

國立臺灣大學生物資源暨農學院

植物醫學碩士學位學程

碩士論文

Master Program for Plant Medicine

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

市場潛力柑橘品種對黃龍病的感病性評估

與田間黃龍病現況調查

Virulence analysis of Huanglongbing on potentially-
marketing citrus cultivars and the current status of
Huanglongbing in Taiwan

梁維容

Wei-Jung Liang

指導教授：洪挺軒 博士

Advisor: Ting-Hsuan Hung Ph. D.

中華民國 112 年 9 月

September 2023



國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

市場潛力柑橘品種對黃龍病的感病性評估與田間黃龍
病現況調查

Virulence analysis of Huanglongbing on
potentially-marketing citrus cultivars and the current status
of Huanglongbing in Taiwan

本論文係梁維容（學號 R09645003）在國立臺灣大學植物醫學
碩士學位學程完成之碩士學位論文，於民國 112 年 9 月 23 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：

洪挺軒 博士 洪挺軒 (指導教授)
國立臺灣大學植物病理與微生物學系 教授

林乃君 博士 林乃君
國立臺灣大學化學系 教授

張立 博士 張立
國立臺灣大學植物病理與微生物學系 助理教授

沈原民 博士 沈原民
國立臺灣大學植物醫學碩士學位學程 助理教授

蔡佳欣 博士 蔡佳欣
行政院農業部農業試驗所植物病理組 助理研究員

碩士學位學程主任 葉世甲 (簽名)

致謝

首先，要感謝我的指導老師洪挺軒教授，謝謝老師領我進入柑橘這個領域，並且給予最大的支持，讓我在豐富資源的環境中，能全心全意地做研究。再來是感謝我的口試委員們，感謝林乃君老師、沈原民老師、張立老師，以及蔡佳欣學長在論文上的大力斧正，並給予許多珍貴的建議和回饋，使我的論文能更臻完美。感謝我的父母，無論是精神上與經濟上的給予都是最無私的，謝謝你們無條件地養育我至今。

進入研究所之初，感謝楹瑩和見辰陪著我一起摸索，學習如何嫁接、磨練開車技術，迷糊之間也開啟了田間調查，讓我往後在面臨失敗，都有充分的動力去重新嘗試。感謝臺東成功健康種苗場提供的優質種苗，讓我的實驗多了一份保障；感謝陳祈男學長、李建瑩學長、施伯明學長、李宗翰學長、陳佳翰學長、莊雅竹學姊、張旭屏夫婦、李聲達先生、邱永豐先生、李俊賢先生、王贊崇先生、蔡蒼振先生等柑橘領域的前輩們，在採樣與田間調查上的諸多協助，有你們的支持，才有今日的研究成果。

在植物病毒研究室裡，感謝舜閔學長不厭其煩地擔任我實驗期間的專業顧問，感謝宥均學長總是給我高度的肯定還有協助處理繁重的實驗，感謝我的好兄弟楹瑩陪我經歷柑橘研究的漫長之路並相互支持，感謝實驗室的所有夥伴們，在煩悶的研究之餘，一起吃喝玩樂、討論實驗，真的好開心。感謝植醫學程的老師們、同學們，還有植物教學醫院的成員們，讓我在三年的碩士期間有許多成長。

最後，想要感謝研究期間遇到的農友，儘管素昧平生，你們依然毫不猶豫地給予信任、分享知識並協助我的調查，感受到你們對果園投注的心力與感情，並享用著你們收成的美味柑橘，無疑是我完成論文最重要的動力來源。

中文摘要



柑橘作為臺灣產量最大的果樹，其經濟價值不容小覷。產期集中、品種單一化，是臺灣的柑橘產業長期以來的問題，而肆虐全世界的黃龍病一直是柑橘品質與產量的重要限制因子。農業試驗所的嘉義分所保存逾 170 個柑橘品種，並積極進行新品種的選育，其中不乏優良柑橘品種，儘管園藝性狀良好，其抗黃龍病的抗病能力卻是缺乏掌握的。有鑑於此，本研究選擇四種具有市場潛力的柑橘品種—臍橙、黃金茂谷、佛利蒙、與扁實檸檬，進行黃龍病之感病程度的測試，並與主流品種當中已知較感病的極柑、桶柑還有已知較耐病的文旦、優利加檸檬相互比較。此外，本研究也測試不同的接種條件，對試驗結果的影響。四品種當中，黃金茂谷最感病，感染後葉片強烈黃化斑駁，且植株矮化程度高，臍橙與佛利蒙次之，扁實檸檬較耐病，罹病嚴重度低且菌量低，感病程度近似優利加檸檬。接種條件方面，雖然小植株與大植株在菌量增殖速度相差不大，但是小植株的發病速度普遍較快，此外矮小且分枝多的植株，其菌量分布較均勻。本研究也針對具市場潛力的品種，調查田間黃龍病的現況。罹病率方面，屏東的扁實檸檬與臺東的臍橙、佛利蒙的罹病率偏高，北部山區的佛利蒙、臍橙與黃金茂谷都沒有檢測到黃龍病，整體而言，罹病率與健康種苗的使用率無相關性。感染黃龍病的樣本中，多數都能檢測到原噬菌體，以 T1 原噬菌體單獨感染及 T1+ T3 原噬菌體複合感染的比例為主，有趣的是，不含任何已知原噬菌體的樣本，其菌量比較低。由於國內以往的黃龍病研究多半是針對市場的主流品種，缺乏新興品種或是非主流品種的學術研究資料，本研究針對上述四個具市場潛力的柑橘品種，提供黃龍病的試驗資料及田間危害現況，有助於未來推廣品種及田間管理能更加精準，因「品種」制宜。同時，本研究也累積臺灣本島的黃龍病生態資料，如噬菌體類型，為黃龍病菌系的演變提供資訊。

關鍵詞：黃龍病、多樣化柑橘品種、感病性、罹病率、原噬菌體

Abstract

Citrus, as Taiwan's largest fruit tree crop, holds significant economic value. The concentrated harvest season and few citrus varieties supplied have been long-standing issues in Taiwan's citrus industry. The widespread Huanglongbing (HLB), also known as citrus greening disease, has been a crucial limiting factor for citrus quality and yield worldwide. Chiayi Agricultural experiment branch, Taiwan Agricultural Research Institute preserves over 170 citrus varieties and actively engages in breeding new varieties. While many of these varieties exhibit excellent horticultural traits, their susceptibility to HLB remains unclear. In light of this, this study aimed to select four citrus varieties with market potential, Navel, Ora, Fremont and Shiikuwasha, to test their susceptibility to HLB, and compared them with mainstream susceptible varieties such as Ponkan and Tankan, as well as resistant varieties like Wentan and Eureka Lemon. Additionally, this study also tested different inoculation conditions to assess their impact on the experimental results. Among the four varieties, Ora displayed the highest susceptibility to HLB, showing strong mottled yellowing on infected leaves and significant stunting. Navel and Fremont were the second, while Shiikuwasha exhibited greater disease tolerance, with lower disease severity and *Candidatus Liberibacter asiaticus* quantity, comparable to Eureka Lemon. In terms of inoculation conditions, although the rate of CLAs proliferation did not significantly differ between small and large plants, small plants generally exhibited faster disease progression. Furthermore, shorter plants with more branches displayed a higher detection rate of CLAs. This study also investigated the current status of HLB in the field for the selected market potential varieties. Disease incidence varied, with higher rates of Shiikuwasha in Pingtung and Navel and Fremont in Taitung. In the northern regions, Fremont, Navel and Ora showed no detectable presence of HLB. Overall, disease incidence did not correlate with the usage of the healthy seedlings. Among the HLB-infected samples, most contained prophages, with the highest proportion attributed to the T1 prophage alone or in combination with the T3 prophage. Interestingly, samples lacking any known prophage displayed lower CLAs quantity. Given that previous HLB research in Taiwan mainly focused on mainstream market varieties, academic research data on emerging or non-mainstream varieties is scarce. This study provides valuable experimental and field data on HLB for the aforementioned four citrus varieties with market potential. This

information will contribute to more precise field management and variety promotion, tailored to specific varieties. Additionally, this study collected ecological data on HLB in Taiwan, including information on prophage types, which offers insights into the evolution of CLAs.

Key words: Huanglongbing, variation of citrus cultivars, susceptibility, disease incidence, prophage



目錄



口試委員審定書	i
致謝	ii
中文摘要	iii
Abstract	iv
目錄	vi
圖表目錄	viii
壹、前言	1
一、 臺灣之柑橘產業	1
二、 柑橘產業困境與調適	1
三、 柑橘健康種苗制度與具市場潛力之品種的推廣	2
四、 研究目的	4
貳、 前人研究	5
一、 黃龍病之歷史	5
二、 黃龍病之病原分類	6
三、 黃龍病之發病生態與防治	6
四、 黃龍病於植株上的病徵表現	7
五、 感染黃龍病之生理機制與其應用性	8
六、 各品系之柑橘對黃龍病的抗感病性	9
七、 病原菌之偵測與在植株體內的分布情形	10
八、 黃龍病菌之噬菌體	11
參、 材料與方法	14
一、 核酸萃取	14

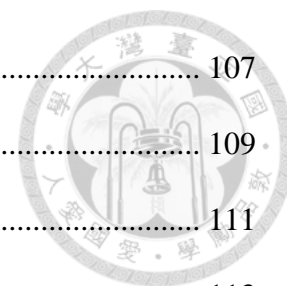
二、	傳統 PCR 反應及膠體電泳分析.....	14
三、	建構黃龍病菌 real-time PCR 標準曲線.....	15
四、	Real-time PCR (Polymerase chain reaction) 反應.....	16
五、	具市場潛力之柑橘品種對黃龍病的抗感性評估.....	17
六、	黃龍病菌於不同柑橘品種的分佈情形.....	19
七、	早期偵測黃龍病的指標.....	20
八、	柑橘黃龍病的危害現況及黃龍病菌原噬菌體類型之調查.....	22
肆、	結果.....	24
一、	柑橘黃龍病之發病生態.....	24
二、	柑橘黃龍病的罹病率及原噬菌體類型.....	34
伍、	討論.....	38
一、	柑橘黃龍病之發病生態.....	38
二、	柑橘黃龍病的罹病率及原噬菌體類型.....	44
陸、	結語.....	49
柒、	參考文獻.....	50
捌、	表.....	64
玖、	圖.....	87
拾、	附錄表.....	117
拾壹、	附錄圖.....	121



圖表目錄

表一、溫室接種之小植株的初始陽性時間點、最高菌量時間點與最高菌量 ..	64
表二、溫室接種之大植株的初始陽性時間點、最高菌量時間點與最高菌量 ..	65
表三、溫室接種之佛利蒙的黃龍病菌量變化	66
表四、溫室接種之扁實檸檬的黃龍病菌量變化	67
表五、溫室接種之臍橙的黃龍病菌量變化	68
表六、溫室接種之黃金茂谷的黃龍病菌量變化	69
表七、溫室接種之優利加檸檬的黃龍病菌量變化	70
表八、溫室接種之文旦的黃龍病菌量變化	71
表九、溫室接種之椪柑的黃龍病菌量變化	72
表十、溫室接種之桶柑的黃龍病菌量變化	73
表十一、溫室接種之小植株的罹病嚴重度的變化	74
表十二、溫室接種之大植株的罹病嚴重度的變化	75
表十三、溫室接种植株體內的菌量分布	76
表十四、黃龍病感染後之目標基因的相對表現量	77
表十五、黃龍病罹病率與各縣市使用健康種苗比例	81
表十六、市場潛力品種之田間罹病株的菌量、罹病嚴重度與病徵類型	83
表十七、田間調查之黃龍病菌的噬菌體種類	85
表十八、不同原噬菌體組成之黃龍病菌在植株體內的菌量	86
圖一、小植株組試驗與大植株組試驗的黃龍病菌量增殖情形	90
圖二、以廣義估計方程式推算各品種之菌量隨時間的變化	93
圖三、黃龍病菌對生長長度的影響	95
圖四、黃龍病感染後之(A)植株矮化情形及(B) (C)葉部病徵表現	104

圖五、評估黃龍病之抗感病程度	107
圖六、黃龍病菌在植株體內的檢出率	109
圖七、黃龍病對葉綠素含量的影響	111
圖八、溫室接种植株的基因表現量差異	113
圖九、各品種於不同縣市之罹病率與健康種苗使用比例的相關性	114
圖十、田間黃龍病罹病植株的菌量	115
圖十一、不同柑橘品種上的黃龍病菌之原噬菌體種類	116
附錄表一、柑橘苗之傳統 PCR 病原檢測的引子對	117
附錄表二、黃龍病菌 Real-time PCR 定量所使用的引子對及探針	118
附錄表三、基因表現量測定所使用的引子對	119
附錄表四、田間調查所使用的黃龍病罹病嚴重度與葉片病徵調查方式	120
附錄圖一 A、黃金茂谷接種黃龍病後隨時間的病徵變化.....	121
附錄圖一 B、臍橙接種黃龍病後隨時間的病徵變化.....	122
附錄圖一 C、桶柑接種黃龍病後隨時間的病徵變化.....	123
附錄圖一 D、佛利蒙接種黃龍病後隨時間的病徵變化.....	124
附錄圖一 E、扁實檸檬接種黃龍病後隨時間的病徵變化.....	125
附錄圖一 F、優利加檸檬接種黃龍病後隨時間的病徵變化	126
附錄圖一 G、文旦接種黃龍病後隨時間的病徵變化.....	127
附錄圖二、黃龍病菌分布試驗的植株於接種後一年半的生長情形	129



壹、前言



一、臺灣之柑橘產業

柑橘屬於芸香科 (Rutaceae)，此科 (family) 大約 150 屬，其中 4 屬作為栽培使用，包含黃皮屬 (*Clausena*)、枳屬 (*Poncirus*)、金橘屬 (*Fortunella*) 及柑橘屬 (*Citrus*)，以柑橘屬為最大宗 (楊等，2002)。在臺灣，柑橘為分布最廣、產量與產值最高的果樹 (不考慮檳榔)。根據 110 年農業統計年報，柑橘類的總種植面積為 25,054 公頃，其中椪柑種植面積最大 (5,101 公頃)，總產量為 465,871 公噸，其中柳橙產量最高 (115,121 公噸)。

臺灣最早的柑橘栽培紀錄始於清領時期，由中國移民遷臺時攜入，有文旦、佛手柑、番柑與椪柑等品種，為自給自足，少大規模生產。日治時期，因應日本國內的消費需求，加上政府的生產獎勵計畫，柑橘才商品化，與香蕉、鳳梨併列為三大主要的經濟果樹；產業發展之初，華盛頓臍橙、麻豆文旦具備品質優良且耐儲運之特性，為主要輸日品種，而椪柑、斗柚則適合作為島內的鮮食品種，然而隨著時代遷移，椪柑逐漸晉升為輸出大宗；另有來自華南、東南亞的檸檬、葡萄柚等引入，至此臺灣已累積了 47 個栽培種。國民政府遷臺之後，農復會在 1950 年代推行優良甜橙苗木，晚崙西亞與椪柑是主流品種，1960-1980 年代，官方與民間大量引種，品種漸趨多元化，包含了優利加檸檬、鳳梨甜橙、茂谷柑、佛利蒙、血橙等，1980 年代後，農業試驗所嘉義分所建構柑橘育種與健康種原基地，近年育成之柑橘品種有「臺農一號金香」、「臺農天王柑」與「臺農一號黃水晶」等 (王等，2000；曾，2005；黃等，2013)。

二、柑橘產業困境與調適

目前臺灣的市場主要供應椪柑、柳橙、文旦與桶柑等四品種，在 110 年的農業統計年報中，上述品種的產量占整體的 74%。品種少樣化，加上產期集中 (主要產期為 11 月-2 月)，使柑橘產業經常面臨供需失衡的風險，在農業勞力人口吃緊的情況下，產季期間的人力調配更是一大挑戰 (徐與呂，1995)。

就市場競爭力而言，小農型態經營致使生產效率與產量難以提升，加上缺乏

品種多樣性，國產柑橘恐怕難以在內銷及外銷市場立足（胡，2013；徐與呂，1995）。就生產面而言，產業結構的不穩固，容易使農民管理果園之意願下降，粗放管理或荒廢的果園淪為病蟲害大量孳生的毒窟，更為鄰近的柑橘園帶來潛在威脅（洪，2006）。

為了因應上述的挑戰，政府在 2002 年推動產業結構調整計畫，於 2006-2017 年間縮減了 2,765 公頃的不具競爭力之品種（王等，2019），並輔導品種更新，推廣優良品種，如：佛利蒙、豔陽柑、明尼吉柚與萊姆等具市場潛力的品種（劉等，2019）。

三、 柑橘健康種苗制度與具市場潛力之品種的推廣

世界上主要的柑橘生產大國皆實施柑橘健康種苗計畫，如美國 (Vidalakis et al., 2010)、巴西 (Carvalho et al., 2019)、西班牙 (José et al., 2015) 及南非 (Von Broembsen & Lee, 1988)，旨在防止病原擴散及維持品種優良特性。臺灣從 1973 年起培育柑橘健康種苗，先後以熱療（黃與徐，1989）、頂稍嫁接等方式消除病原（黃龍病、萎縮病、破葉病、鱗砧病等），農業試驗所嘉義分所與臺灣大學合作建立無病毒化之原原種，培育原種園與採穗園，並於各重要產區設置健康苗圃，包含青果社宜蘭分社與新竹分社、梅山合作農場、成功健康種苗場，供應地方農友健康柑橘種苗（黃與楊，2004）。此外農試所嘉義分所成立的柑橘種原庫，保存了 160 多個柑橘品種（林等，1989），其中不乏具市場潛力的，以下挑選出四個已有健康種苗供應之品種—佛利蒙柑 (Fremont)、扁實檸檬 (Shiikuwasha, Hiramimi lemon)、臍橙 (Navel)、黃金茂谷 (Ora)，詳述該品種之特性及生產概況。


佛利蒙柑之親本為地中海寬皮柑 (Clementine) 與椪柑，屬於早熟種雜交寬皮柑，耐潰瘍病、黑點病與油脂病，開花結果穩定，具備豐產特性，且掛果期持久，比椪柑略早成熟，果實偏小，果重 100-150 公克，成熟時糖度可高達 14-15 °Brix，因為果實顏色亮麗，亦有發展為盆栽柑橘的潛力（李，2007；黃與陳，2012；楊等，2002）。目前在宜蘭冬山與三星、新竹峨眉、臺中東勢與豐原、南投中寮與竹山、雲林古坑、臺東卑南有栽培。



扁實檸檬 (*Citrus depressa* Hay.) 屬於臺灣原生種，又稱「臺灣香檬」，在臺灣各地的山區及離島都有野生種的紀錄，果實偏小，果重約 50 公克，果肉偏酸苦，適合榨成果汁販售 (林與陳，2006；林等，2012)。其果皮具有豐富的橘皮素(tangeretin)與川陳皮素(nobiletin)，兩者皆屬於多甲氧基類黃酮 (Polymethoxyflavones) (鄧等，2011；Lee et al., 2010)，可以減緩神經退化(帕金森氏症及阿茲海默症) (Nakajima & Ohizumi, 2019)、抑制癌細胞增生 (Goh et al., 2019)、抑制白色脂肪形成 (Lee et al., 2011)，具有機能性食品與化學治療的應用潛力。臺灣的香檬產業結構迥異於多數柑橘品種，由合作社擔任加工、販售的角色，皆以契作形式生產，目前有兩大合作社，其一為「永信合作社」，總共契作面積有 230 甲，主要契作戶位於屏東麟洛、內埔、長治、竹田等鄉鎮，其二為「臺灣好田」，主要契作戶位於南投竹山與高雄岡山及旗山，另外，臺東長濱大俱來與金剛山也有小農零星栽培。

臍橙為古老柑橘品系，屬於早熟種甜橙，在 19 世紀初就有栽培紀錄，其品系繁雜，多數為華盛頓臍橙 (Washington Navel) 的枝條芽變異，如白柳 (Shirayanagi) 臍橙、Dream 臍橙，也有來自珠心胚選育的，如 Frost 臍橙 (江等，2015)。臍橙因為果頂有副果，常開裂成臍狀，民間別稱財丁、肚臍丁，早在日治時期 (1910 年) 就引進臺灣，由杉原株氏會社於臺東栽培，所需之栽培技術門檻高，產區與產量至今仍相當侷限；臍橙具雄不稔及部分胚株不稔的特性，因此果實無籽，其環境適應性窄，若開花與結果期遭遇高溫及土壤過乾，常會導致嚴重落果，因此選擇溫度 24-34°C 之地區、建立灌溉系統維持土壤水分恆定是重要的；臍橙果型大，果重約 200-250 公克，果肉柔軟多汁且無籽，加上果實具備吉祥意象，市場上常供不應求 (許，2011；陳等，2013；楊等，2002)。目前在臺東成功、東河與卑南、南投水里、臺中東勢與宜蘭員山有零星栽培，並以臺東地區較具規模。

黃金茂谷屬於晚熟種寬皮柑，數十年前由以色列的沃卡尼中心 (The Volcani Center) 育種而成，名為“Orah”，其母本為‘Temple’ tangor，父本有兩種說法，早期文獻紀錄為‘Dancy’ mandarin，近期分子標記的結果認為‘Kinnow’ mandarin，在以色列、泰國都有商業化的栽培 (Graham et al., 2015)。因該品種多



籽，已利用 gamma 輻射的技術獲得少籽品系，將少籽品系命名為“Orri”、“Or”或“Ori”，並於近年成為以色列內外銷的主流品種 (USDA/FAS, 2023)。中國約二十年前引進黃金茂谷，當地稱之為沃柑，因豐產、果形漂亮、採收期長、耐儲運等特性而廣受歡迎，於廣西、雲南等地區大面積栽培 (Jiang & Cao, 2011)。臺灣自泰國引進黃金茂谷，經蘇鴻基教授脫毒，由嘉試所保存及生產健康接穗，因其果皮金黃、外型似茂谷般扁平，而以「黃金茂谷」為名，黃金茂谷在臺灣的學術資料尚少，根據筆者田間觀察與農民口述，黃金茂谷具豐產、不易裂果、甜度高等特性。目前在宜蘭頭城有黃金茂谷小面積的生產專區（約 5 公頃），另外苗栗卓蘭、臺中東勢也有零星栽培。

四、 研究目的

臺灣柑橘產業發展有著漫長的歷史，產業規模甚大，在農業中佔有一席之地，然而長期存在著品種少樣化的問題，加上長年遭受黃龍病等致命性之病害的侵擾，田間管理不甚容易，無論是銷售或栽培都是嚴峻挑戰。儘管臺灣擁有多樣化的柑橘品種，大部分品種的栽培規模仍然有限，有關黃龍病等病蟲害的抗感病資訊亦不齊全，有鑑於上述四個具市場潛力之品種—佛利蒙、臍橙、扁實檸檬與黃金茂谷，目前在臺灣已有少量栽培，加上具有一定的市場接受度，因此本論文以此四個品種做為研究標的，另外選擇四個已知黃龍病之感病性的品種—椪柑、桶柑、文旦、優利加檸檬，作為比較基準，調查黃龍病於上述八個品種的發病生態，以病芽接種的方式感染植株，分析其對黃龍病的感病程度，包含了病原菌之增殖速度、在植株體內的分布，與病徵表現等多面向之探討，並且實際走入田間，了解上述之品種的栽培現況，黃龍病的危害程度等，最後綜合接種研究(溫室實驗)與田間調查的資訊，探討這些品種的優勢及劣勢，期盼能作為黃龍病管理方針的依據，提升新興柑橘品種於產業上之能見度及發展潛力。此外，本論文嘗試分析田間樣本帶有的噬菌體種類，與盧等前人所做的研究結果相互參照，探討黃龍病菌株之演變，作為黃龍病菌於臺灣之生態演化上的研究資料。

貳、 前人研究



一、 黃龍病之歷史

黃龍病為重要的世界級柑橘病害，對產值及產量影響甚鉅，依據危害程度不同，可導致減產 30%至 100%，並使感染的果園 7-10 年內失去經濟價值 (Gottwald et al., 2007)。據 Aubert (1993) 的報導，黃龍病發展至 1990 年初已在亞洲及非洲地區危害超過六千萬株植物。在黃龍病的文獻記載當中，首次於 1919 年的中國南方發生，至 1936 年成為嚴重病害，並且持續而緩慢地入侵其他柑橘栽培區，過後幾十年間陸續出現在亞洲、非洲、大洋洲、中南美及北美洲多達 40 多個國家 (Bové, 2006)，其中包含了巴西的聖保羅 (Teixeira et al., 2005)、美國的佛羅里達州 (Graham et al., 2020)等柑橘重要產地。

早期黃龍病在各地區有不一樣的稱謂，南非的“greening”，印度的“dieback”，菲律賓的“mottle leaf”，都是指同一病害因子 *Candidatus Liberibacter* 所造成的；1995 年 International Organization of Citrus Virologists (IOCV) 將“huanglongbing”發表為正式的病名，黃龍病之英文名稱至此統一 (Bové, 2006)。

臺灣於 1951 年首次發現疑似柑橘黃龍病之病害，當時的植物病理學家-松本巍教授將其命名為立枯病 (Likubin)，研究之初，誤以為其病原是 Citrus tristeza virus (CTV) (Matsumoto et al., 1968; Matsumoto et al., 1961)。奇怪的是，耐 CTV 的酸橘是臺灣田間常見的砧木，理論上田間立枯病不應如此普遍，透過不同品種的嫁接試驗，推測立枯病似乎為 CTV 以外之病原造成的，而電子顯微鏡的觀察提供了進一步的證據 (邱，1979；黃，1989；蘇，2010)。

在研究初期，黃龍病已肆虐全臺，極柑、桶柑與柳橙普遍發病嚴重 (蘇等，2010)。至 1970 年代，臺灣田間的柚類普遍立枯、葉片黃化，經證實是黃龍病菌感染 (黃與張，1980)，隨後黃 (1987) 發現黃龍病菌可感染檸檬、葡萄柚與金柑，而蔡等(2011)則是在 2006 年紀錄到宜蘭的金柑感染黃龍病，且與其他病毒 (柑橘萎縮病、破葉病) 複合感染比例極高，各縣市黃龍病陽性比例普遍達 30%以

上，其中文旦、檸檬的罹病率最高。

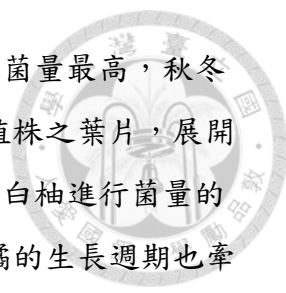
二、黃龍病之病原分類

黃龍病的致病因子 *Candidatus Liberibacter*，是一種韌皮部局限性的革蘭氏陰性菌，由於難以離體培養，細菌學家對該病原之拉丁二名法命名一直存有疑慮，隨著 PCR 技術與 DNA 定序發展，透過 16S rDNA 序列比對後，黃龍病之病原被列入 *Candidatus*，並以 *Liberibacter* 作為種名 (Bové, 2006)。另外，根據 16S rDNA 與生態習性、地理分布，可進一步將造成黃龍病的病原分為三個種，在演化學上有一假說，是此三個種分別在三個洲發生演化，故以洲作為命名依據，*C. L. asiaticus* (亞洲種) 主要分布在亞洲國家、巴西及美國，*C. L. africanus* (非洲種) 分布於非洲各國，*C. L. americanus* (美洲種) 存在於巴西 (Bové, 2006; Nelson et al., 2013)。亞洲種造成的危害最嚴重，在涼爽或溫暖環境下都會顯現病徵，而非洲種與美洲種則對熱敏感，其中非洲種在涼爽環境下 (20-25°C) 才會顯現病徵，若長期在超過 30°C 的環境下，病徵有機會受到抑制 (Nehela & Killiny, 2020)。

有關黃龍病菌的生命史，黃 (1987) 以電子顯微鏡觀察數種柑橘罹病葉之葉脈為樣本，發現黃龍病菌僅存在於韌皮部之篩管中，具備多形性 (pleomorphic)，成熟型為桿狀，大小約 350-550 X 1500-3300 nm，也有細長之生長型與球狀之衰老型，主要以出芽 (budding) 方式繁殖，也可行二裂生殖 (binary fission)，菌體可經由變形方式穿過篩孔細胞移動至鄰近篩管。

三、黃龍病之發病生態與防治

黃龍病可藉由帶病的無性繁殖苗、接穗，以及媒介昆蟲傳播，亞洲種 (*C. L. asiaticus*) 的媒介昆蟲為亞洲柑橘木蝨 (*Diaphorina citri* Kuwayama)，屬於永續性傳播，可終生帶毒，不過傳毒率相當低 (黃等, 1984; 洪, 2006)。月橘 (*Murraya paniculata* var. *paniculata*) 是臺灣極普遍的圍籬植物，烏柑仔 (*Severinia buxifolia*) 常見於柑橘園，兩者都是木蝨的良好寄主，Hung et al. (2000a) 調查上述兩種植物是否可能為田間黃龍病的中間寄主，結果發現黃龍病菌在月橘中無法繁殖，但在烏柑仔上能穩定增殖，為潛在的感染源。



季節會影響黃龍病菌之族群波動。黃 (1987) 觀察到夏季的菌量最高，秋冬略為下降，並且在不同柑橘品種都有同樣的趨勢，而田間罹病植株之葉片，展開後約四個月菌量遽增。蔡等 (2007) 針對田間的紅江橙、茂谷與白柚進行菌量的四季調查，發現春秋季菌量較高、夏冬季較低。有趣的是，柑橘的生長週期也牽動著黃龍病菌及柑橘木蝨的族群波動：當地上部抽梢，地上部的黃龍病菌族群量提升，新梢成熟後，菌量隨之下降，根部的菌量也會隨著根系生長週期而消長；由於春梢期的黃龍病菌族群量與木蝨族群量是全年當中最高的，春季是柑橘感染黃龍病風險最高的時期；而木蝨感染黃龍病菌的高峰則是在秋梢期，推測入冬之後，黃龍病菌應偏好藏匿於木蝨體內或是植株根部 (Nehela & Killiny, 2020)。

臺灣的學者洪 (2006) 著手黃龍病之流行病學與木蝨生態的研究，也證實春梢期是柑橘黃龍病發生的高峰，由於木蝨成蟲獲毒能力較低，以若蟲期獲毒為主，通常在春芽期木蝨大量繁殖並羽化遷飛進行病原傳播，因此洪認為清除荒廢田區與帶病植株，避免滋生帶毒木蝨，是防堵黃龍病的首要工作；此外，有防治柑橘木蝨的柑橘園發病率可以控制在 20% 以下，其病勢發展曲線之 r 值為 0.51/年，但是沒有防治的田區，發病率則逼近 60%，其病勢發展曲線之 r 值為 1.08/年，顯示除滅柑橘木蝨是延緩病勢發展的重要手段。

在整合性管理方面，由於黃龍病屬於系統性病害，至今仍無有效的防治方法。防治原則包含了健康種苗體系 (避免由無性繁殖體傳播)、抗生素療法 (灌注四環黴素於罹病株體內)、殺蟲劑 (如大滅松) 滅絕媒介昆蟲，或是移除罹病枝條及罹病株等潛在傳染源；此外，若發病初期剪除罹病枝條並配合化學藥劑使用，有機會延長柑橘的壽命 (蔡等，2011)。

四、黃龍病於植株上的病徵表現

葉片是最常用於判斷是否罹患黃龍病的部位。葉片雜色斑駁的病徵 (界線模糊的黃綠相間)，為澱粉粒堆積於葉肉細胞，加上葉綠素、葉黃素、胡蘿蔔素降解所致；葉片變厚、葉脈木栓化的病徵，是由於形成層之分生能力過度活躍，導致異常增生之維管束細胞相互擠壓，讓初生木質部擠破表皮細胞所造成的；受感染的葉片可能會比正常葉片小，葉片的兩邊大小不均，有時會有似營養缺乏之病

徵，不過單純營養缺乏通常會比較均勻地出現在各枝條上，而黃龍病造成的病徵則常有不均勻分布的情形；嚴重感染時，新梢葉片會比較小、節間較短且向上生長，稱為「兔耳」，隨之而來的是梢枯與落葉，感病品種可能在數個月或數年後死亡 (Nehela & Killiny, 2020; 黃, 1987)。

在花果上，黃龍病感染會導致非季節花，小果、畸形果，也會造成果皮較厚、轉色不均 (citrus greening)，種子不孕，提早落果等，果汁會變苦、變少，嚴重影響產量、產值；畸形果與生長素 (IAA)、離層素 (ABA) 在果實外果皮組織的不均勻分布有關 (Nehela & Killiny, 2020)。

五、 感染黃龍病之生理機制與其應用性

黃龍病之監測 (monitoring) 與檢測 (diagnosis) 一直是重要的研究方向。儘管分生技術已相當成熟，具有很高的敏感性及專一性 (Hung et al., 1999a, 1999b; 田, 2009)，然而黃龍病潛伏期較長、病原在植株體內分布不均，經常需要仰賴採集者的經驗方能提升檢測的正確率 (Futch et al., 2009)，潛伏感染 (無病徵樹作為感染源) 也成為黃龍病擴散的途徑 (李, 2019)。

早期偵測的敏感性、正確性與效率，是眾所矚目的焦點。近年來許多學者嘗試利用光學影像 (de Moraes Pontes et al., 2020; Garcia-Ruiz et al., 2013; Mishra et al., 2011; Pourreza et al., 2015; Sankaran & Ehsani, 2011; K. Wang et al., 2019)、有機揮發物 (Cevallos-Cevallos et al., 2012; Xu et al., 2023)、動物對氣味的辨識 (Gottwald et al., 2020)、代謝體學 (Chen et al., 2022; Martinelli et al., 2015; Wang et al., 2022; Xue et al., 2022; Zuñiga et al., 2020) 等方式，除了探索早期偵測黃龍病的可行性，也幫助人們更了解黃龍病的致病過程。

有關黃龍病之病徵形成，Nehela and Killiny (2020) 認為有三個主要機制：一為 glucose-phosphate transport (GPT) 表現增加，使澱粉堆積在葉部，擾亂了光合代謝產物的輸送，二為植物荷爾蒙 (如茉莉酸) 失衡，三為解毒蛋白 (特別是 glutathione-S-transferase) 的活化及去毒作用發生。

病徵也反應了黃龍病對植物生理的影響，在前人研究中 (Albrecht &

Bowman, 2008; Hu et al., 2017) 歸納出數個常受影響的生理代謝，包含了逆境反應、轉錄相關的訊息傳導、養分運輸、細胞建構、碳水化合物之代謝、荷爾蒙的生理代謝與光合作用等。

學者經常透過轉錄體學的資訊，與生理變化連結，進一步解釋各品種的耐抗病機制。Hu et al. (2017) 比較耐病的泰國檸檬(*C. hystrix*)與感病的橙類 (*C. sinensis*) 在黃龍病初感染時的基因表現量差異 (differential expressed genes, DEGs)，結果發現在耐病的泰國檸檬上，澱粉生合成與光合作用都未受到黃龍病干擾，與二次代謝物、過氧化物相關的基因則是被上調控，可能為該品種展現耐病的機制。Wang et al. (2016) 選擇園藝性狀相似但抗病性不同的品種做比較，探討耐病之 Jackson 葡萄柚與感病之 Marsh 葡萄柚在轉錄體上的差異，結果發現基因表現差異主要發生在細胞壁、脂質及黃樟素等二次代謝物上：與細胞壁結構相關的基因 (如 cellulose synthase cellulases) 在 Marsh 葡萄柚的表現量增加，與防禦直接相關的基因 (如 NPR1-like genes)，在 Jackson 葡萄柚的表現量增加。Curtolo et al. (2020) 將多個柑橘品種依據感病性分為三組，調查各組在感染黃龍病後的轉錄體，發現多數與纖維素合成及澱粉合成相關的基因，在感病品種被上調，然而在耐病及抗病品種則沒有明顯的差異，此外作者也發現到耐病與抗病品種受調控的基因不多，感病品種反之，而且耐抗病品種受調控的基因傾向更早發生，推測耐、抗病品種對黃龍病菌防禦啟動的較快。

黃龍病菌在入侵柑橘寄主後，不僅會改變柑橘葉片的光合色素之平衡，促進醣類轉化成澱粉，間接導致澱粉大量累積在葉綠體中，造成胞器結構損壞，同時促進葉綠素分解，最終產生肉眼可見的斑駁與黃化等病徵 (Etxeberria et al., 2009; Killiny & Nehela, 2017)。Li et al. (2021) 發現在植株感染黃龍病後，無論是否有出現病徵，chlorophyllase 皆大量累積，而 chlorophyllase 可能就會直接干擾葉綠素生合成；作者從葉片萃取之葉綠素，以紫外光可見的分光光度計量測，健康對照組葉綠素濃度最高，黃龍病罹病株之無病徵者明顯低於健康對照組，而有病徵者則明顯更低於無病徵者。

六、 各品系之柑橘對黃龍病的抗感病性

普遍認為商業化的柑橘品種當中，沒有抗病的品種，然而品種間的感病程度有所差異，有關各栽培種對黃龍病的感病性報告常有分歧，可能是隨機變因太多，柑橘寄主的性狀、地理環境、栽培管理方式以及病原菌的致病力都會影響到發病的嚴重程度，此外研究者對感病表現的解讀方式也會影響到最終的結論。


Miles et al. (2017) 認為黃龍病的感病程度與柑橘間的親緣關係有相關性，該團隊分析了柑橘屬及相近物種對黃龍病的感病性，結果發現病徵最耐病的，都與柑橘屬的親緣關係較遠，包含了過山香 (*Clausena excavata*)、月橘 (*Murraya paniculata*)、烏柑仔 (*Severinia buxifolia*) 等非柑橘屬的物種，在柑橘屬內，最耐病的是以枸橼 (*Citrus medica*) 為首的支系，非枸橼的後代通常都比較感病，只有兩個酸橙 (*Citrus aurantium*) 的後代例外，總結而言，若該品種的譜系當中有越高比例的枸橼基因，對黃龍病就越耐病。

Ramadugu et al. (2016) 分析了近百種的柑橘屬及類柑橘的抗感病性，六年的田間試驗中，每年進行菌量檢測及病徵、生長勢調查，隨後分出八個抗感病層級，多數的柑橘栽培種都是對黃龍病感病的，而 *Eremocitrus*, *Microcitrus*, *Poncirus* 等非柑橘屬的則相當耐黃龍病，由於可以和柑橘屬雜交，作者認為未來可以作為黃龍病的抗耐病性的研究或是成為育種母本及砧木。

蔡等 (2011) 針對臺灣常見的接穗與砧木品系，進行黃龍病的增殖速率及病徵程度調查，在接穗品系方面，椪柑與桶柑最感病，發病速度最快、PCR 訊號最早出現，其次是甜橙，再其次是文旦與優利加檸檬，而金柑最耐病，發病及病菌增殖速度皆相當緩慢，在砧木品系方面，酸橘與四季橘最感病，其次是廣東檸檬、烏柑仔，屬於耐病的為枳柚、枳橙 (*troyer citrange*)。

七、病原菌之偵測與在植株體內的分布情形

有關黃龍病菌早期感染的移動分布，Johnson et al. (2014) 做了詳實的報導，該研究發現無論是溫室中的嫁接感染或是田間透過媒介昆蟲感染，黃龍病菌偏好從感染處移動到根部，在根系先建立族群，當植株長出新梢，病原再大量複製並隨著韌皮部的養分運輸快速移動至地上部，感染其餘枝條，因此在韌皮部阻塞，使地上部出現病徵之前，根部早已遭受病原的破壞而減少，作者推測根部病徵可能是細菌的 effectors 造成的。




新梢是柑橘木虱偏好取食與產卵的部位。Folimonova and Achor (2010) 發現隨著病害的發展，病原菌被偵測到的機會增加了，而相較於有強烈病徵的葉片，尚未出現肉眼可見之病徵的新葉有更多的病原菌存在。李 (2019) 調查不同柑橘品種之新梢出現黃龍病菌的時間點，發現柳橙在抽梢後一周即可偵測到病原菌，椪柑與桶柑之新梢兩周後出現病原且增殖速度最快，白金柚則是在三至四周後，病原才出現於新梢。

黃龍病菌在植株體內的分布情形，不僅有生態學上的意義，同時也可做為採樣的參考依據。Li et al. (2009) 針對甜橙、檸檬、酸橙等五種柑橘進行調查，結果發現不同植株之間或是相同植株的不同部位之菌量差異都很大，嫁接處附近之菌量最低，越靠近樹冠上層菌量越多。馮 (2014) 將田間枝條上的芽點嫁接於柑橘苗上，觀察發病率，分析不同柑橘品種體內之黃龍病菌的均勻度，結果發現感病的椪柑，其枝條上的平均菌量最高、分佈也最均勻，其次為文旦與檸檬，耐病的柳橙菌量最低、分佈最不均勻。蔡等 (2007) 以田間的罹病植株之不同部位為標的，探討各部位的病原菌濃度，結果發現果實的菌量最多，其次為老葉與成熟葉，根部與嫩葉僅少量存在，新芽最低。

八、黃龍病菌之噬菌體

在細菌的基因組成上，噬菌體扮演很重要的角色，尤其是溫和型噬菌體，該類型的噬菌體有裂解期 (lytic cycle) 及潛溶期 (lysogenic cycle)，裂解期會裂解寄主細胞並釋出後代，潛溶期則是相對穩定的狀態，可以合併到寄主的染色體做為原噬菌體 (prophage)，或是以質體原噬菌體 (plasmid prophage) 形式複製 (Casjens, 2003)。就科學研究的角度而言，獲取噬菌體的基因資訊，有助於建立病原菌之基因多樣性圖譜，讓科學家得以了解該病原之族群分類、寄主專一性等資訊，這些資訊更可進一步應用於病原之快速檢測、尋找該病害之感染源頭，以及病害風險管理 (Dai et al., 2019; Louws et al., 1999)。

由於黃龍病菌在原噬菌體區域具高度變異之特性 (Zhou et al., 2011)，自從發現了黃龍病之噬菌體，其基因體被廣泛地研究。目前已知的黃龍病之噬菌體有三種。Zhang et al. (2011) 分析從柑橘寄主上分離出的 '*Ca. L. asiaticus*' UF506，發現




兩個環形的噬菌體，分別是 SC1 與 SC2，SC1 帶有 suspected lytic cycle 基因，只在植物寄主當中會進入裂解期，在木蝨體內以原噬菌體形式存在，而 SC2 缺少了裂解期相關之基因，無論在植物寄主或木蝨上，皆以 excision plasmid 的形式複製，此外 SC1 與 SC2 帶有參與溶原性轉化 (lysogenic conversion) 的基因，包含了兩個過氧化酶，有助於黃龍病菌適應其植物及昆蟲寄主。

除了原本就已被報導過的 SC1 (T1 prophage, NC_019549.1，本文以下簡稱 T1) 與 SC2 (T2 prophage, NC_019550.1，本文以下簡稱 T2)，Zheng et al. (2018) 發現部分自中國南方取得的樣本中，含有新一類的 prophage，稱作 Type 3 prophage (P-JXGC-3, KY661963.1，本文以下簡稱 T3)，作者也發現到多種原噬菌體可能存在於同個樣本，唯獨 T2+T3 之組合不存在，而且所有樣本都至少含有一種原噬菌體，由於調查範圍侷限於中國南方，不排除還有其他的噬菌體尚未被發現 (Dominguez-Mirazo et al., 2019)。

噬菌體的類型與基因序列也在許多地區被應用於黃龍病菌的分群，甚至可追溯病菌的來源。在中國，Fu et al. (2020) 發現高海拔地區和低海拔地區的黃龍病源頭不一樣，低海拔的黃龍病源自廣東，主要是種苗傳播，高海拔的黃龍病可能源自雲南及四川，此外低海拔的黃龍病群可再細分成兩個亞群，與黃龍病入侵的時間點有關，晚期入侵的地區，噬菌體有較高的基因多樣性。在印度，Das et al. (2021) 同樣以噬菌體的基因將黃龍病分群，結果發現不同地區的黃龍病族群有不同的來源，此外樣本中涵蓋了三個噬菌體的所有組合(包含中國沒有的 T2 + T3 的組合)，作者認為噬菌體的組成類型及其序列做為黃龍病的分群依據，有足夠的敏感性及效率。

對於黃龍病菌而言，噬菌體不僅可能會協助黃龍病菌侵略寄主 (Jain et al., 2015)，甚至可能影響到黃龍病菌對寄主的適應性 (Fleites et al., 2014)。Bao et al. (2021) 以生理角度著手，探討帶有不同噬菌體之黃龍病菌分離株，是否會在植株寄主上會有不一樣的病徵發展，結果發現在 Nianju (*Citrus reticulata*) 上，T1 CLas 會造成明顯的黃化及落葉病徵，而 T2 CLas 造成典型的缺鋅病徵，但在沙田柚 (*C. maxima*) 及優利加檸檬 (*C. limon*) 上則沒有明顯差異。



在臺灣及日本，有關黃龍病菌的噬菌體及基因型的分類，已有初步的研究。Tomimura et al. (2010) 針對 bacteriophage-type DNA polymerase region 及 *nusG-rplK* operon 兩個基因區段設計引子對，以 duplex PCR 檢測琉球群島及臺灣的黃龍病菌，發現多數樣本屬於 genotype II，然而所有臺灣樣本及部分鄰近臺灣之琉球島群的樣本屬於 genotype I。馮 (2014) 也利用上述方法對臺灣之黃龍病菌進行分類，結果發現臺灣田間多數以 genotype I 為主，少部分為 genotype II，而 genotype II 出現在扁實檸檬上的機率最高。盧 (2017) 自全臺各地的田間取得黃龍病樣本，採用 Zheng et al. (2016) 所設計的引子對，分析噬菌體的類型，發現含 T1 的樣本有較高比例具嚴重的葉部病徵，且與 CTV 的複合感染比例較高，暗示著含有 T1 的黃龍病菌競爭力較差，此外 T1 廣泛存在於多個品種，T2 則主要在柚類與甜橙類上。

參、 材料與方法




一、 核酸萃取

參考 Hung et al. (1999b) 與高 (2022) 之植物總核酸萃取法，改良後的操作過程如下：

取約 0.2 公克的葉片組織，剪碎後放入 2 ml Eppendorf® Safe-Lock Tubes，加入兩顆研磨鋼珠，加入 0.8 ml DNA 核酸萃取液【100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA-2Na, 0.25 M NaCl, pH 8.0】，使用 SPEX SamplePrep Geno/Grinder®2010 高速組織研磨震盪均質機，以 1,500 rpm 震盪 8 分鐘，確認磨碎後，再加入 0.8 ml DNA 核酸萃取液、0.178 ml Sarkosyl【10% N-Lauroylsarcosine】，並混合均勻，於 55°C 乾浴 10 分鐘，以 6,000 rpm 離心 5 分鐘。取 0.8 ml 上清液至新的 1.5 ml 離心管中，加入 0.6 ml PCI【Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol= 25 : 24 : 1】，充分混合成乳狀，以 12,000 rpm 離心 5 分鐘；取 0.5 ml 上清液至新的 1.5 ml 離心管中，與 0.3 ml isopropanol 輕輕混勻，移至 Gene-Spin™-V³ Miniprep purification kit (Protech Technology, Taipei, Taiwan) 提供的 Spin column (事先與 Collection tube 組裝好)，靜置 3 分鐘，以 12,000 rpm 離心 1 分鐘，倒掉 collection tube 中的濾液，加入 0.7 ml 70% 酒精到 Spin column，以 12,000 rpm 離心 1 分鐘，倒掉 collection tube 中的濾液，以 12,000 rpm 離心 3 分鐘去除殘餘的酒精；加入 100 µl TE buffer【10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0】(預先加熱到 65°C) 到 Spin column 膜上後，靜置 4 分鐘使核酸充分溶解；將 Spin column 移到新的 1.5 ml 離心管上，以 12,000 rpm 離心 1 分鐘，即完成核酸萃取。

二、 傳統 PCR 反應及膠體電泳分析

針對黃龍病，使用 Hung et al. (1999b) 所設計之黃龍病專一性引子對，於 PCR 熱循環反應器內進行目標序列增幅。總體積為 25 µl，包含 9 µl ddH₂O，12.5 µl 2X ExpressGO™ PreMix-CE、1 µl pmole/µl primer pairs 與 2.5 µl 之核酸樣本。溫度循環條件為：94 °C 作用 2 分鐘；【94°C 作用 1 分鐘，60°C 作用 1 分鐘，72°C 作用 1 分鐘】共 30 cycles；72°C 作用 10 分鐘。



由於萎縮病、破葉病與鱗砧病之病毒病原屬於 RNA 病毒，因此在進行 PCR 檢測前，需要將核酸樣本進行體外反轉錄，使 RNA 反轉錄為 complementary DNA (cDNA)，步驟如下：準備 0.5 ml 微量離心管，每管加入 Random primer (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 2 μl 、dNTPs (2.5 mM) 8 μl 、RNA 樣本 16 μl ，混合均勻後，置於 PCR 機器中，於 65°C 反應 5 分鐘；取出後置於冰上，每管加入 5X RT buffer 8 μl 、0.1 M DTT 4 μl 、MMLV Reverse Transcriptase 2 μl ，置於 PCR 機器中，於 25°C 反應 15 分鐘→42°C 反應 50 分鐘，即完成 cDNA 合成步驟。以上述步驟製備之 cDNA 樣本，用於檢測萎縮病 (CTV)、破葉病 (CTLV) 與鱗砧病 (CEVd)，所使用之專一性引子對分別來自 Hung et al. (2000b)、張 (2012) 與林 (2015)，引子對序列資訊整理於 (附錄表一)。溫度循環條件皆為：94°C 作用 2 分鐘；94°C 作用 30 秒，58°C 作用 45 秒，72°C 作用 1 分鐘】共 40 cycles；72°C 作用 8 分鐘。

三、 建構黃龍病菌 real-time PCR 標準曲線

首先，使用 TOPO TA Cloning[®] Kits (pCR[®] 2.1-TOPO[®], Invitrogen[™]) 將含有目標基因片段之 PCR 產物轉殖到質體中，步驟如下：於 PCR tube 中加入 4 μl 之 PCR 產物、1 μl 之鹽溶液 (salt solution)、1 μl 之 pCR[®] 2.1-TOPO[®] vector，混合均勻後，於室溫下反應 30 分鐘使黏合。另外，準備含有 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin 之 1.5% LB (Luria-Bertani) 固態培養基 (以下簡稱 LB/Kan 培養基)，均勻塗抹上 40 μl X-gal 及 40 μl 之 100mM IPTG，晾乾備用。待黏合反應完成後，取 6 μl 與半溶解之大腸桿菌勝任細胞 (JM109) 混合，冰浴 5 分鐘，隨後放入 42°C 水浴槽中，heat shock 30-45 秒，再立即冰浴 5 分鐘，隨後加入 300 μl 之液態 LB 培養液，於 37°C 培養箱中 1 小時回復。將菌液均勻塗佈於上述 LB/Kan 培養基上，放置於 37°C 培養箱中 12 小時，進行藍白篩，挑選出白色菌落，於 LB/Kan 之固態培養基上保存，利用傳統 PCR 及膠體電泳確認質體 DNA 之大小否符合該質體原長度加上目標片段之長度，即目標片段是否成功轉殖到質體中，隨後將質體 DNA 送定序，確認目標片段之序列正確。

將帶有正確序列之質體的菌於 37°C 液態培養 12 小時，利用 PROTECH Gene-Spin[™] Miniprep Purification Kit 抽取質體 DNA，步驟如下：將 1 ml 菌液以 13,000

g 離心 1 分鐘，倒掉上清液。加入 200µl solution I 充分混合使之溶解，再加入 200µl solution II、300µl solution III，上下倒置混勻，以 13,000 g 離心 10 分鐘。抽取上清液倒入 spin column 中，以 13,000 g 離心 1 分鐘，倒掉下層濾液。加入 700 µl Wash buffer，以 13000 g 離心 1 分鐘。以 13,000 g 離心 3 分鐘去除殘留液，將 spin column 置於乾淨之微量離心管中，以 65°C 烘乾，隨後加入 50 µl TE buffer (預先加熱至 65°C)，靜置 4 分鐘使核酸充分溶解，以 13,000 g 離心 1 分鐘，濾出液體為質體 DNA，為標準品之材料。標準品製備流程如下：依據質體與目標片段之基因序列計算分子量，再依據分子量及核酸濃度計算 1 µg 之核酸含有的基因對組數 (copy number)，配製成含有 10^{10} 至 10^1 copies 之標準品。

四、 Real-time PCR (Polymerase chain reaction) 反應

本次研究採用 TaqMan primer/probe 系統，並參考田 (2009) 之研究的 real-time PCR 試驗設計。黃龍病菌之引子對與探針序列是依據黃龍病之系統 II 病原的基因序列設計，可增幅出長度 95 bp 的 *SecE* 基因之序列，針對柑橘植株使用的是 Christensen et al. (2004) 設計的，可增幅出長度 68 bp 的 18S rDNA 之序列(附錄表二)。反應條件如下：

2X Taqman Gene Expression Master mix	5 µl
Probes (最終濃度：30 nM)	0.06 µl
Primer pairs (最終濃度：Forward primer-396 nM/Reverse primer-396 nM)	0.44 µl
DNA templates (最終量 90 ng)	4.5µl
Total volume	10 µl

溫度循環條件：50 °C, 2 分鐘→95 °C, 10 分鐘→【95 °C, 15 秒→60 °C, 1 分鐘】× 40 cycles

使用帶有黃龍病原之 *secE* 基因的質體 (標準品的濃度已知) , 透過序列稀釋配置 10^1 - 10^{10} 之標準品後, 進行 real-time PCR 偵測, 建立已知 copy number 對應的 cycle threshold。在增幅過程中, 同時測定 reporter dye 發出的螢光強度, 透過由標準品建立的絕對定量系統回推樣本中黃龍病菌的基因體組數。以健康植株作為對照組。

五、具市場潛力之柑橘品種對黃龍病的抗感性評估


1. 試驗植物來源

欲測試的市場潛力品種有佛利蒙 (酸橘砧)、扁實檸檬 (廣東檸檬砧)、臍橙 (酸橘砧)、黃金茂谷 (酸橘砧)。做為比較基準的常見品種有感病的極柑 (廣東檸檬砧)、桶柑 (酸橘砧), 以及耐病的檸檬 (廣東檸檬砧)、文旦 (柚砧/枳柚砧)。購入的嫁接種苗以傳統 PCR 或 rtPCR 檢測柑橘之四大病原—黃龍病、萎縮病、破葉病與鱗砧病, 確保無上述病原菌的感染, 才進行使用, 引子對及檢測方法參考(附錄表一)。在兩次的獨立接種試驗中, 植株大小不同, 「小植株組試驗」使用嫁接後不滿一年的小植株, 「大植株組試驗」使用嫁接後超過一年的大植株, 大、小植株的高度差約一公尺(極柑除外)。

2. 芽接種黃龍病於柑橘植株

由於黃龍病在植株體內容易分布不均, 採用的芽穗不一定百分之百帶有黃龍病之病原 (馮, 2014), 因此需要接種多個芽, 以確保有較高的接種率。從田間取得帶黃龍病菌之柑橘接穗, 「小植株組試驗」的接穗來源是嘉試所古坑農場的極柑病株, 「大植株組試驗」的接穗來源是斗六田間之柚類, 經 PCR 或 rtPCR 確認僅有黃龍病而無其他重要病毒—萎縮病、破葉病與鱗砧病, 才進行使用。根據植株大小不同, 處理組的每株植物以嫁接方式接種 2-4 個病芽, 接種於接穗與砧木癒合處上方的主幹上, 並以未接種病原菌的植株作為對照組。

3. Real-time PCR 偵測病原菌量與增殖速度



透過標準品建立出的絕對定量之迴歸公式，及 Real-time PCR 所測得的 C_T 值，可回推病原菌在寄主體內的基因組套數 (copy number)，藉此得知黃龍病菌在寄主體內的繁殖情形。本實驗依據二次的接種試驗 (小植株組、大植株組) 之結果，描述不同品種感染黃龍病後的菌量變化。接種病原後第二個月起，每月使用 Real-time PCR 偵測病原菌含量變化，每株植物隨機選取 3-4 片葉，進行檢測。在統計分析上，使用 SAS Enterprise Guide 8.3 軟體作常態性檢定，隨後在 RStudio 以廣義估計方程式分析各品種隨時間的菌量變化，最後以 Tukey's HSD 法檢定兩品種間的菌量是否具有顯著差異 ($\alpha=0.05$)。

4. 病徵及植株生長勢的觀察

本實驗依據二次的接種試驗 (小植株組、大植株組) 之結果，描述不同品種感染黃龍病後的性狀變化。小植株組與大植株組分別追蹤至接種後第 14 個月及接種後第 8 個月，在接種後第四個月起，每兩個月記錄一次。

根據帶有病徵的葉片或枝條比例計算出罹病嚴重度 (disease severity)，公式為：有病徵的葉片或枝條數 / 所有的葉片或枝條數 $\times 10$ (罹病嚴重度最低至最高為 0-10)。

此外也記錄病徵類型。紀錄抽梢與否以及量測枝條生長的長度，作為生長勢的指標，計算減少生長之比例，公式為：(健康對照組之平均生長長度 - 接種組之平均生長長度) / 健康對照組之平均生長長度 $\times 100\%$ 。

在統計分析上，使用 SAS Enterprise Guide 8.3 軟體作常態性檢定，並以雙樣本 t 檢定 (資料符合常態分佈) 或 Wilcoxon 檢定 (資料不符合常態分佈)，比較各品種的接種組與對照組之生長長度是否具有顯著性差異 ($\alpha=0.05$)。

5. 各品種對黃龍病的抗感病評估

本段落綜合菌量、葉部病徵等因子，判斷各品種對黃龍病的抗感病程度。將罹病嚴重度設為 X、菌量設為 Y，以植株個體為單位繪製分布圖，並以 $X=3, Y=3$ 做為界線，進行歸納：罹病嚴重度高 (≥ 3) 且菌量高 ($\geq \log 3$) 視為極度感病，罹病嚴重度高 (≥ 3) 且菌量低 ($\leq \log 3$) 視為中度感病，罹病嚴重度低 (≤ 3) 且菌量高 ($\geq \log 3$) 視為中度感病，罹病嚴重度低 (≤ 3) 且菌量低 ($\leq \log 3$) 視為

耐病。主要以小植株試驗中 8-14 month post-inoculation (mpi) 的結果作為依據，大植株試驗中 6-8 mpi 的結果作為輔助，透過上述的評量指標，觀察各品種的分佈趨勢。



六、黃龍病菌於不同柑橘品種的分佈情形

1. 試驗植物及黃龍病菌接穗來源

欲測試的品種有臍橙 (酸橘砧)、黃金茂谷 (酸橘砧)、佛利蒙 (酸橘砧)、扁實檸檬 (廣東檸檬砧) 與天王柑 (酸桔砧)、椪柑 (廣東檸檬砧)、桶柑 (酸橘砧)、檸檬 (廣東檸檬砧)、文旦 (柚砧)、長實金柑與枳柚 (實生苗)，共十個品種。除了長實金柑及天王柑非健康種苗，其餘的柑橘材料皆是從臺東成功健康種苗場購入之 1-2 年生的健康種苗 (符合「柑橘種苗驗證病害作業須知」中之規定)。購入的嫁接種苗以傳統 PCR 或 rtPCR 檢測柑橘之四大病原—黃龍病、萎縮病、破葉病與鱗砧病，確保無上述病原菌的感染，才進行使用，引子對及檢測方法參考(附錄表一)。

2. 芽接種黃龍病於柑橘植株

從田間之罹病文旦及白柚取得帶黃龍病菌之芽穗，每株植物以嫁接方式接種 2 個病芽，嫁接點固定於砧木以上 20 公分左右之主幹上。

3. 調查不同高度之葉片上的黃龍病菌量

接種後第 7、13 個月調查黃龍病菌量，於嫁接點往上 20 公分起，間隔 10 公分取一樣本，直到最高點，每個樣本以打洞機取 20 葉盤 (leaf disc)，若該高度沒有葉片則忽略。每個樣本分別抽取核酸後，以 Real-time PCR 測量 C_T 值，並帶入標準品之迴歸式換算出絕對菌量。

依據相對高度，將菌量數據整理為上層、中層、下層之平均菌量，再針對不同品種、時間點進行討論。由於同一植株上，黃龍病菌常有分布不均的問題，為了解已接種成功的植株上能測到菌的機率，將 C_T 值 < 37 的樣本視為有測到病原，計算每株植物上病原的檢出率 (%) = 該植株中有測到病原的樣本數 / 該植株總檢測的樣本數 $\times 100$ 。

將檢出率的資料作統計分析作常態性檢定，若資料符合常態，以單因子

ANOVA (資料符合常態分佈) 檢定，若資料不符合常態，作 Kruskal-Wallis test 檢定，當品種間的檢出率有統計上的顯著差異，再以 Tukey's HSD (ANOVA 的事後檢定) 或 Dunn test (Kruskal-Wallis test 的事後檢定) 進行兩兩品種間的比較 ($\alpha=0.05$)。

七、 早期偵測黃龍病的指標

1. 葉片之葉綠素含量分析

測量黃龍病罹病植株的葉綠素的含量是否與健康植株有所差別，不過量測的是成熟葉片之葉綠素的相對濃度，使用手持式的 SPAD 502-puls handheld chlorophyll meter (KONICA MINOLTA, Tokyo, Japan) 進行非破壞性檢測，接種成功後於第四、六、八個月量測，每株植物隨機取 5 片葉，每片葉量測四個點，然後取平均值做為該植株的葉綠素含量。

在統計分析上，使用 SAS Enterprise Guide 8.3 軟體作常態性檢定，並以雙樣本 t 檢定 (當資料符合常態分佈) 或 Wilcoxon 檢定 (當資料不符合常態分佈)，比較各品種在同一時間點的接種組與對照組之葉綠素含量是否具有顯著性差異 ($\alpha=0.05$)。

2. 基因表現量之差異分析

參考 Hu et al. (2017) 研究，已知在抗感病植株上，表現趨勢具有顯著差異的基因 (Differentially expressed genes)，挑選出其中四個，分別是 *glgA* (glycogen synthase)、*LCHb1* (light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 1)、*CESA* (cellulose synthase A)、*XTH23* (xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23)，利用 RT-qPCR 的技術分析黃龍病感染植株與健康植株上，基因轉錄量的差異，並以 *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) 作為 internal reference control，以 Ct method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 計算相對表現量。基因與引子對資訊，統整於 (附錄表三)。

由於總核酸萃取的成品中含有 DNA 與 RNA，測量轉錄體含量前，需要先去 DNA，接著將純化出的 RNA 反轉錄為 cDNA，才做 qPCR 分析。純化 RNA 的過程採用 TURBO DNase™ Treatment and Removal Reagents (Thermo Fisher

Scientific Inc., USA), 依照供應商提供的操作手冊進行, 步驟如下: 準備 0.5 ml 微量離心管, 加入核酸樣本 8 μ l、10X TURBO DNase™ Buffer 1 μ l、TURBO DNase™ Enzyme 1 μ l, 混合均勻後, 置於 PCR 機器中 37°C 反應 30 分鐘, 隨後取出, 每管加入 DNase Inactivation Reagent 2 μ l, 室溫下反應 5 分鐘 (過程中輕彈 2-3 次), 離心 2,000 g, 5 分鐘, 取含有 RNA 的上清液到新管子, 即完成純化 RNA 的步驟。

將純化後的 RNA, 以 NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) 測量核酸濃度與純度, 接著進行反轉錄將 RNA 反轉錄成 cDNA, 步驟如下: 準備 0.5 ml 微量離心管, 每管加入 Random primer (1 μ M/ μ l) 1 μ l、dNTPs (10 mM) 4 μ l、RNA 樣本 8 μ l, 混合均勻後, 置於 PCR 機器中 65°C 反應 5 分鐘; 取出後置於冰上, 每管加入 5X RT buffer 4 μ l、0.1 M DTT 2 μ l、MMLV RT enzyme 1 μ l, 置於 PCR 機器中, 42°C 反應 50 分鐘, 即完成 cDNA 合成步驟。所有 cDNA 樣本以 RT-qPCR 進行轉錄體量化分析, 本實驗採用 SYBR Green 系統, 並參考 Hu et al. (2017) 的 real-time PCR 試驗設計與 primer 序列設計, 反應條件如下:

2X PowerUp™ SYBR® Green Master Mix	5 μ l
Primers (10 μ M)	0.4 μ l
DNA templates	1 μ l
ddH ₂ O	3.6 μ l
Total volume	10 μl

反應置於溫度循環機 QuantStudio™ 3 Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) 中進行, 溫度循環條件為: 95°C, 30 秒、【95°C, 5 秒、60°C, 25 秒】40 循環。

在統計分析上，使用 SAS Enterprise Guide 8.3 軟體作常態性檢定，並以雙樣本 t 檢定(資料符合常態分佈)或 Wilcoxon 檢定(資料不符合常態分佈)，比較各品種在同個時間點的接種組與對照組之基因表現量是否具有顯著性差異 ($\alpha=0.05$)。



八、 柑橘黃龍病的危害現況及黃龍病菌原噬菌體類型之調查

1. 採樣方法

為了解目前佛利蒙、臍橙、扁實檸檬與黃金茂谷於田間的黃龍病罹病率，本研究針對上述品種之主要栽培縣市進行調查。佛利蒙柑採集區域有新竹、宜蘭、雲林等，臍橙採集區域有南投、臺東、苗栗、臺中等，扁實檸檬採集區域有高雄、屏東、臺東、花蓮等，黃金茂谷採集區域有苗栗、臺中、嘉義、宜蘭等。調查方法如下：於上述之各品種的主要栽培縣市中尋找果園，並於每個果園隨機選擇 8-10 棵樹，記錄每株植物之罹病嚴重度(有病徵的枝條數 / 所有枝條數 $\times 10$) 及疑似黃龍病的病徵類型(附錄表四)，並進行葉片採樣，由於黃龍病在植株體內經常有分布不均的現象，採樣位點盡量均勻分布於各枝條 (Iwanami et al., 2009；蔡等, 2011)；此外，也會記錄種苗來源等資訊，以利後續分析。

2. 罹病率調查及黃龍病菌量檢測

每株植物之葉片樣本分別抽取總核酸，先以傳統 PCR 檢測是否感染黃龍病，每個果園分別計算其罹病率(陽性株數/總調查株數)，陽性的樣本再以 Real-time PCR 分析絕對菌量。在統計分析上，使用 SAS Enterprise Guide 8.3 軟體作常態性檢定，若資料符合常態，以單因子 ANOVA (資料符合常態分佈) 檢定，若資料不符合常態，使用 RStudio 作 Kruskal-Wallis test 檢定，當品種間的菌量有差異，再以 Tukey's HSD (ANOVA 的事後檢定) 或 Dunn test (Kruskal-Wallis test 的事後檢定) 進行兩兩品種間的菌量比較 ($\alpha=0.05$)。

3. 原噬菌體檢測

上述黃龍病檢測結果為陽性之田間樣本，利用 Bao et al. (2021) 研究中之引子對，以傳統 PCR 偵測 T1 prophage、T2 prophage 與 T3 prophage。溫度循環條件為：96 °C 作用 5 分鐘；【94°C 作用 30 秒，60°C 作用 30 秒，72°C 作用 1 分鐘】共

35 cycles ; 72°C作用 10 分鐘。PCR 樣本以膠體電泳分析。



肆、 結果



一、 柑橘黃龍病之發病生態

1. Real-time PCR 之標準曲線與菌量換算

含有目標片段之質體的分子量為 2487745.64 Da，其核酸樣本濃度為 150.4 ng/ μ l，經計算後得 1 μ l 的核酸中有 3.63×10^{10} 個質體，加 ddH₂O 稀釋成 10^{10} - 10^1 個/ μ l 之不同稀釋倍數的質體核酸做為定量的標準品，以 Real-time PCR 檢測標準品的 C_T 值，將質體的基因組套數設為 X，C_T 值設為 Y，繪製散佈圖及標準曲線，獲得迴歸式： $Y = -3.45 \times \log(X) + 39.199$ ($R^2 = 0.996$)，做為黃龍病樣本絕對定量之依據。

2. 不同柑橘品種之病原菌量追蹤

共進行兩次的菌量追蹤試驗，「小植株組」的病穗來自古坑農場的極柑，「大植株組」的病穗來自斗六田間的文旦，受試品種包含佛利蒙(於本文中，稱之為 Fremont)、扁實檸檬(於本文中，稱之為 depressa)、臍橙(於本文中，稱之為 Navel)、黃金茂谷(於本文中，稱之為 Ora)、優利加檸檬(於本文中，稱之為 Eureka)、文旦(於本文中，稱之為 Wentan)、桶柑(於本文中，稱之為 Tankan)與極柑(於本文中，稱之為 Ponkan)。小植株組追蹤至接種後第 14 個月(極柑除外，因追蹤至接種後第 6 個月全數死亡)，大植株組追蹤至接種後第 8 個月。

統計各品種初次測到病原的時間點、最高菌量的時間點與最高菌量，將結果彙整於(表一)及(表二)。在初次能測到病原菌的時間點上，小植株普遍早於大植株，而個別試驗當中，品種間沒有明顯差異。小植株組在接種後第二個月，有 25% 的植株始能測到病原菌，接種後第三個月，超過 80% 的植株都能測到病原菌；大植株組在接種後第三個月，不到 20% 的植株有測到病原菌，接種後第六個月，超過 80% 的植株都有測到病原菌。

小植株試驗中，多數品種在超過一年後達到最高之平均菌量，佛利蒙與極柑例外，佛利蒙於接種後第 3 個月達到最高，極柑於第 6 個月(即該品種菌量調查的最後一個時間點)達菌量最高。各品種依據最高之平均菌量，由高至低排列，依序為文旦、桶柑、黃金茂谷、極柑、臍橙、佛利蒙、優利加檸檬、扁實檸檬，僅文

旦的最高之平均菌量超過 10,000 copies，桶柑、黃金茂谷、椪柑與臍橙介於 5,000–10,000 copies，佛利蒙為 3,836 copies，優利加檸檬與扁實檸檬小於 1,000 copies (表一)。

大植株試驗中，多數品種在超過半年後達最高之平均菌量，唯優利加檸檬於第 3 個月達到最高。依據最高之平均菌量，由高至低排列，依序為椪柑、黃金茂谷、臍橙、桶柑、優利加檸檬、佛利蒙、文旦、扁實檸檬；僅椪柑的最高平均菌量超過 10,000 copies，黃金茂谷為 5,884 copies，臍橙、桶柑、優利加檸檬、佛利蒙介於 2,000–5,000 copies，文旦與扁實檸檬小於 500 copies (表二)。

針對菌量隨時間的變化，以下將依據不同品種進行分述，並比較大小植株的菌量增殖情形，植株間菌量之變化以中位數繪製折線圖呈現 (圖一)，各品種的平均菌量及標準差則統整於(表三)至(表八)。下文所述的菌量若無特別說明，皆指該品種的平均菌量。

小植株的佛利蒙在接種後第 3 個月菌量達最高峰，平均菌量為 3,836 copies，然而往後的菌量偏低，多數時候不超過 1,000 copies，第 12 個月甚至只有 62 copies，第 13 個月後回到 1,000 copies 以上，卻仍不超過 3,000 copies (表三)。大植株的佛利蒙在接種後第 6 個月的菌量超過 1,000 copies，第 7 個月菌量最高，達 2,169 copies，隨後在第 8 個月降至 1,000 copies 以下(表三)。大植株佛利蒙的菌量增殖相對緩慢，最高菌量也不及小植株，無論大小植株，任一時間點的菌量都未超過 10,000 copies，在統計分析方面，綜合 2-8 month post-inoculation (mpi)的數據，比較大、小植株的菌量，結果顯示小植株組顯著高於大植株組($P = 0.0077$) (表三)(圖一 A)。

小植株的扁實檸檬在接種後一年期間，菌量皆不超過 1,000 copies，在第 3 個月出現一小高峰，往後維持穩定而緩慢的上升，第 14 個月的菌量最高，平均 557 copies (表四)。大植株的扁實檸檬在接種後至第 8 個月，菌量不超過 200 copies，第四個月後維持穩定而低的菌量，第 6 個月的平均菌量 161 copies 為最高(表四)。相較於其他品種，扁實檸檬的菌量偏低，但能穩定上升數個月才下降，此外小植株的菌量普遍比大植株高；在統計分析方面，綜合 2-8 mpi 的數據，小植株組的菌量顯著高於大植株組($P = 0.008$) (表四)(圖一 B)。

小植株的脐橙在第 8 個月首次超越 1,000 copies，下個月又下跌至 26 copies，隨後逐漸爬升並趨於穩定，第 12-14 個月的菌量超過 3,000 copies，第 14 個月的菌量最高，達 5,031 copies (表五)。大植株的脐橙在接種後半年內菌量穩定上升，至第 6 個月達最高峰，平均 4,996 copies，隨後略為下降，第 8 個月的菌量為 723 copies，似乎尚未穩定(表五)。大植株的增殖速度較快，接種後半年就逼近小植株接種後超過一年的菌量，菌量的起伏變化也比較小；在統計分析方面，綜合 2-8 mpi 的數據，大、小植株的菌量並無顯著差異($P = 0.1600$) (表五) (圖一 C)。

小植株的黄金茂谷在接種後第 3 個月有一小高峰，菌量為 1,843 copies，第 4 個月驟降，隨後爬升至 1,000 copies 以上，並維持穩定上升數個月，第 13 個月菌量達最高，平均 6,483 copies；整體而言，在菌量有明顯增殖後，往後的菌量幾乎很少再低於 1,000 copies(表六)。大植株的黄金茂谷在接種後第 5 個月才有明顯增幅，至第 7 個月達菌量高峰，平均 5,884 copies，第 8 個月略為下降，仍不確定菌量是否達穩定狀態(表六)。小植株接種後約一年才達到最高菌量，大植株接種後約半年就達到最高菌量，前者的最高菌量略高於後者，無論植株大小，黃龍病菌皆適應良好；在統計分析方面，綜合 2-8 mpi 的數據，大、小植株的菌量並無顯著差異($P = 0.37$) (表六) (圖一 D)。

小植株的優利加檸檬在接種後第 5 個月，菌量達一個小高峰，平均為 409 copies，隨後菌量略為下降，維持低而穩定的菌量，至接種後第 13 個月達最高，平均菌量為 814 copies (表七)。大植株的優利加檸檬在接種後的追蹤期間，菌量普遍不高，平均菌量幾乎不超過 200 copies，唯第三個月，其中一株(編號 L1)的菌量高達 10,225 copies，使平均菌量拉高至 2,560 copies，隨後第 4-5 個月的平均菌量幾乎為 0，第 6 個月才微微上升，平均 62 copies，第 7 個月的平均菌量 197 copies，第 8 個月菌量又下降到只剩 33 copies；在接種黃龍病菌的植株中，L1 以外的三株，任一時間點的菌量皆不超過 100 copies，病原增殖情況極差(表七)。小植株的菌量增殖速度和增殖量都高於大植株，不過綜合 2-8 mpi 數據，大、小植株的菌量無統計上的顯著差異($P = 0.5220$) (表七) (圖一 E)。

小植株的文旦在接種後半年才開始有明顯增殖，第 8 個月劇增，平均菌量超過 10,000 copies，第 9-11 個月的平均菌量介於 1,000–3,000 copies，第 12 個月後

持續上升，於第 14 個月達最高峰，平均菌量 14,288 copies (表八)。大植株的文旦在追蹤期間，多數植株的菌量從未超過 100 copies，病原菌的增殖情形極差，第 6 個月的平均菌量最高，225 copies，其餘時間點的平均菌量皆不超過 50 copies (表八)。在接種後半年內，大小植株幾乎沒有明顯增殖，儘管小植株的某些時間點的平均菌量較高，但植株間的菌量差異甚大，綜合 2-8 mpi 的菌量進行比較，結果顯示大、小植株的菌量無顯著差異($P=0.2128$) (表八) (圖一 F)。

小植株的椪柑在接種後第 5 個月有明顯的增殖，平均菌量 1,581 copies，第 6 個月達最高，平均菌量 6,479 copies，所有植株在接種後 6 個月內因故死亡(表九)。大植株的椪柑在接種後第 4-5 個月開始有明顯增殖，於第 6 個月超過 1,000 copies，並在第 8 個月達最高峰，平均菌量 10,764 copies (表九)。大小植株的增殖速度沒有明顯差別，大植株在接種超過半年後菌量急速上升，小植株則尚未達穩定菌量就因故死亡；在統計分析方面，綜合 2-6 mpi 的菌量進行比較，結果顯示大、小植株的菌量無顯著差異($P=0.1744$) (表九) (圖一 G)。

小植株的桶柑在接種後第 5 個月，菌量明顯提升，平均菌量 1,093 copies，往後菌量下跌，至第 10 個月僅剩 12 copies，隨後大幅上升，於第 12-14 個月才相對穩定，第 13 個月的平均菌量最高，7,219 copies (表十)。大植株的桶柑在接種後第 6 個月，菌量明顯提升，於第 7 個月達最高，平均菌量 4,881 copies，第 8 個月下降至 2,468 copies (表十)。大小植株的增殖速度相差不大，不過在接種不到一年期間，大植株有較高且穩定的增殖量；在統計分析方面，綜合 2-8 mpi 的菌量進行比較，結果顯示大、小植株的菌量無顯著差異($P=0.0761$) (表十) (圖一 H)。

在品種間的菌量差異上，將小植株組與大植株組分開比較，綜合所有時間點的數據做菌量變化趨勢圖，結果如(圖二)。在小植株組，臍橙、黃金茂谷桶柑與佛利蒙的菌量顯著高於檸檬與扁實檸檬的菌量，其餘品種間則無顯著差異(圖二 A)。在大植株組，臍橙、黃金茂谷與桶柑的菌量顯著高於文旦與扁實檸檬的菌量，其餘品種間則無顯著差異(圖二 B)。

3. 黃龍病對生長勢的影響及病株的病徵、罹病嚴重度

自接種後第 4 個月起，每兩個月記錄枝條的生長長度、抽梢頻率，作為生長勢的指標，並計算處理組相較於健康對照組，其減少或增加生長之比例，大、小

植株組在接種後的追蹤期間的生長情形如(圖三)所示。由於多數品種的處理組與對照組之抽梢頻率相差不大，除了桶柑的處理組的抽梢頻率較低 (data not shown) ，推測黃龍病對生長勢的影響主要為枝條生長的長度而非抽梢頻率。

在小植株組，所有品種的處理組相較於健康對照組，平均生長勢皆有下降。在統計分析方面，針對各品種比較罹病植株與健康植株的生長勢是否具有顯著差異，結果顯示僅扁實檸檬 ($P = 0.0369$) 與黃金茂谷 ($P = 0.0044$) 具有顯著差異。黃金茂谷的矮化幅度最大，減少了 87.4%，扁實檸檬減少了 54.3%。外觀上，黃金茂谷的高度落差是所有品種當中最明顯的(圖三 A)。

在大植株組，扁實檸檬、黃金茂谷、優利加檸檬、佛利蒙等四個品種的處理組相較於健康對照組，平均生長勢下降；文旦、椪柑、臍橙、桶柑等四個品種的處理組相較於健康對照組，平均生長勢上升。在統計分析方面，針對各品種比較罹病植株與健康植株的生長勢是否具有顯著差異，結果顯示僅黃金茂谷 ($P = 0.0310$) 具有顯著差異，生長長度減少 36.8%。外觀上，所有品種的高度落差都不甚明顯(圖三 B)。

黃龍病之病徵通常在病原菌開始增殖後才逐漸顯現，罹病嚴重度為量化的病徵，呈現帶病徵之葉片/枝條的比例(範圍：0-10)，而病徵種類則描述病徵的樣態；本段落比較不同品種之發病速度與嚴重程度，做為判斷植株對病原之耐抗病強度的依據之一。

小植株組的發病情形如(表十一)、(圖四 i)、及(附錄圖一)所示。接種後 4-8 個月，各品種陸續顯現病徵，黃金茂谷的病徵最早出現也最嚴重，其次為臍橙，桶柑與佛利蒙的病徵較晚顯現且罹病嚴重度普遍不高，扁實檸檬、優利加檸檬及文旦的罹病嚴重度更低，病徵也相對更輕微，椪柑在接種後第 6 個月內陸續因故死亡，死亡前皆尚未發病。許多品種病徵最嚴重的時間點約為接種後 10 個月，並且在往後幾個月內有恢復生長勢的情形。以下依據發病速度快慢，依序詳述各品種的發病過程。

小植株的黃金茂谷在第 4 個月的發病初期，六株當中就有四株出現病徵，平均罹病嚴重度 4.5，病徵為疑似缺元素之徵狀，皆出現在新葉；第 6 個月，有三株最早發病的已死亡，發病植株的新葉與成熟葉輕微斑駁；第 8 個月，病徵為黃

化斑駁及葉片捲曲硬化；第 10 個月，平均罹病嚴重度 8.9 為最高，首次出現葉脈突起之輕微木栓化的病徵；第 12 個月，成熟葉及新葉都出現強烈黃化斑駁的病徵，第 14 個月，病徵轉為輕微(表十一)(圖四 i)(附錄圖一 A)。

小植株的臍橙在第 4 個月首次有發病紀錄，僅一株有黃化斑駁之病徵但輕微；第 6 個月，四株已死亡，剩餘的兩株無肉眼可見病徵，第 8 個月，開始出現黃化斑駁及葉脈黃化之病徵，第 10 個月的平均罹病嚴重度 6.3 為最高；第 12 個月，其中一株出現捲曲硬化之病徵，該植株在兩個月內經歷落葉與生長，新生之葉片在第 14 個月時無任何病徵，另一株則維持黃化斑駁之病徵(表十一)(圖四 i)(附錄圖一 B)。

小植株的桶柑在接種後第 6 個月，有三株已死亡且尚未發病；第 8 個月，僅存三株當中有兩株輕微發病，病徵為黃化斑駁；第 10 個月，已發病的兩株進一步顯現輕微木栓化及捲曲硬化的病徵；第 14 個月，罹病嚴重度為 0.0，皆無肉眼可見之病徵。僅存的二株當中，一株在追蹤期間未曾發病(表十一)(圖四 i)(附錄圖一 C)。

小植株的佛利蒙在接種後第 6 個月，有四株已死亡且尚未發病，剩餘兩株中有一株輕微發病；至第 12 個月，平均罹病嚴重度皆不超過 3.0，病徵類型為黃化斑駁及新葉小葉化；第 14 個月，平均罹病嚴重度 6.4 為最高，病徵類型為黃化斑駁及捲曲硬化(表十一)(圖四 i)(附錄圖一 D)。

小植株的扁實檸檬在接種後第 8 個月首次記錄到病徵，平均罹病嚴重度為 2.1，發病期間的病徵類型包含輕微黃化斑駁、新葉小葉化及似微量元素缺乏之葉肉黃化，病徵主要發生在新葉；至接種後 14 個月，僅輕微發病，平均罹病嚴重度不超過 3.0(表十一)(圖四 i)(附錄圖一 E)。

小植株的優利加檸檬在接種後第 8 個月首次記錄到病徵，皆為黃化斑駁；至接種後 14 個月，平均罹病嚴重度不超過 2.0；接種後第 14 個月，病徵葉掉落，而成熟葉及新生葉片，皆未出現肉眼可見的病徵。僅存的四株當中，一株(L3)在追蹤期間未曾發病(表十一)(圖四 i)(附錄圖一 F)。

小植株的文旦在接種後第 10 個月首次記錄到病徵，病徵為葉脈黃化；至接種後 14 個月期間，平均罹病嚴重度不超過 2.0，主要病徵類型為黃化斑駁；接種

的六株當中，三株在追蹤期間未曾發病(表十一)(圖四 i)(附錄圖一 G)。

大植株組的發病情形如(表十二)及(圖四 ii)所示。至接種後第 8 個月(追蹤的最後時間點)只有扁實檸檬、椪柑、黃金茂谷與臍橙發病。扁實檸檬的病徵最早出現但罹病嚴重度不高，椪柑、黃金茂谷與臍橙病徵稍晚顯現，椪柑在發病初期的罹病嚴重度就偏高，黃金茂谷與臍橙僅輕微發病。佛利蒙、優利加檸檬、文旦與桶柑在追蹤期間尚未發病。

以下依據發病速度快慢，依序詳述各品種的發病過程。大植株的扁實檸檬在第 4 個月的發病初期，接種的五株當中有三株出現病徵，病徵包含新葉疑似缺元素(葉肉黃化而葉脈仍維持綠色)及成熟葉輕微黃化斑駁；第 6 個月，首度出現新葉小葉化的病徵，第 8 個月，主要病徵為疑似缺元素，僅一株尚未發病。追蹤期間，平均罹病嚴重度皆不超過 3.0。

大植株的椪柑在第 8 個月首度記錄到病徵，包含黃化斑駁、葉脈木栓化、葉片捲曲硬化及新葉的葉肉黃化，以黃化斑駁為主要病徵，平均罹病嚴重度 6.7，普遍發病嚴重，接種的六株當中僅一株(P5)未發病。

大植株的黃金茂谷在第 8 個月首度記錄到病徵，平均罹病嚴重度 1.7，接種的四株當中有二株發病，病徵包含新葉黃化、及成熟葉輕微捲曲硬化，發病仍不嚴重。

大植株的臍橙在第 8 個月首度記錄到病徵，接種的四株僅一株發病，平均罹病嚴重度 0.5，病徵為葉脈黃化，發病仍不嚴重。

4. 各品種對黃龍病的抗感病評估

由前述之罹病嚴重度及菌量，兩項數據構成的二維向量裡，觀察各品種的點分布趨勢，藉此歸納抗病性(圖五)。

佛利蒙的點主要分布在中度感病的區域，其中一株小植株在接種後第 8-12 個月有較高罹病嚴重度，另一株小植株則是到第 14 個月時罹病嚴重度才升高；由上述結果推測佛利蒙應屬於中度感病，病原增殖量難以超過 1,000 copies，且普遍發病不嚴重；另外，大植株因為全數尚未發病，所以無法看出趨勢(圖五 A)。

扁實檸檬的點多半落在耐病的區域，所有植株的菌量都偏低，且多數病徵輕微，有趣的是，大植株反而有較高的罹病嚴重度；由上述結果推測扁實檸檬應為



中度感病至耐病，部分植株發病過程較長(圖五 B)。

臍橙的點分布廣，尤其是罹病嚴重度落差極大，小植株多半落在極度感病與中度感病的區域，僅一株未顯現病徵但菌量高；由上述結果推測臍橙應介於中度感病至極度感病，雖然植株間的菌量差異大，但是普遍發病嚴重；另外，大植株僅一株發病，尚無法看出趨勢，不納入判斷(圖五 C)。

黃金茂谷的點分布廣，尤其是罹病嚴重度落差極大，小植株多半落在極度感病的區域，唯兩株在第 10 個月時發病嚴重但菌量偏低，兩株第 12 個月時發病輕微；由上述結果推測黃金茂谷應屬於極度感病，儘管不同時間點的發病情形變化大(可能是因為能迅速落葉並長新葉的關係)，但是普遍菌量高，在特定時間點也有很高的罹病嚴重度；另外，大植株僅二株發病，難以看出趨勢(圖五 D)。

優利加檸檬的點多半落在耐病的區域，有很多植株是完全沒有病徵的，僅一株第 8 個月時有較高的罹病嚴重度；由上述結果推測優利加檸檬應屬於耐病，菌量皆不超過 1,000 copies，且病徵輕微；另外，大植株皆未發病，尚無法看出趨勢，不納入判斷(圖五 E)。

文旦的點分布廣，尤其是菌量方面落差極大，小植株多半落在耐病至中度感病的區域，僅一株第 12 個月及兩株第 14 個月落在極度感病的區域；由上述結果推測文旦應介於耐病至中度感病，部分植株的菌量極高，但多數都不顯現病徵，僅少數輕微或嚴重發病；由於大植株皆未發病，尚無法看出趨勢，不納入判斷(圖五 F)。

椪柑的分布圖是由大植株試驗的結果構成，在第 8 個月時幾乎所有植株都落在極度感病的範疇，僅一株無病徵且菌量低；由上述結果推測椪柑應屬於極度感病(圖五 G)。由於小植株在第 6 個月以前全數死亡，且皆未發病，因此未顯現數據。

桶柑的點分布廣，菌量與罹病嚴重度在植株間的落差極大，小植株多半落在中度感病的區域，無病徵或病徵輕微，僅兩株第 8 個月及兩株第 14 個月時有較高的罹病嚴重度；由上述結果推測桶柑應為中度感病，部分植株的發病時間點較晚；由於大植株皆未發病，尚無法看出趨勢，不納入判斷(圖五 H)。

總結而言，在本次試驗的結果中，依據感病程度的排序，由高至低為椪柑、

黃金茂谷、臍橙、佛利蒙、桶柑、扁實檸檬、文旦、優利加檸檬。椪柑與黃金茂谷屬於極度感病，由於椪柑的植株間趨勢較集中，推測其感病性略高於黃金茂谷；臍橙為中度感病至極度感病；佛利蒙與桶柑的情形類似，整體而言為中度感病，不過植株間的差距甚大，追蹤期間會有部分植株難以顯現病徵；扁實檸檬為中度感病至耐病，植株間差異不大，發病植株的病徵普遍不強烈，部分植株病徵難以顯現；文旦為中度感病至耐病，少數植株菌量高且有輕微病徵；優利加檸檬屬於耐病，多數植株菌量低且完全無病徵。

5. 黃龍病菌於植株體內的分佈情形

為了解黃龍病菌感染不同柑橘品種之過程及其分佈情形有何不同，本實驗共調查了十個柑橘品種，在接種黃龍病菌後第 8 及 13 個月，不同高度之菌量分布情形，接種點固定於穗砧接合處上方 20 公分左右，結果如(表十三)。

接種後第 8 個月，植株菌量普遍偏低，多數不超過 1,000 copies；依高度而言，上層的平均菌量最高 (224 copies)，下層的平均菌量其次 (124 copies)，中層的平均菌量最低 (僅 39 copies)；依品種而言，金柑與桶柑的平均菌量較高，其餘品種的平均菌量皆不超過 200 copies；病菌在各品種的分布趨勢上，枳柚與優利加檸檬在下層平均菌量較高，其餘品種則是上層平均菌量較高。

接種後第 13 個月，部分品種的菌量提升至 2,000-4,000 copies；依高度而言，中層平均菌量最高 (1,905 copies)，上層平均菌量其次 (891 copies)，下層平均菌量最低 (563 copies)；依品種而言，扁實檸檬、黃金茂谷、天王柑與優利加檸檬的平均菌量仍然極低，不超過 200 copies，臍橙的平均菌量為 929 copies，枳柚、佛利蒙、金柑、椪柑與桶柑的平均菌量皆超過 1,000 copies，菌量高的品種，同一植株的不同高度間菌量差異也很大；病菌在各品種的分布趨勢上，臍橙與黃金茂谷在下層的平均菌量最高，枳柚、椪柑與桶柑在中層的平均菌量最高，扁實檸檬、佛利蒙、金柑、天王柑與優利加檸檬則是上層的平均菌量最高。

病原於高度上的檢出率之結果如(圖六)。接種後第 8 個月，整體平均的檢出率為 46%，金柑的檢出率最高 (89%)，扁實檸檬、桶柑與優利加檸檬的檢出率皆超過 50%，佛利蒙、臍橙、黃金茂谷、天王柑、椪柑與枳柚的檢出率小於 50%，其中椪柑最低 (25%)。品種間的檢出率並無統計上的顯著差異。



接種後第 13 個月，整體平均的檢出率為 59%，除了金柑與天王柑，其他品種的檢出率皆提升了，臍橙的檢出率最高 (85%)，黃金茂谷、天王柑與枳柚的檢出率仍小於 50%，其中天王柑的檢出率最低 (僅 24%)；在統計分析方面，品種間的檢出率無顯著差異。

6. 葉片之葉綠素含量分析

黃龍病感染植株後有機會影響葉綠素含量，本段落分析不同品種於接種後之葉綠素是否受到影響及受影響的時間點，在小植株組接種後，第 4、6、8 個月量測 SPAD 數值，比較接种植株與健康植株間是否有差別(圖七)。

接種後第 4 個月，多數品種的對照組高於處理組；佛利蒙與桶柑中，對照組與處理組的差距較大，對照組比處理組分別高出 6 及 5.8 個單位，在文旦、椪柑，對照組比處理組高出 5 及 4.3 個單位，在臍橙、優利加檸檬，對照組略高於處理組，在扁實檸檬、黃金茂谷，對照組反而比處理組低；所有品種的處理組與對照組皆無統計上的顯著差異(圖七 A)。

接種後第 6 個月，多數品種的對照組高於處理組，但差距變的更小；臍橙的差距較大，對照組比處理組高出 5.1 個單位，佛利蒙、黃金茂谷、文旦及桶柑，對照組僅略高於處理組，差距不超過 3 個單位，在扁實檸檬、優利加檸檬，對照組反而比處理組低；所有品種的處理組與對照組皆無統計上的顯著差異(圖七 B)。

接種後第 8 個月，多數品種的對照組高於處理組，臍橙、黃金茂谷、桶柑差距大，對照組比處理組高出 6 個單位以上，在優利加檸檬，對照組比處理組高出 4.1 個單位，在佛利蒙與文旦，對照組和處理組幾乎無差別，在扁實檸檬，對照組略低於處理組；所有品種當中，僅優利加檸檬有統計上的顯著性差異(圖七 C)。

7. 黃龍病感染柑橘植株所造成的基因表現量差異

為了解不同品種感染植株後的基因表現量差異，本實驗分析接種後第 3 (尚未出現肉眼可見病徵)、6 (部分植株開始出現病徵)及 13 (多數植株已顯現病徵)個月的基因變化量，以小植株組試驗的核酸樣本為實驗材料，呈現各品種在感染後的三個時間點、四個基因的變化情形，結果如(表十四)與(圖八)。

在時間點方面，接種後第三個月的基因表現之波動最大，總計有七個品種-基因組合有被上調控或下調控(在接種組與健康對照組之間有顯著差異)(表十四)。在品種方面，優利加檸檬的基因表現之波動最大，總計有四個基因-時間點組合有被上調控或下調控(表十四)(圖八)。

依據不同基因探討各品種在不同時間點的調控情形。與纖維素生合成相關的基因-*CESA*，僅優利加檸檬在第三、六個月時被上調控，其餘品種皆未受調控。與細胞壁降解相關的基因-*XTH23*，佛利蒙與極柑在第三個月時被下調控，優利加檸檬在第十三個月被下調控。與光合作用相關的基因-*LCHb1*，臍橙與文旦在第三個月被下調控，黃金茂谷在第六個月被上調控。與澱粉生合成相關的基因-*glgA*，被調控的次數最多，佛利蒙、扁實檸檬、優利加檸檬、桶柑與極柑在第三個月時，都被下調控，極柑在第六個月被上調控，佛利蒙與文旦在第十三個月被下調控(表十四)。

二、 柑橘黃龍病的罹病率及原噬菌體類型

1. 具市場潛力之柑橘品種的栽培分佈及黃龍病之罹病率

罹病率及使用健康種苗的調查結果如(表十五)。本次採樣遍及全臺各縣市，共採集了 681 株樹，不同品種有各自較為集中的產區，扁實檸檬主要在高雄、屏東，臍橙主要在臺東，佛利蒙遍及中北部及臺東，黃金茂谷主要在宜蘭。整體而言，扁實檸檬的平均罹病率 49% 為最高，其次為臍橙 34%、佛利蒙 14%，黃金茂谷 8% 為最低。

佛利蒙的採樣點包含宜蘭、新竹、臺東等 6 縣市，總計採樣 27 個果園、230 株樹。臺東的平均罹病率 46% 為最高，其次為南投 25%、宜蘭 14%，雲林、新竹及臺中皆為 0%。臺東的 6 個果園中，3 個罹病率超過 50%，其中 1 個(佛利蒙與臍橙混種的田)甚至高達 100%。

扁實檸檬的採樣點包含屏東、南投等 5 縣市，總計採樣 21 個果園、168 株樹。屏東的平均罹病率 71% 為最高，其次為高雄 50%、南投 45%，臺東及花蓮皆為 0%；屏東的 10 個果園中，就有 7 個的罹病率超過 50%，普遍罹病率高；高雄的 2 個果園，分別位於岡山與旗山，前者罹病率 12.5%，後者 87.5%，差異甚



大；南投的 5 個果園中，有 2 個果園的罹病率超過 50%，其中 1 個果園於調查時已呈現半荒廢狀態；花蓮的 2 個果園，皆已荒廢 1-2 年，許多植株的枝條完全枯萎並且被砧木取代。

臍橙的採樣點包含南投、苗栗、臺中及臺東，總計採樣 21 個果園、168 株樹。臺東的平均罹病率 56% 為最高，其次為南投 20%、苗栗及臺中皆為 0%。臺東的 11 個果園中，6 個罹病率超過 50%，成功鎮有 2 個果園及卑南鄉的 1 個果園(佛利蒙與臍橙混種的田)罹病率高達 100%。

黃金茂谷的採樣點包含雲林、宜蘭、苗栗及臺中，總計採樣 14 個果園、123 株樹。雲林的平均罹病率 38% 為最高，其次為宜蘭 11%，苗栗及臺中皆為 0%。黃金茂谷的所有田區，罹病率皆不超過 50%。

本次田間調查也收集了種苗來源的資訊，依據是否全園皆使用健康種苗進行分類，計算各縣市完全使用健康種苗之果園的比例。整體而言，佛利蒙有 38% 的果園使用健康種苗，扁實檸檬有 19%，臍橙有 62%，黃金茂谷有 57% (表十五)。將健康種苗之比例與罹病率進行相關性分析，結果顯示使用健康種苗的果園之比例與該縣市之平均罹病率的相關係數小於 0.01，兩者幾乎無關(圖九)。

2. 罹病之植株的病徵、罹病嚴重度及帶菌量

本次田間調查中，以傳統 PCR 檢測到 182 個為黃龍病陽性的樣本，後續以 Real-time PCR 分析菌量，將菌量與病徵等資訊呈現於(表十六)。在品種間，黃金茂谷的平均菌量 (24,123 copies) 最高，佛利蒙的平均菌量 (8,698 copies) 其次，臍橙的平均菌量 (4,465 copies) 第三，扁實檸檬的平均菌量 (344 copies) 最低；在統計檢定方面，扁實檸檬與其他三者的菌量有統計上的顯著差異(圖十)。

佛利蒙總計有 32 株黃龍病陽性，在田間呈現的主要病徵為葉片黃化斑駁、葉脈木栓化及葉片捲曲硬化，平均罹病嚴重度為 5.3。植株間的菌量差異很大，菌量最高達 87,271 copies，最低僅 2 copies，若依據鄉鎮分類，臺東卑南鄉的罹病植株最多(22 株)，平均菌量 (12,030 copies) 遠高於宜蘭及南投地區，平均罹病嚴重度最高 (7.7)；宜蘭的三個鄉鎮當中，以春季調查的三星鄉，其平均菌量 (3,908 copies) 為最高，夏季調查的大同鄉與冬山鄉，兩者的罹病植株菌量皆不超過 1,000 copies (表十六)。

扁實檸檬總計有 82 株黃龍病陽性，在田間呈現的主要病徵為葉片黃化斑駁及葉片捲曲硬化，部分有新葉小葉化，未觀察到任何葉脈木栓化的病徵，平均罹病嚴重度 8.2。若依據鄉鎮分類，南投竹山鎮的罹病植株最多 (17 株)，平均菌量 672 copies，平均罹病嚴重度為 8.9，冬季調查的高雄旗山鎮(共 7 株)的平均菌量 781 copies，為所有鄉鎮中最高；屏東的五個鄉鎮皆於春季進行調查，普遍菌量不高，各鄉鎮的平均菌量皆不超過 300 copies (表十六)。

臍橙總計有 58 株黃龍病陽性，在田間呈現的主要病徵為葉片黃化斑駁、葉脈木栓化及葉片捲曲硬化，部分有新葉小葉化，平均罹病嚴重度 6.5。若依據鄉鎮分類，臺東成功鎮的罹病植株最多 (24 株)，平均菌量 4,268 copies，平均罹病嚴重度為 8.1，臺東東河鄉(共 11 株)的平均菌量 7,209 copies 為所有鄉鎮中最高，但平均罹病嚴重度為最低，僅 4.5 (表十六)。

黃金茂谷總計有 10 株黃龍病陽性，在田間呈現的主要病徵為葉片黃化斑駁及葉片捲曲硬化，平均罹病嚴重度為 6.1。宜蘭頭城的平均菌量為 4,854 copies，雲林古坑的平均菌量為 69,083；最高菌量 (170,108 copies) 的樣本與最低菌量 (154 copies) 的樣本，兩者菌量差約 1,000 倍 (表十六)。

3. 黃龍病之原噬菌體類型調查

田間帶有黃龍病菌的 182 個核酸樣本，以傳統 PCR 分析是否存在黃龍病的三種噬菌體，結果顯示於(表十七)及(圖十一)。90.1% (164 個樣本)有噬菌體感染，單獨感染 Type 1 prophage (以下簡稱 T1)占 45.6% (83 個樣本)，單獨感染 Type 3 prophage (以下簡稱 T3)僅 1.1% (2 個樣本)，複合感染 T1 + T3 占 43.4% (79 個樣本)，9.9% (18 個樣本)不帶上述任一種噬菌體，且所有樣本均未檢測到 Type 2 prophage (以下簡稱 T2)。

佛利蒙複合 T1 + T3 比例占 59%為最高，單獨 T1 占 22%，不帶任一種噬菌體的樣本占 19%，單獨 T3 的樣本為 0%，南投的 2 個樣本皆不帶任一種噬菌體，宜蘭、臺東則以 T1 + T3 複合之樣本為主(表十七)。

扁實檸檬的單獨 T1 占 82%為最高，複合 T1 + T3 比例占 13%，不帶任一種噬菌體的樣本占 5%，單獨 T3 的樣本為 0%。屏東的 57 個樣本中，有 95%為單獨 T1 感染，相較於南投、高雄，噬菌體組成較為單一(表十七)。

臍橙的複合 T1 + T3 比例占 76%為最高，單獨 T1 占 9%，單獨 T3 占 2%，不帶任一種噬菌體的樣本占 14%，所有帶有噬菌體的樣本皆來自臺東，不帶任一噬菌體的樣本皆來自南投，兩縣市的噬菌體組成差異極大(表十七)。

黃金茂谷的複合 T1 + T3 比例占 50%為最高，單獨 T1 占 40%，單獨 T3 占 10%，不帶任一種噬菌體的樣本為 0%(表十七)。

分析噬菌體種類與菌量間的關係，結果如(表十八)所示。相較於有噬菌體的樣本，不帶任一種噬菌體的樣本，其平均菌量明顯較低，僅 603 copies，T1+T3 複合感染的樣本，其平均菌量最高，為 8,085 copies；若單就個別縣市內做比較，宜蘭及臺東之佛利蒙、屏東之扁實檸檬，其不帶任一種噬菌體的樣本的平均菌量最低，唯高雄的扁實檸檬，反而是不帶任一噬菌體之樣本的菌量最高。

伍、 討論



一、 柑橘黃龍病之發病生態

1. 具市場潛力之品種對黃龍病的感病性

在黃龍病的研究初期，柑橘各品種的抗感病性就已經是重要的研究項目之一 (Matsumoto et al., 1968)。國內的研究中，早期認為黃龍病在田間僅感染椪柑、柳橙與桶柑，然而隨時間的推移，黃龍病菌產生演變，耐病的文旦、金柑也逐漸在田間出現罹病案例 (黃與張，1980；蔡等，2007)。近年來各式品種推陳出新，過往的抗感病性之研究資料，漸漸地無法應付當前產業所需，儘管部分品種能找到外國的文獻來補足，但環境條件、病原特性及種原等差異，仍可能導向不同的結論 (Folimonova et al., 2009; Ramadugu et al., 2016)。在臺灣尚無相關研究資料的情況下，本研究能進一步提供產業所需的資訊。

本研究的限制因子為時間尺度與環境，由於調查時間不到兩年，僅能獲取葉部病徵與生長勢的資訊，難以得知黃龍病感染數年後對產量或植株壽命的影響，且溫室試驗的環境相對單純，在田間多重逆境挑戰之下，黃龍病帶來的衝擊勢必更加顯著 (蔡等，2007；賴，2014；Wu et al., 2017)。四個具市場潛力之品種—佛利蒙、扁實檸檬、臍橙、黃金茂谷，和優利加檸檬相比，都是相對感病的品種，因此在田間實務上，需特別注意黃龍病。

病徵方面，感染黃龍病後的主要病徵，在不同品種間有所差異，以下針對本研究所列的四個具市場潛力之品種進行探討。


黃金茂谷在四者當中為最感病，感染初期成熟葉為斑駁黃化，隨後逐漸硬化捲曲並落葉，而新葉則容易有葉肉褪色、葉脈仍綠的似缺元素之病徵，植株矮化程度為本次調查的所有品種當中最顯著的，就本次試驗結果而言，其感病程度近似於椪柑。此外植株內的菌量高，推測黃金茂谷是黃龍病菌之良好寄主。在臺灣田間，本研究觀察到的病徵主要為葉片黃化斑駁及捲曲硬化。在中國的廣西，Liu et al. (2020)調查田間之黃金茂谷的黃龍病病徵，發現葉片黃化斑駁之病徵與黃龍病最相關，其次為葉片均勻黃化、葉脈黃化、缺鋅之黃化，在結果期，果實轉色不均為重要的判斷依據，並且受危害的植株有嚴重落果及果實生長遲緩等情形。綜合本研究及上述文獻的資訊，黃龍病對黃金茂谷的影響大，甚至可能影響

產量及果實品質，罹病率高的地區，若無法大規模更新健康植株，不建議種植該品種。目前只有宜蘭頭城有黃金茂谷生產專區，該區的罹病率不高，若要降低擴散速率，應多著重於媒介昆蟲的防治 (洪，2006)。

臍橙的感病性略低於黃金茂谷，葉片斑駁及捲曲情形不如黃金茂谷那麼嚴重，但有觀察到葉脈黃化。在臺灣田間，本研究觀察到的病徵主要為葉片黃化斑駁、葉脈木栓化及葉片捲曲硬化，偶有新葉小葉化。在中國，王與江(2009)的報導中，臍橙在罹病後的葉部病徵主要為黃化斑駁及缺元素之斑駁，少數為均勻黃化，發病嚴重時，地上部與地下部衰敗，最終整株枯死。Wang et al. (2019) 的研究發現臍橙受黃龍病感染後，果實生長速度變慢、果形變小，且可溶性固形物的含量下降、粗纖維比例提高，食用品質大幅降低。臍橙在臺灣的栽培史漫長，尤其是東部地區的栽培可追溯至日治時期，本次調查發現臺東各鄉鎮普遍有罹病的情形，尤其成功鎮有極高的罹病率；感染源普遍存在，加上臍橙的感病性偏高，黃龍病對東部產區的威脅是不容小覷的，部分發病嚴重的田區，如果沒有全園同步更新，零星補植健康種苗的意義不大。

佛利蒙的感病性比臍橙更低，葉部病徵型態與黃金茂谷相似，但發病速度慢，就本次試驗結果而言，其感病程度近似於桶柑。Koizumi et al. (1993) 將佛利蒙視為與椪柑等多數寬皮柑的感病性相當，健康苗接種後的發病情形不太一致，雖然佛利蒙在植株間的表現差異大，部分植株病徵輕微，但作者認為病徵強度才是判斷該品種是否抗黃龍病的關鍵。Ramadugu et al. (2016) 將佛利蒙的感病程度，與枸橼 ('Indian citron hybrid)、烏柑仔 (Chinese box orange)、枳柚 ('Swingle' citrumelo) 並列，田間自然感染黃龍病的植株，有明顯病徵及高菌量，但不致於落葉，且感染後四年內無死亡植株。在四個市場潛力品種當中，佛利蒙是唯一在批發市場上有品名代碼的，近幾年佛利蒙在市場上逐漸普及，推測全臺已累積一定的栽培面積。佛利蒙的東部產區與臍橙有高度重疊，田間現況與困境相似，西部產區除了南投竹山之外，都未檢測到罹病植株，黃龍病的威脅相對較低，然而部分地區的健康種苗並不普及，會是未來的隱憂。

扁實檸檬的感病性比佛利蒙低，發病初期最容易觀察到的病徵是新葉之葉肉黃化，葉片生長速度較慢，成熟葉的病徵主要為不均勻的黃化斑駁，偶有觀察到



葉脈黃化，葉脈黃化的葉片通常一段時間後會落葉，由於該品種的抽梢頻率高、生長旺盛，計算出來的罹病嚴重度多半較低。扁實檸檬僅在臺灣、日本與韓國生產 (Asikin et al., 2018)，病蟲害之相關學術文獻資料不多。在臺灣，本研究在田間觀察到的病徵主要為黃化斑駁及小葉化，嚴重時捲曲；馮 (2014) 還有觀察到小果的病徵。在日本，Iwanami et al. (2009) 紀錄到一株罹病的扁實檸檬在一年內突然衰弱並嚴重落葉，最終死亡，其他植株則是全株均勻黃化。臺灣的扁實檸檬因其產業結構因素，栽培區相當集中，屏東為主要產地，黃龍病罹病率極高，使用健康種苗的比例極低，部分田區的植株普遍因不明原因黃化衰弱，然而其他縣市的田區，即使未調查到黃龍病的存在，也不約而同的有植株普遍衰弱的問題，嚴重的甚至廢園。由於本次研究未針對衰弱植株的病因做詳細研究，只能推測除了黃龍病之外，還有其他未知的逆境因子亟待探究。

2. 基因表現差異及葉綠素含量與抗感病的關聯以及作為早期偵測的可能性

本論文嘗試以非破壞性檢測之葉綠素含量與特定基因之表現量差異，了解不同品種感染黃龍病後之生理層級與基因層級的變化，並討論是否能作為早期偵測黃龍病的方法。

在基因表現量方面，本研究共選擇四個與黃龍病感染後之性狀表現相關的基因，涵蓋了纖維素合成、細胞壁降解、澱粉合成、光合作用等生理層面。決定基因表現量的因子可能有很多，葉齡、感染階段與試驗條件都會影響到基因被調控的程度 (Balan et al., 2018)。Martinelli et al. (2013) 發現相較於成熟葉片，年輕葉片中，系統性後天抗性 (systemic acquired resistance) 是較不被激發的，推測是最容易自然感染黃龍病的部位。由於本次對基因表現的研究是以早期偵測為目標，並未特別挑選特定部位作為樣本，加上植株的發病程度難以統一，導致標準差較大，多數時候接種組和健康對照組並無顯著差異。

本研究中，黃龍病感染後的基因調控，主要都發生在接種後半年內。接種後一年，基因調控的幅度變低、品種間的差異趨緩，與前人研究 (Curtolo et al., 2020; Fan et al., 2012) 呼應。

優利加檸檬作為本研究中最耐病的品種(病徵最輕微且菌量低)，在初期感染，纖維素合成之相關基因 (*CESA*) 被上調控，澱粉生合成之相關基因 (*glgA*) 被下

調控，感染後約一年，病徵才陸續顯現，細胞壁的降解之相關基因 (*XTH23*) 被下調控；光合作用之相關基因 (*LCHb1*) 則不受調控(不過在 8mpi 進行非破壞性葉綠素檢測，接種組的葉綠素含量有顯著下降)。從上述結果推測，優利加檸檬在感染初期便強化細胞壁的功能，抑制澱粉粒堆積，並「試圖」維持正常的光合作用，與 *C. ichangensis* (Wu et al., 2020) 及 *C. hystrix* (Hu et al., 2017) 有相似的耐病機制。

文旦在感染初期，*LCHb1* 表現量下降，病原穩定增殖後，*glgA* 表現量下降；*CESA* 與 *XTH23* 則不受調控。推測文旦在感染初期光合作用有受到影響，後期啟動減緩澱粉生成的機制，有可能是因為出現了供源 (source) 與積儲 (sink) 間的養分運輸干擾 (Martinelli et al., 2012)，不過整體的耐病機制不明朗。

值得注意的是，文旦在植株間的基因調控差異很大，尤其是 *CESA*，感染初期，有一株上調近 40 倍，該植株往後的菌量增殖速度相對緩慢，感染中期，有兩株分別上調 190、70 倍，菌量也在同一時間點劇烈上升。此外，優利加檸檬在感染初期，菌量最高的兩棵植株，*CESA* 上調高達 54 及 63 倍。推測在上述兩品種中，菌量與 *CESA* 的調控有密切關聯，*CESA* 上調似乎可以抑制病原增殖，而菌量突然增加，也會誘使 *CESA* 上調。

椪柑作為本研究中最感病的品種，其基因表現量波動最劇烈，在感染初期，*glgA* 與 *XTH23* 的表現量下降，隨後 *glgA* 轉為上調控，近 40 倍；*LCHb1* 與 *CESA* 則不受調控。雖然早期就已經開始減緩澱粉生成及細胞壁降解，看似為耐病的趨勢，但是一段時間後，澱粉合成轉為加速，而植株也隨之快速死亡。

佛利蒙在感染初期的基因調控與椪柑相似，但在病原穩定增殖後，*glgA* 表現量下降，由此推測佛利蒙在早期就啟動了基因調控，減少黃龍病對生理的負面影響，並且到後期又再次調控基因，以減緩澱粉生成，這或許是佛利蒙比椪柑耐病，以及其葉部病徵不明顯的原因之一。

黃金茂谷的感病程度僅次於椪柑，基因表現量幾乎不受調控，在感染中期，葉部病徵已十分明顯，但只有觀察到 *LCHb1* 表現量上升，暗示著調適的速度趕不上發病的速度。比較特別的是，有一棵植株在感染後期的 *CESA* 上調 45 倍，回溯菌量資料後發現追蹤期間，該植株多次測不到菌量(病原分布較不均勻)，是否

因為細胞壁抵禦病原的能力有所提升，值得進一步探討。

桶柑與扁實檸檬為中度感病至耐病的品種，基因表現量幾乎不受調控，僅在感染初期，*glgA* 表現量下降，整體的感病機制不明朗。若不考慮統計上的顯著性差異，桶柑在感染初期，*CESA* 平均上調 32 倍，可能與初期菌量增殖速度快有關，在感染中期，菌量最高的一株當月死亡，其 *XTH23* 上調 30 倍，可推測該植株在死亡前細胞壁可能發生大量崩解。

臍橙在四個基因的表現量幾乎不受調控，僅感染初期，*LCHb1* 下調控，感病機制不明朗。過去曾有文獻 (Chin et al., 2021) 指出臍橙在感染黃龍病後，光合作用相關蛋白受到明顯的調控。值得注意的是，一棵菌量增殖速度較慢的植株，基因表現量有劇烈的變化，在感染初期，*LCHb1* 下調近 18 倍，在感染中期，*CESA* 下調近 26 倍。

整體來說，本研究四個指標基因，只能推論出部分的生理機制因黃龍病感染而產生變化，難以像基因表現群組 (gene expression profile) 或轉錄組學 (transcriptomic) 的資料能對該品種的抗感病機制作出較完整的歸納 (Curtolo et al., 2020; Hu et al., 2017)。此外重複數少、植株的個體差異等因素，導致標準差過大 (Chin et al., 2020)，也是本研究的限制。在早期偵測方面，對於感病品種(如黃金茂谷)而言，由於肉眼可見病徵早於基因產生變化，因此該四個基因不適合作為早期偵測的指標；對於耐病品種(如優利加檸檬)而言，感染早期通常菌量較低且尚未有肉眼可見的病徵，但該四個基因已受調控，有機會作為是否受感染的指標，然而須注意的是，本次選擇的基因皆不是對黃龍病菌的具專一性之基因，無法排除有其他環境因子或植株的生理狀態會影響到這些基因的調控 (Liu et al., 2013; Nawaz et al., 2019; Zolkiewicz & Gruszka, 2022)，比較適合應用於環境條件較單一的情境，如溫室接種試驗。

在葉綠素檢測方面，多數處理組與對照組之間並無顯著差異，只有優利加檸檬在病徵開始顯現時，處理組的葉綠素含量顯著低於對照組，因此就本次實驗結果而論，非破壞性的葉綠素檢測，普遍不適合作為早期偵測的方法。

3. 不同嫁接方式、植株大小對於溫室接種試驗的影響

本篇論文因不同的目的，總共進行了三次的接種試驗。第一次接種，以探討

不同高度的菌量差異以及檢出率為目的，所使用的植株較大棵，接種點集中於砧木上方 20 公分處，另外二次是探討菌量增殖的變化及發病過程，為大小植株試驗，接種點盡量平均分散。

從菌量及發病情形來看，第一次接種的結果最差，部分感病品種在一年後的菌量偏低，且病徵也不明顯，後兩次的接種試驗，以小植株組的發病速度較快(所有品種於接種後一年期間陸續顯現病徵)，大植株試驗的發病速度較慢(扁實檸檬例外)，但兩次試驗的菌量及病原增殖速度相差不大。由上述結果可推測，分散接種位點有利於病原定殖 (colonization) ，而選擇小植株為接種對象，可以加速發病，這點在耐病的優利加檸檬上差距更加明顯，從植株的性狀表現來看，或許是因為大植株的維管束及根系構造較為強壯，能維持更穩定的養分運輸功能，進而延緩葉部病徵表現及生長衰弱等現象 (Johnson et al., 2014; Sivager et al., 2021; Sivager et al., 2022) 。

4. 黃龍病菌於植株體內的分佈趨勢

本研究發現無論是抗病或感病品種，黃龍病菌都有分布不均的現象，不過檢出率在品種間有所差異；耐病的品種當中，金柑與優利加檸檬的檢出率高，但枳柚的檢出率低，感病的品種當中，扁實檸檬的檢出率高，而黃金茂谷的檢出率低，檢出率較高的品種(金柑、扁實檸檬)有一個共同特點是，植株的分枝數多且植株較矮，而檢出率較低的品種則無任何分枝且植株較高(附錄圖二)。由上述結果看來，檢出率與耐抗病沒有相關性，似乎反而與分枝多寡有關。由本研究之檢出率的結果，可以推論分枝多且植株矮，對黃龍病的移動是極有利的條件；此外，Louzada et al. (2016) 在地下部也觀察到同樣的現象 — 靠近土表的橫向根系有較均勻的病原分布及較高菌量，土壤下層的直向根系反之。建議未來在黃龍病的接種試驗上，可選擇去除頂芽優勢，讓植株橫向發展，或許會更有利於病原增殖及加速發病 (Albrecht & Bowman, 2012) 。

本研究也發現儘管病原分布不均，但非完全隨機，而是有群聚分布(patchy distribution)的現象，能測到病原菌的位點普遍是相鄰的 (Li et al., 2009; Louzada et al., 2016) 。在高度分佈方面，病原有較高機率分佈於中上層 (Li et al., 2009) ；此外，單棵植株的最高菌量位點，多數在上層區，可推論成熟葉的菌量比老葉的

菌量還多 (洪, 1994; 蔡等, 2007)。

本段落的實驗植株，在菌量增殖及病徵發展的速度普遍偏慢，推測可能原因是接種位點過於集中，且多數植株在接種時已相當高大，這樣的條件並不適合黃龍病的感染，甚至最感病的椪柑，在接種後一年才有較高的菌量，且病徵發展尚不明顯。特別的是，金柑的病原增殖速度快、平均菌量偏高，似乎不如過去文獻所提到的那麼耐病 (蔡等, 2007)，甚至在上層的展開葉出現明顯的黃化斑駁及葉片下捲等病徵 (附錄圖二)，與 Tsai et al. (2006) 報導臺灣田間金柑感染黃龍病的病徵描述相似。本研究所使用的金柑種苗非來自健康種苗體系，原本已帶有 CTV，不排除兩病原產生協同作用 (賴, 2014)。另外，本次試驗中，枳柚接種後的菌量濃度高，但接種後一年間未顯現病徵，為耐病的展現(附錄圖二)；蔡等 (2007) 接種第二型強烈系統之黃龍病菌，枳柚在一年內葉片幾乎沒有黃化病徵，矮化程度不高，與本研究結果相似。然而在 Folimonova et al. (2009) 的研究中，以人工接種田間病穗，發現枳柚的菌量高，且一年內有部分老葉黃化。Ramadugu et al. (2016) 的研究中，以田間木蝨自然感染，觀察為期六年，枳柚不僅菌量高且有明顯病徵。由上述結果可知，接種方式、環境條件等因素，可能導向不一樣的抗感病結論。

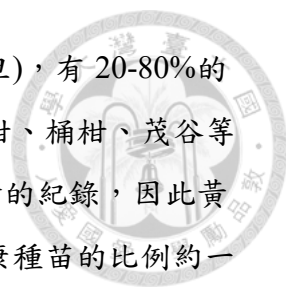
二、柑橘黃龍病的罹病率及原噬菌體類型

本實驗室在過去曾針對黃龍病與柑橘萎縮病等重要的柑橘系統性病害做全臺的田間調查 (蔡等, 2007; 盧, 2017)。不同於前人研究，本研究專注於四個具市場潛力的品種，強化調查的深度，以黃龍病及其噬菌體資料為主軸，並加入栽培資訊做為輔助，一同進行探討。

1. 不同品種與地區之黃龍病罹病率的探討

罹病率的資料，作為病害嚴重程度的量化指標，不僅可應用於預測該病害在未來的變化趨勢，也能協助農民在田間管理方面作出較有利的決策，或是作為研究人員擬定區域防治策略時的參考資料。

本次調查結果發現，不同地區的罹病率有很大的差異。在臺中、苗栗及新竹地區調查的佛利蒙、臍橙與黃金茂谷，許多植株年齡已超過五年，達穩定生產階段，然而全數未檢測到黃龍病，為本次調查中意料之外的結果。約十六年前，蔡

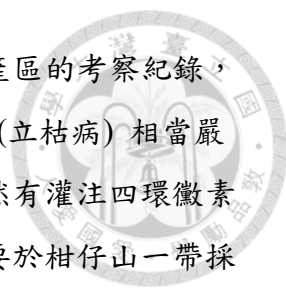


等 (2007) 在新竹與苗栗的調查(包含椪柑、桶柑、海梨柑、文旦)，有 20-80% 的罹病率，約六年前，盧 (2017) 在臺中至苗栗的調查中(包含椪柑、桶柑、茂谷等品種)，仍有 20-30% 的罹病率。前人調查至今並未有大規模更新的紀錄，因此黃龍病在這些地區絕跡的可能性並不高。種苗方面，儘管使用健康種苗的比例約一半，非使用健康種苗的，多為農民取田間接穗自行嫁接(一般的種苗繁殖或二次嫁接於田間植株)，由此可見田間植株是否健康，不僅直接影響到種苗的健康，也間接的影響到未來黃龍病的盛行程度。

市場潛力品種在中北部能免於黃龍病侵擾的原因，除了歸功於田間的媒介昆蟲管理良好，或許也有一些歷史背景可考。1986 年健康種苗體系開始運作之後，北部地區有青果社之新竹分社的健康苗圃，為鄰近地區供應椪柑、桶柑等主流品種的健康苗木，並於往後數年間，設立超過十公頃的示範田區 (施與黃，1989；黃與楊，2004)。1996 年起因應 WTO 帶來的衝擊，青果社配合政府政策，在新竹、苗栗一帶推廣佛利蒙等新興品種，促進老園更新，此外於新拓墾的果園栽植桶柑與椪柑之健康種苗，總面積達 800 公頃，其中涵蓋了峨眉鄉 (劉等，2019)，是本研究調查中佛利蒙的重點樣區。陳等 (2015) 的報告中指出臺中東勢地區的黄龍病少見，可能與教育講習的強度及廢園較少有關。從上述的背景來看，常見品種與新興品種之健康種苗的供應、果園更新、舉辦農民教育訓練，都可能使新推出之品種較不容易受黃龍病的威脅，本次田間調查的結果，也為過去政府、學者與民間合力投注於柑橘產業的心血結晶提供證明。

臍橙與佛利蒙都是臺東縣的罹病率最高，分別為 56% 與 46%，總計 16 個果園中，有 15 個使用健康種苗，1 個未知。多數農友使用健康種苗，罹病率卻居高不下的原因，或許可以從黃龍病之流行病學中尋找線索。在洪 (2006) 建立的黃龍病之流行病模型裡，引用指數增長模型 $x = x_0 e^{rt}$ ；若要降低 x (於 t 時間的病害嚴重程度)，需要降低 x_0 (初始的病株比例) 或 r 值 (病害增長速度)，需特別注意的是，只有在 r 值很低或同時降低 r 值 (移植病株、防治柑橘木蟲、清除廢園) 的時候，降低 x_0 值 (種植健康種苗) 才有效果。

儘管成功、東河一帶種植柑橘的歷史相當悠久，然而在黃龍病的學術報導中很少提到，兩篇未發表的「本省柑桔栽培管理現況估評」，分別由嘉義農業試驗



所的林瓊久技正與黃阿賢技佐撰寫，為民國六十八年全臺柑桔產區的考察紀錄，兩位作者皆提到臺東地區的栽培與病蟲害管理不佳，且黃龍病（立枯病）相當嚴重，尤其是卑南鄉的初鹿、東河鄉的泰源多有廢園的情形，雖然有灌注四環黴素進行治療，但效果參差不齊。在本次調查中，成功鎮的臍橙主要於柑仔山一帶採樣，柑仔山為臺灣最早栽種臍橙的地方，至今已逐漸萎縮，許多田區早已退耕還林，調查的三個果園罹病率都很高，而東河鄉的臍橙主要於泰源一帶採樣，有罹病的兩個果園罹病率都很高，另一個園雖然沒有檢測到黃龍病，但樹體黃化相當嚴重，卑南鄉的臍橙與佛利蒙多同時混種於一個田區內，相對成功鎮與東河鄉，罹病率較輕微。整體而言，許多栽培臍橙與佛利蒙之田區，多半有數十年的柑橘栽培史，推測長時間未大規模同步更新，導致黃龍病嚴重。根據洪 (2006) 的黃龍病之流行病模型，若要降低罹病率，建議更新已失去產能的病株或果園，並且強化媒介昆蟲的防治，否則新植的健康種苗仍然有很高機率受感染。

宜蘭頭城的黃金茂谷與屏東的扁實檸檬，是本次調查中栽培集中且有獨立銷售系統的專業產區。從本研究之溫室試驗的結果，判斷黃金茂谷屬於感病程度較高的品種，不過在田間調查中，頭城的黃金茂谷罹病率低，推測可能和當地原先帶原比例不高有關。此區的農民部分使用健康種苗，部分採健康種苗定植後的接穗繁殖。雖然目前罹病率不高，但植株一旦感染後可能對果實品質與產量的影響大，對於主打高品質的頭城黃金茂谷，黃龍病在未來會是一項隱憂。屏東的扁實檸檬情況則相反，雖然溫室試驗的結果顯示，扁實檸檬受到的影響相對輕微，但是本次調查中發現屏東的罹病率極高，是否與農民使用非健康種苗體系生產的種苗有關，或是該區的檸檬罹病率高 (蔡等, 2007)，尚待進一步探究。前人曾提到田間感染植株會有小果 (馮, 2014) 及萎凋 (Iwanami et al., 2009) 的問題，對於果實產量及植株生產年限的影響，也是未來研究值得繼續深入的部分。

2. 不同品種、地區的噬菌體類型

影響不同類型之噬菌體組成的因素有很多，Fu et al. (2020) 認為噬菌體的活躍性 (activity) 與氣候環境及柑橘寄主的多樣性有關，此外帶病種苗的來源也是關鍵因素。臺灣最早種植柑橘的紀錄可追溯至清朝時期，並於日治時期開始自國外大量引種，柑橘的栽培面積逐漸擴展 (王等, 2000；曾, 2005)。另一方面，

黃龍病自 1951 年進入臺灣便迅速蔓延 (Matsumoto et al., 1961) ，至今已超過 70 年。臺灣的黃龍病菌族群，是否發展出了不同於其他國家的面貌，值得深入探究。噬菌體的基因做為黃龍病菌基因體中變異較大的區域 (Zhou et al., 2011) ，無疑是很好的研究標的。

盧 (2017) 的報導為首次記錄臺灣的噬菌體類型與分布，調查結果如下：未檢出任一個已知噬菌體的比例最高 (40.91%)，其次為 T1 單獨感染 (38.11%)，T1+T2 複合感染 (10.14%)及 T2 單獨感染 (8.74%)的比例最低。當時已知的黃龍病噬菌體只有兩個 (T1 及 T2)，T3 尚未被發表。本次的研究增加了 T3 的調查，結果如下：T1 單獨感染的比例最高 (45.6%)，其次為 T1+T3 複合感染 (43.4%)，未檢出任一個已知噬菌體占 9.9%，T3 單獨感染占 1.1%。

雖然本研究所調查的品種及區域都較為限縮，但 T3 檢出率極高，在四個市場潛力品種當中都存在，推測 T3 應早已普遍存在於田間，暗示著盧 (2017) 研究中近半數未檢出噬菌體的樣本中，可能含有 T3。

儘管 T1+T3 複合感染的樣本比例不少，在過去報導中，T3 的基因含有 T1 和 T2 皆沒有的 restriction-modification (R-M) 系統，R-M 系統的目標通常是用於阻擋外源的 DNA 入侵，也是細菌普遍用於對抗噬菌體的方式，因此對於會進入裂解期的 T1 而言，具有一定程度的選汰壓力 (Zheng et al., 2018; Varani et al., 2013)。在前人的報導中，T1 裂解導致黃龍病菌弱化，進而減緩植物寄主的發病速度，寄主較不容易死亡，田間也更容易觀察到嚴重的葉部病徵 (Zheng et al., 2023; 盧, 2017)。本研究嘗試比較 T1 單獨感染及 T1 + T3 複合感染的植株是否在發病嚴重程度上有所差別，結果發現噬菌體組成與發病程度無明顯關聯。

本研究有 18 個樣本未檢出任一個已知的噬菌體，或許是還有尚未被發現的噬菌體存在，未來可以近一步利用基因定序資料，尋找潛在的噬菌體。

盧 (2017) 提到 T2 的分布與品種及地區有關，T2 在南部的地區比例越高，且多存在於柚類及甜橙類，本研究在南部調查的品種主要為寬皮柑類的扁實檸檬，或許是本次田間調查未檢測到 T2 的原因。

本次田間調查中，不同品種於不同地區的噬菌體種類及組成都有所區別。在臺東地區，靠縱谷的卑南鄉，佛利蒙與臍橙經常於同個果園混種，有類似的噬菌

體組成，此外噬菌體類型相當豐富，在一個果園內，就有機會發現兩種以上的噬菌體組合，顯示此區的黃龍病菌可能有多個來源 (Islam et al., 2022)；相反的是，靠海岸的成功鎮與東河鄉，噬菌體組成單一，35 株罹病的臍橙，都是 T1+T3 複合感染。

在南投縣的竹山鎮，佛利蒙和臍橙的採樣點為清水溪與濁水溪的交匯處，都測不到已知的三種噬菌體，扁實檸檬的採樣點則是在清水溪較上游處，以 T1 單獨感染與 T1+T3 複合感染為主，推測兩區的黃龍病菌族群有相當顯著的差異，是品種不同還是地理條件所帶來的區隔，仍需進一步調查才能釐清。

屏東縣在本次調查的區域中，噬菌體組成最單一，高達九成以上都是單獨感染 T1，與盧 (2017) 所調查的結果相差甚大 (單獨感染 T2 與未檢出占了七成左右)，由於本次在屏東的樣本都是扁實檸檬，與盧調查的品種幾乎不重疊，因此可以推論至少在屏東地區，扁實檸檬的黃龍病菌族群和其他柑橘品種似乎是相當不同的，這樣的結論也和馮 (2014) 的研究相呼應。另一方面，南投與高雄產區的扁實檸檬，其噬菌體組成都比屏東還要豐富，推測屏東產區的黃龍病族群單一化，很可能是帶病種苗所造成的 (種苗皆來自同一個非健康種苗的生產體系)。

本次的田間調查還有一項有趣的發現：不含任一種已知噬菌體的樣本，檢測出來的菌量較低。若從噬菌體之於細菌所扮演的角色來看，或許這樣的現象並不奇怪，噬菌體能提升細菌的病原性及其對寄主的適應性，並且提升細菌基因體的多樣性 (Varani et al., 2013)；反面而論，不帶噬菌體的細菌，很有可能是較不具競爭力的。

陸、 結語

在黃龍病的抗感病試驗中，本次針對四個具市場潛力之品種及四個市場主流品種進行研究，依據感病程度由高至低排列，依序為極柑、黃金茂谷、臍橙、佛利蒙、桶柑、扁實檸檬、文旦、優利加檸檬；市場潛力品種當中，黃金茂谷屬於極度感病，該品種在感染黃龍病後，出現葉片強烈黃化、植株高度矮化等病徵，此外菌量增殖高，受黃龍病影響甚大，臍橙介於極度感病至中度感病，發病速度較慢，佛利蒙屬於中度感病，發病速度慢且菌量也較低，而扁實檸檬介於中度感病至耐病，發病嚴重程度低，且菌量極低。

在早期偵測黃龍病的試驗中，結果顯示特定基因之表現量在黃龍病感染初期有較明顯的調控情形，有機會輔助早期偵測，然而基因調控機制受品種、檢測時間點等因子的影響甚大，無法完全取代病原菌之分子檢測；另外非破壞性的葉綠素含量測定的敏感度不佳，無法作為早期偵測的指標。儘管上述兩指標在早期偵測黃龍病的效果並不顯著，但仍可提供一些資訊，幫助理解植株如何受黃龍病的影響。


透過黃龍病在柑橘體內的分布調查，以及接種試驗的條件測試，發現選用小植株為接種對象、分散接種點，可加快植株的發病速度，此外矮化植株並增加分枝數，有利於病原菌的擴散分布，上述結果將能協助優化溫室接種試驗的流程，提升對黃龍病的掌握程度。


四個具市場潛力品種的田間調查中，扁實檸檬的主要產區以及臺東的臍橙與佛利蒙，普遍有黃龍病的發生，尤其是扁實檸檬的罹病率極高，雖然本次接種試驗的結果認為扁實檸檬較耐黃龍病，但長期而言對產量與品質的影響仍不容忽視；另外本次在臺中、苗栗、新竹山區都未採集到黃龍病樣本，推測和過去健康種苗與新興品種推廣之政策有關。

除了獲取黃龍病的生態資料，田間調查期間，筆者也觀察到這些市場潛力品種面臨的困境，所涉及的不單純只是病蟲害等栽培面向。每個品種、每個地區各有別於他者的生產樣貌，如何躋升為具有產業規模的品種，多數時候黃龍病不是主要且唯一的阻礙，品種的正確性、栽培管理與病蟲害管理的強度、銷售通路的健全性，都是筆者在本次田間調查中，所觀察到的隱憂與挑戰。

柒、 參考文獻

- 王安石、蔡志勇、沈雅鈞。(2019)。北部地區柑橘產業發展與輔導。北部地區柑橘栽培管理技術暨產業輔導研討會：1-10。
- 王妙珍、徐信次、林瓊玖。(2000)。柑橘種原無病毒化保存及利用現況。中國園藝，46(2):191-196。
- 王道平、江映錦。(2009)。臍橙“冬黃”和黃龍病黃化的差異及其防治。中國南方果樹，38(5):59-60。
- 田幸茹。(2009)。柑橘黃龍病菌在柑橘寄主與媒介木蝨體內的定性與定量偵測。國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。
- 江淑雯、林延諭、盧柏松。(2015)。不同臍橙品種在臺東地區之適應性。臺東區農業改良場研究彙報第25輯：33-42。
- 李宗翰。(2019)。黃龍病菌於柑橘寄主體內之移動與影響亞洲柑橘木蝨(半翅目：扁木蝨科)獲菌因子之探討。國立臺灣大學植物醫學碩士學位學程碩士論文。
- 李國明。(2007)。高糖度具栽培價值之柑桔新品種佛利蒙柑。花蓮區農業專訊(62):13-14。
- 林書妍、陳右人。(2006)。台灣原生柑橘之研究及其利用現況。植物種苗，8(1):1-12。
- 林詠洲、陳邦華、黃阿賢、林義恭。(2012)。北部地區具發展潛力之柑橘品種。技術服務季刊，91:7-9。
- 林雋軼。(2015)。臺灣兩種主要柑橘類病毒之同步偵測、發病生態及交互作用之探討。國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所博士論文。
- 林瓊玖、葉節耀、劉玉花、駱清令。(1989)。臺灣柑橘種原保存。柑橘試驗研究成果專題研討會專集：6-16。
- 邱人璋。(1979)。柑桔類毒素病害及木瓜毒素病研究現況。文旦立枯病及木瓜病毒病害之研究與防治研討會：5-7。
- 施明山、黃美華。(1989)。柑橘健康苗繁殖推廣現況。柑橘試驗研究成果專題研討會專集：93-102。

- 
- 洪士程。(2006)。柑桔木蝨傳播黃龍病之生態研究。國立臺灣大學昆蟲學研究所博士論文。
- 洪挺軒。(1994)。柑橘黃龍病原擬細菌診斷用核酸探針之製備與應用於感染生態之研究。國立臺灣大學植物病蟲害研究所博士論文。
- 胡倍輔。(2013)。全球化下國家與產業關係調整：以台灣柑橘產業為例。國立中山大學政治學研究所碩士論文。
- 徐信次、呂明雄。(1995)。柑橘品種多樣化。台灣柑橘之研究與發展研討會專刊：33-42。
- 高唯峻。(2022)。不同品種聖誕紅植株體內植物菌質體之定量追蹤及溫度對植物菌質體之影響。國立臺灣大學植物醫學碩士學位學程碩士論文。
- 張立。(2012)。柑橘破葉病毒感染性選植株之構築及偵測方法之改良。國立台灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。
- 許秀霞。(2011)。做客「成功」、成功做客—臺東縣成功鎮客家家族記事。臺東大學人文學報，1(2):137-177。
- 陳祈男、黃維廷、蔡佳欣、蔡志濃、湯楊欽憲、石憲宗。(2015)。柑橘健康管理生產體系之研究。103年度重點作物健康管理生產體系及關鍵技術之研發成果研討會：166-183。
- 陳盟松、賴文龍、葉士財、黃偉峻。(2013)。臍橙栽培管理及成本分析。臺中區農業技術專刊，189：1-38。
- 曾立維。(2005)。日治時期台灣柑橘產業的開啓與發展。國立政治大學史學研究所碩士論文。
- 馮雅智。(2014)。柑橘黃龍病之病菌系統演化、發病生態與植物菌質相關性之探討。國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所博士論文。
- 黃安利。(1987)。柑橘立枯病原菌之形態與消長動態之電顯研究。國立臺灣大學植物病蟲害研究所博士論文。
- 黃阿賢、陳祈男。(2012)。台灣中北部有潛力的柑橘新興品種。苗栗區農業專訊，58：10-14。

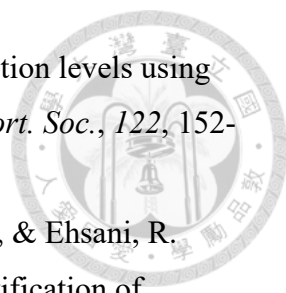
- 
- 黃阿賢、陳祈男、楊儒民、唐佳惠。(2013)。台灣柑橘品種改良之回顧與展望。臺灣果樹育種研討會專刊：105-113。
- 黃阿賢、楊儒民。(2004)。柑橘健康種苗繁殖體系與台灣健康種苗計畫。植物種苗，6(2)：19-29。
- 黃秋雄。(1989)。柑橘立枯病媒介蟲傳播試驗之過去與現況。柑橘試驗研究成果專題研討會專刊：169-178。
- 黃秋雄、徐信次。(1989)。熱療法培育本省無毒優良柑橘種苗。柑橘試驗研究成果研討會專刊：103-111。
- 黃秋雄、張清安。(1980)。菌質與麻豆文旦立枯症兆發生關係之研究。中華農業研究，29(1):13-19。
- 黃秋雄、蔡梅玉、王清玲。(1984)。木蝨媒介傳播柑桔立枯病之研究。中華農業研究，33(1):65-72。
- 楊秀珠、王怡玗、呂明雄、李堂察、洪士程、徐信次、陳富永、童伯開、黃阿賢、黃莉欣、黃裕銘、蔡東纂、蘇文瀛。(2002)。柑桔整合管理 (楊秀珠, Ed.)。行政院農委會農業藥物毒物試驗所。
- 劉元昌、張志展、李宗樺。(2019)。北部地區柑橘產銷研究-以青果合作社新竹分社為例。北部地區柑橘栽培管理技術暨產業輔導研討會特刊，第 52 號：73-85。
- 蔡佳欣、洪挺軒、蘇鴻基。(2011)。柑橘黃龍病之發生生態及防治研究。農作物害蟲及其媒介病害整合防治技術研討會專刊：73-89。
- 蔡佳欣、蘇鴻基、馮雅智、洪挺軒。(2007)。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。植物病理學會刊，16(3):121-129。
- 鄧凱云、楊筱姿、陳怡宏、林欣榜、蔡孟貞。(2011)。國產柑橘類果皮製成陳皮之多甲基類黃酮含量及抗氧化活性研究。臺灣農業化學與食品科學，49(6):338-345。
- 盧潔。(2017)。臺灣柑橘黃龍病之病菌原噬菌體類型、罹病率及複合感染柑橘萎縮病之現況調查。國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。

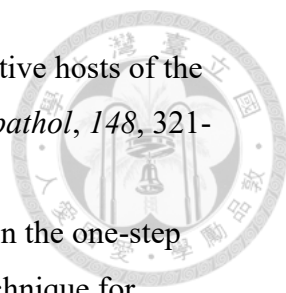


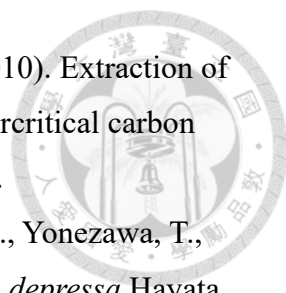
- 賴巧娟。(2014)。台灣重要柑橘品種複合感染柑橘黃龍病菌及柑橘萎縮病毒之研究。國立臺灣大學植物病理與微生物學研究所碩士論文。
- 蘇鴻基、蔡佳欣、馮雅智、洪挺軒。(2010)。柑桔黃龍病之研究及健康管理。農業試驗所特刊，149：33-61。
- Albrecht, U., & Bowman, K. D. (2008). Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. *Plant Sci.*, 175, 291-306.
- Albrecht, U., & Bowman, K. D. (2012). Tolerance of trifoliolate citrus rootstock hybrids to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Sci. Hortic.*, 147, 71-80.
- Asikin, Y., Kawahira, S., Goki, M., Hirose, N., Kyoda, S., & Wada, K. (2018). Extended aroma extract dilution analysis profile of Shiikuwasha (*Citrus depressa* Hayata) pulp essential oil. *J. Food Drug Anal.*, 26, 268-276.
- Aubert, B. (1993). Citrus greening disease, a serious limiting factor for citriculture in Asia and Africa. Proceedings of the 4th Congress of the International Society of Nurserymen, South Africa (pp 817-820).
- Balan, B., Ibanez, A. M., Dandekar, A. M., Caruso, T., & Martinelli, F. (2018). Identifying host molecular features strongly linked with responses to Huanglongbing disease in citrus leaves. *Front. Plant Sci.*, 9, 277.
- Bao, M. L., Zheng, Z., Chen, J. C., & Deng, X. L. (2021). Investigation of citrus HLB symptom variations associated with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” strains harboring different phages in southern china. *Agronomy*, 11, 2262.
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant. Pathol.*, 88, 7-37.
- Carvalho, S. A. d., Girardi, E. A., Mourão Filho, F. d. A. A., Ferrarezi, R. S., & Coletta Filho, H. D. (2019). Advances in citrus propagation in Brazil. *Rev. Bras. Frutic.*, 41.
- Casjens, S. (2003). Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol. Microbiol.*, 49, 277-300.
- Cevallos-Cevallos, J. M., Futch, D. B., Shilts, T., Folimonova, S. Y., & Reyes-De-Corcuera, J. I. (2012). GC-MS metabolomic differentiation of selected citrus

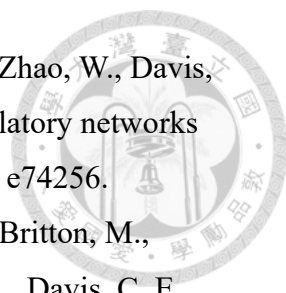
- varieties with different sensitivity to citrus huanglongbing. *Plant Physiol. Biochem.*, *53*, 69-76.
- Chen, Q., Min, A., Luo, S., He, J., Wu, R., Lin, X., Wang, Y., He, W., Zhang, Y., Lin, Y., Li, M., Zhang, Y., Luo, Y., Tang, H., & Wang, X. (2022). Metabolomic analysis revealed distinct physiological responses of leaves and roots to Huanglongbing in a citrus rootstock. *Int. J. Mol. Sci.*, *23*, 19.
- Chin, E. L., Ramsey, J., Saha, S., Mishchuk, D., Chavez, J., Howe, K., Zhong, X., Flores-Gonzalez, M., Mitrovic, E., Polek, M., Godfrey, K., Mueller, L. A., Bruce, J., Heck, M., & Slupsky, C. M. (2021). Multi-omics comparison reveals landscape of *Citrus limon* and *Citrus sinensis* response to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. *PhytoFrontiers™*, *1*, 76-84.
- Chin, E. L., Ramsey, J. S., Mishchuk, D. O., Saha, S., Foster, E., Chavez, J. D., Howe, K., Zhong, X., Polek, M., Godfrey, K. E., Mueller, L. A., Bruce, J. E., Heck, M., & Slupsky, C. M. (2020). Longitudinal transcriptomic, proteomic, and metabolomic analyses of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck graft-inoculated with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. *J. Proteome Res.*, *19*, 719-732.
- Christensen, N. M., Nicolaisen, M., Hansen, M., & Schulz, A. (2004). Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Mol. Plant Microbe Interact.*, *17*, 1175-1184.
- Curtolo, M., de Souza Pacheco, I., Boava, L. P., Takita, M. A., Granato, L. M., Galdeano, D. M., de Souza, A. A., Cristofani-Yaly, M., & Machado, M. A. (2020). Wide-ranging transcriptomic analysis of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki*, *Citrus sinensis* and contrasting hybrids reveals HLB tolerance mechanisms. *Sci. Rep.*, *10*, 20865.
- Jiang D., & Cao, L. (2011). The performances of Orah which is late -maturing variety with high sugar content introduction in Chongqing. *South China Fruit*, *40*, 33-34.
- Dai, Z., Wu, F., Zheng, Z., Yokomi, R., Kumagai, L., Cai, W., Rascoe, J., Polek, M., Chen, J., & Deng, X. (2019). Prophage diversity of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Strains in California. *Phytopathology*, *109*, 551-559.
- Das, A. K., Chichghare, S. A., Sharma, S. K., Kumar, J. P. T., Singh, S., Baranwal, V. K., Kumar, A., & Nerkar, S. (2021). Genetic diversity and population structure

- of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ associated with citrus Huanglongbing in India based on the prophage types. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 95.
- de Moraes Pontes, J. G., Vendramini, P. H., Fernandes, L. S., de Souza, F. H., Pilau, E. J., Eberlin, M. N., Magnani, R. F., Wulff, N. A., & Fill, T. P. (2020). Mass spectrometry imaging as a potential technique for diagnostic of Huanglongbing disease using fast and simple sample preparation. *Sci Rep.*, 10, 13457.
- Dominguez-Mirazo, M., Jin, R., & Weitz, J. S. (2019). Functional and comparative genomic analysis of integrated prophage-like sequences in "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". *mSphere*, 4, 6.
- Etxeberria, E., Gonzalez, P., Achor, D., & Albrigo, G. (2009). Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 74, 76-83.
- Fan, J., Chen, C., Yu, Q., Khalaf, A., Achor, D. S., Brlansky, R. H., Moore, G. A., Li, Z.-G., & Gmitter, F. G. (2012). Comparative transcriptional and anatomical analyses of tolerant rough lemon and susceptible sweet orange in response to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection. *MPMI*, 25, 1396-1407.
- Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., & Herskovits, A. A. (2015). A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 13, 641-650.
- Fleites, L. A., Jain, M., Zhang, S., & Gabriel, D. W. (2014). "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" prophage late genes may limit host range and culturability. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 6023-6030.
- Folimonova, S. Y., & Achor, D. S. (2010). Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathology*, 100, 949-958.
- Folimonova, S. Y., Robertson, C. J., Garnsey, S. M., Gowda, S., & Dawson, W. O. (2009). Examination of the responses of different genotypes of citrus to huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology*, 99, 1346-1354.
- Fu, S., Bai, Z., Su, H., Liu, J., Hartung, J. S., Zhou, C., & Wang, X. (2020). Occurrence of prophage and historical perspectives associated with the dissemination of huanglongbing in mainland China. *Plant Pathol.*, 69, 132-138.

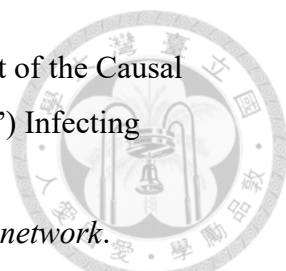
- 
- Futch, S., Weingarten, S., & Irey, M. (2009). Determining HLB infection levels using multiple survey methods in Florida citrus. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, *122*, 152-157.
- Garcia-Ruiz, F., Sankaran, S., Maja, J. M., Lee, W. S., Rasmussen, J., & Ehsani, R. (2013). Comparison of two aerial imaging platforms for identification of Huanglongbing-infected citrus trees. *Comput. Electron. Agric.*, *91*, 106-115.
- Goh, J. X. H., Tan, L. T. H., Goh, J. K., Chan, K. G., Pusparajah, P., Lee, L. H., & Goh, B. H. (2019). Nobiletin and derivatives: functional compounds from citrus fruit peel for colon cancer chemoprevention. *Cancers*, *11*, 34.
- Gottwald, T., Poole, G., McCollum, T., Hall, D., Hartung, J., Bai, J., Luo, W., Posny, D., Duan, Y. P., Taylor, E., da Graca, J., Polek, M., Louws, F., & Schneider, W. (2020). Canine olfactory detection of a vectored phyto-bacterial pathogen, *Liberibacter asiaticus*, and integration with disease control. *PNAS*, *117*, 3492-3501.
- Gottwald, T. R., Graça, J. V. d., & Bassanezi, R. B. (2007). Citrus Huanglongbing: The Pathogen and Its Impact. *PHP*, *8*, 31.
- Graham, H. B., Frederick, G. G., Jr., Chunxian, C., Mikeal, L. R., Claire, T. F., & Gregory, T. M. (2015). Investigating the parentage of 'Orri' and 'Fortune' mandarin hybrids. *Acta Hort.* 1065, 449-456.
- Graham, J., Gottwald, T., & Setamou, M. (2020). Status of huanglongbing (HLB) outbreaks in Florida, California and Texas. *Trop. Plant Pathol.*, *45*, 265-278.
- Hu, Y., Zhong, X., Liu, X. L., Lou, B. H., Zhou, C. Y., & Wang, X. F. (2017). Comparative transcriptome analysis unveils the tolerance mechanisms of *Citrus hystrix* in response to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection. *PLoS One*, *12*, e0189229.
- Hung, T. H., Wu, M. L., & Su, H. J. (1999a). Detection of fastidious bacteria causing citrus greening disease by nonradioactive DNA probes. *JJP*, *65*, 140-146.
- Hung, T. H., Wu, M. L., & 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.

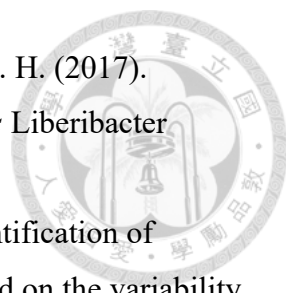
- 
- Hung, T. H., Wu, M. L., & Su, H. J. (2000a). Identification of alternative hosts of the fastidious bacterium causing citrus greening disease. *J Phytopathol*, *148*, 321-326.
- Hung, T. H., Wu, M. L., & Su, H. J. (2000b). A rapid method based on the one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for detection of different strains of citrus tristeza virus. *J. Phytopathol.*, *148*, 469-475.
- Islam, M. R., Haque, M. M., Khatun, H., Sarker, J., Wang, Y., Ke, W., Cen, Y., Lavagi-Craddock, I., & Deng, X. (2022). Huanglongbing in Bangladesh: a pilot study for disease incidence, pathogen detection, and its genetic diversity. *J. Citrus Pathol.*, *9*.
- Iwanami, T., Uechi, N., & Kawano, S. (2009). Temporal change in the distribution of PCR-positive tissue within the tree canopy of *Citrus depressa* affected by greening. *Kyushu Plant Protection Research*, *55*, 68-75.
- Jain, M., Fleites, L. A., & Gabriel, D. W. (2015). Prophage-encoded peroxidase in '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' is a secreted effector that suppresses plant defenses. *Mol. Plant Microbe Interact.*, *28*, 1330-1337.
- Johnson, E. G., Wu, J., Bright, D. B., & Graham, J. H. (2014). Association of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. *Plant Pathol.*, *63*, 290-298.
- José, A. P., Pedro, C., Mari, C. V., & Luis, N. (2015). The citrus nursery tree certification program in Spain. *Acta Hort.* 1065, 745-751.
- Killiny, N., & Nehela, Y. (2017). One target, two mechanisms: the impact of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and its vector, *Diaphorina citri*, on citrus leaf pigments. *Mol. Plant Microbe Interact.*, *30*, 543-556.
- Koizumi, M., Prommintara, M., Linwattana, G., & Kaisuwan, T. (1993). Field evaluation of citrus cultivars for greening disease resistance in Thailand. *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*, *12*.

- 
- Lee, Y. H., Charles, A. L., Kung, H. F., Ho, C. T., & Huang, T. C. (2010). Extraction of nobiletin and tangeretin from *Citrus depressa* Hayata by supercritical carbon dioxide with ethanol as modifier. *Ind. Crops Prod.*, *31*, 59-64.
- Lee, Y. S., Cha, B. Y., Saito, K., Choi, S. S., Wang, X. X., Choi, B. K., Yonezawa, T., Teruya, T., Nagai, K., & Woo, J. T. (2011). Effects of a *Citrus depressa* Hayata (shiikuwasa) extract on obesity in high-fat diet-induced obese mice. *Phytomedicine*, *18*, 648-654.
- Li, B., Zhang, Y., Qiu, D. W., Francis, F., & Wang, S. C. (2021). Comparative proteomic analysis of sweet orange petiole provides insights into the development of Huanglongbing symptoms. *Front. Plant Sci.*, *12*, 656997.
- Li, W., Levy, L., & Hartung, J. S. (2009). Quantitative distribution of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in citrus plants with citrus huanglongbing. *Phytopathology*, *99*, 139-144.
- Lin, C. Y., Wu, M. L., Shen, T. L., Yeh, H. H., & Hung, T. H. (2015). Multiplex detection, distribution, and genetic diversity of Hop stunt viroid and Citrus exocortis viroid infecting citrus in Taiwan. *Virology Journal*, *12*, 11.
- Liu, F., Wang, X., Chen, D., Chen, X., Liao, H., Wang, N., Huang, H., & Huang, Q. (2020). Nested-PCR detection and investigation for *Candidatus Liberibacter asiaticus* of Orah. *Journal of Southern Agriculture*, *51*, 101-107.
- Liu, R., Xu, Y. H., Jiang, S. C., Lu, K., Lu, Y. F., Feng, X. J., Wu, Z., Liang, S., Yu, Y. T., Wang, X. F., & Zhang, D. P. (2013). Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins, positively involved in abscisic acid signalling, require a transcription repressor, WRKY40, to balance their function. *J. Exp. Bot.*, *64*, 5443-5456.
- Louws, F., Rademaker, J., & de Bruijn, F. (1999). The three ds of pcr-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *37*, 81-125.
- Louzada, E. S., Vazquez, O. E., Braswell, W. E., Yanev, G., Devanaboina, M., & Kunta, M. (2016). Distribution of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' above and below ground in Texas Citrus. *Phytopathology*, *106*, 702-709.
- Martinelli, F., Ibanez, A. M., Reagan, R. L., Davino, S., & Dandekar, A. M. (2015). Stress responses in citrus peel: Comparative analysis of host responses to Huanglongbing disease and puffing disorder. *Sci. Hortic.*, *192*, 409-420.

- 
- Martinelli, F., Reagan, R. L., Uratsu, S. L., Phu, M. L., Albrecht, U., Zhao, W., Davis, C. E., Bowman, K. D., & Dandekar, A. M. (2013). Gene regulatory networks elucidating huanglongbing disease mechanisms. *PLoS One*, 8, e74256.
- Martinelli, F., Uratsu, S. L., Albrecht, U., Reagan, R. L., Phu, M. L., Britton, M., Buffalo, V., Fass, J., Leicht, E., Zhao, W., Lin, D., D'Souza, R., Davis, C. E., Bowman, K. D., & Dandekar, A. M. (2012). Transcriptome profiling of citrus fruit response to Huanglongbing disease. *PLoS One*, 7, e38039.
- Matsumoto, T., Su, H. J., & Lo, T. T. (1968). Indexing procedures for 15 virus diseases of citrus trees. International Organization of Citrus Virologists and Committee on Indexing Procedures, Diagnosis, and Nomenclature, USA.
- Matsumoto, T., Wang, M. C., & Su, H. J. (1961). Studies on likubin. In Price W. C (ed.), Proceedings of 2nd conference of the international organization of citrus virologists (pp 121-125).
- Menouni, R., Hutinet, G., Petit, M.-A., & Ansaldi, M. (2015). Bacterial genome remodeling through bacteriophage recombination. *FEMS Microbiol. Lett.*, 362(1), 1-10.
- Miles, G. P., Stover, E., Ramadugu, C., Keremane, M. L., & Lee, R. F. (2017). Apparent tolerance to huanglongbing in citrus and citrus-related germplasm. *Hortscience*, 52, 31-39.
- Mishra, A., Karimi, D., Ehsani, R., & Albrigo, L. G. (2011). Evaluation of an active optical sensor for detection of Huanglongbing (HLB) disease. *Biosyst. Eng.*, 110, 302-309.
- Nakajima, A., & Ohizumi, Y. (2019). Potential benefits of nobiletin, a citrus flavonoid, against alzheimer's disease and parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 14, 3380.
- Nawaz, M. A., Lin, X., Chan, T.-F., Imtiaz, M., Rehman, H. M., Ali, M. A., Baloch, F. S., Atif, R. M., Yang, S. H., & Chung, G. (2019). Characterization of cellulose synthase A (CESA) gene family in eudicots. *Biochem. Genet.*, 57, 248-272.
- Nehela, Y., & Killiny, N. (2020). Revisiting the complex pathosystem of huanglongbing: deciphering the role of citrus metabolites in symptom development. *Metabolites*, 10(10), 25, 409.

- 
- Nelson, W., Munyaneza, J., McCue, K., & Bové, J. (2013). The pangaeian origin of "*Candidatus Liberibacter*" species. *J. Plant Pathol.*, *95*, 455-461.
- Pourreza, A., Lee, W. S., Ehsani, R., Schueller, J. K., & Raveh, E. (2015). An optimum method for real-time in-field detection of Huanglongbing disease using a vision sensor. *Comput. Electron. Agric.*, *110*, 221-232.
- Ramadugu, C., Keremane, M. L., Halbert, S. E., Duan, Y. P., Roose, M. L., Stover, E., & Lee, R. F. (2016). Long-term field evaluation reveals huanglongbing resistance in citrus relatives. *Plant Dis.*, *100*, 1858-1869.
- Sankaran, S., & Ehsani, R. (2011). Visible-near infrared spectroscopy based citrus greening detection: Evaluation of spectral feature extraction techniques. *Crop Prot.*, *30*, 1508-1513.
- Sivager, G., Calvez, L., Bruyere, S., Boisne-Noc, R., Brat, P., Gros, O., Ollitrault, P., & Morillon, R. (2021). Specific physiological and anatomical traits associated with polyploidy and better detoxification processes contribute to improved Huanglongbing tolerance of the Persian Lime compared with the Mexican Lime. *Front. Plant Sci.*, *12*, 685679.
- Sivager, G., Calvez, L., Bruyere, S., Boisne-Noc, R., Hufnagel, B., Cebrian-Torrejón, G., Doménech-Carbó, A., Gros, O., Ollitrault, P., & Morillon, R. (2022). Better tolerance to Huanglongbing is conferred by tetraploid Swingle citrumelo rootstock and is influenced by the ploidy of the scion. *Front. Plant Sci.*, *13*, 1030862.
- Subirats, J., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C. M., Balcázar, J. L., & Simonet, P. (2016). Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *48*, 163-167.
- Teixeira, D. C., Ayres, J., Kitajima, E. W., Danet, L., Jagoueix-Eveillard, S., Saillard, C., & Bové, J. M. (2005). First report of a huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* Species, "*Candidatus Liberibacter americanus*", with the disease. *Plant Dis.*, *89*, 107.
- Tomimura, K., Furuya, N., Miyata, S., Hamashima, A., Torigoe, H., Murayama, Y., Kawano, S., Okuda, M., Subandiyah, S., & Iwanami, T. (2010). Distribution of two distinct genotypes of citrus greening organism in the Ryukyu islands of Japan. *Jpn. Agric. Res. Quart.*, *44*, 151-158.

- 
- Tsai, C.-H., Su, H.-J., Liao, Y.-C., & Hung, T.-H. (2006). First Report of the Causal Agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) Infecting Kumquat in Taiwan. *Plant Disease*, *90*, 1360-1360.
- USDA/FAS. (2023). Citrus Annual. *Global agricultural information network*.
- Varani, A. M., Monteiro-Vitorello, C. B., Nakaya, H. I., & Sluys, M.-A. V. (2013). The role of prophage in plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *51*, 429-451.
- Vidalakis, G., Da Graca, J., Dixon, W., Ferrin, D., Kesinger, M., & Krueger, R. R. (2010). Citrus quarantine, sanitary and certification programs in the USA. Prevention of introduction and distribution of citrus pests. Part 1-quarantine and introduction programs. *Citrograph*, *3*, 26-35.
- Von Broembsen, L. A., & Lee, A. T. C. (1988). South Africa's citrus improvement programme. *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*, *10*.
- Wang, K., Liao, Y., Meng, Y., Jiao, X., Huang, W., & Liu, T. C.-y. (2019). The early, rapid, and non-destructive detection of citrus Huanglongbing (HLB) based on microscopic confocal raman. *Food Anal. Methods*, *12*, 2500-2508.
- Wang, Q., Chen, J., Xu, M., Shen, Y., Zhou, M., Zhu, F., Lu, J., & Cheng, H. (2019). Effect of Huanglongbing on the quality of newhall navel orange. *Shipin Kexue / Food Science*, *40*, 48-53.
- Wang, Y. S., Zhou, L. J., Yu, X. Y., Stover, E., Luo, F., & Duan, Y. P. (2016). Transcriptome profiling of huanglongbing (HLB) tolerant and susceptible citrus plants reveals the role of basal resistance in HLB tolerance. *Front. Plant Sci.*, *7*, 933.
- Wang, Z., Niu, Y., Vashisth, T., Li, J., Madden, R., Livingston, T. S., & Wang, Y. (2022). Nontargeted metabolomics-based multiple machine learning modeling boosts early accurate detection for citrus Huanglongbing. *Hortic. Res.*, *9*, uhac145.
- Wu, H., Hu, Y., Fu, S., Zhou, C., & Wang, X. (2020). Coordination of multiple regulation pathways contributes to the tolerance of a wild citrus species (*Citrus ichangensis* ‘2586’) against Huanglongbing. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, *109*, 101457.

- 
- Wu, J., Johnson, E. G., Bright, D. B., Gerberich, K. M., & Graham, J. H. (2017). Interaction between *Phytophthora nicotianae* and *Candidatus Liberibacter asiaticus* damage to citrus fibrous roots. *J. Citrus Pathol.*, 4.
- Xu, Q., Bai, J., Ma, L., Li, Z., Tan, B., Sun, L., & Cai, J. (2023). Identification of multiple symptoms of huanglongbing by electronic nose based on the variability of volatile organic compounds. *Ann. Appl. Biol.*, 183, 181-195.
- Xue, A., Liu, Y., Li, H., Cui, M., Huang, X., Wang, W., Wu, D., Guo, X., Hao, Y., & Luo, L. (2022). Early detection of Huanglongbing with EESI-MS indicates a role of phenylpropanoid pathway in citrus. *Anal. Biochem.*, 639, 114511.
- Yan, J., Yuan, F., Long, G., Qin, L., & Deng, Z. (2012). Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis in citrus. *Mol. Biol. Rep.*, 39(2), 1831-1838.
- Zhang, S., Flores-Cruz, Z., Zhou, L., Kang, B. H., Fleites, L. A., Gooch, M. D., Wulff, N. A., Davis, M. J., Duan, Y. P., & Gabriel, D. W. (2011). '*Ca. Liberibacter asiaticus*' carries an excision plasmid prophage and a chromosomally integrated prophage that becomes lytic in plant infections. *MPMI*, 24, 458-468.
- Zheng, Y., Zhang, J., Li, Y., Liu, Y., Liang, J., Wang, C., Fang, F., Deng, X., & Zheng, Z. (2023). Pathogenicity and transcriptomic analyses of two "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" strains harboring different types of phages. *Microbiol. Spectr.*, 11, e0075423.
- Zheng, Z., Bao, M., Wu, F., Chen, J., & Deng, X. (2016). Predominance of single prophage carrying a CRISPR/cas system in "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" strains in southern China. *PloS One*, 11, e0146422.
- Zheng, Z., Bao, M., Wu, F., Van Horn, C., Chen, J., & Deng, X. (2018). A Type 3 Prophage of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' carrying a restriction-modification system. *Phytopathology*, 108, 454-461.
- Zhou, L., Powell, C. A., Hoffman, M. T., Li, W., Fan, G., Liu, B., Lin, H., & Duan, Y. (2011). Diversity and plasticity of the intracellular plant pathogen and insect symbiont "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" as revealed by hypervariable prophage genes with intragenic tandem repeats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 6663-6673.

Zolkiewicz, K., & Gruszka, D. (2022). Glycogen synthase kinases in model and crop plants - from negative regulators of brassinosteroid signaling to multifaceted hubs of various signaling pathways and modulators of plant reproduction and yield. *Front. Plant Sci.*, *13*, 939487.

Zuñiga, C., Peacock, B., Liang, B., McCollum, G., Irigoyen, S. C., Tec-Campos, D., Marotz, C., Weng, N.-C., Zepeda, A., Vidalakis, G., Mandadi, K. K., Borneman, J., & Zengler, K. (2020). Linking metabolic phenotypes to pathogenic traits among “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” and its hosts. *NPJ Syst. Biol. Appl.*, *6*, 24.

捌、 表

表一、 溫室接種之小植株的初始陽性時間點、最高菌量時間點與最高菌量

Table 1. Initial positive time point, peak-titer time point and the peak titer of greenhouse-inoculated small plants

品種	初始陽性的時間點 (個數)							最高平均菌量 之時間點	最高平均菌量 (copy number)
	2 mpi	3 mpi	4 mpi	5 mpi	7 mpi	8 mpi	9 mpi		
Fremont	2	4	0	0	0	0	0	3 mpi	3836
depressa	0	3	1	0	0	0	1	14 mpi	557
Navel	4	1	0	1	0	0	0	14 mpi	5031
Ora	1	4	0	1	0	0	0	13 mpi	6483
Eureka	1	2	0	0	1	0	0	13 mpi	814
Wentan	0	5	0	0	0	1	0	14 mpi	14288
Ponkan	1	4	0	0	dead	dead	dead	6 mpi	6479
Tankan	2	3	0	1	0	0	0	13 mpi	7218
Total	11	26	1	3	1	1	1	-	-
	25%	59%	2%	7%	2%	2%	2%	-	-

mpi: month post-inoculation

表二、溫室接種之大植株的初始陽性時間點、最高菌量時間點與最高菌量

Table 2. Initial positive time point, peak-titer time point and the peak titer of greenhouse-inoculated large plants

品種	初始陽性的時間點 (個數)						最高平均菌量 之時間點	最高平均菌量 (copy number)
	2 mpi	3 mpi	4 mpi	5 mpi	6 mpi	7 mpi		
Fremont	0	0	0	1	1	1	7 mpi	2169
depressa	1	0	3	1	0	0	6 mpi	161
Navel	0	3	0	1	0	0	6 mpi	4996
Ora	0	1	0	2	1	0	7 mpi	5884
Eureka	0	1	1	0	1	0	3 mpi	2560
Wentan	0	1	0	1	0	0	6 mpi	225
Ponkan	0	0	1	1	1	1	8 mpi	10764
Tankan	0	2	0	0	2	0	7 mpi	4881
Total	1	8	5	7	6	2	-	-
	3%	28%	17%	24%	21%	7%		

mpi: month post-inoculation

表三、溫室接種之佛利蒙的黃龍病菌量變化

Table 3. Variation of CLas titer in greenhouse-inoculated Fremont

mpi	copy number (mean ± STD)	
	小植株組	大植株組
2	40.7 ± 87.9	1.0 ± 0.0
3	3836.0 ± 2806.8	2.4 ± 1.3
4	669.6 ± 341.2	1.0 ± 0.0
5	1151.4 ± 323.9	331.8 ± 572.9
6	3050.4 ± 2307.5	1790.7 ± 2346.6
7	1302.1 ± 134.3	2168.6 ± 1831.2
8	377.8 ± 484.1	674.9 ± 386.2
9	186.6 ± 125.9	-
10	148.5 ± 208.6	-
11	426.1 ± 95.9	-
12	62.4 ± 7.4	-
13	1318.5 ± 925.3	-
14	2014.3 ± 1668.5	-
大小植株 菌量比較 (2-8 mpi)		
P = 0.0077**		

mpi: month post-inoculation

** *P-value < 0.01*

- *No data*



表四、溫室接種之扁實檸檬的黃龍病菌量變化

Table 4. Variation of CLas titer in greenhouse-inoculated depressa



mpi	copy number (mean ± STD)	
	小植株組	大植株組
2	2.4 ± 1.4	7.6 ±14.4
3	150.8 ± 184.1	8.0 ±15.5
4	43.9 ± 33.6	107.8 ±95.7
5	204.8 ± 199.4	100.0 ±135.3
6	269.4 ± 267.8	161.0 ±233.3
7	358.3 ± 234.8	56.1 ±27.8
8	431.1 ± 328.7	137.1 ±156.4
9	98.7 ± 41.3	-
10	141.5 ± 99.1	-
11	86.0 ± 55.8	-
12	406.4 ± 142.7	-
13	550.6 ± 124.1	-
14	556.8 ± 245.9	-

大小植株

菌量比較

(2-8 mpi)

P = 0.008**

mpi: month post-inoculation

** *P-value < 0.01*

- *No data*

表五、溫室接種之臍橙的黃龍病菌量變化

Table 5. Variation of CLas titer in greenhouse-inoculated Navel



mpi	copy number (mean \pm STD)	
	小植株組	大植株組
2	463.3 \pm 678.9	1.0 \pm 0.0
3	715.2 \pm 1492.1	76.8 \pm 75.3
4	143.0 \pm 324.3	149.2 \pm 138.4
5	940.8 \pm 1513.8	518.9 \pm 808.1
6	699.1 \pm 828.6	4996.0 \pm 3707.1
7	866.6 \pm 342.8	3783.4 \pm 1637.1
8	1863.1 \pm 1242.1	732.1 \pm 722.1
9	26.0 \pm 32.0	-
10	600.0 \pm 597.2	-
11	1022.3 \pm 828.8	-
12	3363.0 \pm 1817.0	-
13	3650.6 \pm 1720.0	-
14	5030.6 \pm 862.3	-
大小植株 菌量比較 (2-8 mpi)	P = 0.16	

mpi: month post-inoculation

- No data

表六、溫室接種之黃金茂谷的黃龍病菌量變化

Table 6. Variation of CLas titer in greenhouse-inoculated Ora



mpi	copy number (mean ± STD)	
	小植株組	大植株組
2	18.0 ± 39.3	1.0 ± 0.0
3	1843.2 ± 2020.9	178.2 ± 351.3
4	242.6 ± 591.6	5.8 ± 9.5
5	1061.4 ± 1020.6	770.6 ± 1018.3
6	2432.8 ± 5023.3	842.6 ± 538.4
7	3377.3 ± 1291.7	5883.8 ± 1738.7
8	4005.2 ± 3767.6	1354.6 ± 2052.7
9	967.2 ± 505.4	-
10	1190.0 ± 1963.1	-
11	852.7 ± 1029.4	-
12	2472.4 ± 2232.6	-
13	6482.8 ± 614.1	-
14	2086.0 ± 588.0	-

大小植株

菌量比較

P = 0.37

(2-8 mpi)

mpi: month post-inoculation

- No data

表七、溫室接種之優利加檸檬的黃龍病菌量變化

Table 7. Variation of CLas titer in greenhouse-inoculated Eureka Lemon



mpi	copy number (mean ± STD)	
	小植株組	大植株組
2	6.9 ± 7.0	1.1 ± 0.3
3	298.6 ± 562.0	2560.1 ± 5110.1
4	91.8 ± 135.1	4.0 ± 6.1
5	409.0 ± 296.1	1.0 ± 0.0
6	191.9 ± 169.9	61.8 ± 96.7
7	299.7 ± 377.4	197.1 ± 349.8
8	287.1 ± 276.1	33.2 ± 47.0
9	143.2 ± 159.7	-
10	258.1 ± 243.6	-
11	174.2 ± 129.2	-
12	666.3 ± 360.3	-
13	813.5 ± 285.8	-
14	416.4 ± 172.0	-
大小植株		
菌量比較		P = 0.5220
(2-8 mpi)		

mpi: month post-inoculation

- No data

表八、溫室接種之文旦的黃龍病菌量變化

Table 8. Variation of CLas titer in greenhouse-inoculated Wentan



mpi	copy number (mean ± STD)	
	小植株組	大植株組
2	2.3 ± 1.7	1.9 ± 1.6
3	210.3 ± 586.0	30.1 ± 48.2
4	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
5	2.7 ± 2.9	6.3 ± 9.1
6	289.2 ± 541.9	225.2 ± 388.3
7	1213.8 ± 1866.8	1.0 ± 0.0
8	13582.7 ± 31054.9	19.0 ± 30.6
9	1050.1 ± 1125.3	-
10	2080.2 ± 3754.1	-
11	1444.4 ± 1956.9	-
12	7107.2 ± 6438.0	-
13	7736.9 ± 5082.1	-
14	14287.6 ± 5336.8	-

大小植株

菌量比較

P = 0.2128

(2-8 mpi)

mpi: month post-inoculation

- No data

表九、溫室接種之椪柑的黃龍病菌量變化

Table 9. Variation of CLas titer in greenhouse-inoculated Ponkan



mpi	copy number (mean \pm STD)	
	小植株組	大植株組
2	33.0 \pm 76.8	1.0 \pm 0.0
3	549.3 \pm 955.4	1.0 \pm 0.1
4	19.2 \pm 17.2	229.7 \pm 511.3
5	1580.5 \pm 1860.0	848.2 \pm 1444.3
6	6479.3 \pm 8292.8	4651.5 \pm 7034.4
7	dead	1645.8 \pm 1822.3
8	dead	10763.6 \pm 10971.2
9	dead	-
10	dead	-
11	dead	-
12	dead	-
13	dead	-
14	dead	-
大小植株 菌量比較 (2-6 mpi)		
		P = 0.1744

mpi: month post-inoculation

- No data

表十、溫室接種之桶柑的黃龍病菌量變化

Table 10. Variation of CLas titer in greenhouse-inoculated Tankan



mpi	copy number (mean ± STD)	
	小植株組	大植株組
2	229.2 ± 551.5	1.8 ± 1.6
3	315.2 ± 419.8	198.4 ± 379.6
4	1.1 ± 0.2	57.3 ± 112.7
5	1092.9 ± 1406.8	259.2 ± 516.5
6	717.9 ± 567.1	2301.4 ± 2328.7
7	1221.1 ± 1057.5	4881.1 ± 5039.2
8	339.2 ± 433.4	2468.4 ± 2902.1
9	335.8 ± 579.8	-
10	11.9 ± 18.9	-
11	709.6 ± 645.2	-
12	6422.5 ± 5939.7	-
13	7218.5 ± 3552.0	-
14	5773.4 ± 1292.5	-
大小植株		
菌量比較		P = 0.0761
(2-8 mpi)		

mpi: month post-inoculation



表十一、溫室接種之小植株的罹病嚴重度的變化

Table 11. Variation of disease severity of greenhouse-inoculated small plants

品種	罹病嚴重度 (mean ± STD)						主要的病徵類型
	4 mpi	6 mpi	8 mpi	10 mpi	12 mpi	14 mpi	
Fremont	0.0 ±0.0	0.0 ±0.1	1.7 ±2.4	2.7 ±1.8	1.7 ±2.3	6.4 ±5.1	葉片黃化斑駁、新葉小葉化
depressa	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	2.1 ±0.6	2.2 ±1.3	2.1 ±0.8	2.3 ±1.6	新葉疑似缺元素、植株矮化、新葉小葉化
Navel	0.6 ±1.3	0.0 ±0.0	5.0 ±0.0	6.3 ±1.8	5.8 ±2.5	5.0 ±7.1	葉片黃化斑駁
Ora	4.5 ±3.6	4.3 ±2.2	7.6 ±2.5	8.9 ±1.9	3.2 ±0.7	8.4 ±1.4	葉片黃化斑駁、新葉疑似缺元素、植株矮化
Eureka	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	1.3 ±2.5	0.5 ±1.0	1.2 ±1.3	0.0 ±0.0	葉片黃化斑駁
Wentan	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.4 ±0.7	0.9 ±1.6	1.8 ±2.9	葉片黃化斑駁
Tankan	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	3.9 ±3.5	4.7 ±4.2	0.9 ±0.8	0.0 ±0.0	葉片黃化斑駁及捲曲硬化

mpi: month post-inoculation



表十二、溫室接種之大植株的罹病嚴重度的變化

Table 12. Variation of disease severity of greenhouse-inoculated large plants

品種	罹病嚴重度(mean ± STD)			主要的病徵類型
	4 mpi	6 mpi	8 mpi	
Fremont	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	-
depressa	2.2 ±2.9	2.9 ±2.6	2.9 ±2.9	葉片黃化斑駁、新葉疑似缺元素
Navel	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.5 ±1.0	葉脈黃化
Ora	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	1.7 ±2.4	新葉疑似缺元素
Eureka	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	-
Wentan	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	-
Ponkan	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	6.7 ±2.1	葉片黃化斑駁、葉脈木栓化、新葉疑似缺元素
Tankan	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	-

mpi: month post-inoculation

- No symptoms

表十三、溫室接種植株體內的菌量分布

Table 13. Distribution of CLAs in greenhouse-inoculated plants

接種後 時間	品種	重複數	平均菌量 (copy number)				
			整株	下層	中層	上層	
8 mpi	佛利蒙	Fremont	2	44	0	0	102
	扁實檸檬	depressa	6	52	50	46	57
	臍橙	Navel	5	45	1	2	107
	黃金茂谷	Ora	3	55	9	1	116
	天王柑	Tianung Giant	5	182	103	0	383
	椪柑	Ponkan	1	188	0	0	376
	桶柑	Tankan	2	647	1	0	1293
	優利加檸檬	Eureka	3	46	108	6	32
	枳柚	Swingle	3	114	256	104	4
	金柑	Kumquat	3	732	724	564	795
13 mpi	佛利蒙	Fremont	3	2846	1302	1778	5457
	扁實檸檬	depressa	6	187	193	156	198
	臍橙	Navel	4	929	1919	0	419
	黃金茂谷	Ora	4	17	45	4	7
	天王柑	Tianung Giant	5	33	0	3	78
	椪柑	Ponkan	2	3499	1907	4182	3783
	桶柑	Tankan	3	1891	50	3694	1920
	優利加檸檬	Eureka	3	60	28	54	87
	枳柚	Swingle	4	2190	950	6011	255
	金柑	Kumquat	4	1873	829	1833	2948

mpi: month post-inoculation

表十四、黃龍病感染後之目標基因的相對表現量

Table 14. Relative expression levels of target genes after HLB infection

Variety	Gene target	mpi	$2^{-(\Delta\Delta CT)}$ ^a		p-value ^b	Regulation ^c	
			healthy	HLB			
Fremont	<i>CESA</i>	3	1.489	1.852	0.7763	No	
		6	1.147	0.694	0.4502	No	
		13	1.101	0.572	0.4038	No	
	<i>glgA</i>	3	1.106	0.506	<.0001	down	
		6	1.005	1.362	0.2784	No	
		13	1.002	0.434	0.0415	down	
	<i>LCHb1</i>	3	1.217	0.162	0.1623	No	
		6	1.472	3.062	0.3965	No	
		13	1.332	0.995	0.632	No	
	<i>XTH23</i>	3	1.076	0.471	0.0314	down	
		6	1.117	1.016	0.8597	No	
		13	1.026	0.366	0.1078	No	
	depressa	<i>CESA</i>	3	1.164	2.060	0.2311	No
			6	1.231	3.705	0.152	No
			13	3.190	1.529	0.5287	No
<i>glgA</i>		3	1.003	0.177	<.0001	down	
		6	1.072	1.218	0.5452	No	
		13	1.055	1.598	0.0694	No	
<i>LCHb1</i>		3	1.098	0.270	0.1203	No	
		6	1.559	2.648	0.4798	No	
		13	1.046	1.803	0.3355	No	
<i>XTH23</i>	3	1.108	2.296	0.4612	No		
	6	1.056	0.961	0.885	No		
	13	1.098	0.776	0.3839	No		
Navel	<i>CESA</i>	3	1.176	3.003	0.3021	No	
		6	1.002	12.046	0.2199	No	
		13	1.127	9.973	0.4684	No	

Ora	<i>glgA</i>	3	1.238	0.979	0.2655	No
		6	1.097	4.916	0.4814	No
		13	1.315	0.748	0.4575	No
	<i>LCHb1</i>	3	1.001	0.275	<.0001	down
		6	1.470	1.201	0.7741	No
		13	1.429	1.715	0.8047	No
	<i>XTH23</i>	3	1.005	2.578	0.086	No
		6	1.027	0.373	0.0604	No
		13	1.014	0.949	0.8747	No
	<i>CESA</i>	3	1.069	3.330	0.1894	No
		6	1.017	4.524	0.303	No
		13	1.040	20.706	0.2598	No
	<i>glgA</i>	3	1.117	0.156	0.1328	No
		6	1.055	2.726	0.1294	No
		13	1.003	0.862	0.3136	No
<i>LCHb1</i>	3	1.074	0.658	0.1603	No	
	6	1.103	17.327	0.0057	up	
	13	1.042	1.321	0.3498	No	
<i>XTH23</i>	3	1.003	1.703	0.0973	No	
	6	1.030	1.368	0.6098	No	
	13	1.068	0.328	0.0599	No	
Eureka	<i>CESA</i>	3	1.123	48.260	0.0432	up
		6	1.022	3.939	0.0418	up
		13	1.234	1.074	0.8374	No
	<i>glgA</i>	3	1.048	0.434	0.0366	down
		6	1.035	2.506	0.1319	No
		13	1.012	0.778	0.3612	No
	<i>LCHb1</i>	3	1.001	0.591	0.3685	No
		6	1.055	0.971	0.9215	No
		13	1.153	0.864	0.6485	No
<i>XTH23</i>	3	1.070	0.552	0.1994	No	
	6	1.033	4.999	0.0824	No	

		13	1.002	0.397	0.0009	down
Wentan	<i>CESA</i>	3	1.029	9.647	0.2251	No
		6	1.001	392.711	0.2236	No
		13	1.057	0.546	0.067	No
	<i>glgA</i>	3	1.001	0.865	0.5308	No
		6	1.192	4.959	0.1516	No
		13	1.000	0.553	0.0065	down
	<i>LCHb1</i>	3	1.050	0.436	0.0455	down
		6	1.328	4.057	0.1061	No
		13	1.220	0.574	0.0932	No
		3	1.052	1.645	0.4262	No
		6	2.117	8.391	0.2216	No
		13	1.151	0.652	0.2599	No
Ponkan	<i>CESA</i>	3	1.001	2.618	0.1048	No
		6	1.584	3.141	0.5456	No
	<i>glgA</i>	3	1.014	0.051	0.0137	down
		6	1.255	38.478	0.0103	up
	<i>LCHb1</i>	3	1.047	0.047	0.0509	No
		6	1.257	1.851	0.5429	No
	<i>XTH23</i>	3	1.018	0.104	0.0176	down
		6	1.626	6.669	0.0621	No
	Tankan	<i>CESA</i>	3	1.385	57.847	0.0687
6			2.255	1.930	0.8946	No
13			1.157	6.524	0.0837	No
<i>glgA</i>		3	1.023	0.202	0.0271	down
		6	1.083	1.649	0.6915	No
		13	1.217	0.632	0.3748	No
<i>LCHb1</i>		3	1.124	0.141	0.1323	No
		6	1.408	1.479	0.949	No
		13	1.469	2.225	0.6321	No
<i>XTH23</i>		3	1.064	0.613	0.3393	No
		6	1.266	9.855	0.1004	No

13 1.063 0.259 0.0631

No

^a We used delta-delta Ct method formula to calculate the relative gene expression, with GAPDH as the internal reference gene

^b On each timepoint, Wilcoxon rank-sum test was applied to determine whether there was significant difference between the HLB-inoculated group and the healthy control group.

^c Up or down regulation depended on statistical significance ($P < 0.05$)

表十五、黃龍病罹病率與各縣市使用健康種苗比例

Table 15. Disease incidence of HLB and the percentage of healthy seedlings-used in each county.

品種	縣市	鄉鎮	樣本數	平均罹病率	最低-最高罹病率	使用健康種苗之果園的比例
Fremont	臺東縣	卑南	48	46%	25-100%	83%
	南投縣	竹山	8	25%	25-25%	100%
	宜蘭縣	三星、大同、冬山	50	14%	10-20%	20%
	雲林縣	古坑	24	0%	0-0%	0%
	新竹縣	芎林、峨眉	76	0%	0-0%	0%
	臺中市	東勢、豐原	24	0%	0-0%	100%
	總計		230	14%	-	38%
depressa	屏東縣	內埔、竹田、長治、潮州、麟洛	80	71%	38-100%	0%
	高雄市	岡山、旗山	16	50%	13-88%	100%
	南投縣	竹山	40	45%	0-88%	20%
	臺東縣	長濱	16	0%	0-0%	50%
	花蓮縣	瑞穗	16	0%	0-0%	0%
	總計		168	49%	-	19%
	Navel	臺東縣	成功、卑南、東河	88	56%	0-100%
南投縣		水里、竹山	40	20%	0-75%	40%
苗栗縣		大湖	8	0%	0-0%	100%
臺中市		東勢、豐原	32	0%	0-0%	50%
總計			168	34%	-	62%

Ora	雲林縣	古坑	8	38%	38-38%	0%
	苗栗縣	卓蘭	18	0%	0-0%	100%
	臺中市	東勢、豐原	32	0%	0-0%	25%
	宜蘭縣	頭城	65	11%	0-40%	57%
	總計		123	8%	-	57%

- no data

表十六、市場潛力品種之田間罹病株的菌量、罹病嚴重度與病徵類型

Table 16. CLas titer, disease severity and symptom types of field-infected plants from varieties with market potential

品種	縣市	鄉鎮	調查季節	樣本數	平均菌量	最低-最高菌量	平均罹病嚴重度	主要病徵類型
Fremont	宜蘭縣	三星	秋	3	3908	534 - 9442	5.0	葉片對稱、非對稱黃化斑駁 葉脈木栓化
		大同	夏	2	444	84 - 804	3.0	葉片非對稱黃化斑駁 葉脈木栓化
		冬山	夏	3	346	179 - 479	5.7	葉片非對稱黃化斑駁 葉脈木栓化 葉片捲曲硬化
	南投縣	竹山	春	2	22	2 - 41	-	-
	臺東縣	卑南	夏	22	12030	148 - 87271	7.7	葉片對稱、非對稱黃化斑駁 葉脈木栓化 葉片捲曲硬化
depressa	南投縣	竹山	秋	17	672	90 - 3209	8.9	葉片對稱、非對稱黃化斑駁 葉片捲曲硬化 新葉小葉化
				內埔	7	161	35 - 500	-
	屏東縣	長治	春	11	277	10 - 1106	-	-
				15	191	39 - 466	-	-
				13	222	19 - 671	-	-

	麟洛		11	121	3 - 226	-	-	
	岡山		1	48	48 - 48	10.0	葉片對稱、非對稱黃化斑駁	
高雄市	旗山	冬	7	781	122 - 2140	5.9	葉片對稱、非對稱黃化斑駁 葉片捲曲硬化	
南投縣	竹山	夏	8	1096	15 - 5326	-	-	
	成功	夏	24	4268	39 - 24165	8.1	葉片對稱、非對稱黃化斑駁 葉脈木栓化 葉片捲曲硬化 新葉小葉化	
Navel	臺東縣	卑南	夏	15	4565	334 - 12606	7.1	葉片對稱、非對稱黃化斑駁 葉脈木栓化 葉片捲曲硬化
	東河	春	11	7209	142 - 17565	4.5	葉片對稱、非對稱黃化斑駁 葉脈木栓化 葉片捲曲硬化	
	宜蘭縣	頭城	秋	7	4854	154 - 11776	4.6	葉片對稱、非對稱黃化斑駁 葉脈木栓化 葉片捲曲硬化
Ora	雲林縣	古坑	冬	3	69083	980 - 170108	7.7	葉片對稱、非對稱黃化斑駁 葉片捲曲硬化

- no data

表十七、田間調查之黃龍病菌的噬菌體種類

Table 17. Prophage types in CLas from field survey

品種	地區	number (percentage)				總計
		No ^a	T1 單獨感染	T1 + T3 複合感染	T3 單獨感染	
Fremont	全臺	6 (18.8%)	7 (21.9%)	19 (59.4%)	0 (0.0%)	32 (100.0%)
	宜蘭	1 (12.5%)	1 (12.5%)	6 (75.0%)	0 (0.0%)	8 (100.0%)
	南投	2 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)
	臺東	3 (13.6%)	6 (27.3%)	13 (59.1%)	0 (0.0%)	22 (100.0%)
depressa	全臺	4 (4.9%)	67 (81.7%)	11 (13.4%)	0 (0.0%)	82 (100.0%)
	南投	0 (0.0%)	8 (47.1%)	9 (52.9%)	0 (0.0%)	17 (100.0%)
	屏東	3 (5.3%)	54 (94.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	57 (100.0%)
	高雄	1 (12.5%)	5 (62.5%)	2 (25.0%)	0 (0.0%)	8 (100.0%)
Navel	全臺	8 (13.8%)	5 (8.6%)	44 (75.9%)	1 (1.7%)	58 (100.0%)
	南投	8 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	8 (100.0%)
	臺東	0 (0.0%)	5 (10.0%)	44 (88.0%)	1 (2.0%)	50 (100.0%)
Ora	全臺	0 (0.0%)	4 (40.0%)	5 (50.0%)	1 (10.0%)	10 (100.0%)
	宜蘭	0 (0.0%)	3 (42.9%)	3 (42.9%)	1 (14.3%)	7 (100.0%)
	雲林	0 (0.0%)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	0 (0.0%)	3 (100.0%)
Total	全臺	18 (9.9%)	83 (45.6%)	79 (43.4%)	2 (1.1%)	182 (100.0%)

^a without any known prophage

※由於 T2 噬菌體完全未檢測到，因此未顯示於表格中。

※The result of T2 phage was not shown in the table due to zero-detection.

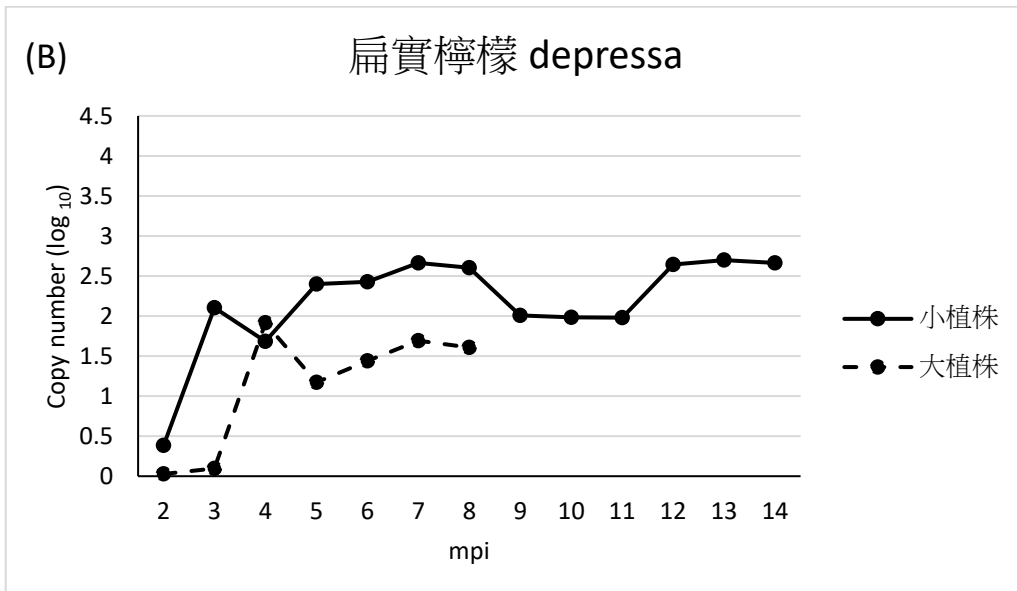
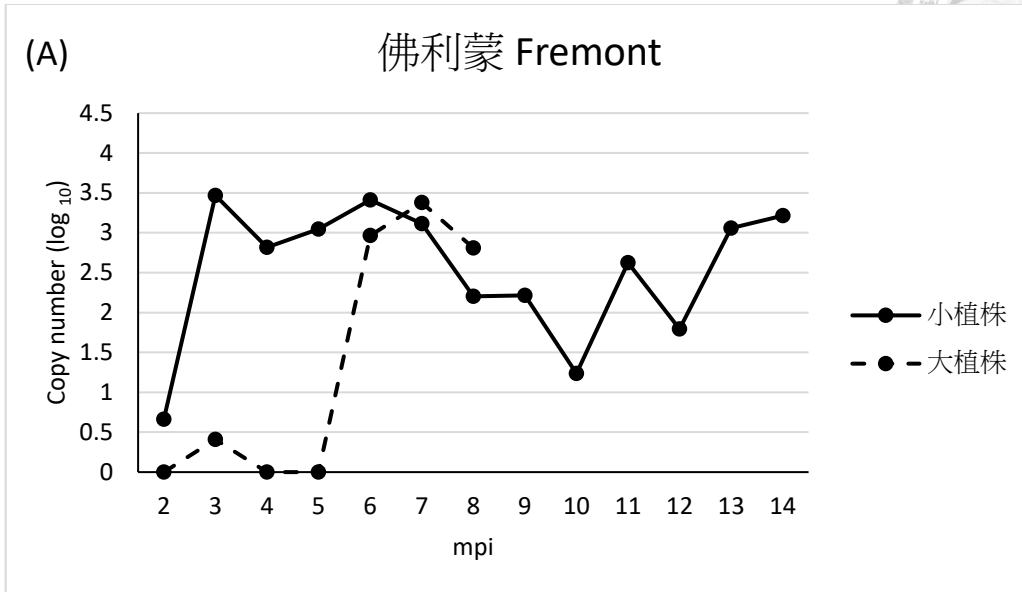
表十八、不同原噬菌體組成之黃龍病菌在植株體內的菌量

Table 18. CLas quantity inside plants with different prophage type composition

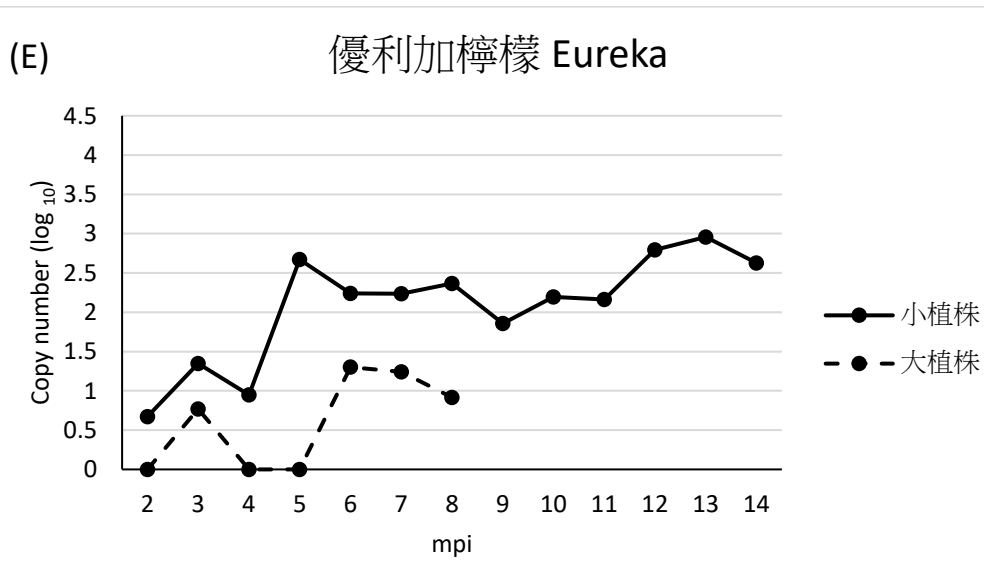
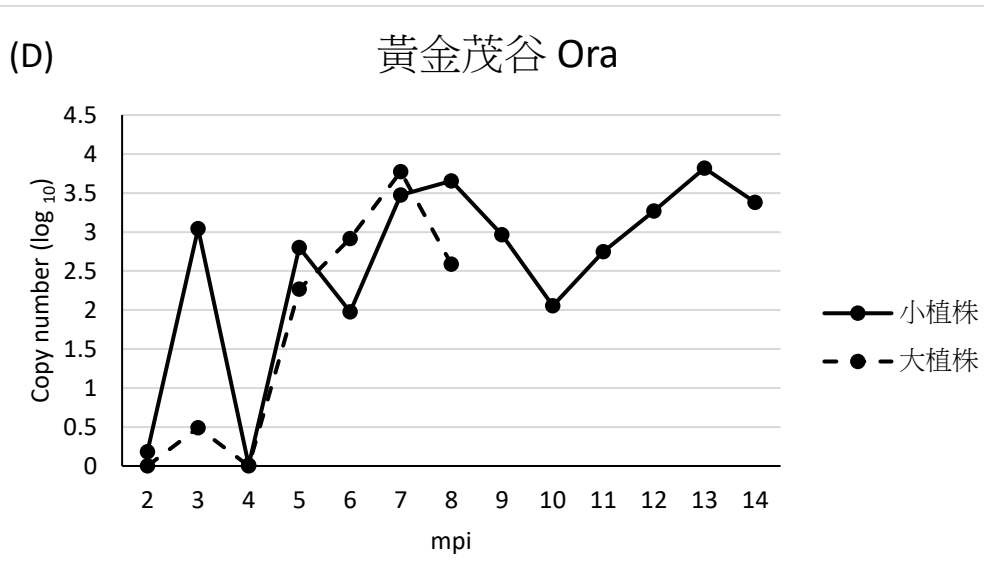
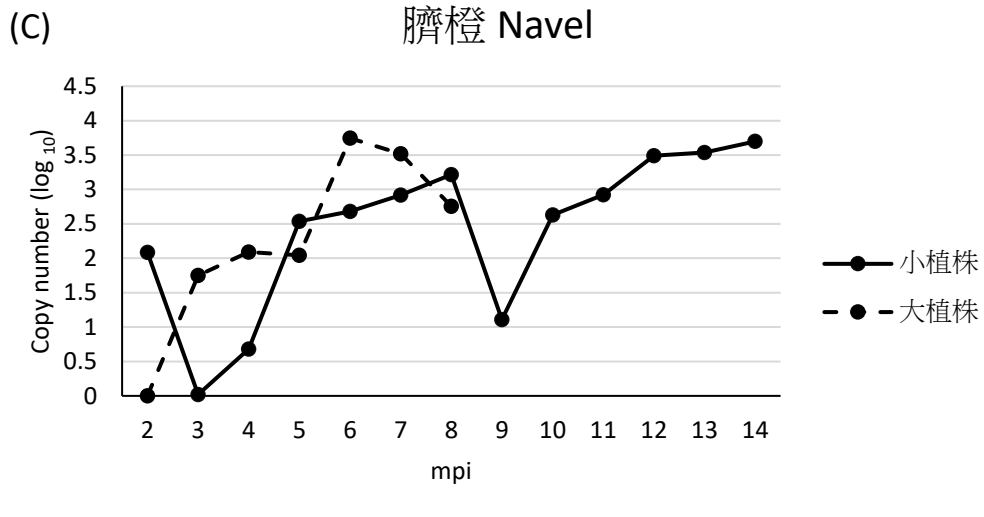
品種	地區	平均菌量 (copy number)			
		No	T1 單獨感染	T1+T3 複合感染	單獨感染 T3
Fremont	全臺	140	6727	12127	-
	宜蘭	179	479	2165	-
	南投	22	-	-	-
	臺東	207	7768	16725	-
depressa	全臺	313	269	809	-
	南投	-	351	958	-
	屏東	75	204	-	-
	高雄	1028	844	136	-
Navel	全臺	1096	6606	4886	2201
	南投	1096	-	-	-
	臺東	-	6606	4886	2201
Ora	全臺	-	13706	36891	1953
	宜蘭	-	6221	4455	1953
	雲林	-	36163	85544	-
Total	全臺	603	1843	8085	2077

- no data

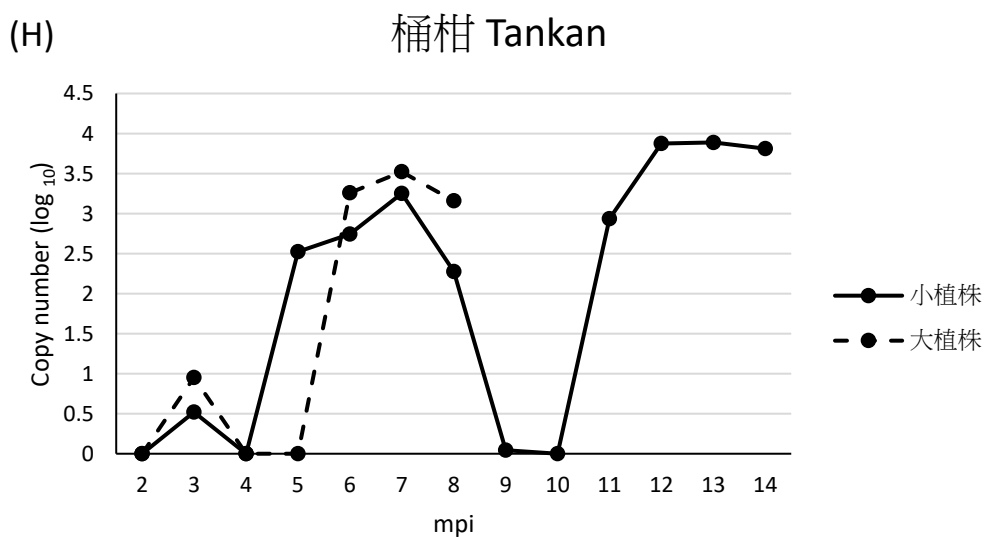
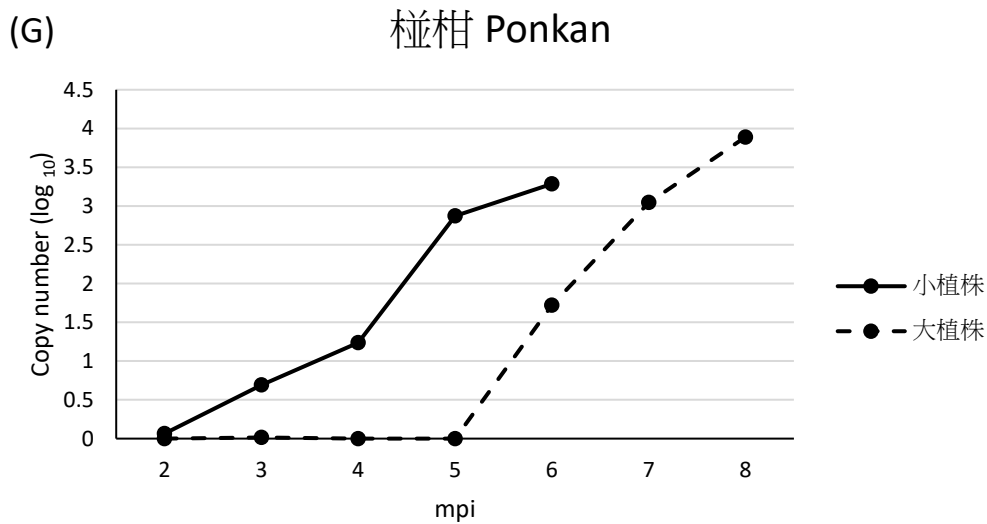
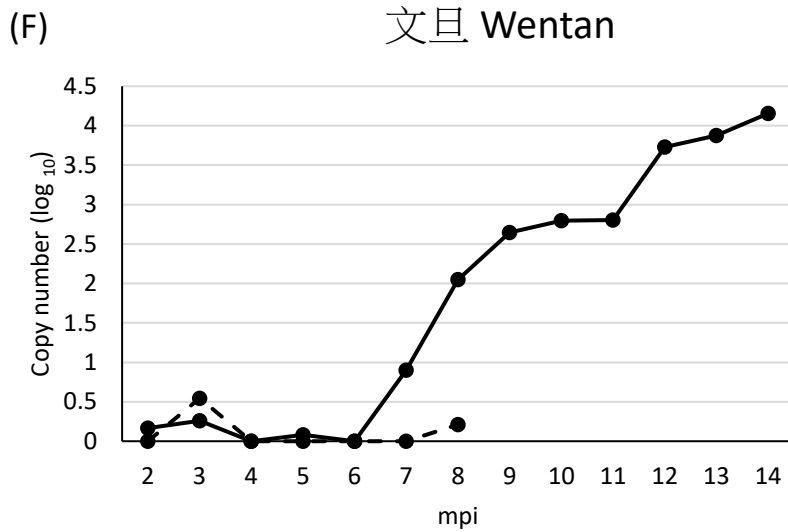
玖、圖



(續後頁) (Continued)



(續後頁) (Continued)



圖一、小植株組試驗與大植株組試驗的黃龍病菌量增殖情形

以 Real-time PCR 之 TaqMan 系統進行絕對定量，測定黃龍病菌量的逐月變化。(A)佛利蒙、(B)扁實檸檬、(C)臍橙、(D)黃金茂谷、(E)優利加檸檬、(F)文旦、(G)極柑、(H)桶柑的大、小植株組，個別以中位數繪製出菌量波動曲線，並於同一張圖呈現，以利於比較大、小植株的菌量差別。小植株追蹤至接種後第 14 個月(極柑除外，因所有極柑植株皆於接種後第六個月內死亡)，大植株追蹤至接種後第 8 個月。

Figure. 1 CLas proliferation in “Small-plant test” and “Large-plant test”

Monthly changes in the absolute quantification of CLas were determined by the TaqMan system in real-time PCR. The fluctuation curves of CLas for (A) Fremont, (B) depressa, (C) Navel, (D) Ora, (E) Eureka, (F) Wentan, (G) Ponkan and (H) Tankan were individually plotted using the median for both large and small plants. These curves were then presented on the same graph to facilitate the comparison of differences between large and small plants. The tracking period for small plants extended to the 14th mpi (excluding Ponkan, as all Ponkan plants died within the 6th mpi), while the tracking period for large plants extended to the 8th mpi.

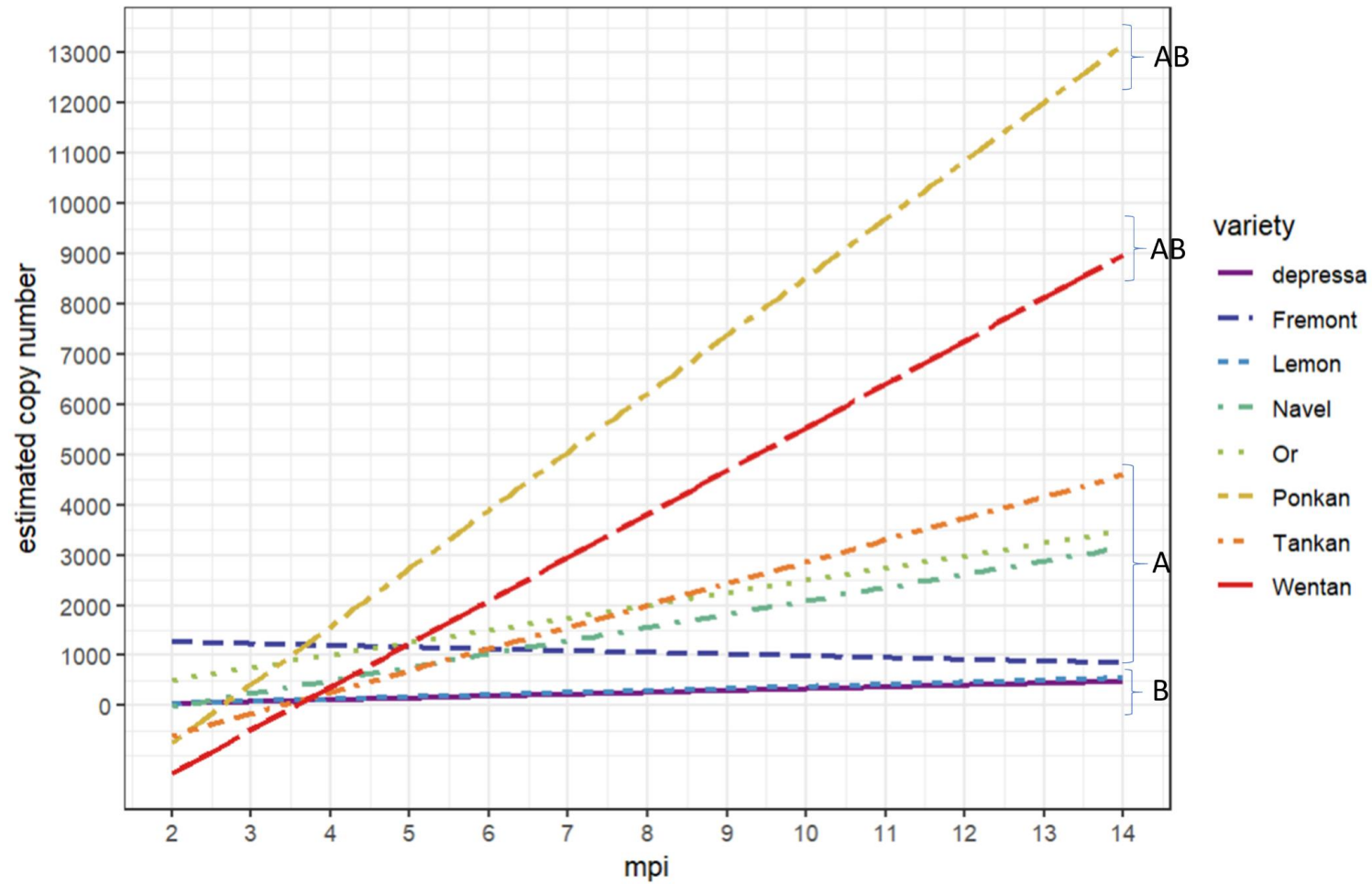
mpi: month post-inoculation



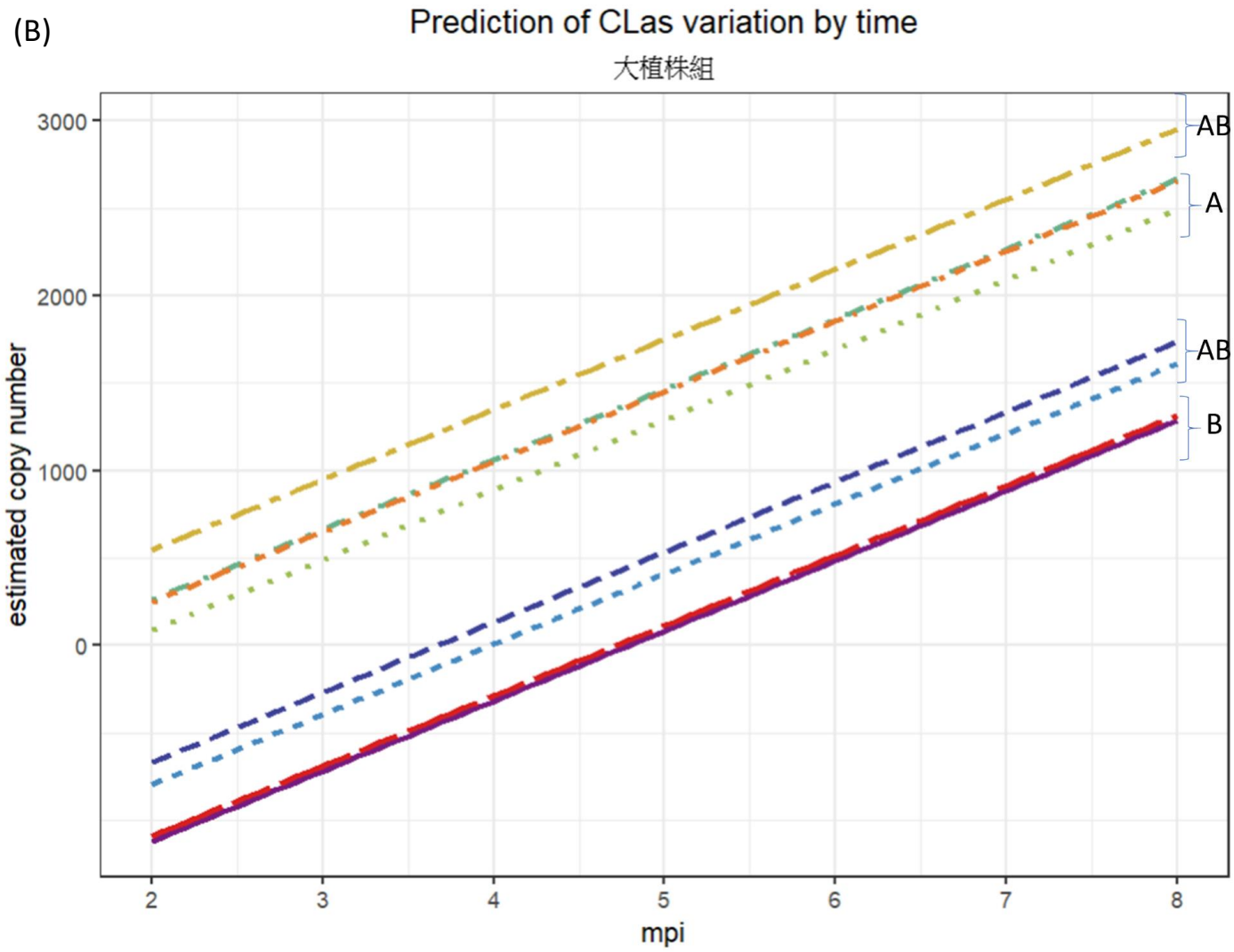
(A)

Prediction of CLAs variation by time

小植株組



(續後頁) (Continued)



(續後頁) (Continued)



圖二、以廣義估計方程式推算各品種之菌量隨時間的變化

為了解(A)小植株與(B)大植株的品種間菌量是否有差異，使用 Tukey's HSD 法進行事後檢定，並在迴歸線旁標記檢定結果，若為不同字母則表示兩者具有統計上的顯著差異($\alpha = 0.05$)。

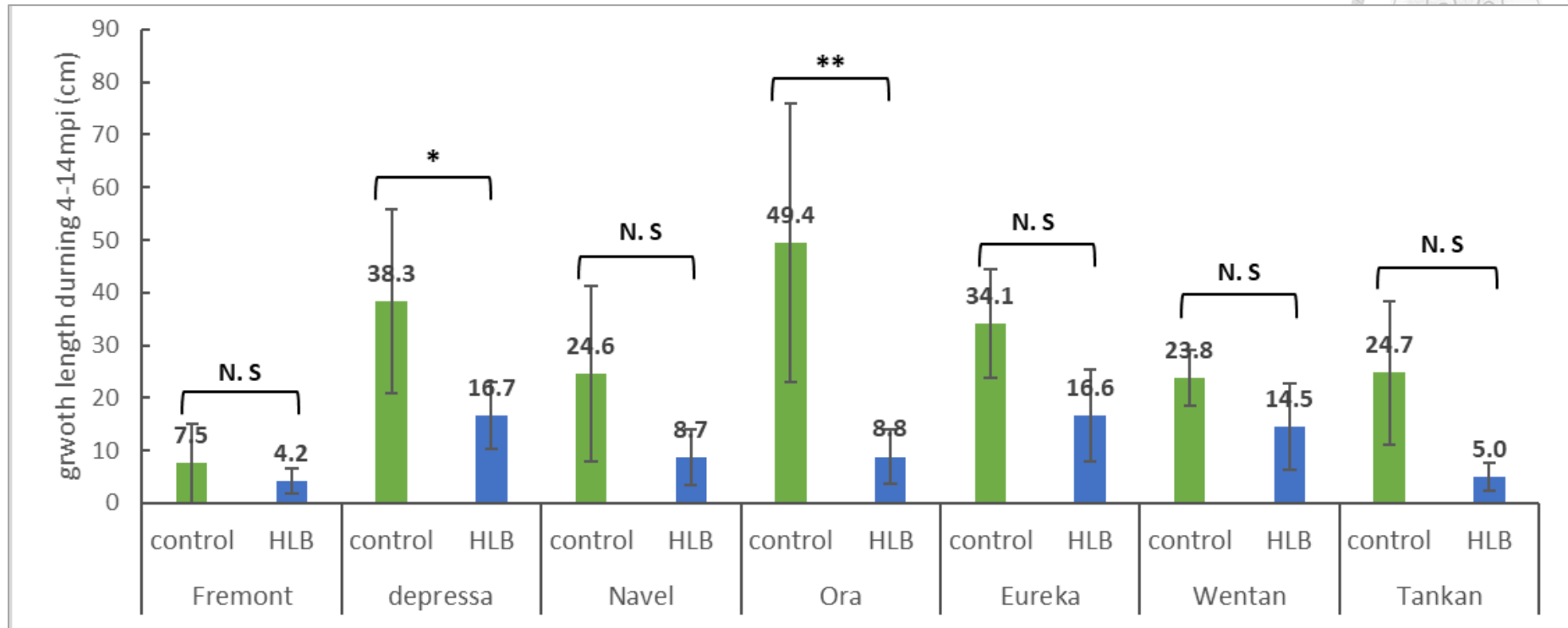
Figure 2. Estimation of CLas quantity for each variety over time by the generalized estimation equation

In order to determine if there were differences in CLas quantity among the varieties in (A) small plants and (B) large plants, a post hoc test using Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) method was employed. The test results were indicated alongside the regression line. If different letters were used, it signified statistically significant differences between the two ($\alpha = 0.05$).

mpi: month post-inoculation



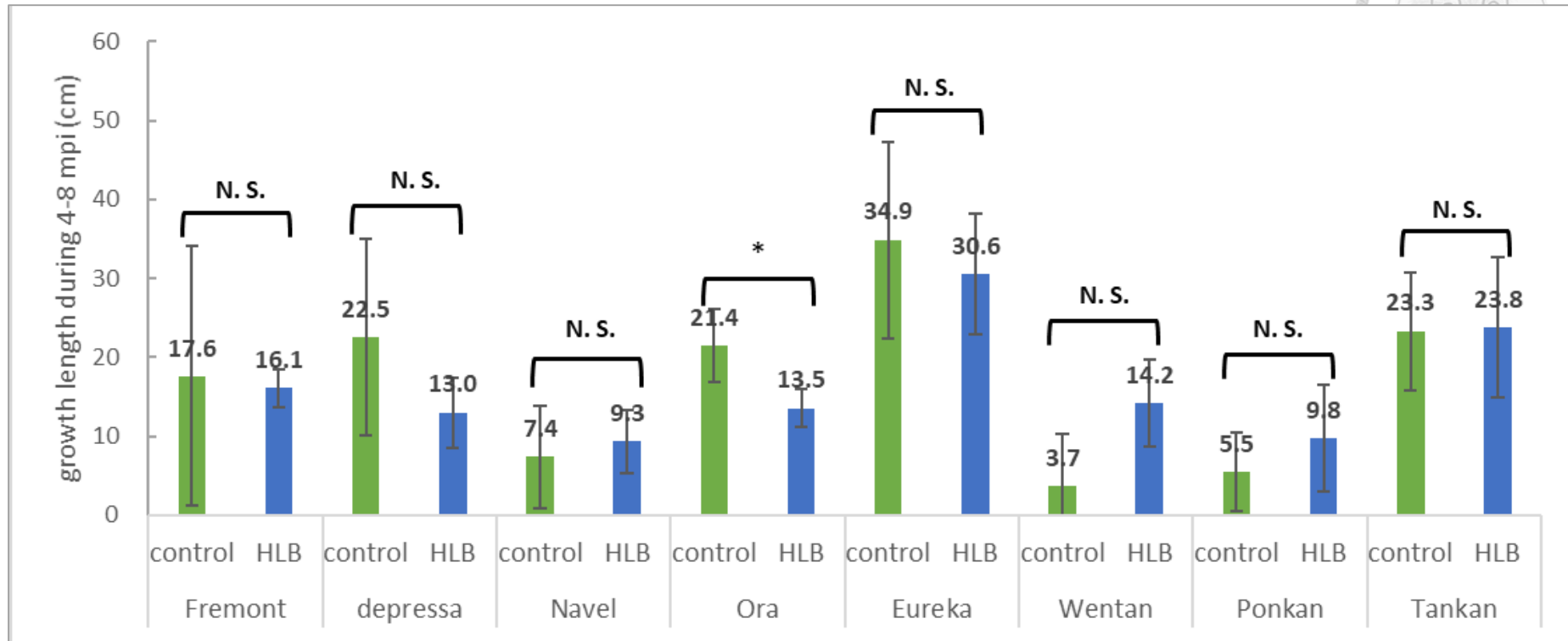
A. 小植株組 “Small-plant test”



(續後頁) (Continued)



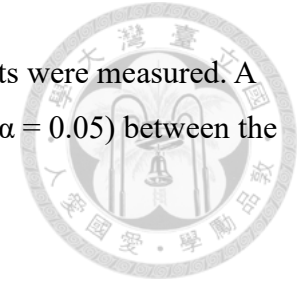
B. 大植株組 “Large-plant test”



圖三、黃龍病菌對生長長度的影響

紀錄接種後第四個月起至追蹤的最後一個月，(A)小植株與(B)大植株的總生長長度。利用雙樣本 T 檢定或 Wilcoxon 雙樣本檢定判斷接種組與健康對照組之間是否有統計上的顯著性差異($\alpha=0.05$)。

Figure 3. The impact of CLAs on growth



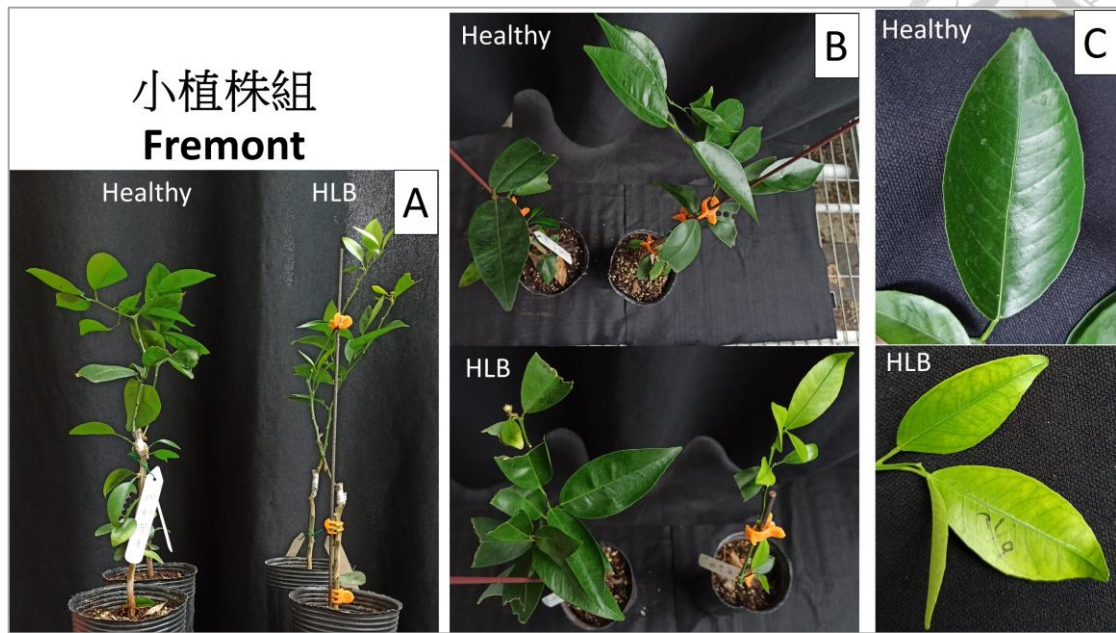
From the fourth month post-inoculation until the final month, the total growth length of (A) small plants and (B) large plants were measured. A two-sample t-test or Wilcoxon rank-sum test was employed to determine if there were statistically significant differences ($\alpha = 0.05$) between the inoculated group and the healthy control group in terms of growth length.

* $P < 0.05$

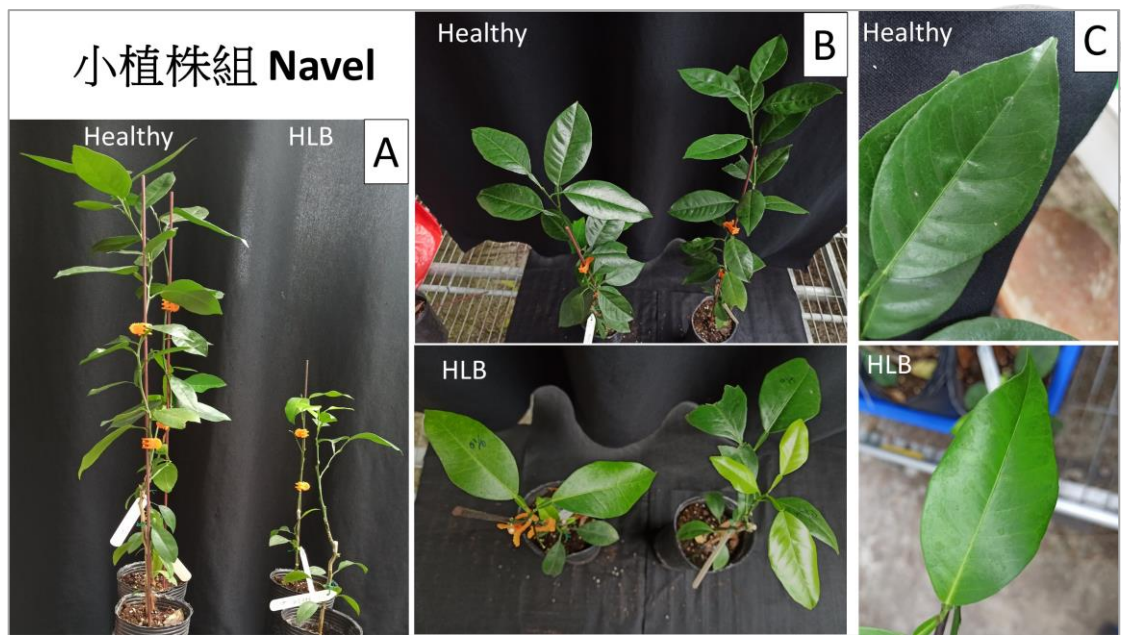
** $P < 0.01$

N. S. no significance

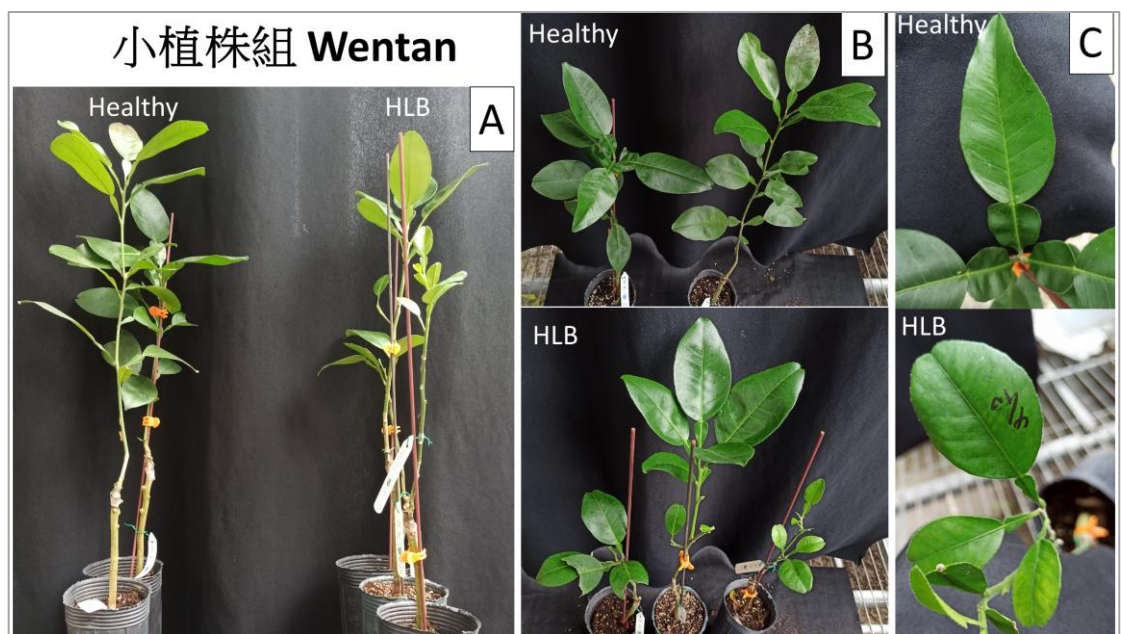
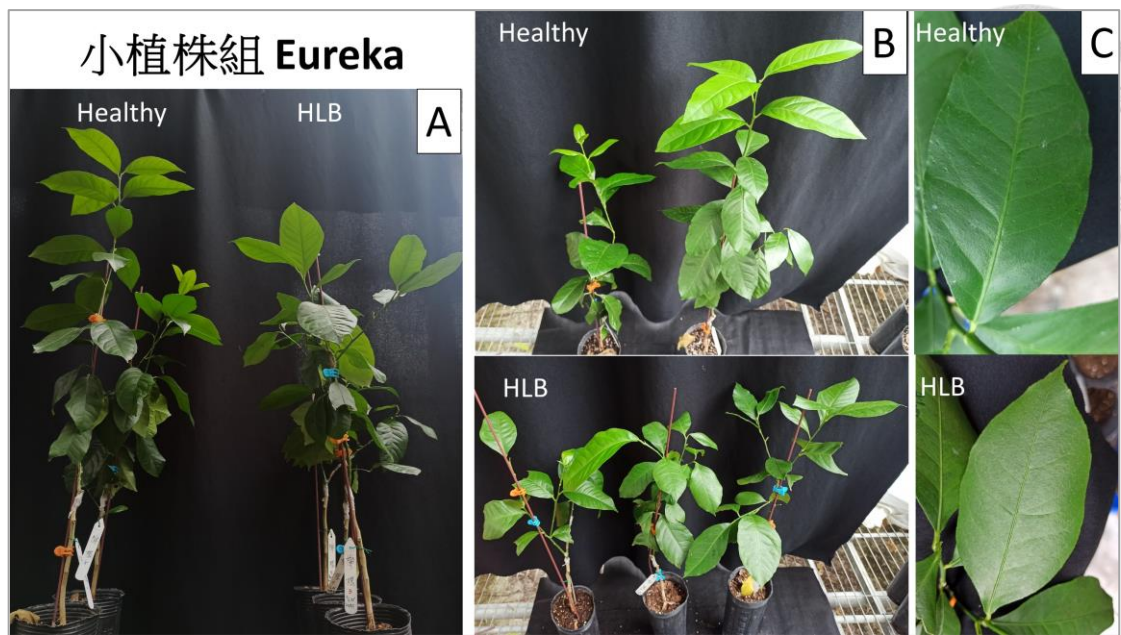
i. 小植株組 Small-plant test



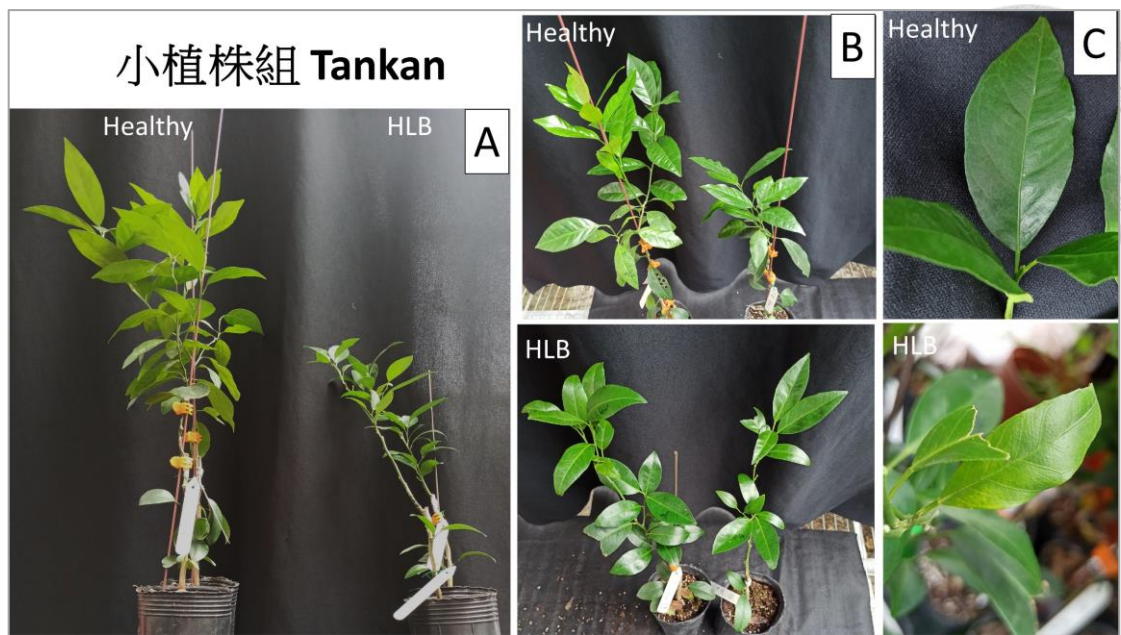
(續後頁) (Continued)



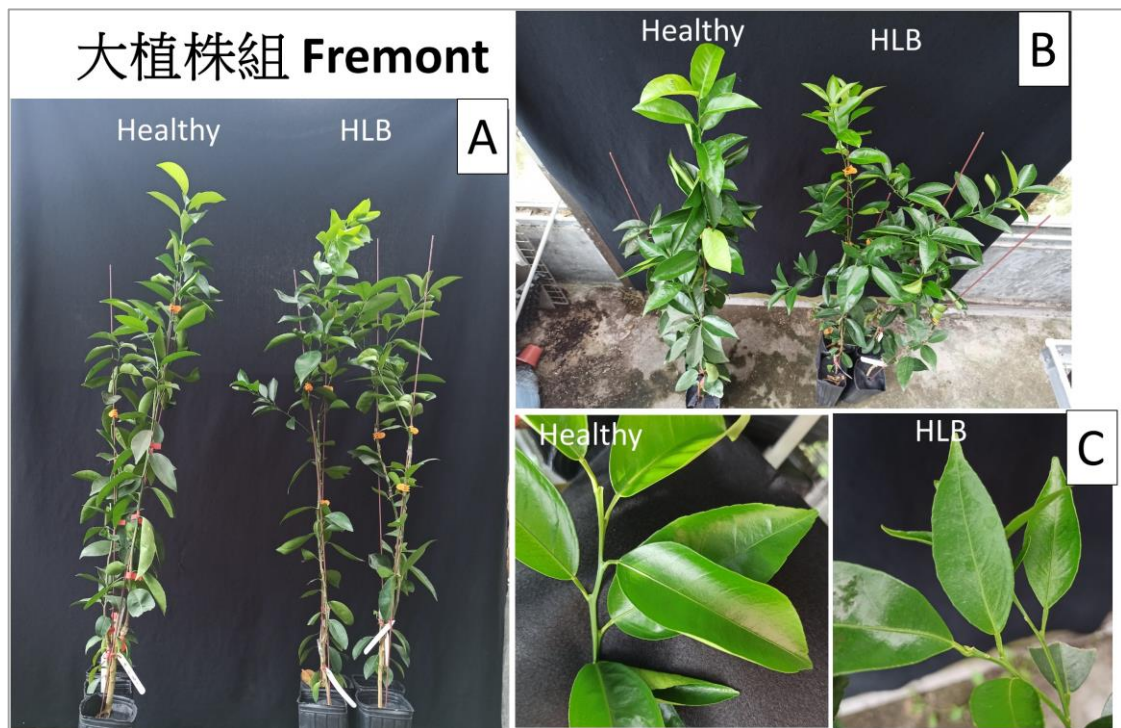
(續後頁) (Continued)



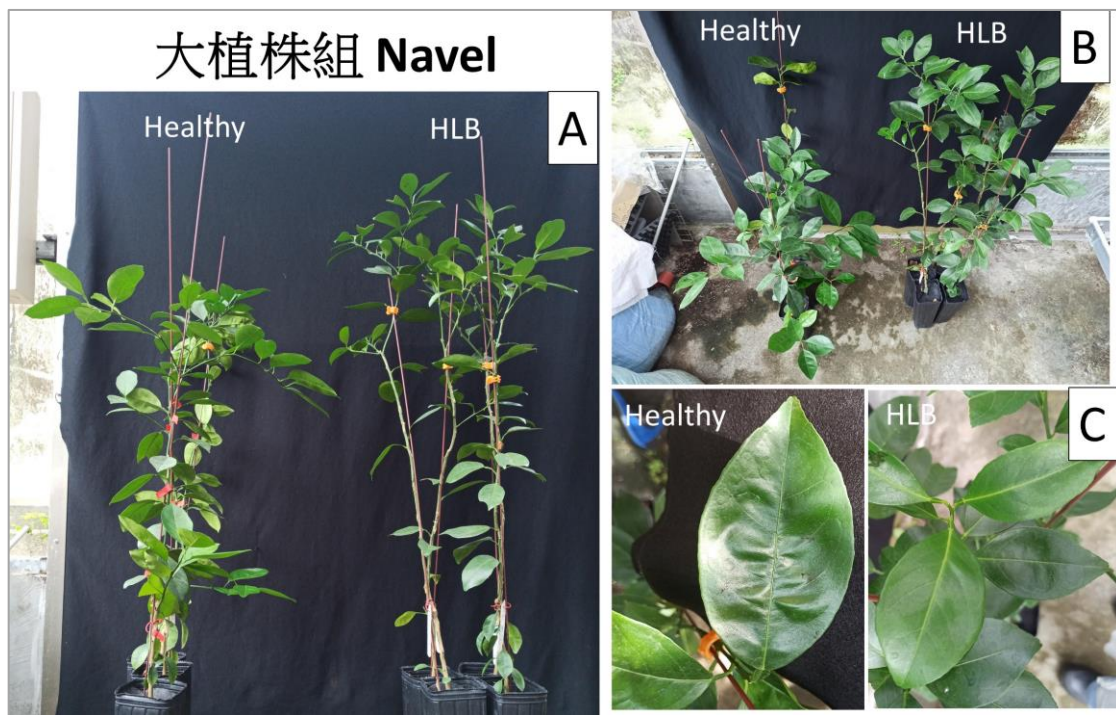
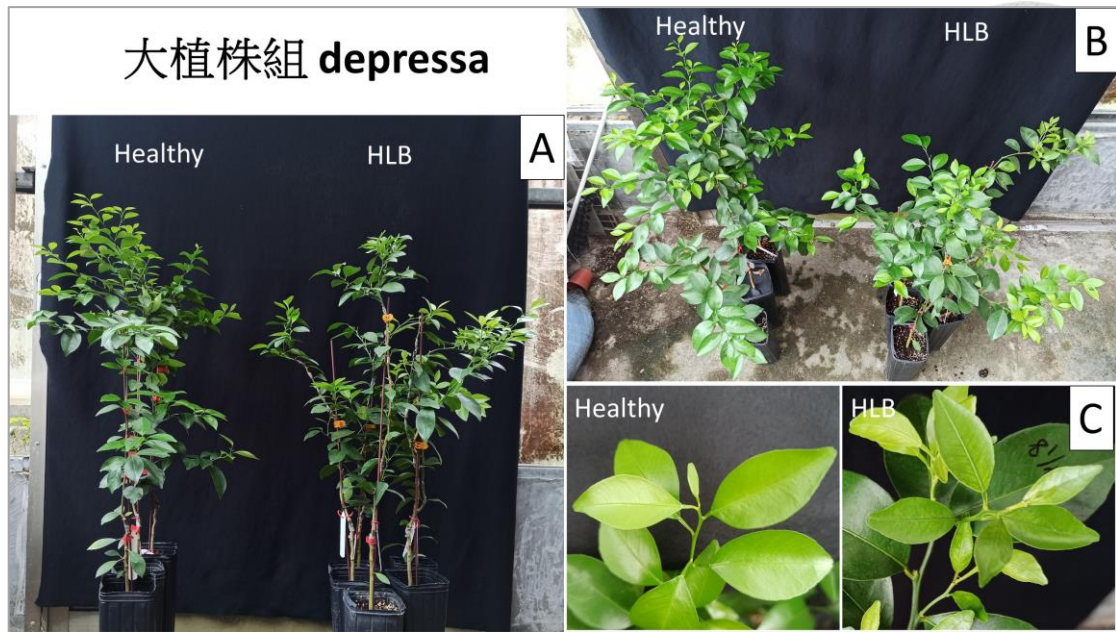
(續後頁) (Continued)



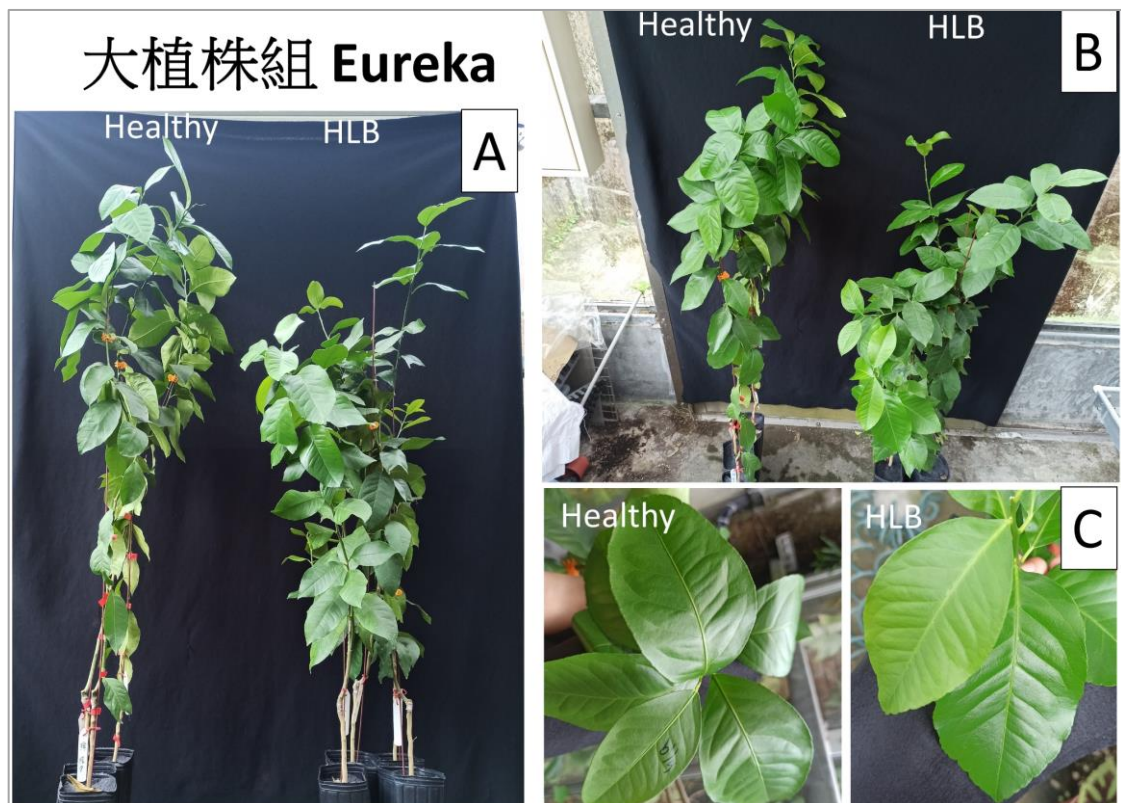
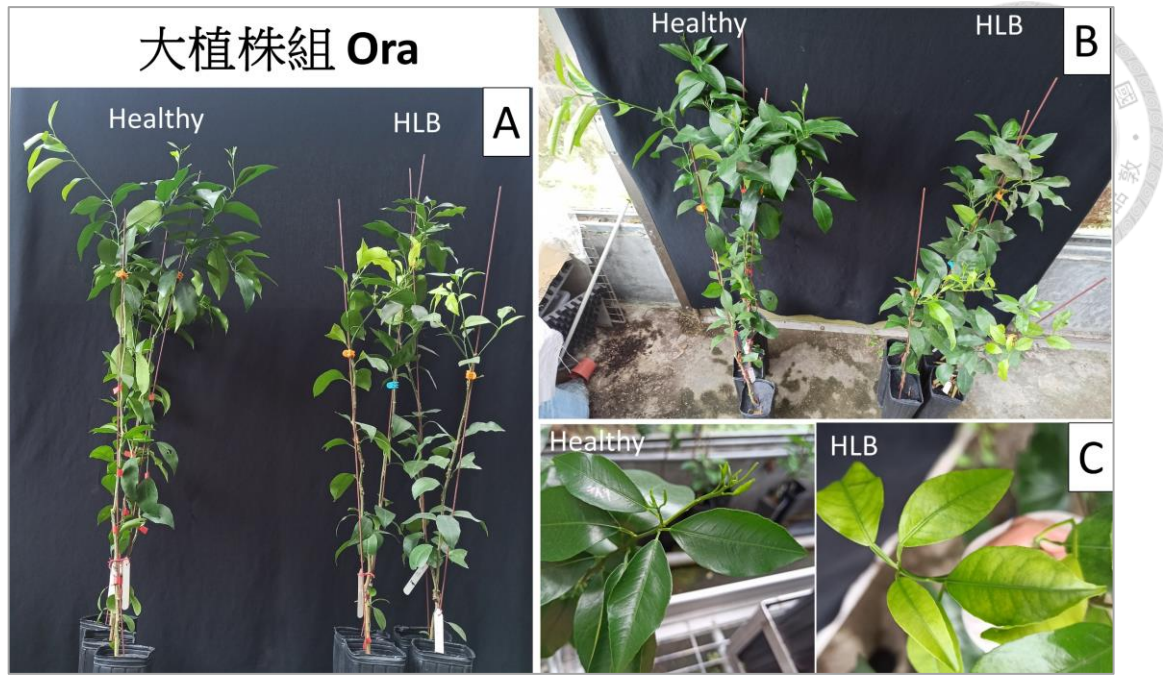
ii. 大植株組 “Large-plant test”



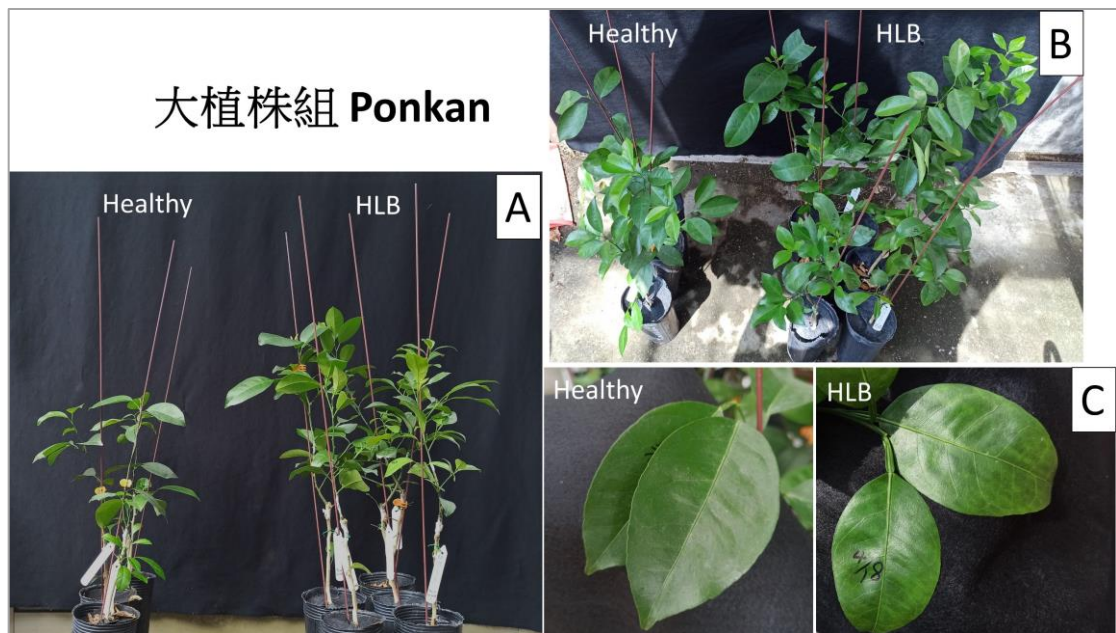
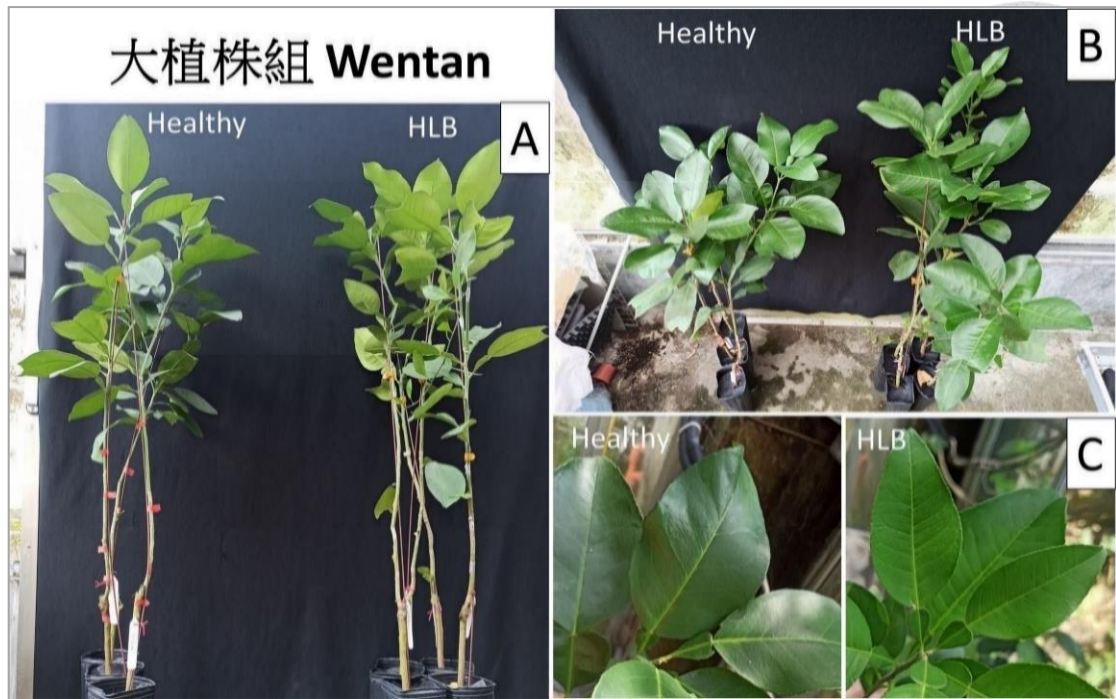
(續後頁) (Continued)



(續後頁) (Continued)



(續後頁) (Continued)



(續後頁) (Continued)



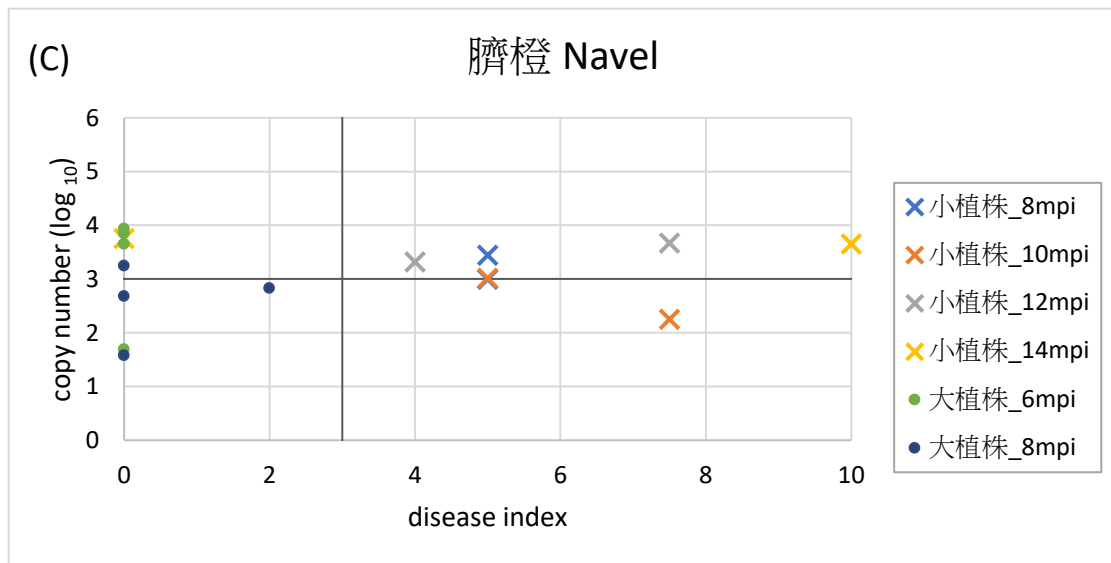
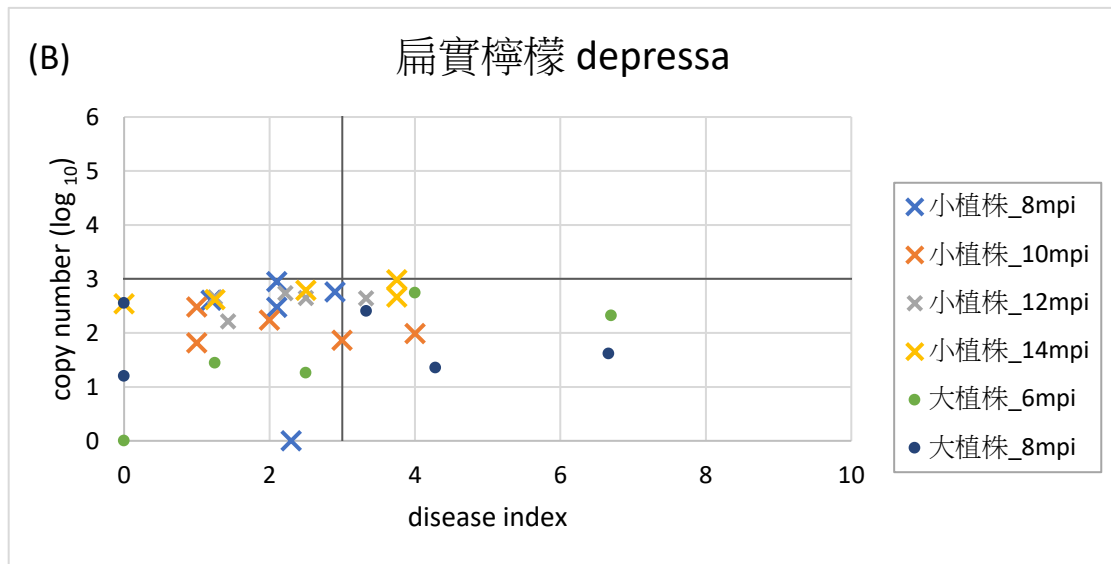
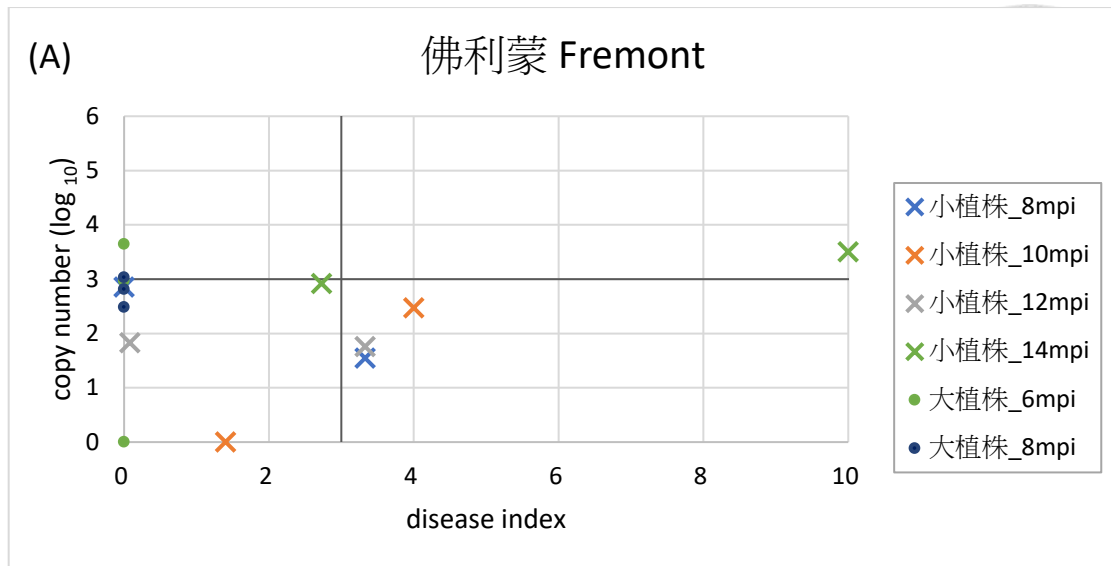
圖四、黃龍病感染後之(A)植株矮化情形及(B) (C)葉部病徵表現

(i)小植株組於接種後第 14 個月紀錄，(ii)大植株組於接種後第 8 個月紀錄。

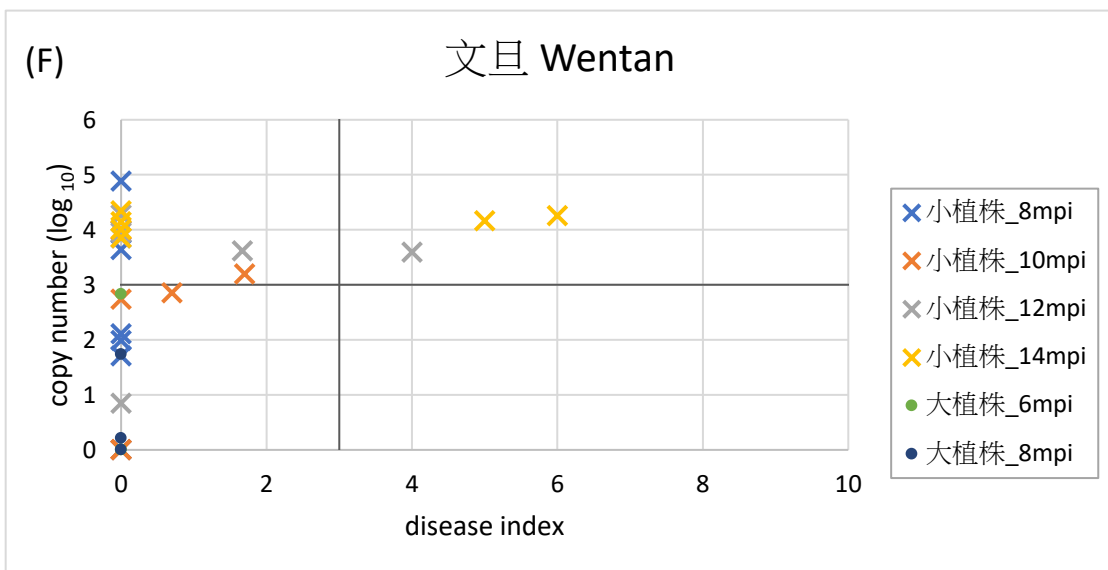
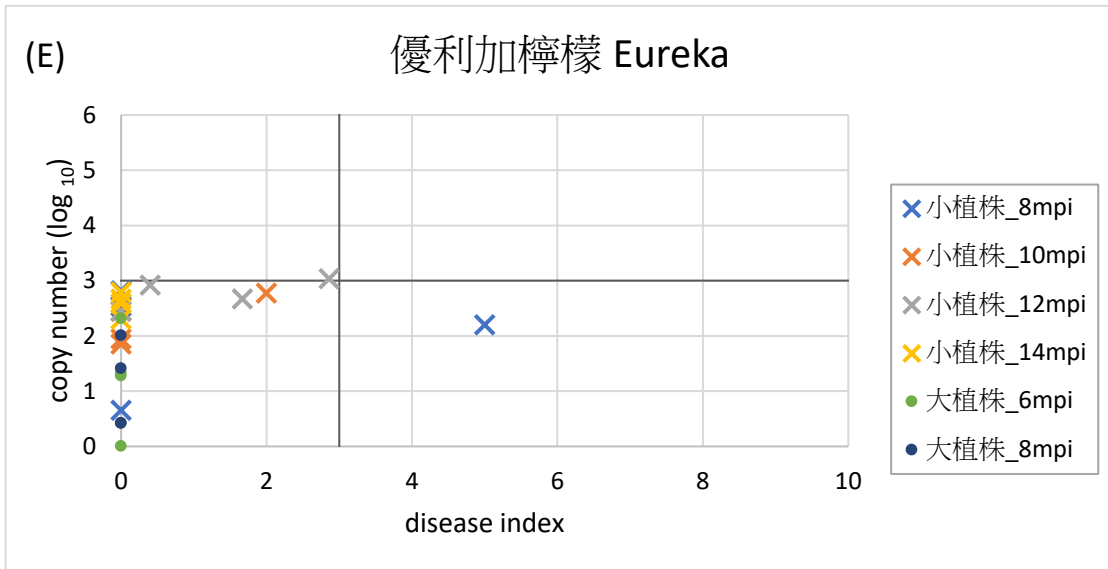
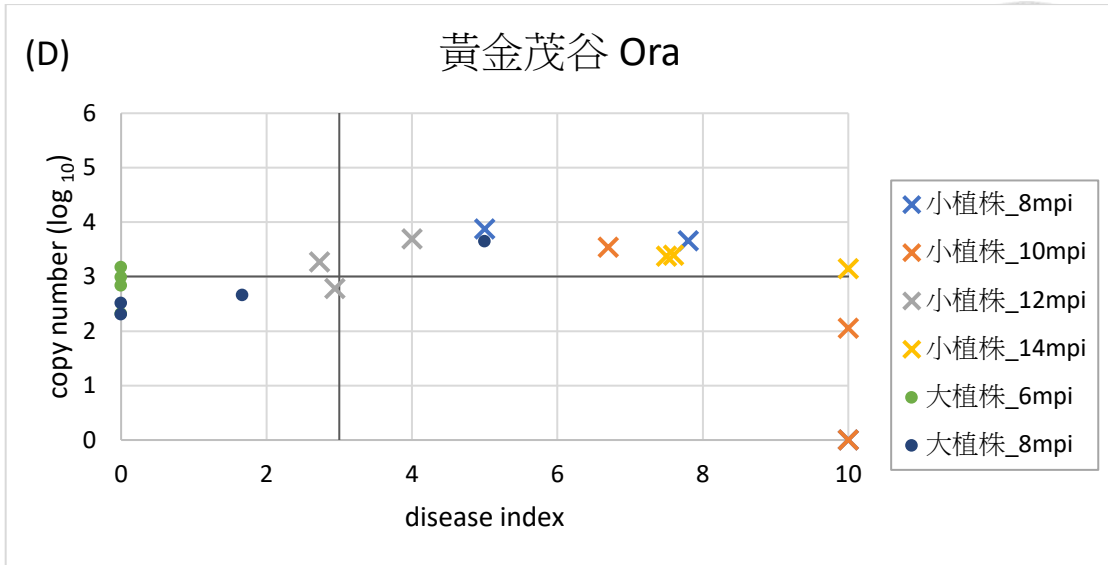
Figure 4. (A) Plant stunting or (B) (C) Leaf symptoms after HLB infection

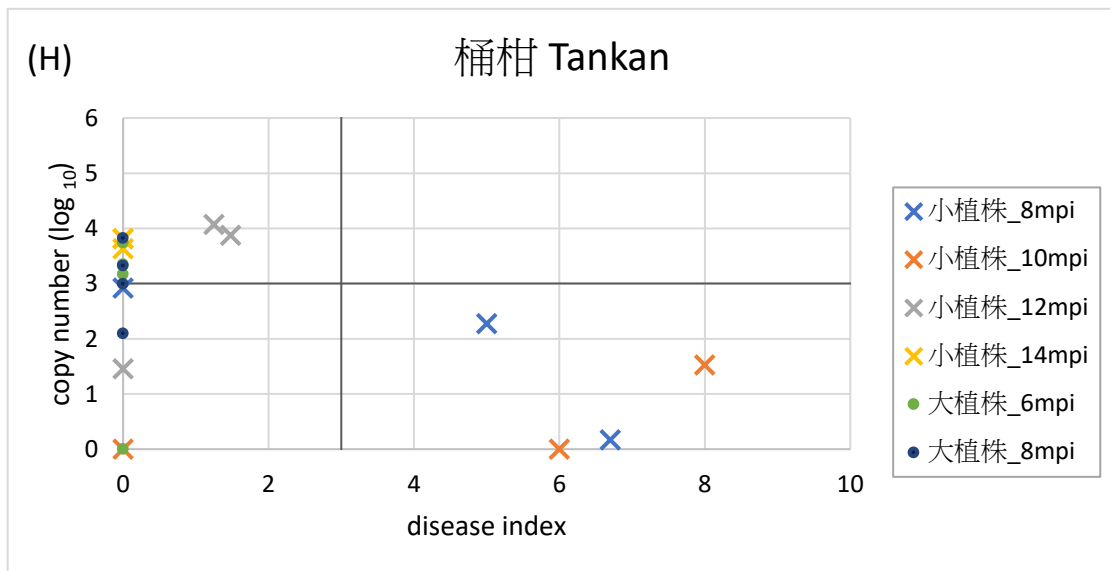
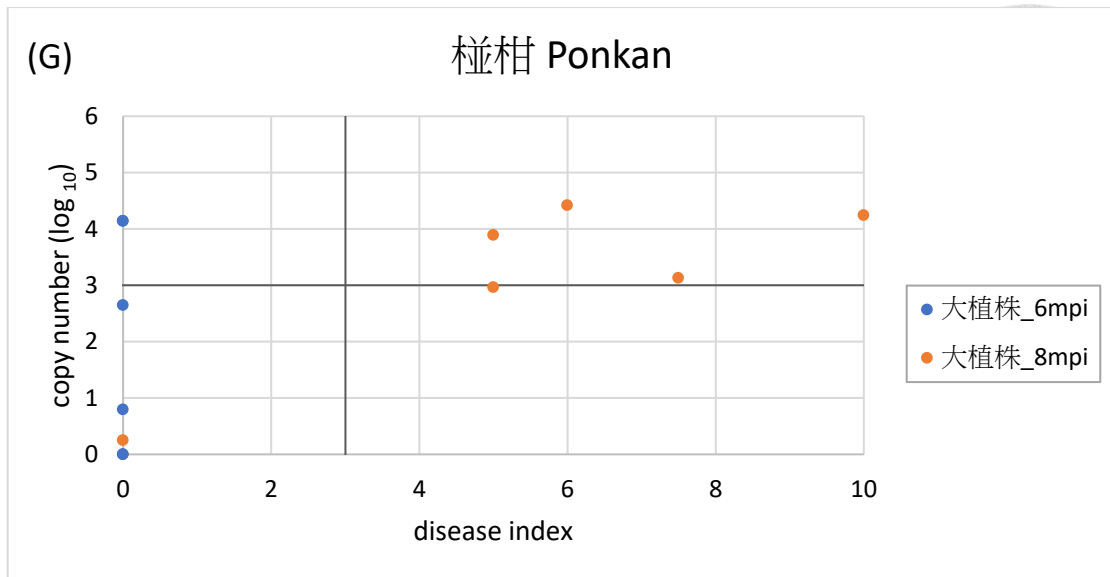
(i) Small plants were recorded at 14th mpi, and (ii) large plants were recorded at 8th mpi.

mpi: month post-inoculation



(續後頁) (Continued)





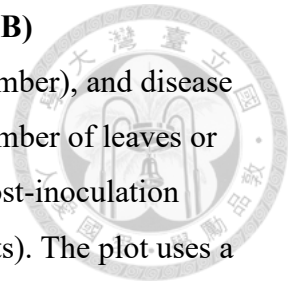
圖五、評估黃龍病之抗感病程度

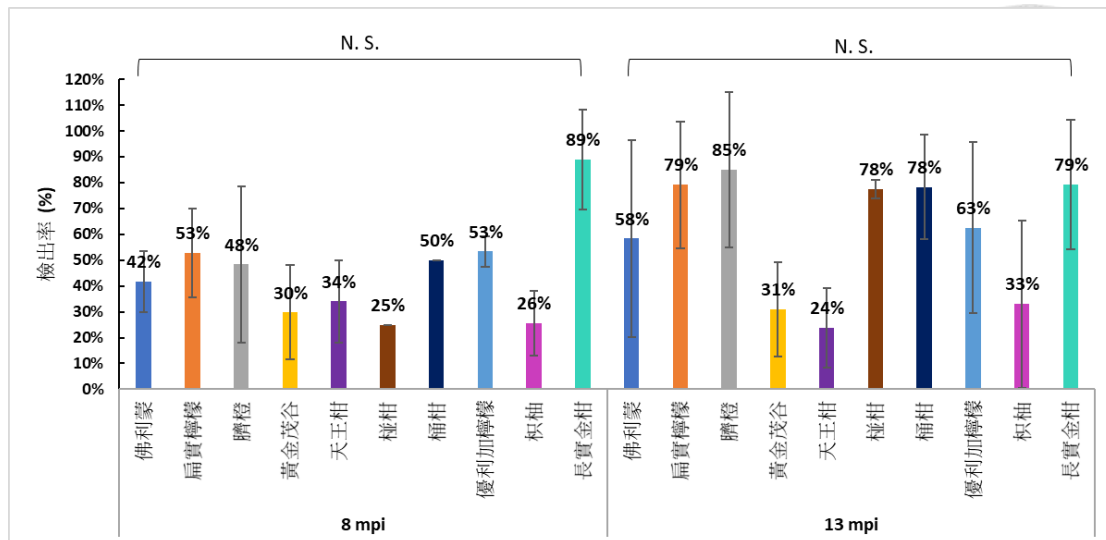
由菌量(copy number)及罹病嚴重度(有病徵的葉片或枝條數/所有葉片或枝條數)兩項參數所構成的散佈圖，呈現每棵植株在接種後期(小植株為接種後的第 8 至 14 個月；大植株為接種後第 6 至 8 個月)的分佈情形，並以菌量=3、罹病嚴重度=3 為界線，作為判斷黃龍病之感病程度的依據：兩個指標皆高於 3，屬於極度感病的範疇，其中一個指標小於 3，屬於中度感病的範疇，兩個指標皆小於 3，屬於耐病的範疇。綜合所有點的分布趨勢，判斷(A)佛利蒙、(B)扁實檸檬、(C)臍橙、(D)黃金茂谷、(E)優利加檸檬、(F)文旦、(G)椪柑、(H)桶柑等品種對黃龍病的感病程度。

Figure 5. Evaluation of the susceptibility to Huanglongbing (HLB)

A scatter plot composed of two parameters, CLas quantity (copy number), and disease index (number of leaves or branches with HLB symptoms / total number of leaves or branches), illustrates the distribution of each plant during the late post-inoculation period (8th to 14th mpi for small plants; 6th to 8th mpi for large plants). The plot uses a threshold of CLas quantity = 3 and disease index = 3 as a criterion to determine the degree of susceptibility to Huanglongbing: if both indicators are above 3, it falls into the category of extremely susceptible; if either one indicator is below 3, it is considered moderately susceptible, and if both indicators are below 3, it falls into the resistant category. By analyzing the overall trend in the distribution of all data points, the susceptibility level of (A) Fremont, (B) depressa, (C) Navel, (D) Ora, (E) Eureka, (F) Wentan, (G) Ponkan and (H) Tankan to Huanglongbing can be determined.

mpi: month post-inoculation





圖六、黃龍病菌在植株體內的檢出率

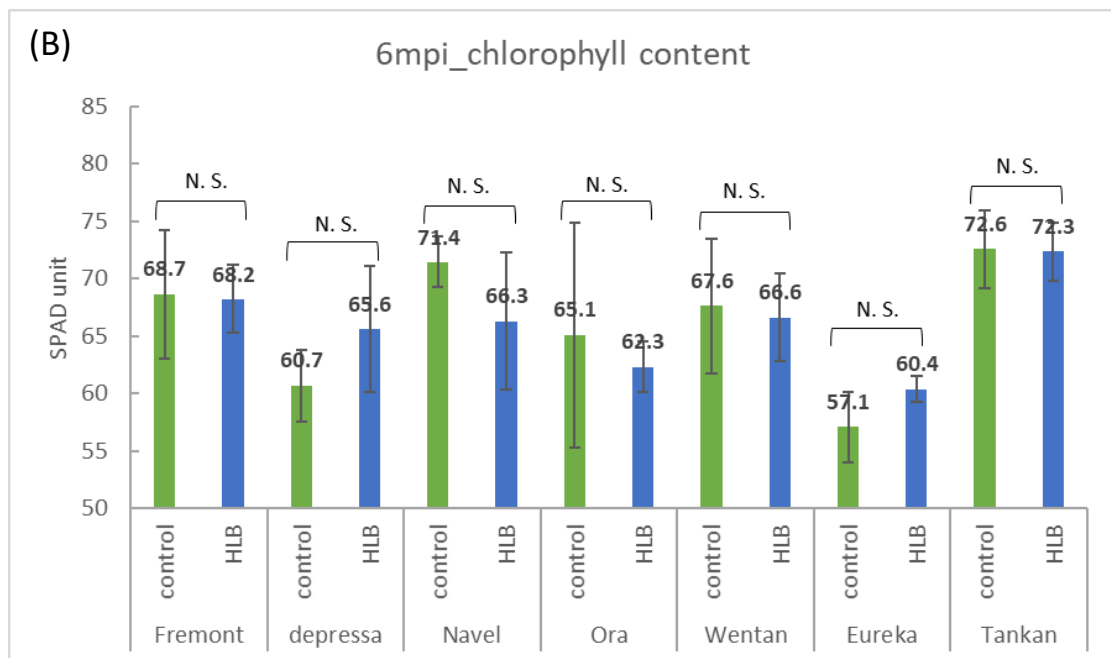
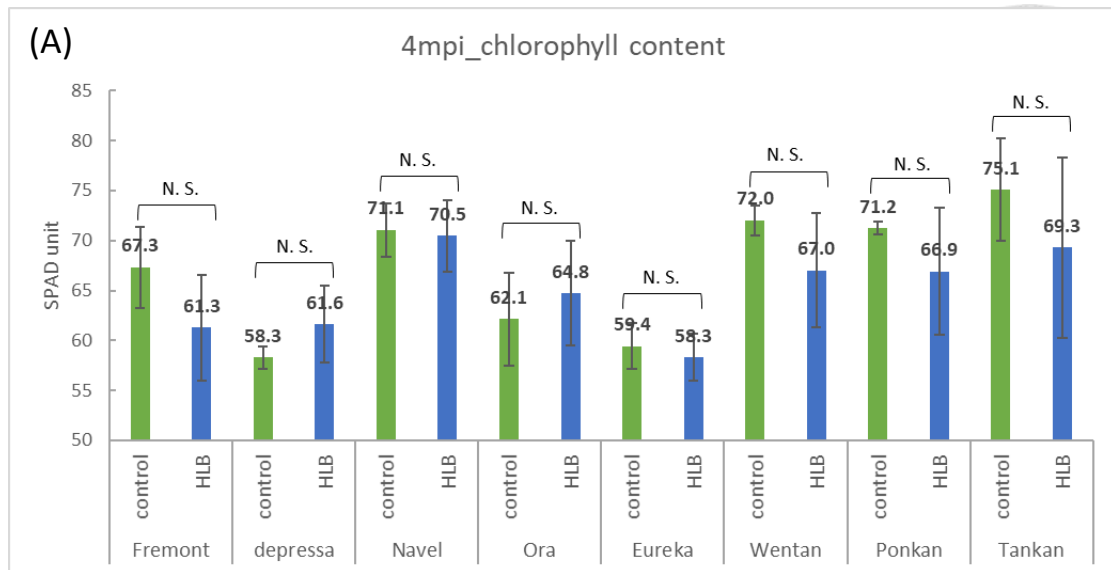
自接種點往上，於不同高度取葉片樣本進行 QPCR 檢測，並計算檢出率(有檢測到黃龍病菌的樣本數/總檢測樣本數)。採用無母數單因子檢定，並以 Dunn's test 進行事後檢定，判斷在相同時間點，品種間的黃龍病菌之檢出率是否具有顯著性差異($\alpha = 0.05$)。

Figure 7. The detection rate of CLAs in plants

Leaf samples were taken at different heights above the inoculation point for QPCR testing. The detection rate (number of samples with CLAs-positive / total number of samples tested) was calculated. A non-parametric one-way ANOVA was employed, followed by Dunn's test for post hoc analysis, to determine whether there are significant differences ($\alpha = 0.05$) in detection rate of CLAs among the varieties at the specific time.

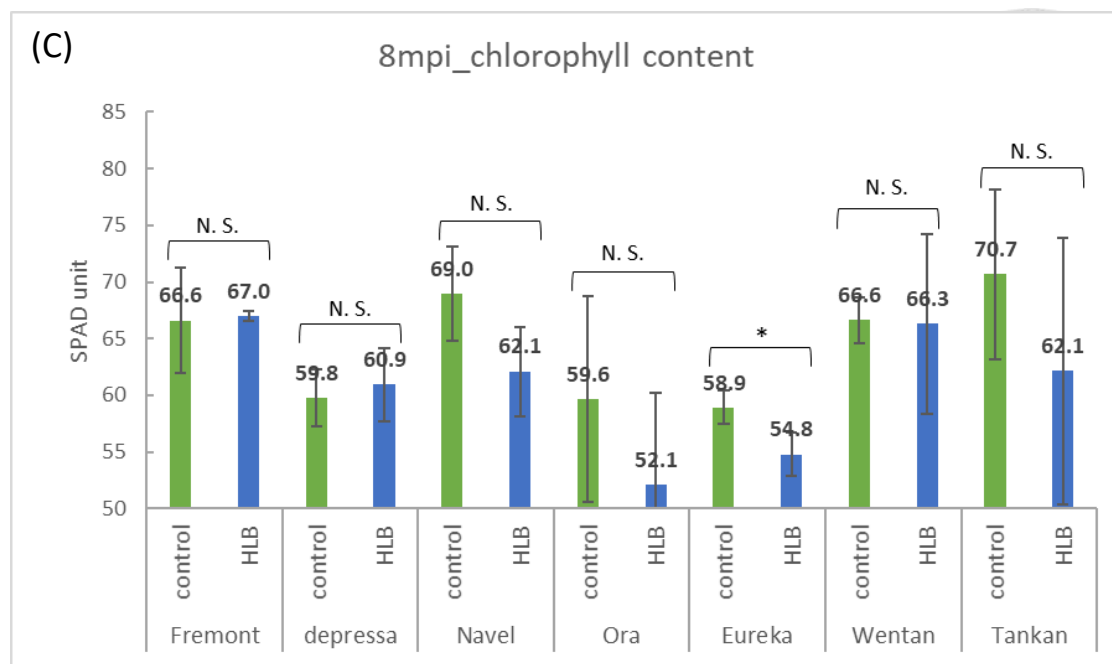
mpi: month post-inoculation

N. S. No significance



(續後頁)

(Continued)



圖七、黃龍病對葉綠素含量的影響

紀錄小植株組接種後(A)第四個月、(B)第六個月及(C)第八個月，葉片之葉綠素含量。利用雙樣本 T 檢定或 Wilcoxon 雙樣本檢定判斷接種組與健康對照組之間是否有統計上的顯著性差異($\alpha=0.05$)。

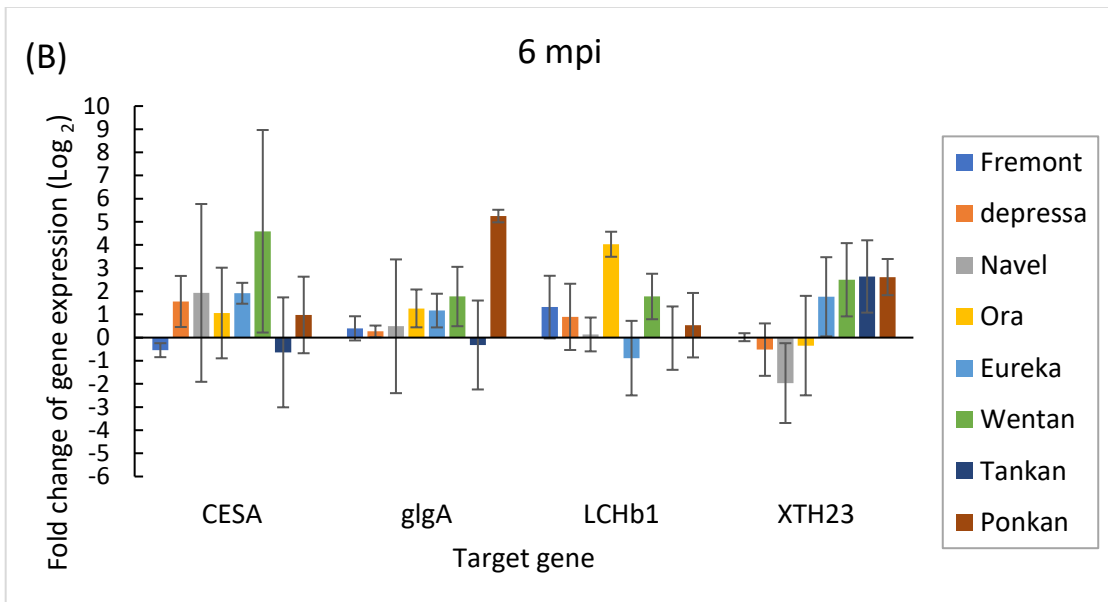
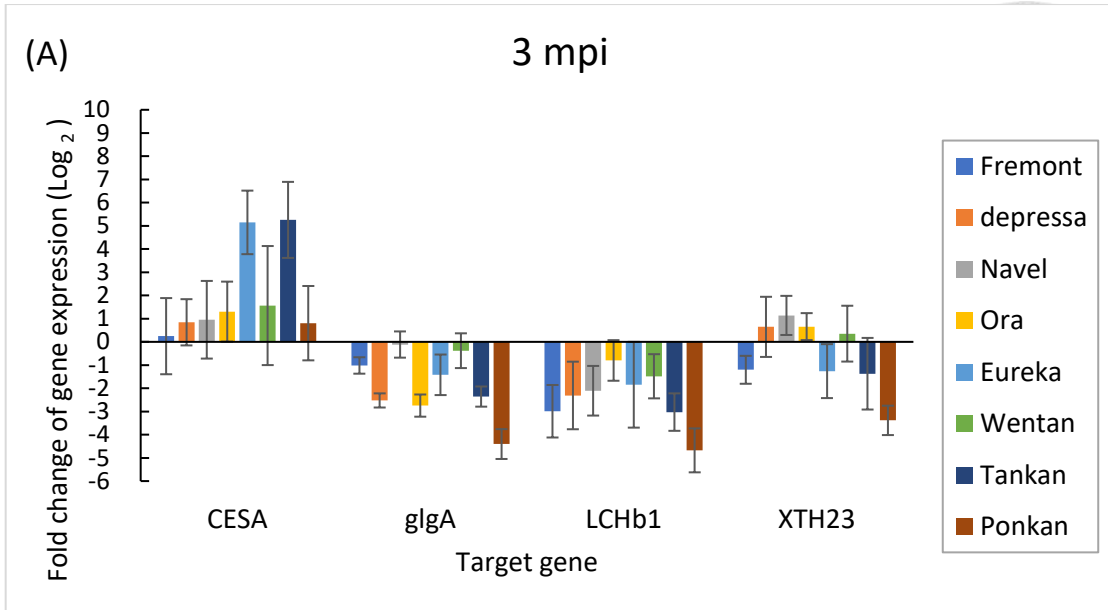
Figure 6. The impact of Huanglongbing on chlorophyll content

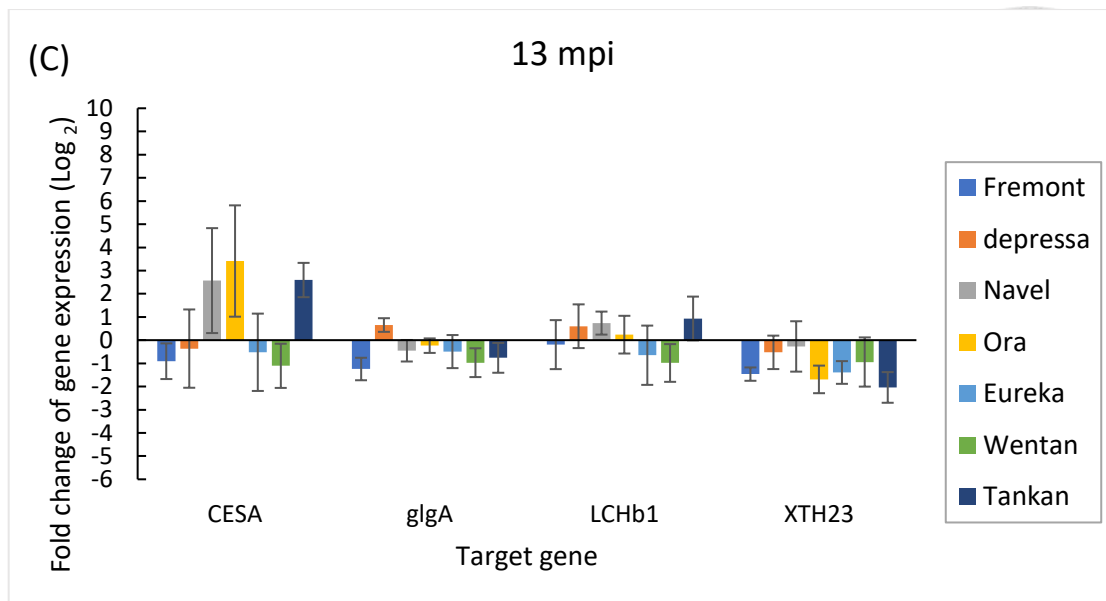
The chlorophyll content of leaves for the small plants at the (A) 4th mpi, (B) 6th mpi, and (C) 8th mpi. We utilized a two-sample t-test or Wilcoxon rank-sum test to determine if there are statistically significant differences ($\alpha = 0.05$) between the inoculated group and the healthy control group.

* $P < 0.05$

N. S. No Significance

mpi: month post-inoculation





圖八、溫室接種植株的基因表現量差異

小植株組接種後(A)第三個月、(B)第六個月及(C)第十三個月，以 rt-QPCR 量測四個目標基因之表現量，並以 GAPDH 基因作為參考基因，代入 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式，計算接種組之於對照組之相對基因表現量。

Figure 8. Differential expressed genes of Greenhouse-grown trees

At the (A) 3th mpi, (B) 6th mpi, and (C) 13th mpi for the small plants, the expression levels of four target genes were measured using rt-QPCR. GAPDH gene was used as a reference gene. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula was applied to calculate the relative gene expression levels of the inoculated group compared to the control group.

CESA: cellulose synthase A

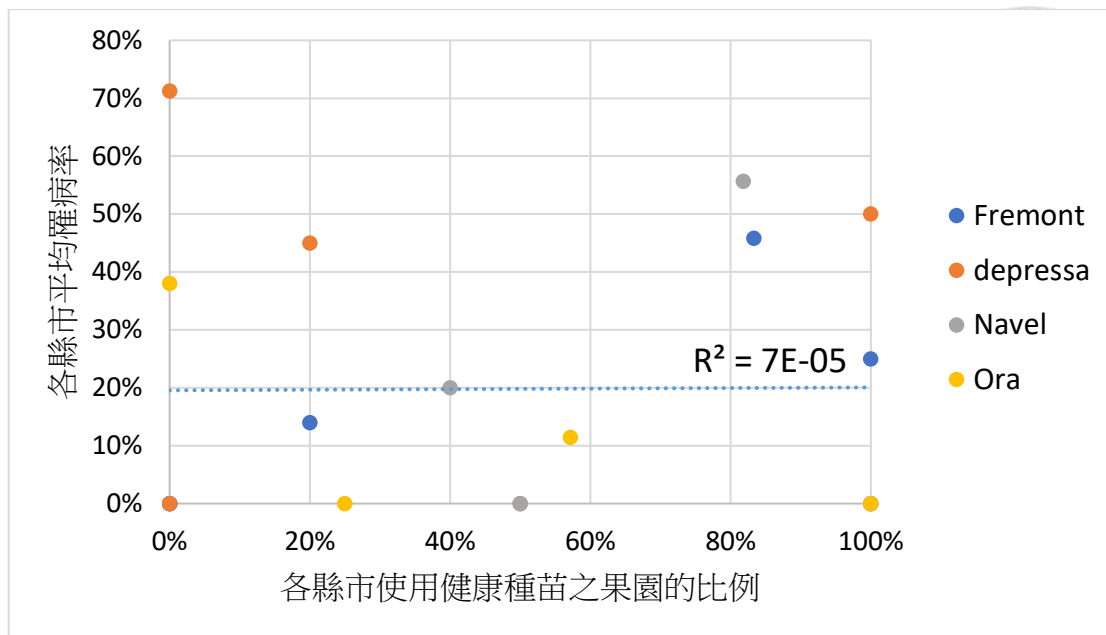
glgA: glycogen synthase

LCHb1: light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 1

XTH23: xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23

GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

mpi: month post-inoculation

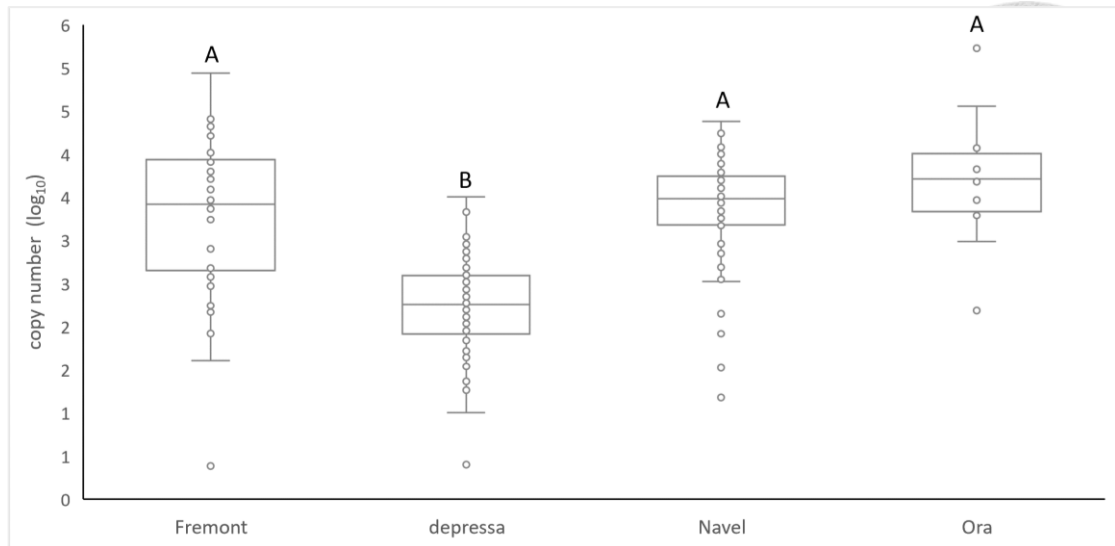


圖九、各品種於不同縣市之罹病率與健康種苗使用比例的相關性

將各品種於不同縣市的罹病率設為 y 軸、於不同縣市使用健康種苗的果園比例設為 X 軸，繪製散布圖，並計算相關性，所得決定係數(R^2 值)為 $7E-05$ 。

Figure 9. The correlation between disease incidence and the proportion of healthy seedling usage across different varieties and counties

The disease incidence for each variety in different counties were set as the y-axis, while the proportion of orchards using healthy seedlings in different counties was set as the x-axis. A scatter plot was generated, and the correlation was calculated, resulting in a determination coefficient (R^2 value) of $7E-05$.

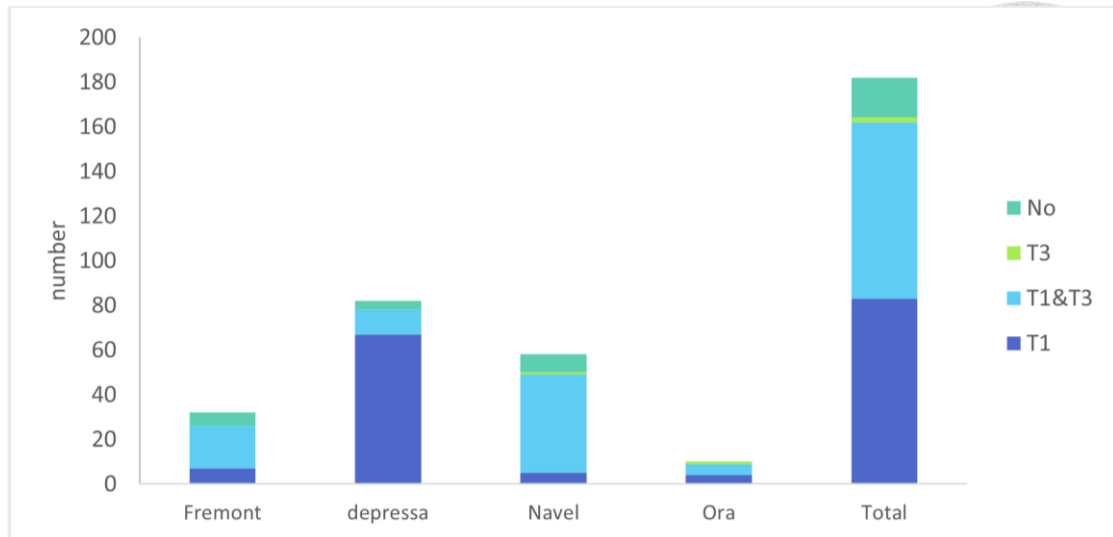


圖十、田間黃龍病罹病植株的菌量

傳統 PCR 檢測結果為陽性的樣本，以 QPCR 定量，依據不同品種繪製合鬚圖。在統計分析方面，採用無母數單因子檢定，並以 Dunn's test 進行事後檢定，判斷品種間的黃龍病菌量是否具有顯著性差異($\alpha=0.05$)，若為不同字母則表示兩者具有統計上的顯著差異($\alpha=0.05$)。

Figure 10. The quantity of CLAs in diseased trees from field survey

For positive samples in traditional PCR, quantitative PCR (QPCR) was conducted. Whisker plots were generated based on different varieties. In terms of statistical analysis, a non-parametric one-way ANOVA was utilized, followed by Dunn's test for post hoc analysis, to assess whether there were significant differences ($\alpha = 0.05$) in CLAs quantity among the varieties. If different letters were used, it indicated statistically significant differences between the two ($\alpha = 0.05$).



圖十一、不同柑橘品種上的黃龍病菌之原噬菌體種類

田間黃龍病陽性的樣本，以傳統 PCR 檢測是否有已知的三個原噬菌體存在(分別為 T1 prophage, T2 prophage 及 T3 prophage)，並依據不同品種進行計算。

Figure 11. Prophage types of CLAs on different cultivars

Field samples with CLAs-positive were subjected to traditional PCR to detect the presence of three known prophages (T1 prophage, T2 prophage, and T3 prophage). Calculation was performed based on different varieties.

No: Without any known prophage

T3: T3 prophage only

T1&T3: both T1 and T3 prophage

T1: T1 prophage only



拾、附錄表

附錄表一、柑橘苗之傳統 PCR 病原檢測的引子對

Appendix table 1. Primer pairs for traditional PCR pathogen detection in citrus seedlings

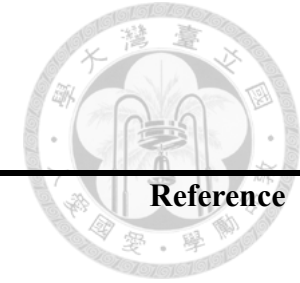
Target organism	Sequence (5'-3') of primer	Size (bp)	Reference
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> (CLas)	Fw: CACCGAAGATATGGACAACA Rv: GAGGTTCTTGTGGTTTTTCTG	226	(Hung et al., 1999b)
Citrus tristeza virus (CTV)	Fw: TTATGGACGACGAGACAAAGA Rv: CCAAGCTGCCTGACATTAGT	655	(Hung et al., 2000b)
Citrus tatter leaf virus (CTLV)	Fw: CGCTGTCGGTTTTGATACTCCAC Rv: TGCGGAATTTTAAACGACTCC	501	(張, 2012)
Citrus exocortis viroid (CEVd)	Fw: TTTCGCTGCTGGCTCCACA Rv: ACCTCAAGAAAGATCCCGA	196	(Lin et al., 2015)



附錄表二、黃龍病菌 Real-time PCR 定量所使用的引子對及探針

Appendix table 2. Primer pairs and probes for Real-time PCR in CLas quantification

Target organism, gene	Sequence (5'-3') of primer or probe	Reference
CLas, <i>secE</i>	Fw: 5'- AGGTTGGCTGTGTTAAATTTTTTAAAGCAA-3' Rv: 5'- ACAATAACCGAAACCAAAACCTCACT-3' Probe: 5'-FAM-ACGGCCAGAATATCTT-MGB-NFQ-3'	(田, 2009)
Plant 18S rDNA	Fw: 5'- GACTACGTCCCTGCCTTTG -3' Rv: 5'- AACACTTCACCGGACCATTCA -3' Probe: 5'-FAM- ACACACCGCCCGTCGCTCC-MGB-NFQ-3'	(Christensen et al., 2004)



附錄表三、 基因表現量測定所使用的引子對

Appendix table 3. Primer pairs for gene expression quantification

Gene name (symbol)	Gene ID	Sequence (5'-3') of primer	Reference
cellulose synthase A (<i>CESA</i>)	102616000	Fw: 5'- ACTGTCACATCAAAGGCAAC -3' Rv: 5'- CATCTGAGATACCGGCAAC -3'	(Hu et al., 2017)
Glycogen synthase (<i>glgA</i>)	102630022	Fw: 5'- ATGAGATACGGA ACTATAACCAG -3' Rv: 5'- ATCTTAATGCCGTCAACATGC -3'	Same as above
light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 1 (<i>LCHb1</i>)	107175516	Fw: 5'- TGGCGACTACGGTTGGGACAC-3' Rv: 5'- TCACCGAACTTGACTCCGTTG-3'	Same as above
xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23 (<i>XTH23</i>)	102625605	Fw: 5'- ATGGCTTCAGTATTGCATCT-3' Rv: 5'- TGGCCGTTGTTGAGTATATT-3'	Same as above
*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (<i>GAPDH</i>)	2597	Fw: 5'- GCGCTGACAATGAGCTGAAA-3' Rv: 5'- GGTACAGCAGAGGGTACTGT-3'	(Yan et al., 2012)

* internal reference gene

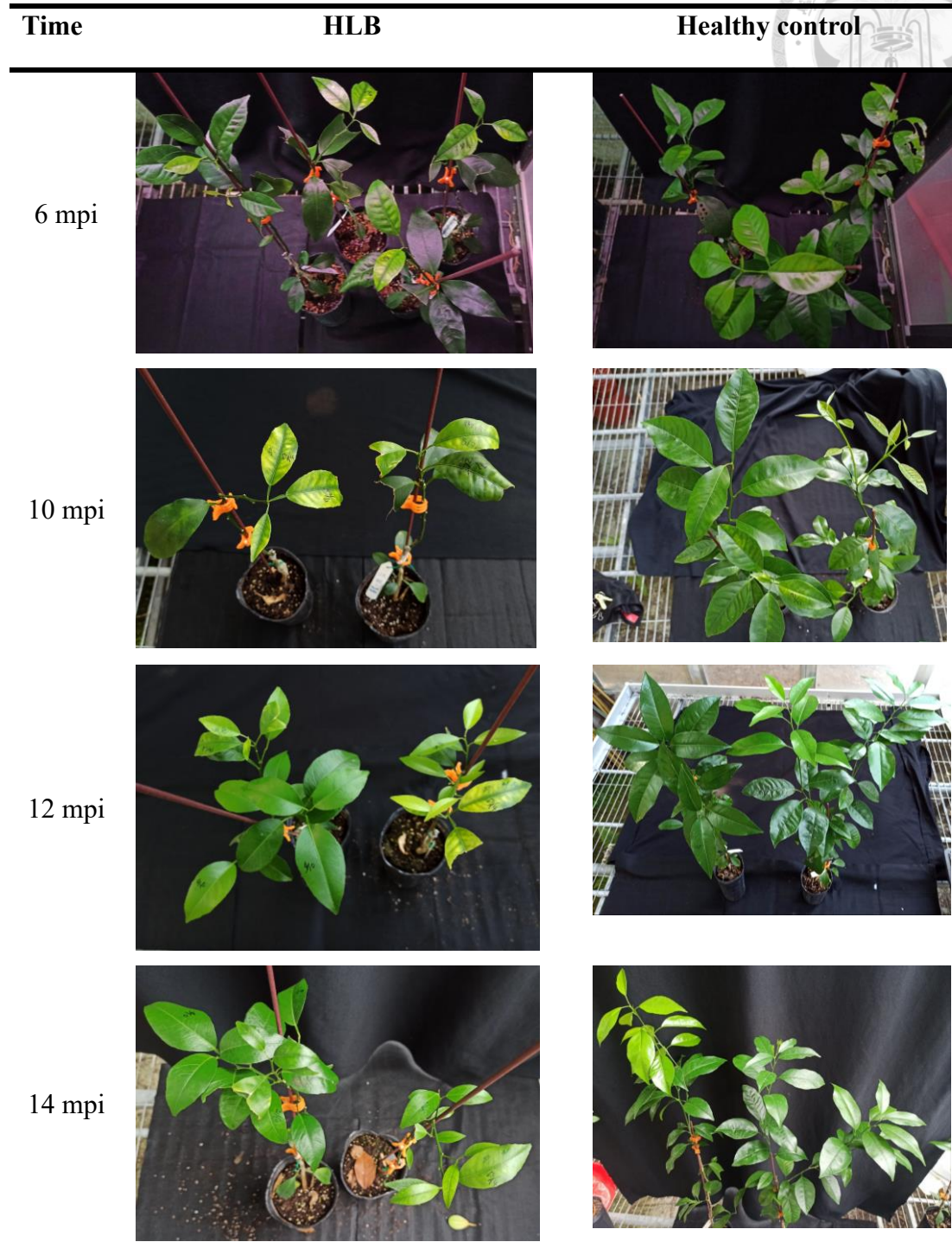


附錄表四、田間調查所使用的黃龍病罹病嚴重度與葉片病徵調查方式

Appendix table 4. The method used to record disease index and leaf symptoms in field survey

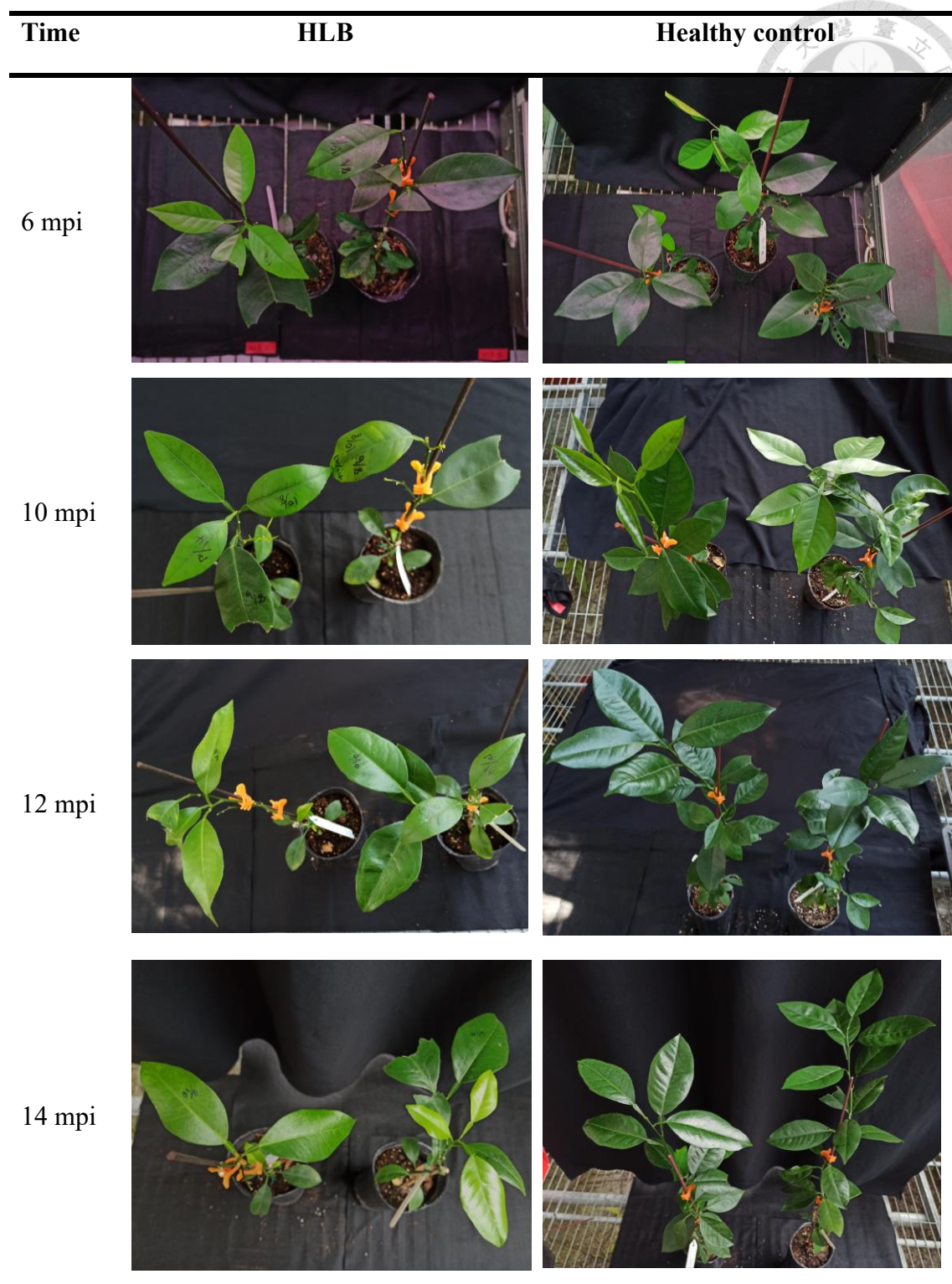
植株罹病嚴重度 (有病徵枝條數/總觀察枝條數) x 10	葉片病徵
	葉片對稱黃化斑駁
	葉片非對稱黃化斑駁
	葉脈木栓化
	葉片捲曲硬化
	新葉小葉化(兔子葉)

拾壹、 附錄圖



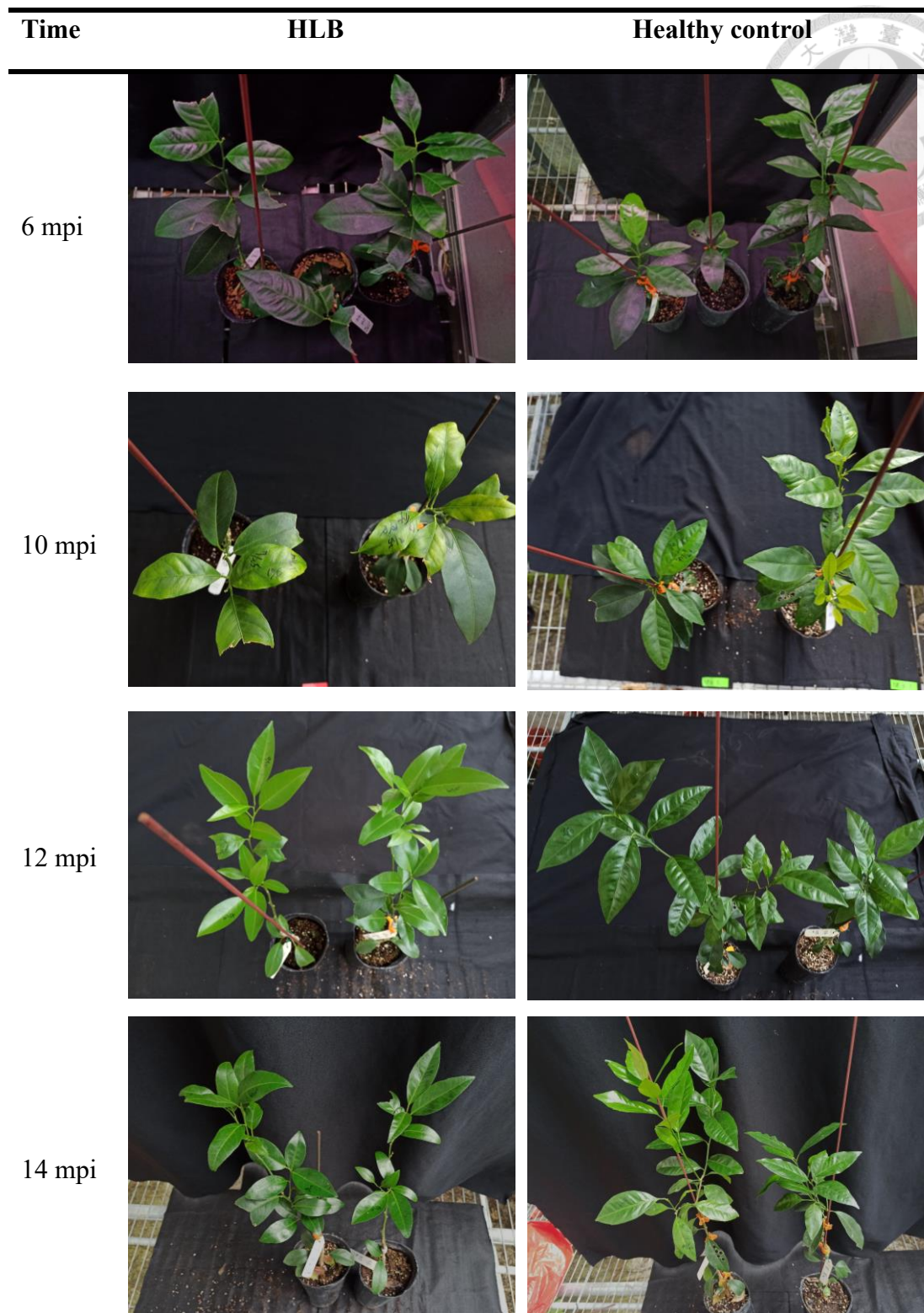
附錄圖一 A、黃金茂谷接種黃龍病後隨時間的病徵變化

Appendix Figure 1A. Symptom variation of Ora after HLB inoculation



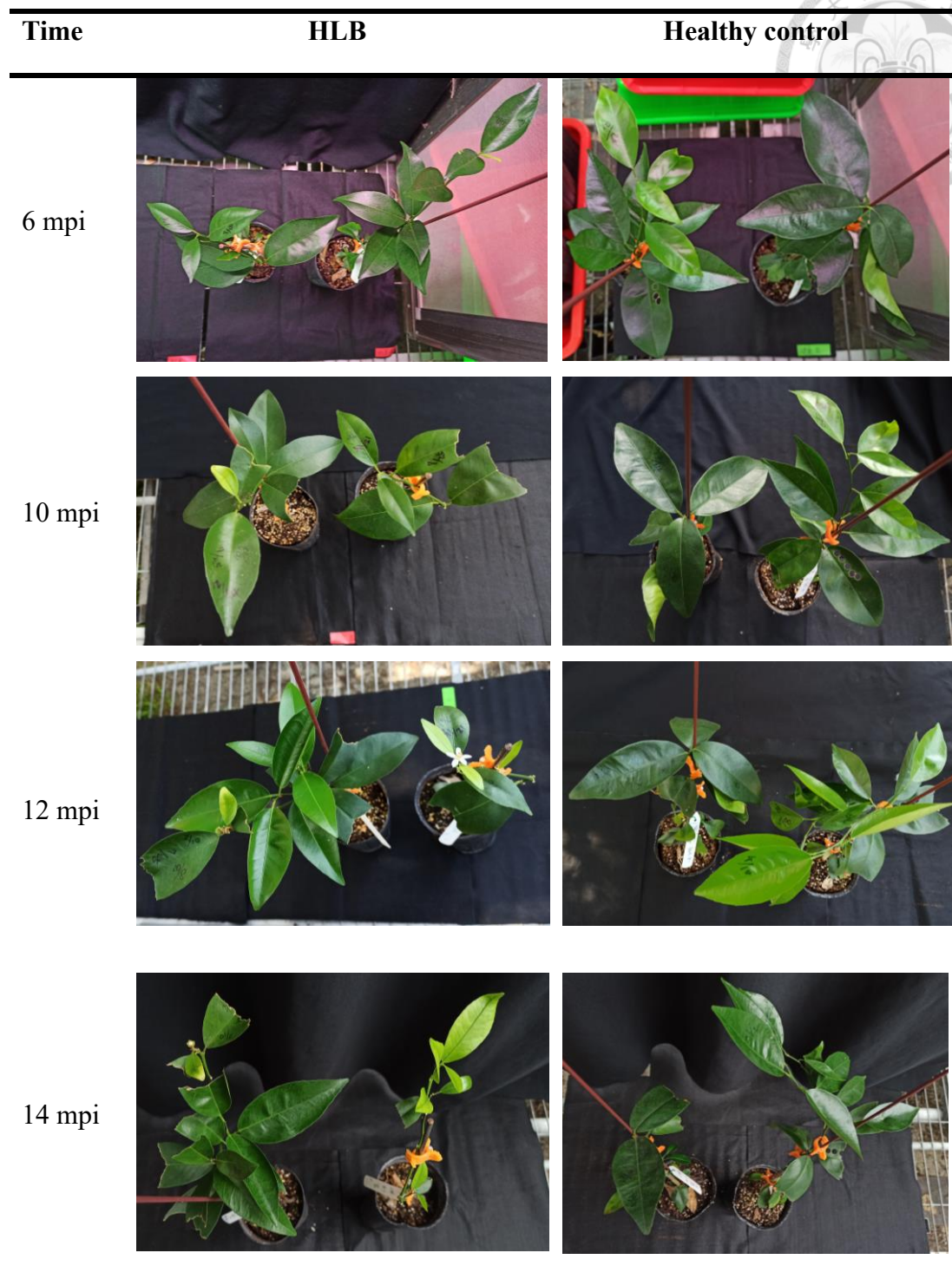
附錄圖一 B、臍橙接種黃龍病後隨時間的病徵變化

Appendix Figure 1B. Symptom variation of Navel after HLB inoculation



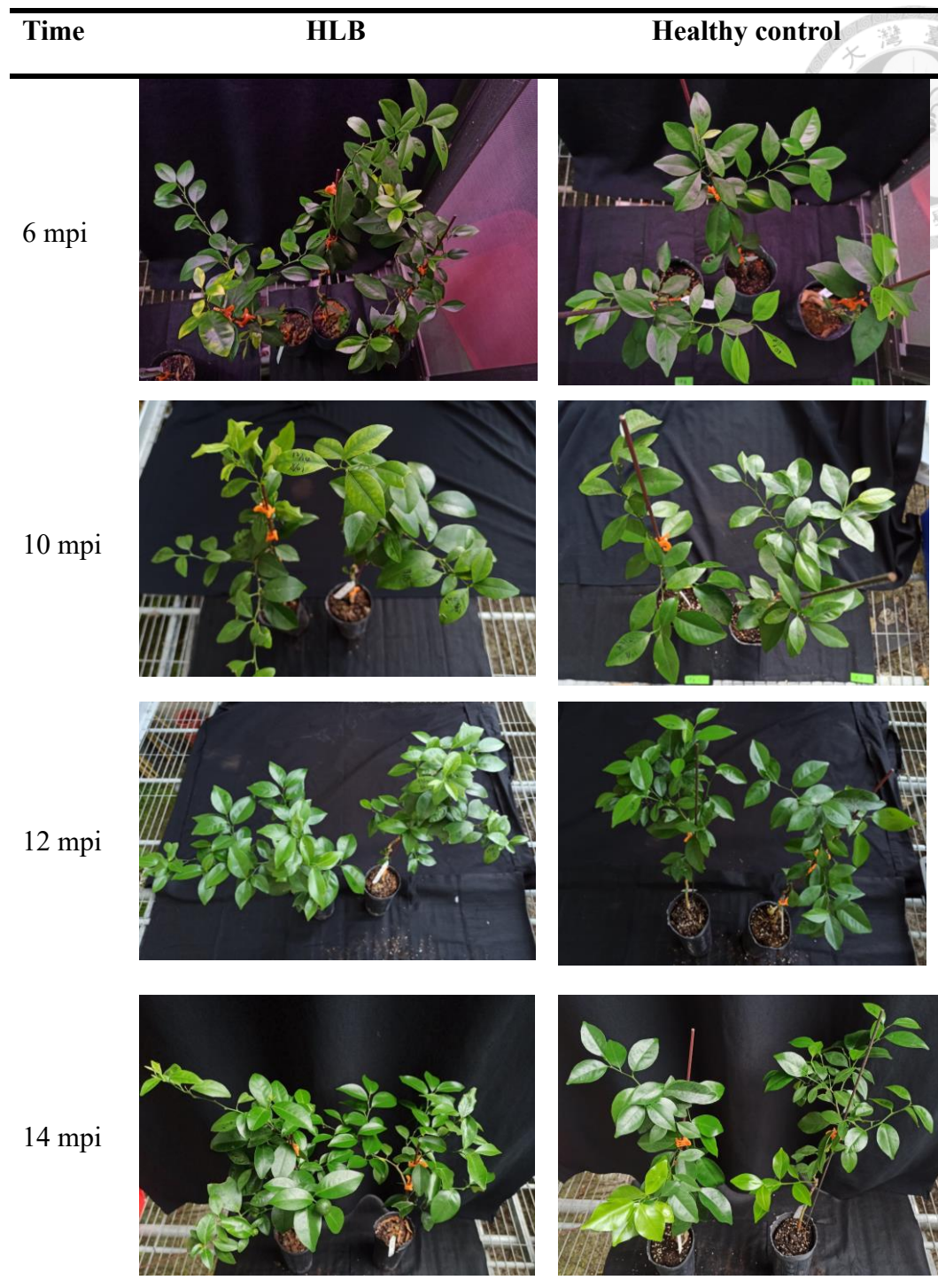
附錄圖一 C、桶柑接種黃龍病後隨時間的病徵變化

Appendix Figure 1C. Symptom variation of Tankan after HLB inoculation



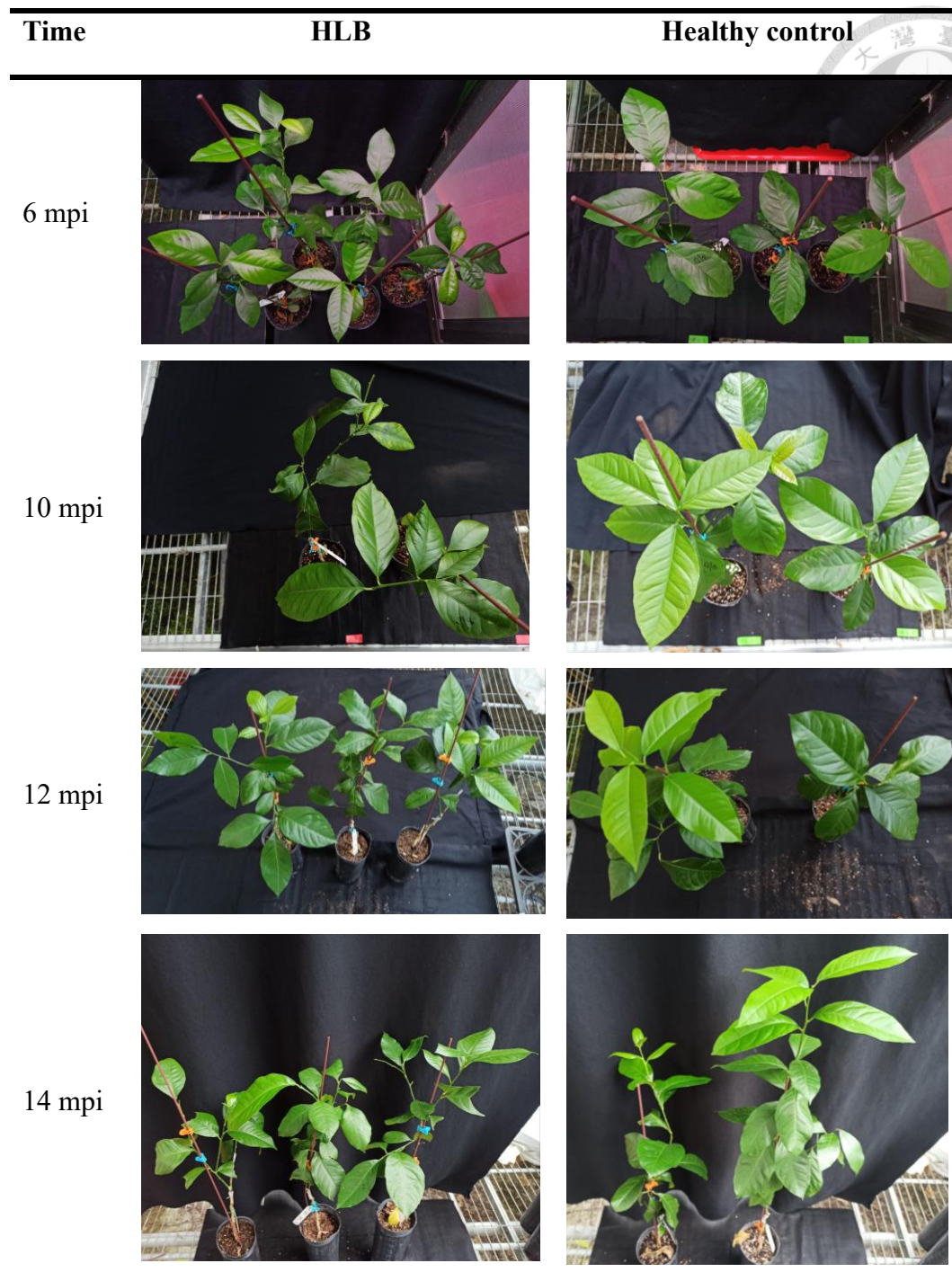
附錄圖一 D、佛利蒙接種黃龍病後隨時間的病徵變化

Appendix Figure 1D. Symptom variation of Fremont after HLB inoculation



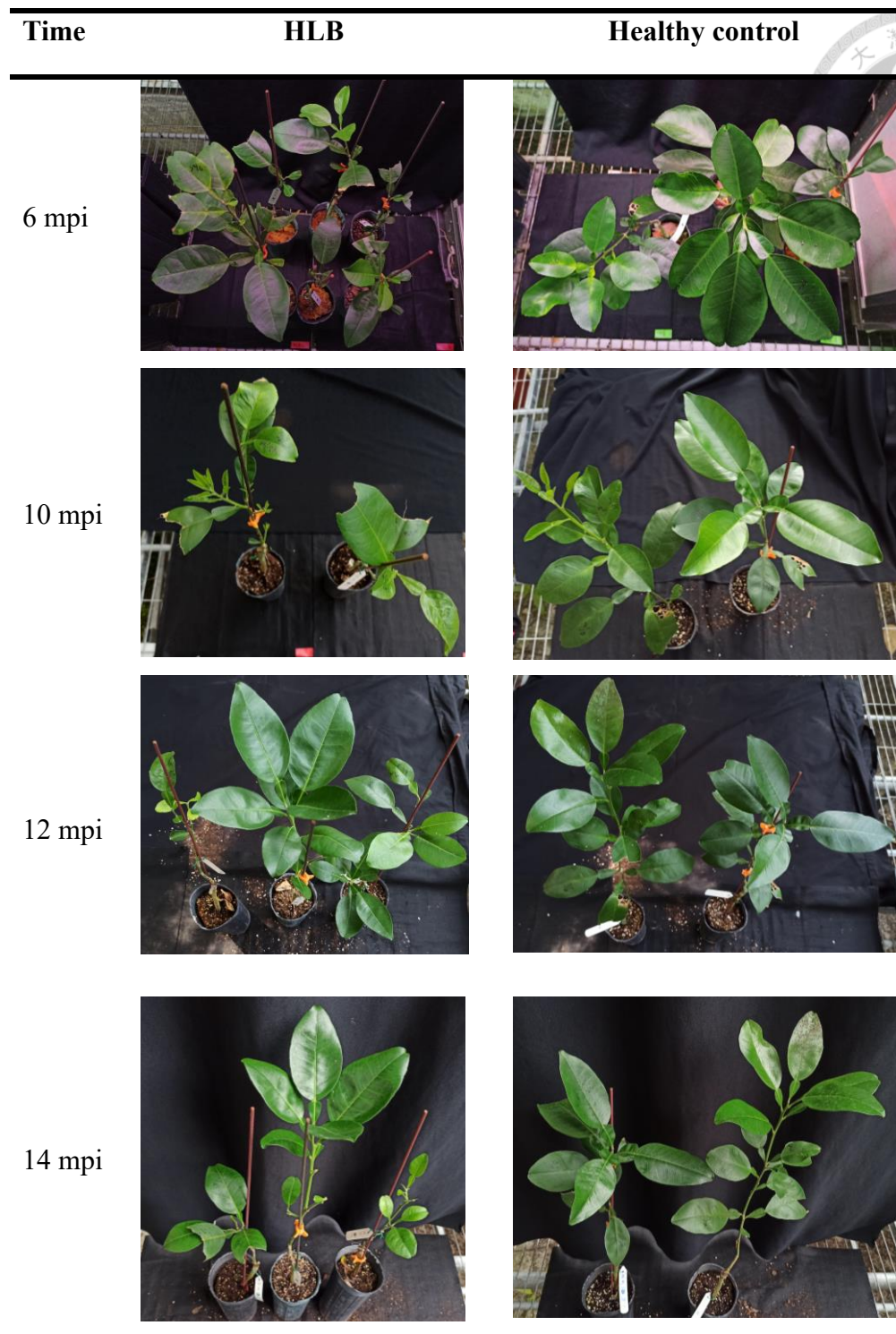
附錄圖一 E、扁實檸檬接種黃龍病後隨時間的病徵變化

Appendix Figure 1E. Symptom variation of depressa after HLB inoculation



附錄圖一 F、優利加檸檬接種黃龍病後隨時間的病徵變化

Appendix Figure 1F. Symptom variation of Eureka after HLB inoculation



附錄圖一 G、文旦接種黃龍病後隨時間的病徵變化

Appendix Figure 1G. Symptom variation of Wentan after HLB inoculation



(續後頁) (Continued)



附錄圖二、黃龍病菌分布試驗的植株於接種後一年半的生長情形

Appendix Figure 2. Growth status of plants from the CLas distribution trial one and a half years after inoculation