



公開
 密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：1001030100

農業部苗栗區農業改良場114年度科技計畫研究報告

計畫名稱：可攜式即時核酸檢測平台技術驗證推廣 (第1年/全程2年)

(英文名稱) Verification and promotion of portable real-time nucleic acid detection platform technology

計畫編號：114農科-10.1.3-苗-01

全程計畫期間：自 114年1月1日 至 115年12月31日

本年計畫期間：自 114年1月1日 至 114年12月31日

計畫主持人：鐘珮哲

研究人員：洪文瀆、賴巧娟

執行機關：農業部苗栗區農業改良場



1140997



一、執行成果中文摘要：

本研究旨在驗證植物病害快篩行動箱（非動力式核酸萃取套組結合 LAMP 呈色法/螢光法）在草莓炭疽病與葉枯病檢測中的穩定性與應用效益。不同核酸擴增方式敏感度比對結果顯示，行動箱萃取法產生的核酸品質穩定度不佳，內生基因 Actin 條帶微弱或無法辨識，推測為核酸萃取效率問題；該核酸用於 LAMP 呈色法時，不論健康或接種葉片皆呈陰性，初步懷疑是試劑呈色穩定度不足。隨後改用 LAMP 螢光試劑檢測炭疽病，卻出現無論接種與否皆呈陽性的非專一性反應。葉枯病 LAMP 法開發中，雖然成功優化 LAMP 反應濃度，但使用快萃核酸進行第二次比對時，LAMP 反應全數失敗，且 Actin PCR 結果極差，nested PCR 敏感度亦受影響，顯示快篩箱的核酸萃取品質極度不均一，建議優先改善快篩箱人員操作流程以確保核酸品質及濃度，並加強田間試驗控制組設計以避免汙染。育苗場域應用成果顯示，透過快篩箱進行母株潛伏感染檢測的精準防治模式，使育苗期（6-10月）炭疽病化學藥劑施用次數大幅減少至4次，定植後植株補植率僅為0.5%，證明快篩技術能有效控管病原源頭，且能精準用藥與提升種苗品質效益。

二、執行成果英文摘要：

This study aimed to validate the stability and application efficacy of a portable molecular diagnostic kit (non-powered nucleic acid extraction combined with LAMP colorimetric/fluorescent assay) for detecting strawberry anthracnose rot and leaf blight. Comparison of different nucleic acid amplification methods revealed that the nucleic acid quality extracted using the portable kit was unstable, with the internal control gene (Actin) bands appearing faint or undetectable, suggesting issues with extraction efficiency. When this extracted nucleic acid was used in the LAMP colorimetric assay, all samples, regardless of infection status, yielded negative results, initially suggesting poor stability of the colorimetric reagent. Subsequent testing for anthracnose rot using the LAMP fluorescent assay, however, resulted in non-specific positive signals for both infected and uninfected samples. In the leaf blight LAMP assay development, although the optimal LAMP reaction concentration was determined, the second comparative trial using the kit-extracted nucleic acids failed entirely in the LAMP reaction. Furthermore, Actin PCR results were poor, and nested PCR sensitivity was compromised, demonstrating the highly inconsistent quality of nucleic acid extraction by the portable kit. It is recommended to prioritize improving the standard operating procedure for kit personnel to ensure consistent nucleic acid quality and concentration, and to enhance control group design in field trials to prevent contamination. Field application results demonstrated that the precision management model, utilizing the kit for screening mother plants for latent infections, significantly reduced the frequency of chemical application for anthracnose rot control to only 4 times during the nursery period (June to October). The post-transplanting replanting rate was only 0.5%, proving that the rapid screening technology effectively controlled the source of pathogens, enabled precise chemical use, and improved runner plants quality and efficacy.

三、計畫目的：





將已開發之植物病害快篩行動箱進行草莓炭疽病現地檢測方法比對，並以草莓另一重要病害葉枯病為開發目標，開發創新性高靈敏度之快篩檢測技術與設備，大幅縮短檢測時間，降低檢驗成本，提供國內相關產業應用，強化田間管理提升果品品質。

四、重要工作項目及實施方法：

(一)完成植物病害快篩行動箱-草莓炭疽病現地測試與方法比對。

1.植物病害快篩行動箱萃取植物DNA步驟：

(1).將微型加熱器開啟並設定為70°C使其預熱。

(2).利用剪刀及鑷子取100mg的植物樣品(約5元硬幣大小)並放入微量離心管中。

(3).利用Pipette將500ul的PL Buffer試劑加入至微量離心管中並以研磨杵研磨使其粉碎分解(液體轉為青綠色即可)。

(4).利用Pipette將微量離心管中混合液移置Filter Syringe針筒中後，過濾並收集於新的微量離心管中，並將微量離心管置於微型加熱器中於70°C下反應10分鐘。

(5).待加熱時間到，將微量離心管置於離心管架放置3~5分鐘使其溫度恢復至室溫。

(6).組合Binding Plate過濾碟與Binding Syringe針筒，並將先前恢復至室溫之微量離心管中混合液加入組合後的Binding Syringe針筒中過濾並去除廢液。

註：以下步驟，如遇活塞推桿需拔出時，請先將過濾碟與針筒分離，再將活塞推桿拔出。

(7).利用Pipette將500ul的W1 Buffer試劑加入至Binding Syringe針筒中過濾並去除廢液。

(8).利用Pipette將1000ul的W2 Buffer試劑加入至Binding Syringe針筒中過濾並去除廢液。

(9).重覆吸放數次以完全去除W2 Buffer試劑後，加入200ul EL Buffer試劑並靜置3分鐘。

(10).過濾並收集過濾液於新的微量離心管中。

2.植物病害快篩行動箱恆溫環狀擴增法(LAMP)核酸擴增步驟：

(1).取出常溫化快篩試劑，利用Pipette加入24ul水回溶試劑(呈桃紅色液體)。

(2).加入1ul植物萃取DNA後，置於微型加熱器中於65°C下反應15~60分鐘，並觀察其顏色變化。

若60分鐘後仍呈桃紅色，則未受病菌感染，為陰性健康；反之，在45分鐘內呈橘色、黃色或淡黃色，則表示受病害感染，為陽性，作物有病害潛伏感染宜進行預防。

3.將以植物病害快篩行動箱萃取的草莓葉片核酸，以nested-PCR方式進行核酸擴增，與植物病害快篩行動箱恆溫環狀擴增法(LAMP)核酸擴增結果比對，確認病害篩檢的穩定性與正確性。

(二)收集並保存不同栽培地區的草莓葉枯病病原菌。

自國內草莓主要栽培地區採集罹病株，切取大小約0.2cm²之病健部進行組織表面消毒，先將組織浸於0.5%(v/v)之次氯酸鈉1分鐘，再以無菌水浸洗三次後，置於無菌之擦手紙吸乾多餘水分後，將組織置於1.5% water agar (瓊脂)上，於25°C培養，待菌絲由組織邊緣長出後，以單菌絲分離技術將菌絲切下置於PDA (potato dextrose agar, 馬鈴薯葡萄糖瓊脂)培養基平板上(於90 mm Petri dish, Alpha Plus)，於25°C，12小時光照環境下進行培養。菌株以ITS、TEF與TUB進行親緣分析，經分析後如有與造成草莓葉枯病*Neopestalotiopsis rosae*不同分群之菌株再進行離葉接種以完成病原性測定。

(三)應用已開發之草莓葉枯病 nested-PCR分子檢測技術於LAMP法並進行實驗室方法比對。

使用草莓葉枯病菌 (ML2147、M2411) 之 genomic DNA 作為模板，以 ITS1/ITS4、T1/Bt2b、EF-2/EF1-728F 為引子對，增幅 ITS、TEF 與 TUB 基因片段，並以其做為目標序列，進行引子設計。定序之序列先與其相近之盤多毛孢屬真菌 (*Neopestalotiopsis* sp.、*Pestalotiopsis*



1140997



sp. 及 *Pseudopezalotriopsis* sp.) 比對，並挑選有差異之區域進行引子對設計。設計條件引子長度介於 18~24 mer，解鏈溫度 (Melting Temperature, Tm) 介於 55~65°C 之間，GC content 介於 40%~60%，PCR 產物大小介於 100~500 bp。設計出來之引子再與 NCBI genome database 資料庫 (包含 *Colletotrichum* spp.、*Trichoderma* spp.、*Fusarium* spp.、*Botrytis* spp.、*Xanthomonas fragariae* 與 *Fragaria ananassa*) 進行 BLAST 比對，比對結果條件若出現 1 個以上具有 E-value 小於 1 的序列，將該引子標記為專一性較差之引子，其餘為具有高專一性之引子。以專一性引子對設計序列區間設計 LAMP 引子對，並以葉枯病的核酸進行實驗室方法比對，確認草莓葉枯病 nested-PCR 與 LAMP 法檢測極限、專一性等。

(四) 依據現地檢測結果提供農民防治策略。

於農民育苗期間與定植後以植物病害快篩行動箱定期每月進行炭疽病篩檢，分述如下：

1. 於溫室(或簡易遮雨)的育苗場域，在無外觀病徵條件下以每1千株取1株葉片為原則，確認田間炭疽病潛伏感染情形，由於炭疽病從潛伏感染至發病的時間長短受到外界環境的影響，包含溫度、氮肥施用量等因素，如已有潛伏感染發生，建議農民施用炭疽病推薦藥劑進行防治，並滾動式視田間環境條件與實際發病情形進行防治方法調整；如未檢出病菌，則可施用非農藥資材(如波爾多液)或生物農藥、微生物資材等進行預防，以提供農民精準防治策略，期減少夏季育苗不必要之施藥。

2. 於草莓定植高架床，在無外觀病徵條件下以每1千株取1株葉片為原則，確認田間炭疽病潛伏感染情形，如已有潛伏感染發生，建議農民施用炭疽病推薦藥劑進行防治，並滾動式視田間環境條件與實際發病情形進行防治方法調整；如未檢出病菌，則可施用非農藥資材(如波爾多液)或生物農藥、微生物資材等進行預防，由於國內草莓主要炭疽病菌種類為 *Colletotrichum siamense*，好發溫度範圍約為 28-32°C，溫度降低後發生率顯著減少，藉由現地檢測可確認田間潛在風險，以提供農民精準防治策略，

五、結果與討論：

示範場域草莓母株檢測情形及防治策略

分別於4月10日、5月9日、6月10日、6月27日、7月8日、7月11日以植物病害快篩行動箱檢測草莓育苗母株，篩檢情形如下：

4月10日檢測28株樣本，其中9株快篩試劑呈色反應為橙色或黃色。

6月10日檢測8株樣本，其中8株快篩試劑呈色反應為橙色或黃色。

6月27日檢測41株樣本，其中6株快篩試劑呈色反應為橙色或黃色。

7月8日檢測44株樣本，其中1株快篩試劑呈色反應為橙色或黃色。

7月11日檢測23株樣本，其中5株快篩試劑呈色反應為橙色或黃色。

植物病害快篩箱核酸萃取方式比較

為確認植物病害快篩箱萃取植物核酸的效率，分別以濾膜、silic beads 不同方式進行核酸萃取，並以草莓炭疽病(ML133)進行離葉接種，再將所產生的病斑以上述不同方式萃取後分別進行炭疽病 nested PCR 與 LAMP 法增幅反應，但仍未出現目標條帶，推測可能因為接種病斑上的菌量不均勻所致，將改採整個完整病斑萃取核酸。

不同核酸擴增方式敏感度比對試驗

以快篩箱萃取之田間草莓樣本以 nested PCR 方式偵幅，仍無目標條帶出現，且植物內生基因 actin 結果亦未穩定呈現，推測可能原因為萃取方法造成核酸品質不佳。以 ML133 gDNA 序列稀釋後進行 LAMP 法之結果，negative control (ddH₂O) 亦有污染的可能性，因而建議進行田間試





驗時，應加入健康草莓葉片及有炭疽病感染之葉片作為控制組，以避免汙染(偽陽性)的可能性。

兩種完整方法炭疽病檢測敏感度比對試驗

由於目前植物病害快篩行動箱是以非動力式核酸萃取套組(主要由緩衝液及過濾針筒)完成植物核酸萃取；完成核酸萃取後，接著將所得之核酸以LAMP法進行核酸擴增，並添加指示染料來進行擴增與否的判斷，陽性擴增樣品的顏色為橙色或黃色，陰性為紫紅色(粉色)。為比較於實驗室以不同方式萃取核酸並且以nested PCR進行核酸擴增的敏感度，以人工離葉接種炭疽病並分樣，共6個樣本進行分樣(分為兩組)，每組皆包含1個健康葉片樣本與5個葉片接種帶有病徵之樣本。1組樣本以植物病害快篩行動箱進行測試，另1組樣本則由農科院的實驗室進行測試。結果以植物病害快篩行動箱萃取核酸並進行LAMP法核酸擴增的樣本，不論是否為健康或接種的葉片皆呈現陰性反應。而在農科院進行試驗的樣本，健康葉片無呈現專一性條帶，5個接種葉片樣本皆有專一性條帶，且以快篩箱萃取的核酸進行nested PCR的結果，除了第6個樣本未呈現專一性條帶之外，其他皆有呈現。以草莓植株核酸的內生基因Actin作為萃取核酸效率的比對，可發現於農科院實驗室萃取的樣本1-5皆有清楚條帶呈現，6較弱但仍可見條帶；然快篩箱萃取的核酸，條帶皆較為微弱，樣本4和6則幾乎無法辨識。依據本次比對試驗結果，初步歸納行動快篩箱未正常呈色可能須朝向試劑呈色穩定度進行相關確認。

炭疽病快篩試劑呈色穩定度確認與改善

因快篩試劑(呈色法)穩定度不佳，工研院改以螢光試劑製成LAMP試劑，第1次比對試驗由苗栗場提供8個草莓葉片分樣樣本，其中有4個葉片接種炭疽病菌，分送工研院與農科院進行盲測，農科院以nested PCR方式可正確檢測相對應之接種葉片，而工研院以LAMP(螢光試劑)檢測無論是否接種螢光反應結果皆為陽性，因而需請工研院確認螢光呈色是否有非專一性表現。第2次比對試驗分別進行健康葉片核酸、葉枯病菌接種葉片核酸、炭疽病比對試驗的8個核酸樣本(植物)和炭疽病菌的核酸、葉枯病比對試驗的8個核酸樣本(植物)和葉枯病菌的核酸、negative control同步進行炭疽病菌的螢光試劑測試，結果顯示尚需請工研院確認並改善快篩箱人員操作核酸快萃過程以確保核酸品質及濃度以利後續LAMP進行及呈色反應。

草莓葉枯病LAMP檢測法開發及實驗室比對

應用已開發之草莓葉枯病 nested-PCR分子檢測技術於LAMP法之開發，進行兩次實驗室比對，第1次比對，苗栗場提供8個接種葉枯病之葉片樣本，僅以1ul核酸進行LAMP反應的條件下只有4個樣本呈現陽性反應，經調整LAMP反應的核酸濃度後8個接種樣本皆呈現陽性反應。第2次比對試驗，工研院快萃之8個接種葉片核酸經LAMP反應無陽性反應，苗栗場以工研院快萃核酸進行actin PCR結果不佳，電泳結果條帶亮度不佳，且葉枯病之nested PCR(+8 ul)僅有2個樣本有符合接種結果，然其電泳條帶亮度差，建議工研院探討每批次核酸萃取品質皆不均一是否從人員操作問題改善。

育苗期及產果期防治策略

示範場域育苗母株為組織培養苗馴化後之G1，皆以快篩箱進行快篩，依據快篩結果進行以下防治建議：(1)無潛伏感染：施用微生物製劑後，直接進入育苗溫室場域進行管理；(2)潛伏感染：於隔離場域施用系統性推薦藥劑至少2次後，再進行快篩確認植株狀態。該場域於育苗期間(6-10月間)繁殖約4200株草莓苗，期間依據目視病徵發生情形與快篩結果施藥，針對炭疽病防治共計施用4次化學藥劑。溫室試驗場域於11月6日完成定植(約2千株)，除例行管理時目視判斷病害發生情形將炭疽病感染造成植株萎凋者汰除補植(截至11月22日補植10株)，並將依據現地抽測結果提供產果期防治策略。



1140997



六、結論：

炭疽病快篩與比對試驗

一、行動箱快篩流程與待改善問題

植物病害快篩行動箱的標準作業流程為：利用非動力式核酸萃取套組（主要由緩衝液及過濾針筒組成）完成植物核酸萃取；將所得核酸以 LAMP 法進行核酸擴增，並添加指示染料進行擴增與否的判斷。依據標準，陽性擴增樣品的顏色應為橙色或黃色，陰性則為紫紅色（粉色）。然而，在初步試驗中，以行動箱萃取核酸並進行 LAMP 法擴增的樣本，無論是否為健康或接種葉片，皆呈現陰性反應，顯示 LAMP 法的呈色穩定度或核酸擴增效率存在問題，故須進行比對驗證。

二、炭疽病核酸擴增敏感度比對試驗結果

為比對行動箱快篩流程與傳統實驗室方法的敏感度，本試驗將人工接種炭疽病葉片共 6 個樣本（1 個健康葉片與 5 個接種病徵葉片）分為兩組。一組樣本以行動箱流程進行測試；另一組則由農科院實驗室以標準方法萃取核酸並以敏感度更高的 nested PCR 進行核酸擴增。結果顯示，在農科院進行試驗的樣本中，健康葉片無呈現專一性條帶，而 5 個接種葉片樣本皆有專一性條帶，結果正確。相對地，行動箱萃取核酸後進行 LAMP 法測試的樣本則全部呈陰性。值得注意的是，將行動箱萃取的核酸用於 nested PCR 擴增的結果顯示，除了第 6 個樣本未呈現專一性條帶外，其他樣本皆有呈現，這初步表明行動箱萃取的核酸並非完全無效，僅是 LAMP 法呈色反應失敗。

三、核酸萃取效率比對結果

為了評估行動箱非動力式萃取套組的核酸萃取效率，本試驗以草莓植株核酸的內生基因 Actin 作為效率比對的指標。結果顯示，於農科院實驗室萃取的樣本 1-5 皆有清楚的 Actin 條帶呈現，樣本 6 雖較弱但仍可見條帶；然而，快篩箱萃取的核酸條帶皆較為微弱，其中樣本 4 和 6 則幾乎無法辨識。此結果明確指出，行動快篩箱的非動力式核酸萃取效率與品質，相較於實驗室標準方法有顯著不足。

四、試驗結果討論與改善建議

依據本次比對試驗結果，初步歸納行動快篩箱未能正常呈色的原因，可能須朝向兩大方向確認：

呈色穩定度問題：由於行動箱萃取的核酸仍可在 nested PCR 中成功擴增，因此初步懷疑是 LAMP 試劑的呈色穩定度有待改善，無法準確反應擴增成功的結果。

核酸品質與濃度問題：Actin 內生基因比對結果證實，快篩箱萃取的核酸條帶微弱，品質及濃度不足，這可能是導致 LAMP 擴增效率低落或最終呈色反應受損的間接原因。

後續針對健康葉片核酸、葉枯病菌接種葉片核酸、以及炭疽病菌/葉枯病菌核酸等多個樣本進行螢光試劑測試的結果顯示，尚需請工研院確認並改善快篩箱人員操作核酸快萃的過程，以確保核酸品質及濃度能符合後續 LAMP 擴增及呈色反應的需求。

葉枯病LAMP檢測法建立與實驗室比對

應用已開發之草莓葉枯病 nested-PCR 分子檢測技術於 LAMP 法開發時，第一次實驗室比對結果確認了 LAMP 反應對核酸起始濃度的依賴性。初期，在僅使用 $1\mu\text{l}$ 核酸進行反應的條件下，苗栗場提供的 8 個接種葉枯病樣本中僅有 4 個樣本 LAMP 螢光試劑反應結果呈現陽性。然而，經由調整 LAMP 反應的核酸濃度後，8 個接種樣本皆成功呈現陽性反應。此結果證實了 LAMP 擴增的引子對設計與反應條件是可行的，只要能確保足夠的核酸濃度，該技術具有 100% 的檢測成功率。行動箱核酸萃取品質的穩定性與改善雖然在第一次 LAMP 檢測比對試驗已優化，但第二次實驗室比對的結果顯示行動箱快萃產出的核酸品質不佳。工研院快萃的 8 個接種葉片核酸進行 LAMP 反應時，全數無陽性反應，顯示核酸品質不足以支持 LAMP 擴增。此外，苗栗





場利用這些快萃核酸進行內控基因 Actin PCR 時，電泳結果條帶亮度極差，證實了萃取效率低或存在抑制物。即使是敏感度更高的葉枯病 nested PCR（並增加核酸使用量至 $8\mu\text{l}$ ），也僅有 2 個樣本能勉強符合接種結果，且條帶亮度亦不佳。由於核酸萃取品質不佳，影響 LAMP 法甚至 nested PCR 的檢測效果，因此建議工研院應優先探討每批次核酸萃取品質皆不均一的問題，從人員操作流程的標準化進行改善，以確保非動力式快篩箱所產製的核酸品質與濃度，能穩定達到後續 LAMP 擴增反應的最低要求。

減藥成效與效益討論

示範場域將快篩技術應用於育苗決策的成果，與慣行育苗方式相比，顯著降低化學藥劑的使用頻率（達 80% 以上），主要效益討論如下：

1. 精準控管病原源頭

以組織培養苗作為母株搭配快篩技術於遮雨環境下育苗，避免噴灌給水，解決了草莓育苗的最大瓶頸-潛伏感染病害。藉由育苗初期隔離或施用防治資材處理潛伏感染的母株，場域能從源頭控制病原菌，大幅降低了病害在育苗期的傳播風險。這方式有效改善慣行方式中，農民為防範潛伏病原傳播所採取的「平均 5-7 天施藥一次」的高頻率預防措施。

2. 提升經濟與環境永續效益

高頻率施藥模式不僅大大增加農民的藥劑成本，對草莓植株也是一種逆境往往造成藥害。

- 經濟效益：用藥次數由數十次大幅降至 4 次，顯著降低了藥劑成本、施藥的人力與時間成本。

- 環境效益：減少化學藥劑的使用，有助於降低農藥殘留和環境負擔，同時也有助於延緩病原菌產生藥劑抗性的風險。

3. 種苗品質的直接驗證

該場域育苗子苗定植後，極低的汰除補植率（僅 10 株）是精準防治成功的直接證明。這代表從育苗期輸出的種苗具有極高的健康度，能有效降低進入產果期後，因種苗帶菌而導致病害爆發的風險。

以組織培養苗作為母株於遮雨環境下育苗，避免噴灌給水並搭配快篩箱的精準防治策略，使育苗管理從高成本、高頻率施用化學藥劑之防治模式，轉變為低成本、低藥量、高效率的病原導向式防治，實現了用藥頻率大幅減少，並提升了種苗的健康品質。

七、參考文獻：

1. 鐘珮哲、吳竝毅、曹嘉惠。2020。偵測潛伏感染期草莓炭疽病病原菌技術之研發。苗栗區農業改良場研究彙報第9期: 46-57。
2. 鐘珮哲、洪文濱。2022。草莓炭疽病行動化田間即時檢測技術之開發與應用。苗栗區農業專訊100期:14-16。
3. Cerkauskas, R. F. 1987. Latent colonization by *Colletotrichum* spp. implications for mycoherbicides. *Phytopathology* 77:1703-1703.
4. Chung, P. C., Wu, H. Y., Wang, Y. W., Ariyawansa, H. A., Hu, H. P., Hung, T. H., Tzean, S. S., and Chung, C. L. 2020. Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Taiwan and description of a new species, *Colletotrichum miaoliense* sp. nov. *Sci. Rep.* 10:14664.
5. Chung, P. C., Wu, H. Y., Chen, Y. J., Hung, T. H., and Chung, C. L. 2022. Development of a nested PCR assay for detecting *Colletotrichum siamense* and *Colletotrichum fructicola* on symptomless strawberry plants. *PLoS ONE* 17:e0270687.
6. Debode, J., Van Hemelrijck, W., Baeyen, S., Creemers, P., Heungens, K., and





- Maes, M. 2009. Quantitative detection and monitoring of *Colletotrichum acutatum* in strawberry leaves using real-time PCR. *Plant Pathol.* 58:504-514.
7. Freeman, S., Horowitz, S., and Sharon, A. 2001. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. *Phytopathology* 91:986-992.
8. Ishikawa, S. 2004. Simple diagnosis using ethanol immersion of strawberry plants with latent infection by *Colletotrichum acutatum*, *Dendrophoma obscurans*, and *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *Journal of General Plant Pathology* 70: 249-255.
9. Mertely, J. C., D. E. Legard. 2004. Detection, isolation, and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. from strawberry petioles. *Plant Disease* 88: 407-412.
10. Perez-Hernandez, O., Nam, M. H., Gleason, M. L., and Kim, H. G. 2008. Development of a nested polymerase chain reaction assay for detection of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Plant Dis.* 92:1655-1661.
11. Rahman, M., Islam, T., Schwegel, R., and Louws, F. 2019. Simultaneous detection of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from quiescently infected strawberry foliage by real-time PCR based on high resolution melt curve analysis. *Am. J. Plant Sci.* 10:382-401.
12. Wu, H.Y., Tsai, C.Y., Wu, Y.M., Ariyawansa, H.A., Chung, C.L., Chung, P.C. 2021. First report of *Neopestalotiopsis rosae* causing leaf blight and crown rot on strawberry in Taiwan. *Plant Dis.* 105:487.
13. Zhang, X., Harrington, T. C., Batzer, J. C., Kubota, R., Peres, N. A., and Gleason, M. L. 2016. Detection of *Colletotrichum acutatum* sensu lato on strawberry by loop-mediated isothermal amplification. *Plant Dis.* 100:1804-1812.





圖一、進行植物病害快篩行動箱檢測的植株

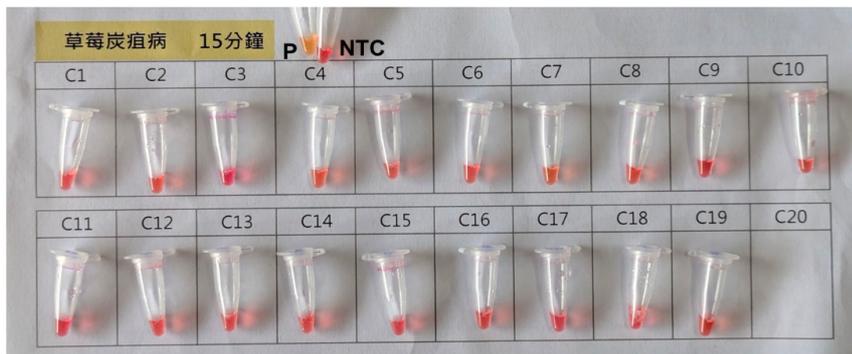




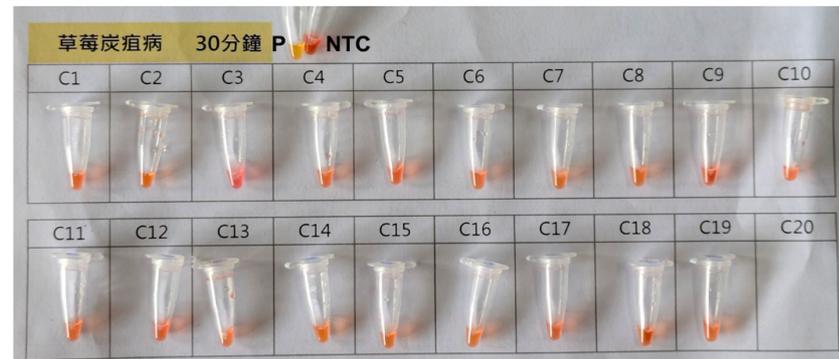
檢測0分鐘



檢測15分鐘

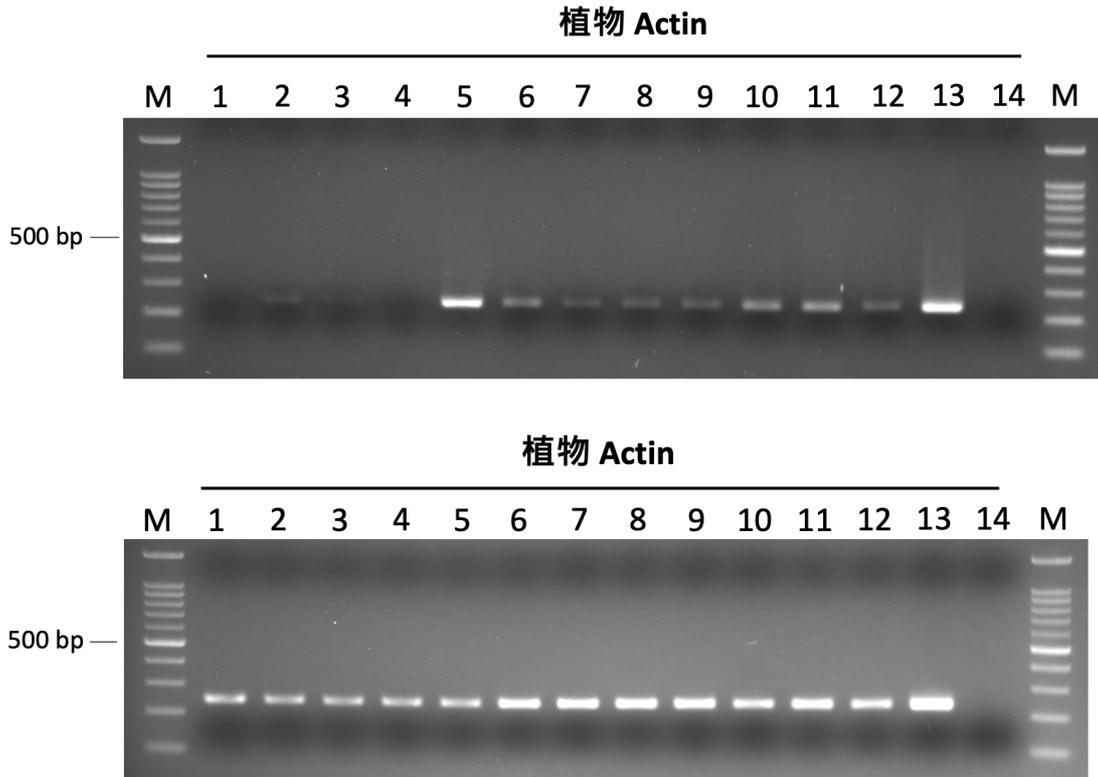


檢測30分鐘

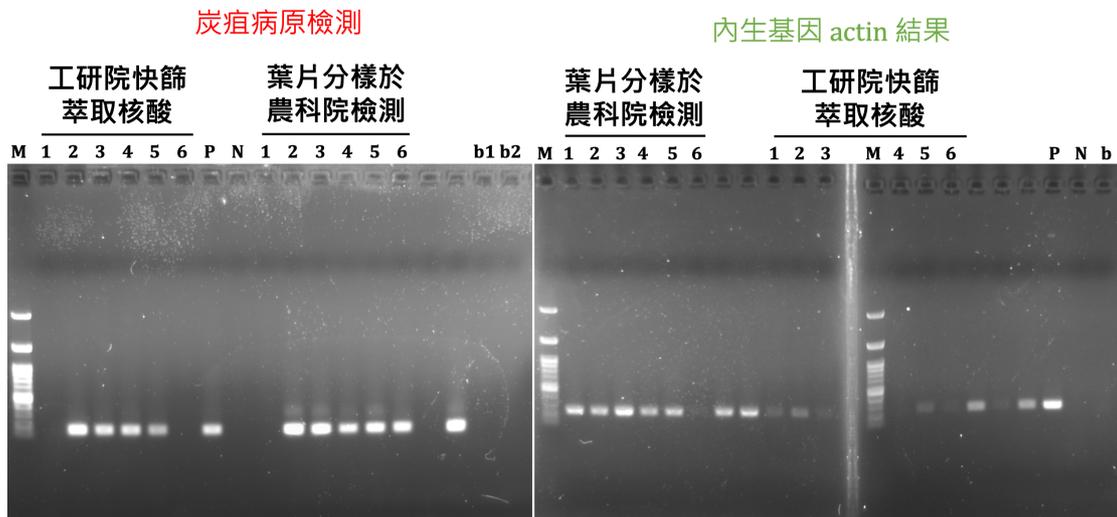


圖二、以植物病害快篩行動箱進行 LAMP 法之呈色結果





圖三、葉片經 silic beads(上)及濾膜(下)2 種不同萃取核酸方法後，以 PCR 偵測植物內生基因 actin



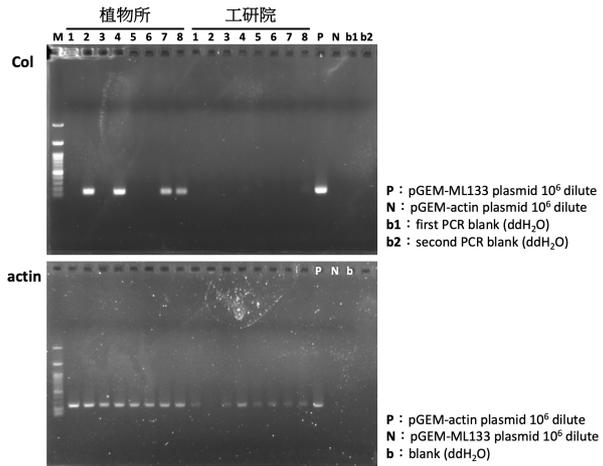
圖四、兩種完整方法敏感度比對試驗炭疽病檢測結果





編號	sample name	炭疽C 66°C		炭疽C 67°C	
		-/+	Ct	-/+	Ct
	Positive control	+	9.51	+	10.04
	NTC	-	11.26	-	-
1	c1	+	11.17	+	12.50
2	c2	+	11.34	+	12.05
3	c3	+	9.98	+	10.76
4	c4	+	10.67	+	11.02
5	c5	+	9.78	+	10.33
6	c6	+	10.05	+	11.39
7	c7	+	10.33	+	10.17
8	c8	+	8.82	+	10.97

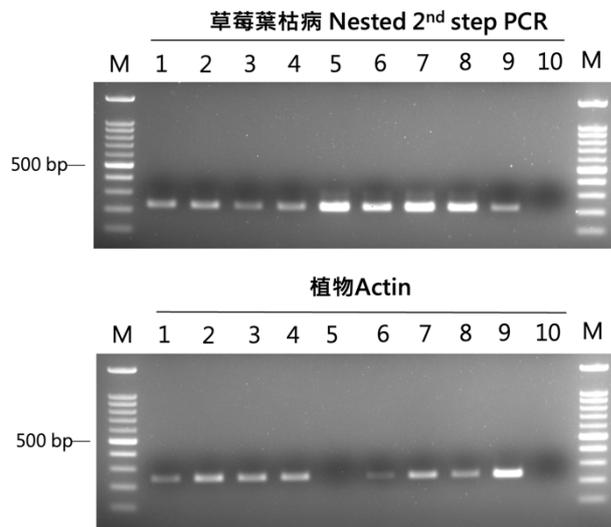
註：-未檢出，+有檢出



圖五、炭疽病快篩試劑呈色穩定度確認與改善，需請工研院確認螢光試劑是否有非專一性表現（左為螢光試劑結果）

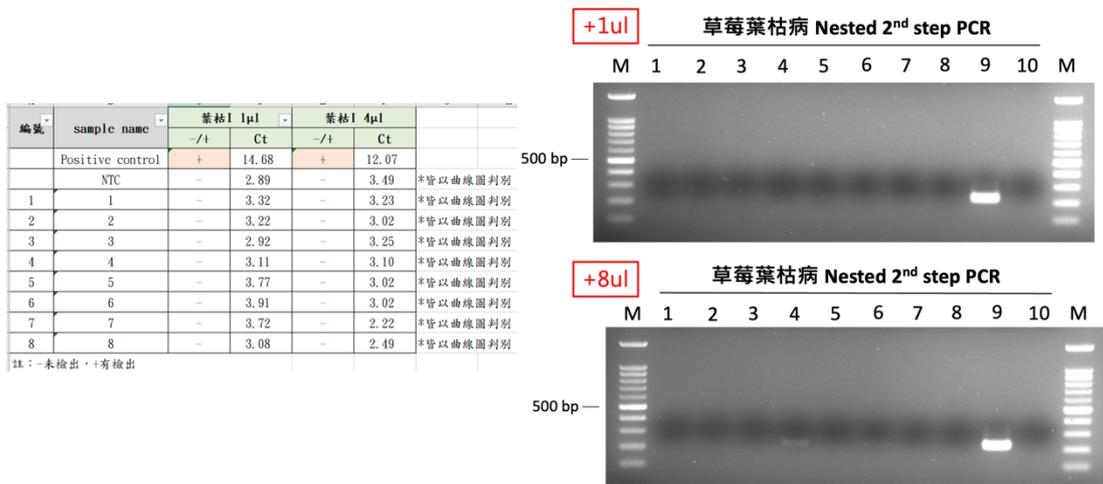
編號	sample name	葉枯C	
		-/+	Ct
	Positive control	+	11.41
	NTC	-	3.05
1	w1-2ul	+	22.90
2	w1-3ul	+	22.92
3	w1-4ul	+	24.45
4	w2-2ul	+	24.47
5	w2-3ul	+	26.37
6	w2-4ul	+	28.13
7	w3-2ul	+	27.07
8	w3-3ul	-	37.75
9	w3-4ul	-	39.52
10	w4-2ul	+	26.54
11	w4-3ul	+	26.84
12	w4-4ul	+	29.04

註：-未檢出，+有檢出



圖六、葉枯病建立 LAMP 檢測實驗室比對，經調整 LAMP 反應的核酸濃度後 8 個接種樣本皆呈現陽性反應（左）；苗栗場以 nested PCR 8 個樣本皆可呈現專一性條帶（右）





圖七、工研院快萃之 8 個接種葉片核酸經 LAMP 反應無陽性反應 (左)，苗栗場以工研院快萃核酸進行 actin PCR 結果不佳，電泳結果條帶亮度不佳，且葉枯病之 nested PCR(+8 ul)僅有 2 個樣本有符合接種結果，然其電泳條帶亮度差 (右)



圖八、溫室試驗場域於 11 月 6 日完成定植 (約 2 千株)，截至 11 月 22 日補植 10 株，補植率約為 0.5%

