

四、種子（苗）病害防治研究

一 抗病毒血清製備技術之開發與利用

邱燕欣、王慧如

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，本計畫於完成葡萄病毒 A (Grapevine Virus A) 之抗血清之生產

80ml，力價稀釋可達 8,000-16,000 倍（表 4-1）。

103 年度建立了馬鈴薯青枯病及軟腐病之種薯收成後免疫螢光檢測之檢測流程一式。菌體增量：收集之菌株除了瘡痂病無法以 523 培養基增量外，其他菌株皆可以增量至 3-4mg，供兔子免疫反應使用。兔子免疫血清確認，以 ELISA 方式確認抗原抗血清反應，免疫抗血清稀釋 8,000-16,000 可以達到檢測值之標準。

二 草莓病害非農藥防治技術開發

袁雅芬

為開發草莓炭疽病防治用微生物製劑，本場自臺灣中南部及東部地區田土中分離出 26 株耐熱微生物，經對峙培養篩選出 5

表 4-1、以 ELISA 方式確認抗原抗血清反應，免疫抗血清稀釋 8,000-16,000 可以達到檢測值之標準

Rabbit number	immunogen (0.2 ug)	Dilution fold of sera							blank serum
		1000X	2000X	4000X	8000X	16000X	32000X	64000X	16000X
1E+08	R.solanacearum	1.098	1.091	1.046	1.027	0.995	0.963	0.875	0.05
1E+08	R.solanacearum	1.062	1.055	1.031	1.025	1.002	0.94	0.843	0.048
1E+08	P.caratovora	1.08	1.029	0.96	0.862	0.601	0.437	0.228	0.076
1E+08	P.caratovora	1.007	0.968	0.87	0.79	0.579	0.423	0.207	0.08
1E+08	E.chrysanthemi	1.102	1.091	1.03	0.999	0.918	0.789	0.597	0.046
1E+08	E.chrysanthemi	1.141	1.084	1.06	1.02	0.947	0.858	0.753	0.044

8,000-16,000 可以達到檢測值之標準

株拮抗微生物，如表 4-2 所示可於 PDA 上抑制草莓炭疽病菌落生長達 44.62% 以上；5 株拮抗微生物培養 24 小時的菌液即可抑制病原菌孢子發芽或發芽管生長。

在生物防治試驗，刺傷接種炭疽病菌前草莓葉片處理拮抗微生物培養液，1 週後以編號 B2014-12 與 21 拮抗微生物可使病斑較對照組略小（表 4-3）；刺傷接種後處理拮抗微生物編號 B214-12 亦可減少 16% 病斑面積（表 4-4）。噴灑炭疽病菌孢子懸浮液接種前連續 3 天處理拮抗微生物菌液，結果由圖 4-1 可知 B2014-12 處理較對照組罹病度減少 2.3-4%，市售生物農藥則以 Bs 最具防治效果，可減少植株罹病度 4.3-12.5%。



圖 4-1、以不同生物農藥噴灑草莓苗，處理 4 次後再接種，1 週後植株平均罹病度

表 4-2、拮抗微生物於對峙培養 1 週後，對炭疽病菌落生長抑制效果

菌株編號	生長抑制率	菌株編號	生長抑制率
B2014-06	50.54%	B2014-21	46.77%
B2014-07	44.62%	B2014-22	45.16%
B2014-12	53.23%	CK	0.00%

表 4-3、草莓接種前處理以不同藥劑，1 週後平均病斑大小

處理	ck	B2014-06	B2014-07	B2014-12
病斑直徑 (cm)	0.48	0.56	0.41	0.4
處理	B2014-21	B2014-22	純白練黴菌素	枯草桿菌
病斑直徑 (cm)	0.4	0.51	0.4	0.3
處理	百克敏 3000X	腐絕快得寧 1200X		
病斑直徑 (cm)	0.4	0.3		

表 4-4、草莓接種 1 週後平均病斑面積大小

處理	平均病斑面積 (mm ²)
CK	92.5
B2014-12	77.7
B2014-21	90.5
Bs	69.5
Ba	91.8
Bm	85.5
腐絕快得寧 1200X	76.4

三 田間檢測性馬鈴薯病毒 Y 檢測試紙之開發

邱燕欣、王慧如

開發可於田間操作、快速檢測馬鈴薯病毒 Y, PVY 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，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。103 年度完成馬鈴薯病毒 Y 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）。目前 PVY 的檢驗方式以酵素連結免疫吸附分析（ELISA）及反轉錄-聚合酶連鎖反應（RT-PCR）檢測為主，但是檢驗方式皆有其限制。ELISA 與 RT-PCR

的檢驗步驟繁複，耗費的檢驗時間相較於快速檢測試紙也較長。加上操作過程使用的試劑需要定量，所以需要專屬的實驗室及受訓的檢驗人員來操作才行；加上檢驗時間長，等待報告的時間往往超過一天以上。而快速檢驗試紙的優勢在於：其檢驗時間快僅需 5~15 分鐘，專一性高操作簡單（表 4-5）。

四 馬鈴薯病毒 Y 之快速檢測技術

邱燕欣、王慧如

在反轉錄聚合酶連鎖反應（reverse transcription- Polymerase chain reaction, RT-PCR）檢測反應中，利用試驗室可取得之不同材質吸附膜，進行馬鈴薯病毒 Y 之汁液印漬捕捉反轉錄聚合酶連鎖反應（Print Capture RT-PCR, PC-RT-PCR）檢測技術縮短抽取核酸的人力物力，本年度，依照 2014 年 Zulaykha 等人開發的純化流程，將感染 PVY 病毒之菸草葉片經由不同離心力的分

表 4-5、RT-PCR、ELISA 與快速檢驗試紙比較

	RT-PCR	ELISA	快速檢驗試紙
操作時間	6 小時	3 小時	15 分鐘
操作難易度	需抽取 RNA 並做 PCR 反應，步驟繁複，需專業人士操作	有微量操作步驟，人員需訓練	單一步驟，人員不需訓練
檢體處理	需抽取 RNA	磨碎	磨碎
操作儀器	PCR 反應儀	定量吸管	不需
判讀儀器	電泳	ELISA 判讀儀	肉眼判讀
試劑保存	-20	4	室溫
場所	實驗室	實驗室	就地、現場
專一性	最佳	佳	佳
靈敏度	最佳	佳	佳
費用	300 元/反應	30 元/反應	150 元/反應

離與蛋白質硫酸銨沉澱法抽取純化 PVY 病毒顆粒，再取材於實驗室中各種常見的紙或是生化膜，例如：轉漬膜、過濾膜等，將葉片汁液直接滴在膜或紙上進行吸附、烘乾、回溶、加熱，再進行 RT-PCR，最後以瓊脂糖膠體電泳法（agarose gel electrophoresis）做檢測結果確認，8 種試驗室可取得的紙或生化膜檢測結果以 CALBIOCHEM 公司產品 Miracloth 為最佳。

五 豇豆種傳病害滅菌處理技術之研究

蘇士閔、江筱曄、劉俊延

豇豆種子所攜帶之豇豆萎凋病菌（*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*（FOT））能藉由污染種子表面或侵入種皮內部而進行傳播。本研究 103 年度試驗結果顯示（表 4-6），分別在屏東白仁白

皮、紅花仁淡青皮、紫仁花莢豇豆與黑仁青莢目豆上檢測到 FOT 的存在，種帶 FOT 比率為 3~25%。其他真菌與細菌的種帶比率也相當高，經表面消毒後雖可有效減少部分真菌與細菌的帶菌率，但仍有存在於種皮內部的可能性。利用殺真菌劑進行種子滅菌處理結果顯示，因種子自然攜帶 FOT 的比率偏低且不穩定，無法有效確定藥劑的滅菌效果。

六 ISTA 豆類種子健康檢查驗證體系之建立

蘇士閔、劉俊延、江筱曄

本計畫依 ISTA 之檢測方式建立豌豆葉斑病菌與菜豆炭疽病菌檢測流程。豌豆葉斑病菌檢測作業流程以培養基法進行種子上的病原真菌培養，觀察病原真菌的形態特徵進行鑑定。判別上觀察種子周圍的柄

表 4-6、不同殺真菌劑處理對屏東白仁白皮豇豆種子之滅菌效果

處理	帶菌率（%）							
	FOT				真菌			
	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
派美尼/1500	0	0	0	0	38	30	12	18
亞托敏/2000	0	0	0	0	70	50	6	18
三泰隆/3000	4	4	0	0	42	38	12	40
待克利/3000	2	2	0	0	82	46	18	22
松香酯酮/1000	0	0	0	4	100	96	90	94
鋅錳乃浦/400	0	4	2	4	92	80	50	58
撲滅寧/1200	6	4	2	6	92	96	52	56
嘉保信/1500	0	4	10	4	98	88	96	88
無菌水（CK）	6	0	0	0	74	96	74	88



圖 4-2、人工帶菌豌豆種子之麥芽抽出物培養基(MEA)上培養情形。種子周圍有柄子器產生，種子表面菌絲較稀疏。

子器產生，培養基背面的深褐色沉澱等特徵(圖 4-2)。種子表面菌絲生長較稀疏，大部分雜菌之菌絲生長密集。檢測過程中 2,4-D 鈉鹽溶液的使用可抑制種子發芽，減少發芽後的幼苗對觀察的干擾。菜豆炭疽病檢測作業流程檢測方法以紙巾法進行種子上的病原真菌培養，鏡檢種子表面上黑褐色病斑上褐色剛毛(setae)的分生孢子盤。

病菌與菜豆炭疽病菌之檢測作業流程；植物類病毒檢測上，則依澳洲提供之檢測方法，利用反轉錄聚合酶鏈鎖反應建立包含馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒與番茄黃色矮化類病毒等六種番茄與茄科種子類病毒之檢測作業流程(圖 4-3)。

七 出口種子檢疫病原標準檢測技術之開發

蘇士閔、邱燕欣、王慧如、劉俊延

鍾文全

本計畫 103 年度在種傳植物病毒檢測上，利用直接酵素聯結抗體免疫吸附法完成香瓜茄嵌紋病毒、豌豆早褐病毒、菸草微綠斑駁病毒與香瓜壞疽斑點病毒之檢測作業流程；在種傳植物病原真菌檢測上，分別利用培養基與濕濾紙法完成豌豆葉斑

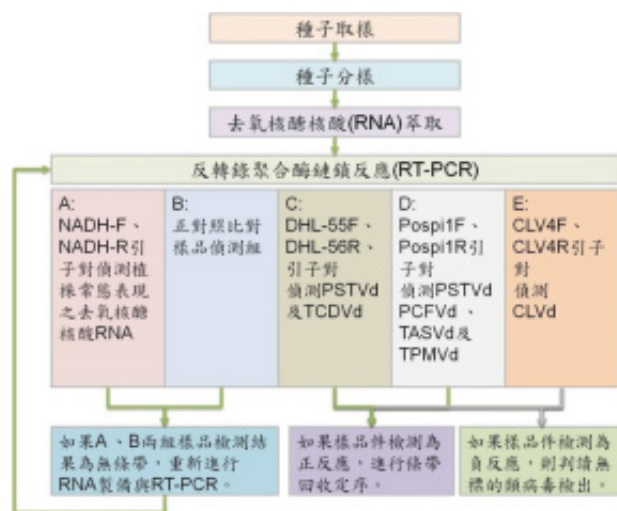


圖 4-3、利用反轉錄聚合酶鏈鎖反應建立包含馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒與番茄黃色矮化類病毒等六種番茄與茄科種子類病毒之檢測作業流程。