



日本西瓜種子檢驗方法

在果斑病之應用概況

-佐藤仁敏博士 專題演講心得與整理

農試所生技組 關政平 張凱為 吳明哲

一、前言

隨著國際貿易的發展，植物種子及種苗的流通也更加便利與頻繁。據估計種苗主要的出口品為蔬菜種子，其中又以西瓜種子為最大宗，於2008年西瓜種子的出口值，佔了所有出口值的23%。然而，在進出口這些種子與種苗的同時，各國必須承擔由國外引進之種子與種苗帶有害蟲或病原的風險。若這些種苗感染的是國內未曾發生之害蟲或病原菌時，後果不僅會影響該植物本身之栽種，甚至可能危及其他栽培作物，進而造成當地生態衝擊，因此在進口時應要嚴格實施種苗的檢疫以達安全把關的效果；同樣地，由國內輸出之種子與種苗也必須做到確實的害蟲及病原菌檢測，防止輸入國不慎栽種感染的種苗，而影響當地的農產業。

在國際上為達到評鑑世界種子品質之一致性，早在1924年就成立了國際種子檢查協會(International Seed Testing Association, 簡稱ISTA)，包含我國在內目前已有77個會員國。ISTA的主要任務在於制定國際間通用的種子採樣與檢測方法，以及提供種子分析技術的認證與相關訓練，並核發認證予合格之實驗室，授權其執行種子的檢測以維護國際間種子的品質。

農業試驗所於102年12月18日邀請ISTA執行委員會委員亞洲區唯一委員暨代表佐藤仁敏(Masatoshi Sato)博士蒞臨生技組會議廳進行專題演講(圖一)，講題為「Seed health testing methods, in particular bacterial fruit blotch」(健康種苗檢驗方法—細菌性果斑病之檢驗)。佐藤仁敏博士不僅為日本獨立行政法人種苗管理中心病害檢查課課長，且自2007年迄今擔任多年的ISTA執行委員會委員，擁有豐富的種苗檢測相關學識與經驗，透過此次的專題演講可以瞭解現今細菌性果斑病通用的檢測方法，不論是在學術知識的傳播上或是對種子貿易的

作者：關政平助理研究員
連絡電話：04-23317323

實際應用上均有所助益，對所有聽眾而言都是獲益匪淺。

二、細菌性果斑病

瓜類細菌性果斑病（*Bacterial fruit blotch disease*; BFB）是由 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*（Aac）所引起的，此病菌可感染多種瓜類作物，包括西瓜、甜瓜、苦瓜及南瓜等。在台灣各地均有細菌性果斑病的發生，感染較嚴重的瓜田可達到60%以上的罹病率，造成鉅額的農業損失。瓜類細菌性果斑病廣泛地發生於世界各地，以西瓜為例，舉凡美洲的美國、巴西、哥斯大黎加、尼加拉瓜等，亞洲的中國、南韓、泰國、日本與台灣，歐洲的土耳其，非洲的南非及大洋洲的澳洲均有西瓜細菌性果斑病的災情發生，足見瓜類細菌性果斑病對國際瓜類作物造成巨大的衝擊，使得瓜類細菌

性果斑病成為國際上瓜類產業極為重視的疾病，為了防範此病害的發生與維護瓜類健康種子，發展準確、迅速、靈敏及低花費的檢測技術就顯得特別重要，而這也是本次演講的宗旨。

三、演講摘要與整理

此次專題演講內容除整理目前種苗最新的細菌性果斑病檢測方法外，也介紹日本獨立行政法人種苗管理中心的健康種苗業務情形及說明國際種子檢查協會（*International Seed Federation*; ISF）的任務與管理事項。目前國際種子協會對於種苗的細菌性果斑病的檢測尚無統一的方法，以下為本次專題演講探討之各國現行檢測法，茲將說明如下：

1. *Greenhouse grow-out (GGO)*：已是廣泛例行性種子檢測方法之一，此法亦是美國採用的檢驗BFB常用方法。在溫室中以高溫、高濕的條件培養種苗，由子葉觀察是否有果斑病的病徵。由於種子汙染細菌不均一，因此一批檢測必須培養約一到三萬顆種子，一般而言，有感染的種苗培養2至3周後即會顯現出病徵。此方法的優點在於其所要求的技術門檻不高，經過藥劑處理過的種苗亦可適用此法，且偵測到的是具有感染力的活菌，有利於進一步的分析。反觀其缺點，由於培養於高溫、高濕環境亦有利於其他黴菌的滋長，易發生黴菌汙染種苗的狀況，且培養所需之空間與數量過於龐大，若以機械手臂操作時易產生交叉汙染的現象，此外，細菌性果斑病感染的寄主種類繁多，不同的寄主往往會



圖一、講者佐藤博士和現場翻譯林宗俊博士討論與會人員的提問。

有不同的病徵，有些較不明顯的症狀往往也會被忽略，容易有偽陰性的情形產生，因此在病徵的判斷上需要專業的人員來執行。

2. Sweat box (SBX)：為一種經改良之種苗grow-out assay。種苗在高溫高濕的環境下，定溫培養於sweat box（保濕盒）內，操作與檢測大致與上述GGO法相似。由於此方法皆在盒內進行，具有容易觀察與發現病徵出現之優點，並可依此作為判斷種苗是否感染Aac的標準，但是對於有些非Aac之其它微生物也可能引起相似的病徵會造成錯誤的判斷為其缺點。而應用此法作為檢測標準的國家例如荷蘭的官方機構Netherlands Inspection Service for Horticulture。

3. Monsanto direct PCR-Wash method：洗下種子後不需經過菌體培養直接進行聚合酶連鎖反應（polymerase chain reaction; PCR）法檢測。操作上是將約五千顆種子加入緩衝液內，經震盪培養20小時後，取約10 ml的上清液進行核酸的萃取。利用PCR法的優點在於其高靈敏度與所需的時間短。在靈敏度方面，穩定且準確的PCR結果取決於所選擇引子，目前已有多組引子對被開發，其中以SEQID4/SEQID5與SL1/SR1因其具有較佳之專一性，所以應用較為廣泛，據研究指出SEQID4/SEQID5之靈敏度約為50 pg，而SL1/SR1之靈敏度甚至可達1 pg；在時效性方面，使用本種苗檢測法，僅需約兩天的時間即可確立感染與否。然而，此法並無法區分種苗所感染的是死菌或活菌。

4. Syngenta Taqman PCR-wash method：已有許多家種苗公司採用此方法。種苗的處理與核酸的萃取與上述Monsanto direct PCR-Wash method相同，兩者間的差異在於，洗下種子後進行的分析法是定量式之real-time PCR。利用real-time PCR可以達到定量且提高檢測的靈敏度。

5. Immunomagnetic captured PCR method：此法使用磁珠純化法結合PCR進行BFB檢測。利用與果斑菌抗體結合的免疫磁珠吸附由種子表面洗出之果斑病菌，磁珠捕捉到的Aac菌體經離心濃縮及免疫吸附後，較容易藉由磁力把其他PCR干擾物質分離出。再經過去除免疫磁珠等步驟，最後使用PCR或是real-time PCR法進一步檢測。此法雖仍在試驗階段，但一般認為經過免疫磁珠吸附處理後能初步純化待測物中的果斑病菌濃度，能有效提升PCR的靈敏度，據研究指出透過real-time PCR法檢測，連5000顆種子洗出物中有0.02%的感染率都可偵測到。而且由於吸附過後的果斑菌仍具有活性，因此可以塗抹於半選擇性培養基（semi-selective medium）培養保存之，以待後續的分析，亦或是可應用於接種植物之用，以了解其致病性。

6. Sweat-bag seedlings method：主要是由日本研發改良而成的新式檢測西瓜種苗病害之方法。這個技術包含純化與偵測兩個部分，偵測時可使用特殊的引子與聚合酶引導之環式擴增核酸法（Loop-Mediated Isothermal Amplification；LAMP）及半選擇性培養基檢驗，假若結

果為陽性反應，則可使用血清反應及致病性試驗。此法具有在短時間內檢測大量種子的優點，已引起產業界的關注，未來日本打算推廣此法至種苗業。

四、心得與建議

為了提升瓜類檢測之可信度，佐藤博士認為未來需要深入探討的研究方向包括病原菌在西瓜種子內部的分佈情形與確實位置、病原菌在種子與種苗的分佈動態及引起發病所需之最少菌量數等，透過瞭解這些對病原菌與種子之關連性，將有助於提升BFB診斷的準確性。

細菌性果斑病已是許多國家在種苗進出口檢疫時極為重視的病害，由於細菌性果斑病的發生大多數是經過被感染的種子所傳播，因此建立此病菌有效並精確的診斷方法，方為預防此病害最有效的方法。佐藤博士在本次專題演講有系統的報告目前各國於種苗所採用的各種細菌性果斑病檢測技術，但每一種方法各有其優缺點及適用性，再者不同的檢測條件下可能會產生不同的結果，因此若能更嚴謹地規範檢測的方法與各項檢測參數，對各個國家或是種苗公司而言，將會是一大福音。

五、參考文獻

曾國欽、呂昀陞、鄭安秀、黃德昌、徐世典。2010。近年來我國重大作物病害之發生及其診斷、監測與防治。瓜類細菌性果斑病：病原菌檢測與病害管理。農業試驗所特刊149號。pp193~204。

Sato, M. 2009. Bacterial fruit blotch of watermelon in Japan and its seed health testing methods. International symposium on the watermelon industrial development and utilization. P.10-16.

Koenraadt, H., Borst, R., van Vliet, A., Hoekstra, M., van Schieand J., Buimer, M. 2005. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* with the sweatbox method. Phytopathology 95: 962.

Oya, H., Nakagawa, H., Saito, N., Uematsu, H., Ohara, T. 2008. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from seed using LAMP method. Jpn. J. Phytopathol. 74: 304-310.

Sato, M., Shirakawa, T., Matsuura, T., Tashiro, T. 2006. Method for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon and melon seeds using enrichment system with seedlings. Jpn. J. Phytopathol. 72: 311-312.

Shirakawa, T., Aizawa, M., Komiya, Y., Abiko, K. 2000. Development of semiselective medium for isolation and detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from seeds and plant materials. Jpn. J. Phytopathol. 66: 132.

Walcott, R. R., Gitaitis, R. D. 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. Plant Dis. 84: 470-474.