

四、種子（苗）病害防治研究

一 各國家種薯繁殖及驗證制度

邱燕欣

馬鈴薯為全球僅次於稻米、小麥、玉米的重要糧食作物，其繁殖系統以無性繁殖的塊莖繁殖為主，繁殖倍率深受栽培環

境與病蟲害影響，因此各馬鈴薯生產國家針對馬鈴薯生產流程發展出特有的驗證制度。本計劃收集亞洲國家-日本、越南、印尼、荷蘭、加拿大以及美國六個國家的馬鈴薯生產驗證制度（圖 4-1~4-4），以提供臺灣馬鈴薯生產驗證制度之借鏡。

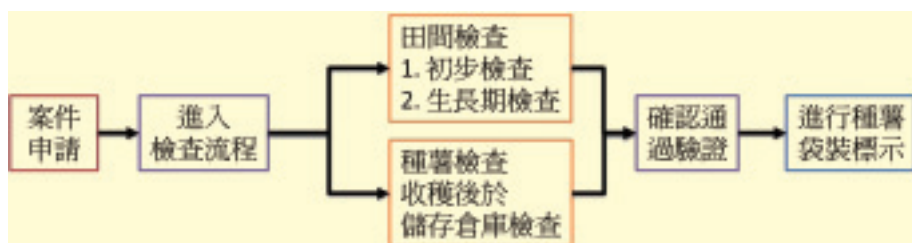


圖 4-1、印尼種薯驗證系統流程



圖 4-2、日本基本種田間檢查時程安排與標的

二 重大植物有害生物監測調查、預警及官方防治

簡怡文、邱燕欣、袁雅芬

本場 102 年度辦理農作物病蟲害診斷服務，共完成 28 件樣本診斷，其中包含 15 項病害與 7 項蟲害，以及 10 項其他原因（如氣候、生理因素、藥害、肥傷...等）造成之植株異常狀態（表 4-1）。

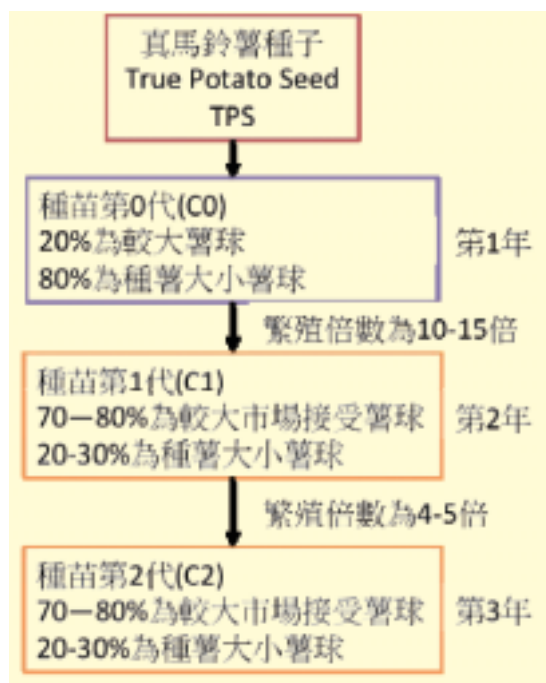


圖 4-3、於越南紅河三角洲區 Red River Delta, RRD 現行馬鈴薯 TPS 繁殖流程轉殖：台農 2 號木瓜、blank：水。

三 瓜類作物病害防治技術之開發

袁雅芬、簡怡文、李美娟

102 年度已取得 27 個南瓜品系共 324 個樣本進行白粉病原菌接種試驗；同時自不同地點收集白粉病原菌進行繁殖與保存；並建立南瓜對白粉病抗性之病害等級；本年度接種的品系皆為較感白粉病特性之品種。測試 11 種培養基組合均未能使編號 14-12 與 15-25 拮抗微生物的細胞濃度達 10^9 /ml，但是由試驗結果可知添加適當鈣鹽有助於細胞生長。

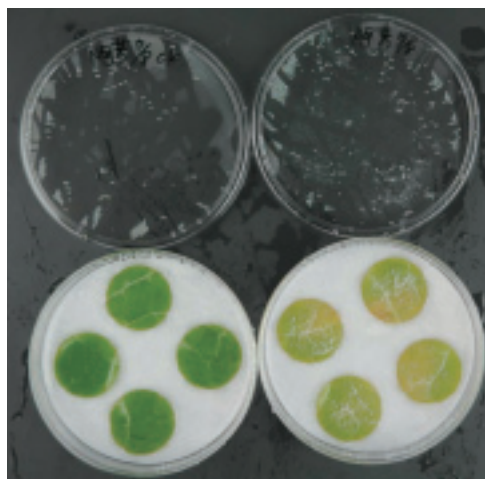


圖 4-5、南瓜葉片接種白粉病原菌後之發病情形

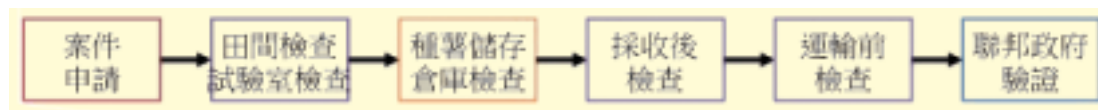


圖 4-4、美國馬鈴薯種薯生產驗證案件申請流程

表 4-1、102 年度農作物病蟲害診斷諮詢服務案件

收件日期	收件編號	作物別	診斷結果	狀態
102 年 12 月 23 日	(診) U11030115IZ001	文心蘭	查看診斷結果	結案
102 年 12 月 05 日	(診) U11030106IZ001	十字花科蔬菜	查看診斷結果	結案
102 年 12 月 04 日	(診) U11021223IZ001	番茄	查看診斷結果	結案
102 年 11 月 05 日	(診) U11021129IZ002	馬鈴薯	查看診斷結果	結案
102 年 11 月 04 日	(診) U11021129IZ001	酪梨	查看診斷結果	結案
102 年 10 月 31 日	(診) U11021129IZ003	番茄	查看診斷結果	結案
102 年 10 月 02 日	(診) U11021105IZ001	其他【龍柏】	查看診斷結果	結案
102 年 09 月 24 日	(診) U11021003IZ001	甘藍	查看診斷結果	結案
102 年 09 月 11 日	(診) U11020917IZ001	蝴蝶蘭	查看診斷結果	結案
102 年 08 月 26 日	(診) U11020917IZ002	馬鈴薯	查看診斷結果	結案
102 年 08 月 19 日	(診) U11020823IZ003	其他【桂花】	查看診斷結果	結案
102 年 08 月 19 日	(診) U11020823IZ002	柑桔（柑橘）	查看診斷結果	結案
102 年 08 月 14 日	(診) U11020823IZ001	其他【紅菜】	查看診斷結果	結案
102 年 08 月 05 日	(診) U11020823IZ005	國蘭	查看診斷結果	結案
102 年 08 月 02 日	(診) U11020802IZ001	甜椒	查看診斷結果	結案
102 年 06 月 17 日	(診) U11020823IZ007	其他【仙履蘭】	查看診斷結果	結案
102 年 06 月 11 日	(診) U11020618IZ002	甜椒	查看診斷結果	結案
102 年 06 月 01 日	(診) U11020613IZ001	其他【櫻花】	查看診斷結果	結案
102 年 05 月 30 日	(診) U11020613IZ002	其他【茶樹】	查看診斷結果	結案
102 年 05 月 22 日	(診) U11020823IZ008	其他【黃金果】	查看診斷結果	結案
102 年 05 月 15 日	(診) U11020613IZ004	其他【相思樹】	查看診斷結果	結案
102 年 05 月 10 日	(診) U11020618IZ001	蝴蝶蘭	查看診斷結果	結案
102 年 05 月 10 日	(診) U11020613IZ005	其他【油菊】	查看診斷結果	結案
102 年 05 月 01 日	(診) U11020613IZ003	其他【牛樟】	查看診斷結果	結案
102 年 04 月 29 日	(診) U11020502IZ001	其他【牛樟】	查看診斷結果	結案
102 年 04 月 22 日	(診) U11020425IZ001	其他【5 月桃】	查看診斷結果	結案
102 年 04 月 11 日	(診) U11020418IZ002	蝴蝶蘭	查看診斷結果	結案
102 年 03 月 19 日	(診) U11020418IZ001	長豇豆	查看診斷結果	結案

四 建立馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒快速檢測技術

邱燕欣、王慧如

馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L.) 又名洋芋、黃獨、陽芋、荷蘭薯、山藥蛋、爪哇薯、馬之薯、日本番薯、番仔番薯，為原產於南美洲秘魯之一年生茄科植物，由於球莖營養價值高，目前已為歐美地區部分國家主食。目前亞洲各國家地區的馬鈴薯需求量直逐漸上昇，種薯需求量增加，對於影響馬鈴薯產量的各種病害檢測技術更需要快速發展。馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒 Potato spindle tuber viroid (PSTVd) 為第一個在植物病害檢出的類病毒，由於造成馬鈴薯球變小成細長紡錘狀而得名，為一封閉的核糖核酸類病毒引起，Family: Pospiviroidae Common names: Potato spindle tuber viroid (PSTVd) 可藉由種薯無性繁殖 Vegetative propagation 所傳播，也可經由機械傳播 Mechanical transmission，目前研究顯示也可感染馬鈴薯種子與花粉，而茄科作物如番茄與辣椒也為其寄主，因此要特別防範種子傳播，媒介昆蟲部分已經證實蚜蟲可傳播馬鈴薯捲葉病毒 Potato leafroll virus (PLRV) 以及馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒 PSTVd。在嚴重發生的地區可以造成 68% 的損失，目前台灣為非疫區，為因應需求，本計劃發展馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒快速檢測技術，國內進口植物病原微生物 PSTVd 輸入之檢疫申請：與荷蘭方聯繫樣品提供向防檢局申請植物病原微生物輸入。依據樣品 PSTVd

基因特性及文獻進行專一性引子對比較之檢測試驗，待測樣品於 RNA 萃取，為進行抽取植物全 RNA 流程之穩定性：依據馬鈴薯基因特性及文獻進行馬鈴薯內部正對照引子設計與合成。本計劃根據澳洲的標準化之檢驗技術，成功于本場建立 PSTVd 的 RT-PCR 檢測技術，並且建立了 PSTVd 的正對照質體，靈敏約為 1ng/ml 的病毒量。

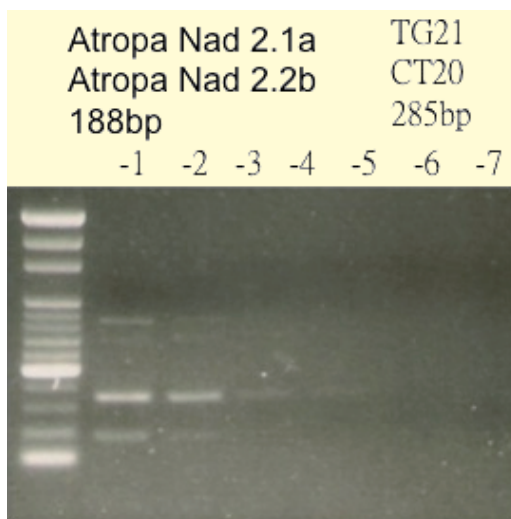


圖 4-6、將 PSTVd 樣品與健康樣品混合後序列稀釋作為 RT-PCR 之測樣品

五 馬鈴薯病毒 PVS、PVX、PVY 抗血清生產

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，本計畫於完成產馬鈴薯病毒 PVS、PVX、PVY 之抗血清之

生產各 80ml，力價稀釋可達 8000-16,000 倍。

六 十字花科種子健康檢查驗證體系之建立

蘇士閔、魏芊珊、黃玉梅

本計畫已依國際種子檢查協會規定公

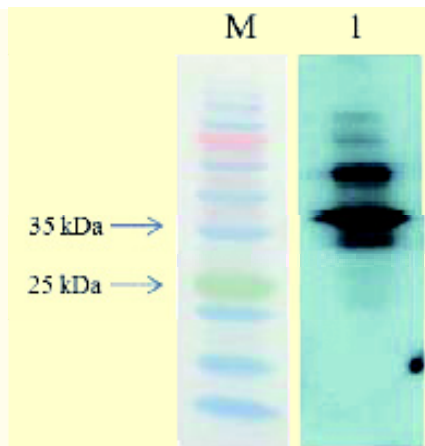
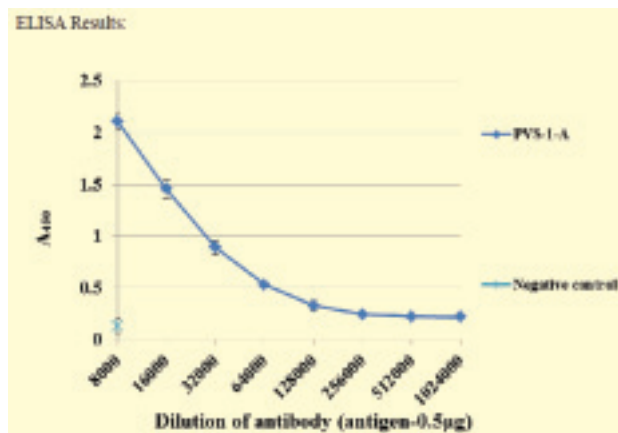


圖 4-7、免疫兔子回收之 PVS 粗血清 ELISA 與西方染漬法測試

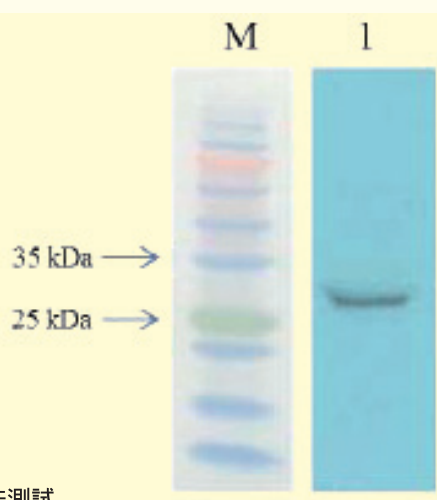
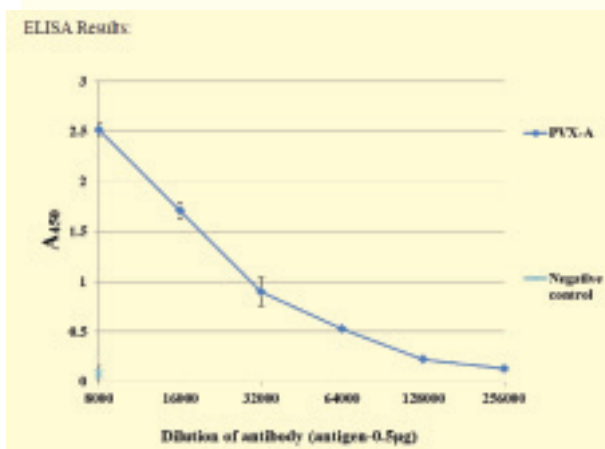


圖 4-8、免疫兔子回收之 PVX 粗血清 ELISA 與西方染漬法測試

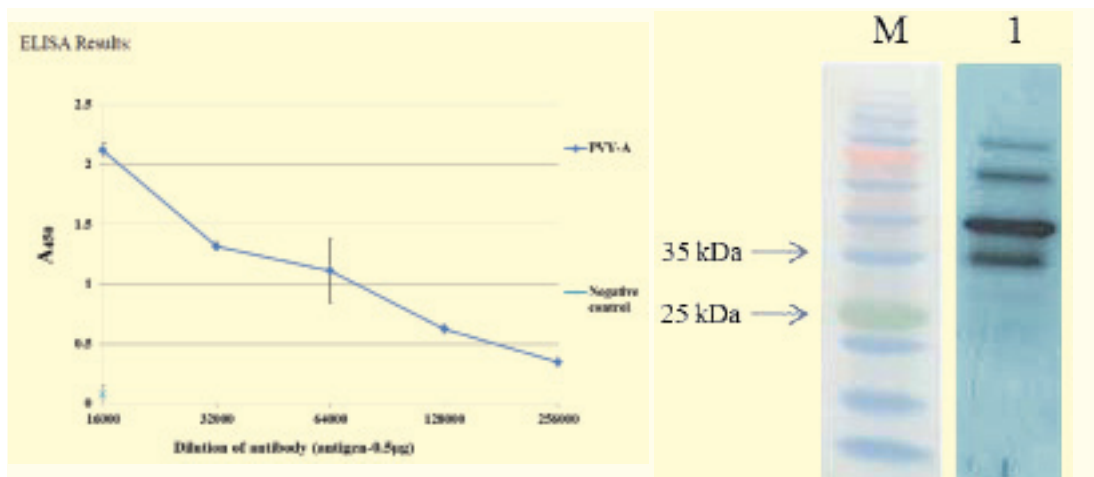


圖 4-9、免疫兔子回收之 PVY 粗血清 ELISA 與西方染漬法測試

告之檢測方法建立十字花科種子黑腐病菌檢測流程。(表 4-2) 以人工污染種子進行檢測流程的測試，可於 FS 及 mCS20ABN 兩種選擇性培養基上觀察到測試菌落的標準形態(圖 4-10、表 4-3)，且靈敏度測試結果可達 0.01% 的帶菌率，經接種甘藍幼苗可顯現黑腐病之典型 V 形病徵。(圖 4-11)

七 外銷重要蔬菜番茄及甜椒種子滅菌處理技術之研究

蘇士閔、林利娜、黃玉梅

本計畫利用氯化鉀電解水、熱水及殺菌劑等方法，研究最適處理條件進行種子滅菌處理，以減少茄科細菌性斑點病之種

表 4-2、符合 ISTA 規範之十字花科黑腐病菌檢測流程

1. 試驗組

- 1.1 將種子浸泡在經預冷的 0.85% NaCl 溶液(含 0.02% 的 Tween 20)中，每 10 ml NaCl 溶液放入 1000 顆種子，以 150 rpm 在室溫下震盪 2-2.5 小時。
- 1.2 吸取種子萃取液(原液) 0.5ml 加到 4.5ml 的 0.85% NaCl 溶液均勻混合，即 10^1 倍稀釋液。
- 1.3 再自 10^1 倍稀釋液吸取 0.5ml 加到 4.5ml 的 0.85% NaCl 溶液均勻混合，即 10^2 倍稀釋液。
- 1.4 分別自原液、 10^1 與 10^2 倍稀釋液吸取 100µl 滴至 FS 及 mCS20ABN 選擇性培養基上，並以滅菌 L 型玻棒進行塗佈，於 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 培養 4-5 天。

2. 正對照組

- 2.1 將 Xcc 標準菌株培養於 NA 上 3-4 天，以 0.85% NaCl 溶液洗下菌落製成懸浮液後進行序列稀釋，稀釋至約 10^2 - 10^4 cfu / ml。
- 2.2 吸取稀釋液各 100 µl 分別滴至 FS 及 mCS20ABN 選擇性培養基上，並以滅菌 L 型玻棒進行塗佈後，與供試樣品共同於 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 培養 4-5 天。

表 4-2、符合 ISTA 規範之十字花科黑腐病菌檢測流程

3. 空白對照組

3.1 將未浸泡過種子的 0.85% NaCl 溶液進行序列稀釋。

3.2 分別自原液、 10^1 與 10^2 倍稀釋液各吸取 100 μ l，滴至 FS 及 mCS20ABN 選擇性培養基上，並以滅菌 L 型玻棒進行塗佈。後，與供試樣品共同於 $28\pm 2^\circ\text{C}$ 培養 4-5 天。

4. 培養情形觀察

4.1 檢視供試樣品的菌落情形並與正對照組比較可疑菌落的形態。

4.2 Xcc 在 FS 選擇性培養基上呈淡綠色黏稠狀小型菌落，周圍有澱粉水解透化圈，記錄前可放置於 4°C 數小時使透化圈更明顯並可將培養皿放置在黑絨布上幫助判別透化圈。

4.3 Xcc 在 mCS20ABN 選擇性培養基上呈淡黃色黏稠狀菌落，周圍有澱粉水解透化圈，記錄前可放置於 4°C 數小時使透化圈更明顯。

4.4 記錄 Xcc 可疑菌落及其他菌落的數量。

4.5 將可疑菌落移殖至 YDC 培養基上再培養，每一可疑菌落使用一個培養皿避免交互污染，並將正對照組中的 Xcc 菌落再培養於 YDC 培養基上作為對照。於 $28\pm 2^\circ\text{C}$ 培養 248 小時，觀察其生長情形。

4.6 Xcc 在 YDC 培養基上呈淡黃色黏稠菌落並具流動性。

4.7 記錄每一個再培養菌落的測試結果。

5. 病原性測試

5.1 以移植針刮取少量於 YDC 培養基上培養 24~48 小時的菌落，在培育至 4 片真葉的甘藍植株上，選擇最年輕的兩片真葉，於接近葉緣之主葉脈選擇 6 點進行穿刺接種，每一菌株使用 3 棵甘藍植株。

5.2 將於 YDC 培養基上培養 24~48 小時的 Xcc 標準菌株之菌落進行穿刺接種作為正對照組，以無菌水進行穿刺接種做為負對照組。同樣在培育至 4 片真葉的甘藍植株上，選擇最年輕的兩片真葉，於接近葉緣之主葉脈選擇 6 點進行穿刺接種。正、負對照組各使用 1 棵甘藍植株。

5.3 培養於 $20-25^\circ\text{C}$ 植物生長箱/溫室中，於接種後 104 天檢查植株是否出現 V 形黃化、壞疽、葉脈黑褐化等病徵。與接種 Xcc 標準菌株之植株上的病徵進行比較並記錄之。

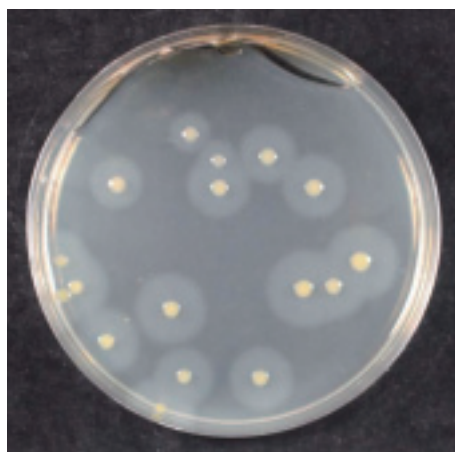
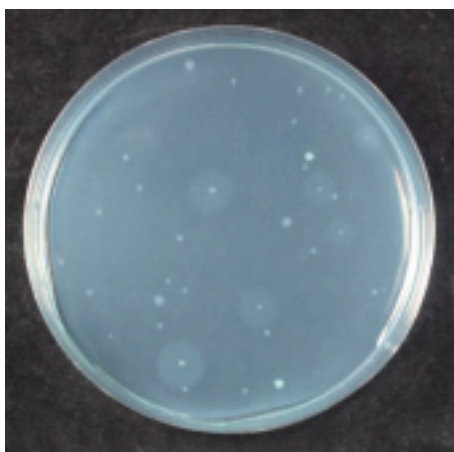


圖 4-10、Xcc 在 FS 選擇性培養基上會呈現淡綠色黏稠狀的小型菌落，周圍會出現澱粉水解透化圈（左圖），在 mCS20ABN 選擇性培養基上會呈現淡黃色黏稠狀的菌落，周圍也會產生澱粉水解透化圈（右圖）。

表 4-3、利用 FS 及 mCS20ABN 選擇性培養基檢測十字花科種子攜帶不同比例之人工污染 Xcc 種子之靈敏度測試

Treatment ¹⁾	Xcc	
	FS	mCS20ABN
0 (Check)	— ²⁾	—
0.5	+	+
0.2	+	+
0.1	+	+
0.05	+	+
0.03	+	+
0.02	+	+
0.01	+	+



圖 4-11、於甘藍葉片上穿刺接種經檢測流程分離出之 Xcc 菌株，顯示出典型的 V 形黃化壞疽病徵。

1) Samples with different Ratio of artificial infested seed (%)

2) "—" means no Xcc was detected and "+" means Xcc was detected.

傳情形與其初次接種源。以 HClO 濃度 50 ppm 以上的氯化鉀電解水處理 5 分鐘以上即可有效除滅甜椒種子與番茄種子上的病原菌（表 4-4~4-5）；45°C 熱水處理 30 分鐘以上可明顯降低甜椒種子上的帶菌情形，甚至在番茄種子上，45°C 熱水處理 10 分鐘即有明顯成效。（表 4-6~4-7）殺菌劑試驗

中以 0.6% 漂白水滅菌效果最好，而嘉賜銅處理，除有效降低帶菌情形、甚至完全除滅病原菌外，同時也不會降低種子的發芽率。

表 4-4、不同 HClO 濃度之氯化鉀電解水處理人工污染甜椒種子之滅菌效果

HClO 濃度 (ppm)	處理時間 (min)	帶菌率 (%)	發芽率 (%)	雜菌率 (%)
0 (CK)	1	53.5	60.7	42.7
	5	46.1	58.9	31.2
	10	44.7	57.8	32.3
	30	28.9	78.9	52.5
500	1	0	89.0	12.0
	5	0	92.7	2.0
	10	0	95.1	1.9
	30	0	96.9	6.1

表 4-4、不同 HCIO 濃度之氯化鉀電解水處理人工污染甜椒種子之滅菌效果（續）

HCIO 濃度 (ppm)	處理時間 (min)	帶菌率 (%)	發芽率 (%)	雜菌率 (%)
200	1	0	95.7	6.0
	5	0	88.6	8.0
	10	0	97.4	4.8
	30	0	91.5	0
100	1	0	98.9	7.0
	5	1.0	94.9	6.0
	10	0	90.3	6.0
	30	0	100.0	11.3
50	1	2.8	88.7	28.4
	5	0	87.1	4.6
	10	0	95.3	32.6
	30	0	91.1	12.6
10	1	29.2	78.0	42.0
	5	7.5	92.3	44.7
	10	0	52.9	79.6
	30	4.7	80.9	70.1

表 4-5、不同 HCIO 濃度之氯化鉀電解水處理人工污染番茄種子之滅菌效果

HCIO 濃度 (ppm)	處理時間 (min)	帶菌率 (%)	發芽率 (%)
0 (CK)	1	9.7	90.2
	5	13.5	90.4
	10	12.3	81.5
	30	6.2	84.3
500	1	0	93.9
	5	0	93.0
	10	0	92.0
	30	0	91.0
200	1	0	86.8
	5	0	92.0
	10	1.0	86.8
	30	0	93.7

HCIO 濃度 (ppm)	處理時間 (min)	帶菌率 (%)	發芽率 (%)
100	1	2.0	91.9
	5	0	88.8
	10	0	91.3
	30	0	90.0
50	1	0	95.9
	5	0	94.6
	10	0	98.1
	30	0	95.6
10	1	2.0	96.9
	5	0	93.3
	10	1.8	94.4
	30	0	95.1

表 4-6、不同溫度之熱水處理人工汙染 (Xv) 甜椒種子之滅菌效果

熱水溫度 (°C)	處理時間 (min)	帶菌率 (%)	發芽率 (%)	雜菌率 (%)
45	10	24.0	93.2	14.4
	30	4.0	94.9	12.1
	60	0.9	95.1	4.8
50	10	0	96.1	6.8
	30	0	91.9	4.0
	60	0	96.7	13.0
55	10	0	94.7	18.7
	30	0	94.2	16.1
	60	0	87.0	10.0
60	10	0	88.8	11.1
	30	0	7.1	16.3
	60	0	0	12.5

表 4-7、不同溫度之熱水處理人工汙染 (Xp) 番茄種子之滅菌效果

熱水溫度 (°C)	處理時間 (min)	帶菌率 (%)	發芽率 (%)	雜菌率 (%)
45	10	1	68	13
	30	0	57	25
	60	0	59	20
50	10	0	49	15
	30	0	26	18
	60	0	47	7
55	10	0	37	16
	30	0	0	18
	60	0	0	21
60	10	0	0	10
	30	0	0	7
	60	0	0	11

表 4-8、不同溫度之熱水處理人工汙染（Xv）番茄種子之滅菌效果

熱水溫度（℃）	處理時間（min）	帶菌率（%）	發芽率（%）	雜菌率（%）
45	10	0	43	26
	30	0	50	22
	60	0	31	36
50	10	0	74	24
	30	0	78	27
	60	0	68	16
55	10	0	47	19
	30	0	0	26
	60	0	2	23
60	10	0	50	29
	30	0	0	27
	60	0	0	23

表 4-9、不同殺菌劑處理對人工汙染甜椒種子之滅菌效果

	帶菌率（%）						發芽率（%）					
	處理時間（hr）											
藥劑／濃度（ppm）	1/6	0.5	1	6	14.5	24	1/6	0.5	1	6	14.5	24
嘉賜銅／2000	27	17	3	0	0	0	82	94	98	79	81	94
多保鏈黴素／2000	99	98	99	100	88	100	53	52	39	23	24	63
鏈四環黴素／2000	88	60	76	27	10	7	58	77	61	90	89	96
氫氧化銅／1000	68	49	53	0	0	0	61	73	77	72	81	91
歐索林酸／2000	57	42	15	22	3	27	99	99	100	84	55	96
福多寧／500	96	99	95	98	92	95	6	6	3	0	7	4
四氯異苯腈／280	98	99	100	100	100	91	2	18	4	1	7	21
免賴得／600	95	87	95	65	76	12	17	28	11	41	50	86
亞托敏／1000	88	96	96	95	84	94	10	12	4	1	16	11
依得利／1000	94	87	92	92	92	89	28	23	7	1	9	5
0.6%漂白水	0	0	0	0	0	0	99	99	79	8	5	0
無菌水（CK）	92	95	92	98	95	91	10	7	3	0	1	6

八 輸出植物種傳病害檢測標準方法與平台建立之研究

沈翰祖、林宗俊、林筑蘋、邱燕欣

許秀惠、黃晉興、黃莉欣、蔡佳欣

鄧汀欽、鄭櫻慧、鍾文全、關政平

蘇士閔、蘇秋竹

本計畫針對十字花科黑腳病菌、瓜類蔓枯病菌、茄科細菌性斑點病菌、番茄細菌性葉斑病菌、菸草嵌紋病毒、豌豆種媒嵌紋病毒與南瓜嵌紋病毒等 7 種重要種傳病原建立檢測作業流程。十字花科黑腳病菌之檢測係以濾紙法進行種子上的病原真菌培養，觀察形態特徵進行鑑定；瓜類蔓枯病菌之檢測則以冷凍濾紙法進行種子上

的病原真菌培養，同樣以形態特徵進行鑑定；菸草嵌紋病毒、豌豆種媒嵌紋病毒與南瓜嵌紋病毒則同樣以直接酵素聯結抗體免疫吸附法（direct ELISA）進行檢測；茄科細菌性斑點病菌則是萃取種子內部及外部附著之細菌，將種子萃取液以稀釋平板法培養在 mTMB 與 CKTM 兩種半選擇性培養基上，分離出具活性的 *Xanthomonas* 屬細菌，再藉由病原性測試確認可疑菌株；番茄細菌性葉斑病菌的檢測是以專一性引子對進行 PCR 反應，來偵測 PST 之 *hrpZ_{PST}* 之專一性區間，其經電泳分析核酸擴增產物所呈現之條帶位置為 532bp。最後由不同實驗室間的能力測試比對確認檢測作業流程之可行性。