

台灣農業研究

第六十卷

第二期

研究報告

培養基鹽類配方、活性碳與蔬果添加物對台灣白及無菌播種之影響

曹進義、陳威臣、夏奇鈺..... 77

感染百子蓮之 *Nerine virus X* 病毒之血清學與分子生物學鑑定及其檢測技術之建立

江芬蘭、張清安、鄭櫻慧、陳金枝..... 89

白芷培植體及飲片歐前胡素之萃取

蕭翌柱、鄭統隆、高瑞隆、賴瑞聲、黃嘉新..... 101

長期不同耕作制度及作物殘體管理對土壤有機質含量的影響

譚增偉、陳桂暖..... 115

不同栽植期對水稻田雜草相之影響

蕭巧玲、楊純明、李裕娟..... 125

柳橙果實綠黴病之發生與藥劑防治

蔡志濃、安寶貞、鄭秀芳..... 139

利用亞磷酸中和水溶液防治果樹苗木疫病

安寶貞、王姻婷、蔡志濃..... 149

中華民國一〇〇年六月

行政院農業委員會農業試驗所出版

中華民國 台灣 台中市

培養基鹽類配方、活性碳與蔬果添加物對台灣白及無菌播種之影響¹

曹進義² 陳威臣² 夏奇鈺^{2,3}

摘 要

曹進義、陳威臣、夏奇鈺。2010。培養基鹽類配方、活性碳與蔬果添加物對台灣白及無菌播種之影響。台灣農業研究 60:77-88。

本研究藉由 5 種不同鹽類配方 Kundson (Knudson 1946)、VW (Vacin & Went 1949)、全量及半量之 MS (Murashige & Skoog 1962) 以及花寶 1 號 (HYPONeX 7-6-19) 皆添加 0.8% Bacto agar 與 3% 蔗糖為基礎培養基，配合 0.1% 活性碳，以及不同含量之香蕉或馬鈴薯的添加，共 4 種試驗進行台灣白及黃熟果莢無菌播種，測試上述因子對台灣白及種子發芽與促進芽體生長發育之影響。試驗結果顯示取自黃熟果莢之種子在無菌播種，培養於 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 環境 8 天後即可發芽，培養 50 天後顯示出在 5 種不同鹽類配方與含有 0.1% 活性碳、香蕉或馬鈴薯蔬果添加物 (2.5、5.0、7.5、10%) 之培養基中，對種子發芽影響不顯著 ($P > 0.05$)，小苗單株鮮重於 1/2 MS 添加 0.1% 活性碳培養基中可達 20.0 mg，於 MS 添加 0.1% 活性碳培養基為 20.8 mg，而於 VW 添加 0.1% 活性碳培養基僅 7.4 mg，以 1/2 MS 配方培養基對小苗發育之促進效果最顯著；添加活性碳有助於小苗發育；添加香蕉或馬鈴薯皆可促進小苗鮮重的增加，而以馬鈴薯較香蕉為佳，其添加之最適濃度為 7.5%。因此，以 1/2 MS 鹽類，配合 0.1% 活性碳與 7.5% 馬鈴薯的添加為最佳台灣白及無菌播種與培養之培養基。

關鍵詞：台灣白及、種子發芽、小苗發育、瓶內培養。

前 言

台灣白及 [*Bletilla formosana* (Hayata) Schltr.] 為台灣特有種之蘭科植物，分布於台灣全境之平地與高山地區，與中藥材所用之白及 [*B. striata* (Thunb) Reichb. f.] 為同屬異種，其塊莖亦可作為藥材使用，植株並兼具園藝觀賞

價值 (Na *et al.* 1978)。白及主要以分株法繁殖，繁殖速率緩慢，無法滿足規模化種植的需求 (Lin *et al.* 1994; Yang *et al.* 2002)，且以無性分株方式繁殖，種苗易受病毒感染，並有種性退化之缺點 (Yang *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2005)；此外因為白及原生地的減少與遭受破壞，使得台灣白及與中國大陸白及之野生族群

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2502 號。接受日期：100 年 3 月 31 日。

2. 本所生物技術組聘用助理研究員、助理研究員及副研究員。台灣 台中市。

3. 通訊作者，電子郵件：hsia@tari.gov.tw；傳真機：(04)23302806。

正在快速減少中 (Lin *et al.* 1994; Zhu & Wang 1999; Fu *et al.* 2006)，中國已將白及列為珍稀瀕危的保護植物 (Peng *et al.* 2004)，並開始以組織培養方式進行繁殖研究，成效相當良好 (Peng *et al.* 2004; Yang *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2005)。台灣白及在無菌播種方面早期有少量之研究，Lin *et al.* (1994) 指出台灣白及以胚發育期至魚雷前期 (torpedo) 之種子萌芽率最佳，並可利用雙氧水進行種子預措處理，達到提早發芽之效果。Yeh *et al.* (1995) 的研究則指出，MS (Musashiage & Skoog 1962) 基本鹽類及蔗糖為提供台灣白及原球體發育必要之營養成分，且經由 peptone、NAA 的添加以及配合光照處理可促進小苗之發育。台灣白及為台灣本土原生植物，可作為藥材及園藝觀賞之用，考量其野生族群正逐漸減少，值得吾人在種原保存及種苗繁殖方面加強研究開發。本研究以不同鹽類配方培養基配合活性碳、香蕉與馬鈴薯等蔬果有機物的添加，篩選出對於台灣白及無菌播種及瓶苗生長最佳之培養基組成，建立台灣白及組織培養大量繁殖體系。

材料與方法

試驗材料與消毒

本研究所使用之台灣白及採自宜蘭蘇花公路，由花蓮改良場蘭陽分場所提供。植株開花後以人工自花授粉，經 120 天後取尚未開裂之黃熟果莢作為無菌播種之用。果莢先以 70% 酒精進行表面消毒，再放入添加 Tween 20 展著劑之 0.6% 次氯酸鈉溶液中，以超音波震盪 1 分鐘，再以手搖震盪消毒 15 分鐘，其後以無菌水清洗 3 次，消毒後之果莢以解剖刀剖開後取出種子進行播種，並進行不同基本鹽類、添加 0.1% 活性碳之不同基本鹽類、香蕉有機添加物配合添加或不添加 0.1% 活性碳、馬鈴薯有機添加物配合添加或不添加 0.1% 活性碳對台灣白及種子發芽與小苗發育之影響等共 4 種試驗。

基本鹽類配方培養基之影響試驗設計

無菌播種所使用之培養基其基本鹽類配方分別為 Kundson (Knudson 1946)、VW (Vacin & Went 1949)、全量及半量 MS (Murashige & Skoog 1962) 以及花寶 1 號 (HYPONeX 7-6-19, USA) 共 5 種，為單因子試驗，各處理 5 重複，以探討不同基本鹽類對台灣白及種子發芽與小苗發育之影響，其中 VW 及 MS 為粉末商品 (Duchefa, Netherlands)。所有配方培養基皆添加 3% (30 g·L⁻¹) 蔗糖及 0.8% (8 g·L⁻¹) Bacto agar (Difco, USA)。

0.1% 活性碳添加之影響試驗設計

以上述培養基添加單一 0.1% (g·L⁻¹) 活性碳，採每一處理各 5 重複的單因子試驗，以探討活性碳的添加對台灣白及種子發芽與小苗發育之影響。

不同濃度之香蕉有機添加物配合添加或不添加 0.1% 活性碳之影響試驗設計

該二因子試驗是以上述 1/2 MS 鹽類配方培養基分別添加 2.5% (25 g·L⁻¹)、5.0% (50 g·L⁻¹)、7.5% (75 g·L⁻¹)、10% (100 g·L⁻¹) 之香蕉，並配合添加或不添加 0.1% 活性碳，每一處理組合各 5 重複，以探討培養基中不同濃度之香蕉添加物與 0.1% 活性碳對台灣白及種子發芽與小苗發育之影響。

不同濃度之馬鈴薯有機添加物配合添加或不添加 0.1% 活性碳之影響試驗設計

該二因子試驗是以上述 1/2 MS 鹽類配方培養基分別添加 2.5%、5.0%、7.5%、10% 之馬鈴薯，並配合添加或不添加 0.1% 活性碳，每一處理組合各 5 重複，以探討培養基中不同濃度之馬鈴薯添加物與 0.1% 活性碳對台灣白及種子發芽與小苗發育之影響。

台灣白及種子接種與培養環境

上述之培養基配製完成後將之 pH 皆調整至 5.6，再以 121°C 滅菌 20 分鐘。培養之試管

(25 mm × 150 mm) 每管置 10 mL 培養基，在消毒後擺成斜面冷卻備用。無菌播種以接種環沾取種子後，將種子平均散置於培養基表面，每支試管內大約接種 200–250 個種子。接種後置於 (25 ± 1)°C 恆溫、光照強度 38 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 及 14 小時光週期環境中培養。

台灣白及小苗發育時期區分與性狀調查

為評估上述各試驗的不同培養基處理對種子發芽與小苗發育之影響，調查時將小苗發育時期區分成 1 (原球體)、2 (第一片葉長出)、3 (第一片葉成熟長出第二片葉)、4 (第二片葉長大於 0.5 cm)、5 (第三片葉長大於 0.5 cm) 共 5 個時期，如圖 1 所示，於播種後 50 天進行發芽率、小苗發育時期與小苗鮮重等性狀調查。發芽率為每支試管中原球體 (含) 以上發育時期之總苗數除以播種種子數，單株鮮重為個別發育時期之小苗總重除以株數得到之平均鮮重。

統計分析

上述 4 種試驗所得資料均經 SAS 9.1.3 統計分析套裝軟體 (SAS Institute Inc. 2002) 進行變方分析 (ANOVA) 後，若處理間差異顯著，則再利用 least significant difference (LSD) 測驗比較各處理平均值間之個別差異性。

結 果

基本鹽類配方培養基之效果

自花授粉 120 天後之台灣白及果莢已呈黃熟狀態，在果莢消毒後將種子接種於不同鹽類配方培養基中，培養 8 天後即可觀察到種子發芽；播種後 20 天，不同配方培養基上之種子發芽率可達 100%，此時種子苗之第一片葉已長出；在培養 50 天後可見第三片葉長出，並伴隨著根長出。在 5 種鹽類配方培養基中，以 1/2 MS 培養基對促進小苗的發育效果最佳，小苗發育階段至第 4 和第 5 時期的合併比例共達 39.1%



圖 1. 台灣白及種子苗之不同發育時期。(A) 時期 1，原球體；(B) 時期 2，長出第一片葉；(C) 時期 3，第一片葉成熟長出第二片葉；(D) 時期 4，第二片葉大於 0.5 cm；(E) 時期 5，第二片葉成熟第三片葉大於 0.5 cm (Bar = 5 mm)。

Fig. 1. Stages of seedling developmental of *Bletilla formosana* in *in vitro* culture. (A) Stage 1, protocorm; (B) Stage 2, protocorm with 1st leaf; (C) Stage 3, formation of 2nd leaf < 0.5 cm in length; (D) Stage 4, formation of 2nd leaf > 0.5 cm in length; (E) Stage 5, formation of 3rd leaf > 0.5 cm in length. (Bar = 5 mm)

(表 1)，與其他處理呈顯著差異，而以 VW 培養基最差。比較種子苗之單株鮮重，各配方培養基中則以 MS 培養基最佳，其第 4 及第 5 發育期之單株鮮重分別為 12.2 mg 與 20.2 mg，其次為 1/2 MS 培養基之 10.7 mg 與 12.7 mg。

0.1% 活性碳添加對台灣白及發芽及苗期之效果

於不同鹽類配方之培養基中添加 0.1% 活性碳，在培養 50 天後各配方培養基中之種子發

芽率皆達 100%，顯示適量活性碳的添加不會影響種子的發芽。小苗的發育同樣以 1/2 MS 培養基為最佳，第 4 和第 5 發育時期的小苗合併比例為 46.2%；MS 鹽類培養基其次，合併比例亦達 38.6% (表 2)。以單株鮮重來看，1/2 MS 培養基與 MS 培養基中，第 5 發育時期之小苗單株鮮重分別為 20.0 mg 及 20.8 mg 同列最高，而以 VW 培養基之 7.4 mg 最差。與未添加活性碳之相同配方培養基相比 (表 1)，雖然發

表 1. 不同鹽類配方培養基對台灣白及無菌播種種子發芽與小苗發育之影響

Table 1. Effect of different basal salt media on *in vitro* seed germination and seedling development of *Bletilla formosana*

Basal salt formula ^z	Seed germination (%) ^y	% of seedling at various developmental stages ^x			Fresh weight of seedling at various developmental stages (mg/seedling)			
		1 + 2	3	4 + 5	2	3	4	5
HYPONeX	100 a ^w	66.5 ± 2.21 b	16.3 ± 1.87 b	17.2 ± 0.63 b	3.3 ± 0.14 bc	5.5 ± 0.32 b	7.8 ± 0.43 cd	10.5 ± 0.56 c
Kundson	98 a	67.4 ± 2.70 b	9.2 ± 0.96 c	21.4 ± 1.85 b	2.7 ± 0.13 cd	4.3 ± 0.28 c	8.5 ± 0.42 c	10.2 ± 0.83 c
VW	99 a	90.4 ± 0.72 a	1.8 ± 0.10 d	6.8 ± 0.69 c	4.3 ± 0.30 a	4.8 ± 0.40 bc	7.0 ± 0.48 d	10.2 ± 0.45 c
1/2 MS	100 a	38.1 ± 1.57 c	22.9 ± 2.51 a	39.1 ± 3.60 a	3.7 ± 0.24 ab	7.7 ± 0.42 a	10.7 ± 0.51 b	12.7 ± 0.46 b
MS	100 a	72.0 ± 4.84 b	12.5 ± 2.67 bc	15.5 ± 2.24 b	2.4 ± 0.17 d	7.0 ± 0.30 a	12.2 ± 0.28 a	20.2 ± 0.38 a

^z Bacto agar (0.8%) and sucrose (3%) were used to prepare basal salt media, using the formula of HYPONeX 7-6-19 (HYPONEX, USA), Kundson (Duchefa, Netherlands), VW (Duchefa, Netherlands), 1/2 MS (Duchefa, Netherlands), or MS (Duchefa, Netherlands).

^y Seed germination was recorded at 50 days after sowing.

^x Refer to Figure 1 for development stages of plants.

^w Means ± standard error (n = 5). Means within each column followed by with the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

表 2. 含有 0.1% 活性碳之不同鹽類配方培養基對無菌播種之台灣白及種子發芽與小苗發育之影響

Table 2. Effect of basal salt media amended with 0.1% charcoal on *in vitro* seed germination and seedling development of *Bletilla formosana*

Basal salt formula ^z	Seed germination (%) ^y	% of seedling at various developmental stages ^x			Fresh weight of seedling at various developmental stages (mg/seedling)			
		1 + 2	3	4 + 5	2	3	4	5
HYPONeX	100 a ^w	69.7 ± 3.65 b	0.7 ± 0.27 b	29.6 ± 3.69 c	1.8 ± 0.14 c	3.6 ± 0.26 c	7.4 ± 0.43 c	14.7 ± 0.45 b
Kundson	100 a	61.2 ± 3.04 b	20.3 ± 1.95 a	18.5 ± 1.31 d	3.4 ± 0.17 b	7.1 ± 0.27 b	11.4 ± 0.43 a	13.8 ± 0.52 b
VW	100 a	79.7 ± 2.08 a	4.1 ± 0.60 b	16.2 ± 1.64 d	2.8 ± 0.14 b	3.4 ± 0.19 c	3.8 ± 0.26 d	7.4 ± 0.20 c
1/2 MS	100 a	29.9 ± 3.98 c	23.9 ± 1.67 a	46.2 ± 2.33 a	5.9 ± 0.46 a	6.8 ± 0.35 b	9.9 ± 0.31 b	20.0 ± 0.72 a
MS	100 a	38.9 ± 1.25 c	22.3 ± 2.10 a	38.6 ± 1.23 b	5.8 ± 0.33 a	9.2 ± 0.51 a	10.5 ± 0.56ab	20.8 ± 0.51 a

^z Bacto agar (0.8%) and sucrose (3%) were used to prepare basal salt media, using the formula of HYPONeX 7-6-19 (HYPONEX, USA), Kundson (Duchefa, Netherlands), VW (Duchefa, Netherlands), 1/2 MS (Duchefa, Netherlands), or MS (Duchefa, Netherlands).

^y Seed germination was recorded at 50 days after sowing.

^x Refer to Figure 1 for development stages of plants.

^w Means ± standard error (n = 5). Means within each column followed by with the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

芽率相似，但添加活性碳有助於小苗之分化，於第 4 及第 5 發育期之小苗有較高的比例。在鮮重方面，以第 5 發育期來看，除 VW 及 MS 培養基外，各鹽類配方在添加 0.1% 活性碳後之單株鮮重皆有增加。

不同濃度之香蕉有機添加物配合添加或不添加 0.1% 活性碳之效果

由於 1/2 MS 鹽類培養基對台灣白及小苗發育之促進效果較其他鹽類配方為佳 (表 1)，因此以 1/2 MS 鹽類配方為基本培養基，除添加 2.5–10% 之 4 種不同含量的香蕉外，並同時比較 0.1% 活性碳添加對種子發芽及發育之影響。結果如表 3 所示，在培養基中添加香蕉並不會影響種子發芽，種子發芽率仍可達 100%。香蕉含量與活性碳之添加對小苗的發育存在極顯著交感作用，但無論添加或未添加活性碳皆以含 2.5% 香蕉之培養基於第 4 及第 5 發育期具有較高比例之小苗 (28.3%) (表 3)，但與未添加

香蕉之 1/2 MS 培養基相較 (表 1、2)，添加香蕉後對小苗發育之表現較差 (表 3)。而培養基隨著香蕉含量的增加，對小苗發育有不良影響，含 10% 高濃度香蕉之培養基若未添加 0.1% 的活性碳，小苗發育大多停於第 1 及 2 發育時期 (表 3)，且大部分已發芽之種子無法長成完整之植株 (圖 2)。香蕉含量與活性碳添加除第 3 發育時期外，其他發育時期對小苗鮮重皆存在極顯著交感作用，培養基中添加香蕉雖然對小苗的鮮重有增加的作用，但除 2.5% 香蕉外，提高香蕉濃度之增重效果必須配合活性碳的添加 (表 3)。

不同濃度之馬鈴薯有機添加物配合添加或不添加 0.1% 活性碳之效果

將上述試驗以馬鈴薯代替香蕉添加於播種培養基中，結果顯示馬鈴薯的添加不會影響種子發芽，種子發芽率皆可達 100%。不同濃度馬鈴薯與添加活性碳對台灣白及種子發芽與小

表 3. 1/2 MS 基本鹽類培養基添加 0.1% 活性碳與不同含量香蕉泥對無菌播種之台灣白及種子發芽與小苗發育之影響

Table 3. Effect of charcoal and banana homogenates in 1/2 MS medium on *in vitro* seed germination and seedling development of *Bletilla formosana*

Charcoal (%) ^z	Banana homogenate (%) ^z	Seed germination (%) ^y	% of seedling at various developmental stages ^x			Fresh weight of seedling at various developmental stages (mg/seedling)			
			1+2	3	4+5	2	3	4	5
0.0	2.5	100 a	36.9 ± 1.93 d	37.7 ± 1.69 b	25.4 ± 1.05 a	6.2 ± 0.40 a	7.3 ± 0.45 b	11.7 ± 0.22 cd	25.0 ± 0.25 c
0.1	2.5	100 a	40.7 ± 1.17 d	31.0 ± 2.60 c	28.3 ± 1.98 a	5.9 ± 0.47 a	9.2 ± 0.36 a	10.8 ± 0.56 d	21.1 ± 0.45 d
0.0	5.0	100 a	35.0 ± 1.64 d	45.7 ± 1.41 a	19.3 ± 1.66 b	2.7 ± 0.17 de	3.3 ± 0.18 e	7.8 ± 0.30 e	14.5 ± 0.36 e
0.1	5.0	100 a	58.6 ± 3.09 c	23.7 ± 1.73 d	17.7 ± 1.72 b	4.7 ± 0.23 b	7.6 ± 0.38 b	12.8 ± 0.40 c	24.9 ± 0.41 c
0.0	7.5	100 a	70.4 ± 2.87 b	14.7 ± 1.48 e	14.9 ± 1.65 b	2.4 ± 0.17 e	4.3 ± 0.23 d	6.2 ± 0.30 f	13.6 ± 0.26 e
0.1	7.5	100 a	74.5 ± 0.95 b	6.4 ± 0.56 f	19.1 ± 1.42 b	3.4 ± 0.22 cd	9.1 ± 0.32 a	17.3 ± 0.50 a	26.0 ± 0.31 b
0.0	10.0	98 a	92.1 ± 0.94 a	5.9 ± 0.74 f	0.0 ± 0.00 c	4.6 ± 0.21 b	5.5 ± 0.29 c	— ^w	—
0.1	10.0	100 a	74.2 ± 1.83 b	11.2 ± 0.81 e	14.6 ± 1.12 b	4.2 ± 0.17 bc	8.9 ± 0.37 a	15.4 ± 0.44 b	28.6 ± 0.53 a
Significance									
Charcoal (C)		NS ^v	**	**	NS	NS	**	**	**
Banana (B)		NS	**	**	**	**	**	NS	NS
C × B		NS	**	**	**	**	NS	**	*

^z Charcoal and banana homogenates were added to the medium containing 0.8% bacto agar, 3% sucrose and 1/2 MS (Duchefa, Netherlands).

^y Seed germination was recorded at 50 days after sowing.

^x Refer to Figure 1 for development stages of plants.

^w No seedling.

^v NS = Non-significant; * = significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

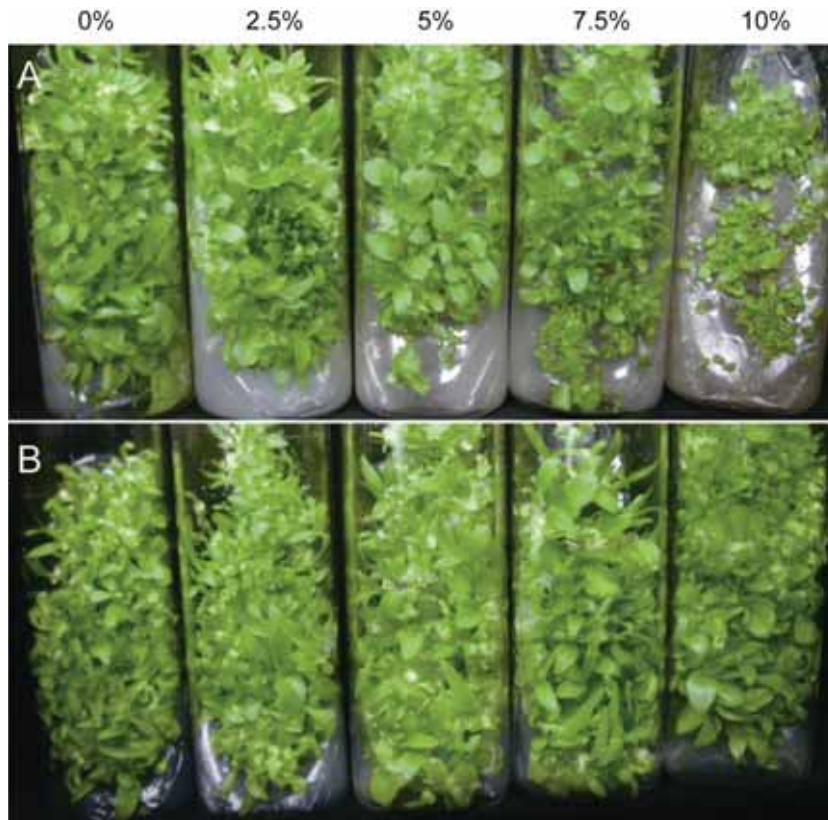


圖 2. 台灣白及於不同含量香蕉之 1/2 MS 基本鹽類培養基 (A) 未添加或 (B) 添加 0.1% 活性碳，培養 50 天之種子發芽與小苗發育情形。圖中試管由左至右香蕉之含量分別為 0%、2.5%、5.0%、7.5% 及 10.0%。小苗於 (B) 添加與 (A) 未添加 0.1% 活性碳培養基中顏色有所差異。

Fig. 2. Seedlings of *Bletilla formosana* in 1/2 MS basal salt medium containing banana homogenates without (A) or with (B) 0.1% charcoal for 50 days. Left to right: Concentrations of banana homogenates in the medium, 0% (left tube), 2.5%, 5.0%, 7.5% and 10% (right tube). Note differences in color of seedlings between the treatments of 0.1% charcoal (B) and the treatments without charcoal (A).

苗發育皆存在極顯著交感作用 (表 4)，其中以含有 7.5% 馬鈴薯與 0.1% 活性碳組合的培養基為最佳，於第 4 及第 5 發育時期的小苗比例達 67.2%，第 5 發育時期的小苗之平均單株鮮重可達 26 mg；但若僅以鮮重來看，則以 5.0% 馬鈴薯並添加 0.1% 活性碳之培養基的 30.7 mg 為最高。各濃度之馬鈴薯配合活性碳添加對小苗發育及重量均有促進效果，但相對於不含馬鈴薯及活性碳之培養基 (表 1)，高濃度馬鈴薯

(7.5%、10%) 培養基之小苗生長不受抑制，皆可長成完整植株 (圖 3)。

討 論

蘭科植物之種子非常小，胚分化只達圓球胚階段 (globular embryo stage)，不含胚乳，沒有子葉、胚根、胚芽等養分儲藏器官，需經由外在之環境供應充足的養分 (蘭菌共生或無菌播種培養基) 方能順利萌發長大 (Arditti 1967;

Lee 1990)。蘭科植物種子成熟度亦影響其種子的萌芽能力，不同蘭屬間其最佳果莢採收時間有所差異，在蝴蝶蘭白花雜交種的研究顯示，授粉後 110 天採收之果莢在播種後 10 天即可發芽，若延至果莢黃熟甚至開裂才行播種，亦不影響種子萌芽能力及原球體發育 (Tu & Lee 1987)；但在萬代蘭 (Mathews & Rao 1980)、喜普鞋蘭 *Cypripedium* (Harvais 1980)、台灣白及 (Lin *et al.* 1994) 等蘭屬的研究則顯示，於黃熟期採收之果莢播種後，種子不發芽或發芽率不佳，甚至影響小苗之生長，可能原因為種子成熟後抑制物質之形成，進而影響種子發芽與生長。在白及屬的研究顯示，其種子在胚接近成熟時播種發芽率最高 (Nagashima 1982)；Lin *et al.* (1994) 則認為台灣白及以發育至魚雷期之種子萌芽率與小苗生長為最佳，而黃熟果莢之種子則無法發芽。在本試驗中採用授粉 120 天尚未開裂之黃熟台灣白及果莢播種，在各種不同配方基本鹽類之培養基中，其發芽率皆可達

100%，且小苗順利發育與生長，另以已開裂之果莢進行播種，亦有良好之發芽率 (資料未顯示)，此結果較相似於 Nagashima (1982) 之研究，而與 Lin *et al.* (1994) 的結果有所差異。在種子成熟度的影響方面，在 Lin *et al.* (1994) 的研究中指出黃熟尚未開裂之台灣白及種子無法萌芽，本試驗使用黃熟尚未開裂之台灣白及果莢於不同鹽類之培養基進行無菌播種，於播種後 8 天即可見種子發芽，20 天後萌芽率達 100%，種子萌芽與小苗生長速度較 Lin *et al.* (1994) 與 Yeh *et al.* (1995) 之觀察快速，可能與材料來源與無菌播種過程不同而有所差異，因此，在本試驗中，推測授粉後 120 天之台灣白及果莢成熟度應該適合於無菌播種之用。此外，我們利用室溫下已開裂 2 週果莢之種子進行無菌播種，發現其種子仍具有良好之發芽能力 (資料未顯示)，推測一個具有良好結實率之台灣白及果莢其發芽適期應有相當的時間範圍，在不同的發芽培養基中亦有相當的適應性。

表 4. 1/2 MS 基本鹽類培養基添加 0.1% 活性碳與不同含量馬鈴薯泥對台灣白及種子發芽與小苗發育之影響

Table 4. Effect of charcoal and potato homogenates in 1/2 MS medium on *in vitro* seed germination and seedling development of *Bletilla formosana*

Charcoal (%) ^z	Potato homogenate (%) ^z	Seed germination (%) ^y	% of seedling at various developmental stages ^x			Fresh weight of seedling at various developmental stages (mg/seedling)			
			1+2	3	4+5	2	3	4	5
0.0	2.5	100 a	22.2 ± 1.18 c	35.6 ± 1.59 ab	42.2 ± 1.21 e	5.1 ± 0.23 b	4.2 ± 0.33 d	6.2 ± 0.31 e	11.0 ± 0.30 e
0.1	2.5	100 a	26.0 ± 1.36 c	20.4 ± 0.77 d	53.7 ± 2.01 c	5.8 ± 0.17 a	11.5 ± 0.25 a	12.8 ± 0.36 c	24.7 ± 0.85 b
0.0	5.0	100 a	13.8 ± 1.00 d	26.0 ± 1.44 d	60.2 ± 2.40 b	6.3 ± 0.23 a	6.6 ± 0.43 c	10.1 ± 0.51 d	15.1 ± 0.29 d
0.1	5.0	100 a	10.1 ± 1.11 d	39.6 ± 2.47 a	50.3 ± 2.39 cd	4.1 ± 0.34 c	7.1 ± 0.45 c	15.1 ± 0.67 b	30.7 ± 0.56 a
0.0	7.5	100 a	61.1 ± 0.54 a	11.4 ± 0.59 e	27.5 ± 0.70 f	2.7 ± 0.09 d	4.3 ± 0.33 d	6.9 ± 0.37 e	14.9 ± 0.36 d
0.1	7.5	100 a	0.0 ± 0.00 e	32.8 ± 2.13 c	67.2 ± 2.13 a	- ^w	10.3 ± 0.52 b	16.3 ± 0.33 a	26.1 ± 0.63 b
0.0	10.0	100 a	57.6 ± 2.82 a	18.9 ± 1.19 d	23.5 ± 2.76 f	2.5 ± 0.17 d	4.5 ± 0.21 d	9.5 ± 0.29 d	17.5 ± 0.24 c
0.1	10.0	100 a	44.1 ± 1.87 b	12.0 ± 0.71 e	43.9 ± 2.44 de	4.0 ± 0.34 c	6.7 ± 0.41 c	13.1 ± 0.42 c	25.5 ± 0.34 b
Significance									
Charcoal (C)		NS ^v	**	**	**	**	**	**	**
Potato (P)		NS	**	**	**	**	**	**	**
C × P		NS	**	**	**	**	**	**	**

^z Charcoal and potato homogenates were added to the medium containing 0.8% bacto agar, 3% sucrose and 1/2 MS (Duchefa, Netherlands).

^y Seed germination was recorded at 50 days after sowing.

^x Refer to Figure 1 for development stages of plants.

^w No seedling.

^v NS = Non-significant; *, ** = significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

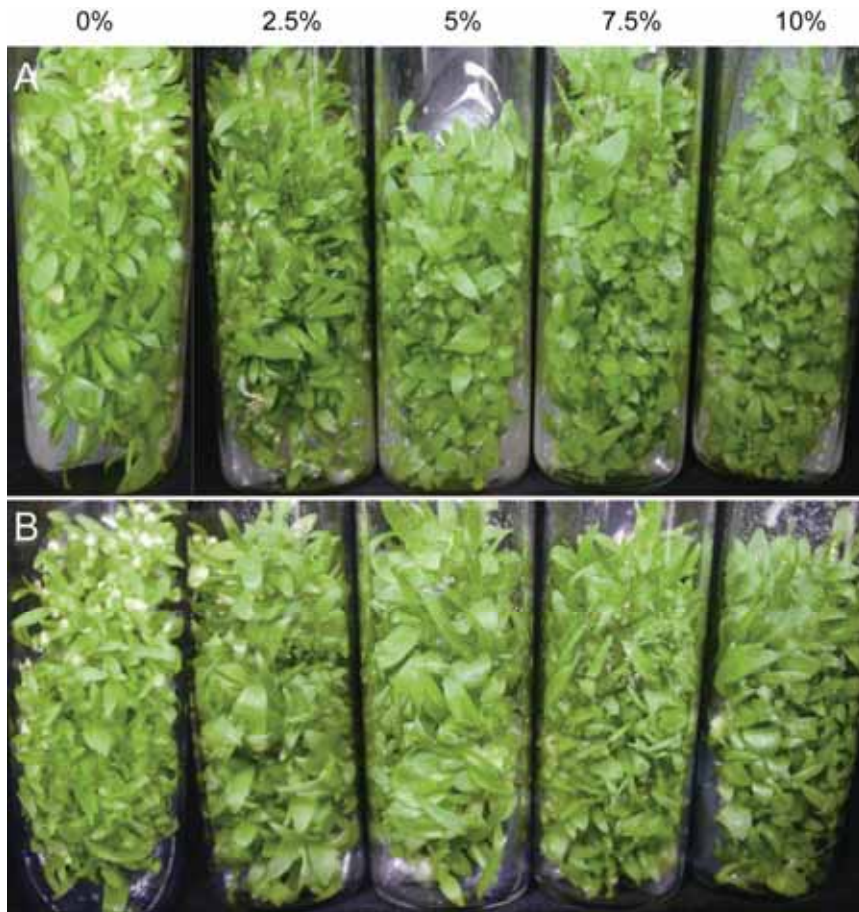


圖 3. 台灣白及於不同含量馬鈴薯之 1/2 MS 基本鹽類培養基 (A) 未添加或 (B) 添加 0.1% 活性碳培養 50 天之種子發芽與小苗發育情形。圖中試管由左至右馬鈴薯之含量分別為 2.5%、5.0%、7.5% 及 10.0%。小苗於 (B) 添加與 (A) 未添加 0.1% 活性碳培養基中顏色有所差異。

Fig. 3. Seedlings of *Bletilla formosana* in 1/2 MS basal salt medium containing potato homogenates without (A) or with (B) 0.1% charcoal for 50 days. Left to right: Concentrations of potato homogenates in the medium, 0% (left tube), 2.5%, 5.0%, 7.5% and 10% (right tube). Note differences in color of seedlings between the treatments of 0.1% charcoal (B) and the treatments without charcoal (A).

MS 培養基配方之總離子濃度為 93.8 mM，1/2 MS 培養基之總離子濃度為 46.9 mM (Tu & Lee 1988)，Kundson (Knudson 1946) 與 VW (Vacin & Went 1949) 配方總離子濃度約為 30 mM (Lo *et al.* 2008)，花寶 1 號 (HYPONeX 7-6-19) 為商業生產之複合肥料，其總 N% 較上述鹽類培養基均低 (Tu & Lee 1988)。Lin *et al.*

(1994) 的研究指出，MS 基本鹽類及蔗糖是台灣白及原球體發育成小苗之必要營養成分，2 倍量之 MS 基本鹽類則會產生傷害 (總離子濃度達 187.6 mM)，使小苗表皮皺縮變形且抑制生長。根據 Ichihashi (1979) 的研究顯示，認為總離子濃度在 60 mM 時較有利於白及地上部生長。在本研究中台灣白及於 MS、1/2 MS、

Kundson、VW 及花寶 1 號鹽類配方培養基中，種子發芽率皆可達 100%，且小苗可順利發育，五種鹽類配方培養基中以 1/2 MS 小苗發育為最佳 (表 1)，因此，在白及屬相較於其他蘭科植物，種子發芽與小苗發育對鹽類濃度之適應較廣，降低鹽類濃度應有利於種子發芽與小苗生長 (Arditti 1967; Ichihashi 1979; Tu & Lee 1988; Lu & Lee 1990; Wu & Lee 1991)。

在蘭科植物的無菌播種及離體培養中常添加活性碳，因其具有吸附酚類化合物、抑制過氧化酵素活性、降低褐化率、促進芽、根與植株生長、型態發生等複雜之功效 (Tisserate 1979; Patel & Thorpe 1984; Pan & Staden 1998)，在本試驗中，於不同鹽類配方培養基中添加 0.1% 的活性碳，對種子的發芽沒有並無不良之影響，且活性碳的添加可促進小苗發育與生長 (表 2-4 及圖 2)。Ernst (1975) 的研究亦顯示，活性碳的添加對蘭科植物沒有不良影響，但 Van (1987) 對於倒距蘭屬 *Anacamptis pyramidalis* 等 18 種歐洲蘭科植物的研究卻顯示，活性碳的添加會降低其種子發芽率與抑制小苗發育，而 Lin *et al.* (1994) 的研究指出 0.1-0.3% 之活性碳適合台灣白及種子發芽與生長，但 0.5% 以上活性碳的添加則降低種子發芽率與抑制小苗生長與發育。在本試驗中，以 0.1% 活性碳添加於不同鹽類配方培養基中，結果顯示小苗生長較為快速，單株鮮重亦有增加，對台灣白及無菌播種小苗之生長發育具有促進之效果，但受有機物影響，這一點在香蕉、馬鈴薯添加試驗中，活性碳與這二種有機添加物間均有顯著之交感效應可以印證。

在蘭花的組織培養中，培養基除了基本的鹽類之外，常另行添加蔬果汁促進小苗之發育 (Arditti 1967)，其中香蕉與馬鈴薯為較常用之蔬果添加物，在幾種蘭科植物的研究顯示，於培養基中添加適量的香蕉 (6-10%) 或馬鈴薯 (2-4%)，對於小苗發育、生長與鮮重的提升都

具有良好效果 (Lo *et al.* 2004; Shiau *et al.* 2005; Yan *et al.* 2006)；在台灣一葉蘭的研究亦顯示，培養基中香蕉含量達 150 g·L⁻¹ 時，種子發芽率降低 (Juang & Lee 1986)。在本試驗中使用 2.5-10% 香蕉 (表 3) 與馬鈴薯 (表 4) 的添加並不會影響台灣白及種子的發芽，但香蕉的含量顯著影響小苗之生長與發育 (表 3)，使用量達 10% 時，對小苗生長會產生抑制作用。但馬鈴薯的添加對小苗的生長與發育則有促進之效果 (表 4)，其中以含有 7.5% 馬鈴薯與 0.1% 活性碳之培養基對台灣白及之小苗生長促進效果最佳，在培養 50 天後，第 4 及第 5 發育期小苗率達 67.2%，發育 5 期之小苗平均鮮重達到 26.1 mg。於 Lin *et al.* (1994) 與 Yeh *et al.* (1995) 對台灣白及無菌播種的研究中除了進行不同 MS 鹽類、蔗糖、活性碳濃度、果莢成熟度之處理外，並未進行蔬果添加物對台灣白及種子發芽與小苗生長發育影響之探討，本研究中台灣白及種子發芽與小苗生長皆較上述學者研究結果 (培養 135 天) 的快速，除與種子之成熟度有關外，應與播種培養基的鹽類濃度以及適當之有機添加物促進小苗發育有關。

本研究藉由已知培養基配方的篩選，配合適當濃度之蔬果添加物及活性碳添加，利用於台灣白及之無菌播種，不但種子之發芽率高，且能加速小苗之發育與提高瓶苗之品質，提升了台灣白及無菌播種繁殖體系之效率，此繁殖系統可提供大量優良之台灣白及種苗作為生產藥材或為園藝資源之所需。

引用文獻 (Literature cited)

- Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Bot. Rev.* 33:1-97.
- Duan, J. X. and S. Yazawa. 1995. Floral induction and development in *Phalaenopsis* in vitro. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 43:71-74.
- Ernst, R. 1975. Studies in asymbiotic culture of orchid. *Amer. Orchid Soc. Cult.* 44:12-18.
- Fu, Z. H., J. X. Zhang, H. L. Li, and B. Yang. 2006. Study

- on seed germination and rapid propagation of *Bletilla striata* Rchb. f. J. Wuhan. Bot. Res. 24:80–82. (in Chinese with English abstract)
- Harvais, G. 1980. Scientific notes on a *Cypripedium regina* of northwestern Ontario, Canada. Amer. Orchid Soc. Bull. 49:237–244.
- Ichihashi, S. 1979. Study on the media for orchid seed germination. III. The effect of total ionic concentration, cation/anion ratio, $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratio, and minor elements on the growth of *Bletilla striata*. New Phytol. 83:121–128.
- Juang, J. H. and N. Lee. 1986. Effect of niacin, coconut milk and banana homogenate on seed germination and seedling growth of *Pleione formosana*. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 32:132–138. (in Chinese with English abstract)
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for orchid seed germination. Amer. Orchid Soc. Bull. 15:214–217.
- Lee. 1990. Embryo culture of orchids. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 36:223–244. (in Chinese with English abstract)
- Lin, Y. J., C. C. Chuan, F. T. Yeh, N. Y. Chiu, and H. S. Tsay. 1994. Tissue culture of *Bletilla formosana* I. The influence of seed maturity and pretreatment on seed germination and seedling development. J. Agric. Res. China 43:40–50. (in Chinese with English abstract)
- Lo, S. F., S. M. Nalawade, C. L. Kuo, C. L. Chen, and H. S. Tsay. 2004. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* makino-A medicinally important orchid. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 40:528–535.
- Lo, S. F., C. L. Kuo, C. L. Chen, and H. S. Tsay. 2008. *In vitro* seed germination and mass propagation of *Dendrobium moniliforme*, a native species in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 57:295–304. (in Chinese with English abstract)
- Lu, I. L. and N. Lee. 1990. *In vitro* germination of *Cymbidium Dayanum*. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 36:198–209. (in Chinese with English abstract)
- Mathews, V. H. and P. S. Rao. 1980. *In vitro* multiplication of *Vanda* hybrids through tissue culture technique. Plant Sci. Lett. 17:383–389.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with *tobacco* tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473–491.
- Na, C., W. S. Kan, N. Y. Chiu, and R. J. Yang. 1978. Pharmacognostical researches on *Bletillae* tuber Pai-Chi. China Med. Coll. Annu. Bull. 9:454–467. (in Chinese with English abstract)
- Nagashima, T. 1982. Studies on the seed germination and embryogenesis in the *Bletilla striata* Rchb. f. and *Calanthe discolor* Lindl. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 51:82–93. (in Chinese with English abstract)
- Pan, M. J. and J. V. Staden. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture-A review. *Plant Growth Regul.* 26:155–163.
- Patel, K. R. and T. A. Thorpe. 1984. *In vitro* differentiation of plantlets from embryonic explants of lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl. ex Loud). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 3:131–142.
- Peng, L., X. D. Liu, H. Liu, and X. W. Liu. 2004. Tissue culture and rapid propagation of *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f. Chinese Wild Plant Resources 23:65. (in Chinese with English abstract)
- Shiau, Y. J., S. R. Yang, U. C. Chen, C. N. Hsia, and H. S. Tsay. Effect of Vegetable and fruit homogenates on seedling development of *Dendrobium moniliforme* (L.) sweet culture *in vitro*. J. Agric. Res. China 54:23–31. (in Chinese with English abstract)
- Tisserat, B. 1979. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. J. Exp. Bot. 30:1275–1283.
- Tu, M. C. and N. Lee. 1987. Effect of pollination time and capsule maturity on seed germination in *Phalaenopsis* white hybrid. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 33:190–200. (in Chinese with English abstract)
- Tu, M. C. and N. Lee. 1988. Effect of nitrogen, sucrose concentration and light intensity on seed germination and seedling growth in *Phalaenopsis* white hybrid. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 34:293–302. (in Chinese with English abstract)
- Vacin, E. F. and F. W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 110:605–613.
- Van, W. J. 1987. Effect of activated charcoal on *in vitro* propagation of Western European orchid. Acta Hort. 212:131–138.
- Wu, S. C. and N. Lee. 1991. *In vitro* seed germination of *Phaius tankervilleae*. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 37:183–188. (in Chinese with English abstract)
- Yan, N., H. Hu, J. L. Huang, K. Xu, H. Wang, and Z. K. Zhou. 2006. Micropropagation of *Cypripedium flavum* through multiple shoots of seedlings

- derived from mature seeds. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 84:113–117.
- Yang, J. H., Q. J. Meng, J. D. Li, and H. T. Wu. 2002. Rapid propagation of *Bletilla striata* Reich b. f. by tissue culture. *Shandong Sci.* 15:13–16. (in Chinese with English abstract)
- Yeh, F. T., Y. C. Lin, C. C. Chen, N. Y. Chiu, and H. S. Tsay. 1995. Tissue culture of *Bletilla formosana* II. The influence of medium components on immature seed germination and seeding development. *J. Agric. Res. China* 5:353–363. (in Chinese with English abstract)
- Zhu, Y. Q. and X. G. Wang. 1999. Fast propagation techniques of *Bletilla ochracea* by means of tissue cultures. *J. Zhejiang For. Coll.* 16:164–169. (in Chinese with English abstract)
- Zhang, J. X., Z. H. Fu, H. L. Li, and B. Yang. 2005. Relationship between embryo growth and seeds sprouting of *Bletilla striata*. *Subtrop. Plant Sci.* 34:32–35. (in Chinese with English abstract)

Effect of Basal Salts, Active Charcoal, and Vegetable/Fruit Homogenates on Seed Germination and Seedling Development *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr in *In Vitro* Culture¹

Chin-Yi Tsao², Uei-Chern Chen², and Chi-Ni Hsia^{2,3}

Abstract

Tsao, C. Y., U. C. Chen, and C. N. Hsia. 2010. Effect of basal salts, active charcoal, and vegetable/fruit homogenates on seed germination and seedling development *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr in *in vitro* culture. J. Taiwan Agric. Res. 60:77–88.

This study was conducted to determine effect to basal salts, active charcoal and vegetable/fruit homogenates on seed germination and seedling development of *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr in *in vitro* culture. Bacto agar (0.8%) and sucrose (3%) were used to prepare the five culture media, using reported basal formulations of Knudson (Knudson 1946), VW (Vacin & Went 1949), MS (Murashige & Skoog 1962), 1/2 MS, or HYPONeX 7-6-19. Results showed that seeds of *B. formosana* were all germinated on these basal salt media after incubation at ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) for 8 days. Among the five basal salt media tested, the medium containing 1/2 MS was the best treatment for development and growth of seedling of *B. formosana*. Adding 0.1% active charcoal to each of the five basal salt media had no significant ($P > 0.05$) effects on seed germination as all the seeds germinated on each medium after incubation at ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) for 50 days. Fresh weight of 50-day-old seedling was 20.0 mg/plant for the treatment of 1/2 MS + active carbon and 20.8 mg/plant for MS + active charcoal but it was only 7.4 mg/plant for the treatment of VW + active charcoal. Adding banana or potato homogenates (at 2.5, 5.0, 7.5, 10%) to the medium containing 1/2 MS, with or without 0.1% active charcoal, had no negative effect on seed germination. Although both banana and potato substrates in the medium caused an increase in fresh weight of seedlings, the potato substrate was superior to the banana substrate for seedling development. This study suggests that the medium containing 1/2 MS salts, 0.1% active charcoal and 7.5% potato substrate is the best for seed germination and seedling development of *B. formosana* under aseptic conditions.

Key words: *Bletilla formosana*, Seed germination, Seedling development, *In vitro* culture.

-
1. Contribution No. 2502 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: March 31, 2011.
 2. Respectively, Assistant Researcher, Assistant Researcher, and Associate Researcher, Biotechnology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Corresponding author, e-mail: hsia@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04)23302806.

感染百子蓮之 *Nerine virus X* 病毒之血清學與分子生物學鑑定及其檢測技術之建立¹

江芬蘭^{2,4} 張清安^{3,4} 鄭櫻慧² 陳金枝^{2,5}

摘要

江芬蘭、張清安、鄭櫻慧、陳金枝。2011。感染百子蓮之 *Nerine virus X* 病毒之血清學與分子生物學鑑定及其檢測技術之建立。台灣農業研究 60:89-100。

本研究於梅峰地區採集獲得葉片呈現黃綠斑駁病徵之百子蓮植株，取其葉片接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.)，經連續 3 次單斑接種後獲得一分離株 (AL-1)。將 AL-1 回接於百子蓮實生苗植株亦可造成與田間病株類似之斑駁病徵。以接種 AL-1 之奎藜葉片為材料，利用高低速交替及硫酸鈉等密度平衡離心進行病毒純化，純化試料經電子顯微鏡觀察，病毒顆粒為絲狀，長度預估約 508 nm。純化病毒經 SDS-PAGE 電泳分析顯示其鞘蛋白乃由單一種蛋白質基本單位 (protein subunit) 所構成，分子量估算為 25 kDa。將純化之 AL-1 病毒顆粒注射於白兔後所製備之多元抗體於 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)、SDS-免疫擴散反應 (SDS-immunodiffusion test) 及西方轉漬法反應中，可與同源之純化病毒抗原及百子蓮罹病株發生反應。以萃取自接種 AL-1 之奎藜病葉之全量核酸為模版，利用數組本研究所設計之引子對分別進行病毒全長度基因體之 RT-PCR 核酸增幅與選殖，定序結果確認 AL-1 分離株之全長基因體約由 6577 個核苷酸所組成 (不包含 polyA)，內含 5 個轉譯架構 (ORF 1-5) 分別對應 5 種基因產物。其中 ORF 2-3 含有彼此重疊之序列，此等基因體結構與已知之 *Potexvirus* 屬病毒相同。經比對 GenBank 上已登錄之其他 10 種 potexviruses 全長基因體序列後顯示，AL-1 基因體之核苷酸與胺基酸序列均與 *Nerine virus X* (NVX) 最為相近，相同度高達 93% 以上。針對 AL-1 之 ORF1 及鞘蛋白基因所分別設計之二種引子對，均可以專一性地檢測出 AL-1。基於前述 AL-1 分離株之生物特性、血清學以及全長度基因體之分析結果，證實本研究於呈現黃綠條紋及斑駁病徵之百子蓮所分離之病毒應為 NVX 病毒之一個系統，此乃 NVX 於台灣發生之首度報導。

關鍵詞：百子蓮、病毒病、*Nerine virus X* 病毒、多元抗體、全長基因體、RT-PCR 檢測。

-
1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2505 號。接受日期：100 年 4 月 19 日。
 2. 本所植物病理組研究助理、副研究員、助理研究員。台灣 台中市。
 3. 朝陽科技大學生化科技研究所教授兼所長。台灣 台中市。
 4. 江芬蘭及張清安於本研究報告同為第一作者之貢獻度。
 5. 通訊作者，電子郵件：chinzue@tari.gov.tw；傳真機：(04)23302803。

前 言

百子蓮 (*Agapanthus africanus* L.) 又名愛情花，為石蒜科百子蓮屬多年生草本植物，原產南非，可生產切花亦可供盆栽及花壇觀賞，近年來逐漸受到消費者青睞，栽培面積有增加趨勢。感染百子蓮的病毒目前已知僅有 *Nerine virus* X (NVX)，病毒引起褪綠條斑病徵 (Fuji *et al.* 2006)。NVX 為 *Potexvirus* 屬成員之一，病毒顆粒體為絲狀，平均長度約 540 nm (Phillips & Brunt 1980)。NVX 首次於荷蘭被發現可感染根希百合 (又稱報春花，*Nerine sarniensis*) (Hakkaart *et al.* 1975; Maat 1976)，隨後在英國被發現可自然感染早花百子蓮 (*Agapanthus praecox* subsp. *orientalis*) (Phillips & Brunt 1980)。

目前已報導 NVX 可感染的寄主包括百子蓮以及根希百合 (Phillips & Brunt 1980; Brunt 1995)，寄主範圍包括蔥科 (Alliaceae)、莧科 (Amaranthaceae)、石蒜科 (Amaryllidaceae)、藜科 (Chenopodiaceae) 及番杏科 (Tetragoniaceae) 等 (Phillips & Brunt 1980)。

關於 NVX 病毒之研究，以往報告僅有其病毒基本特性以及血清製備等基礎資料 (Phillips & Brunt 1980)，及至 2006 年日本學者 Fuji *et al.* 發表發生於百子蓮上之 NVX 病毒全長度基因體序列 (Fuji *et al.* 2006)，才更進一步依據分子生物學之特性確立此病毒與其他 potexviruses 之差異，使得對於此病毒之分類地位有更完備之記錄。本研究於國內之梅峰地區所採得之百子蓮罹病株，也證實於台灣所種植之百子蓮有 NVX 之發生。本研究針對此病毒分離株之病毒純化、抗血清製備以及其血清檢測技術之實用性評估、全長度基因體之選殖與定序、分子特性解析、以及專一性引子對應用於病毒核酸檢測等方面有更詳盡之研究。

材料與方法

材料來源、保存方法與接種試驗

本研究於 2004 年自位於南投縣之梅峰地區，採得葉片出現黃綠條紋及斑駁病徵之百子蓮植株為材料，取病葉切成約 1 cm 正方形小組織塊，浸漬於 50% glycerol 溶液中並保存於 -20°C，作為長期保存材料。接種時將罹病葉以 0.05 M 之磷酸鉀緩衝液 (potassium phosphate buffer, pH 7.5)，以 1:10 (g/mL) 比例研磨成汁液，利用汁液機械接種法接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.)，約 6 天後於葉片產生黃化局部病斑 (local lesion)，經連續 3 次單斑分離接種後獲得一分離株 AL-1，作為本研究各項試驗用之代表性病毒株。AL-1 分離株另以汁液機械接種法接種於番杏 (*Tetragonia expansa*) 以及健康的百子蓮植株，觀察病徵之表現。

病毒純化及電子顯微鏡觀察

將 AL-1 病毒分離株接種繁殖於奎藜葉片作為純化材料，利用高低速交替及硫酸銨等密度平衡離心進行病毒純化，純化方法如以往之研究 (Chen & Chang 1998)。取適量已純化之 AL-1 分離株病毒顆粒被覆於 300 mesh 之銅網上，以 2% PTA (phosphotungstic acid) 進行陰染 (Hall *et al.* 1945)，在 40,000 倍率之穿透式電子顯微鏡 (HITACH H-7000, Tokyo, Japan) 下進行病毒顆粒型態的觀察，並計算 100 個病毒顆粒體，估算病毒之長度。

抗血清製備

取純化之百子蓮 AL-1 分離株病毒 1 mL (1 mg/mL) 與 1 mL 完全乳化劑 (complete Frenud's adjuvant) (Sigma, Sigma-ALDRICH, Inc., St. Louis, USA) 充分混合，將乳化完全之病毒抗原注射於兔子皮下肌肉。每隔一週注射 1 次，第二次後之注射以不完全乳化劑 (incomplete Frenud's adjuvant) (Sigma) 取代，第

4 次注射後一週開始進行採血。每次採血，由兔子耳朵之靜脈採得 30–40 mL 之血液，於 37°C 水浴靜置 4 小時，取其上清液並經過離心 (8000 rpm, 10 分鐘) 後，取血清液分裝保存於 -20°C，供血清反應測試之需。

血清檢測

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 分析：取 0.1 g 之罹病葉組織，以 3 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 研磨均勻後，加入 EIA 反應盤內 (100 μ L/ well) 進行覆膜反應 (coating reaction)，其次分別以對應 AL-1 分離株抗體之免疫球蛋白 (IgG) 進行 ELISA 反應，詳細之測定流程如已發表之報告所述 (Chen & Chang 1998)。

SDS-免疫擴散反應法 (SDS-immunodiffusion test)：分別取 1 g 之植物組織於研鉢內與 1 mL 之 3% SDS 溶液及 1 mL 之二次蒸餾水研磨均勻，再以兩層紗布過濾，取其濾液置耐熱指形管內以熱水 (95–100°C) 悶 3 分鐘，做為 SDS 處理過之抗原 (SDS-treated antigens)；純化病毒則取病毒純化液置耐熱指形管內，與 3% SDS 溶液及 1 mL 之二次蒸餾水以 1:1:1 (體積比) 混合均勻後，同樣以熱水 (95–100°C) 悶 3 分鐘。SDS 處理過之抗原，再與 AL-1 病毒分離株之抗血清進行 SDS-免疫擴散反應 (Purcifull & Batchelor 1977)。

西方轉漬法 (Western blotting)：將 0.1 g 之罹病葉組織，以液態氮磨碎，加入 200 μ L 之樣品處理液 (240 mM Tris HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 4% β -Mercaptoethanol)。再取 100 μ L 研磨液加入等體積之 LDS 溶液 (Laemmli 1970)，混勻後進行電泳。SDS-PAGE 電泳後，將膠體轉漬於 PVDF 膜 (Millipore Co., MA, USA)，以 AL-1 分離株之抗血清進行免疫反應。

AL-1 全長度基因體定序分析

取 AL-1 純化病毒，以核酸純化試劑組萃

取其核酸 (QIAamp viral RNA mini kit, Qiagen, Hilden, Germany)，以此純化病毒之核酸為模版，首先利用逢機引子 OPA8 (5'-GTGACGTAGG) 進行 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 反應，所獲得之 658 bp DNA 片段經定序後與 GenBank 基因庫比對結果，確知此 DNA 片段乃屬於 *Potexvirus* ORF1 (replicase) 之部分序列。

繼續利用此 658 bp DNA 片段所定序出之核苷酸序列，於其近 3' 端設計 AFORF658-1 引子 (5'GAAGTAATCAAAGCCAAGC)，並配合下游引子 Oligo-d (T)₁₄ (5'GCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTT)，以純化病毒之核酸為模版，進行病毒 3'端基因體之 RT-PCR 增幅，預估可獲得 2.6 kbp 之 DNA 片段產物。將 RT-PCR 增幅所得之 2.6 kbp 之 DNA 片段，經選殖與定序後，發現其與已登錄於 GenBank 上之 *Nerine virus* X (Acc. No. AB219105) 最為相近，因此進一步利用自行選殖之 658 bp DNA 片段之序列，取其近 5'端設計 AFORF658-2 引子 (5'TGATATAGCGTCGGGGTGAAAG)，並利用 NVX (Acc. No. AB219105) 已知對應 ORF1 之序列設計 NVXORF1-u1 引子 (5'CACAGCGGGATAAACTGGACCAGATT)，應用 AFORF658-2/NVXORF1-u1 之引子對預估可針對 AL-1 之 ORF1 基因上游增幅出約 1.5 kbp 之核酸片段，將此 1.5 kbp 核酸片段產物經選殖並定序後，繼續依據所得序列設計 AFORF1-d 引子 (5'CTTGACGTGTAAGCAGCCTAA C)，並借用 NVX (AB219105) 基因體 5'端 25 個核苷酸作為引子 (NVX5'end, 5'AAAACCAACACAACCTAAAACCAA)，利用 NVX5'end/AFORF1-d 引子對進行 RT-PCR 增幅，所增幅出之核酸片段預期將對應 AL-1 基因體 5'端約 2.3 kbp 之產物，將 RT-PCR 所得之 DNA 片段產物進行選殖與定序。

本試驗進行 AL-1 病毒分離株全長度基因

體之 RT-PCR 增幅、選殖與定序，其中 RT-PCR 增幅反應乃利用具有校正除錯功能之單步驟 RT-PCR 試劑組 (One-Step RT-PCR kit, Invitrogen, California)。反應時，於每一 50 μ L 反應液中分別加入 2 μ L RNA、25 μ L 2 \times Reaction Mix、1 μ L RT/Platinum[®] Taq HiFi mix、及各 1 μ L 之 20 μ M AL-c-up 及 Oligo-d (T)14 引子對，於熱循環反應儀 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT) 中進行 30 個 PCR 循環反應。反應程序為 50 $^{\circ}$ C 下合成 cDNA 30 分鐘，94 $^{\circ}$ C 下變性 1 分鐘，53 $^{\circ}$ C 下煉合 1 分鐘，72 $^{\circ}$ C 下聚合 2 分鐘，最後一個循環中之 72 $^{\circ}$ C 聚合反應延長為 6 分鐘。將 RT-PCR 增幅所得之 DNA 片段，選殖於 pOSI-T 載體 (GeneMark Com., Taipei, Taiwan)，並轉殖於 *Escherichia coli* DH5 α 宿主中，再以篩選性培養基及 *Eco*RI 限制酵素切割篩選具有與 RT-PCR 預估產物相同大小之轉殖株，送交明欣生物技術公司進行核苷酸序列分析 (ABI PRISM 377-96 DNA 序列分析儀, Perkin-Elmer, CA, USA；及其配用之放射性標幟反應試劑組 ABI PRISM BioDye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction kit)，所得之核酸序列以 Vector NTI Suite (InforMax, Inc. Wesconsin, USA) 核酸序列分析軟體進行分析比對。

AL-1 全長度基因體與其他不同 potexviruses 之比對分析

將 AL-1 全長度基因體分別針對 ORF 1 (replicase protein)、ORF 2 (triple gene block protein 1)、ORF 3 (triple gene block protein 2)、ORF 4 (triple gene block protein 3)、ORF 5 (coat protein) 之核苷酸與胺基酸序列，與 GenBank 上已登錄並與 AL-1 基因體相同度較相近之 10 種不同的 potexviruses，包括 *Nerine virus X* (NVX)、*Potato virus X* (PVX)、*Cymbidium mosaic virus* (CymMV)、*Clover yellow mosaic virus* (CIYMV)、*Hosta virus X* (HVX)、*Opuntia*

virus X (OVX)、*Cactus virus X* (CVX)、*Cassava common mosaic virus* (CsCMV)、*Bamboo mosaic virus* (BaMV)、*Foxtail mosaic virus* (FoMV) 等進行基因相同度之分析比對，以瞭解 AL-1 之分類特性。

AL-1 專一性引子對之設計與測試

本試驗針對百子蓮罹病株所分離出之 AL-1 病毒分離株之基因體序列，以對應 ORF 1 (replicase) 及 ORF 5 (coat protein) 之核苷酸序列，分別設計引子對以進行田間罹病株之 RT-PCR 檢測。對應 ORF 1 之引子對為 ALORFup/ALORFdw (5' TGT GGCAGGCTTGT AGAGA /5' GCTTGGCTTTGATTACTT C)，對應鞘蛋白的引子對為 ALCPup/ALCPdw (5' TCTTCCCGCACAAATCCAAAA/ATAGGGTG CAGAGCTGCTGT)。另以國外研究學者已發表之 *Potexvirus* 簡併式引子對 Potex 4/Potex 5 (5' AGCATGGCGCCATCTTGTGACTG/5'CTGAA GTCACAATGGGTGAAGAA) (Miglino *et al.* 2005) 作為對照。將不同來源之 potexviruses 包括 CVX、BaMV、CymMV、PVX 以及 AL-1 罹病組織以上述不同引子對進行 RT-PCR 檢測，反應條件如前述。RT-PCR 之增幅產物之預估分子量大小，以 ALORFup/ALORFdw 反應者為 429 bp、以 ALCPup/ALCPdw 反應者為 469 bp、以 Potex 4/Potex 5 反應者為 280 bp。

結 果

病毒接種、純化及電子顯微鏡觀察

取葉片出現黃綠條紋及斑駁病徵之百子蓮罹病組織 (圖 1A)，進行汁液機械接種於奎藜及番杏葉片，約 6 天後於植株葉片出現褪綠黃化斑點，取奎藜上之單斑進行接種可成功回接於百子蓮植株，於 30 天後造成葉片之黃綠斑駁病徵 (圖 1B)，經 ELISA 檢測出有病毒性反應。由接種 AL-1 分離株之奎藜葉片 (圖 2A) 之 120 g 葉片組織中，可純化出 6.5 mg 之病毒。針對



圖 1. 感染 *Nerine virus X* 病毒 AL-1 分離株之百子蓮植株病徵。(A) 田間罹病株葉片呈現黃綠條紋及斑駁病徵；(B) 百子蓮健康苗接種 NVX AL-1 分離株 30 天後於新葉出現之黃綠斑駁病徵。

Fig. 1. Symptoms on leaves of African lily infected by AL-1 isolate of *Nerine virus X*. (A) Symptoms on field plants; (B) Chlorotic mottle symptom developed at 30days after inoculation.

AL-1 分離株之純化病毒顆粒，進行電子顯微鏡觀察，病毒顆粒為呈絲狀型態，其長度約為 508 nm (圖 2B)，符合馬鈴薯 X 屬病毒之平均長度約 470–580 nm 之範圍 (Brunt 1995)。純化病毒經 SDS-PAGE 電泳分析顯示其鞘蛋白乃由單一種蛋白質基本單位 (protein subunit) 所構成，分子量估算約為 25 kDa (圖 2C)。

抗血清製備及血清檢測分析

將免疫注射後製備所得對應百子蓮 AL-1 病毒分離株之抗血清，進行 ELISA、SDS-免疫擴散反應法及西方轉漬法等血清檢測反應。以 AL-1 病毒分離株之抗血清所純化的免疫球蛋白 (IgG) 進行 ELISA 反應，可與同源奎藜單斑抗原及田間百子蓮病株發生反應，但不與百子蓮實生苗健康對照及 4 種 potexviruses (包括 CVX、BaMV、CymMV 及 PVX) 之罹病組織之病毒抗原反應 (結果未出示)，此血清反應結果與西方轉漬法之結果相同 (圖 2D)。進行 SDS-免疫擴散反應法測試中，AL-1 血清可與純化病毒、繁殖於奎藜以及番杏葉片之 AL-1

抗原以及田間百子蓮病株發生免疫沈澱反應，且沈澱帶兩兩間均產生同源性的融合現象 (identical fusion) (圖 3)，顯示田間罹病株內有與 AL-1 分離株同源之病毒存在，AL-1 血清與健康組織則無白色沈澱反應。此等血清試驗結果顯示 AL-1 病毒抗血清，可實際應用於百子蓮罹病株之病毒發生檢測。

全長度基因體分析以及鞘蛋白基因比對鑑定

AL-1 分離株之全長基因體共解得約 6577 個核苷酸 (不包含 poly-A tail)，登錄於 GenBank 取得序號為 HQ166711，其中 5'端 25 個核苷酸序列乃借用 GenBank 上已登陸發表之 *Potexvirus* AB219105 基因體 5'頂端 25 個核苷酸為引子 (NVX5'end) 與 AL-1 之下游引子 (AFORF1-d) 進行 RT-PCR 而得。所解得之 AL-1 全長度基因體序列經分析後，發現內含五個轉譯架構分別對應 *Potexvirus* 屬病毒基因體之 ORF 1 (replicase protein, nt 88-4599)、ORF 2 (triple gene block protein 1, nt 4635-5321)、ORF 3

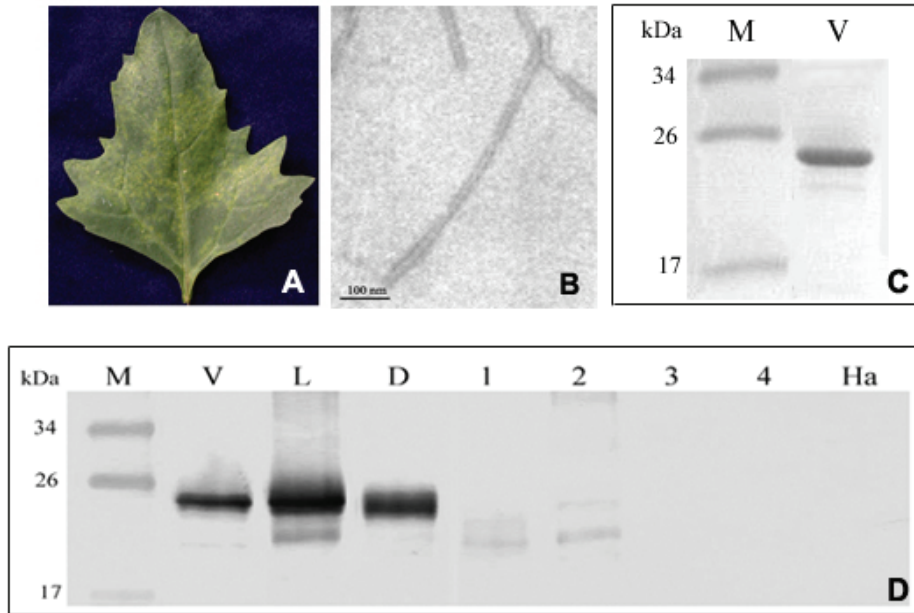


圖 2. AL-1 病毒分離株之接種、純化病毒電顯觀察與蛋白質電泳分析。(A) 接種在奎藜上所產生之局部病斑；(B) AL-1 分離株之純化病毒絲狀顆粒電子顯微鏡觀察；(C) AL-1 純化病毒於 SDS-PAGE 之電泳分析，病毒蛋白質分子量預估為 25 kDa；(D) 西方轉漬法檢測 AL-1 純化病毒、單斑病組織及田間百子蓮罹病組織之病毒，以 AL-1 抗血清進行免疫分析。M：蛋白質標準分子量；V：AL-1 純化病毒；L：AL-1 分離株感染之奎藜單斑；D：百子蓮罹病株；1：CVX (*Cactus virus X*)；2：BaMV (*Bamboo mosaic virus*)；3：CymMV (*Cymbidium mosaic virus*)；4：PVX (*Potato virus X*)；Ha：健康百子蓮葉組織。

Fig. 2. Bioassay, TEM observation, electrophoresis and immuno analysis of *Nerine virus X* isolate AL-1 by Western blotting. (A) Local lesions shown on the leaf of *Chenopodium quinoa* developed by the inoculation of AL-1; (B) Morphology of a purified virus particle; (C) SDS-PAGE analysis of the purified AL-1 particles showing the subunit of viral coat protein; (D) Western blotting analysis using AL-1 antiserum; purified virus sample of AL-1 (lane V), AL-1-infected *C. quinoa* leaf tissue (lane L), AL-1-infected African lily tissue (lane D), and different potexviruses including *Cactus virus X* (lane 1), *Bamboo mosaic virus* (lane 2), *Cymbidium mosaic virus* (lane 3) and *Potato virus X* (lane 4) and preparation of healthy African lily (lane Ha). Lane M, protein markers.

(triple gene block protein 2, nt 5302-5658)、ORF 4 (triple gene block protein 3, nt 5438-5797) 及 ORF 5 (coat protein, nt 5787-6446)。

AL-1 之全長度基因體與目前已登錄之 *Potexvirus* 病毒比對結果，與由日本學者 Fuji *et al.* 於 2006 年發表之 *Nerine virus X* (GenBank Acc. No. AB21910) 最相近，全長度核苷酸之序列相同度高達 98.9% (表 1)。進一步與 GenBank 已登錄之 10 種 potexviruses 包括 NVX (AB219105)、BaMV (D26017)、CIYMV (NC_001753)、

CsCMV (U23414)、CymMV (EF125178)、CVX (AF308158)、FoMV (EF630359)、HVX (AJ620114)、OVX (AY366209)、PVX (M95516) 等進行 ORF 1 至 ORF 5 之相同度比對，結果顯示無論是核苷酸或胺基酸序列，AL-1 與 NVX 病毒在此等區域之相同度均高達 93% 以上；但與其他 9 種 potexviruses 之胺基酸相同度於 ORF 1 為 37.6–43.0%、ORF 2 為 20.0–30.7%、ORF 3 為 29.6–42.4%、ORF 4 為 7.4–21.3%、ORF 5 為 15.6–38.0%。

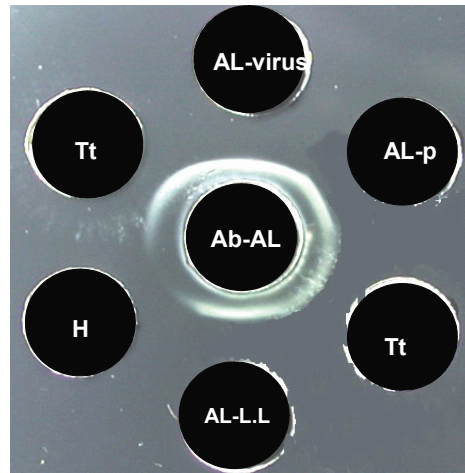


圖 3. SDS-免疫擴散反應分析 AL-1 病毒分離株與其抗血清之反應。中央穴加入 AL-1 抗血清 (Ab-AL)，周圍六穴乃分別加入經 SDS 處理後之 AL-1 純化病毒 (AL-virus)、百子蓮罹病組織 (AL-p)、AL-1 感染之番杏罹病單斑組織 (Tt)、AL-1 感染奎藜之局部病斑 (AL-L.L) 及健康奎藜對照抗原 (H)。AL-1 抗血清與純化之 AL-1 病毒、田間百子蓮病株、同源奎藜病組織及 AL-1 感染之番杏病組織等產生同源性之免疫沈澱反應。

Fig. 3. Sodium dodecyl sulfate (SDS)-immunodiffusion test of the antiserum against AL-1 isolate of *Nerine virus X*. The central well was filled with the antiserum against AL-1 (Ab-AL). The peripheral wells were filled with SDS-treated antigens including purified AL-1 virion (AL-virus), field diseased leaf tissues of African lily (AL-p), AL-1-infected *Tetragonia* leaf tissues (Tt), AL-1-induced local lesion tissue of *Chenopodium quinoa* (AL-L.L), and tissue of healthy African lily (H).

表 1. 百子蓮病毒 AL-1 分離株與其他不同 potexviruses 間在基因體內 5 個轉譯架構 (Open reading frame) 上之序列分析比較。

Table 1. Sequence analysis and comparison on the five different open reading frame (ORF) of *Nerine virus X* isolate AL-1 and other potexviruses.

Potexvirus ^y	Accession no.	Percent identity ^z									
		Nucleotide					Amino acid				
		ORF 1	ORF 2	ORF 3	ORF 4	ORF 5 (CP)	ORF 1	ORF 2	ORF 3	ORF 4	ORF 5 (CP)
NVX	AB219105	98.7	99.0	99.7	99.7	99.1	98.5	93.0	100.0	99.2	95.9
BaMV	D26017	51.1	46.8	52.1	22.7	43.7	37.6	23.5	37.9	8.3	20.1
CIYMV	NC_001753	52.9	43.3	52.5	27.5	51.6	40.2	25.7	42.4	11.6	34.1
CsCMV	U23414	52.9	46.9	47.3	40.1	49.5	40.9	27.4	33.1	16.5	32.3
CymMV	EF125178	52.3	45.9	49.7	38.2	52.6	41.3	20.0	32.2	21.3	36.7
CVX	AF308158	54.2	50.4	47.4	28.5	49.1	41.2	30.3	35.2	10.7	29.3
FoMV	EF630359	50.7	49.6	47.9	22.1	41.5	38.3	28.5	29.6	7.4	15.6
HVX	AJ620114	53.5	49.5	48.8	31.1	49.0	39.5	26.9	34.4	15.7	32.4
OVX	AY366209	54.7	48.4	43.8	24.2	49.6	41.1	30.7	32.8	10.7	30.9
PVX	M95516	54.2	47.0	49.7	31.9	50.7	43.0	22.2	32.8	8.3	38.0

^z Values were obtained using the analysis program of Vector NTI Suite (InforMax, Inc., Wesconsin, USA).

^y Potexviruses including *Nerine virus X* (NVX), *Bamboo mosaic virus* (BaMV), *Clover yellow mosaic virus* (CIYMV), *Cassava common mosaic virus* (CsCMV), *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), *Cactus virus X* (CVX), *Foxtail mosaic virus* (FoMV), *Hosta virus X* (HVX), *Opuntia virus X* (OVX), and *Potato virus X* (PVX).

AL-1 之 ORF2-3、ORF 3-4 間之核酸序列相互間有重疊之處，為 *Potexvirus* 病毒之特性之一，稱為 triple gene block (TGB)，並且為其所屬 *Alphaflexiviridae* 科病毒的高保留區特性 (Abou Haidar & Gellaty 1999)。由核酸序列分析比對結果與 AL-1 之分子特性顯示其確屬於 *Potexvirus* 的成員之一，且為 NVX 病毒之不同分離株。

RT-PCR 專一性檢測引子之設計與應用

本研究證實 AL-1 可與 *Potexvirus* 簡併式引子對 Potex 4/Potex 5 反應，產物大小約 280 bp 核酸片段 (圖 4A)。針對 AL-1 基因體對應 ORF 1 (replicase protein) 以及 ORF 5 (coat protein)

區域所設計之引子對，均可專一性地檢測出 AL-1 之核酸片段產物，獲得與預估大小相同之 DNA 片段產物，以 ALORFup/ALORFdw 增幅出 ORF1 上約 429 bp 之核酸片段 (圖 4B)，而以 ALCPup/ALCPdw 增幅出 CP 上約 469 bp 之核酸片段。從 AL-1 純化病毒、AL-1 田間自然感染之罹病組織，以及繁殖於奎藜葉片上之單斑等均可檢出 AL-1 病毒相對應之核酸片段訊號，但此二引子對不與 CVX、BaMV、CymMV 以及 PVX 等 4 種不同的 potexviruses 病毒之核酸反應 (圖 4C)，顯示此二組引子對可用於百子蓮上作 NVX 病毒之專一性檢測。

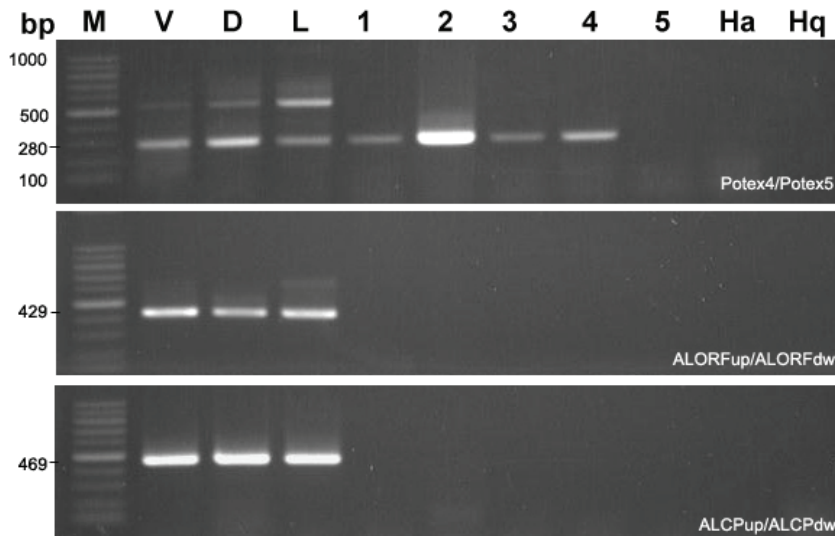


圖 4. 不同引子對進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR) 檢測百子蓮 *Nerine virus X* 病毒之電泳分析結果。M：100 bp DNA 標準標幟；V：AL-1 純化病毒；D：百子蓮罹病株葉片組織；L：AL-1 分離株感染之奎藜單斑；1：CVX (*Cactus virus X*)；2：BaMV (*Bamboo mosaic virus*)；3：CymMV (*Cymbidium mosaic virus*)；4：PVX (*Potato virus X*)；Ha：健康百子蓮葉組織；Hq：健康奎藜葉組織。

Fig.4. Amplification result of reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) by the use of three sets of primer for the detection of *Nerine virus X* (NVX) and several other potexviruses. A 280 bp DNA product was consistently amplified by potexvirus-specific degenerated primers (Potex 4/ Potex 5) from AL-1 and four different potexviruses including CVX, BaMV, CymMV, and PVX. Amplicons of 429 bp and 469 bp were obtained by two NVX specific primer pairs of ALORFup/ALORFdw and ALCPup/ALCPdw, respectively. Lane M, 100-bp ladder DNA molecular markers; lane V, purified virus particles of AL-1; Lane 2, field collected African lily tissue infected by AL-1; Lane 3, AL-1-induced local lesion tissue of *Chenopodium quinoa*; Lane 1, 2, 3, and 4, four different potexviruses of CVX, BaMV, CymMV and PVX, respectively. Lane Ha and Hq, the healthy controls of African lily and *C. quinoa* leaves, respectively.

討 論

本研究根據電子顯微鏡觀察、血清反應及核酸分子特性分析結果，顯示分離自百子蓮罹病株之 AL-1 病毒分離株，乃屬於馬鈴薯 X 屬病毒的成員之一，且與目前日本學者在日本之百子蓮罹病株上分離鑑定而得之 *Nerine virus* X (NVX) 為相同病毒之不同分離株 (Fuji *et al.* 2006)。

田間採回之百子蓮罹病葉呈現褪綠條紋及斑駁病徵，可成功接種於奎藜形成單斑，也可感染番杏形成褪綠黃色斑點，回接於健康的百子蓮植株出現褪綠斑駁病徵，證實分離到之病毒株乃引起田間病毒病害之病原。另外，本研究以血清學以及分子特性鑑定之方式，在純化病毒、罹病株以及接種於單斑之 AL-1 分離株等不同樣品於 SDS-免疫擴散反應中呈現同源相同病毒之免疫沈澱反應，以及 RT-PCR 反應中對應病毒 ORF 1 及 CP 之兩組專一性引子對均可由此 3 種樣品檢出預估之病毒核酸片段，此等證據顯示田間罹病株確實受到 AL-1 分離株相同病毒之感染。

目前已報告可感染百子蓮之病毒僅有 NVX 的記錄 (Fuji *et al.* 2006; Phillips 1996)。而 NVX 田間可自然感染寄主之種類有紀錄僅有百子蓮以及根希百合，NVX 之傳播途徑主要是經由機械性的汁液傳播或種球帶毒而繁殖，目前記錄上並未能經由蟲媒 (Derk & Maat 1995)、種子或花粉傳播 (Phillips 1996; Brunt 1995)。百子蓮繁殖方式主要以播種及分株兩種方式，利用播種法在短時間內可獲得較多的株數，但需經過 3-4 年才能開花，以分株法繁殖時需注意母本帶毒問題，以避免透過帶毒母本將病毒繁殖於子球。國內目前僅於梅峰地區取得此病毒罹病之樣品，在埔里地區取得之百子蓮樣品並未檢測出此病毒之發生 (未出示結果)。因此有關於 NVX 病毒在國內所栽種之百

子蓮發生之實際概況以及其對百子蓮生育之影響，尚待後續更多之調查與研究。

根據百子蓮全長度基因體比對結果顯示，其序列與日本學者 Fuji *et al.* 於 2006 年發表之 NVX (GenBank Acc.No. AB21910) (Fuji *et al.* 2006) 全長度 6582 bp 序列之核苷酸序列相同度高達 98.9%。本研究借用此病毒基因體 5' 頂端 25 個核苷酸作為引子 NVX5'end (5' AAA ACCAACACAACCTAAAACCAA)，利用 NVX 5'end/AFORF1-d 引子對進行 AL-1 分離株核酸之 RT-PCR 增幅，成功地選殖出 AL-1 基因體 5' 端預估約 2.3 kbp 之核酸片段，而因此與其他之核酸片段整合獲得其全長度之基因體，雖然此 25 個核苷酸不全然是 AL-1 的 5' 端序列，但因此可獲得 AL-1 病毒分離株全長度之基因體定序，進一步瞭解其 ORF 1-5 與目前已發表之 NVX 病毒之分類關係，乃屬於相同病毒之不同系統，進而藉此分子生物學之特性釐清 AL-1 病毒分離株之分類地位。

本研究針對百子蓮 AL-1 病毒分離株所製備之抗血清及其核酸檢測用引子對，無法檢測出 BaMV、CVX、CymMV 及 PVX 等 4 種不同的 potexviruses 病毒，而單獨僅專一性地檢出 AL-1，此等 AL-1 檢測試劑的專一性檢測效能，尚待後續更多不同 *Potexvirus* 病毒的加入檢測方能更為明確。目前自製之 AL-1 檢測試劑對於國內栽種之國內所栽培或是進口百子蓮種苗之病毒篩檢，可以有效發揮病毒檢測以及病毒的發生資訊，實際應用於追蹤此病毒可能產生的風險之需。

引用文獻 (Literature cited)

- Abou Haidar, M. G. and D. Gellatly. 1999. Potexviruses. p. 1364-1368. *in: Encyclopedia of Virology*. 2nd ed. (Granoff, A. and R. G. Webster, eds). Academic Press. San Diego.
- Brunt, A. A. 1995. Major genera of plant viruses. p. 29-66. *in: Virus and Virus-Like Diseases of Bulb and Flower Crops*. (Loebenstein, G., R. H. Lawson,

- and A. A. Brunt, eds.) John Wiley & Sons. West Sussex, United Kingdom.
- Chen, C. C. and C. A. Chang. 1998. Characterization of a potyvirus causing mild mosaic on tuberose. *Plant Dis.* 82:45–49.
- Derks, A. F. L. M. and D. Z. Maat. 1995. Nerine viruses. p. 335–340. *in: Virus and Virus-Like Diseases of Bulb and Flower Crops.* (Loebenstein, G., R. H. Lawson, and A. A. Brunt, eds.) John Wiley & Sons. West Sussex, United Kingdom.
- Fuji, S., K. Shinoda, H. Furuya, H. Naito, and F. Fukumoto. 2006. Complete nucleotide sequence of *Nerine virus X* (NVX-J) isolated from the African lily plant (*Agapanthus campanulatus* L.) in Japan. *Arch. Virol.* 151:205–208.
- Hakkaart, F. A., D. Z. Maat, and F. Quak. 1975. Viruses and meristem culture of Nerine. *Acta. Hort.* 47: 51–53.
- Hall, C. E., M. A. Jakus, and E. O. Schmitt. 1945. The structure of certain muscle fibrils as revealed by the use of electron stains. *J. Appl. Physiol.* 16: 459–465.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* 227: 680–685.
- Maat, D. Z. 1976. Two potyvirus in Nerine. *Acta. Hort.* 59:81–82.
- Miglino, R., A. Jodłowska, and A. R. Schadewijk. 2005. First report of Narcissus mosaic virus infecting *Crocus* spp. cultivars in the Netherlands. *Plant Dis.* 89:342.
- Phillips, S. 1996. Nerine X potyvirus. p. 825–826. *in: Viruses of Plants: Descriptions Lists from the VIDE Database.* (Brunt, A. A., K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs, and L. Watson, eds). CAB International. Cambridge.
- Phillips, S. and A. A. Brunt. 1980. Some host and properties of an isolate of Nerine virus X from *Agapanthus praecox* subsp. *orientalis*. *Acta. Hort.* 110:65–70.
- Purcifull, D. E., and D. L. Batchelor. 1977. Immunodiffusion Tests with Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-Treated Plant Viruses and Plant Viral Inclusions. *Fla. Agric. Exp. Sta. Tech. Bull.* 788. 39 pp.

Serological and Molecular Identification of *Nerine virus X* Infecting African Lily (*Agapanthus africanus* L.) and Development of its Detection Techniques¹

Fen-Lang Chiang^{2,4}, An-Chin Chang^{3,4}, Ying-Huey Cheng², and Chin-Chih Chen^{2,5}

Abstract

Chiang, F. L., C. A. Chang, Y. H. Cheng and C. C. Chen. 2010. Serological and molecular identification of *Nerine virus X* infecting african lily (*Agapanthus africanus* L.) and development of its detection techniques. J. Taiwan Agric. Res. 60:89–100.

African lily (*Agapanthus africanus* L.), native in South-Africa, is currently a popular bulbous floral crop in Taiwan and many other countries. An African lily exhibiting foliar chlorotic strip and mottle symptom was collected from Mai-Fung nursery of Taiwan University in 2005. A virus isolate, designated as AL-1, was obtained from this plant by establishing a single lesion isolate in *Chenopodium quinoa* Willd. Back inoculation of AL-1 onto seedlings of African lilies confirmed that AL-1 was able to induce chlorotic mottle symptom which was similar to what was observed in the field. Virions of AL-1 were successfully purified from the inoculated tissue of *C. quinoa* by differential and equilibrium centrifugation in cesium sulfate. Elongated virus particles estimated at 508 nm in length were observed from the purified sample under an electron microscope. By SDS-PAGE, molecular weight of AL-1's coat protein was determined as 25 kDa. An antiserum against purified AL-1 virions was prepared in rabbit and shown to react strongly and specifically with its homologous antigens prepared from diseased samples of field-collected or inoculated ones in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), SDS-immunodiffusion, and western blotting tests. Full-length genome of AL-1 was revealed by RT-PCR amplification with random primer and several primer pairs designed in this study according to those closely related virus sequences in the GenBank. Genome of AL-1 was found to compose 6577 nucleotides, excluding the poly (A) tails, in which five open reading frames (ORF) encoding presumably replicase (ORF 1), triple gene blocks (ORF 2–4) and coat protein (ORF 5) were located. This genome structure was equivalent to that of *Potexvirus* and most resembled to *Nerine virus X* (NVX) (Acc. No. AB219105) in the GenBank. The percent identities of nucleotide and amino acid sequences of the full-length genomes between AL-1 and NVX were 98 and 93%, respectively, indicating they were isolates of the same virus. A primer pair for specific detection of AL-1 was designed and shown to be

-
1. Contribution No. 2505 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: April 19, 2010.
 2. Respectively, Research assistant, Associate Researcher, Assistant Researcher, Plant Pathology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Professor and Chair, Graduate Institute of Biochemical Science and Technology, Chaoyang University of Technology, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Chiang, F. L. and Chang, C. A. contributed equally to this study as first authors.
 5. Corresponding author, e-mail: chinzue@tari.gov.tw; Fax: (04)23302803.

useful in routine RT-PCR test. Our results revealed that AL-1 was an isolate of NVX based on the biological and serological characterizations and the molecular analysis of the full-length genomic sequences. To our knowledge, it's the first report of NVX occurrence in Taiwan.

Key words: African lily, *Agapanthus africanus*, Virus disease, *Nerine virus X*, Polyclonal antiserum, Full-length genome, RT-PCR.

白芷培植體及飲片歐前胡素之萃取¹

蕭翌柱^{2,4} 鄭統隆³ 高瑞隆³ 賴瑞聲³ 黃嘉新³

摘要

蕭翌柱、鄭統隆、高瑞隆、賴瑞聲、黃嘉新。2011。白芷培植體及飲片歐前胡素之萃取及含量分析。台灣農業研究 60:101-114。

白芷為國人延用已久的傳統藥材，其被廣泛地應用於治療一些症狀，像是鼻炎、鼻息肉以及皮膚病。白芷所含的有效成分主要是呋喃香豆素衍生物，包含有歐前胡素、白當歸素以及白芷素等，由於少有運用組織培養誘導產生白芷微塊莖和綠色癒傷組織等培植體的資料，因此，本研究目的乃探討萃取培植體中歐前胡素的方法。結果顯示，白芷癒傷組織繼代培養於含 WPM 基本鹽類並添加 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $8.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 洋菜粉的固體培養基中 30 天後之鮮重最高 ($25.0 \text{ g}/\text{瓶}$)，其次依序為接種在 B-5 ($18.6 \text{ g}/\text{瓶}$)、 $1/2 \text{ MS}$ ($9.7 \text{ g}/\text{瓶}$) 和 MS ($5.1 \text{ g}/\text{瓶}$) 基本鹽類培養基。將白色癒傷組織繼代培養於 $\text{WB}_1\text{N}_{0.5}$ 培養基 90 天後，誘導綠色癒傷組織生成的比率達到 60.0%。在三種不同的溶劑 (甲醇、去離子水和乙醇) 中，甲醇是最適當的溶劑，其可由每 1 g 的市售白芷根飲片乾燥樣品萃取到 $772.3 \mu\text{g}$ 的歐前胡素。白芷白色癒傷組織以 WPM 培養基繼代培養 3 個月後，其歐前胡素之含量為 $32.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ，但培育 3 個月的白芷微塊莖歐前胡素含量則可達到 $83.3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。本研究顯示能利用白芷微塊莖大量生產歐前胡素及大量繁殖苗株的可行性。

關鍵詞：白芷、培植體、根飲片、歐前胡素。

前言

白芷始載於距今約 1900 多年前的神農本草經，列為草部中品，爾後歷代諸家醫學典籍皆有著錄，為我國延用已久的傳統藥材之一。白芷味辛性溫，芳香通竅而表汗，能治療眉稜骨痛、頭風侵目淚出、去面部黑氣和斑痕，長肌膚、潤顏色、可作面脂、葉可作浴湯。近年來，隨著經濟發展及養生保健風氣逐漸興起，

一些新興的香草、藥草栽培園區多引入作為種原保存及觀賞用植物；另外，白芷根部除了主要的藥材用途外，其嫩葉也能兼作蔬菜或沙拉鮮食 (Pistrick 2002)。

市售白芷藥材多為繖形科 (Umbelliferae) 獨活屬植物白芷 (*Angelica dahurica* Benth. et Hook.) 的乾燥根，其另有川白芷 (*A. anomala* Lallen) 以及台灣 (杭) 白芷 [*A. dahurica* Benth. et Hook. var. *formosana* (Boiss.) Yen] 等近緣植

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2516 號。接受日期：100 年 5 月 16 日。
2. 本所作物種原組助理研究員。台灣 台中市。
3. 本所生物技術組副研究員、助理研究員、助理研究員、助理研究員。台灣 台中市。
4. 通訊作者，電子郵件：yjshiau@tari.gov.tw；傳真機：(04)23331705。

物 (Yen 1980; Chiu & Chang 1995)。近代研究發現白芷複方製品具有嫩白皮膚的良好效果 (Su *et al.* 1994)，如應用於製造高價美白化妝品應具有經濟價值，然因自然原生地持續不斷受到人為開發與破壞，加上種原頻遭採擷，致使此一藥用植物野生族群已有日益減少趨勢，在貨源不繼下，不肖商家常以粗糙獨活 (*Heracleum scabridum* Franch) 偽品混充販售 (Zeng *et al.* 2001)，更突顯珍貴種原保存的重要。

目前，雖有學者選用同屬植物大和當歸 (*A. acutiloba*) 和中國當歸 (*A. sinensis*) 之莖頂、腋芽及體胚等進行離體培養研究 (Watanabe *et al.* 1998; Tsay & Huang 1998)，或是探討細胞懸浮培養量產歐前胡素 (imperatorin) 的技術 (Chang 1991)，但是，迄今尚未有運用組織培養誘導產生白芷微塊莖和綠色癒傷組織並分析其歐前胡素含量報導。因此，本研究將取市售不同根徑的白芷飲片為材料，探討萃取歐前胡素最適當的溶劑種類及方法，再據此應用高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 分析比較市售飲片以及誘導生成之微塊莖與癒傷組織培植體之歐前胡素含量。

材料與方法

材料來源

本試驗使用之市售白芷飲片係於民國 97 年 11 月購自台中市信譽良好的中藥進口商，其原產地來自中國大陸四川省。將原包裝啟封後，依飲片直徑大小檢選分類並個別進行萃取及分析。用於誘導微塊莖和綠色癒傷組織之白芷莖頂材料，則取自農試所田區試種觀察，並經選拔出生長勢強健且根系粗大的種苗。

培植體的消毒及預培養

白芷植株以自來水沖洗乾淨後，用 12 號解剖刀片自莖葉著生處之短縮莖，依序由外向內環刻去除 2-3 層葉鞘，再切取腋芽及長度約 2-3 cm 的頂芽進行外部消毒。亦即取前述材料依序經

70%酒精浸漬 15 秒，再以 0.5%次氯酸鈉水溶液震盪消毒 5 分鐘，再仿照 Pedersen & Brandt (1992) 的方法，在無菌操作台上用解剖刀環切去除 1-2 層包覆在芽體外之幼嫩葉鞘、葉柄和葉片，並取得長度約為 5 mm 之莖頂組織進行培養以促進微塊莖的發育。腋芽及莖頂培植體使用的培養基含有 MS (Murashige & Skoog 1962) 基本鹽類，另添加 1 mg·L⁻¹ BA、0.5 mg·L⁻¹ NAA、30 g·L⁻¹ 蔗糖及 8.5 g·L⁻¹ 洋菜粉，pH 值為 5.7。誘導幼嫩葉鞘和葉柄生成白色癒合組織之初代培養基，則採用學者發表的配方，即含有 MS 基本鹽類、1 mg·L⁻¹ 2,4-D、0.5 mg·L⁻¹ kinetin、30 g·L⁻¹ 蔗糖及 8.5 g·L⁻¹ 洋菜粉，pH 值為 5.7 (Chang *et al.* 1993)。

培養基調配完成後在添加凝膠物質前，先以 1 N NaOH 或 0.5 N HCl 調整培養基 pH 值；另外，培養基以玻璃瓶分裝後，先以雙層鋁箔紙密封瓶口並置入殺菌釜內以溫度 121℃、壓力 1.05 kg·cm⁻² 滅菌 15 分鐘，再取出放冷備用。各項試驗均置於溫度 24℃、光照 12 小時、光量為 100 μE·m⁻²·s⁻¹ 及光波長為 350-800 nm 環境下進行培養，且經過預培養後，未受微生物污染之培植體，即可作為試驗用材料。

白芷白色癒傷組織繼代培養及綠色癒傷組織之誘導試驗

不同鹽類培養基對於白色癒傷組織繼代培養之影響：選取白芷幼嫩葉柄再接種於誘導產生白色癒傷組織之固體培養基，取此種白色癒傷組織作為供試材料並繼代培養於僅含有 MS、1/2 MS、WPM (Lloyd & McCown 1980) 和 B-5 (Gamborg *et al.* 1968) 基本鹽類並添加 30 g·L⁻¹ 蔗糖和 8.5 g·L⁻¹ 洋菜粉的固體培養基中 30 天，再調查白色癒傷組織生長情形。每一處理重複 3 次，每次各接種 500 mL 容量之蘭花瓶 5 瓶，每瓶含 100 mL 培養基並接種 1.5 g 供試材料。

含 BA 和不同濃度 NAA 培養基對於誘導白芷生成綠色癒傷組織之影響：取前項繼代培

養生長最佳的白色癒傷組織，分別接種於含有 WPM 基本鹽類另添加 30 g·L⁻¹ 蔗糖、8.5 g·L⁻¹ 洋菜粉、1 mg·L⁻¹ BA 和不同濃度 NAA (0.5, 1, 2, 4, 8 mg·L⁻¹) 的固體培養基中，各處理組代號分別為 WPM (對照組)、WB₁N_{0.5}、WB₁N₁、WB₁N₂、WB₁N₄ 和 WB₁N₈。培植體在各培養基中培養 90 天後，調查綠色癒傷組織生成情形。每一處理重複 3 次，每次各接種 500 mL 容量之蘭花瓶 5 瓶，每瓶含 100 mL 培養基並接種 1.5 g 材料。

白芷歐前胡素萃取及定量

不同溶劑對於歐前胡素萃取量之影響：試驗係將市售白芷飲片區分為 A (2.5 cm 以上)、B (1.5–2.5 cm) 和 C (0.8–1.5 cm) 三組後，個別置於不鏽鋼盤並放入恆溫 50°C 的烘箱內烘乾，再秤重並磨粉。進行指標成分萃取時，每一樣品的用量為 0.2 g；樣品依試驗需要，分別以 20 mL 的去離子水、甲醇 (99.9%, Mallinckrodt Chemical Ltd., USA) 或乙醇 (95%, Taiwan Sugar Corporation, Taiwan) 作為供試溶劑，經充分與樣品粉末混合後，用超音波震盪器 (Elma[®] D-78224, Germany) 加以震盪，同時配合隔水加熱 (恆溫 50°C) 1 小時，使材料內含成分完全釋出。粗萃溶液先經離心機 (Hermle Z-383K, Germany) 在 15°C 低溫下高速離心 (9000 rpm) 10 分鐘以取得第一次萃取之上清液。第一次萃取後殘留的藥渣，則再加入 10 mL 的去離子水、甲醇或乙醇進行第二次萃取；最後，合併所有的上清液並以高速離心機 (Savant[™] SC-110, USA) 配合真空濃縮機 (Savant[™] RVT-110, USA) 濃縮 1.5 小時，再用 95% 乙醇定量到 5 mL，再經 0.22 μm 微孔膜 (Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland) 過濾後，即可進行 HPLC 檢測和分析。

本試驗使用之 HPLC 包括分離模組 (Waters 2695 HPLC separation module, USA)、光電矩陣檢測器 (Waters 2996 Photodiode

Array Detector, USA) 以及自動樣品注入器。固定相 (stationary phase) 使用 Symmetry[®] C18 層析管柱 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm, Ireland) 並且層析管柱溫控裝置的設定溫度為 30 °C；移動相 (mobile phase) 為 0.01% 三氟乙酸 (TFA) 及乙腈 (ACN) (40 : 60, v/v) 之混合溶液；儀器檢測時之移動相流速設定為 1 mL·min⁻¹；所有供試樣本和標準品溶液在光電矩陣檢測器以 295 nm 光波長進行檢測前，皆以 0.22 μm 過濾膜先濾除雜質，再以每次 30 μL 的注射量進行含量分析。此外，本試驗使用 ChromaDex[™] imperatorin 標準品 (ASB-00009070-005, China) 並以 100% 甲醇溶解後，再配製成 0.1、1、10、20、80 和 100 μg·ml⁻¹ 的標準濃度，以繪製標準檢量線及層析光譜。

不同乾燥法對於歐前胡素萃取量的影響：白芷苗株莖基部培植體培養在 500 mL 玻璃蘭花瓶約 60 天，其基部可形成微塊莖，每次秤取 8 g 微塊莖作為材料進行乾燥試驗及分析，並調查各處理組培植體之鮮/乾重比值以及歐前胡素含量的差異。萃取流程如前項說明，惟供試材料除烘乾法 (以 40°C 熱風乾燥 48 小時) 外，另採用冷凍乾燥機 (FD-25B3P8, 宏誠, 台灣) 進行真空冷凍乾燥，以比較不同乾燥方式對於歐前胡素萃取量的影響，使用的 8 段式冷凍乾燥溫度及時間依序為 -20°C (0.5 小時)、-10°C (1 小時)、-5°C (1.5 小時)、4°C (2 小時)、12°C (5 小時)、18°C (5 小時)、22°C (5 小時) 及 26°C (48 小時)。乾燥後之各供試樣本分別再經磨粉及秤重取樣，並選擇乙醇作為溶劑，最後仍如前述方法取上清液進行 HPLC 分析。

白芷培植體歐前胡素之定量分析

取白芷苗株莖基部發育產生的微塊莖 (培養期 3 個月)、白色癒傷組織 (培養 1 個月及 3 個月) 與綠色癒傷組織 (培養 1 個月及 3 個月) 等材料，依照前項試驗所得最佳條件，個別進行指標成分歐前胡素之萃取及定量分析。

試驗統計分析

以上試驗每一處理皆重複 3 次，獲得的資料計算各處理之算術平均值及其標準機差 (standard error, SE)，並以 SAS 8.2 (SAS Institute Inc. 2001) 統計軟體進行變方分析 (analysis of variance, ANOVA) 後，在 5% 顯著性水準下以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test, LSD test) 檢定各處理間差異的顯著性。

結 果

不同鹽類培養基對於白色癒傷組織繼代培養之影響

白芷癒傷組織分別繼代培養於含有 MS、1/2 MS、WPM 和 B-5 基本鹽類並添加 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $8.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 洋菜粉的固體培養基 30 天後，以繼代於 WPM 基本鹽類培養基之白色癒傷組織不但質地鬆軟且體積大於其他處理組，平均鮮重也由原本的每瓶 1.5 g 增加為 $(25.0 \pm 1.4) \text{ g}$ (表 1)，顯著高於接種於 MS ($5.1 \pm 0.6 \text{ g}$)、1/2 MS ($9.7 \pm 0.4 \text{ g}$) 和 B-5 ($18.6 \pm 1.0 \text{ g}$) 基本鹽類之處理組，以 MS 和 1/2 MS 固體培養基培育的癒傷組織呈淡黃色，質地較硬脆且體積小於以 WPM 固體培養基培育者；此外，調查癒傷組織平均乾物重及鮮重/乾重比值，也以培養

於 WPM 基本鹽類培養之癒傷組織最高，分別為 0.6 g 和 42.8 。

含 BA 和不同濃度 NAA 培養基對於誘導白芷生成綠色癒傷組織之影響

將白色癒傷組織接種於 WPM (對照組)、 $\text{WB}_1\text{N}_{0.5}$ 、 WB_1N_1 、 WB_1N_2 、 WB_1N_4 和 WB_1N_8 之培養基 90 天後，誘導綠色癒傷組織生成的比率，係以 $\text{WB}_1\text{N}_{0.5}$ 處理組最高 ($60.0 \pm 9.4\%$)，對照組和 WB_1N_8 處理組則無綠色癒傷組織生成 (表 2)； WB_1N_4 處理組癒傷組織的平均鮮重 ($33.3 \pm 2.1 \text{ g}$) 及鮮/乾重比值 (30.9 ± 1.9) 皆顯著高於對照組之平均鮮重 ($26.4 \pm 0.5 \text{ g}$) 及鮮/乾重比值 (25.0 ± 1.3)；至於比較各處理組之間癒傷組織的平均乾重並無顯著差異。

不同溶劑對於歐前胡素萃取量之影響

市售白芷飲片依根徑區分為 A (2.5 cm 以上)、B ($1.5\text{--}2.5 \text{ cm}$) 和 C ($0.8\text{--}1.5 \text{ cm}$) 三組 (圖 1) 並比對 HPLC 標準檢量線 (圖 2) 以檢測其歐前胡素含量，結果以去離子水作為溶劑時，自 B、C 兩組萃取之指標成分含量分別為 ($30.3 \pm 2.1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 與 ($29.0 \pm 3.1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)，這些數值雖略高於 A 組之 ($22.3 \pm 2.4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (表 3)，但比較後並無顯著差異；若以甲醇或乙醇作為溶劑時，則各組所萃取出來的指標成分數量仍是以

表 1. 不同鹽類培養基對於白芷癒傷組織繼代培養之影響

Table 1. Effect of different basal salt media on growth of callus of *Angelica dahurica*^z

Basal salts media	Fresh weight/flask (g)	Dry weight/flask (g)	Fresh weigh/dry weight ratio
MS	$5.1 \pm 0.6 \text{ d}^y$	$0.3 \pm 0.1 \text{ c}$	$19.6 \pm 2.4 \text{ b}$
1/2 MS	$9.7 \pm 0.4 \text{ c}$	$0.4 \pm 0.1 \text{ bc}$	$22.4 \pm 1.7 \text{ b}$
WPM	$25.0 \pm 1.4 \text{ a}$	$0.6 \pm 0.0 \text{ a}$	$42.8 \pm 1.9 \text{ a}$
B-5	$18.6 \pm 1.0 \text{ b}$	$0.5 \pm 0.1 \text{ ab}$	$39.8 \pm 1.0 \text{ a}$

^z Data is mean and statistical analysis of three replications, each replication with 5 flasks per treatment. Callus (1.5 g fresh weight) was inoculated in each 500 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL solid media and incubated at 24°C under $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ photosynthetic photon flux density for 30 days. Each basal salt medium (MS, 1/2MS, WPM and B-5) contained $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose and $8.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Difco agar. The pH value is 5.7 for all the four media.

^y Data presented are mean \pm standard error ($n = 3$). Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

表 2. BA 和不同濃度 NAA 對於白芷白色癒傷組織誘導綠色癒傷組織之影響

Table 2. Effect of BA and different NAA concentrations on production of green callus from white callus of *Angelica dahurica*^z

BA (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)	Green callus induction rate (%)	Average fresh weight per flask (g)	Average dry weight per flask (g)	Fresh weigh/dry weight index
0	0	0.0 ± 0.0 c ^y	26.4 ± 0.5 b	1.1 ± 0.1 a	25.0 ± 1.3 b
1	0.5	60.0 ± 9.4 a	31.1 ± 1.0 ab	1.1 ± 0.1 a	27.6 ± 1.0 ab
1	1	53.3 ± 5.4 a	31.9 ± 0.8 ab	1.1 ± 0.1 a	28.4 ± 1.3 ab
1	2	26.7 ± 5.4 b	30.2 ± 1.5 ab	1.0 ± 0.1 a	29.3 ± 0.6 ab
1	4	13.3 ± 5.4 bc	33.3 ± 2.1 a	1.1 ± 0.1 a	30.9 ± 1.9 a
1	8	0.0 ± 0.0 c	31.5 ± 2.8 ab	1.1 ± 0.1 a	29.9 ± 1.6 ab

^z Data is mean and statistical analysis of three replications, each replication with 5 flasks per treatment. Callus (1.5 g fresh weight) was inoculated in each 500 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL solid media and incubated at 24°C under 100 μE·m⁻²·s⁻¹ photosynthetic photon flux density for 90 days. The culture medium contained WPM basal salts, 30 g·L⁻¹ sucrose, 8.5 g·L⁻¹ Difco agar and different concentrations of plant growth regulators (BA and NAA), pH = 5.7.

^y Data presented are mean ± standard error (n = 3). Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.



圖 1. 中藥房之白芷不同根徑乾燥飲片(A-C)。 (A) 2.5 cm 以上； (B) 1.5–2.5 cm； (C) 0.8–1.5 cm。 (比例尺 = 3.7 cm)

Fig. 1. Dry root slices of *Angelica dahurica* from a drug store showing differences in root diameter (A–C). (A) above 2.5 cm; (B) 1.5–2.5 cm; and (C) 0.8–1.5 cm. (Scale bar = 3.7 cm)

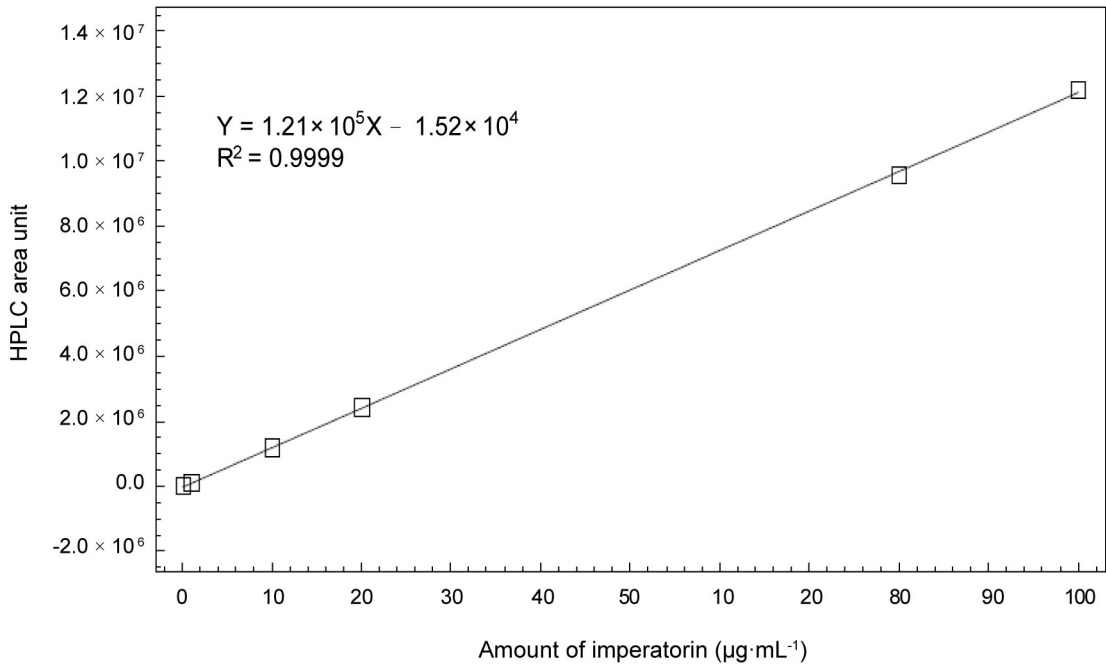


圖 2. 歐前胡素之高效液相層析儀 (HPLC) 標準檢量線 (標準溶液濃度: 0.1、1、10、20、80 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

Fig. 2. The high performance liquid chromatography (HPLC) standard calibration curve of imperatorin (standard concentrations: 0.1, 1, 10, 20, 80 and 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

表 3. 不同溶劑對市售白芷飲片歐前胡素萃取量之影響

Table 3. Effect of different solvents on imperatorin extracted quantity of market *Angelica dahurica* slices^z

Slice specifications	Solvents		
	Deionized water ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Methanol ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Ethanol ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
A ^y	22.3 ± 2.4 a ^x	581.3 ± 49.1 b	521.0 ± 38.3 a
B	30.3 ± 2.1 a	696.0 ± 34.8 ab	526.0 ± 23.7 a
C	29.0 ± 3.1 a	772.3 ± 21.3 a	585.5 ± 28.5 a

^z Data is mean and statistical analysis of three replications, each replication with 0.2 g dry weight and 20 mL solvent for extracting the imperatorin composition per treatment.

^y Diameter of root slices, A: above 2.5 cm; B: 1.5–2.5 cm; C: 0.8–1.5 cm.

^x Data presented are mean ± standard error (n = 3). Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

C 組最高、其次為 B 組；A 組樣本不論採用甲醇或乙醇進行萃取，其歐前胡素含量均比 B、C 二組低，分別為 $(581.3 \pm 49.1) \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 及 $(521.0 \pm 38.3) \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。另外，若以 C 組樣本為例，比較三種不同溶劑對於白芷飲片歐前胡素

之萃取量，則甲醇溶劑可自乾燥白芷樣本，萃取出最高 $(772.3 \pm 21.3) \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 的指標成分，如使用乙醇溶劑則為 $(585.5 \pm 28.5) \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ，若以去離子水作為溶劑之歐前胡素萃取量最低 (表 3、圖 3)。

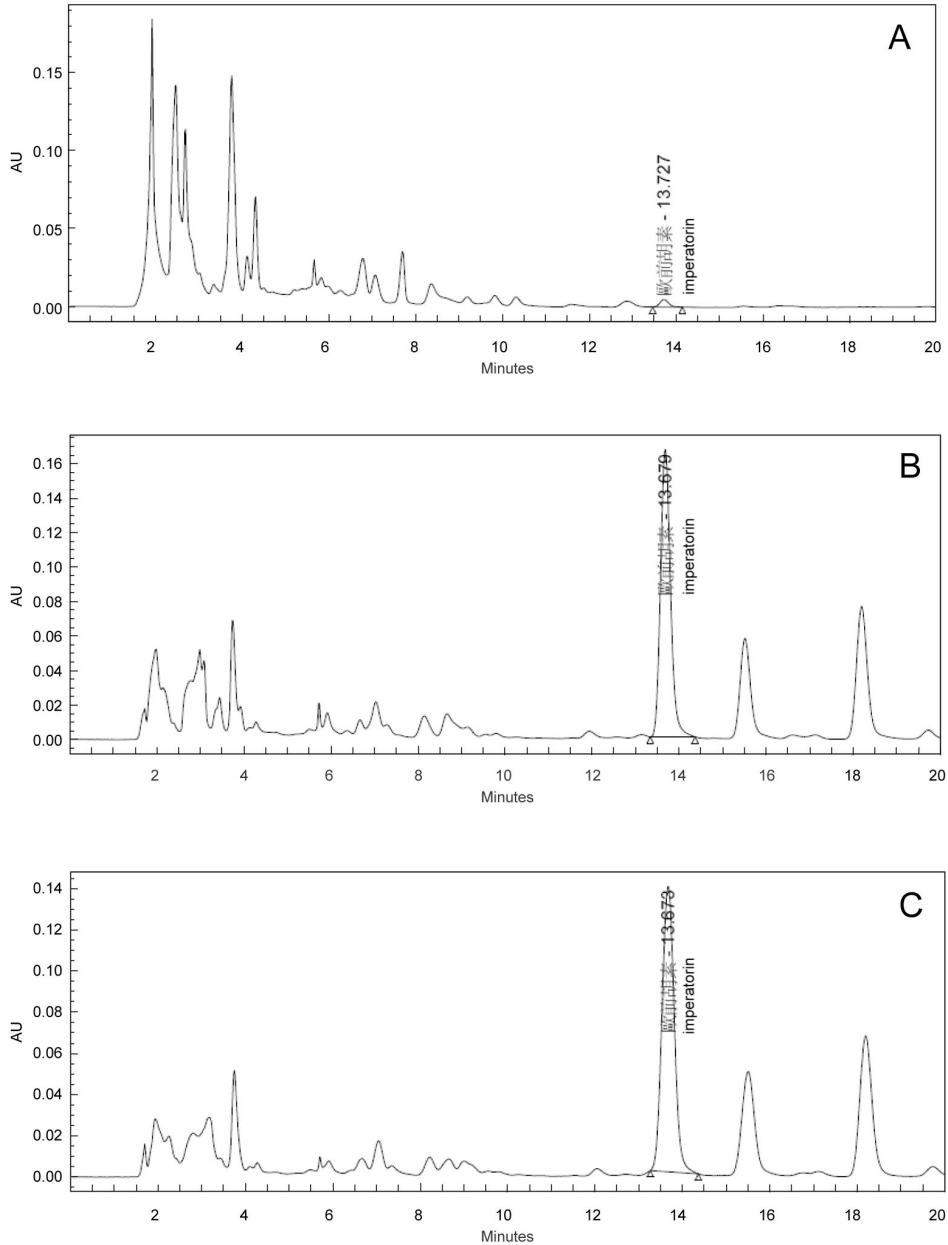


圖 3. 以不同溶劑萃取市售白芷飲片 (根徑 0.8–1.5 cm) 歐前胡素之 HPLC 層析光譜圖。(A) 去離子水；(B) 甲醇；(C) 乙醇。

Fig. 3. The HPLC chromatograms of imperatorin extracted contents of market *Angelica dahurica* slices (root slices diameter from 0.8–1.5 cm) through various solvents. (A) deionized water; (B) methanol; (C) ethanol.

不同乾燥法對於歐前胡素萃取量的影響

在 500 mL 玻璃蘭花瓶培養 60 天的白芷微塊莖，其採用烘乾方式得到的樣本鮮/乾重比值為 10.3 ± 1.0 (圖 4)；採用冷凍乾燥法之樣本鮮/乾重比值則為 10.5 ± 0.2 ，二者並無顯著差異；若再比較不同乾燥方法對於歐前胡素萃取量的差異得知，白芷樣本不論採用烘乾方式或冷凍乾燥法後之歐前胡素萃取量，仍分別為 $(386.7 \pm 102.8) \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $(393.8 \pm 3.8) \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ，二者經比較並無顯著差異。

白芷培植體歐前胡素之定量分析

取 WPM 培養基繼代培養 1 個月及 3 個月後之白芷白色癒傷組織 (圖 5)，經烘乾並檢測其歐前胡素含量依序為 $(2.5 \pm 2.0) \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $(32.0 \pm 2.2) \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (圖 6)；另取綠色癒傷組織作為檢測對象，則不論培養期是 1 個月或是 3 個月，其歐前胡素含量皆未被檢出；若檢測白芷微塊莖 (圖 7) 的歐前胡素含量，則最高可達到 $(83.3 \pm 21.6) \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

討 論

在植物組織培養過程中，常在培養基內加入不同種類和濃度的生長調節劑，以促進培植體之生長與分化，其中又以添加如 NAA 及 2,4-D 等植物生長素 (auxin) 並配合 BA 或 kinetin 等細胞分裂素 (cytokinin) 較為普遍，例如，將大和當歸 (*A. acutiloba*) 莖頂及腋芽培養於含有 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kinetin 及 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 之 MS 培養基 8 週，可以誘導不定芽萌生；若切取高約 3 cm 芽體並繼代培養於添加 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA 的 MS 培養基，則能促進不定根的形成 (Watanabe *et al.* 1998)。在培養基中添加 $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 及 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 或是單獨添加 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ，也有促進彩虹鳥蕉莖頂培植體萌生新芽的作用 (Shiau 1999)。在誘導甘蔗培植體萌生不定芽的試驗，則以添加 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA、 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kinetin 及 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 之 MS 培養基效果最

佳，且學者認為此種配方優於其他處理組的主要原因，可能與 cytokinin 和 auxin 的濃度及比例維持平衡有關 (Ramanand *et al.* 2006)，此一論點也與早期的研究結果相似，亦即 cytokinin 和 auxin 間含量的相對比值較高時，可促進新梢的生長，當相對比值較低時，則有利於根系形成，如果二者含量約略相等，則促進癒合組織的生長 (Miller & Skoog 1953; Skoog & Tsui 1948)。

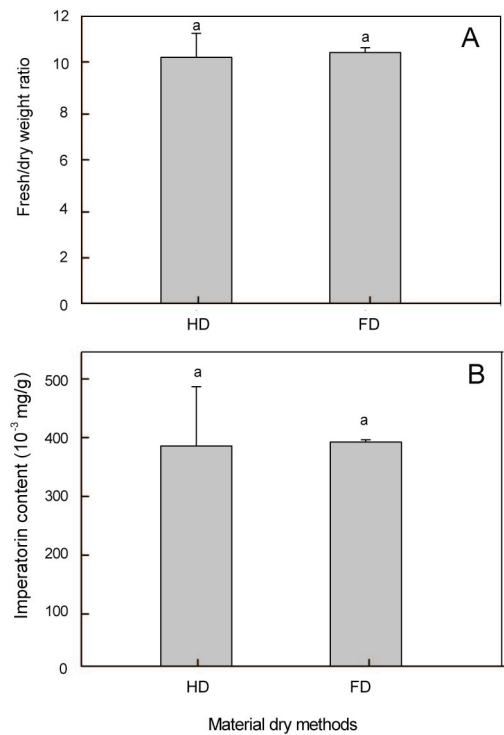


圖 4. 乾燥方法對於白芷微塊莖鮮/乾重比值 (A) 及歐前胡素含量 (B) 之影響。HD：在 40°C 溫度下烘乾 48 hr；FD：依序以 -20°C (0.5 h)、 -10°C (1 h)、 -5°C (1.5 h)、 4°C (2 h)、 12°C (5 h)、 18°C (5 h)、 22°C (5 h) 和 26°C (48 h) 冷凍乾燥。試驗計算平均值和標準機差 ($n = 3$)。

Fig. 4. Effect of drying methods on fresh/dry weight ratios (A) and imperatorin contents (B) of *Angelica dahurica* microtubers. HD: heat dried at 40°C for 48 hr; FD: freeze dried at -20°C (0.5 h), -10°C (1 h), -5°C (1.5 h), 4°C (2 h), 12°C (5 h), 18°C (5 h), 22°C (5 h), 26°C (48 h), respectively. Vertical bars indicate standard error ($n = 3$).

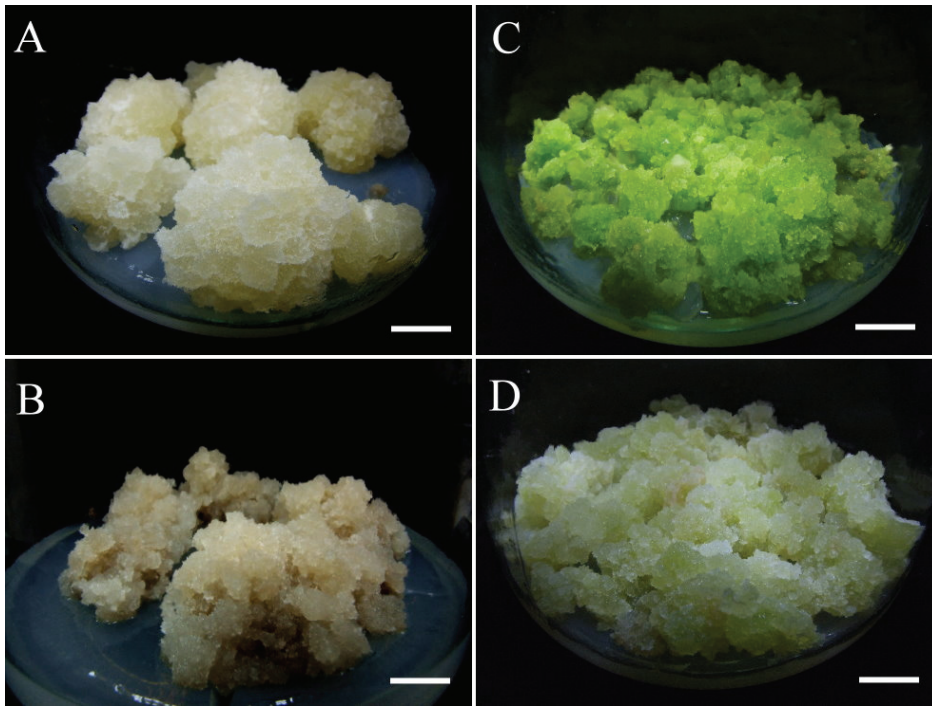


圖 5. 在 WPM 基本鹽類培養基培育 1 個月 (A、C) 以及在 WPM 基本鹽類配合 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 與 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 培養基培育 3 個月 (B、D) 之白芷癒傷組織。(A) 培養 1 個月的白色癒傷組織 (比例尺 = 1.5 cm); (B) 培養 3 個月的白色癒傷組織 (比例尺 = 1.2 cm); (C) 培養 1 個月的綠色癒傷組織 (比例尺 = 1.4 cm); (D) 培養 3 個月的綠色癒傷組織 (比例尺 = 1.4 cm)。

Fig. 5. Callus of *Angelica dahurica* cultured for 1 month (A, C) on WPM medium and 3 months (B, D) on the combination of WPM basal salts, $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA medium. (A) 1-month-old white callus (scale bar = 1.5 cm); (B) 3-month-old white callus (scale bar = 1.2 cm); (C) 1-month-old green callus (scale bar = 1.4 cm); and (D) 3-month-old green callus (scale bar = 1.4 cm).

本研究預備試驗結果則顯示 (圖表未提供), 使用 MS 基本鹽類並添加 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 及 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 培養基, 不但能誘導白芷微塊莖生成, 且培植體伴隨產生的癒傷組織也較少, 因此, 可作為誘導白芷微塊莖生成的適當配方。

若探討含 MS、1/2 MS、WPM 和 B-5 等不同鹽類配方培養基對於白芷癒傷組織繼代培養的影響, 則以 WPM 基本鹽類配方較佳且適合白芷癒傷組織的繼代培養 (表 1)。文獻報導指出, 在培養 *Dendrobium phalaeopsis* 莖頂時, 培養基中的氮鹽基 (NH_4^+) 比硝酸鹽基 (NO_3^-) 更能促進新芽培植體的生長 (Gandawidaja

1980); De-Eknamkul (1985a) 也認為, *Anchusa officinalis* 進行癒合組織懸浮培養時, 如果將 B-5 培養基中的 NO_3^- 含量由原本的 24.7 mM ($1533.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 降低為 15 mM ($930 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 可使細胞生長更為良好。檢視 MS、WPM 和 B-5 三種基本鹽類配方, 以 MS 培養基之 NH_4NO_3 與 KNO_3 各含 $1650 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1900 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 最高, 換算 NH_4^+ 與 NO_3^- 含量分別為 $371.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 $2664.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 濃度比則為 $1:7.2$; WPM 培養基配方的氮源來自於 NH_4NO_3 ($400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 與 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($556 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 二種化學藥品, 換算 NH_4^+ 與 NO_3^- 含量分別為 $90 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 $615.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,

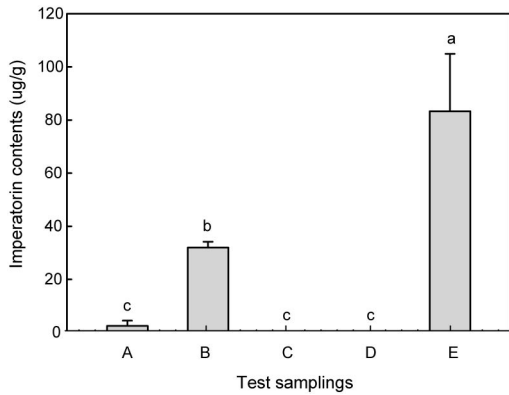


圖 6. 白芷癒傷組織及微塊莖之歐前胡素含量。(A) 培養 1 個月的白色癒傷組織；(B) 培養 3 個月的白色癒傷組織；(C) 培養 1 個月的綠色癒傷組織；(D) 培養 3 個月的綠色癒傷組織；(E) 培養 3 個月的微塊莖。試驗計算平均值和標準機差 (n = 3)。

Fig. 6. Contents of imperatorin in callus (A-D) and microtuber (E) of *Angelica dahurica*. (A) 1-month-old white callus; (B) 3-month-old white callus; (C) 1-month-old green callus; (D) 3-month-old green callus; (E) 3-month-old microtuber. Vertical bars indicate standard error (n = 3).

濃度比約為 1 : 6.8；至於 B-5 培養基氮源配方 KNO_3 的含量高達 $2500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的含量僅有 $134 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，換算 NH_4^+ 與 NO_3^- 含量分別為 $36.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 $1519.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，濃度比約為 1 : 41.6。據試驗結果顯示 (表 1)，使用 WPM 基本鹽類配方比 MS、1/2 MS 或 B-5 更適宜白芷癒傷組織生成，其原因除了添加的植物生長調節劑調控作用外，應與培養基中具有較低的 NO_3^- 含量和適當的 NH_4^+ 與 NO_3^- 濃度比值有關。此外，葉綠素的化學結構係由紫質 (porphyrin) 及葉綠素醇 (phytol) 所組成，紫質因為是由四個含氮的吡咯環 (pyrrole rings) 形成環狀結構，因此，培養基中的適當的氮源濃度以及植物生長調節劑的存在，也可能影響葉綠素的生合成，本研究之培養基中添加 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 及 $0.5\text{--}1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA，也顯示有助於誘導白色癒傷組織轉變成綠色癒傷組織 (表 2)。



圖 7. 培養 3 個月之白芷微塊莖外觀。(比例尺 = 0.5 cm)

Fig. 7. The appearance of a 3-month-old microtuber of *Angelica dahurica*. (scale bar = 0.5 cm)

現代藥理證明，白芷根為中樞興奮藥及鎮痛、治風要藥，用於流行性感冒及產前產後之頭痛有卓效；對於齒痛、顏面神經痛、眉稜骨痛及便血等症狀有緩解功效；白芷及其他獨活屬植物所含的有效成分，主要是呋喃香豆素衍生物 (furo-coumarin derivatives)，例如，具有抗菌及治療白癜風與銀屑病效果良好的歐前胡素，以及白當歸素 (angelical)、白芷素 (byak-angelicin)、白芷酸 (angelic acid)、繖形花內酯 (umbelliferone) 及香檸檬油素 (bergaptene) 等成分 (Ken 1970; Yen 1980)。目前，由川白芷和台灣白芷植株葉柄部位能夠誘導產生癒合組織，若以細胞懸浮培養仍能檢測到歐前胡素的存在 (Chang 1998)；為探討市售白芷飲片的歐前胡素含量並藉以修正檢測流程和分析方法，本試驗自市售品中依根直徑之不同，將其區分成 3 組再分別採用去離子水、甲

醇和乙醇作為溶劑以評估萃取歐前胡素的效能，結果發現，根徑大小與歐前胡素含量似成反比關係 (表 3)，如果進一步分析不同來源的白芷材料 (市售品、微塊莖和癒傷組織)，則市售品的歐前胡素含量 (772.3 ± 21.3) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 仍高於培養 3 個月之微塊莖 (83.3 ± 21.6) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 或白色癒傷組織 (32.0 ± 2.2) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (表 3、圖 6)。Wang *et al.* (2007) 曾收集中國大陸 21 個不同地區的市售白芷藥材進行成分的鑑別與分析，在所有樣品中歐前胡素含量最高者為 1889.3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ，最低值則為 479.8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ，約有近半數地區的樣品其歐前胡素含量介於 600 – 900 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ，也與本試驗檢測所用的市售品含量相近 (表 3)。Chang (1991) 則研究台灣白芷細胞懸浮培養以量產歐前胡素的技術，並分析比較市場品杭白芷 (667.3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)、野生台灣白芷根 (234.8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)、莖葉 (11.8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 和懸浮細胞 (8.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 歐前胡素的含量；本試驗結果則發現，白芷微塊莖的歐前胡素含量顯著高於白色癒傷組織 (圖 6)，因此，若取微塊莖為材料，不但能以繼代培養方式生產歐前胡素，另一方面也可用於誘導產生優良苗株專供田間栽培販售，此應是一項值得參考的藥材量產策略。

以 WPM 固體培養基培養 3 個月後的白芷白色癒傷組織已呈現老化與褐化現象 (圖 5)，但是，分析其歐前胡素含量 (32.0 ± 2.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 仍顯著高於培養 1 個月者 (2.5 ± 2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (圖 6)，此也符合在老化懸浮細胞中累積有較高量歐前胡素的論點 (Chang 1991)；至於，繼代培養在含有 WPM 基本鹽類並添加 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 及 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 培養基 1 和 3 個月的綠色癒傷組織無法產生歐前胡素的原因，可能與植物生長調節劑之存在或是氮源的競爭有關，例如，以 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 低濃度的 NAA 取代原培養基中的 2,4-D，可大幅提升金雞納樹 (*Cinchona ledgeriana*) 緊實球狀組織 (Compact globular structures, CGS) 產生較多的 quinoline 生物鹼

(Hoekstra *et al.* 1990)；在藥用牛舌草 (*Anchusa officinalis*) 細胞懸浮培養的培養基中添加 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 不但有助於細胞的生長並且能增加 rosmarinic acid 的生成量，若是添加 BA 或 kinetin 則無類似的效果 (De-Eknamkulc & Ellis 1985b)；Fujita *et al.* (1981) 曾研究改良硬紫草 (*Lithospermum erythrorhizon*) 細胞懸浮培養之培養基配方並探討外加植物生長調節劑對紫草素 (shikonin) 產量的影響，結果發現 NH_4^+ 的存在會抑制紫草素的形成，若是培養基中以 6.7 mM 的 NO_3^- (415.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 作為培植體唯一的氮源時，則可以獲得較多量的紫草素；報導同時也指出，培養液添加 10^{-5} M kinetin 會阻礙紫草素的生合成，若是含有 10^{-6} M 吲哚乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA)，則可提高紫草素的產量。Yazaki *et al.* (1987) 進一步試驗發現，紫草素的生合成並非受到 NH_4^+ 的影響，而是因麩氨醯氨 (glutamine) 的過度累積；對一般的植物體而言， NH_4^+ 可由固氮作用或自土壤中吸取得，但 NH_4^+ 濃度太高不只抑制雙氮酶的作用，也會影響細胞能量的代謝並產生毒害，因此，植物體會迅速同化 NH_4^+ ，而其初級產物即是 glutamine；儘管 glutamine 影響紫草素生合成的機制尚不清楚，但是，本試驗之白芷白色癒傷組織，繼代培養於不添加生長調節劑但含有 NH_4^+ (90 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 WPM 培養基中 3 個月，仍能累積 (32.0 ± 2.2) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 的歐前胡素 (圖 6)，故推測 glutamine 的存在應有利於歐前胡素的生合成；而白色癒傷組織在轉變成為綠色癒傷組織後，減低歐前胡素的生合成，其原因可能是在光照環境下，癒傷組織細胞受到植物生長調節劑調控的影響，活化內部 δ -aminolevulinic acid dehydrase (ALA dehydrase) 或是 ALA synthetase 等酵素並促進 ALA 的生合成，而 ALA 即為合成葉綠素的前驅物質，上述物質的生合成會轉移和消耗培養基中的氮源，或許因此降低歐前胡素的生成量。

另外，表 3 和圖 3 試驗結果也顯示，甲醇雖是萃取歐前胡素頗具效能的溶劑，卻也是一種容易引起肝臟中毒的化學藥品，考量一般民間日常使用含有白芷的複方藥材，大多僅以清水煎煮藥液，因此，為求符合實際應用現況並期望研究成果能提供國人參考，本試驗仍選用乙醇進行白芷歐前胡素之萃取與分析；實驗數據也證明選用純水煎煮白芷飲片並不容易提取指標成分，故建議國人在煎煮含白芷的湯藥時，能酌量添加食用級乙醇或日常使用的米酒，對於提高藥材療效可能較有助益。

誌 謝

本試驗承農委會主管科技計畫經費補助(98 農科-5.3.3-農-C1)，特此申謝。

引用文獻 (Literature cited)

- Chang, W. D. 1991. Studies on Tissue Culture of *Angelica dahurica* var. *formosana*. Master thesis. China Medical University. Taichung. 77 pp. (in Chinese)
- Chang, W. D. 1998. I. Studies on the Production of Secondary Metabolites by Tissue Cultures of *Cryptocarya chinensis*, *Angelica dahurica* and *Lycium barbarum*. II. Study on the Chemical Constituents of *Suriana maritima*. Ph. D. Dissertation, National Taiwan University, Taipei. 265 pp. (in Chinese)
- Chang, W. D., C. C. Chen, Y. S. Chang, and H. S. Tsay. 1993. Studies on tissue culture of *Angelica dahurica* var. *formosana*. I. Callus induction and medium evaluation. Jour. Agric. Res. China. 42:253–264. (in Chinese with English abstract)
- Chiu, N. Y. and K. H. Chang. 1995. Tai-wan pai-chih. p.149–150. in: The Illustrated Medicinal Plants of Taiwan (3). (Chiu, N. Y. and K. H. Chang, eds.) Southern Materials Center Inc., Taiwan. (in Chinese)
- De-Eknamkul, W. and B. E. Ellis. 1985a. Effects of macronutrients on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*. Plant Cell Rep. 4:46–49.
- De-Eknamkul, W. and B. E. Ellis. 1985b. Effects of auxins and cytokinins on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*. Plant Cell Rep. 4:50–53.
- Fujita, Y., Y. Hara, C. Suga, and T. Morimoto. 1981. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Plant Cell Rep. 1:61–63.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspend cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151–158.
- Gandawidaja D. 1980. Effect of nitrate and ammonium on the growth of tissue culture of *Dendrobium phalaeopsis* Fitzg. Ann. Bogor. 7:63–69.
- Hoekstra, S. S., P. A. A. Harkes, R. Verpoorte, and K. R. Libbenga. 1990. Effect of auxin on cytodifferentiation and production of quinoline alkaloids in compact globular structures of *Cinchona ledgeriana*. Plant Cell Rep. 8:571–574.
- Ken, W. S. 1970. Pai-Chih. p.644–645. in: Manual of Medicinal Plants in Taiwan (3). (Ken, W. S., ed.) National Research Institute of Chinese Medicine. Taipei, Taiwan. (in Chinese)
- Lloyd, G. and B. McCown. 1980. Commercially feasible micro-propagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. Pro. Inter. Plant Prop. Soc. 30:421–427.
- Miller, C. O. and F. Skoog. 1953. Chemical control of bud formation in tobacco stem segments. Am. J. Bot. 40:768–773.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473–497.
- Pedersen, C. and K. Brandt. 1992. A method for disinfection of underground rhizome tips of *Alstroemeria* and *Heliconia*. Acta Hort. 325:499–504.
- Pistrick, K. 2002. Notes on neglected and underutilized crops: current taxonomical overview of cultivated plants in the families Umbelliferae and Labiatae. Genet. Res. Crop Evol. 49:211–225.
- Ramanand, N. K., N. Subhanand, M. Lal, and S. B. Singh. 2006. Plantlet regeneration through leaf callus culture in sugarcane. Sugar Tech. 8:85–87.
- Shiau, Y. J. 1999. The Study of Tissue Culture in *Heliconia psittacorum* L. f. cv. *rhizomatosa*. Master thesis. National Chung Hsing University, Taichung. 177 pp. (in Chinese)
- Skoog, F. and C. Tsui. 1948. Chemical control of growth

- and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured in vitro. *Am. J. Bot.* 35:782–787.
- Su, Z., L. J. Shou, Y. L. Bai, and J. M. Xin. 1994. Summary of pai-chih improved the looks. *J. Henan Univ. Chin. Med.* 9:46. (in Chinese)
- Tsay H. S. and H. L. Huang. 1998. Somatic embryo formation and germination from immature embryo derived suspension cultured cells of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Plant Cell Rep.* 17:670–674.
- Wang, T. T., H. Jin, Q. Li, W. M. Cheng, Q. Q. Hu, X. H. Chen, and K. S. Bi. 2007. Isolation and simultaneous determination of coumarin compounds in radix *Angelica dahurica*. *Chromatographia* 65:477–481.
- Watanabe, A., S. Araki, S. Kobari, H. Sudo, T. Tsuchida, T. Uno, N. Kosaka, K. Shimomura, M. Yamazaki, and K. Saito. 1998. *In vitro* propagation, restriction fragment length polymorphism, and random amplified polymorphic DNA analysis of *Angelica* plants. *Plant Cell Rep.* 18:187–192.
- Yazaki, K., H. Fukui, M. Kikuma, and M. Tabata. 1987. Regulation of shikonin production by glutamine in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Plant Cell Rep.* 6:131–134.
- Yen, K. Y. 1980. Pai-chih. p.25–26. *in: The Illustrated Chinese Materia Medica Crude Drugs.* (Yen, K. Y., ed.) Southern Materials Center Inc. Taiwan. (in Chinese)
- Zeng, Y. H., X. H. Kuang, and C. Q. Xiong. 2001. Study on the differentiation between pai-chih and false xiang-pai-chih. *China Pharmacist* 4:232.

Extraction of Imperatorin from Root Slices and Explants of *Angelica dahurica*¹

Yih-Juh Shiau^{2,4}, Toong-Long Jeng³, Jui-Lung Kao³, Jui-Sheng Lai³, and
Chia-Hsin Huang³

Abstract

Shiau, Y. J., T. L. Jeng, J. L. Kao, J. S. Lai, and C. H. Huang. 2011. Extraction of imperatorin from root slices and explants of *Angelica dahurica*. *J. Taiwan Agric. Res.* 60:101–114.

Angelica dahurica has long been a popular plant for traditional medicine by Chinese people. It is widely used to treat disorders, such as catarrh, nasal polypus and skin affections. The main active ingredients of *A. dahurica* are furo-coumarin derivatives, including imperatorin, angelical, and byak-angelicin. Information is scarce on extraction of imperatorin from microtubers and green callus of *A. dahurica* plants grown in tissue culture. The objective of this study was to investigate methods of extraction for imperatorin produced in explants of *A. dahurica*. Results showed that the fresh weight of callus of *A. dahurica* was the highest (25.0 g/flask) in 30-day-old cultures on the medium containing WPM basal salts supplemented with 30 g·L⁻¹ sucrose and 8.5 g·L⁻¹ agar, followed by cultures on B-5 basal salt medium (18.6 g/flask), 1/2 MS medium (9.7 g/flask) and MS medium (5.1 g/flask). The rate of formation of green callus was 60% after white callus of *A. dahurica* subcultured on WB₁N_{0.5} medium for 90 days. Among the three solvents (methanol, water and ethanol) investigated, methanol was the best solvent for extraction of imperatorin from commercial root slices of *A. dahurica* which yielded 772.3 µg of imperatorin in each gram of dry sampling. Imperatorin in white callus from 3-month-old cultures on WPM medium was 32.0 µg·g⁻¹, whereas imperatorin in microtubers from 3-month-old cultures was 83.3 µg·g⁻¹. This study suggests that it is possible for mass-production of imperatorin and mass-propagation of plantlets using microtubers of *A. dahurica*.

Key words: *Angelica dahurica*, Explant, Root slice, Imperatorin.

-
1. Contribution No. 2516 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: May 16, 2011.
 2. Assistant Researcher, Plant Germplasm Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Respectively, Associate Researcher, Assistant Researcher, Assistant Researcher, and Assistant Researcher, Biotechnology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Corresponding author, e-mail: yjshiau@tari.gov.tw; Fax: (04)23331705.

長期不同耕作制度及作物殘體管理對土壤有機質含量的影響¹

譚增偉^{2,3} 陳桂暖²

摘 要

譚增偉、陳桂暖。2011。長期不同耕作制度及作物殘體管理對土壤有機質含量的影響。台灣農業研究 60:115-124。

長期施用化學肥料下，連續 20 年間不同耕作制度與作物殘體管理對土壤有機質含量變化的影響顯示，不同耕作制度間，從剛開始的第 3 年後，即造成土壤有機質含量呈明顯差異，以旱作連作者最高，水稻連作區者次之，水旱田輪作最低，且各耕作制度，表土有機質含量且均隨年度間呈增加趨勢，其中以旱作連作者增加之幅度亦最大；水田連作者次之，輪作者最低。作物殘株移除、掩埋或焚燒，三者間對土壤有機質含量造成的差異，每年的結果並不一致，但均呈逐年遞增趨勢，即於作物收穫後，即使將作物殘體移除或燒灰，並不會造成土壤有機質含量恒低於殘體掩施者，亦不會使土壤有機質含量逐年遞減；顯見原蔗田土壤在改變作物及耕作系統下，歷經 20 年土壤有機質似仍未達平衡狀態。

關鍵詞：水稻、玉米、耕作制度、連作、輪作、作物殘體、有機質。

前 言

基於農業環境永續發展的概念，世界上許多和土壤環境有關的長期田間試驗在被探討或仍在進行，涉及的項目包括耕作制度、連作、輪作、耕犁、有機與化學肥料、作物殘株利用等問題，而土壤有機質更為其中經常被討論的因子。為了評估土壤與作物管理措施對土壤與作物之影響，遂發展成以土壤品質的概念作為一種評估的工具，而土壤有機質即為土壤品質的重要指標之一 (Dick & Gregorich 2004; Scheller & Raupp 2005)。各種耕作系統下，不同管理與種

種物理、化學與生物因子均影響土壤有機質與作物殘體的分解、累積與平衡問題，而在傳統農耕下，經常性的耕犁和大量使用化學肥料與農藥，被認為極易造成耕地土壤有機質的損失與產量衰退 (Herencia *et al.* 2007)。Rasmussen *et al.* (1980) 發現，每次作物殘體經燒灰處理，45 年後與作物殘體掩埋者比較，其對土壤有機質含量幾乎沒有影響。國內則不見這方面的報導，或因長期田間試驗不易維持有關。故本研究目的即藉由長期田間試驗之設立，探討我國常行之耕作制度及田間作物殘體處理方式對土壤有機質含量變化之影響趨勢。

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2517 號。接受日期：100 年 3 月 29 日。

2. 本所農業化學組助理研究員、研究助理。台灣 台中市。

3. 通訊作者，電子郵件：tsengweitan@tari.gov.tw；傳真：(04)23302805。

材料與方法

本長期試驗田設立於台中市霧峰區農業試驗所農場 68 號田，乃典型之砂頁岩粘板岩非石灰性沖積土，質地為粉質壤土，面積連區外保護區計 0.45 ha，試驗前（1985 年以前），該田區為以種植甘蔗為主之旱田，未曾種植過水稻，1985 年最後一次甘蔗收穫後，曾連續兩期作水稻及一作玉米之無處理試驗，以求田區之平整。剛開始數年，該試驗田區無犁底層，土壤在浸水翻犁後太軟，插秧前必需先放水曝曬 2 天待表土較硬，再灌水插秧，曝曬時為免生雜草，先以殺草劑防治之。試驗田區平均分割為 4 部分，各部分不同連、輪作區，一年兩期作計：(I) 水稻連作，即兩期作均水稻；(II) 一期水稻、二期旱作（玉米）；(III) 一期旱作（玉米）、二期水稻；(IV) 旱作連作，即兩期作均為玉米。各部分內之處理均為 3 種：(1) 僅施化學肥料 + 作物殘體移除；(2) 施化學肥料 + 作物殘體掩埋；(3) 施化學肥料 + 作物殘體燒灰。計 2 重複，24 小區，小區面積 10 m × 10 m。水稻採人工插秧，行株距 24 cm × 24 cm；玉米整地播種，行株距 70 cm × 25 cm。前述作物殘體移除，意指作物收穫後，將地上部份之蔴稈移除田區，其中水稻以聯合收割機收穫後，稻草不經切碎直接留於地表，再以人工移除之，但仍保留地上部經收割機收穫後切留稻株之稻草頭（約 10 cm 長），而玉米稈則以人工用鐮刀自地表約 10 cm 切下移除之；作物殘體掩埋，意指以聯合收割機收穫水稻後，經切碎之稻草留於地表，玉米稈則以人工用鐮刀切成小段留於地表，二者於整地時再分別以曳引機隨碎土混合而掩施土中；作物殘體燒灰，意指未經切碎之稻草與玉米稈留於地表，乾後點火燒之，整地時再分別以曳引機隨碎土混合而掩施土中。本試驗田完全使用化學肥料；氮肥用硫酸銨、磷肥用過磷酸鈣，鉀肥用氯化鉀。一、二期水稻三要素用量均為 124 kg N/ha（基肥、一追、二

追各 27.7%及穗肥 17%），140 kg P₂O₅/ha（100%作基肥），70 kg K₂O/ha（基肥及一追各 50%）。春、秋作玉米三要素用量均為 270 kg N/ha（基肥，一追各 50%），140 kg P₂O₅/ha（100%作基肥），70 kg K₂O/ha（基肥，一追各 50%）。即玉米之氮肥用量為水稻的 2 倍，磷、鉀用量則相同。1987–1991 年間每年二期作後（玉米為秋作後）各小區分別採取表、底土樣本，每期計 48 個土樣。後鑑於期作間之比較，於 1992 年開始亦採取一期水稻後及春作玉米後之表、底土樣本，同為 48 個土樣，分析土壤有機質含量（土壤中目視可辨別之作物殘體於取樣秤重時去除之）；分析方法採重鉻酸鉀法（Chang 1981）。前述表、底土樣本，係每小區採 9 點混合為 1 個樣本，表土為 0–15 cm，底土為 15–30 cm，每年採樣方法均一致。

結 果

不同耕作制度下土壤有機質含量變化

不同耕作制度在完全施用化學肥料下，表土有機質含量如圖 1-A 所示（二期作後之測值），剛開始的 1987 年二期作後測值僅兩期結果而差異極小，其後即差異明顯且擴大，在連續 20 年間以旱作連作區者表土有機質含量最高，介於 15.5–30.0 g/kg，平均為 22.7 g/kg ± 4.6 g/kg；水稻連作區者次之，介於 15.4–23.1 g/kg，平均為 19.1 g/kg ± 2.5 g/kg，較旱作連作平均減少 3.7 g/kg ± 2.4 g/kg；水旱田輪作最低，其中一期旱作二期水田者又較一期水田二期旱作者略高，前者介於 15.8–21.5 g/kg，平均為 18.1 g/kg ± 1.9 g/kg，較水田連作平均減少 1.0 g/kg ± 0.9 g/kg；後者介於 13.8–20.7 g/kg，平均為 16.6 g/kg ± 2.2 g/kg，較水田連作平均減少 2.4 g/kg ± 0.9 g/kg。上述各耕作制度，表土有機質含量隨年度間呈增加趨勢如圖 1-A，其中又以旱作連作者最大，以 1987 年為基準，則各年度增加之幅度介於 0.4–14.5 g/kg，20 年間平均增加 7.6 g/kg ± 4.4 g/kg；水稻連作

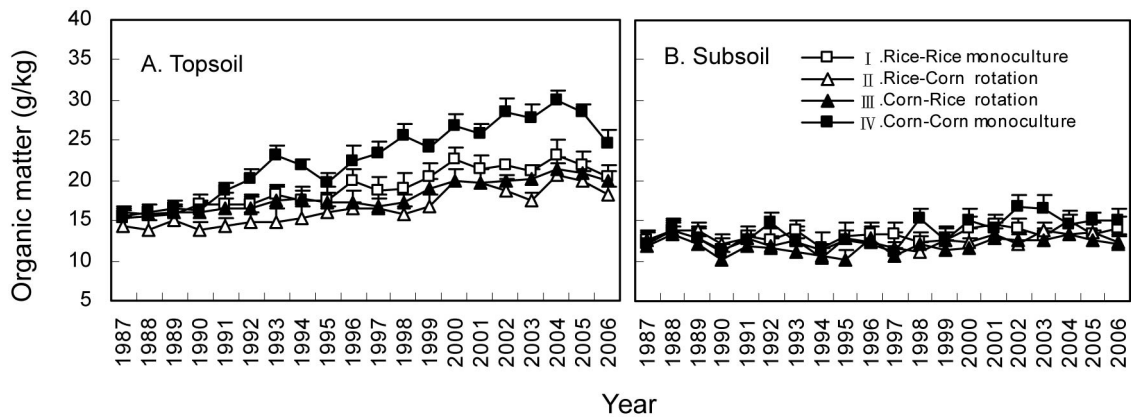


圖 1. 長期不同耕作制度對二期作後表底土有機質含量之影響。

Fig. 1. Effect of long-term cropping systems on content of soil organic matter in topsoil (A) and subsoil (B) tested after the second crop in each year. The experiment was conducted from 1987 to 2006 and, for each year, there were four treatments, including: I. Rice-Rice monoculture; II. Rice-Corn rotation; III. Corn-Rice rotation and IV. Corn-Corn monoculture.

者次之，各年度增加之幅度介於 0.2–7.7 g/kg，平均增加 3.9 g/kg ± 2.4 g/kg；輪作者最低，其中一期旱作二期水田者，各年度增加之幅度介於 -0.1–5.6 g/kg，平均增加 2.3 g/kg ± 1.8 g/kg；而一期水田二期旱作者增加最小，各年度增加之幅度介於 -0.6–6.3 g/kg，平均增加 2.2 g/kg ± 2.1 g/kg。

至於底土有機質含量變化如圖 1-B，顯示年度間各不同耕作制度之底土有機質含量及其分佈幅度遠不及表土，且在不同耕作制度間並不如表土之差異明顯，其中水稻連作者有機質含量介於 11.1–15.0 g/kg，平均為 13.2 g/kg ± 0.9 g/kg；一期水田二期旱作者介於 10.4–13.9 g/kg，平均為 12.6 g/kg ± 0.9 g/kg；一期旱作二期水田者介於 10.1–13.2 g/kg，平均為 11.8 g/kg ± 0.9 g/kg；旱作連作者介於 11.1–16.7 g/kg，平均為 13.6 g/kg ± 1.7 g/kg。

上述圖 1 乃二期作各不同耕作制度間之結果，若連續一、二期作，各耕作制度在連續 20 年間表底土有機質含量變化情形如圖 2，更可清楚顯示其變化趨勢。圖 2-A 顯示各耕作制度

之表土有機質含量以旱作連作區者最高，介於 15.5–30.0 g/kg，平均為 22.9 g/kg ± 3.9 g/kg；水稻連作區者次之，介於 15.4–23.1 g/kg，平均為 18.8 g/kg ± 2.2 g/kg；水旱田輪作則最低，其中一期旱作二期水田者介於 13.6–21.5 g/kg，平均為 17.4 g/kg ± 1.9 g/kg，而一期水田二期旱作者介於 13.8–21.1 g/kg，平均為 17.1 g/kg ± 2.1 g/kg；此時表土有機質含量略低於圖 1 者，因尚包含一期作。又圖 2A 顯示各耕作制度之表土有機質含量與年度間呈增加趨勢，增加之幅度亦以旱作連作者最高，水稻連作區者次之，一期水田二期旱作者最低。至於底土的結果則影響較小如圖 2B。

不同作物殘體管理之土壤有機質含量變化

各耕作制度下，作物殘株不同處理方式下土壤有機質含量變化如圖 3，顯然殘株處理之間，不論是移除，掩埋或焚燒，差異趨勢並不明顯，即圖之顯示，並非每個年度均以殘株掩埋者之土壤有機質含量最高，抑或殘株移除者其有機質含量就一定最低，但均隨年度呈增加趨勢。其中水稻連作區 (圖 3A)，殘株掩埋、

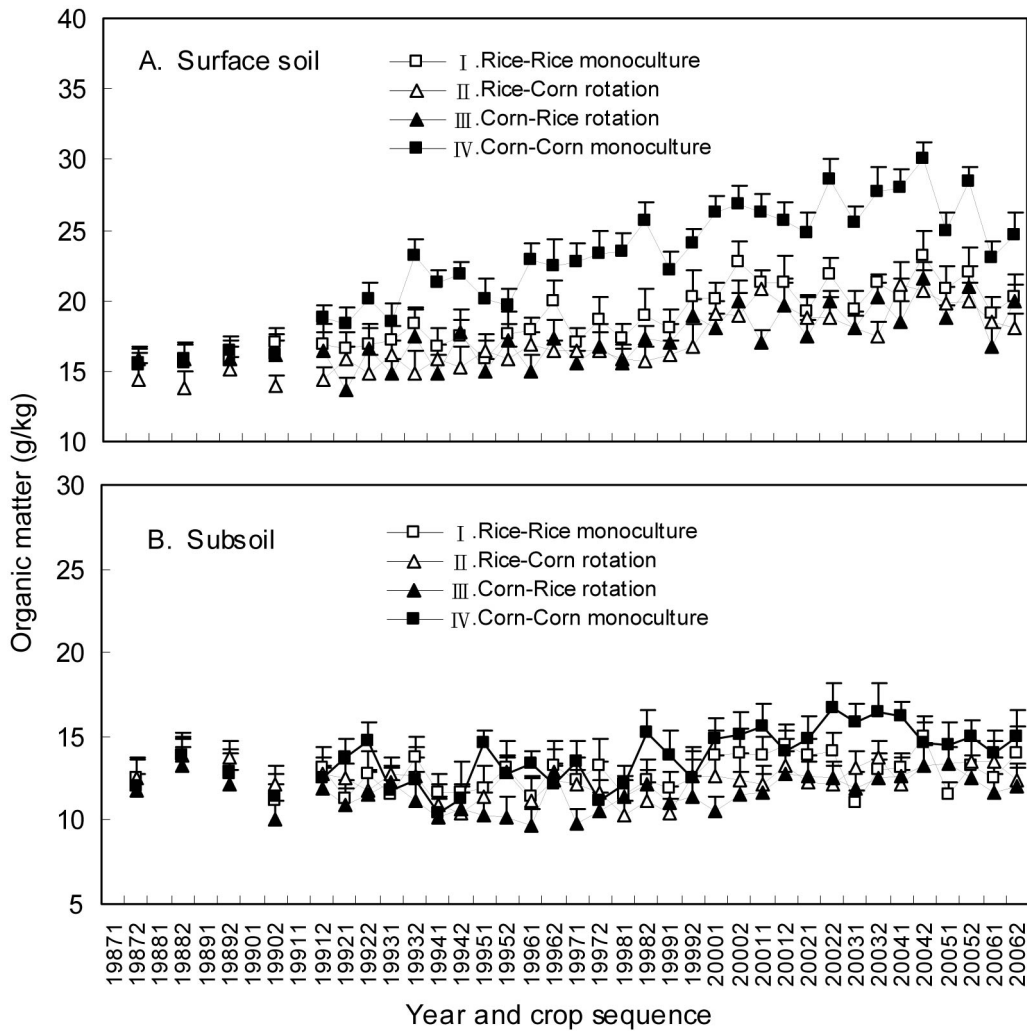


圖 2. 長期不同耕作制度連續一、二期作對表底土有機質含量分佈趨勢及差異比較。19871、19872 分別表示 1987 年一期作 (水稻或春作玉米) 及 1987 年二期作 (水稻或秋作玉米)，餘類推。

Fig. 2. Content of organic matter in the topsoil and subsoil of the long-term cropping systems experiment (1987–2006) survived after harvest of the first crop and the second crop in each year. Year and crop sequences are: 19871: first crop (rice or spring corn) in 1987; 19872: second crop (rice or fall corn) in 1987 and so on.

殘株移除、殘株焚燒者其有機質含量分別平均為 19.6 g/kg ± 3.1 g/kg、18.8 g/kg ± 2.3 g、18.8 g/kg ± 3.3 g/kg；旱作連作區 (圖 3D)，殘株掩埋、移除、焚燒者其有機質含量分別平均為 22.8 g/kg ± 4.7 g/kg、22.6 g/kg ± 4.4 g、22.8 g/kg ± 5.2 g/kg；一期水田二期旱作者 (圖 3B) 各為 16.8 g/kg ±

3.1 g/kg、16.9 g/kg ± 2.7 g/kg、16.2 g/kg ± 1.9 g/kg；一期旱作二期水田者 (圖 3C) 則為 18.4 g/kg ± 2.0 g/kg、18.0 g/kg ± 2.8 g、17.8 g/kg ± 3.1 g/kg。此表示 20 年間，各耕作制度間有機質含量雖有差異，但同一耕作系統下之殘株掩埋、移除、焚燒，三者間對有機質含量之影響趨勢不明顯。

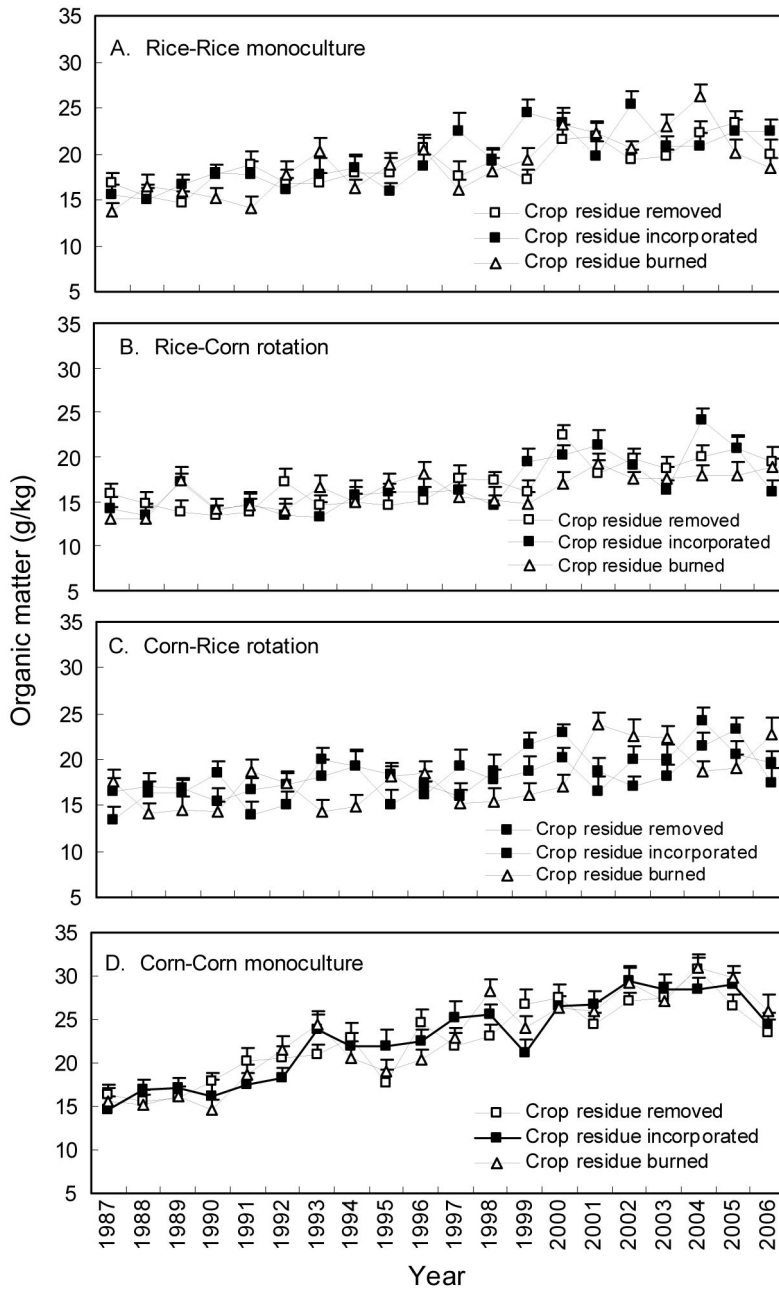


圖 3. 長期不同耕作制度下作物殘體管理對二期作後表土有機質含量之影響。

Fig. 3. Effect of crop residue managements under different long-term cropping systems (A–D) on content of organic matter in topsoil surveyed each year after the harvest of the the second crop. The experiment was conducted from 1987 to 2006 and the methods for the residue management in each year were: crop residue removed, crop residue incorporated in the soil and crop residues burned.

在不分耕作制度下，比較各殘株處理方式對土壤有機質含量變化如圖 4，此時不同殘株處理方式之差異趨勢並不明顯，其中殘株掩埋處理者，20 年間土壤有機質含量介於 15.3–23.5 g/kg，平均為 $19.4 \text{ g/kg} \pm 2.8 \text{ g/kg}$ ；殘株移除者有機質含量介於 15.2–23.6 g/kg，平均為 $19.1 \text{ g/kg} \pm 2.7 \text{ g/kg}$ ；殘株焚燒者有機質含量介於 14.6–23.5 g/kg，平均為 $18.9 \text{ g/kg} \pm 2.9 \text{ g/kg}$ 。三者之差異趨勢雖不一致，但有機質含量均隨年度呈增加趨勢，以 1987 年為基準，殘株掩埋處理者各年度增加之幅度介於 0.3–9.1 g/kg，20 年間平均增加 $4.3 \text{ g/kg} \pm 2.7 \text{ g/kg}$ ；殘株移除者各年度增加之幅度介於 -0.4–8.0 g/kg，20 年間平均增加 $3.7 \text{ g/kg} \pm 2.6 \text{ g/kg}$ ；殘株焚燒者各年度增加之幅度介於 -0.4–8.5 g/kg，20 年間平均增加 $4.1 \text{ g/kg} \pm 2.8 \text{ g/kg}$ 。換言之，作物殘株處理方式不論是移除、掩埋或焚燒，三者間對土壤有機質含量的影響，差異並不顯著；即使將作物

殘株移除或焚燒，並不會恆使土壤有機質含量少於將作物殘株掩埋於土壤中者，亦不會使土壤有機質含量逐年遞減，相反的，三種殘株處理方式均造成土壤中有機質含量呈逐年遞增趨勢。

討 論

本試驗自 1987 年起每年固定於二期作（玉米為秋作）結束後取土樣，自 1992 年開始亦採取一期作（玉米為春作）後之土樣，由於兩個期作（土壤採樣前）歷經之溫度分佈不同，一期作由低溫至高溫，二期作則由高溫至低溫（圖 5），而期作別之年平均溫度分佈如圖 6，其中一期作之平均溫度較高，平均為 $25.3^\circ\text{C} \pm 0.3^\circ\text{C}$ ，二期作之平均溫度較低，平均為 $21.5^\circ\text{C} \pm 0.57^\circ\text{C}$ ，恆較一期作平均低 $4.4^\circ\text{C} \pm 0.68^\circ\text{C}$ ，此種差異，有可能一、二期作後土壤有機質含量不同。通常溫度會嚴重影響土壤有機質的分解，自然亦

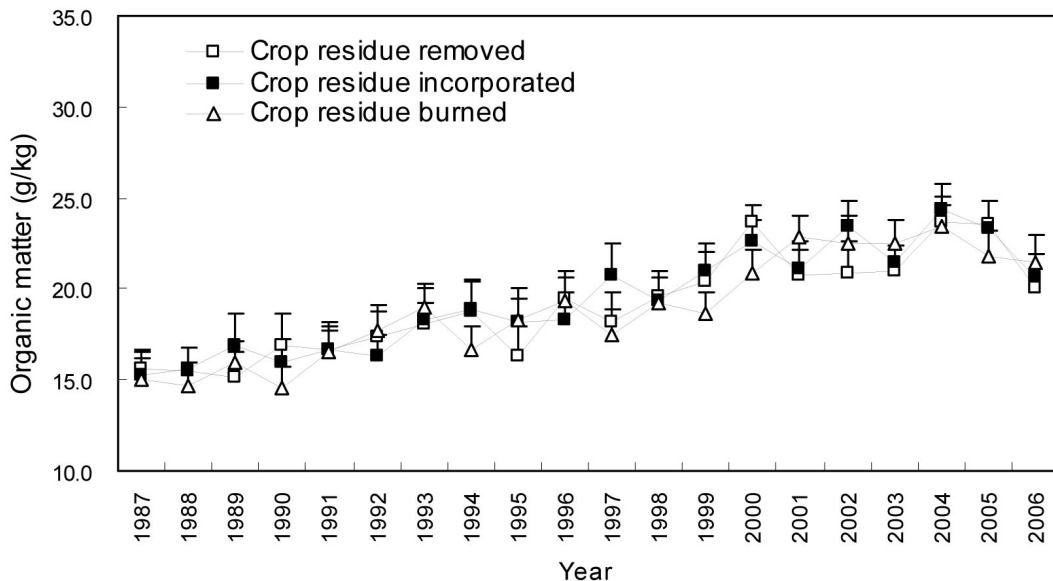


圖 4. 長期作物殘體管理對二期作後表土有機質含量分佈趨勢及差異比較。

Fig. 4. Effects of long-term crop residue managements on content of organic matter in top soil surved each year after the second crop during 1987–2006. The methods for residue management in each year were: 1, crop residue removed, 2, crop residue incorporated in the soil and 3, crop residues burned.

影響有機質含量的高低，及地區性、季節性的差異分佈 (Tanaka 1978; Spoisito 1989; Spoisito & Zabel 2003; Yadvinder-Singh *et al.* 2004; Hartemink 2006)，即使是少量的溫度變化，亦足以影響土壤中有機質的生化反應 (Karlen *et al.* 1994)。圖 7 為分別就表底土比較 1992–2006 年間，一、二期作後土壤有機質之含量差異，其中表土有機質含量，二期作者大於一期作，平均差異為 $1.3 \text{ g/kg} \pm 0.5 \text{ g/kg}$ ；底土之差異較小，僅為 $0.5 \text{ g/kg} \pm 0.4 \text{ g/kg}$ ，就有機質含量言應可忽略。這種現象，致使歷年水田連作之表土有機質含量分佈圖呈明顯的鋸齒狀，即一期作低，二期作高 (圖 2A)，而底土影響小故不明顯 (圖 2B)。另水旱田狀態因通氣性的差異亦影響有機質分解，致水田狀態的有機質分解慢而含量一般要大於旱田者 (Tanaka 1978; Spoisito 1989)，故圖 2A 的結果，水田連作者，有機質含量大於一期水田二期旱作者。圖 2A 中，Ⅲ (一期旱田、二期水田) 之趨勢線成極明顯鋸齒狀，則為上述 2 個因子即溫度與水旱田狀態之加成作用的結果；二期作平均溫度低且為水田，有機質分解慢，故Ⅲ之二期作土壤有機質含量幾乎恆高於一期作者。圖 2A 中，水田連作 (I) 與旱田連作 (IV) 之鋸齒狀趨勢圖，應只是期作別之效應，至於一期水田二期旱作者，一期雖為水田但溫度高，二期雖溫低，但為旱田，二效應互抵，故Ⅱ之鋸齒狀趨勢圖較不明顯。本試驗中旱作連作區之有機質含量與其年度間之增加趨勢均遠大於水田連作與水旱田輪作者，應與其雜草滋生旺盛有關；雖然 2000 年前之連作障礙嚴重，致雜草叢生，而 2001 年開始雖有台農 1 號生長良好，此時雜草亦適應良好，生長旺盛。一般而言，雜草對助長土壤中有機質含量的效果非常明顯 (Collin *et al.* 1992; Rajendra & Goswami 1992)，至於一般耕犁除草等作業，易造成土壤通氣良好，此有助有機質之分解，故犁次數愈多，愈不利有機

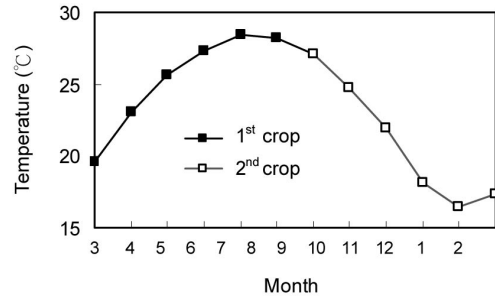


圖 5. 期作別之月平均溫分佈差異。

Fig. 5. Average monthly temperature in the experimental field during the period of 1992 to 2006.

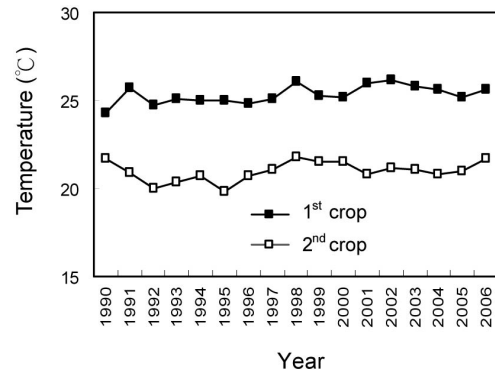


圖 6. 期作別之年平均溫分佈差異 (1990–2006)。

Fig. 6. Average annual temperature in the experimental field during the period of 1992 to 2006.

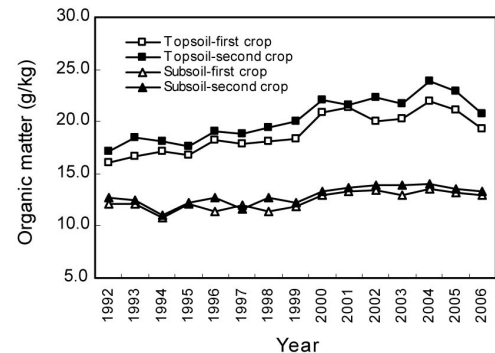


圖 7. 歷年來期作別之表底土有機質含量差異。

Fig. 7. Contents of organic matter in topsoil and subsoil of the experimental plots surveyed each year after harvesting of first and second crops during 1992–2006.

質的成長 (Karlen *et al.* 1994; Wander *et al.* 1994; Bordovsky *et al.* 1999; Edmeades 2003; Melero *et al.* 2006)，而本試驗結果，旱作連作之有機質含量較高應即是雜草效應，可能與本試區從不噴施殺草劑及不行耙田除草作業亦有關。

吾人常期望若將作物收穫後之殘體掩施於土壤中，能增加土壤有機質含量，否則即有減少或逐年遞減之虞，許多研究報告均顯示此一相類似結果 (Rajendra Prasad & Goswami 1992; Kumar & Goh 2000)，事實上，作物殘株處理對土壤有機質含量的效應，還是要依土壤性質、殘株種類、加入的頻率，尤其是氣候等因子的影響 (Bulluck *et al.* 2000; Scheller & Raupp 2005)，致常有不一致的結果，更顯示長期觀察的重要性。Yadvinder-Singh *et al.* (2004) 之長期試驗，顯示加入小麥桿與廐肥之土壤比加入綠肥者能固定較多的碳，並認為是因穀類作物殘株和堆廐肥比綠肥具有較高之腐植係數 (Beri *et al.* 1995; Yadvinder-Singh *et al.* 1995) 之故。更有報導指出，任何作物即使地上部因收穫而帶走，但土壤仍以根系形式而增加碳量，因根系總是與土壤緊密膠結在一起，當它分解時受微生物分泌的多糖類粘膠體之作用，在一定時間內可抵抗微生物的分解 (Collins 1992; Martens *et al.* 1992; Kumar & Goh 2000)。圖 4 之結果，在無地上物掩施下，土壤有機質含量並不會恆比將地上物掩施者少，即是因溫度高，地上部分解快，且在根系-土粒-微生物分泌多醣膠粘體之機制下的結果；且有機質含量在 20 年間為遞增趨勢，表示原蔗田土壤在改變作物及耕作系統下，經過了 20 年土壤有機質仍未達平衡狀態。

引用文獻 (Literature cited)

- Beri, V., B. S. Sidhu, G. S. Bahl, and A. K. Bhat. 1995. Nitrogen and phosphorus transformations as affected by crop residue management practices and their influence on crop yield. *Soil Use Manage.* 11:51–54.
- Bordovsky, M., M. Choudhary, and C. J. Gerard. 1999. Effects of tillage, cropping, and residue management on soil properties in the Texas rolling plains. *Soil Sci.* 164:331–340.
- Bulluck, L. R., M. Brosius, G. K. Evanylo, and J. B. Ristaino. 2002. Organic and synthetic amendments influence soil microbial, physical and chemical properties on organic and conventional farms. *Appl. Soil Ecol.* 19:147–160.
- Chang, I. W. 1981. The methods of soil testing. p.9–26. *in: The Diagnostic Technique in Crop Requirement for Fertilizer Applying.* Agric. Res. Inst. Pub. Taichung, Taiwan. (in Chinese)
- Collins, H. P., P. E. Rasmussen, and C. L. Douglas, Jr. 1992. Crop rotation and residue management on soil carbon and microbial dynamics. *Sol Sci. Soc. Am. J.* 56:783–788.
- Dick, W. A. and E. G. Gregorich. 2004. Developing and maintaining soil organic matter levels. p. 103–120. *in: Managing Soil Quality Challenges in Modern Agriculture.* (Schjonning, P., S. Elmholt, and B. T. Christensen eds.) CABI Pub. CAB International. Wallingford, UK.
- Edmeades, D. C. 2003. The long-term effects of manures and fertilizers on soil productivity and quality: a review. *Nutr. Cycling Agroecosyst.* 66:165–180.
- Hartemink, A. E. 2006. Assessing soil fertility decline in the tropics using soil chemical data. *Adv. Agron.* 89:179–225.
- Herencia, J. F., J. C. Ruiz-Porras, S. Melero, P. A. Garcia-Galavis, E. Morillo, and C. Maqueda. 2007. Comparison between organic and mineral fertilization for soil fertility levels, crop macronutrient concentrations, and yield. *Agron. J.* 99:973–983.
- Karlen, D. L., G. E. Varvel, D. G. Bullock, and R. M. Cruse. 1994. Crop rotations for the 21st century. *Adv. Agron.* 53:1–45.
- Kumar, K. and K. M. Goh. 2000. Crop residues and management practices: effects on soil quality, soil nitrogen dynamics, crop yield, and nitrogen recovery. *Adv. Agron.* 68:197–319.
- Martens, D. A., J. B. Johanson, and W. T. Jr. Frankenberg. 1992. Production and persistence of soil enzymes with repeated addition of organic residues.

- Soil Sci. 153:53–61.
- Melero, S., J. C. Ruiz, J. F. Herencia, and E. Madejon. 2006. Chemical and biochemical properties in a silty loam soil under conventional and organic management. *Soil Tillage Res.* 90:162–170.
- Prasad, R. and N. N. Goswami. 1992. Soil fertility restoration and management for sustainable agriculture in South Asia. *Adv. Soil Sci.* 17:37–77.
- Rasmussen, P. E., R. R. Allmaras, C. R. Rohde, and N. C. J. Roager. 1980. Crop residue influence on soil carbon and nitrogen on wheat-fallow system. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44:496–500.
- Scheller, E. and J. Raupp. 2005. Amino acid and soil organic matter content of topsoil in a long term trial with farmyard manure and mineral fertilizer. *Biol. Agric.* 22:379–397.
- Sposito, G. 1989. *The Chemistry of Soils*. Oxford University Press, Inc. 277 pp.
- Sposito, G. and A. Zabel. 2003. The assessment of soil quality. *Geoderma.* 114:143–144.
- Tanaka, A. 1978. Role of organic matter. p. 605–620. *in: Soils & Rice*. (Brady, N. C., ed.) IRRI. Los Banos, Laguna, Philippines.
- Wander, M. M., S. J. Traina, B. R. Stinner, and S. E. Peters. 1994. Organic and conventional management effect on biologically active soil organic matter pools. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58:1130–1139.
- Yadvinder-Singh, Bijay-Singh, J. K. Ladha, C. S. Khind, R. K. Gupta, O. P. Meelu, and E. Pasuquin. 2004. Long-term effects of organic inputs on yield and soil fertility in the rice-wheat rotation. *Soil Sci. Am. J.* 68:845–853.
- Yadvinder-Singh, Bijay-Singh, M. S. Maskina, and O. P. Meelu. 1995. Response of wetland rice to nitrogen from cattle manure and urea in a rice-wheat rotation. *Trop. Agric.* 72:91–96.

Effect of Long-Term Cropping Systems and Crop Residue Managements on Content of Organic Matter in Soil¹

Tseng-Wei Tan^{2,3} and Kuei-Nuan Chen²

Abstract

Tan, T. W. and K. N. Chen. 2011. Effect of long-term cropping systems and crop residue managements on content of organic matter in soil. *J. Taiwan Agric. Res.* 60:115–124.

A long-term experiment was conducted from 1987 to 2006 in a field of noncalcareous sandstone and slate alluvial soil at the experimental farm of Taiwan Agriculture Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, to evaluate the effects of cropping systems and crop residue managements on content of soil organic matter in topsoil and subsoil. In this study, there were four cropping systems including I, Rice-Rice monoculture; II, Rice-Corn rotation; III, Corn-Rice rotation and IV, Corn-Corn monoculture and three crop residue management methods, including 1, manual removal of crop residues; 2, incorporation of crop residues in the soil and 3, burning of crop residues. Results showed that the content of soil organic matter was significantly ($P < 0.05$) higher in the treatment of continuous corn-corn monoculture, compared to the treatment of continuous rice-rice monoculture. In contrast, the content of soil organic matter was slightly lower in the treatments of rice-corn rotation and corn-rice rotation, compared to the treatment of rice-rice monoculture. All the four cropping systems, especially for the continuous corn monoculture, resulted in increased organic matter in the soil during the period of 20 years. Results also showed that burning or manually removal of crop residues had no significant ($P > 0.05$) effect on content of soil organic matter, compared to the treatment of incorporation of crop residues in the soil. This long-term study indicates that rice and corn grown in continuous monoculture or in rotation and under different managements of crop residues, burning, removal or buried in soil, cause no loss of organic matter in top soil and subsoil.

Key words: Rice, Corn, Cropping system, Monoculture, Rotation, Crop residue, Soil organic matter.

-
1. Contribution No. 2517 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: March 29, 2011.
 2. Assistant Researcher and Research Assistant, Agricultural Chemistry Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Corresponding author, e-mail: tsengweitan@tari.gov.tw; Fax: (04)23302805.

不同栽植期對水稻田雜草相之影響¹

蕭巧玲² 楊純明^{2,3} 李裕娟²

摘 要

蕭巧玲、楊純明、李裕娟。2011。不同栽植期對水稻田雜草相之影響。台灣農業研究 60:125–138。

全球暖化及氣候快速變遷現象已對農作生產與農業環境帶來全面性的衝擊，農田雜草族群種類與數量也發生明顯的變化。本研究於 2009 年在行政院農委會農業試驗所農場（臺中市霧峰區）兩期稻作期間，以春分/大暑為中心之溫度梯度進行 10 次水稻栽植期，探討溫度及光照對水稻田雜草相之影響。每個栽植期皆同時種植 4 個良質稻種，即桃園 4 號 (TY 4)、臺稈 9 號 (TK 9)、臺農 71 號 (TNG 71) 及高雄 145 號 (KH 145)，且均於插秧後 28 天進行雜草取樣及調查族群種類與數量。又收集試區鄰近農試所一級農業氣象測站之氣象測值，計算累加日均溫 (ADMAT)、累加日照時數 (ADSH) 及累加日射量 (ADIR) 等氣象變因數值，以分析稻田雜草相之氣象環境效應及暖化情境的影響。結果顯示試驗區內雜草科別數及種別數有隨著 ADMAT 增加而上升的趨勢，尤以 TY 4 及 TK 9 田區達顯著水準；ADSH 對雜草種類之影響呈現不顯著的凹型二次曲線分佈，ADIR 對雜草族群種類之影響趨勢近似於 ADMAT，然僅 TK 9 田區顯著相關。若將 4 個良質稻種之栽培田區全部雜草資料合併分析，無論雜草科別數或種別數，皆與此三種氣象變因顯著相關，其中 ADMAT 及 ADIR 為曲線正相關，ADSH 為凹型曲線相關。又比較 4 個良質稻種田區在兩期稻作期間所調查之雜草相，發現一期稻作之 5 個栽植期合計以滿天星數量最多，其次為紅骨草；二期稻作之 5 個栽植期合計則以尖瓣花及多花水莧之數量居前二位。此 4 種雜草在水稻秧苗移植後 4 週所調查之數量，經與 ADMAT 比較呈現出凸型或凹型曲線關係。若合併兩期稻作 10 個不同栽植期調查之全部田區雜草資料，總數以尖瓣花數量最多，且其單位面積植株密度隨著 ADMAT 的增加而升高，其次為滿天星、千金子及稗草。綜合試驗結果，顯示不同水稻品種栽植田區之雜草種類與數量在期作間互異，且受到栽植期氣溫之影響。

關鍵詞：栽植期、水稻、雜草種類、雜草密度。

前 言

田間雜草與主作物之間對於光線、水分利用與營養源等的強力競爭，且為病蟲原寄主及

相剋毒害作用等影響，使雜草被認為是引起作物減產的有害生物因素之一 (Chiang 1995)，也因此彰顯出雜草管理在作物栽培過程中的重要性。一般農田雜草發生與土壤中的雜草種子庫

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2518 號。接受日期：100 年 5 月 10 日。

2. 本所作物組助理研究員、研究員、助理研究員。台灣 台中市。

3. 通訊作者，電子郵件：cmyang@tari.gov.tw；傳真機：(04)23317118。

(soil seed bank)，因各種環境、土壤質地、氣候、耕作方式及除草劑使用而產生不同的雜草種類、數量與分佈，亦因各項因子間的交感而產生差異 (Kuo 2004; Dyer 1995)。以耕作方式而言，水田與旱田雜草之發生種類與數量即有明顯不同，臺灣旱田雜草因明顯環境差異而多達 400 餘種，水田雜草則因經常處於湛水及較為均一栽培環境而僅有 165 種之紀錄 (Chiang & Leu 1982; Chiang *et al.* 2003)，且多以一年生雜草為主。

水稻係國內最主要的糧食作物，依據農糧署 2009 年出版之行政院農業委員會「統計年報」資料，臺灣總稻作面積為 254,590 ha (Agricultural Statistics Yearbook 2009)。國內兩期稻作由於栽培氣候之明顯不同，一期稻作之生育期由較低之氣溫與日射量朝向高溫、多日射量氣象環境生長，二期稻作則由生長初期之高溫、多日射量至收穫時之低溫、低日射量 (Lee *et al.* 2009)，導致病、蟲、草害的發生存在期作特性與差異。對雜草而言，因為二期稻作收穫後至一期稻作插秧之間約有 90 天左右非湛水甚至乾燥狀態，此時原在湛水缺氧下休眠的旱田種子可能陸續萌芽、生長 (Kuo 2004)，於是在一期稻作田間常見有旱田雜草 (Chiang & Leu 1982)。整體來說，一期稻作普遍可見如野茨菰 (*Sagittaria trifolia*)、牛毛氈 (*Eleocharis acicularis*) 及水蜈蚣 (*Kyllinga brevifolia* Rottb.) 等雜草，二期稻作則以鴨舌草 [*Monochoria vaginalis* (Burm F.) Presl]、紅骨草 [*Rotala indica* (willd) Koehne]、尖瓣花 (*Sphenoclea zeylanica* Gaertn) 及芒稷 [*Echinochloa colona* (L.) Link] 等較常發生 (Chiang & Leu 1982)。

人類活動排放的溫室氣體乃是全球暖化及氣候變遷的主要原因之一，目前氣候的溫暖化已是不爭的事實，自 1850 年起地表平均溫度即以每百年約 0.74°C 的速度增加 (IPCC 2007)。隨著暖化情境的持續加劇，近年來因氣候異常

而頻繁發生的各種氣象災害 (如熱浪、豪大雨、乾旱、寒潮、冰風暴) 愈趨明顯，可預期將對農業生產帶來負面影響，包括稻米生產的「安全環境」均將受到嚴重威脅 (Lu *et al.* 2006)。臺灣慣行的一期稻作期間約在 2-6 月，二期稻作則在 7-11 月間，但是無論一、二期作，幼穗形成及穀粒充實期間的氣候變化對於產量與品質之影響最為關鍵 (Lu *et al.* 2008)。綜合各種資訊來源，栽植期的調整可能係稻作栽培因應氣候變遷與全球暖化的主要調適策略之一 (Lu *et al.* 2006; Lee *et al.* 2009)，然而伴隨著栽植期的調整所發生的田間病、蟲、草害問題，可能也將出現不同與不等的變化，仍有待謀求妥善的因應管理對策。

當水稻的生育期往前或往後調整，必然出現異於現行栽培環境的氣候條件，使病、蟲、草源之發生組成有所差異。對於雜草來說，栽植期的改變將產生不同的雜草種類及生長表現，直接影響雜草與作物之間的競爭關係 (Chiang & Leu 1982; Andersson & Milberg 1998)。另以大豆為例，Tungate *et al.* (2007) 模擬全球暖化對作物-雜草間相互作用影響，發現決明子 (*Senna obtusifolia*) 及刺金午時花 (*Sida spinosa*) 兩種雜草達到最大生質量的溫度較大豆高，甚至在最高溫 (42/37°C) 處理下兩種雜草的生質量仍高於大豆，且大豆之根/莖比 (root: shoot ratio) 在高溫時明顯低於兩種雜草。由此可見，在高溫下大豆的競爭力低於此兩種雜草，因此預料雜草對大豆的生長與產量的危害相當顯著。Patterson *et al.* (1999) 指出增溫 3°C 可促進常見雜草羅氏草 (*Rottboellia cochinchinensis*) 的乾物重及葉面積分別增加 88 及 68%，該雜草並可能隨著全球暖化趨勢逐漸向北方高緯度地區推移。除了溫度之外，其他氣象因子如光照亦是影響雜草萌發與地理分佈的重要因素，例如中國大陸的一種菊科入侵植物-飛機草 (*Eupatorium odoratum* L.) 就隨著

光輻射量的增強而生質量增加，使得高光照地區逐漸遭受飛機草入侵危害的風險 (Zhang *et al.* 2009)，導致當地植物族群生物多樣性受到威脅。此外，諸如耕犁、種植及肥料施用等栽培措施在時間上的調整，也將會影響雜草的擴散與分佈 (Andersson & Milberg 1998)，因此亦必須改變雜草管理模式以為因應。

CO₂ 濃度上升將造成氣候暖化，而 CO₂ 又是植物行光合作用製造含碳化合物所需的碳源，當各種活動製造的 CO₂ 排放造成暖化情境的升高，可能會增進植物的光合作用效率及生產量 (Erice *et al.* 2006; Chiang & Chiang 2010)。然而，由於對 CO₂ 的利用途徑不同，增加 CO₂ 濃度對於 C₃ 與 C₄ 型植物的光合作用產生的效益也存有差異，C₄ 型植物的光合作用效率隨著 CO₂ 濃度的上升很快就達到飽和，而 C₃ 植物則能持續的進行光合作用 (Ziska 2001)。Kimball (1983) 指出 C₃ 型植物隨著 CO₂ 倍增時可提高生物量達 40%，但 C₄ 型植物僅增加 11%。同理，預期在高 CO₂ 濃度下將會使多年生 C₃ 型雜草提高光合作用效率，此光合產物充分的轉移至地下莖或塊莖等積儲器官而有利於其生長與繁衍 (Oechel & Strain 1985)。因此，田間 C₃ 與 C₄ 型雜草之間的競爭與分佈可能會因為氣候暖化而改變，雜草管理的困難度亦因而增加 (Patterson *et al.* 1999)。Ziska (2000) 曾估算提高 CO₂ 濃度增加雜草競爭對大豆減產造成的衝擊，發現 C₃ 型雜草藜 (*Chenopodium album* L.) 將使得大豆減產 39%，但是 C₄ 型雜草刺莨 (*Amaranthus retroflexus* L.) 的減產幅度反而由 45% 降至 30%。顯見 CO₂ 濃度的上升將影響 C₃、C₄ 型雜草與農作物間的競爭關係，C₃ 型雜草的危害程度可能高於 C₄ 型雜草。

有鑑於全球暖化對雜草與農作物間競爭關係的深遠影響，殊有必要深入瞭解暖化情境下田間雜草相分佈的異動。本研究於 2009 年進行 4 個良質稻種的 10 個栽植期種植，調查各栽植

期田區發生的草相，並依據插秧至調查日期之間所累積的日均溫、日照時數及日射量等 3 種不同氣象變因，藉以釐清氣象因子對草相分佈的影響及不同良質稻種田區之間雜草發生種類與數量的差異，作為未來雜草管理與評估雜草危害的依據。

材料與方法

本研究於臺中市霧峰區之行政院農業委員會農業試驗所農場進行田間試驗，以 2009 年一期稻作期間之立春 ('Lichun' or first day of spring; 代號 SS) 與二期稻作期間之大暑 ('Dashu' or first day of mid-summer; 代號 MS) 等兩個節氣為栽植中心期，在兩節氣前後 15 天及 30 天實施合計 10 個節氣之栽植期 (表 1)；包括一期稻作期間之立春前 30 天 (代號 SS - 30 d)、立春前 15 天 (代號 SS - 15 d)、立春 (代號 SS)、立春後 15 天 (代號 SS + 15 d) 及立春後 30 天 (代號 SS + 30 d) 等 5 個栽植期，二期稻作期間之大暑前 30 天 (代號 MS - 30 d)、大暑前 15 天 (代號 MS - 15 d)、大暑 (代號 MS)、大暑後 15 天 (代號 MS + 15 d) 及大暑後 30 天 (代號 MS + 30 d) 等 5 個栽植期。每個節氣栽植期皆種植桃園 4 號 (TY 4)、臺農 71 號 (TNG 71)、臺梗 9 號 (TK 9) 及高雄 145 號 (KH 145) 等 4 種良質稻種，每一栽植期田區面積 0.1 ha (50 m × 20 m)，均分為 4 個小區逢機栽培。當秧苗於 3-4 葉齡期時，以南北向多本植人工插於試驗田區，田區土壤為偏酸性 (pH 5.4) 之壤土，有機質含量約為 2.21%。本田區在試驗前一年 (2008) 以非化學方式進行雜草管理，2009 年合計 10 個栽植期皆於草相調查後以人工拔除較大株雜草，降低對稻株生長之影響。

在肥料的施用，插秧前施用 200 kg ha⁻¹ 的臺肥 39 號複合肥料粒劑 (12% N，臺灣肥料股份有限公司，高雄市) 作為基肥，插秧後 1-2 週施用 200 kg ha⁻¹ 的臺肥硫銨粒劑 (21% N)

表 1. 2009 年兩期稻作期間 10 個不同栽植期之移植日期、草相調查日期、氣象變因累加值及各良質稻種 [桃園 4 號 (TY 4)、台農 71 號 (TNG 71)、臺梗 9 號 (TK 9) 和高雄 145 號 (KH 145)] 田區調查之雜草科別數與種別數

Table 1. Effect of transplanting dates on number of family and species of weeds and climatic variables in the first and second crop seasons of four cultivars (cv. TY 4, TNG 71, TK 9 and KH 145) of paddy rice grown in 2009

Crop	Symbol ^z	Date of Transplanting	Date of weed survey	Climatic variable ^y			TY 4 ^x		TNG 71		TK 9		KH 145	
				ADMAT (°C)	ADSH (h)	ADIR (MJ m ⁻²)	F ^w	S	F	S	F	S	F	S
1 st crop	SS - 30 d	12/24/08	01/21/09	428.50	196.90	258.19	0	0	0	0	0	0	0	0
	SS - 15 d	01/20/09	02/17/09	524.20	216.50	292.20	3	3	5	5	0	0	5	5
	SS	02/09/09	03/09/09	594.00	191.80	312.07	0	0	4	4	0	0	6	8
	SS + 15 d	02/19/09	03/19/09	568.40	181.40	307.16	0	0	0	0	0	0	0	0
	SS + 30 d	03/05/09	04/02/09	560.70	159.90	280.34	0	0	0	0	0	0	0	0
2 nd crop	MS - 30 d	06/23/09	07/21/09	800.30	135.00	337.93	1	1	3	3	3	3	1	1
	MS - 15 d	07/07/09	08/04/09	817.30	149.70	349.81	5	8	5	7	4	6	5	7
	MS	07/23/09	08/20/09	799.00	143.80	321.34	7	10	2	2	6	8	5	6
	MS + 15 d	08/10/09	09/07/09	813.60	213.50	391.20	6	9	6	7	6	7	6	7
	MS + 30 d	08/20/09	09/17/09	821.00	225.80	392.28	5	5	3	3	5	6	3	3

^z SS: 'Lichun' (first day of spring; 02/09/ 2009). According to the lunar calendar, Lichun refers to the day when the sun is exactly at the celestial longitude of 0°. SS - 30 d and SS - 15 d are transplanting of rice seedlings at 30 and 15 days before Lichun, respectively, and SS + 15 d and SS + 30 d are 15 and 30 days after Lichun, respectively.

MS: 'Dashu' (first day of mid-summer; 07/23/2009). According to the lunar calendar, Dashu refers to the day when the sun is exactly at the celestial longitude of 120°. MS - 30 d and MS - 15 d are transplanting of rice seedlings at 30 and 15 days before Dashu, respectively, and MS + 15 d and MS + 30 d are 15 and 30 days after the date of Dashu, respectively.

^y ADMAT: accumulated daily mean air temperatures; ADSH: accumulated daily sunshine hours; and ADIR: accumulated daily irradiance.

^x Rice cultivar: TY 4: Taoyuan No.4; TNG 71: Tainung No.71; TK 9: Taiken No.9; KH 145: Kaohsiung No.145.

^w F: number of weed family; and S: number of weed species.

為第一次追肥，插秧後 4-5 週施用 200 kg ha⁻¹ 的臺肥硫銨粒劑為第二次追肥，再於抽穗前 1-2 週施用 100 kg ha⁻¹ 的臺肥 39 號複合肥料粒劑為穗肥，合計 120 kg ha⁻¹ 的氮素。

各節氣栽植期之各水稻品種田區，皆統一於插秧後第 4 週進行草相調查，每一稻種小區均逢機割取 4 個 1 m² 的取樣點來調查雜草的科屬別與種別，以平均值表示。先將 1 m² 面積內的所有雜草樣本割取攜回，經過清洗、分類後記錄雜草科別數與種別數。試驗期間之氣象資料，乃收集試區鄰近之一級農業氣象測站測值 (月報表)，包括每日的平均氣溫 (DMAT)、日射量 (IR)、日照時數 (DSH) 等氣象因子。而各節氣栽植期從移植日期至移植後 28 天 (草相調查日期，表 1) 累加之 3 種氣象因子之測值，則包括累加日平均氣溫 (accumulated daily

mean air temperature; ADMAT)、累加日射量 (accumulated daily irradiance; ADIR) 及累加日照時數 (accumulated daily sunshine hours; ADSH) 等變因。試驗資料之統計分析，係利用 SAS 統計軟體 (version 8.1, SAS Institute)，統計繪圖軟體則採用 SigmaPlot (version 8.0 SPSS ASC BV, the Netherlands)。

結 果

本研究以 2009 年一、二期稻作期間之立春與大暑兩節氣作為栽期中心期，分別於節氣前後 15 天及 30 天各栽植 TY 4、TNG 71、TK 9 及 KH 145 等 4 個良質稻種，10 個節氣栽植期資料，各期之移植日期、秧後第 4 週草相調查日期、氣象因子累加值及各稻種田區所調查之草相科別數與種別數等皆可予以比較 (表 1)。

各節氣栽植期之日均溫、日照時數與日射量等三個氣象因子之累加值及雜草相存在差異，顯示以二期稻作期間之栽植期氣象變因測值較高，而雜草族群科別與種別較多 (表 1)。

試驗期間各良質稻種田區於移植後 28 天所調查之雜草族群科別數及種別數與該期間累

加日均溫 (ADMAT) 關係繪製於圖 1，兩者皆隨著 ADMAT 的升高而增加，其中尤以 TY 4 及 TK 9 田區之雜草科別數及種別數呈現明顯二次曲線上升趨勢。又各節氣栽植期調查之雜草科別數及種別數與日照時數累加值 (ADSH) 之關係繪於圖 2，惟未達顯著二次曲線關係。

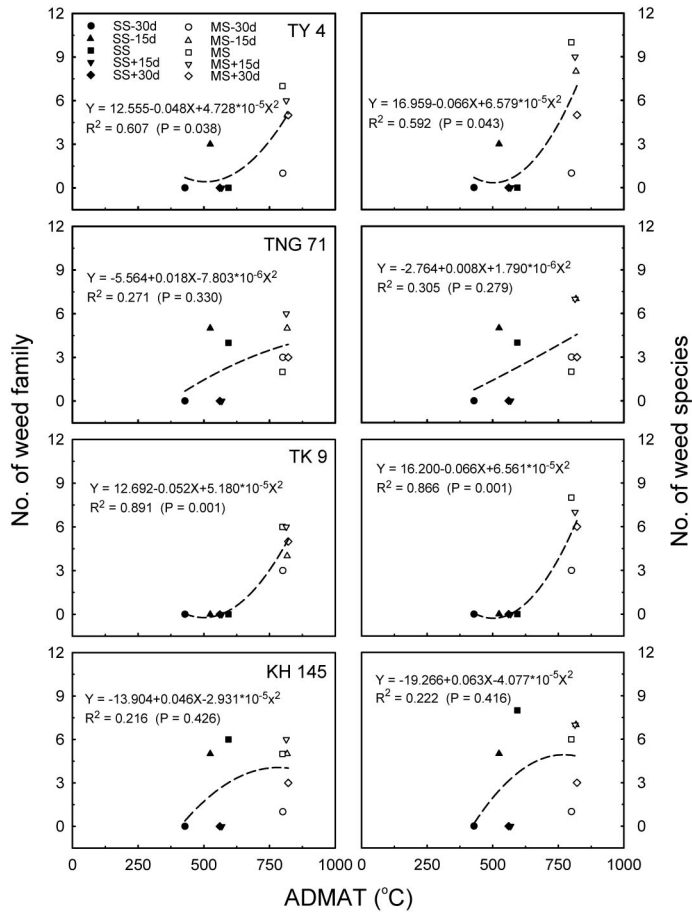


圖 1. 2009 年兩期稻作期間合計 10 個不同栽植期栽培 4 個良質稻種於插秧後第 4 週田間調查之雜草科別及種別數目與該期間累加日均溫 (ADMAT) 之關係。

Fig. 1. The relationships between numbers of weed family and species and accumulated daily mean air temperatures (ADMAT) measured at 4 weeks after transplanting of 4 rice cultivars in paddy fields in the first and second crops of 2009. There were five transplanting dates for each cultivar in each crop season, SS - 30 d: 30 days before Lichun; SS - 15 d: 15 days before Lichun; SS: Lichun (02/09/2009); SS + 15 d: 15 days after Lichun; SS + 30 d: 30 days after Lichun; MS - 30 d: 30 days before Dashu; MS - 15 d: 15 days before Dashu; MS: Dashu (07/23/2009); MS + 15 d: 15 days after Dashu; and MS + 30 d: 30 days after Dashu. Lichun (SS) is the first day of spring and Dashu (MS) is the first day of mid-summer, according to the lunar calendar. The four rice cultivars were: TY 4, Taoyuan No. 4; TNG 71, Tainun No. 71; TK 9, Taiken No. 9; and KH 145, Kaohsiung No. 145.

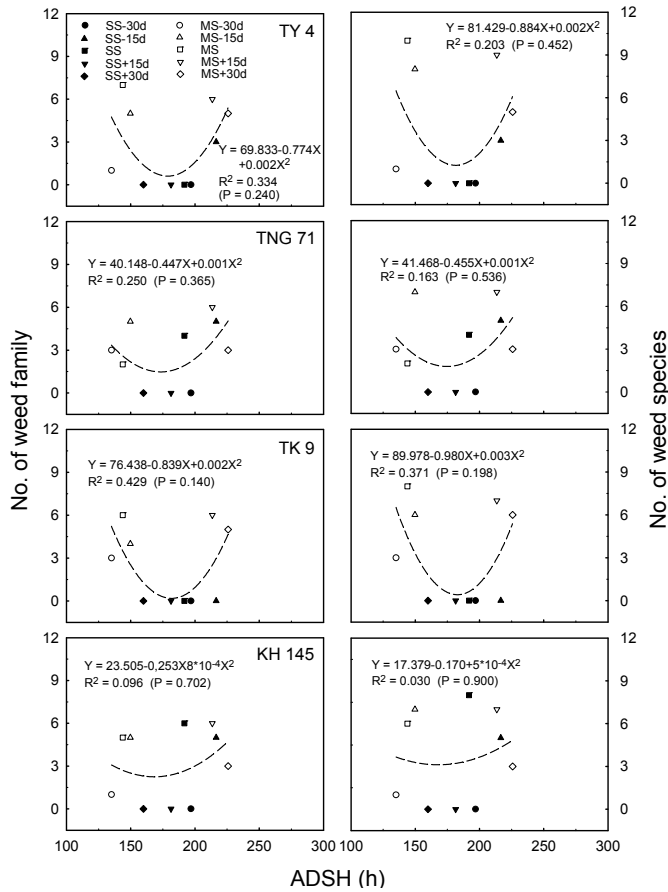


圖 2. 2009 年兩期稻作期間合計 10 個不同栽植期栽培 4 個良質稻種於插秧後第 4 週田間調查之雜草科別及種別數目與該期間累加日照時數 (ADSH) 之關係。

Fig. 2. The relationships between numbers of weed family and species and accumulated daily sunshine hours (ADSH) measured at 4 weeks after transplanting of 4 quality rice cultivars grown in paddy fields in both first and second crops of 2009. There were five transplanting dates for each cultivar in each crop season, SS - 30 d: 30 days before Lichun; SS - 15 d: 15 days before Lichun; SS: Lichun (02/09/2009); SS + 15 d: 15 days after Lichun; SS + 30 d: 30 days after Lichun, MS - 30 d: 30 days before Dashu; MS - 15 d: 15 days before Dashu; MS: Dashu (07/23/2009); MS + 15 d: 15 days after Dashu; and MS + 30 d: 30 days after Dashu. Lichun (SS) is the first day of spring and Dashu (MS) is the first day of mid-summer, according to the lunar calendar. The four rice cultivars were: TY 4, Taoyuan No. 4; TNG 71, Tainung No. 71; TK 9, Taiken No. 9; and KH 145, Kaohsiung No. 145.

而在日射量累加值 (ADIR) 關係上亦呈現上升趨勢，惟僅有 TK 9 田區之雜草科別數及種別數概隨著累加日射量呈顯著二次曲線增加關係 (圖 3)。

將各稻種田區合計 10 個節氣栽植期所調查之草相與氣象資料合併分析，由迴歸曲線分

析結果，可發現除 ADSH 對雜草種別數外，ADMAT、ADIR 皆顯著以二次曲線關係影響稻田雜草族群種類 ($P < 0.001$)，無論係雜草科別數及種別數均大多因溫度、日照時數及日射量累加值的升高而增加 (圖 4)。比較圖中各稻種田區之雜草族群種類多寡，以 KH 145 田區所

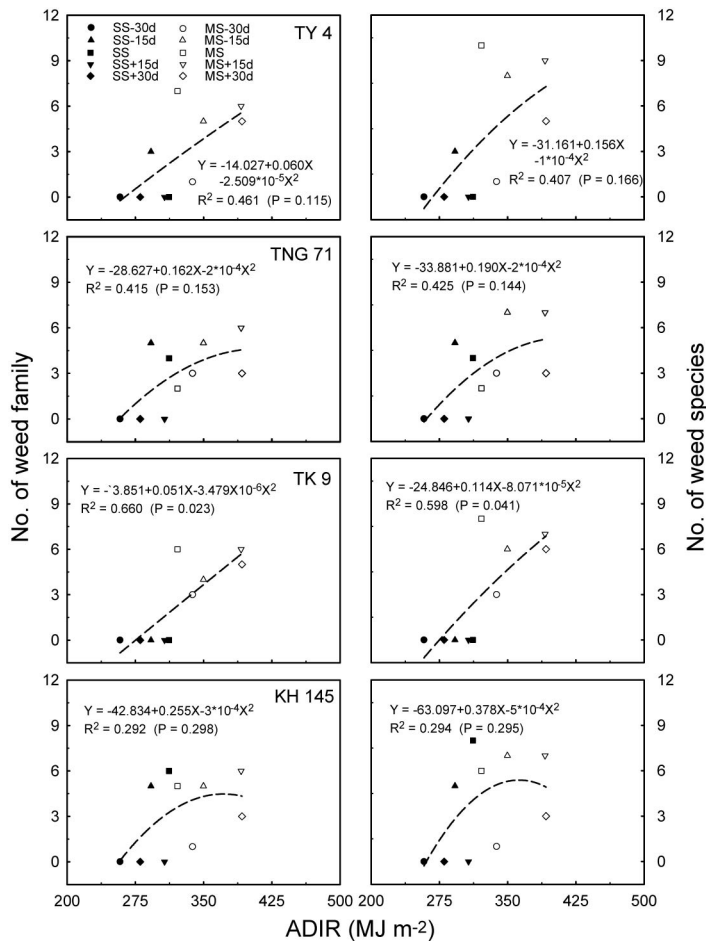


圖 3. 2009 年兩期稻作期間合計 10 個不同栽植期栽培 4 個良質稻種於插秧後第 4 週田間調查之雜草科別及種別數目與該期間累加日射量 (ADIR) 之關係。

Fig. 3. The relationships between numbers of weed family and species and accumulated daily irradiance (ADIR) measured at 4 weeks after transplanting of 4 quality rice cultivars grown in paddy fields in both first and second crops of 2009. There were five transplanting dates for each cultivar in each crop season, SS - 30 d: 30 days before Lichun; SS - 15 d: 15 days before Lichun; SS: Lichun (02/09/2009); SS + 15 d: 15 days after Lichun; SS + 30 d: 30 days after Lichun, MS - 30 d: 30 days before Dashu; MS - 15 d: 15 days before Dashu; MS: Dashu (07/23/2009); MS + 15 d: 15 days after Dashu; and MS + 30 d: 30 days after Dashu. Lichun (SS) is the first day of spring and Dashu (MS) is the first day of mid-summer according to the lunar calendar. The four rice cultivars were: TY 4, Taoyuan No. 4; TNG 71, Tainung No. 71; TK 9, Taiken No. 9; and KH 145, Kaohsiung No. 145.

調查之科別數與種別數較多，依序再為 TNG 71、TY 4 及 TK 9 之田區。

進一步分析雜草族群密度最多之 KH 145 田區草相，發現不同節氣栽植期於移植後 28

天調查之雜草種類存有差異，一期稻作期間之各節氣栽植期僅立春前 15 天及立春兩栽植期之取樣點發現雜草，其餘節氣栽植期由於雜草數量甚少而未出現在取樣點 (表 2)。其中，立

春前 15 天栽植期以滿天星 (*Alternanthera sessilis* R. Brown) 分布較多，其次為紅骨草 [*Rotala indica* (Willd) Koehne]、母草 [*Lindernia procumbens* (Krock.) Borbas] 及球花蒿草 (*Cyperus difformis* L.)；立春節氣栽植期發現有二期作期間才會出現的尖瓣花 (*Sphenoclea zeylanica* Gaertn.)，且其分布較多，其次為千金子 [*Leptochloa chinensis* (L.) Nees]、紅骨草、滿

天星、稗草 [*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv]、球花蒿草、節節花 (*Alternanthera nodiflora* R. Brown)。二期稻作期間之 5 個節氣栽植期均發現雜草，且雜草種類相對較為多元，以大暑前 15 天、大暑及大暑後 15 天三個節氣栽植期之雜草族群密度較多 (數字未列出)。在此 5 個節氣栽植期，除了大暑栽植期 (多花水莧 *Ammannia multiflora* Roxb. 分布最多) 外，以尖

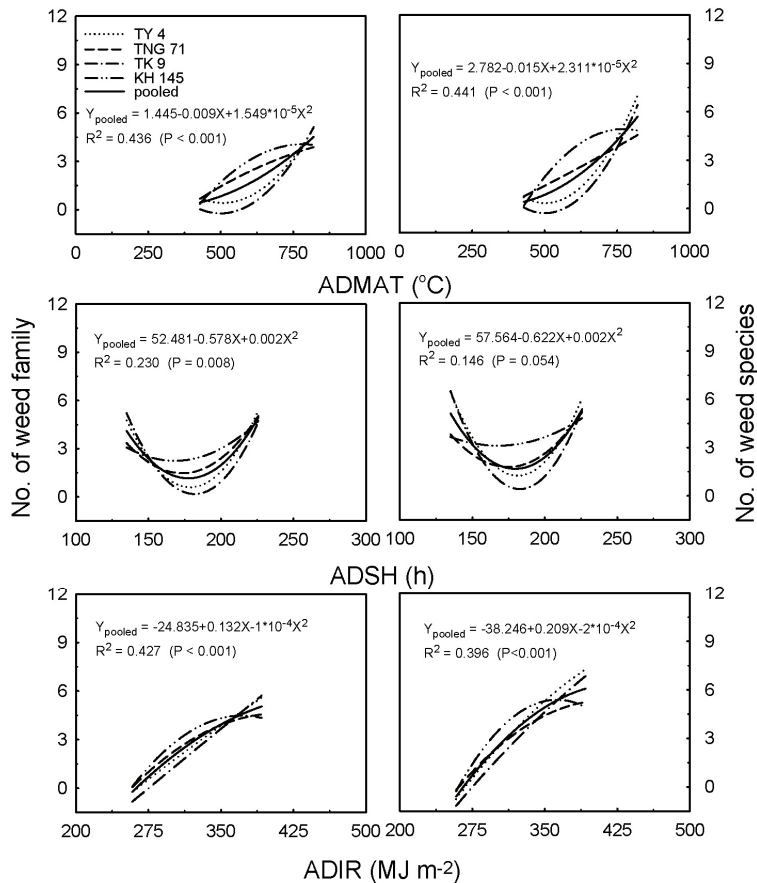


圖 4. 2009 年兩期稻作期間合計以 10 個不同栽植期栽培 4 個良質稻種於插秧後第 4 週田間調查之雜草科別及種別數目與該期間各別累加氣象變因之關係。

Fig. 4. Comparisons of the relationships between numbers of weed family and species and accumulated values of climatic variables (ADMAT, ADSH, and ADIR) measured at 4 weeks after transplanting of 4 quality rice cultivars grown in paddy fields in both first and second crops of 2009. ADMAT: accumulated daily mean air temperature; ADSH: accumulated daily sunshine hours; and ADIR: accumulated daily irradiance. The four rice cultivars were: TY 4, Taoyuan No. 4; TNG 71, Tainung No. 71; TK 9, Taiken No. 9; and KH 145, Kaohsiung No. 145.

表 2. 2009 年兩期稻作期間 10 個不同栽植期於插秧後 4 週在良質稻種高雄 145 號田區調查之雜草族群科別數、種別數及密度高低排序

Table 2. Number of weed family and species and order of weed population density in the fields of paddy rice cultivar KH 145 transplanted at five different dates in each of the two crop seasons in 2009

Rice crop in 2009	Symbol ^z	No. of weed family	No. of weed species	Species of weeds in order of population density
1 st crop	SS - 30 d	0	0	Not available ^y (no planting)
	SS - 15 d	5	5	<i>Alternanthera sessilis</i> > <i>Rotala indica</i> > <i>Lindernia procumbens</i> > <i>Cyperus difformis</i>
	SS	6	8	<i>Sphenoclea zeylanica</i> > <i>Leptochloa chinensis</i> > <i>Rotala indica</i> > <i>Alternanthera sessilis</i> > <i>Echinochloa crus-galli</i> > <i>Cyperus difformis</i> > <i>Alternanthera nodiflora</i>
	SS + 15 d	0	0	Not available (cold weather)
	SS + 30 d	0	0	Not available (cold weather)
2 nd crop	MS - 30 d	1	1	<i>Sphenoclea zeylanica</i>
	MS - 15 d	5	7	<i>Sphenoclea zeylanica</i> > <i>Cyperus difformis</i> > <i>Monochoria vaginalis</i> > <i>Echinochloa crus-galli</i> > <i>Leptochloa chinensis</i> > <i>Cyperus iria</i> > <i>Rotala indica</i>
	MS	5	6	<i>Ammannia multiflora</i> > <i>Sphenoclea zeylanica</i> > <i>Alternanthera sessilis</i> > <i>Fimbristylis littoralis</i> > <i>Leptochloa chinensis</i> > <i>Echinochloa crus-galli</i>
	MS + 15 d	6	7	<i>Sphenoclea zeylanica</i> > <i>Ammannia multiflora</i> > <i>Monochoria vaginalis</i> > <i>Leptochloa chinensis</i> > <i>Ludwigia octovalvis</i> > <i>Echinochloa crus-galli</i> > <i>Cyperus difformis</i>
	MS + 30 d	3	3	<i>Sphenoclea zeylanica</i> > <i>Ammannia multiflora</i> > <i>Alternanthera sessilis</i>

^z SS: "Lichun" (first day of spring; 02/09/2009). According to the lunar calendar, Lichun refers to the day when the sun is exactly at the celestial longitude of 0°. SS - 30 d and SS - 15 d are transplanting of rice seedlings at 30 and 15 days before Lichun, respectively, and SS + 15 d and SS + 30 d are 15 and 30 days after the date of Lichun, respectively.

MS: "Dashu" (first day of mid-summer; 07/23/2009). According to the lunar calendar, Dashu refers to the day when the sun is exactly at the celestial longitude of 120°. MS - 30 d, MS - 15 d are transplanting of rice seedlings at 30 and 15 days before Dashu, respectively, and MH + 15 d and MH + 30 d are 15 and 30 days after the date of Dashu, respectively.

瓣花分布佔多數，而大暑前 30 天栽植期僅取樣到尖瓣花。大暑前 15 天栽植期之雜草族群密度排序為尖瓣花、球花蒿草、鴨舌草、稗草、千金子、碎米莎草 (*Cyperus iria* L.) 及紅骨草等，大暑栽植期為多花水莧、尖瓣花、滿天星、木虱草 (*Fimbristylis littoralis* Gaudich)、千金子及稗草等，大暑後 15 天栽植期為尖瓣花、多花水莧、鴨舌草、千金子、水丁香 [*Ludwigia octovalvis* (Jacq.) Raven]、稗草及球花蒿草等，大暑後 30 天栽植期則為尖瓣花、多花水莧及滿天星。

栽植期之氣象環境乃影響雜草族群分佈的主要因素之一，在所調查之三個氣象變因當中，亦發現 ADMAT 與雜草科別數及種別數之間皆達顯著二次曲線關係 (圖 4; $P < 0.001$)。若續將各稻種田區兩期稻作合計 10 個節氣栽植期所調查雜草族群數量最多前兩名與

ADMAT 繪製關係圖，則未達顯著水準 (圖 5)。未來將持續進行更多栽植期調查，期以釐清其等與溫度變因之關係。無論如何一期稻作期間之雜草族群以滿天星 (圖 5A) 及紅骨草 (圖 5B) 最多，各節氣栽植期之 ADMAT 介於 428–594°C 區間；二期稻作期間則以尖瓣花 (圖 5C) 及多花水莧 (圖 5D) 最多，各節氣栽植期之 ADMAT 落於 799–821°C 範圍。雖然未達統計上顯著水準，滿天星、紅骨草及尖瓣花與 ADMAT 之間呈現凸型曲線分佈，多花水莧則為凹形曲線分佈。再將兩期稻作合計 10 個節氣栽植期之雜草族群數量合併分析，以排名前四位之雜草種類而言，族群數量最多之尖瓣花與 ADMAT 之曲線關係達到顯著水準 (圖 6)。其次之滿天星、千金子及稗草雖為凹形曲線分佈，然未達顯著二次曲線關係。

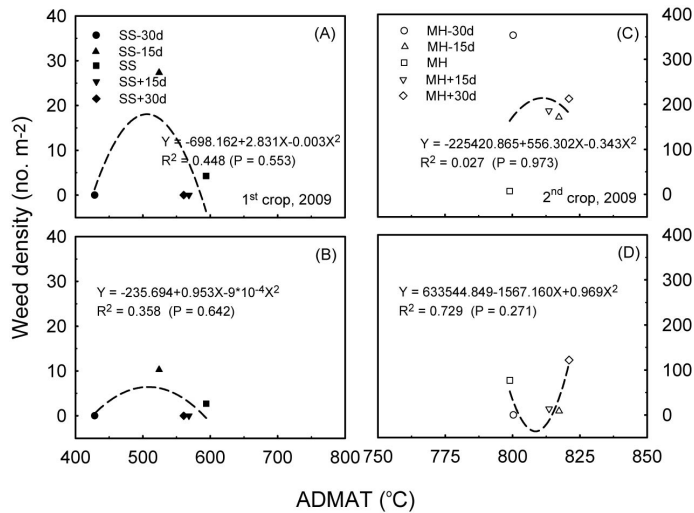


圖 5. 2009 年兩期稻作期間分別以 5 個不同栽植期栽培 4 個良質稻種於插秧後 4 週在田區調查之雜草族群數量最多及次多者與該期間累加日均溫之關係。一期稻作期間 5 個栽植期之雜草族群總數以滿天星 (A) 最多，其次為紅骨草 (B)；二期稻作期間 5 個栽植期之雜草族群總數以尖瓣花 (C) 最多，其次為多花水菟 (D)。

Fig. 5. Changes in density of the top two largest weed populations, *Alternanthera sessilis* (L.) R. Brown (A) and *Rotala indica* (Willd) Koehne (B) of first crop and *Sphenoclea zeylanica* Gaertn. (C) and *Ammannia multiflora* Roxb. (D) of second crop, with accumulated daily mean air temperature (ADMAT) measured at 4 weeks after transplanting of 5 planting periods (refer to Table 2) in paddy fields cultivated with 4 quality rice cultivars. The four rice cultivars were: TY 4, Taoyuan No. 4; TNG 71, Tainung No. 71; TK 9, Taiken No. 9; and KH 145, Kaohsiung No. 145.

討 論

本研究利用立春與大暑為栽植中心期的節氣進行栽培試驗，可由氣象變因與雜草相的分佈關係 (表 1)，發現冬末及早春的栽植期 (由立春前 30 天至立春後 30 天) 可能會因冷氣團及寒流來襲，限制了萌芽雜草種類與數量，特別是立春前 30 天節氣栽植期。二期稻作期間的各節氣栽植期，由於溫暖潮濕天氣使得所調查到的雜草族群種類與數量概多於一期稻作期間之各栽植期者。而由本試驗計算之 3 種氣象變因，不僅彰顯兩期稻作氣象環境的差異，也反應了兩期稻作之間雜草相的差別 (表 1、圖 4)。在溫度較低的一期稻作期間，雜草種子萌芽及生長分散於較長之時間；以稗草為例，一期稻作發育至 3 片本葉需時 18 日，二期稻作僅需 8 日 (Chiang 1995)，單由氣溫對雜草生長的影響

即可預期雜草對稻株的不等競爭壓力，最後終將反應於稻株的生長表現。

綜合 10 個節氣栽植期插秧後 28 天之累加溫度與各稻種田區之雜草相，顯示出雜草科別數與種別數均隨著累加溫度的升高而增多 (圖 1)。由於溫度的增加有利於多數雜草種子生理代謝效率及植體生質量的蓄積而促進萌發與苗株生長 (Tungate *et al.* 2007)，因此分佈於二期稻作期間的 5 個節氣栽植期之雜草種類與數量普遍大於一期稻作期間的栽植期 (表 1、表 2、圖 4、圖 5)。通常溫度的高低與日射量的多寡高度相關而可相互估算 (Yao *et al.* 2002)，本試驗亦顯示日射量與雜草分布之曲線關係和氣溫與雜草分佈之曲線關係類似 (圖 3)，因此可以預期稻田雜草族群在高溫及高日射量下快速繁衍。

除溫度影響，光照是另一項促進雜草萌發與生長的因子 (Colbach *et al.* 2002)，本試驗合

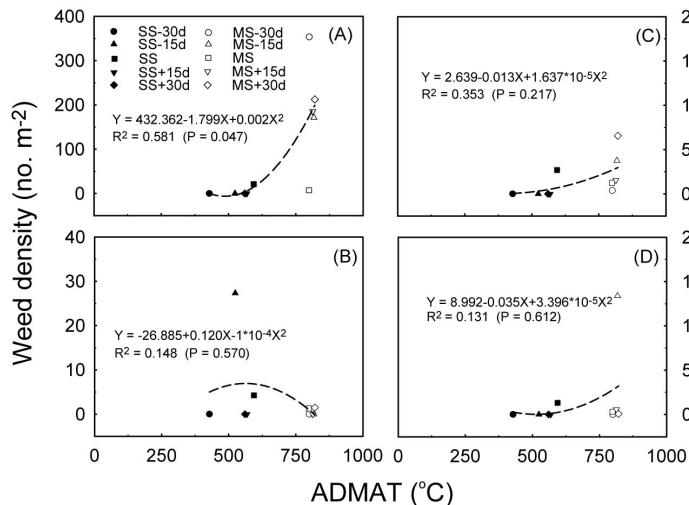


圖 6. 2009 年兩期稻作期間合計 10 個不同栽植期於 4 個良質米稻種田區在插秧後 4 週調查之雜草族群總數排名前四位之雜草密度與累加日均溫之關係。雜草族群數量由高至低依序為尖瓣花 (A)、滿天星 (B)、千金子 (C) 及稗草 (D)。

Fig. 6. Effect of accumulated daily mean air temperature (ADMAT) on population density of major weeds (A–D) in 4 paddy rice cultivars grown in both first and second crops in 2009. There were five transplanting dates for each cultivar in each crop season, SS – 30 d: 30 days before Lichun, SS – 15 d: 15 days before Lichun; SS: Lichun (02/09/2009); SS + 15 d: 15 days after Lichun; SS + 30 d: 30 days after Lichun; MS – 30 d: 30 days before Dashu; MS – 15 d: 15 days before Dashu; MS: Dashu (07/23/2009); MS + 15 d: 15 days after Dashu; and MS + 30 d: 30 days after Dashu. Lichun (SS) is the first day of spring and Dashu (MS) is the first day of mid-summer, according to the lunar calendar. ADMAT was measured at 4 weeks after transplanting. The largest weed population was *Sphenoclea zeylanica* (A), followed by *Alternanthera sessilis* (B), *Leptochloa chinensis* (C), and *Echinochloa crus-galli* (D).

併各稻種田區之雜草相與氣象資料分析結果，顯示了溫度與日射量兩種氣象變因對雜草種類 (圖 4) 及數量 (圖 5、6) 的顯著影響，成為決定雜草相與擴散的兩項重要因子 (Colbach *et al.* 2002)。在自然界中某些雜草種類需要每日長達 12 小時之光照才能提高萌芽率，如白夏菊 (*Matricaria perforata*) 及菊科的 *Lapsana communis*，亦有僅需要短暫 (約 5 秒) 的閃光效應即可萌芽的雜草，如薺菜 (*Capsella bursa-pastoris*)、大爪草 (*Spergula arvensis*) 及蕁麻 (*Urtica urens*) (Dyer 1995; Millberg & Andersson 1997)。由本研究日照時數與雜草族群種類之凹型曲線分佈關係，似乎在較高及較低的日照時數兩端具有較多雜草族群，是否代表分別存在陽性 (需要較長日照時數) 及陰性

(需要較短日照時數) 的雜草族群於兩期稻作栽植期 (圖 4)，則需要再進一步的探討。

經比較不同稻種田區之雜草種類，概以 KH 145 田區之科別數及種別數較多，以 TK 9 田區較少。事實上各水稻品種田區所調查到的雜草相不盡相同，某些草類會跨節氣栽植期出現。針對水田雜草相變動的相關研究當中，其一原因係長期使用除草劑而淘汰一年生雜草，卻增加多年生雜草種類 (Chiu & Hong 1982; Chiang 1995)。其二原因乃由於外來入侵植物之強勢競爭，導致可耕地雜草相發生改變 (Patterson *et al.* 1999; Chiang & Chiang 2010)。近年來全球暖化及氣候的快速變遷也引起有關雜草相變化之研究，有鑑於溫室氣體 CO₂ 濃度的增加將提高 C₃ 型雜草的光合作用及其水分

利用效率，促使雜草生長速率與淨同化速率相對的提高，很可能擴大了 C₃ 型雜草的競爭潛力 (Bunce 1997; Ziska 2000)。本研究中 KH 145 田區所分布的雜草計有 24 種 (表 2)，調查發現二期稻作常見的尖瓣花已擴散至 5 個節氣栽植期，並且出現於一期稻作的立春節氣栽植期中，可見至少在霧峰試驗地區暖化趨勢擴大了尖瓣花的發生時間及生存空間。Chiang & Chiang (2010) 亦指出暖化升溫趨勢已縮小期作間水田雜草種類與發育的差距，很可能係主要危害於二期稻作的尖瓣花提早變成一期稻作困擾的潛在原因。在以往的研究中，尖瓣花因為南北氣候差異多集中分布於臺南、高雄一帶 (Chiang & Leu 1982)，從 Chiang & Chiang (2010) 的調查可發現其分布區域已往北推移，推測暖化情境將逐漸使得原來生長於低緯度的雜草往較高緯度的北方擴散 (Patterson *et al.* 1999)。本項試驗結果再指證以氣溫變因與雜草分佈最具相關性，10 個節氣栽植期合併分析的雜草族群數量當中，以尖瓣花最多並與累加溫度之間存有顯著的二次曲線關係，而且千金子及稗草亦在高溫下生長較為有利 (圖 5、圖 6)。

國內早期的雜草相調查 (Chiang & Leu 1982)，發現一期稻作經常出現的雜草種類為野茨菰、牛毛氈及水蜈蚣，二期稻作則為鴨舌草、紅骨草、尖瓣花及芒稷，與本研究所調查之草相略有出入。是否與氣候變遷或區域性分佈 (本研究僅限於臺中市霧峰區農業試驗所農場) 差異有關，尚待多年期試驗深入究明。1960 年代水田發生頻率最高的雜草依序為稗草 (69.1%)、鴨舌草 (68.3%)、球花蒿草 (53%) 及蠹眼草 (31.4%) 等 (Hong 1976; Chiang *et al.* 2002)，除了蠹眼草受除草劑壓力幾近消失外，前三類雜草目前仍可在中部水田發現。本研究合併各稻種田區及節氣栽植期資料發現，發生頻度最高依序為尖瓣花、滿天星、千金子及稗草 (圖 6)，以光合作用利用效率而言，除了稗草為 C₄ 型雜草外，其他三類為 C₃ 雜草 (Elmore

& Paul 1983; Chiang & Chiang 2010)，似乎 C₃ 型雜草分佈高過 C₄ 型雜草。早期 C₄ 型的稗草是水田危害較為嚴重的雜草之一，排除除草劑篩選壓力及其他因素，若以氣候變遷及暖化趨勢進展角度來看，可能逐漸改變水田危害之雜草種類朝向 C₃ 型雜草演進。除了氣象變因之外，不同時代的耕犁及栽培操作未必相同，任何農耕措施都會因為造成雜草種子休眠或打破休眠、抑或干擾其生存與生活環境而影響雜草種類與數量 (Dyer 1995; Andersson & Milberg 1998; Benech-Arnold *et al.* 2000)，須有更多的試驗來釐清時空因素及其複雜的交感。

證諸於目前氣候變遷及全球暖化趨勢，文明的持續發展使得地球難以避免朝向日益增溫的方向，勢將對於農業生產操作帶來不同以往的改變。為了減緩暖化情境的危機，吾人應當努力於減少各項農耕作業的能源消耗及碳排放，採行因應的調適與緩解策略來確保糧食安全與品質。本研究發現栽植期的調整將影響雜草的種類與數量，因此也勢將造成雜草管理上的差異，這方面的研究亦需配套進行。未來仍需收集更多資料來確認雜草相的變化，並建立一套完整的分析流程，提供日後雜草管理應用所需。

引用文獻 (Literature cited)

- Agricultural Statistics Yearbook. 2009. Published by Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei. 332 pp.
- Andersson, T. N. and P. Milberg. 1998. Weed flora and the relative importance of site, crop, crop rotation, and nitrogen. *Weed Sci.* 46:30–38.
- Benech-Arnold, R. L., R. A. Sánchez, F. Forcella, B. C. Kruk, and C. M. Ghersa. 2000. Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *Field Crops Res.* 67:105–122.
- Bunce, J. A. 1997. Variation in growth stimulation by elevated carbon dioxide in seedlings of some C₃ crop and weed species. *Global Change Biol.* 3: 61–66.
- Chiang, M. Y. and L. S. Leu. 1982. Weeds and weed damage of paddy field in Taiwan. *Weed Sci. Bull.* 3:18–46. (in Chinese with English abstract)

- Chiang, M. Y. 1995. Paddy weeds in Taiwan: an overall view on flora, ecology and control. *Plant Prot. Bull.* 37:339–355. (in Chinese with English abstract)
- Chiang, M. Y., Y. J. Chiang, and C. I. Yuan. 2002. Weed resistance and flora change induced by herbicides in Taiwan. p.25–30. *in*: Special Symposium on 40 Years of Herbicide Use in Taiwan. Weed Science Society of ROC. Taichung. (in Chinese with English abstract)
- Chiang, M. Y., Y. J. Chiang, C. I. Yuan, L. M. Hsu, and F. Y. Chen. 2003. Current status and prospects of weed management of croplands in Taiwan. p.245–258. *in* the Proceedings of 2003 International Conference on Plant Health Management. Agriculture Development Foundation. Taipei. (in Chinese with English abstract)
- Chiang, M. Y. and Y. J. Chiang. 2010. Potential impacts of climate change on agricultural land and environmental weeds in Taiwan. p. 99–116. *in* the Proceedings of the International Workshop on Climate Change and Food Crisis. Tainan District Agricultural Research and Extension Station, COA. Tainan, Taiwan. (in Chinese with English abstract)
- Chiu, C. C. and W. C. Hong. 1982. A review of chemical weeding for paddy rice in central Taiwan. *Weed Sci. Bull.* 3:62–70. (in Chinese with English abstract)
- Colbach, N., B. Chauvel, C. Durr, and G. Richard. 2002. Effect of environmental conditions on *Alopecurus myosuroides* germination. I. Effect of temperature and light. *Weed Res.* 42:210–221.
- Dyer, W. E. 1995. Exploiting weed dormancy and germination requirement through agronomic practices. *Weed Sci.* 43:498–203.
- Elmore, C. D. and R. N. Paul. 1983. Composite list of C₄ weeds. *Weed Sci.* 31:686–692.
- Erice, G., J. J. Irigoyen, P. Pérez, R. Matínez-Carrasco, and M. Sánchez-Díaz. 2006. Effect of elevated CO₂, temperature and drought on dry matter partitioning and photosynthesis before and after cutting of nodulated alfalfa. *Plant Sci.* 170:1059–1067.
- Hong, R. T. 1976. Investigation of weed flora on paddy fields in the Taichung district. *Plant Prot. Bull.* 18: 268–275. (in Chinese with English abstract)
- IPCC. 2007. Summary for Policymakers. The Physical Science Basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press. UK. 996 pp.
- Kimball, B. A. 1983. Carbon dioxide and agricultural yield: an assemblage and analysis of 430 prior observations. *Agron. J.* 75:779–788.
- Kuo, W. H. 2004. Seed ecology and weed management. *Weed Sci. Bull.* 25:53–68. (in Chinese with English abstract)
- Lee, Y. J., C. M. Yang, and C. L. Hsiao. 2009. Influence of climatic conditions on production of rice cultivar TNG 71. *J. Taiwan Agric. Res.* 58:45–54. (in Chinese with English abstract)
- Lu, H. S., Y. H. Liu, and Central Weather Bureau. 2006. Environmental challenge and strategy for quality rice culture in Taiwan. *Crop Environ. Bioinform.* 3:297–306. (in Chinese with English abstract)
- Lu, M. M., Y. L. Chen, and G. H. Chen. 2008. Impact of global warming trend on rice cultural environment in Taiwan. *Crop Environ. Bioinform.* 5:60–72. (in Chinese with English abstract)
- Milberg, P. and L. Andersson. 1997. Seasonal variation in dormancy and light sensitivity in buried seeds of eight annual weed species. *Can. J. Bot.* 75:1998–2007.
- Oechei, W. C. and B. R. Strain. 1985. Native species response to increased atmospheric carbon dioxide concentration. p. 117–154. *in*: Direct Effects of Increasing Carbon Dioxide on Vegetation. (Strain, B. R. and J. D. Cure, eds.) Dept. of Energy, DOE/ER-0238. Washington, DC. 286 pp.
- Patterson D. T., J. K. Westbrook, R. J. V. Joyce, P. D. Lingren, and P. D. Rogasik. 1999. Weeds, insects, and diseases. *Climate Change* 43:711–727.
- SAS Institute. 1998. SAS/STAT User's Guide. Version 8.1. SAS Inst., Cary, NC. USA. 3812 pp.
- Tungate, K. D., D. W. Israel, D. M. Watson, and T. W. Ruffy. 2007. Potential changes in weed competitiveness in an agroecological system with elevated temperatures. *Environ. Exp. Bot.* 60:42–49.
- Yao, M. H., S. Chen, K. S. Chi, and J. C. Tsai. 2002. Estimating solar radiation from daily temperature data. *J. Agric. Res. China.* 51:73–83. (in Chinese with English abstract)
- Zhang, J. H., Z. W. Fan, Y. D. Shen, and L. Z. Liu. 2009. Effect of different illumination on *Eupatorium odoratum* growth. *J. Anhui Agri. Sci.* 37:9967–9968. (in Chinese with English abstract)
- Ziska, L. H. 2000. The impact of elevated CO₂ on yield loss from a C₃ and C₄ weed in field-growth soybean. *Global Change Biol.* 6:899–905.
- Ziska, L. H. 2001. Changes in competitive ability between a C₄ crop and a C₃ weed with elevated carbon dioxide. *Weed Sci.* 49:622–627.

Effect of Planting Date on Population and Density of Weeds in the Paddy Field¹

Chiao-Ling Hsiao², Chwen-Ming Yang^{2,3}, and Yuh-Jyuan Lee²

Abstract

Hsiao, C. L., C. M. Yang, and Y. J. Lee. 2011. Effect of planting date on population and density of weeds in the paddy field. *J. Taiwan Agric. Res.* 60:125–138.

Global warming and climate change has become a major issue on crop production and agricultural environment, including changes in population, density and distribution of weeds. A field study was conducted in 2009 at the experimental farm of Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan to determine effects of planting date, in terms of temperature and solar radiation, on weed population and density in the spring crop (first crop of 2009) and the fall crop (second crop of 2009) of paddy rice (*Oriza sativa*). Seedlings (3–4 leaf-stage) of four quality rice cultivars, TY 4, TK 9, TNG 71 and KH 145, were transplanted into the paddy field at five different dates in each crop season. Data on accumulated values of daily mean air temperature (ADMAT), daily sunshine hours (ADSH) and daily irradiance (ADIR) of different planting periods in each crop season were recorded. The populations and densities of weeds were collected at 4 weeks after transplanting. Results showed that number of family and species of weeds increased significantly ($P < 0.05$) with increasing value of ADMAT for the cultivars TY 4 and TK 9. Number of family and species of weeds increased significantly ($P < 0.05$) with increasing value of ADIR for the cultivar TK9 but no significant difference ($P > 0.05$) with increasing value of ADSH for all cultivars tested. Results of pooled data of four rice cultivars showed that changes in number of family and species of weeds were correlated with these three meteorological parameters in a curvilinear trend. In the plots of all four rice cultivars, the most predominant weed species (with the highest density) in the first crop season was *Altemanthera sessilis*, followed by *Rotala indica*, whereas the most predominant weed species in the second crop season was *Sphenoclea zeylanica*, followed by *Ammannia multiflora*. Populations of these four weed species were curvilinearly correlated to changes of ADMAT. Results of combined data of both crop seasons (with 10 planting periods in total) showed that the population density was the highest for *Sphenoclea zeylanica*, followed by *Altemanthera sessilis*, *Leptochloa chinensis*, and *Echinochloa crus-galli* and the increase of population density was associated with the increase of ADMAT values. This study suggests that weed species and density in the first and second crops of paddy rice are affected by rice cultivars and values of ADMAT in the planting period.

Key words: Planting period, Rice paddy, Weed population, Weed density.

-
1. Contribution No. 2518 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: May 10, 2011.
 2. Respectively, Assistant Research, Researcher, and Assistant Researcher, Crop Science Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Corresponding author, e-mail: cmyang@tari.gov.tw; Fax: (04)23317118.

柳橙果實綠黴病之發生與藥劑防治¹

蔡志濃² 安寶貞^{2,3} 鄭秀芳²

摘 要

蔡志濃、安寶貞、鄭秀芳。2011。柳橙果實綠黴病之發生與藥劑防治。台灣農業研究 60:139–148。

柳橙綠黴病 (由 *Penicillium digitatum* 引起) 是我國柳橙果實最常見的貯藏期病害之一。綠黴病菌菌絲培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (PDA) 時, 4°C 以下與 36°C 以上均不會生長, 最適生長溫度為 24°C。人工接種試驗結果顯示, 柳橙果實經針刺製造傷口, 接種綠黴菌分生孢子懸浮液後, 分別置於 4°C 至 36°C 間隔 4°C 之定溫箱中 7 天, 結果 8°C 以下及 32°C 以上不會發病, 24°C 發病最早且最嚴重, 約第 2–3 天即發病; 但無傷痕處理的果實則完全不發病。藥劑試驗結果顯示, 抑制綠黴病菌孢子發芽以 25% 克熱淨溶液 2000 倍稀釋液 (ai 125 ppm) 之效果最好, 抑制率為 100%; 41.8% 腐絕水懸劑 500 倍稀釋液 (ai 836 ppm) 之效果次之; 次氯酸鈉 (NaOCl) 300 ppm (ai) 及二氧化氯 (ClO₂) 100 ppm (ai) 之效果均不佳。而抑制綠黴菌菌絲生長亦以 25% 克熱淨溶液 2000 倍稀釋液之效果最佳, 抑制率為 100%, 其他供試藥劑之效果均差。果實浸藥實驗: 不論先接種病原菌再浸藥或者先浸藥再接種病原菌, 均以 25% 克熱淨溶液 2000 倍稀釋液效果最好, 浸泡該藥劑稀釋液後, 只要不造成新傷口, 於室溫下至少可保護柳橙果實 9 天以上不被病原菌感染; 而且傷痕接種的果實如果在 16 小時內浸藥, 亦可抑制病徵出現。其他供試藥劑, 包括腐絕水懸劑 500 倍稀釋液 (ai 836 ppm) 及次氯酸鈉 (NaOCl) 2000 ppm (ai) 皆無防治效果。

關鍵詞: 柳橙、綠黴病、藥劑防治、克熱淨。

前 言

柑橘為台灣重要的經濟果樹之一, 其中柳橙栽培面積最廣, 約一萬公頃, 主要分佈於雲林、嘉義及台南地區 (Council of Agriculture 2009)。由於柳橙豐產, 經常造成產銷失衡、價格低落等問題, 因此急需拓展外銷。近年來政

府積極開拓外銷大陸市場, 但綠黴病 (由 *Penicillium digitatum* Saccardo 引起) 和青黴病 (由 *Penicillium italicum* Wehmer 引起) 是柳橙果實最常見的貯藏期病害, 尤其綠黴病更是近年來引起柳橙果實腐敗之元兇, 曾造成 97 年外銷中國柳橙果實大量腐敗, 因此該病害成為目前果品外銷的最主要限制因子。台灣對於柑橘

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2521 號。接受日期: 100 年 6 月 17 日。

2. 本所植物病理組副研究員、研究員兼組長、研究助理。台灣 台中市。

3. 通訊作者, 電子郵件: pjann@tari.gov.tw; 傳真機: (04)23302803。

綠黴病等病害之研究相當少，僅有 Sawada (1922) 及羅清澤等 (Lo *et al.* 1952) 記錄病害之發生，並未有深入之研究。因此作者等進行相關研究，探討柳橙果實綠黴病之發生因子及尋求病害之有效防治方法。

材料與方法

供試菌株之分離、鑑定、培養及接種源配製

病菌分離及鑑定：將罹患綠黴病之柳橙果實採回，直接刮取病菌分生孢子塗抹於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar, PDA, DIFCO, USA) 上，之後進行單孢分離，再將純化之病原菌培養於 PDA 培養基上，並以顯微鏡觀察病原菌形態特性當鑑定依據。經初步培養與接種試驗，選取生長良好與病原性 (virulence) 強的菌株 PD9701 (分離自雲林縣古坑鄉之罹病柳橙) 供試。試驗前，先將菌株接種於 PDA 平板上置於 24°C 下無光照定溫箱中培養 5-7 天，供下列各項試驗。

分生孢子懸浮液之配製：將純化之菌株 PD9701 培養於 PDA 培養基，置於 24°C 下無光照定溫箱中培養 5-7 天後，以無菌移植環刮取孢子移入無菌蒸餾水中，製備孢子懸浮液 (1×10^6 spores/mL) 供試。

柳橙綠黴病菌之生長溫度

將供試之 PD9701 菌株培養於 PDA 培養基，置於 24°C 下無光照定溫箱中培養 5-7 天後，以滅菌過之打孔器 (孔徑 1 cm) 切取菌絲塊，菌絲面朝下置入直徑 9 cm 之 PDA 培養基，分別置於 4-36°C 間隔 4°C 之定溫培養箱中培養，每天量取菌落直徑，至第 7 天為止。每溫度處理 5 皿，試驗重複進行 2 次。

藥劑對綠黴病菌孢子發芽之影響

供試藥劑之配製：供試藥劑與濃度分別為 25% 克熱淨溶液 (iminocytidine triacetate) 稀釋 1000 倍 (ai 250 ppm) (億豐農化廠股份有限公司)、41.8% 腐絕水懸劑 (thiabendazole) 稀釋

250 倍 (ai 1672 ppm) (興農股份有限公司)、2,4-Dichloro phenoxyacetic acid (2,4-D, 石原產業株式會社) 50 ppm (ai) 及次氯酸鈉 (NaOCl) 600 ppm (ai)。配製各藥劑的稀釋液時，先配製 10% CV-8 蔬菜汁 (每公升含 10% V-8 蔬菜汁與 0.2% 碳酸鈣 (CaCO₃))，蔬菜汁與碳酸鈣混合後先經 1500 rpm 離心 5 分鐘，取上層液滅菌後使用，再將 10% CV-8 蔬菜汁與各種供試藥劑混合，充分搖盪混合均勻溶解後，再加入滅菌蒸餾水，配製成所需濃度。

孢子發芽率測定：以滅菌微量吸管取 20 μ L 不同藥劑之溶液，置於滅菌玻片之凹槽 (每玻片含 2 凹槽) 內，再以無菌微量吸管取 20 μ L 供試綠黴病菌孢子懸浮液，滴於含農藥之玻片凹槽內，並混合均勻。此時，藥劑經與等體積的孢子懸浮液混合後，藥劑濃度已分別稀釋為 25% 克熱淨濃度 2000 倍 (ai 125 ppm)、41.8% 腐絕濃度 500 倍 (ai 836 ppm)、2,4-D 25 ppm 及次氯酸鈉 (NaOCl) 300 ppm，而 CV-8 蔬菜汁之濃度亦降為 5%。供試玻片並置於直徑 9 cm 之玻璃培養皿內，培養皿內約含 5-10 mL 無菌水保濕。培養皿置於 24°C 下，經 16 小時後，於顯微鏡下逢機計算 200 個孢子之發芽率。每處理 2 皿，4 重複，重複進行 2 次。以滅菌蒸餾水處理作為對照組。

藥劑對綠黴病菌菌絲生長之影響

將供試菌株 PD9701 移植至 PDA 培養基，於 24°C 之定溫培養箱中培養 5-7 天後，以滅菌過之打孔器 (孔徑 1 cm) 切取菌絲塊供試。

利用藥劑平板測試法測定供試藥劑之抑菌效果。藥劑的配製方法：先將適量之供試藥劑溶於 5-10 mL 之無菌蒸餾水中。每 100 mL 之 PDA 裝置於 250 mL 血清瓶中，滅菌後等培養基溫度降至 60-70°C 時，快速加入適量之供試藥劑後搖勻，倒入塑膠培養皿中，每皿 15 mL，配製成含 25% 克熱淨溶液 2000 倍及 41.8% 腐絕水懸劑 500 倍之 PDA 平板。待培養基冷卻後，

將直徑 1 cm 的菌絲塊，菌絲面朝下置入直徑 9 cm 之含藥劑的 PDA 培養基平板中心，置於 24°C 之定溫培養箱中培養，每天量取菌落直徑。每溫度處理 5 皿，重複進行 2 次。以不添加任何藥劑作為對照。

柳橙果實傷痕接種綠黴病菌

將柳橙以水清洗乾淨後吹乾，再分別進行不同之處理：(i) 不製造傷口，接種病原菌分生孢子懸浮液 (1×10^6 spores/mL)；(ii) 製造傷口，以 3 號蟲針 5 支為一把，每果實製造 20 處傷口，接種病原菌分生孢子。(iii) 對照組製造傷口後接種無菌蒸餾水。每處理 10 粒柳橙果實，4 重複；重複進行 2 次。接種方法為將果實浸泡於懸浮液中 30 秒後吹乾，套塑膠袋，置於 24°C 之定溫培養箱中培養，每天觀察病害發生情形，記錄發病率，至 20 天為止。對照組接種無菌蒸餾水。

溫度對柳橙果實綠黴病之發病影響

將當天採收之柳橙果實以蒸餾水清洗乾淨後吹乾，製造傷口 (同上)，接種病原菌分生孢子 (1×10^6 spores/mL) 後，再套塑膠袋，分別置於 4–36°C 間隔 4°C 之定溫培養箱中培養，每天觀察病害發生情形，記錄發病率，至 7 天為止。對照組傷痕處理後接種無菌水。每處理 10 粒柳橙果實，4 重複；試驗重複進行 2 次。

接種前後施藥對病害發生之影響

供試藥劑包括 25% 克熱淨溶液 2000 倍稀釋液 (ai 125 ppm)、41.8% 腐絕水懸劑 500 倍稀釋液 (ai 836 ppm)、2,4-D 水溶液 (25 ppm) 及次氯酸鈉 (NaOCl) 水溶液 (2000 ppm)。配製時稱取需求量的藥劑，倒入含 10 L 自來水的水桶中，攪拌均勻後備用。將當天採收之柳橙以無菌蒸餾水清洗乾淨後吹乾，製造傷口 (同上) 後，再進行兩種試驗：(i) 果實先接種病原菌後 5 小時，再分別浸泡供試藥劑水溶液 30 秒後吹乾，再套塑膠袋；(ii) 果實先浸泡供試

藥劑 30 秒後吹乾，再接種病原菌後套塑膠袋。接種後置於室溫下 (24°C) 每天觀察病害之發生情形，記錄發病率，至 10 天為止。對照組接種病原菌，不浸藥，浸於自來水中。每處理 10 粒柳橙果實，4 重複。

不同時間處理克熱淨對綠黴病的防治效果

果實先傷痕接種病原菌後不同時間再浸藥之發病情形：將當天採收之柳橙果實清洗吹乾後，以蟲針製造傷口，再接種病原菌。接種後之果實分別於 4–24 小時間隔 4 小時、2 天及 3 天浸 25% 克熱淨溶液 2000 倍 30 秒後吹乾，再套塑膠袋，處理後置於室溫下 (24°C)，5 天後觀察病害之發生情形。對照組處理與重複數同上。

果實傷痕處理後浸藥，不同天數後接種之發病情形：將當天採收之柳橙果實清洗、吹乾後，以蟲針製造傷口，再將果實浸泡於 25% 克熱淨溶液 2000 倍 30 秒後，分別於 0–9 天每天接種分生孢子懸浮液，接種後套塑膠袋並置於室溫下 (24°C)，5 天後觀察病害之發生情形。對照組處理與重複數同上。

果實浸藥後於不同天數後傷痕接種之發病情形：將當天採收之柳橙果實清洗、吹乾後，先浸 25% 克熱淨溶液 2000 倍 30 秒。之後，分別於 0–9 天每天接種一處理，接種前以蟲針製造傷口，接種後套塑膠袋，5 天後觀察病害之發生情形，全程實驗均在室溫下 (24°C) 進行。對照組處理與重複數同上。

統計分析

以上試驗差異顯著性測驗，係利用 SAS 9.1 統計分析軟體 (SAS Institute, Inc. 2004) 進行變方分析 (analysis of variance, ANOVA) 及最小顯著差異性 (least significant difference, LSD) 測驗。

結 果

柳橙綠黴菌之分離與鑑定

經調查、取樣分離及形態鑑定結果，造成

採收後柑橘果實快速腐敗的病菌為 *Penicillium* spp.，90%以上由 *P. digitatum* 引起（造成綠黴病），極少部份為 *P. italicum*（造成青黴病），而雲林縣古坑區出口之柳橙腐敗皆是由綠黴菌所引起。綠黴病與青黴病的外觀病徵容易區別，兩者的初期病徵均為水浸狀軟腐，而後病斑迅速擴大長出白色黴狀物，1-2 天之後罹患綠黴病果實上的黴狀物轉為灰綠色，青黴病果實為藍色，此時孢子均已成熟，輕彈病果，即有大量的孢子粉狀物掉落。此外，在採收前，極少數的樹上柳橙果實會出現綠黴病，均為有傷口的病果；而地面上的落果則經常出現綠黴病。

溫度對柳橙綠黴菌菌絲生長之影響

將綠黴菌菌絲塊培養於 PDA 培養基，置於設定為不同溫度之定溫箱中培養，溫度低於 4°C 以下或高於 36°C 以上時菌絲均不生長，8°C 以下與 32°C 以上時生長緩慢，最適生長溫度為 24°C（圖 1）。

藥劑對綠黴菌孢子發芽之影響

測試藥劑對綠黴菌分生孢子發芽之抑制效果，結果以 25%克熱淨 2000 倍稀釋液之效果最好，發芽率為 0%；41.8%腐絕水懸劑 500 倍稀釋液之效果次之，發芽率為 5.8%；其餘處理之效果均不佳，80% 2,4-D (25 ppm) 處理者為 68.8%，次氯酸鈉 300 ppm 為 80.5%；而對照組孢子之發芽率為 82.0%。利用費雪最小顯著差異測驗法 (Fisher's least significant difference test, LSD) 分析結果，克熱淨與腐絕與對照無藥劑處理比較達 5%顯著性差異。

藥劑對綠黴菌菌絲生長之影響

將供試藥劑添加於 PDA 培養基，測試各藥劑對綠黴菌菌絲生長之抑制效果，結果亦以 25%克熱淨溶液 2000 倍稀釋液之效果最佳，菌絲完全不生長，顯著優於其他處理；41.8%腐絕水懸劑 500 倍之抑制能力次之，較對照處理顯著為佳（圖 2）。

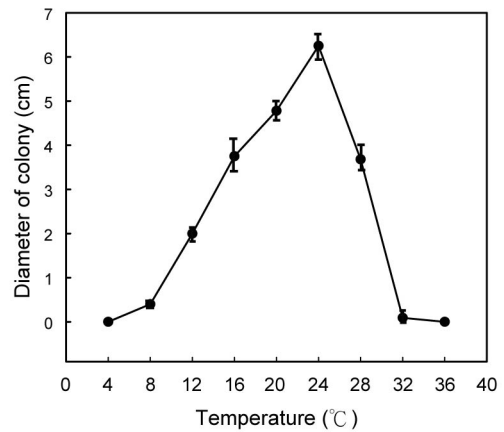


圖 1. 不同溫度對綠黴菌 (*Penicillium digitatum*) 在 PDA 培養基上之生長影響 (生長 7 天)。

Fig. 1. Effect of temperature on mycelial growth of *Penicillium digitatum* on PDA cultures at 24°C for 7 days.

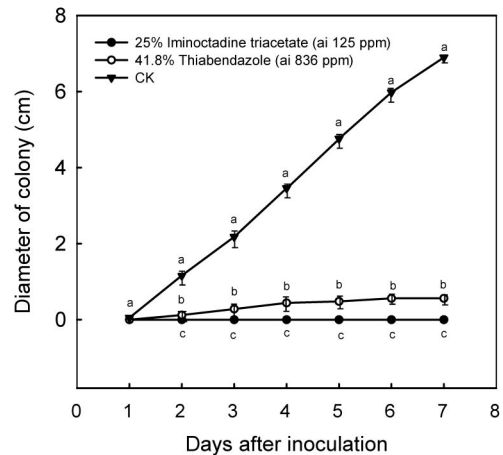


圖 2. 克熱淨及腐絕對綠黴菌 (*Penicillium digitatum*) 菌絲在 PDA 上之生長抑制情形 (24°C)。

Fig. 2. Suppression of mycelial growth of *Penicillium digitatum* grown on PDA amended with different fungicides. Cultures were incubated at 24°C and measured daily for colony diameter for 8 days. Values of the same day followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

柳橙果實接種綠黴菌後之發病情形

於 24°C 之定溫箱中，柳橙製造傷口接種病原菌後第 2-3 天即出現病徵；但無傷痕處理組接種至第 20 天仍完全不發病 (圖 3)。

柳橙果實傷痕接種後置於不同溫度下之發病情形

將柳橙傷痕接種病原菌後置於不同溫度之定溫箱中，結果以 24°C 時之發病最快，第 3 天即有 70% 果實出現病徵，其餘溫度尚未發病；第 4 天時 24°C 之果實發病率為 100%，其次為 20°C 處理之發病率為 80%，16°C 之發病率為 50%；接種後第 5 天時 20°C 之發病率為 100%；第 7 天時 8°C 以下及 32°C 以上則仍未發病，未接種病菌之對照處理均未發病 (圖 4)。

接種前後施藥對病害發生之影響

先接種病原菌再浸不同藥劑處理，結果以浸 25% 克熱淨溶液 2000 倍稀釋液之發病率最低，該處理之果實至第 10 天尚未發病 (發病率為 0，與其他處理達 5% 顯著性差異)；其他處理之發病率均甚高，且處理間差異性不顯著，浸 41.8% 腐絕水懸劑 500 倍、80% 2,4-D (25 ppm)、次氯酸鈉 (2000 ppm) 及對照處理之果實第 3 天即開始發病，第 4 天發病率幾乎達 100%。先浸不同藥劑處理再接種病原菌，結果亦以先浸 25% 克熱淨溶液 2000 倍處理之果實發病率最低，至第 10 天未發病 (與其他處理達 5% 顯著性差異)；而其他處理與對照組之果實第 3 天即發病，第 4 天發病率幾乎達 100% 發病，各組間差異性不顯著 (圖 5)。



圖 3. 柳橙果實傷痕與無傷痕接種綠黴菌 (*Penicillium digitatum*) 之結果。(A) 無傷痕接種不產生病徵；(B) 傷痕接種之病徵。(於 24°C 定溫箱中 20 天)

Fig. 3. Comparison of fruits of sweet orange inoculated with conidial suspension of *Penicillium digitatum* with (B) and without (A) wounding treatment. Fruits were stored at 24°C for 20 days. Note severe green mold on wounded fruits (B) but no green mold on unwounded fruits (A).

不同時間處理克熱淨對綠黴病的防治效果

果實先接種病原菌後不同時間再浸藥之發病情形：先接種病原菌再經不同時間後浸 25% 克熱淨溶液 2000 倍稀釋液，第 5 天之調查結果顯示，接種 16 小時內再浸藥劑之果實皆無發病，接種 20 小時後再浸藥劑之果實則有 30% 發病，接種 2 天後再浸藥劑之果實則 100% 發病，接種後無浸藥之對照組發病率亦為 100% (圖 6)。

果實傷痕處理後浸藥，不同天數後再接種病原菌之發病情形：柳橙果實先製造傷口後浸 25% 克熱淨溶液 2000 倍稀釋液，每天接種 4 組 (每組 10 粒) 柳橙果實，接種後 5 天觀察發病情形，結果至第 9 天後接種之柳橙亦未發病，但無浸藥之對照組發病率則為 100% (圖 7)。

果實浸藥後於不同天數後傷痕接種病原菌之發病情形：無傷痕處理之柳橙果實先浸 25%

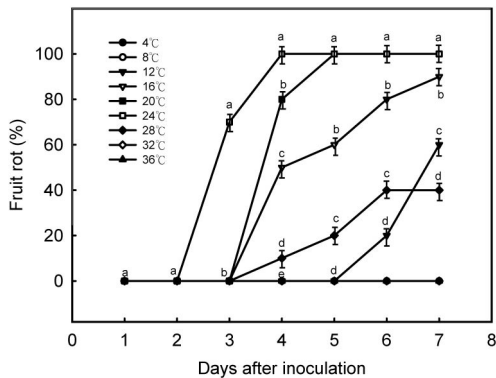


圖 4. 柳橙果實傷痕接種綠黴菌 (*Penicillium digitatum*) 後，於不同溫度下之發病情形。

Fig. 4. Effect of temperature on development of fruit rot of sweet orange artificially inoculated with *Penicillium digitatum*. Fruits were wounded using a bundle of five of needles and then soaked in a suspension of *P. digitatum* containing 10^6 conidia/mL. Orange fruits were incubated at 24°C and examined daily for incidence of fruit rot for a period of 8 days. Values of the same day followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

克熱淨溶液 2000 倍稀釋液，接種病原菌前再製造傷口，每天接種 4 組 (每組 10 粒) 柳橙果實，接種後 5 天調查果實發病率，結果當天接種之柳橙有 45% 發病，1 天後接種之果實有 70% 發病，2 天後接種之果實則 95% 發病，無浸藥之對照組發病率亦為 100% (圖 8)。

討 論

政府於 2008 年開始積極拓展柳橙果實外銷市場，主要銷往大陸，卻發生外銷果實運送

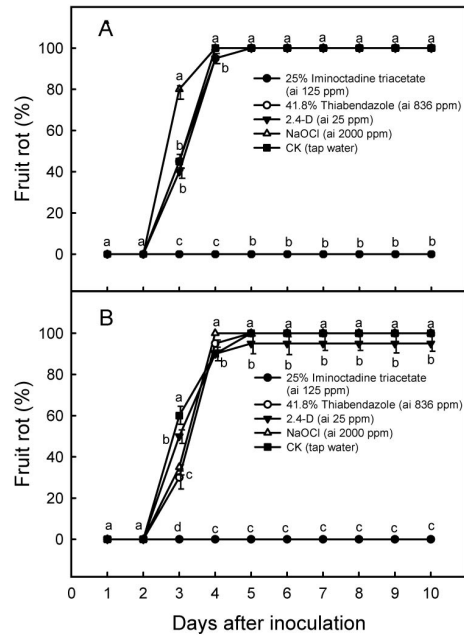


圖 5. 不同藥劑與使用時機對柳橙果實綠黴病的防治效果。(A) 果實傷痕處理後先接種綠黴菌 (*Penicillium digitatum*) 再浸泡藥劑；(B) 果實先浸藥劑後再傷痕接種綠黴菌。

Fig. 5. Effect of time of application of fungicides on control of fruit rot of sweet orange caused by *Penicillium digitatum*. Orange fruits were wounded, inoculated with *P. digitatum* (10^6 conidia/mL) and then soaked in a chemical solution (A) or they were soaked in a chemical solution and then inoculated with *P. digitatum* by wounding treatment (B). Values of the same date followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

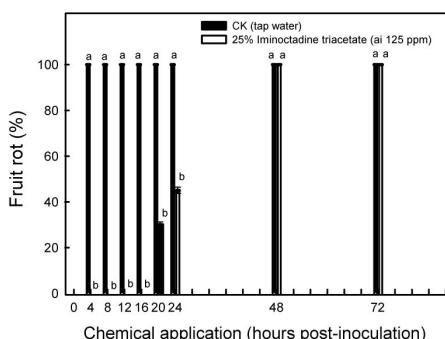


圖 6. 柳橙果實傷痕接種綠黴菌 (*Penicillium digitatum*)，於不同時間後浸泡克熱淨水溶液，置於 24°C 下 5 天後之發病情形。

Fig. 6. Effect of duration between inoculation of *Penicillium digitatum* and treatment of iminoctadine triacetate on control of fruit rot of sweet orange. Orange fruits were wounded and inoculated with conidiospore suspension (10^6 conidia/mL) of *P. digitatum*, and then dipped in the solution of iminoctadine triacetate at different time after inoculation. Fruit rot in each treatment was rated after incubation at 24°C for 5 days. Values in the same hour followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

至目的地後大量腐敗的情形。依據記載，引起柑橘果實快速腐敗的 *Penicillium* 病害，主要有綠黴菌 (*P. digitatum*) 與青黴菌 (*P. italicum*) (Huang *et al.* 2003)，而經取樣分離與形態鑑定結果，從雲林縣出口之柳橙快速腐敗皆由綠黴病菌所引起，而古坑地區與中部地區的柑橘 *Penicillium* 病害亦 90% 以上由綠黴菌引起。綠黴病菌與青黴病菌形態上主要之差異為，綠黴病菌分生孢子梗 (conidiophore) 分支較少約 1-2 支，青黴病菌分生孢子梗分支較多約 2-6 支。收集到的綠黴菌與青黴菌菌株經核糖體內轉錄區間 (internal transcribed spacers, ITS region) DNA 定序，綠黴菌的 ITS1-5.8S DNA-ITS2 全長序列為 498 bp，青黴菌為 497 bp，與 NCBI 收集的菌株序列比對，相似度最高 (best hit) 均達 100% (未發表)，顯示分生證據與形態特性之鑑定相符合。

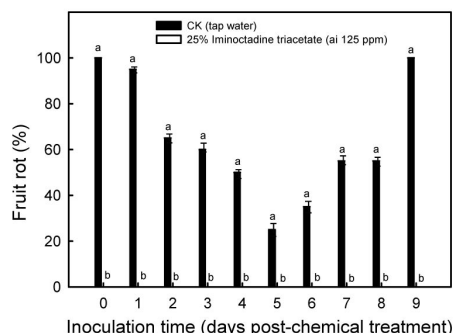


圖 7. 傷痕處理之柳橙果實浸泡克熱淨水溶液，不同天數後再接種綠黴菌 (*Penicillium digitatum*)，於 24°C 下 5 天後之果實發病情形。

Fig. 7. Effect of duration between treatment of injured fruits with iminoctadine triacetate and inoculation of *Penicillium digitatum* on fruit rot of sweet orange. Fruits of sweet orange were wounded and dipped in iminoctadine triacetate solution, and then inoculated with conidiospore suspension (10^6 spores/mL) of *P. digitatum* at different time after the fungicide treatment. Fruit rot in each treatment was rated after incubation at 24°C for 5 days. Values in the same day followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

綠黴病菌為弱病原菌 (兼性寄生菌, facultative parasite)，不易侵染樹上健康的綠色果實，當柳橙果實轉色且受傷時才會被感染 (Huang *et al.* 2003)，經本試驗之結果亦顯示柳橙無傷口時接種病原菌，果實並不會被侵染而發病，有傷口時病菌才能侵入感染；傷痕處理之柳橙果實接種後，在 8°C 以下及 32°C 以上不出現病徵，而 20-28°C 均適合發病，且以 24°C 發病最快，接種第 3 天即出現病徵 (圖 4)。此與，病菌培養於 PDA 上時的生長情形相仿，但稍有出入，人工培養時在 4°C 以下與 36°C 以上不會生長，16-28°C 生長良好，且以 24°C 生長最快速 (圖 1)。

綠黴病菌之分生孢子於水中發芽率很低，幾乎不發芽，有研究報告指出添加葡萄糖、有機酸或檸檬酸可促進孢子發芽 (Pelser & Eckert 1977)，或添加柑橘果實外皮組織亦可促進孢子發芽 (Davis & Smoot 1965)，本研究則

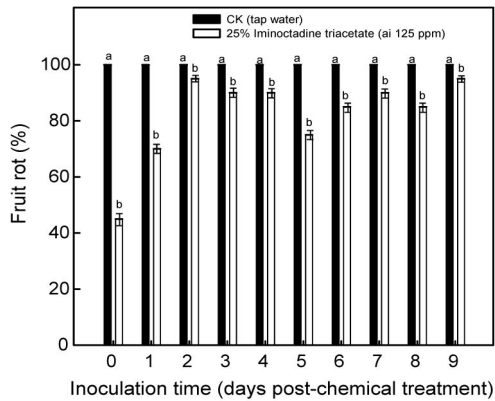


圖 8. 柳橙果實浸泡克熱淨水溶液，經不同天數後傷痕接種綠黴菌 (*Penicillium digitatum*)，在 24°C 下 5 天後之果實發病情形。

Fig. 8. Effect of duration between treatment of uninjured fruits with iminocadine triacetate and inoculation of *Penicillium digitatum* by wounding on fruit rot of sweet orange. Uninjured fruits of sweet orange were dipped in iminocadine triacetate solution first, and then inoculated with conidiospore suspension (10^6 conidia/mL) of *P. digitatum* by wounding at different time after the fungicide treatment. Fruit rot was rated after incubation at 24°C for 5 days. Values in the same day followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

添加 5% 蔬菜汁 (V-8 juice)，即可促使孢子大量發芽，以進行藥劑試驗。

在植物保護手冊中，防治柑橘綠黴病的推薦藥劑僅有 41.8% 腐絕水懸劑 500 倍稀釋液 (Fei *et al.* 2010)。但「克熱淨」在外銷柑橘類訂有農藥殘留量，包括我國為 5.0 ppm，澳大利亞為 5.0 ppm，歐盟為 5.0 ppm 及日本為 1.0 ppm (Tzeng 2008)，該藥劑可使用於外銷柳橙果品之防黴處理，因此本研究選擇該兩藥劑，進行抑菌與抑病試驗評估。試驗結果顯示，25% 克熱淨溶液 2000 倍稀釋液 (ai 125 ppm) 與 41.8% 腐絕水懸劑 500 倍稀釋液 (ai 836 ppm) 對綠黴菌的菌絲生長與分生孢子發芽之抑制效果均甚佳 (圖 2 & 4)，尤其克熱淨溶液在推薦濃度 (即 ai 125 ppm) 時可以 100% 抑制病菌活動。在防

治果實綠黴病害時，克熱淨溶液亦有相當好的抑病功效，但腐絕水懸劑的防病功效非常差，該處理發病情形與對照處理無顯著性差異 (圖 5)。國外曾經報導綠黴病菌對於腐絕有抗藥性之菌株存在 (Bus *et al.* 1991; Harding 1972; Holmes & Eckert 1999)，台灣綠黴病菌是否有此現象值得進一步探討。克熱淨 (ai 125 ppm) 防治柳橙綠黴病的效果雖然甚佳，然而藥劑處理的時機會影響病害防治的功效，藥劑處理後的果實只要沒有新的傷口，病菌在 9 天內均無法侵入感染 (圖 7)，但是藥劑處理的果實如果有新的傷口，綠黴菌可立即入侵，誘發病害 (圖 8)；而經過傷痕接種病菌的果實，如果在 16 小時內施用克熱淨，可以完全抑制病徵出現；但時間超過 16 小時以後，克熱淨即逐漸失去抑制效果 (圖 6)。

除上述兩種藥劑外，次氯酸鈉與二氧化氯兩種經常用來表面消毒的化學品亦被評估，但在高濃度下 (分別為 300 ppm 與 100 ppm)，兩種藥劑對分生孢子發芽與保護果實方面的效果均甚差。此外，國外之研究報告使用溫水處理、碳酸鈉、碳酸氫鈉 (Palou *et al.* 2001) 或丁胺鹽 (2-Aminobutane salts) (Eckert & Kolbezen 1964) 對於綠黴病有防治之效果，在台灣之防病成效如何，尚待探討。

柑橘綠黴菌之主要傳播與侵染器官為分生孢子，靠空氣傳播，一般存在於田間、集貨場、貯藏庫、包裝容器和零售市場，可說是無處不在，從而感染果實，造成損失 (Huang *et al.* 2003)。綠黴病菌之分生孢子在果園土壤內可存活 1 年以上，可為田間感染之初次感染源 (Kuramoto 1979)，因此採果時不慎掉落地面的果實應捨棄，以減低感染源。當柳橙結實後，病原菌會感染地面落果或侵染樹上受傷的果實，大量繁殖產生分生孢子，成為二次感染源，增加園內的病菌密度。這些孢子隨風飛散而附著於果實上，跟隨柳橙果時採收後一起進入貯

藏庫，如果果實碰觸與擠壓受傷，病菌即可侵入感染。因此貯藏或運輸期間，如果環境高溫多濕，發病較為嚴重，若能將環境控制於 8°C 以下，則病害不會發生。又本實驗發現，果實感染綠黴菌後 16 小時內處理克熱淨藥劑，可以完全抑制病害發生，因此採收後的果實應儘早進行浸藥處理。以降低發病率，浸藥後的果實應避免表皮受傷，再被病菌入侵。

引用文獻 (Literature cited)

- Bus, V. G., A. J. Bongers, and L. A. Risse. 1991. Occurrence of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazalil on citrus fruit from different geographic origins. *Plant Dis.* 75:1098–1100.
- Council of Agriculture. 2009. *Agricultural Statistics Yearbook*. Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei. 351 pp. (in Chinese)
- Davis, P. L. and J. J. Smoot. 1965. Inducement of germination of *Penicillium digitatum* spores by orange rind components and effect of pH of substrate. *Phytopathology* 55:1216–1218.
- Eckert, J. W. and M. J. Kolbenzen. 1964. 2-Aminobutane salts for the control of postharvest decay of citrus, apple, pear, peach, and banana fruits. *Phytopathology* 54:978–986.
- Fei, W. C., Y. C. Wang, F. S. Chen, H. M. Lin, and Y. H. Lee. 2010. *Plant Protection Manual*. Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substance Research Institute. Council of Agriculture. Taichung. 963 pp. (in Chinese)
- Harding, P. R. 1972. Differential sensitivity to thiabendazole by strains of *Penicillium italicum* and *P. digitatum*. *Plant Dis. Rep.* 56:256–260.
- Holmes, G. J. and J. W. Eckert. 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology* 89:716–721.
- Huang, T. C. 2003. *Citrus Protection Compendium*. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine Pub., Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei. 378 pp. (in Chinese)
- Kuramoto, T. 1979. Survival of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* in soil. *Sull. Fruit Tree Res. Stn., Ser. B. Okitsu (Jpn)* 6:137–149.
- Lo, T. U., S. C. Chang, K. S. Kung, and R. J. Chiu. 1952. Survey on citrus diseases and insect pests. *J. Agric. Forest.* 1:78–126. (in Chinese)
- Palou, L. J. L., Smilanick, J., Usall, and I. Vinas. 2001. Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate and sodium bicarbonate. *Plant Dis.* 85:371–376.
- Pelser, P. du T. and J. W. Eckert. 1977. Constituents of orange juice that stimulate the germination of conidia of *Penicillium digitatum*. *Phytopathology* 67:747–754.
- Sawada, K. 1922. *Descriptive Catalogue of the Formosan Fungi* 2:130. (in Japanese)
- Tzeng, D. S. 2008. *Handbook of Maximum Residual Limits for Taiwan Agricultural Products Export to Foreign Countries (or Regions)*. National Chung Hsing University & Agriculture and Food Agency Pub., Council of Agriculture, Executive Yuan. Taichung. 494 pp.

Etiology and Control of Fruit Rot of Sweet Orange Caused by *Penicillium digitatum*¹

Jyh-Nong Tsai², Pao-Jen Ann^{2,3}, and Hsiu-Fang Cheng²

Abstract

Tsai, J. N., P. J. Ann, and S. F. Cheng. 2011. Etiology and control of fruit rot of sweet orange caused by *Penicillium digitatum*. J. Taiwan Agric. Res. 60:139–148.

Fruit rot or green mold caused by *Penicillium digitatum* is the most common postharvest disease of sweet orange (*Citrus sinensis* cv. 'Liu-cheng') in Taiwan. A study was conducted to determine effect of temperature on growth of the pathogen and development of fruit rot of sweet orange and effect of fungicide treatment on control of this postharvest disease. Results showed that the minimum, optimum and maximum temperature for mycelial growth of *P. digitatum* on PDA was 8, 24, and 36°C, respectively. The pathogen infects orange fruits through wounds and incidence of fruit rot was affected by storage temperatures, high incidence of fruit rot at the storage temperature of 24°C but no fruit rot at the storage temperature above 32°C or below 12°C. Symptoms of green mold appeared on inoculated fruits after storing at 24°C for 2–3 days. Among the five fungicides [Iminoctadine triacetate (ai 125 ppm), Thiabendazole (ai 836 ppm), 2,4-Dichloro phenoxyacetic acid (2,4-D) (25 ppm), sodium hypochloride (2000 ppm), and chloride dioxide (100 ppm)] tested, iminoctadine triacetate at 125 ppm was the most effective fungicide, which completely suppressed mycelial growth of *P. digitatum* on PDA and inhibited conidial germination in 5% CV-8 juice. Treatment of orange fruits with iminoctadine triacetate at 125 ppm before or after inoculation of *P. digitatum* also completely prevented the development of fruit rot for 9 days. However, iminoctadine triacetate was ineffective if the chemical was applied after inoculation of *P. digitatum* for 16 hours or longer. The fungicide thiabendazole at 836 ppm was effective in reducing spore germination of *P. digitatum* but was ineffective in reducing incidence of fruit rot. This study suggests that prevention of fruit injury, treatment of orange fruits with iminoctadine triacetate, and storage of orange fruits under cool temperature may be necessary for effective control of green mold of sweet orange caused by *P. digitatum*.

Key words: Sweet orange, *Citrus sinensis*, Green mold, *Penicillium digitatum*, Postharvest disease, Disease control, Iminoctadine triacetate.

-
1. Contribution No. 2521 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: June 17, 2011.
 2. Respectively, Associate Researcher, Researcher and Director, and Assistant, Plant Pathology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Corresponding author, e-mail: pjann@tari.gov.tw; Fax: (04)23302803.

Control of Phytophthora Disease of Fruit Tree Seedlings by Neutralized Phosphorous Acid¹

Pao-Jen Ann^{2,3}, Ien-Tien Wang², and Jyh-Nong Tsai²

Abstract

Ann, P. J., I. T. Wang, and J. N. Tsai. 2011. Control of Phytophthora disease of fruit tree seedlings by neutralized phosphorous acid. J. Taiwan Agric. Res. 60:149–156.

A greenhouse study was conducted to determine effects of neutralized phosphorous acid solution (NPA) on control of Phytophthora diseases of kumquat (*Fortunella margarita*) grafted on Rangpur lemon (*Citrus limon*), loquat (*Eriobotrya japonica* cv. 'Mogi') and avocado (*Persea americana* cv. 'Tainan'). The NPA solution was prepared by dissolving phosphorous acid in water and then adding equal weight of potassium hydroxide to the solution. For kumquat, 1-year-old seedlings were sprayed with NPA solution (1000 mg/L), 50 mL/seedling, for 2 or 3 times at weekly interval and then sprayed with zoospore suspensions of *Phytophthora citrophthora*, 10 mL/seedling, at 7 days after last NPA spray. After inoculation for 14 days, each seedling was recorded for disease incidence on leaves. In another experiment, 5-year-old kumquat plants grafted on Rangpur lemon were sprayed with NPA (1000 mg/L), 500 mL/plant, for 3 times at weekly interval and inoculated with the pathogen, 200 mL/plant, at 7 days after last NPA spray. For loquat, 6-month-old seedlings were treated with NPA (2000 mg/L) by soil drenching or with NPA (1000 mg/L) by spraying for 3 times at 30-day interval. The seedlings were then inoculated with *Phytophthora nicotianae* by placing one gram of pathogen-colonized wheat-oat grains on the wounded area of basal stems. For avocados, 6-month-old seedlings were inoculated with *Phytophthora cinnamomi* by drenching with 100 mL of chlamydospore suspension on each plant and then treated with NPA (1000 or 2000 mg/L) by soil drenching for 3 times at 3-month interval. Results showed that spraying kumquat seedlings with NPA at 1000 mg/L (a.i.) for 2–3 times significantly reduced seedling blight (< 2% infected leaves) caused by *P. citrophthora*, compared to untreated controls (> 44.8% infected leaves). Similarly, NPA sprayed three times on 5-year-old kumquat plants was also effective in reducing incidence of Phytophthora fruit rot, leaf blight and twig blight. Application of NPA at 2000 mg/L by soil drenching or at 1000 mg/L by spraying completely controlled basal stem rot of loquat caused by *P. nicotianae*, whereas more than 60% of seedlings were killed in the controls. The avocado seedlings treated with NPA by soil drenching and inoculated with the pathogen were all survived during the test period, whereas 50–60% seedlings were killed in the pathogen-inoculated control. Avocado seedlings treated with NPA were taller and heavier than the pathogen-inoculated control, but they were shorter and lighter than the non-inoculated control. This study reveals that NPA is a chemical with potential for practical use in the management of Phytophthora diseases of kumquat, loquat and avocado.

-
1. Contribution NO. 2525 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: June 9, 2011.
 2. Respectively, Plant Pathologist and Director, Assistant, and Associate Plant Pathologist, Plant Pathology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Corresponding author, e-mail: pjann@tari.gov.tw; Fax: (04)23302803.

Key words: Phosphorous acid, Phytophthora diseases, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae*, Disease control, Kumquat, Avocado, Loquat.

Introduction

Phosphorous acid (H_3PO_3) is an inorganic P fertilizer beneficial to subsequent crops (MacIntire *et al.* 1950). It has also been used since 1980s to control diseases of field crops caused by oomycetes (Cohen & Coffey 1986) and other pathogens. Examples of commercial products containing neutralized phosphorous acid are Foli-R-Fos 400 (20% phosphorous acid, U. I. M. Agrochemicals, Australia) (Wicks *et al.* 1991), Nutri-Phite P Foliar (4% N-30% P_2O_5 -8% K_2O , Biagro Western Sales, Inc., Visalia, CA) (Forster *et al.* 1998), Guard P. K. (7% N-21% P_2O_5 -21% K_2O , Agrichem, Australia), Akomon-40 (Chaluvharaju *et al.* 2004), and Potphos (Chaluvharaju *et al.* 2004). In Taiwan, a neutralized phosphorous acid (NPA) at pH 6.2–6.7 was developed and used for control Phytophthora diseases in horticultural crops (Ann *et al.* 1997b, 2009). The NPA solution was prepared by dissolving phosphorous acid in water and then adding equal amount of potassium hydroxide to the solution.

The NPA solution is easy to prepare and is effective in the control of late blight of potato and tomato caused by *Phytophthora infestans* (Montagne) de Bary (Tsai *et al.* 2009), blight of lily caused by *P. nicotianae* Breda de Haan = *P. parasitica* Dastur (Ann *et al.* 2009), and basal stem rot of pepper caused by *P. capsici* Leonian (Ann *et al.* 2009). The objective of this greenhouse study was to determine effects of NPA in the control of Phytophthora diseases of three fruit trees, including Phytophthora blight of kumquat (*Fortunella japonica*) caused by *Phytophthora citrophthora* (Smith & Smith) Leonian (Ann *et al.* 1997b), basal stem rot of loquat (*Eriobotrya japonica*) caused by *P. nicotianae* (Chern *et al.* 1998), and root rot of avocado (*Persea americana*) caused by *Phytophthora cinnamomi* Rands (Ann *et al.* 2005).

Materials and Methods

Preparation of neutralized phosphorous solution (NPA)

High purity phosphorous acid (H_3PO_3 , 99% white crystal, Aldrich Co., USA) and experimental grade potassium hydroxide (> 85% KOH pellet GR, Merck Co.,

USA) were used to prepare neutralized phosphorous acid (NPA) solutions at concentrations of 1000, 2000 and 5000 mg/L by the method of Ann *et al.* (2009). The procedure consists of dissolving phosphorous acid into distilled water and then adding an equal amount (1 : 1 ratio, w/w) of potassium hydroxide to the phosphorous acid solution. Ann *et al.* (2009) reported that pH values of NPA solutions at 500–5000 mg/L were 6.26–6.45.

Pathogens and inoculum preparation

Pathogens: Three isolates of *Phytophthora* species were used in the study, including isolate Tari95004 (A¹ mating type) of *P. citrophthora* from a diseased stem of kumquat, isolate Tari95024 (A² mating type) of *P. nicotianae* from a diseased basal stem of loquat, and isolate Tari94006 (A² mating type) of *P. cinnamomi* from a diseased root of avocado (Table 1). These isolates were single-zoospore cultures, previously isolated by the senior author from host plants grown in Taiwan.

Inoculum preparation: The three isolates of *Phytophthora* were inoculated on VA-medium containing 5% V-8 juice (Campbell Co., USA), 0.02% $CaCO_3$ and 1.5% agar (Hwei shen Co., Taiwan), incubated at 24°C for 3–5 days and used in this study. For inoculation of kumquat plants, a large amount of sporangia of *P. citrophthora* was prepared by the method of Hwang *et al.* (1976). Mycelial mats with sporangia were chilled at 15°C for 4–6 hours for differentiation and release of zoospores. Zoospore suspensions were adjusted to the concentrations of about 5,000–10,000 zoospores/mL and stored in an icebox until used for inoculation. To prepare inoculum for inoculation of avocado, mycelial mates and large amount of chlamydospores were collected from five plates (9 cm diam.) of *P. cinnamomi* cultures by the method described by Hwang & Ko (1978), placed in 200 mL of distilled water, homogenized in an Onmi mixer homogenizer at 4500 rpm for 1 min and then filtered through a double-layer cheesecloth. The chlamydospore suspension was adjusted to 100–200 spores per milliliter using sterile distilled water and used for inoculation of avocado. To prepare inoculum for inoculation of loquat, five agar discs (5 mm × 5 mm × 3 mm) containing fresh mycelia mates of *P.*

Table 1. List of *Phytophthora* isolates used in the study

<i>Phytophthora</i> species	Isolate No.	Mating type	Source	Location	Year of Isolation
<i>P. citrophthora</i>	Tari95004	A ¹	Kumquat stem	Ilan	1995
<i>P. nicotianae</i>	Tari95024	A ²	Loquat basal stem	Taichung	1995
<i>P. cinnamomi</i>	Tari94006	A ²	Avocado root	Chiayi	1994

nicotianae grown on VA-medium were removed and inoculated on wheat-oat grain substrate (wheat : oat : distilled water at 1 : 1 : 1 ratio; v/v/v) in each 300 mL flask containing 50 g of grain substrate. The cultures in flasks were incubated at 25°C for one month.

Control of *Phytophthora* blight of kumquat by NPA

Both young seedlings and 5-year-old plants of kumquat grafted on Rangpur lemon (*Citrus limon*) were used to study control of *Phytophthora* blight by NPA. For the seedling study, 1-year-old kumquat seedlings (20–30 cm in height) were planted in the growth substrate containing paddy field soil (clay loam, pH 5.5), vermiculate (no.4), perlite, and peat moss at 5 : 2 : 2 : 1 ratio (by volume) in black plastic containers (8 cm × 8 cm × 20 cm; L × W × H). The kumquat seedlings were individually sprayed with 50 mL (enough amount for covering one seedling) of NPA at 1000 mg/L at weekly interval for two or three times during the winter-spring seasons (about 15–20°C). The control seedlings were sprayed weekly with distilled water, 50 mL/seedling. Both treated and control seedlings were individually inoculated by spraying 10 mL of zoospore suspension of *P. citrophthora* on each plant at 7 days after last spray of NPA. For the control without the pathogen, seedlings were sprayed with distilled water. Clear plastic bags were used to cover individual seedlings (inoculated and control) for 2 days to maintain high humidity and then removed. Disease severity was recorded at 1 and 2 weeks after inoculation by examining each seedling for lesions on leaves and gummosis on twigs. Each treatment consisted of 5 seedlings and the experiment was repeated once.

To test the effect of NPA on protection of fruit and other aboveground tissues, 5-year-old kumquat plants (about 150 cm in height × 100 cm in diam.) were grown in the growth substrate in plastic pots (36 cm in diam. × 50 cm in height), 1 plant/pot, and kept in the greenhouse. The growth substrate for the 5-year-old kumquat plants was prepared by the same method described in the seedling tests. During the winter and spring period, plants with mature green fruits were individually sprayed with 500 mL of 1000 mg/L NPA, two or three times at weekly interval. Plants sprayed with 80% fosetyl-aluminum WP (CiBaGi Co., USA) diluted 200 times (conc. ai 4000 mg/L) were used as the fungicide control. At 1 week after the last chemical application, the NPA treated plants in the greenhouse were covered with a plastic sheet and inoculated with *P. citrophthora* by spraying 200 mL of the zoospore suspension on each plant. The inoculated kumquat plants were then kept under cool conditions (15–20°C). Plants were examined for number of infected fruits and leaves at 7 days after inoculation and number of infected twigs at 21 days after inoculation. Each treatment

consisted of 5 seedlings and the experiment was repeated once.

Control of *Phytophthora* foot rot of loquat seedlings by NPA

Loquat seedlings cv. 'Mogi' were planted in black plastic containers (8 cm × 8 cm × 20 cm, L × W × H), containing the same growth substrate described in the kumquat study. After growing for 6 months in the greenhouse, each seedling was treated with NPA for 3 times at monthly interval by pouring 50 mL of NPA at 2000 mg/L into the drench of the growth substrate or spraying 10 mL of NPA at 1000 mg/L over the entire plant at each time. Plants treated with distilled water by drenching or spraying were used as controls. At 10 days after the second NPA application, the basal stem of each seedling was slightly wounded by knife scraping, inoculated with *P. nicotianae* by placing one gram of wheat-oat grain mixture colonized by the pathogen on the wound and rapped the inoculated stem with two layers of parafilm "M" membranes (Pechinery Co., USA). Two places were inoculated on each seedling. Plants with stems inoculated with autoclave wheat-oat grain mixture without the pathogen were used as controls. Seedlings were examined weekly and plants killed by the pathogen were recorded for a period of 3 months. Each treatment contained 10 seedlings and the experiment was repeated once.

Control of *Phytophthora* root rot of avocado seedlings by NPA

Avocado seedlings of a local variety from Tainan county were planted in plastic containers (20 cm in diam. × 30 cm in height) containing soils collected from a paddy field in Chiayi county, Taiwan. The soil, belonging to clay loam with pH 5.5, was heated at 80°C for 30 min and stored at room temperature (24–28°C) for one month before use. There were five treatments for this experiment: 1000 mg/L NPA + pathogen, 2000 mg/L NPA + pathogen, 80% fosetyl-aluminum WP (4000 mg/L) + pathogen, pathogen-inoculated control and uninoculated control. Each of the 6-month-old seedlings was inoculated with *P. cinnamomi* by pouring 100 mL of chlamyospore suspension onto the soil surface in the evening. In the next morning, 200 mL of the chemical solution (NPA or Fosetyl-aluminum) were applied to the soil surface of each plant and two more applications thereafter at 3-month interval. Plants, treated or controls, were kept in the greenhouse for three months and then recorded number of seedlings killed by *P. cinnamomi*. At the end of the experiment, all survived plants were removed and measured for plant height and total plant weight. Each treatment consisted of 10 plants and the experiment was repeated once.

Statistical analysis

Data collected from each experiment were analyzed by analysis of variance (ANOVA), and means were compared by least significant difference (LSD) test at $P=0.05$.

Results

Control of Phytophthora disease of kumquat by NPA

Results of artificial inoculation tests in the greenhouse showed that kumquat seedlings sprayed with 50 mL of NPA at 1000 mg/L for two to three times effectively controlled leaf blight and twig gummosis caused by *P. citrophthora*. The leaf infection rates of NPA treatments were 2% and 0%, respectively, for the 1st and 2nd tests,

compared to 44.8% and 50.8%, respectively, for the controls (Table 2). All the infected seedlings developed symptoms of gummosis and dieback on infected twigs and they were killed within 6 months. Results also showed that application of 1000 mg/L NPA or 4000 mg/L fosetyl-aluminum on 5-year-old plants of kumquat by spraying for two to three times effectively reduced Phytophthora fruit rot of kumquat (Table 3). In the 2nd test, three applications of NPA at weekly interval completely suppressed development of Phytophthora disease on plants, whereas the disease rates on plants inoculated with *P. citrophthora* without NPA sprays were 80, 59, and 20% on fruits, leaves and twigs, respectively.

Table 2. Control of Phytophthora blight of kumquat seedlings by neutralized phosphorous acid solution (NPA)^z

Treatment ^y	No. NPA application	% Infected leaves ^x		Other symptoms
		7 dpi	14 dpi	
Test 1				
NPA, 50 mL/plant at 1000 mg/L	2	2 b ^w	2 b	
Control-1 (with pathogen)	0	30.5 a	44.8 a	Gummosis and dieback
Control-2 (without pathogen)	0	0 b	0 b	
Test 2				
NPA, 50 mL/plant at 1000 mg/L	3	0 b	0 b	
Control-1 (with pathogen)	0	25.1 a	50.8 a	Gummosis and dieback
Control-2 (without pathogen)	0	0 a	0 a	

^z Neutralized phosphorous acid solution (NPA) was prepared by dissolving phosphorous acid in distilled water and then adding equal weight of potassium hydroxide.

^y 1-year-old seedlings of kumquat grafted on Rangpur lemon were individually sprayed with 50 mL NPA at 1000 mg/L for 2 times at weekly interval. Seedlings in the controls were sprayed with distilled water.

^x Inoculation was done by spraying 10 mL of zoospore suspension of *Phytophthora citrophthora* on young shoots of each kumquat seedling at 7 days after the last application of NPA. Disease was rated at 7 and 14 days after inoculation of the pathogen.

^w Means of the same test within each column followed by the same letters were not significantly different at 5% level according to LSD test.

Table 3. Control of Phytophthora blight of kumquat plants by neutralized phosphorous acid solution (NPA)^z

Treatment ^y	Concentration (ai, mg/L)	No. application	Disease incidence (%) ^{x, w}		
			Fruit	Leaves	Twigs
Test 1					
NPA, 500 mL/plant	1000	2	0 b ^v	8.1 b	10 b
80% Fosetyl-aluminum WP, 500 mL/plant	4000	2	0 b	7.2 b	5 bc
Control-1 (with pathogen)			100 a	92.5 a	35 a
Control-2 (without pathogen)			0 b	0 b	0 c
Test 2					
NPA, 500 mL/plant	1000	3	0 b	0 c	0 b
80% Fosetyl-aluminum WP, 500 mL/plant	4000	3	0 b	8.3 b	0 b
Control-1 (with pathogen)			80 a	59.0 a	20 a
Control-2 (without pathogen)			0 b	0 c	0 b

^z Phosphorous acid solution was neutralized with equal weights of potassium hydroxide.

^y 5-year-old potted plants of kumquat were individually sprayed with 500 mL chemical solution two times (test 1) or three times (test 2) at weekly interval. Seedlings in the controls were sprayed with distilled water.

^x Inoculation was performed by spraying 100 mL of zoospore suspension of *Phytophthora citrophthora* on each plant at 7 days after the treatment of NPA or Fosetyl-aluminum.

^w Disease incidence was recorded at 7 days after inoculation for fruit rot and leaf blight and 14 days after inoculation for twig blight.

^v Means of the same test within each column followed by the same letters were not significantly different at 5% level according to LSD test.

Control of *Phytophthora* foot rot of loquat seedlings by NPA

Results of the greenhouse experiments showed that three applications of 10 mL of NPA at 1000 mg/L by foliar spray or 50 mL of NPA at 2000 mg/L by soil drenching at 30-day intervals completely suppressed the development of stem rot of loquat seedlings caused by *P. nicotianae* (Table 4). None of the NPA-treated seedlings were killed during the study period of three months, whereas the percentage of dead seedlings in the pathogen-inoculated controls was 60 and 65% for test 1 and test 2, respectively.

Control of *Phytophthora* root rot of avocado seedlings by NPA

Results of the greenhouse experiments showed that both NPA and fosetyl-aluminum were effective chemicals for control of root rot of avocado seedlings caused by *P. cinnamomi* (Table 5). During the 9 months period, no dead seedlings were found in the treatment of NPA or fosetyl-aluminum, whereas 50–60% of seedlings were killed in the pathogen-inoculated controls. Results of both tests also showed that application of 2000 mg/L NPA (100 mL/plant) by soil drenching for 3 times at 3 month interval, was the most effective method for control of avocado root rot and the treatment improved seedling growth by increasing seedling height and seedling weight (Table 5). The treatment of fosetyl-aluminum (100 mL/plant, 4000 mg/L) was the second-best, followed by the treatment of 1000 mg/L NPA. All the chemical treatments (NPA and fosetyl-aluminum) also significantly ($P < 0.05$) improved seedling vigor of avocado, compared to the pathogen-inoculated controls.

Discussion

Phytophthora species are important pathogens causing serious diseases on numerous crops and are distributed worldwide (Erwin & Ribeiro 1996). In Taiwan, *Phytophthora* diseases are common on crops due to warm and humid climates, which are favorable for propagation and dissemination of the pathogen and development of the disease (Ho *et al.* 1995). Synthetic fungicides are generally used by growers to control crop diseases including *Phytophthora* diseases. In order to reduce the negative impact of synthetic fungicides, the search for materials that are effective, safe, cheap and easy to use for the control of *Phytophthora* diseases has become a major pursue for researchers in Taiwan.

Many reports suggest that phosphorous acid and its salts are effective and useful inorganic chemicals for control of crop diseases caused by *Phytophthora* spp. and other oomycetes (Cohen & Coffey 1986; Guest & Grant 1991). Saindrenan & Guest (1995) reported that the major mechanism for control of diseases by these chemicals was due to induced host resistance to the pathogen by the phosphorous acid ion. Several products containing phosphorous compounds have been developed and used commercially for control of crop diseases caused by oomycetes (Wicks *et al.* 1991; Forster *et al.* 1998; Chaluvaraju *et al.* 2004). However, none of these commercial products are commonly used in Taiwan due to high price and other reasons such as easy oxidation in air. The NPA solution reported by Ann *et al.* (1997a, 2009) is cheap and easy to prepare and it is effective in the control of diseases of vegetable crops, including foliar and blossom blight of lily caused by *P. nicotianae* (Ann *et al.* 2009), basal stem

Table 4. Control of *Phytophthora* foot rot of loquat seedlings by neutralized phosphorous acid solution (NPA)^z

Treatment	Application method	Seedling killed (%) ^{y,x}
Test 1		
NPA at 2000 mg/L	Soil drench, 50 mL/plant, 3 applications at 30-day interval	0 b ^w
Control-1 (with pathogen)		60 a
Control-2 (without pathogen)		0 b
Test 2		
NPA at 1000 mg/L	Foliar spray, 10 mL/plant, 3 applications at 30-day interval	0 b
Control-1 (with pathogen)		65 a
Control-2 (without pathogen)		0 b

^z Phosphorous acid was neutralized with equal weights of potassium hydroxide in distilled water.

^y 6-mo-old potted seedlings of loquat were individually inoculated with *Phytophthora nicotianae* at 10 days after the second application of NPA. Inoculation was performed by placing one gram of pathogen-colonized wheat-oat grains on each of the two wounded areas of basal stem of each seedling.

^x Diseased plants were assessed at 90 days after inoculation.

^w Means of the same test followed by the same letters were not significantly different at 5% level according to LSD test.

Table 5. Control of *Phytophthora* root rot of avocado seedlings by neutralized phosphorous acid solution (NPA)^z

Treatment ^y	Concentration (mg/L)	Seedling ^x killed (%)	Plant vigor ^x	
			Height (cm)	Weight (g/plant)
Test 1				
NPA, 200 mL/plant	1000	0	98.8 b ^w	311 c
NPA, 200 mL/plant	2000	0	110.4 a	381 b
80% Fosetyl-aluminum WP, 200 mL/plant	4000	0	106.3 ab	366 b
Control-1 (with pathogen)		60	47.5 c	99 d
Control-2 (without pathogen)		0	112.5 a	497 a
Test 2				
NPA, 200 mL/plant	1000	0	94.4 b	360 c
NPA, 200 mL/plant	2000	0	105.5 a	476 b
80% Fosetyl-aluminum WP, 200 mL/plant	4000	0	98.2 b	466 b
Control-1 (with pathogen)		50	62.8 c	186 d
Control-2 (without pathogen)		0	109.6 a	514 a

^z Phosphorous acid was neutralized with equal weights of potassium hydroxide in distilled water.

^y Chlamydospore suspensions of *Phytophthora cinnamomi* were applied to the soil surface of 6-mo-old seedlings of loquat in the evening, 100 mL/seedling, followed by application of chemical solution (NPA or Fosetyl-aluminum), 200 mL/seedling, in the next morning. Two more chemical treatments (NPA or Fosetyl-aluminum) were applied by soil drenching at 3-month interval.

^x Disease and plant vigor were determined at 90 days after the last chemical application.

^w Means of the same test within each column followed by the same letters were not significantly different at 5% level according to LSD test.

rot of pepper caused by *P. capsici* (Ann *et al.* 2009) and late blight of potato and tomato caused by *P. infestans* (Tsai *et al.* 2009). This study further confirms the effectiveness and usefulness of NPA for control of *Phytophthora* diseases of fruit tree seedlings such as kamquat, loquat and avocado grown in the greenhouse.

Previous reports indicated that 2–3 foliar sprays of NPA at the concentration of 1000 mg/L at weekly interval prior to the inoculation of *Phytophthora* pathogen was effective for control of foliar and blossom blight of lily (Ann *et al.* 2009) and late blight of potato and tomato (Tsai *et al.* 2009). This study reveals that the NPA concentration and application method used in lily (Ann *et al.* 2009) as well as potato and tomato (Tsai *et al.* 2009) is also effective in the control of leaf and twig blights (Table 2) and fruit rot (Table 3) of kamquat caused by *P. citrophthora*. Meanwhile, the treatment of NPA at 1000 mg/L was equal to or slightly better than the treatment of Fosetyl-aluminum at 4000 mg/L (the recommended concentration). Ann *et al.* (2009) reported that NPA applied by soil drenching at a higher concentration (2000–5000 mg/L) was more effective than NPA applied by foliar spray at a lower concentration (1000 mg/L) in the control of *Phytophthora* basal stem rot of pepper. This study showed that NPA completely suppressed basal stem rot of loquat seedlings caused by *P. nicotianae*, either by soil drenching (50 mL/pot at 2000 mg/L) or by foliar

spray (10 mL/plant at 1000 mg/L) was used (Table 4). The concentrations of NPA applied to loquat were relatively lower than those applied to pepper (Ann *et al.* 2009), but the efficiency of NPA in suppression of the basal stem rot in loquat was much better than the basal stem rot in pepper. The reason for such differences between loquat and pepper remains unknown.

This study suggests that NPA is an inorganic chemical with potential for management of crop diseases caused by *Phytophthora* spp. In addition to the control of *Phytophthora* diseases in vegetable crops in previous reports (Ann *et al.* 1997a, 2009; Tsai *et al.* 2009) and fruit trees (kamquat, loquat and avocado) in this study, it warrants further investigations on the use of NPA for management of *Phytophthora* diseases in other crops.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Hung-Chang Huang for review of the manuscript, and the National Science Council of the Republic of China for partial support of the study (Projects NSC 92-2313-B-055-003, NSC 93-2313-B-055-001 & NSC 94-2313-B-055-001).

Literature cited

Ann, P. J., T. F. Hsieh, and M. L. Hsieh, 1997a. Control of *Phytophthora* diseases of horticultural crops with phosphorous acid. *Plant Prot. Bull.* 39:403–404.

- (Abstract in Chinese)
- Ann, P. J., J. N. Tsai, I. T. Wong, T. F. Hsieh, and C. Y. Lin. 2009. A simple technique, concentration and application schedule for using neutralized phosphorous acid to control *Phytophthora* diseases. *Plant Pathol. Bull.* 18:185–195.
- Ann, P. J., I. T. Wong, F. H. Chang, and J. N. Tsai. 2005. *Phytophthora* diseases of avocado in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 55:13–24. (in Chinese with English abstract)
- Ann, P. J., I. F. Wu, and C. Y. Lin. 1997b. Studies on etiology of quick decline and death of kumquat in Ilan areas and the disease control. *Plant Pathol. Bull.* 6:198. (abstract in Chinese)
- Chaluvaraju, G., P. Basavaraju, N. P. Shetty, S. A. Deepak, K. N. Amruthesh, and H. S. Shetty. 2004. Effect of some phosphorous-based compounds on control of pearl millet downy mildew disease. *Crop Prot.* 23:595–600.
- Chern, L. L., P. J. Ann, and H. R. Young. 1998. Foot and root rot of loquat in Taiwan caused by *Phytophthora*. *Plant Dis.* 82:651–656.
- Cohen, T. and M. D. Coffey. 1986. Systemic fungicides and the control of Oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:311–338.
- Erwin, D. and O. Ribeiro. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS press. Minnesota. 562 pp.
- Forster, H., J. E. Adaskaveg, D. H. Kim, and M. E. Stanghellini. 1998. Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of pepper to *Phytophthora* root and crown rot in hydroponic culture. *Plant Dis.* 82:1165–1170.
- Guest, D. I. and B. R. Grant. 1991. The complex action of Phosphonates in plants. *Biol. Rev.* 66:159–187.
- Ho, H. H., P. J. Ann, and H. S. Chang. 1995. The Genus *Phytophthora* in Taiwan. *Acad. Sin. Mon. Ser.* 15. Taipei, Taiwan, ROC. 86 pp.
- Hwang, S. C., W. H. Ko, and M. Aragaki. 1976. A simplified method for sporangial production by *Phytophthora cinnamomi*. *Mycologia* 68:1233–1234.
- Hwang, S. C., and W. H. Ko. 1978. Biology of chlamydospores, sporangia, and zoospores of *Phytophthora cinnamomi* in soil. *Phytopathology* 68:726–731.
- MacIntire, W. H., S. H. Winterberg, L. J. Hardin, A. J. Sterges, and L. B. Clements. 1950. Fertilizer evaluation of certain phosphorus, phosphorous, and phosphoric materials by means of pot cultures. *Agron. J.* 42:543–549.
- Pegg, K. G., A. W. Whiley, J. B. Saranah, and R. J. Glass. 1985. Control of *Phytophthora* root rot of avocado with phosphorous acid. *Aust. Plant Pathol.* 14:25–29.
- Saindrenan, P. and D. V. Guest. 1995. Involvement of phytoalexins in the response of phosphonate-treated plants to infection by *Phytophthora* species. p. 375–390. *in: Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action.* (Daniel, M. and R. P. Purkayastha, eds.) Marcel Dekker, INC. New York.
- Tsai, J. N., P. J. Ann, I. T. Wang, S. Y. Wang, and C. Y. Hu. 2009. Control of *Phytophthora* late blight of potato and tomato with neutralized phosphorous acid. *J. Taiwan. Agric. Res.* 58:185–195. (in Chinese with English abstract)
- Wicks, T. J., P. A. Magarey, M. F. Waxhtel, and A. B. Frensham. 1991. Effect of postinfection application of phosphorous (phosphonic) acid on the incidence and sporulation of *Plasmopara viticola* on grapevine. *Plant Dis.* 75:40–43.

利用亞磷酸中和水溶液防治果樹苗木疫病¹

安寶貞^{2,3} 王姻婷² 蔡志濃²

摘 要

安寶貞、王姻婷、蔡志濃。2011。利用亞磷酸溶中和水液防治果樹苗木疫病。台灣農業研究 60:149–156。

本研究評估簡便調製之亞磷酸中和水溶液 (neutralized phosphorous acid solution, NPA) 對三種果樹幼苗疫病之防治效果。一年生的長實金柑 (*Fortunella margarita*)/廣東檸檬 (*Citrus limon*) 嫁接苗每株噴布 50 mL NPA (濃度 1000 mg/L)，每星期施用一次，2–3 次後，再接種 *Phytophthora citrophthora* 的游走子懸浮液，接種 14 天後疫病幾乎不會發生；而對照處理則有 44.8% 與 50.8% 的葉片染病，並且伴隨枝條流膠與枝枯。而五年生的結果金柑苗每株噴布 500 mL 相同濃度的 NPA 三次，可以完全保護果實、葉片及枝條不被病菌感染；而接種病菌的對照處理的發病率分別為 80%，59% 及 20%，發病之枝條同樣伴隨流膠與枝枯。六個月大的茂木枇杷 (*Eriobotrya japonica* cv. 'Mogi') 實生苗之土壤表面每株灌注 50 mL NPA (2000 mg/L) 或噴布 10 mL NPA (1000 mg/L) 三次，每次間隔 30 天，之後莖基部接種疫病菌 *P. nicotianae* 之麥粒菌種，90 天後均無幼苗死亡；而對照處理則有 60% 與 65% 的死亡率。六個月大的台南種酪梨 (*Persea americana* cv. 'Tainan') 在接種 *P. cinnamomi* 厚膜孢子懸浮液後，每盆土壤灌注 100 mL NPA (1000 mg/L 或 2000 mg/L) 三次，每次間隔 90 天，NPA 的處理在試驗期間均無植株死亡，而接菌對照處理有 50% 與 60% 死亡率，NPA 處理組的平均株重比接菌對照處理顯著為重，但比不接菌對照處理顯著為差。

關鍵詞： 亞磷酸、疫病、*Phytophthora cinnamomi*、*Phytophthora citrophthora*、*Phytophthora nicotianae*、疫病防治、金柑、枇杷、酪梨。

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2525 號。接受日期：100 年 6 月 9 日。

2. 本所植物病理組研究員兼組長、研究助理、副研究員。台灣 台中市。

3. 通訊作者，電子郵件：pjann@tari.gov.tw；傳真機：(04)23302803。

「台灣農業研究」稿約

一、本刊為行政院農業委員會農業試驗所發行之學術性季刊，刊登農業試驗研究相關之研究稿件：

論 說：由本所邀請專家撰寫。

研究報告：關於農業科學未曾發表之研究報告，按題目、作者、摘要、前言、材料與方法、結果、討論、結論（一般略去）、誌謝（可略去）、引用文獻等依序撰寫，圖與表附於其後，全文以不超過 10 印刷頁為原則。

研究簡報：關於農業科學未曾發表之簡短原始研究報告，不須分章節撰寫，但須附中英文摘要，全文以不超過 4 印刷頁為原則。

二、稿件應以中文或英文撰寫。來稿請送原稿及電子檔案各一份（內各附照片原圖，繪製圖版可附原圖與影印圖片二份）。文稿以 A4 大小之白色紙張（長 29.6 公分，寬 21 公分）兩倍行高（double space）打字，12 號字體，左邊對齊，版面應上下預留 3 公分，左右 2 公分之空間，並自第二頁起在右下角以阿拉伯數字註明頁數。撰寫時，中文以細明體、英文以 Times New Roman 字體打字；英文字距一格，句距二格。審查接受之稿件，隨文請附紙本文稿一份與電子檔案，以利送審及電腦排版等作業。

三、稿件格式：

題 目：宜簡短，能充分反應文旨，並附簡題（Running title）（中文 12 字；英文 6 字以內為原則）。英文題目除介系詞、連接詞等字外，每字第一字母應大寫。題目附小註，說明研究報告編號。

作 者：作者姓名置中，中文名字間空一格；英文姓名則名在前姓氏在後，作者二人或二人以上時，以“，”相隔，最後一人前加“and”字樣，其表示方法如 Chen-Seng Huang, Chen-Chang Chen, and Chyr-Guan Chen。每一作者須附小註，以說明所屬機關單位，通訊作者須附電子郵件信箱與傳真機號碼。題目與作者同置第一頁。

摘 要：不分段落、宜簡潔明確。摘要之前應加作者、年代、題目、期刊、及卷期，摘要之後應附關鍵詞（Key words），關鍵詞不超過 5 個，每個英文關鍵詞第一字母應大寫。摘要以不超過 500 字為原則。以中（英）文發表者須附英（中）文摘要，置於本文之後，且內容須與中（英）文摘要相符，並附稿件編號、作者、通訊作者之小註。

本 文：依序為前言（INTRODUCTION）、材料與方法（MATERIALS AND METHODS）、結果（RESULTS）、討 論（DISCUSSION）、結 論（CONCLUSION）、誌 謝（ACKNOWLEDGEMENTS）、引用文獻（LITERATURE CITED）。除學名、專有名詞、化學式、數學公式、數字、度量衡單位及縮寫外，文句中不得中外文並用，需使用英（外）文以助明瞭時，須將英（外）文括號置於中文之後。材料與方法、結果兩部份如有必要須分章節，每一章節內並可再分小章節，以助明瞭文稿內容。章節題目（heading）單行置於該章節之前，小章節題目（subheading）直接置於小章節之首。

表 格：

- 1、每一表格應分別繕製，須以 WORD[®]中“表格”工具製作，上方須有標題，並按文中出現順序加上表 1. (Table 1.)，表 2. (Table 2.) 等冠號。
- 2、中文稿之表格標題應中英文並列，冠號與表幅齊頭，表內項目及內容以英文書寫。英文標題及各欄英文細目，除第一字之第一字母大寫外，餘均小寫。
- 3、表格應加分析、簡化與歸納後始可列表。每一表格應在文中標示清楚，以便對照。
- 4、表中內容如需說明，均須附加小註，以 z, y, x,...等縮小小寫字母置於右上角，並於表下依次敘述。表格僅列橫線。

5、性質類同之圖與表，務請精簡與合併。

圖 片：

- 1、手繪圖版以黑色墨水分別繪圖紙或描繪紙（白色透明紙）上。如以電腦繪圖，請以鐳射印表機或同規格之印表機列印，力求清晰。
- 2、圖中所有標示應以英文書寫（Arial 字型）或註明於標題之後。
- 3、照片以光面紙為原則，清晰度以縮小 50%可判讀為宜。多幅照片儘量製成併版；如有特別指明，應加圈或箭頭表明。顯微照相，應加比例尺大小；照片大小以不超過版面（25 cm × 18 cm）為宜。
- 4、圖版及照片下方應有標題，並按文中出現的順序加上**圖 1. (Fig. 1.)**、**圖 2. (Fig. 2.)** 等冠號，在文中須標示清楚，以便對照。中文稿標題應中英文併列，力求明確。
- 5、除併圖外，每一圖片應單頁製作。
- 6、照片、圖片背面應註上冠號及作者姓名，以免排印錯誤。

誌 謝：不分段落，包括人物、經費來源等。誌謝可略去。

引用文獻：

- 1、列舉確實曾引用之文獻。文獻以登載於學術性期刊、書籍、研討會之文章及學位論文為限。文中涉及引用文獻時，根據該文獻的作者與年代加以括號：如 (Sung 1991)、(Lo 1991, 1992)、(Chen & Ho 1983)、(Sung 1991; Hsu *et al.* 1992)，以年代先後為序置於引用文處。
- 2、文獻須以英文撰寫，以姓名字母為序。作者相同時以年代先後為序。
- 3、文獻之書寫方法以期刊為例，依序為作者、年代、題目、期刊、卷期、頁數。
- 4、期刊名須依該期刊公告之縮寫撰寫；如無者，請參照 Biosciences Information Service (1992) 出版之“Serial Sources for the BIOSIS Previews Database”或依該學術領域之慣例撰寫。
- 5、文獻書寫範例如下：
 - (1) 原中文報告引用文獻出自學術性期刊
Hsu, S. H., T. Y. Chung, T. C. Kuo, and S. F. Wang. 1992. Studies on the micro-climate of greenhouse. I. Light environment of greenhouse. *J. Agric. China* 157:34-43. (in Chinese with English abstract)
 - (2) 原中文報告引用文獻出自著作性書籍
Sung, J. M. 1991. Nitrogen metabolism of rice. Chinese Agronomy Press. Taipei. 100 pp. (in Chinese)
 - (3) 原中文報告引用文獻出自編輯性書籍
Yang, C. M. and C. Y. Lin. 2003. Studies on rice precision farming system. p.1-12. *in: Rice Precision Farming System*. (Yang, C. M. and C. Y. Lin, eds.) Agric. Res. Inst. Pub. No. 105. Taichung. 252 pp. (in Chinese with English abstract)
 - (4) 原中文報告引用文獻出自研討會專刊
Chang C. A. 2001. Application and extension of virus-free seedling for the control of virus diseases of passionfruit in Taiwan. p.31-38. *in the Proceeding of Symposium on Application of Healthy Plant for Control of Plant Diseases*. Taiwan Phytopathol. Soc. Pub. Taichung. (in Chinese with English abstract)

四、單位、縮寫格式、括號及統計分析

1、凡文中出現之數值，除非另有特別之意義，一律用阿拉伯數字書寫。單位如以英文表示，則用國際公認標準符號（SI units）代替全文，各常用之縮寫單位參照說明如下：

- (1)長度：公里 (km)、公尺 (m)、公分 (=厘米)(cm)、公釐 (=毫米)(mm)、微米 (μm)。

- (2)重量 (W)：公斤 (kg)、公克 (g)、毫克 (mg)、 μg 。
 - (3)容積 (V)：公升 (L)、公撮 (=毫升) (mL)、 μL 。
 - (4)面積：公頃 (ha)、平方公尺 (m^2)、平方公分 (cm^2)。
 - (5)溫度：攝氏 ($^{\circ}\text{C}$)、絕對溫度 (K，但須加以說明)。
 - (6)時間：日 (天) (d)、時 (h)、分 (min)、秒 (s)。
 - (7)濃度：莫耳 (M)、千分之一莫耳 (mM)、當量 (N)、千分之一當量 (mN)。
 - (8)重力加速度： g 。
- 2、其他之縮寫：平均 (av)、大約 (ca)、直徑 ($diam.$)。
 - 3、括號：括號字型全以半形 ()，括號前後各空一格。
 - 4、統計分析：達顯著性水準以*、**或處理間顯著差異區分，以 a、b、c、...表示者均應加註顯著機率值 P (例如 $P < 0.01$)；各統計量請採慣用符號，例如相關係數 (r)、決定係數 (R^2)、變異係數 (cv)、標準差 (sd)、平均值標準差 (se) 等。
 - 5、其他問題：
 - (1)單位與其前面數值之間應空一格，如 220 g。
 - (2)數學運算符號與其前後數值之間應各空一格，如 $P = 0.014$ 、 23.6 ± 3.0 、 15×2 。
 - (3)在 \pm 、 \times 或 to 的前後兩數值若是含有單位，請用 $23.6\% \pm 3.0\%$ 、 $15 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ 、 20°C to 30°C (即勿省略前面數值之單位)。
 - (4)數值起迄符號用- (全型破折號)，勿用~或-，且與前後兩數值之間無須留空格，如 3-6、2005-2007 年、7 月 20-25 日。
 - (5)年代一律用西元。

五、其他注意事項

1. 生物學名以斜體字表示，屬名第一字母大寫。學名於摘要、本文、每一圖表中第一次出現時，須寫全名，如 *Citrus sinensis*；第二次出現時，屬名保留第一字母後加句點“.”，種名全寫，如 *C. sinensis*。生物學名於本文中首次出現時應加註命名者。
2. 中文稿件中，外文名詞應儘量翻譯成中文，若是不常見名詞應於文中第一次出現時以括號標出原文。摘要及本文中，英文縮寫於第一次出現時，須附全名。

六、投稿方式

1. 稿件內容務須依照上列規定格式書寫，本期刊編輯委員保有修改與退稿之權利。文稿經本期刊接受後，作者得送含文稿內容之磁片或電子檔案 (IBM 相容電腦之文書管理檔，如 Word 檔或其他)，並由作者負責前二校。除筆誤與錯字外，作者在校稿時，不得擅自更改內容與數據。
2. 審稿程序請上網參閱本期刊「論文審查制度流程」，網址：<http://www.tari.gov.tw/>。

七、文稿必須是作者本身的著作，且作者為唯一的著作權擁有者，否則因此引發之法律責任將由作者負責。投稿應為未經刊登之文章，亦不得一稿多投。投稿需經所有作者同意。稿件經本期刊接受後，投稿人需繳交「著作權讓與書」，如未提供者，本期刊不予刊登。著作財產權屬農試所所有，非經本所書面同意，不得轉載或移轉他處發表。本期刊有權對文稿進行必要之詞句修改。

八、來稿經編審委員會審查合格後刊登，由本刊印贈抽印本 50 本；彩色頁印刷及抽印本加印費用由投稿人自行負擔。

九、其他未盡事宜本期刊得隨時修正或補充。

台灣農業研究

(原中華農業研究)

第六十卷 第二期

中華民國一〇〇年六月出版

發行人：陳駿季

總編輯：方尚仁

主編：陳盈佑 吳宜晏

編審委員：

生技組：吳明哲（主審）

作物組：歐錫坤（主審）

黃肇家 楊純明 施昭彰

農化組：郭鴻裕（主審）

簡宣裕 劉滄琴

植病組：安寶貞（主審）

鄧汀欽

應動組：王清玲（主審）

陳健忠

農工組：林木連（主審）

種原組：溫英杰（主審）

農經組：張采蘋（主審）

花卉中心：謝廷芳（主審）

嘉義分所：楊宏仁（主審）

鳳山分所：陳甘澍（主審）

Vol. 60, No. 2

June, 2010

JOURNAL
OF
TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

PUBLISHER: Chen, Junne-Jih

EDITOR IN CHIEF: Fang, Shan-Jen

EDITORS:

Chen, Ying-You Wu, Yi-Yan

EDITORIAL BOARD:

Ann, Pao-Jen (Plant Pathology)

Chang, Tsai-Ping (Agriculture Economics)

Chen, Kan-Shu (Tropical Horticulture)

Guo, Horng-Yuh (Agriculture Chemistry)

Hsieh, Ting-Feng (Floriculture)

Ou, Shyi-Kuan (Crop Science)

Lin, Mu-Lien (Agriculture Engineering)

Wang, Chin-Ling (Applied Zoology)

Wen, Ien-Chie (Crop Genetic Resources)

Wu, Min-Tze (Biotechnology)

Yang, Hong-Ren (Subtropical Agriculture)

EDITORIAL ADVISORY BOARD:

Chen, Chien-Chung

Chien, Shiuah-Yuh

Deng, Ting-Chin

Huang, Chao-Chia

Huang, Li-Duhng

Liu, Tsang-Sen

Shih, Jau-Chang

Yang, Chwen-Ming

Reviewers of the related fields are also invited from universities and other research organizations.

台灣農業研究第六十卷第二期

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：方尚仁

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)23302301

出版日期：中華民國一〇〇年六月三十日

定價：新臺幣一七五元

展售門市：

1. 國家書店 / 104 臺北市松江路209號1樓 (02)25180207

國家網路書店 <http://www.govbooks.com.tw>

2. 五南文化廣場 / 400 臺中市中山路6號 (04)22260330

承印者：學安文化事業有限公司

電話：(04)22861600

ISSN 0022-4847

GPN 2009500560

Journal of Taiwan Agricultural Research

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

Vol. 60, No. 2

Research Reports

- Effect of Basal Salts, Active Charcoal, and Vegetable/Fruit Homogenates on Seed Germination and Seedling Development *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr in *In Vitro* Culture
Chin-Yi Tsao, Uei-Chern Chen, and Chi-Ni Hsia 77
- Serological and Molecular Identification of *Nerine virus* X Infecting African Lily (*Agapanthus africanus* L.) and Development of its Detection Techniques
Fen-Lang Chiang, An-Chin Chang, Ying-Huey Cheng, and Chin-Chih Chen 89
- Extraction of Imperatorin from Root Slices and Explants of *Angelica dahurica*
Yih-Juh Shiau, Toong-Long Jeng, Jui-Lung Kao, Jui-Sheng Lai, and Chia-Hsin Huang 101
- Effect of Long-Term Cropping Systems and Crop Residue Managements on Content of Organic Matter in Soil
Tseng-Wei Tan and Kuei-Nuan Chen 115
- Effect of Planting Date on Population and Density of Weeds in the Paddy Field
Chiao-Ling Hsiao, Chwen-Ming Yang, and Yuh-Jyuan Lee 125
- Etiology and Control of Fruit Rot of Sweet Orange Caused by *Penicillium digitatum*
Jyh-Nong Tsai, Pao-Jen Ann, and Hsiu-Fang Cheng 139
- Control of Phytophthora Disease of Fruit Tree Seedlings by Neutralized Phosphorous Acid
Pao-Jen Ann, Ien-Tien Wang, and Jyh-Nong Tsai 149