

三、種子(苗)檢查、檢測及驗證

一 番椒及甜瓜之新興輔助作物選育技術開發

龔美玲、林如玲、薛道原、張倚瓏

抗病育種為防治病害最有效的方法，本研究針對嚴重危害番椒果實產量的炭疽病，期望協助育種者早期篩選抗病基因，縮短育種世代，加速抗病優良品種育成，提升國產品種國際競爭力。已知‘種苗亞蔬四號’(F₁品種)的綠熟果對炭疽病的抗病性較佳，故本研究以其衍生之F₂分離族群作為研究材料。接種試驗結果確認‘種苗亞蔬四號’母本之綠熟果對炭疽病原菌 *Colletotrichum actatum* 具抗病性，而父本為感病(圖 3-1)。QTL 定位結果偵測到番椒抗炭疽病基因位於第 12 條染色體，並建立新的連鎖 SNP 分子標誌，距離約

5 cM，而文獻報告過在該條染色體上存在微效抗病基因。

甜瓜栽培容易受 Potyvirus 感染，阻礙植株生長，降低品質，造成嚴重減產。然而，由於缺乏抗病毒品種，甜瓜育種遲遲無法推展。CRISPR/Cas9 等新興植物育種技術提供了有效的方法來敲除寄主中參與植物病毒感染的蛋白，例如 eIF4E 蛋白，提供新的機會以取得具病毒抗性的種原。擬透過新的 sgRNA 設計，以靶向不同目標序列同時具有不同 GC 含量的 sgRNA 進行測試，希望能提高基因編輯的效率。本年度總共完成 4 個構築，並個別成功送入農桿菌中(圖 3-2)，針對目前獲得的 37 個轉植株進行定序(圖 3-3)，尚未獲得 eIF4E 基因編輯成功的植株，其餘轉植株持續分離培養中。

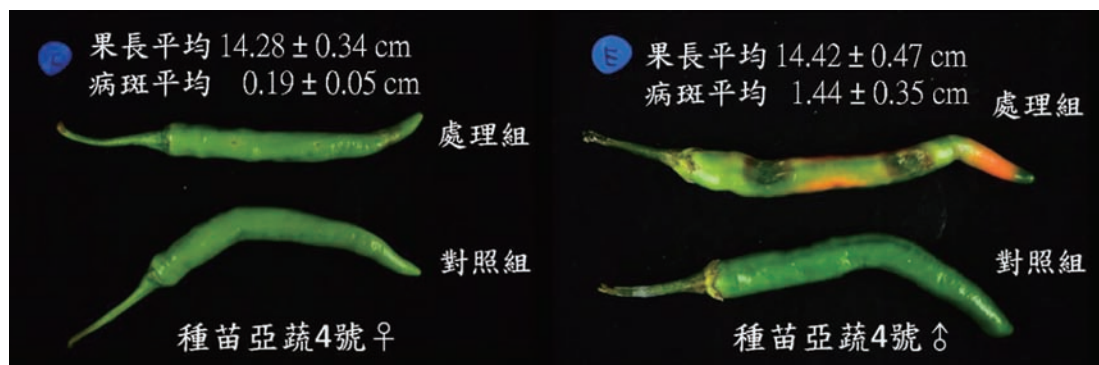


圖 3-1、「種苗亞蔬四號」親本之炭疽病菌接種情形。

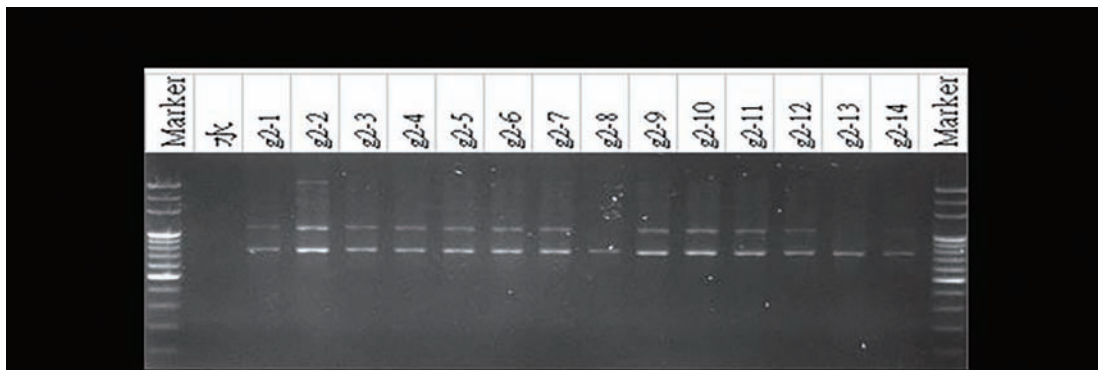


圖 3-2、將 *eIF4E-g2* 表現載體轉形到農桿菌 LBA4404 後，菌落以 35S promoter 和 Cas9 專一性引子對進行 PCR 確認。

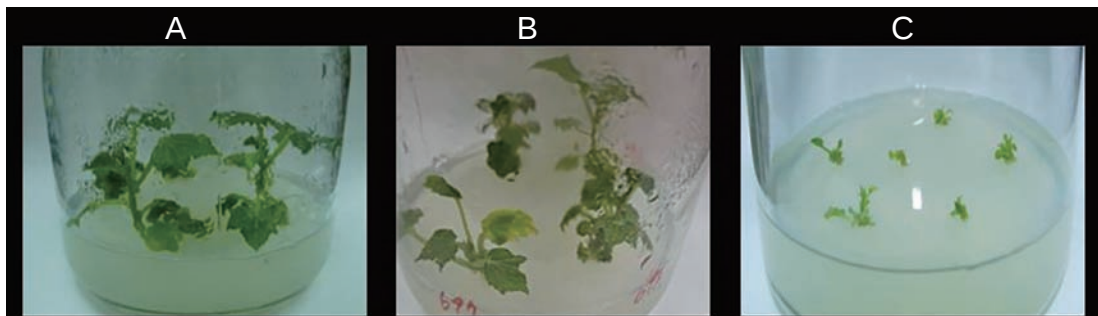


圖 3-3、分別以帶有 *eIF4E-g2* (A)、*eIF4E-g3* (B) 及 *MELO3C-p54* (C) 表現載體的農桿菌感染甜瓜得到的轉殖植株。

二 建立花椰菜產業導向性狀精準高效選育技術

龔美玲、張倚璣

花椰菜為十字花科薺屬蔬菜作物，其主要食用部為原始花軸及其未分化的花原體，生育過程中莖頂端形成肥大塊狀之花球。消費者對於高品質花椰菜的要求，除了外觀球形完整、花球緊密外，顏色需潔白無斑點，常見栽培者綑綁外葉或使用不織布遮光，避免強光照射下使花球顏色變色發黃，因此若能選育強光下花球顏色仍能維持潔白之品系，必定能節省不少農業人力。本研究擬透過建立具有一致性之花椰菜花球顏色表型汰選方法及花椰菜花球顏色特定性狀分子標誌，精準選育產業導向之花椰菜品種。本年度測試使用可攜

測色儀 NH310，於現球第 14 日後調查花椰菜花球顏色，其束葉遮光顯著影響花球表面顏色改變(圖 1)，處理遮光與否之色差值 ΔE 可高達 13.8(表 1)，未來將持續釐清照光量、照光時間點等影響，並優化調查技術，供作為可靠的花球性狀篩選之分子標誌表型資訊。另一方面，使用文獻 SSR 標誌、SRAP 標誌以及利用公開 SNP 資訊設計分子標誌，然而在本研究使用之花椰菜 F_2 分離族群中，經篩選可用的多型性標誌數量遠比預期少(表 2)，部分標誌雖在親本間具多型性，但在 F_2 族群中僅存在其中一親本的基因，因此下一年度預計利用 Genotyping-by-sequencing 技術獲得更多數量的多型性 SNP 標誌，期能加速花椰菜品種系之育成。



圖 3-4、夏作花椰菜束葉與否處理 H5 品系之花球顏色表現。左：束葉處理；右：未束葉。

表 1、夏作花椰菜束葉與否之花球測色儀量測表現。

品系	H5		p 值
處理	束葉	不束葉	
花球重量 (g)	790.8±105.8	739.7±74.2	0.15
花面最大直徑 (cm)	23.7±2.3	26.0±2.0	0.162
L*	71.3±3.9	65.8±3.6	0.111
a*	3.9±0.9*	5.2±0.5*	0.043
b*	20.8±2.1*	33.4±2.3*	0.0003
兩者色差 ΔE	13.8		-
測色儀說明	束葉花球較不束葉淺 (偏白)		
	束葉花球較不束葉綠		-
	束葉花球較不束葉藍		

*p 值 <0.05

表 2、文獻標誌多型性篩選。

標誌類型	測試數量	親本間多型性數量 (比例)	F ₂ 多型性標誌數量 (比例)	參考文獻
SSR	240	39 (16%)	12 (5%)	Szewc-McFadden et al., 1996; Lowe et al., 2004; Iniguez-Luy et al., 2008; Li et al., 2011; Vaidya et al., 2012; Zhao et al., 2012; Zhang et al., 2015; Zhu et al., 2018
SNP	39	7 (18%)	6 (15%)	Stansell et al., 2018
SRAP	144	69 (48%)	29 (20%)	Li and Quiros, 2001; Zhao et al., 2020

茄科作物土傳病害抗、感病品系根部微生物群分析與應用

林如玲、周明燕、張惠如

臺灣地處熱帶與亞熱帶，氣候高溫多濕，作物栽培易受病蟲害影響，由於土地密集耕作且長期依賴肥料與農藥，使得土壤地力衰退。近年因全球暖化及氣候變遷，導致旱、澇等極端氣候頻度增加，影響作物生理及病蟲族群消長。由於栽培環境的變化速度遠快過於作物本身的調適，造成農作生產極不穩定，影響農民收益甚鉅。依據統計，土壤傳播病害每年約造成10-20%的番茄產量損失，且因密集栽培造成土壤傳播性病害增加。由於土壤病原會產生休眠結構，同時土壤異質環境阻礙

農藥的破壞效果，化學燻蒸又有產生抗藥性及健康和生態疑慮，因此土傳病害難以有效控制。近期越來越多研究發現，應用微生物資源的調整，可作為提升環境韌性的生產調整方案。本計畫以番茄抗根瘤線蟲基因型為標的，透過番茄根瘤線蟲抗、感病品系的田間種植(圖3-5)，於不同的生長階段進行根部土壤採樣，建立優化的土壤DNA萃取流程，取得品質信賴的DNA(圖3-6)，完成細菌16S rDNA library的建置，進行土壤全基因體次世代定序。希望藉由抗、感病品系間的微生物相組成分析，鑑別差異性生物標的，並藉由培養方法分離關鍵的核心微生物群(表3-3)，測試其對番茄生長的影響，未來可做為提供土壤調節提高作物生產的應用。



圖 3-5、番茄根瘤線蟲抗、感病品系田間栽種採樣。

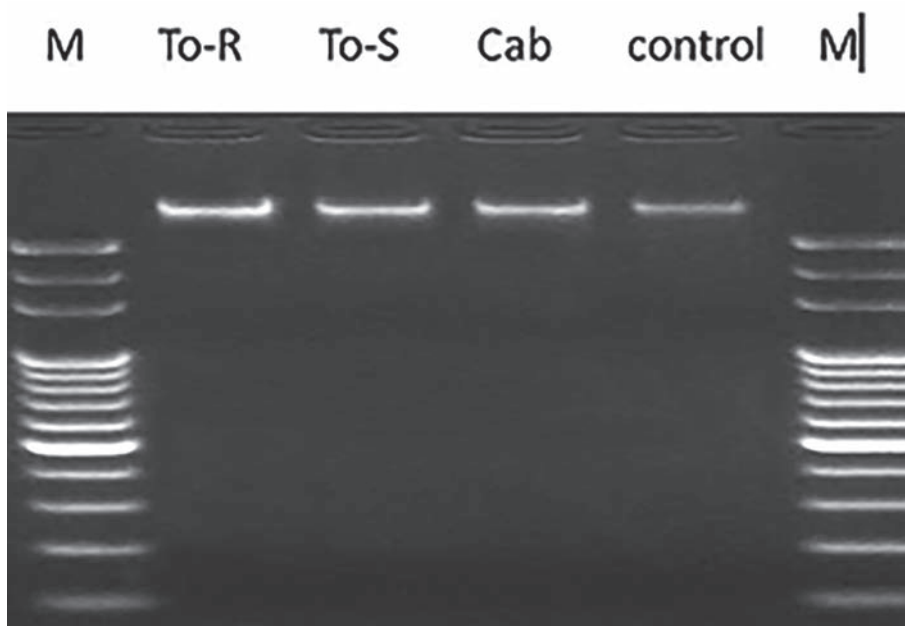


圖 3-6、根部土壤 DNA 萃取品質確認

表 3-3、抗根瘤線蟲番茄根部土壤微生物群分離

編號 (No.)	菌落形狀 (shape)	菌落邊緣 (margin)	菌落剖面 (elevation)	菌落顏色 (color)	菌落大小 (size)	定序結果
AR-1	Rround	Entire	convex	yellow, shiny	6mm	<i>Chryseobacterium</i> sp.
AR-2	Rround	Entire	convex	white, shiny	3mm	<i>Burkholderia</i> sp.
AR-3	Rround	Entire	convex	transparent, shiny	2.5mm	<i>Microbacterium</i> sp.
AR-5	Rround	Entire	flat	pale yellow	3mm	<i>Streptomyces</i> sp.
AR-6	Rround	Entire	convex	white, shiny	2.5mm	<i>Microbacterium</i> natoriense
AR-7	irregular	lobate	flat	White, dry	2mm	<i>Streptomyces</i> rishiriensis
AR-8	Rround	Entire	convex	white, shiny	1.5mm	<i>Bosea</i> sp.
AR-9	Rround	Entire	convex	White	<1mm	<i>Microlunatus</i> terrae
AR-11	Rround	Entire	flat	white, shiny	7mm	<i>Rhizobium</i> pusense

四 番茄萎凋病生理小種 Fol 3 抗病基因分子標誌建立與應用

周明燕、龔美玲、周佳霖

番茄除了加工、料理用外，也可以當作新鮮水果食用，在人類的食物中佔有重要地位。全球番茄栽培面積約 500 萬公頃、產量高達 1 億 7 千萬公噸(FAOSTAT, 2017)，是全球僅次於馬鈴薯的第二大宗蔬菜作物，台灣每年也有 4500~5000 公頃的栽培面積。番茄萎凋病是由 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*(FOL) 所引起的維管束疾病，病原菌生長適溫 27-28℃，從 5-38℃ 皆可存活，可在土壤中越冬，透過雨水、灌溉水及土壤傳播，是番茄非常嚴重的真菌性病害。番茄萎凋病一般在開花結果期開始發病，發病初期側邊下位葉開始枯黃，由下而上褐化枯死，剖開莖部，可看到維管束褐化，置於清水中，不會有白色煙霧狀菌液滲出，是與青枯病最明顯的差異點(圖 3-7)。番茄萎凋病病原菌之生理小種有 Fol 1(中國為主)、Fol 2(臺灣主要)、Fol 3(國外主要)。主要抗病基因 *I-1*(抗 Fol 1)、*I-2*(抗 Fol 2)、*I-3*(抗 Fol 3)、*I-7*(抗 Fol 3) 分別來自野生番茄 *S. pimpinellifolium* 及 *S. pennellii*。*I-1* 及 *I-2* 已經普遍存在商業品種中，然而，對 Fol 3 的抗性尚未被廣泛利用。Fol 3 最初於 1979 年在澳大利亞首先被發現，然

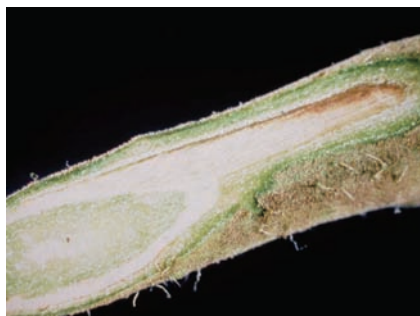
後於 1982 年在佛羅里達州被發現(Scott and Jones 1989)隨後陸續出現在全球各地，生理小種 Fol 3 在我國尚未被發現，但普遍存在於世界各地的番茄產區。為了提高我國番茄品種國際競爭力，商業品種導入抗病基因勢在必行。為了協助育種者提高抗病基因導入效率，本計畫針對 Fol 3 進行 *I-3* 抗病基因 PCR 檢測技術開發。

番茄 LA0716 表現了對於番茄萎凋病的抗性，抗性來自於第七號染色體的 *I-3* 基因(Tanksley & Costello, 1991; Lim et al. 2008)。Catanzariti 等人(2015)確定了 *I-3* gene 屬於 *SRLK* 基因家族的一員，並確認是由 *SpSRLK-5* 基因提供 *I-3* 專一性的抗性。重新搜尋番茄抗病基因 *I-3* 相關文獻資料進行背景選拔分子標誌改善。經測試 8 組番茄 *I-3* 文獻分子標誌，其中四組獲得一致結果，4 組無多型性(圖 3-8)。

Catanzariti 等針對 *I-3* 基因本身開發了 CAPS-SR5 標誌。為了簡化檢測、程序降低篩檢成本，以符合產業應用需求，本研究進行 CAPS-SR5 標誌改善，將 CAPs 轉換成具共顯性的 SCAR 標誌。經探勘附近 SNPs 資訊，並設計成 83 組 SCAR 引子組合，進行多型性測試，測試結果篩選出兩組 SCAR 標誌，PCR 結果與 CAPS-SR5 標誌一致(圖 3-9)，可以作為後續回交材料前景選拔分子工具。



<https://reurl.cc/qONQDy>



<https://reurl.cc/g0MOOb>



<https://reurl.cc/6E01pZ>

圖 3-7、番茄萎凋病一般在開花結果期開始發病，發病初期側邊下位葉開始枯黃，由下而上褐化枯死（左），受感染植物的維管組織（中）和腐爛的根（右）部出現褐色條紋。

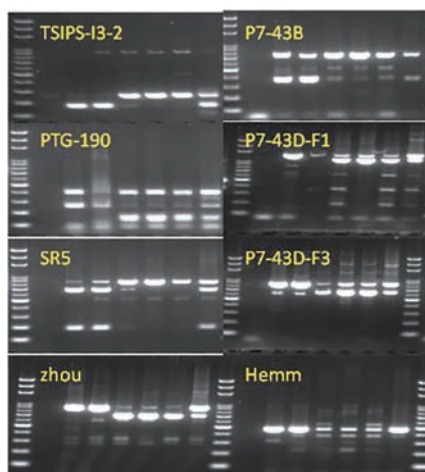


圖 3-8、測試番茄萎凋病抗病基因 *I-3* 文獻分子標誌，其中 4 組（左）獲得一致結果，4 組（右）無多型性。

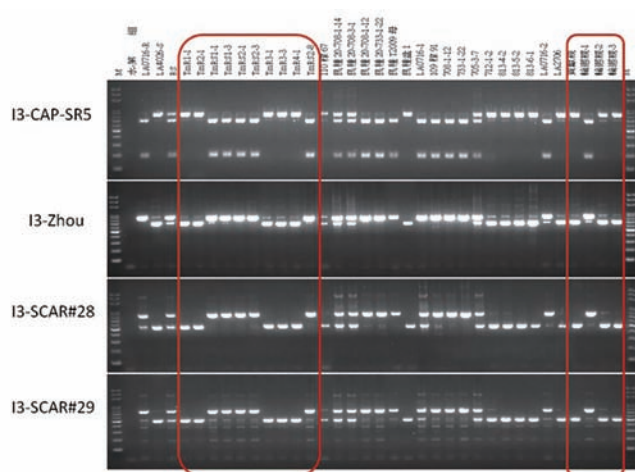


圖 3-9、SCAR 標誌 *I-3-SCAR#28* 及 *I-3-SCAR#29* 經過 PCR 驗證結果顯示與 *CAP-SR5* 結果一致。

五 加強基因轉殖植物安全管理 - 基因轉殖植物之檢測

周明燕、陳哲仁、張惠如

根據我國植物品種及種苗法與其相關管理法規，有關基因轉殖作物在上市前除須進行生物安全評估外，上市後，產品除須標示外，亦須接受主管機關監控，以維護國內生態環境與消費者之安全。有關基因轉殖作物之進出口管理，現階段採行邊境管制及境內源頭管理措施，針對較可能進口之基因轉殖作物，包括大豆、玉米、水稻、馬鈴薯、油菜及木瓜等作物，在進

出邊境時採樣偵測，同時針對高風險作物對國內種苗業者進行源頭抽檢，以確保我國作物生產不受基改作物污染。

本計畫配合農糧署執行基因轉殖作物安全監控，本年度共抽檢木瓜種苗生產業者 15 家、累積採樣數 26 件；玉米種子業者 10 家、累積採樣數 20 件；木瓜田間栽培區不定期抽檢高雄 1 區、採 3 樣品，皆無檢出目標基改片段，確保我國田間無基因轉殖作物種植及被污染風險。各小組成員檢測能力維持測試，針對木瓜葉片、木瓜種子、大豆種子、玉米、油菜進行盲樣能力試驗，定性檢定結果皆 100% 符合。

表 3-4、110 年度國內種苗業者及栽培田監測一覽表

	木瓜栽培園	木瓜種苗業者	採樣數	玉米業者	採樣數
新北市		2	3		
新竹縣		2	2		
台中市		2	3	3	6
彰化縣				2	3
南投縣		3	5	1	1
雲林縣				1	2
嘉義縣		3	5		
台南市				2	4
高雄市	1	1	5	1	4
屏東縣		2	3		
	1	15	26	10	20

六 基因編輯作物檢測技術測試評估

陳哲仁、曾一航、林如玲、張惠如

根據歐盟 GMO 實驗室網絡在 2019 年所提示之技術文件內容，有專家指出基因編輯作物在 DNA 輸送體系及組織培養再生過程中的各種環境壓力及體細胞變異，會在基因體或表觀基因體 (epigenome) 上留下印痕 (scar)，具有作為檢測標的利用之可能性。為測試驗證上述觀點，本年度以種苗場利用 CRISPR/Cas9 系統所建立之 *eIF4* 基因編輯甜瓜品系為試驗材料，包括：3 個未成功編輯品系 (308、309、310 品系)、1 個已編輯品系 (252-5 品系；C → T)，以及未編輯親本 Charentais，並選用 *MspI/HpaII*、*DpnI/DpnII*、*McrBC* 等限制酵素，進行低通量甲基化敏感性酵素 -RAPD 分析，藉此比對品系間是否存在可偵測之胞嘧啶 (Cytosine, C) 甲基化修飾改變。由於參試品系不論有無發生鹼基

置換均源自相同遺傳背景，引子測試過程中所出現之電泳條帶有無及訊號強弱差異，顯示其間存在不同程度的甲基化修飾 (圖 3-10)。根據試驗結果，在下列限制酵素 -RAPD 組合中，包括：(1)*DpnI/DpnII* 限制酵素搭配 RAPD 引子 (OPAV06-13、OPV14-03、OPM06-05、OPAJ15-04)；(2)*HpaII/MspI* 限制酵素搭配 RAPD 引子 (OPAF-16)；(3)*McrBC* 限制酵素搭配 RAPD 引子 (OPZ-06)，雖均可在 252-5 品系觀察到多型性條帶存在，然未發現屬於受測已基因編輯品系 (252-5) 之專一性胞嘧啶甲基化印痕。而 Lee 等人 (2020) 之試驗結果亦指出，在阿拉伯芥目標基因啟動子區域進行基因編輯後，其與野生型 (wild type) 植株對應序列間並未出現胞嘧啶甲基化差異存在。故甲基化印痕在基因編輯作物檢測之應用可行性，目前仍缺乏相關實驗證據支持。

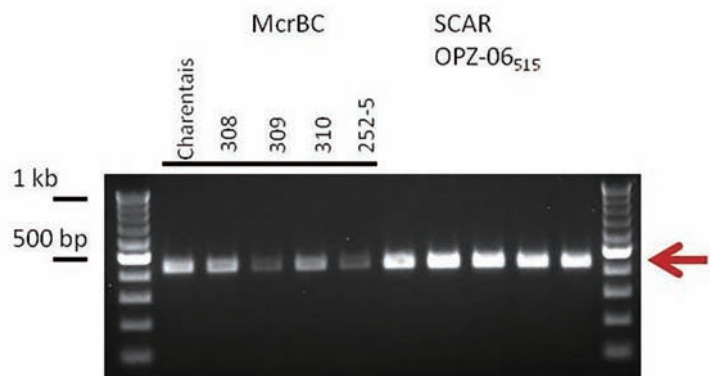


圖3-10、OPZ-06₅₁₅專一性片段之 *McrBC* 酵素-胞嘧啶甲基化修飾分析結果比較基因組DNA經過 *McrBC* 甲基化敏感酵素(左)及未經酵素處理(右)之品系間差異，可見252-5及309品系在此一基因體位點，因為序列甲基化程度高而導致擴增片段的訊號減弱。

七 水稻種子高效能供料及品種辨識系統之研究

許鑄云、鍾佩恩、張雅琪

本計畫建構水稻種子高效能供料及品種辨識系統進行水稻種子影像擷取與分類，利用影像處理技術針對‘臺南 16 號’、‘高雄秈 7 號’、‘臺中秈 17 號’及‘臺中秈糯 2 號’等 4 個水稻品種之種子影像進行形態特徵與色彩特徵之擷取，並以類神經網路分類器、形態貝氏分類器、色彩貝氏分類器和卷積類神經網路分類器進行水稻種子品種之區分，另針對雜

草型紅米則採用色彩進行辨識。根據系統功能測試，各水稻品種有效影像擷取率範圍為 90.7~92.6%，有效影像擷取率平均達 91.5%(表 3-5)；各水稻品種辨識成功率範圍為 92.2~99.1%，品種辨識成功率平均達 95.4%(表 3-6)；各水稻品種平均處理速度範圍為 109~134 粒 / 分鐘，平均為 120 粒 / 分鐘(表 3-7)。未來將應用不同機器學習原理建置分類器以提升品種辨識成功率，並建置雲端資料庫，針對不同年度之水稻種子建立分類器，之後再將各年度的分類器結合為大型分類器，以提升其品種辨識成功率。

表 3-5、水稻品種有效影像擷取率結果

項目	臺南 16 號	高雄秈 7 號	臺中秈 17 號	臺中秈糯 2 號
總數 (粒)	4,153	3,644	3,864	3,955
有效影像擷取率 (%)	91.7	91.1	90.7	92.6

註：有效影像擷取率 = (總數 - 無效影像) / 總數

表 3-6、水稻品種辨識成功率結果

項目	臺南 16 號	高雄秈 7 號	臺中秈 17 號	臺中秈糯 2 號
總數 (粒)	4,153	3,644	3,864	3,955
品種辨識成功率 (%)	92.2	95.7	99.1	94.6

註：辨識正確率 = 辨識正確數 / 總數

表 3-7、系統之平均處理速度結果

項目	臺南 16 號	高雄秈 7 號	臺中秈 17 號	臺中秈糯 2 號
總數 (粒)	4,153	3,644	3,864	3,955
時間 (秒)	1,853	1,932	2,125	1,953
速度 (粒 / 分鐘)	134	113	109	122

八 種子數位圖鑑平台之研究

許鑄云、張雅琪、鍾佩恩

本計畫針對茄科等 35 個科別共 118 種植物種子進行種子外觀特徵影像處理，採用多模態階層式分類器應用於植物種子辨識，包括：形狀 (BLOB)、局部二值模式 (LBP) 紋理特徵、色彩統計 (Color SOM)、灰度共生矩陣 (GLCM) 紋理特徵與方向梯度直方圖 (HOG) 紋理特徵，可分別代表其影像重要特徵。最後結合機器學習方法，設計一個雙層網路，結合自組

織映射神經網路分類器 (SOM) 與機率神經網路 (PNN)，著重於處理大分類問題，透過先行自組織映射神經網路，將大分類群聚化，分化成不同的聚類，再透過機率神經網路做推估模擬，輸出種子辨識類別，提供種子自動辨識和檢索。結果顯示在最終決策融合 PNN 時，以 85% 為其平均辨識結果，而以 TOP-5 做為辨識規則，則辨識率可高達 95%，所使用的運算時間與運用資源相對少，其平均一筆樣本處理時間為 55 毫秒，有效提升種子檢查效率。(圖 3-11)



圖 3-11、種子數位圖鑑平台

九 強化與 ISTA 及新南向國家種子檢查技術合作

陳易徵、何育如

本計畫本年度擬參加 ISTA 常會相關活動，惟因 COVID-19 疫情影響，ISTA 常會改以線上會議形式舉行，累計完成參與 2021 年 ISTA 線上年會、規則修訂及技術委員會工作報告共計 7 場。並協助我國

國家代表完成通訊投票，以執行我國國家會員相關權利。

本年度技術委員會活動參與包含，參加 ISTA 活力技術委員會十字花科種子胚根突出法 (Radicle Emergence) 比對試驗 1 次，並完成試驗結果提交；並以電子郵件方式聯繫 VIG 技術委員會相關事宜，包含 activity report 內容校閱、2022-2024 擔任技術委員意願調查等。(圖 3-12、圖 3-13)



圖 3-12、參與 ISTA 相關活動：因 COVID-19 疫情影響，2021 年 ISTA 常會以線上會議模式舉行。

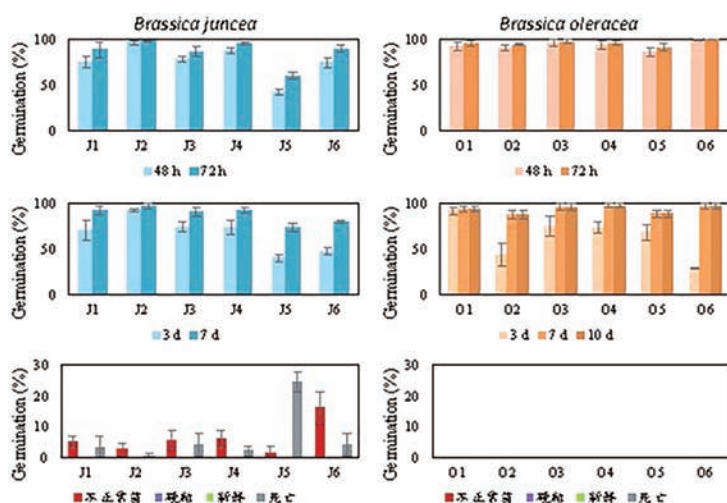


圖 3-13、參加 ISTA 活力技術委員會十字花科種子胚根突出法 (Radicle Emergence) 比對試驗，並完成試驗結果提交。

十 自動化幼苗評鑑系統建構與種子檢測平台整合

陳易徵、鄭若蘋、蔡維中、周柏頤

黃國益

本計畫利用類神經網路分類器，辨識幼苗影像種子、根系、莖軸、鞘葉等構造，並設計操作者程式介面。以訓練合格之檢測人員對於類神經網路分類器進行訓練，針對不同品種及品質之種子樣本進行測試，提升其比對正確性，進行自動化影像擷取機構製作及調整及設計機械化樣本製

備，減少樣本製備所需人力及時間。

目前已完成 12,760 筆影像樣本 (解析度 300dpi) 之數據資料。針對特徵萃取部分以色彩特徵建立倒傳遞類神經網路分類器進行水稻發芽苗的構造之分類，並利用骨架化、Dijkstra 演算法等方法進行特徵萃取，針對 12,760 個樣本進行特徵萃取測試，平均特徵萃取成功率為 92.27%。最後以支持向量機針對所有樣本進行測試，結果顯示，平均準確率為 96.89%。(圖 3-14)、(表 3-8)

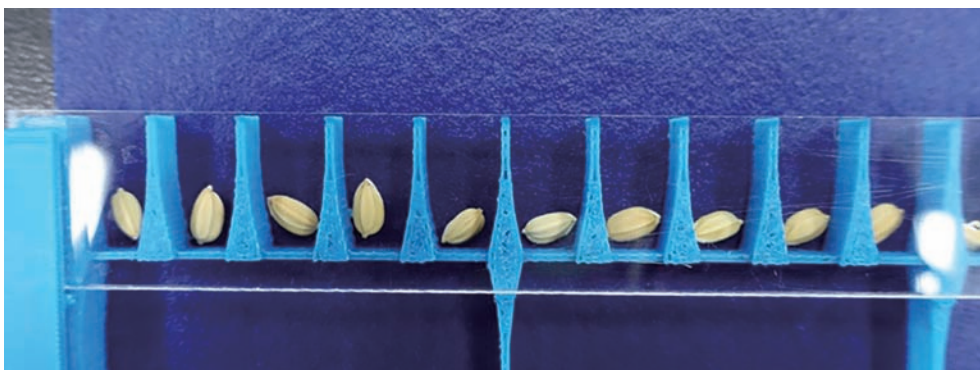


圖 3-14、設計適於擷取幼苗影像之發芽容器。

表 3-8、影像特徵萃取正確率達 92%

發芽盤尺寸	數量 (個)	特徵萃取正確數 (個)	萃取正確率 (%)
A4(1 x 25)	1,100	1,001	88.89
A4(2 x 25)	2,650	2,327	87.81
A5(1 x 20)	8,760	8,220	93.84
A5(2 x 20)	250	225	90.00
合計	12,760	11,773	92.26

+ 一 氣候變遷下番茄田區關鍵雜草調查與管理計畫

許鑄云、鍾佩恩、鄭捷珉、張雅琪

本計畫調查不同地區的番茄田區雜草相變化，及評估主要病害寄主雜草於氣候變遷下其種子和幼苗的影響。調查3處主要產區包括：雲林虎尾、嘉義水上和高雄美濃等3個地區，以光果龍葵(*Solanum americanum*)作為番茄主要病害中間寄主，並以光果龍葵種子和幼苗進行溫度逆境和水分逆境等模擬極端氣候條件下之試驗。光果龍葵種子可發芽的溫度範圍為16~30℃，最適合發芽的溫度範圍為

恆溫16℃，恆溫24℃以上均無發芽，另20/30℃變溫亦具發芽能力。光果龍葵幼苗高溫處理下，以36℃處理1天的幼苗性狀表現較佳，之後隨著溫度升高和處理時間拉長，幼苗性狀表現不良的情形越明顯。在水分逆境下，光果龍葵種子在水分潛勢0~-1.0MPa之間，其發芽率明顯隨著水分減少而下降，在-0.1MPa時尚有44%，在-0.2MPa大幅降低到3%，而在-0.4~-1.0MPa之間則不發芽。光果龍葵幼苗在缺水和淹水環境處理下，相較於淹水逆境，光果龍葵幼苗對於缺水更為敏感，其幼苗性狀表現明顯較差。(圖3-15)

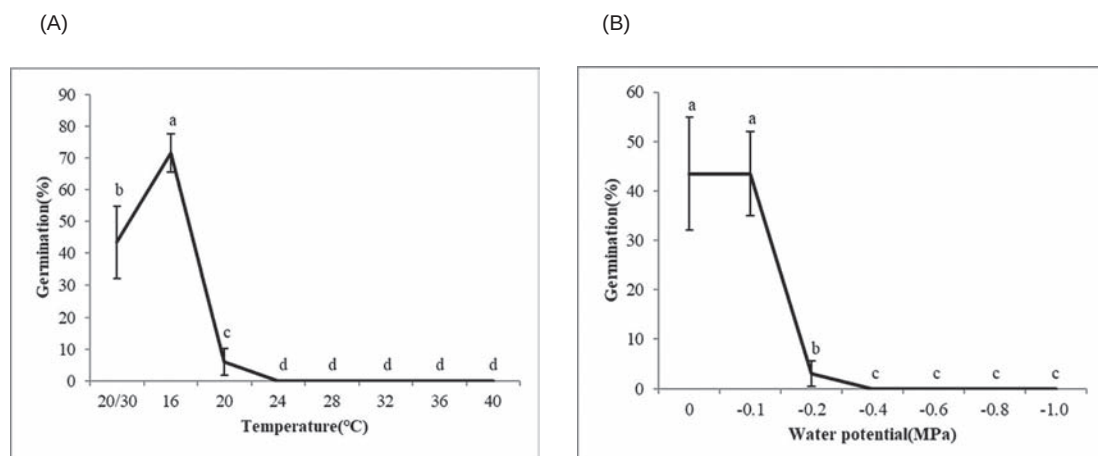


圖 3-15、光果龍葵種子在不同逆境下之表現。(A) 不同溫度 (B) 不同水分潛勢。各平均值上示以相同字母者為 5% 水準下經 LSD 測驗未達顯著差異。

十一 種傳病原檢測流程優化暨物理滅菌處理技術開發之研究

蘇士閔、江筱曄、楊昕蓉、白欣茹

邱燕欣

本年度「植物種傳病原檢測作業流程優化研究」之計畫目標為建立整合性假單孢桿菌屬檢測作業流程以提升效率並降低成本支出。針對 5 種 *Pseudomonas* 屬病原細菌，包含 *P. syringae* pv. tomato (Pst)、*P. viridiflava* (Pv)、*P. cichorii* (Pc)、*P. syringae* pv. maculicola (Psm)、*P. syringae* pv. lachrymans (Pal) 測試出 5 組專一性引子對，包含 MM5F / MM5R (偵測 Pst)、20F / 20R (偵測 Pv)、SfL1 / SfR2 (偵測 Pc)、cflF / cflR (偵測 Psm 與 Pst)、PalF / PalR (偵測 Pal)，並以廣效性引子

對 UpBacF/ UpBacR 為內控制組及完成最佳反應條件測試，病原萃取則以磷酸緩衝溶液之萃取效率優於 0.85% 氯化鈉溶液。已完成檢測作業流程文件擬訂。而「重要蔬菜種傳病原物理滅菌處理技術之開發」計畫目標在於測試高壓靜電場應用於瓜類種子的滅菌處理效果，期能協助國內種子業者降低因病原污染種子造成的經濟損失。(圖 3-16 ~ 圖 3-18)

本年度針對瓜類細菌性果斑病菌 (*Acidovorax citrulli*, Acit) 為主要防治對象，在人工帶菌 (Acit) 胡瓜種子上的試驗結果顯示，高壓靜電場處理強度在 100-200 kv/cm*min 範圍內，包含 5 kv/cm 處理 20 與 30 分鐘、10 kv/cm 處理 5 與 10 分鐘及 20 kv/cm 處理 5 分鐘等組合，即可在不影響種子發芽的狀況下除滅種子上的 Acit。

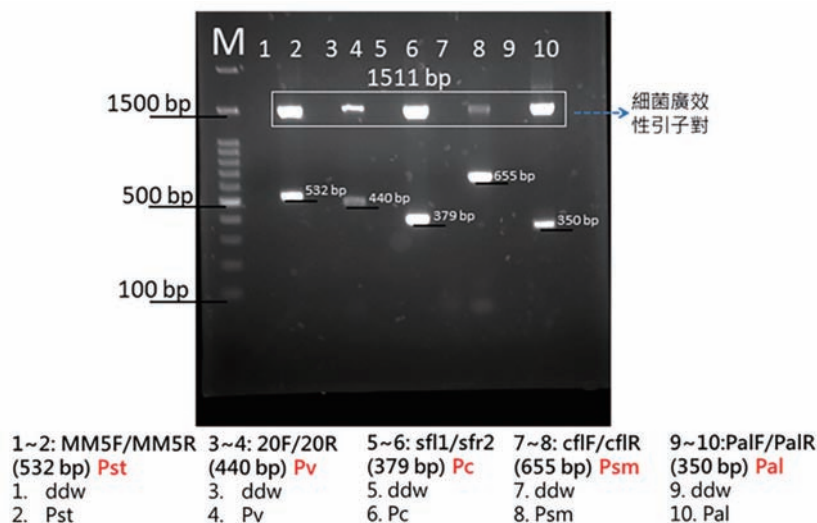


圖 3-16、專一性與廣效性引子對測試。1-2 為 MM5F/MM5R (532 bp) · 1:ddw · 2:Pst; 3-4 為 20F/20R (440 bp) · 3:ddw · 4:Pst; 5-6 為 SfL1/SfR2 (379 bp) · 5:ddw · 6:Pst; 7-8 為 cflF/cflR (650 bp) · 7:ddw · 8:cPsm; 9-10 為 PalF/PalR (350 bp) · 9:ddw · 10:cPal。1511 bp 為 UpBacF/UpBacR 之廣效性條帶。

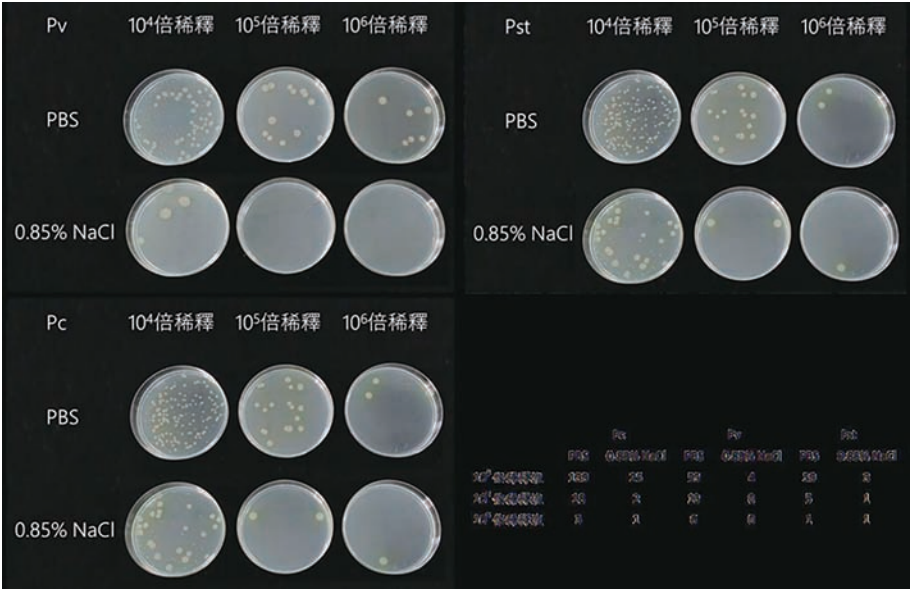


圖 3-17、比較 PBS 與 0.85% NaCl 兩種種子萃取緩衝液之萃取效果

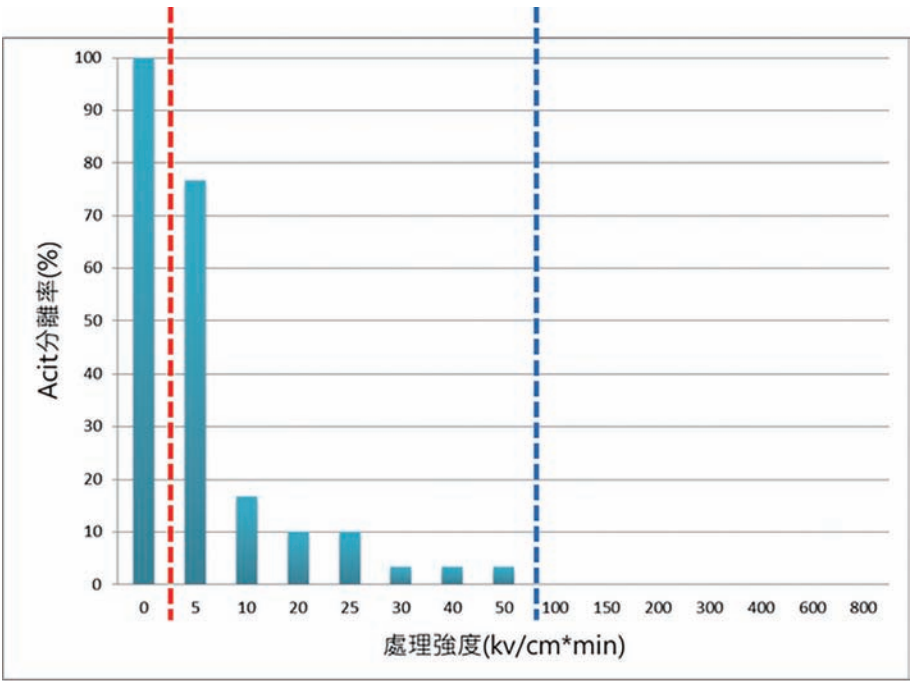


圖 3-18、圖 3-8、高壓靜電場 (HVEF) 不同處理強度下對人工帶菌胡瓜種子的滅菌效果。