進行電子顯微鏡之切片觀察，其結果與 PCR 一致，並無發現 HLB 病原菌體存在，然可於其葉脈之韌皮部細胞中發現似病毒顆粒之大量堆積（圖二），推測此似 HLB 之黃化病徵可能為 CTV 之強毒系統所引起。

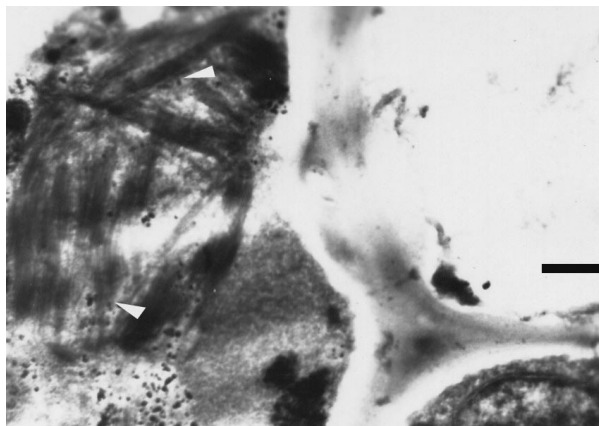
### 討 論

台灣自 1951 年發生 HLB 以來至今已超過 50 年，

表三、各柑橘品種植株潛伏感染 HLB、CTV 及 CTLV 之比率調查

Table 3. Incidence of latent infection of HLB, CTV, and CTLV in several symptomless citrus cultivars

品種分類	代表品種	調查產區	樣本數	感染比率(%)			
				HLB	CTV	CTLV	CTV+CTLV
寬皮柑類	椪柑	新埔、頭份	30	0/30 (0%)	22/30 (73.3%)	0/30 (0%)	8/30 (26.7%)
寬皮柑×甜橙	海梨柑、桶柑	新埔、關西、峨嵋、頭份、三灣	70	0/70 (0%)	48/70 (68.6%)	0/70 (0%)	22/70 (31.4%)
甜橙類	柳橙	古坑、竹崎	40	0/40 (0%)	12/40 (30%)	0/40 (0%)	28/40 (70%)
柚類	文旦、白柚 西施柚	斗六、吉安、瑞穗、玉里	80	4/80 (5%)	0/80 (0%)	42/80 (52.5%)	0/80 (0%)
雜柚	葡萄柚、明尼桔柚	瑞穗、玉里	20	0/20 (0%)	14/20 (70%)	2/20 (10%)	4/20 (20%)
金柑類	長實金柑	員林、礁溪、三星	50	0/50 (0%)	18/50 (36%)	0/50 (0%)	32/50 (64%)
檸檬類	尤利佳檸檬	里港、九如、高樹	50	3/50 (6%)	0/50 (0%)	24/50 (48%)	0/50 (0%)



圖二、田間衰弱黃化之椪柑植株，雖無 HLB-PCR 訊號，但經電子顯微鏡之組織切片觀察，可見其葉脈韌皮部組織有大量似 CTV 顆粒堆積之內涵體（箭頭所示）。（橫線 = 700 nm）。

Fig. 2. Electron micrograph of CTV-like particles accumulated in phloem cell of the diseased Ponkan showing yellow symptom, but negative for HLB-PCR detection. (The bar represents 700 nm)

然至目前 HLB 仍分佈在田間而成爲柑橘生產之限制因子。在本研究發現田間黃化衰弱之各品種柑橘病株約有 30% 以上爲 HLB 所引起，而以耐病品種之文旦、檸檬感染率較高，金柑最低。雖然目前已知此病由木虱

所傳播，然經數十年卻無法將其壓制，目前並已擴散至全國各地。由本研究可瞭解其原因除媒介昆蟲傳播外，更重要之原因爲傳染源一直存在於田間無法去除。在椪柑與桶柑產區常可發現路邊或是田與田之交界處常有零星幾棵中度或輕度黃化之文旦分佈，經 HLB-PCR 檢測其感染 HLB 達 70~80%，相同的情形亦發生在柳橙與金柑產區（表一），由於農民常少量雜種些耐病品種，其可感染十年以上而不死亡，因此往往成爲主要之感染源，反而影響了主要品種之生產。椪柑、桶柑、柳橙過去即被認爲對 HLB 敏感之品種<sup>(2-16)</sup>，再加上這些感病品種幾乎是 100% 感染 CTV，而 CTLV 亦普遍感染 30% 以上，因此 HLB 與病毒複合感染的結果，似亦可解釋田間感病品種快速萎凋死亡之另一原因。而柚類與檸檬產區之黃化病株相對於感病品種，則有較高的比率感染 HLB，經查訪農民瞭解其感染 HLB 已數年之久，但在其果實未完全失去商品價值之前，大部分之果農大多不願更新，尤其以種植文旦之農民普遍認爲“老叢”文旦，果肉細緻，甜度較高，因此超過 30 年之老柚樹，縱使感染 HLB 亦捨不得去除。另一耐病品種檸檬，雖然感染 HLB 會使其產果量下降，果實變小，但由於消費者只取其酸果汁，因此對果實品質影響尚可忍受，也造成檸檬植株淘汰率低，病株四處分佈，除造成生產成本增加，也加速



HLB 擴大蔓延於整個產區，更造成其他對 HLB 敏感之柑橘品種不易在此區種植。以本次位於屏東之紅江橙健康種苗園試驗區而言，由於其附近檸檬病株的存在，造成此健康園於短短三年即 29% 感染 HLB，影響甚鉅。金柑非屬於柑橘屬，過去亦無 HLB 感染報告，因此一直被視為 HLB 之抗病品種，直至 2006 始報導宜蘭地區之長實金柑可自然感染 HLB<sup>(21)</sup>，而為瞭解此為一偶發狀況或 HLB 病原菌確已演化可蔓延於此抗病品種，於本試驗中發現宜蘭地區約有 10% 之黃化病株已被 HLB 感染，說明了此病原系統已開始蔓延中，而此新病原系統特性則尚待確認。

CTV 雖然為一古老病毒，很早即存在於台灣田間，但至目前為止 CTV 仍以幾乎 100% 的感染率危害台灣重要經濟柑橘品種，包括椪柑、柳橙、桶柑、金柑。另外由 CTV 100% 之感染可知，此病毒應該為農民一開始即種植帶毒而無病徵之種苗，因而造成田間 100% 之感染。而雖然 Su (1981) 曾發現新 CTV 系統可危害文旦柚類及葡萄柚稱之為 CTV 柚類系統<sup>(18)</sup>，不過在經過本次調查後可發現柚類包含文旦、白柚、西施柚感染 CTV 之比率甚低，尚未有明顯擴散，究其原因應為此 CTV 病毒系統除造成植物衰弱外，亦造成果實縮小變硬，俗稱“石頭柚”，完全無商品價值而遭砍除。然葡萄柚、明尼桔柚對 CTV 之感染率卻達到 90% 以上，由於葡萄柚係柚類與甜橙或酸橙雜交之品種，而明尼桔柚係葡萄柚 (Duncan grapefruit) 與紅桔 (Dancy tangerine) 雜交而來，因而容易被其他非 CTV 柚類系統感染而成無病徵之帶毒株。

CTLV 不像 CTV 有較高之寄主選擇性，但則隨著不同寄主而有不同之感染率，依本試驗結果可知 CTLV 已感染台灣全部之經濟品種幾乎皆可達 30% 以上，而以金柑與柳橙最高，然尚未達到如 CTV 般 100% 帶毒率，表示目前市面販賣之各品種種苗尚未全面被 CTLV 所感染，但南部柳橙之 CTLV 帶毒率於黃化與無病徵之植株已高達 70~90%，是否台灣南部大部分之種苗來源已被感染則值的關注。不過此病主要由機械傳染，台灣並無媒介昆蟲，因此只需得到無毒種苗並消毒修剪工具即可避免感染，然其所造成之果實品質危害，目前則尚未可知。由於一直以來台灣田間皆種植帶毒之病株，且病毒之系統複雜，為除去此一干擾，瞭解何種病徵才是 HLB 之標準黃化病徵，本次特別調查無病毒之紅江橙園試驗區可發現 HLB 以第六型病徵 71.9% 感染率最高，代表此為 HLB 之標準病徵。而第四型與第五型亦有 30%~40% 之感染率，可能有其他因子複合作用而造成，如根腐或天牛幼蟲危害等。而第一與第三型亦有少量之 HLB 感染，推測其應為感染初

期或是亦有 HLB 之弱毒系統存在，目前則尚在進行接種試驗分析中。另外在這甜橙健康園區檢測 127 棵黃化病株皆無 CTV 及 CTLV 反應，其原因為其附近皆為檸檬園無其他柑橘品種種植，檸檬雖可為 CTV 感染，但有報告指出實驗上媒介昆蟲不易將 CTV 從檸檬傳播至其他柑橘<sup>(24)</sup>，而本試驗在屏東調查之各檸檬園亦無 CTV 感染反應亦間接證實此一現象。因此此紅江橙健康園在無 CTV 感染源或蚜蟲不易傳播的情況下，田間雖有媒介昆蟲存在亦無法傳染。而 CTLV 雖有感染源存在但無媒介昆蟲，亦無法傳播感染。由此可知健康種苗之使用以及去除感染源之重要性。最後本實驗於黃化病株研究中發現，有些椪柑植株雖呈現與 HLB 相似之病徵卻無 HLB-PCR 之訊號，亦無 CTLV 之 RT-PCR 反應，但經 CTV-ELISA 檢測具正反應之高讀值，經電子顯微鏡切片觀察，確無 HLB 病原菌之存在，然而其韌皮部細胞有大量似病毒顆粒之堆積，可能為引起此黃化病徵之主因，表示田間黃化之病株可能有部分由強烈 CTV 病毒系統所引起。因此推行健康種苗制度逐步將帶毒病株更新，以及如何解決目前各產區內廣泛分佈對 HLB 耐病之感染源，實為目前提升我國柑橘產業之首要目標。

## 引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Calavan, E. C., Christiansen, D. W., and Roistacher, C. N. 1963. Symptoms associated with tatter-leaf virus infection of Troyer citrange rootstock. *Plant Dis. Rep.* 47: 971-975.
2. da Graca, J. V. 1991. Citrus greening disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 109-136.
3. Garnier, M., and Bové, J. M. 1983. Transmission of the organism associated with citrus greening disease from sweet orange to periwinkle by dodder. *Phytopathology* 73:1358-1363.
4. Garnsey, S. M. 1970. Viruses in Florida's Meyer lemon trees and their effects on other citrus. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 83: 66-71.
5. Huang, A. L. 1987. Electronmicroscopical studies on the morphology and population dynamic of fastidious bacteria causing citrus Likubin. National Taiwan University Graduate Institute of Plant Pathology and Microbiology. Doctoral Dissertation. (in Chinese)
6. Huang, C. H., and Chang, C. A. 1980. Studies on the relation of mycoplasma-like organism with the decline of Wentan pummelo in Taiwan. *J. Agric. Res. China* 29: 13-19.
7. Hung, T. H., Wu, M. L., and Su, H. J. 1999a. Detection of fastidious bacteria causing citrus greening disease by nonradioactive DNA probes. *Ann. Phytopathol.*

- Soc. Jpn. 65:140-146.
8. Hung, T. H., Wu, M. L., and Su, H. J. 1999b. Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the polymerase chain reaction. *J. Phytopathol.* 147: 599-604.
  9. Hung, T. H., Wu, M. L., and Su, H. J. 2000. A rapid method based on the one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for detection of different strains of *Citrus tristeza virus*. *J. Phytopathol.* 148: 469-475.
  10. Knorr, L. C., and Ducharme, E. P. 1951. This is tristeza-Ravenger of Argentina's citrus industry. *Citrus Magazine* 13: 17-19.
  11. Lee, K. M. 2005. Impact and response of domestic industry to kumquat imported from China. *Hualien District Agricultural Newsletter.* 51:17-21. (in Chinese)
  12. Lin, Y. H., and Hung, T. H. 2004. Strain-differentiation of Citrus tatter leaf virus (CTLV) and development of a rapid method for CTLV detection. National Taiwan University Graduate Institute of Plant Pathology and Microbiology. Master Thesis. (in Chinese)
  13. Luo, G. C., Ann, P. J., and Jiang, M. Y. 2002. Introduction. Pages 2-8 *in: The illustrated handbook of plant protection, Series 9.* G. C. Luo. ed. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Taipei, 47 pp. (in Chinese)
  14. Matsumoto, T., Wang, M. C., and Su, H. J. 1961. Studies on Likubin. Pages 121-125 *in: Proceedings of 2nd conference of the international organization of citrus virologists.* W. C. Price ed. University of Florida, Gainesville, 265 pp.
  15. Miyakawa, T. 1978. A bud-union disorder of Japanese citrus on Poncirus trifoliata rootstock caused by tatter leaf virus. *Rev. Plant Prot. Res.* 11:1-10.
  16. Miyakawa, T. 1980. Experimentally induced symptoms and host range of citrus likubin (greening disease). *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 46:224-30.
  17. Schneider, H. 1954. Anatomy of bark of bud union, trunk and roots of quick-decline affected sweet orange trees on sour orange rootstock. *Hilgardia* 16: 567-581.
  18. Su, H. J. 1981. A tristeza virus strain causing dwarf of pummelo and grapefruit. Pages 423-430 *in: Proc. Int. Soc. Citriculture Vol. I.* K. Matsumoto, S. Sasaki, and Y. Saito, eds. Int. Soc. Citriculture, Tokyo.
  19. Su, H. J., and Cheon, J. U. 1984. Occurrence and distribution of tatter-leaf-citrus stunt complex on Taiwanese citrus. *Phytopathologist and Entomology, NTU* 11: 42-48.
  20. Su, H. J., and Wu, R. Y. 1979. Preliminary study on the etiology of Wentan pomelo decline. *Natl. Sci. Counc. Sym.* 1:45-57.
  21. Tsai, C. H., Su, H. J., Liao, Y. C., and Hung, T. H. 2006. First report of the causal agent of Huanglongbing ("*Candidatus Liberibacter asiaticus*") infecting kumquat in Taiwan. *Plant Dis.* 90: 1360.
  22. Tsai, M. C., and Su, H. J. 1991. Development and characterization of monoclonal antibodies to *Citrus tristeza virus* (CTV) strains in Taiwan. Pages 46-50 *in: Proceedings of the eleventh Conference of the International Organization of Citrus Virologists.* B. H. Brlansky, R. F. Lee, and L. W. Timmer, eds. University of Florida, Gainesville, 459 pp.
  23. Tsai, M. C., Su, H. J., and Garnsey, S. M. 1993. Comparative study on stem-pitting strains of CTV in the Asian countries. Pages 16-19 *in: Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists.* P. Moreno, J. V. da Graca, and L. W. Timmer, eds. University of California, Lake Alfred, 471 pp.
  24. Roistacher, C. N., and Bar-Jospen, M. 1984. Transmission of tristeza virus by *Aphis gossypii* from sweet orange, grapefruit and lemon to Mexican lime, grapefruit and lemon. Pages 9-18 *in: Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists.* S. M. Garnsey, L. W. Timmer, and J. A. Dodds, eds. University of California, Riverside, 377 pp.



## ABSTRACT

Tsai, C. H.<sup>1</sup>, Su, H. J.<sup>1</sup>, Feng, Y. C.<sup>1</sup>, and Hung, T. H.<sup>1,2</sup> 2007. Study of citrus Huanglongbing and its complex infection with *Citrus tristeza closterovirus* and *Citrus tatter leaf capillovirus* in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 16: 121-129 (<sup>1</sup>Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taiwan, R. O. C.; <sup>2</sup>Corresponding author, E-mail: thung@ntu.edu.tw, Fax: +886-2-23625717)

This research is to study the incidence of Huanglongbing (HLB) in decline citrus trees and complex infection of *Citrus tristeza closterovirus* (CTV) and *Citrus tatter leaf capillovirus* (CTLV) in HLB-affected trees in all main citrus producing areas of Taiwan. The result indicated that average 30% of citrus crop showing yellow symptoms was infected by HLB over Taiwan. Eureka lemon infected HLB in Pingtung county was the worst, having 52.8% incidence. In HLB-infected lemon trees, there were about 40% co-infected with CTLV, but no co-infection of CTV. Diseased pummelo samples collected in Yunlin and Hualien counties were 30~45% infected by HLB and approximately 40% HLB-infected pummelo were co-infected with CTLV. However, complex infection of CTV was variability in different pummelo cultivars. In Wentan, Paiyu, and Kao Pan pummelo cultivars only 3~8% co-infected by CTV, but 90% incidence of CTV co-infection were found in hybrid pummelo including grapefruit and Minneola tangelo. Yellowing kumquat collected in Yilan county had the least incidence of 10% of HLB infection, but complex infection of CTV or CTLV was still over high incidence of 60%. Therefore, HLB infection and complex infection of virus disease were significantly different among citrus cultivars. Due to virus co-infection in the field was complicated, in order to distinguish typical HLB symptoms, 6 types of yellowing samples were collected from virus-free sweet orange field. After HLB inspecting, the highest incidence of HLB was type 6. In latent infection study, only 5~6% symptomless pummelo and lemon were infected by HLB. It also means HLB was correlated closely with yellow symptoms and latent infection was less. Finally, little HLB-like but negative to HLB-PCR samples were observed in electron microscopy and a large number of CTV-like particles were accumulated in phloem cell which seemed to be the reason of their decline.

Key words: Huanglongbing, symptom type, complex infection, citrus cultivar, *Citrus tristeza closterovirus*, *Citrus tatter leaf capillovirus*