

106 年度國際農業科技合作計畫出國研習  
出國報告（出國類別：研習）

重要外銷種子種傳病原檢測技術  
與品保制度交流

服務機關：行政院農業委員會種苗改良繁殖場

姓名職稱：蘇士閔 助理研究員

派赴國家：荷蘭

訓練期間：106 年 07 月 02 日至 07 月 15 日

報告日期：106 年 07 月 28 日

## 公務出國報告摘要

頁數：共 30 頁

報告名稱：重要外銷種子種傳病原檢測技術與品保制度交流

主辦機關：行政院農業委員會種苗改良繁殖場

聯絡人/電話：蘇士閔/ 04-25825488

出國人員：蘇士閔助理研究員

出國類別：研習

出國地區：荷蘭南荷蘭省

出國期間：民國 106 年 07 月 02 日至 07 月 15 日

報告日期：民國 106 年 07 月 28 日

分類/目：F0/綜合（農業類）

關鍵詞：種子健康檢查(seed health testing)、種傳病原(seed-borne pathogen)

摘要：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。

## 目 次 表

| 項次 | 內 容                    | 頁次 |
|----|------------------------|----|
|    | 摘要 -----               | 1  |
|    | 目次表 -----              | 2  |
| 壹、 | 目的 -----               | 3  |
| 貳、 | 研習內容 -----             | 5  |
| 參、 | 研習紀錄與心得 -----          | 6  |
|    | 一、關於 Naktuinbouw ----- | 6  |
|    | 二、植物病原檢測 -----         | 9  |
|    | 三、種子品質檢查 -----         | 23 |
| 肆、 | 檢討與建議 -----            | 26 |
|    | 一、提升實驗室管理 -----        | 26 |
|    | 二、檢查技術改進 -----         | 27 |
|    | 三、實驗室整合 -----          | 28 |
|    | 四、未來業務或研究方向規劃 -----    | 29 |
| 伍、 | 附件：研習相關資料              |    |

## 壹、目的

近年來因全球種子貿易日趨頻繁，種傳病害也越來越受重視。除國家檢疫的病原生物外，因種傳病害造成作物損失的病原項目也備受關注，從ISTA的種子健康檢查之病原種類逐年增加也可見其端倪。因此本場在以引領種苗產業發展為己任之願景目標下，已訂定種子種苗之病原檢測工作為最重要任務之一。而在國際種子貿易中檢測方法的可信度與一致性是種子健康檢查結果是否被接受最重要環節。除ISTA與ISHI-Veg公告的檢測方法外，還有許多病原的檢測方法未被全世界統一接受。以瓜類細菌性果斑病(BFB)為例，目前全世界僅美國STA實驗室與荷蘭Naktuinbouw實驗室的檢測結果被較多國家承認；我國屬於BFB之疫區，以往種子公司之瓜類種子外銷時多送往美國STA實驗室進行檢測，唯曠日廢時且所費不貲(BFB檢測收費，不含運費，STA實驗室約 15,000新台幣、Naktuinbouw實驗室約 16,000新台幣)。前幾年台灣種子業者曾有輸日瓜類種子被檢出果斑病菌後遭銷毀蒙受極大損失，因此種子業者積極要求政府建立檢測方法，唯檢測方法同樣必須先取得其他國家的信任才得以行之。為以最有效率的方式獲得能被國際認可之重要種傳病原檢測技術，以協助國內種子出口業者是本次國際合作計畫的最重要目的。

本場自102年起應防檢局委託，在本場TAF實驗室架構下建立一種子病原檢測體系，改善以往防檢局分散委託大學或其他試驗機關之研究室及檢測時程不確定的問題，TAF實驗室架構係在檢測實驗室導入ISO/IEC 17025: 2005的品質管理精神，提升樣品檢測結果的正確性與可追溯性。計畫執行由本場病理研究室與種子健康檢查室建立檢測方法完成檢測方法確效後由生物技術課TAF實驗室進行檢測服務。目前已建立並提供檢測服務的植物病害檢測技術項目包括有：十字花科黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)、瓜類細菌性果斑病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)、胡瓜綠斑嵌紋病毒 (*Cucumber green mottle mosaic virus*)、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*)、番茄嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus*)、十字花科黑

腳病菌 (*Phoma lingam*)、瓜類蔓枯病菌 (*Didymella bryoniae*)、菜豆炭疽病菌 (*Colletotricum lindemuthianum*)、豌豆葉斑病菌 (*Ascochyta pisi*)、菸草嵌紋病毒 (*Tobacco mosaic virus*)、豌豆種媒嵌紋病毒 (*Pea seed-borne mosaic virus*)、南瓜嵌紋病毒 (*Squash mosaic virus*)、馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒 (*Potato spindle tuber viroid*)、番茄黃色矮化類病毒 (*Tomato chlorotic dwarf viroid*)、辣椒小果類病毒 (*Pepper chat fruit viroid*)、番茄頂矮化類病毒 (*Tomato apical stunt viroid*)、番茄類病毒 (*Tomato planta macho viroid*)、金魚藤潛伏類病毒 (*Columnnea latent viroid*) 等。期能透過提供種傳植物病原檢測服務協助國內種子業者種子提升產品出口競爭力。

在前述背景與實務需求下，今(106)年度獲得本會國際處國際農業科技合作計畫經費挹注，讓本場赴荷研習計畫成行。

## 貳、研習內容

一、 研習日期：106年07月02日至07月15日

二、 研習地點：Naktuinbouw, Netherlands（荷蘭園藝植物檢測中心）

三、 研習人員：蘇士閔 助理研究員

四、 研習行程：

| 日期                   | 課程/活動  | 講師   |
|----------------------|--|--|
| 7月3日<br>(Monday)     | ● Naktuinbouw 環境介紹與業務簡介                                | Dr. Marcel Toonen  |
| 7月4日<br>(Tuesday)    | ● 簡介瓜類細菌性果斑病菌與番茄細菌性潰瘍病菌及相關研究方向<br>● 研究部門實驗室與檢測實驗室巡禮    | Dr. Harrie Koenraad<br>Ms. Wendy Roels<br>Ms. Shirley Nieuwenhuize |
| 7月5日<br>(Wednesday)  | ● 瓜類細菌性果斑病菌檢測流程－Sweat box & qPCR                       | Ms. Eva den Dekker<br>Mr. Paulo da Silva Ribeiro                   |
| 7月6日<br>(Thursday)   | ● 參觀 NAK laboratory<br>● 荷蘭馬鈴薯種薯生產驗證體系介紹               | Ms. Linda Smits<br>Mr. Ir. Henk van de Haar                        |
| 7月7日<br>(Friday)     | ● 番茄細菌性潰瘍病菌檢測流程－半選擇性培養基<br>● 種子品質檢查與線蟲檢查介紹             | Mr. Paulo da Silva Ribeiro   |
| 7月10日<br>(Monday)    | ● <i>Fusarium oxysporum</i> 等病原真菌檢測及相關研究<br>● 植物病原細菌檢測 | Dr. Harrie Koenraad<br>Mr. Paulo da Silva Ribeiro                  |
| 7月11日<br>(Tuesday)   | ● 番茄種帶細菌性潰瘍病菌、葉斑病菌與斑點病菌之檢測－培養基塗佈                       | Ms. Eva den Dekker   |
| 7月12日<br>(Wednesday) | ● 種傳真菌檢測方法與問題討論<br>● 種傳病毒／類病毒檢測技術討論                    | Mr. ing Marco Hofman   |
| 7月13日<br>(Thursday)  | ● 觀賞植物類病毒病害介紹<br>● 研習結束                                | Dr. Ellis Meekes   |
| 7月14日<br>(Friday)    | ● 賦歸   |  |

## 參、研習紀錄與心得

### 一、 關於 Naktuinbouw

抵達 Naktuinbouw 當日下午，由統管檢測實驗室工作之 Dr. Marcel Toonen 簡介 Naktuinbouw 的歷史演進與業務內容。Naktuinbouw 係荷蘭文 Nederlandse Algemene Kwaliteitsdienst Tuinbouw 之縮寫，是一負有公共責任的非營利組織，其願景寄於「全世界園藝生產的專業栽培者或貿易商，都能夠擁有適合的品種及其健康、可靠的繁殖材料」。



圖一、Naktuinbouw 正門景色。



圖二、Naktuinbouw 招牌。

Naktuinbouw 負責荷蘭國內園藝作物種子種苗及其植物病害檢測與診斷等相關事務，接受國內及國際上多個單位監督，包含有歐盟、荷蘭經濟事務部、荷蘭植物保護機關等。Naktuinbouw 整個機構及其檢測實驗室獲有 ISO 9001、ISO/IEC 17020: 1998、ISO/IEC 17025: 2005、CPVO entrustment 與 ISTA 多項認證。Naktuinbouw 「檢測實驗室」業務範圍含括品種純度、種子品質、種子健康、檢疫檢測、病害診斷等，服務對象為全世界的種子種苗業者、農民與荷蘭國家檢疫機關。在植物病原檢測方面包含有：(1)種子健康檢查－針對種子攜帶之病原真菌、細菌、線蟲、病毒與類病毒；(2)病害診斷服務－檢測病害植體樣本與土壤樣本也能派專家外出進行田間診斷。Naktuinbouw 每年的檢測案件數約在 27~35 萬件不等。除檢測工作外，Naktuinbouw 也設有研究發展部門，進行各類檢測技術之研究。Naktuinbouw 長期與全世界公、私立之種子研究單位或植物保護機構維持合作關係，提供或協助各種檢測技術的教育訓練，推動檢測方法國際標準化不遺餘力，已成為全世界最權威的種子種苗檢測實驗室。



圖三、Naktuinbouw 擁有 ISTA 等多項認證。

溫室建造與管理系統一向是荷蘭強項，在 Naktuinbouw（總部）約 40 公頃的土地上，除設置小面積的露天試驗田區外，絕大部分是溫室建築，且大多是



配備控制系統的精密溫室，能精準掌控水分、肥料與藥劑的供給，並配合不同作物或用途進行溫室管理；也因為土地與溫室成本高，栽培上幾乎都縮小株距、採密集種植，然後充分運用管理技術與控制系統精準地進行培育。



圖四、Naktuinbouw 品種檢定中心與溫室群。



圖五、Naktuinbouw 溫室群。

## 二、 植物病原檢測

Dr. Harrie Koenraadt 是 Naktuinbouw 的資深植物病理學家，隸屬於研究發展部門。Dr. Koenraadt 畢業於瓦赫寧恩大學研究所，後負笈美國密西根州立大學取得博士學位，專長是病毒與分子生物技術，曾待過先正達公司負責研發工作，後來進入 Naktuinbouw 專責種子病理學與種子健康檢查技術研發，發表著作豐碩。Dr. Koenraadt 目前也擔任 ISTA 種子健康檢查委員會委員，時常協助 ISTA 主辦實驗室間的能力測試或擔任研習課程講師。筆者本次在 Naktuinbouw 時關於種子病原檢測技術之理論內容或討論均是由 Dr. Koenraadt 負責。

初次見面自我介紹後，筆者便提起 2015 年底曾電郵徵詢 Dr. Koenraadt 同意本場種子檢查室（以下簡稱種檢室）加入當年度的 CGMMV 與 SqMV 的能力測試，於是話題就直接從該次能力測試切入；因為種檢室這次能力測試成績僅獲得 BMP，筆者一直耿耿於懷，便討論到原因可能包含種子研磨方法與顆粒粗細、儀器廠牌及抗血清廠牌選擇等。Dr. Koenraadt 認為，抗血清品質應是最重要的關鍵點，雖然種檢室用的也是大品牌(Agdia)，但這兩年來該廠牌的品質表現似有所差異，Dr. Koenraadt 也提供了他們所用抗血清廠牌(Prime diagnostics)供筆者參考。Dr. Koenraadt 甚至拿出綜合結果報告與筆者討論。令人稍稍寬慰的，本次能力測試參試的 21 個實驗室中，在 CGMMV 項目只有 3 個實驗室成績為 A，其餘均為 BMP，在 SqMV 項目則有近 2/3 實驗室成績為 BMP。但為求檢測品質良好，Dr. Koenraadt 勉勵筆者可以適度調整使用材料後再進行測試。雖然不同廠牌或型號儀器會影響檢查結果，但目前能力測試採用參考物質當作大家共同的標準，應仍是一可接受的作法。

在植物病原細菌－瓜類細菌性果斑病菌（*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, Aac）與番茄細菌性潰瘍病菌（*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Cmm）之相關研究方面，Dr. Koenraadt 介紹了二種病原細菌相關背景與 Naktuinbouw 目前使用的檢測方法（Sweat box, medium and Taqman PCR for Aac; medium & Taqman PCR for Cmm）（詳細流程參閱附件內容）後，討論到目前國際上有公

開的一些方法，例如針對 Aac 檢測，美國防疫機關(APHIS)所建立的 NSHS (National Seed Health System)裡的部分方法目前已沒有在使用，日本 NCSS 開發的 Sweat bag & LAMP PCR 則受限於專利保護未公開而不易推廣，至於其他甫經文獻報導的技術，如 PMA-qPCR 與 enrichment PCR，未來經過進一步確效後，可望應用於 Aac 檢測上。至於未來 ISTA 是否會公告 Aac 的檢測方法，目前尚在討論中，因此可先以 EPPO 2016 pm7/127(1)文件為參考標準建立檢測流程。在 Aac 檢測技術細節上，Dr. Koenraad 提醒，加入 *Acidovorax cattleyae* (Acat) 菌株作為 Internal control 是相當重要的關鍵點之一。在 Cmm 檢測方面，Dr. Koenraad 建議筆者可先參考 EPPO 2016 PM 7/42(3)與 ISF ISHI-veg 的文件。在檢測細節上，因為 Cmm 培養時容易變異而且長很慢（約需 4-5 天），所以在培養基上比較菌落形態相當重要，也因此雖然 Cmm 在台灣沒有發生且是重要檢疫病原，但還是建議應引進菌株作為對照用，如果只進行 PCR 檢測並僅用 Cmm 的 DNA 當對照組，則無法進行形態鑑別步驟。Dr. Koenraad 還推薦美國植物病理學會 (American Phytopathology Society, APS)新出版的 Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material (2nd Edition) 給筆者，其內容相當豐富詳盡，可作為種傳病原檢測的標準參考書。



圖六、Naktuinbouw 檢測瓜類細菌性果斑病菌之 sweat box 方法。



圖七、瓜類細菌性果斑病發病造成缺株。



圖八、疑似發病之植株需取樣進行後續確認。



圖九、高濕環境下常見葉片水浸狀黃化之非果斑病徵



圖十、高濕環境下常見真菌感染之非果斑病徵。

在 Aac 檢測的實務操作，本次有實際參與他們進行 sweat box 檢定過程。sweat box 係在強化的塑膠箱中放入厚厚一層泥炭土再撒播上定量（約 500 顆須視種子大小調整）種子後置入生長箱培養。檢查時需戴手套，同一案件的樣品看完後欲檢視其他案件樣品時，務必更換手套並注意使用器具的消毒；先檢視上方葉片是否有明顯病徵，然後再以手或鑷子撥開植株觀察莖或子葉有無病徵，發現疑似病徵時要取出病株放入取樣袋中並給予編號及記錄；有發現到可疑病株的箱子檢查完即可丟棄於指定廢棄物桶中，未發現可疑病株的箱子還需待第二位檢查人員檢視確認無誤後方可丟棄。同一天進行檢測的所有案件會加入共同參考的負對照與正對照組各一箱，負對照組使用經檢測確認無 Aac 污染的種子，正對照組同樣先放入無 Aac 污染的種子，再分散放入 5~6 顆自然帶菌的種子。在檢查完所有案件的樣品後，才先取樣負對照組中的未發病植株，最後才打開正對照組的箱子並取出發病植株，所有樣品帶回實驗室後再加入其他對照用的 Aac 與 Acat 菌株及 Aac 的 DNA 以備進行 multiplex qPCR。本次進行 sweat box 檢定所發現的疑似罹病植株中，部分植株經 Multiplex qPCR 確認為陽性反應，即帶有 Aac。因此再取出保存的樣品汁液，以滅菌牙籤沾取後，穿刺接種於第 2 片真葉初萌的感病香瓜與西瓜幼苗頂梢上，以確認其病原性，約 4-5 天後觀察

幼苗發病情形。指導人員解釋說這個動作並不是每次都需要做，而且實際測到帶菌種子樣品的比例並不高。



圖十一、將分離到的細菌性果斑病菌接種到感病的甜瓜與西瓜幼苗上進行病原性測定。

在以浸泡方式進行種子病原萃取時，為能有效取得存活於種子內部的病原，如十字花科種子，會在萃取液浸泡 3.5 小時後，先取定量萃取液一次（萃取污染種子表面病原），然後以均質機打碎後再取一次（萃取種子內部的病原）然後再進行後續步驟。

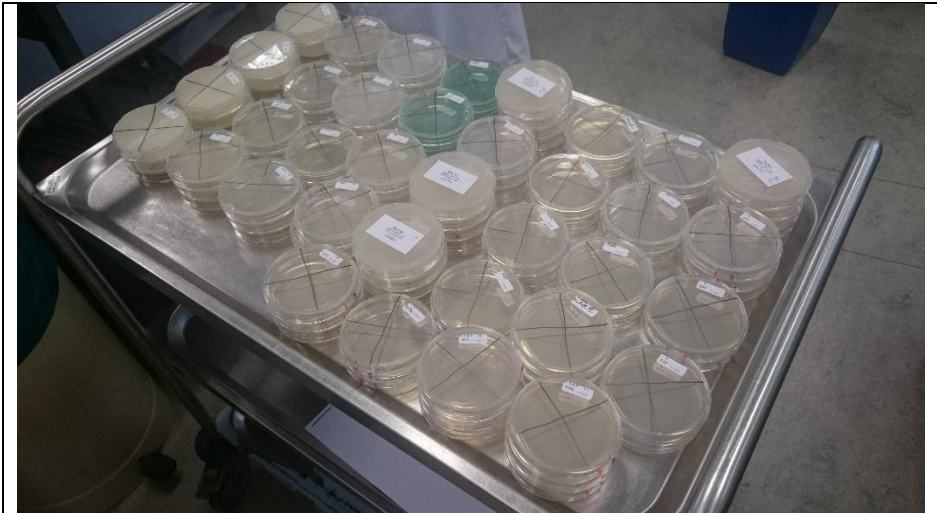
在 Cmm 的實務操作方面，主要進行的是番茄種子上的病原細菌萃取與（半）選擇性培養基塗布（詳細內容參閱附件），同時一起檢測的番茄病原細菌還有葉斑病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, Pst)與斑點病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, Xcv (此以舊學名稱之，本菌已分成 4 個種))。番茄種子是用鐵胃均質機(Stomacher blender)進行病原菌萃取，種子浸泡於定量緩衝液 14 小時後，放入鐵胃均質機拍打 4 分鐘（Naktuinbouw 用的速度為第 4 級需視機器不同而調整），然後進行第一次離心後留下上清液 50ml，再進行第二次離心；離心完成後緩緩倒掉上清液留下少量液體與沈澱物，再經震盪混合後即為樣品萃取原液。將萃取原液序列稀釋 10 倍與 100 倍然後塗布於各病原菌的（半）選擇性培養基。Cmm 用的培養基是 CMMIT 與 SCMF 兩種半選擇性培養基；Pst 用的是 KBBC 與 KBZ 兩種半選擇性培養基；Xcv 則是用 mMXV 與 mTMB 兩種半選擇性培養基。各培養基原液 2 皿、10 倍稀釋液 1 皿、100 倍稀釋液 1 皿，接著準備所有的對照組處理。負對照組是將稀釋用的緩衝液進行同樣的序列稀釋後塗布到所有的半選擇性培養基上；Cmm 的對照組中，有一個別的負對照，是在緩衝液中加入 0.1 ml 的 Cmm spike (20-100 CFU/0.1ml)，然後在樣品原液中同樣加入 0.1 ml 的 Cmm spike (20-100 CFU/0.1ml)，塗布於 CMMIT 與 SCMF 兩種半選擇性培養基，另外再取另一種培養形態有顯著差異的 *C. m.* subsp. *tessellarius* (Cmtes)一樣進行 spike-in 後，塗布於 CMMIT 與 SCMF，同時取三個不同的 Cmm 菌株，以竹籤刮取菌泥後，放入緩衝液中製成懸浮液，進行序列稀釋成  $10^1$  至  $10^7$  倍懸浮液，取  $10^6$  與  $10^7$  倍懸浮液塗布至 CMMIT 與 SCMF。PST 的正對照組取一個菌株、Xcv 正對照組取四個菌株（分屬四個不同種），依 Cmm 菌株作法塗布至各別半選擇性培養基與 KB 上，然後送進 26~28C、無光照下培養。培養 10 天後即可進行菌落形態觀察與判斷可疑菌落。Cmm 在 CMMIT 上會呈現黃色、黏稠、突起的菌落，當培養時間拉長，菌落顏色會較深黃，隨著菌落變大形狀也會變得不規則；在 SCMF 上，Cmm 會有點半透明、灰色、黏稠，形狀不規則，菌落中心會出現程度不一的灰至近黑色色素，因此培養基上的菌落形態

觀察需要有相當的經驗以作研判，初接觸的人員最好只要有疑似的菌落就都挑出來進行後續的步驟（YDC 培養基與 PCR），以資確認；判斷過程中也不要僅依賴視覺觀察，可以更審慎地用移殖環等工具去輕刮菌落，或是聞一下味道等，都有助於判斷。在 Naktuinbouw 實驗室，固定每隔一週就會更新一次所有可以接受檢測的細菌菌株到會使用到的各種培養基上，且都有不同的序列稀釋倍數，如果有案件時隨時即有正對照的菌落可供參照。記錄時，會記下每個培養皿的全菌落數（約略計算，無法計算時以數學符號“無限大”表示），與要挑出的可疑菌落種類數並給予編號，全部調查完後需再確認 spike-in 的培養皿上的菌落呈現並記錄。未觀察到可疑菌落的培養皿需再經第二位操作人員檢視確認，案件即可簽名結案。

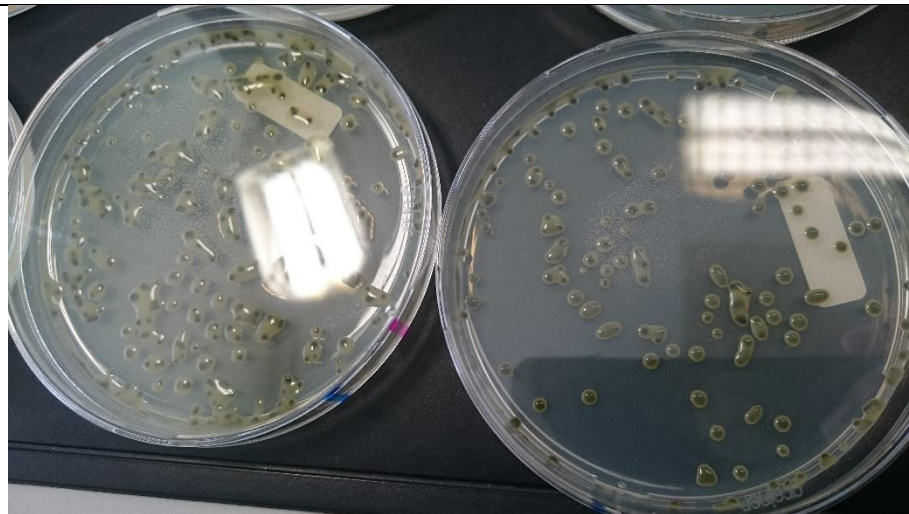


圖十二、番茄種子用鐵胃均質機(Stomacher blender)進行病原菌萃取。

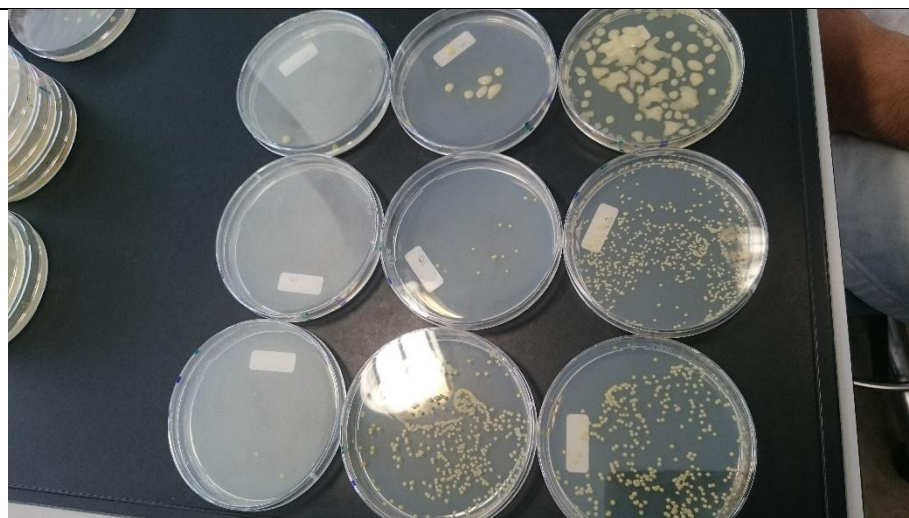




圖十三、病原細菌檢測時的各種半選擇性培養基。



圖十四、番茄細菌性潰瘍病菌在 SCMF 培養基上的菌落形態。



圖十五、番茄細菌性潰瘍病菌在 CMMIT 培養基上的菌落形態。

Naktuinbouw 在真菌檢測方面是以培養與形態觀察為主，Dr. Koenraadt 認為可能還要十年左右才能漸漸將分生技術導入真菌檢測實務工作上。目前 Dr. Koenraadt 在 *Fusarium* 方面的研究主要是蘆筍病害，因為蘆筍是荷蘭相當重要的蔬菜作物，為加速接種至發病的時間，比較試管法（in vitro，種植於培養基中再以孢子接種）與傳統方法（in vivo，種植於土壤中再澆灌孢子懸浮液）進行測試不同菌株之病原性，結果發現，部分菌株在試管法中會感染蘆筍幼苗並於根部產生壞疽病徵，但是在傳統方法中則不會，經確認試管法可能導致偽陽性。此外，Dr. Koenraadt 與荷蘭法賀寧恩大學等機關合作正在開發應用 Taqman PCR 技術於 *Fusarium oxysporum* 不同分化型之檢測，也同時蒐集 *Fusarium oxysporum* 不同分化型菌株進行親緣關係探討，目標之一是甜瓜萎凋病菌（*F. o. f. sp. melonis*）的 Taqman PCR 技術建立，在本項技術研究過程中 Dr. Koenraadt 有參考中興大學土環系黃政華老師的文獻，另外與筆者研究計畫有合作關係的屏科大植醫系林盈宏博士亦是 *Fusarium oxysporum* 檢測技術的專家，因此筆者與 Dr. Koenraadt 有談及如有我方提供協助之處，筆者會勉力達成。筆者另有提出關於部分種子萃取時可能會受種子內含物影響而無法有效檢測目標病原 Dr. Koenraadt 表示如擔心種子內成分對萃取的影響，利用 Internal control 如 28s rDNA 來確認即可，Dr. Koenraadt 也建議可逐步採用 Taqman PCR 在專一性表現上會比用傳統 PCR 好，可以改善檢測效能。真菌檢測工作方面，負責執行的檢測人員共有 5 人，為熟悉所有提供檢測服務的真菌種類，真菌人員的訓練時間需要 2 年；目前檢測的真菌種類有 32 種，除種子外也接受植株與土壤的樣品，檢查方法以培養基與濾紙法為主，雖然部分真菌種類可以 PCR 檢測，但申請案件較少。在鐮孢菌屬(*Fusarium spp.*)的檢測上，主要以培養基（PDA with ox gall，溫度 24-28 °C，黑暗 12h、近紫外光(NUV)照光 12h）為主，如發現可疑菌落會移植到可促進產胞的 SNA 培養基（synthetic nutrient agar medium，溫度 20 °C(低溫逆境)，黑暗 12h、近紫外光(NUV)照光 12h）上，待檢查產胞結構與孢子形態以做確認。雖然 Naktuinbouw 接受鐮孢菌的 PCR 檢測申請，但是最多只判定到

種 (species)，如 *F. oxysporum*、*F. foetens*。檢測種傳真菌，有時會需要抑制種子發芽，但有時則希望讓種子發芽長出小苗以能更清楚地做判斷，因為部分真菌會隨幼苗生長而感染幼苗的莖或是子葉，所以如果需要種子發芽的檢測項目，執行要注意該種子是否有休眠現象，若種子會休眠則需先採低溫或其他方式打破休眠。



圖十六、Naktuinbouw 真菌檢測以培養與形態觀察為主。



圖十七、*Fusarium* spp.引起的蘆筍病害是 Dr. Koenraadt 目前研究主題之一。

四年前，澳洲在台灣出口的番茄種子上檢測出類病毒（viroid）後，類病毒的問題即開始受到國際多個實驗室的重視，Dr. Koenraad 也是從那時開始進行相關研究及開發檢測方法。目前 ISF 的網站上已公告可參考的類病毒檢測方法可供下載。Dr. Koenraad 與合作夥伴的近期研究結果發現，檢測 24 年前的多批番茄種子樣品，可發現即有類病毒存在，其中來自台灣的種子批佔了大多數，但是他們在來自荷蘭、美國、坦桑尼亞、日本等各洲國家的種子批中也都發現早有類病毒存在；不過在類病毒污染種子所發芽的幼苗上，都沒測到過類病毒。所以，對於種子是否為類病毒的傳播途徑，仍有待進一步研究方能確認。針對檢測流程的細節，本場邱助研員燕欣詢問其 RNA 萃取方式。Dr. Koenraad 回應，Naktuinbouw 在檢查類病毒的流程中，RNA 萃取是用全自動核酸萃取儀進行，萃取出來的 RNA 不另外做核酸品質確認，而是在抽出的 RNA 懸浮液中 spike-in 已知濃度的類病毒（如 DLVd）懸浮液。



圖十八、病毒檢測前進行種子研磨的乾式研磨機。



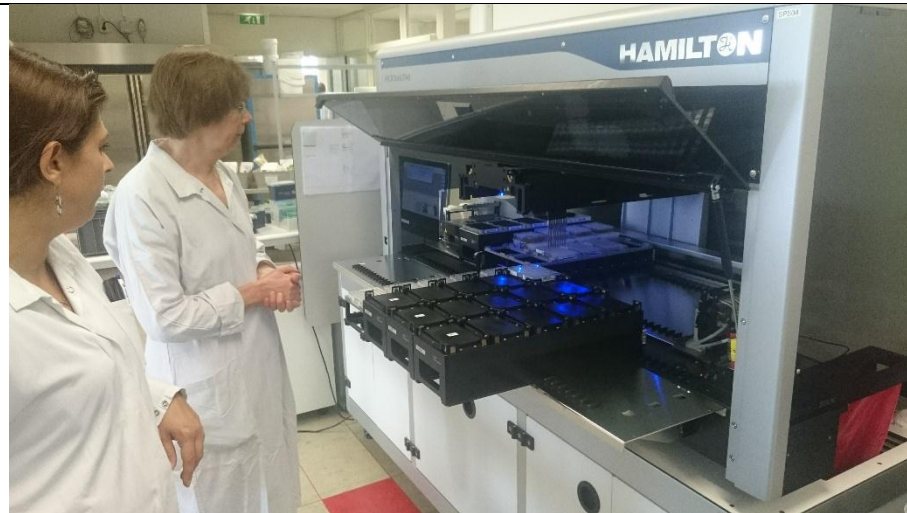
圖十九、病毒檢測前進行植體葉片研磨的捶打型機器，使用時要戴耳機以保護聽力。



圖二十、病毒檢測前進行植體葉片研磨。



圖二十一、病毒檢測前除直接研磨種子外，也可以先用紙間法讓種子發芽後再進行檢測。



圖二十二、病毒檢測時進行 ELISA 分析的自動化機器。

除種子健康檢查外，Naktuinbouw 研發部門的 Dr. Ellis Meekes 是研究觀賞植物病害的專家，專長在由病原細菌與病毒或類病毒引起的觀賞植物病害。本次研習的最後一天，安排 Dr. Meekes 向筆者介紹由類病毒引起的病害。目前常見危害觀賞植物的類病毒主要有 Avsunviroidae 與 Pospiviroidae。其中 Pospiviroidae 的寄主範圍廣，目前常見感染馬鈴薯、番茄等茄科作物，但是茄科外的多種植物也都有被感染的可能，有時候被感染者並沒有病徵顯現。Dr. Meekes 研究結果發現，PSTVd 在很多國家的觀賞植物上都存在，包含如日本、義大利等。因

此針對這類新病原的檢測技術開發相當重要，但因類病毒沒有蛋白質外鞘，所以無法利用 ELISA 等血清學的方法進行檢測，以前主要是用 R-PAGE 進行檢測，但是其具有無法偵測低濃度類病毒等缺點，目前則以 RT-PCR 為主要檢測方法。Naktuinbouw 已經開發出 Taqman RT-PCR 的檢測技術，可以在觀賞植物的葉片（新葉）或組織培養苗等樣品進行偵測。在建立檢測技術時有相當多需考慮到方法的 repeatability、reproducibility、specificity、sensitivity、robustness 等重點，如萃取類病毒用的 kit、進行 RT 的 kit 等（例如 Dr. Meekes 有測試 RNA-to-Ct 與 Ultrplex 兩種），都必須測試其效果；操作時也要注意污染，因為類病毒的結構很穩定，只要碰過帶有類病毒的樣品，就容易污染到其他樣品或對照組，因此勤換手套很重要；有些植物葉片萃取物有可能影響 PCR 結果；而這些問題可以透過 real-time RT-PCR 的 Ct 值呈現，同時也要特別注意曲線的變化。Dr. Meekes 還有帶領筆者參觀病毒株的保存溫室，蒐集到的病毒株透過存活於寄主植物體內的保存，可以用作試驗時的正對照組。而在溫室的管理措施上除用化學藥劑防治大部分的病害與蟲害外，也配合使用 Bioline 等天敵產品防治薊馬避免過量施藥造成對寄主植物的危害。



圖二十三、Naktuinbouw 的病毒株保存溫室。

### 三、 種子品質檢查

Naktuinbouw 種子品質檢查項目包含有水分測定、潔淨度分析、發芽試驗與 TTC 染色活力檢測(非 ISTA 認證項目)，與種檢室同樣依循 ISTA 規範進行，然而在執行細節上 Naktuinbouw 有一些做法是值得我們借鏡與學習的。在發芽試驗方面，除了定溫生長箱外，20<->30 °C 變溫環境的設計是，一平臺上注有定溫 30 °C 的水，該空間氣溫則定在 20 °C；執行 20<->30 °C 發芽試驗時，在平臺上放上濾紙，濾紙下方有一吸水紙條以保持濾紙濕潤，然後將種子放在濾紙上，再蓋上透明罩子保濕。使用沙床法時，他們有兩種沙子以配合作物不同使用，棕色的河沙顆粒較大，主要用於豆科種子。TTC 活力檢測進行判斷時，由兩個人同時執行，以減少判斷錯誤機率。執行種子品質檢查的人員約有 11-12 人，內部能力測試的執行每個項目每年進行 12 次。

另外，病原線蟲檢查是由種子品質檢測的人員執行，最主要作物為洋蔥，也接受土壤樣品，平均每天約有 60 個樣品。



圖二十四、Naktuinbouw 進行種子發芽試驗時，20<->30 °C 變溫環使用的平臺。





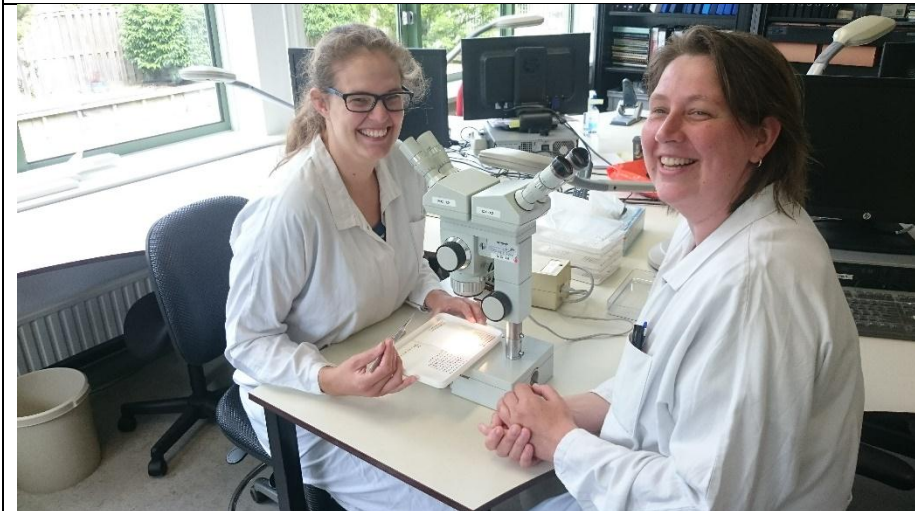
圖二十五、20<->30 °C 發芽試驗平台上，濾紙下方有一吸水紙條以保持濾紙濕潤。



圖二十六、Naktuinbouw 進行種子發芽試驗時，沙床法所使用粒徑較小的白沙。



圖二十七、Naktuinbouw 進行沙床法時，針對豆科種子所使用粒徑較大的棕色河沙。



圖二十八、TTC 活力檢測進行判斷時，由兩個人同時執行，以減少判斷錯誤機率。

## 肆、檢討與建議

### 一、 提升實驗室管理

源自於英文” The devil is in the details.” 的” 魔鬼藏在細節裡” 不只是郭台銘董事長在管理他的超大事業集團的座右銘也該是我們在管理檢測實驗室是應依據的指導原則。雖然在一間種子檢測實驗室裡，人的專業因素很重要，但為了能夠發出一份可信任的報告，整個實驗室的管理仍應如精密機械工廠一般地規劃與執行。在 Naktuinbouw 的實驗室中，每個流程、每個步驟的安排，表格的設計；誰操作那個部分、用了哪台機器、哪一個操作台；只能在哪個隔離場所做反應液的混合；培養基用什麼顏色線條標示，序列稀釋塗布好的培養基順序怎麼放；放培養基鐵架的高度、層板的大小都極為精準地配合工作所需；甚至人員訓練到每個人的做法習慣都趨近一致以避免錯誤。每個細節都幾乎制度化，甚至考量檢測人員每天工作都一樣的話會容易出現疲乏，所以每天每個人被安排工作內容不會一成不變做的步驟會是不一樣的，但是接續流程的人員接下來時卻不會弄錯；每隔一段時間也會將人員輪調到不同的組別，再透過如師徒制般的訓練與考核，讓人員儘速熟悉工作內容。而在需要人為判定的步驟，如 sweat box 方法中判斷幼苗有無發病、培養基上有沒有可疑菌落、TTC 活力檢測染色情形的呈現等，都會由兩個人先後或同時做確認。凡以上所述種種，都需要專業專注地規劃與執行管理才能達成，才能讓所有的過程順暢、快速，檢查過程可追溯，最後送出一份令全世界信服的結果報告。



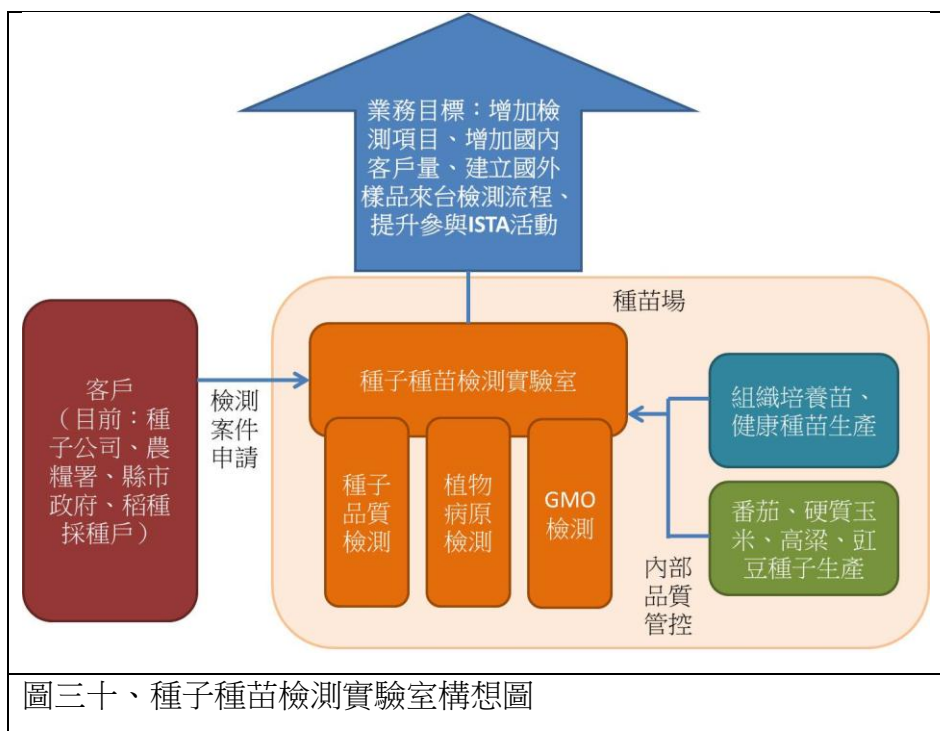
## 二、 檢查技術改進

未來在本場的檢測工作上，首要的應是在提升檢查流程執行的制度化，讓所有的檢查人員與操作方式要趨近一致，減少發生錯誤的機會。在硬體或必要耗材上，則應盡量統一部分關鍵設備，例如 real-time PCR 或 PCR 儀器、ELISA 測定儀、自動核酸萃取儀，以及常用的核酸萃取套組、抗血清等，當然事先的品質測試與確認原不可少，讓設備或耗材一致同樣可以減少出錯機率，或是在出錯時能快速找出問題點。本次研習亦參觀了以馬鈴薯檢測為主（還有檢測少量的穀類或草類種子）的 NAK 實驗室，因與 Naktuinbouw 長期互相合作關係，NAK 實驗室在關鍵步驟也多採用與 Naktuinbouw 同型儀器。所以，如何在現有的法規限制下進行高品質的採購亦是可以努力的重點之一。提升儀器的量能也是未來幾年需再加強的地方，Naktuinbouw 在種子萃取上配合種子與樣品不同使用的機器也不同，例如欲進行病原細菌檢測時，番茄種子用的是小型、拍打式的鐵胃均質機，番椒種子用

的是往復式震盪培養器；進行病毒或類病毒檢測時，瓜類種子用的是乾粉研磨機，如果是葉片可以用捶打式或鑽頭式研磨機。最後則是在操作過程所需要用到的小型器具如萃取種子用的容器菌落移植環或挑針血清瓶等儘量都以一次性使用的器具為原則可避免污染的情況發生。

### 三、 實驗室整合

本場在未來任務、願景與價值的規劃中，檢測檢定是三大任務之一。Naktuinbouw 在現行檢測業務上與本場未來發展重點有極高的相似度，無論是園藝植物品種性狀檢定、種子品質檢查、植物病原檢測。因此筆者建議在同屬實驗室性質的檢測業務上可參考 Naktuinbouw 進行整合將生物技術課 TAF 實驗室種苗經營課種子檢查室繁殖技術課病理研究室整合成一個以實驗室檢測為主的課室其中在細分成種子品質檢測（種子品質檢查不應分部門，所有人員統一進行每日工作分配）、病原檢測、GMO 檢測等部門別，同樣以 ISO 17025 的精神與架構下設置 1-2 名職員主司實驗室管理，讓人員訓練與調配、文件管理等管理工作可在同一課室下進行，避免目前分屬於三個課室的管理困擾，讓人力與設備儀器等資源集中；也透過獨立檢查業務課室協助其他課室在無毒組培苗、健康種苗、玉米高粱等種子生產上進行內控檢測。而在檢測課室的未來業務目標上，則可以著重於增加檢測項目（如增加病原種類、增加植體或土壤樣本之病原檢測申請、增加種子活力檢測等）、增加國內客戶量（可擴展至組培場、育苗場、農民）、建立國外樣品來台檢測流程、提升參與 ISTA 活動等。



圖三十、種子種苗檢測實驗室構想圖

#### 四、 未來業務或研究方向規劃

在 ISTA 公告的病原細菌檢測方法中，近幾年才開始加入傳統 PCR（PCR 與電泳）的使用來加快檢測效率，但那主要是考量部分地區或國家的實驗室可能還無力負擔昂貴的檢測儀器之故。從 Naktuinbouw 在各種病原細菌上的檢測方法來看，主要係以半選擇性培養基搭配 Taqman PCR 為技術內容；就 Dr. Koenraadt 所猜想，未來或有可能以 PMA 或增量培養技術取代半選擇性培養基的使用，但是 Taqman PCR 在實務上應該能維持相當長的一段時間；雖然其儀器與所用探針的成本目前仍略高於其他技術，但是隨著 Taqman PCR 技術漸漸普及，未來成本有望降低，而且其專一性相較於傳統 PCR 或 SYBR Green 系統為高，而且免去電泳分析所需的時間、人力與耗材等成本。本場在病原細菌或病毒檢測工作上，未來或也可逐漸提升為以 Taqman PCR 為主要技術與 Naktuinbouw 等國際級實驗室接軌。

近兩年來，因台灣輸出的番茄種子被國外檢出類病毒的關係，不僅防檢局時時擔心國內的防疫管制措施與國際的檢疫情勢，國外許多實驗室也關注並開始進行相關研究。在這次研習中，從 Dr. Koenraadt 與 Dr. Meekes 提供的資料與訊息可

以發現，類病毒，尤其是目前最受注意的茄科作物類病毒 PSTVd 等幾種，並不是只有在台灣生產（也可能其實只是轉出口）的種子上被發現，在其他國家生產或輸出的種子亦有同樣的類病毒存在，而且並非是近年才開始有種子被類病毒汙染的情形，甚至在許多觀賞植物上也都能測出類病毒。依循這些資訊，或許本場在已建立檢測方法（已知目前農試所、亞蔬也都有建立檢測方法）的基礎下，能著手進行國內作物、觀賞植物或雜草上的類病毒分布調查，同時也可以進一步研究類病毒從種子移動到植株的可能傳播途徑，如有成果將能進一步地作為國內防檢疫工作的基礎。

另外，筆者將會視 Dr. Koenraad 的需求，協助蒐集一些台灣本地、不同分化型的萎凋病菌菌株，再將 DNA 寄過去給他，目前已取得屏科大植醫系林盈宏博士同意提供西瓜蔓割病菌 DNA。

## 伍、附件

| 附件序號 | 附件名稱                                      |
|------|---|
| 附件一、 | Naktuinbouw 簡介                            |
| 附件二、 | Naktuinbouw 實驗室介紹                         |
| 附件三、 | 利用 Taqman PCR 技術進行瓜類細菌性果斑病菌檢測(海報)         |
| 附件四、 | 種帶瓜類細菌性果斑病菌檢測方法                           |
| 附件五、 | 番茄種子上之細菌性潰瘍病菌檢測                           |
| 附件六、 | <i>Fusarium</i> spp.引起之 Asparagus decline |
| 附件七、 | 甜瓜萎凋病菌與西瓜蔓割病菌之檢測分子標記開發                    |
| 附件八、 | 番茄與甜椒種子上之類病毒檢測                            |
| 附件九、 | 荷蘭 NAK 馬鈴薯種薯生產認證規範                        |