

柑桔病害檢測試劑套組


柑桔類為世界上重要之水果種類，也是國際間農產品貿易的主要項目之一。柑桔無論在栽培面積及產量上仍是台灣最重要的果樹產業，柑桔栽培地區遍布全台各地，病蟲害防治較其他作物複雜且困難，又其主要以無性繁殖為主，容易受到多種系統性病原(systemic pathogens)的感染危害。台灣重要柑桔系統性病原包括黃龍病病菌(*Candidatus Liberibacter asiaticus*)、柑桔萎縮病毒(*Citrus tristeza virus*)、柑桔破葉病毒(*Citrus tatter leaf virus*)與柑桔鱗砧次病毒(*Citrus exocortis viroid*)等，這類病原入侵寄主後往往形成植株之系統性感染(Systemic infection)，病原可分布於植株各部位之組織中，甚至隨無性繁殖經帶病種苗傳播而形成全面的感染，不但嚴重妨礙柑桔類的生長，且因無有效防治之藥劑，植株一旦被感染發病，則會導致產量低、果實品質差、壽命短，而無經濟價值。生產及種植健康種苗是目前防治這些病害的主要方式，因此，確保柑桔種苗健康，並能及早發現病害予以適當防治，是目前柑桔生產的重要工作。

柑桔重要系統性病害

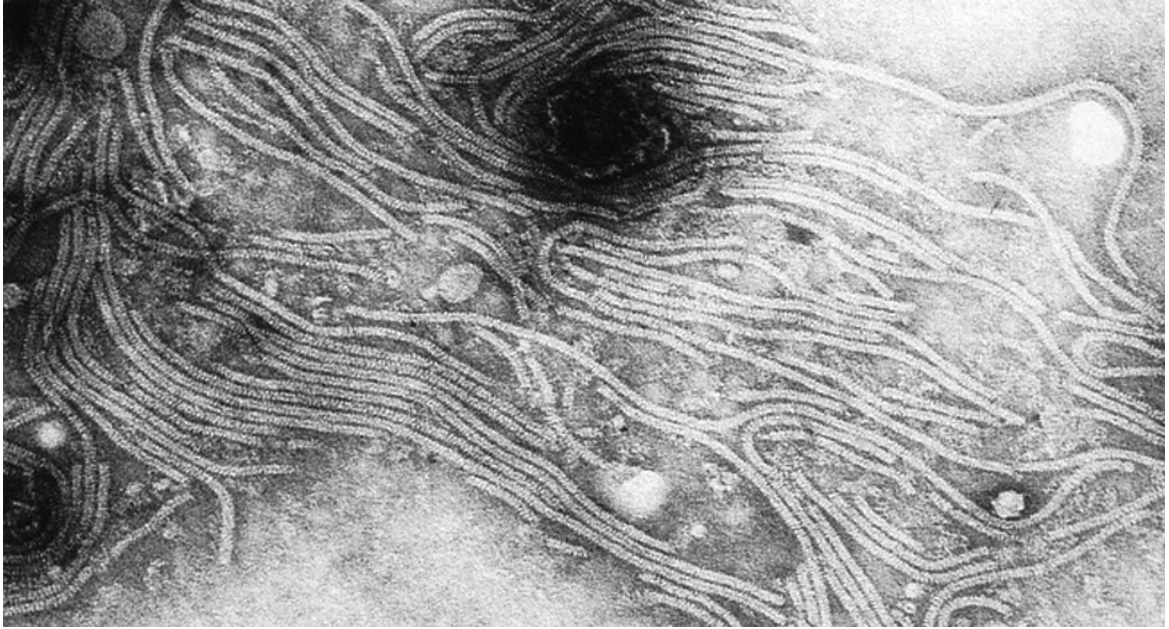
柑桔黃龍病(citrus Huanglongbing = citrus greening)是台灣最重要的柑桔病害，柑桔一旦感染黃龍病易造成植株無法行光合作用而枯死。本病於1943年首次在中國發生，因罹病柑桔接穗有生長黃化之現象，爰以黃龍病稱之。自

1951年開始台灣之柑桔亦嚴重發病，近1/3的柑桔園都受到危害，對柑桔產業構成極大威脅。

柑桔萎縮病由柑桔萎縮病毒所引起，可由蚜蟲(主要是大桔蚜)傳播，全世界柑桔皆普遍受其危害，是柑桔最重要的病毒病害之一。其所引起的病徵因病毒的系統、柑桔的品種及砧木的組合因素而不同。受害嚴重的植株會產生黃化、植株與果實萎縮、嚴重的木質部凹陷等病徵；危害較輕者雖外表病徵不明顯，但仍會影響植株的發育與果實的產量，造成果實因缺乏水分致品質口感不



柑桔罹染黃龍病造成
植物無法行光合作用
而枯黃甚至枯死



柑桔萎縮病毒 (*Citrus tristeza virus*)，長絲狀

佳。柑桔萎縮病鑑定不易，除潛伏期長外，亦易與其他生長障礙因子混淆。

柑桔破葉病由柑桔破葉病毒引起，對多數之柑桔類及不同品種造成潛伏感染，通常無病徵；但感染枳橙時，葉片則會產生萎縮、畸形、斑紋及破裂等病徵。在枳橙枝條有時出現鋸齒型扭曲。經濟品系柑桔嫁接於枳殼或枳橙時，則明顯出現接合部鼓起摺裂縫，於強風時易在此部位斷裂。

柑桔鱗砧病由柑桔鱗砧次病毒所引起，罹病植株砧木之樹皮膨大、縱裂 (bark shelling)、成鱗片狀脫皮 (bark sloughing)，嚴重時阻礙植株發育，引起樹勢矮化 (stunting)。惟此病因柑桔之品種不同所造成的危害也有所差異。在以感病品種如枳殼、枳橙或廣東檸檬為砧木時，會出現病徵。其他如甜橙、椪柑、桶柑及酸桔屬抗病品種，則未出現明顯病徵。

目前防治這些柑桔系統性病害的主要方式是生產及種植無病原種苗。若種苗遭受該等疫病之侵染，輕則生長遲緩，無法順利開花結果或影響品質，嚴重時則植株死亡，造成重大損失，且帶有病原之種苗將成為田間首次感染源，大面積的種植傳播後影響層面增廣，損失更大。因此，確保所生產的種苗健康至為重要。

柑桔無指定疫病蟲害種苗驗證制度

世界上主要柑桔生產國家或地區，如美國的加州與佛州、巴西、南非、澳洲、西班牙及以色列等，均利用柑桔的健康種苗制度以防止重要疫病傳播。農委會為防止柑桔特定疫病藉由種苗傳播蔓延，自民國 70 年起即推動柑桔健康種苗繁殖制度，於農業試驗所嘉義分所 (以下簡稱嘉義分所) 建立原種園，收集保存優良母樹 (原種樹、採穗樹)，透過

去病原化與定期檢定以獲取健康無病之植株，再大量繁殖接穗供應給苗圃。

動植物防疫檢疫局於 93 年底頒布「柑桔無指定疫病蟲害種苗驗證作業須知」，分別對原種園、採穗園與嫁接苗繁殖圃等之設置與管理方式，以及該等柑桔園圃之設備及工具消毒等提出明確規範，以供業者遵循。於檢查程序與方法上，亦針對不同園圃訂定其採樣數量及檢查間隔時間等。

為利於柑桔無指定疫病蟲害種苗驗證業務執行，嘉義分所為受理機關，負責申請案之受理及發證事宜；並委託各區農業改良場為檢查機關，負責繁殖圃之設置、操作管理及種苗查驗等工作；同時由國立台灣大學植物病理與微生物學系（以下簡稱台大植微系）、農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所（以下簡稱鳳山分所）與嘉義分所為檢驗機關，負責病原之檢驗工作。業者填具申請書並繳交檢查費，向受理機關提出驗證申請。受理機關將查驗結果通知業者，符合規定之種苗，予以核發證明書。透過種苗驗證制度之施行，除提升柑桔種苗及其產品品質外，亦促進我國柑桔產業升級。

快速檢測試劑套組研發

健康種苗是目前防治上述該等病害的主要方法，但是帶有病原體的種苗如僅是潛隱性感染 (Latent infection)，在外觀上未顯現任何癥狀，則易被誤認為健康無病苗，致使病原隨種苗傳播蔓延，引發更嚴重問題。因此，柑桔健康種苗制度之推展需搭配敏感且正確的鑑

定技術，以根絕上述重要的柑桔系統性病原，並協助田間再感染情況之追蹤。

目前較迅速的偵測方法是利用單元抗體以酵素連結免疫分析 (ELISA) 法作偵測，但是仍約需時 2 天。聚合酶鏈反應 (PCR) 及反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR) 偵測法是最敏感的方法，但是步驟較為繁瑣且費用高。另可用墨西哥萊姆 (Mexican lime)、尤利佳檸檬 (Eureka lemon)、酸橙及廣東檸檬苗等指示植物進行生物檢定，雖然無需額外儀器，但是需要花費較長時間，且亦非明確易判。由於柑桔果農並不易依上述方法自行檢測，故於發現柑桔疑似感染黃龍病、萎縮病和破葉病時，都送至台大植微系、嘉義分所或鳳山分所等國家認可的學術研究單位進行檢測。

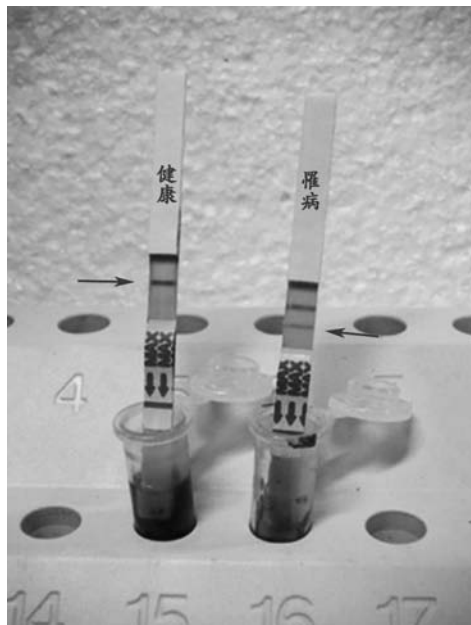


柑桔萎縮病毒膠金抗體檢測試劑組，包含試紙條、萃取緩衝液、研磨棒與小試管等

有鑑於此，農委會特別委託台灣大學針對柑桔黃龍病菌、萎縮病毒、破葉病毒等系統性病害進行各種快速診斷試劑之研發，包括聚合酶鏈反應、酵素連結免疫分析、核酸雜合 (nucleic acid hybridization)、微陣列晶片 (microarray) 與膠金抗體試劑 (colloidal gold-antibody probe) 等。其中以膠金抗體試劑的研發最受矚目，它是以免疫金 (immunogold) 技術為平台，成功開發出結合色層分析與免疫技術之快速檢驗試劑。由於免疫金技術是利用金顆粒表面的負電荷與蛋白質的正電荷基團靜電吸附而形成牢固物理結合，並通過抗原抗體特異性結合，不需經過任何儀器，即得到明顯易辨的鑑定結果，且幾乎不會與組織細胞發生吸附作用，具有很高的專一性。

以柑桔萎縮病毒膠金抗體檢測試劑組為例，包含試紙條、萃取緩衝液、研磨棒與小試管等。檢測時僅需摘取待測的葉片樣本約 0.5 克，放入小試管內，加入 1 毫升萃取緩衝液，以研磨棒磨出汁液，並於檢測時將樣品研磨液點滴於測試區，樣品液體會依毛細現象往判讀區移動，並回溶抗體與訊號產生體之結合物，當樣品中含有欲測試之抗原時，則會在判讀區顯現出可以肉眼判讀之訊號。約 5 分鐘即可判

定結果，如出現兩條帶為陽性，出現一條帶則為陰性。因此，本試劑組具有簡便快速，特異性強、敏感性高，肉眼即可判讀，結果易於保存，無需特殊儀器設備等優點，未來本試劑組在技術移轉並商品化量產後，即可讓果農自行進行檢測，亦利於研究人員進行田間再感染情況之追蹤與流行病學研究。



將試紙條放入樣本萃取液內，約 5 分鐘可判讀結果，出現兩條帶者為陽性 (罹病)，出現一條帶者為陰性 (健康)

結語

在推動產業國際化之經濟環境下，台灣水果市場愈來愈開放，水果銷售市場之競爭亦愈趨激烈，如近年來美國甜橙及葡萄柚等進口已逐年增加。所幸，台灣的柑桔生產環境、生產技術及品種均極具特色，在品種上則椪柑、柳橙、桶柑、文旦等均具有本土特殊風味，故與國外品種有所區隔。柑桔產業未來主要策略即是朝向永續發展與品

種多樣化，因此，對這些栽培過程中影響生產至鉅的重要病害之診斷與防治益顯其重要性。上述試劑之研發成功，除對防疫檢疫人員於進行柑桔病害偵測時可提供正確且快速的鑑定外，亦能提供一般果農自行檢測，及早發現疫情予以控制，對我國柑桔健康種苗管理及柑桔產業甚有助益。🌿