中華民國植物病理學會九十六年年會論文摘要

F-01 由 Pythium palingenes 引起之巴西野牡丹根腐病 - 黃晉興 (行政院農業委員會農業試驗所) Root rot of *Tibouchina semidecandra* caused by Pythium palingenes -Huang J. H. (Plant Pathology Division, COA)

巴西野牡丹 (Tibouchina semidecandra Cogn.), 為 一種開豔紫色花朵、觀賞用之常綠小灌木,深受消費 者喜愛。2004 年夏季首次於台中縣霧峰鄉一處盆花栽 培農場發現巴西野牡丹植株大量死亡,植株呈現失水 萎凋、落葉的病徵,而根部出現褐化腐敗的現象,發 病率高達80%以上,而其他農場巴西野牡丹盆花陸續 傳出相同病害,嚴重影響栽培。自罹病植株根部可穩 定分離出一種具有無隔菌絲之微生物,該菌於 V8-juice agar 培養基無孢囊產生,唯有水中才能產生孢囊及游 走子。菌絲透明無隔,直徑可達7µm,孢囊亞球形或卵 形有乳突,大小為28-44×23-33 µm (平均 35×28 µm), 孢囊內的原生質釋出於泡囊內形成游走子;游走子腎 形雙鞭毛,靜止子大小為 10-12.5 µm (平均 12 µm); 藏卵器頂生,少數間生,大小為 27-40 µm (平均 34.5 μm);每個藏卵器有 1-4 藏精器,藏精器類球形或桿 狀,大小為 8-22.5 ×5-6.25 µm (平均 20.8 ×5.6 µm), 藏精器柄常纏旋藏卵器基部;卵孢子球形或亞球形, 淡褐色,非充滿型 (aplerotic),大小為22.5-35 μm (平 均 29 µm), 其壁厚 1.25-2.5 µm (平均 1.8 µm), 依上 述之形態特性,此菌鑑定為 Pythium palingenes Drechsler。除了巴西野牡丹之外,該菌可危害玫瑰, 但不危害蕃茄、胡瓜、白菜等;菌絲生長最適溫為32 ~36℃,生長速度可達 3.8 cm/day;接種後,植株若不 浸漬在水中則病害較輕,若接種後浸漬水中1小時以 上則病害嚴重,25℃以上可造成嚴重病害。

F-02 台灣出現 A² 配對型的 *Phytophthora capsici* - 安 寶貞、王姻婷、蔡志濃 (行政院農業委員會農業試驗所 植物病理組) Appearance of A² mating type of *Phytophthora capsici* in Taiwan - Ann, P. J., Wong, I. T., Tsai, J. N. (Division of Plant Pathology, Agricultural Research Institute, COA)

自從 1977 年 Phytophthora capsici (辣椒疫病菌) 在

台灣出現以來,30 年間自田間分離到的辣椒疫病菌均 為 A¹ 配對型 (mating type), 但 2007 年 4 月與 6 月間在 台中霧峰地區的茄子果實與蕃茄植株上兩次同時分離 到 A¹ 與 A² 配對型的辣椒疫病菌,為台灣首次出現 P. *capsici* A^2 新記錄。比較同時分離到的 A^1 與 A_2 菌株, 並同時與其他地區的辣椒疫病菌 A1 菌株比較,結果在 生理與形態方面,兩種配對型的特性大致相似,但仍 有相當差異,新出現的 A² 菌株比 A¹ 菌株耐低溫,生 長溫度為 8-28-36℃ (A¹ 為12-28-36℃); 且 A² 的胞囊較 狹長、長寬比 (L/B) 約為 1.8 (A¹ 約為 1.3-1.5), 胞囊脫 落率較高, 胞囊柄 (pedicels) 較長, 平均 25-30 µm (A1 約為 5-10 µm), 胞囊大小平均 68-72×37-40 µm (A¹為 60-61×40-44 µm)。兩種配對型均會產生厚膜胞子 (Chlamydospores),大小相近,A2 菌株為 42-44 µm (A1 為 43 μm)。兩者的有性器官的形態與大小亦十分相 近,A²菌株的藏卵器、卵胞子及藏精器平均分別為35-36 µm, 28-29 µm 及11-12×13 µm (A¹ 為 32-38 µm, 26-32 µm,14-18×14-17 µm)。在病原性方面,接種 結果顯示 A² 菌株對蕃茄幼苗或茄子果實的致病力均明 顯較 A¹ 菌株為強,病勢進展亦較快,接種三天後,茄 子果實之發病率為 87.5% (A¹ 為37.5%), 蕃茄幼苗的發 病率為 100% (A¹ 為75%)。此外,分析比對核醣體內轉 錄區間 (internal transcribed spacer, its) DNA 序列, 兩者 的相似度亦高達 99% 以上。

F-03 莧菜疫病菌 - 安寶貞¹、王姻婷¹、黃晉興¹、蔡志 濃¹、王三太² (¹ 行政院農業委員會農業試驗所植物病理 組;² 行政院農業委員會農業試驗所作物組) Amaranthus *Phytophthora* in Taiwan - Ann, P. J.¹, Wong, I. T.¹, Huang, J. S.¹, Tsai, J. N.¹ and Wong, S. T.¹ (¹ Division of Plant Pathology, Agricultural Research Institute, COA;² Division of Crop Science, Agricultural Research Institute, COA)

2007 年1 月至4 月間,雲林西螺蔬菜專業區莧菜 園內首度出現疫病,無論紅莧或白莧均普遍發生,且 株根、莖、葉均可被感染,但以葉片發病最常見,罹 病葉片初現灰綠色水浸狀斑點,而後擴大成直徑 3-5 cm 之灰褐色圓斑,病組織與健康部位無明顯界限,病

徵與晚疫病十分相近; 莖部與莖基部時被感染時, 組 織褐變腐敗且出現隘縮情形,罹病株不久枯萎倒伏, 有些罹病田因病情嚴重而犁田廢耕。在此同時,在台 中霧峰與南投草屯等地區的田間野莧與莧菜上,也經 常可以發現類似疫病等葉枯病徵出現。經分離與純化 作業,共獲得六個地點的菌株,經初步鑑定與核醣體 內轉錄區間 (internal transcribed spacer, its) DNA 序列 (ITS) 分析比對,發現危害莧菜之病菌為尙無記錄之疫 病菌種;從西螺莧菜分離的疫病菌(西螺菌株)與從台 中南投中部地區分離者(中部菌株)在胞囊與有性世代 器官之型態與大小方面十分相近,但菌落型態、菌絲 生長速率及配對型上則有明顯不同。兩者的菌絲生長 範圍約為 8-32℃,但西螺菌株生長較快速,約為中部 莧菜菌株之兩倍,最適溫為24℃,每日直線生長速率 約0.7 cm;中部莧菜菌株生長十分緩慢,最適溫為28 ℃,生長速率 0.35-0.41 cm。兩者胞囊均有顯著乳凸 (papilla)、部分為脫落性,具有短梗 (av.9-10 µm),西 螺菌株之胞囊大小平均為 49.2-51.4×35.1-38.5 µm,中 部菌株為 42.9-47.6 ×31.3-32.3 μm。又西螺菌株為 A² 配對型,而中部菌株為同絲型(homothallism),但兩者 的藏卵器、卵胞子及藏精器的型態與大小則十分相似, 西螺菌株平均分別為 35.5 μm, 29.7 μm及 14.6 μm, 而中部菌株為 35.2-36.0 µm, 27.9-29.5 µm 及 14.3-15.4×16.9-17.7 µm。兩者均屬 Waterhouse 分類群中的 第2群,兩者的 its DNA 序列相似度亦高達 99% 以 上,經與已知疫病菌比對,該菌與 Phytophthora capsici 最為相近。此外,接種七品種系的莧菜與野 莧,除am84 品系外,均嚴重發病。

F-04 黑點根腐病菌 (Monosporascus cannonballus) 子 囊孢子對瓜類作物之發芽與侵入 — 蘇俊峯¹、林益昇² (¹ 行政院農委會農業試驗所植物病理組;² 國立中興大 學 植物 病 理 系) Germination and penetration of Monosporascus cannonballus ascospores on cucurbitaceous plants - Su, J. F.¹ and Lin, Y. S.² (¹ Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, COA; ² Dept. of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung)

黑點根腐病菌 Monosporascus cannonballus 的子囊 孢子在人工培養基上不會或甚少發芽。本研究新發展 包埋子囊孢子發芽法 (embedded ascospore germination method, EAGM) 則可於植株根圈 2 mm 觀察到子囊孢 子在 2% water agar 上發芽,接種後第 7、14、21 與 28 天的子囊孢子發芽率分別為 0、17、83 與 85%;以 ln (1+ germination rate) 對接種後天數 (每7天一個間隔) 作圖與進行迴歸分析,得到方程式 y= -0.7122x²+ 5.0514x-4.3496 (R²= 0.9998 ; 1≤x≤4)。雖然EAGM 法 可計算得到子囊孢子的發芽率,卻無法得知其成功侵 入植株根部的數據 (number of germinated and penetrated ascospores, GPA)。另 Stanghellini 等人所發展的土壤試 管法 (soil tube method, STM), 雖然無法觀察到子囊泡 子的發芽率,但卻可計數 GPA 的個數。因此本研究利 用 STM 法將洋香瓜 (秋香)、越瓜 (銀華、農友白皮)、 冬瓜 (農友細長1號、小惠)、南瓜 (壯士、鳳凰)、西瓜 (富寶2號、勇士)、絲瓜(美菱、東光)與蒲瓜(永樂、 永秀) 等 13 種供試瓜類作物接種本病原菌之子囊孢子 (3×10³ ascospores/g soil) 12 天後,在供試植株根部可 觀察到有 5-91 顆 GPA,其中在越瓜(銀華)與洋香瓜 (秋香) 根部有較多的 GPA,每個根系有 91 與 77 顆, 其次為蒲瓜(永樂)的66顆,而在越瓜(農友白皮)、冬 瓜 (農友細長1號、小惠)、南瓜(壯士、鳳凰)、西瓜 (富寶2號、勇士)、絲瓜(美菱、東光)與蒲瓜(永秀) 等根系上則依序有 22、9、5、18、33、19、23、7、6 與 39 顆,其與越瓜 (銀華) 和洋香瓜 (秋香) 的 GPA 差 異顯著 (P< 0.05)。雖然 EAGM 法與 STM 法為兩種不 同觀察子囊孢子在根圈發芽的接種方式,若依 EAGM 法所得方程式,計算接種後第12天2mm 根圈中子囊 孢子的發芽率為 8.18%, 再參考 Stanghellini 等人在 STM 法中以圓柱體體積公式求得根圈 2 mm 子囊孢子 總數 (ascospore population in rhizosphere, APR) 的方 法,將 APR×8.18% 則可得到在供試 13 種瓜類作物根 圈的子囊孢子發芽顆數 (number of germinated ascospores, GA)。再將 GPA/GA ×100% 定義為有效侵 入率 (penetration efficiency, PE, %), PE 值表示在根圈 發芽的子囊孢子當中,能夠成功侵入寄主根部所佔的 比率。計算 PE 值所得結果顯示,洋香瓜(秋香) 與越瓜 (銀華) 為最高,分別有 55 與 48%,其次為蒲瓜(永 樂、永秀)與越瓜 (農友白皮)的37、22與25%,而西瓜 (富寶2號、勇士)、冬瓜(農友細長1號、小惠)、絲瓜 (美菱、東光)與南瓜(壯士、鳳凰)等的 PE 值分別為 13、10、9、4、7、8、7 與14%,其與洋香瓜(秋香) 和越瓜 (銀華) 的PE 值差異顯著 (P<0.05)。

F-05 台灣蝴蝶蘭園之眞菌多樣性調查 - 陳人瑋、鍾文 鑫 (國立中興大學植物病理系) Fungal diversity at Phalaenopsis garden in Taiwan - Chen, J. W., and Chung, W. H. (Dept. of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung)

蝴蝶蘭是台灣花卉外銷出口重要農作物,2006 年 其出口總值已達3538 萬美元,且栽培面積逐年增加。 依據台灣植物病害名彙指出,可造成蝴蝶蘭眞菌性病 害者有 Sclerotium rolfsii、Fusarium solani、F. proliferatum

Botrytis cinerea

Phytophthora parasitica、 P. palmivora 及 Colletotrichum gloeosporioides 等7種病原真菌,然而蝴蝶蘭園區內的 真菌相資料卻十分缺乏。為建立蝴蝶蘭園區真菌相資 料,本研究自臺中、彰化、雲林、嘉義、台南、高雄 及屛東等地共48 家蘭園中蒐集蝴蝶蘭植株之根、葉、 落葉等組織及栽培介質,共分離到 255 個菌株,其中 131 個菌株經形態學特徵及 TS rDNA 核苷酸序列比對 後, 分屬 Fusarium (63)、Penicillium (21)、Trichoderma (17) \ Aspergillus (13) \ Alternaria (9) \ Colletotrichum (3) 及 Cochliobolus (2), 另未能鑑定菌株均屬子囊菌類 (Ascomycetes)。而所有已鑑定菌株中以 Fusarium 屬真 菌在蝴蝶蘭園區所佔比例最高,且經人工接種蝴蝶蘭 葉片後顯示菌株間的病原性強弱表現亦有差異。

F-06 無病原性尖鐮胞菌 Fo366 對胡瓜及長豇豆萎凋 病之防治與其作用機制之初探 - 王照仁、林益昇 (國立 中興大學植物病理學系) Control of Fusarium wilt of cucumber and asparagus bean by using nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo366 and its possible mechanism-Wang, C. J., and Lin, Y. S. (Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung)

花蓮胡瓜萎凋病抑病土中所分離得到的無病原性 尖鐮胞菌菌株 Fo366,以育苗混菌接種法分別導入胡 瓜、長豇豆與菜豆植株中,在接種後第八週其對照組 之萎凋病發病度分別為 85%、62.5% 與 85%;而處理 組之發病度則分別為 44%、8.3% 與 75%,表示 Fo366 並非對所有萎凋病菌之寄主作物皆具良好的防治效 果。此外,以育苗介質混菌法來試驗不同濃度的Fo366 對長豇豆萎凋病的防治效果,結果指出Fo366的族群 密度必須高於病原菌的10倍以上,方具防治功效。另 外,利用剪胚轴法將 Fo366 直接導入胡瓜植株內 2 週 後,再以剪根的方式 (root dipping) 強制接種 (challenge inoculation) 胡瓜萎凋病菌,結果顯示 Fo366 並不能延 緩萎凋病病勢發展。因此推論 Fo366 防病萎凋病的機 制可能是競爭作用。本研究另篩選其他來源之無病原 性尖鐮胞菌,發現菌株Fo159、Fo276 和Fo501 以育苗 介質混菌法導入長豇豆中,其發病度分別為29.2%、 4.5% 與 33.3%,明顯低於對照組的 75%,其中 Fo276 頗具防治潛力。

F-07 利用核醣體核酸基因間隔區鑑別台灣胡瓜與長 豇豆之病原及非病原性尖鐮胞菌 - 王照仁、鍾文鑫、林 益昇 (國立中興大學植物病理學系) Identification of pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* on cucumber and Asparagus bean in Taiwan based on the inter-genic spacer of the ribosomal region- Wang, Chao-Jen, Chung, Wen-Hsin, and Lin, Yi-Sheng (Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung)

胡瓜與長豇豆萎凋病菌和無病原性尖鐮胞菌 (Fo276) 無法由菌落型態加以區分,故嘗試以尖鐮胞菌 之專一性引子對 FIGS11/ FIGS12 針對核醣體核酸基因 間隔區 (Inter-genic spacer, IGS) 經聚合酶連鎖反應 (PCR)進行增幅,結果顯示皆可增幅出約550至650bp 片段,仍無法區分病原與非病原性尖鐮胞菌。將 Fo276 之 DNA 片段解序後,設計專一性引子對 FIGS11/ NPIGS12,經 PCR 增幅後僅可於 Fo276 得到一約 500 bp 產物;而測試的胡瓜與長豇豆萎凋病菌共 17 個菌 株,以及絲瓜、苦瓜、洋香瓜與菜豆萎凋病菌上共13 個菌株則無。再以 FIGS11/ FIGS12 測試其他無病原性 尖鐮胞菌株 Fo366、Fo95020、Fo95021、Fo95022、 Fo95024 和 Fo95026,結果顯示除 Fo95020 與 Fo95021 外,其餘供試菌株皆可增幅出約 500 bp 產物。進一步 溫室胡瓜盆栽生物防治試驗結果亦顯示除 Fo95020 與 Fo95021 外,其餘供試菌株均可延緩胡瓜萎凋病之發 展。本研究設計的專一性引子對是否可用來篩選具防 病潛力之無病原性尖鐮胞菌,則有待進一步證實。

F-08 Population structure of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* collected in Taiwan from 2005 to 2007 - Zongming Sheu, and Tieng-cheng Wang (AVRDC-The World Vegetable Center)

Tomato fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) is a devastating disease of tomato worldwide. This disease recently caused severe damage in many tomato production areas in Taiwan and it has become an important production constraint. The objective of this study was to investigate the population structure of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) in Taiwan from 2005 to 2007. A total of 123 Fol isolates were obtained from tomato stems and petioles expressing typical symptoms. They were characterized by physiological races, vegetative compatibility grouping (VCG) and restriction fragment length polymorphisms of the intergenic spacer region of rDNA (IGS-RFLP). Race determination were conducted using the root-dip inoculation on two-week-old seedlings of the host differentials included Bonny Best (no resistance), UC82-L (resistance to race 1), and Florida MH-1 (resistance to races 1 and 2). Except for two race 1 and one avirulent isolates, all isolates were race 2 which caused severe symptoms on cultivars Bonny Best and UC-82L. Only the VCG type of 103 isolates have been successfully determined since other isolates didn't produce suitable mutants on chlorate medium. Two VCG types were identified. Among them, 100 isolates belonged to VCG TW1 while 3 isolates belonged to VCG TW2. Each VCG has a consistent and distinct IGS-RFLP pattern resulting from EcoRI, RsaI, and HaeIII digestions. In addition, the AFLP technique was used to assess the genetic diversity of 43 representative Fol isolates from different locations at the genome-wide level. A total of 429 DNA fragments ranging from 50-700bp were scored from five primer combinations. Among them, 234 DNA fragments were polymorphic. No polymorphism correlated with geographic origin was observed. Cluster analysis using UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) clearly separated the tested isolates into two distinct groups. The evidence from vegetative compatibility, IGS-RFLP haplotyping and AFLP analysis confirmed that there now exist two clonal lineages in Taiwan. VCG TW1 was the predominate one across Taiwan, and the few VCG TW2 isolates were restricted to Hsinyi, Naotou County. The study demonstrated the simple population structure of Fol and the predominance of race 2 in Taiwan. It offered very important information to enhance the program of breeding for resistance and future studies of the pathogen population.

F-09 迷迭香根腐病之研究 - 吳魁偉、孫岩章、蔡碧雲 (台灣大學生物資源暨農學院植物醫學研究中心) The study on root rot disease of rosemary - Wu, K. W., Sun, E. J., and Tsai, B.Y. (Research Center for Plant Medicine, College of Bioresources and Agriculture, NTU)

迷迭香是為香草業者中重要的經濟作物之一,經 調查花蓮及北部地區之迷迭香常在夏天高溫多濕的環 境下,發生根腐病(Root rot),病徵為地上部黃化、枯 死。經由鏡檢迷迭香根部組織,可在根部組織中發現 卵孢子(Oospore)或厚膜孢子(Chlamydospore)等構 造,以選擇性培養基進行迷迭香根的病健部組織分 離,所分離到的約 120 株病菌分離株,並鑑定出 Pythium 及 Phytophthora, 且以 Pythium 之分離檢出率 達 98 % 為最主要, Phytophthora 之分離檢出率為 2 %。將所有120分離株依外部型態特徵做初步的鍵定與 分群, 共得 20 群, 再逐一鑑定出其中有 Pythium 6 種, Phytophthora 2 種,此8 種經分別接種於試管中已 發根迷迭香扦插苗及穴盤介質栽培扦插苗,以檢定其 病原性,結果發現,其中5種 Pythium 及2種 Phytophthora 皆具病原性,且兩類中分別以 Pythium myriotylum 及 Phytophthora nicotianae 最為主要。在藥 劑防治上,以浸泡迷迭香盆栽地下部根系的方式,各 施予 500X 鋅錳乃浦及 500X 甲基多保淨,浸泡時間分 別為 10 秒、20 秒及 60 秒,結果顯示,在浸泡鋅錳乃 浦 20 秒與甲基多保淨 10 秒,皆有良好的防治效果。 而以滴管澆灌此兩種農藥的方式,以檢定藥害情形, 亦發現藥害情況並不明顯。在迷迭香所分離到的較強 病原性的菌株中,選定腐霉菌 P. myriotylum、P. ostracodes、P. catenulatum 及疫病菌 Ph. nicotianae,分 別接種於甘藍、番茄和包心芥菜等3種蔬菜幼苗作 物,其結果皆顯示可造成此3種蔬菜之根腐病徵。而 在本研究中,已經由柯霍氏準則的驗證,證明迷迭香 根腐病之發生、病原性和真菌種類,此對迷迭香根腐 病的了解及後續之防治將有所幫助。

F-10 葉用甘藷根莖腐病之研究 - 游加興¹、蔡碧雲¹、 孫岩章² (¹ 國立台灣大學植物病理與微生物學系;² 國 立台灣大學生農學院植物醫學研究中心) Study on root and stem rot of sweet potato - Yu, C. S., Tsai, B. Y., and Sun, E. J. (¹ Dept. of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei; ² Research Center for Plant Medicine, College of Bioresources and Agriculture, NTU)

2006 年於台北市、台北縣樹林及永和等首先發現 田間種植之葉用甘藷發生植株葉片萎凋、部分莖組織 褪色的病徵,嚴重者莖基部黑色軟腐、全株產生缺水 枯死、根部腐敗,最後造成全株死亡。詢問當地農友 得知,該病害的歷史可追溯到十年以上。經病原菌分 離、純種培養、人工接種及再培養,可依柯霍氏法則 確認該病原為一種桿菌,該細菌依形態、革蘭氏染 色、Biolog 鑑定及 NGM 選擇性培養基鑑定,確認為 Erwinia chrysanthemi。此病為台灣之首次記錄,病菌 主要危害葉用甘藷的莖部與根部,造成莖基部黑腐與 根部褐化軟腐,進而引起植株萎凋枯死,此與國外甘 諸細菌性根莖腐病病徵極為相似且病原菌相同,因此 稱之為葉用甘藷根莖腐病(root and stem rot)。在品種抗 性測定方面發現供試四種葉用甘藷品種中以永和種1 號最為抗病,桃園2號、台農71號及永和種2號皆具 感染性。以濾紙圓盤法測試市售9種藥劑在3種不同 稀釋倍數下對根莖腐病菌菌株生長之抑制效果,顯示 四環黴素對葉用甘藷根莖腐病之菌生長之抑制效果最 佳,而嘉賜黴素對 E. chrysanthemi 無任何防治效果, 其餘7種防治藥劑包括銅快得寧、氫氧化銅、鏈四環 黴素、多保鏈黴素、鏈黴素、維利黴素、嘉賜黴素等 實驗藥劑均能抑制 E. chrysanthemi 根莖腐病菌之生 長。

F-11 樣果果實蒂腐病病原調查與防治藥劑篩選 一 倪 蕙芳¹、楊宏仁¹、陳瑞祥² (¹ 行政院農委會農業試驗所 嘉義農業試驗分所植物保護系;² 國立嘉義大學生化科 技學系) Pathogen Survey and Screening of Control Chemicals for Stem End Rot of Mangos - Ni, H.-F.,¹ Yang, H.-R.¹ and Chen, R. S.² (¹ Plant Protection Department, Chiayi Agricultural Experiment Station, Agricultural Research Institute, COA; ² Department of Biochemical Science and Technology, National Chiayi University)

蒂腐病為檬果主要之採收後病害,影響果實品質 及市場價值甚巨。本研究由凱特及愛文檬果果實蒂腐 病徵上進行病原菌分離,結果發現造成國內檬果蒂腐 病之主要病原菌除了 Lasiodiplodia theobromaae 外, Phomopsis sp. 亦為主要的病原菌。在 2007 年調查之愛 文檬果結果發現,果腐病徵由Lasiodiplodia sp. 引起者 佔31%,由 Phomopsis sp. 引起者則佔 52%;另外於凱 特檬果上則發現僅有 12% 之果腐病斑由 Lasiodiplodia sp. 引起,卻有高達 68% 之果腐病斑由 Phomopsis sp. 所引起, 顯然在此兩種檬果品種上, Phomopsis sp. 之 高感染率是檬果蒂腐病發生之主要原因。將所分離之 Lasiodiplodia sp. 及 Phomopsis sp. 於檬果果實及枝條進 行人工接種,結果發現兩種病原菌均對檬果果實或枝 條具有病原性, Phomopsis sp. 在果實接種時病徵出現 較慢,周圍較圓滑;而接種 Lasiodiplodia 則病徵出現 較快,病徵周圍呈不規則狀;但在田間發病果實上, 兩者所造成之病徵則不易區別。另一方面,在檬果枝 條內生菌相調查中亦發現,Lasiodiplodia sp.、 Phomopsis、 Pestalopsis sp.、 Fusarium sp. 及 Colletotrichum sp. 等菌皆普遍存在於枝條,且族群數量 可能受田間氣候或檬果生長狀態等因子影響,在不同 時期略有差異。為進一步瞭解檬果蒂腐病之發生與果 梗帶菌率之相關性,本研究分別在不同產區調查愛文 及凱特檬果蒂腐病的罹病情形與果梗帶菌率,結果顯 示不同產區樣果的罹病率差異極為明顯,在官田地區 5 個果園之罹病率介於 14 - 98%,而玉井地區 5 個果園 發病率則均僅在 16 - 40% 之間,藉由統計分析後發 現,果實發病情形與果梗之帶菌率並無明顯相關性。 由於本研究發現 *Phomopsis* sp. 亦為造成樣果蒂腐病之 主要病原,故利用 8 種殺眞菌劑進行室內防治藥劑篩 選,結果發現除了亞托敏外,其於如賽普護汰寧、貝 芬依滅列、撲克拉錳、克熱淨、菲克利腐絕、貝芬撲 克拉、依普銅等 7 種藥劑在 10 ppm a.i. 濃度時對 *Phomopsis* sp. 之生長均有抑制作用。

F-12 利用木黴菌防治番茄疫病 - 許淑麗^{1,2}、倪蕙芳 ²、楊宏仁²、陳瑞祥³ (¹國立嘉義大學農學研究所;²行 政院農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護 系;³國立嘉義大學生化科技學系) Application of *Trichoderma virens* for the control of *Phytophthora capsici* on tomato - Hsu, S. L.^{1,2}, Ni, H.-F.,² Yang, H.-R.², and Chen, R. S.³ (¹Graduate Institute of Agriculture, National Chiayi University; ² Plant Protection Department, Chiayi Agricultural Experiment Station, Agricultural Research Institute, COA; ³ Department of Biochemical Science and Technology, National Chiayi University)

番茄疫病菌 (Phytophthora capsici) 主要發生於高溫 多濕之環境,爲番茄苗期主要病害之一,危害幼苗地 際部或地際部以上之莖部,初呈淡褐色至暗褐色之縊 縮病徵,後呈現腰折狀而枯死。由於現階段針對土壤 傳播性病害的防治,仍多採取傳統化學藥劑防治,爲 降低化學農藥的使用及其對生態環境的危害,故本研 究測試應用木黴菌作為防治番茄疫病生物製劑之可行 性。本試驗應用各地作物土壤中收集分離木黴菌菌 株,初步利用玻璃紙抗生法篩選獲得10株對疫病菌具 有拮抗性之木黴菌菌株,其中以 Tri-003、Tri-080 及 Tri-157 等菌株對疫病病原菌之生長具有較強抑制性。 此三菌株分別自木瓜、香蕉及芹菜田間土壤分離所 得,經形態特性及分子鑑定均為 Trichoderma virens。 在 PDA 培養皿測試,其對亞蔬番茄P. capsici 分離株及 水里辣椒 P. capsici 分離株生長抑制率皆為 100%。以 菌株 Tri-157 進行 PDB 培養不同時間後,所得之濾液 與疫病菌在 PDA 平板進行抗生試驗, 接種 5 天後調查 結果顯示,隨著木黴菌培養日數增加,疫病菌落生長 受其濾液抑制的效果愈明顯,培養5天以上之濾液所 產生之抑制圈即明顯大於對照組。於溫室試驗中發

現,將菌株 Tri-157 培養於 PDB 中,於培養後不同時 間取其濾液與亞蔬蕃茄 P. capsici 分離株同時接種於已 育苗一週之翠紅蕃茄幼苗,結果顯示培養3 天以上之 濾液即可以明顯減少疫病菌對番茄幼苗造成倒伏之比 率,培養7 天以上之濾液對番茄疫病可以達到100% 之 防治效果,顯示本研究所得之木黴菌株對番茄疫病應 具有開發為生物防治製劑之潛力。

F-13 天然植物保護製劑「黑修羅」的抑菌能力與防病效果 - 陳俊宏、謝廷芳 (行政院農業委員會農業試驗 所花卉研究中心) The antifungal activity and disease control efficiency of natural plant protectant, Black Asura -Chen, C. H., and Hsieh, T. F. (Floriculture Research Center, Agricultural Research Institute, COA, Ku-Keng, YunLin, Taiwan)

台灣地處熱帶與亞熱帶氣候區,植物病害種類繁 多、長久以來農民多仰賴化學藥劑來防治植物病害、 導致消費者對農藥殘留的疑慮難除,因此政府倡導安 全農業的理念與作法,祈望能有效降低對化學藥劑的 依賴。許多報告指出由植物中可萃取特殊的抑菌物 質,用以防治多種植物病害。本研究以微乳化技術, 將萃取自植物的精油與皀素調配成天然植物保護製劑 - 「黑修羅」微乳劑,並測試其抑菌能力及防病效 果。結果顯示「黑修羅」微乳劑 8000 倍稀釋液於水瓊 脂平板培養基上可有效抑制印度棗炭疽病菌 (Colletotrichum sp.)、木瓜炭疽病菌 (Colletotrichum gloeosporioides)、芒果炭疽病菌 (C. gloeosporioides)、 香蕉炭疽病菌 (C. musae)、文旦炭疽病菌 (C. gloeosporioides)、蘋果炭疽病菌 (C. gloeosporioides) 和 十字花科蔬菜炭疽病菌(C. higginsianum)等孢子發芽及 附著器形成之效果;在相同稀釋倍數下,於水瓊脂平 板培養基上亦具有抑制蝴蝶蘭灰黴病菌 (Botrytis cinerea) 及十字花科蔬菜黑斑病菌 (Alternaria brassicicola) 孢子發芽的效果。而在溫室試驗中,以 「黑修羅」微乳劑 8000 倍稀釋液施用於蝴蝶蘭花瓣 上,可有效降低蝴蝶蘭灰黴病之發生;而以4000 倍稀 釋液施用於白菜植株上,亦可有效減輕白菜炭疽病菌 之危害。耐貯藏試驗發現「黑修羅」微乳劑穩定性 高,經54±2℃ 貯放14 天後,仍保有良好之製劑穩定 度。以具環境友好與高安全性的天然植物保護製劑防 治植物病害,是符合安全農業的一項病害防治新技 術。

黃振文¹ (¹ 國立中興大學植物病理學系;² 行政院農委 會農試所植病組) Antimicrobial Activity of Edible Mushrooms from Taiwan - Chen, J. T. ^{1,2}, and Huang, J. W ¹. (¹Depantment of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung; ² Division of Plant Pathology, Agricultural Research Institute, COA)

利用 Alternaria brassicicola、 Colletorichum Phytophthora capsici、Pythium aphanidermatium 及 Rhizoctonia solani 等六種植物病原真菌及 Acidovorax avenae subsp. citrulli > Erwinia carotovora subsp. carotovora E. chrysanthemi Ralstonia solanacearum Xanthomonas campestris pv. oryzae X. campestris pv. campestris 及 X. axonopodis pv. vesicatoria 等七種植物 病原細菌,評估台灣食用菇類二十七個菌株之培養濾 液的抗菌活性。結果發現這些菇類菌株的培養濾液具 有抑制植物病原菌的效果,且抑菌功效會隨菇菌菌株 的不同而有明顯的差異。參試的菌株中,香菇 (Lentinus edodes) 與紫丁香蘑 (Lepista nuda) 菌株之培養 濾液可完全抑制白菜炭疽病菌 (C. higginsianum)的孢子 發芽,其最小抑菌濃度 (MIC) 為濾液稀釋 2 倍;香 菇、紫丁香蘑及靈芝 (Ganoderma lucidum) 菌株培養濾 液對十字花科蔬菜黑斑病菌 (A. brassicicola) 的孢子亦 有抑制發芽的效果,其 MIC 分別為濾液稀釋 16 倍、2 倍及4倍;香菇、紫丁香蘑、雞腿蘑 (Coprinus comatus) 及金耳 (Tremella aurantialba) 等四個菌株培養 濾液可完全抑制青椒疫病菌 (Phytophthora capsici) 的游 走孢子發芽,其 MIC 分別為濾液稀釋 8 倍、4 倍、8 倍及 2 倍。惟前述所有培養濾液均無法有效抑制萵苣 萎凋病菌 (F. oxysporum f. sp. lactucae) 的分生孢子發 芽,亦無法有效抑制 R. solani、P. aphanidermatium、 C. higginsianum 及 F. oxysporum f. sp. lactucae 等菌之菌 絲生長。針對植物病原細菌方面,發現香菇、柳松菇 (Agrocybe cylindracea)、靈芝及舞菇(Grifola frondosa) 等四個菌株培養液可顯著抑制細菌性果斑病菌 (A. avenae subsp. citrulli) 的細胞增殖;柳松菇菌培養濾液 尚可抑制海芋軟腐細菌 (E. carotovora subsp. carotovora);舞菇、柳松菇與香菇的培養濾液則可抑制 蓮霧青枯病菌 (R. solanacearum);而香菇、紫丁香蘑及 柳松菇的培養濾液可抑制水稻白葉枯病菌 (X. campestris pv. oryzae) 的生長。至於洋菇、靈芝、香 菇、雞腿蘑、舞菇及紫丁香蘑等六種菇類培養濾液對 於十字花科黑腐病菌 (X. campestris pv. campestris) 與茄 科細菌性斑點病 (X. axonopodis pv. vesicatoria),分別有 不同程度的抑制功效。進一步,以紫丁香蘑菌絲培養

濾液測試抗菌物質之耐熱性與防病功效,發現該菌產 生的抗菌物質具有熱穩定性。溫室試驗,發現噴佈紫 丁香蘑培養濾液,可有效抑制青椒疫病的發生。綜合 本研究的初步成果,證明食用菇類的培養濾液具有研 發成為植物保護製劑的潛力。

F-15 Microencapsulated formulation of antagonistic bacteria with chitinolytic activity and application in fungal disease contro¹ - Lin, Yu-Chun1, Chen, Chao- Ying² and Chen, Ming-Ju¹ (¹ Department of Animal Science and Technology, National Taiwan University, ² Department of Pathology and Microbiology, National Taiwan University)

Corn components can be found in thousands of products. However, maize diseases, which could reduce yield potential, alter normal maturity and reduce grain quality, create serious problems for the maize grower. Recently, a novel gram-positive strictly aerobic, motile sporulating bacterium was isolated from a soil sample and identified as Bacillus cereus. The strain presented remarkable activity to inhibit the growth of fungus. Thus, this strain was encapsulated by both spray drying and extrusion methods. The optimization techniques were applied to search the best formula and spray-dried condition for maximum viability of B. cereus C1L. The final aim of this study was to develop a new biopesticide using microencapsulation to provide protections from extreme environmental conditions and enhanced residual stability. Results indicated that the cell numbers of Bacillus cereus C1L were reached to 10⁹ cfu/mL and cultivation cost was as low as 0.7 NTD/Kg when sugar yeast powder was used as the nitrogen source. Further encapsulation of this strain by two different methods found that spray drying with corn starch showing the best plant induced resistance. Optimization results indicated that B. cereus C1L with 18.3% corn starch and 12.5% gum Arabic dehydrating at 73.5 °C would produce a biopesticide with the highest viability of this strain. The verification experiment yielded a result close to the predicted values, with no significant difference (P=0.05).

F-16 Study on purification and biocontrol ability of Anthraquinone-derivatives of *Trichoderma harzianum* - Chou, Jing-Po¹, Peng, Kou-Cheng², and Lo, Chaur-Tsuen¹ (¹ National Formosa University, Yulin; ² National Dong-

Hwa University, Hualien)

Anthraquinone-derivatives, pachybasin and chrysophanol, were purified by a silica column chromatography with two different solvent systems from Trichoderma harzianum strain R1-6. The fungus was incubated in sugarcane bagasses solid medium at room temperature without rotation. Our goal is to determine the biocontrol function of T. harzianum against Rhizoctonia solani, Botrytis cinerea, Fusarium solani, Sclerotiwa sclerotiam, Sclerotium rolfsii, Colletotrichum gloeosporioides. Alternaria brassicicola, Fusarium oxysporum f. sp. luffae and to detect the mechanisms of the compounds against bacteria and virus. The results indicated that about 233 mg of pure chrysophanol and 773 mg of pure pachybasin could be recovered per kilogram of solid cultural medium, with yields corresponding to $1.7\pm$ 0.2% and 5.6 \pm 0.5%, respectively. It also showed that chrysophanol and pachybasin inhibited mycelial growth of R. solani, the percentage of growth-inhibition were over 32% and 36% respectively. The percentage-inhibition for mycelial growth of Botrytis cinerea were respectively at 18% and 22%.

F-17 植物抽取液與拮抗微生物對作物病原菌之影響 (Effect of plant extracts and antifungal bacteria on growth of plant pathogens) - Yeh, Chien-Cheng¹, Lu, Hsueh-Yi¹, Shi Li-Shian¹, Lo, Chaur-Tsuen¹ (¹ Dept. of Biotechnology, National Formosa University, Yulin)

近幾年由於國人對保健之重視,促使推廣有機農 業的發展,因此對於病蟲害防治的生物防治產品已成 為我國發展之目標。本試驗嘗試從中草藥、植物萃取 物來檢測對病原菌之抑制能力,並探討其對作物病害 的防治能力,以作為未來發展生物製劑之目標。本試 驗材料取自 12 種植物,以有機溶劑(如甲醇)萃取或高 溫蒸餾等方式萃取物;其中11種萃取液與病原菌炭疽 病菌 Colletotrichum higginsianum (Ch)、黑斑菌 Alternaria brassicicola (Ab) 進行對峙試驗, 顯示對 Ch、Ab 菌株具有抑制能力的植物萃取液有中草藥之知 母、忍冬藤、射干、鳳尾草等四種。另外以竹炭液來 測試對下列病原菌炭疽病菌 (C. higginsianum)、黑斑菌 (A. brassicicola)、根腐菌 (Fusarium solani)、疫病菌 (Phytophthora parasitica)、 腐 霉 菌 (Pythium aphanidermatum) 之胞子發芽率與菌絲生長抑制;結果 顯示,對根腐菌胞子發芽率有明顯被抑制的濃度在

2500ppm;而黑斑菌胞子發芽率在1250ppm 濃度下即 有明顯被抑制的效果。另外在2500ppm 濃度下,對炭 疽病菌與黑斑菌菌絲生長有50%的抑制效果。不同 的,竹炭液對根腐菌菌絲生長抑制率達50%,則需在 5000ppm 濃度下;反之在1250ppm 濃度下對疫病菌菌 絲則有65%的抑制效果,而在2500ppm 濃度下則對腐 霉菌菌絲生長抑制有65%的效果。至於利用分離出之 174 株細菌與 Botrytis cinerea、B. elliptica、Rhizoctonia solani、Sclerotium rolfsii、Sclerotinia sclerotium、F. solani、F. oxysporum f. sp. luffae,等作對峙培養,則顯 示僅有11 株出現透明環;但植物病害防治測試,則有 48 株對 B. cinerea 有拮抗能力,目前菌株種類則在鑑定 中。

F-18 番石榴立枯病之生物防治 - 周浩平¹、陳昱初¹ (¹ 行政院農業委員會高雄區農業改良場) Biological Management of Guava Myxosporium Wilt - Chou, H. P.¹, Chen, Y. C.¹ (¹ Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan)

番石榴立枯病 (Guava wilt) 為一真菌性病害,病原 菌為 Myxosporium psidii,病原菌只能經傷口侵害寄 主,並引起落葉、落果、枝條枯萎,而後病勢慢慢擴 散導致全株死亡, 高屛地區發生相當嚴重, 目前此病 害尙無任何藥劑可供防治。本研究主要利用拮抗微生 物來進行病害防治測試,以期應用於田間防治病害, 主要自高雄縣燕巢鄉、田寮鄉與屛東縣九如鄉等鄉鎭 之番石榴、茄子與瓜類等作物栽培土壤與有機栽培介 質中取樣,並以序列稀釋法進行微生物分離,使用之 培養基質為營養瓊脂培養基 (Nutrient agar),分離結果 顯示每公克的土壤與樣品中含有超過10⁸ CFU 的細菌 數,顯示田間作物栽培土壤或是堆肥中皆有很豐富的 微生物相。目前已初步篩選出5個細菌菌株於馬鈴薯 瓊脂培養基 (Patato Dextrose Agar) 上對番石榴立枯病菌 有抑制生長的效果,經食品工業發展研究所鑑定結果 確認5 個菌株皆屬於枯草桿菌 (Bacillus spp.) 與放線菌 類 (Streptomyces spp.) 微生物,此外於 2007 年間自水 稻稻桿中亦分離出對紋枯病菌 Rhizoctonia solani 具有 拮抗效果之細菌,且在培養基上對番石榴立枯病菌亦 有拮抗之現象,未來將繼續利用這些拮抗微生物來進 行其他經濟果樹病害的防治試驗。

F-19 Evaluation of cucumbers for resistance to downy mildew and powdery mildew under field and greenhouse

conditions - Chien-Hua Chen, Tien-Cheng Wang (AVRDC - The World Vegetable Center)

Downy mildew and powdery mildew, caused by Pseudoperonospora cubensis and Sphaerotheca fuliginea, respectively, are two of the most important diseases affecting cucumber production in Taiwan. Farmers in Taiwan are used to controlling these diseases with frequent fungicide application, however, fungicide-resistant strains of the pathogens were reported recently which might be associated with high selective pressure. Utilization of host resistances could be one of the effective substitute strategies for decreasing fungicide applications and increasing yields using safe and environmentally friendly production practices. In this study, a total of 66 cucumber accessions/cultivars were evaluated for their resistance to downy mildew and powdery mildew by nature infection in the field in spring, 2007. Eleven accessions (TOT0362, TOT0908, TOT0996, TOT1007, TOT1295, TOT1298, TOT1303, TOT2536, TOT4318, TOT4529, and PI197088) were resistant to downy mildew, while 3 accessions (TOT2536, TOT7883, and PI197088) and 4 cultivars (Parade, Marketmore 76, Harvestmore, and Freedom House No.1) were resistant to powdery mildew. Two entries TOT 2536 and PI 197088 exhibited high resistance to both downy and powdery mildew and they will be highly valuable for breeding programs. The evaluation of disease resistance at the seedling stage can save a lot of costs, therefore laboratory inoculation protocols were developed for assessing the reactions of cucumber accessions to the mildews. Cucumber seedlings at the one true leaf stage were successfully re-inoculated with the mildews in the growth chamber as well as in the greenhouse. Those resistant accessions selected from the field evaluation exhibited an almost immune reaction after artificial inoculation at the seedling stage. Further studies are being conducted to assess the correlation of disease reactions between the field and in the growth chamber or greenhouse. A modified and reliable protocol for evaluating the resistance of cucumbers to mildews at the seedling stage in the growth chamber will be developed in the near future.

F-20 Reclassification of *Venturia* sp. causing pear scab and their sensitivity to fungicides in Taiwan - Wu, W. Y.¹,

Chung, W. H.¹, Chung, W. C.², Huang, J. W.¹ (¹ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung; ² Taiwan Seed Improvement and Propagation Station, COA)

Pear scab caused by Venturia spp. including Venturia pirina (Syn. V. pyrina), and V. nashicola. Among the two species, V. pirina were identified as pathogen specie caused pear scab in Taiwan before. Recently, more than 50 single isolate of Venturia sp. obtained from Sinpu, Hsinchu and Sinshe, Taichung. According to morphological characters and ITS sequences, these isolates showed high similarity to V. nashicola. However, we did not compare with type strain of V. pirina and V. nashicola, and more isolates are needed to observe in future. Moreover, 16 single isolates of Venturia sp. were tested the sensitivity to benomyl (50% WP), kresoxim-methyl (44.2% SC) and trifloxystrobin (50% WP). According to the effective concentration 50 (EC₅₀) values, in 100ppm and 500ppm (active ingredient, a.i.), these fungicides were efficacy to inhibit the mycelial growth. However, two single isolates were low sensitive to benomyl and trifloxystrobin under 10ppm.

F-21 辣椒果實成份對辣椒炭疽病菌 (Colletotrichum acutatum) 之影響 - 陳盈如¹、王升陽²、張碧芳¹ (¹國立 中興大學植物病理學系;²國立中興大學森林學系) Effects of hot pepper fruit contents on Colletotrichum acutatum causing anthracnose - Chen, Ying-Ru¹, Wang, David², and Chang, Pi-Fang Linda¹ (¹Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan;² Department of Forestry, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan)

本研究評估辣椒栽培品種群香 (Capsicum annuum) 及抗炭疽病辣椒種原 AVRDC PBC932 (Capsicum chinense) 之新鮮果實成份、乙酸乙酯萃取物與果實自 然揮發物質對辣椒炭疽病菌 (Colletotrichum acutatum) 的抗菌效果。初步結果顯示兩供試辣椒果實汁液 (水溶 性物質)對炭疽病菌分生孢子發芽及菌落生長並無抑制 效果,而乙酸乙酯萃取物則可以抑制炭疽病菌分生孢 子發芽及菌落生長。另外,直接利用兩供試辣椒果實 的自然揮發物質進行抑菌測試,結果發現二者皆可抑 制病原菌生長,進一步利用氣相層析質譜儀 (gas chromatography-mass spectroscopy, GC-MS) 分析辣椒果 實之揮發物質,以推測可能的抑菌成份,目前由分析 結果可知在抗病辣椒種原 AVRDC PBC932 中含有較高量的多環芳香煙 (Naphthalene)衍生物,而此成分是否為辣椒中可能的抑菌物質及是否參與辣椒抗炭疽病的機制則有待進一步測試。

F-22 台灣地區放線菌聚酮與非核醣體多胜肽合成酶基因群之多樣性調查 - 蔡依真¹、吳雯雅¹、鍾文鑫¹、鍾文金² (¹國立中興大學植物病理學系;²行政院農業委員會種 苗改 良繁 殖場) Biodiversity of polyketide synthase (PKS-I and PKS-II) and ribosomal polyketide synthase (NRPS) in different actinomycetes in Taiwan. - Tsai, Y. C. ¹, Wu, W. Y¹., Chung, W. H. ¹, Chung, W. C. ² (¹ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung; ²Taiwan Seed Improvement and Propagation Station, COA)

放線菌是一群型態特殊且分布廣泛的革蘭氏陽性 菌,可產生許多二次代謝物,如 avermectin、 tetracycline、rapamycin 等,並廣泛應用於醫療、家畜 飼料添加物及植物保護上。而放線菌所分泌的二次代 謝物主要是藉聚酮合成酶 (polyketide synthase, PKS) 或 非核醣體多胜肽合成酶 (non-ribosomal polyketide synthase, NRPS) 系統合成聚酮與胜肽等兩類化合物。 本研究自台灣各地不同作物相之栽培土壤,包括台 北、桃園、苗栗、台中、南投、台南、高雄、屛東、 澎湖、宜蘭等地,共分離到460 個疑似放線菌菌株, 其中 130 株經 16S rRNA 鑑定後,有 103 株確定為放線 菌群,共70種,分屬 Streptomyces (鏈黴菌屬)、 Kitasatosporia 及 Nocardioides (類諾卡氏菌屬),其中鏈 黴菌屬所佔比率最高,約為 94%。進一步分析其 PKS-I、PKS-II 與 NRPS 之序列多樣性,發現 PKS-I 序列於 不同菌株間之變異性極高,且多屬於酮醯基合成酶 (ketoacyl synthase domain)。此外於生物活性測試中, 得知不同碳素源明顯影響鏈黴菌屬之抗生性,顯示碳 素源可能影響 PKS 或 NRPS 之基因群表現。

F-23 香蕉組培苗繁殖系統污染原鑑定及防治 - 蘇慶昌 ¹、趙治平¹、陳其麗¹、林清勝¹、柯文雄² (¹ 台灣香蕉 研究所;² 國立中興大學植物病理學系) Identification and control of contamination in the banana tissue culture plantlets production system - Su, C. C. 1, Chao, C. P.¹, Chen, C. L.¹, Lin, C. S.¹ and Ko, W. H.² (¹ Taiwan Banana Research institute, Chiuju, Pingtung;² Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung)

台灣香蕉研究所由 72 年起,在 MS 培養基中利用 莖頂分生組織增殖技術,迄今已培育5,124 餘萬株香蕉 組織培養苗供蕉農種植。香蕉組培苗量化生產流程, 培養基配製至馴化階段,常遭受雜菌污染造成 2~3 成 繁苗材料之損失。調查發現污染香蕉組培養苗繁苗材 料之雜菌以真菌最多,細菌居次。真菌污染原包括青 黴 (Penicillium)、 黑黴 (Aspergillus)、 紅黴 (Neurospora) 等8屬,而細菌污染原為枯草桿菌 (Bacillus) 及 Achromobacter 等 5 種。高溫多溼,夏秋兩季香蕉組培 過程中污染最為嚴重。試驗資料顯示,香蕉組培苗分 切增殖過程中,利用不同型式之二氧化氯產品 1,500~2,500ppm 溶液,定期進行環境消毒,可有效預 防雜菌之污染。大量分切完成後,在培養室內進行馴 化, 苗瓶污染率 (2.1~4.5%) 亦低於室外馴化場 4.1~7.4% 之污染率。苗瓶移至室外馴化前,瓶口以3M 衛生膠帶密封後之污染率 3.5%,亦明顯低於未封口對 照處理苗瓶 21.2% 之污染率。馴化場避免將馴化苗瓶放 置地面,亦可有效降低香蕉瓶苗污染率。

F-24 由鐮孢菌 *Fusarium* spp. 造成蝴蝶蘭之病害 - 陳 純葳¹、黃晉興¹、謝廷芳² (¹ 行政院農委會農業試驗所 植物病理組、² 花卉中心) The disease of phalaenopsis caused by *Fusarium* spp. - Chen, C. W. ¹, Huang, J. H. ¹, and Hsieh, T. F. ² (¹ Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute; Floriculture Research Center, Agricultural Research Institute, COA)

2004 年至 2007 年,於台灣中南部 17 個蘭園中調 查蝴蝶蘭葉片黃化、葉基部黑褐化壞疽之病害,罹病 株經組織分離疑似病原真菌並純化培養以供鑑定。所 有蘭園之大部分罹病株皆可分離得Fusarium solani,僅 於2處蘭園少數罹病株分離出 F. oxysporum,此外從根 部腐敗的部位亦可分離到上述鐮孢菌。接種上述菌株 於蝴蝶蘭測試其病原性,結果顯示,不同部位分離到 之 F. solani 與 F. oxysporium 皆可爲害根部與葉基部, 於根部皆造成黑褐色壞疽、隘縮的病徵,惟兩者於葉 基部的病徵不同, F. solani 為害初期出現黑褐色壞疽病 斑,爾後從病斑周圍開始黃化,嚴重時造成整葉黃 化、落葉,並常於病斑上發現橘紅色的子囊殼,而 F. oxysporum 為害初期產生黑褐色壞疽病斑,爾後內部轉 呈白至淡褐色,並只會造成病斑附近輕微黃化,與田 間罹病株病徵相似,並能再分離得原接種之病原菌, 完成柯霍氏法則。F. solani 在 PDA 斜面培養基上菌落 呈白至淡黄色,並可產生橘紅色子囊殼;大孢子為兩 端略彎曲之長柱狀,無色,3-5 個隔膜,大小24.842.2×5.0-6.2 µm (avg. 31.0×5.0 µm);小孢子長橢圓 形, 無色, 平均大小11.5×5.0 µm; 厚膜孢子球形, 多 端生,直徑 5.6-5.7 µm;子囊孢子雙室,中央隘縮, 平均大小 10.8×5.0 µm; 菌絲生長最適溫度為 28℃。 F. oxysporum 在 PDA 斜面培養基上菌落淡桔色至淡紫 色, 會產生橘紅色孢子堆與藍綠色球形菌核體; 大孢 子鐮刀形, 無色, 3-5 個隔膜, 大小 24.8-52.1×3.7-5.0 µm (avg. 44.5 × 4.5 µm);小分生孢子橢圓形,無 色,平均大小 6.2 × 4.4 µm;厚膜孢子球至橢圓形, 端生或間生,直徑 6.35-6.65 µm; 菌絲生長最適溫度 為 24℃。人為傷口會促進 F. solani 與 F. oxysporum 為 害蝴蝶蘭。此外,經過溴化甲烷減壓燻蒸處理,仍無 法滅除植株病斑上的病原菌。分別施用二氧化氯等五 種藥劑於栽培溫室中具有病徵與未有病徵顯現之蝴蝶 蘭上,10 週後發現其發病率與罹病度皆增加,與未施 藥之對照組比較無顯著差異,顯示此5種藥劑未具防 治效果。

補遺 台灣保健植物之疫病-安寶貞、王姻婷、蔡志濃
(行政院農業委員會農業試驗所植物病理組)
Phytophthora diseases of medicinal herbs in Taiwan - Ann,
P. J., Wong, I. T., and Tsai, J. N. (Division of Plant
Pathology, Agricultural Research Institute, COA) (編者按
本摘要為民國 95 年年會稿(編號 F-27) 當年漏列於摘 要集於今年補錄)

至 2006 年 10 月為止,新發現有 6 種保健植物罹 患疫病,包括 Phytophthora parasitica (par) 危害香林投 (七葉蘭) (Pandanus amaryllifolius) 的根部與莖部,造成 莖部 與 莖 基 部 腐 敗 ; P. parasitica 危 害 刺 蔥 (Zanthoxylum ailanthoides) 的根部與莖基部,造成莖基 部腐敗與全株枯萎; P. parasitica 與 P. palmivora) (pal) 危害香椿 (Toona sinensis) 的根部與莖基部,造成幼苗 與田間植株萎凋死亡; P. palmivora 與 P. tropicalus (tro) 危害迷迭香 (Rosmarinus officinalis) 全株,造成植株死 亡;而 P. cryptogea (cry) 危害丹參 (Salvia miltiorrhiza) 與黃耆 (Astragalus membranaceus),造成丹蔘苹基部腐 敗與全株萎凋,與黃耆莖枯與全株萎凋。這些危害保 健植物的疫病菌株,除香椿 pal 菌株外,均爲典型疫病 菌 (typical type),各菌株之菌絲生長溫度:香林投 par (A²)、刺蔥 par (A¹) 及香椿 par (A¹) 均為 8-(28)-36°C, 香椿 pal (A²) 與迷迭香 pal (A¹) 為 12-(28)-32℃,迷迭 香 tro (Ao) 為 8-(28)-32°C, 丹蔘 cry (A¹) 為 8-(24)-32 ℃,而黃耆 cry (A1) 為 8-(28-32)-36℃; 胞囊大小方 面:香林投 par 為 30-(53.5)-70.5 × 21-(39.4)-54.5 µm,

長寬比 1.01-(1.36)-2.09; 刺蔥 par 為 40-(47)-55×35-(38.3)-45 μ m,長寬比 1.13-(1.23)-1.43;迷迭香 pal 為 45-(59.8)-70×35-(37.8)-40 μ m,長寬比 1.29-(1.58)-1.87,胞囊柄 0.5-(1.9)-5 μ m;迷迭香 tro 為 35-(44.9)-52.5×22.5-(27.9)-45 μ m,長寬比 1-(1.61)-2.22,胞囊 柄 25-(65)-150 μ m;丹蔘 cry 為 45-(56.4)-65×30-(35.7)-40 μ m,長寬比 1.25-(1.59)-2.17;黃耆 cry 為 37.5-(42.4)-52.5×25-(31.1)-35 μ m,長寬比 1.21-(1.36)-1.5。

B-01 Xanthomonas campestris pv. incanae 引起之紫羅 蘭細菌性萎凋病 - 吳雅芳、陳紹崇、黃淑惠、鄭安秀¹ (¹ 行政院農業委員會台南區農業改良場) Bacterial blight of Stocks caused by Xanthomonas campestris pv. incanae - Wu, Y. F., S. C. Chen, S. H. Huang and A. S. Cheng (¹ Tainan District Agricultural Research and Extension Station, COA)

2006 年春於彰化縣紫羅蘭栽培區採集到的萎凋型 病株,花葉呈失水狀,莖基部老葉黃化脫落,脫落處 傷口明顯,並往上下縱裂,由表皮往內褐化,無腐爛 現象,橫切根部置於清水中有明顯菌流。牛肉煎汁培 養基平板之菌落為黃色。接種菸草數日後黃化,未呈 現典型過敏性反應。以5號蟲針沾菌針刺接種紫羅蘭 莖部,2-3 天後接種部位初呈水浸狀,水浸狀斑往上、 下擴大,漸轉為黑褐色,5 天後由接種側開始出現輕微 萎凋症狀,往上及下葉片黃化掉落,葉片脫落處痕跡 明顯凹陷、褐化,有縱裂現象,約3 週後全株枯死。 危害4種供試紫羅蘭品種,但不危害其他9種十字花 科蔬菜及6種非十字花科植物。本研究結果確認引起 紫羅蘭細菌性萎凋病之病原細菌為 Xanthomonas campestris pv. incanae。室內藥劑試驗結果顯示 20% 歐 索林酸可濕性粉劑、40% 銅快得寧可濕性粉劑、68.6% 多保鏈黴素可濕性粉劑有抑菌效果。

B-02 Thaxtomin A 之產生為造成台灣馬鈴薯瘡痂病病 原菌 *Streptomyces scabies* 重要之生物特性 - 黃巧雯、 楊尙書、曾德賜 (國立中興大學植物病理系) Thaxtomin A production as a primed factor for potato scab caused by *Streptomyces scabies* in Taiwan - Huang, C. W., Yang, S. S., and Tzeng, D. S. (Dept. of Plant Pathology, National Chung Hsing University)

由鏈黴菌 Streptomyces scabies 所造成之瘡痂病, 為馬鈴薯栽培上普遍發生之世界性重要病害,近年來 台灣中南部地區本病為害亦有趨於嚴重之勢,主要病 徵在薯塊上造成表面有隆起或凹陷的壞疽病斑,嚴重 時多數病斑擴大癒合,致使薯塊品質與市場價值大為 降低。引起本病之病原菌,已知包括 Streptomyces scabies、S. acidiscabies 與S. turgidiscabies 等。典型瘡 痂病病徵之造成已知主要與病原菌產生 thaxtomin A 毒 質可造成細胞肥大、組織壞死有關。為瞭解國內發生 的瘡痂病病原之生物學與危害作用等特性,以爲防治 應用參考,本研究先後從斗南及潭子地區所採集罹病 樣品分離到包括 D1、T1~T6 等七個具典型鏈黴菌型態 特性之菌株,此7個菌株經顯微鏡檢視,均具螺旋狀 孢子梗、孢子表面平滑,於 ISP4 (international streptomyces project) 培養基上, 菌落呈灰色, 均可於 arabinose \inositol \sucrose \raffinose \xylose \ mannitol、fructose 等單一碳源供應下生長。綜合上述 生理與型態特性,本研究進而選殖、解序各供試菌株 之 16S rDNA 序列,經 GenBank 分析比對,證實可將 其歸屬於 Streptomyces scabies。有鑑於 thaxtomins 產生 為本病病原菌感染攸關重要因子,本研究以人工接種 檢視上述菌株之致病性,證實所有菌株分別接種到健 康小薯塊一個半月後,皆可造成表皮破裂、龜裂狀、 隆起之典型病徵。此7 個供試病原菌株旋經於 OMB (oat meal broth) 培養七天後,取上清液,經由醋酸乙酯 (ethyl acetate) 萃取濃縮,及 HPLC (High performance liquid chromatography) 分析檢測,已證實均有 thaxtomin A 產生。而 S1、S3、S4、S30 等有益微生物 菌株中,則除 S4 有微量疑似 thaxtomin A 於代謝物中 有待進一步確認,均未見 thaxtomin A產生,顯示 thaxtomin A 產生特性確爲國內所分離7個供試鏈黴菌病 原致病作用攸關重要因子。為瞭解本病生物防治應用 之可行性,本研究以對峙培養檢測 BS-1、TKS1-1、 TLB7-7、OF3-16、SP4-17、WG6-14 及WP8-12 等 7 株已知對多數重要病原真菌與細菌具優異抗生活性且 產孢性狀良好之枯草桿菌 群(BSG) 菌株對 S. scabies T1 之拮抗性,已證實以 WG6-14 拮抗性最為優異,此一 菌株於本病生物防治上之應用性,以及 thaxtomin A 生 合成基因 txtA 存在與否與鏈黴菌致病性之關係,將為 未來繼續探討之重點。

B-03 鏈黴菌 *Streptomyces griseobrunneus* S3 菌株所產 生 Chi18bA 幾丁質分解酵素之分子特性及其與抗真菌 性之關係 - 黃琇屛、陳金堯、曾德賜 (國立中興大學植 物病理學系) Molecular characteristics of Chi18bA chitinase of *Streptomyces griseobrunneus* S3 and the role it may play in antifungal activity - Huang, S. P., Chen, Gin-Yao, and Tzeng, Dean Der-Syh (Dept. of plant pathology, National Chung Hsing University)

幾丁質分解性鏈黴菌 Streptomyces spp. 在病害生物 防治上之應用,近年來蔚為趨勢,本研究由生物殺菌 劑開發應用已獲成效之 Streptomyces griseobrunneus S3 (SGS3) 成功選殖其 ChiA 全長基因,經解序後證實共 計含 1668bp,可轉譯出約 612 個胺基酸,分子大小約 為 61.2kDa,由比對序列並證實其屬 Famyily 18 subfamily B 之 Chi18bA,同時已知 Chi18bA 可能為一 由四個次單元構成。本研究利用聚合酶連鎖反應法, 配合專一性引子對之應用,檢測Chi18bA 基因於 15 個 台灣本土性具優異幾丁質分解能力鏈黴菌菌株的存在 情形,證實其中有14個供試菌株具有此基因。本研究 將所選殖 SGS3Chi18bA 的 catalytic domain 轉型至 pET26b (+) 大腸桿菌表現載體,並進而誘導表現、萃 取純化重組蛋白,利用此純化蛋白製備已進而成功製 作其免疫檢測用多元抗血清。萃取鏈黴菌 SGS3 外泌蛋 白,配合西方轉漬法檢測,結果顯示確實可於61kDa 位置檢測到如預期之反應條帶。另將 Chi18bA 全長基 因轉型至同一大腸桿菌載體,並經誘導表現及純化此 一酵素全長蛋白。此一酵素蛋白純化製備旋經添加人 工合成幾丁質受質作用,反應產物以Aminex HPX 42A 層析管行高效液相層析 (HPLC) 分離,檢測結果證實此 Chi18bA 酵素製備在 chitotriose 添加下,其主要反應產 物為 chitobiose 及 chitooligosacchride, 唯其對 chitobiose 則不會繼續作用。另在 chitohexaose 添加 下,以 Chi18bA 作用後按時序檢測分解過程產物,可 發現於反應初始,主要產物含包括 chitopentaose、 chitotetraose 、 chitotriose 、 chitobiose 及 chitooligosacchride 等不同長度的 polymer, 唯其終產物 仍以 chitobiose 為主,並同時伴隨著 chitooligosacchride 的出現,此些試驗結果充分顯示 Chi18bA 應為一內切 酵素 (Endochitinase)。本研究繼而於不同的基質添加 下,比較 Chi18bA 與先前本研究室既有之 SGS3 Chi19F 作用性之差異,結果中發現Chi18bA 與Chi19F 均以 chitosan 添加下作用性最好,glyco-chitin 之添加 則作用性最差,唯值得注意的是Chi18bA 對colloidal chitin 的分解效果也很差,而 Chi19F 則反之。在 ChiA 與 ChiF 混合添加下,其對 glyco-chitin 的分解作用具 有明顯的協力效果,然對 chitosan 則無此現象。 Alternaria brassicicola 與 Botrytis cineria 兩病原眞菌之 影響,唯試驗結果顯示 Chi18bA 與 Chi19F 均無明顯的 抑制效果,由於 Chi19F 已被證實於 SGS3 對病原真菌 之超寄生作用中扮演關鍵性角色 (Yang and Tzeng, 2005),同一作用過程中 Chi18bA 協力作用可能的影響 將為本研究繼續探討之重點。

B-04 The use of biofungicide agent *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* WG6-14 as probiotics in chicken layer rearing - Liang Ying-Ju, Huang, Wen-De and Tzeng Dean Der-Syh (Department of Plant Pathololgy, National Chung Hsing University)

Bacillus subtilis var. amyloliquefaciens WG6-14, a Taiwan-native endospore forming strain obtained from guava rhizosphere, was shown to be plant growth promoting bacterium with great antagonistic effectiveness against wide spectrum of important phytopathogenic fungi and bacteria. The development of its biofungicide application was successful, and the commercialized use in plant disease control is now in progress. As B. subtilis has been widely applied as direct-fed microbial (DFM) known with beneficial bioregulator function in animal science, the possible use of B. subtilis WG6-14 as probiotic in chicken layer rearing was explored. Both liquid and powder formulations of the tester strain (contains approximately 10¹⁰ endospores per ml/gm) produced by a fermentation pilot plant located at the university campus were used for the conducted tests. The tester DFM was applied as supplements together with either the chicken feeds or water supply at final concentration approximately 10⁸ endospores per ml/gm. A total of 750 heads of chicken layers at 50 wks old were used for the tests. The fermentor produced broth culture of WG6-14 was administered to drinking water for 600 heads, the rest 150 heads without WG6-14 supplementation in drinking water were used as compared control. The daily egg yield and quality were monitored on a weekly basis. Results obtained 2 months after treatment indicated a substantial decrease among WG6-14 treated layers the cholesterol content of egg yolks by approximately 17% as compared to the non-treated control. A paralleled analysis by dilution plate count the micro flora within the drinking water and the layer litters indicated the presence of WG6-14 as the predominant microbe in drinking water among the treated groups, the presence of contaminant microbes appeared to be nondetectable. In contrast to this, that among the non-treated group contained various kinds of contaminant microorganisms. Also worth noting was that a qualitative examination by use of selective media revealed the layer

litters from the control group consisted of bountiful amount of coliform bacteria and quite substantial amount of Salmonella species. Whereas the layer litter collected from WG6-14 treated group contains approximately 10⁴ cfu/gfw of WG6-14, no Salmonella and a very much reduced numbers of coli-form bacteria. The improved intestinal microflora appeared to have certain connection to an enhanced stress resistance; the daily egg yield reduction of the treated layers was less than 10%comparing to 20-30% of the non-treated control when a bird-flu hit the herd on the 6th week. It was also noted during the experiment the in situ ammonium content of litter piles was reduced by half or even by 2/3 comparing to that from the non-treated controls. In Taiwan, the total amounts of layers reached 23 million heads in 2006, the accompanied daily production of about 74 thousand tons chicken litters have posed great threat to our environmental safety. As WG6-14 has been shown to be antifungal, the functioning of the layer litters as disease fighting agent seems to be apparent. Although the diseasecontrol effectiveness await to be explored, the observed beneficial effect of WG6-14 indicated its usefulness as a chicken layer probiotic to reduce also the potential threat of layer litter pollution.

B-05 Application of fluorescence nanoprobe for detection of plant quarantine pathogens - Yao, K. S¹., Li, S. J.¹, and Tzeng, K. C.² (¹ Department of Life Science, MingDao University, Changhua, Taiwan; ² Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan)

Silica nanoparticles were prepared using the water-inoil (w/o) micro-emulsion technique. Observations showed that the size of the silica nano-particles was 44.5 ± 4.7 nm and the shape was circular. The organic dye, tris-2, 2' bipyridyl dichlororuthenium (II) hexahydrate (Rubpy) could efficiently uptake the silica nanoparticles. The result showed that the fluorescence of Rubpy-doped silica nanoparticles was photostable using the collisional quenching fluorescence test and photostability analysis. The Rubpy-doped silica nano-particles modified by chemical process were conjugated with rabbit anti-*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesiticola* XVT 40 IgG antibodies. Fluorescence nanoprobes were then applied rapidly in the detection antigens of *X. axonopodis* pv. *vesiticola* XVT 40 using fluorescence-linked immunosorbent assay and fluorescence microscope immunoassay. These results demonstrated that the fluorescence silica nanoprobe biomarker will have potential for diagnosis applications on plant diseases.

B-06 應用 SYBR Green real-time PCR 技術檢測瓜類 細菌性果斑病菌 - 宋秉峰¹、呂昀陞^{1,2}、朱家慶¹、徐世 典¹、曾國欽¹ (¹國立中興大學植物病理學系;²行政院 農委會農業試驗所植物病理組) Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* by SYBR Green real-time PCR -Sung, Ping-Feng¹; Leu, Yun-Sheng^{1,2}; Chu, Chia-Ching¹; Hsu, Shih-Tien¹; Tzeng, Kuo-Ching¹ (¹ Department of Plant pathology, National Chung-Hsing University; ² Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.)

瓜類細菌性果斑病菌 (Acidovorax avenae subsp. citrulli, Aac) 為國際重要之檢疫病原細菌,可感染西 瓜、甜瓜與苦瓜等葫蘆科作物,此病菌可藉由種子傳 播,開發快速之種子檢測技術為防範此病菌傳播之重

要工具。本研究利用 random amplified polymorphic DNA (RAPD) 技術篩選出對 Aac 具專一性之核酸片段 D11-300,分析此片段之核苷酸序列進行專一性引子對 之設計,獲得引子對 SL1/SR1,此組引子對僅可對果 斑病菌產生 194 bp 之專一性 DNA 片段,對其他供試 菌株則無法增幅出此片段,其靈敏度可達 100 pg 或 1.25×10² cfu。進一步利用此組引子對進行 SYBR Green real-time PCR 分析,測試之結果顯示,應用此技 術可專一性檢測出瓜類細菌性果斑病菌,所測得之 Tm 値約為 77.9°C;此一技術可將檢測之靈敏度提升至1 pg 或 1.45 cfu。此外應用此技術進行瓜類帶菌種子之檢 測,亦可成功檢測出瓜類細菌性果斑病菌之螢光訊 號,且 PCR 檢測流程僅需 2 小時。此快速檢測技術可 提供防檢疫人員使用,以加強我國檢測瓜類細菌性果 斑病菌之能力。

B-07 台灣木瓜黑腐病菌之鑑定與偵測 - 楊雯馨¹、呂 昀陞^{1,2}、曾國欽¹、鄧文玲¹、徐世典¹ (¹ 臺中市國立中 興大學植物病理學系;² 行政院農委會農業試驗所植物 病理組 Identification and detection of *Erwinia* sp. infecting papaya in Taiwan - Yang, W. S.¹, Leu, Y. S.^{1,2}, Tzeng, K. C.¹, Deng, W. L.¹ and Hsu, S. T.¹ (¹ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung; ² Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.)

台灣中南部地區自民國 94 年起發生嚴重之木瓜黑 腐病,該病之罹病植株出現葉片水浸狀斑點,葉柄下 垂,植株心部壞死等病徵。前期之研究顯示木瓜黑腐 病主要係由 Erwinia sp. 所引起。本研究進一步利用 PCR 技術增幅此病原菌之 16S rDNA 與 intergenic transcribed spacer (ITS) 序列,分析結果顯示台灣木瓜 黑腐病菌之 16S rDNA 序列與 Pectobacterium cypripedii 相似度為 96.8%, 但與國外之木瓜病原菌 Erwinia papaya 之相似度則為 97.9%,此外在 ITS 序列比對之 資料中亦顯示,此病原菌與P. cypripedii 之相似度僅為 78.6%,因此台灣木瓜黑腐病原細菌與國外之 E. papaya 較為相近。此外本研究利用 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 技術篩選出對木瓜黑腐病 菌具專一性之核酸片段 C5-950。分析此 DNA 片段之 核?酸序列進行專一性引子對之設計,獲得引子對 C5-1R/C5-1L,以此引子對測試台灣各地所分離出之木瓜 黑腐病菌皆能增幅出 300 bp 之 DNA 專一性片段,而 對非標的細菌則無法增幅出此片段,其靈敏度為10 pg,此結果顯示引子對 C5-1R/C5-1L 可應用於台灣木 瓜黑腐病菌之檢測。

B-08 Control of Bacterial Disease by Transfer of Bacterial harpin Gene into Plants Yi-Chiao Huang¹, Cheng-Hsien Kuo², Wen-Ling Deng¹ and Hsiou-Chen Huang² (¹ Department of Plant Pathology and ² Graduate Institute of Biotechnology, National Chung Hsing University, Taichung 40224, Taiwan)

The ability of Pseudomonas syringae (Ps) strains to elicit the the hypersensitive response (HR) or to be pathogenic on their host plants is controlled by hrp (hypersensitive response and pathogenicity)/hrc (hypersensitive response and conserved) genes. The hrp/hrc gene cluster coding Type III secretion system (T3SS) complex at the center of pathogenicity island (Pai) is conserved in Ps strains. The hrp-encoded T3SS is required for the translocation of effectors and the effectors appear to trigger a network of signaling pathways that the defense responses of plants. We focused on the identification of harpin (HrpZ) from the phytopathogen *P. syringae* pv. *averrhoi* HL1 (Pav) isolated from carambola (star fruit plant) and application of harpin to enhance the disease resistance in tomato by using transgenic plants. We created transgenic tomato and petunia plants in which the constitutive promoter CaMV 35S and pathogen-inducible promoter hsr515 (hypersensitive response-related gene) control the expression of the hrpZ gene, furthermore, the signal peptide PR1-b at the N-terminus of the hrpZ gene was constructed for controlling the secretion of HrpZ protein into apoplast. The DNA insertion and expression of transgenic lines were confirmed by PCR and RT-PCR. The transgenic tomato exhibited high levels of resistance to bacterial spot disease, but the extended flower longevity was just shown in transgenic plants transformed with 35Sderived hrpZ or 35S-derived hrpZ with PR1b signal peptide constructs in transgenic petunia. In future, it is necessary to further investigate the mechanism by which harpin protein can enhance resistance and extend flower longevity.

B-09 台灣水稻新病害 - 細菌性條斑病 - 陳純葳、許秀 惠、謝麗娟、張義璋 (行政院農委會農業試驗所植物病 理組) Bacterial leaf streak of rice - a new disease in Taiwan - Chen, C. W., Hseu, S. H., Hsieh, L. J. and Chang, Y. C. (Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, COA)

台灣稻作病害依記載已有75種病原,其中稻熱病 和白葉枯病為兩大流行病害。2007 年二期作期間 (8月 中、下旬),分別於南投縣草屯鎭早熟糯稻田區和雲林 縣二崙鄉台南 11 號田區,首次發現有葉部條斑狀病徵 嚴重發生,發病稻株於葉面上出現暗綠色和黃褐色條 斑狀病徵,對光觀看呈半透明狀,嚴重時病斑融合壞 疽呈乾枯狀,病班上常附著許多細小球狀之黃色菌泥 (ooze)。隨後陸續在台中、彰化、雲林、嘉義、台南等 地區亦發現相同的病徵。採集各地區罹病組織、挑取 各病斑上的菌泥,及剪取經表面消毒之罹病葉片,放 於 Wakimoto's medium agar (WMA) 平板培養基上,置 25℃ 室溫下 7 天後,分離出疑似白葉枯病菌之黃色細 菌,待純化培養3次後,共得69個菌株。經過16S rDNA 定序比對,結果顯示此細菌與 Xanthomonas oryzae pv. oryzae 相似度高達 97% 以上。選取不同地區 採集之6個菌株為供試菌株,與1個白葉枯病菌菌株做 對照,分別以 WMA 固體斜面試管培養基和 WM 液體 培養基震盪培養,3天後再各以毛筆塗抹接種法和噴霧 接種法,將細菌接種於株齡21 天之8 個供試水稻品種 葉面上,以測試其病原性。結果顯示使用此兩種接種

法,6 個供試菌株在8 個供試水稻品種上皆造成條斑狀 病徵,且明顯與白葉枯病菌造成的典型葉枯型病徵不 同,而與國外報導由不同病原型*X. oryzae* pv. *oryzicola* 引起之細菌性條斑病 (Bacterial leaf streak) 的病徵相 似。再採集病斑做組織分離,又得與接種時相同之細 菌菌株,故推測此新發現之病害為細菌性條斑病,但 有關病原型之確認,實有待進一步的生理生化試驗來 釐清。

N-01 根瘤線蟲生長與溫度之關係 - 蔡佳芳,陳珮 臻,蔡東纂 (國立中興大學植物病理學系) The relation between the growth of root-nematode and temperature -Tsay, J. F., Chen, P. J., and Tsay, T. T. (Dept. of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung)

根瘤線蟲普遍存於世界各地,其危害使作物大幅 减產,全球所使用之殺線蟲劑中 50% 是為了防治此線 蟲。化學防治方法雖有良好成效卻造成環境污染、生 態破壞等問題。以溫水處理來進行植物繁殖體之檢防 疫處理已行之有年,許多報告指出它可以有效降低土 壤、空氣及種子傳播性之病原,同時可減少化學污 染。本實驗探討不同溫度之溫水處理對 Meloidogyne incognita、M. javanica、M. hapla 及其寄主之生長影 響。分為接種線蟲後立即放入溫水浴處理及接種後15 天處理二種試驗。Mi、Mi 接種於空心菜上的處理溫度 為 10、15、25、30、35、40℃, Mh 接種於蕃茄上, 置於10、20、30、40℃。接種45天後測量寄主根瘤指 數、土中蟲數、及線蟲卵孵化率。Mi、Mj 之生長在各 處理中無顯著差異,但在15℃以下及40℃以上無法 生長,而 Mh 在 10℃ 下生長顯著較 Mi、Mj 好,但在 30°C 則較*Mi、Mj* 差,顯示 *Mh* 比*Mi、Mj* 更耐低溫。 接種後 15 天處理的試驗中, Mi 在 15℃下, 及 Mj 30 ℃, Mh 10、30°C 的根瘤指數高於接種後立刻處理的試 驗,顯示以非最適生長溫度處理會影響線蟲侵入寄主 的能力。孵化率在接種後立即處理的試驗中,Mi 的 15、30、35℃;及 Mj 35℃的處理高於接種 15 天後處 理的試驗,顯示經溫度逆境篩選後的線蟲,成功侵染 寄主後則有較佳生長力。

N-02 線蟲作為河川污染生物指標之模式建立-吳秀 珍,陳珮臻,蔡東纂 (國立中興大學植物病理學系) Establishing model of nematodes as bioindicators for river pollution- Wu, H. C., Chen, P. J., and Tsay, T. T. (Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung)

由於人類的生活和河川環境息息相關,因此必須 要有適當的監測方法來管理河川環境確保其生態平 衡;本研究在建立線蟲作為河川污染生物指標之模 式。北港溪流域全河段包含未受污染、輕度、中度及 嚴重污染區域,在此流域的調查中,共採樣 6995 隻線 蟲分屬於 18 個科、30 個屬、5 種 c-p 值以及 7 種食 性。水體及底質樣本中分別以c-p2的 Aphelenchoididae 及 c-p1 的 Monhysteridae 出現頻率最高,優勢屬分別是 取食真菌的 Aphelenchoides 及取食細菌與基質的 Eumonhystera。將底質線蟲族群的 MI 值與環境資料的 RPI 值做比較,發現 RPI 值越高污染越嚴重的情況下 其 MI 值就越低。而中上游及下游近出海口之嚴重污染 河段分別以 c-p1 的 Monhysteridae 及 c-p2 的 Xyalidae 為顯著族群。以 PRIMER v6 進行分析,發現線蟲科及 屬群聚皆有明顯的測站間差異,且每一測站的線蟲種 類、數量、MI 值及食性和環境因子皆有明顯的相關 性,由此結果證實線蟲種類可反映河川污染情形。線 蟲做爲河川污染生物指標之模式建立已於本研究初步 完成,配合線蟲群聚並無季節性的優勢,日後採集無 須擔心季節問題,此模式可供日後全年河川環境監 測、河川棲地復育及相關研究使用。

N-03 農藥對植物寄生性線蟲的毒殺能力 - 葉耀仁、 蔡東纂、陳珮臻(國立中興大學植物病理系) Nematicidal Activity of Pesticides on Plant Parasitic Nematodes - Yhe, Yao-Jen, Tsay, Tung-Tsuan and Chen, Peichen (Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University)

本 實 驗 選 用 南 方 根 瘤 線 蟲 (Meloidogyne incognita)、南方根腐線蟲 (Pratylenchus coffeae)、腎形 線蟲 (Rotylenchulus reniformis) 與一種腐生性線蟲 Rhabditis sp.,四種不同寄生習性之線蟲來進行藥劑試 驗。供試藥劑選用 13 種殺菌劑,6 種殺蟲劑和 7 種除 草劑,其化學分類類型皆不相同。結果顯示,所有供 試殺菌劑與殺蟲劑皆可毒殺線蟲(各線蟲致死率範圍為 17.4%~100%)。依得利致死率為 68.4%~100%, 佈飛松 91.1%~100%,和阿巴汀達100%的毒殺效果最顯著。 七種除草劑中僅5種具毒殺線蟲的效果(各線蟲致死率 範圍為 9.5%~100%),其中以施得圃可毒殺所有供試線 蟲,致死率達100%。比較不同寄生習性的線蟲,根腐 線蟲與腎形線蟲在各藥劑處理後,致死率結果相近, 顯示其對不同類型藥劑之感受性相似。而較多種類藥 劑對南方根瘤線蟲有較顯著的毒殺作用,如:快得 寧, 2,4-D 和培丹處理後致死率分別達 57%, 93.8% 和

100%。腐生性線蟲 Rhabditis sp.經腐絕, 嘉磷塞異丙胺 鹽處理後致死率達 100%, 巴拉刈的處理致死率 87.6%, 死亡率較其它三種線蟲高。比較結果可看出不 同寄生習性之線蟲對於藥劑感受性並不相同。

V-01 Identification and characterization of a mechanically transmissible *Tomato leaf curl New Delhi virus* infecting oriental melon - Chien, Rui-Che¹, Tsai, Wen-Shi1², Green, Sylvia K.² and Jan, Fuh-Jyh¹ (¹ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung 402; ² AVRDC-The World Vegetable Center, Shanhua, Tainan 741, Taiwan)

Mosaic, leaf curl, and puckering symptoms were observed in Cucumis melo L. var. Silver Light plants in the field during 2007 spring season. Three samples were collected from symptomatic plants. A virus culture SL-1 was isolated and established in the systemic hosts, Nicotiana benthamiana and C. melo plants via mechanical inoculation. Viral DNA was extracted from diseased oriental melon plants with leaf curl from field and polymerase chain reaction (PCR) with reported described primers was used to detect the presence of begomoviral DNA-A, DNA-B, and associated satellite DNA. Begomoviral DNA-A was detected in all three diseased samples. The PCR-amplified 1.5 kb viral DNA-A from one positive sample was cloned and sequenced. Base on the assembled sequence, specific primers were designed for cloning the full-length DNA-A of the isolate SL-1, which was determined as 2739 nucleotides (nt) in length. The DNA-A contained the conserved nanonucleotides-TAATATTAC and eight open reading frames, including three in virus sense (AV1 to AV3) and five in virus complementary sense (AC1 to AC5). The full-length DNA-B was also cloned and sequenced and found to be 2673 nt. The DNA-B contained two open reading frames, including the nuclear shuttle protein in virus sense and the moving protein in the virus complementary sense. BLASTn analysis and sequence comparison with those available in the GenBank showed that isolate SL-1 has highest nucleotide identity of 97% and 93%, respectively, with the DNA-A and DNA-B of Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) from Thailand. Our results indicate that the virus causing leaf curl disease on oriental melon is an isolate of ToLCNDV and designated as ToLCNDV-OM (ToLCNDV- oriental melon isolate). In addition, 38 plants species from 4 families were mechanically inoculated with ToLCNDV-OM for host reaction assay. Systemic symptoms were observed on plants of *C. melo*, *C. sativus*, *Luffa aegyptiaca*, *Cucurbita pepo*, *Lagenaria siceraria*, *N. benthamiana*, and *Lycopersicum esculentum*. To our knowledge, this is the first report of ToLCNDV causing a severe disease on oriental melon plants and can be transmitted through mechanical inoculation.

V-02 Molecular diversity and agroinfection of tomatoinfecting begomoviruses in Taiwan - Tsai, Wen-Shi^{1, 2}, Shih, Su-Ling¹, Green, Sylvia K.¹ and Jan, Fuh-Jyh² (¹ AVRDC - The World Vegetable Center, Shanhua, Tainan 741; ² Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan)

Nine begomoviral DNA-A were isolated from tomato yellow leaf curl-diseased samples collected throughout Taiwan from 1997 to 2000. They ranged from 2737 to 2741 nucleotides in length. DNA-B was not detected. Viral DNA-As of eight of the isolates shared >92.7% nucleotide identities and had highest nucleotide identity (83.3%) with Tomato yellow leaf curl Guangdong virus (isolate G3). Based on the ICTV criteria for begomovirus species classification, including DNA-A nucleotide identity of <89%, these seven virus isolates belong to a distinct begomovirus species, namely Tomato leaf curl Taiwan virus (ToLCTWV). The other isolate, CT1, had highest nucleotide identity (74.9%) with Tomato leaf curl Malaysia virus and is another distinct begomovirus, named "Tomato leaf curl Hsinchu virus (ToLCHsV)" sharing 72.4 to 74.1% nucleotide identity with the ToLCTWV isolates. In 2003 an island-wide survey was conducted to determine distrubtion of these two viruses in Taiwan. A total of 138 symptomatic tomato samples were collected, including 28 from Ilan, 5 from Hsinchu, 9 from Nantou, 9 from Changhwa, 12 from Chiavi, 30 from Tainan, 10 from Kaohsiung, 11 from Pingtung, 12 from Taitung and 12 from Hualien counties. All symptomatic samples were found to contain geminiviral DNAs using PCR with the degenerate begomovirus specific primers- PAL1v1978B and PAR1c715H. A positive PCR reaction with the ToLCTWV-specific primer pair KD981231-PAV1/PAC1

was obtained with 137 samples. None of the samples reacted with the ToLCHsV specific primer pair - CT1-PAV2/PAC2. The DNA-A of the begomovirus-positive, but ToLCTWV and ToLCHsV negative isolate HS7 was found to have 2756 nucleotides. It is considered a strain of Ageratum yellow vein Hualien virus (AYVHuV), based on its highest nucleotide identity of 91.3% with the AYVHuV-[Hu4]. It was found to be a recombinant, having 92.8% nucleotide identity with ToLCTWV-[GT6] in its 2119-2725nt region and 98.4% nucleotide identity with AYVHuV-[Hu4] in the remaining nucleotide region. DNA-B was not detected in any of the isolates. The pathogencity of ToLCTWV was confirmed using DNA-A agroinfection with two isolates, FD (Tainan) and GT6 (Hualien). Typical yellow leaf curl symptoms were induced on Lycopersicon esculentum TK70. Following agroinfection, the virus could then be transmitted by Bemisia tabaci to tomato plants inducing the typical symptoms. These results indicate that the predominant begomovirus on tomato in Taiwan, as of 2003, is the monopartite ToLCTWV.

V-03 The identification of satellite molecule, DNA beta in begomovirus infected tomato plants - Chen, Chun-Yu¹, Shih, Cheng-Wu¹, Tseng, Min-Hua1, Peng, Jui-Chu², Yu, Tsong-Ann¹, and Chiang, Chu-Hui¹ (¹ Department of Molecular Biotechnology, Da-Yeh University, Changhua, Taiwan, R.O.C.; ²Tainan District Agriculture Improvement Station, COA.,Tainan)

Four satellite DNA isolates were identified in association with the begomovirus from tomato plants collected from Tainan and Changhua. Clones of the DNA beta molecules were obtained by PCR using the primers derived from the conserved region found both in Tomato leaf curl virus satellite DNA (TLCV-sat) and Tomato yellow leaf curl virus satellite DNA (TYLCV-sat). The full length of the circular satellite isolates contained nucleotides of 1170 to 1348. Analysis of the sequences revealed that these DNAs were belonging to TLCV-sat. A single open reading frame that encodes a putative C1 protein consisting of 118 amino acids was observed. An adenine-rich region and a highly satellite conserved region contains a potential hairpin structure with the loop sequence of TAATATTACCG was exist in the four TLCVsat isolates. Comparison of the full length sequence of the four TLCV-sat DNA isolates with other begomovirus satellite DNA from NCBI showed that they share high nucleotide identity to the China isolates with about 96%. Such high nucleotide identity was also observed when compared to *Ageratum yellow vein virus* satellite DNA. The evolutionary relationships of the four TLCV-sat with other TLCV-sat and TYLCV-sat DNA were further analyzed by phylogenetic tree. It is apparent that the four TLCV-sat isolates are in the same genotype that including China and other Taiwan isolates and the distance relationships were close to the Japan and Indonesia isolates. However, they are quite different from the isolates from other Asian countries.

V-04 台灣地區感染瓜類新病毒之鑑定及分子特性分析 - 鄭櫻慧、朱子逸、王如玉、陳金枝、張清安 (行政 院農委會農業試驗所植物病理組) Identification and molecular characterization of a new cucurbit-infecting tobamovirus in Taiwan-Cheng, Y. H., Chu T. Y., Wang, Z. Y., Chen, C. C. and Chang, C. A. (Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, Taiwan)

從彰化二崙地區採集到表現疑似嵌紋病徵的西 瓜,利用台灣常見包含 Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) 在內的病毒抗血清偵測均無反應,但 從病組織內可觀察到疑似 tobamovirus 的桿狀病毒粒 子。病毒經過三次單斑分離後仍可回接西瓜及矮南 瓜,此病毒分離株暫稱為WT2。以接種矮南瓜為材料 進行病毒純化所得之病毒顆粒作爲製備抗血清及抽取 病毒 RNA 進行分子分析的材料。純化病毒免疫白兔得 到的抗血清進行 ELISA 偵測時與病毒本身有強烈反 應,但不與 CGMMV、Tobacco mosaic virus (TMV) 這 兩個在台灣普遍存在的 tobamovirus 反應。利用此抗血 清進行田間調查時,在西瓜、甜瓜、冬瓜和扁蒲上都 偵測到此病毒存在。選殖及定序病毒基因體時首先利 用在病毒 RNA 的 3' 端接續 poly (A) 尾端,之後再利用 poly (T) 與簡併式引子 WT23 (5' - AA (A/G) TTTTT (T/C) TTTTATACTAG-3') 為引子進行反轉錄聚合酶連 銷反應,增幅區域經選殖及定序分析,共包含 2152 nucleotides,包含 partical replicase、movement protein (MP)、coat protein (CP) gene 利司' untranslated region (3' UTR)。與基因庫中資料比對結果,WT2與Cucumber mottle virus (CMoV) (AB261167) 相同度最高,在 MPgene 達 88%、CP gene 達 87%、3' UTR 達 82%。根 據以上結果,WT2 可能為CMoV 的一個分離株或是一

新的tobamovirus。

V-05 台灣地區感染茄科作物之番椒葉脈斑駁病毒之 分離與鑑定 - 鄭櫻慧、蔡筱婷、陳淑貞、陳金枝、張清 安(行政院農委會農業試驗所植物病理組) Isolation and identification of *Pepper veinal mottle virus* on solanaceous crops in Taiwan - Cheng, Y. H., Tsai, S. T., Chen, S. J., Chen, C. C. and Chang, C. A. (Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, Taiwan)

自 2004 年起採集自嘉義、南投和彰化等縣的番 茄、甜椒和辣椒等茄科作物疑似病毒感染樣本,這些 樣本利用 ELISA 檢測時與分離自番椒嵌紋病毒(Pepper veinal mottle virus, PVMV) 的抗血清呈正反應。感病材 料的汁液接種於紅藜 (Chenopodium amaranticolor) 葉 片,在接種葉出現局部病斑,經過三次單斑分離後可 再接種回番茄、甜椒及辣椒。和辣椒葉脈斑駁病毒 (Chilli veinal mottle virus, ChiVMV) 不同, PVMV 之番 茄、甜椒及辣椒三分離株雖可感染甜椒及辣椒但幾乎 不造成病徵; 接種番茄時, 甜椒及辣椒分離株雖可感 染植株但不引起病徵,番茄分離株則引起葉片壞疽等 病徵,其病毒濃度亦高於甜椒和辣椒分離株,ChiVMV 則無法感染番茄。利用 potyvirus 的簡併式引子 (HRP5/dT) 進行反轉錄聚合酵素連鎖反應以增幅其 3' 端基因體並進行選殖及定序分析,所得之 1.5 Kb 核酸 序列含一1162-nt 的包含 NIb 和鞘蛋白基因的轉譯架構 (open reading frame) 及 393-nt 的非轉譯區 (non-coding region)。根據其核酸序列推測的鞘蛋白分子量為 30.9 kDa,此大小與 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析純化病毒 的鞘蛋白分子量相似。三分離株在鞘蛋白基因有98% 以上的相同度,在3'非轉譯區的相同度達到99%以 上。與登錄於 GenBank 之核苷酸序列比對結果發現, 所分離之病毒與 Pepper veinal mottle virus 的鞘蛋白基 因 (AB126177) 具有 98% 的相同度。核苷酸序列分析 的結果顯示三分離株對番茄病原性不同應與鞘蛋白無 關。

V-06 2007 年初台南地區洋香瓜病毒病害嚴重發生原 因之探討 - 彭瑞菊¹、鄭安秀¹、葉錫東² (¹行政院農委 會台南區農業改良場、²國立中興大學植物病理系) Discussion of the seriously melon virus disease occurred in Tainan at 2007 - Peng, J. C.¹, Chang, A. S.¹, Yeh, S. D.² (¹Tainan District Agriculture Improvement Station, Tainan, COA; ²Dept. of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung)

台南場轄區 (雲嘉南) 為瓜類主要的栽培區之一, 2006 年洋香瓜栽培面積達 3,747 公頃,佔台灣地區栽 培面積的 77.9%。瓜類病毒病害在台灣造成危害有十 種,常見的主要有:胡瓜嵌紋病毒 (Cucumber mosaic virus, CMV)、木瓜輪點病毒-西瓜系統 (Papaya ringspot virus-watermelon strain, PRSV-W)、矮南瓜黃化嵌紋病 毒 (Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)、西瓜銀斑病 毒 (Watermelon silver mottle virus, WSMoV)、胡瓜黃斑 病毒 (Melon yellow spot virus, MYSV) 及胡瓜綠斑嵌紋 病毒 (Cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV)。 六種病毒均可經由媒介昆蟲及機械傳播;除西瓜銀斑 病毒及胡瓜黃斑病毒由薊馬傳播外,其他四種病毒可 經由蚜蟲傳播,另外胡瓜綠斑嵌紋病毒尙可經由種子 帶毒傳播。瓜類病毒在不同作物的發生各有差異,複 合感染極為普遍且嚴重,植株迅速死亡,無藥劑可 治,致使栽培者血本無歸。2006 年底至 2007 年初調查 轄區內洋香瓜栽培園區,除了東山鄉以外,其他鄉鎭 包括台南市安南區;台南縣佳里鎭、七股鄉、西港 鄉、北門鄉、柳營鄉、將軍鄉罹病毒比率均非常高, 達 81~100%,上述幾種病毒均有檢測到,尤其是西瓜 銀斑病毒,所有有翹尾病徵的植株,均可檢測到。洋 香瓜病毒病害發生嚴重目幼苗即罹病,經種子檢測推 究其原因可能為發芽率偏低 (69.3%)、畸型株率偏高 (16.1%),且畸型株生長勢弱,田間若有病株加上媒介 昆蟲極易感病。又因暖冬,少降雨,田間昆蟲(蚜蟲及 薊馬) 族群密度高,傳播比率升高,且農民摘心整蔓 時,手或機械操作時接觸汁液藉著人為及機械傳播, 導致洋香瓜田剛開始病毒罹病比例不高,但是整蔓後 一星期,常常可見罹病比例超過5成以上,病毒的寄 主範圍均相當廣泛,洋香瓜田邊雜草或是其他瓜類(絲 瓜、南瓜、冬瓜…)易感染病毒可能為二次感染源。另 外廢園後,將病株殘體棄置於田區內或周圍,或者鄰 區的病株都可成為病毒的來源,也都是導致秋作洋香 瓜病毒病害發生嚴重的主因,針對病毒病害發生嚴 重、為避免農民一再重種沒有收成、感染源一直留存 田間,讓病毒病害更加擴大,建請農民進行洋香瓜病 毒病清園,大面積的徹底清園,才能消除病毒感染 源,防止病毒病害持續擴散。台南市清園面積為 146.52 公頃、台南縣為 440.60 公頃。總面積超過五百 公頃,農委會動用巨額農損基金補償農戶損失。植物 病毒病害的防治首重在預防的工作,希望藉由減少蟲 媒的發生及接觸性的傳播來降低病毒的蔓延,2007年 底秋作洋香瓜至12月中病毒病害的發生在15%以下。

Carlavirus 屬病毒之特性 - 邱慧琪¹、陳滄海¹、張清安 ² (¹國立屛東科技大學植物保護系、² 行政院農委會 農 業試驗所 植物病理組) The occurrence of common mulberry (*Broussonetia papeyrifera* (L.) L' Herit. ex Vent.) mosaic disease and characterization of a carlavirus isolated from mosaic common mulberry in Taiwan - Chiu, H. C.¹, Chen, T. H.¹ and Chang, C. A.² (¹ Department of Plant Protection, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan ; Division of Plant Pathology, Agricultural Research Institue, Wufeng, Taichung, Taiwan)

構樹 (Broussonetia papeyrifera (L.) L' Herit. ex Vent.) 落葉性喬木或灌木,葉可供作豬、牛、羊、鹿的 飼料,樹皮可造紙,由於其耐煙塵,可作為工廠和礦 山區的綠化用樹,亦常為平地或低海拔區域的先驅植 物,目前台灣地區並無經濟栽培,皆為道路旁綠化或 荒地之先趨植物,故分佈零散。2003年於屛東地區發 現構樹葉片呈現嚴重黃綠嵌紋病徵,田間病害發生率 為 41%。經週年觀察,發現田間病徵隨季節變化,有 嚴重至輕微甚至消失之現象。田間病葉經由奎藜 (Chenopodium quinoa) 做單斑分離,可分離出一種絲狀 病毒,病毒粒子大小約為600-650nm。病毒熱不活化 溫度為 70℃; 耐稀釋度為 104; 室溫 (24℃) 下活性可 維持 3-4 天。機械接種 16 科 64 種供試植物,僅藜科的 奎藜、紅藜、綠藜及豆科之豇豆等4 種植物可被感 染,葉部呈現黃色局部斑點病徵。新鮮奎藜病葉,經 高低速交替離心及硫酸銫密度梯度離心,每100g 可獲 得純化病毒收量約為1.86 mg。經電泳分析估算病毒鞘 蛋白分子量約為 36 kDa。白兔經免疫注射,可製備出 力價 1024 之抗血清。瓊脂擴散反應發現不會與同屬 carlavirus 之 Lily symptomless virus (LSV) 及 Lycoris virus T (LVT) 發生沉澱反應。以針對 carlavirus 屬病毒 之廣效性引子對進行 RT-PCR,構樹嵌紋病葉及奎藜病 葉皆可增幅出約224 bp 核酸產物,經與GenBank 中已 知的 carlaviruses 序列比對後,發現其僅與 Daphne virus S 及 Twisted-stalk leaf streak virus (TsLSV) 之核苷 酸序列相同度 (percent identity) 最高達 78%。由以上資 料比對結果顯示,本研究之構樹病毒分離株可能為文 獻所未曾記載之一新種 carlavirus,建議暫時先將其命 名為構樹嵌紋病毒(Common mulberry mosaic virus)。

V-08 利用細菌表現蛋白製備鑑別番椒葉脈斑駁病毒 和辣椒葉脈斑駁病毒專一性抗血清-鄭櫻慧、江佳典、 蘇佑縈、陳金枝、張清安(行政院農委會農業試驗所植 物病理組) Preparation of two specific antisera of pepper veinal mottle virus and chilli veinal mottle virus with bacterial expression proteins - Cheng, Y. H., Chiang, C. D., Shu, U. I., Chen, C. C. and Chang, C. A. (Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, Taiwa)

番椒嵌紋病毒 (Pepper veinal mottle virus, PVMV) 和辣椒葉脈斑駁病毒 (Chilli veinal mottle virus, ChiVMV) 同為感染茄科番椒屬作物的 potyvirus, 二者 寄主範圍略有不同,但有抗血清相關性,即利用純化 病毒製備的多元抗體無法區分此二病毒。因此二病毒 的 3' 端非轉譯區差異很大,利用此區域設計專一性引 子進行多重反轉錄聚合酶連鎖反應 (multiplex reverse transcriptase - polymerase chain reaction, multiplex RT-PCR),利用增幅產物分子量大小不同,可以區分此二 病毒。multiplex RT-PCR 雖可準確區分此二病毒,但不 適用樣本數量大的田間偵測,因此嘗試製備專一性抗 體。分析 ChiVMV 與 PVMV 鞘蛋白的胺基酸序列,因 二者鞘蛋白的C端及中間區域相似度高達 88.6%,但在 N端差異較大,因此利用差異大的N端胜肽,ChiVMV 利用鞘蛋白 N 端 39 個胺基酸 (4.3kDa), PVMV 鞘蛋白 N 端 25 個胺基酸 (2.8 kDa) 後接綠色螢光蛋白 (28.2 kDa),使成複合蛋白加大分子量加強免疫反應,再以 pET-28b (+) 爲表現載體,轉型於 E. coli Rosetta 並經 IPTG 誘導後產生一 32.5 kDa 與 31.0 kDa 之複合表現蛋 白。將此二複合蛋白大量表現及純化後分別進行白兔 免疫注射,獲得兩株抗血清,稱為 aCPR 與 aPPR。將 aCPR 及 aPPR 分別進行西方漬墨法,分析材料包含 ChiVMV、PVMV感染的菸草及甜椒和健康植株、兩種 抗血清皆與自身感染之植株反應而不與另一病毒感染 的植株反應。用在檢測田間採集樣本時,也可正確區 分樣本為 ChiVMV 或 PVMV 感染。

V-09 Bidens mottle virus 感染萵苣之鑑定及病毒全長 度基因體之定序分析 - 陳金枝、黃春惠、廖吉彥、鄧汀 欽、陳麗雯、鄭櫻慧、張清安 (行政院農業委員會農業 試驗所 植物病理組) Identification of Bidens mottle virus infecting lettuce and analysis of its full-length genomic sequence - Chen, C. C., Huang, C. H., Liao, J. Y., Deng, T. C., Chen, L. W., Cheng, Y. H., and Chang, C. A. (¹ Division of Plant Pathology, Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan)

本研究由霧峰地區所栽培之萵苣上發現部分植株 葉片呈現黃斑嵌紋病徵,經接種於奎藜 (Chenopodium

quinoa Willd.) 後分離單斑得到一個病毒分離株 WF1。 WF1 抗原與 potyvirus 專一性單株抗體在 ELISA 及西 方轉漬法檢測下呈現明顯正反應。利用 potyvirus 簡併 式引子對(HRP5/dT)與WF1 分離株之核酸進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT polymerase-chain reaction, RT-PCR),可得到一預期之 1.3 kb 片段。該產物經選殖及 定序後,其鞘蛋白氨基酸序列與 Sunflower chlorotic spot virus (SuCSV, AF538686)相同度高達 99.3%, 而 與美國佛羅里達大學所發表的 Bidens mottle virus (BiMoV, EF467235) 之 NIb 206 個氨基酸序列相同度亦 高達 98%。有鑑於此,本研究乃向美國 ATCC 購得佛 羅里達大學所發表及保存之 BiMoV-UF 病毒分離株作 爲對照比對材料。另外將 WF1 分離株接種於菸草進行 病毒純化及免疫注射,製備出對應 WF1 之抗血清(# 161)。由 SDS- 免疫擴散反應顯示本研究之 WF1 分離 株及 BiMoV-UF 均與 #161 抗血清產生明顯沈澱帶相 互融合之同源反應。BiMoV-UF之 核酸若與上述 HRP5/dT 引子對進行 RT-PCR 反應,可獲得與 WF1 相 同大小之增幅產物,經解序後亦確認兩者鞘蛋白基因 之氨基酸序列相同度高於 99%,顯示本研究由萵苣上 所分離之 WF1 應與 BiMoV-UF 屬於相同之病毒。爾後 本研究由咸豐草上陸續分離獲得三個病毒分離株 (B3、 B4 及 B12),另外也在花蓮栽培之萵苣上獲得一病毒分 離株 Hln1,以 #161 抗血清測試此等分離株結果均與 BiMoV-UF 產生同源反應,且各分離株之鞘蛋白氨基酸 序列亦均與 BiMoV-UF 達到 99% 以上之相同度, 顯示 台灣之萵苣及咸豐草已普遍遭受 BiMoV 之感染。本研 究針對WF1、HLn1、B3、B4、及B12等病毒分離株 均已完成其全長度基因體之核甘酸定序,登錄於 GenBank 取得登錄序號分別為 EU250213、 EU250214、EU250212、EU250211、及EU25021。本研 究爲完成BiMoV全長度基因體定序之首次發表。

V-10 Capsicum chlorosis virus 感染孤挺花之血清學及 分子生物特性之鑑定 - 陳金枝 1、江芬蘭¹、陳宗祺²、 葉錫東³、黃春惠¹、鄭櫻慧¹、張清安¹(¹行政院農業委 員會農業試驗所 植物病理組;²亞洲大學 生物科技學 系;³國立中興大學 植物病理學系) Serological and molecular identification of Capsicum chlorosis virus infecting amaryllis --- Chen, C. C.¹, Chiang, F. L.¹, Chen, T. C.², Yeh, S. D.³, Huang, C. H.¹, Cheng, Y. H.¹, and Chang, C. A.¹(¹Division of Plant Pathology, Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung; ²Department of Biotechnology, Asia University, Wufeng, Taichung; ³ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan)

本研究於后里及古坑地區發現葉片呈現黃化同心 輪斑之孤挺花植株,將其汁液摩擦接種於奎藜 (Chenopodium quinoa Willd.) 葉片上會產生局部斑點。 將奎藜斑點及罹病孤挺花葉片組織與本研究室所保存 之多種病毒抗血清進行 ELISA 反應,結果發現與 Capsicum chlorosis virus (CaCV-gloxinia) 抗血清產生明 顯正反應,顯示孤挺花輪斑病徵可能是 CaCV 感染所 致。本研究由二個地區之罹病孤挺花植株上共分離獲 得二個分離株。此等分離株除與 CaCV-gloxinia 抗血清 有正反應外,其病毒核酸以對應 Tospovirus L 基因之廣 效性引子對 gL3637/gL4435c (Chu et al., 2001, Phytopathology 91: 361-368) 進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反 應 (Reverse-transcriptase polymerase-chain reaction, RT-PCR),均可獲得與預估相符約800 bp之DNA 片段。進 一步以可增幅WSMoV全長核鞘蛋白 (nucleocapsid protein, NP) 基因序列之引子對 (WN2328/ WN3534) 進 行RT-PCR,亦均可獲得預估之1.2 kb-1.4kb片段,該1.2 kb片段經選殖與定序後顯示內含一完整轉譯架構 (open reading frame),對應一個 275 個胺基酸的蛋白序列。 與所有已知 tospoviruses 的核鞘蛋白基因序列比對後發 現,此二個分離株對應 NP 之胺基酸序列與同屬於 WSMoV 血清群之 CaCV 最相近,相同度高於 98% 以 上。基於上述血清反應與核酸特性分析結果,證實本 研究由孤挺花所得之二個病毒分離株,均屬於 CaCV 之分離株。CaCV 乃於 2002 年由 McMichael, L. A. 等 學者首次於辣椒、番茄等作物發現而命名。記錄上 CaCV 亦可感染蘭花、大岩桐及彩色海芋。本研究結果 首次證實 CaCV 亦可感染孤挺花,造成黃化同心輪 斑。

V-11 WSMoV 感染海芋之血清學及分子生物特性之鑑 定 一 陳金枝¹、黃春惠¹、陳宗祺²、葉錫東³、鄭櫻慧 ¹、張清安¹ (¹行政院農業委員會農業試驗所植物病理 組;²亞洲大學生物科技學系;³國立中興大學植物病 理學系) Serological and molecular identification of Watermelon silver virus infecting calla lily - Chen, C. C., Huang, C. H., Chen, T. C., Yeh, S. D., Cheng, Y. H., and Chang, C. A. (¹Division of Plant Pathology, Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung; ²Department of Biotechnology, Asia University, Wufeng, Taichung; ³ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan)

有 TSWV (Tomato spotted wilt virus)、CCSV (Calla lily chlorotic spot virus) > CaCV (Capsicum chlorosis virus)。筆者自 2006 年調查后里地區栽培之海芋發現 CaCV 的感染之後,2007 年持續調查病害時,發現葉 片呈現黃綠色條斑(點)之Pot of Gold 品種之海芋罹病 株,經由 ELISA 檢測發現與 Tospovirus 屬之 WSMoV (Watermelon silver mottle virus) 之抗血清產生正反應, 而其病葉汁液接種於奎藜 (Chenopodium quinoa Willd.),所產生之單斑也與 WSMo V 抗血清產生正反 應,經由單斑分離法獲得3個病毒分離株。分離株之 病毒核酸以對應 Tospovirus L 基因之廣效性引子對 gL3637/gL4435c (Chu et al., 2001, Phytopathology 91: 361-368) 進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR, Reverse- transcriptase polymerase-chain reaction,),均可 獲得與預估相符約 800 bp 之 DNA 片段。進一步以可 增幅WSMoV全長核鞘蛋白 (nucleocapsid protein, NP) 基因序列之引子對 (WN2328/5'-CCATTGGTTTGCC 一 TCCG -3' 及 WN3534/5'-CGTCGACAGAGCAATC GAGGC-3') 進行 RT-PCR, 亦均可獲得預估之 1.1 kb 片 段,將此等片段選殖與定序後顯示內含一完整轉譯架 構(open reading frame),可對應產生一個 275 個胺基酸 的蛋白。與GenBank 比對後發現此3個分離株對應NP 之胺基酸序列與 WSMoV 最相近,相同度均高於 98% 以上。此3 個分離株與15 個 CaCV 之海芋分離株在血 清反應上對 WSMoV 之多元抗體及單株抗體均為正反 應,證實其爲同屬於WSMoV 血清群之病毒,然而N基 因序列分析之結果則證明由形成黃綠色條斑病徵之海 芋葉片上所得之二個分離株為WSMoV。此為首次發現 WSMoV可感染海芋之報告。

V-12 美人蕉嵌紋病分離之菜豆黃化嵌紋病毒特性-羅 尹芝¹、陳滄海¹、張清安² (¹ 國立屛東科技大學植物保 護系、² 行政院農委會 農業試驗所 植物病理組) Characterization of *Bean yellow mosaic virus* isolated from mosaic canna (*Canna* spp.) in Taiwan - Lo, Y. C.¹, Chen,T. H.¹, Chang, C. A.² (¹ Department of Plant Protection, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung; ² Division of Plant Pathology, Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan)

美人蕉 (Canna spp.) 為一年生或多年生之草本植物,主要作為觀賞植物。2003 年於台灣屛東發現美人 蕉葉片呈現嵌紋與條斑疑似病毒病之病徵。田間嵌紋 病葉經由奎藜 (Chenopodium quinoa) 做單斑分離,可分 離出一種絲狀病毒,病毒粒子長度約為780-800nm。病 毒熱不活化溫度為 50℃; 耐稀釋度為 10-3; 室溫 (24 ℃) 下活性僅可維持約 1 天,冷凍 (-80℃) 可保存 6 個 月。機械接種 17 科 68 種供試植物,僅藜科之奎藜、 紅藜、綠藜可被感染。奎藜單斑病組織超薄切片,可 於細胞中觀察到風車狀內含體。100 克新鮮奎藜病葉為 材料經高低速交替離心及硫酸銫等密度梯度離心,於 PET 離心管口距液面 7.2-7.5cm 可得一病毒帶,病毒收 量為 1.2mg。以 Potyvirus 屬病毒之廣效性引子對進行 反轉錄聚合酵素連鎖反應 (one step RT-PCR) , 美人蕉 嵌紋病葉及奎藜病葉皆可增幅出約 473bp 核酸產物。 進一步再選殖本病毒之鞘蛋白核酸及核苷酸序列分 析,共解得全長 1263 個核苷酸序列,再與 GenBank 中 已知的77個親緣關係較近之potyviruses 序列比對後, 發現其核苷酸序列與中國報導在美人蕉所分離之菜豆 黃化嵌紋病毒 (Bean yellow mosaic virus, BYMV) 序列 有 93% 之相同度 (percent identity), 由以上資料比對結 果顯示,本研究中由美人蕉分離之病毒株應為 BYMV °

V-13 First record of *Bean yellow mosaic virus* infecting a member of the family Orchiaceae, *Phaius tankervilliae* - Lee, Shu-Chuan, Chang, Heng and Chang, Ya-Chun (Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei)

Phaius tankervilliae is a native species of the family Orchidaceae in Taiwan. A P. tankervilliae plant showing chlorotic streak and mottle was obtained in mountain area of Taipei County. Systemic symptom and chlorotic lesions appeared when we mechanically inoculated the plant saps onto the leaves of Nicotiana benthamiana and Chenopodium quinoa, respectively. After three successive single lesion isolations in C. quinoa, one virus isolate was obtained and named PT. The host range test of PT isolate was performed. Filamentous virus particles with length of 750 nm in crude plant extract were observed via the transmission electron microscope. The originally infected and PT-inoculated plants were tested with indirect-ELISA using antibodies against Cymbidium mosaic virus (CymMV), Odontoglossum ringspot virus (ORSV) and potyviruses. Among these tests, only a monoclonal antibody specific to the potyvirus group (Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) gave positive result. To confirm the ELISA results, the plant sample was also tested by RT-PCR using specific primers for CymMV and ORSV as

well as degenerate primers for potyviruses. A 1.6-kb RT-PCR fragment amplified by potyvirus degenerate primers was cloned and sequenced. This fragment showed 97% sequence identity to Bean yellow mosaic virus (BYMV) in a BLAST search against NCBI nucleotide database. The cloned fragment of PT isolate contains 1630 nucleotides including partial NIb, complete CP gene and 3' untranslated region (UTR). To develop serological methods for PT detection, an antiserum against its CP was generated using bacterial expressed recombinant protein. This antiserum has a titer of 16,000 upward and was successfully used in both I-ELISA and western blot analyses. Based on the results of virion morphology, I-ELISA, RT-PCR and sequence analysis, the PT isolate obtained from P. tankervilliae is an isolate of BYMV, and designated as BYMV-PT isolate. This is the first report of BYMV infecting native orchid in Taiwan.

V-14 竹嵌紋病毒之快速檢測技術-單一引子反轉錄聚 合連鎖反應 SPRT-PCR - 邱燕欣、王慧如、何書豪、鍾 文全、楊佐琦 (行政院農業委員會種苗改良繁殖場) A rapid method for detecting *Bamboo mosaic virus* (BaMV) - Single primer Reverse transcription polymerase chain reaction Chiu, Y.-H, Wan, H.-J, He, S.-H, Chung, W.-C, Yang, T.-C.(Taiwan Seed Improvement and Propagation Station, COA. Sinshe, Taichung, Taiwan.)

竹嵌紋病毒 (Bamboo mosaic virus) 屬於 Potexvirus 屬,普遍感染台灣之麻竹及綠竹,是至目前發現感染 竹類唯一之病毒,對竹子的生長發育造成相當大的危 害。台灣是全世界竹嵌紋病毒危害最嚴重之地區,多 數竹的栽培區罹病率甚至高達 90% 以上,感染此病毒 之植株生長勢受影響,竹筍竹材之產量及品質下降。 由於竹類以無性繁殖法繁殖、病毒代代相傳、綿延不 斷;再加上本病毒易經機械傳播,造成此病害普遍發 生於麻竹、綠竹栽培區。竹類之栽培主要藉由無性分 株法進行繁殖,而動植物防疫檢疫局有鑑於此病害對 於竹類生產之嚴重性,積極實施「綠竹種苗病毒檢定 驗證作業須知」,建立綠竹母本園,而早期正確的檢 測與診斷竹母本或竹苗是否感染 BaMV,常用的檢測 方法為酵素聯結抗體免疫測定法(ELISA),但是血清製 備過程中,血清供應動物的設置、抽取純化過程皆須 耗損大量的人力物力,而竹類市場以東方國家為主, 目前尙無商業生產之竹嵌紋病毒之血清供應。種苗改 良繁殖場為建立一觀賞用竹類母本園,需要一快速檢 測所收集之植株材料,因而參考 2006 年 Miglino 等人 所發表之以 Potex 病毒屬其conserved viral replicaseencoding regions 序列設計之廣效性引子對進行偵測, 預計產出 200bp 之條帶,但是試驗結果不僅增幅出預 設 200bp 之條帶, 更增幅出一明亮且大小約為 500bp 之條帶。進一步將所得條帶進行增幅、轉殖以及解 序,得知在感染竹類的 Bamboo mosaic virus 的序列 中,可以單一引子 Potex4 增幅出 500bp 的片段,其黏 合溫度可增高至 60℃,黏合時間也可修正為 45 秒,大 幅降低檢驗之時間,利用此單一引子進行專一性之測 試,挑選出 Potyvirus 屬之病毒 Potato virus Y、Papaya ring spot virus - W、Potexvirus 屬之 Potato virus X、 Lily virus X、Cymbidium mosaic virus、Tobamovirus 屬 之 Tomato mosaic virus、Carlavirus 屬之Lily symptomless virus、Potato virus S、健康竹,皆無專一 性條帶的產生。故此一專一性高之單一引子 - RT-PCR 不僅可應用於綠竹種苗病毒檢定驗證作業之母本園檢 驗,更可縮短 ELISA 檢驗所需時間與人力資源。

V-15 具同時偵測齒舌蘭輪斑及蕙蘭嵌紋病毒之雙特 異性多元抗體之製備與檢測效果比較 - 陳姿蓉、陳金 枝、鄭櫻慧、張清安 (行政院農業委員會農業試驗所植 物病理組) Preparation and application of polyclonal antiserum with double specificity that can detect Odontoglossum ringspot and Cymbidium mosaic virus simultaneously - Chen, C. R., Chen, C. C., Cheng, Y. H., and Chang, C. A. (Division of Plant Pathology, Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan)

我國蘭花產業近年來輸出的品目逐漸以種苗為 重,為延續企業之商機,確保蘭花種苗的品質與健康 為生產管理之關鍵目標。已知能夠感染蘭花的近 30 種 病毒中,以齒舌蘭輪斑病毒(Odontoglossum ringspot virus, ORSV)及蕙蘭嵌紋病毒(Cymbidium mosaic virus, CymMV)之發生最普遍。目前檢測此二種病毒應用最 普遍之技術為酵素連結抗體免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),傳統上必須分別使用兩 種專一性抗體進行檢測,但若能研發可同時偵測 ORSV及CymMV 二種病毒之抗血清,將可節省時 間、材料及人工,提升檢測效率。過去本研究室已成 功應用重組蛋白技術將ORSV及CymMV 之鞘蛋白基 因之部分片段構築成為四種不同組合(CyOrN, OrCyN, CyOrH,及OrCyH)之單一重組蛋白進行多元抗體之製 備,並證實可同時偵測ORSV及CymMV 二種病毒。

前二者乃分別利用二病毒之 CP 基因之 N 端與 C 端重 組而成,後二者則單以二病毒 CP 基因之N端進行重 組。本研究則分別以二病毒 CP 基因之 C 端序列進行 重組蛋白之構築,其中 CyOrC 代表 CymMV 之 CP 基 因C端在前而ORSV 之CP 基因之C端接續在後所構 成。而OrCyC 則爲與CyOrC 前後相反之構築。所獲得 之二種重組蛋白大量純化後分別進行免疫,製備獲得 二株多元抗體。將此二抗體連同過去已經完成之另四 種重組蛋白抗體同時進行 160 個蘭花樣品之臨床 ELISA 測試,並以反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 對 檢測結果具爭議性之樣品進行再確認。結果顯示六種 重組蛋白抗體中以本次試驗所得之 Anti-OrCyC 與過去 所製備之 Anti-OrCyN 效果最穩定,可以同時檢測兩種 蘭花病毒,並與利用單特異性之傳統抗體所獲得之檢 測結果吻合, 故已具有實際應用之價值。本試驗並進 一步測試應用此類具有雙特異性之重組蛋白抗體進行 免疫捕捉RT-PCR 技術以瞭解是否可同時偵測兩種蘭花 病毒之可行性。結果發現此類重組蛋白抗體在免疫捕 捉之效果上似乎不如混和兩種單特異性抗體之效果。 其原因可能在於此兩類型抗體與與完整病毒顆粒之親 和性有先天上之差異有關

V-16 番茄種子種苗帶病毒率檢測及發展番茄種子去 病毒技術之研究 - 彭瑞菊¹、陳紹崇¹、葉錫東² (¹行政 院農委會台南區農業改良場、² 國立中興大學植物病理 系) Detection of the tomatoes seed and seedling virus infection rate and development of virus-free tomato seed and seedling production - Peng, J. C.¹, Chen, S. C.¹, Yeh, S. D.² (¹Tainan District Agriculture Improvement Station, Tainan, COA; ² Dept. of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung)

番茄是雲嘉南地區主要經濟作物之一,95 年栽培 面積 4597 公頃,雲嘉南 2083 公頃佔 45.3%,常見之 病蟲害如病毒病、青枯病、細菌性斑點病、根瘤線 蟲、早疫病、晩疫病、黑葉黴病、銀葉粉蝨、斑潛 蠅、蚜蟲、番茄夜蛾、甜菜夜蛾等。目前病毒病已成 為番茄栽培上的最大障礙,番茄的病毒病害主要有: 番茄嵌紋病毒 (Tomato mosaic virus; ToMV)、胡瓜嵌 紋病毒 (Cucumber mosaic virus; TOMV)、胡瓜嵌 紋病毒 (Cucumber mosaic virus; TYLCV)、馬鈴薯 病毒 Y (Potato virus Y; PVY) 及番茄斑點萎凋病毒 (Tomato spottd wilt virus; TSWV),病徵依感染的病毒 種類、栽培品種及環境因素而異,主要發生在葉片, 呈黃綠不均的嵌紋,偶有壞疽條斑或水浸狀斑,葉片 受害後,呈凹凸不平、皺縮或畸形,新葉顏色變淡 黃,葉片縮小或變細如細繩狀,植株矮小,嚴重者生 長停頓,甚至枯死,番茄病毒病之田間複合感染情況 相當普遍。罹病株率可高達 100%,造成農民嚴重損 失。番茄種子採收時,除了種子會帶毒外(ToMV),另 外種子採收時也易受到病毒的污染,雖然採種後去除 種子的果膠,經過滾筒乾燥去種毛,但是仍有病毒污 染種子,以至於農民一培育出來,種苗就是病毒感染 的植株,本研究共收集市售番茄種子75 個品種,檢測 方法為番茄嵌紋病毒 (ToMV)、胡瓜嵌紋病毒 (CMV) 、馬鈴薯病毒 Y (PVY) 及番茄斑點萎凋病毒 (TSWV) ,抽取種子(苗)RNA 進行RT-PCR,另番茄黃化捲葉 病毒 (TYLCV) 抽取種子 (苗) DNA 進行 PCR, 檢測結 果種子感(污)染番茄捲葉病毒(TYLCV)2.3%,番茄嵌 紋病毒 (ToMV) 為 3.4%, 胡瓜嵌紋病毒 (CMV) 為 0.5%,馬鈴薯Y病毒(PVY)為0.2%,並未檢出番茄斑 點萎凋病 (TSWV)。種苗部分感 (污) 染番茄嵌紋病毒 (ToMV) 為 0.46%,感(污)染番茄捲葉病毒(TYLCV) 0.35%, 並未檢出其他病毒。另收集感染 ToMV 的番茄 種子,以 12.5% 之磷酸三鈉處理 40 分鐘及 15% 之磷 酸三鈉處理 20 分鐘,去病毒最為有效。

V-17 應用放線菌蛋白酶清除污染固體及種子表面上兩種蘭花病毒感染力之研究 - 陳宏榮、陳金枝、鄭櫻慧、張清安 (行政院農業委員會農業試驗所 植物病理 組) Application of Streptomyces proteases to disinfect two orchid viruses contaminated on the surface of tools and orchid seeds - Chen, H. L., Chen, C. C., Cheng, Y. H., and Chang, C. A. (Division of Plant Pathology, Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan)

蘭花產業為我國目前觀賞花卉中具最高產值者, 其中蝴蝶蘭更被農委會選為四大外銷旗艦作物之一。 近年來我國蝴蝶蘭外銷之品目逐漸轉以種苗為主,因 此病毒之感染與否即成為界定種苗品質優劣標準之 一。蘭花病毒病中,齒舌蘭輪斑病毒(Odontoglossum ringspot virus, ORSV)與蕙蘭嵌紋病毒(Cymbidium mosaic virus, CymMV)是感染蘭花之近三十種病毒中分 佈最普遍影響最嚴重的二種。在田間此二病毒並不藉 由媒介昆蟲傳播,而是以污染栽培器具或種子表皮, 再經由傷口入侵而造成感染。本研究乃針對過去所篩 選具有分解蘭花病毒鞘蛋白能力的放線菌菌種(CA5) 之生產效率及實際應用方式進行研究,期能應用 CA5 所分泌之蛋白分解酵素有效清除污染於器具或種子表 面之病毒顆粒,以降低此二病毒之危害。試驗中先比

較傳統與具內溝槽設計之三角瓶對所培養之 CA5 菌量 及酵素活性之影響,結果發現最高酵素分解活性分別 於第12天(2494 U/ml) 及第10天(3029 U/ml)出現, 顯示使用溝槽三角瓶確實可在較短的時間內獲得較高 之酵素活性。此外在培養程序上試驗結果顯示;將菌 種先於大豆液體培養基 32℃ 下進行前培養,再取達到 最高活性前一天(第5天)的培養液作為菌種,接種1% 菌量於相同培養基中,在30℃下培養6天,可獲得 4149 U/ml 之最高活性, 顯著高於對照流程之 3029 U/ml。將上述培養流程所獲之 CA5 菌液過濾後,再以 硫酸銨濃縮成爲後續試驗之酵素材料。利用此材料處 理確定已污染病毒之蘭花種子,再以 ELISA 及 RT-PCR 測試後發現,經 CA5 酵素液處理之蘭花種子已經 明顯偵測不到病毒存在。另外以相同酵素材料處理污 染蘭花病毒之固體表面試驗中,亦確定稀釋4倍之濃 縮酵素液處理 30 秒後,已明顯無法利用 ELISA 再偵測 到病毒的殘留,且於接種試驗中亦確定已完全摧毀病 毒之感染能力。

V-18 利用重組鞘蛋白製備可偵測多種海芋病毒之廣 效性單株抗體 - 林為方、胡文綺、張雅君(國立臺灣大 學植物病理與微生物學系) The production of monoclonal antibody with broad spectrum reactivity against calla lilyinfecting potyviruses using recombinant capsid protein -Lin, Wei-Fang, Hu, Wen-Chi and Chang, Ya-Chun (Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei)

海芋 (calla lily) 原產於南非,其分類地位屬於天南 星科 (Araceae)、馬蹄蓮屬 (Zantedeschia),由於其花型 典雅且花色多樣,近年來廣受消費者喜愛,爲台灣重 要經濟花卉之一。病毒病害為海芋栽培之限制因子, 且國內外報導指出感染海芋之病毒以 Potyvirus 屬為最 大宗,會造成植株矮化、葉面嵌紋、生長不良、花器 畸型等,影響切花產量及產值。目前針對感染海芋的 potyviruses 之檢測技術,除了利用 RT-PCR 外,以血清 學原理所發展的 ELISA 偵測技術更廣為使用。為了在 檢測上節省耗費並加快篩選健康海芋種苗的速度,故 本研究嘗試研發可廣泛性偵測多種 potyviruses 之單株 抗體。其抗原之製備是以國內曾報導感染海芋之五種 potyviruses 包括海芋潛徵病毒 (Calla lily latent virus, CLLV)、芋頭嵌紋病毒 (Dasheen mosaic virus, DsMV)、蕪菁嵌紋病毒 (Turnip mosaic virus, TuMV)、 海芋嵌紋病毒 (Zantedeschia mosaic virus, ZaMV) 及海 芋微嵌紋病毒 (Zantedeschia mild mosaic virus, ZaMMV)

之鞘蛋白基因為對象,經由序列比對,選取序列保守 性較高之區域,長度為121 個胺基酸,分別設計專一 性引子對,以 PCR 增幅出目標片段,再將五種病毒之 鞘蛋白保守性片段分別進行選殖並接合,以構築含多 種海芋病毒鞘蛋白保守性序列的表現載體,並以大腸 桿菌表現其重組鞘蛋白 (recombinant capsid protein)。 進一步純化此重組鞘蛋白,免疫老鼠以製備單株抗 體,經 indirect-ELISA 方式篩選所獲得之多株穩定表現 之融合瘤細胞,從中選取一反應最好之細胞株,其抗 體可專一性的檢測出五種海芋病毒的鞘蛋白。將細胞 注入老鼠腹腔產生大量腹水,並測試其效價至少為 105。另外,於廣效性測試中,此單株抗體亦可偵測到 至少另外 10 種 potyviruses。我們的研究顯示利用保守 性的胺基酸序列所生產的重組蛋白,可作為製備廣效 性抗體的抗原來源,同時縮短篩選廣效性抗體的時 間,不失為一種生產廣效性抗體的好策略。

SC-01 Molecular cloning and analysis of genes encoding xylanase in *Phytophthora parasitica* - Lai, Ming-Wei and Liou, Ruey-Fen (Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei)

During plant infection, pathogens produce a diverse range of cell-wall degrading enzymes, including cellulases, pectinases, and xylanases. The latter includes endo-beta-1, 4-xylanase, which is the key enzyme required for the degradation of xylan, the predominant hemicellulose in the cell walls of plants and the most abundant renewable hemicellulose on earth. In addition to their possible roles in pathogenesis, endo-beta-1, 4xylanases of some fungi are known to elicit defense response in plants. To investigate the function of endobeta-1, 4-xylanases of Phytophthora parasitica, an oomycete plant pathogen that causes severe disease in a wide variety of plant species, we cloned the genes by PCR using primers that were designed according to putative xylanase genes retrieved from the genome databases of P. sojae and P. ramorum. Analysis of the sequences indicated that we have obtained three genes which encode putative endo-beta-1, 4-xylanases in P. parasitica. Phylogenic analysis indicated that xylanases of Phytophthora form a cluster distinct from those of other plant pathogens, and show a closer relationship with family 10 glycosyl hydrolases. In addition, the expression of xylanase genes by P. parasitica grown in culture and in the infection

process was analyzed and the results will be presented.

SC-02 Construction of artificial miRNA for generating transgenic resistance against potyviruses in plants - Ustianenko Dmytro, Kuan-Chun Chen, and Shyi-Dong Yeh (Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung)

The genus Potyvirus is the largest and economically most important plant virus group. The objective of this study was directed to generate transgenic plants with a high level of resistance against different potyviruses using the artificial miRNA (amiRNA) approach. In order, to create a broad spectrum resistance to different viruses, a genome conserved regions among 16 viruses of Potyvirus were found using nucleotide alignment. The 273-nt premiR159a from Arabidopsis was chosen as a backbone for the construction and expression of amiRNAs. Using oligonucleotide-directed mutagenesis, a 21 nucleotide region of miR159 was replaced by a synthetic 21nucleotide sequence targeting at the highly conserved regions of the CI, NIb, or CP genes. The synthetic sequences were then moved to the binary vector pBA-DC-HA or pB2T-DC-HA. Plants of Nicotiana benthamiana were transformed with Agrobacteria carrying the binary vector. To check the expression of designed amiRNA, the total RNA was isolated from agro-infiltrated leaves and detected by northern blotting with a specific probe against the corresponding amiRNA sequence (21nt). After the confirmation of amiRNA expression, the agro-infiltrated leaves were used to regenerate the transgenic lines. Our results indicated that three constructed amiRNAs from preamiRNAs, namely amiR- CI159, amiR-NIb159, and amiR-CP¹⁵⁹, with sequences complementary to CI, Nib and CP conserved regions, respectively, was efficiently expressed in agro infiltrated leaves. The resistance of these transgenc lines against differnet potyviruses are being evaluated under greenhouse conditions and in tissue culture stage.

SC-03 Transgenic melons expressing antifungal protein (AFP3) conferred resistance against *Rhizoctonia solani* - Pu-Ti Wang¹, Yen-Ling Chang¹, Chu-Hui Chiang¹, Yu-Ting Chen², Sei-Fu Shaw^{3, 4}, Shyi-Dong Yeh⁵, Hsin-Der Shih⁶, and Tsong-Ann Yu¹ (¹ Department of Molecule Biotechnology, Da Yeh University, Changhua, Taiwan, ²

Biotechnology Center, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ³ Institute of Plant and Microbial Biology, Academia Sinica Taipei, Taiwan, ⁴ Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ⁵ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ⁶ Division of Plant Pathology, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung, Taiwan)

Melon (Cucumis melo L.) is one of the economically important crops on the tropics and subtropics. Fungal disease is often causing serious economy loss of melon, hence fungicides are generally used to protect against melon diseases. In consideration of the harmful and dangerous effects to the environment ecosystem, the transgenic approach is a better and more convenient way to control the fungal diseases. The anti-fungal protein gene constructions, Bo-AFP3-HB-GFP and Cp-AFP3-HB-GFP, were kindly supplied by Dr. Shaw, Jei -Fu in Academia Sinica. Transgenic melon lines carrying Bo-AFP3-HB-GFP or Cp-AFP3-HB-GFP genes were previously generated in our laboratory. In this study, we evaluated the resistance of inde -pendent transgenic lines against Rhizoctonia solani under greenhouse condition, and also confirmed their transgene insertion by genomic DNA PCR and Southern blotting. Line B28, line C14 and line C25 exhibited higher resistance against to R. solani and express higher transcript levels of afp3 analyzed by RT-PCR. Photomicrographs under fluorescence microscopy showing GFP proteins was apparently expressing in the higher resistant transgenic leaves.

SC-04 Double resistance of transgenic watermelon expressing an untranslatable chimeric construct carrying parts of the coat protein coding sequences of *Zucchini yellow mosaic virus* and *Papaya ringspot virus* type-W Chen Jun-Han¹, Li Chin-Mei¹, Chiang Chu-Hui¹, Yeh Shyi-Dong², Yu Tsong-Ann¹ (¹ Department of Molecule Biotechnology, Da Yeh University, Changhua, Taiwan; ² Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan)

Watermelon is an economically important crop of the tropics and subtropics. Virus disease often causes serious economic loss of watermelon and there is still no chemical to control the virus disease. Watermelon silver mottle virus (WSMoV), Zuchini yellow mosaic virus (ZYMV) and Papaya ringspot virus Type-W (PRSV-W) are the most hazardous species among all kinds of viruses infected in watermelon. Transgenic watermelon lines carrying ZYMV and PRSV-W coat protein (CP) double fusion gene were previously generated in our laboratory. Therefore, this study was discussed to evaluate resistance of independent transgenic watermelon lines against ZYMV and PRSV-W under greenhouse conditions. Line 9 and line 10 showed immunity against ZYMV and PRSV-W after challenge inoculation. No virus was detected by indirect ELISA, western blotting, RT-PCR, and northern blotting in the immunity transgenic watermelon lines. Line 1 was highly resistant to ZYMV and PRSV-W 30 days postinoculation, showing no symptom. The expression of the transgene in the all transgenic lines was not detected by northern blotting before challenged inoculation. For this reason we consider that the virus resistance is RNA-mediated.

百合灰黴病 (Lily gray mold) 為台灣百合栽培的重 要真菌性病害之一,其病原菌為 Botrytis elliptica (Berk.) Cooke。灰黴病菌感染百合造成葉片焦枯、花器 畸形及花瓣萎凋進而影響切花品質及種球的培育,一 般田間多以殺菌劑防治,但易產生抗藥性菌株導致防 治效果不盡理想,因此發展生物防治法 (biological control) 以達成防治病害的目的。本實驗室自太魯閣國 家公園布洛灣遊憩區的臺灣百合根圈分離篩選出多個 具有生物防治潛力的菌株,其中以臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株之表現最佳。本研究利用對抗生素 rifampicin 具抗 性的 C1L 菌株,處理於臺灣百合幼苗根圈後回收根內 及根表的細菌計算族群密度,發現 C1L 菌株在臺灣百 合根部有良好的群聚能力 (colonization)。利用可同時 表現於 Escherichia coli 與 Bacillus spp. 的載體 pHY300PLK 建構可表現綠色螢光蛋白質 (green fluorescent protein, GFP) 的載體系統,使C1L 菌株產生 自發性螢光。綠色螢光標定之 C1L 菌株的誘導植株系

統性抗病能力 (induced systemic resistance)、抑制真菌 孢子發芽及生長的能力皆與野生菌株之功效相近。進 一步利用共軛焦雷射顯微鏡 (confocal laser scanning microscope) 觀察螢光標定之 C1L 菌株在百合幼苗根部 群聚的情形,初步觀察到 C1L 菌株可附著根毛進入根 部表層細胞間隙,進而進入組織深層細胞間隙,指出 此細菌能在植物根部附生及內生。

SC-06 龍葵萃取物抑制甘藍黑斑病菌之成分鑑定 -范籹晨¹、王升陽²、黃振文¹ (¹ 國立中興大學植物病理 學系;² 國立中興大學森林系) Identification of the antifungal compounds from black nightshade extracts suppressive to *Alternaria brassicicola* - Fan, M. C.¹, Wang, S. Y.², and Huang, J. W.¹ (¹ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; ² Department of Forestry, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan)

利用甘藍黑斑病菌 (Alternaria brassicicola Schweinitz) 檢測龍葵 (Solanum nigrum L.) 與少花龍葵 (Solanum photeinocarpum Nakamura) 乙醇萃取物的抑菌 活性,結果僅龍葵萃取物具有抑菌效果,其乙醇萃取 物於 4000 ppm 濃度下,可抑制 80% 孢子的發芽,另 有 20% 孢子發芽後立即膨大成球形;若該萃取物濃度 降至且 500 ppm 時,處理過的孢子雖可發芽,但卻有 100% 發芽管出現膨大的現象。本研究進一步將乙醇萃 取物分別以正己烷 (n-hexane)、乙酸乙酯 (ethyl acetate) 、正丁醇 (n-butanol) 及水進行液相 - 液相萃取,獲得 各溶劑萃取的濃縮成分。經抗菌試驗,證實乙酸乙酯 及正丁醇萃取的物質具有抑菌的效果。隨後再利用逆 向管柱層析,以不同比例之水與甲醇混合作為沖提 劑,依極性高至低逐次流洗,總共獲得18 個分離物 (Bu-01~Bu-18);其中 Bu-05 分離物具有抑菌活性。接 著再以高效能液相管柱層析 (HPLC) 進行純化,共得到 9 個化合物,其中僅第1、2、3、4、8 及9號化合物在 濃度 200 ppm 以上,可抑制 100% 的孢子發芽。取第9 號化合物經核磁共振 (NMR) 分析,證明其歸屬於咖啡 酸醣苷衍生物,至於1、2、3、4及8號化合物之結構 則尙待進一步之研究。

SC-07 草莓灰黴病菌抗 Strobilurin (QoI) 類殺菌劑之 抗藥性機制探討 - 陳麗淑¹、黃俊德²、鍾文鑫¹ (¹ 中興 大學植物病理系、² 台灣先正達股份有限公司屛東試驗 站) Investigation of resistant mechanisms in *Botrytis cinerea* to strobilurin fungicides - Chen, L. S.¹, Huang, C.

Strobilurin (QoI) 類為一廣效性殺菌劑,具有阻隔 粒線體電子傳遞鏈而降低 ATP 產生之作用機制。先前 的藥劑測試,顯示台灣草莓灰黴病菌已對 Qol 類藥劑 中的 44.2% 克收欣水懸劑與 10% 亞托敏水懸劑產生了 低感受性現象。前人研究指出,抗 QoI 類藥劑之產生 機制為粒線體中 cytochrome b (cyt b) 基因的第 129 或 143 處密碼子 (codon) 產生了點突變現象,進而改變胺 基酸結構降低 QoI 類藥劑的作用。然而,經增幅 cyt b 基因片段與解序得知,抗 Qol 類藥劑之草莓灰黴病菌 於 cyt b 基因中之第 129 與 143 codon 處並未發生突變 現象,推測主要影響草莓灰黴病菌之抗藥性產生並非 cyt b 基因點突變所導致。此外,將抗 QoI 類藥劑之菌 株於含 salicylhydroxamate (SHAM) 的培養基上培養 後,得知抗藥性菌株對 QoI 類藥劑之感受性明顯提 高,而SHAM 之主要作用為抑制粒線體中 alternative oxidase (AOX) 之活性, 顯示 AOX 於抗 QoI 類藥劑的 反應中扮演了重要角色。

植物根圈環境存在許多微生物,大部份為腐生 性,少部分會造成植物病害,另外有一些微生物則益 於植物的生長。本實驗室由花蓮布洛灣臺灣百合根圈 環境中,篩選到一株臘狀芽孢桿菌 C1L 菌株,具有生 物防治的功能,能協助台灣百合、葵百合以及玉米對 抗灰黴病和葉枯病,C1L 菌株具有促進植物生長的能 力,可經由澆灌的方式,增進阿拉伯芥株高、鮮重、 葉面積和果莢數目。為進一步探討 C1L 菌株促進植物 生長的因子,透過植物組織培養的方法,種植阿拉伯 芥與菸草於 I 型培養皿的一側,並在另一側培養 C1L 菌株,使得植物與細菌間僅有揮發性氣體能流通影 響,結果顯示 C1L 菌株的揮發性氣體無法促進阿拉伯 芥的生長;但以揮發性氣體處理菸草後再將植株移至 溫室盆栽內,可觀察到菸草的葉面積明顯地增加。進 一步利用氣相層析質譜儀分析 C1L 菌株所產生的揮發 性氣體成份,初步分離鑑定出兩個有機化合物,分別 為 dimethyl disulfide 與 trisulfide dimethyl,其餘成份之 鑑定尚在進行中。未來將探究揮發性有機化合物與臘 狀芽孢桿菌 C1L 菌株促進植物生長的相關性。

SC-09 Molecular characterization of the CP gene and 3' UTR of *Chilli veinal mottle virus* from South and Southeast Asia - Tsai, Wen-Shi^{1, 2}, Huang, Yi-Chien¹, Green, Sylvia K.¹ and Jan, Fuh-Jyh² (¹AVRDC-The World Vegetable Center, Shanhua, Tainan 741; ² Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan)

Twenty-four isolates of Chilli veinal mottle virus (ChiVMV), including two from China, four from India, two from Indonesia, eight from Taiwan and eight from Thailand, as determined by ELISA using antiserium from DSMZ, Germany, were further analyzed. Pathogenicity of the virus isolates was confirmed by induction of systemic mosaic and/or necrotic ringspot symptoms on Capsicum annuum cv. Early Calwonder following mechanical inoculation. The 3' terminal sequences of the viral genomic RNAs were determined. The coat protein (CP) coding regions ranged from 858 to 864 nucleotides and the 3' untranslated regions (3' UTR) from 275 to 289 nucleotides in length. All isolates had the inverted repeat sequence GUGGNNNCCAC in the 3' UTR. The DAG motif, conserved in aphid-transmitted potyviruses, was also observed in all isolates. Based on their high CP amino acid and nucleotide identity of >94.8 and >89.5%, respectively, with the reported ChiVMV reference isolates, including the pepper vein banding virus (PVBV), the chilli veinbanding mottle virus (CVbMV) and the CVbMV Chiengmai isolate (CVbMV-CM1), all 24

isolates were confirmed as ChiVMV. Based on phylogenetic analysis, all the above ChiVMV isolates can be classified into three clusters. Group 1 includes all isolates from China and Taiwan, three from Thailand (UB32, PJ and T97) and CVbMV-CM1. Group 2 includes the remaining five Thailand isolates, two Indonesian isolates and CVbMV. Group 3 includes all Indian isolates and the PVBV. The nucleotide identity of the CP plus 3' UTR ranged from 93.3 to 99.9%, 95.2 to 99.7%, and 90.4 to 99.9% of the viruses within groups 1, 2 and 3, respectively. In addition, a conserved region of 204 amino acids with >90.2% identity was identified in the C terminal region of the CP gene of ChiVMV and *Pepper veinal* *mottle virus* (PVMV), which may explain the serological cross reaction between these two viruses.

SC-10 Bacillus mycoides 防治甘藍幼苗立枯病之效果 評估 - 黃靜淑、黃振文 (國立中興大學植物病理學系) Efficacy evaluation of Bacillus mycoides for control of cabbage seedling damping-off - Huang, J. S., and Huang, J. W. (Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan)

Rhizoctonia solani kühn AG-4 與 Pythium aphanidermatum Edson 兩者皆可以引起甘藍幼苗死亡 的現象,是甘藍苗床的重要病原菌。本試驗主要目的 在於探討 Bacillus mycoides BM01 與 BM02 菌株防治甘 藍苗期病害的效果。首先利用培養皿對扣法測試 Tryptic soy agar (TSA) \ Nutrient agar (NA) \ Soy powder milk agar (SPMA) > Potato dextrose agar (PDA) 、及Luria-Bertani medium (LB) 等五種培養基培養 BM01 與 BM02 後,其產生之氣體對兩病原菌生長的 影響,結果發現 BM01 與 BM02 兩菌株培養在 TSA 與 SPMA 上所產生之氣體對此二種病原菌皆具有較優異 的抑制效果。進一步,以氣相層析質譜儀分析兩菌株 在TSA 上所產生之二硫化二甲基 (disulfide dimethyl) 具有抑制 R. solani AG-4 的效果。此外,利用三明治培 養法測試 TSA 與 SPMA 培養 BM-01 與 BM02 所產生 的分泌物質對於病原菌生長的影響,結果顯示 BM01 及BM02 兩菌株抑制 R. solani AG-4 菌絲生長率達 50% 以上,至於對 P. aphanidermatum 菌絲生長的抑制率則 達 90% 以上。在溫室中,利用 10% 黃豆粉培養 B. mycoides 之 SPMBM01 與 SPMBM02 菌液,然後以不 同比例分別混拌至含有病原菌栽培介質中,密封放置 一天後播種甘藍種子,結果顯示 SPMBM02 菌液均匀 混拌於介質的處理,可以促進甘藍植株生長外,尚可 降低 R. solani AG-4 危害植株之罹病率達 50% 左右。

SC-11 蕈狀芽孢桿菌對於番茄防禦相關基因表現之影 響與促進植株生長之初步探討-陳和緯、黃振文、張碧 芳(國立中興大學植物病理學系) Preliminary studies on *Bacillus mycoides* affecting tomato defense - related genes expression and promoting plant growth - Chen, Her-Wei, Huang, Jenn-Wen, and Chang, Pi-Fang Linda (Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan)

番茄萎凋病菌 (Fusarium oxysporum f. sp.

lycopersici) 導致的番茄萎凋病 (Fusarium wilt of tomato) 爲臺灣番茄栽培的重要土媒真菌病害之一,也是夏季 番茄生產的主要限制因子,病原菌可經由土壤侵入植 株根莖組織內,致使植株萎凋死亡。已知將5% 玉米粉 或 5% 黃豆粉培養的蕈狀芽孢桿菌 (Bacillus mycoides) 培養液混合到土壤後種植番茄,可降低此病害的發 生。本試驗利用蕈狀芽孢桿菌 BM02 懸浮液與土壤混 合,於種植番茄兩週後可測得「病程相關基因 (pathogenesis-related genes)」的表現,顯示 BM02 可誘 導防禦相關基因表現,種植四週後將植株接種番茄萎 凋病菌,在接種後二週與四週的番茄植株根部測得 PR5 表現量較對照組高,此現象可能與番茄的抗性相 關。此外,以混合 BM02 的土壤種植番茄植株,可降 低植株對白粉病的發病率。將 BM02 以不同方式施用 於番茄、西瓜、萵苣等作物,發現施用 BM02 可提升 植株株重,其中又以 BM02 與土壤混合後直接播種的 方式最為有效。

SC-12 Xanthomonas 屬植物病原菌之鑑別性培養基之 研發及應用 - 劉慈芬、宋靄寧、李永安 (輔仁大學生命 科學系) Development and application of the differential medium for plant pathogenic Xanthomonas spp. - Sung, Ai-Ning, Liu, Tzu-Fen, and Lee, Yung-An. (Department of Life Science, Fu Jen Catholic University, Taipei)

利用鑑別性培養基 (Xan-D 培養基) 培養 Xanthomonas 屬病原細菌,在28℃ 培養3-5 天,菌株 皆呈現淡綠色至深綠色、水亮、上突且菌株周圍有透 明及白霧狀兩種暈圈。而由植物葉片與種子分離出來 之黃色但非 Xanthomonas 屬菌株,如 Pantoea sp.、 Pseudomonas sp.、Erwinia sp. 及 Arthrobacter sp.等,在 Xan-D 培養基上均未呈現綠色,且菌株型態均為黃色 且扁平,與 Xanthomonas 屬菌株有很大的不同。X. campestris pv. campestris 菌株在 Xan-D 培養基生長的 菌落回收率 (recovery) 為 Luria agar (LA) 培養基的 128%, 顯示 Xanthomonas 屬菌株在 Xan-D 培養基的生 長較在 LA 培養基為佳。Xan-D 培養基可應用於自罹病 植物組織中,分離 Xanthomonas 屬病原細菌,從具有 十字花科黑腐病病徵的甘藍葉片中,可以 Xan-D 培養 基分離出具有明顯特徵的 Xanthomonas 屬病原細菌。 Xan-D 培養基亦可應用於種子檢測上,將X. campestris pv. campestris XCC1-1 菌株混合青江菜 (Brassica chinensis) 種子,或X. campestris pv. coriandri NCPPB 1457 混合香菜種子,再使用 Xan-D 培養基分離,結果 顯示,Xan-D 培養基雖無法抑制腐生菌生長,但

SC-13 Erwinia chrysanthemi 藍色色素存在於植物罹病 組織內的直接證據 - 陳家欣、游竣惟、李永安 (輔仁大 學生命科學系) Direct evidence for the existence of indigoidine in the Erwinia chrysanthemi - infected plant tissues - Chen, C.-H., Yu, Chun-Wei, and Lee, Yung-An (Department of Life Science, Fu Jen Catholic University, Taipei)

Erwinia chrysanthemi 可產生 indigoidine 藍色色 素,目前推測此色素可以提高 E. chrysanthemi 在植物 寄主內所受到的氧化逆境之抗氧化的能力。不過由於 indigoidine 藍色色素不易純化且無標準品,目前仍無法 直接證實 E. chrysanthemi 可在植物寄主內產生 indigoidine。本研究已研發出自 E. chrysanthemi 純化 indigoidine 藍色色素的簡單方法。將 E. chrysanthemi 培養於NGM 培養基來誘導大量藍色色素產生,接著將 菌體從培養基上取下來,經 SDS、Tris 緩衝液、及酒 精處理及清洗後,即可取得純化出 indigoidine 藍色色 素。此純化出的藍色色素經由核磁共振和紅外線光譜 分析,可確認其純度,並鑑定其結構為indigoidine。藍 色色素溶於 DMSO 溶劑,以甲醇 (methanol) 為移動相 進行 HPLC 分離, 偵測波長 615 nm 處之吸光值, 可以 在大約三分鐘時產生一個明顯的波峰。將受到 E. chrysanthemi 感染之蝴蝶蘭罹病組織,經萃取及純化 後,經 HPLC 檢測,結果顯示罹病組織內確實存在有 indigoidine藍色色素。

SC-14 Erwinia chrysanthemi 之黃色色素及其基因選殖 之研究 - 游硯仁、李永安 (輔仁大學生命科學研究所) Studies on the yellow pigment and its gene cloning of Erwinia chrysanthemi - Yu, Yen-Jen, and Lee, Yung-An (Department of Life Science, Fu Jen Catholic University, Taipei)

植物軟腐病原細菌 Erwinia chrysanthemi 會產生 indigoidine 藍色色素,將 E. chrysanthemi 不同菌株 (strain) 培養在 NGM 培養基上,有些菌株呈藍色,但 多數菌株則呈深綠色,並且在含不同有機氮的培養基 上,發現在含 casitone 的有機氮的培養基上,E. chrysanthemi 菌株會呈黃色,此黃色色素可溶於酒精及 丙酮,而 indigoidine 藍色色素則不溶於酒精及丙酮。 取培養在 NGM 培養基的 *E. chrysanthemi* 菌體,可以 酒精及丙酮取得黃色上清液,而沈澱的菌體則呈藍 色,因此在 NGM 培養基上,*E. chrysanthemi* 會同時產 生藍色及黃色色素,而呈深綠色。*E. carotovora* subsp. *carotovora* 在含 casitone 的有機氮的培養基上,並未呈 黃色,因此可依此特性區分 *E. chrysanthemi* 及 *E. carotovora*。自 *E. chrysanthemi* pb1(Echpb1) 的基因庫 (genomic library)中,篩選出黃色的*E. coli* 菌落 (*E. coli* EPI300 E-11),利用轉位子標定方法 (transposontagging),發現 β -ketoacyl- ACP synthase I 基因參與黃 色色素的產生,由此推斷黃色色素可能為脂肪酸的衍 生物。

SC-15 感染紅龍果之蟹爪蘭 X 病毒之特性分析與田間 調查 - 毛青樺、呂有其、張雅君(國立臺灣大學植物病 理與微生物學系) Characterization of a new Zygocactus virus X isolate from pitaya and its field survery - Mao, Ching-Hua, Lu, Yu-Chi and Chang, Ya-Chun (Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei)

紅龍果 (Hylocereus spp.) 原產熱帶美洲雨林, 屬仙 人掌科 (Cactaceae) 三角柱屬多年生攀緣性肉質植物, 喜高溫多濕之氣候。目前全台紅龍果栽種面積近 1000 公頃、每年栽種面積及總產量有持續增加的趨勢。研 究報導顯示 Potexvirus 屬之仙人掌 X 病毒 (Cactus virus X, CVX) 為國內已知唯一感染紅龍果的病毒,且普遍 存在於栽種的紅龍果植株中。2006 年本實驗室對陽明 山觀光果園的紅龍果進行田間調查,利用 CVX 抗血清 和專一性引子對,同時以 indirect-ELISA 和 RT-PCR 檢 測所採集樣品,結果發現每一個樣品都對 CVX 抗血清 呈現正反應,但其中 39 號紅龍果樣品無法增幅出 CVX 的專一性 RT-PCR 產物,卻可產生約 150 bp 的非 專一性片段。將此 150 bp 的片段純化、定序及比對 後,發現與 Potexvirus 屬之蟹爪蘭 X 病毒 (Zygocactus virus X, ZVX) 有最高之序列相同度。為進一步確認 39 號樣品是否被 ZVX 感染,我們利用已發表之 ZVX 序 列 (AY366208) 設計專一性引子對,成功從樣品 RNA 中增幅出預期的 800 bp RT-PCR 產物,並且進行解序 和序列比對,證實其與 ZVX 核苷酸序列相同度達 94%。當我們將 39 號紅龍果樣品組織液接種至白藜 (Chenopodium quinoa),7 至 8 天後接種葉出現淡黃色 的局限性病斑。因此以白藜進行三次單斑分離,獲得 一病毒分離株稱為 P39,並對其進行寄主範圍之測試。

根據 P39 已定序的部分設計專一性引子,配合 dT-BamHI 引子成功地從罹病植物全 RNA 增幅出約5 kb 片段,經選殖與解序後,再設計P39專一性引子與 ZVX 5'端非轉譯區專一性引子,以 RT-PCR 增幅出 5' 端的部分。目前已完成 P39 全長度 6624 個核苷酸之定 序與序列分析,發現 P39 與 ZVX 的 RdRp 與 CP 基因 之胺基酸序列相同度分別達 97% 和 96%,故可確認 P39 為一新發現可感染紅龍果之 ZVX 分離株,並命名 為 ZVX-P39,此為台灣 ZVX 的首次報導,亦為 ZVX 感染紅龍果之新記錄。將 ZVX-P39 病毒分離株各個基 因與其它已知序列的 Potexvirus 屬病毒進行序列比對及 類緣分析,結果顯示感染仙人掌科的 potexvirus 都屬同 一個分群中,顯示彼此的類緣關係較密切。為了解 ZVX 在紅龍果的感染情況,我們利用 ZVX 專一性引子 對陽明山地區種植的紅龍果進行RT-PCR 檢測,結果顯 示其感染比例達 50%, 此意味著 ZVX 是台灣紅龍果產 業應重視的新病毒。

SC-16 LsGRP1 蛋白質於葵百合葉片中之誘導表現 - 姚先玟、陳昭瑩 (國立台灣大學植物病理與微生物學 系) Induced expression of LsGRP1 in the leaves of *Lilium* cv. Star Grazer - Yao, H. W. and Chen, C. Y. (Dept. of Plant Pathology and Microbioligy, National Taiwan University)

為探討 LsGRP1 (Lilium 'Star Gazer' glycine-rich protein 1) 蛋白質在葵百合葉片之表現,將LsGRP1 之 cDNA 構築於大腸桿菌蛋白質表現系統之載體上,進行 LsGRP1 表現與純化,發現細菌表現之LsGRP1 蛋白質 在電泳膠體上有偏移及部分 C 端胺基酸缺失的現象。 進一步利用所得之 LsGRP1 製作多元抗體,得到含有 LsGRP1 抗體之兔子血清。使用 LsGRP1 抗體血清偵 測,進行經水楊酸處理之葵百合葉片蛋白質萃取條件 之測試,結果顯示利用非離子界面活性劑 Triton X-100 及還原劑硫氫乙醇 (2-mercaptoethanol) 萃取所得之蛋白 質樣品中可偵測到較高量之 38.2 kDa 蛋白質訊號,而 以高溫高鹼性處理及添加聚乙烯聚吡咯烷酮 (polyvinylpoly- pyrrolidone) 成分時可以偵測到約 66 kDa 的蛋白質訊號,又以高溫高鹼性處理所得66 kDa 訊號較強。進一步針對不同處理之葵百合葉片進行蛋 白質萃取、電泳分析及偵測,所有處理皆可穩定地偵 測到 38.2 kDa 蛋白質訊號, 且於百合灰黴病菌感染之 葉片蛋白質樣品中可偵測到最強的訊號。然而,僅有 在系統性誘導之系統葉蛋白質樣品中可偵測到 66 kDa 蛋白質訊號,推測 LsGRP1 可以巨大複合產物或是不 同後轉譯修飾形式存在於植物中,於系統性誘導之系統葉中可以 66 kDa 蛋白質形式存在。

SC-17 Identification and characterization of Apple chlorotic leaf spot virus in Taiwan - Wu, Zhong-Bin and Jan, Fuh-Jyh (Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan)

Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), Apple stem pitting virus (ASPV) and Apple stem grooving virus (ASGV) are economically important pathogens for commercial rosaceous fruit trees. Pear plants (Pyrus spp.) showing virus-induced symptoms of chlorotic and ring pattern were found in the orchards of central Taiwan. Degenerate primers for the coat protein (CP) genes of ACLSV, ASPV and ASGV were designed for detecting these viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). ACLSV was detected in the diseased pear plants by RT-PCR and a virus culture, designated LT, was isolated. The CP gene sequence and it deduced amino acid sequence of LT revealed 87.8-92.4% nucleotide identities and 90-97% amino acid identities, respectively, with those of ACLSV CP genes available in GenBank. LT was able to be mechanically transmitted to a range of herbaceous indicators. Flexuous and filamentous particles of around 750 nm were observed in negative stained samples from purified virions under the electron microscope. In addition, the accumulation and proliferation of virus particles in close association with endoplasmic reticulum were observed in ACLSV infected pear cells. Back inoculation of the virus to pear seedlings induced chlorotic symptoms similar to those observed in the fields. The polyclonal- and monoclonal antibody generated can specifically detected the 21 kDa CP in virus infected plants by western blotting analysis and can also be applied for quarantine purpose by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In 2007, three out of 219 imported pear scions from Japan and Mainland China were identified as ACLSV-infected by indirect-ELISA. Further, phylogenetic analyses revealed both host-associated and geographically - associated clustering of ACLSV isolates. Our data present the first conclusive evidence of ACLSV as the causal agent of the diseased pear plants showing symptoms of chlorotic in Taiwan.

SC-18 台灣產芒果炭疽病菌對 QoIs (Strobilurin) 及苯 丙咪唑 (Benzimidazole) 類殺菌劑之感受性及抗藥性機 制之研究 彭孟慈¹、黃俊德²、鍾文鑫¹ (¹國立中興大 學植物病理學系;² 台灣先正達股份有限公司屛東試驗 站) Sensitivity and resistance of mango anthracnose fungi to QoIs(Strobilurin) and Benzimidazoles in Taiwan. Peng, M. T.¹, Hung, C. T.², Chung, W. H.¹ (¹ Dept. of Plant Pathology National Chung Hsing University, ² Syngenta Taiwan Agricultural Research Station, Pintung).

QoI 類與苯丙咪唑類 (Benzimidazoles) 殺菌劑為常 用防治芒果炭疽病之藥劑。先前研究顯示,台灣芒果 炭疽病菌已對 QoI 類殺菌劑中之克收欣 (Kresoxim methyl, 44.2% 水懸劑)、亞托敏 (Azoxystrobin,10% 水 懸劑) 與三氟 (Trifloxy strobin, 50% 粒劑) 產生了低感受 性的現象。根據前人研究指出,Cytochrome b 基因中 第 129 與 143 密碼子之突變為控制抗藥性產生的機 制,然而經進一步分析卻發現台灣芒果炭疽病菌於 cyt b 第 143 並無突變現象產生。此外,經添加 SHAM (Salicyhydroxamic acid)之測試指出,Alternative oxidase (AOX)亦非其抗藥性產生之機制。另對苯丙咪 唑類 (Benzimidazoles)藥劑之感受性測試中,得知台灣 芒果炭疽病之抗藥性菌株與感受性菌株仍同時存在於 田間。此外,經專一性引子增幅並分析後,確定抗藥 性菌株在藥劑作用點 β-tubulin 基因上第 198 密碼子的 位置發生點突變,然未發現菌株在第 200 密碼子的位 置發生改變,此結果顯示,台灣芒果炭疽病菌對苯丙 咪唑類藥劑之抗藥性產生導因於 β-tubulin 基因的突 變。