

## 四、種子（苗）病害防治研究

### 一 重要外銷種子種傳病原檢測技術與品保制度交流

蘇士閔

行政院農業委員會種苗改良繁殖場（以下簡稱種苗場）以引領國內種苗產業發展為願景目標，其中種子種苗病原檢測工作為重要任務之一。為協助國內種子業者種子出口與執行防檢局委辦之輸出種子植物病原檢測業務，於 106 年 07 月 02 日至 07 月 15 日期間，派筆者赴荷蘭園藝植物檢測中心－Naktuinbouw 進行研習。Naktuinbouw 每年的植物病原檢測案件

可達 27~35 萬件，是歐洲、甚至全世界的重要檢測實驗室。本次重點研習項目為 Naktuinbouw 的種子健康檢查技術，主要針對我國種子出口需檢測或未來可能面對的病原項目，包含瓜類細菌性果斑病菌（*Acidovorax citrulli*）、番茄細菌性潰瘍病菌（*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*）、類病毒（Viroid）及尖鏟胞菌（*Fusarium oxysporum*）的不同分化型（*Formae specialis*）等；同時在研習過程中了解 Naktuinbouw 的實驗室管理方法，期能讓我國在國際重要檢疫及種傳病原檢測技術上逐步接軌國際。

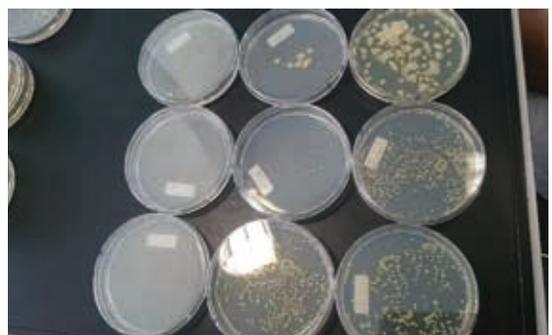


圖 4-1、本場派員赴荷蘭園藝檢測中心進行種子品質檢查與種傳病原檢測等技術交流

## 二 植物種子種苗認驗證體系之建立

蘇士閔、陳蕙瑤、邱燕欣

### (一) 國際重要種傳病害檢測體系之建立

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，本計畫擬參考已發表之以 PCR 為基礎的檢測方法，建立一可針對瓜類細菌性果斑病菌 (*Acidovorax citrulli*) 之檢測作業流程以提供檢測服務。本試驗以改良式 WFB68 培養液培養人工汙染細菌性果斑病菌之西瓜種子樣品。將不同帶菌率之種子樣品加入培養液中，於 30°C 震盪培養 24 小時。使用專一性引子對 SEQID4/SEQID5 檢測瓜類細菌性果斑病。結果顯示樣品帶菌率 0.25%、0.1%、0.016% 皆可由 PCR 方式測出病原菌，經電泳分析觀察到 246 bp 的 Aac 專一性條帶。本研究

另以溴化丙錠 (propidium monoazide, PMA) 結合 qPCR 技術，擬測試其提升檢測效率之可行性。PMA 是一種具光反應之 DNA 染劑，當死亡或受傷的微生物其細胞壁及細胞膜因構形改變，使 PMA 得以進入微生物體內，進而嵌入 (intercalate) DNA 中，經光照後與 DNA 共價結合，造成在 PCR 反應時 DNA 無法複製；而活菌細胞壁完整，PMA 無法進入細胞體內，可以區隔活菌與死菌。因此結合 PMA 與 qPCR 技術，可精確檢測目標環境中攜帶活菌的量，避免死菌的影響，同時取代培養步驟，節省了相當多時間。在混合不同濃度活菌及死菌的試驗中，PMA-qPCR 的方法能有效偵測活菌，且 PMA 能抑制死菌 DNA 的增幅，使檢測的結果更加精確。

Aac 專一性引子對 SEQID4/SEQID5

Primers	Insert size (bp)	Primer sequence (5'-3')	References
SEQID4	246	TCg TCA TTA CTg AAT TTC AAC A	Schaad et al., 1999
SEQID5		CCT CCA CCA ACC AAT ACg CT	

細菌廣效性引子對 UpBacF/UpBacR

Primers	Insert size (bp)	Primer sequence (5'-3')	References
UpBacF	1511	TAC ggC TAC CTT gTT ACg ACT T	Eden et al. 1991
UpBacR		gAA gAg TTT gAT CCT ggC TCA g	

PCR 反應條件：

Step 1：95 °C 反應 5 分鐘。

Step 2：(95 °C 30 秒、53 °C 30 秒、72 °C 30 秒) 共 35 循環。

Step 3：72 °C 反應 5 分鐘後停止，降溫至 4 °C。

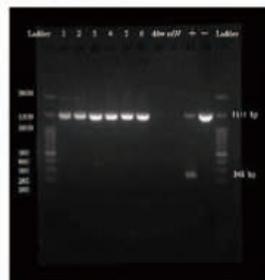


圖 4-2、本場已建立種傳瓜類細菌性果斑病菌檢測作業流程

### 三 病害防治有機資材應用種子披衣處理之研究

蘇士閔、江筱擘、徐麗芬

葫蘆科作物發生瓜類蔓枯病情況相當普遍，目前有機農法多只能採用如選擇抗病品種、注意田間衛生及清園、或清除莖基部葉片來減少病原菌入侵感染及發病的機會，尚無推薦防治資材可供有機農友利用於田間防治或種子消毒，本計畫擬利用有益微生物製劑或其他非農藥資材進行種子處理或拌種，開發符合有機規範的防治方法，期於種苗期即能有效抑制瓜類蔓枯病發生。有益微生物

對瓜類蔓枯病菌的抑制評估結果，以木黴菌抑制率 70.97% 較佳。有益微生物製劑混拌種子試驗中，木黴菌（寶林）及液化澱粉芽孢桿菌相較於其他製劑之處理效果較佳，正常苗率分別為 31% 及 28%；在蔓枯病防治效果上，也是以混拌木黴菌及液化澱粉芽孢桿菌（BS2）發病度 36% 及 37% 之效果較佳。木醋液試驗結果顯示，胡瓜種子經木醋液浸種處理後在正常苗、不正常苗、硬粒種子、新鮮未發芽及死亡種子率上，各處理組間皆無差異，供試胡瓜種子發芽率平均 94% 以上。而木醋液對菌絲生長抑制率最高僅 6.19% 抑制效果不明顯。

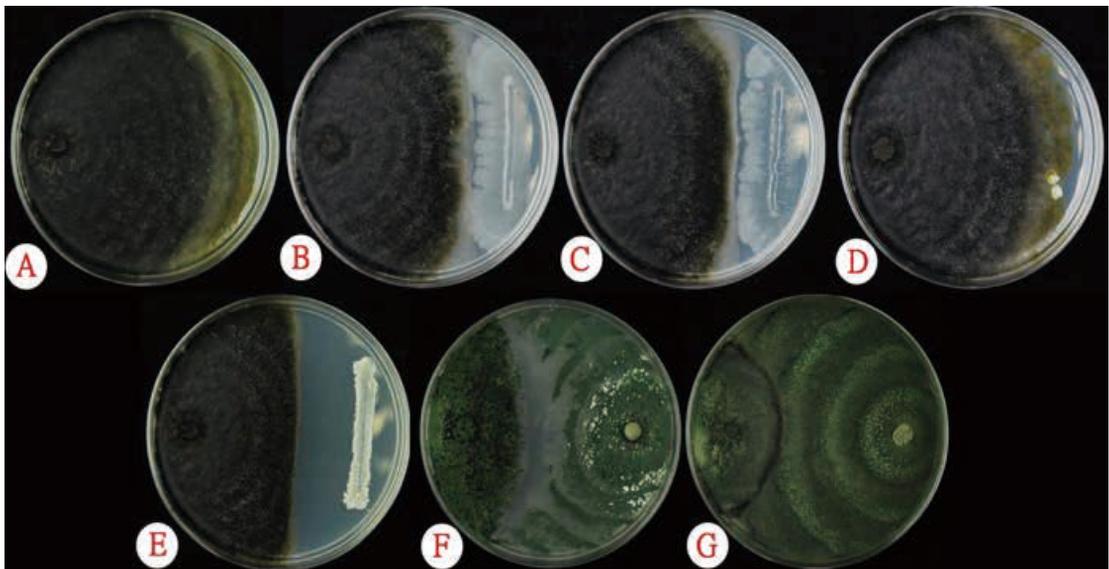


圖 4-3、比較自行開發之微生物菌株（E）與市售製劑菌株對瓜類蔓枯病菌生長的抑制能力。A 為對照組

#### 四 建立十字花科蔬菜重要種傳及出口檢疫病原分子檢測作業流程

蘇士閔、邱燕欣、簡良芬

本年度計畫目標為建立十字花科作物重要種傳及出口檢疫病原分子檢測作業流程，檢測對象為十字花科蔬菜細菌性軟腐病菌 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, Pcc) 與十字花科蔬菜細菌性葉枯病菌 (*Pseudomonas viridiflava*, Pv)。在細菌性軟腐病菌 (Pcc) 檢測方面，利用 PEB 培養液浸泡人工污染種子樣品 16 小時以萃取及增量種子上的 Pcc，萃取完成後取部分培養液序列稀釋，將 104 與 105 倍稀釋液塗佈於 CVP 培養基上，置於 27°C、培養 48 小時，觀察有無造成凹陷的可疑菌落；其餘培養液經離心、濃縮後進行 DNA 萃取，再以專一性引子對 EC3F/EC4R 進行增幅，增幅產物

以電泳分析觀察是否有 497bp 的條帶呈現。最後綜合鑑別性培養基與 PCR 結果進行判定。在細菌性葉枯病菌 (Pv) 檢測方面，利用 0.02% Tween 80 溶液浸泡人工污染種子樣品萃取種子上的 Pv，萃取完成後進行萃取液離心、濃縮，濃縮萃取液經序列稀釋後塗佈於 KBZ 與 KBBC 培養基上，培養在 28°C 下、4-7 天，與正對照菌株比較觀察有無疑似菌落，挑取可疑菌落於 KB 培養基上增量後製成懸浮液，再以專一性引子對 20F/20R 進行增幅，增幅產物以電泳分析觀察是否有 440bp 的條帶呈現以進行結果判定。

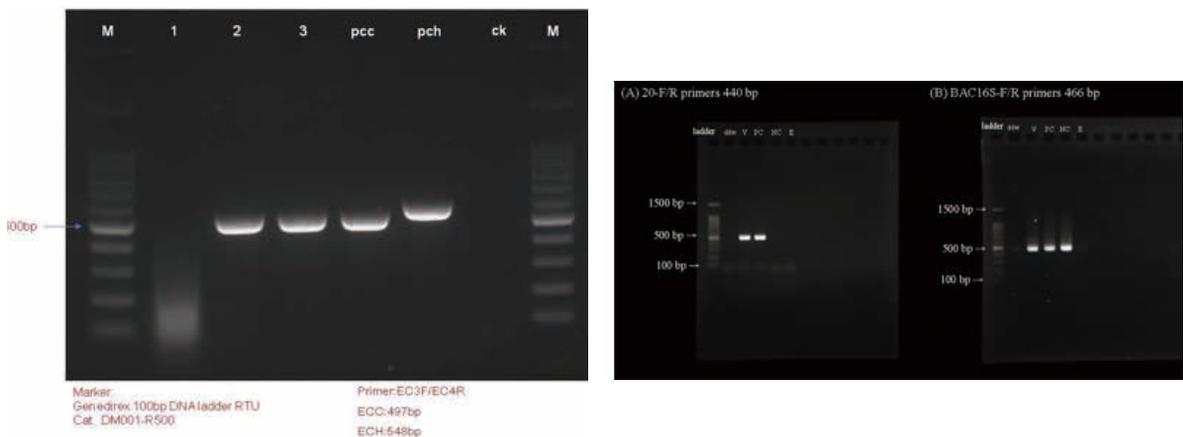


圖 4-4、本場已建立種傳十字花科蔬菜細菌性軟腐病菌與葉枯病菌分子檢測作業流程之檢測結果

## 五 番茄重要種傳病原檢測技術之建立

蘇士閔、徐麗芬、陳蕙瑤、邱燕欣

菸草嵌紋病毒 (Tobacco mosaic virus, TMV) 與番茄嵌紋病毒 (Tomato mosaic virus, ToMV) 是國際種子貿易上重要種傳病毒。TMV 在番茄種子上主要因機械方法污染種子而傳播，ToMV 可污染種子外表或其他部位但並未感染胚細胞，當種子發芽，幼根突破種皮時因造成微細傷口，病毒藉機侵入根部細胞造成幼苗感染，或藉由其他人為操作 (人手或工具) 接觸到污染在種皮上的病毒，而將病毒藉由傷口傳染到幼苗。此種病毒性質穩定，能忍受乾燥或低溫等不良環境，於種子長期保存後

仍能保持活性。本研究參考國際種子檢查協會 (International Seed Testing Association, ISTA) 公告之種子健康檢查方法，建立 Tobamovirus bioassay 檢測作業流程，利用碳化矽粉末摩擦葉片製造傷口，將番茄種子萃取液接種至抗病菸草，放置於溫度 20~25°C 的環境中、提供至少 12 小時的光照，培養 5 到 7 天，檢查植物於接種葉片上典型壞疽病斑的發生情形並記錄。同時本場也持續建置 Real-Time RT-PCR 檢測作業流程中。

行政院農業委員會種子檢查室 標準作業程序 第 00 章 番茄之菸草嵌紋病毒與番茄嵌 紋病毒檢測	發行日期	20XX.XX.XX
	版 次	A
	頁 別	21-1/4
21.1. 適用範圍：本方法適用於菸草嵌紋病毒( <i>Tobacco mosaic virus</i> , TMV)之檢測，與番茄嵌紋病毒( <i>Tomato mosaic virus</i> , ToMV)之檢測。		
21.2. 檢驗方法：利用機械接種菸草葉片產生局部病斑的方式，將種子萃取液均勻塗抹於未受感染之菸草葉片表面，經培養後觀察其葉片發生壞疽病斑的情形，判斷檢驗種子是否具帶有病毒。		
21.2.1. 工作環境需具備：		
21.2.1.1 研磨機(廠牌 KURABO SH-100)、研磨珠(廠牌 KURABO Z-20，直徑 20mm) 與可拋棄式 30ml 試管(廠牌 SARSTEDT)：研磨種子用。		
21.2.1.2. 微量吸管：1 µl、10 µl、20 µl、100 µl、1000 µl、5 ml。		
21.2.1.3. 高溫高壓滅菌釜(Hirayama, HVE-50)。		

圖 4-5、本場已建立符合 ISTA 公告方法之種傳 Tobamovirus 檢測作業流程

## 六 馬鈴薯採收後病害檢測技術之建立

邱燕欣、王慧如、連珮君

為建立採收後種薯建立臺灣健康馬鈴薯種薯驗證系統中種薯品質驗證技術，及健康種薯系統 - 馬鈴薯病害檢測流程，與本場馬鈴薯瓶苗、種薯生產鏈進行結合，106 年度利用生產的馬鈴薯軟腐病血清可以針對採收後薯臍上的軟腐病菌進行檢定，利用圓形打孔器（0.5 公分直徑）在馬鈴薯薯臍部位進行取樣，以 25 個薯塊為一個檢定樣品，培

養於 30 mL 培養液，以人工接種方式在收集管加入 0.5mL（100 cfu/mL）軟腐病之病原細菌，在 16 小時富集（enrich）培養後，吸取培養液進行非直接法之 ELISA，ELISA 檢定吸光值反應值可達 2.58 以上，可準確檢定出馬鈴薯軟腐病病原細菌。

## 七 草莓病害非農藥防治技術開發

邱燕欣、王慧如、連珮君

研發適用於防治草莓炭疽病的微生物製劑並導入草莓種苗生產，運用鈣肥、含矽化物及幾丁質等物質的添加與有益微生物的施用，去除化學農藥的用量，達到降低炭疽病發生與繁殖苗倍率增加之目的，與本場草莓組織培養定植苗生產鏈進行結合。106 年度以豐香與‘桃園 4 號’作為試驗材料，進行草莓組培定植苗跳苗非農藥處理方式比較，處理組包括對照組、處理組為本場分離之微生物液肥（A）與市售微生物液肥（B）每 2 週澆灌一次，前期觀察匍匐

莖數、中期花朵數、後期觀察結果數，並在澆灌 4 次後，採取葉片進行炭疽病離葉接種，觀察有無協助抗病性反應。因結果期受今年秋後降溫緩慢影響，花期延後，目前在‘豐香’與‘桃園 4 號’花朵數無顯著性差異，離葉接種顯示豐香與桃 4 號對於本場分離之微生物液肥（A）100X 稀釋液（21%）處理後 4 次，對於對照組炭疽病發病（87%）有顯著性。

## 八 葡萄重要病毒血清製備

邱燕欣、王慧如、連珮君

本計畫期研發之葡萄病毒檢測用血清 (GLRaV-3 與 GVA)，與市售檢測血清比較專一性及力價，確認本場血清品質與檢定範圍，106 年度利本場使用收集彰化與卓蘭地區葡萄 4 處田區各 10 件樣品，分別利用本場生產之田間 GVA 與 GLRaV 病毒血清與市售血清

(Bioreba) 檢定，結果顯示本場開發的 GVA 與 GLRaV 病毒血清背景值雖高，但是檢定結果與市售血清 (Bioreba) 相同，利用間接法可以套組化葡萄檢定血清，達到利用的目的地。

## 九 番茄細菌性斑點病偵測分子代謝因子技術建立

邱燕欣、王慧如、連珮君

種子(苗)病理檢查常用生物性接種檢測與分子檢測如 PCR，生物性接種檢測耗時，而分子標的檢測呈現陽性反應時，常因是否為無生命(繁殖)的 DNA 尚未分解，DNA 經由 PCR 增量，該病原已無致病能力而被詬病。因此快速檢測仍具活性的分子檢測技術為本計畫所突破的目標。本計畫擬利用偵測番茄細菌性斑點病侵入植物或代謝所需之 RNA 作為分子檢測的標的，解決現今分子檢測標的為 DNA 易造成偽陽性之誤差。1. 利用 Gum D Gene 作為番茄細菌性斑點病 RNA 檢定引子，並且比較

DNA 與 RNA 的檢定靈敏度顯示，RNA 檢定的靈敏度及可檢定時間為 16~48 小時，DNA 則落在 24~48 小時。完成菌體與種子共培養流程建立，在種子加入標地病原細菌共同培養後進行 DNA 與 RNA 萃取，以專一性引子偵測，可於培養 16 小時後，以 RNA 增幅出標的基因，可於 36 小時後，DNA 及 RNA 增幅出標的基因。顯示 RNA 可加速種子病原菌檢定的時效性。不採取種子破碎研磨的方式可以減少 PCR 抑制物質的產生，且批次檢定的種子量上升，相對檢定母體，次樣品較具代表性。