台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.71 No.2 2022

Research Articles

87 Establishment of the Early Prediction Model of Water Deficit Stress for Cherry Tomato Using Hyperspectral Data

Yuan-Kai Tu, Han-Wei Chen, Min-Kun Chi, Shih-Lun Fang, Min-Hwi Yao, and Bo-Jein Kuo

101 Improvement of Wide-Spectrum Detection of Different Potyviruses Infecting Passion Fruit by the Mixture of Two Kinds of Polyclonal Antibodies Against East Asian Passiflora Virus

Chin-Chih Chen, Fen-Lang Chiang, Ying-Huey Cheng, and Jia-Yi Liao

123 Study on Detection Methods of Rice Pollen Viability

Chi-Ni Hsia, Shuen-Chi You, Chin-Yi Tsao, Yong-Jie Su, and Charng-Pei Li

135 Occurence of Grape Ripe Rot in Taiwan and the Pathogenicity and Phylogenetic Relationship of Its Primary Causal Agent *Colletotrichum viniferum*

Chu-Ping Lin, Chih-Li Wang, Jyh-Nong Tsai, Yu-Lun Dai, Pao-Jan Ann, Yue-Mei Zhan, and Shun-Yuan Huang

159 Detection of Fipronil, Acetamiprid, Dimethomorph and Tebuconazole Residues in Agricultural Samples with Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Shu-Chen Chang, Hsuan Shentu, Ching-Hua Kao, Shu-Chin Lo, and Ming-Yao Chiang

Short Communication

171 *De novo* Genome Assembly of the *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* by Using the Nanopore-Based DNA Sequencing Technology

Yuan-Kai Tu, Chia-Hsin Tsai, Yen-Chun Lin, Po-Chun Ou, and Han-Wei Chen

ISSN 2790-086X

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究 JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH Vol.71 No.2 2022

ISSN 2790-086X
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.71 No.2 2022

研究報告

87 利用高光譜資料建立小果番茄缺水逆境早期預測模型

杜元凱、陳涵葳、紀銘坤、方士倫、姚銘輝、郭寶錚

101 混合兩種百香果病毒 East Asian Passiflora Virus 多元抗體以提升百香果不同馬鈴薯Y屬病毒之廣效性檢測

陳金枝、江芬蘭、鄭櫻慧、廖家翌

123 水稻花粉活力檢測方法研究

夏奇鋸、游舜期、曹進義、蘇永傑、李長沛

135 台灣葡萄晚腐病發生調查及其主要病原 *Colletotrichum viniferum* 之病原性與親緣關係

林筑蘋、王智立、蔡志濃、戴裕綸、安寶貞、詹月梅、黃順源

159 應用直接競爭型酵素免疫分析法檢測農產品中芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利之殘留

張淑貞、申屠萱、高靜華、羅淑卿、江明耀

研究簡報

171 應用奈米孔定序平台進行蝴蝶蘭褐斑病菌基因體 *de novo* 組裝之研究

杜元凱、蔡佳欣、林彥君、歐柏均、陳涵葳

行政院農業委員會農業試驗所出版

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH Vol.71 No.2 2022

《台灣農業研究》編審會

總編輯

謝廷芳／農業試驗所植物病理組

領域主編 (按筆劃序)

王強生／國立中興大學農藝學系
古新梅／國立中興大學農藝學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
呂秀英／苗栗區農業改良場
杜宜殷／國立台灣大學園藝暨景觀學系
林彥蓉／國立台灣大學農藝學系
林慧玲／國立中興大學園藝學系
侯豐男／國立中興大學昆蟲學系
陳右人／國立台灣大學園藝暨景觀學系
陳世銘／國立台灣大學生物產業機電工程學系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
張永和／私立靜宜大學食品營養系
張瑞璋／農業藥物毒物試驗所
莊愷瑋／國立嘉義大學農藝學系
郭寶錚／國立中興大學農藝學系
黃炳文／國立中興大學應用經濟學系
黃振文／國立中興大學植物病理學系
黃裕銘／國立中興大學土壤環境科學系
黃肇家／農業試驗所作物組
楊正澤／國立中興大學昆蟲學系
楊純明／私立明道大學精緻農業學系
路光暉／國立中興大學昆蟲學系
鄒裕民／國立中興大學土壤環境科學系
劉力瑜／國立台灣大學農藝學系
蔡致榮／農業試驗所
鍾文鑫／國立中興大學植物病理學系
顏國欽／國立中興大學食品暨應用生物科技學系

英文主編 (按筆劃序)

王寅東／美國德州農工大學
張宗仁／美國喬治亞大學
楊景程／美國佛吉尼亞理工大學
鍾光仁／國立中興大學植物病理學系

邀請領域主編

葉信宏／中央研究院農業生物科技研究中心

編輯助理

王立蓉／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
王紫瑜／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

編輯顧問

陳烈夫／農業試驗所技術服務組

台灣農業研究

第七十一卷　第二期　　中華民國一一一年六月三十日

出版者　行政院農業委員會農業試驗所
發行人　林學詩
總編輯　謝廷芳
地址　413008 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　https://www.tari.gov.tw/jtar
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　https://www.ipress.tw/J0042

編印　Ainosco Press
地址　234634 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話　(02)2926-6006
E-mail　press@airiti.com

定價　新台幣一七五元
展售門市　1. 國家書店 / 104472 台北市松江路 209 號 1 樓 / 電話 : (02)2518-0207
國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw
2. 五南文化廣場 / 400002 台中市中山路 6 號 / 電話 : (04)2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 71(2):87–99 (2022)
DOI:10.6156/JTAR.202206_71(2).0001

研究報告

利用高光譜資料建立小果番茄缺水逆境早期預測模型

杜元凱[1] 陳涵葳[1] 紀銘坤[2] 方士倫[3] 姚銘輝[4] 郭寶錚[5,*]

摘要

杜元凱、陳涵葳、紀銘坤、方士倫、姚銘輝、郭寶錚。2022。利用高光譜資料建立小果番茄缺水逆境早期預測模型。台灣農業研究 71(2):87–99。

高光譜資料收集為非破壞性檢測方法，所得光譜資料可應用於判斷植物是否處於逆境生理狀態及有無病害發生。番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 為我國重要的鮮食蔬菜，合適的水分管理對於品質與產量具關鍵影響。為建立番茄缺水逆境生理之預測方法，便於早期偵測缺水逆境，及早進行水分管理，本研究以小果番茄「玉女」品種進行缺水逆境處理，利用蒸散速率、氣孔導度和碳同化率等界定其生理狀態，處理期間收集冠層葉片高光譜資料，並以淨最小平方-判別分析 (partial least squares-discriminant analysis; PLS-DA) 建立缺水逆境預測模型。結果顯示番茄植株蒸散速率、氣孔導度和碳同化率分別於缺水處理 8、9 和 10 d 後顯著低於對照組 ($P < 0.05$)，外觀形態則在處理 11 d 後才出現肉眼可觀察之葉片乾枯、萎縮現象，顯示早期缺水逆境生理反應約落於處理 10−11 d 時發生。利用 348−1,052 nm 高光譜資料建立的 PLS-DA 模型之準確度、敏感度和特異度分別為 0.90−0.93、0.87−0.89 和 0.92−0.95，顯示 PLS-DA 模型針對早期缺水逆境狀態發生具有不錯的判別能力。此外，透過迴歸係數和變數投影重要性 (variable importance in the projection) 篩選出 4 個特徵波段：348−584 nm、638−817 nm、937−950 nm 和 1,016−1,052 nm，並進一步使用這些特徵波段建立新的 PLS-DA 模型，該模型之準確度、敏感度和特異度分別為 0.87−0.93、0.79−0.92 和 0.90−0.92，顯示若僅使用特徵波段建立 PLS-DA 模型，將能降低資料蒐集和後續運算的成本。

關鍵詞：高光譜、小果番茄、缺水逆境、淨最小平方判別分析。

前言

根據2018年經濟部農業用水量統計報告，台灣2008−2018年間旱、澇加劇及頻仍，水情不穩導致對農業灌溉用水的營運及植物生產影響甚鉅，加以2021年上半年發生近50年來最嚴重的旱災，如何有效利用水資源為現今農業的重要課題。番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 是台灣重要的蔬菜作物之一，食用方式多元，尤其小果番茄管理更加精緻，多採設施栽培方式生產，為目前經濟價值較高的番茄類型，主要栽培品種為「聖女」、「玉女」和「嬌女」等，其中又以「玉女」為目前最主要的商業品種。

小果番茄從定植到採收約需 110−130 d，栽培期間水分供給量會顯著影響產量與品質，當水分供給不足時導致土壤水分潛勢 (water potential) 過低，或因高溫、低相對溼度等環境因素導致蒸氣壓差 (vapor pressure deficit; VPD) 過高，番茄植株無法維持水分潛勢而進入缺水逆境。缺水逆境對植物的影響取決於缺水嚴重程度與持續時間，植物在遭逢逆境初期，會進行生理狀態策略性的轉移與改變，以

投稿日期：2021 年 8 月 13 日；接受日期：2021 年 11 月 23 日。
* 通訊作者：bjkuo@nchu.edu.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市
[3] 國立中興大學農藝系碩士班學生。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所農業工程組研究員。台灣 台中市。
[5] 國立中興大學農藝系教授。台灣 台中市。

減輕逆境所造成的負面影響。而若逆境無法移除或負面影響仍持續，將導致植株生長受限、花粉乾縮及果實無法正常發育，並致使落花與落果率上升及成熟果實重量下降，造成品質與產量的損失 (Lichtenthaler 1998)。研究指出 'Ryna®' 番茄在開花期或果實發育期若遭遇缺水逆境，減產約 25% (Nangare *et al*. 2016)。然而，若於植物出現明顯外表形態改變前的早期缺水逆境狀態下，移除逆境壓力，則植物可迅速恢復活力 (Lichtenthaler 1998)。因此，為避免缺水逆境造成作物產量下降，開發可信度高且能偵測早期缺水逆境的逆境偵測技術，以及早因應缺水對作物栽培造成影響，已為重要農業研究項目之一 (Nemeskéri & Helyes 2019)。

判斷番茄植株是否處於缺水逆境生理狀態的方法，除直觀地記錄肉眼可察覺之植株外觀形態外，也可透過合適的生理指標加以判別。當番茄遭逢與感受缺水逆境，將逐漸由正常生理狀態轉換為缺水逆境生理狀態，葉綠素螢光係數 (Fv/Fm)、蒸散速率 (transpiration rate)、碳同化率 (assimilation rate) 及氣孔導度 (stomatal conductance) 等生理參數將產生變化，以反應番茄水分含量、傳導和相關反應的變化及累積效應 (Nemeskéri & Helyes 2019; Parkash & Singh 2020)。其中，蒸散速率、碳同化率和氣孔導度等 3 個指標由於可以連續觀察其數值變化，且在不同品種及植物的營養生長期、開花期與果實發育期等生育階段均能穩定反應植物在缺水下的生理變化與受損嚴重度，已常作為偵測植物缺水逆境的主要生理指標 (Liang *et al*. 2020)。

光譜資料收集與分析具有快速獲取大量資料、非破壞性與無須與待測物接觸等特性，近年逐漸應用於植物逆境生理相關研究 (Cotrozzi & Couture 2020)。研究植物生理變化的光譜波長範圍，主要包括可見光 (visible, 400−700 nm)、近紅外光 (near infrared, 700−1,100 nm) 和短波紅外光 (short-wave infrared, 1,100−2,400 nm) 區域。高光譜 (hyperspectral) 通常係指檢測一系列小於 10 nm 的窄波段連續光譜訊號，優點在於能獲得大量光譜資訊，可切實反應植物生理變化，且具備田間應用的潛力。如葡萄 (*Vitis vinifera* L. cv. 'Rosario Bianco') 和番茄等作物中，植株冠層反射光譜與葉片及植株含水率均具備高度相關性 (Suhandy *et al*. 2006; Ihuoma & Madramootoo 2020)。在利用高光譜資料進行模型建構時，由於高光譜資料具有高維度與高度共線性 (collinearity) 的特性，若使用最小平方法 (least squares) 進行分析，所建構的模型預測能力通常不佳 (Mariotto *et al*. 2013)。淨最小平方法 (partial least squares; PLS) 可以處理高維度與高度共線性資料，Barker & Rayens (2003) 結合 PLS 與線性判別分析 (linear discriminant analysis) 所發展出的淨最小平方-判別分析 (partial least squares-discriminant analysis; PLS-DA)，屬於一種監督式 (supervised classification) 的判別分析方法，經常用來處理分類與判別問題。PLS-DA 相當適合應用於分析高光譜資料，透過重要變數挑選流程，可進一步找到決定分類與判別結果的特徵波段。

小果番茄為台灣重要的蔬菜作物，缺水逆境會造成品質、產量下降，為建立一套非破壞性之小果番茄缺水逆境早期預測方法，本研究利用光譜儀收集缺水與正常處理之小果番茄冠層葉片反射率資料，並以重要生理指標界定番茄生理狀態，最後以高光譜與生理狀態資料進行 PLS-DA 模型建構與特徵波段挑選。所建立之預測模型期能提供栽培者於番茄進入缺水逆境生理狀態早期即有效以予判斷，俾於及早進行合適水分管理，穩定品質與產量。

材料與方法

植物材料

試驗材料選用目前溫室栽培主要的小果番茄品種「玉女」作為供試品種。種子以 3 mg L^{-1} 的次氯酸鈉溶液消毒，隨後播種於無菌水浸濕濾紙 (No. 541, Whatman®, Maidstone, UK) 並置於塑膠培養皿。待種子的胚根突破種皮後，將小果番茄種子移到含 Bas Van Buuren (BVB, De Lier, The Netherlands) 育苗用培養土之塑膠穴盤，並於台中市霧峰區行政院農業委員會農業試驗所生物技術組溫室培養。

水分逆境試驗

當小果番茄具有 3–4 片完全展開本葉，將每個塑膠透水網籃以細紗網包覆後，填入 4 kg BVB 培養土後，澆灌 7 L 水至土壤完全潮濕。試驗處理分為缺水處理組和對照組兩組，缺水處理組定植後不再給水，對照組則每日供水 800 mL 直至水分由土壤中排出。

植株生理特性調查

葉片相對含水量

參考 Zhou *et al*. (2017) 方法，取樣處理組與對照組定植 5 d 後的小果番茄，逐日取由頂芽往下第 1–3 片完全展開葉的小葉進行試驗，至植株葉片萎凋為止。以 1 株為 1 重複，每重複取 3 片小葉進行調查，共進行 5 重複。並以精密天秤 (AB204-S/FACT, Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) 秤量小葉葉片鮮重 (fresh weight; FW)，之後將葉片懸浮於去離子水中，在常溫避光環境中靜置 4 h。以吸水紙擦乾葉片秤量其膨潤重 (turgor weight; TW) 後，放入烘箱以 60℃烘至完全乾燥，記錄乾重 (dry weight; DW)，換算為葉片相對含水量，公式如下：

$$\text{葉片相對含水量 (\%)} = \frac{\text{FW (g)} - \text{DW (g)}}{\text{TW (g)} - \text{DW (g)}} \times 100\%$$

氣體交換參數

缺水處理與正常給水植株之氣體交換參數、葉溫及葉綠素螢光參數，係利用攜帶型光合作用測量系統 LI-6800 (LI-COR, Lincoln, NE, USA) 進行量測。本試驗中處理組與對照組在定植後第 5 天開始測量，於每日上午 10–12 時期間以 LI-6800 測量處理組與對照組植株葉片之氣體交換參數，測量葉片選擇由頂芽而下之第 1–3 片完全展開葉，每日測量 1 次，至植株葉片萎凋為止。所有處理組均以 1 株番茄植株為 1 重複，每重複測量 3 片葉片，共進行 5 重複。

葉綠素螢光測量

依 Liang *et al*. (2020) 方法，利用葉綠素螢光計 (FluorPen FP110-LM/D, PSI, Praha, Czechia) 葉片夾夾取試驗植株葉片進行暗適應 (dark adaptation) 處理。葉片夾夾取每植株由上往下第 1–3 片完全展開葉葉片，暗適應處理 30 min 後，以葉綠素螢光計測量葉片 Fv/Fm 變化。以 1 株為重複，每重複量測 3 片葉片，共進行 5 重複。

光譜資料收集

小果番茄冠層葉片反射光譜以光譜儀 (MS-720, EKO, Tokyo, Japan) 進行收集。反射光譜波段收集範圍為 348–1,052 nm，解析度為 3 nm，光譜儀收集反射光的鏡頭角度為 45 度。依據 Asaari *et al*. (2018) 方法進行反射光譜測量與分析，測量前光譜儀分別以硫酸鋇白板和不含植物的土壤表面作為完全反射值和背景值進行相對反射率的計算，其計算公式如下：

$$\text{相對反射率 (\%)} = \frac{\text{測量值} - \text{背景值}}{\text{白板反射值} - \text{背景值}} \times 100\%$$

於晴朗無雲的天氣下，將待測植物移至日照充足的位置，並以腳架將光譜儀固定於植株頂芽垂直上方 30 cm 處，量測處理組與對照組植株葉片的反射光譜。所有量測過程須調整待測植株位置，避免溫室屋頂骨架、腳架或光譜儀在待測植株葉片上形成陰影，影響反射光譜量測結果。以 1 株為重複，每重複收集 3 次植株冠層葉片反射光譜變化，共進行 5 重複。

光譜資料處理與標定

依光譜儀 MS-720 解析度將所收集的反射光譜波段收集範圍 348–1,052 nm 分割為 211 個波段區間，每波段區間所收集到的葉片反射率視為一解釋變數，並以番茄生理狀態做為反應變數標定的標準。其中，光譜資料若界定為正常生理狀態則標定為 0，界定為缺水逆境生理狀態者則標定為 1。若處理組番茄葉片的蒸散速率、氣孔導度和碳同化率與對照組相比，至少有一項無顯著差異時 ($P \geq 0.05$)，則

將該葉片其所對應的高光譜資料標示為正常生理狀態 (0)；若處理組番茄葉片的蒸散速率、氣孔導度和碳同化率與對照組相比，三者均顯著低於對照組數值 ($P < 0.05$)，則將該葉片其所對應的高光譜資料標示為缺水逆境生理狀態 (1)。

PLS-DA 模型建立與特徵波段挑選

PLS 模型分解形式表示如下：

$$X = TP^T + E \quad (1)$$

$$Y = UQ^T + G \quad (2)$$

其中，P 為預測變數 X 的負荷量矩陣 (loading matrix)，Q 為反應變數 Y 的負荷量向量，Y 為類別資料，而 T 與 U 分別為 X 與 Y 的得點矩陣 (score matrix)。具有相關性的 X 矩陣經過分解之後，所產生的潛在變數 (latent variables; LVs) 之間無關聯性，且得點向量間 (t) 與負荷量向量間 (p) 均為直交 (orthogonal)，每一個 p 則具有正則 (orthonormal) 的特性。E 與 G 為誤差項。

而因 T 為 Y 的預測變數，式 (2) 可改寫成式 (3)：

$$Y = TQ^T + F \quad (3)$$

而 P 與 Q 可透過最小平方法估計：

$$Q^T = (T^TT)^{-1}T^TY \quad (4)$$

$$P^T = (T^TT)^{-1}T^TX \quad (5)$$

潛在變數必須同時包含預測變數 X 與反應變數 Y 的最大共變異程度，而為了使充分潛在變數包含 Y 的訊息，則必須透過負荷量權重 W (loading weights) 建立。因此，式 (2) 可進一步改寫成式 (6)：

$$Y = TQ^T + F = XWQ^T + F = XB + F \quad (6)$$

為了評估各個波長在 PLS-DA 模型中的重要性，本研究參考 Fernández-Novales *et al*. (2018) 的方式，使用各波長的變數投影重要性 (variable importance in the projection; VIP) (Wold *et al*. 1993) 與迴歸係數來進行特徵波段 (長) 的挑選。其中，VIP 分數大於 1 者將被視為重要波段 (Wold *et al*. 1993)。

PLS-DA 模型預測準確度評估與交叉驗證

若真實為 1 且模型判斷為 1，此為真陽性 (true positive; TP)；若真實為 0 且模型判斷為 0，此為真陰性 (true negative; TN)；若真實為 1 但模型判斷為 0，此為偽陰性 (false negative; FN)；若真實為 0 但模型判斷為 1，此為偽陽性 (false positive; FP)。準確度即是模型整體的分類正確率 [式 (7)]，而敏感度為真陽性率 (true positive rate)，即實際為 1 的樣本中 TP 的比例 [式 (8)]；特異度則為真陰性率 (true negative rate)，即實際為 0 的樣本中 TN 的比例 [式 (9)]。

$$\text{Accuracy} = (TP + TN)/(TP + TN + FP + FN) \quad (7)$$

$$\text{Sensitivity} = TP/(TP + FN) \quad (8)$$

$$\text{Specificity} = TN/(TN + FP) \quad (9)$$

交叉驗證採行十折交叉驗證 (10-fold cross-validation)，數據集將隨機分成 10 等份，輪流將其中 9 份作為建模數據，1 份作為驗證數據進行驗證。最終，將 10 次驗證結果的正確率的平均值作為模型準確度的估計。

結果

外表形態變化

「玉女」小果番茄在缺水處理過程中，處理 10 d 後外觀形態與對照組無顯著差異，處理 11–12 d 後處理組植株出現明顯葉面積減小、葉片下垂、軟化和捲曲等典型缺水障礙形態變化 (圖 1A、B)。

生理指標評估

缺水處理組與正常給水處理組之葉片相對水分含量變化如圖 2 所示，處理 5–10 d 後之缺水處理組葉片的相對水分含量與對照組

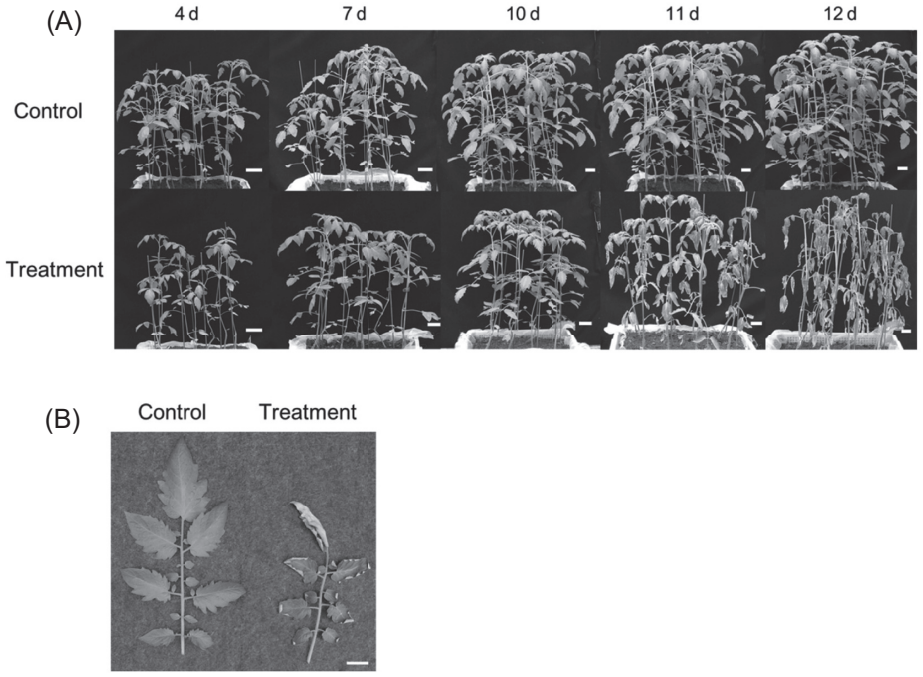


圖 1. 「玉女」小果番茄苗株的對照組和缺水處理組之外表型變化。(A) 對照組與處理組處理 4、7、10、11 及 12 d 時全株形態變化；(B) 對照組與處理組處理 12 d 時葉片的形態變化 (bar = 5 cm)。

Fig. 1. The phenotypic changes of 'Rosada' cherry tomato seedlings in the control and drought treatment. (A) The changes of the whole plant in the control and the treatment on 4, 7, 10, 11 and 12 d; (B) The changes of the leaves in the control and the treatment group on the 12 d (bar = 5 cm).

葉片無顯著差異，在此期間葉片的相對水分含量均維持在 84–92% 之間。直至處理 11 d 後，缺水處理組葉片的相對水分含量方降至 79.52%，顯著低於對照組。缺水處理組葉片的 Fv/Fm 值在處理 4 d 時與對照組無顯著差異，處理 7 d 後處理組葉片的 Fv/Fm 值為 0.75，顯著低於對照組 (圖 3A)。由 LI-6800 收集葉片光合作用相關指標的連續變化結果顯示，缺水處理組葉片蒸散速率在處理 8 d 後為 0.0049 mol m^{-2} s^{-1}，顯著低於對照組；氣孔導度和碳同化率變化，則分別於處理 9 d 後和 10 d 後方顯著低於對照組，數值分別為 0.21 mol m^{-2} s^{-1} 和 10.01 μmol m^{-2} s^{-1} (圖 3B–D)。番茄植株發生外表形態改變前，蒸散速率、氣孔導度和碳同化率均顯著下降 (圖 1、圖 3)。

高光譜資料標定

缺水處理組與對照組葉片反射光譜圖 (348–1,052 nm) 如圖 4，對照組冠層葉片的反

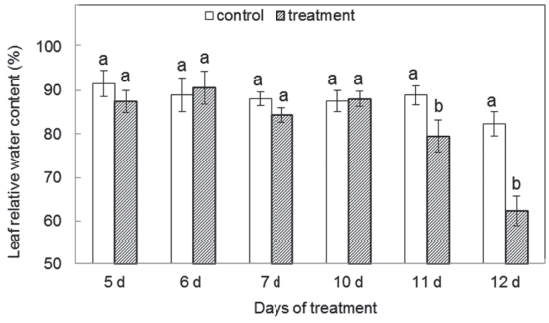


圖 2. 溫室內「玉女」小果番茄苗株正常給水的對照組和缺水處理組處理 5、6、7、10、11 及 12 d 時的葉片相對水分含量變化。誤差線為平均值標準差 (N = 5)，各平均值上示以相同字母表示為 5% 水準下經非成對 t-檢定未達顯著差異。

Fig. 2. The leaf relative water content of the control and the drought treatment of the 'Rosada' cherry tomato seedlings in the greenhouse when they were treated for 5, 6, 7, 10, 11 and 12 d. Error bar is the standard deviation of the mean (N = 5). The same letter means that two treatments are not significantly different at 5% level by unpaired Student's t-test.

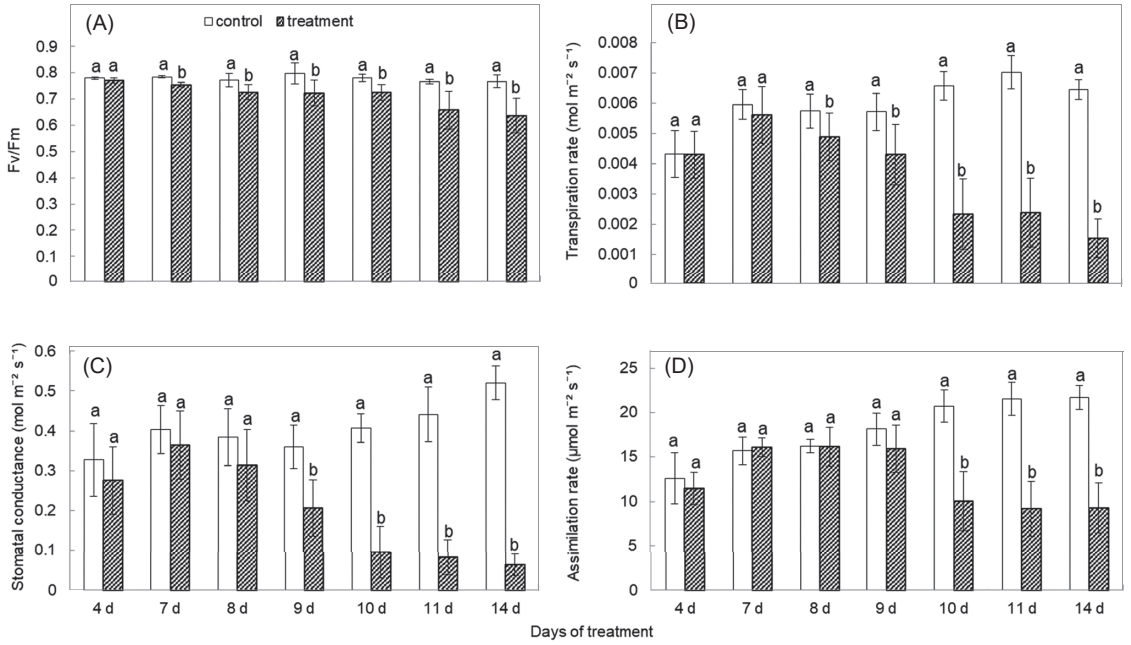


圖 3. 「玉女」小果番茄苗株正常給水的對照組和缺水處理組處理 4、7、8、9、10、11 及 14 d 時各生理指標變化。(A) Fv/Fm 值；(B) 蒸散速率；(C) 氣孔導度；(D) 碳同化率。誤差線為平均值標準差 (N = 5)，各平均值上示以相同字母表示為 5% 水準下經非成對 t- 檢定未達顯著差異。

Fig. 3. Biological indicators of the control and the drought treatment of the 'Rosada' cherry tomato seedlings when they were treated for 4, 7, 8, 9, 10, 11 and 14 d. (A) Fv/Fm value; (B) transpiration rate; (C) stomatal conductance; and (D) assimilation rate. Error bar is the standard deviation of the mean (N = 5). The same letter means that two treatments are not significantly different at 5% level by unpaired Student's t-test.

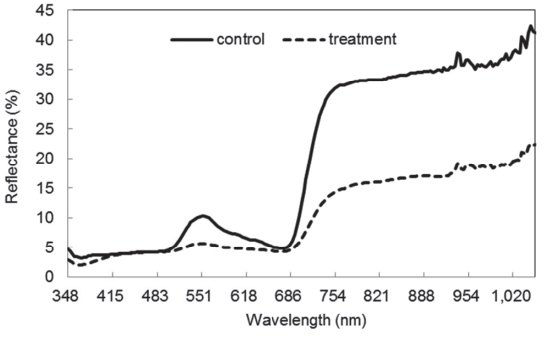


圖 4. 「玉女」小果番茄苗株於蒸散速率、氣孔導度和碳同化率均出現顯著差異後，對照組 (N = 32) 和處理組 (N = 35) 冠層葉片反射率平均值的變化。

Fig. 4. Changes of the average values of canopy reflectance in the control (N = 32) and the treated (N = 35) 'Rosada' cherry tomato seedlings after transpiration rate, stomatal conductance and carbon assimilation rate appeared significantly different morphology.

射率在 490−610 nm、690−1,020 nm 等波段區間明顯高於處理組。光譜資料依 3 個生理指標界定為正常生理狀態並標定為 0 者有 335 筆，屬於早期缺水逆境生理狀態並標定為 1 者有 175 筆，共 510 筆光譜資料。

PLS-DA 預測模型建立、表現評估和特徵波段挑選

依據全波段高光譜資料所建構之 PLS-DA 模型 (模型 I)，預測準確度為 0.93，敏感度為 0.89，特異度為 0.95，十折交叉驗證之準確度為 0.90，敏感度為 0.87，特異度為 0.92 (表 1)。而由圖 5 得知，全波段 PLS-DA 模型在包含 8 個隱藏變數即具有相對低的分類錯誤率 (misclassification rate)，故將模型精簡為使用 8 個隱藏變數的模型 II，模型 II 之預測準確度

為 0.92，敏感度為 0.89，特異度為 0.94，十折交叉驗證之準確度為 0.91，敏感度為 0.87，特異度為 0.93 (表 1)。模型 I 和模型 II 的迴歸係數分布結果如圖 6A、B，兩模型的趨勢大致相同，波峰波谷皆位在第 40−60 個、第 100−140 個和第 200 個之後的解釋變數區間，所對應到的波段包括 479−547 nm、682−817 nm 及 1,016−1,052 nm 等 3 波段。將前述 3 個波段作為特徵波段進一步建立 PLS-DA 模型 III，其預測準確度為 0.93，敏感度為 0.92，特異度

表 1. 「玉女」小果番茄苗株對照組和缺水處理組高光譜資料之 PLS-DA 模型分析結果比較。

Table 1. Comparison of partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) model analysis results of hyperspectral data collected from the control and the treated 'Rosada' cherry tomato seedlings.

Model	Spectral band (nm)	Process	Sensitivity	Specificity	Accuracy
I	348−1,052	cal[z]	0.89	0.95	0.93
		cv[y]	0.87	0.92	0.90
II	348−1,052	cal	0.89	0.94	0.92
		cv	0.87	0.93	0.91
III	479−547 682−817 1,016−1,052	cal	0.92	0.93	0.93
		cv	0.88	0.92	0.90
IV	348−506 638−767	cal	0.79	0.91	0.87
		cv	0.79	0.90	0.86
V	348−388 516−584 655−756 937−950 1,026−1,052	cal	0.85	0.94	0.91
		cv	0.83	0.91	0.88

[z] calibration.
[y] 10-fold cross-validation.

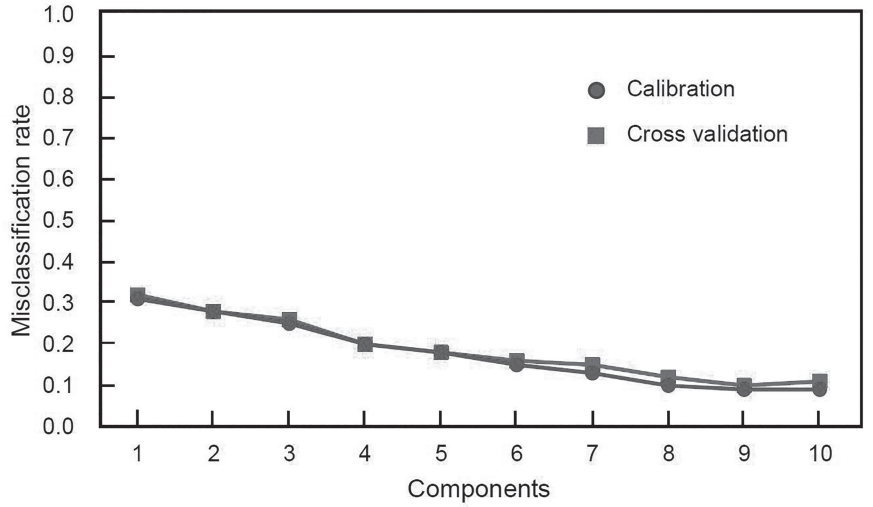


圖 5. 「玉女」小果番茄苗株對照組和缺水處理組高光譜資料之 PLS-DA 預測模型採用的隱藏變數個數和相對應的分類錯誤率。

Fig. 5. The number of latent variables and the misclassification rate used in the partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) prediction model of the hyperspectral data collected from the control and the treated 'Rosada' cherry tomato seedlings.

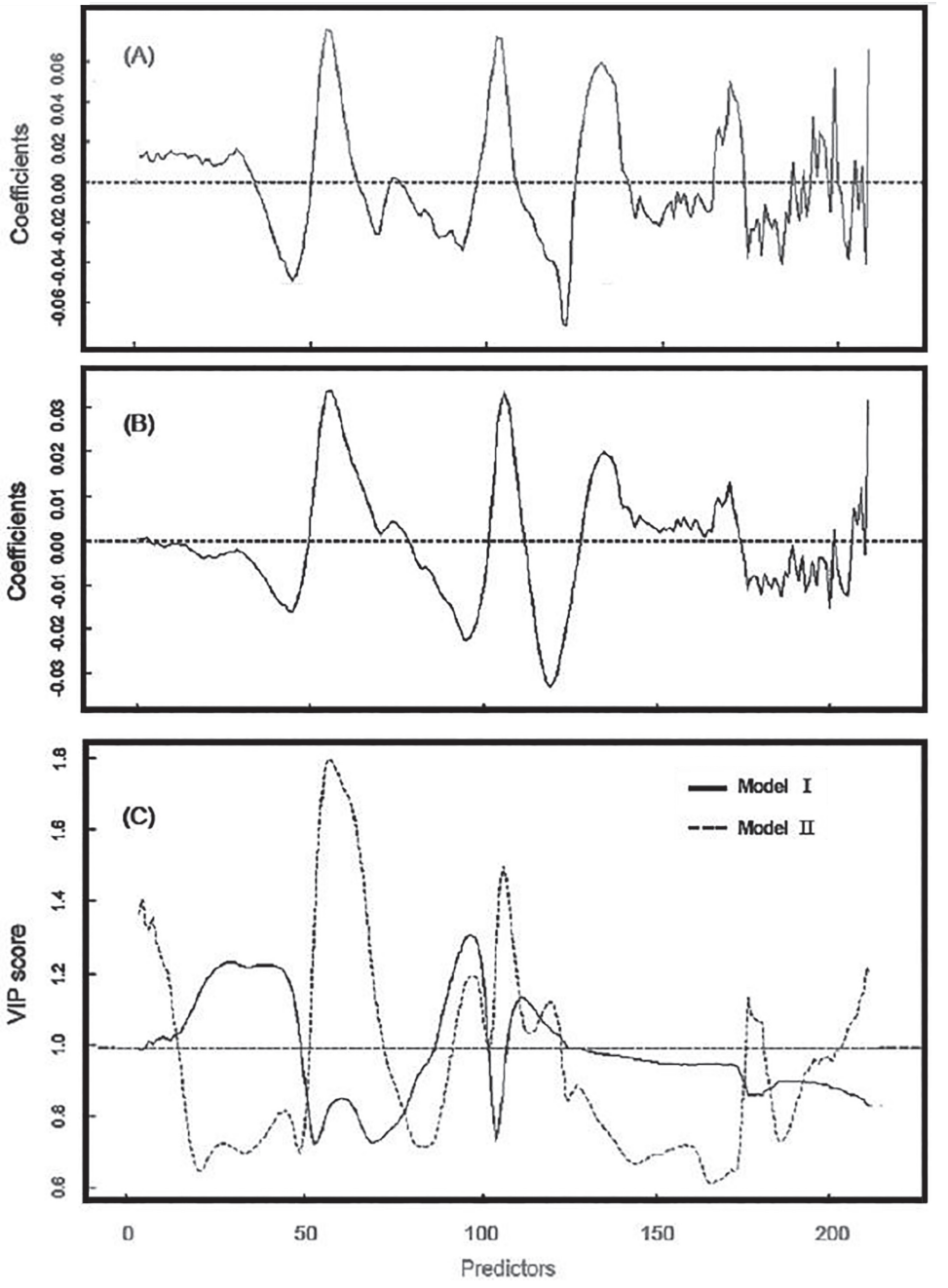


圖 6. 「玉女」小果番茄苗株對照組和缺水處理組高光譜資料之 PLS-DA 預測模型 I、II 各變數之迴歸係數與 VIP 分數。(A) 模型 I 之迴歸係數；(B) 模型 II 之迴歸係數；(C) VIP 分數。

Fig. 6. The regression coefficient and variable importance in the projection (VIP) score of variables used in the partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) prediction model I and II of the hyperspectral data collected from the control and the treated 'Rosada' cherry tomato seedlings. (A) Regression coefficient of model I; (B) regression coefficient of model II; and (C) VIP score.

為 0.93，十折交叉驗證準確度為 0.90，敏感度為 0.88，特異度為 0.92 (表 1)。另一方面，模型 I 和模型 II 以 VIP 分數大於 1 為標準，所找出的特徵波段則略有差異 (圖 6C)。模型 I 利用 VIP 法找出的特徵波段為 348−506 nm 及 638−767 nm，以這兩個波段建立 PLS-DA 模型 IV，其預測準確度為 0.87，敏感度為 0.79，特異度為 0.91，十折交叉驗證準確度為 0.86，敏感度為 0.79，特異度為 0.90 (表 1)；模型 II 利用 VIP 法找出的特徵波段為 348−388 nm、516−584 nm、655−756 nm、937−950 nm 及 1,026−1,052 nm，以這 5 個波段建立 PLS-DA 模型 V，其預測準確度為 0.91，敏感度為 0.85，特異度為 0.94，十折交叉驗證準確度為 0.88，敏感度為 0.83，特異度為 0.91 (表 1)。

討論

本研究利用「玉女」小果番茄進行缺水與正常給水處理，試驗期間調查正常生理、早期缺水逆境等狀態下外觀形態差異以及葉片相對水分含量、Fv/Fm、蒸散速率、氣孔導度和碳同化率等生理數據，同時進行非破壞性葉片反射光譜資料收集。相關數據資料以 PLS-DA 進行模型建構與特徵波段挑選，期望建立一有效的小果番茄早期缺水逆境預測模型。

番茄植株經缺水處理後，葉片相對水分含量在處理 11 d 時下降至 79%，開始與對照組出現顯著差異，並在處理 12 d 時下降至 62% (圖 2)，與 ‘Arvento’ 番茄在缺水逆境下，葉片相對含水量由 82% 降至 50% 的結果相似 (Zhou *et al*. 2017)。此外，當植物遭逢缺水、高溫逆境時，會造成 PSII 系統中的 D1 蛋白質受到破壞而降解，導致 Fv/Fm 值下降，Fv/Fm 比值下降是反應植物遭逢非生物逆境處理的早期生理指標之一 (Poudyal *et al*. 2019; Parkash & Singh 2020)。本研究結果顯示，Fv/Fm 值在處理 7 d 時即出現顯著下降，並隨處理時間的增加，Fv/Fm 值下降幅度越大，與前人研究番茄處於缺水逆境生理狀態下的結果一致 (Nangare *et al*. 2016; Liang *et al*. 2020)。說明本研究施加之缺水處理，可有效使番茄由正常生理狀態進入逆境生理狀態，並導致早期 Fv/Fm 值與後期葉片相對水分含量的變化。

依據 Nemeskéri & Helyes (2019) 研究指出，當作物遭逢缺水逆境，會由正常生理狀態轉移到逆境生理狀態，以反應逆境對作物產生的負面影響，在缺水逆境早期經常發生肉眼不可見的生理反應，主要由於植株內部水勢逐漸降低，導致葉片保衛細胞萎縮與氣孔關閉。而葉片水分大約有 80% 是由氣孔蒸散，因此氣孔關閉會抑制水分蒸散以維持植株水分含量，氣孔關閉同時將抑制環境中 CO_2 進入葉片細胞，進一步抑制光合作用與碳同化速率 (Lawson & Matthews 2020)。若缺水逆境無法移除，將加劇對作物的危害，因而逐漸發展出肉眼可見的生理障礙，如葉片萎凋、黃化與生長勢弱化等直至凋零死亡。綜上，由缺水逆境所引起可見以及不可見的生理狀態改變為一連續性的進展。本試驗中番茄葉片的蒸散速率和氣孔導度分別在缺水處理 8 d 和 9 d 後顯著下降，而碳同化率則於處理 10 d 時才開始顯著下降。由於在缺水逆境中番茄各生理指標除受缺水影響外，溫度、溼度等非生物性因素與病蟲害等生物性因素均會對生理指標產生影響，如以單一生理指標評估缺水逆境可能會有高估現象。

本試驗目的在於建立一番茄缺水逆境預測模型，希望在外表型態發生改變前即可判斷番茄是否已進入早期缺水逆境生理狀態，以及早移除缺水逆境壓力。前人研究已有使用氣孔導度與蒸散速率進行早期缺水逆境的標定 (Fernández-Novales *et al*. 2018)，然而，蒸散速率除受到水分逆境會顯著下降外，在高相對濕度和低 VPD 等環境條件下，蒸散速率也會顯著下降 (Tu *et al*. 2021)。此外，在本研究收集資料過程中也發現，少數植株的氣孔導度與蒸散速率數值顯著低於控制組植株會發生在同一天，綜合考慮植株個體差異及無法排除的環境影響因素，為更加準確界定番茄植株是否處於早期缺水逆境生理狀態，因此本試驗以相對嚴格的生理指標 (氣孔導度、蒸散速率、碳同

化速率) 皆顯著低於對照給水組植株為標準，以二元分類 (binary classification) 區分番茄是否處於早期缺水生理狀態 (圖 3)。

Carter (1991) 研究了 6 種不同植物的葉片在不同的水分含量下對葉片光譜反射特性的影響，發現 1,300−2,500 nm 波段反射率受水分對輻射的直接吸收所影響 (初級影響)，對 400−1,300 nm 波段反射率的影響，則是由水分含量變化造成的葉片內部結構的變化引起的 (次級影響)。在輕微乾旱時，水分的次級影響大於初級影響；在重度乾旱時則主要由水分的初級影響決定。因此，若想早期偵測植株水分狀態，可先著重在 400−1,300 nm 範圍內進行特徵波段選取 (Carter 1991)。本研究在番茄在缺水處理後，於蒸散速率、氣孔導度和碳同化率均出現顯著差異，而外觀形態尚未發生變化期間，缺水處理組在與對照組冠層葉片反射光譜資料在 490−610 nm、690−1,020 nm 等波段區間出現分離現象 (圖 4)。'Picus' 小果番茄在以 20、40、60、80 和 100% 水分灌溉處理時，在 450−900 nm 的波段區間也可觀察到光譜資料分離的現象 (Ihuoma & Madramootoo 2020)。顯示本研究的小果番茄經缺水逆境處理後所造成的生理狀態轉變與相關反應，亦將反應至光譜數值的變化。進一步將 348−1,052 nm 範圍分割為 211 個波段，並進行 PLS-DA 模型配適，該模型 (模型 I) 的預測準確率為 0.93，十折交叉驗證準確率為 0.90 (表 1)。為減輕運算上的負荷，本研究觀察分類錯誤率降低的情形，將模型隱藏變數精簡至 8 個得到模型 II，該模型的預測準確率為 0.92，十折交叉驗證準確率為 0.91，且敏感度和特異度亦與模型 I 無明顯差異 (表 1)。表示此處將模型精簡，並未影響模型的預測能力。

另一方面，為降低反射光譜波段使用數目，並篩選出與缺水逆境的較為相關之特徵波段，本研究利用 PLS-DA 模型迴歸係數與 VIP 分數兩種方法進行特徵波段篩選。模型 I 和模型 II 以迴歸係數法得到的波段大致相同 (圖 6A、B)，為 479−547 nm、682−817 nm 及 1,016−1,052 nm 等 3 波段。然而，模型 I 和模型 II 以 VIP 分數所找出的特徵波段則略有差異 (圖 6)，分別為 348−506 nm、638−767 nm 以及 348−388 nm、516−584 nm、655−756 nm、937−950 nm、1,026−1,052 nm。可見以不同方法進行特徵波段篩選結果將不盡相同，但仍有許多重疊之處。此外，模型 III、IV、V，其預測準確度分別為 0.93、0.87、0.91，十折交叉驗證準確率為 0.90、0.86、0.88 (表 1)，與模型 I、II 相比，除模型 IV 模型表現較差，模型 III、V 並未有明顯落差。表示縮減光譜波段範圍與數目，並不會明顯影響模型的預測能力。進一步將本研究所找出的特徵波段進行疊合，重疊範圍為 348−584 nm、638−817 nm、937−950 nm 及 1,016−1,052 nm 等 4 個區間。Rapaport *et al*. (2015) 分析缺水逆境下葡萄葉片反射光譜結果時發現 530−570 nm、700−750 nm、1,380−1,420 nm 及 1,450−1,590 nm 對於水分潛勢和氣孔導度的評估甚是重要。Elvanidi *et al*. (2018) 研究結果則指出 451−554 nm、640−670 nm 及 700−1,000 nm 等波段反射值變化對於番茄是否遭逢缺水逆境相當敏感，而 Köksal (2011) 和 Schlemmer *et al*. (2005) 亦指出上述波段亦能用於偵測玉米 (*Zea mays* L.) 和菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 的缺水逆境。本研究所挑選之特徵波段與前述研究之結果均有重疊，符合過去的研究。

結論

本研究使用葉片蒸散速率、氣孔導度和碳同化率等生理指標區分「玉女」小果番茄正常生理與早期缺水逆境的生理狀態，並以光譜儀收集冠層葉片的高光譜反射率，利用 PLS-DA 進行早期缺水逆境預測模型建構，預測準確可達 0.93。結果亦顯示，可提早 1−2 d 預知早期缺水逆境已發生，評估現行溫室番茄栽培滴灌系統應已有充足時間可以即時因應並給水。此外，利用迴歸係數與 VIP 篩選特徵波段結果與前人研究相符，同時發現若僅使用特徵波段對於模型預測效能並無明顯影響，但能簡化高光譜資料收集的技術門檻，提升未來應用高光譜資料進行非破壞性檢測之應用潛力。

誌謝

本研究承蒙科技部整合計畫 MOST 108-

2321-B-055-001 計畫經費支持，使本研究得以順利執行，謹此致謝。

引用文獻

Asaari, M. S. M., P. Mishra, S. Mertens, S. Dhondt, D. Inzé, N. Wuyts, and P. Scheunders. 2018. Close-range hyperspectral image analysis for the early detection of stress responses in individual plants in a high-throughput phenotyping platform. ISPRS J. Photogramm. Remote Sens. 138:121–138. doi:10.1016/j.isprsjprs.2018.02.003

Barker, M. and W. Rayens. 2003. Partial least squares for discrimination. J. Chemom. 17:166–173. doi:10.1002/cem.785

Carter, G. A. 1991. Primary and secondary effects of water content on the spectral reflectance of leaves. Amer. J. Bot. 78:9l6–924. doi:10.1002/j.1537-2197.1991.tb14495.x

Cotrozzi, L. and J. J. Couture. 2020. Hyperspectral assessment of plant responses to multi-stress environments: Prospects for managing protected agrosystems. Plants People Planet 2:244–258. doi:10.1002/ppp3.10080

Elvanidi, A., N. Katsoulas, K. P. Ferentinos, T. Bartzanas, and C. Kittas. 2018. Hyperspectral machine vision as a tool for water stress severity assessment in soilless tomato crop. Biosyst. Eng. 165:25–35. doi:10.1016/j.biosystemseng.2017.11.002

Fernández-Novales, J., J. Tardaguila, S. Gutiérrez, M. Marañón, and M. P. Diago. 2018. In field quantification and discrimination of different vineyard water regimes by on-the-go NIR spectroscopy. Biosyst. Eng. 165:47–58. doi:10.1016/j.biosystemseng.2017.08.018

Ihuoma, S. O. and C. A. Madramootoo. 2020. Narrow-band reflectance indices for mapping the combined effects of water and nitrogen stress in field grown tomato crops. Biosyst. Eng. 192:133–143. doi:10.1016/j.biosystemseng.2020.01.017

Köksal, E. S. 2011. Hyperspectral reflectance data processing through cluster and principal component analysis for estimating irrigation and yield related indicators. Agric. Water Manag. 98:1317–1328. doi:10.1016/j.agwat.2011.03.014

Lawson, T. and J. Matthews. 2020. Guard cell metabolism and stomatal function. Annu. Rev. Plant Biol. 71:273–302. doi:10.1146/annurev-arplant-050718-100251

Liang, G., J. Liu, J. Zhang, and J. Guo. 2020. Effects of drought stress on photosynthetic and physiological parameters of tomato. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 145:12–17. doi:10.21273/JASHS04725-19

Lichtenthaler, H. K. 1998. The stress concept in plants: An introduction. Ann. N. Y. Acad. Sci. 851:187–198. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb08993.x

Mariotto, I., P. S. Thenkabail, A. Huete, E. T. Slonecker, and A. Platonov. 2013. Hyperspectral *versus* multispectral crop-productivity modeling and type discrimination for the HyspIRI mission. Remote Sens. Environ. 139:291–305. doi:10.1016/j.rse.2013.08.002

Nangare, D. D., Y. Singh, P. S. Kumar, and P. S. Minhas. 2016. Growth, fruit yield and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by deficit irrigation regulated on phenological basis. Agric. Water Manag. 171:73–79. doi:10.1016/j.agwat.2016.03.016

Nemeskéri, E. and L. Helyes. 2019. Physiological responses of selected vegetable crop species to water stress. Agronomy 9:447. doi:10.3390/agronomy9080447

Parkash, V. and S. Singh. 2020. A review on potential plant-based water stress indicators for vegetable crops. Sustainability 12:3945. doi:10.3390/su12103945

Poudyal, D., E. Rosenqvist, and C. O. Ottosen. 2019. Phenotyping from lab to field-tomato lines screened for heat stress using *F*v/*F*m maintain high fruit yield during thermal stress in the field. Funct. Plant Biol. 46:44–55. doi:10.1071/FP17317

Rapaport, T., U. Hochberg, M. Shoshany, A. Karnieli, and S. Rachmilevitch. 2015. Combining leaf physiology, hyperspectral imaging and partial least squares-regression (PLS-R) for grapevine water status assessment. ISPRS J. Photogramm. Remote Sens. 109:88–97. doi:10.1016/j.isprsjprs.2015.09.003

Schlemmer, M. R., D. D. Francis, J. F. Shanahan, and J. S. Schepers. 2005. Remotely measuring chlorophyll content in corn leaves with differing nitrogen levels and relative water content. Agron. J. 97:106–112. doi:10.2134/agronj2005.0106

Suhandy, D., N. Khuriyati, and T. Matsuoka. 2006. Determination of leaf water potential in tomato plants using NIR spectroscopy for water stress management. Environ. Control Biol. 44:279–284. doi:10.2525/ecb.44.279

Tu, Y. K., H. W. Chen, S. L. Fang, M. H. Yao, Y. Y. Tseng, and B. J. Kuo. 2021. Establishing of early discrimination methods for drought stress of tomato by using environmental parameters and NIR spectroscopy in greenhouse. Acta Hortic. 1311:501–512. doi:10.17660/ActaHortic.2021.1311.64

Wold, S., E. Johansson, and M. Cocchi. 1993. PLS -

Partial least squares projections to latent structures. p.523–550. *in*: 3D QSAR in Drug Design: Theory, Methods and Applications. (Kubinyi, H. ed.) ESCOM Sci. Pub. Leiden, The Netherlands. 759 pp.

Zhou, R., X. Yu, C. O. Ottosen, E. Rosenqvist, L. Zhao, Y. Wang, W. Yu, T. Zhao, and Z. Wu. 2017. Drought stress had a predominant effect over heat stress on three tomato cultivars subjected to combined stress. BMC Plant Biol. 17:24. doi:10.1186/s12870-017-0974-x

Establishment of the Early Prediction Model of Water Deficit Stress for Cherry Tomato Using Hyperspectral Data

Yuan-Kai Tu[1], Han-Wei Chen[1], Min-Kun Chi[2], Shih-Lun Fang[3], Min-Hwi Yao[4], and Bo-Jein Kuo[5,*]

Abstract

Tu, Y. K., H. W. Chen, M. K. Chi, S. L. Fang, M. H. Yao, and B. J. Kuo. 2022. Establishment of the early prediction model of water deficit stress for cherry tomato using hyperspectral data. J. Taiwan Agric. Res. 71(2):87–99.

Hyperspectral data collection is a kind of non-destructive detection method, which can be applied to determine the physiological status and disease occurrence of plants. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is an important vegetable in Taiwan, and proper water management during growth process has crucial impacts on quality and yield. In order to establish a method for predicting the early stage of water deficit stress for tomatoes, 'Rosada' tomato seedlings were administrated with drought treatment and physiological parameters including the transpiration rate, stomatal conductance and assimilation rate were determined. During the period of experiments, the hyperspectral reflectance data of the leaf canopy were collected as well. The physiological status of tomato was further determined by the results of physiological parameters. Coupling with the hyperspectral data, the partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) was constructed to predict the early stage of stress status induced by drought treatment. The results showed that the transpiration rate, stomatal conductance, and assimilation rate were significantly lower than those of the control group 8, 9 and 10 d after drought treatment ($P < 0.05$), while the morphology appeared obvious phenotypic variation 11 d after drought treatment. We concluded that the early physiological response to water deficit stress occurred approximately 10−11 d after drought treatment. The prediction accuracy, sensitivity and specificity of the PLS-DA models obtained from 348−1,052 nm were at the range of 0.90−0.93, 0.87−0.89 and 0.92−0.95, respectively. The results indicated that the PLS-DA model possessed acceptable prediction performance. Furthermore, four important characteristic bands, 348−584, 638−817, 937−950 and 1,016−1,052 nm, which were selected from the regression coefficients and variable importance in the projection (VIP) scores. We established additional PLS-DA models by these characteristic bands, and the prediction accuracy, sensitivity and specificity were 0.86−0.93, 0.79−0.92 and 0.90−0.92, respectively. These results showed that PLS-DA models established by the characteristic bands had no significant improvement to the model performance. However, the models could reduce the cost of data collection and subsequent operations.

Key words: Hyperspectral data, Cherry tomato, Water deficit, PLS-DA.

Received: August 13, 2021; Accepted: November 23, 2021.
* Corresponding author, e-mail: bjkuo@nchu.edu.tw
[1] Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[2] Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[3] Master's student, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung City, Taiwan, ROC.
[4] Research Fellow, Agricultural Engineering Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[5] Professor, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 71(2):101–121 (2022)
DOI:10.6156/JTAR.202206_71(2).0002

研究報告

混合兩種百香果病毒 East Asian Passiflora Virus 多元抗體以提升百香果不同馬鈴薯 Y 屬病毒之廣效性檢測

陳金枝[1,*]　江芬蘭[2]　鄭櫻慧[1]　廖家翌[2]

摘要

陳金枝、江芬蘭、鄭櫻慧、廖家翌。2022。混合兩種百香果病毒 East Asian Passiflora virus 多元抗體以提升百香果不同馬鈴薯 Y 屬病毒之廣效性檢測。台灣農業研究 71(2):101–121。

罹染病毒的百香果若出現果實木質化病徵，造成畸型變小、果汁率低、風味變差，對品質與產量影響甚大。在台灣，East Asian Passiflora virus (EAPV) AO 與 IB 系統及 Telosma mosaic virus (TeMV) 為可感染百香果之 3 種主要的馬鈴薯 Y 屬 (*Potyvirus*) 病毒。本研究以細菌生合成系統分別誘導表現 EAPV-AO 和 EAPV-IB 鞘蛋白 (coat protein; CP) 作為抗原，經兔免疫注射後製備出具有廣效檢測 19 種不同馬鈴薯 Y 屬病毒之多元抗體，分別稱之為 Anti-EAPV-AOCP 和 Anti-EAPV-IBCP，並於間接式-酵素連結免疫吸附反應 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA) 檢測中發現以此二抗體等比例混合 (稱之為 Anti-EAPVmix) 進行檢測，也可用於檢出台灣及泰國的百香果 TeMV，並提升對 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 等 3 種病毒的檢出率。應用 Anti-EAPVmix 檢測病毒在百香果植株枝條上之分布顯示，以近新芽之枝條上段部位葉片所測得之病毒檢出率較高，適合作為提升檢出病毒之採樣部位。本研究顯示混合兩種 EAPV 的多元抗體，一次檢測即可達到監測至少 3 種台灣主要的百香果 *Potyvirus* 屬病毒，並可擴及其他不同的 potyvirus，且可節省檢測所需耗材和降低成本之效益，可強化對田間百香果病毒發生的監測及健康種苗的病毒檢測內控機制。

關鍵詞：百香果 potyvirus 病毒、多元抗體、抗體混合液、廣效性檢測。

前言

百香果 (*Passiflora* spp.) 為西番蓮科 (Passifloraceae) 西番蓮屬 (*Passiflora*) 的多年生蔓性植物，原生於南美洲巴西等熱帶美洲地區。百香果有『果汁之王』稱號，具有高經濟價值，在全球果汁工業上具有重要地位。「台農 1 號」為國內百香果之主力品種，以嫁接苗作為種苗繁殖生產及銷售主力。國內百香果栽培面積逐年增加，2020 年已達 894 ha，鮮果產量 28,526 Mg，產值達 12.8 億元。但栽培過程中容易遭受病毒、真菌、蟲害等危害，尤以引起果實木質化之病毒影響百香果生育及產值最鉅 (Liberato & Zerbini n.d.)，因此種苗之無特定病毒檢測從源頭控管健康品質，乃確保百香果產值之重要關鍵。

國際間百香果的病毒種類，紀錄上約有 20 種，涵蓋 *Carlavirus*、*Cucumovirus*、*Cilevirus*、*Nepovirus*、*Potyvirus*、*Rhabdovirus*、*Tobamovirus* 及 *Tymovirus* 屬之病毒 (Liberato & Zerbini n.d.; Spiegel *et al*. 2007; Parrella & Lanave 2009; Coutts *et al*. 2011; Song & Ryu 2011; Nakasato *et al*. 2020)。亞洲地區已知百香果病毒種類，包括 (1) 2 種東亞百香果病毒 (East Asian Passiflora virus; EAPV)：EAPV-AO 類群主要引起葉片嵌紋和果實木質化 (Iwai *et al*. 2006a)；EAPV-IB 類群引起斑駁或輕微嵌紋病徵 (Chang 1992; Fukumoto *et al*. 2012)；

投稿日期：2021 年 8 月 17 日；接受日期：2021 年 11 月 25 日。
* 通訊作者：chinzue@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理計畫助理。台灣 台中市。

(2) 豇豆蚜傳嵌紋病毒 (cowpea aphid-borne mosaic virus; CABMV)，即以往台灣學者發表引起漣葉徵狀的百香果漣葉病毒 (passionfruit crinkle virus; PCV) (Chang & Lin 1989)；但僅於當年偶發之病例，後續未再於台灣百香果上發現此病毒 (Chang *et al*. 2017)；(3) 胡瓜嵌紋病毒 (cucumber mosaic virus; CMV) 引起葉片黃斑病徵 (Liberato & Zerbini n.d.)；(4) 夜香花嵌紋病毒 (Telosma mosaic virus; TeMV 或 TelMV) 為泰國近年於百香果上發現的病毒 (Chiemsombat *et al*. 2014)，引起葉片嵌紋、果皮嵌紋和木質化病徵；(5) 二種 *Begomovirus* 屬病毒：包含聖誕紅捲葉病毒 (Euphorbia leaf curl virus; EuLCV) 及木瓜捲葉廣東病毒 (papaya leaf curl Guangdong virus; PaLCuGDV)，首次由台灣學者報導可發生於百香果 (Cheng *et al*. 2014)，常伴隨於寒流低溫氣候下發病而引起葉片嵌紋皺縮，氣溫回暖後新生的葉片恢復無病徵。EuLCV 在中國大陸 (Ma *et al*. 2004) 和南韓 (Kil *et al*. 2016) 均有發生；PaLCuGDV 於 2004 年由中國大陸學者首次報導 (Wang *et al*. 2004)，因此在中國大陸和台灣均有發生。

上述之 EAPV-AO、EAPV-IB、TeMV 和 CABMV 均屬於馬鈴薯 Y 屬病毒 (*Potyvirus*) 成員；近年，越南當地學者於 2018 年在美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 基因資料庫 (GenBank) 登錄一種新興的馬鈴薯 Y 屬病毒，可感染當地百香果造成葉片斑駁病徵，將其命名為 Passiflora mottle virus (PaMV) (accession no. MG087836)；然而，依照國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) 以全長度核酸定序為分類依據，與目前已登錄於 NCBI GenBank 的 passionfruit Vietnam virus (PVNV-DakNong; accession no. MH286883) 為相同病毒 (Chong *et al*. 2018; Do *et al*. 2021)。台灣百香果並未有此病毒發生。

木質化為影響百香果生育之主因，目前國際間引起百香果木質化的病毒種類包括澳洲的 passionfruit woodiness virus (PWV) (Wylie & Jones 2011)、巴西的 CABMV (Nascimento *et al*. 2006)、泰國的 TeMV (Chiemsombat *et al*. 2014)；而日本、台灣、中國大陸和東南亞等亞洲地區主要為 EAPV 感染所引起 (Iwai *et al*. 2006b; Chong *et al*. 2018)；引起台灣嚴重型木質化病徵之主要病毒為 EAPV-AO 系統 (Chang *et al*. 2017; Chong *et al*. 2018) 和 2017 年發現之 TeMV (Chen *et al*. 2019; Tsai 2019)。

TeMV 首次於 2008 年越南夜香花 (*Telosma cordata*) 上被發現 (Ha *et al*. 2008)，文獻上紀錄的 TeMV 寄主包括有夜香花 (Ha *et al*. 2008)、廣藿香 (*Pogostemon cablin*) (Noveriza *et al*. 2012)、翼柄決明 (*Senna alata* L.) (Yao *et al*. 2019) 和百香果 (Chiemsombat *et al*. 2014; Lixue *et al*. 2017; Chen *et al*. 2018b; Yang *et al*. 2018)。近年於泰國 (Chiemsombat *et al*. 2014) 和中國大陸 (Lixue *et al*. 2017; Chen *et al*. 2018b; Yang *et al*. 2018; Xie *et al*. 2020) 陸續證實 TeMV 也會引起百香果木質化病徵，影響百香果之果實品質。Lee *et al*. (2020) 以往於 2017–2019 年期間在台灣田間百香果產地的調查結果顯示 TeMV 已普遍存在台灣田間，檢出率大約在 32.1–35.8%，但仍屬零星發生。

免疫檢測法中的酵素連結免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 應用於植物病毒之檢測，具有可一次大量篩檢樣品的優點 (Clark & Adams 1977; Clark 1981; Koenig & Paul 1982; Baranwal *et al*. 2020)。近年來高靈敏度的核酸檢測技術應用，可以提升對病毒檢測的準確度，但在田間對病毒病的大量調查監測及產業貿易流通上的檢疫，免疫檢測法仍為最適合者。因此，開發可提升免疫檢測法的病毒多元抗體，並配合適當的取樣部位，可達到提升病毒檢出率的效果。

本研究利用細菌生合成系統分別表達 EAPV-AO 和 EAPV-IB 的鞘蛋白 (coat protein; CP) 做為抗原，製備對應同源病毒之多元抗體，探討其對不同百香果 potyviruses 病毒之檢測效果，並分析以混合兩者抗體方式進行 indirect ELISA 時對提升病毒檢出率的成效，另探討 EAPV 系統的病毒在罹病植株枝條上之分布差異，以建立最適合免疫檢測的取樣部位，綜合免疫檢測法與適當取樣技術以提升對百香果病毒的檢測準確度。

材料與方法

罹染病毒之病組織

台灣來源之百香果罹病組織

本研究採用 2017–2020 年期間，由國內的南投埔里以及台中霧峰區和后里區田間檢出 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 之百香果葉片組織，先行以反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 確認其單獨或複合感染狀態 (Lee *et al*. 2020)，作為供試材料。

泰國來源之百香果罹病組織

2019年3月透過當地學者協助於泰國之曼谷 (Bangkok)、清邁 (Chiang Mai) 和清萊 (Chiang Rai) 等地之百香果田區採取葉片嵌紋徵狀者，樣品乃透過行政院農業委員會動植物防疫檢疫局之『特定植物檢疫物及物品輸入辦法』核准輸入 (輸入許可證號 108-V-500)，於隔離管制規範條件下進行病毒鑑定之相關試驗。試驗完畢依規定以高溫高壓滅菌法 (121℃、20 min) 將材料進行消毒與銷毀。

越南來源之百香果罹病組織

2019 年 11 月於越南之嘉萊省 (Gia Lai) 和大叻 (Đà Lạt) 等地，在當地種苗貿易商協助下於農民客戶種植的百香果田區採取葉片出現嵌紋徵狀者，樣品乃透過行政院農業委員會動植物防疫檢疫局之『特定植物檢疫物及物品輸入辦法』核准輸入 (輸入許可證號 108-V-582)，於隔離管制規範條件下進行病毒鑑定之相關試驗。試驗完畢依規定以高溫高壓滅菌法 (121℃、20 min) 將材料進行消毒與銷毀。

應用細菌生合成系統表現病毒 CP 及其多元抗體製備

本試驗使用於田間採集並以 RT-PCR 確認為單獨感染 EAPV-AO 和 EAPV-IB 的百香果罹病組織進行之。

病毒 CP 核酸片段之選殖與定序分析

核酸純化：取 0.1 g 之受測罹病組織樣品，依據商業化植物核酸微量萃取試劑組 (Plant Total RNA mini Kit, Viogene, Viogene-BioTek Corparation, Taipei, Taiwan) 之步驟，進行供試植物組織樣品全量核醣核酸 (total RNA) 之萃取。

單步驟 RT-PCR 法：以純化所得之 RNA 為模板，利用 *Potyvirus* 病毒之簡併式引子對 HRP-5/Oligo-$dT_{(14)}$ (5′ATGATHGARKCNTG-GGG3′/5′GCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTT3′) (Pappu *et al*. 1998; Chen *et al*. 2006) 進行病毒基因體 3′端約 1.3 kbp 核酸片段之單步驟 RT-PCR 反應。RT-PCR 依據試劑組 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 之配方，於每一25 μL 反應液中分別加入 1 μL 之全量 RNA、12.5 μL 之 2× Reaction Mix、0.5 μL 之 SuperScript III RT-/Platinum Taq Mix、各 1 μL 之 10 μM 上游和下游引子，和 9 μL 之 DEPC-treated water。所有試劑混合均勻後，於熱循環反應儀 (Biometra T3000 Thermocycler, Analytik Jena, Unterschleißheim, Germany) 中進行。設定反應程序為：50℃下進行反轉錄 30 min、94℃變性 2 min；之後進行 26 個 PCR 循環反應：94℃下變性 1 min、52℃下煉合 50 s，72℃下聚合 1 min 30s，最後一個循環之 72℃聚合反應延長為 6 min。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem, Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) 進行分析判讀結果。

核酸片段選殖和核苷酸序列分析：以 HRP-5/Oligo-$dT_{(14)}$ 引子對所增幅出的 1.3 kbp 核酸片段，選殖於 pGEM-T Easy Vector Systems 載體上 (Promaga, Madison, WI, USA)，篩選出含有此特定嵌入序列 (insert sequence) 的選殖株送交核酸定序公司 (明欣生物科技有限公司，台灣台北市)，以自動核酸定序儀分析其核苷酸序列。所得序列以 Vector NTI Suite (InforMax, Inc., Wisconsin, USA) 分析軟體進行分析，並與 NCBI GenBank 已登錄的 EAPV CP 核苷酸和胺基酸序列進行比對分析，確認本研究病毒試驗株之 CP 核苷酸序列。

病毒分離株 CP 基因之蛋白質表現及多元抗體製備

依據兩種 EAPV 的 CP 序列定序結果，針對可增幅病毒全長度 CP 核苷酸序列，設計

EAPV-AO 和 EAPV-IB 的專一性引子對如下：(1) AOCP-u/AOCP-d [5′-TACCATGGGCAC-CAAATCAGAA AATGAC-3′ (劃底線者為 *Nco*I 切位)/5′-CCTCGAGTCACTGCGGGGAATTCATA-3′ (劃雙底線者為 *Xho*I 切位)]；(2) IBCP-u/IBCP-d [5′- ACCATGGGCTCATTCACTGGAAAAG-3′ (劃底線者為 *Nco*I 切位)/5′-GCTCGAGTTACT-GCGGAGGAACCAT-3′ (劃雙底線者為 *Xho*I 切位)]；以單獨罹染 EAPV-AO 或 EAPV-IB 之百香果葉片組織全量 RNA 為模板，參照上述 RT-PCR 反應條件，以其對應之 CP 表現用引子對，於 50℃下煉合，26 個 PCR 循環增幅，以增幅病毒之全長度 CP 供表現載體選殖用。

將增幅所得之 EAPV-AOCP 和 EAPV-IB-CP 核酸片段以 *Nco*I 和 *Xho*I 切割，剪接於同樣經 *Nco*I 和 *Xho*I 切割之 pET28a(+) 載體 (Novagen, Inc., Madison, WI, USA)，經選殖後所獲得之質體 pET-EAPV-AOCP 和 pET-EAPV-IBCP 分別轉型於 *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3) 進行表現蛋白誘導與純化，相關試驗方法參照以往研究報告進行 (Li *et al*. 1998; Chen *et al*. 2018a)。純化後的病毒表現蛋白沉澱物以 pH 8.0 之 Tris-EDTA 緩衝液溶解均勻，並進行 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 電泳分析，再經西方墨點法 (western blotting) 以市售 *Potyvirus* 單元抗體 (Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) 確認帶有免疫反應之病毒 CP 表現株，以確認 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 之表現。西方墨點法試驗步驟參照以往研究報告進行 (Chen *et al*. 2018a)。

進一步選用有表現 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 之 pET 選殖株，參照以往研究報告進行大量表現蛋白之誘導與純化 (Li *et al*. 1998; Chen *et al*. 2018a)，將純化之表現蛋白濃縮為 1 mg mL^{-1} 以做為抗原，並送交濁水溪生物科技有限公司 (台灣桃園市) 進行每週 1 次、每次注射 1 mg 之純化表現蛋白，連續 4 wk 的兔免疫注射，第 5 週起由兔耳朵進行靜脈採血，每次採約 30–40 mL 以獲得多元抗體。

EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體之檢測效果評估

EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體對不同 potyviruses 之檢測效果

本試驗參照前述 indirect ELISA 方法 (Clark & Adams 1977; Chang *et al*. 1988; Chen *et al*. 2018a) 進行受測樣品與 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體之反應。取 0.1 g 罹病葉組織進行試驗。

Indirect ELISA 法：首先以此免疫檢測法評估本研究所自製的多元抗體之檢測效果，以 EAPV-AOCP、EAPV-IBCP 以及經等比例混合之 EAPV-AOCP/EAPV-IBCP (稱之為 Anti-EAPVmix) 多元抗體等 3 種組合，分別稀釋 1,000× 液後，再與受測樣品進行反應，樣品來源包括 2017–2020 年於國內田間百香果田區採集之單獨罹染 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 之分離株、毛西番蓮 (*Passiflora foetida*) 分離株 EAPV-AO-PF1、泰國與越南之百香果 potyvirus 病毒株、本研究室保存之不同 *Potyvirus* 屬病毒罹病組織 (表 1)；文獻記錄上可感染百香果之其他種 potyviruses (Fischer & Rezende 2008; Parrella & Lanave 2009)，則以本研究室保存者替代之，包括 CABMV (Chang & Lin 1989)、bean yellow mosaic virus (BYMV) (Chen *et al*. 1999)、Passiflora virus Y (PaVY 豇豆分離株) (鄭櫻慧博士提供) 和 soybean mosaic virus (SMV 大豆分離株)。

取 0.1 g 之罹病葉組織，以 3 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 研磨均勻後，加入 96 孔 enzyme immunoassay (EIA) 反應盤內 (100 μL/孔)，進行 indirect ELISA 檢測；呈色反應以 150 μL/孔之比例加入濃度為 1 mg mL^{-1} 之鹼性磷酸酶酵素基質 (p-Nitrophenyl phosphate; p-NPP) (Amresco, Solon, OH, USA) 進行。反應 30–35 min 後，以 ELISA 讀值儀 (PTI max microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值，做為評估病毒濃

表 1. 利用細菌表現之 East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO 和 EAPV-IB 融合性鞘蛋白所製備的多元抗體於間接式酵素連結免疫吸附法檢測不同 *Potyvirus* 病毒之效果。

Table 1. Detection effectiveness of the polyclonal antibodies against the bacterial-expressed fusion coat proteins of East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO and EAPV-IB reacted with different potyviruses in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

	ELISA reading (A_{405nm})[y]		
Virus-infected sample[z]	Anti-EAPV-AOCP	Anti-EAPV-IBCP	Anti-EAPVmix[x]
East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO-Tw			
EAPV-AO-Tw	1.786	1.305	1.625
EAPV-AO-PF1	1.356	0.918	1.490
EAPV-IB-Tw	1.954	2.401	2.669
Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)	0.272	0.750	0.608
Telosma mosaic virus (TeMV)			
TeMV-Tw	0.592	0.849	1.101
TeMV-TL	0.602	0.808	0.892
Passionfruit Vietnam virus (PVNV)-VN	0.333	0.583	0.735
Passiflora virus Y (PaVY)	1.455	2.159	2.173
Soybean mosaic virus (SMV)	1.283	1.333	2.143
Bean yellow mosaic virus (BYMV)	0.408	1.151	1.337
Bean common mosaic virus (BCMV)-BlCM	0.795	0.922	0.819
Potato virus Y (PVY)-potato	0.582	1.015	0.673
Papaya ringspot virus (PRSV)	1.217	2.045	2.018
Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)	0.701	1.694	1.614
Maize dwarf mosaic virus (MDMV)	0.922	1.251	1.568
Butterfly flower mosaic virus (BFMV)	0.245	1.033	1.457
Ornithogalum mosaic virus (OrMV)-Or1	0.644	0.851	1.217
Turnip mosaic virus (TuMV)-YC5	0.194	0.289	0.365
Bidens mottle virus (BiMV)-Leu	0.265	0.941	1.056
Zantedeschia mild mosaic virus (ZaMMV)	0.496	1.031	0.957
Konjac mosaic virus (KoMV)	0.092	0.159	0.177
Dasheen mosaic virus (DMV)	0.063	0.147	0.115
Lycoris potyvirus	0.240	0.261	0.329
Lily mottle virus (LMoV)	0.088	0.330	0.410
D-CK	2.972	2.625	2.955
2H-CK	0.108	0.182	0.190

[z] Tested potyviruses are collected and preserved materials in the laboratory. TeMV-TL was collected from Thailand's passion fruit fields in 2019. PVNV-VN was collected from Vietnam in 2019. EAPV-AO-PF1 was collected from *Passiflora foetida*.
[y] The mean absorbance value of two replicate wells is shown. Samples with ELISA readings lower than two times of the healthy control (2H-CK) are considered undetectable. The bacterial-expressed viral proteins are used as positive controls (D-CK).
[x] Anti-EAPVmix represents an equivalent mixture of Anti-EAPV-AOCP and Anti-EAPV-IBCP.

度高低之依據。樣品吸光值大於 2 倍之健康葉片吸光值者，判讀為正反應。

另以於西方墨點法中，選用 EAPV-AO、EAPV-IB、CABMV、BYMV、PaVY、SMV 和 TeMV 進行反應，評估上述單獨或混合式等 3 種抗體組合對受測樣品的反應性。

病毒多元抗體檢測敏感度分析

本試驗分別以 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體，以及 Anti-EAPVmix 抗體等 3 種組合，加上以往已完成之 TeMV-CP 多元抗體 (Lee *et al*. 2020)，以稀釋 1,000× 液進行檢測敏感度之比較分析。

將單獨罹染 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 之百香果罹病組織，取 0.1 g 組織先行以 3 mL 之 15 mM碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 研磨後，再以此緩衝液經 5× 系列稀釋至 5^{-8} 的樣品液，各稀釋液分別取定量 (100 μL $well^{-1}$) 加入 96 孔 EIA 反應盤內，每樣品加 2 孔為 2 重複，進行 indirect ELISA 反應；最終進行 35 min 之呈色反應。樣品吸光值大於 2 倍之健康葉片吸光值者，視為正反應。

EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體及其抗體混合液對百香果罹病組織之檢測效果

為評估以單獨 EAPV-AOCP 或 EAPV-IBCP 多元抗體及 Anti-EAPVmix 抗體對百香果病毒罹病組織之檢出效果，本試驗將受測樣品數放大，選用單獨罹染受測病毒之百香果罹病組織包括 EAPV-AO 有 23 個、EAPV-IB 有 27 個和 TeMV 有 30 個；其中 TeMV 百香果分離株包括有台灣分離株 21 個和泰國分離株 9 個，乃分別屬於不同地理類緣關係者 (Lee *et al*. 2020)。每種受測樣品均分別與上述 EAPV-AOCP、EAPV-IBCP 多元抗體和抗體混合液 Anti-EAPVmix 等 3 種抗體組合進行 indirect ELISA 檢測，分析被檢出病毒的樣品數。而 TeMV 罹病樣品則加測與 TeMV-CP 多元抗體 (Lee *et al*. 2020) 之反應，以做為 TeMV-CP 多元抗體檢出病毒之正反應對比。

以 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體混合液檢測百香果罹病枝條之病毒分布

檢取確認有罹染 EAPV-AO 或 EAPV-IB 之百香果枝條共 51 條，以新芽端起始，將枝條依序劃分為上、中、下三段，分別採樣每區段上之葉片和莖部組織各 0.2 g，以 6 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (pH 9.6) 研磨均勻後，加入 96 孔 EIA 反應盤內 (100 μL/孔)，以抗體混合液 Anti-EAPVmix 進行 indirect ELISA 檢測試驗，評估各不同枝條部位上葉片及莖部組織的病毒分布差異。

以 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體混合液檢測台灣田間百香果罹病樣品之效果

由上述已建立的最適當取樣部位進行採樣，以 indirect ELISA 法檢測南投縣埔里大坪頂百香果栽培區之 12 個田區和后里 1 個田區的百香果葉片樣品，進行病毒病發生調查。分別以 EAPV-AOCP、EAPV-IBCP 和抗體混合液 Anti-EAPVmix 等 3 組多元抗體進行檢測，評估對田間百香果病毒的檢出率。

結果

EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 融合性蛋白表現及其多元抗體檢測評估

EAPV-AO 和 EAPV-IB 之 CP 表現蛋白免疫檢測結果：本研究針對 EAPV-AO 和 EAPV-IB 全長度 CP 核酸片段分別所構築之 pET-EAPV-AOCP 和 pET-EAPV-IBCP 選殖株，在 *E. coli* Rosetta (DE3) 宿主內以 1 mg mL^{-1} 之 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) 誘導蛋白質之表現，兩者均包含有部分 pET28a(+) 表現載體的融合性蛋白，表現蛋白分子量預估分別為 EAPV-AOCP 約為 37 kDa、EAPV-IBCP 約為 33 kDa，於 SDS-PAGE 電泳分析中均可見其融合性表現蛋白分子量，與預估值相符且為不帶有病毒核酸嵌入序列的 pET28a(+) 表現載體所有 (圖 1A)。於西方墨點法中，市售 *Potyvirus* 病毒的單元抗體可與 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 表現蛋白產生正反應 (圖 1B)，顯示本研究之 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 表現蛋白均具有 *Potyvirus* 病毒之抗原特性；進一步分別以各自的表現蛋白為抗原所製成之多元抗體，由西方墨點法分析結果，顯示可分別與其同源的表現蛋白 (EAPV-AOCP/37 kDa、EAPV-IBCP/33 kDa) 產生正反應 (圖 1C)。

EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體對不同 potyviruses 的檢測效果：本研究所製備的 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體，除可

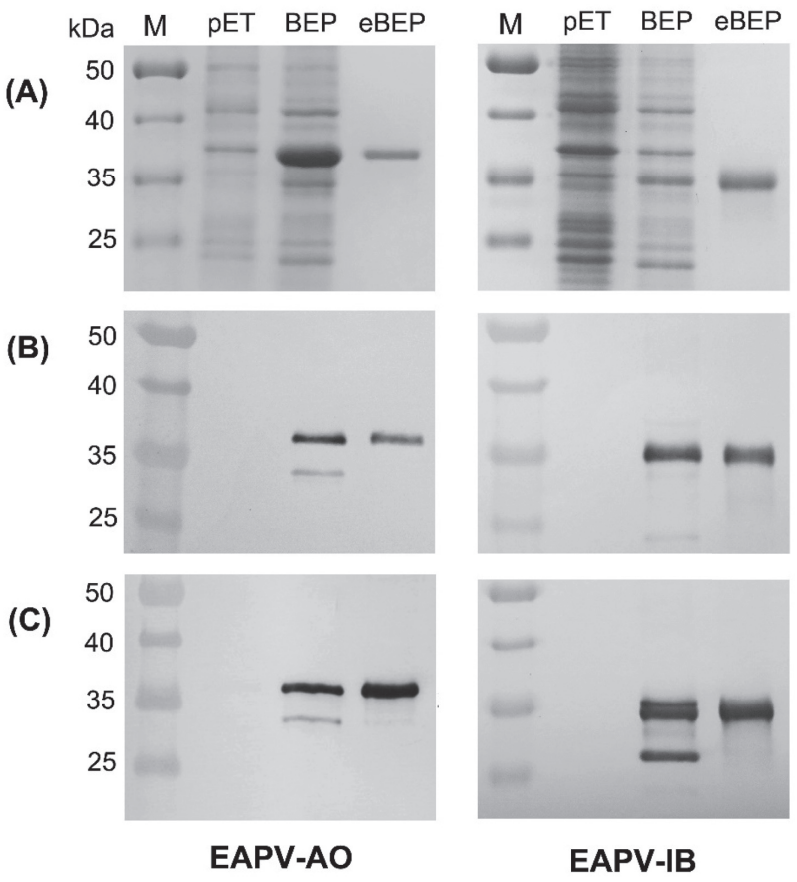


圖 1. 應用細菌大量表現的 East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO 和 EAPV-IB 融合性表現蛋白之 (A) SDS-PAGE 電泳及 (B、C) 西方墨點法分析。(A) SDS-PAGE 蛋白質電泳圖，病毒鞘蛋白之融合性表現蛋白分子量預估分別為 EAPV-AO/37 kDa 和 EAPV-IB/33 kDa。受測樣品分別與 (B) Agdia 公司出品之 *Potyvirus* 單元抗體 (C) 自製之 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體進行西方墨點法分析。行 M：蛋白質分子量標幟；行 pET：細菌表現之 pET28a(+) 蛋白 (未帶有病毒鞘蛋白)；行 BEP：細菌表現之病毒鞘蛋白；行 eBEP：純化後之細菌表現的病毒鞘蛋白。

Fig. 1. (A) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and (B, C) western blotting assays of the bacterial-expressed coat protein (CP) of East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO and EAPV-IB. (A) The bacterial-expressed fusion proteins of EAPV-AO (37 kDa) and EAPV-IB (33 kDa) (lane eBEP) were observed by SDS-PAGE. (B) The monoclonal antibody to *Potyvirus* purchased from Agdia, and (C) the polyclonal antibodies to EAPV-AO CP and EAPV-IB CP prepared in this study were used to react with the bacterial-expressed viral CPs. Lane M: protein markers; lane pET: IPTG-induced bacterial cell lysate containing the empty vector pET28a(+); lane BEP: IPTG-induced bacterial cell lysate containing pET28a(+) with viral CP insert; and lane eBEP: the purified bacterial-expressed CPs of EAPV-AO and EAPV-IB, respectively.

與其同源的融合性蛋白產生正反應外 (圖 1C)；也可於 indirect ELISA 法中分別與下列樣品產生正反應 (表 1)，包括 (1) 同源病毒之融合性蛋白 (D-CK)；(2) 百香果 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 罹病組織；TeMV 包含台灣 (Tw) 和泰國 (TL) 分離株；(3) 毛西番蓮 EAPV-AO-PF1 分離株；(4) 記錄上可感染百香果之其他種 potyviruses 包括 BYMV、CABMV、PaVY 豆類分離株、SMV 及越南新興百香果病毒 PVNV-VN；(4) 其他受測試之不同 potyviruses (表 1)。本結果顯示所製備出之 2 種 EAPV 分離株之多元抗體，均可檢出至少 19 種受測

試的不同 potyviruses，具有廣效性檢測同屬病毒的效果。而以等比例混合的 EAPV-AOCP/EAPV-IBCP 多元抗體 (Anti-EAPVmix)，同樣具有廣效性檢出 19 種受測 potyviruses 樣品的效果 (表 1)。

進一步於西方墨點法分析結果顯示：本研究之 EAPV-AOCP、EAPV-IBCP 多元抗體及其抗體混合液 Anti-EAPVmix 對於文獻記錄上可感染百香果之不同 *Potyvirus* 屬病毒 (圖 2) 包括 EAPV-AO、EAPV-IB、CABMV、BYMV、PaVY、SMV 和 TeMV 於對應病毒 CP 的條帶上均產生正反應，顯示此等抗體於 indirect ELISA 對上述受測樣品產生正反應者，確實是與受測病毒分子產生反應之結果。

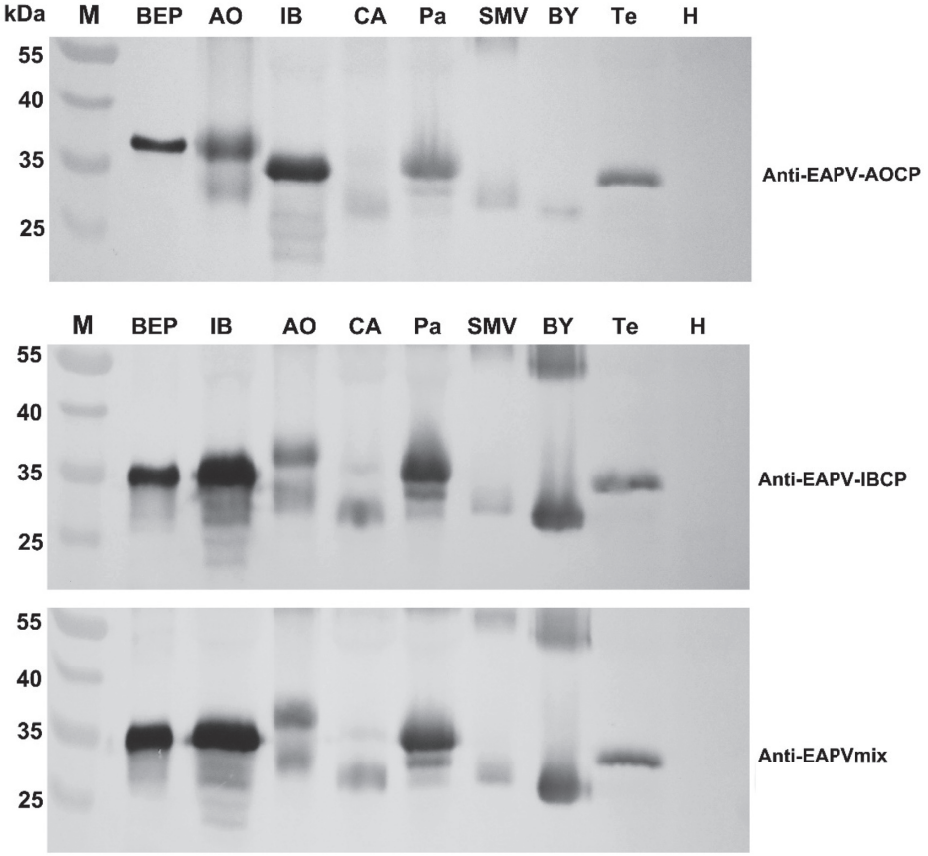


圖 2. 以西方墨點法分析 East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO 和 EAPV-IB 多元抗體及其抗體混合液對不同馬鈴薯 Y 屬病毒之反應。受測樣品分別與多元抗體 Anti-EAPV-AOCP、Anti-EAPV-IBCP 以及此兩種病毒抗體等比例混合者 (Anti-EAPVmix) 進行反應。行 M：蛋白質分子量標幟；行 BEP：細菌表現之 pET28a(+) 病毒鞘蛋白正對照；不同罹病組織包括：行 AO (EAPV-AO)、行 IB (EAPV-IB)、行 CA (cowpea aphid-borne mosaic virus; CABMV)、行 Pa (Passiflora virus Y; PaVY)、行 SMV (soybean mosaic virus; SMV)、行 BY (bean yellow mosaic virus; BYMV)、行 Te (Telosma mosaic virus; TeMV)；行 H：健康百香果葉片組織。

Fig. 2. Analysis of the polyclonal antibodies of East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO, EAPV-IB and their mixture reacted to different potyviruses in western blotting assay. Samples were reacted to the antibodies of Anti-EAPV-AOCP, Anti-EAPV-IBCP and Anti-EAPVmix (the mixture of Anti-EAPV-AOCP and Anti-EAPV-IBCP at equal ratio), respectively. Lane M: protein markers; lane BEP, IPTG-induced bacterial cell lysate containing pET28a(+) with viral CP insert; different virus-infected passiflora leaf tissues including: lane AO (EAPV-AO), lane IB (EAPV-IB), lane CA (cowpea aphid-borne mosaic virus; CABMV), lane Pa (Passiflora virus Y; PaVY), lane SMV (soybean mosaic virus; SMV), lane BY (bean yellow mosaic virus; BYMV) and lane Te (Telosma mosaic virus; TeMV); lane H: the healthy passiflora tissues.

病毒多元抗體檢測敏感度分析

於 indirect ELISA 檢測中，以高於健康對照的 ELISA 讀值 (A_{405nm}) 2 倍判讀為正反應之依據，本試驗分別以 EAPV-AOCP、EAPV-IBCP 多元抗體和抗體混合液 (Anti-EAPVmix) 進行對檢出受測樣品的敏感度。以 EAPV-AOCP 多元抗體而言，對其同源病毒 EAPV-AO 具有較高之檢測敏感度，可達樣品稀釋倍數的 5^{-8}，此檢測敏感度分別高於對檢測 EAPV-IB 和 TeMV 的 5× 和 25× (表 2)；以 EAPV-IBCP 多元抗體而言，對其同源病毒 EAPV-IB 也具有較高之檢測敏感度，可達樣品稀釋倍數的 5^{-7}，此檢測敏感度分別高於對檢測 EAPV-AO 和 TeMV 的 5× 和 25× (表 2)；以抗體混合液 Anti-EAPVmix 而言，均可檢出 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV，且可檢出各種受測病毒樣品的稀釋倍數至少可達到 5^{-6} (表 2)；本試驗另測試以往已研製的 TeMV-CP 多元抗體，均可檢出 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 百香果罹病組織，可檢出各種受測病毒樣品的稀釋倍數至少可達到 5^{-6} (表 2)。本研究進一步顯示 EAPV-AOCP、EAPV-IBCP 和 TeMV-CP 多元抗體對彼此之病毒抗原均有免疫反應性，雖無法做為專一性抗體，但具有廣效性檢測的成效。

表 2. 以細菌表現之 East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO 和 EAPV-IB 融合性鞘蛋白製備出之多元抗體對檢測同源抗原和 Telosma mosaic virus (TeMV) 之敏感度分析。

Table 2. Sensitivity detection of the polyclonal antibody against bacterial expressed fusion coat proteins of East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO and EAPV-IB reacted to their original virus and Telosma mosaic virus (TeMV).

	ELISA reading (A_{405nm}) of series dilutions of antigen[y]							
Antigen[z]	5^{-1}	5^{-2}	5^{-3}	5^{-4}	5^{-5}	5^{-6}	5^{-7}	5^{-8}
Reacted with Anti-EAPV-AOCP								
EAPV-AO	1.254	2.198	2.097	1.442	0.590	0.251	0.116	0.106
EAPV-IB	0.733	1.692	1.542	1.043	0.725	0.164	0.097	0.039
TeMV	0.804	1.032	0.561	0.219	0.151	0.114	0.067	0.071
2H-CK	0.180	0.064	0.098	0.074	0.046	0.072	0.074	0.090
Reacted with Anti-EAPV-IBCP								
EAPV-AO	0.894	1.643	1.550	1.213	0.554	0.206	0.136	0.150
EAPV-IB	1.650	2.149	2.285	2.249	1.363	0.444	0.242	0.162
TeMV	1.231	1.407	0.863	0.491	0.350	0.179	0.148	0.094
2H-CK	0.102	0.072	0.076	0.088	0.142	0.196	0.208	0.230
Reacted with Anti-TeMVCP								
EAPV-AO	0.592	1.505	1.466	1.365	0.872	0.301	0.198	0.101
EAPV-IB	0.539	1.293	1.336	1.206	0.886	0.408	0.189	0.122
TeMV	2.252	2.602	2.254	1.557	1.007	0.316	0.144	0.094
2H-CK	0.144	0.060	0.068	0.070	0.100	0.108	0.178	0.162
Reacted with Anti-EAPVmix[x]								
EAPV-AO	1.753	2.430	2.347	1.951	1.269	0.568	0.315	0.288
EAPV-IB	1.608	2.445	2.476	2.486	1.922	0.675	0.356	0.256
TeMV	1.419	1.785	1.773	0.645	0.489	0.281	0.232	0.224
2H-CK	0.058	0.046	0.064	0.098	0.166	0.182	0.334	0.360

[z] Tested antigens are the diseased passiflora leaves individually infected by East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO, EAPV-IB and Telosma mosaic virus (TeMV).

[y] The mean absorbance value of two replicate wells is shown. Samples with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) readings lower than two times of the healthy control (2H-CK) are considered undetectable. The underlined value means the endpoint of positive detection by tested polyclonal antibody.

[x] Anti-EAPVmix represents an equivalent mixture of Anti-EAPV-AOCP and Anti-EAPV-IBCP.

EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體及其抗體混合液提升罹病組織病毒檢出率之效果

本試驗以單獨感染 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 之百香果罹病組織為受測對象，並放大檢測樣品數，用於評估單獨以 EAPV-AOCP 或 EAPV-IBCP 多元抗體、或抗體混合液 Anti-EAPVmix 對檢出罹病組織上特定病毒的效果，以釐清 Anti-EAPVmix 對檢測大量樣品的實際效益。由檢測結果顯示：(1) 對檢測 EAPV-AO 罹病組織而言 (表 3)，受測的 23 個樣品均能以 EAPV-AOCP 多元抗體或 Anti-EAPVmix 檢出，而正反應樣品的 ELISA 讀值平均值，則以 Anti-EAPVmix 檢出者為 0.616，高於單獨以 EAPV-AOCP 抗體檢出的 0.454；若以

表 3. 以 indirect ELISA 法和不同抗體檢測單獨罹染 East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO 之百香果罹病組織。

Table 3. Detection of the East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO infected passiflora tissues by different polyclonal antibodies in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

	ELISA reading (A_{405nm}) of samples detected with[y]		
EAPV-AO isolate[z]	Anti-EAPV-AOCP	Anti-EAPV-IBCP	Anti-EAPVmix[x]
1	0.666	0.145	0.715
2	0.530	0.099	0.613
3	0.517	0.246	0.608
4	0.282	0.107	0.293
5	0.292	0.126	0.385
6	0.770	0.384	1.196
7	0.432	0.177	0.543
8	1.519	1.190	2.031
9	0.784	0.403	1.310
10	0.682	0.153	1.005
11	0.466	0.230	0.672
12	0.319	0.129	0.414
13	0.311	0.114	0.429
14	0.255	0.124	0.340
15	0.210	0.089	0.250
16	0.312	0.077	0.477
17	0.374	0.119	0.496
18	0.276	0.095	0.348
19	0.411	0.155	0.602
20	0.233	0.105	0.335
21	0.246	0.075	0.330
22	0.239	0.054	0.312
23	0.314	0.103	0.457
D-CK	2.267	2.049	2.240
2H-CK	0.184	0.186	0.206
No. positive	23	5	23
Av. positive value	0.454	0.490	0.616

[z] Tested antigens are the diseased passiflora leaves only infected by East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO. Positive control (D-CK) is the bacterial expressed viral protein.

[y] The mean absorbance value of two replicate wells is shown. Samples with ELISA readings lower than two times of the healthy control (2H-CK) were considered undetectable by indirect ELISA.

[x] Anti-EAPVmix represents an equivalent mixture of Anti-EAPV-AOCP and Anti-EAPV-IBCP.

EAPV-IBCP 多元抗體檢測，則僅檢出 5 個樣品，正反應樣品讀值之平均值為 0.490；(2) 對檢測 EAPV-IB 罹病組織而言 (表 4)，受測的 27 個樣品均能以 EAPV-IBCP 多元抗體或 Anti-EAPV-mix 檢出，而正反應樣品的 ELISA 讀值平均值，則以 Anti-EAPVmix 檢出者為 1.604，高於單獨以 EAPV-IBCP 抗體檢出的 1.333；若以 EAPV-AOCP 多元抗體檢測，則僅檢出 26 個樣

表 4. 以 indirect ELISA 法和不同抗體檢測單獨罹染 East Asian Passiflora virus (EAPV)-IB 之百香果罹病組織。

Table 4. Detection of the East Asian Passiflora virus (EAPV)-IB infected passiflora tissues by different polyclonal antibodies in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

	ELISA reading (A_{405nm}) of samples detected with[y]		
EAPV-IB isolate[z]	Anti-EAPV-IBCP	Anti-EAPV-AOCP	Anti-EAPVmix[x]
1	1.975	1.385	2.181
2	0.806	0.450	1.067
3	0.806	0.453	1.223
4	0.461	0.282	0.785
5	0.903	0.558	1.350
6	1.383	0.897	1.740
7	2.245	1.397	2.398
8	2.075	1.157	2.216
9	1.233	1.004	1.404
10	2.163	1.636	2.210
11	1.513	0.867	1.742
12	0.508	0.495	1.058
13	1.758	1.780	1.585
14	1.190	0.985	1.802
15	1.597	0.967	2.174
16	1.276	0.639	1.443
17	1.838	1.210	1.431
18	0.852	0.667	1.066
19	0.888	0.751	1.376
20	1.023	0.952	1.617
21	0.853	0.712	1.514
22	1.440	0.999	2.094
23	1.466	0.850	1.658
24	2.150	1.992	2.398
25	2.052	1.232	1.751
26	1.550	0.813	1.726
27	0.168	0.168	0.286
D-CK	2.317	2.992	2.386
2H-CK	0.145	0.168	0.206
No. positive	27	26	27
Av. positive value	1.333	0.967	1.604

[z] Tested antigens are the diseased passiflora leaves only infected by East Asian Passiflora virus (EAPV)-IB. Positive control (D-CK) is the bacterial expressed viral protein.

[y] The mean absorbance value of two replicate wells is shown. Samples with ELISA readings lower than two times of the healthy control (2H-CK) were considered undetectable by indirect ELISA.

[x] Anti-EAPVmix represents an equivalent mixture of Anti-EAPV-AOCP and Anti-EAPV-IBCP.

品，讀值平均值為 0.967；(3) 對檢測 TeMV 罹病組織而言 (表 5)，受測的 30 個樣品中 (包含 21 個台灣分離株和 9 個泰國分離株)，均能以 TeMV-CP 多元抗體或抗體混合液 Anti-EAPV-mix 檢出，其正反應樣品的 ELISA 讀值平均值，則以 TeMV 多元抗體檢出者的 1.452，高於以 Anti-EAPVmix 檢出之 0.628；若單獨以 EAPV-AOCP 或 EAPV-IBCP 多元抗體做檢測，則檢出之樣品數分別為 19 和 16 個，無法全數檢出 TeMV。

本試驗結果進一步顯示，對田間罹染病毒的百香果罹病組織而言，在放大受檢樣品數時，以抗體混合液 Anti-EAPVmix 均可檢出 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV，且對 EAPV-AO 和 EAPV-IB 的檢測，有優於單獨以個別抗體檢測的效果；此外，本抗體混合液均可檢出台灣和泰國的百香果 TeMV 分離株，有達到以非同源抗體進行替代性檢測不同類病毒的效果。

以 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體混合液檢測百香果罹病枝條之病毒分布

本研究探討以抗體混合液 Anti-EAPVmix 檢測百香果枝條上、中、下三區段內之葉片和莖部採樣對檢出病毒的影響，檢測罹染 EAPV-AO 或 EAPV-IB 共 51 個枝條的結果顯示：無論是取樣哪個區段的受測組織，以採取葉片組織做檢測，所獲得的 ELISA 正反應讀值平均 (A_{405nm}) (約 1.159–1.421) 均高於各區段的莖部組織檢測值 (約 0.727–0.907)，尤其以上段區域內的葉片 (含新葉) 之病毒檢出率最高，達 92.1%；其他各部位的病毒檢出率介於 68.6–78.4% (表 6)。

以 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 多元抗體混合液檢測不同田區百香果罹病樣品之效果

由上述已建立的 EAPV-AOCP/EAPV-IB-CP 抗體混合檢測法，以及最適當的枝條上段葉片取樣部位為基礎，以 indirect ELISA 法檢測進行田間不同百香果田區的病毒發生調查。由埔里大坪頂 12 個田區和后里 1 個田區共 387 個受檢樣品，結果顯示以抗體混合液 Anti-EAPVmix 可檢出 321 個樣品罹染病毒，均高於單獨以 EAPV-AOCP 抗體檢出數 302 個和以 EAPV-IBCP 抗體檢出數 274 個，顯示抗體混合法可檢出更多罹染病毒的樣品數 (表 7)，對田間百香果病毒發生調查有提升檢出病毒準確度的效果。

討論

本研究為台灣首度完成以細菌生合成系統誘導表現百香果病毒 EAPV-AOCP 和 EAPV-IB-CP 做為抗原，製備出具有廣效檢測不同馬鈴薯 Y 屬病毒之多元抗體，並印證以此兩種多元抗體混合使用可提升對同源病毒及其他百香果 *Potyvirus* 病毒的檢測效率，除了可簡化免疫檢測法的操作及節省成本外，對於田間百香果病毒發生調查鑑定也可做為替代性的多元抗體使用，尤其用於廣效檢測 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 而提升檢出病毒的準確度；進一步以 indirect ELISA 法探討 EAPV 病毒在百香果枝條不同部位為不均勻分布，並掌握可提升檢出病毒之取樣部位，整體技術可提升以免疫檢測百香果 potyviruses 的效益。

EAPV-AO 和 EAPV-IB 為亞洲常見的百香果病毒 (Iwai *et al*. 2006b; Chang *et al*. 2017; Chong *et al*. 2018)；在台灣，引起嚴重型木質化病徵主要為 EAPV 的 AO 系統 (Chong *et al*. 2018)，影響百香果品質甚鉅，因此在百香果種苗產業上被高度重視；此 2 種病毒，在台灣於 2016 年行政院動植物防疫檢疫局公告實施為『百香果種苗病害驗證作業須知』之標的病毒。近年來 TeMV 在泰國、中國大陸和台灣的百香果田間發生，也會引起百香果木質化病徵 (Lixue *et al*. 2017; Yang *et al*. 2018; Lee *et al*. 2020; Xie *et al*. 2020)，筆者等人近年來調查 TeMV 在台灣百香果產地的檢出率大約在 32.1–35.8%，顯示 TeMV 已普遍存在台灣田間 (Lee *et al*. 2020)。本研究為提升以免疫檢測法對 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 等百香果病毒之檢出效率，除以往已完成 TeMV 多元抗體製備與免疫檢測應用外 (Lee *et al*. 2020)，

表 5. 以 indirect ELISA 法和不同抗體檢測單獨罹染 Telosma mosaic virus (TeMV) 之百香果罹病組織。

Table 5. Detection of the Telosma mosaic virus (TeMV)-infected passiflora tissues by different polyclonal antibodies in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

	ELISA reading (A_{405nm}) of samples detected with[y]			
TeMV isolate[z]	Anti-TeMVCP	Anti-EAPV-AOCP	Anti-EAPV-IBCP	Anti-EAPVmix[x]
Tw 1	2.037	0.348	0.300	0.634
Tw 2	1.186	0.214	0.236	0.428
Tw 3	1.023	0.090	0.112	0.251
Tw 4	1.511	0.539	0.249	0.898
Tw 5	1.407	0.153	0.179	0.299
Tw 6	1.920	0.437	0.343	0.647
Tw 7	1.746	0.310	0.135	0.461
Tw 8	1.279	0.405	0.459	0.589
Tw 9	1.618	0.216	0.110	0.430
Tw 10	1.647	0.358	0.178	0.682
Tw 11	0.992	0.203	0.115	0.370
Tw 12	2.060	0.479	0.455	0.738
Tw 13	1.672	0.256	0.247	0.390
Tw 14	1.025	0.123	0.142	0.310
Tw 15	1.382	0.215	0.136	0.415
Tw 16	1.530	0.202	0.105	0.607
Tw 17	1.351	0.158	0.128	0.299
Tw 18	1.683	0.398	0.184	0.732
Tw 19	1.473	0.652	0.246	1.035
Tw 20	2.240	0.824	0.883	1.223
Tw 21	1.789	1.084	0.722	1.507
TL1	1.334	0.643	0.398	1.019
TL3	1.062	0.237	0.421	0.681
TL5	1.408	0.367	0.165	0.695
TL6	0.894	0.329	0.311	0.694
TL7	1.790	0.651	0.380	1.055
TL8	1.666	0.446	0.579	0.880
TL9	1.763	0.729	0.411	0.788
TL14	0.599	0.114	0.072	0.304
TL15	0.461	0.073	0.076	0.392
D-CK	2.060	2.163	2.150	2.031
2H-CK	0.182	0.214	0.172	0.180
No. positive	30	19	16	30
Av. positive value	1.452	0.500	0.415	0.628

[z] Tested antigens are the diseased passiflora leaves only infected by Telosma mosaic virus (TeMV), sample Tw 1–21 are Taiwan isolates and TL is Thailand isolates. Positive control (D-CK) is the bacterial expressed viral protein.

[y] The mean absorbance value of two replicate wells is shown. Samples with ELISA readings lower than two times of the healthy control (2H-CK) are considered undetectable. The bacterial-expressed viral proteins are used as positive controls (D-CK).

[x] Anti-EAPVmix represents an equivalent mixture of Anti-EAPV-AOCP and Anti-EAPV-IBCP.

表 6. 應用多元抗體混合法於 indirect ELSIA 檢測百香果枝條不同部位之病毒分布。

Table 6. Detection of the viruses on different portions of passiflora branches by the mixture of polyclonal antibodies against East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO and EAPV-IB in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

	ELISA reading (A_{405nm}) of different portions on shoot[y]					
	Stem			Leaf		
Sample[z]	Upper	Middle	Lower	Upper	Middle	Lower
1	0.955	1.455	0.969	1.436	1.660	2.654
2	0.748	2.145	0.033	1.055	2.407	2.500
3	0.338	0.120	0.094	1.321	1.851	2.153
4	0.222	0.045	0.083	2.515	2.066	1.773
5	0.223	1.268	1.916	1.595	2.129	2.401
6	1.316	1.057	0.159	1.767	2.361	2.635
7	2.235	0.945	0.634	1.625	1.537	2.062
8	0.727	1.818	1.157	1.676	1.812	2.083
9	1.525	2.040	0.884	2.512	0.214	2.465
10	1.252	1.061	1.415	1.906	1.890	1.028
11	1.743	2.634	0.588	2.047	0.070	0.579
12	1.626	0.089	0.389	2.267	2.360	2.362
13	0.044	0.037	0.122	0.365	0.114	1.743
14	0.548	1.210	0.494	1.149	2.336	1.810
15	1.286	1.717	1.731	2.302	1.749	2.309
16	0.038	0.059	0.624	0.042	1.209	1.093
17	0.156	0.273	0.614	1.081	1.777	1.519
18	0.951	0.218	0.170	2.030	1.518	1.872
19	2.157	1.956	1.760	1.977	0.380	0.414
20	0.427	0.930	0.121	1.306	0.144	1.295
21	0.808	0.750	0.785	0.807	0.040	0.317
22	0.701	1.112	0.948	1.545	0.075	0.399
23	1.146	1.171	0.770	1.206	0.285	0.136
24	0.572	0.507	0.374	0.330	0.219	0.279
25	1.383	0.635	1.210	0.306	0.203	0.116
26	0.585	0.094	0.123	0.246	0.763	0.217
27	0.427	0.521	0.196	0.762	0.934	1.071
28	0.400	0.244	0.093	1.143	1.539	1.264
29	0.139	0.103	0.081	0.941	1.393	1.194
30	0.435	0.493	0.817	0.689	0.064	0.065
31	0.602	0.265	0.258	1.068	0.876	1.494
32	0.474	0.481	0.388	0.971	0.214	0.127
33	0.041	0.149	0.105	0.357	0.084	0.073
34	1.310	0.367	0.157	1.416	0.811	0.078
35	0.071	0.850	0.237	0.141	0.594	0.161
36	0.465	0.168	0.197	0.592	0.074	0.046

表 6. 應用多元抗體混合法於 indirect ELSIA 檢測百香果枝條不同部位之病毒分布。(續)

Table 6. Detection of the viruses on different portions of passiflora branches by the mixture of polyclonal antibodies against East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO and EAPV-IB in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). (continued)

	ELISA reading (A_{405nm}) of different portions on shoot[y]					
	Stem			Leaf		
Sample[z]	Upper	Middle	Lower	Upper	Middle	Lower
37	1.426	0.655	0.305	0.273	1.265	0.116
38	0.090	1.105	0.209	0.336	0.599	0.145
39	0.453	0.149	0.166	0.579	0.074	0.067
40	1.386	0.611	0.218	1.229	0.260	0.071
41	0.889	0.268	0.380	1.167	1.286	0.122
42	0.232	0.345	1.081	1.097	0.855	1.628
43	0.206	0.217	0.652	0.495	0.983	1.206
44	1.112	0.770	0.499	0.658	0.040	0.040
45	0.131	0.049	1.139	0.481	0.047	0.583
46	0.263	0.503	0.206	1.189	0.628	1.068
47	0.330	0.130	0.192	0.788	1.414	1.088
48	0.676	1.124	0.438	1.121	0.045	0.038
49	0.025	0.028	0.609	0.029	0.158	0.931
50	0.087	0.426	0.216	0.166	0.990	0.252
51	0.129	0.346	0.530	0.741	0.353	0.057
No. positive	40	38	35	47	38	35
% positive	78.4	74.5	68.6	92.1	74.5	68.6
Av. positive value	0.864	0.907	0.727	1.159	1.203	1.421

[z] Tested samples are the diseased passiflora leaves infected by East Asian Passiflora virus (EAPV)-AO, EAPV-IB or telosma mosaic virus (TeMV).

[y] The mean absorbance value of two replicate wells is shown. Samples with ELISA readings lower than two times of the healthy control (2H-CK) are considered undetectable. The bacterial-expressed viral proteins are used as positive controls (D-CK). Anti-EAPVmix represents an equivalent mixture of Anti-EAPV-AOCP and Anti-EAPV-IBCP was used for reaction.

於本研究中開發以細菌生合成系統誘導表現 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 做為多元抗體製備的抗原來源。由本研究結果顯示所獲得對應 EAPV-AOCP 和 EAPV-IBCP 的多元抗體，除了可有效檢測個別的同源病毒抗原外，也具有對其他百香果和花卉等 potyviruses (表 1) 的廣效性檢出效果。利用表現載體之細菌生合成系統獲得病毒 CP 抗原，可突破病毒罹病檢體缺乏或病毒純化不易的瓶頸，而成功製備出可有效檢測特定病毒之多元抗體與正對照品，進而掌握對特定病毒之檢測鑑定能力，此策略以往已見諸對台灣尚未發生之蘭花病毒 Cymbidium ringspot virus (CymRSV) (Chen & Chiang 2017) 及百香果 TeMV (Lee *et al*. 2020) 等病毒之檢測試劑製備，藉此技術可實用於開發不同來源病毒的檢測試劑，達到強化自主檢疫監測重要作物病毒的能力。

病毒多元抗體使用於免疫反應中容易產生非專一性的結果 (Shukla *et al*. 1988; Jordan & Hammond 1991)，乃因抗原免疫過程中，因為所對應同一分子的不同抗原決定基 (antigenic determinants) 而產生 (Souiri *et al*. 2014)；尤其以全長度 CP 為抗原所製備出的多元抗體，更容易導致對特定病毒的非專一性反應 (Shepard *et al*. 1974; Shukla *et al*. 1989)，多元抗體因此可針對不同病毒達到廣效性檢測的效果。廣

表 7. 以 indirect ELISA 法和不同抗體檢測田間百香果罹染病毒之檢出數。

Table 7. Field survey by detection of the passiflora viruses with the different polyclonal antibodies in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

	No. of samples positively detected by indirect ELISA[y]			
Field[z]	Tested no. samples	Anti-EAPV-AOCP	Anti-EAPV-IBCP	Anti-EAPVmix
Puli 1	40	30	31	36
Puli 2	15	12	10	12
Puli 3	30	28	9	28
Puli 4	5	5	5	5
Puli 5	32	9	6	11
Puli 6	50	43	42	47
Puli 7	27	23	22	23
Puli 8	39	31	30	33
Puli 9	22	11	11	11
Puli 10	29	28	27	28
Puli 11	23	21	22	22
Puli 12	28	19	18	20
Houli	47	42	41	45
Total no.	387	302	274	321

[z] Tested sapmples were collected from different passiflora fields located in Puli, Nantou County and Houli, Taichung City, Taiwan.
[y] No. of the virus positively detected samples was conducted by the in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) by the polyclonal antibody against East Asian Passiflora virus (EAPV)-AOCP, EAPV-IBCP and the mixture of EAPV-AOCP/EAPV-IBCP (Anti-EAPVmix) at equal ratio, respectively.

效性免疫檢測對檢測植物病毒而言，具有降低成本與提升對不同病毒 (或未知病毒) 同時檢出效率的優點，在國內外的研究上目前大多以 2 種或以上的病毒 CP 基因重組後，同時構築於表現載體上，再利用細菌表現融合性重組蛋白的方式以獲得多重抗原來源，以製備可廣效性檢測不同類病毒之抗體，相關成功的研究包括有可同時檢測瓜類或茄科病毒 cucumber mosaic virus (CMV)、papaya ringspot virus (PRSV) 和 groundnut bud necrosis virus (GBNV) (Kapoor *et al*. 2014a)；可同時檢測馬鈴薯病毒 potato virus Y (PVY) 和 PVX (Kapoor *et al*. 2014b) 的多元抗體等。

本研究以單獨表現 EAPV-AOCP 或 EAPV-IBCP 的融合性蛋白做為抗原而個別製備出之對應抗體，本身即具有可同時檢測多種 potyviruses 的效果 (表 1、圖 2)；在百香果病毒方面，包括可檢出常見的 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV，更可擴及毛西番蓮的 EAPV-AO 分離株、泰國 TeMV 分離株和越南的百香果新興病毒 PVNV (表 1)，具有高度檢出對不同來源的同屬病毒之潛力；而若改以抗體混合液 Anti-EAPVmix 進行檢測，同樣具有廣效性檢出 19 種受測 potyviruses 樣品的效果，尤其於 EAPV-AO、EAPV-IB 和 TeMV 罹病組織的稀釋倍數達 5^{-6} 時，仍均可以抗體混合液 Anti-EAPVmix 檢出 (表 2)；此外，若擴展到田間大量罹病樣品的檢測時，對病毒的檢出率以抗體混合法均有優於以單一種病毒抗體做檢測的效果 (表 3、表 4、表 7)，顯見本研究所使用的 EAPV-AOCP/EAPV-IBCP 抗體混合檢測方式，具有提升對百香果不同 potyviruses 廣效性檢測的成效，更可節省檢測耗材使用與成本。

病毒感染作物後，在植物體各部位組織內通常為不均勻分布 (Chen *et al*. 1999; Chen *et al*. 2013)，因此以免疫檢測法檢測病毒時，須配合適當的取樣部位以提升檢出準確度，例如筆者以往已報告由百合種球或植株根系取樣檢測可穩定檢出 Plantago asiatica mosaic virus (PlAMV) 病毒且獲得高檢出率 (Chen *et al*. 2013)。本研

究以 EAPV-AOCP/EAPV-IBCP 多元抗體混合法檢測田間罹染有 EAPV-AO 或 EAPV-IB 的百香果枝條，依其不同部位的葉片或莖部組織檢測病毒結果，可於近新芽區段的完全展開葉片檢出更高比例的病毒，顯示此區段上的葉片更適合用於做為病毒檢測的取樣部位；此對於建立百香果病毒檢測準確度上，除可應用抗體混合法同時檢測可能的百香果不同 potyviruses 時，簡化檢測用抗體種類和節省成本外，更可採樣適當部位達到以免疫檢測提升病毒檢出率的成效。

本研究發現以 EAPV-AOCP/EAPV-IBCP 抗體混合方式可達到檢出台灣和泰國 TeMV 百香果分離株的效果 (表 1、表 5)，其重要意義在於泰國 TeMV 分離株與台灣分離株在 CP 胺基酸的相同度比較分析中，具有不同地理位置之類緣差異 (Lee *et al*. 2020)，仍可以本研究之免疫檢測方法檢出；此外，也可檢出越南新興的百香果病毒 PVNV (Chong 2018) (表 1)。本研究所應用之抗體混合法可一次檢出潛在的 EAPV-AO、EAPV-IB、TeMV 和 PVNV 等不同百香果 potyviruses (表 1)，可提升對田間監測不同 potyviruses 發生概況的效益，尤其對大量調查與篩檢不同地理位置之同類病毒具有相當高之應用潛力。而對於亞洲不同地理位置上之百香果 EAPV-AO、EAPV-IB、TeMV 或其他種 potyviruses 檢測，未來若能收集更多的國際百香果 potyviruses 進行檢測試驗，則可進一步對於本研究所研製的百香果病毒抗體之檢測廣度有更明確的成效評估。

誌謝

本試驗承本組病毒研究室助理黃美容小姐協助多元抗體檢測試驗；農業試驗所退休研究人員張清安博士保存於本實驗室之百香果 PCV (同 CABMV) 材料；行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 106 年百香果重要病毒檢測試劑套組開發應用計畫 [106 農科 -9.4.1- 檢 -B3 (1)] 和行政院農業委員會 107 年度農業研發成果跨域整合創新加值與產業化應用計畫 (MOST 107-3111-Y-067E-016) 之經費補助，謹此一併致謝。

引用文獻

Baranwal, V. K., R. Kapoor, S. Kumar, and N. Srivastava. 2020. Recent advances of virus diagnostics in horticultural crops. p.27–37. *in*: Applied Plant Virology: Advances, Detection, and Antiviral Strategies. (Awasthi, L. P., ed.) Academic Press. London, UK. 821 pp. doi:10.1016/B978-0-12-818654-1.00002-5

Chang, C. A. 1992. Characterization and comparison of passionfruit mottle virus, a newly recognized potyvirus, with passionfruit woodiness virus. Phytopathology 82:1358–1363. doi:10.1094/Phyto-82-1358

Chang, C. A., E. Hiebert, and D. E. Purcifull. 1988. Purification, characterization, and immunological analysis of nuclear inclusions induced by bean yellow mosaic and clover yellow vein potyviruses. Phytopathology 78:1266–1275. doi:10.1094/Phyto-78-1266

Chang, C. A. and H. H. Lin. 1989. Passionfruit crinkle virus, a new potyvirus isolated from passionfruit in Taiwan. Plant Prot. Bull. 31:409–410.

Chang, C. A., L. C. Huang, Y. C. Chen, Y. Y. Lin, H. C. Lu, and Y. D. Lin. 2017. A review of the research and control of passionfruit virus diseases in Taiwan. J. Plant Med. 59(3):1–12. doi:10.6716/JPM.201709_59(3).0001

Chen, C. C., C. A. Chang, and T. Dai. 1999. Variable distribution patterns of bean yellow mosaic potyvirus and cucumber mosaic cucumoviruses in gladiolus plant and their influence on virus detection. Plant Pathol. Bull. 8:117–120. (in Chinese with English abstract) doi:10.6649/PPB.199909_8(3).0005

Chen, C. C., H. T. Hsu, Y. H. Cheng, C. H. Huang, J. Y. Liao, H. T. Tsai, and C. A. Chang. 2006. Molecular and serological characterization of a distinct potyvirus causing latent infection in calla lilies. Bot. Stud. 47:369–378.

Chen, C. C., Y. L. Jhang, B. Y. Lin, F. L. Chiang, Y. H, Cheng, and T. C. Deng. 2013. Serological reagent preparation and improvement of serological method for the detection of *Plantago asiatica mosaic virus* in lily. J. Taiwan Agric. Res. 62:268–279. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2013.06203.07

Chen, C. C. and F. L. Chiang. 2017. Development and application of the molecular and serological detection methods for *Cymbidium ringspot virus*. J. Taiwan Agric. Res. 66:202–218. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2017.06603.04

Chen, C. C., F. L. Chiang, and C. H. Huang. 2018a. Molecular and serological identification of *Gloriosa stripe mosaic virus* on Christmas bells (*Sandersonia*

aurantiaca Hook). J. Taiwan Agric. Res. 67:229–246. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.201809_67(3).0001

Chen, C. C., F. L. Chiang, C. M. Hsu, and M. R. Huang. 2019. Development and application of nucleic acid detection technology for *East Asian Passiflora virus* and *Telosma mosaic virus*. J. Plant Med. 61(2–3):73. (in Chinese)

Chen, S., N. Yu, S. Yang, B. Zhong, and H. Lan. 2018b. Identification of *Telosma mosaic virus* infection in *Passiflora edulis* and its impact on phytochemical contents. Virol. J. 15:168. doi:10.1186/s12985-018-1084-6

Cheng, Y. H., T. C. Deng, C. C. Chen, C. H. Chiang, and C. A. Chang. 2014. First report of *Euphorbia leaf curl virus* and *Papaya leaf curl Guangdong virus* on passion fruit in Taiwan. Plant Dis. 98:1746. doi:10.1094/PDIS-05-13-0554-PDN

Chiemsombat, P., S. Prammanee, and N. Pipattanawong. 2014. Occurrence of *Telosma mosaic virus* causing passion fruit severe mosaic disease in Thailand and immunostrip test for rapid virus detection. Crop Prot. 63:41–47. doi:10.1016/j.cropro.2014.04.023

Chong, Y. H. 2018. Characterization of passionfruit-infecting viruses in Taiwan and Vietnam and generation of cross-protection effective mild strains of *East Asian Passiflora virus*. Doctoral Dissertation. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 163 pp.

Chong, Y. H., Y. H. Cheng, H. W. Cheng, Y. C. Huang, and S. D. Yeh. 2018. The virus causing passionfruit woodiness disease in Taiwan is reclassified as *East Asian Passiflora virus*. J. Gen. Plant Pathol. 84:208–220. doi:10.1007/s10327-018-0777-4

Clark, M. F. 1981. Immunosorbent assays in plant pathology. Ann. Rev. Phytopathol. 19:83–106. doi:10.1146/annurev.py.19.090181.000503

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475–483. doi:10.1099/0022-1317-34-3-475

Coutts, B. A., M. A. Kehoe, C. G. Webster, S. J. Wylie, and R. A. C. Jones. 2011. Indigenous and introduced potyviruses of legumes and *Passiflora* spp. from Australia: Biological properties and comparison of coat protein nucleotide sequences. Arch Virol. 156:1757–1774. doi:10.1007/s00705-011-1046-4

Do, D. H., Y. H. Chong, V. C. Ha, H. W. Cheng, Y. K. Chen, T. N. L. Bui, T. B. N. Nguyen, and S. D. Yeh. 2021. Characterization and detection of passiflora mottle virus and two other potyviruses causing passionfruit woodiness disease in Vietnam. Phytopathology 111:1675–1685. doi:10.1094/PHYTO-10-20-0481-R

Fischer, I. H. and J. A. M. Rezende. 2008. Diseases of passion flower (*Passiflora* spp.). Pest Technol. 2(1–2):1–19.

Fukumoto, T., M. Nakamura, M. Rikitake, and H. Iwai. 2012. Molecular characterization and specific detection of two genetically distinguishable strains of *East Asian Passiflora virus* (EAPV) and their distribution in southern Japan. Virus Genes 44:141–148. doi:10.1007/s11262-011-0676-7

Ha, C., S. Coombs, P. A. Revill, R. M. Harding, M. Vu, and J. L. Dale. 2008. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. Arch. Virol. 153:25–36. doi:10.1007/s00705-007-1053-7

Iwai, H., R. Terahara, Y. Yamashita, S. Ueda, and M. Nakamura. 2006a. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of an Amami-O-Shima strain of *East Asian Passiflora potyvirus*. Arch. Virol. 151:1457–1460. doi:10.1007/s00705-006-0779-y

Iwai, H., Y. Yamashita, N. Nishi, and M. Nakamura. 2006b. The potyvirus associated with the dappled fruit of *Passiflora edulis* in Kagoshima prefecture, Japan is the third strain of the proposed new species *East Asian Passiflora virus* (EAPV) phylogenetically distinguished from strains of *Passion fruit woodiness virus*. Arch. Virol. 151:811–818. doi:10.1007/s00705-005-0659-x

Jordan, R. and J. Hammond. 1991. Comparison and differentiation of potyvirus isolates and identification of strain-, virus-, subgroup-specific and potyvirus group-common epitopes using monoclonal antibodies. J. Gen. Virol. 72:25–36. doi:10.1099/0022-1317-72-1-25

Kapoor, R., B. Mandal, P. K. Paul, P. Chigurupati, and R. K. Jain. 2014a. Production of cocktail of polyclonal antibodies using bacterial expressed recombinant protein for multiple virus detection. J. Virol. Methods 196:7–14. doi:10.1016/j.jviromet.2013.09.016

Kapoor, R., B. Mandal, P. K. Paul, and R. K. Jain. 2014b. Simultaneous detection of potato viruses Y and X by DAC-ELISA using polyclonal antibodies raised against fused coat proteins expressed in *Escherichia coli*. J. Plant Biochem. Biotechnol. 23:332–335. doi:10.1007/s13562-013-0251-5

Kil, E. J., H. Seo, H. S. Byun, S. S. Suh, T. K. Lee, K. Y. Lee, J. H. Lee, J. K. Kim, S. J. Ko, H. S. Choi, C. S. Kim, and S. Lee. 2016. First report of *Euphorbia leaf curl virus* in passion fruits in South Korea and its natural occurrence in papaya. Plant Dis. 100:865. doi:10.1094/PDIS-08-15-0854-PDN

Koenig, R. and H. L. Paul. 1982. Variants of ELISA in plant virus diagnosis. J. Virol. Methods 5:113–125. doi:10.1016/0166-0934(82)90088-X

Lee, W. L., C. Thanarut, C. C. Hsu, G. C. Lee, F. L. Chiang, and C. C. Chen. 2020. Molecular characterization of the *Telosma mosaic virus* passionfruit isolates and the development and application of its wide-spectrum molecular detection techniques. J. Taiwan Agric. Res. 69:46–64. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.202003_69(1).0004

Li, R. H., F. W. Zettler, D. E. Purcifull, and E. Hiebert. 1998. The nucleotide sequence of the 3′-terminal region of dasheen mosaic virus (*Caladium* isolate) and expression of its coat protein in *Escherichia coli* for antiserum production. Arch. Virol. 143:2461–2469. doi:10.1007/s007050050476

Liberato, J. R. and F. M. Zerbini. n.d. Diseases of Passionfruit (*Passiflora* spp.). The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Passionfruit.aspx (visit on 08/25/2021)

Lixue, X., X. Y. Zhang, S. Zheng, L. J. Zhang, and T. Li. 2017. Molecular identification and specific detection of *Telosma mosaic virus* infecting passion fruit. Sci. Agric. Sin. 50:4725–4734.

Ma, X. Y., J. H. Cai, G. X. Li, B. X. Qin, and X. P. Zhou. 2004. Molecular characterization of a distinct *Begomovirus* infecting *Euphorbia pulcherrima* in China. J. Phytopathol. 152:215–218. doi:10.1111/j.1439-0434.2004.00832.x

Nakasato, K., S. Fujioka, Y. Sugawara, T. Ono, T. Nishio, and S. Tsuda. 2020. First detection of two potyviruses, uraria mosaic virus and passiflora mosaic virus Y, from passionfruit in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 86:401–404. doi:10.1007/s10327-020-00932-4

Nascimento, A. V. S., E. N. Santana, A. S. K. Braz, P. F. Alfenas, G. Pio-Ribeiro, G. P. Andrade, M. G. de Carvalho, and F. M. Zerbini. 2006. Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. Arch. Virol. 151:1797–1809. doi:10.1007/s00705-006-0755-6

Noveriza, R., G. Suastika, S. H. Hidayat, and U. Kartosuwondo. 2012. Potyvirus associated with mosaic disease on patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] plants in Indonesia. J. ISSAAS 18(1):131–146.

Pappu, S. S., H. R. Pappu, C. A. Chang, A. K. Culbreath, and J. W. Todd. 1998. Differentiation of biologically distinct peanut stripe potyvirus strains by a nucleotide polymorphism-based assay. Plant Dis. 82:1121–1125. doi:10.1094/PDIS.1998.82.10.1121

Parrella, G. and C. Lanave. 2009. Identification of a new pathotype of *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) infecting blue passion flower and some evolutionary characteristics of BYMV. Arch Virol. 154:1689–1694. doi:10.1007/s00705-009-0485-7

Shepard, J. F., G. A. Secor, and D. E. Purcifull. 1974. Immunochemical cross-reactivity between the dissociated capsid proteins of PVY group plant viruses. Virology 58:464–475. doi:10.1016/0042-6822(74)90081-6

Shukla, D. D., P. M. Strike, S. L. Tracy, K. H. Gough, and C. W. Ward. 1988. The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. J. Gen. Virol. 69:1497–1508. doi:10.1099/0022-1317-69-7-1497

Shukla, D. D., J. Jilka, M. Tosic, and R. E. Ford. 1989. A novel approach to the serology of potyviruses involving affinity-purified polyclonal antibodies directed towards virus-specific N termini of coat proteins. J. Gen. Virol. 70:13–23. doi:10.1099/0022-1317-70-1-13

Song, Y. S. and K. H. Ryu. 2011. The complete genome sequence and genome structure of passion fruit mosaic virus. Arch Virol. 156:1093–1095. doi:10.1007/s00705-011-0961-8

Souiri, A., M. Zemzami, S. Amzazi, and M. M. Ennaji. 2014. Polyclonal and monoclonal antibody-based methods for detection of plant viruses. Eur. J. Sci. Res. 123:281–295.

Spiegel, S., M. Zeidan, I. Sobolev, Y. Beckelman, V. Holdengreber, Y. Tam, M. Bar Joseph, Z. Lipsker, and A. Gera. 2007. The complete nucleotide sequence of Passiflora latent virus and its phylogenetic relationship to other carlaviruses. Arch Virol. 152:181–189. doi:10.1007/s00705-006-0833-9

Tsai, Y. T. 2019. Isolation and identification of *Telosma mosaic virus* on passionfruit in Taiwan and development of its detection techniques. Master Thesis. International Master Program of Agriculture, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 94 pp.

Wang, X., Y. Xie, and X. Zhou. 2004. Molecular characterization of two distinct begomoviruses from papaya in China. Virus Genes 29:303–309. doi:10.1007/s11262-004-7432-1

Wylie, S. J. and M. G. K. Jones. 2011. The complete genome sequence of a *Passion fruit woodiness virus* isolate from Australia determined using deep sequencing, and its relationship to other potyviruses. Arch. Virol. 156:479–482. doi:10.1007/s00705-010-0845-3

Xie, L., F. Gao, J. Shen, X. Zhang, S. Zheng, L. Zhang, and T. Li. 2020. Molecular characterization of two recombinant isolates of telosma mosaic virus infecting *Passiflora edulis* from Fujian Province in China.

PeerJ 8:e8576. doi:10.7717/peerj.8576

Yang, K., H. Yan, L. Song, P. Jin, W. Miao, and H. Cui. 2018. Analysis of the complete genome sequence of a potyvirus from passion fruit suggests its taxonomic classification as a member of a new species. Arch. Virol. 163:2583–2586. doi:10.1007/s00705-018-3885-8

Yao, L. Z., X. O. Li, J. G. Wang, S. Y. Chen, and X. J. Wang. 2019. First report of *Telosma mosaic virus* infecting Emperor's Candlesticks (*Senna alata*) in China. Plant Dis. 103:594. doi:10.1094/PDIS-04-18-0706-PDN

Improvement of Wide-Spectrum Detection of Different Potyviruses Infecting Passion Fruit by the Mixture of Two Kinds of Polyclonal Antibodies Against East Asian Passiflora Virus

Chin-Chih Chen[1,*], Fen-Lang Chiang[2], Ying-Huey Cheng[1], and Jia-Yi Liao[2]

Abstract

Chen, C. C., F. L. Chiang, Y. H. Cheng, and J. Y. Liao. 2022. Improvement of wide-spectrum detection of different potyviruses infecting passion fruit by the mixture of two kinds of polyclonal antibodies against east Asian passiflora virus. J. Taiwan Agric. Res. 71(2):101–121.

When the virus-infected passion fruits showed woodiness symptoms on fruits, the fruits were deformed and smaller resulting in a low juice rate, poor flavor and quality, which could cause a great impact on yield. Two East Asian Passiflora viruses (EAPV-AO and EAPV-IB) and Telosma mosaic virus (TeMV) are the three main potyviruses infecting passion fruits in Taiwan. In this study, the polyclonal antibodies against the coat proteins (CP) of EAPV-AO and EAPV-IB were respectively prepared from immunizing rabbits with the bacterial expressed viral CPs, revealing that both antibodies have a wide-spectrum response with 19 tested potyviruses. In indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA), the equivalent mixture of polyclonal antibodies against the CPs of EAPV-AO and EAPV-IB, denoted Anti-EAPVmix, could also be used to detect passionfruit isolates of TeMV from Taiwan and Thailand, and to improve the detection rate of EAPV-AO, EAPV-IB, and TeMV. The distribution of viruses on plant branches was detected by Anti-EAPVmix. The virus was detected at a high rate from the upper part near new leaves, which is recommended for sampling. Our result showed that the mixture of EAPV polyclonal antibodies can be used to detect not only the three major passiflora viruses in Taiwan but also other potyviruses to save the detection time and costs. The detection method can strengthen the field survey of passiflora viruses and the internal control of healthy seedlings.

Key words: *Passiflora* potyviruses, Polyclonal antibody, Antibody mixture, Wide-spectrum detection.

Received: August 17, 2021; Accepted: November 25, 2021.
* Corresponding author, e-mail: chinzue@tari.gov.tw
[1] Associate Research Fellows, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[2] Project Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 71(2):123–134 (2022)
DOI:10.6156/JTAR.202206_71(2).0003

研究報告

水稻花粉活力檢測方法研究

夏奇鈱[1] 游舜期[2] 曹進義[3] 蘇永傑[4] 李長沛[5,*]

摘要

夏奇鈱、游舜期、曹進義、蘇永傑、李長沛。2022。水稻花粉活力檢測方法研究。台灣農業研究 71(2):123–134。

水稻是台灣最重要的糧食作物，其產量與米質會受高溫的影響而下降，在水稻的生長過程中以開花當日對高溫最為敏感，因此瞭解花粉的耐熱性是評估耐熱水稻品種的重要指標。本研究除最適化水稻花粉培養所需配方外，並比較花粉染色法、花粉培養與電阻抗式流式細胞儀 (impedance flow cytometry; IFC) 3 種花粉活力檢測方法，同時以 IFC 檢測經不同溫度處理後花粉的活力變化。試驗以粳稻「台南 11 號」('Tainan 11'; 'TN11') 與耐熱秈型陸稻 (aus type) 'Nagina 22' ('N22') 為材料，針對花粉培養液中之蔗糖、硼酸及硝酸鈣逐項進行最適濃度測試，結果顯示 2 品種之花粉皆以含有 22.5% 蔗糖、60 mg L^{-1} 硼酸與 200 mg L^{-1} 硝酸鈣之培養液可獲得最高之花粉萌發率。比較 3 種染劑分別為二乙酸螢光素酯 (fluorescein diacetate; FDA)、2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride; TTC) 以及碘化鉀 (I_2/KI) 對水稻花粉之染色率，結果顯示 2 品種皆以 1% I_2/KI 之染色率最高，TTC 之染色率最低，FDA 染色率居中。利用花粉培養、FDA 染色及 IFC 分析三種方法進行花粉活力檢測，在 'TN11' 和 'N22' 均顯示 IFC 檢測與花粉培養或 FDA 染色之結果無顯著差異，顯示 IFC 可作為花粉活力快速檢測方法。進一步利用 IFC 檢測花粉經 25–45℃溫度處理 15 min 後之活力變化，結果顯示 'TN11' 之花粉活力隨著溫度上升明顯下降；而 'N22' 在溫度上升至 35℃時才開始下降，顯示 'N22' 花粉對於高溫的耐受性較 'TN11' 為高。

關鍵詞：水稻、花粉發芽培養基、花粉活力、電阻抗式流式細胞儀。

前言

近百年來，人類以石化燃料為主的能源活動型態，加速了地球溫室氣體量的累積，進而導致全球氣溫持續上升以及極端天氣的頻繁發生，對農業生產系統產生直接之衝擊 (Intergovernmental Panel on Climate Change 2013)。水稻是僅次於小麥的全球最重要穀類作物，也是台灣最主要的糧食作物，台灣水稻的生產亦必須面對全球氣候暖化衝擊的挑戰 (Ho *et al*. 2013)。對抗氣候暖化，除了研發各種栽培調適技術幫助作物度過逆境挑戰外，長期來看，選育耐高溫逆境的水稻新品種更為根本，因此如何對現有水稻遺傳資源的耐熱性作出快速有效率的評估，是育成耐熱水稻新品種的第一步，為此我們有必要瞭解高溫如何影響水稻的生長發育。

水稻在不同發育時期遭遇高溫所受到的影響並不相同，營養生長期的高溫，直接造成葉片光合作用率下降、同化產物減少、發生過氧化傷害，導致植株的生長受抑制，如分蘗減少、株高增長緩慢等。生殖期遭遇高溫，

投稿日期：2021 年 8 月 13 日；接受日期：2021 年 11 月 30 日。
* 通訊作者：charngpei@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。
[5] 農委會農業試驗所作物組副研究員。台灣 台中市。

則以抽穗開花期影響最大，其次是孕穗期 (花粉母細胞減數分裂期)，而抽穗期又以開花當日受高溫影響最大，高溫能讓花粉粒的膨脹率降低，導致花藥囊開裂比例下降，進而影響花粉粒的散出，造成雌蕊柱頭上花粉數不足，高溫同時也讓花粉管的伸長受阻，最終表現於穎花稔實率與米質的降低 (Matsui *et al*. 2000, 2001)。值得一提的是，上述生殖過程在穎花開放後約 1 h 間即可完成，所以發生於開花前 1 h 或開花後 1 h 的高溫對穎花授粉的影響力將明顯降低，也就是說高溫效應對水稻生殖影響巨大，但其最關鍵的影響在空間上僅局限於一個器官 (穎花)，在時間上則極為短暫 (1 h)，因此要瞭解高溫對生殖生長的危害必須有精確的評估方式 (Fahad *et al*. 2018)。傳統耐高溫品種的篩選多在田間或設施下進行，但要讓開花中的穎花感受到高溫，並針對受影響之穎花完成調查，在實務上有其困難度 (Julia & Dingkuhn 2013)。這也說明若能找到反應受測品種對高溫耐受性的衡量指標，例如花粉的耐熱特性，將有助提高耐熱水稻品種篩選的精確度與效率 (Coast *et al*. 2016)。

傳統上對花粉活力的評估有許多方法，依其實施處可分為 *in vivo* (體內) 與 *in vitro* (體外)，*in vivo* 直接於植物組織上觀察，如觀察柱頭上花粉數、花粉管伸長情形等，一般需要透過組織固定、染色或切片等技術的配合，精確度高但觀察之數量有限，因此較適合作為現象觀察而非大量篩選之用 (Shi *et al*. 2018)。*In vitro* 以細胞染色法或花粉發芽培養最為常用 (Song *et al*. 2001)，近年來則有針對單一細胞對電流之阻抗反應加以分析的電阻抗式流式細胞儀 (impedance flow cytometry; IFC)，IFC 每一樣品分析之細胞數可從數千至數萬不等，需要的時間僅數十秒至數分鐘，與上述必須透過顯微鏡觀查染色之花粉粒數或計算花粉管萌發比率的傳統方法，具有節省人力與時間並提高檢測效率之優勢 (Heidmann *et al*. 2016)。

本研究以台灣栽培面積最多的粳稻「台南 11 號」(‘Tainan 11’; ‘TN11’) 與來自印度的耐熱秈型陸稻 ‘Nagina 22’ (‘N22’) 為材料，除針對花粉培養液中最重要的成分蔗糖、硼酸及硝酸鈣濃度進行最適化研究，建立適用於水稻花粉萌發之培養基作為花粉活力評估之用外，並比較 3 種花粉活力染劑，分別為二乙酸螢光素酯 (Fluorescein diacetate; FDA)、2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-triphenytetrazolium chloride; TTC) 與碘化鉀 (I_2/KI) 對水稻花粉之染色率。此外，比較 IFC 分析、花粉培養及 FDA 染色 3 種花粉活力檢測方法，用以瞭解 IFC 檢測技術與現行花粉活力檢測方法獲得之結果是否具有差異性；並以 IFC 檢測花粉經不同溫度處理後其活力的變化，研究結果將應用於未來耐熱水稻品種篩選之用。

材料與方法

水稻材料與栽培管理

供試之水稻種子由農試所作物組水稻研究室提供，分別為耐熱秈型陸稻 ‘N22’ 與粳稻 ‘TN11’。將發芽 2 wk 後之小苗移至裝有田土之塑膠盆 (61.7 × 42.8 × 8.9 cm^3) 內種植，每盆種 4–6 株，並於分蘗與幼穗形成期施用台肥農友牌硝磷基特 43 號肥料 (N-P_2O_4-K_2O = 15-15-15) 共 25 g，植株於農試所生技組裝有風扇水牆溫室內栽培，每週灌水 3 次。

花粉取樣與染劑配製

選取剛突出劍葉葉枕之稻穗加以標記，於第 2 天將標記稻穗之分蘗從植株基部剪下並插入水杯中帶回，每一品種選取 3–5 株，每株取 1 分蘗，將分蘗置於無菌操作台之日光燈下促進穎花開放。取每一穗之主枝梗上段即將開裂之穎花，以鑷子將花藥自穎花中取出，放入微量試管中加以輕壓釋出花粉，作為不同染劑染色或花粉培養試驗之用。

將 2 g 碘化鉀完全溶解水中後，再加入 1 g 碘並定量至 100 mL 配製 1% I_2/KI，並以深色瓶保存備用。以丙酮為溶劑配製 0.2% FDA (A 液) 保存於深色瓶內，另行配製 30% 蔗糖溶液，以 A 液緩慢加入蔗糖溶液中並攪拌均勻，至液體呈現白色混濁後停止是為 B 液，取 B 液作為染色之用 (Tseng *et al*. 2013)。以磷酸緩衝液配製 1% TTC 染液，並保存於深色瓶內備用。

水稻花粉發芽培養液中 3 種成分之濃度最適化

蔗糖濃度測試：稻穗之取得同花粉取樣所述，每一穗取 5 朵穎花，將穎花中之 6 個花藥囊取出 5 個，分別置入裝有 5 種蔗糖濃度處理之 500 μL 培養液中，將分別取自 5 朵穎花之 5 個花藥粒混合擠壓釋出花粉，作為 1 重複，共 3 重複。培養液中皆含有 60 mg L^{-1} 硼酸，並分別添加蔗糖使其濃度為 20、22.5、25、27.5 及 30% 共 5 種處理。將 5 個處理之花粉培養液置入 30℃恆溫箱中黑暗培養 10 min 後，取 50 μL 花粉培養液滴於凹槽玻片上進行顯微鏡檢測，每一重複共觀察 100 粒花粉，將花粉管長度超過花粉粒直徑者視為發芽，計算花粉發芽比率。

硼酸濃度測試：稻穗取得同上花粉取樣所述，每一花穗取 5 朵穎花，將穎花中之 6 個花藥粒取出，分別置入裝有 6 種硼酸濃度處理之 500 μL 花粉培養液中，將分別取自 5 朵穎花之 5 個花藥粒混合擠壓釋出花粉，作為 1 重複，共 3 重複。培養液含有 22.5% 蔗糖並分別添加適量之硼酸，使其濃度為 25、50、60、100、150 及 200 mg L^{-1} 共 6 種處理。培養條件以及花粉發芽率計算方式同上蔗糖處理所述。

硝酸鈣濃度測試：於含有 22.5% 蔗糖與 60 mg L^{-1} 硼酸之培養液中，分別添加適量之 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$，使其濃度分別為 60、100、200、300 及 400 mg L^{-1} 共 5 種處理。花粉取樣、培養條件以及花粉發芽率計算方式同上蔗糖處理所述。

以 FDA、TTC 及 I_2/KI 染色法檢測花粉活力

稻穗取得方式同花粉取樣所述，取每穗主枝梗上段即將開裂之穎花 1 朵，以鑷子將花藥取出，將分別取自 5 朵穎花之花藥粒一起放入微量試管中輕壓釋出花粉，以混合後之花粉作為 3 種染劑試驗之材料，此為 1 重複。於凹槽玻片上滴 50 μL 之 1% I_2/KI 染色液，加入適量花粉後蓋上蓋玻片，置於 30℃黑暗環境下培養 10 min 後進行鏡檢；FDA 染色之培養條件相同，但染色時間為 15 min；TTC 染色過程為將花粉放入裝有 1% TTC 染液的離心管中，置於 30℃黑暗環境下培養 3 h 後，吸取 50 μL 花粉染色液滴於凹槽玻片後進行鏡檢。每一染色處理共進行 3 重複，每一重複共調查 100 粒花粉。

以花粉培養、FDA 染色與 IFC 分析進行花粉活力檢測

花粉取樣與上述染色法相同，花粉培養試驗之操作為先於凹槽玻片上滴 50 μL 花粉培養液 (22.5% 蔗糖、60 mg L^{-1} 硼酸、200 mg L^{-1} 硝酸鈣)，再加入花粉並蓋上蓋玻片，置入裝有濕潤濾紙之保鮮盒內，於 30℃黑暗環境下培養 10 min 後進行顯微鏡檢測。花粉培養與 FDA 染色處理，共進行 3 重複，每 1 重複調查 100 粒花粉。IFC 分析方法使用之電阻抗式流式細胞儀型號為 Ampha Z30 (Amphasys, Root, Switzerland)，將花粉材料放入裝有 500 μL AF6 buffer (Amphasys, Root, Switzerland) 的離心管中，使用 100 μm 濾網進行過濾，將濾液以 AF6 buffer 定量到 500 μL 混合均勻後上機檢測，同樣進行 3 重複。

以 IFC 檢測溫度處理對花粉活力之影響

選取稻穗突出劍葉葉枕約 5 cm 之分蘗 6 支，從基部剪下並插入水杯中帶回，置於無菌操作台之日光燈下使穎花開放，取位於花穗上段主枝梗上即將開裂之穎花，每穗取 6 朵穎花，將 2 穗共 12 朵穎花之花藥取出混合放入裝有 1.8 mL AF6 buffer 的微量試管中加以擠壓，以 100 μm 濾網過濾，將濾液分裝至 6 個微量試管並定量至 500 μL，將裝有花粉濾液之微量試管置於不同溫度設定之乾浴器中，溫度設定分別為 25、30、35、40、45 及 100℃，經 15 min 處理後進行分析，每一溫度處理共 3 重複。IFC 分析使用 120 μm 孔徑晶片，電波頻率設定為 12 MHz、馬達轉速 35 rpm，其他檢測參數 Modulation/Amplification/Demodulation 設定為 4/6/2，trigger level: 0.1，設定分析數量為 30,000 個細胞，並透過 AmphaSoft 2.0 (Amphasys, Root, Switzerland) 軟體進行結果分析。

統計分析方法

試驗採用完全逢機設計 (completely randomized design; CRD)，試驗所得資料經 SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 套裝統計分析軟體進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)。若處理間差異顯著 ($P < 0.05$)，則利用最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD) 比較各處理平均值間之差異。

結果

水稻花粉發芽培養液中 3 種主成分濃度最適化測試

本試驗針對花粉培養液中最重要的 3 種成分－蔗糖、硼酸及硝酸鈣依序逐項測試其最佳濃度。首先將培養液中硼酸濃度固定於預備試驗中之最佳濃度 60 mg L^{-1}，以 2.5% 蔗糖為一個濃度分級，測試 20–30% 蔗糖濃度對 2 (品) 種水稻花粉萌發之影響，結果如表 1 與圖 1 所示。‘N22’ 與 ‘TN11’ 兩 (品) 種皆以含有 22.5% 蔗糖之培養液獲得最高花粉萌發率，分別為 39.7% 與 34.3%，且與其他濃度間呈現顯著之差異。

將培養液之蔗糖濃度固定於 22.5%，測試 25–200 mg L^{-1} 硼酸濃度對 2 (品) 種水稻花粉萌發之影響，結果如表 2 所示。‘N22’ 與 ‘TN11’ 兩 (品) 種皆於含有 60 mg L^{-1} 硼酸之培養液獲得最高之花粉萌發率，分別為 26.0% 與 32.3%，顯著高於其他濃度處理。

表 1. 花粉培養液中蔗糖濃度對水稻花粉萌發之影響。

Table 1. Effect of sucrose concentration on rice pollen germination[z].

	Germination (%)	
Sucrose (%)	‘Nagina 22’	‘Tainan 11’
20.0	31.0 ± 2.1 b[y]	19.3 ± 0.6 b
22.5	39.7 ± 1.2 a	34.3 ± 1.3 a
25.0	22.3 ± 1.9 c	18.3 ± 1.5 b
27.5	19.7 ± 1.2 c	13.3 ± 1.5 c
30.0	7.7 ± 0.9 d	11.0 ± 1.2 c

[z] Pollen germination medium contained various concentration of sucrose and 60 mg L^{-1} boric acid.
[y] Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

表 2. 花粉培養液中硼酸濃度對水稻花粉萌發之影響。

Table 2. Effect of boric acid concentration on rice pollen germination[z].

	Germination (%)	
H_3BO_3 (mg L^{-1})	‘Nagina 22’	‘Tainan 11’
25	8.0 ± 1.2 d[y]	11.7 ± 1.2 d
50	19.0 ± 1.7 b	24.0 ± 1.7 b
60	26.0 ± 1.7 a	32.3 ± 1.9 a
100	12.7 ± 0.3 c	18.7 ± 2.0 c
150	10.3 ± 0.9 cd	13.3 ± 2.3 d
200	7.0 ± 1.7 d	13.7 ± 0.3 cd

[z] Pollen germination medium contained various concentration of boric acid and 22.2% sucrose.
[y] Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

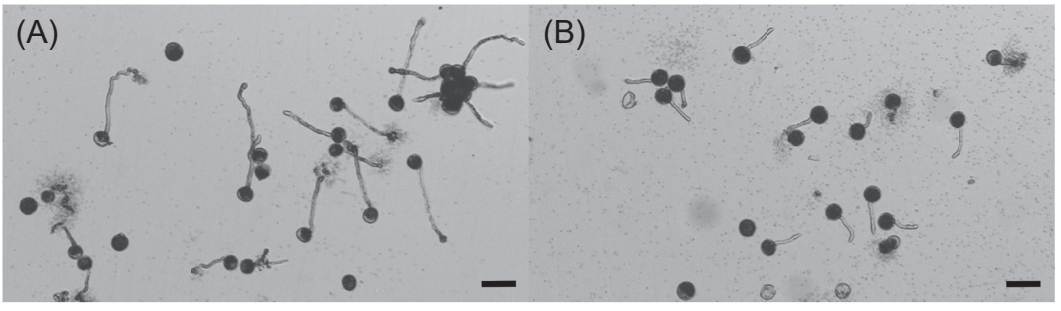


圖 1. 水稻花粉於修正後之花粉培養液中萌發之情形。水稻品種 (A) ‘Nagina 22’；(B)「台南 11 號」。

Fig. 1. *In vitro* pollen germination of two rice cultivars in the modified medium. Rice cultivar of (A) ‘Nagina 22’ and (B) ‘Tainan 11’. Bar = 100 μm.

將培養液中蔗糖與硼酸濃度分別固定為 22.5% 與 60 mg L^{-1}，測試 60–400 mg L^{-1} 硝酸鈣對水稻花粉萌發之影響，結果如表 3 所示。‘N22’ 與 ‘TN11’ 兩 (品) 種皆以含有 200 mg L^{-1} 硝酸鈣之培養液具有最高花粉萌發率，分別為 76.0% 與 78.7%，顯著高於其他濃度處理。

綜合上述三試驗之結果，2 (品) 種水稻對 3 種成分及其最適濃度之反應具有一致性，花粉萌發率會隨 3 種成分濃度上升至最適濃度後下降，花粉培養液中之蔗糖、硼酸及硝酸鈣之最適濃度依序為 22.5%、60 mg L^{-1} 與 200 mg L^{-1}，於此培養液中 2 (品) 種之花粉管萌發率皆可達 75% 以上 (表 3)。

以 FDA、TTC 及 I_2/KI 染色法檢測花粉活力

水稻花粉分別以 I_2/KI、FDA 與 TTC 染色法檢測活力，花粉於染色處理完成後以光學或螢光顯微鏡觀察花粉粒染色之情形。結果顯示 ‘N22’ 與 ‘TN11’ 兩 (品) 種之花粉染色率皆以 I_2/KI 最高，分別為 89.7% 與 93.7%，其次為 FDA，而以 TTC 最低，3 種染色法呈現顯著差異 (表 4、圖 2)。

以花粉培養、FDA 染色與 IFC 分析進行花粉活力檢測

比較於 30℃黑暗環境下，以 FDA 染劑進行 15 min 染色或於花粉培養液中培養 10 min，再以顯微鏡計算染色率與花粉萌發率，

表 3. 花粉培養液中硝酸鈣濃度對水稻花粉萌發之影響。

Table 3. Effect of calcium nitrate concentration on rice pollen germination[z].

$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (mg L^{-1})	Germination (%)	
	‘Nagina 22’	‘Tainan 11’
60	68.3 ± 2.2 b[y]	62.3 ± 2.2 c
100	64.0 ± 2.3 b	70.0 ± 1.7 b
200	76.0 ± 2.1 a	78.7 ± 0.9 a
300	37.3 ± 3.1 c	48.3 ± 3.2 d
400	34.0 ± 1.2 c	40.7 ± 0.9 e

[z] Pollen germination medium contained 22.2% sucrose, 60 mg L^{-1} boric acid and various concentration of calcium nitrate.

[y] Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

表 4. 以 3 種細胞染色方法檢測水稻之花粉染色率。

Table 4. Comparison of various cell staining methods on rice pollens.

Staining Method[z]	Staining ratio (%)	
	‘Nagina 22’	‘Tainan 11’
I_2/KI	89.7 ± 1.5 a[y]	93.7 ± 2.9 a
FDA	78.0 ± 2.0 b	80.7 ± 1.5 b
TTC	40.3 ± 2.3 c	55.3 ± 2.5 c

[z] FDA: fluorescein diacetate; TTC: 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride.

[y] Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

以及將花粉置入緩衝液後以 IFC 進行花粉活力分析，結果如表 5 所示。‘N22’ 花粉以 FDA 之染色率最高為 73.3%，與 IFC 分析結果差異不顯著，但卻顯著高於花粉培養之結果。‘TN11’ 則顯示 3 種檢測方法差異皆不顯著，在 65.7–73.6% 之間。除利用 ANOVA 以 LSD 比較各處理平均值間之差異外 (表 5)，並以成對 *t* 檢定進行兩兩處理組平均值差異性檢定，結果顯示在測試的 2 (品) 種中 IFC 與花粉培養或 IFC 與 FDA 染色法均顯示無明顯差異 (資料未顯示)。

以 IFC 檢測溫度對花粉活力之影響

首先將經 100℃處理後之花粉以 IFC 分析，將呈現之細胞族群定義為死亡細胞 (dead)，並於此細胞群右方劃一十字線，以相對 100℃處理死亡細胞群十字線右上方之細胞群定義為具有活力之花粉 (viable)，右下方則為尚未死亡但活力低下之細胞群 (non-viable) (圖 3)。將經不同溫度處理後之花粉以 IFC 進行分析，記錄各溫度處理之活力細胞群、低活力細胞群、死細胞群占全體細胞之比例，結果如表 6 與表 7 所示。‘N22’ 之花粉經不同溫度處理後，以 25–30℃具有最高之花粉活力，比率在 59.9–62.3% 之間，其次為 35–40℃間，花粉活力在 53.5–54.1% 之間時，溫度上升至 45℃時，具活力花粉之占比降至 46.5%。‘TN11’ 花粉亦以 25℃處理之花粉活力最高為 61.3%，溫度處理在 25–40℃之間時，每上升 5℃，花粉活力隨溫度上升而明顯下降，具活力之花粉由 61.3% 下降至 36.3%。

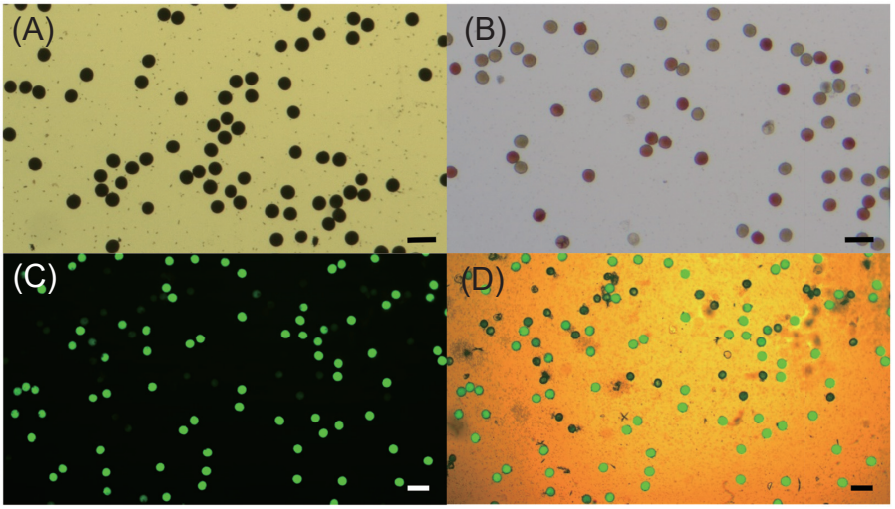


圖 2. 「台南 11 號」水稻花粉以 3 種染劑染色後花粉呈色情形。染劑為 (A) I_2/K；(B) TTC；(C) FDA 於螢光暗視野下；(D) FDA 於螢光明視野下觀察之情形。

Fig. 2. Pollens of 'Tainan 11' staining with (A) I_2/KI; (B) 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC); (C) fluorescein diacetate (FDA) under florescence light with dark sight; and (D) FDA under florescence light with bright sight. Bar = 100 μm.

表 5. 以不同方法檢測水稻花粉之活力表現。

Table 5. Comparison of different methods on rice pollen viability analysis.

	Germination rate & staining ratio (%)	
Method[z]	'Nagina 22'	'Tainan 11'
Germination	62.7 ± 2.1 b[y]	65.7 ± 6.4 a
FDA staining	73.3 ± 4.2 a	71.7 ± 2.3 a
IFC viability	69.2 ± 3.4 ab	73.6 ± 1.9 a

[z] FDA: fluorescein diacetate; IFC: impedance flow cytometry.
[y] Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

討論

分析花粉活力的方法眾多，其中利用 *in vitro* 花粉培養因可直接獲得花粉萌發與花粉管伸長之數據，被認為是可信度較高的方法，但因不同種植物間花粉發芽所需之環境條件並不相同，且花粉培養基所需成分在不同物種或同物種不同品種間亦不盡相同，必須針對不同植物種類加以開發 (Shivanna & Rangaswamy 1992)。Tushabe & Rosbakh (2021) 根據 1,572 篇來自 114 科 412 屬總共 816 種植物所發表之花粉發芽培養基相關論文進行統計，針對配方中 110 個成分加以分析，結果顯示最常用之成分及其占比分別為蔗糖 (89%)、硼酸 (77%)、Ca^{2+} (59%)、Mg^{2+} (44%)，以及 K^+ (39%)。本研究亦以花粉培養基中最重要占比之 3 成分蔗糖、硼酸及硝酸鈣進行最佳濃度試驗。Kariya (1989) 比較 10、20 與 30% 蔗糖，以及比較 5–500 mg L^{-1} 硼酸濃度對水稻花粉培養之影響，指出水稻花粉發芽最佳之配方為 20% 蔗糖、20 mg L^{-1} 硼酸與 1% 洋菜，萌發芽率可達 87.3–91.6%，但蔗糖濃度提高至 30% 時，萌發芽率降至 54–59%。Coast *et al*. (2016) 使用 20% 蔗糖、40 mg L^{-1} 硼酸、40–60 mg L^{-1} 硝酸鈣、3 mg L^{-1} Vitamin B_1 及 10% polyethylene glycol (PEG) 作為培養基，花粉萌發率亦可達 80% 以上。上述兩研究顯示水稻花粉培養所需成分相當簡單，本研究除希望花粉培養基配方具有成分簡單之特性外，並希望其為純粹之液體培養基，其優點為不需加熱溶解洋菜或 PEG，亦不需等待培養基降溫方能使用，具有配製容易且可冷凍保存之優點；雖然成分簡單之液體培養基可能有滲透壓不理想之問題，並不適合花粉發芽

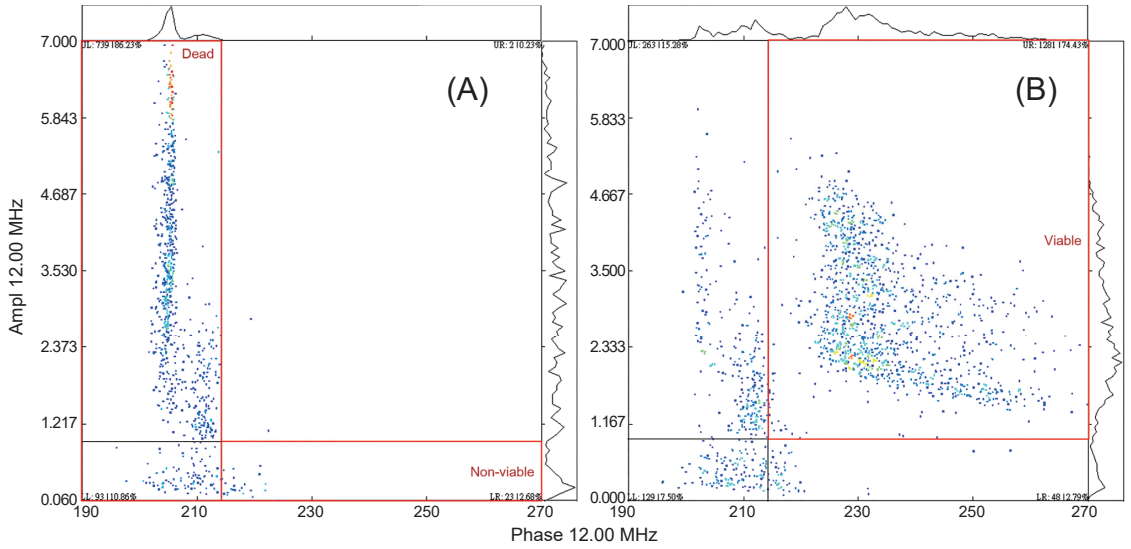


圖 3. 水稻 'Nagina 22' 花粉經溫度處理後利用電阻抗式流式細胞儀以 12 MHz 交流電檢測之花粉細胞分布圖形。花粉經 (A) 100℃ 處理 15 min；(B) 25℃ 處理 15 min。

Fig. 3. Dot plots of rice 'Nagina 22' analyzed by impedance flow cytometry at 12 MHz. Pollens were treated with (A) 100℃ for 15 min and (B) 25℃ for 15 min.

表 6. 水稻 'Nagina 22' 花粉經不同溫度處理 15 min 後以電阻抗式流式細胞儀分析之花粉活力表現。

Table 6. Pollen viability of 'Nagina 22' analyzed by impedance flow cytometry after various temperature treating for 15 min.

	'Nagina 22'			
Temperature (℃)	Dead (%)	Non-viable (%)	Viable (%)	Relative viable (%)[z]
25	33.2 ± 1.4 b	4.5 ± 0.7 b	62.3 ± 1.4 a[y]	100 ± 0.0 a
30	35.2 ± 2.1 b	4.8 ± 1.0 b	59.9 ± 1.8 a	96.2 ± 1.7 a
35	36.8 ± 3.2 b	9.1 ± 2.0 a	54.1 ± 1.3 b	86.8 ± 1.4 b
40	36.7 ± 2.2 b	9.9 ± 1.6 a	53.5 ± 0.9 b	85.9 ± 2.7 b
45	44.8 ± 1.6 a	8.7 ± 0.5 a	46.5 ± 1.7 c	74.8 ± 4.4 c
100	92.6 ± 1.5	6.4 ± 1.5	1.0 ± 0.1	1.7 ± 0.1

[z] Relative viable % = viable % at various temperature treatment/viable % at 25℃ × 100%.
[y] Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

需時較長之植物，但水稻花粉萌發相當快速 (10–20 min) 則不受此限。本研究在預備試驗時測試 12.5、15、17.5 及 20% 蔗糖濃度對水稻花粉萌發之影響，結果顯示以 20% 蔗糖處理得到最高之萌發率，與上述兩研究之結果相同，但因尚未見到濃度效應的下降，因此本研究更進一步提高蔗糖濃度，測試花粉萌發率是否還能持續提高，結果顯示含有 22.5 % 蔗糖優於 20% 蔗糖以及其他濃度，本研究與上述 Kariya (1989) 在比較 10、20 與 30% 蔗糖濃度試驗不同之處，為本研究使用較小之蔗糖級距 (2.5%)，推測 Kariya 所使用之蔗糖濃度級距太大 (10%) 不利得到正確之最適濃度。此外，Kariya (1989) 使用含有 20% 蔗糖、20 mg L^{-1} 硼酸與 1% 洋菜培養基即可獲得高於 80% 之萌芽率，但本研究中若使用僅添加蔗糖與硼酸之液體培養基，其最佳發芽率僅 26.0–32.3% 之間，推測 Kariya 配方中之洋菜應亦能提供有助花粉萌發之營養元素。而本研究在含有 22.5% 蔗糖、20 mg L^{-1} 硼酸溶液中添加 200 mg L^{-1} 硝

表 7. 水稻「台南 11 號」花粉經不同溫度處理 15 min 後以電阻抗式流式細胞儀分析之花粉活力表現。

Table 7. Pollen viability of 'Tainan 11' analyzed by impedance flow cytometry after various temperature treating for 15 min.

	'Tainan 11'			
Temperature (℃)	Dead (%)	Non-viable (%)	Viable (%)	Relative viable (%)[z]
25	31.7 ± 1.5 d[y]	7.0 ± 1.9 b	61.3 ± 0.6 a	100 ± 0.0 a
30	35.6 ± 4.1 cd	10.1 ± 2.4 ab	54.4 ± 2.9 b	88.7 ± 4.2 b
35	39.3 ± 2.5 bc	13.3 ± 3.9 ab	47.4 ± 2.2 c	77.3 ± 3.5 c
40	42.8 ± 2.0 b	17.0 ± 2.6 a	40.2 ± 4.6 d	65.6 ± 7.2 d
45	52.1 ± 3.0 a	11.6 ± 6.0 ab	36.3 ± 4.4 d	59.1 ± 6.8 d
100	90.8 ± 1.0	8.2 ± 1.2	0.9 ± 0.3	1.5 ± 0.5

[z] Relative viable % = viable % at various temperature treatment/viable % at 25℃ × 100%.
[y] Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

酸鈣後花粉萌發率獲得顯著提升，'N22' 之花粉萌發率從 26.0% 提升至 76.0%，'TN11' 則從 32.3% 提升至 78.7% (表 2、表 3) 效果顯著。Steer & Steer (1989) 指出在 *in vitro* 花粉培養基中添加硝酸鈣對許多植物而言具有關鍵之作用，在本研究中亦顯示添加適當濃度之硝酸鈣，具有顯著提升水稻花粉管萌發之效果 (表 3)。

花粉利用細胞染色法鑑定其活力，雖未能直接證明花粉之發芽能力，但因具有快速簡單的優點而被廣泛採用，然而各種染劑之作用機制並不相同，因此在不同物種中所呈現之染色率是否能代表花粉活力必須先加以釐清，例如 TTC 能與正常細胞中的脫氫酶反應被還原成無法透過細胞膜的紅色酯類化合物，如果細胞死亡或活力衰退，則顯示未能染色或染色較淺，因此可以根據染色深淺程度來分析其細胞活力 (Khatun & Flowers 1995)；非螢光且非極性之 FDA 被具有活力之細胞吸收後，可藉由活細胞內之酯酶 (esterase) 將其裂解，並釋出具螢光物質，此時將細胞置於顯微鏡下以波長 495 nm 藍光照射，可觀察到黃綠色之螢光 (Khatun & Flowers 1995)；碘化鉀 (I_2/KI) 則能與細胞內之澱粉作用形成深藍色之碘化澱粉 (Song *et al*. 2001)。Khatun & Flowers (1995) 以 FDA 進行水稻花粉活力檢測，結果顯示 FDA 染色後呈現之螢光亮度介於中間者難以判定。在本研究中水稻花粉以 FDA 染色後，其黃色螢光在螢光顯微鏡暗視野下易於分辨，且可利用明視野及螢光同時開啟，將未染色之花粉細胞區別出來 (圖 2D)，是 3 種細胞染色法中較少人為誤判與具有穩定表現之方法。Khatun & Flowers (1995) 研究結果亦顯示，以 TTC 進行水稻花粉染色，染色率可達 100%，但是觀察到加熱致死之花粉以 TTC 染色後，亦能呈現均一的紅色，因此對 TTC 作為分辨細胞活力的作用存疑。在本研究中則顯示，雖然 TTC 染色時間已延長至 3 h，但染色率仍偏低 (表 4)，且染色之花粉細胞呈現不同程度之粉紅顏色 (圖 2B)，易產生人為之誤判。水稻花粉活力檢測最常用之染劑應為 I_2/KI，一般將染色深、粒型飽滿者視為有活性之花粉，將染色淺或部分染色以及形狀皺縮空扁花粉粒視為不具活性之花粉 (Song *et al*. 2001; Saragih *et al*. 2013; Ramesh *et al*. 2017)。Song *et al*. (2001) 以 I_2/KI 染色野生稻 (*Oryza rufipogon*)、栽培種稻 (*Oryza sativa*) 以及兩者雜交種之花粉，染色比率分別為 98.1、94.0 與 66.2%，但以相同之花粉進行培養時，花粉管萌芽率則分別為 58.4、84.9 與 33.9%，顯示被染色的花粉中有相當高比例並不具備發芽之能力。本研究中將 'TN11' 與 'N22' 兩 (品) 種之花粉以 I_2/KI 染色，染色比率皆接近 95%，在本研究中曾經將 60℃或 100℃處理 10 min 後之水稻花粉以 I_2/KI 染色，結果顯示高溫處理後之花粉經染色後亦呈現深褐色 (資料未顯示)，這與上述 Khatun & Flowers (1995) 不推薦 TTC 之原因相似，亦即以加熱致死之花粉進行染色仍可見其呈色，因此質疑此一染色法分辨細胞活力之

可信度。推測在本研究中經 60℃或 100℃處理之水稻花粉雖已不具發芽之活性，但因澱粉粒仍存在於花粉細胞內，因此染色後仍可呈現出深褐色，但此一呈色並不代表花粉具有活性。此外為確認 I_2/KI 對水稻花粉活力之鑑別力，在本研究中曾取雄不稔水稻品種之花粉以 I_2/KI 染色，結果花粉呈現淡褐色且呈現非圓形之不規則形狀 (資料未顯示)，證實 I_2/KI 染色對於雄不稔品種確有鑑別能力，但對於正常發育 (非敗育型) 花粉之活力之鑑別能力在本研究中則有待進一步釐清。Prasad *et al*. (2006) 研究亦指出 I_2/KI 染色代表花粉粒中澱粉粒之累積，藉此表達花粉之活力，但並不表示具有澱粉粒之花粉能於柱頭發芽或具有與胚珠結合之能力，但雄不稔品種之花粉因花粉敗育，未能正常發育之花粉通常伴隨澱粉粒無法充實之情形，故染色率低。

不同染劑對不同植物花粉活力檢測之效果並無一致性，過去的研究對於原因並未有太多探討，大多歸咎於物種本身之特性，但建議在使用染色法證明花粉活力前必須對其適當性加以確認 (Firmage & Dafni 2001)。一般可利用新鮮花粉與經過加熱花粉以同一染劑進行染色，觀察染劑是否具有區別性；或利用染色法與其他類型之花粉檢測方法如花粉培養方法交叉使用來確認其適當性。本研究將染色法中表現較為穩定之 FDA 染色法與花粉培養法以及 IFC 檢測法進行比較，3 種方法檢測所得之數據，在 ‘TN11’ 和 ‘N22’ 均顯示 IFC 分析結果與 FDA 染色或花粉培養所獲得之結果在統計上無顯著差異 (表 5)，據此推論 IFC 應可作為水稻花粉活力之檢測方法。IFC 原理為利用多頻波之交流電通過單細胞，並將各個細胞產生之電阻抗訊息加以收集，在處理數量、速度及精準度方面，較現行大量依賴人力調查之花粉活力檢測方法，除節省人力外並可提高效率 (Heidmann *et al*. 2016)。

Satake & Yoshida (1978) 研究指出開花當天對穎花稔實率影響甚鉅，而在開花前 1 d 或開花後 1 d 施以高溫處理，穎花稔實率並不會受到高溫處理的影響而下降，甚至在開花前連續 5 d 或開花後連續 5 d 處理高溫 (不超過 41℃) 結果亦不受影響，只要開花當日之溫度不超過臨界高溫，穎花稔實率並不會受到高溫處理的影響而下降。顯示開花期高溫對稔實率有絕對之影響，但開花前的高溫影響較小，而開花後之高溫則影響更小。水稻花粉管生長至胚囊與受精完成分別在開花後 30 min 與 1.5 h 間，亦即在高溫處理 (38℃或 41℃) 前 1 h 所開之穎花其受精已接近完成，因此稔實率之表現為正常 (Cho 1955)。研究顯示水稻以開花過程中對高溫最為敏感，整個受精的過程約1–1.5 h，依品種不同而有所差異，大部分品種開花落在早上 9 點到下午 2 點間，這期間的高溫將阻礙花粉粒膨脹與花藥囊開裂，進而影響花粉散落在柱頭上之數量、阻礙花粉萌發與花粉管伸長，最終造成受精率下降甚至不育。因此在水稻開花的過程中，有關穎花之開花時間、花藥基部開裂之比例和長度，以及花粉的活力、柱頭上之花粉數，皆可作為評估水稻受到高溫傷害的指標 (Matsui *et al*. 2000, 2001; Kumar *et al*. 2015)。上述研究證實花粉活力會受到溫度影響，但高溫處理之水稻植株，因每株或每穗之發育期具有差異性，且不同穗或同一穗上之穎花其發育期亦具有差異性，因此除非長時間施以高溫，否則溫度處理的影響應僅及於正在開花之穎花，但高溫試驗之調查若以整穗、整株或小區產量作為樣本單位時，容易降低其關聯性，原因在於高溫影響只及於正在開花之穎花，若能針對受影響之穎花進行調查，更能具體反應出穎花稔實率 (產量) 與高溫處理的實際關聯性，然而實務上在田間並不容易做到。本研究將花藥 (粉) 從當日將開花的穎花中取出，施以不同溫度處理後，以 IFC 檢測花粉活力之變化，結果顯示非耐熱品種 ‘TN11’ 之花粉，其活力隨著溫度上升有較明顯之下降 (表 7)，經 35℃處理之花粉活力已降至 50% 以下 (47.4%)；而耐熱品種 ‘N22’ 之花粉活力在 30–40℃處理後，花粉活力表現穩定未有明顯變化，在 45℃處理後才開始明顯下降至 50% 以下 (46.5%) (表 6)。Satake & Yoshida (1978) 也指出，以 35℃溫度處理後獲得之稔實率，可將對高溫敏感的品種區別出來，而以 38℃高溫處理則可將耐高溫品種如 ‘N22’ 與其他不耐熱

品種區別出來。在本研究中 'TN11' 在 35℃時測得之花粉活力為 47.4%，相對於 25℃溫度處理之花粉活力為 77.3%，應不屬於對高溫敏感之品種，但繼續升溫至 40℃時，花粉活力持續明顯下降，顯示其亦非耐高溫品種；而 'N22' 在 35℃時測得之花粉活力為 54.1%，相對於 25℃溫度處理之花粉活力為 86.8%，在 40℃時測得之花粉活力為 53.5%，相對於 25℃溫度處理之花粉活力仍高達 85.9%，因此可將其歸類於耐高溫品種，此一結果與 Satake & Yoshida (1978) 對 'N22' 之分類相吻合。

Rudich *et al*. (1977) 以著果率、花粉管萌發率與授粉率來區分番茄品種對高溫的敏感性，本研究嘗試將水稻花粉施以溫度梯度處理，藉由檢測花粉活力的改變來瞭解該品種花粉對溫度的敏感性，結果顯示耐熱之 'N22' 之花粉活力表現符合其耐熱之特性。水稻耐熱品種對高溫之反應除表現於花粉之耐熱性外，亦可表現在其他與生殖生長過程相關的特性，例如開花時花藥相對於穎苞位置，若在開花時花藥仍處於穎苞內有利於花粉散落柱頭，若花藥已溢出穎苞則可能影響到柱頭所需之最低花粉數；又如花藥囊在高溫時的開裂程度，同樣會影響到柱頭所需之最低花粉數；又如以提早開花躲避高溫之開花型態等，以上這些特性亦有助於提高授粉率，但並非藉由提高或維持花粉活力來達成，育種人員在品種選育的過程中應該對這些特性加以觀察並記錄，用以綜合考評該品種之耐熱特性。本研究比較不同花粉活力檢測方法之適用性，並以 IFC 分析花粉經由不同溫度處理後活力之變化，藉由花粉活力變化建立不同水稻品種花粉耐溫性 (pollen thermo-tolerance) 之資料，未來將以此為基礎，針對台灣目前推廣之水稻品種建立其花粉耐溫之基本資料，作為水稻育種以及在推廣水稻品種時之重要參考。

誌謝

本研究係執行行政院農委會 109 農科-21.2.1-農-C1 計畫之成果。

引用文獻

Cho, J. 1955. Cytological study of double fertilization in *Oryza sativa* L. Jpn. J. Breeding 5:131–148. doi:10.1270/jsbbs1951.5.131

Coast O., A. J. Murdoch, R. H. Ellis, F. R. Hay, and K. S. V. Jagadish. 2016. Resilience of rice (*Oryza* spp.) pollen germination and tube growth to temperature stress. Plant Cell Environ. 39:26–37. doi:10.1111/pce.12475

Fahad S., M. Z. Ihsan, A. Khaliq, I. Daur, S. Saud, S. Alzamanan, W. Nasim, M. Abdullah, I. A. Khan, C. Wu, D. Wang, and J. Huang. 2018. Consequences of high temperature under changing climate optima for rice pollen characteristics-concepts and perspectives. Arch. Agron. Soil Sci. 64:1473–1488. doi:10.1080/03650340.2018.1443213

Firmage, D. H. and A. Dafni. 2001. Field tests for pollen viability; a comparative approach. Acta Hortic. 561:87–94. doi:10.17660/ActaHortic.2001.561.13

Heidmann, I., G. Schade-Kampmann, J. Lambalk, M. Ottiger, and M. Di Berardino. 2016. Impedance flow cytometry: A novel technique in pollen analysis. PLoS One 11:e0165531. doi:10.1371/journal.pone.0165531

Ho, C. H., C. M. Yang, C. L. Hsiao, and M. H. Lai. 2013. Changes of climatic variables during grain-filling stage affect yield and quality of rice cultivars bred from different regions in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 62:321–339. doi:10.6156/JTAR/2013.06204.03

Intergovernmental Panel on Climate Change. 2013. Summary for policymakers. p.3–29. *in*: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (Stocker, T. F., D. Qin, G. K. Plattner, M. M. B. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P. M. Midgley, eds.) Cambridge University Press. Cambridge, UK. 1535 pp.

Julia, C. and M. Dingkuhn. 2013. Predicting temperature induced sterility of rice spikelets requires simulation of crop-generated microclimate. Eur. J. Agron. 49:50–60. doi:10.1016/j.eja.2013.03.006

Kariya, K. 1989. Sterility caused by cooling treatment at the flowering stage in rice plants: III. Establishment of a method of in vitro pollen germination. Jpn. J. Crop Sci. 58:96–102. doi:10.1626/jcs.58.96

Khatun, S. and T. J. Flowers. 1995. The estimation of pollen viability in rice. J. Exp. Bot. 46:151–154. doi:10.1093/jxb/46.1.151

Kumar, N., N. Kumar, A. Shukla, S. C. Shankhdhar, and D. Shankhdhar. 2015. Impact of terminal heat stress on pollen viability and yield attributes of rice (*Oryza sativa* L.). Cereal Res. Commun. 43:616–626. doi:10.1556/0806.43.2015.023

Matsui, T., K. Omasa, and T. Horie. 2000. High temperature at flowering inhibits swelling of pollen grains, a driving force for thecae dehiscence in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Prod. Sci. 3:430–434. doi:10.1626/pps.3.430

Matsui, T., K. Omasa, and T. Horie. 2001. The difference in sterility due to high temperatures during the flowering period among Japonica-rice varieties. Plant Prod. Sci. 4:90–93. doi:10.1626/pps.4.90

Prasad P. V. V., K. J. Boote, L. H. Allen Jr., J. E. Sheehy, and J. M. G. Thomas. 2006. Species, ecotype and cultivar differences in spikelet fertility and harvest index of rice in response to high temperature stress. Field Crops Res. 95:398–411. doi:10.1016/j.fcr.2005.04.008

Ramesh, R., T. Ramesh, P. R. Rao, V. G. Shankar, and M. H. V. Bhave. 2017. Study the effect of high temperature stress on pollen viability, stigma exertion, sterility in rice. J. Pharmacogn. Phytochem. 6(4):2016–2024.

Rudich, J., E. Zamski, and Y. Regev. 1977. Genotypic variation for sensitivity to high temperature in the tomato: Pollination and fruit set. Bot. Gaz. 138:448–452. doi:10.1086/336947

Saragih, A. A., A. B. Puteh, M. R. Ismail, and M. M. A. Mondal. 2013. Pollen quality traits of cultivated (*Oryza sativa* L. ssp. indica) and weedy (*Oryza sativa* var. nivara) rice to water stress at reproductive stage. Aust. J. Crop Sci. 7:1106–1112.

Satake, T. and S. Yoshida. 1978. High temperature-induced sterility in indica rices at flowering. Jpn. J. Crop Sci. 47:6–17. doi:10.1626/jcs.47.6

Shi, W., X. Li, R. C. Schmidt, P. C. Struik, X. Yin, and S. V. K. Jagadish. 2018. Pollen germination and *in vivo* fertilization in response to high-temperature during flowering in hybrid and inbred rice. Plant Cell Environ. 41:1287–1297. doi:10.1111/pce.13146

Shivanna, K. R. and N. S. Rangaswamy. 1992. Pollen biology: A laboratory manual. Springer-Verlag. New York, NY. 119 pp.

Song, Z. P., B. R. Lu, and J. K. Chen. 2001. A study of pollen viability and longevity in *Oryza rufipogon*, *O. sativa*, and their hybrids. Int. Rice Res. Notes 26:31–32.

Steer, M. W. and J. M. Steer. 1989. Pollen tube tip growth. New Phytol. 111:323–358. doi:10.1111/j.1469-8137.1989.tb00697.x

Tseng, C. S., Y. R. Lin, C. P. Kuan, M. H. Lai, and M. T. Wu. 2013. Effect of buffer zones on pollen-mediated gene flow of transgenic rice. J. Taiwan Agric. Res. 62:259–267. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2013.06203.06

Tushabe, D. and S. Rosbakh. 2021. A compendium of *in vitro* germination media for pollen research. Front. Plant Sci. 12:709945. doi:10.3389/fpls.2021.709945

Study on Detection Methods of Rice Pollen Viability

Chi-Ni Hsia[1], Shuen-Chi You[2], Chin-Yi Tsao[3], Yong-Jie Su[4], Charng-Pei Li[5,*]

Abstract

Hsia, C. N., S. C. You, C. Y. Tsao, Y. J. Su, and C. P. Li. 2022. Study on detection methods of rice pollen viability. J. Taiwan Agric. Res. 71(2):123–134.

Rice is the major staple food in Taiwan, however, detrimental effects on rice grain yield and quality by the heat stress have been observed. Since anthesis is the most sensitive stage to high temperature in the rice life cycle, the viability of pollens under the heat stress will be an appropriate index for thermo-tolerance of the variety. In addition to establishing an *in vitro* pollen culture medium, a number of pollen staining methods as well as using an impedance flow cytometry (IFC) for pollen viability analysis were conducted in this study. Fresh pollens of a japonica rice cultivar 'Tainan 11' ('TN11') and a heat-tolerant aus type rice cultivar 'Nagina 22' ('N22') were used in all experiments. In order to establish a proper medium for pollen tube germination, the ultimate concentration of various important components including sucrose, boric acid and calcium nitrate was investigated in successive terms. The results showed that a medium containing 22.5% sucrose, 60 mg L^{-1} boric acid, and 200 mg L^{-1} calcium nitrate had the highest pollen tube germination rate of 76.0% in 'N22' and 78.7% in 'TN11'. Three pollen staining methods including I_2/KI, fluorescein diacetate (FDA), and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) were compared in this study. The highest staining rate was obtained from I_2/KI followed by FDA and the lowest rate was found from TTC. Three methods of *in vitro* pollen culture, FDA staining, and IFC analysis were investigated for pollen viability. Although no difference was found among these three methods on pollen viability in 'TN11', FDA resulted in a higher staining rate than the *in vitro* pollen culture in 'N22'. However, there was no difference found on IFC with the other two methods in 'N22'. It is concluded that IFC was not different from pollen staining or *in vitro* pollen culture in detecting pollen viability. Fresh pollens of the two rice cultivars were subjected to temperature from 25℃ to 45℃ for 15 min before analyzing by IFC. The results showed that pollen viability was significantly decreasing along with raising the temperature in 'TN11'; however, no significant decrease was found until 35℃ , and no significant changes in pollen viability between 35℃ to 40℃ were found in 'N22'. The results indicated that pollens of 'N22' had higher thermo-tolerance than that of 'TN11'.

Key words: *Oriza sativa* L., *In vitro* pollen germination medium, Pollen viability, Impedance flow cytometry.

Received: August 13, 2021; Accepted: November 30, 2021.
* Corresponding author, e-mail: charngpei@tari.gov.tw
[1] Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[3] Contract Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[4] Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[5] Associate Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 71(2):135–157 (2022)
DOI:10.6156/JTAR.202206_71(2).0004

研究報告

台灣葡萄晚腐病發生調查及其主要病原 *Colletotrichum viniferum* 之病原性與親緣關係

林筑蘋[1,*] 王智立[2,3] 蔡志濃[4] 戴裕綸[5] 安寶貞[6] 詹月梅[7] 黃順源[8]

摘要

林筑蘋、王智立、蔡志濃、戴裕綸、安寶貞、詹月梅、黃順源。2022。台灣葡萄晚腐病發生調查及其主要病原 *Colletotrichum viniferum* 之病原性與親緣關係。台灣農業研究 71(2):135–157。

由 *Colletotrichum* spp. 引起之葡萄晚腐病 (grape ripe rot) 為影響台灣葡萄產業最重要的病害之一，為更瞭解引發台灣葡萄晚腐病之病原菌的主要種類、親緣關係、病徵及田間感染分布狀況，本研究自 2012–2020 年間於葡萄主要產區採集呈現典型葡萄晚腐病徵之葡萄果實、具壞疽病斑之枝條或葉片，藉由組織分離得 *Colletotrichum* spp. 分離株共 40 株。利用 internal transcribed spacer (*ITS*)、lyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (*GAPDH*)、actin (*ACT*)、beta-tubulin 2 (*TUB2*) 以及 chitin synthase 1 (*CHS-1*) 等 5 個基因建立多重序列親緣關係樹，結果顯示自罹病果實分離之 28 個分離株主要為 *Colletotrichum viniferum*，並可分成兩個次支序群 (subclade)，屬於次支序群 T 菌株分離比例高達 85.7%，屬於次支序群 C 的菌株僅占 3.6%；其他菌株分別為 *Colletotrichum fructicola* (7.1%) 及 *Colletotrichum tropicale* (3.6%)。*C. viniferum* 次支序群 T 菌株分布範圍包括苗栗縣卓蘭鎮、台中市新社區與霧峰區、彰化縣大村鄉以及南投縣信義鄉、國姓鄉、水里鄉與埔里鎮等葡萄主要產地；調查結果也顯示可自田間罹病葉片上分離到 *C. viniferum*。田間葡萄幼果接種試驗結果顯示 *C. viniferum* 次支序群 T 之菌株可自幼果期潛伏感染果實，並於果實轉色初期至成熟時產生典型晚腐病徵；溫室葡萄盆栽接種試驗證明 *C. viniferum* 次支序群 T 之菌株可引起葉片壞疽，病徵多自葉緣一端開始發展，葉片壞疽周圍常伴隨大範圍黃暈，嚴重時造成落葉，部分菌株可引起葉脈褐化。此外，藉人工接種試驗亦觀察到葡萄卷鬚壞疽與花穗壞疽等病徵。從田間調查與病原性試驗結果可確認 *C. viniferum* 次支序群 T 之菌株可於葡萄果實、葉片、卷鬚與花穗等組織造成多型態的病徵。

關鍵詞：次支序群、葉部病徵、多基因序列親緣關係、葡萄晚腐病、*Colletotrichum viniferum*。

前言

葡萄晚腐病 (grape ripe rot) 為台灣最嚴重之葡萄病害，對產量影響甚鉅，為葡萄產業化生產主要限制因子之一。本病常見的病徵主要出現在果實，造成果粒軟腐、裂果與流汁，病斑處產生橘色到橘紅色分生孢子堆，乾燥環境下罹病果呈現乾癟狀態；一般認為葡萄晚腐病菌較少感染葉片，但會在葉片上行有限的腐生繁殖 (Kuo & Hseu 2003; Ko 2008)。

投稿日期：2021 年 9 月 3 日；接受日期：2022 年 1 月 27 日。
* 通訊作者：cplin@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 國立中興大學植物病理學系副教授。台灣 台中市。
[3] 國立中興大學植物醫學暨安全農業碩士學位學程副教授兼主任。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。
[5] 農委會農業試驗所植物病理組計畫助理。台灣 台中市。
[6] 農委會農業試驗所植物病理組前研究員兼組長。台灣 台中市。
[7] 農委會農業試驗所植物病理組臨時人員。台灣 台中市。
[8] 內政部役政署替代役。台灣 南投縣。

早期真菌鑑定主要根據菌株形態，因此台灣葡萄晚腐病一直被認為是由 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. 引起 (Kuo & Hseu 2003; Ko 2008; Tzean *et al*. 2019)。然而，近年的分子親緣研究顯示即便是同一種 *Colletotrichum*，分離株間仍存在許多遺傳差異，無法以形態特徵進行區分，如菌落型態容易隨著培養條件以及菌株培養時間改變，難以作為鑑定依據。此外，由於單一基因在炭疽病菌屬內歧異度有限，無法作為 *Colletotrichum* sp. 菌株鑑定依據，須結合多基因做多重序列親緣關係分析 (multi-gene phylogeneic analysis) 方可將菌種做出較詳盡的劃分 (Cai *et al*. 2009; Prihastuti *et al*. 2009; Weir *et al*. 2012)。藉由多重序列親緣關係分析，以往鑑定為 *C. gloeosporioides* 的菌株其實可再分類成多個種，因此將之稱為『*C. gloeosporioides* 複合種』(*C. gloeosporioides* species complex) 或『廣義 *C. gloeosporioides*』(*C. gloeosporioides* sensu lato 或 *C. gloeosporioides* s.l.) (Rojas *et al*. 2010; Weir *et al*. 2012)。

近年的多重序列分析結果顯示引起葡萄晚腐病的病原菌，包括 *Colletotrichum aenigma* (Yan *et al*. 2015)、*Colletotrichum citri* (Lei *et al*. 2016)、*Colletotrichum fructicola* (Peng *et al*. 2013; Echeverrigaray *et al*. 2020; Lim *et al*. 2020)、*Colletotrichum godetiae* (Zapparata *et al*. 2017)、*Colletotrichum hebeiense* (Yan *et al*. 2015)、*Colletotrichum karstii*、*Colletotrichum kahawae*、*Colletotrichum limitticola*、*Colletotrichum nymphaeae* (Echeverrigaray *et al*. 2020)，以及 *Colletotrichum viniferum* (Peng *et al*. 2013; Lei *et al*. 2016; Oo & Oh 2017; Echeverrigaray *et al*. 2020; Gao *et al*. 2020; Yokosawa *et al*. 2020) 等 10 個種，分屬於 *C. gloeosporioides* 複合種、*Colletotrichum acutatum* 複合種以及 *Colletotrichum boninense* 複合種等。另外，intergenic sequence between Apn2 and MAT1-2-1 (*ApMat*) 基因之序列被認為亦有助釐清 *Colletotrichum* spp. 之分類 (Silva *et al*. 2012)。根據 *ApMat* 基因序列所進行的分析發現，自日本重要葡萄產區之一的長野縣境內蒐集之葡萄晚腐病菌為 *C. fructicola*、*Colletotrichum perseae*、*C. viniferum*、*Colletotrichum* spp.，以及另外一群與 *C. viniferum* 親緣關係相當接近之支序群 V (clade V) 族群 (Yokosawa *et al*. 2017, 2020)。

雖然在各地區引發葡萄晚腐病的主要病原菌種類不一，*C. viniferum* 或親緣相近之族群普遍存在於亞洲的中國、韓國和日本，以及南美洲的巴西等地 (Peng *et al*. 2013; Lei *et al*. 2016; Oo & Oh 2017; Echeverrigaray *et al*. 2020; Yokosawa *et al*. 2020)，並為中國與巴西多數葡萄產區主要的葡萄晚腐病病菌，且較其他 *Colletotrchum* spp. 對葡萄果實具更高的病原性 (Yan *et al*. 2015; Lei *et al*. 2016; Echeverrigaray *et al*. 2020)；而於日本的研究指出，境內除有少數 *C. viniferum* 菌株外，主要以與 *C. viniferum* 親緣關係相當接近卻又在親緣關係上具差異的支分群 V (clade V) 的分離株，其同樣具備高致病力，為區域內主要的病原菌族群 (Yokosawa *et al*. 2020)，在此稱為『日本支序群 V』。

在台灣，*C. viniferum* 與 *Colletotrichum tropicale* 曾被報導可感染葡萄果實造成葡萄晚腐病 (Duan *et al*. 2018; Lin *et al*. 2019; Duan & Chen 2020)，其中 Duan & Chen (2020) 自台灣中部主要葡萄產區之葡萄晚腐病果實上分離 24 株炭疽病菌，透過分析 internal transcribed spacer (*ITS*)、glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (*GAPDH*)、beta-tubulin 2 (*TUB2*)、actin (*ACT*) 與 *ApMat* 等 5 個基因的核酸序列，並以 *C. viniferum* 菌株代號 GZAAS5.08608 為參考菌株的分析結果顯示其中 22 株與 *C. viniferum* 各基因序列的相同度最高 (98.2–100%)，另 2 株與 *C. tropicale* 基因序列的相同度最高 (97.8–100%)。

為瞭解在台灣葡萄栽植區域引發葡萄晚腐病之病原菌種類與特性，本研究自 2012 年起，陸續前往苗栗、台中、彰化及南投等地區的重要葡萄產地及一處生鮮超市蒐集罹染晚腐病的葡萄果實、出現疑似病斑之枝條芽點、壞疽葉片以及具壞疽斑的園區雜草 (牛筋草，*Eleusine indica*)，分離得 *Colletotrichum* spp. 菌株後以 *ITS*、*GAPDH*、*ACT* 及 *TUB2*、chitin synthase 1 (*CHS-1*) 等基因之核酸序列分析親緣關係，

經由廣泛的調查，釐清引起台灣葡萄晚腐病之主要炭疽病菌種類以及各菌種分布狀況，並透過人工接種試驗，確認主要病原菌 *C. viniferum* 在葡萄幼果及葉片與其他組織之病原性及引起之病徵。

材料與方法

葡萄晚腐病菌菌株分離與保存

罹病植物組織採集地點包括苗栗縣卓蘭鎮、台中市霧峰區、后里區與新社區、彰化縣大村鄉、南投縣埔里鎮、水里鄉與信義鄉等地的葡萄栽培區，收集的樣本包括罹病果實、葉片以及園區內出現褐色水浸狀病徵的雜草 (牛筋草)。另外，也自大里區的生鮮超市收集罹病果實。分離菌株時，將待分離之組織用自來水清洗過後，切取新鮮罹病部位約 7 × 7 × 2 mm^3，經 0.5% 次氯酸鈉 (NaClO) 表面消毒 30 s，以擦手紙吸乾表面多餘水分後，放置於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (Potato dextrose agar, PDA; Difco, Lawrence, KS, USA) 平板培養基上，放置於室溫 (24–28℃) 1–2 d 以純化分離菌株。收集葡萄葉片及枝條的真菌分離株後，依下列公式計算各種菌的組織分離率：分離出菌種的組織數量/該園區總分離之組織數量 × 100%。

若有菌落疑似為 *Colletotrichum* spp. 時，選取單一分生孢子移植於新的 PDA，並靜置於室溫以 12 h 光週期培養 7 d，以觀察菌落與分生孢子形態，一旦確認為 *Colletotrichum* spp.，切取菌塊 (10 × 10 × 0.5 mm^3)，移置於無菌礦物油 (100% mineral oil, Sigma, Burlington, MA, USA) 中保存。

病原菌分子鑑定

真菌 genomic DNA (gDNA) 抽取：供試菌株以 PDA 於 25℃培養 10 d 後，刮取菌絲進行研磨至呈粉末狀，其後添加 500 μL CF buffer (農業試驗所配方，未顯示資料) 混合均勻，再用微量吸管將溶液吸取至 1.5 mL 離心管，以 11,269× *g* 離心 10 min。吸取 200 μL 上清液移至新的 1.5 mL 離心管，並於 100℃乾浴加熱 10 min 後，將核酸以 ddH_2O 稀釋 10× 後放置於 -20℃保存備用。

基因序列增幅與定序：將萃取自供試菌株之 gDNA 以特定引子對進行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR)，增幅的序列包括 *ITS* (White *et al*. 1990)、*GAPDH* (Templeton *et al*. 1992)、*CHS-1* (Carbone & Kohn 1999)、*TUB2* (Glass & Donaldson 1995)、*ACT* (Carbone & Kohn 1999) 和 *ApMat* (Silva *et al*. 2012) 等序列片段；所使用之引子對如各文獻所列，惟一例外是用於增幅 *TUB2* 的前置引子 (forward primer) T39 (5′-ATCACAACAACGCTTGCGACG-3′)，其為本研究自行設計。PCR 反應混合液 (20 μL) 包含 10 μL 耐熱聚合酶預混液 (*Taq* DNA polymerase 2× Master Mix RED; Ampliqon, Odense, Denmark)，1 μL gDNA，10 μM 引子對各 1 μL 以及 7 μL ddH_2O。PCR 反應流程為：95℃解旋反應 (denature) 5 min；95℃解旋反應 30 s、56℃黏合反應 (annealing) 30 s、72℃延長反應 (extension) 30 s，進行 35 次循環；最後以 72℃ 7 min 進行最終延長反應。以瓊脂膠體電泳確認 PCR 增幅產物為單一明顯條帶後，送交源資國際生物股份有限公司 (Tri-I Biotech Inc., New Taipei, Taiwan) 進行定序。

親緣關係樹分析：親緣演化分析共使用 126 株菌株的序列資料，包含本研究分離之 40 株供試菌株和 86 株參考菌株 (reference strain)，參考菌株的序列資料由美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 資料庫取得。將各基因之序列分別透過 MEGA X 軟體 (Kumar *et al*. 2018) 以 Clustal W (Thompson *et al*. 1994) 進行初步排列分析 (alignment)，再透過人工方式進行序列的微調和確認，最終各基因片段用以構築單基因 (*ApMat*) 親緣關係樹或 3 基因 (*ITS* + *GAPDH* + *TUB2*) 和 5 基因 (*ITS* + *GAPDH* + *TUB2* + *CHS-1* + *ACT*) 之多基因親緣關係樹。親緣關係樹利用最大似然法 (maximum likelihood; ML) 和貝葉斯法 (Bayesian inference analysis; BI) 二種演算方法進行構築，最適取代模型透過線上分析軟體 Smart Model Selection (Lefort *et al*. 2017) 和 MEGA X 軟體進行預測，其中最大似然法不分基因區段預測，貝葉斯法則依各基因區段單獨預測，

結果如表 1。最大似然法親緣關係樹之構築透過 MEGA X 軟體執行，並以啟發式 (heuristic method) 方法中 nearest neighbour interchange (NNI) 之方式搜索樹型，最終演化樹分支的支持度以拔靴法 (bootstrap) 進行 1,000 次取樣來檢驗。貝葉斯法之親緣關係樹利用 MrBayers v. 3.2.7 (Ronquist *et al*. 2012) 構築，建構過程採用馬可夫鏈蒙地卡羅 (Markov chain monte carlo; MCMC) 演算法，運行 1,000,000 代，每 1,000 棵樹取樣一次，前 25% 之樹屏除，剩餘之樹用以取得共同樹 (或稱一致樹；consensus tree)，並顯示後驗機率 (posterior probabilities; PP)，表示對此親緣樹分支的支持度，最終親緣關係樹以 FigTree v. 1.4.4 (Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology 2018) 進行繪製。

病原性測試

菌株以 PDA 培養並以 12 h 光週期培養 10–14 d，以無菌水搜集分生孢子，並將濃度調成 1 × 10^6 孢子 mL^{-1} 之懸浮液，添加稀釋 10,000× 展著劑 (加收活展；興農股份有限公司，台灣台中市)，製成接種源。以「巨峰」葡萄 (‘Kyoho’) 為供試植物，並以無菌水取代分生孢子懸浮液作為對照組，以下列方法進行接種。罹病組織隨後再進行組織分離，確認分得相同病原菌以完成柯霍氏法則。

果實接種：2017–2018 年夏季與秋季時於台中后里區 1 處果園，挑選初結果 1 mo 內之果串，將在樹上持續發育的供試果串全部浸泡入置備好的分生孢子懸浮液中 10 s，再以白色紙袋將果串封緊避免與外界直接接觸並避免雨水流入，持續觀察供試果串生長過程及病徵表現，直至結果 1.5 mo 後果實轉色成熟。每菌株接種 7 串以上。

植株接種：於溫室內，取種植於盆栽中高約 110–150 cm 並經催芽 2 mo 後之植株 (具葉片與嫩梢)，以上述置備好的分生孢子懸浮液噴霧全部植株，包括葉片正面、背面以及嫩梢等，直至水滴滑落，每處理共 5 盆。以透明塑膠袋開口朝下，由上往下將植株套起，套入前以噴霧器噴水使塑膠袋內部表面維持有水珠狀態。靠近植株頂端的塑膠袋角落以剪刀剪出長約 5–7 cm 的開口，每個角落各 2 刀，以使植株能透氣。接種植株置入 28℃、12 h 光週期的走入式生長箱，持續觀察。

菌株型態與生長觀察

為觀察 *C. viniferum* 次支序群 T 菌株型態，以 F217069、F217131、F217133 與 F217141 作為供試菌株，培養在 PDA 平板培養基，以 22–24℃、12 h 光週期方式培養 7–10 d 後觀察菌落型態，並挑取培養基表面的分生孢子記錄。刺激壓器生成方式為將分生孢子以 0.5% V8 做成懸浮液，滴在載玻片上並保濕，以 22–24℃無光照的方式培養 2 d 後觀察。使用

表 1. 本研究各親緣關係分析所使用的核甘酸替換模型。

Table 1. Nucleotide substitution models used in phylogenetic analyses in this study.

	1 gene phylogenetic tree		3 genes phylogenetic tree		5 genes phylogenetic tree	
Gene/locus[z]	Maximum likelihood	Bayesian inference analysis	Maximum likelihood	Bayesian inference analysis	Maximum likelihood	Bayesian inference analysis
ApMat	K80[y]	HKY + G	-	-	-	-
ITS	-[x]	-	T92 + G	GTR + G	GTR + G	GTR + G
GAPDH	-	-	T92 + G	HKY + G	GTR + G	GTR + G
TUB2	-	-	T92 + G	GTR + G	GTR + G	GTR + G
CHS-1	-	-	-	-	GTR + G	K80 + G
ACT	-	-	-	-	GTR + G	GTR + G

[z] *ApMat*: intergenic sequence between Apn2 and MAT1-2-1; *ITS*: internal transcribed spacer; *GAPDH*: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *TUB2*: beta-tubulin 2; *CHS-1*: chitin synthase; *ACT*: actin.

[y] K80: Kimura 2-parameter; T92: Tamura 3-parameter; GTR: general time reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; G: gamma distribution.

[x] Not used in analysis.

的顯微鏡為 Olympus BX40 (Olympus, Tokyo, Japan)，拍照設備為Canon 50 D (Canon, Tokyo, Japan)。為觀察菌絲生長狀況，菌株在 PDA 上黑暗培養 3–5 d 後，切下菌落邊緣之新鮮菌塊，移植於 PDA 培養基的邊緣，放置於 4–40℃ (以 4℃為間距，共 10 個溫度)，每個溫度下每菌株每次測試 3 皿，即 3 重複，測試不同溫度下菌絲生長速率。每日記錄菌絲直線生長距離，部分溫度下於 10 d 即長滿培養基，故測量 1–9 d 的生長數據，每皿每日生長速率計算方法為 (生長滿 9 d 距離 − 生長滿 1 d 距離) cm/8 d (單位：cm d^{-1})，取 3 重複數之平均值代表該菌株。試驗重複 3 次。

結果

葡萄晚腐病菌株分離

自 2012–2020 年間，陸續自台灣各地葡萄產區，包括苗栗縣 (卓蘭鎮)、台中市 (新社區、霧峰區及后里區)、彰化縣 (大村鄉)、南投縣 (信義鄉、水里鄉、國姓鄉及埔里鎮) 等地，以及台中市大里區的生鮮超市蒐集出現晚腐病徵之葡萄果實；目標病徵包括果實表面出現針點狀黑色凸起物或橘色孢子堆，以及果肉軟腐。鏡檢發現所獲得的菌株之分生孢子皆為透明、中央具明顯油滴、兩端圓鈍之長桿狀孢子，初步鑑定為 *C. gloeosporioides* s.l. (Sutton 1992; Weir *et al*. 2012)。從中挑選 28 株進一步進行核酸序列分析。

另一方面，也到曾發生晚腐病之葡萄果園，於葡萄果實發育過程及採收後，分別採集出現褐化病徵之葡萄葉片 (以下分別稱為『產季罹病葉片』及『採收後罹病葉片』)；並於果實採收後，採集外觀出現疑似壞疽、褐斑之枝條及芽點 (以下稱為『具褐斑的枝條或芽點』)。自這些病組織分離真菌菌株的結果顯示 *Colletotrichum* spp. 之分離率相當高，其他 *Pestalotiopsis* sp.、Botryosphaeriaceae、*Alternaria* sp.、*Diaporthe* sp. 以及 *Fusaruim* sp. 等真菌亦有一定比例 (表 2)。『產季罹病葉片』、『採收後罹病葉片』及『具褐斑的枝條或芽點』的 *Colletotrichum* 屬菌株分離率分別為 35.9、92.3 及 41.7%，後續各自其中挑選 6、4 及 1 株代表性分離株進行後續分析 (表 2)。

此外，在一個曾發生葡萄晚腐病之果園採集到呈現褐色水浸狀病徵之雜草，組織分離及鏡檢後發現所獲菌株是 *C. gloeosporioides* s.l.，挑選其中 1 株分離株和前述 *Colletotrichum* 屬菌株一併進行親緣關係分析。以上共計 40 株 *Colletotrichum* 菌株，詳細分離來源請見表 3。

多重序列親緣關係分析

為鑑定前述 40 個分離株的種類，由已知研究挑選 51 株隸屬於 *Colletotrichum* 屬菌株做為參考菌株 (Weir *et al*. 2012; Peng *et al*. 2013; Yan *et al*. 2015; de Silva *et al*. 2019)， 其 中包含 31 種模式菌株 (type strain)；為在已知資料庫中尋得更相近於本研究之已知菌種，

表 2. 台灣 2015–2019 年間，各真菌於葡萄不同生長階段或組織之分離比例。

Table 2. Isolation percentages of fungi isolated in different stages or diseased tissues of grape during 2015–2019 in Taiwan.

	Diseased leaves		
Isolation percentages (%)	Before fruits were harvested	After fruits were harvested	Shoot or bud[z]
Colletotrichum sp.	35.9	92.3	41.7
Pestalotiopsis sp.	23.4	76.9	75.0
Botryosphaeriaceae	15.6	15.4	63.2
Alternaria sp.	32.8	19.2	11.8
Phomopsis sp.	12.5	25.0	36.8
Fusarium sp.	15.6	50.0	33.3
Others	70.3	15.4	29.9

[z] Brown spots or lesions on the shoots or buds before sprouting.

表 3. 本研究分離與蒐集之菌株相關資訊與其登錄在 GenBank 的序列號碼。

Table 3. List of the isolates which were isolated in this study and related information and accession numbers in GenBank.

Species	Isolate[z]	Source	Year	Location	*ITS*[y]	*GAPDH*	*ACT*	*TUB2*	*CHS-1*	*ApMat*
Colletotrichum fructicola	F215089	leaf	2015	Xinshe	MW492596	MW480628	MW480587	MW489256	MW480669	-
	F215147	fruit	2015	Xinshe	MW492597	MW480629	MW480588	MW489257	MW480670	MW835243
	F216037	weed								
		(*Eleusine indica*)	2016	Xinshe	MW492602	MW480634	MW480593	MW489262	MW480675	MW835247
	F217125	leaf	2017	Puli	MW492609	MW480641	MW480600	MW489269	MW480682	-
	F217155	leaf	2017	Xinyi	MW492615	MW480647	MW480606	MW489275	MW480688	-
	F218126	leaf	2018	Xinshe	MW492625	MW480657	MW480616	MW489285	MW480698	-
	t220155	fruit	2020	Xinyi	MW492629	MW480661	MW480620	MW489289	MW480702	-
Colletotrichum tropicale	F212108	fruit	2012	Dacun	MW492594	MZ128124	MW480585	MW489254	MW480667	MW835240
	F216025	twig	2016	Dacun	MW492599	MW480631	MW480590	MW489259	MW480672	MW835244
	F216082	leaf	2016	Dacun	MW492604	MW480636	MW480595	MW489264	MW480677	-
	F217120	leaf	2017	Dacun	MW492608	MW480640	MW480599	MW489268	MW480681	-
	F218113	leaf	2018	Xinshe	MW492622	MW480654	MW480613	MW489282	MW480695	-
Colletotrichum viniferum	F215071	fruit	2015	Supermarket at Taichung	MW492595	MW480627	MW480586	MW489255	MW480668	MW835242
C. viniferum subclade T	F212083	fruit	2012	Zhuolan	MW492592	MW480624	MW480583	MW489252	MW480665	MW835239
	F212087	fruit	2012	Guoxing	MW492593	MW480625	MW480584	MW489253	MW480666	-
	F215090	fruit	2015	Xinshe	MW930857	MW927709	MW927706	MW927707	MW927708	MW835241
	F215149	fruit	2015	Xinshe	MW492598	MW480630	MW480589	MW489258	MW480671	-
	F216035	fruit	2016	Xinshe	MW492600	MW480632	MW480591	MW489260	MW480673	MW835245
	F216036	leaf	2016	Xinshe	MW492601	MW480633	MW480592	MW489261	MW480674	MW835246
	F216184	fruit	2016	Shuili	MW492605	MW480637	MW480596	MW489265	MW480678	-
	F217069	fruit	2017	Wufeng	MW492606	MW480638	MW480597	MW489266	MW480679	-
	F217115	fruit	2017	Dacun	MW492607	MW480639	MW480598	MW489267	MW480680	-
	F217131	leaf	2017	Puli	MW492610	MW480642	MW480601	MW489270	MW480683	MW835237
	F217133	fruit	2017	Puli	MW492611	MW480643	MW480602	MW489271	MW480684	MW835238
	F217141	leaf	2017	Dacun	MW492612	MW480644	MW480603	MW489272	MW480685	MW835249

表 3. 本研究分離與蒐集之菌株相關資訊與其登錄在 GenBank 的序列號碼。(續)

Table 3. List of the isolates which were isolated in this study and related information and accession numbers in GenBank. (continued)

Species	Isolate[z]	Source	Year	Location	*ITS*[y]	*GAPDH*	*ACT*	*TUB2*	*CHS-1*	*ApMat*
	F217153	fruit	2017	Xinyi	MW492614	MW480646	MW480605	MW489274	MW480687	-
	F217177	fruit	2017	Dacun	MW492616	MW480648	MW480607	MW489276	MW480689	-
	F217179	fruit	2017	Wufeng	MW492617	MW480649	MW480608	MW489277	MW480690	-
	F217209	fruit	2017	Dacun	MW492618	MW480650	MW480609	MW489278	MW480691	-
	F217211	fruit	2017	Dacun	MW492619	MW480651	MW480610	MW489279	MW480692	-
	F218102	fruit	2018	Xinshe	MW492620	MW480652	MW480611	MW489280	MW480693	-
	F218110	fruit	2018	Xinshe	MW492621	MW480653	MW480612	MW489281	MW480694	-
	F218118	fruit	2018	Xinshe	MW492623	MW480655	MW480614	MW489283	MW480696	-
	F218123	fruit	2018	Xinshe	MW492624	MW480656	MW480615	MW489284	MW480697	-
	F218130	fruit	2018	Xinshe	MW492626	MW480658	MW480617	MW489286	MW480699	-
	t220153	fruit	2020	Xinyi	MW492627	MW480659	MW480618	MW489287	MW480700	-
	t220154	fruit	2020	Xinyi	MW492628	MW480660	MW480619	MW489288	MW480701	-
	t220156	fruit	2020	Xinyi	MW492630	MW480662	MW480621	MW489290	MW480703	-
	t220157	fruit	2020	Xinyi	MW492631	MW480663	MW480622	MW489291	MW480704	-
	t220158	fruit	2020	Xinyi	MW492632	MW480664	MW480623	MW489292	MW480705	-

[z] All isolates were isolated from diseased mature fruits which showed typical ripe rot of grape or lesions on leaves or twigs.

[y] *ITS*: internal transcribed spacer; *GAPDH*: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *ACT*: actin; *TUB2*: beta-tubulin 2; *CHS-1*: chitin synthase; *ApMat*: intergenic sequence between Apn2 and MAT1-2-1.

加以用 F215069 之 *GADPH* 和 *TUB2* 基因為代表進行 BLAST 分析搜尋，挑選序列與之最相近的已知菌株各 2 株共 4 株 (菌株代號分別為 J11 與 J2-1；CGRS1 與 CGRQ1。已知皆為 *C. viniferum*) 一併納入分析；以上共 55 株參考菌株 (表 4)。利用 *ITS*、*ACT*、*TUB2*、*GAPDH*、及 *CHS-1* 等 5 個基因的聯合序列針對前述總共 95 株菌建構最大概率親緣關係樹的分析結果顯示 (圖 1)，本研究的 40 株菌可鑑定為 3 種 *Colletotrichum* sp.，其中 28 株與 *C. viniferum* L. J. Peng, L. Cai, K. D. Hyde & Zi Y. Ying 模式菌株及其他分離自中國的 *C. viniferum* 參考菌株親緣關係較相近，構成一個穩定的 *C. viniferum* 支序群，拔靴法支撐數值 (bootstrap support values) 為 96%，而貝葉斯事後概率數值 (Bayesian posterior probabilities) 為 0.99，可鑑定為 *C. viniferum*；7 株與 *C. fructicola* 的菌株形成一支序群，拔靴法支撐數值為 76%，而貝葉斯事後概率數值為 1，鑑定為 *C. fructicola*；5 株與 *C. tropicale* 的菌株形成一支序群，拔靴法支撐數值為 91%，而貝葉斯事後概率數值為 1，可鑑定為 *C. tropicale* (圖 1)。

親緣關係分析也顯示 *C. viniferum* 支序群明顯包含 2 個次支序群，分別稱為次支序群 T 與次支序群 C。但須注意次支序群 T 的拔靴法支撐數值小於 50% 而貝葉斯事後概率值為 0.74，而次支序群 C 則分別為 67% 與 0.99，數值皆較低，說明這樣的分群方式可能還不是很穩定。

自台灣田間或生鮮超市葡萄果實分離之 28 株菌中，24 株 (占全體 85.7%) 屬於 *C. viniferum* 次支序群 T，1 株 (3.6%) 與源自中國的 *C. viniferum* 參考菌株同屬於次支序群 C，而其他 3 個分離株，2 株為 *C. fructicola* (7.1%)，1 株為 *C. tropicale* (3.6%)；自「產季罹病葉片」所獲得的 6 個分離株中，1 株為 *C. viniferum* 次支序群 T、3 株為 *C. fructicola*，另 2 株為 *C. tropicale*；『採收後罹病葉片』的 4 個分離株中，2 株為 *C. viniferum* 次支序群 T、1 株為 *C. fructicola*，及 1 株為 *C. tropicale*；自『具褐斑的枝條或芽點』分離到的代表性菌株為 *C. tropicale*；自雜草分離的菌株為 *C. fructicola* (圖 1)。

表 4. 本研究使用之參考菌株相關資訊與其登錄在 GenBank 的序列號碼。

Table 4. List of the reference isolates used in this study and related information and accession numbers.

Species	Isolates	*ITS*	*GAPDH*	*ACT*	*CHS*	*TUB2*	*ApMat*	Reference
Colletotrichum aenigma	ICMP18608, C1253.4	JX010244	JX010044	JX009443	JX009774	JX010389	-	Weir *et al.* (2012)
	JZB330025, B1	KF156860	KF377492	KF377529	KF289005	KF288964	-	Yan *et al.* (2015)
Colletotrichum asianum	ICMP18580, BPDI4, C1315.4	FJ972612	JX010053	JX009584	JX009867	JX010406	-	Weir *et al.* (2012)
	ICMP18696, C1187	JX010192	JX009915	JX009576	JX009753	JX010384	-	Weir *et al.* (2012)
Colletotrichum aeschynomenes	ICMP17673, 3-1-3	JX010176	JX009930	JX009483	JX009799	JX010392	-	Weir *et al.* (2012)
Colletotrichum alatae	ICMP17919, C1275.5	JX010190	JX009990	JX009471	JX009837	JX010383	-	Weir *et al.* (2012)
Colletotrichum alienum	ICMP12071, C824	JX010251	JX010028	JX009572	JX009882	JX010411	-	Weir *et al.* (2012)
	ICMP18621, C1194.22	JX010246	JX009959	JX009552	JX009755	JX010386	-	Weir *et al.* (2012)
Colletotrichum aotearoa	ICMP18537, C1282.4	JX010205	JX010005	JX009564	JX009853	JX010420	-	Weir *et al.* (2012)
Colletotrichum chrysophilum	CMM4268	KX094252	KX094183	KX093982	KX094083	KX094285	-	de Silva *et al.* (2019)
Colletotrichum clidemiae	ICMP18658, C1317.1	JX010265	JX009989	JX009537	JX009877	JX010438	-	Weir *et al.* (2012)

表 4. 本研究使用之參考菌株相關資訊與其登錄在 GenBank 的序列號碼。(續)

Table 4. List of the reference isolates used in this study and related information and accession numbers. (continued)

Species	Isolates	*ITS*	*GAPDH*	*ACT*	*CHS*	*TUB2*	*ApMat*	Reference
Colletotrichum cordylinicola	ICMP18579, LC0955, C1315.1	JX010226	JX009975	HM470235	JX009864	JX010440	-	Weir *et al*. (2012)
Colletotrichum conoides	CAUG17	KP890168	KP890162	KP890144	KP890156	KP890174	-	Diao *et al*. (2017)
Colletotrichum endophyticum	UOM1137, F5-2D	MH728809	MH707467	MH781483	MH805853	MH846566	-	de Silva *et al*. (2019)
	CAUG28	KP145441	KP145413	KP145329	KP145385	KP145469	-	Diao *et al*. (2017)
Colletotrichum fructicola	CBS130416, ICMP18581, C1315.3, LC0033	JX010165	JX010033	JX009501	JX009866	JX010405	JQ807838	Weir *et al*. (2012) Yokosawa *et al*. (2020)
	CBS125397, C1316.21	JX010173	JX010032	JX009581	JX009874	JX010409	-	Weir *et al*. (2012)
	ICMP18613, C1253.2	JX010167	JX009998	JX009491	JX009772	JX010388	-	Weir *et al*. (2012)
Colletotrichum grevilleae	CBS132879	KC297078	KC297010	KC296941	KC296987	KC297102	-	Yan *et al*. (2015)
Colletotrichum gloeosporioides	CBS112999, ICMP17821	JQ005152	JQ005239	JQ005500	JQ005326	JQ005587	-	Weir *et al*. (2012)
	CORCG5	HM034809	HM034807	HM034801	HM034805	HM034811	-	Diao *et al*. (2017)
Colletotrichum hebeiense	JZB330028, K3	KF156863	KF377495	KF377532	KF289008	KF288975	-	Yan *et al*. (2015)
Colletotrichum hystricis	CBS142411, CPC 28153	KY856450	KY856274	KY856023	KY856190	KY856532	-	de Silva *et al*. (2019)
Colletotrichum horri	ICMP10492, C1180.1	GQ329690	GQ329681	JX009438	JX009752	JX010450	-	Yan *et al*. (2015)
Colletotrichum kahawae	ICMP17816, C1266.1	JX010231	JX010012	JX009452	JX009813	JX010444	-	Weir *et al*. (2012)
Colletotrichum makassarense	CBS143664, CPC28612	MH728812	MH728820	MH781480	MH805850	MH846563	-	de Silva *et al*. (2019)
	CPC28556	MH728815	MH728821	MH781478	MH805848	MH846561	-	de Silva *et al*. (2019)
Colletotrichum musae	CBS116870, ICMP19119	JX010146	JX010050	JX009433	JX009896	HQ596280	-	Weir *et al*. (2012)
	ICMP17817, C1266.11, IMI52264	JX010142	JX010015	JX009432	JX009815	JX010395	-	Diao *et al*. (2017)
Colletotrichum nupharicola	CBS470.96, ICMP18187, C1275.25	JX010187	JX009972	JX009437	JX009835	JX010398	-	Weir *et al*. (2012)
	CBS472.96, C1275.26, ICMP17940	JX010188	JX010031	JX009582	JX009836	JX010399	-	Diao *et al*. (2017)
Colletotrichum psidii	CBS145.29	JX010219	JX009967	JX009515	JX009901	JX010443	-	Weir *et al*. (2012)
Colletotrichum queenslandicum	ICMP1778	JX010276	JX009934	JX009447	JX009899	JX010414	-	Weir *et al*. (2012)
	ICMP18705, C956.1	JX010185	JX010036	JX009490	JX009890	JX010412	-	Weir *et al*. (2012)
Colletotrichum salsolae	ICMP19051, C1314	JX010242	JX009916	JX009562	JX009863	JX010403	-	Weir *et al*. (2012)
Colletotrichum siamense	ICMP18578, C1315.2	JX010171	JX009924	JX009518	JX009865	JX010404	-	Weir *et al*. (2012)

表 4. 本研究使用之參考菌株相關資訊與其登錄在 GenBank 的序列號碼。(續)

Table 4. List of the reference isolates used in this study and related information and accession numbers. (continued)

Species	Isolates	*ITS*	*GAPDH*	*ACT*	*CHS*	*TUB2*	*ApMat*	Reference
	CMM3814	KC702994	KC702955	KC702922	KC598113	KM404170	-	de Silva *et al*. (2019)
	CBS130420, LC921, LLTA01	HM131511	HM131497	HM131507	JX009895	JX010415	-	Weir *et al*. (2012)
Colletotrichum theobromicola	ICMP18649, CBS124945, C1316.13	JX010294	JX010006	JX009444	JX009869	JX010447	-	Weir *et al*. (2012)
Colletotrichum ti	ICMP4832	JX010269	JX009952	JX009520	JX009898	JX010442	-	Weir *et al*. (2012)
Colletotrichum tropicale	ICMP18653, CBS124949, 5101	JX010264	JX010007	JX009489	JX009870	JX010407	-	Weir *et al*. (2012)
	CPC28607	MH728814	MH707464	MH781479	MH805849	MH846562	-	de Silva *et al*. (2019)
Colletotrichum tainanense	CBS143666, UOM1298T, CPC30245	MH728818	MH728823	MH781475	MH805845	MH846558	-	de Silva *et al*. (2019)
	UOM1290	MH728805	MH728819	MH781487	MH805857	MH846570	-	de Silva *et al*. (2019)
Colletotrichum viniferum	CI026	MN758919	MN785021	-	-	MN785082	-	Echeverrigaray *et al*. (2020)
	CI036	MN758928	MN785030	-	-	MN785091	-	Echeverrigaray *et al*. (2020)
	CA041	MN758932	MN785034	-	-	MN785095	-	Echeverrigaray *et al*. (2020)
	CA043	MN758934	MN785036	-	-	MN785097	-	Echeverrigaray *et al*. (2020)
	CA044	MN758935	MN785037	-	-	MN785098	-	Echeverrigaray *et al*. (2020)
	LMF18-1	MN758936	MN785038	-	-	MN785099	-	Echeverrigaray *et al*. (2020)
	LMF18-2	MN758937	MN785039	-	-	MN785100	-	Echeverrigaray *et al*. (2020)
	LMF18-6	MN758940	MN785042	-	-	MN785103	-	Echeverrigaray *et al*. (2020)
	CNU171001	MG182340	MG182341	-	-	MG182342	-	Oo & Oh (2017)
C. viniferum subclade C	GZAAS5.08601, yg1	JN412804	JN412798	JN412795	-	JN412813	-	Yan *et al*. (2015)
	JZB330008, G12-1	KF156846	KF377476	KF377513	KF288989	KF288962	-	Yan *et al*. (2015)
	JZB330017, PTT3-1	KF156854	KF377485	KF377522	KF288998	KF288963	-	Yan *et al*. (2015)
	CAUG27	KP145440	KP145412	KP145328	KP145384	KP145468	-	de Silva *et al*. (2019)
	GZAAS5.08608, gg4	JN412802	JN412800	JN412793	-	JN412811	KJ623242	Peng *et al*. (2013); Yokosawa *et al*. (2020)
	J11	KF156868	KF377500	KF377537	KF289012	KF288979	-	
	J2-1	KF156867	KF377498	KF377536	KF289011	KF288978	-	
	CGRS1	KJ534683	KJ534750	KJ534740	KJ534709	KJ534675	-	
	CGRQ1	KJ534682	KJ534749	KJ534739	KJ534708	KJ534676	-	

表 4. 本研究使用之參考菌株相關資訊與其登錄在 GenBank 的序列號碼。(續)

Table 4. List of the reference isolates used in this study and related information and accession numbers. (continued)

Species	Isolates	*ITS*	*GAPDH*	*ACT*	*CHS*	*TUB2*	*ApMat*	Reference
Colletotrichum xanthorrhoeae	ICMP17903, BRIP45094, C1271	JX010261	JX009927	JX009478	JX009823	JX010448	-	Weir *et al*. (2012)
Clade V	16-15	-	-	-	-	-	LC466510	Yokosawa *et al*. (2020)
	16-16	-	-	-	-	-	LC466511	Yokosawa *et al*. (2020)
	17-18-3	-	-	-	-	-	LC466540	Yokosawa *et al*. (2020)
	17-25-1	-	-	-	-	-	LC466518	Yokosawa *et al*. (2020)
	17-25-2	-	-	-	-	-	LC466519	Yokosawa *et al*. (2020)
	16-13	-	-	-	-	-	LC466509	Yokosawa *et al*. (2020)
	16-37	-	-	-	-	-	LC466507	Yokosawa *et al*. (2020)
	16-103	-	-	-	-	-	LC466482	Yokosawa *et al*. (2020)
	16-106	-	-	-	-	-	LC466483	Yokosawa *et al*. (2020)
	16-107	-	-	-	-	-	LC466484	Yokosawa *et al*. (2020)
	16-108	-	-	-	-	-	LC466485	Yokosawa *et al*. (2020)
	17-17-1	-	-	-	-	-	LC466536	Yokosawa *et al*. (2020)
	17-17-2	-	-	-	-	-	LC466537	Yokosawa *et al*. (2020)
	17-33-2	-	-	-	-	-	LC466547	Yokosawa *et al*. (2020)
	17-47-2	-	-	-	-	-	LC466531	Yokosawa *et al*. (2020)
outgroup *Colletotrichum boninense*	CBS123755	JQ005153	JQ005240	JQ005501	JQ005327	JQ005588	-	Weir *et al*. (2012)

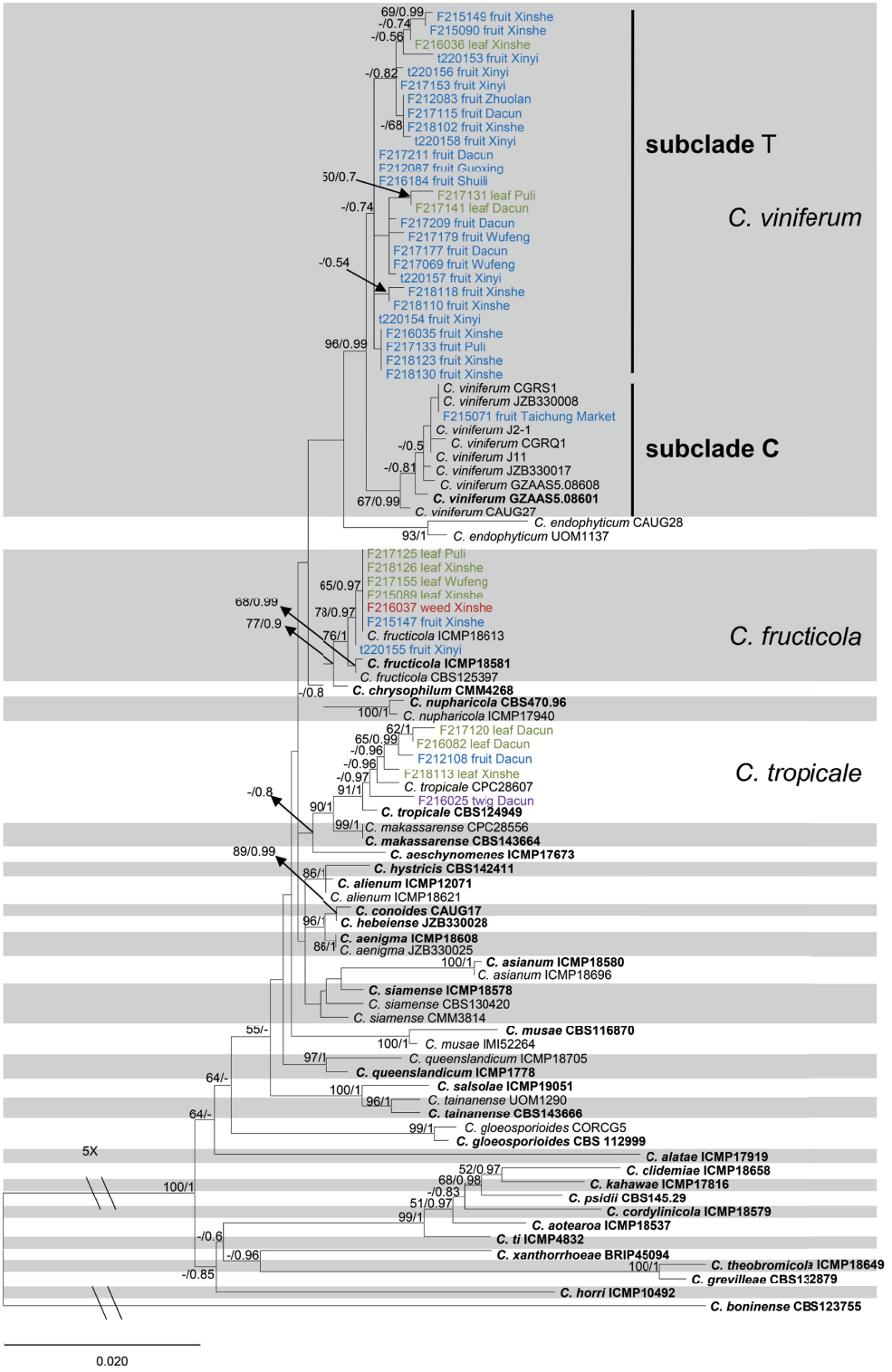


圖 1. 以 *Colletotrichum gloeosporioides* 複合種共 95 個菌株建構之最大概率親緣關係樹，以 *ITS*、*GAPDH*、*TUB2*、*ACT* 及 *CHS-1* genes 等 5 基因建構之。

Fig. 1. A maximum likelihood phylogenetic tree based on 95 isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. The tree was generated using concatenated sequences of genes encoding the ribosomal internal transcribed spacer (*ITS*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), beta-tubulin 2 (*TUB2*), actin (*ACT*) and chitin synthase 1 (*CHS-1*). The bootstrap support values (≥ 50%) and Bayesian posterior probabilities (PP ≥ 0.5) are displayed at the nodes. The tree was rooted to *Colletotrichum boninense* (CBS 123755). The bar indicates 0.02 expected changes per site. Type strains are displayed in bold. Isolates of this study which isolated from different tissues are indicated by colors: leaves in green, fruits in blue, twigs in purple, and weeds in red.

C. viniferum 次支序群 T 與其他 *C. viniferum* 菌株的親緣關係

為瞭解 *C. viniferum* 次支序群 T 與其他地域 *C. viniferum* 菌株的親緣關係，本研究收集目前已發表之 *C. viniferum* 核酸序列資料進行分析，但由於各研究團隊用以分析的核酸序列種類未必相同，以下親緣分析分為二個部分進行。Echeverrigaray *et al*. (2020) 與 Oo & Oh (2017) 個別發表自巴西 (8 株) 與韓國 (1 株) 收集的 *C. viniferum* 菌株，因 Oo & Oh (2017) 僅公布並分析 *ITS*、*GAPDH* 與 *TUB2* 等基因的核酸序列 (表 4)，因此第一部分分析也採取相同策略，納入分析的菌株包括本研究所分離的 *C. viniferum* 次支序群 T 菌株 8 株與次支序群 C 菌株 1 株、源自中國的次支序群 C 菌株 9 株，以及外群菌株 1 株，共 28 株菌，根據上述 3 基因的序列作親緣關係分析 (圖 2)，結果顯示所有 *C. viniferum* 分離株初步細分成 3 個分群，並與分離地區具相關性，其中巴西分群的 8 菌株可再分成關係相近的 2 小群。原屬於 *C. viniferum* 次支序群 T 之台灣菌株與巴西菌群的親緣關係較近，原屬於 *C. viniferum* 次支序群 C 的台灣菌株 F215071 與韓國 1 菌株則與中國菌群較接近。

第二部分分析聚焦於探討台灣 *C. viniferum* 次支序群 T 與跟 *C. viniferum* 具高度親緣關係之日本支序群 V 菌株 (Yokosawa *et al*. 2020) 的親緣關係；Yokosawa *et al*. (2020) 以 *ApMat* 基因序列建構親緣關係樹，因此本研究也採取相同策略，納入分析的菌株包括本研究分離之 *C. viniferum* 次支序群 T 菌株 8 株、*C. viniferum* 次支序群 C 菌株 1 株，以及參考菌株 17 株 (表 4)，共 26 株菌 (圖 3)。分析結果顯示，台灣的次支序群 T 及中國的次支序群 C 較相近，日本分群 V 之菌株自成一支序群，支序群的拔靴法支撐數值為 86% 而貝葉斯事後概率數值為 0.97，與台灣的次支序群 T 及中國的次支序群 C 可明顯區別。分離自生鮮超市果實的 F215071 菌株與次支序群 C 之 *C. viniferum* 模式菌株 (GZAAS5.08601) 分屬於同一支序群。*ApMat* 序列構築的親緣關係結果與前述分析 5 個基因之序列所獲結論一致。

C. viniferum 次支序群 T 的菌株特性描述及在葡萄造成之病徵

本研究自罹病葡萄葉片與果實分離的菌株主要屬於 *C. viniferum* 次支序群 T，以 F217069 為代表性菌株，描述其特徵如下：菌落為灰色到灰綠色，氣生菌絲生長平鋪至微蓬鬆；分生孢子透明，長橢圓形 (cylindrical)，兩端圓鈍或偶有一端稍微尖起，具明顯液胞；長度為 12.4-14.0-16.0 μm (min.-avg.-max.)，寬度為 4.8-5.3-6.0 μm，長寬比為 2.2-2.6-3.3 (表 5、圖 4)。壓器 (appressorium) 為灰綠色到褐棕色之間，多數為不規則的卵狀 (irregular ovoid) 或棍棒狀 (clavate)，邊緣為圓鋸齒狀 (crenate)，偶而出現不規則裂瓣 (lobed)；長度為 8.0-10.9-15.6 μm，寬度為 4.4-6.8-10.0 μm (表 5、圖 4)。菌絲最適生長溫度為 28℃，4℃以下以及 40℃以上無法生長。另針對菌株 F217131、F217133 與 F217141 所進行的分析顯示，其壓器與分生孢子之形態均與 F217069 相似，最適生長溫度也是 28℃，但菌株生長速度與菌落特徵呈現些微差異：F217131 的菌落型態與 F217069 相似，F217133 與 F2171413 的菌落為深墨綠色至灰白色，帶淡黃色。

C. viniferum 次支序群 T 菌株在田間栽植葡萄所引起的病徵主要包括：罹病葡萄葉片出現葉緣局部或大面積壞疽，並且伴隨明顯大範圍的黃暈 (圖 5A–C)；若果實罹病，成熟葡萄果粒腐爛、皺縮，表面出現黑色、顆粒、輪紋排列的分生孢子盤，濕度高時出現橘色菌泥 (圖 5D、E)。

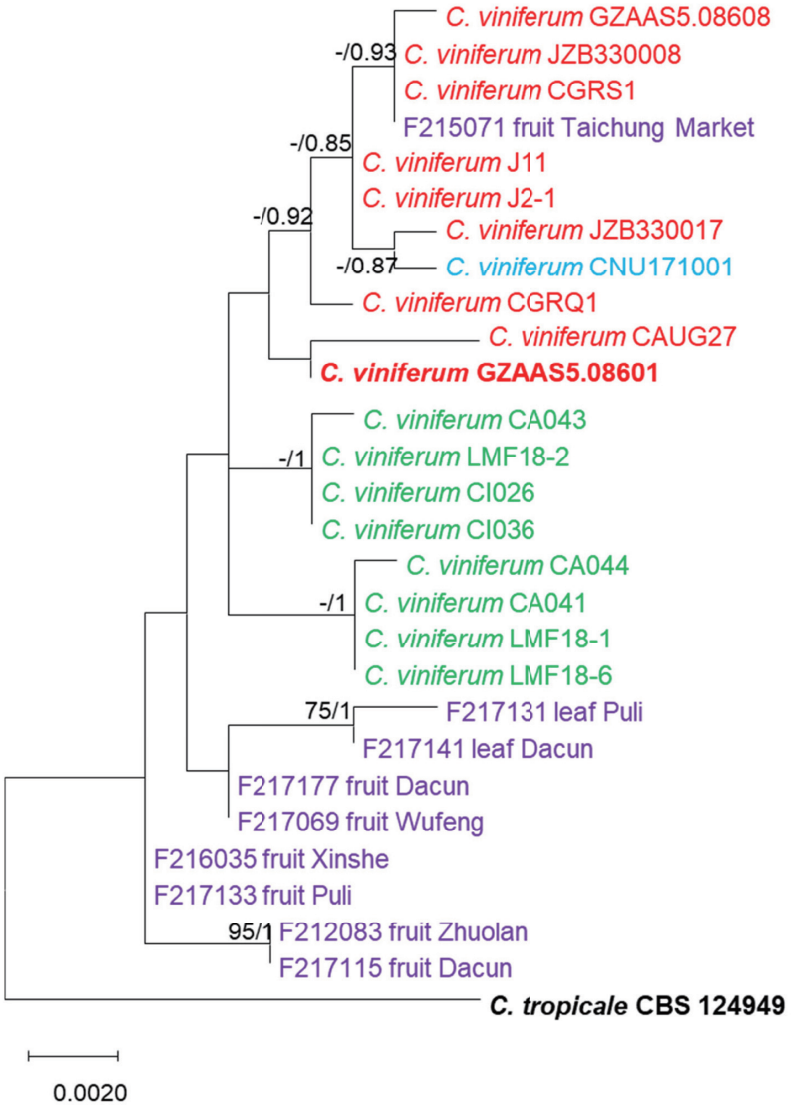


圖 2. 以 *Colletotrichum gloeosporioides* 複合種共 28 菌株以 *ITS*、*GAPDH* 及 *TUB2* 等 3 基因建構之最大概率親緣關係樹。

Fig. 2. A maximum likelihood phylogenetic tree of 28 isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. The tree was generated using concatenated sequences of internal transcribed spacer (*ITS*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and beta-tubulin 2 (*TUB2*) genes. The tree was rooted to *Colletotrichum tropicale* (CBS 124949). The bar indicates 0.002 expected changes per site. Type strains are displayed in bold. *Colletotrichum viniferum* isolates from different countries are indicated by colors: China in red, Taiwan in purple, South Korea in blue, and Brazil in green.

C. viniferum 次支序群 T 菌株之病原性測試

為瞭解 *C. viniferum* 次支序群 T 的病原性，選擇不同組織來源的 *C. viniferum* 次支序群 T 菌株進行病原性測試，供試菌株包括分離自罹病果實的菌株 F217069 與 F217133，及分離自罹病葉片的菌株 F217141 與 F217131，以葡萄園植株幼果或生長箱盆栽植株所進行的接種試驗顯示：(1) 果實接種：以 F217069、

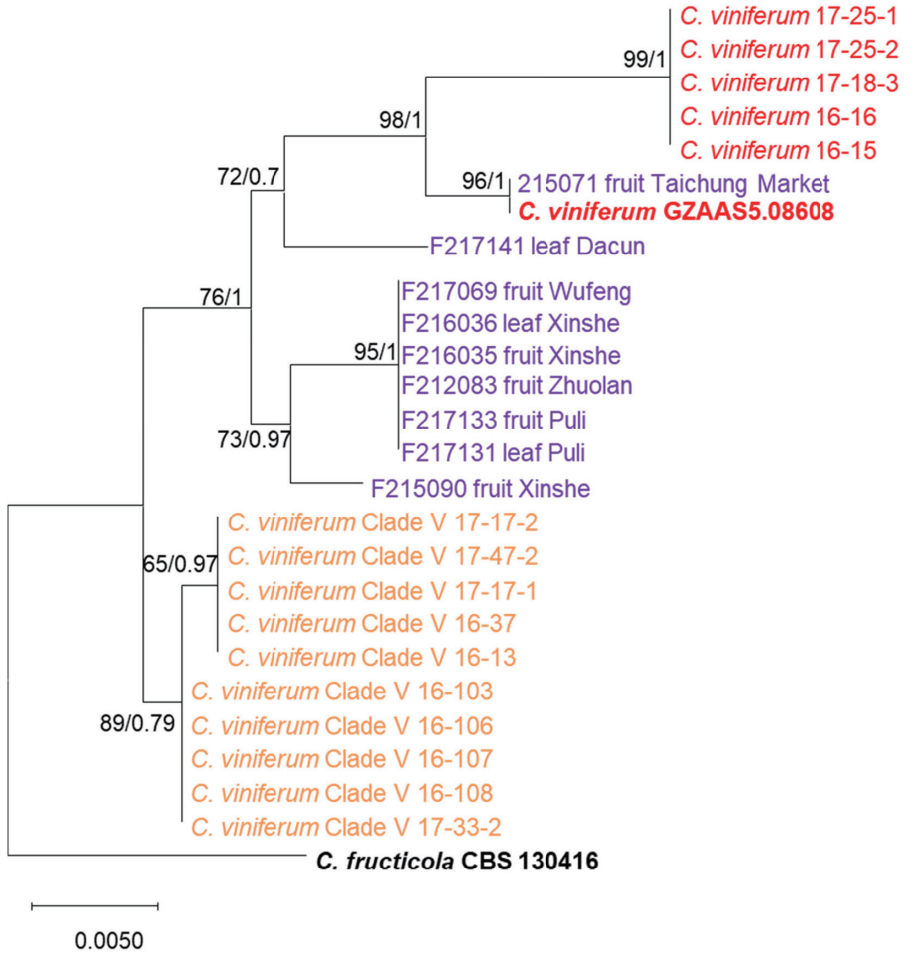


圖 3. 以 *Colletotrichum gloeosporioides* 複合種共 26 菌株之 *ApMat* 基因建構之最大概率親緣關係樹。

Fig. 3. A maximum likelihood phylogenetic tree of 26 isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. The tree was generated using intergenic sequence between Apn2 and MAT1-2-1 (*ApMat*) partial sequence. The bootstrap support values (≥ 50%) and Bayesian posterior probabilities (≥ 0.5) are displayed at the nodes. The tree was rooted to *Colletotrichum fructicola* (CBS 130416). The bar indicates 0.005 expected changes per site. Type strains are displayed in bold. *Colletotrichum viniferum* isolates from different countries or Japanese clade V are indicated by colors: China in red, Taiwan in purple, and Japanese clade V in orange.

F217133、F217141 及 F217131 等菌株之孢子懸浮液個別接種於葡萄幼果 5 wk 後，接種果實皆出現點狀、塊狀或網狀紫褐色病斑；果實開始轉色前，病斑逐漸擴大並出現紫紅色暈圈；果實轉色後至成熟期間，病斑褐化，果實凹陷、果肉軟爛，果粒逐漸皺縮，表面出現黑色點狀同心圓排列的病兆，環境適合下產生橘色菌泥；接種無菌水的對照組則無病徵出現 (圖 6)。以上 4 個菌株分別接種葡萄幼果所造成的病徵與在田間觀察到的葡萄晚腐病徵相同，且可分離得相同病原菌，故依柯霍氏法則確認其病原性。(2) 盆栽植株接種：於生長箱內，以孢子懸浮液噴布葡萄盆栽植株，感染 3–5 d 後，上述 4 個供試菌株皆可造成葉片壞疽腐爛 (圖 7A、B)；感染 10–14 d 後，接種葉片皆出現壞疽、黃化、落葉，但個別菌株造成的病徵稍有不同：F217069 與 F217133 引發葉脈褐化 (圖 7C)，F217133 與 F217131 造成葉片斑點病徵 (圖 7D)。此外，4 個菌株皆可造成卷鬚與花穗褐化壞疽 (圖 7E、F)。相對的，處理無菌水的

表 5. *Colletotrichum viniferum* 次支序群 T 型態與生理特徵。

Table 5. Synopsis of morphological and physical data of the *Colletotrichum viniferum* subclade T isolates in Taiwan.

Isolate no.	Conidia length × width min.-avg.-max (μm)	Appressorium length × width min.-avg.-max (μm)	Length width ratio	Optimum temp. for mycelium growth	Mycelium growth rate at optimum temp. (mm d^{-1})
F217069	12.4-14.0-16.0 × 4.8-5.3-6.0	8.0-10.9-15.6 × 4.4-6.8-10.0	2.2-2.6-3.3	28℃	5.4
F217131	12.0-13.6-15.6 × 4.8-5.4-6	9.0-12.6-17.0 × 6.0-6.7-9.0	2.0-2.5-3.1	28℃	5.0
F217133	12.8-14.9-16.4 × 4.4-4.8-5.6	7.6-8.7-10.4 × 3.6-4.4-6.0	2.46-3.1-3.7	28℃	4.6
F217141	11.6-13.1-14.8 × 4.4-4.7-5.2	8.0-10.7-20.0 × 4.8-5.8-8.8	2.4-2.8-3.3	28℃	3.9

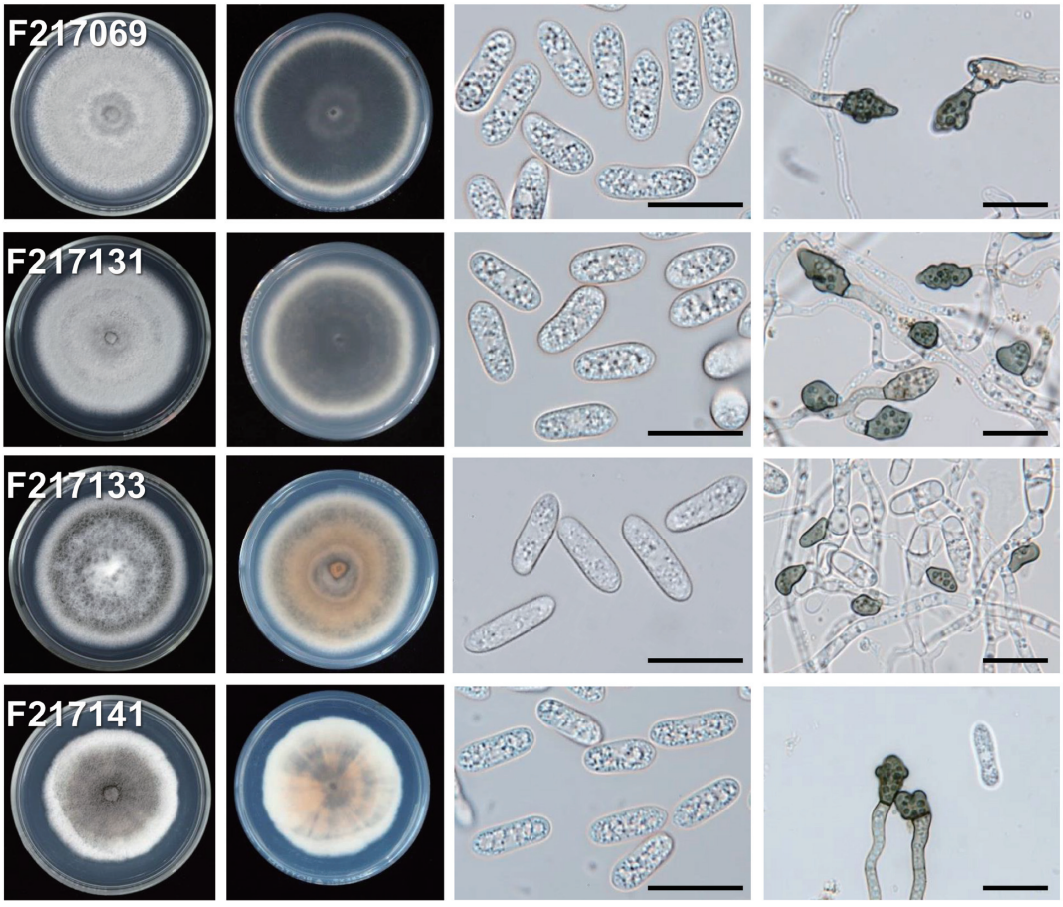


圖 4. *Colletotrichum viniferum* 次支序群 T 菌株型態特徵。由左至右，正面菌落、背面菌落、分生孢子、壓器。

Fig. 4. Morphological features of isolates of *Colletotrichum viniferum* subclade T. The top and reverse views of a colony, conidia, and appressoria of each isolate were illustrated in one row from left to right. Cultures were grown on PDA at 22–24℃ under 12 h light period for 7 to 9 d. Conidia were from 7-day PDA cultures. Appressoria formed on glass slides and developed from conidia suspended in 0.25–0.5% V8 juice for 24 h. Bar = 10 μm.

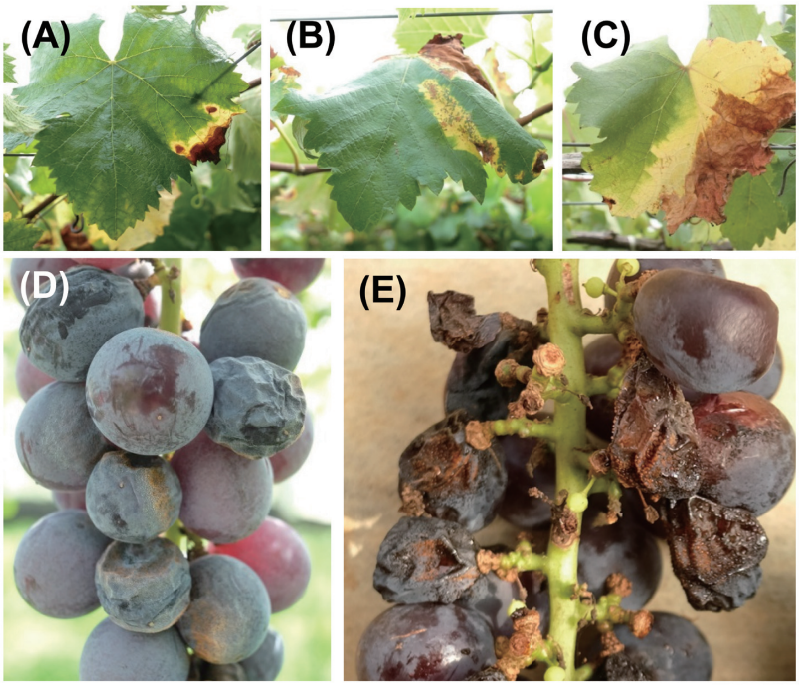


圖 5. *Colletotrichum viniferum* 次支序群 T 在田間引起之 (A–C) 葡萄葉片與 (D、E) 果實病徵。

Fig. 5. The typical field symptoms caused by *Colletotrichum viniferum* subclade T, including (A–C) diseased leaves and (D, E) fruits.

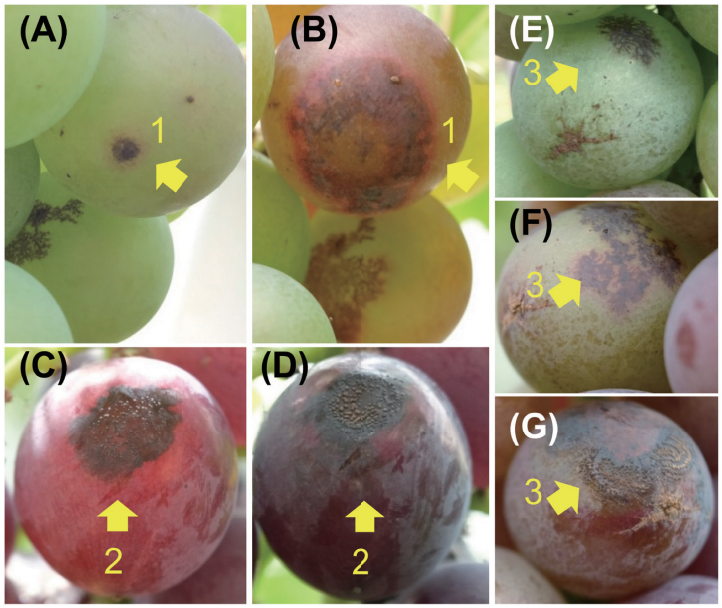


圖 6. 田間幼果人工接種 *Colletotrichum viniferum* 次支序群 T 菌株 F217069 在果實成熟後形成之病徵。

Fig. 6. Symptoms of grape fruits (cultivar: 'Kyoho') inoculated by the isolate F217069 of *Colletotrichum viniferum* subclade T. These 1-month-old fruits in the orchard were inoculated *in planta* with the conidia spore suspension (1×10^6 conidia mL^{-1}) of the isolate. The typical symptoms of grape ripe rot appeared after veraison.

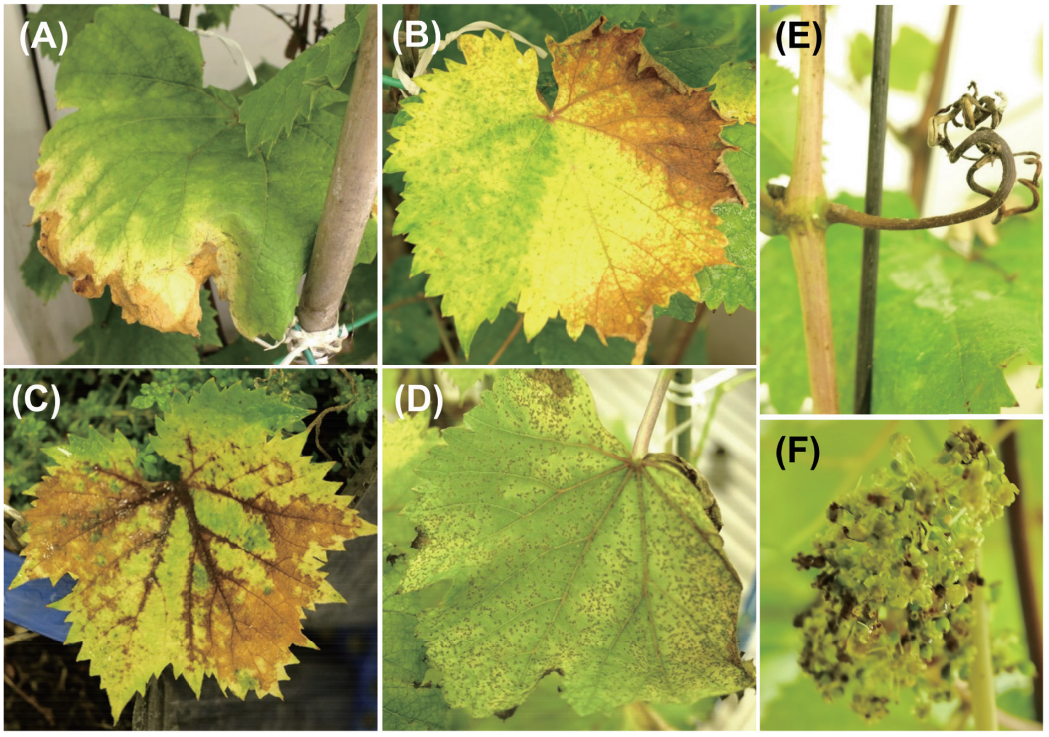


圖 7. 溫室植株人工接種 *Colletotrichum viniferum* 次支序群 T 菌株 (A–C, E, F) F217069 或 (D) F217133 後在葉片、卷鬚或花上形成之病徵。

Fig. 7. Symptoms of grape leaves (cultivar: 'Kyoho'), young shoots and blossom inoculated by the isolate (A–C, E, F) F217069 or (D) F217133 of *Colletotrichum viniferum* subclade T in greenhouse assays. The potted plants were inoculated with the conidia spore suspension (1×10^6 conidia mL^{-1}) and then were kept in 28℃ and high humidity condition (relative humidity; RH > 85%).

對照組完全無病徵。自上述呈現病徵的部位均可再分離得相同病原菌，完成柯霍氏法則。

討論

C. viniferum 次支序群 T 為台灣主要葡萄晚腐病菌

為釐清台灣葡萄晚腐病菌種類與病原田間分布狀況，本研究於 2012–2020 年自苗栗、台中市、彰化，以及南投等地的葡萄產區，共逾 35 場次之葡萄園蒐集可疑病害組織。從分生孢子形態初判，自葡萄果實分離的 *Colletotrichum* 分離株皆為 *C. gloeosporioides s. l.*，隨機挑選其中 28 株進行多重序列親緣關係分析，發現 25 株為 *C. viniferum* (89.4%)，2 株為 *C. fructicola* (7.1%)，1 株為 *C. tropicale* (3.6%)。鑑定為 *C. viniferum* 的菌株中，計有 24 株屬於 *C. viniferum* 次支分群 T，分離比例高達 85.7%，另 1 株 (3.6%) 與 *C. viniferum* GZAAS5.08601 (模式菌株) 和 GZAAS5.08608 等菌株同屬於 *C. viniferum* 次支序群 C。

這些結果顯示 *C. viniferum* 次支分群 T 為台灣葡萄果實晚腐病菌的主要病原族群，先前的研究也支持 *C. viniferum* 為台灣葡萄果實晚腐病菌的結論 (Duan & Chen 2020)，但這些分離株究竟屬於 *C. viniferum* 次支序群 T 或次支序群 C 仍待進一步分析。

特別一提的是，本研究之次支序群 T 的菌株型態與屬於次支序群 C 的 *C. viniferum* 標準株 (Peng *et al.* 2013) 相似，但本研究之次支

序群 T 菌株菌絲最適生長溫度為 28℃，較標準株的 25℃稍高。

C. viniferum 次支序群具地域相關性

藉由建構 *ACT*、*CHS-1*、*GAPDH*、*TUB2* 以及 *ITS* 的多序列親緣關係樹，*C. viniferum* 在中國大陸首次被記錄 (Peng *et al*. 2013)。特別的是，再經 Yan *et al*. (2015) 的研究發現即便都是分 離自中國的 *C. viniferum* 菌株仍顯現遺傳歧異度，似可再區分為不同支序群或甚至分種。本研究參考 Yan *et al*. (2015) 自 *C. viniferum* 各支序群選擇代表菌株做為「*C. viniferum* 參考菌株」，這些菌株與 *C. viniferum* 次支序群 T 明顯區隔，和 F215071 同被歸納於 *C. viniferum* 次支序群 C (圖 1)；不過，次支序群 T 與次支序群 C 的拔靴法支撐數值及貝葉斯事後概率數值皆不高，其分群穩定度仍待進一步驗證。另透過 *ITS*、*GAPDH* 與 *TUB2* 等基因的親緣關係分析，*C. viniferum* 次支序群 T、次支序群 C 及巴西菌株明顯依來源區域分屬於不同的支序群，而韓國菌株與 *C. viniferum* 次支序群 C 屬於相同分群 (圖 2)，顯示地理區隔在菌群分化的重要角色。

Yokosawa *et al*. (2020) 利用 *ApMat* 基因分析日本長野縣葡萄晚腐病菌，親緣關係分析結果顯示，該地區葡萄晚腐病主要病原為「分群 V」菌株群，其與 *C. viniferum* 模式菌株親緣關係相近，雖有差異，但未達另立新種的程度。本研究參考 Yokosawa *et al*. (2020) 的分析方法，同樣利用 *ApMat* 基因進行分析的結果發現日本的分群 V 的菌株可與 *C. viniferum* 次支序群 T 及次支序群 C 的菌株有明顯區隔，顯示 *ApMat* 基因可以明顯區分不同地域來源的菌株 (圖 3)。事實上，以 *ApMat* 基因序列進行分析時，F215071 菌株與源自中國的次支序群 C 菌株 GZAAS5.08601 (*C. viniferum* 模式菌株) 分屬於同一支序群，與前述分析 5 個基因之序列所獲結論一致。F215071 菌株係分離自台中生鮮超市葡萄果實，雖然欠缺果實種植來源記錄，根據序列資料，很難排除其自國外移入的可能性，未來仍需更多的證據才能確認。

C. viniferum 次支序群 T 亦可感染田間葡萄葉片

除了葡萄果實，本研究也在其他組織發現 *Colletotrichum* spp. 具高分離比例。尤其『產季罹病葉片』到『採收後乾枯葉片』，*Colletotrichum* 屬菌株的分離率由 35.9% 提高到 92.3%。分別自『產季罹病葉片』菌株隨機取樣 6 株、『採收後乾枯葉片』菌株隨機取樣 4 株，親緣分析結果顯示其分別有 1 與 2 株菌株屬 *C. viniferum* 次支序群 T (表 2、圖 1)。

自 *C. viniferum* 次支序群 T 菌株中選取 4 株代表菌株進行接種試驗，自罹病葉片分離得的 *C. viniferum* 次支序群 T 菌株 (F217133 與 F217147) 可感染果實引起典型晚腐病徵；反之由罹病果實分離得的菌株 (F217069 與 F217131) 亦可感染葉片引起葉片壞疽。各菌株在果實或植株造成之病徵雖有些微差異但大致相似：接種 1 mo 後直至果實轉色前才出現病徵，顯示潛伏感染的可能性 (圖 6)。盆栽植株接種試驗中，除可感染葉片外，亦可感染嫩梢與花穗 (圖 7E、F)。本研究的調查與試驗說明 *C. viniferum* 次支序群 T 的菌株在田間可交互感染葉片與果實，且試驗結果顯示菌株對嫩梢與花穗等具高病原性。在相同接種條件下，部分菌株出現葉片病徵不盡相同的狀況，推測可能是因為菌株病原性之差異或葉片生理狀態不同所造成，Yan *et al*. (2015) 的研究也顯示 *C. viniferum* 不同分離株對葡萄的致病力的確存在由低到高的廣泛變異，確切決定因素仍需要未來驗證。

其他 *Colletotrichum* 菌種分離狀況與病原性

部分 *Colletotrichum* 屬親緣種如 *Colletotrichum capsici* (Sawant *et al*. 2012; Pan *et al*. 2016)、*C. godetiae* (Baroncelli *et al*. 2014) 以及 *C. nymphaeae* (Liu *et al*. 2016) 等可感染葡萄枝條引起葡萄植株炭疽病 (grapevine anthracnose)。此外，*C. capsici* 雖可在田間感染葡萄葉片，但未有感染葡萄果實的紀錄；不過，溫室試驗證實其可感染葡萄果實，因此也可能具備在田間引發晚腐病的潛力 (Pan *et al*. 2016)；然而，並非所有

存在於葡萄枝條的 *Colletotrichum* spp. 皆會感染葡萄造成損失，例如分離自葡萄枝條上的 *C. dematium* 與 *C. siamense*，係以腐生方式存在於枝條表面 (Jayawardena *et al*. 2018)。本研究在『葡萄果實晚腐病』、『採收後焦枯之葡萄葉』和『產季間果園內雜草』等組織分離得 *C. viniferum*、*C. fructicola*，以及 *C. tropicale* 等，另在葡萄園罹病雜草也分離得 *C. fructicola*，這些菌株對葡萄果實的病原性與致病力仍有待未來釐清。除了 *Colletotrichum* 屬之外，自『產季罹病葉片』、『採收後乾枯葉片』以及『枝條或芽點壞疽斑』還可分離 *Pestalotiopsis*、Botryosphaeriaceae、*Alternaria* sp.、*Phomopsis* sp. 和 *Fusaruim* sp. 等多種真菌，其病原性也有待確認。

台灣晚腐病調查結論

總結以上，本研究發現在台灣引發葡萄晚腐病菌主要的菌群為 *C. viniferum* 次支序群 T，且根據菌株分離結果最早於 2012 年即記錄得其存在，可知次支序群 T 至少從 2012 年開始即存在於田區，分布範圍包括台灣主要及次要葡萄產地。次支序群 T 可感染葡萄果實、葉片、嫩梢、花穗，並於葉片上造成壞疽、黃化、斑點及葉脈褐化等病徵。田間生態方面，在葡萄果實採收後，*C. viniferum* 次支序群 T 仍持續殘存在葉片上，可成為下季感染來源；在葡萄萌芽期，若遇環境條件適合，藏匿於枝條病斑、殘存之罹病葉片或落葉的病原菌可在短時間內產生大量分生孢子，藉由雨水噴濺到新生葉片上 (圖 5A–C；圖 7A–D)，也可能藉由噴濺感染田間嫩梢或花穗 (圖 7E、F)。至結果期，*C. viniferum* 再從葉片伺機感染幼果，並以『潛伏感染』的方式蟄伏至果實轉色後才顯現病徵 (圖 5D、E、圖 6)。因此，葉片甚至花穗與嫩梢皆可能成為果實晚腐病的重要感染源，要做好葡萄晚腐病防治，得在萌芽期起即密切注意葉片與花穗等是否出現疑似病徵；此外，由於花穗病徵與露菌病造成的徵狀相近，必須小心區分，以避免因誤診導致誤用，錯失關鍵防治時機。

誌謝

本文承蒙行政院農業委員會農業試驗所 104 農科-10.6.3-農-C1(8)、105 農科-10.5.3-農-C1(7)、106 農科-9.5.2-農-C1(2)，以及 107 農科-8.4.2-農-C1(8) 計畫經費支持，農業試驗所陸明德助理研究員提供植株供試，陳品儒、黃麟婷與林建毅等助理協助調查與進行試驗。

引用文獻

Baroncelli, R., S. Sreenivasaprasad, C. R. Lane, M. R. Thon, and S. A. Sukno. 2014. First report of *Colletotrichum acutatum sensu lato* (*Colletotrichum godetiae*) causing anthracnose on grapevine (*Vitis vinifera*) in the United Kingdom. New Dis. Rep. 29:26. doi:10.5197/j.2044-0588.2014.029.026

Cai, L., K. D. Hyde, P. W. J. Taylor, B. S. Weir, J. M. Waller, M. M. Abang, J. Z. Zhang, Y. L. Yang, S. Phoulivong, Z. Y. Liu, H. Prihastuti, R. G. Shivas, E. H. C. McKenzie, and P. R. Johnston. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Divers. 39:183–204.

Carbone, I. and L. M. Kohn, 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91:553–556. doi:10.2307/3761358

de Silva, D. D., J. Z. Groenewald, P. W. Crous, P. K. Ades, A. Nasruddin, O. Mongkolporn, and P. W. J. Taylor. 2019. Identification, prevalence and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing anthracnose of *Capsicum annuum* in Asia. IMA fungus 10:8. doi:10.1186/s43008-019-0001-y

Diao, Y. Z., C. Zhang, F. Liu, W. Z. Wang, L. Liu, L. Cai, and X. L. Liu. 2017. *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of chili in China. Persoonia 38:20–37. doi:10.3767/003158517X692788

Duan, C. H., H. R. Pan, and C. C. Wang. 2018. Identification, pathogenicity and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* isolates from five fruit crops in Taiwan. Taiwan Pestic. Sci. 5:91–111. (in Chinese with English abstract) doi:10.6671/TPS.201812_(5).06

Duan, C. H. and G. Y. Chen. 2020. Molecular identification and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* isolates from grape in Taiwan. J. Plant Med. 62(4):23–32. (in Chinese with English abstract) doi:10.6716/JPM.202012_62(4).0003

Echeverrigaray, S., F. J. Scariot, G. Fontanella, F. Favaron, L. Sella, M. C. Santos, J. Schwambach, C. Pedrotti, and A. P. L. Delamare. 2020. *Colle-*

totrichum species causing grape ripe rot disease in *Vitis labrusca* and *V. vinifera* varieties in the highlands of southern Brazil. Plant Pathol. 69:1504–1512. doi:10.1111/ppa.13240

Gao, H., X. Yin, X. Jiang, H. Shi, Y. Yang, C. Wang, X. Dai, Y. Chen, and X. Wu. 2020. Diversity and spoilage potential of microbial communities associated with grape sour rot in eastern coastal areas of China. PeerJ 8:e9376. doi:10.7717/peerj.9376

Glass, N. L. and G. C. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 61:1323–1330. doi:10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995

Jayawardena, R. S., K. D. Hyde, K. W. T. Chethana, D. A. Daranagama, A. J. Dissanayake, I. D. Goonasekara, I. S. Manawasinghe, A. Mapook, S. C. Jayasiri, A. Karunarathna, C. G. Li, C. Phukhamsakda, I. C. Senanayake, D. N. Wanasinghe, E. Camporesi, T. S. Bulgakov, X. H. Li, M. Liu, W. Zhang, and J. Y. Yan. 2018. Mycosphere notes 102–168: Saprotrophic fungi on *Vitis* in China, Italy, Russia and Thailand. Mycosphere 9:1–114. doi:10.5943/MYCOSPHERE/9/1/1

Ko, Y. 2008. Illustrated Book of Plant Diseases of Economic Fruit Trees in Taiwan. Yi Hsien Publishing Co. Ltd. New Taipei, Taiwan. 431 pp. (in Chinese)

Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol. 35:1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096

Kuo, K. C. and S. H. Hseu. 2003. Ripe rot of grape. p.115–119. *in*: Compendium of Grape Diseases and Pests. (Wang, C. L., P. J. Ann, H. L Lin, C. I. Yuan, C. P. Chang, K. C. Kuo, S. H. Hseu, Y. S. Yang, T. C. Yang, M. Y. Chiang, and T. T. Tsay) Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine. Taipei, Taiwan. 250 pp. (in Chinese)

Lefort, V., J. E. Longueville, and O. Gascuel. 2017. SMS: Smart model selection in PhyML. Mol. Biol. Evol. 34:2422–2424. doi:10.1093/molbev/msx149

Lei, Y., X. B. Tang, R. S. Jayawardena, J. Y. Yan, X. D. Wang, M. Liu, T. Chen, X. M. Liu, J. C. Wang, and Q. X. Chen. 2016. Identification and characterization of *Colletotrichum* species causing grape ripe rot in southern China. Mycosphere 7:1177–1191. doi:10.5943/mycosphere/si/2c/8

Lim, Y. S., O. Hassan, and T. Chang. 2020. First report of anthracnose of shine muscat caused by *Colletotrichum fructicola* in Korea. Mycobiology 48:75–79. doi:10.1080/12298093.2019.1697190

Lin, C. P., J. N. Tsai, and P. J. Ann. 2019. Preliminary report of *Colletotrichum viniferum* and other new species of *Colletotrichum* sp. As Grape Ripe Rot Causing Pathogens in Taiwan. J. Plant Med. 61(2–3):74. (in Chinese) doi:10.6716/JPM.201909_61(2_3).0006

Liu, M., W. Zhang, Y. Zhou, Y. Liu, J. Y. Yan, X. H. Li, R. S. Jayawardena, and K. D. Hyde. 2016. First report of twig anthracnose on grapevine caused by *Colletotrichum nymphaeae* in China. Plan Dis. 100:2530. doi:10.1094/PDIS-05-16-0632-PDN

Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. 2018. Figtree v1.4.4. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology, Edinburgh, Scotland. http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/ (visit on 08/04/2021)

Oo, M. M. and S. K. Oh. 2017. Identification and characterization of new record of grape ripe rot disease caused by *Colletotrichum viniferum* in Korea. Mycobiology 45:421–425. doi:10.5941/MYCO.2017.45.4.421

Pan, F. Y., Y. Huang, L. Lin, Y. M. Zhou, R. F. Wei, W. F. Guo, L. Yin, and J. Lu. 2016. First report of *Colletotrichum capsici* causing grape ripe rot in Guangxi, China. Plant Dis. 100:2531. doi:10.1094/PDIS-05-16-0691-PDN

Peng, L. J., T. Sun, Y. L. Yang, L. Cai, K. D. Hyde, A. H. Bahkali, and Z. Y. Liu. 2013. *Colletotrichum* species on grape in Guizhou and Yunnan provinces, China. Mycoscience 54:29–41. doi:10.1016/j.myc.2012.07.006

Prihastuti, H., L. Cai, H. Chen, E. H. C. McKenzie, and K. D. Hyde. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. Fungal Divers. 39:89–109.

Rojas, E. I., S. A. Rehner, G. J. Samuels, S. A. Van Bael, E. A. Herre, P. Cannon, R. Chen, J. Pang, R. Wang, Y. Zhang, Y. Q. Peng, and T. Sha. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with Theobroma cacao and other plants in Panama: Multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. Mycologia 102:1318–1338. doi:10.3852/09-244

Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, and J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61:539–542. doi:10.1093/sysbio/sys029

Sawant, I. S., S. P. Narkar, D. S. Shetty, A. Upadhyay, and S. D. Sawant. 2012. First report of *Colletotrichum*

capsici causing anthracnose on grapes in Maharashtra, India. New Dis. Rep. 25:2. doi:10.5197/j.2044-0588.2012.025.002

Silva, D. N., P. Talhinhas, V. Várzea, L. Cai, O. S. Paulo, and D. Batista. 2012. Application of the *Apn2*/*MAT* locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: An example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. Mycologia 104:396–409. doi:10.3852/11-145

Sutton, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. p.1–26. *in*: *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. (Bailey, J. A. and M. J. Jeger, eds.) C. A. B. International. Wallingford, UK. 388 pp.

Templeton, M. D., E. H. A. Rikkerink, S. L. Solon, and R. N. Crowhurst. 1992. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. Gene 122:225–230. doi:10.1016/0378-1119(92)90055-T

Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673–4680. doi:10.1093/nar/22.22.4673

Tzean, S. S., K. C. Tzeng, C. A. Chang, T. T. Tsay, and H. F. Yen. 2019. List of Plant Diseases in Taiwan. 5th ed. Taiwan Phytopathological Society Press. Taichung, Taiwan. 329 pp. (in Chinese)

Weir, B. S., P. R. Johnston, and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Stud. Mycol. 73:115–180. doi:10.3114/sim0011

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p.315–322. *in*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds.). Academic Press. London, Britain. 482 pp.

Yan, J. Y., M. M. R. S. Jayawardena, I. D. Goonasekara, Y. Wang, W. Zhang, M. Liu, J. B. Huang, Z. Y. Wang, J. J. Shang, Y. L. Peng, A. Bahkali, K. D. Hyde, and X. H. Li. 2015. Diverse species of *Colletotrichum* associated with grapevine anthracnose in China. Fungal Divers. 71:233–246. doi:10.1007/s13225-014-0310-9

Yokosawa, S., N. Eguchi, K. I. Kondo, and T. Sato. 2017. Phylogenetic relationship and fungicide sensitivity of members of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex from apple. J. Gen. Plant Pathol. 83:291–298. doi:10.1007/s10327-017-0732-9

Yokosawa, S., N. Eguchi, and T. Sato. 2020. Characterization of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex causing grape ripe rot in Nagano Prefecture, Japan. J. Gen. Plant Pathol. 86:163–172. doi:10.1007/s10327-020-00907-5

Zapparata, A., D. D. Lio, S. Sarrocco, G. Vannacci, and R. Baroncelli. 2017. First report of *Colletotrichum godetiae* causing grape (*Vitis vinifera*) berry rot in Italy. Plant Dis. 101:1051. doi:10.1094/PDIS-12-16-1764-PDN

Occurence of Grape Ripe Rot in Taiwan and the Pathogenicity and Phylogenetic Relationship of Its Primary Causal Agent *Colletotrichum viniferum*

Chu-Ping Lin[1,*], Chih-Li Wang[2,3], Jyh-Nong Tsai[4], Yu-Lun Dai[5], Pao-Jan Ann[6], Yue-Mei Zhan[7], and Shun-Yuan Huang[8]

Abstract

Lin, C. P., C. L. Wang, J. N. Tsai, Y. L. Dai, P. J. Ann, Y. M. Zhan, and S.Y. Huang. 2022. Occurence of grape ripe rot in Taiwan and the pathogenicity and phylogenetic relationship of its primary causal agent *Colletotrichum viniferum*. J. Taiwan Agric. Res. 71(2):135–157.

Grape ripe rot caused by *Colletotrichum* spp. is one of the most devastating diseases for grape production in Taiwan. To reveal population structures, phylogenetic relationships, symptoms, and geographic distribution of the causal organisms in the field, grape samples with the typical ripe rot symptoms on fruits, and necrotic lesions on twigs and leaves were collected and investigated. Moreover, symptoms from field samples and inoculated plants were also recorded. From 2012 to 2020, a total of 40 *Colletotrichum* isolates were isolated and identified with the phylogenetic analysis based on the concatenated sequences of internal transcribed spacer (*ITS*), lyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (*GAPDH*), actin (*ACT*), beta-tubulin 2 (*TUB2*), and chitin synthase 1 (*CHS-1*) genes. The phylogenetic tree showed that grape ripe rot in Taiwan was mainly caused by *Colletotrichum viniferum*, which was divided into two subclades, subclade T and subclade C. Among 28 isolates that were isolated from diseased fruits of grape ripe rot, 85.7% of these isolates belonged to *C. viniferum* subclade T, 3.6% to *C. viniferum* subclade C, 7.1% to *Colletotrichum fructicola*, and 3.6% to *Colletotrichum tropicale*. The results also showed that *C. viniferum* subclade T could be isolated not only from diseased fruits but also from symptomatic leaves. The pathogens are distributed in most major grape-growing areas, including Zhuolan in Miaoli County, Xinshe and Wufeng in Taichung City, Dacun in Changhua County, and Xinyi, Guoxing, Shuili and Puli in Nantou County. When inoculated on young fruits *in planta* in the field, the isolates of *C. viniferum* subclade T induced the typical ripe rot symptoms on grapefruits after veraison, suggesting that the pathogens were able to establish a latent infection. When inoculated on whole potted plants in a greenhouse, isolates of *C. viniferum* subclade T caused various symptoms on leave, such as necrotic lesions with a large area of yellow halo on the leave margin, defoliation, and browning leaf veins. Furthermore, necrosis on shoots and blossoms was also observed. The results from field investigations and artificial inoculations indicate that the isolates of *C. viniferum* subclade T could cause various symptoms on fruits, leaves, shoots, and blossoms of grapes.

Key words: Subclade, Foliar symptoms, Multilocus phylogeny.

Received: September 3, 2021; Accepted: January 27, 2022.

* Corresponding author, e-mail: cplin@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[2] Associate Professor, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung City, Taiwan, ROC.
[3] Associate Professor and Program Director, Master Program for Plant Medicine and Good Agricultural Practice, National Chung Hsing University, Taichung City, Taiwan, ROC.
[4] Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[5] Project Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[6] Former Research Fellow and Division Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[7] Temporary Worker, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[8] Substitute Services Draftee, National Conscription Agency Ministry of the Interior, Nantou County, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 71(2):159–170 (2022)
DOI:10.6156/JTAR.202206_71(2).0005

研究報告

應用直接競爭型酵素免疫分析法檢測農產品中芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利之殘留

張淑貞[1,*] 申屠萱[2] 高靜華[3] 羅淑卿[4] 江明耀[5]

摘要

張淑貞、 申屠萱、高靜華、羅淑卿、江明耀。2022。應用直接競爭型酵素免疫分析法檢測農產品中芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利之殘留。台灣農業研究 71(2):159–170。

為評估農藥免疫檢測快篩法之農藥把關效能，應用直接競爭型酵素免疫分析 (direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay; dcELISA) 商品檢測農產品中之芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利殘留。此 4 種農藥的 dcELISA 可檢測範圍與檢測極限分別為 0.5–100 ng mL^{-1} 與 0.23–0.52 ng mL^{-1}。小松菜、胡蘿蔔、綠茶、南瓜、山藥切碎後各外加芬普尼、亞滅培、達滅芬及得克利 50 ng mL^{-1}，經萃取、稀釋後以 dcELISA 檢測農藥，此 4 種農藥之回收率各為 73.1–123.6%、61.7–111.1%、72.5–102.3%、67.9–113.9%。顯示農藥免疫檢測之靈敏度高，農藥回收率良好，由檢體萃取至結果判讀僅需 1 h，未來可應用在農產品高風險農藥之快篩檢測。

關鍵詞：直接競爭型 ELISA 免疫檢測、芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利。

前言

針對食品安全，台灣的衛生福利部食品藥物管理署 (食藥署) 與行政院農業委員會農糧署 (農糧署)，每年都會以公告的『食品中殘留農藥檢驗方法－多重殘留分析法』抽檢市售農產品上的農藥殘留。『食品中殘留農藥檢驗方法－多重殘留分析方法 (五)』於 2019 年 5 月 10 日公告修正，可檢驗 380 品項農藥 (https://www.fda.gov.tw/TC/)，檢體採用 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) 方法進行前處理，再以氣相層析串聯質譜儀 (gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC/MS/MS) 或液相層析串聯質譜儀 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC/MS/MS) 分析農藥。此方法之檢體處理方法複雜且須使用毒性化學物質，分析儀器昂貴、耗材成本高，且需單件逐一上機分析，耗費時間長，並需由專業人才操作，不易廣設檢驗站，亦無法滿足市售農產品臨場快篩把關的需求。

台灣自 1985 年開始推廣以家蠅乙醯膽鹼酯酶及蘇力菌為核心的農藥快篩方法，快速篩檢農產品上殘留之有機磷、胺基甲酸鹽類等神經劇毒農藥及部分殺菌劑 (Chiu *et al*. 1991; Cheng *et al*. 2015; Chang *et al*. 2016)，經多年推廣此項技術已廣泛應用於民間單位進行農藥殘留自主把關檢驗，每年抽驗件數逾 100 萬件。因應劇毒農藥逐年禁用政策，台灣在 2014 年開始應用抗原、抗體特異性結合的免疫學原理，針對市面上常檢出不合格之高風險農藥，發展農藥免疫檢測快篩技術，隨後在 2016 年後開始有相關之農藥免疫檢測快篩

投稿日期：2021 年 10 月 17 日；接受日期：2022 年 2 月 25 日。
* 通訊作者：scchang@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所應用動物組副研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所應用動物組技佐。台灣 台中市。貢獻度等同第一作者。
[3] 農委會農業試驗所應用動物組前研究員兼組長。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所農業化學組助理研究員。台灣 台中市。
[5] 農委會農業試驗所應用動物組助理研究員。台灣 台中市。

商品上市 (Chang *et al*. 2018)。農藥免疫檢測技術係應用免疫學原理，研發可辨識特定農藥的抗體，再結合膠體金側流免疫分析技術 (colloidal-gold based lateral-flow immunoassay) 或酵素連結免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 技術，製成檢測試劑，可用於快篩農產品中的農藥殘留。其中直接競爭型酵素免疫分析 (direct competitive ELISA; dcELISA) 較適合用來發展為農藥檢測之商品，因其已將農藥抗體固定在微量盤，實際操作時，只要加入待測農藥與酵素-農藥半抗原結合體，二者同時競爭與農藥抗體結合的機會，經洗滌去除游離部分後，與農藥抗體結合之酵素-農藥半抗原會被固定在盤底，再加入受質呈色並經光譜儀偵測，即可經由顏色深淺，來推得待測樣品中之農藥含量，日本、美國已有相關產品 (Watanabe *et al*. 2004, 2005; Kranthi *et al*. 2009; Yamasaki *et al*. 2015)。台灣現也有 4 合 1 農藥 ELISA 試劑套組，應用 dcELISA，在同一 ELISA 96 孔盤中同時檢測芬普尼 (fipronil)、亞滅培 (acetamiprid)、達滅芬 (dimethomorph)、得克利 (tebuconazole) 等 4 種農藥，依其說明書言檢測極限各為 0.68、1.14、0.23、0.61 ppb，皆較『食品中殘留農藥檢驗方法—多重殘留分析方法 (五)』中，上述 4 種農藥之檢測極限 1–50 ppb 低，應可嘗試應用在農產品農藥殘留檢測。其中芬普尼、亞滅培為殺蟲劑，達滅芬、得克利為殺菌劑。芬普尼為苯吡唑類 (phenylpyrazoles) 殺蟲劑，對昆蟲兼具接觸毒與胃毒，對非目標昆蟲如蜜蜂毒性高且會降低雄蜂生育力 (Mayer & Lunden 1999; Yu 2008; Kairo *et al*. 2017)。台灣已於 2017 年公告禁用 4.95% 芬普尼水懸劑，但依據農糧署於 2019 年 1 月至 2020 年 6 月農作物農藥殘留檢測的月報表，每月皆有農產品被驗出芬普尼不當殘留 (https://www.afa.gov.tw/cht/)，顯示芬普尼仍有違規使用情形。亞滅培為新尼古丁類系統性殺蟲劑，具高水溶性，其作用機制是與尼古丁乙醯膽鹼受體 (nicotinic acetylcholine receptor) 結合，干擾乙醯膽鹼神經訊息之傳遞，造成昆蟲過度興奮並癱瘓而死亡 (Tomizawa & Casida 2005; Yu 2008)，在台灣可用於茶、十字花科包葉菜類、小葉菜類等多種作物上之薊馬、粉蝨、蚜蟲、黃條葉蚤等重要害蟲防治。達滅芬為肉桂醯胺類 (cinnamic acid amides) 殺真菌劑，具局部系統移行性，可抑制疫病 (phytophthora diseases)、露菌病 (downy mildew) 等病原真菌之菌絲及游走孢子生長 (Cohen *et al*. 1995; Reuveni 1997; Ann *et al*. 2015)，在台灣常用於防治多種根莖類、果菜類及葉菜類作物之疫病與露菌病。得克利為三唑類 (triazoles) 殺真菌劑，具系統移行性，兼具保護及治療性效果 (Brenneman & Culbreath 1994; Rial-Otero *et al*. 2005; Paul *et al*. 2007)，用於防治多種作物之炭疽病 (anthracnose) 與瓜果類白粉病 (powdery mildew) (Wong & Midland 2007; Xu *et al*. 2014; Keinath 2015)。此 4 種農藥除芬普尼目前禁用外，其餘皆為台灣農作物上普遍使用的農藥。食藥署於 2010–2017 年間抽驗市售農產品農藥殘留，達滅芬檢出違規率則每年皆在前 3 名，芬普尼、亞滅培、得克利則輪流名列前 4 名，顯示此 4 種農藥在台灣違規使用風險較其他農藥高，宜加強殘留檢測 (Hou *et al*. 2019)。

為評估農藥免疫檢測快篩法在現有農藥生化快篩系統中，強化農藥把關效能之可行性，故擬評估農藥免疫檢測快篩法與農藥生化快篩法檢體萃取液共用之可行性。因農藥生化快篩法中，農產品中的農藥以乙醇萃取，萃取液中植體切碎後釋出之干擾物質與乙醇是否會降低農藥抗體之檢測極限，影響農藥抗體之農藥辨識能力，皆有待進一步地確認，故進行本研究。

材料與方法

藥劑與儀器

試驗中使用的 49 類共 93 種農藥詳如附錄，有些農藥因為已在台灣農業禁用，故改購入高純度之標準品，如芬普尼標準品 (96% 純度) 購自 Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany)，商品農藥亞滅培 (20% soluble powder; SP)、達滅芬 (50% wettable powder; WP) 購自興農股份有限公司 (台灣台中市)，得克利 (25.9% emulsifiable concentrate; EC) 購自台灣拜耳股份有限公司 (台灣台北市)。其中芬普尼標準品因在水中的溶解度僅 2 mg L^{-1}，故以甲醇先

配製成 2 mg mL^{-1} stock solution，其餘 3 種商品農藥則以 100 mM phosphate buffered saline (PBS) buffer 配製成 2 mg mL^{-1} stock solution，存放於 4℃，試驗前再稀釋至所需濃度。芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利直接競爭型免疫檢測試劑組購自費司科技有限公司 (台灣台中市)。ELISA 以 96 孔微量盤酵素免疫分析儀 (ELx808™ Absorbance Microplate Reader) (Biotek,Winooski, VT, USA) 及微量盤清洗儀 (Wellwash™ Microplate Washer) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 進行。

dcELISA 之檢測極限

參考芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利直接競爭型免疫檢測試劑組使用說明，為能應用標準檢量線估算檢體中的農藥濃度，故以內含 1.9% 乙醇的樣品萃取稀釋液配製上述 4 種農藥，濃度各為 0、0.5、1、3、10 及 100 ng mL^{-1}，每個濃度進行 3 重複，分別建立此 4 種農藥之標準檢量線。分別取上述各農藥 50 μL 逐一注入試劑組內已吸附此 4 種農藥抗體的微量孔盤中；再各別加入此 4 種農藥的農藥-酵素結合體，至含相應抗體的微量孔中，每孔 50 μL，於室溫靜置 30 min 後，甩掉微量孔盤中的反應液。每孔加入 200 μL 清洗液，於微量盤清洗儀中震盪 10 s、靜置 1 min、倒掉清洗液，重複 3 次。最後一次清洗後拍乾清洗液，加入 100 μL 受質液，於室溫靜置 10 min，進行呈色反應。再於每孔加入 50 μL 終止液，終止反應，並以微量盤酵素免疫分析儀記錄 450 nm 波長的吸光值。

以上述各農藥進行 ELISA 後的吸光值為 B，對照組無放置農藥時吸光值為 B_0，計算吸光值抑制比 B/B_0，抑制率 = $(1 - B/B_0) \times 100\%$。將各農藥濃度取 log 值後，與其相應之吸光值抑制比進行直線回歸分析，得一直線回歸方程式。將抑制比 0.9 帶入此直線回歸方程式，計算出的農藥濃度，即為此農藥 ELISA 抑制率達 10% 時的農藥濃度 (10% inhibitory concentration; IC10)，即為檢測極限。農藥檢測範圍則為吸光值抑制比 0.2–0.8 間的農藥濃度。

交叉反應 (cross-reactivity; CR)

為確認此試劑組對 4 種標的農藥芬普尼、亞滅培、達滅芬及得克利辨識力之專一性，依據農藥特性篩選待測農藥，包括與上述 4 種標的農藥結構相似的農藥，及與上述 4 種農藥結構相異之非標的農藥，全部共 49 類 93 種農藥，包括殺蟲劑、殺菌劑及除草劑等，詳如附錄。因為未來擬應用在農產品檢驗，故以商品農藥為測試標的，若為台灣已禁用、無法購得商品農藥，則改以高純度之農藥標準測試。

以交叉反應率檢視農藥抗體之專一性，交叉反應率 = (標的農藥之 IC50/非標的農藥之 IC50) × 100% (Li *et al*. 2015)。當交叉反應率小於 0.1% 時，非標的農藥在此 ELISA 之 IC50 大於標的農藥 1,000×，表示此標的農藥 ELISA 辨識力之專一性良好。故依據上述 4 種標的農藥的標準檢量線，推算各標的農藥在 50% 抑制率時的農藥濃度 (IC50)。將待測農藥的濃度配製為此濃度的 1,000×，再以上述 ELISA 步驟進行反應，若 ELISA 之抑制率小於 50%，即表示此標的農藥 ELISA 與待測農藥之交叉反應率小於 0.1%。若 ELISA 之抑制率大於 50%，則將待測農藥配製多個濃度，進行 ELISA 後，建立其農藥濃度 log 值與吸光值抑制比間的回歸線，據以推算其 IC50，並根據上述公式算出交叉反應率。

植物檢體前處理與農藥回收率

參考芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利直接競爭型免疫檢測試劑組使用說明，以小松菜、紅蘿蔔、綠茶、山藥、南瓜等 5 種市售農產品進行農藥回收率測試，試驗檢體均為有機認證產品，並經水沖洗 10 min，每種農產品皆取樣 3 重複，小松菜每株為 1 重複，紅蘿蔔、山藥、南瓜每條為 1 重複，綠茶每罐為 1 重複。為確認此方法是否可檢測以農藥生化快篩法萃取之檢體萃取液，故取樣重量依據農藥生化快篩法 (Chiu *et al*. 1991) 調整，即小松菜 0.5 g，綠茶 1 g，紅蘿蔔、山藥、南瓜各 1.5 g。首先將各檢體切碎，放入直徑 1 cm、高 7 cm 之玻璃試管，分別加入 95% 乙醇 1 mL，再分別加入各配製成 50 mg L^{-1} 的芬普尼、亞滅培、達滅芬及得克利各 10 μL，使萃取液各含有 0.5 mg mL^{-1} 農藥，震盪 20 s 後靜置 3 min。從每管取出 30 μL 酒精萃取液至另一新試管中，分別加

入 1,470 μL 萃取稀釋液。取前述萃取稀釋液各 50 μL 分別加入含此 4 種農藥抗體之微量孔盤，再個別加入此 4 種農藥的農藥-酵素結合體，每孔 50 μL，其餘依前述 dcELISA 步驟進行反應，再經由上述建立之 4 種農藥的直線回歸方程式推算檢體所含農藥濃度，並據此計算農藥回收率。如以吸光值抑制比 B/B_0 與添加的農藥濃度 (log 值) 建立直線回歸方程式 y = ax + b，檢體萃取液中之農藥濃度 = POWER {(10, [(檢體的 B/B_0 值 − b)/a]}。農藥回收率 = (檢體萃取液中之農藥濃度/實際添加之農藥濃度) × 100%，檢測方法可信度之管制範圍為 60–140% 農藥回收率 (Hsu *et al*. 2014)。

結果

dcELISA 之檢測極限

芬普尼、亞滅培、達滅芬及得克利等 4 種農藥各配製成 5 種濃度，進行直接競爭型 ELISA。各農藥與對照組之間的吸光值抑制比，與相應各農藥濃度 log 值間的直線回歸分析如 (圖 1)，R^2 值皆在 0.9899–0.9948 間，可檢測範圍皆為 0.5–100 ng mL^{-1}。各依其直線回歸方程式估算，芬普尼、亞滅培、達滅芬及得克利檢測極限 (IC10) 依序為 0.30、0.52、0.23 及 0.39 ng mL^{-1}。

交叉反應

測試此試劑組所含之芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利等 4 種農藥抗體與 49 類 93 種農藥之交叉反應率，其中芬普尼抗體對與其化學結構相近的農藥益斯普之交叉反應率為 40.1%，亞滅培對與其結構相近的類尼古丁類藥劑賽果培、益達胺、賽速安、可尼丁之交叉反應率各為 47.6、31.3、1.0 及 0.8% (表 1)，除此之外，此 4 種農藥抗體對其餘農藥的交叉反應率皆小於 0.1%。顯示此試劑組對亞滅培、芬普尼、達滅芬及得克利農藥之專一性。

植物檢體前處理與農藥回收率

以此試劑組進行芬普尼、亞滅培、達滅芬

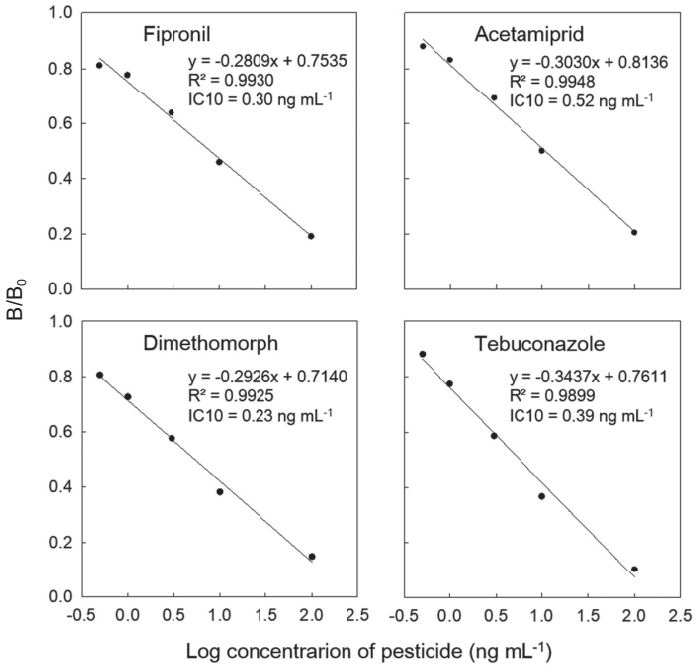


圖 1. 芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利之 dcELISA 抑制曲線。每個點為 3 個重複的平均值。

Fig. 1. Inhibition curves of fipronil, acetamiprid, dimethomorph and tebuconazole in the direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (dcELISA). Each point is the average of triplicate determinations. IC10: 10% inhibitory concentration.

表 1. 芬普尼、亞滅培、達滅芬及得克利抗體在直接競爭型酵素免疫分析中對其他非目標農藥之交叉反應。

Table 1. Cross-reactivity of the non-target pesticides to fipronil, acetamiprid, dimethomorph, and tebuconazole antibodies in the direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (dcELISA).

	Cross-reactivity (%)[z]			
Pesticide	Fipronil	Acetamiprid	Dimethomorph	Tebuconazole
Phenylpyrazoles				
Fipronil	100.0	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Ethiprole	40.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Other 91 pesticides[y]	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Neonicotinoid				
Acetamiprid	< 0.1	100.0	< 0.1	< 0.1
Thiacloprid	< 0.1	47.6	< 0.1	< 0.1
Imidacloprid	< 0.1	31.3	< 0.1	< 0.1
Thiamethoxam	< 0.1	1.0	< 0.1	< 0.1
Clothianidin	< 0.1	0.8	< 0.1	< 0.1
Other 88 pesticides[y]	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Cinnamic acid amides				
Dimethomorph	< 0.1	< 0.1	100.0	< 0.1
Other 92 pesticides[y]	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Triazoles				
Tebuconazole	< 0.1	< 0.1	< 0.1	100.0
Other 92 pesticides[y]	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1

[z] Cross-reactivity was calculated as (IC50 of target pesticide/IC50 of other pesticide) × 100%. IC50: 50% inhibitory concentration.
[y] Pesticides tested were listed in the appendix.

及得克利在小松菜、紅蘿蔔、綠茶、山藥、南瓜等 5 種農產品農藥回收率評估。取樣重量依據農藥生化快篩法調整，即小松菜 0.5 g，綠茶 1 g，紅蘿蔔、山藥、南瓜各 1.5 g，各加入乙醇 1 mL，每個檢體再加入上述 4 種農藥。檢測得知芬普尼、亞滅培、達滅芬及得克利在上述 5 種農產品上的回收率各為 73.1–123.6%，61.7–111.1%、72.5–102.3% 及 67.9–113.9%，各重複間之 CV 值皆小於 14.8% (表 2)。農藥回收率皆在 60–140% 管制範圍內，精確度與目前食藥署公告之檢驗方法相當 (Hsu *et al*. 2014)。

討論

芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利直接競爭型免疫檢測試劑組之檢測極限在 0.23–0.52 ng mL^{-1} 之間，其靈敏度足以檢測國內訂定容許量 1 mg kg^{-1} 之作物上的農藥。Watanabe *et al*. (2005) 評估克凡派 ELISA 試劑之檢測效能，以含 5% 甲醇之水溶液配製克凡派各濃度，確認其 dcELISA 檢測範圍在 1–10 ng mL^{-1}，檢測極限為 0.1 ng mL^{-1}；Watanabe & Miyake (2013) 測試殺蟲劑賽速安 dcELISA 試劑組的檢測範圍為 0.1–4.1 ng mL^{-1}，檢測極限為 0.1 ng mL^{-1}；Liu *et al*. (2012) 研發數個可檢測有機磷劑類殺蟲劑的抗體，最靈敏的抗體對甲基巴拉松之抑制比 0.85 時的檢測濃度為 2.1 ng mL^{-1}。本研究測試芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利 4 合 1 農藥 ELISA 試劑組之檢測極限及檢測範圍皆與前述文獻相當。

在檢體處理方面，由於多數農藥非水溶性，現今國內農藥檢驗方法中的檢體處理多以有機溶劑萃取，但有機溶劑會對抗體蛋白質中的氫鍵等結構作用力產生影響，干擾農藥與抗體的鍵結，進而影響農藥 ELISA 時的靈敏度 (Yang *et al*. 2008)。農業試驗所研發的『農藥殘毒快速檢驗方法』即生化快篩法，則使用乙醇萃取農藥，對試驗操作者較為安全 (Chiu *et al*. 1991)。Watanabe *et al*. (2004, 2005) 測試萃取

表 2. 應用直接競爭型酵素免疫分析組檢測外加農藥於農產品上之農藥回收率。

Table 2. Recovery of the pesticides from agricultural samples with the direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (dcELISA) kit.

	Pesticide recovery rate (CV) (%)[z]			
Sample	Fipronil	Acetamiprid	Dimethomorph	Tebuconazole
Komatsuna	105.3 (3.8)	74.0 (3.3)	92.8 (3.8)	92.1 (6.9)
Carrot	123.6 (5.7)	111.1 (6.2)	88.0 (6.0)	72.1 (5.3)
Yam	73.1 (5.3)	61.7 (4.0)	102.3 (4.9)	92.7 (3.7)
Pumpkin	98.6 (6.2)	73.8 (14.8)	72.5 (3.3)	113.9 (5.0)
Green tea	84.8 (2.1)	83.3 (6.7)	78.2 (6.9)	67.9 (6.7)

[z] Pesticide recovery rate (%) = (pesticide detected in sample/pesticide added in sample) × 100%. CV: coefficient of variation.

液含 5% 甲醇、5% 乙醇、5% 丙酮、5% 乙腈 (acetonitrile) 等 4 種溶劑對克凡派 dcELISA 的影響，結果顯示甲醇與乙醇對農藥抗體與農藥間結合的量影響最小，可做為萃取用溶劑。前述文獻亦測試檢液含甲醇 1–30% 對殺菌劑四氯異苯腈 (chlorothalonil) ELISA 的影響，得知含甲醇量越高，吸光值越低，即對農藥抗體與農藥間結合的抑制越大，降低此 ELISA 檢測的靈敏度，濃度不宜高於 5%。本研究採用檢體前處理的方法係參考農業試驗所發展的生化快篩法，使用 95% 乙醇萃取農產品檢體上的農藥，為避免過高的乙醇成分干擾 ELISA，將此乙醇萃取液稀釋 50×，使萃取稀釋液僅含 1.9% 乙醇，再進行 ELISA，可避免有機溶劑對分析結果的干擾，同時也可降低檢體的基質干擾情形，使回推檢體上的農藥濃度更為準確。

檢測方法在檢體之檢測極限是指應用此方法在檢體上能檢測到的農藥最低濃度，此與檢體農藥萃取方法與後續萃取液的稀釋倍數有關。以小葉菜為例，此方法取 0.5 g 小葉菜，以 1 mL 乙醇萃取農藥，此時農藥濃度稀釋 2×，此萃取液再稀釋 50× 才進入 ELISA，檢體上的農藥濃度共稀釋 100×。根據前述芬普尼、亞滅培、達滅芬及得克利 dcELISA 之直線回歸方程式所推估出之檢測極限各為 0.30、0.52、0.23 及 0.39 ng mL^{-1}，加上此 100× 的稀釋倍數，可推估此方法檢測植物檢體中含上述 4 種農藥的檢測極限為 30、52、23 及 39 ng mL^{-1}，相當於 0.030、0.052、0.023 及 0.039 mg mL^{-1}。以達滅芬為例，多數作物的達滅芬殘留容許量在 1.0–10.0 ppm，相當於 1.0–10.0 mg mL^{-1}，應用此試劑組的檢測極限足以檢測小葉菜類含達滅芬的殘留。

農藥免疫檢測是應用抗體與抗原特異性結合的原理，所發展之新一代的農藥殘留快篩技術，應用直接競爭型 ELISA 搭配免疫分析儀，可一次同時檢測多件樣品。本研究測試芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利直接競爭型免疫檢測試劑組，評估其應用在小葉菜類的小松菜、根菜類的紅蘿蔔及山藥、瓜菜類的南瓜、茶類的綠茶等作物中殘留農藥的檢測可行性，結果顯示此 4 種農藥的回收率介於 61.7–123.6%，coefficient of variation (CV) 值介於 2.1–14.8%，具有穩定的回收率及良好的重複性。

農藥快篩方法是以快速、簡便、準確為發展原則，當精準的公告檢驗方法因為價格、設備、人力、耗時等限制，無法擴大抽驗數量時，農藥快篩方法包括免疫快篩及生化法皆可在農藥初篩階段發揮把關功能，大量且快速的攔截殘留農藥過量的農產品，提升公告檢驗方法效率。未來若能應用日益精進的分析技術，如微流體晶片技術、奈米免疫層析技術 (Khizar *et al*. 2020; Stueber *et al*. 2021; Wu *et al*. 2021, 2022)，縮減檢驗步驟，提升操作便利性，拓展可檢驗的農藥種類，當更能符合農產品農藥快篩應用需求。若再能連結以乙醯膽鹼酯酶為基礎的農藥快篩生化法，將更能擴大農藥快篩效能，提升農產品食用安全。

誌謝

本研究承行政院農業委員會 106 農科-12.2.4-農-C1 計畫經費補助。試驗期間承吳森源先生、朱雅琳小姐、蕭妤芳小姐、楊侑蓁小姐協助相關試驗執行，謹此致謝。

引用文獻

Ann, P. J., J. N. Tsai, I. T. Wong, J. H. Huang, C. P. Lin, S. T. Wang, and C. K. Yang. 2015. Studies on phytophthora disease of amaranth and its control in Taiwan. p.13–22. *in*: Proceedings of the Symposium on Important New Emerging Crop Diseases in Taiwan and Their Controls. September 18, 2015. Taichung, Taiwan. Taiwan Agric. Res. Inst., Taichung, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Brenneman, T. B. and A. K. Culbreath. 1994. Utilizing a sterol demethylation inhibiting fungicide in an advisory program to manage foliar and soilborne pathogens of peanut. Plant Dis. 78:866–872. doi:10.1094/PD-78-0866

Chang, S. C., T. M. Chou, and C. H. Kao. 2016. Activities of the housefly acetylcholinesterase and its susceptibility to chlorpyrifos, chlorpyrifos oxon and propoxur. Formosan Entomol. 36:74–83. (in Chinese with English abstract) doi:10.6662/TESFE.2016009

Chang, S. C., C. H. Kao, H. Shen-Tu, T. M. Chou, and S. C. Lo. 2018. Potential application of immunoassay for the detection of pesticide residues in agriculture. p.122–133. *in*: Proceedings of the 2018 International Symposium on Proactive Technologies for Enhancement of Integrated Pest Management of Key Crops. September 4–6, 2018. Taichung, Taiwan. Taiwan Agric. Res. Inst., Taichung, Taiwan.

Cheng, E. Y., Y. B. Huang, M. Y. Chiang, Y. H. Hou, and C. C. Nien. 2015. The study of pesticide residues control by the combination of AChE screening and chemical analysis: The Taipei model. J. Taiwan Agric. Res. 64:53–63. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2015.06401.06

Chiu, C. S., C. H. Kao, and E. Y. Cheng. 1991. Rapid bioassay of pesticide residues (RBPR) on fruits and vegetables. J. Agric. Res. China 40:188–203. doi:10.29951/JARC.199106.0008

Cohen, Y., A. Baider, and B. H. Cohen. 1995. Dimethomorph activity against oomycete fungal plant pathogens. Phytopathology 85:1500–1506. doi:10.1094/Phyto-85-1500

Hou, P. H., Y. C. Liao, Y. F. Tsai, C. H. Yang, F. M. Liu, Y. C. Huang, F. Chou, H. L. Tao, M. C. Lu, C. Y. Lu, P. Y. Chen, C. M. Chen, T. L. Chiu, and H. Y. Wang. 2019. Monitoring of pesticide residues in agricultural products on markets in 2018. Ann. Rept. Food Drug Res. 10:58–71. (in Chinese with English abstract)

Hsu, Y. H., Y. H. Chen, M. C. Lin, H. F. Cheng, and D. Y. C. Shih. 2014. Survey on pesticide residues in raw materials of traditional Chinese medicines (X). Ann. Rept. Food Drug Res. 5:211–223. (in Chinese with English abstract)

Kairo, G., Y. Poquet, H. Haji, S. Tchamitchian, M. Cousin, M. Bonnet, M. Pelissier, A. Kretzschmar, L. P. Belzunces, and J. L. Brunet. 2017. Assessment of the toxic effect of pesticides on honey bee drone fertility using laboratory and semifield approaches: A case study of fipronil. Environ. Toxicol. Chem. 36:2345–2351. doi:10.1002/etc.3773

Keinath, A. P. 2015. Efficacy of fungicides against powdery mildew on watermelon caused by *Podosphaera xanthii*. Crop Prot. 75:70–76. doi:10.1016/j.cropro.2015.05.013

Khizar, S., H. Ben Halima, N. M. Ahmad, N. Zine, A. Errachid, and A. Elaissari. 2020. Magnetic nanoparticles in microfluidic and sensing: From transport to detection. Electrophoresis 41:1206–1224. doi:10.1002/elps.201900377

Kranthi, K. R., M. Davis, C. D. Mayee, D. A. Russell, R. M. Shukla, U. Satija, M. Kshirsagar, D. Shiware, and S. Kranthi, 2009. Development of a colloidal-gold based lateral-flow immunoassay kit for 'quality-control' assessment of pyrethroid and endosulfan formulations in a novel single strip format. Crop Prot. 28:428–434. doi:10.1016/j.cropro.2009.01.003

Li, X., H. Zhang, Y. Ji, Z. Zheng, Q. Bian, and G. Zhu. 2015. Immunochemical and molecular characteristics of monoclonal antibodies against organophosphorus pesticides and effect of hapten structures on immunoassay selectivity. Food Agric. Immunol. 26:109–119. doi:10.1080/09540105.2013.873390

Liu, B., Y. Ge, Y. Zhang, Y. Song, Y. Lv, X. Wang, and S. Wang. 2012. Production of the class-specific antibody and development of direct competitive ELISA for multi-residue detection of organophosphorus pesticides. Food Agric. Immunol. 23:157–168. doi:10.1080/09540105.2011.608120

Mayer, D. F. and J. D. Lunden. 1999. Field and laboratory tests of the effects of fipronil on adult female bees of *Apis mellifera*, *Megachile rotundata* and *Nomia melanderi*. J. Apic. Res. 38:191–197. doi:10.1080/00218839.1999.11101009

Paul, P. A., P. E. Lipps, D. E. Hershman, M. P. McMullen, M. A. Draper, and L. V. Madden. 2007. A quantitative review of tebuconazole effect on Fusarium head blight and deoxynivalenol content in wheat. Phytopathology 97:211–220. doi:10.1094/PHYTO-97-2-0211

Reuveni, M. 1997. Post-infection applications of K_3PO_3, phosphorous acid and dimethomorph inhibit development of downy mildew caused by *Plasmopara viticola* on grapevines. J. Small Fruit Vitic. 5(2):27–38. doi:10.1300/J065v05n02_03

Rial-Otero, R., M. Arias-Estévez, E. López-Periago, B. Cancho-Grande, and J. Simal-Gándara. 2005. Variation in concentrations of the fungicides tebuconazole and dichlofluanid following successive applications to greenhouse-grown lettuces. J. Agric. Food Chem. 53:4471–4475. doi:10.1021/jf047848h

Stueber, D. D., J. Villanova, I. Aponte, Z. Xiao, and V. L. Colvin. 2021. Magnetic nanoparticles in biology and medicine: Past, present, and future trends. Pharmaceutics 13:943. doi:10.3390/pharmaceutics13070943

Tomizawa, M. and J. E. Casida. 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45:247–268. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930

Watanabe, E., H. Eun, K. Baba, T. Arao, Y. Ishii, S. Endo, and M. Ueji. 2004. Evaluation and validation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for the neonicotinoid insecticide imidacloprid in agricultural samples. J. Agric. Food Chem. 52:2756–2762. doi:10.1021/jf0498867

Watanabe, E., K. Baba, H. Eun, T. Arao, Y. Ishii, M. Ueji, and S. Endo. 2005. Evaluation of a commercial immunoassay for the detection of chlorfenapyr in agricultural samples by comparison with gas chromatography and mass spectrometric detection. J. Chromatogr. A 1074:145–153. doi:10.1016/j.chroma.2005.03.100

Watanabe, E. and S. Miyake. 2013. Quantitative determination of neonicotinoid insecticide thiamethoxam in agricultural samples: A comparative verification between high-performance liquid chromatography and monoclonal antibody-based immunoassay. Food Anal. Methods 6:658–666. doi:10.1007/s12161-012-9461-z

Wong, F. P. and S. L. Midland. 2007. Sensitivity distributions of California populations of *Colletotrichum cereale* to the DMI fungicides propiconazole, myclobutanil, tebuconazole, and triadimefon. Plant Dis. 91:1547–1555. doi:10.1094/PDIS-91-12-1547

Wu, K. H., W. C. Huang, S. C. Chang, C. H. Kao, and R. H. Shyu. 2021. Preparation of competitive immunochromatographic assay for detection of residual fipronil in urine and food samples. Mater. Express 11:63–72. doi:10.1166/mex.2021.1889

Wu, K. H., W. C. Huang, S. C. Chang, and R. H. Shyu. 2022. Colloidal silver-based lateral flow immunoassay for detection of profenofos pesticide residue in vegetables. RSC Adv. 12:13035–13044. doi:10.1039/D2RA01654K

Xu, X. F., T. Lin, S. K. Yuan, D. J. Dai, H. J. Shi, C. Q. Zhang, and H. D. Wang. 2014. Characterization of baseline sensitivity and resistance risk of *Colletotrichum gloeosporioides* complex isolates from strawberry and grape to two demethylation-inhibitor fungicides, prochloraz and tebuconazole. Australas. Plant Pathol. 43:605–613. doi:10.1007/s13313-014-0321-8

Yamasaki, T., T. Inoue, Y. Hirakawa, S. Miyake, E. Ueno, and I. Saito. 2015. Validation of ELISA kits for pesticide residue analysis in vegetables and fruits. J. Food Hyg. Saf. 56:240–246. doi:10.3358/shokueishi.56.240

Yang, T., W. G. Huangfu, and X. C. Xie. 2008. Indirect competitive ELISA (IC-ELISA) for multiresidues detection of the pyrethroids. Food Sci. Technol. 33:291–294. (in Chinese with English abstract)

Yu, S. J. 2008. The Toxicology and Biochemistry of Insecticides. CRC Press. Boca Raton, FL. 296 pp. doi:10.1201/9781420059762

附錄 . 應用於交叉反應試驗之農藥含括 49 類共 93 種農藥。

Appendix. Pesticides including 93 pesticides in 49 categories were used in the cross-reactivity tests.

Classification	Mode of action	Pesticide	Manufacturer
Insecticide[z]	1A	Carbofuran	Dr. Ehrenstorfer GmbH
		Methomyl	Dr. Ehrenstorfer GmbH
		Oxamyl	DuPont Taiwan Ltd.
		Propoxur	Dr. Ehrenstorfer GmbH
		Carbaryl	Dr. Ehrenstorfer GmbH
	1B	Profenofos	Dr. Ehrenstorfer GmbH
		Acephate	Dr. Ehrenstorfer GmbH
		Fenitrothion	Dr. Ehrenstorfer GmbH
		Disulfoton	Dr. Ehrenstorfer GmbH
		Chlorpyrifos	Sinon Corp., Taiwan
	2B	Fipronil	Dr. Ehrenstorfer GmbH
		Ethiprole	Sinon Corp., Taiwan.
	3A	Cypermethrin	Sinon Corp., Taiwan.
		Deltamethrin	Sinon Corp., Taiwan.
		Fenvalerat	Sinon Corp., Taiwan.
		Cyhalothrin	Dr. Ehrenstorfer GmbH
		alpha-Cypermethrin	Dr. Ehrenstorfer GmbH
		Fenpropathrin	Sinon Corp., Taiwan.
		Bifenthrin	Sinon Corp., Taiwan.
		Permethrin	Sinon Corp., Taiwan.
	4A	Acetamiprid	Sinon Corp., Taiwan.
		Imidacloprid	Bayer Taiwan Ltd.
		Thiamethoxam	Syngenta Taiwan Ltd.
		Thiacloprid	Bayer Taiwan Ltd.
		Clothianidin	Lih-Nung Co., Taiwan Ltd.
		Dinotefuran	Alfa Co., Taiwan Ltd.
	5	Spinosad	Dow AgroSciences Taiwan Ltd.
	6	Abamectin	Sinon Corp., Taiwan.
		Emamectin benzoate	Syngenta Taiwan Ltd.
		Milbemectin	Mitsui-Chem., Taiwan Ltd.
	7	Fenoxycarb	Agrowaho Co., Taiwan Ltd.
		Pyriproxyfen	Sinon Corp., Taiwan.
	9	Pymetrozine	Sinon Corp., Taiwan.
	10A	Clofentezine	Lanlix Corp. Sci. Co., Taiwan Ltd.
		Etoxazole	Lih-Nung Co., Taiwan Ltd.
	11	*Bacillus thuringiensis*	Sumitomo Co., Taiwan Ltd.
	12	Diafenthiuron	Sinon Corp., Taiwan.
		Bromopropylate	Worldwide Agrochem. Co., Ltd.
	13	Chlorfenapyr	BASF Taiwan Ltd.
	14	Cartap hydrochloride	Sinon Corp., Taiwan.

附錄 . 應用於交叉反應試驗之農藥含括 49 類共 93 種農藥。(續)

Appendix. Pesticides including 93 pesticides in 49 categories were used in the cross-reactivity tests. (continued)

Classification	Mode of action	Pesticide	Manufacturer
	15	Flufenoxuron	BASF Taiwan Ltd
		Teflubenzuron	Dr. Ehrenstorfer GmbH
		Chlorfluazuron	FMC Co., Taiwan Ltd.
	16	Buprofezin	Dr. Ehrenstorfer GmbH
	17	Cyromazine	Dr. Ehrenstorfer GmbH
	18	Tebufenozide	Agrowaho Co., Taiwan Ltd.
	19	Amitraz	FMC Co., Taiwan Ltd.
	20B	Acequinocyl	Chia Tai Co., Taiwan Ltd.
	21A	Fenpyroximate	Nihon Nohyaku Co., Taiwan Ltd.
		Pyrimidifen	Sinon Corp., Taiwan.
		Tebufenpyrad	HKC Co., Taiwan Ltd.
		Fenazaquin	Nihon Nohyaku Co., Taiwan Ltd.
	22A	Indoxacarb	FMC Co., Taiwan Ltd.
	23	Spirodiclofen	Bayer Taiwan Ltd.
	28	Chlorantraniliprole	FMC Co., Taiwan Ltd.
	UN	Dicofol	Harvest Chemical Co., Ltd.
		Bifenazate	United Phosphorus Ltd.
Fungicide[y]	B1	Carbendazim	Sinon Corp., Taiwan.
		Thiabendazole	Sinon Corp., Taiwan.
	B4	Pencycuron	HKC Co., Taiwan Ltd.
	C2	Oxycarboxin	Tong Ho Chem. Co., Taiwan Ltd.
		Boscalid	Dr. Ehrenstorfer GmbH
	C3	Pyraclostrobin	BASF Taiwan Ltd
		Trifloxystrobin	Bayer Taiwan Ltd.
		Kresoxim-methyl	Dr. Ehrenstorfer GmbH
		Azoxystrobin	Wonderful Agriculture Co., Ltd.
		Famoxadone Cymoxanil	DuPont Taiwan Ltd.
	C5	Fluazinam	Ya Chung Co., Taiwan Ltd.
	E1	Quinoxyfen	Dow AgroSciences Taiwan Ltd.
	E2	Cyprodinil fludioxonil	Syngenta Taiwan Ltd.
	E3	Procymidone	Lih-Nung Co., Taiwan Ltd.
		Iprodione	Sinon Corp., Taiwan.
	F2	Edifenphos	Sinon Corp., Taiwan.
	F3	Etridiazole	United Phosphorus Ltd.
	G1	Tebuconazole	Bayer Taiwan Ltd.
		Difenoconazole	Sinon Corp., Taiwan.
		Hexaconazole	HKC Co., Taiwan Ltd
		Flutriafol	Dr. Ehrenstorfer GmbH
		Prochloraz	Sinon Corp., Taiwan.
	G2	Tridemorph	Alfa Co., Taiwan Ltd.

附錄 . 應用於交叉反應試驗之農藥含括 49 類共 93 種農藥。(續)

Appendix. Pesticides including 93 pesticides in 49 categories were used in the cross-reactivity tests. (continued)

Classification	Mode of action	Pesticide	Manufacturer
	H5	Dimethomorph	Sinon Corp., Taiwan.
	I1	Tricyclazole	Sinon Corp., Taiwan.
	M2	Sulfur	Sinon Corp., Taiwan.
	M3	Mancozeb	Sinon Corp., Taiwan.
	M5	Chlorothalonil	Ihara Chemical Co, Ltd.
Herbicide[x]	C1	Ametryn	Alfa Co., Taiwan Ltd.
	C2	Diuron	Wonderful Agriculture Co., Ltd.
	D	Paraquat	Sinon Corp., Taiwan.
	G	Glyphosate-isopropylammonium	Sinon Corp., Taiwan.
	H	Glufosinate ammonium	Sinon Corp., Taiwan.
	K1	Pendimethalin	Sinon Corp., Taiwan.
	K3	Butachlor	Sinon Corp., Taiwan.
	O	2,4-D	Sigma Aldrich

[z] Including 57 pesticides in 24 categories by Insecticide Resistance Action Committee (IRAC).
[y] Including 28 pesticides in 17 categories by Fungicide Resistance Action Committee (FRAC).
[x] Including 8 pesticides in 8 categories by Herbicide Resistance Action Committee (HRAC).

Detection of Fipronil, Acetamiprid, Dimethomorph and Tebuconazole Residues in Agricultural Samples with Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Shu-Chen Chang[1,*], Hsuan Shentu[2], Ching-Hua Kao[3], Shu-Chin Lo[4], and Ming-Yao Chiang[5]

Abstract

Chang, S. C., H. Shentu, C. H. Kao, S. C. Lo, and M. Y. Chiang. 2022. Detection of fipronil, acetamiprid, dimethomorph and tebuconazole residues in agricultural samples with direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay. J. Taiwan Agric. Res. 71(2):159–170.

In order to evaluate the rapid screening efficiency of pesticide immunoassay, a commercial direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (dcELISA) was conducted to detect the residues of fipronil, acetamiprid, dimethomorph, and tebuconazole in agricultural samples. The detectable range and the detection limit of these four pesticides by this dcELISA kit were 0.5–100 ng mL^{-1} and 0.23–0.52 ng mL^{-1}, respectively. Agricultural samples such as komatsuna, carrots, green tea, pumpkin, and yam were chopped and each added with fipronil, acetamiprid, dimethomorph, and tebuconazole to 50 ng mL^{-1}. After extraction and dilution, residual pesticides were detected by dcELISA. The recovery rates of these four pesticides were 73.1–123.6%, 61.7–111.1%, 72.5–102.3% and 67.9–113.9%, respectively, which indicated immunoassay has high sensitivity and a good recovery rate. It takes only one hour from sample extraction to result interpretation, and is adequate for rapid screening of pesticide residues for agricultural products with high risk or known pesticide application records.

Key words: Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (dcELISA), Fipronil, Acetamiprid, Dimethomorph, Tebuconazole.

Received: October 17, 2021; Accepted: February 25, 2022.

* Corresponding author, e-mail: scchang@tari.gov.tw

[1] Associate Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

[2] Junior Technical Specialist, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC. Co-first author.

[3] Former Research Fellow and Division Director, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

[4] Assistant Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

[5] Assistant Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 71(2):171–183 (2022)
DOI:10.6156/JTAR.202206_71(2).0006

研究簡報

應用奈米孔定序平台進行蝴蝶蘭褐斑病菌基因體 *de novo* 組裝之研究

杜元凱[1] 蔡佳欣[2] 林彥君[3] 歐柏均[3] 陳涵葳[1,*]

摘要

杜元凱、蔡佳欣、林彥君、歐柏均、陳涵葳。2022。應用奈米孔定序平台進行蝴蝶蘭褐斑病菌基因體 *de novo* 組裝之研究。台灣農業研究 71(2):171–183。

蝴蝶蘭出口產值達 40 億元，是台灣外銷花卉之首；高溫多濕的栽培環境，易發生由 *Acidovorax avenae* subsp. *Cattleyae* (*AAC*) 所引起的蝴蝶蘭褐斑病，影響苗株出口造成產業損失。本研究應用奈米孔定序平台對兩個 *AAC* 菌株收集系進行基因體解序，AAC_10001 與 AAC_9906R 之長讀序資料量、平均讀序長度、讀序品質分別為 1.49 Gbp、18.7 kb、11.9 與 1.96 Gbp、17.29 kb、12.3，基因體 DNA 具有高度連續性，定序品質佳。對解序資料進行 *de novo* 組裝，AAC_10001 與 AAC_9906R 之連續體數量分別為 6 個與 5 個，最大的連續體長度為 5.7 Mb 與 5.6 Mb，序列 guanine-cytosine (GC) 含量約為 67.4% 與 67.5%，基因體平均定序深度為 230 倍。AAC_10001 與 AAC_9906R 基因體結構比對結果顯示，兩者具有 12 個主要的局部共線性區塊 (locally collinear blocks; LCB)，其中 AAC_10001 菌株 LCB 2 有一段 132 kb 的基因體島遺傳元件插入，包含一個 DNA 修復蛋白、一群參與第四型分泌系統的蛋白、一個整合酶與一個轉位酶，可能影響菌株致病性、共生性、代謝特性、環境適應性或對抗生素產生抗性。本研究使用奈米孔定序平台對蝴蝶蘭 *AAC* 菌株進行基因體解序，建立細菌基因體長片段讀序生物資訊分析流程，完成 *AAC* 菌株基因體序列 *de novo* 組裝與初步分析，是國內首例以三代定序技術完成的蝴蝶蘭褐斑病細菌基因體研究，可提供未來準確診斷和長期監測的方向，期望有助於國內蘭園病害防治策略。

關鍵詞：奈米孔定序技術、蝴蝶蘭褐斑病、基因體解序、細菌抗藥性。

前言

蝴蝶蘭褐斑病是由 *Acidovorax avenae* subsp. *Cattleyae* (*AAC*) 所引起，為短桿型具有鞭毛的革蘭氏陰性菌，好發於高溫多濕環境。*AAC* 主要分布在菲律賓、義大利、美國、葡萄牙、澳洲及台灣等地 (Ding *et al*. 2010)，其典型病徵為葉片出現水浸狀斑點，隨後轉為暗褐色或黑色不規則凹陷壞疽斑，病徵周圍具有明顯黃暈，病斑持續擴大會導致葉片黃化乾枯，嚴重時植株死亡。依據財政部統計資料顯示，2020 年蝴蝶蘭出口總值為 40 億元，是台灣外銷花卉之首，蝴蝶蘭多採溫室密集栽培，一旦染病便快速擴散，而潛伏苗株上的 *AAC* 可能影響商品檢疫，造成產業損失 (Hseu *et al*. 2011)。研究指出 *A. avenae* 可透過基因水平轉移機制獲得嘉賜黴素 (kasugamycin) 抗性基因 (Yoshii *et al*. 2015)，而國內業者常以鏈黴素進行蝴蝶蘭褐斑病防治，長期施用易產生抗藥性變異菌株，造成防治工作越日趨困難 (Huang 2001)。透過細菌基因體解序與分析，有助建立菌株外表型差異與其基因型之關聯，如生長勢、致

投稿日期：2021 年 3 月 15 日；接受日期：2021 年 11 月 18 日。
* 通訊作者：swaychen@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。

病力、移動力、生物膜形成，或是對抗生素的耐受性等；*A. citrulli* M6 菌株基因體序列組裝研究，證實了低拷貝數的 pACM6 質體的存在，且該質體具有 Fic-VbhA 抗毒性模組，可能影響 M6 菌株對抗生素的耐受性 (Yang *et al*. 2019)。此外，比對柑橘潰瘍病之 *Xanthomonas citri* 菌株基因體序列，結果支持質體融合 (fusion) 與重組的發生，且提示傳統栽培管理會提高環境選拔壓力，可能影響致病型 (pathotype) 之進化 (Huang *et al*. 2021)。

次世代定序 (next-generation sequencing; NGS) 技術藉由橋式聚合酶連鎖反應 (solid-phase bridge polymerase chain reaction; solid-phase bridge PCR)，可對小於 450 bp 之短讀序 (short reads) 進行定序，具有高通量、高準確性與低成本之優點，但短讀序無法正確拼接高度重複序列區域，基因體序列組裝時易產生序列間隙 (gaps)。近年快速成長的第三代定序技術，著重於即時、單分子與長片段讀序 (long reads) 技術之發展，如 Oxford Nanopore Technologies (ONT) 所開發的奈米孔定序 (nanopore sequencing) 以及 Pacific Biosciences (PacBio) 研發的單分子即時 (single-molecule real time; SMRT) 定序技術等，其中 PacBio SMRT 讀序長度為 10–15 kb，ONT 奈米孔讀序長度更可達到 200–300 kb，長片段定序可彌補 NGS 序列組裝時，重複序列、二級結構與極端 guanine-cytosine (GC) 含量所造成的影響。目前簡易式奈米孔定序平台 (MinION) 售價僅需 1,000 美元，連結筆記型電腦即可進行定序工作，單個定序晶片 (flow cell) 可產生 30 Gb 定序資料量，對原始 DNA 片段進行讀序，可避免 PCR 擴增的錯誤及鹼基偏好的影響。相對於其他定序平台而言，MinION 具有攜帶方便、超長讀序，即時監控定序情形等優點，廣泛應用於微生物鑑定、微生物抗藥性診斷、微生物基因體組裝與基因水平轉移等研究領域。如溫室番茄細菌性斑點病 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; *Pto*) 菌株層級的診斷 (Mechan Llontop *et al*. 2020)，或黑麥草種子上新型 *Xanthomonas* 屬菌株之鑑定 (Li *et al*. 2020)。本研究使用 MinION 對蝴蝶蘭 *AAC* 菌株進行基因體解序，建立細菌基因體長片段讀序生物資訊分析流程，完成 *AAC* 菌株基因體序列 *de novo* 組裝與初步分析，是國內首例以三代定序技術完成的蝴蝶蘭褐斑病細菌基因體研究，可提供未來準確診斷和長期監測的方向，期望有助於國內蘭園病害防治策略。

材料與方法

蝴蝶蘭褐斑病細菌基因體文庫製備與定序

本研究所使用的 *AAC* 菌株收集系由農試所植病組蔡佳欣博士提供，包括 AAC_10001 與 AAC_9906R。*AAC* 菌株接種於 lysogeny broth (LB) 液體培養基，於 37℃轉速 100 rpm 條件下培養 2 d，並使用 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) extraction buffer 進行 DNA 萃取，接續經 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25：24：1) 去除蛋白質和有機溶劑，再以異丙醇沉澱 DNA，最後以 Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) 進行 DNA 定量與品質檢測。基因體文庫製備使用 Ligation Sequenc-ing Kit (SQK-LSK109, Nanopore, Oxford, UK) 和 Kapa Hyper Prep Kit (KK8502, Roche, Pleasanton, CA, USA)，流程簡述如下：

1. DNA end-repair 和 dA tailing：取 1 μl 待測基因體 DNA，加入 End Repair & A-Tailing Buffer (Roche) 和 End Repair & A-Tailing Enzyme Mix (Roche)，於 20℃下反應 60 min 和 65℃下反應 30 min。
2. Adapter Ligation and Clean-up：完成端點修飾的基因體 DNA 加入 Adapter Mix (AMX, Nanopore)、Ligation Buffer (Roche) 和 DNA Ligase (Roche)，於 20℃反應 4 h，隨後放入 4℃冰箱持續進行接合反應。反應完成後使用 Agencourt® AMPure XP beads (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, USA) 進行樣本純化，並使用 Long Fragment Buffer (LFB, Nanopore) 移除小片段 DNA。
3. Priming and loading the SpotON flow cell：本研究使用 MinION 機型的 R9.4.1 版本 Spot ON 定序晶片 (FLO-MINSP6, Nanopore)，依照原廠指示步驟進行 Priming Step 並將基因

體 DNA 與 Sequencing Buffer (SQB, Nanopore)、Loading Beads (LB, Nanopore) 均勻混合，接續將此混合溶液滴入晶片的樣本槽，最後按照 MinKNOW 軟體 (3.6.0 版本) 指示設定並執行定序程序，總定序時間為 4 h。

蝴蝶蘭褐斑病細菌基因體序列 *de novo* 組裝與分析

MinION 輸出的原始資料檔案格式為 FAST5，定序資料前處理首先以 Guppy 套件 (0.0.7a1 版本) 進行鹼基判定 (basecalling)，再以 Porechop (0.2.4 版本) 套件移除 adapter 序列，最後以 NanoPlot 套件 (1.33.0 版本) 進行序列品質控管 (quality control, QC)，並接續進行基因體序列分析，包括：

1. 基因體組裝：經品質管控後的序列資料使用 Unicycler 套件 (0.4.8 版本) 進行基因體 *de novo* 組裝。以 Bandage 套件 (0.8.1 版本) 呈現視覺化圖形協助組裝判定。
2. 定序深度分析：以 BWA (0.7.17 版本) 套件將品質管控後的序列資料對 *AAC* 基因體解序資料進行序列比對，再以 Bedtools 套件 (2.28.0 版本) 進行定序深度計算。
3. 基因體 GC 含量分析：*AAC* 基因體解序資料以 GC Content Plot Online (http://www.endmemo.com/bio/gcdraw.php) 功能進行 GC 含量分析與繪圖。
4. 基因體註解：使用 Prokka 套件 (1.14.5 版本) 進行基因註解。
5. 基因體序列結構分析：使用 MUMmer 套件 (4.0 版本) 對基因體解序資料進行比對，比對條件設定連續長度大於 1 kb，且同源性大於 90% 以上，並將結果繪製共線性圖。以 Mauve 套件 (2.4.0 版本) 進行基因體結構與序列重組分析。

結果與討論

本研究利用奈米孔定序平台進行 *AAC* 菌株基因體定序，AAC_10001 與 AAC_9906R 菌株分別取得 1.49 Gbp 和 1.96 Gbp 的長讀序資料，讀序長度分布如圖 1 所示。AAC_10001 菌株共計有 80,694 條讀序，平均讀序長度為 18.47 kb，讀序長度中位數 (N50) 為 31.47 kb，平均讀序品質為 11.9；而 AAC_9906R 得到 113,120 條讀序，平均長度為 17.29 kb，長度中位數 35.22 kb，讀序品質為 12.3 (表 1)。奈米孔定序技術原理是在薄膜上鑲嵌 α-hemolysin、MspA 或 CsgG 奈米孔洞跨膜蛋白，給予穩定電壓後離子通過奈米孔洞可形成固定電流，待測 DNA 片段與奈米孔洞跨膜蛋白會以主動運輸的方式讓單股 DNA 通過薄膜，此時序列上的鹼基會改變奈米孔洞的電流訊號，記錄電流訊號變化即可得到 DNA 片段序列，

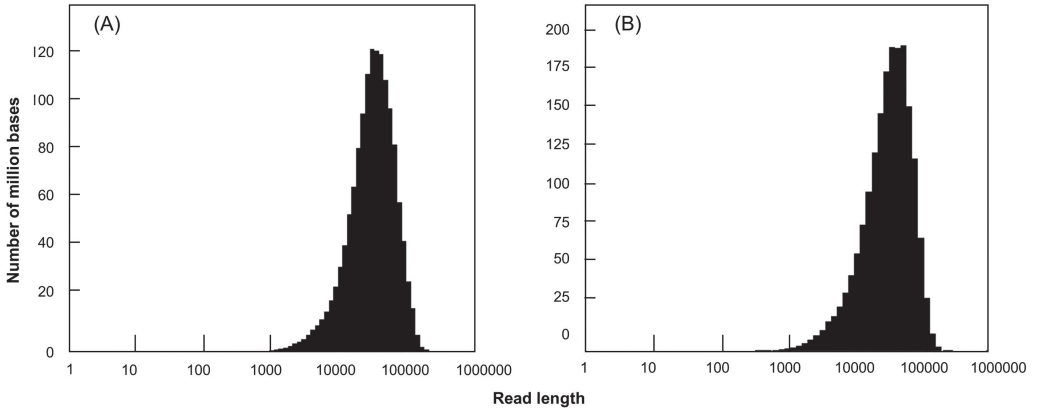


圖 1. *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*AAC*) 基因體奈米孔定序之長度分布。(A) 菌株 10001；(B) 菌株 9906R。

Fig. 1. Read-length distributions of (A) *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*AAC*) starin 10001 and (B) strain 9906R. Data obtained by nanopore sequencing.

表 1. *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*AAC*) 菌株 10001 與菌株 9906R 基因體之奈米孔定序平台定序結果。

Table 1. Post-sequencing results of the *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*AAC*) strain 10001 and 9906R genome.

Nanopore statistics	AAC_10001	AAC_9906R
No. of reads	80,694	113,120
Mean read length (bp)	18,474.8	17,291.2
Median read length (bp)	12,835.5	9,661.0
Read length N50 (bp)	31,473.0	35,216.0
Mean read quality[z]	11.9	12.3
Median read quality	12.2	12.7
Total bases (bp)	1,490,806,246	1,955,978,135

[z] Phred score.

因此奈米孔定序長度完全由待測 DNA 片段品質決定，10–30 kb 最為常見 (Amarasinghe *et al*. 2020)，最長甚至可達 2.3 Mb (Payne *et al*. 2019)，此次上機結果多數序列超過 10 kb，且集中在 15–35 kb 長度區間，顯示本研究所製備的基因體 DNA 完整性好、品質佳。

Unicycler 套件可選擇 conservative、normal、bold 三種模式進行基因體組裝，其中 conservative 模式會帶入短讀序橋梁 (short read bridge)，bold 模式則會盡可能的合併多個連續體 (contig)；本試驗選擇 normal 模式進行 *AAC* 菌株基因體 *de novo* 組裝，該模式在組裝的完整性與正確性間取得一個折中的方案，AAC_10001 與 AAC_9906R 分別得到 6 個與 5 個 contigs，其中最大的 contig 為 5.7 Mb 與 5.6 Mb，利用 Bandage 套件協助定序資料視覺化呈現 (圖 2)，理想的細菌基因體組裝為單個或數個環狀 contigs，代表細菌染色體 DNA 與數個質體 DNA (Wick *et al*. 2015)，5.7 Mb 之 AAC_10001_01 contig 首尾沒有出現重疊序列，因此呈現線性，而 5.6 Mb 之 AAC_9906R_01 可順利組成環狀，後續便以上述 2 個 contigs 作為 AAC_10001 與 AAC_9906R 的染色體 DNA 進行分析。

AAC 菌株基因體 DNA 鹼基組成分析結果如圖 3A、B，AAC_10001 與 AAC_9906R 之 GC 含量，分別為 67.4% 及 67.5%。定序資料經 Bedtools 套件進行定序深度分析，*AAC* 基因體平均定序深度約為 230 倍，以 AAC_10001 為例 (圖 3C)，定序深度在基因體中分布相當均勻。在 Illumina 短讀序平台下，細菌基因體組裝之正確率，受到分析套件、定序覆蓋深度、品質過濾步驟，以及參考序列選擇等

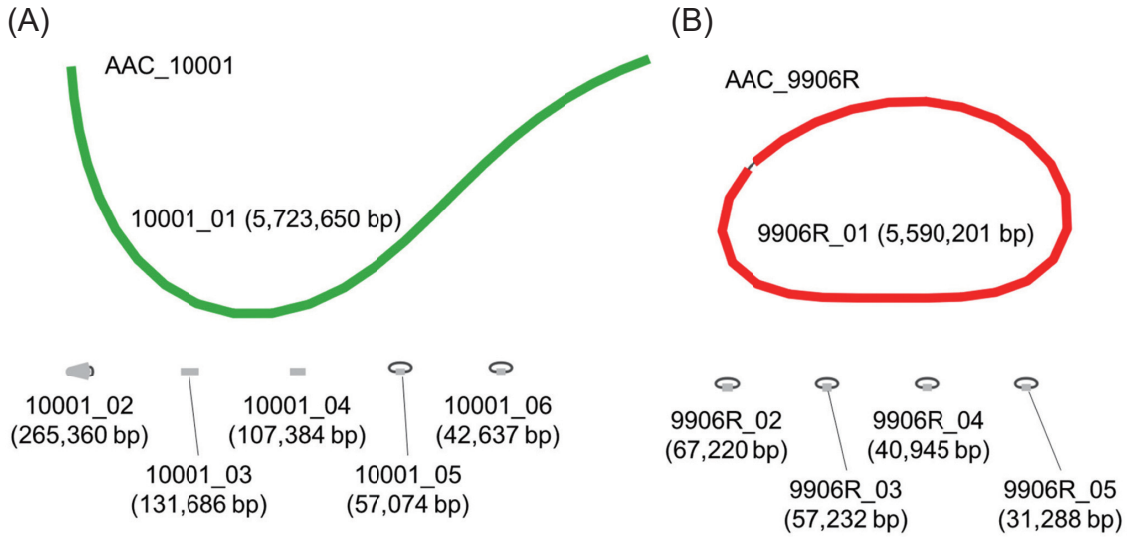


圖 2. *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*AAC*) 基因體序列 *de novo* 組裝結果。(A) 菌株 10001；(B) 菌株 9906R。

Fig. 2. *De novo* assembly graph of (A) *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*AAC*) starin 10001 and (B) strain 9906R genome.

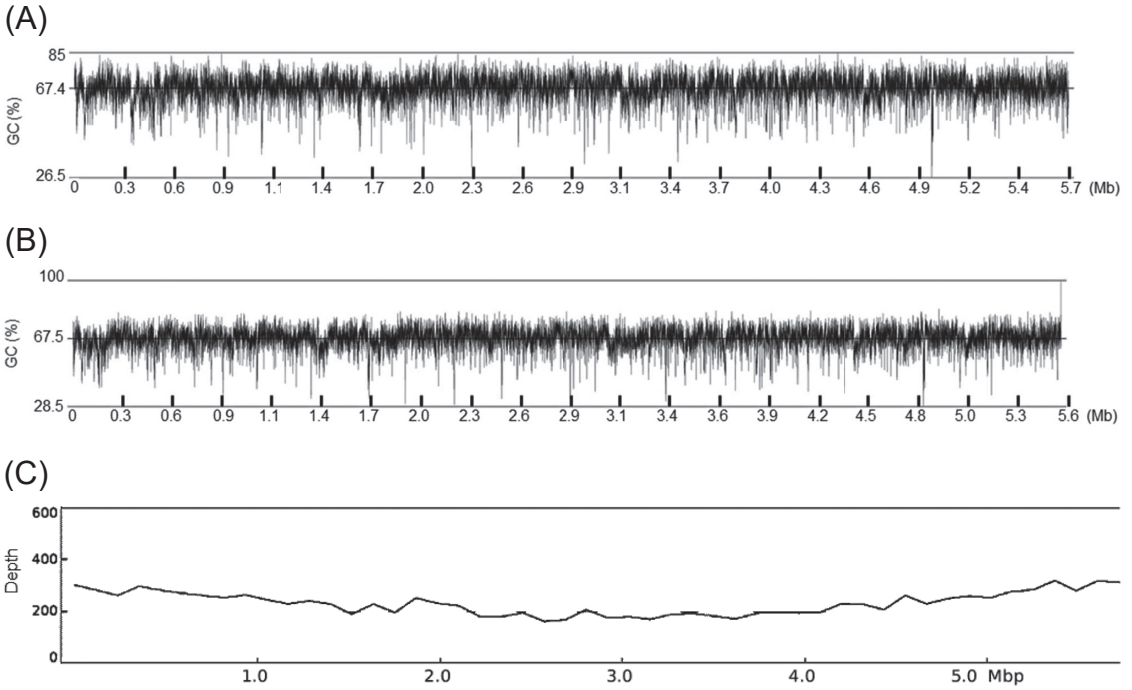


圖 3. *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*AAC*) 基因體解序 GC 含量分析與定序深度分析。(A) 菌株 10001 與 (B) 菌株 9906R 之 GC 含量分析；(C) AAC_10001 菌株基因組各區域定序深度。

Fig. 3. Results of guanine-cytosine (GC) content and sequencing depth across the assembly of (A) *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*AAC*) strain 10001 and (B) strain 9906R. (C) Read coverage distribution of AAC_10001.

影響；*Listeria monocytogenes* 解序資料配合參考序列進行組裝，顯示定序深度在 50 倍以上時，可得到 99.9% 組裝正確率 (Pightling *et al*. 2014)；ONT 定序平台需要更高的定序覆蓋深度，根據 Sutton *et al*. (2021) 的研究，*Escherichia coli* 基因體之 ONT 定序資料，以 Canu 或 Flye 套件進行組裝時，定序深度在 62 倍時，才可完成高連續性的基因體組裝，並建議以 ONT 定序平台資料進行基因體組裝時，定序覆蓋深度至少要達到 100 倍才會有可靠的結果。*Pseudomonas aeruginosa* 基因體組裝結果亦顯示，單獨使用 ONT 定序資料進行組裝，在 560 倍的超深覆蓋率情況下其正確率可達 99.8%，但深度增加並不能再提升正確率 (Molina-Mora *et al*. 2020)。

蝴蝶蘭褐斑病 *A. avenae* subsp. *Cattleyae* 命名最早由 Willems *et al*. (1992) 所發表，但近年利用 16S rDNA 進行基因型分析後，則建議將 *A. avenae* subsp. *Cattleyae* 修正為 *A. cattleyae* (Schaad *et al*. 2008)，美國國家生物技術資訊中心 (National center for biotechnology information; NCBI) 發佈之 *A. cattleyae* 參考序列註冊號為 NZ_CP028290，是來自 CAT98_1 菌株的 Illumina MiSeq 定序結果 (Zeng *et al*. 2017)。本研究比較 AAC_10001、AAC_9906R 與 CAT98_1 之序列，探討 ONT 長讀序組裝與 Illumina 短讀序組裝之差異 (表 2)。AAC_10001 與 AAC_9906R 基因體序列長度與 CAT98_1 相當接近，分別為 5.7、5.6 和 5.6 Mb，序列 GC 含量也近似，分別為 65.2、67.4 和 67.5%，但 CAT98_1 為短讀序組裝結果，其 contigs 數量為 428 個，較 AAC_10001 與 AAC_9906R 之 contig 數量多，且 gaps 共計 1.1 Mb，約占 CAT98_1 基因體序列之 20%。CAT98_1 基因體序列經 Prokka 套件註解，共包含 4,564 個編碼序列 (coding DNA sequence; CDS)、3 個 rRNA 序列，以及 53 個 tRNA 序列；本試驗完成之 *AAC* 基因體解序資料則有 8,630 個以上的 CDS，

表 2. *Acidovorax cattleyae* 菌株 CAT98_1、*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*AAC*) 菌株 10001 與菌株 9906R 基因體之解序與註解結果比較。

Table 2. Genome statistics of *Acidovorax cattleyae* strain CAT98_1, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*AAC*) strain 10001 and 9906R.

	Short reads	Long reads	
Item[z]	CAT98_1	AAC_10001	AAC_9906R
Total length (bp)	5,618,386	5,723,650	5,590,201
Total ungapped length (bp)	4,501,780	5,723,650	5,590,201
Gap ratio (%)	19.6	0	0
No. of contigs	428	1	1
Contig N50 (bp)	23,226	5,723,650	5,590,201
GC content (%)	65.2	67.4	67.5
No. of CDS	4,564	8,689	8,630
No. of rRNA	3	7	7
No. of tmRNA	1	1	1
No. of tRNA	53	36	35

[z] GC: guanine-cytosine; CDS: coding DNA sequence.

註解之 rRNA 與 tRNA 序列數量，分別為 7 個與 35 個。Weirather 等人的研究指出，ONT 長讀序組裝時最大的誤差來自鹼基錯配 (mismatch)，通常是鹼基判定異常所致 (Weirather *et al*. 2017)，這些錯配可能造成轉譯框架位移 (frameshift) 或提早出現終止子 (stop codon)，繼而影響基因體解序後的蛋白質預測 (Watson & Warr 2019)。僅使用 ONT (R9.4 版本) 長讀序組裝的情況下，50 倍覆蓋深度的 *E. coli* 基因體解序資料，錯誤率約為 12.5% (Dohm *et al*. 2020)，而 560 倍覆蓋深度的 *P. aeruginosa* 基因體解序資料，錯誤率降至 0.2% (Molina-Mora *et al*. 2020)，本試驗在相同定序平台下取得 230 倍覆蓋深度解序資料，以最高 99.8% 正確率進行估算，若細菌之平均基因長度為 1 kb，則每個基因可能出現 2 次誤配，導致框架位移或提早出現終止子，這可能是本試驗解序所得之 CDS 數量約為 CAT98_1 的 2 倍之原因。此外，短讀序組裝的高碎片化特徵，無法完整重建基因體的重複結構，高度重複出現的 rRNA 數量，與 CDS 數量通常被低估 (Molina-Mora *et al*. 2020)。

以 MUMmer 套件分析 AAC_10001、AAC_9906R 兩菌株基因體序列，與 CAT98_1 之序列差異，根據比對結果繪製共線性圖 (圖 4)，紅色點表示正義股 1 kb 以上之連續片段且具有 90% 之相似性，綠點則表示同源性片段出現在反義股，本研究解序之基因體結構與 CAT98_1 相近，僅少數位置發生倒位 (inversion)，並無大規模的基因重組 (圖 4)。MUMmer 採用修正 Smith-Waterman local alignment 演算法，利用錨點對齊的方式減少隨機序列比對的發生 (Delcher *et al*. 1999)，但 MUMmer 識別高度同源區域 (homologous sites) 設定錨點後，只能進行直系同源序列 (orthologous sequence) 與異源同源序列 (xenologous sequence) 之比對，卻無法進行旁系同源序列 (paralogous sequence) 或多拷貝之直系同源序列 (orthologous sequence) 之比對 (Darling *et al*. 2010)。本試驗另以 Mauve 套件進行 3 個基因體序列比對，Mauve 套件採用錨點對齊的方式提升運算效率，但較 MUMmer 有更寬鬆的比對規則，容許兩個或多個基因體共享同源序列區域，這些區域稱為局部共線區塊 (locally collinear blocks; LCB)，可在兩個或多個序列間進行局部比對，適合分析基因體之重新

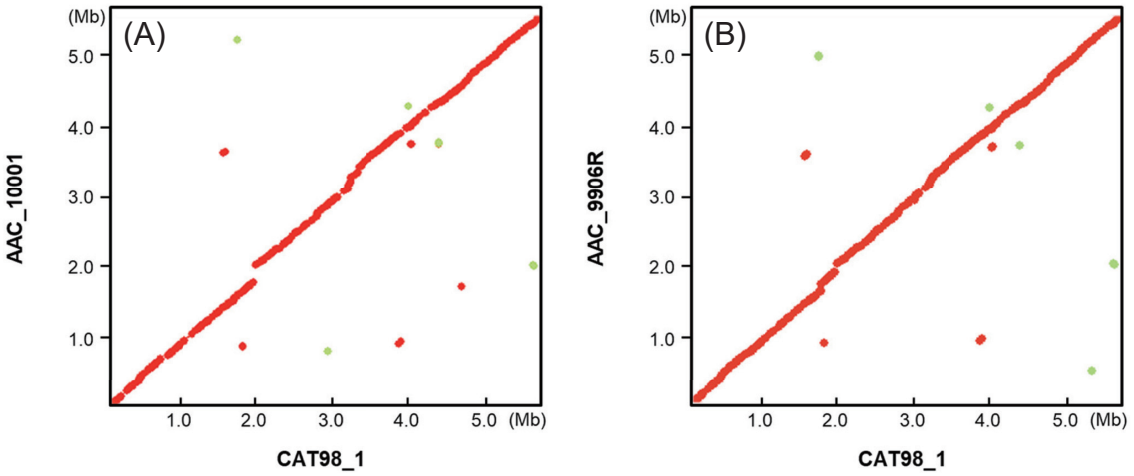


圖 4. *Acidovorax avenae* subsp. *Cattleyae* (*AAC*) 基因體解序資料與 *Acidovorax cattleyae* 菌株 CAT98_1 基因體序列比對結果。(A) 菌株 10001；(B) 菌株 9906R。

Fig. 4. Dot plot of a nucleotide-based alignment of *Acidovorax cattleyae* strain CAT98_1 chromosomal sequence with (A) *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*AAC*) strain 10001 and (B) strain 9906R. Aligned segments are represented as dots. Forward matches are plotted in red, reverse matches in green. Figures generated by MUM-mer.

排列、水平轉移或序列發生缺失 (deletion)、重複 (duplication) 現象的探討 (Darling *et al*. 2004)。本研究顯示蝴蝶蘭褐斑病基因體序列共有 12 個主要的 LCB，CAT98_1 缺少 LCB 2，而 AAC_10001 與 AAC_9906R 之 LCB 2 序列長度相差 132 kb，此外，CAT98_1 之 LCB 4 與 LCB 9 與本試驗長讀序組裝位置互換，但 LCB 序列長度一致 (圖 5A)。LCB 7–8 和 LCB 10–11 間，各有一群小於 1 kb 的 LCB 分布，其相對位置如圖 5B、C 所示。差異性片段利用 NCBI blastx 工具與 Refseq_protein 資料庫進行比對 (表 3)，推測 AAC_10001 菌株 LCB 2 可能有一個基因體島 (genomic island; GEI) 的遺傳元件插入，因為該片段長度介於 10–200 kb 間、含有一個 DNA 修復蛋白、一群參與第四型分泌系統 (type IV secretion system; T4SS) 的蛋白、一個整合酶 (integrase) 與一個轉位酶 (transposase)，符合 Juhas *et al*. (2009) 對 GEI 的特徵描述；此外，T4SS 可以協助 GEI 本身、質體 DNA 或是染色體 DNA 進行自我轉移、水平轉移或重組 (Hamilton *et al*. 2005)，可能影響菌株致病性、共生性、代謝特性、環境適應性或是對抗生素產生抗性。

結論

微生物基因體解序為研究細菌遺傳分類、族群演化和基因水平轉移的最佳策略，各類定序平台的快速進展，使我們可以快速地得到菌株基因體序列，瞭解基因體結構、基因重組、缺失、重複等基因型資料。奈米孔定序平台相較二代短片段定序平台，實務上具快速和低成本的優勢，可減少 PCR 擴增錯誤和高度重複區域對於基因體組裝的影響，非常適合進行細菌基因體之解序與組裝。本研究使用奈米孔定序平台進行蝴蝶蘭褐斑病基因體解序，建立細菌基因體長片段讀序生物資訊分析流程，由細菌核酸萃取至資料分析結束僅需 1 wk，並找到一個可能參與致病性或抗抗生素特性的 GEI，是國內蝴蝶蘭褐斑病細菌基因體研究之首例，期望提供國內蘭園準確診斷和長期監測的方向，有助強化國內溫室蝴蝶蘭病害防治工作。

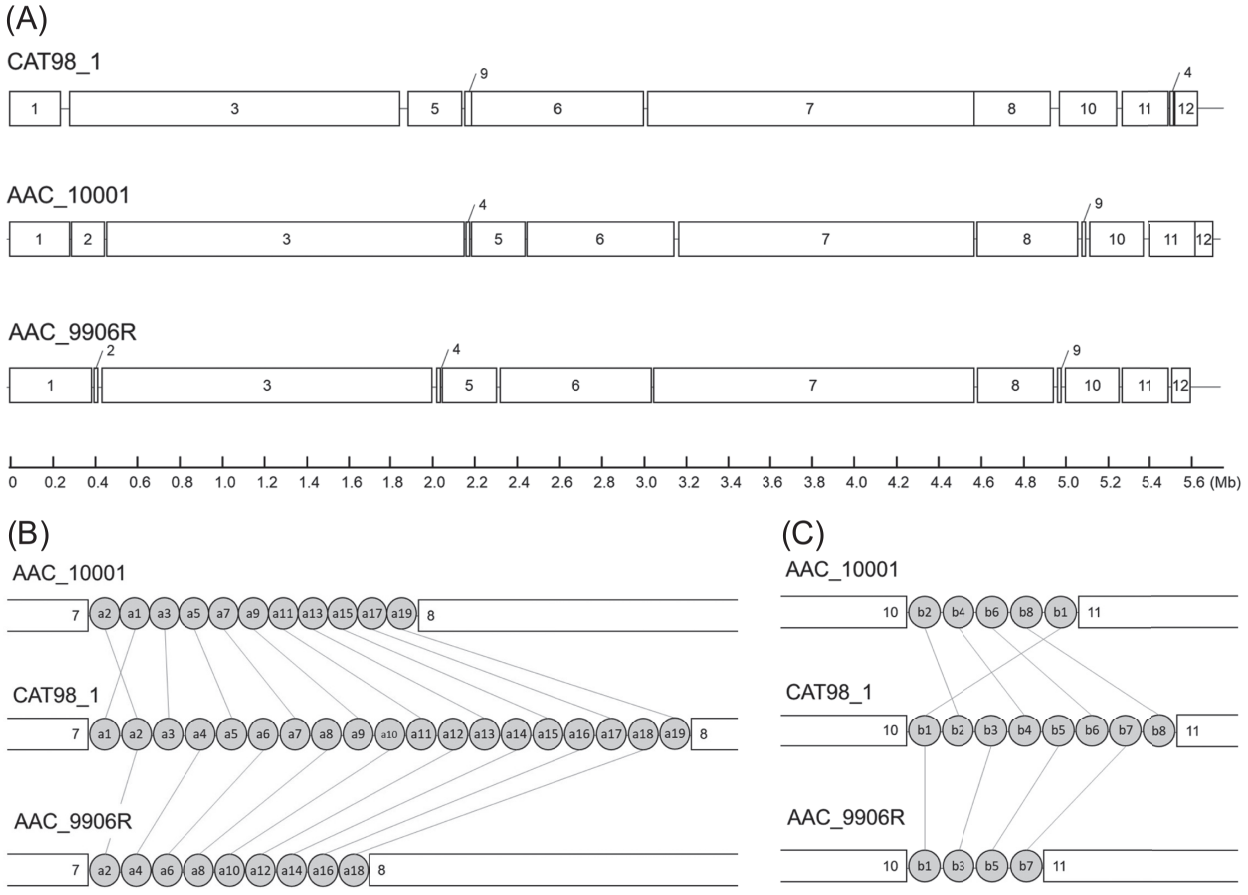


圖 5. *Acidovorax cattleyae* 菌株 CAT98_1、*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*AAC*) 菌株 10001 與菌株 9906R 基因體序列比對分析。(A) 以 Mauve 軟體分析共有 12 個局部共線性區塊 (LCBs)，另有兩群小於 1 kb 的 LCBs，分布於 (B) LCB 7−8 以及 (C) LCB 10−11 之間。

Fig. 5. Visualized genome alignment of the genome of *Acidovorax cattleyae* strain CAT98_1, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*AAC*) strain 10001 and strain 9906R. (A) In total, 12 locally collinear blocks (LCBs) were identified by Mauve and labelled in. There were two set of small LCBs (< 1 kb) located between (B) LCB 7−8 and (C) LCB 10−11.

表 3. *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*AAC*) 菌株 10001 與菌株 9906R 基因體註解結果。

Table 3. Annotation results of *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*AAC*) strain 10001 and 9906R.

	AAC_10001				AAC_9906R			
Location	Accession no.	Length	E-value	Description	Accession no.	Length	E-value	Description
LCB 2	WP_139160155.1	Full	8e-158	PLxRFG domain-containing protein	WP_218297416.1	Partial	2e-69	PLxRFG domain-containing protein
	WP_017438281.1	Full	2e-36	Endolysin	WP_017438281.1	Full	8e-37	Endolysin
	WP_011794861.1	Full	6e-30	DUF4376 domain-containing protein				
	WP_160853018.1	Partial	1e-47	DUF6361 family protein				
	WP_114865077.1	Partial	5e-36	Helicase				
	WP_157768779.1	Full	2e-21	SMI1/KNR4 family protein				
	WP_202907192.1	Partial	7e-17	DNA repair protein RadC				
	WP_111877013.1	Full	2e-120	Conjugal transfer protein TraH				
	WP_011804808.1	Full	9e-98	Type IV secretion system protein TraC				
	WP_011804801.1	Full	4e-81	Type-F conjugative transfer system mat-ing-pair stabilization protein TraN				
	WP_202907158.1	Full	4e-58	Conjugal transfer protein TraG N-ter-minal domain-containing protein				
	WP_162017004.1	Full	2e-53	Conjugal transfer protein TraF				
	WP_055397146.1	Full	8e-52	TraU family protein				
	WP_059400278.1	Full	1e-95	Conjugative transfer system coupling pro-tein TraD				
	WP_063460687.1	Full	2e-60	TraI domain-containing protein				
	WP_011804827.1	Full	1e-35	DUF932 domain-containing protein				
	WP_005792891.1	Full	1e-30	AcaB family transcriptional regulator				
	WP_107134185.1	Full	1e-27	SEC-C domain-containing protein				
	WP_107204843.1	Partial	4e-155	type VI secretion system tip protein VgrG				
	WP_059400388.1	Full	5e-54	ATP-dependent DNA helicase DinG				
	WP_011804837.1	Partial	6e-39	DUF1173 domain-containing protein				
	WP_055399654.1	Partial	4e-26	Fic family protein				
	WP_092939581.1	Full	2e-21	GNAT family N-acetyltransferase				
	WP_218300121.1	Partial	2e-15	HNH endonuclease				

表 3. Acidovorax avenae subsp. cattleyae (AAC) 菌株 10001 與菌株 9906R 基因體註解結果。(續)

Table 3. Annotation results of Acidovorax avenae subsp. cattleyae (AAC) strain 10001 and 9906R. (continued)

Location	AAC_10001				AAC_9906R			
	Accession no.	Length	E-value	Description	Accession no.	Length	E-value	Description
	WP_059400427.1	Partial	4e-61	ParB N-terminal domain-containing pro-tein				
	WP_059400429.1	Partial	2e-29	Integrase domain-containing protein				
	WP_059400431.1	Full	3e-54	PRTRC system protein D				
	WP_108625398.1	Full	4e-77	IS5 family transposase				
	WP_092840623.1	Full	3e-37	IPTL-CTERM sorting domain-con-taining protein	WP_092840623.1	Full	2e-36	IPTL-CTERM sorting domain-con-taining protein
	WP_092839864.1	Partial	1e-78	Methyl-accepting chemotaxis protein	WP_056669722.1	Full	4e-38	Tripartite tricarboxylate transporter per-mease
	WP_196289847.1	Full	3e-64	Type 1 glutamine amidotransferase	WP_196289847.1	Full	3e-47	Type 1 glutamine amidotransferase
	WP_196289848.1	Partial	3e-48	Polyhydroxyalkanoate synthesis re-pressor PhaR				
LCB 7–8	WP_092745669.1	Full	1e-24	Chemotaxis response regulator CheY	WP_092835370.1	Full	1e-17	Protein phosphatase CheZ
	WP_092835372.1	Full	3e-61	EscU/YscU/HrcU family type III se-cretion system export apparatus switch protein	WP_218296960.1	Full	4e-41	Flagellar type III secretion system pro-tein FlhB
	WP_196290539.1	Partial	6e-111	Flagellar biosynthesis protein FlhA	WP_196290539.1	Partial	5e-111	Flagellar biosynthesis protein FlhA
LCB 10–11	WP_092840645.1	Full	6e-75	DUF6402 family protein	WP_107204716.1	Full	8e-06	ArgE/DapE family deacylase
	WP_107204716.1	Full	3e-17	ArgE/DapE family deacylase	WP_175503168.1	Full	2e-05	M20/M25/M40 family metallo-hydro-lase
	WP_175503168.1	Full	2e-14	M20/M25/M40 family metallo-hydro-lase	WP_092840645.1	Full	8e-35	DUF6402 family protein

引用文獻

Amarasinghe, S. L., S. Su, X. Dong, L. Zappia, M. E. Ritchie, and Q. Gouil. 2020. Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis. Genome Biol. 21:30. doi:10.1186/s13059-020-1935-5

Darling, A. C. E., B. Mau, F. R. Blattner, and N. T. Perna. 2004. Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. Genome Res. 14:1394−1403. doi:10.1101/gr.2289704

Darling, A. E., B. Mau, and N. T. Perna. 2010. ProgressiveMauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. PLoS One 5:e11147. doi:10.1371/journal.pone.0011147

Delcher, A. L., S. Kasif, R. D. Fleischmann, J. Peterson, O. White, and S. L. Salzberg. 1999. Alignment of whole genomes. Nucleic Acids Res. 27:2369−2376. doi:10.1093/nar/27.11.2369

Ding, C. Z., W. J. Zhao, D. Y. Cun, H. Y. Chen, and S. F. Zhu. 2010. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* by real-time fluorescent PCR. Acta Phytopathol. Sin. 40:235–241. (in Chinese with English abstract)

Dohm, J. C., P. Peters, N. Stralis-Pavese, and H. Himmelbauer. 2020. Benchmarking of long-read correction methods. NAR Genom. Bioinform. 2(2):lqaa037. doi:10.1093/nargab/lqaa037

Hamilton, H. L., N. M. Domínguez, K. J. Schwartz, K. T. Hackett, and J. P. Dillard. 2005. *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. Mol. Microbiol. 55:1704−1721. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04521.x

Hseu, S. H., C. J. Sung, and H. Shentu. 2011. A specific primer pair for diagnosis and detection of bacterial brown spot pathogen: *Acidovorax avenae* subsp. *Cattleyae* on *Phalaenopsis* orchid. Plant Pathol. Bull. 20:52−64. (in Chinese with English abstract) doi:10.6649/PPB.201106_20(1_2).0006

Huang, C. J., T. L. Wu, P. X. Zheng, J. Y. Ou, H. F. Ni, and Y. C. Lin. 2021. Comparative genomic analysis uncovered evolution of pathogenicity factors, horizontal gene transfer events, and heavy metal resistance traits in citrus canker bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Front. Microbiol. 12:731711. doi:10.3389/fmicb.2021.731711

Huang, T. C. 2001. Brown spot. p.51−56. *in*: Plaint Protection Illustrated Handbook 6: Orchid Protection. (Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, ed.) Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine. Taipei, Taiwan. 127 pp. (in Chinese)

Juhas, M., J. R. van der Meer, M. Gaillard, R. M. Harding, D. W. Hood, and D. W. Crook. 2009. Genomic islands: Tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. FEMS Microbiol. Rev. 33:376−393. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x

Li, T., R. Mann, T. Sawbridge, J. Kaur, D. Auer, and G. Spangenberg. 2020. Novel *Xanthomonas* species from the perennial ryegrass seed microbiome-assessing the bioprotection activity of non-pathogenic relatives of pathogens. Front. Microbiol. 11:1991. doi:10.3389/fmicb.2020.01991

Mechan Llontop, M. E., P. Sharma, M. Aguilera Flores, S. Yang, J. Pollok, L. Tian, C. Huang, S. Rideout, L. S. Heath, S. Li, and B. A. Vinatzer. 2020. Strain-level identification of bacterial tomato pathogens directly from metagenomic sequences. Phytopathology 110:768−779. doi:10.1094/PHYTO-09-19-0351-R

Molina-Mora, J. A., R. Campos-Sánchez, C. Rodríguez, L. Shi, and F. García. 2020. High quality 3C *de novo* assembly and annotation of a multidrug resistant ST-111 *Pseudomonas aeruginosa* genome: Benchmark of hybrid and non-hybrid assemblers. Sci. Rep. 10:1392. doi:10.1038/s41598-020-58319-6

Payne, A., N. Holmes, V. Rakyan, and M. Loose. 2019. BulkVis: A graphical viewer for Oxford nanopore bulk FAST5 files. Bioinformatics 35:2193−2198. doi:10.1093/bioinformatics/bty841

Pightling, A. W., N. Petronella, and F. Pagotto. 2014. Choice of reference sequence and assembler for alignment of *Listeria monocytogenes* short-read sequence data greatly influences rates of error in SNP analyses. PLoS One 9:e104579. doi:10.1371/journal.pone.0104579

Schaad, N. W., E. Postnikova, A. Sechler, L. E. Claflin, A. K. Vidaver, J. B. Jones, I. Agarkova, A. Ignatov, E. Dickstein, and B. A. Ramundo. 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. Avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* (Schaad *et al*., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol. 31:434−446. doi:10.1016/j.syapm.2008.09.003

Sutton, J. M., J. D. Millwood, A. Case Mccormack, and J. L. Fierst. 2021. Optimizing experimental design for genome sequencing and assembly with Oxford Nanopore Technologies. Gigabyte 2021:1−26. doi:10.46471/gigabyte.27

Watson, M. and A. Warr. 2019. Errors in long-read assemblies can critically affect protein prediction. Nat. Biotechnol. 37:124−126. doi:10.1038/s41587-018-0004-z

Weirather, J. L., M. de Cesare, Y. Wang, P. Piazza, V. Sebastiano, X. J. Wang, D. Buck, and K. F. Au. 2017. Comprehensive comparison of Pacific Biosciences

and Oxford Nanopore Technologies and their applications to transcriptome analysis. F1000Research 6:100. doi:10.12688/f1000research.10571.2

Wick, R. R., M. B. Schultz, J. Zobel, and K. E. Holt. 2015. Bandage: Interactive visualization of *de novo* genome assemblies. Bioinformatics 31:3350−3352. doi:10.1093/bioinformatics/btv383

Willems, A., M. Goor, S. Thielemans, M. Gillis, K. Kersters, and J. De Ley. 1992. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. Int. J. Syst. Bacteriol. 42:107−119. doi:10.1099/00207713-42-1-107

Yang, R., D. Santos Garcia, F. Pérez Montaño, G. M. da Silva, M. Zhao, I. Jiménez Guerrero, T. Rosenberg, G. Chen, I. Plaschkes, S. Morin, R. Walcott, and S. Burdman. 2019. Complete assembly of the genome of an *Acidovorax citrulli* strain reveals a naturally occurring plasmid in this species. Front. Microbiol. 10:1400. doi:10.3389/fmicb.2019.01400

Yoshii, A., T. Omatsu, Y. Katayama, S. Koyama, T. Mizutani, H. Moriyama, and T. Fukuhara. 2015. Two types of genetic carrier, the IncP genomic island and the novel IncP-1β plasmid, for the *aac(2')-IIa* gene that confers kasugamycin resistance in *Acidovorax avenae* ssp. *avenae*. Mol. Plant Pathol. 16:288−300. doi:10.1111/mpp.12182

Zeng, Q., J. Wang, F. Bertels, P. R. Giordano, M. I. Chilvers, R. B. Huntley, J. M. Vargas, G. W. Sundin, J. L. Jacobs, and C. H. Yang. 2017. Recombination of virulence genes in divergent *Acidovorax avenae* strains that infect a common host. Mol. Plant Microbe Interact. 30:813−828. doi:10.1094/mpmi-06-17-0151-r

De novo Genome Assembly of the *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* by Using the Nanopore-Based DNA Sequencing Technology

Yuan-Kai Tu[1], Chia-Hsin Tsai[2], Yen-Chun Lin[3], Po-Chun Ou[3], and Han-Wei Chen[1,*]

Abstract

Tu, Y. K., C. H. Tsai, Y. C. Lin, P. C. Ou, and H. W. Chen. 2022. *De novo* genome assembly of the *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* by using the nanopore-based DNA sequencing technology. J. Taiwan Agric. Res. 71(2):171–183.

In Taiwan, orchids takes the lead in floral exports, with the value reaching NTD 4 billion in 2020. However, the orchid bacterial brown spot disease caused by *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*AAC*) is commonly observed in greenhouses. The combination of warm temperature and high humidity provides the optimum conditions for brown spot disease outbreak, resulting in the low-export quality of orchids. In this study, two *AAC* strains were sequenced using nanopore-based sequencing technology. Overall, the average read length and read quality of AAC_10001 and AAC_9906R were 1.49 Gb, 18.7 kb, 11.9 and 1.96 Gb, 17.29 kb, 12.3, respectively. The results showed high contiguity of DNA quality. After *de novo* genome assembly, 6 and 5 contigs were obtained for AAC_10001 and AAC_9906R, in which the largest contig was 5.7 Mb and 5.6 Mb with 67.4% and 67.5% guanine-cytosine (GC) content, and the average sequencing depths for both largest contigs were 230×. Genome structure comparison revealed 12 locally collinear blocks (LCBs) in AAC_10001 and AAC_9906R. We found a putative 132 kb genomic island (GEI) in LCB2 of AAC_10001, harboring a DNA repair protein, a cluster type IV secretory system proteins, an integrase and a transposase. GEI plays a critical role in the bacterial evolution of pathogenicity, symbiosis, metabolism, environmental adaptation, and antibiotics resistance. In this research, we first present a reliable long-read *de novo* assembly pipeline for *AAC* genome study by using nanopore sequencing data only. This could provide fundamental knowledge for strain detection, identification or long-term monitoring and give us a perspective disease prevention strategy to adopt.

Key words: Nanopore sequencing, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, Genome assembly, Bacterial antibiotic resistance.

Received: March 15, 2021; Accepted: November 18, 2021.
* Corresponding author, e-mail: swaychen@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[3] Project Assistants, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Hsieh, Ting-Fang
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chang, Ruey-Jang
Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute

Chang, Yung-Ho
Department of Food and Nutrition, Providence University

Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Iou-Zen
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Chen, Suming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University

Chung, Wen-Hsin
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Do, Yi-Yin
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Huang, Biing-Wen
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Huang, Yuh-Ming
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Juang, Kai-Wei
Department of Agronomy, National Chiayi University

Ku, Hsin-Mei
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Kuo, Bau-Jeng
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Lin, Huey-Ling
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Lin, Yann-Rong
Department of Agronomy, National Taiwan University

Liu, Li-Yu
Department of Agronomy, National Taiwan University

Lu, Hsiu-Ying
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station

Lu, Kuang-Hui
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute

Tzou, Yu-Min
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Yang, Chwen-Ming
Department of Post Modern Agriculture, MingDao Unviersity

Yang, Jeng-Tze
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Yen, Gow-Chin
Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University

English Editorial Board

Chang, Chung-Jan
Department of Plant Pathology, University of Georgia, USA

Chung, Kuang-Ren
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Wang, Yin-Tung
Department of Horticultural Sciences, Texas A&M University, USA

Yang, Chin-Cheng Scotty
Department of Entomology, Virginia Polytechnic Institute and State University, USA

Invited Editor

Yeh, Hsin-Hung
Agricultural Biotechnology Research Center, Academia Sinica

Editorial Assistants

Wang, Li-Jung
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Wang, Zi-Yu
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Consultants to Editorial Office

Chen, Lit-Fu
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 71 No. 2 June 30, 2022

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Publisher	Hsueh-Shih Lin
Editor-in-Chief	Ting-Fang Hsieh
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 413008, Taiwan, ROC
Website	https://www.tari.gov.tw/jtar; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	https://www.ipress.tw/J0042
Press	Ainosco Press
Address	18F, No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 234634, Taiwan, ROC
Tel	+886-2-2926-6006
E-mail	press@airiti.com
Price	NT$ 175 (per copy)
Distributor	1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 104472, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 400002, Taiwan, ROC Tel: +886-4-2226-0330