

草莓炭疽病行動化田間即時檢測技術之開發與應用

鐘珮哲（副研究員兼分場長）
洪文濱（工研院中分院工程師）

前言

根據 110 年農業統計年報，國內草莓栽培面積約為 509 公頃，產量 9,142 公噸（每公頃產量 17,953 公斤），總產值約 18 億元。草莓栽培主要集中在苗栗縣（約 89%），其中以大湖鄉栽培面積最大。五月初至九月底為草莓育苗期，以走蔓（莖）進行繁殖。草莓苗期主要病害為炭疽病、葉枯病、角斑病及萎凋病等，產果期除上述病害外，尚有灰黴病、果腐病、白粉病及及葉芽線蟲等危害。

病害為影響草莓栽培管理及造成產量損失的重要因子，其中真菌性病害炭疽病在近十多年來（約自 2010 年起）成為草莓產業關鍵病害之一。經本場與臺大植微系合作團隊研究可知，臺灣田間炭疽病菌族群以 *Colletotrichum siamense* 為主（佔 75%），*C. fructicola* 次之（佔 11%）。炭疽病具有潛伏感染特性，停留在潛伏感染期的狀態即具有傳播能力。外觀無病徵卻帶有炭疽病菌孢子之草莓種苗（或植株），往往成為傳播來源。由於炭疽病菌孢子可藉由雨水或噴灌水彈濺傳播，露天噴灌育苗方式往往加速炭疽病菌之擴散速度。

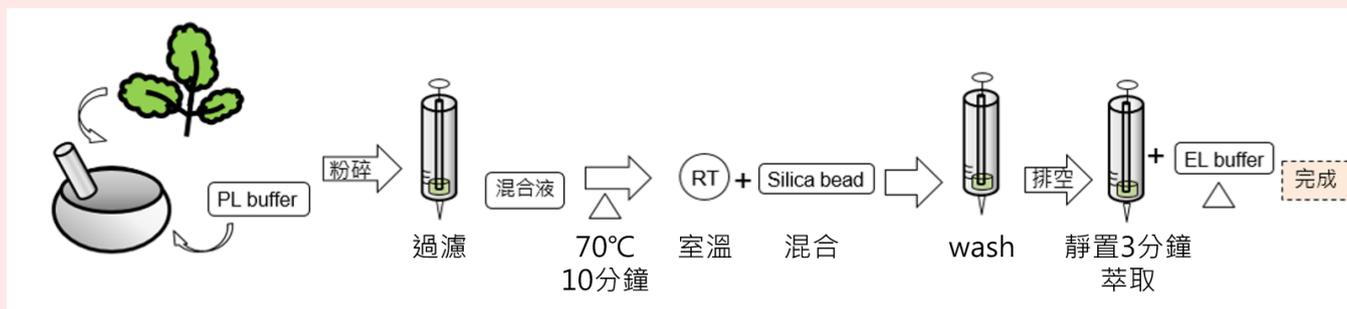
為有效減少炭疽病發生，降低育苗期間施用化學藥劑的頻率，提升定植本田後產果量及確保果品食用安全，健康種苗為首要之務！在健康種苗推動之際，如何有效判斷肉眼無法辨識的潛伏感染，俾利於繁殖健康種苗之不同階段進行品質管控，為當務之急。本文將概述國外已開發之草莓炭疽病潛伏感染檢測方式，並說明本場與工研院中分院合作開發草莓炭疽病行動化田間即時檢測技術之成果。

檢測草莓炭疽病潛伏感染之方式

檢測草莓炭疽病潛伏感染的方式可分為兩大類，一為傳統培養方式 (culture-based)，另一則為分子檢測方式 (PCR based)。傳統培養方式包含巴拉刈法 (Paraquat)、冷凍法 (Freezing)、酒精法 (SDEI) 等，優點是操作簡便，檢測成本較低，若要指導農民或育苗業者此類檢測方式，較易上手；缺點則為需耗費較多時間才能觀察結果（通常需 3~10 天），且必須透過孢子型態作為是否為炭疽病菌之依據，在結果判讀部分需有分類專業背景較為可行。此外，巴拉刈法是英國學者在 1993 年開始用於偵測草莓葉柄上是否有炭疽病菌 (*C. acutatum*)，以確認輸入該國的草莓植株是否有潛伏感染情形。然而，巴拉刈是一種有害物質（禁用殺草劑），攝入、吸入，或通過皮膚、眼睛吸收時有毒，因而近幾年較無文獻報導使用此方式。

分子檢測方式的優點為專一性高且偵測極限值低，菌量尚低的時候即可檢測出來，對於育苗業者內部控管種苗品質相對有助益，且所需時間相較於培養方式縮短許多；缺點則是檢測成本相對高，且須有實驗室進行相關試驗。包含 PCR（聚合酶連鎖反應）、nested PCR（巢式聚合酶連鎖反應）、qPCR（定量即時聚合酶連鎖反應）、HRM（高解析度解離分析）及 LAMP（恆溫環狀核酸擴增法）等方式皆已應用於檢測草莓炭疽病潛伏感染。

近年，本場與臺大植微系合作開發 nested PCR，此技術可以偵測最主要的炭疽病菌 *C. siamense* 與 *C. fructicola*，而不會偵測到其他



圖一、非動力式核酸萃取套組流程圖。

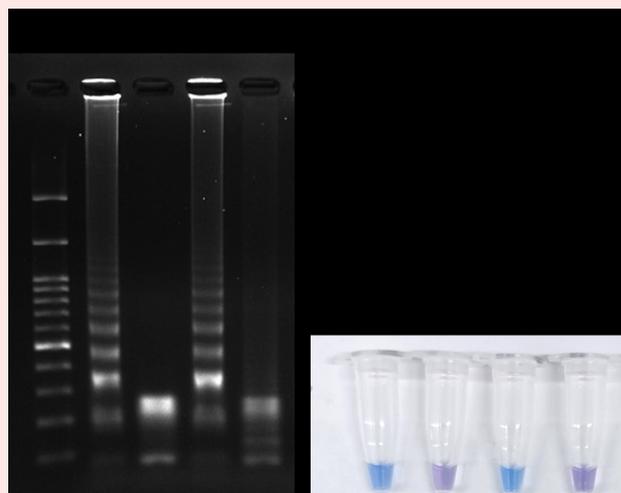
草莓病原菌（如灰黴病、葉枯病、萎凋病及疫病等）或土壤中常見的腐生菌，可穩定偵測 1 pg 之 *C. siamense* DNA（約 15 個分生孢子），具有高度專一性及靈敏度。此技術已實際應用於國內草莓種苗病害驗證作業中。

草莓炭疽病行動化田間即時檢測技術

由於病害對草莓產業的衝擊，農民及育苗業者已逐漸意識到健康種苗的重要性，若能在育苗期間以抽檢方式確認苗況，將有助於管理策略之擬定。然 nested PCR 有操作過程汙染之風險，需於實驗室並由有經驗之研究人員進行。本場與工研院農工合作團隊為促使檢測技術能直接在田間或育苗場操作，合作開發草莓炭疽病行動化田間即時檢測技術，以「草莓炭疽病檢測行動工作站」為目標。

前段提及之 LAMP 檢測法，因其 PCR 的反應溫度維持在約 60~65°C 間即可，與一般 PCR 需有升溫、降溫之循環不同，此特點提升田間使用者自行檢測之機會。為因應草莓炭疽病檢測行動工作站現地分析作業之進行，本團隊完成非動力式核酸萃取套組開發及測試。非動力式核酸萃取套組主要由 5 瓶藥劑 (Buffer) 及兩組過濾針筒即可達成植物核酸萃取之工作（圖一）。非動力式植物核酸萃取套組包含樣品研磨溶酶、去除蛋白質與 RNA、吸附 DNA、清洗、脫附 DNA，為優化操作程序與減少藥劑使用量之設計，搭配簡易工具無須動力裝置或回實驗室即可完成核酸萃取之工作。

完成核酸萃取後，接著將所得之核酸透過可攜式微型加熱器與 LAMP 進行核酸擴增，LAMP 反應的過程中會有焦磷酸的釋放，進而與反應液中的鎂離子形成白色的焦磷酸鎂 (magnesium pyrophosphate) 沉澱，隨著反應時間增加，有機會使用肉眼即可觀察到大量的白色沉澱，也就表示核酸擴增反應有進行。亦可添加指示染料來進行擴增與否的判斷，如採用羥基萘酚藍 (HNB) 指示染料，陽性擴增樣品的顏色為天藍色，陰性為紫羅蘭色。搭配目視判定結果，可達成現地進行試驗與結果判讀（圖二）。



圖二、LAMP 法核酸擴增結果可視化判讀。

為整合可現地進行非動力式植物核酸萃取，接續可攜式微型加熱器與 LAMP 完成核酸擴增，並透過可視化結果判定，本團隊將上述試驗所需材料與工具開發為草莓炭疽病檢測行動工作站之雛型，如（圖三）所示。



圖三、草莓炭疽病檢測行動工作站雛形。

本團隊於今 (111) 年將草莓炭疽病檢測行動工作站實際於草莓育苗農戶工作場域，進行現地炭疽病檢測之田間試驗 (圖四)。首先由研究人員就型態與外觀病徵分別採取健康草莓植株葉片、帶有炭疽病斑之葉片、帶有葉枯病斑之葉片等，透過非動力式植物核酸萃取套組萃取核酸，再進行 LAMP，在核酸擴增反應中另外添加羥基萘酚藍 (HNB) 指示染料，以目視判讀結果。

結語

炭疽病是推動草莓健康種苗時必須檢測之標的病害，而 LAMP 法應用在植物病害檢測方面已有馬鈴薯 Y 病毒 (Potato virus Y)、柑橘黃龍病菌 (*Candidatus Liberibacter spp.*) 等。透過本場與工研院農工合作，未來本技術在充分測試與條件最佳化調整後，可望達成現地檢測與結果判讀。此外，除本文提到的草莓外，亦可藉由 LAMP 反應引子組的專一性設計，進一步應用到其他植物病害檢驗，經由 LAMP 法將病害核酸擴增，透過檢測行動工作站之整合，達成現地操作與簡化分析，將可幫助農民及早判斷潛伏於植株之病害，降低農作物損失，同時確保作物產量及產值。