

一、前 言

近年來全球種子貿易日趨頻繁，種傳病害越來越受重視。由於許多種傳植物病原菌都屬於重要檢疫有害生物，2017 年國際植物保護公約 (IPPC) 通過國際植物防疫檢疫措施標準 (ISPM) 第 38 號即是以種子為檢疫標的，提供植物種傳有害生物風險評估及管理指引給各國植物保護機關 (National Plant Protection Organization, NPPO) 參考，並要求各會員國儘快執行。

為因應我國蔬菜種子外銷需求，防檢局於 102 年度下半年起委託種苗場擔任專責窗口，依各國檢疫規定與國內業者外銷需求，建立多項種子病原檢測作業流程，並協助進行輸出種子病原檢測，檢測結果加註於輸出植物檢疫證明書。惟業者申請種子出口案件繁多，影響種苗場執行檢疫檢測的效率，迫於實驗室規模無法輕易擴大，可能無法滿足業者需求。經參考部分國家係透過學術界或民間專業機構，如美國愛荷華大學的種子科學中心 (Seed Science Center, SSC)，或是荷蘭的 Naktuinbouw，負責建置種傳病原檢疫檢測標準方法與提供檢測服務，爰規劃前往與我國檢疫檢測架構及檢測環境較為相似的美國，學習及參訪美國國家種子健康體系 (National Seed Health System, NSHS) 架構，研擬我國輸出植物種子檢疫檢測鑑定技術相關規範，規劃建立檢測實驗室系統，以期擴充我國種傳病原檢測單位及量能，有效提升檢疫檢測行政效率。

美方安排在 108 年 10 月 22 日至 24 日間拜訪美國農業部 (USDA) 動植物檢疫署 (APHIS) 植物健康科學與技術中心 (CPHST) 位於馬里蘭州貝爾茨維爾 (Beltsville, Maryland) 的檢測實驗室，研習有關病毒及類病毒等重要種傳病原之檢測技術。該實驗室為 APHIS 美國邊境各機場、港口或陸地檢疫站發現可疑檢疫物時，後送進行病原檢測之國家級實驗室。10 月 25 日前往美國農業部動植物檢疫署總部，瞭解美國農業部及動植物檢疫署現行負責業務，美方另安排 10 月 28 日轉赴愛荷華州立大學種子科學中心 (Seed Science Center, ISU) 研習美國種子健康體系 (NSHS) 管理系

統。該中心為 NSHS 總部，平時接受美國全國各地委託（主要是愛荷華州）進行輸出種子特定病原檢測，並出具檢測報告提供 APHIS 參據加註於美國輸出植物檢疫證明書上，以利種子外銷，另在 10 月 29 日前往美國 NSHS 核可之檢測單位 Corteva 種子公司，瞭解該公司種傳病原檢測實驗室之設置，種傳病原之檢測作業，人員訓練過程，每年自我查核及 NSHS 每三年稽核確認是否符合 NSHS 體系等情形。

二、行程及紀要

日期	地點	主要行程紀要
10月21日(一)	臺灣桃園- 日本東京- 美國馬里蘭 州	桃園國際機場搭乘聯合航空 UA7944 班機前往日本東京成田機場，轉乘聯合航空 UA804 班機前往美國華盛頓特區杜勒斯機場。 入住 Crowne Plaza Greenbelt, Maryland
10月22日(二)	馬里蘭州	前往美國農業部 (USDA) 動植物檢疫署 (APHIS) 植物健康科學與技術中心 (CPHST) Beltsville 實驗室 1. 由實驗室副主任 Dr. Vessela A. Mavrodieva 簡介 CPHST 工作目標、Beltsville 實驗室現有研究工作內容，以及種子種苗病原檢測現況。 2. 由分子生物學家 Dr. Stefano Costanzo 帶領，進行番茄種子類病毒之純化、RNA 品質之確認及自動電泳等技術之研習。 3. 由檢測品質管理師 Miss Nicole O'Donahue 帶領，進行純化後之 RNA 品質之確認，並進行即時定量反轉聚合酵素連鎖反應技術 (Real-time RT-PCR) 之研習。 續住 Crowne Plaza Greenbelt, Maryland
10月23日(三)	馬里蘭州	續前往美國 CPHST Beltsville 實驗室 1. 由檢測品質管理師 Miss Nicole O'Donahue 帶領，進行一般性反轉聚合酵素連鎖反應技術 (Conventional RT-PCR) 及自動電泳等技術之研習。 2. 由分子生物學家 Dr. Stefano Costanzo 及檢測品質管理師 Miss Nicole O'Donahue 帶領，進

		<p>行番茄種子類病毒檢測結果之判讀。</p> <p>3. 參訪 APHIS Beltsville 植物檢疫站。</p> <p>4. 由分子生物學家 Ms. Nora Tsai 帶領參訪 Beltsville 實驗室各實驗室及研習次世代定序 (Next Generation Sequencing) 檢測法。</p> <p>續住 Crowne Plaza Greenbelt, Maryland</p>
10 月 24 日(四)	馬里蘭州	<p>續前往美國 CPHST Beltsville 實驗室</p> <p>1. 由分子生物學家 Ms. Gem Santillana 帶領，進行胡瓜綠斑嵌紋病毒 (Cucumber Green Mottle Mosaic Virus, CGMMV) 純化技術之研習。</p> <p>2. 與分子生物學家 Dr. Avijit Roy 及植物病理學家 Dr. Gang Wei 進行番茄褐色皺紋果病毒 (Tomato brown rugose fruit virus, ToBRFV) 之國際檢測趨勢進行討論。</p> <p>續住 Crowne Plaza Greenbelt, Maryland</p>
10 月 25 日(五)	馬里蘭州	<p>前往美國農業部動植物檢疫署 (APHIS)，由美國在台協會動植物檢疫辦事處 (APHIS office) Mr. Russell T. Caplen 簡介美國農業部及動植物檢疫署植物防疫檢疫組現行任務。</p> <p>續住 Crowne Plaza Greenbelt, Maryland</p>
10 月 26 日(六)	馬里蘭州	資料整理
10 月 27 日(日)	馬里蘭州- 愛荷華州	<p>移動，前往盛頓特區羅納雷根機場轉乘美國航空 AA4380 班機前往愛荷華州得梅茵機場。</p> <p>入住 Radisson Hotel Ames at ISU, Iowa</p>
10 月 28 日(一)	愛荷華州	<p>前往愛荷華州立大學種子科學中心 (Seed Science Center, ISU)，由 Dr. Tracy Burns 簡介美國種子健康體系 (NSHS) 管理系統，並由其與 Dr. Charlie Block 共同帶領參訪愛荷華州立大學種子科學中</p>

		心各實驗室進行種傳病原檢測情形。 續住 Radisson Hotel Ames at ISU, Iowa
10月29日(二)	愛荷華州	前往美國 NSHS 核可之檢測單位 Corteva 種子公司，由該公司田間病理學及診斷研究員 Dr. Scott Heuchelin 帶領，參訪該公司種傳病原檢測實驗室，瞭解種傳病原之檢測作業，人員訓練過程，每年自我查核及 NSHS 每三年稽核確認是否符合 NSHS 體系等情形。 續住 Radisson Hotel Ames at ISU, Iowa
10月30日(三) -10月31日(四)	美國愛荷華州-臺灣桃園	10月30日搭乘聯合航空 UA5304 班機由美國愛荷華州得梅茵機場前往美國科羅拉多州丹佛機場，轉乘聯合航空 UA268 班機前往美國加利福尼亞州舊金山機場，再轉乘聯合航空 UA871 班機，於 10月31日 05:15 返抵桃園國際機場。

三、研習內容與說明

(一) 至美國農業部 (Department of Agriculture, USDA) 動植物檢疫署 (Animal and Plant Health Inspection Service, APHIS) 植物健康科學與技術中心 (Center for Plant Health Science and Technology, CPHST) Beltsville 實驗室研習種傳類病毒及病毒之檢測作業

研習課程由實驗室副主任 Dr. Vessela A. Mavrodieva 負責安排及聯繫，課程計有 3 天，概分成 CPHST 及 Beltsville 實驗室簡介，番茄種子馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒屬 (Pospiviroid) 檢測相關作業，實驗室品質管理系統 (QMS)，胡瓜綠斑嵌紋病毒 (Cucumber Green Mottle Mosaic Virus, CGMMV) 之純化技術，以及 CGMMV 與番茄褐色皺紋果病毒 (Tomato brown rugose fruit virus, ToBRFV) 國際檢測趨勢之討論，相關內容摘錄如下：

1. CPHST 及 Beltsville 實驗室簡介 (附件 1)

由 Beltsville 實驗室副主任 Dr. Vessela A. Mavrodieva 簡介 CPHST 工作目標、Beltsville 實驗室現有研究工作內容，以及種子種苗病原檢測現況。CPHST 係架構在 APHIS 植物防疫檢疫部門 (Plant Protection and Quarantine, PPQ) 所設科學與技術單位 (Science & Technology, S&T) 之下，設立的目的係針對植物防疫檢疫法規決策及運作，提供科學解決方案 (scientific solutions)，以保護美國農業免於植物病原之危害。CPHST 負責植物防疫檢疫方法學的建立、科學性的調查、有害生物風險分析及技術開發，目前計有 Otis、Beltsville、Raleigh、Miami、Mission、Fort Collins 及 Phoenix 等 7 間實驗室，分別負責不同領域的技術開發及研究，如 Miami 實驗室即負責檢疫處理技術之相關研究。本次前往研習的 Beltsville 實驗室，為美國邊境各機場、港口或陸地 APHIS 檢疫站於發現可疑檢疫物時，後送進行病原檢測之國家級實驗室，負責

提供即時且可信賴的檢疫有害生物檢測，以確保美國農業免於有害生物的入侵、傳播及立足。目前該實驗室有 35 位職員，負責聯邦層級如各機場港口輸入檢測之後送確認診斷結果、發展及評估管制有害生物診斷方法、技術人員熟練度測試及辦理相關教育訓練，並於 2015 年導入品質管理系統 (Quality Management System) 並經 ISO 17025 認證通過，每年 3 月辦理複訓以確保檢測人員做法一致以避免錯誤，同時於 2019 年設置品管主任籌畫各項品管作業，定期及不定期督導及考核各項檢測作業之正確性以及檢測人員的檢測能力是否維持。

該實驗室依 APHIS 總部指示建立各種須檢測病原之標準作業流程，進行後送植物檢疫物之病原檢測，另參與農業有害生物調查合作計畫 (Cooperative Agriculture Pest Survey, CAPS)，以及植物種原檢疫計畫 (Plant Germplasm Quarantine Program)，協助相關病原之檢測作業。因應新興病原不斷增加，該實驗室持續發展病原檢測技術，並導入新興檢測科技，經評估其正確性及效率，並內化為適合該實驗室之標準作業流程，經 APHIS 審核通過後即可應用於病原檢測。

針對具有高風險性的植物病原 (*Ralstonia solanacearum* R3B2, *Rathayibacter toxicus*, *Xanthomonas oryzae*, *Synchytricum endobioticum*, *Peronosclerospora philippinensis* (*P. sacchari*), *Sclerophthora rayssiae* 及 *Phoma glycinicola*)，該實驗室設有第三級加強型的生物安全設施 (BSL-3 Enhanced Facility，負壓型式)，設施內設有 10 間模組化溫室及 1 間真菌隔離區，用來觀察上述特定植物病原寄主植物於輸入隔離期間是否出現病徵，並設有環氧乙烷消毒及大型高溫高壓滅菌釜等設備，可即時消毒滅菌。

2. 番茄種子類病毒之純化、RNA 品質之確認及自動電泳等技術之研

習

由分子生物學家 Dr. Stefano Costanzo 帶領，進行番茄種子馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒屬 (*Pospiviroid*) 之純化、RNA 品質之確認及自動電泳等技術之研習。檢測的對象有 *Citrus exocortis viroid* (CEVd)、*Columnea latent viroid* (CLVd)、*Pepper chat fruit viroid* (PCFVd)、*Potato spindle tuber viroid* (PSTVd)、*Tomato apical stunt viroid* (TASVd)、*Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) 及 *Tomato planta macho viroid* (TPMVd) 等 7 種類病毒。APHIS 該實驗室參考荷蘭 Naktuinbouw protocol SPN-V043e, v.2.1, 30-10-2017 之實驗方法 (參考操作流程如附件 2)，建立上述 7 種類病毒之核糖核酸 (RNA) 純化操作流程 (work instruction)。每批待測番茄種子秤取 3 公克 (約 1000 粒種子) 之樣本，3 重複，先加入緩衝液以拍打式研磨機 (MiniMix 100 rang, Interscience) 研磨後，按 Sbeadex Maxi Plant Kit 操作指示依序加入各式藥劑，置入 KingFisher Flex (Thermo Fisher Scientific) 核酸自動萃取儀中，以 Naktuinbouw 在 Qiagen BioSprint 96 核酸自動萃取儀所設定的程式，進行磁珠法自動萃取 RNA (操作流程如附件 3)，純化 RNA 後之 96 孔盤上方貼上一層特製鋁箔紙 (aluminum foil cover) 以避免污染產生。經詢問 Dr. Stefano Costanzo 獲告，依其操作經驗，KingFisher Flex 核酸純化系統係採用轉移磁珠而非轉移溶液的獨特專利原理，可以做到從 20ul 到 5ml 樣品的自動化純化，且從動植物樣本及土壤皆可以萃取出 RNA、DNA、蛋白質及細胞，產物品質高，純化效率也高，其開放性系統又可與國內外市場上幾乎所有磁珠試劑相容，加上操作軟體介面簡單，易於設定各種參數以優化實驗步驟，故該實驗室採用此系統萃取純化核酸。

3. 即時定量反轉錄聚合酵素連鎖反應技術 (Real-time RT-PCR) 之研習

由檢測品質管理師 Miss Nicole O'Donahue 帶領，進行純化後之 RNA 含量及品質之確認，並進行即時定量反轉聚合酵素連鎖反應技術 (Real-time RT-PCR) 之研習。取上一階段從番茄樣本純化後的 RNA，先以核酸光譜儀 (TapeStation System, Aglient) 進行 RNA 含量及品質之確認 (確認結果如附件 4)。在檢測樣品準備室中依據各科學文獻所載之 Pospiviroids qPCR 檢測技術，分成 Pospiviroids A (檢測對象為 PSTVd, TGCVd, TPMVd, CFVd, DLVd), Pospiviroids B (檢測對象為 CEVd, CLVd, DLVd), Pospiviroids C (檢測對象為 TPMVd) 及 Pospiviroids TASVd (檢測對象為 TASVd) 等 4 組，依序加入各種藥品及試劑，再用分注管尖戳破 96 孔盤鋁箔紙吸取 RNA 並依序加入無核酸模板對照組 (None-temple-control, NTC)、健康種子 RNA、待測種子 RNA 及正對照 RNA。檢測流程中加入另外一段序列做 Internal control (IC)，探針或引子對 (probes or primers) 會與此序列 Annealing，但增幅出來的片段長度與 Target DNA 不同，以用於偵測檢體內是否含抑制物質，避免偽陰性的發生。隨後樣本移入即時定量反轉聚合酵素連鎖反應 (ABI QuantStudio™ 7 Flex Real-time PCR System) 以 50°C 10 分鐘，90°C 3 分鐘各 1 循環後，另以 95°C 10 秒，60°C 1 分鐘，40 個循環進行 qPCR 反應 (操作流程如附件 5)。

操作過程中，因檢測類病毒種類高達 6 種且分成 4 組進行 qPCR 反應，該實驗室設計實驗表格，將樣本編號，試劑種類、濃度及劑量，樣本在反應盤上之位置一一標示或註記，以避免加藥錯誤 (表格如附件 6)。

4. 一般性反轉錄聚合酵素連鎖反應技術 (Conventional RT-PCR)、自動電泳及結果判讀等技術之研習

由檢測品質管理師 Miss Nicole O'Donahue 帶領，進行一般性反轉錄聚合酵素連鎖反應技術 (Conventional RT-PCR) 及自動電泳

等技術之研習。前階段 qPCR 呈現正反應者，必須再進行 Conventional RT-PCR 及解序進行確認。在 Pospivi A, C 及 T qPCR 呈現反應者，使用 Pospiviroid 廣泛性引子對進行 PCR，在 Pospivi B qPCR 呈現反應者，則使用 Pospiviroid 廣泛性引子對加上 CLVd 專一性引子對進行 PCR。另外，在 qPCR 中用於植物 RNA 內部控制用的 Nad5 如出現反應，亦須以植物的 Nad5 專一性引子對進行 PCR 確認。依操作流程依序加入試劑及無核酸模板對照組 (None-templated control, NTC)、健康種子 RNA、待測種子 RNA 及正對照 RNA，移入 PCR 機器後以 50°C 30 分鐘，94°C 1.5 分鐘各 1 循環後，另以 94°C 30 秒，62°C 90 秒，72°C 45 秒，15 個循環；94°C 30 秒，59°C 90 秒，72°C 45 秒，30 個循環，再以 72°C 7 分鐘 1 循環，後續維持在 4°C 以進行 PCR 反應 (操作流程如附件 7)。PCR 反應結束後以自動電泳儀 (TapeStation System, Agilent) 或 TAE 電泳進行分析，Pospiviroid 將有 195bp 的條帶，CLVd 將有 370bp 的條帶，Nad5 將有 688bp 的條帶。之後由分子生物學家 Dr. Stefano Costanzo 及檢測品質管理師 Miss Nicole O'Donahue 帶領，進行番茄種子類病毒檢測結果之判讀 (自動電泳結果如附件 8)。

操作過程中，該實驗室比照 qPCR 反應設計實驗表格，將樣本編號，試劑種類、濃度及劑量，樣本在反應盤上之位置一一標示或註記，以避免加藥錯誤 (表格如附件 9)。

5. 參訪 APHIS Beltsville 國家植物種原檢疫站 (National Plant Germplasm Inspection Station, NPGIS)

該檢疫站之參訪不在原先美方提供之規劃行程中，因該檢疫站即設於 Beltsville 實驗室內，與防檢局業務高度相關，經由 Beltsville 實驗室副主任 Dr. Vessela A. Mavrodieva 協助，安排前往作短暫參訪。

由於植物及種子可能夾帶有害生物，對於輸入國家的農業生

產環境造成危害，APHIS 在全美國設有 16 個植物檢疫站 (plant inspection station)，其中 15 個檢疫站皆設於國際機場或港口附近，站內的 PPQ 植物檢疫專家將對輸入的植物及種子進行檢查，以確保輸入的植物及種子符合聯邦進口法規和許可要求，不會將美國未有紀錄而可能對美國農業或自然資源造成損害的植物有害生物傳入。當發現管制有害生物時，PPQ 可能要求對輸入檢疫物進行處理，退運或銷燬。另外一個則是唯一一個未設在國際機場或港口，位於馬里蘭州貝爾茨維爾的國家植物種原檢疫站 (NPGIS)。NPGIS 係 APHIS 根據 588 美國農業部許可或管制輸入許可 (a 588 Departmental permit or Controlled Import Permit) 的非商業性研究材料，為專門檢查以植物育種和研究目的而輸入少量植物種原而設計，其位置設於 APHIS Beltsville 實驗室一角，另設有門禁，實驗室人員在未獲得授權下，即使有門禁卡亦無法進入該檢疫站。

輸入人如需自國外輸入以植物育種和研究目的而輸出的少量植物種原，需向 APHIS 申請輸入許可證，俟取得許可證後，需指定送達地點為 NPGIS，並自行列印標籤並附於包裹上，以供 APHIS-PPQ 人員識別進行檢查。目前該檢疫站僅設有檢疫人員 1 名，包裹送達後，檢疫人員先行核對標籤，確認與存檔之輸入許可證相同，隨之剪開包裝核對輸入檢疫物之種類及數量，並以 X 光儀協助檢測種子內食性昆蟲，檢查後予以紀錄，合格者將重新包裝，隔天交由快遞公司取件寄達輸入人，如不符合檢疫規定者，則採熱水處理 (56°C) 或溴化甲烷進行檢疫處理，或以高溫高滅菌釜進行銷毀。

6. 參訪 Beltsville 實驗室各實驗室及研習次世代定序(Next Generation Sequencing)檢測法

由分子生物學家 Ms. Nora Tsai 帶領參訪 Beltsville 實驗室各實驗室及說明次世代定序(Next Generation Sequencing)檢測法。

- (1) **Beltsville 實驗室**：為避免樣本間之交互污染及符合 ISO17025 規定，該實驗室分割成不同區塊以進行管控。實驗室外部區域為門口警衛室、收發室、管理人員辦公室、用餐區及食物冰箱區。所有人員必須持有通行證方能進入實驗室內部，並依通行證權限前往實驗室內部不同區域。該實驗室人員進出管控嚴格，明確區分辦公區、實驗區及用餐區，實驗區內尚依檢測目的及檢測之病原種類分隔成不同實驗小區，不同人員依其權限只能進入被授權區域作業。食物嚴格禁止攜入實驗區，水瓶雖可攜入實驗區，但不得攜入實驗室，如須飲水須至實驗室外飲用，以避免發生實驗污染情事。實驗室內部主要分成檢測區、方法學開發區及低溫標本保存區 3 大區塊。檢測區分成檢測樣本前置作業準備區 (Diagnostic)、PCR 準備室 (PCR Set up)、生物資訊區 (Bioinformatic)、驗證及教育訓練實驗室 (Verification /Training Laboratory) 以及種子病原檢測區 (Seed Test)，前置作業後所抽取之 DNA 或 RNA，必須移到 PCR 準備室加入各種 PCR 藥品，再移到驗證及教育訓練實驗室或種子病原檢測區進行檢測作業。方法學開發區 (Methodology Development Laboratory) 則包括收取樣品區 (Sample receiving)、細胞培養室 (Cell Culture Room)、病毒區 (Virus)、真菌區 (Fungal)、細菌區 (Bacteria/Phytoplasma) 及高風險病原區。
- (2) **次世代定序(Next Generation Sequencing)檢測法**：傳統分子生物學檢測法僅適用在已確認目標有害生物時使用，且每種檢測法每次只能檢測 1 至 2 種有害生物，目前已知極限為每個反應試管內檢測 4 至 5 種有害生物，但正確性及靈敏度將大幅下降，且無法偵測未知或是尚未建立檢測方式之有害生物。次世代定序檢測法係近年新開發結合次世代定序技術應用於有害生物

檢測的方法。利用極有效率的高通量定序，可於短時間將樣品核酸完全定序。Beltsville 實驗室利用此定序技術，於抽取測試植物之 RNA 後，進行 NGS 定序，並將定序結果與該實驗室自 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 及其他文獻所得之病毒序列進行比對，以確定樣品中是否含有病毒，所以只要有相關有害生物的序列，透過此技術結合生物資訊學工具比對相符，即可確認該病毒的存在，且另可有效檢測未有發表紀錄之新興病毒。傳統的次世代定序係針對全基因體 (Whole genome) 進行解序，如 RNA 品質良好，一般至少需要 24 小時。該實驗室自 2018 年引進次世代定序最新技術 (或稱第三代定序)，第三代定序儀 (Nanopore) 僅有簡報筆大小，無需進行 PCR 反應再行解序，僅需研磨樣本抽取樣本 DNA 後即可置入 Nanopore 中進行解序，且因其只對 small RNA 或其他 DNA、RNA 單位進行解序，時間可大幅縮短至 4 個小時。Nanopore 可利用行動電源作為動力來源，解序後之資訊可以透過 WiFi 方式與手提電腦或手機連接，再透過手提電腦或手機之網路即可將序列資訊回傳至實驗室內之生物資訊室，由生物資訊室伺服器進行序列分析、組裝及比對，即可得知檢測樣本是否帶有病毒，惟目前成本及定序錯誤率仍高，該實驗室正極力延攬相關人員進行序列分析、組裝及比對的優化作業，以期未來能實際應用在田間或邊境等第一線之有害生物檢測作業，目前仍以 NGS 檢測相關病毒為主。

7. 胡瓜綠斑嵌紋病毒 (Cucumber Green Mottle Mosaic Virus, CGMMV) 純化技術之研習

由分子生物學家 Ms. Gem Santillana 帶領，進行胡瓜綠斑嵌紋病毒 (Cucumber Green Mottle Mosaic Virus, CGMMV) 純化技術之研習。該實驗室參考國際種子檢查協會 (International Seed

Testing Association) 之 6 方法 (protocol 7-026) 進行取樣檢測，每批待測種子先取超過 2,000 粒種子充分混合，然後依重量或體積分成 20 個 100 粒種子的樣本 (每 100 粒不同的瓜類種子，分別有不同的參考重量或體積)，然後放入刀片式食品級研磨機 (Blender-Oster Brand) 中進行研磨，研磨 25 秒後，停 10 秒鐘，然後再研磨 25 秒，將獲得粉狀種子研磨物，然後置放在冰浴中。取 200 microliter 研磨物放入 2 ml 微量離心管中，依據 Trizol LS 操作流程依序加入各式藥劑及進行各項步驟以萃取 RNA (操作流程如附件 10)。該實驗室使用刀片式食品級研磨機取代傳統手磨式球磨器進行研磨，除可使用機器可節省人力大量檢測樣本外，另研磨機可使用各別玻璃罐 (jar) 進行研磨，除清洗方便外，亦可避免交叉污染。

8. 番茄褐色皺紋果病毒 (Tomato brown rugose fruit virus , ToBRFV) 之國際檢測趨勢

有鑑於全球發生由新興病毒 ToBRFV 引起之重大植物疫情，我國研習人員與該實驗室分子生物學家 Dr. Avijit Roy 及植物病理學家 Dr. Gang Wei 進行 ToBRFV 之發生現況及國際檢測趨勢進行學術性討論。自 2015 年約旦在溫室番茄上分離出屬於菸草嵌紋病毒屬 (Genus *Tobamovirus*) 的病毒株，經基因體全序列比對後發現為新興病毒，並命名為 Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)，隨後以色列在 2017 年報導該國 2014 年自葉片出現嵌紋，偶而伴隨葉片窄化及果實帶有黃色斑點病徵之番茄上所分離得到的 *Tobamovirus* 病毒株，經與上述約旦病毒株比對後發現亦為 ToBRFV。此後該病毒迅速的在許多國家被陸續發現，遍及世界各地。

ToBRFV 的主要寄主為番茄 (*Solanum lycopersicum*) 及番椒屬 (*Capsicum* sp.)，經人工接種發現亦可感染部分茄科及莧科植物

如菸草或藜麥等。在番茄上造成的病徵依品種而異，包括在葉片上出現黃萎、嵌紋及斑駁，偶有窄化現象等病徵，另外可能在總花梗、花萼及葉柄上出現壞死斑。在果實上則出現黃色或棕色斑點或具皺紋之病徵，致使果實無法銷售，另偶有變形或成熟不一致化發生。ToBRFV 在番茄上的發病率不一，如以色列報導在 2014 年出現病徵的果實比例約在 10-15%，而約旦報導在 2015 年的發病率則幾乎達到 100%。另 ToBRFV 在番椒屬作物上造成的病徵則包括葉片變形、黃化及嵌紋，在甜椒的果實上的病徵則為變形，伴隨黃化或棕色區域或綠色條紋。爰此，美國經評估後指出 ToBRFV 如入侵並立足於美國，可能造成每年 23 億美元的重大經濟損失。

ToBRFV 非常穩定，可透過工具、手、衣物或植物間摩擦進行機械傳播，或透過繁殖材料如嫁接或切枝傳播，溫室試驗指出熊蜂 (*Bombus terrestris*) 可攜帶並傳播病毒到授粉期間的健康番茄植株上。該病毒可在種子的種皮及胚乳上發現，但其伴隨種子發展移行至種苗的比率為低，目前該病毒可否透過種子傳播雖仍有待進一步確認，但可能藉由機械傳播在溫室內快速擴散，如以色列在 2014 年發現此病毒後，即觀察到在人為協助傳播以及受感染種子種苗交易行為的狀況下，ToBRFV 在 1 年之內即擴散到以色列全國各地。

由於 ToBRFV 的主要寄主如番茄及甜椒等作物為許多國家之主要種植作物種類，而目前具有 *Tobamovirus* 抗性，如抗菸草嵌紋病毒 *Tobacco mosaic virus* (TMV) 或番茄嵌紋病毒 *Tomato mosaic virus* (ToMV) 的番茄商業品種，仍可受到 ToBRFV 感染，加上該病毒在世界上快速蔓延，許多國家如澳大利亞、紐西蘭、智利及歐盟紛紛採取緊急措施，限制該病毒之寄主種子種苗自疫區輸入，自非疫區輸入者則須經實驗室檢測確認未罹染該病毒，並於

輸入時取樣進一步檢測確認後始可輸入，以避免該病毒入侵危害。由於目前可用於 ToBRFV 的防治方法非常有限，嚴格的檢疫措施以防止 ToBRFV 入侵實為重要，美國已考慮進一步採取檢疫作為，並將在近日內發布相關管理措施。

該實驗室與 Dr. Avijit Roy 及 Dr. Gang Wei 討論 ToBRFV 相關議題時，發現目前可用於 ToBRFV 的防治方法非常有限，除發現病株則應即連根剷除，以確保去除殘留於病株的病毒外，嚴格的檢疫措施以防止入侵實為重要。有鑑於我國尚未發現 ToBRFV 存在，我國目前已預告增列該病毒為我國檢疫有害生物，以強化管制措施，避免 ToBRFV 傳入我國，維護我國農業生產與環境生態之安全。

我研習人員回國後，經查美國為防止 ToBRFV 自境外移入，自 108 年 11 月 22 日起，要求各國輸美之番茄(*Solanum lycopersicum*) 及番椒屬(*Capsicum spp.*)繁殖性植物材料（包括種植用植物、切枝、嫁接苗及種子）及果實，應按下列規定之於輸出國之輸出植物檢疫證明書或再輸出植物檢疫證明書上加註相關事項如下，經檢視其規定，與研習時 Dr. Avijit Roy 及 Dr. Gang Wei 之說明內容相同：

(1) 繁殖性植物材料：

- a. 產自非疫區國家，並加註說明。或；
- b. 於輸出前取樣具代表性樣本並經官方檢測確認未罹染 ToBRFV，並加註說明。
- c. 少量種子（每批種子不超過 50 個包裝，每個包裝不超過每個分類單位（屬、種或栽培種等等）50 顆或 10 公克種子，詳見 <https://www.aphis.usda.gov/plant-health/small-lot-seeds>): 如屬來自單一母株或育種品系，其用途係為育種使用而非商業使用者，所有來源母株應於果實採收前 10 天內經取樣及官方檢測確認未罹染 ToBRFV，並加註說明。

(2) 果實：

- a. 僅限商業行為之番茄及番椒屬果實輸入。
- b. 自墨西哥、以色列及荷蘭輸入者應先取得輸入許可，應符合現行檢疫規定及 ToBRFV 檢疫措施要求，並加註說明。
- c. 加拿大現雖為 ToBRFV 非疫區，惟考量番茄及番椒屬果實可能自墨西哥輸入該國後再轉運輸出至美國，上述果實自加拿大輸美時，仍應符合 ToBRFV 檢疫措施要求，並加註說明。

9. 分享我國執行邊境旅客生物安全檢疫作業現況 (Implementing border biosecurity for passengers)

實驗室副主任 Dr. Vessela A. Mavrodieva 邀請我方研習人員介紹我國執行邊境旅客生物安全檢疫作業現況。我國研習人員說明我國在海空運旅客方面的各項宣導及管制措施，以及分享近日因應境外非洲豬瘟疫情嚴峻所採取的相關強化措施，包括透過各政府機關間的通力合作、強化來自高風險地區旅客手提行李檢查率至 100%、提供旅客自疫區攜帶檢疫物不法行為之罰鍰、強化高風險旅客之辨識與追蹤、增加派駐檢疫犬數量、透過各種管道進行公眾溝通與宣導及發佈國家級警報等各種措施，有效達到管制外來有害生物入侵的成功經驗。(附件 11)

(二) 至美國農業部動植物檢疫署 (USDA-APHIS) 瞭解其現行任務及目標

前往美國農業部動植物檢疫署 (APHIS)，由美國在台協會動植物檢疫辦事處 (AIT-APHIS office)主任 Mr. Russell T. Caplen 簡介美國農業部及動植物檢疫署植物防疫檢疫組現行任務，相關內容摘要如下：

1. 美國農業部 (U.S. Department of Agriculture, USDA) 之架構及任務：

USDA 係基於健全的公共政策、有效的科學方法及有效的管理方式，在食品、農業、自然資源、農村發展、營養及相關問題上發揮領導作用。其願景為透過創新擴大經濟機會，幫助美國鄉村繁榮發展；促進農業生產的可持續性，以更好地滋養美國人，同時也幫助養活全世界的人們；並通過恢復森林、改善流域和健康的私人工作土地來保護和養護美國的自然資源。下設 7 大領域 18 個專責單位，以達到對支持農民和農村地區；管理和保護美國的自然資源；加強食品安全，保護動植物健康；研究，教育和推廣等 4 大目標。(附件 12)

2. 美國農業部動植物檢疫署 (Animal and Plant Health Inspection Service, APHIS) 植物防疫檢疫組 (Plant Protection and Quarantine, PPQ) 之任務

APHIS-PPQ 的任務是保護美國的農業和自然資源，避免具有經濟和環境意義的有害生物之入侵、立足及傳播，並促進農產品的安全貿易。其願景為透過健康的植物和安全的貿易，成就強大而繁榮的美國。

APHIS 在 2015 到 2019 年與植物防疫檢疫相關的任務目標為 (1) 防止植物有害生物的入侵和傳播；(2) 保護森林，城市景觀，牧場和其他自然資源以及私人勞動用地免受有害生物的危害；(3) 確保農產品的安全貿易，為美國生產者創造出口機會；(4) 透過實施監測，預防、即時反應及防治計劃，保護美國農業資源的健康，包括解決人畜共通疾病及事件；以及 (5) 創建一個高性能、高效率、適應性強並具有公民權利的全新 21 世紀 APHIS。APHIS-PPQ 將透過下列方式來達到這些目標：(1) 強化美國的有害生物防範措

施；(2) 優化美國國內有害生物管理和滅除計畫；以及 (3) 減少有害生物所帶來的風險，促進農產品的全球貿易。(附件 13)

(三) 至愛荷華州立大學 (Iowa State University, ISU) 種子科學中心 (Seed Science Center, SSC) 研習美國種子健康體系 (National Seed Health System, NSHS) 管理系統

研習課程由種子科學中心 Dr. Tracy Burns 負責安排及聯繫，課程計有 2 天，概分成美國種子健康體系 (NSHS) 管理系統簡介，愛荷華州立大學種子科學中心各實驗室進行種傳病原檢測情形，以及參訪美國 NSHS 核可之檢測單位 Corteva 種子公司，相關內容摘錄如下：

1. 美國種子健康體系 (NSHS) 管理系統簡介

由愛荷華州立大學種子科學中心行政協調員 Dr. Tracy Burns 簡介美國種子健康體系 (NSHS) 管理系統 (附件 14)。美國的植物檢疫證明書僅能由 USDA 或 USDA 授權的單位簽發，通常是州政府的農業廳，在加州則是郡 (county) 政府農業局的農業專員。種子生產者通常在運輸前於種子儲藏所在地的州取得植物檢疫證明書。在 USDA 建立 NSHS 管理系統之前，只有州政府或聯邦種子實驗室可以進行種子病原檢測並據以簽發植物檢疫證明書。然因為標準化的檢測方法很少，且只有極少數實驗室可以進行檢測，須要建立一套系統核可及授權其他實驗室或公司協助完成檢測，以因應種子業者日益增加的種子病原檢測需求。APHIS-PPQ 經邀集相關利益關係人討論，如美國種子貿易協會 (American Seed Trade Association, ASTA)、美國種子管制員協會 (Association of American Seed Control Officials, AASCO)、官方種子驗證單位協會 (Association of Official Seed Certifying Agencies, AOSCA)、國家植物局 (National Plant Board, NPB) 及愛荷華州立

大學種子科學中心 (Seed Science Center, Iowa State University) , 並於 2001 年公布 7 CFR 353 聯邦法規建立 NSHS , 目的在於規範種子健康實驗室測試、種子採樣、種子外觀檢查及植物產地檢疫標準, 並由 USDA 依據該結果簽發美國植物檢疫證明書。

NSHS 的目標為(1) 制定種子健康實驗室測試標準化作業流程, 用於種子健康實驗室測試之種子取樣程序、種子外觀檢查程序及植物產地檢疫程序; (2) 制定相關程序用以授權私人或公共團體進行上述程序; (3) 利用此種子健康體系以及其他國際間的相關體系, 促進國際植物檢疫改革並促進公正及公平的貿易。APHIS-PPQ 負責監督 NSHS 的正常運行, 種子科學中心 (SSC) 則是代表 APHIS 的 NSHS 管理員, 維持 NSHS 各項業務之運作, 並查核通過認證的驗證單位各項作業是否正常運作並符合規定。

NSHS 下設政策和程序諮詢委員會 (Policy and Procedures Advisory Board, PPAB), 由主要利益關係人之 8 名成員代表組成, 其中主席 1 人, 產業團體 (AOSCA, AASCO, NPB, ASTA) 4 人及產業代表 2 人, 另 APHIS 及種子科學中心可各派 1 人代表參加, 但沒有投票權。PPAB 主要功能係針對 APHIS 之建議, 給予 NSHS 指導及方向。

NSHS 設有行政管理部門以維持 NSHS 之運作, 行政人員有共同主持人 (Co-Director) 2 人, 認證員 (Accreditation Coordinator) 1 人及行政助理 (Administrative Assistant) 1 人。通過 NSHS 認證的任何公共或私人驗證單位應每 3 年至少接受 NSHS 實地查核 1 次, 以確保該單位符合執行所須認證需求, 並維持有效的質量管理體系能力, 查核通過單位僅允許執行其獲得認可之種子健康檢測及/或植物產地檢疫程序。截至 2019 年 10 月, 計有 23 個單位通過 NSHS 認證, 包括 8 個私人檢測實驗室或檢查服務單位, 9 家種子公司, 4 個作物改良協會及 2 個官方種子檢測實驗室。申

請認證之驗證內容可分為 4 大類，包括通過種子取樣以進行種子健康（含病原檢測）檢測驗證者有 12 家，通過種子目視檢查驗證者有 4 家，通過植物產地檢疫驗證者有 6 家，通過種子健康檢測驗證者有 13 家（如附件 15），每個單位可依其需求申請認證 1 項或數項驗證項目，NSHS 認證時之要求概括如下：

- (1) 種子取樣以進行種子健康檢測之作業部分，係依循 AASCO 所制定之種子取樣手冊作業，僅能由通過 NSHS 認證之取樣驗證人員、州政府或聯邦政府人員，並依據該批種子數量多寡及使用合適工具進行取樣，以確保符合種子健康實驗室測試需求。
- (2) 種子目視檢查之作業部分，係依循 APHIS 所制定的輸出手冊作業，在 APHIS 簽發植物檢疫證明書之前，驗證單位檢查人員應至輸出業者生產設施對即將輸出之種子進行目視檢查，確認種子種類無誤，並檢查是否存在由昆蟲造成的明顯損傷或土壤污染，並製作報告交由 APHIS 據以核發植物檢疫證明書。
- (3) 植物產地檢疫之作業部分，在生長季節中，對在田間，苗圃或溫室中生長以產生種子的植物，以適當的間隔進行 1 次或多次的植物病害檢查，如果植物檢疫規定允許，未通過產地檢疫的田間種子通常會在實驗室中進行重新測試。產地檢疫的方式，必須包括：a.田間檢查模式 (Inspection patterns)；b. 取樣及確認病害的方法；c.必須與任何進行田間樣本診斷的第三方實驗室達成書面協議；d.通過認證的驗證單位必須依作物種類分別提供病害診斷材料。(作業流程如附件 16)
- (4) 種子健康檢測之作業部分，必須使用 NSHS 公布的方法進行檢測（目前有 80 種），且僅使用在已通過審查的種子種類上。

新檢測方法在導入成為 NSHS 標準檢測方法之前，必須先提送專家技術小組審閱，並經 PPAB 投票同意專家技術小組之建議，方可使用在種子健康檢測上。其同儕審閱的過程，必須針對各別病害分別組成相關專家技術小組，經該小組以 NSHS 定義的評估標準 (附件 17)，審閱該檢測方法並確認相關資料，與現有方法相比後提出專家技術小組建議。建議可分為 3 種，第 1 種為 A 類，建議接受為標準方法，第 2 種為 B 類，在接受為標準方法之前尚需進一步研究，第 3 種為 C 類，不應接受該測試方法作為標準方法。

NSHS 透過與各國國際相關組織合作，持續評估 NSHS 種子健康檢測標準方法，如 2016 年即參加由 NSHS、國際種子檢測協會 (International Seed Testing Association, ISTA)、國際種子健康倡議 (International Seed Health Initiative, ISHI)、歐洲暨地中海地區植物保護組織 (European and Mediterranean Plant Protection organization, EPPO)、APHIS 及荷蘭 Naktuinbouw 認證實驗室 (Naktuinbouw Accredited Laboratories, NAL) 組成的國際工作小組，評估每個組織所使用的程序及標準，希冀朝向統一的目標邁進，特別是在 NSHS 和 ISHI 標準之間的調和。

NSHS 至少每 3 年對通過認證的驗證單位進行實地查核 1 次，如果有需要可增加查核次數，查核相關費用如機票與其他交通費、住宿費、日支費及保險費等，概由受查核之驗證單位負擔，2019 年已安排查核 9 家公司完畢。查核人員通常需要具有植物病理學或相關科系之學歷，對種子行業非常熟悉且經過 NSHS 培訓並通過審查核可。受查核之驗證單位須在 3 年期滿前 3 個月提出申請以利安排查核行程，受查核對象包括設施、設備及人員，透過實地查核，詳細審閱驗證單位內各項品管手冊 (Quality Manual) 及相關紀錄如下，查核報告將送交 APHIS 決定是否繼

續取得認證資格，或需改善、修正或終止資格：

- (1) 申請和提交品管手冊及所有相關文件。
- (2) 行政單位對品管文件的審查。
- (3) 向行政單位和 USDA-APHIS 提交的查核報告。
- (4) 經 USDA-APHIS 審閱的查核報告，包括決定通過或拒絕通過認證所需的任何品管文件。
- (5) USDA 簽發的通過認證文件。

2. 美國國家種子健康認證領航計畫 (National Seed Health Accreditation Pilot Program, NSHAPP) 簡介及其系統性管理 (System Approach) 概念

愛荷華州立大學種子科學中心行政協調員 Dr. Tracy Burns 隨後簡介美國國家種子健康檢測領航計畫 (National Seed Health Accreditation Pilot Program, NSHAPP) 及系統性管理概念 (附件 18)。由於種傳性病原所造成的病徵多不明顯難以發現，為避免有害生物隨輸入種子入侵美國造成危害，USDA-APHIS 邀集相關種子輸入業者及 NSHS 共同合作，在 2016 年起開始試行 NSHAPP，其目標是針對輸入美國種子建立自願性的植物檢疫有害生物 (病原) 檢測作業模式。透過種子輸入後之自主病原檢測，如有發現並經鑑定為外來檢疫有害病原，將採取後續相對應之檢疫處理措施以防止引入種子傳播外來病原。目前 CGMMV 為該計畫第 1 個被列為檢測的病原，檢測對象為輸入的胡瓜，香瓜及西瓜種子。該計畫自 2016 年開始實施，由於參與業者普遍反應種子取樣檢測數量達 2 萬粒種子過高，且輸入種子總數量常不足 2 萬粒，經過感染單位 (infection unit) 測試研究，如輸入種子總數量不足 2 萬粒 (少量種子)，該計畫接受取樣每個批次 (lot) 少量種子總數量的 5% 進行檢測。截至 2019 年 10 月，計有 7 家種子業者加入，每月定期向 NSHS 通報檢測結果，如有發現特定病原則

須立即通知，並決定退運或銷燬該批罹病種子。目前業者已通報超過 3 萬個批次種子的檢測資料，其中有 40 個 (0.13%) 批號檢測結果通報為正反應，其來源國家包括中國大陸、印度、以色列、秘魯、西班牙、泰國及越南。由於每個批次的病毒檢測需要大量時間和金錢，APHIS 經考慮是否可以減少對低風險種子批次進行病毒檢測的依賴，且依然維持植物檢疫的安全性，決定從少量輸入葫蘆科繁殖用種子之系統性管理著手，在不同的種子生產栽培階段 (控制點) 採取各種管理措施如下，以避免 CGMMV 傳入美國：

- (1) 種子生產區的選擇及準備：非疫區、避免污染措施、有害生物之調查及檢測紀錄、品質管制手冊等。
- (2) 種子來源：檢測過或驗證過之無病毒種子、抗病品種、處理過之種子、檢測及驗證之紀錄等。
- (3) 種子採收前：田間檢查、病害管理、田間衛生、員工訓練、田間檢查及設施查核紀錄等。
- (4) 種子採收期間：機具消毒、採收時機、田間檢查、病原檢測、田間檢查紀錄等。
- (5) 種子調和及處理：種子清洗、處理、研磨及分類、設施查核及處理有效性紀錄等。
- (6) 種子儲藏：儲藏條件、密封包裝、特性維持、設施查核紀錄等。
- (7) 種子健康檢測：官方取樣、檢測標準作業程序、通過認證之檢測實驗室、設施認證及查核紀錄等。
- (8) 種子運輸：可回溯性、運輸過程之衛生措施、輸入檢疫條件、輸入後隔離措施、植物檢疫證明書等。

目前該系統性管理 (system approach) 措施僅限應用於來自荷蘭、智利、澳大利亞及墨西哥生產的葫蘆科少量輸入育種用種子，關切之有害生物對象亦僅為 CGMMV。商業用種子及非系統性管理生產之少量輸入種子，輸入之種子業者仍需持續通報檢測結果。擬採系統性管理之業者需提交有害生物管理計畫和文件，NSHS 受理後將對其計畫進行審核，並需與輸出國的植物檢疫機關共同合作，以完成海外輸出國產地查證作業，整個系統性管理必須能夠證明透過內部查核確認管理計畫有效完成，並保有完整相關文件備查。有害生物管理計畫的內容，必須包括使用檢測確認無罹染病毒之種子，種植區域的有害生物調查，避免機械傳播 (人員、花粉及機具) 病毒的管控措施，植株出現疑似病徵的檢測，蜜蜂及寄主雜草之管理措施等。NSHS 將進行一系列測試以驗證該系統性管理程序下所產生的種子是否未罹染該病毒，如有發現時應立即通報 APHIS。跟大型露天式田間栽培方式相比，育種者種子之病毒監測強度超高，有鑒於目前並沒有來自疫區國家的寄主種子輸入，已成功降低 CGMMV 的入侵風險。

3. 參訪愛荷華州立大學種子科學中心各實驗室

由愛荷華州立大學種子科學中心共同主持人 Dr. Charlie Block 及行政協調員 Dr. Tracy Burns 帶領參訪愛荷華州立大學種子科學中心 (Seed Science Center, SSC) 各實驗室進行種傳病原檢測情形。

種子科學中心係為種子各項實驗專用而設計建造的實驗室，早期附屬在 APHIS 之下，2001 年建立 NSHS 後自 APHIS 所屬機關中獨立出來。全區概分成行政辦公區、案件受理室、樣本研磨室 (Grinding room)、發芽測試實驗室 (Germination lab)、新測試技術實驗室 (Trail testing lab)、植物病理學實驗室 (Plant Pathology lab)、風險評估實驗室 (Risk assessment lab)、植物生理

學實驗室 (Plant Physiology lab)、核酸研究實驗室 (Nucleic acid lab)、種子健康實驗室 (Seed health lab)、ELISA 實驗室 (ELISA Lab)、樣本保存室 (Sample storage room) 及生長箱室 (Growth chamber room)等。

待測試之種子通常在星期一或星期二由申請人親自或由郵寄送達，案件受理後將給予 Barcode 以利追溯，並依據測試項目進行分類送至各實驗室進行檢測或測試。如為進行病原檢測之種子可用鋼珠、刀片式食品級研磨機或液態氮研磨，因檢測案件數眾多，SSC 通常使用 2 種尺寸之鋼珠進行震盪研磨以節省人力及時間，大尺寸之鋼珠在研磨後會再清洗消毒重複利用，小尺寸之鋼珠則直接丟棄，研磨後之樣本加入緩衝液及各式試劑以抽取 DNA 或 RNA，進行後續 PCR 或 ELISA 檢測。考量檢測成本及人力，SSC 通常使用 ELISA 進行病毒檢測，除非沒有檢測血清或輸入國檢疫規定要求，方使用 PCR 方式進行檢測；真菌部分通常以一般培養基 (Water agar) 進行培養後以形態特徵鑑定到屬，如檢測到特定對象之真菌方再進一步鑑定到種；細菌部分通常以屬鑑別培養基進行培養後以菌落特徵或螢光測試鑑定到屬，如有需要再進一步鑑定到種；在線蟲部分則因檢測對象玉米及大豆不會有種傳線蟲而無需檢測。

測試結果需經由資深人員確認後方能出具檢測報告 (參考樣本如附件 19)，報告通常在星期五核發並以電子郵件或紙本寄遞方式送交業者。案件從受理到完成報告皆以 Barcode 進行管理，各個流程之記錄皆鍵入植基於 Microsoft Excel 介面轉換的資訊系統中以利追蹤。

4. 參訪通過美國 NSHS 認證之檢測驗證單位 Corteva 種子公司

前往通過美國 NSHS 認證之檢測驗證單位 Corteva 種子公司，由該公司田間病理學及診斷研究員 Dr. Scott Heuchelin 帶

領，參訪該公司種傳病原檢測實驗室，瞭解種傳病原之檢測作業、人員訓練過程、每年自我查核及 NSHS 每 3 年查核確認是否符合 NSHS 體系等情形。

Corteva 隸屬於 Dow Dupont 公司，前身為 Pioneers 公司，於 2018 年 1 月 5 日改名為 Corteva。自 NSHS 於 2001 年 7 月 18 日建立後，該公司於 2006 年 8 月 6 日加入 NSHS 體系，每 3 年接受 NSHS 實地查核 1 次。該公司主要生產的種子種類為玉米、向日葵、高粱、大豆及小麥，確保生產高品質無病原污染之種子，該公司培訓有專精人員負責相關病蟲害田間檢測及實驗室檢測，但焦點主要放在輸往國家所關切的檢疫有害生物種類上。

NSHS 開放申請認證的 4 大類驗證項目，包括種子取樣以進行種子健康檢測、種子目視檢查、植物產地檢疫及種子健康檢測等，該公司皆有申請並通過認證，透過嚴密的自主管理及落實執行，並與該公司各子單位綿密的網絡式溝通 (Network communication) 及共同合作，以期生產符合各輸往國家的檢疫規定的無病原種子，並透過適當的種子包裝避免運輸時污染，達到行銷全世界的目的。

由於通過認證的檢測驗證人員在進行各項檢查作業時係被授權代表 USDA-APHIS 執行，因此如何確保執行時 100% 的可信度及一致性顯得非常重要。該公司設有學習中心，並在 NSHS 指導下設計及辦理新進人員訓練，另每年召集分布在全美 22 個生產點，以及波多黎各與智利等生產點的相關人員參加複訓。新進人員訓練課程以植物產地檢疫為例通常有 4 天，包括一般性訓練、於實驗室及田間認識對象作物檢疫有害生物之病兆及病徵、紀錄填寫及通報作業等等，結訓時必須通過一般性訓練測試及對象作物所有的檢疫有害生物測試，並由 NSHS 查核確認後方能通

過認證成為檢測驗證人員 (依作物種類各別認證)。每年必須複訓 1 次，每 3 年由 NSHS 查核 1 次，通過複訓及查核者方能繼續作業，未通過者暫停其資格 1 年，1 年後經再次訓練合格後方能再次擔任檢測人員。由於該公司生產點分布於各地，目前在 NSHS 指導下開始辦理線上教育課程，除檢測人員可隨時上線復習相關課程外，亦節省龐大的人員交通、住宿及訓練費用。NSHS 人員另表示如驗證單位規模不大，可向 NSHS 申請，再由 NSHS 安排相關人員接受教育訓練。

檢測人員必須攜帶 GPS 紀錄器執行產地檢疫以追溯檢查路線軌跡，依據生產區之面積及形狀決定檢查點數量，每個檢查點隨機檢查 20 個樣本，並以檢查到的特定病害數量除以檢查數量 (檢查點數量 X 20) 即為感染率 (Infection rate)。如有發現病徵時應拍照並取樣進行染色鏡檢或以分子生物學方式 (通常為 PCR) 進行鑑定，隨後填寫製作相關紀錄於植物檢疫檢查報告 (Phytosanitary Inspection Report)，經公司相關主管人員審核後送交 NSHS 及 APHIS，相關紀錄及照片必須保存 10 年備查。

該公司生產之種子行銷世界各地，因輸往國家檢疫規定各有不同，該公司另依據從現有輸入許可證所蒐集近年來之通關資料，設計檢疫及通關資訊查詢測試系統 (Import requirement research)，以利行銷單位檢視現有儲藏種子可輸往國家以成立訂單、生產單位檢視以進行生產流程排序、檢測單位檢視訂單內尚須病原檢測之種子批號，或是否需要研發新的病原檢測項目。該系統目前可交叉檢索項目有輸入國家 (Import country)、輸出國家 (Export Country)、生產地 (Origin)、作物類別 (Crop) 及輸出型態 (目前僅有種子型態可選擇)，檢索後可出現之資訊欄位有有害生物代碼 (pest code)、有害生物學名 (scientific name)、檢查方式 (輸出前、產地檢疫或實驗室檢測) (Inspection type, before shipping,

field or lab)、田間容許度 (Field tolerance)、產地檢疫流程 (Field protocol)、實驗室檢測容忍度 (Lab tolerance)、實驗室檢測流程 (Lab protocol)、參考文獻(Reference)、退運意見(Return comments, 通常是退運通知書)、整體意見(Comments)、資料來源 (Information resource)、法規文件 (Requirement Documents)及附件 (Attachment)。查詢後會出現可輸出或禁止輸入，可輸出者或出現僅供研究用或可商業用，並分列出不同檢疫及通關要求。

四、心得與建議

本次研習時間短促行程緊湊，在綜合參訪 APHIS Beltsville 實驗室及 NSHS 位於愛荷華州立大學的種子健康中心及相關研習課程後，茲整理相關心得及建議如下：

- (一) 本次拜訪 APHIS 實驗室，研習有關類病毒等重要種傳病原之檢測技術。該實驗室的管理如精密機械工廠一般地規劃與執行，避免人為干擾，確保檢測報告可為國家所信任，2015 年導入品質管理系統 (Quality Management System) 並經 ISO 17025 認證通過，依 APHIS 總部指示，建立各種須檢測病原之標準作業流程，詳細規範每個流程，每個步驟，使用機器，操作台，以及紀錄表格等等，以符合工作所需，於每年複訓以確保檢測人員做法一致以避免錯誤，同時於 2019 年設置品管主任籌畫各項品管作業，並定期及不定期督導及考核各項檢測作業之正確性以及檢測人員的檢測能力是否維持。管控嚴格人員進出，明確區分辦公區、實驗區及用餐區，實驗區內尚依檢測目的及檢測之病原種類分隔成不同實驗小區，不同人員依其權限只能進入被授權區域作業。食物嚴格禁止攜入實驗區，水瓶雖可攜入實驗區，但不得攜入實驗室，如須飲水須至實驗室外飲用，以避免發生實驗室污染。

因 PCR 反應相當靈敏，該實驗室嚴格遵守實驗空間隔離守則，配製試劑與檢體處理必須在不同空間進行，且檢測實驗室的物品不可再拿回 PCR 準備室，尤在操作 Nested PCR 時，第 1 次 PCR 後，因檢體內已含大量增幅產物，當準備進行第 2 次 PCR 時，即可能會造成污染。同樣的，拿到電泳室的物品絕對不可再拿回檢測實驗室及 PCR 準備室。

- (二) 參訪愛荷華州立大學種子科學中心 (Seed Science Center, ISU) 研習美國種子健康體系 (NSHS) 管理系統。該中心為 NSHS 總部，平時接受美國全國各地委託 (主要是愛荷華州) 進行輸出種子特定病原檢測，該中心種子檢測作業業務非常龐大，為避免人為因素干擾，較為繁雜

的檢測流程皆由訓練有素且執行多年的技術人員操作，並訓練在校學生協助參與實驗材料的準備與初步試驗，最後並經資深種子病害檢測人員確認後送交行政管理單位出具檢測報告。所有流程以顏色及標籤管理，確保所有種子檢查過程可追溯。

- (三) 病原檢測流程應標準化及制度化：為確保所有檢測人員與操作方式之一致性，應建立病原檢測標準化流程並加以制度化，另美方 APHIS 實驗室自 2018 年大幅更新並統一檢測設備及耗材，如 real-time PCR 或 PCR 儀器、ELISA 測定儀、自動核酸萃取儀等，以減少出錯機率，或是在出錯時能快速找出問題點。
- (四) 應設置專職品管人員：品管人員可擔任第三方的角色，籌畫實驗室各項檢測作業之品管作業，並定期及不定期督導及考核各項檢測作業之正確性以及檢測人員的檢測能力是否維持，可有效確保檢測報告的正確性。
- (五) 使用合適的儀器設備及作業流程：美方雖參考不同國家的檢測機構及科學文獻建立各項檢測標準作業流程，但仍持續依據不同的病原種類及實驗結果修正各項作業流程，如欲進行番茄種子類病毒檢測，使用小型、拍打式研磨機結合自動核酸萃取機；而進行瓜類種子病毒檢測時，則是球磨式研磨機結合傳統手動方式以萃取核酸。
- (六) 因應國際趨勢，建立重要新興病原檢測技術：目前世界各國因應國際間疫情之發展，紛紛訂立輸入檢疫條件或採取緊急措施，限制新興病原之寄主種子種苗自疫區輸入，自非疫區輸入者則須取樣進一步經實驗室檢測確認未罹染該病毒始可輸入，以避免新興病原入侵危害。為持續順暢我國種子種苗外銷，應及時建立重要新興病原檢測技術。
- (七) 制定種子檢測及測試作業委託辦理相關法規：因應業者申請種子出口案件日漸繁多，影響檢疫檢測執行效率，應可參考部分國家係透過學術界或民間專業機構負責建置種傳病原檢疫檢測標準方法與提供檢測服務之作法，制定種子檢測及測試作業委託辦理相關法規，研擬我

國輸出植物種子檢疫檢測鑑定技術相關規範，規劃建立檢測實驗室系統，以期擴充我國種傳病原檢測單位及量能，有效提升檢疫檢測行政效率。

- (八) 透過本次赴美國研習美國國家種子健康體系，瞭解 USDA 授權愛荷華州立大學種子科學中心執行 NSHS 的實際作法及程序，以及 APHIS 據以核發植物檢疫證明書的方法，將可作為我國制定相關法規、建立檢測驗證實驗室制度系統及核發植物檢疫證明書之參考。另本次研習同時交流植物種傳重要病原檢測技術與標準化流程，亦可供我國參考以加速建立相關技術之時程以強化檢測結果之公正性。目前我國種子輸出檢疫病原檢測作業已朝向病原檢測流程標準化並陸續訂定相關標準作業方式，為因應世界各國逐漸要求進行重要新興病原檢測並加註於植物檢疫證明書之新國際趨勢，未來應建立種子病原檢測專職管理單位，期使我國種子輸出入檢疫檢測制度更加完善。

伍、致謝

本次研習及參訪行程感謝美國在台協會動植物檢疫辦事處 (APHIS office) 主任 Mr. Russell T. Caplen 及陳彥錡小姐，Beltsville 實驗室副主任 Dr. Vessela A. Mavrodieva 及愛荷華州立大學種子科學中心行政協調員 Dr. Tracy Burns 之聯繫及安排，使此行順利圓滿，併致謝忱。