正　本

檔　號：
保存年限：

基隆市報驗商業同業公會
收文 114年11月3日
編號 114315

農業部動植物防疫檢疫署　書函

地址：100060臺北市中正區和平西路二段100號9樓
承辦人：陳薇
電話：(02)3343-6412
傳真：(02)2304-7450
電子信箱：citreous_wei@aphia.gov.tw

200
基隆市仁愛區孝三路65巷28號1樓

受文者：基隆市報驗商業同業公會

發文日期：中華民國114年10月29日
發文字號：防檢四字第1141883468B號
速別：普通件
密等及解密條件或保密期限：
附件：

主旨：「輸出植物種子特定病原檢測作業要點」修正為「輸出植物種子病原檢測作業要點」，並修正全部規定，業經本署於中華民國114年10月29日以防檢四字第1141883468號令修正發布，並自中華民國115年1月1日生效。本案發布令（含行政規則規定）請逕至本署全球資訊網（網址：https://www.aphia.gov.tw）「最新資訊-訊息公告」頁面查閱，請查照。

正本：臺北市進出口商業同業公會、高雄市進出口商業同業公會、臺灣省進出口商業同業公會聯合會、臺北市報關商業同業公會、基隆市報關商業同業公會、花蓮縣報關商業同業公會、高雄市報關商業同業公會、臺中市報關商業同業公會、基隆市報驗商業同業公會、臺北市航空貨運承攬商業同業公會、中華民國進出口商業同業公會全國聯合會、新北市報關商業同業公會、桃園市報關商業同業公會、宜蘭縣報關商業同業公會、基隆市進出口商業同業公會、新北市進出口商業同業公會、桃園市進出口商業同業公會、臺中市進出口商業同業公會、台北市海運承攬運送商業同業公會、高雄市航空貨運承攬商業同業公會、財政部關務署、財政部關務署基隆關、財政部關務署臺北關、財政部關務署臺中關、財政部關務署高雄關、經濟部國際貿易署、農業部農糧署、農業部農業試驗所、農業部農業藥物試驗所、農業部種苗改良繁殖場、農業部桃園區農業改良場、農業部苗栗區農業改良場、農業部臺中區農業改良場、農業部臺南區農業改良場、農業部高雄區農業改良場、農業部花蓮區農業改良場、農業部臺東區農業改良場、農業部林業試驗所、農業部林業及自然保育署、農業部生物多樣性研究所、國立臺灣大學植物教學醫院、國立中興大學植物教學醫院、國立嘉義大學植物教學醫院、國立屏東科技大學植物醫學教學醫院、財團法人農業科技研究院、社團法人台灣種苗改進協會、亞蔬—世界蔬菜中心、本署基隆分署、本署桃園分署、本署臺中分署、本署高雄分署(請轉知相關業者)
副本：本署秘書室、本署植物檢疫組

農業部動植物防疫檢疫署

植物防疫檢疫組

裝

訂

線

檔　　號：
保存年限：

農業部動植物防疫檢疫署　令

發文日期：中華民國114年10月29日
發文字號：防檢四字第1141883468號

修正「輸出植物種子特定病原檢測作業要點」，名稱並修正為「輸出植物種子病原檢測作業要點」，並自中華民國一百十五年一月一日生效。

附修正「輸出植物種子病原檢測作業要點」

署長 杜麗華

輸出植物種子病原檢測作業要點修正規定

一、農業部動植物防疫檢疫署（以下簡稱防檢署）為辦理輸出植物種子病害檢測作業，特訂定本要點。

二、輸出植物種子病原檢測作業，指定下列檢測單位辦理：

（一）農業部種苗改良繁殖場。

（二）農業部農業試驗所。

（三）國立臺灣大學植物教學醫院。

（四）國立中興大學植物教學醫院。

（五）國立嘉義大學植物教學醫院。

（六）國立屏東科技大學植物醫學教學醫院。

（七）財團法人農業科技研究院。

前項檢測單位可檢測之病原種類與方法、取樣數量及收費標準應提供防檢署，並由防檢署公布於其網站。

三、輸出植物種子病原檢測作業流程如附件一。

四、輸出人為符合輸入國（地區）檢疫規定，而須於輸出植物檢疫證明書加註植物種子經檢測未罹染特定病原者，應向防檢署轄區分署提出檢測申請。

前項申請應載明輸出植物種子之學名、數量、重量、輸銷國家（地區）及申請檢測之病原名稱（學名）。

五、取樣方式及數量如下：

（一）由防檢署轄區分署派員至植物種子存放處進行取樣。

（二）各類種子之取樣數量依第二點第二項於防檢署網站公布之資料辦理。

六、樣品由防檢署轄區分署檢疫人員封識，並填寫「送請鑑定植物病蟲害報告表」（附件二），一併交由輸出人送至檢測單位進行

檢測，檢測費用由輸出人依檢測單位收費標準支付予檢測單位。

七、檢測結果通知及分批輸出作業如下：

（一）檢測單位完成檢測後，應將檢測結果登載於「送請鑑定植物病蟲害報告表」後傳送至防檢署轄區分署。

（二）防檢署轄區分署於接獲檢測單位檢測結果後，應函知輸出人檢測結果。檢測合格之種子得分批輸出，但應於二年內輸出完畢，並依實核銷數量，逾期則應重新申請檢測。

（三）前款檢測合格之種子，經輸出人檢附種子儲藏期間安全管制計畫，並經防檢署轄區分署審查通過者，分批輸出期限得延長至四年。

前項第三款安全管制計畫內容應包括種子種類、數量、存放地點、分裝及保存方法、檢測合格之病原種類、消毒設施、操作人員及分批輸出之紀錄格式。

八、輸出植物檢疫證明書核發及加註

輸出人輸出種子時，應檢附前點第一項第二款函向防檢署轄區分署申報輸出檢疫，經防檢署轄區分署確認該批種子係經檢測單位檢測合格後，始於輸出植物檢疫證明書加註檢測結果，並依實核銷數量。

第三點附件一　輸出植物種子病原檢測作業流程

輸出人向防檢署轄區分署申請病原檢測

↓

轄區分署派員取樣

↓

樣品及"送請鑑定植物病蟲害報告表”交由輸出人寄送至檢測單位

↓

檢測單位辦理病原檢測

↓

檢測結果傳送至轄區分署

↓

轄區分署函復輸出人檢測結果。
輸出人申報輸出植物檢疫時，由轄區分署依實核銷。

↓

轄區分署於輸出植物檢疫證明書加註病害檢測結果

第六點附件二　送請鑑定植物病蟲害報告表

<table>
<tr><td colspan="10">鑑定單位：　　　　聯絡者：　　　　電子郵件：
聯絡電話：　　　　傳真：</td></tr>
<tr><td colspan="10">申請鑑定單位：○○分署（植物健康科）　　聯絡者：　　　　電子郵件：
聯絡電話：　　　　傳真：</td></tr>
<tr><td colspan="3">送請鑑定日期：</td><td colspan="3">鑑定項目：</td><td colspan="2">鑑定完成日期：</td><td colspan="2">鑑定者：</td></tr>
<tr><td rowspan="2">編號</td><td rowspan="2">採樣日期</td><td rowspan="2">公文文號</td><td rowspan="2">寄主植物或介質種類(部位)</td><td rowspan="2">輸出國</td><td rowspan="2">鑑定項目</td><td colspan="2">鑑定結果</td><td rowspan="2">臺灣是否有紀錄</td><td rowspan="2">備註</td></tr>
<tr><td>種類名稱（中名）</td><td>學名</td></tr>
<tr><td>例：高-7-001</td><td>1020901</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>廠商名稱</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
</table>

檢疫員：＿＿＿＿＿＿＿　科長(站長)：＿＿＿＿＿＿＿　分署長：＿＿＿＿＿＿

輸出植物種子特定病原檢測作業要點
修正對照表

修正名稱	現行名稱	說明
輸出植物種子病原檢測作業要點	輸出植物種子特定病原檢測作業要點	依據本署一百十四年五月二十六日擴充輸出種子病原檢測量能說明會議決議，鑒於現行規定第五點附件二部分病原檢測方法耗時，而國際上已有新穎技術可供應用且發展快速，另輸入國亦未要求輸入種子須採我國官方逐項公告之方法檢測，為保留輸出種子檢測作業彈性並擴大檢測單位及量能，以滿足業者輸出期程需求，並協助拓展外銷，爰修正本作業要點名稱及內容。
修正規定	現行規定	說明
一、農業部動植物防疫檢疫署(以下簡稱防檢署）為辦理輸出植物種子病害檢測作業，特訂定本要點。	一、農業部動植物防疫檢疫署(以下簡稱防檢署）為辦理輸出植物種子特定病害檢測作業，特訂定本要點。	依據本署一百十四年五月二十六日擴充輸出種子病原檢測量能說明會議決議，刪除特定病原種類及檢測方法，爰修正相關文字。
二、輸出植物種子病原檢測作業，指定下列檢測單位辦理: (一)農業部種苗改良繁殖場。 (二)農業部農業試驗所。 (三)國立臺灣大學植物教學醫院。 (四)國立中興大學植物教學醫院。 (五)國立嘉義大學植物教學醫院。 (六)國立屏東科技大學植物醫學教學醫院。 (七)財團法人農業科技研究院。 前項檢測單位可檢測之病原種類與方法、取樣數量	二、本要點適用之特定病原種類如下： (一) 十字花科蔬菜黑腐病菌（*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*）及十字花科蔬菜細菌性斑點病菌（*Xanthomonas campestris* pv. *raphani*）。 (二) 瓜類細菌性果斑病菌（*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*）。 (三) 胡瓜綠斑嵌紋病毒（*Cucumber green mottle mosaic virus*）。	一、配合修正名稱之說明理由，刪除現行規定第一項特定病原種類。 二、依據一百十四年五月二十六日擴充輸出種子病原檢測量能說明會議決議，除現行農業部種苗改良繁殖場外，為擴大檢測量能，增列農業試驗所、臺灣大學植物教學醫院、中興大學植物教學醫院、嘉義大學植物教學醫院、屏東科技大學植物醫學教學醫院及財團法人農業科技研究院等為輸出種子病原檢測作業之檢測單位，爰增訂第一項序文，明訂輸出植物種子病原檢測

及收費標準應提供防檢署，並由防檢署公布於其網站。	(四) 胡瓜嵌紋病毒（*Cucumber mosaic virus*）。 (五) 番茄嵌紋病毒（*Tomato mosaic virus*）。 (六) 十字花科黑腳病菌（*Phoma lingam*）。 (七) 瓜類蔓枯病菌（*Didymella bryoniae*）。 (八) 菜豆炭疽病菌（*Colletotricum lindemuthianum*）。 (九) 豌豆葉斑病菌（*Ascochyta pisi*）。 (十) 菸草嵌紋病毒（*Tobacco mosaic virus*）。 (十一)豌豆種媒嵌紋病毒（*Pea seed-borne mosaic virus*）。 (十二)南瓜嵌紋病毒（*Squash mosaic virus*）。 (十三)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*）及金魚藤潛伏類病毒（*Columnea latent viroid*）。	作業由本點指定之七款檢測單位辦理。 三、規定各檢測單位可檢測之病原種類與方法、取樣數量及收費標準應提供防檢署公布於其網站，爰增訂第二項。

	(十四)菸草微綠嵌紋病毒(*Tobacco mild green mosaic virus*)。 (十五)矮南瓜黃化嵌紋病毒(*Zucchini yellow mosaic virus*)。 前項輸出植物種子特定病原檢測作業，委由農業部種苗改良繁殖場（以下簡稱種苗場）辦理。	
三、輸出植物種子病原檢測作業流程如附件一。	三、輸出植物種子特定病原之檢測作業流程如附件一。	配合修正名稱之說明理由，刪除特定病原種類，爰酌作文字修正。
四、輸出人為符合輸入國（地區）檢疫規定，而須於輸出植物檢疫證明書加註植物種子經檢測未罹染特定病原者，應向防檢署轄區分署提出檢測申請。 前項申請應載明輸出植物種子之學名、數量、重量、輸銷國家（地區）及申請檢測之病原名稱（學名）。	四、輸出人為符合輸入國（地區）檢疫規定，而須於輸出植物檢疫證明書加註植物種子經檢測未罹染特定病原者，應向防檢署轄區分署提出檢測申請。 前項申請應載明輸出植物種子之學名、數量、重量、輸銷國家（地區）及申請檢測之病原名稱（學名）。	本點未修正。
	五、特定病原之檢測方法如附件二。	一、本點刪除。 二、依據本署一百十四年五月二十六日擴充輸出種子病原檢測量能說明會議決議，爰刪除現行規定附件二特定病原之檢測方法。
五、取樣方式及數量如下： (一)由防檢署轄區分署派員至植物種子存放處進行取樣。 (二)各類種子之取樣數量依第二點第二項於防檢署網站公布之資料辦理。	六、取樣方式及數量： (一)由防檢署轄區分署派員至植物種子存放處進行取樣。 (二)各類種子之取樣數量如附件三。但檢測病原為類病毒者，依附件二之檢測方法所定數量取樣。	一、點次變更。 二、第二點第二項規定各檢測單位可檢測之病原種類與方法、取樣數及收費標準應提供防檢署公布於其網站，爰修正第二款並刪除附件三。

六、樣品由防檢署轄區分署檢疫人員封識，並填寫「送請鑑定植物病蟲害報告表」（附件二），一併交由輸出人送至檢測單位進行檢測，檢測費用由輸出人依檢測單位收費標準支付予檢測單位。	七、送檢 樣品由防檢署轄區分署檢疫人員封識，並填寫「送請鑑定植物病蟲害報告表」（附件四），一併交由輸出人送至種苗場進行檢測，檢測費用由輸出人依種苗場收費標準支付予種苗場。	一、點次變更。 二、配合第二點修正，酌作文字修正，另現行規定附件二及三已刪除，附件四遞移為修正規定附件二，並修正附件內容。
七、檢測結果通知及分批輸出作業如下： (一)檢測單位完成檢測後，應將檢測結果登載於「送請鑑定植物病蟲害報告表」後傳送至防檢署轄區分署。 (二)防檢署轄區分署於接獲檢測單位檢測結果後，應函知輸出人檢測結果。檢測合格之種子得分批輸出，但應於二年內輸出完畢，並依實核銷數量，逾期則應重新申請檢測。 (三)前款檢測合格之種子，經輸出人檢附種子儲藏期間安全管制計畫，並經防檢署轄區分署審查通過者，分批輸出期限得延長至四年。 前項第三款安全管制計畫內容應包括種子種類、數量、存放地點、分裝及保存方法、檢測合格之病原種類、消毒設施、操作人員及分批輸出之紀錄格式。	八、檢測結果通知及分批輸出作業： (一)種苗場依附件二檢測方法完成檢測後，應將檢測結果登載於「送請鑑定植物病蟲害報告表」後傳送至防檢署轄區分署。 (二)防檢署轄區分署於接獲種苗場檢測結果後，應函知輸出人檢測結果。檢測合格之種子得分批輸出，但應於二年內辦理輸出完畢，並依實核銷數量，逾期則應重新申請檢測。 (三)前款檢測合格之種子，經輸出人檢附種子儲藏期間安全管制計畫，並經防檢署轄區分署審查通過者，分批輸出期限得延長至四年。 前項第三款安全管制計畫內容應包括種子種類、數量、存放地點、分裝及保存方法、檢測合格之病原種類、消毒設施、操作人員及分批輸出之紀錄格式。	一、點次變更。 二、配合第二點修正及刪除現行規定第五點附件二檢測方法，酌修本點用詞。
八、輸出植物檢疫證明書核發及加註	九、輸出植物檢疫證明書核發及加註	一、點次變更。 二、配合第二點修正，爰酌作文字修正。

輸出人輸出種子時，應檢附前點第一項第二款函向防檢署轄區分署申報輸出檢疫，經防檢署轄區分署確認該批種子係經<u>檢測單位</u>檢測合格後，始於輸出植物檢疫證明書加註檢測結果，並依實核銷數量。	輸出人輸出種子時，應檢附前點第一項第二款函向防檢署轄區分署申報輸出檢疫，經防檢署轄區分署確認該批種子係經<u>種苗場</u>檢測合格後，始於輸出植物檢疫證明書加註檢測結果，並依實核銷數量。	

第三點附件一　輸出植物種子病原檢測作業流程（修正後）

輸出人向防檢署轄區分署申請病原檢測

⇩

轄區分署派員取樣

⇩

樣品及"送請鑑定植物病蟲害報告表" 交由輸出人寄送至檢測單位

⇩

檢測單位辦理病原檢測

⇩

檢測結果傳送至轄區分署

⇩

轄區分署函復輸出人檢測結果。
輸出人申報輸出植物檢疫時，由轄區分署依實核銷。

⇩

轄區分署於輸出植物檢疫證明書加註病害檢測結果

修正說明：配合修正名稱之說明理由，刪除特定病原種類，及修正第二點檢測單位，爰酌作文字修正。

第三點附件一　輸出植物種子特定病原檢測作業流程（修正前）

輸出人向防檢署轄區分署申請特定病原檢測

↓

轄區分署派員取樣

↓

樣品及"送請鑑定植物病蟲害報告表"交由輸出人寄送至種苗場

↓

種苗場辦理特定病原檢測

↓

檢測結果傳送至轄區分署

↓

轄區分署函復輸出人檢測結果。輸出人申報輸出植物檢疫時，由轄區分署依實核銷。

↓

轄區分署於輸出植物檢疫證明書加註特定病害檢測結果

第五點附件二 特定病原之檢測方法（修正後）

(刪除)

修正說明：依據本署一百十四年五月二十六日擴充輸出種子病原檢測量能說明會議決議，爰刪除現行規定第五點附件二特定病原之檢測方法。

第五點附件二 特定病原之檢測方法（修正前）

一、十字花科黑腐病菌（*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*）及十字花科蔬菜細菌性斑點病菌（*Xanthomonas campestris* pv. *raphani*）檢測方法

檢測方法

半選擇性培養基 (semi-selective medium) 搭配聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

檢測方法簡介

針對十字花科植物種子內部及外部附著之細菌*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc)及*Xanthomonas campestris* pv. *raphani* (Xcr)，將種子萃取液以稀釋平板法培養在兩種半選擇性培養基上，分離具活性之疑似菌落，經YDC培養基進行形態鑑別，再以聚合酶鏈鎖反應檢測疑似十字花科蔬菜黑腐病菌及十字花科蔬菜細菌性斑點病菌之菌落。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。爲避免交叉污染。樣品前處理、樣品浸種萃取、培養基塗佈等過程應與其他檢測或實驗區隔進行，或於無菌操作台內操作，所使用之相關試劑亦應避免與其他檢測或實驗混合使用。

1.2 設備

1.2.1. 聚合酶鏈鎖反應儀：ABI Veriti^{TM} Thermal cycler或同級品。

1.2.2. 電泳裝置：供DNA電泳用，含電泳槽與電源供應器。

1.2.3. 膠片照相裝置：供電泳膠片照相用，FliGel FGIS-3或同級品。

1.2.4. 無菌操作台：LIAN SHEN JW-4N或同級品。

1.2.5. 高溫高壓滅菌釜：HIRAYAMA HVE-50或同級品。

1.2.6. 電子天平：AND GR200或同級品。

1.2.7. 28±2 °C培養箱：JC GL-550或同級品。

1.2.8. 高速離心機：Hitachi CT 15RE或同級品。

1.2.9. 4±2°C冰箱：Law-Chain LC-218或同級品。

1.2.10. 分光光度計：具波長260nm、280nm偵測功能，或可檢測DNA濃度，Implen New NanoPhotometer NP80或同級品。

1.2.11. 強烈震盪器：Scientific Industries Vortex-Genie 2 G560或同級品。
1.2.12. 微量吸管：Thermo或同級品。
1.2.13. 已滅菌之L形或三角形玻棒、移植環。
1.2.14. 酒精燈。
1.2.15. 平面震盪器：Firstek Scientific S-101或同級品。
1.2.16. 酸鹼度計：Denver, UltraBASIC UB-10或同級品，最低偵測極限為0.01 pH unit。
1.2.17. 各種容量燒杯、試管或離心管。

2.試材與試劑

2.1. 待測種子：僅適用於未經處理(無論是以物理、化學或生化方式，包括種衣處理)之種子。需分為 2 個以上的次樣品，每一次樣品最多 10,000 粒種子。
2.2. 正對照菌株：經鑑定、具病原性之 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 及 *X. campestris* pv. *raphani* 標準菌株。以 YDC 培養基(Yeast dextrose chalk agar medium)培養於 28±2℃備用。

2.3. 0.85% w/v NaCl 溶液(含 0.02% v/v Tween20):

Compound	1L
NaCl (Scharlau)	8.5 g
Distilled/de-ionized water	1000 ml
Tween 20 (Sigma)	200 µl

2.3.1. 秤取所需 NaCl 於適當容器中，加入去離子水，待 NaCl 完全溶解後，經 121℃滅菌 15 分鐘。
2.3.2. 滅菌後，再加入 Tween 20 於 NaCl 溶液，4±2℃下保存期限為 3 個月。

2.4. mFS 半選擇性培養基(pH6.5) (參考 2020 年版 ISTA Validated Seed Health Testing Method 7-019a)

Compound	1L
K_2HPO_4 (Scharlau)	0.8 g
KH_2PO_4 (Scharlau)	0.8 g
KNO_3 (Sigma)	0.5 g
$MgSO_4·7H_2O$ (Scharlau)	0.1 g
Yeast extract (BD)	0.1 g
Methyl Green(1% aq.) (Sigma)	1.5 ml
Distilled/de-ionized water	1000 ml
Soluble starch (Sigma)	25.0 g

Bacto agar (BD)	25.0 g
Nystatin (Sigma) (10 mg/ml 50% EtOH) [1]	35 mg (3.5 ml)
D-Methionine (Sigma) (1 mg/ml 50% EtOH) [1]	3 mg (3 ml)
Pyridoxine-HCl (Sigma) (1 mg/ml 50% EtOH) [1]	1 mg (1 ml)
Cephalexin (Sigma) (20 mg/ml 50% EtOH) [1]	50 mg (2.5 ml)
Trimethoprim (Sigma) (10 mg/ml 70% EtOH) [1]	30 mg (3 ml)

[1] 於滅菌後再加入。

2.4.1. 秤取所需成分於一適當容器中(Soluble starch、Agar、D-Methionine、Pyridoxine-HCl 及抗生素除外)，加入去離子水，各成分完全溶解後確認 pH 值並調整至 6.5(低於 6.6)，再加入 Soluble starch 及 Agar，經 121℃滅菌 15 分鐘。

2.4.2. 預備 D-Methionine、Pyridoxine-HCl 及抗生素溶液，配製過程中，使用 50% 或 70%酒精配製，無須再滅菌。使用去離子水，配製完成的溶液必須以 0.2 μm 孔徑濾膜過濾。

2.4.2.1. 溶解 100 mg 的 Nystatin 在 10 ml 的 50% 酒精(EtOH)中，使用量為 3.5 ml/L。

2.4.2.2. 溶解 10 mg 的 D-Methionine 在 10 ml 50%酒精中，使用量為 3.0 ml/L。

2.4.2.3. 溶解 10 mg 的 Pyridoxine-HCl 在 10 ml 的 50%酒精中，使用量為 1.0 ml/L。

2.4.2.4. 溶解 200 mg 的 Cephalexin 在 10 ml 的 50%酒精中，使用量為 2.5 ml/L。

2.4.2.5. 溶解或懸浮 100 mg 的 Trimethoprim 在 10 ml 的 70%酒精中，當 Trimethoprim 無法完全溶解時震盪成均勻懸浮後立即加入培養基，使用量為 2.5 ml/L。

2.4.2.6. 待培養基降溫至約 50℃時加入，緩緩搖晃避免氣泡產生，混和均勻後倒入 9cm 培養皿，置於無菌操作台風乾多餘水分後備用。

2.4.3. 須保存於 4±2℃，並於 4 週內使用以確保抗生素效力。另依澱粉來源不同，培養基使用前可預先放置於冷藏箱至少 4 天，有助於產生更明顯的透化圈。

2.5. mCS20ABN 半選擇性培養基(pH6.5) (參考 2020 年版 ISTA Validated Seed Health Testing Method 7-019a)

Compound	1L
Soya peptone (BD)	2.0 g
Tryptone (BD)	2.0 g
KH_2PO_4 (Scharlau)	2.8 g
$(NH_4)_2HPO_4$ (Ferak)	0.8 g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Scharlau)	0.4 g
L-Glutamine (Sigma)	6.0 g
L-Histidine (Sigma)	1.0 g
D-Glucose (Dextrose) (BD)	1.0 g
Distilled/de-ionized water	1000 ml
Soluble starch (Sigma)	25 g
Bacto agar (BD)	20 g
Nystatin (Sigma) (10 mg/ml 50% EtOH) [1]	35 mg (3.5 ml)
Neomycin sulphate (Sigma) (20mg/ml distilled water) [1]	40 mg (2.0 ml)
Bacitracin (Sigma) (50 mg/ml 50% EtOH) [1]	100 mg (2.0 ml)

[1] 於滅菌後再加入。

2.5.1. 秤取所需成分於一適當容器中(Soluble starch、Agar 及抗生素除外)，加入無菌水或去離子水，各成分完全溶解後確認pH值並調整至6.5(低於6.6)，再加入 Soluble starch 及 Agar，經 121℃滅菌 15 分鐘。

2.5.2. 預備抗生素溶液，使用無菌水或去離子水，以 0.2 μm 孔徑濾膜過濾。以50%酒精配製，無須再滅菌。

2.5.2.1. 溶解 100 mg 的 Nystatin 在 10 ml 的 50% 酒精(EtOH)中，使用量為 3.5 ml/L。

2.5.2.2. 溶解 200 mg 的 Neomycin sulphate (770 U/mg)在 10 ml 的無菌水中，使用量為 2.0 ml/L。

2.5.2.3. 溶解 500 mg 的 Bacitracin (60 U/mg)在 10 ml 的 50%酒精中，使用量為 2.0 ml/L。

2.5.2.4. 待培養基降溫至約 50℃時加入，緩緩搖晃避免氣泡產生，混和均勻後倒入 9 cm 培養皿，置於無菌操作台風乾多餘水分後備用。

2.5.3. 須保存於 4±2℃，並於 4 週內使用以確保抗生素效力。另依澱粉來源不同，培養基使用前可預先放置於冷藏箱至少 4 天，有助於產生更明顯的透化圈。

2.6. YDC 培養基(Yeast dextrose chalk agar medium)

Compound	1L
Bacto Agar (BD)	20.0 g
Yeast extract (BD)	10.0 g
$CaCO_3$ (light powder) (Sigma)	20.0 g
D-Glucose (Dextrose) (BD)	20.0 g
Distilled/de-ionized water	1000 ml

2.6.1. 秤取所有成分，放置於一較大容器中(以便於搖晃，然後再倒入培養皿，例如配製 250 ml 培養基，使用 500 ml 容量之三角錐瓶)，加入無菌水或去離子水，加熱至溶解，經 121℃滅菌 15 分鐘。

2.6.2. 待培養基降溫至約 50℃時，緩緩搖晃避免氣泡產生，並確定 $CaCO_3$ 能平均懸浮分布後，倒入 9cm 培養皿，置於無菌操作台風乾多餘水分後備用。

2.6.3. 配置好之 YDC 培養基倒置並裝入聚乙烯(polythene)塑膠袋中，室溫下保存期限為 3 個月。

2.7. 1xTris acetate EDTA buffer (TAE):

Compound	1L
Tris acetate EDTA (50xTAE)	20.0 ml
Distilled/de-ionized water	980 ml

2.8. 2% agarose gel(電泳膠)之製備(含 SafeView):

Compound	100 ml
Tris acetate EDTA (1xTAE)	100 ml
Agarose	2 g
SafeView	5 µl

2.8.1. 秤取所有成分，加入 100ml 1xTAE 溶液，微波加熱至 Agarose 完全溶解，待降溫至 70℃以下再均勻混合核酸安全染劑(SafeView)。

2.9. 75%酒精：表面消毒用。

2.10. 滅菌去離子水

2.11. PCR 反應試劑：Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (1.5 mM $MgCl_2$ final concentration) (AMPLIQON)

2.12. 檢測目標用引子：十字花科蔬菜黑腐病菌(Xcc)及十字花科蔬菜細菌性斑點病菌(Xcr)之專一性引子對

引子名稱 Primers	增幅片段大小 Amplification product (bp)	引子序列(5’-3’) Primer sequence (5’-3’)	備註 Remark
Xcc2f	200	TGG GTT TTC GCC TAT CAA AC	可偵測 Xcc 與 Xcr
Xcc2r		TGC AAC TAT TCC TAG CAC CG	

Xcr14f Xcr14r	277	CGT TAG CCA GGT AGA AAG CG TCG CTA TTT CCA TCT ACC CG	可偵測 Xcr

2.13. 細菌廣效性引子對：偵測細菌的 16S 核糖體 RNA，內控(internal control)用

引子名稱 Primers	增幅片段大小 Amplification product (bp)	引子序列(5’-3’) Primer sequence (5’-3’)
BAC16S-F BAC16S-R	466	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T GGA CTA CCA GGG TAT CTAATC CTG TT

2.14. DNA 片段分子量標誌(DNA ladders)：可區分 100-1,500 bp 的 DNA 片段。

2.15. 甘藍幼苗(初秋或其他感病品種)：接種用。

2.16. 各項藥品之廠牌可參考使用或採用同級品。

3.步驟與方法

3.1.從種子萃取細菌

3.1.1. 原則上以每 5,000 粒種子(以千粒重估算)為一重複，至少 2 重複。

3.1.2.以每 1,000 粒種子對 10ml 0.85% NaCl 溶液的比例，將種子浸泡在預冷(2-4℃)的 0.85% NaCl 溶液中，利用平面震盪器(轉速 150 rpm)在室溫(20-25℃)下震盪 2.5 小時。

3.2.以半選擇性培養基進行分離

3.2.1. 試驗組之稀釋:取 100 µl 種子萃取液(原液)加入 900 µl 0.85% NaCl 溶液中震盪混合均勻，此即 10^{-1} 倍稀釋液。再自 10^{-1} 倍稀釋液取 100 µl 加入 900 µl 0.85% NaCl 溶液混合均勻，此即 10^{-2} 倍稀釋液。

3.2.2. 正對照組之稀釋:將 *Xcc* 及 *Xcr* 標準菌株培養在 YDC 上 2-3 天，以 0.85% NaCl 溶液洗下菌落製成懸浮液，進行序列稀釋，約稀釋至 10^{2}-10^{4} cfu/ml，稀釋濃度為每個培養皿約可長出 30-300 個菌落。

3.2.3. 空白對照組：未浸泡過種子的 0.85% NaCl 溶液。

3.2.4. 塗佈:分別自試驗組之原液與稀釋液(10^{-1}、10^{-2})、正對照組稀釋液與空白對照組，各取 100µl 滴於 mFS 及 mCS20ABN 半選擇性培養基上，以滅菌的 L 形或三角形玻棒進行塗佈。將塗佈完成的 mFS 及 mCS20ABN 培養皿置於 28±2℃、12 小時光照下培養 4-7 天。

3.2.5. 培養情形觀察與記錄:檢視試驗組的菌落生長情形，並參照正對照菌株的形態，觀察塗佈樣品的兩種半選擇性培養基中是否有疑似典型 *Xcc* 及 *Xcr* 形態的菌落。計算疑似菌落的數量和其他菌落的數量，並觀察其他菌落是否有生長過快而影響生長的情況。

3.2.5.1. 每皿菌落數介於 30-300 之間。菌落數若超過 300 仍需記錄。並以「m」(many)表示菌落之間為離散狀態，無相互黏合的情況，若有菌落之間相互黏合情形，則記錄為「c」(confluent)。空白對照組應無任何細菌生長。

3.2.5.2. *Xcc* 及 *Xcr* 在 mFS 半選擇性培養基上呈淡綠色黏稠狀菌落，周圍有澱粉水解透化圈(圖一)，記錄前可將培養皿放置於 4℃數小時，使透化圈更明顯，亦可將培養皿置於黑絨布上幫助判別透化圈。

3.2.5.3. *Xcc* 及 *Xcr* 在 mCS20ABN 半選擇性培養基上呈淡黃色黏稠狀菌落，周圍有澱粉水解透化圈(圖一)，記錄前可將培養皿放置於 4℃使透化圈更明顯。

3.2.5.4. 同一樣品內之菌落大小及顏色可能有差異。

3.2.5.5. 樣品稀釋液塗佈的菌落數應符合稀釋倍率。

3.2.6. 若存在疑似菌落，每組次樣品中的每個培養皿至少挑取 6 個菌落進行後續於 YDC 培養基上的鑑定，並將正對照組中的 *Xcc* 及 *Xcr* 菌落再培養於 YDC 培養基上作為對照。

3.2.6.1. 將 YDC 培養基分成 4-6 個扇形區域，一扇形區域只能畫線培養一個可疑菌落，且需注意兩獨立菌落之間的間隔，以避免交互汙染。

3.3. 以 YDC 培養基上之形態進行鑑別

3.3.1. 移植疑似 *Xcc* 及 *Xcr* 的菌落到 YDC 培養基。

3.3.2. 置於 28±2℃、12 小時光照下培養 2-3 天，觀察其生長情形。

3.3.3. 與正對照菌株做比較，判定移植菌落中何者具有典型 *Xcc* 及 *Xcr* 形態特徵，記錄此菌落。

3.3.3.1. *Xcc* 及 *Xcr* 在 YDC 培養基上呈淡黃色黏稠菌落，並具流動性(圖二)。

3.3.4. 若具有疑似 *Xcc* 或 *Xcr* 的菌落，挑取可疑菌落進行 PCR 檢測鑑定。若數量充足，在所有次樣品的處理中，隨機且儘可能平均分散地挑取至少 6 個以上的疑似菌落。以移植環刮取單一疑似菌落懸浮於 1 ml 的無菌水中備用。

3.4.聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction)檢測

3.4.1. 使用針對 *Xcc* 及 *Xcr* 具有專一性的引子：Xcc2f/ Xcc2r 及 Xcr14f/ Xcr14r。

3.4.2. 使用針對一般細菌的廣效性引子：BAC16S-F/ BAC16S-R。

3.4.3. 準備 PCR reaction mixture：在 200 µl 的 PCR 離心管中加入 19 µl 之 PCR 反應液後，再加入步驟 3.3.4.製備之細菌懸浮液 1 µl，總體積 20 µl。

3.4.3.1. PCR 反應液配方如下：

Compound	最終濃度	體積
Sterile water		6.5 µl
Taq 2x Mix RED [a]	1X	10 µl
Xcc2f (10 µM)	0.25 µM	0.5 µl
Xcc2r (10 µM)	0.25 µM	0.5 µl
Xcr14f (10 µM)	0.25 µM	0.5 µl
Xcr14r (10 µM)	0.25 µM	0.5 µl
BAC16S-F (10 µM)	0.125 µM	0.25 µl
BAC16S-R (10 µM)	0.125 µM	0.25 µl
Suspension		1 µl

[a] 內含 dNTP 0.4mM、$MgCl_2$ 1.5mM、Taq DNA polymerase 0.2 units/µl。

3.4.3.2. 進行 PCR 反應之檢體包含有：

3.4.3.2.1. 試驗組：疑似菌株之細菌懸浮液。

3.4.3.2.2. 正對照組：*Xcc* 及 *Xcr* 標準菌株之細菌懸浮液。

3.4.3.2.3. 負對照組：其他非 *Xcc* 非 *Xcr* 菌株之細菌懸浮液。

3.4.3.2.4. 空白對照組：無菌水。

3.4.4. PCR 反應條件

3.4.4.1. 95℃反應 5 分鐘。

3.4.4.2. 每循環包含 95℃/30 秒、60℃/30 秒、72℃/30 秒，共 35 個循環。

3.4.4.3. 72℃反應 10 分鐘後停止，降溫至 4℃。

3.4.5. 電泳分析 PCR 產物：取 5 µl PCR 產物（包括試驗組、正對照組、負對照組、空白對照組)與 100 bp 之 DNA ladder，以含有核酸安全染劑(SafeView)之 2%電泳膠進行電泳分析(75V，45 分鐘)；電泳槽內置 1x TAE buffer (1x tris acetate EDTA)。將電泳膠置於影像分析系統拍照記錄。

3.4.6. 檢視電泳分析結果 PCR 產物條帶大小。

3.4.6.1. 具 200 bp 與 466 bp 二條帶：檢體含有 *Xcc*。

3.4.6.2. 具 200 bp、277 bp 與 466 bp 三條帶或具 277 bp 與 466 bp 二條帶：檢體含有 *Xcr*。

3.4.6.3. 具 466 bp 一條帶：負對照組及其他非 *Xcc* 或 *Xcr* 之細菌。

3.4.6.4. 試驗組及正對照皆沒有條帶：重新進行 PCR 檢測。

3.4.6.5. 空白對照組之 PCR 結果應無增幅產物，若有增幅產物出現重新進行 PCR 檢測。

3.5. 以病原性測試進行鑑別（視需求進行）

3.5.1. 在適當的環境下，栽培甘藍感病品種之幼苗到產生 3-4 片真葉的階段。

3.5.2. 將 YDC 培養基上培養 24-48 小時的疑似菌落移殖至內含 5 ml 無菌水之試管中，測量懸浮液的吸光值(OD_{600})。以無菌水調整懸浮液濃度達吸光值(OD_{600})為 0.1-0.2，此時懸浮液濃度約為 10^8 cfu/ml。以剪除葉緣接種法接種於感病甘藍品種，以剪刀沾細菌懸浮液後於葉緣往內約 1 公分處剪下，每待測菌株使用 1-3 棵甘藍植株。

3.5.3. 依 3.5.2.步驟將於 YDC 培養基上培養 24-48 小時的 *Xcc* 和 *Xcr* 標準菌株之菌落調製成 10^8 cfu/ml 細菌懸浮液，剪除葉緣接種作為正對照組；以無菌水進行剪除葉緣接種作為負對照組。正、負對照組各使用 1 棵甘藍植株。

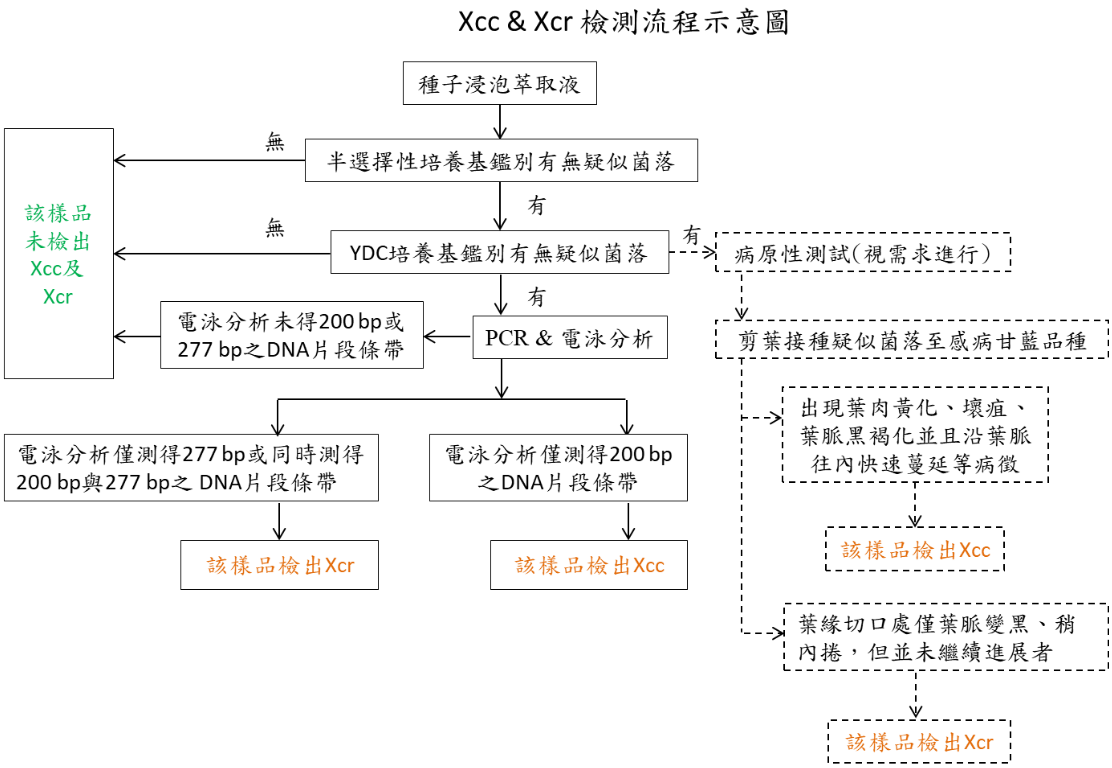
3.5.4. 將完成接種的甘藍苗培養在溫度 25±2℃，每日光照 8-12 小時的環境下。

3.5.5. 接種後每日觀察植物，於接種後約 3-7 天檢查植株，與接種 *Xcc* 和 *Xcr* 標準菌株之正對照組植株上的病徵進行比較並記錄。

3.5.5.1. 出現葉肉黃化、壞疽、葉脈黑褐化且沿葉脈往內快速蔓延等病徵，即表示該疑似菌株為 *Xcc*。

3.5.5.2. 葉緣切口處僅葉脈變黑、稍內捲，但並未繼續進展，變黑之葉脈周圍葉肉僅輕微黃化者，即表示該疑似菌株為 *Xcr*。

3.6. 十字花科蔬菜黑腐病菌及十字花科蔬菜細菌性斑點病菌檢測流程示意圖



*電泳分析 PCR 結果，所有細菌均應測得 466 bp 之 DNA 片段條帶

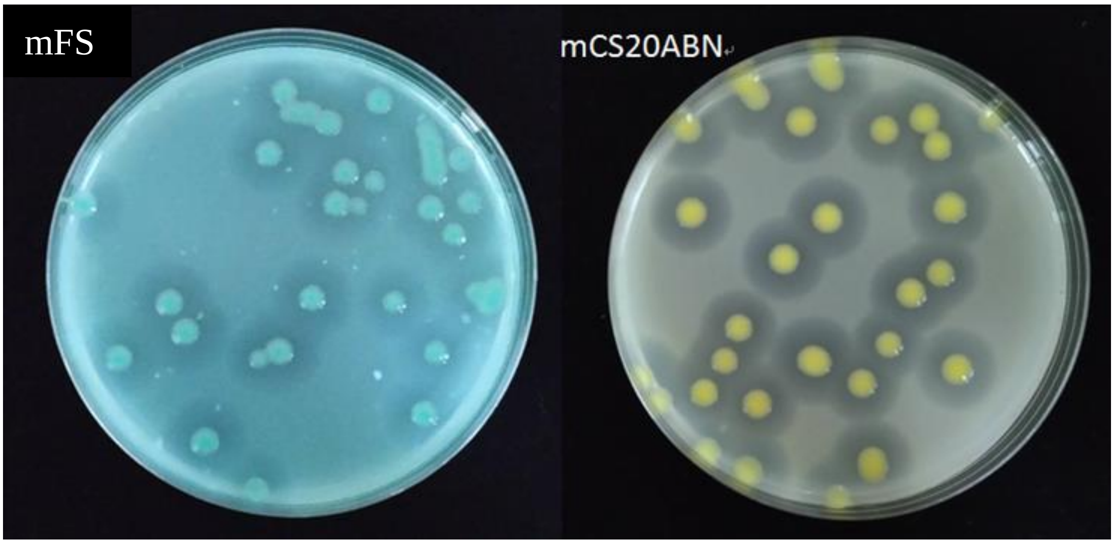
4.結果判讀

4.1. 將種子萃取液塗佈在兩種半選擇性培養基上培養，若在 mFS 培養基上未分離出淡綠色、黏稠狀並帶有透化圈之菌落，或未在 mCS20ABN 培養基上分離淡黃色、黏稠狀並帶有透化圈之菌落，即判定該檢體不含有十字花科蔬菜黑腐病菌(*Xcc*)以及十字花科蔬菜細菌性斑點病菌(*Xcr*)。若分離出疑似菌落則需進行下一步 YDC 形態鑑定。

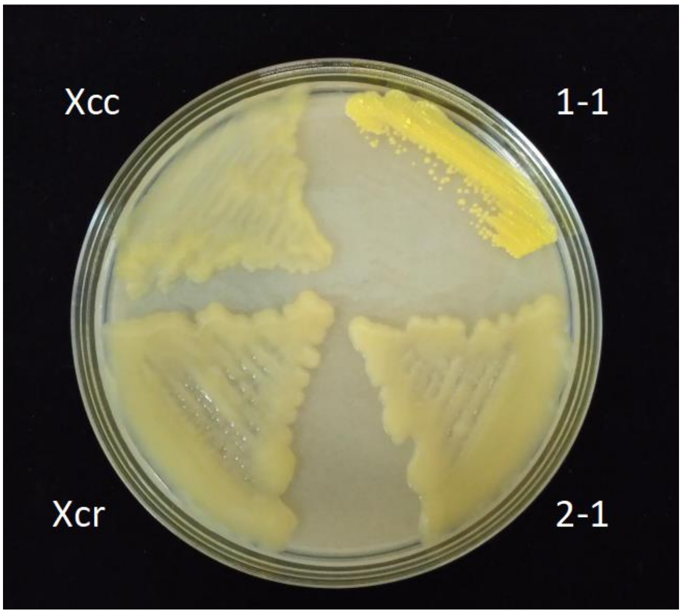
4.2. 若在 YDC 培養基上未分離淡黃色、黏稠狀並具流動性菌落，即判定該檢體不含有 *Xcc* 以及 *Xcr*。若分離出疑似菌落則需進行下一步 PCR 鑑定。

4.3. 依電泳分析結果判讀 PCR 增幅產物時，僅呈現 466 bp 1 個條帶即判定該檢體不含有 *Xcc* 或 *Xcr*。呈現 200 bp、277 bp 與 466 bp 3 個條帶或 277 bp 與 466 bp 2 個條帶均表示檢體含有 *Xcr*；呈現 200 bp 與 466 bp 2 個條帶表示檢體含有 *Xcc*。

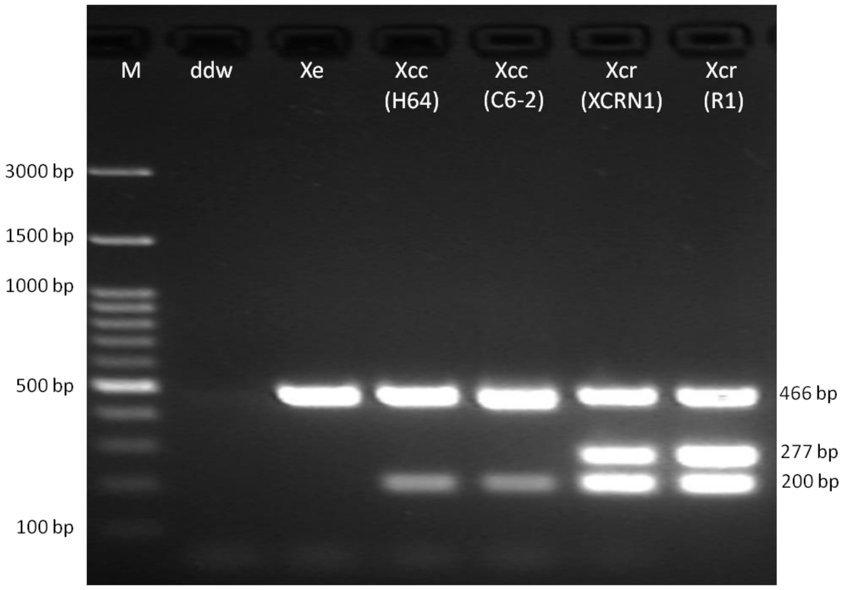
4.4. 依病原性測試結果判讀時，剪除葉緣接種的植株，若出現葉肉黃化、壞疽、葉脈黑褐化並且沿葉脈往內快速蔓延等病徵，即表示該疑似菌株為 *Xcc*；若葉緣切口處僅葉脈變黑、稍內捲，但並未繼續進展，變黑之葉脈周圍葉肉僅輕微黃化者，即表示該疑似菌株為 *Xcr*。



圖一、培養後 7 天，*Xcc* 及 *Xcr* 在 mFS 半選擇性培養基上呈淡綠色黏稠狀菌落，在 mCS20ABN 半選擇性培養基上呈淡黃色黏稠狀菌落，周圍皆可見有澱粉水解透化圈。



圖二、培養後 3 天，*Xcc* 及 *Xcr* 在 YDC 培養基上呈淡黃色黏稠菌落，並具流動性。菌落 1-1 和 2-1 為樣品之疑似菌落，經形態判別，菌落 1-1 非 *Xanthomonas* 屬，菌落 2-1 仍為疑似菌落，待作 PCR 檢測。



圖三、ddw 為無菌水之空白對照組，Xe 為茄科細菌性斑點病菌 *Xanthomonas euvesicatoria* 之負對照組，H64 和 C6-2 為十字花科蔬菜黑腐病菌 *X. campestris* pv. *campestris*，XCRN1 和 R1 為十字花科蔬菜細菌性斑點病菌 *X. campestris* pv. *raphani*。

5.参考文獻

5.1. 吳雅芳、陳紹崇、黃淑惠、鄭安秀。2007。台灣首次報導引起十字花科蔬菜細菌性斑點病之 *Xanthomonas campestris* pv. *raphani*。植物病理學會刊16:87-90。

5.2. 曾國欽、徐世典。2003。重要植物細菌性病害之診斷鑑定。植物重要防疫檢疫病害診斷鑑定技術研習會專刊(二):95-115。

5.3. European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2013. *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin43:7–20.

5.4. Leu, Y. S., Deng, W. L., Yang, W. S., Wu, Y. F., Cheng, A. S., Hsu, S. T., and Tzeng, K. C. 2010. Multiplex Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *X. campestris* pv. *raphani*. Plant Pathol. Bull. 19: 137-147.

5.5. International Seed Testing Association. 2020. International Rules for Seed Testing Chapter 7 Validated Seed Health Testing Methods 7-019a: Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* in *Brassica* spp. seed.

二、瓜類細菌性果斑病（Acidovorax citrulli, syn. Acidovorax avenae subsp. citrulli）檢測方法

檢測方法一

酵素聯結抗體免疫吸附法（Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay, ELISA）

檢測方法簡介

針對瓜類種子中細菌性果斑病菌（***Acidovorax citrulli*, Acit**）之檢測。本檢測方法係以直接酵素聯結抗體免疫吸附法(direct ELISA)進行西瓜果斑病菌之定性檢測，並以ELISA讀值分析儀分析基質受酵素催化反應所呈405nm/492nm之吸收值。

1. 環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。爲避免交叉污染。樣品前處理、樣品萃取、ELISA試劑配製及ELISA等檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。育苗環境應為包覆32目尼龍網的網室或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施。

1.2.設備

1.2.1.ELISA讀值分析儀：具波長405nm、492nm偵測功能者。

1.2.2.恆溫培養箱：可維持37℃恆溫者。

1.2.3.滾珠研磨器：可研磨植物組織者。

1.2.4.八爪微量吸注器及微量吸管。

2 試材與試劑

2.1.試劑

2.1.1. 洗滌液(PBST)

NaCl	8.0 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	1.15 g
KH_2PO^4	0.2 g
KCl	0.2 g
Tween-20	0.5 ml
NaN_3	0.2 g

先調pH值至7.4再加去離子水至總量1000ml

2.1.2. 被覆緩衝液(coating buffer)

Na_2HCO_3	2.93 g
Na_2CO_3	1.59 g

先調pH值至9.6再加PBST至總量1000ml

2.1.3. 樣品萃取緩衝液(sample extraction buffer)

Polyvinylpyrrolidone(PVP)	20 g
Ovalbumin	2 g
Na_2SO_3(anhydrous)	1.3 g
Tween 20	0.5 ml
NaCl	8 g
KH_2PO_4	0.2 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	1.15 g
KCl	0.2 g

先調pH值至7.4再加去離子水至總量1000ml

2.1.4. 結合緩衝液(Conjugate buffer)

BSA	2.0 g

先調 pH 值至 7.4 再加 PBST 至總量 1 000ml

2.1.5.基質緩衝液(Substrate buffer)

$C_4H_{11}NO_2$	97.0 ml
NaN_3	0.2 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.1 g

先調pH值至9.8再加去離子水至總量1000ml

2.1.6.抗血清：Anti-Aac IgG coating antibody、Antibody-enzyme conjugate

2.2.其他耗材

2.2.1.反應容器：如96孔樣品盤、塑膠研磨袋等。

2.2.2.微量吸注器吸管(Pipette tips)：配合微量注器規格，或具同樣功能之同級品。

2.2.3.育苗介質：使用Bas van Buuren (BVB)介質(No.4, Maasland, Netherlands)，或具同樣功能之同級品，使用前必須經過高溫高壓濕熱法消毒後使用。

2.2.4.三寸軟盆或相當大小穴格之穴盤。

註1：前述使用或提及之儀器或藥劑廠牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之廠牌亦不代表為同類產品中較差者。

3.步驟與方法

3.1.種子催芽及育苗

3.1.1 種子播種於 3 寸軟盆或相當大小穴格的穴盤中，每盆或每穴限 1 粒種子。

3.1.2 下壓穴盤中心之介質約 0.5 公分，覆蓋介質後，置於包覆 32 目尼龍網的網室中或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施中。

3.1.3 種子發芽後每 1 植株獨立編號，並避免植株間互相接觸摩擦，栽培到 3 片本葉長出後，每株採樣第 1 及第 2 片葉，置於具編號的採集袋中。

3.2.細菌檢測

3.2.1.將 Anti-Bacteria coating antibody 以被覆緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至 96 格微量盤中，每穴注入 100μl，將微量盤置入保濕盒中，於 37°C恆溫箱反應 4 小時。

3.2.2.取出後以洗滌液清洗微量盤，重複清洗 3 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。將測試之樣品以消毒之刀片切取組織，稱重後加入 10 倍量之樣品萃取緩衝液(即植物組織：萃取緩衝液＝1:10(W/V))，置於研磨袋以滾珠研磨器研磨。

3.2.3.取組織研磨液分別注入 96 格微量盤中，每穴 100μl，每樣品 2 重複，並以健康西瓜組織液(負對照)及含西瓜果斑病菌組織液(正對照)當作對照組。

3.2.4.將微量盤放入保濕盒於 4°C反應過夜，以洗滌液清洗微量盤，再重複清洗 3 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.5.將 antibody-enzyme conjugate 以結合緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100μl，將微量盤置入保濕盒中，於 37°C恆溫箱反應 1 小時。

3.2.6.取出後以洗滌液清洗微量盤，再重複清洗 4 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

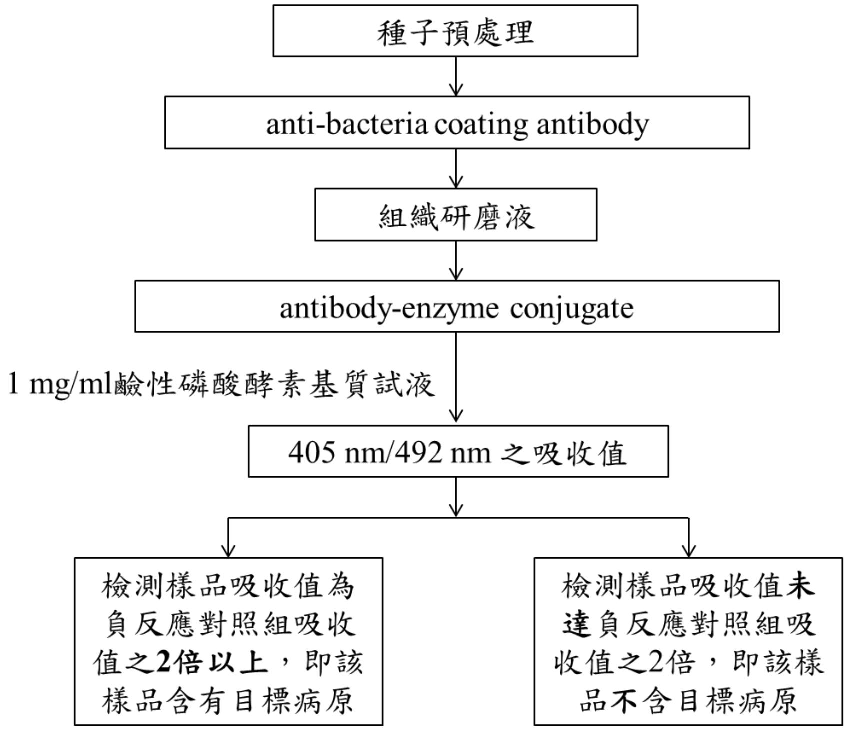
3.2.7.將 p-nitrophenyl phosphate disodium(PNP)與基質緩衝液依 1mg/ml 的濃度配製成鹼性磷酸酵素基質試液後，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100μl，將微量盤放入保濕盒，於室溫暗室靜置 1 小時。

3.2.8.取出微量盤，以 ELISA 讀值分析儀分析 405nm/492nm 之吸收值。

註 2：相關試劑廠牌與使用量依使用者自行決定。

3.3.流程

瓜類細菌性果斑病菌檢測流程示意圖



4.結果判讀

每次實驗必須同時測試正反應(罹染 *Acidovorax* ***citrulli*** 組織)及負反應對照組(健康組織)樣品。以 ELISA 讀值分析儀分析檢體之吸收值結果，須與負反應對照組之結果進行相互比對，當檢體吸收值為負反應對照組吸收值之 2 倍以上，即判定該檢體含有 **Acit**。

檢測方法二

選擇性培養液(Selective broth medium)及聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)

檢測方法簡介

利用選擇性培養液進行種子上的病原細菌培養，取培養液離心後進行聚合酶鏈鎖反應檢測是否出現果斑病菌(*Acidovorax citrulli*, Acit)之專一性條帶。

1. 環境與設備

1.1. 環境：檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。爲避免交叉污染。樣品前處理、樣品細菌萃取、培養基塗佈等過程應與其他檢測或實驗區

隔進行或於無菌操作台內進行，所使用之相關試劑亦應避免與其他檢測或實驗混合使用。

1.2. 設備

1.2.1.移植環與移植針。

1.2.2. 容量3 L、5L等不同容量三角燒瓶。

1.2.3. 震盪器：Scientific Industries Vortex-Genie 2 G560或同級品。

1.2.4. 無菌操作台：SUS 304或同級品。

1.2.5. 30±2 °C培養箱：JC GL-550或同級品。

1.2.6. 恆溫震盪培養箱：LIAN SHEN LUS-150或同級品。

1.2.7. 高溫高壓滅菌釜：Hirayama HVE-50或同級品。

1.2.8. 高速離心機：Hitachi CT15RE或同級品。

1.2.9. 聚合酶鏈鎖反應儀：ABI Veriti TM Thermal cycler或同級品。

1.2.10. 電泳裝置：DNA電泳分析用，含電泳槽與電源供應器。

1.2.11. 膠片照相裝置：FloGel FGIS-3或同級品。

1.2.12. 微量吸管(1 µl、10 µl、20 µl、100 µl、1000 µl、5 ml)。

1.2.13. 電子天平：AND GR200或同級品。

2. 試材與試劑

2.1. 待測種子：僅適用於未經處理(無論是以物理、生物或化學方式，包括種衣處理)之種子；樣品量為種子 30,000 顆，分成 6 個次樣品，每個次樣品 5,000 顆。

2.2. 改良式 WFB68 液態培養液(modified WFB68 broth medium, mWFB68)。

mWFB68 製備

Compound	g/1 L
Bacto-peptone (BD)	5
Calcium chloride dehydrate (ISHIZU)	0.25
Tween 80[1] (SIGMA)	10 ml
Berberine chloride form (SIGMA)	0.2
Methyl violet B (SIGMA)	0.01
Distilled/de-ionized water	1000 ml
Carbenicillin[2] (SIGMA)	0.05
Cefoperazone [2] (SIGMA)	0.05
Cycloheximide[2] (SIGMA)	0.2

[1] 單獨滅菌，於培養基滅完菌、降溫至約 60°C 時添加。

[2] 於滅菌後添加：抗生素用無菌水或 75 %酒精配好濃縮液，放入 4 °C 冰箱避光保存，待培養基滅完菌、降溫至 40-45 °C 之後再加入。

濃縮液配方：

Methyl violet B 1 mg/ml 無菌水，每 1 L 培養液加入 10 ml 濃縮液

Carbenicillin 50 mg/ml 無菌水，每 1 L 培養液加入 1 ml 濃縮液

Cefoperazone 50 mg/ml 無菌水，每 1 L 培養液加入 1 ml 濃縮液

Cycloheximide 200 mg/ml 75 %酒精，每 1 L 培養液加入 1 ml 濃縮液

2.3. YDC 培養基(Yeast extract Dextrose $CaCO_3$ medium, YDC)

YDC 培養基之製備

Compound	g/1 L
Bacto Agar (BD)	20.0
Yeast Extract (BD)	10.0
$CaCO_3$ (light powder) (YAKURI)	20.0
D-Glucose (Dextrose) (BD)	20.0
Distilled/de-ionized water	1000 ml

2.4. Agarose (CONDA 或同級品以上)。。

2.5. 50ml 離心管。

2.6. 滅菌去離子水(ddw)。

2.7. 滅菌 8 連排 PCR 光學反應管。

2.8. 滅菌 1.5 ml 連蓋式離心管。

2.9. PCR 檢測試劑。

2.10. Acit 專一性引子對 SEQID4/ SEQID5。

Primers	Insert size (bp)	Primer sequence (5’-3’)	References
SEQID4	246	TCg TCA TTA CTg AAT TTC AAC A	Schaad et al., 1999
SEQID5		CCT CCA CCA ACC AAT ACg CT	

2.11. 細菌廣效性引子對 UpBacF/ UpBacR。

Primers	Insert size (bp)	Primer sequence (5’-3’)	References

UpBacF UpBacR	1511	TAC ggC TAC CTT gTT ACg ACT T gAA gAg TTT gAT CCT ggC TCA g	Eden et al. 1991

2.12. DNA 片段分子量標誌：可區分 100-3,000 bp 的 DNA 片段。

2.13. 核酸安全染劑(SafeView)。

2.14. 正、負對照菌株：經鑑定、具病原性之瓜類細菌性果斑病菌(Acit)菌株與蝴蝶蘭細菌性褐斑病菌 *A. cattleyae* (Acat)菌株，以 YDC 培養於 30°C±2 備用。

2.15. 1× Tris acetate EDTA Buffer(TAE)。

3. 步驟與方法

3.1. 以選擇性培養液萃取細菌

3.1.1. 配製選擇性培養液：依 2.2.步驟進行製備。瓜類大型種子(如南瓜)之每個次樣品配置 3 L 選擇性培養液，培養液以 5 L 三角燒瓶盛裝；瓜類小型種子(如西瓜、洋香瓜)之每個次樣品配置 2 L 選擇性培養液，培養液以 3 L 三角燒瓶盛裝。

3.1.2. 從種子萃取細菌：將待測種子樣品放入經滅菌的選擇性培養液中，於 30 °C 下以 160 rpm 震盪培養 72 小時。

3.2. 進行培養液離心

3.2.1. 每個次樣品經震盪培養 72 小時後，直接吸取培養液放入 50 ml 離心管中。大型種子次樣品(如南瓜)，吸取 10 ml 培養液；而小型種子次樣品(如西瓜、洋香瓜) ，吸取 20 ml 培養液。

3.2.2. 將含培養液之離心管依次樣品編號並秤重，對稱放置或另取等數量之 50 ml 離心管加適量水調整成與含培養液之離心管同重，以便離心時能夠平衡。

3.2.3. 離心管以 10,000 rpm 於室溫下高速離心 30 分鐘，除去上清液。

3.2.4. 每一離心管添加 1 ml 無菌水將沉澱物製備成 1 ml 懸浮液。將懸浮液(DNA 檢體)保存於-20 °C 環境，待 PCR 檢測用。

3.3. 聚合酶鏈鎖反應(PCR)檢測

3.3.1. 使用針對 Acit 具有專一性的引子對 SEQID4/ SEQID5

3.3.1.2 使用針對一般細菌的廣效性引子對 UpBacF/ UpBacR

3.3.1.3. 準備 PCR reaction mixture：在 200 µl 的 PCR 反應管中置入 24 µl 之 PCR 反應液後，再加入 1 µl 之 DNA 檢體。

3.3.1.4. PCR 反應液配方如下：

Compound	最終濃度	總體積 25 µl
Sterile water		9.7 µl
Taq 2x Master Mix[1]	1×	12.5 µl
SEQID4 (10 µM)	0.2 µM	0.5 µl
SEQID5 (10 µM)	0.2 µM	0.5 µl
UpBacF(10 µM)	0.16µM	0.4µl
UpBacR(10 µM)	0.16µM	0.4µl
DNA		1 µl

[1] 內含 dNTP 0.4 mM、$MgCl_2$ 1.5 mM、Taq DNA polymerase 0.2 units/µl

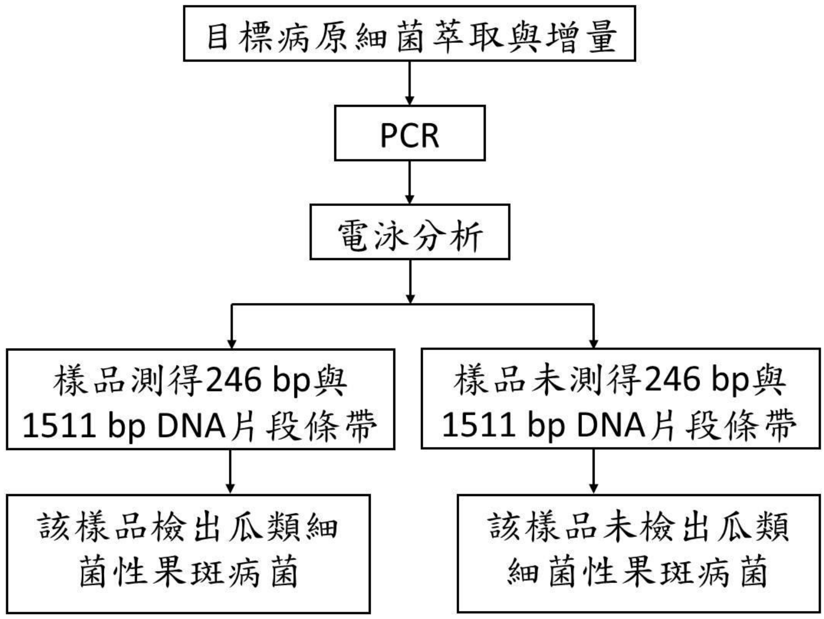
3.3.1.5. 進行 PCR 反應之 DNA 檢體：
3.3.1.5.1. 試驗組：培養液之 DNA 萃取液。
3.3.1.5.2. 正對照組：Acit 標準菌株之 DNA 萃取液。
3.3.1.5.3. 負對照組：Acat 標準菌株之 DNA 萃取液。
3.3.1.5.4. 空白對照組：無菌水(ddw)與選擇性培養液(mWFB68)。
3.3.1.6. PCR 反應條件：

Step 1：95 °C 反應 5 分鐘。
Step 2：(95 °C 30 秒、53 °C 30 秒、72 °C 30 秒)共 35 循環。
Step 3：72 °C 反應 5 分鐘後停止，降溫至 4 °C。

3.3.1.7. 電泳分析 PCR 產物：取 6 µl 之 PCR 產物(包含試驗組、正對照組、空白對照組與 100 bp 之 ladder)，以含有核酸安全染劑(SafeView)之 2%瓊脂凝膠進行電泳分析(100V，30 分鐘)；電泳槽內置 1× TAE buffer (1× tris acetate EDTA)。置於電泳膠影像分析系統觀察拍照。

3.4. 流程

瓜類細菌性果斑病菌檢測流程示意圖



4. 結果判讀：依電泳分析來判讀檢體之 PCR 結果。檢體同時出現與正對照相同之兩條帶，呈現陽性反應，即可判定該檢體含有 Acit。

4.1. 引子對 SEQID4/ SEQID5、UpBacF/ UpBacR 之 PCR 結果。

4.1.1. 正對照組出現 246 bp、1511 bp 條帶。

4.1.2. 負對照組出現 1511 bp 條帶。

4.1.3.空白對照組無條帶產生。

4.1. 4. 試驗組若出現與正對照組相同之 246 bp 、1511 bp 條帶，則可判定該檢體含有 Acit。

4.1.5. 試驗組若僅出現 1511 bp 條帶，可判斷種子帶有非 Acit 之細菌(圖 1)。如試驗組沒有出現 1511bp 條帶，無法確定檢體之 PCR 結果，建議將 3.2.4. 之 1 ml 懸浮液依序稀釋為 10^{-1} 至 10^{-3}，重新進行 PCR 檢測。

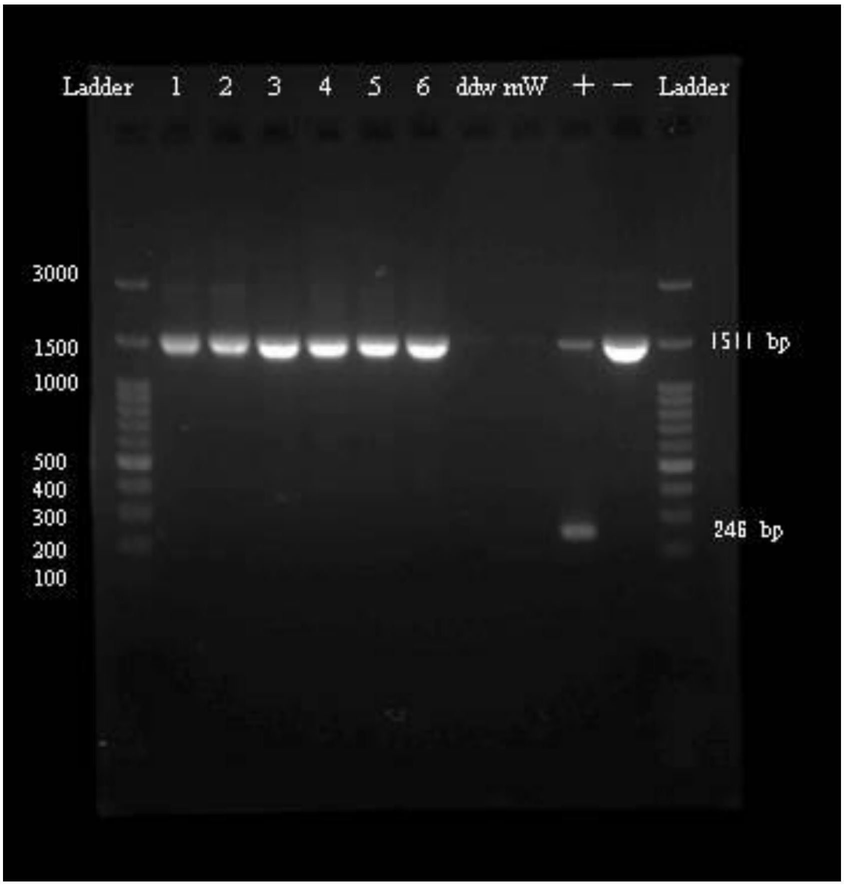


圖 1、電泳分析結果與判讀。各處理組由左至右分別為試驗組(1、2、3、4、5、6 等)檢體、空白對照組 ddw 與 mWFB68 以及正(＋)、負(－)對照組。

5. 參考文獻

5.1. 曾國欽、張世杰。2012。影響種苗貿易之重要病害檢疫。頁71-75。2012 種苗科技暨產業發展研討會專輯。張師竹等著。台南，台灣。89頁。

5.2. 曾國欽、徐世典。2003。重要植物細菌性病害之診斷鑑定。植物重要防疫檢疫病害診斷鑑定技術研習會專刊(二)。頁95-115。

5.3. 周盈甄。2009。瓜類細菌性果斑病菌檢測技術之研發。國立中興大學植物病理學系碩士論文。台中。58頁。

5.4 宋秉峰。1999。鑑定及偵測瓜類細菌性果斑病菌之聚合酵素連鎖反應技術。國立中興大學碩士論文。

5.5. Ha, Y., Fessehaie, A., Ling, K. S., Wechter, W. P., Keinath, A. P., and Walcott, R. R. 2009. Simultaneous detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Didymella bryoniae* in cucurbit seed lots using magnetic capture hybridization and real-time polymerase chain reaction. Phytopathology 99:666-678.

5.6. Randhawa, P. S., Pannu, S.S., and Schaad, N. W. 2001. Improved bio-PCR test for detection of *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* in watermelon and cantaloupe seeds. 2001 APS/MSA/SON Joint Meeting. Salt Lake City, Utah.
5.7. Schaad, N. W., Song, W. Y. and Hatziloukas, E. (1999). PCR primers for detection of plant pathogenic species and subspecies of *Acidovorax*. US Patent 6146834.

三、胡瓜綠斑嵌紋病毒（*Cucumber green mottle mosaic virus*）檢測方法

檢測方法

酵素聯結抗體免疫吸附法(Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay, ELISA)

檢測方法簡介

適用於瓜類種子中胡瓜綠斑嵌紋病毒（*Cucumber green mottle mosaic virus*，CGMMV）之定性檢測。本檢測方法係以直接酵素聯結抗體免疫吸附法(direct ELISA)進行CGMMV之檢測，並以ELISA讀值分析儀分析基質受酵素催化反應所呈405nm/492nm之吸收值。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。爲避免交叉污染。樣品前處理、樣品萃取、ELISA試劑配製及ELISA等檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。育苗環境應為包覆32目尼龍網的網室或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施。

1.2. 設備

1.2.1.ELISA讀值分析儀：具波長405nm、492nm偵測功能者。

1.2.2.恆溫培養箱：可維持37℃恆溫者。

1.2.3.滾珠研磨器：可研磨植物組織者。

1.2.4.八爪微量吸注器及微量吸管。

1.2.5.恆溫箱：供育苗用，可維持28℃環境。

2 試材與試劑

2.1.試劑

2.1.1.洗滌液(PBST)

NaCl	8.0 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	1.15 g
KH_2PO_4	0.2 g
KCl	0.2 g
Tween 20	0.5 ml
NaN_3	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再加去離子水至總量 1000ml

2.1.2.被覆緩衝液(coating buffer)

Na_2HCO_3	2.93 g
Na_2CO_3	1.59 g

先調 pH 值至 9.6 再加 PBST 至總量 1000ml

2.1.3.樣品萃取緩衝液(sample extraction buffer)

NaCl	8.0 g
KH_2PO_4	1.0 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	14.5 g
Ovalbumine (Grade II)	2.0 g
Tween 20	10.0 ml
PVP	20.0 g

先調 pH 值至 7.4 再加去離子水至總量 1000ml

2.1.4.結合緩衝液(Conjugate buffer)

BSA	2 g
PVP-40	20 g
Na azide	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再加 PBST 至總量 1000ml

2.1.5.基質緩衝液(Substrate buffer)

Diethanolamin	97.0 ml
Na azide	0.2 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.1 g

先調 pH 值至 9.8 再加去離子水至總量 1000ml

2.1.6.抗血清：Anti- CGMMV coating antibody、Antibody-enzyme conjugate

2.2.其他耗材

2.2.1.反應容器：如96孔樣品盤、塑膠研磨袋等。

2.2.2.微量吸注器吸管(Pipette tips)：配合微量吸注器規格，或具同樣功能之同級品。

2.2.3.育苗介質：使用Bas van Buuren (BVB)介質(No.4, Maasland, Netherlands)，或具同樣功能之同級品，使用前必須經過高溫高壓濕熱法消毒後使用。

2.2.4.無菌水、無菌濾紙、培養皿、三寸軟盆或相當大小穴格之穴盤。

註1：前述使用或提及之儀器或藥劑廠牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之廠牌亦不代表為同類產品中較差者。

3. 步驟與方法

3.1.種子催芽及育苗

3.1.1.以無菌水漂洗種子(以包裝分批漂洗)，再以滅菌之鑷子夾取各別種子，放置於鋪設無菌濾紙之培養皿內，並保持種子間互不接觸。

3.1.2.於種子之上再鋪上一層無菌濾紙，並加入無菌水保持濕潤，將培養皿放置於 28℃之恆溫箱中黑暗 3 小時進行浸種。

3.1.3.將種子播種於三寸軟盆或相當大小穴格的穴盤中，每盆或每穴限 1 粒種子，下壓穴盤中心之介質約 0.5 公分，覆蓋介質後，置於包覆 32 目尼龍網的網室中或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施中，種子發芽後每一植株獨立編號，並避免植株間互相接觸摩擦，待第 1 片本葉展開後，以每 10 株為 1 單位採樣葉圓盤，置於具編號的採集袋中。

3.2. 病毒檢測

3.2.1.將 Anti-Virus coating antibody 以被覆緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至 96 格微量盤中，每穴注入 100µl，將微量盤至入保濕盒中，於 37℃恆溫箱反應 2 小時。

3.2.2.取出後以洗滌液清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.3.將測試樣品稱重，加入 10 倍量之瓜類病毒 CGMMV 樣品萃取緩衝液(即植物組織：樣品液＝1:10(W/V))，置於研磨袋研磨。

3.2.4.取組織研磨液分別注入微量盤中，每穴 100µl，每樣品 2 重複，並以健康瓜類組織研磨液(負對照)及含 CGMMV 病毒瓜類組織研磨液(正對照)當作對照組。

3.2.5.將微量盤放入保濕盒於 4℃反應過夜，以洗滌液清洗微量盤 5 分鐘，再重複清洗 4 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.6.將 antibody-enzyme conjugate 以結合緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100µl，將微量盤置入保濕盒中，於 37℃恆溫箱反應 4 小時。

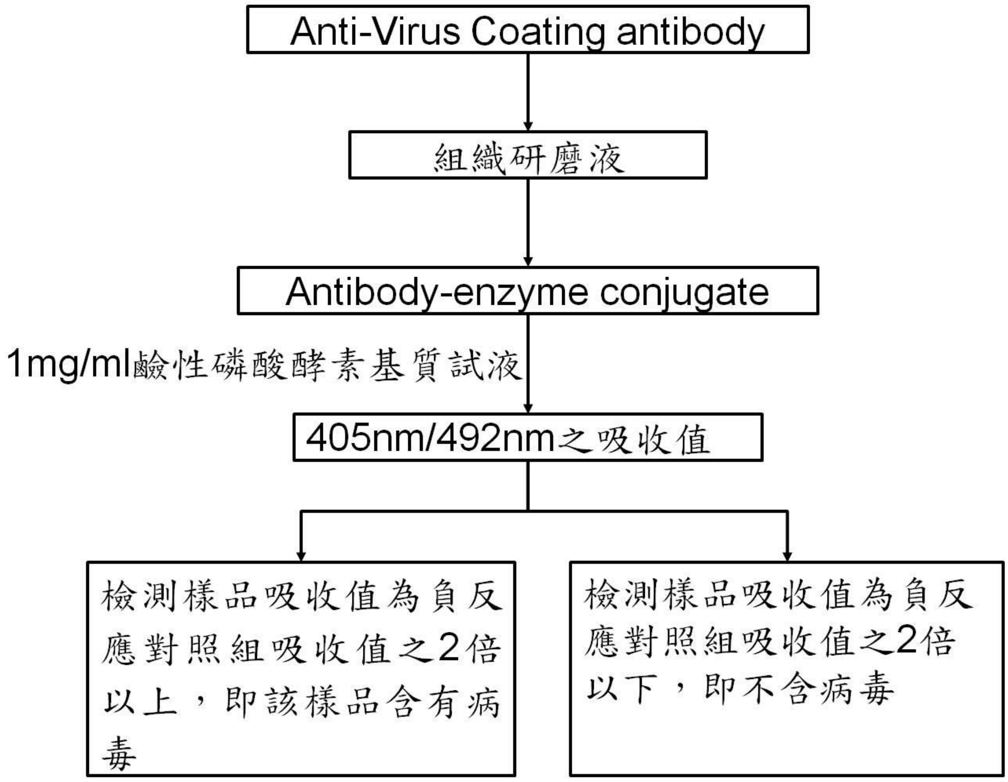
3.2.7.取出後以洗滌液清洗清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.8.將 p-nitrophenyl phosphate disodium (PNP)與基質緩衝液依 1mg/ml 的濃度配製成鹼性磷酸酵素基質試液後，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100µl，將微量盤放入保濕盒，於 37℃暗室靜置 30 分鐘~1 小時。

3.2.9.取出微量盤，以 ELISA 讀值分析儀分析 405nm/492nm 之吸收值。註 2：相關試劑廠牌與使用量依使用者自行決定

3.3.流程

胡瓜綠斑嵌紋病毒檢測流程示意圖



4 .結果判讀

每次實驗必須同時測試正反應(罹染 CGMMV 病毒組織)及負反應對照組(健康組織)樣品。以 ELISA 讀值分析儀分析檢體之吸收值結果，須與負反應對照組之結果進行相互比對，當檢體吸收值為負反應對照組吸收值之 2 倍以上，即判定該檢體含有 CGMMV。

四、胡瓜嵌紋病毒（*Cucumber mosaic virus*）檢測方法

檢測方法

酵素聯結抗體免疫吸附法(Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay, ELISA)

檢測方法簡介

針對瓜類種子中胡瓜嵌紋病毒(*Cucumber mosaic virus*，CMV)之定性檢測。本檢測方法係以間接酵素聯結抗體免疫吸附法(indirect ELISA)進行CMV之檢測，並以ELISA讀值分析儀分析基質受酵素催化反應所呈405nm/492nm之吸收值。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。爲避免交叉污染。樣品前處理、樣品萃取、ELISA試劑配製及ELISA等檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。育苗環境應為包覆32目尼龍網的網室或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施。

1.2.設備

1.2.1.ELISA讀值分析儀：或同級品，具波長405nm、492nm偵測功能者。

1.2.2.恆溫培養箱：可維持37℃恆溫者。

1.2.3.滾珠研磨器：可研磨植物組織者。

1.2.4.八爪微量吸注器及微量吸管。

2.試材與試劑

2.1.試劑

2.1.1.洗滌液(PBST)

NaCl	8.0	g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	1.15	g
KH_2PO_4	0.2	g
KCl	0.2	g
Tween-20	0.5	ml
NaN_3	0.2	g

先調pH值至7.4再加去離子水至總量1000ml

2.1.2.樣品萃取緩衝液(sample extraction buffer)：

Na_2HCO_3	2.93	g

Na_2CO_3	1.59	g

先調pH值至9.6再加PBST至總量1000ml

2.1.3.結合緩衝液(Conjugate buffer)：

BSA	2.0	g
PVP-40	20.0	g
NaN_3	0.2	g

先調 pH 值至 7.4 再加 PBST 至總量 1000ml

2.1.4.基質緩衝液(Substrate buffer)：

Diethanolamine	97.0	ml
NaN_3	0.2	g
$MgCl_2·6H_2O$	0.1	g

先調 pH 值至 9.8 再加去離子水至總量 1000ml

2.1.5.抗血清：Anti- CMV IgG、Goat anti-rabbit AP conjugate

2.2.其他耗材：

2.2.1.反應容器：如96孔樣品盤、塑膠研磨袋等。

2.2.2.微量吸注器吸管 (Pipette tips)：配合微量吸注器規格，或具同樣功能之同級品。

2.2.3.育苗介質：使用Bas van Buuren (BVB)介質(No.4, Maasland, Netherlands)，或具同樣功能之同級品，使用前必須經過高溫高壓濕熱法消毒後使用。

2.2.4.三寸軟盆或相當大小穴格的穴盤。

註1：前述使用或提及之儀器或藥劑廠牌不代表為同類產品 中最好者；反之，未使用或提及之廠牌亦不代表為同類產品中較差者。

3.步驟與方法

3.1.種子催芽及育苗

3.1.1種子播種於三寸軟盆或相當大小穴格的穴盤中，每盆或每穴限1粒種子。

3.1.2下壓穴盤中心之介質約0.5公分，覆蓋介質後，置於包覆32目尼龍網的網室中或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施中。

3.1.3種子發芽後每一植株獨立編號，並避免植株間互相接觸摩擦，栽培到三片本葉長出後，每株採樣第1及第2之三出葉各一片小葉，置於具編號的採集袋中。

3.2.病毒檢測

3.2.1.將測試樣品稱重，加 10 倍量之樣品萃取緩衝液(即植物組織：萃取緩衝液＝1:10(W/V))，置於研磨袋以滾珠研磨器研磨。

3.2.2.取組織研磨液分別注入 96 格微量盤中，每穴 100µl，每樣品 2 重複，並以健康植物組織液(負對照)及含病毒(CMV)組織液(正對照)當作對照組。

3.2.3.將微量盤放入保濕盒於 4℃反應過夜，以洗滌液清洗微量盤 5 分鐘，再重複清洗 4 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.4.將病毒抗血清以結合緩衝液(conjugate buffer)依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100µl，將微量盤置入保濕盒中，於 37℃恆溫箱反應 2 小時。

3.2.5.取出後以洗滌液清洗微量盤 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.6.將山羊抗兔血清連接酵素(Goat anti-rabbit AP conjugate)以結合緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100µl，將微量盤至入保濕盒中，於 37℃恆溫箱反應 2 小時。

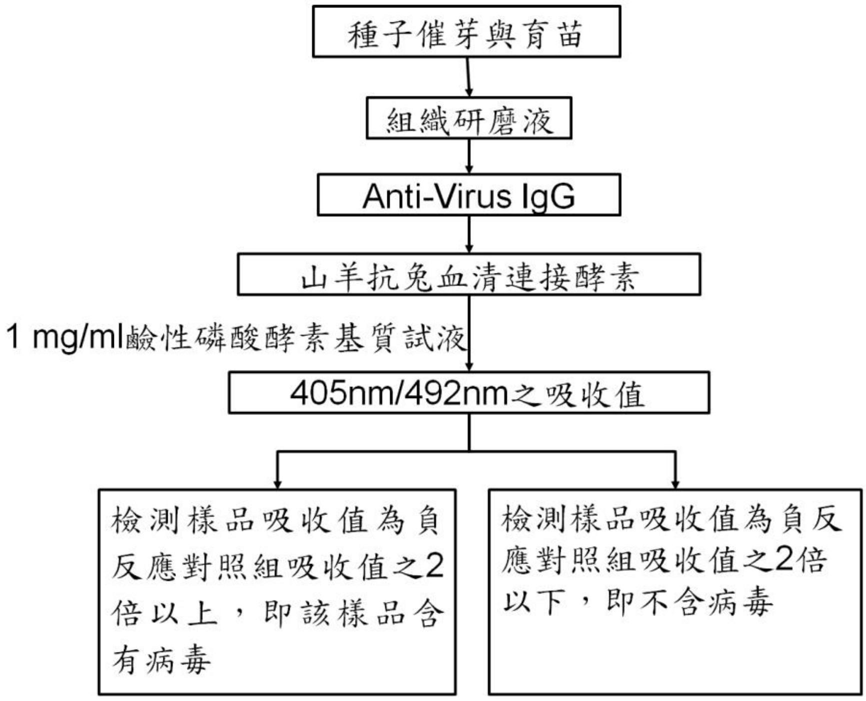
3.2.7.取出後以洗滌液清洗微量盤 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.8.將 p-nitrophenyl phosphate disodium (PNP)與基質緩衝液依 1mg/ml 的濃度配製成鹼性磷酸酵素基質試液後，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100µl，將微量盤放入保濕盒，於 37℃暗室靜置 30 分鐘~1 小時。

3.2.9.取出微量盤，以 ELISA 讀值分析儀分析 405nm/492nm 之吸收值。註 2：相關試劑廠牌與使用量依各單位使用者自行決定

3.3 流程

胡瓜嵌紋病毒檢測流程示意圖



4.結果判讀

每次實驗必須同時測試正反應(罹染 CMV 病毒組織)及負反應對照組(健康組織)樣品。以 ELISA 讀值分析儀分析檢體之吸收值結果，須與負反應對照組之結果進行相互比對，當檢體吸收值為負反應對照組吸收值之 2 倍以上，即判定該檢體含有 CMV。

五、番茄嵌紋病毒（*Tomato mosaic virus*）檢測方法

檢測方法

反轉錄聚合酶鏈鎖反應（Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR）

檢測方法簡介

針對茄科種子中番茄嵌紋病毒(*Tomato mosaic virus*, ToMV)之檢測。本檢測方法係利用兩組引子對進行一步驟 RT-PCR反應，以偵測ToMV 之外鞘蛋白(coat protein, CP)轉錄體，並增加植物β-actin轉錄體之專一性增幅條帶作為植物RNA樣品的正對照，進行電泳分析核酸擴增產物所呈現之條帶位置分別為550bp及121bp。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。爲避免交叉污染。樣品前處理、樣品RNA萃取、one-step RT-PCR試劑配製及one-step RT-PCR等檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。one-step RT- PCR相關試劑之配製(如引子稀釋、酵素混合分裝等)應於無菌操作台內進行。

1.2.設備

1.2.1.核酸檢測：具波長260nm、280nm偵測功能之分光計，或可檢測核酸濃度與純度之相關儀器。

1.2.2.低溫離心機：可達20,000 × g，並具4℃溫控功能。

1.2.3.離心機：供各式微量離心管離心用。

1.2.4.聚合酶鏈鎖反應器：ABI Veriti TM Thermal cycler或同級品。

1.2.5.電泳裝置：供DNA電泳用，含電泳槽與電源供應器。

1.2.6.膠片照相裝置：供電泳膠片照相用。

1.2.7.核酸自動萃取機：供檢測植物體的DNA萃取用，使用TAN; Smart LabAssiist-16或同級品。

1.2.8.恆溫箱：供育苗用，可維持25℃及28℃環境。

2.試材與試劑

2.1.試劑

2.1.1.反轉錄聚合酶鏈鎖反應(RT-PCR)試劑

2.1.1.1檢測目標用引子

2.1.1.1.1可偵測ToMV病毒外鞘蛋白轉錄體之引子對

引子F：ToMV no.1，5′- Tgg gCC CCT ACC ggg ggT -3′

引子R：ToMV no.3，5′- TTC AAC AgC AgT TCA gCg Ag -3′

RT-PCR 增幅產物：DNA 片段大小 550 bp(顯示該樣品含有病毒 ToMV)

2.1.1.1.2可偵測植物β-actin轉錄體之引子對

引子F：ActinF，5′- CAT gTT CCC Tgg TAT TgC TgA -3′

引子R：ActinR，5′- gAT CCT CCA ATC CAg ACA CTg TA-3′

RT-PCR 增幅產物：DNA片段121 bp (顯示該樣品含有植物RNA)

※合成之引子拆封後，以0.1X DEPC water稀釋成適當濃度，分裝後置於–20℃儲存備用。

2.1.2.dNTP (deoxyribonucleoside triphosphate)：含dATP (deoxyadenosine triphosphate) 、 dCTP (deoxycytidine triphosphate)、dGTP(deoxyguanosine triphosphate)及dTTP (deoxythymidine triphosphate)。

2.1.3.反轉錄酵素(Reverse Transcriptase)：AMV-RTase (5 U/μL)，或同級品。

2.1.4.聚合酶(*Taq* DNA polymerase)：AMV-Optimized Taq (5 U/μL)，或同級品。

2.1.5.電泳用試藥：Safe View DNA Stain、Agarose、Loading dye(含bromophenol blue、xylene cyanol FF或功用相同者)、DNA片段分子量標誌(DNA molecular weight marker)，可區分100-1000bp的DNA片段。

2.2.其他耗材

2.2.1.配合聚合酶鏈鎖反應器使用之反應容器：如PCR反應管、96孔樣品盤等。

2.2.2.微量吸注器吸管(Pipette filter tips) ：配合微量吸注器規格，如Aerosol barrier pipette tips或具同樣功能之同級品。

2.2.3.育苗介質：使用Bas van Buuren (BVB)介質(No.4, Maasland, Netherlands)，或具同樣功能之同級品，使用前必須經過高溫高壓濕熱法消毒後使用。

2.2.4.無菌水、滅菌濕紙巾、可密閉之小型培養容器、1.5吋栽培盆。

註1：所有耗材均必須採用無DNase、RNase者。

註2：前述使用或提及之儀器或藥劑廠牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之廠牌亦不代表為同類產品中較差者。

3.步驟與方法

3.1種子催芽與育苗

3.1.1.以無菌水漂洗種子(以包裝分批漂洗)，以滅菌過之鑷子夾取個別種子，擺放於鋪設濕紙巾(滅菌)之容器內，種子間互不接觸。

3.1.2.於種子之上再鋪一層濕紙巾，加入無菌水保持濕潤。將容器密閉，擺置25℃定溫箱，進行催芽。每 24 小時觀察是否發芽，並持續加入無菌水，保持濕潤。使用於育苗期之介質以濕熱消毒法滅菌處理後，填充於 1.5 吋栽培盆。

3.1.3.下壓盆面中心之介質約 0.5 公分，放置已催芽之種子後，覆蓋介質。放置於 12 小時光照 28℃，12 小時黑暗 25℃之生長箱，待植株長出真葉後即可進行採樣。

3.2.RNA萃取

3.2.1.先將所有需要操作之器械及耗材放置於無菌操作台中(藥劑除外)，並開啟紫外線殺菌燈 10 分鐘以上，全程必須於無菌操作台內操作。開始操作時，務必關閉紫外線殺菌燈。

3.2.2.將待檢植物葉片置於 2ml 離心管中，1000µl Pipette 及 1000µl tip 吸起 Lysis Buffer (LB) 400µl，加到含有葉片之 2ml 離心管中，將離心管置於均質機以 1000 rpm 震盪 30 秒，樣品均勻攪拌後，於室溫中靜置約 10min。

3.2.3.靜置樣品期間，TAN Bead combo kit 96 孔盤置於無菌操作台上，並從塑膠包裝袋內取出，將各試劑添加至以下直行管柱內。(依樣品數量決定管柱使用量)

3.2.4.依照試劑套組指示於各個反應孔內加入藥劑。

3.2.4.1.第 2 直行/第 8 直行：用 1000µl pipette 及 1000µl tip 將 Wash Buffer1(WB1)800µl 加入其管柱中。

3.2.4.2.第 2 直行/第 8 直行：用 100µl pipette 及 100µl tip 將 Magnetic Beads 混合均勻後 80µl 加入其管柱中。

3.2.4.3 第 3 直行/第 9 直行：用 1000µl pipette 及 1000µl tip 將 Wash Buffer2(WB2)800µl 加入其管柱中。

3.2.4.4.第 4 直行/第 10 直行：用 1000µl pipette 及 1000µl tip 將 Wash Buffer3 (WB3)800µl 加入其管柱中。

3.2.4.5.第 6 直行/第 12 直行：用 100µl pipette 及 100µl tip 將 Elution Buffer(EB)100µl 加入其管柱中。

3.2.5.將已靜置 10min 之樣品溶液於試管震盪器震盪約 10 秒後，置於高速離心機中離心 10,000 rpm、10min。將上清液倒入第 1 及第 7 直行管柱內。

3.2.6.用 100μl pipette 及 100μl tip 將 70% EtOH 100μl 加入第 1 及第 7 直行管柱中，並以 tip 混合均勻。

3.2.7.用 1000μl pipette 及 1000μl tip 將 Binding Buffer 400μl 加入第 1 及第 7 直行管柱中，並以 tip 混合均勻。

3.2.8.打開核酸自動萃取機(Smart LabAsist-16)電源開關(機器後方右下角)。

3.2.9.將 96 孔盤斜角朝左下方，順著軌道推到底置入機器中。

3.2.10.將 2 條攪拌棒順著磁棒架軌道推到底，並關上門。

3.2.11.選擇操作流程”RNA-BWE”,按”Start”開始運作。

3.2.12.待流程結束(約 45 分鐘後)，打開門，取出 96 孔盤，置於無菌操作台上。

3.2.13.用 100μl pipette 及 100μl tip 將第 6 直行及第 12 直行之 Elution Buffer (EB)吸出並置入新的 1.5ml 離心管中。最後於-20℃冰箱中保存。

3.3.目標病毒 RT-PCR 檢測：

ToMV外鞘蛋白之轉錄體與植物β-actin基因之轉錄體均需檢測，植物總量RNA取約1μl進行RT-PCR反應。

3.4.ToMV外鞘蛋白基因轉錄體檢測：10μM，預期DNA片段550bp片段

Primer 名稱	序列
ToMV no.1	5′- Tgg gCC CCT ACC ggg ggT -3′
ToMV no.3	5′- TTC AAC AgC AgT TCA gCg Ag -3′

3.5.植物β-actin基因轉錄體檢測：10 μM，預期DNA片段121 bp片段

Primer 名稱	序列
ActinF	5′- CAT gTT CCC Tgg TAT TgC TgA -3′
ActinR	5′- gAT CCT CCA ATC CAg ACA CTg TA -3′

3.6. RT-PCR 條件

A	50℃	30 min
B	92℃	2min
C	92℃	30 sec
D	55℃	30sec
E	**72℃**	**30sec**
重複步驟(C)到(E)35 個循環		
F	**72℃**	**7min**
G	**4℃**	∞

3.7.One-step RT-PCR 試劑建議用量(以 Takara 為例)

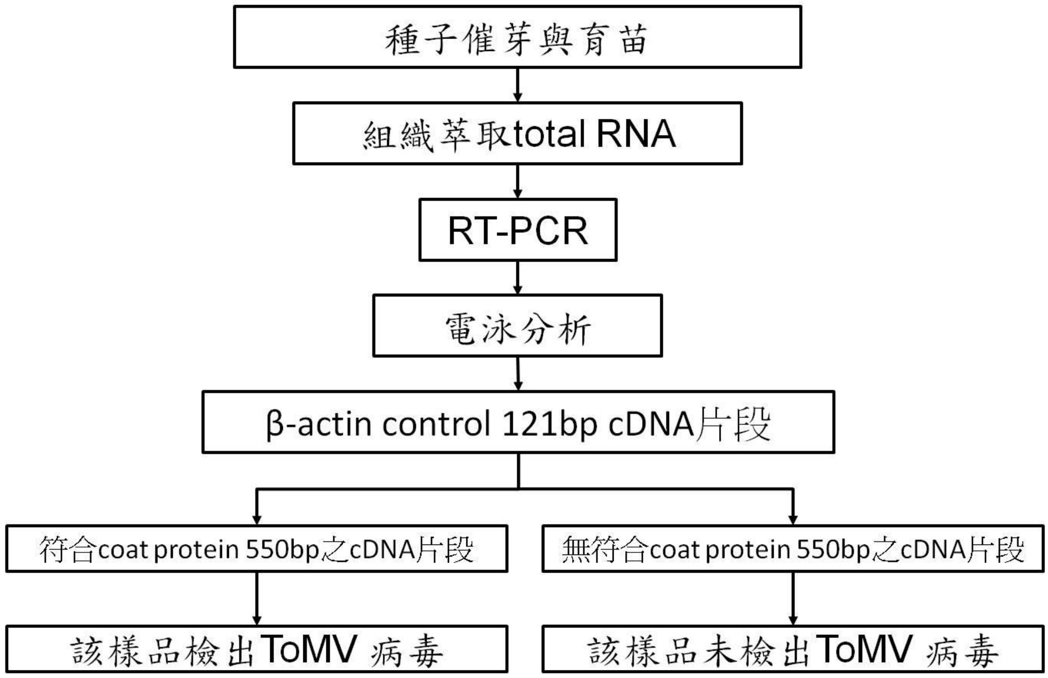
Rnase free distilled water	4.75	μl
10×buffer	1.25	μl
25mMMgCl_2	2.50	μl
10mMdNTP	1.25	μl
Rnase inhibitor (40Units/μl)	0.25	μl
AMV RTase(5Units/μl)	0.25	μl
AMV Optimized Taq(5Units/μl)	0.25	μl
Primer ToMV no.1(10Mm)	0.25	μl
Primer ToMV no.3 (10μM)	0.25	μl
Primer ActinF (10μM)	0.25	μl
Primer ActinR (10μM)	0.25	μl
Template(總量 RNA)	1.00	μl
Total	12.50	μl

(※RT-PCR 相關試劑廠牌與使用量依各單位使用者自行決定)

3.8.PCR 檢測電泳分析：每次製備正反應對照物質均需進行定序確認目標序列無誤，並於每次實驗時同時測試正反應(罹染 ToMV 病毒組織)及負反應對照組(健康組織)樣品。檢體 cDNA 之電泳結果，須與正反應對照組及 DNA 片段分子量標誌之電泳結果進行相互比對，當檢體 cDNA 與正反應對照組 cDNA 二者之 PCR 增幅產物大小相同，且經由 DNA 分子量標記物質估算 PCR 增幅產物大小無誤，即判定該檢體含有 ToMV。

3.9.流程

番茄嵌紋病毒檢測流程示意圖



4 .結果判讀

每次實驗必須同時測試正反應(罹染 ToMV 組織)及負反應對照組(健康組織)樣品。檢體 cDNA 之電泳結果，須與正反應對照組及 cDNA 片段分子量標誌之電泳結果進行相互比對，當檢體 cDNA 與正負反應對照組 cDNA 二者之 RT-PCR 增幅產物，皆有出現 121bp 之植物 β-actin 基因 cDNA 產物，即判斷 RT-PCR 成功，當檢體 cDNA 與正反應對照組 cDNA 二者之 RT-PCR 增幅產物大小相同，且經由 cDNA 分子量標記物質估算 RT-PCR 增幅產物大小為 550bp，即判定該檢體含有 ToMV。

六、十字花科黑腳病菌（*Phoma lingam*）檢測方法

檢測方法

濾紙法(Standard blotter test, SBT)

檢測方法簡介

本方法適用於十字花科黑腳病菌(*Phoma lingam*)之檢測。利用濾紙法進行種子上的病原真菌培養，觀察病原真菌的形態特徵進行鑑定。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。爲避免交叉污染，樣品前處理、樣品萃取皆需與其他檢測或實驗區隔進行。

1.2.設備

1.2.1.移植環、移植針、解剖刀、鑷子。

1.2.2.光學顯微鏡：目鏡10X，物鏡10 X、40 X、100X (Nikon Eclipse 80i或同級品以上)。

1.2.3.解剖顯微鏡(Olympus SZX16或同級品以上)

1.2.3.高溫高壓滅菌釜(Hirayama HVE-50或同級品以上)

1.2.4.培養箱：可維持20±2 °C (可調整光照週期與溫度，具近紫外光(波長300-400 nm)燈管) (名器F-360DN或同級品以上)。

1.2.5. -20±2°C冷凍櫃(Ruey Shing LCF411-SL或同級品以上)。

1.2.6.無菌操作台(Lian Shen JW-4N或同級品以上)。

2.試材與試劑

2.1.待測種子：僅適用於未經處理(無論是以物理、生物或化學方式，包括種衣處理)之種子。

2.2.直徑 9 cm 滅菌塑膠培養皿(Yeh Chung 或同級品以上)

2.3.直徑 9 cm 圓形濾紙(TOYO ADVANTEC® No. 1 或 Whatman® No. 1)

2.4.無菌水

2.5.水瓊脂培養基(water agar medium，WA) (BD Bacto agar 或同級品以上)

2.6.正對照菌株：經鑑定具病原性之 *Phoma lingam* (有性時期: *Leptosphaeria maculans*)菌株，以 WA 培養於 20±2°C 培養箱備用。

3.步驟與方法

3.1.將 3 張經滅菌過的直徑 9 cm 圓形濾紙置入直徑 9 cm 滅菌塑膠培養皿中，再添加 5 ml 無菌水。

3.2.每個培養皿放入 50 顆種子，共 20 個培養皿。

3.3.將培養皿先置於 20±2°C、黑暗環境下培養 24 小時，再將培養皿移到-20 °C 冷凍櫃中放置 24 小時以抑制種子發芽。將培養皿移置於 20±2°C 培養箱，在輪替 12 小時近紫外光、12 小時黑暗的環境下培養 14 天。

3.4.在一放有濕濾紙(添加 5 ml 無菌水)的培養皿中放入正對照菌株直徑 5 mm 新鮮菌絲塊，與待測樣品共同培養。

3.5.流程

十字花科黑腳病菌檢測流程示意圖

濾紙法培養

↓

於20±2˚C、黑暗環境下培養24小時

↓

於-20 ˚C冷凍櫃中放置24小時以抑制種子發芽

↓

20±2˚C ，12小時近紫外光、12小時黑暗培養

↓

顯微鏡鏡檢

↓

觀察是否有柄子器存在

↓

計算帶菌率

4. 結果判讀

依據國際種子檢查協會出版之 International Seed Testing association. 2019. International Rules for Seed Testing Annexe to Chapter 7: 7-004: Detection of *Leptosphaeria maculans* and *Plenodomus biglobosus* in Brassica spp. seed，培養至第 11 天時，先以解剖顯微鏡 25 倍放大倍率觀察種子及及周邊濾紙上是否已有 *P. lingam* 鬆散的銀白色菌絲(圖 1)產生。待培養至第 14 天，以解剖顯微鏡 25 倍放大倍率進行第二次檢查，受測種子及周邊濾紙是否有與 *Phoma lingam* 標準菌株相同之柄子器產生(圖 2-圖 4)，有觀察到柄子器的種子即為受感染種子。檢查結果計算後以百分率(%)記錄。

圖 1. 種子及周邊濾紙上 *Phoma lingam* 鬆散的銀白色菌絲。

圖 2. *Phoma lingam* 的柄子器散生於甘藍種子及周邊濾紙上。

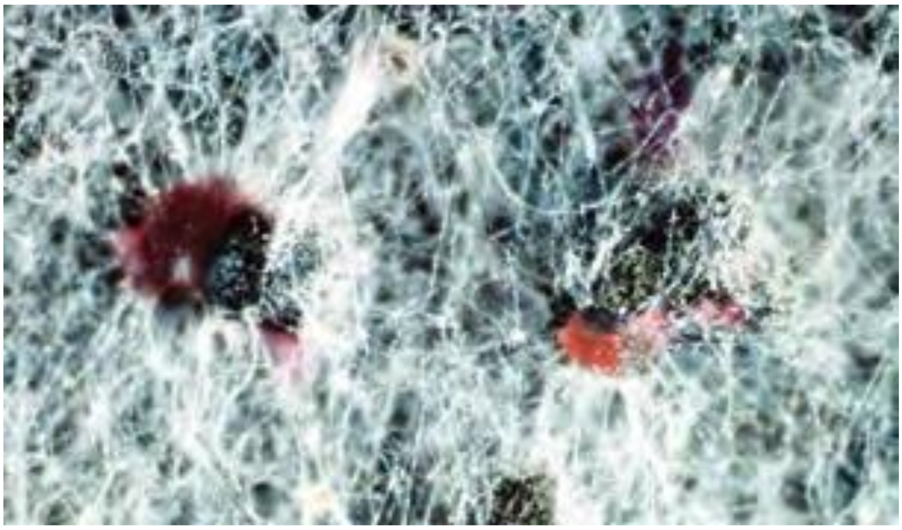


圖 3. 解剖顯微鏡下觀察之受感染種子及周邊濾紙上 *Phoma lingam* 鬆散的銀白色菌絲及其柄子器。

圖 4. 受感染種子表面可見 *Phoma lingam* 柄子器。

七、瓜類蔓枯病菌（*Didymella bryoniae*）檢測方法

檢測方法

冷凍濾紙法(Deep freezing blotter test, DFB)

檢測方法簡介

本方法適用於瓜類蔓枯病菌（*Didymella bryoniae*）之檢測。利用濾紙法配合低溫處理進行種子上的病原真菌培養，觀察目標病原真菌的形態特徵進行鑑定。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。爲避免交叉污染。樣品前處理、樣品萃取皆需與其他檢測或實驗區隔進行。

1.2.設備

1.2.1.移植環、移植針、解剖刀、鑷子。

1.2.2.光學顯微鏡：目鏡10X，物鏡10 X、40 X、100X (Nikon Eclipse 80i或同級品以上)。

1.2.3.解剖顯微鏡(Olympus SZX16或同級品以上)

1.2.3.高溫高壓滅菌釜(Hirayama HVE-50或同級品以上)

1.2.4.培養箱：可維持20-24 °C (可調整光照週期與溫度，具近紫外光(波長300-400 nm)燈管) (名器F-360DN或同級品以上)。

1.2.5.冷凍櫃：可維持－20±2 °C(Ruey Shing LCF411-SL或同級品以上)。

2.試材與試劑

2.1.待測種子：僅適用於未經處理(無論是以物理、生物或化學方式，包括種衣處理)之種子。

2.2.直徑 9 cm 滅菌塑膠培養皿(Yeh Chung 或同級品以上)

2.3.直徑 9 cm 圓形濾紙(TOYO ADVANTEC® No. 1 或 Whatman® No. 1)

2.4.馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(potato dextrose agar，PDA) (BD Difco 或同級品以上)

2.5.無菌水

2.6.正對照菌株：經鑑定具病原性之 *Didymella bryoniae* 菌株，以 PDA 培養於 20-24 °C 備用。

3.步驟與方法

3.1.將 6 張經滅菌的直徑 9 cm 圓形濾紙以無菌水浸濕後置入直徑 9 cm 滅菌塑膠培養皿中。

3.2.每個培養皿內置入 10 顆種子，共 40 個培養皿。

3.3.將培養皿放到 20-24 °C 培養箱，無光照培養 24 小時。

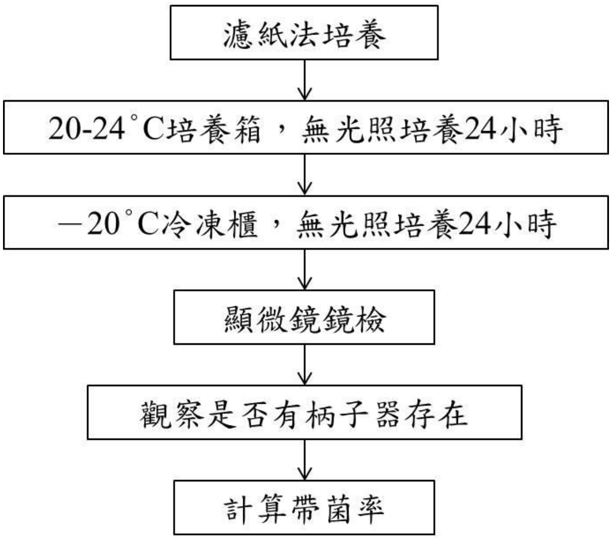
3.4.將培養皿移到－20 °C 冷凍櫃，無光照培養 24 小時。

3.5.在一放有濕濾紙的培養皿中放入正對照菌株直徑 5 mm 新鮮菌絲塊，於 20-24 °C 培養箱內，12 小時光照培養、12 小時無光照培養。

3.6.將受測樣品與正對照菌株共同培養於 20-24 °C 培養箱，以 12 小時光照、12 小時無光照培養的循環條件，培養 5~8 天後取出觀察。

3.7.流程

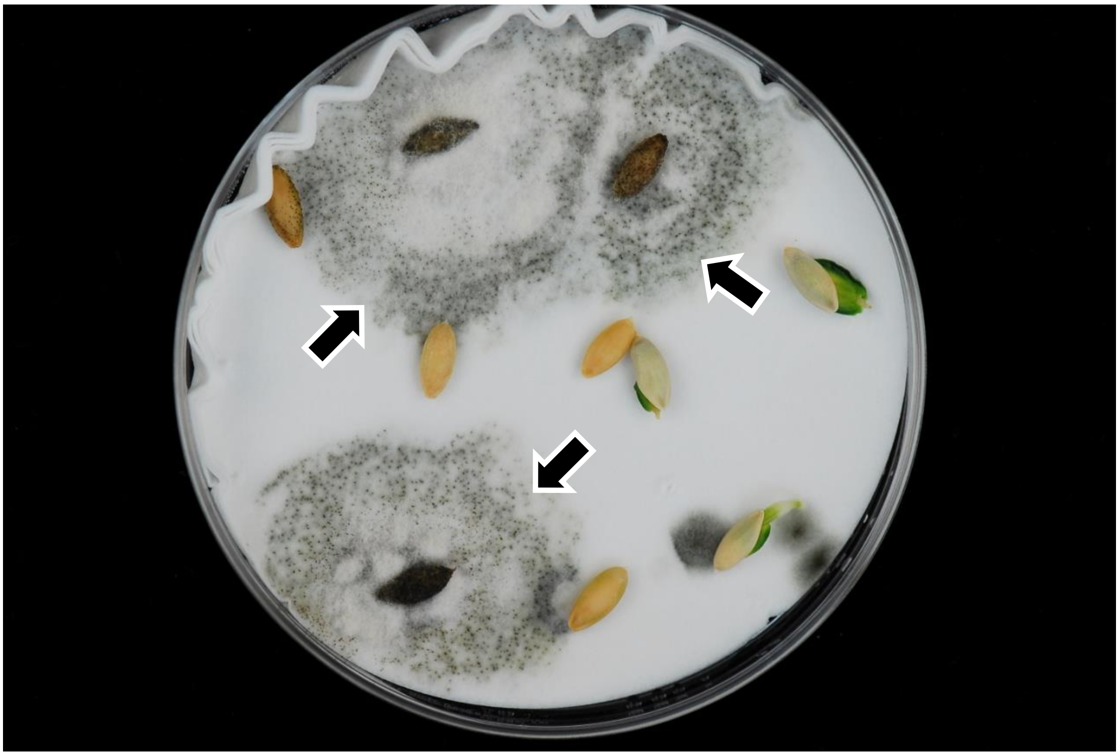
十字花科黑腳病菌檢測流程示意圖



4. 結果判讀

依據國際種子檢查協會出版之國際種子檢驗法定規則(可參考 Mathur, S. B. and Kongsdal, O. 2003. Chapter 5. Blotter method. p89-317. Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi. 1st ed. 425p. International Seed Testing Association (ISTA) published. Bassersdorf, CH-Switzerland)，以解剖顯微鏡放大 50 倍率，檢查受測種子及其周邊濾紙，是否有是否有與 *Didymella bryoniae* 標準菌株相同之柄子器產生(圖 1、圖 2 與圖 3)。有觀察到柄子器的種子即為受感染種子。

圖 1. 受感染之種子及其周邊濾紙，可觀察到黑褐色柄子器產生。



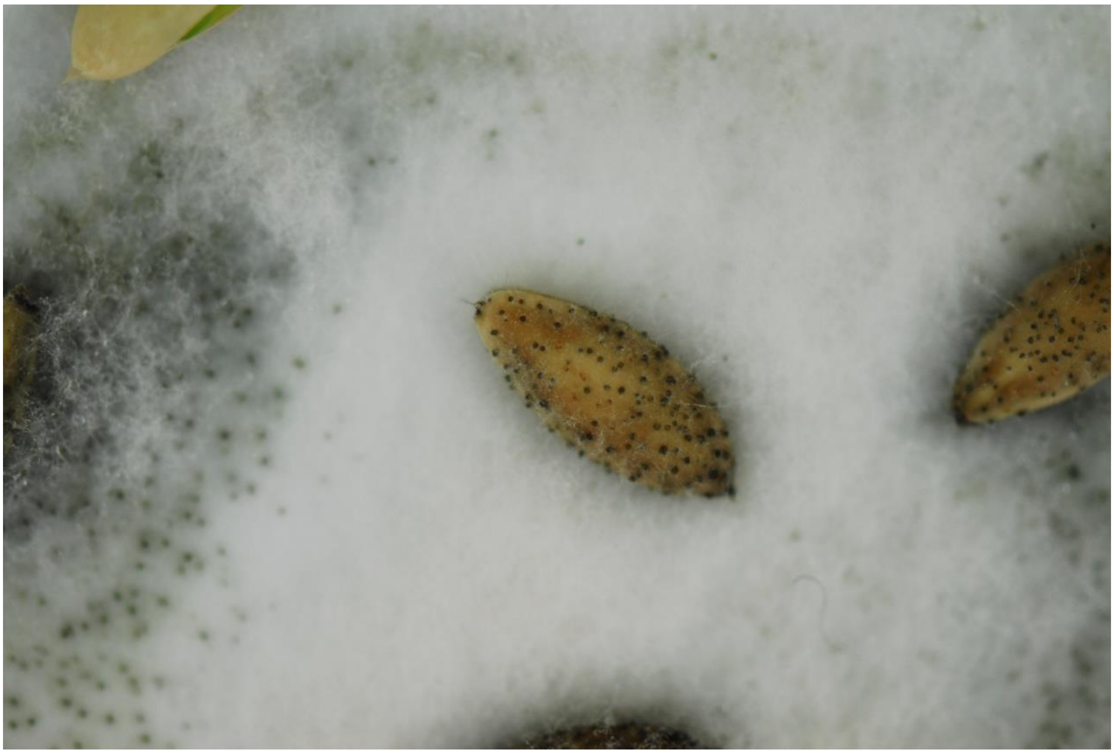


圖 2. 受感染的種子上有許多黑褐色柄子器產生。

圖 3. *Didymella bryoniae* 在胡瓜種子上的柄子器。

八、菜豆炭疽病菌（*Colletotricum lindemuthianum*）檢測方法

檢測方法

紙巾測試法(Paper toweling test)

檢測方法簡介

本方法適用於菜豆炭疽病菌(*Colletotricum lindemuthianum*)之檢測。利用紙巾測試法進行種子上的病原真菌培養，觀察目標病原真菌的形態特徵進行鑑定。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。爲避免交叉污染，樣品前處理、樣品萃取皆需與其他檢測或實驗區隔進行。

1.2.設備

1.2.1.移植環、移植針、解剖刀及鑷子。

1.2.2.光學顯微鏡：目鏡10X，物鏡10 X、40 X、100X (Nikon Eclipse 80i或同級品以上)。

1.2.3.解剖顯微鏡(Olympus SZX16或同級品以上)

1.2.4.高溫高壓滅菌釜(HIRAYAMA HVE-50或同級品以上)

1.2.5.培養箱：可維持20-24 °C (名器F-360DN或同級品以上)。

2.試材與試劑

2.1.待測種子：僅適用於未經處理(無論是以物理、生物或化學方式，包括種衣處理)之種子。

2.2.紙巾 350 x 450 mm (Mayflower 或同級品以上)

2.3.馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基(potato dextrose agar，PDA) (BD Difco 或同級品以上)

2.4.1%次氯酸鈉(Clorox®或同級品以上)

2.5.無菌水

3.步驟與方法

3.1.菜豆種子浸泡於 1%次氯酸鈉進行表面消毒 10 分鐘，取出以無菌水漂洗 3 次後置於滅菌紙巾上陰乾。

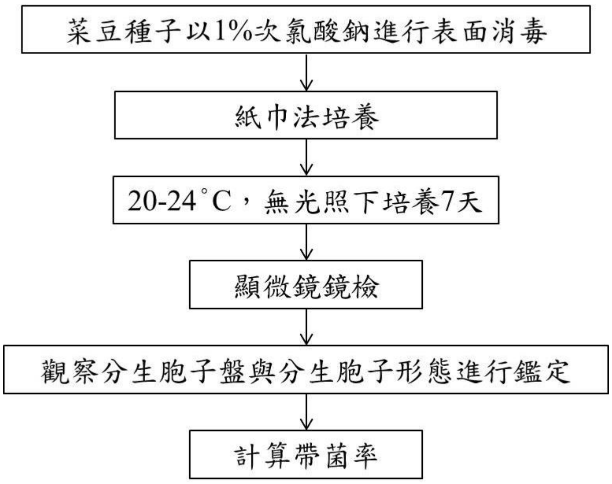
3.2.每個培養皿放置 1 張滅菌過、經無菌水浸濕的雙層 350 x 450 mm 紙巾

3.3.將已表面消毒之 50 顆種子個別放置於上述 3.2 培養皿，再用滅菌過、經無菌水浸濕的單層 350 x 450 mm 紙巾覆蓋於種子上，之後將紙巾縱向折兩次。

3.4.將培養皿置於 20-24 °C 培養箱無光照下培養。

3.5.流程

菜豆炭疽病菌檢測流程示意圖



4.結果判讀

4.1.依據國際種子檢查協會出版之國際種子檢驗法定規則(可參考 International Seed Testing association. 2008. International Rules for Seed Testing Annexe to Chapter 7: 7-006: Detection of *Colletotrichum lindemuthianum* on *Phaseolus vulgaris* (Bean))，待測種子培養 7 天後，將單層紙巾移除，用肉眼觀察經去除種皮的子葉上有無明顯與健康組織區隔的黑色病斑，以 25 倍放大倍率之顯微鏡觀察每個病斑上有無帶有暗褐色剛毛(setae)的分生胞子盤(acervuli)。

4.2.*C. lindemuthianum* 分生胞子盤上的有隔剛毛長約 6 µm x 100µm，分生胞子盤呈灰橘色，內有 2.5-5.4 µm x 11-20 µm 大小、透明圓柱形分生胞子，其末端呈圓形，具有一至兩個油滴。小型的病斑常需要較長的培養時間來使分生胞子盤形成。

九、豌豆葉斑病菌（*Ascochyta pisi*）檢測方法

檢測方法

培養基檢測

檢測方法簡介

本方法適用於豌豆葉斑病菌(*Ascochyta pisi*)之檢測。利用培養基進行種子上的目標病原真菌檢測與培養，觀察目標病原真菌的形態特徵進行鑑定。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。爲避免交叉污染，樣品前處理、樣品萃取皆需與其他檢測或實驗區隔進行。

1.2.設備

1.2.1.移植環、移植針、解剖刀及鑷子。

1.2.2.光學顯微鏡：目鏡10X，物鏡10 X、40 X、100X (Nikon Eclipse 80i或同級品以上)。

1.2.3.解剖顯微鏡(Olympus SZX16或同級品以上)

1.2.4.高溫高壓滅菌釜(HIRAYAMA HVE-50或同級品以上)

1.2.5.培養箱：可維持20-24 °C (名器F-360DN或同級品以上)。

2.試材與試劑

2.1.待測種子：僅適用於未經處理(無論是以物理、生物或化學方式，包括種衣處理)之種子；報驗樣品量為種子 400 顆。

2.2.直徑 9 cm 滅菌塑膠培養皿(Yeh Chung 或同級品以上)

2.3.麥芽瓊酯培養基(malt agar，MA) (BD Bacto malt extract 與 BD Bacto agar 或同級品以上)或馬鈴薯葡萄糖瓊酯培養基(potato dextrose agar，PDA) (BD Difco 或同級品以上)

2.4.0.2% 2,4-Dichlorophenoxyacetate (2,4-D)鈉鹽溶液(Sigma 或同級品以上)

2.5.1%次氯酸鈉(Clorox®或同級品以上)

2.6.無菌水

2.7.滅菌紙巾

3.步驟與方法

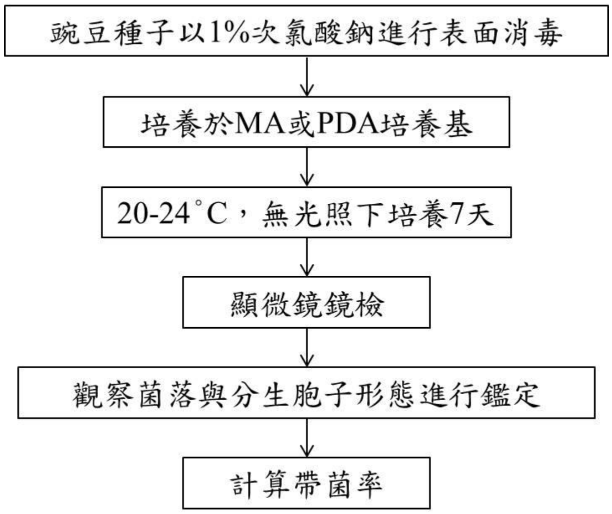
3.1.豌豆種子浸泡於 1%次氯酸鈉進行表面消毒 10 分鐘後，以滅菌紙巾吸乾 1%次氯酸鈉，再於 0.2% 2,4-D 鈉鹽溶液中浸泡 5 分鐘後取出以無菌水漂洗，置於滅菌紙巾上陰乾。

3.2.每個培養皿(MA 或 PDA)中放置 10 顆豌豆種子。

3.3.將培養皿置於 20-24°C 培養箱，無光照下培養 7 天。

3.4.流程

豌豆葉斑病菌檢測流程示意圖



4. 結果判讀

依據國際種子檢查協會出版之國際種子檢驗法定規則(可參考 International Seed Testing association. 2008. International Rules for Seed Testing Annexe to Chapter 7: 7-005: Detection of *Ascochyta pisi* on *Pisum sativum* (Pea)，待測種子培養 7 天後，用肉眼觀察種子表面有無白色菌絲纏繞，疑似菌落以 25 倍放大倍率觀察菌落邊緣有無波浪狀菌絲。培養基背面可見菌落中央呈深橘褐色，至菌落外圍顏色漸淡。*A. pisi* 有時會在靠近培養基附近產生膠狀橘褐色分生胞子器，在解剖顯微鏡 20-25 倍率下並同時使用上下光源觀察，可以見到菌絲纏繞並呈現捲曲狀，上面會附著霧氣水珠。分生胞子器直徑可達 250 μm，孢子呈透明圓柱狀，稍彎曲帶有圓形末端，在隔膜處稍縊縮，大小在 12 x 4.5 μm。

十、菸草嵌紋病毒（*Tobacco mosaic virus*）檢測方法

檢測方法

酵素聯結抗體免疫吸附法(Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay, ELISA)

檢測方法簡介

針對菸草嵌紋病毒(*Tobacco mosaic virus*，TMV)之檢測。本檢測方法係以直接酵素聯結抗體免疫吸附法(direct ELISA)進行菸草嵌紋病毒TMV之定性檢測，並以ELISA讀值分析儀分析基質受酵素催化反應所呈405nm/492nm之吸收值。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。爲避免交叉污染。樣品前處理、樣品萃取、ELISA試劑配製及ELISA等檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。育苗環境應為包覆32目尼龍網的網室或具阻隔媒介昆蟲入侵功能之設施。

1.2.設備

1.2.1.天平

1.2.2.微量吸管(Micropipette)：0.1-20μl、20-200μl及200-1000μl）。

1.2.3.恆溫培養箱：可維持37℃恆溫者。

1.2.4.八爪微量吸注器：200-1000μl。

1.2.5.酵素免疫分析儀：具波長405 nm偵測功能者。

1.2.6.酸鹼值測量儀

1.2.7.滾珠研磨器：可研磨植物組織者。

1.2.8.洗滌設備包括：洗滌瓶、洗滌桶、空氣幫浦及12孔（8孔）注液器組。

1.2.9.其他設備如電磁攪拌器、冷凍櫃及冷藏櫃等。

1.2.10.陰性對照組：係經檢具品質管控(QC)證明之陰性對照組材料。

1.2.11.陽性對照組：係經檢具品質管控(QC)證明之陽性對照組材料。

1.2.12.空白對照組：覆著Coating buffer空白孔洞（background）。

1.2.13.其他：鑷子、量筒、厚紗布及保濕盒。

2.試材與試劑

2.1.試劑：

2.1.1.洗滌液(PBST)

NaCl	8.0 g
$Na_2HPO_4.2H_2O$	1.15 g
KH_2PO_4	0.2 g
KCl	0.2 g
Tween-20	0.5 ml
NaN_3	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再加去離子水至總量 1000ml

2.1.2.被覆緩衝液(coating buffer)

Na_2HCO_3	2.93 g
Na_2CO_3	1.59 g

先調pH值至9.6再加1X PBST至總量1000ml，存放於4°C

2.1.3.品萃取緩衝液(sample extraction buffer)

Na_2SO_3	1.3 g
Ovalbumine (Grade II)	2.0 g
Tween 20	20.0 ml
PVP MW, 24-40,000	20.0 g
NaN_3	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再 1X PBST 至總量 1000ml，存放於 4°C

2.1.4.結合緩衝液(Conjugate buffer)

BSA	2 g
PVP MW, 24-40,000	20 g
NaN_3	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再加 PBST 至總量 1000ml

2.1.5.基質緩衝液(Substrate buffer)

Diethanolamine, DEA	97.0 ml
NaN_3	0.2 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.1 g

先調 pH 值至 9.8 再加去離子水至總量 1000ml

2.1.6.抗血清：Anti- TMV coating antibody、Antibody-enzyme conjugate

2.1.7.p-nitrophenyl phosphate disodium(PNP)

2.2.其他耗材

2.2.1.丟棄式刀片、培養皿、無菌水、二次滅菌水、秤藥紙及無菌濾紙。

2.2.2.ELISA 96孔微量反應盤

2.2.3.塑膠研磨袋及採集袋

2.2.4.微量吸管尖(Micropipette tips)：10µl、200µl、1.5 ml，或具同樣功能之同級品。

2.2.5.育苗介質：使用Bas van Buuren (BVB)介質(No.4, Maasland, Netherlands)，或具同樣功能之同級品，使用前必須經過高溫高壓濕熱法消毒後使用。

2.2.6.三寸軟盆或相當大小穴格之穴盤

註1：前述使用或提及之儀器或藥劑廠牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之廠牌亦不代表為同類產品中較差者。

3.步驟與方法

3.1.種子催芽及育苗

3.1.1.以無菌水漂洗種子(以包裝分批漂洗)，再以滅菌之鑷子夾取各別種子，放置於鋪設無菌濾紙之培養皿內，並保持種子間互不接觸。

3.1.2.於種子之上再鋪上一層無菌濾紙，並加入無菌水保持濕潤，將培養皿放置於 28℃之恆溫箱中黑暗 3 小時進行浸種。

3.1.3.將種子播種於三寸軟盆或相當大小穴格的穴盤中，每盆或每穴限 1 粒種子，下壓穴盤中心之介質約 0.5 公分，覆蓋介質後，置於包覆 32 目尼龍網的網室中或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施中，種子發芽後每一植株獨立編號，並避免植株間互相接觸摩擦，待第 1 片本葉展開後，以每 10 株為 1 單位採樣葉圓盤，置於具編號的採集袋中。

3.2.病毒檢測

3.2.1.將 Anti-Virus coating antibody 以被覆緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至 ELISA 96 孔微量反應盤(以下簡稱微量盤)中，每穴注入 100μl，將微量盤至入保濕盒中，於 37℃恆溫箱反應 2 小時。

3.2.2.取出後以洗滌液清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.3.將測試樣品稱重，加入 10 倍量之菸草嵌紋病毒 TMV 樣品萃取緩衝液(即植物組織：樣品液＝1:10(W/V))，置於塑膠研磨袋以滾珠研磨器研磨。

3.2.4.取組織研磨液分別注入微量盤中，每穴 100μl，每樣品 2 重複，並以健康組織研磨液(負對照)及含菸草嵌紋病毒 TMV 組織研磨液(正對照)當作對照組。

3.2.5.將微量盤放入保濕盒於 4℃反應過夜，以洗滌液清洗微量盤 5 分鐘，再重複清洗 4 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.6.將 antibody-enzyme conjugate 以結合緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100μl，將微量盤置入保濕盒中，於 37℃恆溫箱反應 4 小時。

3.2.7.取出後以洗滌液清洗清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

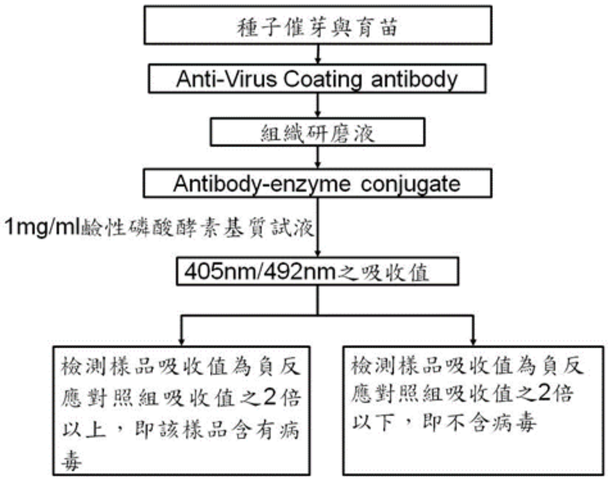
3.2.8.將 p-nitrophenyl phosphate disodium(PNP)與基質緩衝液依 1mg/ml 的濃度配製成鹼性磷酸酵素基質試液後，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100µl，將微量盤放入保濕盒，於 37℃暗室靜置 30 分鐘~1 小時。

3.2.9.取出微量盤，以 ELISA 讀值分析儀分析 405nm/492nm 之吸收值。

註 2：相關試劑廠牌與使用量依使用者自行決定。

3.3.流程

菸草嵌紋病毒 TMV 檢測流程示意圖



4. 結果判讀

4.1.檢測值讀取：設定酵素免疫分析儀於 405 nm 波長下讀取讀值。

4.2.吸收標準

4.2.1.呈色狀況：陽性對照組(罹染 TMV 病毒組織)必呈現顯著黃色，其他含有病毒之檢體呈現不同程度之黃色，健康檢體、空白背景值（background reaction）及陰性對照組則無色彩呈現。

4.2.2.病毒陽性反應：檢體兩重複讀值皆大於健康對照組 2 倍值以上，視為陽性反應。

十一、南瓜嵌紋病毒 (*Squash mosaic virus*)檢測方法

檢測方法

酵素聯結抗體免疫吸附法(Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay, ELISA)

檢測方法簡介

針對南瓜嵌紋病毒(Squash mosaic virus，SqMV)之檢測。本檢測方法係以直接酵素聯結抗體免疫吸附法(direct ELISA)進行南瓜嵌紋病毒SqMV之定性檢測，並以ELISA讀值分析儀分析基質受酵素催化反應所呈405nm/492nm之吸收值。

1.設備與材料

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。爲避免交叉污染。樣品前處理、樣品萃取、ELISA試劑配製及ELISA等檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。育苗環境應為包覆32目尼龍網的網室或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施。

1.2.設備

1.2.1.天平

1.2.2.微量吸管(Micropipette)：0.1-20μl、20-200μl及200-1000μl。

1.2.3.恆溫培養箱：可維持37℃恆溫者。

1.2.4.八爪微量吸注器：200-1000μl。

1.2.5.酵素免疫分析儀：具波長405 nm偵測功能者。

1.2.6.酸鹼值測量儀

1.2.7.滾珠研磨器：可研磨植物組織者。

1.2.8.洗滌設備包括：洗滌瓶、洗滌桶、空氣幫浦及12孔（8孔）注液器組。

1.2.9.其他設備如電磁攪拌器、冷凍櫃及冷藏櫃等。

1.2.10.陰性對照組：係經檢具品質管控(QC)證明之陰性對照組材料。

1.2.11.陽性對照組：係經檢具品質管控(QC)證明之陽性對照組材料。

1.2.12.空白對照組：覆著Coating buffer空白孔洞（background）。

1.2.13.其他：鑷子、量筒、厚紗布及保濕盒。

2.試材與試劑

2.1.試劑

2.1.1.洗滌液(PBST)

NaCl	8.0 g
$Na_2HPO_4.2H_2O$	1.15 g
KH_2PO_4	0.2 g
KCl	0.2 g
Tween-20	0.5 ml
NaN_3	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再加去離子水至總量 1000ml

2.1.2.被覆緩衝液(coating buffer)

Na_2HCO_3	2.93 g
Na_2CO_3	1.59 g

先調pH值至9.6再加1X PBST至總量1000ml，存放於4℃

2.1.3.樣品萃取緩衝液(sample extraction buffer)

Na_2SO_3	1.3 g
Ovalbumine (Grade II)	2.0 g
Tween 20	20.0 ml
PVP MW, 24-40,000	20.0 g
NaN_3	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再 1X PBST 至總量 1000ml，存放於 4℃

2.1.4.結合緩衝液(Conjugate buffer)

BSA	2 g
PVP MW, 24-40,000	20 g
NaN_3	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再加 PBST 至總量 1000ml

2.1.5.基質緩衝液(Substrate buffer)

Diethanolamine, DEA	97.0 ml
NaN_3	0.2 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.1 g

先調 pH 值至 9.8 再加去離子水至總量 1000ml

2.1.6.抗血清：Anti- SqMV coating antibody、Antibody-enzyme conjugate。

2.1.7.p-nitrophenyl phosphate disodium(PNP)

2.2.其他耗材

2.2.1.丟棄式刀片、培養皿、無菌水、二次滅菌水、秤藥紙及無菌濾紙。

2.2.2.ELISA 96孔微量反應盤

2.2.3.塑膠研磨袋及採集袋

2.2.4.微量吸管尖(Micropipette tips)：10µl、200µl、1.5 ml，或具同樣功能之同級品。

2.2.5.育苗介質：使用Bas van Buuren (BVB)介質(No.4, Maasland, Netherlands)，或具同樣功能之同級品，使用前必須經過高溫高壓濕熱法消毒後使用。

2.2.6.三寸軟盆或相當大小穴格之穴盤

註1：前述使用或提及之儀器或藥劑廠牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之廠牌亦不代表為同類產品中較差者。

3. 步驟與方法

3.1.種子催芽及育苗

3.1.1.以無菌水漂洗種子(以包裝分批漂洗)，再以滅菌之鑷子夾取各別種子，放置於鋪設無菌濾紙之培養皿內，並保持種子間互不接觸。

3.1.2.於種子之上再鋪上一層無菌濾紙，並加入無菌水保持濕潤，將培養皿放置於 28℃之恆溫箱中黑暗三小時進行浸種。

3.1.3.將種子播種於三寸軟盆或相當大小穴格的穴盤中，每盆或每穴限 1 粒種子，下壓穴盤中心之介質約 0.5 公分，覆蓋介質後，置於包覆 32 目尼龍網的網室中或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施中，種子發芽後每一植株獨立編號，並避免植株間互相接觸摩擦，待第 1 片本葉展開後，以每 10 株為 1 單位採樣葉圓盤，置於具編號的採集袋中。

3.2.南瓜嵌紋病毒 SqMV 檢測

3.2.1.將 Anti-virus coating antibody 以被覆緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至 ELISA 96 孔微量反應盤(以下簡稱微量盤)中，每穴注入 100µl，將微量盤至入保濕盒中，於 37℃恆溫箱反應 2 小時。

3.2.2.取出後以洗滌液清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.3.將測試樣品稱重，加入 10 倍量之南瓜嵌紋病毒 SqMV 樣品萃取緩衝液(即植物組織：樣品液＝1:10(W/V))，置於塑膠研磨袋以滾珠研磨器研磨。

3.2.4.取組織研磨液分別注入微量盤中，每穴 100µl，每樣品 2 重複，並以健康組織研磨液(負對照)及含南瓜嵌紋病毒 SqMV 組織研磨液(正對照)當作對照組。

3.2.5.將微量盤放入保濕盒於 4℃反應過夜，以洗滌液清洗微量盤 5 分鐘，再重複清洗 4 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.6.將 antibody-enzyme conjugate 以結合緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100µl，將微量盤置入保濕盒中，於 37℃恆溫箱反應 4 小時。

3.2.7.取出後以洗滌液清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

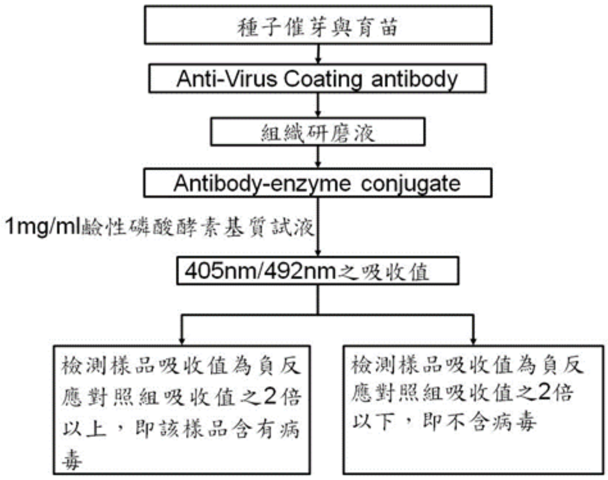
3.2.8.將 p-nitrophenyl phosphate disodium(PNP)與基質緩衝液依 1mg/ml 的濃度配製成鹼性磷酸酵素基質試液後，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100μl，將微量盤放入保濕盒，於 37℃暗室靜置 30 分鐘~1 小時。

3.2.9.取出微量盤，以 ELISA 讀值分析儀分析 405nm/492nm 之吸收值。

註 2：相關試劑廠牌與使用量依使用者自行決定。

3.3. 流程

南瓜嵌紋病毒SqMV檢測流程示意圖



4.結果判讀

4.1.檢測值讀取：設定酵素免疫分析儀於 405 nm 波長下讀取讀值。

4.2.吸收標準

4.2.1.呈色狀況：陽性對照組(罹染南瓜嵌紋病毒(*Squash mosaic virus*，SqMV)病毒組織)必呈現顯著黃色，其他含有病毒之檢體呈現不同程度之黃色，健康檢體、空白背景值（background reaction）及陰性對照組則無色彩呈現。

4.2.2.病毒陽性反應：檢體兩重複讀值皆大於健康對照組 2 倍值以上，視為陽性反應。

十二、豌豆種媒嵌紋病毒（*Pea seed-borne mosaic virus*）檢測方法

檢測方法

酵素聯結抗體免疫吸附法(Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay, ELISA)

檢測方法簡介

針對豌豆種媒嵌紋病毒（*Pea seed-borne mosaic virus*，PSbMV）之檢測。本檢測方法係以直接酵素聯結抗體免疫吸附法(direct ELISA)進行豌豆種媒嵌紋病毒PSbMV之定性檢測，並以ELISA讀值分析儀分析基質受酵素催化反應所呈405nm/492nm之吸收值。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。爲避免交叉污染。樣品前處理、樣品萃取、ELISA試劑配製及ELISA等檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。育苗環境應為包覆32目尼龍網的網室或具阻隔媒介昆蟲入侵功能之設施。

1.2.設備

1.2.1.天平

1.2.2.微量吸管(Micropipette)：0.1-20μl、20-200μl及200-1000μl。

1.2.3.恆溫培養箱：可維持37℃恆溫者。

1.2.4.八爪微量吸注器：200-1000μl。

1.2.5.酵素免疫分析儀：具波長405 nm偵測功能者

1.2.6.酸鹼值測量儀

1.2.7.滾珠研磨器：可研磨植物組織者。

1.2.8.洗滌設備包括：洗滌瓶、洗滌桶、空氣幫浦及12孔（8孔）注液器組。

1.2.9.其他設備如電磁攪拌器、冷凍櫃及冷藏櫃等。

1.2.10.陰性對照組：係經檢具品質管控(QC)證明之陰性對照組材料。

1.2.11.陽性對照組：係經檢具品質管控(QC)證明之陽性對照組材料。

1.2.12.空白對照組：覆著Coating buffer空白孔洞（background）。

1.2.13.其他：鑷子、量筒、厚紗布及保濕盒。

2.試材與試劑

2.1.試劑：

2.1.1.洗滌液(PBST)

NaCl	8.0 g
$Na_2HPO_4.2H_2O$	1.15 g
KH_2PO_4	0.2 g
KCl	0.2 g
Tween-20	0.5 ml
NaN_3	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再加去離子水至總量 1000ml

2.1.2.被覆緩衝液(coating buffer)

Na_2HCO_3	2.93 g
Na_2CO_3	1.59 g

先調pH值至9.6再加1X PBST至總量1000ml，存放於4℃

2.1.3.樣品萃取緩衝液(sample extraction buffer)

Na_2SO_3	1.3 g
Ovalbumine (Grade II)	2.0 g
Tween 20	20.0 ml
PVP MW, 24-40,000	20.0 g
NaN_3	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再 1X PBST 至總量 1000ml，存放於 4℃

2.1.4.結合緩衝液(Conjugate buffer)

BSA	2 g
PVP MW, 24-40,000	20 g
NaN_3	0.2 g

先調 pH 值至 7.4 再加 PBST 至總量 1000ml

2.1.5.基質緩衝液(Substrate buffer)

Diethanolamine, DEA	97.0 ml
NaN_3	0.2 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.1 g

先調 pH 值至 9.8 再加去離子水至總量 1000ml

2.1.6.抗血清：Anti-PSbMV coating antibody、Antibody-enzyme conjugate

2.1.7.p-nitrophenyl phosphate disodium(PNP)

2.2.其他耗材

2.2.1.丟棄式刀片、培養皿、無菌水、二次滅菌水、秤藥紙及無菌濾紙。

2.2.2.ELISA 96孔微量反應盤。

2.2.3.塑膠研磨袋及採集袋

2.2.4.微量吸管尖(Micropipette tips)：10µl、200µl、1.5 ml，或具同樣功能之同級品。

2.2.5.育苗介質：使用Bas van Buuren (BVB)介質(No.4, Maasland, Netherlands)，或具同樣功能之同級品，使用前必須經過高溫高壓濕熱法消毒後使用。

2.2.6.三寸軟盆或相當大小穴格之穴盤。

註1：前述使用或提及之儀器或藥劑廠牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之廠牌亦不代表為同類產品中較差者。

3.步驟與方法

3.1.種子催芽及育苗

3.1.1.以無菌水漂洗種子(以包裝分批漂洗)，再以滅菌之鑷子夾取各別種子，放置於鋪設無菌濾紙之培養皿內，並保持種子間互不接觸。

3.1.2.於種子之上再鋪上一層無菌濾紙，並加入無菌水保持濕潤，將培養皿放置於 28℃之恆溫箱中黑暗 3 小時進行浸種。

3.1.3.將種子播種於三寸軟盆或相當大小穴格的穴盤中，每盆或每穴限 1 粒種子，下壓穴盤中心之介質約 0.5 公分，覆蓋介質後，置於包覆 32 目尼龍網的網室中或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施中，種子發芽後每一植株獨立編號，並避免植株間互相接觸摩擦，待第 1 片本葉展開後，以每 10 株為 1 單位採樣葉圓盤，置於具編號的採集袋中。

3.2.豌豆種媒嵌紋病毒 PSbMV 檢測

3.2.1.將 Anti-virus coating antibody 以被覆緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至 ELISA 96 孔微量反應盤(以下簡稱微量盤)中，每穴注入 100µl，將微量盤至入保濕盒中，於 37℃恆溫箱反應 2 小時。

3.2.2.取出後以洗滌液清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.3.將測試樣品稱重，加入 10 倍量之豌豆種媒嵌紋病毒 PSbMV 樣品萃取緩衝液(即植物組織：樣品液＝1:10(W/V))，置於塑膠研磨袋以滾珠研磨器研磨。

3.2.4.取組織研磨液分別注入微量盤中，每穴 100µl，每樣品 2 重複，並以健康組織研磨液(負對照)及含豌豆種媒嵌紋病毒 PSbMV 組織研磨液(正對照)當作對照組。

3.2.5.將微量盤放入保濕盒於 4℃反應過夜，以洗滌液清洗微量盤 5 分鐘，再重複清洗 4 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

3.2.6.將 antibody-enzyme conjugate 以結合緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100μl，將微量盤置入保濕盒中，於 37℃恆溫箱反應 4 小時。

3.2.7.取出後以洗滌液清洗清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤拍打至厚紗布上甩乾。

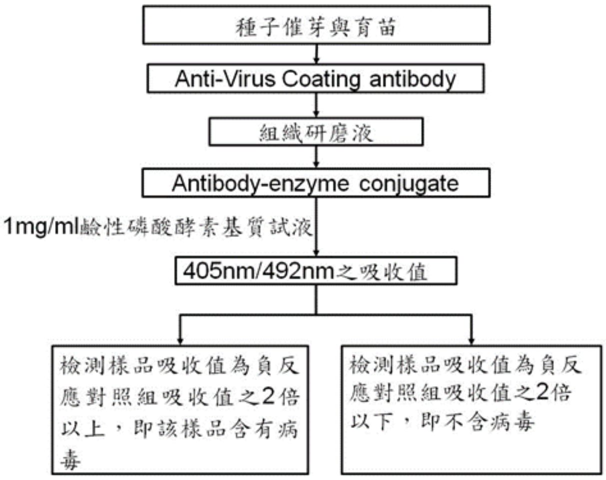
3.2.8.將 p-nitrophenyl phosphate disodium(PNP)與基質緩衝液依 1mg/ml 的濃度配製成鹼性磷酸酵素基質試液後，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100μl，將微量盤放入保濕盒，於 37℃暗室靜置 30 分鐘~1 小時。

3.2.9.取出微量盤，以 ELISA 讀值分析儀分析 405nm/492nm 之吸收值。

註 2：相關試劑廠牌與使用量依使用者自行決定。

3.3.流程

豌豆種媒嵌紋病毒 PSbMV 檢測流程示意圖



4.結果判讀

4.1.檢測值讀取：設定酵素免疫分析儀於 405 nm 波長下讀取讀值。

4.2.吸收標準

4.2.1.呈色狀況：陽性對照組(罹染豌豆種媒嵌紋病毒(*Pea Seed-borne Mosaic virus*， PSbMV)病毒組織)必呈現顯著黃色，其他含有病毒之檢體呈現不同程度之黃色，健康檢體、空白背景值（background reaction）及陰性對照組則無色彩呈現。

4.2.2.病毒陽性反應：檢體兩重複讀值皆大於健康對照組 2 倍值以上，視為陽性反應。

十三、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(*Columnea latent viroid*)檢測方法

檢測方法

兩階段式反轉錄聚合酶鏈鎖反應(2 steps Reverse transcription polymerase chain reaction, 2 steps RT-PCR)檢測

檢測方法簡介

針對馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒(*Potato spindle tuber viroid* ，PSTVd)、番茄黃色矮化類病毒(*Tomato chlorotic dwarf viroid* ，TCDVd)、辣椒小果類病毒(*Pepper chat fruit viroid* ，PCFVd)、番茄頂矮化類病毒(*Tomato apical stunt viroid* ，TASVd)、番茄類病毒(*Tomato planta macho viroid* ，TPMVd)及金魚藤潛伏類病毒(*Columnea latent viroid* ，CLVd)之檢測。利用4組引子包括NADH-F、NADH-R、DHL-55F、DHL-56R、Pospi1F、Pospi1R、CLV4F、CLV4R等引子（其中NADH-F、NADH-R為植株常態表現之核醣核酸RNA偵測引子對，為比對RNA萃取效能之引子對）進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應，以偵測類病毒馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒PSTVd、番茄黃色矮化類病毒TCDVd、辣椒小果類病毒PCFVd、番茄頂矮化類病毒TASVd、番茄類病毒TPMVd及金魚藤潛伏類病毒CLVd等檢疫類病毒，以電泳分析核酸增幅產物所呈現之條帶位置，進行結果判讀。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。爲避免交叉污染。樣品前處理、樣品 RNA 萃取、2 steps RT-PCR 試劑配製檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。2 steps RT-PCR 相關試劑之配製（如引子稀釋、酵素混合分裝等）應於無菌操作台內進行。

1.2.設備

1.2.1.研磨機

1.2.2.水浴槽：可維持65℃。

1.2.3.烘箱：可維持 70℃

1.2.4.核酸檢測：具波長260 nm、280 nm偵測功能之分光光度計，或可檢測核酸濃度與純度之相關儀器。

1.2.5.低溫離心機：可達 20,000 × g，並具 4℃ 溫控功能。

1.2.6.離心機：供各式微量離心管離心用。

1.2.7.聚合酶鏈鎖反應器：ABI VeritiTM Thermal cycler 或同級品。

1.2.8.電泳裝置：供 DNA 電泳用，含電泳槽與電源供應器。

1.2.9.膠片照相裝置：供電泳膠片照相用。

2.試材與試劑

2.1.藥品、研磨液與萃取液配方

2.1.1.種子研磨液配方 1

藥劑	最終濃度	1L 配置量
1.0M Tris-HCl pH8.0	0.2M	200ml
NaCl	1.0M	58.4g

2.1.2.種子研磨液配方 2

藥劑	最終濃度	1L 配置量
0.5M EDTA pH8.0	0.1M	200ml
Sodium lauryl sulphate	2.5g/100ml	25g
PVP-40	6.6g/100ml	66g

2.1.3.萃取液：取等體積之種子研磨液配方 1 及種子研磨液配方 2 均勻混合

2.1.4.5M potassium acetate

2.1.5.isopropyl alcohol

2.1.6.70%酒精

2.1.7.2-mercaptoethanol

2.1.8.無菌水及 RNase-free 無菌水

2.2.兩階段式反轉錄聚合酶鏈鎖反應(2 steps RT-PCR) 試劑

2.2.1.檢測目標用引子：可偵測類病毒與植物 internal control RNA 之引子對

引子對名稱	序列(5’-3’)
NADH-F	GGA CTC CTG ACG TAT ACG AAG GAT C
NADH-R	AGC AAT GAG ATT CCC CAA TAT CAT
DHL-55F	GGG GAA ACC TGG AGC GAA C
DHL-56R	CCT GAA GCG CTC CTC CGA GC
Pospi1F	GGG ATC CCC GGG GAA AC

Pospi1R	AGC TTC AGT TGT (T/A) TCC ACC GGG T
CLV4F	GGG GCT CCT GAG ACC GCT CTT G
CLV4R	GGG GCA ACT CAG ACC GAG C

※合成之引子拆封後，以 0.1X DEPC water 稀釋成適當濃度，分裝後置於–20℃儲存備用。

2.2.2.反轉錄酶 Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/μl)

2.2.3.Deoxynucleotide Mix dNTP (deoxyribonucleoside triphosphate)：含 dATP (deoxyadenosine triphosphate)、dCTP (deoxycytidine triphosphate)、dGTP(deoxyguanosine triphosphate) 及 dTTP (deoxythymidine triphosphate)、10 mM each dATP, dCTP, dGTP, dTTP。

2.2.4.Protector RNase Inhibitor(40 U/μl 、Storage buffer: 20 mM Hepes-KOH, 50 mM KCl, 8 mM dithiothreitol, 50% glycerol (v/v), pH approx. 7.6 (at 4°C))或同級品。

2.2.5.Random Hexamer Primer(600μM)或同級品。

2.2.6.Transcriptor RT Reaction Buffer(5X) (5X conc.: 250 mM Tris/HCl, 150 mM KCl,40 mM MgCl2, pH approx. 8.5 (25°C))或同級品。

2.2.7.2X PCR MIX

2.3.電泳用試藥

2.3.1.Safe View DNA Stain、Agarose

2.3.2.Loading dye（含 bromophenol blue 、xylene cyanol FF 或功用相同者）

2.3.3.DNA 片段分子量標誌 (DNA molecular weight marker)：可區分 100-1000bp 的 DNA 片段

2.4.正反應對照物質：為將 PSTVd、CLVd 標的基因序列接合於 TOPO 載體後，轉殖於大腸桿菌增量之質體，以確保檢測與定期監測用質體之處理作業的一致，以維持其檢驗結果之可靠性。

2.5.其他耗材

2.5.1.塑膠研磨袋及冰塊。

2.5.2.離心管：1.5ml、2ml 及 50ml。

2.5.3.配合聚合酶鏈鎖反應器使用之反應容器：如 PCR 反應管、96 孔樣品盤等，必須採用無 DNase、RNase 者。

2.5.4.微量吸管尖(Pipette filter tips)：配合微量吸注器規格，如 Aerosol barrier pipette tips 或具同樣功能之同級品。

註 1：前述使用或提及之儀器或藥劑廠牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之廠牌亦不代表為同類產品中較差者。

3.步驟與方法

3.1.種子分樣與研磨

3.1.1.將 400 顆種子放置塑膠研磨袋，以研磨機均勻研磨成粉狀(如果不易研磨，可先利用鐵槌等工具略敲碎)。

3.1.2.加入 5ml 的種子研磨液配方 1，均勻懸浮種子研磨液，再加入 10μl 2-mercaptoethanol。

3.1.3.加入 5ml 的種子研磨液配方 2，均勻懸浮種子研磨液，置於冰上保存，待其他樣品研磨完成。

3.1.4.加入 50ml 之萃取液，均勻懸浮後，取出 50ml 之種子萃取液至 50ml 離心管。

3.2.樣品 RNA 萃取

3.2.1.取出 1.5ml 之種子萃取液至 2ml 離心管進行 65℃水浴，10 分鐘。

3.2.2.加入 500μl 5M potassium acetate，混合均勻後，置於冰上 30 分鐘。

3.2.3.於 10℃離心 10,000rpm，10 分鐘。

3.2.4.取出 900μl 上清液置入 1.5ml 離心管，加入 540μl isopropyl alcohol，輕輕上下搖晃混合均勻後，置於冰上 30 分鐘。

3.2.5.於 10℃離心 10,000rpm，10 分鐘。

3.2.6.移除上清液，以 70%酒精清洗沉澱物後，移除酒精後於 70℃烘箱乾燥沉澱物。

3.2.5.以 50μl RNase-free 無菌水回溶沉澱物。

3.3.Reverse transcription

成份	體積
RNase-free 無菌水	9μl
Primer Random Hexamer Primer, 600 pmol/μl	2.0μl
Template（總量 RNA）(1μg)	2.0μl
置於冰上 10min	
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5× conc.	4.0μl
RNase inhibitor (40Units/μl)	0.5μl
Deoxynucleotide Mix, 10 mM each	2.0μl

Transcriptor Reverse Transcriptase, 20 U/μl	0.5μl
Total	20.00μl

3.4.目標類病毒 PCR 檢測

3.4.1.植物 NADH 基因轉錄體檢測：10 μM，預期 188 bp 片段

Primer 名稱	序列
NADH-F	GGA CTC CTG ACG TAT ACG AAG GAT C
NADH-R	AGC AAT GAG ATT CCC CAA TAT CAT

3.4.2.PSTVd、TCDVd 檢測：10 μM，預期 354 bp 片段

Primer 名稱	序列
DHL-55F	GGG GAA ACC TGG AGC GAA C
DHL-56R	CCT GAA GCG CTC CTC CGA GC

3.4.3.Posipviroidae 檢測：10 μM，預期 196-228 bp 片段

Primer 名稱	序列
Pospi1F	GGG ATC CCC GGG GAA AC
Pospi1R	AGC TTC AGT TGT (T/A) TCC ACC GGG T

3.4.4.CLVd 檢測：10 μM，預期 373 bp 片段

Primer 名稱	序列
CLV4F	GGG GCT CCT GAG ACC GCT CTT G
CLV4R	GGG GCA ACT CAG ACC GAG C

3.4.PCR 條件

3.4.1.NADH 引子對 RT-PCR 條件

A. 94℃ 2 min

B. 94℃ 30 sec

C. 62℃ 30 sec

D. 72℃ 30 sec

重複步驟（B）到（D）40 個循環

E. 72℃ 7 min

F. 15℃ ∞

3.4.2.NADH 引子對 PCR 試劑建議用量（以 Allbio 為例）

成份	體積
無菌水	6.5µl
P Easy-Pfu 2X PCR SuperMix	12.5µl
Primer F (10µM)	2.0µl
Primer R (10µM)	2.0µl
template（總量 cDNA）	2.0µl
Total	25.00µl

3.4.3.DHL55-DHR56 引子對 PCR 條件

A. 94℃ 2 min

B. 94℃ 30 sec

C. 58℃ 30 sec

D. 72℃ 30 sec

重複步驟（B）到（D）40 個循環

E. 72℃ 7 min

F. 15℃ ∞

3.4.4.DHL55-DHR56 引子對 PCR 試劑建議用量（以 Allbio 為例）

成份	體積
無菌水	6.5µl
P Easy-Pfu 2X PCR SuperMix	12.5µl
Primer F (10µM)	2.0µl
Primer R (10µM)	2.0µl
template（總量 cDNA）	2.0µl
Total	25.00µl

3.4.5.pospiviroids 引子對 PCR 條件：

A. 94℃ 2 min

B. 94℃ 30 sec

C. 58℃ 30 sec

D. 72℃ 30 sec

重複步驟（B）到（D）40 個循環

E. 72℃ 7 min

F. 15℃ ∞

3.4.6.pospiviroids 引子對 PCR 試劑建議用量（以 Allbio 為例）

成份	體積
無菌水	6.5μl
P Easy-Pfu 2X PCR SuperMix	12.5μl
Primer F (10μM)	2.0μl
Primer R (10μM)	2.0μl
template（總量 cDNA）	2.0μl
Total	25.00μl

3.4.5.CLVd 引子對 PCR 條件：

A. 94℃ 2 min

B. 94℃ 30 sec

C. 58℃ 30 sec

D. 72℃ 30 sec

重複步驟（B）到（D）40 個循環

E. 72℃ 7 min

F. 15℃ ∞

3.4.6.CLVd 引子對 PCR 試劑建議用量（以 Allbio 為例）

成份	體積
無菌水	6.5μl
P Easy-Pfu 2X PCR SuperMix	12.5μl
Primer F (10μM)	2.0μl
Primer R (10μM)	2.0μl
template（總量 cDNA）	2.0μl
Total	25.00μl

3.5.PCR 檢測電泳分析：依循膠體電泳操作方法，進行配置膠片、電泳操作、照相系統使用分析

註 2：PCR 相關試劑廠牌與使用量依使用者自行決定。

4.結果判讀

4.1 每次實驗必須同時測試正反應及負反應對照組（健康種子）樣品，且待測種子萃取檢體必須出現 NADH-F/NADH-R 引子對可增幅之 188bp 片段大小的產物。又 CLV4F/LV4R 引子對使用 CLVd plasmid 作為反應組之正對照，DHL-55F/DHL-56R 與 Pospi1F/Pospi1R 使用 PSTVd plasmid 作為反應組之正對照。

4.2 檢體 cDNA 之電泳結果，須與正反應對照組及 cDNA 片段分子量標誌之電泳結果進行相互比對，當檢體 cDNA 與正反應對照組 cDNA 二者之 RT-PCR 增幅產物大小相同，且經由 cDNA 分子量標記物質估算 RT-PCR 增幅產物大小無誤，即判定該檢體含有該成分。

十四、菸草微綠嵌紋病毒(Tobacco mild green mosaic virus, TMGMV)

檢測方法

檢測方法

酵素聯結抗體免疫吸附法(Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay, ELISA)

檢測方法簡介

針對菸草微綠嵌紋病毒(Tobacco mild green mosaic virus, TMGMV)之檢測。本檢測方法係以直接酵素聯結抗體免疫吸附法(direct ELISA)進行菸草微綠嵌纹病毒 TMGMV 之定性檢測，並以酵素免疫分析儀（ELISA Reader）分析基質受酵素催化反應所呈現 405nm/492nm 之吸收值。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。爲避免交叉污染。樣品前處理、樣品萃取、ELISA 試劑配製及 ELISA 等檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。

1.2.設備

1.2.1.天平

1.2.2.微量吸管(Micropipette)：0.1-20µl、20-200µl 及 200-1000µl。

1.2.3.恆溫培養箱：可維持 37℃恆溫者。

1.2.4.八爪微量吸注器：200-1000µl。

1.2.5.酵素免疫分析儀：具波長 405 nm/492nm 偵測功能者

1.2.6.酸鹼值測量儀

1.2.7.滾珠研磨器：可研磨植物組織者。

1.2.8.洗滌設備包括：洗滌瓶、洗滌桶、空氣幫浦及 12 孔（8 孔）注液器組。

1.2.9.其他設備如電磁攪拌器、冷凍櫃及冷藏櫃等。

1.2.10.陰性對照組：係經檢具品質管控(QC)證明之陰性對照組材料。

1.2.11.陽性對照組：係經檢具品質管控(QC)證明之陽性對照組材料。

1.2.12.空白對照組：覆著 Coating buffer 空白孔洞（background）。

1.2.13.其他：鑷子、量筒、厚紗布及保濕盒。

2.試材與試劑

2.1.試劑：

2.1.1.洗滌液(PBST)，　pH 7.4

NaCl	8.0 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	14.5 g
KH_2PO_4	1.0 g
Tween-20	1.5 ml
NaN_3	0.2 g

溶劑：去離子水配製，體積總量 1000ml

存放於 4℃

2.1.2.被覆緩衝液(coating buffer), pH　9.6

Na_2HCO_3	2.92 g
Na_2CO_3	1.60 g

溶劑：去離子水配製，體積總量 1000ml

存放於 4℃

2.1.3.樣品萃取緩衝液(sample extraction buffer),　pH 7.4

NaCl	8.0g
KH_2PO_4	1.0 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	14.5 g
Tween 20	1.5 ml
PVP MW, 24-40,000	20.0 g
NaN_3	0.2 g

溶劑：PBST 配製，體積總量 1000ml

存放於 4℃

2.1.4.結合緩衝液(Conjugate buffer)，　pH 7.4

NaCl	8.0g
KH_2PO_4	1.0 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	14.5 g
Tween 20	1.5 ml
BSA	5.0 g

NaN_3 0.2 g

溶劑：PBST 配製，體積總量 1000ml

存放於 4℃

2.1.5.基質緩衝液(Substrate buffer) , pH 9.8

Diethanolamine, DEA	97.0 ml
NaN_3	0.2 g
$MgCl_2$	0.1 g

先溶於 800ml 去離子水，使用鹽酸(hydrochloric acid)調整 pH 值至 9.8，再加去離子水至總量 1000ml， 存放於 4℃

2.1.6.抗血清：Anti- TMGMV coating antibody、Antibody-enzyme conjugate

2.1.7.p-nitrophenyl phosphate disodium(PNP)

2.2.其他耗材

2.2.1.丟棄式刀片、培養皿、無菌水、二次滅菌水、秤藥紙及無菌濾紙。

2.2.2.ELISA 96 孔微量反應盤。

2.2.3.塑膠研磨袋及採集袋

2.2.4.微量吸管尖(Micropipette tips)：10µl、200µl、1.5 ml，或具同樣功能之同級品。

3.步驟與方法

3.1.種子催芽及育苗

3.1.1 將 100 粒種子平均播種於栽培容器中，置於包覆 32 目尼龍網的網室中或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施中。

3.1.2 種子發芽後至 1 片本葉長出後，每株採樣第 1 片葉，置於具編號的研磨袋，每 20 片葉子為一編號，每樣品共 5 編號。

3.2. 將 Anti-virus coating antibody 以被覆緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至 ELISA 96 孔微量反應盤(以下簡稱微量盤)中，每穴注入 100µl，將微量盤至入保濕盒中，於 37℃恆溫箱反應 2 小時。

3.3 取出後以洗滌液清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤置於厚紗布上拍打甩乾。

3.4 取組織研磨液分別注入微量盤中，每穴 100µl，每樣品 2 重複，並以健康組織研磨液(負對照)及含 TMGMV 組織研磨液(正對照)當作對照組。

3.5 將微量盤放入保濕盒於 4℃反應過夜，以洗滌液清洗微量盤 5 分鐘，再重複清洗 4 次，將微量盤置於厚紗布上拍打甩乾。

3.6 將 antibody-enzyme conjugate 以結合緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100µl，將微量盤置入保濕盒中，於 37℃恆溫箱反應 4 小時。

3.7 取出後以洗滌液清洗清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤置於厚紗布上拍打甩乾。

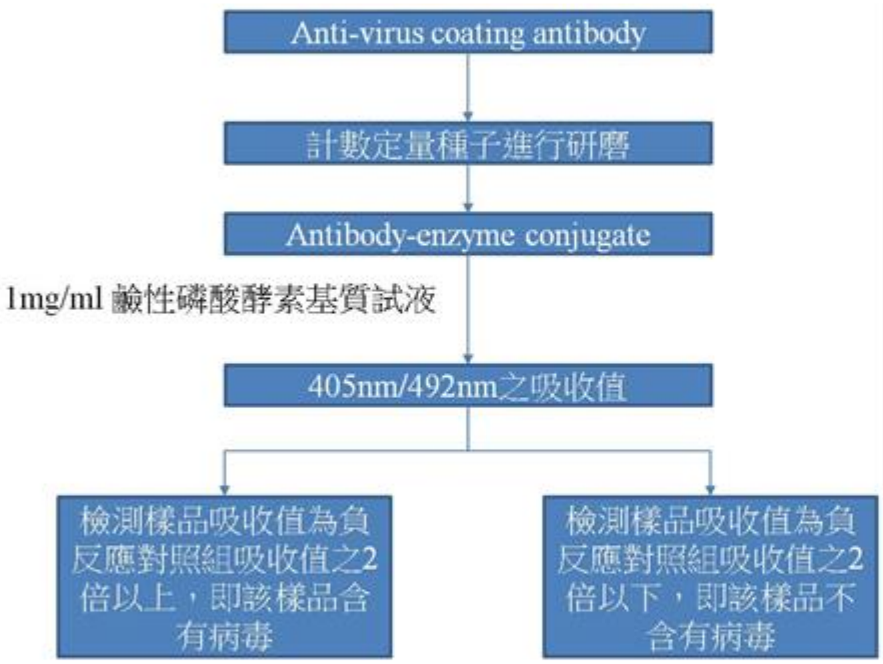
3.8 將 p-nitrophenyl phosphate disodium(PNP)與基質緩衝液依 1mg/ml 的濃度配製成鹼性磷酸酵素基質試液後，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100µl，將微量盤放入保濕盒，於 37℃暗室靜置 30 分鐘~1 小時。

3.9 取出微量盤，以 ELISA 讀值分析儀分析 405nm/492nm 之吸收值。

註 2：相關試劑廠牌與使用量依使用者自行決定。

3.10 流程

菸草微綠嵌紋病毒(Tobacco mild green mosaic virus, TMGMV)檢測流程示意圖



4.結果判讀

4.1.檢測值讀取：設定酵素免疫分析儀於 405 nm 波長下讀取讀值。

4.2.吸收標準

4.2.1.呈色狀況：陽性對照組(罹染菸草微綠嵌紋病毒(Tobacco mild green mosaic virus, TMGMV)病毒組織)必呈現顯著黃色，其他含有病毒之檢體呈現不同程度之黃色，健康檢體、空白背景值（background reaction）及陰性對照組則無色彩呈現。

4.2.2.病毒陽性反應：檢體兩重複讀值之平均值大於陰性對照組 2 倍值以上，視為陽性反應。

十五、矮南瓜黃化嵌紋病毒(Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)檢測方法

檢測方法

酵素聯結抗體免疫吸附法(Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay, ELISA)

檢測方法簡介

針對矮南瓜黃化嵌紋病毒(Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)之檢測。本檢測方法係以直接酵素聯結抗體免疫吸附法(direct ELISA)進行矮南瓜黃化嵌纹病毒 ZYMV 之定性檢測，並以酵素免疫分析儀（ELISA Reader）分析基質受酵素催化反應所呈現 405nm/492nm 之吸收值。

1.環境與設備

1.1.環境

檢測場所需寬敞、潔淨、通風、光線良好。爲避免交叉污染。樣品前處理、樣品萃取、ELISA 試劑配製及 ELISA 等檢測過程皆需與其他檢測或實驗區隔進行，所使用之相關試劑亦不得與其他檢測或實驗混合使用。

1.2.設備

1.2.1.天平

1.2.2.微量吸管(Micropipette)：0.1-20µl、20-200µl 及 200-1000µl。

1.2.3.恆溫培養箱：可維持 37℃恆溫者。

1.2.4.八爪微量吸注器：200-1000µl。

1.2.5.酵素免疫分析儀：具波長 405 nm/492nm 偵測功能者

1.2.6.酸鹼值測量儀

1.2.7.滾珠研磨器：可研磨植物組織者。

1.2.8.洗滌設備包括：洗滌瓶、洗滌桶、空氣幫浦及 12 孔（8 孔）注液器組。

1.2.9.其他設備如電磁攪拌器、冷凍櫃及冷藏櫃等。

1.2.10.陰性對照組：係經檢具品質管控(QC)證明之陰性對照組材料。

1.2.11.陽性對照組：係經檢具品質管控(QC)證明之陽性對照組材料。

1.2.12.空白對照組：覆著 Coating buffer 空白孔洞（background）。

1.2.13.其他：鑷子、量筒、厚紗布及保濕盒。

2.試材與試劑

2.1.試劑：

2.1.1.洗滌液(PBST)， pH 7.4

NaCl	8.0 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	14.5 g
KH_2PO_4	1.0 g
Tween-20	1.5 ml
NaN_3	0.2 g

溶劑：去離子水配製，體積總量 1000ml

存放於 4℃

2.1.2.被覆緩衝液(coating buffer), pH 9.6

Na_2HCO_3	2.92 g
Na_2CO_3	1.60 g

溶劑：去離子水配製，體積總量 1000ml

存放於 4℃

2.1.3.樣品萃取緩衝液(sample extraction buffer), pH 7.4

NaCl	8.0g
KH_2PO_4	1.0 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	14.5 g
Tween 20	1.5 ml
PVP MW, 24-40,000	20.0 g
NaN_3	0.2 g

溶劑：PBST 配製，體積總量 1000ml

存放於 4℃

2.1.4.結合緩衝液(Conjugate buffer)， pH 7.4

NaCl	8.0g
KH_2PO_4	1.0 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	14.5 g
Tween 20	1.5 ml
BSA	5.0 g

NaN_3 0.2 g

溶劑：PBST 配製，體積總量 1000ml

存放於 4℃

2.1.5.基質緩衝液(Substrate buffer) , pH 9.8

Diethanolamine, DEA	97.0 ml
NaN_3	0.2 g
$MgCl_2$	0.1 g

先溶於 800ml 去離子水，使用鹽酸(hydrochloric acid)調整 pH 值至 9.8，再加去離子水至總量 1000ml，

存放於 4℃

2.1.6.抗血清：Anti- ZYMV coating antibody、Antibody-enzyme conjugate

2.1.7.p-nitrophenyl phosphate disodium(PNP)

2.2.其他耗材

2.2.1.丟棄式刀片、培養皿、無菌水、二次滅菌水、秤藥紙及無菌濾紙。

2.2.2.ELISA 96 孔微量反應盤。

2.2.3.塑膠研磨袋及採集袋

2.2.4.微量吸管尖(Micropipette tips)：10μl、200μl、1.5 ml，或具同樣功能之同級品。

3.步驟與方法

3.1.種子催芽及育苗

3.1.1 將 100 粒種子平均播種於栽培容器中，置於包覆 32 目尼龍網的網室中或具阻隔媒介蚜蟲入侵功能的設施中。

3.1.3 種子發芽後至 1 片本葉長出後，每株採樣第 1 片葉，置於具編號的研磨袋，每 20 片葉子為一編號，每樣品共 5 編號。

3.2. 將 Anti-virus coating antibody 以被覆緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至 ELISA 96 孔微量反應盤(以下簡稱微量盤)中，每穴注入 100μl，將微量盤至入保濕盒中，於 37℃恆溫箱反應 2 小時。

3.3 取出後以洗滌液清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤置於厚紗布上拍打甩乾。

3.4 取組織研磨液分別注入微量盤中，每穴 100μl，每樣品 2 重複，並以健康組織研磨液(負對照)及含 ZYMV 組織研磨液(正對照)當作對照組。

3.5 將微量盤放入保濕盒於 4℃反應過夜，以洗滌液清洗微量盤 5 分鐘，再重複清洗 4 次，將微量盤置於厚紗布上拍打甩乾。

3.6 將 antibody-enzyme conjugate 以結合緩衝液依瓶身標示倍數稀釋，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100μl，將微量盤置入保濕盒中，於 37℃恆溫箱反應 4 小時。

3.7 取出後以洗滌液清洗清洗 5 分鐘，再重複清洗 2 次，將微量盤置於厚紗布上拍打甩乾。

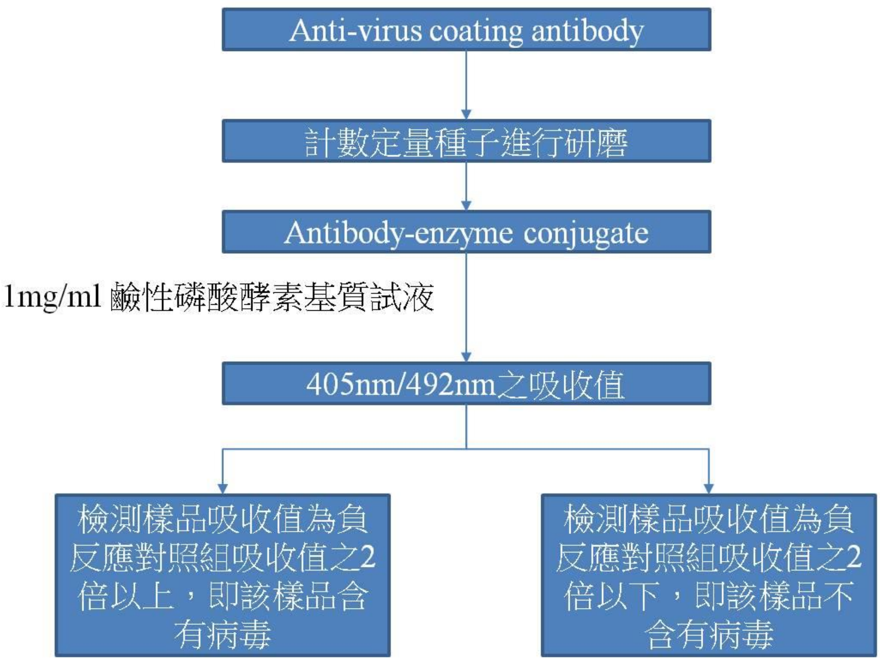
3.8 將 p-nitrophenyl phosphate disodium(PNP)與基質緩衝液依 1mg/ml 的濃度配製成鹼性磷酸酵素基質試液後，以八爪微量吸注器吸取至微量盤中，每穴注入 100μl，將微量盤放入保濕盒，於 37℃暗室靜置 30 分鐘~1 小時。

3.9 取出微量盤，以 ELISA 讀值分析儀分析 405nm/492nm 之吸收值。

註 2：相關試劑廠牌與使用量依使用者自行決定。

3.10 流程

矮南瓜黃化嵌紋病毒(Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)檢測流程示意圖



4.結果判讀

4.1.檢測值讀取：設定酵素免疫分析儀於 405 nm 波長下讀取讀值。

4.2.吸收標準

4.2.1.呈色狀況：陽性對照組(罹染矮南瓜黃化嵌紋病毒(Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)病毒組織)必呈現顯著黃色，其他含有病毒之檢體呈現不同程度之黃色，健康檢體、空白背景值（background reaction）及陰性對照組則無色彩呈現。

4.2.2.病毒陽性反應：檢體兩重複讀值之平均值大於陰性對照組 2 倍值以上，視為陽性反應。

第六點附件三　種子取樣數量（修正後）

(刪除)

修正說明：修正規定第二點第二項規定各檢測單位可檢測之病原種類與方法、取樣數及收費標準應提供防檢署公布於其網站，爰刪除第六點附件三。

第六點附件三　種子取樣數量（修正前）

<table>
<tr><th colspan="2" rowspan="2">種子種類</th><th colspan="2">取樣數量</th></tr>
<tr><th>一般用途（如繁殖或食用）</th><th>試驗研究用</th></tr>
<tr><td rowspan="3">茄科</td><td>番茄</td><td>50 公克</td><td rowspan="20">至少取 400 粒種子</td></tr>
<tr><td>辣椒</td><td>50 公克</td></tr>
<tr><td>甜椒</td><td>50 公克</td></tr>
<tr><td rowspan="6">十字花科</td><td>花椰菜</td><td>50 公克</td></tr>
<tr><td>青花菜</td><td>50 公克</td></tr>
<tr><td>甘藍</td><td>50 公克</td></tr>
<tr><td>芥藍</td><td>50 公克</td></tr>
<tr><td>不結球白菜</td><td>50 公克</td></tr>
<tr><td>青江白菜</td><td>50 公克</td></tr>
<tr><td rowspan="4">葫蘆科</td><td>西瓜</td><td>1,000 粒</td></tr>
<tr><td>南瓜</td><td>1,000 粒</td></tr>
<tr><td>洋香瓜</td><td>1,000 粒</td></tr>
<tr><td>胡瓜</td><td>1,000 粒</td></tr>
<tr><td rowspan="2">菊科</td><td>萵苣</td><td>50 公克</td></tr>
<tr><td>萬壽菊</td><td>50 公克</td></tr>
<tr><td>番木瓜科</td><td>木瓜</td><td>1,000 粒</td></tr>
<tr><td rowspan="2">豆科</td><td>豇豆</td><td>1,000 粒</td></tr>
<tr><td>鵲豆</td><td>1,000 粒</td></tr>
<tr><td colspan="2">其他種類</td><td>大型者 1,000 粒、
小型者 50 公克</td></tr>
</table>

第六點附件二　送請鑑定植物病蟲害報告表（修正後）

<table>
<tr><td colspan="4">鑑定單位：</td><td colspan="3">聯絡者：
聯絡電話：</td><td colspan="3">電子郵件：
傳真：</td></tr>
<tr><td colspan="4">申請鑑定單位：○○分署（植物健康科）</td><td colspan="3">聯絡者：
聯絡電話：</td><td colspan="3">電子郵件：
傳真：</td></tr>
<tr><td colspan="3">送請鑑定日期：</td><td colspan="3">鑑定項目：</td><td colspan="2">鑑定完成日期：</td><td colspan="2">鑑定者：</td></tr>
<tr><td rowspan="2">編號</td><td rowspan="2">採樣日期</td><td rowspan="2">公文文號</td><td rowspan="2">寄主植物或介質種類(部位)</td><td rowspan="2">輸出國</td><td rowspan="2">鑑定項目</td><td colspan="2">鑑定結果</td><td rowspan="2">臺灣是否有紀錄</td><td rowspan="2">備註</td></tr>
<tr><td>種類名稱（中名）</td><td>學名</td></tr>
<tr><td>例：高-7-001</td><td>1020901</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>廠商名稱</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
</table>

檢疫員：____________________ 科長(站長)：_____________________分署長：_________________

修正說明：點次變更。配合現行規定附件二、附件三刪除，爰將現行規定附件四修正為附件二，並修正相關人員職稱。

第七點附件四　送請鑑定植物病蟲害報告表（修正前）

鑑定單位：	聯絡者： 聯絡電話：	電子郵件： 傳真：	
申請鑑定單位：○○分署（植物健康科）	聯絡者： 聯絡電話：	電子郵件： 傳真：	
送請鑑定日期：	鑑定項目：	鑑定完成日期：	鑑定者：

編號	採樣日期	公文文號	寄主植物或介質種類(部位)	輸出國	鑑定項目	鑑定結果		臺灣是否有紀錄	**備註**
						種類名稱（中名）	學名		
例：高-7-001	1020901								廠商名稱

檢疫員：____________________ 科長(主任)：_____________________分署長：_________________