

## 四、種子 ( 苗 ) 病害防治研究

### 一 國際重要種傳病害檢測體系之建立

蘇士閔、劉俊延

瓜類細菌性果斑病 (Bacterial fruit blotch, BFB) 是瓜類作物重要種子傳播性病害之一，本研究利用國外發表之環型恆溫核酸增幅法 (Loop-mediated isothermal Amplification, LAMP) 之引子組合 (表 4-1) 擬建立瓜類細菌性果斑病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, Aac) 檢測作業流程。本試驗針對 LAMP 檢測瓜類細菌性果斑病菌應用情形，結果顯示單純檢測病原菌之 DNA 萃取物可以有陽性反應，檢測健康子葉之 DNA 萃取物有陰性反應。利用人工帶菌種子進行 LAMP 檢測，發現健康組織子葉之 DNA 萃取物大部分呈現陰性反應，有一管呈現陽性反應，可能的原因推測是操作過程中受到污染的結果。而在接種處理組之 DNA 萃取物只有一管呈

現陽性反應。原因推測可能是取 DNA 萃取液的核酸濃度不足，或是引子對受到污染，導致 LAMP 無法增量。在增量檢測分析之試驗中，發現 LAMP 檢測  $10^7$ - $10^8$  cfu/ml 處理組有呈色反應，但藉由專一性引子對 (表 4-1) PCR 檢測發現全部 DNA 萃取液均能增幅出 246bp 的 Aac 專一性條帶 (圖 4-1)。推測原因可能此組 LAMP 引子組合之靈敏度較專一性引子對 SEQID4/SEQID5 為差或病原增量的效果不佳。

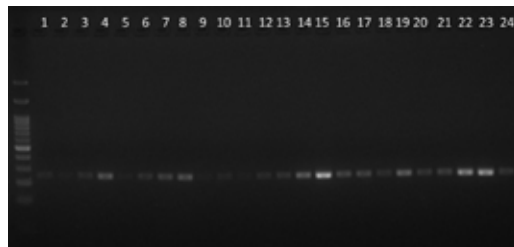


圖 4-1、以 SEQID4/SEQID5 專一性引子對進行 PCR 後可於各濃度增幅出 246 bp 的 Aac 專一性條帶。1-3:  $10^1$  cfu/ml ; 4-6:  $10^2$  cfu/ml ; 7-9:  $10^3$  cfu/ml ; 10-12:  $10^4$  cfu/ml ; 13-15:  $10^5$  cfu/ml ; 16-18:  $10^6$  cfu/ml ; 19-21:  $10^7$  cfu/ml ; 22-24:  $10^8$  cfu/ml 。

表 4-1、LAMP 引子名稱與序列

引子名稱		序 列
LAMP primers (Oya <i>et al.</i> , 2008)	F3	5'-TTGATTCACCGCCGAACG-3'
	B3	5'-TTACAGACGATAAATGACCCGG-3'
	FIP	5'-TACGGCTGTACAGTCGTAGCT-GACTCGCATGATTTCCCCA-3'
	BIP	5'-TTGCACCTCATTGCAAATGCC-CCGTCTGGAATGAACTAAGCT-3'
	Loop B	5'-TGAGTGGCGACAGACGCA-3'
Specific primers (Schaad <i>et al.</i> , 1999)	SEQID4	5'-TCGTCATTACTGAATTTCAACA-3'
	SEQID5	5'-CCTCCACCAACCAATACGCT-3'

## 二 出口種子檢疫病原標準檢測技術之開發

蘇士閔、邱燕欣、鍾文全、  
王慧如、劉俊延、簡良芬

本年度已建立十字花科細菌性葉斑病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, Psm) 與辣椒微斑病毒 (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) 之檢測標準作業流程。Psm 之檢測方法 (圖 4-2) 係以其 *cfl* 基因上 650bp 的特殊片段作為標的，並以專一性引子對 *cflF*/*cflR* 進行檢測；測試結果，於人工帶菌之種子萃取液中可正確測得 Psm 的存在。PMMoV 之檢測方法則以直接酵素聯結抗體免疫吸附法 (direct ELISA) 進行定性檢測；測試結果，同樣可於測試樣品中測得 PMMoV 之存在。



圖 4-2、十字花科細菌性葉斑病菌檢測流程。

## 三 有機病害防治資材應用種子披衣處理之研究

蘇士閔、徐麗芬、黃崧銘、  
江筱曄、蔡雅竹

本研究以市售有益微生物產品，包含蕈狀芽孢桿菌、木黴菌、枯草桿菌、莎氏菌，進行玉米種子粉衣處理，觀察其對玉米露菌病 (圖 4-3) 與紋枯病發生之影響。試驗結果 (表 4-2) 顯示，經粉衣枯草桿菌之玉米種子能降低露菌病發病率至 42%，明顯優於未經處理之對照組 (發病率 91%)，但尚不及化學藥劑滅達樂處理 (發病率 17%) 之效果。在紋枯病之防治上，同樣以枯草桿菌處理組可降低發病率至 60%，明顯優於未經處理之對照組 (發病率 83%) (表 4-3)。在貯藏時間試驗結果，各處理在粉衣兩個月後，仍能觀察到四種有益微生物均穩定存活在種子上且不影響發芽率。此外，各處理之種子經播種後一個月在各處理幼苗之根圈土壤中仍有  $1.3 \times 10^4 \sim 3.1 \times 10^5$  cfu/g soil 的有益微生物存活。



圖 4-3、披衣玉米種子置於甘蔗露菌病病株之中央，兩側皆放置甘蔗露菌病莖。

表 4-2、玉米種子披衣處理添加有益微生物對露菌病之防治效果

種子披衣配方	發病率 (%)	
CK	91	a
木黴菌	58	abc
莎氏菌	75	ab
枯草桿菌	42	bc
蕈狀芽孢桿菌	83	ab
滅達樂	17	c

表 4-3、玉米種子披衣處理添加有益微生物對玉米紋枯病之防治效果

種子披衣配方	發病率 (%)		發芽率 (%)	
CK	83	ab	53	b
木黴菌	63	bc	90	a
莎氏菌	90	a	83	a
枯草桿菌	60	c	87	a
蕈狀芽孢桿菌	73	abc	83	a
滅達樂	53	c	77	a

#### 四 豇豆種傳病害滅菌處理技術之研究

蘇士閔、江筱曄

市售常見豇豆品種種子之帶菌情形調查結果 (表 4-4) 顯示，於經表面消毒之屏東白仁白皮、紫仁花莢、農會種、紅花仁淡青皮、高雄青莢、農友 131 及紫茵二號等品種豇豆種子發現有 FOT 帶菌情形，帶菌率介於 0.3~1.0% 間，其中以農友 131

豇豆種子 FOT 帶菌率為 1% 最高。其他真菌攜帶情形，則以「紅花仁淡青皮」品種帶菌率最高，達 31.0%。發芽率則介於 94~100% 間。利用殺真菌劑處理農友 131 豇豆種子之滅菌效果的試驗結果 (表 4-5) 顯示，經待克利及撲滅寧藥劑浸泡處理 4 小時後，可降低 FOT 帶菌率至 0%，也降低其他真菌帶菌率至 20~35%，但以 CK 處理之 FOT 比率結果所示，種子自然攜帶 FOT 的帶菌情形並不穩定。

表 4-4、市售常見豇豆品種種子帶菌及發芽率情形

豇豆品種	FOT 分離率 (%)	其他真菌分離率 (%)	發芽率 (%)
屏東白仁	0.3	4.0	96
紫仁花莢	0.3	3.0	100
農會種	0.5	10.0	98
黑仁青莢	0	5.8	94
紅仁目豆	0	1.8	100
紅花仁淡青皮	0.3	31.0	99
高雄青莢	0.3	0.8	97
白鶴	0	3.8	99
農友 131	1.0	8.5	96
紫茵二號	0.3	6.0	98
矮腳豇豆	0	0.3	95
肥簪豆	0	0.3	97
八月豆	0	1.0	99
種苗場 101 年	0	4.0	99

表 4-5、不同殺真菌劑處理對農友 131 豇豆種子之滅菌效果

處理	FOT 分離率 (%)				其他真菌分離率 (%)				發芽率 (%)			
	處理時間 (hr)				處理時間 (hr)				處理時間 (hr)			
藥劑 / 稀釋倍數 (X)	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
待克利 /3,000	0	2	16	0	26	20	36	20	98	94	96	96
三泰隆 /3,000	0	6	4	24	56	66	30	66	100	94	94	94
鋅錳乃浦 /400	0	0	0	4	50	58	52	74	96	94	98	98
撲滅寧 /1,200	0	6	0	0	42	58	38	35	100	94	100	100
無菌水 (CK)	2	0	20	2	64	52	80	60	88	100	98	100

## 五 第三型葡萄捲葉病毒 GLRaV-3 血清製備生產技術建立

王慧如、邱燕欣

無性繁殖體在進行組織培養大量繁殖前，進行標的病害的檢測可確保繁殖體的健康，為生產健康種苗之基石。組織培養的標的病害包括病毒病、類病毒病以及菌質體病害，多以 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)、

PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)，作為檢測植物病毒病之技術，其中 ELISA 仍是主要檢測植物病毒病之技術，血清為此技術之重要成本，因此本計畫擬以大腸桿菌表現轉殖之 GLAaV-3 重組蛋白，作為生產標的病毒之蛋白來源，生產重要作物之檢測血清，104 年度已完成 GLRaV-3 之抗原生產 4mg（圖 4-4），完成抗血清之生產 80ml，力價稀釋可達 8,000-16,000 倍。

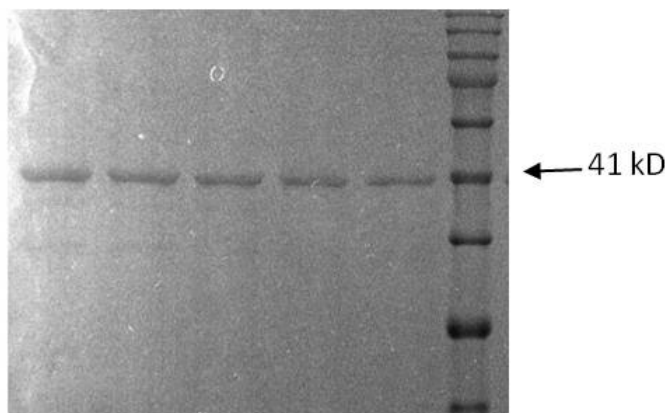


圖 4-4、GLRaV-3 之抗原重組蛋白質純化之 SDS-PAGE 圖。

## 六 草莓病害非農藥防治技術開發

連珮君、邱燕欣、袁雅芬、王思婕

104 年利用高劑量培養法可以使得梯次液態培養之微生物可以在培養 7 日之後達 109 cfu/ml 的菌量 (原 107cfu/ml)，可穩定供應田間測試施用。105 年將植物保護推薦使用之藥劑配置培養基與有益微生物進行對峙培養，所測試之藥劑皆不會抑制該為生物之影響，顯示田間可並行慣行農法進行蟲害防治。田間測試 3 個區間分別於大湖與泰安 2 處，以每週噴施一次連續四次後，每次 105cfu/ml、每株約 10ml，連續觀察 5 週，可顯著抑制葉表面之病斑數從 72% 下降至 25% (圖 4-5)，及單株死亡率從 42% 下降至 14% (圖 4-6)。

## 七 馬鈴薯種薯檢測細菌性病害技術建立

王慧如、邱燕欣

馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L.)，為茄科茄屬的一年生草本植物，原產於南美洲秘魯及玻利維亞的安地斯山區。單位面積產量高、生長期短，只需 3~4 個月即可成熟，且具貯藏性，為歐美地區許多國家主食，也是世界第四大作物。青枯病和軟腐病為細菌性病害。青枯病原細菌為 *Ralstonia solanacearum*，是由許多不同菌系組成的一個複合體 (complex species)，青枯病屬於土傳性病害，病原細菌主要經由根部的自然傷口、

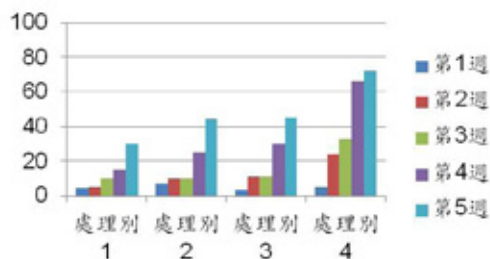


圖 4-5、以不同濃度之有益微生物噴灑草莓苗，處理 4 次後，調查大湖地區試驗田葉面病斑發生率

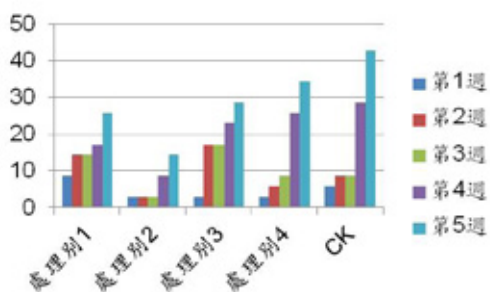


圖 4-6、以不同濃度之有益微生物噴灑草莓苗，處理 4 次後，調查大湖地區試驗田株株死亡率。

移植、寄生性線蟲、昆蟲、農具等造成的傷口侵入，此外受污染的水源、種苗或攜帶病土的鞋子及工具等等，也都會傳播青枯病，軟腐病的病原細菌為 *Pectobacterium* (舊稱 *Erwinia*) 可引起蔬菜、花卉、糧食及特用作物等之軟腐病害。本次試驗將以 ELISA 確認青枯病 (*Ralstonia solanacearum*; 12602) 與 2 株軟腐病菌 (*Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora*; 12851) (*Pectobacterium chrysanthemi*; 13150) 抗體的專一性，再透過免疫螢光染色法 (Immunofluorescence Microscopy) 偵測青枯病菌與軟腐病菌。



## 八 美國與加拿大鮮食芽菜生產相關法規盤點

王思婕、邱燕欣

利用關鍵字於搜尋引擎搜尋：USA、SPROUT PRODUCTION、USDA、FDA、CANADA 等，交叉搜尋官方資料，進行美國與加拿大芽菜生產管理資料蒐集整理。亞洲與歐美過去對於芽菜的食用習慣不同，芽菜在亞洲多為熟食方式烹煮，在歐美國家則多為生食：包括芽菜沙拉或是夾入三明治麵包等，屬於即時食用之品項，美國以 Ready-to-Eat (RTE) Products 作為該項品目名稱。因而對於芽菜生產過程中，導致腸胃不適的微生物管控相較嚴謹。由於芽菜生產過程較類似食物處理過程，因而在美國的相關規定屬於美國食品藥物管理局 (U.S. Food and Drug Administration, FDA) 管理，而美國農部 USDA 以研究病原菌鑑定篩檢技術為主。依照美國食品藥物管理局所建立的作業指南 (Guidance for Industry) 規定芽菜生產必須依照：1. 生鮮蔬果生產指導手冊 (Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables)，2. 降低芽菜病原污染的指導手冊 (Guidance for Industry: Reducing Microbial Food Safety Hazards For Sprouted Seeds)，3. 生產灌溉水的取樣作業指導手冊 (Guidance for Industry: Sampling And Microbial Testing Of Spent Irrigation Water During Sprout Production)

以及 4. 生產即時實用食品 (ready to eat, RTE) 的優良操作規範 (GMPs)，標準作業流程 (SOPs) 以及生產環境採樣檢測建議，才進行芽菜之生產。加拿大則是要求在芽菜生產工廠，必須在生產的流程中設置檢測點 (critical control point)，針對可能殘留的化學物質或是污染的微生物如沙門氏桿菌 (Salmonella) 及大腸桿菌 (E. coli O157:H7) 進行檢測。依據加拿大水洗豆芽生產，擬定豆芽菜生產的潛在風險及建議防治方式，生產廠商須有辦法辨識操作上產生的風險，並針對不同風險決定其解決方式。臺灣現無相關法規規定，但依照生產過程汙染之風險管理，應可協助栽培業者審視生產流程。

## 九 蔬菜育苗技術自動化提升研究

方煒、連珮君、邱燕欣、袁雅芬

為因應氣候變遷、資源匱乏、糧食短缺等全球性議題，期望在未來人類能確保環境永續兼顧糧食安全，植物是解決方案中很重要的一環，高效率且低汙染的量產種苗是關鍵的技術。在臺灣蔬菜、花卉作物的種苗多數仰賴育苗中心以溫室進行育苗。本研究旨在探討如何將植物工廠的技術應用於種苗栽培，初期目標在建構合乎成本效益的軟硬體系統，使植物工廠育苗比現有的溫室育苗方式更具產業競爭力。本研究使用冷藏貨櫃購建構育苗用植物工廠，並建立作物種苗量產栽培標準作業程序，以生產高品質的作物種苗。第一年度

分別在臺大與竹農育苗場各建立一個育苗貨櫃(圖4-7、圖4-8)，可分別擺放5個與6個育苗床架，每個可栽培四層，每層可擺放四個穴盤，總計每批次可分別栽培80個與96個穴盤。系統功能包括溫度、濕度控制、燈具高低可調、養液pH、EC可調、內循環均風系統與燈光光週期設定、抽水馬達定時控制或與燈光同步控制、二氧化碳濃度控制等功能。系統建置完成後首要工作是使用此設備進行育苗的試量產，以確認硬體系統的正常操作並逐步完成栽培目標作物的種苗量產標準作業程序的建立。



圖4-7、擺放於新竹新豐竹農育苗場廠區停車場內的育苗貨櫃



圖4-8、臺大環控貨櫃內部改建成育苗用(左：施工中，右：栽培中)

#### 十 開發植物病害快速診斷檢測試劑 - 田間檢測性馬鈴薯病毒Y檢測試紙之開發

王慧如、邱燕欣

開發可於田間操作、快速檢測之檢測試紙之開發，針對在臺灣較常發生且病徵容易與其他生理因子混淆之馬鈴薯病毒病 - 馬鈴薯病毒Y與馬鈴薯病毒X，協助田間檢查人員進行目視判斷，順利推動

馬鈴薯健康種苗驗證制度業務之執行。完成馬鈴薯病毒Y粗血清與PVX粗血清之免疫球蛋白IgG純化、膠體金與PVY抗體結合條件測試、試劑組裝與測試、試劑原型與初步陽性樣本及陰性樣本測試，並利用不同來源樣品完成4批次的檢測試紙與RT-PCR及ELISA之測試，試驗結果顯示目前開發之馬鈴薯病毒Y檢測試紙檢測靈敏度約為0.01mg/ml(PVY virus particles)。

## 十一 植物重大有害生物監測、預警及診斷服務

王思婕、王慧如、袁雅芬、

何書豪、邱燕欣

一般農民於栽培作物過程中，常因環境氣候因素導致病蟲害發生，一般農民可憑藉經驗或書籍知識判斷，或是送至附近農藥商行尋求答案，本場為加強指導轄區農民辦理作物病蟲害防治工作，在防疫檢疫局計畫支持下，於繁殖技術課病理研究室設有病蟲害診斷服務站，提供附近區域內農友完善的作物病蟲害諮詢服務。農友可將罹病植株採樣後自行送驗。104 年度樣品收樣 50 件：病害 31 件、蟲害：11 件、有害動物：4 件，其他藥害或生理因素：4 件。案件中以蔬菜及瓜果類為最多為 26 件，其次為果樹類 12 件。

## 十二 健全農藥殘留容許量與其使用方法一致性之研究

王思婕、袁雅芬、邱燕欣

針對已訂定大類容許量之藥劑，比對各別單一科屬之作物種類，依據所可能蒐集到的相關科學佐證資料，評估使用方法訂定之適合性，以及藥效、藥害與安全採收期等使用方法訂定之相關規範，作為提供農友安全用藥之參考。本場接受防疫檢疫局之委辦，於 104 年分析完成 15 種農藥於 206 科別作物之使用方法評估，提出國內使用方法評估意見書與有效性評估藥效、藥害及評估意見。