台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.66 No.3 2017

Research Articles

171 Anthracnose of Pitaya (*Hylocereus* spp.) Caused by *Colletotrichum* spp., A New Postharvest Disease in Taiwan
Chu-Ping Lin, Pao-Jen Ann, Hung-Chang Huang, Jay-Ting Chang, and Jyh-Nong Tsai

184 Development of Microspore Embryogenesis and Plant Regeneration of *Brassica oleracea* var. *italica*
Chi-Ni Hsia, Uei-Chern Chen, Chin-Yi Tsao, and Yi-Mei Chou

193 Screening the Culture Substrates for Endophytic Fungi, *Lasmenia* sp. CB10, and Evaluation of Its Effect on Control of Tomato Fusarium Wilt
Pei-Hsin Lo, Wen-Chuan Chung, and Wen-Hsin Chung

202 Development and Application of the Molecular and Serological Detection Methods for *Cymbidium ringspot virus*
Chin-Chih Chen and Fen-Lang Chiang

219 The Influence of Soil Physical and Chemical Properties on the Development of Bakanae Disease of Rice
Su-Chen Lin, Chun-Yu Zheng, Chao-Yi Wang, Chi-Yu Chen, and Wei-Lun Lin

230 Seed Transmissibility and Detection of *Zucchini yellow mosaic virus* in Cucurbits
Ting-Chin Deng, Chin-Hui Tsai, Yi-Ting Lin, and Chien-Ming Chou

240 Effects of Plant Growth Regulators on the Mycelia Growth and Fruit Body Formation of *Pleurotus ostreatus* in Liquid Medium
Sian-Yi Ciou, Yi-Zhen Zhao, Ya-Han Chang, Chin-Hsiung Hung, and Li-Ru Chen

248 A Novel *Indica* Rice Breeding Line Selection with Low Cadmium Accumulation Level by Functional Markers Assisted Backcross Strategy
Pi-Jen Wu, Yu-Wen Lin, Charng-Pei Li, Chien-Hui Syu, Woei-Shyuan Jwo, Hsing-Mu Yen, Horng-Yuh Guo, Ming-Hsin Lai, and Dong-Hong Wu

Short Communication

261 Inhibition on Osteoclasts Activity of *Auricularia polytricha* Extracts
Shu-Hui Yang, Hui-Ting Yang, and Hung-Chun Liu

ISSN 0022-4847

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究 JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH Vol.66 No.3 2017

ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.66 No.3 2017

研究報告

171 台灣新紀錄之引起採收後紅龍果炭疽病之*Colletotrichum* spp.
林筑蘋、安寶貞、黃鴻章、張捷婷、蔡志濃

184 青花菜小孢子培養之胚誘導及胚發芽條件建立
夏奇鈱、陳威臣、曹進義、周宜玫

193 內生真菌 *Lasmenia* sp. CB10菌株培養基質之篩選暨評估其防治番茄萎凋病之潛力
羅佩昕、鍾文全、鍾文鑫

202 *Cymbidium ringspot virus* 核酸及血清檢測法之建立及其應用
陳金枝、江芬蘭

219 土壤理化性質對水稻徒長病發生之影響
林素禎、鄭春玉、王朝儀、陳啟予、林璋倫

230 矮南瓜黃化嵌紋病毒 (ZYMV) 經瓜類種子傳播的特性及其檢測
鄧汀欽、蔡錦慧、林羿廷、周建銘

240 植物生長調節劑對液體培養基蠔菇菌絲生長及出菇之影響
邱獻毅、趙苡蓁、張雅涵、洪進雄、陳麗如

248 以功能性分子標誌輔助回交策略選育具低鎘累積能力之秈稻新品系
吳佩真、林毓雯、李長沛、許健輝、卓緯玄、顏信沐、郭鴻裕、賴明信、吳東鴻

研究簡報

261 木耳萃取物抑制蝕骨細胞活性
楊淑惠、楊惠婷、劉虹君

行政院農業委員會農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

楊純明／農業試驗所作物組

領域主編（按筆劃序）

王強生／國立中興大學農藝學系
王淑珍／國立台灣大學農藝學系
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
吳文哲／國立台灣大學昆蟲學系
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
沈偉強／國立台灣大學植物病理與微生物學系
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
柯俊成／國立台灣大學昆蟲學系
高景輝／國立台灣大學農藝學系
張永和／靜宜大學食品營養系
張瑞璋／農業試驗所植物病理組
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
陳世銘／國立台灣大學生物產業機電工程學系
陳右人／國立台灣大學園藝暨景觀學系
陳宗禮／國立中興大學農藝學系
陳郁蕙／國立台灣大學農業經濟學系
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
曾夢蛟／國立中興大學園藝學系
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
黃鵬林／國立台灣大學園藝暨景觀學系
楊正澤／國立中興大學昆蟲學系
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
簡立賢／國立中興大學應用經濟學系
顏國欽／國立中興大學食品暨應用生物科技學系

編輯助理

吳惠卿／農業試驗所技術服務組
顧佩容／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
王立蓉／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

編輯助理顧問

吳宜晏／農業試驗所技術服務組

台灣農業研究

第六十六卷　第三期　　中華民國一〇六年九月三十日

出版者　行政院農業委員會農業試驗所
發行人　陳駿季
總編輯　楊純明
地址　41362 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　http://www.tari.gov.tw
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　http://aspers.airiti.com/JTAR

編印　Airiti Press Inc.
地址　23452 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／ 10485 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／ 40042 台中市中山路 6 號／電話 : (04) 2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 66(3):171–183 (2017)
DOI: 10.6156/JTAR/2017.06603.01

Research Article

Anthracnose of Pitaya (*Hylocereus* spp.) Caused by *Colletotrichum* spp., A New Postharvest Disease in Taiwan

Chu-Ping Lin[1], Pao-Jen Ann[2], Hung-Chang Huang[3, 4], Jay-Ting Chang[5], and Jyh-Nong Tsai[6,*]

Abstract

Lin, C. P., P. J. Ann, H. C. Huang, T. T. Chang, and J. N. Tsai. 2017. Anthracnose of pitaya (*Hylocereus* spp.) caused by *Colletotrichum* spp., a new postharvest disease in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 66(3):171–183.

Pitaya (*Hylocereus undatus*, *H. polyrhizus*, and *H. costaricensis*) has been widely planted as a fruit crop in Taiwan in the past three decades. Field survey in pitaya orchards during 2009 to 2013 showed that anthracnose of pitaya caused by *Colletotrichum* spp. was one of the major postharvest diseases in Taiwan. Disease symptoms encompassed brown colored sunken spots with or without water-soaked necrosis on the harvested fruits skin after storing at room temperature for 5–10 d, which apparently shortening the marketable period and reducing the price of the harvested fruits. Based on morphological characteristics and ITS region sequences, at least three species of *Colletotrichum* isolated from diseased fruits of pitaya collected from orchards in Taiwan were identified, including *C. truncatum* and 2 species within each respective *C. gloeosporioides* and *C. boninense* species complex, with isolation frequencies of 21.8, 73.4, and 4.8%, respectively, during 2009 to 2013. However, to precisely discriminate the *Collectotrichum* species within each respective *C. gloeosporioides* and *C. boninense* species complex, further multi-locus phylogenetic analyses are mandatory in the future. This is the first report of anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. as an important postharvest disease of pitaya in Taiwan.

Key words: *Hylocereus* spp., Postharvest disease, Anthracnose, *Colletotrichum* spp.

INTRODUCTION

Pitaya [*Hylocereus undatus* (Haworth) Britton & Rose, *H. polyrhizus* (Weber) Britt. & Rose, and *H. costaricensis* (F.A.C. Weber) Britton & Rose], also known as dragon fruit, has become an economically important fruit crop, and has been widely cultivated in Taiwan in the past three decades (Liu & Liu 2015). The period for fruit production of pitaya was mainly in the summer months (Jun. to Sep.), with average temperature 28–32℃. According to our observation, severe economic losses could occurr during storage, transportation, and marketing of harvested pitaya fruits which were under room temperature (RT, 24–32℃) and high humidity, conditions conducive to the development of postharvest diseases.

A postharvest disease with light brown lesions on pitaya fruits caused by *Bipolaris cactivora* (Petr.) Alcorn was previously reported in Taiwan by Wang & Lin (2005). However,

Received: July 26, 2016; Accepted: December 20, 2016.
* Corresponding author, e-mail: TsaiJN@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Former Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Former Research Fellow, Lethbridge Research and Development Centre, Agriculture & Agri-Food Canada, Canada, Lethbridge.
[4] Visiting Chair Professor, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[5] Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[6] Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

symptoms on some specimens of pitaya fruits collected in 2009 in the pitaya production orchards in Taiwan were different from the previously reported postharvest disease of pitaya caused by *B. cactivora* (Wang & Lin 2005). Further disease survey in this paper revealed that anthracnose was frequently found on harvested fruits of pitaya stored at room temperature in Taiwan.

The objective of this study was to report anthracnose as a new postharvest disease of pitaya in Taiwan, based on disease survey, isolation and identification of the causal organisms, conducting pathogenicity tests to fulfill Kock's postulates, examining of morphological traits and rDNA ITS sequences blasting and preliminary phylogenetic analysis.

MATERIALS AND METHODS

Field survey on postharvest diseases of pitaya

Field surveys on postharvest diseases of pitaya, *H. undatus*, *H. polyrhizus*, and *H. costaricensis*, were conducted from 2009 to 2013. During the experimental period, there were 12 pitaya orchards in total in the major pitaya production areas in Taiwan, including two orchards in each county of Changhua, Hualien, Nantou, and Pingtung, and one orchard in each county of Chiayi, Taichung, Tainan, and Yilan. Thirty freshly harvested fruits of pitaya without visible lesions were collected from each orchard and stored at room temperature (RT) for 5 to 15 days during fruit production period (Jun. to Sep.). Fruits showing symptoms of brown colored sunken spots were recorded, followed by isolation and identification of the disease causal agents.

Isolation and maintenance of the disease causal agents

Tissues (0.5 cm × 0.5 cm × 0.2 cm; L × W × H) were excised from lesions of diseased pitaya fruits, and immersed in 0.5% (v/v) NaOCl for 30 s, then overlaid on potato dextrose agar (PDA; Difco Co., USA) in Petri dishes, 1 diseased tissue/dish. The plates were incubated for 3 d at 22–24℃ under 12 h/12 h light/dark period. Once the hyphae emerged from tissues and spread onto agar media, small agar blocks containing hyphal tips were cut and transferred onto PDA media. By colony features on agar media and conidial morphology under microscopy, the fungi isolates preliminarily identified as *Colletotrichum* spp were further purified by single-spore isolation technique to establish axenic culture. A total of 124 single spore isolates of *Colletotrichum* spp. were obtained and cultured on PDA at 22–24℃ under 12 h/12 h light/dark period for 7 d. Agar plugs (0.5 cm × 0.5 cm × 0.2 cm; L × W × H) containing mycelial mats were excised from the edge of 5-day-old colony on PDA in Petri dishes, and immersed in mineral oil (Sigma-Aldrich., USA) in plastic tubes (7–10 plugs/tube), sealed with parafilm™, and kept at 22–24℃ for long-term storage. For each working culture preparation, one mycelial plug of each isolate was retrieved from one long-term storage vial, subcultured on PDA plate, and incubated at 22–24℃ under 12 h/12 h light/dark period for 7 d.

Morphology and growth of *Colletotrichum* spp.

To study the effects of temperature on growth of *Colletotrichum* isolates F211117, F211178, and F210016, agar blocks (0.5 cm × 0.5 cm × 0.2 cm; L × W × H) containing mycelial mats were cut from the colony edge of 5-day-old PDA cultures in Petri dishes and inoculated on fresh PDA Petri dishes center, 1 block/dish. The dishes were sealed with parafilm™ and incubated differently at 4 to 40℃ with 4℃ intervals in dark. Colony diameter of each dish was measured daily for a period of 7 d. Growth rate (mm/day) of each colony was calculated by: (colony diameter of the 7th day – colony diameter of the 1st day)/6 days. Experiments were repeated twice, each isolate with three replicates at each temperature.

For conidial propagation, the 3 *Colletotrichum* isolates were grown on PDA in Petri

dishes at 22–24℃ under 12 h/12 h light/dark period. After incubation for 7 d, conidia were harvested by washing the colony with sterilized double distilled water (ddH_2O), 15 mL/dish. To study conidia and appressoria morphological characteristics of the Collectotrichum species, the conidia were suspended in 0.5% V8 juice (Campbell Co., USA), pipetted onto glass slide, 20 μL/slide, then superposed on wet tissue in a Petri dish sealed with parafilm™, and incubated at 24℃ in dark for 20 h or 60 h. Totally, 100 conidia and 100 appressoria were randomly selected and examined for color, size, shape and length/width (L/W) ratio under a compound light microscope (Olympus BX40).

rDNA ITS blasting and phylogentic analysis

Mycelial mats of *Colletotrichum* isolates F211117, F211178, and F210016, were collected from 5-day-old PDA cultures and used for extraction of DNA, using Genomic DNA Purification Kit (GeneMark Technology Co., Taiwan) according to the manufacturer's protocol. The primers ITS5/ITS4 for internal transcribed spacer (ITS; White *et al*. 1990) were used for polymerase chain reaction (PCR) under the recommended PCR conditions. The PCR amplicons were sequenced in both directions by the Seeing Bioscience Co., Taipei, Taiwan. DNA sequences were assembled by Vector NTI software v. 10.0 (InforMax Inc., USA). The sequences were uploaded to GenBank and NCBI BLAST database (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) to blast the best hit. Multiple sequence alignment based on ITS sequences was performed initially by Clustal Omega. A distance tree generated by the neighbour-joining (NJ) algorithm estimated by bootstrapping with 1,000 replicates was built by MEGA v.7.0 (Kumar *et al*. 2016).

Pathogenicity test

To prove the pathogenicity of the 3 *Colletotrichum* isolates, F211117, F211178, and F210016, Koch's postulates tests were conducted using freshly harvested fruits of *H. undatus*. In brief, twenty days prior to harvesting, the fruits selected for pathogenicity tests were covered individually with paper bags mainly to prevent latent infection by *Collectotrichum* pathogens during fruit growing stage in the orchard. Conidia were collected from 7-day-old PDA cultures in Petri dishes by washing the colonies with sterilized ddH_2O. The conidial suspension was filtered through 8-layer sterilized gauze, and adjusted concentration to 1×10^6 conidia/mL using sterilized ddH_2O. For each isolate, cotton mats, about 1 cm in diameter, were soaked in conidial suspension as inoculums. Two pitaya fruits of each set were respectively inoculated two sites with or without wounding. Twenty wounded spots were created by puncturing the fruit skin about 1 mm in depth with a bundle of 10-insect dissecting needles. Each site was covered with one cotton mat mentioned above which absorbed the conidial suspension. Instead, cotton mats soaked with sterilized ddH_2O was served as control. The inoculated fruits were placed in a plastic box moisture chamber (32 cm × 20.5 cm × 10 cm, L × W × H) bottom overlaid with moist paper towel, 2 fruits in a chamber. The chamber were covered with lid for maintaining high relative humidity (> 95%), and incubated at RT for 4 to 6 d, thereafter examined the presence of lesions on each fruit. Lesion showing anthracnose symptoms on each inoculation site were excised for pathogen reisolation by the methods described previously. Disease incidence (DI) was calculated by the formula: DI (%) = (No. of infected sites)/(Total No. of inoculated sites) × 100 (%). The inoculation tests were repeated two times.

RESULTS

Disease survey and symptoms on pitaya fruits in storage

The survey results from 2009 to 2013 showed that anthracnose disease was the most important postharvest disease of pitaya in

Taiwan. Survey the total 360 fruits, collected from 12 different orchards and stored at RT, 73.1% of the fruit samples showed symptoms of anthracnose. Symptoms first appeared on cutting sites or scales of pitaya fruits stored at RT for 5 to 10 days. Light brown colored, water-soaked sunken spots were formed on the surface of diseased fruits, producing of grayish to pinkish spore masses on some of the lesions under humid conditions (Fig. 1). Lesions on fruits often expanded and coalesced, causing fruit scales withering and fruits watery and softening. Beside the typical symptoms mentioned above (Fig. 1A), some diseased fruits produced black microsclerotia, setae and acervuli (Fig. 1B), and some showed light to dark brown lesions (Fig. 1C).

Isolation and preliminary identification of the fungi isolates

In addition to the 12 orchards investigated during the field survey in 2009 to 2013, pitaya fruits from other orchards and market showed anthracnose symptoms were also selected for isolation of causal agents. A total of 124 fungal isolates were isolated from pitaya fruits and established pure cultures by single-spore isolation technique. All the 124 isolates were identified as *Colletotrichum* spp. according to the colony features on PDA media and conidial morphology. Three major types of conidia were found among these *Colletotrichum* isolates (Table 1). Isolates belonging to conidial type 1 produced straight cylindrical shaped conidia, average L/W ratio > 2.5 and < 3.5; isolates belonging to conidial type 2 produced long falcate conidia, average L/W ratio > 6.5 and < 7.5; isolates belonging to conidial type 3 produced straight cylindrical shaped conidia, average L/W ratio > 1.5 and < 2.5, which were shorter and wider than those of conidial type 1 in general. Of the 124 single-spore isolates of *Colletotrichum* from pitaya fruits, the isolation frequencies of conidial types 1, 2, and 3 were 73.4, 21.8 and 4.8%, respectively (Table 1).

Colonial and microscopic characteristics of *Colletotrichum* isolates

Three *Colletotrichum* isolates, F211117, F211178, and F210016, belonging to conidial types 1, 2 and 3, respectively, were selected for subsequent studies. The three isolates grown on PDA at RT for 7 days showed differences in colonial morphology. Colonies of isolate F211117 were greyish white to dark grey, formed aerial mycelia initially (Fig. 2A), later produced massive orange color conidia. Colonies of isolate F211178 were greyish to greenish white, cottony to floccose (Fig. 2B). Colonies of isolate F210016 were smooth and

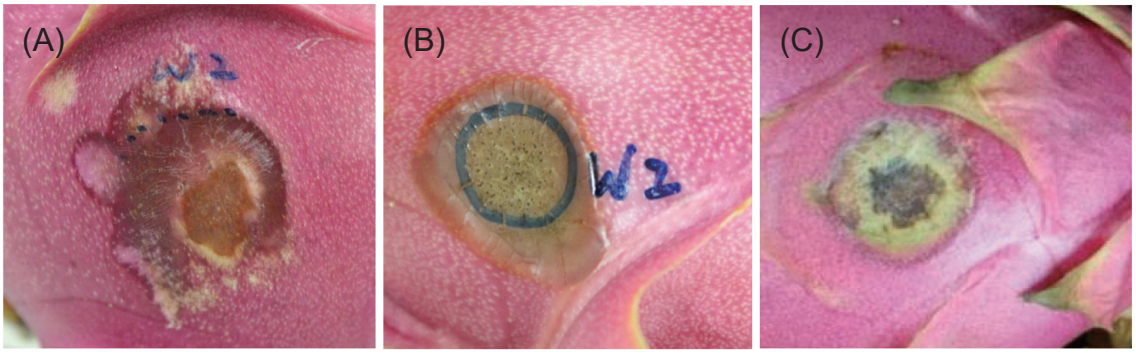


Fig. 1. Symptoms of anthracnose on pitaya fruits (*Hylocereus undatus*). Beside typical symptoms of brown, sunken, and severe water-soaking caused by *Colletotrichum gloeosporioides* isolate F211117 (A), *C. truncatum* isolate F211178 caused symptoms of black spot and formed microsclerotia in the inoculation site (B), and *C. boninense* F210016 caused symptoms of light to dark brown lesions with mild water-soaking (C). Pitaya fruits were inoculated, using conidial suspension (1×10^6 conidia mL^{-1}) of respective isolates, and incubated at RT for 4 to 6 d.

Table 1. Conidial types and morphological characteristics of *Colletotrichum* isolates from diseased fruits of pitaya in Taiwan, 2009–2013[z].

Conidial type	No. of isolate	Ratio (%)	Character of conidia[y]
1	91	73.4	Straight and cylindrical, > 2.5 and < 3.5 in avg. L/W ratio
2	27	21.8	Falcate, > 6.5 and < 7.5 in avg. L/W ratio
3	6	4.8	Straight and cylindrical, < 1.5 and < 2.5 in avg. L/W ratio
Total	124	100.0	

[z] Pitaya fruits were collected from orchards in the major pitaya-producing counties in Taiwan. Fruits developed anthracnose symptoms during the period of storage at room temperature (RT) for 1–15 d were used for isolation of *Colletotrichum*.
[y] Conidia were harvested from 7-day-old PDA cultures under 12 h/12 h photoperiod at 22–24℃.

flat, white to salmon (Fig. 2C)

Morphological features of conidia produced on 7-day-old PDA cultures and appressoria produced in 0.5% V8 juice were compared. In isolate F211117, conidia were hyaline, aseptate, straight or cylindrical, round apex, truncate base, (14.9) 12.5–17.8 × (5.2)–3.6–7 µm [(avg.) min.–max., length × width), and (2.9) 2.1–4.5 (L/W) (Fig. 3A). Appressoria were sepia to light brown, oval or globular, (7.8) 4.8–9.8 × (6.3) 5.1–8.4 µm (Fig. 3B). In isolate F211178, conidia were longer than those of conidial type 1 and type 3, (24.7) 19.5–30 × (3.8) 2.5–5 µm and (6.5) 4.5–11.5 (L/W), and the conidial shape were crescent with abrupt apex and truncate base (Fig. 3C). Appressoria were smooth, oval, at first 20 h, (7.7) 5.7–10.2 × (5.4) 4.7–6.7 µm (Fig. 3D), at 60 h, some of the appressoria turned into clavate to irregular, in groups or dense clusters (Fig. 3G). In isolate F210016, conidia were straight, cylindrical with round apex and base (Fig. 3E), (14.2) 12.5–17.5 × (6.1) 5.0–7.5 µm, and (2.4) 1.6–3.5 (L/W). Appressoria were oval or irregular, and (10.2) 6.0–22.3 × (8.1) 4.7–16.7 µm (Fig. 3F). Furthermore, isolate F211178 produced setae on PDA cultures as well as on lesions of diseased fruits with abrupt tip (Fig. 3H). However, setae were absent in the isolates F211117 and F210016.

Temperatures that affect the hyphal growth rate varied with these three anthracnose pathogens (Fig. 4). The range of minimum and maximum temperatures for hyphal growth were 4–8 and 36–40℃, respectively, with optimum

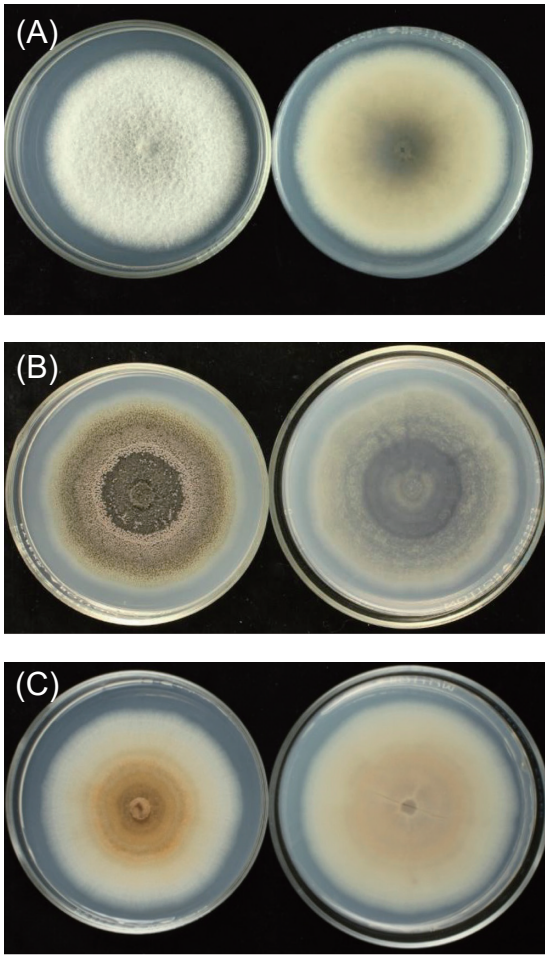


Fig. 2. Top and reverse colony features of *Colletotrichum gloeosporioides* isolate F211117 (A), *C. truncatum* isolate F211178 (B), and *C. boninense* isolate F210016 (C). The cultures were grown on PDA at 22–24℃ under 12 h/12 h light/dark period for 7 to 9 d. Distinct differences in colony color and texture among the three *Colletotrichum* species were noted. (Left row = top view; Right row = bottom view)

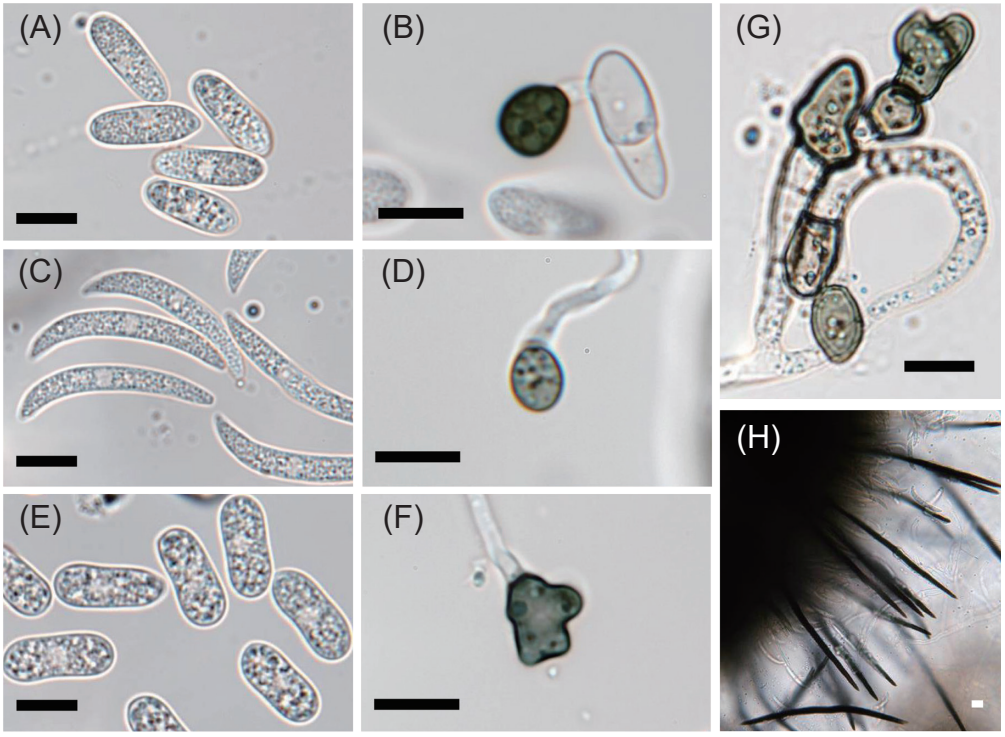


Fig. 3. Conidia (A, C, E), appressoria (B, D, F, G), and setae (H) of *Colletotrichum gloeosporioides* isolate F211117 (A, B), *C. truncatum* isolate F211178 (C, D, G, H), and *C. boninense* isolate F210016 (E, F). The cultures were grown on PDA for 7 d for formation of conidia, and subsequently submerged in 0.5% V8 juice for 20 h (D, E, F) for formation of appressoria. Some of the apporessoria of *C. truncatum* isolate F211178 turned into different shapes at 60 h (G). Differences in morphology of conidia and shape of appressoria among the three *Colletotrichum* species were noted. Setae of *C. truncatum* isolate F211178 (H) present, whereas were absent for the isolates F211117 and F210016, cultured on PDA at 22–24℃ under 12 h/12 h light/dark period for 14 d. (Bar = 10 μm)

temperature of 28–32℃ (Fig. 4).

Based on the morphological characteristics, including size and shape of conidia and appressoria (Figs. 2 and 3, Table 1) and capacity of setae formation (Fig. 2G), also compared with the description and circumscription of previous literatures, the *Colletotrichum* isolates F211117, F211178 and F210016 were identified as *C. gloeosporioides* (Sutton 1992; Weir *et al*. 2012), *C. truncatum* (Damm *et al*. 2009; Guo *et al*. 2014), and *C. boninense* (Moriwaki *et al*. 2003; Damm *et al*. 2012), respectively.

Blasting rDNA ITS sequences of the *Colletotrichum* isolates

The rDNA ITS regions of the three *Colletotrichum* isolates, F211117 (conidial type 1), F211178 (conidial type 2) and F210016 (conidial type 3), were sequenced and deposited in NCBI GenBank, with accession numbers: KM881568–KX197406 (Table 1). Blast the GenBank database with the uploading ITS region sequences of isolates F211117, F211178 and F210016, query revealed the best hits of 99.8, 100 and 100% identity to those annotated ITS regions of *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., *C. truncatum* (Schwein.) Andrus & W.D. Moore, and *C. boninense* Moriwaki, Toy. Sato & Tsukib, respectively (Table 2).

Additionally, ITS regions of other *Colletotrichum* isolates were also sequenced (Table 2). The other 11 isolates belonging to conidial type 1 showed 99.0–99.8% identity to isolates F211117 (conidial type 1). Again, these

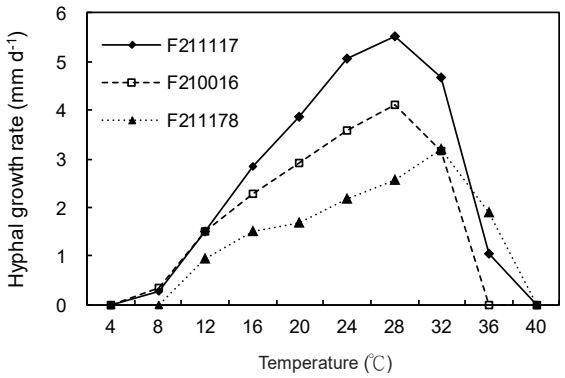


Fig. 4. Effect of temperatures on colony growth rate of *Colletotrichum gloeosporioides* isolate F211117, *C. truncatum* isolate F211178, and *C. boninense* isolate F210016. Colony growth rate was measured daily on PDA cultures for 7 d.

Table 2. Comparison of ITS region sequences and blast results of *Colletotrichum* isolates belonging to different conidial types.

Isolate	GenBank accession no.	Identity to ref. seq., respectively (%)	Geographic origin	Best hit accession no.[z], identity (%)
Conidial type 1, *C. gloeosporioides*				
F211117	KM881568, 598 bp	As ref. seq. of type 1	Taichung	AY266389.1, 99.8
F211156	KX197384, 599 bp	99.0	Hualien	EU552111.1, 100
F210004	KX197385, 599 bp	99.2	Nantou	AY266373.1, 100
F210042	KX197386, 599 bp	99.3	Nantou	KT966505.1, 99.8
F210052	KX197387, 599 bp	99.3	Nantou	KT390195.1, 100
F210008	KX197388, 598 bp	99.8	Nantou	AY266389.1, 100
F210035	KX197389, 598 bp	99.8	Nantou	AY266389.1, 100
F210332	KX197390, 598 bp	99.8	Hualien	AY266389.1, 100
F210203	KX197391, 598 bp	99.7	Taichung	AY266389.1, 99.8
F210024	KX197392, 598 bp	99.5	Taichung	AY266378.1, 100
F210199	KX197393, 598 bp	99.5	Taichung	AY266378.1, 100
F210235	KX197394, 598 bp	99.5	Taichung	AY266378.1, 100
Conidial type 2, *C. truncatum*				
F211178	KM881567, 604 bp	As ref. seq. of type 2	Pingtung	AY266370.1, 100
F211109	KX197395, 604 bp	99.8	Taichung	AY266372.1, 100
F211113	KX197396, 604 bp	99.8	Taichung	AY266372.1, 100
F212206	KX197397, 604 bp	99.8	Taichung	AY266372.1, 100
F210115	KX197398, 604 bp	100.0	Taichung	AY266370.1, 100
F211165	KX197399, 604 bp	100.0	Nantou	AY266370.1, 100
F212051	KX197400, 604 bp	100.0	Nantou	AY266370.1, 100
F213095	KX197401, 604 bp	100.0	Nantou	AY266370.1, 100
F213119	KX197402, 604 bp	100.0	Changhua	AY266370.1, 100
F213132	KX197403, 604 bp	100.0	Nantou	AY266370.1, 100
F213202	KX197404, 604 bp	100.0	Nantou	AY266370.1, 100
Conidial type 3, *C. boninense*				
F210016	KM881566, 618 bp	As ref. seq. of type 3	Taichung	JX258728.1, 100
F212054	KX197405, 617 bp	99.7	Nantou	JX258728.1, 99.7
F212102	KX197406, 618 bp	100.0	Taichung	JX258728.1, 100

[z] The best hit accession numbers of GenBank listed in conidial types 1, 2, and 3 were annotated as ITS region sequences of *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. trunctum*, and *C. boninense*, respectively.

sequences also showed best hit to those ITS regions annotated *C. gloeosporioides* individually. On the other hand, totally 10 isolates belonging to conidial type 2, and totally 2 isolates of conidial type 3, exhibited 99.8–100% and 99.7–100% identity to isolates F211178 (conidial type 2) and F210016 (conidial type 3), respectively. Coincidentally, the sequences of these isolates belonging to conidial types 2 and 3 were all hit the annotated *C. truncatum* and *C. boninense* in the GenBank, respectively. Preliminary phylogenetic analysis of the rDNA ITS region sequences of F211117 (conidial type 1), F211178 (conidial type 2) and F210016 (conidial type 3) and other ITS sequences of allied *Collectotrichum* species retrieved from GenBank database by maximum parsimony further confirmed the relatedness and identity of the *Colletotrichum* anthracnose pathogens isolated from dragon fruits in Taiwan (Fig. 5).

Pathogenicity of *Colletotrichum* isolates

Inoculation tests showed that all the three *Colletotrichum* isolates, F211117 (*C. gloeiosporoides*), F211178 (*C. truncatum*), and F210016 (*C. boninense*), from pitaya fruits were pathogenic to fruits of pitaya variety *H. undatus* (Table 3). Inoculated fruits showed up lesions after incubation at RT for 4 to 5 d. In

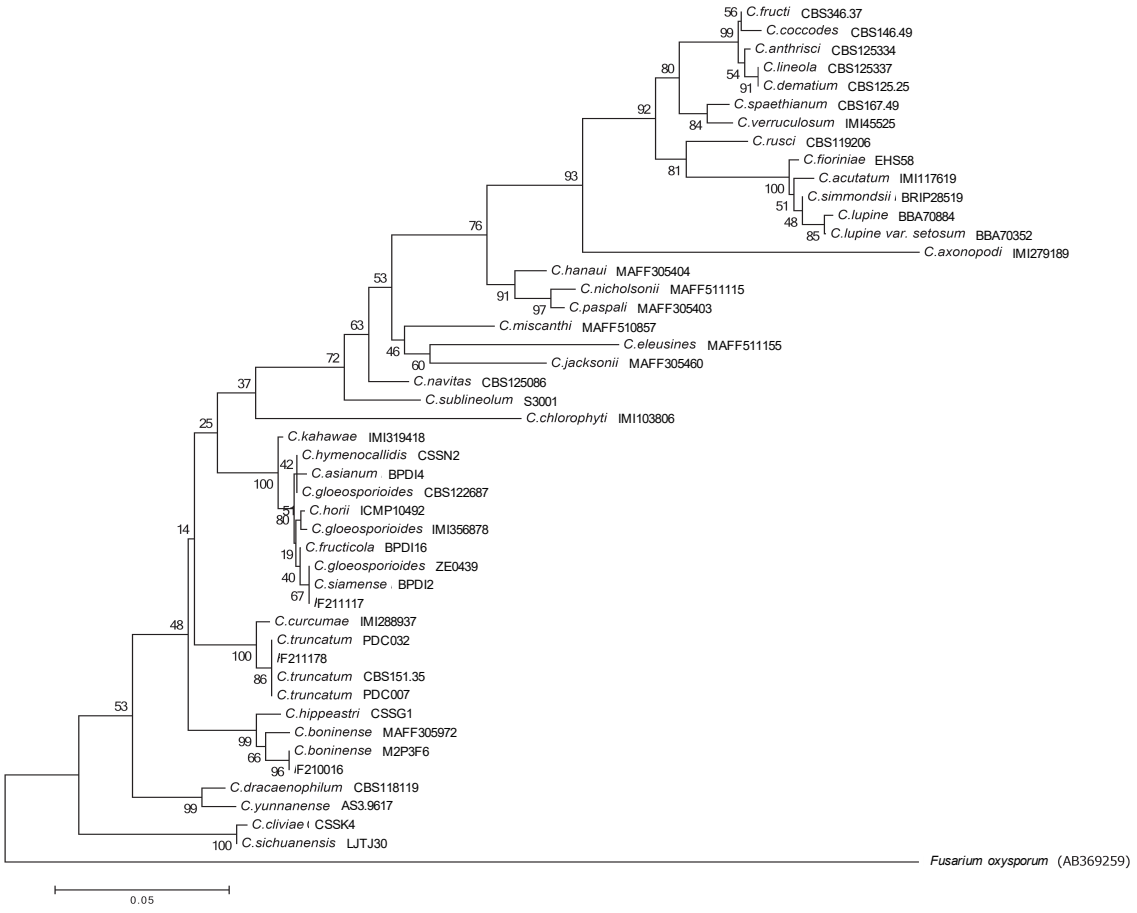


Fig. 5. A neighbour-joining tree based on the rDNA ITS region sequences, showing the phylogenetic relationships of F211117 (conidial type 1), F211178 (conidial type 2) and F210016 (conidial type 3) to other *Colletotrichum* species. The accession number of each sequence was indicated after allied *Collectotrichum* species and *Fusarium oxysporum*.

contrast to unwounding, wounding treatment substantially increased susceptibility of pitaya fruits to the three *Colletotrichum* isolates (Table 3). The range of disease incidences of unwounded pitaya fruits were 25.0, 75.0 and 12.5% for the isolates F211117, F211178, and F210016, respectively, whereas 100% on wounded fruits for all the three isolates. The symptoms on inoculated pitaya fruits were identical to the symptoms on naturally infected pitaya fruits collected from orchards and stored at RT. The pathogenicity of the three isolates to pitaya variety *H. polyrhizus* was similar to those on pitaya variety *H. undatus* (data not shown).

DISCUSSION

Survey of pitaya fruits during 2009 to 2013 reveals that anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. is one of the most important postharvest diseases of pitaya in Taiwan. Morphological characteristics, molecular features and phylogentic analysis, and pathogenicity tests further confirmed the identity of the three causal *Colletotrichum* species: *C. gloeosporioides*, *C. truncatum*, and *C. boninense* as causal organisms. This is the first report of pitaya fruit rot disease caused by three *Colletotrichum* spp. via Kock postulates in Taiwan.

Blasting all of the rDNA ITS region sequences of conidial type 1 on GenBank database showed the best hit to *C. gloeosporioides*, with identity ranging from 99.0% to 99.8% (Table 2). The identity derived from ITS sequences concurred with the morphological characteristics of the *Collectotrichum* species with type 1 conidia (Figs. 1A and 1B). Hence, in a broad sense based on genetics and biology, the *Collectotrichum* isolates F211117 isolated from dragon fruit rot in Taiwan matches the circumscription of *C. gloeosporioides* (Sutton 1992; Masyahit *et al*. 2009; Weir *et al*. 2012). Actually this specie is heterogenous in nature in terms of variation in features of colony, conidia, setae, appresorium and host specificity, etc. Thus, Sutton (1992) further separated 6 formae speciales of physiological taxa and one variety with *Glomerella* teleomorph of *C. gloeosporioides* from *C. gloeosporioide* species complex; Weir *et al*. (2012) documented even more forma specials of it. Furthermore, to resolve the limitation using only ITS rDNA marker to distinguish *C. gloeosporioides* isolates collected worldwide in the past 50 years, by using multigenes' sequences: actin (ACT), calmoludin (CAL), chitin synthase-1 (CHS-1), glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), internal transcribed spacers (ITS), glutamine synthase (GS), manganese superoxide dismutase-2 (SOD-2) and beta-tubulin (TUB2), conducted phylogenetic analysis with Bayesian Inferernce methods, Weir *et al*. (2012) accepted 22 species plus one subspecies within the *C. gloeosporioides complex*. In similar status, contrast to traditional *C. gloeosporioides*, *C. boninense* was erected by Moriwaki *et al*. (2003) based on the morphological and molecular characterization of *Collectotrichum* isolated from six plant species in Pacific Cost

Table 3. Pathogenicity of isolates of *Colletotrichum* spp. on fruits of *Hylocereus undatus*[z].

Species	Isolate	Disease incidence (%)[y]	
		Unwounded	Wounded
C. gloeosporioides	F211117	25.0 ± 25.0	100 ± 0
C. truncatum	F211178	75.0 ± 25.0	100 ± 0
C. boninense	F210016	12.5 ± 12.5	100 ± 0
Control (ddH_2O)	-	0.0 ± 0.0	0 ± 0

[z] *Colletotrichum* isolates, F211178, F211117, and F210016, representing conidial types 1, 2, and 3, respectively, were used for inoculation tests on wounded and unwounded fruits of pitaya variety *Hylocereus undatus*. The experiment was conducted 2 times.
[y] Disease incidence (%) = (No. of infected sites)/(Total No. of inoculated sites) × 100%, values are mean ± standard error.

of Japan. Its conidia are characterized by with basal hilum and peripheral thickening at the tip of conidiogenous cell. However, the marked deviation among collected isolates were revealed by rDNA ITS phylogenetic analysis, also implicating composite of species complex. A multi-locus phylogenetic study conducted by Damm *et al*. (2012) using 7 genes: ITS, ACT, TUB2, CHS-1, GAPDH, HIS-3 (histoine-3) and calmodulin (CAL), with maximum parsimony and maximum likelihood methodologies, of the 86 isolates and other strains which previously recognized as *C. boninense* actually comprised of 18 clades. These clades were accepted as individual species and totally 17 species were included in the *C. boninense* species complex (Damm *et al*. 2012). Likewise, *Collectotrichum* species with curved conidia and dark setae were grouped in the *C. dematium* complex in general. Damm *et al*. (2009) performed a comprehensive exploration to determine the phylogenetic affiliation of the 97 isolates, including *C. dematium*, *C. lineola*, *C. truncatum* and other *Collectorrichum* species with curved conidia, using multilocus genes: ITS, ACT, TUB2, CHS-1, GAPDH, HIS-3. As a result, 20 clades resolved, four new species described: *C. anthrisci*, *C. liriopes*, *C. rusci* and *C. verruculosum*; two new combinations *C. spaethianum* and *C. tofieldiae* were made, and *C. truncatum* was epitypified; *C. capsici* was sanctioned as basionym of *C. truncatum*. In this paper, we considered *Colletotrichum* isolates F211117 and F210016, including other isolates possessing cylindrical conidial types 1 and 3 as *C. gloeosporioides* and *C. boninense*, whereas *Colletotrichum* isolates F211118 possessing curved conidial type 2 as *C. truncatum* listed in Table 2, respectively. However, multi-locus phylogenetic analysis would be useful for further discrimination of species identity within populations of the 124 isolates (Cai *et al*. 2009; Damm *et al*. 2009; Prihastuti *et al*. 2009; Damm *et al*. 2012; Weir *et al*. 2012).

Fruit anthracnose of *Hylocereus* spp. caused by *Colletotrichum* spp. was reported in several countries, including *C. gloeosporioides* in Malaysia (Masyahit *et al*. 2009) and Brazil (Takahashi *et al*. 2008), and *C. truncatum* in China (Guo *et al*. 2014). This study demonstrates that, in addition to *C. gloeosporioides* and *C. truncatum* reported in other countries and in Taiwan in this study, *C. boninense* is also recognized as a causal agent of fruit anthracnose of pitaya in Taiwan (Tables 1 and 2). Among the three *Colletotrichum* species, *C. gloeosporioides* is the most predominant and important postharvest pathogen of pitaya in Taiwan, followed by *C. truncatum*, and *C. boninense*.

The results of artificial inoculation tests indicate that wounding is a conducive factor for infection of *C. gloeosporioides*, *C. truncatum*, or *C. boninense* on pitaya fruits (Table 3). This explains why symptoms of pitaya anthracnose are frequently observed at the cutting sites of fruit stem or scales of pitaya fruits. It is of paramount importance to develop effective methods for protection of pitaya fruits from injury before and after harvest.

Colletotrichun gloeosporioides is a pathogen with wide host range including numerous economically important crops (Freeman *et al*. 1998; Perfect *et al*. 1999). Preliminary inoculation tests showed that *C. gloeosporioides* isolated from diseased fruits of pitaya also caused anthracnose on fruits of papaya (*Carica papaya*) and leaves of Chinese cabbage (*Brassica rapa chinensis*) and sweet pepper (*Capsicum annuum*) (Lin *et al*. unpublished data). On the other hand, *C. gloeosporioides* from diseased fruits of papaya, avocado (*Persea americana*), or grapes (*Vitis vinifera*) could cause symptoms of anthracnose on pitaya fruits by artificial inoculation (Lin *et al*. unpublished data). These results suggest that isolates of *C. gloeosporioides* from pitaya fruits and fruits of other crops are lack of host specificity.

The optimal temperature range for hyphal growth of *Colletotrichum* spp. from pitaya fruits is 28–32℃ (Fig. 4) which is similar to the temperature range for favorable infection of pitaya fruits in the orchards in Taiwan. Thus, severe

losses in marketable fruits may occur if pitaya fruits are produced at the temperature 28–32℃ in the orchard and stored at room temperature (28–32℃) after harvest. Since low temperature (below 8℃) is unfavorable for hyphal growth of *Colletotrichum* spp. (Fig. 4), it is recommended to store pitaya fruits at cooler temperatures (below 8℃) to minimize losses of harvested fruits during storage and transit period. As *Colletotrichum* spp. are known as latent infection pathogens (Baker *et al*. 1940; Cerkauskas 1988; Perfect *et al*. 1999), infection of pitaya fruits by the *Collectotrichum* pathogens may have already occurred in the field but quiescent and remained symptomless at harvest. The symptoms of anthracnose could develop rapidly if the infected fruits are stored at high temperature (28–32℃) and high humidity. Therefore, in addition to storing harvested fruits of pitaya at cooler temperature (below 8℃), practice for protection of pitaya fruits from infection of *Colletotrichum* spp. in the field such as bagging of young fruits or application of chemical fungicides at right time period may be effective in preventing pitaya fruits from infection by anthracnose pathogens.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the grants (100 AS-9.2.2-CI-C4, 101AS-10.2.2-CI-C1, 102AS-10.2.2-CI-C2, 103AS-10.2.1-CI-C2, and 104AS-10.6.3-CI-C1) of Taiwan Agricultural Research Institute (TARI) from 2011 to 2015.

REFERENCES

Baker, R. E. D., S. H. Crowdy, and R. K. McKee. 1940. A review of latent infections caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and allied fungi. Trop. Agric. 17:128–132.

Cai, L., K. D. Hyde, P. W. J. Taylor, B. S. Weir, J. 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.

Cerkauskas, R. F. 1988. Latent colonization by *Colletotrichum* spp.: Epidemiological considerations and implications for mycoherbicides. Can. J. Plant. Pathol. 10:297–310.

Damm, U. J., H. C. Woudenberg, P. F. Cannon, and P. W. Crous. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. Fungal Divers. 39:45–87.

Damm, U., P. F. Cannon, J. H. C. Woudenberg, P. R. Johnston, B. S. Weir, Y. P. Tan, R. G. Shivas, and P. W. Crous. 2012. The *Colletotrichum boninense* species complex. Stud. Mycol. 73:1–36.

Freeman, S., T. Katan, and E. Shabi. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. Plant Dis. 82:596–605.

Guo, L. W., Y. X. Wu, H. H. Ho, Y. Y. Su, Z. C. Mao, P. F. He, and Y. Q. He. 2014. First report of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* in China. J. Phytopathol. 162:272–275.

Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 33:1870–1874.

Liu, P. C. and C. P. Liu. 2015. Present breeding status and prospect of Taiwan Pitaya. p.29–44. *in*: The Improvement of Production Technology of Pitaya in Taiwan. April 16, 2014. Pingtung, Taiwan. Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Kaohsiung, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Masyahit, M., K. Sijam, Y. Awang, and M. G. M. Satar. 2009. The first report of the occurrence of anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. on dragon fruit (*Hylocereus* spp.) in Peninsular Malaysia. Amer. J. Appl. Sci. 6:902–912.

Moriwaki, J., S. Toyozo, and T. Tsukiboshi. 2003. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. Mycoscience 44:47–53.

Perfect, S. E., H. B. Hughes, R. J. O'Connell, and J. R. Green. 1999. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. Fungal Genet. Biol. 27:186–198.

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.

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.) CAB. International, Wallingford. 388 pp.

Takahashi, L. M., D. D. Rosa, M. A. Basseto, H. G. de Souza, and E. L. Furtado. 2008. First report of *Colletotrichum gloeosporioides* on *Hylocereus megalanthus* in Brazil. Aust. Plant Dis. Notes 3:96–97.

Wang, C. L. and C. C. Lin. 2005. Fruit rot of pitaya and stem rot of cacti in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 14:269–274. (in Chinese with English abstract)

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

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. Shinsky, and T. J. White, eds.) Academic, New York. 482 pp.

台灣新紀錄之引起採收後紅龍果炭疽病之 *Colletotrichum* spp.

林筑蘋[1] 安寶貞[2] 黃鴻章[3,4] 張捷婷[5] 蔡志濃[6,*]

摘要

林筑蘋、安寶貞、黃鴻章、張捷婷、蔡志濃。2017。台灣新紀錄之引起採收後紅龍果炭疽病之 *Colletotrichum* spp.。台灣農業研究 66(3):171–183。

紅龍果 (白肉 *Hylocereus undatus*，紅肉 *H. polyrhizus* 及 *H. costaricensis*) 為台灣近 20 年來廣受栽培的果樹，依 2009 到 2013 的田間調查顯示，由 *Colletotrichum* spp. 引起的炭疽病為台灣紅龍果主要採收後病害，導致果實倉儲期縮短或降低商品價值，以及經濟價值損失。病斑自果實採收後室溫儲藏 5–10 d 間開始出現，表皮呈現褐色凹陷，嚴重者可能出現水浸狀腐爛。以組織分離罹病果實上的病原菌，並根據形態以及 ITS 區域序列及類緣分析，至少確定有 3 種 *Colletotrichum* spp.，包括 *C. gloeosporioides*、*C. truncatum* 與 *C. boninense* 可感染紅龍果。2009 到 2013 期間自罹染炭疽病之組織上分離各病原之分離率分別為 73.4、21.8 及 4.8%。近年來其他學者發現 *C. gloeosporioides* 與 *C. boninense* 個別為複合族群 (species complex)，族群內可再藉由多基因親源分析 (multi-locus phylogenetic analysis) 區分出多個新種 *Colletotrichum* spp.。為鑑定感染紅龍果之 *Colletotrichum* spp.，未來將再進行多基因親源分析。紅龍果炭疽病為台灣紅龍果重要之採收後病害，本篇在台灣為 *Colletotrichum* spp. 引起之紅龍果炭疽病之首篇報導。

關鍵詞：紅龍果、採後病害、炭疽病、*Colletotrichum* spp.。

投稿日期：2016 年 7 月 26 日；接受日期：2016 年 12 月 20 日。
* 通訊作者：TsaiJN@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] 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。
[3] 加拿大萊斯布里奇研究中心農業及農業食品部前研究員。加拿大 萊斯布里奇。
[4] 農委會農業試驗所植物病理組講座教授。台灣 台中市。
[5] 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。
[6] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 66(3):184–192 (2017)
DOI: 10.6156/JTAR/2017.06603.02

研究報告

青花菜小孢子培養之胚誘導及胚發芽條件建立

夏奇鋸[1,*] 陳威臣[2] 曹進義[3] 周宜玫[4]

摘要

夏奇鋸、陳威臣、曹進義、周宜玫。2017。青花菜小孢子培養之胚誘導及胚發芽條件建立。台灣農業研究 66(3):184–192。

十字花科之青花菜 (*Brassica oleracea* var. *italica*) 是營養價值很高的蔬菜，本研究以台灣青花菜商業一代雜交品種 (F_1) 為材料，測試不同 F_1 之小孢子培養反應，並建立小孢子之胚誘導及胚發芽所需條件，用以生產雙單倍體 (doubled haploid; DH) 植株作為培育純系之用。利用 5 種 F_1 青花菜以每毫升含有 4×10^4 個小孢子濃度接種於 NLN-13 培養液中，並以 32℃ 處理 1 d，其中 3 品種有胚形成，2 品種未有反應，胚誘導率以「慶農 B-45」最高。比較取自「農友天綠」不同長度花蕾之小孢子，結果顯示取自 4.0–5.0 mm 長度花蕾之小孢子，平均可獲得 17.1 個胚/皿，顯著較取自 3.0–3.9 mm 長度花蕾之 7.0 胚/皿為高 ($P < 0.01$)。「慶農 B-45」以含有 13% 蔗糖之 NLN 培養基 (全量及半量鹽類濃度) 與 32℃ 處理時間 (1、2 及 3 d) 組合進行小孢子培養。結果顯示以全量 NLN 培養基在 32℃ 處理 1 d 獲得 6.9 胚/皿最高。將「慶農 B-75」子葉期胚施以 1–5 d 之脫水配合溫度處理，處理後之胚先接種於含有生長調節劑之固態培養基預培養 1 wk，再繼代於不含生長調節劑之培養基中培養 4 wk 後，調查胚發芽之比率。結果顯示子葉期胚於 25℃ 以濾紙脫水 1 d 或於 4℃ 以濾紙脫水 1–5 d 皆有助提高發芽率 (35.0–48.3%)。將「慶農 B-75」由小孢子發育而來之 23 株小苗以流式細胞儀檢測其染色體倍體性，結果顯示 DH 及單倍體之比率分別為 60.9% 及 34.8%。DH 植株之比率超過 60%，有助於育種實務上之利用。

關鍵詞：青花菜、胚分化、雙單倍體。

前言

青花菜 (*Brassica oleracea* var. *italica*) 是十字花科蕓苔屬甘藍種中的重要蔬菜，因富含營養素是現代人極佳的保健蔬菜。青花菜以高品質之一代雜交種 (F_1) 最受消費者青睞，在生產 F_1 的育種流程中，自交系親本的培育需時 6–8 yr，且青花菜具有自交不親和性及自交弱勢，純系親本的培育相對困難，不利於新品種的快速育成。台灣的環境高溫多溼，對於抗病、耐熱等特性的篩選具有先天優勢，若能發展出更高效率的純系育成技術，因應市場及氣候環境之快速變化不斷推陳出新，才能在競爭劇烈的種苗市場中占有一席之地 (Wang *et al*. 2011)。

小孢子培養是在離體 (*in vitro*) 條件下對未成熟的花粉進行人工培養，小孢子受到培養環境之影響，由原本配子體分化轉為孢子體分化，並發育形成胚。小孢子培養過程中除了獲得單倍體植株外，一般有一定比率之小孢子會在分化的過程中發生染色體自然倍加的情形，亦可經由人為之染色體倍加處理讓單倍體成為 2 倍體，這些由單倍體倍加而來之 2 倍體，是遺傳上的同質結合體，稱為雙單倍體 (doubled

投稿日期：2016 年 3 月 16 日；接受日期 : 2016 年 4 月 15 日。
* 通訊作者：hsia@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。

haploid; DH)，也是育種上所稱的純系。小孢子培養可以在任何育種世代實施，將基因型立即固定成為同質結合體，具有加速純系育成之優點 (Forster & Thomas 2005)。

蕓苔屬植物的單倍體最早由 Keller *et al*. (1975) 自小油菜 *Brassica campestris* 以及 Thomas & Wenzel (1975) 自大油菜 *Brassica napus* 的花藥培養出來；但從 Lichter (1982) 發展出油菜小孢子培養技術後，大多數蕓苔屬植物皆改採小孢子培養，原因是游離培養之小孢子為單細胞，其分化不受體細胞之干擾，且具有數量上之優勢，在效率上遠遠超過花藥培養。目前小孢子培養技術已純熟應用於育種流程，加速了許多十字花科蔬菜新品種之育成 (Ferrie & Caswell 2011)。

青花菜小孢子的研究最早見於 Takahata & Keller (1991)，與油菜相較，青花菜的小孢子培養難度較高 (Da Silva Dias 2003)。台灣在十字花科花藥培養的研究甚少 (Chang *et al*. 1996)，小孢子培養技術的建立更付之闕如，學研界宜加快研發的腳步，並協助種苗產業將此一技術實際應用於青花菜育種流程。本研究以台灣青花菜商業 F_1 栽培種為材料，建立小孢子培養在胚誘導以及胚發芽所需之條件，並以流式細胞儀檢測再生植株之染色體倍體性，作為生產 DH 植株及加速純系親本育成之參考。

材料與方法

青花菜 F_1 品種之種子分別購自慶農種苗 (Chinglong Seed Co., Taiwan) 的「B-45」、「B-75」，欣樺種苗 (Singflow Seed Co., Taiwan) 的「BR1210」以及農友種苗 (Known-you Seed Co., Taiwan) 的「清華」、「清華 3 號」、「綠王」、「天綠」等品種。將種子播種於泥炭土與蛭石 1：1 混合介質中，種子發芽 4 wk 後假植至相同介質的 3 寸盆中，經 4 wk 培養後定植於 9 寸盆中。植株於恆溫 24℃、光照 16 h、光照強度為 130 μmol m^{-2} s^{-1} 之精密溫室內生長至開花。生長期間每週施用一次 1 g L^{-1} 花寶 2 號 (20 N-20 P_2O_5-20 K_2O) 液肥，花芽分化後改施相同濃度之花寶 3 號 (10 N-30 P_2O_5-20 K_2O) 液肥。

小孢子培養

分離小孢子之操作流程修改自 Custers (2003)。將花蕾依長度分級，若未註明花蕾長度，則小孢子取自 3–4 mm 長度之花蕾。取 16 朵消毒後之花蕾以針筒推進器加壓，將小孢子由花藥囊內釋出，加入 2 mL 之 B5 培養基配方 (Gamborg *et al*. 1968) 添加 13% 蔗糖 (B5-13) 培養液後以 37 μm 濾網過濾，重複壓迫花蕾、過濾動作，將共約 8 mL 濾液收集於離心瓶。將 3 批次濾液收集於同一離心管並定量至 25 mL，放入預冷至 4℃ 之離心機以 100× *g* 離心 6 min，將上清液吸除後加入 10 mL B5-13 液體培養基，重複上述離心動作 2 次，最後加入 10 mL NLN 或 1/2 NLN 鹽類配方 (Nitsch & Nitsch 1967)，添加 13% 蔗糖之液體培養基 (以下簡稱 NLN-13 或 1/2 NLN-13) 搖勻製作懸浮液。取 10 μL 懸浮液以血球計數器於顯微鏡下計算小孢子數，並據此推算小孢子懸浮液之實際濃度。加入適量之 1/2 NLN-13 或 NLN-13 培養液，將懸浮濃度調整至每毫升含 4×10^4 個小孢子。取 5 mL 懸浮液加入直徑 6 cm 培養皿，每皿並加入 0.1 mL 活性碳溶液，活性碳溶液之配製為 1 g 活性碳與 0.5 g agarose (Sigma type IX) 溶於 100 mL 水中並經高壓滅菌後備用。培養皿以 parafilm™ 加封後置於 32℃ 恆溫箱中培養 1–3 d 後，移至 25℃ 黑暗中靜置培養 2 wk，再將培養皿移至 34.3 μmol m^{-2} s^{-1} 光照下，以 60 rpm 震盪培養直到幼胚分化，幼胚發育至子葉期後進行發芽促進處理。

促進子葉期胚發芽之前處理

將子葉期小胚直接繼代至 MSB2 固體培養基 (對照組)，或切除子葉後繼代於相同培養基置於 25℃ 光照下培養；或將小胚放入置有濾紙之直徑 9 cm 培養皿，分別置於 25℃ 或 4℃ 黑暗中進行 1、3 及 5 d 脫水處理，之後同樣繼代於 MSB2 培養基中培養；或將小胚直接種於 MSB2 培養基並置於 4℃ 黑暗中培養 1、3 或 5 d 後移至 25℃ 光照環境下培養。培養容器為直徑 9 cm 培養皿內含 25 mL MSB2 培養基。MSB2 培養基組成為 MS 基本鹽類 (Murashige & Skoog 1962)、20 g L^{-1} 蔗糖、9 g L^{-1} 的 Bac-

to agar，並添加2.0 mg L^{-1} zeatin、2.0 mg L^{-1} 6-苯甲基腺嘌呤 (N6-benzyladenine, BA) 及 0.1 mg L^{-1} 吲哚乙酸 (Indole-3-acetic acid, IAA)。每皿接種 10 個小胚，每一處理共接種 10 皿。上述所有胚培植體均於 MSB2 培養基中培養 1 wk 後，繼代至不含生長調節劑之 MS 培養基中繼續培養 3 wk，再進行抽芽率調查。

染色體倍體性檢測

切取出瓶成活小植株之第 1 片成熟葉約 1 cm^2，加入 CyStain UV Precise P Kit (Partec, Germany) 0.2 mL 萃取緩衝液，以刀片將組織切碎後再添加 0.8 mL 染色液後過濾，濾液靜置 3 min 後，以流式細胞儀 (Ploidy Analyzer, Partec, Germany) 檢測染色體之倍體性。每一葉片取樣 2 次，每一樣品檢測之細胞核數為 2,500 個。

結果

取自 5 種青花菜 F_1 之小孢子以 4 × 10^4 mL^{-1} 小孢子濃度接種於 NLN-13 培養液中，以 32℃處理 1 d 後置於黑暗中靜置培養 2 wk，移至震盪培養繼續 2 wk 後調查產胚結果，如表 1 所示。5 種青花菜 F_1 因花蕾數及花粉量不同，因此接種之總皿數不同，但各皿之小孢子接種濃度相同。5 種 F_1 中有 3 種具有胚反應，以「慶農 B-45」平均每皿 5.43 個胚最高，其次為「欣樺 BR1210」及「農友天綠」。共有 2 品種未產生胚，分別為「農友清華」及「農友清華 3 號」。

取自「農友天綠」同一植株之花蕾，花蕾長度分別為 3.0–3.9 mm 及 4.0–5.0 mm，小孢子以 4 × 10^4 mL^{-1} 濃度接種於 NLN-13 培養液，並於 32℃處理 1 d，胚誘導結果如表 2 所示。取自花蕾長度 3.0–3.9 mm 之小孢子，平均可獲得 7.0 胚/皿，而取自 4–5.0 mm 花蕾長度之小孢子，平均可獲得 17.1 胚/皿，兩處理間的差異極為顯著 ($P < 0.01$)。

「農友天綠」以 4 × 10^4 mL^{-1} 濃度接種於 NLN-13 培養液，比較 32℃處理 1、2 及 3 d 對胚誘導之影響如表 3 所示。「農友天綠」在 3 種處理時間所得之平均胚數介於僅 8.3–11.4/皿之間，以 2 d 處理組最高，但各處理間的差異並不顯著。此外，在小孢子培養 4 wk 後，進行第 1 次產胚數調查，調查子葉期胚之個數；

表 1. 青花菜 F_1 雜交種對小孢子胚形成之影響。

Table 1. Effect of broccoli F_1 hybrid on microspore embryogenesis[z].

Cultivar[y]	No. petri dish with embryo/total petri dish	Total embryo	Embryo/petri dish
Chinglong B-45	13/14	76	5.43
Singflow BR1210	5/51	5	0.10
Known-you			
Tender Green (天綠)	2/60	5	0.08
Known-you Ching Hua (清華)	0/5	0	0.00
Known-you Ching Hua No. 3 (清華 3 號)	0/5	0	0.00

[z] Microspores were inoculated with 4 × 10^4 microspores mL^{-1}.
[y] Chinglong (慶農), Singflow (欣樺), Known-you (農友).

表 2. 青花菜「農友天綠」取自不同長度花蕾之小孢子對胚誘導之影響。

Table 2. Effect of microspores taken from flower buds in various lengths on embryo induction of broccoli 'Known-you Tender Green'[z].

Bud length (mm)	Total petri dish	Embryos/petri dish
3.0–3.9	17	7.0 ± 3.9 b[y]
4.0–5.0	12	17.1 ± 13.5 a

[z] Microspores were inoculated with 4 × 10^4 microspores mL^{-1} in the NLN-13 medium and treated at 32℃ for 1 d.
[y] Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.01$) by LSD test.

再經 1 wk 培養後，將後續長出之胚記錄為第 2 次胚。在表 3 中顯示總產胚數及第 1 次產胚數以 32℃處理 2 d 者最高，第 2 次產胚數則以處理 3 d組較高，但因各皿間之產胚數差異大，造成各處理間之差異在統計上並不顯著。

以「慶農 B-45」進行 NLN 鹽類濃度 (全量及半量) 以及 32℃溫度處理時間 (1、2 及 3 d) 組合之複因子試驗，結果如表 4 所示。培養基、高溫處理時間以及兩者之交感對總出胚數的影響皆不顯著。6 個處理中以全量 NLN 培養基配合 32℃處理 1 d 獲得 6.9 胚/皿最高，最低者為全量 NLN 培養基配合 32℃處理 3 d 的 3.1 胚/皿，其餘各組則介於 4.2–6.4 胚/皿之間。將獲得之胚依長度細分為大於 4 mm (多數介於 4–6 mm 之間) 或小於 4 mm (多數介於 2–3.9 mm 之間) 兩種分開計算。在大胚 (4–6 mm) 方面，培養基、高溫處理時間兩因子各別之影響皆不顯著，但兩者間之交感對大胚數的影響顯著，結果仍以全量 NLN 培養基配合 32℃處理 1 d 獲得 5.5 胚/皿最高，其餘各組合除 NLN 培養基配合 32℃處理 3 d 之 1.4 胚/皿較低外，各處理之大胚數介於 3.0–3.6 胚/皿之間；在小胚 (2–3.9 mm) 方面，培養基、高溫處理時間以及兩因子間交感對小胚數的影響皆不顯著，除 1/2 NLN 培養基配合 32℃處理 3 d 之 2.8 胚/皿較高外，其餘各處理組合介於 1.2–1.9/皿之間。

以「慶農 B-75」小孢子培養於 1/2 NLN-13 培養液經 32℃處理 2 d，總共接種 31 皿，獲得 665 個胚，每皿平均胚數達 21.5 個 (資料未顯示)。以前述所得之子葉期胚進行促進發芽之脫水與溫度組合試驗，處理後之胚先於含有 BA 及 zeatin 之固態芽體誘導培養基中預培養 1 wk，再繼代於 MS 基本培養基中培養 3

表 3. 以 32℃溫度處理青花菜「農友天綠」小孢子不同天數對胚誘導之影響。

Table 3. Effect of microspore culture at 32℃ with various duration on embryo induction of broccoli 'Known-you Tender Green' [z].

32℃ (d)	No. petri dish with embryo/total petri dishe	Embryo/petri dish	1st Embryo/petri dish[y]	2nd Emgryo/petri dish[y]
1	11/16	8.3 ± 11.1 a	5.8 ± 8.0 a	2.6 ± 3.7 a
2	12/14	11.4 ± 9.6 a	8.8 ± 8.5 a	2.6 ± 2.6 a
3	12/13	9.3 ± 9.9 a	5.9 ± 7.8 a	3.4 ± 4.1 a

[z] Microspore were inoculated with 4×10^4 microspores mL^{-1} in the NLN-13
[y] 1st and 2nd embryos were collected separately after 4-wk and 5-wk culturing, respectively.

表 4. 培養基及高溫處理時間對青花菜「慶農 B-45」小孢子胚誘導之影響。

Table 4. Effect of NLN salt strength in combination with various duration at 32℃ on embryo induction of broccoli 'Chinglong B-45' microspores.

Medium	32℃ (d)	Embryo/petri dish	Big embryo/petri dish[z]	Small embryo/petri dish[y]
½ NLN-13	1	5.1 ± 5.0 ab[x]	3.3 ± 2.9 ab	1.8 ± 2.5 ab
½ NLN-13	2	4.2 ± 4.7 ab	3.0 ± 3.5 ab	1.2 ± 1.6 b
½ NLN-13	3	6.4 ± 4.5 ab	3.6 ± 3.3 ab	2.8 ± 2.2 a
NLN-13	1	6.9 ± 2.3 a	5.5 ± 3.0 a	1.4 ± 1.4 ab
NLN-13	2	5.0 ± 2.0 ab	3.1 ± 1.5 ab	1.9 ± 1.4 ab
NLN-13	3	3.1 ± 2.4 b	1.4 ± 2.2 b	1.7 ± 1.3 ab
Medium		NS	NS	NS
Duration of 32℃		NS	NS	NS
Medium × Duration of 32℃		NS	*	NS

[z] Length of big embryos = 4–6 mm
[y] Length of small embryos = 2–3.9 mm
[x] Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) by LSD test.
* significant at $P < 0.05$

wk 後調查抽芽率 (表 5)。結果顯示，未經任何處理之對照組平均每皿抽芽率僅 1.7%；切除子葉有助於抽芽率提升，每皿抽芽率提高為 18.3%；將子葉期胚置於以濾紙上在 25℃下進行 1–3 d 脫水處理，之後與對照組進行相同之繼代培養，3 種脫水時間中以脫水 1 d 者效果最佳，平均每皿抽芽率達 46.7%，但於 25℃下脫水超過 1 d (3 或 5 d) 會造成胚體嚴重失水，導致成活胚數減少；於 4℃低溫下同樣進行濾紙脫水處理，結果顯示隨著脫水天數增加，有助於抽芽率之提升，但處理 1–5 d 間的抽芽率差異不顯著，每皿抽芽率介於 35.0–48.3% 之間；同樣於 4℃低溫但未經濾紙脫水處理之胚 (直接於培養基上培養)，平均每皿抽芽率在 18.3–25.0% 之間。

將「慶農 B-75」小孢子培養發育而來之植株，取其葉片以流式細胞儀檢測染色體倍體數，結果如圖 1 所示。總共檢測 23 株，其中有 8 株為單倍體占 34.8%，14 株為 2 倍體占 60.9%，1 株為 4 倍體占 4.3%。

討論

十字花科作物的小孢子培養，自油菜開始已建立有相當充實的研究基礎 (Lichter 1982)，高效率之油菜小孢子培養技術已成功育成了許多新品種 (Ferrie & Caswell 2011)。同為蕓苔屬的青花菜與油菜相較，青花菜小孢子的胚誘導率較低 (Takahata & Keller 1991)。本試驗以台灣市售青花菜 F_1 為材料，利用相同的培養條件測試不同 F_1 青花菜小孢子培養之反應，因生長箱空間之限制，各品種係分批

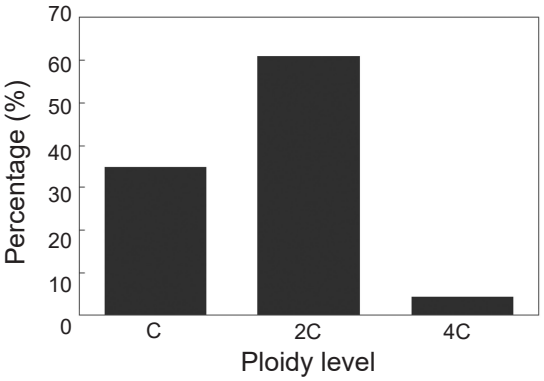


圖 1. 以流式細胞儀檢測青花菜「慶農 B-75」小孢子再生植株之倍體性及其比例。

Fig. 1. Ploidy level and its percentage from microspores derived plants of broccoli 'Chinglong B-75' as determined by flow cytometry.

表 5. 青花菜「慶農 B-75」子葉期胚以溫度、脫水處理對促進抽芽之影響。

Table 5. Effect of desiccation in combination with temperature treatments on shoot germination of cotyledonary embryos derived from microspore of broccoli 'Chinglong B-75'[z].

Treatment	No. embryo	Shoot germination (%)
25℃	60	1.7 ± 4.1 e[y]
25℃ cutting cotyledon	60	18.3 ± 17.2 cde
25℃ filter dry 1d	60	46.7 ± 22.5 a
25℃ filter dry 3d	60	16.7 ± 40.8 e
25℃ filter dry 5d	60	6.7 ± 16.3 de
4℃ filter dry 1d	60	35.0 ± 10.5 abc
4℃ filter dry 3d	60	36.7 ± 19.7 ab
4℃ filter dry 5d	60	48.3 ± 11.7 a
4℃ 1d	60	20.0 ± 6.3 bcd
4℃ 3d	60	18.3 ± 16.0 cde
4℃ 5d	60	25.0 ± 18.7 bc

[z] Embryos were first cultured on MSB2 medium for 1-wk followed by 4-wk culturing on a hormone-free MS medium. MSB2 medium- MS basal salts supplemented with 20 g L^{-1} sucrose, 2.0 mg L^{-1}, BA, 2.0 mg L^{-1} zeatin, 0.1 mg L^{-1} IAA, and 9.0 g L^{-1} Bacto agar.

[y] Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.015$) by LSD test.

種植並於生長箱內誘導花芽分化，再以相同之培養條件進行小孢子培養，各品種之反應不一。但同一品種在不同培養條件下仍有相似的胚誘導反應，亦即高反應品種在不同條件下仍比低反應品種有較多的胚形成，顯示品種基因型是影響小孢子培養成功與否之重要因子。

影響十字花科雙單元體誘導，最重要的 3 個步驟分別為胚誘導、胚發育成苗以及 DH 的比例。其中，影響胚誘導的因子，包括 (1) 供試植株的基因型及生長環境：一些研究顯示小孢子體胚發育只由少數的基因控制，因此不同品種甚至單株間具有很大的差異性 (Da Silva Dias 2001)。此外，供試植株生長的環境，尤其在花芽誘導與花粉發育期間的溫度變化，對於開花的數量以及小孢子之品質有很大的影響。在本試驗中因為環控栽培空間的限制，各品種係分批播種及種植，雖然生長環境條件相似，但各批次植株的生長狀態可能有差異，雖然小孢子以相同條件進行培養，但因母體植株生理狀態的不同，推測有可能因此影響小孢子的表現，造成產胚數的差異。綜合表 1 中各 F_1 小孢子胚誘導的表現來看亦明顯不同，表 1 中「農友清華」及「農友清華 3 號」之花蕾經加壓、過濾及離心後之小孢子數量極少，因此雖然以相同濃度接種，但其接種皿數相對減少。觀察其花藥發現有萎縮、短小的現象，推測小孢子量少，可能與花藥發育不完全有相關。

影響因子 (2) 小孢子發育階段：一般認為單核中晚期到雙核早期的小孢子，是最適合培養的時期，由於小孢子發育時期需經染色於顯微鏡下觀察方能確認，在實務操作上必須藉由花蕾的大小、花冠與花藥長度的比值等外觀性狀作為取樣的指標，其中以花蕾的長度最常作為小孢子發育階段指標之用。綜觀十字花科甘藍類蔬菜如花椰菜、青花菜或甘藍小孢子培養，取樣之花蕾大小大多介於 2.5–4.0 mm 之間，本試驗大都採 3.0–4.0 mm 長度之花蕾，但在青花菜試驗中曾發現放寬取樣大小 (大於 3.5 mm)，其小孢子的產胚率反而有較佳之表現 (資料未列)。因此，進行不同花蕾長度之比較試驗，將花蕾長度取樣大小放寬到 4.0–5.0 mm。在表 2 中顯示，青花菜「農友天綠」小孢子取自長度 4.0–5.0 mm 花蕾，較取自 3.0–3.9 mm 長度之花蕾有較高之產胚率，表示針對個別品種有必要建立花蕾外觀與小孢子發育階段之相關資料。此外，對於花芽誘導環境對花蕾發育的影響亦應一併考慮，有前人研究指出，生長箱內穩定之低溫有助小花蕾發育變慢，因此較大之花蕾反而更吻合小孢子培養所需之發育階段 (Pratap *et al*. 2009)。本試驗青花菜植株於 24℃恆溫之精密溫室中生長至開花，推測恆定之溫度助於小花蕾持續發育，並與有較大之花蕾外觀有關。

影響因子 (3) 小孢子培養條件：相對於提供開花植株最佳的生長環境與花芽分化的環境，以得到最佳品質之小孢子，在誘導小孢子進行胚發育的過程中，則需施予一些逆境處理，用意在改變原本配子體發育路徑轉向孢子體發育。研究顯示，高溫逆境會影響染色體分裂時微管體 (microtubule) 的分布，讓正常狀態下呈現大小不均的營養核與生殖核分裂，趨向於大小平均的體細胞分裂，因而有利於孢子體發育 (Simmonds & Keller 1999)。一般蕓苔屬植物小孢子培養最常使用的逆境處理為高溫 (heat shock)，溫度逆境對一些花藥培養反應較低的品種有增進之效果，使用之溫度一般為 30–35℃，處理時間 1–3 d，之後再恢復於 25℃培養 (Ferrie 2003)。在表 3 中「農友天綠」以 32℃處理 1–3 d 對胚誘導之影響差異並不顯著，雖然 2 d 處理組每皿之平均胚數較高，在產胚表現上亦較為整齊 (多數為大胚)，但因同一處理各皿間之產胚數差異大，處理機差大導致處理間的差異並不顯著。此外，在處理 3 d 組發現其總胚數較處理 2 d 組減少，推測延長高溫處理時間從 1 d 至 2 d 有助胚的誘導，但處理時間延長至 3 d，從 2 次胚數增加的結果來看，表示高溫處理時間過長可能造成胚的延遲發育。從表 3 結果來看，推測「農友天綠」小孢子胚形成的主要影響仍在於品種本身，但適當的溫度處理天數雖可以小幅改善產胚數。

影響因子 (4) 培養基：蕓苔屬植物最常使用的小孢子培養基改良自 Nitsch & Nitsch (1967) 鹽類配方，並添加胺基酸如麩醯胺酸 (l-glutamin)、絲胺酸 (l-serine) 的 NLN 液體培養基，蔗糖濃度在 8–17%，pH 值在 5.8–6.6 之間，常用之蔗糖濃度為 13%，pH 值為 6.1

或 6.2。NLN-13 培養基是油菜小孢子培養最常用的培養基配方，但薈苔屬中不同種蔬菜對於 NLN 鹽類濃度及蔗糖濃度有不同的反應 (Custers 2003)。Da Silva Dias (2001) 以 10 種青花菜進行試驗，指出 32.5℃處理 1 d 較處理 2 d 為佳，且使用 1/2 NLN 對於一些高反應品種較使用全量 NLN 有更佳之效果。在表 4 中「慶農 B-45」以全量及半量 NLN-13 配合 32℃處理 1–3 d 進行複因子試驗，雖然結果顯示各處理因子及其交感對總胚數/皿之影響差異並不顯著，但若將胚依大小區分來看，發現在大胚方面，培養基與高溫處理時間的交感作用對大胚數的影響顯著。以全量 NLN 培養基配合 32℃處理 1 d 獲得 5.5 胚/皿最高，但延長高溫處理時間至 3 d，則以 1/2NLN 培養基有較高之小胚數，顯示低鹽培養基中延長高溫處理時間對於阻礙胚發育的影響較小。

由小孢子發育而來的胚與體胚 (somatic embryo) 發育過程相似，經過圓形胚、心型胚、魚雷型胚後發育成為子葉期胚，小孢子發育至子葉期後，將從液體培養基繼代至固體培養基中培養，胚在發芽及發根後成為完整之植株。但有別於一般體胚具有高抽芽率之特性，小孢子發育而來之胚，培養於不含生長調節劑的培養基中分化成為小苗的比率偏低。一般而言，小孢子接種 3 wk 後肉眼即可見到各種發育時期的胚逐漸形成，將子葉期胚取出繼代至固態之 B5 或 MS 培養基培養，以甘藍種 (*B. oleracea*) 為例，體胚成功發育為植株的比率約在 35–70% 之間 (Babbar *et al*. 2004)。體胚亦可藉由培養基中添加 ABA (abscisic acid)、適度脫水、低溫 (4℃) 以及添加少量生長調節劑來提高成苗之比率 (Hansen 2000)。從表 5 總共 11 種促進胚發芽的處理結果來看，切除子葉、脫水、低溫皆有助於提高胚的抽芽率，其中以脫水處理對抽芽率的提高效果最佳。以溫度合併脫水處理來看，雖然 25℃溫度下脫水 1 d 抽芽率達 46.7%，但在 25℃溫度下延長脫水時間超過 1 d 即會對胚體造成傷害；而以 4℃低溫配合脫水處理 1–5 d 皆有助胚抽芽率之提高，顯示 4℃低溫配合脫水處理具有較穩定之抽芽促進效果，抽芽率在 35.0–48.3% 之間，符合一般對 *B. oleracea* 抽芽率之預期。

小孢子培養除作為形態發生研究之用外，主要作為快速培育純系之工具。由小孢子而來之植株，理論上應為單倍體，但實際上由小孢子培養而來之再生植株具有一定比率染色體倍加之情形，自然倍加之機制推測一為染色體複製後未分開，二為細胞分裂後分隔膜未發育，造成兩細胞的融合 (fusion)，二者皆能造成細胞染色體之倍加 (Aionesei *et al*. 2005)。以育種為目的的小孢子培養，主要在獲得同質結合具有稔性之 2 倍體 (DH) 植株，因此再生小苗的倍體性表現，關係到實務上是否需要進一步實施染色體倍加處理。影響小孢子植株倍體性表現的主要因子，包括 (1) 材料之基因型、(2) 小孢子的發育階段、(3) 培養的方法與條件。Takahata & Keller (1991) 使用青花菜小孢子培養獲得數百個再生植株，其中有超過 80% 是單倍體，但 Farnham (1998) 使用 6 個青花菜品種中，平均有 53–56% 是 2 倍體，表現最好之 'Marathon' 品種，2 倍體比率高達 78%。Da Silva Dias (2003) 之青花菜小孢子培養，其中自然倍加之 2 倍體比率為 43–88%，並建議 2 倍體比率高於 60% 以上者毋須進行染色體倍加處理。本試驗以「慶農 B-75」小孢子培養獲得之 23 株小苗進行流式細胞儀檢測，2 倍體之比率最高，達 60.9%；其次為單倍體之 34.8% 及 4 倍體之 4.3%，顯示「慶農 B-75」在小孢子培養過程中染色體自然倍加率高，DH 植株比率超過 60%，並不需要藉助秋水仙素處理即可獲得相當高比率之同質雙單元體，有助於育種實務上之利用。

引用文獻

Aionesei, T., A. Touraev, and E. Heberle-Bors. 2005. Pathways to microspore embryogenesis. p.11–34. *in*: Biotechnology in Agriculture and Forestry 56-Haploid in Crop Improvement. (Palmer, C. E., W. A. Keller, and K. J. Kasha, eds.) Springer-Verlag. Berlin, Germany. 318 pp.

Babbar, S. B., P. K. Agarwal, S. Sahay, and S. S. Bbhojwani. 2004. Isolated microspore culture of *Brassica*: An experimental tool for developmental studies and crop improvement. Indian J. Biotechnol. 3:185–202.

Chang, Y. M., P. C. Liou, and C. H. Hsiao. 1996. Anther culture of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *cap-*

itata) and broccoli (*B. oleracea* L. var. *italica*) I. Varieties, developmental stages and cultural medium relation with regeneration. J. Agric. Res. China 45:35–46. (in Chinese with English abstract)

Custers, J. B. M. 2003. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). p.185–193. *in*: Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. (Maluszynski, M., K. J. Kasha, B. P. Forster, and I. Szarejko, eds.) Kluwer Academic. Dordrecht, Netherlands. 428 pp.

Da Silva Dias, J. C. 2001. Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis. Euphytica 119:389–394.

Da Silva Dias, J. C. 2003. Protocol for broccoli microspore culture. p.195–204. *in*: Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. (Maluszynski, M., K. J. Kasha, B. P. Forster, and I. Szarejko, eds.) Kluwer Academic. Dordrecht, Netherlands. 428 pp.

Farnham, M. W. 1998. Doubled-haploid broccoli production using anther culture: Effect of anther source and seed set characteristics of derived lines. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 123:73–77.

Ferrie, A. 2003. Microspore culture of *Brassica* species. p. 205–215. *in*: Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. (Maluszynski, M., K. J. Kasha, B. P. Forster, and I. Szarejko, eds.) Kluwer Academic. Dordrecht, Netherlands. 428 pp.

Ferrie, A. M. R. and K. L. Caswell. 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell Tissue Organ Cult. 104:301–309.

Forster, B. P. and W. T. B. Thomas. 2005. Doubled haploids in genetics and plant breeding. Plant Breed Rev. 25:57–88.

Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151–158.

Hansen, M. 2000. ABA treatment and desiccation of microspore-derived embryos of cabbage (*Brassica Oleracea* ssp. *capitata* L.) improves plant development. J. Plant Physiol. 156:164–167.

Keller, W. A., T. Rajhathy, and J. Lacapra. 1975. *In vitro* production of plants from pollen in *Brassica campestris*. Can. J. Genet. Cytol. 17:655–666.

Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z. Pflanzenphysiol. 105:427–434.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473–497.

Nitsch, C. and J. P. Nitsch. 1967. The induction of flowering *in vitro* in stem segments of *Plumbago indica* L. I. The production of vegetative buds. Planta 72:355–370.

Pratap, A., S. K. Gupta, and Y. Takahata. 2009. Microsporogenesis and haploidy breeding. p.293–307. *in*: Biology and Breeding of Crucifers. (Gupta, S. K., ed.) CRC. New York. 385 pp.

Simmonds, D. H. and W. A. Keller. 1999. Significance of preprophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus*. Planta 208:383–391.

Takahata, Y. and W. A. Keller. 1991. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. Plant Sci. 74:235–242.

Thomas, E. and G. Wenzel. 1975. Embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. Z. Pflanzenzuecht. 74:77–81.

Wang, S. T., S. H. Hseu, K. S. Chen, C. C. Chiou, S. P. Li, C. Y. Lin, H. L. Lo, J. N. Lin, M. M. Hsu, C. F. Hong, L. C. Chang, and P. H. Chen. 2011. Adjusting breeding strategies of cruciferous vegetable to match challenges of climate change. p.135–152. *in*: Proceeding of the Workshop on Crop Breeding and Management of Agricultural Environment for Coping with Climate Change. (Wu, D. H., M. T. Lu, T. H. Tseng, Y. T. Wang, and C. L. Hsiao, eds.) Taiwan Agricultural Research Institute. Taichung, Taiwan. 214 pp. (in Chinese with English abstract)

Development of Microspore Embryogenesis and Plant Regeneration of *Brassica oleracea* var. *italica*

Chi-Ni Hsia[1,*], Uei-Chern Chen[2], Chin-Yi Tsao[3], and Yi-Mei Chou[4]

Abstract

Hsia, C. N., U. C. Chen, C. Y. Tsao, and Y. M. Chou. 2017. Development of microspore embryogenesis and plant regeneration of *Brassica oleracea* var. *italica*. J. Taiwan Agric. Res. 66(3):184–192.

Brassica oleracea var. *italica* is an important vegetable in the world with rich nutrition for human health. The objective of this study was to establish a microspore culture system using elite broccoli F_1 hybrids from Taiwan to produce doubled-haploid (DH) lines for breeding purpose. Microspores taken from 5 commercial F_1 hybrids were surveyed for embryogenesis. Microspores were inoculated with 4×10^4 microspores/mL into NLN-13 medium in combination with a heat shock treatment at 32℃ for 1 d before moving to 25℃ for culturing. Embryo induction was found derived from 3 out of 5 cultivars, among them 'Chinglong B-45' had the highest embryogenesis rate. However, two cultivars were found without any embryogenesis. Microspores of 'Known-you Tender green' were taken from two different bud lengths for embryogenesis. A higher embryo induction rate (17.1 embryos/petri dish) was obtained from 4.0–5.0 mm length of bud than that of from 3.0–3.9 mm length of bud (7.0 embryos/petri dish). An experiment using two culture media in combination with three durations at 32℃ was conducted using 'Chinglong B-45'. Among six treatments, NLN medium with 1-d culturing at 32℃ had the highest embryogenesis with 6.9 embryos/petri dish. Various stress treatments were conducted using cotyledonary embryos derived from 'Chinglong B-75' to improve germination. Treated embryos were precultured on the hormone containing medium for 1-week followed by 4 wk culturing on a hormone-free medium for shoot germination. A low shoot germination rate of 1.7% was obtained from the control which was without any stress treatment. In contrast, shoot germination rate of 46.7% and 48.3% were obtained from filter paper dry treatments at either 25℃ for 1 d or at 4℃ for 5 d, respectively. Ploidy levels were analyzed using flow cytometry for a total of 23 microspores derived plants of 'Chinglong B-75'. Rates of 34.8% and 60.9% were obtained for haploid and diploid, respectively. A high DH production rate of 60% derived from the microspore culture would facilitate breeding program in practice.

Key words: Broccoli, Embryogenesis, Doubled haploid.

Received: March 16, 2016; Accepted: April 15, 2016.
* Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw
[1] Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Contract Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 66(3):193–201 (2017)
DOI: 10.6156/JTAR/2017.06603.03

研究報告

內生真菌 *Lasmenia* sp. CB10 菌株培養基質之篩選暨評估其防治番茄萎凋病之潛力

羅佩昕[1]　鍾文全[2]　鍾文鑫[3,*]

摘要

羅佩昕、鍾文全、鍾文鑫。2017。篩選內生真菌 *Lasmenia* sp. CB10 菌株之培養基質暨評估其防治番茄萎凋病之潛力。台灣農業研究 66(3):193–201。

本研究將分離自佛手柑之內生真菌 *Lasmenia* sp. CB10 菌株培養於不同基質，證實 CB10 菌株培養於米糠 (rice bran) 之基質 (簡稱 RBCB10) 對抑制番茄萎凋病菌 Fol146 菌株菌絲生長效果最佳。測試於栽培介質混合不同比例之 RBCB10 對番茄植株生長影響，結果指出混合 0.5% (w/v) 或 1% (w/v) 之 RBCB10 皆不會影響番茄生長。進一步將 0.5% (w/v) RBCB10 與帶 Fol146 菌株之感染土混合，證實添加 RBCB10 可減少 Fol146 菌株之族群量。另比較 RBCB10 基質之不同施用方式對其防治番茄萎凋病之效果，得知以混合 0.5% (w/v) RBCB10 之泥炭土作為育苗介質，可降低萎凋病的罹病度達 26.7%；而直接將 0.5% (w/v) RBCB10 添加於感染土之處理，則可降低萎凋病罹病度達 40.7%。未來於田間試驗時可直接以添加方式將 RBCB10 混合於土壤中，以達延緩番茄萎凋病之效果。

關鍵詞：內生真菌、*Lasmenia* sp.、番茄萎凋病、米糠。

前言

植物內生菌 (endophytes)，目前被廣泛接受之定義為「生物體在生活史的某一階段進入植物體內，並纏據於植物組織中，且不會引起寄主植物產生任何病徵者」(Petrini 1991)。目前已知內生真菌可於寄主植物體內產生特殊之二次代謝產物，保護寄主植物不受到病原菌或害蟲之感染與攻擊 (Strobel & Daisy 2003)。內生真菌的寄主廣泛，從草本植物到木本植物體內皆有分佈，且可產生與寄主植物相似的代謝產物，其中研究最多的為中草藥植物之內生真菌 (Strobel 2002; Tejesvi *et al*. 2007)。中草藥內生真菌除於醫藥之應用外，近年來更擴展到農業，Proença Barros & Rodrigues-Filho (2005) 指出，自芸香科月橘 [*Murraya paniculata* (L.) Jack] 所分離出內生真菌 *Eupenicillium* sp. 可產生具殺蟲效果之 Alantryphenone、Alantrypinene 及 Alantryleunone 等生物鹼。此外，自中草藥錫蘭肉桂 (*Cinnamomum zeylanicum* J. Presl) 中所分離到內生真菌 *Muscodor albus* Worapong, Strobel & W.M. Hess，亦可產生抑制植物與人體病原菌生長效果的揮發性氣體，為具潛力之微生物薰蒸劑 (mycofumugation) (Strobel *et al*. 2001)。

根據行政院農業委員會 2014 年農業統計年報，台灣番茄種植以嘉義縣、台南市及高雄市種植面積最廣。目前台灣已記錄可為害番茄之病原有 10 種真菌性、3 種細菌性、6 種病毒及 1 種線蟲 (Wang 1995; Hsu *et al*. 2002)。其中，由 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen 所引起之番茄萎凋

投稿日期：2016 年 8 月 31 日；接受日期：2016 年 11 月 1 日。
* 通訊作者：wenchung@nchu.edu.tw
[1] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植保系助理研究員。台灣 高雄市。
[2] 農委員種苗改良繁殖場生物技術課研究員兼課長。台灣 台中市。
[3] 國立中興大學植物病理學系教授。台灣 台中市。

病 (Fusarium wilt of tomato) 為栽培主要限制因子；該病害為土壤傳播性病害，於番茄幼苗或成株所造成病徵包含植株矮化、下位葉黃化及維管束褐化 (Huang *et al*. 2012)。對於防治番茄萎凋病，目前並無推薦藥劑。因此，台灣目前主要以篩選或培育抗病品種防治該病害；而對於不抗病之品種，則搭配適當的栽培管理方式減少番茄萎凋病的影響，包括：(1) 栽種抗病嫁接種苗與健康種苗；(2) 種子消毒；(3) 接種內生菌根菌，或以其他尖鐮胞菌進行交叉保護；(4) 清除病株並減少灌水避免傳播；(5) 發病田不連作種植番茄，可與水稻進行輪作 (Sun & Huang 1996; Huang *et al*. 2012)。另於生物防治方面，有許多研究指出，*Penicillium oxalicum*、*Trichoderma* sp.、菌根菌及 *Pseudomonas* sp. 具有降低番茄萎凋病的發病情形 (De Cal *et al*. 1999; Srivastava *et al*. 2010)。

隨著對農業安全與環境問題的重視，許多高毒或難分解之化學農業藥劑已逐漸退出市場，因此尋找合適防治病蟲害之替代方式是未來重要課題。應用內生真菌作為土壤添加物或以二次代謝產物防治番茄萎凋病之研究甚少；本研究嘗試利用 Ho (2011) 於台中市新社種苗繁殖改良場之芸香科中草藥植物佛手柑 (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle) 莖頂幼葉處分離，菌株代號為 CB10 之 *Lasmenia* sp. 內生真菌防治番茄萎凋病。先前研究已發現，CB10 菌株對台灣地區常見的 9 種植物病原真菌與病原細菌，具有抑制生長效果，其中對 *Fusarium oxysporum* 具有良好之生長抑制效果。本研究目的為：(1) 測試 *Lasmenia* sp. CB10 菌株於不同培養基質中對 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 菌株 Fol146 之抑制效果；(2) 分析添加含 *Lasmenia* sp. CB10 菌株之栽培基質對番茄生長之影響；(3) 評估於溫室環境下，施用含 *Lasmenia* sp. CB10 菌株栽培基質對防治番茄萎凋病 (Fusarium wilt of tomato) 之效果。

材料與方法

供試菌株來源

內生菌株代號 CB10 為 Ho (2011) 自台中市新社種苗繁殖改良場內，中草藥植物佛手柑莖頂幼葉處所分離之內生真菌 *Lasmenia* sp.，由中興大學植物寄生菌暨農藥抗藥性分子診斷實驗室提供。自砂管 (10 g soil, 1 g agar, 100 mL dH_2O) 移至馬鈴薯蔗糖瓊脂 (potato sucrose agar, PSA) 平板培養基與斜面中，於 25℃無燈照之精密恆溫生長箱中培養 7 d 後備用。

本研究所供試番茄萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) 為保存於中興大學植物寄生菌暨農藥抗藥性分子診斷實驗室之菌株，菌株代號 Fol146，單孢培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA) 斜面培養基中，於 28℃精密恆溫生長箱循環光照 12 h 進行培養 7 d 後備用。

番茄萎凋病之感染土製備

將 2 管培養 7 d 之 Fol146 菌株各以 9 mL 之無菌水將孢子洗下，並將孢子懸浮液加入經高溫高壓 (121℃, 15 1b, 20 min) 滅菌過的燕麥砂培養基 (砂土：燕麥：水 = 200 : 100 : 30) (w : w : v) 中，置於室溫 (25–28℃) 下培養，每週將燕麥砂培養基均勻搖晃混合，使內部菌絲均勻生長。培養 2 wk 後，將其取出並加入相同體積 (約 300 g) 預先以網篩 (20 mesh, 0.840 mm) 篩過並經 2 次高溫高壓滅菌過之田土均勻混拌，加入 10–20 mL 無菌水使其濕潤，再經培養 1 wk 後進行陰乾。陰乾後之混合土以四兩裝粉碎機 (RT-04, Taiwan) 磨碎備用，作為後續試驗的人工混菌感染土的接種源。製備完成之番茄萎凋病菌 (Fol146) 土壤以五氯硝苯蛋白胨瓊脂 (quintozene peptone agar; PCNB) 平板測定族群量方法測定其族群量 (Nash *et al*. 1962)。

測試不同基質培養 *Lasmenia* sp. CB10 菌株對番茄萎凋病菌菌絲生長的抑制效果

選取燕麥粒 (oat grain)、小麥粒 (wheat grain)、米糠 (rice bran)、豆粕 (soybean meal)、芝麻粕 (sesame meal) 及太空包木屑 (mushroom sawdust) 做為測試基質，將上述基質磨製為粉狀 (≤ 0.1 cm) 後，秤取 40 g 之固態基質置於蘭花組織培養瓶中，並加入 16 mL 無

菌水 (水分相對含量 40%)，以高溫高壓滅菌後冷卻。將 25℃無照光培養 7 d 之 *Lasmenia* sp. CB10 菌株，以內徑 8 mm 之打孔器，切取菌落邊緣之菌絲圓盤，取 8 個菌絲圓盤放入裝有固態基質之蘭花組織培養瓶中，放置於 25℃無照光培養 28 d 後供後續實驗使用。

以內徑為 8 mm 之打孔器於 PSA 平板中央切取培養基圓盤後，使於培養基形成圓凹槽。將已培養 CB10 菌株之不同基質填滿凹槽，於 25℃無照光培養 3 d 後，以微量噴瓶將番茄萎凋病菌 (Fol146) 之孢子懸浮液 (1×10^4 spores mL^{-1}) 噴灑於 CB10 菌株之菌落周圍。以 CB10 菌株培養在 PSA 之 8 mm 菌絲圓盤作為對照組，於 25℃無照光培養 5 d 後記錄抑制圈大小，每處理 3 重複。

添加不同比例 RBCB10 對番茄生長之影響

由上述結果顯示，培養於米糠基質之 *Lasmenia* sp. CB10 菌株，有增加其抑制番茄萎凋病菌 Fol146 菌株生長之效果，因此後續試驗皆以米糠 (rice bran, RB) 為 CB10 之培養基質，所得含 CB10 菌株之米糠稱為 RBCB10。試驗之進行係先行將 RBCB10 以 0.5% 與 1% (w/v) 之比例分別添加於經高溫高壓滅菌之泥炭土 (BVB Substrate, The Netherlands) 中，並將其均勻混合，作為育苗介質。爾後將於無菌水內以 120 rpm 搖瓶 3 d 之番茄種子 (農友 301，台灣) 播種於含 RBCB10 之穴苗盤 (8 cm × 16 cm) 中，於播種 7 d 後開始觀察植株生長勢，並量測番茄植株葉片數 (leaf number) 與株高 (plant height)，每週量測 1 次，共量測 3 wk。試驗中以 0.5% 與 1% (w/v) 比例之 RB 分別添加於經高溫高壓滅菌之泥炭土與未添加任何基質之泥炭土作為對照組。本試驗每處理重複 5 次，每重複 3 株。

評估 RBCB10 抑制土壤中番茄萎凋病菌之效果

依前項試驗結果，證實以 0.5% 或 1.0% (w/v) 比例混合 RBCB10 後，與無添加之泥炭土比較，指出對番茄生長無顯著影響，故後續試驗以 0.5% (w/v) 比例混合 RBCB10。將 100 g 含 Fol146 菌株 (5×10^3 propagules g^{-1} soil) 之感染土分裝至 8 cm × 12 cm 的 PP 材質塑膠袋內，再以 0.5% (w/v) 比例之 RBCB10 加入後均勻混合。本試驗以混合 0.5% (w/v) RB 與未混合基質之泥炭土作為對照組。混合後靜置於室溫 (24–28℃)，7 d 後開始計算各處理內 Fol146 菌株之菌量，並以 7 d 為間隔，共調查 6 次。每次調查以取出 10 g 混合基質之泥炭土添加於 90 mL 之無菌水中，均勻震盪後，進行 10× 系列稀釋並塗佈至 PCNB 平板，5–7 d 後計算菌落數量，並推算每克感染土中番茄萎凋病菌之菌量。

比較不同 RBCB10 施用方式防治番茄萎凋病之效果

本試驗比較 2 種施用方式對防治番茄萎凋病之效果，第 1 種為以混合 0.5% (w/v) RBCB10 做為育苗介質，將番茄種子先行播種於已含 RBCB10 之泥炭土，待播種 21 d 後將番茄幼苗移至 4.5 cm 含有番茄萎凋病菌 (Fol146) 感染土 (5×10^3 propagules g^{-1} soil) 之塑膠軟盆中。試驗中以泥炭土混拌 0.5% (w/v) RB 基質與泥炭土未做任何添加者作為對照組。各處理置於溫室 (25–35℃)，移植 7 d 後開始觀察並計算罹病度，且每隔 7 d 觀察 1 次，共觀察 7 次。每處理 5 重複，每重複 3 株。

第 2 種方法為，將 RBCB10 以 0.5% (w/v) 比例直接與含 Fol146 番茄萎凋病菌 (5×10^3 propagules/g soil) 之感染土進行均勻混拌後，分裝於 7.5 cm 黑色塑膠軟盆，將已有 2–3 片真葉之番茄幼苗移植於該塑膠軟盆。試驗中以泥炭土混拌 0.5% (w/v) 比例之 RB 與泥炭土未做任何添加者作為對照組。各處理置於溫室 (25–35℃)，移植 7 d 後開始觀察並計算罹病度，且每隔 7 d 觀察 1 次，共觀察 7 次。每處理 3 重複，每重複 3 株。

本項試驗番茄萎凋病之罹病等級分為 0–3 級：0 級為無葉片黃化萎凋；1 級為 < 50% 之葉片黃化；2 級為 > 50% 之葉片黃化；3 級為全株黃化萎凋、死亡。並依照下列公式計算其罹病度 (disease severity)：

$$\text{Disease severity (\%)} = \frac{0 \times n_0 + 1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3}{N \times 3} \times 100$$

$n_0 - n_3$ = 各級罹病的植株數，N = 總植株數。

結果

不同基質培養 CB10 菌株對番茄萎凋病菌菌絲生長抑制效果

CB10 菌株於不同基質上抑制番茄萎凋病菌之效果顯示，以米糠 (rice bran) 培養 CB10 菌株可得到較好之抑菌效果，於培養 CB10 菌株之米糠基質周圍產生明顯的抑制圈達 1.5 cm，豆粕 (soybean) 次之，抑制圈 1.2 cm (圖 1)。然而，以芝麻粕 (sesame meal) 或太空包木屑 (mushroom sawdust) 作為基質培養 CB10 菌株，對番茄萎凋病菌生長之抑制效果不佳，抑制圈僅分別為 0.4 cm 與 0.3 cm。

添加不同比例 RBCB10 對番茄生長之影響

以 0.5% 與 1% (w/v) 比例之 RBCB10 混合於泥炭土後，將番茄種子播入。番茄植株量測結果顯示，葉片數目於種植 21 d 後，以 0.5% 或 1% (w/v) 比例之米糠 (RB) 混合之泥炭土與未添加之對照組比較，雖無顯著差異但有減少番茄葉片數之情形；而混以 0.5% 或 1.0% (w/v) 比例之 RBCB10 之泥炭土，則可增加番茄植株之葉片數，其中又以混合 1% (w/v) 比例之 RBCB10 的結果最顯著 (表 1)。另株高量測結果顯示，以泥炭土中分別混合 0.5% 與 1% (w/v) 比例之 RBCB10 與未添加之泥炭土，番茄株高分別為 12.4、13.2 及 12.8 cm，無顯著差異；然泥炭土中混合 0.5% 或 1% (w/v) 比例之 RB，其株高分別為 10.5 cm 與 8.0 cm，顯示 RB 對番茄之生長有抑制情形，而以混合 1% (w/v) RB 之泥炭土影響番茄幼苗生長最明顯 (表 1)。

RBCB10 對土壤中番茄萎凋病菌之抑制效果

將 RBCB10 以 0.5% (w/v) 比例混合帶 Fol146 之感染土後，調查感染土中 Fol146 菌株量變化，結果得知混合後第 21 天，Fol146 族群量由 5×10^3 propagules g^{-1} soil 下降至 1.6×10^3 propagules $^{-1}$g soil，第 42 天則下降至 8.4×10^2

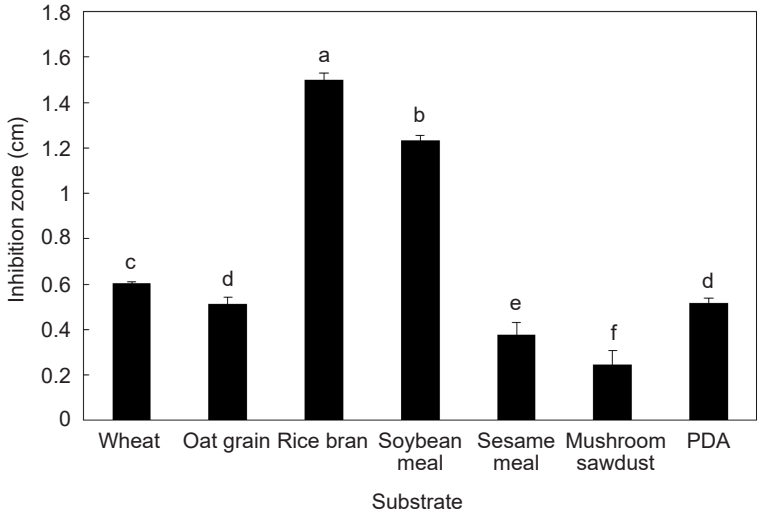


圖 1. *Lasmenia* sp. CB10 菌株培養於不同基質上對其抑制番茄萎凋病菌 (Fol146) 之影響。

Fig. 1. Efficacy of *Lasmenia* sp. CB10 cultured on different substrates on inhibiting the mycelium growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol146. Means with the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ according to LsD test.

表 1. 溫室條件下以不同比例混合米糠 (rice bran, RB) 與培養 *Lasmenia* sp. CB10 菌株之米糠 (RBCB10) 對番茄生長影響。

Table 1. Effect of soil mixed with different ratios of rice bran (RB) and RB grew by *Lasmenia* sp. CB10 on the growth of tomato in the greenhouse.

	Leaf number			Plant height (cm)		
Treatment	7[z]	14	21	7	14	21
0.5% RB[y]	1.5	2.1	2.6 bc	4.9	8.6	10.5 b[x]
1% RB	1.3	1.8	2.4 c	3.6	4.7	8.0 c
0.5% RBCB10[w]	2.0	2.3	2.9 b	4.9	9.5	12.4 a
1% RBCB10	1.9	1.9	3.4 a	4.7	6.2	13.2 a
CK (soil)	1.8	2.0	2.7 bc	5.3	8.7	12.8 a

[z] The day after treatment.
[y] Rice bran.
[x] Means followed by the same letter(s) in the column are not significantly different at $P < 0.05$ according to LSD test.
[w] *Lasmenia* sp. CB10 grown on rice bran for 28 d.

propagules g^{-1} soil；而感染土中添加米糠與未添加基質之 Fol146 感染土，於第 42 天仍分別維持在 3 × 103 propagules g^{-1} soil 與 2 × 10^3 propagules g^{-1} soil (圖 2)。結果證實，添加 RBCB10 後，具有降低土壤中番茄萎凋病菌之族群量的效果。

不同 RBCB10 施用方式對番茄萎凋病之防治效果

以混合 0.5% (w/v) RBCB10 之泥炭土作為育苗介質之方式之結果顯示，移植後第 49 天，以 0.5% (w/v) RBCB10 為番茄育苗基質之處理組，罹病度為 66.2%，而未添加之泥炭土與混合 0.5% (w/v) RB 之泥炭土的罹病度，分別為 88.9% 與 77.8%，指出混合 0.5% (w/v) RBCB10 為育苗介質之處理具有延緩病害發生的效果，罹病度可降低 26.7% (圖 3 A)。

另將 RBCB10 以 0.5% (w/v) 比例直接與感染土進行混合，並移植已長出 2–3 片真葉之番茄幼苗之方式，結果得知於幼苗移植 49 d 後，其罹病度為 55.6%；而以 0.5% (w/v) 比例混合 RB 之處理與未添加任何基質之泥炭土，

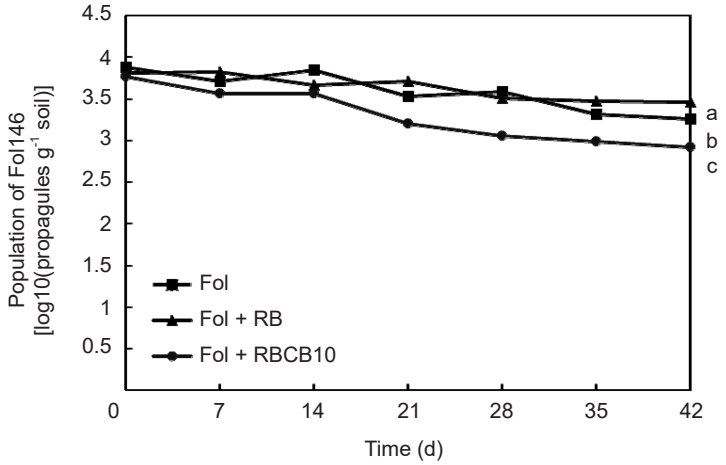


圖 2. 感染土混合 0.5% (w/v) RBCB10 介質後對其中番茄萎凋病菌 (Fol146) 族群量之影響。

Fig. 2. Effect of 0.5% (w/v) RBCB10 mixed with infested soil on the population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Fol146. Means with the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ according to LsD teg.

罹病度分別為 96.3% 與 100.0%，指出以直接混合 0.5% (w/v) 比例 RBCB10 之處理，亦具有延緩病害發生之效果，番茄萎凋病之罹病度可降低 40.7% (圖 3 B)。

討論

將 *Lasmenia* sp. CB10 菌株培養於不同基質，測試其對番茄萎凋病菌菌絲生長抑制效果，顯示於米糠與豆粕基質生長的 CB10 菌株，對番茄萎凋病菌之菌絲生長具有較好抑制效果，而培養於太空包木屑基質之抑制效果最不顯著。由於本研究所供試之各種基質內的碳氮素之比例不同，而碳氮素的比例不同會影響活性物質的產生 (Ripa *et al*. 2009)。米糠與豆粕為高氮含量物質，而太空包木屑則為高碳含量物質 (Huang & Peng 2008)；即基質中的碳氮比例可能為影響 CB10 菌株抗菌活性物質分泌能力之因子。

於溫室條件下，比較添加不同比例之 RBCB10 是否影響番茄植株生長發育。結果指出，混合 1% (w/v) RBCB10 之泥炭土，雖能增加番茄幼苗之葉片數，但於株高影響上，添加 0.5% 或 1.0% (w/v) 之 RBCB10 對株高並無顯著影響，推測 CB10 菌株對幼苗無明顯生長促進效果。反之，只添加 1% (w/v) 比例之米糠影響番茄幼苗生長顯著，可造成植株矮小。Khan *et al*. (2007) 曾指出，未發酵之米糠，遇水進行發酵後所產生之高溫、氧氣消耗及產生大量還原與毒害物質會抑制雜草的生長或發芽。推測 1% (w/v) 比例之米糠於土壤中可能因發酵，產生高熱或有害物質，進而影響番茄植株根部之發展；而添加 1% (w/v) RBCB10，由於米糠已部分被 CB10 菌株所分解利用，降低對番茄植株生長之負面影響。雖添加 0.5% (w/v) 比例之米糠亦可能於土壤中發酵，但相對土壤比例較少，有害物質於土壤稀釋下，對於番茄根部造成傷害不明顯。因此，在考量未來田間施用與可能風險，混合 0.5% (w/v) RBCB10 被認為是進行植株番茄植株育苗與防治番茄萎凋病較合適之比例。

溫室條件下，比較不同 RBCB10 之施用方式對番茄萎凋病的防治效果，結果顯示以混合 RBCB10 之泥炭土做為育苗介質之方式，或 RBCB10 直接添加於感染土之方式皆可延緩番茄萎凋病之發病情形，但以直接添加於感染土之處理效果較佳。將混合 RBCB10 之泥炭土做為育苗介質，雖有機會讓 CB10 菌株先行纏據於番茄幼苗根圈，但於後續觀察中 CB10 菌株未有大量纏據於根圈的現象 (結果未呈現)；推測原因為番茄根系之分泌物無法吸引 CB10 菌株，造成 CB10 菌株纏據於番茄根圈的效果有限；且 CB10 菌株生長緩慢，導致延緩番茄

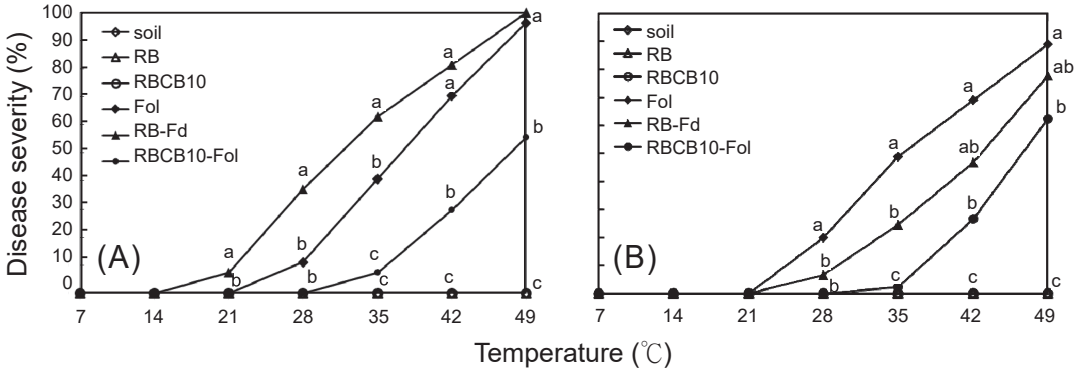


圖 3. 溫室條件下不同施用 0.5% (w/v) RBCB10 的方式對其防治番茄萎凋病之效果。(A) 以 RBCB10 作為育苗介質 ; (B) RBCB10 直接與感染土混合。

Fig. 3. Efficacy of 0.5% (w/v) RBCB10 with different treating way on control of Fusarium wilt in the greenhouse. (A) RBCB10 mixed with peat moss as seedbed soil; (B) seedlings planted on infested soil amended with 0.5% (w/v) RBCB10. Means with the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ according to LsD teg.

萎凋病之效果較不明顯。雖 Larena *et al*. (2003) 曾指出，將 *Penicillium oxalicum* 菌株於番茄移植前施用，可使 *P. oxalicum* 菌株有效於育苗介質中與根圈建立穩定的族群量，對番茄萎凋病具持續性的防治效果，然而 CB10 菌株卻不明顯，可能因 CB10 菌株係分離自佛手柑，與番茄之親合性不足有關。

透過 RBCB10 直接與感染土混合對土壤中番茄萎凋病菌之抑制試驗中，顯示將 RBCB10 直接添加於感染土之施用方式中，CB10 菌株可能有較高機率與番茄萎凋病菌直接接觸。由於米糠基質已先行長滿一定的族群量，且同一空間內同時存在病原菌，因此當 CB10 菌株受到病原菌之威脅時，其抗菌物質之分泌可能會提高。Vinale *et al*. (2009) 曾指出，當防治菌與病原菌共同培養時，可促進防治菌分泌二次代謝產物之能力。本研究中亦觀察到，添加米糠於感染土之處理，其發病情形較不混合任何基質帶菌土之處理嚴重，推測添加米糠後，可能成為土壤中番茄萎凋病菌之養分來源，導致番茄萎凋病菌生長更快。Tu *et al*. (1992) 研究指出，土壤中加入有機質可利於土壤中病原菌的生長。依上述結果，未來於田間應用 CB10 菌株防治土傳病害時，將 RBCB10 以直接添加方式混合於帶有番茄萎凋病菌之土壤中，透過添加方式直接抑制病原菌之生長，進而延緩病原菌感染番茄根部，達到降低番茄萎凋病病勢發展的效果。本研究尚未評估一次施用與多次施用方式對防治番茄萎凋病之效果，未來可進一步於田間進行試驗。

引用文獻

De Cal, A., R. García-Lepe, S. Pascual, and P. Melgarejo. 1999. Effects of timing and method of application of *Penicillium oxalicum* on efficacy and duration of control of Fusarium wilt of tomato. Plant Pathol. 48:260–266.

Ho, M. Y. 2011. The Study of Biodiversity of Endophytic Fungi from Chinese Herb and Its Application on Control of Vegetable Disease. Master Thesis, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing Unversity. Taichung, Taiwan. 55 pp. (in Chinese with English abstract)

Hsu, S. T., T. T. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsay. 2002. List of plant diseases in Taiwan. p. 50–52. *in*: List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathological Society. Taichung. 386 pp. (in Chinese)

Huang, C. H., P. D. Roberts, and L. E. Darnoff. 2012. Fusarium diseases of tomato. p.145–158. *in*: Fusarium Wilts of Greenhouse Vegetable and Ornamental Crops. (Gullino, M. L., J. Katan, and A. Garibaldi, eds.) American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 256 pp.

Huang, J. W. and Y. H. Peng. 2008. Development of container medium and organic amendment with agricultural wastes. p.127–136. *in*: Proceedings of Symposium on Plant Disease Management in the Era of Energy-Saving and Carbon Reduction. November 20, 2008. Taichung, Taiwan. Taiwan Agricultual Research Institute Council of Agriculture, Executive Yuan, Taichung, Taiwan. (in Chinese)

Khan, M. A. I., K. Ueno, S. Horimoto, F. Komai, K. Tanaka, and Y. Ono. 2007. Evaluation of the use of rice bran compost for eco-friendly weed control in organic farming systems. Am. J. Environ. Sci. 3(4):234–239.

Larena, I., P. Sabuquillo, A. Melgarejo, and A. De Cal. 2003. Biocontrol of Fusarium and Verticillium wilt of tomato by *Penicillium oxalicum* under greenhouse and field conditions. J. Phytopathol. 151:507–512.

Nash, S. M. and W. C. Snyder. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot Fusarium in field soils. Phytopathology 52:567–572.

Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. p.179–197. *in*: Microbial Ecology of Leaves. (Andrews, J. H. and S. S. Hirano, eds.) Springer. New York. 499 pp.

Proença Barros, F. A. and E. Rodrigues-Filho. 2005. Four spiroquinazoline alkaloids from *Eupenicillium* sp. isolated as an endophytic fungus from leaves of *Murraya paniculata* (Rutaceae). Biochem. Syst. Ecol. 33:257–268.

Ripa, F. A., F. Nikkon, S. Zaman, and P. Khondkar. 2009. Optimal conditions for antimicrobial metabolites production from a new *Streptomyces* sp. RUPA-08PR isolated from bangladeshi soil. Mycobiology 37:211–214.

Srivastava, R., A. Khalid, U. S. Singh and A. K. Sharma. 2010. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. Biol. Control 53:24–31.

Strobel, G. A. 2002. Microbial gifts from rain forests. Can. J. Plant Pathol. 24:14–20.

Strobel, G. and B. Daisy. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67:491–502.

Strobel, G. A., E. Dirkse, J. Sears, and C. Markworth. 2001. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. Microbiology 147:2943–2950.

Sun, S. and Z. Huang. 1996. Plant Fusarium Diseases in Taiwan. Shih Wei. Taichung, Taiwan. 170 pp. (in Chinese)

Tejesvi, M. V., M. S. Nalini, B. Mahesh, H. S. Prakash, K. R. Kini, H. S. Shetty, and V. Subbiah. 2007. New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. Boletin de la Sociedad Química de México 1:19–26.

Tu, C. C., T. F. Hsieh, and W. H. Tsai. 1992. Studies on control of lily southern blight by application of soil amendments. J. Agric. Res. China 41:280–294. (in Chinese with English abstract)

Vinale, F., E. L. Ghisalberti, K. Sivasithamparam, R. Marra, A. Ritieni, R. Ferracane, S. Woo, and M. Lorito. 2009. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. Lett. Appl. Microbiol. 48:705–711.

Wang, T. C. 1995. Diseases of Solanaceous vegetables. p.43–54. *in*: Taiwan Agricultural Encyclopedia. 3rd ed. (Lin, I. S., C. H. Cheng, and W. C. Kao, eds.) Taiwan Agricultual Research Institute Council of Agriculture, Executive Yuan. Taichung, Taiwan. 500 pp. (in Chinese)

Screening the Culture Substrates for Endophytic Fungi, *Lasmenia* sp. CB10, and Evaluation of Its Effect on Control of Tomato Fusarium Wilt

Pei-Hsin Lo[1], Wen-Chuan Chung[2], and Wen-Hsin Chung[3,*]

Abstract

Lo, P. H., W. C. Chung, and W. H. Chung. 2017. Screening the culture substrates for endophytic fungi, *Lasmenia* sp. CB10, and evaluation of its effect on control of tomato fusarium wilt. J. Taiwan Agric. Res. 66(3):193–201.

The endophytic fungi *Lasmenia* sp. CB10 was isolated from medicinal plant, fingered citron (*Citrus medica* var. *sarcodactylis*). The screening test indicated that CB10 grew in rice bran (RBCB10) showed highly efficacy on inhibiting the mycelium growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol146). Moreover, peat moss mixed with 0.5% or 1% (w/v) RBCB10 did not promote the growth of tomato seedlings significantly. The control efficacy demonstrated that the infested soil of Fol146 mixed with 0.5% (w/v) RBCB10 could decrease the population of Fol146. Compared with different application method of RBCB10, the peat moss mixed with 0.5% (w/v) RBCB10 used as seedbed soil then the tomato seedlings were transplanted into infested soil of Fol146 could decrease 26.7% disease severity of tomato Fusarium wilt. On the other hand, the infested soil of Fol146 mixed with 0.5% (w/v) RBCB10 directly could decrease the disease severity by 40.7%. The results suggested that field soil mixed with RBCB10 directly might be suitable for delaying the severity of tomato Fusarium wilt under field condition.

Key words: Endophytic fungi, *Lasmenia* sp., Fusarium wilt, Rice bran.

Received: August 31, 2016; Accepted: November 1, 2016.
* Corresponding author, e-mail: wenchung@nchu.edu.tw
[1] Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agriculture Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
[2] Research Fellow and Chief, Propagation Technology Division, Seed Improvement and Propagation Station, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Professor, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 66(3):202–218 (2017)
DOI: 10.6156/JTAR/2017.06603.04

研究報告

Cymbidium ringspot virus 核酸及血清檢測法之建立及其應用

陳金枝 [1,*]　江芬蘭 [2]

摘要

陳金枝、江芬蘭。2017。*Cymbidium ringspot virus* 核酸及血清檢測法之建立及其應用。台灣農業研究 66(3):202–218。

Cymbidium ringspot virus (CymRSV) 為國外已有發生之病毒，目前國內尚未有此病毒之發生紀錄。本研究針對此病毒進行其核酸及血清檢測試劑製備，以應用於蘭花病毒監測。核酸檢測法方面，以對應 CymRSV 鞘蛋白 (coat protein; CP) 之核苷酸序列設計 2 組引子對，應用於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應法 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)。CyRcpu/CyRcpd 引子對可增幅出涵蓋 CymRSV-CP 基因全長及其兩端序列共約 1370 bp 之片段，CyRu/CyRd 引子對可增幅出 CymRSV-CP 基因高保留區約 540 bp 之片段，於 RT-PCR 中均可成功檢測到市售之 CymRSV RNA 標準對照品 (DSMZ 出品)，獲得與預估分子量相符之核酸增幅產物。CyRu/CyRd 引子對於 60℃煉合溫度下，於 RT-PCR 法中可專一性檢出 CymRSV。另外，針對 CymRSV-CP 基因序列設計 4 條引子 (CyR-FIP/CyR-BIP/CyR-F3/CyR-B3)，以反轉錄-恆溫環形核酸增幅法 (reverse transcription Loop-mediated isothermal amplification; RT-LAMP)，可於 65℃恆溫條件下於 1 h 反應中成功擴增此病毒核酸分子，並直接以目視法判讀反應結果，可專一性檢出 CymRSV 之標準對照品，且有高於 RT-PCR 約 25 倍之靈敏度。在免疫檢測法方面，以人工基因合成 CymRSV 全長度鞘蛋白核酸片段，並構築於 pET28b 表現載體，於 *Escherichia coli* (Rosetta) 細菌宿主中進行蛋白表現，獲得分子量約 41.8 kDa 之融合性表現蛋白 (BEP189)，且可與 2 種國外市售之 CymRSV 多元抗體產生正反應；以 BEP189 做為抗原所製備出之多元抗體 (CymRSV#189) 於間接式-酵素連結免疫吸附反應 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA) 及西方墨點法 (western blotting) 反應中，均可與其同源之表現蛋白及國外市售之 CymRSV 免疫檢測標準品產生正反應，但不與健康蘭花組織以及 9 種其他蘭花病毒產生正反應，自製之多元抗體可成功應用於 CymRSV 之專一性免疫檢測與鑑別。本研究首次開發 RT-LAMP 法於 CymRSV 之核酸快檢以輔助對此病毒之鑑定，並研發可實務應用於蘭花上對 CymRSV 監測之 RT-PCR 技術，且自製之多元抗體可有效地鑑別 CymRSV。

關鍵詞：CymRSV、血清檢測、RT-PCR 檢測、反轉錄-恆溫環形核酸增幅法。

前言

Cymbidium ringspot virus (CymRSV) 屬於 *Tombusviridae* 科、番茄叢矮病毒屬 (*Tombusvirus*) 的球型病毒，為單股 RNA 核酸，鞘蛋白分子量約為 41 kDa，病毒顆粒大小約為直徑 30 nm (Fauquet *et al*. 2005)。此病毒首次於 1963 年在英國南部之蕙蘭 (*Cymbidium* spp.) 上被發現，罹病株之葉片產生黃色輪點 (chlorostic ring-mottle)， 若與 *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) 複合感染則會加重病徵表現 (Hollings & Stone 1963)。此病毒特性穩定，主要藉由汁液傳播、器具污染、土壤或灌溉水傳播，尚無種子傳播或蟲媒記錄 (Hollings

投稿日期：2016 年 9 月 12 日；接受日期：2016 年 11 月 14 日。
* 通訊作者：chinzue@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] 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

et al. 1977)。CymRSV 普遍發生於草本植物上，實驗室可接種發病之寄主範圍廣泛，目前只在歐洲被發現，分佈仍不普遍，台灣尚無此病毒之發生報告。此病毒有兩個分離株系統 (strain)，包括豆科之白花苜蓿 (white clover, *Trifolium repens*) (Hollings *et al*. 1977) 及蕙蘭 (*Cymbidium* spp.) (Hollings & Stone 1963, 1977)，可經由寄主接種及血清反應加以判別。CymRSV 自從 1963 於蕙蘭上被發現後，2000 年代並未再在蘭花上被發現 (Elliott *et al*. 1996; Siegmann *et al*. 1998; Freitas-Astua *et al*. 1999)。但其兩種天然寄主包括蕙蘭及白色苜宿在國內均有種植，加上可透過病毒汁液傳播快速之特性，一旦發生此病毒病害，對蘭花產業有潛在之威脅，因此有必要加強對 CymRSV 之監測，以防範病毒之發生。

國際上目前記錄可感染蘭花的病毒種類超過 30 種 (Zettler *et al*. 1990; Zheng *et al*. 2011b)，其中 CymMV 與 *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) 在蘭花上普遍發生，可感染蘭花的種類最多，對蘭花產業經濟面的影響最為深重 (Zettler *et al*. 1990; Wong *et al*. 1994; Khentry *et al*. 2006)。台灣已報告可感染蘭花之病毒包括 *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) (Zheng *et al*. 2008b)、*Carnation mottle virus* (CarMV) (Zheng *et al*. 2011a, 2011b)、*Cucumber mosaic virus* (CMV)、CymMV、ORSV (Chang *et al*. 1999) 及 *Phalaenopsis chlorotic spot virus* (PhCSV) (Zheng *et al*. 2008a)，其中 PhCSV 與 *Basella rugose mosaic virus* (BaRMV) 為同種異名 (Huang & Chang 2006; Zheng *et al*. 2011b)。國際上可感染蘭花之 *Potyvirus* 屬病毒約有 16 種 (Zheng *et al*. 2008a)，其中已見諸台灣之其他作物寄主者包括感染豆類之 *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)、感染天南星科之 *Dasheen mosaic virus* (DsMV)、感染十字花科或花卉之 *Turnip mosaic virus* (TuMV)，及感染蘭花或洛葵之 BarMV (Huang & Chang 2006; Zheng *et al*. 2011b)。

由於國際間花卉種苗 (球) 的貿易活絡，病毒有可能隨種苗 (球) 行銷國際而傳播的風險，尤其蘭花種苗之進出口檢疫條件中，病毒檢測為決定貿易順暢之關鍵，近年來國際間逐漸要求無特定病毒之檢疫 (Khentry *et al*. 2006)。

受病毒感染之蘭花大多有病徵之呈現 (Zettler *et al*. 1990)，但蘭花品系多樣，在特定品系上並不呈現病徵，故僅由病徵呈現容易發生誤判 (Tanaka *et al*. 1997; Koh *et al*. 2014)，需藉由檢測方法加以明確地判別才能發揮對控管病毒發生或傳播之效益。迄今，不同之免疫檢測法已開發於蘭花病毒之檢測 (Tanaka *et al*. 1997; Hu & Wong 1998; Eun *et al*. 1999; Chang *et al*. 2003; Lee & Chang 2008)，其中酵素連結免疫吸附反應法 (enzyme-linked immunesorbent assay; indirect ELISA) 具有特定敏感度，在操作及成本上適用於大量樣品之篩檢，已普遍被應用於植物病毒檢測或國際貿易之檢疫 (Lommel *et al*. 1982)，或應用於蘭花病毒發生調查以及健康種苗生產的品質控管需要 (Arunasalam & Pearson 1989; Hu *et al*. 1993; Vejaratpimol 1998; Grisoni *et al*. 2004; Khentry *et al*. 2006; Lee & Chang 2008; Liu *et al*. 2013)。

隨著核酸檢測技術之發展與應用，已大幅提升病毒檢出之敏感度與正確度，而對於蘭花病毒之檢測，反轉錄-聚合酶鏈鎖反應法 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 之應用已見諸許多報告 (Ryu *et al*. 1995; Chung *et al*. 1996; Chang *et al*. 1999; Zhou *et al*. 2004; Lee & Chang 2006; Yamane *et al*. 2008)，可應用於組織培養之早期檢測確保無特定病毒之繁殖 (Choi *et al*. 2010)；而快速簡易之核酸檢測改進法亦陸續被開發，包括多重 (multiplex) RT-PCR (Lee & Chang 2006; Ali *et al*. 2014; Kim & Choi 2015)、反轉錄-恆溫環形核酸增幅法 (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification; RT-LAMP) (Lee *et al*. 2011; Tsai *et al*. 2016) 和定量 RT-PCR (Eun *et al*. 2000) 等。

國內學者 (Chang *et al*. 2005) 已成功開發 *Tombusvirus* 屬專一性引子對，可成功檢測同屬病毒之 *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) 及 *Cucumber necrosis virus* (CNV)。CymRSV 為 *Tombusvirus* 屬成員，目前於國內未發生而被歸類為有害生物必需檢疫之病毒，為強化對此

病毒之專一性診斷鑑定與進出口檢疫之監測能力以預防機先，本研究針對 CymRSV 開發其診斷鑑定檢測試劑，包括核酸分子檢測用引子對及免疫檢測用之病毒多元抗體，以建立自主檢測技術，強化對此病毒之監測體系。

材料與方法

CymRSV 正對照品材料來源

Cymbidium ringspot virus (CymRSV) 為國外已發生之病毒，目前國內尚未有此病毒之發生紀錄。本研究之 CymRSV 核酸正對照品分別來自 (1) 購買市售 CymRSV RNA 商品 (德國 DSMZ 出品)；(2) 委託波仕特生物科技股份有限公司 (台北市，台灣) 進行基因合成於 pUC57 質體上 (pUC57-CyRCP)，包含有全長度鞘蛋白 (coat protein, CP) 之 1140 個核苷酸 (nucleotide, nt) 序列以及 2 種限制酶切位 (5' 端之 *Nco*I、3' 端之 *Sac*I 切位)。免疫檢測用之 CymRSV 正對照品乃購自市售之 CymRSV 蛋白 (德國 DSMZ 及美國 Agdia 公司出品)。

反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 及核酸引子對

本試驗設計 RT-PCR 檢測用引子對，乃參考已發表於美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 基因資料庫 (GenBank) 所登錄之 CymRSV 序號 (AY500885、NC003532 及 X15511) 加以比對分析後，設計 2 組引子對，其一可增幅全長度 CP 基因及包含其兩端核酸序列之引子對 CyRcpu/CyRcpd (5'TCGTCTGGATAGATGGGAGAT 3'/5'AACATT CACTGTCAGCTTGTT 3')，增幅片段預估約 1370 bp；另一引子對 CyRu/CyRd (5' CGGTGGCRATMTCTAGRAT 3'/5' GAAGGTWACTGTGTAGTGGA 3') 為依據 CP 高保留區所設計之簡併式引子對，可增幅片段預估約 540 bp。

RT-PCR 進行步驟如下：(1) 受測樣品植物組織全量核酸之純化，本試驗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，進行供試植物全量 RNA 之萃取；(2) RT-PCR 增幅核酸片段，以市售 DSMZ-CymRSV RNA 或植物全量 RNA 為模版，利用 CyRcpu/CyRcpd 或 CyRu/CyRd 引子對分別於反應管中進行反應。

RT-PCR 乃以商業化單步驟 RT-PCR 試劑組 (GeneMark Co. Ltd., Taichung, Taiwan) 做為反應試劑，於總體積為 25 μL 之反應管中，混合有下列成分包括 1 μL RNA、5 μL 之 5× RT Reaction buffer、5 μL 之 5× Enhancer buffer、0.5 μL 之 RT Enzyme mix、0.1 μL RNase Block、11.4 μL 之 Nuclease free water、10 μM 之受測病毒引子各 1 μL，於熱循環反應儀 (Biometra T3000 Thermocycler, Germany) 中進行。反應條件為 50℃下進行反轉錄反應 30 min，再以 94℃下變性 50 s，所獲得之反轉錄核酸繼續進行 PCR 反應，條件如下：94℃下變性 50 s，60℃下煉合 50 s，72℃下聚合 2 min 為一循環，共進行 30 個循環，最後一個步驟以 72℃聚合 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。

本試驗另以 CyRu/CyRd 引子對與其他已報導可感染蘭花之 9 種病毒種類，於 60℃煉合溫度下進行 RT-PCR 反應中，選用之病毒來源乃保存於本研究室之罹病組織，包括蘭花之 *Cymbidium mosaic virus* (CymMV)、*Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) 和 *Capsicum chlorosis virus* (CaCV)；彩色海芋之 *Cucumber mosaic virus* (CMV)、*Dasheen mosaic virus* (DsMV) 和 *Turnip mosaic virus* (TuMV)、康乃馨之 *Carnation mottle virus* (CarMV)、落葵之 *Basella rugose mosaic virus* (BaRMV)、豇豆之 *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)。

反轉錄-恆溫環形核酸增幅法 (Reverse transcription Loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP) 及引子組設計

以對應 CymRSV-CP 核苷酸序列為模板，依

據日本 EIKEN 公司之引子對設計軟體 (LAMP primer designing software PrimerExplorer, EIKEN Chemical Co. Ltd. Tokyo, Japan) 進行可應用於 RT-LAMP 反應之引子對共 4 條，分別為 CyR-FIP (5' GCCCAGCGTTAGCTGA ACCAGTCCTTCTACGAACCGCAACCG 3')、CyR-BIP (5' TGTGGCTACCACAGC-CACGACGCCCTTTGCACCATTGAGAC 3')、CyR-F3 (5' ACAAACGCAGTGGGTGACTT 3') 和 CyR-B3 (5' GCGTTACTCCCGTGAAG GTT 3')。取 DSMZ-CymRSV RNA 或受測樣品之全量核酸為模板，依據市售 RT-LAMP 試劑組條件 (RNA Amplification Kit, EIKEN Chemical Co. Ltd. Tokyo, Japan) 進行反應，每一反應管 (總量 25 μL) 含有 1 μL 核酸模板、各 2 μL 之 40 pmol FIP 及 BIP 引子、各 0.25 μL 之 5 pmol F3 及 B3 引子、12.5 μL 之 2× Reaction mix、1 μL 之 Enzyme mix、1 μL 之 Fluorescent dye 及 5 μL 之 Nuclease free water；反應條件於 65℃下增幅 60 min 後，再經 95℃終止反應 2 min。反應結果以 1.5% 電泳瓊膠 (SeaKem Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., USA) 進行分析判讀結果，並以目視法觀察綠螢光之有無加以判讀，反應液有呈現螢光者為正反應，可進一步以離心法觀察正反應者有白色沉澱。

本試驗另以此 4 條引子組與上述已報導之其他 9 種蘭花病毒種類，於 65℃黏合溫度下進行 RT-LAMP 反應。

RT-PCR 與 RT-LAMP 之檢測敏感度比較

將市售之 DSMZ-CymRSV RNA 正對照品以無菌水進行 5× 系列稀釋後，取各個稀釋倍數之核酸各 1 μL 做為模板，分別以 RT-PCR 及 RT-LAMP 之個別適合反應條件進行核酸增幅與判別反應結果。

CymRSV 鞘蛋白選殖、融合性蛋白表現及多元抗體製備

以帶有全長度 CymRSV-CP 核酸序列之 pUC57-CyRCP 為模板，將其核酸以 *Nco*I/*Sac*I 限制酶酵素切割後，將 CymRSV-CP 基因選殖於以同樣酵素切割並回收之表現載體 pET28b (+) (Novagen, Inc. Madison, WI, USA) 上，獲得一選植株 pETCyRCP，並將其質體轉型於 *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3) 宿主內進行 CymRSV-CP 之表現。轉型株以 M9 培養基中 (Li *et al*. 1998) 於 37℃下培養約 2–3 h 後，加入 1 mg mL^{-1} 之 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) 誘導蛋白質表現 (Chen *et al*. 2002)。經 4 h 之 IPTG 誘導培養後，取菌液以 5.9× *g* 轉速離心 10 min，取其沉澱物以 0.5 M Tris-EDTA (pH 8.0) 之緩衝液溶解均勻，並進行 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 電泳，以分析表現蛋白之分子量。選用確定有預估大小約 41.8 kDa 表現蛋白之選殖株進行大量培養以純化表現蛋白，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 (桃園市，台灣) 進行兔免疫注射以製備多元抗體。

自製 CymRSV-CP 多元抗體之免疫檢測效果評估

將兔免疫所得之 CymRSV 多元抗體 (#189) 純化其免疫球蛋白 (Immunoglobulin; IgG) 後，進行 indirect ELISA 及西方墨點法 (western blotting)，並與兩種市售 (Agdia 和 DSMZ) CymRSV 多元抗體比較對正對照品之檢測效果，以評估自製之 CymRSV#189 抗體之有效性。

本試驗另以 CymRSV#189 抗體與上述已報導之其他 9 種蘭花病毒種類，於上述兩種免疫檢測法中進行反應，以評估此抗體對於 CymRSV 之專一性檢測效果。相關免疫檢測法之步驟詳述如下：

Indirect ELISA 法：本方法乃參照以往研究報告進行 (Clark & Adams 1977; Chen *et al*. 2013)。反應步驟如下：(1) 病組織覆膜反應：取新鮮葉片 0.1 g 磨碎，加入 3 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 混合，取組織液添加於 96 孔 ELISA 反應盤中 (100 μL $孔^{-1}$)，每樣品 2 個重複，置於 37℃生長箱 4 h (或 4℃隔夜)；然後以 1× PBST (137 mM NaC1, 1.5 mM KH_2PO_4, 1 mM Na_2H-

PO_4, pH 7.4, 0.05% Tween 20) 沖洗 3 次；(2) 與受測病毒之抗體反應：以自製之 CymRSV #189 免疫球蛋白 (IgG) 其 1,000× 稀釋反應液，添加於各反應孔中 (100 μL 孔$^{-1}$)，於 25℃定溫反應 3–4 h (或 4℃隔夜)，之後以 1× PBST 沖洗 3 次；市售多元抗體則參照抗體使用濃度說明進行之；(3) 與二次抗體反應：加入已稀釋 6,000× 之鹼性磷酸酶酵素連結山羊抗兔 IgG (AP-conjugate goat anti-rabbit immunoglobulin, Jackson, West Grove, PA, USA)，100 μL 孔$^{-1}$，置於 25℃之定溫箱反應 3–4 h；再以 1× PBST 沖洗液沖洗 3 次；(4) 呈色反應：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 Ind., Ohio, USA)，150 μL 孔$^{-1}$，反應 40–50 min，以 ELISA 讀值儀 (PTI max micro plate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值。樣品吸光值大於 2 倍健康葉片吸光值者，判讀為檢出病毒之正反應。

西方墨點法：取 0.1 g 待測樣品置於 1.5 mL 微量離心管內，加入液態氮磨碎，加入 200 μL dissociation buffer (240 mM Tris HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 4% β-Mercaptoethanol) 混勻。再加入 200 μL 之 LDS 溶液 (Laemmli 1970) 混合後，於熱水中悶熱 3–5 min，以 5.9× *g* 離心 5 min 後取適量上清液進行電泳分析。取電泳完之 SDS-PAGE 膠體，轉漬於 PVDF 膜 (Millipore Co., MA, USA)，並與自製 CymRSV#189 多元抗體或市售抗體進行免疫反應。

自製和市售 CymRSV 多元抗體檢測蘭花樣品之比較

對於蘭花樣品檢測效果之比較，取蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* spp.)、文心蘭 (*Oncidium* spp.)、小花蕙蘭 (*Cymbidium* spp.) 及嘉德麗雅蘭 (*Cattleya* spp.) 等 4 種不同蘭花種類樣品，分別與自製抗體 CymRSV#189 和兩種市售抗體 (Agdia 和 DSMZ 出品) 反應，並將於 indirect ELISA 中與 Agdia 多元抗體有產生正反應之蘭花樣品，再以西方墨點法測試其與 CymRSV#189、CymRSV-Agdia 和 CymRSV-DSMZ 抗體之反應；並以 CyRu/CyRd 引子對進行 RT-PCR 測試，由是否獲得預估 540 bp 之核酸產物片段，以佐證免疫檢測法之檢測結果。

結果

RT-PCR 檢測

本研究於可涵蓋 CymRSV-CP 基因全長其及兩端部分核酸之區域所設計之引子對 (CyRcpu/CyRcpd)，以及針對 CP 核酸高保留區設計之引子對 (CyRu/CyRd)，於 RT-PCR 法中均可成功檢測到市售 DSMZ-CymRSV RNA 之標準對照品，增幅出之產物分子量分別為 1,370 bp (圖 1A) 與 540 bp (圖 1B) 之核酸片段，均與預期之大小相符；進一步選殖此等核酸片段並定序分析後，確屬 CymRSV 之核酸序列無誤 (結果未出示)。另以 CyRu/CyRd 引子對與其他已報導可以感染蘭花之其他 9 種病毒，於 60℃煉合溫度下之 RT-PCR 反應中，均不與 CymMV、ÓRSV、CaCV、CMV、CarMoV、BarMV、TuMV、BYMV 及 DsMV 之核酸模板產生反應 (圖 2A)。

RT-LAMP 及 RT-PCR 法之檢測敏感度比較

本研究以 RT-LAMP 檢測法，針對 CymRSV-CP 核酸區域所設計的 CyR-FIP、CyR-BIP、CyR-F3 及 CyR-B3 引子組，可於 65℃恆溫條件下反應 1 h 後，成功進行此病毒核酸分子之擴增反應，電泳分析市售 DSMZ-CymRSV RNA 正對照品可見其增幅產物 (圖 3A 上)，以目視法可觀察到 CymRSV 之正對照品有螢光表現以及白色沉澱，而健康對照品則無上述反應 (圖 3A 下)。對於以 5× 系列稀釋之 DSMZ-CymRSV RNA 正對照品，以 CyRu/CyRd 引子對進行 RT-PCR 檢測，可檢出已稀釋 5^{-4}× 之核酸 (圖 3B)，而以 RT-LAMP 可成功檢測已稀釋 5^{-6}× 之核酸 (圖 3C)。此結果顯示對於 CymRSV 之核酸檢測，以 RT-LAMP 法有高於 RT-PCR 檢測的 25 倍靈敏度。本研究另以 RT-LAMP 引子組與國內已報告之 9 種蘭花

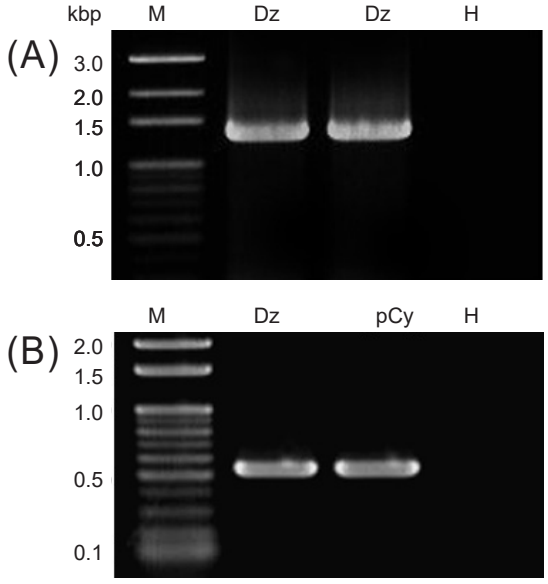


圖 1. CymRSV 引子對進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 之電泳分析結果。(A) 以 CyRcpu/CyRcpd 引子對進行 1,370 bp 全長度鞘蛋白核酸之增幅；(B) 以 CyRu/CyRd 引子對進行 CymRSV 鞘蛋白區域內之 540 bp 核酸片段之增幅。行 M：100 bp DNA 標準標幟；行 Dz：市售 DSMZ-CymRSV RNA 標準品；行 pCy：pUC57-CyRCP 標準品；行 H：健康蝴蝶蘭組織。

Fig. 1. Amplification results of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the detection of *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV). (A) An expected 1,370-bp DNA fragment was amplified from the commercial DSMZ-CymRSV RNA by the CyRcpu/CyRcpd primer pair; (B) A 540-bp DNA fragment was amplified from the DSMZ-CymRSV RNA and artificial synthesized nucleotide fragment coding for viral coat protein (pUC57-CyRCP) by the CyRu/CyRd primer pair. Lane M, 100-bp ladder DNA molecular marker; lane Dz, the commercial DSMZ-CymRSV RNA; lane pCy, the pUC57-CyRCP positive control; and lane H, the total RNA of the healthy orchid tissue.

病毒包括 CymMV、ORSV、CaCV、CMV、CarMV、BaRMV、TuMV、BYMV 及 DsMV 罹病組織全量核酸進行反應，均無螢光正反應 (結果未出示)，顯示此引子組可用以鑑別蘭花上之 CymRSV 病毒。

CymRSV 表現蛋白及其多元抗體檢測評估

本研究針對 CymRSV-CP 全長度核酸片段所選殖之 pETCyRCP 選植株，於 *E. coli* Rosetta (DE3) 宿主內經由 IPTG 誘導大量之融合性表現蛋白 (BEP189)，於 SDS-PAGE 電泳分析中可見 BEP189 表現蛋白之分子量大約為 41.8 kDa ，與預估值相符且為不帶有 CymRSV-CP 之 pET28b 表現載體所有 (圖 4A)。將 BEP189 表現蛋白為抗原所製備出之多元抗體 (#189) 於西方墨點法中，此抗體除可同源之 41.8 kDa 表現蛋白產生正反應外，也與市售之 CymRSV-DSMZ 正對照品於預估之病毒分子量 41 kDa 產生正反應 (圖 4B)；且 Agdia (圖 4C) 及 DSMZ (圖 4D) 兩種市售之 CymRSV 多元抗體也均可與分子量約 41.8 kDa 之 BEP189 表現蛋白產生正反應，此等交叉反應結果顯示，本研究之 CymRSV-BEP189 表現蛋白可做為 CymRSV 免疫檢測之正對照品，且以其為抗原所製備出之多元抗體 (#189)，可成功應用於西方墨點法進行 CymRSV 之檢測。

而於 indirect ELISA 反應中，DSMZ 及 Agdia 兩種市售之 CymRSV 多元抗體對於表現蛋白 BEP189 之反應值分別為 0.49 及 0.50，均為正反應讀值；而 #189 抗體與同源之表現蛋白、DSMZ 及 Agdia 出品之兩種市售正反應對照品之 ELISA 讀值均為正反應值，平均值

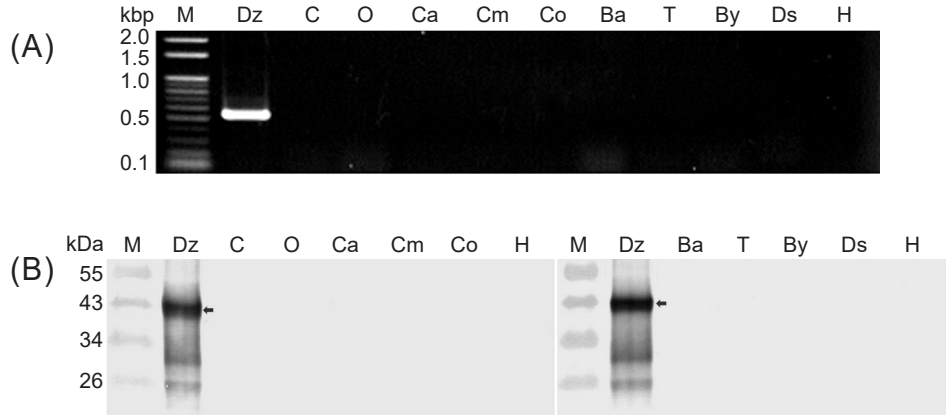


圖 2. 自製之引子對及多元抗體對 CymRSV 之專一性檢測效果。(A) 利用 CyRu/CyRd 引子對於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 中進行不同病毒之核酸分子檢測。行 M：100 bp DNA 標準標幟；行 Dz：市售 DSMZ-CymRSV RNA 標準品；(B) 西方墨點法分析，受測樣品與 CymRSV#189 抗體反應。行 M：蛋白質分子量標幟；行 Dz：市售 CymRSV-DSMZ 蛋白標準品；行 C：*Cymbidium mosaic virus* (CymMV)；行 O：*Odontoglossum ringspot virus* (ORSV)；行 Ca：*Capsicum chlorosis virus* (CaCV)；行 Cm：*Cucumber mosaic virus* (CMV)；行 Co：*Carnation mottle virus* (CarMV)；行 Ba：*Basella rugose mosaic virus* (BaRMV)；行 T：*Turnip mosaic virus* (TuMV)；行 By：*Bean yellow mosaic virus* (BYMV)；行 Ds：*Dasheen mosaic virus* (DsMV)；行 H：健康蝴蝶蘭組織。箭頭所指為 CymRSV-CP。

Fig. 2. The efficiencies of designed primers and prepared polyclonal antibody on detecting CymRSV specifically. (A) Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of the different viruses by the CymRSV primer pair-CyRu/CyRd. Lane M, 100-bp ladder DNA molecular marker; lane Dz, the commercial DSMZ-CymRSV RNA; (B) Western blotting assay, the tested samples were reacted with the CymRSV#189 antibody. Lane M, protein markers; lane Dz, the commercial CymRSV-DSMZ protein; lane C, *Cymbidium mosaic virus* (CymMV); lane O, *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV); lane Ca, *Capsicum chlorosis virus* (CaCV); lane Cm, *Cucumber mosaic virus* (CMV); lane Co, *Carnation mottle virus* (CarMV); lane Ba, *Basella rugose mosaic virus* (BaRMV); lane T, *Turnip mosaic virus* (TuMV); lane By, *Bean yellow mosaic virus* (BYMV); lane Ds, *Dasheen mosaic virus* (DsMV); and lane H, the healthy tissue of orchid. The CymRSV-CP is indicated by an arrow.

分別為 2.31、2.75 及 2.40。

上述結果顯示於兩種免疫檢測中，自製之 CymRSV#189 抗體可與其同源抗原 CymRSV-BEP189 表現蛋白以及市售之標準 CymRSV 病毒蛋白對照品產生正反應；此外，CymRSV#189 抗體與其他 9 種蘭花病毒包括 CymMV、ORSV、CaCV、CMV、CarMoV、BarMV、TuMV、BYMV 及 DsMV 等之寄主罹病組織抗原於 indirect ELISA 反應讀值均在 0.03–0.10 之間，均為負反應值；且於西方墨點法中也不與 CymMV 等其他 9 種受測病毒產生正反應 (圖 2B)。此等結果顯示在蘭花病毒檢測上，自製之 CymRSV#189 抗體於 indirect ELISA 和西方墨點法兩種免疫檢測反應中，具有對 CymRSV 檢測之專一性。

自製和市售 CymRSV 多元抗體檢測蘭花樣品之比較

本研究以 indirect ELISA 法針對不同來源之蘭花種類進行 CymRSV 之實際檢測效果，以自製之 CymRSV#189 抗體及 DSMZ 和 Agdia 兩種市售之多元抗體進行檢測比較。結果顯示，於 indirect ELISA 檢測中，Agdia 多元抗體可與正反應對照品及受測之蘭花樣品產生正反應讀值 (表 1)，其中包括 7 個蝴蝶蘭樣品之 ELISA 讀值介於 0.39–0.59 之間，12 個文心蘭樣品讀值介於 0.24–0.79 之間，9 個小花蕙蘭樣品讀值介於 0.24–0.83 之間，6 個嘉德麗雅蘭樣品讀值介於 0.94–1.31 之間；然而，#189 和 DSMZ 多元抗體僅與正對照標準品產生正反應讀值，與上述受測樣品均為負反應讀值。

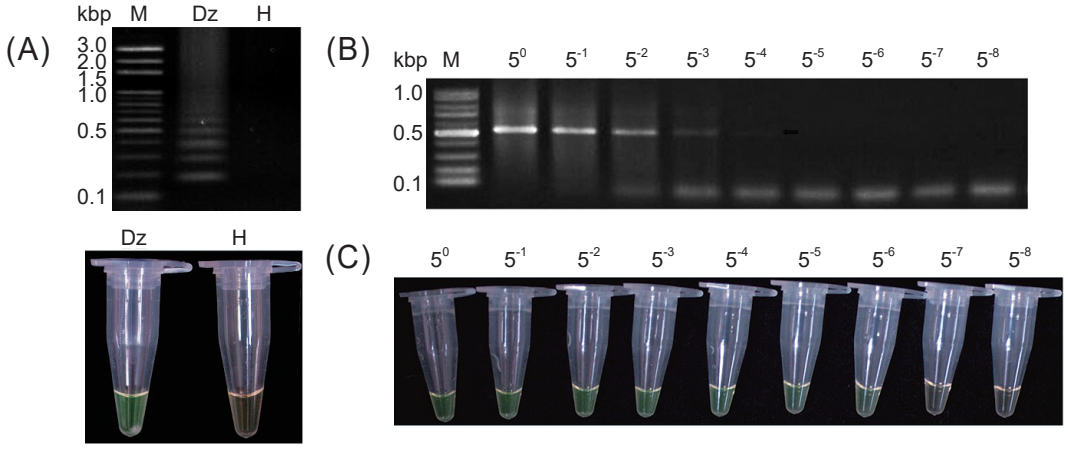


圖 3. 以反轉錄-恆溫環形核酸增幅法 (RT-LAMP) 及反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 對檢測 CymRSV 之敏感度比較。(A) RT-LAMP 正反應者之電泳分析產物 (上) 及目視反應液有螢光及白色沉澱 (下)。行 M：100 bp DNA 標準標幟；行 Dz：市售 DSMZ-CymRSV RNA 標準品；行 H：健康蝴蝶蘭組織。(B) 以 CyRu/CyRd 引子對於 RT-PCR 檢測中，可檢測到稀釋 5^{-4} 倍之 DSMZ-CymRSV RNA 標準品；箭頭所指為 540 bp 之核酸增幅產物。(C) 以 CyR-FIP/CyR-BIP/CyR-F3/CyR-B3 引子組於 RT-LAMP 檢測法中，可檢測到稀釋 5^{-6} 倍之 DSMZ-CymRSV RNA 標準品。行 M：100 bp DNA 標準標幟。

Fig. 3. Comparison of the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) and reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) on the sensitivity for detecting CymRSV. (A) The amplicon of RT-LAMP was analyzed by agarose gel electrophoresis (upper panel) and the amplification result of fluorescent with white precipitate was observed by naked eyes (lower panel). Lane M, 100-bp ladder DNA molecular marker; lane Dz, the commercial DSMZ-CymRSV RNA; and lane H, the healthy tissue of orchid. (B) The 5^{-4} dilution of the commercial positive control of DSMZ-CymRSV RNA was detected by CyRu/CyRd primers in RT-PCR. The expected 540-bp amplicons are indicated by an arrow. (C) The 5^{-6} dilution of the commercial positive control of DSMZ-CymRSV RNA was detected by CyR-FIP/CyR-BIP/CyR-F3/CyR-B3 primer set in RT-LAMP. Lane M, 100-bp ladder DNA molecular marker.

上述以 Agdia 抗體檢出正反應者，進一步以西方墨點法檢測結果顯示，#189、DSMZ 和 Agdia 等多元抗體均無檢出受測蘭花樣品之 CymRSV 病毒蛋白分子條帶 (41 kDa)，但 Agdia 多元抗體則普遍與上述 4 種蘭花樣品於大約 24–25 kDa 處有非專一性條帶 (圖 5)，此等樣品進一步以 CyRu/CyRd 引子對進行 RT-PCR 檢測，並未出現 540 bp 之核酸片段條帶 (表 1)，顯示於 indirect ELISA 免疫檢測法中，由 Agdia 抗體所檢出之正反應者，乃屬偽陽性反應。

討論

本研究針對國內尚未發生之檢疫病毒 CymRSV 所研製之 RT-PCR 檢測用引子對，以及 RT-LAMP 引子組均可專一性檢出 CymRSV；此外，自製之多元抗體 CymRSV#189，其與市售之標準正對照品和多元抗體比較後，顯示可成功應用於 indirect-ELISA 及西方墨點法兩種免疫檢測法中進行 CymRSV 之專一性檢測。於蘭花上對此病毒之監測，以 indirect-ELISA 再配合 RT-PCR 法或 RT-LAMP 之輔助鑑定，可確保對此病毒診斷鑑定的正確性。

本研究所設計之 CyRu/CyRd 引子對，於 60℃煉合溫度下進行 RT-PCR，並未與蘭花常見病毒 CymMV 和 ORSV 產生反應，也與文獻上已知可感染蘭花之其他病毒包括 CaCV、CMV、CarMoV、BarMV、TuMV、BYMV 及 DsMV 病毒核酸不產生反應 (圖 2A)，顯示以 RT-PCR 法可有效檢出 CymRSV。本研究針對 CymRSV 所建立之 RT-PCR 法，可專一性檢測 CymRSV，為首度開發應用於蘭花樣品上對此病毒之監測用途者。

本研究應用 RT-LAMP 於 CymRSV 檢測，

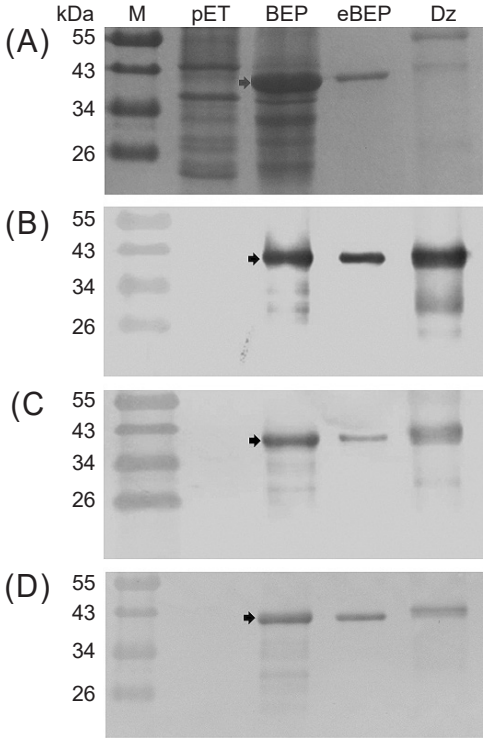


圖 4. 應用細菌大量表現之 CymRSV 融合性表現蛋白之 SDS-PAGE 電泳及西方墨點法分析。(A) CymRSV 融合性表現蛋白 (41.8 kDa) 之 SDS-PAGE 蛋白質電泳圖。受測樣品分別與自製之 CymRSV#189 多元抗體 (B)、Agdia 公司 (C) 及 DSMZ (D) 出品之 CymRSV 多元抗體進行西方墨點法分析。行 M：蛋白質分子量標幟；行 pET：細菌表現之 pET28b(+) 蛋白 (未帶有病毒鞘蛋白)；行 BEP：細菌表現之病毒鞘蛋白；行 eBEP：純化後之細菌表現的病毒鞘蛋白；行 Dz：市售 CymRSV- DSMZ 蛋白標準品。箭頭所指為 CymRSV-CP 表現蛋白。

Fig. 4. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting assays of the bacterial-expressed coat protein (CP) of CymRSV. (A) A 41.8-kDa bacterial-expressed fusion protein of CymRSV-CP was observed in the SDS-PAGE assay. The polyclonal antibody #189 prepared in this study (B), and the purchased polyclonal antibodies from Agdia (C) and DSMZ (D) were used to react with the bacterial-expressed CymRSV-CP. Lane M, protein markers; lane pET, IPTG-induced bacterial cell lysate containing the expression vector pET28b(+) without CymRSV-CP insert; lane BEP, IPTG-induced bacterial cell lysate containing pET28b(+) with CymRSV-CP insert; lane eBEP, the purified bacterial-expressed CymRSV-CP; and lane Dz, the commercial CymRSV-DSMZ protein. The target proteins are indicated by arrows.

可有高於 RT-PCR 法 25 倍之敏感度，可藉此提昇對 CymRSV 之檢出效率。LAMP 核酸檢測法於 2000 年由日本研發，乃利用 *Bst* DNA polymerase，在 65℃左右的恆溫環境下進行核酸增幅，不需 95℃的高溫處理以解開雙股 DNA 模板。針對 6 個區域以 4 條引子對進行核酸增幅，可讓 DNA 增幅成為長鍊狀並形成環型構造，並釋放出焦磷酸根 (pyrophosphate) 和反應溶液中的鎂離子形成不溶於水的焦磷酸鎂，而產生肉眼可見的白色混濁色，判斷反應結果 (Notomi *et al*. 2000)，或可搭配螢光試劑染色加強判讀。針對 RNA 核酸，亦可於恆溫中一次進行單步驟 RT-LAMP 增幅反應。此技術可於單一恆溫條件下縮短核酸增幅反應時間，且專一性與靈敏度都比傳統 PCR 法為高，能直接以肉眼判斷反應結果，適合用於快篩檢測，為相當具有潛力的簡易核酸檢測技術，近年來已逐漸被學術界高度重視，並有許多用於動植物病原檢測的報告陸續產出 (Savan *et al*. 2005; Huang *et al*. 2010, 2014; Fukuta *et al*. 2013; Przewodowska *et al*. 2015; Tasi *et al*. 2016)。LAMP 或 RT-LAMP 應用於植物

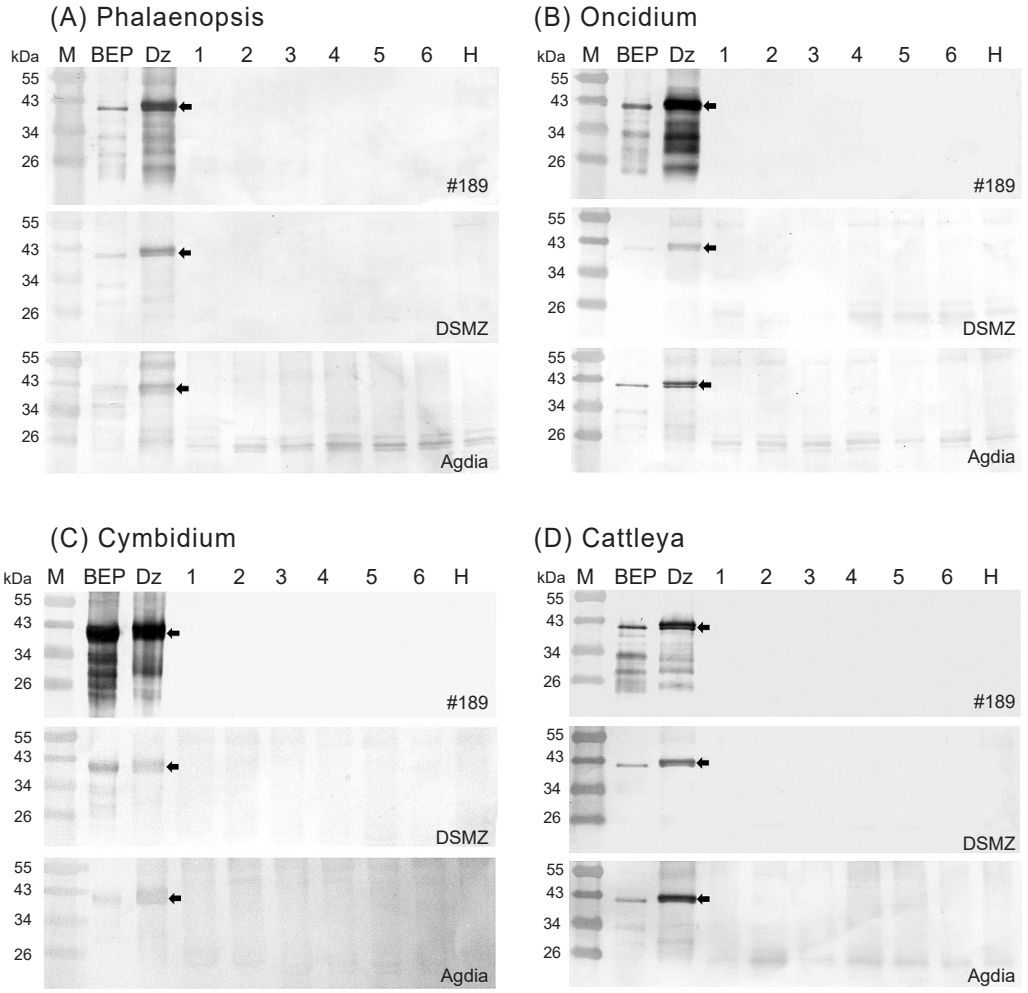


圖 5. 以西方墨點法分析不同蘭花樣品之 CymRSV。蝴蝶蘭 (A)、文心蘭 (B)、小花蕙蘭 (C) 和嘉德麗雅蘭 (D) 等受測樣品乃於 indirect ELISA 檢測中與 CymRSV-Agdia 抗體產生正反應者。分別與自製之 CymRSV#189 多元抗體、市售 CymRSV 多元抗體 (DSMZ 及 Agdia 公司出品) 進行反應。行 M：蛋白質分子量標幟；行 BEP：細菌表現之 CymRSV-CP；行 Dz：市售 CymRSV-DSMZ 蛋白標準品；行 H：健康蘭花組織。箭頭所指為 CymRSV-CP。

Fig. 5. Western blotting assays for detection of CymRSV from different orchids. The samples of Phalaenopsis (A), Oncidium (B), Cymbidium (C) and Cattleya (D) positively reacted to CymRSV-Agdia antibody in indirect ELISA were further tested in western blotting assay using the polyclonal antibody #189 prepared in this study and two commercial antibodies purchased from the DSMZ and Agdia companies. Lane M, protein markers; lane BEP, the IPTG-induced bacterial cell lysates containing the expressed CymRSV CP; lane Dz, the commercial CymRSV-DSMZ protein; lane 1 -6, the different tested samples; and lane H, the healthy tissue of orchid. The expected CymRSV-CP is indicated by arrows.

DNA 或 RNA 病毒以及類病毒方面已有許多成功之例，包括有 *Potato virus Y* (PVY) (Nie 2005; Zhao *et al*. 2012)、*Cucumber mosaic virus* (CMV) (Zhao *et al*. 2012)、*Tomato spotted wilt virus* (Fukuta *et al*. 2004)、*Banana bunchy top virus* (BBTV) (Peng *et al*. 2012)、*Plum pox virus* (Varga & James 2006)、*Melon yellow spot virus* (Kuwabara & Sakai 2008)、*Chrysanthemum virus* B (Fukuta *et al*. 2005)、*Japanese yam mosaic virus* (Fukuta *et al*.

表 1. 以自製和市售 CymRSV 多元抗體於間接式 - 酵素連結免疫吸附反應法中檢測不同蘭花之比較。

Table 1. Comparison of the results for detecting CymRSV from different orchids in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) using the self-produced and commercial polyclonal antibodies.

	ELISA reading (A_{405nm})[z]			
Orchid sample	#189	DSMZ	Agdia	RT-PCR[y]
Phalaenopsis 1	0.03	0.01	0.45	-
Phalaenopsis 2	0.03	0.01	0.51	-
Phalaenopsis 3	0.02	0.01	0.42	-
Phalaenopsis 4	0.04	0.02	0.49	-
Phalaenopsis 5	0.02	0.01	0.49	-
Phalaenopsis 6	0.04	0.02	0.59	-
Phalaenopsis 7	0.03	0.01	0.39	-
D-CK[x]	2.76	2.92	2.73	+
2 H-CK	0.13	0.05	0.29	-
Oncidium 1	0.08	0.07	0.37	-
Oncidium 2	0.08	0.04	0.27	-
Oncidium 3	0.10	0.06	0.29	-
Oncidium 4	0.06	0.06	0.26	-
Oncidium 5	0.06	0.06	0.52	-
Oncidium 6	0.08	0.06	0.41	-
Oncidium 7	0.09	0.07	0.25	-
Oncidium 8	0.07	0.05	0.42	-
Oncidium 9	0.11	0.07	0.24	-
Oncidium 10	0.06	0.06	0.25	-
Oncidium 11	0.06	0.04	0.66	-
Oncidium 12	0.03	0.01	0.79	-
D-CK	3.81	3.92	2.52	+
2 H-CK	0.22	0.17	0.23	-
Cymbidium 1	0.05	0.02	0.34	-
Cymbidium 2	0.06	0.04	0.24	-
Cymbidium 3	0.05	0.03	0.24	-
Cymbidium 4	0.05	0.02	0.24	-
Cymbidium 5	0.06	0.03	0.39	-
Cymbidium 6	0.05	0.02	0.83	-
Cymbidium 7	0.05	0.02	0.51	-
Cymbidium 8	0.08	0.02	0.41	-
Cymbidium 9	0.05	0.03	0.36	-
D-CK	2.34	2.77	2.51	+
2 H-CK	0.10	0.08	0.20	-
Cattleya 1	0.09	0.03	0.94	-
Cattleya 2	0.08	0.03	1.15	-
Cattleya 3	0.08	0.02	1.23	-
Cattleya 4	0.07	0.03	1.27	-
Cattleya 5	0.10	0.03	1.31	-
Cattleya 6	0.08	0.02	1.11	-
D-CK	3.08	3.45	3.27	+
2 H-CK	0.14	0.06	0.79	-

[z] The polyclonal antisera to CymRSV prepared in this study (#189), andpurchased from DSMZ and Agdia companies were used for comparison. The ELISA readings higher than two times of the healthy control's (2H-CK) were determined as positive results.

[y] RT-PCR was conducted by the CymRSV primer pair CyRu/CyRd. +, A 540-bp DNA fragment was amplified; -, no predicts were produced.

[x] D-CK: the ELISA-positive control of CymRSV purchased from DSMZ.

2003)、*Potato leafroll virus* (Ahmadi *et al*. 2013)、*Wheat yellow mosaic virus* (Zhang *et al*. 2011)、*Peach latent mosaic viroid* (Boubourakas *et al*. 2009) 等數十種以上。蘭花常見病毒 CymMV 和 ORSV 於近期也已開發出 RT-LAMP 檢測技術 (Lee *et al*. 2011; Tsai *et al*. 2016)，本研究針對 CymRSV 所開發之 RT-LAMP 檢測法，為首度證實 RT-LAMP 可應用於此病毒之快速檢測，且其敏感度高於 RT-PCR，並具有對 CymRSV 檢測之專一性效果，未來可輔助對此病毒之監測或診斷鑑定之需。

RT-PCR 法具有高於 ELISA 檢測敏感度之優點，可更精準地檢出病毒，在蘭花病毒之檢測上已有許多開發與應用實例 (Wong *et al*. 1994; Jeong *et al*. 2001)；然而，ELISA 適用於大量樣品檢測或病毒發生調查之大量篩檢。而 CymRSV 多元抗體試劑在國際上目前至少有 Agdia (Agida Inc., USA)、AC (AC Diagnostics Inc., USA) 及 DSMZ (Leibnuz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Germany) 等品牌之市售試劑可購買使用，本研究選用 Agdia 及 DSMZ 之多元抗體做為對照，用以比較自製的 CymRSV#189 抗體之實際檢測效果。綜合 indirect ELISA、RT-PCR 及西方墨點法之檢測結果顯示，CymRSV-Agdia 與蝴蝶蘭、文心蘭、小花蕙蘭及嘉德麗雅蘭等蘭花組織會產生偽陽性結果 (表 1、圖 5)；而 CymRSV#189 與 CymRSV-DSMZ 對於正對照品以及不同蘭花種類之 indirect ELISA 檢測結果較相符，於西方墨點法中 CymRSV#189 無偽陽性現象。且 CymRSV#189 於此兩種免疫檢測法中並不與其他 9 種蘭花病毒 (包括 CymMV、ORSV、CaCV、CMV、CarMoV、BarMV、TuMV、BYMV 及 DsMV) 產生非專一性反應，預期在蘭花樣品上具有對 CymRSV 之檢測專一性；整體而言，於 indirect ELISA 和西方墨點法中，CymRSV#189 對 CymRSV 或蘭花健康組織之鑑別效果等同於市售 CymRSV-DSMZ 多元抗體者，顯示本研究所自製之 CymRSV#189 多元抗體適用於 indirect ELISA 及西方墨點法中對 CymRSV 之免疫檢測。

市售 CymRSV-Agdia 以 DAS-ELISA kit 為主要檢測方式，本研究僅購買其 coating IgG 做為 indirect ELISA 之檢測，在本研究中會與蘭花組織呈現非專一性之偽陽性反應，可能是其對 CymRSV 之檢測不適用於 indirect ELISA 法所致。然而，indirect ELISA 具有可減少使用抗體而節省檢測成本之優點，本研究所自製之 CymRSV#189 多元抗體以 indirect ELISA 法即可達到專一性檢出 CymRSV 的效果，可在節省抗體用量上達到對病毒之檢測效益。

Elliott *et al*. (1996) 以 ELISA 法及市售 CymRSV 多元抗體 (Agdia 出品提供) 針對不同蘭花病毒進行 ELISA 免疫檢測法之篩選時也曾發現，部分樣品之 ELISA 讀值有高於 2 倍健康對照者，理應為正反應讀值的判讀結果，但進一步以機械接種法確認其檢出有 CymRSV 之樣品並不會感染受測寄主，因此仍判定所檢出之正反應值非由 CymRSV 所致，並因此表示對於病毒之檢測必須至少有 2 種方法之輔助檢測結果較為具體。本研究所開發之不同檢測技術，也證實可強化對 CymRSV 之正確檢測。

以往為解決病毒特性不穩定或不易純化而造成檢測試劑不易製備之瓶頸，可直接從罹病組織中純化出含有病毒核酸之植物全量核酸，再以可包含全長度病毒鞘蛋白基因之核酸引子對配合 RT-PCR 增幅法直接增幅出病毒之鞘蛋白基因後，利用細菌表現蛋白系統，成功研製病毒抗原並製備抗體以因應病毒之免疫檢測，已見諸國內外許多研究成果 (Li *et al*. 1998; Lee & Chang 2008)。筆者等人以往應用此策略已完成夜來香微嵌紋病毒 (*Tuberose mild mosaic virus*, TMMV) (Chen *et al*. 2002)、海芋潛隱病毒 (Calla lily latent virus; CLLV) (Chen *et al*. 2006)、及百合車前草嵌紋病毒 (*Plantago asiatica mosaic virus*; PlAMV) (Chen *et al*. 2013) 等花卉病毒之檢測試劑而成功應用於進口種球 (苗) 之檢測。在本研究中，於未能取得 CymRSV 罹病植物組織檢體下，透過基因合成技術進行 CymRSV 已知核苷酸序列之人工合成，以及利用表現載體之細菌生

合成系統獲得多元抗體製備所需之病毒鞘蛋白抗原，突破無法取得病毒材料之瓶頸而成功製備出可有效檢測 CymRSV 之多元抗體，此抗原製備技術可解決對於國內尚未發生之檢疫病毒檢測之需要。尤其近年來國際貿易活動蓬勃發展，輸出入植物之檢疫問題為國際貿易之重要關鍵，對於國內尚未發生之檢疫病毒種類，可藉此建立可實用之檢測試劑，達到強化國內自主檢疫監測能力的目標。

本研究另以 CymRSV#189 和 CymRSV-DSMZ 兩種抗體，進行 indirect ELISA 檢測 268 個蝴蝶蘭、27 個文心蘭、14 個小花蕙蘭及 15 個嘉德麗雅蘭樣品，此 2 種抗體均未檢出 CymRSV。未來可持續以本研究所自製之抗體進行更多蘭花樣品對此病毒之監測，除可節省購買市售抗體之成本外，也同時可達到準確檢測之效果。

CymRSV 病毒自從 1963 於蕙蘭上被發現後，目前雖未再在蘭花種類上被發現 (Elliott *et al*. 1996; Siegmann *et al*. 1998; Freitas-Astua *et al*.1999)，僅侷限在歐洲地區，但其傳播途徑相當多元，對蘭花產業之影響存有潛在之風險；並且隨著國際貿易交流之活絡，透過種苗輸出入之途徑有可能引進境外發生之檢疫病毒風險，此發生風險見諸於百合 PlAMV 病毒之國際貿易傳播，已在美國、英國等地發現經由百合種球進口攜帶病毒之報告 (Anderson *et al*. 2013; Hammond *et al*. 2015)。因此，對於目前僅於國外發現偶發於蘭花上且被我國規範為檢疫有害生物之 CymRSV 而言，針對蘭花及其他可能寄主作物建立國內自主監測此病毒之能力相當重要，以能防範於未然。本研究所研發之 CymRSV 核酸檢測及免疫檢測用多元抗體，可各就其檢測上之優點而相互輔助以鑑定 CymRSV，有效應用於此病毒之診斷鑑定與監測之需，進而強化對此病毒的自主監測管理能力。

誌謝

本研究部分經費由行政院農業委員會農業試驗所科技計畫 (重要檢疫病毒及花卉新發生病毒檢測試劑開發與應用；102 農科-10.2.1-農-C5) 支助。本試驗承本組病毒研究室同仁劉星君小姐協助核酸檢測、黃美容小姐協助樣品採集及免疫檢測試驗、許家銘和王孝允先生協助病毒核酸檢測分析，謹此致謝。

引用文獻

Ahmadi, S., M. A. Almasi, F. Fatehi, P. C. Struik, and A. Moradi. 2013. Visual detection of *Potato leafroll virus* by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA with hydroxynaphthol blue dye. J. Phytopathol. 161:120–124.

Ali, R. N., A. L. Dann, P. A. Cross, and C. R. Wilson. 2014. Multiplex RT-PCR detection of three common viruses infecting orchids. Arch. Virol. 159:3095–3099.

Anderson, H., A. Fox, S. Matthews-Berry, P. Reed, and A. Skelton. 2013. Rapid pest risk analysis for *Plantago asiatica mosaic virus*. https://secure.fera.defra.gov.uk/phiw/riskRegister/downloadExternalPra.cfm?id=4074 (visit on 8/7/2017)

Arunasalam, G. and M. N. Pearson. 1989. ELISA detection of *Odontoglossum ringspot virus* in mature plants and protocorms of *Cymbidium* orchids: Potential solutions to problems of sample preparation time and low virus concentration. J. Phytopathol. 126:160–166.

Boubourakas, I. N., S. Fukuta, and P. E. Kyriakopoulou. 2009. Sensitive and rapid detection of peach latent mosaic viroid by the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. J. Virol. Methods 160:63–68.

Chang, C. A., H. H. Lee, C. C. Chen, M. J. Lin, and C. P. Wang. 2003. Phytosanitary certification program of Oncidium seedlings and its future prospect to the development of ornamental industry in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 12:141–148. (in Chinese with English Abstract)

Chang, C. A., Y. S. Tseng, C. C. Chen, and T. C. Deng. 1999. Detection of odontoglossum ringspot tobamovirus by DNA probe hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction. Plant Pathol. Bull. 8:29–36. (in Chinese with English Abstract)

Chang, Y. C., S. C. Lee, and I. J. Lin. 2005. Development and application of a rapid detection method for the genus *Tombusvirus*. Plant Pathol. Bull. 14:41–50. (in Chinese with English abstract)

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., T. Hsiang, F. L. Chiang, and C. A. Chang. 2002. Molecular characterization of *Tuberose mild mosaic virus* and preparation of its antiserum to the coat protein expressed in bacteria. Bot. Bull. Acad. Sin. 43:13–20.

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)

Choi, S. H., J. S. Hong, and K. H. Ryu. 2010. Early detection of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in tissue-cultured phalaenopsis plantlets. Korean J. Hortic. Sci. 28:103–107.

Chung, S. Y., K. E. Yoon, K. H. Ryu, and W. M. Park. 1996. Detection of *Cymbidium mosaic virus* from orchids by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification of the viral coat protein and 3'-noncoding region sequence. Korean J. Kor. Soc. Hort. Sci. 37:158–165.

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.

Elliott, M. S., F. W. Zettler, M. T. Zimmerman, O. W. Jr. Barnett, and M. D. LeGrande. 1996. Problems with interpretation of serological assays in a virus survey of orchid species from Puerto Rico, Ecuador, and Florida. Plant Dis. 80:1160–1164.

Eun, A. J. C. and S. M. Wong. 1999. Detection of Cymbidium mosaic potexvirus and Odontoglossum ringspot tobamovirus using immuno-capillary zone electrophoresis. Phytopathology 89:522–528.

Eun, A. J., M. Seoh, and S. M. Wong. 2000. Simultaneous quantitation of two orchid viruses by the Taqman real-time RT-PCR. J. Virol. Methods 87:151–160.

Fauquet, C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball. 2005. Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxnomy of Viruses. Elsevier Academic Press, New York. 1162 pp.

Freitas-Astua, J., J. A. M. Rezende, and E. W. Kitajima. 1999. Incidence of orchid viruses in the state of São Paulo, Brazil. Fitopatol. Bras. 24:125–130.

Fukuta, S., K. Ohishi, K. Yoshida, Y. Mizukami, A. Ishida, and M. Kanbe. 2004. Development of immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Tomato spotted wilt virus* from chrysanthemum. J. Virol. Methods 121:49–55.

Fukuta, S., M. Tamura, H. Maejima, R. Takahashi, S. Kuwayama, T. Tsuji, T. Yoshida, K. Itoh, H. Hashizume, Y. Nakajima, Y. Uehara, and Y. Shirako. 2013. Differential detection of *Wheat yellow mosaic virus*, *Japanese soil-borne wheat mosaic virus* and *Chinese wheat mosaic virus* by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification reaction. J. Virol. Methods 189:348–354.

Fukuta, S., T. Iida, Y. Mizukami, A. Ishida, J. Ueda, M. Kanbe, and Y. Ishimoto. 2003. Detection of *Japanese yam mosaic virus* by RT-LAMP. Arch. Virol. 148:1713–1720.

Fukuta, S., Y. Nimi, K. Ohishi, Y. Yoshimura, N. Anai, M. Hotta, M. Fukaya, T. Kato, T. Oya, and M. Kanbe. 2005. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method for detection of two viruses and chrysanthemum stunt viroid. Ann. Rept. Kansai Pl. Prot. 47:31–36. (in Japanese with English abstract)

Grisoni, M., F. Davidson, C. Hyrondelle, K. Farreyrol, M. L. Caruana, and M. Pearson. 2004. Nature, incidence, and symptomatology of viruses infecting *Vanilla tahitensis* in French Polynesia. Plant Dis. 88:119–124.

Hammond, J., D. Bampi, and M. D. Reinsel. 2015. First report of *Plantago asiatica mosaic virus* in imported asiatic and oriental lilies (*Lilium* hybrids) in the United States. Plant Dis. 99:292.

Hollings, M. and O. M. Stone. 1963. Cymbidium ringspot (a previously undescribed virus). p.90. *in*: Glass House Crops Research Institute Annual Report. Littlehampton, England. 146 pp.

Hollings, M., and O. M. Stone. 1977. Cymbidium ringspot virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 178. (http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=178) (visit on 9/6/2016)

Hollings, M., O. M. Stone, and R. J. Barton. 1977. Pathology, soil transmission and characterization of cymbidium ringspot, a virus from cymbidium orchids and white clover (*Trifolium repens*). Ann. Appl. Biol. 85:233–248.

Hu, J. S., S. Ferreira, M. Wang, and M. Q. Xu. 1993. Detection of cymbidium mosaic virus, odontoglossum ringspot virus, tomato spotted wilt virus, and potyviruses infecting orchids in Hawaii. Plant Dis. 77:464–468.

Hu, W. W. and S. M. Wong. 1998. The use of DIG-labelled cRNA probes for the detection of *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV) and *Odotonglossum ringspot tobamovirus* (ORSV) in orchids. J. Virol. Methods 70:193–199.

Huang, C. H. and Y. C. Chang. 2006. Basella rugose mosaic virus, a new potyvirus infecting *Basella rubra*. Plant Pathol. 55:819.

Huang, C. H., G. H. Lai, M. S. Lee, W. H. Lin, Y. Y. Lien, S. C. Hsueh, J. Y. Kao, W. T. Chang, T. C. Lu, W. N. Lin, H. J. Chen., and M. S. Lee. 2010. Development

and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of chicken anaemia virus. J. Appl. Microbiol. 108:917–924.

Huang, Y. H., C. H. Chen, T. M. Hung, M. L. Wu, and T. T. Chang. 2014. Development of the detection method for tree brown root rot disease based on the loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Plant Pathol. Bull. 23:1–13. (in Chinese with English abstract)

Jeong, J. H., D. C. Yan, and K. Y. Paek. 2001. Comparison of ELISA and RT-PCR for efficient diagnosis of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in *Cymbidium hoosai* Makino. Korean J. Kor. Soc. Hort. Sci. 42:336–340.

Khentry, Y., A. Paradornuwat, S. Tantiwiwat, S. Phansiri, and N. Thaveechai. 2006. Incidence of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in *Dendrobium* spp. in Thailand. Crop Prot. 25:926–932.

Kim, S. M. and S. H. Choi. 2015. Simultaneous detection of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in orchids using multiplex RT-PCR. Virus Genes 51:417–422.

Koh, K. W., H. C. Lu, and M. T. Chan. 2014. Virus resistance in orchids. Plant Sci. 228:26–38.

Kuwabara, K. and H. Sakai. 2008. Detection of *Melon yellow spot virus* (MYSV) by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). Ann. Rep. Kanto-Tosan Plant Prot. Soc. 55:7–10.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685.

Lee, M. S., M. J. Yang , Y. C. Hseu, G. H. Lai, W. T. Chang, Y. H. Hsu, and M. K. Lin. 2011. One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Cymbidium mosaic virus*. J. Virol. Methods 173:43–48.

Lee, S. C. and Y. C. Chang. 2006. Multiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with an internal control of plant *nad5* mRNA. Plant Pathol. Bull. 15:187–196. (in English with Chinese abstract)

Lee, S. C. and Y. C. Chang. 2008. Performances and application of antisera produced by recombinant capsid proteins of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus*. Eur. J. Plant Pathol. 122:297–306.

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.

Liu, F. X., Y. C. Han, W. D. Li, X. Q. Shi, W. Xu, and M. G. Lin. 2013. Incidence of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* affecting Oncidium orchids in Hainan Island, China. Crop Prot. 54:176–180.

Lommel, S. A., A. H. McCain, and T. J. Morris. 1982. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Phytopathology 72:1018–1022.

Nie, X. 2005. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of *Potato virus Y*. Plant Dis. 89:605–610.

Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanebe, N. Amino, and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 28:E63.

Peng, J., J. Zhang, Z. Xia, Y. Li, J. Huang, and Z. Fan. 2012. Rapid and sensitive detection of banana bunchy top virus by loop-mediated isothermal amplification. J. Virol. Methods 185:254–258.

Przewodowska, A., B. Zacharzewska, J. Chołuj, and K. Treder. 2015. A one-step, real-time reverse transcription loopmediated isothermal amplification assay to detect *Potato virus Y*. Amer. J. Potato Res. 92:303–311.

Ryu, K. H., K. E. Yoon, and W. M. Park. 1995. Detection by RT-PCR of *Cymbidium mosaic virus* in orchids. J. Phytopathol. 143:643–646.

Savan, R., T. Kono, T. Itami, and M. Sakai. 2005. Loop-mediated isothermal amplification: an emerging technology for detection of fish and shellfish pathogens. J. Fish Dis. 28:573–581.

Siegmann, B. J., M. S. Elliott, and F. W. Zettler. 1998. Relative incidences of CymMV, ORSV and CymRSV in commercial, private and public orchid collections. Proc. Fla. State Hort. Soc. 111:41–43.

Tanaka, S., H. Nishii, S. Ito, M. Kameya-Iwaki, and P. Sommartya. 1997. Detection of *Cymbidium mosaic potexvirus* and *Odontoglossum ringspot tobamovirus* from Thai orchids by rapid immunofilter paper assay. Plant Dis. 81:167–170.

Tsai, C. C., C. Y. Huang, I. S. Weng, and W. L. Liu. 2016. One-step RT-LAMP analysis for efficient detection of *Odontoglossum ringspot virus* from Oncidiinae hybrids (Orchidaceae). J. Gen. Plant Pathol. 82:89–95.

Varga, A. and D. James. 2006. Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Plum pox virus*. J. Virol. Methods 138:184–190.

Vejaratpimol, R., C. Channuntapipat, P. Liewsaree, T. Pewnim, K. Ito, M. Iizuka, and N. Minamiura. 1998. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of cymbidium mosaic virus in orchids. J. Ferment. Bioeng. 86:65–71.

Wong, S. M., C. G. Chng, Y. H. Lee, K. Tan, and F. W. Zettler. 1994. Incidence of Cymbidium mosaic and Odontoglossum ringspot viruses and their significance in orchid cultivation in Singapore. Crop Prot. 13:235–239.

Yamane, K., K. Oyama, E. Iuchi, H. Ogawa, T. Suzuki, and T. Natsuaki. 2008. RT-PCR detection of *Odontoglossum ringspot virus*, *Cymbidium mosaic virus* and *Tospoviruses* and association of infections with leaf-yellowing symptoms in *Phalaenopsis*. J. Phytopathol. 156:268–273.

Zettler, F. W., N. J. Ko , G. C. Wisler, M. S. Elliot, and S. M. Wong. 1990. Viruses of orchids and their control. Plant Dis. 74:621–626.

Zhang, Z. Y., X. J. Liu, D. W. Li, J. L. Yu, and C. G. Han. 2011. Rapid detection of wheat yellow mosaic virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Virol. J. 8:550.

Zhao, L., J. Cheng, X. Hao, X. Tian, and Y. Wu. 2012. Rapid detection of tobacco viruses by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Arch. Virol. 157:2291–2298.

Zheng, Y. X., C. C. Chen, and F. J. Jan. 2011a. First report of *Carnation mottle virus* in Phalaenopsis orchids. Plant Dis. 95:354.

Zheng, Y. X., C. C. Chen, and F. J. Jan. 2011b. Identification and characterization of three new phalaenopsis orchid-infecting viruses. Acta Hortic. 901,127–132.

Zheng, Y. X., C. C. Chen, Y. K. Chen, and F. J. Jan. 2008a. Identification and characterization of a potyvirus causing chlorotic spots on *Phalaenopsis* orchids. Eur. J. Plant Pathol. 121:87–95.

Zheng, Y. X., C. C. Chen, C. J. Yang, S. D. Yeh, and F. J. Jan. 2008b. Identification and characterization of a tospovirus causing chlorotic ringspots on *Phalaenopsis* orchids. Eur. J. Plant Pathol. 120:199–209.

Zhou, G. H., X . Q. Chen, M. H. Li, J. L. Zhou, T. H. Tang, S. X. Feng, L. J. Guo, and W. Zhang. 2004. Identification and detection of two major viruses infecting orchids by molecular technique. Virol. Sin. 19:149–152.

Development and Application of the Molecular and Serological Detection Methods for *Cymbidium ringspot virus*

Chin-Chih Chen[1,*] and Fen-Lang Chiang[2]

Abstract

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(3):202–218.

Cymbidium ringspot virus (CymRSV) is recorded in foreign countries, but not found in Taiwan. The molecular and serological detection reagents for the inspection of CymRSV on orchids were developed in this study. In molecular detection, two primer pairs for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were designed based on the nucleotide sequences of CymRSV coat protein (CP). The primer pair CyRcpu/CyRcpd was designed for amplifying the full-length CP gene and its flanking borders. The primer pair CyRu/CyRd was used to amplify the conserved region of the CymRSV-CP gene. In RT-PCR, the expected 1370-bp and 540-bp DNA fragments were amplified by the primer pairs CyRcpu/CyRcpd and CyRu/CyRd, respectively, from the commercial DSMZ-CymRSV RNA. The annealing temperature under the 60℃, the primer pair CyRu/CyRd was used to specifically detect CymRSV in RT-PCR. A set of four primers (CyR-FIP/CyR-BIP/CyR-F3/CyR-B3) was successfully used to amplify CymRSV RNA under 65℃ for 1 h in reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP), and the results were able to be determined by naked eye observation. RT-LAMP with a specificity for CymRSV detection and has a 25-time higher sensitivity than RT-PCR assay. In serological detection, the predicted 41.8 kDa of the bacterial expressed fusion protein (BEP189) was positively reacted to two commercial CymRSV antibodies. The CymRSV antiserum (#189) was prepared from the rabbit immunized with the bacterial-expressed CymRSV-CP. In the detections of CymRSV by the ways of indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) and western blotting, the prepared antibody #189 specifically reacted with its expressed CP as well as with the commercial controls of CymRSV, but not reacted to the healthy orchid tissues and other 9 viruses on orchids. This is the first report to develop the RT-LAMP method for detecting CymRSV and to apply the RT-PCR assay for inspecting CymRSV on orchids. Moreover, the prepared polyclonal antibody against CymRSV is efficient to differentiate CymRSV from other 9 tested orchid viruses.

Key words: *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV), Serological detection, RT-PCR detection, RT-LAMP.

Received: September 12, 2016; Accepted: December 14, 2016.
* Corresponding author, email: chinzue@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 66(3):219–229 (2017)
DOI: 10.6156/JTAR/2017.06603.05

研究報告

土壤理化性質對水稻徒長病發生之影響

林素禎[1,*] 鄭春玉[2] 王朝儀[2] 陳啟予[3] 林瑋倫[4]

摘要

林素禎、鄭春玉、王朝儀、陳啟予、林瑋倫。2017。土壤理化性質對水稻徒長病發生之影響。台灣農業研究 66(3):219–229。

近年來由 *Fusarium fujikuroi* Nirenberg 引起的水稻徒長病 (bakanae disease of rice) 在台灣各地有逐漸嚴重的趨勢，本試驗於農業試驗所溫室內利用 8 個不同類型土壤以及 3 個不同接種病原菌之方法進行研究。8 個試驗土壤分別採自於彰化縣芬園鄉、屏東縣萬巒鄉、彰化縣和美鎮、彰化縣線西鄉、彰化縣竹塘鄉、彰化縣二林鎮、彰化縣芳苑鄉與台南市佳里區，所使用的水稻品種為「高雄 139 號」。病原菌接種處理分別為 (1) 在種子浸種前 (種子接菌)，(2) 種子發芽後 (胚根接菌)，(3) 接於土壤中 (土壤接菌) 三種，接種源濃度依序為 4.5×10^6 spores mL^{-1}、4.5×10^6 spores mL^{-1} 與 5.4×10^5 spores g^{-1} soil。水稻播種 35 d 後進行生長調查與死亡率調查，試驗結果顯示：3 個接種病原菌方法中，以種子接菌處理之水稻徒長病死亡率最高，且該處理之水稻植株總乾物重亦最小。在種子接菌處理之 8 個土壤中，水稻徒長病死亡率以彰化縣芬園鄉土壤最高 (66%)，其次為彰化縣和美鎮土壤 (45%)，第三為屏東縣萬巒鄉土壤 (29%)，第四為彰化縣線西鄉土壤 (23%)。此外，水稻徒長病死亡率也分別與土壤 pH 值、有效性鈣含量及硼含量呈顯著直線負相關 ($P < 5\%$)，其他土壤理化性質則與水稻徒長病死亡率無顯著直線相關 ($P > 5\%$)。在胚根接菌與土壤接菌處理之 8 個土壤中，水稻徒長病死亡率皆以彰化縣芬園鄉土壤最高，分別為 20% 與 12%，但這兩種接菌處理在其他 7 個土壤中對水稻之影響則與對照組無顯著差異。本試驗結果顯示：帶有徒長病原菌的水稻種子在彰化縣芬園鄉、彰化縣和美鎮、屏東縣萬巒鄉及彰化縣線西鄉四種土壤中具有較高發病的機率。

關鍵詞：水稻徒長病、*Fusarium fujikuroi*、土壤性質。

前言

水稻徒長病最早於 1828 年在日本已有本病害記載 (Ito & Kimura 1931)，為水稻栽培區普遍存在之病害。水稻徒長病在台灣最早於 1912 年由澤田氏所記載報告，此病害又稱馬鹿苗病，在農民口中俗稱「稻公」。病害發生在水稻之苗期及分蘗盛期，罹病植株呈現徒長，罹病苗常比健康苗高出 1/3–1/2 以上，病苗纖細黃綠色，葉幅變小，葉片與葉鞘之著生角加大 (Chang 2003)。此病害所造成的損失在危害嚴重的地區可減產 40–50% (Ou 1985)。此病害主要由受汙染之稻種帶菌傳播，近年來農友雖有做稻種消毒，田間還是普遍發生，尤其以台東、花蓮地區最為嚴重，該地區主要種植品種高雄 139 號及台梗 2 號，田間罹病率超過 10% (Huang & Chu 2009)。

根據張氏報告，被病原菌污染的穀粒，若每顆穀粒平均帶有 4.2 個菌體，播種後可得 8.25% 之徒長苗，證明污染於稻殼外之病菌亦可致病 (Chang 2003)。Yu & Sun (1977) 報告指出，土壤接種徒長病菌分生孢子，當每公

投稿日期：2016 年 8 月 24 日；接受日期：2016 年 11 月 17 日。
* 通訊作者：linmay@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所農業化學組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所農業化學組研究助理。台灣 台中市。
[3] 國立中興大學植物病理學系副教授。台灣 台中市。
[4] 國立中興大學植物病理學系碩士班研究生。台灣 台中市。

克土壤含 645 個菌體時，即可引起稻苗徒長病。Chang (2003) 指出，稻田中徒長病菌分布不均，稻徒長病株附近的土壤含較高濃度的病菌，病組織中之病菌被埋入土壤中可為感染源，但因病菌族群密度不高，所以稻苗徒長病雖可經由土壤傳播，但機會比稻種傳播小。Lin *et al*. (2016) 研究指出，稻稈帶菌亦是另一個感染途徑，在感病土壤中具有感染下一季水稻的潛在能力。

有關土壤性質對水稻徒長病之影響鮮少有人研究，為了瞭解土壤性質對此病害之影響，本文選擇不同質地、母質與酸鹼值之 8 個土壤進行測試；本文中亦測試 *Fusarium fujikuroi* 3 種接種方法 (種子接菌、胚根接菌與土壤接菌) 對水稻徒長病發生之影響，探討此病原菌傳播的可能途徑，以作為此病害防治對策之參考。

材料與方法

試驗土壤

選擇不同質地、母質與酸鹼值之土壤進行試驗，試驗土壤有 8 個，土壤採集地點、座標與地上植生如表 1。在土壤質地方面，選擇細質地土壤 (彰化縣竹塘鄉的粘板岩石灰性老沖積土，黏粒含量 23%，坋粒含量 48%，砂粒含量 29%，屬壤土) 與粗質地土壤 (彰化縣芳苑鄉的粘板岩石灰性老沖積土，黏粒含量 3%，坋粒含量 24%，砂粒含量 73%，屬砂質壤土) 各 1 個土壤。在母質方面，選擇粘板岩沖積土、砂頁岩沖積土及砂頁岩粘板岩混合沖積土 3 種母質的土壤。粘板岩沖積土為屏東縣萬巒鄉的酸性土壤，及彰化縣二林鎮的微鹼性土壤。砂頁岩沖積土為彰化縣芬園鄉的酸性土壤，及台南市佳里區的微鹼性土壤。砂頁岩與粘板岩混合沖積土為靠近八卦山的彰化縣和美鎮土壤，及靠近台灣海峽的彰化縣線西鄉土壤。

土壤理化性質分析

採集上述試驗土壤，土壤樣品從田間採集後，風乾、磨碎、過篩，分析各項理化性質，包括土壤 pH 值 (酸鹼度)、EC 值 (電導度)、質地、有機質、有效性氮、磷、鉀、鈣、鎂、鐵、錳、銅、鋅與硼。土壤 pH 值與 EC 值的測定方法為水土重量比 1：1，以酸鹼度測定儀 (Suntex SP-701) 及電導度測定儀 (Denver Instrument Model 20) 檢測之。土壤質地以粒徑分析儀 (Beckman Coulter LS 13 320) 分析。有機質以總有機碳分析儀 (Elementar vario MAX C) 測定後換算為有機質含量。有效性氮先用 2M KCl 抽出後以自動分析儀 (Astoria Analyzer Series 300) 測定。有效性磷、鉀、鈣、鎂、鐵、錳、銅、鋅、硼以 Mehlich-3 method (Mehlich 1984) 抽出後，以感應耦合電漿分析儀 (Inductively coupled plasma spectrometry, ICP, HORIBA Jobin Yvon ULTIMA 2C) 測定。

病原菌製備與孢子數計數

水稻徒長病菌 (*Fusarium fujikuroi*) 由中

表 1. 土壤採集處。

Table 1. Soil sampling sites.

No.	Sampling site	Coordinate		Cover plant
		N	E	
1	Fangyuan, Changhua	23°56’55”	120°21’38”	Rice
2	Chutang, Changhua	23°51’24”	120°25’41”	Sweet potato
3	Wanluan, Pingtung	22°35’57”	120°35’13”	Weed
4	Erlin, Changhua	23°53’44”	120°23’18”	Rice
5	Fenyuan, Changhua	24°00’36”	120°39’35”	Weed
6	Chiali, Tainan	23°10’49”	120°12’00”	Rice
7	Hemei, Changhua	24°06’47”	120°30’42”	Rice
8	Siansi, Changhua	24°07’32”	120°26’25”	Rice

興大學植物病理學系真菌研究室提供 (菌株編號 IL01)，取病原菌單孢培養於 1/2 PDA 培養基上 (1/2 PDA 培養基配方如下：1000 mL 的純水中含 100 g Potato，10 g Dextrose，15 g Agar)，於 25℃培養箱中光照黑暗各 12 h 培養 14 d 後，在培養皿中加入 10 mL 無菌水，以吸管輕刮培養基上之病原菌，吸取菌液至燒杯中，反覆上述步驟 2 次。蒐集菌液，以滅菌水稀釋 10× 後，吸取 1 mL 菌液加在血球計數器 (hemocytometer) 上，在顯微鏡下計數水稻徒長病菌之孢子數。

水稻品種

水稻栽培品種為「高雄 139 號」，是行政院農業委員會高雄區農業改良場於 1975 年完成命名登記的良質品種。全生育日期 1 期作 130 d，2 期作 108 d，適合花蓮及台東栽植，產量高，但對水稻徒長病為感病品種。

試驗處理

採集之試驗土壤有 8 個 (如表 1)，在 8 個土壤中，每個土壤各有 4 種接菌處理：(1) 對照組，水稻種子與栽培土壤皆不接種水稻徒長病菌，對照組水稻種子直接以流動的自來水浸種 2 d，待多數的種子長出白色的芽點後，選取有白色芽點的種子種植在裝有 50 g 試驗土壤的圓形塑膠栽培盆 (容積 110 mL) 中。以下各處理之水稻種子催芽方式皆與對照組相同。(2) 種子接菌：在水稻種子上接種病原菌，接種方法如下：將 50 粒種子放入 100 mL 燒杯內，加入病原菌菌液，讓種子完全浸入菌液中，病原菌濃度為 4.5×10^6 spores mL^{-1}，浸泡 1 h 後，菌液先倒出瀝乾，讓種子在塑膠淺盤上陰乾 1 d，放入生長箱內 25℃黑暗培養 7 d。取出種子，以流動的自來水浸種 2 d，待種子發芽後，播種於栽培盆中。(3) 胚根接菌：在種子發芽後接種病原菌，接種方法如下：種子以流動的自來水浸水 2 d，發芽後放入病原菌液體中，浸泡 1 h，病原菌濃度為 4.5×10^6 spores mL^{-1}，取出種子播種。(4) 土壤接菌：在 50 g 土壤中加 6 mL 菌液，病原菌濃度為 4.5×10^6 spores mL^{-1}，土壤與病原菌菌液充分混勻後倒入栽培盆中。此時，土壤中病原菌之濃度為 5.4×10^5 spores g^{-1} soil。水稻種子經催芽後種植在上述已接菌的土壤中。上述 4 種處理之圓形塑膠栽培盆中皆內裝 50 g 試驗土壤，每個栽培盆中皆種 10 粒水稻種子，每處理各種 4 盆。

試驗設計

在 8 個試驗土壤中每個土壤各有 4 個接種病原菌處理，因農業試驗所溫室中日照角度與抽風設備所造成之微氣候可能會對水稻生長產生影響，故分為 4 個區集，每個區集內都有 8 個土壤與 4 個接種病原菌處理，每一處理各 1 盆，逢機擺放，為逢機完全區集設計 (RCBD)。

溫室管理與生育調查

在水稻種子種植 7 d 後每週澆灌 1 次 Modified Hoagland 營養液，每盆 20 mL，提供水稻生長所需營養。在水稻播種 14 d 後進行發芽率調查，播種 35 d 後進行水稻生育調查與徒長病死亡率調查，秤取各處理水稻地上部與根之鮮重，將水稻地上部與根分別放在 80℃烘箱中，2 d 後秤取乾重。苗期水稻罹病植株呈現徒長，病苗纖細黃綠色，葉片與葉鞘之著生角加大，而罹病嚴重之水稻會死亡，在水稻植株上有白粉紅色的菌絲層，菌絲層上密生分生孢子，偶爾可見橙色之分生孢子堆，菌絲層最後轉變為淡灰色 (Chang 2003)。水稻徒長病死亡之判定標準為植株莖基部有水稻徒長病菌絲體纏據，死亡。

鈣含量與硼含量對水稻徒長病菌菌絲生長之影響

不同鈣含量對水稻徒長病菌菌絲生長之影響：在不同鈣含量試驗中，鈣離子之濃度為 0、1,000 mg kg^{-1}、2,000 mg kg^{-1}、3,000 mg kg^{-1}、4,000 mg kg^{-1}、5,000 mg kg^{-1}，以 $CaCO_3$ (聯工化學廠公司 EP 級一級) 為試藥。取 100 mL 去離子水加入 250 mL 燒杯中，加 1.2 g 馬鈴薯葡萄糖 (Potato dextrose broth, BD Co., USA)，加入所需要的 $CaCO_3$ 試藥，攪拌溶解後，測量溶液之 pH 值。加 1.5 g Agar (BD Co., USA) 後，以兩層鋁箔紙封口，放入滅菌鍋中，121℃，1.2 kg cm^{-2} 滅菌 20 min。取出培

養基放冷至 50–60℃時分裝至直徑 9 cm 培養皿中，每皿 15 mL，放冷，備用。選擇水稻徒長病菌生長最外圈之菌絲做為接種源，以滅菌竹籤沾取病原菌少許，放在培養基正中央，每處理 6 重複。培養皿以石蠟膜封口，放入培養箱中 26℃黑暗培養 8 d，測量病菌菌落生長最長直徑與最短直徑，計算其平均直徑。

不同硼含量對水稻徒長病菌菌絲生長之影響：在不同硼含量試驗中，硼離子之濃度為 0、5 mg kg^{-1}、25 mg kg^{-1}、125 mg kg^{-1}、250 mg kg^{-1}、500 mg kg^{-1}，以硼砂 ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) (聯工化學廠公司 EP 級一級) 為試藥。取 100 mL 去離子水加入 250 mL 燒杯中，加 1.2 g 馬鈴薯葡萄糖 (Potato dextrose broth, BD Co., USA)，加入所需要的硼砂試藥，攪拌溶解後，測量溶液之 pH 值。加 1.5 g Agar (BD Co., USA) 後，以兩層鋁箔紙封口，放入滅菌鍋中，121℃，1.2 kg cm^{-2} 滅菌 20 min。取出培養基放冷至 50–60℃時分裝至直徑 9 cm 培養皿中，每皿 15 mL，放冷，備用。選擇水稻徒長病菌生長最外圈之菌絲做為接種源，以滅菌竹籤沾取病原菌少許，放在培養基正中央，每處理 6 重複。培養皿以石蠟膜封口，放入培養箱中 26℃黑暗培養 9 d，測量病菌菌落生長最長直徑與最短直徑，計算其平均直徑。

相關性分析

水稻徒長病死亡率與土壤理化性質進行相關性分析時，當簡單相關性分析結果顯著，表示水稻徒長病死亡率與土壤理化性質間存在直線相關。相關性分析可在 Excel 試算表管理軟體中進行 (Lu *et al*. 2006)。Excel 在「資料分析」裡提供了「相關係數」的計算，但不提供相關係數的顯著性測驗，不過可以透過輸入公式或函數來進行。相關係數 (r) 的顯著性測驗可利用 t 檢定 (Yu 1981; Lu *et al*. 2006)，公式如下：

$$|t| = \frac{|r|}{\sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}}} > t_{(\alpha/2,\, n-2)}$$

式中 n 為樣本數，$t(\alpha/2, n-2)$ 為 α 顯著水準下自由度等於 $n-2$ 的雙尾 t 臨界值。t 臨界值的計算，可利用 Excel 的 TINV 函數，其格式為：T INV (probability, degree_freedom)，probability 為雙尾機率值 (故若指定顯著水準為 0.05，只需直接輸入 0.05 即可，不必再除以 2)，而 degree_freedom 為自由度。Excel 的絕對值及開方根函數分別為 ABS 及 SQRT。將兩資料集的相關係數 (r) 與樣本數 (n) 帶入上述公式中計算 t 檢定的實測值。當 t 的實測值大於其臨界值，表示兩資料集存在顯著的直線相關。本文中利用 Excel 的 CORREL 函數，計算水稻死亡率與土壤理化性質之相關係數 (r)，得到相關係數後，利用上述公式與 Excel 的 TINV 函數，算出 t 檢定的實測值和臨界值，當 t 檢定的實測值大於臨界值時，即表示水稻死亡率與土壤理化性質存在有直線相關。反之，則表示兩資料集無直線相關，但無法認定兩資料集無任何關係或互相獨立，也有可能是其他二次以上的關係 (Lu *et al*. 2006)。

資料統計與分析

本文中水稻的生育調查資料及水稻徒長病菌在培養基上生長所量測的直徑，皆利用 SAS 套裝統計分析軟體先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，若處理效應顯著 ($P < 0.05$)，則再利用最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗以比較各處理平均值間之差異性。

結果與討論

徒長病原菌接種對水稻植株生長之影響

水稻生育調查與徒長病死亡率調查如表 2，由表 2 中可知，水稻發芽率在 8 個土壤中之 3 種接菌處理與對照組皆無顯著差異 ($P > 5\%$)，發芽率為 95–100%。

在水稻徒長病死亡率方面，芳苑土壤中以病原菌接種在種子之死亡率最高 (18%)，顯著 ($P < 5\%$) 比接種在胚根與土壤及對照組之 3 個處理高，其他 3 個處理死亡率為 0–5%。在竹塘土壤中，3 個接菌處理與對照組間無顯著差異，死亡率為 0–2%。在萬巒土壤中，以病原菌接種在種子之死亡率最高 (29%)，顯著比其

他 3 個處理高，其他 3 個處理死亡率為 0–8%。在二林土壤中，3 種接菌處理與對照組間無顯著差異，死亡率為 0–10%。在芬園土壤中，以病原菌接種在種子之死亡率最高 (66%)，顯著比其他 3 個處理高，而病原菌接種在胚根 (20%) 與土壤 (12%) 兩處理之死亡率亦顯著比對照組 (0%) 高。在佳里土壤中，以病原菌接種在種子之死亡率最高 (20%)，顯著比其他 3 個處理高，其他 3 個處理死亡率為 0–5%。在和美土壤中，以病原菌接種在種子之死亡率最高 (45%)，顯著比其他 3 個處理高，其他 3 個處理死亡率為 0–11%。在線西土壤中，以病原菌接種在種子之死亡率最高 (23%)，顯著比其他 3 個處理高，其他 3 個處理死亡率為 0–2%。由以上結果可知，水稻徒長病原菌接種在種子之死亡率最高，而在 8 個試驗土壤中，種子接菌處理死亡率則以芬園土壤 (66%) 最高，和美土壤次之 (45%)，萬巒土壤第三 (29%)。上述結果顯示，當水稻種子受徒長病原菌感染，並生長在適合病原菌存活的土壤中，就可能使水稻徒長病發生。Chang (2003) 報告指出，稻種帶菌是徒長病的主要傳播途徑，土壤傳播之機率比較小。本文試驗結果與其相符。

水稻植株總乾物重在芳苑、竹塘、二林與佳里 4 個土壤中，3 個接菌處理與對照組間皆無顯著差異 (P > 5%)。在萬巒土壤中，以徒長病原菌接種在種子之水稻植株總乾物重最小 (123 mg plant^{-1})，比對照組 (160 mg plant^{-1}) 少 23%，其他 2 個接菌處理與對照組則無顯著差異。在芬園土壤中，病原菌接種在種子之水稻植株總乾物重 (52 mg plant^{-1}) 最小，比對照組 (112 mg plant^{-1}) 少 54%，而病原菌接種在胚根之水稻植株總乾物重 (83 mg plant^{-1}) 亦比對照組少 26%，病原菌接種在土壤與對照組兩處理之水稻植株總乾物重無顯著差異。在和美土壤中，病原菌接種在種子之水稻植株總乾物重最小 (53 mg plant^{-1})，比對照組 (78 mg plant^{-1}) 少 32%，其他 2 個接菌處理與對照組則無顯著差異。在線西土壤中，病原菌接種在種子之水稻植株總乾物重最小 (75 mg plant^{-1})，比對照組 (94 mg plant^{-1}) 少 20%，其他 2 個接菌處理與對照組則無顯著差異。

由以上結果可知，種子接菌並在適合病原菌生長的土壤中，對水稻生長之影響比胚根接菌與土壤接菌兩個處理大。這可能是因為種子接菌處理在生長箱內培養了 7 d，讓病原菌有較長的時間接觸種子。根據 Chang (2003) 指出，被病原菌污染的穀粒，若每顆穀粒平均帶有 4.2 個菌體，播種後可得 8.25% 之徒長苗，證明污染於稻殼外之病菌可致病。

試驗土壤理化性質分析

試驗土壤的理化性質如表 3，粗質地的芳苑土壤砂粒含量比細質地的竹塘土壤多 44%，兩個土壤之 pH 值皆為微鹼性，分別為 7.6 與 7.5。竹塘土壤的有機質比較高 (5.0%)，但有效性磷含量較低 (38 mg kg^{-1})，可能是因有效性鈣含量較高 (6,067 mg kg^{-1})，形成難溶性之磷酸化合物所致。萬巒土壤與二林土壤之母質皆為粘板岩沖積土，萬巒土壤 pH 值為 4.5，二林土壤 pH 值為 7.6，兩者相差 3.1 unit，二林土壤有效性鈣含量較高 (3,117 mg kg^{-1})，但其有效性磷含量較低 (39 mg kg^{-1})。芬園土壤與佳里土壤之母質皆為砂頁岩沖積土，芬園土壤 pH 值為 5.1，佳里土壤 pH 值為 7.5，兩者相差 2.4 unit，佳里土壤有效性鈣含量為 1928 mg kg^{-1}，而芬園土壤有效性鈣含量較低 (994 mg kg^{-1})。靠近八卦山的和美土壤與靠近台灣海峽的線西土壤皆為砂質岩與粘板岩混合非石灰性沖積土，和美土壤有機質含量 (2.8%) 與黏粒含量 (21%) 皆比線西土壤高，線西土壤有機質含量與黏粒含量分別為 1.6% 與 10%。

水稻徒長病死亡率與土壤理化性質之相關性

水稻徒長病死亡率與土壤理化性質之相關性分析如表 4，由表 4 可知，水稻徒長病死亡率與土壤 pH 值、EC 值、砂粒含量、有機質含量、有效性氮含量、有效性磷含量、有效性鉀含量、有效性鈣含量、有效性鎂含量、有效性鐵含量、有效性錳含量、有效性銅含量、有效性鋅含量與有效性硼含量之相關係數分別為 -0.712、-0.543、-0.166、-0.117、-0.276、0.180、0.191、-0.685、-0.399、0.297、-0.665、-0.618、-0.271、-0.797。在 Excel 軟

表 2. 徒長病原菌接種對水稻植株生長之影響。

Table 2. The influence of pathogen inoculation of bakanae disease on the rice growth.

Sampling site	Inoculation treatment	Germination rate (%)	Mortality rate (%)	Shoot dry weight (mg plant^{-1})	Root dry weight (mg plant^{-1})	Dry weight of whole plant (mg plant^{-1})
Fangyuan	Control[z]	100 ± 0 A[v]	0 ± 0 A	48 ± 10	25 ± 7	73 ± 17 A
	Soil[y]	100 ± 0 A	5 ± 6 A	41 ± 11	23 ± 6	64 ± 17 A
	Radicle[x]	100 ± 0 A	0 ± 0 A	43 ± 4	24 ± 1	67 ± 4 A
	seed[w]	98 ± 5 A	18 ± 5 B	38 ± 6	19 ± 3	57 ± 8 A
Chutang	Control	100 ± 0 A	0 ± 0 A	63 ± 5	33 ± 5	96 ± 10 A
	Soil	100 ± 0 A	0 ± 0 A	56 ± 9	35 ± 8	91 ± 17 A
	Radicle	98 ± 5 A	2 ± 5 A	56 ± 9	28 ± 8	84 ± 16 A
	seed	98 ± 5 A	2 ± 5 A	47 ± 11	24 ± 7	71 ± 18 A
Wanluan	Control	100 ± 0 A	0 ± 0 A	110 ± 2	50 ± 7	160 ± 6 A
	Soil	100 ± 0 A	5 ± 6 A	103 ± 4	51 ± 8	154 ± 11 A
	Radicle	98 ± 5 A	8 ± 5 A	93 ± 9	46 ± 7	139 ± 14 AB
	seed	98 ± 5 A	29 ± 12 B	86 ± 15	37 ± 9	123 ± 24 B
Erlin	Control	100 ± 0 A	0 ± 0 A	69 ± 4	35 ± 3	103 ± 6 A
	Soil	100 ± 0 A	0 ± 0 A	69 ± 15	25 ± 8	94 ± 23 A
	Radicle	100 ± 0 A	5 ± 6 A	65 ± 19	27 ± 12	91 ± 30 A
	seed	100 ± 0 A	10 ± 8 A	62 ± 3	21 ± 4	82 ± 6 A
Fenyuan	Control	98 ± 5 A	0 ± 0 A	78 ± 5	34 ± 7	112 ± 10 A
	Soil	100 ± 0 A	12 ± 5 B	77 ± 8	28 ± 5	106 ± 11 A
	Radicle	100 ± 0 A	20 ± 8 B	61 ± 8	22 ± 4	83 ± 12 B
	seed	95 ± 6 A	66 ± 4 C	41 ± 13	11 ± 4	52 ± 13 C
Chiali	Control	98 ± 5 A	0 ± 0 A	56 ± 10	23 ± 3	79 ± 9 A
	Soil	100 ± 0 A	0 ± 0 A	53 ± 12	25 ± 6	78 ± 18 A
	Radicle	100 ± 0 A	5 ± 6 AB	52 ± 7	25 ± 4	77 ± 10 A
	seed	100 ± 0 A	20 ± 14 B	50 ± 8	21 ± 4	71 ± 7 A
Hemei	Control	100 ± 0 A	0 ± 0 A	52 ± 3	26 ± 4	78 ± 7 A
	Soil	100 ± 0 A	2 ± 5 A	60 ± 10	28 ± 4	88 ± 14 A
	Radicle	98 ± 5 A	11 ± 9 A	55 ± 5	23 ± 3	77 ± 8 A
	seed	100 ± 0 A	45 ± 10 B	38 ± 12	14 ± 3	53 ± 14 B
Siansi	Control	95 ± 10 A	0 ± 0 A	60 ± 1	34 ± 7	94 ± 7 A
	Soil	100 ± 0 A	2 ± 5 A	59 ± 3	27 ± 2	86 ± 4 A
	Radicle	100 ± 0 A	2 ± 5 A	58 ± 4	31 ± 4	89 ± 6 A
	seed	98 ± 5 A	23 ± 11 B	52 ± 5	23 ± 5	75 ± 8 B

[z] Control: non-inoculation of pathogen.
[y] Soil: pathogen inoculated in soil.
[x] Radicle: pathogen inoculated after radicle emergence.
[w] Seed: pathogen inoculated before seed submerged.
[v] Means within each column in the same sampling site followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

體中輸入公式或函數計算出 *t* 檢定的實測值和臨界值，由表 4 中可知，土壤 pH 值、土壤有效性鈣含量與硼含量之 *t* 檢定的實測值大於臨界值，表示土壤 pH 值、有效性鈣、硼含量分別與水稻徒長病死亡率有直線相關。而其相關係數皆為負數，負數表示負相關，即土壤 pH

表 3. 試驗前土壤之理化性質分析。

Table 3. The physical and chemical properties of tested soils before experiment.

Sampling site	pH (1 : 1)	EC (μS cm^{-1})	Sand (%)	OM (%)	N (mg kg^{-1})	P (mg kg^{-1})	K (mg kg^{-1})	Ca (mg kg^{-1})	Mg (mg kg^{-1})	Fe (mg kg^{-1})	Mn (mg kg^{-1})	Cu (mg kg^{-1})	Zn (mg kg^{-1})	B (mg kg^{-1})
Fangyuan	7.6	205	73	1.7	20	142	96	3,077	181	394	124	6.8	9.8	1.0
Chutang	7.5	612	29	5.0	43	38	78	6,067	259	406	110	10.1	10.0	2.0
Wanluan	4.5	421	6	3.2	67	481	200	479	157	520	11	1.6	3.9	0.1
Erlin	7.6	777	26	3.0	25	39	99	3,117	325	647	61	4.3	5.8	1.6
Fenyuan	5.1	304	25	3.1	12	157	96	994	165	665	8	0.8	4.3	0.2
Chiali	7.5	421	29	1.3	14	221	115	1,928	334	677	38	1.1	7.5	1.1
Hemei	5.9	404	37	2.8	23	58	137	1,490	297	569	25	4.3	11.1	0.4
Siansi	6.0	431	47	1.6	14	103	148	1,043	227	829	17	2.5	15.4	0.5

表 4. 土壤理化性質與水稻徒長病死亡率之相關性分析。

Table4. Correlation analysis between soil physical and chemical properties and the mortality rate of Bakanae disease.

Sampling site	Mortality rate (%)	pH (1 : 1)	EC (μS cm^{-1})	Sand (%)	OM (%)	N (mg kg^{-1})	P (mg kg^{-1})	K (mg kg^{-1})	Ca (mg kg^{-1})	Mg (mg kg^{-1})	Fe (mg kg^{-1})	Mn (mg kg^{-1})	Cu (mg kg^{-1})	Zn (mg kg^{-1})	B (mg kg^{-1})
Fangyuan	18	7.6	205	73	1.7	20	142	96	3077	181	394	124	6.8	9.8	1.0
Chutang	2	7.5	612	29	5.0	43	38	78	6067	259	406	110	10.1	10.0	2.0
Wanluan	29	4.5	421	6	3.2	67	481	200	479	157	520	11	1.6	3.9	0.1
Erlin	10	7.6	777	26	3.0	25	39	99	3117	325	647	61	4.3	5.8	1.6
Fenyuan	66	5.1	304	25	3.1	12	157	96	994	165	665	8	0.8	4.3	0.2
Chiali	20	7.5	421	29	1.3	14	221	115	1928	334	677	38	1.1	7.5	1.1
Hemei	45	5.9	404	37	2.8	23	58	137	1490	297	569	25	4.3	11.1	0.4
Siansi	23	6.0	431	47	1.6	14	103	148	1043	227	829	17	2.5	15.4	0.5
Correlation coefficient (r)^{z}		-0.712	-0.543	-0.166	-0.117	-0.276	0.180	0.191	-0.685	-0.399	0.297	-0.665	-0.618	-0.271	-0.797
t-test measured values (t_m)^{y}		2.485*	1.713	0.446	0.313	0.760	0.485	0.515	2.490*	1.150	0.824	2.357	2.079	0.745	3.490*
t-test critical values [$t(\alpha/2, n-2)$]^{x}		2.447	2.447	2.447	2.447	2.447	2.447	2.447	2.447	2.447	2.447	2.447	2.447	2.447	2.447

^{z} Correlation coefficients (r) were analyzed from the mortality rates of rice and soil properties.

^{y} t-test measured values (t_m) = ABS(r)/SQRT[(1-r^2)/(n − 2)], 'r' is the correlation coefficient, 'n' is the sample number, 'ABS' and 'SQRT' are the statistical functions in Excel software.

^{x} t-test critical values [$t(\alpha/2, n-2)$] = TINV (probability, degree_freedom), 'α/2' is the two-tailed probability, 'n − 2' is the degree of freedom，'TINV' is the statistical function in Excel software, 'degree_freedom' is the degree of freedom.

*$t_m > t(\alpha/2, n-2)$, At probability = 0.05, n − 2 = 6.

值、鈣與硼的含量越高，水稻徒長病的死亡率越低。Lin *et al*. (2016) 指出，在高 pH 值的土壤中，稻稈上的水稻徒長病菌存活數較低。Graham (1983) 報告指出，鈣可降低植物病害 (如 *Pythium*、*Sclerotinia*、*Botrytis* 和 *Fusarium*) 的罹病率。Graham & Webb (1991) 報告指出，硼可降低植物病害 [如 *Plasmodiophora brassicae* (Woron.)、*Fusarium solani* (Mart.) (Sacc.)、*Verticillium albo-atrum* (Reinke & Berth)、*Tobacco mosaic virus*、*Tomato yellow leaf curl virus*] 的罹病率，本文試驗結果與前人研究結果相似。在 Lin *et al*. (2016) 研究中指出，水稻徒長病菌在高 pH 值的培養基上生長良好，土壤 pH 值不是直接抑制水稻徒長病菌生長之因子。而鈣與硼是否可直接抑制水稻徒長病菌之生長，需要進一步測試。本文下一部分，將探討鈣含量與硼含量對水稻徒長病菌菌絲生長之影響。

鈣含量與硼含量對水稻徒長病菌菌絲生長之影響

不同鈣添加量對水稻徒長病菌菌絲生長之影響試驗結果如表 5，由表 5 中可知，不添加鈣之對照組 pH 值為 5.0 ± 0.1，其水稻徒長病菌菌絲直徑為 3.3 cm ± 0.1 cm；而添加鈣 1,000 mg kg^{-1} 後，培養基溶液之 pH 值提高為 7.4 ± 0.1，並顯著促進水稻徒長病菌菌絲生長 (P < 5%)，其菌絲直徑為 4.9 cm ± 0.2 cm；在添加鈣 2,000 mg kg^{-1} 後，培養基溶液之 pH 值提高為 7.5 ± 0.1，其水稻徒長病菌菌絲直徑 (7.4 cm ± 0.2 cm)，顯著比對照組及添加鈣 1,000 mg kg^{-1} 處理組長；在添加鈣 3,000 mg kg^{-1}、4,000 mg kg^{-1} 及 5,000 mg kg^{-1} 的 3 個處理之培養基溶液，pH 值依序為 7.6 ± 0.0 及 7.7 ± 0.0、7.7 ± 0.1，其水稻徒長病菌菌絲直徑依序為 7.3 cm ± 0.3 cm、7.1 cm ± 0.3 cm 及 7.2 cm ± 0.4 cm。此 3 處理之水稻徒長病菌菌絲直徑與添加鈣 2,000 mg kg^{-1} 處理組無顯著差異 (P > 5%)。由上述結果可知，培養基中添加鈣 1,000–5,000 mg kg^{-1} 可顯著促進水稻徒長病菌菌絲之生長。Lin *et al*. (2016) 研究指出，水稻徒長病菌在 pH 值 6.5–8.0 的培養基上之菌絲直徑顯著 (P < 5%)，比在 pH 值 5.0 之對照組長。本文中添加鈣 1,000–5,000 mg kg^{-1} 時，可使培養基之 pH 值提高為 7.4–7.7，此結果與前人研究之結果相吻合。

不同硼添加量對水稻徒長病菌菌絲生長之影響試驗結果如表 6，由表 6 中可知，不添加硼之對照組 pH 值為 5.0 ± 0.0，其水稻徒長病菌菌絲直徑為 4.1 cm ± 0.4 cm；而添加硼 5 mg kg^{-1} 與 25 mg kg^{-1} 後，培養基溶液之 pH 值分別提高為 5.4 ± 0.1 與 6.2 ± 0.0，但此二處理之水稻徒長病菌菌絲長度 (分別為 4.4 cm ± 0.3 cm 與 4.7 cm ± 0.1 cm) 與對照組 (4.1 cm ± 0.4 cm) 無顯著差異 (P > 5%)；在添加硼 125、250 及 500 mg kg^{-1} 的三處理之培養基溶液 pH 值依序為 7.9 ± 0.0，8.1 ± 0.0，8.2 ± 0.0，其水稻徒長病菌菌絲直徑依序為 5.6 cm ± 0.1 cm、6.4 cm ± 0.2 cm，5.4 cm ± 0.2 cm，此三處理之水稻徒長病菌菌絲長度顯著比對照組長

表 5. 不同鈣添加量對水稻徒長病菌菌絲生長之影響

Table 5. The influence of calcium amendment on the hyphal growth of rice bakanae disease pathogen.

Ca amendment (mg kg^{-1})	pH of growth medium	Colony diameter[z] (cm)
0	5.0 ± 0.1	3.3 ± 0.1 a[y]
1,000	7.4 ± 0.1	4.9 ± 0.2 b
2,000	7.5 ± 0.1	7.4 ± 0.2 c
3,000	7.6 ± 0.0	7.3 ± 0.3 c
4,000	7.7 ± 0.0	7.1 ± 0.3 c
5,000	7.7 ± 0.1	7.2 ± 0.4 c

[z] The pathogen of rice bakanae disease was cultured at 26℃ for 8 d in growth chamber.
[y] Means within the same column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test. Mean ± standard error (n = 6).

表 6. 不同硼添加量對水稻徒長病菌菌絲生長之影響

Table 6. The influence of boron amendment on the hyphal growth of rice bakanae disease pathogen.

B amendment (mg kg^{-1})	pH of growth medium	Colony diameter[z] (cm)
0	5.0 ± 0.0	4.1 ± 0.4 a[y]
5	5.4 ± 0.1	4.4 ± 0.3 a
25	6.2 ± 0.0	4.7 ± 0.1 a
125	7.9 ± 0.0	5.6 ± 0.1 b
250	8.1 ± 0.0	6.4 ± 0.2 c
500	8.2 ± 0.0	5.4 ± 0.2 b

[z] The pathogen of rice bakanae disease was cultured at 26℃ for 9 d in growth chamber.
[y] Means within the same column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test. Mean ± standard error. (n = 6).

(P < 5%)。由上述結果可知，培養基中添加硼砂 125–500 mg kg^{-1} 可顯著促進水稻徒長病菌菌絲之生長。

由表 5 與表 6 中可知，培養基中添加鈣或硼皆可促進水稻徒長病菌之生長，但由表 4 中可知，水稻徒長病死亡率與有效性鈣含量及硼含量呈顯著直線負相關。這說明在鈣含量高或硼含量高的土壤中，水稻徒長病死亡率較低並非因土壤中的鈣或硼直接抑制病原菌之生長，而是藉由其他間接的機制所促成。可能的原因如：鈣會提高土壤 pH 值，改變土壤微生物相，Guo (1985) 研究指出土壤在高 pH 值下細菌與放線菌數量較低 pH 值時多，Alabouvette (1986) 研究指出抑病土壤可降低植物土生性病害之嚴重程度是由於土壤微生物間的養分競爭。另外，鈣與硼為植物生長之必要元素，有關鈣在控制植物病害機制之研究如：Dordas (2008) 報告指出，鈣可在兩方面影響植物的罹病率：(1) 鈣會影響植物細胞膜的穩定度，當鈣缺乏時會造成糖與胺基酸的滲漏，間接引起病原菌的入侵 (Marschner 1995)；(2) 鈣是中層細胞壁成分 calcium polygalacturonates 的重要元素，當鈣離子濃度降低時，會增加植物的罹病率，使病原菌入侵導管與篩管，產生萎凋等病徵。Zhang *et al*. (2014) 報告指出，鈣離子在植物的病害防禦上扮演關鍵的角色，並在植物細胞的訊號傳遞過程中擔任第二信使 (second messenger)，在病原菌尚未接觸植物之前，細胞質內的鈣離子濃度一般維持在較低含量，但當病原菌入侵時，細胞質內的鈣離子濃度迅速提升。有關硼在控制植物病害機制之研究，Dordas (2008) 報告指出，硼對於細胞壁的構造與穩定性具有直接的影響，同時可以降低植物病原菌所造成的傷害，具體的原因目前瞭解有限，但是與下列原因可能有關：(1) 硼可提升細胞壁構造的穩定與硬度，支撐細胞的形狀與強度 (Marschner 1995; Brown *et al*. 2002)；(2) 硼在細胞膜的滲透性、穩定性與功能 (Marschner 1995; Brown *et al*. 2002; Dordas & Brown 2005)，(3) 硼與酚類化合物及木質素的代謝有關 (Blevins & Lukaszewski 1998; Brown *et al*. 2002)。有關土壤中鈣或硼在控制水稻徒長病害之機制是藉由土壤微生物相之改變而降低病害，或藉由作物生理之改變而減輕病害程度，或改變根部型態而降低病原菌入侵等之研究，尚待進一步探討。

本文試驗結果顯示，當種子帶菌並在適合病原菌生長的土壤中，就可能使水稻徒長病發生。在八個試驗土壤中，水稻徒長病死亡率以彰化縣芬園鄉土壤最高 (66%)，其次為彰化縣和美鎮土壤 (45%)，第三為屏東縣萬巒鄉土壤 (29%)，第四為彰化縣線西鄉土壤 (23%)。因此，建議在類似這四種土壤理化性質的地區，必須特別留意本病害的發生與防治。

誌謝

感謝行政院農業委員會農業試驗所農化組郭鴻裕研究員提供試驗土壤採集地點資訊，加快本研究之進行速度；感謝農業試驗所作物組賴明信研究員提供水稻種子，使本研究得以順利進行。

引用文獻

Alabouvette, C. 1986. Fusarium-wilt suppressive soils from the Châteaurenard region: Review of a 10-year study. Agronomie 6:273–284.

Blevins, D. G. and K. M. Lukaszewski. 1998. Boron in plant structure and function. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49:481–500.

Brown, P. H., N. Bellaloui, M. A. Wimmer, E. S. Bassil, J. Ruiz, H. Hu, H. Pfeffer, F. Dannel, and V. Römheld. 2002. Boron in plant biology. Plant Biol. 4:205–223.

Chang, Y. C. 2003. Bakanae disease of rice. p.256–262. *in*: Compendium of Rice Diseases and Pests. (Zou, H. J. and J. P. Shi, eds.) Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei, Taiwan. 448 pp. (in Chinese)

Dordas, C. 2008. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. Agron. Sustain. Dev. 28:33–46.

Dordas, C. and P. H. Brown. 2005. Boron deficiency affects cell viability, phenolic leakage and oxidative burst in rose cell cultures. Plant Soil 268:293–301.

Graham, D. R. 1983. Effects of nutrients stress on susceptibility of plants to disease with particular reference to the trace elements. Adv. Bot. Res. 10:221–276.

Graham, D. R. and M. J. Webb. 1991. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. p.329–370. *in*: Micronutrients in Agriculture. 2nd ed. (Mortvedt, J. J., F. R. Cox, L. M. Shuman, and R. M. Welch, eds.) Soil Science Society of America Madison, WI. 760 pp.

Guo, K. S. 1985. Soil organisms. p.113. *in*: Soil Science. (Guo, K. S., ed.) Tzi-Yi Press. Taipei, Taiwan. 801 pp. (in Chinese)

Huang, T. C. and S. C. Chu. 2009. The occurrence and control of rice bakanae disease in Taiwan. p.29–43. *in*: Proceedings of Symposium on Achievements and Perspectives of Rice Protection in Taiwan. July 9, 2009. Chiayi, Taiwan. Chiayi Agricultural Research Branch, Agricultural Research Institute. Chiayi, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Ito, S. and J. Kimura. 1931. Studies on the bakanae disease of the rice plant. Rep. Hokkaido Agric. Exp. Stn. 27:1–95. (in Japanese with English abstract)

Lin, S. C., C. Y. Zheng, C. Y. Wang, Z. Z. Wu, and C. Y. Chen. 2016. Epidemical study of *Fusarium fujikuroi* by rice straws. J. Taiwan Agric. Res. 65:92–102. (in Chinese with English abstract)

Lu, X. Y., M. L. Wei, and C. T. Lu. 2006. Using Excel to solve the related issues in agricultural data analysis (No. 4): Correlation and regression. Tech. Serv. 67:27–30. (in Chinese)

Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed. Academic Press. London, England. 889 pp.

Mehlich, A. 1984. Mehlich 3 soil test extractant: A modification of Mehlich 2 extractant. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 15:1409–1416.

Ou, S. H. 1985. Rice Diseases. 2nd ed. Commonwealth Mycological Institute. Slough, England. 380 pp.

Yu, C. H. 1981. Applied Statistics. Chao-Jen Pub. Taichung, Taiwan. 516 pp. (in Chinese)

Yu, K. S. and S. K. Sun. 1977. Studies on inoculum potential and incubation period of rice bakanae disease. Plant Prot. Bull. 19:245–250. (in Chinese with English abstract)

Zhang, L., L. Du, and B. W. Poovaiah. 2014. Calcium signaling and biotic defense responses in plants. Plant Signal Behav. 9. doi:10.4161/15592324.2014.973818.

The Influence of Soil Physical and Chemical Properties on the Development of Bakanae Disease of Rice

Su-Chen Lin[1,*], Chun-Yu Zheng[2], Chao-Yi Wang[2], Chi-Yu Chen[3], and Wei-Lun Lin[4]

Abstract

Lin, S. C., C. Y. Zheng, C. Y. Wang, C. Y. Chen, and W. L. Lin. 2017. The influence of soil physical and chemical properties on the development of bakanae disease of rice. J. Taiwan Agric. Res. 66(3):219–229.

In recent years, bakanae disease of rice caused by *Fusarium fujikuroi* Nirenberg seems getting worse and widespread in Taiwan. In order to explore the influence of soil physical and chemical properties on the disease occurrence, 3 inoculation methods in 8 soil samples were conducted in greenhouse at Taiwan Agricultural Research Institute. The 8 soil samples were collected respectively from (1) Fenyuan, Changhua county, (2) Wanluan, Pingtung county, (3) Hemei, Changhua county, (4) Siansi, Changhua county, (5) Chutang, Changhua county, (6) Erlin, Changhua county, (7) Fangyuan, Changhua county, and (8) Chiali, Tainan county. The tested rice cultivar was 'Kaohsiung 139'. There were three pathogen inoculation treatments: (1) seed inoculation, rice seeds were submerged in spore suspension before soaked in water for producing radicals; (2) radical inoculation, the germinating seeds with radicals were submerged in spore suspension before planting; (3) soil inoculation, soils were directly mixed with spore suspension . The inoculation densities respectively were 4.5×10^6 spores mL^{-1}, 4.5×10^6 spores mL^{-1}, and 5.4×10^5 spores g^{-1} soil. Thirty five days after planting, plant growth and mortality of rice were surveyed. The results indicated that rice seed inoculation treatment, if compared with the other two treatments, showed the highest mortality rate and the lowest plant dry weight. Among the 8 testing soil samples, the highest mortality rate was found in Fenyuan 66%, followed by Hemei 45%, Wanluan 29%, and Siansi 23%. In addition, the mortality rates of seed inoculation in 8 soil samples showed a significantly negative linear correlation ($P < 0.05$) between soil pH, available calcium and boron, respectively. As to the other soil physical and chemical properties, they did not show any significant linear correlation ($P > 0.05$). The highest mortality rates in both radical inoculation and soil inoculation treatments were 20% and 12%, respectively, in Fenyuan soil; however, the mortality rates in the other 7 testing soil samples showed no significant difference if compared with control. In this experiment, the results suggested that high occurrence potential of bakanae disease may be precautious especially if the rice seeds were infested with *Fusarium fujikuroi* in the previous 4 soil sampling sites (Fenyuan, Hemei, Wanluan, and Siansi) or any location with similar soil physical and chemical properties.

Key words: Bakanae disease of rice, *Fusarium fujikuroi*, Soil properties.

Received: August 24, 2016; Accepted: December 17, 2016.
* Corresponding author, email: linmay@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agriculture Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Research Assistants, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agriculture Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Associate Professor, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Graduate Student, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 66(3):230–239 (2017)
DOI: 10.6156/JTAR/2017.06603.06

研究報告

矮南瓜黃化嵌紋病毒 (ZYMV) 經瓜類種子傳播的特性及其檢測

鄧汀欽[1,*] 蔡錦慧[2] 林羿廷[2] 周建銘[3]

摘要

鄧汀欽、蔡錦慧、林羿廷、周建銘。2017。矮南瓜黃化嵌紋病毒 (ZYMV) 經瓜類種子傳播的特性及其檢測。台灣農業研究 66(3):230–239。

比較生物分析 (bioassay)、間接法酶聯抗體免疫分析 (indirect ELISA)、西方墨漬法 (western blot) 及反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 等檢定方法之靈敏度，據以研擬瓜類種子帶矮南瓜黃化嵌紋病毒 (ZYMV) 的標準檢測流程，其中包括群體測試的採樣及統計分析、供試樣品製備、適合的檢驗方法及檢測結果的表示等。以出口種子檢測來測試標準檢測流程，其中 1 個南瓜種子批號有 ZYMV 檢出；以 “Seedhealth” 程式計算，病毒檢出率為 0.47 ± 0.46%，其中 ELISA 陽性反應的檢體經 RT-PCR 檢測，明確顯示 ZYMV 的存在，核酸解序其 RT-PCR 產物，進一步確定檢測結果；但以出芽試驗檢測同批種子，未能在子代苗株發現病株。檢測市售胡瓜種子，所有 9 個供試品種都呈陰性反應。ZYMV 接種胡瓜，部分抗病品種的果實與種子以 ELISA 檢驗均無 ZYMV 檢出，取感病品種的罹病株果實採樣，新鮮種子中可測得 26% 帶有 ZYMV，種子乾燥 15 d 後，全數供試種子均無 ZYMV 檢出。西瓜罹病株果實之果蒂、果底、果皮、外果肉、內果肉及果中柱均有 ZYMV 分佈，未成熟的種子則比成熟的種子帶有較多病毒，通常西瓜「甜美人」比「黑美人」的種子較容易測出 ZYMV。另置於 10℃冰箱保存 1 yr 的「甜美人」西瓜種子，仍有 60% 可檢出 ZYMV，而出芽試驗所檢測的種子傳染率仍為 0。

關鍵詞：標準檢測流程、病毒檢測、胡瓜、西瓜、南瓜。

前言

矮南瓜黃化嵌紋病毒 (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) 在 1981 年於法國 (Lecoq *et al*. 1981) 與義大利 (Lisa *et al*. 1981) 同時被發現並命名，隨後在全球各地相繼被發現，1985 年台灣也發表 ZYMV 之分離與鑑定報告 (Hseu *et al*. 1985)。ZYMV 屬於 *Potyviridae* 科之 *Potyvirus* 屬，長絲狀病毒顆粒，田間接觸感染或靠蚜蟲以非永續性方式傳播，可感染多種葫蘆科作物，是 1980 年代胡瓜、絲瓜、苦瓜、冬瓜、南瓜、甜瓜及西瓜田間發生最普遍且最嚴重的病毒，造成植株葉片黃化、嵌紋，全株矮化或萎凋、果實與種子變形，若幼株受感染則無法開花結果。當時認為 ZYMV 無經種子傳播的能力 (Lecoq *et al*. 1981; Nameth *et al*. 1985; Greber *et al*. 1987; Provvidenti & Robinson 1987; Gleason & Provvidenti 1990; Robinson *et al*. 1993; Wong *et al*. 1994)， 但 10 年內世界五大洲各種瓜類作物幾乎都可發現被 ZYMV 感染的情形，其快速又廣泛的傳播特性，被懷疑有經種子媒介傳染的能力。1990 代的報告指出，南瓜種子帶有 18.9% 的 ZYMV (Davis & Mizuki 1986)，Greber *et*

投稿日期：2016 年 10 月 26 日；接受日期：2016 年 11 月 24 日。
* 通訊作者：tcde@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

al. (1988) 檢出 *Cucurbita pepo* L. 有 1% 的 ZYMV 種傳率，Al-Musa (1989) 證實 ZYMV 感染的 *Ranunculus sardous* Crantz 之種子所長出的實生苗有 1.3% 帶有 ZYMV。此外，Schrijnwerkers *et al*. (1991) 證實 *C. pepo* 罹病株新鮮果實中的種子半數以上可檢測出 ZYMV，且病毒都存在於種皮外部；或認為 ZYMV 僅是汙染種子外表 (Desbiez & Lecoq 1997)，但 ZYMV 可侵染至甜瓜果實中，隨果實的運銷作長距離傳播亦被 Lecoq *et al*. (2003) 證實。經多年論證，ZYMV 可經種子傳播的現象才在本世紀被定調 (Fletcher *et al*. 2000; Riedle-Bauer *et al*. 2002; Tobias & Palkovics 2003; Muller *et al*. 2006; Coutts, *et al*. 2011; Simmons, *et al*. 2011; Lestari & Nurhayati 2014; Sevik & Balkaya 2015)。Simmons *et al*. (2011) 證實 ZYMV 在南瓜 (*C. pepo* sub. *texana*) 經種子傳染至種苗 (seed to seedling transmission) 的現象，係因 ZYMV 已侵染至種胚 (embryonic infection)。上述文獻中確切的數據，使 ZYMV 經種子傳染的現象無所遁形。因此，近年來瓜類種子進出口有關 ZYMV 的檢疫備受關注。本文研究以台灣的瓜類材料及病毒株系進行試驗，確認 ZYMV 經種子傳播的特性，同時據以擬訂標準檢測流程供瓜類種子中 ZYMV 的檢驗。

材料與方法

ZYMV 檢測方式比較

以 ZYMV 冬瓜分離株 (31B05) 作為供試病毒，接種栗南瓜 (*Cucurbita maxima* Duch) 「味平」，新葉出現病徵後採植株葉片，以純水研磨淬取汁液，經 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6} 系列稀釋後，當檢體進行以下試驗。

生物分析 (bioassay)：以等量 0.1 M 磷酸緩衝液 (KPB buffer) 與系列稀釋的檢體混合製備成接種源，磨擦接種至奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片，共 6 株 (6 重複，採拉丁方格設計)。接種之植株置於隔離網室內，連續觀察 7–10 d 後由局部病斑的出現，檢測供試檢體中具有感染力的病毒之數量，也是傳統的病組織中病毒耐稀釋性 (dilution end point; DEP) 測定。

聯抗體免疫分析 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)：本試驗所用 ZYMV 多元抗血清為先前實驗室所製備保存 (Hseu 1985)，免疫球蛋白 (immunoglobulin G; IgG) 純化及酶聯抗體免疫分析 (ELISA) 沿襲 Clark & Adams (1977) 的方法。取上述系列稀釋的 ZYMV 檢體，以等量 coating buffer 混合後，經間接法 (indirect) ELISA (Lommel *et al*. 1982) 進行試驗，再以 ELISA 讀值機 (Multiskan Ascent, Thermo, Finland) 測定盤中各穴樣品在 405 nm 之吸收值 (A_{405})。一般測試樣品的 ELISA 讀值若超過負對照組的 2 倍，即判定為正反應 (有病毒檢出)。

西方墨漬法 (western blot)：依據 Towbin *et al*. (1979) 的方法，將系列稀釋的 ZYMV 檢體以含有 1% SDS 的 12% polyacrylamide 進行膠體電泳 (SDS-PAGE) 後，把膠體放入轉漬槽內，將蛋白轉漬於 0.45 μm 硝化纖維紙 (nitrocellulose paper) 上，再與 ZYMV 抗體反應，然後加入以鹼性磷酸酶標定之山羊抗兔免疫球蛋白 (Sigma A8233)，反應後再以基質 nitro-blue tetrazolium chloride (NBT) 及 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt (BCIP) 加入呈色。

反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR)：系列稀釋的供試材料以 Plant Total RNA Extraction Miniprep System (Viogene, CA, USA) 進行全量 RNA 之萃取純化，利用 MMLV reverse transcriptase (50 U μL^{-1}, Startagene) 合成 1st strand cDNA，利用專一性引子對：ZYMV-CP-5' (5'-GGTTCATGTCCCACCAAGC-3') 及 ZYMV-CP-3'(5'-ATGTCGAGTATCACATTTCC-3') 增幅 NIb/CP 片段 (Yakoubi *et al*. 2008) 進行反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 檢測 ZYMV。分別取 1 μL RNA、2 μL 0.5PC 引子及 15 μL DEPC-DW，加入 AccuPower RT/PCR Premix tube (Bioneer, Korea) 中混合均勻，將反應液置於 MultiGene TC-9600 Thermo Cycler (Labnet, Edison, NJ,

US) 中進行增幅反應，反應溫度及時間：70℃ 5 min 及 10℃ 10 min (for denature)；42℃ 60 min 及 95℃ 10 min (for RT)；95℃ 30 s；50℃ 30 s；72℃ 60 s，共 30 個循環，最後一個循環中 72℃下聚合 10 min。反應結果以 1.2% 瓊脂電泳進行分析，預期可得 605 bp 的 DNA 產物。

瓜類種子 ZYMV 檢測的標準程序

群體測試 (Group testing) 採樣：每個批號送驗的樣本 (submitted sample) 至少 1,000 粒種子，試驗時供試樣本 (working sample) 分別從送驗樣本隨機取樣，共取 690 粒種子進行群體測試：以 1 粒 (10 組)、3 粒 (10 組)、5 粒 (10 組)、10 粒 (10 組)、100 粒 (5 組) 為標準，1 組為 1 個檢體 (Specimen)，每次測試 45 個檢體。

供試檢體製備：以純水 (每毫升 1 粒種子) 振盪洗滌每組種子外層，浸泡並搖盪過夜，取洗出懸浮液為供試檢體。

檢測方法：以自製的 ZYMV 抗血清所製備的免疫球蛋白試劑進行間接法 ELISA，每一個 ELISA 微量盤進行 45 個檢體加上正負對照組進行試驗，檢測結果若有疑慮時，輔以 RT-PCR (Yakoubi *et al*. 2008) 確認檢測結果。

檢測結果的統計分析：計算群體測試各群組中 ZYMV 正反應的個數，以 Seedhealth 程式 (Chiang *et al*. 2007) 演算出送驗樣本中 ZYMV 的檢出百分率 (proportion)，並含上下可信賴區間 (confidence interval)。

檢出率 (Incidence)：以上檢測的檢出率為種子帶病毒 (seed-carried) 的百分率。

出芽試驗 (Growing-out test)：供試種子直接播種於穴盤中，發芽後連續追蹤觀察 1 mo，於苗株第 1 對本葉展開時，取苗株組織進行 ELISA 檢測，其結果係測試病毒經種子傳染子代苗 (seed to seedling) 的能力。

南瓜種子帶 ZYMV 檢疫檢測實例

2015 年 4 月防檢局送驗 2 個批號 (seed lots)：9894C-AN 及 9894C-AO 的南瓜種子各 1000 粒，利用上述檢疫檢測的標準程序進行 ZYMV 之檢測。

胡瓜種子中 ZYMV 的檢測

以 ELISA 篩檢市售胡瓜 (*Cucumis sativus* L.) 種子是否帶有 ZYMV，供試品種有「秀綠」('Shiou-leu')、「文秀」('Wen-shiou')、「阿秀」('A-shiou')、 'F-1786'、「新嬌」('Sin-jau')、「萬吉」('Vantage')、「彩綠二號」('Bountiful No.2')、「華燕」('Fa-yen')、及「鳳燕」('Feng-yen') 等。取上述各品種種子播種於溫室，栽培長至第 1 對本葉時期，以 ZYMV 病汁液磨擦接種植株子葉及第 1 對本葉，每個品種試驗 6 重複。供試植物置於隔離網室中，連續觀察病徵發展，採收前以 ELISA 分別檢測植株上下各部位組織，確認 ZYMV 感染與否。

採集接種後發病的胡瓜罹病株果實，以 ELISA 檢測鮮採的種子帶有 ZYMV 的比率，並解剖分離種皮及皮下含胚與胚乳組織的部分，分別檢測；新鮮種子乾燥保存 15 d，再以蒸餾水浸潤 2 d 後行解剖分離各供試種子的種皮及皮下含胚與胚乳組織，分別檢測。

收集罹病株種子，播種於泥炭土為介質的穴盤中，連續追蹤觀察 1 mo，同時記錄病徵，並於苗株第 1 對本葉展開時，取脫落的種皮、未脫落的子葉與第 1 對本葉部分葉組織進行病毒檢測。

西瓜種子中 ZYMV 的檢測

2013 年 5 月調查田間瓜類病毒病害時，發現有西瓜 (*Citrullus vulgaris* Schrad. ex Eckkl. & Zeyh)「甜美人」('Tien-Mei-Zen') 及「黑美人」('Dark Belle') 的植株感染 ZYMV，採其果實隔離挑取果蒂、果底、果皮、外果肉、內果肉及果中柱等組織以 ELISA 檢測，均有 ZYMV 侵染現象。採集果實中所有未成熟及已成熟的種子，分別以 ELISA 進行病毒檢測。剩餘種子置於 10℃冰箱保存 13 mo，再行取出以 ELISA 進行病毒檢測。收集罹病株種子，播種於泥炭土為介質的穴盤中，連續追蹤觀察 1 mo，同時記錄病徵，並於苗株第 1 對本葉展開時，取脫落的種皮、未脫落的子葉與第 1 對本葉部分葉組織進行病毒檢測。

結果

病毒檢測方法比較

ZYMV 經 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6} 系列稀釋後進行生物分析、間接法酶聯抗體免疫分析、西方墨漬法及反轉錄聚合酶連鎖反應等檢定法之結果比較如圖 1。在病毒的 DEP 是 10^{-4} 的情形下，反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 的檢測靈敏度為 10^{-6}，以自製的免疫檢定試劑用於西方墨漬法可有效測得 10^{-2} 稀釋的檢體，用於 ELISA 則為 10^{-3}。因此，試驗中 ZYMV 檢定的標準流程，以間接法 ELISA 作為例行檢測的主要方法，檢測結果若有虞慮，必要時以 RT-PCR 確認之。

南瓜種子帶 ZYMV 檢疫檢測實例

以檢測標準程序進行南瓜種子 ZYMV 之檢疫檢測，種子批號 9894C-AO 的 45 個檢體都是負反應；但種子批號 9894C-AN 的 10 個檢體 (1 粒種子/檢體) 中有 0 個為正反應，10 個檢體 (3 粒種子/檢體) 中有 1 個為正反應，10 個檢體 (5 粒種子/檢體) 中有 1 個為正反應，10 個檢體 (10 粒種子/檢體) 中有 0 個為正反應，5 個檢體 (100 粒種子/檢體) 中有 1 個為正反應。

利用 Seedhealth 程式演算出送驗樣本中 ZYMV 的檢出率及信賴區間，批號 9894C-AN 的種子中 ZYMV 的檢出率是 0.47 ± 0.46%，批號 9894C-AO 的種子中 ZYMV 的檢出率是 0。

取 2 個正反應的檢體 (9894C-AN-5-5 及 9894C-AN-100-5)，1 個負反應的檢體 (9894C-AN-3-2) 及純水 (CK) 做對照，進行檢測標準程序中 RT-PCR 的步驟，結果如圖 2 所示。正反應的檢體都可增幅出 605 bp 的核酸產物，經解序與 BLAST 比對，該片段與 GenBank Accession HM005312 (ZYMV polyprotein gene of watermelon in Mali) 有 93% 相同度 (Identity)。

胡瓜種子中 ZYMV 的檢測

ZYMV 接種胡瓜「新嬌」、「萬吉」、「彩綠二號」、「華燕」(圖 3A)、「鳳燕」等品種因具有部份抗性，果實與種子以 ELISA 檢測均無 ZYMV 檢出。胡瓜「秀綠」、「文秀」、「阿秀」(圖 3B)、'F-1786' 等品種極感病，取其罹病株果實，在新鮮種子中可測得 26% (11/42) 帶有 ZYMV，且病毒僅存在於種皮 (ELISA A_{405} = 1.253)，皮下含胚與胚乳組織的部分無病毒檢出 (ELISA A_{405} = 0.014)。新鮮種子乾燥保存

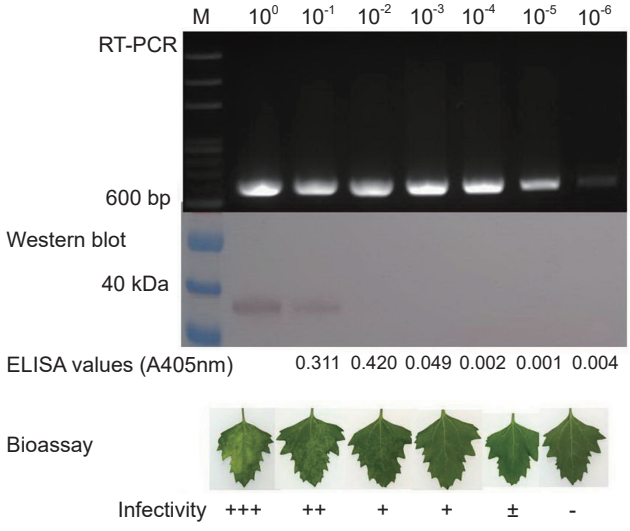


圖 1. 反轉錄聚合酶連鎖反應、西方墨漬法抗體檢定、酶聯抗體免疫分析、及生物分析檢定 ZYMV 的靈敏度比較。

Fig. 1. Comparisons of sensitivities for detection of ZYMV by RT-PCR, western blot, ELISA and bioassay.

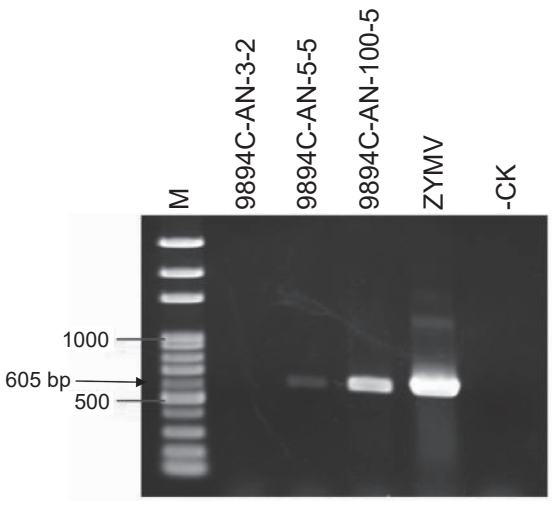


圖 2. 以 RT-PCR 確認 ELISA 反應的結果：2 個正反應的檢體 (9894C-AN-5-5 及 9894C-AN-100-5) 及 1 個負反應的檢體 (9894C-AN-3-2)，正反應的檢體可增幅出 605 bp 的核酸產物。

Fig. 2. Confirmation of ELISA-positive specimens (9894C-AN-5-5 and9894C-AN-100-5) and negative specimen (9894C-AN-3-2) by RT-PCR. A 605 bp fragment was yielded by the PCR.

15 d 後，全數供試 45 粒種子的種皮或皮下含胚與胚乳組織的部分均無法檢出 ZYMV。出芽試驗供試 45 株苗，全數無 ZYMV 檢出。

西瓜種子中 ZYMV 的檢測

從佈滿 ZYMV 的西瓜罹病果實中採集的新鮮種子，極易測得病毒，如圖 4 所示。雖然西瓜「黑美人」成熟的種子中有 58%，未熟的種子中有約 69% 測不到 ZYMV。但是如圖 5 所示，「甜美人」成熟的種子 98%，未熟的種子 100% 都可測到 ZYMV。「甜美人」成熟的種子在低溫乾燥保存 13 mo 後再行檢測，仍有 60% 可檢出 ZYMV (圖 5)。但出芽試驗 90 株苗，全數無 ZYMV 檢出。

討論

比較文內 ZYMV 的各種檢測方法，抗體有效僅達 10^{-2}，接種試驗僅達 10^{-4}，RT-PCR 可達 10^{-6}。短時間內需完成大量標本的檢測時，目前仍以 ELISA 最為實用，但 ELISA 檢

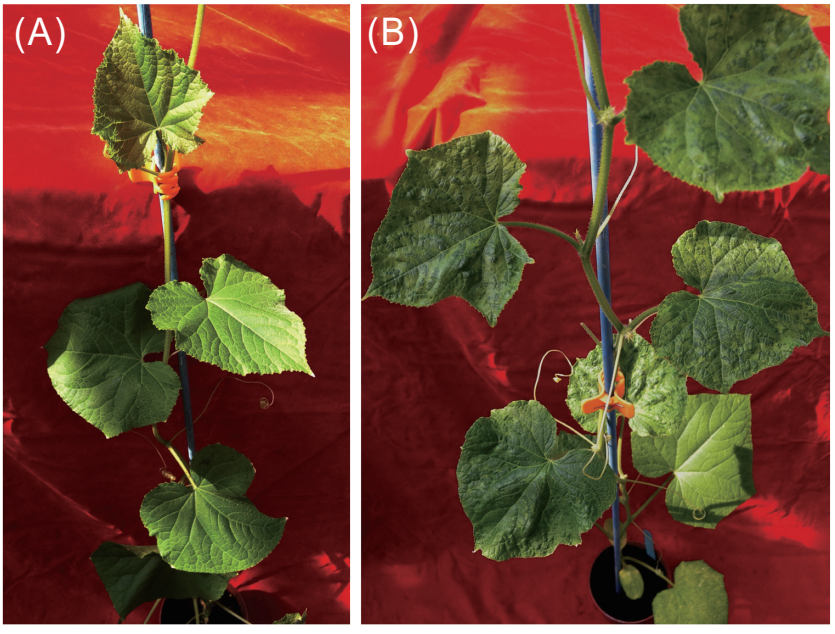


圖 3. 胡瓜「華燕」接種 ZYMV，上位葉無病徵，以 ELISA 檢驗無 ZYMV 檢出 (A)；胡瓜「阿秀」接種 ZYMV 後，系統性感染造成上位葉的病徵 (B)。

Fig. 3. Inoculation assay on different cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Following inoculation with ZYMV, no symptom was observed and no virus was detected on upper leaves of cucumber cv. 'Fa-yen' (A); as compared to the systemically developing symptoms shown on cucumber cv. 'A-shiou' (B).

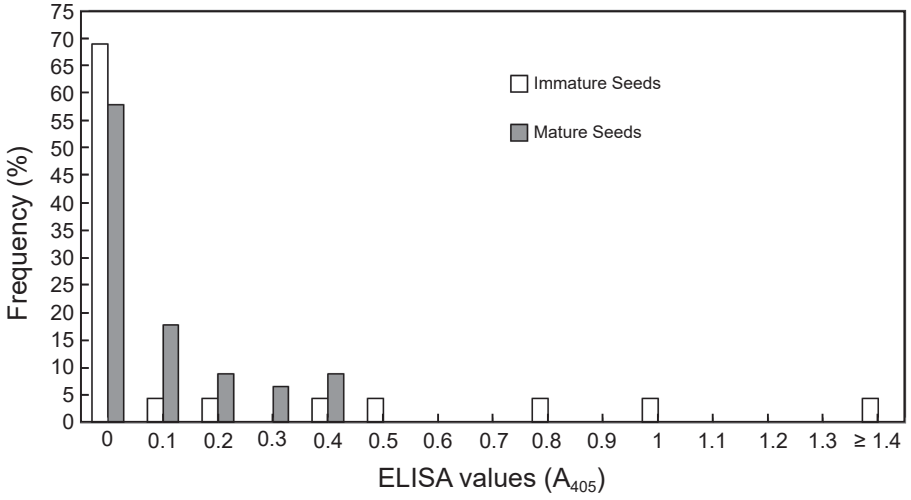


圖 4. 間接法 ELISA 檢測感染 ZYMV 的西瓜品種「黑美人」，所有樣本在各反應值 (A_{405}) 的檢出頻率比較。

Fig. 4. Comparative frequency of indirect ELISA values (A_{405}) of seeds derived from ZYMV-infected watermelon cv. 'Dark Belle'.

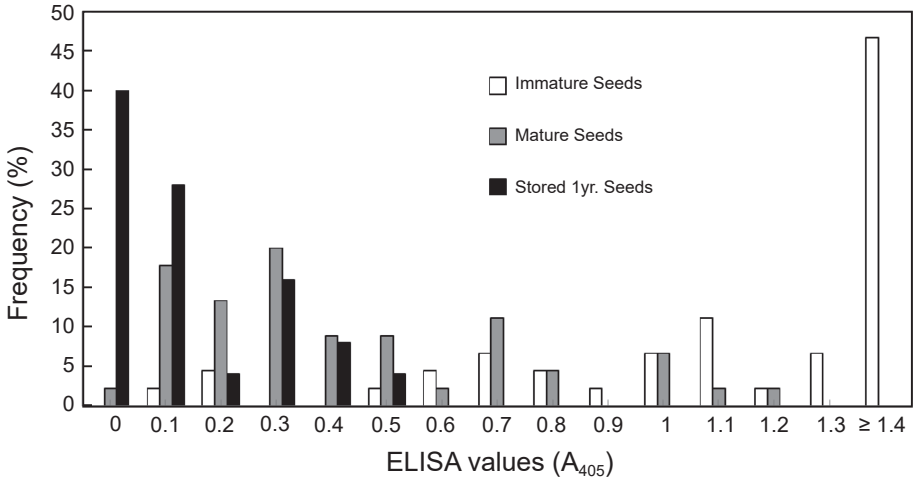


圖 5. 間接法 ELISA 檢測感染 ZYMV 的西瓜品種「甜美人」，所有樣本在各反應值 (A_{405}) 的檢出頻率比較。

Fig. 5. Comparative frequency of indirect ELISA values (A_{405}) of seeds derived from ZYMV-infected watermelon cv. 'Tien-Mei-Ren'.

測出現臨界值時，需以靈敏度最高的 RT-PCR 結果來判斷。Yakoubi *et al*. (2008) 報告的 RT-PCR 來檢測 ZYMV，尤其是引子對的設計，是我們與其他方法比較之後，發現較有效率的方法，因此引用來當標準檢測程序之一。

多數前人研究有關 ZYMV 經種子傳播的試驗都是以南瓜 (*Cucurbita* sp.) 為寄主，最終結論是正面認定會經種子傳播 (Davis & Mizuki 1986; *Greber et al*. 1988; Schrijnwerkers *et al*. 1991; Robinson *et al*. 1993; Fletcher *et al*. 2000; Tobias & Palkovics 2003; Muller *et al*. 2006; Coutts, *et al*. 2011; Simmons, *et al*. 2011; Lestari & Nurhayati 2014; Sevik & Balkaya 2015; Harth *et al*. 2016)，但其中也有負面認定不會經種子傳播 (Nameth *et al*. 1985; Provvidenti & Robinson, 1987; Greber *et al*.

1987; Gleason & Provvidenti 1990; Robinson *et al*. 1993; Wong *et al*. 1994)。此外，以甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 為寄主的試驗，都是負面結論 (Lecoq *et al*. 1981; Provvidenti & Robinson 1987)，唯一胡瓜的試驗，也是負面結論 (Robinson *et al*. 1993)。本研究試驗顯示，ZYMV 會經南瓜、胡瓜、及西瓜種子傳播的事實，當 ZYMV 系統性感染西瓜及胡瓜植株時，病毒可侵染到果實中，散佈至果實內所有果肉組織中，污染到種子或其衍生組織，因此種皮可測到病毒的存在，尤其是新鮮或未成熟的種子，但多數種皮以內含胚乳層及種胚部份則無病毒可檢出。雖然一系列的報告指出 ZYMV 會侵染至種胚 (embryonic infection)，造成病毒由種子傳染至子代苗 (seed-to-seedling transmission) 的垂直傳染 (vertical transmission) 現象 (Simmons *et al*. 2011; Simmons *et al*. 2013; Harth *et al*. 2016)，但是這所有試驗都僅以一個南瓜品種 (*Cucurbita pepo* ssp. *texana*) 為材料。我們的試驗結果顯示，ZYMV 種傳率隨瓜的種類而異，胡瓜、西瓜和南瓜的狀況各不相同，同一種瓜也隨品種間對病毒的感受性 (susceptibility) 而異，抗病胡瓜品種全無 ZYMV 種傳問題；西瓜「黑美人」種子帶病毒率明顯較低 (較不易被檢出) 應是具有抗病性，使 ZYMV 在果實內移行受限。雖然 Simmons *et al*. (2015) 有試驗證實轉基因抗 ZYMV 的南瓜品種不能免除病毒經種子的垂直傳染，但若寄主抗病機制是抑制病毒移行，使 ZYMV 未能系統性感染植株，而無病毒蔓延至果實內，就應無種子被侵染，也無病毒經種子垂直傳染至子代苗的問題。

胡瓜和西瓜種子帶有病毒係在果肉內種子形成過程中 ZYMV 污染到外部種皮所致，病毒無法在成熟鞣化的種皮上繁殖，所以成熟的種子上檢出的病毒量較未成熟的種子少，且經採種程序乾燥貯存後，絕對寄生但未入侵至種胚的 ZYMV 多數遭自然消退 (denature)，餘存的病毒量也較難檢出。自 ZYMV 感染的胡瓜及西瓜果實所採的種子及檢測帶有 ZYMV 的南瓜種子，經出芽試驗，觀察長出的實生苗，證實全數種子皆無傳染 ZYMV 的能力，因此 ZYMV 感染第二代瓜苗的機會甚低。Robinson *et al*. (1993) 也曾報告採自 ZYMV 感染株的數萬顆南瓜或胡瓜種子，經溫室內出芽試驗，結果第二代瓜苗皆無病毒感染。Simmons *et al*. (2013) 認為 ZYMV 在 *C. pepo* ssp. *texana* 種子感染率高達 21.9%，但傳染到子代苗只有 1.6%，有所謂棲群瓶頸 (population bottleneck) 效應的發生。因此，很明顯種子帶病毒率 (seed-carried rate) 不等於種子傳播率 (seed-transmitted rate)。

結論

瓜類種子國際貿易、跨國採種或種源交換日趨頻繁，病毒經種子媒介傳播入境的風險也日增，為了檢疫與防疫之需，必須有一套被世界各國接受的標準程序檢測種媒病毒 (Maddox 1997)。本文證實 ZYMV 可被南瓜、胡瓜、及西瓜種子傳播，於是針對這 3 種瓜類，擬訂 ZYMV 檢測的標準程序，包括送驗樣品數、群體測試的採樣及統計分析、供試樣品製備、適合的檢驗方法及檢測結果的表示等。依國際種子檢查規則，檢測結果應以受感染數的百分比，或一定重量樣品內檢出的病毒數表示。至於在作物健康管理防疫策略內，種子攜帶 ZYMV 的容許率在不同瓜類不同品種均有待訂定，但在檢疫檢測時之檢出率容許度 (tolerance) 應為 0。

誌謝

本研究經費由農委會農業試驗所科技計畫 (104 農科-9.7.3-農-C2 及 105 農科 -9.7.3- 農-C2) 補助，謹致謝忱。

引用文獻

Al-Musa, A. M. 1989. Severe mosaic caused by zucchini yellow mosaic virus in cucurbits from Jordan. Plant Pathol. 38:541−546.

Chiang, K. S., T. C. Deng, H. H. Lai, and S. F. Wang. 2007. A statistical method to estimate virus seed-transmission rate by results of group tests. Plant Pathol. Bull. 16:225−229. (in Chinese with English abstract)

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.

Coutts, B. A., M. A. Kehoe, C. G. Webster, S. J. Wylie, and R. A. C. Jones. 2011. Zucchini yellow mosaic virus: Biological properties, detection procedures and comparison of coat protein gene sequences. Arch. Virol. 156:2119−2131.

Davis, R. F. and M. K. Mizuki. 1986. Seed transmission of *zucchini yellow mosaic virus* in squash. Phytopathology 76:1073.

Desbiez, C. and H. Lecoq. 1997. *Zucchini yellow mosaic virus*. Plant Pathol. 46:809−829.

Fletcher, J. D., A. R. Wallace, and B. T. Rogers. 2000. Potyviruses in New Zealand buttercup squash (*Cucurbita maxima* Duch.): Yield and quality effects of ZYMV and WMV 2 virus infections. New Zeal. J. Crop. Hort. Sci. 28:17−26.

Gleason, M. L. and R. Provvidenti. 1990. Absence of transmission of *zucchini yellow mosaic virus* from seeds of pumpkin. Plant Dis. 74:828.

Greber, R. S., G. D. McLean, and M. S. Grice. 1987. *Zucchini yellow mosaic virus* in three States of Australia. Aust. Plant Pathol. 16:19−21.

Greber, R. S., D. M. Persley, and M. E. Herrington. 1988. Some characteristics of Australian isolates of *zucchini yellow mosaic virus*. Aust. J. Agric. Res. 39:1085−1094.

Harth, J. E., H. E. Simmons, and A. G. Stephenson. 2017. Vertical infection of *Zucchini yellow mosaic virus* via pollen transmission occurs at a lower frequency than ovule transmission. Eur. J. Plant Pathol. 147:717−720.

Hseu, S. H., H. L. Wang, and C. H. Huang. 1985. Identification of a *Zucchini yellow mosaic virus* from Cucumis sativus. J. Agric. Res. China 34:87−95. (in Chinese with English abstract)

Lecoq, H., C. Desbiez, C. Wipf-Scheibel, and M. Girard. 2003. Potential involvement of melon fruit in the long distance dissemination of cucurbit potyviruses. Plant Dis. 87:955−959.

Lecoq, H., M. Pitrat, and M. Clement. 1981. Identification and characterization of a potyvirus causing yellow stunt of melon. Agronomie 1:827−834.

Lestari, S. M. and E. Nurhayati. 2014. Seed transmission efficiency of squash mosaic virus on Cucurbitaceae. J. Fitopathol. Indonesia 10:81−86. (in Indonesian with English abstract)

Lisa, V., G. Boccardo, G. D'Agostino, G. Dellavalle, and M. D'Aquilio. 1981. Characterization of a potyvirus that causes zucchini yellow mosaic. Phytopathology 71:667−672.

Maddox, D. A. 1997. Regulatory needs for standardized seed health tests. p.81−92. *in*: Plant Pathogens and the Worldwide Movement of Seeds (McGee, D. C., ed.). APS Press. St. Paul, MN. 109 pp.

Müller, C., H. Bröther, S. Von Bargen, and C. Buttner. 2006. *Zucchini yellow mosaic virus* - Incidence and sources of virus infection in field-grown cucumbers and pumpkins in the Spreewald, Germany. J. Plant Dis. Prot. 113:252−258.

Nameth, S. T., J. A. Dodds, A. O. Paulus, and A. Kishaba. 1985. *Zucchini yellow mosaic virus* associated with severe diseases of melon and watermelon in southern California desert valleys. Plant Dis. 69:785−788.

Provvidenti, R. and R. W. Robinson. 1987. Lack of seed transmission in squash and melon plants infected with *zucchini yellow mosaic virus*. Cucurbit Genet. Coop. Rpt. 10:81−82.

Riedle-Bauer, M., B. Suarez, and H. J. Reinprecht. 2002. Seed transmission and natural reservoirs of *Zucchini yellow mosaic virus* in *Cucurbita pepo* var. *styriaca*. J. Plant Dis. Prot. 109:200−206.

Robinson, R. W., R. Provvidenti, and J. W. Shail. 1993. Tests for seedborne transmission of zucchini yellow mosaic virus. HortScience 28:694−696.

Schrijnwerkers, C. C. F. M., N. Huijberts, and L. Bos. 1991. Zucchini yellow mosaic virus; Two outbreaks in the Netherlands and seed transmissibility. Neth. J. Plant Pathol. 97:187−191.

Sevik, M. A., and A. Balkaya. 2015. Seed transmissibility of viruses in winter squash landraces collected from the Black Sea region of Turkey. Plant Prot. Sci. 51:195−199.

Simmons, H. E., E. C. Holmes, F. E. Gildow, M. A. Bothe-Goralczyk, and A. G. Stephenson. 2011. Experimental verification of seed transmission of *Zucchini yellow mosaic virus*. Plant Dis. 95:751−754.

Simmons, H. E., J. P. Dunham, K. E. Zinn, G. P. Munkvold, E. C. Holmes, and A. G. Stephenson. 2013. *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, Potyvirus): Vertical transmission, seed infection and cryptic infections. Virus Res. 176:259−264.

Simmons, H. E., H. R. Prendeville, J. P. Dunham, M. J. Ferrari, J. D. Earnest, D. Pilson, G. P. Munkvold, E. C. Holmes, and A. G. Stephenson. 2015. Transgenic virus-resistance in crop-wild *Cucurbita pepo* does not prevent vertical transmission of *Zucchini yellow mosaic virus*. Plant Dis. 99:1616−1621.

Tóbiás, I. and L. Palkovics. 2003. Characterization of Hungarian isolates of *Zucchini yellow mosaic vi*

rus (ZYMV, potyvirus) transmitted by seeds of *Cucurbita pepo* var Styriaca. Pest Manag. Sci. 59:493–497.

Towbin, H., S. Theophil, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350–4354.

Wong, S. M., C. G. Chng, C. Y. Chng, and P. L. Chong. 1994. Characterization of an isolate of *Zucchini yellow mosaic virus* from cucumber in Singapore. J. Phytopathol. 141:355–368.

Yakoubi, S., C. Desbiez, H. Fakhfakh, C. Wipf-Scheibel, F. Fabre, M. Pitrat, M. Marrakchi, and H. Lecoq. 2008. Molecular, biological and serological variability of *Zucchini yellow mosaic virus* in Tunisia. Plant Pathol. 57:1146–1154.

Seed Transmissibility and Detection of *Zucchini yellow mosaic virus* in Cucurbits

Ting-Chin Deng[1,*], Chin-Hui Tsai[2], Yi-Ting Lin[2], and Chien-Ming Chou[3]

Abstract

Deng, T. C., C. H. Tsai, Y. T. Lin, and C. M. Chou. 2017. Seed transmissibility and detection of *Zucchini yellow mosaic virus* in cucurbits. J. Taiwan Agric. Res. 66(3):230−239.

Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) had been comparatively detected by bioassay, indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), western blot, and reverse transcription-PCR (RT-PCR). Accordingly, a standard operating procedure for detection of ZYMV carried by cucurbit seeds was set. The procedure includes sampling technique and statistical analysis mode for group test, specimen preparation for testing, acceptable methods for ZYMV detection, and formal expression of tested results. To practice the procedure, a seed lot of *Cucurbit* sp. for quarantine test was tested by ELISA and the proportion of positive was 0.47 ± 0.46% calculated by 'Seedhealth' program. ZYMV involved in these positively detected specimens were confirmed by the analysis of RT-PCR and the nucleotide sequencing of RT-PCR products. However, no seedlings from the same seed lot were infected by ZYMV when tested by growing-out test. All tested seeds collected from 9 local commercial cucumber cultivars were detected to be completely negative. Plants of various cucumber cultivars were inoculated with ZYMV, no virus was detected in fruit or seed derived from some resistant cultivars; whereas, ZYMV-infected fruits were harvested from symptomatic plants of susceptible cultivars. The incidence of ZYMV on fresh seeds in infected fruits was estimated to be 26%; even so, the virus became undetectable after dry preservation of the seeds for 15 d. The distribution of ZYMV on fruit of watermelon was observed, and the virus was found in fresh pedicle, fruit base, fruit peel, outer pulp, inner pulp and innermost pulp. Immature seeds contained more virus than that of mature seeds. Regularly, it's easier to detect ZYMV in seeds of watermelon cv. 'Tien-Mei-Zen' than that of 'Dark Belle'. The virus was still detectable in 60% of the 'Tien-Mei-Zen' seeds stored at 10℃ for 1 yr, but the seed transmission rate detected by growing out test was kept 0.

Key words: Standard operating procedure, Virus indexing, Cucumber, Watermelon, Pumpkin.

Received: October 26, 2016; Accepted: November 24, 2016.
* Corresponding author, e-mail: tcde@tari.gov.tw
[1] Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Research Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 66(3):240–247 (2017)
DOI: 10.6156/JTAR/2017.06603.07

研究報告

植物生長調節劑對液體培養基蠔菇菌絲生長及出菇之影響

邱獻毅 [1]　趙苡蓁 [2]　張雅涵 [2]　洪進雄 [3,*]　陳麗如 [4]

摘要

邱獻毅、趙苡蓁、張雅涵、洪進雄、陳麗如。2017。植物生長調節劑對液體培養基蠔菇菌絲生長及出菇之影響。台灣農業研究 66(3):240–247。

本研究探討植物生長調節劑 (plant growth regulator; PGR) 在液體培養方式下對蠔菇菌絲、原基及子實體生長的影響。在分別添加 1、6 mg L^{-1} 的 1-萘乙酸 (α-naphthaleneacetic acid; NAA)、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid; 2,4-D) 或 0.2、1.5 mg L^{-1} 的 6-苄氨基嘌呤 (6-Benzylaminopurine; BA) 的培養液中，接種蠔菇菌絲塊，進行25℃靜置培養。菌絲生長調查結果顯示，在添加 1.5 mg L^{-1} BA 或 1、6 mg L^{-1} 2,4-D 的培養液中，菌絲生長量最高，在接種後 21 d 達 7.5–7.8 cm，而 6 mg L^{-1} NAA 有抑制菌絲生長的情形。在原基及子實體形成的調查結果顯示，培養 21 d 後，在 1 mg L^{-1} 2,4-D 處理組中，原基及子實體形成數最多，其原基及子實體平均形成數分別為 235.5 個及 5.2 個。而在 1.5 mg L^{-1} BA 處理組中，原基形成數最低，平均為 58.4 個。在 6 mg L^{-1} 2,4-D 處理組中，子實體形成數最低，平均為 2.6 個。本研究顯示，培養液中添加 1 mg L^{-1} 2,4-D 能顯著影響蠔菇菌絲生長、原基誘導與子實體發生，未來可進一步進行放大試驗規模，尋求可以符合商業生產的植物生長調節劑及其最適濃度。

關鍵詞：出菇、液體培養、植物生長調節劑、蠔菇。

前言

蠔菇 [*Pleurotus ostreatus* (Jacq.exFr.) Kumm.]，屬傘菌目、側耳科、側耳屬真菌，乃國內前 5 大栽培菇類 (Lu 2009)。蠔菇富含蛋白質、胺基酸、微量元素、多醣與抗氧化物質，具有高營養低熱量特性，並有提高免疫力、保護肝臟、降低血壓與膽固醇、以及增進心腦血管代謝的功能 (Sarangi *et al*. 2006; Jayakumar *et al*. 2008)。行政院農業委員會農糧署統計資料顯示，蠔菇栽培量每年約為 3,000 萬包太空包，產量約為 12,000 Mg，產值約為新台幣 5.4 億。每年用於太空包生產的木屑需約 36,000 Mg，但近年來林木資源逐漸短缺，將是未來菇類固體栽培必須面臨的重大問題。因此，在環境生態及菇農生產成本的壓力下，近年來已有許多研究以農業廢棄物，如雜草、玉米桿、稻草等，作為替代基質的研發實例 (Liang *et al*. 2009; Naraian *et al*. 2009; Li *et al*. 2012)。

Yurekli *et al*. (2003) 指出在 30℃黑暗條件下，*Lentinus sajor-caju* 在含葡萄糖的培養液中振盪培養，每毫升培養液最高有 0.18 mg 吲哚乙酸 (Indole acetic acid; IAA) 的產出。植物生長調節劑 (plant growth regulator; PGR) 除廣泛地應用於作物的生產與栽培上，也應用於菇類生產的研究。*Pleurotus sajor-caju* 培養液中添加 2 mg L^{-1} IAA 振盪培養，可增加 28% 的菌絲及蛋白質產量 (Mukhopadhyay *et al*. 2005)。Jonathan & Fasidi (2001) 提出 2,4-二

投稿日期：2016 年 8 月 30 日；接受日期：2016 年 12 月 12 日。
* 通訊作者：chhung@mail.ncyu.edu.tw
[1] 國立嘉義大學園藝學系碩士。台灣 嘉義市。
[2] 國立嘉義大學園藝學系助理。台灣 嘉義市。
[3] 國立嘉義大學園藝學系教授兼系主任。台灣 嘉義市。
[4] 中國文化大學園藝暨生物技術學系助理教授。台灣 台北市。

氯苯氧乙酸 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D) 可促進食用菌的菌絲生長，依菌種而異。添加 8–15 mg kg^{-1} 1-萘乙酸 (α-naphthaleneacetic acid, NAA) 於栽培介質中，可提高平菇 (Wang *et al*. 2001) 及菌核鮑魚菇 (*Pleurotus tuber-regium*) 的產量 (Chen 2004)。添加 NAA 於液體培養基中，亦可提高桑黃 (Guo *et al*. 2009) 及金頂側耳 (*Pleurotus citrinopileatus*) 的菌絲及胞外多醣產量 (Huang *et al*. 2006)。除生長素外，添加 2 mg kg^{-1} 6-苄氨基嘌呤 (6-Benzylaminopurine; BA) 於平菇生產，可提高子實體產量 71% (Ciou *et al*. 2001)；添加 35 mg L^{-1} BA 至巴西蘑菇液體培養基中，對菌絲生長及可溶性醣與蛋白質含量均有顯著影響 (Guo *et al*. 2007)。

菇類由營養生長的菌絲分化為子實體的出菇過程，是菇類生產重要的一環，適當環境條件和營養需求是必要條件。探討適合出菇的栽培介質、培養基或條件，除能了解菇類生長的養分需求外，也能提升出菇速度、產量及品質。太空包的固體介質，除菌絲生長期與原基誘導期長外，介質成分複雜、體積龐大及栽培環境不易調控都是探討出菇條件的障礙 (Arjona *et al*. 2009)。因此，學者提出使用液體培養的方式，菌絲體可作為液體菌種接種太空包，也可萃取胞內多醣作為抗氧化的保健食品。採用液體菌種培養，具有較傳統菌種培養有生產週期短、菌齡一致及接種方便等優點 (Yan *et al*. 2007; Chen *et al*. 2016)。近年來亦有利用改良養液配方的液體培養基進行出菇的研究，並比較不同菇類的差異性，或使用環境調控來探討不同菇類及菌株特性與出菇需求。本研究目的在於以液體培養的方式建立蠔菇的出菇系統，並探討添加不同濃度的 NAA、2,4-D 或 BA 對蠔菇菌絲生長及出菇的影響。未來可應用於調控菌絲、菇體的生長速度或產量，或將液體培養模式結合生物技術與生化分析方法，在子實體的形成機制與其生理生化反應上能作較深入的研究。

材料與方法

菌種來源與接種源製備

本試驗所使用之蠔菇 *Pleurotus ostreatus* 為台灣一般商業栽培品種 (為台灣秋冬季栽培之低溫型白色蠔菇)，購自法商家樂福商場之新鮮菇體，於無菌操作台分離後培養在 potato dextrose agar (PDA; Himedia Chemicals, Mumbai, India) 試管斜面上，保存於 4℃冰箱內，每 2 mo 更新繼代培養一次。接種試驗前繼代於 PDA 平板培養基，於 25℃恆溫生長箱中黑暗培養，待長滿菌絲時使用。以直徑 0.7 cm 打孔器於長滿菌絲的平板外圍打洞，取其菌種塊作為接種源。

培養液組成分

培養液成分以 Leatham (1983) 發表的香菇液體培養配方為基礎進行修改。Leatham 培養基組成為每公升含 25 g D-glucose, 2.5 g L-glutamic acid、4 g D-glucuronic acid、2 g KH_2PO_4、2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、10 mL mineral solution、1 mL trace element solution、1 mL vitamin solution 及 0.1 mL salicylic acid solution。修改後配方為每公升含 20 g Dextrose (Choneye Pure Chemicals, Taipei, Taiwan)、1.5 g Asparagine (Hayashi Pure Chemical Ind., Ltd., Osaka, Japan)、2 g KH_2PO_4 (Choneye Pure Chemicals, Taipei, Taiwan)、2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Hayashi Pure Chemical Ind., Ltd., Osaka, Japan)、10 mL mineral solution、1 mL trace element solution、1 mL vitamin solution 及 0.1 mL salicylic acid solution (表 1)。

PGR 之添加處理與接種

在培養液中分別添加不同濃度的 NAA (1、6 mg L^{-1})、2,4-D (1、6 mg L^{-1}) 及 BA (0.2、1.5 mg L^{-1})，以無添加任何生長調節劑作為對照組。將各處理之養液分別取 25 mL 注入 250 mL 的錐形瓶中，以高溫高壓 (121℃及 1.2 atm) 滅菌 20 min 後，放置於無菌操作台冷卻。再接入直徑 0.7 cm 的菌絲塊，經暗培養 2 d 後，再移至光週期 18 h，光強度 10 μmol m^{-2} s^{-1}，光源為 40 W 螢光燈 (FL30D/29, China electric MFG. Co., Taipei, Taiwan) 的光照環境下進行培養，溫度為 25℃。從光照開始，每 3 d 記錄菌絲生長量、原基數及子實體數。

表 1. 修改後 Leatham 培養液配方。

Table 1. Modified composition of Leatham liquid medium.

Chemical	Content/L in stock	Content/L in medium
Dextrose		20.0 g
Asparagine		1.5 g
KH_2PO_4		2.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		2.0 g
Mineral solution		10 mL
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3.67 g	
$MgSO_4 \cdot 7H_20$	4.39 g	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.20 g	
Trace element solution		1 mL
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	14.1 g	
$CuSO_4 \cdot 6H_2O$	0.784 g	
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.081 g	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.051 g	
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0.081 g	
$SnCl_2 \cdot 2H_2O$	0.038 g	
HCl	2 mL	
Vitamin solution		1 mL
Myo-inositol	1 g	
Thiamine-HCl	1 g	
Pyridoxine-HCl	0.1 g	
Nicotinic acid	0.1 g	
Sodium pantothenate	0.1 g	
p-Aminobenzoic acid	0.1 g	
Riboflavin	0.1 g	
Biotin	0.03 g	
Folic acid	0.01 g	
Cyanocobalamin	0.01 g	
Salicylic acid solution		0.1 mL
Salicylic acid[z]	10 g	

[z] Salisylic acid is pre-dissolved in 95% ethanol before dissolved in water.

統計分析

本研究採用完全逢機設計 (Completely randomized design；CRD) 進行試驗，每處理 4 重複，每重複 4 樣本數。試驗數據以 SAS 軟體進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，以最小顯著差異分析 (least significant difference test; LSD test) 分析不同處理間是否有顯著差異 ($P < 0.05$)。

結果

PGR 處理對蠔菇菌絲生長的影響

NAA、2,4-D 及 BA 處理對蠔菇菌絲生長均有明顯的影響 (圖 1)。在接種 3 d 後，6 mg L^{-1} NAA 處理明顯抑制菌絲生長，並持續到接種後 21 d，菌絲生長量只達 5.5 cm，明顯低於對照組 (7.0 cm)。接種 6 d 後，1.5 mg L^{-1}

BA 處理即有明顯促進菌絲生長的情形，到接種 9 d 後，菌絲生長量達 5.1 cm，與其他處理組差異最大，能促進菌絲生長的現象持續到接種後 21 d，菌絲生長量達 7.8 cm。其次為 1 和 6 mg L^{-1} 2,4-D 的處理組，這 2 個濃度對促進菌絲生長的現象並無明顯差異，持續到接種後 21 d，促進生長的效率與 1.5 mg L^{-1} BA 處理組相近，分別為達到 7.7 cm 及 7.5 cm。此外，施用 1 mg L^{-1} NAA 或 0.2 mg L^{-1} BA 對菌絲生長無明顯的影響，到接種後 21 d，菌絲生長是略低於對照組。由以上結果顯示，施用 1.5 mg L^{-1} BA、1 或 6 mg L^{-1} 2,4-D 於培養液中皆可促進蠔菇菌絲生長。

PGR 處理對蠔菇原基生成的影響

PGR 對原基生成的影響如表 2 所示，在接種後 6 d 後開始有原基生成，對照組平均每瓶有 12 個原基，在 6 mg L^{-1} 2,4-D 及 1 mg L^{-1} NAA 的處理組中，能顯著促進原基生成，平均每瓶達 25 個，約有 2 倍的促進效率，同樣在接種後 9 d 及 12 d 也最為顯著 ($P < 0.05$)。在接種 15 d 及 18 d 後，1 mg L^{-1} 2,4-D 及 1 mg L^{-1} NAA 處理能促進原基生成的效果最為顯著，而到接種 21 d 後，以 1 mg L^{-1} 2,4-D 的促進效果最佳，平均每瓶達 236 個，約有 2.6 倍的促進效率；1 mg L^{-1} NAA 處理組的促進效果其次，平均每瓶達 191 個。接種 21 d 後，對照組平均每瓶 91.8 個原基生成，然而，1.5 mg L^{-1} BA 處理組僅有每瓶 58.4 個，顯示 1.5 mg L^{-1} BA 對原基生成有抑制作用，而 0.2 mg L^{-1} BA 處理組則無顯著影響。由此研究顯示，添加 2,4-D 或 NAA (1、6 mg L^{-1}) 可促進原基生成，其中以 1 mg L^{-1} 2,4-D 的作用最為顯著。

PGR 處理對蠔菇子實體發生的影響

接種 6 d 後，開始觀察到子實體的發生，初期在 1 mg L^{-1} 2,4-D 及 0.2 或 1.5 mg L^{-1} BA 處理組中子實體發生數較多 ($P < 0.05$)，隨著接種日數增加，不同處理組間之子實體發生的則有差異 (表 3)。原本在生長初期子實體發生數較多的 BA 處理組，子實體發生趨勢較平緩，到接種 21 d 後，與對照組 (3.0 個/瓶) 比較並無明顯差異。雖 2,4-D 處理組在接種後 6–15 d 的期間，子實體發生有停滯的現象，但 1 mg L^{-1} 2,4-D 處理組在接種 18 d 後，子實體快速發生；到接種 21 d 後子實體發生數可達 5.1

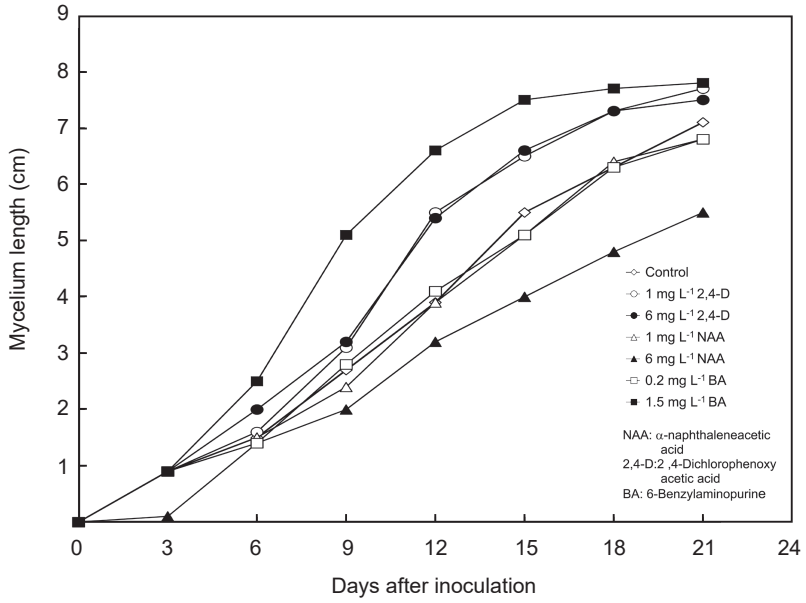


圖 1. 植物生長調節劑對蠔菇菌絲生長的影響。

Fig. 1. Effects of plant growth regulators in liquid media on mycelium growth of *Pleurotus ostreatus*.

表 2. 植物生長調節劑對於蠔菇原基生成的影響[z]。

Table 2. Effect of plant growth regulators (PGRs) in liquid media on primordia number of *Pleurotus ostreatus*[z].

	Average number of primordia					
PGR[y]	Day 6	Day 9	Day 12	Day 15	Day 18	Day 21
Control	12.1 b[x]	27.3 c	29.9 c	45.5 d	65.5 de	91.8 c
2,4-D						
1 mg L^{-1}	16.4 b	35.0 bc	50.5 ab	134.6 a	164.3 a	235.5 a
6 mg L^{-1}	25.1 a	51.2 a	61.8 a	85.0 bc	108.5 bc	164.4 b
NAA						
1 mg L^{-1}	25.0 a	42.5 ab	63.6 a	129.2 a	133.7 ab	190.7 b
6 mg L^{-1}	13.5 b	30.0 bc	49.7 ab	113.0 ab	103.0 bc	168.5 b
BA						
0.2 mg L^{-1}	12.6 b	34.6 bc	40.4 bc	65.1 cd	90.0 cd	116.2 c
1.5 mg L^{-1}	11.6 b	25.3 c	27.7 c	32.3 d	48.3 e	58.4 d
LSD	7.1	15.1	18.4	39.3	31.3	27.5

[z] Each treatment had 4 replications with 4 flasks per replication.
[y] PGR : NAA :α-naphthaleneacetic acid; 2,4-D:2,4-Dichlorophenoxyacetic acid; 2,4-D) ; BA 6-Benzylaminopurine.
[x] The same letters within column are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.

表 3. 植物生長調節劑對於蠔菇子實體發生數的影響[z]。

Table 3. Effect of plant growth regulators (PGRs) in liquid media on fruit body number of *Pleurotus ostreatus*[z].

	Average number of fruit body					
PGR[y]	Day 6	Day 9	Day 12	Day 15	Day 18	Day 21
Control	0.3 bc[x]	1.0 c	1.2 bc	1.6 b	2.2 ab	3.0 bc
2,4-D						
1 mg L^{-1}	1.0 a	1.0 c	1.0 cd	1.4 bc	2.3 ab	5.1 a
6 mg L^{-1}	0.2 c	0.3 d	0.2 d	0.6 c	1.9 b	2.6 c
NAA						
1 mg L^{-1}	0.8 ab	1.8 ab	1.5 abc	2.1 ab	2.8 ab	4.1 ab
6 mg L^{-1}	0.7 abc	1.1 bc	1.9 ab	2.6 a	2.4 ab	3.4 bc
BA						
0.2 mg L^{-1}	1.1 a	1.9 a	2.2 a	2.7 a	3.0 a	3.0 bc
1.5 mg L^{-1}	1.3 a	1.7 ab	1.9 ab	1.9 ab	2.7 ab	3.1 bc
LSD	0.6	0.7	0.9	0.9	1.1	1.5

[z] Each treatment had 4 replications with 4 flasks per replication.
[y] PGR : NAA :α-naphthaleneacetic acid; 2,4-D:2,4-Dichlorophenoxyacetic acid; 2,4-D) ; BA 6-Benzylaminopurine.
[x] The same letters within column are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.

個，但較高濃度的 6 mg L^{-1} 2,4-D 處理組有抑制子實體發生的現象，平均只有 2.6 個，其他處理間並無顯著差異。

討論

本研究以 Leatham (1983) 發表的香菇液體培養配方為基礎進行修改，並添加 2,4-D, NAA 及 BA 等植物生長調節劑 (Plant Growth Regulators; PGR) 於培養液中，探討其對蠔菇菌絲生長、原基誘導及子實體發生時期的影響。由研究結果顯示，經修正後的 Leatham (1983) 香菇液體培養配方也適用於本研究的

蠔菇液體培養系統，而 PGR 對蠔菇菌絲生長到子實體發生均有顯著影響，惟本試驗的 3 個時期，低溫蠔菇對不同 PGR 的敏感性也不相同。前人研究顯示，在平菇產料中添加 2 mg kg^{-1} BA 可提高鮮菇產量 71%，能提早出菇且明顯改善菇體外觀品質 (Ciou *et al*. 2001)。在姬松茸 (*Agaricus Blaze*) 的液體培養試驗中，添加 20–50 mg L^{-1} BA 可以促進菌絲生長量，其中以 35 mg L^{-1} 處理菌絲生產量達到最大，且可溶性醣與蛋白質含量均有顯著影響 (Guo *et al*. 2007)。Wang *et al*. (2009) 以大球蓋菇 (*Stropharia rugoso-annulata*) 進行深層發酵試驗，也得到添加 BA 處理能增加菌絲鮮重與菌球數的結果。而本研究添加 0.2 mg L^{-1} BA 對蠔菇菌絲生長、原基誘導及子實體發生並無顯著影響，而 1.5 mg L^{-1} BA 可促進菌絲生長，但不利於原期誘導與子實體發生，推測可能與過度營養生長有關。同時本研究在操作過程中僅針對液體培養液進行調配及殺菌，而並未針對液體培養液之酸鹼度加以測定，而液體除去培養液之酸鹼度是否會影響試驗結果，亦值得在未來的試驗中深入探討。

過去的研究指出生長素並非只在高等植物中合成，在酵母菌或其他真菌中，也可製造生長素，合成量可能還更高。如 *Lentinus sajor-caju* 在含葡萄糖的培養液 (pH 7.5) 中振盪培養，在 30℃黑暗條件下，每毫升培養液可達 0.18 mg IAA 的產出 (Yurekli *et al*. 2003)，顯示生長素可能是影響食用菌生長與發育重要的因子。本試驗添加 2,4-D (1、6 mg L^{-1}) 處理可提高菌絲生長速度，1 mg L^{-1} 2,4-D 可同時促進蠔菇菌絲生長、原基誘導與子實體發生，而高濃度的 2,4-D (6 mg L^{-1}) 則有抑制子實體發生的情形。過去的研究亦指出 2,4-D 可促進食用菌的菌絲生長，但在不同菌種的作用濃度有所差異，1 mg L^{-1} 2,4-D 可促進 *Lentinus subnudus* (Berk) 的菌絲生長，但對 *Schizophyllum commune* (Fr. ex Fr.) 有最大促進作用的濃度為 10 mg L^{-1} 2,4-D (Jonathan & Fasidi 2001)。本研究顯示 1 mg L^{-1} NAA 對菌絲生長與子實體發生並無顯著影響，但可以促進原基形成，6 mg L^{-1} NAA 處理雖然會抑制菌絲生長，但也有促進原基形成，對子實體發生則無顯著影響。添加 3–15 mg L^{-1} NAA 於桑黃培養液中，可提高桑黃菌絲乾重與胞外多醣產量，其中以 5.0 mg L^{-1} NAA 處理 192 h 後，胞外多醣產量達到 0.86 g L^{-1}，產量增加 56% (Guo *et al*. 2009)。在金頂側耳 (*Pleurotus citrinopileatus*) 液體培養基中添加 0.2 mg L^{-1} NAA，顯著促進菌絲產量，而在 0.3 mg L^{-1} NAA 處理組中則有最大胞外多醣產量，添加 1.5 mg L^{-1} 吲哚丁酸 (Indole butyric acid, IBA) 處理之菌絲體與胞外多醣產量都達到最大量 (Huang *et al*. 2006)。以麥草與棉籽殼作為介質栽培平菇，分別施用 10 及 15 mg kg^{-1} NAA，可提高 3 個潮菇的產量及轉潮時間 (Wang *et al*. 2000)。添加 8 mg kg^{-1} NAA 於栽培介質中，提高菌核鮑魚菇 (*Pleurotus tuber-regium*) 產量 (Chen 2004)。雖然有許多前人研究提出 NAA 對菌絲及子實體形成有促進作用，但本試驗添加 1 或 6 mg L^{-1} NAA 的結果並不同，推測可能與培養基成分、NAA 添加濃度或菌種差異均有關。Yan & Liou (2000) 認為過高濃度 NAA 可能會不利於蜜環菌的生長。在 NAA 對虎奶菇產量的試驗中也發現，若增加 NAA 作用濃度，有可能出現抑制虎奶菇菌絲生長的現象 (Chen 2004)。

綜合上述結果，本研究之蠔菇培養在添加 1 mg L^{-1} 2,4-D 的液體培養液中，雖然對其菌絲生長量、原基生成數以及子實體發生數有顯著促進的作用，而 2,4-D 能促進菌絲生長或原基體形成均與及蠔菇出菇生理機制有關更值得進一步追蹤探討。由於子實體誘發物質在食用菇產業上具高經濟價值，許多學者嘗試透過各類添加物質誘導或促進菇類子實體的產生 (Magae *et al*. 2005; Berne *et al*. 2008)。目前菇類生產以太空包栽培為主，其栽培基質可視為緩衝物，會稀釋生長激素對菇類生長的影響，造成效果的差異。而不同植物生長調節劑種類、劑量及添加時機，也需要視其菇種而異，因植物生長調節劑在菇類之應用機制仍需要進一步的探討。雖然植物生長調節劑目前已經廣泛被應用植物生產，植物生長調節劑在菇類生產及出菇機制之研究仍然很少數，期望未來若能應用在商業太空包菇類生產上，可以達到提升產量及縮短栽培時間的目的。

引用文獻

Arjona, D., C. Aragon, J. A. Aguilera, L. Ramirez, and A. G. Pisabarro. 2009. Reproducible and controllable light induction of in vitro fruiting of the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Mycol. Res. 113:552–558.

Berne, S., F. Pohleven, T. Turk, and K. Sepcić. 2008. Induction of fruiting in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) by polymeric 3-alkylpyridinium salts. Mycol. Res. 112:1085–1087.

Chen, J. T., C. C. Cheng, J. T. Huang, and H. D. Shih. 2016. Preliminary studies on the development of liquid spawn for *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quěl. J. Taiwan Agric. Res. 65:136–145. (in Chinese with English abstract)

Chen, X. X. 2004. The influence of α-natphthaleneacetic acid on the output of *Pceurotub tuber-regium* (F.r) Sing. J. Ningde Teach. College (Natrual Science) 16(1):62–64. (in Chinese with English abstract)

Ciou, C. E., W. D. Wang, J. J. Shao, and J. Jiang. 2001. The increase effect in production of *Pleurotus ostreatus* cultured in raw material media. Edible Fungi 6:3–4. (in Chinese)

Guo, X., X. Zou, and M. Sun. 2009. Effects of phytohormones on mycelia growth and exopolysaccharide biosynthesis of medicinal mushroom *Phellinus linteus*. Bioproc. Biosyst. Eng. 32:701–707.

Guo, Y., H. S. Yang, G. L. Li, and H. Chang. 2007. Effect of 6-BA on the growth and bio-chemical character of *Agaricus blazei* Murill mycelium. J. Anhui Agric. Sci. 35:641–651. (in Chinese with English abstract)

Huang, Q., X. Xin, X. Liu, and J. Sun. 2006. The influence of several kinds of factors on the growth of mycelia and exopolysaccharide of *Clitocybe maxima*. Food Sci. 10:174–178. (in Chinese with English abstract)

Jayakumar, T., M. Sakthivel, P. A. Thomas, and P. Geraldine. 2008. *Pleurotus ostreatus*, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain. Chem. Biol. Interact. 176:108–120.

Jonathan, S. G. and I. O. Fasidi. 2001. Studies on phytohormones, vitamins and mineral element requirements of *Lentinus subnudus* (Berk) and *schizophyllum* commune (Fr. Ex. Fr) from Nigeria. Food Chem. 75:303–307.

Leatham, G. F. 1983. A chemically defined medium for the fruiting of *Lentinus edodes*. Mycologia 75:905–908.

Li, W. S., Y. S. Lue, and M. H. Chen. 2012. Rice straw for production of Phoenix-tail mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. J. Taiwan Agric. Res. 61:90–99. (in Chinese with English abstract)

Liang, Z. C., C. Y. Wu, Z. L. Shieh, and S. L. Cheng. 2009. Utilization of grass plants for cultivation of *Pleurotus citrinopileatus*. Intl. Biodeter. Biodegr. 63:509–514.

Lu, Z. H. 2009. High-yield cultivation techniques of *Pleurotus geesteranus*. Zhejiang Shiyongjun 17(4):46–48. (in Chinese)

Magae, Y., T. Nishimura, and S. Ohara. 2005. 3-O-alkyl-D-glucose derivatives induce fruit bodies of *Pleurotus ostreatus*. Mycol. Res. 109(3):374–376.

Mukhopadhyay, R., S. Chatterjee, B. P. Chatterjee, and A. K. Guha. 2005. Enhancement of biomass production of edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* grown in whey by plant growth hormones. Process Biochem. 40:1241–1244.

Naraian, R., R. K. Sahu, S. Kumar, S. K. Garg, C. S. Singh, and R. S. Kanaujia. 2009. Influence of different nitrogen rich supplements during cultivation of *Pleurotus florida* on corn cob substrate. Environmentalist 29:1–7.

Sarangi, I., D. Ghosh, S. K. Bhutia, S. K. Mallick, and T. K. Maiti. 2006. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. Intl. Immunopharmacol. 6:1287–1297.

Wang, Q., Y. C. Zhang, and J. Zhao. 2009. Effect on the mycelia growth of *Stropharia rugoso-annulata* by exogenous hormones in liquid culture. Edible Fungi China 28(5):32–33. (in Chinese with English abstract)

Wang, Z. Q., D. F. Hwang, R. Y. Ying, and J. G. Yu. 2001. Effect on yeilds and intrevals of harvest of *Pleuratus ostreatus* cultured in different raw material media mixed with different concentration NAA. Edible Fungi China 20(3):23–25. (in Chinese with English abstract)

Yan, C. H. and D. Y. Liou. 2000. The study of NAA on the growth of *Armillaria mellea* (Vahl. exFr.) Quel and the activities of CAT and SOD. J. Microbiol. 20(2):19–22.

Yan, J., Z. F. Zhou, W. K. Wang, W. D. Yuan, and N. Lu. 2007. Comparison for liquid spawn of different strains of *Pleurotus geesteranus*. Acta Agric. Zhejiangensis 19(2):127–129. (in Chinese with English abstract)

Yurekli, F., H. Geckil, and F. Topcuoglu. 2003. The synthesis of indole-3-acetic acid by the industrially important white-rot fungus *Lentinus sajor-caju* under different culture conditions. Mycol. Res. 107:305–309.

Effects of Plant Growth Regulators on the Mycelia Growth and Fruit Body Formation of *Pleurotus ostreatus* in Liquid Medium

Sian-Yi Ciou[1], Yi-Zhen Zhao[2], Ya-Han Chang[2], Chin-Hsiung Hung[3*], and Li-Ru Chen[4]

Abstract

Ciou, S. Y., Y. Z. Zhao, Y. H. Chang, C. H. Hung, and L. R. Chen. 2017. Effects of plant growth regulators on the mycelia growth and fruit body formation of *Pleurotus ostreatus* in liquid medium. J. Taiwan Agric. Res. 66(3):240–247.

The experiments were conducted to study the effects of plant growth regulators on the growth of mycelia and the formation of primordia and fruiting body of *Pleurotus ostreatus* cultured in liquid medium. The mycelia of *P. ostreatus* were inoculated in culture medium containing 1 mg L^{-1} or 6 mg L^{-1} α-naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), or 0.2 mg L^{-1} or 1.5 mg L^{-1} 6-Benzylaminopurine (BA) at 25℃ without shaking. The results showed that the growth of mycelia in liquid medium containing 1.5 mg L^{-1} BA or 1, 6 mg L^{-1} 2,4-D attained 7.5–7.8 cm after inoculation for 21 d. However, the treatment of 6 mg L^{-1} NAA inhibited the growth of mycelia. Twenty-one days after inoculation, treatment of 1 mg L^{-1} 2,4-D significantly induced the formation of primordia and fruiting bodies ($P < 0.05$) with an *avg*. of 235.5 and 5.2, respectively. The application of 1.5 mg L^{-1} BA significantly reduced the number of primordia to the lowest (58.4 in *avg*.), and 6 mg L^{-1} 2,4-D treatment inhibited the formation of fruit bodies (2.6 in *avg*.). Study indicated that application of 1 mg L^{-1} 2,4-D in liquid medium can significantly enhance the growth of mycelia and the formation of primordia and fruit body of *P. ostreatus*. The scale-up experiments based on this study will be conducted for optimizing the commercial production of *P. ostreatus* in the future.

Key words: Fruit body formation, Liquid culture, Plant growth regulator, *Pleurotus ostreatus*.

Received: August 30, 2016; Accepted: December 12, 2016.
* Corresponding author, e-mail: chhung@mail.ncyu.edu.tw
[1] Graduate Student, Department of Horticultural Science, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.
[2] Assistant, Department of Horticultural Science, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.
[3] Professor and Head, Department of Horticultural Science, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.
[4] Assistant Professor, Department of Horticulture and Biotechnology, Chinese Culture University, Taipei, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 66(3):248–260 (2017)
DOI: 10.6156/JTAR/2017.06603.08

研究報告

以功能性分子標誌輔助回交策略選育具低鎘累積能力之秈稻新品系

吳佩真[1,#] 林毓雯[2,#] 李長沛[3] 許健輝[4] 卓緯玄[5] 顏信沐[5] 郭鴻裕[6] 賴明信[7] 吳東鴻[5,*]

摘要

吳佩真、林毓雯、李長沛、許健輝、卓緯玄、顏信沐、郭鴻裕、賴明信、吳東鴻。2017。以功能性分子標誌輔助回交策略選育具低鎘累積能力之秈稻新品系。台灣農業研究 66(3):248–260。

本研究將運用分子輔助回交技術，將粳稻具有降低鎘累積量的遺傳組成置換至秈稻品種中，藉此改良秈稻品種的遺傳組成。而研究策略則先運用功能性標誌篩檢國內栽培品種對於鎘吸收的遺傳特性，再利用分子輔助選種技術選育 1 個具有低累積性的秈稻新品系，最後直接在高風險區進行現地評估與品系驗證試驗。首先，建立根吸收 (*OsNRAMP1*) 主效基因座的功能性標誌，確認國內推薦秈稻品種均帶有鎘易吸收基因型，與過去已知秈稻較粳稻品種更易吸收轉運土壤中鎘物質之現象相符。隨之，利用分子輔助回交育種法，從前期研究 (2006–2011) 所選育「台中秈 10 號」全染色體置換系中，挑出適當品系由 2014 年第 1 期作開始，選育出帶有低鎘累積特性的秈稻新品系。2015 年第 1 期作在后里試驗區進行現地評估，可知秈稻新品系台中秈 10 號 *qCdT7* 帶有低累積基因型，與「台中秈 10 號」有高度相似株型，但大幅下降鎘累積程度達 42.2%，能有效降低秈稻品種易發生鎘米風險的困擾。總結，本試驗運用分子輔助回交策略改良國內秈稻栽培品種後，並於現地栽培環境下進行初步可行性評估，冀望新品系選育能兼具在稻作生產與食品安全上提供一項緩解措施。

關鍵詞：鎘累積量、田間試驗、功能性標誌、秈稻、分子輔助回交。

前言

隨著工業發展，各種人為污染物經由環境輾轉進入食物鏈，使得國人健康備受威脅，其中又以重金屬污染最受關注。行政院環保署自 1982 年起著手進行土壤污染調查工作，截至 2016 年 3 月 31 日止，尚有 2,639 筆 (約 375 ha) 農地被公告為農地污染控制場址 (https://sgw.epa.gov.tw/public/)。依據土壤及地下水污染整治法，上述場址在整治完成前禁止栽種作物，防止污染物隨作物生產流入市場。主要重金屬中又以鎘最易轉運累積，且不會對稻株造成顯著毒害，而作物對重金屬的累積受土壤及氣候因子、植物特性及農業管理等諸多因素影響，其風險需賴多方共同把關。

為加強農產品安全，衛生福利部針對食米訂有重金屬限量標準，其鎘含量標準值為 0.4 mg kg^{-1}，而環保署也針對食用作物農地訂有較

投稿日期：2016 年 11 月 4 日；接受日期：2016 年 12 月 12 日。
* 通訊作者：dhwu@tari.gov.tw
# 表作者對本研究具同等貢獻。
[1] 農委會農業試驗所作物組研究助理。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所農業化學組副研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所作物組副研究員。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] 農委會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。
[6] 農委會農業試驗所農業化學組研究員兼組長。台灣 台中市。
[7] 農委會農業試驗所作物組研究員。台灣 台中市。

其他用地更為嚴格的重金屬限量標準，食用作物農地之監測標準值為 2.5 mg kg^{-1}、管制標準值為 5 mg kg^{-1}；但除了主要農業區之農田之外，仍有諸多零星農田從事農業生產且緊鄰都會區與工廠，在生活、工廠廢水並未與灌溉水源分流的現況下，使得生產環境惡劣、土地污染氾濫，重金屬污染導致農田休耕與食米安全等民生新聞不斷，對其農田及作物存有潛在風險 (Lin *et al*. 2012)。

水稻係國內主要農作物之一，每年栽培面積可達 25 萬公頃，依據農糧署 2015 年統計資料顯示國內整體比例以粳稻為主要栽培品種，但其中秈稻品種「台中秈 10 號」在 2015 年第 1 期作的栽培面積仍位居前 4 名，且自 1980 年品種命名後長達 30 yr 均為秈稻主要領先品種，穩定栽培於台中、彰化與雲林等地區 (http://kiscrop.tari.gov.tw/kiscrop/index.aspx)。從過去諸多研究顯示秈稻品種對重金屬的累積能力較粳稻高 (Uraguchi & Fujiwara 2012; Jha & Bohra 2016)， 另據 Guo *et al*. (2007) 及 Romkens *et al*. (2009) 的研究報告指出，其進行大規模土壤與各品種鎘累積能力預測與模式建立，亦發現國內秈稻比「台農 67 號」等粳稻品種的鎘累積能力高出 1 倍。故在鎘濃度符合管制標準之農田，秈稻品種相較於粳稻品種可能產生鎘米的風險高出許多。

土壤中鎘元素在稻穀中的累積過程，主要是經過 (1) 根系對土壤鎘的稀釋活化與吸收，(2) 木質部的容載與轉運，(3) 再經節間韌皮部聚集在稻穀內。因此，由水稻對鎘吸收、轉運和累積的生理模式，也決定了水稻各植體部位中鎘含量分布，大致循序著根系、莖葉、穀粒遞減 (Uraguchi *et al*. 2009; Uraguchi & Fujiwara 2012, 2013)。隨著水稻基因體定序與分子標誌開發日漸豐富且公開於生物資料庫上，相較於其他產量與生物性逆境研究領域，水稻鎘累積能力相關基因定位研究雖有限，但回顧多篇定位研究時，仍可發現 *qCd7* (Norton *et al*. 2010)、*qGCd7* (Ishikawa *et al*. 2010)、*qCdT7* (Tezuka *et al*. 2010; Miyadate *et al*. 2011)、*qCdp7* (Abe *et al*. 2011) 等基因座相繼均被定位在水稻第 7 條染色體短臂上，在同一區域中也利用據圖選殖或基因誘變等技術，挖掘出 *OsZIP8* (Os07g0232800, Ramesh *et al*. 2003)、*OsHMA3* (Os07g0232900, Ueno *et al*. 2009, 2010; Miyadate *et al*. 2011)、*OsNRAMP5* (Os07g0257200, Ishikawa *et al*. 2012; Ishimaru *et al*. 2012) 與 *OsNRAMP1* (Os07g0258400, Takahashi *et al*. 2011) 等基因與鎘含量有關，顯示第 7 號染色體短臂靠近中節處為其重要熱區。

在 Ueno *et al*. (2009, 2010) 研究中，利用秈稻 'Anjana Dhan (An)' 與粳稻 'Nipponbare' 的雜交 F2 族群，定位到效應高達 85.6% 變異解釋量的主效 QTL，隨後精細定位出 *OsHMA3* 基因。另一方面，在 Miyadate *et al*. (2011) 與 Tezuka *et al*. (2010) 則利用高鎘累積秈稻 'Cho-Ko-Koku (CKK)' 與粳稻 'Akita 63' 建立另一分離族群，在上述區域中定位到一個 *qCdT7* 主效基因座，進一步發現該基因座內 *OsHMA3* 基因存有核苷酸變異。該 CKK 秈稻親本在該基因座上，因第 7 內顯子上缺失核苷酸 153 bp，亦產生缺失 51 個胺基酸變異，導致該對偶基因喪失隔離功能。其基因功能調控位於根部細胞液泡膜上，將使鎘離子不會被儲存在根部細胞液泡內，進而直接轉運到木質部中，使得秈稻親本的莖部鎘濃度較高，最終導致稻穀鎘累積量提升；該研究亦發現，粳稻 'Nipponbare' 與秈稻 'IR24' 所帶有的 *OsHMA3* 對偶基因與低鎘親本 'Akita 63' 一致，均在第 7 內顯子上保有完整 153 bp 核苷酸。

隨後，在 Takahashi *et al*. (2011) 研究中，確認同樣位於 *qCdT7* 主效基因座內，且與前述 *OsHMA3* 基因僅相距 1.5 Mb 的 *OsNARMP1* 基因係另一個調控基因。該基因調控根部細胞膜上鎘離子吸收通道的重要功能，基因啟動子區域存有 406 bp 的大片段刪除變異。具高鎘累積特性的秈稻品種 'Habataki'，因缺乏該片段使得基因表現過量而吸收較多的鎘，低鎘累積品種 'Nipponbare' 因該片段的負調控抑止根部吸收過量的鎘。而高鎘累積特性的秈稻品種 'Habataki'，則因基因啟動子區域存有 406 bp 的大片段刪除變異，使得基因表現過量而吸收較多的鎘；進一步也發現秈稻品種 'Habataki'

與粳稻品種 'Sasanishiki' 在 *OsHMA3* 基因座上則係 'Nipponbare' 類型的低鎘累積對偶基因，秈稻 'An' 與 'CKK' 係鎘高累積對偶基因，顯示部分秈稻品種內仍帶有正常功能的 *OsHMA3* 基因；而 *OsNRAMP1* 基因座上，則粳稻 'Nipponbare'、'Sasanishiki' 及 'Tsukinohikari' 均屬於低鎘吸收對偶基因。而秈稻品種 'Habataki'、'Jarjan'、'Anjana Dhan' 及 'Cho-Ko-Koku' 係高鎘吸收對偶基因，顯示該基因座在秈粳亞種間具有穩定遺傳變異。由此可知，存在於第 7 號染色體上 *qCdT7* 基因座的 *OsHMA3* 基因與 *OsNRAMP1* 基因具重要調控鎘累積及吸收功能，且在高低累積特性親本中存有自然遺傳變異可供品種選育。

全球稻作生產區以秈稻栽培為主要體系，而秈稻栽培也持續穩定存於我國水稻生產體系中。本文研究希望自行開發鎘累積相關功能性標誌，確認國內品種的遺傳特性，再藉由分子輔助回交策略，將粳稻第 7 條染色體上 *qCdT7* 基因座的遺傳組成置換至「台中秈 10 號」中。並利用過去已建立的染色體置換系族群加速選育期程，最後直接進行現地評估試驗，確認新品系上各植體部分的鎘累積能力與改良效果，冀望降低秈稻植株中鎘的含量，減緩秈稻栽培所面臨的環境衝擊並提升食米安全。

材料與方法

試驗材料

在 2014 年第 1 期作於台中市霧峰區之行政院農委會農業試驗所試驗田培育 18 個參試品種，其中包含國內主要栽培品種 14 個粳稻、2 個秈稻以及 2 個日本對照品種，分別為「台南 11 號」、「台中 192 號」、「台粳 14 號」、「台中秈 10 號」、「台中秈糯 2 號」、「高雄 139 號」、「台粳 2 號」、「台粳 9 號」、「台東 30 號」、「台粳 16 號」、「台粳 8 號」、「台東 33 號」、「台粳 4 號」、「台粳糯 3 號」、「台農 71 號」、「台農 67 號」、'Nipponbare' 及 'Habataki'，採慣行肥培管理。在分蘗盛期進行葉片組織取樣，並隨即冷凍乾燥保存備用，供後續鎘累積相關功能性標誌設計與目標基因型確認使用。

選育「台中秈 10 號」導入系

利用前期研究 (2006–2011 年) 已選育的「台中秈 10 號」染色體置換系族群，該族群以粳稻「台粳 2 號」為提供親，秈稻「台中秈 10 號」為輪迴親。利用連續回交將粳稻不同條染色體分別置換到「台中秈 10 號」的遺傳背景下，在各置換系的背景回復成輪迴親後，保存每個染色體回交後裔的自交種子 (BC_3F_2 或 BC_4F_2 世代)，作為各染色體中逐步置換片段族群使用 (Wu *et al*. 2013a)。本研究在 2014 年第 1 期作自冷藏庫取出帶有粳稻第 7 條染色體片段置換系 (#TCS10.7_3) 的分離種子，該品系在該染色體短臂上已置換為「台粳 2 號」、長臂則仍維持異質結合體狀態；取出 96 顆種子先於溫室育苗後，進行長臂上遺傳組成的基因型篩檢，挑出第 7 條染色體長臂上均回復為「台中秈 10 號」遺傳組成者，再移植至農試所試驗田健化植株、待成熟後收穫種子，供下一期作種子繁殖使用 (圖 1)。

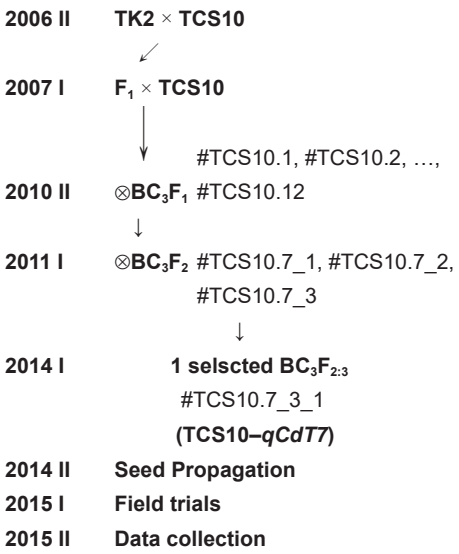


圖 1. 運用分子輔助回交選育將「台粳 2 號」第 7 號染色體上的 *qCdT7* 片段導入「台中秈 10 號」中之選育流程圖。

Fig. 1. The breeding scheme of introgression of *qCdT7* locus and different segment lengths of chromosome 7 from 'Taikeng 2' to 'Taichung Sen 10' by marker-assisted backcross selection.

專一性標誌設計與基因型分析

本試驗用以前景選拔鎘吸收之功能性標誌，係針對文獻所示 *OsNRAMP1* 基因座 5'UTR 區域上 406 bp 的 InDel 多型性 (Takahashi *et al*. 2011)，由水稻基因註解資料庫 (The Rice Annotation Project Database, RAP-DB) 下載秈稻 *OsNRAMP1* 基因座上所編碼 *OsNRAMP1* 序列 (Os07g0258400)。另至美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI)，下載該基因坐落第 7 條染色體之 BAC 序列 (AP014963)，匯入 BioEdit 編輯軟體 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA) 進行序列排列比對後，藉由引子設計軟體 Primer Premier 5 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) 設計專一性引子 NRAMP1 (表 1)。

另針對 *OsHMA3* 基因座，Ueno *et al*. (2010) 及 Miyadate *et al*. (2011) 進行精密定位，使用了相關的連鎖標誌，將之先對雜交親本進行適用性測試，最後選出 RM21263 和 CdT–E 兩個穩定專一且親本間具多型性之連鎖標誌做為後續篩選之用；而 Kumagai *et al*. (2014) 與 Yan *et al*. (2016) 等研究指出，*OsHMA3* 基因座內所編碼的胺基酸 C 末端長達 51 個胺基酸刪除變異具重要功能性，即第 7 內顯子上缺失核苷酸 153 bp 處，藉由 Yan *et al*. (2016) 研究中所使用基因選殖引子 R7mf1 與 R7 進行定序目標刪除位點。

而瞭解背景回復率所需 InDel 標誌，則參考 Wu *et al*. (2013b) 全基因組 InDel 套組，並在部分長距離區間中增補 SSR 標誌加強選拔；

表 1. 台灣栽培品種在鎘累積相關基因座上以 *OsHMA3* 連鎖標誌與 *OsNARMP1* 功能標誌之基因型分析，材料清單以 2015 年栽培面積比例排序。

Table 1. The genotype of Taiwan current cultivars, which listed by the percentage of cultivation area, for the linkage makers of *OsHMA3* and the functional marker of *OsNARMP1* locus related cadmium accumulation.

			OsHMA3 locus			*OsNARMP1* locus
Variety	Abbrev.	Subspecies	RM21263[z]	153 bp[y]	CdT-E[x]	NARMP1
Tainan 11	TN11	*japonica*	A	+	A	A
Taichung 192	TC192	*japonica*	A	+	A	A
Taikeng 14	TK14	*japonica*	A	+	A	A
Taichung Sen 10	TCS10	*indica*	B	+	B	B
Taichung Sen waxy 2	TCSW2	*indica*	B	+	B	B
Kaohsiung 139	KH139	*japonica*	A	+	A	A
Taikeng 2	TK2	*japonica*	A	+	A	A
Taikeng 9	TK9	*japonica*	A	+	A	A
Taitung 30	TT30	*japonica*	A	+	A	A
Taikeng 16	TK16	*japonica*	A	+	A	A
Taikeng 8	TK8	*japonica*	A	+	A	A
Taitung 33	TT33	*japonica*	A	+	A	A
Taikeng 4	TK4	*japonica*	A	+	A	A
Taikeng waxy 3	TKW3	*japonica*	A	+	A	A
Tainung 71	TNG71	*japonica*	A	+	A	A
Tainung 67	TNG67	*japonica*	A	+	A	A
Nipponbare (low check)		*japonica*	A	+	A	A
Habataki (high check)		*indica*	B	+	B	B

[z] The genotypes A and B indicated the amplicom size of RM21263 marker for 'Nipponbare' and 'Habataki', respectively.
[y] The positive sign indicated the complete sequence of 153 bp at the exon 7 of *OsHMA3* gene.
[x] The genotypes A and B indicated the amplicom size of CdT–E marker for 'Nipponbare' and 'Habataki', respectively.

專一性引子與輔助背景選拔標誌，均先經兩親本「台中秈 10 號」與「台粳 2 號」多型性篩選，並為使多型性標誌在全基因組能均勻分布，將所得多型性標誌利用 BLAST 套件將其引子序列對應至所屬 PACs/BACs 確認 IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project) build 5 版的物理圖譜位置，再依 IRGSP 網站 Build 5 所公布各染色體上 PACs/BACs 對應於 Nipponbare/Kasalath 遺傳圖譜資訊 (Harushima *et al*. 1998; IRGSP 2005)。將所有多型性標誌的物理位點轉換成遺傳圖譜位置，便於推估分子標誌間可能的遺傳距離、有效監控遺傳重組區間。遺傳背景回復率估算，則以植株整體攜有輪迴親遺傳距離總長之百分比為基礎，其中由各分子標誌所坐落相鄰區間之平均長度累計輪迴親遺傳總長，並視輪迴親同質結合體基因型或異質結合體基因型分別給予加權係數 1 或 0.5 進行統計。

葉片基因組 DNA 萃取如 Wu *et al*. (2013b) 所描述；PCR 的反應條件為 94℃ 2 min；94℃ 30 s、50℃、55℃或 60℃ (依黏合溫度最佳化測試結果) 20 s、72℃ 30 s，預擴產物循環 2 次；94℃ 20 s、55℃ (50℃或 60℃) 15 s、72℃ 20 s，循環 30 次 (因不同分子標誌的擴增效率不同，將正負加減 2 次循環)；72℃ 3 min；反應結束後以 4℃保存擴增產物。PCR 產物進行電泳分析時，為提高膠體上之電泳功率，僅讓電泳液與膠體兩端接觸即可，避免 0.5× TBE 電泳緩衝液淹沒膠體，於 26 cm × 26 cm 之 3% Agarose I (Amresco, USA) 膠體上以 350 V (15 V/cm) 進行電泳分析。

田間試驗評估

確認以功能性分子標誌輔助回交策略，選育具低鎘累積秈稻新品系之可行性，在台中市后里地區高風險試驗田進行現地評估，已先針對試區進行土壤含鎘濃度梯度分析。先期試驗結果顯示，分布範圍為 1–4 mg kg^{-1}，並由東往西存有逐漸增加趨勢，據此劃定試驗田西側作為本試驗試區。參試品系分別為已知高鎘累積秈稻品種 'Habataki'、低鎘累積粳稻品種「台農 71 號」、輪迴親「台中秈 10 號」、提供親「台粳 2 號」與新品系台中秈 10 號 *qCdT7* 等 5 個品種 (系)，並在試區內以每間隔 2 行、2 株 (0.56 m × 0.36 m) 的土壤採樣密度進行網格式土壤取樣，建構當期作土壤鎘濃度空間分布，且各土壤取樣點均在行間與株間的交叉點上，可供後續鄰近上下對角 4 株樣品的背景濃度校正使用。

田間栽培採行一致性管理作業，將各參試品種 3–4 葉齡秧苗，以南北向單本植插秧於試驗田區，每品系種植 20 株、採單行順序排列，行株距 0.28 m × 0.18 m。在肥料施用採慣行栽培，於栽植期間施予四次化學肥料；基肥施用於插秧前 1–2 d，以台肥 39 號複合肥料 (粒劑，12% N，台灣肥料股份有限公司，高雄市) 施用 200 kg ha^{-1}；第 2 次肥料施用於插秧後 1 wk (即水稻成活期)，以台肥硫銨(粒劑，21% N) 施用 200 kg ha^{-1}；第 3 次肥料施用於插秧後 3–4 wk (即水稻分蘗期)，以台肥硫銨用量 200 kg ha^{-1}；第 4 次為穗肥，施用於插秧後約 8 wk、曬田結束，以台肥 39 號複合肥料用量 200 kg ha^{-1}，合計 132 kg ha^{-1} 的氮素。

土壤與植體重金屬含量分析

試區內 51 個土壤樣品均係由表土向下挖取半徑 5 cm、深 15 cm 土柱，土壤樣品經風乾，以木製磨土棍粉碎，過 0.5 mm 篩網，儲存於乾淨塑膠罐中，供後續土壤鎘濃度分析使用。土壤鎘分析係採微波輔助王水消化法進行樣品消化，所得濾液以感應耦合電漿光譜儀 (Ultima 2C, Horiba Jobin Yvon, Irvine, CA, USA) 測定鎘濃度，流程如同 Romkens *et al*. (2009) 敘述。而各品種系的植體樣品於成熟期進行取樣，包含根部、地上部莖葉、糙米與稻殼；在樣品前處理上，先以清水仔細清洗各部位植體樣品以去除黏附的土壤與灰塵等，再以去離子水清洗，置入烘箱以 70℃烘乾至恆重備用。各植體樣品經粉碎、酸處理後以感應耦合電漿質譜儀 (Agilent 7500C, Santa Clara, CA, USA) 測定鎘濃度，其分析流程亦如同 (Romkens *et al*. 2009) 敘述。

植體與糙米鎘累積能力

高風險田區的污染物大多伴隨灌溉水而來，因此土壤累積濃度通常以入水口處較高，

再向周圍遞減；避免田間土壤濃度不均質現象干擾品系鎘累積差異，故在高風險污染田區進行現地評估試驗時，將考量該測試樣品中「植體樣品鎘濃度 (Cd_{sample})」與其「採樣點下土壤鎘濃度 (Cd_{soil})」的比值，即生物性濃縮係數 (bio concentration factor, BCF)：

$$BCF = Cd_{sample} / Cd_{soil}$$

來呈現作物的吸收能力 (Zhang *et al*. 2014; Lin *et al*. 2015)，以此進行後續各品系間統計檢定。

農藝性狀調查

另為瞭解參試品系在高風險田區的性狀表現，先在成熟期調查品系株高，隨後各刈取 6 株調查產量性狀與生質量參數；稻穀以 40℃乾燥至 13% 含水量後調查單株總粒重與產量構成要素，產量構成要素包含每穗穎花數 (number of spikelets per panicle)、有效穗數 (panicle number)、稔實率 (fertility percentage) 及千粒重 (1000-grain weight) 等；而用以調查生質量參數的地上部莖葉及地下部根部則經 70℃烘乾至恆重後，秤量其乾物重，而單株收穫指數 (harvest index) 則分別取各單株總粒重與其全株乾重 (即總粒重與莖葉乾重之總和) 之比值。

試驗統計分析

試驗資料分析先以 R 統計軟體中的「agricolae」套件進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA) 檢定，各變因項達顯著水準後，再使用最小顯著性差異測驗 (least significance difference; LSD) 判定處理間的差異是否達到顯著性。而田間鎘濃度空間分布繪圖，則使用 R 統計軟體中的「geoR」、「lattice」及「latticeExtra」套件，用採樣點資料重新建構分布曲面梯度圖的函數，將原本梯度函數生產曲面預測值，最後利用「levelplot」套件畫製梯度分布圖。

結果與討論

本研究先搜尋生物資料庫中已發表的鎘吸收基因 *OsNRAMP1* 基因序列，自行開發專一性功能性標誌，並以 'Nipponbare' 與 'Habataki' 分別作為低、高鎘累積對照品種，分析國內各栽培品種 *OsNRAMP1* 鎘累積基因型。該組功能性引子擴增 *OsNRAMP1* 基因 5'UTR 的片段，夾取 ATG 前-1473 至-1068 處之 406 bp 大片段刪除差異處，低鎘累積品種產物大小 652 bp，高鎘累積品種則為 246 bp (圖 2)。而國內 13 個主要粳稻栽培品種、「台農 67 號」均與 'Nipponbare' 帶有相同低鎘累積 *OsNRAMP1* 對偶基因型，而籼稻「台中籼 10 號」與「台中籼糯 2 號」則與高鎘累積品種 'Habataki' 的基因型一致。顯示國內粳稻品種鎘累積能力均屬於低累積遺傳類型，而本研究中 2 個籼稻品種 (TCS10, TCSW2) 的遺傳特性是屬於高累積類型 (表 1)。

在 Guo *et al*. (2007) 與 Romkens *et al*. (2009)

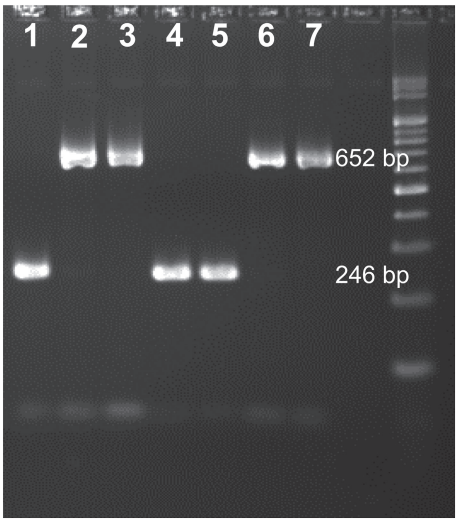


圖 2. 水稻 *OsNRAMP1* 基因型分析，功能性標誌 NRAMP1 夾取該基因 5'UTR 區域具 406 bp 變異處，能區分低累積或高累積特性對偶基因，其樣品排序由左至右分別為 'Habataki'、'Nipponbare'、「台農 71 號」、「台中籼糯 2 號」、「台中籼 10 號」、「台粳 2 號」與品系台中籼 10 號 *qCdT7*。

Fig. 2. The electrophoresis result of functional marker NRAMP1 illustrating PCR products with tolerant and sensitive alleles at *OsNRAMP1* locus (m-gel marker: 100 bp ladder). Lanes denote 1. 'Habataki', 2. 'Nipponbare', 3. 'Taihung 71', 4. 'Taichung Sen waxy 2', 5. 'Taichung Sen 10', 6. 'Taikeng 2', and 7. TCS10-*qCdT7*, respectively.

的研究中也顯示國內秈稻品種的鎘累積性比粳稻品種高出許多，其中包含了「台中秈 10 號」等；而第 7 條染色體上的主效基因座 *qCdT7* 還包含了 4 個相關基因 (圖 3)，由此可知國內秈稻品種高累積特性可由 *OsNRAMP1* 基因解釋部分的遺傳變異。因此，本試驗優先考量將「台中秈 10 號」第 7 號染色體上 *qCdT7* 基因座上的組成，置換為低鎘累積的粳稻品種片段，隨後以 NRAMP1 標誌作為該基因的功能性標誌。

進一步考量 *qCdT7* 基因座內可能存著 *OsHMA3* 自然變異的對偶基因，與鎘離子隔離於根部細胞液泡之機制有關。依據前人研究顯示，粳稻品種 *OsHMA3* 對偶基因係屬於有助隔離鎘離子並降低其在木質部中轉運，而部分秈稻品種則喪失隔離功能進而使稻穀鎘含量增加。為了讓「台中秈 10 號」從根部吸收 (*OsNARMP1*) 至木質部轉運能力 (*OsHMA3*) 均達到降低稻穀鎘累積的能力，將粳稻上述兩個基因同時保留至秈稻品種中，先以 *OsHMA3* 基因座旁緊密連鎖標誌 (RM2163、CdT–E) 判斷雜交親本間的差異 (表 1)，並可協助確認「台粳 2 號」置換至「台中秈 10 號」，亦在國內秈、粳栽培品種中具有多型性。但在 *OsHMA3* 第 7 內顯子上 153 bp 缺失處的定序結果，顯示「台粳 2 號」等粳稻品種均與 'Nipponbare' 帶有相同對偶基因，同時也確認「台粳 2 號」與「台中秈 10 號」上 *OsHMA3* 基因具有相同遺傳組成。此結果如同秈稻 'IR24'，與粳稻品種帶有相同 *OsHMA3* 低累積對偶基因一致 (Miyadate *et al*. 2011)。

另外加速「台中秈 10 號」低鎘累積導入

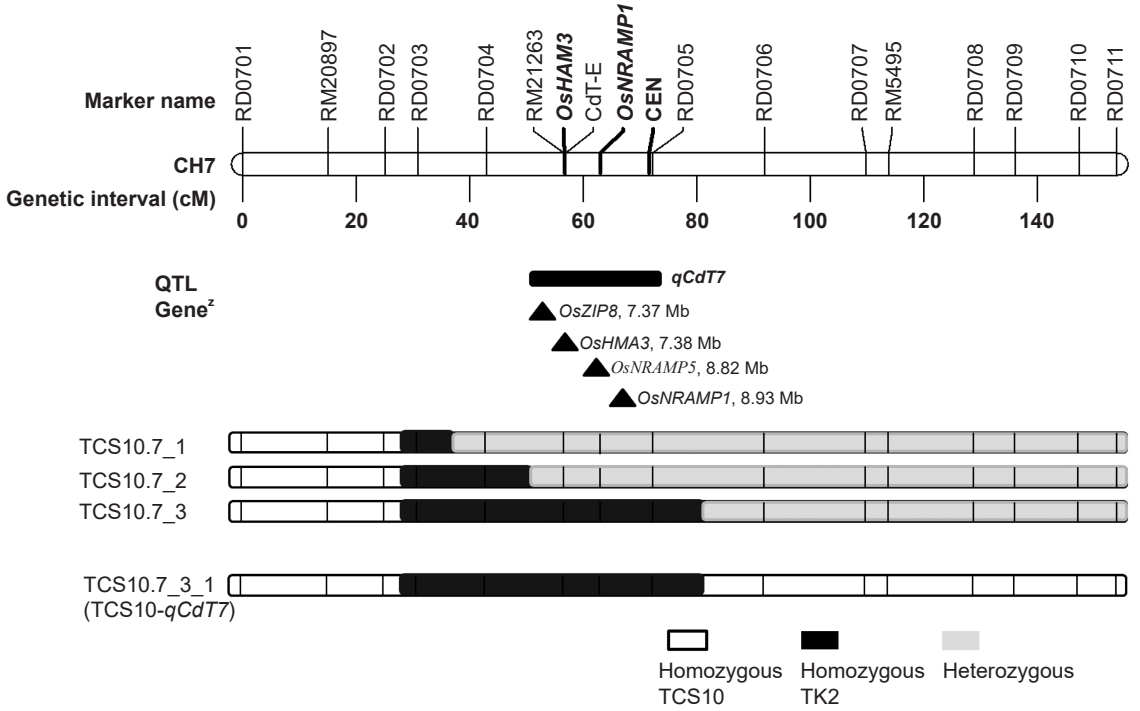


圖 3. 圖解「台中秈 10 號」第 7 號染色體階層片段置換系之遺傳組成 (Wu *et al*. 2013a)，並排列 QTL 基因座 *qCdT7* 內 4 個鎘累積相關基因的位置。

Fig. 3. Graphical genotypes of 'TCS10' stepped aligned inbred recombinant lines on chromosome 7 (Wu *et al*. 2013a), and illustrated the relationship among four known genes and major locus *qCdT7*.

[z] Locus ID and its reference: *OsZIP8*, Os07g0232800 (Ramesh *et al*. 2003); *OsHMA3*, Os07g0232900 (Ueno *et al*. 2009, 2010; Miyadate *et al*. 2011); *OsNRAMP5*, Os07g0257200 (Ishikawa *et al*. 2012; Ishimaru *et al*. 2012); *OsNRAMP1*, Os07g0258400 (Takahashi *et al*. 2011).

系的選育期程，從導入粳稻第 7 號染色體的逐步片段置換系開始篩檢，而片段置換系 #TCS10.7_3 的遺傳背景利用 139 個距離平均 10–15 cM 的 InDel 標誌 (Wu *et al*. 2003) 進行全基因體分析，結果顯示回復為「台中秈 10 號」，背景回覆率為 94.11%。以第 7 號染色體上 13 個 InDel 與 SSR 標誌檢定幼苗期 #TCS10.7_3 分離後裔於幼苗期檢定 94 株，第 7 號染色體上則分布 13 個 InDel 與 SSR 標誌，篩檢結果選獲 20 株目標植株，其染色體長臂均回復為「台中秈 10 號」遺傳組成者。另長臂區間中為「台粳 2 號」、異質結合體與重組體的頻度，分別為 21、31 與 22 株。而針對 #TCS10.7_3 片段置換系的短臂末端本已回復為「台中秈 10 號」，再經分離選拔後所選獲的 20 株近同源系，僅保留第 7 條染色體短臂上近 40 cM 區間為「台粳 2 號」的組成，背景回覆率可達 96.46% (圖 2)。

本試驗在台中市后里地區高風險試驗田進行現地評估，有助直接驗證秈稻改良品系對於降低鎘累積能力，並考量試區土壤鎘濃度趨勢對參試品系的影響，在取樣間距為 0.56 m × 0.36 m 每行依序取土 3 次、共 51 個取樣點下，可知該期作土壤鎘濃度由東向西濃度由 1.07–2.85 mg kg^{-1} 依序遞增，各植株間略有土壤濃度差異。進一步可知，各品系行「台農 71 號」、'Habataki'、「台中秈 10 號」、「台粳 2 號」與台中秈 10 號 *qCdT7* 的土壤平均鎘濃度，分別為 2.03、1.71、2.48、2.48 以及 2.85 mg kg^{-1}；後續將利用各單株最近採樣點的土壤濃度進行植體生物濃縮係數 (BCF) 之校正使用 (圖 4)。

各試驗品系均取樣 6 株，化驗根部、莖葉、糙米與稻殼的鎘累積量，並轉換成 BCF，隨後進行各品系最小顯著性差異統計檢定，結果顯示全株 4 個部位的 BCF 在各品種間達顯著差異 ($p < 0.05$)，如表 2。在根部上，其最小顯著門檻值 (LSD) 為 0.7116，BCF 值最高級別係同屬秈稻品種的輪迴親「台中秈 10 號」與 'Habataki'，BCF 值達到 4.0234 與 4.0478，然後依序遞減為「台農 71 號」(2.9924)、提供親「台粳 2 號」(2.6685) 以及新改良品系「台中秈 10 號 *qCdT7*」(2.2242)。可知秈稻新品系與輪迴親「台中秈 10 號」的 BCF 值達到顯著差異，新品系改良後下降幅度可達 44.7%。莖葉的 BCF 值也是以秈稻 'Habataki' 達到 0.9215 為最高，而輪迴親「台中秈 10 號」次

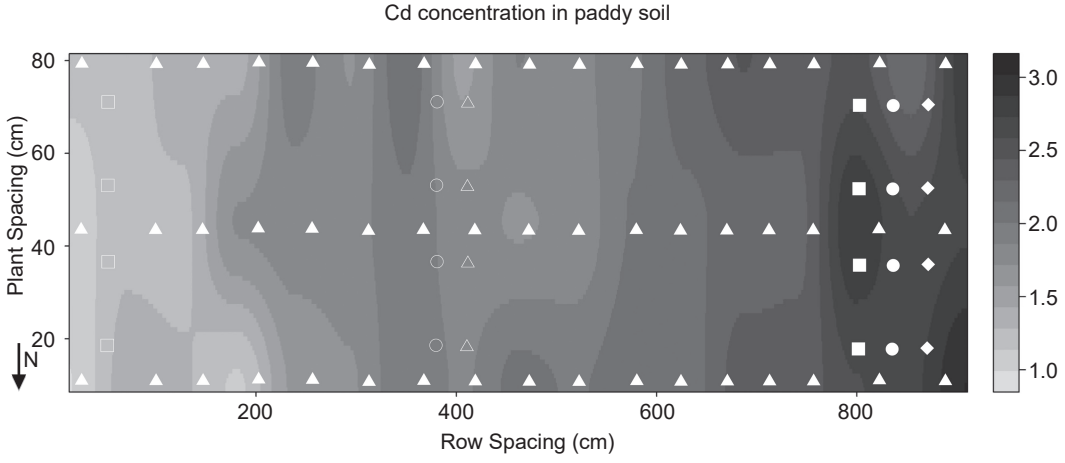


圖 4. 后里試區 2015 年第 1 期作鎘濃度分布圖，其中以實心三角代表 51 個土壤採樣點與空心圓為「台農 71 號」、空心三角為 'Habataki'、實心方形為「台中秈 10 號」、實心圓形為「台粳 2 號」以及實心菱形為品系「台中秈 10 號」*qCdT7* 等參試品種的植株位置。

Fig. 4. Spatial distribution of cadmium concentration (mg kg^{-1}) in the Haoli paddy field. Samples of surface soil were collected at 51 sites in the first cropping season of 2015, and different marker symbols indicated by solid triangles, hollow circles, hollow triangles, solid squares, solid circles and solid diamond were applied to soil samples, 'TNG71', 'Habataki', 'TCS10', 'TK2' and 'TCS10-*qCdT7*' individuals, respectively.

之 (0.6212)，秈稻新品系與另 2 個粳稻品種的 BCF 值則為 0.4667–0.3637，在最小顯著差異門檻 0.1548 之下，新品系的莖葉 BCF 值與輪迴親未達顯著差異水準，然與輪迴親相比之下降幅度業達 24.9%。在糙米的 BCF 值上，以最小顯著差異門檻 0.048 為分界，可見與前述性狀的排序相仿，仍以秈稻品種 'Habataki' 的 BCF 值 0.3706 為最高，輪迴親「台中秈 10 號」的糙米 BCF 值 0.2667 排次之，秈稻新品系 (0.1540) 與粳稻「台農 71 號」(0.1251) 以及「台粳 2 號」 (0.1124) 同屬於較低累積量者。新品系的糙米 BCF 值與秈稻品種達到顯著差異，並較輪迴親「台中秈 0 號」下降 42.2%。且在稻殼 BCF 值上，也可以發現新品系的 BCF 值是最低者 (0.0562)，與其他參試品種相較之下，並未分配過多鎘含量累積在稻殼上。

新品系台中秈 10 號 *qCdT7* 所種植區的土壤鎘濃度最高 (2.85 ± 0.16 mg kg^{-1})，而兩親本「台中秈 10 號」與「台粳 2 號」採樣點的土壤濃度則略低，亦達 2.52 ± 0.32 mg kg^{-1}，但「台中秈 10 號」糙米累積量達 0.67 ± 0.16 mg kg^{-1}、「台粳 2 號」糙米累積量則為 0.28 ± 0.03 mg kg^{-1}。在尚未考量彼此土壤濃度不均下，新品系台中秈 10 號 *qCdT7* 的糙米累積量僅為 0.44 ± 0.09 mg kg^{-1}，已較「台中秈 10 號」糙米濃度下降 34.3%。但其新品系糙米 BCF 值 (0.1540) 則顯著低於「台中秈 10 號」的 BCF 值 (0.2667)。顯示新品系的吸收性可下降 42.2%，能有效表現出低鎘累積特性，比秈稻品種「台中秈 10 號」降低許多風險。

目前已知運用分子輔助育種策略，將粳稻第 7 條染色體上 *qCdT7* 基因座的組成置換至秈稻中，可成功大幅降低新品系糙米中的鎘累積現象。但依據前人研究發現在第 7 條染色體上 *qCdT7* 基因座區間中，陸續發現 4 個與鎘吸收、轉運等相關功能的基因。其中 *OsZIP8* (Ramesh *et al*. 2003) 與 *OsNRAMP5* (Ishikawa *et al*. 2012; Ishimaru *et al*. 2012) 係藉由過度表現或基因轉殖等技術確認其功能，而 *OsNRAMP5* 基因座上的遺傳變異則是由粳稻突變庫中所尋獲，甚至在後續研究中也發現缺失 *OsNRAMP5* 基因將導致水稻生長與稻穀產量顯著降低，且 Tezuka *et al*. (2010) 與 Miyadate *et al*. (2011) 研究中亦排除 *OsZIP8* 是 *qCdT7* 基因座內調控鎘累積表現的候選基因。推測上述 2 項基因存在於秈、粳稻間的自然變異之可能性偏低，但需進一步藉由定序分析或 RNA 表現量確認在此新品系上的功能性。

性狀調查上，各參試品系均取樣 6 株，進行株高、產量構成要素、莖葉乾重、根部取樣乾重與收穫指數等性狀檢定，各調查性狀在參試品系間均具顯著差異 ($P < 0.05$)，顯示各調查性狀均能穩定呈現品種間的遺傳差異。而新品系經過多次回交後，大部分遺傳組成已與輪迴親「台中秈 10 號」相仿，在 2015 年第一期作后里試驗田的農藝性狀調查上，兩者外觀上

表 2. 「台中秈 10 號」*qCdT7* 品系與親本與其他品種在各植體部位上鎘生物濃縮係數的統計分析，資料收集自 2015 年第 1 期作。

Table 2. Comparisons of bio concentration factor among 'TCS10'-*qCdT7*, its parents and other two cultivars in four biomass components. Data were collected in the first cropping season in 2015.

		Bio concentration factor			
Variety/Line	Subspecies	Root	Shoot	Brown rice	Husk
Habataki	*indica*	4.0478 a[z]	0.9215 a	0.3706 a	0.0969 a
TNG71	*japonica*	2.9924 b	0.3637 d	0.1251 c	0.0738 ab
TK2	*japonica*	2.6685 bc	0.3931 d	0.1124 c	0.0721 ab
TCS10	*indica*	4.0234 a	0.6212 bc	0.2667 b	0.0913 a
TCS10-*qCdT7*	*indica*	2.2242 c	0.4667 cd	0.1540 c	0.0562 b
$LSD_{0.05}$		0.7116	0.1548	0.0488	0.0282

[z] Values are expressed as the mean of six plants and means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

亦有高度相似性。新品系株高 107.7 cm 與輪迴親「台中秈 10 號」109.7cm 相近；在分蘗數、每穗穎花數、稔實率以及千粒重等產量構成要素上均未達顯著差異且呈現高度相似，僅其中新品系的每穗穎花數略比輪迴親增加 12.1%，在分蘗數、稔實率與千粒重均維持與輪迴親相似程度下，似乎有增產趨勢，且在新品系的莖葉乾重偏低 (36.6 g) 下，其新品系的收穫指數 (穀粒總乾重/全株乾重) 可達 0.51，與輪迴親「台中秈 10 號」收穫指數 0.48 相比略增 4.2% 但未達顯著差異，如表 3 與圖 5。

本試驗首重於現地栽培環境下進行秈稻後裔的鎘元素累積能力之探討，對於目標栽培環境具有直接應用效益，並利用分子輔助育種技術大幅改良栽培品種的生產風險，農民不需要重新適應新品種的栽培管理，新品系選育能兼具在稻作生產與食品安全上提供一項緩解措施，對於農民生產與市場銷售等產業經濟發展提供保護作用，亦穩定國內稻作發展並提升環境安全永續利用。

表 3. 「台中秈 10 號」*qCdT7* 品系與親本與其他品種針對生質量、產量構成要素與收穫指數的統計分析，資料收集自 2015 年第 1 期作。

Table 3. Comparisons of plant height, biomass dry weight and yield components among 'TCS10'-*qCdT7*, its parents and other two cultivars. Data was collected in the first cropping season in 2015.

Variety/Line	Plant height (cm)	Panicle number	Spikelets/ panicle	Fertility (%)	1000-grain weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root dry weight (g)	Harvest index
Habataki	96.0 b[z]	13.8 ab	153.3 a	88.4 ab	23.30 c	34.8 bc	9.6 ab	0.56 a
TNG71	98.3 b	15.7 a	78.6 b	81.0 c	25.48 ab	31.3 c	6.6 c	0.45 c
TK2	112.2 a	15.8 a	92.0 b	92.0 a	24.63 b	46.5 a	10.6 a	0.42 c
TCS10	109.7 a	11.8 ab	139.6 a	88.9 ab	26.18 a	43.8 ab	7.7 bc	0.48 bc
TCS10-*qCdT7*	107.7 a	11.0 b	156.6 a	86.3 b	26.16 a	36.6 abc	6.6 c	0.52 ab
$LSD_{0.05}$	5.19	4.1	26.7	5.1	0.87	11.0	2.5	0.06

[z] Values are expressed as the mean of six plants and means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

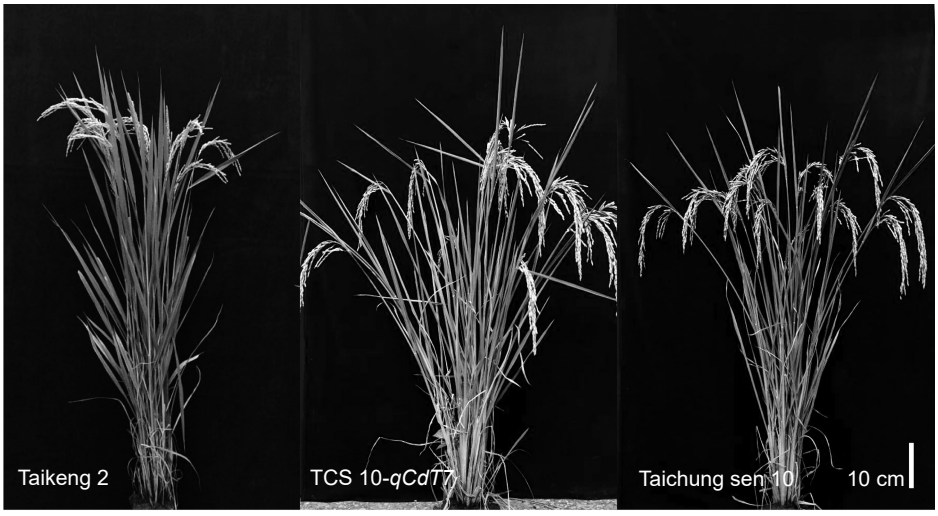


圖 5. 新品系台中秈 10 號 *qCdT7* 與兩親本在成熟期時的株形影像紀錄。

Fig. 5. Comparison of morphological characteristics between novel line (TCS10-*qCdT7*) and recurrent parent ('TCS10'). Bar is 10 cm.

引用文獻

Abe, T., F. Taguchi-Shiobara, Y. Kojima, T. Ebitani, M. Kuramata, T. Yamamoto, M. Yano, and S. Ishikawa. 2011. Detection of a QTL for accumulating Cd in rice that enables efficient Cd phytoextraction from soil. Breed Sci. 61:43–51.

Guo, H. Y., T. S. Liu, C. L. Chu, C. F. Chiang, and P. F. Römkens. 2007. Prediction of heavy metal uptake by different rice species in paddy soils near contaminated sites of Taiwan. p.95–116. *in*: Proceedings of the International Workshop of ESAFS 8: New Solutions to Soil Pollution and Distribution, Bioavailability and Management of Heavy Metals. October 22–23, 2007. Tsukuba, Japan Food Fert. Tech. Ctr. Publ., Taipei, Taiwan.

Harushima, Y., M. Yano, A. Shomura, M. Sato, T. Shimano, Y. Kuboki, T. Yamamoto, S. Y. Lin, B. A. Antonio, A. Parco, H. Kajiya, N. Huang, K. Yamamoto, Y. Nagamura, N. Kurata, G. S. Khush, and T. Sasaki. 1998. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F_2 population. Genetics 148:479–494.

International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based sequence of the rice genome. Nature 436:793–800.

Ishikawa, S., T. Abe, M. Kuramata, M. Yamaguchi, T. Ando, T. Yamamoto, and M. Yano. 2010. A major quantitative trait locus for increasing cadmium-specific concentration in rice grain is located on the short arm of chromosome 7. J. Exp. Bot. 61:923–934.

Ishikawa, S., Y. Ishimaru, M. Igura, M. Kuramata, T. Abe, T. Senoura, Y. Hase, T. Arao, N. K. Nishizawa, and H. Nakanishi. 2012. Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. PROC. Natl. Acad. Sci. USA 109:19166–19171.

Ishimaru, Y., R. Takahashi, K. Bashir, H. Shimo, T. Senoura, K. Sugimoto, K. Ono, M. Yano, S. Ishikawa, T. Arao, H. Nakanishi, and N. K. Nishizawa. 2012. Characterizing the role of rice *NRAMP5* in manganese, iron and cadmium transport. Sci. Rep. 2:286.

Jha, U. C. and A. Bohra. 2016. Genomics enabled breeding approaches for improving cadmium stress tolerance in plants. Euphytica 208:1–31.

Kumagai, S., T. Suzuki, K. Tezuka, N. Satoh-Nagasawa, H. Takahashi, K. Sakurai, A. Watanabe, T. Fujimura, and H. Akagi. 2014. Functional analysis of the C-terminal region of the vacuolar cadmium-transporting rice *OsHMA3*. FEBS Lett. 588:789–794.

Lin, Y. W., T. S. Liu, C. T. Chen, H. J. Tang, H. T. Chen, J. R. Job, J. H. Tsai, Y. H. Lin, C. C. Chang, S. J. Tsai, and W. T. Huang. 2012. Contents of cadmium and lead in vegetable crops produced in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 61:38–51. (in Chinese with English abstract)

Lin, Y. W., T. S. Liu, H. Y. Guo, C. M. Chiang, H. J. Tang, H. T. Chen, and J. H. Chen. 2015. Relationships between Cd concentrations in different vegetables and those in arable soils, and food safety evaluation of vegetables in Taiwan. Soil Sci. Plant Nutr. 61:983–998. (in Chinese with English abstract)

Miyadate, H., S. Adachi, A. Hiraizumi, K. Tezuka, N. Nakazawa, T. Kawamoto, K. Katou, I. Kodama, K. Sakurai, H. Takahashi, N. Satoh-Nagasawa, A. Watanabe, T. Fujimura, and H. Akagi. 2011. *OsHMA3*, a P_{1B}-type of ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles. New Phytol. 189:190–199.

Norton, G. J., C. M. Deacon, L. Xiong, S. Huang, A. A. Meharg, and A. H. Price. 2010. Genetic mapping of the rice ionome in leaves and grain: identification of QTLs for 17 elements including arsenic, cadmium, iron and selenium. Plant Soil 329:139–153.

Ramesh, S. A., R. Shin, D. J. Eide, and D. P. Schachtman. 2003. Differential metal selectivity and gene expression of two zinc transporters from rice. Plant Physiol. 133:126–134.

Romkens, P. F. A. M., H. Y. Guo, C. L. Chu, T. S. Liu, C. F. Chiang, and G. F. Koopmans. 2009. Prediction of Cadmium uptake by brown rice and derivation of soil-plant transfer models to improve soil protection guidelines. Environ. Pollut. 157:2435–2444.

Takahashi, R., Y. Ishimaru, T. Senoura, H. Shimo, S. Ishikawa, T. Arao, H. Nakanishi, and N. K. Nishizawa. 2011. The *OsNRAMP1* iron transporter is involved in Cd accumulation in rice. J. Exp. Bot. 62:4843–4850.

Tezuka, K., H. Miyadate, K. Katou, I. Kodama, S. Matsumoto, T. Kawamoto, S. Masaki, H. Satoh, M. Yamaguchi, K. Sakurai, H. Takahashi, N. Satoh-Nagasawa, A. Watanabe, T. Fujimura, and H. Akagi. 2010. A single recessive gene controls cadmium translocation in the cadmium hyperaccumulating rice cultivar Cho-Ko-Koku. Theor. Appl. Genet. 120:1175–1182.

Ueno, D., I. Kono, K. Yokosho, T. Ando, M. Yano, and J. F. Ma. 2009. A major quantitative trait locus controlling cadmium translocation in rice (*Oryza sativa*). New Phytol. 182:644–653.

Ueno, D., N. Yamaji, I. Kono, C. F. Huang, T. Ando, M. Yano, and J. F. Ma. 2010. Gene limiting cadmium accumulation in rice. PROC. Natl. Acad. Sci. USA 107:16500–16505.

Uraguchi, S. and T. Fujiwara. 2012. Cadmium transport and tolerance in rice: perspectives for reducing grain cadmium accumulation. Rice 5:5.

Uraguchi, S., S. Mori, M. Kuramata, A. Kawasaki, T. Arao, and S. Ishikawa. 2009. Root-to-shoot Cd translocation via the xylem is the major pROCess determining shoot and grain cadmium accumulation in rice. J. Exp. Bot. 60:2677–2688.

Uraguchi, S. and T. Fujiwara. 2013. Rice breaks ground for cadmium-free cereals. Curr. Opin. Plant Biol. 16:328–334.

Wu, D. H., K. K. Hwu, C. S. Wang, C. H. Su, W. L. Chuang, M. Y. Lin, C. P. Li, W. S. Jwo, H. M. Yen, and M. H. Lai. 2013a. Construction and evaluation of rice whole chromosome substitution lines of indica cultivar 'Taichung sen 10' carrying japonica cultivar 'Taikeng 2'. p.113. *in*: Proceedings of the Agronomy Society of Taiwan 2013 Annual Meeting. April 25, 2013. Taichung, Taiwan. Agric. Soc. Taiwan. Publ., Taichung, Taiwan.

Wu, D. H., H. P. Wu, C. S. Wang, H. Y. Tseng, and K. K. Hwu. 2013b. Genome-wide InDel marker system for application in rice breeding and mapping studies. Euphytica 192:131–143.

Yan, J., P. Wang, P. Wang, M. Yang, X. Lian, Z.Tang, C. F. Huang, D. E. Salt, and F. J. Zhao. 2016. A loss-of-function allele of *OsHMA3* associated with high cadmium accumulation in shoots and grain of Japonica rice cultivars. Plant Cell Environ. 39:1941–1954.

Zhang H, J. Chen, L. Zhu, G. Yang, and D. Li. 2014. Transfer of cadmium from soil to vegetable in the Pearl River Delta area, South China. PLoS One 9:e108572.

A Novel *Indica* Rice Breeding Line Selection with Low Cadmium Accumulation Level by Functional Markers Assisted Backcross Strategy

Pi-Jen Wu[1,#], Yu-Wen Lin[2,#], Charng-Pei Li[3], Chien-Hui Syu[4], Woei-Shyuan Jwo[5], Hsing-Mu Yen[5], Horng-Yuh Guo[6], Ming-Hsin Lai[7], and Dong-Hong Wu[5,*]

Abstract

Wu, P. J., Y. W. Lin, C. P. Li, C. H. Syu, W. S. Jwo, H. M. Yen, H. Y. Guo, M. H. Lai, and D. H. Wu. 2017. A novel *Indica* rice breeding line selection with low cadmium accumulation level by functional markers assisted backcross strategy. J. Taiwan Agric. Res. 66(3):248−260.

The goal of this study was to improve the genetic uptake factor in *indica* rice cultivars through introgression of a *japonica* DNA segment that limits Cd accumulation. Our strategy was to screen the genetic potential of Cd uptake in Taiwan cultivars using a functional marker, to develop a novel *indica* line by marker-assisted selection, and then to evaluate the genetic improvement of the target breeding line under field conditions. Genotyping with the functional marker of *OsNRAMP1* showed that the current Taiwan *indica* cultivars possessed a high accumulation allele that was consistent with the phenotype of the Cd accumulation trend between Taiwan *indica* and *japonica* cultivars. Subsequently, we selected advanced backcross inbred lines (BC_4F_2) from a chromosome 7 segment substitution line population that was derived from the cross between 'Taichung Sen 10 (TCS10)' and 'Taikeng 2' based on previous studies (2006–2011). An *indica* line, TCS10-*qCdT7*, that limits Cd accumulation was developed in the first cropping season of 2014 and possessed 96% genetic background similarity compared with the recurrent parent 'TCS10'. In the first cropping season of 2015, this new breeding line exhibited the highly similar morphological characteristics compared with the *indica* variety 'TCS10', but had a Cd bio concentration factor in brown rice that was 44.4% less than that in the 'TCS10' parent. In summary, this study was conducted in a field environment and improved one of Taiwan's popular *indica* cultivars using a marker-assisted backcross approach. The newly developed lines in this study would have the potential to contribute greatly to the future cultivation of rice production and increase the food safety within the Taiwan rice industry.

Key words: Cadmium accumulation, Field trial, Functional marker, *Indica* rice, Marker assisted backcross selection.

Received: November 4, 2016; Accepted: December 12, 2016.
* Corresponding author, e-mail: dhwu@tari.gov.tw
# The author contributed equally to this work as first author.
[1] Research Assistant, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Associate Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Associate Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Assistant Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[5] Assistant Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[6] Research Fellow and Director, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[7] Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 66(3):261–265 (2017)
DOI: 10.6156/JTAR/2017.06603.09

研究簡報

木耳萃取物抑制蝕骨細胞活性

楊淑惠 [1,*] 楊惠婷 [2] 劉虹君 [3]

摘要

楊淑惠、楊惠婷、劉虹君。2017。木耳萃取物抑制蝕骨細胞活性。台灣農業研究 66(3):261–265。

本試驗以大鼠卵巢切除 (OVX) 模式，探討餵食木耳子實體 (AP) 或木耳萃取物 (APE) 對骨質代謝的影響及其機制。SD 雌鼠分成 3 組，偽手術正常飼料組 (V0)，卵巢切除給予木耳子實體粉末組 (A1)，或卵巢切除給予木耳萃取物組 (A2)。研究結果顯示，餵食木耳子實體粉末可以有效改善 OVX 大鼠的血脂肪值，但對改善骨質代謝效果不顯著。餵食木耳萃取物大鼠的血液生化值及其骨質密度可以改善至接近偽手術組，探討其機制發現餵食木耳萃取物顯著增加卵巢切除大鼠血漿中的蝕骨細胞抑制因子濃度及血鈣濃度。

關鍵詞：木耳子實體、木耳萃取物、卵巢切除、骨質密度、骨源鹼性磷酸酶、蝕骨細胞抑制因子。

正常骨骼的代謝過程稱為骨質再造 (bone remodeling)，人體每年約有 10% 的骨質會進行更換，蝕骨細胞 (osteoclast) 溶解骨質與造骨細胞 (osteoblast) 填補骨質的作用，周而復始進行，維持骨質恆定狀態 (Wade 2001)。骨源鹼性磷酸酶 (bone-specific alkaline phosphtase; BAP) 是造骨細胞活性的指標，BAP 濃度增加代表造骨細胞活性增加 (Bruder *et al*. 1990)。蝕骨細胞抑制因子 (osteoprotegerin; OPG) 為調節骨質吸收的醣蛋白，可抑制骨吸收作用。OPG 會抑制蝕骨細胞活性 (Yasuda *et al*. 1998)，缺乏 OPG 小鼠會有嚴重的骨質疏鬆情形 (Bucay *et al*. 1998)。木耳水萃取物之前期研究，顯示具有改善卵巢切除大鼠血脂及骨質疏鬆之功效。又研究顯示杏鮑菇 (*Pleurotus eryngii*) 萃取物可減少卵巢切除 CD 大鼠的骨骼鈣質流失 (Shimizu *et al*. 2006)，攝食菇類之麥角固醇經 UV 照射轉化產生的維生素 D_2 可以改善骨骼健康 (Chen *et al*. 2015)。由紅棗、黑大豆、黑木耳所組成的采坤茶萃取物，動物實驗證明具有明顯的雌激素活性 (Su *et al*. 2003)。

本試驗以 6 wk 齡雌性 SD 大鼠 (Sprague Dawley rat) 為實驗動物，動物育養 1 wk 後施行卵巢切除術 (ovariectomized, OVX)。經 3 wk 復原期，先由尾靜脈採血後進行隨機組分成 3 組 (n = 25)，偽手術正常飲食組 (X0) 9 隻及實驗組添加木耳子實體粉末 A1 組 (1.25 g Kg^{-1} BW AP)，添加木耳萃取物 A2 (0.5 g Kg^{-1}BW APE) 各 8 隻。於飼育期 16 mo 結束後犧牲實驗動物，採集血液檢體及下肢股骨進行生化分析及切片判讀。

在本試驗開始的第 0 週 (卵巢切除手術後 3 wk) 的血液生化值分析值顯示，試驗組大鼠的膽固醇、三酸甘油酯及極低密度脂蛋白膽固醇指標高於 X0 組，呈現出類更年期的血液生化值變化。經 16 wk 餵食木耳子實體 (A1) 組或木耳萃取物 (A2) 組，三項血脂肪指標改善至接近 X0 組數值，如表 1 所示。試驗組的總膽固醇濃度由 86.25–96.25 mg dL^{-1} 下降至與 X0

投稿日期：2016 年 8 月 2 日；接受日期：2016 年 11 月 25 日。
* 通訊作者：debbie@fthes-tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所經營利用系副研究員兼主任。台灣 高雄市。。
[2] 中國醫藥大學營養系副教授。台灣 台中市。
[3] 中國醫藥大學營養系研究生。台灣 台中市。

表 1. 實驗期間各組實驗動物的血液生化值。

Table 1. The blood biochemistry value of Sprague Dawley rats.

	Rats with different treatments[z]		
Plasma parameter	X0	A1	A2
AST (U L^{-1})			
wk 0	121.5 ± 11.9 ab[y]	125.0 ± 11.4 a	103.3 ± 5.5 b
wk 16	72.0 ± 2.1 b	92.1 ± 4.3 a	81.4 ± 9.5 ab
ALT (U L^{-1})			
wk 0	51.5 ± 2.2 a	50.5 ± 2.2 ab	46.3 ± 2.2 b
wk 16	48.8 ± 2.2 b	54.4 ± 3.1 ab	37.1 ± 2.5 c
Cholesterol (mg dL^{-1})			
wk 0	74.3 ± 1.8 c	86.3 ± 0.4 b	96.3 ± 3.4 a
wk 16	68.6 ± 2.4 a	75.3 ± 3.8 a	71.1 ± 2.7 a
Triglyceride (mg dL^{-1})			
wk 0	35.8 ± 1.9 d	52.0 ± 2.7 b	60.5 ± 2.1 a
wk 16	33.8 ± 3.2 a	36.0 ± 2.0 a	26.7 ± 2.1 b
HDL-C (mg dL^{-1})			
wk 0	23.8 ± 0.5 a	21.8 ± 0.3 b	23.8 ± 0.6 a
wk 16	29.2 ± 1.6 ab	30.1 ± 1.6 a	26.7 ± 0.9 ab
LDL-C (mg dL^{-1})			
wk 0	6.3 ± 0.5 a	5.0 ± 0.2 b	6.5 ± 0.3 a
wk 16	4.8 ± 0.4 b	6.1 ± 0.8 ab	5.1 ± 0.3 ab
VLDL (mg dL^{-1})			
wk 0	44.3 ± 0.0 c	59.5 ± 0.0 b	66.0 ± 0.1 a
wk 16	34.6 ± 0.0 b	39.0 ± 0.1 a	39.3 ± 0.1 a
Ca (mg dL^{-1})			
wk 0	8.1 ± 0.1 b	8.9 ± 0.3 a	6.3 ± 0.3 c
wk 16	9.4 ± 0.2 a	8.9 ± 0.3 ab	18.8 ± 0.2 b

[z] X0: sham-operated rat fed on chow diet; A1: OVX rat fed on chow diet supplemented with 1.25 g kg^{-1} BW AP; and A2: OVX rat fed on chow diet supplemented with 0.5 g kg^{-1} BW APE.

[y] Values are presented as mean ± SEM., Values shared with different superscripted letter(s) are significant differences from each group ($P < 0.05$).

組無顯著差異 ($P > 0.05$)；A2 組的三酸甘油酯濃度 26.71 mg dL^{-1} 顯著低於 X0、A1 組 ($P < 0.05$)。試驗組的極低密度膽固醇 (VLDL-C) 濃度由 59.5–66.0 mg dL^{-1} 下降至 39.0–39.3 mg dL^{-1}。結果顯示，餵食木耳子實體粉末或木耳萃取物，均可以有效改善 OVX 大鼠的血液血脂肪值。肝功能指標評估，試驗 A2 組的 AST 值由 103.25 μL^{-1} 下降至 81.43 μL^{-1}；ALT 值由 46.25 μL^{-1} 下降至 37.14 μL^{-1}，顯示餵食木耳萃取物可以有效改善 OVX 大鼠的發炎情形。

利用切片影像分析骨切片，如圖 1 及圖 2 所示，計數骨質密度，X0 組 69.5% 與 A2 組 62.1% 無顯著差異 ($P > 0.05$)，而顯著高於 A1 組 54.3% ($P < 0.05$)。血漿中骨源鹼性磷酸酶 (bone-specific alkaline phosphatase; BAP) 濃度其代表含意為成骨細胞的活性，如圖 3 所示，X0 組 4.0 pmol L^{-1} 與 A2 組 2.65 pmol L^{-1} 無統計上差異 ($P > 0.05$) 但顯著高於 A1 組 1.75 pmol L^{-1} ($P < 0.05$)。蝕骨細胞抑制因子 (osteoprotegerin; OPG) 濃度如圖 4 所示，A2 組血漿中 OPG 濃度 0.27 pmol L^{-1} 顯著高於

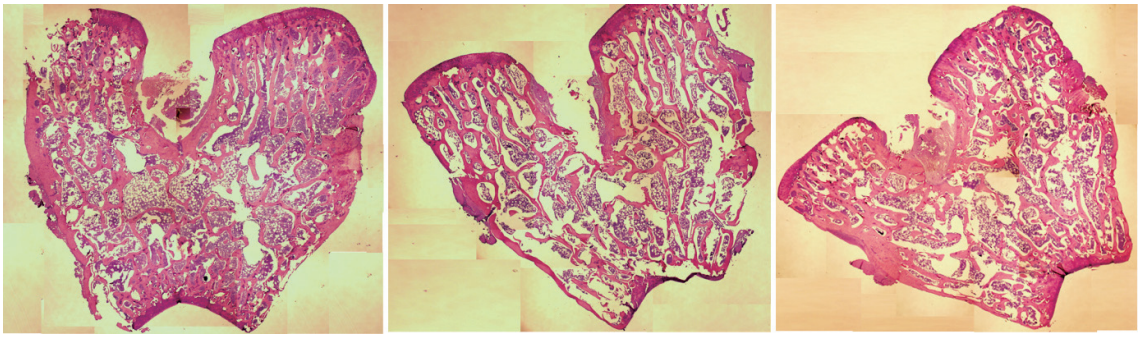


圖 1. 不同處理之 SD 大鼠骨組織切片。

Fig. 1. Bone histology sections under H&E stain with different treatments. X0: sham rat + chow diet; A1: ovx rat + 1.25 g kg^{-1} BW AP; A2: ovx rat + 0.5 g kg^{-1} BW APE.

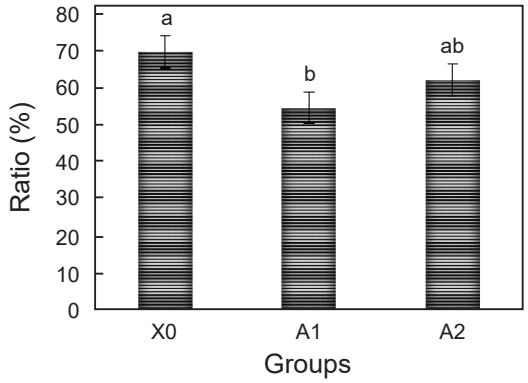


圖 2. 不同處理之 SD 大鼠的骨質密度。

Fig. 2. Bone density of rats with different treatments. Values are means with SEM represented by vertical bar. Values shared with different superscripted letters are significant differences from each group ($P < 0.05$). X0: sham-operated rat fed on chow diet; A1: OVX rat fed on chow diet supplemented with 1.25 g kg^{-1} BW AP; A2: OVX rat fed on chow diet supplemented with 0.5 g kg^{-1} BW APE.

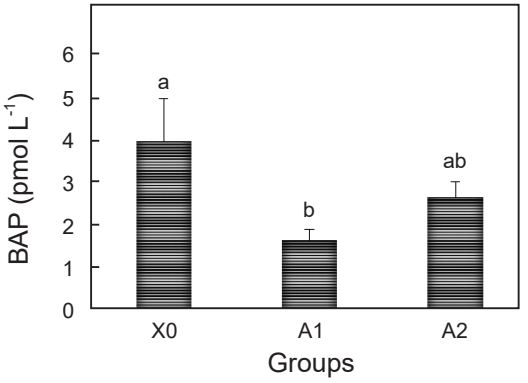


圖 3. 不同處理之 SD 大鼠血漿中骨源鹼性磷酸酶濃度。

Fig. 3. Plasma bone-specific alkaline phosphatase concentration of rats with different treatments. SD: Sprague-Dawley rat. Values are means with SEM represented by vertical bar, Values shared with different superscripted letters are significant differences from each group ($P < 0.05$). ALP：Alkaline Phosphatase; X0: sham-operated rat fed on chow diet; A1: OVX rat fed on chow diet supplemented with 1.25 g kg^{-1} BW AP; and A2: OVX rat fed on chow diet supplemented with 0.5 g kg^{-1} BW APE.

X0 組 0.13 pmol L^{-1}、A1 組 0.07 pmol L^{-1} ($P < 0.05$)。Yasuda *et al*. (1998) 研究顯示，OPG 可經由 1,25 $(OH)_2D_3$、PTH 或 IL-11 刺激 signaling pathways 抑制類蝕骨細胞的形成，Bucay *et al*. (1998) 研究也顯示，小鼠缺乏 OPG 時，蝕骨細胞活性增加造成骨吸收，而出現嚴重的骨質疏鬆情形。試驗初期至犧牲點血漿中鈣離子濃度，各組就統計而言無顯著差異，唯比較試驗期間變化，A2 組之血漿鈣離子濃度由 6.3 mg dL^{-1} 增加至 8.79 mg dL^{-1} 最為顯著，如圖 5 所示。

以上結果顯示，餵食木耳或萃取物均可有效改善 OVX 大鼠的血液血脂肪值。攝食木耳萃取物可以有效將 OVX 大鼠的血液生化值及骨質代謝問題，並改善至接近正常組狀態。此結果可能與萃取物增加蝕骨細胞抑制因子濃

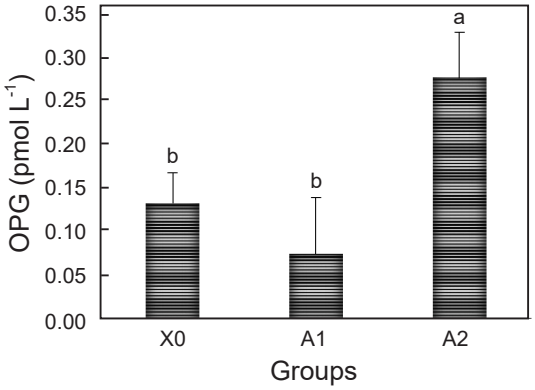


圖 4. 大鼠血漿中蝕骨細胞抑制因子 (osteoprotegerin) 濃度。

Fig. 4. Plasma osteoprotegerin concentration of different groups. Values are means with SEM represented by vertical bar., Values shared with different superscripted letters are significant differences from each group ($P < 0.05$). X0: sham-operated rat fed on chow diet; A1: OVX rat fed on chow diet supplemented with 1.25 g kg^{-1} BW AP; and A2: OVX rat fed on chow diet supplemented with 0.5 g kg^{-1} BW APE.

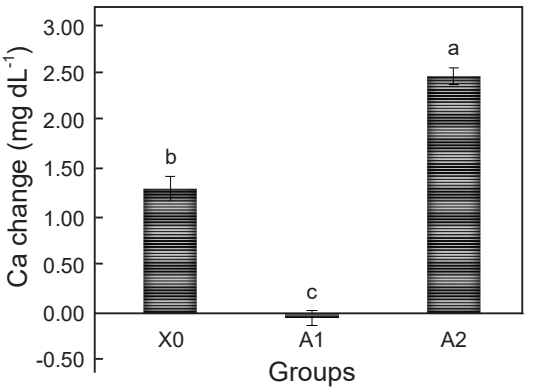


圖 5. 餵食 16 週大鼠血漿中血鈣變化。

Fig. 5. Plasma Ca concentration change at 16 wk of different groups. Values are means with SEM represented by vertical bar., Values shared with different superscripted letters are significant differences from each group ($P < 0.05$). X0: sham-operated rat fed on chow diet; A1: OVX rat fed on chow diet supplemented with 1.25 g kg^{-1} BW AP; and A2: OVX rat fed on chow diet supplemented with 0.5 g kg^{-1} BW APE. Value change = Ca (W16) − Ca (W0).

度，抑制蝕骨細胞活性，而減少骨質流失有關。木耳 (*Auricularia polytricha*) 萃取物含有水溶性多醣、多酚類、麥角固醇等物質，至於何者為改善骨質疏鬆之功效指標成分有待進一步研究。

引用文獻

Bruder, S. P. and A. I. Caplan. 1990. A monoclonal antibody against the surface of osteoblasts recognizes alkaline phosphatase isoenzymes in bone, liver, kidney, and intestine. Bone 11:133–139.

Bucay, N., I. Sarosi, C. R. Dunstan, S. Morony, J. Tarpley, C. Capparelli, S. Scully, H. L. Tan, W. Xu, D. L. Lacey, W. J. Boyle, and W. S. Simonet. 1998. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes Dev. 12:1260–1268.

Chen, S. Y., H. T. Yu, J. P. Kao, C. C. Yang, S. S. Chiang, D. O. Mishchuk, J. L. Mau, and C. M. Slupsky. 2015. Consumption of vitamin D2 enhanced mushrooms is associated with improved bone health. J Nutr. Biochem. 26:696–703.

Shimizu, K., M. Yamanaka, M. Gyokusen, S. Kaneko, M. Tsutsui, J. Sato, I. Sato, M. Sato, and R. Kondo. 2006. Estrogen-like activity and prevention effect of bone loss in calcium deficient ovariectomized rats by the extract of *Pleurotus eryngii*. Phytother. Res. 20:659–664.

Su, S. Y., J. S. Lee, C. W. Lai, Y. Y. Wang, M. T. Lai, M. C. Yu, and C. H. Hsu. 2003. Antioxidatives effects and estrogenic activity of Chinese herbs Charming-Queen tea. J. Chin. Med. 14:193–203. (in Chinese with English abstract)

Wade, J. P. 2001. Rheumatology: 15. Osteoporosis. CMAJ 165:45–50.

Yasuda, H., N. Shima, N. Nakagawa, S. I. Mochizuki, K. Yano, N. Fujise, Y. Sato, M. Goto, K. Yamaguchi, M. Kuriyama, T. Kanno, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, and K. Higashio. 1998. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. Endocrinology 139:1329–1337.

Inhibition on Osteoclasts Activity of *Auricularia polytricha* Extracts

Shu-Hui Yang[1,*], Hui-Ting Yang[2], and Hung-Chun Liu[3]

Abstract

Yang, S. H., H. T. Yang, and H. C. Liu. 2017. Inhibition on osteoclasts activity of *Auricularia polytricha* extracts. J. Taiwan Agric. Res. 66(3):261–265.

This study investigated the effect of bone metabolism and mechanism of feeding *Auricularia polytricha* fruiting body powder (AP) or extract (APE) on ovariectomized (OVX) rats. Female Sprague Dawley rats were divided into 3 groups, sham operated group fed on chow diet (V0), OVX fed on AP (A1) group or OVX fed on APE (A2) group. AP treatment effectively improved blood lipid values, but not significantly affected the bone metabolism. The blood biochemistry values and bone density of APE treatment can be improved to near sham operated group. APE treatment significantly increased osteoprotegerin concentration and calcium concentration of plasma on ovariectomized rats.

Key words: *Auricularia polytricha* powder, *Auricularia polytricha* extracts, Ovariectomy, Bone density, Bone-specific alkaline phosphatase, Osteoprotegerin.

Received: August 12, 2016; Accepted: December 25, 2016.
* Corresponding author, email: debbie@fthes-tari.gov.tw
[1] Associate Research Fellow and Head, Department of Management and Utilization, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
[2] Associate Professor, Department of Nutrition, China Medical University, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Graduate Student, Department of Nutrition, China Medical University, Taichung, Taiwan, ROC.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chang, Ruey-Jang
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural 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, Chung-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Chen, Iou-Zen
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Chen, Su-Ming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University
Chen, Yu-Hui
Department of Agricultural Economics, National Taiwan University
Chien, Li-Hsien
Department of Applied Economics, National Chung Hsing 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, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute
Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Huang, Pung-Ling
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Huang, Yuh-Ming
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
Juang, Kai-Wei
Department of Agronomy, National Chiayi University
Kao, Ching-Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University
Ko, Chiun-Cheng
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan 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
Shen, Wei-Chiang
Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University
Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute
Tseng, Menq-Jiau
Department of Horticulture, National Chung Hsing University
Tzou, Yu-Min
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Wang, Shu-Jen
Department of Agronomy, National Taiwan University
Wu, Wen-Jer
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University
Yang, Jeng-Tze
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Yen, Gow-Chin
Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University

Editorial Assistants

Ku, Pei-Jung
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research
Wang, Li-Jung
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research
Wu, Huei-Ching
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

Consultant to Editorial Assistants

Wu, Yi-Yan
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 66 No. 3 September 30, 2017

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Publisher	Junne-Jih Chen
Editor-in-Chief	Chwen-Ming Yang
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 41362, Taiwan, ROC
Website	http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	http://aspers.airiti.com/JTAR
Press	Airiti Press Inc.
Address	18F., No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 23452, 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 10485, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 40042, Taiwan, ROC Tel: +886-4-2226-0330