

四、種子（苗）病理研究

一 孤挺花、山藥及芋病毒檢測技術與健康種苗繁殖體系之建立

楊佐琦、蕭芳蘭、邱燕欣、

王慧如、王惠亮

利用先前感染病毒山藥(編號為#21、#30)之葉片，抽取全RNA，以primer1:POTYD341和primer2:POTYU341再進行RT-PCR所得到的基因片段(341bp)。將此DNA片段插至T-Vector DNA再轉殖於腸桿菌(*E. coli* DH 5 α)。進行PCR反應，得到轉殖成功基因片段(約為525bp)再進行核酸定序，比對NCBI序列所得結果為*Yam mild mosaic virus*。以間接法酵素聯結抗體免疫吸附法(I-ELISA)檢測孤挺花、山藥及芋頭病毒。採集孤挺花花瓣各一片，計142品種528株，檢測孤挺花病毒HCV、HLV、胡瓜嵌紋病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)、馬鈴薯Y屬病毒(Potyvirus)。檢測結果健康約佔20.64%、有HCV血清反應約佔78.21%、有HCV(uncross)血清反應約佔71.02%、有HLV血清反應約佔4.54%、有CMV血清反應約佔0.38%和有POTY血清反應約佔1.14%。每一樣品採集山藥葉片上、中、下各一片，品種為恆春山藥、陽明山刺薯、中埔紅薯、宜蘭原生種、基隆山藥、大汕、台農二號、名間長虹及花蓮3號，9種品種共247株，山藥病毒檢測以

海芋嵌紋病毒(*Zantedeschia mosaic virus*, ZaMV)、海芋微嵌紋病毒(*Zantedeschia mild mosaic virus*, ZaMMV)、芋嵌紋病毒(*Dasheen mosaic virus*, DaMV)、胡瓜嵌紋病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)、無菁嵌紋病毒(*Turnip mosaic virus*, TuMV)和馬鈴薯Y屬病毒(Potyvirus)為主。檢測結果健康約佔10.9%、有ZaMV血清反應約佔48.6%、有ZaMMV血清反應約佔55.9%、有DsMV血清反應約佔20.6%、有TuMV血清反應約佔87.9%、有POTY血清反應約佔26.7%，而CMV血清反應約佔7.69%。芋頭樣品採取心葉向下算第三片葉，檢測的病毒種類與山藥病毒相同。複檢先前已測出為健康的樣品45株，大甲芋檳榔心43株和高雄一號2株，檢測結果，大甲芋檳榔心有24株健康，高雄一號有1株健康。在台灣孤挺花的葉片及花軸普遍有因病毒感染所引起的嵌紋病徵。篩選種苗繁殖改良場屏東分場所栽植之孤挺花嵌紋病罹病葉或經三次單斑分離之奎藜來純化病毒。純化後在離心管中僅見一乳白色帶。孤挺花嵌紋病葉純化病毒之紫外光吸光值最高在258nm，最低在248nm，A_{max}/A_{min}之比值為1.007，A₂₆₀/A₂₈₀之比值為1.269。在電子顯微鏡下，從其形狀及長度判斷，此一病毒可能為一Closterovirus。從孤挺花嵌紋病株所純化之病毒免疫注射於紐西蘭雌兔所製得之抗血清，在SDS免疫擴散反應(SDS-

immunodiffusion) 中，僅與三次單斑分離之病毒形成一條反應帶，與純化之病毒則形成二條反應帶。抗血清與三次單斑分離之病毒交互吸收後所製備的免疫球蛋白，在ELISA試驗中，仍能與純化之病毒反應，但與三次單斑分離之病毒則無任何反應。三次單斑分離純化後之D13C病毒在

離心管中距液面約1.5公分處可見一白色環帶，光度吸收值A_{max}在258nm，A_{min}在247nm，A_{max}/A_{min}之比值為1.03，A₂₆₀/A₂₈₀之比值為1.208，此一病毒為孤挺花潛隱病毒 (*Hippeastrum latent virus*, Carlavirus)。

表4-1、孤挺花病毒ELISA檢測

品種	樣品數	病毒血清反應樣品數					
		HCV	HCV (uncross)*	HLV	POTY	CMV	無
Amigo	5	3	3	0	0	0	2
Hercule	4	2	2	0	0	0	2
Sunny	2	2	2	1	0	0	0
Salmon Pearl	5	5	5	1	0	0	0
EOS	2	1	1	0	0	0	1
Orange Sovereign	3	3	3	0	0	0	0
Red Lion	5	4	4	0	0	0	1
Roma	4	3	3	0	0	0	1
Clown	5	5	4	1	0	0	0
Olympus	1	1	0	0	0	0	0
Ludwig Dazzler	5	5	4	1	0	0	0
Lucky Strike	4	4	3	0	0	0	0
Susan	3	3	2	0	0	0	0
Telstar	2	2	2	0	0	0	0
Picotree	7	6	6	0	0	0	1
Pamela	3	3	3	0	0	0	0
Bolero	2	1	1	0	0	0	1
Donau	5	5	5	1	0	0	0
Germa	3	3	3	0	0	0	0
Yellow Goddess	5	2	1	0	0	0	3
Green Goddess	1	1	1	0	0	0	0
Papillio Butterfly	1	0	1	1	0	0	0
Pasadena	1	1	1	0	0	0	0
Mary Lou	5	4	3	0	0	0	1
Double Record	3	3	3	0	0	0	0

表4-1、孤挺花病毒ELISA檢測(續1)

品種	樣品數	病毒血清反應樣品數					
		HCV	HCV (uncross)*	HLV	POTY	CMV	無
Jewel	5	3	2	0	0	0	2
Lady Jane	5	5	5	0	0	0	0
Red Peacock	2	2	0	0	0	0	0
Ster Van Holland	5	3	2	0	0	0	1
Carina	3	0	0	0	0	0	3
Double Picotee	2	2	2	0	0	0	0
Las Vegas	4	4	4	0	0	0	0
Calimero	5	3	4	0	0	0	1
Christmas Gift	2	2	1	0	0	0	0
Kalahari	4	4	2	0	0	0	0
Vlammenspel	1	1	1	0	0	0	0
Aphrodite	4	4	4	0	0	0	0
Unique	5	5	5	0	0	0	0
Smoked Salmon	9	8	7	0	0	0	1
Alure	3	3	2	0	0	0	0
Design	5	3	3	0	0	0	2
Giraffe	2	2	2	0	0	0	0
Amoretta	2	1	1	0	0	0	1
Scarlet Baby	5	5	4	1	0	0	0
Pre. Johnson	4	4	4	1	0	0	0
Andes	6	5	4	0	0	0	1
Apple Blossom	4	4	3	0	0	0	0
Flores Hekker	5	2	2	0	0	0	3
Bestseller	1	1	1	0	0	0	0
Fantastica	1	1	1	0	0	0	0
Trendsetter	5	2	1	0	0	0	3
Hermitage	5	4	3	0	0	0	1
Soloman	4	0	0	0	0	0	4
Poyal Velvet	3	3	1	1	0	0	0
Nymph	4	4	4	1	0	0	0
Liberty	3	3	3	0	0	0	0
Red Sensation	2	1	1	0	0	0	1
Toronto	4	4	4	0	0	0	0

表4-1、孤挺花病毒ELISA檢測(續2)

品種	樣品數	病毒血清反應樣品數					
		HCV	HCV (uncross)*	HLV	POTY	CMV	無
Barotse	1	1	1	0	0	0	0
Basuto	2	2	1	0	0	0	0
Blushing Bride	4	3	3	1	0	0	1
Bold Leader	2	2	2	1	0	0	0
Candy Floss	3	3	3	0	0	0	0
Carnival	1	1	1	0	0	0	0
Cocktail	4	4	4	0	0	0	0
Double Six	5	5	5	1	0	0	0
Honeymoon	2	2	2	0	0	0	0
Intokazi	2	2	2	0	0	0	0
Merry Christmas	3	3	3	0	0	0	0
Milady	5	5	5	1	0	0	0
Miracle	2	2	1	0	0	0	0
Panarella	4	4	4	0	0	0	0
Pizzazz	1	1	1	0	0	0	0
Ragtime	2	2	2	1	0	0	0
Razzmatazz	2	1	2	0	0	0	0
Rio	2	2	2	0	0	0	0
Rozetta	5	4	5	0	0	0	0
Snow White	5	5	5	0	0	0	0
Spring Time	2	2	2	0	1	0	0
Summer Time	2	2	2	2	0	0	0
Wedding Dance	1	1	1	0	0	0	0
Zanzibar	3	3	3	0	0	0	0
Christmas Star	2	1	1	0	0	0	1
Top Choice	4	4	4	0	0	0	0
Amico	3	3	3	0	0	0	0
Pardina Cross	4	2	1	0	0	0	2
Piccolo	3	3	3	0	0	0	0
Silver Red	5	3	2	0	0	1	2
Silver Lining	3	3	2	1	0	0	0
Sparkled Red	2	1	0	0	0	0	1
Red Star	5	4	4	0	0	0	1

表4-1、孤挺花病毒ELISA檢測(續3)

品種	樣品數	病毒血清反應樣品數					
		HCV	HCV (uncross)*	HLV	POTY	CMV	無
Pink Wonder	3	3	2	0	0	1	0
Salmon	4	1	1	0	0	0	3
Salmon Wonder	4	3	3	0	0	0	1
White Striped	5	4	4	0	0	1	1
Fairytale	5	4	4	0	0	0	1
Matterhorn	3	3	2	0	0	0	0
Wonderland	3	1	1	0	0	0	1
Mont Blanc	4	4	4	0	0	1	0
Fortune	3	1	1	0	0	0	2
Bright Star	5	5	5	0	0	0	0
Philadelphia	5	5	5	0	0	0	0
Tosto	5	5	5	0	0	2	0
Salmon Peacock	5	0	0	0	0	0	5
Amalfi	5	5	5	0	0	0	0
Alfresco	5	5	5	0	0	0	0
Joker	5	5	5	0	0	0	0
San Remo	5	0	0	0	0	0	5
White Peacock	4	1	1	0	0	0	3
Blossom Peacock	5	4	3	1	0	0	1
Charisma	5	0	0	0	0	0	5
Dancing Queen	5	2	2	0	0	0	3
Jaguar	5	3	3	0	0	0	2
Red Charm	4	3	1	0	0	0	1
Desert Dawn	5	5	5	1	0	0	0
Baby Star	5	5	5	0	0	0	0
Elvas	5	5	5	1	0	0	0
Minerva	4	4	4	0	0	0	0
Comtesse	5	2	0	0	0	0	3
Rilona	3	1	1	0	0	0	2
Double Romo	3	3	3	1	1	0	0
Lambada	4	4	3	0	0	0	0
Movie Star	5	5	5	0	0	0	0
Promise	4	0	0	0	0	0	4

表4-1、孤挺花病毒ELISA檢測(續4)

品種	樣品數	病毒血清反應樣品數					
		HCV	HCV (uncross)*	HLV	POTY	CMV	無
Picotee Redlining	3	3	3	0	0	0	0
Mambo	5	5	3	0	0	0	0
Vera	4	4	4	0	0	0	0
Sydney	5	3	2	0	0	0	2
Athene	3	3	3	0	0	0	0
Amoretta	5	5	5	0	0	0	0
Amputo	5	1	1	0	0	0	4
Soarlet Baby	5	4	4	0	0	0	1
La Paz	5	5	5	0	0	0	0
White Baby	5	4	4	0	0	0	1
Ruby Meyer	4	3	3	0	0	0	1
Misty	4	4	3	2	0	0	0
Santa Cruz	5	1	1	0	0	0	4
Lima	4	4	4	0	0	0	0
Chico	2	0	0	0	0	0	2
Grandeur	3	2	2	0	0	0	1
Santos	5	3	3	0	0	0	2
Giraffe	5	2	1	0	0	0	3
合計	528	413	375	24	2	6	109

* : HCV(uncross)為uncross absorbed的Hippeastrum crinkle virus抗血清

表4-2、山藥病毒ELISA檢測

品種	樣品數	病毒血清反應樣品數						
		ZaMV	ZaMMV	DsMV	CMV	TuMV	POTY	無
恆春山藥	30	29	22	11	0	29	13	0
陽明山刺薯	30	19	17	9	0	23	10	6
中埔紅薯	30	18	20	5	0	29	6	1
宜蘭原生種	27	1	3	1	0	15	0	11
基隆山藥	19	4	8	1	0	18	3	1
大汕	29	22	22	14	11	29	11	0
台農二號	27	18	21	5	7	27	16	0
名間長虹	29	8	22	5	1	29	7	0
花蓮3號	26	1	3	0	0	18	0	8
合計	247	120	138	51	19	217	66	27

表4-3、芋頭病毒ELISA檢測

品種	樣品數	病毒血清反應樣品數						
		ZaMV	ZaMMV	DsMV	CMV	TuMV	POTY	無
大甲芋檳榔心	43	0	0	14	0	0	19	24
高雄一號	2	0	0	1	0	0	1	1
合計	45	0	0	15	0	0	20	25

二 茄科作物符合優良農業操作標準的病害管理模式之建立

楊佐琦、林上湖、蕭芳蘭、

邱燕欣、文紀鑾

94年度健康馬鈴薯種薯以「種苗二號」品種為材料，採用網室種植面積0.1公頃，合計生產1,000kg原原種薯，已全數供應雲林縣斗南鎮農會作為未來原種採種生產使用。

而建立符合優良農業操作標準的馬鈴薯病害管理模式部分：由於「種苗二號」品種具有抗PVY及PVX病毒病，以及晚疫病之特性，能有效降低農藥使用量，符合優良農業操作標準的病害管理目標，另馬鈴薯基本種及原原種薯良好生產準則(TGAP)業完成編撰並報會核定中。

又馬鈴薯適合於砂質壤土及鬆軟之壤土栽培，進行土壤改良將有助於提高單位面積種薯產量。

馬鈴薯由母瓶增殖至原原種採收前之田檢，一系列ELISA病毒檢驗費用所費不貲，如何改進生產流程與成本結構，攸關未來推廣走向。

三 有益微生物於花卉種苗生產之應用

蕭芳蘭、文紀鑾、何書豪

收集自土壤根圈及植物組織分離出的螢光細菌 (fluorescent *Pseudomonas*)、囊叢枝內生菌根真菌 (vesicular-arbuscular mycorrhiza)、枯草桿菌 (*Bacillus* sp.)，以及市售之微生物製劑：根博士 (菌根真

表4-4、介質添加有益微生物種植BM品種彩色海芋種球

處理	重量	小於10g	10.1g-20g	大於20g
Gm		1	9	10
Ge		0	12	8
Gig		1	7	12
根博士		1	17	2
B菌		1	16	3
B-19		3	11	6
K菌S		2	14	4
FPS-67		2	8	10
CK		0	13	7

* 每一處理使用1500 cm³之介質，將FPS67、B-19、B菌、培養後製成10⁸cfu/ml 細菌懸浮液，取150cc澆灌；K菌S稀釋400倍取150cc澆灌；內生菌根菌Ge、Gm、Gig各取25ml、20ml、30ml加入5吋盆中，每盆帶菌量1000個孢子；根博士取10g加入5吋盆中。

表4-5、介質添加有益微生物種植BM品種彩色海芋組培瓶苗

處理	重量 小於10g	10-20g	大於20g
Gm	0	9	11
Ge	0	11	9
Gig	0	7	13
根博士	0	12	8
B菌	7	13	0
B-19	5	15	0
K菌S	2	18	0
FPS-67	9	11	0
CK	0	13	7

* 每一處理使用1500 cm³之介質，將FPS67、B-19、B菌、培養後製成10⁸cfu/ml 細菌懸浮液，取150cc澆灌；K菌S稀釋400倍取150cc澆灌；內生菌根菌Ge、Gm、Gig各取25ml、20ml、30ml加入5吋盆中，每盆帶菌量1000個孢子；根博士取10g加入5吋盆中。

菌)、K 菌 S (枯草桿菌)，計8種處理，添加至介質，培育BM品種彩色海芋種球以及BM品種彩色海芋組培瓶苗，6個月後調查對彩色海芋種球生長之影響，結果顯示無論種植彩色海芋種球或者彩色海芋組培瓶苗，種球重量大於20公克者，以介質添加Gig之處理數量最多，其次為介質添加

Gm之處理，顯示囊叢枝內生菌根真菌Gig與Gm可以促進彩色海芋種球肥大。

四 彩色海芋組培瓶內病原檢測及防治技術建立

楊佐琦、蕭芳蘭、文紀鑒

利用圓盤濾紙法進行培養基上的農藥篩選試驗，測試14種農藥對18支彩色海芋組培瓶內苗污染細菌的抑制效果，發現20%歐索林酸可濕性粉劑1000倍抑制效果最好，抑制作用達到“+++”的有5支菌株，抑制作用達到“++”的有7支菌株；40%銅快得寧混合可濕性粉劑500倍，抑制作用達到“++”的有1支菌株，抑制作用達到“+”的有2支菌株，且抑制的菌株正好為歐索林酸無法抑制的菌株。目前沒有一種農業藥劑可以抑制所有的污染細菌，因此必須不同的藥劑互相配合使用。此外，陸續由彩色海芋、草莓、以及馬鈴薯之組培瓶內苗分離到21支菌株，正在個別鑑定其菌種名。

表4-6、農業藥劑抑制彩色海芋組培瓶內苗污染細菌的效果評估

菌株處理	鏈黴素 3000X	鏈黴素 1000X	多保鏈黴素 1000X	嘉賜黴素 1000X	鏈土黴素 1000X	歐索林酸 1000X	脒硫混銅 500X	三元硫酸銅 500X
組1	+	+	+	-	+	+++	-	-
組2	+	+	+	-	+	+++	-	-
組4	+	+	+	-	+	++	-	-
組5	-	-	-	-	-	-	-	-
組7	+	+	+	-	+	++	-	-
組10	+	+	+	-	+	++	-	-

表4-6、農業藥劑抑制彩色海芋組培瓶內苗污染細菌的效果評估(續)

菌株處理	鏈黴素 3000X	鏈黴素 1000X	多保鏈黴素 1000X	嘉賜黴素 1000X	鏈土黴素 1000X	歐索林酸 1000X	脲硫靛銅 500X	三元硫酸銅 500X
組12	-	-	-	-	-	-	-	-
組13	+	+	+	-	+	+++	-	-
組15	+	+	+	-	+	++	-	-
組17	-	-	-	-	-	-	-	-
組18	+	+	+	-	+	++	+	-
組19	+	+	+	-	+	+++	-	-
組21	+	+	+	-	+	++	-	-
組32	-	-	-	-	-	-	-	-
組33	+	+	+	-	++	+	-	-
組34	+	++	+	-	-	++	+	-
組35	+	+	+	-	+	+++	-	-
組37	-	-	-	-	-	-	-	-

表4-7、農業藥劑抑制彩色海芋組培瓶內苗污染細菌的效果評估

菌株處理	鋅波爾多 800X	嘉賜銅 1000X	鹼性氯氧化銅 500X	銅滅達樂 1000X	銅快得寧 500X	氫氧化銅 500X	波爾多 500X	CK
組1	-	-	-	-	-	-	-	-
組2	-	-	-	-	-	-	-	-
組4	-	-	-	-	-	-	-	-
組5	-	-	-	-	++	-	-	-
組7	-	-	-	-	-	-	-	-
組10	-	-	-	-	-	-	-	-
組12	-	-	-	-	+	-	-	-
組13	-	-	-	-	-	-	-	-
組15	-	-	-	-	-	-	-	-
組17	-	-	+	-	-	-	-	-
組18	-	-	-	-	-	-	-	-
組19	-	-	-	-	-	-	-	-
組21	-	-	-	-	-	-	-	-
組32	-	-	-	-	-	-	-	-
組33	-	-	-	-	-	-	-	-
組34	-	-	-	-	-	-	-	-
組35	-	-	-	-	-	-	-	-
組37	-	-	-	-	+	-	-	-

五 重大有害生物抗藥性調查與管制策略之研究（細菌性軟腐病）

邱燕欣、何書豪、蕭芳蘭、楊佐琦

細菌性軟腐病菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*) 的寄主範圍廣泛，不僅造成植株腐爛、死亡，更因傳播快速造成大面積農作損失，使農民心血付諸一鉅；現今台灣的蝴蝶蘭產業已朝集中、精緻管理，過去業者爲了照顧產值高的蘭園，不惜成本、濫施農藥或連續使用單一藥劑，不但效果有限，並且容易產生軟腐病菌抗藥性的問題，本試驗即爲檢驗蘭園中感染植株造成軟腐的病原菌進一步檢驗菌株，利用聚合酶鏈鎖反應技術（專一性片段增幅反應）偵測目前所分離至受感染造成蘭花軟腐都爲 *E. chrysanthemi*，並且利用不同檢驗方法檢驗該菌株是否已具抗藥性，其中利用厚型圓盤濾紙法進行15種農藥對 *Erwinia* 屬病原菌的抑制試驗中得知，以20%歐索林酸可濕性粉劑1000倍對供試的十二株 *Erwinia* 屬病原菌的抑制效果較佳，但菌株間對藥劑的感受性不同，由此可知實際溫室或田間用藥必須多樣化才具實際抑制效果，以20%歐索林酸可濕性粉劑1000倍對供試的12株 *Erwinia* 屬病原菌的抑制效果較佳，供試菌株 PHER1 僅歐索林酸1000倍稀釋液對其具抑制性；鏈土黴素倍稀釋液、歐索林酸倍稀釋液對供試菌株



PHER6、PHER8具抑制性；多保鏈黴素倍稀釋液、鏈土黴素倍稀釋液、歐索林酸倍稀釋液對供試菌株 PHER2、ER5、PHER12 與 PHER13 具抑制性；多保鏈黴素1000倍稀釋液、鏈土黴素1000倍稀釋液、歐索林酸1000倍稀釋液對供試菌株 PHER4、PHER7、PHER9、PHER10、PHER11 具抑制性，而利用含銅 CYE medium 培養基測試下，供試菌株皆呈現抗銅反應，而利用含不同銅離子、銅離子、鋅離子、錳離子以及鏈黴素之 NA medium 對菌株生長抑制情形，則因離子濃度不同，抑制生長情況亦不同，但菌株產生抗藥性狀況已顯現，蘭園用藥態度應更加謹慎，避免造成大面積病害的發生。