

財團法人中正農業科技社會公益基金會
109 年農業科技研究計畫成果研討會議程

一、研討會時間：中華民國 109 年 7 月 01 日(星期三)

二、研討會地點：國立中興大學生物產業機電工程大樓 一樓演講廳

三、議程：

09:30~10:00 報 到

10:00~10:30 開幕典禮：陳炯松董事長、詹富智院長

10:30~12:00 專題報告

13:00~17:30 成果報告

時 間	題 目	演 講 人
第一節	專題報告	主持人： 李健全顧問
10:30~11:00	熱帶・亞熱帶溫室設計的應用理論與實務 編纂—熱帶亞熱帶溫室在台灣發展的故事	黃裕益教授 國立中興大學生物產業機電工程系
11:00~11:30	熱帶・亞熱帶溫室設計的應用理論與實務 編纂—熱帶亞熱帶溫室的構造與環境控制	張金元助理研究員 行政院農業委員會臺中區農業改良場
11:30~12:00	熱帶・亞熱帶溫室設計的應用理論與實務 編纂—熱帶亞熱帶溫室的展望與發展	蔡致榮副所長 行政院農業委員會農業試驗所
12:00~13:30	午 餐	
第二節	成果報告	主持人： 盛中德教授
13:30~14:00	表面增強拉曼光譜技術建立作物農藥殘留 快篩體系	劉豫川教授 臺北醫學大學醫學系
14:00~14:30	巴西蘑菇護肝保健產品開發與利用	楊啟裕組長 財團法人農業科技研究院動物科技研 究所
14:30~15:00	以蓖麻葉作為機能性飼料添加物	李滋泰教授 國立中興大學動物科學系
15:00~15:30	茶 會	
第三節	成果報告	主持人： 吳靖宙主任
15:30~16:00	以機器學習理論結合紅外線熱成像與微氣 候預測植物病徵之研究	張淵仁教授 逢甲大學航太與系統工程學系
16:00~16:30	由副梢生產「如玉」梨高接用之自給花穗	張哲嘉教授 國立中興大學園藝學系
16:30~17:00	改善目前台灣草莓苗生產模式	楊雯如教授 國立臺灣大學園藝暨景觀學系
綜合討論 17:00~17:30	主持人：劉易昇執行長、李健全顧問、盛中德教授、吳靖宙主任	

熱帶亞熱帶型態溫室在台灣發展的故事

國立中興大學生物產業機電工程學系 黃裕益

一、台灣熱帶亞熱帶型態溫室的發展

溫室的應用以保溫為初始目的，源起於高緯度寒帶地區。台灣跨處熱帶亞熱帶緯度，氣候型態終年適宜作物生長，但相對具有夏季高溫高濕，季節梅雨，豪大雨後接續的強日射，頻繁發生的颱風，及冬季偶爾侵襲的寒流等氣候特性，年年造成不同類型天然災害的農業損失。在台灣農業發展的過程，為克服此些不利作物生產氣候，也開始利用人為資材或設施以保護作物，確保農業生產。從早期使用稻草或塑膠布覆蓋土壤，防止雜草孳生及雨水沖刷。切花外銷鼎盛時期，使用遮雨棚隔離雨水，防止病害。為穩定夏季蔬菜生產的蔬菜栽培網室等簡易設施的利用。到引進並改良園藝設施先進地區技術，用以蝴蝶蘭等高經濟作物生產的全環控精密溫室。在熱帶亞熱帶的氣候體驗下，因應作物品項，生長階段，經營目標與商業模式等，依使用目的與需求機能，各有發展對應的栽培設施型式，依發展階段，約可區分有下列重要時間發展點。

- ～1968 試驗溫室及私人觀賞溫室
- 1968～ 塑膠布及外銷切花遮雨棚應用
- 1969～ 蔬菜網室
- 1975～ 鋁管簡易塑膠布溫室
- 1985～ 導入荷蘭 venlo 型精密玻璃溫室
- 1987～ 木瓜網室
- 1996～ 塑膠布水牆溫室
- 2000～ 熱帶亞熱帶地區自然通風結構型溫室
- 2014～ 熱帶水果溫室
- 2017～ 推動設施農業型計劃

二、熱帶亞熱帶溫室的發展方向

依據行政院主計總處 1990～2015 年的普查統計，各類栽培設施面積的變動趨勢如圖 1-1，2005 年後呈現大幅成長。於 2015 年設施栽培面積共達 32,861 公頃，各類設施所占面積比例如圖 1-2，以栽培果樹及蔬菜的簡易水平棚架及網室為主要生產設施，設施建造成本較高的塑膠布溫網室及溫室各為 1,846 及 1,104 公頃，合計僅約為設施總面積的 9%。水平棚架及網室等簡易設施的應用，在台灣的農業生產雖有具體的助益，但面臨強風或豪雨侵襲，作物損傷或設施損壞的風險相對也高。為穩定蔬果生產，農政單位於 2017 年開始推動 5 年設施農業計劃，推廣加強型水平棚架網室，鋁管塑膠布溫網室及結構型溫室等抗風性設施。另外氣候異常持續加劇，農民業者為能計劃性生產，及安全高品質產品的消

目 錄

專題報告

熱帶・亞熱帶溫室設計的應用理論與實務編纂—

熱帶亞熱帶溫室在台灣發展的故事	黃裕益	1
熱帶亞熱帶溫室的構造與環境控制	張金元	4
熱帶亞熱帶溫室的展望與發展	蔡致榮	6

成果報告

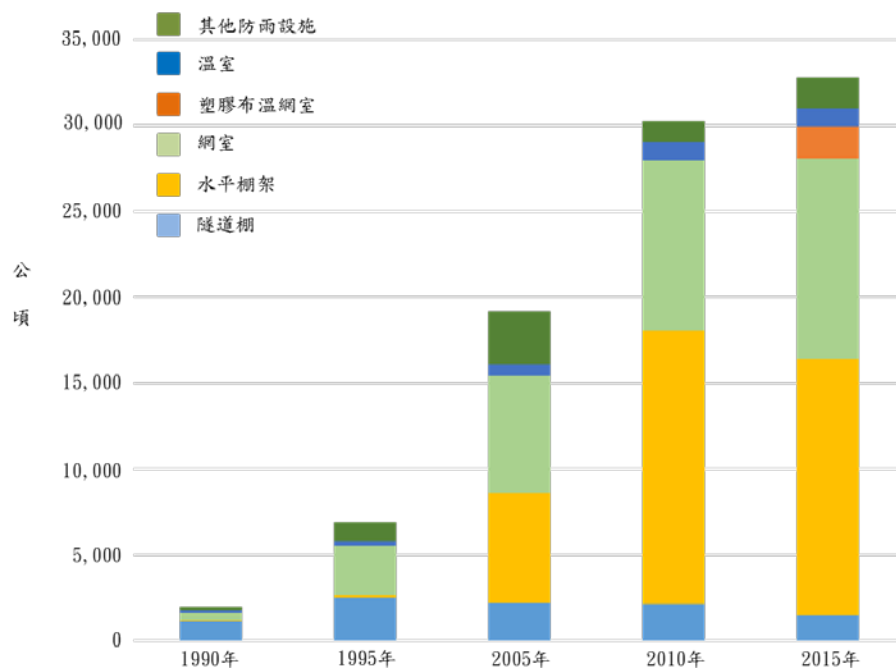
表面增強拉曼光譜技術建立作物農藥殘留快篩體系	劉豫川	8
巴西蘑菇護肝保健產品開發與利用	楊啟裕	22
以蓖麻葉作為機能性飼料添加物	李滋泰	33
以機器學習理論結合紅外線熱成像與微氣候預測植物病徵之研究	張淵仁	40
由副梢生產「如玉」梨高接用之自給花穗	張哲嘉	51
改善目前台灣草莓苗生產模式	楊雯如	70

費導向需求，對抗風性較高，能夠導入適當環控設備的鉅管塑膠布溫網室或結構型溫室，使用意願也提高。除蔬果類外，原本露天栽培的熱帶果樹，為防患病蟲害及氣象災害也逐漸走進設施栽培。綜合諸因素，今後溫室設置面積預估將快速增加，而在歷經 40 餘年發展過程的經驗累積，相較於高緯度地區溫室的應用概念，位於熱帶亞熱帶台灣的溫室，在結構安全，氣候環境與農業經營型態等方面，各具有差異的設計考量與應用狀況。

(1)結構安全方面，相較於寒帶地區溫室以增加光線透光率，及積雪垂直荷重為結構設計著眼點，使用輕型鋼構材及玻璃被覆為主。在熱帶亞熱帶氣候地區，基於低成本考量，目前溫室大部分使用鉅管構材及軟質塑膠布被覆，於颱風經年性發生的氣候中，溫室抗風安全性為基本要求，結構主要承受橫向風力荷重，如何在不增加過多成本，滿足室內作物光環境需求的前提下，經由零組件的補強與改良，開發低成本耐候型溫室為發展方向。

(2)氣候環境方面，相較於高緯度，低溫乾燥的大陸性氣候，使用大面積規模多連棟的溫室，內部氣候利用無遮光，高度環控的方式調整室內環境。於熱帶亞熱帶區域強日射，高溫高濕氣候型態，病蟲害多發生，多連棟大面積的溫室內容易累積過多熱量與水氣，必須藉助困難達到的龐大通風量才能加以排除。於目前溫室環控設備尚未普及使用的情況下，如何運用台灣蝴蝶蘭溫室環控發展的經驗，建立適當經濟溫室面積規格，與遮光，通風裝置及室內循環扇等基本配備的應用模式，調節適當作物生理的氣候環境，提高溫室使用效率，邁向熱帶亞熱帶區域溫室全年性生產的方向發展。

(3)農業經營型態方面，如荷蘭等園藝先進國家溫室，以農企業型態經營，大面積栽培管理作業，充分自動化降低生產成本，集中蕃茄或彩椒等少品項蔬果作物，較不重視風味以追求產量為生產目標。蝴蝶蘭溫室以外，台灣熱帶亞熱帶型態的溫室，普遍為0.2~0.3公頃的小農經營，栽培作物從葉菜到瓜果類及果樹等多樣品項，產品因應消費導向著重外觀與風味品質。在農業經營型態的發展，除推動農企業的創設外，並須結合小農共同經營，資材與技術共購共享，以降低生產成本確保供銷通路。在生產面，掌握既有高品質關鍵栽培技術，發揮熱帶亞熱帶充足日照優勢，融入荷蘭等先進高產量栽培觀念技術，增進設施農業經營收益。



注:2015 年塑膠布溫網室新增列為統計項目，於本書名稱為簡易型溫室

圖 1 台灣歷年各類設施栽培面積的變動(行政院主計總處，2018)

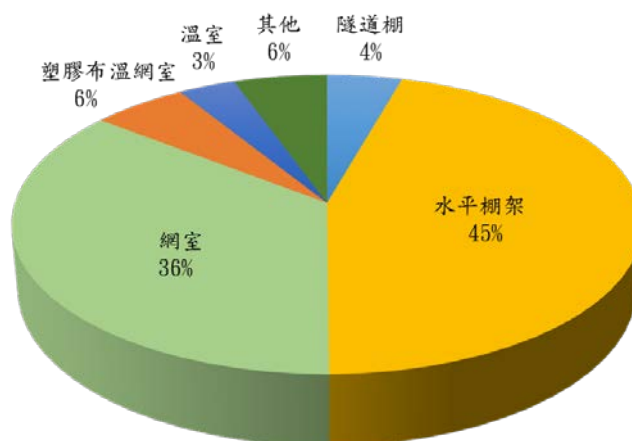


圖 2 2015 年台灣各類設施栽培面積比例(行政院主計總處，2018)

熱帶亞熱帶溫室的構造與環境控制

行政院農業委員會臺中區農業改良場 張金元

臺灣位處於熱帶、亞熱帶氣候區，有別於歐、美、日地區的溫、寒帶氣候區，在夏季有高溫、強降雨及颱風等侵襲，冬季則有低溫、寒流鋒面過境，又因產業多屬小農小栽培面積的結構，因此溫室構造與環境控制模式的發展較多樣態，並與歐美等地區有其不同之處，促使財團法人中正農業科技社會公益基金會委託台灣農業設施協會編撰有關熱帶、亞熱帶氣候區之溫室構造與環境控制專刊書籍，提供本土產業參考應用。

因應自然環境的變化，臺灣農業設施的發展歷程，從早期的遮風、避雨、遮光、防寒等需求，從網室、簡易溫室、強固型的溫室，以及發展環控型溫室、防颱型、防災型、防疫型的溫室型態，並進化到智慧型的溫室，為一相當多元化的生物與工程科學的綜合技術，包含環境控制、材料科技、機電控制、農業設施、結構工程等多項持續進步中的現代科技，而資通訊科技的大幅進步更造成農業也走入智慧化的應用領域，溫室包含多項技術領域，其中 2 大重要的項目即是溫室的構造與環境控制，講述內容包含溫室總體規劃設計、設計理論、系統設計、優化設計等，環境控制設備與應用包含環境控制的理論基礎、溫室內氣候環境特徵與控制、環境控制項目(光、溫室、濕度、CO₂、氣流、灌溉)等內容。

溫室的設計思維可分為二方向，一為溫室材料結構的優化設計，利用材料工程，以材質、形狀、形貌、機能的四項組合技術，提升溫室結構的基本強度；一為溫室組合抗颱強化設計，因應颱風來臨時的設計手段，以合理的成本與設施進行防颱工程設計。

在環境控制設備與應用方面，內容敘述光、輻射與日出方程式，環境分析方面包含濕空氣線圖(Psychrometric Chart)的應用，溫室栽培環境可分為熱量與水分的動態平衡的監測及調控，其中，可利用濕空氣線圖查詢求得絕對濕度(x, Absolute humidity)與飽和水蒸氣量(SMC)、相對濕度(RH, Relative Humidity)、乾球溫度、濕球溫度與露點溫度、比容與密度、比熱與焓等數值，均有其物理意義，並應用於環控設備控制策略中。

目前臺灣地區設施內的通風及噴霧控制，普遍依賴經驗法則，導致控制的結果有供不應求、或是供過於求的情況發生，不符合作物生長之環境所需。例如應用飽和蒸汽壓差控制法，與作物葉面之氣孔開度有關，能作為建置一高壓噴霧系統之控制準則，可根據溫室設施環境條件，利用熱平衡建立 VETH 線圖，進而設計通風量及噴霧水量，進而估算單位面積下所需之噴霧水量，以及設施內溫度可降低之幅度。已有研究指出，利用飽差控制在臺灣夏季玉女小番茄的栽培，結果顯示飽差控制環境下，作物的氣孔開度及光合作用皆優於未控制的環境，飽差控制可達到冷卻、調整蒸散量，促進光合成作用的效果。

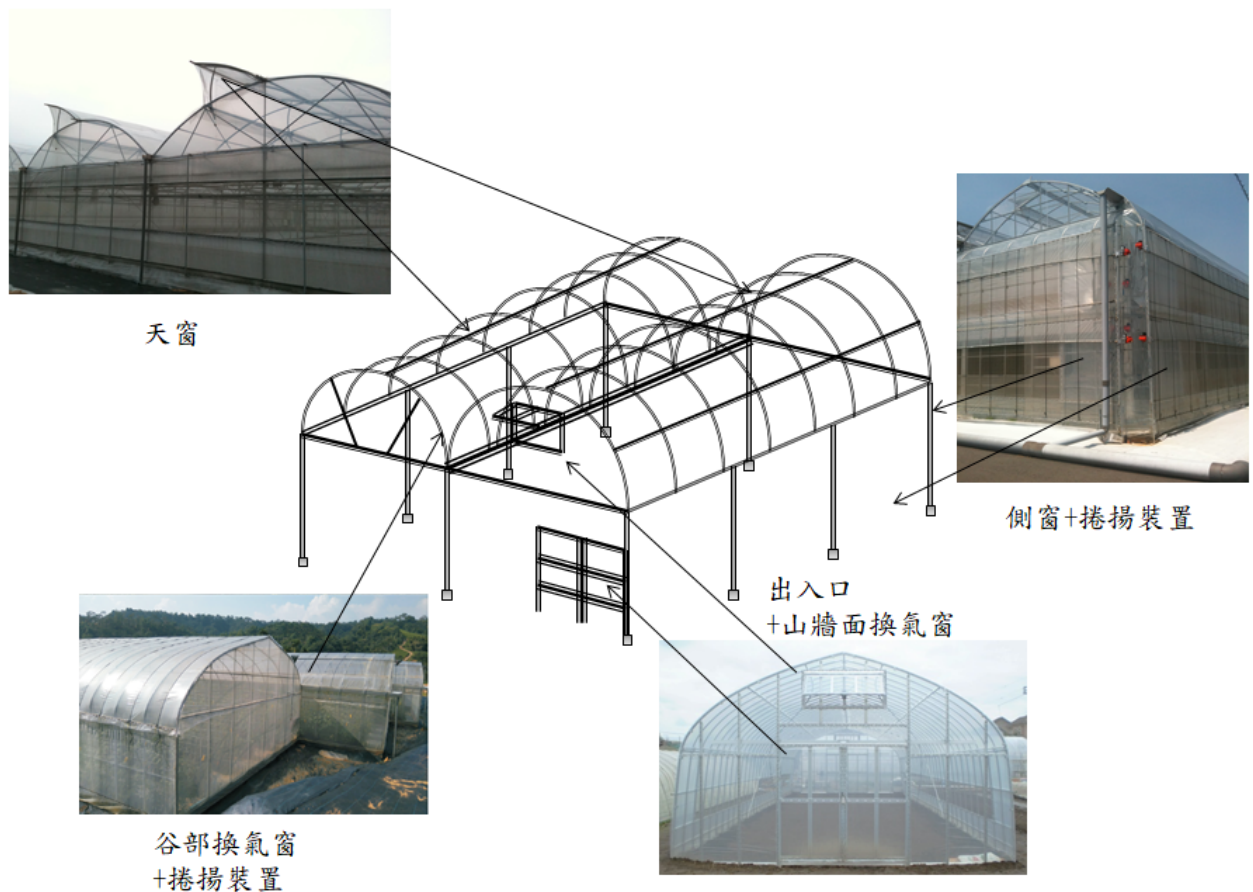


圖 1 塑膠布溫室常用的通氣窗位置及種類

熱帶亞熱帶溫室未來發展動向及展望

行政院農業委員會農業試驗所 蔡致榮

溫室栽培在未來將有可能為數十億人口帶來相對平價，卻又空前變化的高品質飲食生活。尤其是多數新鮮食用的蔬菜都將在"覆蓋下(under cover)"的環境栽種，以現況來看，溫室栽培已在西歐快速發展中，因受到人口、經濟與社會因素的壓力，使得受到保護的溫室栽培模式將戲劇性地擴展，但是溫室生產也相對地產生新的限制因素。在氣候變遷下，溫室栽培的發展將更多元化。溫室栽培仍將考量栽培成本而發展，但也會挑戰生產過程所需的控制面向，這將因現行科技的發展逐步實現。本文首先說明影響未來溫室栽培幾項環境因子的新研發，接著針對溫室的未來、未來的溫室、次世代溫室種植概念與半密閉溫室等層面加以探討。

溫室農耕是一個快速採用新科技的部門，溫室生產現在以其高品質農產品非常高的生產力為特點。溫室生產的高科技性質使它成為農業部門中最適合應用循環性法規以求更高永續性者之一。溫室栽培的發展為未來的趨勢，雖然未來難以預測，當藉由化石類燃料加熱被逐步淘汰，溫室生產所需的額外能量必需來自可得的再生資源，像是生質量或地熱與逐漸地從永續生產所獲得的電力；發光二極體(LED)將確保提供增強與非季節生產所需補光；具有冷卻與加熱功能的熱泵，將因勝過加熱器而被使用，並將應用在沒有加熱的溫室區域。在許多永續性措施上，雖然溫室執行得非常好。然而，進一步的改善極度重要，尤其在減少石化能源與水的使用方面。

另外溫室與垂直農場間的差異將變得更加模糊，有鑑於溫室與垂直農場兩者將操作的外在環境，溫室將有更多的垂直農場功能(光照、冷卻)，而且垂直農場將採用讓其變得更經濟的溫室功能。由於內部作物與室外的氣候，溫室被覆材料將被客製以取得太陽輻射的最佳好處，具有任意修改性質的「主動窗」材料，將

從目前的高階應用進入溫室被覆的主流使用，並發揮其效應。

應用環境感應器及資通訊技術，將可解決專業工人短缺的問題，因此未來的溫室將逐漸朝向具高度自動化、感測器使用、大數據分析與人工智慧的自主溫室開發，其中所有生長因素被精確量測，並以整合方式控制。由於未來溫室栽培不易受天氣變動性所影響，人工智慧的第一個商業應用將很有可能是垂直農場，再延伸使用於溫室，隨著人工智慧的發展與應用，機器視覺與機器人、作物操作管理與產品品質將更進一步改良。這些發展不只是關於科技，也關於科技與生物間交互作用。科技也將幫助並助益需要高程度教育與專門技術的栽培者，以妥善利用這些發展。

未來溫室園藝將以資源最有效率的使用，以確保高品質產品的永續生產，其係植物生產永續強化的最高範例。溫室園藝將為作物生產領導角色，進而影響露天栽培技術的創新應用。溫室園藝有一個明亮的未來，我國未來開發亞熱帶及熱帶永續溫室體系應考量方向，包括硬體面、軟體面、綜合系統整合評鑑及其它可用支援技術的導入。除了上述趨勢之掌握外，若干值得關注精進的議題包括：利基作物的評估設定、溫室系統化設計與評估及溫室農耕實踐的標準作業程序、炎夏溫室控溫設計與控制策略、不損失PAR成份的新穎被覆、適合潮濕氣候之降溫系統、省水與肥料之施用技術及零排放實踐、栽種作物生理知識的掌握與運用並訴求作物控制、輔助溫室農耕的省力或自動機械、配套的病蟲害綜合防治與採後檢疫處理，以及強化節能技術與策略等。任何精進溫室農耕的行動努力都值得肯定，但最重要問題無關特定技術的研發，而是必須優先處理技術針對地區狀況的適應與最佳化，以及配套進行該等技術使用在農藝性與經濟性之結果評估。

表面增強拉曼光譜技術建立作物農藥殘留快篩體系

臺北醫學大學 醫學系 生物化學暨細胞分子生物學科 劉豫川教授

摘要

目前農藥殘留檢驗是利用各種精密的氣相層析質譜儀及串聯式質譜儀(GC/MS、GC/MS/MS)、液相層析質譜儀及串聯式質譜儀(LC/MS、LC/MS/MS) 建立農藥資料庫，希望在農藥殘留檢驗不僅是技術之提升而是檢驗數據之精準及可靠性。然而質譜儀設備價錢昂貴、樣品前處理複雜、樣品檢測時間過長，並不適合應用在建立作物農藥殘留快篩體系。我們研究團隊最近創新結合以電化學法製造貴金屬奈米粒，及利用表面增強拉曼散射(surface-enhanced Raman scattering; SERS)中貴金屬奈米粒之表面電漿激發所產生之熱電子效應，將水分子團中之氫鍵打斷以製造具活性、穩定且獨立之弱氫鍵結構 pH 中性的液態電漿活化水(plasmon-activated water; PAW)，其性質有別於一般認知以強氫鍵作用之團聚水(bulk water)，在傳統電化學氧化還原法製備金與銀 SERS 活性基材時若使用 PAW 水，其 SERS 訊號的再現性均可顯著提升，創新 PAW 水有別於一般去離子的特性，將有助於在 PAW 水中進行相關 SERS 基材的創新研究與建立作物農藥殘留快篩體系。研究結果顯示在電化學法中使用 PAW 或臨場 PAW 來製造 SERS 基材時，與一般去離子水(DIW)比較，電流較大、效果較佳，尤其是在臨場 PAW 的環境下。在 PAW 或臨場 PAW 來製造時，所得 SERS 活性黃金基材上 R6G 的拉曼訊號較強，且光譜的再現性較佳，尤其是在臨場 PAW 的環境下。PAW 或臨場 PAW 下來製造時，所得 SERS 活性黃金基材上 R6G 的拉曼圖譜較均勻、光譜的再現性較佳(圖譜顏色較一致)，尤其是在臨場 PAW 的環境下。另外有奈米貴金屬的濾紙上、玻片上與銀基材上 SERS 訊號強度相當，同時發現 PAW 製造之 SERS 金/銀奈米粒滴在濾紙上，比用 DIW 製造之金/銀濾紙，檢測 R6G 時訊號強、再現性亦佳，顯示開發低價濾紙上 SERS 試片之潛力。同時以 PAW 製造之 SERS 金/銀複合基材，比 DIW 製造之複合基材，檢測 R6G 時訊號強且再現性佳，且也比純銀 SERS 基材的再現性佳。在農藥益達胺(imidacloprid, IM)的檢測上，可發現以 PAW 製造之 SERS 基材，比 DIW 製造之 SERS 基材，檢測 IM 時訊號強且再現性佳。進一步分析發現以 PAW 製造之 SERS 基材，比 DIW 製造之 SERS 基材，感測 0.1-20 ppm IM，靈敏度高(線性斜率較大)且再現性佳(R^2 較接近於 1)。同時農藥亞滅培(acetamiprid, AC)的檢測上，結果亦類似，感測 0.1-20 ppm AC，靈敏度高(線性斜率較大)且再現性佳(R^2 較接近於 1)。

關鍵詞：表面增強拉曼散射、電漿活化水、農藥、快篩、電化學

一、前言

(1) 背景說明

隨著國人生活水準的提升，對農產品的需求趨向多元化，也日益重視養生保健，因此不僅關注農產品的食味及營養，更關心安全衛生品質，如農產品之殘留農藥及重金屬污染等。另我國加入世界貿易組織（WTO）後，為拓展農產品國外市場，也需加強安全衛生品質的提升，以提升國產農產品內外銷市場之競爭力，紓緩國外農產品開放進口之衝擊。目前國內已公告有容許量之農藥多達 300 餘種，再依作物種類不同則有近 2 千多種容許量訂定，因此要全部建立分析方法較花費時間，目前果蔬多重農藥殘留分析方法分別由國家標準局及衛生署公告，由於新技術運用於微量分析之研究日益成熟，且在分析時效及檢驗數量之需求下，建立快速且準確之樣品前處理及創新的儀器分析方法乃當務之急。希望在快篩農藥殘留檢驗作業不僅是技術之提升而是檢驗數據之精準及可靠性，以達外銷有保障、內銷更安心的目的。目前農藥殘留檢驗是利用各種精密的氣相層析質譜儀及串聯式質譜儀（GC/MS、GC/MS/MS）、液相層析質譜儀及串聯式質譜儀（LC/MS、LC/MS/MS）建立農藥資料庫，針對農、畜、漁產品之前處理檢驗技術不斷研究及開發，希望在農藥殘留檢驗不僅是技術之提升而是檢驗數據之精準及可靠性，同時力求檢測技術與國際接軌下，研發可以同時檢驗 340 種以上之農藥分析方法；其敏感度可達百萬分之一至千萬分之一，除可達安全標準管制需要，更可對違規用藥的農產品測出不合格的農藥，使農藥殘留無所遁形。利用質譜儀檢測作物農藥殘留是目前的主力方式，然而設備價錢昂貴、樣品前處理複雜、樣品檢測時間過長、農藥偵測極限濃度僅到 ppm 等級，並不適合應用在建立作物農藥殘留快篩體系。另一方面，具有指紋鑑定功能的拉曼散射光譜儀，已被廣泛應用在鑑定界面上被吸附之分子與其化學吸附之本性，且目前商業上已有攜帶式的拉曼光譜儀，配備有 514, 633 and 785 nm 三種雷射光源與濾鏡系統，在做農藥殘留快篩檢測時更佳的方便，且價格較質譜儀便宜、操作簡單、樣品分析時間短，進一步利用奈米貴金屬表面電漿共振現象所發展的表面增強拉曼散射光譜（SERS），農藥偵測訊號可增強上百萬以上，因此可做到極低濃度的單分子檢測，其靈敏度可達 ppb 甚或 ppb 以下，在建立作物農藥殘留快篩體系具有優勢與發展的潛能。

我們研究團隊在教授、醫生、博士後與學生的努力下，最近創新結合以電化學法製造貴金屬奈米粒，及利用表面增強拉曼散射中貴金屬奈米粒之表面電漿激發所產生之熱電子效應，將水分子團中之氫鍵打斷以製造具活性、穩定且獨立之弱氫鍵結構 pH 中性的液態電漿活化水(plasmon-activated water; PAW)，其性質有別於一般認知以強氫鍵作用之團聚水(bulk water)，在傳統電化學氧化還原法製備金與銀 SERS 活性基材時若使用 PAW 水，其 SERS 訊號的再現性均可顯著提升，創新 PAW 水有別於一般去離子的特性，將有助於在 PAW 水中進行相關 SERS 基材的創新研究與發展 SERS 光譜在農藥殘留快篩體系的建立。

(2) 前人研究

質譜分析儀：由於質譜儀較其他的偵測器選擇性高，美國、歐盟、日本、韓國、中國大陸等均逐漸以質譜儀進行多重農藥殘留檢測，並逐步取代目前所使用的偵測器，歐盟並明確規範出使用質譜儀的要求(European Commission, 2007)，定義一級質譜(MS) 及二級質譜(MS/MS) 的辨識點 (Identification points, Ips)，並要求若未提供全質譜(full scan spectra)，推薦藥劑需有 3Ips，禁用藥劑需有 4 Ips。在符合中華民國實驗室認證體系(TAF) 的 ISO/IEC 17025 認證規範之實驗室的體系下，利用各種精密的氣相層析質譜儀(GC/MS、GC/MS/MS)、液相層析質譜儀(LC/MS、LC/MS/MS) 來針對農、畜、漁產品之檢驗技術進行研究及開發。

拉曼光譜儀：具有指紋鑑定功能的拉曼光譜，已被廣泛應用在鑑定界面上被吸附之分子與其化學吸附之本性，且目前商業上已有攜帶式的拉曼光譜儀，配備有 514, 633 and 785 nm 三種雷射光源與濾鏡系統，在做農藥殘留快篩檢測時更佳的方便，且價格較質譜儀便宜、操作簡單，進一步使用表面增強拉曼散射光譜(SERS)，可做到極低濃度的單分子檢測，其靈敏度可達 ppb 甚或 ppb 以下，在建立作物農藥殘留快篩體系具有優勢與發展的潛能。

表面增強拉曼散射文獻報導：最近由中研院的跨校研究團隊發表一項發明是利用貴金屬奈米粒子的表面電漿特性，所發展的表面增強拉曼散射技術為基礎，製作「捕捉與偵測細菌雙功能快速檢驗晶片」，具有超高的靈敏度，在幾秒鐘之內就可以取得單隻細菌的光譜，因此可望在短短幾小時內篩檢出菌血症與敗血症病人血液中的細菌(正常細菌檢測程序需時 2-5 天)，因此，可以有效幫助醫師快速而有效的使用抗生素，減少濫用抗生素的情形。1982 年 Lee 等人[1]發現以奈米的金及銀粒子可穩定的增強拉曼散射訊號，從此 SERS 技術的應用與研究更加地廣泛。1983 年 Stacy 的團隊更將拉曼散射增強到 10^{14} 倍，甚至 1997 年 Nie 的團隊突破性地以 SERS 技術偵測單一分子[2]。近年來，以 SERS 技術發展之各類生物醫學感測器正被廣泛研究，如以病毒為基礎奈米結構之 SERS 用於感測低濃度的 0.25 ng/ μ l DNA[3]。Li 等人[4]以銀/石墨烯奈米複合物快速臨場檢測水中微量之抗生素含量。Zhou 等人[5]報導採用合成的銀奈米顆粒塗佈的細菌的細胞壁，用 SERS 光譜檢測飲用水中的活細菌，研究結果顯示在銀奈米合成後，細菌的拉曼信號強度主要決定於細胞壁的 ζ 電位，比在簡單地混合膠體的細菌懸浮液的情況下，使用這種策略的細菌的拉曼信號的增強大約是 30 倍，而所需的總檢測時間只需要 10 分鐘，而總的反應物量可低至 1 毫升。經由疏水載玻片上 SERS 圖譜分析，此策略可以檢測到的細菌數目降低到 2.5×10^2 個/ mL。Ilkhani 等人[6]報導開發之生物感測器用於篩選化療藥物所造成 DNA 修飾/損傷的評估，此感測器利用 SERS 光譜和電化學方法來監測感官膜修飾和觀察藥物-DNA 的反應性。Grochowska 等人[7]報導製備 Au 薄膜沉積在高度有序的結構化鈦模板上的方法，其可用於 SERS 與電化學感測上，而 Ti 模板是從陽極氧化的鈦基材中選擇性去

除 TiO₂ 奈米管形成，測量的平均 SERS 信號顯著高於裸 Ti 模板觀察到的信號，這是由於 Au 膜顆粒附近的強電磁場。由文獻中的報導顯示 SERS 光譜在發展低濃厚分析物與快篩上的發展潛力。

表面增強拉曼散射在農藥檢驗上之文獻報導：尤於拉曼光譜具有指紋鑑定功能，而 SERS 光譜可有效提升光譜的解析度與放大訊號強度，近年來文獻中有許多 SERS 光譜在蔬果農藥測定上的應用[8-10]。Tan 等人[11]報導製備利用金屬羰基配合物-奈米粒子的結合，進而導致結合物的拉曼光譜 CO 振動的頻移的概念製造 SERS 晶片，可用有機磷酸鹽農藥的測定，其偵測極限濃度可達 0.1 ppb。了解植物中的農藥行為對於有效應用農藥和減少攝入農藥的暴露是非常重要的，Yang 等人[12]報導利用金奈米顆粒作為探針的 SERS 圖譜分析，了解活的羅勒葉上的農藥的滲透和持久性，結果顯示活葉在 30 分鐘至 48 h 的表面暴露後，農藥（10 mg/L）比已採收葉片更快、更深入地滲透到內部，在活葉上，系統殺蟲劑噻菌靈和非系統農藥 ferbam 可以分別穿透深度為 225 和 130 μ m。在 1 週後檢測到活葉上噻菌靈的降解，而 2 週後檢測到 ferbam 的表觀降解。快速抽樣和多成分檢測對於監測農藥殘留分析至關重要，Wang 等人[13]報導採用壁虎式的奈米觸手表面增強拉曼光譜（G-SERS）平台，同時檢測三種農藥，通過在 3D 奈米錐陣列上沉積銀奈米粒子（AgNPs）獲得的 G-SERS 平台是靈活和獨立的，此 SERS 陣列可提供優異的 SERS 活性（增強因子= 1.2×10^7 ）與優異的再現性（RSD = 5.8%），從黃瓜、蘋果和葡萄表面直接取樣，迅速可靠地測定了 thiram（TMTD），甲基對硫磷（MPT），孔雀石綠（MG）及其多種成分農藥。

創新電漿活化水的特性研究：我們研究團隊在教授、醫生、博士後與學生的努力下，最近創新結合以電化學法製造貴金屬奈米粒，及利用表面增強拉曼散射中貴金屬奈米粒之表面電漿激發所產生之熱電子效應，將水分子團中之氫鍵打斷以製造具活性、穩定且獨立之弱氫鍵結構(reduced hydrogen-bonded structure, RHBS) pH 中性的液態電漿活化水[14-17]，其性質有別於一般認知以強氫鍵作用之團聚水(bulk water)，例如此 PAW 水對氧氣以及氯化鈉的溶解度高，可去除自由基，抑制氧化壓力，具有還原能力，蒸汽壓高，反應電子傳送速率快、擴散係數大；使用 PAW 水能全方位的提升電解水產氫、產氧的效率[18,19]；此 PAW 水可成功創新利用在安全與有效率的血液透析研究[20]，實驗中透析分子與物質在 PAW 水的擴散係數顯著地提升，因此呈現更有效率的血液透析結果，進一步以奈米金修飾的人工腎臟，在做血液透析的同時照射共振光於人工腎臟，可更有效率、更安全，此歸因於在做血液透析能臨場(in situ)製造 PAW 水[21]。進一步研究發現與室溫下一般去離子水的蒸汽比較，PAW 水的蒸汽能對玻璃表面做奈米結構的蝕刻處理，將金薄膜沉積其上後，所得 R6G 的 SERS 訊號再現性顯著提升[22]，另外在傳統電化學氧化還原法製備金與銀 SERS 活性基材時若使用 PAW 水，其 SERS 訊號的再現性均可顯著提升，創新 PAW 水有別於一般去離子的特性，將有助於在 PAW 水中進行相關 SERS 基材的創新研究。

(3) 擬解決問題

農藥殘留管制為農產品安全品質最重要的一環，殘留檢驗是把關的重要手段之一。不同農產品在生產過程中因防治需要使用不同農藥，為強化管制功能必須使用能同時檢出多種農藥的分析方法以有效控管安全品質。目前農藥殘留檢驗是利用各種精密的氣相層析質譜儀及串聯式質譜儀(GC/MS、GC/MS/MS)、液相層析質譜儀及串聯式質譜儀(LC/MS、LC/MS/MS) 建立農藥資料庫，針對農、畜、漁產品之前處理檢驗技術不斷研究及開發，希望在農藥殘留檢驗不僅是技術之提升而是檢驗數據之精準及可靠性，同時力求檢測技術與國際接軌下，研發可以同時檢驗 340 種以上之農藥分析方法；其敏感度可達百萬分之一至千萬分之一，除可達安全標準管制需要，更可對違規用藥的農產品測出不合格的農藥，使農藥殘留無所遁形。農產品中之農藥及其它化學污染物之監測及調查，針對不同介質（生鮮蔬果、水畜產品、農產加工品、環境檢體及生物檢體等）需用不同之前處理，並應可同時偵測多數之化合物，此即多種殘留同時分析法。多種農藥及其代謝產物分析在不同基質上之前處理方法非常重要，在傳統農藥分析上，通常需先將樣品經過複雜前處理後，再以適當的儀器偵測，偵測儀器包括毛細管氣相層析儀及高效液相層析儀與質譜儀相連接等。利用質譜儀檢測作物農藥殘留是目前的主力方式，然而設備價錢昂貴、樣品前處理複雜、樣品檢測時間過長、農藥偵測極限濃度僅到 ppm 等級，並不適合應用在建立作物農藥殘留快篩體系。另一方面，具有指紋鑑定功能的拉曼散射光譜儀，已被廣泛應用在鑑定界面上被吸附之分子與其化學吸附之本性，且目前商業上已有攜帶式的拉曼光譜儀，配備有 514, 633 and 785 nm 三種雷射光源與濾鏡系統，在做農藥殘留快篩檢測時更佳的方便，且價格較質譜儀便宜、操作簡單、樣品分析時間短，進一步利用奈米貴金屬表面電漿共振現象所發展的表面增強拉曼散射光譜 (SERS)，農藥偵測訊號可增強上百萬以上，因此可做到極低濃度的單分子檢測，其靈敏度可達 ppb 甚或 ppb 以下，在建立作物農藥殘留快篩體系具有優勢與發展的潛能。

SERS 效應的產生是來自奈米金屬的侷限表面電漿共振效應，由於金屬中銀的莫耳消滅係數最高，因此銀之 SERS 增強效應優於金，然而與金奈米粒比較，銀的缺點為在一般環境中嚴重的老化問題。現今有很多發展出的技術可以製備具 SERS 活性的金屬基材，其中利用電化學程序，更可有效控制基材表面的粗糙度與均勻再現性。我們實驗室最近在金、銀 SERS 活性基材的研究當中，嘗試添加二氧化鈦與三氧化二鋁等氧化物奈米粒以製備具 SERS 活性奈米複合物，實驗結果顯示，不僅可增加 SERS 活性基材的穩定度，還可以顯著提高分析物的 SERS 訊號，對 R6G (Rhodamine 6G)染料偵測的極限濃度可降低至 1 ppq 以下 [23,24]。最近我們發展以電化學 UPD (underpotential deposition)策略沉積銀奈米粒子，以達兼具 SERS 活性與安定性之目的。結果顯示，銀奈米粒子覆蓋率可高達 0.95，修飾後之電極，其 R6G 拉曼光譜強度會增加 50 倍，且偵測極限濃度可低至 2×10^{-15} M，同時可有效提高具 SERS 活性基材的抗老化能力，此開發

之 SERS 活性基材更可在無需純化程序下有效檢驗出痛風病人關節液中的單鈉尿酸鹽(MSU) [25]。我們研究團隊利用電化學方法在奈米貴金屬製造與表面增強拉曼光譜技術的應用上，已有豐富之研究經驗，最近創新利用貴金屬奈米粒之表面電漿激發所產生之熱電子效應，將水分子團中之氫鍵打斷以製造具活性、穩定且獨立之弱氫鍵結構 pH 中性的液態電漿活化水。最近研究發現，PAW 水的蒸汽對玻璃與矽基材表面奈米處理後所得之 SERS 活性基材，或在 PAW 水中對金與銀基材進行電化學粗化程序處理後，具有高度之 SERS 再現性，相關技術值得進一步發展成感測器，之前研究亦顯示利用貴金屬奈米複合物製造的 PAW 水活性更佳、且對中草藥的萃取能力更強。因此本計畫擬以臨場即時(in situ)製造 PAW 水與電化學技術為基礎，製造高靈敏度、高再現性的 SERS 活性金、銀與其複合物基材，以降低農藥分子的極限偵測濃度與提高 SERS 光譜檢測的可靠度。

二、實驗方法

(1) 製造靈敏度、再現性高的SERS活性基材

所有實驗均使用 18.2 MΩ cm 之去離子水(DIW)，由 MilliQ 系統提供。所有電化學實驗均於三槽式之玻璃反應器中進行，首先以黃金(或銀)薄片為基材(工作面積為 0.238 cm²)，以自動拋光研磨機(Minimet 1000)先以鑽石膏將基材粗拋，接著以直徑為 1.0 μm 氧化鋁粉拋光，後經直徑為 0.05 μm 氧化鋁粉拋光至呈鏡面狀，經過超音波水洗後，再以 H₂O₂ 清洗表面之。以此清洗後之黃金(或銀)基材為工作電極，飽和氯化鉀之銀/氯化銀為參考電極，相對電極為白金片。放入已曝氬氣 30 分鐘之 20 ml、0.1 M 氯化鉀水溶液中(使用 PAW 與 DI 水)；ex situ PAW 水之製備詳述於實驗室發表的文獻。於室溫下，將線路與電化學量測系統(ECO, PGSTAT30)接好，設定 CV 之陰極與陽極掃描端電位分別為-0.28 V(停留 10 秒)及 1.22 V(停留 5 秒)，掃描速率為 500 mV/s，共 25 圈(實驗中照 green LED)，而對銀基材的粗化條件為 CV 之陰極與陽極掃描端電位分別為-0.30 V(端電位不停留)及 0.2 V(端電位不停留)，掃描速率為 25 mV/s，共 5 圈(實驗中照 blue LED)，待系統開路電位(open circuit potential, OCP)穩定後才開始進行實驗，實驗全程均曝氬氣；因 CV 過程中在基材表面會產生奈米金或銀，照共振光時即可產生 PAW 水，因此實驗後電極上即有具高 SERS-活性金屬奈米粒沉積，而後將電極以去離子水洗淨後置於真空烘箱中保存，以利進行後續實驗。如前所述，若先對金(或銀)，再對銀(或金)工作電極作 ORC 粗化處理(不改變電解質水溶液)，實驗過程中配合共振光的照射，即可於電極表面製備複合奈米金銀錯合物。

(2) 基材上SERS樣品製備

SERS 活性測試：上述製備之基材其 SERS 活性，以文獻中常見之 SERS 活性探測分子 Rhodamine 6G 大分子染料分析物溶液來檢測，利用 SAMs 模式(分析

物會自組裝吸附於金或銀奈米粒子表面)，直接量測分析物於溶液中之 SERS 光譜(實驗時對焦於基材上金屬奈米粒子表面)；亦可將含有分析物之溶液滴於基材上，進一步抽真空處理，量測乾式吸附分析物之 SERS 光譜。另可改變分析物之濃度，以求固定濃度下，基材上粒子具 SERS 活性點的數目。

農藥分子檢測：製備之具SERS活性基材檢測生物分子，如前述之方式可直接量測農作物榨汁前處理或以溶劑或PAW水萃取之分析物於溶液中之SERS光譜，亦可量測乾式吸附分析物之光譜(實驗前可利用硫醇類或其他化學藥劑架橋分子將農藥分子接在金屬奈米粒子上)；另外稀釋分析物於溶液中之濃度，以決定SERS活性基材對特定分析物之偵測極限濃度，亦可由調整金屬奈米粒子的LSPR位置與選擇不同雷射激發光源，得到特定分析物之最佳SERS光譜，並由農藥分子濃度與SERS光譜強度作圖，以得到定量分析時所需要的線性範圍。

(3) SERS活性基材之特性測試

(a) 以表面增強拉曼光譜(Renishaw, inVia or Model RAMaker)與傅立葉轉換紅外線光譜(FTIR, model Bruker-Tensor 27) 評估 SERS 效應之大小與分析物 SERS 光譜強度大小，分析檢測分子與奈米金屬顆粒界面間之化學結構以及其界面間的鍵結作用力，與檢測分子在奈米金屬顆粒表面吸附的方向性。

拉曼光譜實驗，光源採用 25 mW 之氦-氖雷射(He-Ne laser)在 632.8 nm 的激發線(亦可用 300 mW 二極體 785 nm 雷射或 50 mW 氬離子 514.5 nm 雷射)，以垂直方式照射試樣表面，每單位 1 mm 直徑的表面積約承受光強度 1 mW 的照射(亦可調整雷射光之強度，並以功率計紀錄強度)；粗勘之掃描範圍由 100 到 2000 cm^{-1} ，曝光累積時間為 10 s，掃描 2 次，而細勘每次曝光累積時間為 10 s，掃描 1 次；訊號以電荷耦合元件(charge-coupled device, CCD)偵測，解析度為 1 cm^{-1} 。實驗之再現性是經由樣品上六個不同區域進行量測，以及三次不同批次實驗，以光譜中強度最大之峰的強度當作標準比較，以 RSD 評估光譜可靠度，亦可以圖譜影像判斷光譜可靠度。

(b) SERS活性基材上之安定性

將 SERS 基材置於密封之加熱座(THMS 600, Linkam Scientific Instruments)內進行同步之升溫 SERS 實驗，升溫速率控制在 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，以量測具 SERS 活性基材的熱安定性，若需降溫時，系統注入液態氮以完成；此方式亦可進行臨場溫度-SERS 光譜研究，探求分析物光譜之溫度相關性。另外將 SERS 活性基材置於固定溫度與相對濕度的環境中一段時間，評估 SERS 活性基材試片的老化情況。

三、結果與討論

(1) 表面增強拉曼散射活性基材的製造

圖 1 所示為設計電化學臨場 (in situ) 製造電漿活化水 (PAW) 的反應器，來製造 SERS 活性黃金基材 (圖 1a)；圖 1b 與 1 c 分別顯示為電化學氧化還原法粗化黃金基材第 5 與 20 圈的循環伏安圖，顯示電漿活化水或臨場電漿活化水下來製造時，與一般去離子水(DIW)比較，電流較大、效果較佳，尤其是在臨場電漿活化水的環境下；同時在電化學標準氧化還原平衡測試時(圖 1d)，電漿活化水或臨場電漿活化水，與一般去離子水(DIW)比較，電流較大、氧化還原平衡較完美，尤其是在臨場電漿活化水的環境下。圖 2 顯示為在不同水中與有無照共振綠光環境下，製造 SERS 活性黃金基材上探測分子 R6G 的拉曼光譜圖。與圖 2a 比較(DIW, 不照光)，顯示電漿活化水或臨場電漿活化水下來製造時(圖 2b-d)，所得 SERS 活性黃金基材上探測分子 R6G 的拉曼訊號較強，且光譜的再現性較佳(相對標準差較低)，尤其是在臨場電漿活化水的環境下。

圖 3 顯示為在不同水中與有無照共振綠光環境下，製造 SERS 活性黃金基材上探測分子 R6G 的拉曼圖譜 (mapping)。與圖 3a 比較(DIW, 不照光)，顯示電漿活化水或臨場電漿活化水下來製造時(圖 3b-d)，所得 SERS 活性黃金基材上探測分子 R6G 的拉曼圖譜較均勻、光譜的再現性較佳(圖譜顏色較一致)，尤其是在臨場電漿活化水的環境下。圖 4 顯示為濾紙上 SERS 訊號強度(黑色)，玻片上 SERS 訊號強度(紅色與綠色)，銀基材上 SERS 訊號強度(藍色)，表現相當，顯示開發低價濾紙上 SERS 試片之潛力。

圖 5 所示為在不同水中製造 SERS 活性金/銀複合基材上探測 R6G 標準分子的拉曼光譜圖，由圖中可發現以創新電漿活化水 (PAW system) 製造之表面增強拉曼散射活性金/銀複合基材 (圖 5b)，比一般去離子水 (DIW system) 製造之複合基材 (圖 5a)，檢測 R6G 標準染料分子，訊號強 (cps 高) 且再現性佳 (相對標準差 RSD 低)，且比純銀基材 (空白組) 的再現性佳 (圖 1c)。圖 5a, 5b 與 5c 之 RSD 分別為 9.9%, 2.7% 與 8.7%，一般 SERS 感測晶片的 RSD 要控制在 10% 以下，RSD 愈低代表所得 SERS 光譜的可靠度愈高。圖 6 顯示為濾紙上含有在不同水中製造 SERS 活性金/銀複合膠體，探測 R6G 標準分子的拉曼光譜圖，同樣地由圖中可發現電漿活化水 (PAW) 製造之表面增強拉曼散射活性複合金/銀奈米粒滴在濾紙上 (紅色)，比用一般去離子水 (DIW) 製造之複合金/銀濾紙 (綠色)，檢測 R6G (圖 6a: 高濃度 R6G; 圖 6b: 低濃度 R6G)，訊號強 (cps 高)、再現性亦佳。

圖 7 顯示為 SERS 活性銀基材製造後，用不同水浸泡去除雜質後探測分子 R6G 的拉曼光譜圖，由圖中可發現以電漿活化水(PAW)清除雜質之表面增強拉曼散射活性銀基材 (圖 7b and 7d)，比用一般去離子水 (DIW) 清除雜質之表面增強拉曼散射活性銀基材 (圖 7a and 7c)，訊號再現性佳。在 PAW 系統之 RSD 分別為 9.4% 與 7.6%，而在 DIW 系統之 RSD 分別高達為 26.6% 與 19.1%，顯示利用電漿活化水處理後的 SERS 光譜的再現性確實較佳。圖 8 顯示為 SERS 活性金/銀基材在不

同水中製造後，用不同水浸泡去除雜後探測分子 R6G 的拉曼光譜圖，由圖中可發現以電漿活化水 (PAW)製造與清除雜質之表面增強拉曼散射活性金/銀基材 (圖 8c and 8f)，比用一般去離子水 (DIW) 製造與清除雜質之表面增強拉曼散射活性金/銀基材 (圖 8a and 8d)，訊號再現性佳。在 PAW 系統之 RSD 分別為 5.1% 與 4.3%，而在 DIW 系統之 RSD 分別高達為 20.2%與 18.1%。

(2) 表面增強拉曼散射活性基材用於常見農藥檢測

圖 9 顯示為在不同水中製造 SERS 活性金基材上探測不同濃度的農藥分子益達胺 (imidacloprid, IM)的拉曼光譜圖，由圖中可發現以電漿活化水 (PAW system) 製造之表面增強拉曼散射活性基材 (圖 9b)，比一般去離子水 (DIW system)製造之基材 (圖 9a)，檢測益達胺，訊號強且再現性佳 (不同濃度皆然)。進一步分析發現以電漿活化水 (PAW system)製造之表面增強拉曼散射活性基材 (圖 10b)，比一般去離子水 (DIW system)製造之基材 (圖 10a)，感測 0.1-20 ppm 的益達胺，靈敏度高 (線性斜率較大)且再現性佳 (R^2 較接近於 1)。

圖 11 顯示為在不同水中製造 SERS 活性金基材上探測不同濃度的農藥分子亞滅培 (acetamiprid, AC)的拉曼光譜圖，由圖中可發現以電漿活化水製造之表面增強拉曼散射活性基材 (圖 11b)，比一般去離子水製造之基材 (圖 11a)，檢測亞滅培，訊號強且再現性佳 (不同濃度皆然)。進一步分析發現以電漿活化水製造之表面增強拉曼散射活性基材 (圖 12b)，比一般去離子水製造之基材 (圖 12a)，感測 0.1-20 ppm 的亞滅培，靈敏度高 (線性斜率較大)且再現性佳 (R^2 較接近於 1)。

四、結論

隨著奈米科技的進展與相關產品的問世，奈米科技其實已經開始進入民眾的生活，近年來由科技部大力推動之「奈米科技」與「生物科技」，經過近幾年的努力，已經是一般大眾耳熟能詳之新名詞，而「奈米科技」與「生物科技」結合的未來發展潛力無窮。近年來隨著食品安全衛生問題的日益嚴重，傳統利用質譜檢驗食品或農作物中農藥的殘留，已不足以應付突如其來的食安風暴。近年來文獻中有許多 SERS 光譜在蔬果農藥測定上的應用。另外創新 PAW 水有別於一般去離子的特性，將有助於在 PAW 水中進行相關 SERS 基材的創新研究與發展 SERS 光譜在農藥殘留快篩體系的建立。計畫期間已完成 SERS 活性基材之開發與一些常見農藥的檢測，研究結果顯示在電化學法中使用 PAW 或臨場 PAW 來製造 SERS 基材時，與一般去離子水(DIW)比較，電流較大、效果較佳，尤其是在臨場 PAW 的環境下。在 PAW 或臨場 PAW 來製造時，所得 SERS 活性黃金基材上 R6G 的拉曼訊號較強，且光譜的再現性較佳，尤其是在臨場 PAW 的環境下。PAW 或臨場 PAW 下來製造時，所得 SERS 活性黃金基材上 R6G 的拉曼圖譜較均勻、光譜的再現性較佳(圖譜顏色較一致)，尤其是在臨場 PAW 的環境下。另

外有奈米貴金屬的濾紙上、玻片上與銀基材上 SERS 訊號強度相當，同時發現 PAW 製造之 SERS 金/銀奈米粒滴在濾紙上，比用 DIW 製造之金/銀濾紙，檢測 R6G 時訊號強、再現性亦佳，顯示開發低價濾紙上 SERS 試片之潛力。同時以 PAW 製造之 SERS 金/銀複合基材，比 DIW 製造之複合基材，檢測 R6G 時訊號強且再現性佳，且也比純銀 SERS 基材的再現性佳。在農藥益達胺 (imidacloprid, IM) 的檢測上，可發現以 PAW 製造之 SERS 基材，比 DIW 製造之 SERS 基材，檢測 IM 時訊號強且再現性佳。進一步分析發現以 PAW 製造之 SERS 基材，比 DIW 製造之 SERS 基材，感測 0.1-20 ppm IM，靈敏度高 (線性斜率較大) 且再現性佳 (R^2 較接近於 1)。同時農藥亞滅培 (acetamiprid, AC) 的檢測上，結果亦類似，感測 0.1-20 ppm AC，靈敏度高 (線性斜率較大) 且再現性佳 (R^2 較接近於 1)。此計畫之研究策略可應用於其他農藥的檢測上，計畫實驗成果可創新應用於「表面增強拉曼光譜技術建立作物農藥殘留快篩體系」等相關農藥殘留光譜檢測產業之突破性發展，亦可應用於質譜檢測產業，發展新的檢測思維。

五、謝誌

感謝財團法人中正農業科技社會公益基金會實驗經費的贊助 (中基—農—A—107—004、中基—農—A—108—020)，感謝臺北醫學大學實驗場地與儀器使用的贊助。

六、參考文獻

- [1]. Lee, P. C.; Meisel, D. *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 3391.
- [2]. Nie, S.; Emory, S. R. *Science* **1997**, 275, 1102.
- [3]. Lebedev et. al. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 77, 306.
- [4]. Li, Y. T.; Qu, L. L.; Lin, D. W.; Song, Q. X.; Fathi, F.; Long, Y. T. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 43, 94.
- [5]. Zhou, H.; Yang, D.; Ivleva, N. P.; Mircescu, N. E.; Niessner, R.; Haisch, C. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 1525.
- [6]. Ilkhani, H.; Hughes, T.; Li, J.; Zhong, C. J.; Hepel, M. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 80, 257.
- [7]. Grochowska, K.; Szkoda, M.; Karczewski, J.; Śliwiński, G.; Siuzdak, K. *Talanta* **2017**, 166, 207.
- [8]. Kim, et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8, 32094.
- [9]. Alsammarraie, F. K.; Lin, M. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65, 666.
- [10]. Cui, H.; Li, S.; Deng, S.; Chen, H.; Wang, C. *ACS Sens.* **2017**, 2, 386.

- [11]. Tan, et al., *Biosens. Bioelectron.* **2017**, 96, 167.
- [12]. Yang, T.; Zhao, B.; Kinchla, A. J.; Clark, J. M.; He, L. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65, 3541.
- [13]. Wang, et al., *Anal. Chem.* **2017**, 89, 2424.
- [14]. Chen, et al. *ACS Nano* **2014**, 8, 2704.
- [15]. Chen, et al. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 808.
- [16]. Yang, C. P.; Chen, H. C.; Wang, C. C.; Tsai, P. W.; Ho, C. W.; Liu, Y. C. *Sci. Rep.* **2015**, 5, 18152.
- [17]. Chen, et al. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 22166.
- [18]. Hwang, et al. *Sci. Rep.* **2015**, 5, 16263.
- [19]. Chen, H. C.; Mai, F. D.; Yang, K. H.; Chen, L. Y.; Yang, C. P.; Liu, Y. C. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 28456.
- [20]. Chen, et al. *Sci. Rep.* **2014**, 4, 4425.
- [21]. Chen, et al. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8, 19691.
- [22]. Chen, et al. *Green Chem.* **2016**, 18, 3098.
- [23]. Mai, F. D.; Yang, K. H.; Liu, Y. C.; Hsu, T. C. *Analyst* **2012**, 137, 5906.
- [24]. Yang, K. H.; Liu, Y. C.; Hsu, T. C.; Juang, M. Y. *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 7530.
- [25]. Ou, K. L.; Hsu, T. C.; Liu, Y. C.; Yang, K. H.; Tsai, H. Y. *Anal. Chim. Acta* **2014**, 806, 188.

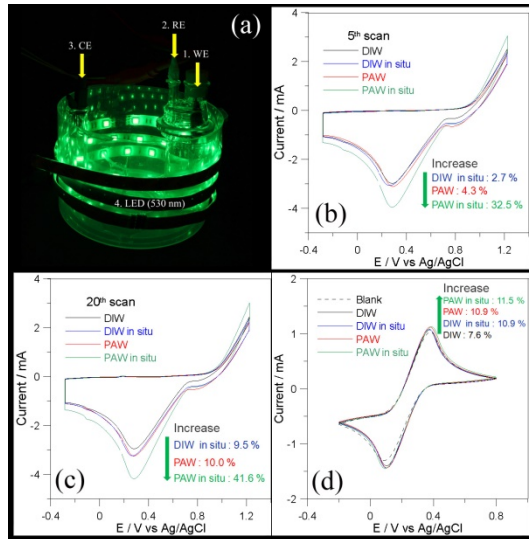


圖 1. 臨場 (in situ) 製造電漿活化水 (PAW) 來製造 SERS 活性黃金基材：(a) 反應裝置圖；(b) 電化學氧化還原法粗化黃金基材 (第 5 圈)；(c) 電化學氧化還原法粗化黃金基材 (第 20 圈)；(d) 電化學氧化還原平衡測試

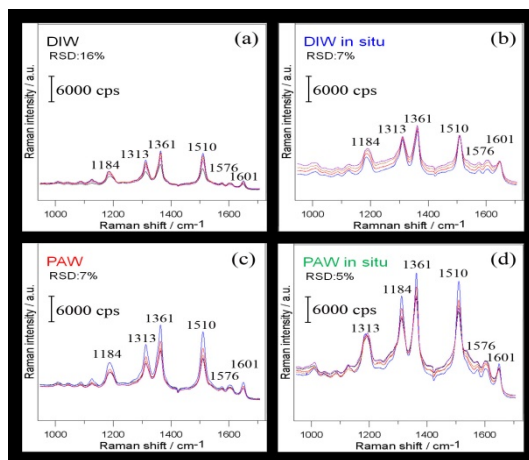


圖 2. 在不同環境下製造 SERS 活性黃金基材上探測分子 R6G 的拉曼光譜圖：(a) 去離子水 (DIW, 不照光)；(b) 去離子水 (DIW, 照共振光)；(c) 電漿活化水 (PAW, 不照光)；(d) 電漿活化水 (PAW, 照共振光)

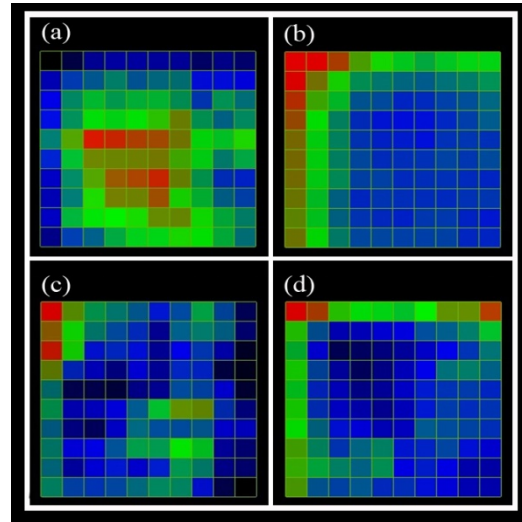


圖 3. 在不同環境下製造 SERS 活性黃金基材上探測分子 R6G 的拉曼訊號圖譜 (mapping)：(a) 去離子水 (DIW, 不照光)；(b) 去離子水 (DIW, 照共振光)；(c) 電漿活化水 (PAW, 不照光)；(d) 電漿活化水 (PAW, 照共振光)

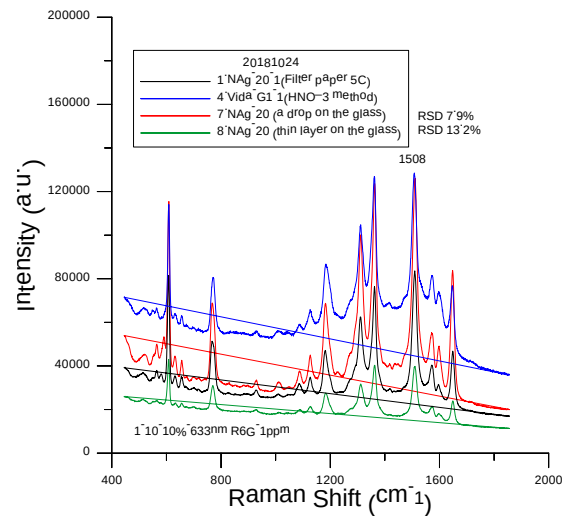


圖 4. 濾紙上 SERS 訊號強度(黑色)，玻片上 SERS 訊號強度(紅色與綠色)，銀基材上 SERS 訊號強度(藍色)，表現相當。

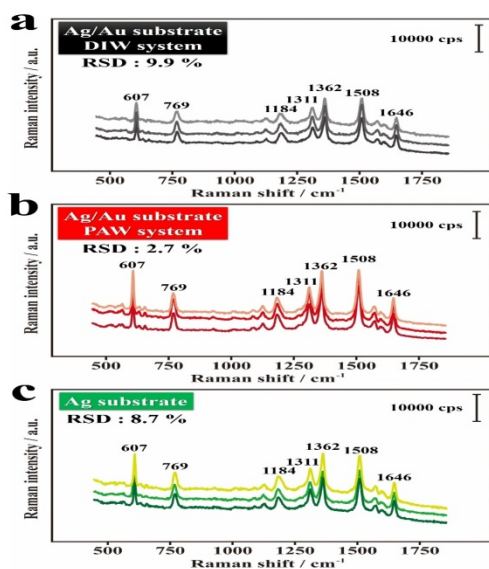


圖 5. 在不同水中製造 SERS 活性金/銀複合基材上探測 R6G 標準分子的拉曼光譜圖：(a) 在去離子水 (DIW system) 製造；(b) 在電漿活化水 (PAW system) 製造；(c) 在去離子水 (DIW system) 製造 SERS 活性銀基材 (空白組)

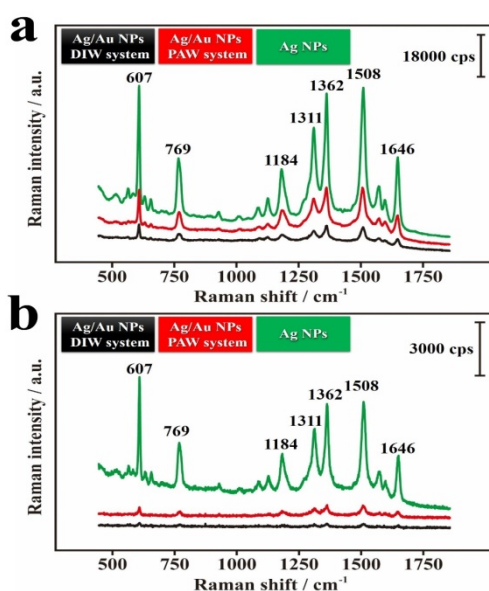


圖 6. 濾紙上含有在不同水中製造 SERS 活性金/銀複合膠體探測 R6G 標準分子的拉曼光譜圖：(a) 高濃度的檢測分子；(b) 低濃度的檢測分子。紅色為以電漿活化水 (PAW) 系統製

造之 SERS 活性銀/金膠體，黑色為以去離子水 (DIW) 系統製造之 SERS 活性銀/金膠體，綠色為沒有金修飾的銀膠體光譜 (空白組)。

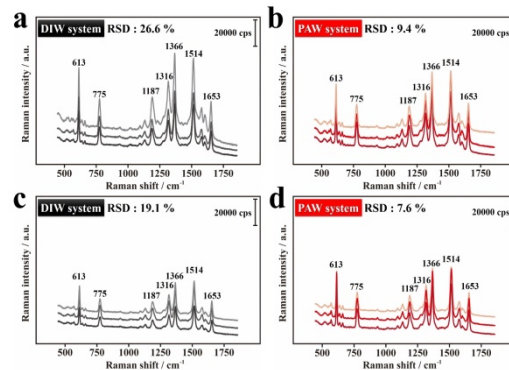


圖 7. SERS 活性銀基材製造後用不同水浸泡去除雜後探測分子 R6G 的拉曼光譜圖：(a) 泡在去離子水 (DIW)；(b) 泡在電漿活化水 (PAW)；(c) 泡在去離子水 (DIW)；(d) 泡在電漿活化水 (PAW)。a,b 為第一批實驗；c,d 為第二批實驗

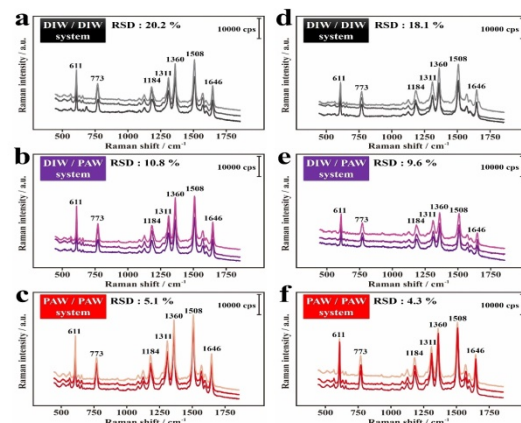


圖 8. SERS 活性金/銀基材在不同水中製造後用不同水浸泡去除雜後探測分子 R6G 的拉曼光譜圖。DIW/DIW: DIW 系統中製造、泡 DIW (光譜 a 與 d)；DIW/PAW: DIW 系統中製造、泡 PAW (光譜 b 與 e)；PAW/PAW: PAW 系統中製造、泡 PAW (光譜 c 與 f)。

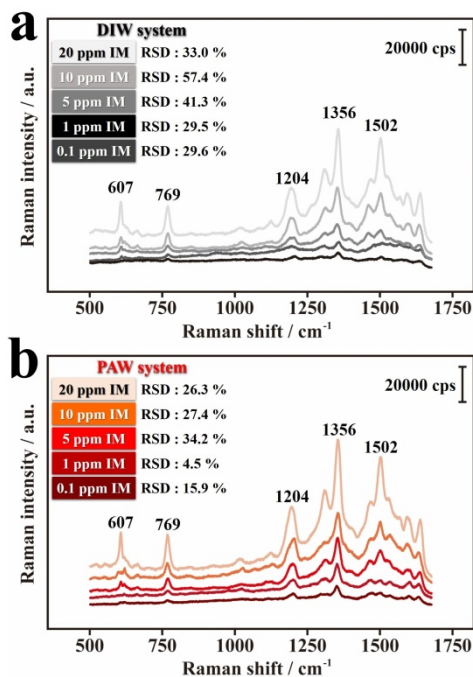


圖 9. 在不同水中製造 SERS 活性金基材上探測不同濃度的農藥分子益達胺 (imidacloprid, IM) 的拉曼光譜圖：(a) 在去離子水 (DIW system) 製造；(b) 在電漿活化水 (PAW system) 製造。

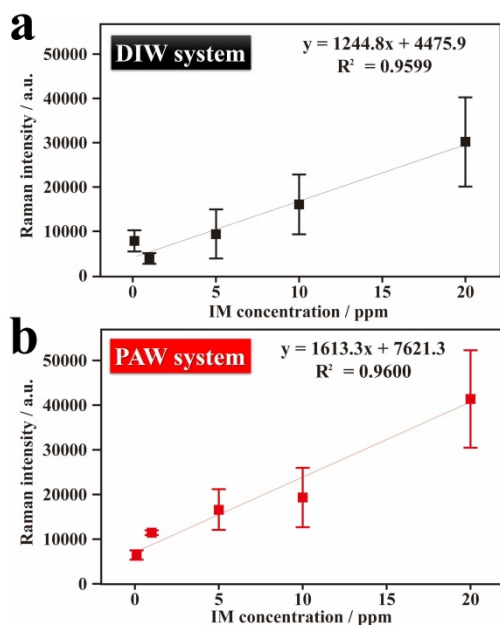


圖 10. 在不同水中製造 SERS 活性金基材上探測不同濃度的農藥分子益達胺 (imidacloprid, IM) 的拉曼感測圖：(a) 在去離子水 (DIW system) 製造；(b) 在電漿活化水 (PAW system) 製造。

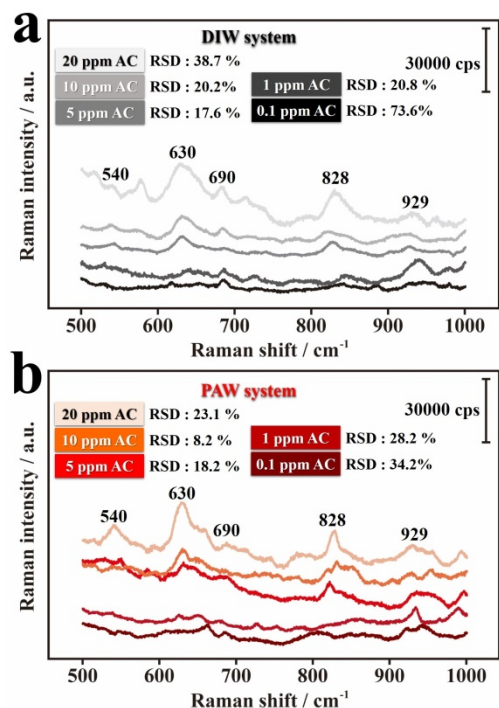


圖 11. 在不同水中製造 SERS 活性金基材上探測不同濃度的農藥分子亞滅培 (acetamiprid, AC) 的拉曼光譜圖：(a) 在去離子水 (DIW system) 製造；(b) 在電漿活化水 (PAW system) 製造。

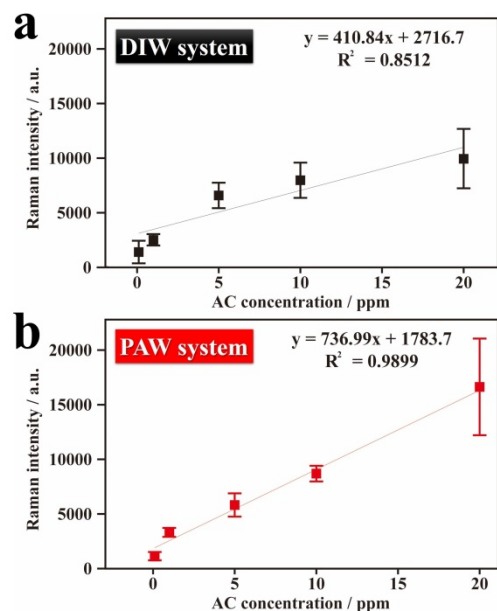


圖 12. 在不同水中製造 SERS 活性金基材上探測不同濃度的農藥分子亞滅培 (acetamiprid, AC) 的拉曼感測圖：(a) 在去離子水 (DIW system) 製造；(b) 在電漿活化水 (PAW system) 製造。

巴西蘑菇護肝保健產品開發與利用

洪鈺雯、張芳毓、羅偉哲、楊啟裕

財團法人農業科技研究院動物科技研究所

摘要

根據衛生福利部資料統計，肝癌是全球第三大致死癌症，在台灣近五年來則是徘徊在第一、二大之致死癌症。巴西蘑菇 (*Agaricus blazei* Murill) 的子實體中的 β -(1 $\rightarrow$ 6)-D 葡聚多醣體 (β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan) 含量高，為菇類之冠。依據文獻指出 β -D-聚葡萄糖可以活化人體巨噬細胞、T 細胞、B 細胞、自然殺手細胞等，藉此加強人體的免疫功能，大幅增加人體對抗疾病侵襲的能力，進一步研究發現，巴西蘑菇中的多醣體，能增強肝血的流動，可能使肝機能得到恢復，預防變性或壞死、纖維增生，加上透過強化人體的免疫機能，增強人體對抗病毒的能力，或許可以預防台灣極為盛行的肝炎。另外，巴西蘑菇所含的維他命、礦物質是肝細胞再生的重要營養素，並可促進肝臟代謝，減輕肝臟負擔。本計畫將依循衛福部公告的「健康食品之護肝保健功效評估」(衛署食字第 1031304063 號)之高脂飼料誘導非酒精性脂肪肝方法，評估巴西蘑菇萃取液濃縮物是否有助於延緩經高脂飼料誘導所引起之脂肪肝或降低其危險因子的功效。

壹、前言

巴西蘑菇 (*Agaricus blazei* Murill) 又稱姬松茸、小松菇、巴西洋菇、柏氏蘑菇，為常見的食藥用真菌。原產地於巴西，亦分佈於秘魯、美國加州南部及佛羅里達州海邊，其外觀呈菇柄長且粗、色白，菇傘呈短筒狀、淺褐色。現今前求每年約超過一億人口將巴西蘑菇作為健康食品食用，其形式多半用做養身食材或飲品。在日本進行的研究導致鑑定出某些具有抗腫瘤活性的物質之後，在全世界引起了極大的科學和經濟興趣。巴西蘑菇因含有大量多醣體在許多文獻中為探討免疫功效，但仍有幾篇針對脂質代謝，如高膽固醇飲食大鼠降血脂 (de Miranda et al., 2013) 功效，對小鼠酒精性脂肪肝之影響 (Uyanoglu et al., 2014) 及在小鼠糖尿病模式上的影響 (Furukawa et al. 2006)。除癌症和慢性肝炎外，這種蘑菇還被用於抗多種疾病的民間醫學，包括糖尿病，動脈硬化和高脂血症 (Wasser et al., 1999)。

β -葡聚糖自然存在於穀物、細菌和真菌的細胞壁中，其理化性質因來源而異。 β -葡聚糖形成帶有 1-3 個 β -糖苷鍵的線性骨架，但其分子量、溶解度、黏稠度、分支結構和膠凝特性各不相同，從而在動物中引起多種生理效應，而巴西蘑菇的 β -葡聚糖為 β -(1 $\rightarrow$ 6)。

許多文獻表明， β -葡聚糖可有效治療癌症，多種微生物感染，高膽固醇血症和糖尿病等疾病。它們的作用機制涉及將它們識別為非自身分子，因此它們的存在會刺激免疫系統 (Chen et al. 2007)。最近的研究還表明， β -葡聚糖對改善代謝症候群有益 (Uskokovic et al., 2013; Mirjan et al. 2013)，代謝症候群包含是高血糖，高血壓、血脂異常、胰島素抵抗和中樞性肥胖在內的一系列危險因素的集合 (Xu et al., 2017)。巴西蘑菇內 β -葡聚糖對於護肝之功效，也已有文獻指出對於四氯化碳誘導之肝損傷有保護之功效 (Al-Dbass et al., 2012)。

非酒精性脂肪肝 (Non- alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 在歐美地區已經成為主要的肝病之一，台灣由於飲食及生活習慣的改變，病人有逐漸增加的趨勢。非酒精性脂肪肝依照其嚴重程度可分為脂肪肝、脂肪性肝炎 (Non- alcoholic steatohepatitis, 簡稱 NASH) 與肝硬化。

NAFLD是指脂肪（主要是三酸甘油酯）在肝細胞中的積累超過肝臟重量的5%，主要由胰島素抵抗引起，因此經常與肥胖，第2型糖尿病和血脂異常伴隨的代謝變化一起發生。

貳、材料與方法

一、藥品與試劑

Cholesterol/Cholesteryl Ester Quantitation Assay kit (abcam, Cat. No. ab65359)、Triglyceride Quantitation Assay kit (abcam, Cat. No. ab65336)、Superoxide Dismutase (SOD) Colorimetric Activity Kit (Invitrogen™, Cat. No. EIASODC)、Glutathione Colorimetric Detection Kit (Invitrogen™, EIASHC)、60%高脂飼料 (ResearchDiets, Cat. No. D12492)、Chloroform (Sigma-Aldrich, Cat. No. C2432)、10% Buffered Neutral Formalin (ASK®, Cat. No. 02F010)、Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Biological Industries, Cat. No. 02-023-1A)、注射用水 (信東生技股份有限公司)、0.9% normal saline (信東生技股份有限公司)、Isoflurane (寶齡富錦生技股份有限公司)。

二、巴西蘑菇萃取、濃縮與檢測

本研究使用台灣南投埔里鎮栽種的巴西蘑菇（由新台灣植物新藥股份有限公司提供），以現代化農場經營管理，再將收成後的巴西蘑菇進行乾燥，提供優良製造標準 (Good Manufacturing Practice, GMP) 的食品加工廠以水分別進行三批次萃取，經調配、充填、鎖蓋、排爐、殺菌及貼標後，製造成每瓶60 mL的巴西蘑菇液，儲放於 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ / $60\pm 5\%$ RH條件下，設定取樣點為第0、1、2、3、6、9、12 個月進行長期安定性試驗，抽樣分析每瓶裝的巴西蘑菇液的 β -glucan含量為0.517~0.624%，符合在0.44~0.66%允收規格內，pH 值為5.38~5.43及包含總生菌數、大腸桿菌、大腸桿菌群、沙門氏桿菌、金黃色葡萄球菌、黴菌、酵母菌檢測結果皆呈現陰性。將上述的巴西蘑菇液經濃縮及凍乾成為巴西蘑菇萃取液濃縮物後，冷藏保存供後續試驗使用。

三、實驗動物

6週齡之C57BL/6JNarl (B6) 品系雄性小鼠，購自國家實驗動物中心（台北，台灣），飼養於獨立空調與12小時自動明暗控制之GLP動物試驗室（動物科技研究所，財團法人農業科技研究院，苗栗，台灣），動物房溫度控制於 $18-26^{\circ}\text{C}$ 、濕度維持在30-70%。小鼠飼養皆符合財團法人農業科技研究院實驗動物照護及使用委員會 (Institutional Animal Care and Use Committee of Agricultural Technology Research Institute) 之規範，動物實驗核准編號為實動字第108012。

四、各試驗組別資訊

依循衛福部「健康食品之護肝保健功效評估」（衛署食字第1031304063號）之高脂飼料誘導非酒精性脂肪肝方法，將C57BL/6JNarl品系雄性小鼠隨機分組如下表：

組別	試驗內容	樣本數
A.正常對照組	餵飼正常飼料（LabDiet cat#5058）；每隻小鼠每日以管餵針經口服注射用水 0.2 mL，連續 18 周。	n=10
B.負控制組 （肝損傷組）	餵飼 60%高脂飼料（D124592）；每隻小鼠每日以管餵針經口服注射用水 0.2 mL，連續 18 周。	n=10
C.巴西蘑菇萃取液濃縮物0.25倍劑量組	餵飼 60%高脂飼料（D124592）；每隻小鼠每日以管餵針經口服巴西蘑菇萃取液濃縮物（175 mg/kg b.w./day）0.2 mL，連續 18 周。	n=10
D.巴西蘑菇萃取液濃縮物0.5倍劑量組	餵飼 60%高脂飼料（D124592）；每隻小鼠每日以管餵針經口服巴西蘑菇萃取液濃縮物（350 mg/kg b.w./day）0.2 mL，連續 18 周。	n=10
E.巴西蘑菇萃取液濃縮物1倍劑量組	餵飼 60%高脂飼料（D124592）；每隻小鼠每日以管餵針經口服巴西蘑菇萃取液濃縮物（700 mg/kg b.w./day）0.2 mL，連續 18 周。	n=10
F.巴西蘑菇萃取液濃縮物2倍劑量組	餵飼 60%高脂飼料（D124592）；每隻小鼠每日以管餵針經口服巴西蘑菇萃取液濃縮物（1400 mg/kg b.w./day）0.2 mL，連續 18 周。	n=10

五、巴西蘑菇萃取液濃縮物之護肝功效試驗

將小鼠以單手保定方式固定後，A 及 B 組小鼠以餵食針每日依體重口服投予 0.2 mL 注射用水，C 組小鼠投予巴西蘑菇萃取液濃縮物 0.25 倍劑量（175 mg/kg b.w.），D 組小鼠投予巴西蘑菇萃取液濃縮物 0.5 倍劑量（350 mg/kg b.w.），E 組小鼠投予巴西蘑菇萃取液濃縮物 1 倍劑量（700 mg/kg b.w.），F 組小鼠投予巴西蘑菇萃取液濃縮物 2 倍劑量（1400 mg/kg b.w.）；期間 A 組小鼠給予一般飼料（LabDiet cat#5058），B~E 組小鼠給予 60%高脂飼料餵飼連續誘導 18 周。試驗期間每周秤量體重 1 次，並且於投予後第 18 周進行以心臟採血後犧牲，檢測肝臟功能生化指標，包含麩胺酸苯醋酸轉氨基酵素（Aspartate aminotransferase，AST；又稱 Glutamic Oxaloacetic Transaminase，GOT）、麩胺酸丙酮酸轉氨基酵素（Alanine aminotransferase，ALT；又稱 Glutamic Pyruvic Transaminase，GPT）、總膽固醇（Total Cholesterol，TC）與三酸甘油酯（Triglyceride，TG）。另將小鼠肝臟組織取下後以冰 0.9% 生理食鹽水洗乾淨後，進行秤重及拍照。將最大右肝葉以 10%中性福馬林固定，之後修片並進行 H&E 染色及病理觀察與判讀，其餘肝組織儲存於-70 °C 以下冷凍保存，以利進行後續的肝臟中脂質-三酸甘油酯與總膽固醇之分析，與肝臟中超氧化物歧化（Superoxide Dismutase，SOD）與穀胱甘肽（Glutathione，GSH）酵素活性之分析。

六、血清生化指標分析

血液於室溫靜置約30分鐘後，於4℃下以離心機3,500 rpm 離心 15 分鐘，取上層血清於 -70℃以下冷凍櫃保存。使用全自動乾式生化分析儀(FUJIFILM, DRI-CHEM 4000i)，進行AST、ALT、TC與TG參數分析。

七、肝臟中三酸甘油酯 (TG) 與總膽固醇 (TC) 檢測分析

收集0.1 g的肝臟組織，使用冰的生理食鹽水沖洗，加入1 mL脂質萃取液I (氯仿: 甲醇 = 2 : 1) 利用組織均質機 (QIAGEN, TissueLyser II) 研磨萃取，以3,500 rpm離心15分鐘，取上清液，再用脂質萃取液I定量至1 mL，再加入200 µL 0.9% 的生理食鹽水，以3,500 rpm離心10分鐘，去除上清液，利用脂質萃取液II (氯仿: 甲醇: ddH₂O = 3 : 48: 47) 定量到1 mL，以3,500 rpm離心10分鐘，去除上層液，再以甲醇定量到900 µL，再利用脂質萃取液I定量至1 mL，將甲醇揮發後，分別使用膽固醇及三酸甘油酯商用市售試劑組分析肝中膽固醇及三酸甘油酯含量。

八、肝臟中超氧化物歧化酶 (SOD) 與穀胱甘肽 (GSH) 檢測分析

依照 Superoxide Dismutase (SOD) Colorimetric Activity Kit (Invitrogen™, Cat. No.EIASODC) 套組說明，秤重0.1 g的肝臟組織，使用冰的生理食鹽水沖洗，加入1 mL PBS 中均質，以1,500×g，4℃下離心 10 分鐘，取上清液進行檢測，其測定的方法是以黃嘌呤和黃嘌呤氧化酶產生超氧自由基，其與 2- (4-碘苯基) -3- (4-硝基苯酚) - 5-苯基四唑氯化 (2- (4-iodophenyl) -3- (4-nitrophenol) -5- phenyltetrazolium chloride) 而形成紅色 azan 染料顯影。超氧化物歧化酶活性為測量該反應氯化物在測定條件下的受抑制程度。SOD 的每一單位抑制 50% 的 2- (4-碘苯基) -3- (4-硝基苯酚) -5-苯基四氮唑的還原速率，SOD 的比活性測定值是以 U / (g protein) 表示。檢測肝臟中 GSH 依照 Glutathione Colorimetric Detection Kit (Invitrogen™, EIAGSHC) 套組進行檢測，取 0.1g 肝臟組織於 1% SSA 中進行萃取，以 14,000 rpm，4℃下離心 10 分鐘，取上清液進行後續分析，其測定方法為通過使用 2-vinylpyridine 阻斷樣品中的任何游離 GSH，可以測定氧化型穀胱甘肽 (GSSG)，任何未經 2-乙基吡啶處理的樣品都將產生總 GSH 含量，單位為 µM / (mg protein) 表示。

九、組織病理學檢查與病變評分

肝臟以10%中性福馬林固定至少24小時後，委外進行組織包埋、切片及染色與組織病理判讀。使用蘇木紫－伊紅 (Hematoxylin & Eosin, H&E) 染色，為了避免觀察主觀上的偏差，所有的組織病理切片都是由最大右葉肝的同一位置切取下來，進行組織H&E染色，於光學顯微鏡下觀察不同處理組的組織病理學變化。肝細胞脂肪油滴堆積乃依據依循衛福部公告的「健康食品之護肝保健功效評估」(衛署食字第1031304063號) 公告之健康食品之護肝保健功效所述，將病灶分5 級等半定量評分。

評分	肝細胞脂肪油滴病變程度
0	正常 (0%)
1	輕微 (<10%)
2	中度 (10 ~ 33%)
3	嚴重 (33 ~ 66%)
4	極嚴重 (66 ~ 100%)

組織病理依據 Shackelford 等人於 Toxicologic Pathology 所發表之文獻 (2002) 所述分 5 級等評分。

評分	病變程度
0	正常(0%)
1	極微 (< 10%)
2	輕度 (10 ~ 39%)
3	中度 (40 ~ 79%)
4	嚴重 (80 ~ 100%)

十、統計分析

各試驗組所得數值以Microsoft Excel求出平均數(Mean)及標準偏差值(standard deviation, SD)，最終以Mean ± SD呈現於報告中。體重、血清生化學及肝臟中脂質與酵素活性分析之統計方法以One-Way ANOVA進行分析，若 $p < 0.05$ ，代表至少有兩組間有顯著差異性，再以Duncan's Multiple Range Test同時比較各組別間之差異 ($p < 0.05$)。脂肪肝半定量與組織病理學病變分析係以各劑量組動物所呈現的脂肪肝與病變經記錄後與正常對照組與負控制組進行Score value 分析，以統計軟體SPSS (Ver. 22.0)電腦統計套裝軟體進行變異數分析 (analysis of variance, ANOVA)，並以 Duncan's test 多重比較來比對不同劑量組間顯著差異效果 ($p < 0.05$)。

參、結果與說明

一、臨床症狀、存活率與體重變化

於小鼠開始投予後每日進行死亡率及臨床症狀觀察，動物外觀、精神狀態、行為、呼吸、口鼻觀察、眼睛、皮膚、消化或代謝等，試驗期間皆無動物死亡且無因試驗物質造成之異常症狀。試驗期間，每周監測各組別實驗動物體重皆穩定上升，且正常對照組與負控制組（肝損傷組）隨著周數增加體重有顯著差異 ($p < 0.05$)，從第8周開始，給予巴西蘑菇萃取液濃縮物 1 倍劑量組之組別與負控制組（肝損傷組）有顯著差異 ($p < 0.05$)。每周體重變化如圖 1。

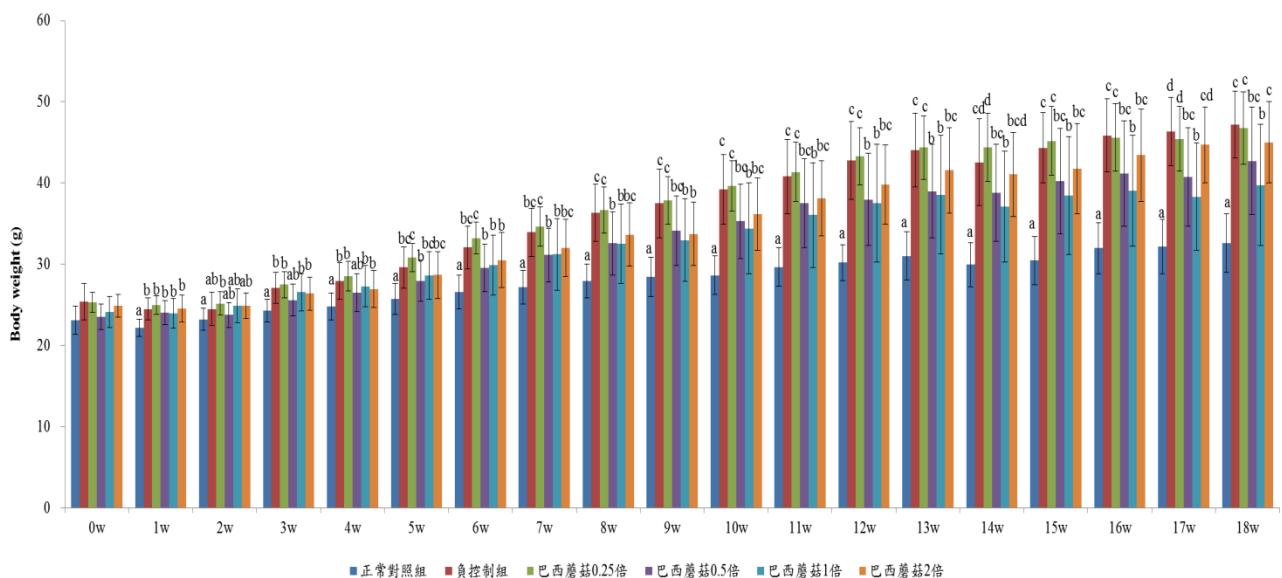


圖1、給予巴西蘑菇萃取液濃縮物連續18周下對於高脂飼料誘導非酒精性脂肪肝小鼠的每周體重變化。Values represent mean ± SD。a,b,c,d 不同字母代表有顯著性差異 ($p < 0.05$)。

二、小鼠肝重與體重比

將小鼠犧牲後取下肝臟組織秤重，與犧牲當周體重進行肝體比計算（肝臟重/體重 $\times 100\%$ ）。結果顯示，負控制組（肝損傷組）的小鼠肝臟與各組相較下明顯腫大，且肝體比顯著性較高於正常對照組（ $p < 0.05$ ），給予巴西蘑菇萃取液濃縮物1倍與2倍劑量組之肝體比顯著較低於負控制組（肝損傷組）（ $p < 0.05$ ），如圖2。

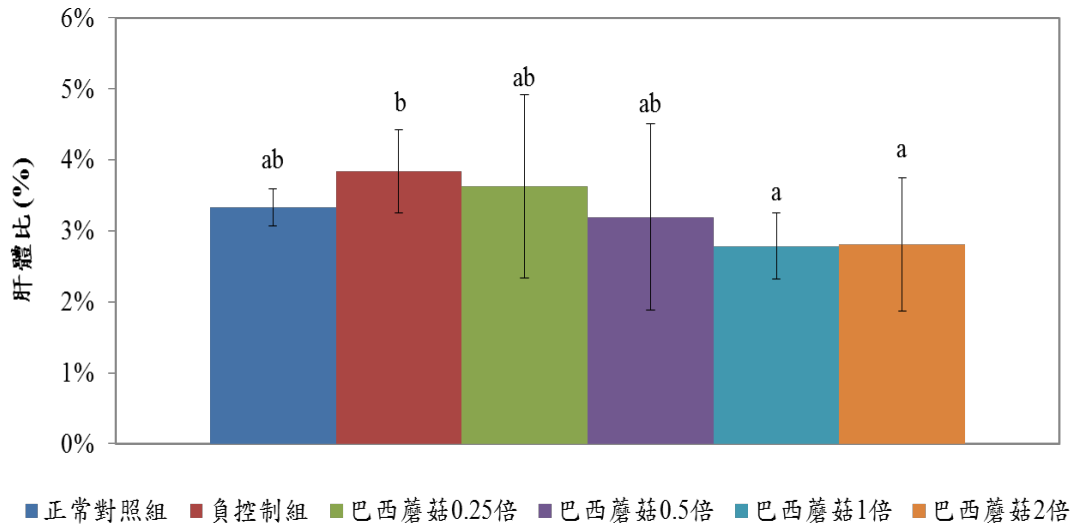


圖2. 巴西蘑菇萃取液濃縮物對於高脂飼料誘導非酒精性脂肪肝18週後之小鼠肝體比表現。

三、血清生化值檢測

1. 血清中麩胺酸苯醋酸轉氨基酵素（AST）與丙氨酸轉氨酶（ALT）含量分析

在小鼠血清中 AST 分析結果顯示，正常對照組與負控制組（肝損傷組）有顯著差異（ $p < 0.05$ ），且給予巴西蘑菇萃取液濃縮物 0.25 倍、0.5 倍與 2 倍劑量組與負控制組（肝損傷組）有顯著差異（ $p < 0.05$ ）；在 ALT 分析中，正常對照組與負控制組有顯著差異（ $p < 0.05$ ），且給予巴西蘑菇萃取液濃縮物 0.25 倍、0.5 倍、1 倍與 2 倍劑量組皆與負控制組（肝損傷組）皆有顯著差異（ $p < 0.05$ ），如圖 3。表示給予巴西蘑菇萃取液濃縮物 0.25 倍劑量以上能有效降低血清中肝臟發炎指數 AST 與 ALT 的表現。

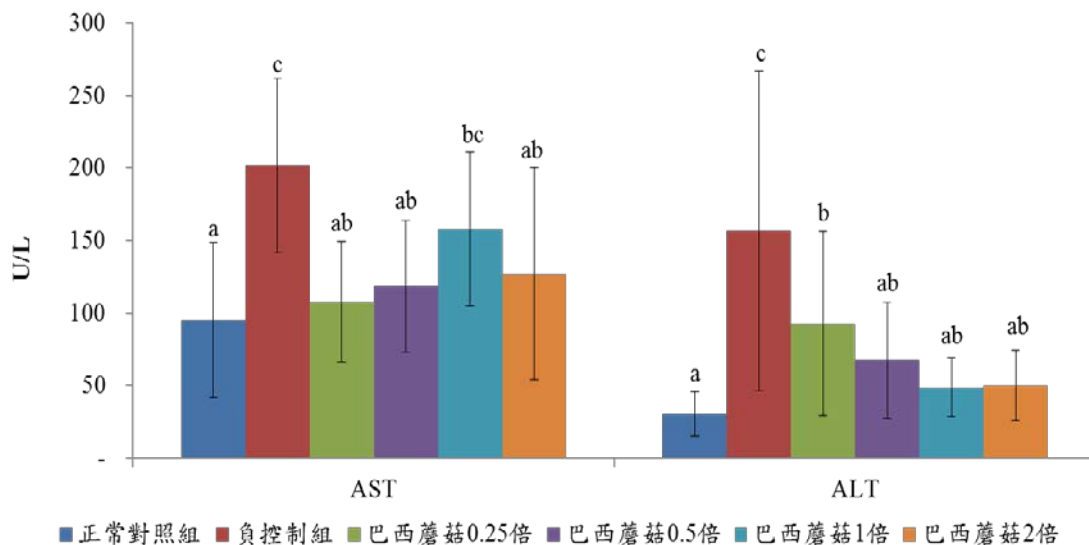


圖3. 巴西蘑菇萃取液濃縮物對於高脂飼料誘導非酒精性脂肪肝18週後之小鼠血清中AST與ALT影響。Values represent mean $\pm$ SD。a,b,c不同字母代表有顯著性差異（ $p < 0.05$ ）。

2. 血清中三酸甘油脂 (TG) 與總膽固醇 (TC) 含量分析

在小鼠血清中 TG 分析結果顯示，各組間皆無顯著差異 ($p>0.05$)。在血清中 TC 分析結果顯示，正常對照組與負控制組 (肝損傷組) 具顯著差異 ($p<0.05$)，且給予巴西蘑菇萃取液濃縮物 0.5 倍與 1 倍組別與負控制組 (肝損傷組) 有顯著性差異 ($p<0.05$)，如圖 4。表示給予巴西蘑菇萃取液濃縮物 0.5 倍與 1 倍劑量以上能降低血清中總膽固醇含量。

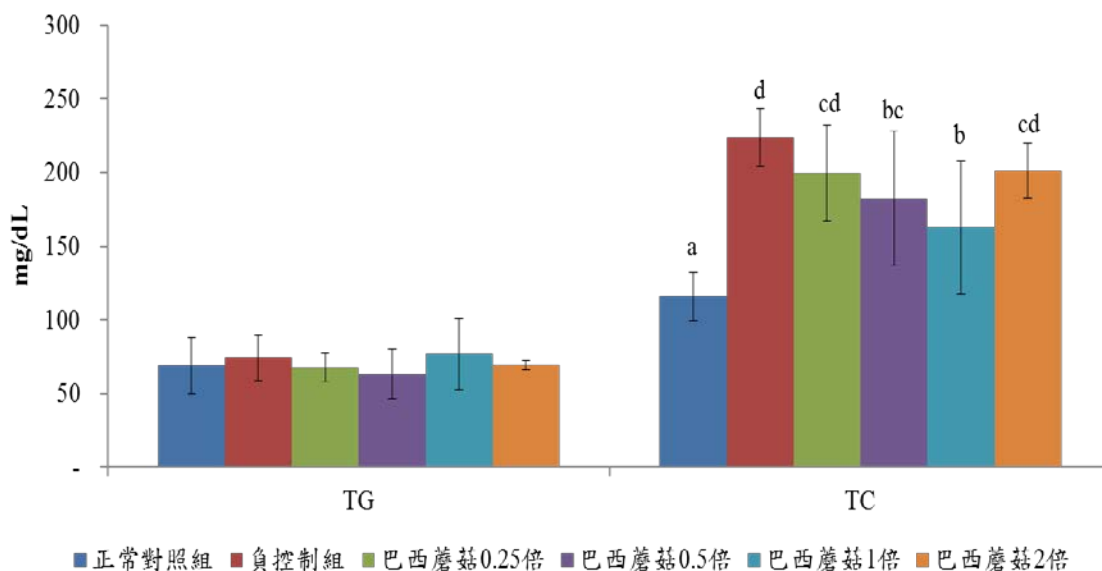
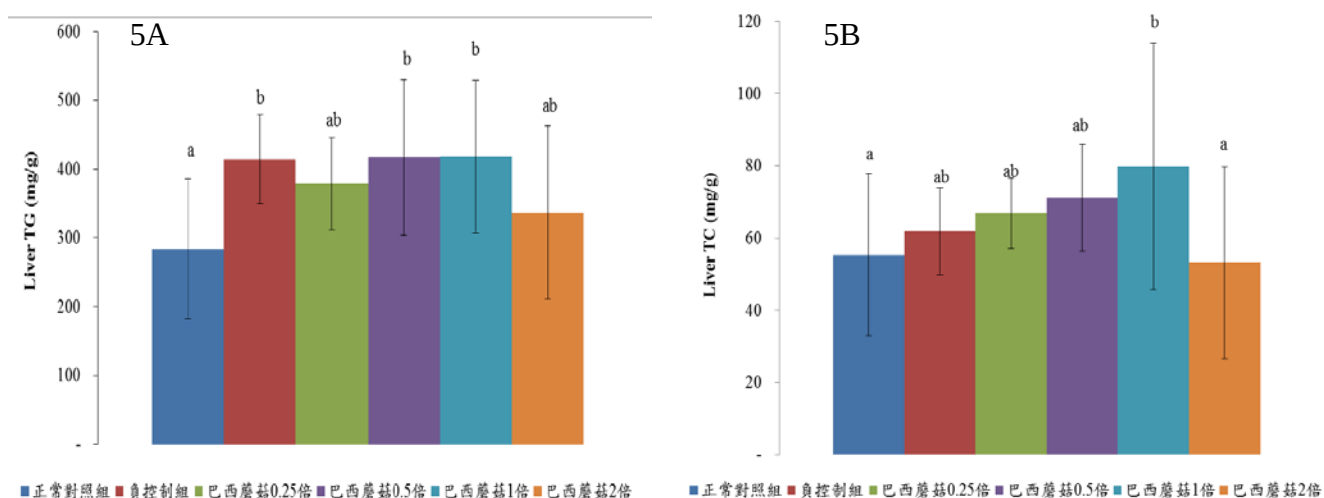


圖4. 巴西蘑菇萃取液濃縮物對於高脂飼料誘導非酒精性脂肪肝18週後之小鼠血清中TG與TC影響。Values represent mean $\pm$ SD。a,b,c,d 不同字母代表有顯著性差異 ($p<0.05$)。

四、肝臟中三酸甘油脂 (TG) 與總膽固醇 (TC) 含量分析

在小鼠肝臟中 TG 檢測分析中，正常對照組與負控制組 (肝損傷組) 具顯著性差異 ($p<0.05$)，給予巴西蘑菇萃取液濃縮物與負控制組 (肝損傷組) 皆無顯著性差異 ($p>0.05$)，如圖 5A。在小鼠肝臟中 TC 檢測分析正常對照組與負控制組 (肝損傷組) 無顯著差異 ($p>0.05$)，給予巴西蘑菇萃取液濃縮物 1 倍劑量組別與負控制組 (肝損傷組) 有顯著性差異 ($p<0.05$)，如圖 5B。



影響。Values represent mean $\pm$ SD。a,b 不同字母代表有顯著性差異 ($p<0.05$)。

五、肝臟中超氧化物歧化酶 (SOD) 與穀胱甘肽 (GSH) 檢測分析

在小鼠肝臟中 SOD 檢測分析中，正常對照組與負控制組(肝損傷組)具顯著性差異($p<0.05$)，給予巴西蘑菇萃取液濃縮物與負控制組皆無顯著性差異 ($p>0.05$)，如圖 6A。

在小鼠肝臟中GSH檢測分析中，正常對照組與負控制組(肝損傷組)具顯著性差異($p<0.05$)，給予巴西蘑菇萃取液濃縮物與負控制組皆無顯著性差異 ($p>0.05$)，如圖6B。

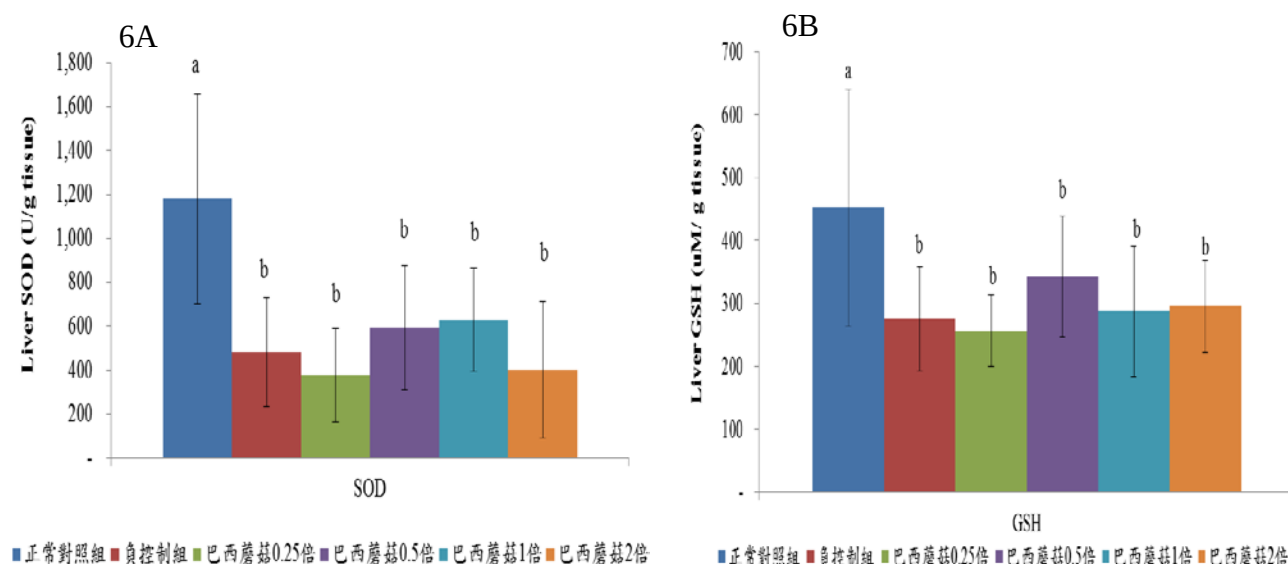


圖6. 巴西蘑菇萃取液濃縮物對於高脂飼料誘導非酒精性脂肪肝18週後之小鼠肝臟中SOD與GSH酵素活性分析。Values represent mean $\pm$ SD。^{a,b}不同字母代表有顯著性差異 ($p<0.05$)。

六、小鼠肝臟外觀及組織病理判讀

正常對照組之小鼠肝葉顏色呈現深鮮紅色，表面無許脂肪顆粒；局部極輕微的單核球炎症細胞浸潤於肝細胞中，無觀察到任何肝細胞脂肪油滴堆積病灶；負控制組（肝損傷組）之小鼠肝顏色呈淡奶黃色，表面及切面有許多脂肪顆粒；肝細胞呈現極嚴重的脂肪油滴堆積，與嚴重的單核球炎症細胞浸潤；巴西蘑菇萃取液濃縮物 0.25 倍劑量組小鼠肝葉顏色呈現淡紅色，表面有些許脂肪顆粒；肝細胞呈現極嚴重的脂肪油滴堆積，與局部中度的單核球細胞浸潤；巴西蘑菇萃取液濃縮物 0.5 倍、1 倍及 2 倍劑量組小鼠之肝葉顏色呈現鮮紅色，表面有些許脂肪顆粒；肝細胞呈現輕度的脂肪油滴堆積，與局部極輕度的單核球細胞浸潤，如圖 7。

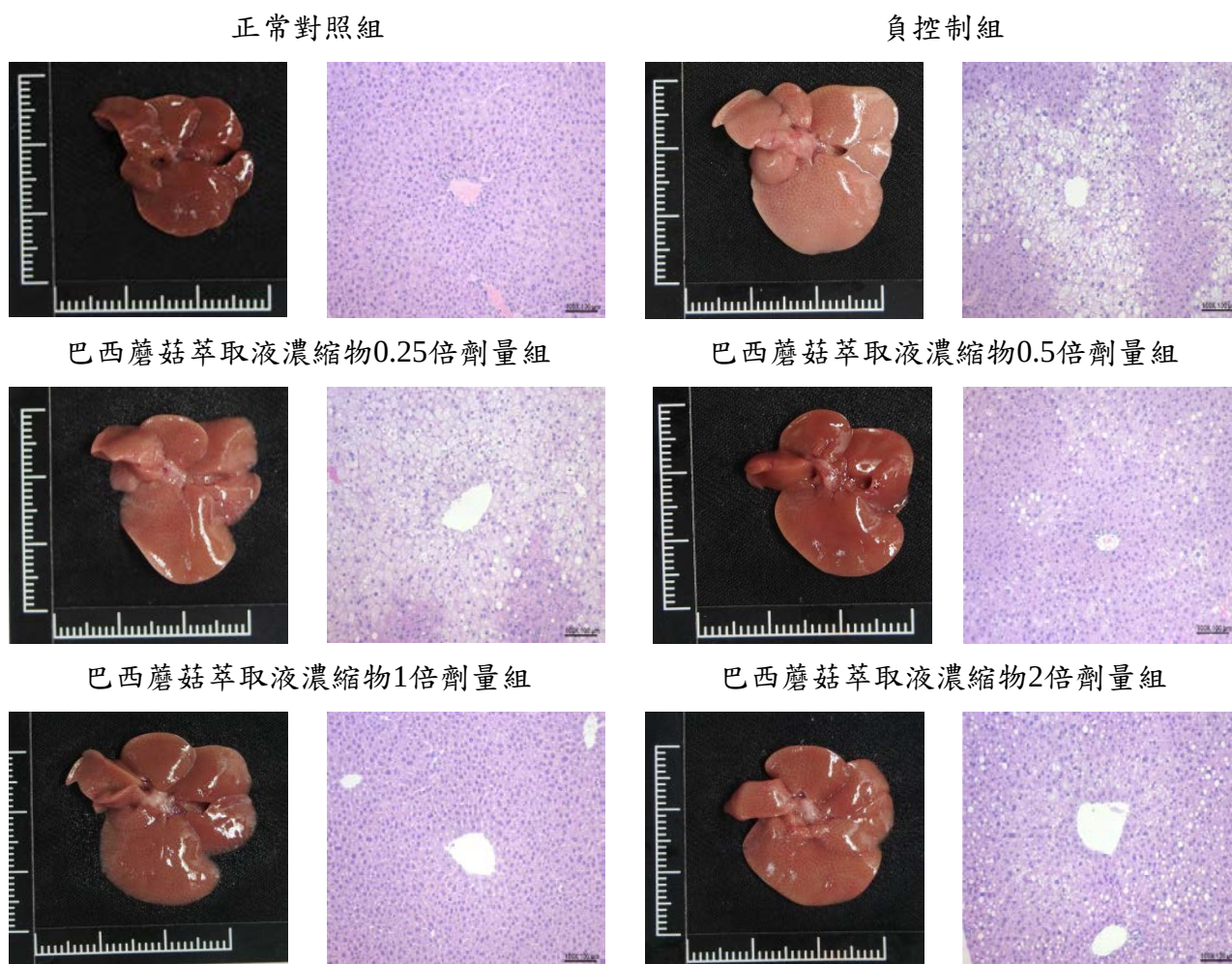


圖 7. 巴西蘑菇萃取液濃縮物對於高脂飼料誘導非酒精性脂肪肝 18 週後之小鼠肝臟外觀及肝臟組織病理結果。

肆、結論

綜合以上結果，試驗期間各組小鼠均存活，且臨床觀察亦未發現異常症狀；在血清生化值部分，巴西蘑菇萃取液濃縮物0.25倍、0.5倍與 2倍劑量組與負控制組比較下，可顯著降低血清中肝臟損傷指標AST；0.25倍、0.5倍、1倍與 2倍劑量組皆可顯著降低血清中ALT數值($p<0.05$)；且0.5 倍與1倍劑量組也能顯著降低($p<0.05$)血清中TC含量。肝臟外觀及病理組織判讀顯示，負控制組（肝損傷組）的小鼠肝臟體積較大，顏色呈淡奶黃色，肝細胞有極嚴重脂肪油滴堆積，表面有許多脂肪顆粒，單核球炎症細胞浸潤嚴重；而投予巴西蘑菇萃取液濃縮物0.5倍、1倍與2倍的小鼠肝葉顏色則明顯呈現偏向正常組之淡紅色，肝細胞呈現輕度的脂肪油滴堆積，表面有些許脂肪顆粒，單核球炎症細胞浸潤極微程度。綜合以上動物試驗結果顯示，攝取巴西蘑菇萃取液濃縮物0.5倍劑量以上有助於降低血清中 ALT、AST、TC表現，並能減少肝臟中的脂肪堆積。

伍、參考文獻

1. 健康食品之護肝保健功效評估方法。衛生福利部部授食字第 1031304063 號公告。
2. Van der Heijden, R. A., Sheedfar, F., Morrison, M. C., Hommelberg, P. P., Kor, D., Kloosterhuis. 2015. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6J mice.
3. Tetri, L. H., Basaranoglu, M., Brunt, E. M., Yerian, L. M., and Neuschwander-Tetri, B. A. 2008. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans-fats and a high fructose corn syrup equivalent. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.
4. FARRELL, Geoffrey C., LARTER, Claire Z. 2006. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. Hepatology.
5. Bose, Mousumi. 2008. The major green tea polyphenol,(-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. The Journal of nutrition.
6. de Miranda, A. M., Ribeiro, G. M., Cunha, A. C., Silva, L. S., dos Santos, R. C., Pedrosa, M. L., and Silva, M. E. 2014. Hypolipidemic effect of the edible mushroom *Agaricus blazei* in rats subjected to a hypercholesterolemic diet. Journal of physiology and biochemistry.
7. Cynthia Shackelford, Gerald Long, Jeffrey Wolf, Carlin Okerberg, Ronald Herebert. 2002. Qualitative and Quantitative Analysis of Nonneoplastic Lesions in Toxicology Studies. Toxicologic Pathology. Vol. 30, No. I, p93-96.
8. Ohno, N., Furukawa, M., Miura, N. N., Adachi, Y., Motoi, M., & Yadomae, T. 2001. Antitumor β -glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. Biological and Pharmaceutical Bulletin.
9. Lewis, J. R., and Mohanty, S. R. 2010. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. Digestive diseases and sciences.
10. Fabbrini, E., Sullivan, S., and Klein, S. 2010. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. Hepatology.
11. Angulo, P. 2007. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease. Nutrition reviews.
12. Hetland, G., Johnson, E., Lyberg, T., Bernardshaw, S., Tryggestad, A. M. A., and Grinde, B. 2008. Effects of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on immunity, infection and cancer. Scandinavian journal of immunology.
13. Firenzuoli, F., Gori, L., Lombardo, G. 2008. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of literature and pharmaco-toxicological problems. Advance Access Publication.
14. Gonzaga, M.L.C., Ricardo, N.M.P.S., Heatley, F., Soares, S.D.A. 2005. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murrill. Carbohydrate Polymers.
15. Marchesini, G., Brizi, M., Bianchi, G., Tomassetti, S., Bugianesi, E., Lenzi, M., and

- Melchionda, N. 2001. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*.
16. Marchesini, G., Brizi, M., Morselli-Labate, A. M., Bianchi, G., Bugianesi, E., McCullough, A. J., and Melchionda, N. 1999. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *The American journal of medicine*.
17. Gonzaga, M. L. C., Menezes, T. M., de Souza, J. R. R., Ricardo, N. M., & Soares, S. D. A. 2013. Structural characterization of β glucans isolated from *Agaricus blazei Murill* using NMR and FTIR spectroscopy. *Bioactive carbohydrates and dietary fibre*.
18. Chen, J., and Seviour, R. 2007. Medicinal importance of fungal β -(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-glucans. *Mycological research*.
19. Uskokovic, A., Mihailovic, M., Dinic, S., Jovanovic, J.A., Grdovic, N., Markovic, J., Poznanovic, G., Vidakovic, M. 2013. Administration of a beta-glucan-enriched extract activates beneficial hepatic antioxidant and anti-inflammatory mechanisms in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Funct. Foods*.
20. Mirjana, M., Jelena, A., Aleksandra, U., Svetlana, D., Nevena, G., Jelena, M., Ibrahim, M., Ana, S.D., Goran, P., Melita, V. 2013. Beta-glucan administration to diabetic rats reestablishes redox balance and stimulates cellular pro-survival mechanisms. *J. Funct. Foods*.
21. Xu, J., Wang, X., Cao, K., Dong, Z., Feng, Z., and Liu, J. 2017. Combination of β -glucan and *Morus alba* L. leaf extract promotes metabolic benefits in mice fed a high-fat diet. *Nutrients*.
22. Al-Dbass, A. M., Al-Daihan, S. K., & Bhat, R. S. 2012. *Agaricus blazei Murill* as an efficient hepatoprotective and antioxidant agent against CCl₄-induced liver injury in rats. *Saudi journal of biological sciences*.

致謝

感謝財團法人中正農業科技社會公益基金會之研究經費支持。

以蓖麻葉作為機能性飼料添加物

國立中興大學動物科學系 李滋泰教授

近年來，飼料添加物的趨勢已從抗生素轉往益生菌及植生劑。反觀於抗生素濫用造成地抗藥性及環境污染，益生菌及植生劑取之於自然，對於環境及牧場均是雙贏。當飼料原料價格在國際間水漲船高，本研究應用之飼料添加物取向於成本較低的在地農業副產物-蓖麻葉片。蓖麻為一種廣泛在熱帶、副熱帶種植的植物，其種子具有蓖麻鹼為一種天然的抗蟲劑；蓖麻油更用來當作工業用油，目前積極研究做為替代能源。蓖麻葉片相對來說成本低且產量豐富，在台灣中南部廣為種植。蓖麻葉片是一種中草藥，在本草綱目也曾記載：「治痰喘咳嗽」。初步實驗說明其富含有效物質，具有一定之抗氧化力，希望能夠取代畜牧產業使用抗生素，成為一種天然且健康的飼料添加物。因此本研究擬藉 *Ricinus communis* L. 之葉片，評估其抗氧化能力，探討蓖麻葉片粉碎添加於肉雞飼糧中，是否對蛋雞的產蛋效率及蛋品質有益，並觀察蛋雞生產表現是否有類似添加抗生素之正面影響，找出最適添加比例，期望成為優良之蛋雞飼料添加物。

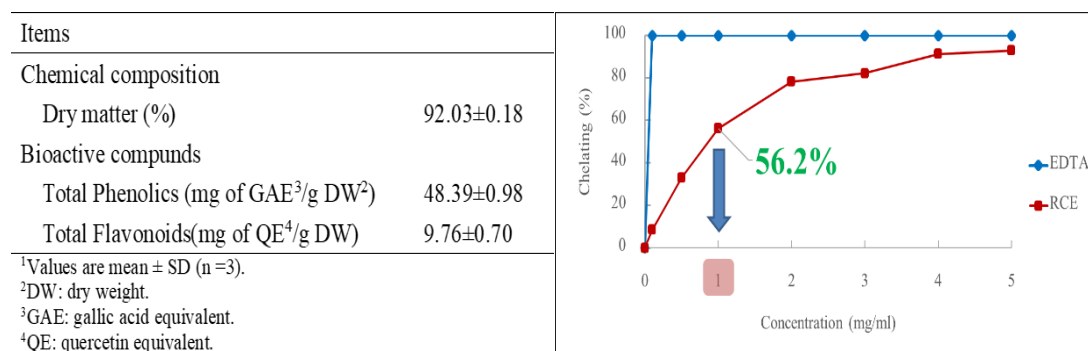
蓖麻為廣泛種植於亞熱帶及熱帶的植物，蓖麻油可做為工業替代能源，蓖麻粕則作為動物蛋白質飼料原料。目前蓖麻籽的市價為每公斤 1.8 元，一顆蓖麻籽能種出高 20 呎之蓖麻，其葉片大而圓，佔整株植物比例高。傳統上蓖麻葉的應用主要是製備殺蟲劑及作為蓖麻蠶食物來源 (Shripad et al., 2003)，製作蓖麻蠶絲應用於製造業及美容產業。蓖麻葉含少量蓖麻鹼及蓖麻毒蛋白，為主要抗蟲成分。其含量低並不會造成動物中毒。葉油中脂肪酸組成主要為共軛脂肪酸，44.1%油酸，12.25%亞麻仁油酸，8% β -桐酸，7.25%亞麻油酸，並含 13%飽和脂肪酸(Johnson et al., 2007)。

動物體每天在遭受氧化壓力，氧化壓力造成動物體採食量降低，因此生長緩慢，飼料換蛋率及體重均不理想亦影響畜禽之產品品質。(Barlett and Smith, 2003; Ryder et al., 2004) 近年來，使用抗生素能夠減輕動物體的氧化壓力，增加畜產品的產量，但抗生素亦造成動物組織及人類體內要藥物殘留及抗藥性的問題，因此在動物之飼糧添加抗生素已漸為飼料或飼養業者所反對，但使用抗生素確實降低飼養成本且提高獲利。限制使用抗生素造成飼養成本的加重，直接反

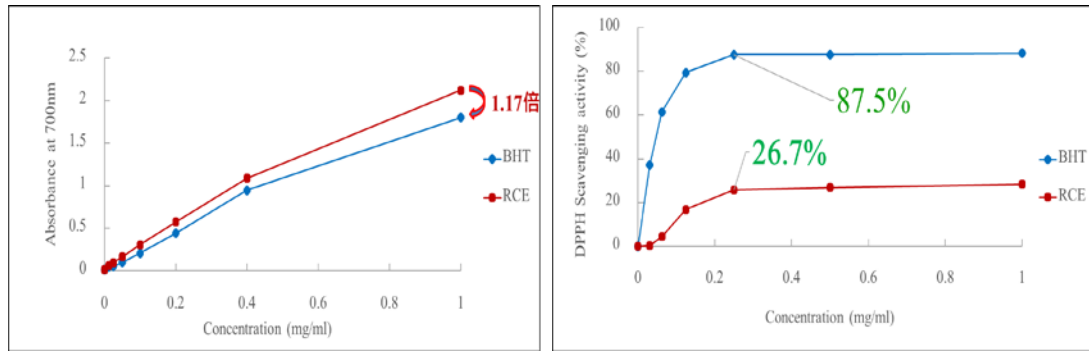
應至畜產品價格提高。因此，近幾年積極研究天然之飼料添加物—益生菌、植生劑，希望能夠取代抗生素作為亦成本低且有效之飼料添加物。而蓖麻葉作為一種中草藥，其具有（一）純天然性：所含天然成分，無藥殘、無抗藥性。（二）抗菌功能：其富含類黃酮，能夠抑制真菌及細菌的生長。（三）抗氧化能力：其含豐富分類及類黃酮等有效成分，大量氫氧基能清除自由基，降低體內氧化壓力，動物採食量增加進而影響生長速率。(Hashemi et al., 2010)

綜合以上，本研究計畫將以蓖麻葉片作為材料，以水萃方式進行體外試驗，更能反應日後在畜產業之應用，粉碎後的蓖麻葉片直接依比例加入蛋雞飼糧中，觀察其作為植生劑對於蛋雞是否具有改善產蛋及蛋品質之效果，有效利用蓖麻葉此一成本低的添加物，達到降低抗生素使用亦能降低飼料成本。

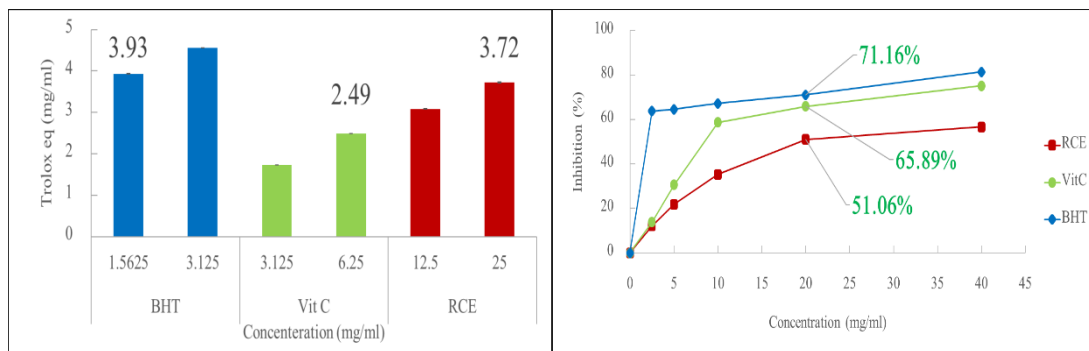
另研究結果亦顯示，添加蓖麻葉能夠改善飼料效率、蛋黃顏色、提高血清中抗氧化酶活性，並活化 Nrf2 基因增加下游二期酶的表現量。蓖麻葉可以拿來做為植生劑並添加於蛋雞飼糧中，而又已添加 0.5% 能夠達到最好的飼料換蛋率，添加 2% 則能增加更多的二期酶控制基因的表現。



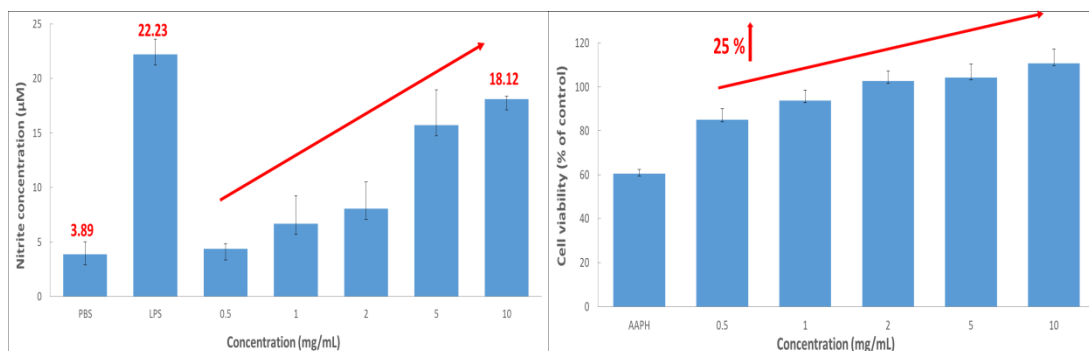
▲蓖麻葉內生物活性化合物的化學成分和含量(表一)及亞鐵離子螯合能力(圖一)，結果顯示，總酚類化合物含量約為 48.39 mg 沒食子酸當量/g DW。總黃酮類化合物含量約為 9.76 mg 槲皮素當量/g DW。亞鐵離子螯合能力在濃度為 1 mg/ml 時螯合能力為 56.2%，濃度為 4 mg/ml 時螯合能力為 91.2%。



▲ 蕁麻葉水草物之還原力(圖二)及 DPPH 自由基清除能力(圖三), 濃度為 1 mg/ml 之還原能力相當於 1 mg/ml BHT 的 1.17 倍。DPPH 自由基清除能力顯示, 濃度為 0.25 mg/ml 時清除力為 26.7 %, 而 BHT 的清除能力為 87.5 %。



▲ 蕁麻葉水草物之總抗氧化力(TEAC)(圖四)及脂質氧化抑制能力(圖五), 總抗氧化力(TEAC)分析中, 濃度為 12.5 mg/ml 時相當於 3.09 mg/ml 之 trolox 當量, 而濃度為 1.56 mg/ml 的 BHT 和 6.25 mg/ml 的維生素 C 分別相當於 3.93 和 2.94 mg/ml 之 trolox 當量。脂質氧化抑制之能力, 濃度為 20 mg/ml 抑制能力達 51.06 %, 維生素 C 及 BHT 抑制能力分別為 65.89 % 及 71.16 %。



▲ 雞隻周邊血液單核細胞免疫測試之一氧化氮釋出量(圖六)與細胞存活率(圖七), 10 mg/ml 蕁麻水草物之一氧化氮釋出量為控制組 PBS 之 4.6 倍, 對照組 LPS 為樣本之 1.2 倍。在細胞存活率方面, 蕁麻水草物濃度 0.5 mg/ml 至 10 mg/ml 時, 存活率增加 25 %。

表一、添加蓖麻葉粉於蛋雞飼糧中對蛋雞生產性能之影響 1

Item	Treatments ¹				SEM ³	P-values
	Control	0.5%RC	1%RC	2%RC		
1-12 wk						
Feed intake, g/day/bird	105.3	103.2	104.7	104.9	3.14	0.988
Laying rate, %	91.3	93.2	92.3	92.5	1.18	0.718
Egg mass, g/day/bird	57.3	57.4	57.4	57.2	0.24	0.942
FCR ² , %	1.92 ^a	1.79 ^b	1.86 ^a	1.89 ^a	0.02	0.013

¹Control: basal diet; 0.5% RC: 0.5% *Ricinus communis* leaves; 1% ML: 1% *Ricinus communis* leaves; 2% ML: 2% *Ricinus communis* leaves. Results are provided as the means of 8 replicates in each control and treatment group (n=8).

²FCR: feed conversion rate.

³SEM: standard error of the mean.

^{a, b, c}Means within the same rows without the same superscript letter are significantly different ($P < 0.05$).

表二、添加蓖麻葉粉於蛋雞飼糧中對蛋雞之雞蛋品質影響

Item	Treatments ¹				SEM ²	P-values
	Control	0.5%RC	1%R C	2%R C		
1-12 wk						
Egg weight, g	57.3	57.4	57.4	57.2	0.24	0.941
Eggshell strength, kg/cm ²	4.10	4.08	4.19	4.07	0.05	0.421
Haugh unit, HU	81.2	81.9	83.0	81.5	0.77	0.404
Yolk color score	3.8 ^c	4.8 ^b	5.0 ^{ab}	5.2 ^a	0.13	<0.0001
Shell thickness, mm	0.36	0.36	0.37	0.36	0.01	0.840

¹Control: basal diet; 0.5% RC: 0.5% *Ricinus communis* leaves; 1% ML: 1% *Ricinus communis* leaves; 2% ML: 2% *Ricinus communis* leaves. Results are provided as the means of 8 replicates in each control and treatment group (n=8).

²SEM: standard error of the mean.

^{a, b, c}Means within the same rows without the same superscript letter are significantly different ($P < 0.05$).

表三、添加蓖麻葉粉於蛋雞飼糧中對蛋雞之血液生化值影響

Item	Treatments ¹				SEM ⁵	P-values
	Control	0.5% RC	1%RC	2%RC		
Glucose, mg/dl	197.5	214.0	222.8	221.7	8.57	0.209
BUN ² , mg/dl	4.3	4.8	3.3	3.5	1.01	0.714
Creatinine, mg/dl	0.1	0.1	0.1	0.1	0.03	0.390
Uric acid, mg/dl	4.0	3.7	4.2	3.2	0.42	0.488
SGOT ³ , U/L	155.5	151.0	143.0	142.5	9.11	0.699
SGPT ⁴ , U/L	1.0	1.3	1.3	1.0	0.18	0.452
Total Protein, g/dl	4.7	4.2	4.8	4.6	0.18	0.188
Albumin, g/dl	1.9	1.7	1.9	1.9	0.05	0.124
Globulin, g/dl	2.9	2.5	2.9	2.7	0.15	0.272
Alkaline P — tase, IU/L	632.8	571.5	517.8	787.5	107.76	0.361
Triglycerides, mg/dl	1517.5	1721.3	1947.3	1742.3	272.40	0.745
HDL Cholesterol, mg/dl	43.3	44.5	46.5	44.0	4.10	0.950
LDL Cholesterol, mg/dl	21.3	24.5	31.8	27.3	4.76	0.482
Total Cholesterol, mg/dl	90.8	93.5	103.3	94.3	5.06	0.370

¹Control: basal diet; 0.5% RC: 0.5% *Ricinus communis* leaves; 1% ML: 1% *Ricinus communis* leaves; 2% ML: 2% *Ricinus communis* leaves. Results are provided as the means of 4 replicates in each control and treatment group (n=4).

²BUN: Blood Urea Nitrogen.

³SGOT: serum glutamic oxaloacetic transaminase.

⁴SGPT: Serum Glutamic-Pyruvic Transaminase

⁵SEM: standard error of the mean.

^{a, b, c}Means within the same rows without the same superscript letter are significantly different ($P < 0.05$).

表四、添加蓖麻葉粉於蛋雞飼糧中對蛋雞血清抗氧化酶活性和 MDA 含量的影響

Item ³	Treatments ¹				SEM ²	P-value
	Control	0.5% RC	1% RC	2% RC		
SOD (U/mL)	38.04 ^b	41.61 ^{ab}	42.98 ^{ab}	44.37 ^a	1.38	0.066
CAT (nmol/min/ml)	51.23	53.73	67.41	65.14	9.15	0.524

¹Control: basal diet; 0.5% RC: 0.5% *Ricinus communis* leaves; 1% ML: 1% *Ricinus communis* leaves; 2% ML: 2% *Ricinus communis* leaves. Results are provided as the means of 6 replicates in each control and treatment group (n=6).

²SEM: standard error of the mean.

³CAT, SOD, and MDA represent catalase, superoxide dismutase, and malondialdehyde, respectively.

^{a, b, c}Means within the same rows without the same superscript letter are significantly different ($P < 0.05$).

表五、添加蓖麻葉粉於蛋雞飼糧中對蛋雞雞蛋保存能力之影響

Item	Treatments ¹				SEM ²	P-values
	Control	0.5%R C	1%R C	2%R C		
0 wk						
Egg weight, g	56.2	57.4	58.2	57.9	0.82	0.365
Eggshell strength, kg/cm ²	4.02	4.07	4.38	4.35	0.22	0.561
Haugh unit, HU	81.5	85.7	86.0	85.4	2.03	0.367
Yolk color score	3.6 ^b	5.0 ^a	4.6 ^a	5.3 ^a	0.22	<0.0001
Shell thickness, mm	0.37 ^b	0.39 ^{ab}	0.41 ^a	0.41 ^a	0.01	0.0092
6 wk						
Egg weight, g	53.9	54.1	54.0	53.4	0.97	0.983
Eggshell strength, kg/cm ²	3.99	3.92	4.23	4.11	0.21	0.801
Haugh unit, HU	60.3	62.1	64.4	61.0	1.99	0.518
Yolk color score	3.6 ^b	4.0 ^{ab}	4.6 ^a	4.8 ^a	0.27	0.019
Shell thickness, mm	0.36	0.36	0.36	0.37	0.01	0.768

¹Control: basal diet; 0.5% RC: 0.5% *Ricinus communis* leaves; 1% ML: 1% *Ricinus communis* leaves; 2% ML: 2% *Ricinus communis* leaves. Results are provided as the means of 8 replicates in each control and treatment group (n=8).

²SEM: standard error of the mean.

^{a, b, c}Means within the same rows without the same superscript letter are significantly different ($P < 0.05$).

Laying Diet Supplementation with *Ricinus communis* L. leaves and Evaluation of Productive Performance and Potential Modulation of Antioxidative Status

Bing-Wen Su^{1*}, Wei-Chih Lin^{1*}, Li-Jen Lin², Chung-Ming Huang¹, Wen-Yang Chuang¹,
Den-Jen Wu³, Chia-Hung Shih³ and Tzu-Tai Lee^{1,4}

¹ Department of Animal Science, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan

² School of Chinese Medicine, College of Chinese Medicine, China Medical University, Taichung 404, Taiwan

³ Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Miaoli County 363, Taiwan

⁴ The iEGG and Animal Biotechnology Center, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan

This study evaluated the antioxidant capacity of *Ricinus communis* L. (RC) leaves and powder when used as a feed additive for laying hens. Results showed that the total phenolic content of the aqueous leaf extract of *Ricinus communis* L. (RCE) was 48.39 mg gallic acid equivalent (GAE) per gram dry weight (DW). The flavonoid content was 9.76 mg quercetin dihydrate equivalent (QE)/g DW. Ferrous chelating activity was approximately 56.2% with an RCE concentration of 1 mg/mL; the highest chelating activity was 91.2% with 4 mg/mL extract. The reducing power of 1 mg/mL RC was 1.17 times better than 1 mg/mL butylated hydroxytoluene (BHT). The Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) value of 12.5 mg/mL RCE was equivalent to 3.09 mg/mL Trolox. RCE (10 mg/mL) had a lipid oxidative inhibition capacity of 35.3%. A total of 80 ISA brown laying hens at twenty-nine weeks of age were randomly allocated into the control or 1 of 3 treatment groups; the latter received 0.5%, 1% or 2% of RC, respectively, for 12 weeks. Results showed that the RC supplementation improved the feed conversion rate and 0.5% RC generated the best results. Additionally, the egg yolk score was significantly increased in all RC-supplemented groups. Moreover, there was no significant difference in serum characteristics between the treatment groups. Serum antioxidant enzyme activity showed that superoxide dismutase (SOD) activity increased in the RC-supplemented groups relative to the control but was not significantly different. mRNA expression levels of the antioxidant regulatory genes *GCLC*, *GST*, *HO-1*, *SOD1*, and *SOD2* were significantly increased with 2% RC supplementation. In summary, RC is a suitable feed additive for laying hens and the addition of 0.5% RC leaf powder resulted in the greatest benefits.

Key words: Antioxidant properties, egg quality, laying hens, *Ricinus communis* L. leaves

J. Poult. Sci., 57: 1–11, 2020

Acknowledgments

The authors thank the Chung Cheng Agriculture Science and Social Welfare Foundation and Ministry of Science and Technology (MOST 107-2313-B-005-037-MY2) and the iEGG and Animal Biotechnology Center from The Feature Areas Research Center Program within the framework of the Higher Education Sprout Project by the Ministry of Education (MOE) and in Taiwan for supporting this study.

本研究已發表於國際期刊

The Journal of Poultry Science (SCI) (2020 57:1–11).

人工智慧應用於預測植物病徵之研究

中臺科技大學資訊管理系 陳錦杏

逢甲大學航太與系統工程學系 賴政佑 黃柏文 張淵仁

摘要

台灣農業環境屬潮濕且高溫氣候，因此病蟲害也相對猖獗，從而影響本土的農業以及農產品的產量與品質，故本研究主要在於提前發現植物病害，並對症下藥以減少產品的損失。

本研究中，以茄科類蜜 3 小番茄作為實驗對象，使用一般相機及紅外線熱成像相機針對本研究植物進行連續影像拍攝，導入深度學習理論，以此分析植物發病前後的影像特徵，據以建置一植物病徵預測模型。

從結果而言，選取不同深度學習網絡進行轉移學習以及訓練集與測試集的比例會對準確率造成一定程度上的影響，又以 VGG-16 演算法的準確率較高，可達 98.75%。

關鍵詞：深度學習、植物病害、影像處理、蜜 3 小番茄

壹、導論

一、研究動機

以目前國內農業環境而言，台灣位處於熱帶以及亞熱帶地區，其環境屬於潮濕且高溫氣候，適合各種病蟲害的發生與傳播，這會嚴重的影響本土的農業以及其農產品的品質與產量。目前本土農民大多以化學方式進行防治病害，然而過多的使用農藥也會對整體環境造成一定程度的影響，如病蟲產生抗藥性、水質遭受汙染、農產品有過多農藥殘留、本土生物遭受危害等。由於上訴原因，應多加落實新的農業政策(如物理性防治)，以此有效地達到病蟲害防治，且不汙染環境。

關於植物病蟲害的發生與環境，透過近世紀的研究，植病學家所提出的「植物病害三角形(Disease Triangle)」理論，其中說明了病害發生其三角關係：病原菌(Pathogen)、寄主(Host)、環境(Environment)，這三項一旦缺少任何一種條件，病害便不會產生，或者其病徵影響程度會處於可容許程度內。(許雅媛&楊純明，2014)

二、研究目的

由於本土農業其植物常遭受不同之病害，且處於不同的環境條件下，因此本研究若能提前檢測出植物病害，亦能有效地達到病害防治的目的且提高產品之產量，若能將環境溫度、明亮程度、空氣流動等進行控制，將能大幅度的降低病蟲害的發生。本研究中，以茄科類小番茄做為實驗對象，針對發生病癥前期之番茄

葉片將其移除，以避免其病徵擴散至整個植株或散播至其餘植株上，導致產品之產量下降、品質的降低，而造成經濟上的損失。本研究使用一般相機，輔以紅外線熱成像技術針對植物進行熱成像連續影像擷取，並導入深度學習理論，分析植物發病前後紅外線熱成像特徵之相關性，據以建置一植物病徵預測模型，提供未來預測植物病徵之參考。

三、研究方法

本研究將植物病癥使用深度學習之神經元自行提取特徵，使植物即使處於不同的生長環境下，其發生病徵狀況皆能處理，本研究使用一般相機及紅外線熱像儀進行影像拍攝，並根據自然光影像及紅外線熱影像進行影像的前處理，後續使用深度學習理論，以此建置病徵檢測模型，並將建置的預測模型，使用本研究之植物健康與罹病影像進行測試，以達到可用之預測準確度。

貳、文獻回顧

Stoll et al. (2008)採用紅外線熱成像技術針對葡萄藤葉於不同灌溉條件下進行接種(Inoculate)真菌病原體(Fungal Pathogen)之檢測，其研究中表示使用熱圖像進行遠程檢測可提前診斷病癥，且其葉片溫度對於葉片水分具高度敏感性，在此研究結果表明，出現明顯病徵前，其葡萄藤特徵性熱反應之證據相當明顯，故在良好之灌溉環境下植株於真菌感染其熱效應能被良好的顯示出來。

Raza et al. (2015)以熱成像及可見光影像進行蕃茄感染新番茄粉孢菌(*Oidium Neolycopersici*)之觀察，其研究說明相同植株使用不同種方式進行拍攝(可見光與熱成像)，其局部及總體經過影像計算後，能改善整體模型，達到準確率的提升。

Nachtigall et al. (2016)使用卷積神經網絡(Convolutional Neural Network, CNN)對蘋果樹病癥進行分類，其研究中使用深度學習網絡 AlexNet 進行罹病判別，其準確率可達 97.3%，且使用深度學習能自行從數據中學習相關特徵，不同於機器學習需自行尋找特徵，若以同樣的方式提供數據，圖片微小差異，如不同之光照及背景，會使深度學習網絡有更好的表現。

Mohanty et al. (2016)使用深度學習進行圖像之植物病癥檢測，其研究使用智慧型手機進行圖像拍攝，並使用三種不同視覺表現(可見光、黑白、去背景)之圖像，輸入深度學習網絡型學習，其結果說明使用深度學習網絡能有效的識別圖像病進行分類，雖使用神經網絡訓練模型所需時間較長，但其分類速度較快，若是適當的使用 client-server 架構進行運算，則有機會於智慧型手機上實施。

Wang et al. (2017)以深度學習自動影像評估植物病癥，其研究以健康蘋果葉及 *Botryosphaeria obtusa* 真菌所引起的黑腐病蘋果葉進行研究，並使用公開的深度學習網絡架構，例如牛津大學視覺幾何研究群(Visual Geometry Group)提出的 VGG16、VGG19、Google 提出的 Inception-v3，以及 ResNet50 進行轉移學習，

其結果表明 VGG 模型診斷程度較好，亦證明使用深度學習網絡能有效地分辨出植株是否罹病。

陳等(2019)以機器學習理論結合紅外線熱成像預測植物病徵之研究，其研究以黃瓜葉與番茄葉做為主要研究對象，以自然光影像及熱成像影像進行前處理後，套用機器學習方式提取相關特徵，且建置一模型預測植物病癥，其結果表明使用機器學習方式能有效地分辨植物罹病狀態並提早 7 天預測植物已經罹病。

參、研究方法

一、卷積神經網路(Convolutional neural network models, CNN)

CNN 卷積神經網路主要是受到哺乳動物視覺腦皮層方面的研究啟發，參考了哺乳動物使用不同層次的神經元感知世界的方式，以此假設此模型為視覺皮質層，內含不同的神經元組織，每個神經元負責識別不同的形狀，每個神經元看到相對應的目標後會產生刺激，並將此刺激訊號與其他神經元互相交流，進而建構出完整理解此目標的神經網絡。

我們以階層架構的神經元系統做解釋，低階層的神經元偵測到刺激訊號輸入後，會與其他神經元相互交流，以發展出高階層對目標物體的偵測。說明如下：

第一層級的神經元結構負責識別低階特徵，例如臉部的輪廓。

第二層級的神經元結構負責識別顏色與形狀，例如膚色與下顎線條。

第三層級的神經元結構負責識別細節，例如耳朵，鼻子與眼睛。

第四層級的神經元結構負責整體識別整個目標，例如臉部與對應之人。

也就是說，當視覺皮質層看到特定目標時，皮質層內的神經元，因不同的刺激訊號而被激活，並與其他的神經元組織形成一整體的識別神經網絡。

因此，CNN 卷積神經網路就是在此模型當中獲得靈感而被建立，CNN 的架構如下圖 2 所示(LeCun *et al.*, 1995, 1998)。原始的圖片(Raw image)輸入後，會以過濾器(通常為 3*3 或 5*5)，將圖片的數據傳入 Convolution layer，我們可以想像過濾器就像一個小手電筒，由圖片的左上開始順序的掃描圖片整張圖片，以嘗試理解此圖片，並提取圖片的特徵成為一個特徵映射圖(feature map)，藉由此特徵映射圖，演算法可以理解此資料的區域的特徵，例如眼睛，耳朵等等，不管這些區域的特徵位置如何(translation invariance)。

接著要經過 Pooling layer 進行次採樣(sub sampling)過程，此過程是經由一任意大小的窗口(稱為 strike)，提取其總和、最大值或平均值以便將特徵映射圖進行降維，以圖 3 為例，其在 pooling layer 使用 2*2 的窗口進行提取最大值，如此可以同時保留資料的重要訊息時，又可以進行降維。我們稱 convolution layer 與 pooling layer 為隱藏層(如圖 3)。

經過 Pooling layer 後會進入全連接層(fully connected layer)，所謂的全連接層就是進行 softmax 操作，並輸出預測值。也就是當觀察到特定模式時，最後會點亮的節點(如圖 4 所示)。在本研究中，一張植物的葉子圖片被輸入後，此 CNN

模型會嘗試使用 convolution layer 以及 pooling layer 提取特徵映射圖，以便理解這些罹病葉子的小特徵，而且不管這些特徵所在位置如何，最後會被預測，也就是點亮為健康或罹病兩個節點。

肆、實驗設備與分析流程

一、影像擷取設備

(一) 可見光相機

為體現簡單、方便、隨處可得的理想，本研究使用智慧型手機(如下圖 5(左))進行植物影像擷取，以作為植物病徵偵測特徵擷取來源之參考。其規格為 1200 萬像素廣角與長焦雙鏡頭相機 (4032x3024pixels) 之 iPhone7 plus。

(二) 紅外線熱像儀

本研究將使用手機用紅外線熱感應鏡頭(Pro-Grade Thermal Camera for Smartphone)(如下圖 5(右))進行植物影像擷取，以作為植物病徵偵測特徵擷取來源之參考。其規格為：1.品牌：FLIR；2.型號：FLIR ONE Pro；3.規格：測量範圍(-20°C 到 400°C)、Detector Pixels (1440x1080 Pixels)；精度：±3°C 或±5%。

然而針對植物不同環控之影像擷取，仍需要實際於現場進行測試，以便獲得穩定且有效之植物影像供分析使用。

二、植物樣本

本研究以茄科作物之小番茄為實驗對象，小番茄品種為蜜 3 小番茄(如圖 6)，栽種於商業用農場(如圖 7)，數量眾多，亦能蒐集到大量數據。

三、實驗流程

本研究的深度學習實驗流程如下圖 8，先拍攝植株上葉片的自然光影像及熱影像，然後將所有的影像做去背景的前處理，處理完畢的影像即可送入不同深度學習網絡進行學習並且建模，訓練出的模型可供測試樣本診斷及檢測。

(一) 影像擷取

在實驗中，本研究於商業農場中採用隨機取樣方式收集數據，共拍攝 6 天，每天自然光影像及熱像儀影像皆各拍攝 100 張，其中 50 張為健康葉片，50 張為不健康葉片，如下圖 9 所示。

(二) 影像前處理

由於深度學習使用神經元進行運算，故影像內的背景會造成相當大的影響而導致模型準確率下降，本研究將所有葉子的自然光影像和熱影像做去背景前處理，結果如下圖 10、11 所示，除了主要分析的葉片部分，其餘背景全數刪除。

(三) 選取深度學習網絡

將前處理過後的數據匯入選取的深度學習網絡進行轉移學習，深度學習網絡有許多種，本研究將使用以下 5 種神經網絡：GoogLeNet、AlexNet、VGG16、VGG19 與 ResNet50。本研究依序將數據輸入 5 種神經網絡，將神經網絡最後三層替換為 FullyConnectLayer、SoftmaxLayer、ClassificationLayer 以此進行建模，並比較何種神經網絡較適合本研究數據使用。

(四) 數據建模

選定神經網絡後，將數據拆分為訓練數據集以及測試數據集，訓練數據比例與測試數據比例，分別為 90%、80%、70%、60%、50% 訓練數據集剩餘數據則為測試數據集，以此訓練模型，再使用剩餘之測試數據進行準確率測試並比較何種訓練數據與測試數據比例較適合本研究數據使用。

伍、結果與討論

一、本研究使用深度學習之結果

從實驗結果中，我們可以發現使用不同的神經網絡進行轉移學習，其準確率如下圖 12 所示，使用 GoogLeNet、VGG-16 與 VGG-19 的訓練準確率都相當的高，而在測試階段 GoogLeNet 與 VGG-19 相對比 VGG-16 的測試準確率相差 1%，故在我們選取 VGG-16 此種神經網絡進行後續的分析與比較。

延續上述結果，我們採用 VGG-16 進行模型建模，在此我們也發現使用不同比例的訓練數據集與測試數據集也會對準確率造成影響，故我們將訓練與測試之比例分配成 5 種，分別為 A、B、C、D、E，如下表 1 所示。

表 1、資料訓練比例

	訓練資料分配比例				
分配	A	B	C	D	E
訓練比例	90%	80%	70%	60%	50%
測試比例	10%	20%	30%	40%	50%

並將 A、B、C、D、E 此五種分配方式，使用 VGG-16 進行轉移學習建模，得到之準確率將其進行比較，如下圖 13 所示。我們可以發現使用 80% 訓練數據

集，在訓練準確率與測試準確率都有較好的結果。

二、使用深度學習與機器學習之比較

將本次實驗結果與使用機器學習於番茄葉病徵之檢測結果(陳錦杏，2019)進行比較，其使用機器學習於番茄葉之各天準確率如下圖 14，由下圖中可以發現使用機器學習進行罹病番茄葉的診斷其準確率最高可達 100%，而最低的準確率也有在 85%以上，表示其模型具有一定程度的辨識能力。

而本研究結果發現，使用深度學習網絡進行轉移學習的準確率皆可高達 98%以上，使用不同訓練集比例的準確率也能在 95%以上，表明使用深度學習網絡進行轉移學習的結果優於單純使用機器學習，這可能是因為機器學習需要自行尋找特徵，若是沒有抓取到更明顯的特徵將會導致準確率無法上升。而深度學習是讓圖片進入其神經元自行抓取特徵，且圖片增強方式也有較多種可使神經元進行訓練，故其準確率會較高。

機器學習的結果是使用各天 100 張進行模型與預測，並比較其準確率，而本實驗是將全部數據輸入深度學習網絡進行訓練與測試，可以發現使用數據量較多也會使準確率相對提高，使用較多數據量能使深度學習之神經元有較多的學習空間，使網絡預測準確率相對提升。

陸、結論

從研究結果顯示，運用熱影像及自然光影像，以及深度學習的分類技術，可以有有效的對植物葉子的罹病狀態進行分辨甚至預測。

在使用深度學習結果顯示，挑選何種神經網絡進行轉移學習會和準確率有相關性，而在本研究中可以發現使用 VGG-16 神經網絡進行轉移學習較為適合本實驗數據，使用不同比例之訓練數據集也會對準確率造成一定程度的影響，在本實驗結果中發現使用 80%訓練數據集、20%測試數據集對於本實驗數據較為合適。

使用機器學習與深度學習皆能有效地將罹病番茄葉進行辨識，若能在機器學習上提取重要關鍵特徵，其準確率也會相對提高，且兩者對於資料量的多寡也會對其準確率造成一定程度上的影響。對模型建置來說，有較多數據，能使模型越趨穩定，也能使模型訓練時獲得較多的重要參數，從而提升其準確率。

目前本研究所使用之深度學習結果仍有改善空間，未來將使用不同深度學習網絡進行訓練並比較其準確率，也可多嘗試使用不同影像增強方式，以提高整體之預測性。

致謝

本文之研究成果由中正農業基金會計畫（108—中基—農—1）所資助，使得本研究能夠順利完成。特別感謝台中農改場高德錚博士給予本研究指導與建議，特此致謝。

參考文獻

1. 許雅媛、楊純明，2014，『淺談植物免疫系統及其在農業上之應用』，農業試驗所技術服務季刊，97 期：24-27 頁。
2. 蕭至恆，2018，『利用遷移式學習與植物器官獨立模型進行植物影像辨識』，國立台灣大學電機資訊學院資訊網路與多媒體研究所碩士論文。
3. 陳錦杏、謝聲偉、黃柏文、張淵仁，2019，『以機器學習理論結合紅外線熱成像預測植物病徵之研究』，國際資訊管理學術研討會論文。
4. Manickavasagan, A., Jayas, D. S., White, N. D.G., Paliwal, J., 2005, “Applications of Thermal Imaging in Agriculture- A Review,” CSAE/SCGR 2005 Meeting Winnipeg, Manitoba, Paper No. 05-002.
5. Mohanty, S. P., Hughes, D., Salathé, M., 2016, “Using Deep Learning for Image-Based Plant Disease Detection,” *frontiers in Plant Science*, DOI 10.3389/fpls.2016.01419, pp. 1-7.
6. Oerke, E. C., Steiner, U., 2010, “Potential of Digital Thermography for Disease Control,” *Springer Sciencr+Business Media B.V.*, DOI 10.1007/978-90-481-9277-9_11, pp. 1-16.
7. Oerke, E. C., Fro'hling, P., Steiner, U., 2011, “Thermographic Assessment of Scab Disease on Apple Leaves ,” *Precision Agriculture* , Vol.12, pp. 699-715.
8. Raza, S.E. A., Prince, G., Clarkson, J. P., Rajpoot, N. M., 2015, “Automatic Detection of Diseased Tomato Plants Using Thermal and Stereo Visible Light Images,” *PLOS ONE*, Vol. 10, No.4, pp. 1-20.
9. Stoll , M., Schultz , H. R., Baecker , G., Berkelmann-Loehnertz, B., 2008, “Early Pathogen Detection Under Different Water Status and the Assessment of Spray Application in Vineyards through the use of Thermal Imagery,” *Precision Agriculture* , vol.9, pp.407-417.



圖 1、植物病害三角關係圖(許雅媛&楊純明，2014)

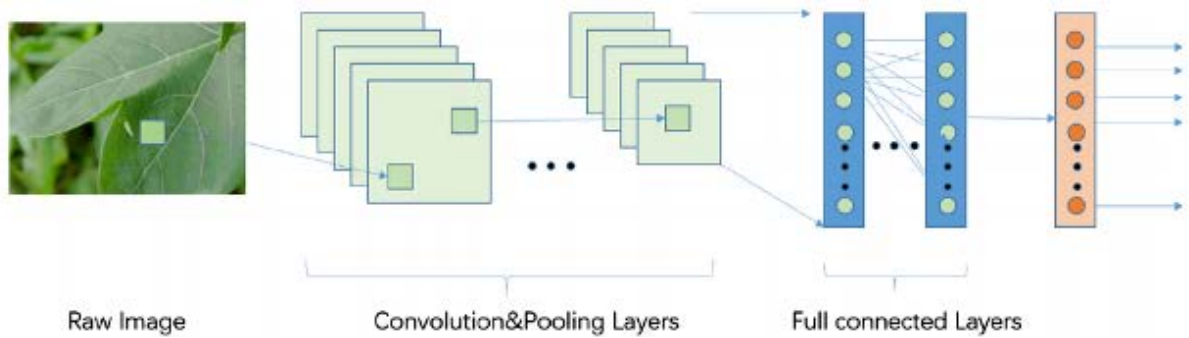


圖 2、CNN 卷積神經網路的架構圖(LeCun *et al.*, 1995, 1998)

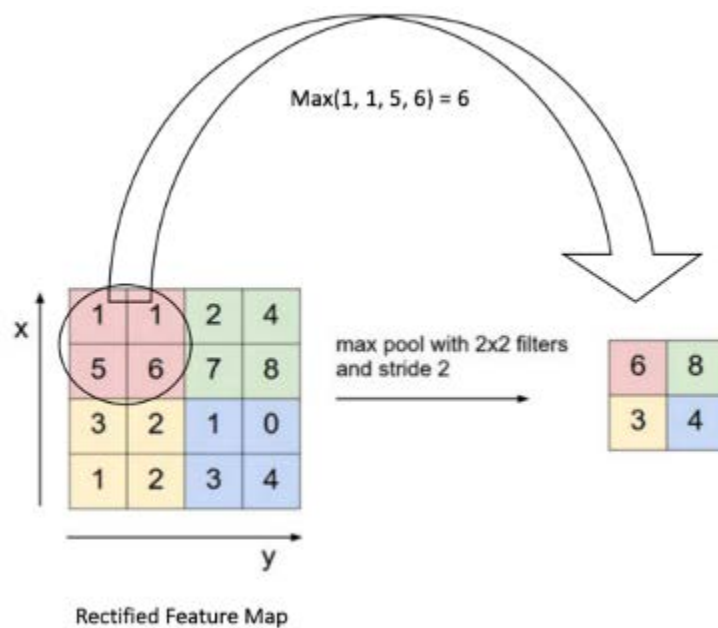


圖 3、 Pooling layer 的操作流程

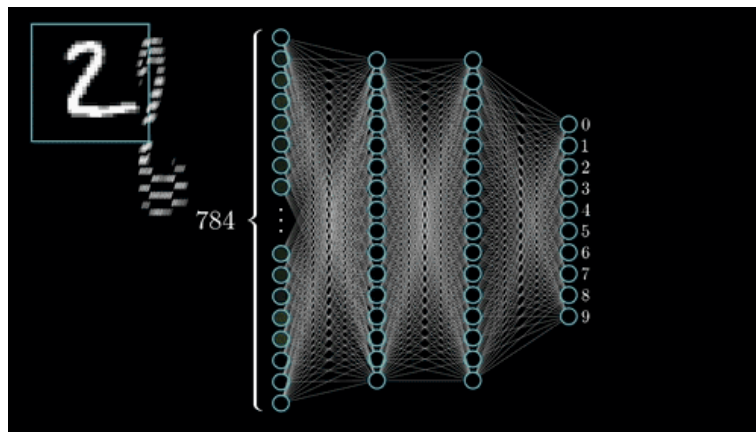


圖 4 全連接層(fully connected layer)



圖 5、紅外線熱感應影像擷取設備：(左)iPhone7 plus；(右)手機用紅外線熱感應鏡頭



圖 6、蜜 3 小番茄



圖 7、營業用農場

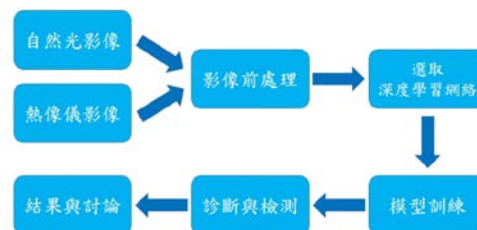


圖 8、深度學習實驗流程圖



圖 9、(左)健康番茄葉片 (右)不健康番茄葉片

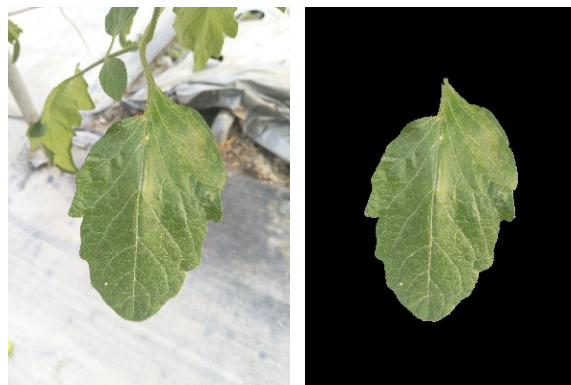


圖 10、(左)自然光影像 (右)前處理後自然光影像

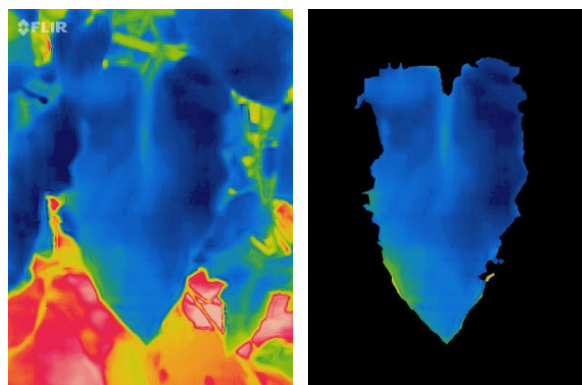


圖 11、(左)熱影像 (右)前處理後熱影像

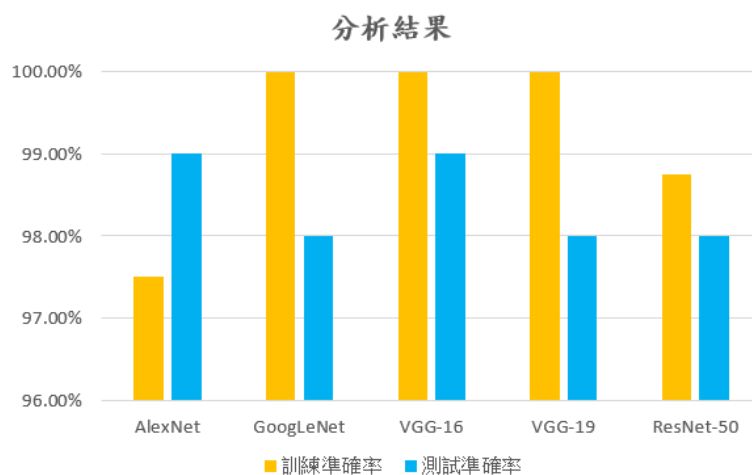


圖 12、使用不同神經網絡進行轉移學習其訓練與測試準確率比較

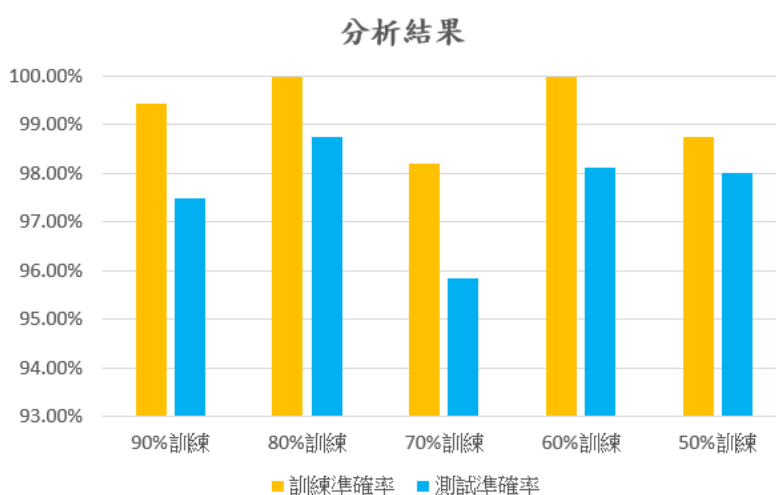


圖 13、使用不同比例之訓練資料集之訓練與測試準確率比較

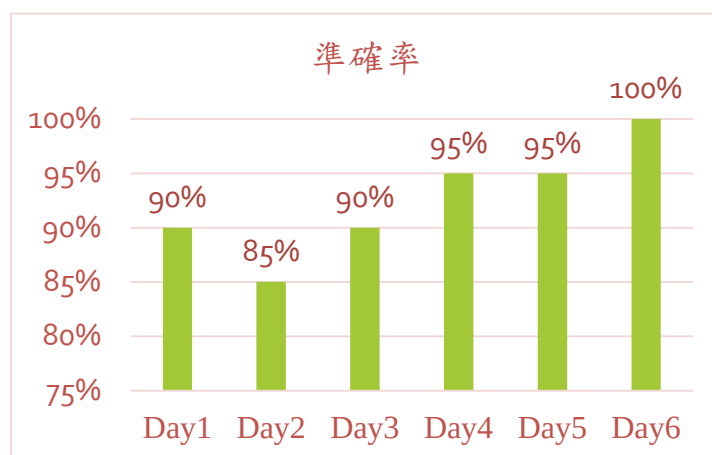


圖 14、番茄葉模型驗證各天準確率(陳錦杏，2019)

由副梢生產‘如玉’梨高接用之自給花穗

國立中興大學園藝學系 胡庭維 張哲嘉

摘要

‘如玉’梨(*Pyrus* spp.)為台灣目前少數可於低海拔地區自產梨穗供應高接需求之品種，惟其花穗品質不穩，影響開花、著果、產量及貯藏性。本試驗評估產自副梢(bourse shoot)生產花穗之生態生理及修剪、貯藏對花芽品質影響，亦調查果實生育與貯藏特性。副梢在4月中旬停梢，此時大部分芽體已進行花芽分化，5月中旬飽滿的芽體皆轉變為花芽，8月中旬花芽內的所有花原基(floral primordium)皆分化出心皮原基(carpel)。成熟的花芽具12-13個鱗片(scales)、1-2個營養原基(vegetative primordium)、9-10個苞片(bracts)、7-9個花原基。然在8月中旬起花芽發生消蕾(abortion)與異常(abnormalities，形成次花序)之生理障礙，於9月、10月益發嚴重。將花穗於10月底採收後冷藏並每兩週取出插水促使芽體萌發，發現萌芽率(9.9%→47.8%)與單芽開花數量(0→4)隨貯藏時間增長而增加，消蕾率則無明顯變化(12.9%~19.1%)。於3、4、5月中旬分別對副梢進行修剪，修剪後再生的新梢長度與直徑低於未修剪之副梢，且越晚修剪新梢再生的生長量越差，甚至沒有芽體萌發，未修剪之副梢上有89.2%的芽體形成花芽，然經修剪處理之新梢則無花芽形成。果實的生理成熟度為花後125至135天之間，平均單果重為395.2 g，可溶性固形物含量11.5 °Brix、可滴定酸含量0.18%。採收果實以聚乙烯塑膠袋密封、冷藏在2 °C之中，可貯藏2個月，並能維持優良品質。

關鍵詞：高接梨、‘如玉’梨、花穗、生態生理、消蕾、異常芽、修剪、果實品質、生長曲線、貯藏

前言

台灣的梨產業最早在1890年自中國華南一帶引進，選育出強健且高產的‘橫山’梨，廣為種植(施，2011)。1929年由日本引溫帶梨品種，在台中梨山種植，因日本梨品種果肉細緻、酸度低，吸引農民興趣使種植面積快速擴展。在1975年東勢農民張榕生先生發現平地梨樹徒長枝上高接(寄接)的溫帶梨花芽可正常結果，且果實品質優良，促使其他農民紛紛採取此方法生產溫帶梨(林等，1995；施，2011)。

自高接梨技術研發成功後，低海拔地區高接溫帶梨的生產模式開啟台灣梨產

業發展(劉，2005)。利用高接梨技術(top-working system)生產的梨鮮果相較高山地區提早數月，且果實品質優良、深受消費者喜愛，因此許多農民願意每年花費高人力成本在‘橫山’梨徒長枝上進行高接，遂成為台灣主要梨產業生產模式。截至2020年止，台灣梨樹種植面積5,196公頃，其中低海拔地區面積為3,450公頃(農業統計資料查詢，2019；農情報告資源網，2019)，主要高接的品種有‘新興’梨與‘豐水’梨。台灣每年高接的梨穗由日本進口，以及梨山生產的國產梨穗，然日本進口梨穗品質優於國產，農民偏好使用日本梨穗進行高接生產。近年來，日本受到氣候以及核災影響，梨穗產量逐年下降，雖然已開放中國進口梨穗，但是因檢疫及病蟲害疫區問題，梨穗的品質不穩定，無法成為梨穗進口主要來源，若台灣可自行生產出高優質的梨穗，不用受限於他國，對於台灣梨產業具重大意義。

為滿足梨樹的休眠需求，冬季需要長時間的低溫，所以國產梨穗由高海拔梨山地區生產。但台灣高山已種植梨樹多年，病蟲源孳生已久不易防治，以及果實與梨穗需要同時進行栽培，管理技術操作複雜度高，再加上需考量到國土安全問題，高山地區已不適合做為梨穗供應的產區，以低海拔地區作為梨穗供應來源是未來國產花穗考量的目標(施，2010)。此外，台灣高接梨品種均以日本的褐皮梨品種為主，品種缺乏多元性，且高接生產的日本梨品種無法回銷日本，梨果的外銷市場受到限制。北半球主要梨果生產的國家，產季主要集中在9月至11月，唯有台灣的高接梨技術可以使提早數月生產新鮮梨果(施，2010)。

台灣現有可在低海拔產梨花穗的品種非常稀少(施，2010)，‘蜜雪’梨與‘如玉’梨是少數初步開發出以副梢(bourse shoot)養穗、嫁接之自給自足栽培系統(張和許，2015)。「蜜雪」梨與「如玉」梨皆為綠皮梨可為台灣高接梨產業新增品種多樣性，但「蜜雪」梨果皮易生成果鏽(russet)影響外觀，並且果實易發生貯藏寒害；「如玉」梨則無果鏽問題，且果皮可藉由套袋技術變為亮麗白色，耐貯性亦較高，更具市場競爭力(羅和施，2011)。「如玉」梨為綠皮、早熟的品種，由「新世紀」(*P. pyrifolia*)與中國「京白梨」(*P. ussuriensis*)雜交的後代，品種特性與台灣現有栽培的沙梨(*P. pyrifolia*)不同，「如玉」梨的父母本皆為高需冷性的梨品種，但是在台灣自產花穗的栽培模式下可於低海拔地區進行花芽分化，培養副梢成為下一年度高接所需的花穗來源，未來無須進口梨穗，或自台灣高山上剪取花穗，解決高接梨接穗來源問題，應可成為未來台灣高接梨產業的主力品種(施昭彰未發表資料)。

「如玉」梨的栽培模式為每年在12月中旬至1月初進行高接，之後開花、著果，5月至6月期間採收果實，果實採收後留下副梢培養成下一年度高接所需的花穗，在10月初進行採穗，經5°C冷藏2個月後高接(圖1)。然「如玉」梨常在高接後常有單一接穗開花數少甚至沒有花開放，以及果實採收成熟度不一、採收後果實品質

參差不齊等問題(胡和張，2016)，此可能源自於花穗品質不佳，但尚無相關生態生理的研究，無法得知‘如玉’高接用花穗品質不穩是因芽體花芽分化不完整或環境逆境誘發的生理障礙。此外，‘如玉’高接時間最長可達一個月，不同時間點高接的果實發育沒有同步，農民為搶早採收時期一致，果實採收的成熟度不一，品質差異甚大，需要建立‘如玉’果實採收的標準，改善品質參差不齊之問題。

本研究希能瞭解造成‘如玉’花穗品質不穩定之原因、尋求改善方法並確立果實採收標準與冷藏適期。試驗包括以下四個主軸：1)瞭解副梢花芽發育期間物候期、型態與構造，建立花序生育特徵之基本資料；2)經由冷藏期長短對梨穗品質之影響，得知最佳冷藏時間；3)評估可否經由副梢回剪及所萌發側芽之誘引，培育花穗，減少因低海拔地區熱障礙所造成花芽異常；4)調查果實生長曲線與形質的變化，以建立採收適期、採收標準；亦調查冷藏期間的果實品質變化，以建立儲藏適期及條件。

材料與方法

一、植物材料：

於台中市東勢區之 15 年生‘如玉’/‘橫山’梨果園進行。園內植株行距 5 至 6 公尺，株距 2 至 3 公尺，採水平棚架整枝。以完全逢機方式(CRD)選擇園區生長勢相近之植株進行標記，標定材料為 2015 年 12 月底嫁接在‘橫山’梨(砧木)徒長枝之未著果‘如玉’梨副梢。

二、副梢物候期及型態構造之調查：

1. 副梢之生長及物候期：

於高接副梢芽萌動後(第一波生理落果後，約 1 月中旬)，於每株樹標定三支副梢，每株樹為一重複，六重複，共 18 支副梢。再依副梢上芽體數目將副梢區分成上、中、下三部位，每個部位長度接近，自 2016 年 3 月中旬起至 9 月中旬止，每兩週調查一次。

調查項目包含：

- (1) 副梢生長量：以接穗萌芽處為基底，向上最高到頂芽，兩者之間的長度。
- (2) 副梢上節間數：計算副梢上所有節間數量。
- (3) 副梢直徑：副梢三個部位，每個部位中間處以游標卡尺調查副梢直徑。
- (4) 葉綠素含量：副梢三個部位，每個部位選三片葉片，以葉綠素讀值計 (SPAD502, Minolta, Japan)測量每片葉片的三個點取平均數作為該葉片葉綠素含量。
- (5) 落葉率：(掉落的葉片/副梢上所有葉片) x 100%。

2. 芽體型態發育與結構之變化：

副梢停梢後(約 4-5 月中旬)至 10 月中旬止(農民慣行之採穗時間)，分別於每月中旬剪取長約 70 至 90 公分之副梢(具 10-15 個芽)，隨即放入夾鏈袋中、冰浴，帶回實驗室後取飽滿的芽體進行下列調查。

調查項目包含：

- (1) 切片調查：將芽體鱗片剝除後的固定於 FAA (formalin: acetic acid: 70% ethanol=5:5:90) 中，以酒精及 TBA (t-butanol) 序列脫水，包埋於石蠟中，以轉動式切片機(HistoSTAT 820, Reichert)製成 8-10 μ m 之切片，經 safranin O (FERAK BERLIN) 與 fast green (Panreac) 染色後於光學顯微鏡 (ECLIPSE-Ci-S, Nikon) 下觀察(蔡，1975)。
- (2) 各階段芽體分化與發育比率則參考 Peng and Iwahori (1994) 與曹(2010)之方法，將其區分成 Vegetative bud 期(V)、Inflorescence primordia 期(IF)、Floral primordium 期(F)、Sepal 期(S)、Petal 期(P)、Stamen 期(St)、Carpel 期(C)。

3. 異常芽調查：

- (1) 消蕾率：剝除鱗片後，於解剖顯微鏡(SMZ745T/C-PS PLAIN, Nikon)下觀察。如有黑化壞死之花原基(圖 2B)，即紀錄為消蕾，消蕾率=(消蕾芽/總芽數) $\times$ 100%。
- (2) 次花序形成率(異常率)：剝除鱗片後，於解剖顯微鏡(SMZ745T/C-PS PLAIN, Nikon)下觀察。如自營養原基分化出花序者(圖 2D)，則紀錄之，次花序形成率=(次花序芽數/總芽數) $\times$ 100%。

三、冷藏時間對接穗花芽品質之影響：

依農民慣行之栽培方式，於 10 月底採收梨穗，並即冷藏於 5 $^{\circ}$ C(洪，2014)。隨後每隔兩週取出 12 支花穗，於生長箱中(25 $^{\circ}$ C)以清水瓶插，調查其萌芽率、開花數及異常率，翌年 1 月中旬止。

四、回剪對副梢生長與花芽形成之影響：

分別於 3、4 及 5 月對副梢進行回剪，每處理三株樹，每株樹回剪 6 枝副梢，修剪強度為留下 2-3 個側芽促使萌發出新梢，並於側芽萌發後開始調查，每兩週調查一次。

調查項目包含：

- (1) 回剪後副梢生長長度：萌芽後新梢基部至頂端之長度。
- (2) 回剪後副梢生長節位數：調查新梢上的節位數量。
- (3) 成梢率：(萌發生長之枝條數/修剪後留下之芽數) $\times$ 100%。
- (4) 花芽率：(花芽數/所有芽數) $\times$ 100%。

五、果實生長曲線與採收成熟度及貯藏性：

1. 果實生長曲線

於前年 12 月中高接在 16 年生以上‘橫山’砧木的‘如玉’梨小果，於 1 月底標定開花日，3 月標定果串留果數 3-4 顆，小果大小相近，形狀正常，約開花 40 天後採樣，每 10 天採樣一次，每次採收 15 顆果實。

調查項目包含：

- (1) 果實縱徑：以電子式游標卡尺測量果柄部至果蒂部最長之距離。
- (2) 果實橫徑：以電子式游標卡尺測量果實赤道部最寬之距離。
- (3) 果實鮮重：以電子天平測量之。
- (4) 硬度：以手持式硬度計在梨果實赤道部位分取三點削皮後測定，求取平均值。以 kg/cm^2 表示。
- (5) 可溶性固形物含量：以數位式糖度計(Plate 101, Atago, Japan)測定。
- (6) 可滴定酸：取 1 ml 梨果汁，加入蒸餾水 9 ml 及 10 μl 0.1%的酚酞(w/v ethanol)指示劑，以 0.1N NaOH 滴定至呈現粉紅色，紀錄滴定量，以蘋果酸為標準換算之。

2. 果實貯藏能力調查：

購買於正常產季 6 月採收的果實，等級為 8 粒裝大小(8 大)的梨果，果實由聚乙烯塑膠袋密封，並裝在保麗龍隔板上，放置於冷藏 2°C 之環境中。自 6 月起至 12 月止，每個月取出 15 粒果實以調查果實品質之變化。

調查項目包含：

- (1) 失重率：果實未冷藏前標記編號，再測量鮮重紀錄為冷藏前的重量，冷藏後計算失重率， $(\text{冷藏前重量}-\text{冷藏後重量})/\text{冷藏前重量} \times 100\%$ 。
- (2) 硬度：以手持式硬度計在梨果實赤道部位分取三點削皮後測定，求取平均值。以 kg/cm^2 表示。
- (3) 可溶性固形物含量：以數位式糖度計(Plate 101, Atago, Japan)測定。
- (4) 可滴定酸：取 1 ml 梨果汁，加入蒸餾水 9 ml 及 10 μl 0.1%的酚酞(w/v ethanol)指示劑，以 0.1 N NaOH 滴定至呈現粉紅色，紀錄滴定量，以蘋果酸為標準換算之。

結果與討論

一、‘如玉’梨副梢上花芽發育期間物候期、型態與構造之變化

‘如玉’梨副梢於 4 月初開始生長明顯趨緩，4 月中旬大部分副梢皆已停梢，生長量沒有明顯變化，停梢之副梢平均長度為 63.8 cm (圖 3)。「如玉」梨在 4 月中旬副梢停梢後約有 85%的芽體已開始形態轉變，相隔一個月後 5 月中旬飽滿的芽體

皆已轉變為花芽。後續花芽內花原基組織逐漸分化、發育，8月中旬已分化出具開花、著果能力之構造，可為完整之花芽(表 1、圖 4)，包括 12-13 個鱗片、1-2 個營養原基、9-10 個苞片、7-9 個花原基(表 2)，然同時也觀察到消蕾與單芽多花序之異常花芽(圖 2)，且日益嚴重，至 10 月中旬發現 14.3%消蕾花芽、57.2%花序異常(圖 5)。

試驗結果顯示，花芽中花原基消蕾是導致高接後開花數量減少的主因，最早發現於花芽分化完整之後，為夏季高溫期，可推論‘如玉’分化完全之花芽受高溫逆境影響，導致產生生理障礙而消蕾。單芽多花序的異常花芽，即除正常主花序外，其混合芽下方側生葉原基發生花芽再分化形成次花序，此可能因‘如玉’梨主花序分化及生育完成較早或敗育，而生長季後期養分持續運移至營養原基中再加上環境適合所致。次花序雖然增加花序上小花穗數，但次花序發育時間短，著果後果實品質不佳，並無經濟價值。

Ito et al. (1999)指出，停梢為梨樹花芽誘導的首要條件，若枝條持續生長，GA 與 Auxin 等植物賀爾蒙濃度高，因而抑制芽體進行花芽分化。Banno et al. (1985)認為，梨枝條生長停止後，其上的梨芽有鱗片包覆且數量逐漸增加，當 12 片鱗片與 10 片左右的苞片形成之後，芽內的營養分生組織即能開始轉變為生殖相的分生組織，若梨芽內的鱗片與苞片發育的數量不足，持續為營養狀態。‘如玉’梨在 4 月中旬停梢後，副梢上大部分芽體已有形態轉變並開始花芽分化，‘如玉’的副梢在生長早期已停梢可能有助於花芽提早形成。台灣低海拔地區的‘玉金香’梨最早在 7 月中旬進行花芽分化(曹, 2010)，日本梨‘新興’在高海拔地區 9 月份開始花芽分化(陳等, 1997)，低海拔高接生產的‘新興’在 7 月(徐, 2015)，‘豐水’在日本約 7 月初(Banno et al., 1986)‘新水’在 6 月底(Peng, 1994)。本試驗的‘如玉’在高接後約 1 月 20 日萌芽後，副梢即開始生長，故花芽分化時間提早 2 至 4 個月。另外，Raknganh et al. (1995)指出，在高緯度溫帶氣候，於早春設立塑膠溫室提高梨樹生長周圍的溫度，比自然開放的環境中，提早一個月促進花芽形成。台灣平地栽培的‘如玉’生長在相對高溫的環境中，或有助於提早花芽誘導。

然高溫的環境加速葉片成熟，縮短葉齡，致使葉片提早老化、掉落(林與林, 1995)。Fu et al. (2011)指出，夏季高溫環境下，梨樹新梢生長旺盛與成熟葉競爭養分，進而造成葉片衰老掉落，特別是枝條下部的葉片。‘如玉’梨的葉片在五月中旬葉綠素含量達到最高(圖 6)，推測葉片接近成熟，副梢下段的葉片發育時間最長，葉齡高於中段與上段的葉片，在 7 月初開始零星的葉片掉落，至 8 月底則大量掉落(圖 7)。

Yamamoto (2010)說明梨芽中花序凋亡的過程，首先花芽外部的鱗片含水量下降而失去保護功能，致使內部的花序對於外界逆境耐受能力下降而生理代謝異常，

最後發生花序消蕾之現象。試驗中‘如玉’梨副梢歷經8月颱風侵襲，葉片大量掉落，同時發現消蕾之花芽，推測可能在大量落葉後，造成芽鱗鬆散，失去保護功能，此時正值8月高溫時期，花芽無法耐受高溫，故花序逐漸乾枯死亡。徐(2015)發現，在卓蘭高接栽培模式下‘新興’副梢上的花芽，在葉片落時期花芽快速的褐化壞死。張(2008)也發現低海拔採穗的‘玉金香’與‘早生黃金’，發育完全之花芽大多因提早落葉而芽體鱗片鬆散、消蕾或提早開花。上述報告均指出，副梢下段的花芽最先消蕾，可能葉片最早掉落有關。

‘如玉’梨的花芽具單芽多花序的異常現象(圖 2D)。單芽多花序為花葉混合芽中營養芽發生花芽分化，而形成另一花序之異常芽(第二花序)。第二花序在主花芽發育後期生成，可能因為主花序消蕾後，花序基部的營養原基積存能力提高，養分供給失衡，使得營養原基行花芽分化所致 (Verissimo et al., 2002; Yamamoto, 2010)，或芽體內部主花序發育成熟後積存能力下降，使養分運移至營養芽原基中，再加上外界環境適合梨芽進行花芽分化，最後促使營養原基形成新花序(馬等，2014)。

經由‘如玉’芽體形態觀察，發現造成‘如玉’花穗品質不佳的主因並非花芽分化之問題，而是花芽發育後期，環境逆境誘發生理障礙，造成花芽消蕾以及異常花芽。

二、冷藏期對梨穗品質之影響

10月中旬採收‘如玉’梨花穗後，須離體冷藏2個月以解除休眠，並於12月中旬高接，開始新年度的生產。在花穗冷藏的10週期間內，花芽消蕾率為12%至19%之間，沒有顯著變化，顯示冷藏期不影響花穗品質(表 4)，此‘橫山’梨相同，離體枝條開花數表現不受冷藏處理週數的影響(洪，2014)。此外，冷藏期間尚觀察‘如玉’花芽與內部花原基的橫、縱徑些微的增長。蘋果與梨的花芽經低溫解除內生休眠(endodormancy)後，花芽轉為生態休眠(ecodormancy)，花芽外部鱗片與內部花序上花原基開始增加自由水(free water)流動性與含水量，故體積逐漸增加，直到萌芽(Bubán and Faust, 1995; Saito et al., 2015)。「如玉」花芽冷藏期間的生長，可能為已解除內生休眠，花芽含水量增加細胞體積增長，顯示離體花芽在冷藏期間仍有保有正常生理及發育的能力。

造成‘如玉’梨花穗品質不佳的主因為花芽發育後期的生理障礙。農民習慣於10月才開始採收花穗，目的為讓花芽在樹上有足夠的發育時間，高接後能有最佳的開花品質，然10月份花芽容易發生消蕾與花序結構異常，採穗時間顯然太晚。‘如玉’梨副梢上花芽在8月中旬已臻分化完全，及其花穗可忍受長時間冷藏，或許未來可將採穗時間提早至8月，以避免花芽生理障礙發生。但提早採穗必然要更長的冷藏時間，期間花穗仍有呼吸作用消耗枝條中貯藏的澱粉及養分，超過10週以

上冷藏是否影響高接之後的開花表現，需後續研究證實。

三、回剪對副梢生長與花芽形成之影響

為避免台灣夏季高溫縮短葉齡提早掉落，於春季期間對‘如玉’副梢進修剪(圖 8)促使新梢再生，新生之葉片可以渡過長時間的高溫環境，減少因提早落葉造成花芽消蕾之問題。經修剪後再生的新梢長度與直徑低於未修剪之副梢，且越晚修剪新梢再生的生長量越差，甚至 5 月修剪後芽體沒有萌發，無新側枝形成(圖 9)。未修剪之副梢上有 89.2% 的芽體形成花芽，而修剪處理之新梢上均無花芽形成(表 3)。

‘如玉’副梢經修剪後再生能力差，不易再形成新梢。推測‘如玉’梨修剪試驗期間正值果實發育，以及‘橫山’砧木以水平棚架式栽培，容易增生大量徒長枝，果實與徒長枝競爭養分，對修剪後副梢再生的新梢生長不利。另外，隨著芽體年齡增長，內部累積抑制物質越多，越難藉由修剪刺激側芽萌發。‘如玉’在 4 月中旬副梢停梢生長停止、進入休眠，在停梢前 3 月修剪可以有效刺激側芽萌動，但停梢後進行修剪，刺激側芽的效果下降，如 5 月份修剪無法誘使芽體萌發。此外，成熟的葉片會生合成 ABA 累積到芽中，抑制側芽萌發(Fuchigami and Nee, 1987; Campoy and Egea, 2011)。本試驗修剪的方式，側芽留有葉片，可能存在抑制物質影響修剪刺激萌芽的效果，除葉後或許可以提高萌芽率與新梢生長。除上述影響外，品種特性也是影響修剪效益的因素之一(Mike, 1986)。張(2008)指出生長勢強的‘玉金香’梨品種修剪後再生能力好，可藉由修剪控制生長勢，減少養分浪費，然生長勢弱的‘早生黃金’則與之相反。‘如玉’的枝條再生弱，也可能跟品種特性有關，不適合利用修剪之動作誘發新梢再生。未來，如能提早至 2 月份甚，至更早進行修剪，可以改善萌芽率低與生長量不足之問題。

四、果實生育特性及貯藏性

本試驗於高接開花後 44 天開始採樣，小果發育已經歷過細胞分裂期，然其生長仍為類似單 S 型曲線(圖 10A)，此與趙(2007)調查‘豐水’梨的結果相似。

以果實生長曲線估算‘如玉’梨的生理成熟度為花後的 125 至 135 天(5/25-6/04)之間，這期間採收的果實品質最佳，平均單果重為 395.2 g，可溶性固形物含量可達到 11.5 °Brix、可滴定酸含量 0.18 % (圖 10B、C)。若採收期延長，雖可增加果實鮮重，但可能產生糖度降低與裂果之風險(林等，1995；顏等，1991)。徐與黃(2000)提出，梨果實採收的標準有果臍部肥厚、果皮由粗糙轉細緻平滑果點消失、果皮呈現品種特有色澤、種子由白色轉變為褐黑色、果皮出現臘質、果肉可溶性固形物增加、香氣濃厚等特徵。但‘如玉’梨利用套袋技術提改變果色為趨近白色(圖 11)，

採收適期不易由果實外觀判定。經本研究可藉開花日數估算生育所需日數，建立採收適期。

為調節市場供需，台灣梨果常以低溫貯藏方式來延長果實品質，但‘如玉’梨果實採收成熟度越高則越容易在貯藏期間品質發生劣變，所以果農寧提早採收果實，以延長‘如玉’果實貯藏時間。但採收成熟度不足，果實品質不佳，影響販售的價值。本試驗在‘如玉’果實品質最佳期間(花後 134 天、6/04)採收，以 2℃、果實密封塑膠袋冷藏，瞭解在高採收成熟度下的貯藏時間。結果顯示，冷藏期間，‘如玉’梨果實失重率逐漸增加，但失重幅度微小，冷藏 5 個月最大失重率為 0.55 % (圖 12A)。園產品採收後仍是有生命的活生物體，繼續呼吸與蒸散作用等生理變化，梨果實冷藏期間的失重跟水分散失有關(劉，1995；趙，2007)。[○]‘如玉’梨果實冷藏期間失重率低，可能果實在冷藏前經聚乙烯塑膠袋包覆，得以減少水分散失及失重率(圖 12A)。在冷藏 3 個月後可溶性固形物下降約 1 °Brix (圖 12B)，與侯(2002)的‘雪梨’及郭等(2005)‘新雪’冷藏結果類似，此因呼吸作用消耗葡萄糖、有機酸及脂肪，產生能量及二氧化碳，供給細胞進行生理反應使用所致(劉，1995)。

‘如玉’梨果實在冷藏 2 個月後開始出現黑色斑點，且隨儲藏時間增加黑斑越來越多，冷藏至 4 個月變成大面積黑色的燙斑(圖 13)。梨果實在低溫冷藏下果皮出現黑斑，應為低溫造成的寒害症狀，且在不同溫度下的症狀有所不同，如‘新雪’梨低溫貯藏(1、5、9、13℃)，1℃果皮變黑程度嚴重、13℃變黑最輕微，不同溫度下冷藏的貯藏能力不一樣(郭，2005)。但是侯(2002)指出‘雪梨’貯藏期間果皮變黑受到包裝袋內的高二氧化碳濃度促進，若添加二氧化碳吸收劑可減少果皮變黑現象。本試驗的‘如玉’梨果實在冷藏期間果皮變黑，除低溫寒害之外，也有可能因袋內二氧化碳濃度過高促成的生理障礙，但需進一步確認。經過 5 個月冷藏後，‘如玉’果肉出現果肉褐變(browning disorder)的生理障礙，可能與果肉細胞累積過多的自由基，破壞細胞膜穩定性，造成果肉崩解併發酵素型褐化反應有關 (Franck et al., 2007)；或者與細胞壁酵素，如：纖維素酶、聚半乳糖醛酸酶和 β-半乳糖甘酶，在梨果實貯藏期間降解細胞壁，果肉組織崩解，造成褐化反應(Yamaki and Kajiura, 1983)。

在‘如玉’梨果實品質最佳期間(花後 134 天)採收的梨果，冷藏在 2℃之中，貯藏 2 個月之後果實開始發生劣變，或許貯藏的溫度(2℃)與方法(果實聚乙烯塑膠袋密封)並非最佳條件，未來需進一步探討。

誌謝

本研究承財團法人中正農業科技社會公益基金會『107-中基-農-5』與『108-中基-農-4』計畫之補助、農業試驗所作物組施昭彰博士提供寶貴意見，謹致謝忱。

聲明

本研究為第一作者碩士論文之一部份，刻正準備發表於正式期刊，特此聲明。

參考文獻

1. 馬春暉、李鼎立、王然. 2014. 梨子花發育對果實品質的影響. 園藝學報 41(8): 1682-1688.
2. 林信山、林嘉興. 1995. 利用頂端優勢舒緩台灣平地溫帶梨之高溫逆境. 臺中區農業改良場研究彙報 48: 55-68.
3. 林嘉興、張林仁、廖萬正. 1995. 認識國產高品質梨之果實. 臺中區農業專訊 12: 5-7.
4. 林嘉興、張林仁、廖萬正. 1995. 梨樹開花期之生理與著果之探討. 台中區農業改良場專訊 12: 18-25.
5. 胡庭維、張哲嘉. 2016. 山梨糖醇混合硼酸溶液處理對‘如玉’(*Pyrus* spp.)高接梨萌芽、果實與花芽品質之影響。興大園藝 41(3): 11-22。
6. 侯惠茹. 2002. 砂梨之低溫貯藏與生理障礙之研究. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文. 台北.
7. 施伯明. 2011. 梨產業概況. 桃園區農業技術專輯 7: 1-6.
8. 施昭彰. 1999. 溫帶果樹高接花穗生產方法. 中華民國發明專利第 103213 號.
9. 施昭彰. 2010. 平地栽培之梨產業規劃. 2010 年宜蘭地區果樹產業發展研討會專刊 p. 43-56.
10. 洪千惠. 2014. 橫山梨(*Pyrus pyrifolia* Nakai)花粉採集技術之研究. 臺灣大學園藝暨景觀學系學位論文. 台北.
11. 徐昊辰. 2015. 臺灣低海拔地區梨(*Pyrus pyrifolia* Nakai.)生產改進 I. 海拔高度對新興梨花芽形成與休眠性之影響 II. 果實內無機成分與台中二號梨儲藏過程中梨蜜症發生機率之關係. 臺灣大學園藝學研究所學位論文. 台北.
12. 徐信次、黃和炎. 2000. 寄接梨之栽培管理. 台南區農業改良場技術專刊 89-8. pp. 29. 行政院農業委員會.
13. 張哲嘉、許怡萱. 2015. 臺灣西部平地溫帶果樹發展. 農業試驗所特刊第 189 號 p. 66-88.

14. 張祐銘. 2008. 低海拔高接梨花穗品質與高接梨果實發育關係之研究. 國立中興大學碩士論文. 台中.
15. 曹靖玟. 2010. 玉金香高接用花穗的花序發育. 國立台灣大學生態學與演化生物學研究所碩士論文. 台北.
16. 莊耿彰. 1996. 東方梨的一般栽培生理(三). 農業世界 151: 85-88.
17. 郭純德、尤進欽、張致盛. 2009. 亞洲梨之採收後處理. 興大農業 68: 12-16
18. 郭純德、張致盛、尤進欽、黃碧海. 2005. 貯藏溫度對‘新雪’梨果實品質及寒害之影響. 台灣園藝 52(4): 401-412.
19. 陳中、黃朝窗、邱仁文、黃朝卿. 1997. 豐水梨腋花芽促生栽培技術改進研究. 提升果樹產業競爭力研究會專集(二) p. 187-196.
20. 行政院農委會農糧署. 2019. 農情報告資源網.
https://agr.afa.gov.tw/afa/afa_frame.jsp
21. 行政院農委會. 2019. 農業統計資料查詢.
<https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/inquiry/InquireAdvance.aspx>
22. 廖萬正. 1991. 利用“二次催芽栽培法”在本省低海拔地區生產高需冷性東方梨. 臺中區農業改良場研究彙報 32: 33-39.
23. 廖萬正. 1994. 台灣低海拔地區生產東方梨之研究. 臺灣經濟果樹栽培技術及應用研究研討會專集 p.161-166.
24. 趙婉琪. 2007. 嫁接‘豐水’梨果肉水心症之研究. 國立宜蘭大學園藝學系碩士論文. 宜蘭.
25. 劉梅芳. 2005. 梨產業現況與發展策略. 臺中區農業改良場特刊 75: 1-11.
26. 劉富文. 1995. 園產品採收後處理及貯藏技術. 台灣省青果運銷合作社. 台北.
27. 蔡淑華. 1975. 植物組織切片技術綱要. 茂昌圖書. 台北. pp. 72.
28. 顏昌瑞、林宗賢. 1991. 果實生長發育與果實品質之改進. 台灣果樹之生產及研究發展研討會專刊 p. 55-60.
29. 羅國偉、施伯明. 2011. 梨品種介紹. 桃園區農業技術專輯 7: 7-11.
30. Banno, K., S. Hayashi, and K. Tanabe. 1985. Relationships between flower bud formation and endogenous growth regulators in Japanese pear cultivars (*Pyrus serotina* Rehd.) J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 54(1): 15-25.
31. Banno, K., S. Hayashi, and K. Tanabe. 1986. Morphological and histological studies on flower bud differentiation and development in Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). J. Japan. Soc. Hortic. Sci. 55(3): 258-265.
32. Bubán, T. and M. Faust. 1995. New aspects of bud dormancy in apple trees. Acta

- Hortic. 395: 105-111.
33. Campoy, J. A., D. Ruiz, and J. Egea. 2011. Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: A review. *Sci. Hortic.* 130(2): 357-372.
 34. Franck, C., J. Lammertyn, Q. T. Ho, P. Verboven, B. Verlinden, and B. M. Nicolai. 2007. Browning disorders in pear fruit. *Postharvest Bio. Technol.* 43(1): 1-13.
 35. Fu, C. M., N. Z. Huang, Z. G. Zhao, S. H. Li, Z. Q. Huang, Y. P. Shi, and F. L. Tang. 2011. Research advances on secondary blooming in south early-maturing pear and its control measures. *J. Southern Agric.* 42: 422-425.
 36. Fuchigami, L. H. and C. C. Nee. 1987. Degree growth stage model and rest-breaking mechanisms in temperate woody perennials. *HortScience* 22: 836-845.
 37. Ito A, H. Yaegaki, H. Hayama, S. Kusaba, I. Yamaguchi, and H. Yoshioka H. 1999. Bending shoots stimulates flowering and influences hormone levels in lateral buds of Japanese pear. *Hortscience* 34(7): 1224-1228.
 38. Mike, A. 1986. Physiological response of fruittree to pruning. *Hort. Rew.* 8: 337-378.
 39. Nee, C. C., C. H. Tsai, and D. D. Anstine. 2002. Asian pear germplasm-future trends and current research in the industry. *Acta Hortic.* 587: 61-69.
 40. Peng, S. A. and S. Iwahori. 1994. Morphological and cytological changes in apical meristem during flower bud differentiation of Japanese pear, *Pyrus serotina* Nakai. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 63(2): 313-321.
 41. Petri, J. L., G. B. Leite, and Y. Yasunobu. 2002. Studies on the causes of floral bud of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) in southern Brazil. *Acta Hort.* 587: 375-379.
 42. Raknganh, J., H. Gemma, and S. Iwahori. 1995. Flower bud formation in Japanese pear trees under adverse conditions and effects of some growth regulators. *Jpn. J. Trop. Agr.* 39(1): 1-6.
 43. Saito, T., P. A. Tuan, A. Katsumi-Horigane, S. Bai, A. Ito, Y. Sekiyama, H. Ono, and T. Moriguchi. 2015. Development of flower buds in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) from late autumn to early spring. *Tree Physiol.* 35(6): 653-662.
 44. Teskey, B. J. E. and J. S. Shoemaker. 2012. Pear, p.127-163. In: Teskey, B. J. E. and J. S. Shoemaker (eds). *Tree fruit production*. AVI Publishing. Westport, Conn.
 45. Verissimo, V., J. P. Gardin, R. Trevisan, J. B. da Silva, and F. G. Herter. 2002. Morphological and physical parameters of flower buds of trees of two Japanese pear

- cultivars grown at three different areas of Southern Brazil, and their relationship with flower bud abortion intensity. *Acta Hort.* 587: 381-387.
46. Yamaki, S. and I. Kajiura. 1983. Change in the polysaccharides of cell wall, their constituent monosaccharides and some cell wall-degrading enzyme activities in the watercore fruit of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehder var. *culta* Rehder). *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 52(3): 250-255.
47. Yamamoto, R. R. 2010. Study on dormancy progression and floral primordia abortion occurrence in 'Housui' Japanese pear grown under mild winter conditions. Osaka Prefecture University, Tsukuba. PhD Diss. p. 124.

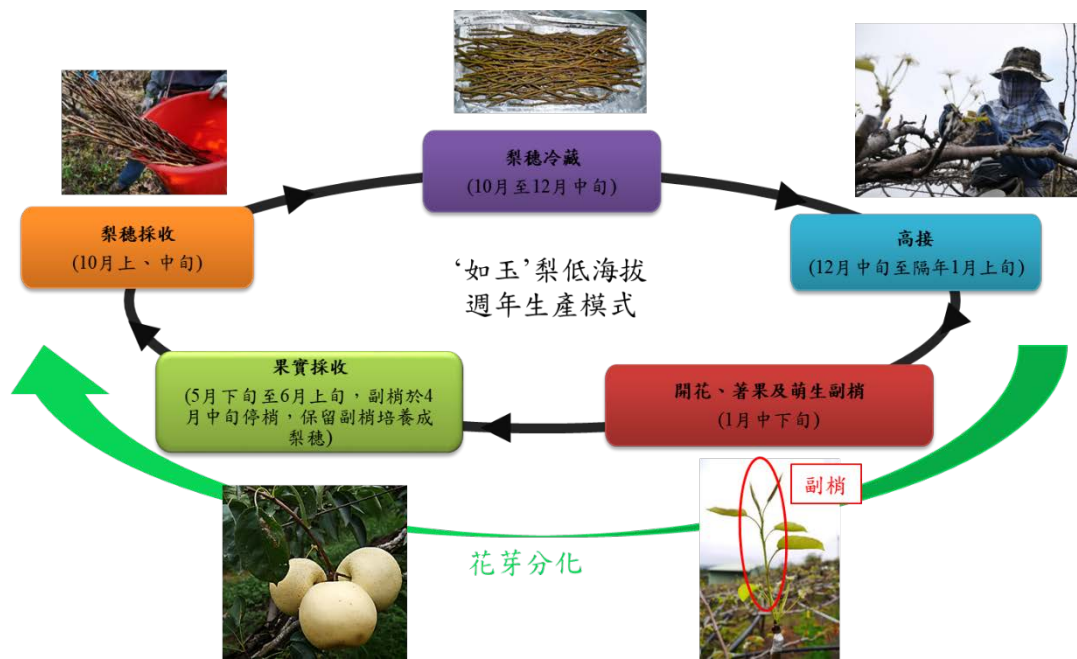


圖 1. ‘如玉’梨低海拔週年生產模式

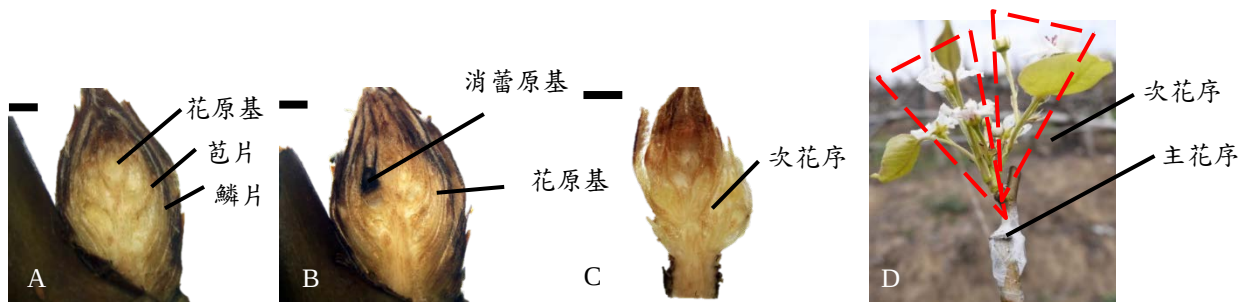


圖 2. ‘如玉’梨(A)正常花芽、(B)消蕾花芽、(C)結構異常花芽、(D)單芽多花序。
Bar=1mm. (胡和張, 2016)

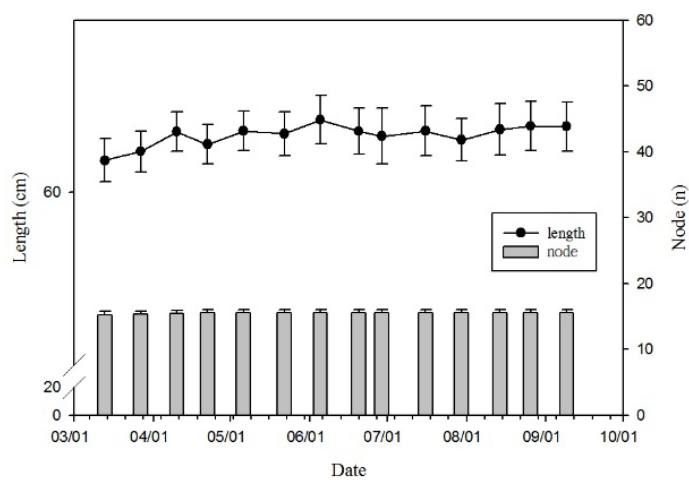


圖 3. ‘如玉’梨副梢生長變化

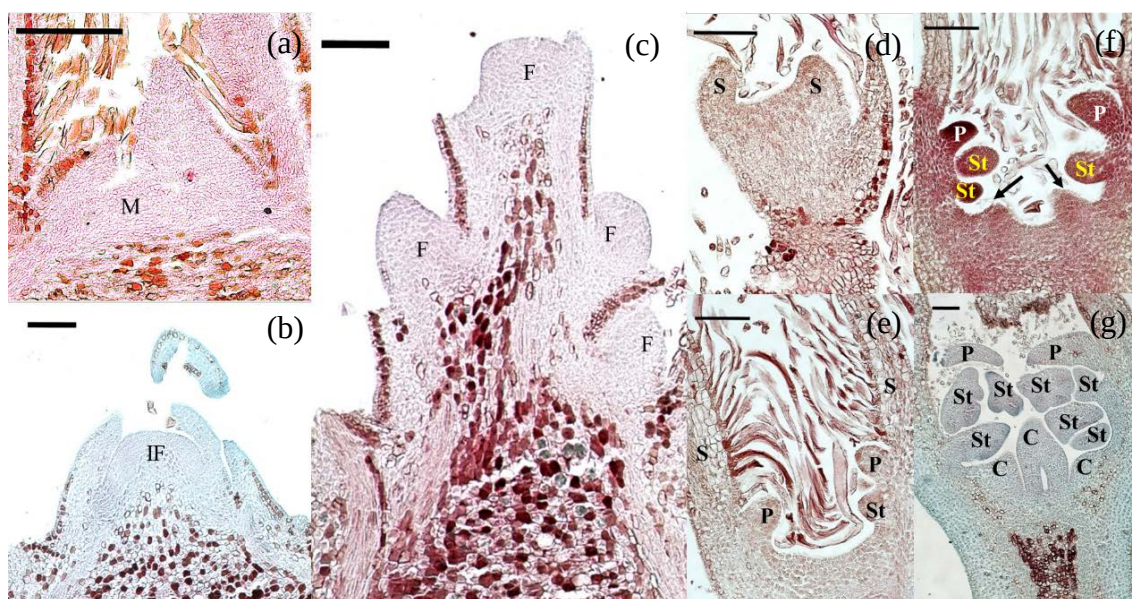


圖 4. '如玉'梨芽體花芽分化；(a)營養芽、(b)花序原基、(c)小花原基、(d)花萼原基、(e)花瓣原基、(f)雄蕊原基、(g)心皮原基。M: meristem；IF: inflorescence primordia；F: floral primordia；P: petal；St: stamen；arrow: carpel primordium；C: carpel. Bar=100

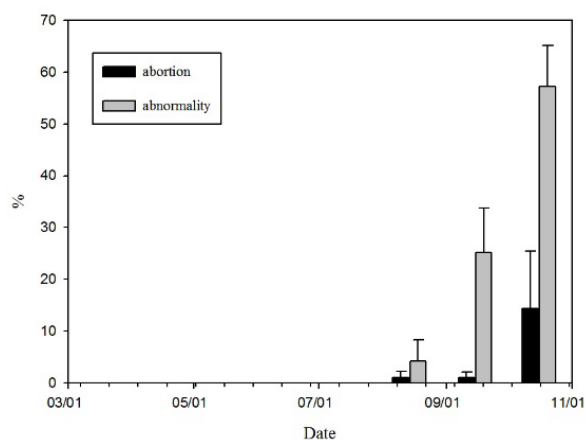


圖 5. '如玉'梨消蕾芽與異常芽之比率

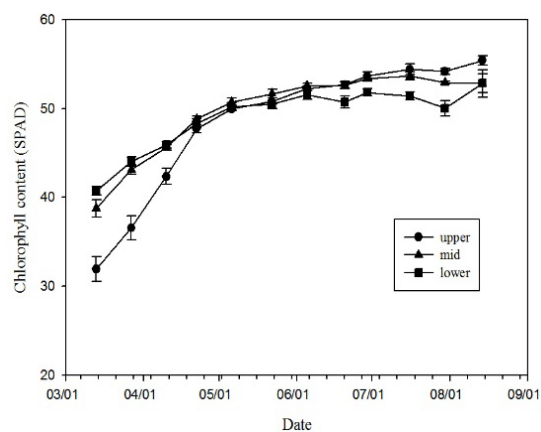


圖 6. '如玉'梨副梢上葉片葉綠素含量變化

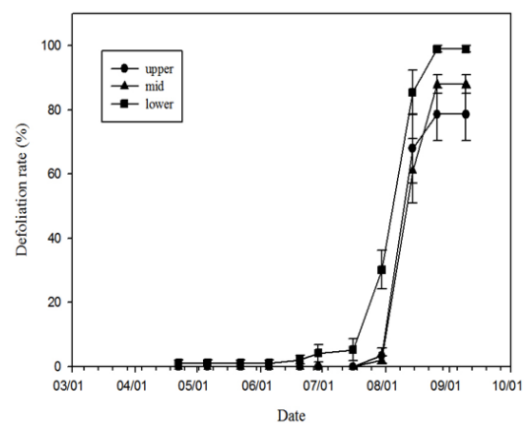


圖 7. '如玉'梨副梢上葉片掉落率

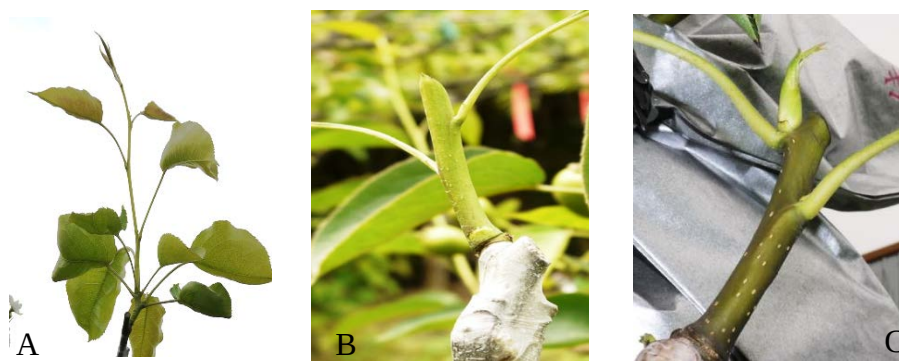


圖 8. '如玉'梨副梢(A)未修剪前；(B)修剪模式及(C)修剪後萌芽。

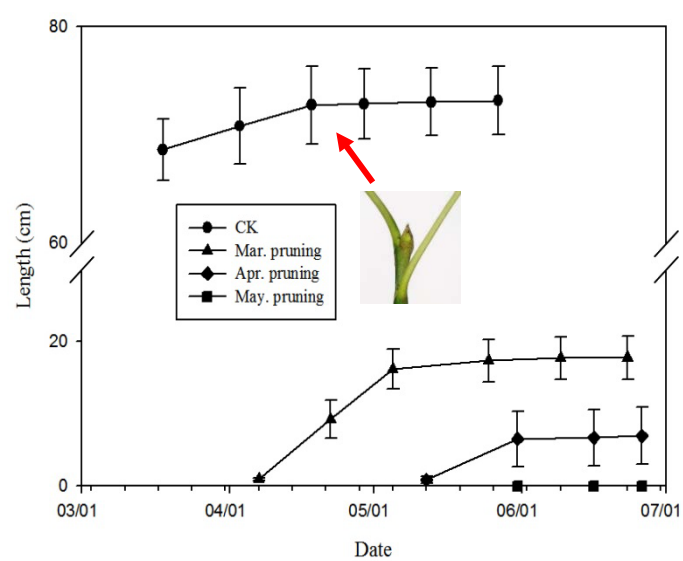


圖 9. 不同時期修剪'如玉'對副梢生長之影響(停梢判定:芽鱗包覆生長點)

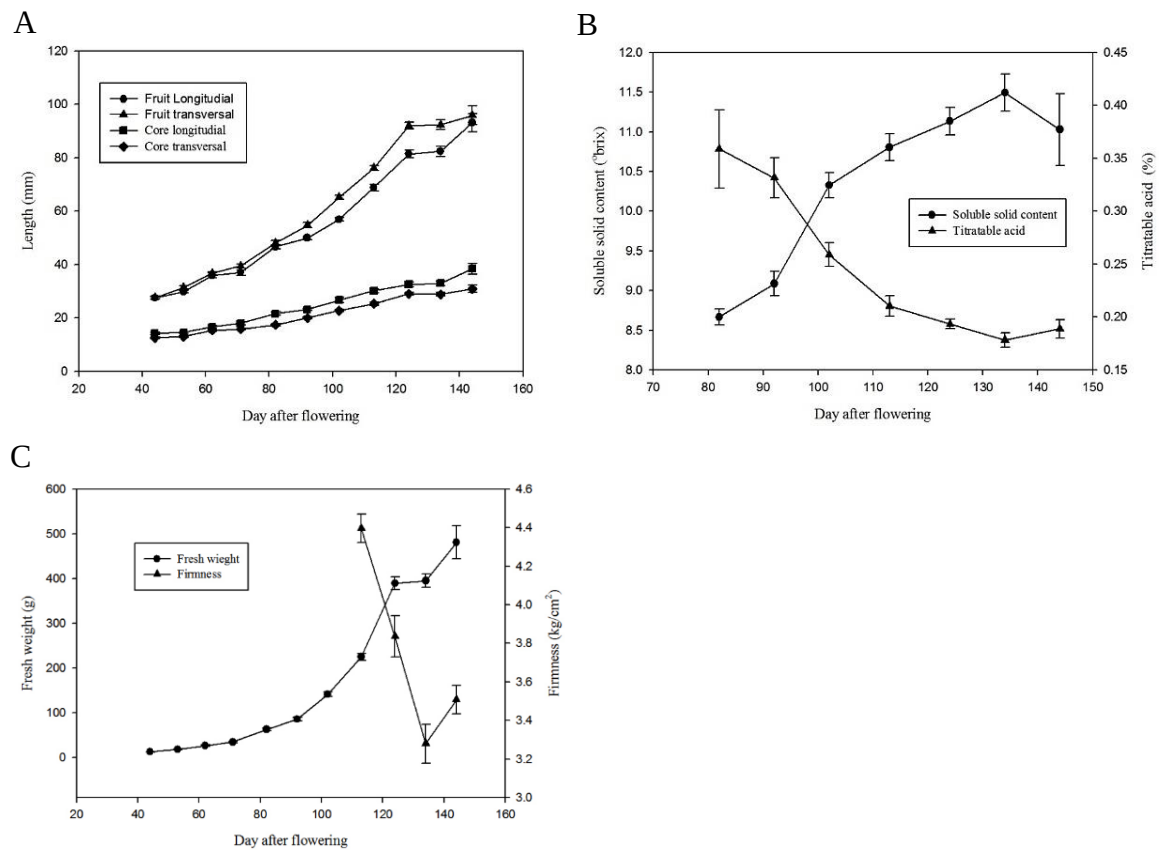


圖 10. ‘如玉’高接梨(A)果實生長變化、(B)可溶性固形物與可滴定酸含量變化、(C)果實鮮重與硬度變化



圖 11. ‘如玉’梨高接梨果實發育情形。(Scale = 10 cm)

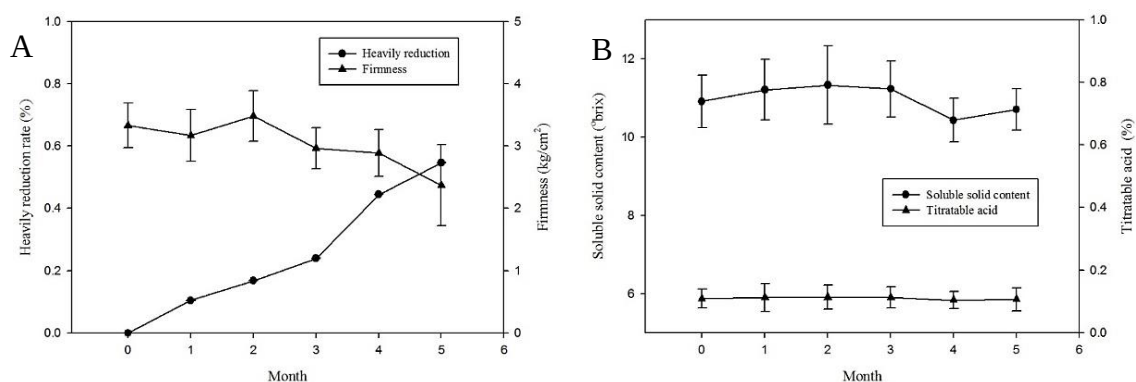


圖 12. ‘如玉’梨果實冷藏期間(A)失重率與硬度變化、(B)可溶性固形物與可滴定酸變化

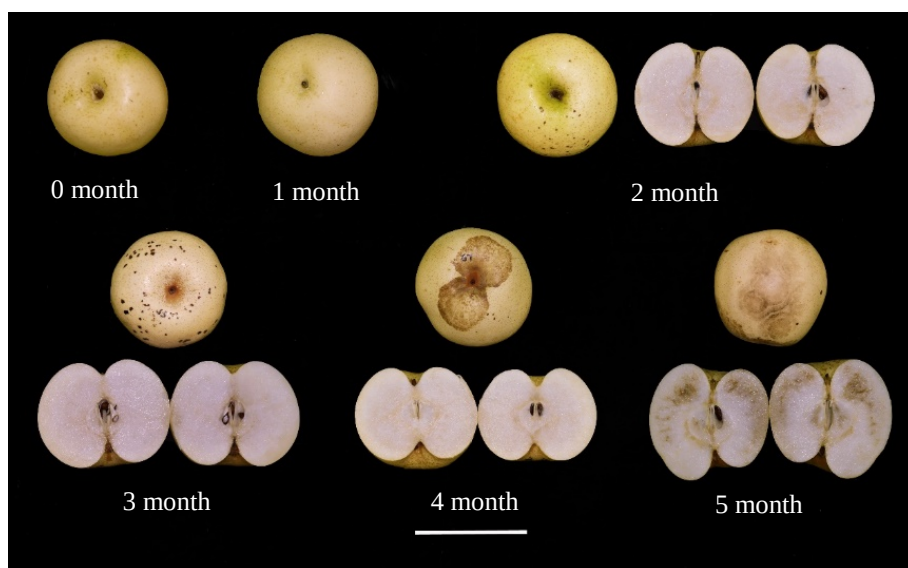


圖 13. ‘如玉’梨果實冷藏期間的變化。(scale = 10 cm)

表 1. ‘如玉’梨各月份芽體階段分化階段百分比

month	Stage of differentiation						
	V. (%)	IF. (%)	F. (%)	S. (%)	P. (%)	St. (%)	C. (%)
April	20.0	28.3	51.7	0.0	0.0	0.0	0.0
May	0.0	0.0	1.7	40.7	30.5	44.1	0.0
June	0.0	0.0	0.0	13.6	22.7	27.3	36.4
July	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	28.6	87.5
Aug.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	98.4
Sep.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
Oct.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0

^z V.: vegetative bud, IF.: Inflorescence primordia, F.: Floral primordium, S.: Sepal, P.: Petal, St.: Stamen, C.: Carpel.

表 2. ‘如玉’梨花芽內結構數量。(08 月 14 日採樣)

Structures	Number
Scale	12-13
Vegetable primordia	1-2
Bracts	9-10
Flower primordia	7-9

表 3. 冷藏時間對‘如玉’梨花穗品質之影響

冷藏週次	總芽數	萌芽率 ^z	開花數	消蕾率 ^y
0	16.1 ± 1.7	9.9 ± 5.0	0.1 ± 0.3	15.4 ± 2.1
2	15.0 ± 1.5	34.3 ± 7.7	1.6 ± 1.0	14.6 ± 1.9
4	17.7 ± 0.9	42.3 ± 5.1	2.0 ± 0.7	16.5 ± 3.7
6	16.9 ± 1.0	38.4 ± 5.0	2.1 ± 0.9	17.3 ± 4.0
8	17.0 ± 0.9	41.3 ± 7.3	3.8 ± 1.4	12.9 ± 3.7
10	17.8 ± 2.0	47.8 ± 8.9	4.0 ± 1.1	19.1 ± 1.6

^z 萌芽率: (萌芽數/總芽數) x 100%^y 消蕾率: (消蕾花芽/總芽數) x 100%

表 4. 不同時期修剪對‘如玉’梨副梢再生與花芽形成之影響

修剪 時間	副梢長度 (cm)	副梢節位數 (No.)	副梢直徑 (mm)	成梢率 (%) ^z	萌芽時間 (day)	花芽率 (%) ^y
CK	73.2 ± 3.1a	19.1 ± 0.8a	8.2 ± 0.2a	0 c	—	89.2±0.8
3/18	17.7 ± 3.0b	5.9 ± 0.5b	5.8 ± 0.2ab	21.7 ± 5.4a	14	—
4/22	6.9 ± 4.3bc	3.2 ± 1.7bc	3.2 ± 1.6bc	6.3 ± 3.6ab	28	—
5/7	0c	0c	0 ± 0c	0 c	—	—

^z 成梢率: (成梢數/修剪後芽體數) x 100%.^y 花芽率: (花芽數/總芽數) x 100%

改善目前台灣草莓苗生產模式

國立臺灣大學園藝暨景觀學系 楊雯如教授

摘要

台灣草莓主要栽培品種屬於相對短日型，開花臨界日長為 14 小時，因此生產限制因子為溫度，在無溫控環境下，無法全年產果。栽培上，育苗期為 4 月中至 10 月上旬，定植期為 9 月中至 10 月上旬，產果期為 12 月至翌年 4 月。夏季氣候因子常常致使定植期缺苗，因此本研究在建立吻合草莓種苗三級制度的產苗系統。第一年 9-11 月於植物工場由組織培養苗生產無病毒、健康的母株生產一級種苗作為設施育苗之母株，11 至翌年 2 月於溫室中生產二級苗，其放大倍率為 21 倍；4-6 月於加強型塑膠布溫室高架床生產 3 級苗，放大倍率，5.5 倍。於 7-9 月間，利用 50ppm 促進休眠節點分化出走莖，提高插穗產量，配合冷藏處理避開夏季嚴峻環境，於 10 月進行扦插，又可放大繁殖倍率 2-3 倍，全年生產倍率約為 300 倍。

關鍵字：草莓種苗三級制度、走莖、穴盤苗、冷藏

前人研究

台灣草莓主要栽培品種為‘豐香’(‘桃園一號’)，屬於相對短日型(facultative short day)，其臨界日長為 14 小時。由於台灣地處熱帶與亞熱帶之間，日長介於 10.75 到 13.75 小時，因此溫度是台灣草莓生產的限制因子。目前栽培模式為利用高畦生產，產期可由 12 月持續至翌年 4 月；一般育苗期為 4 月中至 10 月上旬，於 9 月中至 10 月上旬間定植，由於氣候型態變遷初秋溫度偏高，近年來有延後種植的趨勢。

走莖繁殖為草莓苗的主要生產方式，草莓植株具短縮莖(crown)，走莖由植株短縮莖基部葉片的腋芽分化而來，發育成熟的走莖具有節點，節點內具有分生組織，單數節點為休眠之芽體、雙數節點向上形成不定芽，向下形成不定根而成一新植株，稱為子株(daughter plant)(Darrow, 1966; White, 1927; Hancock, 1999b)。走莖發生與草莓母株大小呈正相關，植株愈大產生的走莖愈多(Skirvin et al., 1987)。台灣早期育苗採老株育苗法，每年於果實生產期結束後(4 月)，自栽培田間選取若干行，經摘除老葉、果梗等，照顧植株使其發育出走莖，再培育出新株。鑑於

老株育苗法，果實與草莓苗生產皆為同一田區，病蟲害得以持續繁衍，防治極為困難，因此苗栗區農業改良場開發高架育苗法，在育苗圃以塑膠鉢中培育季草莓長出之走莖，待至3月初，定植於六吋盆，並置於高架架上，植株大約於5月底開始將大量萌發的走莖盛接於軟鉢或穴植管，對草莓生產的改進，有巨大貢獻。然而，長年營養繁殖，導致品種老化、苗株抗病力弱等問題，加上氣候急驟變化，每年6月至9月高溫暴雨，加劇草莓苗生產問題，近年定植期草莓苗不足及價格過高等問題日益嚴重。

避過颱風侵襲。栽培環境參數的控制及生長調節劑的運用皆有促進走莖發生的效果，日夜溫26/22℃配合暗中解決產業問題的關鍵在短時間提高走莖發生量及斷處理可促進‘Redchief’與‘Guardian’草莓走莖發育(Durner et al., 1984)；噴施BA 1200 ppm + GA 300 ppm可以增加走莖上的子株數(Ali et al., 2011)。於走莖上單數節位之休眠芽點施用GA 50 ppm，可打破休眠，發生走莖，進而提高子株數(Hala and Ragab, 2003)。鑑於無可避免的高溫多濕及颱風襲擊問題，本研究室運用氣變冷藏插穗及扦插穴盤苗，可避過夏季嚴峻環境，生產高品質草莓苗。

本研究室致力於建立一個吻合草莓種苗三級制度的產苗系統。利用植物工場由組織培養苗生產無病毒、健康的母株生產一級種苗作為設施育苗之母株，再以此生產二級及三級種苗，供草莓生產。草莓苗的量產取決於育苗期間走莖發生量，因此本研究在評估植物生長調節劑或修剪對提高走莖產量的影響，並進一步評估所生產走莖之冷藏效果及扦插成苗率。

材料與方法

植物材料

‘豐香’（桃園1號，*Fragaria × ananassa* Duch. cv. ‘Toyonoka’），以走莖莖頂生長點培養、出瓶、水耕栽培於國立臺灣大學全人工光源植物工場，使用養液為Enshi配方，日長16小時、溫度25/20℃。於2017年11月採收走莖，定植位於嘉義的結構型捲揚式塑膠布溫室中，初時子株連走莖定植3吋盆於高度遮陰區域發根並馴化3週，再分株換至6吋盆置於高架床中間，高架床兩側空間置放3吋盆進行誘苗，生產二級苗。二級苗於2018年5月送至苗栗獅潭海拔高度約360公尺之草莓苗生產圃生產三級苗。二級母株先定植於栽植袋（約7吋盆）置之高架試驗床中間，開始誘植子株至穴植管，並標定部分走莖以進行單數節芽體打破休眠試驗。2019年5月於苗栗獅潭苗圃加強型塑膠布溫室進行三級苗量產試驗，溫室面積為30m²。

促進單數節芽體走莖萌發試驗

單數節芽體萌發試驗處理分為 GA₃ 及走莖修剪處理。108 年試驗 GA₃ 試驗處理濃度為 25、50、及 100ppm，對照組以 H₂O 處理，每次試驗三重複，每重複 50 條走莖，試驗進行 5 次。走莖修剪則是於第一節點後 2cm 處減除走莖，對照組則不修剪，每次試驗三重複，每重複 100 條走莖，試驗進行 5 次。109 年 5 月進行量產試驗 GA₃ 試驗處理為 50ppm 及 H₂O 對照處理，修剪處理及其對照，3.6m² 為一重複，每重複具 200 株二級母株，三重複。

插穗冷藏及穴盤扦插試驗

2018 年 6-8 月採集走莖，。走莖收存於夾鏈袋、外套塑膠袋的格狀層架（層架下方開放）、及塑膠保鮮盒(Tupperware)，冷藏條件 5°C，冷藏 63 天後，於 50 格穴盤進行扦插試驗。扦插後，穴盤置於高度遮陰(半日照)的層架上，0、7、14、及 28 天，再移到未遮陰的平面床架，評估子株成活率。

統計分析

本試驗為完全隨機化設計（completely randomized design, CRD）。試驗所得之數據以 SigmaPlot 10.0（SPSS Inc., USAS）進行繪圖並顯示標準差（stand error），以變異分析同時期各處理彼此間之差異，確定處理間之差異達顯著水準（ $P \leq 0.05$ ），再進一步以最小顯著性差異（Least Significant Difference LSD_{0.05}, CoStat 6.2, CoHort Software, USA）判定各處理彼此間之差異。

結果與討論

促進單數節芽體走莖萌發試驗

露天高床育苗三級苗生產系統中，於在走莖上單數節點，以修剪或 GA₃ 處理皆可促使走莖發生(圖 1)。修剪處理的走莖發生率為 63%，對照組僅為 3%(圖 2A)；而 GA 處理則以 GA 50ppm 效果最佳，走莖發生率為 59%，對照組僅為 4%（圖 2B）。單數節位誘導發生之子株，無論是施以 GA 或走莖修剪，子株的存活率與雙數節位子株間並無差異，處理間也無差異。



圖 1、單數節點走莖誘發，施以 (A) 50 ppm GA 或(B)修剪。

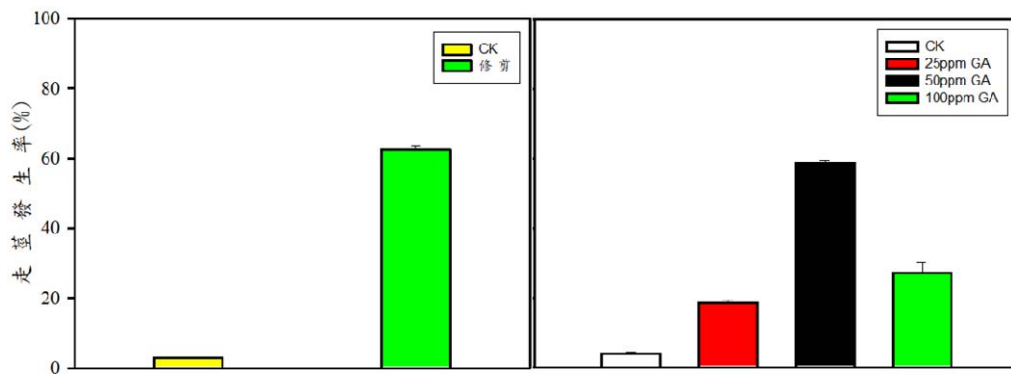


圖 2、(A)修剪及(B) GA₃ 處理對單數節點休眠芽體走莖誘發之影響。修剪試驗以不修剪的走莖為對照；GA₃ 處理則為 25、50、及 100ppm，H₂O 處理為對照組。

穴盤扦插試驗

於 5°C 冷藏庫冷藏 63 日取出插穗扦插於穴盤，經過 14 日的半日照環境的馴化（圖 3），再移入全日照露天栽培床，成苗率 77%且縮短育成日數但馴化時間過久，可能因為子株營養生長不良而降低成苗率（圖 4）。



圖 3、穴盤扦插苗，(A)馴化層架(半日照環境)、(B)馴化期間扦插苗生長情形、及(C)穴盤苗

移入全日照平面栽培床的生長情形。

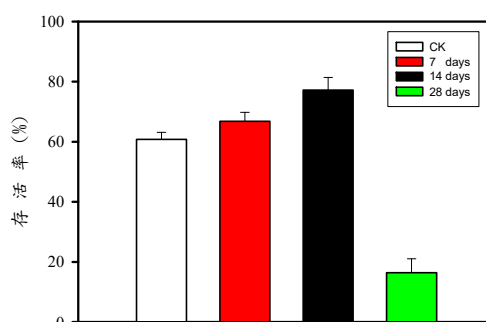


圖 4、半日照環境馴化對穴盤扦插苗成活率之影響。扦插穴盤置於層架 0、7、14、及 28 天，再移入全日照的露天栽培床架。

冷藏插穗扦插試驗

夾鏈袋、格架外套下開式塑膠袋及塑膠保鮮盒(Tupperware)冷藏方式分別有 18%、69%及 77%成苗率(圖 5)。研究室先前試驗顯示 Tupperware 塑膠保鮮盒品牌特殊材質與結構有最好的插穗保存效果，但因價格過高，本試驗目的在尋替代方案，試驗結果顯示，簡易格架外覆下開型塑膠布，成苗率可達 69%，為可行的替代方案。

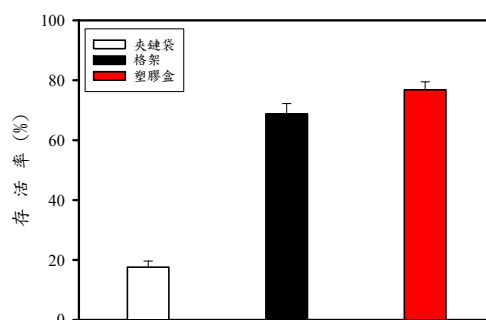


圖 5、冷藏方式對穴盤扦插苗成活率之影響。三種冷藏方式分別為夾鏈袋、格架外套下開式塑膠袋及塑膠保鮮盒(Tupperware)。

量產試驗

高床育苗三級苗生產系統中，2019 年 4 月上旬定植 800 株二級苗栽植袋做為育苗母株，截至 6 月底共產生 4431 株採穗母株，殖倍率 5.5 倍(圖 6)。利用 GA₃ 處理及修剪處理，於 7 至

9 月底間，200 株/3.6m² 可分別取得插穗 1516 及 866 個，扦插後成活子株數分別為 1171 及 623 株。與對照組相比，GA₃ 處理插穗數與苗株數分別增加 220% 及 190% ，修剪處理增加 82%及 55%(圖 7)。



圖 6、草莓扦插苗生產，(A) 四月定植二級苗於高床育苗三級苗生產採穗母株，(B) 九月底扦插苗生長情形 (C)冷藏 2 個月之插穗扦插於 50 格穴盤。

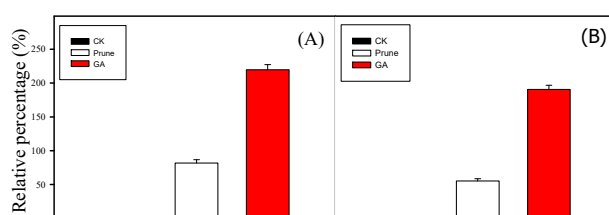


圖 7、提高插穗產量試驗，採穗母株之走莖以 GA 與修剪處理處理對(A)插穗數及(B)苗株數之影響。

結論

本研究建立之吻合草莓種苗三級制度的產苗系統。第一年 9-11 月於植物工場由組織培養苗生產無病毒、健康的母株生產一級種苗作為設施育苗之母株，11 至翌年 2 月於溫室中生產二級苗，其放大倍率為 21 倍；4-6 月於加強型塑膠布溫室高架床生產 3 級苗，放大倍率，5.5 倍。因此，9 個月間可放大健康苗株 115 倍。於 7-9 月利用採穗及冷藏，又可放大 2-3 倍，全年生產倍率約為 300 倍。

參考文獻

- Ali M., T. S. Taghavi and S. Manochehr. 2011. Effects of banzyladenine and gibberellin on runner production and some vegetative traits of three strawberry cultivars. *Afr. J. Agric. Res.* 6(18): 4357-4361.
- Darrow, G.M. 1966. *The Strawberry: History, Breeding and Physiology*, Holt, Rinehart & Winston, New York.
- Durner, E.F., J.A. Barden, D.G. Himelrick, and E.B. Poling. 1984. Photoperiod and temperature effects on flower and runner development in day-neutral, junebearing, and everbearing strawberries. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 396-400.
- Hala, F. S.A., and M.I. Ragab. 2003. Hormone levels and protein patterns in dormant and non-dormant buds of strawberry, and induction of bud break by gibberellic acid. *Egypt J. Biol.* 5: 35-42.
- Hancock, J. F. 1999. Cultural systems, p. 111-129. In: J. F. Hancock (ed.). *Strawberries*. CAB International, Wallingfer, UK.
- Skirvin, R.M., A.G. Otterbacher, J. Sullivan, K. Steffen, and R.L. Bell. 1987. The effect of parent plant size and cultivar on runner production in strawberry. *Adv. Strawberry. Prod.* 6: 6-10.
- White, P.R. 1927. Studies of the physiological anatomy of the strawberry, *J. Agric. Res.* 35: 481-492.