

建立符合國際規範之瓜類種子傳播果斑病菌檢測技術平台

撰文/黃秀珍·胡仲祺·張瑞璋·邱安隆·曾國欽

前言

植物種子可以攜帶真菌、細菌、病毒等病原微生物而成為傳播病害的主要工具之一。植物病害藉由種子為媒介而擴散蔓延者，統稱為種傳病害，除了造成種子發芽率降低、苗期死亡率升高等問題之外，更可能引進新的病原種類或不同生理小種而造成病害的大流行，嚴重降低作物的產量與品質，對農業經濟損失至鉅。因此生產品質良好且不帶病原的種子，是確保成功量產高品質農產品的首要條件。

瓜類作物的細菌性果斑病 (Bacterial fruit blight) 為西瓜、洋香瓜等重要瓜果作物產業的主要威脅之一，係由細菌性果斑病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*，簡稱 Aac) 所引起。該病曾在 1989 年於美國佛羅里達州西瓜田發生嚴重感染，導致幾乎全園無收穫的嚴重經濟損失。臺灣地區則於 1992 至 1993 年間在雲林、台南等地的西瓜田最早發現此病，經中興大學植物病理系徐世典教授鑑定證實感染果斑病菌後，又分別在台東、花蓮、嘉義、高雄等地的瓜類露天栽培區紛紛出現疫情，造成農民的嚴重損失，而受到 Aac 感染或污染的種子是本病的最主要的原始感染源 (Primary inoculum)。在美國對於種苗業者所販售的西瓜與洋香瓜種子上的 Aac 病菌

訂有「零容忍 (Zero-tolerance)」的政策，即一旦種子被檢出 Aac 則不得販售之規定。美國業者利用發芽法 (Grow-out test) 檢測，需求每一批次的瓜類種子，直接採取一萬到三萬粒種子在實驗室或溫室條件下進行發芽測試，之後再觀察發芽後的瓜苗子葉上是否出現水浸狀的病斑，以不得檢出 Aac 病菌作為診斷的標準，預防該病害的發生。

建立種傳病原檢定技術平台之目的

現今由於世界貿易流通發達，種子已儼然成為新病害傳播至世界各地的主要途徑之一，因此亟需建立符合國際規範的種傳病原檢測技術平台，以因應種子生產者、貿易商及農民對於健康種子的需求，並遵守各國政府所設定的檢疫規範。本文針對現行國際規範之種傳病原檢測技術平台作簡要介紹，期望能對基本原則及申請國際認證 (Accreditation) 過程有所了解，進而在國內建立符合國際規範的瓜類種子傳播細菌性果斑病菌檢測技術平台，以提振國內農業生物技術，確保農業相關產業的永續發展。

國際規範種傳病原檢測技術平台之規則及基本精神

依據國際種子檢查協會 (International Seed Testing Association, ISTA) 所頒布的國際種子檢查規則 (International Rules for Seed Testing) 所揭示，種子健康檢查的目的在於藉由測定種子樣品的健康情形而推知該批次種子的狀況與價值。然而每種病原體檢測技術在靈敏度、專一性、與檢測速度方面皆有其極限，且其難易度與所花費的價格亦有極大的差異，在客戶（報驗單位）方面，對於上述的靈敏度等極限也會依據不同的栽種目的或販售對象而有不同的需求。然而種子不同於其他消費性質之農產品（如水果或肉品），其檢查或檢驗結果將受到嚴苛的後續檢討，因為種子終將被種植，抽樣檢驗的結果是否能正確反映出整批種子在田間種植後的健康狀況，終將接受種子商與農民的考驗。不論是檢測報告判定不帶特定病原、卻於田間顯著發病（偽陰性），或是判定帶有病原、但在其他地方實際栽植後，卻無任何發病狀況（偽陽性），都將損害負責檢驗機構的公信力，並可能使檢驗單位面臨法律責任之追訴。

欲符合國際規範之基本精神，以 ISTA 與國際標準化組織 (ISO) 所建立的原則來說明，所謂國際規範所代表的基本精神即為追求一致性 (Uniformity) 與可追溯性 (Traceability)。此處的一致性，一方面指抽驗樣本與整批貨品間的一致性（取樣技術與取樣代表性），另一方面指檢驗技術層次的一致性，包含可重複性 (Repeatability) 與再現性 (Reproducibility)。可重複性係同一個操作者（或同一台機器，同一個檢驗單位等）再次從事相同的實驗（例如再次檢驗相同的樣本），是否會得到相同的結果；因此，可重複性反映出該檢驗員（或該機器、該單位等）所發出的報告是否可以信賴。而再現性係指不同的操作人員（不同國家、不同檢驗單位、不同的時空環境下）使用相同的技術平台進行檢驗，是否會得到相同的結果；故再現性則反映出該技術平台是否可以推廣至其他單位或國家，並在不同時空環境下使用。一個符合國際規範具有一致性的

技術平台，必須讓同一操作員每次均可得到相同結果，並且使不同的操作員在不分地點、季節、國家等環境下亦能獲得相同的結果，如此才可達到一致性的目標。

可追溯性係指相關於工作的文件與物品等之完整紀錄與保存，當結果出現問題、面臨客戶投訴或法律責任時，皆可追溯至問題發生的源頭，並加以解決。可追溯性適用於抽驗樣本（取樣時即已分樣為三份，其中一份進行檢驗、一份交由客戶保存、另一份由檢驗單位保存，期限為一年）、相關之技術文件、實驗室儀器之定期校正與保養紀錄、檢驗結果紀錄、與所發出證明文件之紀錄等（文件紀錄最少需保存六年）。其中技術文件部分必須有各個版本與修訂的完整紀錄，以便於追溯在一段特定期間內所進行的檢驗工作是依據何種版本的技術文件。如此當異常結果或爭議出現時，即可順利解決問題，並據以改進標準操作程序，以防止問題的再度發生。

為達到上述的目標，檢驗單位內應分別設置技術部門 (Technical Department) 與品質保證部門 (Quality Assurance Department, 簡稱品保)，以監督檢驗工作均依照標準操作程序進行，確保檢驗結果之一致性與可追溯性。其中技術部門負責檢驗工作之確實執行，而品保則負責檢驗工作與結果品質的確認。通常在檢驗單位中，工作人員在檢驗技術方面均已受充分訓練並有豐富經驗，但在品保工作方面，卻經常受到忽視，反而造成檢驗結果不一致性，而導致無法獲得客戶的信賴與國際規範的認證。因此欲獲得國際組織（如 ISTA）的認證，品保部門的工作與技術部門同等重要。品保之主要工作為文件管制 (Document control) 與稽核 (Auditing)。在文件管制部份，包括：確認將 ISTA 發布的各種技術文件的修訂版本交給相關的工作人員並將舊版的技術文件回收、確認工作人員按照新版本的標準操作流程進行工作並須將儀器保修校正紀錄、檢驗結果紀錄、發證紀錄妥善建檔保管等。而在稽核部分，可分為內部稽核與外部稽核，外部稽核由上級

單位或組織(如 ISTA)定期進行,而品保則須負責內部定期與不定期稽核,著重於文件紀錄的檢查與實際操作之監督,確保所有工作均按照標準操作程序進行,並發現與解決工作流程中的問題。另外,除定期召開稽核會議之外,並有外部單位(同儕或上級單位)不定時進行的精準度試驗(Proficiency tests,或適任性測驗),例如 ISTA 稽核單位會不定期將已知結果的樣本分別寄給各會員國進行檢驗,以確保不同單位的檢測結果的一致性,並及早發現問題而加以改進。

在這樣嚴謹的規範下,ISTA 所認證的種子健康檢查方法,僅針對 26 種病原體/作物的組合(即只能對這 26 種組合在 ISTA 國際種子檢驗證書上進行結果報告)。而西瓜果斑病菌 Aac 與西瓜作物並不屬於 ISTA 認證的種子健康檢查方法中的病原體與作物組合,因此即使檢驗單位確實使用某種檢測方法而判定該樣本並未帶有 Aac 病菌,也不能在 ISTA 國際種子檢驗證書上報告,而美國農部的國家種子健康系統(National Seed Health System, NSHS)亦僅針對 10 種園藝作物與 2 種農藝作物各 24 種病原體認證檢測的方法,可見要求之標準相當高。

國際種子健康檢查組織或單位

目前國際上有所謂的國際級、國家級或地方級、甚至貿易商自組的種子組織,且已建立國際規範的種子健康檢查之組織包括 ISTA(截至 2013 年 1 月 1 日已有包含 77 個國家中的 202 個會員實驗室、42 個個人會員與 43 個組織會員)、國際種子聯邦(International Seed Federation, ISF)中的 International Seed Health Initiative (ISHI)、美國農業部的 NSHS 及其他主要農業國家防疫檢疫單位與獨立公司或實驗室(如荷蘭的 Netherlands General Inspection Service for Agricultural Seeds and Seed Potatoes, NAK、美國的 Eurofins/STA 公司等)。這些主要單位與組織均各自發展適合本身特性的種子健康檢查之標準操作流程、技術平台及收費標準,

然而彼此之間亦保持著微妙的競爭與合作關係,互相承認對方的檢查技術與規範,並結合為聯盟,但互相競爭國際種子貿易商大客戶與檢查技術平台之領導地位。儘管各單位間各自獨立發展不同的標準操作流程與檢測技術平台,但皆遵守國際規範的基本精神與標準,才能確保彼此間檢驗結果的有效性與可流通性。而種苗業者與農民則亦須遵循這些單位與組織所設定的各種技術規範、檢疫法規及收費標準,按照買賣雙方皆能認可的檢測靈敏度、專一性、速度及價格等基本需求申請種子健康檢查,才能使產品進入國際貿易市場,並保障彼此間的法律經濟權益與農產之品質。

現行瓜類種子中Aac菌的檢測技術平台

目前瓜類種子中 Aac 菌的檢測方法,尚未納入 ISTA 的國際種子檢查規則的規範中,然而目前在科學文獻中已有許多的檢測方法,其中較常使用的方法有下列數種:

1. 發芽法(Grow-out test)

如前述,本法為生物檢驗法的一種。此法具有極高的生物意義,因本法為直接檢測仍具有感染力的 Aac 病菌,而非失去活力的殘存菌體。但因瓜類種子催芽至子葉展開通常需要耗時一週以上,較為耗時耗力,且一次採用 10,000-30,000 粒種子,須溫室或培養箱等空間。目前國際上僅有極少數實驗室(如美國的 Eurofins/STA)被認證可進行此檢測方法。

2. 細菌培養法

亦為生物檢驗法的一種。本法以種子的浸出液或萃取液,經進行系列稀釋(或濃縮)後,先以移植環將稀釋液畫線於 KB 培養基上培養 48 小時後,再將可疑的單一菌落移植於改良之半選擇性培養基 WFB68 上,於 30°C 培養 48 小時後,觀察是否有 Aac 菌落產生,並進一步在菸草葉片上測試是否可引起過敏性反應,從而判斷該菌是否具有感染力。

3. 血清學檢測法

本法利用果斑病菌之抗血清，應用免疫擴散法、直接或間接酵素鏈結免疫吸附法 (direct or indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)、或西方墨點法等血清學技術，進行瓜類種子中 Aac 病菌的檢測工作。此法已被普遍應用於一般的防疫檢疫工作中，靈敏度可達到 10^4 - 10^5 CFU/ml。

4. 聚合酵素鏈反應法(Polymerase Chain Reaction, PCR)

此方法利用 Aac 基因體中已知的特異性核酸序列設計引子對，並以 PCR 方法進行 DNA 增幅以檢測 Aac 基因體 DNA 片段的存。此法為目前最靈敏的 Aac 分子檢測法，但此法所檢測到的僅為 Aac 基因體之片段，無法得知其是否仍具有感染力或辨認基因體是否完整，因此有可能造成偽陽性的結果。

5. 免疫吸附-聚合酵素鏈反應法(IMS-PCR)

此法為結合血清學與 PCR 檢測法，應用專一性的血清配合磁珠 (Magnetic beads)，將較為完整的細菌體先行捕捉並濃縮，再以 PCR 方法進行檢測。此方法可去除樣本中的干擾物質，以增加反應的靈敏度與準確度。

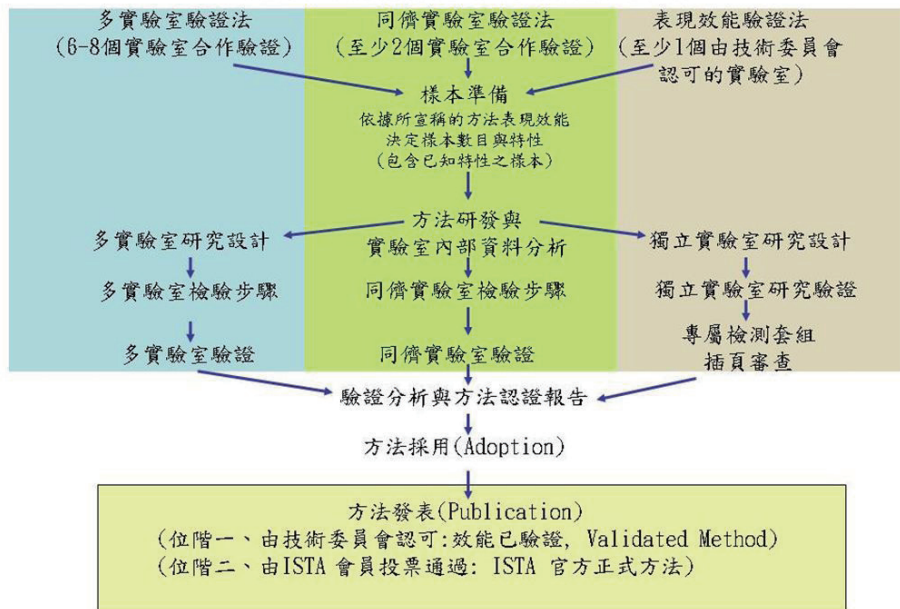
美國農部 NSHS 所認證通過的 Eurofins/STA 公司，目前所採行的 Aac 菌檢測方法，包括發芽法、ELISA 及 PCR 方法，其中以發芽法最為可信，並廣為種苗商及農民所要求採用。另 NSHS 亦認證 Seminis Inc. 公司的 PCR-Wash method，但僅限使用該公司所申請的一組引子對。上述二家公司所使用的方法係屬於真正通過認證流程而符合國際規範的種傳病菌檢測技術。在美國農部的 NSHS 系統下發布的標準操作流程中，清楚地規範該方法所適用的作物種類 (e.g Cucurbits)、病原體 (e.g Aac) 及所需樣本的大小 (每批次 (lot) 種子抽驗 10,000-30,000 粒，次級樣本 (sub-sample) 最多不得超過 5,000 粒)，並詳細說明所須準備的物品與空間、每一工作天的每個步驟如何進行，與檢測結果如何紀錄與判讀，因而可確保檢測結果的一致性與可追溯性。

種子健康檢查方法驗證 (Method Validation) 流程(適用於新方法與原方法之改良及原方法之表現效能認證)

對於檢測方法驗證流程的主要目標，在於提供一套標準系統用以評估新開發或改良的方法，比較現行不同方法間的效力，或審查與維護現行方法所宣稱的檢測效力。由於科技的進步與病原體不斷的變化，檢測技術也必須與時俱進，不斷改良，並持續加入更新更好的檢測技術平台。因此各種苗產業相關之國際組織皆設立方法驗證的標準流程，以便隨時更新改進檢測方法。以 ISTA 的種子健康檢查方法驗證之流程為例 (圖一) 說明，如圖一所示，依據不同的驗證需求，方法驗證分為三種規模：多實驗室驗證、同儕實驗室驗證、與表現效能驗證。多實驗室驗證 (或稱為環狀測試 (Ring test)，是由組織者或發起人選定 6-8 個以上，地位平等的實驗室共同參與驗證 (Certified) 某一檢測方法的效力)，是最有效的認證，但費時費力且需花費鉅資，因此通常僅用於新開發的方法。同儕實驗室驗證則僅需要至少 2 個同等的實驗室參與，通常用於原有方法改良之驗證需求。而表現效能驗證則僅須由技術委員會認可的一個實驗室進行即可，適用於確認現行檢測方法是否達到或維持其所宣稱的檢測效力。而實際施行時所需的規模必須由技術委員會開會決定。

不論是何種驗證規模，首先皆須確認該方法所宣稱的檢測效力，並按照其宣稱之效力準備樣本，包含已知特性的對照樣本。如前述，每種檢測方法皆有其適用範圍與極限，並適用於不同的檢測目的。因此必須先確認該方法所宣稱可檢測的病原體 / 作物組合、靈敏度、專一性等參數，以及其特定之檢測目的，並據以準備樣本。之後經由適當的實驗設計、實驗操作、實驗室間交叉驗證、結果分析與審查，若能通過審查即可獲得採用，再經由發表的程序，即可取得效能已驗證之方法 (Validated method) 的位階，進而發表 (Publication) 檢測方法，俾取得提交 ISTA 會員大會表決的資格；倘該方法能

ISTA 種子健康檢測方法驗證流程



圖一 國際種子檢查組織(ISTA)之種子健康檢查方法驗證流程

獲得表決通過，即可取得「官方正式方法」的地位，並正式加載於國際種子檢查規則中。簡言之，整套流程的設計，即為取得符合適用於該目的 (Fitness for Purpose) 的認證檢驗方法。

然而即使已經加入 ISTA，大部分國家亦均按照自身農業特性與需求，來建立符合該國利益之種子健康檢查標準與檢測平台，各國的種子檢查單位與組織也按照本身的特性與需求發展不同的驗證流程，以確認新方法或改良方法的表現效能及一致性。例如美國農部的 NSHS 系統即自行研發技術套組與相關資訊，其來源包括發表於科學期刊、或實驗室中已經採行但尚未發表的種子健康檢查法、特定病原體 / 作物組合專屬之檢測法、其他國際組織 (如 ISHI 與 ISTA) 認可的標準檢測法、相關種傳病原檢測資料等。因此只要能遵循前述的國際規範之基本精神，透過向相關國際組織申請認證的流程並獲得通過認證，即可在本國建立符合國際規範的種傳病害檢測技術平台。

結語

為因應農業相關產業國際化所帶來的競爭與衝擊，行政院農業委員會已提出精緻農業及十大研究團隊計畫，其中即包括植物種苗重點產業研究團隊。而防檢局亦已指導籌組研究團隊，配合各級相關從業人員開始在國內建立十字花科蔬菜及瓜類種傳病原檢測之技術平台，期望能依照前述國際規範之基本精神，即遵循一致性與可追溯性的最高指導原則，透過向相關國際組織申請認證的流程並獲得通過認證，即可在本國建立符合國際規範的種傳病原檢測技術平台，以供防檢疫相關工作人員使用。在進口種子部分，可防堵從國外藉種子輸入造成病菌之入侵與擴散；在出口種子部分，則為國內種子生產者節省巨額的國外檢查經費與報驗所需人力物力成本，可確保我國種子產業之利益。

AgBIO

黃秀珍 國立中興大學 生物科學研究所 教授
 胡仲祺 國立中興大學 生物科學研究所 副教授
 張瑞璋 行政院農業委員會 動植物防疫檢疫局 組長
 邱安隆 行政院農業委員會 動植物防疫檢疫局 技正
 曾國欽 國立中興大學 植物病理學系 教授

參考文獻

1. 鄭安秀、黃德昌 (2001) 洋香瓜及西瓜細菌性果斑病。台南區農業專訊 36:11-13。
2. Castro, A. C., Fessehaie, A., and Ling, K. (2006) Progress towards a commercial PCR-based assay for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Seed Science and Technology 34: 101-116.
3. 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 Disease 84: 470-474.
4. International Rules for Seed Testing. Edition 2010. International Seed Testing Association/ISTA.
5. ISTA網站, From <http://www.seedtest.org/en/home.html>
6. STA網站-種子健康部分, From http://www.stalabs.com/Seed_Quality/Seed_Health.php
7. USDA-APHIS NSHS美國農業部動植物檢疫局所轄國家種子健康系統認證之種子健康檢驗技術, From http://www.seedhealth.org/files/pdf/Vegetable_Crops.pdf

