台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.65 No.2 2016

Research Articles

109 The Control Efficacy on Oriental Fruit Fly (*Bactrocera dorsalis*) with Five Insecticides of Different Modes of Action in 'Liucheng' Orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Liucheng]
Hui-Zhen Lu, Tai-Chuan Wang, Shou-Horng Huang, and Chi-Nan Chen

117 Characteristics of Cauliflower New Variety 'Tainung No. 1'
Hui-Ling Lo, Chen-Yu Lin, San-Tai Wang, Kan-Shu Chen, Shiow-Huey Hey, and Tsai-Fat Sheen

128 Effects of Flooding Treatments on the Storage Quality of Sweet Potato after Post-Harvest
Che-Lun Huang, Qi-Dong Liu, Wayne C. Liao, and Yung-Chang Lai

136 Preliminary Studies on the Development of Liquid Spawn for *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quěl.
Jin-Tong Chen, Chi-Chu Cheng, Jian-Tan Huang, and Hsin-Der Shih

146 A Study on Applying Micro-Fog Chiller Blowing System in the Open Roof Greenhouse
Fu-Liang Hong, Li-Duhng Huarng, and Ming-Hwi Yao

154 Increasing Drought Tolerance in a Salt-Tolerant *Japonica* Rice Cultivar Using Marker-Assisted Selection
I-Chun Lien, Chieh-Wei Kuo, Su-Chen Kuo, Yann-Rong Lin, and Yong-Pei Wu

173 Evaluation of the Effectiveness of Four Herbivore-Induced Plant Volatiles on Attracting Natural Enemies
Yaw-Jen Dong and Shaw-Yhi Hwang

184 Effect of Bagging Materials on Pericarp Coloration and Pesticide Residues of 'Yu-Her-Pao' Litchi (*Litchi chinensis* Sonn) Fruit
Hsin-Hsiu Fang, Wen-Li Lee, Chi-Cho Huang, and Yu-Shen Liang

194 Serological and Molecular Identification of *Nerine latent virus* Infecting Blood Lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn)
Chin-Chih Chen, Chin-An Chang, and Fen-Lang Chiang

207 Rice Bacterial Foot Rot Disease Caused by *Dickeya zeae* in Taiwan
Ching-Yi Lin, Chiao-Wen Huang, Hong-Ren Yang, Chia-Hsin Tsai, Sui-Li Hsu, and Hui-Fang Ni

ISSN 0022-4847
Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究 JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH Vol.65 No.2 2016

ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.65 No.2 2016

研究報告

109 五種不同作用機制藥劑於柳橙果實對東方果實蠅防治效果
盧慧真、王泰權、黃守宏、陳祈男

117 花椰菜「台農1號」之育成
羅惠齡、林楨祐、王三太、陳甘澍、許秀惠、沈再發

128 淹水處理對甘藷收穫後塊根儲藏品質之影響
黃哲倫、劉啟東、廖文昌、賴永昌

136 杏鮑菇液體菌種開發之研究
陳錦桐、鄭吉助、黃健覃、石信德

146 低溫微霧降溫系統運用於開頂溫室之研究
洪福良、黃禮棟、姚銘輝

154 運用分子標幟輔助提升耐鹽粳稻之耐旱性
連怡鈞、郭介煒、郭素真、林彥蓉、吳永培

173 四種蟲害誘導之植物揮發性成分對天敵之誘效評估
董耀仁、黃紹毅

184 不同套袋材料對「玉荷包」荔枝果實著色與農藥殘留之影響
方信秀、李文立、黃基倬、梁佑慎

194 由火球花所分離之 *Nerine latent virus* 之血清學及分子生物學鑑定
陳金枝、張清安、江芬蘭

207 由 *Dickeya zeae* 引起之水稻細菌性基腐病
林靜宜、黃巧雯、楊宏仁、蔡佳欣、許淑麗、倪蕙芳

行政院農業委員會農業試驗所出版

台灣農業研究 JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH Vol.65 No.2 2016

《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／中興大學農藝系
申　雍／中興大學土壤環境科學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
呂秀英／苗栗區農業改良場
柯文雄／中興大學植物病理學系
侯豐男／中興大學昆蟲學系
郭鴻裕／農業試驗所農業化學組
高景輝／台灣大學農藝學系
陳世銘／台灣大學生物產業機電工程系
陳吉仲／中興大學應用經濟系
陳宗禮／中興大學農藝系
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
陳福旗／屏東科技大學農園生產系
黃振文／中興大學植物病理學系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／台灣大學園藝暨景觀學系
鄔宏潘／中央研究院植物暨微生物學研究所
曾夢蛟／中興大學園藝系
蔡致榮／農業試驗所
蔡新聲／朝陽科技大學生化科技研究所
歐錫坤／農業試驗所作物組
簡立賢／中興大學應用經濟系
蘇正德／東海大學食品科學系

編輯助理

王立蓉／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
吳宜晏／農業試驗所技術服務組
陳相君／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

台灣農業研究

第六十五卷　第二期　　中華民國一〇五年六月三十日

出版者	行政院農業委員會農業試驗所
發行人	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.) 65(2):109–116 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06502.01

研究報告

五種不同作用機制藥劑於柳橙果實對東方果實蠅防治效果

盧慧真[1]　王泰權[2]　黃守宏[3]　陳祈男[4,*]

摘要

盧慧真、王泰權、黃守宏、陳祈男。2016。五種不同作用機制藥劑於柳橙果實對東方果實蠅防治效果。台灣農業研究 65(2):109–116。

東方果實蠅 [*Bactrocera dorsalis* (Hendel)] 是世界上重要果樹害蟲，成蟲產卵於果實、幼蟲在果實內蛀食造成嚴重危害，使果品失去經濟價值。目前東方果實蠅整合管理已經發展出許多防治方式，藥劑防治兼具有效及操作簡便的特性，因此本研究著重於登記於柑橘類的害蟲防治用藥。以果實浸藥法探討 2.4% 第滅寧水懸劑 (稀釋 1,500×)、50% 馬拉松乳劑 (稀釋 800×)、30% 賜派芬水懸劑 (稀釋 5,000×)、2% 阿巴汀乳劑 (稀釋 2,000×) 對柳橙 [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Liucheng] 果實上之東方果實蠅防治效果，並以 4.5% 印楝素乳劑稀釋 10×、100×、1,000× 作為忌避果實蠅產卵的正對照組進行產卵危害偏好試驗。試驗結果顯示，第滅寧、馬拉松、阿巴汀皆對果實蠅有直接觸殺效果，其中以第滅寧的防治效果最好，使果實蠅無法完成產卵行為；阿巴汀可減少東方果實蠅於柳橙果實中的產卵量，而馬拉松則無忌避效果。印楝素處理雖然無毒殺成蟲的效果，但是可忌避東方果實蠅減少其產卵量。印楝素為有效的東方果實蠅忌避藥劑，本研究亦對該藥劑處理後之柳橙果實進行品質分析與官能品評，結果顯示稀釋 10× 印楝素處理使果實表面出現藥斑、失重率增加且果肉呈現異味。本研究中以第滅寧為防治東方果實蠅效果最佳藥劑；印楝素雖有忌避防治效果，惟施用濃度過高亦可能影響果實品質與商品價值，因此未來可進一步探討該藥劑搭配其他措施以整合防治東方果實蠅。

關鍵詞：東方果實蠅、柑橘、藥效試驗、果實品質分析。

前言

柑橘 (桔) 為台灣重要的經濟果樹，根據 2013 年農業統計年報資料，全國柑橘栽培面積約 25,888 ha，占全國果樹栽培面積 13.7%，年產值逾新台幣 130 億元。柑橘栽培生產過程面臨若干蟲害威脅，其中東方果實蠅 [*Bactrocera dorsalis* (Hendel)] 對造成柑橘發育中、後期果實危害，以致果實品質下降及產量減損。東方果實蠅分類地位屬於雙翅目 (Diptera)、果實蠅科 (Tephritidae)，是東南亞及太平洋地區經濟果樹重要害蟲之一 (Clarke *et al*. 2005)，據記載寄主種類有 38 科 150 餘種 (Metcalf & Metcalf 1992)，包括柑橘、楊桃、檬果、番石榴、蓮霧、桃、木瓜、印度棗、枇杷、釋迦、香蕉、百香果等果樹作物 (Huang *et al*. 2013)。雌成蟲以產卵管刺入果實危害，產卵於果皮下，外觀可見明顯產卵孔。幼蟲孵化後在果實內部蛀食果肉，造成果皮呈現水浸狀，導致果實腐爛及落果，嚴重影響果實產量及品質。台灣因為氣候溫暖，全年可見其危害。東方果實蠅發育受溫度影響，年約發生 8–10 世代，自 5 月開始數量逐漸增加，發生高峰以 7–9 月發生密度較高，11 月至翌春 3 月數量較少 (Hwang *et al*. 1997; Hung *et al*. 2008)。根據 Cheng (2005) 估計，如未採適當

投稿日期：2015 年 5 月 26 日；接受日期：2015 年 8 月 3 日。
* 通訊作者：cnchen@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系約聘人員。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。
[3] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員。台灣 嘉義市。
[4] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所園藝系助理研究員。台灣 嘉義市。

防治措施，東方果實蠅將可造成台灣 10–30% 的水果果實受害。

東方果實蠅的整合防治技術，包括化學藥劑噴灑、不孕性雄蟲釋放 (Steiner *et al*. 1970)、餌劑誘殺 (Ho *et al*. 2006, 2007; Ho & Hung 2008) 及滅雄處理技術 (Chuang & Hou 2008; Chen *et al*. 2010)、果實套袋及田間清理落果等，田間操作常採化學藥劑噴灑、餌劑誘殺及滅雄處理技術等防治方式。本研究著重於化學藥劑保護果實的研究，以『植物保護手冊』登記用於柑橘害蟲之 4 種不同作用機制之藥劑，包含合成除蟲菊殺蟲劑 (pyrethroid insecticides) 之第滅寧 (deltamethrin)、有機磷殺蟲劑 (organophosphorus insecticides) 之馬拉松 (malathion)、特窗酸類 (tetronic acids) 殺蟎劑之賜派芬 (spirodiclofen) 與抗生素類 (antibiotic) 殺蟎劑之阿巴汀 (abamectin) 進行果實浸藥試驗，並以印楝素 (azadirachtin) 當作正控制組 (Chen *et al*. 1996; Singh & Singh 1998; Silva *et al*. 2012)。探討除了登記用藥之外，其他藥劑對東方果實蠅的產卵防治效果，並搭配柳橙 [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Liucheng] 果實品質分析數據，提供將來田間防治害蟲時共同防治東方果實蠅之參考。

材料與方法

東方果實蠅飼養

本試驗蟲源取自國立中興大學，為實驗室建立之穩定族群。東方果實蠅羽化後 15–20 d，即以內壁塗抹番石榴果汁的產卵誘集器誘使雌蟲產卵，幼蟲以人工飼料 (Chiu 1978) 飼育於上方覆蓋黑布的塑膠四方盆中，成蟲飼養於 30 cm × 30 cm × 30 cm 養蟲箱內 (博視有限公司，台灣台中市)，並以含水海綿供給水分，以酵母抽出物：蛋白腺：糖 = 1：1：1 作為成蟲飼料餵食。幼蟲與成蟲飼育環境，則維持在溫度 28℃ ± 1℃、光週期 12D：12L。

東方果實蠅產卵偏好選擇試驗

試驗中自『植物保護手冊』中選擇 4 種作用機制不同、均可用於防治柑橘有害生物之化學藥劑，進行室內東方果實蠅產卵偏好選擇試驗 (choice test)，並以 3 種稀釋倍數之印楝素作為正對照組。試驗藥劑名稱、劑型與試驗用濃度分別如下：以 2.4% 第滅寧水懸劑稀釋 1,500× (台灣拜耳股份有限公司，台灣桃園市)、50% 馬拉松乳劑稀釋 800× (國豐化學工業股份有限公司，台灣桃園市)、30% 賜派芬水懸劑稀釋 5,000× (台灣拜耳股份有限公司，台灣桃園市)、2% 阿巴汀乳劑稀釋 2,000× (國豐化學工業股份有限公司，台灣桃園市)，以及稀釋 10×、100× 與 1,000× 共 3 種濃度之 4.5% 印楝素乳劑 (台灣科研生物技術有限公司，台灣台中市) 等 5 種藥劑、7 種處理組，與無藥劑處理之對照組進行選擇性試驗。藥劑處理是將柳橙果實浸泡於選定藥劑中 10 s 後取出，並置於室溫下自然晾乾 2 h；而對照組則是浸泡 1 次過濾水中 10 s，同樣置於室溫下自然晾乾 2 h。東方果實蠅產卵偏好選擇試驗，取 25 隻羽化後 15 d 的東方果實蠅雌性成蟲置入 24.5 cm × 24.5 cm × 63.0 cm 養蟲箱 (博視有限公司，台灣台中市) 作為 1 試驗重複，每藥劑處理使用 5 組養蟲箱重複。取藥劑處理過的柳橙果實與對照組果實各 1 個，於養蟲箱中相隔 45 cm 對置放入，養蟲箱上方放置成蟲飼料與含水海綿餵食，考量一齡幼蟲約 36 h 孵化，為避免幼蟲孵化造成實驗數據計算複雜，因此試驗於室溫下觀察 30 h 後取出柳橙，再分別計算各果實上的產卵孔數及每孔中果實蠅卵數。

印楝素處理之柳橙果實品質分析與官能品評

選取 32 顆柳橙果實以電子天秤秤重後逢機分為 4 組、每組 8 顆果實分別浸泡於 1 次過濾水、稀釋 10×、100×、1,000× 4.5% 之印楝素乳劑 10 s 後，果蒂朝上置於室溫下自然晾乾。晾乾後的果實逐一以 PE 袋包覆，置於室溫下貯放 7 d 後，自各處理逢機取 5 顆果實秤重計算單果失重率並分析果實品質，剩餘果實作官能品評與拍照記錄用。失重率公式為：

$$\text{失重率 (\%)} = \left[1 - \frac{\text{貯放 7 日後果實重 (g)}}{\text{處理前果實重 (g)}}\right] \times 100\%$$

柳橙果實品質分析項目，包含果皮厚、果汁率、可溶性固形物於可滴定酸含量。果實剝開後，以 0.01 mm 厚度計 (Teclock, Japan) 量測果皮厚；果球剝瓣後以電動榨汁機 (Braun, MPZ6, USA) 榨汁過濾秤其果汁重，柳橙果汁重占果實重量之百分率即為果汁率。果汁中可溶性固形物含量以手提式曲折計 (Atago, Japan) 測定，果汁可滴定酸含量則取 5 mL 果汁加 95 mL 蒸餾水與 1 滴酚酞指示劑，再以 0.1 N NaOH (Sigma, USA) 標準液滴定至溶液自無色轉呈粉紅色，換算為每 100 mL 果汁中檸檬酸 (citric acid) 含量。

5 位受試者 (年齡 28–38 歲，2 名男性、3 名女性) 分別品嘗浸泡過稀釋 10×、100×、1,000× 印楝素和對照柳橙，依個人觀感對柳橙的酸味、甜味、果汁率、口感、風味從 1–5 分，從酸味、甜味與風味最淡，果汁最少與口感最差者評為 1 分，最優則評為 5 分，並記錄受試者是否感受柳橙果實呈現異味。

統計分析

東方果實蠅產卵偏好選擇試驗，參考 Silva *et al*. (2012) 的公式，分別以果實上產卵孔數與產卵數計算 7 種處理組合 (每處理組合含藥劑處理組及對照組各 1 顆柳橙) 之各養蟲箱中東方果實蠅對柳橙果實穿刺與產卵行為之忌避指數 (deterrence index; DI) 與分類區間 (classification intervals; CI)，計算方式分別如下：

$$DI = \frac{2 \times G}{G + P}$$

G：經藥劑處理果實上東方果實蠅產卵孔數/卵數。
P：對照組果實上東方果實蠅產卵孔數/卵數。

$$CI = 1 \pm t_{(4;\ \alpha = 0.05)} \times \frac{sd}{\sqrt{5}}$$

t：Student's t-test 在雙尾檢定 ($\alpha = 0.05$) 的 t-value。
sd：DI 的標準差。

計算結果 DI < CI 表示藥劑對東方果實蠅產卵行為有忌避效果，DI 介於 CI 上、下限區間表示藥劑無忌避效果，DI > CI 表示藥劑對東方果實蠅產卵行為有誘引效果。

東方果實蠅產卵偏好選擇試驗中，東方果實蠅於不同藥劑處理組的死亡率、柳橙果實品質分析各項目結果，以 SAS 統計軟體 (SAS Institute, USA) 的 ANOVA 程式分析，並以最小顯著差異 (least significance difference; LSD) 比較各處理間是否存有顯著差異。死亡率、失重率與果汁率等數據於分析前先經反正弦角度轉換 (arcsine transformation)。

結果

東方果實蠅產卵偏好選擇試驗中，放入 2.4% 第滅寧水懸劑稀釋 1,500× 果實的養蟲箱中，共有 91.2% 東方果實蠅死亡，顯著地高於 50% 馬拉松乳劑稀釋 800× 處理組 (蟲死亡率 72.8%)、2% 阿巴汀乳劑稀釋 2,000× 處理組 (蟲死亡率 35.2%)，在 30% 賜派芬水懸劑稀釋 5,000× 與 3 種稀釋倍數 4.5% 印楝素乳劑處理間的蟲死亡率最低，介於 2.4–10.4% 間 (表 1)。相較於賜派芬與印楝素處理，東方果實蠅暴露於放有第滅寧、馬拉松或阿巴汀處理果實之養蟲箱，其死亡率皆明顯提升 (表 1)。

分別以產卵孔數及產卵數計算東方果實蠅對柳橙穿刺行為與產卵行為的忌避效果，結果顯示 2.4% 第滅寧水懸劑稀釋 1,500× 處理組與稀釋 10×、100× 4.5% 印楝素乳劑處理組其 DI < CI (表 1)，可觀察到經藥劑處理之柳橙果實上的產卵孔數少於對照果實上產卵孔數，推測這 3 種藥劑處理對果實蠅停落穿刺行為有忌避效果；而以蟲卵數計算 DI 與 CI 值，除第滅寧處理果實上未見東方果實蠅產卵而不列入計算外，其餘包含 2% 阿巴汀乳劑稀釋 2,000× 處理與 3 種稀釋倍數 4.5% 印楝素乳劑處理的 DI < CI (表 1)，顯示這些處理減少了東方果實蠅於柳橙中的產卵量。相對地在 50% 馬拉松乳劑稀釋 800× 處理組與 30% 賜派芬水懸劑稀釋 5,000× 處理組中的 DI 均落於 CI 上、下限界間 (表 1)，東方果實蠅於藥劑處理與對照果實的產卵孔數、產卵數無明顯差異。

經稀釋 10×、100×、1,000× 3 種 4.5% 印

表 1. 5 種化學藥劑處理柳橙果實對於東方果實蠅穿刺率、產卵率與其死亡率的影響。

Table 1. Effects of 5 chemicals on oriental fruit fly puncture and oviposition to sweet orange and its mortality.

Insecticide	Mortality (%)	Punctures no. per fruit		Deterrence index (puncture)	Classification index (puncture)		Punctures inhibitor	Egg no. per fruit		Eggs per punctures		Deterrence index (oviposition)	Classification index (oviposition)		Oviposition inhibitor
		+[z]	-		Upper	Lower		+	-	+	-		Upper	Lower	
Deltamethrin	91.2 a[y]	0.2	2.8	0.083	1.265	0.735	Y[x]	0.0	534.2	0.0	190.8	0.000	N/A	N/A	N/A
Malathion	72.8 b	2.6	3.6	0.977	1.499	0.501	N	349.2	373.0	134.3	103.6	0.989	1.494	0.506	N
Spirodiclofen	3.2 d	2.4	2.8	0.980	1.356	0.644	N	658.4	524.6	274.3	187.4	1.109	1.494	0.506	N
Abamectin	35.2 c	1.4	3.4	0.540	1.689	0.311	N	83.0	560.8	59.3	164.9	0.386	1.551	0.449	Y
Azadirachtin															
10× diluted	2.4 d	1.2	7.8	0.217	1.270	0.730	Y	36.2	1,668.8	30.2	213.9	0.036	1.096	0.904	Y
100× diluted	10.4 d	1.2	7.2	0.270	1.243	0.757	Y	105.2	1,604.8	87.7	222.9	0.106	1.138	0.862	Y
1,000× diluted	8.8 d	3.4	5.0	0.747	1.593	0.407	N	323.2	1,653.8	95.1	330.8	0.307	1.312	0.688	Y

[z] The insecticides treated (+) or the control (-) within each cages.
[y] Mean with the same letters referred to no significant difference by the LSD test at $P < 0.05$.
[x] Inhibition effects of the insecticide on puncture/oviposition. Abbreviations: Y: has inhibition effects; N: no obvious influence; N/A: analysis was not available.

楝素乳劑處後，並貯放 7 d 之柳橙果實，稀釋 10× 印楝素處理柳橙果實果皮上具有光澤感，但果實頂有明顯褐化藥斑，縱切面明顯看出藥斑造成色素層 (flavedo) 與絨層 (albedo) 凹陷 (圖 1)。果實品質部分，對照組與各處理間果實單果重並無顯著差異，但稀釋 10× 印楝素處理果實失重率達 3.45%，高於失重率介於 2.45–2.61% 的對照與其他濃度處理。果汁重與果汁率，則以對照組最高、稀釋 1,000× 處理組最低。果皮厚度、可溶性固形物與可滴定酸含量於各處理間，則無顯著差異 (表 2)。柳橙果實經 5 位受試者官能品評，均表示稀釋 10× 印楝素處理的果實具有異味，並評寫該組果實甜味低、酸味高且風味差；有 3 位受試者認為稀釋 100× 印楝素處理果實呈現異味，而在稀釋 1,000× 印楝素處理果實與對照組中無此現象，且兩者風味評價接近 (表 3)。

討論

目前東方果實蠅防治方式已導入區域共同防治與整合性管理觀念，藉由密度監測搭配滅雄、食物誘殺技術、落實田間清潔，可有效降低東方果實蠅的數量 (Huang *et al*. 2008)，惟田間果實蠅族群密度升高時，化學藥劑仍是快速有效的防治方法。登記於『植物保護手冊』的柑橘類果實，能直接施用在東方果實蠅的防治藥劑為 2.4% 第滅寧水懸劑，但於柑橘類作物栽培管理過程施用的其他藥劑，對東方果實蠅是否亦有防治效果為本次試驗重點。藥效試驗顯示，果實於 2.4% 第滅寧水懸劑的處理後防治效果最佳，對東方果實蠅死亡率達 91.2%。試驗數據 (DI < CI) 顯示，第滅寧處理造成東方果實蠅無法有效完成穿刺行為與產卵，具有良好的保護效果。然而，試驗過程中觀察到東方果實蠅仍會於藥劑處理果實上停落，故以觸殺效果取代忌避效果稱之或許較為合適。在置有馬拉松處理果實之養蟲箱，有 72.8% 東方果實蠅死亡，顯示該藥劑對東方果實蠅有毒殺效果，但產卵偏好選擇試驗結果顯示，該藥劑無忌避效果，仍會造成柳橙果實受害。然若馬拉松配合蛋白質水解物使用，同時誘引並毒殺雌蟲與雄蟲，可藉此提高東方果

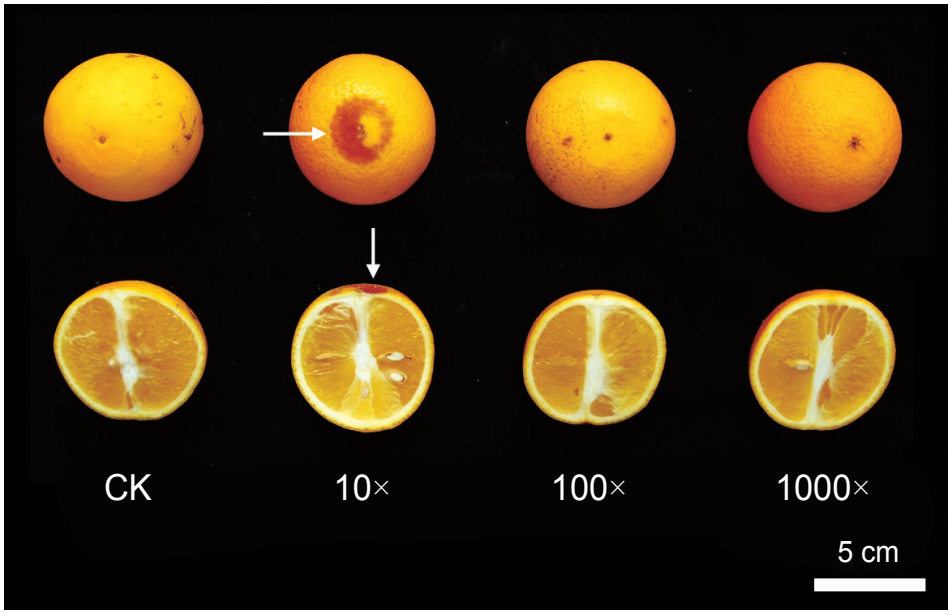


圖 1. 不同濃度印楝素處理後並儲藏 7 d 之柳橙外觀與剖面照，其中 10× 印楝素處理之果實可於果實底部觀察到果實表面出現壞疽狀的塌陷的藥害 (箭頭所指處) 症狀。

Fig. 1. The morphology of sweet orange after 7 d storage by treated with different concentrations of azadirachtin, especially the fruit treated with high concentration of azadirachtin revealed severely collapse (indicated by arrows) in the surface of fruit.

表 2. 使用不同濃度印楝素處理果實並儲藏 7 d 後之果實品質分析。

Table 2. Fruit quality of sweet oranges after 7 d storage by treated with different concentrations azadirachtin.

Insecticide	Original fruit weight (g)	Post storage fruit weight (g)	Water loss (%)	Peel thickness (mm)	Juice weight (g)	Juice rate (%)	Total soluble solids (°Brix)	Titratable acidity (%)
Control	118.78 a[z]	115.88 a	2.45 b	3.26 a	48.3 a	41.6 a	12.72 a	0.26 a
Azadirachtin								
10× diluted	116.19 a	112.18 a	3.45 a	3.53 a	41.2 ab	36.9 ab	11.90 a	0.30 a
100× diluted	116.08 a	113.15 a	2.53 b	3.70 a	43.3 ab	38.2 ab	12.40 a	0.32 a
1,000× diluted	115.95 a	112.93 a	2.61 b	3.65 a	39.3 b	34.7 b	12.18 a	0.30 a

[z] Mean with the same letters referred to no significant difference by the LSD test at $P < 0.05$.

表 3. 不同濃度印楝素處理後柳橙果實官能品評結果。

Table 3. The organoleptic evaluation of sweet oranges after different azadirachtin concentration treatments.

Insecticide	Sour	Sweet	Juicy	Texture	Flavor	Peculiar taste
Control	1.2	2.6	2.9	2.6	3.6	N[z]
Azadirachtin						
10× diluted	1.9	2.0	2.8	2.2	1.3	Y
100× diluted	1.2	1.8	2.6	2.4	1.8	Y (3/5 subjects)
1,000× diluted	1.3	3.3	2.7	2.4	3.4	N

[z] Sweet orange fruit has peculiar taste (Y) or not (N) answered by 5 subjects.

實蠅之誘殺率 (Cornelius *et al*. 2000a, 2000b; Chen *et al*. 2001)。前述結果與在甜瓜實蠅 (*Dacus ciliatus* Loew) 及瓜實蠅 (*Bactrocera cucurbitae* Coquillett) 上藥劑試驗結果相似，合成除蟲菊類藥劑對果實蠅科害蟲具有擊昏 (knock-down) 作用而產生果實保護的效果，有機磷類藥劑則無法有效地保護果實不受危害 (Maklakov *et al*. 2001; Dong *et al*. 2002)。此外，阿巴汀雖然為抗生素類的藥劑，但過去果實蠅藥劑試驗指出該藥劑具有使果實蠅接觸死亡效果 (Albrecht & Sherman 1987; Dong *et al*. 2002)，與本研究結果相符；阿巴汀處理未能減少果實蠅穿刺產卵行為，但可觀察到處理後果實中果實蠅的產卵數減少。相較於前述 3 項藥劑，賜派芬則完全沒有毒殺東方果實蠅與產生忌避的效果。

過去研究結果顯示，高濃度的印楝素對於東方果實蠅、瓜實蠅與地中海果實蠅 (*Ceratitits capitata* Wiedemann) 具有產卵忌避效果 (Chen *et al*. 1996; Singh & Singh 1998; Silva *et al*. 2012)。本試驗之正對照組使用高濃度印楝素 (稀釋 10× 與 100×) 處理，顯示對果實蠅有極強的忌避效果，使得果實上的產卵孔數與產卵量明顯減少；低濃度印楝素 (稀釋 1,000×) 處理並未減少東方果實蠅於柳橙上產卵孔數，但能有效抑制果實蠅產卵量。印楝素對於果實蠅並無毒殺效果，這與 Dong *et al*. (2002) 與 Singh & Singh (1998) 於瓜實蠅試驗結果相同。印楝素作用機制特殊，可造成鱗翅目害蟲拒食及幼蟲生長抑制 (Hasan & Ansari 2011)，有潛力成為未來於柑橘栽培管理整合防治的候選藥物之一。本試驗亦評估印楝素處理後的柳橙果實，對果實外觀、品質之影響。在果實品質分析結果中，處理組與對照組間於處理前、處理過後貯放 7 d 之單果重、果皮厚、可溶性固形物、可滴定酸含量等均無顯著差異，但 10× 印楝素處理果實失重率顯著高於其他 3 組果實，官能品評受訪者均表示該組果實有明顯異味存在，並認為果肉甜味較低、酸味較高且風味為 4 組中最差。此外，10× 印楝素處理的果實，頂部出現明顯凹陷藥斑，推測在果實浸藥處理後晾乾過程因高濃度藥液堆積所致。高濃度印楝素處理過的果實出現失重、外觀呈現藥斑、果實品質劣化等狀況，均會造成果品價值喪失或減損，即使採 100× 印楝素處理，部分受試者依然反應果實具有不良異味，因此不推薦直接施用高濃度印楝素作為防治處理方式。

評估以上不同作用機制於東方果實蠅的藥劑防治效果，以第滅寧與印楝素兩種效果最佳。第滅寧於 2014 年通過延伸使用在柑橘東方果實蠅防治上，可擊昏並觸殺東方果實蠅避免果實受害，本試驗亦顯示對柑橘果實有極佳的保護效果。惟『植物保護手冊』推薦本藥劑用於柑橘類所定之安全採收期為 30 d，田間使用需注意藥劑殘留問題。印楝素雖具忌避東方果實蠅產卵的效果，但是高濃度施用可能造成果實風味的異變及果實外表損害等不良反應，而降低作物商品價值，因此未來可嘗試發展如配合誘殺等其他防治方法，以達到降低東方果實蠅於果園中危害。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會 104 農科-9.4.2-農-C1 (3) 計畫補助，國立中興大學昆蟲學系昆蟲生理生化研究室路光暉教授提供試驗用東方果實蠅來源，並感謝林玄學先生、黃瓊慧小姐及林永華小姐協助試驗工作。

引用文獻

Albrecht, C. P. and M. Sherman. 1987. Lethal and sublethal effects of avermectin B1 on three fruit fly species (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 80:344–347.

Chen, C. C., Y. J. Dong, H. C. Wen, Y. Y. Chuang, T. C. Yang, and K. Y. Ho. 2010. Field evaluation of the trapping efficacy of a paste formulation of methyl eugenol for the oriental fruit fly. Formosan Entomol. 30:65–76. (in Chinese with English abstract)

Chen, C. C., Y. J. Dong, and L. L. Cheng. 2001. Evaluation of trapping effectiveness of the improved McPhail trap for oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*) (Diptera: Tephritidae). Formosan Entomol. 21:65–75. (in Chinese with English abstract)

Chen, C. C., Y. J. Dong, L. L. Cheng, and R. F. Hou. 1996. Deterrent effect of neem seed kernel extract on ovi-

position of the oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) in guava. J. Econ. Entomol. 89:462–466.

Cheng, M. F. 2005. The control strategies of the oriental fruit fly. p.197–205. *in*: Proceeding of Symposium on the Taiwan Citrus Industry Development. July 20–21, 2005. Chiayi, Taiwan. Department of Horticultural Science, National Chiayi University, Chiayi. (in Chinese)

Chiu, H. T. 1978. Studies on the improvement of mass rearing for oriental fruit flies. Plant Prot. Bull. 20:87–92. (in Chinese with English abstract)

Chuang, Y. Y. and R. F. Hou. 2008. Effectiveness of attract-and-kill systems using methyl eugenol incorporated with neonicotinoid insecticides against the oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 101:352–359.

Clarke, A. R., K. F. Armstrong, A. E. Carmichael, J. R. Milne, S. Raghu, G. K. Roderick, and D. K. Yeates. 2005. Invasive phytophagous pests arising through a recent tropical evolutionary radiation the *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies. Annu. Rev. Entomol. 50:293–319.

Cornelius, M. L., J. J. Duan, and R. H. Messing. 2000a. Volatile host fruit odors as attractants for the oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 93:93–100.

Cornelius, M. L., L. Nergel, J. J. Duan, and R. H. Messing. 2000b. Responses of female oriental fruit flies (Diptera: Tephritidae) to protein and host fruit odors in field cage and open field tests. Environ. Entomol. 29:14–19.

Dong, Y. J., L. L. Cheng, and C. C. Chen. 2002. Laboratory bioassay of 10 insecticides against the melon fly (*Bactrocera cucurbitae*). J. Agric. Res. China. 51:66–72. (in Chinese with English abstract)

Hasan, F. and M. S. Ansari. 2011. Toxic effects of neem-based insecticides on *Pieris brassicae* (Linn.). Crop. Prot. 30:502–507.

Ho, K. Y. and S. C. Hung. 2008. Studies on the effectiveness of spinosad bait attracting the oriental fruit fly at three orchards in Chiayi region. J. Agric. For. (NCYU) 5:1–10. (in Chinese with English abstract)

Ho, K. Y., S. C. Hung, and C. C. Chen. 2007. Attracting effectiveness of spinosad bait in killing the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). Formosan Entomol. 27:147–155. (in Chinese with English abstract)

Ho, K. Y., S. C. Hung, C. C. Chen, and Y. H. Cheng. 2006. Effectiveness of spinosad bait in the control of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), (Diptera: Tephritidae) in citrus orchard. J. Taiwan Agric. Res. 55:101–110. (in Chinese with English abstract)

Huang, Y. B., C. H. Kao, M. Y. Chiang, E. Y. Cheng, and M. C. Lee. 2008. Studies on small model area-wide control of the oriental fruit fly for citrus. J. Taiwan Agric. Res. 57:63–73. (in Chinese with English abstract)

Huang, Y. B., T. M. Chou, M. Y. Chiang, Y. S. Hsieh, Y. T. Hung, P. L. Chen, and R. J. Chang. 2013. Integrated Pest Management and Control Tactics of the Oriental Fruit Fly. Taiwan Agricultural Research Institute. Taichung, Taiwan. 115 pp. (in Chinese)

Hung, S. C., K. Y. Ho, and C. C. Chen. 2008. Investigation of fruit damages of litchi caused by *Conopomorpha sinensis* bradley and *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in Chiayi. J. Taiwan Agric. Res. 57:143–152. (in Chinese with English abstract)

Hwang, Y. B., C. H. Kao, and E. Y Cheng. 1997. The monitoring and control of the oriental fruit fly in Taiwan. Plant Prot. Bull. 39:125–136. (in Chinese with English abstract)

Maklakov, A., I. Ishaaya, A. Freidberg, A. Yawetz, A. R. Horowitz, and I. Yarom. 2001. Toxicological studies of organophosphate and pyrethroid insecticides for controlling the fruit fly *Dacus ciliatus* (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 94:1059–1066.

Metcalf, R. L. and E. R. Metcalf. 1992. Plant Kairomones in Insect Ecology and Control. Chapman & Hall. New York. 168 pp.

Silva, M. A., G. C. D. Bezerra-Silva, J. D. Vendramim, and T. Mastrangelo. 2012. Inhibition of oviposition by neem extract: A behavioral perspective for the control of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). Fla. Entomol. 95:333–337.

Singh, S. and R. P. Singh. 1998. Neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts and azadirachtin as oviposition deterrents against the melon fly (*Bactrocera cucurbitae*) and the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*). Phytoparasitica 26:191–197.

Steiner, L. F., W. G. Hart, E. J. Harris, R. T. Cunningham, K. Ohinata, and D. C. Kamakahi. 1970. Eradication of the oriental fruit fly from the Mariana Islands by the methods of male annihilation and sterile insect release. J. Econ. Entomol. 63:131–135.

The Control Efficacy on Oriental Fruit Fly (*Bactrocera dorsalis*) with Five Insecticides of Different Modes of Action in 'Liucheng' Orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Liucheng]

Hui-Zhen Lu[1], Tai-Chuan Wang[2], Shou-Horng Huang[3], and Chi-Nan Chen[4,*]

Abstract

Lu, H. Z., T. C. Wang, S. H. Huang, and C. N. Chen. 2016. The control efficacy on oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*) with five insecticides of different modes of action in 'Liucheng' orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Liucheng]. J. Taiwan Agric. Res. 65(2):109–116.

The oriental fruit fly [*Bactrocera dorsalis* (Hendel)] is one of the most important pests in the world. The females lay eggs into fruit surface and hatch, then the larvae cause the damages of fruit dropping. Chemical control is widely used to manage the problem of oriental fruit flies by its low cost and fast control compared with other practices. This study focused on effects of some registered insecticides, which were used for pest management of sweet orange (*Citrus sinensis*) in Taiwan before. The fruits were dipped with 2.4% deltamethrin SC (1,500×), 50% malathion EC (800×), 30% spirodiclofen SC (5,000×), 2% abamectin EC (2,000×) in choice test. 4.5% azadirachtin EC in 10×, 100×, and 1,000× were used as positive control of deterrent oviposition, and water was used as negative control. The results showed that the females directly died by the treatments of deltamethrin, malathion and abamectin. The treatment of deltamethrin almost prevented the females from penetrating and laying eggs. The treatment of abamectin also suppressed laying eggs to fruit effectively. However, the treatment of malation did not have any oviposition deterrence effect. The treatment of azadirachtin could not kill the oriental fruit flies, but it reduced the numbers of laying eggs in oranges. In addition, the laying eggs decreased with the increasing of the concentrations of azadirachtin. Both 10× and 100× diluted azadirachtin revealed the greatest repellent effect in our experiment. The fruit quality and sensory evaluation for fruits were conducted after the application of insecticides. Drug spots appeared on the surface, and weight loss and odd smell were observed on the fruit treated with 10× azadirachtin. Overall, the deltamethrin was better than other insecticides for the control of oriental fruit flies in this study. Azadirachtin can inhibit the oviposition of oriental fruit fly, but inappropriate concentration of insecticides may affect fruit appearance and its quality. Therefore, the repellent treatment of azadirachtin integrated with other field techniques may have the potential to develop a new control method of oriental fruit fly in the future.

Key words: *Bactrocera dorsalis*, Citrus, Insecticide efficacy, Fruit quality analysis.

Received: May 26, 2015; Accepted: August 3, 2015.

* Corresponding author, e-mail: cnchen@dns.caes.gov.tw

[1] Contract employee, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[2] Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[3] Associate Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[4] Assistant Research Fellow, Department of Horticulture, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(2):117–127 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06502.02

研究報告

花椰菜「台農 1 號」之育成

羅惠齡[1] 林楨祐[1] 王三太[2,*] 陳甘澍[3] 許秀惠[4] 沈再發[5]

摘要

羅惠齡、林楨祐、王三太、陳甘澍、許秀惠、沈再發。2016。花椰菜「台農 1 號」之育成。台灣農業研究 65(2):117–127。

花椰菜「台農 1 號」由行政院農業委員會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所於 2002 年至 2010 年進行品系比較試驗及區域試驗，並進行花球儲藏試驗，再先後於 2012 年 7 月取得品種權、2013 年 10 月辦理品種授權。本品種適合台灣秋冬季栽培，具早生特性，生育日數為 55–65 d，花球蕾粒細密、品質佳，富含花青素且不易產生蕾葉，為台灣消費者喜愛的青骨鬆花品種。又因平均蕾球重為 660 g，適於小家庭食用。「台農 1 號」在播種後 10 d、25 d 的芽、苗期全株之酚類化合物含量 (total phenol)、FRAP (free reducing ability of plama) 還原能力及 Trolox 等價抗氧化能力 TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) 等，均較對照的日本商業品種為高。「台農 1 號」花球包在塑膠袋內置於 4℃冰箱儲藏 14 d、24 d，失重率分別為 3.2%、5%，與日本商業品種相當。綜此試驗數據，「台農 1 號」花椰菜新品種可提供消費者新選擇。

關鍵詞：台農 1 號、新品種、紫花椰菜。

前言

花椰菜 (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) 為十字花科蔓苔屬的重要蔬菜。近年有白色花球品種，還有黃橙色、綠色及紫色等多色的花椰菜 (multicolor cauliflower)，不僅增加顏色變化吸引消費者，並因所含色素提升品種的營養成分及人體之保健效益。其中，紫花椰菜品種在台灣只有種苗商從國外進口商業品種種子，供少數農民栽培生產，但進口種子昂貴增加農民生產成本。為了增加蔬菜生產市場的多樣化，提供消費者新的選擇，希望能選育出適合秋冬季栽培的紫花椰菜。行政院農委會農業試驗所鳳山分所沈再發前分所長乃於 1979 年自英國引進 25 個優良紫花椰菜品種，經長期選育工作而選出 Cauliflower Sicilion 'Purple Late' 及 Sicilion Purple selection 'Early Autumn' 兩品系適合南台灣秋冬季栽培。又經鳳山分所多年之選拔馴化，從這兩個品系中選拔早生及結花球情形良好的單株，自 1998–2001 年進行自交系選拔，選育出適合台灣地區栽培的新品系 A20-1-3-9。另經區域試驗及採後儲藏試驗，而於 2012 年 5 月通過農委會蔬菜品種審議委員會審查，同年 7 月 20 日取得花椰菜新品種「台農 1 號」之品種權，並於 2013 年 10 月辦理品種授權，授權廠商為農友種苗公司及慶農種苗公司。

材料與方法

品系比較試驗

以花椰菜新品系 A20-1-3-9、2001-042-

投稿日期：2015 年 4 月 14 日；接受日期：2015 年 9 月 8 日。
* 通訊作者：stwang@fthes-tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所蔬菜系助理研究員。台灣 高雄市。
[2] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所蔬菜系研究員兼主任。台灣 高雄市。
[3] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所研究員兼分所長。台灣 高雄市。
[4] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植物保護系研究員兼主任。台灣 高雄市。
[5] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所前分所長。台灣 高雄市。

1、2001-043-2 為試驗材料，2002 年以日本商業品種 'TI-168' 及加拿大引進的 'Purple Cape' 為對照品種。'Purple Cape' 為耐寒品種，在台灣南部氣候不結花球，因此 2003 年以 'TI-168' 及 'Rosalind' 為對照品種。2002 及 2003 年在鳳山熱帶園藝試驗分所分別於 10 月播種、11 月定植，試驗採逢機完全區集設計，4 重複。試驗畦長 10 m，畦寬 1 m，雙行植，行距 0.5 m，株距 0.8 m，小區面積 10 m^2，每重複 25 株。花球大小達採收時，調查全區產量、定植至採收天數、花蕾粗細及花蕾顏色。每小區採樣 10 株，調查株高、花球高、花球重、花球徑與收穫率。調查結果以 SAS (SAS Enterprise Guide 4.1) 進行統計分析。

區域試驗

為評估花椰菜新品系 A20-1-3-9 於不同試驗地區之產量與生育表現，分別於 2004–2008 年間在鳳山熱帶園藝試驗分所及新港地區進行區域試驗。新港地區之試驗於 2004 年 8 月播種、9 月定植；在鳳山分所之試驗於 2005–2008 年期間，均為 9 月播種、10 月定植。試驗採逢機完全區集設計，4 重複，畦長 10 m，畦寬 1 m，雙行植，行距 0.4 m，株距 0.8 m，小區面積 10 m^2，每重複 25 株。採收時每小區逢機採樣 10 株，調查株高、花球重、花球徑，並且採收全區植株以調查小區產量，並換算為每公頃產量。調查結果皆以 SAS (SAS Enterprise Guide 4.1) 軟體進行統計分析。

植株園藝性狀調查

花椰菜 A20-1-3-9 之植株性狀調查，以日本瀧井種苗公司之 'TI-168' 與野崎採種場之「紫雲」為對照品種，在露天環境下評估。小區面積 1 m × 10 m，試驗採逢機完全區集設計，4 重複。2009 年 11 月 4 日定植，A20-1-3-9 於 2010 年 1 月 7 日至 1 月 12 日 (定植後 64–69 d) 採收，對照品種 'TI-168' 於 1 月 15 日至 1 月 18 日 (定植後 72–75 d) 採收，「紫雲」於 1 月 20 日至 1 月 25 日 (定植後 77–82 d) 採收。採收時每小區調查 10 株，共 40 株，調查其的株高、葉色、葉數、葉長、葉寬 (葉片性狀調查為植株從地上部算起地 3 片葉)、葉形、花球重、花球徑及花球高。

苗菜用途抗氧化力評估

參試 5 個品種為花椰菜 A20-1-3-9、 'TI-168' 及「紫雲」與白花椰菜 'SP-51' 及「50 天春夏花椰菜」當作對照品種，1 月 12 日播種，播種後 25 d 採收，採樣約 200–300 株。洗淨晾乾後放入生機調理機中攪碎成泥狀，放入 50 ml 離心管中，離心機以 RCF (離心力) 5,590× *g* 快速離心，取上清液置於 4℃冰箱備用，每品種 3 重複，進行維他命 C 含量、DPPH (5,2,2-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) 清除力、酚類化合物、FRAP 還原能力 (free reducing ability of plasma) 及 Trolox 等價抗氧化能力 (Trolox equivalent antioxidant capacity; TEAC) 分析。

芽菜抗氧化力評估

花椰菜 A20-1-3-9 芽菜進行抗氧化能力測定。參試 5 個品種為花椰菜「台農 1 號」、A20-1-3-9、'TI-168' 及「紫雲」與白花椰菜「麗雪」，以「美國青花椰菜」當作對照品種，3 月 19 日播種，播種後 10 d 採收。採樣約 300–500 株，洗淨晾乾後放入生機調理機中攪碎成泥狀，，離心機以 RCF (離心力) 5,590× *g* 快速離心，取上清液置於 4℃冰箱備用，每品種 3 重複，進行維他命 C 含量、DPPH 清除力、酚類化合物、FRAP 還原能力及 Trolox 等價抗氧化能力 (TEAC) 分析。

花球花青素含量試驗

花椰菜 A20-1-3-9 進行花青素含量測定，共 4 個參試品種 (系)，包括花椰菜 A20-1-3-9、'TI-168'、「紫雲」及市售白花椰菜 (對照品種)。新鮮樣品取花頂端以下 0.3–0.4 cm 為試驗材料，試驗量為 1.0 g，每品種 3 重複。加入 99 mL 乙醇 (70%) 及 1 mL 之 HCl (1%)，於 4℃黑暗中萃取 48 h 後，取上清液利用分光光譜儀 (HITACHI U2000) 測定吸光值，以空白液做歸零校正，測定花青素含量。

煮後品評試驗

花椰菜 A20-1-3-9 利用水煮及微波兩種烹

煮方式進行煮後品評試驗。水量為 500 mL，花球量為 300 g，水煮方式為水滾後放入花球，水煮時間分為 1.5、2、2.5 及 3 min。微波功力 700 W，微波時間分為 3、3.5、4、4.5 及 5 min 處理，比較水煮及微波兩種烹煮方式 A20-1-3-9 顏色及口感之差異。顏色分為紫色、淡紫色及綠色。口感分為軟、硬及脆。品評方式為逢機尋找 10 人進行官能品評試吃，試吃後填寫問卷並做資料統計。

花球貯藏試驗

花椰菜 A20-1-3-9 與對照品種 'TI-168' 及「紫雲」進行花球貯藏性試驗。花球採收後除葉、稱重，置入 20 L 中型聚乙烯塑膠袋中包好。一袋裝 10 顆花球，放入 4℃冰箱中貯藏 14、24 及 34 d 後，分別取出調查花球重量，計算失重率。

失重率 (%)
= [(貯藏前鮮重 − 貯藏後鮮重)/貯藏前鮮重] × 100%。

結果

品系比較試驗

2002 年紫花椰菜品系比較試驗結果，如表 1 所示，球高、球重、球徑及產量等 4 項性狀差異達 1% 顯著水準，A20-1-3-9 之花球高度較對照品種 'TI-168' 矮、球重較重、球徑較粗；'Purple cape' 品種則不結花球。2003 年紫花椰菜品系比較試驗結果，如表 2 所示，株高性狀達 5% 顯著水準，花球高度、花球重量及產量等 3 項性狀達 1% 顯著水準。A20-1-3-9 之植株較對照品種 'Rosalind' 高、花球較高、花球較輕與產量較低，但生育日數相差 20 d 以上；A20-1-3-9 較對照品種 'TI-168' 差異不顯著。

綜合兩次品系比較試驗結果，A20-1-3-9 與對照品種 'TI-168' 產量無顯著差異，但在花球高度及生育日數有差異，故入選進行後續區域試驗。

區域試驗

A20-1-3-9 於 2004–2008 年間在鳳山分所之區域試驗結果，如表 3 所示。與對照品種 'TI-168' 比較，株高方面於 2006 及 2008 年達 5% 以上差異顯著水準，其餘年度差異未達 5% 顯著水準。花球高度除 2008 年較 'TI-168' 矮外，其餘年度差異不顯著。在花球重方面，除了 2006 年試驗差異未達 5% 顯著水準，其餘年度皆達 5% 以上差異顯著水準，A20-1-3-9 之花球重低於 'TI-168'。莖粗差異不顯著。產量方面，2006 年試驗差異未達 5% 顯著水準，其餘年度皆達 5% 以上差異顯著水準，A20-1-3-9 產量低於 'TI-168'。A20-1-3-9 之定植至採收天數為 50–70 d，屬於中生品種；'TI-168'

表 1. 2002 年紫花椰菜新品系比較試驗。

Table 1. New purple cauliflower varieties test in 2002[z].

Variety	Plant height (cm)	Curd height (cm)	Curd weight (g)	Curd diameter (cm)	Yield (Mg ha^{-1})	Cultivation period (days after planting)
A20-1-3-9	74.4	33.5	980.5	18.1	11.5	52–58
2001-042-1	73.2	38.1	717.0	17.3	10.2	38–52
2001-043-2	73.5	38.4	679.5	16.9	8.7	40–45
TI-168	78.7	37.0	744.0	17.1	11.3	52–58
Purple cape	74.9	-[x]	-	-	-	-
LSD 0.05	6.2	2.1	129.2	1.5	1.6	
Significant difference[y]	NS	**	**	**	**	

[z] Sowing date: October 5, 2002; planting date: November 9, 2002; survey date: December 31, 2002. Planting location: Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan.
[y] NS, **: the difference was not significant at 0.01 level, respectively.
[x] No curd.

表 2. 2003 年紫花椰菜品系比較試驗。

Table 2. New purple cauliflower varieits test in 2003[z].

Variety	Plant height (cm)	Curd height (cm)	Curd weight (g)	Curd diameter (cm)	Yield (Mg ha^{-1})	Cultivation period (days after planting)
A20-1-3-9	82.2	28.9	852.3	18.4	14.3	52–56
2001-042-1	77.9	28.2	962.5	18.8	16.1	52–69
2001-043-2	74.9	28.8	758.8	17.4	12.7	52–62
Rosalind	71.0	24.7	1693.0	21.2	28.4	83
TI-168	80.4	32.0	856.8	18.5	14.4	56–69
LSD 0.05	7.1	3.4	365.1	2.4	6.1	
Significant differences[y]	*	**	**	NS	**	

[z] Sowing date: October 8, 2003; planting date: November 12, 2003; survey date: January 3, 2004 to February 3, 2004. Planting location: Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan.
[y] NS, *, **: the difference was not significant at 0.05 and 0.01 level, respectively.

表 3. 花椰菜新品系 A20-1-3-9 鳳山地區區域試驗 2004–2008 年結果。

Table 3. Results of regional trial of cauliflower variety/line A20-1-3-9 in Fengshan area in 2004–2008.

Years	Variety/ line	Plant height (cm)	Curd height (cm)	Curd weight (g)	Curd diameter (cm)	Yield (Mg ha^{-1})	Cultivation period (days after planting)
2004	A20-1-3-9	76.5	40.1	355.2*	13.7	5.9*	57
	TI-168	86.6	42.8	467.2	14.3	7.8	70
2005	A20-1-3-9	66.3	29.6	480.0*	18.1*	8.0*	54
	TI-168	68.3	25.7	721.3	21.3	12.0	80
2006	A20-1-3-9	67.4*[z]	28.7	809.7	17.1	13.5	68
	TI-168	77.4	33.3	869.8	17.6	14.5	82
2007	A20-1-3-9	71.2	34.4	595.3*	16.8	9.9*	61
	TI-168	79.6	42.2	721.3	17.5	12.0	79
2008	A20-1-3-9	70.5*	33.7	476.3*	20.9*	7.9*	75
	TI-168	84.4	45.3	706.5	16.1	11.8	89

[z] *significant at 0.05 level with 40 sampling dates using unpaired *t*-test analysis.

為 70–90 d，屬於中晚生品種。新港區域試驗結果，如表 4，球徑達 5% 以上差異顯著水準，其餘性狀差異未達 5% 顯著水準。A20-1-3-9 之球徑較小。A20-1-3-9 之定植至採收天數約 58 d；'TI-168' 為 69 d。雖然新港地區因農民第一次種紫色花椰菜，田間作業掌握不夠，以致產量低，但 A20-1-3-9 之中生種特性仍可呈現，較 'TI-168' 早結花球。綜合鳳山及新港地區之 6 次區域試驗結果，A20-1-3-9 與對照品種 'TI-168' 在花球高度及球徑均差異一般不顯著，在花球重及單位面積產量上較低，比 'TI-168' 顯著較早採收。

表 4. 花椰菜 A20-1-3-9 2004 年新港地區區域試驗結果。

Table 4. Results of A20-1-3-9 regional trial in Shingang area in 2004.

Variety	Plant height (cm)	Curd weight (g)	Curd diameter (cm)	Yield (Mg ha^{-1})	Cultivation period (days after planting)
A20-1-3-9	75.3	349.5	13.0	5.8	58
TI-168	72.0	408.3	14.3	6.8	69

植株園藝性狀

花椰菜 A20-1-3-9 與對照品種 'TI-168' 及「紫雲」的植株性狀，如表 5 所示，A20-1-3-9 株高平均為 72.3 cm，較 'TI-168' 及「紫雲」高。A20-1-3-9 展幅為 73.3 cm，較 'TI-168' 及「紫雲」小，屬中等大小，3 品種間達 5% 以上差異顯著水準。A20-1-3-9 花球下的葉片數平均 22.5 片葉，較 'TI-168' 及「紫雲」為低，顯示較早結花球。植株形態如圖 1、2 所示。花椰菜 A20-1-3-9 與對照品種 'TI-168' 及「紫雲」的葉片性狀調查，如表 6 所示，A20-1-3-9 的葉片較大，其葉長與葉寬比為 2.24，葉為寬倒卵形。A20-1-3-9 葉中肋寬度較 'TI-168' 與「紫雲」為窄。花球性狀如表 7 所示，花椰菜 A20-1-3-9 在花球重、花球高度低於「紫雲」，差異顯著，而與 'TI-168' 沒有顯著差異。A20-

表 5. A20-1-3-9、'TI-168' 與「紫雲」紫花椰菜植株性狀之比較。

Table 5. Comparisons of plant characteristics of purple cauliflower varieties A20-1-3-9, 'TI-168', and 'Shiun'.

Variety	Plant height (cm)	Canopy (cm)	Number of leaves (No.)
A20-1-3-9	72.3 ± 7.1[z]	73.3 ± 11.7	22.5 ± 2.0
TI-168	61.5 ± 6.5	86.7 ± 6.5	25.4 ± 1.8
Shiun	58.9 ± 7.5	96.3 ± 8.6	28.9 ± 2.5

[z] The average and standard deviation of three samples.

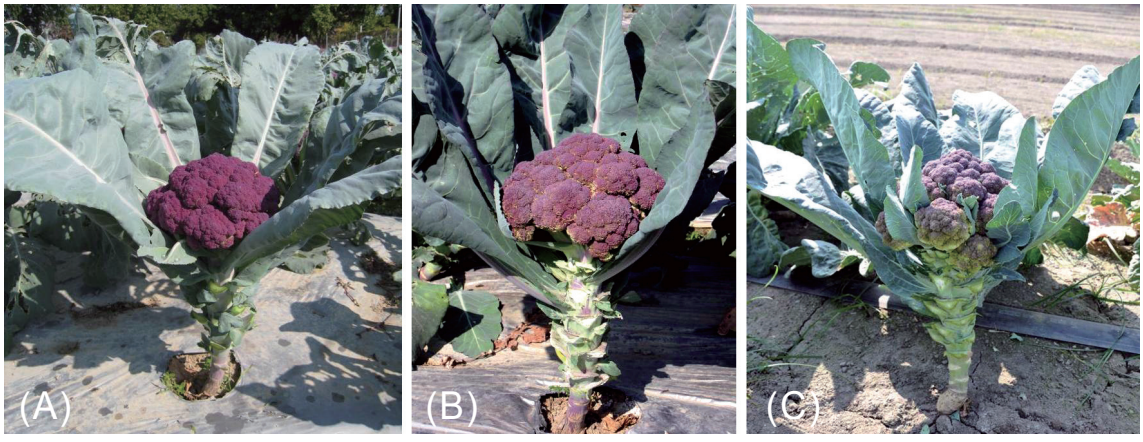


圖 1. 花椰菜 A20-1-3-9 (A)、'TI-168' (B) 及「紫雲」(C) 之植株型態比較。

Fig. 1. Plant characteristics of purple cauliflower varieties A20-1-3-9 (A), 'TI-168' (B), and 'Shiun' (C).



圖 2. 花椰菜 A20-1-3-9 (A) 與 'TI-168' (B) 及「紫雲」(C) 之蕾球型態比較。

Fig. 2. Curds of purple cauliflower varieties A20-1-3-9 (A), 'TI-168' (B), and 'Shiun' (C).

表 6. A20-1-3-9 與 'TI-168' 及「紫雲」葉片差異之調查。

Table 6. Camparisons of leaf characteristics of purple cauliflower varieties A20-1-3-9, 'TI-168', and 'Shiun'.

Variety	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Main pulse (cm)	Petiole length (cm)
A20-1-3-9	59.7 ± 5.9[z]	26.6 ± 2.7	2.5 ± 0.4	15.8 ± 3.4
TI-168	56.8 ± 3.0	24.7 ± 2.3	3.2 ± 0.3	3.0 ± 0.2
Shiun	49.1 ± 3.5	22.1 ± 2.2	3.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0

[z] The average and standard deviation of three samples.

表 7. A20-1-3-9 與 'TI-168' 及「紫雲」之花球性狀。

Table 7. Curd characteristics of purple cauliflower varieties A20-1-3-9, 'TI-168', and 'Shiun'.

Variety	Curd weight (cm)	Curd diameter (cm)	Curd height (cm)
A20-1-3-9	657.1 ± 151.8[z]	18.9 ± 1.7	14.4 ± 2.1
TI-168	691.8 ± 136.9	19.2 ± 2.3	13.6 ± 2.5
Shiun	804.2 ± 310.8	20.5 ± 3.4	17.9 ± 2.5

[z] The average and standard deviation of three samples.

1-3-9 花球平均重 657 g、花球徑 18.9 cm、花球高 14.4 cm。

苗菜用途抗氧化力評估

為評估花椰菜新品系 A20-1-3-9 植株當苗菜之用途，進行花椰菜苗菜抗氧化能力測定。試驗結果如表 8 所示，A20-1-3-9 在總酚化合物含量、FRAP 還原能力及 TEAC 抗氧化能力均較 'TI-168' 及「紫雲」為高。A20-1-3-9 與「紫雲」維他命 C 含量相同，但皆較 'TI-168' 高。在 DPPH 清除力方面，數值越低，代表清除 50% DPPH 能力越佳；供試品種中以 'TI-168' 清除能力較好，其次為 'SP-51' 及「紫雲」品系，A20-1-3-9 在 DPPH 清除力最差。白花椰菜品種在維他命 C 含量、DPPH 清除力、總酚化合物含量、FRAP 還原能力及 TEAC 抗氧化能力均較紫花椰菜品種為高。綜合上述試驗結果，A20-1-3-9 苗菜較 'TI-168' 及「紫雲」有較好的抗氧化能力，但以參試白花椰菜與紫花椰菜相比較，參試白花椰菜苗菜有較好的抗氧化能力。

芽菜用途抗氧化力評估

花椰菜新品系 A20-1-3-9 芽菜進行抗氧化能力測定，試驗結果如表 9 所示。A20-1-3-9 在維他命 C 含量較 'TI-168'、「紫雲」及「美國青花菜」為高，在總酚化合物含量方面，A20-1-3-9 大於 'TI-168' 而小於「紫雲」。在 DPPH 清除力、FRAP 還原能力及 Trolox 等價抗氧化能力 (TEAC) 分析含量均小於 'TI-168' 及「紫

表 8. 花椰菜苗菜抗氧化能力測定。

Table 8. Antioxidant capacity of seedlings in different varieties of cauliflower[z].

Variety	Vit-C (mg %)	DPPH EC50 (μL)	T-phenol (mg mL^{-1})	FRAP (mM %)	TEAC (mM Trolox)
A20-1-3-9	0.65 ± 0.01[y]	541.23 ± 1.77	325.92 ± 0.49	3.44 ± 0.05	3.89 ± 0.18
TI-168	0.46 ± 0.16	517.48 ± 2.24	266.35 ± 0.52	1.79 ± 0.01	2.69 ± 0.04
Ziyun	0.65 ± 0.01	521.74 ± 1.05	248.05 ± 1.00	1.88 ± 0.06	0.97 ± 0.01
SP-51	1.30 ± 0.01	521.20 ± 0.30	360.45 ± 0.89	2.46 ± 0.01	4.27 ± 0.03
50 days spring summer cauliflower	1.82 ± 0.29	527.81 ± 1.75	343.67 ± 1.65	2.98 ± 0.02	4.14 ± 0.11

[z] Seedlings are grown twenty-five days after planting.
[y] The average and standard deviation of five samples.

表 9. 花椰菜芽菜抗氧化能力測定。

Table 9. Antioxidant capacity of sprout in different carieties of cauliflower and broccoli[z].

Variety	Vit-C (mg %)	DPPH EC50 (μL)	T-phenol (mg mL^{-1})	FRAP (mM %)	TEAC (mM Trolox)
A20-1-3-9	1.60 ± 0.35[y]	216.6 ± 4.7	451.6 ± 4.2	3.76 ± 0.17	10.26 ± 0.21
TI-168	1.20 ± 0.60	184.3 ± 2.1	389.3 ± 3.2	4.52 ± 0.08	11.18 ± 0.04
Shiun	1.00 ± 0.35	184.9 ± 0.9	494.9 ± 1.2	6.35 ± 0.14	17.19 ± 0.22
American Broccoli	1.00 ± 0.35	175.6 ± 0.6	647.5 ± 2.5	7.34 ± 0.20	17.16 ± 0.19
Li Snow	1.60 ± 0.35	183.4 ± 0.5	433.7 ± 4.7	3.95 ± 0.14	9.45 ± 0.43

[z] Seedlings are harvested ten days after seeding.
[y] The average and standard deviation of five samples.

雲」。美國青花菜品種在 DPPH 清除力、總酚化合物含量及 FRAP 還原能力均較紫花椰菜品種為高。綜合上述試驗結果，A20-1-3-9 芽菜均較 'TI-168' 及「紫雲」的抗氧化能力為低，但以參試青花椰菜與紫花椰菜相比較，參試青花椰菜芽菜有較好的抗氧化能力。

花球花青素含量試驗

花椰菜新品系 A20-1-3-9 進行花青素含量測定，試驗結果如表 10 所示。A20-1-3-9 花青素含量為 12.37 μM g^{-1}，較 'TI-168' (13.19 μM g^{-1}) 及「紫雲」(21.41 μM g^{-1}) 為低，與 'TI-168' 無顯著差異。以紫花椰菜與白花椰菜相比較，白花椰菜花青素含量僅有 0.05 μM g^{-1}，明顯較紫花椰菜花青素含量為低。

煮後品評試驗

花椰菜 A20-1-3-9 利用水煮及微波兩種烹煮方式進行煮後品評試驗。試驗結果得知，水煮處理花球上花青素會溶於水中，使花球呈現綠色，隨著水煮時間增加，花青素溶於水中含量也增加。水煮時間以 3 min 口感較佳，1.5–2.5 min 處理花球，口感較硬。在微波烹煮方面，微波 3–5 min 均能夠保持紫色花球色澤，不會掉色，但微波 5 min 會有燒焦味，口感也較硬較乾。以微波 4.5 min 口感較好。雖然微波烹煮方式可以保持花球顏色，但較水煮方式口感較硬、較乾，無法保持水分。水煮是一般家庭常用的烹煮方式，較微波烹煮方式口感較佳，卻有花青素易溶於水中，使花球無法保持紫色而呈現綠色的缺點。以水煮 3 min 的烹飪方式，可以保留較多紫色並兼顧口感佳。

表 10. 花椰菜花球花青素含量測定。

Table 10. Anthocyanin content in different varieties of cauliflower.

Variety	Anthocyanin (μM g^{-1})
A20-1-3-9	12.37 ± 1.58[z]
TI-168	13.19 ± 0.26
Shiun	21.41 ± 0.90
Cauliflower	0.05 ± 0.02

[z] The average and standard deviation of three samples.

花球貯藏試驗

花椰菜 A20-1-3-9 與對照品種 'TI-168' 及「紫雲」進行花球貯藏性試驗，花球採收後放入 4℃冰箱中貯藏 14、24 及 34 d，調查花球失重率。試驗結果如表 11 所示，隨著貯藏天數增加，花球失重率也增高。A20-1-3-9 貯藏後 14 d 失重率平均為 3.2%，與對照品種 'TI-168' 3.2% 及「紫雲」的 2.6% 沒有顯著差異。A20-1-3-9 貯藏後 24 d 失重率平均為 5.0%，而對照品種花球平均失重率同樣為 5.3%，沒有顯著差異。A20-1-3-9 貯藏後 34 d 失重率平均為 7.6%，與對照品種 'TI-168' 6.9% 及「紫雲」的 8.5% 沒有顯著差異。綜合上述，A20-1-3-9 花球貯藏後 14、24 及 34 d 失重率與對照品種 'TI-168' 及「紫雲」沒有顯著差異。3 個紫花椰菜品種以 'TI-168' 貯藏後 34 d 失重率低，花球較不退色，是較耐貯藏的品種，A20-1-3-9 次之，「紫雲」貯藏後失重率最高，花球退色，相對於前兩者是較不耐貯藏的品種。

表 11. 花椰菜 A20-1-3-9 與對照品種 'TI-168' 及「紫雲」花球貯藏試驗。
Table 11. Storage ability of A20-1-3-9, 'TI-168', and 'Shiun' purple cauliflower.

		14 d after storage		24 d after storage		34 d after storage	
Variety	Curd weight (g)	Weight (g)	Weight loss (%)	Weight (g)	Weight loss (%)	Weight (g)	Weight loss (%)
A20-1-3-9	454.5	439.3	3.2	431.4	5.0	420.1	7.6
TI-168	622.7	603.3	3.2	590.6	5.3	580.6	6.9
Shiun	815.1	793.0	2.6	771.1	5.3	742.7	8.5

討論

紫色花椰菜原產於歐洲，為 1、2 年生植物，葉片大形具臘粉，幼苗莖部略呈紅色，株高 50–80 cm，具側芽，有倒伏現象，花球為紫色 (Currence 1954)。花菜類喜好冷涼乾燥氣候，生長適溫為 20–25℃，花蕾發育溫度為 18℃，若遇低溫 10–12℃以下易受寒害，花球發育期遇高溫 30℃以上，則青花菜及紫色花椰菜易生柳狀細葉，即蕾葉 (leafy)，而降低商品價值 (Chen 2011)。台灣之花椰菜及青花菜的栽培已非常普遍，其品質及風味亦受到消費者的喜愛與肯定 (Lin *et al*. 2010)，而現在消費者希望能吃到多樣化的彩色蔬菜，因此才會有紫色花椰菜的育成。雖然國外早已有紫花椰菜品種，但植株生育期日數為 80 d 以上。

紫花椰菜花球呈紫紅色，富含多量的花青素，品質優良，風味極佳，主要食用部位為脆嫩的花球 (Lee *et al*. 2007)。選育出來的新品種「台農 1 號」的生育日數為 55–65 d，收穫期較對照品種 'TI-168' 集中且較早生，株形直立、不易倒伏，花球蕾粒細密、品質佳，花球顏色為鮮豔的紫紅色，花球無蕾葉。而對照品種 'TI-168' 平均蕾球重雖然較花椰菜「台農 1 號」花球為重，但其花球形成時間較晚，需 80–90 d，屬晚生品種，具株型高大易倒伏，花蕾粒粗、顏色為暗紫色、著色不均勻且採收期較分散等缺點。

為評估花椰菜「台農 1 號」可作為葉菜與芽菜用之可行性，於種子播種後 25 d 採收，進行花椰菜苗菜抗氧化能力測定。其中，維生素 C 含量、總酚類化合物含量、FRAP 還原能力及 TEAC 抗氧化能力，數值愈高，代表抗氧化力愈佳。而 DPPH 清除力方面，清除力數值愈低，代表清除 50% DPPH 能力愈佳。「台農 1 號」苗菜在總酚化合物含量、FRAP 還原能力及 TEAC 抗氧化能力均較對照品種 'TI-168' 及「紫雲」為高。Wang *et al*. (2009) 指出其他十字花科蔬菜如甘藍維生素 C 含量為 0.11 mg %，DPPH 清除力為 6.13 EC50 (μL)，FRAP 還原能力為 0.89 mM %。芥藍 DPPH 清除力為 69.29 EC50 (μL)，TEAC 抗氧化力為 1.59 mM Trolox。青梗白菜 DPPH 清除力為 64.97 EC50 (μL)，TEAC 抗氧化力為 1.54 mM Trolox。油菜 DPPH 清除力為 42.51 EC50 (μL)，TEAC 抗氧化力為 1.21 mM Trolox。與前述其他十字花科蔬菜相比，花椰菜「台農 1 號」苗菜無論是在維生素 C 含量 (0.65 mg %)、FRAP 還原能力 (3.44 mM %) 及 TEAC 抗氧化力 (3.89 mM Trolox) 均表現較好。種子播種後 10 d 採收之芽菜維生素 C 含量、總酚類化合物含量均較其苗菜為高，抗氧化力指標如 TEAC、DPPH 清除力相應升高。而芽菜可以用生食方式保留最多維生素 C，而且適口性佳，經品評測試具有好吃、營養的特點 (Lo *et al*. 2010)。「台農 1 號」為青骨鬆花品種 (圖 3)，符合台灣消費趨勢，其花球大小與對照品種 'TI-168' 接近，而花球重量較輕。

一般花椰菜種在田間栽培，會蓋不織布或折花球外葉向內覆蓋花球，來增加潔白色，但「台農 1 號」不需特別覆蓋花球。然而，高溫對紫花椰菜的轉色是負面的影響，高溫時花球雖會轉色但不均勻。鳳山地區 9 月可以定植並採收到花球，但花球顏色易受高溫影響。所以南部地區不宜早於 10 月定植，中部地區與 1,000 m 以下中低海拔地區則有機會於 9 月定

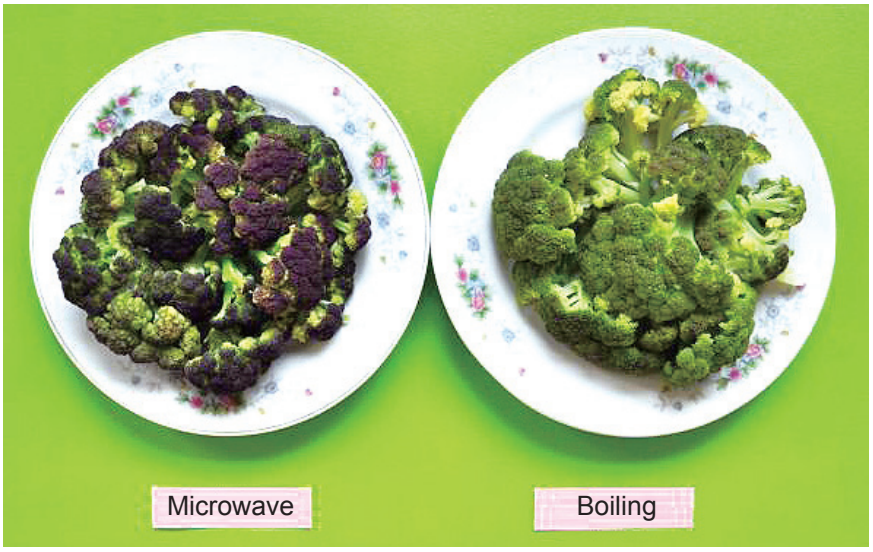


圖 3. 花椰菜 A20-1-3-9 蕾球不同烹煮方式外觀顏色比較。
Fig. 3. Curd color of purple cauliflower variety A20-1-3-9 after cooling by microwave (left) and boiling (right).

植而採收正常轉色之花球，未來或可研究相關栽培技術改進而提早產期。

目前紫花椰菜在推廣上最常遇到的問題，是如何於烹煮後仍能保持花色。「台農 1 號」花球表面為紫色，利用水煮方式花青素會溶於水中而脫色，除了可用建議的微波烹煮方式外，利用大火快炒或油炸殺菁方式，這不符合健康飲食，但可保持花色。另外，配合有機業者栽培生產，與白色、黃色花椰菜做成彩色生菜沙拉，不但保持營養成分，也可賞心悅目。「台農 1 號」為中生品種，花球重約 660 g，適合小家庭，且能適應台灣南部氣候環境種植。紫花椰菜對溫度的敏感度高於白花椰菜，依據多年來種植經驗，如果現蕾期有低溫的配合，花球會轉色均勻且蕾粒細緻。

本品種於 2012 年 7 月取得品種權後，於 2013 年 10 月授權給農友種苗及慶農種苗等兩家公司，並於 2014 年 1 月與兩家種苗公司合作，至花椰菜產區台南與西螺辦理花椰菜「台農 1 號」觀摩會。會中除了介紹授權的種苗商及花椰菜「台農 1 號」品種特性外，也準備了不同烹煮方式的成品供大家試吃品評。與會來賓也至田間實地參觀，兩處委託試驗農戶也分享栽培心得，受到廣大消費者喜愛。

結論

花椰菜「台農 1 號」為開放授粉 (OP) 品種，優點為中生，花球顏色可正常轉色，少發生蕾葉、側芽等不良性狀。A20-1-3-9 苗菜在總酚類化合物含量、FRAP 還原能力及 TEAC 抗氧化能力，均較日本商業品種 'TI-168' 及「紫雲」為高，芽菜有較高的維他命 C 含量，為台灣消費者所喜愛的青骨鬆花品種。缺點為可採收期間短，採收時要注意適收時期，注意可運用人力在單一時間採收的量，回推預定種植面積，分批種植與採收。花球表面富含花青素易溶於水，因此要注意烹煮的方式。花椰菜「台農 1 號」為中生品種且收穫期集中，有利採收與控管出貨。蕾枝為綠白色，屬於台灣消費者所喜愛的青骨鬆花品種。本品種富含花青素，營養豐富、適口性佳，適合快炒及生菜食用，可提供消費者更多樣化的選擇。

誌謝

本品種育成是行政院農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所蔬菜系合作的成果，感謝歷年來參與各項試驗工作同仁的熱心協助與幫忙，謹此誌謝。

引用文獻

Chen, W. L. 2011. Factor antioxidant capacity of cabbage investigate. p.177–190. *in*: Science and Technology Program. (Tsai, Y. F., ed.) Taichung District Agricultural Research and Extension Station, Special Pub. of DARES 107, Taichung, Taiwan. 251 pp. (in Chinese)

Currence, T. M. 1954. Vegetable Crops Breeding: Teaching Manual. Department of horticulture, University of Minnesota, Institute of Agriculture. St. Paul, MN. 272 pp.

Lee, S. P., J. N. Lin, H. L. Lo, K. S. Chen, and T. D. Liou. 2007. The new cauliflower members of the purple cauliflower. Gardening Friend 119:27–28.

Lin, C. Y., H. L. Lo, S. T. Wang, and S. H. Hseu. 2010. Breeding of cauliflower and Chinese kale for resistance to black rot. J. Taiwan Soc. Hortic Sci. 56:296. (in Chinese)

Lo, H. L., S. P. Lee, J. N. Lin, S. T. Wang, and K. S. Chen. 2010. Breeds of excellent purple cauliflower 'A20-1-3-9' line. J. Taiwan Soc. Hortic Sci. 56:265. (in Chinese)

Wang, N. T., T. T. Wang, and S. J. Tsao. 2009. Determination of the total antioxidant capacity in fresh and senescent leafy vegetable. Taichung DARES Res. Rep. 104:67–82. (in Chinese with English abstract)

Characteristics of Cauliflower New Variety ‘Tainung No. 1’

Hui-Ling Lo[1], Chen-Yu Lin[1], San-Tai Wang[2,*], Kan-Shu Chen[3], Shiow-Huey Hey[4], and Tsai-Fat Sheen[5]

Abstract

Lo, H. L., C. Y. Lin, S. T. Wang, K. S. Chen, S. H. Hey, and T. F. Sheen. 2016. Characteristics of cauliflower new variety ‘Tainung No. 1’. J. Taiwan Agric. Res. 65(2):117–127.

A new cauliflower variety ‘Tainung No. 1’ has been registered by the Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch of Taiwan Agricultural Research Institute in July of 2012. Prior to this registration, all line trials, regional trials and storage test for the new variety had been conducted during 2002 to 2010. The cultivation season of ‘Tainung No. l’ is from autumn to winter in Taiwan. It can be harvested ca. 55–65 d after transplanting. ‘Tainung No. l’ cauliflower is ideal for family use because of its vivid purple color, average size of 660 g, delicate fine floret and low incidence of leafy curd. The antioxidant capacity of ‘Tainung No. l’ sprouts and seedlings (10 d and 25 d of seeding, respectively) is higher than two Japanese commercial varieties tested in analyses of total phenols, free reducing ability of plasma (FRAP), and trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). Wrapped in a plastic bag and stored in a 4℃ refrigerator, ‘Tainung No. l’ cauliflower curd had 3.2% and 5% weight loss in 14 d and 24 d, respectively. This is comparable to the storability of Japanese varieties tested. The new bred variety of cauliflower ‘Tainung No. 1’ gives local consumers more choice of the vegetables.

Key words: Tainung No. 1, New variety, Purple cauliflower.

Received: April 14, 2015; Accepted: September 8, 2015.

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

[1] Assistant Research Fellows, Department of Vegetables, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

[2] Research Fellow and Head, Department of Vegetables, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

[3] Research Fellow and Director, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

[4] Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

[5] Former Director, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(2):128–135 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06502.03

研究報告

淹水處理對甘藷收穫後塊根儲藏品質之影響

黃哲倫[1]　劉啟東[2]　廖文昌[3]　賴永昌[4,*]

摘要

黃哲倫、劉啟東、廖文昌、賴永昌。2016。淹水處理對甘藷收穫後塊根儲藏品質之影響。台灣農業研究 65(2):128–135。

本試驗目的為瞭解甘藷栽培期間，若在不同生育時期遭遇淹水逆境，對甘藷塊根收穫後儲藏之影響。分別在春、秋兩期作以甘藷「台農 66 號」為材料，在 3 個不同生育時期進行淹水處理，包括甘藷生育初期 (種植後第 45 d)、生育後期 (種植後第 110 d) 淹水 6 d 以及生育初期與後期各淹 6 d (種植後第 45、110 d) 的處理，收穫後塊根儲藏在適當的條件下 (15℃，相對濕度 90%) 進行 60 d 的儲藏試驗。試驗結果顯示，在秋作塊根腐爛率及塊根重量喪失率皆隨著儲藏時間增加而增加，而在儲藏第 30 d，淹水處理組與對照組間之根腐爛率及塊根重量喪失率並無顯著差異存在；惟 40 d 後，淹水處理組與對照組間之根腐爛率及塊根重量喪失率有顯著差異存在。在春作之所有儲藏日數，淹水處理組與對照組間之根腐爛率及塊根重量喪失率皆無顯著差異存在。另外，本試驗發現甘藷在生育後期淹水處理後，造成儲藏期間損失的主要因素為塊根腐爛情況的發生，而秋作甘藷生育期間遭遇淹水逆境將顯著造成腐爛率的增加。因此，為保持甘藷塊根品質，在秋作經淹水後之甘藷塊根，應該避免儲藏超過 30 d；而春作甘藷發現生育初期淹水以及生育後期淹水共計 2 次淹水處理，其儲藏腐爛情況出現較早，大約在儲藏 20–30 d 時塊根腐爛率大量增加，故其儲藏時間不應超過 20 d。

關鍵詞：甘藷、淹水處理、收穫後儲藏、塊根品質。

前言

台灣每年的甘藷栽培面積約 10,000 ha，係台灣相當重要的雜糧作物。雖然台灣全年都能種植甘藷，由於春夏季多雨且在夏季到秋季間常有颱風帶來的豪雨侵襲，不僅成為春夏作甘藷生產最大限制因子，亦限制主要栽培期落於秋裡作，栽培面積可達全年甘藷生產面積的 70%。此期作的降雨少，初期高溫有利地上部生長，至甘藷塊根發育時期溫度逐漸降低，日夜溫差大，有利塊根生長發育 (Li & Kao 1985; Li *et al*. 1989)。近年由於氣候變遷的影響，台灣全年雨量分布呈現較以往集中的現象，發生豪雨的頻率增加，而原本少雨的秋裡作近年亦常有豪雨發生。此一全球天氣及氣候的極端化趨勢，除了台灣，在亞洲及非洲等地亦有很高機會因為過多降水 (雨) 而帶給農作物生產重大的災損，包括淹水逆境對甘藷生產的威脅 (Rosenzweig *et al*. 2001; Vermeulen *et al*. 2012; Kamoshita *et al*. 2013)。

甘藷栽培期間土壤水分過高時，土壤中二氧化碳濃度也會增加，致使甘藷莖葉與塊根的發育受阻礙，尤其是塊根乾物重有顯著的降低，顯示淹水逆境會直接對塊根的發育造成影響 (Siqinbatu *et al*. 2013; Zhang *et al*. 2015)。而在不同的塊根發育時期遭遇淹水逆境，對塊根會有不同程度的影響，Li *et al*. (1989) 利用

投稿日期：2015 年 7 月 31 日；接受日期：2015 年 9 月 11 日。
* 通訊作者：davidlai@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系助理研究員。台灣 嘉義市。
[2] 國立嘉義大學農藝學系副教授。台灣 嘉義市。
[3] 長庚科技大學護理系副教授。台灣 嘉義縣。
[4] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系研究員兼系主任。台灣 嘉義市。

甘藷「台農 66 號」在生育初期 (植後第 45 d) 及生育後期 (植後第 100 d) 分別進行 6 d 的淹水處理，發現甘藷在生育初期對淹水逆境的耐性較佳。Roberts & Russo (1991) 以不同甘藷品種在生育中期 (植後第 60 d) 及生育後期 (植後第 110 d) 進行淹水處理，發現生育中期遭遇淹水逆境使塊根數目及鮮重顯著下降，但在生育後期遭遇淹水逆境對塊根發育則無影響。

甘藷的主要生產國在熱帶與亞熱帶，甘藷塊根在這些地區收穫後，由於高溫的儲藏環境，塊根的呼吸作用、蒸散作用及其他生理代謝作用持續進行，造成塊根中水分散失、塊根皺縮、腐爛等損失。而且大約 1–2 wk 後會有萌芽的情況，加速消耗塊根中的養分，使塊根品質降低 (Ree *et al*. 2003)。Picha (1986) 以 6 個品種優良無病甘藷塊根為材料，經過適當的癒傷處理後，在相對濕度 90% 及 15.6℃的冷藏庫儲藏 1 yr，發現塊根仍保持休眠，沒有發芽情況，並且重量損失控制在 6.7–16.1%。塊根的呼吸作用在收穫時最高，其後在癒傷與第 1 個月儲藏期間緩慢降低，1 mo–1 yr 間的儲藏期間幾乎保持恆定。由此顯示，挑選品質良好的甘藷塊根，再配合適當的收穫後處理及儲藏措施，便能維持甘藷塊根的品質。另甘藷生育期間的栽培條件及環境等因子，都有可能對收穫後儲藏產生影響，例如收穫前或收穫時遭遇淹水逆境使得甘藷塊根處於缺氧，則在收穫及儲藏過程中容易腐爛，並使儲藏過程中容易遭受細菌或真菌類病原菌感染 (Wu & Chu 2000; Edmunds *et al*. 2008)。本試驗主要探討甘藷栽培期間遭遇淹水逆境，對收穫後儲藏的影響，希望有助於甘藷產業在遭遇淹水災害的傷害評估，以及災後甘藷塊根品質管控與儲藏特性的參考。

材料與方法

本試驗於 2011 年 9 月 (秋作) 及 2012 年 4 月 (春作) 在行政院農委會農業試驗所嘉義分所進行，試驗設計採用單因子逢機完全區集設計。以甘藷 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]「台農 66 號」為供試品種，不同生育時期人工淹水逆境為處理，採 3 重複。每個處理小區種植 3 行各 6 m，行距 1.1 m，株距為 0.25 m，生育期 150 d。種植前進行整地，採畦作栽培，肥料用量為 110 (N)-55 (P_2O_5)-220 (K_2O)，作為基肥 1 次施用，其他栽培管理及病蟲害防治依循甘藷慣行法栽培管理模式。秋作與春作之雨量分布如圖 1，秋作栽培期間降雨天數及降雨量皆較少，總降雨量為 691.9 mm，而春作栽培期間降雨天數多、降雨量高，總降雨量為 3,067.3 mm。

試驗處理別為 (1) 甘藷植後 45 d (45 day after planting; 45 DAP)、(2) 植後 110 d (110 DAP) 進行人工淹水 6 d、以及 (3) 植後 45 d 及 110 d (45 & 110 DAP) 各進行人工淹水 6 d，(4) 生育期正常灌溉的對照組等 4 種，每個試驗處理進行 3 重複。處理組淹水高度達畦高 8 成以上，淹水處理 6 d 後即刻進行排水處理，對照組水分管理維持在土壤水分 60–70% 範圍。生育期間灌溉 2–3 次，灌溉後隔天立刻進行排水，處理組與試驗組皆於植後 150 d 進行收獲。植後 45 d 為塊根生育初期，亦為塊根形成初期，植後 110 d 為塊根發育後期，亦為主要塊根澱粉充實階段。春作甘藷發育階段較秋作為早，秋作甘藷收穫日數約 5 mo，春作約為 4–4.5 mo。由秋作及春作各重複小區收穫之塊根中，選取 150–250 g 外觀良好無病蟲害之塊根，逢機選拔 35 個塊根，於 15℃、相對濕度 90% (Picha 1986) 冷藏庫進行 60 d 的儲藏試驗。每隔 10 d 進行儲藏性狀調查，調查項目包括腐爛率、重量損失百分率及發芽率。腐爛率為塊根儲藏期間腐爛個數占全部儲藏個數的比率，以塊根腐爛部分面積達總面積 10% 以上即列為腐爛個數。重量損失百分率為塊根儲藏期間重量損失與儲藏前原有塊根重量之比率。發芽率為塊根儲藏期間發芽個數占全部儲藏個數的比率。

結果

以不同期作別、不同淹水處理下之甘藷塊根收穫後，進行 60 d 之儲藏試驗，儲藏期間甘藷塊根腐爛情形之變方分析結果，如表 1。秋作儲藏天數 10、20 及 30 d 的處理間差異未達 5% 顯著水準，惟 40、50 及 60 d 處理差異

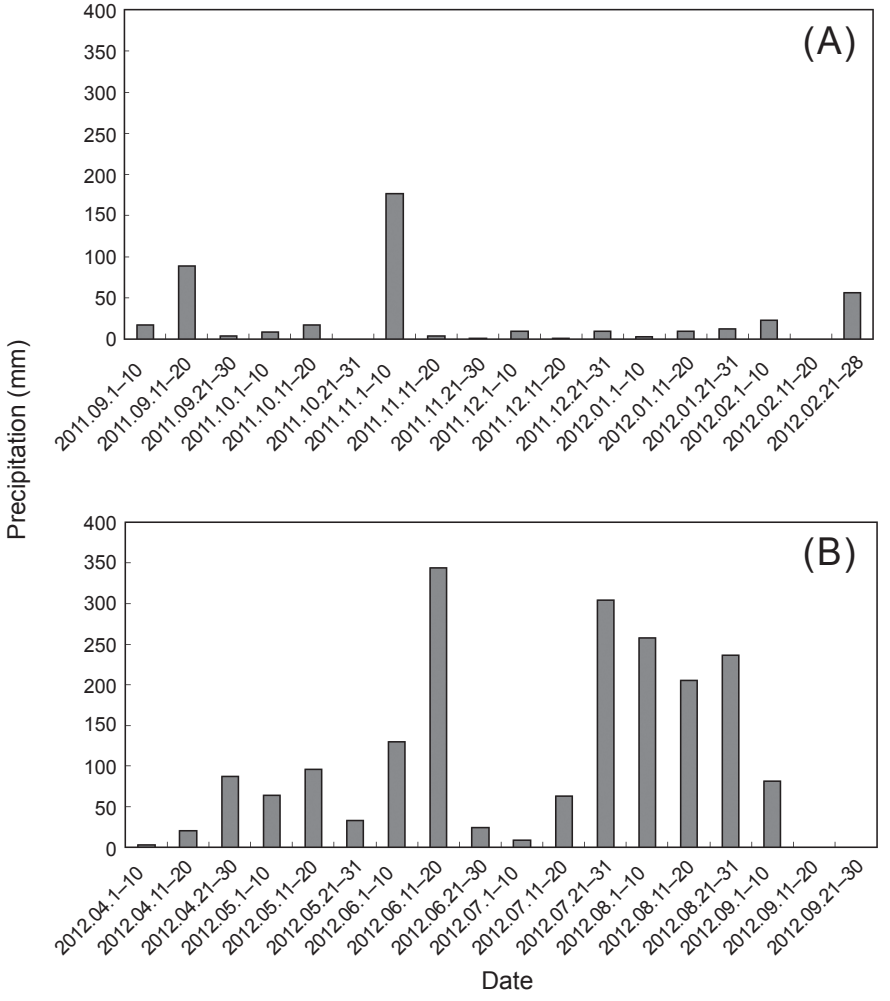


圖 1. 不同期作栽培期間嘉義地區降雨量分布，(A) 秋作、(B) 春作。

Fig. 1. The distribution of precipitation in Chayi area in spring and autumn cropping seasons. (A) Autumn crop; (B) Spring crop.

表 1. 不同生育時期淹水處理對秋作及春作甘藷「台農 66 號」塊根儲藏期間腐爛個數影響之變方分析。

Table 1. ANOVA for rotten sweet potato 'TNG 66' tuberous roots during storage periods that treated with flooding in different stages of autumn and spring cropping seasons.

			Mean square					
Cropping season	Source of variation	df	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d	60 d
Autumn crop	Treatment (T)	3	-	0.67	9.64	72.75*	35.78*	44.89*
	Block (B)	2	-	0.58	0.08	9.00	12.25	7.58
	Error	6	-	0.92	3.64	13.00	7.69	7.47
Spring crop	Treatment (T)	3	2.22	4.75	117.64**	50.00	7.64	4.56
	Block (B)	2	1.08	9.08	3.08	2.33	4.00	0.75
	Error	6	0.97	5.42	6.97	20.33	7.89	1.64

*, ** 5% and 1% significant levels, respectively.

達 5% 顯著水準；而春作儲藏天數僅 30 d 處理間差異達 5% 顯著水準，其他儲藏天數皆未達顯著水準。秋作及春作塊根在儲藏期間腐爛個數的結果，如圖 2，塊根腐爛個數皆隨著儲藏時間增加而增加。秋作儲藏期間腐爛個數情形如圖 2A，對照組與淹水處理組在儲藏 10–30 d，腐爛個數之差異皆不顯著，30 d 腐爛個數在 1.3–5.3 之間；而淹水處理組與對照組的腐爛個數在 40 d 時，塊根腐爛個數快速增加，而且淹水處理與對照組間差異達 5% 顯著水準；在 30–50 d 間，對照組由 1.3 增加到 16.3，淹水處理組則由 2.0–5.3 增加到 21.3–24.7；在 50–60 d 間腐爛個數趨緩，但淹水處理組與對照組之塊根腐爛個數仍有顯著差異；至 60 d 時，塊根腐爛個數最高，而淹水處理組與對照組之塊根腐爛個數亦有顯著差異。其中，淹水處理組腐爛個數占調查塊根的 81–84%，而對照組則是 58.9%。

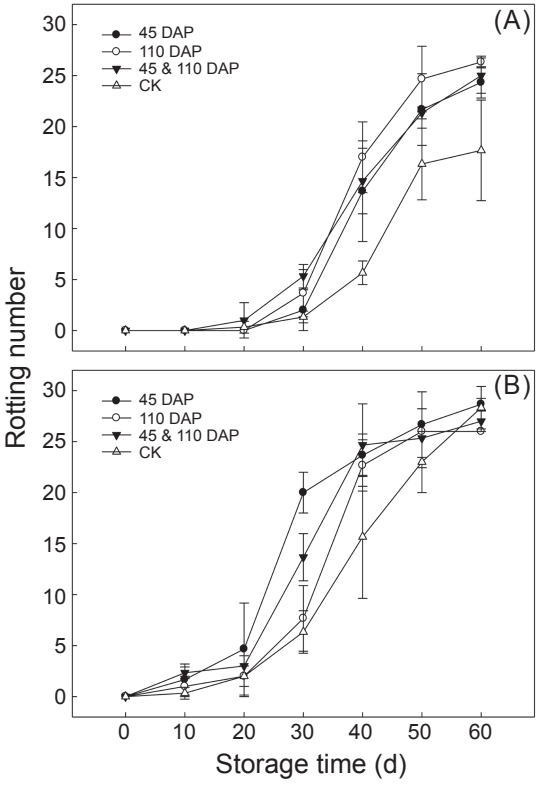


圖 2. 不同生育期間淹水處理對秋作及春作甘藷「台農 66 號」塊根儲藏期間腐爛個數之影響。(A) 秋作、(B) 春作 (n = 30)。

Fig. 2. Effects of flooding treatments in different growth stages on the rotten tuberous roots of sweet potato 'TNG 66' grown in autumn and spring cropping seasons. (A) Autumn crop; (B) Spring crop (n = 30).

春作儲藏期間腐爛個數情形，如圖 2B，塊根腐爛個數皆隨儲藏時間增加而增加。20 DAP 前對照組與淹水處理皆無顯著差異，30 DAP 時各處理組間塊根腐爛個數有顯著差異存在。其中，對照組腐爛個數為 6.3，與 110 DAP 的 7.7 無顯著差異，而 45 DAP 與 45 & 110 DAP 皆顯著較對照組和 110 DAP 為高，其腐爛個數皆快速增加；分別由 20 DAP 的 4.7 和 3.0，增加到 20 和 13.7；至 40 DAP，110 DAP 腐爛個數增加快速，由 30 d 的 7.7 到 22.7，而淹水處理間腐爛個數為 22.7–24.7，但處理間並無顯著差異存在。另外，對照組增加也十分快速，由 30 d 的 6.3 增加到 15.7，但對照組與淹水處理間差異未達顯著水準。至 50 DAP 時，對照組持續快速增加，腐爛個數為 23.0，但淹水處理則趨緩，但對照組與淹水處理間並無顯著差異。至 60 DAP 時，塊根腐爛個數達最高，惟對照組與淹水處理間並無顯著差異，但腐爛個數比率已達總個數之 86.7–95.6%。由於春作多雨，初期淹水的處理，其栽培後期仍然遭受多水的淹水逆境，因此造成 45 DAP 的甘藷塊根比 110 DAP 的塊根易腐爛、不耐儲藏。

在重量損失百分率方面，春秋作不同儲藏期之變方分析結果，如表 2。秋作儲藏天數 10、20 及 30 d，處理間差異未達 5% 顯著水準，至 40、50 及 60 d，處理間差異達 5% 顯著水準；而春作各儲藏天數皆未達顯著水準。秋作及春作儲藏期間重量損失百分率結果，如圖 3，塊根重量損失百分率皆隨著儲藏時間增加而增加。秋作儲藏期間重量損失百分率，如圖 2A，儲藏期間 30 d，淹水處理間與對照組皆無顯著差異，但重量喪失百分率皆上升緩慢，其中 10 d 重量損失率為 2.3–2.6%，20 d 為 3.8–4.1%，30 d 為 5.3–6.7%；在 40 d 時，45 & 110 DAP 顯著高於其他處理與對照組，其重量損失率為 8.8%，而對照組為 7.3%，但與 45 DAP 和 110 DAP 的 6.7% 和 7.6% 無顯著差異；

表 2. 不同生育時期淹水處理對甘藷「台農 66 號」塊根儲藏期間重量損失百分率影響之變方分析。

Table 2. ANOVA for weight loss of sweet potato 'TNG 66' tuberous roots during storage periods that treated with flooding in different stages of autumn and spring cropping seasons.

			Mean square					
Cropping season	Source of variation	df	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d	60 d
Autumn crop	Treatment (T)	3	0.07	0.08	1.10	2.36**	2.89*	5.77*
	Block (B)	2	0.21	0.00	0.82	0.48	0.92	0.47
	Error	6	0.11	0.17	0.88	0.21	0.66	1.22
Spring crop	Treatment (T)	3	2.04	6.06	2.72	15.46	4.41	-
	Block (B)	2	0.22	4.59	0.47	0.71	0.79	-
	Error	6	0.99	3.61	1.53	5.90	8.59	-

*, ** 5% and 1% significant levels, respectively.

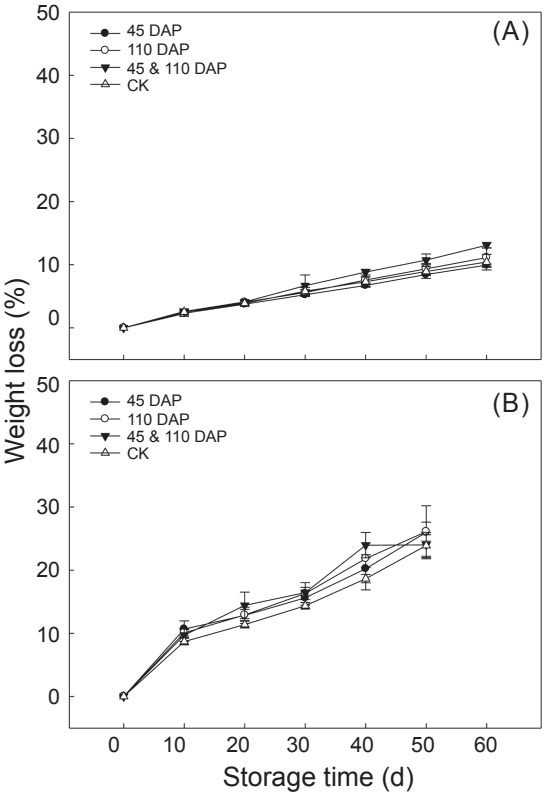


圖 3. 不同生育時期淹水處理對秋作及春作甘藷「台農 66 號」塊根儲藏期間重量損失百分率之影響。(A) 秋作、(B) 春作。

Fig. 3. Effects of flooding treatments in two copping seasons on the percentages of weight loss in sweet potato 'TNG 66' that stored with different storage durations. (A) Autumn crop; (B) Spring crop.

50 d 時，110 DAP 與 45 & 110 DAP 較高，分別為 9.4 和 10.7%，對照組和 45 DAP 為 8.9 和 8.5% 皆較淹水 2 次的處理低；60 d 的結果與第 50 d 相似，110 DAP 與 45 & 110 DAP 較高分別為 11.14 和 13.09%，對照組和 45 DAP 為 10.42 和 9.94% 顯著較淹水 2 次的處理低。

春作儲藏期間之重量喪失百分率結果，如圖 2B，塊根重量喪失百分率皆隨儲藏時間增加而增加，但各淹水處理間與對照組重量損失率皆未達顯著水準。其中，10 DAP 損失率為 8.7–10.7%，20 DAP 為 11.4–14.4%，30 DAP 為 14.4–6.4%，40 DAP 為 18.7–24.0%，50 DAP 為 23.9–26.1%。至 60 DAP，則因腐爛情況嚴重，影響重量喪失率之計算，而不予列入分析，但在 50 DAP 以前，其重量喪失率皆較秋作高出許多。發芽率方面，秋作及春作各處理在儲藏期間之發芽率皆為 0，各處理與對照組皆無顯著差異，期作間也無顯著差異。

討論

Edmunds *et al*. (2008) 及 Thompson *et al*. (1992) 等多位學者指出，在甘藷生育期間，淹水逆境誘發塊根腐爛以及儲藏病害增加，使儲藏期間的腐爛情況及重量損失率增加。Chang *et al*. (1982) 指出淹水逆境使無氧呼吸相關產物含量上升，使得塊根產生腐爛現象，而儲藏期間的腐爛情況也會上升。本試驗結果顯示，在秋作不同生育時期遭遇淹水逆境，也同樣增加儲藏期間的腐爛情況及重量損失率；在春作，因為生育期間除人工淹水處理外，還遭遇自然淹水逆境，使處理效應受影響，但仍在儲藏特定期間可看出，淹水逆境使腐爛情況增加。

在生育期間淹水逆境對塊根的傷害，除了在收穫時，塊根已呈現可察明的腐爛情況外，可能因傷害程度的不同，在收穫當時的塊根外觀沒有顯現。但是在儲藏期間，受到淹水逆境傷害的塊根便容易發生腐爛的現象，發生原因主要為生育期間遭遇淹水逆境對塊根的傷害。由本試驗亦發現，秋作及春作兩期作不同生育期間淹水處理的儲藏試驗結果存有差異。在秋作儲藏期間，對照組表現在 30 DAP 以前與淹水處理無顯著差異，但 40 DAP 以後淹水處理組皆達顯著水準，表示 40 DAP 以後不同生育時期的淹水處理，對儲藏期間的塊根腐爛有顯著影響。另外，由圖 1 亦發現儲藏 40 d 後之不同生育期的淹水處理，對各儲藏期間腐爛情況的影響無顯著差異，表示在秋作甘藷生育期間遭受淹水逆境，不管是在生育初期或生育後期，其收穫後的塊根在儲藏 30 d 後，腐爛情況便急速上升，因此應該避免儲藏超過 30 d。

在春作儲藏期間，生育初期淹水的處理 (45 DAP) 在 20–30 d 間儲藏期腐爛個數增加快速，生育後期淹水 (110 DAP) 在第 30–40 d 間儲藏期增加快速；但由於春作生育期間之累積雨量為 1,958 mm，遠高於秋作之 436 mm，造成對照組在第 30–50 d 間儲藏期之腐爛塊根亦快速增加，故造成大部分儲藏期淹水處理組與對照組之間皆無顯著差異，顯示春作無論淹水逆境或對照組皆可造成儲藏期間的塊根腐爛明顯增加，主要因為春作期間雨量遠高於秋作。但比較各淹水處理間對儲藏後之腐爛效應，發現生育初期淹水以及淹水 2 次的處理，其儲藏腐爛情況出現較早，在 20–30 d 大量增加，故其因此儲藏時間不應超過 20 d；而生育後期遭遇淹水的處理，腐爛增加在 30–40 d 間，因此儲藏不宜超過 30 d。在塊根重量喪失率，本試驗結果顯示秋作甘藷在不同生育期遭受淹水逆境，對儲藏期間塊根重量喪失率有影響，其重量損失率隨儲藏時間增加緩慢上升，儲藏 40 d 以後淹水處理與對照組有顯著差異。而春作重量損失率隨儲藏時間增加而上升，但在不同儲藏時期，塊根重量喪失率在淹水處理組及對照組間並無顯著差異存在。

綜合以上結果，發現甘藷在生育後期淹水處理後，造成儲藏期間損失的主要因素為塊根腐爛情況的發生，而秋作甘藷生育期間遭遇淹水逆境將顯著造成腐爛率的增加。因此，為保持甘藷塊根品質，在秋作經淹水後之甘藷塊根，應該避免儲藏超過 30 d；但春作甘藷發現生育初期淹水以及淹水兩次的處理，其儲藏腐爛情況出現較早，大約在儲藏 20–30 d 時塊根腐爛率大量增加，故其因此儲藏時間不應超過 20 d；另外春作甘藷因為栽培期間雨量遠較秋作高，影響試驗處理效益，使得試驗處理間及對照組之塊根腐爛率並無顯著差異。

引用文獻

Chang, L. A., L. K. Hammett, and D. M. Pharr. 1982. Ethanol, alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase in storage roots of four sweet potato cultivars during simulated flood-damage and storage. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 107:674–677.

Edmunds, B., M. Boyette, C. Clark, D. Ferrin, T. Smith, and G. Holmes. 2008. Postharvest Handling of Sweet Potatoes. North Carolina Cooperative Extension Service. Raleigh, NC. 53 pp.

Kamoshita, A., J. I. Sakagami, and M. Fosu. 2013. Improvement of resilience of crop production under waterlogged conditions in humid Asia and Africa for sustainable agricultural development. Field Crop. Res. 152:1–2.

Li, L. and C. H. Kao. 1985. Stress physiology of sweet potatoes. 1. Flooding effects on sweet potatoes. J. Agric. Assoc. China New Ser. 132:115–120. (in Chinese with English abstract)

Li, L., H. F. Yen, and C. H. Kao. 1989. Stress physiology of sweet potatoes. 2. A reevaluation of flooding effect. J. Agric. Assoc. China New Ser. 147:28–37. (in Chinese with English abstract)

Picha, D. H. 1986. Weight loss in sweet potatoes during curing and storage: Contribution of transpiration and respiration. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 111:889–892.

Ree, D., Q. Qirschot, R. Amour, E. Rwiza, R. Kapinga, and T. Carey. 2003. Cultivar variation in keeping quality of sweet potato. Postharvest Biol. Technol. 28:313–325.

Roberts, W. and V. Russo. 1991. Time of flooding and cultivar affect sweet potato yield. Hort. Sci. 26:1473–1474.

Rosenzweig, C., A. Iglesias, X. B. Yang, P. R. Epstein, and E. Chivian. 2001. Climate change and extreme weather events implications for food production, plant diseases, and pests. Global Change Hum. Health 2:90–104.

Siqinbatu, Y. K., H. Hiroaki, R. Endo, and S. Toshio. 2013. Effects of water contents and CO_2 concentrations in soil on growth of sweet potato. Field Crops. Res. 152:36–43.

Thompson, P. G., D. A. Smittle, and M. R. Hall. 1992. Relationship of sweet potato yield and quality to amount of irrigation. Hort. Sci. 27:23–26.

Vermeulen, S. J., B. M. Campbell, and J. S. I. Ingram. 2012. Climate change and food systems. Annu. Rev. Environ. Resour. 37:195–222.

Wu, C. Y. and T. M. Chu. 2000. The growth and yield responses of sweet potato plant subjected to under waterlogging stress. I: The study of anaerobic respiration and root rotting of sweet potato roots. Chinese Agron. J. 10:259–278. (in Chinese with English abstract)

Zhang, H., L. Zhu, C. Zhang, Y. Ning, and Y. Zhang. 2015. Effect of water stress on dry mass accumulation and allocation in sweet potato based on stable isotope analysis. Can. J. Plant Sci. 95:263–271.

Effects of Flooding Treatments on the Storage Quality of Sweet Potato after Post-Harvest

Che-Lun Huang[1], Qi-Dong Liu[2], Wayne C. Liao[3], and Yung-Chang Lai[4,*]

Abstract

Huang, C. L., Q. D. Liu, W. C. Liao, and Y. C. Lai. 2016. Effects of flooding treatments on the storage quality of sweet potato after post-harvest. J. Taiwan Agric. Res. 65(2):128–135.

The objective of this research was to study effects of flooding treatments during different growth stages of spring and autumn cropping seasons on the storage quality of sweet potato after post-harvest. Cultivar 'Tainung No. 66' ('TNG 66') was grown in spring and autumn cropping season and treated with flooding for six days in different growth stages, i.e., initial growth stage (45 DAP), late growth stage (110 DAP), and both initial and late growth stages (45 & 110 DAP). After harvest, the tuberous roots of sweet potato from different flooding treatments were stored in the chamber at 15℃ and 90% relative humidity (RH) for 60 days. The results showed that numbers of rotten roots and the percentage of weight loss among different treatments increased with the increasing of storage time. In autumn cropping season, numbers of rotten roots and the percentage of weight loss between flooding treatments and no treatment were not significantly different before 30 days of storage, but these were significant difference after 40 days of storage. In spring cropping season, numbers of rotten roots and the percentage of weight loss between flooding treatments and no treatment were not significantly different among all the storage times, and heavy rain in the season was detrimental to the storage quality of sweet potato roots. Overall, this study showed that the major factor of weight loss during storage was the increasing numbers of rotten roots, and the flooding treatment in different growth stages would increase the numbers of rotten roots in autumn cropping season. In order to maintain the quality of stored roots, the storage time of sweet potato tuberous roots, which exposed to flooding treatments prior to storage, should not be extended to more than 30 days. In spring cropping season, the rotten numbers of roots would increase largely during 20–30 days of storage whether sweet potato was exposed to flooding treatments in early stage or both early and late stages, so that the storage time should not be extended to more than 20 days of storage.

Key words: Sweet potato, Flooding treatment, Storage after post-harvest, Tuberous root quality.

Received: July 31, 2015; Accepted: September 11, 2015.

* Corresponding author, e-mail: davidlai@dns.caes.gov.tw

[1] Assistant Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experimental Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Taiwan, ROC.

[2] Associate Professor, Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.

[3] Associate Professor, Department of Nursing, Chang Gung University of Science and Technology, Chiayi, Taiwan, ROC.

[4] Research Fellow and Head, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experimental Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(2):136–145 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06502.04

研究報告

杏鮑菇液體菌種開發之研究

陳錦桐[1] 鄭吉助[2] 黃健覃[3] 石信德[4,*]

摘要

陳錦桐、鄭吉助、黃健覃、石信德。2016。杏鮑菇液體菌種開發之研究。台灣農業研究 65(2):136–145。

以搖瓶培養杏鮑菇液體菌種，評估不同含碳、氮素營養源的液體培養基，對杏鮑菇 B012 與 ESPS 二菌株菌絲生長之影響，並探討不同液體菌種接種量對於菌絲長滿栽培基質所需時間與出菇特性。結果發現，液體培養的含碳素營養源以可溶性澱粉對杏鮑菇菌絲生長最佳，含氮素營養源則以酵母抽出物培養對菌絲生物量表現最佳。在不同液體菌種接種量對菌絲長滿栽培瓶表現上，二菌株皆以 20 mL 或 30 mL 之接種菌量表現最佳，平均只要 16.3–16.5 d 即可長滿栽培瓶，比對照組固體菌種長滿基質需要 22.8–23.5 d 顯著快速。在出菇產量表現上，B012 菌株以 10 mL 或 20 mL 接種量的產量最高，平均每瓶產量為 186.5 g 與 185.6 g，而 ESPS 菌株則以接種量 20 mL 的表現最佳，平均每瓶產量為 190.2 g。二菌株的試驗結果都顯示，利用液體菌種方式生產杏鮑菇產量，顯著高於接種固體菌種的栽培方式。綜合研究結果，以液體菌種方式生產杏鮑菇，可節省其菌種之製備時間、接種後菌絲培養及出菇採收所需時間，較傳統固體菌種栽培方式縮短 30–32 d，並可降低培養基之成本及提高栽培庫房的年利用率 4–5 次。

關鍵詞：杏鮑菇、液體菌種、產量。

前言

杏鮑菇 [*Pleurotus eryngii* (Dc.: Fr.) Quěl.] 為蠔菇屬的一種真菌，具有絕佳的風味、質地及烹煮特性，深受消費者喜愛而被譽為蠔菇類的極品 (Singer 1986)。台灣是全世界最早研究開發與生產杏鮑菇的國家之一 (Peng 1993)，杏鮑菇富含高量的蛋白質、纖維素、多糖及礦物質，而脂肪含量低 (Yan *et al*. 2002)，除具有豐富的營養成分外，又具有降血壓、降血脂等功效 (Chen *et al*. 2012)，是具有天然、營養、保健等特性的珍貴食用菇類，非常受到台灣消費者歡迎。在 2005 年台灣杏鮑菇年產量僅 2,000 Mg，至 2011 年達 9,000 Mg 以上，呈現大幅成長，係台灣第 3 大產值的生鮮菇類 (Fang & Tsai 2011)。長期以來杏鮑菇栽培大多利用固體菌種方式進行植菌，固體菌種生產要經過較為繁瑣的原種、母種、栽培種的 3 級培育，最後才能擴大到栽培瓶 (袋) 生產，需要的工作量大、工續繁瑣，又因雜菌污染率高、生長週期長、菌齡不一致及標準規模化程度低 (Ruan *et al*. 2008)，致使栽培生產常出現不穩定現象。

自 1948 年美國 Humfeld 氏首先採用並報導液體培養技術可以培養傘菌屬菇類 (*Agaricus campestris* L.) 菌絲體後，利用深層醱酵技術培養各種食、藥用菌，引起人們極大重視 (Eyal *et al*. 1991)。Szuecs (1958) 是第 1 個用發酵槽來培養羊肚菌 (*Morchella esculenta* Fr.) 與多種食用菌菌絲體，從此食用菌液體培

投稿日期：2015 年 6 月 24 日；接受日期：2015 年 9 月 14 日。
* 通訊作者：tedshih@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。
[3] 南投縣埔里鎮公所農經觀光課技士。台灣 南投縣。
[4] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。

養菌種的成功例子相繼出現。大多數的食藥用菇類的菌絲均能在適宜的培養條件下於液體培養基中生長，並生產出符合標準的液體菌種 (Leatham & Griffin 1984; Kawai *et al*. 1995; Friel & McLoughlin 2000)。近年來荷蘭、日本、韓國及中國大陸已有報導應用液體菌種生產技術進行洋菇、杏鮑菇及金針菇之商業運轉 (Yamanaka 2011; Li *et al*. 2012)，國內菇類栽培業者對於液體菌種一直都採取觀望態度，到目前為止僅少數菇農嘗試，限制了液體菌種的推展 (Shih *et al*. 2011)。本研究進行杏鮑菇液體發酵培養基的碳、氮素源組成及培養條件的初步探討，並予比較出菇生產特性，以確定其適宜的營養液配方與搖瓶培養條件，期以提供液體菌種培養杏鮑菇商業生產的參考而有助於杏鮑菇產業的發展。

材料與方法

供試杏鮑菇品系與基礎培養基製作

杏鮑菇 [*Pleurotus eryngii* (Dc.: Fr.) Quěl.] 來源為農委會農業試驗所植病組菇類研究室所雜交保存之 B012 (Peng *et al*. 2001) 及自東石農會栽培的杏鮑菇子實體分離的 ESPS 2 支菌株。馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (potato dextrose agar; PDA) 的製作，係先將馬鈴薯洗淨、削皮並挖去芽眼，切成小丁塊，取 200 g 在容器中加水 1,000 mL，煮沸約 20 min。以數層紗布過濾取其濾液後，加入 20 g 洋菜 Bacto agar (BD, USA)，用小火加熱並不斷攪拌，至完全融化為止。再加入 20 g 葡萄糖 ($C_6H_{12}O_6$) (Sigma, USA)，攪拌至溶解，最後將培養基溶液加水補充至總量為 1,000 mL。趁熱分裝試管，將之以 121℃高溫及 1.2 kg cm^{-2} 高壓蒸氣進行滅菌 20 min，取出置桌上擺成斜面，待冷卻凝固後即成為 PDA 試管培養基。抑或以血清瓶裝載培養基，經高溫高壓滅菌後，在無菌操作台內將尚未凝固的 PDA 倒入無菌的培養皿，每皿倒入約 15 mL，待冷凝後即可收取平板培養基備用。試驗用的杏鮑菇二菌株分別培養於 PDA 試管及平板，在 24℃培養置長滿後置於 5℃定溫箱保存，每 3 mo 定期更新 1 次。

液態基礎培養基配製與不同碳素源對杏鮑菇菌絲生長的影響

以 0.2% (W/V) 酵母抽出物 (yeast extract) (Difco, USA)、0.1% (W/V) 磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4) (Sigma, USA)、0.05% (W/V) 硫酸鎂 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Sigma, USA) 及 0.01% (W/V) 硫酸亞鐵 ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (Sigma, USA) 為基礎培養液，分別加入 0.5% (W/V) 葡萄糖、蔗糖 (sucrose) (Sigma, USA)、麥芽抽出物 (malt extract) (Difco, USA)、可溶性澱粉 (potato starch) (Sigma, USA) 及甘油 (glycerol) (Sigma, USA) 等 5 種不同碳素源所配置的液態培養基。各取 100 mL 裝入 500 mL 玻璃搖瓶內，每 1 處理 4 重複，搖瓶口以透氣矽膠塞塞緊後，經高溫高壓蒸氣 121℃，1.2 kg cm^{-2} 壓力條件下滅菌 20 min，待冷卻後接種。每一搖瓶分別接種，以打孔器 (內徑 10 mm) 切取培養在 PDA 平板 10 d 的杏鮑菇二菌株菌絲塊 5 塊，續將搖瓶置於轉速 150 rpm 的搖盪培養箱 (Hsin Chien Xiang, 580C)。經 24℃定溫暗培養 7 d 後，將搖瓶內培養好的菌絲球以抽氣過濾方式，用先秤重之濾紙 (Whiteman No. 1) 收集菌絲球，並用蒸餾水反復沖洗 3 次，然後將收集到的菌絲球在烘箱 60℃的溫度下乾燥 2 d。以分析天平稱量，扣除濾紙重量後取其平均值，以測定菌絲生物乾物重。

不同有機與無機含氮素營養源對杏鮑菇菌絲生長的影響

以 2% (W/V) 可溶性澱粉、0.1% (W/V) 磷酸二氫鉀、0.05% (W/V) 硫酸鎂及 0.01% (W/V) 硫酸鐵為基礎培養液，先各取 100 mL 裝入 500 mL 的玻璃搖瓶內，再分別加入 0.3% (W/V) 米糠 (rice brain)、粉頭 (wheat middlings)、硫酸銨 [$(NH_4)_2SO_4$] (Bio Basic, Canada)、硝酸鈉 ($NaNO_3$) (Hanawa, Japan)、尿素 (urea) (Bio Basic, Canada) 及酵母抽出物等 6 種不同含氮素營養源所配置的液態培養基，每處理 4 重複。搖瓶口以透氣矽膠塞塞緊後，經高壓蒸氣 1.2 kg cm^{-2} 壓力條件下滅菌 20 min。待冷卻後，每搖瓶分別接種，以打孔器 (內徑 10 mm) 切取培養在 PDA 平板 10 d

的杏鮑菇二菌株菌絲塊 5 塊，將搖瓶置於轉速 150 rpm 的搖盪培養箱。在 24℃定溫箱暗培養 7 d 後，將搖瓶內培養好的菌絲球以抽氣過濾方式，用先秤重之濾紙 (Whiteman No.1) 收集菌絲球，並用蒸餾水反復沖洗 3 次。然後，將收集到的菌絲球在烘箱 60℃的溫度下烘乾 2 d，再用分析天平稱量，扣除濾紙重量後取其平均值，以測定菌絲乾物重。

液體菌種製作

由碳氮素源的測試結果，配製 2.0% (W/V) 可溶性澱粉、0.3% (W/V) 酵母抽出物、0.1% (W/V) 磷酸二氫鉀、0.05% (W/V) 硫酸鎂及 0.01% (W/V) 硫酸鐵，並調整 pH 值為 6.0。此液體培養基以可溶性澱粉搭配酵母抽出物的組合，稱此為 SY 液體培養基。將 100 mL 配製後培養液倒入 500 mL 玻璃搖瓶，經高溫高壓 (121℃及 1.2 kg cm^{-2} 壓力) 條件下滅菌 30 min 後備用。在無菌操作台內，切取 1 皿在 PDA 平板培養 10 d 的杏鮑菇菌絲塊加入 100 mL 無菌水，經均質機 (Han Shuo, UH-500A) 以 2,842× *g* 處理 30 s 均質後，利用分注器接種 5 mL 的菌量到含 SY 液體培養基的玻璃搖瓶中。置於 24℃振盪培養箱中下靜置 24 h 後，再以 150 rpm 條件振盪培養 3 d。另利用平板稀釋法分析菌落數 (colony-forming units mL^{-1}; CFU mL^{-1})，同時取培養的菌絲團在光學顯微鏡下觀察菌絲團型態大小。

木屑菌種製作

取雜木屑與米糠按體積比 10：1 方式，加水調至 65% 含水量後，裝入四角玻璃瓶內，每瓶裝入量約 50 g 左右。在 121℃及 1.2 kg cm^{-2} 條件下滅菌 30 min，冷卻後在無菌操作台內，將經培養在 PDA 平板 10 d 的杏鮑菇 B012 與 ESPS 菌絲切割成小塊 (10 mm × 10 mm)，分別接種 1/2 平板的菌絲量到四角瓶培養基。置於 24℃培養直到菌絲長滿瓶內基質為止，菌絲培養期間不照光。

瓶裝栽培基質的製作

篩取雜木木屑 (購買新鮮的雜木屑經堆積 4 mo 後，期間每個月加水翻堆 1 次) 濕重 400 kg，同時取樣栽培所需的輔料麥麩與米糠，分別測定水分含量。以栽培基質乾物重計算，木屑乾物重占 60%，混合乾物重 25% 的麥麩與 15% 的米糠。將上述基質原料，以混合後拌入全重 1% 碳酸鈣，再混合攪拌槽中攪拌均勻，同時調整栽培基質含水量為 63% 左右。取一半的栽培基質以自動裝瓶機 (廣太原，台中市)，將基質裝瓶 (1,100 mL 聚丙烯塑膠瓶，口徑 80 mm，每瓶濕重約 750 g) 以機械在塑膠瓶基質中心打一個洞、封蓋，移入電腦自動程式控制的殺菌釜 (廣太原，台中市) 內滅菌 (121℃, 1.2 kg cm^{-2}, 60 min) (Chen *et al*. 2005)。滅菌後送入冷卻室放冷至隔夜待接種。

接種不等量之液體菌種對於杏鮑菇於塑膠栽培瓶內走菌速度的影響

利用分注器分別吸取在 24℃靜置 24 h 後再以 150 rpm 條件振盪培養 3 d 的杏鮑菇 B012 與 ESPS 二菌株液體菌種，在接種室每 1 塑膠栽培瓶分別接種 5、10、20 及 30 mL 的液體菌種；並以接種匙接種 15 g 固體菌種作為對照，分別為 4 重複，每重複處理分別為 12 瓶。隨後將塑膠栽培瓶放置於 24℃培養室培養，直到菌絲長滿塑膠栽培瓶，並調查每 1 處理的走菌完成所需天數。在杏鮑菇菌絲長滿栽培瓶後，打開瓶蓋進行菌絲生長的濃密度調查，按菌絲薄、稀少、密、厚、濃密外觀研判紀錄。隨後將菌瓶移入出菇室，控制溫度在 16℃ ± 1℃，以超音波加濕機提高與維持栽培室的相對濕度在 90–93%，利用二氧化碳偵測器偵測栽培室內二氧化碳濃度，搭配外氣風門的控制，將二氧化碳濃度控制在 1,000–1,500 mg L^{-1}，刺激菌絲扭結形成原基出菇。在菇體發育至菌傘尚未反捲前採收，每瓶只採收 1 次。採收時不分菇體大小一起採收，採收後的菇體切除基部附著之木屑，秤重並記錄。這期間調查各處理之菇體原基形成時間，在入庫降溫刺激後，每天觀察記錄每 1 處裡的菌絲表面扭結成原基的所需天數，每 1 處理調查 4 重複，每 1 重複 12 瓶。觀察紀錄查出菇時間、產量，並比較出菇產量等特性 (Peng *et al*. 2000)。

生物效率 (Biological Efficiency) 之計算

生物效率 (%)

$$= \left(\frac{\text{採收菇體之鮮重}}{\text{接種時之栽培基質乾重}} \right) \times 100\%$$

產菇效率 (Production Efficiency) 之計算

產菇效率 (%)

$$= \left(\frac{\text{採收菇體之鮮重}}{\text{菌絲長滿栽培基質後未出菇前的基質乾重}} \right) \times 100\%$$

統計分析

試驗資料分析以 SAS 統計分析套裝軟體 (SAS® Enterprise Guide 4.1, SAS Institute Inc.) 進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA) 後，以最小顯著差異性分析 (least significant difference test; LSD test)，在 5% 顯著水準下比較各處理平均值間之差異。

結果

最佳碳素源試驗

測試葡萄糖、蔗糖、麥芽糖、可溶性澱粉及甘油等 5 種碳素源對杏鮑菇 B012 與 ESPS 二菌株菌絲生物量 (乾物重) 之影響，結果發現 B012 及 ESPS 二菌株以可溶性澱粉培養生物產量最高 (圖 1)。B012 及 ESPS 二菌株培養 7 d 後，比其他處理都高，生物量分別為 147.1 mg 與 142 mg。對葡萄糖與蔗糖的利用，二菌株的差異頗大，ESPS 菌株在可溶性澱粉、葡萄糖與蔗糖的利用上沒有顯著差異，但 B012 菌株則以可溶性澱粉生長最佳，葡萄糖與蔗糖次之。其他的碳素源，如麥芽抽出物，則生長較差，其中又以甘油培養效果最差。

最佳含氮營養源試驗

採用 B012 與 ESPS 二菌株表現都較佳的可溶性澱粉作為碳素源，再分別測試 0.3% 米糠、粉頭、硫酸銨、硝酸鈉、尿素及酵母抽出物等 6 種不同含氮營養源，結果發現杏鮑菇 B012 菌株在這 6 種含氮營養源中，以酵母抽出物與米糠的培養其菌絲生長表現較佳，其次為粉頭、硫酸銨與硝酸鈉，尿素對菌絲生長表現最差。杏鮑菇 ESPS 菌株，則以酵母抽出物培養菌絲生長最佳，生物量達 595 mg，其次為米糠，而粉頭與硫酸銨則再次之，在尿素與硝酸鈉的培養生長表現最差，尤其是硝酸鈉菌絲生物量最差僅達 97.6 mg。二支杏鮑菇菌株，都以酵母抽出物培養所得到之生物產量最高，而且 ESPS 品系生物產量比 B012 品系高出近 1 倍 (圖 2)。以上得知，二品系最佳液體培養氮素源以酵母抽出物為最佳。

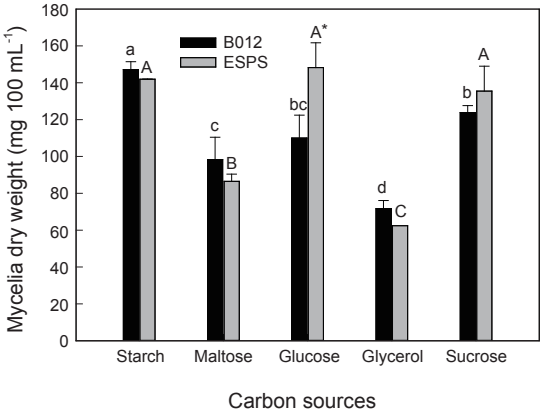


圖 1. 五種碳素源液體培養杏鮑菇 B012 和 ESPS 二品系對菌絲體乾物重之影響。

Fig. 1. Effect of five carbon sources on mycelial dry weight of the two king oyster mushroom strains B012 and ESPS in 100 milliliter liquid culture for 7 days. * Means (n = 3) among different carbon sources for each strain followed with the same letter are not significantly different (P = 0.05) by LSD test.

杏鮑菇液體培養菌種對菌絲長滿栽培瓶的影響

杏鮑菇 B012 及 ESPS 二菌株接種液體培養基後，在 24℃靜置培養 1 d 後，再震盪培養 3 d，經於光學顯微鏡下可觀察到菌絲團漸漸形成 (圖 3)。量測其液體菌種菌落數分別為 2.83×10^3 CFU mL^{-1} 及 2.16×10^3 CFU mL^{-1}，顯示利用液體培養生產之菌絲生長非常快速。

不同接種量的杏鮑菇液體菌種，其菌絲長滿塑膠栽培瓶的天數與固態菌種相比較，發現塑膠栽培瓶以液體菌種接種後，走菌完成天數隨著接菌量增加而明顯縮短。其中，接種 20 mL 與 30 mL 之菌量的 B012 及 ESPS 栽培瓶生長速度最快，其平均長滿塑膠栽培瓶所需天數分別為 16.3、16.3、16.5 及 16.4 d；其次為 10 mL 接菌量，菌絲平均長滿塑膠栽培瓶所需天數分別為 21 d 及 22 d。B012 及 ESPS 菌株用 5 mL 菌種量接菌者，其菌絲平均長滿塑膠栽培瓶所需天數分別為 21.9 d 及 22.7 d (圖 4)，但仍明顯比一般固態菌種接種，菌絲長滿栽培瓶所需的時間 22.7 d 與 23.5 d 快速。

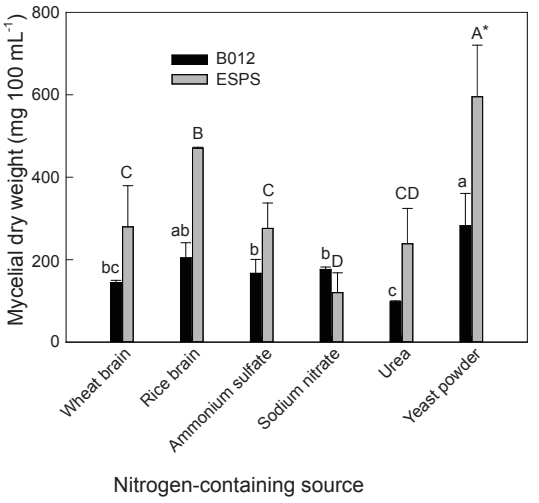


圖 2. 不同有機與無機含氮素營養源液體培養杏鮑菇 B012 與 ESPS 二品系 7 d 對菌絲生物量之影響。

Fig. 2. Effect of six nitrogen-containing sources on mycelial dry weight of the two king oyster mushroom strain B012 and ESPS in 100 milliliter liquid culture for 7 days at 24℃. * Means (n = 3) among different nitrogen sources for each strain followed with the same letter are not significantly different (P = 0.05) by LSD test.

接種不等量之液體菌種與固體菌種接種對於杏鮑菇於塑膠栽培瓶內走菌速度、產量與出菇特性的影響

在杏鮑菇的菌絲長滿栽培瓶後，移除塑膠瓶蓋，檢視杏鮑菇二菌株不同接種菌量對栽培瓶內菌絲生長影響。結果發現，杏鮑菇 B012

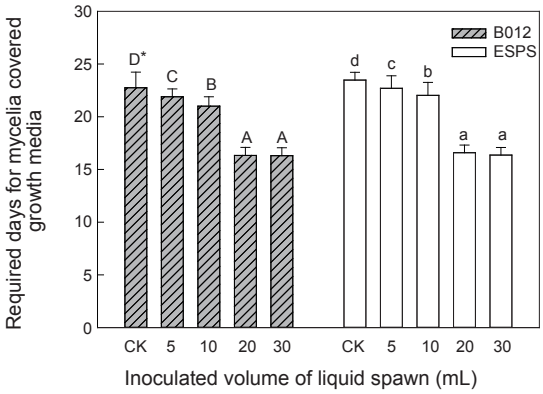


圖 4. 不同液態菌種接種量對杏鮑菇 B012 與 ESPS 二品系完成走菌長滿時間的影響。

Fig. 4. Effect of inoculated volume of liquod spawn of king oyster mushroom strains B012 and ESPS on the days required for mycelia to cover growth media at 21℃. Bar = standard error.

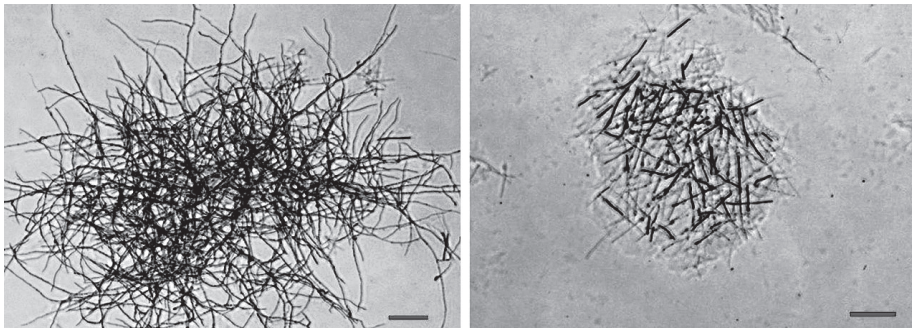


圖 3. 杏鮑菇 B012 與 ESPS 二菌株液體培養 4 d 在光學顯微鏡下之菌絲團型態 (尺標為 0.1 mm)。

Fig. 3. Microscopic observation of morphology of two king oyster mushroom strains B012 (left) and ESPS (right) pellets obtained from shake-flask cultivation (Bar = 0.1 mm).

及 ESPS 二菌株接種液體菌種 5 mL 的栽培基質表面，其菌絲生長情形較接種一般固態菌種稀疏，而在接種量 10、20 及 30 mL 的栽培瓶表面菌絲生長則較為濃密 (表 1)，與一般固體菌種相似，顯示 5 mL 接種量偏低。在菇體原基形成時間，杏鮑菇 B012 菌株以接種量 10 mL 與 20 mL 最快形成菇體原基，分別為 11.5 d 與 11.8 d，而接種 5 mL 與 30 mL 菌量的則在 13.3 d 與 13.5 d 形成原基，但仍比固體菌種形成原基需 17.8 d 快速。ESPS 菌株在形成菇體原基的時間，則以接種菌量 5、10 及 20 mL 的最快形成，分別為 10.5、11.0 及 10.5 d，而接種量 30 mL 與固體菌種則較晚形成。

表 1. 接種不同菌量液體菌種與固體菌種後對杏鮑菇菌絲的生長情形與菇體原基形成影響。

Table 1. Effect of liquid spawn quantity and solid spawn of two king oyster mushroom strains on the mycelial growth and primordial induction.

Strain	Treatment (mL)	Mycelial growth	Days from stimulating to primordia formation
B012	5	++[z]	13.3 ± 1.0 b[y]
	10	+++	11.5 ± 0.6 c
	20	+++	11.8 ± 1.0 c
	30	+++	13.5 ± 0.6 b
	Solid (CK)	+++	17.8 ± 1.7 a
ESPS	5	++	10.5 ± 0.6 b
	10	+++	11.0 ± 0.8 b
	20	+++	10.5 ± 0.6 b
	30	+++	11.5 ± 1.3 a
	Solid (CK)	+++	12.5 ± 1.0 a

[z] Mycelial growth: +: few and thin; ++: general dense; +++: dense and thick.
[y] Means (n = 4) with the same letter in a column are not significantly different (P < 0.05) by LSD test.

在出菇特性方面，接種 5、10、20 及 30 mL 液體菌種菌量的栽培瓶，B012 菌株之子實體平均產量分別為 174.7、186.5、185.6 及 174.1 g，其生物效率分別為 66、67.8、66.2 及 69.0%；對照組平均產量為 169.6 g，生物效率為 61.2%。接種 5、10、20 及 30 mL 菌量於 ESPS 菌株之子實體，平均產量分別為 186.1、181.2、190.2 及 186.3 g，其生物效率分別為 69.6、65.9、67.9 及 68.3%；對照組平均產量為 179.0 g，生物效率為 65.6% (表 2)。在入庫降溫刺激出菇至採收所需天數，B021 菌株以接種菌量 20 與 30 mL 所需生長日數較短，分別為 17.5 d 與 17.7 d，而接種菌量在 5 mL 處理由刺激出菇至採收所需生長日數為 19.6 d，與用固體菌種相同，接種菌量 10 mL 則需達 21.7 d。在 ESPS 菌株不同接種菌量由

表 2. 杏鮑菇不同液體菌種接種量對出菇特性與產量之影響。

Table 2. Effects of various liquid spawn volumes on the fruiting characteristics of two strains of king oyster mushroom.

Strain	Treatment[z] (mL)	Average yield[y] (g bootle^{-1})	Biological efficiency (%)	Production efficiency (%)	Days from treated to 1st picking
B012	5	174.7 ± 3.7 b[x]	66.0 ± 1.6 ab	69.3 ± 1.7 b	19.6 ± 1.3 b
	10	186.5 ± 1.6 a	67.8 ± 0.8 ab	78.1 ± 1.0 a	21.7 ± 0.5 a
	20	185.6 ± 3.1 a	66.2 ± 1.3 ab	71.1 ± 1.4 b	17.5 ± 1.9 c
	30	174.1 ± 1.5 b	69.0 ± 3.6 a	75.1 ± 3.9 ab	17.7 ± 1.7 c
	Solid (CK)	169.6 ± 4.0 b	61.2 ± 1.9 b	62.4 ± 1.9 c	19.6 ± 1.0 b
ESPS	5	186.1 ± 2.0 ab	69.6 ± 0.6 a	77.0 ± 0.7 ab	18.6 ± 0.8 a
	10	181.2 ± 3.7 ab	65.9 ± 1.5 a	73.8 ± 1.6 b	18.6 ± 0.5 a
	20	190.2 ± 3.2 a	67.9 ± 1.1 a	79.6 ± 1.3 a	18.7 ± 0.8 a
	30	186.3 ± 4.2 ab	68.3 ± 1.8 a	76.1 ± 2.0 ab	17.2 ± 0.4 b
	Solid (CK)	179.0 ± 2.7 b	65.6 ± 1.7 a	67.0 ± 1.7 c	19.4 ± 2.0 a

[z] Each sawdust medium containing 60% sawdust, 25% wheat brain, and 15% rice brain (dry weight).
[y] The spawn running period required for fruiting was about 30 days. There were 5 replicates and each replicate consisted of 12 bottles of substrate.
[x] Means with the same letter in a column are not significantly different (P < 0.05) by LSD test.

刺激至採收所需生長日數，則以接種 30 mL 所需的 17.2 d 最快，其餘的處理則在 18.6 d 左右，而用固體菌種的栽培菌瓶，由刺激至採收所需生長日數為 19.4 d，但二者並無顯著差異 (表 2)。

討論

本研究以液體培養方式生產二株杏鮑菇菌株的菌種，探討液體培養基最適合的碳氮素源，以及培養 4 d 後接種至塑膠栽培瓶後菌絲生長情形與出菇特性，並以一般傳統固態培養方式所製作的固體菌種接種至塑膠栽培瓶作為對照。碳素源主要作用為構成細胞物質，亦為生產代謝產物所供給菌種所需的碳基能源，由供試杏鮑菇 B012 與 ESPS 二支菌株探討碳素源對其菌絲生長的影響。結果發現二支杏鮑菇菌株對於碳素源的利用上有差異，B012 菌株利用優劣順序為澱粉、蔗糖、葡萄糖、麥芽抽出物與甘油，而 ESPS 菌株則是以葡萄糖、澱粉與蔗糖同為最佳，其次是麥芽抽出物、甘油。此與前人研究碳原的優劣順序為葡萄糖、蔗糖、果糖、麥芽糖、澱粉與甘油 (Liu *et al*. 2009b) 之結果不完全相同，這可能與試驗所採用的杏鮑菇菌株不同，對於碳素源的利用性有所差異所致，而甘油較不適合供作杏鮑菇菌絲生長。氮素源是構成菇類蛋白質和核酸的主要元素，以 6 種有機、無機的含氮營養源進行試驗，發現有機含氮營養源比無機氮素源更適合杏鮑菇菌絲生長。在杏鮑菇 B012 與 ESPS 二支菌株，皆以酵母抽出物為氮源菌絲生物量表現最佳，其次為米糠與粉頭，而無機態的氮素源如硫酸銨、硝酸鈉與尿素，則明顯比較差。試驗結果類似於 Liu *et al*. (2009b) 及 Jin & Yu (2007) 的研究。有機含氮營養源酵母抽出物、米糠、粉頭的培養基，含有蛋白質、維生素 B 群、微量元素和膳食纖維等，在高溫滅菌中蛋白質分解成胨、肽、胺基酸，又含其他營養物質，因此杏鮑菇菌絲利用率較高。無機態氮源硫酸銨，雖然可以 NH_4^+ 方式被杏鮑菇利用，但利用率則較低；而硝酸鈉以 NO_3^- 形式存在，也較難被杏鮑菇菌絲吸收利用。此一結果與 Liu *et al*. (2009b) 的研究相同。

比較杏鮑菇液體菌種與固體菌種對菌絲長滿基質的時間，結果液體菌種顯著的比固體木屑菌種快速，縮短 6–7 d 左右的時間，與 Liu *et al*. (2009a) 研究結果相似。而在接種杏鮑菇不同液體菌種量至塑膠栽培瓶對菌絲長滿時間的影響，發現菌絲生長速度因菌株不同而有所差異，液體接種量並非愈多愈好。研究發現 B012 菌株接種量在 5 mL 時菌絲長滿時間需要 21.9 d，EPSP 菌株也需要 22.7 d。在菌絲長滿栽培瓶後，可發現基質表面菌絲較為稀疏，但隨著接菌量增加而縮短走菌長滿基質時間，同時菌絲生長也較為濃密；如杏鮑菇 B012 菌株接菌種量 20 mL 只需 16.3 d，而 ESPS 菌株也只要 16.6 d。但是，接種量提高至 30 mL 時，菌絲長滿栽培瓶時間並無再縮減，且菌絲濃密度相同。顯示接種量 20 mL，即可達到栽培瓶最快生長所需的菌種量。一般固體菌種的製作流程需由試管接種至滅菌後麥粒或木屑瓶，在經過 15–20 d 形成麥粒菌種或木屑菌種，而後再將菌種接種至滅菌後之木屑培養瓶經過 20 d 擴增成為木屑菌種，最後將此木屑菌種接種至塑膠栽培瓶。菌種經過多次轉管，菌種純度與活力易受影響，不但耗時費力，又需維持一定庫房空間用來培養菌種。食用菌液體菌種與固體菌種相比，液體菌種具有培養時間短、走菌快、菌齡整齊和接種方便等優點 (Liu *et al*. 1997)，主要原因在於液體菌種中片段多萌發生長點也多，分散度大，吃料生長快速，且在培養料中呈現立體生長模式，而使菌絲可快速長滿基質。

本研究以液體菌種方式接種培養，不僅長滿菌瓶時間縮短，在菇體原基形成時間，也顯著比固體菌種所需時間短。其中，以 10 mL 或 20 mL 的接種菌量為最快，但在接種量 30 mL 時，則會延緩。在 ESPS 菌株原基形成時間甚至與固體菌種無顯著差異，顯示過多接種量是不需要，且會延遲菇原基的形成。是否與養分提供較高或通氣性差異有關，確實原因仍需進一步研究。對於接種不同液體菌種量對出菇特性表現上，以液體菌種接種走菌完成後的栽培瓶，經刺激出菇的子實體，其外觀相較於對照固體菌種接種者在外觀表現無差異。

在 B012 與 ESPS 菌株的出菇產量，以接種 10 mL 或 20 mL 的平均產量明顯高於其他處理與固體菌種 (對照組)，但是在刺激出菇至採收所需日數，二菌株表現有所差異。B012 菌株以 20 mL 或 30 mL 接種量為最快，而 ESPS 菌株則是以接種 30 mL 菌量的所需時間為最短。杏鮑菇在目前商業生產多以冷房環控生產方式進行，大都以採收 1 次為原則，對於杏鮑菇走菌培養的時間，刺激出菇至採收所需時間與出菇產量等就非常重要。縮短培養與出菇時間，不僅可降低栽培庫房的能源耗損，節省生產成本，也有助於栽培庫房的利用率提升。研究發現液體菌種的接種量在 20 mL 時，對於杏鮑菇 B012 與 ESPS 二菌株以 1,100 mL 塑膠栽培瓶，具有最佳的效果，在菌絲長滿培養瓶所需時間上比固體菌種縮短 6–7 d，在刺激至出菇採收所需時間也縮短 1–2 d，出菇產量則每瓶提高 11–16 g 以上。由此顯示，每瓶最佳液體菌種每瓶接種量為 20 mL。在杏鮑菇 B012 與 ESPS 二支菌株，由生長的溫度與菌落大小、不同碳氮素源的生物量表現及接種後菌絲長滿時間與出菇產量等特性，均以 ESPS 菌株較優，顯示出杏鮑菇不同菌株間的表現會有所不同。是否能以相同培養基在同一溫度下其菌落生長大小來做為菌種生長活力與產量的評估，仍需再多做多一些品系與重複，才有助於研判，但整體上而言，菌株的生長活力表現仍可作生產菌株篩選的參考。

傳統的食用菇類生產過程中，使用的菌種大多是固態 (體) 菌種。固體菌種一般生產模式為試管母種繁殖至生產原種，再由原種擴增培養生產栽培種 (塑膠瓶或袋)。這樣的傳統菌種生產模式，一般要經過 60–90 d 的時間才能進行栽培生產，生產週期較長，而且培養成本也較高，生產受季節和氣候影響較大，而且菌種品質仍有很大需改善之處。相較於固體菌種，應用液體菌種於菇類，除可縮短培養時間、菌絲生長快速、菌齡整齊及增加庫房設施使用效率等優點外，還有利於食用菇類生產的規模化及工廠化 (Shih *et al*. 2011)，又具有降低栽培成本而提高收益。中國大陸學者 Guo & Liu (2011) 計算以液體菌種栽培食用菌，每栽培袋成本可降低 0.732 元人民幣，成本利潤率提高 42.08% (Guo & Liu 2011)。綜合本研究結果，得知以液體菌種方式栽培生產杏鮑菇，可節省其菌種之製備時間、接種後菌絲培養與出菇採收所需時間，較傳統固體菌種栽培方式縮短約 30–32 d。此外，亦可降低培養基之成本，栽培庫房每年又可提高 4–5 次利用率，總此提高其產量的效益。

杏鮑菇為農業試驗所育成的商業化菇類品種 (Peng *et al*. 2000)，近年來產量持續成長，依據農糧署統計資料估算目前產值已達新台幣 10 億元以上，為台灣重要生產菇類之一。有關國內應用液體菌種生產食用菇類的研究剛起步，本研究初步利用振盪培養方式生產液體菌種，顯示其應用在栽培上具可行性與進步性。本系列研究後續將利用大型發酵槽方式探討商業生產菌種之生產方法，期望開發杏鮑菇以液體菌種作為主要生產模式，全面提高國內杏鮑菇的生產技術，並推廣至菇類產業應用。

誌謝

本研究承農委會經費 (98 農科-1.1.1-農 C3) 支持，對於參與研究工作之菇類研究室同仁的協助，謹此誌謝。

引用文獻

Chen, J. T., S. Y. Chien, J. T. Peng, and M. H. Chen. 2005. Recycling application of spent king oyster mushroom substrate for production of *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quěl. J. Taiwan Agric. Res. 54:235–244. (in Chinese with English abstract)

Chen, S. Y., K. J. Ho, Y. J. Hsieh, J. L. Wang, and J. L. Mau. 2012. Contents of lovastatin, gamma-aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. LWT-Food Sci. Technol. 47:274–278.

Eyal, J., W. R. Grace, and C. Conn. 1991. Mushroom mycelium grown in submerged culture- Potential food applications. p.31–64. *in*: Biotechnology and Food Ingredients. (Goldberg, I. and R. Williams, eds.) Van Nostrand Reinhold Pub. New York. 577 pp.

Fang, Y. D. and C. J. Tsai. 2011. Mushroom industrial policy and guidance measures. p.1–8. *in*: Proceedings of the Symposium on Mushroom. October 24, 2011. Taichung, Taiwan. Taiwan Agric. Res. Inst. Pub. No.

155, Taichung, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Friel, M. T. and A. J. McLoughlin. 2000. Production of a liquid inoculum spawn of *Agaricus bisporus*. Biotechnol. Lett. 22:351–354.

Guo, J. L. and X. Liu. 2011. Comparison between liquid culture and solid culture technologies for edible mushroom spawn production and analysis on their economic benefits. Sci. Agric. Sin. 44:835–841. (in Chinese with English abstract)

Jin, P. and Y. Yu. 2007. Effect of cultural conditions on mycelia growth of *Pleurotus eryngii*. J. Univ. Sci. Technol. Suzhou 24:59–62. (in Chinese with English abstract)

Kawai, G., H. Kobayashi, Y. Fukushima, and K. Ohsaki. 1995. Effect of liquid mycelial culture used as a spawn on sawdust cultivation of shiitake (*Lentinula edodes*). Mycoscience 37:201–207.

Leatham, G. F. and T. J. Griffin. 1984. Adapting liquid spawn *Lentinus edodes* to oak wood. Appl. Microbiol. Biot. 20:360–363.

Li, H., X. G. Wang, Y. F. Li, and Z. G. Liu. 2012. Research progress on production of edible fungus strain in liquid. Hortic. Seed 6:123–125.

Liu, G. H., J. Tu, J. C. Zhang, and Y. L. Jia. 2009a. A study on the preparation of liquid spawn of *Pleurotus eryngii*. Northern Hortic. 11:230–232. (in Chinese with English abstract)

Liu, M. S., H. Y. Chen, and H. B. Sun. 1997. A survey of studies on edible fungi by submerged culture technology. Jiangxi Sci. 15:193–198. (in Chinese with English abstract)

Liu, T., Z. M. Diao, and Y. Q. Qi. 2009b. Study on the effects of different carbon sources and nitrogen sources of *Pleurotus eryngii*. Northern Hortic. 6:222–224. (in Chinese with English abstract)

Peng, J. T. 1993. Studies on the preparation of substrate for the cultivation of *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quěl. p.116. *in*: Proceeding of First International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. August 23, 1993. Hong Kong. The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong.

Peng, J. T., M. C. Dai, and Y. F. Tsai. 2000. Effect of different methods for controlling humidification on the production of *Pleurotus eryngii* using bottle cultivation technology. J. Agric. Res. China 49(3):54–59. (in Chinese with English abstract)

Peng, J. T., M. C. Dai, Y. F. Tsai, M. H. Chen, and J. T. Chen. 2001. Selection and breeding of king oyster mushroom. J. Agric. Res. China 50(4):43–58. (in Chinese with English abstract)

Ruan, X. D., X. L. Zhang, and H. W. Zhang. 2008. Development and application of liquid strain in edible fungi. Liaoning Agric. Sci. 1:32–35. (in Chinese with English abstract)

Shih, H. D., J. T. Chen, and C. J. Chen. 2011. Development and application of the liquid spawn for mushroom industry. p.37–43. *in*: Proceedings of the Symposium on Mushroom. October 24, 2011. Taichung, Taiwan. Taiwan Agric. Res. Inst. Pub. No. 155, Taichung. (in Chinese with English abstract)

Singer, R. 1986. The Agaricales in Modern Taxonomy. 4th ed. Koeltz Scientific Books Press. Köenigstein, Germany. 981 pp.

Szuecs, J. 1958. Method of Growing Mushroom Mycelium and the Resulting Products. U.S. Patent 2850841. United States Patent Office. Alexandria, VA. 3 pp.

Yamanaka, K. 2011. Mushroom cultivation in Japan. WSMBMP Bull. 4:1–10.

Yan, M. J., C. H. Jiang, and S. X. Tsai. 2002. Nutrient analysis of *Pleurotus eryngii*. Edible Fungi 24(2):11–12. (in Chinese)

Preliminary Studies on the Development of Liquid Spawn for *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quěl.

Jin-Tong Chen[1], Chi-Chu Cheng[2], Jian-Tan Huang[3], and Hsin-Der Shih[4,*]

Abstract

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(2):136–145.

Liquid spawn of king oyster mushrooms (*Pleurotus eryngii*) was cultured in shake flasks, and then the effects of different carbon and nitrogen sources on the mycelium growth in culture medium of the B012 and ESPS strains of the mushrooms were assessed. In addition, the effects of inoculating different amounts of the liquid spawn of the B012 and ESPS strains of king oyster mushroom on the time required for mycelia to completely cover the growth media and on the fruiting characteristics were examined. Results showed that soluble starch was the optimal carbon source while yeast extract was the optimal nitrogen source for mycelia growth of the king oyster mushroom. The minimum days required to achieve complete coverage of mycelia over the growth media were, on average, 16.3 to 16.5 days, with 20 mL or 30 mL of liquid spawn of king oyster mushroom inoculation. The control checks were solid spawn, which required 22.8–23.5 days before the king mushroom mycelia completely covered the growth media. The data showed that mycelium growth with liquid spawn was substantially faster than that with solid spawn. Regarding fruiting characteristics, the B012 strain, when inoculated with 10 mL or 20 mL of king oyster mushroom liquid spawn, exhibited highest yields of 186.5 g and 185.6 g, respectively, per bottle on average. The ESPS strain, which was inoculated with 20 mL of liquid spawn, showed the optimal yield, with 190.2 g per bottle on average. The bottle production results showed that the average yield was substantially higher with liquid spawn than with solid spawn. Cultivating king oyster mushrooms with liquid spawn saves time in preparing the spawn, waiting for the mycelia to cover the growth media, and harvesting. The liquid-spawn cultivation technique is 30 to 32 days shorter than the solid-spawn cultivation technique for cultivating king oyster mushrooms. The technique reduces medium cultivation costs while increasing the utilization of the cultivation room by 4–5 times per year.

Key words: King oyster mushroom, Liquid spawn, Yield.

Received: June 24, 2015; Accepted: September 14, 2015.
* Corresponding author, e-mail: tedshih@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.
[3] Associate Technician Specialist, Department of Agriculture and Tourism, Puli Township Office, Nantou, Taiwan, ROC.
[4] Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(2):146–153 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06502.05

研究報告

低溫微霧降溫系統運用於開頂溫室之研究

洪福良[1]　黃禮棟[2]　姚銘輝[2,*]

摘要

洪福良、黃禮棟、姚銘輝。2016。低溫微霧降溫系統運用於開頂溫室之研究。台灣農業研究 65(2):146–153。

本研究以開頂溫室為對象，利用低溫微霧機進行蒸發冷卻的降溫試驗，以評估低溫微霧機的降溫效益。傳統鼓風式噴霧降溫系統，利用擾流風扇搭配常溫細霧、噴霧量及環境內濕度之影響，在無法降低水霧溫度的情況下，使溫室設施內的降溫效果不彰。因此，本研究利用低溫微霧降溫系統，以 100 kgf cm^{-2} 壓力噴出 10℃低溫微霧，利用熱氣上升冷氣下降原理，將高溫、高濕的氣體透過溫室上方開頂機構排出設施外，讓溫室內溫濕度能有效控制及改善，達到降溫效果。試驗結果顯示，在 12:00，室外氣溫為 28.2℃，則對照組 (ORG1) 溫室在無任何降溫設備控制之下，受到太陽輻射而產生的熱累積量來到最大，為當日最高溫 39.8℃，相較於試驗組 (ORG2) 溫室在低溫微霧降溫系統的作用下，當時溫度為 22.2℃，濕度為 72.8%，其降溫幅度達 15℃以上，且狀態變化平穩。顯示開啟低溫微霧降溫系統後，可大幅度降低溫室內的溫度。

關鍵詞：開頂溫室、低溫微霧、噴霧系統、蒸發冷卻。

前言

開頂溫室的通風對流為目前農業設施較普遍應用的降溫方式，可使溫室內外空氣進行交換，排除設施內高溫高濕的空氣，可減少因高濕而衍生的病蟲害而促進植物生長。通風方式可分為機械通風及自然通風 2 種，為減少成本支出，農家多使用自然通風。惟後者容易造成通風量不足之情況，此時就必須利用機械通風加以輔助改善。在通風良好情況下，設施內降溫極限僅止於與外部氣溫相同，若是作物所需溫度低於外氣溫時，則可應用蒸發冷卻原理使用噴霧降溫，作為一種解決高溫的方法 (Prenger *et al*. 2002)。

在噴霧冷卻的應用上，微霧之蒸散速率影響降溫系統的冷卻能力，是相當重要的參數。當霧滴離開噴嘴後，在空氣中高速運動所產生的摩擦與吸熱的過程中粒徑會逐漸蒸散與縮小，霧粒的生命週期可由 Langmuir 方程式 (Reist 1993) 計算之，如公式 1 所示：

$$t = \frac{\rho RT(d^2)}{8DM(P_S - P_L)} \quad (1)$$

$$\text{其中 } D \approx D_0 \left(\frac{T_{in} + 273}{T_0}\right)^{1.94} \quad (2)$$

公式 1、2 中，ρ 為水的密度 (g cm^{-3})，R 為氣體常數 62,360 (cm^3 · mmHg K^{-1} · mole^{-1})，T 為環境絕對溫度 [K = (℃ + 273)]，d 為霧粒之初始粒徑 (cm)，t 為微霧粒從初始粒徑 d 至完全蒸散之時間 (s)，D 為空氣中水蒸氣之擴散係數，D_0 為水蒸汽在 1 大氣壓和 0℃情況下之擴散係數 (0.219 cm^2 s^{-1})，T_{in} 為微霧的溫度 (℃)，T_0 為 273.15 (K)，M 為水分子量 (18 g mole^{-1})，P_S 為微霧溫度 (T_f) 時之飽和蒸汽壓 (mmHg)，P_L 為水蒸汽在環境溫度下的蒸汽壓 (mmHg)。

投稿日期：2015 年 7 月 17 日；接受日期：2015 年 9 月 15 日。
* 通訊作者：mhyao@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所農業工程組研究助理。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所農業工程組研究員。台灣 台中市。

在一液體平面上各種不同溫度之蒸汽壓 (如 P_S)，可由 Antoine equation 估算之 (Dean 1985)，如公式 3 所示：

$$\ln P_{\infty}(T) = A - \frac{B}{T} \quad (3)$$

公式 3 中，T 為液體絕對溫度 (K)，A、B 為常數值。水在 20℃時，A = 21.18，B = 5,367。

在研究微霧與空氣接觸時產生的熱交換量時，需分為兩個情況討論，一為微霧與空氣間的溫度差而產生的顯熱交換量，如熱傳導、熱對流及熱輻射等 (Katsoulas *et al*. 2001)；二為微霧和周圍空氣的水蒸氣分壓之間的壓差而產生的質傳，所造成的潛熱交換量，而兩者的代數總和即為空氣與微霧間的總熱傳量，其空氣與微霧之顯熱交換量如公式 4，微霧蒸散時所產生的潛熱交換量如公式 5 所示：

$$Q_c = h_c (T_a - T_w) \times A \quad (4)$$

$$Q_e = h_{fg} \times \Delta m_{fg} = h_{fg} \times \sigma (\omega_a - \omega_s) \times A \quad (5)$$

公式 4、5 中，Q_c 為顯熱量 (W)，h_c 為空氣與水表面之熱傳係數 (W m^{-2} K^{-1})，T_a 為空氣溫度 (K)，T_w 為微霧溫度 (K)，A 為微霧之體表面積 (m^2)，Q_e 為潛熱量 (W)，h_{fg} 為微霧單位質量的汽化熱，即焓值 (kJ kg^{-1})，Δm_{fg} 為微霧在相變化過程的質量變化率，即質傳量 (kg s^{-1})，σ 為質傳係數 (W m^{-1} K^{-1})，ω_a 空氣中絕對濕度 (kg kg^{-1} dry air)，ω_s 為微霧溫度的絕對濕度 (kg kg^{-1} dry air)。

在應用上，若質傳量為正值時，則表示空氣中的水分將凝結出來；若為負值時，表示水滴將蒸發至空氣中，空氣中的水分將增加。在整理公式 4 及 5 後，可得微霧與空氣的總熱交換量 Q_t 為：

$$Q_t = Q_c + Q_e = [h_c (T_a - T_w) + \sigma (\omega_a - \omega_{w,s}) h_{fg}] \times A \quad (6)$$

水蒸氣在空氣中移動的狀態下，符合 Lewis 提出的，對於空氣絕熱加濕過程，熱傳係數 (h_c) 及質量擴散係數略約相等，其 h_c 與 σ 之比 (路易士數) 約等於 1 (Holman 1990)，且等於濕空氣比熱 (C_p) 之理論 (Hwalader & Liu 2002)。故公式 1 可改寫為公式 7，並代入公式 6 整理後即可得總熱交換量如公式 8 所示。

$$Q_c = C_p \sigma (T_a - T_w) \times A \quad (7)$$

$$Q_t = \sigma (h_a - h_w) \times A \quad (8)$$

h_a 為周圍空氣的焓值 (kJ kg^{-1} dry air)，h_w 為霧滴邊界層空氣的焓值 (kJ kg^{-1} dry air)。公式 8 說明霧粒溫度 T_w 時之邊界層附近空氣與環境的焓差，即焓位勢與微霧表面積對總熱交換量的影響，噴霧系統中的 A，則為所有水滴表面積的總和。此點可知水滴藉由高壓霧化增加其體表面積後，可直接提升其總熱交換量，如公式 10 所示，V_{total} 為噴霧總體積 (L)，i 為同體積之水滴總數，S_{total} 為總熱交換面積 (m^2)。

$$V_{total} = i \times \pi d^3 6^{-1} \quad (9)$$

$$S_{total} = i \times \pi d^2 \quad (10)$$

本研究為瞭解低溫微霧在降溫過程中設施內溫度及相對濕度之變化及分布情形，採用曲面繪圖軟體 (Surface Mapping System; Surfur 7.0) 繪製溫度及相對濕度之等高線分布圖。此外，計算溫度及相對濕度之標準差代表其分布均勻度。

材料與方法

試驗溫室

本研究所使用的試驗溫室設置於行政院農委會農業試驗所 (Taiwan Agricultural Research Institute) 內 (24°1'49"N, 120°41'45"E; north-south direction)，其結構為圓屋頂鋅管塑膠布溫室，長度為 12 m、寬度為 5 m，屋頂高度為 4.3 m，集水槽高度為 3 m，覆蓋材料

為 0.18 mm 厚之 PEP (polyethylene plastics) 利得膜。無內外遮蔭，4 側立面裝有防蟲網及捲揚作業的塑膠布，開口方向為東西向，屋頂為捲揚開頂式，由馬達驅動使塑膠布捲收至屋頂頂部。屋頂兩側開頂面積各為 31.2 m^2，占圓頂總面積 52%。同樣式溫室兩棟相鄰，試驗組溫室則內部裝設低溫微霧降溫系統，對照組僅只有開頂自然通風為對照比較，溫室規格如圖 1 所示。

低溫微霧系統之設計與架構

本研究利用台灣羽和企業股份有限公司所生產的噴霧控制系統，以低溫水作為低溫微霧空調主機之設計基礎，將冷卻介質-水，經由 5 道過濾器過濾後注入第 1 水箱儲存，再由循環馬達輸送至蒸發器熱交換為 6–8℃之低溫水之後，經由水離子化器進行 2 次過濾並分解為更細小的離子以增加霧化效果。離子化後之潔淨水會進入第 2 水箱儲存，最後由下方出口處之高壓水泵送至低溫水管路及各噴頭執行噴霧降溫作業，而噴頭端的擾流風扇則以強制對流方式增加微霧的熱交換效率，提升降溫效果。系統設計圖如圖 2 所示。

微氣候量測設備

溫度感測元件採用 Campbell Scientific Inc. 所生產的 Type E thermocouple，線徑大小為 0.076 mm，其溫度感測器在溫室內中央斷面及距離地面 1 m 水平面處等距放置，量取溫室內溫度場分布狀況。Type E 溫度感測器分布於地面上方高度 1 m 與 3 m 的水平斷面，共 12 點。溫、濕度感測器採用 Vaisala Inc. 所生產的 HMP60，其溫度範圍為 40–60℃，濕度範圍為 0–100% RH。其元件採用電容式 INTERCAP® 芯片，可省去更換芯片時還需重新校準過程中的停機時間，將本元件分別置於溫室橫向室外與平面中心，距離地面 1、2 及 3 m 各裝設 1 組，共計 3 組，量測溫室內的相對濕度值及溫室外大氣相對濕度值。各感測器架設位置如圖 3 所示，溫室之溫、濕度分布，溫度誤差為 ± 0.3℃，相對濕度誤差為 ± 3%，資料擷取間隔設定為 1 min，擷取時間設為 00:00–23:59 共 1,440 min。

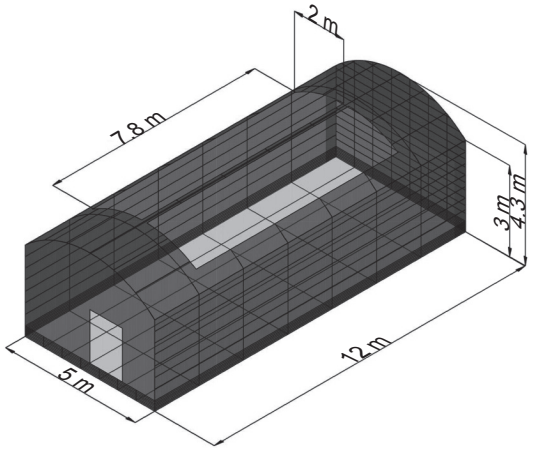


圖 1. 開頂溫室示意圖。

Fig. 1. Schematic diagram of the open roof greenhouse.

降溫試驗

本研究利用水為降溫介質，將水經過多級淨化處理後，經熱交換器冷卻為 6–7℃低溫冰水，進入高壓幫浦加壓至 100 kgf cm^{-2} 壓力後，輸送至開頂溫室內架設於 2.5 m 高度的 38 顆結構精密的不鏽鋼霧化噴頭 (直徑 0.15 mm)，噴頭內部產生強大的離心力及渦流，高速噴出粒徑約為 16 μm 之 10℃高壓微霧 (Yu *et al*. 2015)。再藉由 6 組擾流風扇產生風速為 3.4 m s^{-1} 之離心氣流攜帶，迅速地傳送至溫室內各處，使降溫更有效率 (Arbel *et al*. 2003)。試驗於 2014 年 2 月 17 日 10:00–17:00 期間啟動低溫微霧降溫系統，共 7 h。控制策略為利用 PLC 數位控制器，當溫室內環境濕度低於 60% 時，低溫微霧降溫系統立即啟動，利用熱氣上升、冷氣下降原理，經開啟開頂，將高溫、高濕的氣體排出設施外，讓溫室內溫、濕度能有效控制及改善，達到降溫效果。當濕度達到 80%，則停止噴霧。為瞭解微霧系統之冷卻效果，以兩棟同規格之開頂溫室做比較試驗，觀察室內溫度之變化。一為自然通風之對照組 (ORG1)，另一為低溫降溫系統試驗組 (ORG2)，觀察室內濕度在 60–80% 區間之最大降溫效果。

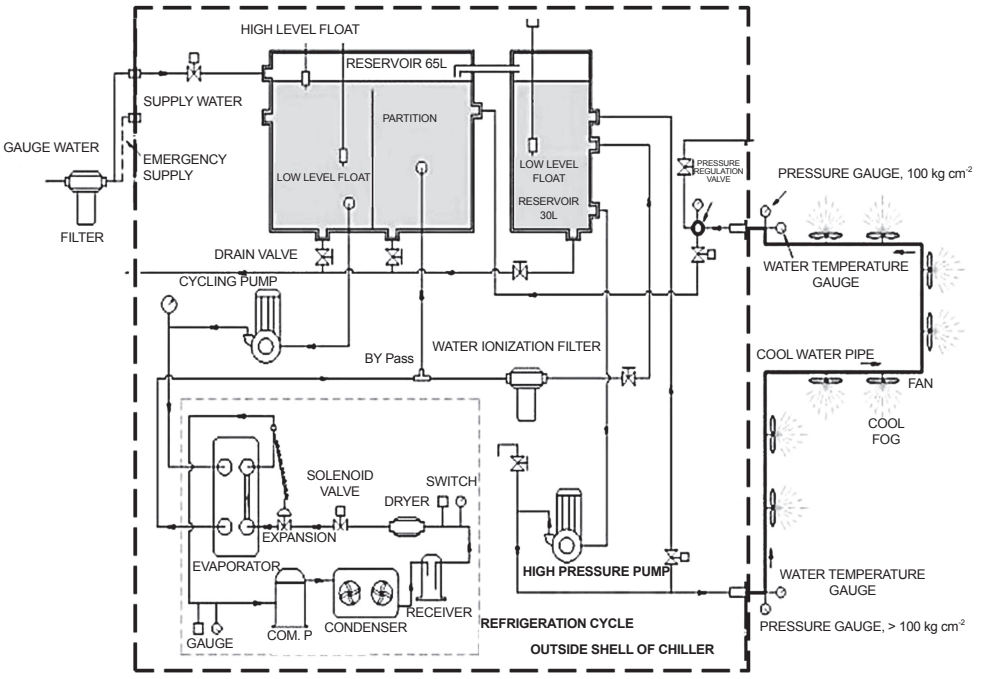


圖 2. 低溫微霧系統圖。

Fig. 2. Layout of the micro-fog chiller blowing/spraying system.

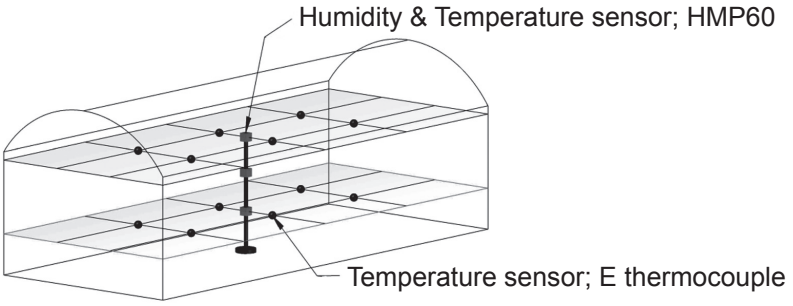


圖 3. 感測器配置圖。

Fig. 3. Layout of the allocation of measuring sensors for temperature and relative humidity.

結果與討論

蒸散時間與熱交換方程式

由公式 1 及 2 可得出，當溫室內之平均溫度為 39.8℃，微霧粒徑為 16 μm，以及溫度為 10℃時，計算得出霧粒的生命週期為 0.6 s。當微霧粒徑為 16 μm，將噴霧量 78.28 mL min^{-1} 代入公式 9，$78.28 = i \times \pi \times (0.0016)^3 \times 6^{-1}$，則 $i = 3.65 \times 10^{10}$，代入公式 10，$S_{total} = 3.65 \times 10^{10} \times \pi \times (0.000016)^2 = 29.35$，可求出微霧之總熱交換面積為 29.35 m^2 min^{-1}。並以環境溫度 39.8℃、相對濕度 25.4% 的條件下，以 10℃低溫水噴霧，其空氣中熱傳導係數的 $\sigma = 0.033$ W m^{-1} K^{-1} 估算本試驗所採用的噴頭 1 min 所能帶走的熱量，由濕空氣線圖求出 $h_a = 69.81$ (kJ kg^{-1} dry air) 與 $h_w = 29.27$ (kJ kg^{-1} dry air)。將參數數值代入公式 7 及 8 之中，$Q_t = 0.033 (69.81 - 29.27) \times 3.65 \times 10^{10} \times 4 \times \pi \times (8$

$\times 10^{-6})^2 = 39$，即可求得總熱交換量約為 39 kW。當環境溫度高時，促進霧滴蒸散並與空氣產生潛熱交換的原因，為兩者水蒸氣壓的壓力差，而溫度越低，其水蒸氣的分壓越低。當微霧的水蒸氣壓力低於空氣中水蒸氣的壓力時，空氣中的水蒸氣則會在微霧的邊界層上產生凝結 (Abdel-Ghany *et al*. 2006)。反之，微霧邊界層上的水蒸氣則會蒸散至空氣中，使空氣中濕度增加。若霧粒未蒸散完全的狀態下，水滴易附著在作物上，造成植物發生病蟲害，也使得溫室內的環境變成潮濕的情況，故在應用上需以強制通風增加霧粒飄移的距離並提升蒸散效率及降溫效果。

低溫微霧降溫試驗

本研究以 data logger 記錄 2 月 17 日 10:00 開啟低溫微霧降溫系統至 17:00 量測結束，並觀察開頂溫室溫、濕度變化情形。低溫微霧降溫試驗中，依不同的濕度設定值，對溫室內實際溫度變化範圍有極大的影響。根據 Fukatsu & Hirafuji (2005) 研究顯示，感測器訊號配合 PID 程序控制器，其反應時間為 1 s，具有高準確性與高反應性的特性，本研究利用其反應特性可精準控制濕度範圍。本研究利用 PID 程序控制濕度，低於 60% 則啟動低溫微霧系統，濕度高於 80% 則關閉系統。結果顯示，低溫微霧降溫系統作動後 5 min 之變化情形，如圖 4 所示，內部溫度可由原來的 31.8℃降至 24.4℃，相對濕度亦由原本之 35.2% 增加至 74.5%，濕度每分鐘增加效率為 17.7%。由圖 5 可觀察出，於 11:00 之後 ORG2 溫室內相對濕度變化漸趨穩定，表示整個空間的濕度分布均勻，且隨著濕度增加而溫度變化呈現下降之趨勢，亦可看出此系統在開啟後，約 1 h 即能將溫室內溫度調節達到穩定狀態。表 1 顯示在 12:00，室外氣溫為 28.2℃，則 ORG1 溫室在無任何降溫設備控制之下，受到太陽輻射而產生的熱累積量來到最大。其溫度當日最高溫為 39.8℃、濕度為 25.4%，相較於 ORG2 溫室在低溫微霧降溫系統的作用下，溫室內平均溫度為 22.2℃，濕度為 72.8%，其降溫幅度達 15℃以上。

噴霧前後溫室內部斷面之溫度分布

圖 6 為當日所紀錄之設施內部溫度分布圖。試驗期間高低溫度差值可定義以一量化指標 (Prenger *et al*. 2002)，用以表示溫度分布的均勻程度與高低值。圖中溫度差值設為 0.5℃。ORG2 溫室由於低溫微霧降溫系統係進行間歇式動作，所以不同時段時在溫度分布上有明顯差異。由圖 6A 可看出進行降溫試驗前，設施內部溫度形成 5–6℃的溫度梯度差異，其最高溫為 38.2℃，分布於設施中較為不通風且受日照之內側，設施中間部分屬於溫度較低處，其溫度為 32℃，此時溫度標準差值為 ± 0.62℃。啟動低溫微霧降溫系統 3–6 min 後，如圖 6B 與圖 6C 所示，藉由風扇作動使霧粒均勻的散布，增加室內氣流的亂度，改善室內溫度分布

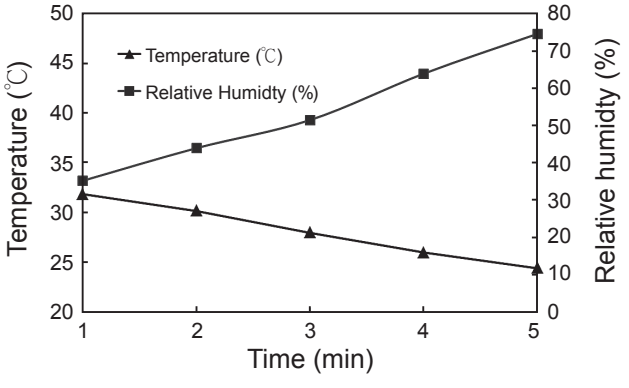


圖 4. 平均溫、濕度於開頂溫室內變化情形。

Fig. 4. Changes in the average temperature and relative humidity inside the open-roof greenhouse.

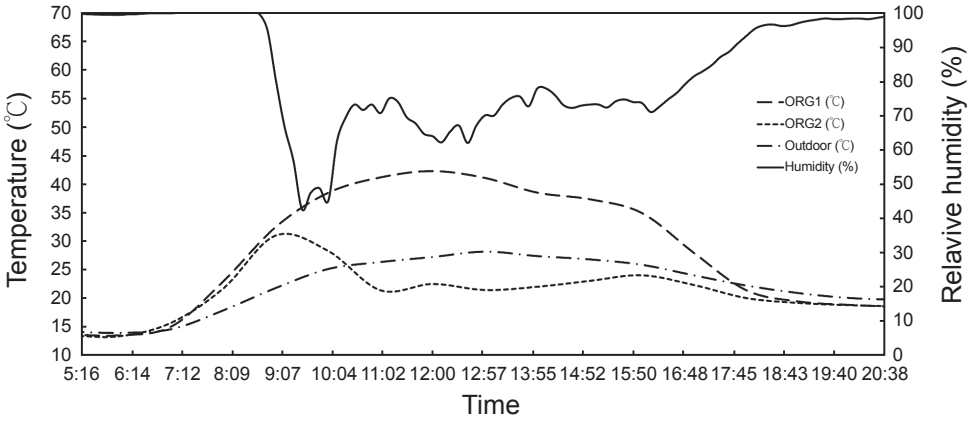


圖 5. 全天降溫試驗之溫、濕度變化圖 (2014 年 2 月 17 日)。

Fig. 5. Diurnal variations of temperature and relative humidity inside and outside greenhouse variation with a micro-fog chiller blowing system on February 17, 2014.

表 1. 連續噴霧操作下室內外溫度與相對濕度之變化 (2014/2/17 10:00–17:00)。

Table 1. Variation of temperature and relative humidity for both indoors and outdoors greenhouse with blowing chill fog (continuous spraying) at the period of 10:00–17:00 on February 17, 2014.

	Temperature (℃)			Relative humidity (%)		
Time	ORG1	ORG2	Outdoor	ORG1	ORG2	Outdoor
00:00	15.1	14.9	15.6	100.0	98.4	88.2
01:00	14.8	14.5	15.4	100.0	97.9	88.5
02:00	14.7	14.4	15.2	100.0	98.3	89.2
03:00	14.4	14.1	14.9	100.0	98.2	88.9
04:00	13.9	13.7	14.4	100.0	98.0	89.0
05:00	13.8	13.6	14.3	100.0	98.6	90.0
06:00	13.6	13.4	14.1	100.0	98.4	90.0
07:00	15.2	15.8	14.7	100.0	99.8	90.1
08:00	23.1	21.9	18.0	76.8	79.1	79.0
09:00	32.6	24.1	21.9	42.1	41.9	59.1
10:00	38.5	25.4	25.2	30.3	46.9	45.4
11:00	39.2	22.5	26.4	26.9	67.6	42.0
12:00	39.8	22.2	28.2	25.4	72.8	37.8
13:00	40.1	22.5	28.2	25.9	67.0	35.4
14:00	38.5	22.1	27.5	31.6	66.5	42.4
15:00	37.4	23.1	26.9	33.7	60.6	45.7
16:00	35.0	24.1	25.9	36.0	65.1	46.8
17:00	28.0	22.4	24.1	53.9	64.6	56.1
18:00	21.5	20.1	22.3	71.8	80.3	66.9
19:00	19.5	19.3	21.0	84.8	86.3	73.7
20:00	18.9	18.9	20.1	93.3	88.0	77.6
21:00	18.6	18.7	19.8	99.1	90.0	79.4
22:00	18.9	18.8	19.9	100.0	89.9	79.8
23:00	18.4	18.4	19.7	100.0	93.1	81.3

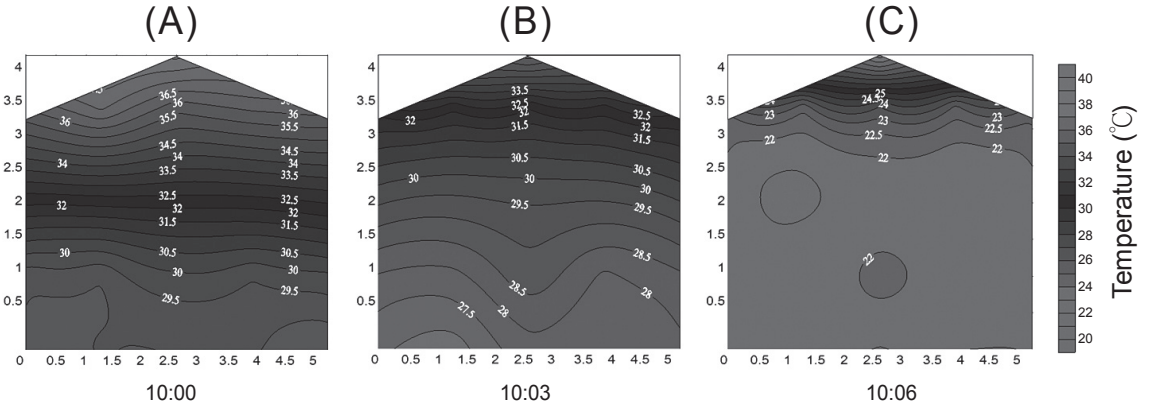


圖 6. 噴霧前後溫室內部斷面之溫度分布情形。

Fig. 6. Changes in temperature profile before and after switching on the micro-fog chiller blowing system in a greenhouse.

之均勻度，提高蒸散冷卻的效應。設施內部溫度值可降至 22.2℃，濕度為 79.7%，且溫度分布較為平均，減緩室內溫度梯度現象的產生，溫度標準差值縮小為 ± 0.48℃。

結論

傳統風機式噴霧降溫法已普遍應用於溫室植栽及市場等開放性空間進行降溫調節，但無法調控微霧的溫度及粒徑大小，而使降溫效果受限。本研究採用高壓低溫微霧降溫系統，可調整噴霧出水之壓力大小，配合 0.15 mm 噴頭孔徑使其噴霧粒徑最小化，以 100 kg cm^{-2} 的壓力噴霧，配合擾流風扇，增加微霧飄移距離。大部分霧粒在掉落地面以前就完全蒸發，再利用蒸散冷卻的原理，低溫霧粒與熱氣形成蒸散作用，由開頂溫室上方排出熱氣。溫室內溫度與大氣溫度 (outdoor) 相較之下，其降溫幅度可達 6℃；則 ORG1 溫室在無任何降溫設備控制之下，其降溫幅度達 15℃以上。本研究之低溫微霧降溫系統，以高壓噴霧能產生較佳的霧化效果，提升蒸發冷卻效率，發揮開頂溫室之最大降溫效益。

誌謝

本研究感謝農委會設施農業技術升級計畫 (103 農科-14.4.1-農-C4) 與 (104 農科-16.4.1-農-C4) 的支持，特表謝意。

引用文獻

Abdel-Ghany, A. M., E. Goto, and T. Kozai. 2006. Evaporation characteristics in a naturally ventilated, fog-cooled greenhouse. Renew. Energy 31:2207–2226.

Arbel, A., M. Barak, and A. Shklyar. 2003. Combination of forced ventilation and fogging systems for cooling greenhouses. Biosyst. Eng. 84:45–55.

Dean, J. A. 1985. Lange's Handbook of Chemistry. 13th ed. McGraw-Hill. New York. 1792 pp.

Fukatsu, T. and M. Hirafuji. 2005. Field monitoring using sensor-nodes with a web server. J. Robot. Mechatron. 17:164–172.

Hawlader, M. N. A. and B. M. Liu. 2002. Numerical study of the thermal hydraulic performance of evaporative natural draft cooling towers. Appl. Therm. Eng. 22:41–59.

Holman, J. P. 1990. Heat Transfer. 7th ed. McGraw-Hill. New York. 714 pp.

Katsoulas, N., A. Baille, and C. Kittas. 2001. Effect of misting on transpiration and conductances of a greenhouse rose canopy. Agric. For. Meteorol. 106:233–247.

Prenger, J. J., R. P. Fynn, and R. C. Hansen. 2002. A comparison of four evapotranspiration models in greenhouse environment. Trans. ASAE 45:1779–1788.

Reist, P. C. 1993. Aerosol Science and Technology. 2nd ed. McGraw-Hill. New York. 379 pp.

Yu, K. C., H. M. Huang, and Y. C. Chiang. 2015. Discussion and measurement of applying a cooling fogging air-conditioning system for working environment cooling and air quality improvement. J. Appl. Sci. 15:763–772.

A Study on Applying Micro-Fog Chiller Blowing System in the Open Roof Greenhouse

Fu-Liang Hong[1], Li-Duhng Huarng[2], and Ming-Hwi Yao[2,*]

Abstract

Hong, F. L., L. D. Huarng, and M. H. Yao. 2016. A study on applying micro-fog chiller blowing system in the open roof greenhouse. J. Taiwan Agric. Res. 65(2):146–153.

This study used an open-roof greenhouse to evaluate the evaporative cooling efficiency of a micro-fog chiller blowing system in the open roof greenhouse. A traditional blowing sprayer cooling system uses turbulent fan with room temperature fog/mist sprayer coordinated with the control of spraying amount and relative humidity to cool down temperature inside a greenhouse. Due to the lack of ability to reduce temperature of the fog, the cooling efficiency inside the greenhouse is not so effective. Therefore, a micro-fog chiller blowing system by spraying 10℃ micro-fog at 100 kgf cm^{-2} pressure has been setup and applied for this purpose. The opened roof enabled the hot humid air to rise and exhaust from the top openings of the greenhouse, whereas the cold dry air was blowing through side wall openings for cooling down temperature and lowering relative humidity inside the greenhouse. It resulted in excellent cooling effect. Experimental results showed that when the outdoor temperature was 28.2℃ at 12:00, the greenhouse (ORG1) without installing the cooling system would cumulate the radiant heat to the maximum extent and increased temperature up to 39.8℃ during daytime. On the other hand, the greenhouse installed with a micro-fog chiller blowing system (ORG2) had its temperature to 22.2℃ with relative humidity of 72.8%. The cooling effect reached more than 15℃ in temperature reduction and could keep it up in a steady state. Results suggest that the micro-fog chiller blowing system is capable of reducing temperature inside the greenhouse effectively.

Key words: Open-roof greenhouse, Micro-fog chiller, Blowing system, Evaporative cooling.

Received: July 17, 2015; Accepted: September 15, 2015.
* Corresponding author, e-mail: mhyao@tari.gov.tw
[1] Research Assistant, Agricultural Engineering Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Research Fellows, Agricultural Engineering Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(2):154–172 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06502.06

研究報告

運用分子標幟輔助提升耐鹽粳稻之耐旱性

連怡鈞[1] 郭介煒[2] 郭素真[3] 林彥蓉[4] 吳永培[5,*]

摘要

連怡鈞、郭介煒、郭素真、林彥蓉、吳永培。2016。運用分子標幟輔助提升耐鹽粳稻之耐旱性。台灣農業研究 65(2):154–172。

本研究以 5 個粳型稻 (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) 誘變品系 SM61、CWY981126、CWY981127、CWY981128 及 CNY911303 等為材料，在 5 葉齡以 100、150、200、250 及 300 mM NaCl 等 5 種不同濃度溶液進行模擬鹽分處理，在各品系之耐鹽性評估中，發現除了 150 mM 鹽分逆境外，耐鹽表現均以 CWY981126 顯著優於其他品系。而以 4 個秈型稻 (*Oryza sativa* ssp. *indica*) 品種 (系) 'HY15'、'IR29'、'IR64' 及 SM1 為材料，在幼苗期 3 葉齡以 28% 聚乙二醇 (PEG 6000) 進行模擬缺水逆境處理，結果發現 'HY15' 的秧苗期耐旱性表現較佳。進一步以 CWY981126 為耐鹽性輪迴親，而 'HY15' 為耐旱性貢獻親，經 2 次回交將耐旱性導入 CWY981126 中。各回交世代選育過程均先經過缺水，挑選出耐鹽和耐旱的後代，再透過分子標幟之背景輔助選拔，發現 BC_1F_1、BC_2F_1 及 BC_2F_2 的回復率分別為 73.6、85.5 及 88%，與理論的遺傳回復率相近。而 BC_2F_3 品系經耐旱特性檢測，發現有 7 個品系之耐旱表現優良，進一步分析此 7 個品系之耐鹽表現，結果以 LD1、LD7、LD8 及 LD10 等 4 個品系之耐鹽表現良好，接近或優於輪迴親 CWY981126。由此推測，此 4 個品系已兼具有耐旱及耐鹽特性。綜合上述結果，顯示在分子標幟輔助下 BC_2F_2 回交後代平均已有 88% 比率回復至輪迴親的遺傳背景，成功將耐旱性導入耐鹽粳稻中，而選育出同時具耐鹽及耐旱特性潛力的新品系。這些品系值得進一步探討，希望未來能提供國內外缺水及鹽化土地的栽培利用。

關鍵詞：分子標幟輔助選拔、耐旱、耐鹽、水稻。

前言

水稻稻穀年均產量僅次於小麥，是世界第 2 重要的禾穀類糧食作物，全球超過一半人口以水稻作為主食，尤其是發展中國家人民所需熱量的主要來源。2008 年全球共有 15,570 萬公頃的土地栽種水稻，總共生產 66,100 萬噸的稻米 [International Rice Research Institute (IRRI) 2009]。隨著全球人口日益增長，糧食需求不斷的增加，帶給農業重大的挑戰，聯合國糧農組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 估計 2050 年時世界糧食產量需求要增加 60%，其中大部分糧食來源需由現有土地生產，尤其是經由水稻生產供應，顯示水稻生產將面臨越來越多的壓力和挑戰。然而，由於全球暖化效應加劇，加上如極端天氣事件發生、降雨量分布不均、肥料過度使用及鹽化土地面積增加等因素，皆將不利於水稻的生長與發育，因此未來非生物逆境將成為作物產量的最主要限制因子之一 (Brown & Halweil 1998; Pandey *et al*. 2000)。世界上約有 35% 水稻生產於看天田區，其稻米的生產

投稿日期：2015 年 8 月 7 日；接受日期：2015 年 9 月 21 日。
* 通訊作者：wuypei@dns.caes.gov.tw
[1] 國立嘉義大學農藝學系碩士生。台灣 嘉義市。
[2] 國立嘉義大學農藝學系助理教授。台灣 嘉義市。
[3] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系研究助理。台灣 嘉義市。
[4] 國立台灣大學農藝學系副教授。台灣 台北市。
[5] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系副研究員。台灣 嘉義市。

最主要受到乾旱影響；而沿海地區及內陸的水稻田區，乾旱通常會伴隨鹽害情形發生 (Wang *et al*. 2013b)。亞洲許多地區灌溉水是用來降低水田土壤中之鹽分，但因缺乏乾淨的灌溉水，往往導致土壤 2 次鹽化，從而增加逆境對水稻的影響。因此，鹽害是僅次於乾旱，影響水稻產量之第 2 大非生物逆境限制因素。

國際水稻基因體計畫 (International Rice Genome Sequencing Project; IRGSP) 於 1997 年開始針對粳稻「日本晴」('Nipponbare') 進行全基因體序列研究，在 2002 年公布粳稻品種「日本晴」(Goff *et al*. 2002) 和秈稻品種 '93-11' (Yu *et al*. 2002) 基因組的定序草圖後，2005 年時也完成「日本晴」的全基因體定序，其大小約 389 Mb (IRGSP 2005)。此結果促進多種分子標幟的發展，其中簡單序列重複 SSR (simple sequence repeat) 在水稻基因體內因分布廣泛數量豐富、多型性高、共顯性 (co-dominant)、易於探測及可使用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 技術操作等特性，故廣泛應用在圖譜建立、分子輔助選拔與定位選殖 (positional cloning)，有效提升了工作效率 (McCouch *et al*. 1997)。隨著後基因體學時代的來臨，應用分子生物技術輔助傳統育種工作，大幅提升了育種效率及縮短育種年限。而分子標幟可以偵測生物體內能遺傳至後代的特定 DNA 序列、蛋白質，目前以 DNA 標幟應用最廣泛 (Wu & Wang 2011)。

大多數水稻之非生物逆境耐受特性係受數量性狀基因座 (quantitative trait loci; QTLs) 所控制，遺傳特性複雜且容易受環境干擾，因此無法由植株外觀進行準確的判斷，導致選拔效率低下 (Wang *et al*. 2013a)。利用目標性狀 QTLs 圖譜定位，將有助於更進一步瞭解這些性狀的遺傳基礎，然而僅少數 QTLs 已被證實並作為育種指標。因為大多數的 QTLs 於不同遺傳背景或環境下，受遺傳與環境交感作用之影響，導致缺乏再現性 (Li *et al*. 2005; MacMillan *et al*. 2006; Yue *et al*. 2008)，也阻礙了耐逆境育種的研究發展。

分子標幟輔助選拔 (marker-assisted selection; MAS) 屬於間接選拔，且由於目標性狀的遺傳不會隨品種材料或環境不同而有差異，相當穩定且再現性佳。因此，藉由基因體學發現和標記新基因，再透過與目標基因緊密連鎖分子標幟的偵測，如此目標性狀便可間接依分子標幟表現而選出 (Wu & Wang 2011)。又應用 MAS 於水稻耐旱育種時，首要條件為目標基因在不同遺傳背景族群中均表現，如此耐旱 QTLs 在各遺傳背景中才具應用價值，並於確立與目標 QTLs 緊密連鎖的分子標幟後，可藉由分子標幟表現來選育耐旱水稻品種 (Wang *et al*. 2013a)，如此可大幅提升耐旱水稻的育種效率。

耐鹽與耐旱逆境基因的堆疊，是耐多重逆境水稻育種之重要目標。選育同時具耐鹽及耐旱雙重耐逆境特性之新品種，除了平日可於水田栽培外，栽培過程若發生逆境衝擊，因其具有耐多重逆境特性，故可降低減產效應，穩定糧食生產。在逆境易發生區，如於缺水、鹽化、或缺水及鹽化同時存在之多變環境下，更可利用耐多重逆境之耐逆境品種增加糧食的生產，因此耐多種逆境水稻的選育已逐漸成為當前育種者追求之重要目標。達成選育耐多重逆境新品種的方法，可藉由基因堆疊來完成，透過同時堆疊多個基因進入單一遺傳背景中，即可促使多個基因同時表現在 1 個品種中 (Mundt 1990)。基因堆疊過程相當複雜，僅藉由傳統育種很難有效完成，特別是控制目標性狀基因常與一些不良特性緊密連鎖，要打破顯性和上位性的效應困難度很高，常常需經過多次回交之操作方能達成 (Young & Tanksley 1989)。透過以外觀表現、穀粒質量性狀及分子標幟為基礎之背景選拔，篩選子代以快速回復至輪迴親的基因型，讓子代回復率可達到 85–96% (Dokku *et al*. 2013)，使外表性狀配合分子標幟之篩選可真正落實應用於基因堆疊中，此為耐多種逆境水稻的選育成功與否的關鍵決定因素。

過去研究結果顯示，耐旱與耐鹽有關基因座之數量龐大且組成複雜，控制基因廣泛分布於水稻基因組中，在不同族群或環境中只有極少數 QTLs 會持續的被檢驗出 (MacMillan *et al*. 2006; Yue *et al*. 2008; Zang *et al*. 2008)，目前只有發現少數與耐旱有關主效 QTLs，如 *qtl12.1*、*DRO1* 或與分子標幟 EM11-11 緊密

連鎖的 QTLs，耐鹽相關之 *SKC1* 與 *Saltol*，這些基因已被確認並應用於水稻 MAS 育種 (Ren *et al*. 2005; Bernier *et al*. 2007; Kumar *et al*. 2007; Uga *et al*. 2013)。因此，從種原中開發、檢測與耐旱、耐鹽相關緊密連鎖之分子標幟，對於發展耐旱與耐鹽水稻新品種將扮演非常重要的角色 (Yue *et al*. 2008)。

透過化學誘變方式進行水稻育種，其不僅可增加種原變異，更可創造種原新穎性，是作物育種的有效手段之一。Jwo (2007) 在疊氮化鈉 (sodium azide) 誘變水稻「台農 67 號」('TNG67') 突變品系為材料，在秧苗期耐鹽篩選逆境下，結果選出分別具有耐鹽及感鹽突變品系。Yen & Lin (2011) 則在 1,005 個粳稻嘉農育 911303 號 (CNY911303) 的甲基磺酸乙酯 (EMS) 誘變品系中，篩選出耐鹽品系 SM61，該品系耐鹽表現優於 'Pokkali' 及 'Nona Bokra' 等已知的耐鹽水稻品種，遺傳分析結果發現其耐鹽性由單一顯性基因所控制。Wu (2013) 以 'IR64' 經 2 次疊氮化鈉誘變品系為材料，在 M_3 族群進行 20% PEG 6000 溶液模擬水分缺乏逆境處理，結果選得 126 株 M_3 耐旱株，這些品系在 M_4 世代 3 葉齡時再以 28% PEG 6000 溶液進行耐旱性確認。結果發現有 9 個突變品系表現了高度耐旱性，上述結果顯示化學誘變不僅可增加栽培種的多樣性，更有助於耐逆境水稻之開發。

由於台灣地區非生物逆境發生時機不易精確預測，因此需積極投入非生物逆境水稻的研發，如此方能因應全球暖化的衝擊 (Wu 2013)。基此，本研究乃利用粳稻耐鹽品系 CWY981126 及秈稻耐旱品種 'HY15' 為親本，透過 2 次回交將 'HY15' 之耐旱性導入 CWY981126 中。而在回交過程中，各世代均則先進行缺水逆境篩選後，再後輔以分子標幟之背景選拔，期經此將耐鹽與耐旱特性進行堆疊，選育出同時具有耐鹽暨耐旱之粳稻新品系。

材料方法

試驗材料

供試品系不同鹽分濃度之耐受性： CNY911303 係來自 1 mM 疊氮化鈉誘變「台農 67 號」種子所培育之香味突變品系，本品系 M_8 世代再以 100 mM 之 EMS 溶液再次進行誘變，其後以譜系法持續純化繁殖後，於 M_6 世代各品系於 3 葉齡時利用 150 mM NaCl 溶液進行耐鹽篩選，結果選出 SM61、CWY981126、CWY981127 和 CWY981128 等 4 個秧苗期呈現耐鹽之品系。此 4 個品系及誘變親本 CNY911303，即為不同 NaCl 鹽分濃度耐受性測定用材料。將此 5 個品系以水耕液培育至幼苗期 5 葉齡，分別以含有 100、150、200、250 及 300 mM NaCl 之水耕液進行模擬鹽分逆境處理，並以 RCBD (randomized complete block design) 設計排列。各品系於不同濃度處理時均採用 4 重複，每重複 8 株。在處理滿 1 d 後，開始進行耐鹽等級調查，耐鹽等級標準參考 Jwo *et al*. (2008) 修改自 IRRI (2002) 所定水稻標準評估系統之鹽害分級標準 (standard evaluation system for rice; SES)。經此挑選耐鹽表現佳者，以供作分子標幟輔助育種之輪迴親使用。

供試品系耐旱測試： 以 'HY15'、'IR29'、'IR64' 及 SM1 等 4 個秈稻 (*O. sativa* ssp. *indica*) 為材料，其中 'HY15' 為中國大陸引進之耐旱佳之秈稻品種，而 'IR29' 和 'IR64' 則為國際稻米研究所 (International Rice Research Institute; IRRI) 引進之缺水敏感型秈稻品種，至於 SM1 係 'IR64' 以疊氮化鈉誘變所得秧苗期表現耐旱之品系。4 個品種 (系) 均於水耕液中培育，至幼苗期 3 葉齡時，再以 28% PEG 6000 水耕液進行模擬缺水逆境處理，並以 RCBD 設計排列。各品種 (系) 處理時均採用 4 重複，每重複 8 株。在處理滿 1 d 後，開始進行耐旱等級調查，耐旱處理等級標準採用 IRRI (1996) 所定水稻標準評估系統進行。經此挑選耐旱佳者，供分子標幟輔助育種之貢獻親使用。

耐逆境表現調查

耐鹽等級調查： 種子進行模擬鹽分逆境處理前，以免賴得粉劑 (Benomyl) 稀釋 1,000× 溶液消毒種子 1 d，再將發芽種子點播於 80 孔的栽培盤中進行水耕栽培，水耕營養液採用改良式木村氏 B 培養液配方 (Kimura B solution)

(Yoshida 1976) 進行。發芽種子先以 0.5× 水耕液培養，當生長達 1 葉齡時更換為 1× 水耕液，持續生長至 3 葉齡時再換成 1.5× 水耕液。當植株平均達 5 葉齡時，以 NaCl 之 1.5× 水耕液進行耐鹽等級評估，同時以敏感型 'IR64' 做為對照品種，而耐鹽等級調查則同上述供試品系於不同鹽分濃度下耐受性之標準進行。惟分子標幟輔助育種之 BC_2F_3 回交後代，則於耐鹽處理後進行復水處理，當敏感型對照品種 'IR64' 耐鹽等級平均達 7 級時，即進行復水處理 (圖 1)。存活回交後代移至田間培育，並收穫自交種子利用。

耐旱試驗與等級調查：材料種子同樣係以免賴得粉劑稀釋 1,000× 溶液消毒種子 1 d，再將發芽種子點播於 80 孔的栽培盤中進行水耕栽培。營養液同樣採用改良式木村氏 B 培養液配方，發芽種子先以 0.5× 水耕液培養，當生長達 1 葉齡時更換為 1× 水耕液，持續生長至 3 葉齡時再換成 1.5× 水耕液。當植株生長平均達 3 葉齡時，進行耐旱篩選及評估，即以 28% PEG 6000 之 1.5× 水耕液處理，同時培育敏感型 'IR64' 作為對照品種。耐旱處理等級調查標準，採用 IRRI (1996) 所定水稻標準評估系統進行。分子標幟輔助育種 BC_1F_1、BC_2F_1 及 BC_2F_2 回交後代經耐旱處理後，乃進行復水，而敏感型對照品種 'IR64' 耐旱等級平均達 7 級時，即進行復水處理 (圖 2)。存活回交後代移至田間培育，並收穫自交種子利用。

此外，為避免耐逆境操作時微環境之影響，在水耕盤中的 4 個角落、邊上、中間 4 個位置及中央位置均放入 'IR64' 作為對照，作為逆境等級進展、微環境穩定為否等控制及操作。當 'IR64' 的表現不正常時，該次試驗即予捨棄，尤其需進行復水操作時，'IR64' 的耐逆境等級表現是判定復水時機的依據。

分子標幟輔助水稻耐旱與耐鹽特性之堆疊

以 'HY15' 作為貢獻親，CWY981126 為輪迴親，進行雜交組合建立，並於 F_2 世代進行耐旱處理。由調查結果中，選出耐旱等級 3 之耐旱株與 CWY981126 進行回交族群建立。各回交世代 (BC_1F_1、BC_2F_1、BC_2F_2) 再以 28 % PEG 6000 缺水逆境進行篩選試驗，同樣耐旱等級 3 且復水後存活植株進一步移植田間栽培。存活植株再利用散布於 12 對染色體上，距離 30 centiMorgan 之分子標幟且進行分析及背景選拔，與輪迴親本 CWY981126 遺傳回復率高之植株則進行回交及自交，產生之回交



圖 1. 水稻秧苗期耐鹽等級調查標準。(A) 植株生長正常，耐鹽等級為 0；(B) 植株葉片捲曲或下位葉黃化，耐鹽等級為 1；(C) 植株葉片先端乾枯白化，耐鹽等級為 3；(D) 植株葉片約 1/2 乾枯白化，耐鹽等級為 5；(E) 植株葉片約 2/3 乾枯白化，耐鹽等級為 7；(F) 植株完全乾枯白化，耐鹽等級為 9。

Fig. 1. Standards used for evaluating salt-tolerance in rice seedlings. (A) When plant growth is normal, the scale of salt-tolerance is denoted 0; (B) some leaves are rolled or discolored, the scale of salt-tolerance is denoted 1; (C) some leaf tips are drying, the scale of salt-tolerance is denoted 3; (D) about 1/2 leaves are drying, the scale of salt-tolerance is denoted 5; (E) about 2/3 leaves are drying, the scale of salt-tolerance is denoted 7; and (F) whole plant nearly dead and wilted, the scale of salt-tolerance is denoted 9.



圖 2. 水稻幼苗期耐旱等級之型態。(A)–(F) 為水稻 3 葉齡幼苗進行水分逆境處理後，不同耐旱等表現之等級，分別為 (A) 未乾旱處理，等級為 0；(B) 植株葉片捲曲或下位葉黃化，等級為 1；(C) 植株葉片先端乾枯白化，等級為 3；(D) 植株葉片約 1/2 乾枯白化，等級為 5；(E) 植株葉片約 2/3 乾枯白化，等級為 7；(F) 植株完全乾枯白化，等級為 9。

Fig. 2. The different scales of rice morphology in response to drought treatment. (A)–(F) Rice was treated with 28% PEG 6000 at 3-leaf-old stage and scaled as (A) none treatment, the scale of drought-tolerance is denoted 0. (B) Some leaves are rolled or discolored, the scale of drought-tolerance is denoted 1. (C) Some leaves tips are drying, the scale of drought-tolerance is denoted 3. (D) About 1/2 leaves of the plant are drying, the scale of drought-tolerance is denoted 5. (E) About 2/3 leaves of the plant are drying, the scale of drought-tolerance is denoted 7. (F) The whole plants are almost dead and drying, the scale of drought-tolerance is denoted 1, respectively.

種子及自交 BC_2F_2 種子。至於 BC_2F_2 族群，係獲選 BC_2F_1 之自交種子分別取相同比例混合而成，之後乃經缺水逆境及存活株背景選拔，而獲選之 BC_2F_2 分別收穫自交種子並成立 BC_2F_3 品系。BC_2F_3 品系則以進行 28% PEG 6000 缺水逆境及 200 mM 鹽分逆境，再確認耐多重逆境特性。檢定採用 RCBD 試驗設計，每系 3 重複，每重複 4 株。分子標幟輔助耐旱及耐鹽特性之堆疊及選育詳細流程，如圖 3 所示。

分子標幟分析

水稻 DNA 萃取：水稻基因體 DNA 的萃取是逆境處理前，先取水稻幼苗葉尖 4 cm 之新鮮葉片，經冷凍乾燥約 1 d 後，採用修改自 Kazuhiro *et al*. (1998) 發表之 benzyl chloride 法進行 DNA 萃取。

PCR 反應、電泳分析及基因型判讀：PCR 反應及電泳分析採用 Liao (2012) 發表的方式進行，比對子代與親代 PCR 擴增後產物的 DNA 片段大小，電泳圖譜若僅出現 1 個 DNA 條帶，且與 'HY15' 條帶相同者，則此子代為同型合子，基因型紀錄為 A；只出現 1 個 DNA 條帶而與 'IR64' 條帶相同者，則子代亦為同型合子，基因型紀錄為 B；子代同時出現兩個條帶並與兩個親本相同者，即為異型合子，基因型紀錄為 H。由於 BC_1F_1、BC_2F_1 均為回交子代，為避免自交種子的混雜影響，其雜交種子在基因型的分析中只會出現輪迴親同型合子 B 與異型合子 H，當子代基因型出現與貢獻親同型合子 A 者，則為自交植株，分析發現後乃淘汰自交單株。

建立多型性分子標幟：本研究主要利用 SSR 及 STS 分子標幟進行分析，而分子標幟之挑選先依據 Hsu (2012) 發表之多型性分子標幟資料進行，即挑選 CWY981126 和 'HY15' 間具多型性分子標幟進行分析。分子標幟不足位置，則額外自行設計 SSR 及 indel 填補，自行設計之 SSR 來源根據水稻分子標幟資料庫網站 Gramene (http://www.gramene.org/markers/microsat/) 已公布之 SSR 分子標幟序列 (Sup-

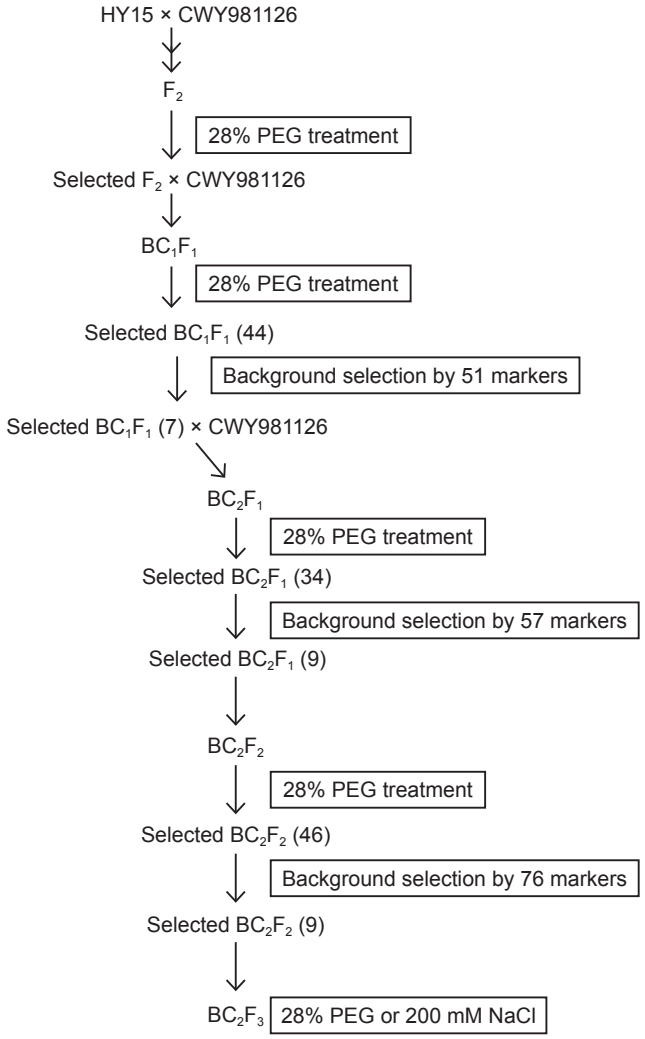


圖 3. 分子標幟輔助耐旱特性轉移至 CWY981126 之回交育種流程，包含 28% PEG 6000 水分處理及用於背景選拔之分子標幟說明。括弧內數值為每 1 個回交世代挑選植株數。

Fig. 3. The backcross breeding scheme for transfering the drought-tolerant trait to CWY981126 by MAS (marker-assisted selection), with details of the treatment of 28% PEG 6000 and markers used for background selection. The numbers of plants selected in each generation are indicated in parentheses.

plementary Table 18, IRGSP 2005)，indel 的設計則是根據 Shen *et al*. (2004) 所發表 indel 存在位置進行相關引子設計。

繪製連鎖圖譜：利用專一性引子將目標片段擴增，並以電泳系統將擴增片段加以分離，挑選出在 2 個輪迴親與貢獻親間具備多型性的分子標幟，使用 RAP-DB 網站提供 IRGSO/RAP build 5 版 BAC/PAC 位置，轉換成在 IRGSP 網站 Build 5 版所公布的連鎖圖譜位置，並將結果利用 GGT 2.0: graphical genotypes/2007 edition 軟體 (http://www.wageningenur.nl/) 進行統計分析，並用於輔助選拔之分子標幟的連鎖圖譜繪出。

統計分析：試驗中統計分析使用 Microsoft Office Excel 2010 套裝軟體，對試驗中產量構成要素和各葉齡處理天數先進行變方分析，並於有顯著差異之項目再以 LSD (α = 0.05) 進行品系間比較。

結果

品系耐逆境測定

各品系對不同鹽分濃度耐受性：利用 CNY911303、SM61、CWY981126、CWY981127 及 CWY981128 等 5 個香米品系進行 100、150、200、250 及 300 mM 不同模擬鹽分濃度耐受性比較，結果在 100 mM 鹽分逆境下，稻株在處理 2 d 時即開始出現耐鹽等級差異。由試驗結果，發現除 SM61 外，其餘 4 個品系經 100 mM 鹽分逆境處理 5 d 時已達 3 級，而在 7 d 除品系 CWY981127 外，其餘品系均表現均達 3 級以上，9 d 時以品系 SM61 之耐鹽等級表現最佳，最終於 14 d 時所有品系則皆達到 7 級以上。而經由變方分析及多重比較發現，各品系於 5、7、9 及 14 d 時，其品系間之耐鹽表現達到顯著差異水準，而 14 d 之耐鹽等級以 CWY981126 耐鹽表現最佳 (表 1)。

在 150 mM 鹽分逆境處理下，於 2 d 時各品系葉片開始出現鹽分處理反應差異，3 d 時除 CWY981127 外，其餘 4 個品系皆已達 3 級。而在 5 d 時，則是除了 SM61 之外，其餘品系均表現 3 級以上，CWY981128 甚至達到 5 級。在 10 d 時，各品系皆達到 7 級以上，但整體而言仍以 CWY981126 仍維持最佳的耐鹽表現。至 14 d 時，CNY911303 與 CWY981128 耐鹽等級已達 9 級，但其餘 3 品系均未達 9 級 (表 1)。

在 200、250 及 300 mM 模擬鹽分逆境處理時，各品系處理後 2 d 耐鹽等級已皆達 3 級以上，其中以 SM61 對鹽分逆境表現最為敏感。在鹽分逆境處理後 2–4 d，即呈現 5–8 級的表現，並最快達到耐鹽等級 9 級；而 5 個品系經 3 種高鹽分逆境處理後，結果發現 CWY981126 的耐鹽表現仍維持優良表現 (表 1)。

綜合上述研究發現，CWY981126 不論是在 100、250 及 300 mM 模擬鹽分處理下，均是表現最優良的耐鹽品系，表現皆顯著高於其餘 4 個品系。而在 200、250 及 300 mM 模擬鹽分處理時雖表現並非最佳者，但仍有相當不錯的耐鹽反應，顯示本品系對不同濃度鹽分的耐受性佳。在 100 與 150 mM 模擬鹽分處理表現較佳的 SM61 和 CWY981127，其在 200、250 及 300 mM 模擬鹽分處理下，對鹽分耐受性並沒有一致性的穩定反應 (表 1)。

品系耐旱性測定：‘HY15’、‘IR29’、‘IR64’ 及 SM1 等於稻株幼苗 3 葉齡時，以 28% PEG 6000 進行模擬缺水逆境處理，結果稻株經缺水逆境處理 1 d 時即出現耐旱等級之差異。在 2 d 時，所有品種 (系) 皆達到 5 級，而在 3 d 時除了 ‘IR29’ 達到 7 級，其餘品系均未達到耐旱等級 7 級。雖然自 4 d 開始 ‘HY15’ 的耐旱表現低於 ‘IR29’，但是最終在 8 d 時只有 ‘IR29’ 達到 9 級。經由變方分析結果，顯示品系間耐旱等級表現皆未達顯著水準，雖然 ‘HY15’ 的耐旱反應表現不及耐旱品系 SM1，但 1 d 時仍以 ‘HY15’ 的表現最佳，並於最終 8 d 之耐旱表現高於缺水敏感型品種 ‘IR29’ (表 2)。

上述 4 個品系在 3 葉齡 28% PEG 6000 模擬缺水逆境處裡之耐旱表現調查結果，其中 ‘HY15’ 幼苗期之耐旱表現並未顯著高於敏感型品種 ‘IR64’ 及 ‘IR29’，其原因可能是 ‘HY15’ 耐旱特性主要表現時期並非在幼苗期，而係於生殖生長期或其他生長時期時才表現出耐旱特性。此由 Lin *et al.* (2014) 結果指出，‘HY15’ 雖具有秧苗期耐旱特性，然其經過 4 次回交轉移至 ‘TK9’ 後，結果 ‘HY15’ 及 BC_4F_4 品系之產量及產量要素表現相當優越，顯示在生殖生長期或其他生長時期時的高度耐旱性。然而，另有可能係在模擬缺水逆境處理下容易受到微氣候因素影響，致使調查上較易發生誤差，造成無法充分表現出本品種秧苗期之耐旱特性 (表 2)。

水稻耐旱與耐鹽特性堆疊族群之選拔

回交世代 (BC_1F_1 及 BC_2F_1) 之分子標幟背景選拔：在 ‘HY15’ 與 CWY981126 之 BC_1F_1 回交世代，經幼苗期 3 葉齡模擬缺水逆境處理分析，結果挑選耐旱表現較佳的 44 株，進行分子標幟背景選拔。共利用 51 個分子標幟，其中包括 28 個 SSR、5 個 STS 及 18 個 indel 分子標幟 (表 3、圖 4)，而在背景選拔過程中，有 7 株的基因型呈現同型合子 A。由於 BC_1F_1 世代基因型應與 CWY981126 相同或是

表 1. 5 個梗稻誘變品系的 5 葉齡幼苗在 5 種不同氯化鈉鹽分濃度處理 14 d 於 1–9 個耐鹽等級之耐鹽表現。

Table 1. The score of salinity-tolerance on 1–9 scales of five *japonica* mutants treated with 5 concentrations of NaCl for 14 days at five-leaf-old seedling stage.

		Scale of salt-tolerance[z]													
		Days after treatment													
Treatment	Line	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
100 mM NaCl	CWY981126		1.00	1.75	2.63	3.38 ab	3.69	4.50 ab	5.00	6.69 a	7.00	7.06	7.25	7.38	8.19 b
	CWY981127		1.19	1.56	2.88	3.19 b	3.63	3.88 c	4.63	6.00 bc	6.81	6.88	7.31	7.44	8.50 ab
	CWY981128		1.19	2.19	2.88	3.25 b	3.69	4.56 a	5.06	6.44 ab	7.19	7.13	7.50	7.75	8.88 a
	SM61		1.38	1.69	2.56	2.63 c	3.56	4.06 bc	4.50	5.94 c	7.06	7.25	7.44	7.69	8.50 ab
	CNY911303		1.25	2.06	2.94	3.88 a	4.25	4.44 ab	5.00	6.56 a	7.00	7.13	7.31	7.81	8.63 a
150 mM NaCl	CWY981126		1.69 b	3.00 b	3.81 b	4.63 b	5.13 b	5.19 b	6.50 ab	7.13 b	7.38 c	7.38 c	7.44 c	8.06 b	8.69 ab
	CWY981127		1.75 b	2.94 b	4.19 ab	4.31 b	5.19 ab	5.19 b	6.31 b	7.13 b	8.00 a	7.94 ab	7.94 ab	8.50 ab	8.31 c
	CWY981128		2.56 a	3.69 a	4.69 a	5.19 a	5.69 a	6.00 a	6.88 a	7.56 a	8.06 a	8.00 a	8.13 a	8.69 a	9.00 a
	SM61		1.69 b	3.38 ab	3.75 b	3.63 c	4.44 c	5.13 b	5.25 c	6.31 c	7.50 bc	7.50 bc	7.50 bc	7.56 c	8.50 bc
	CNY911303		2.19 ab	3.44 ab	4.25 ab	4.13 bc	5.31 ab	5.31 b	6.44 ab	7.06 b	7.94 ab	7.94 ab	7.94 ab	8.19 b	9.00 a
200 mM NaCl	CWY981126	2.06	4.13 c	6.00 b	6.19 b	6.88 b	7.19 b	8.81	8.94						
	CWY981127	2.50	4.75 b	6.00 b	6.31 b	7.06 b	7.31 b	8.81	9.00						
	CWY981128	2.25	4.25 bc	5.94 b	6.06 b	6.69 b	7.19 b	8.56	8.94						
	SM61	2.44	5.94 a	7.06 a	8.00 a	8.38 a	8.69 a	9.00	9.00						
	CNY911303	2.50	4.63 bc	5.94 b	6.00 b	6.88 b	7.19 b	8.81	9.00						
250 mM NaCl	CWY981126	3.19 bc	5.44 bc	6.44 b	6.81 b	7.31 c	7.81 c								
	CWY981127	3.81 a	5.50 bc	6.50 b	6.81 b	7.56 bc	8.38 b								
	CWY981128	3.50 ab	5.25 c	6.69 ab	7.06 b	7.50 bc	8.50 b								
	SM61	3.00 c	6.25 a	7.00 a	8.31 a	8.94 a	9.00 a								
	CNY911303	3.88 a	5.81 ab	6.94 a	6.94 b	7.81 b	8.13 bc								
300 mM NaCl	CWY981126	3.56 ab	5.88	6.31	7.25 b	8.19 b									
	CWY981127	3.06 b	5.56	6.50	7.63 b	8.63 a									
	CWY981128	3.69 a	5.88	6.50	7.56 b	8.69 a									
	SM61	3.94 a	5.75	6.69	8.19 a	8.94 a									
	CNY911303	3.94 a	6.06	6.44	7.44 b	8.88 a									

[z] Means with none or the same letter of a row are not significantly different at 5% level by LSD test.

表 2. 4 個秈稻品種在 3 葉齡幼苗以 28% PEG 6000 處理之耐旱等級表現。

Table 2. The scale of drought-tolerance on 1–9 scales of four indica rice treated with 28% PEG 6000 at three-leaf-old seedling stage.

	Scale of drought-tolerance							
	Days after treatment							
Line or variety	1	2	3	4	5	6	7	8
HY15	2.56	5.50	6.69	7.63	7.56	7.75	8.25	8.88
IR64	2.88	5.75	6.50	7.31	7.50	7.56	8.13	8.81
SM1	2.75	5.44	6.44	7.19	7.19	7.44	7.94	8.63
IR29	3.31	5.88	7.06	7.50	7.50	7.56	8.25	9.00

異型合子，故此 7 株為自交株而淘汰，而所餘 37 株 BC_1F_1 與 CWY981126 的遺傳相似度介於 68.1–81.2%，平均為 73.6% (圖 5)。選用與 CWY981126 相似度最高之 7 株 BC_1F_1 與輪迴親本進行回交，其遺傳相似度分別為 81.2、79.4、78.7、77.9、77.1、76.9 及 76.4%。同樣 BC_2F_1 世代幼苗期 3 葉齡經模擬缺水逆境處理挑選出 34 株耐旱 BC_2F_1，使用 57 個分子標幟進行背景選拔 (表 3、圖 4)，包括 36 個 SSR、5 個 STS 及 16 個 indel 分子標幟。又為避免特定基因型的重複篩選，除 RM1282 外，各回交世代使用之分子標幟均不相同；而 34 株 BC_2F_1 植株經過基因型判讀並去除自交株後，最終獲得 28 株 BC_2F_1 植株進行分析。其等與 CWY981126 的遺傳相似度介於 75.3–95.3%，平均約 85.5% (圖 5)。選用遺傳相似度較高之 9 株，其遺傳相似度分別為 95.3、90.1、89.5、89.3、88.8、88.6、88.6、88.4 及 87.8%，此 9 株 BC_2F_1 植株於自交後乃分別收獲 BC_2F_2 種子。

BC_2F_2 世代分子標幟背景選拔：各 BC_2F_1 單株收穫之自交種子，分別取 25 粒種子均勻混合成 BC_2F_2 族群。本族群經模擬缺水耐旱試驗篩選後，挑選耐旱較佳 46 植株，並以 76 個分子標幟進行背景選拔 (表 3、圖 4)，包括 41 個 SSR、4 個 STS 及 31 個 indel 分子標幟。除 indel 分子標幟 CH0448 外，此世代使用之分子標幟亦與前兩世代不同。分析結果顯示，46 株 BC2F2 植株與 CWY981126 的遺傳相似度介於 78.2–96.5% (表 4)，平均 88% (圖 5)。遺傳相似度 95.4、90、90.4、89.9、92.9、95、93.95、92.5、96.3 及 91.8% 的 10 株 BC_2F_2 稻株自交，分別收穫 BC_2F_3 種子供後裔耐旱及耐鹽檢定使用。

BC_2F_3 世代之後裔檢定：以獲選之 BC_2F_2 自交種子成立 BC_2F_3 品系，並利用此 10 個品系進行後裔檢定，藉以確認 'HY15' 之耐旱基因已成功導入 CWY981126 中。10 個品系耐旱處理結果，如表 5 所示。由各品系的耐旱等級表現，得知缺水處理 5 d 內，耐旱親本 'HY15' 的耐旱表現皆優於所有品系，且顯著高於耐鹽親本。在處理 1 至 5 d 內，除了品系 LD2、LD4 及 LD6 等 3 個品系之耐旱表現與 CWY981126 的耐旱等級相同或較差外，其餘品系耐旱等級表現雖不及 'HY15'，但耐旱表現大都顯著高於敏感親本 CWY981126。另外，為確立 BC_2F_3 世代耐鹽性是否仍保留於回交後代，由存活且耐旱性表現較佳的 7 個 BC_2F_3 品系進行耐鹽性檢測，結果如表 6 所示。由各品系的鹽分處理 5 d 開始表現耐鹽等級間之差異，而耐鹽親本 CWY981126 的耐鹽與品系 LD1、LD7、LD8 及 LD10 表現十分接近，並以 LD10 的耐鹽性表現最佳。復水後的恢復表現，則以 LD1、LD5、LD7、LD8 及 LD10 表現較佳。

討論

品系間耐逆境測定

Yen & Lin (2011) 從 CNY911303 之 EMS 誘變品系選得 11 個耐鹽品系，其 6 葉齡時以 300 mM NaCl 鹽分逆境處理 3 d，結果以 SM61 的存活率 83.33% 最佳，顯著高於其他耐鹽品系。本研究以 5 個品系在幼苗期 5 葉齡

表 **3.** CWY981126 與 ‘HY15’ 間應用於背景選拔具多型性分子標幟之數量。

Table 3. The number of polymorphic markers between CWY981126 and ‘HY15’ used for background selection.

		Genetic marker			
Backcross generation	Chromosome	SSR	STS	Indel	Subtotal
LD-BC_1F_1	1	6	0	1	7
	2	2	0	4	6
	3	5	0	0	5
	4	1	0	4	5
	5	1	1	1	3
	6	2	1	0	3
	7	3	1	1	5
	8	0	0	2	2
	9	0	1	2	3
	10	1	0	1	2
	11	3	1	1	5
	12	4	0	1	5
	Total	28	5	18	51
LD-BC_2F_1	1	5	0	2	7
	2	6	0	1	7
	3	3	1	2	6
	4	1	1	3	5
	5	4	0	0	4
	6	2	1	1	4
	7	3	0	1	4
	8	3	0	1	4
	9	1	1	3	5
	10	1	0	1	2
	11	2	1	1	4
	12	5	0	0	5
	Total	36	5	16	57
LD-BC_2F_2	1	14	0	6	9
	2	14	1	1	8
	3	10	1	3	6
	4	3	0	4	5
	5	11	0	1	7
	6	9	1	1	7
	7	10	0	2	6
	8	6	1	4	8
	9	3	0	3	5
	10	4	0	3	5
	11	7	0	3	5
	12	14	0	0	5
	Total	41	4	31	76

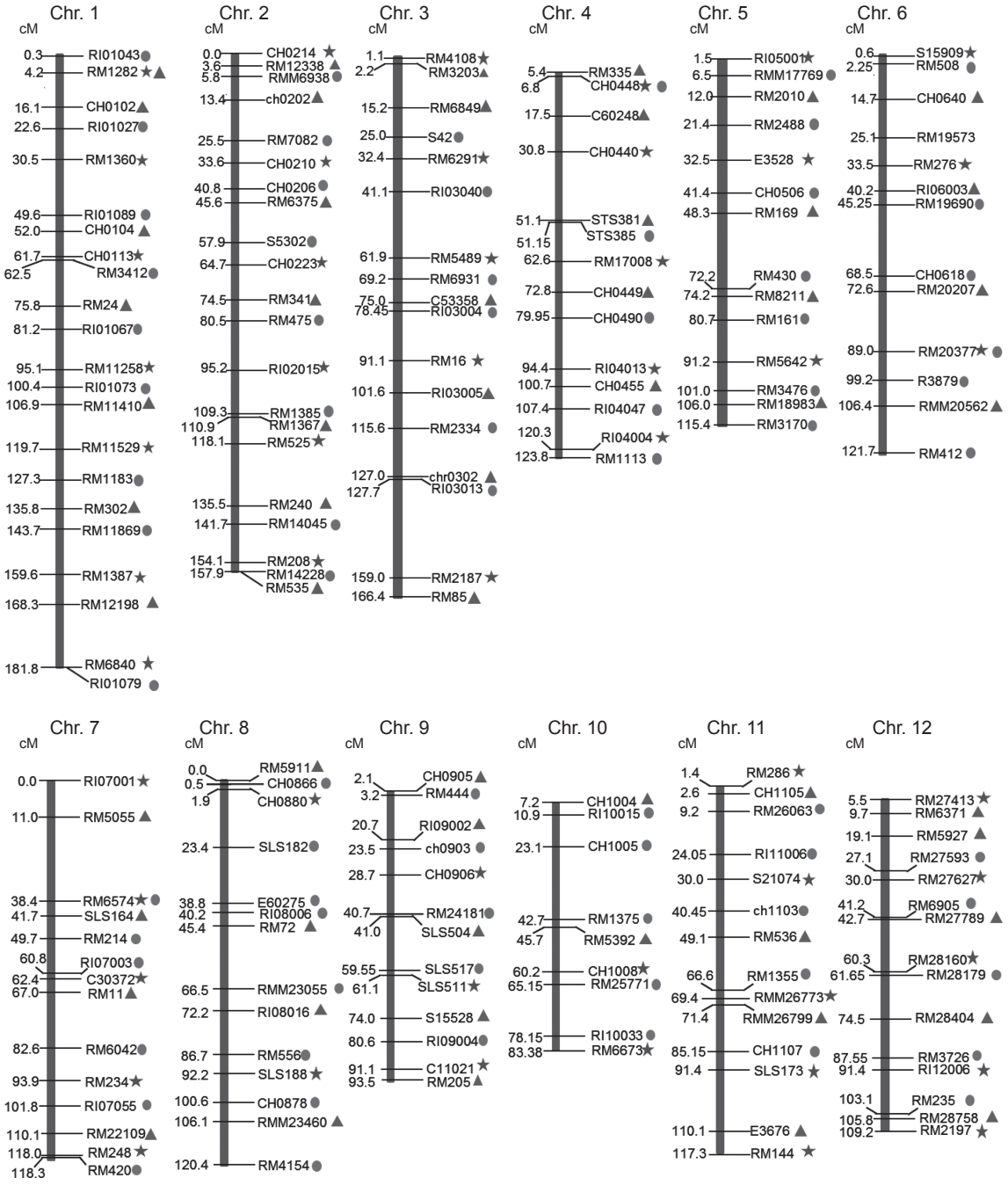


圖 4. 使用於回交族群背景選拔之多型性分子標幟。分別使用其中的 51 個分子標幟於 BC_1F_1 背景選拔 (星形)、57 個分子標幟於 BC_2F_1 背景選拔 (三角形) 及 76 個分子標幟於 BC_2F_2 背景選拔 (圓形)。分子標幟代號 RM 開頭為 SSR 分子標幟，C、E 或 S 為 STS 分子標幟，CH、STS、SLS 或 RI 為 indel 分子標幟。

Fig. 4. The polymorphic markers used for background selection in backcross population. 51 markers among all markers were applied to BC_1F_1 background selection (star), 57 markers among all markers were applied to BC_2F_1 background selection (triangle), and 76 markers among all markers were applied to BC_2F_2 background selection (circle). The prefixes RM indicates SSR markers, C, R, S or E indicates STS markers, and CH, STS, SLS or RI indicates indel markers.

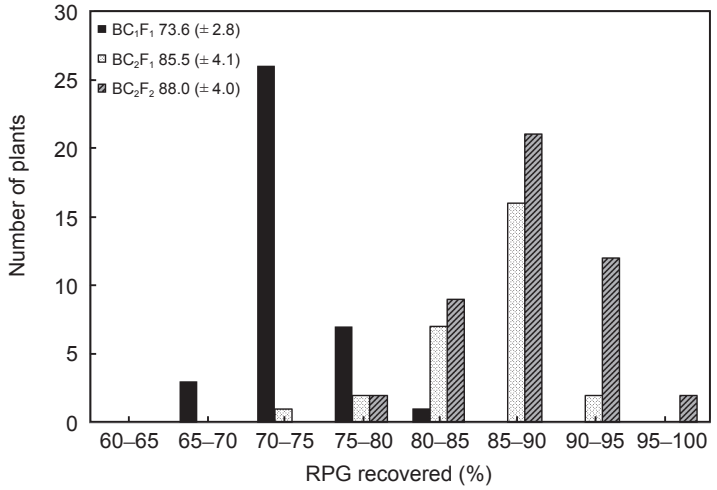


圖 5. CWY981126/'HY15' 分子標幟輔助回交族群 BC_1F_1、BC_2F_1 和 BC_2F_2 回復輪迴親 CWY981126 基因體比率之頻率分布。左上角為每世代平均值，括弧內數值為標準差。

Fig. 5. The frequency distribution of recurrent parent genome (RPG) recovered rate using marker-assisted backcrossing in BC_1F_1, BC_2F_1, and BC_2F_2 populations derived from the backcross of CWY981126/'HY15'. The numbers in the upper left indicate the mean values of RPG recovered (± SD) in each generation.

表 4. 以 76 個分子標幟應用於分子標幟輔助育種以分析 CWY981126 與 'HY15' 雜交後代 BC_2F_2 之基因體組成。

Table 4. Marker-assisted selection analysis of genome composition of BC_2F_2 derived from cross between CWY981126 and 'HY15' by 76 polymorphic markers.

Individual[z]	A[y] (%)	B[x] (%)	H[w] (%)	-[v] (%)	RPG recovered (%)	Total (cM)	Recombinant[u]	H-segment[t]
CWY981126	0.0	100.0	0.0	0.0	100.00	1,363.2	0	0
38	0.0	92.9	7.1	0.0	96.45	1,363.2	9	5
4	1.1	92.4	6.5	0.0	95.65	1,363.2	8	3
18	0.0	88.9	11.1	0.0	94.45	1,363.2	13	7
37	2.5	88.4	9.1	0.0	92.95	1,363.2	7	4
3	8.7	87.7	3.6	0.0	89.50	1,363.2	6	2
13	5.6	87.4	7.0	0.0	90.90	1,363.2	9	3
46	4.9	87.3	3.7	1.4	89.15	1,363.2	14	3
9	4.4	86.1	9.5	0.0	90.85	1,363.2	6	1
40	1.2	85.9	13.0	0.0	92.40	1,363.2	10	5
14	7.3	85.8	6.9	0.0	89.25	1,363.2	9	4
17	4.8	85.8	9.5	0.0	90.55	1,363.2	11	6
11	0.0	85.6	14.4	0.0	92.80	1,363.2	7	4
10	5.8	85.5	8.7	0.0	89.85	1,363.2	10	4
8	4.1	85.3	10.7	0.0	90.65	1,363.2	13	4
6	3.7	85.0	11.3	0.0	90.65	1,363.2	9	3
16	8.4	85.0	6.7	0.0	88.35	1,363.2	9	3
32	6.5	85.0	8.5	0.0	89.25	1,363.2	12	4
19	0.8	84.8	14.4	0.0	92.00	1,363.2	9	4
29	5.5	84.7	8.4	1.4	88.90	1,363.2	14	5

表 4. 以 76 個分子標幟應用於分子標幟輔助育種以分析 CWY981126 與 'HY15' 雜交後代 BC_2F_2 之基因體組成 (續)。

Table 4. Marker-assisted selection analysis of genome composition of BC_2F_2 derived from cross between CWY981126 and 'HY15' by 76 polymorphic markers (continued).

Individual[z]	A[y] (%)	B[x] (%)	H[w] (%)	-[v] (%)	RPG recovered (%)	Total (cM)	Recombinant[u]	H-segment[t]
22	8.5	84.6	6.3	0.6	87.75	1,363.2	15	5
12	8.2	84.1	6.3	1.4	87.25	1,363.2	11	3
20	9.5	84.1	6.4	0.0	87.30	1,363.2	11	4
35	5.6	83.8	10.6	0.0	89.10	1,363.2	9	4
7	9.3	83.4	7.3	0.0	87.05	1,363.2	7	2
24	8.8	83.0	8.2	0.0	87.10	1,363.2	13	2
21	7.1	82.7	5.8	4.4	85.60	1,363.2	14	4
34	2.1	82.6	15.3	0.0	90.25	1,363.2	14	7
25	11.8	81.9	4.9	1.4	84.35	1,363.2	14	3
44	2.3	81.3	16.4	0.0	89.50	1,363.2	12	6
1	6.1	80.9	11.9	1.1	86.85	1,363.2	17	7
5	4.1	80.8	15.1	0.0	88.35	1,363.2	16	7
15	0.0	80.4	19.6	0.0	90.20	1,363.2	11	6
41	7.6	80.2	12.1	0.0	86.25	1,363.2	14	5
31	7.8	80.0	9.7	2.5	84.85	1,363.2	20	5
2	4.0	79.4	13.9	2.7	86.35	1,363.2	14	6
45	0.6	79.2	18.7	1.4	88.55	1,363.2	17	8
28	10.7	79.1	8.8	1.4	83.50	1,363.2	16	5
26	6.6	78.6	10.8	4.0	84.00	1,363.2	16	4
39	9.0	78.2	12.8	0.0	84.60	1,363.2	16	7
43	11.0	78.1	9.5	1.4	82.85	1,363.2	14	4
27	9.1	76.9	12.6	1.4	83.20	1,363.2	12	3
30	5.1	75.8	19.1	0.0	85.35	1,363.2	18	8
36	14.4	75.6	10	0.0	80.60	1,363.2	16	5
23	14.0	73.8	12.2	0.0	79.90	1,363.2	20	8
42	9.0	73.7	17.3	0.0	82.35	1,363.2	14	6
33	13.5	71.2	13.9	1.4	78.15	1,363.2	15	6
HY15	100.0	0.0	0.0	0.0	0.00	1,363.2	0	0

[z] Arrangement by the percentage of RPG (recurrent parent genome) recovered.
[y] The percentage of 'HY15' genome.
[x] The percentage of CWY981126 genome.
[w] The percentage of heterozygote.
[v] The percentage of missing data.
[u] The frequency of crossing-over happened in chromosome segments.
[t] Amount of heterozygote in all markers.

時進行耐鹽篩選處理，結果發現 SM61 於高鹽濃度下的表現不佳，而以 CWY981126 有最穩定之鹽分逆境耐受性，惟各品系之鹽害指數均隨處理日期增加而提高。此與 Kuo *et al*. (2013) 以 SM61 與 'IR64' 之 8 個回交耐鹽品系的試驗結果相似，在 8 個耐鹽品系不同水稻幼苗齡期的 200 mM 耐鹽處理下，各品系之鹽害指數均隨處理日期增加而提高，尤其是處理之苗齡愈

表 5. ‘HY15’、CWY981126 和 10 個耐旱品系 3 葉齡時以 28% PEG 6000 處理後之耐旱等級反應。

Table 5. The scale of drought-tolerance in ‘HY15’, drought sensitive parent CWY981126, and 10 drought-tolerant BC_2F_3 lines by the treatment of 28% PEG 6000 solution at 3-leaf-old seedling stage.

	Score of drought tolerance							
	Days after treatment							
Line or variety	1	2	3	4	5	6	7	8
HY15	5.00 c[z]	4.67 e	4.50 d	4.50 e	4.50 d	5.00 c	4.67 e	4.50 d
CWY981126	6.17 b	6.67 ab	6.67 ab	7.17 ab	7.00 ab	6.17 b	6.67 ab	6.67 ab
LD1	6.33 b	6.17 bcd	6.50 abc	6.50 bcd	6.50 abc	6.33 b	6.17 bcd	6.50 abc
LD2	7.67 a	7.50 a	7.67 a	7.83 a	7.83 a	7.67 a	7.50 a	7.67 a
LD3	5.67 bc	5.67 bcde	6.00 bc	6.17 bcd	6.50 abc	5.67 bc	5.67 bcde	6.00 bc
LD4	5.50 bc	5.67 bcde	6.67 ab	7.00 abc	7.00 ab	5.50 bc	5.67 bcde	6.67 ab
LD5	6.33 b	6.33 abc	6.50 abc	6.33 bcd	6.33 bc	6.33 b	6.33 abc	6.50 abc
LD6	5.83 bc	6.00 bcd	6.67 ab	6.83 abcd	7.00 ab	5.83 bc	6.00 bcd	6.67 ab
LD7	5.00 c	5.00 de	5.33 cd	5.67 de	5.17 cd	5.00 c	5.00 de	5.33 cd
LD8	5.33 bc	5.33 cde	6.00 bc	6.00 bcd	5.83 bcd	5.33 bc	5.33 cde	6.00 bc
LD9	5.17 bc	5.17 cde	5.67 bcd	5.83 cd	6.00 bc	5.17 bc	5.17 cde	5.67 bcd
LD10	6.00 bc	6.17 bcd	6.33 bc	6.33 bcd	6.50 abc	6.00 bc	6.17 bcd	6.33 bc

[z] Means with the same letter of a row are not significantly different at 5% level by LSD test.

表 6. ‘HY15’、CWY981126 和 7 個耐旱品系 5 葉齡時以 200 mM NaCl 處理後之耐鹽等級反應。

Table 6. The scale of salt-tolerance in ‘HY15’, CWY981126, and 7 drought-tolerant BC_2F_3 lines by the treatment of 200 mM NaCl at 5-leaf-old seedling stage.

	Score of salt tolerance							
	Days after treatment					Days after rewater treatment		
Line or variety	4	5	6	7	8	2	4	6
HY15	3.2 a[z]	4.0 a	4.7 a	6.2 a	7.0 a	7.2 a	7.2 a	7.0 a
CWY981126	3.0 a	3.3 ab	3.8 ab	5.6 a	7.0 a	7.2 a	7.2 a	7.5 ab
LD1	3.0 a	3.0 b	3.7 ab	4.3 bc	6.0 ab	7.0 ab	6.7 a	6.5 ab
LD3	3.3 a	3.7 ab	4.0 ab	6.0 ab	7.2 a	7.3 a	7.2 a	7.2 ab
LD5	3.0 a	3.0 b	3.5 ab	5.2 ab	6.2 ab	6.7 ab	6.3 ab	6.3 ab
LD7	3.0 a	3.0 b	3.3 b	4.7 abc	5.0 ab	6.7 ab	6.7 ab	6.7 ab
LD8	3.0 a	3.3 ab	3.3 b	4.5 abc	6.0 ab	6.5 ab	5.8 ab	6.2 ab
LD9	3.3 a	3.3 ab	3.5 ab	5.5 ab	6.8 ab	7.3 a	7.2 ab	6.7 ab
LD10	3.0 a	3.2 ab	3.0 b	3.3 c	5.7 b	5.7 b	6.0 b	6.0 b

[z] Means with the same letter of a row are not significantly different at 5% level by LSD test.

早，鹽害指數有相對提升的現象。然幼苗期不同鹽分逆境下之篩選，僅顯示不同品種 (系) 間幼苗期是否具有鹽分逆境耐受性，對於水稻成株期對鹽分逆境耐受性程度則仍有待需要進一步測試。

由 CWY981126 在 100、250 及 300 mM 鹽分逆境處理下具較佳耐鹽表現，且與誘變親本 CNY911303 之表現有顯著之差異，而 SM61 耐鹽性在 200、250 及 300 mM 鹽分逆境處理時，鹽害指數較其他品系表現差，此結果似與其他學者之結果似有所相違 (Yen & Lin 2011; Kuo *et al*. 2013)。究其原因，可能是由於 SM61 品系生長勢相對柔弱，處理後 SM61 之鹽分耐受性表現乃不及其他品系。不過由於水稻幼苗期之耐鹽篩選與測試可快速得知品系間之鹽分耐受程度訊息，據此可快速選出具耐鹽性材料，在操作上相當簡易可行，是耐鹽水稻評估及選育時值得利用的模式。而本試驗結

果，可知粳稻耐鹽品系 CWY981126 耐鹽表現良好，故本品系值得作為分子標幟輔助育種之輪迴親使用。

作物品種生育初期之耐旱特性是該品種抗旱性的重要指標之一 (Bayuelo-Jiménez *et al*. 2002)，因此幼苗期耐旱篩選是耐旱育種篩選的重要環節。而幼苗期進行耐旱鑑定可對多個品種 (系) 及雜交子代進行簡單快速篩選，可降低育種選擇的複雜性、減少田間工作量及避免氣候環境的影響，從而以提高選拔效率和加速育種程序 (Zhou *et al*. 2005)。本研究利用 4 個不同品種 (系) 於 3 葉齡時以 28% PEG 6000 進行模擬缺水逆境試驗，結果經乾旱處理後，不同品種 (系) 間之乾旱指數並無明顯差異，但自處理後 1 d 開始，'HY15' 的乾旱指數表現均優於耐旱敏感型對照品種 'IR29'，惟與耐旱敏感型對照品種的 'IR64' 相比，'IR64' 的耐旱表現優於 'HY15'。造成此現象的原因，可能係因 'IR64' 的生長勢相對較快速強健，致使耐旱處理後之耐旱等級表現反較 'HY15' 佳。然由 Lin *et al*. (2014) 結果指出，'HY15' 具有優良耐旱特性，故仍選擇 'HY15' 作為分子標幟輔助育種耐旱性的貢獻親。

Shinada *et al*. (2014) 指出許多主要的農藝性狀包括產量、抗病性及耐逆境等特性，通常由多個數量性狀基因座所控制，且研究主要集中在 QTLs 定位及 QTLs 對表現型變異貢獻度的估計。水稻耐鹽特性是一個複雜的數量性狀，可能為涉及眾多基因的數量性狀基因座 (Gregorio *et al*. 2013)，尤其耐鹽特性在幼苗期和生殖生長期之控制機制可能有所不同 (Moradi *et al*. 2003)。目前最廣為人知的耐鹽基因 *Saltol* 和 *SKC1* 基因，則均於幼苗期表現 (Kuo *et al*. 2013)，至於水稻耐旱基因截至目前則大都未獲選殖。Hsu (2012) 針對 'HY15' 幼苗期之耐旱基因進行圖譜定位，結果發現 2 個耐旱 QTLs 分別與第 12 條染色體長臂與短臂上，與 2 分子標幟 RM277 (62.2–64.4 cM) 與 RM6693 (91.9–94.6 cM) 呈現緊密連鎖現象。Uga *et al*. (2011) 在陸稻 'Kinandang Patong' 與 'IR64' 間重組自交系中，則發現根系統結構 (root system architecture; RSA) 基因 *DRO1*，該基因經回交導入淺根系品種發現對提升耐旱及產量表現有所助益，該基因已獲選殖 (Uga *et al*. 2013)。雖然水稻耐旱基因目前選殖的結果相當少，惟目前仍有許多耐旱品種已選育命名，諸如「沪旱 3 號」、'Doddabyranellu'、'Dhan 4' 與 'Doddi' (Lin *et al*. 2011)，顯示應可結合耐逆境及分子標幟技術的應用，加速抗多重逆境水稻之選育。尤其水稻在栽培利用過程中，其遭遇逆境的種類、時機及期限均有很大的不確定性，如鹽化土地常會拌隨著乾旱的環境的出現，顯示抗多重逆境水稻品種的研發符合台灣栽培環境的需要。然由於耐鹽及耐旱特性的控制因子均相當複雜 (Shinada *et al*. 2014)，可利用之耐逆境分子標幟相當有限，故因應現階段之需求，需先找出適當的輪迴親與貢獻親本，以幼苗期進行耐旱篩選，再將耐旱及耐鹽特性透過回交方導入優良品種中，並在連續回交過程中利用分子標幟輔助背景篩選，短期內快速選獲同時具有耐旱及耐鹽水稻新品系，培育出符合台灣需求之耐多重逆境水稻。而透過幼苗期之耐鹽及耐旱篩選結果，本研究篩選出 CWY98126 適合作為輪迴親，而 'HY15' 可供做為貢獻親。

分子標幟輔助耐鹽及耐旱基因堆疊水稻族群之選育

Collard *et al*. (2005) 指出傳統回交育種至少需要經過 6–8 次的回交才能大致回復輪迴親之基因型，但藉由分子標幟輔助回交育種，只需回交 3–4 次，甚至 2 次即可達到此目標。顯示應用分子標幟輔助於堆疊耐逆境 QTLs 之育種，當回交族群數量足夠時，其可有效達到選拔數量性狀表現型的目的 (Ashikari & Matsuoka 2006; Nagai *et al*. 2012)。然而，QTLs 堆疊結果常無法如預期效益，會有如 QTLs 間上位性影響，且 QTLs 因遺傳背景的不同而會有所變化 (Miedaner *et al*. 2006; Bovill *et al*. 2010)。尤其傳統回交育種回交後代基因型理論上 BC1 世代回復至輪迴親基因體比率為 75%，BC2 世代為 87.5%，到 BC3 世代則回復率為 93.8%。但回交育種操作過程，會因族群數量較小或親本遺傳背景較遠，致使回復至輪迴親基因體比率常較理論值低 (Collard *et*

al. 2005)。Kuo *et al*. (2013) 利用秈粳回交育種結果，顯示分子標幟輔助回交育種回復至輪迴親基因體比率高於傳統回交育種，於 BC2、BC3 世代回復到輪迴親基因體的比率平均可達 89% 及 96.4%，達到了分子標幟輔助育種的預期結果。顯示回交後代族群數量，會影響後代回復輪迴親遺傳背景之速度與比率。

本研究利用秈粳稻回交族群為材料，透過不同回交世代幼苗期耐旱的篩選，將秈稻耐旱特性導入或堆疊至耐鹽粳稻親本中，經 2 次回交再使獲選子代自交 2 次，故理論上 BC_2F_3 的遺傳回復率應雖無法像 Kuo *et al*. (2013) 結果。但 BC_2F_1 的回復率，仍大致上已接近理論輪迴親 CWY981126 遺傳背景；然 BC_1F_1 及 BC_2F_1 世代時，其分子標幟背景選拔時所測定之遺傳回復率。由圖 5 得知，2 世代的回復率分別為 73.6% 和 85.6%，稍低於理論之回復率，推測原因可能是使用之分子標幟數量不足。故於 BC_2F_2 世代乃進一步提高分子標幟密度及使用數量，期藉此涵蓋整個水稻基因體的背景選拔。結果由 46 株的 BC_2F_2 回交後代基因型分布得知，其遺傳回復平均達到 88%，最高者可達到 96.5%，顯示 BC_2F_2 世代部分後代幾乎回復到 CWY981126 的基因型，達到本研究設定之預期目標。故前 BC_1 及 BC_2 等 2 個回交世代回復率雖低於理論回復率，但仍可透過 BC_2F_2 高密度之分子標幟輔助達到目標。由於可知利用子標幟輔助進行回交育種時，其使用之回交族群大小及分子標幟數量需足夠，如此方能快速回復回交後代至輪迴親之遺傳背景，尤其對於不同的回交世代應進行回復率檢視。當實際回復率低於理論回復率時，宜增加回交族群數量及分子標幟密度或回交次數，如此才能順利達到分子標幟輔助回交育種的目標。

由 BC_2F_2 回交後代中選出回復率較高之 10 株，經繁殖至 BC_2F_3 世代，10 個品系在進行後裔耐檢測中，結果有 7 個品系之耐旱特性優於耐旱敏感親本 CWY981126，且檢測 7 個品系耐鹽特性是否依然保留，結果發現 LD1、LD3、LD7 及 LD10 等 4 個品系之耐鹽性表現良好 (表 6)。其中，LD7、LD10 之耐鹽性甚至優於輪迴親 CWY981126，此與 Kuo *et al*. (2013) 結果相似，其將 SM61 耐鹽性以 3 次回交導入 'IR64' 後，結果回交後代之耐鹽性表現優於貢獻親本。顯示耐逆境特性在回交過程，可能因為數量基因基因重組，致使回交後代之耐逆境特性優於原來之親本；而 4 個獲選耐鹽品系之耐旱性表現，則以 LD7 的表現最好。

由上述結果顯示，分子標幟回交育種過程可快速選育耐多重逆境之水稻新品系，有效將不同逆境特性進行組合或堆疊，提供未來全球暖化下逆境環境之水稻栽培需求。惟水稻耐逆境特性幼苗期及成株期的控制機制並不相同 (Moradi *et al*. 2003)，故獲選之 LD7 及 LD10 等品系雖因此幼苗期耐旱及耐鹽特性表現較佳，未來可進一步深入評估。尤其是逆境下之大面積產量試驗及品質評估，如此方能確認實用性，進而推廣供台灣水稻栽培利用。

引用文獻

Ashikari, M. and M. Matsuoka. 2006. Identification, isolation and pyramiding of quantitative trait loci for rice breeding. Trends Plant Sci. 11:344–350.

Bayuelo-Jiménez, J. S., R. Craig, and J. P. Lynch. 2002. Salinity tolerance of species during germination and early seedling growth. Crop Sci. 42:1584–1594.

Bernier, J., A. Kumar, V. Ramaiah, D. Spaner, and G. Atlin. 2007. A large-effect QTL for grain yield under reproductive-stage drought stress in upland rice. Crop Sci. 47:507–516.

Bovill, W. D., M. Horne, D. Herde, M. Davis, G. B. Wildermuth, and M. W. Sutherland. 2010. Pyramiding QTL increases seedling resistance to crown rot (*Fusarium pseudograminearum*) of wheat (*Triticum aestivum*). Theor. Appl. Genet. 121:127–136.

Brown, L. R. and B. Halweil. 1998. China's water shortage could shake world food security. World Watch 11:10–21.

Collard, B. C. Y., M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer, and E. C. K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica 142:169–196.

Dokku, P., K. M. Das, and G. J. N. Rao. 2013. Pyramiding of four resistance genes of bacterial blight in Tapaswini, an elite rice cultivar, through marker-assisted selection. Euphytica 192:87–96.

Goff, S., S. A. Goff, D. Ricke, T. H. Lan, G. Presting, R. Wang, M. Dunn, J. Glazebrook, A. Sessions, P. Oeller, H. Varma, D. Hadley, D. Hutchison, C. Martin, F. Katagiri, B. M. Lange, T. Moughamer, Y. Xia, P. Budworth, J. Zhong, T. Miguel, U. Paszkowski, S. Zhang, M. Colbert, W. L. Sun, L. Chen, B. Cooper, S. Park, T. C. Wood, L. Mao, P. Quail, R. Wing, R. Dean, Y. Yu, A. Zharkikh, R. Shen, S. Sahasrabudhe, A. Thomas, R. Cannings, A. Gutin, D. Pruss, J. Reid, S. Tavtigian, J. Mitchell, G. Eldredge, T. Scholl, R. M. Miller, S. Bhatnagar, N. Adey, T. Rubano, N. Tusneem, R. Robinson, J. Feldhaus, T. Macalma, A. Oliphant, and S. Briggs. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). Science 296:92–100.

Gregorio, G. B., M. R. Islam, G. V. Vergara, and S. Thirumeni. 2013. Recent advances in rice science to design salinity and other abiotic stress tolerant rice varieties. SABRAO J. Breed. Genet. 45:31–41.

Hsu, J. H. 2012. The Platform of Polymorphic Markers and Genetic Mapping of a Drought Tolerance Gene at Seedling Stage in Rice. Master Thesis, Graduate Institute of Agronomy, National Chiayi University. Chiayi, Taiwan. 98 pp. (in Chinese with English abstract)

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

International Rice Research Institute. 1996. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute. Manila, Philippines. 52 pp.

International Rice Research Institute. 2002. Rice Almanac. CABI. Wallingford, UK. 253 pp.

International Rice Research Institute. 2009. Harvested area of rough rice by country and geographical region (USDA). World rice statistics: Trend in the rice economy. http://beta.irri.org/solutions/index.php?option=com_content&task=view&id=250 (visit on 9/10/2015)

Jwo, W. S. 2007. Physiological Characterizations of Salt Tolerance at Germaination and Seedling Stages in Rice (*Oryza sativa* L.) Tainung 67 Mutants. Master Thesis, Master Programs of Life Sciences, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 122 pp. (in Chinese with English abstract)

Jwo, W. S., C. G. Chern, M. H. Lai, H. M. Yen, T. H. Tseng, and H. E. Yen. 2008. Screening technique for salt tolerance in the rice seedling stage. J. Taiwan Agric. Res. 57:193–204. (in Chinese with English abstract)

Kazuhiro, K., Y. Niwa, T. Yamaguchi, H. Sunohara, H. Hirano, and M. Umeda. 1998. A rapid and easy-handling procedure for isolation of DNA from rice, Arabidopsis and tobacco. Plant Biotechnol. 15:45–48.

Kumar, R., R. Venuprasad, and G. Atlin. 2007. Genetic analysis of rainfed lowland rice drought tolerance under naturally-occurring stress in eastern India: Heritability and QTL effects. Field Crops Res. 103:42–52.

Kuo, S. C., C. W. Kuo, Y. R. Lin, and Y. P. Wu. 2013. Marker-assisted selection of salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). J. Taiwan Agric. Res. 62:137–156. (in Chinese with English abstract)

Li, Z., P. Mu, C. Li, H. Zhang, Z. Li, Y. Gao, and X. Wang. 2005. QTL mapping of root traits in a doubled haploid population from a cross between upland and lowland japonica rice in three environments. Theor. Appl. Genet. 110:1244–1252.

Liao, Y. N. 2012. The Genetic Analysis and Coarse Mapping of the Rice Floury Gene, *FLOURY ENDOSPERM6* (*FLO6*). Master Thesis, Graduate Institute of Agronomy, National Chiayi University. Chiayi, Taiwan. 73 pp. (in Chinese with English abstract)

Lin, K. H., C. W. Kuo, Y. C. Hsu, Y. R. Lin, and Y. P. Wu. 2014. Increasing drought tolerance of rice cultivar 'TK9' using marker-assisted selection. Crop Environ. Bioinform. 11:143–164. (in Chinese with English abstract)

Lin, Y. R., S. C. Kuo, and Y. P. Wu. 2011. The breeding strategies and developments of stress resistant rice for global warming in Taiwan. p.65–78. *in*: Proceeding of the Workshop on Crop Breeding and Management of Agricultural Environment for Coping with Climate Change. August 31, 2011. Taichung, Taiwan. Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung. (in Chinese with English abstract)

MacMillan, K., K. Emrich, H. P. Piepho, C. E. Mullins, and A. H. Price. 2006. Assessing the importance of genotype × environment interaction for root traits in rice using a mapping population II: Conventional QTL analysis. Theor. Appl. Genet. 113:953–964.

McCouch, S. R., X. Chen, O. Panaud, S. Temnykh, Y. Xu, Y. G. Cho, N. Huang, T. Ishii, and M. Blair. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. Plant Mol. Biol. 35:89–99.

Miedaner, T., F. Wilde, B. Steiner, H. Buerstmayr, V. Korzun, and E. Ebmeyer. 2006. Stacking quantitative trait loci (QTLs) for Fusarium head blight resistance from non-adapted sources in an European elite spring wheat background and assessing their effects on deoxynivalenol (DON) content and disease severity. Theor. Appl. Genet. 112:562–569.

Moradi, F., A. M. Ismail, G. B. Gregorio, and J. A. Egdane. 2003. Salinity tolerance of rice during reproductive development and association with tolerance at the seedling stage. Ind. J. Plant Physiol. 8:105–116.

Mundt, C. C. 1990. Probability of mutation to multiple virulence and durability of resistance gene pyramids. Phytopathology 80:221–223.

Nagai, K., T. Kuroha, M. Ayano, Y. Kurokawa, R. B. Angeles-Shim, J. H. Shim, H. Yasui, A. Yoshimura, and M. Ashikari. 2012. Two novel QTLs regulate internode elongation in deepwater rice during the early vegetative stage. Breed. Sci. 62:178–185.

Pandey, S., D. D. Behura, R. Villano, and D. Naik. 2000. Economic Cost of Drought and Farmers' Coping Mechanisms: A Study of Rainfed Rice Systems in Eastern India. International Rice Research Institute. Los Baños, Philippines. 47 pp.

Ren, Z. H., J. P. Gao, L. G. Li, X. L. Cai, W. Huang, D. Y. Chao, M. Z. Zhu, Z. Y. Wang, S. Luan, and H. X. Lin. 2005. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. Nat. Genet. 37:1141–1146.

Shen, Y. J., H. Jiang, J. P. Jin, Z. B. Zhang, B. Xi, Y. Y. He, G. Wang, C. Wang, L. Qian, X. Li, Q. B. Yu, H. J. Liu, D. H. Chen, J. H. Gao, H. Huang, T. L. Shi, and Z. N. Yang. 2004. Development of genomewide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. Plant Physiol. 135:1198–1205.

Shinada, H., N. Iwata, T. Sato, and K. Fujino. 2014. QTL pyramiding for improving of cold tolerance at fertilization stage in rice. Breed. Sci. 63:483–488.

Uga, Y., K. Okuno, and M. Yano. 2011. Dro1, a major QTL involved in deep rooting of rice under upland field conditions. J. Exp. Bot. 62:2485–2494.

Uga, Y., K. Sugimoto, S. Ogawa, J. Rane, M. Ishitani, N. Hara, Y. Kitomi, Y. Inukai, K. Ono, N. Kanno, H. Inoue, H. Takehisa, R. Motoyama, Y. Nagamura, J. Wu, T. Matsumoto, T. Takai, K. Okuno, and M. Yano. 2013. Control of root system architecture by deeperrooting 1 increases rice yield under drought conditions. Nat. Genet. 45:1097–1102.

Wang, Y., J. Zang, Y. Sun, J. Ali, J. L. Xu, and Z. Li. 2013a. Background-independent quantitative trait loci for drought tolerance identified using advanced backcross introgression lines in rice. Crop Sci. 53:430–441.

Wang, Y., L. Zhang, A. Nafisah, L. Zhu, J. Xu, and Z. Li. 2013b. Selection efficiencies for improving drought/salt tolerances and yield using introgression breeding in rice (*Oryza sativa* L.). Crop J. 1:134–142.

Wu, L. and C. Wang. 2011. Application of molecular marker assisted selection in gene pyramiding and selection of new cultivars. J. Northeast Agric. Univ. 18:79–84.

Wu, Y. P. 2013. Drought tolerant rice lines by screening an 'IR64' mutant stock. J. Taiwan Agric. Res. 62:195–208. (in Chinese with English abstract)

Yen, C. C. and J. H. Lin. 2011. Screening, inheritance and linkage marker analyses of salt tolerance in mutated scented japonica rice (*Oryza sativa* L.). Plant Prod. Sci. 14:260–269.

Yoshida, S. 1976. Routine procedures for growing rice plants in culture solution. p.61–66. *in*: Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. (Yoshida, S., D. A. Forno, J. H. Cook, and K. A. Gomez, eds.) International Rice Research Institute. Manilla, Philippines. 83 pp.

Young, N. D. and S. D. Tanksley. 1989. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the Tm-2 locus of tomato during backcross breeding. Theor. Appl. Genet. 77:353–359.

Yu, J., S. Hu, J. Wang, G. K. Wong, S. Li, B. Liu, Y. Deng, L. Dai, Y. Zhou, and X. Zhang. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. spp. *indica*). Science 296:79–92.

Yue, B., W. Xue, L. Luo, and Y. Xing. 2008. Identification of quantitative trait loci for four morphologic traits under water stress in rice (*Oryza sativa* L.). J. Genet. Genom. 35:569–575.

Zang, J. P., Y. Sun, Y. Wang, J. Yang, F. Li, Y. L. Zhou, L. H. Zhu, R. Jessica, F. Mohammadhosein, and J. L. Xu. 2008. Dissection of genetic overlap of salt tolerance QTLs at the seedling and tillering stages using backcross introgression lines in rice. Sci. China Life Sci. 51:583–591.

Zhou, G. S., K. H. Cui, D. M. Jin, C. G. Cao, C. G. Xu, and B. S. Luo. 2005. Studies on using rooting capacity to appraise the drought resistance of different varieties of *Oryza sativa* at seedling stage. Sci. Agric. Sin. 38:2571–2576. (in Chinese with English abstract)

Increasing Drought Tolerance in a Salt-Tolerant *Japonica* Rice Cultivar Using Marker-Assisted Selection

I-Chun Lien[1], Chieh-Wei Kuo[2], Su-Chen Kuo[3], Yann-Rong Lin[4], and Yong-Pei Wu[5,*]

Abstract

Lien, I. C., C. W. Kuo, S. C. Kuo, Y. R. Lin, and Y. P. Wu. 2016. Increasing drought tolerance in a salt-tolerant *Japonica* rice cultivar using marker-assisted selection. J. Taiwan Agric. Res. 65(2):154–172.

Five mutant lines of *Oryza sativa* ssp. *japonica*, SM61, CWY981126, CWY981127, CWY9811268, and CNY911303, were evaluated for salt tolerance by treated with 100, 150, 200, 250, and 300 mM NaCl solutions, respectively. The CWY981126 showed the most tolerant cultivar under all concentrations except 150 mM of NaCl. On the other hand, drought tolerant cultivars were evaluated among four *indica* rice cultivars including 'HY15', 'IR29', 'IR64', and SM1 by treated with 28% PEG 6000. The 'HY15' showed the best tolerance to drought stress. To improve drought tolerance in the salt-tolerant *japonica* cultivar, the 'HY15' was used as a donor parent to pyramid the drought tolerant trait into the CWY981126. After two backcross generations, the drought tolerant trait was successfully introgressed into the salinity tolerant line, CWY981126. For each generation, all progenies were visually screened by drought or salinity stress tolerant phenotypes combined with a background selection using molecular markers. The recovery rates of recurrent parental genome in BC_1F_1, BC_2F_1, and BC_2F_2 were 73.6%, 85.5%, and 88%, respectively. Seven accessions of BC_2F_3 exhibited better drought tolerance than the recurrent parent, and four of them such as LD1, LD7, LD8, and LD10 also showed good salinity tolerance, indicating that these lines have dual tolerance to drought and salinity. Thus, new accessions harboring both drought and salinity tolerance were bred and could be applied to cultivate in fields with water deficiency and high salinity in Taiwan.

Key words: Marker-assisted selection, Drought tolerance, Salinity tolerance, Rice.

Received: August 7, 2015; Accepted: September 21, 2015.
* Corresponding author, e-mail: wuypei@dns.caes.gov.tw
[1] Master student, Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Professor, Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.
[3] Research Assistant, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
[4] Associate Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.
[5] Associate Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(2):173–183 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06502.07

研究報告

四種蟲害誘導之植物揮發性成分對天敵之誘效評估

董耀仁[1]　黃紹毅[2,*]

摘要

董耀仁、黃紹毅。2016。四種蟲害誘導之植物揮發性成分對天敵之誘效評估。台灣農業研究 65(2):173–183。

本研究使用 4 種經昆蟲取食傷害誘導後會產生之植物揮發性成分水楊酸甲酯、順式 3-己烯-1-醇、2-苯乙醇及沉香醇，搭配黃色黏板於行政院農委會農業試驗所 (梅園、枇杷、玉米及萬苣田區) 調查所捕獲之天敵種類及數量，調查中主要捕獲之天敵種類有小黑花蝽象、六條瓢蟲、花蚊及膜翅目寄生蜂等。4 種成分中，僅水楊酸甲酯對小黑花蝽象具顯著誘引效果，而所有成分對六條瓢蟲、花蚊及膜翅目寄生蜂等其他天敵皆無明顯誘引效果。經過進一步調查發現，水楊酸甲酯對於小黑花蝽象之誘引效果會因濃度不同而有所差異，其中以 99.0% 水楊酸甲酯效果最好 (5.2 隻/黏板)，其次為 1.0% (4.9 隻/黏板) 及 0.1% (4.8 隻/黏板)，3 者均顯著高於對照組 (0.9 隻/黏板)。將水楊酸甲酯與其他成分混合後，與順式 3-己烯-1-醇混合可捕獲最多小黑花蝽象 (3.3 隻/黏板)，其次為僅使用水楊酸甲酯之處理組 (3.2 隻/黏板)，兩者間無顯著差異，但皆顯著高於對照組 (0.6 隻/黏板)。在 2014 及 2015 年 1–2 月間於梅園連續進行 4 wk 調查後，水楊酸甲酯處理組於各時間點捕獲小黑花蝽象之數量均顯著高於對照組。而除了梅園外，水楊酸甲酯於枇杷、玉米及萬苣田 3 種不同作物之環境中，亦可有效誘引小黑花蝽象。綜合上述之結果，水楊酸甲酯具有作為小黑花蝽象田間誘引劑之開發潛力，但必須考慮到不同濃度以及與不同化學成分混合後對於誘引效果之影響。

關鍵詞：蟲害誘導之植物揮發性成分、水楊酸甲酯、小黑花蝽象、誘引劑。

前言

植物在生長發育的過程中會釋放揮發性有機化合物，植食性昆蟲可以利用這些物質來尋找寄主植物 (Jolivet 1998)。當植物受植食性昆蟲危害後，所產生的揮發性成分除了量較平時更多外，組成亦不相同，而此類揮發性成分被稱為蟲害誘導之植物揮發性成分 (herbivore induced plant volatiles)。而天敵則會利用蟲害誘導之植物揮發性成分尋找寄主/食餌，對於植物而言可達到降低蟲害之目的 (Pare & Tumlinson 1999; Howe & Jander 2008)。

目前已知多種植物遭受昆蟲危害時會釋放出水楊酸甲酯 (methyl salicylate) (Scutareanu *et al*. 1997; Dicke *et al*. 1998; van Poecke *et al*. 2001)。多篇研究顯示，水楊酸甲酯可誘引草蛉 (*Chrysopa nigricornis* Burmeister)、褐草蛉 (*Hemerobius* sp.)、大眼長蝽 (*Geocoris pallens* Stal)、盲蝽 (*Deraeocoris brevis* Uhler)、食蚜虻科 (Syrphidae) 的花虻、食螨瓢蟲 (*Stethorus punctum picipes* Casey)、小黑花蝽象 (*Orius tristicolor* White) 及智利捕植螨 (*Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot) 等多種捕食性天敵 (James 2003a, 2003b; De Boer & Dicke, 2004; James & Price 2004; James 2005)。

除水楊酸甲酯外，2-苯乙醇 (2-Phenylethanol) 對草蛉 (*Chrysopa carnea* Steph) 及粉斑瓢蟲 (*Coleomegilla maculata* DeGeer)

投稿日期：2015 年 9 月 2 日；接受日期：2015 年 10 月 1 日。
* 通訊作者：oleander@dragon.nchu.edu.tw
[1] 農委會農業試驗所應用動物組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 國立中興大學昆蟲學系教授。台灣 台中市。

亦具誘引作用 (Zhu *et al*. 1999)。順式 3-己烯-1-醇 (cis-3-Hexen-1-ol) 則可誘引小繭蜂科 (Broconidae)、纓小蜂科 (Mymaridae)、花虻、食蠣瓢蟲及小黑花蝽象等多種天敵 (James 2005; Williams *et al*. 2008; Yu *et al*. 2008)。而沉香醇 (Linalool) 亦為多種植物受昆蟲危害後所釋放的揮發性成分，被認為可能參與植物的間接防禦作用 (Yang *et al*. 2013)。Kessler & Baldwin (2001) 研究證實沉香醇施用於煙草上可提高大眼長蝽對煙草天蛾 (*Manduca sexta* Linnaeus) 卵的捕食率。此外，沉香醇搭配黃色黏板於黑楊 (*Populus nigra* Italica) 林區誘引到之姬蜂科 (Ichneumonidae) 寄生蜂的數目，較正己烷對照組多 6 倍 (McCormick *et al*. 2014)。

寄生性或捕食性天敵在搜尋寄主/食餌的過程中，首先是寄主/食餌棲所的確認，天敵可藉由蟲害誘導之植物揮發性成分進行寄主/食餌的搜尋與定位 (Dicke 2015)。Mallinger *et al*. (2011) 於大豆田之研究結果顯示，施用水楊酸甲酯可吸引大豆蚜 (*Aphis glycines* Matsumura) 的天敵，並降低田間大豆蚜族群，顯示蟲害誘導之植物揮發性成分可吸引天敵並降低害蟲的族群，近年來開始有相關研究探討如何將蟲害誘導之植物揮發性成分應用於農業上，希望能夠增強對害蟲的生物防治 (Penaflor & Bento 2013)。惟在國內此領域尚無研究。因此，本試驗將於農業試驗所測試水楊酸甲酯、順式 3-己烯-1-醇、2-苯乙醇及沉香醇此 4 種蟲害誘導之植物揮發性成分於田間誘引天敵之效果，以獲得這些成分於田間誘引天敵之資料，並探討其應用於國內害蟲防治的可行性。

材料與方法

供試藥劑、使用資材及試驗地點

水楊酸甲酯 (methyl salicylate)，純度 99.0%；順式 3-己烯-1-醇 (cis-3-hexen-1-ol)，純度 98.0%；2-苯乙醇 (2-phenylethanol)，純度 99.0%；沉香醇 (linalool)，純度 97.0% 及乙醇 (ethanol absolute)，純度 ≥ 99.9%，均購自台灣默克股份有限公司，天敵調查用黃色黏板 (長 28.0 cm，寬 16.5 cm) 購自振詠興業有限公司，透明含蓋玻璃管 (直徑 1.5 cm，長 4.5 cm) 購自美國 Kimble 公司。

天敵調查方法參考 James (2003b)，利用蟲害誘導之植物揮發性成分 (裝於透明含蓋玻璃管) 搭配黃色黏板懸掛於田間來誘捕天敵。試驗之設置為將 3 mL 供試成分裝於透明含蓋玻璃管內，於玻璃管蓋上開直徑 0.3 cm 圓孔供氣味散出，以 50 cm 單螺線纏繞綁住玻璃管後，使玻璃管依附於黏板上，並使單螺線穿過黃色黏板上圓形開孔將整個裝置懸掛於試驗田區之植株樹枝上 (梅及枇杷)，或以支架進行懸掛 (玉米及萵苣，因作物本身無法進行懸掛) (圖 1)。

試驗地點選定人為操作干擾少以及對天敵不利影響較少的田區，以降低人為因素對於調查結果的影響，4 塊田區分別為農業試驗所 (台中市霧峰區中正路 189 號) 梅園 (plum, 1.1 ha)、枇杷園 (loquat, 0.5 ha)、玉米田 (maize, 0.3 ha) 及萵苣田 (lettuce, 0.3 ha)，上述 4 塊田區分屬果樹、糧食及蔬菜 3 類不同作物環境。梅園及枇杷園為多年育種園區，少用化學藥劑且田區以機械除草方式管理對天敵影響小，玉米及萵苣田亦分別為育種及種源活化用田區，雖屬短期作物但生長期間亦少用化學藥劑且使用機械除草。各田區試驗進行時，植物之生長狀況及害蟲發生概況分別如次，梅園：開花結果期，主要發生害蟲為薊馬、蚜蟲及葉蟬；枇杷園：開花結果期，主要發生害蟲為薊馬；玉米田：成熟期，主要發生害蟲為薊馬及蚜蟲；萵苣田：開花期，主要發生害蟲為薊馬及蚜蟲。此外，上述 4 塊田區於調查期間皆未施用化學藥劑。

不同蟲害誘導之植物揮發性成分對天敵誘引效果

為明瞭 4 種蟲害誘導之植物揮發性成分對天敵的誘引效果，於梅園中心 (長 60 m，寬 60 m) 選定 50 株梅樹 (東西向 10 株，南北向 5 株，每株彼此間隔距離 5 m 以上)，將分別含有未稀釋之水楊酸甲酯、順式 3-己烯-1-醇、2-苯乙醇及沉香醇的黃色黏板，以及未含有任何成分之對照組黃色黏板，隨機懸掛於選定梅

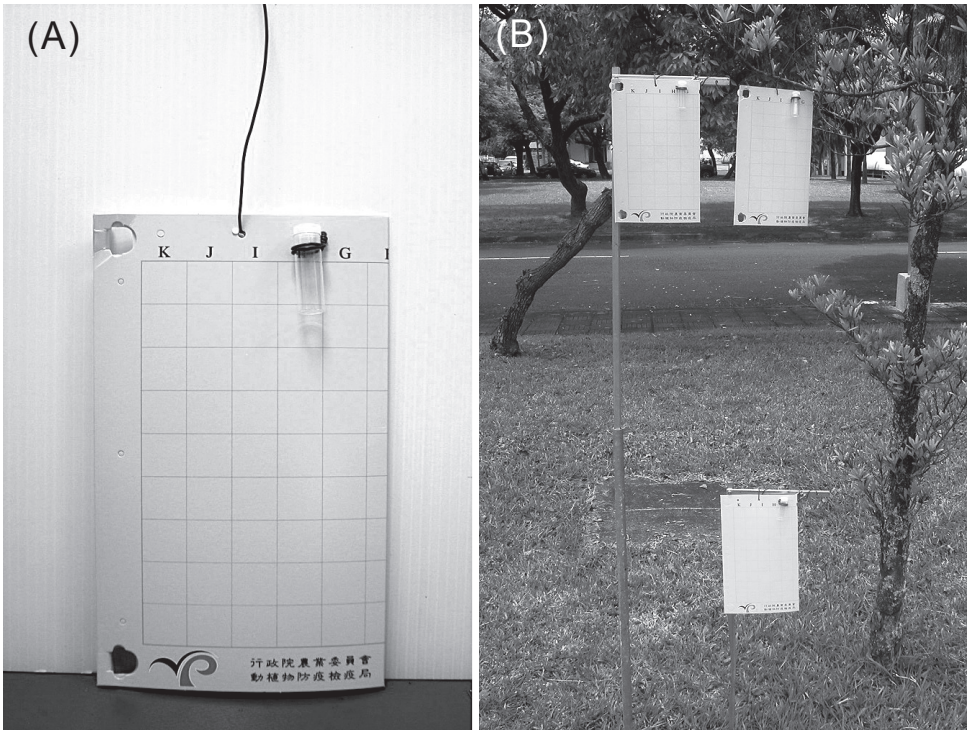


圖 1. (A) 蟲害誘導之植物揮發物性成分與黃色黏板之搭配以及 (B) 黏板於不同作物田區懸掛高度示意圖。

Fig. 1. The photographs of (A) the combination of a herbivore-induced plant volatile and a yellow sticky paper, and (B) the schematic diagram of the heights of yellow sticky papers hanged in different farmlands.

樹的樹枝上，懸掛高度約 1.7 m。經 2 wk 後，將黏板帶回試驗室觀察，並記錄黏板上所捕獲之天敵種類及數量，本試驗 10 重複。

不同濃度水楊酸甲酯對天敵誘引效果

為明瞭水楊酸甲酯不同濃度是否影響對天敵之誘引效果，參考 James (2006) 對金眼草蛉誘引效果試驗中所使用之水楊酸甲酯濃度 (99.0、10.0 及 1.0%)，並且再多選用 0.1% 之濃度，其中 10.0、1.0 及 0.1% 三種濃度為將水楊酸甲酯以乙醇稀釋。於梅園中心選定 60 株梅樹 (東西向 12 株，南北向 5 株，每株間彼此間隔距離 5 m 以上)，將搭配不同濃度水楊酸甲酯之黃色黏板、搭配僅含有乙醇之黃色黏板、以及未搭配供試成分之對照組黃色黏板，隨機懸掛於選定梅樹的樹枝上，懸掛高度約 1.7 m。經 2 wk 後，將黏板帶回試驗室觀察，並記錄黏板上所捕獲天敵之種類及數量，本試驗 10 重複。

水楊酸甲酯混合不同蟲害誘導之植物揮發性成分後對天敵誘引效果

為測試混合它種蟲害誘導之植物揮發性成分能否提高水楊酸甲酯對天敵的誘引效果，參考 Maeda *et al*. (2015) 於葡萄園測試多種蟲害誘導之植物揮發性成分混合時，是否較單一成分使用時增強對食蠣瓢蟲誘引效果試驗所使用之等比例混合方式。於梅園中心選定 50 株梅樹 (東西向 10 株，南北向 5 株，每株間彼此間隔距離 5 m 以上)，將分別搭配未稀釋水楊酸甲酯、水楊酸甲酯 1 : 1 混合順式 3-己烯-1-醇、水楊酸甲酯 1 : 1 混合 2-苯乙醇及水楊酸甲酯 1 : 1 混合沉香醇之黃色黏板及未搭配供試成分之對照組黃色黏板，隨機懸掛於選定梅樹的樹枝上，懸掛高度約 1.7 m。經 2 wk 後，將黏板帶回試驗室觀察，並記錄黏板上所捕獲天敵之種類及數量，本試驗 10 重複。

水楊酸甲酯於不同作物田區對天敵誘引試驗

為明瞭不同作物環境是否影響水楊酸甲酯對天敵之誘引效果，分別於農業試驗所枇杷園、玉米田及萵苣田 3 類不同作物田區進行試驗。枇杷園試驗設置為於枇杷園中心 (長 25 m，寬 25 m) 選定 20 株枇杷樹 (東西向 5 株，南北向 4 株，每株彼此間隔 5 m 以上)，將搭配未稀釋水楊酸甲酯之黃色黏板與未搭配供試成分之對照組黃色黏板，隨機懸掛於選定枇杷樹的樹枝上，懸掛高度約 1.7 m。經 2 wk 後，將黏板帶回試驗室觀察，並記錄黏板上所捕獲天敵之種類及數量，本試驗 10 重複。玉米田試驗設置為於玉米田中心 (長 25 m，寬 25 m) 設立 20 根支架 (長 25 cm，高 1.7 m，東西向設立 5 根，南北向 4 根，每支架彼此間隔 5 m 以上)，將搭配未稀釋水楊酸甲酯之黃色黏板與未搭配供試成分之對照組黃色黏板，隨機懸掛於選定支架上。經 2 wk 後，將黏板帶回試驗室觀察，並記錄黏板上所捕獲天敵之種類及數量，本試驗 10 重複。萵苣田試驗設置為於萵苣田中心 (長 25 m，寬 25 m) 設立 20 根支架 (長 25 cm，高 80 cm，東西向設立 5 根，南北向 4 根，每支架彼此間隔 5 m 以上)，將搭配未稀釋水楊酸甲酯之黃色黏板與未搭配供試成分之對照組黃色黏板，隨機懸掛於選定支架上。經 2 wk 後，將黏板帶回實驗室觀察，並記錄黏板上所捕獲天敵之種類及數量，本試驗 10 重複。

水楊酸甲酯誘引小黑花蝽象連續調查試驗

為測試水楊酸甲酯是否可穩定有效的誘引小黑花蝽象，分別於 2014 年及 2015 年兩個年度同一時期 (1–2 月間) 於梅園進行調查試驗。試驗設置為於梅園中心 (長 25 m，寬 25 m) 選定 20 株梅樹 (東西向 5 株，南北向 4 株，每株彼此間隔 5 m 以上)，將搭配未稀釋水楊酸甲酯之黃色黏板及未搭配供試成分之對照組黃色黏板，隨機懸掛於選定梅樹的樹枝上，懸掛高度約 1.7 m。經 1 wk 後，將黏板帶回試驗室觀察，並記錄黏板上所捕獲天敵之種類及數量，每 wk 調查 1 次，連續調查 4 wk，本試驗 10 重複。

統計分析

本試驗所得各項試驗資料均以 SAS-EG (Version 4.1, 2006) 統計分析軟體進行分析，不同蟲害誘導之植物揮發性成分對天敵誘引效果試驗、不同濃度水楊酸甲酯對天敵誘引效果試驗及水楊酸甲酯混合不同蟲害誘導之植物揮發性成分後對天敵誘引效果試驗等 3 試驗所得之試驗資料，於進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA) 後，再以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD test) 分析其差異顯著性。水楊酸甲酯於不同作物田區對天敵誘引試驗及水楊酸甲酯誘引小黑花蝽象連續調查試驗之試驗資料，則以 *t*-test 分析水楊酸甲酯處理組與對照組平均值間是否存在差異。

結果

不同蟲害誘導之植物揮發性成分對天敵誘引效果

水楊酸甲酯、順式 3-己烯-1-醇、2-苯乙醇及沉香醇 4 種蟲害誘導之植物揮發性成分中，僅水楊酸甲酯對小黑花蝽象有顯著誘引效果，平均每黏板所捕獲的小黑花蝽象數量為 2.5 隻，顯著高於對照組的 0.4 隻；除小黑花蝽象外，4 種蟲害誘導之植物揮發性成分對六條瓢蟲 (*Cheilomenes sexmaculata* Fabricius)、變斑隱勢瓢蟲 (*Cryptogonus orbiculus* Gyllenhal)、太田隱勢瓢蟲 (*Cryptogonus ohtai* Sasaji)、花虻及膜翅目的寄生蜂等天敵無明顯誘引效果 (表 1)。

不同濃度水楊酸甲酯對天敵誘引效果

99.0% 水楊酸甲酯所捕獲之小黑花蝽象數量 (5.2 隻/黏板) 最高，其次為 1.0% (4.9 隻/黏板) 及 0.1% (4.8 隻/黏板) 水楊酸甲酯處理組，以上 3 處理組所捕獲之小黑花蝽象數量皆顯著高於對照組 (0.9 隻/黏板)。10.0% 水楊酸甲酯處理組 (2.1 隻/黏板) 所捕獲之小黑花蝽象數量雖較對照組多，但彼此無顯著差異。此外，

表 1. 水楊酸甲酯、順式 3-己烯-1-醇、2-苯乙醇及沉香醇於梅園中誘引天敵之效果。

Table 1. The effectiveness [means (± SE)] of methyl salicylate, cis-3-hexen-1-ol, 2-phenylethanol, and linalool on attracting natural enemies in plum orchard[z].

Natural enemy (species, genus, family or order)	Mean number of natural enemies (± SE)				
	Methyl salicylate	Cis-3-hexen-1-ol	2-Phenylethanol	Linalool	Control
Orius	2.5 (0.4) a[y]	0.9 (0.4) b	0.8 (0.2) b	0.7 (0.2) b	0.4 (0.2) b
Coccinellidae	4.3 (0.7) ab	2.9 (0.3) b	5.0 (0.8) a	4.3 (0.9) ab	5.8 (0.8) a
Cheilomenes sexmaculata	3.9 (0.5) ab	2.9 (0.3) b	4.7 (0.9) ab	3.9 (0.6) ab	5.5 (0.8) a
Cryptogonus orbiculus	0.2 (0.1) a	0.0 (0.0) a	0.2 (0.1) a	0.3 (0.2) a	0.2 (0.2) a
Cryptogonus ohtai	0.2 (0.1) a	0.0 (0.0) a	0.2 (0.1) a	0.1 (0.1) a	0.0 (0.0) a
Syrphidae	2.3 (1.4) a	1.6 (0.5) a	1.5 (0.4) a	0.9 (0.2) a	0.5 (0.2) a
Hymenoptera	9.5 (0.6) ab	7.4 (0.7) b	10.3 (0.5) a	8.3 (1.1) ab	8.9 (0.9) ab

[z] Experiment conducted in a Taiwan Agricultural Research Institute plum orchard.
[y] For each natural enemy, means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ (Fisher's protected LSD test).

99.0% 水楊酸甲酯處理組所捕獲之六條瓢蟲數量 (3.7 隻/黏板) 顯著高於與對照組 (1.8 隻/黏板)，其餘不同濃度處理組所捕獲六條瓢蟲數量雖然較對照組多，但與對照組相比並無顯著差異；而各濃度處理組所捕獲之寄生蜂數量與對照組相比亦皆無顯著差異 (表 2)。

水楊酸甲酯混合不同蟲害誘導之植物揮發性成分後對天敵誘引效果

水楊酸甲酯混合順式 3-己烯-1-醇所捕獲之小黑花蝽象數量 (3.3 隻/黏板) 最多，其次為水楊酸甲酯處理組 (3.2 隻/黏板)，兩者所捕獲之小黑花蝽象數量皆顯著高於對照組 (0.6 隻/黏板)；水楊酸甲酯與 2-苯乙醇及沉香醇混合之處理組所捕獲小黑花蝽象數量 (2.1 隻/黏板) 雖然較對照組 (0.6 隻/黏板) 多，但彼此間無顯著差異。水楊酸甲酯混合 2-苯乙醇處理組所捕獲之中華斑腿盲蝽象 (*Campylomma chinensis* Schuh) 數量 (1.8 隻/黏板)，顯著高於對照組 (0.9 隻/黏板)，其餘各處理組與對照組間皆無顯著差異。除此之外，水楊酸甲酯混合 2-苯乙醇處理組所捕獲之六條瓢蟲數量 (2.5 隻/黏板) 顯著少於對照組 (5.5 隻/黏板)，而其餘各處理組所捕獲之六條瓢蟲數量，以及各處理組所捕獲之變斑隱勢瓢蟲與太田隱勢瓢蟲數量皆與對照組間無顯著差異。在花虻所捕獲到之數量上，除水楊酸甲酯混合順式 3-己烯-1-醇處理組外 (9.1 隻/黏板)，其餘各處理組所捕獲花虻數量均顯著較對照組 (4.3 隻/黏板) 多，以水楊酸甲酯混合 2-苯乙醇處理組所捕獲到之數量最高 (30.8 隻/黏板)；而各處理組所捕獲之寄生蜂數量與對照組間皆無顯著差異 (表 3)。

表 2. 不同濃度之水楊酸甲酯於梅園中誘引天敵之效果。

Table 2. The effectiveness [means (± SE)] of different concentration methyl salicylate on attracting natural enemies in plum orchard[z].

Natural enemy (species, genus, family or order)	Mean number of natural enemies (± SE)					
	Methyl salicylate					
	99.0%	10.0%	1.0%	0.1%	Alcohol	Control
Orius	5.2 (1.1) a[y]	2.1 (0.2) b	4.9 (0.5) a	4.8 (1.3) a	0.5 (0.2) c	0.9 (0.3) bc
Coccinellidae	4.0 (0.7) a	2.6 (0.5) ab	3.4 (0.9) ab	2.2 (0.4) b	2.5 (0.3) ab	1.8 (0.4) b
Cheilomenes sexmaculata	3.7 (0.7) a	2.4 (0.5) ab	3.1 (0.7) ab	1.9 (0.5) b	2.3 (0.4) ab	1.8 (0.4) b
Hymenoptera	11.6 (0.9) b	16.0 (1.7) ab	18.1 (1.0) a	15.7 (0.8) ab	16.6 (3.6) ab	15.2 (1.5) ab

[z] Experiment conducted in a Taiwan Agricultural Research Institute plum orchard.
[y] For each natural enemy, means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ (Fisher's protected LSD test).

表 3. 水楊酸甲酯等比例混合順式 3-己烯-1-醇、2-苯乙醇或沉香醇後於梅園中誘引天敵之效果。

Table 3. The effectiveness [means (± SE)] of methyl salicylate mixed with cis-3-hexen-1-ol, 2-phenylethanol or linalool in 1:1 ratio on attracting natural enemies in plum orchard[z].

Natural enemy (species, genus, family or order)	Mean number of natural enemies (± SE)				
	Methyl salicylate	Methyl salicylate/ cis-3-hexen-1-ol	Methyl salicylate/ 2-phenylethanol	Methyl salicylate/ linalool	Control
Orius	3.2 (0.9) a[y]	3.3 (0.9) a	2.1 (0.6) ab	1.7 (0.7) ab	0.6 (0.3) b
Campylomma chinensis	1.8 (1.1) ab	0.5 (0.3) b	3.2 (1.4) a	0.6 (0.3) b	0.9 (0.7) b
Coccinellidae	5.2 (0.9) ab	6.1 (1.1) a	2.8 (0.5) b	4.9 (1.7) ab	5.9 (1.3) a
Cheilomenes sexmaculata	4.8 (0.9) ab	5.2 (1.0) a	2.5 (0.6) b	4.4 (1.7) ab	5.5 (1.3) a
Cryptogonus orbiculus	0.3 (0.2) a	0.5 (0.2) a	0.1 (0.1) a	0.5 (0.2) a	0.3 (0.2) a
Cryptogonus ohtai	0.1 (0.1) a	0.2 (0.1) a	0.3 (0.2) a	0.0 (0.0) a	0.0 (0.0) a
Syrphidae	21.2 (5.7) a	9.1 (2.1) b	30.8 (5.9) a	21.7 (4.1) a	4.3 (0.9) b
Hymenoptera	27.8 (3.3) a	26.5 (3.8) a	22.9 (2.6) a	28.2 (3.1) a	25.8 (2.7) a

[z] Experiment conducted in a Taiwan Agricultural Research Institute plum orchard.
[y] For each natural enemy, means followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ (Fisher's protected LSD test).

水楊酸甲酯於不同作物田區對天敵誘引試驗

水楊酸甲酯搭配黃色黏板於枇杷園所捕獲的小黑花蝽象數量 (3.3 隻/黏板) 顯著較對照組多 (0.5 隻/黏板)；在玉米田水楊酸甲酯處理組所捕獲小黑花蝽象數量 (1.6 隻/黏板) 亦顯著多於對照組 (0.2 隻/黏板)；萵苣田也有同樣的結果，水楊酸甲酯處理組平均每黏板捕獲 5.7 隻小黑花蝽象，而對照組平均每黏板僅捕獲 0.8 隻；除小黑花蝽象外，黏板上亦捕獲六條瓢蟲、花虻及寄生蜂，惟與對照組相較均無顯著差異 (表 4)。

水楊酸甲酯誘引小黑花蝽象連續調查試驗

水楊酸甲酯搭配黃色黏板誘引小黑花蝽象之連續測試中，於 2014 年連續 4 wk 的調查中所捕獲的小黑花椿象數量 (4.8、2.3、3.0 及 3.8 隻/黏板) 均顯著多於對照組 (1.2、0.3、0.5 及 0.9 隻/黏板)；2015 年水楊酸甲酯處理組所捕獲小黑花蝽象數量 (3.6、2.1、4.1 及 4.8 隻/黏板) 亦均顯著多於對照組 (0.5、0.1、1.1 及 1.7 隻/黏板) (表 5)。

討論

蟲害誘導之植物揮發性成分在植物-害蟲-

表 4. 水楊酸甲酯於枇杷、玉米及萵苣 3 種不同作物田區誘引天敵之效果。

Table 4. The effectiveness [means (± SE)] of methyl salicylate on attracting natural enemies in loquat, maize, and lettuce fields[z].

Natural enemy (species, genus, family or order)	Mean number of natural enemies (± SE)					
	Loquat		Maize		Lettuce	
	Methyl salicylate	Control	Methyl salicylate	Control	Methyl salicylate	Control
Orius	3.3 (0.7)[*]	0.5 (0.3)	1.6 (0.2)[*]	0.2 (0.1)	5.7 (0.8)[*]	0.8 (0.4)
Campylomma chinensis	0.9 (0.2)	0.8 (0.2)	2.6 (1.4)	1.8 (0.7)	1.4 (0.3)	0.7 (0.2)
Syrphidae	0.9 (0.4)	0.7 (0.4)	0.1 (0.1)	0.1 (0.1)	0.1 (0.1)	0.1 (0.1)
Hymenoptera	10.7 (1.5)	9.4 (1.3)	21.2 (4.6)	17.2 (3.8)	22.2 (2.2)	20.1 (1.8)

[z] Experiments conducted in Taiwan Agricultural Research Institute loquat, maize and lettuce field.
[*] For each natural enemy, the asterisk indicated a significant difference from the control at $P < 0.05$ (*t*-test).

表 5. 2014 年及 2015 年 1–2 月間連續 4 wk 於梅園中調查水楊酸甲酯對於小黑花蝽象誘引效果之結果。

Table 5. The investigation results [means (± SE)] of the effectiveness of methyl salicylate on attracting *Orius* in plum orchard for four successive weeks on January–February in 2014 and 2015[z].

	Mean number of natural enemies (± SE)			
	2014		2015	
Week	Methyl salicylate	Control	Methyl salicylate	Control
1	4.8 (1.0)*	1.2 (0.6)	3.6 (0.7)*	0.5 (0.2)
2	2.3 (0.5)*	0.3 (0.2)	2.1 (0.4)*	0.1 (0.1)
3	3.0 (1.1)*	0.5 (0.3)	4.1 (1.4)*	1.1 (0.3)
4	3.8 (0.7)*	0.9 (0.3)	4.8 (1.3)*	1.7 (0.4)

[z] Experiment conducted in a Taiwan Agricultural Research Institute plum orchard.
* For each natural enemy, the asterisk indicates a significant difference from the control at $P < 0.05$ (*t*-test).

天敵交互作用中扮演重要角色，於農業害蟲防治中具增強寄主植物抗性與生物防治應用之潛力，因此受到學者重視 (War *et al*. 2011; Penaflor & Bento 2013)。此研究呈現出水楊酸甲酯等 4 種蟲害誘導之植物揮發性成分，於台灣田間對天敵誘引的調查試驗結果。

於試驗中，水楊酸甲酯、順式 3-己烯-1-醇、2-苯乙醇及沉香醇 4 種蟲害誘導之植物揮發性成分，搭配黃色黏板使用後主要捕獲之天敵有小黑花蝽象、六條瓢蟲、花虻及寄生蜂等。雖然 4 種成分對六條瓢蟲、花虻及寄生蜂等天敵並無明顯誘引效果，但水楊酸甲酯對小黑花蝽象則具有顯著的誘引效果。

在國外研究中水楊酸甲酯可誘引多種天敵 (James 2003a, 2003b; De Boer & Dicke 2004; James & Price 2004; James 2005)，雖然本研究於水楊酸甲酯不同施用濃度的試驗與水楊酸甲酯混合不同蟲害誘導之植物揮發性成分的試驗中，水楊酸甲酯處理組顯著誘引六條瓢蟲與花虻，但在枇杷、玉米及萵苣不同作物田區之試驗中，其對於除了小黑花蝽象外之天敵的誘引效果則不顯著。順式 3-己烯-1-醇、2-苯乙醇及沉香醇在國外研究中指出對不同天敵具誘引效果 (Zhu *et al*. 1999; James 2005; Williams *et al*. 2008; Yu *et al*. 2008; McCormick *et al*. 2014)，但本試驗與對照組相較之下，此 3 種成分對天敵並無顯著誘引效果。James (2005) 指出天敵生理狀態、季節、作物生長時期或其他內在或外在因子皆可能會影響蟲害誘導之植物揮發性成分對天敵的誘引效果。在本試驗中選用的作物及其生長狀況、進行調查的時間以及園區或田區中蟲害發生的情形等因素，皆可能對結果造成影響。

水楊酸甲酯在國外於室內嗅覺反應與田間調查研究中能誘引數種小黑花蝽象，包括 *O. laevigatus* Fieber、*O. tristicolor* 及 *O. similis* Zheng (James 2003b; James 2005; Yu *et al*. 2008; Lee 2010; Stepanycheva *et al*. 2014)。本研究於梅園試驗中亦證實水楊酸甲酯對小黑花蝽象具誘引效果，99.0、1.0 及 0.1% 水楊酸甲酯處理組捕獲之小黑花蝽象數量均顯著高於對照組，10.0% 水楊酸甲酯處理組捕獲之小黑花蝽象數量雖然較對照組多但無顯著差異。James (2006) 研究報告指出 99.0% 水楊酸甲酯較 10.0% 及 1.0% 水楊酸甲酯捕獲更多草蛉 (*Chrysopa oculata* Say)；De Boer & Dicke (2004) 將水楊酸甲酯以正己烷稀釋成不同濃度 (0.02、0.2、2、20、200 及 2,000 μg mL^{-1})，並以 Y 型管測試其對智利捕植蟎之誘引效果，結果顯示水楊酸甲酯於 0.2–200 μg mL^{-1} 濃度範圍內對智利捕植蟎具誘引效果，其中以 2 μg mL^{-1} 處理組對智利捕植蟎誘引效果最好。濃度太低 (0.02 μg mL^{-1}) 完全無誘引效果，而濃度太高 (2,000 μg mL^{-1}) 則反而有忌避效果，顯示出水楊酸甲酯對天敵的誘引效果會因使用濃度不同而改變。本試驗中 0.1% 水楊酸甲酯即對小黑花蝽象有顯著誘引效果，且其誘引效果與 99.0% 和 1.0% 無顯著差異，於田間應用時可採用較低濃度以降低施用成本。

當植物遭受害蟲危害時所誘導產生的揮發性成分不只 1 種，混合這些成分有可能較單獨使用 1 種成分對天敵有更好的誘引效果，亦可能誘引到更多種的天敵 (Kaplan 2012)。順式 3-己烯-1-醇、順式-乙酸-3-己烯酯 (cis-3-hexenyl acetate) 及水楊酸甲酯於前人研究中皆對食蚜瓢蟲具誘引效果 (James & Price 2004; James 2005)。Maeda *et al*. (2015) 於葡萄園以黃色黏板搭配等比例混合的順式 3-己烯-1-醇、順式-乙酸-3-己烯酯及水楊酸甲酯，發現混合後顯著較單獨使用 1 種成分時捕獲更多的食蚜瓢蟲。此外，Tóth *et al*. (2009) 亦發現添加醋酸可增加苯乙醛 (phenylacetaldehyde) 對草蛉 (*Chrysoperla carnea* sensu lato) 的誘引效果，上述成分中再加入水楊酸甲酯時誘效可再提升。本試驗中水楊酸甲酯混合其餘 3 種蟲害誘導之植物揮發性成分，並不能顯著增加對小黑花蝽象、中華斑腿盲蝽、六條瓢蟲等瓢蟲及寄生蜂的捕獲數量；且當水楊酸甲酯混合順式 3-己烯-1-醇後，與單獨僅使用水楊酸甲酯相比，對花蚋的捕獲數量反而顯著的降低。由試驗結果可得知，水楊酸甲酯混合其他蟲害誘導之植物揮發性成分後會影響其對天敵的誘引效果，因田間害蟲發生並不一定只有 1 種，因此於田間應用時除了考量提升對標的天敵的誘效外，仍需考量對其他種天敵的影響。而從試驗結果可發現，水楊酸甲酯等比例混合順式 3-己烯-1-醇較僅使用水楊酸甲酯處理組捕獲更多小黑花蝽象，雖然於分析結果中兩者無顯著差異。然而，是否可藉由調整二者混合之比例達到提升對小黑花蝽象之誘引效果，則有待後續試驗確認。

James (2006) 於未噴施化學藥劑之葡萄園以黃色黏板搭配水楊酸甲酯對金眼草蛉 (*Chrysopa oculata* Say) 進行調查，結果於連續 5 wk 的調查中，前 3 wk 水楊酸甲酯處理組之黃色黏板上金眼草蛉數量較對照組多 5–8 倍。金眼草蛉是北美地區田間蚜蟲及葉蟎等害蟲之重要捕食性天敵，亦是華盛頓州地區啤酒花田及葡萄園保育生物防治計畫中重要的天敵 (James 2003a, 2003b, 2006)。而除金眼草蛉外，水楊酸甲酯亦被證實可誘引草蛉 (*C. nigricornis*) 並增加其於水楊酸甲酯處理田區的數量，水楊酸甲酯被認為有極大的潛力作為害蟲防治的資材，不論是作為誘引劑監測草蛉或其他田間天敵，亦或是增加天敵的族群數量及提升生物防治效果 (James 2003a, 2003b; James & Price 2004)。Kruidhof *et al*. (2015) 指出棲所的結構和化學複雜性可能會影響寄生性天敵對蟲害誘導之植物揮發性成分的反應程度及尋找寄主的效率，顯示作物環境的差異可能會影響蟲害誘導之植物揮發性成分對天敵的誘效。惟本試驗於梅、枇杷、玉米及萵苣等 4 種不同類作物田區試驗中，水楊酸甲酯搭配黃色黏板均顯著較對照組黏板捕獲更多小黑花蝽象，顯示利用水楊酸甲酯於田區誘引小黑花蝽象的應用潛力。2014 年及 2015 年兩年同時期於梅園連續 4 wk 的調查試驗中，水楊酸甲酯處理組黃色黏板每週均較對照組黏板顯著捕獲更多小黑花蝽象且兩年試驗結果一致，亦顯示水楊酸甲酯對小黑花蝽象具有穩定誘效，我們認為水楊酸甲酯具有應用作為小黑花蝽象田間誘引劑之潛力。

小黑花蝽象被公認為最能壓制薊馬密度之天敵，除捕食薊馬外，小黑花蝽象亦可捕食粉蝨、蚜蟲、葉蟎等小型害蟲以及蛾類、甲蟲或其他昆蟲的卵，是台灣田野間常見的捕食性天敵，並已應用於農業害蟲生物防治 (Wang *et al*. 2002; Lu *et al*. 2011)。Kelly *et al*. (2014) 於蕃茄園施用水楊酸甲酯，發現可提高人工飼養的捕食性蝽象 (*Podisus maculiventris* Say) 釋放於蕃茄園後的停留率，並增加對煙草天蛾的捕食，說明可利用水楊酸甲酯提高人工飼養天敵釋放於田間防治害蟲的效果。本試驗中水楊酸甲酯對小黑花蝽象具穩定誘引效果，未來若能運用水楊酸甲酯吸引田區周圍之小黑花蝽象進入田區，監測小黑花蝽象田間密度來決定釋放時機，並利用水楊酸甲酯提高釋放之小黑花蝽象於田區的停留率等方式，將可提高小黑花蝽象對田區害蟲之生物防治效果並減少後續其他防治措施之投入。

綜合試驗結果，水楊酸甲酯於不同類別作物田區皆可有效誘引小黑花蝽象，雖然因使用濃度不同或與它種蟲害誘導之植物揮發性成分

混合會影響其誘效，但整體而言水楊酸甲酯相當具有開發作為小黑花蝽象田間誘引劑之潛力。

引用文獻

De Boer, J. G. and M. Dicke. 2004. The role of methyl salicylate in prey searching behavior of the predatory *Phytoseiulus persimilis*. J. Econ. Entomol. 30:255–271.

Dicke, M. 2015. Herbivore-induced plant volatiles as a rich source of information for arthropod predators: Fundamental and applied aspects. J. Indian Inst. Sci. 95:35–42.

Dicke, M., J. Takabayashi, M. A. Posthumus, C. Schutte, and O. E. Krips. 1998. Plant-phytoseiid interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: Variation in production of cues in response of predatory mites. Exp. Appl. Acarol. 22:311–333.

Howe, G. A. and G. Jander. 2008. Plant immunity to insect herbivores. Annu. Rev. Plant Biol. 59:41–66.

James, D. G. 2003a. Field evaluation of herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects: Methyl salicylate and the green lacewing, *Chrysopa nigricornis*. J. Chem. Ecol. 29:1601–1609.

James, D. G. 2003b. Synthetic herbivore-induced plant volatiles as field attractants for beneficial insects. Environ. Entomol. 32:977–982.

James, D. G. 2005. Further field evaluation of synthetic herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects. J. Chem. Ecol. 31:481–494.

James, D. G. 2006. Methyl salicylate is a field attractant for the goldeneyed lacewing, *Chrysopa oculata*. Biocontrol Sci. Technol. 16:107–110.

James, D. G. and T. S. Price. 2004. Field-testing of methyl salicylate for recruitment and retention of beneficial insects in grapes and hops. J. Chem. Ecol. 30:1613–1628.

Jolivet, P. 1998. Interrelationship between Insects and Plants. CRC Press. Boca Raton, FL. 309 pp.

Kaplan, I. 2012. Attracting carnivorous arthropods with plant volatiles: The future of biocontrol or playing with fire? Biol. Control 60:77–89.

Kelly, J. L., J. R. Hagler, and I. Kaplan. 2014. Semiochemical lures reduce emigration and enhance pest control in open-field predator augmentation. Biol. Control 71:70–77.

Kessler, A. and I. T. Baldwin. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. Science 291:2141–2144.

Kruidhof, H. M., A. L. Roberts, P. Magdaraog, D. Munoz, R. Gols, L. E. M. Vet, T. S. Hoffmeister, and J. A. Harvey. 2015. Habitat complexity reduces parasitoid foraging efficiency, but does not prevent orientation towards learned host plant odours. Oecologia 3346. http://link.springer.com/article/10.1007/s00442-015-3346-y (visit on 6/30/2015)

Lee, J. C. 2010. Effect of methyl salicylate-based lures on beneficial and pest arthropods in strawberry. Environ. Entomol. 39:653–660.

Lu, C. T., Y. C. Chiu, M. Y. Hsu, C. L. Wang, and F. C. Lin. 2011. Using cysts of brine shrimp, *Artemia franciscana*, as an alternative source of food for *Orius strigicollis* (Poppius) (Hemiptera: Anthocoridae). J. Taiwan Agric. Res. 60:300–308. (in Chinese with English abstract)

Maeda, T., H. Kishimoto, L. C. Wright, and D. C. James. 2015. Mixture of synthetic herbivore-induced plant volatiles attracts more *Stethorus punctum picipes* (Casey) (Coleoptera: Coccinellidae) than a single volatile. J. Insect Behav. 28:126–137.

Mallinger, R. E., D. B. Hogg, and C. Gratton. 2011. Methyl salicylate attracts natural enemies and reduces populations of soybean aphids (Hemiptera: Aphididae) in soybean agroecosystems. J. Econ. Entomol. 104:115–124.

McCormick, A. C., S. Irmisch, A. Reinecke, G. A. Boeckler, D. Veit, M. Reichelt, B. S. Hansson, J. Gershenzon, T. G. Köllner, and S. B. Unsicker. 2014. Herbivore-induced volatile emission in black poplar: Regulation and role in attracting herbivore enemies. Plant Cell Environ. 37:1909–1923.

Pare, P. W. and J. H. Tumlinson. 1999. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. Plant Physiol. 121:325–332.

Penaflor, M. F. G. V. and J. M. S. Bento. 2013. Herbivore-induced plant volatiles to enhance biological control in agriculture. Neotrop. Entomol. 42:331–343.

Scutareanu, P., B. Drukker, J. Bruin, M. A. Posthumus, and M. W. Sabelis. 1997. Volatiles from *Psylla*-infested pear trees and their possible involvement in attraction of anthocorid predators. J. Chem. Ecol. 23:2241–2260.

Stepanycheva, E. A., M. O. Petrova, T. D. Chermenskaya, I. V. Shamshev, and I. M. Pazyuk. 2014. The behavioral response of the predatory bug *Orius laevigatus* Fieber (Heteroptera, Anthocoridae) to synthetic volatiles. Entomol. Rev. 94:1053–1058.

Tóth, M., F. Szentkirályi, J. Vuts, A. Letardi, M. Tabilio, G. Jaastad, and G. Knudsen. 2009. Optimization of a phenylacetaldehyde-based attractant for common green lacewings (*Chrysoperla carnea* s.l.). J. Chem. Ecol. 35:449–458.

van Poecke, R. M. P., M. A. Posthumus, and M. Dick. 2001. Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid *Cotesia rubecula*: Chemical, behavioral, and gene expression analysis. J. Chem. Ecol. 27:1911–1928.

Wang, C. L., P. C. Lee, and Y. J. Wu. 2002. Rearing and utilization of O*rius strigicollis* for the control of thrips. p.157–174. *in*: Proceeding of Symposium on the Biological Control of Agricultural Insects and Mites. November 21–22, 2002. Taichung, Taiwan. Formosan Entomol. Spec. Pub. 3. Taichung, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

War, A. R., H. C. Sharma, M. G. Paulraj, M. Y. War, and S. Ignacimuthu. 2011. Herbivore induced plant volatiles: Their role in plant defense for pest management. Plant Signal Behav. 6:1973–1978.

Williams, L., C. Rodriquez-Saona, S. C. Castle, and S. Zhu. 2008. EAG-active herbivore-induced plant volatiles modify behavioral responses and host attack by an egg parasitoid. J. Chem. Ecol. 34:1190–1201.

Yang, T., G. Stoopen, M. Thoen, G. Wiegers, and M. A. Jongsma. 2013. Chrysanthemum expressing a linalool synthase gene ‘smells good’, but ‘tastes bad’ to western flower thrips. Plant Biotechnol. J. 11:875–882.

Yu, H., Y. Zhang, K. Wu, X. W. Gao, and Y. Y. Guo. 2008. Field-testing of synthetic herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects. Environ. Entomol. 37:1410–1415.

Zhu, J., A. A. Cosse, K. S. B. Obrycki, and T. C. Baker. 1999. Olfactory reactions of the twelve-spotted lady beetle, *Coleomegilla maculate* and the green lacewing, *Chrysoperla carnea* to semiochemicals released from their prey and host plant: Electroantennogram and behavioral responses. J. Chem. Ecol. 25:1163–1177.

Evaluation of the Effectiveness of Four Herbivore-Induced Plant Volatiles on Attracting Natural Enemies

Yaw-Jen Dong[1] and Shaw-Yhi Hwang[2,*]

Abstract

Dong, Y. J. and S. Y. Hwang. 2016. Evaluation of the effectiveness of four herbivore-induced plant volatiles on attracting natural enemies. J. Taiwan Agric. Res. 65(2):173–183.

Four synthetic herbivore-induced plant volatiles (methyl salicylate, cis-3-hexen-1-ol, 2-phenylethanol, and linalool) were field-tested for the effectiveness in attracting natural enemies at the Taiwan Agricultural Research Institute. *Orius*, *Cheilomenes sexmaculata*, flower flies (Syrphidae), and Hymenoptera parasitoids which are major natural enemies can be trapped by yellow sticky papers. In four volatiles tested, only methyl salicylate significantly attracted *Orius*. All volatiles showed no significant attraction to *Cheilomenes sexmaculata*, Syrphidae, and Hymenoptera parasitoids. Furthermore, the attractions of methyl salicylate to *Orius* were different at different concentrations. Besides 10.0% methyl salicylate (2.1/trap), 99.0% (5.2/trap), 1.0% (4.9/trap), and 0.1% (4.8/trap) methyl salicylate attracted significantly more *Orius* than control (0.9/trap). Comparing with control (0.6/trap), more *Orius* were significantly trapped on yellow sticky papers in the treatments with a mixture of methyl salicylate and cis-3-hexen-1-ol (3.3/trap) and with methyl salicylate only (3.2/trap). Investigations conducted at a plum orchard for four successive weeks in 2014 and 2015 showed that methyl salicylate attracted significantly more *Orius* than control at every time point. In addition, yellow sticky paper with methyl salicylate also trapped significantly more *Orius* than control in loquat, maize and lettuce fields. In summary, methyl salicylate has the potential to be a field attractant against *Orius*. However, the influences of methyl salicylate at different concentrations and mixed with other herbivore-induced plant volatiles need to be considered.

Key words: Herbivore induced plant volatiles, Methyl salicylate, *Orius*, Attractant.

Received: September 2, 2015; Accepted: October 1, 2015.
* Corresponding author, e-mail: oleander@dragon.nchu.edu.tw
[1] Assistant Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Professor, Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(2):184–193 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06502.08

研究報告

不同套袋材料對「玉荷包」荔枝果實著色與農藥殘留之影響

方信秀[1] 李文立[2] 黃基倬[1] 梁佑慎[3,*]

摘要

方信秀、李文立、黃基倬、梁佑慎。2016。不同套袋材料對「玉荷包」荔枝果實著色與農藥殘留之影響。台灣農業研究 65(2):184–193。

本試驗以「玉荷包」荔枝著果後 55 d 之果實，以不同套袋材質包括網袋、半白袋、全白袋、黃袋與黑袋在樹上進行套袋處理，以慣行農藥防治法為對照組，欲找出提升「玉荷包」荔枝品質與食用安全之栽培模式。結果顯示，使用各種紙質套袋皆顯著增加荔枝果皮花青素含量，使用黃色套袋與黑色套袋則會顯著降低葉綠素含量。各種套袋防治處理皆可顯著減少落果率，並減緩果實生長速度，使果重較輕。農藥殘留檢測結果顯示，於對照組有 3 種農藥殘留，網袋與半白袋有 2 種農藥微量檢出，套白袋、黃袋與黑袋則完全未被檢出。本研究結果顯示，以合適材質套袋處理可減少農藥施用次數及農藥殘留，增加荔枝果皮花青素含量，提升「玉荷包」荔枝食用安全之商品價值。

關鍵詞：荔枝、套袋、農藥殘留、食用安全。

前言

荔枝在中國種植超過 2,200 年，並擴展到亞太地區成為荔枝主要產地，所生產的荔枝占全世界 95% 之產量。台灣、印度、泰國及越南等國家屬於新興的生產國 (Mitra & Pathak 2010)。台灣地理位置介於北緯 21°50’ 至 25°20’ 間，剛好跨越熱帶與亞熱帶，適合荔枝生產。據 2013 年農委會農業統計年報顯示，台灣荔枝種植面積為 11,388 ha (Agriculture and Food Agency 2013)，主要種植於高雄市、台中市、南投縣、台南市、彰化縣、嘉義縣與屏東縣。北部與東北部冬季與初春降雨影響荔枝開花著果，相較之下中南部氣候較適合荔枝生產。全台荔枝面積約有 7 成種植「黑葉」品種，而廣受歡迎的「玉荷包」荔枝生產面積約 2,600 ha，其中高雄地區約2,000 ha為「玉荷包」荔枝重要產區 (Teng & Fang 2012)。

荔枝果皮色澤受到不同色素含量比例影響。於前人研究指出，植物色澤主要受 4 群色素依不同含量共同調控，分別為葉綠素 (chlorophyll)、類黃酮 (flavonoid)、類胡蘿蔔素 (carotenoid) 以及甜菜素 (betalain)。葉綠素為脂溶性且普遍存在植物葉綠體 (chloroplast) 中，依濃度不同呈現不同深度的綠色；類黃酮為水溶性，其中以花青素 (anthocyanin) 對色彩呈現之影響最甚，依構型不同與所在環境 pH 值呈現橘、粉紅、紅、紫、藍及黑藍等顏色。類胡蘿蔔素為脂溶性，可於雜色體 (chromoplast) 中高濃度累積，呈現橘、紅、青銅及褐色 (Davies & Schwinn 2010; Xie *et al*. 2011; He *et al*. 2012)。甜菜素累積於液胞 (vacuole)，可呈現黃、橘、紅及紫色，此類色素目前只被發現累積於石竹目 (Caryophyllales) 植物中，此目最具代表性的水果為火龍果；甜菜素在該類植物中取代花青素之地位，為紅紫等色澤呈現的主要色素。目前對甜菜素

投稿日期：2015 年 5 月 4 日；接受日期：2015 年 10 月 2 日。
* 通訊作者：justinliang@mail.npust.edu.tw
[1] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所熱帶果樹系助理研究員。台灣 高雄市。
[2] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所熱帶果樹系副研究員兼系主任。台灣 高雄市。
[3] 屏東科技大學農園生產系助理教授。台灣 屏東縣。

相關生理機制瞭解尚不完整，未來仍需進一步探討 (Han *et al*. 2009)。而荔枝果皮色澤主要由葉綠素與花青素含量所控制 (Lee & Wicker 1991)。不同品種荔枝成熟後期，果皮隨著葉綠素與花青素累積程度不同，可呈現綠色、淺綠色、綠中帶紅、紅中帶綠、淺紅色與鮮紅色等不同色澤 (Wei *et al*. 2011)。紅色果皮品種於授粉後 12–15 wk 由淺綠轉成黃綠色，並於授粉後 16–20 wk 由黃紅色轉為深紅色，紅色色澤已知為花青素累積於細胞中所呈現，此花青素主成分矢車菊素-3-芸香苷 (cyanidin-3-rutinoside) 高於 75%，矢車菊素-3-葡萄糖苷 (cyanidin-3-glucoside) 與錦葵花素-3-乙醯基葡萄醣 (malvinidin-3-acetylglucoside) 則分別少於 17% 與 9% (Javier *et al*. 1999; Zhang *et al*. 2004)。但果皮色澤於採收後，色素易快速分解轉變為褐色，失去商品價值 (Huang & Scott 1985; Zhang & Quantick 1997; Jiang & Fu 1998; Jiang *et al*. 2004)。

高品質農產品一直是台灣精緻農業的代表，栽培過程經常運用套袋方式提升品質。套袋不但可調整果皮色澤，亦可減少病蟲害發生，為台灣相當普遍的栽培模式。包括芒果、香蕉、番石榴、番荔枝、台灣棗、火龍果與蓮霧皆利用套袋提高農產品價值，並依需求分別使用不同套袋材質以獲取最佳品質 (Lai 2002; Chiang *et al*. 2004; Nguyen *et al*. 2004; Chen 2011)。荔枝若於幼果或中果期套袋可有效防止荔枝細蛾與東方果實蠅叮咬，減少落果與蟲害侵擾 (Wen & Liou 2008)。然而，因荔枝著果量不穩定且套袋人力成本較高，農友多以頻繁噴藥方式進行病蟲害防治。近年來內外銷市場農藥抽檢不合格之情事時有所聞，再加上食安問題逐漸受到消費者重視，為提升消費者食品安全，針對荔枝套袋對品質之影響進行探討。

材料與方法

栽培處理條件

本試驗選用農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所 15 年生「玉荷包」植株，於 2014 年開花著果後進行 7 次用藥，套袋處理於套袋前施藥 4 次，其後即不施藥 (表 1)。套袋處理分別為慣行農藥施用法 (no bagging)、網袋 (net bag)、半面白半面透明袋 (half-white bag)、全白袋 (white bag)、黃袋 (yellow bag) 與黑袋 (black bag) 等 6 種。網袋為同力纖維廠股份有限公司生產之 16 目網袋，長 30 cm，寬 45 cm。半面白半面透明袋與全白袋為合眾紙業生產，長 40 cm，寬 20 cm。黃袋與黑袋亦為合眾紙業生產，長 30 cm，寬 25 cm。套袋時機為生理落果後之中果期 (2014/4/23)。施藥種類包括大滅松 44% 乳劑 (dimethoate)、40.8% 陶斯松乳劑 (chlorpyrifos)、2.4% 第滅寧水懸劑 (deltamethrin)、50% 芬殺松乳劑 (fenthion)、33.5% 快得寧水懸劑 (oxine-copper)、80% 福賽快得寧可濕性粉劑 (fosetyl-aluminium + oxine-copper) 與 40.64% 加保扶水懸劑 (carbofuran)，施藥與套袋時間詳見表 1。每個套袋套 1 個果穗，各套袋處理進行 8 重複。套袋前計算著果數量，並於各套袋處理內安置連續記錄型照度計與溫度計 (HOBO Pendant Temperature/Light Data Logger UA-002, Onset, Boston, USA)，每 10 min 記錄 1 份資料，連續記錄 1 mo。

果實園藝性狀調查

果實於 2014/5/25 同時採收並進行果實園藝性狀調查。落果率計算套袋當天與採收時著果數量，每個套袋處理 8 重複。各處理隨機取 25 粒果實進行單果重記錄。著色比例於 0–100% 以 10% 為級距分級，先取出 10 個級距標準品，再逐粒進行著色比例分級。可溶素固型物分析隨機取 10 粒果實以數位型糖度計 (PAL-1, ATAGO, Tokyo, Japan) 測定。果皮色差值使用色差儀 (color meter ZE 2000, Nippon Denshoku, Tokyo, Japan) 測定果實色差值 (L、a、b 值)，測定時將果目平滑處緊密貼實於測定口避免漏光。各處理分別測定 4 個果實，各 3 個點，共 12 重複。L 值表示亮度，數值愈大則愈亮；a 值正值表示紅色度，負值表示綠色度；b 值以正值表示黃色度，負值表示藍色度。各處理分別取 3 粒果實進行葉

表 1. 農藥施用與套袋處理時間表 (2014 年 3–5 月)。

Table 1. Record of pesticide applications and bagging treatments (March–May, 2014).

Date	Treatment	Bagging treatment					
		No bagging	Net bag	Half-white bag	White bag	Yellow bag	Black bag
March 22th	Deltamethrin 1,500×, Chlorpyrifos 1,000×, Oxine-copper 2,000×	●[z]	●	●	●	●	●
March 28th	Carbofuran 1,200×, Dimethoate 1,000×, Fosetyl-aluminium + oxine-copper 1,000×	●	●	●	●	●	●
April 7th	Deltamethrin 1,500×, Fenthion 1,000×, Oxine-copper 2,000×	●	●	●	●	●	●
April 17th	Chlorpyrifos 1,000×, Dimethoate 1,000×, Fosetyl-aluminium + oxine-copper 1,000×	●	●	●	●	●	●
April 25th	Bagging						
Aprial 28th	Deltamethrin 1,500×, Carbofuran 1,200×, Oxine-copper 2,000×	●					
May 8th	Deltamethrin 1,500×, Fenthion 1,000×, Oxine-copper 2,000×	●					
May 16th	Deltamethrin 1,500×, Oxine-copper 2,000×	●					
May 25th	Harvest and investigation						

[z] Pesticide treatment; note: all these treated fruit were harvested and analyzed for pesticide residues on May 25th.

綠素分析 (Yang *et al*. 1998)，將果皮剝成碎片後隨機取 0.2–0.3 g，以電子天平測定後置於研缽以液態氮快速磨碎，再加入 1.4 mL 80% acetone 萃取後置於 1.5 mL 離心管。於常溫下以 16,000× *g* 離心 (260D, Denville, NJ, USA) 5 min。取 1 mL 上清液，置入石英測光管，於分光光度計 (U-2900, HITACHI, Tokyo, Japan) 測定 663.6 與 646.6 nm 波長吸光值。代入公式計算葉綠素 a、b 濃度 (Porra *et al*. 1989)，Chlorophylls a + b 濃度 (μg g^{-1}) = (17.76 × A646.6 + 7.34 × A663.6)/採樣鮮重 (g)。接續使用相同果實進行花青素測定，將果皮剝成碎片後隨機取 0.2–0.3 g，以電子天平測定後，置於研缽使用液態氮快速磨碎，再加入 1.4 mL 80% methyl alcohol 萃取。置入 1.5 mL 離心管中於常溫下以 16,000× *g* 離心 5 min，取 1 mL 上清液，置入石英測光管於分光光度計 (U-2900, HITACHI, Tokyo, Japan) 測定 530 與 657 nm 波長之吸光值。套入公式計算花青素濃度，總花青素濃度 (μg g^{-1}) = (A530 − 0.333 × A646.6)/採樣鮮重 (g) (Giusti & Wrolstad 2001)。

農藥殘留分析

果實採收後，各處理各抽樣 1 kg 果實送往農業藥物毒物試驗所進行農藥殘留分析，該所將種子去除了，連皮帶果肉使用歐盟公告之 QuEChERS 分析法進行分析 (利用氣相及液相層析串聯式質譜儀定性及定量分析)。

統計分析

所有資料皆於 Microsoft Office Word 與 Excel 進行資料輸入與圖表繪製，另使用 SAS 9.13 版本進行統計分析，並以最小顯著差異分析法 (least significant difference; LSD) 進行變方分析。

結果

不同套袋內之溫度變化

由溫度與照度結果顯示套袋會影響袋內果實環境溫度，除了陰雨天氣溫變化較少之外，各種套袋處理袋內溫度變化相當大。調查採收前 1 mo 的平均溫度，於 13:00 達到最高溫，而 06:00 溫度最低。黑色套袋的溫度

上升最少，而其他套袋處理都可使袋內溫度上升，又以全白袋溫度增加最高。若以平均值觀察 13:00 之溫度，除黑袋溫度較不套袋低，其他套袋處理可增加 1–2℃左右。細部觀察每日溫度變化，最低溫約 20℃，最高溫可達 48℃，全白袋於中午期間常較不套袋處理溫度高 3–7℃。可見套袋易減少空氣流通，並使果實環境溫度上升 (圖 1A、1B)。至於光照度部分，套袋處理光照度明顯減少，套黑袋則完全遮光，套黃袋遮光度次之，而以網袋遮光量最少 (圖 1C)。

果實外觀與園藝性狀

由採收後的果實外觀，可發現不套袋果實外觀較暗紅，套網袋、半白袋、全白袋與黃袋處理較為鮮紅，亦較為美觀。而不透光的黑袋則呈現鮮黃色，只有極小部分轉為紅色，推估光刺激是轉化生成紅色花青素的重要因子 (圖 2)。

觀察果實園藝性狀分析結果，不套袋之果實單果重介於 21–30 g 之間，均重 25.6 g，顯著較所有套袋處理重 (圖 3A)。可溶性固型物分析中，以套網袋之可溶性固型物 20.5°Brix 最高，與不套袋、半白袋與全白袋達顯著性差異 (圖 3B)。而黑色套袋並未因完全不透光，使得可溶性固型物顯著下降。著色比例除了黑色套袋著色比例低於 1 成外，其他處理著色比例介於 46–65% 之間，不同套袋處理並沒有影響著色比例 (圖 3C)。調查套袋前與採收後之落果率，使用慣行農藥防治之落果率顯著性較套袋處理高 (圖 3D)。

為瞭解套袋處理對荔枝果皮葉綠素與花青素含量之影響，果皮葉綠素分析結果顯示，黃色與黑色套袋處理之果皮葉綠素含量皆顯著減

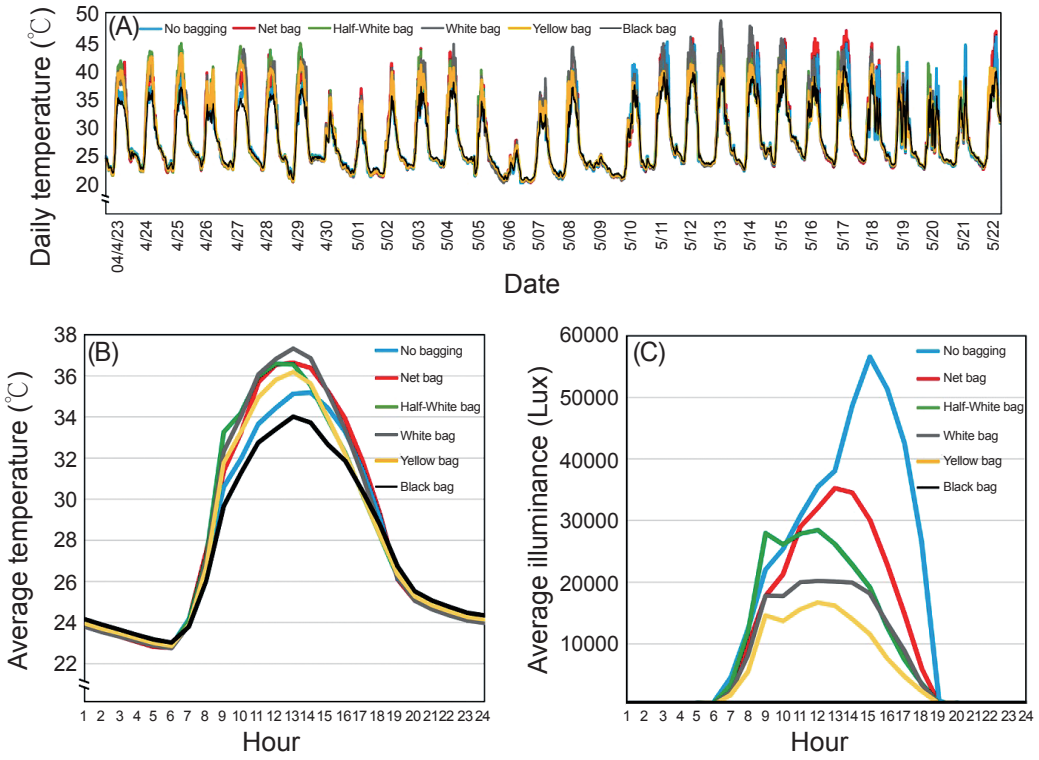


圖 1. 不同套袋處理袋內每日溫度變化 (A)、每小時之溫度變化 (B)、及每小時之光照度變化 (C)。

Fig. 1. Diurnal variations in temperature (A)–(B) and illuminance (C) inside bags made of different bagging materials.

少 (圖 3E)。分析花青素含量可發現不套袋之花青素含量顯著較 4 種紙質套袋還低，使用塑膠網袋花青素含量雖未達顯著性差異，但亦較 4 種紙質套袋為低 (圖 3F)。

進一步比對不同套袋處理之果皮色差質，L 值表示明亮度，黑色套袋使葉綠素含量大量減少，L 值為 56.82 顯著性高於其他套袋處理，而以黃色套袋 38.79 次之。a 值表示紅綠色，正值偏紅負值偏綠，因「玉荷包」為紅中帶綠之品種，可發現標準偏差數值偏高。除黑色套袋 a 值 1.57 最低之外，未套袋之慣行栽培處理 3.16 與全白袋之 2.06 數值均較偏低，表示紅色著色比例與紅色較淺。b 值表示黃藍色，黑色套袋 b 值 23.71，與其他處理有極顯著差異，表示果皮色澤顯著偏黃 (表 2)。

果實農藥殘留分析

藥檢分析結果顯示，慣行農藥施用法可驗到 3 種農藥之殘留，包括 0.01 mg L^{-1} 陶斯松、0.3 mg L^{-1} 第滅寧與 0.2 mg L^{-1} 芬殺松。其中第滅寧含量超過荔枝台灣農藥殘留標準 0.2 mg L^{-1}，但未超過日本進口農藥殘留標準 0.5 mg L^{-1}。而網袋處理檢驗到 0.01 mg L^{-1} 陶斯松與 0.01 mg L^{-1} 第滅寧，半白紙袋處理檢驗到 0.01 mg L^{-1} 陶斯松。而全白袋、黃袋與黑袋處理農藥殘留結果均為零檢出 (N.D.; non-detective)，亦即樣品之農藥殘留量低於偵測極限 (表 3)。

討論

「玉荷包」荔枝在台灣因為產期較「黑葉」、「糯米糍」及「桂味」早採收，且具有大果、紅中帶綠美觀外表與焦核率高等優良特性，使「玉荷包」荔枝一直以來具有高價送禮嘗鮮的市場價值，惟其生產栽培有產量不穩、人力成本過高與產期過度集中等缺點 (Teng & Fang 2012)。在食用安全上，則因「玉荷包」無套袋及網室栽培，為防治東方果實蠅與荔枝細蛾，果農通常在於著果後，每 7–10 d 施藥一次進行病蟲害防治，至採收前 10–14 d 停止用藥。因果園開園採收期約 2 wk，如採收前適逢降雨，部分農民為避免藥效減弱使蟲害發生而再



圖 2. 「玉荷包」荔枝不同套袋處理之果皮色澤外觀。

Fig. 2. The peel color of 'Yu-Her-Pao' litchi fruit packed on tree with different bagging materials.

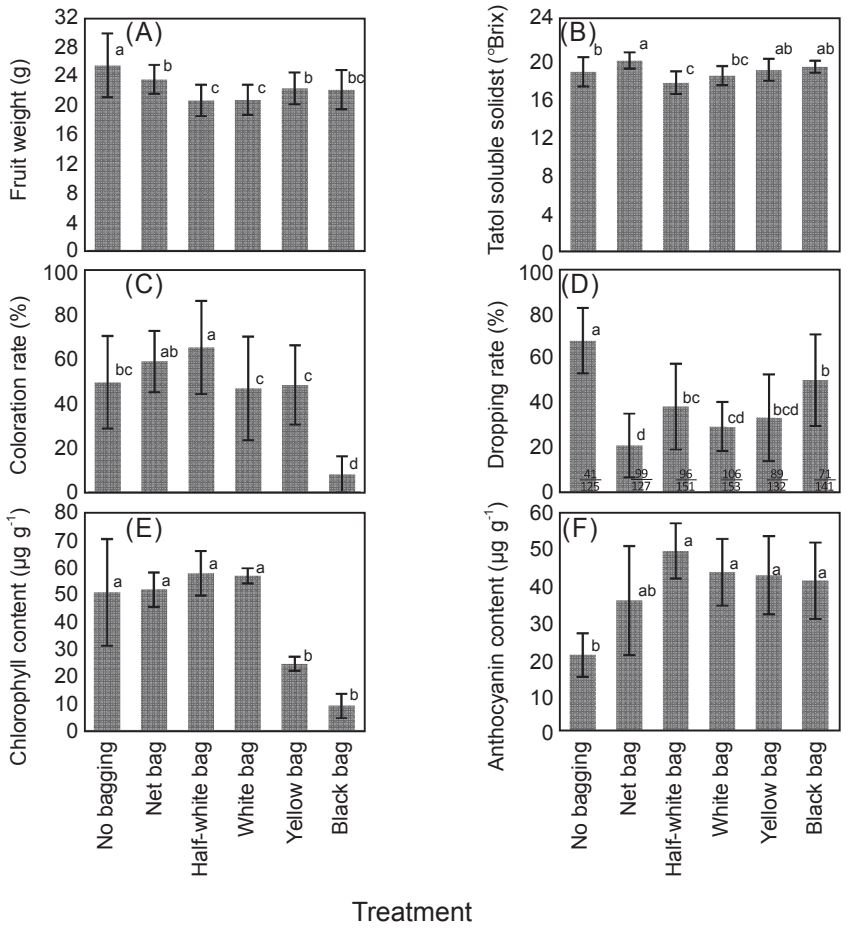


圖 3. 「玉荷包」荔枝以不同套袋處理對果實單果重 (A)、可溶性固型物 (B)、著色比例 (C)、落果率 (D)、葉綠素含量 (E) 與花青素含量 (F) 之影響。落果率 (D) 圖示數字為套袋當天與採收時之總著果數。

Fig. 3. Changes in fruit weight (A), total soluble solids (B), coloration rate (C), dropping rate (D), chlorophyll content (E), and anthocyanin content (F) of 'Yu-Her-Pao' litchi fruit packed on tree with different bagging materials. Means with the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ by LSD test. Bars indicate standard errors of the means. The numbers in dropping rate (D) mean total fruit set number at bagging and harvest day.

表 2. 「玉荷包」荔枝果實以不同套袋處理之果皮色差值。

Table 2. The peel color of 'Yu-Her-Pao' litchi fruit packed on tree with different bagging materials.

	Color characteristics		
Bagging treatment	L	a	b
No bagging	36.63 ± 3.43 bc[z]	3.16 ± 9.08 ab	16.94 ± 3.21 b
Net bag	33.52 ± 2.85 c	7.17 ± 5.70 ab	14.08 ± 2.17 c
Half-white bag	33.97 ± 4.31 c	5.88 ± 7.96 ab	14.53 ± 3.64 bc
White bag	36.73 ± 3.59 bc	2.06 ± 4.94 b	16.37 ± 2.82 bc
Yellow bag	38.79 ± 6.18 b	9.12 ± 11.75 a	16.38 ± 4.74 bc
Black bag	56.82 ± 3.85 a	1.57 ± 6.22 b	23.71 ± 2.18 a

[z] Mean separation within columns and lines at $P < 0.05$ by LSD. Data were the means ± standard deviation ($n = 12$).

表 3. 「玉荷包」荔枝不同套袋處理之果實農藥殘留分析結果。

Table 3. The pesticide residues of 'Yu-Her-Pao' litchi with different bagging treatments.

	Pesticide resides detected (mg L^{-1})					
Pesticide residue (mg L^{-1})	No bagging	Net bag	Half-white bag	White bag	Yellow bag	Black bag
Chlorpyrifos	0.01	0.01	0.01	N.D.	N.D.	N.D.
Deltamethrin	0.30	0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Fenthion	0.20	N.D.[z]	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

[z] N.D.: not detected.

次施藥，易使荔枝殘留農藥導致內外銷抽檢不合格。本試驗以著果後 55 d 為套袋時機，此時已生理落果結束，可減少袋內落果與病害發生，且離採收期仍有 1 mo 時間，有足夠時間讓農藥分解。為提升國人荔枝食用安全，並減低荔枝因農藥殘留不合格受到退貨之嚴重損失，本研究進行不同材質套袋處理，藉由套袋保護及減少施藥次數，提高荔枝品質與食用安全。

使用不同套袋材質會影響光照強度與果實生長溫度，使果皮色素產生變化。荔枝果實生長期間處於較高的呼吸作用速率，於果實成熟後期呼吸作用速率則逐漸減低 (Jiang *et al*. 1986)。本試驗結果顯示，除了黑色套袋處理白天袋內溫度較低之外，其他套袋方式都會讓果實環境溫度上升，尤以全白袋環境溫度增加之幅度最高。調查採收前 1 mo 的溫度，中午時刻全白袋之袋內溫度平均較不套袋溫度高 2.4℃。除了天候陰雨時袋內溫度較不受影響外，套袋皆使果實生長溫度上升。使用白色套袋之袋內溫度最高，但果實重量卻較低，推估可能因呼吸作用較強，間接使碳水化合物累積較慢。不套袋處理果實環境溫度較低，平均果重顯著較套袋處理還高。然而，是否因套袋使果實溫度較高，間接提高呼吸作用影響果重，仍需進一步試驗尚可確認。於之前的預備試驗中，套袋荔枝較不套袋果實生長慢，延後 1 mo 採收，單果重亦可達到 25–30 g，果實著色比例可達 8–9 成，套袋處理之果皮色澤亦較鮮紅明亮。

由不同套袋處理採收後之果皮外觀、套黑袋之果實轉色不全呈現淺黃色，推論當果皮受到嚴重遮光時，原質體 (proplastid) 沒有受到光刺激催化成葉綠素 (Kevin 2009)。進一步觀察葉綠素與花青素分析結果顯示，黑色套袋之果皮葉綠素含量最低。而著色比例低於 1 成，花青素含量測定結果並沒有減少。推估因花青素有許多不同的構型，隨著花青素鍵結的分子不同，會呈現無色、淺黃色、紅紫色、紫色或橙色等不同顏色 (He *et al*. 2010)。本試驗使用 530 nm 波長進行總花青素含量分析，無法個別分析不同的花青素構型與含量，若要深入瞭解，未來需進一步使用高效液相層析儀 (high-performance liquid chromatography; HPLC) 分析。由各處理果皮花青素含量變化結果可見，不套袋與網袋處理之光照度最強，但花青素含量較少。而黑袋處理完全沒有光線，則無法順利轉化累積紅色構型之花青素。此結果顯示，荔枝果皮紅色花青素需要光的刺激才可以生成，但若果皮處於強光環境，亦會減少紅色花青素累積。使用套袋減少光強度，有助於提升果皮紅色花青素累積。於阿拉伯芥光照試驗結果顯示，植株暗處理 5 天後，再進行白光、藍光、UV-A、UV-B 與紅光之照射，與花青素生合成有關的 CHS、F3H、DFR 與 LDOX 等基因於黑暗環境不表現，受到不同光波長刺激 1–24 h 後，此些基因皆大量表現。推測這群基因需受到光的刺激而表現，進而形成花青素 (Cominelli *et al*. 2008)。荔枝轉色可分為，不轉色、部分轉紅與轉紅等 3 階段。已有學者選殖出花青素合成主要的 6 個基因，於 12 個不同荔枝品種基因表現分析結果顯 示，*LcF3H*、*LcDFR*、*LcANS* 與 *LcUFGT* 於轉色比例低的品種表現量都很弱，完全不轉紅的荔枝品種 *LcUFGT* 基因幾乎不表現。另分析 'Feizixiao' (「妃子笑」，同台灣「玉荷包」) 不同

成熟過程果皮，發現 6 個基因中只有 *LcUFGT* 和荔枝轉色有顯著相關 (r = 0.84)，證明 *LcUFGT* 是荔枝轉色最重要的基因。亦有學者研究套袋對 *LcUFGT* 表現量之影響，套袋前 *LcUFGT* 基因表現量極少，移除袋子 7 d 時，*LcUFGT* 表現量大增，果皮隨即呈現深紅色。可知光線可促進 *LcUFGT* 基因表現，亦為花青素累積的重要因子 (Wei *et al*. 2011)。於本試驗之黑色套袋處理嚴重遮陰，可能因此使 *LcUFGT* 基因受到抑制，導致果皮完全未轉色。

荔枝果實生長期間受到荔枝細蛾危害，易發生落果。本試驗套袋處理落果率顯著較未套袋的慣行施藥還低，推估使用農藥防治易有噴藥死角，若蟲害發生易使落果率增加。套袋處理之單果重較低，可能係因落果量較少，養分須分配給較多果實，致果實充實速度較慢，間接使套袋果實最佳採收期延後 1–2 wk。

荔枝為 1 年 1 收果樹，為維護果實品質，荔枝細蛾為農民最主要的防治對象。此蟲俗稱蒂頭蟲，成蟲習慣在果蒂旁產卵，孵出後鑽入果皮取食種仁及果實，受危害果實，於果蒂旁常見黑褐粉狀糞便與荔枝細蛾幼蟲，造成消費者觀感不佳。農民多以頻繁施藥方式予以防治，若防治不力使蟲害發生將造成嚴重落果 (Wen & Liou 2008)，以 50% 芬殺松乳劑與 2.4% 第滅寧水懸劑防治效果較佳 (Wen & Lee 2009)。果農一般 7–10 d 施藥 1 次，若遇大雨有時會再追加施藥。「玉荷包」採收期約於 5 月底開始，但因 5 月常有梅雨來襲，果農為避免蟲害侵擾，有時會在安全採收期內再度施藥，影響消費者食用安全。

依本試驗對照組農藥慣行法之農藥殘留結果，即使於採收前 9 d 施用第滅寧，農藥殘留濃度仍達 0.3 mg L^{-1}，超過國內農藥殘留 0.2 mg L^{-1} 的標準，但符合外銷日本 0.5 mg L^{-1} 標準，顯示採收前使用農藥防治仍有殘留超標之風險。若中果期改用套袋防治，因採收時間離最後 1 次施藥長達 1 mo，多數農藥皆可分解，不只可提升國內市場食用安全，外銷農藥殘留不合格風險亦可降低。於本次試驗中有 3 個套袋處理為農藥零檢出。其他處理亦只有微量殘留。其中，施用陶斯松之處理至採收時已超過 40 d，但仍可於 3 種不同處理中檢測到 0.01 mg L^{-1} (台灣農藥殘留上限 1 mg L^{-1})，雖遠比訂定之殘留標準還低上許多，顯示陶斯松殘留期較長，農友若欲推行「零檢出」安全荔枝，應避免使用陶斯松。未來推動荔枝外銷時，可於生理落果期先使用農藥防治，中果期後再以適當材質進行套袋，應可使消費者與外銷業者安心，並提升台灣水果安全品牌信賴度。

荔枝因結果量不穩定、產期集中、植株較高大與栽培成本較高 (Chang *et al*. 2012; Tseng 2012)，頻繁施藥防治病蟲害易有農藥殘留風險。本試驗對照組使施藥 7 次，套袋處理僅施藥 4 次，有效減少施藥次數。套袋雖會增加人力與紙袋成本，但也減少施藥人力與藥品成本，最重要的是可生產較安全的果品，於本試驗結果顯示套袋荔枝農藥殘留量極低，甚至有部分處理達到零檢出。近年食安問題受到消費者重視，應有一定的消費需求，套袋荔枝生產方式值得果農參考與應用。

引用文獻

Agriculture and Food Agency. 2013. Agricultural Statistics. Agriculture and Food Agency. Nantou, Taiwan. 345 pp. (in Chinese)

Chang, J. W., Y. S. Teng, and H. H. Fang. 2012. The practical cultural model of lychee for adaptation to the climate change. p.39–44. *in*: Proceeding of the Symposium on Litchi-Industry Development in Taiwan. April 17, 2012. Taichung, Taiwan. Taiwan Agric. Res. Inst., Taichung, Taiwan. (in Chinese)

Chen, C. C. 2011. Effects of Bearing Shoot Hoisting and Bagging on Fruit Quality in Mango (*Mangifera indica* L. 'Irwin'). Master Thesis, Department of Horticultural, National Chung Hsin University. Taichung, Taiwan. 64 pp. (in Chinese with English abstract)

Chiang, S. C., D. F. Ke, C. M. Chang, and M. J. Chen. 2004. Comparison in the bunch development and post-harvest quality of banana as affected by Kraft paper cover and polyethylene cover. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 50:245–252. (in Chinese with English abstract)

Cominelli, E., G. Gusmaroli, D. Allegra, M. Galbiati, H. K. Wade, G. I. Jenkins, and C. Tonelli. 2008. Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. J. Plant Physiol. 165:886–894.

Davies, K. M. and K. E. Schwinn. 2010. Molecular biology and biotechnology of flower pigments. p.161–187. *in*: Plant Developmental Biology- Biotechnological Perspectives (Volume 2). (Pua, E. C. and M. R. Davey, eds.) Springer. Berlin. 424 pp.

Giusti, M. M. and R. E. Wrolstad. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. Curr. Protoc. Food Analyt. Chem. F:1.2.1–1.2.13.

Han, X. H., Z. J. Gao, and X. G. Xiao. 2009. Enzymes and genes involved in the betalain biosynthesis in higher plants. Afr. J. Biotechnol. 24:6735–6744.

He, F., L. Mu, G. L. Yan, N. N. Liang, Q. H. Pen, J. Wang, M. J. Reeves, and C. Q. Duan. 2010. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. Molecules 15:9057–9091.

He, F., N. N. Liang, L. Mu, Q. H. Pan, J. Wang, M. J. Reeves, and C. Q. Duan. 2012. Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. Molecules 17:1571–1601.

Huang, P. Y. and K. J. Scott. 1985. Control of rotting and browning of litchi fruit after harvest at ambient temperatures in China. Trop. Agric. 62:2–4.

Javier, R. L., O. F. César, and W. E. Pedro. 1999. Changes in anthocyanin concentration in Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp during maturation. Food Chem. 65:195–200.

Jiang, J. P., M. X. Su, and P. M. Lee. 1986. The production and physiological effects of ethylene during ontogeny and after harvest of litchi fruits. Acta Phytophysiol. Sin. 12:95–103.

Jiang, Y., X. Duan, D. Joyce, Z. Zhang, and J. Li. 2004. Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit. Food Chem. 88:443–446.

Jiang, Y. M. and J. R. Fu. 1998. Effect of postharvest treatment with 6-BA on quality of litchi fruit. Trop. Sci. 36:155–159.

Kevin, P. 2009. Plastid Biology. Cambridge University Press. New York. 212 pp.

Lai, M. H. 2002. Studies on Quality Improvement and Physiological Disorder of 'Keitt' Mango Fruit. Master Thesis, Department of Horticultural, National Taiwan University. Taipei. 72 pp. (in Chinese with English abstract)

Lee, H. S. and L. Wicker. 1991. Anthocyanin pigments in the skin of lychee fruit. J. Food Sci. 56:466–468.

Mitra, S. K. and P. K. Pathak. 2010. Litchi production in the Asia-pacific region. Acta Hortic. 863:29–36.

Nguyen, H., P. Hofman, R. Holmes, L. Bally, B. Stubbings, and R. McConchie. 2004. Effects of nitrogen on the skin colour and other quality attributes of ripe 'Kensington Pride' mango *Mangifera indica* L. fruit. J. Hortic. Sci. Biotech. 79:204–210.

Porra, R. J., W. A. Thompson, and P. E. Kriedelman. 1989. Determination of accurate extraction and simultaneously equation for assaying chlorophyll a and b extracted with different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochem. Biophys. Acta 975:384–394.

Teng, Y. S. and H. H. Fang. 2012. The practical cultural model of lychee for adaptation to the climate change. p.39–44. *in*: Proceeding of the Symposium on Litchi-Industry Development in Taiwan. April 17, 2012. Taichung, Taiwan. Taiwan Agric. Res. Inst., Taichung, Taiwan. (in Chinese)

Tseng, L. C. 2012. Taiwan litchi industry status and counseling measures. p.1–8. *in*: Proceeding of the Symposium on Litchi-Industry Development in Taiwan. April 17, 2012. Taichung, Taiwan. Taiwan Agric. Res. Inst. Taichung, Taiwan. (in Chinese)

Wei, Y. Z., F. C. Hu, G. B. Hu, X. J. Li, X. M. Huang, and H. C. Wang. 2011. Differential expression of anthocyanin biosynthetic genes in relation to anthocyanin accumulation in the pericarp of *Litchi chinensis* Sonn. PLoS One 6:e19455.

Wen, H. C. and C. Y. Lee. 2009. A control for three pests of the Yuh-heh-pau litchi in the fruit stage. Formosan Entomol. 29:95–102. (in Chinese with English abstract)

Wen, H. C. and T. D. Liou. 2008. Insect pests and their injuries on Yuh-heh-bau litchi and effect of fruit bagging in Kao-Ping area of Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 57:133–142. (in Chinese with English abstract)

Xie, R., L. Zheng, S. He, Y. Zheng, S. Yi, and L. Deng. 2011. Anthocyanin biosynthesis in fruit tree crops: Genes and their regulation. Afr. J. Biotechnol. 86:19890–19897.

Yang, C. M., K. W. Chang, M. H. Yin, and H. M. Huang. 1998. Methods for the determination of the chlorophylls and their derivatives. Taiwania 43:116–122.

Zhang, D. L. and P. C. Quantick. 1997. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. Postharvest Biol. Technol. 12:195–202.

Zhang, Z., P. Xuequn, C. Yang, Z. Ji, and Y. Jiang. 2004. Purification and structural analysis of anthocyanins from litchi pericarp. Food Chem. 84:601–604.

Effect of Bagging Materials on Pericarp Coloration and Pesticide Residues of 'Yu-Her-Pao' Litchi (*Litchi chinensis* Sonn) Fruit

Hsin-Hsiu Fang[1], Wen-Li Lee[2], Chi-Cho Huang[1], and Yu-Shen Liang[3,*]

Abstract

Fang, H. H., W. L. Lee, C. C. Huang, and Y. S. Liang. 2016. Effect of bagging materials on pericarp coloration and pesticide residues of 'Yu-Her-Pao' litchi (*Litchi chinensis* Sonn) Fruits. J. Taiwan Agric. Res. 65(2):184–193.

Fruit of 'Yu-Her-Pao' litchi was packed on tree 55 days after fruit setting with different bagging materials to improve the pericarp color and reduce the pesticide residues. The anthocyanin content of pericarp increased in all bagging treatments. The chlorophyll content decreased in fruit packed with yellow and black bags and increased in net bag, half-white bag and white bag. The fruit drop and fruit growth reduced in all bagging treatments. Pesticide applications were stopped after fruit was bagged on tree. The pesticide residues were significantly reduced by bagging treatments. Three kinds of pesticides were detected in control. Two of them were detected with lower levels in fruit packed with net bag and half-white bag. None were detected in other bagging materials including white bag, yellow bag, and black bag. The results of this study indicated that bagging the fruit on tree with suitable bagging materials can increase pericarp anthocyanin content and effectively reduce pesticide application and residues.

Key words: Litchi, Bagging, Pesticide residues, Food safety.

Received: May 4, 2015; Accepted: October 2, 2015.

* Corresponding author, e-mail: justinliang@mail.npust.edu.tw

[1] Assistant Research Fellows, Department of Tropical Fruit Trees, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

[2] Associate Research Fellow and Head, Department of Tropical Fruit Trees, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

[3] Assistant Professor, Department of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(2):194–206 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06502.09

研究報告

由火球花所分離之 *Nerine latent virus* 之血清學及分子生物學鑑定

陳金枝 [1,*] 張清安 [2,*] 江芬蘭 [3]

摘要

陳金枝、張清安、江芬蘭。2016。由火球花所分離之 *Nerine latent virus* 之血清學及分子生物學鑑定。台灣農業研究 65(2):194–206。

由未呈現病徵之火球花 (*Haemanthus multiflorus* Martyn) 植株葉片，經機械接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片後出現局部斑點病徵，以 3 次連續單一斑點分離獲得 1 個分離株 (HM4)。將感染 HM4 之火球花及其接種後之奎藜單斑組織於間接式-酵素連結免疫分析法 (indirect enzyme-linked immunesorbent assay; indirect ELISA) 及西方墨點法中，均可與已知之 *Nerine latent virus* (NeLV) 金花石蒜分離株 (NeLV-LY56) 之抗血清產生正反應。於反轉錄-聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 中應用 NeLV-up/Oligo-d(T)$_{14}$ 引子對，可增幅出 HM4 基因體核酸 3’ 端約 1.5 kbp 之片段，經解序後證實此片段涵蓋 NeLV 之全長度鞘蛋白 (coat protein; CP) 及富含半胱氨酸蛋白 (cysteine-rich protein; CRP) 之轉譯架構 (open reading frame)。將 HM4 及其他 6 個選殖自火球花之 *Carlavirus* 屬病毒分離株核酸序列，與 GenBank 上已登錄之 NeLV (Acc. no. JQ395044) 進行分析比對，結果顯示此等病毒序列於鞘蛋白核苷酸及胺基酸相同度 (identity) 均可達 96–99%，確認 HM4 及其他 6 個選殖序列均為 NeLV。將此 7 個火球花 NeLV 選殖株與來自金花石蒜 (*Lycoris aurea*)、孤挺花 (*Hippeastrum hybridum* Hort.) 及水仙 (*Narcissus* spp.) 之 NeLV 分離株之 CP 序列進行類緣分析 (phylogenetic analyses)，發現此等序列均同屬 NeLV 群組，而火球花分離株則自成 1 個類緣分支。由上述血清學及核酸分子鑑定、類緣分析結果顯示，自火球花上所分離之 HM4 及其他選殖株均為 NeLV 之成員。本試驗亦證實，利用對應 NeLV 金花石蒜分離株之抗血清於 indirect ELISA 及西方墨點法等免疫檢測中，可順利檢測火球花、金花石蒜、孤挺花及水仙等不同寄主受 NeLV 感染之樣品。且其結果與利用 HM4 核酸序列所設計之引子對 (NeLV552u/NeLV552d) 進行 RT-PCR 檢測之結論相符。本研究於 2006–2014 年期間以 indirect ELISA 法調查台灣地區火球花等 4 種石蒜科花卉之 NeLV 感染率 [(檢出數/樣品數) × 100%]，結果分別為火球花 18.4%、金花石蒜 32%、孤挺花 79% 及水仙 13.3%，且印證受 NeLV 單獨感染者均未顯現病徵。經血清學與分子生物學鑑定結果，本研究亦首次證實火球花為 NeLV 之天然寄主。

關鍵詞：火球花病毒病、納麗石蒜潛隱病毒、血清檢測、RT-PCR 檢測、類緣分析。

前言

石蒜科 (*Amaryllidaceae*) 植物種類繁多，高達 90 屬 1,200 種以上，分布全球。包含有水仙屬、孤挺花屬、納麗石蒜屬及石蒜屬等觀賞用種類，台灣也是多種石蒜原生種之分布地。火球花 (*Haemanthus multiflorus* Martyn)，英名 Blood lily，別名紅繡球、血百合或網球花。原產於熱帶非洲，為石蒜科火球花屬 (*Haemanthus* spp.) 之球根花卉，為常見之

投稿日期：2015 年 7 月 29 日；接受日期：2015 年 10 月 5 日。
* 通訊作者：chinzue@tari.gov.tw; cachang@cyut.edu.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] 朝陽科技大學應用化學系教授。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

庭園或盆栽花卉。目前國外對火球花之病毒發生記錄闕如，筆者等於 2005 年起陸續於火球花上診斷鑑定出幾種病毒病害，包括引起黃色輪斑病徵之番椒黃化病毒 (Capsicum chlorosis virus; CaCV) (Chen *et al*. 2009) 及引起黃化葉斑之胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*) (Chen & Chiang 2015)。*Nerine latent virus* (NeLV) 為 *Betaflexiviridae* 科、*Carlavirus* 屬之病毒，病毒顆粒為長絲狀，大小約 660–665 nm。NeLV 首次於納麗石蒜 (*Nerine* spp.) 上被發現與鑑定，1972 年被正式定名，並由 Maat (1978) 確立其病毒特性及血清學之鑑定。此病毒普遍發生於石蒜科 (*Amaryllidaceae*) 之納麗石蒜屬植物 (*Nerine* spp.)，罹病植株通常不顯現病徵 (Maat *et al*. 1978; Derks & Maat 1995)。已記錄之天然寄主尚包括石蒜科的南美水仙 (別名亞馬遜百合，*Eucharis grandiflora*) (Jayasinghe & Dijkstra 1979)、孤挺花 (*Hippeastrum* spp.) (Brolman-Hupkes 1975; Wylie & Jones 2012) 及水仙 (*Narcissus* spp.) (Wylie & Jones 2012) 等。國內之金花石蒜 (*Lycoris aurea*) (Chen *et al*. 2004; Chen *et al*. 2005)、孤挺花及進口水仙上均有鑑定出此病毒之發生 (Chen *et al*. 2005)，且 NeLV 單獨感染此等寄主均引起隱徵型病徵。

Carlavirus 屬之成員均可經由機械傳播方式感染其他寄主 (King *et al*. 2012)，其中 *Potao virus* S (PVS)、*Potato virus* M (PVM) 及 *Potato latent virus* (PoLV) 被報導可經由蚜蟲 (*Myzus persicae*) 以非永續性方式傳播 (MacKinnon 1974; Brattey *et al*. 2002)，本屬病毒目前尚無種子傳播之紀錄 (Hakkaart *et al*. 1975)。而 NeLV 可經由帶毒之無性繁殖體 (如種球或種苗) 傳播，可傳播 NeLV 之蟲媒種類未知 (Derks & Maat 1995)。

NeLV 之核酸序列於 2010 年始發表於美國國家信息中心基因資料庫 (NCBI GenBank)，登錄序號 (accession no.) 包括 HM119498、HM119495、HM119496 及 HM119497。終於促使往後在 NeLV 之鑑定上有明確之依據，並因而據此核酸分子鑑定與分析，得以釐清 1978 年後由不同學者於石蒜科作物上所分離鑑定的 *Carlavirus* 屬病毒之分類地位 (Wylie & Jones 2012)。例如，以往僅由血清學及寄主反應而被歸類於可能與 NeLV 是相同病毒的 Hippeastrum latent virus (HLV) (Maat *et al*. 1978)，透過核酸序列鑑定已確認兩者為完全不同種之病毒 (Wylie & Jones 2012)；另外，2006 年中國大陸學者 (Chen *et al*. 2006) 於水仙上分離而得之 *Carlavirus* 分離株，因當時 NeLV 核酸序列尚未被公開發表而無法比對，乃依據病毒分子核酸序列之獨特性將其鑑定命名為 Narcissus symptomless virus (NSV)，現今與已發表之 NeLV 鞘蛋白核酸序列比對分析後，應歸為 NeLV 的分離株 (Wylie & Jones 2012)。

筆者等人於 2004 年期間，由台灣本土性球根花卉金花石蒜上分離鑑定出 1 種屬於 *Carlavirus* 屬的病毒，與當時 GenBank 上已登錄之病毒核酸序列比對，尚未發現相同類緣病毒，故曾依據其單獨感染之植株未出現病徵之特性，將其命名為 Lycoris virus T (簡稱 LVT) (Chen *et al*. 2004)。LVT 分離株 -LY56 (GenBank Acc. no. JX880023) (Chen *et al*. 2004)，經與 GenBank 上之 NeLV 鞘蛋白序列比對後，亦證實為 NeLV 分離株之一。金花石蒜 NeLV 分離株之病毒顆粒長度約 617 nm，鞘蛋白分子量估算約 32.7 kDa。本實驗室已製備完成對應 LY56 分離株純化病毒顆粒之多元抗體，並確認可應用於病毒之免疫檢測與鑑定 (Chen *et al*. 2004; Chen *et al*. 2005)。此外，NeLV 可機械接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片形成單斑，此特性亦可作為無病徵表現者受 NeLV 感染之鑑定依據。

本研究由無病徵之火球花葉片上分離出 1 種屬於 *Calavirus* 屬之絲狀病毒，並發現與金花石蒜 NeLV-LY56 分離株之抗血清 (Chen *et al*. 2004; Chen *et al*. 2005) 可產生正反應。後續將此分離自火球花的病毒之鞘蛋白基因加以選殖、解序並分析比對後，證實其即為 NeLV 之分離株。本研究並且確認此病毒可以藉由 indirect ELISA 及所開發之專一性引子對於 RT-PCR 下進行例行檢測及鑑定。田間調查發現 NeLV 已普遍發生於金花石蒜、孤挺花、水仙及火球花等石蒜科花卉。

材料與方法

病毒來源、接種及保存

本研究於 2006 年，採集位於霧峰之行政院農委會農業試驗所附近庭園種植之火球花植株葉片進行病毒之分離與鑑定，選取與金花石蒜 NeLV-LY56 病毒分離株抗血清有正反應之葉片，進行後續試驗。接種試驗方面，將葉片組織 1 g 以 10 mL 之 0.05 M (pH 7.5) 磷酸鉀緩衝液 (potassium phosphate buffer) 研磨成粗汁液，以機械接種法接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片，約 10 d 後產生黃化局部病斑；進行連續 3 次單斑分離接種後，獲得一分離株 (代號 HM4)，做為本研究各項試驗用之代表性分離株。2006–2014 年期間陸續於火球花、金花石蒜、孤挺花及水仙植株採集原寄主之罹病組織進行試驗，並將所得之罹病組織切成約 1 cm 正方形小組織塊，浸漬於 50% (v/v) glycerol 溶液中並保存於 -20℃下，做為長期保存材料。

抗血清免疫檢測分析

酵素連結免疫吸附反應 (enzyme-linked immunesorbent assay; ELISA)：本研究採用 indirect ELISA 法進行 NeLV 於火球花及其他石蒜科花卉包括金花石蒜、孤挺花及水仙之鑑定及檢測調查，以釐清 NeLV 於此等花卉上之發生概況。

Indirect ELISA 法乃參照以往研究報告進行 (Chang *et al*. 1988; Chen *et al*. 2013)。其反應步驟如下：(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_2HPO_4, pH 7.4, 0.05% Tween 20) 沖洗 3 次；(2) 與受測病毒之抗體反應：以 NeLV-LY56 抗體的免疫球蛋白 (IgG) 之 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；(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 30–40 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。樣品吸光值大於健康葉片吸光值 2 倍者，判讀為檢出病毒之正反應。

西方墨點法 (western blotting test)：本研究採用西方墨點法進行 NeLV 於火球花罹病組織及其奎藜單斑之血清學鑑定，另針對金花石蒜、孤挺花及水仙之罹病組織亦以相同方式進行檢測，以確認 NeLV 之發生。

試驗步驟如下：取 0.1 g 罹病葉組織，以適量液態氮磨碎後，加入 200 μL 之樣品處理液 (240 mM Tris-HCl, pH 6.8; 10% glycerol, 2% SDS, 4% β-mercaptoethanol) 混合均勻，取 100 μL 研磨液加入等體積之 LDS 溶液 (250 mM Tris-HCl，含 2% (w/v) SDS，4% (w/v) 2-mercaptoethanol 及 10 % (w/v) sucrose (Laemmli 1970) 混勻後，以沸水悶 3 min，放置涼後可於 -20℃冷凍保存。處理後之樣品經 SDS-PAGE 電泳後，取膠體將其轉漬於 PVDF 膜 (Millipore Co., MA, USA)，之後與 NeLV-LY56 病毒抗體進行血清反應。將 PVDF 膜依反應步驟依次移入稀釋 1,000× 之 NeLV-LY56 IgG 的抗體溶液 (l mg mL^{-1})、稀釋 6,000× 之 AP-conjugate 山羊抗兔免疫球蛋白中，各於室溫下反應 1 h，每步驟間均以 1× TBST 浸泡洗 2 次 (每次 10 min)。最終加入 BCIP/NBT 呈色液 (Alkaline phosphatase substrate kit, Bio-Rad, Hercules, CA) (Blake *et al*. 1984) 反應之，依據藍黑色反應條帶做為判斷之依據。

病毒鞘蛋白核酸序列之選殖與定序分析

反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)：本試驗選用與 NeLV-LY56 抗體產生

正反應之火球花罹病組織，進行對應病毒鞘蛋白核酸序列之片段增幅以供選殖與定序。進行步驟如下：(1) 罹病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) 之指示，進行供試植物全量核醣核酸 (RNA) 之萃取；(2) RT-PCR 增幅核酸片段，以植物全量 RNA 為模版，利用引子對 NeLVup (5'-ACCCTTCTACT-TAATCGTGTCTTTG-3') 和 Oligo-d(T)$_{14}$，進行 RT-PCR 反應，預估可獲得病毒 3' 端核酸片段大小約 1.5 kbp 之增幅產物。RT-PCR 乃以商業化單步驟 RT-PCR 試劑組 (Faith Technology Co. Ltd., Taichung, Taiwan) 進行反應，反應管混合以 2 μL RNA、5 μL 之 5× RT reaction buffer、0.5 μL 之 RT enzyme mix、15.5 μL 之 nuclease free water 及 各 1 μL 之 10 μM 引子對，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 1 min，50℃下煉合 50 s，72℃下聚合 2 min 為 1 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。

鞘蛋白核酸片段選殖和核苷酸序列分析：將 RT-PCR 增幅所得之 1.5 kbp DNA 片段選殖於 pGEM®-T Easy 載體上 (Promega, Madison, WI, USA)，再轉型於 *E. coli* DH5α 宿主中，並進行其質體 DNA 之純化，利用 *Eco*RI 限制酵素切割法篩選出含有預估嵌入片段之選殖株，送交核酸定序公司 (明欣生物科技有限公司，台灣台北市)，以自動核酸定序儀分析其核苷酸序列，所得之序列以 Vector NTI Suite (InforMax, Inc., Bethesda, MD, USA) 軟體進行分析比對，並與 GenBank 上已登錄之 NeLV 病毒核酸序列進行鞘蛋白基因序列之比對。本試驗除火球花 HM4 分離株外，另針對其他來自 6 個火球花 Carlavirus 罹病組織之病毒分離株 (HM15、HM94W6、HM03w1、HM03w2、HM03T2、HM03T5) 進行其 3' 端大小約 1.5 kbp 核酸片段之選殖與定序分析。

感染火球花 NeLV 分離株與其他石蒜科病毒分離株之類緣關係比對：本試驗乃選取研究室取自火球花 (HM4、HM15、HM94W6、HM03w1、HM03w2、HM03T2、HM03T5)、金花石蒜 (LY56、LYL39、LY7、LY9)、孤挺花 (ALGC6、ALWF36、ALHL14)，及水仙 (Nar86、Nar87) 等 NeLV 分離株，及 GenBank 上已登錄之 NeLV 序列進行比對。另以同為 *Carlavirus* 屬之孤挺花潛隱病毒 (*Hipeastrum latent virus*; HLV) 及 *Narcissus common latent virus* (NCLV) 作為對照分析之外集團 (outgroup)。針對對應 CP 區域之胺基酸序列進行類緣演化分析 (phylogenetic analysis)，分析方法依據 Tomimura *et al*. (2003) 所發表的方法進行。所有序列先以 CLUSTAL X version 1.8 (Thompson *et al*. 1997) 彙整分析後，再利用 PAUP 4.0 程式 (Swofford 1998) 進行 NJ (neighbor-joining) 結合 BRM 法 (bootstrap resampling method) (Felsenstein 1985; Thompson *et al*. 1997) 作分析。其中 bootstrap values 乃由逢機重複 1,000 次取樣所計算之結果，所得之類緣演化樹以 TreeView 程式顯示 (Page 1996)。

NeLV 核酸引子對之專一性檢測：以 HM4 等不同火球花分離株之核酸序列為模板，設計一組引子對 NeLV552u/NeLV552d (5'-ACGTCCT-GCATTGAAGCCTAT-3'/5'-AGTTGCCTATG TGTGGCGTTA-3') 以進行 RT-PCR 檢測。檢測對象包括火球花、金花石蒜、孤挺花和水仙之罹病組織，以及火球花、金花石蒜、孤挺花接種奎藜後之單斑。RT-PCR 方法設定反應程序如上所述，預估可增幅出大小約 552 bp 之核酸片段。反應結果以 1.2% 電泳瓊膠進行分析。

結果

接種試驗及免疫檢測

與 NeLV-LY56 抗體產生正反應之無明顯病徵之火球花葉片，將其機械接種於奎藜 (*C. quinoa*) 葉片，約 10 d 左右於葉片上形成局部

斑點。試驗中發現與 NeLV-LY56 抗體有反應之火球花樣品，當接種於奎藜葉片時均可產生局部斑點反應，此在無病徵表現而與 NeLV-LY56 抗體有反應之金花石蒜及孤挺花之樣品上亦獲得相同結果，原始罹病組織與奎藜單斑均於 indirect ELISA 中產生正反應讀值 (結果未出示)。

以西方墨點法進行檢測之結果顯示，火球花罹病葉片及其奎藜單斑均可於分子量約 32.7 kDa 處呈現與 NeLV-LY56 抗體產生正反應之蛋白條帶 (圖 1)，此與其他石蒜科花卉包括金花石蒜、孤挺花及水仙等分離株之反應結果相仿。然而奎藜樣品大約於 32.7 kDa 處呈現較明顯且均一之蛋白質反應條帶，而原始寄主罹病組織之 32.7 kDa 蛋白條帶濃度則較低，且尚有其他分子量略低之蛋白條帶存在 (圖 1)，推測乃因主蛋白條帶遭受裂解所造成之現象。本試驗中，火球花等石蒜科花卉樣品均與 NeLV-LY56 抗體產生正反應，也呼應於 indirect ELISA 中產生之正反應，顯示此等感染不同石蒜科花卉之 NeLV 分離株之間的血清類緣關係密切。

火球花分離株之鞘蛋白核酸序列分析

將火球花 HM4 分離株，以 NeLVup/Oligo-d(T)$_{14}$ 引子對進行其 3’ 端核酸片段之 RT-PCR 增幅反應後，於電泳分析中可獲得一預估值約 1.5 kbp 之核酸片段 (結果未出示)，經選殖與定序結果顯示其乃包含 1,560 個核苷酸 (不包括 3’ 端之 poly A)。HM4 此片段與 GenBank 上已登錄之水仙分離株 NeLV-Marijiniup 5 (Acc. No. JQ395044) 之核苷酸及胺基酸相同度均高達 97% 以上 (表 1)。其中，對應 HM4 全長度鞘蛋白之轉譯架構 (open reading frame of coat protein, CP ORF) 有 891 個核苷酸，預估可轉譯出 297 個胺基酸；對應「富含半胱氨酸蛋白」(cysteine-rich protein; CRP) 者有 405 個核苷酸，預估可轉譯出 135 個胺基酸。由上述 3’ 端 1,560 個核苷酸序列比對結果，顯示 HM4 與 NeLV 乃 *Carlavirus* 屬同種之病毒。所獲之 HM4 核酸序列已登錄於 GenBank 資料庫，序號為 KC505177。

進一步將與 NeLV-LY56 抗體產生正反應之不同寄主來源之病毒分離株，包括分離自火球花、金花石蒜、孤挺花及水仙者，選殖其 3’ 端約 1.5 kbp 大小之核酸片段定序，並分析對

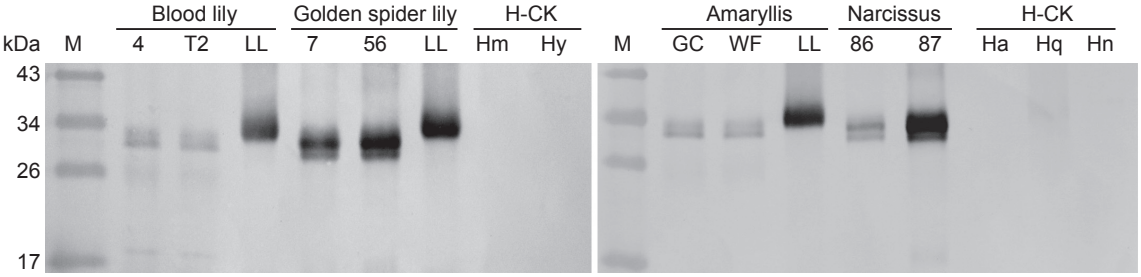


圖 1. 以西方墨點法及 *Nerine latent virus* (NeLV)-LY56 抗體檢測火球花及其他石蒜科花卉上之病毒發生。行 M：蛋白質分子量標幟；分別檢測火球花 (blood lily，行 4 及 T2，分別為 HM4 及 HM03T2)、金花石蒜 (golden spider lily，行 7 及 56，分別為 LY7 及 LY56)、孤挺花 (amaryllis，行 GC 及 WF，分別為 ALGC6 及 ALWF36)；行 LL，HM4、LY56 及 ALWF36 之奎藜單斑組織、水仙罹病組織 (narcissus，行 86 及 87，分別為 Nar86 及 Nar87)；健康組織 (H-CK) 包括火球花 (行 Hm)、金花石蒜 (Hy)、孤挺花 (Ha)、奎藜 (Hq) 及水仙 (Hn)。

Fig. 1. Western blotting for the detection of *Nerine latent virus* (NeLV)-infected tissues of *Amaryllidaceae* ornamental hosts, including blood lily, golden spider lily, amaryllis and narcissus, using the antiserum against NeLV-LY56. Lane M: protein marker; lanes 4 & T2, HM4 and HM03T2 isolates of diseased bloody lily; lanes 7 & 56, LY7 and LY56 isolates of diseased golden spider lily; lanes GC & WF, ALGC6 and ALWF36 isolates of diseased amaryllis; lanes 86 & 87, Nar86 and Nar87 isolates of diseased narcissus; lane LL, local lesions on *Chenopodium quinoa* generated by respective diseased host tissues of HM4, LY56, and ALWF36, respectively. Lanes Hm, Hy, Ha, Hq, and Hn, healthy control (H-CK) of blood lily, golden spider lily, amaryllis, *C. quinoa*, and narcissus, respectively.

應 CP 及 CRP 之核酸序列。證實其 CP 之核苷酸及胺基酸序列均與 NeLV (JQ395044) 達到 96–99% 之相同度 (表 1)，而與 CRP 核苷酸及胺基酸序列均達 97–100% 之相同度 (結果未出示)。此等不同分離株其 CP 序列之 GenBank 登錄序號，詳見表 1。

NeLV 分離株之類緣關係分析

分析比對本研究由火球花等 4 種石蒜科花卉所獲得之 NeLV 分離株之 CP 胺基酸序列顯示，所有火球花分離株之 CP 於 N 端起第 6 個胺基酸為 Asparagine (N)，異於其他分離株之 Lysine (K)，具有其獨特性 (圖 2)；此外所

表 1. 火球花 *Nerine latent virus* (NeLV) 分離株與其他已知 NeLV 病毒之核酸與胺基酸序列相同度比較。

Table 1. Comparison of the identities of nucleotide and amino acid sequences of the coat protein (CP) of *Nerine latent virus* (NeLV) isolated from blood lily with those of other known NeLV isolates available in GenBank.

		% identity of CP[z]	
Isolate[y]	Acc. no.	nt	aa
Marijiniup 5	JQ395044	100.0	100.0
HM4	KC505177	97.0	98.7
HM15	KC505178	96.4	98.3
HM94W6	KM396456	96.5	98.3
HM03W1	KM396457	96.7	98.7
HM03W2	KM396458	96.9	99.0
HM03T2	KM396459	97.0	99.0
HM03T5	KM396460	96.7	99.0
LY56	JX880023	98.5	99.3
LY39	JX913805	98.3	99.3
LY7	JX901048	98.3	99.3
LY9	JX978442	97.5	98.7
ALGC6	JX848395	97.9	98.0
ALWF36	JX848394	96.9	99.3
ALHL14	JX880024	97.1	98.0
Nar86	JX524884	98.9	99.0
Nar87	JX524885	98.9	99.0
Marijiniup 4	JQ395043	77.9	77.9
Hangzhou-2005	AM182569	98.2	99.3
IVT80054	HM119498	99.2	100.0
Ext07	HM119497	97.5	97.6
191191	HM119495	98.0	97.3
281299	HM119496	99.1	99.7
HLV	DQ098905	49.3	38.9
HLV	NC_011540	49.3	38.9
NCLV	AJ311375	52.1	38.3

[z] Percent identities (%) of the respective nucleotide (nt) and amino acid (aa) sequences were analyzed by the Vector NTI Suite (InforMax, Inc., Bethesda, MD). All of the nucleotides (nts) of NeLVs coding for coat protein and cycteine-rich protein are 891 and 405 nts, respectively.

[y] The sequences of NeLV: Marijiniup 5 isolate was used for leader comparison. Isolates collected from blood lily were HM4, HM15, HM94W6, HM03W1, HM03W2, HM03T2, and HM03T5; from Golden spider lily were LY56, LY39, LY7, and LY9; from amaryllis were ALGC6, ALWF36, and ALHL14; from narcissus were Nar86 and Nar87 in this study. Two *Carlavirus* isolates of Hippeastrum latent virus (HLV) and one *Narcissus common latent virus* (NCLV) available in GenBank were used for comparison.

有的火球花分離株之第 13 個胺基酸均為 Asparagine (N)，此與其他分離株大多為 Serine (S) 也有所差異。唯一例外，是 2 個金花石蒜分離株 (LY39 & LY56) 及 1 個孤挺花分離株 (ALGC6)，在此位置下與火球花分離株同為有相同之 Asparagine (圖 2)，顯示 LY39、LY56 及 ALGC63 者與火球花分離株有較相近的類緣 (圖 3)。

此外，將分離自各種不同石蒜花卉之 NeLV 分離株，與可感染石蒜科並同為 *Carlavirus* 屬之 HLV 及 NCLV 為外群 (outgroups) 代表，進行類緣演化分析。其樹狀分析圖結果顯示，不同來源之 NeLV 分離株與 HLV 或 NCLV 呈現不同的分類群組；而群組相近之 NeLV 分離株中，火球花分離株自成一親近群組 (圖 3)；而孤挺花台灣分離株 (ALGC6、ALWF36 及 ALHL14) 則分布於較相近之群組裡，但與國外之兩個孤挺花分離株 (191191 及 Marijiniup 4) 卻分布於不同之群組裡 (圖 3)。金花石蒜或水仙之分離株，其類緣分布較為分散 (圖 3)。

不同石蒜科花卉 NeLV 之 RT-PCR 核酸檢測：以本研究針對 NeLV 之 CP 序列所設計之專一性引子對 (NeLV552u/NeLV552d) 進行火球花、金花石蒜、孤挺花及水仙之 NeLV 罹病組織或其奎藜單斑之 RT-PCR 檢測，於電泳分析結果顯示所有受測之罹病樣品均可被增幅出大小約 552 bp 之預估核酸片段 (圖 4)。

火球花等不同石蒜科花卉寄主發生 NeLV 之調查

2006–2014 年期間，本研究利用 NeLV-



圖 2. 不同 *Nerine latent virus* (NeLV) 分離株及兩種 carlaviruses 鞘蛋白之胺基酸序列比對圖。

Fig. 2. Alignment of the amino acid sequences of different *Nerine latent virus* (NeLV) isolates and two other carlaviruses. Fifty-seven amino acids (aas) in the N-terminal region of coat proteins of 23 NeLV isolates were compared. Isolates collected from blood lily were HM4, HM03W2, HM03T5, HM03T2, HM03W1, HM15, and HM94W6; from golden spider lily were LY39, LY56, LY9, and LY7; from amaryllis were ALGC6, ALWF36, and ALHL14; from narcissus were Nar86 and Nar87 in this study. The 6th and 13th aas of blood lily isolates were both Asparagines (N). Two isolates of Hippeastrum latent virus (*) and one *Narcissus common latent virus* (**) available in GenBank were used for comparison.

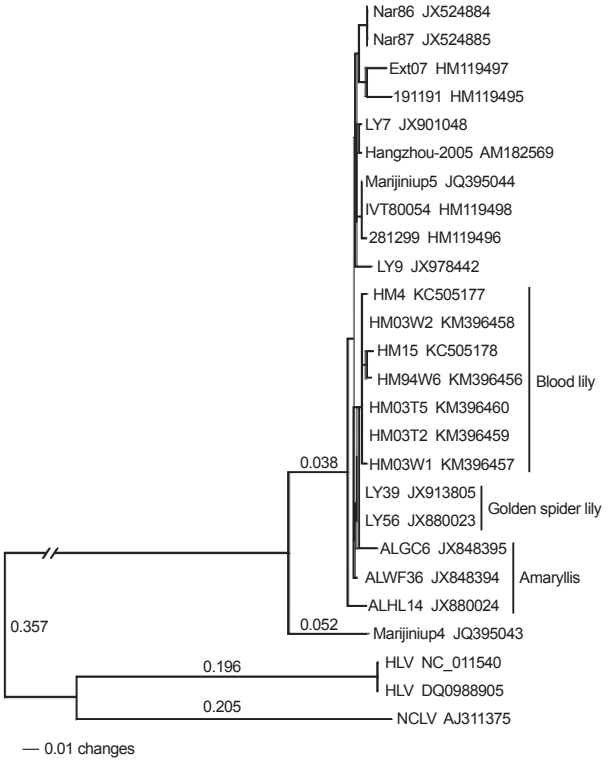


圖 3. 不同 *Nerine latent virus* (NeLV) 分離株及兩種 carlaviruses 之類緣分析。

Fig. 3. A phylogram derived from the analysis of genetic distances based on the amino acid sequences of the coat proteins of 23 isolates of *Nerine latent virus* (NeLV) and two carlavirus isolates. The tree was constructed using the neighbour-joining (NJ) algorithm with the bootstrap resampling method (1,000 random resamplings), using PAUP 4.0. Numbers at each node indicate the percentages of bootstrap samples. Horizontal branch length is drawn according to the scale bar indicating 5 substitutions per 1000 amino acid positions. Isolates collected from blood lily were HM4, HM15, HM94W6, HM03W1, HM03W2, HM03T2, and HM03T5; from golden spider lily were LY56, LY39, LY7, and LY9; from amaryllis were ALGC6, ALWF36, and ALHL14; from narcissus were Nar86 and Nar87 in this study. Sequences of Hippeastrum latent virus (HLV) and *Narcissus common latent virus* (NCLV) isolates were from GenBank and used as outgroup elements.

LY56 抗體以 indirect ELISA 法進行田間石蒜科花卉之 NeLV 發生調查。結果如表 1 所示，火球花、金花石蒜、孤挺花及水仙之檢出率 [(檢出數/樣品數) × 100%] 分別為 18.4、32、79 及 13.3% (表 2)，顯見 NeLV 已普遍發生於多種石蒜科花卉中。

討論

本研究乃以血清學及核酸分子鑑定之結果，首次證明 NeLV 感染火球花。應用以往本研究室由金花石蒜所分離之 NeLV 分離株 (LY56, Acc. no. JX880023) 之抗血清 (Chen *et al*. 2005)，證實可以於 indirect ELISA 及西方墨點法中，與火球花分離株 (HM4) 及其所接種繁殖之奎藜葉片局部斑點組織發生專一性反應。另外，進一步經由選殖與定序 HM4 分離株基因體核酸 3’ 端約 1.5 kbp 大小之片段，發現與已知 NeLV 在鞘蛋白核苷酸及胺基酸序列上有高達 97% 以上之相同度，顯見火球花 HM4 分離株乃屬 NeLV 之系統。本研究中，無病徵顯現之火球花葉片經機械接種於奎藜上可形成局部斑點病徵，但其單斑組織回接火球花時並未成功，其回接之方法尚待確認。然而由上述之相關鑑定結果，顯示 NeLV 確實存在於火球花上，此乃證明火球花為 NeLV 天然寄

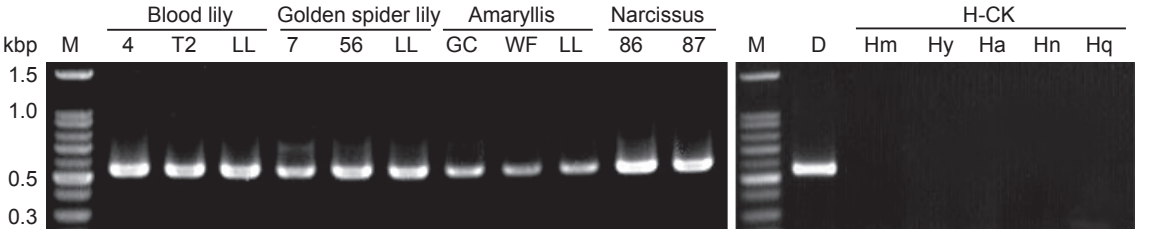


圖 4. 利用 NeLV552u/NeLV552d 引子對於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應中檢測火球花及其他石蒜科花卉之 *Nerine latent virus*。行 M：核酸分子量標幟；分別檢測火球花 (blood lily，行 4 及 T2，分別為 HM4 及 HM03T2)、金花石蒜 (golden spider lily，行 7 及 56，分別為 LY7 及 LY56)、孤挺花 (amaryllis，行 GC 及 WF，分別為 ALGC6 及 ALWF36)；行 LL，HM4、LY56 及 ALWF36 之奎藜單斑組織；水仙罹病組織 (narcissus，行 86 及 87，分別為 Nar86 及 Nar87)；健康組織 (H-CK) 包括火球花 (行 Hm)、金花石蒜 (行 Hy)、孤挺花 (行 Ha)、水仙 (行 Hn) 及奎藜 (行 Hq)；行 D，罹病火球花組織對照。預估增幅出之核酸片段為 552 bp。

Fig. 4. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of *Nerine latent virus* (NeLV)-infected tissues of *Amaryllidaceae* ornamental hosts including blood lily, golden spider lily, amaryllis and narcissus. Lane M: molecular marker; lanes 4 & T2, HM4 and HM03T2 isolates of diseased bloody lily; lanes 7 & 56, LY7 and LY56 isolates of diseased lycoris; lanes GC & WF, ALGC6 and ALWF36 isolates of diseased amaryllis; lanes 86 & 87, Nar86 and Nar87 isolates of diseased narcissus; lane LL, local lesions on *Chenopodium quinoa* generated by respective diseased host tissues of HM4, LY56, and ALWF36. Lanes Hm, Hy, Ha, Hn, and Hq, healthy control (H-CK) of blood lily, golden spider lily, amaryllis, narcissus and *C. quinoa*, respectively; lane D, diseased tissues of bloody lily. The predicted sizes of DNA fragments amplified from NeLV-infected tissue were 552 bp by NeLV552u/NeLV552d primer pair.

表 2. 以 indirect ELISA 檢測 *Nerine latent virus* 於火球花及不同石蒜科花卉之發生。

Table 2. Survey of the occurrences of *Nerine latent virus* on blood lily and other *Amaryllidaceae* ornamental hosts detected by indirect ELISA[z].

Host	Detection rate (%)[y]	No. samples	No. positive detected samples[x]
Blood lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn)	18.4	49	9
Golden spider lily (*Lycoris aurea* Herb.)	32.0	106	34
Amaryllis (*Hippeastrum hybridum* Hort.)	79.0	115	91
Narcissus (*Narcissus* spp.)	13.3	45	6

[z] Indirect ELISA was conducted using the antiserum against *Nerine latent virus* (NeLV)-LY56. Immunoglobulins of the tested antisera were diluted 1/1000 to react with antigens in a dilution of 1/30. The absorbance readings (A_{405nm}) were taken 40 min after addition of enzyme substrate solution. The absorbance values are an average of two replicate wells.
[y] Detection rate (%) was determined by [(No. positive detected samples/No. total samples) × 100%].
[x] Positive detected samples were determined by those ELISA reactivities higher than two times of the healthy control (A_{405nm}).

主之首次紀錄。筆者以往報告有關火球花之病毒病害尚包括有兩種可引起黃斑型病徵之病毒，CaCV (Chen *et al*. 2009) 及 CMV (Chen & Chiang 2015)，歷年之結果使得火球花之病毒病害發生種類更臻明確。

孤挺花 (Derks 1995) 及水仙 (Brunt 1995) 為文獻上已有報導之 NeLV 寄主，金花石蒜可被 NeLV 感染則為筆者等人以往所鑑定 (Chen *et al*. 2004; Chen *et al*. 2005)。本研究中亦透過血清及分子生物學之鑑定，證實孤挺花及水仙上亦可分離到 NeLV 之感染 (表 1、圖 1、圖 4)。加上 2006–2014 年期間所進行之田間不同石蒜科花卉之 NeLV 調查 (表 2)，更進一步印證以往學者報導 NeLV 於石蒜科花卉上已

普遍存在 (Derks & Maat 1995; Wylie & Jones 2012)，且於紀錄上單獨受此病毒感染之寄主並不出現病徵，本研究於火球花上也有相同之發現。

Nerine latent virus 為 *Carlavirus* 屬成員，*Carlavirus* 屬之鞘蛋白分子量範圍為 31–36 kDa (Tiberini *et al*. 2011)。本研究之火球花病毒分離株，依據其鞘蛋白胺基酸序列 (297 aa) 所估算之分子量約為 32.7 kDa，此與西方轉漬法於奎藜樣品所檢測到之蛋白條帶分子量相符，然而其原始寄主罹病組織所反應之蛋白主條帶分子量則略低於 32.7 kDa，且電泳分析中尚有其他分子量更低之蛋白條帶呈現。此種現象於金花石蒜及孤挺花樣品中也有類似之趨勢 (圖 1)，推測此可能與系統性感染組織中之病毒鞘蛋白遭到裂解有關 (Larsen *et al*. 1996)，且罹病組織在冷凍保存過程中會加速蛋白之裂解作用 (Hiebert & McDonald 1973)。反之，NeLV 之鞘蛋白可能於奎藜單斑組織上較為穩定，或推論其組織中有抑制蛋白裂解之成分存在，才會導致此種分子量差異但血清反應一致之結果。此種鞘蛋白裂解現象在過去文獻中其他 *Carlavirus* 屬病毒包括 *Kalanchoe latent virus* (Hearon 1984; Dinesen *et al*. 2009) 及 *Red clover vein mosaic virus* (Larsen *et al*. 1996) 及 *Potyvirus* 屬病毒如 *Turnip mosaic vrius* (TuMV) (Hiebert & McDonald 1973) 均有相同之描述。筆者等人在具感染力之 TuMV 載體系統 (infectious TuMV vector) 研究中，亦曾發現 TuMV 及其所攜帶之外源螢光蛋白 (GFP) 在奎藜單斑上較為穩定，而在系統性寄主上則較易被裂解之情形 (Chen *et al*. 2007)。

在分子層次上，依據 ICTV (The International Committee on Taxonomy of Viruses) 最新的分類標準，*Carlavirus* 屬病毒若其鞘蛋白之核苷酸及胺基酸序列相同度分別低於 72% 及 80% 時，則視為不同之種類 (species) (King *et al*. 2012)。本研究由火球花上所分離之 7 個分離株，均與已知 NeLV (JQ395044) 於鞘蛋白胺基酸序列上有高於 98% 之相同度，因此分類上視為同種病毒應無疑義。此外，由台灣學者於 2005 年登錄在 GenBank 上之孤挺花潛隱病毒 (Hippeastrum latent virus; HLV) (Accession no. DQ098905 及 NC_011540) 原被 ICTV 歸類為 NeLV 之系統 (King *et al*. 2012)，然而本研究比對發現 HLV 與 NeLV 間於鞘蛋白基因之核苷酸與胺基酸序列分別只有 49.3% 及 38.9% 之相同度 (表 1)，故二者顯然應視為同屬 *Carlavirus* 之不同種病毒，而非同種病毒之不同系統。Wylie & Jones (2012) 由其研究之不同 *Carlavirus* 核酸序列分子比對結果，亦表示 HLV 與 NeLV 應屬不同種 *Carlavirus* 病毒。因此有關 HLV 分類地位之釐清，應請 ICTV 重新予以認定。

在類緣分析上，由 CP 胺基酸序列比對 (alignment) 結果顯示，火球花 NeLV 病毒分離株於 CP 之 N 端第 6 個胺基酸具有其獨特性為 Asparagine (N)，乃異於其他 NeLV 分離株者；於第 13 個胺基酸，亦均為 Asparagine (N)，與其他分離株大多為 Serine (S) 有所差異，此等現象顯示出火球花分離株之獨特性，推論與其自成一類緣群組有關，未來需有更多火球花分離株之分析，可更印證此獨特性。目前所採集之火球花分離株自成 1 個類緣分群；而孤挺花台灣分離株 (ALGC6、ALWF36 及 ALHL14) 分布於較相近之群組裡，與國外之兩個孤挺花分離株 (191191 & Marijiniup 4) 為不同之分群裡 (圖 3)；金花石蒜之分離株，其類緣分布較為分散。目前有關 NeLV 不同分離株之核酸序列逐漸被報導與發表，未來需要更多不同來源分離株之加入，以更釐清 NeLV 之類緣演化關係，包括不同寄主來源、地區及國家等因素之影響。

火球花目前常做為庭園花卉，可宿根栽植，有少量種球自國外進口。本研究針對火球花等不同石蒜花卉進行 NeLV 發生調查，其中迄至 2014 年於火球花之調查發現，此病毒於 2006 年首次被發現起持續發生於火球花上，而植株受單獨感染者均不顯現病徵，須經由檢測後方能確知。不同寄主來源之 NeLV 分離株，近年來已因核酸定序結果之釐清，並登錄於 GenBank 上可供比對而使得 NeLV 之核酸分子鑑定方式更加明確而有依據。

受 NeLV 單獨感染之石蒜花卉植株無病徵

表現，本研究另發現經由 indirect ELISA 未檢出此病毒反應之孤挺花樣品，於 RT-PCR 檢測中可檢出 NeLV 之核酸片段 (結果未出示)，顯示 RT-PCR 檢測可提升對 NeLV 之檢出效果，本研究所開發之 RT-PCR 核酸檢測用引子對並已實際應用於進口火球花、金花石蒜、孤挺花或水仙種球之 NeLV 病毒檢定監測，以使進口種球之病毒檢測更臻完整，確保種球之健康。未來在此等石蒜科花卉種球之繁殖系統上，可實務地應用於無 NeLV 健康種苗生產之需。

引用文獻

Blake, M. S., K. H. Johnston, G. I. Russell-Jones, and E. C. Gotschlich. 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. Anal. Biochem. 136:175–179.

Brattey, C., J. L. Badge, R. Burns, G. D. Foster, and E. George. 2002. Potato latent virus: A proposed new species in the genus *Carlavirus*. Plant Pathol. 51:495–505.

Brolman-Hupkes, J. E. 1975. Tentative description of Hippeastrum latent virus in *Hippeastrum* hybridum plants and differentiation from *Hippeastrum mosaic virus*. Neth. J. Plant Pathol. 81:226–236.

Brunt, A. A. 1995. Narcissus viruses. p.322–334. *in*: Virus and Virus-Like Diseases of Bulb and Flower Crops. (Loebenstein, G., R. H. Lawson, and A. A. Brunt, eds.) Wiley. Chichester, UK. 556 pp.

Chang, C. A., D. E. Purcifull, and E. Hiebert. 1988. Characterization and immunological analysis of nuclear inclusions induced by bean yellow mosaic and clover yellow vein potyviruses. Phytopathology 78:1266–1275.

Chen, C. C., C. H. Huang, Y. H. Cheng, T. C. Chen, S. D. Yeh, and C. A. Chang. 2009. First report of *Capsicum chlorosis virus* infecting amaryllis and blood lily in Taiwan. Plant Dis. 93:1346–1346.

Chen, C. C. and F. L. Chiang. 2015. Identification and detection of *Cucumber mosaic virus* isolated from blood lily (*Haemanthus multiflorus*). J. Taiwan Agric. Res. 64:74–79. (in Chinese with English abstract)

Chen, C. C., F. L. Chiang, Y. H. Cheng, Y. M. Chang, Y. Y. Lin, and C. A. Chang. 2005. *Lycoris virus* T, a carlavirus newly identified in golden spider lily also found widespread in narcissus and amaryllis. Plant Pathol. Bull. 14:300.

Chen, C. C., T. C. Chen, J. A. J. Raja, C. A. Chang, L. W. Chen, S. S. Lin, and S. D. Yeh. 2007. Effectiveness and stability of heterologous proteins expressed in plants by *Turnip mosaic virus* vector at five different insertion sites. Virus Res. 130:210–227.

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 to detect the *Plantago asiatica mosaic virus* in lily. J. Taiwan Agric. Res. 62:268–279. (in Chinese with English abstract)

Chen, C. C., Y. Y. Lin, F. L. Chiang, and C. A. Chang. 2004. Serological and molecular characterization of a distinct carlavirus infecting golden spider lily. Plant Pathol. Bull. 3:354. (in Chinese with English abstract)

Chen, J., Y. H. Shi, Y. W. Lu, M. J. Adams, and J. P. Chen. 2006. Narcissus symptomless virus: A new carlavirus of daffodils. Arch. Virol. 151:2261–2267.

Derks, A. F. L. M. 1995. Hippeastrum viruses. p.293–297. *in*: Virus and Virus-Like Diseases of Bulb and Flower Crops. (Loebenstein, G., R. H. Lawson, and A. A. Brunt, eds.) Wiley. Chichester, UK. 556 pp.

Derks, A. F. L. M. and D. Z. Maat.1995. Nerine. p.335–340. *in*: Virus and Virus-Like Diseases of Bulb and Flower Crops. (Loebenstein, G., R. H. Lawson, and A. A. Brunt, eds.) Wiley. Chichester, UK. 556 pp.

Dinesen, M., M. Lundmark, and M. Albrechtsen. 2009. Complete genome sequences of two isolates of *Kalanchoe latent virus*. Arch. Virol. 154:1173–1175.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limita on phyloenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783–791.

Hakkaart, F. A., D. Z. Maat, and F. Quak. 1975. Viruses and meristem culture of Nerine. Acta. Hortic. 47:51–53.

Hearon, S. S. 1984. Comparison of two strains of *Kalanchoe latent virus*, Carlavirus group. Phytopathology 74:670–676.

Hiebert, E. and J. G. McDonald. 1973. Characterization of some proteins associated with viruses in the potato Y group. Virology 56:349–361.

Jayasinghe, U. and J. Dijkstra. 1979. *Hippeastrum mosaic virus* and another filamentous virus in *Eucharis grandiflora*. Neth. J. Plant Pathol. 85:47–65.

King, A. M. Q., M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz. 2012. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses: An Elsevier Title. Elsevier Academic Press. San Diego. 1327 pp.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. Nature 227:680–685.

Larsen, R. C., W. J. Kaiser, and S. D. Wyatt. 1996. First report of a virus disease of chickpea caused by a strain of Red clover vein mosaic carlavirus. Plant Dis. 80:709.

Maat, D. Z., H. Huttinga, and F. A. Hakkaart. 1978. *Nerine latent virus*, some properties and serological detectability in *Nerine bowdenii*. Neth. J. Plant Pathol. 84:47–59.

MacKinnon, J. 1974. Detection, spread, and aphid transmission of potato virus S. Can. J. Bot. 52:461–465.

Page, R. D. 1996. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computer. Comput. Appl. Biosci. 12:357–358.

Swofford, D. L. 1998. PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony), Version 4. Sinauer Associates. Sunderland, MA. 143 pp.

Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL-X windows interface: Flexibel strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25:4876–4882.

Tiberini, A., T. Mascia, and L. Tomassoli. 2011. First nucleotide sequence of a Carlavirus virus genus infecting caper. Phytopathol. Mediterr. 50:482–488.

Tomimura, K., A. J. Gibbs, C. E. Jenner, J. A. Walsh, and K. Ohshima. 2003. The phylogeny of *Turnip mosaic virus*; comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent 'emergence' in East Asia. Mol. Ecol. 12:2099–2111.

Wylie, S. J. and M. G. K. Jones. 2012. Complete genome sequences of seven carlavirus and potyvirus isolates from *Narcissus* and *Hippeastrum* plants in Australia, and proposals to clarify their naming. Arch. Virol. 157:1471–1480.

Serological and Molecular Identification of *Nerine latent virus* Infecting Blood Lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn)

Chin-Chih Chen[1,*], Chin-An Chang[2,*], and Fen-Lang Chiang[3]

Abstract

Chen, C. C., C. A. Chang, and F. L. Chiang. 2016. Serological and molecular identification of *Nerine latent virus* infecting blood lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn). J. Taiwan Agric. Res. 65(2):194–206.

A virus isolate (HM4), obtained from a symptomless blood lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn) plant, was established on *Chenopodium quinoa* Willd. by three successive single lesion re-isolation and inoculation. The original blood lily plant and inoculated *C. quinoa* leaf tissues of HM4 were reacted strongly with the antibody against the LY56 isolate of *Narine latent virus* (NeLV) from golden spider lily in indirect ELISA and western blotting. A 1.5-kbp DNA fragment was amplified by RT-PCR from HM4-infected blood lily and *C. quinoa* tissues using a primer pair specific to the 3'-end of genomic sequences of NeLV. Sequence analyses revealed that the amplicon comprises 1,560 nucleotides spanning the entire open reading frame of coat protein (CP) and the complete cysteine-rich protein region of NeLV. Comparison of nucleotide and amino acid sequences indicated that the CP of HM4 shares 96–99% identities with those of the other six blood lily isolates and the known NeLV isolates documented in the GenBank. Results indicated that HM4 and the other six blood lily isolates are the isolates of NeLV. In phylogenetic analysis, these blood lily isolates and those NeLVs from golden spider lily (*Lycoris aurea*), amaryllis (*Hippeastrum hybridum* Hort.) and narcissus (*Narcissus* spp.) were grouped in the same clade evidently differing from that of Hippeastrum latent virus (HLV) and *Narcissus common latent virus* (NCLV). Phylogenetic analysis indicated that the blood lily isolates are grouped in the same sub-clade. Our studies also confirmed that all the NeLV isolates from blood lily, golden spider lily, amaryllis and narcissus can be detected by the same antiserum against NeLV-LY56 in indirect ELISA and western blotting. Moreover, a 552-bp DNA fragment can be amplified from all these NeLV isolates in RT-PCR using the primers designed from the genomic sequence of HM4. Field surveys were conducted during 2006–2014 by indirect ELISA and showed 18.4, 32, 79, and 13.3% of the incidences of NeLV in blood lilies, golden spider lilies, amaryllis and narcissus, respectively, in Taiwan. Based on the serological and molecular evidences, NeLV naturally infecting blood lilies without showing discernible symptoms is first reported.

Key words: Blood lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn), *Nerine latent virus* (NeLV), Serological detection, RT-PCR detection, Phylogenetic analysis.

Received: July 29, 2015; Accepted: October 5, 2015.
* Corresponding authors, e-mail: chinzue@tari.gov.tw; cachang@cyut.edu.tw
[1] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Professor, Department of Applied Chemistry, Chaoyang University of Technology, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(2):207–217 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06502.10

研究報告

由 *Dickeya zeae* 引起之水稻細菌性基腐病

林靜宜[1] 黃巧雯[1] 楊宏仁[2] 蔡佳欣[3] 許淑麗[4] 倪蕙芳[5,*]

摘要

林靜宜、黃巧雯、楊宏仁、蔡佳欣、許淑麗、倪蕙芳。2016。由 *Dickeya zeae* 引起之水稻細菌性基腐病。台灣農業研究 65(2):207–217。

水稻細菌性基腐病為近來陸續在台灣各地發生之水稻新病害，可造成水稻莖基部產生黑褐色腐爛病徵，已於台灣新竹縣、嘉義縣、苗栗縣、雲林縣及台南市等地發現。本研究自嘉義疑似水稻罹病株經分離純化一種細菌分離株，經水稻接種試驗可產生與田間相似之病徵，並完成柯霍氏法則，確認為此細菌引起。此細菌經 Biolog 鑑定系統鑑定及多種基因 (16S rDNA、*gyrB* 及 *dnaX*) 之序列比對，確認為 *Dickeya zeae*。將此病原菌接種至不同作物，發現除了水稻之外，亦對玉米、馬鈴薯、蘿蔔、白菜及洋蔥等作物具有致病性。該菌於不同溫度下進行液態培養，結果發現此菌可於 10–40℃生長，30–35℃為最適溫度。此外，選用 26 種不同的水稻品種進行對水稻細菌性基腐病菌之感受性試驗，結果顯示所有品種皆可被感染，其中以「台粳 8 號」最為感病，罹病率可達 94.44%。利用濾紙圓盤法測試 10 種市售藥劑對此病原菌之生長抑制能力，結果以 20% 歐索林酸可濕性粉劑之抑制效果最佳。而溫室藥效試驗結果也顯示，以 20% 歐索林酸可濕性粉劑 1,000× 稀釋液，於接種前施用可有效防治水稻細菌性基腐病，顯示歐索林酸可做為農政單位未來推薦防治水稻基腐病藥劑之參考。

關鍵詞：水稻、細菌性基腐病、藥劑篩選。

前言

水稻 (*Oryza sativa*) 為禾本科單子葉植物，是世界重要糧食作物之一。依國際農糧組織 Rice Market Monitor 之資料顯示，2014 年全球稻的栽培面積約為 1.6×10^9 ha，稻米生產約為 7.4×10^9 Mg (http://www.fao.org/3/a-i4147e.pdf)，亞洲、南美洲、中美洲、非洲等地區皆有種植。其中，以亞洲為最大生產地區，約占全球產量之 90%，具有充沛降雨之季風氣候型態的國家幾乎都是生產稻米的大國，如中國、印度、印尼等國家。在台灣，水稻亦是重要的糧食作物，根據行政院農委會 2013 年農業年報 (http://www.afa.gov.tw/Public/GrainStatistics/20144241424285334.pdf) 統計，全台稻作栽種面積約為 270,264 ha，產量約為 1,275,456 Mg，栽種面積及產量都是以粳稻最多，秈稻次之。

台灣氣候高溫多濕，病蟲害繁多，根據台灣植物病害名彙 (Hsu *et al*. 2002) 及相關研究報告紀錄，台灣目前已記載 80 種病原，其中水稻栽培期發生之細菌性病害有水稻白葉枯病 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、細菌性穀枯病 (*Burkholderia glumae*)、細菌性條斑病 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*) (2007年發現) (Chen *et al*. 2008) 等 3 種病害。自 2009

投稿日期：2015 年 7 月 31 日；接受日期：2015 年 10 月 6 日。
* 通訊作者：hfni@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所研究員兼分所長。台灣 嘉義市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系研究助理。台灣 嘉義市。
[5] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員兼系主任。台灣 嘉義市。

年起，新竹、嘉義及彰化等地區之水稻栽植田發現部分水稻根節部和莖基部，最初於土表附近之莖基部引起水浸狀橢圓形病斑，逐漸擴展為不規則形之黑褐色病斑，剝開葉鞘可見罹病處變黑褐色，繼之腐爛，且有惡臭，嚴重時，植株心葉變黃枯死。經比對文獻資料後，懷疑是由細菌性軟腐病菌所造成之水稻細菌性基腐病 (rice bacterial foot rot)，類似病害又於 2013 年於苗栗縣、雲林縣、嘉義縣及台南市等多處水稻田發現，發生範圍已有擴散的趨勢。

水稻細菌性基腐病最早於 1977 年在日本靜岡發現 (Goto 1979)，之後於中國、菲律賓、印度、印尼、孟加拉等東南亞國家皆有發生，部分地區危害較嚴重，現已成為印度重要之水稻細菌性病害 (Amarjit *et al*. 2009; Liu *et al*. 2013)。此外，2011 年於歐洲之水稻栽培區亦發現水稻細菌性基腐病之零星發生 (Bertani *et al*. 2013)。水稻細菌性基腐病在中國發生甚為廣泛，已於中國大陸 15 個省區先後發現此病害之危害，並有擴展蔓延及逐年嚴重的趨勢 (Liu *et al*. 2013)。由於此病害可於水稻不同生長時期感染，水稻分蘗期至孕穗期皆可發病，罹病水稻植株之分蘗減少、莖基部腐爛、產生白穗，嚴重者可造成水稻大面積無法收成。此病害於中國大陸造成水稻產量減少 5–30%，嚴重時可達 50% 以上 (Zhou *et al*. 2009)，對水稻生產影響甚大。

水稻細菌性基腐病是由 *Dickeya* 屬之軟腐細菌所引起，此屬細菌原歸類於 *Erwinia chrysanthemi*，由於 Hauben *et al*. (1998) 利用 16S rDNA 序列分析將原屬於 *Erwinia* 屬之軟腐細菌，歸類於 *Pectobacterium* 屬中，因而使 *E. chrysanthemi* 重新歸屬於 *Pectobacterium chrysanthemi*；此外，Samson *et al*. (2005) 依據 DNA-DNA 雜合反應、16S rDNA 序列、血清特性及表現型的結果進行分析後，再將 *P. chrysanthemi* 歸類於新屬 *Dickeya* 中。*Dickeya* 屬之病原細菌為格蘭氏陰性菌、兼性嫌氧菌，可藉由傷口侵入寄主組織，並可產生果膠分解酵素，分解植物細胞壁與中膠層中之果膠物質，造成植物組織之軟化與崩解。因此，往往造成寄主植物產生軟腐病徵，有些則可造成黑腳 (black-leg)、萎凋 (wilting) 等病徵。此病原菌可侵染雙子葉及單子葉植物，重要經濟作物除了水稻之外，其他如玉米、馬鈴薯、香蕉等皆為其寄主 (Samson *et al*. 2005)，已成為目前世界重要植物病原細菌，且其發生範圍不斷擴大 (Stead *et al*. 2010)。

在台灣，針對水稻細菌性基腐病並無進行相關研究，防治上亦無使用的推薦藥劑，為避免未來造成大量經濟損失，因此本研究將探討台灣之水稻細菌性基腐病菌之特性及評估其對台灣不同水稻品種之抗感病性，同時亦進行防治藥劑之篩選，以提供該病害管理防治參考。

材料與方法

菌株來源

自嘉義地區採集罹病之水稻植株，洗淨瀝乾後，切取病健部組織，經 0.5% 次氯酸鈉 (NaOCl) 及 70% 酒精表面消毒各 30 s，再以無菌水漂洗 3 次後，將組織切碎置入無菌水中震盪均勻。利用移植環沾取懸浮液劃線塗於 NA (Nutrient agar) (Difco Laboratories; Becton, Dickinson and Company, France) 培養基平板上，置於 27℃定溫箱中培養 2–3 d 待細菌長出後，挑選單一菌落移植至新的 NA 培養基平板，重複 3 次以純化細菌。純化後之菌株保存於生理食鹽水中，以供日後試驗使用。

病原性試驗

接種試驗選用種植 2 個月之水稻品種「台粳 8 號」作為試驗植物，供試植物種植於長方型塑膠盆中 (54 cm × 43.5 cm × 13 cm)，每盆種植 20 株水稻，共 3 重複。選用細菌分離株 Ech-1218 作為接種菌株。接種原製備方法為將保存分離株活化培養於 NA 培養基，接種前 1 d 大量更新分離菌株於 YDC 培養基 (yeast extract dextrose calcium carbonate) 培養基 (Wilson *et al*. 1967)，再以無菌蒸餾水配置成細菌懸浮液，並將濃度調整約為 10^8 cfu mL^{-1}。接種方式如下：水稻植株先以滅菌過之牙籤針刺水稻莖基部 1 cm 處，再倒入 1,300 mL 之菌液至上述種有水稻之塑膠盆中進行接

種。另設不接種之水稻作為對照組，置於溫室中觀察發病情形，之後再自接種植株之罹病組織分離細菌，確認是否與原接種之細菌相同。

Biolog Identification System 鑑定菌株

將 Ech-1218 供試菌株利用 Biolog 鑑定系統進行分析，菌株先培養於 5.7% BUGTM agar (Biolog Universal Growth Agar, Biolog Inc., CA, USA) 培養基，於 30℃下培養 16–24 h。再以 IF-A 接種液 (Biolog Inc., CA, USA) 將細菌懸浮，並調整其濃度至 90–98% T (Turbidity) 後，加入 Biolog GEN III 反應盤 (Biolog Inc., CA, USA) 中，每孔加入 100 μL 之懸浮液。培養 20–24 h 後，以光譜儀測讀，將所得資料與 Biolog GEN III 資料庫 (2.6.1 版) 比對，以鑑定細菌種類。

菌株分子鑑定

參考 Wang *et al*. (1993) 之方法並略加修改後進行核酸萃取，將培養於 NA 培養基上之純化菌株 Ech-1218 以滅菌牙籤沾取單一菌落，放入 50 μL 之 0.5 N NaOH。劇烈震盪後短暫離心，再加入 150 μL 之 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 混合均勻。取 10 μL 加入無菌水稀釋 10 倍，再以此製備液 2 μL 作為模板。利用 16S rDNA 序列設計的廣效性引子對 (fD1/rP1) (Weisburg *et al*. 1991) 以及針對 *Dickeya* 屬之 DNA gyrase gene (*gyrB*) 與 DNA polymerase III gamma subunit gene (*dnaX*) 設計之引子對 gyrBf1/gyrBr1 (Pu *et al*. 2012)、dnaXf/dnaXr (Slawiak *et al*. 2009) 進行聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR)，並將其產物進行定序及序列比對以鑑定細菌種類。

病原菌對不同作物之致病性

接種試驗利用株高約為 20 cm 之飼料玉米品種「台農 1 號」作為供試植物，供試植物種植於 45 圓孔穴盤，內含泥炭土。接種方法以滅菌之牙籤沾取細菌懸浮液 (濃度為 10^8 cfu mL^{-1}) 後，穿刺玉米植株莖基部，並以沾取無菌水之牙籤穿刺接種處理作為對照組。接種後植株套上塑膠袋保濕 24 h 後，除去塑膠袋置網室中觀察病徵發展，每種處裡分別接種 8 棵，之後再自接種植株之罹病組織分離細菌，確認是否與原接種之細菌相同。此外，胡蘿蔔塊根、洋蔥鱗莖、馬鈴薯塊莖及包心白菜則利用針筒注射方式，將 50 μL，濃度為 10^8 cfu mL^{-1} 之細菌懸浮液注射入供試植物組織中，每處理 2 重複。放入密封之保鮮盒中保濕，並置於 27℃定溫箱中觀察病徵發展，另以無菌水接種處理作為對照組。

溫度對病原菌生長之影響

以無菌蒸餾水將供試菌株配置成細菌懸浮液，並將濃度調整約為 10^5 cfu mL^{-1}，取 100 μL 之細菌懸浮液加入 5 mL 之 LB Broth (Difco Laboratories; Becton, Dickinson and Company, USA) 中，分別置於 10℃至 40℃，間隔 5℃之不同溫度之震盪培養箱中 (轉速 100 rpm)，每處理 2 重複。24 h 後取出，以系列稀釋平板法計算菌落數後，推估菌株生長濃度。

病原菌對不同水稻品種 (系) 之抗病性測定

自優良水稻推廣品種、曾在台灣種植面積達前 10 大之水稻品種或是嘉義農業試驗分所育成、保存之品種 (系) 中，共選取 26 個水稻品種 (系) 進行測定，其中包含粳稻 18 種：「台農 67 號」('TNG67')、「台農 70 號」('TNG70')、「台農 72 號」('TNG72')、「台農 74 號」('TNG74')、「台農 75 號」('TNG75')、「台粳 2 號」('TK2')、「台粳 4 號」('TK4')、「台粳 8 號」('TK8')、「台粳 9 號」('TK9')、「台粳 14 號」('TK14')、「台粳 16 號」('TK16')、「高雄 139 號」('KH139')、「台南 11 號」('TN11')、「桃園 3 號」('TY3')、「台東 30 號」('TD30')、「台中 192 號」('TC192')、嘉農育 941001 (CNY941001) 與嘉農育 941002 (CNY941002)，秈稻 4 種：「台中秈 10 號」('TCS10')、「台農秈 14 號」('TNGS14')、「台農秈 19 號」('TNGS19')、「台農秈 22 號」('TNGS22') 及秈糯稻 4 種：嘉農秈糯育 892220 號 (CNSY892220)、嘉農秈糯育 892229 號 (CNSY892229)、嘉農秈糯育 892233 號 (CNSY892233) 與嘉農秈糯育 892234 號 (CNSY892234)。各品種及品系利用種子播種發芽後，於網室生長 2 mo 後供接種試驗。接種方法如

上述病原性試驗所述，每品種接種 3 株，各 3 重複，試驗重複 2 次。另設不接種之對照組，接種 2 wk 調查罹病率 (disease incidence)。

藥劑感受性測定

供試藥劑：選用植物保護手冊推薦於防治水稻細菌性病害及其他作物細菌性軟腐病之推薦藥劑作為供試藥劑，共 10 種，包括：77% 氫氧化銅可濕性粉劑 (copper hydroxide，瑞芳農藥植物保護股份有限公司)、40% 銅快得寧可濕性粉劑 (copper hydroxide + oxine-copper，瑞芳農藥植物保護股份有限公司)、2% 嘉賜黴素溶液 (kasugamycin，大勝化學工業股份有限公司)、81.3% 嘉賜銅可濕性粉劑 (kasugamycin + copper oxychloride，大勝化學工業股份有限公司)、20% 歐索林酸可濕性粉劑 (oxolinic，立農化學股份有限公司)、10% 鏈四環黴素 (streptomycin + tetracycline，全台農藥有限公司)、10% 克枯爛可濕性粉劑 (tecloftalam，大勝化學工業股份有限公司)、14% 嘉賜克枯爛可濕性粉劑 (tecloftalam + kasugamycin，大勝化學工業股份有限公司)、30.3% 四環黴素可溶性粉劑 (tetracycline，全台農藥有限公司) 及 68.8% 多保鏈黴素可濕性粉劑 (thiophanate methyl + streptomycin，瑞芳農藥植物保護股份有限公司)。以上供試藥劑之濃度為 10、100 及 1,000 mg L^{-1}。

根據 Tsai *et al*. (2001) 之方法，將直徑 0.8 cm 之濾紙圓盤 (TOYO ADVANTEC) 置於上述各藥劑之不同稀釋倍數之溶液中，於室溫下浸漬 24 h 後將濾紙圓盤取出陰乾，再放置於已塗佈有 0.1 mL 細菌懸浮液 (濃度約為 10^8 cfu mL^{-1}) 之 NA 培養基平板上 (直徑 9 cm)。每 1 培養平板放 4 個濾紙圓盤，並以無菌水處理之濾紙圓盤作為對照組。將各處理之培養平板放置於 27℃無光照定溫箱內，培養 2 d 後，取出觀察細菌生長情形，並測量抑制圈大小 (扣除濾紙圓盤直徑 8 mm)。每處理 3 重複，試驗重複 2 次。

溫室藥效試驗

藥效試驗選用種植 1 mo 之水稻品種「台南 11 號」作為試驗植物，供試植物種植於方型塑膠盆中 (17 cm × 17 cm × 8 cm)，每盆 3 株，置於溫室中生長。供試藥劑以室內藥劑篩選對病原細菌生長較具抑制能力之 20% 歐索林酸可濕性粉劑，及不具生長抑制能力之 77% 氫氧化銅可濕性粉劑作為對比，另以不施藥作為對照。每處理 3 株，各 3 重複。接種方式為利用滅菌牙籤針刺植株莖基部後，將濃度約為 10^8 cfu mL^{-1} 之細菌懸浮液，每盆定量 200 mL，倒入盆中。施藥方式是將 20% 歐索林酸可濕性粉劑以 1,000× 稀釋，77% 氫氧化銅可濕性粉劑以 800× 稀釋後，分別將稀釋藥劑每盆定量 200 mL 加入盆中。施藥時間分為 2 種，一為接種前 1 d 進行第 1 次施藥，另一為接種後 1 d 進行第 1 次施藥，之後兩者均於第 1 次施藥 7 d 後再進行第 2 次施藥。於第 2 次施藥後 7 d 進行病害調查，依病斑之大小分為 0–4 級，0：無病斑；1：病斑長度 < 1 cm；2：1 cm ≤ 病斑長度 < 2 cm；3：2 cm ≤ 病斑長度 < 3 cm；4：病斑長度 ≥ 3 cm，或植株莖部褐化、腐爛，並依下列公式算出罹病度：

$$\text{罹病度 (\%)} = \left[\frac{\Sigma(\text{指數} \times \text{該指數罹病株數})}{(4 \times \text{總調查株數})}\right] \times 100\%。$$

統計分析

各項處理之試驗資料利用 SAS 9.1 版統計分析軟體先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗在 5% 或 1% 顯著水準下，比較處理間平均值之差異。

結果

病原性試驗

自罹病植株分離之 Ech-1218 作為供試菌株，以牙籤針刺法接種「台粳 8 號」之水稻莖基部後，於接種後 2 wk 發現接種水稻植株之莖基部出現水浸狀之褐色橢圓形或不規則形病斑 (圖 1A)，並有腐爛、惡臭的情形產生，與田間罹病株具有相似的病徵，由發病植株之病

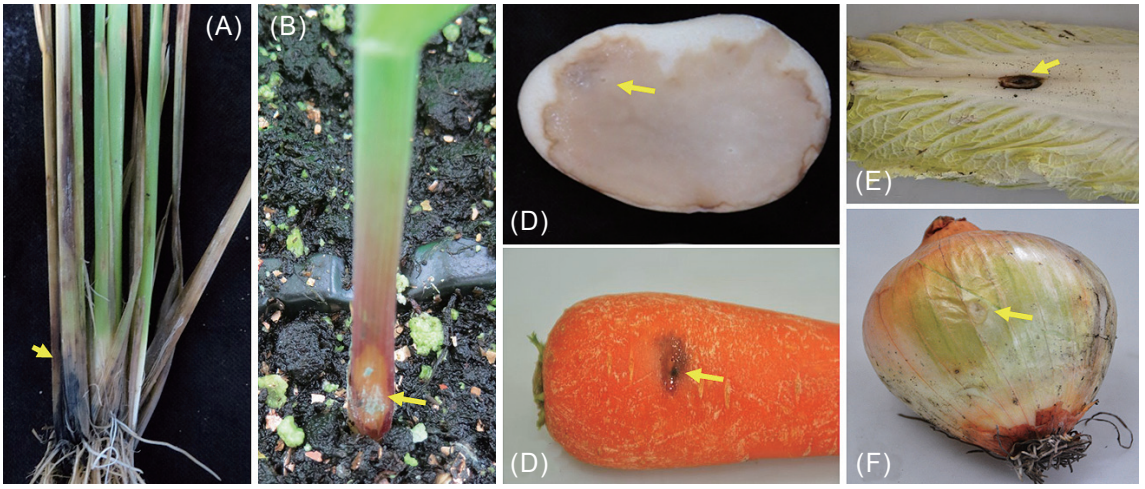


圖 1. 不同作物接種水稻基腐病菌 Ech 1218 後之病徵。(A) 水稻接種 2 wk 後之病徵；(B) 玉米接種 4 d 後之病徵；(C) 馬鈴薯切片接種 1 d 後之病徵；(D) 胡蘿蔔接種 4 d 後之病徵；(E) 包心白菜接種 1 d 後之病徵；(F) 洋蔥接種 3 d 後之病徵。箭頭為接種點之位置。

Fig. 1. Symptoms of different crops inoculated with *Dickeya Zeae* strain Ech1218. (A) Two weeks after inoculation on rice seedlings; (B) four days after inoculation on maize; (C) one day after inoculation on potato slices; (D) four days after inoculation on carrots; (E) one day after inoculation on Chinese cabbages; and (F) three days after inoculation on onion. Arrows indicate the inoculation sites.

斑處可再分離出相同的細菌。而以無菌水接種之對照組植株則無病徵產生。

菌株之 Biolog Identification System 鑑定與分子鑑定

將供試菌株 Ech-1218 於 Biolog Identification System 分析對 95 種碳素源的利用情形，並將分析結果於 Biolog GEN III 資料庫 (2.6.1 版) 比對後，結果顯示供試菌株屬於 *Dickeya chrysanthemi*，相似值為 0.685。此外，供試菌株亦以細菌 16S rDNA 之廣效性 fD1/rP1 引子對進行 PCR 增幅，可增幅出 1 段約 1.5 kb 之 DNA 片段，利用引子對 gyrBf1/gyrBr1 與 dnaXf/dnaXr 則分別可增幅出約 2,412 bp 及 536 bp 之 DNA 片段。此 3 基因區域之 DNA 片段經定序後，將之與 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 基因資料庫進行分析比對，結果供試菌株均與 *D. zeae* EC1 strain 之 16S rDNA (CP006929)、*gyrB* (JQ284042) 及 *dnaX* (JQ284041) 之序列相似度達 99% 以上。

病原菌對不同作物之致病性

除了利用水稻進行病原性試驗外，亦使用不同種之作物進行致病性試驗，包括同屬禾本科之玉米及其他不同科之胡蘿蔔塊根、洋蔥鱗莖、馬鈴薯塊莖及包心白菜。結果顯示，上述之作物經接種後皆可出現病徵，其中玉米、胡蘿蔔塊根於接種後 4 d，即可於接種處發現褐色水浸狀病斑 (圖 1B、1D)；馬鈴薯塊莖切片及包心白菜則於接種後 1 d 即出現褐色病斑 (圖 1C、1E)；洋蔥鱗莖於接種後 3 d 於接種處附近之組織出現水浸狀、軟腐之病徵 (圖 1F)。顯示此病菌除禾本科之水稻、玉米之外，亦對蔬菜類之馬鈴薯及包心白菜等作物具有致病性。

溫度對病原菌生長之影響

溫度與病菌的生長關係試驗方面，利用分離株 Ech-1218 分別於 10、15、20、25、30、35 及 40℃進行測定，結果顯示供試菌株可於 10–40℃等不同溫度下生長，10–35℃之間菌株生長濃度隨溫度升高而漸增；從 35℃至 40℃，

菌株生長濃度則隨溫度上升而緩慢下降 (圖 2)。其中以 30 及 35℃下之菌株平均生長濃度可達 8 Log_{10} cfu mL^{-1} 以上，且兩者之間於 5% 顯著水準下無顯著差異，但與其他溫度處理者具有顯著差異，表示菌株最適宜的生長溫度為 30–35℃。

病原菌對不同水稻品種 (系) 之抗病性測定

利用 26 種水稻品種以傷口接種法進行接種，於 2 wk 後觀察不同品種 (系) 之罹病率，結果發現所有的供試水稻品種 (系) 之莖基部皆出現褐色橢圓形或不規則形病斑之病徵，顯示所有 26 個品種 (系) 均可被感染。其中，有 14 個品種 (系) 之平均罹病率 > 72%，皆屬於粳稻品種 (系)，罹病率最高的為「台粳 8 號」，可達 94.44%，其次為嘉農育 941001 號與「台中 192 號」，罹病率皆為 83.33% (表 1)。而有 7 個品種 (系) 之罹病率 < 60%，包括 1 個粳稻品種 (「台粳 2 號」)、3 個秈稻品種 (「台中秈 10 號」、「台農秈 14 號」及「台農秈 19 號」) 及 3 個秈糯稻 (嘉農秈糯育 892220 號、嘉農秈糯育 892229 號及嘉農秈糯育 892233 號)，其中罹病率最低的品種 (系) 為「台農秈 14 號」與嘉農秈糯育 892229 號，其罹病率皆為 44.44% (表 1)。

室內藥劑感受性測定

利用濾紙圓盤法在 NA 培養基上測定 10 種藥劑對水稻細菌性基腐病菌分離株 Ech-1218 之生長抑制能力，結果顯示供試藥劑中以 20% 歐索林酸可濕性粉劑、10% 鏈四環黴素與 68.8% 多保鏈黴素可濕性粉劑等 3 種供試藥劑之藥效最佳。此 3 種藥劑均為抗生素或其混合劑，當藥劑濃度為 1,000 mg L^{-1} 時，抑制圈大小為 30.25–19.08 mm；藥劑濃度為 100 mg L^{-1} 時，抑制圈大小為 29.08–16.17 mm；藥劑濃度為 10 mg L^{-1} 時，抑制圈大小為 24.33–3.88 mm (表 2)。其他供試之銅劑與抗生素藥劑類，包括 40% 銅快得寧可濕性粉劑、2% 嘉賜黴素溶液、81.3% 嘉賜銅可濕性粉劑、及 14% 嘉賜克枯爛可濕性粉劑等 4 種對此病原菌亦有稍許的生長抑制能力，除了 2% 嘉賜黴素溶液於濃度 100 mg L^{-1} 時，對其抑制圈大小為 2.00 mm 之外，其他 3 種藥劑僅於 1,000 mg L^{-1} 時具有產生 10 mm 以下抑制圈之抑制病原菌生長之能力。此外，供試藥劑中有 3 種藥劑對水稻基腐病菌的生長完全沒有抑制能力，此藥劑分別為 77% 氫氧化銅可濕性粉劑、10% 克枯爛可濕性粉劑與 30.3% 四環黴素可溶性粉劑 (表 2)。

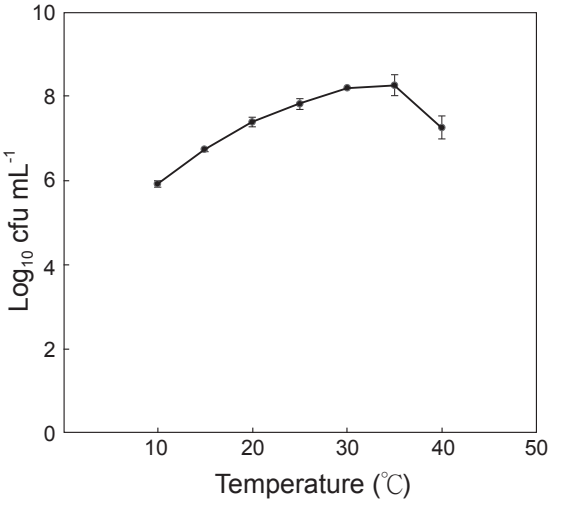


圖 2. 溫度對水稻基腐病菌生長之影響。

Fig. 2. Effect of temperatures on the growth of *Dickeya Zeae* strain Ech1218.

表 1. 水稻基腐病菌 Ech1218 菌株不同水稻品種 (系) 之致病性測定。

Table 1. Pathogenicity test of *Dickeya zeae* strain Ech1218 on different rice varieties.

	Disease incidence (%)[z]		
Variety	Exp. I	Exp. II	Average
TNG67 (台農 67 號)	77.78	66.67	72.22
TNG70 (台農 70 號)	77.78	66.67	72.22
TNG72 (台農 72 號)	66.67	77.78	72.22
TNG74 (台農 74 號)	77.78	55.56	66.67
TNG75 (台農 75 號)	88.89	55.56	72.22
TK2 (台粳 2 號)	55.56	55.56	55.56
TK4 (台粳 4 號)	88.89	66.67	77.78
TK8 (台粳 8 號)	88.89	100.00	94.44
TK9 (台粳 9 號)	88.89	55.56	72.22
TK14 (台粳 14 號)	66.67	55.56	61.11
TK16 (台粳 16 號)	88.89	55.56	72.22
KH139 (高雄 139 號)	88.89	66.67	77.78
TN11 (台南 11 號)	66.67	88.89	77.78
TY3 (桃園 3 號)	66.67	66.67	66.67
CNY941001 (嘉農育 941001)	77.78	88.89	83.33
CNY941002 (嘉農育 941002)	77.78	66.67	72.22
TCS10 (台中秈 10 號)	66.67	44.44	55.56
TNGS14 (台農秈 14 號)	33.33	55.56	44.44
TNGS19 (台農秈 19 號)	55.56	55.56	55.56
TNGS22 (台農秈 22 號)	66.67	55.56	61.11
CNSY892220 (嘉農秈糯育 892220 號)	55.56	44.44	50.00
CNSY892229 (嘉農秈糯育 892229 號)	55.56	33.33	44.44
CNSY892233 (嘉農秈糯育 892233 號)	44.44	66.67	55.56
CNSY892234 (嘉農秈糯育 892234 號)	66.67	66.67	66.67
TD30 (台東 30 號)	88.89	66.67	77.78
TC192 (台中 192 號)	88.89	77.78	83.33

[z] Disease incidence (%) = (number of plants with symptoms/number of inoculated plants) × 100%.

溫室藥效試驗

室內藥劑篩選抑制水稻細菌性基腐病菌效果最佳之藥劑為 20% 歐索林酸可濕性粉劑，因此選用 20% 歐索林酸可濕性粉劑 1,000× 稀釋液進行溫室藥效試驗。另外，亦選用銅劑中之 77% 氫氧化銅可濕性粉劑 800× 稀釋液進行試驗。經施用 2 次之後的結果發現，若於接種前施用 20% 歐索林酸可濕性粉劑稀釋液，其罹病度為 25.0%，若於接種後施用，則其罹病度為 100.0% (表 3)。而 77% 氫氧化銅可濕性粉劑稀釋液於接種前及接種後施用後之罹病度，分別為 90.3% 及 97.2% (表 3)。只有接種前施用 20% 歐索林酸可濕性粉劑稀釋液者與對照無藥劑處理者 (罹病度為 95.9%) 在 1% 顯著水準下即有顯著差異，其他處理之間則無顯著差異 (表 3)。

討論

Dickeya 屬原名 *E. chrysanthemi* 或 *P. chrysanthemi* (Hauben *et al*. 1998; Gardan *et*

表 2. 不同化學藥劑對水稻基腐病菌 Ech1218 之生長抑制效果。

Table 2. Growth inhibition of *Dickeya zeae* strain Ech1218 treated with different agrochemicals.

Agrochemical	Inhibition zone (mm in diam.)[z]		
	1,000 mg L^{-1}	100 mg L^{-1}	10 mg L^{-1}
Copper hydroxide (77.0% WP)	0.00 f[y]	0.00 d	0.00 d
Copper hydroxide + oxine-copper (40.0% WP)	6.78 d	0.00 d	0.00 d
Kasugamycin (2% SL)	7.67 d	2.00 c	0.00 d
Kasugamycin + copper oxychloride (81.3% WP)	1.33 e	0.00 d	0.00 d
Oxolinic (20% WP)	30.25 a	29.08 a	24.33 a
Streptomycin + tetracycline (10.0% SP)	19.08 c	16.17 b	14.17 b
Tecloftalam (10% WP)	0.00 f	0.00 d	0.00 d
Tecloftalam + kasugamycin (14% WP)	7.33 d	0.00 d	0.00 d
Tetracycline (30.3% SP)	0.00 f	0.00 d	0.00 d
Thiophanate methyl + streptomycin (68.8% WP)	20.22 b	16.45 b	3.88 c
CK (dH_2O)	0.00 f	0.00 d	0.00 d
LSD	1.05	1.31	0.34

[z] The inhibition zone did not include the diameters of paper disks (8 mm).
[y] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.

表 3. 化學藥劑於溫室防治水稻基腐病之效果。

Table 3. Efficacy of agrochemicals on the control of rice bacterial foot rot in the greenhouse.

Agrochemical	Fold of dilution	Initial usage time	Disease index (%)[z]
Copper hydroxide (77.0% WP)	800	Before inoculation	90.3 b[y]
Copper hydroxide (77.0% WP)	800	Post inoculation	97.2 b
Oxolinic (20% WP)	1,000	Before inoculation	25.0 a
Oxolinic (20% WP)	1,000	Post inoculation	100.0 b
None (CK)	-		95.9 b
LSD	1%		11.489

[z] Disease index (%) = [Σ(index × diseased plants)/(4 × total inoculated plants)] × 100%.
[y] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 1% by least significant difference (LSD) test.

al. 2003)，為近年所建立的新屬，此屬包含 5 個種，包括 *D. chrysanthemi*、*D. dadantii*、*D. dianthicola*、*D. dieffenbachiae* 及 *D. zeae* (Samson *et al*. 2005)。早期鑑定之水稻細菌性基腐病原菌屬於 *E. chrysanthemi* pv. *zeae*，現今則更名為 *D. zeae*。本研究自嘉義疑似水稻基腐病病徵之水稻罹病株經分離純化及水稻接種試驗確認為細菌所引起。此細菌經由 Biolog 鑑定系統測試，結果為 *D. chrysanthemi*，相似值為 0.685，顯示此細菌屬於 *Dickeya* 屬，由於 Biolog GN 資料庫 (Biolog 6.01 版) 內無 *D. zeae* 之分類，且兩者之親緣關係近似，不易以生化特性及單一基因序列分析區分 (Marrero *et al*. 2013)。因此，本研究利用分子鑑定法以多種基因 (包含 16S rDNA、*gyrB* 及 *dnaX*) (Pu *et al*. 2012) 之序列與 NCBI 基因資料庫進行比對，結果發現均與 *D. zeae* EC1 strain 序列相同度達 99% 以上，依上述資料鑑定該菌為 *D. zeae*，本篇研究報告亦為 *D. zeae* 在台灣引起水稻細菌性基腐病之首篇研究報告。

Dickeya spp. 之病原菌寄主範圍大，包括 11 目 16 科之雙子葉植物及 5 目 10 科之單子葉植物，其中 *D. zeae* 主要寄主有玉米、馬鈴薯、香蕉及菸草等 (Samson *et al*. 2005; Ma *et*

al. 2007)。本研究於不同寄主上進行水稻細菌性基腐病菌致病性試驗，結果發現此病菌除禾本科之水稻、玉米之外，亦對蔬菜類之馬鈴薯及包心白菜等作物具有致病性，且其病害發展迅速，多數於 3–4 d 內即可觀察到組織褐化及水浸狀等病徵出現。此外，研究指出水稻細菌性基腐病菌為高溫菌，最適生長溫度為 36℃，最高生長溫度為 43℃ (Goto 1979)，本研究亦有相似的發現，經試驗發現於 10–40℃不同溫度下皆具生長活性，菌株最適生長溫度為 30–35℃。隨著全球氣候變遷的影響下，台灣氣候暖化，溫度明顯上升，有利於此病原菌大量生長。此外，極端天氣的頻率增加及發生強度增強，如大雨、颱風等經常夾帶強風豪雨，有利於造成植株傷口，可助長細菌性病害之蔓延及傳播。並且強風豪雨易造成水稻倒伏及田區淹水，而颱風過後，經常有溫度升高的現象，高溫高濕的環境更可增加病害發生的嚴重性 (Hung *et al*. 2010)。特別是雨水淹沒之水稻田，此病害之發生會更為猖獗。

水稻細菌性基腐病為近年來新興之水稻病害，已於中國及一些東南亞國家的水稻栽培與生產造成不同程度的影響，中國之研究報告顯示不同的水稻品種之間對水稻基腐病之抗性差異顯著。Wang *et al*. (1987) 對 622 種水稻品種進行水稻基腐病之抗性分析，篩選出 127 個品種為高抗、210 個品種為中抗，並發現抗病品種中多為秈稻及糯稻，粳稻較少，且粳稻罹病度高於秈稻。本研究選用 26 種水稻品種，包含秈稻、秈糯稻及粳稻，進行水稻基腐病菌接種試驗。結果顯示，所有供試品種皆可被感染，其中以粳稻之發病率較秈稻、秈糯稻品種略高。供試之 18 個粳稻品種中，其中 14 個粳稻品種發病率皆高於 72%，尤其以「台粳 8 號」發病最為嚴重；而秈稻與秈糯稻共 8 個品種之發病率則為 44.44–66.7%，其中罹病率最低的品種 (系) 為「台農秈 14 號」與嘉農秈糯育 892229 號，其罹病率皆為 44.44%。由此可知，台灣不同水稻品種之間具有抗性差異，整體以秈稻、秈糯稻品種較粳稻抗病，而秈稻及秈糯稻彼此間之抗性差異並不顯著，此結果與 Wang *et al*. (1987) 之相似。

細菌性病害之防治，除了使用抗病品種之外，亦需輔以藥劑防治以降低病害危害程度。水稻細菌性基腐病目前並無推薦藥劑，因此為提供可參考使用之防治藥劑，本試驗進行病原菌之室內藥劑試驗，結果發現測試之 10 種藥劑中以抗生素類之 20% 歐索林酸可濕性粉劑抑制細菌生長之抑制圈最大，其次為 68.8% 多保鏈黴素可濕性粉與 10% 鏈四環黴素。其中，10% 鏈四環黴素亦為防治水稻白葉枯病之推薦藥劑，可提供作為共同防治此 2 種水稻細菌性病害之藥劑參考。此外，作為水稻細菌性穀枯病推薦藥劑之 2% 嘉賜黴素溶液及其抗生素混合藥劑與 3 種含銅類之藥劑 (包含 40% 銅快得寧可濕性粉劑、81.3% 嘉賜銅可濕性粉劑及 77% 氫氧化銅可濕性粉劑)，對本菌之生長抑制效果不佳，須於高劑量 (1,000 mg L^{-1}) 時始具有抑制病原菌生長之能力。由此可知，此病原菌已對嘉賜黴素及銅劑具有高忍受度，因此應避免於田間頻繁使用含嘉賜黴素及銅類的藥劑，以避免產生抗藥性。本研究於溫室進行 20% 歐索林酸 1,000× 稀釋液及 77% 氫氧化銅可濕性粉劑 800× 稀釋液之藥效試驗，結果發現僅 20% 歐索林酸 1,000× 稀釋液於接種前施用，才能有效減少水稻細菌性基腐病之發生，為預防性藥劑，其田間藥劑防治之關鍵為施用時機。由於在台灣此病害之發生侷限在大水淹沒過之稻田，因此建議於被水淹沒的稻田於退水后立即施藥，以有效降低病害發生。然而，此藥劑目前並非水稻之推薦用藥，其適用性仍需經農政單位進一步評估及通過審查後，才可供農民田間正式使用，以符合安全用藥之宗旨。

水稻細菌性基腐病已於新竹縣、嘉義縣、苗栗縣、雲林縣及台南市等多處水稻田發現，本研究報告首次證實在台灣 *D. zeae* 為引起此病害之病原菌之一。此外，此病原菌亦對玉米、馬鈴薯、蘿蔔及白菜等不同經濟作物具有致病性，具有潛在的威脅性。而台灣之多數水稻品種對此病害皆為感病，不適合利用抗病品種進行防治，而藥劑防治則以 20% 歐索林酸可濕性粉劑對水稻細菌性基腐病菌之抑制效果最佳，為預防性藥劑。以上資訊可提供相關

農政單位管理防治及推薦藥劑之參考，以利防治策略之擬定，並減少水稻細菌性基腐病之發生。

誌謝

本研究工作承嘉義農業試驗分所水稻研究室提供不同品種之水稻種子與賴永昌主任於英文文稿之指正，以及陳幸葵小姐、林江美華小姐及賴素玉小姐協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

Amarjit, S., J. S. Brar, I. S. Kang, and S. Daljit. 2009. Plant disease scenario in Punjab. Pl. Dis. Res. 24:135–141.

Bertani, I., D. Passos da Silva, P. Abbruscato, P. Piffanelli, and V. Venturi. 2013. Draft genome sequence of the plant pathogen *Dickeya zeae* DZ2Q, isolated from rice in Italy. Genome Announc. 1(6):e00905–13.

Chen, C. W., S. H. Hseu, L. J. Hsich, and Y. C. Chang. 2008. Bacterial leaf streak of rice: A new disease in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 17:82. (in Chinese)

Gardan, L., C. Gouy, R. Christen, and R. Samson. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:381–391.

Goto, M. 1979. Bacterial foot rot of rice caused by a strain of *Erwinia chrysanthemi*. Phytopathology 69:213–216.

Hauben, L., E. R. B. Moore, L. Vauterin, M. Steenacker, J. Mergaert, L. Verdonck, and J. Swings. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within *Enterobacteriaceae*. Syst. Appl. Microbial. 21:384–397.

Hsu, S. T., T. T. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsay. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathol. Society. Taichung. 386 pp. (in Chinese)

Hung, T. C., Y. T. Hsu, and Y. C. Chou. 2010. Influence of climate change on the incidence of rice diseases and our adaptive strategies. Plant Prot. Bull. 52:25–42. (in Chinese with English abstract)

Liu, Q. G., Z. Qing, and C. D. Wei. 2013. Advances in research of rice bacterial foot rot. Sci. Agric. Sin. 46:2923–2931. (in Chinese with English abstract)

Ma, B., M. E. Hibbing, H. S. Kim, R. M. Reedy, I. Yedidia, J. Breuer, J. D. Glasner, N. T. Perna, A. Kelman, and A. O. Charkowski. 2007. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. Phytopathology 97:1150–1163.

Marrero, G., K. L. Schneider, D. M. Jenkins, and A. M. Alvarez. 2013. Phylogeny and classification of *Dickeya* based on multilocus sequence analysis. Intl. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:3524–3539.

Pu, X. M., J. N. Zhou, B. R. Lin, and H. F. Shen. 2012. First report of bacterial foot rot of rice caused by a *Dickeya zeae* in China. Plant Dis. 96:1818.

Samson, R., J. B. Legendre, R. Christen, M. F. Saux, W. Achouak, and L. Gardan. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al*. 1953) Brenner *et al*. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and declineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. Intl. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:1415–1427.

Slawiak, M., J. R. C. M. van Beckhoven, A. G. C. L. Speksnijder, R. Czajkowski, G. Grabe, and J. M. van der Wolf. 2009. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. Eur. J. Plant Pathol. 125:245–261.

Stead, D. E., N. Parkinson, J. Bew, J. Hennessy, J. K. Wilson, and J. G. Elphinstone. 2010. The first record of *Dickeya zeae* in the UK. Plant Pathol. 59:401.

Tsai, J. N., P. J. Ann, C. Y. Lin, Y. F. Wu, and S. J. Peng. 2001. Occurrence, variety resistance and chemical control of bacterial spot of carambola. Plant Pathol. Bull. 10:139–145. (in Chinese with English abstract)

Wang, H., M. Qi, and A. J. Cutler. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Res. 21:4153–4154.

Wang, J. S., G. Yao, and Z. D. Fang. 1987. Resistance of rice cultivars to foot rot and the pathogenicity differentiation of the pathogen (*Erwinia chrysanthemi* Burkholder). Sci. Agric. Sin. 20:93–96. (in Chinese with English abstract)

Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173:697–703.

Wilson, E. E., F. M. Zeitoun, and D. L. Fredrickson. 1967. Bacterial phloem canker, a new disease of Persian walnut trees. Phytopathology 57:618–621.

Zhou, H. P., J. H. Fan, J. B. Chen, Y. Guan, and L. J. Mu. 2009. Toxicity measurement for thirteen bactericides to the causal organism of rice bacterial foot rot. J. Yunnan Agric. Univ. 24:307–311. (in Chinese)

Rice Bacterial Foot Rot Disease Caused by *Dickeya zeae* in Taiwan

Ching-Yi Lin[1], Chiao-Wen Huang[1], Hong-Ren Yang[2], Chia-Hsin Tsai[3], Sui-Li Hsu[4], and Hui-Fang Ni[5,*]

Abstract

Lin, C. Y., C. W. Huang, H. R. Yang, C. H. Tsai, S. L. Hsu, and H. F. Ni. 2016. Rice bacterial foot rot disease caused by *Dickeya zeae* in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 65(2):207–217.

Rice bacterial foot rot is a new bacterial disease of rice found in Taiwan recently. Symptoms of the disease include brown sheath rot and dark brown decay of the tillers. The diseased samples were collected in Chiayi County and bacteria were isolated from the symptomatic tissues. Pathogenicity of the bacteria was verified by Koch's postulates. The pathogen was further determined as *Dickeya zeae* by Biolog identification and multi-gene (16S rDNA, *gyrB*, and *dnaX*) sequence analysis. The pathogen could also infect several important crops such as maize, potato, carrots and Chinese cabbage. It could grow at wide range of temperatures, 10–40℃, with optimal range in 30–35℃. The selected 26 rice varieties were all infected by the pathogen. Among these tested varieties, *japonica* rice variety, 'TK8' was most susceptible to the pathogen, with an average incidence of 94.44%. An *In vitro* agrochemical screening test showed that 20% oxolinic was the most effective inhibitor on bacterial growth. A greenhouse trial showed that the chemical could only protect the rice plants if applied before the pathogen infection. The results suggested that 20% oxolinic could be recommended as an effective chemical to control the rice bacterial foot rot disease in the field.

Key words: Rice, Rice bacterial foot rot, Agrochemical screening.

Received: July 31, 2015; Accepted: October 6, 2015.

* Corresponding author, e-mail: hfni@dns.caes.gov.tw

[1] Assistant Research Fellows, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[2] Research Fellow and Director, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[3] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[4] Research Assistant, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[5] Associate Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, 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

Chen, Chi-Chung
Department of Applied Economics, National Chung Hsing 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, Fure-Chyi
Department of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology

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

Chien, Li-Hsien
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Guo, Horng-Yuh
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

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

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

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

Huang, Pung-Ling
Department of Horticulture & Landscape Architecture, National Taiwan University

Kao, Ching Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University

Ko, Wen-Hsiung
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

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

Ou, Shyi-Kuan
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Shen, Yuan
Department of Soil & Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Su, Jeng-De
Department of Food Science, Tunghai University

Tsay, Hsin-Sheng
Graduate Institute of Biochemical Sci. & Technol., Chaoyang University of Technology

Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute

Tseng, Menq-Jiau
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

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

Wu, Hung-Pan
Institute of Plant & Microbial Biology, Academia Sinica

Editorial Assistants

Chen, Siang-Jiun
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

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

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

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 65 No. 2 June 30, 2016

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