

追求健康無特定病害種苗- 蔬菜種苗細菌性病害檢測技術之 TAF認證

簡怡文¹、何書豪²、高佩如²、王慧如²、邱燕欣¹、
袁雅芬¹、沈翰祖³、鍾文全⁴、李美娟⁵

壹、前言

植物種苗是農作物生產的根源，供應健康優良種苗予農民種植，為提高農業生產效率及品質，降低生產成本之主要關鍵之一。

種苗產業國際競爭力提昇的主要關鍵在於品種優勢之掌握程度與優質種苗穩定供應之能力，優良種苗之生產除慎選品種、注重栽培管理外，亦應配合必要之健康檢查，以提昇其品質。因此，有必要了解國際種子苗驗證相關規範，據以擬訂病蟲害檢驗科技之研發方向，使我國制定之驗證標準為各國接受，減少多次檢驗所造成的損耗。

細菌性黑腐病與果斑病分別為十字花科蔬菜與瓜類作物的重要病害，不但影響蔬菜及瓜類品質，造成農民重大損失，更被各國列入檢疫項目。由於此二種病害可藉種子傳播，以此為田間初次

感染源，隨著國際間種子貿易不斷擴大，為防杜病原菌經由種子入侵，危害國內農業生產，並提升我國蔬菜及瓜類作物種子品質，強化種苗產業的競爭力，因而針對十字花科黑腐病及瓜類果斑病進行相關驗證體系之建構相當重要。

台灣加入WTO後，農產品品質須受國際標準之規範並面對國際間之高度競爭壓力，因此農委會防檢局積極推動植物健康種苗制度，除辦理強制性種苗檢查制度，也參考國外經驗，規劃推動輔導性種苗檢查認證制度，希望藉由市場機制輔導業者採用健康種苗，以降低病蟲害感染率，提升種苗品質及產業競爭力。

目前全球健康種苗制度多參考國際種子檢查協會（International Seed Testing Association，簡稱ISTA）之國際種子檢查規則（International Rules for Seed Testing）進行檢查程序。ISTA已利用選擇性培養基的檢測方式，建立出十字花科黑腐病的檢測流程，但對於西瓜果斑病的檢測流程則尚未建立。

在台灣，「財團法人全國認證基金會Taiwan Accreditation Foundation」（簡

1 種苗改良繁殖場繁殖技術課 助理研究員

2 種苗改良繁殖場繁殖技術課 約用助理

3 種苗改良繁殖場生物技術課 副研究員

4 種苗改良繁殖場生物技術課 副研究員 兼課長

5 種苗改良繁殖場繁殖技術課 副研究員 兼課長

稱 TAF) 為一推動國內各領域實驗室符合國際認證，建立國內驗證機構、檢驗機構及實驗室之品質與技術能力的評鑑標準的單位，該基金會結合專業人力評鑑及運用能力試驗，以認證各驗證機構、檢驗機構及實驗室，提昇其品質與技術能力，強化認證公信力，拓展國際市場，提昇國家競爭力。TAF 認證基金會與國際之認證組織間維持相互認可的關係，參與的國際組織包括 IAF 正會員、PAC 正會員、ILAC 正式會員、APLAC 正式會員（資料來自 TAF 網站），通過 TAF 認證之實驗室出具的報告，已經被國際接受認可，通過實驗室認證不但可提高檢測實驗室的檢測能力，並確保對國內外建立實驗室檢測結果的正確性，與執行管理的公信力，可減少成本及時間之重複浪費。

貳、十字花科細菌性黑腐病

十字花科植物，科名 *Brassicaceae*，曾名為 *Cruciferae*，是植物中最繁盛的科

別之一，原產於北半球溫帶地區，現今已被引種到世界各地，人類食用的許多蔬菜出自本科，約有 388 個屬，大約 3,000 餘種。十字花科黑腐病為台灣地區十字花科蔬菜之重要細菌性病害，其為一種維管束病害，初期引起葉緣 V 字型黃化，嚴重時擴展至整個葉片，造成葉片萎凋、乾燥而掉落（圖 1）。十字花科黑腐病之病原菌可藉由種子種苗傳播，以及水、農具...等，經葉緣之水孔侵入，國際間種子檢疫條件亦多包含此項目。

十字花科黑腐病菌檢測方法主要以選擇性培養基、SDS 免疫擴散反應、ELISA、Biolog 快速鑑定系統為主，本實驗室利用間接 ELISA、專一性引子對 PCR 反應或選擇性培養基經測試可準確偵測出十字花科細菌性黑腐病之病原菌（圖 3、圖 4）。

參、西瓜細菌性果斑病

葫蘆科植物，科名 *Cucurbitaceae*，大多為一年生的爬藤植物，常有螺旋狀卷鬚，果實稱瓠果或瓜果，廣泛分布在



圖 1

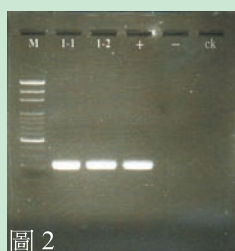


圖 2

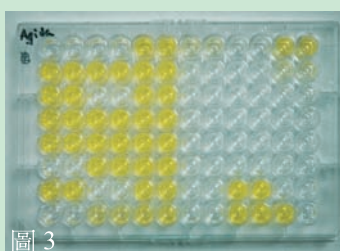


圖 3



圖 4

圖 1 十字花科黑腐病菌發病病徵。

圖 2 利用專一性引子對進行 PCR 檢測十字花科黑腐病。（M：Marker；Sample 1-1、1-2：帶有十字花科黑腐病病原菌之種苗；+：正對照；-：負對照）

圖 3 十字花科黑腐病 ELISA 檢測。

圖 4 十字花科黑腐病選擇性培養基檢測



圖 5 西瓜果斑病菌於幼苗發病病徵。

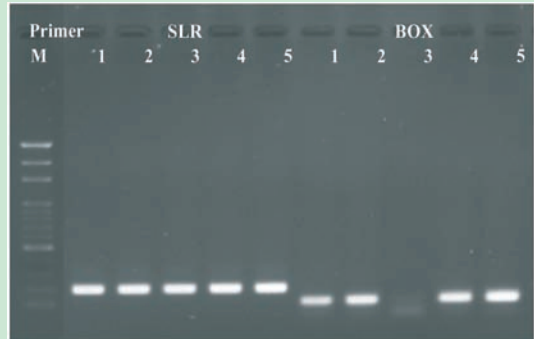


圖 6 細菌性果斑病 PCR 檢測。(M: Marker; Sample 1、2、3、4、5: 帶有西瓜果斑病原菌之種苗。Primer SLR: 帶有西瓜果斑病原菌之樣本會在 200bp 處呈現條帶; Primer BOX: 帶有西瓜果斑病原菌之樣本會在 95bp 處呈現條帶)

全球熱帶和亞熱帶地區，現今已被引種到世界各地栽培，是世界上重要的食用植物科之一，主要包含胡瓜、南瓜、絲瓜、西瓜等常見的蔬菜和瓜果。瓜類細菌性果斑病菌為革蘭氏陰性細菌，病原菌可以殘存於種子內部及表面，帶菌種子與種苗為此病害主要的初次感染源，病原菌於種子發芽時入侵子葉呈現水浸狀斑點（圖 5），病原菌常藉雨水或噴灌之水飛濺，而由少數之罹病幼苗散播至附近健康之幼苗。在高溫多濕環境下，罹病組織常可泌出菌泥，而為田間重要之感染源。果斑病菌由氣孔和傷口侵入，而成熟之瓜果表面會被臘質所覆蓋，所以幼果較成熟果實感病。西瓜細菌性果斑病為我國檢疫病原之一，輸入之瓜類種子應進行檢測以防止病菌之入侵及擴散，如何快速診斷或準確偵測種苗帶菌情形為重要課題。

西瓜細菌性果斑病菌檢測方式以病徵診斷、組織鏡檢、病原菌分離鑑定、專一性引子對 PCR 反應、血清診斷及選擇性培

養基為主，本實驗室以專一性引子對 PCR 反應或直接 ELISA 之檢測方法，經測試可準確偵測出不同植株分離出的瓜類細菌性果斑病之病原菌（圖 6）。

肆、十字花科黑腐病與西瓜果斑病之驗證

本場自田間採集菌株同時自相關研究機關及學校之研究室取得不同菌系之菌株，進行接種試驗，並測試各種檢測方法之檢測靈敏度，篩選出最適當之檢測方法：十字花科細菌性黑腐病以引子組（含 2 條引子序列）進行一步驟 PCR 反應，再進行電泳分析核酸擴增產物所呈現之條帶位置，以偵測十字花科黑腐病菌病原菌，做為標準檢測流程（圖 7）；西瓜細菌性果斑病則以直接酵素聯結抗體免疫吸附法（direct ELISA）進行西瓜果斑病菌之定性檢測，並以 ELISA 讀值分析儀分析基質受酵素催化反應所呈 405nm/492nm 之吸收值，以偵測西瓜果斑病菌病原菌，做為標準檢測流程（圖 8）。

標準檢測流程建立後，與其他單位實驗室進行能力試驗比對，並整理相關試驗資料與認證文件，完成申請TAF認證。

伍、結語

由於種苗產業為我國極具發展潛力及競爭力之產業，隨著國際間蔬菜種子與花卉種苗貿易量不斷擴大，為防杜病原經由種子(苗)入侵，危害國內農業生產，並因應農業相關產業國際化後所面臨的競爭，需加強建構符合目標市場外銷國之種子苗驗證制度，同時檢視我國種子苗健康檢查之技術缺口，參考相關國際標準，促進最新種子苗健康檢查技術之積極研發，降低種傳病害之風險。

為提升實驗室檢測能力與服務品質，強化健康種苗驗證制度的完整性，由本場進行病害檢測及其技術研發的工作包括：酵素連結抗體免疫吸附反應（ELISA），及分子生物技術之聚合酶連鎖反應（PCR）的標準作業建置，其中，蘭花、馬鈴薯、豇豆及瓜類病毒之檢測作業標準已陸續獲得財團法人全國認證基金會之認證，可出具國際認證之檢測結果報告。本場並於 100 年度通過十字花科、西瓜及彩色海芋種苗病害檢測作業標準之 ISO/IEC 17025 認證，未來產業上重要之蔬菜及花卉種苗病害檢測，可委由本場執行，不但可提高檢測實驗室之檢測能力並能確保檢測結果之正確性，與國際相關領域接軌更能建立國內外認可的植物種苗檢測實驗室，將有助於國內相關種苗業者國際競爭力之大幅提昇。

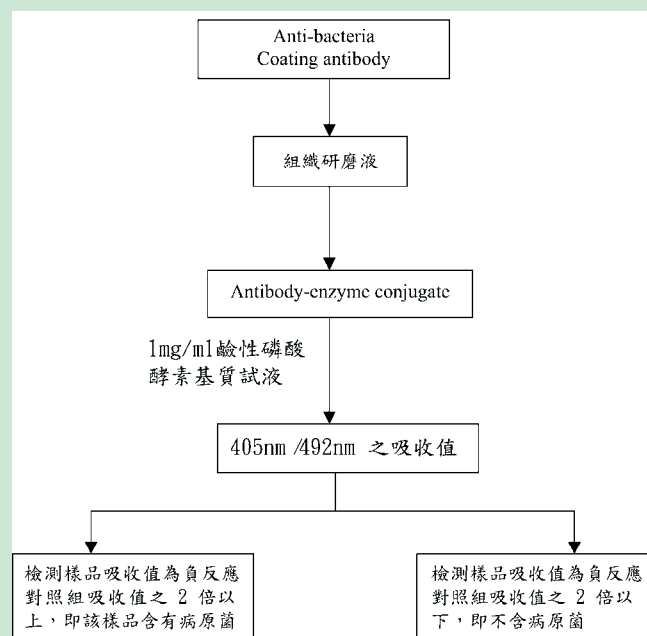
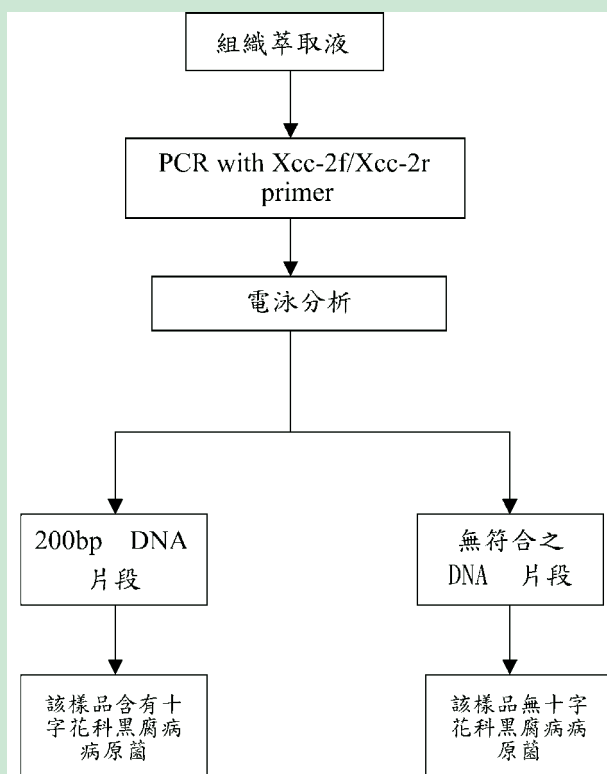


圖 7 十字花科黑腐病菌檢測流程示意圖。(上)

圖 8 西瓜果斑病菌檢測流程示意圖。(下)