

三、種子(苗)檢查、檢測及驗證

一 影像辨識系統輔助水稻種子檢查之研究

陳易徵、羅仕杰、黃國益

本研究開發一套水稻幼苗辨識輔助系統，包括出入料機構、演算法、視覺軟體及控制系統，並建立影像資料庫。所使用的水稻種子係由行政院農業委員會種苗改良繁殖場提供，水稻影像樣本已蒐集苗齡七天 3,850 筆、苗齡十天 2,485 筆資料，總計 6,335 筆水稻影像樣本(解析度 300dpi)。

此系統以色彩特徵建立貝氏分類器進行水稻幼苗的構造之分類，並利用骨架化、分枝去除法、側根去除法、分段曲線連接等方法進行特徵萃取，針對

6,335 筆樣本進行特徵萃取測試，特徵萃取成功率為 88.4%。本年度亦針對發芽容器進行改善，提升其空間利用效率達 286%，惟仍須評估是否影響特徵萃取及辨識品質(圖 3-1)。

另外，本計畫針對紅米以透光度試驗進行辨識，在背光環境下擷取影像，再取 R、G 圖層之灰階平均值以貝氏分類器進行分類，針對 800 張紅米影像樣本(解析度 300dpi)進行測試，其分類正確率為 100%。

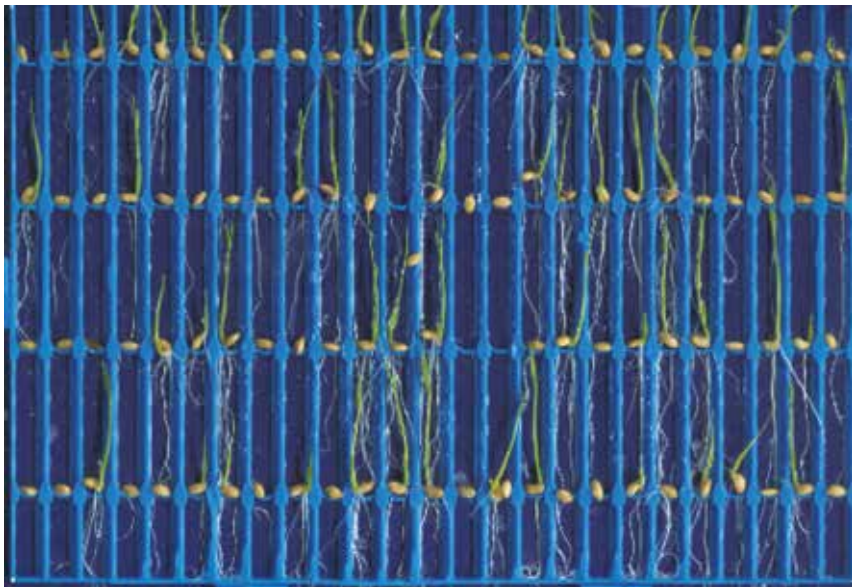


圖 3-1、改良後之發芽容器改善影像辨識系統空間利用效率

二 種子檢查業務成果

郭育玟、蘇士閔、許鐫云、陳易徵

劉芳怡、徐麗芬

107 年度本場種子檢查室受託，依據臺灣地區農作物種苗檢查須知辦理各項種子檢查業務，其中良種繁殖田間檢查作物種類有：水稻、落花生、大豆、玉米、高粱及番茄等，共計 188 件，總面積為 104.28 公頃；室內檢查共計 1,011 件（表 3-1）；另辦理市售種子品質查驗

計 231 件；一般業者申請種子品質檢測計 277 件；核發出口種子 ISTA 檢驗證及英文報告共計 111 件（表 3-2）；全年度種子檢查總件數為 1,818 件。

表 3-1、良種繁殖田間檢查面積及室內檢查件數

檢查作物類別	田間檢查面積（公頃）	室內檢查（件）	備註
水稻	58.35	954	含儲藏性 24 件
落花生	21.96	55	-
大豆	1.97	0	-
玉米	0.50	0	-
高粱	21.70	2	-
番茄	0.10	0	-
合計	104.28	1,011	

表 3-2、各項種子檢查申請案室內檢查件數

檢查種類	室內檢查（件）
市售種子品質查驗	231
一般業者申請（參考性）	277
ISTA 檢驗證	75
英文報告	36
合計	619

三

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、鍾文全

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，107 年度共抽檢木瓜種苗生產業者 27 家皆無轉殖標的基因檢出；木瓜田間栽培區不定期抽檢 2 區，其中臺南白河檢出基因轉殖片段(表 3-3)；邊境監測抽檢玉米種子 47 件，有兩件檢出異常片段皆已送請主管機關進行後續處理。各小組成員檢測能力維持測試，針對木瓜、馬鈴薯、大豆與玉米盲樣樣品進行能力試驗，其中木瓜種子、葉片、大豆葉片、馬鈴薯皆 100% 符合，大豆種子及玉米有部分品項檢測結果偽陽性。

表 3-3、107 年度木瓜種苗業者暨栽培園抽檢摘要表

	種苗業者		栽培園
	家數	採樣件數	
苗栗縣	3	0	
南投縣	3	3	
臺中市	3	3	
彰化縣	5	8	
嘉義市	2	2	
嘉義縣	3	5	1
臺南市	1	1	1
高雄市	3	6	
屏東縣	3	3	
雲林縣	1	3	
總計	27	36	2

四 建立重要出口蔬菜種子檢疫病原分子檢測作業流程

蘇士閔、江筱曄、邱燕欣

葫蘆科作物種子是我國極具外銷潛力之種子產品類別，其中西瓜、甜瓜與南瓜是主要作物種類。統計資料(2012-2016年)指出，前述三項作物出口值分佔第1、3、8名。而依防檢局高雄分局針對出口種子所需進行檢測之植物病原項目統計結果來看，以瓜類作物為寄主之疫病菌 *Phytophthora capsici* 與 *P. drechsleri* 亦是常見的檢疫病原。本計畫主要目標係建立 *P. capsici* (Pc) 與 *P. drechsleri* (Pd) 的標準檢測作業流程，以胡瓜作為主要供試作物種

類，自食品工業研究所生物資源保存及研究中心蒐集得 Pc 菌株 4 個與 Pd 菌株 3 個，對胡瓜的病原性測試結果，Pc 菌株均具有病原性，Pd 則均無病原性。以 *Phytophthora* 屬廣效性引子對 Phy1s/Phy2a-2 進行測試，可有效偵測得 Pc 與 Pd 各個菌株。Pc 專一性引子對 CAPFW/CAPRV2 與 Pd 專一性引子對 ITS-DF2/ITS-DR2 也個別可偵測到 Pc 菌株與 Pd 菌株。以人工污染疫病菌之胡瓜種子進行測試，Pc 專一性引子對 CAPFW/CAPRV2 與廣效性引子對 Phy1s/Phy2a 可有效偵測得 1% 的 Pc 帶菌種子。已擬訂 Pc 與 Pd 檢測作業流程，後續將可提供種子業者檢測服務。



圖 3-2、以 *Phytophthora capsici* 專一性引子對 CAPFW/CAPRV2 (595 bp) 與 *Phytophthora* spp. 廣效性引子對 Phy1s/Phy2a (1,000 bp) 進行人工污染種子檢測試驗。

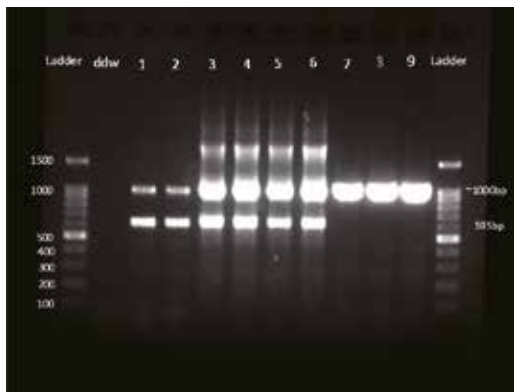


圖 3-3、以 *Phytophthora drechsleri* 專一性引子對 ITS-DF2/ITS-DR2 (567 bp) 與 *Phytophthora* spp. 廣效性引子對 Phy1s/Phy2a (1,000 bp) 進行人工污染種子檢測試驗。

五 基因改造植物性飼料或飼料添加物查驗登記之檢驗

陳哲仁、張惠如、鍾文全

依飼料管理法相關條文申請飼料用途許可證明文件，屬基因改造植物性飼料或飼料添加物者（如玉米、大豆、棉花、油菜及苜蓿等）應依本會通知之申請期限內，繳交參考品及檢驗方法。本場自 105 年起受本會畜牧處委任執行參考樣品及檢驗方法等資料之收件保存及方法測試事宜。本 (107) 年度共收玉米、棉花以及苜蓿共 8 件基因改造參考樣品，累計已收到 311 件參考樣品（含非基因改造對照樣品），全部樣品妥善保存於常溫濕度控制環境中。並且參照歐

盟公告之基因改造作物檢測方法之基本要求，進行各項申請案業者自行提供之定性及定量檢測方法確認。本 (107) 年度完成玉米 5 件、棉花 3 件以及苜蓿 1 件，合計 9 件基改飼料檢測方法確認，累計已建立 156 件基改作物檢測方法（表 3-4）。

表 3-4、107 年度進口基因改造植物性飼料查驗登記檢驗累計完成件數

作物別	單一完成	複合完成
玉米	24	60
大豆	16	11
棉花	15	13
油菜	6	5
苜蓿	3	2
甜菜	1	0
小計	65	91
總數		156

六 建立馬鈴薯重要病毒次世代檢定比對技術

邱燕欣、王慧如、林詩舜

運用 NGS 技術於植物病理研究，不僅可作為病理研究、病原偵測、流行病學族群分析等，也可藉由 RNA 定序分析罹病過程中寄主與病原生物的交替作用，寄主植物病程各階段的基因表現與病徵相關性。病原偵測上，可藉由單一物種複合材料的 RNA 全定序、DNA 定序與病原資料庫比對，瞭解該作物病原的族群相，在多樣品的集合下，瞭解特定作物的病原相與區域的演化差異。國際馬鈴薯中心（International Potato Center，簡稱 CIP）與波伊斯植物研究院（Boyce Thompson Institute）於 2017 年發表小分子核糖核酸（small RNA）分析軟體「VirusDetect」，在取得樣品的小分子核糖核酸序列資料後，去除轉接子（adapter）序列後，上傳分析系統，執行自動化串聯分析，即可比

對出在待測樣品中可能存在的微生物。該團隊運用 CIP 的馬鈴薯材料，成功偵測到待測樣品中含有之前無法有效鑑別的馬鈴薯病毒。因此本研究利用次世代解序，成功收集 2 種馬鈴薯（類）病毒基因序列，並建檔於分析資料庫。並且純化並通過品質確認 2 筆病毒感染馬鈴薯材料，進行全植物體轉錄體解序（包含一健康與罹病材料），每材料解序量為 6 gigabytes，利用小分子 RNA 解序資料，利用 contig 及 blastn，比對 NCBI 資料庫，列出可能性（已接種）病原。並以反轉錄聚合酶鏈式反應（reverse transcription-PCR, RT-PCR），是與酵素連結免疫吸附分析法（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ELISA）加以證實。本年度使用康乃爾大學所建立之 VirusDetect 植物病原 NGS 檢定資料庫，將未知罹染病原之馬鈴薯繁殖材料，可利用此 NGS 資料，比對可能檢定之標地，減少引種潛藏危機（圖 3-4）。



圖 3-4、罹染病毒的馬鈴薯 (A)，經生長點組織培養去病毒後，以 small RNA 進行 VirusDetect 分析，確認無罹染病毒。

七 進口基因改造農糧產品產業應用 追溯與出口邊境管理措施研究

陳哲仁、周明燕、張惠如

國內雖然尚未許可任何基改作物商業生產，但由於曾發生過試驗階段基改木瓜汙染事件，為避免農民自行留種或其他原因之汙染可能性，因此，持續針對木瓜執行輸出農產品檢測。本年度共收到 56 件出口木瓜農產品抽檢樣品，包括木瓜種子出口 50 件及果實出口 6 件，累計出口種子 3,317.27 公斤及果實 4,486 公斤，從登載資料顯示我國木瓜種子銷往全球各主要栽培國家，粗估計產值規模達 3 億元以上(表 3-5)。出口木瓜農產品抽檢自 104 年 9 月起開辦，累計有 230 件抽檢樣品，都未檢出含有基改成分，抽檢工作仍需持續進行，以維護國產木瓜非基改優質形象。

我國飼料所需之玉米及黃豆 95% 以上仰賴進口，且畜禽配合飼料約含 60% 玉米及 20% 黃豆粕，實務面尚無法以國產雜糧完全取代進口飼料使用。現行飼料用玉米及大豆貨品輸入申報貨號已根據食用與飼料用區別，並自 106 年起項下全面細分基改或非基改類別，本年收到進口基改大豆 24 件、基改玉米 42 件、非基改大豆 10 件以及非基改玉米 7 件(表 3-6)。對於申報為基改產品者，分析六項常見基改成分進行篩檢，其中進口基改大豆品種檢測結果發現，主要流通以 Monsanto 公司抗殺草劑品種為主，包括 MON89788 及 MON87708 等；此外，針對輸入申報為非基改飼料者則以品項專一性方法逐一檢測是否含有特定品項，在 9 件輸入申報非基改飼料大豆中及 6 件非基改飼料玉米全數未檢出有效訊號，故可視為合格產品。

表 3-5、出口木瓜種子、種苗以及果實抽檢數量

年度	批次	種子 (公斤)	果實 (公斤)	種苗 (株數)
104*		27 (3334.49)	8 (2508)	0
105		44 (3436.73)	23 (6888)	1 (44)
106		49 (4986.42)	19 (8154)	3 (49)
107		50 (3317.27)	6 (4486)	0

* 自 104 年 9 月開辦出口木瓜農產品檢測

表 3-6、104-107 年度進口玉米及大豆飼料抽檢紀錄

玉米			
年度	進口批次	報驗重量 (公噸)	抽檢批次
104	2,274	3,747,508	15
105	2,178	3,970,983	84
106 (基改)	2,668	3,918,472	62
106 (非基改)	20	5,755	3
107 (基改)	3,333	3,642,210	42
107 (非基改)	22	4,721	7
大豆			
年度	進口批次	報驗重量 (公噸)	抽檢批次
104 (基改)	2,357	2,607,477	58
104 (非基改)	1,317	58,767	
105 (基改)	1,995	2,338,627	84
105 (非基改)	1,349	53,820	
106 (基改)	1,970	2,368,464	80
106 (非基改)	1,400	76,590	50
107 (基改)	2,700	2,473,830	24
107 (非基改)	1,312	74,064	10

八 水稻種子影像辨識系統之研究

許鑄云、張雅琪、鍾佩恩、鄒佩諄

為維持水稻品種純度及縮短水稻品種檢查時間，本計畫主要目的分成 2 部分，第 1 部分為以現有 5 個品種為基礎，擴增新的水稻品種，建立‘臺農 71 號’、‘桃園 3 號’、‘臺 16 號’及‘臺東 30 號’等 4 個品種之影像比對處理技術。各水稻品種有效影像擷取率範圍

為 95.9~98.4%，有效影像擷取率平均達 96.9%；各水稻品種辨識成功率範圍為 84.4~92.4%，品種辨識成功率平均達 88.4% (表 3-7~3-8)。第 2 部分為多樣品自動進出料設備設計，預計可一次性擺放 8 個不同樣品，並於一樣品檢測完畢後自動進行下一樣品辨識。設計使用圓盤供料方式，旋轉供料盤將樣品送入供料桶中，並進行震動供料進行影像擷取。

表 3-7、水稻品種有效影像擷取率結果

項目	臺梗 16 號	臺東 30 號	臺農 71 號	桃園 3 號
總數 (粒)	4,072	4,993	4,053	4,256
有效影像擷取率 (%)	97.13	95.90	98.40	96.35

註：有效影像擷取率 = (總數 - 無效影像) / 總數

表 3-8、水稻品種辨識成功率結果

項目	臺梗 16 號	臺東 30 號	臺農 71 號	桃園 3 號
總數(粒)	2,166	2,938	2,222	3,971
品種辨識成功率(%)	92.35	85.67	84.35	91.16

註：辨識正確率 = 辨識正確數 / 總數

九 種子數位圖鑑平台之研究

許鑄云、鍾佩恩、張雅琪、鄒佩誼

本計畫欲進行種子外觀特徵影像處理，以建置種子數位圖鑑平台，並運用於種子檢查及相關檢驗單位，希冀透過此平台快速檢查出雜草種子或不欲引入的植物種子，避免造成生物性公害的物種散佈，而此系統除了提供於相關檢查及研究人員使用外，並可提供於農民及一般民眾交流使用。今年度針對 170 種禾本科植物種子，使用顯微鏡在可控環境下進行拍攝，每一種植物至少取得 25 張種子影像，其影像的組成包括各個角度的種子。此外，由於禾本科種子大多

外部附著稃殼，具稃殼種子和不具稃殼種子的外觀形態差異甚大，因此亦必須將具稃殼和不具稃殼的種子形態分別納入。使用訓練資料庫的 170 類種子共計 4,250 張種子影像，訓練神經網路分類器後，針對測試資料庫共計 850 張種子影像進行測試，測試結果顯示系統平均辨識率為 84%，且平均每張影像辨識時間為 0.95 秒。另計算混淆矩陣的結果(圖 3-5)，以便於後續分析辨識錯誤的樣本。

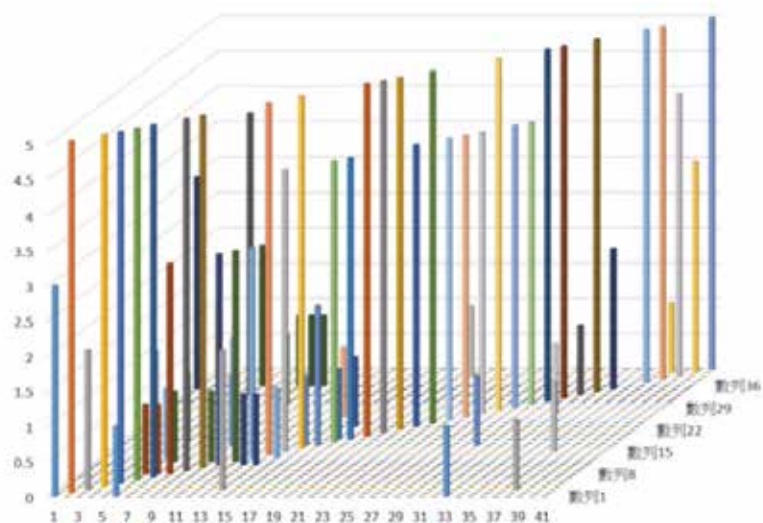


圖 3-5、辨識混淆矩陣的 3D 視圖

十 菇類栽培後介質之生物炭開發與產業加值研究

薛佑光、陳鈴淵

國內近年菇類量產造成大量太空包廢棄介質，每年超過 20 萬公噸，製作堆肥時程長消耗慢，需減少堆積與棄置問題，利用生物炭製程技術，大幅降低菇包廢棄介質重量與體積，並應用於菇類廢包堆肥添加物、土壤改良劑、作物栽培與育苗用介質添加物等之研發，提高廢棄菇包再生效益。本年度以簡易爐組燒製廢菇包生物炭試驗，結果以造粒成直徑約 10mm 之菇包廢棄介質顆粒可以將菇包顆粒製成生物炭，生物炭直徑縮小約為 6-8mm，進行後續甘藍及番茄育苗試驗，結果顯示甘藍育苗添加 2% 及 4% 廢菇包生物炭介質表現較

佳，在葉片大小、莖粗及鮮重上，平均值皆優於對照組。在番茄育苗顯示，添加 4% 及 6% 廢菇包生物炭介質表現較佳，在葉片大小、莖粗及鮮重上，平均值皆優於對照組。

另外與生物炭計畫團隊共同進行青梗白菜盆栽生長試驗，取本場農場（一）區內 pH 為 5.4-5.7、EC 為 0.1-0.15ms 之酸性紅壤，加入由各改良場所提供之芒果修剪枝條、香菇包廢棄介質等 14 種生物炭，以 2% 比例加入 8 吋盆栽中於網室進行青梗白菜栽培。調查青梗白菜採收鮮重及乾重結果，初步顯示以稻殼、芒果枝條、刺竹、菱角殼、番荔枝枝條及綠竹等 6 種生物炭之產量最佳。盆栽後續將繼續種植共 4 次，進行調查分析以了解生物炭對蔬菜長期生育之影響。



圖 3-6、廢菇包介質原料（左）、造粒（中）與生物炭（右）



圖 3-7、廢菇包生物炭不同添加比例番茄育苗試驗



圖 3-8、青梗白菜栽培情形



圖 3-9、青梗白菜生育情形調查

十一 基因轉殖作物高效能監測體系之建立 - 進口種子抽檢追蹤模式

陳哲仁、周明燕、張惠如

106 年 8 月 2 日由本會農糧署、科技處及本場，與日本農林水產省代表舉行座談交流，針對基改木瓜檢測技術與國內檢測結果進行交流，並約定雙方舉辦基改木瓜檢測方法共同試驗，雙方各自提供檢測方法與盲樣檢體予對方實驗室檢測(圖 3-10)，日方由種子種苗中心及國家畜禽育種中心長野分所參與，我方由農業試驗所、臺南區農業改良場及種苗場參與。從本次共同試驗檢測結果顯示，以日方檢測方法檢測日方樣品及臺灣方法檢測臺灣樣品，可以獲得一致性正確結果，顯示雙方都有能力執行彼此的檢測方法，但是，雙方結果仍有一致之處，約定於來年繼續交換意見。



圖 3-10、臺日基改木瓜種子檢測共同試驗日方樣品內容物文件及低溫運輸測試樣品外觀。

106 年 4 月起國際間發現有未經許可的基改矮牽牛於市面流竄，並進行大規模召回下架，本計畫已對此一情事瞭解及蒐集檢測結果相關資訊，透過臺日共同試驗機會取得日本 Takii 公司出品的 African Sunset 品種種子粉末，該品種已經被證實為未經許可之基改品種，檢測方法根據美國農部的調查報告以 CaMV 35S promoter、Nos promoter 以及 NptII- Nos promoter junction 三項標的作為基改矮牽牛篩檢，結果 African Sunset 品種檢出 Nos promoter 及 NptII- Nos promoter junction 兩項訊號(圖 3-11)，並利用日方提供樣品以 TA cloning 方法選殖，建立可信認的檢測用參考質體 DNA，完備定性檢測技術內容。



圖 3-11、基因改造矮牽牛 African Sunset 定性檢測方法，可透過檢測 Nos 啟動子或 Nos-p - NptII 接合處兩項標的進行偵測

十一 國際重要種傳病害檢測體系之建立

蘇士閔、陳蕙瑤、邱燕欣

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。本研究將 PMA-qPCR (溴化丙錠 - 即時聚合酶鏈鎖反應) 技術應用於瓜類細菌性果斑病菌 (Acit) 檢測之測試。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 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。測試結果在混合不同比例的活菌與死菌懸浮

液中，未處理 PMA 者，其 Ct 值與活菌懸浮液相近，處理 PMA 者之 Ct 值較未處理組大幅上升，表示 PMA 符合死菌的 DNA 後主要是活菌 DNA 被增幅；在人工污染 Acit 種子的試驗方面，PMA 處理後隨活菌濃度比例降低 Ct 值則隨之提高，同樣顯示 PMA 處理後主要為種子上活菌的 DNA 被增幅。惟測試過程偶爾活菌 DNA 的增幅亦有被抑制的情形發生。

表 3-9、以不同濃度之活菌與死菌懸浮液處理之人工污染種子進行 PMA-qPCR 測試

viable cells/dead cells (CFU/ml)	Ct value	
	Not treated with PMA	PMA treated
$8 \times 10^6 / 8 \times 10^6$	24.12	27.53
$8 \times 10^5 / 8 \times 10^6$	26.30	29.19
$8 \times 10^4 / 8 \times 10^6$	27.25	30.95
$8 \times 10^3 / 8 \times 10^6$	27.01	30.94
$8 \times 10^2 / 8 \times 10^6$	26.78	31.38
$8 \times 10^1 / 8 \times 10^6$	27.46	31.42

十三

番茄重要種傳病原檢測技術之建立

蘇士閔、邱燕欣、陳姿瑜

在全球蔬菜種子市場中，茄科種子是最主要的種子種類。依聯合國糧農組織 2012 年統計資料指出，茄科種子所佔比例高達 40.4%，約 25.5 億美元，其中番茄種子佔 63.4%，總價值超過 16 億美元；其次為番椒種子約 6.5 億美元。由於茄科種子在全球農業與種子貿易上的重要性極高、交流頻繁，茄科種子可能攜帶之種傳病原及其造成之種傳病害也受到高度重視。番茄輪點病毒(*Tomato*

ringspot virus, ToRSV) 與菸草微綠嵌紋病毒(*Tobacco mild green mosaic virus*, TMGMV) 均有極高機會可藉由種子傳播造成病害發生或進入非疫區，對國內茄科作物生產具有相當高的風險。本計畫測試市售的 ToRSV 與 TMGMV 的 ELISA 血清套組並擬定檢測作業流程，測試結果顯示 Agdia 的 ToRSV 血清套組與 Nano 的 TMGMV 血清套組目前可用於檢測服務。

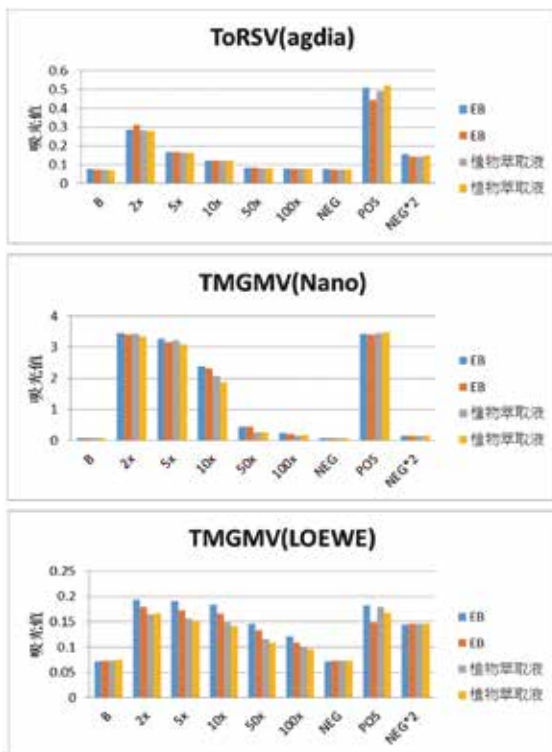


圖 3-12、植物萃取液對市售 ELISA 套組反應呈色的影響。

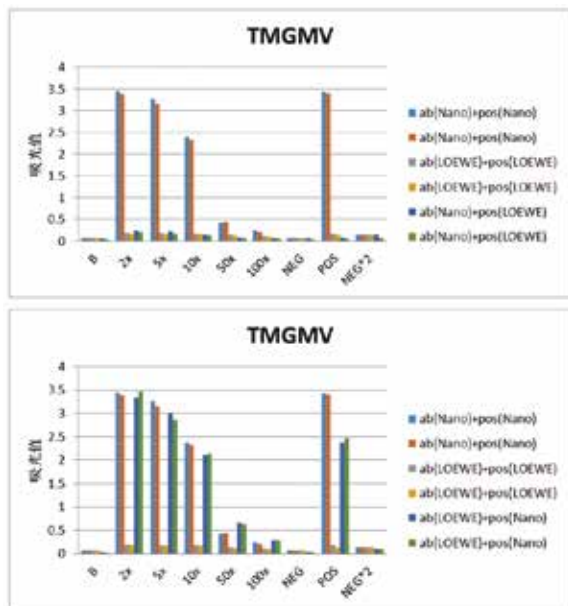


圖 3-13、不同廠牌之 TMGMV 抗原抗體對彼此的辨識效果。

十四

番茄細菌性斑點病檢定技術建立

邱燕欣、連珮君、王慧如、蘇士閔

國際上針對種傳病原細菌之檢疫檢測漸以聚合酵素連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 為主要技術，然而以去氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid, DNA) 作為檢測標的且呈現陽性反應時，常因為是否為死菌的 DNA 而有所爭議。

茄科細菌性斑點病為 *Xanthomonas euvesicatoria* (Xev)、*X. vesicatoria* (Xv)、*X. perforans* (Xp) 與 *X. gardneri* (Xg) 引起，臺灣已被報導之茄科細菌性斑點病菌為 Xev、Xv 與 Xp，其可藉由種子帶菌進行長距離傳播。

本研究利用 Xp 表現 *gumD* 訊息核糖核酸 (messenger RNA, mRNA) 作為檢測標的，初步試驗將培養 24 小時之 Xp 菌體，以 100°C 加熱 10 分鐘後，萃取 DNA 以專一性引子對 (HpaF-f/

r) 進行 PCR 結果為陽性反應，然而萃取 RNA 以專一性引子對 (gumD1F/gumD1R) 進行 RT-PCR 則為陰性反應，與菌體活性相符。進一步以人工污染 Xp 之番茄種子進行測試，比較種子浸液萃取與種子研磨萃取方式試驗結果得知，種子研磨萃取時，受限於破碎種子體積限制，每次僅能研磨 0.1g 種子 (約 100 顆)，且種子經研磨後釋放酚類物質，易抑制 PCR 反應，造成偽陰性結果。利用種子浸液萃取方式則可以減少 PCR 抑制物質產生，且可增加每批次檢測的種子量，檢測結果更具代表性。另外，人工污染種子經浸液培養 16 小時，再萃取浸液之核糖核酸，即可以專一性引子對 (gumD1F/gumD1R) 進行 RT-PCR 偵測到 *gumD* mRNA 表現，36 小時後，以專一性引子對 (HpaF-f/r) 確認病原菌種，顯示以 mRNA 作為檢定標的可以確認菌體活性，並可加速種子病原菌檢定的時效性 (圖 3-14)。

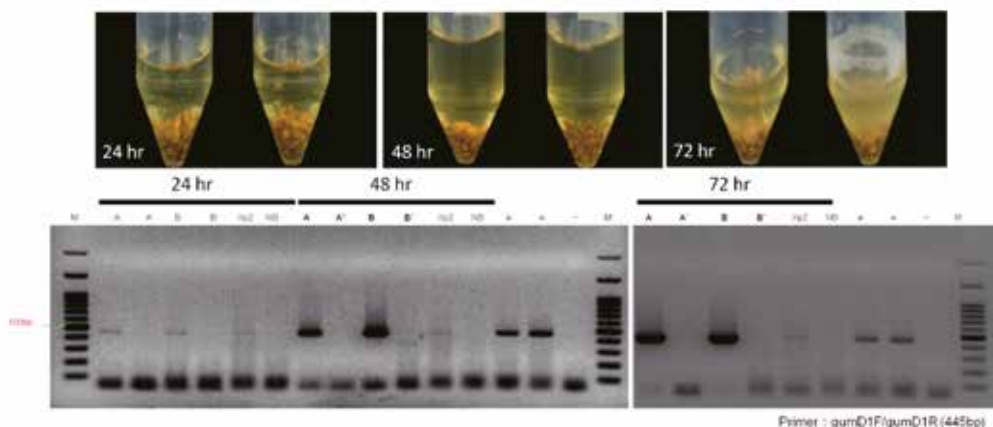


圖 3-14、以 RT-PCR 檢測人工污染 *X. perforans* 番茄種子浸泡液之電泳圖譜

十五 番茄細菌性斑點病分子標誌建立與應用

周明燕、陳哲仁、邱燕欣

番茄細菌性斑點病由 *Xanthomonas* spp. 所引起，當氣溫在 27~30°C、相對濕度 80% 的高溫高濕環境下最適合發病，露天栽培田區容易出現病害。近年來，在設施栽培下也陸續出現感染危害，並逐漸加劇，嚴重時影響產品品質及產量。本研究收集到抗感病材料 13 筆，經接種 *X. euvesicatoria* (race T1)、*X. vesicatoria* (race T2)、*X. perforans* (race T3、T4) 測驗，Hawaii7996、

PI1144990-1 對 T3、T4 生理小種有最高抗性；瑞成 634 及瑞成 528 對 T1 生理小種有最高抗性；PI126933 對 T2 生理小種有最高抗性(表 3-10)。29 組文獻標記測試多型性，僅有 SL10737i、LEOH23-3、RX3-L1、C2-At5g62390、SSR383、SSR63 等 6 組引子組能增幅出多型性，除 RX3-L1 對應到 T1/Rx-3 基因外，其於 5 組標誌都對應到 T3、T4/QTL。進一步使用經確效之抗感病材料測試，6 組文獻標誌對該批材料皆無法呈現規律、穩定之多型性，無法直接運用於輔助抗病育種上。

表 3-10、番茄材料接種三個細菌性斑點病原菌，測試抗感病材料對不同菌系之抗性表現

品種	<i>X. perforans</i> races T3, T4 T5	<i>X.euvesicatoria</i> race T1	<i>X. vesicatoria</i> race T2
H7996 A3	5+*		
PI114490-1	5+		
PI114490-2	3+/3-		
H7981	3+		
PI128216	2+		
PI126933			5+
瑞成 222	5+	3-	5-
瑞成 532	3+		
瑞成 630	3-		
瑞成 634		5+	
瑞成 528		5+	
T103002379			5+
T102002840		5-	5-
青線	5-	5-	5-

* + 表示抗性，數字越大抗性越高；- 表示感病，數字越大表示越感病

十六 番茄第 12 號染色體細菌性青枯病抗病基因分子標誌開發研究

周明燕、陳哲仁、周佳霖、邱燕欣

番茄青枯病 (Bacterial wilt) 由病原菌 *Ralstonia solanacearum* 所引起，寄主範圍廣，其中茄科植物受害最嚴重。由於病原菌可隨病株殘體在土壤中越冬，並可在土壤中存活 1-6 年，是目前危害番茄最嚴重的土傳性病害。育成抗病品種是根本解決番茄細菌青枯病的最有效策略。前人研究指出在番茄第 3、4、6、7、8、10、12 號染色體皆存在與青枯病抗性相關的數量性狀位點。因青枯病抗病性屬於數量性狀 (Quantitative Trait, QT) 基因控制，抗病品種需堆疊較多抗病基因方能獲得較佳抗病效果。綜合前人研究顯示，青枯病抗病基因以第 6 號及第 12 號染色體的抗病基因效

力最明顯。已知第 12 號染色體的抗性基因與 *race1/* 第一演化型 (Phylotypes I) 青枯病菌株有關；第 6 號染色體的抗性基因則與 *race1/* 第一型及 *race3/* 第二型的青枯病菌株有關。本研究應用定向誘導基因組局部突變技術 (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes, TILLING)，針對番茄第 12 號染色體目標區段進行差異序列探勘，開發出 4 個插入和缺失序列 (Insertion or Deletion, InDel) 標誌及 6 個單一核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 標誌 (圖 3-15)，並以 193 個樣品進行標誌驗證，從結果顯示新開發標誌 TM12-1107 及 TM12-2#49 與抗性關連程度皆高於其它文獻 SSR 標誌 (圖 3-16)，且基因型更容易判讀，可以協助育種者進行雜交後裔早期青枯病抗性篩選，提升育種效率。

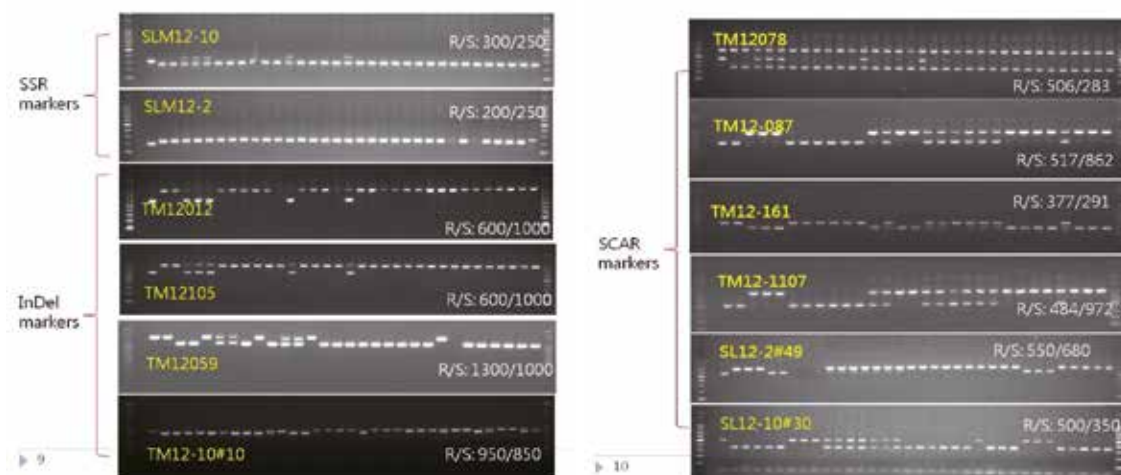


圖 3-15、應用 TILLING 技術在目標區段探勘 SNP，發現 4 組 InDel 標誌 TM12012、TM12105、TM12059 及開發篩選出 6 組 SCAR 標誌，利用不同來源材料測試引子穩定性，皆能穩定增幅出抗感病條帶。

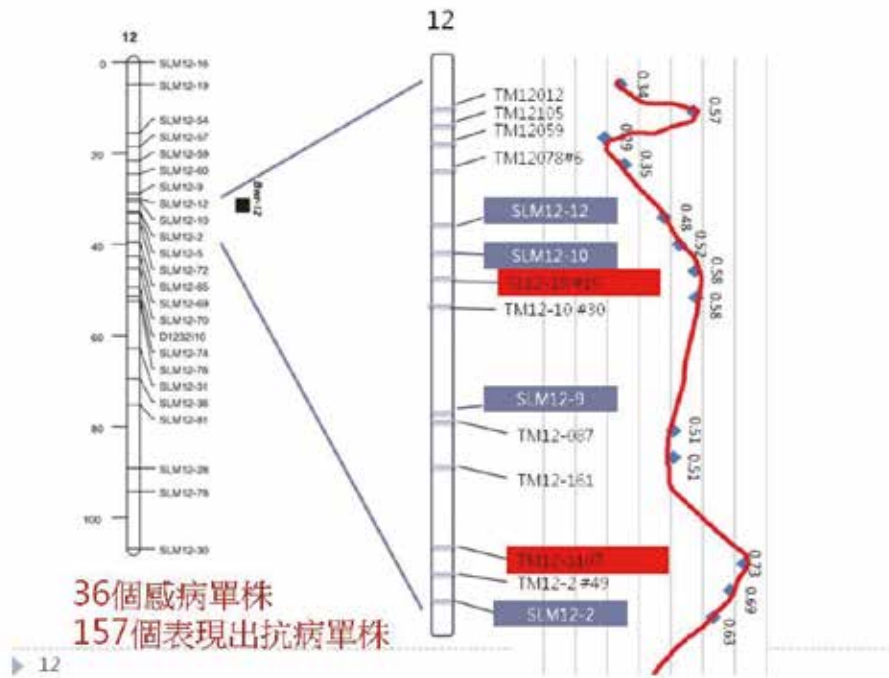


圖 3-16、新開發的番茄青枯病 Bwr-12 抗性基因分子標誌以 NCBI 資料庫 GeneBank HG975224.1 序列為模板，標定相關位置。使用 36 個感病單株及 157 個無發病單株測試基因型與表現型一致率，以編號 TM12-1107 標誌有最高之一致率，可取代原有文獻引子運用於番茄青枯病材料抗性篩選。

十七 蔬菜育苗作業及環境管理智慧聯網建構

薛佑光、張勝智

目前國內專業蔬菜穴盤育苗生產設施只具簡易防雨與通風等功能，仍須使用大量的人工與經驗豐富的管理人員進行育苗的日常栽培管理。而且，許多中大型育苗場因土地取得不易，生產場域分散不同地點，地區微氣候、溫室型態、育苗種類不同，因地點的距離因素無法做到即時性精確化管理。因此，以建構 ICT 智能育苗平台為目標，整合與優化種苗生產，藉由巨量數據庫 (Big data)

之建置，包括建立蔬菜作物育苗生育生理參數、環境條件參數等資料庫，建構周年育苗栽培曆及育苗排程，以減輕育苗者的管理負擔，提高種苗產銷作業效能。

本年度盤點合興育苗場新建育苗設施 700 坪環控及遠端監測系統需求與規劃，作為導入育苗溫室氣象監測系統，與內循環風扇系統、外側牆塑膠布捲揚系統及分區控制之內遮陰系統等環控系統之依據，並由農試所先建置遠端監測系統。

智慧農業種苗產業計畫團隊中，本場負責甘藍與花椰菜周年育苗生育生理

參數之建立，已依照共同調查標準作業流程，選定最常栽培的甘藍（初秋品種）及花椰菜（45 天品種）2 個品種進行穴盤育苗試驗調查，冬季花椰菜則以 65 天青骨白花椰菜品種為育苗試驗品種。本年度於本場自動化溫室及塑膠布遮雨網室 2 種育苗環境下完成周年共 8 期十字

花科蔬菜甘藍與花椰菜育苗生育調查，以及生理參數資料庫建立。未來與育苗環控溫室環境資料庫數據比對分析，可追溯溫網室條件對蔬菜育苗生長之影響，提供育苗期之環控數值調整與栽培模式之修正。



圖 3-17、合興育苗場溫室環控系統調查盤點

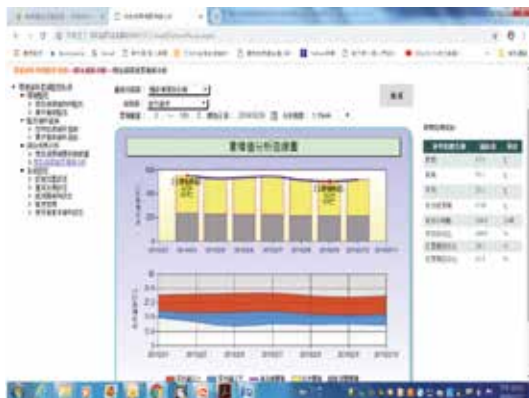


圖 3-18、環控系統微氣候環境累積值分析功能



圖 3-19、甘藍育苗不同溫網室生育情形



圖 3-20、花椰菜育苗不同溫網室生育情形

十八 甜瓜抗 potyvirus 病毒群 CRISPR/Cas9 技術開發

林如玲、陳哲仁、張惠如、鍾文全

甜瓜栽培容易受到馬鈴薯 Y 病毒屬 (Potyvirus) 之侵害，使植株生長受阻，造成產量及品質下降。抗病育種為防治病毒病最有效的方法，但因栽培種甜瓜缺乏適當抗病種原，無法藉由傳統雜交育種取得抗病品系。相關研究指出植物真核轉譯起始因子 eIF4E 參與調介植物病毒入侵宿主的複製過程，利用 RNA 干擾技術使甜瓜 eIF4E 基因靜默，可對多種植物病毒產生廣泛抗性。近期 CRISPR/Cas9 技術已日臻成熟，提供

了對植物本身基因組特定序列進行編輯的工具，能達到對作物獲得新性狀的目的。本計畫利用 CRISPR/Cas9 技術，希望造成甜瓜 eIF4E 基因序列的缺失或插入，進而產生病毒抗性。107 年度設計了 sgRNA 和 Cas9 表現載體，利用原生質體於 PEG 處理下將表現載體導入植物細胞 (圖 3-21)，於轉殖後進行單一原生質體分離及基因多型性分析 (圖 3-22)，挑選可能的突變標的，目前已完成其中 1 個可能突變標的 eIF4E 基因選殖及定序，發現在 sgRNA 標的靶位產生了 1 個核苷酸取代的序列差異 (圖 3-23)，本系統的建立將有助於 CRISPR/Cas9 表現載體的先期確效。



圖 3-21、VH-288 子葉原生質體利用 PEG 處理導入表現載體，經 3 日培養後，於顯微鏡下觀察，細胞仍維持完整。



圖 3-22、單一原生質體於轉殖後進行 eIF4E 基因多型性分析，結果顯示 3E 及 4E 細胞株發生 eIF4E 基因序列變異。

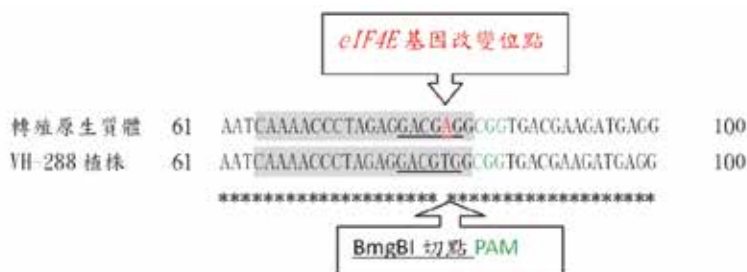


圖 3-23、sgRNA 標的靶位基因確效分析，在 eIF4E 基因外顯子 1 第 81 個位點核苷酸序列發生改變，由 T 變成 A。