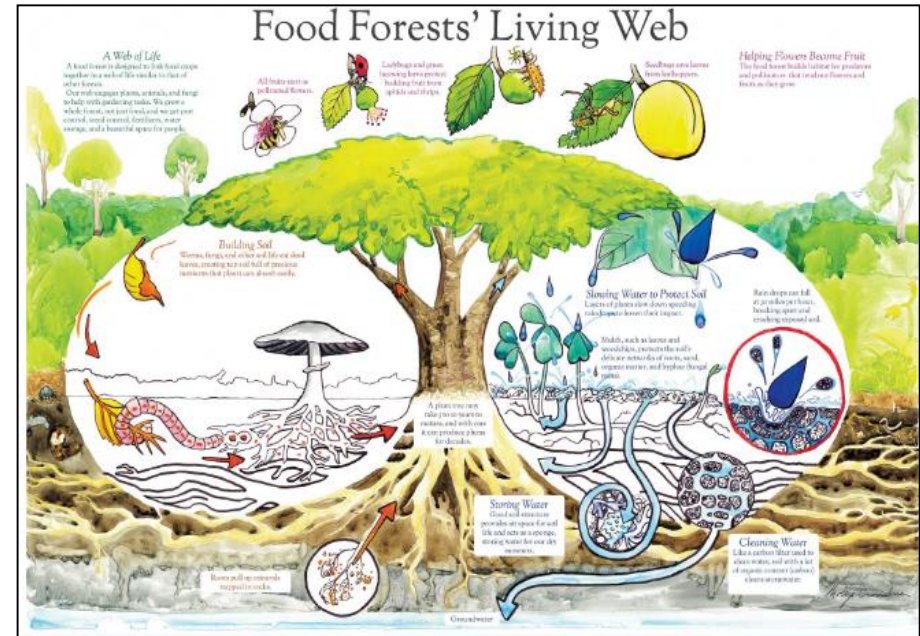
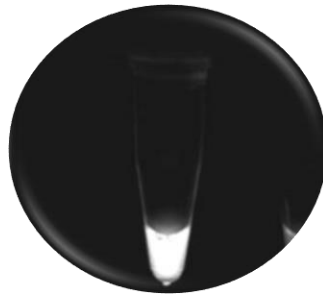
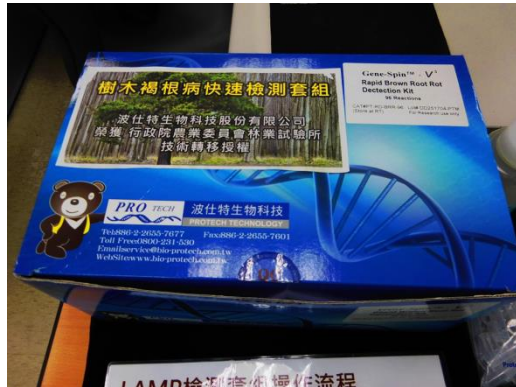


# 樹木褐根病菌之檢測

## Tree BRRD identification



主講人： 吳孟玲 博士  
林業試驗所 副所長  
2018/09/22



受害木材切面具有明顯黃褐色網紋帶

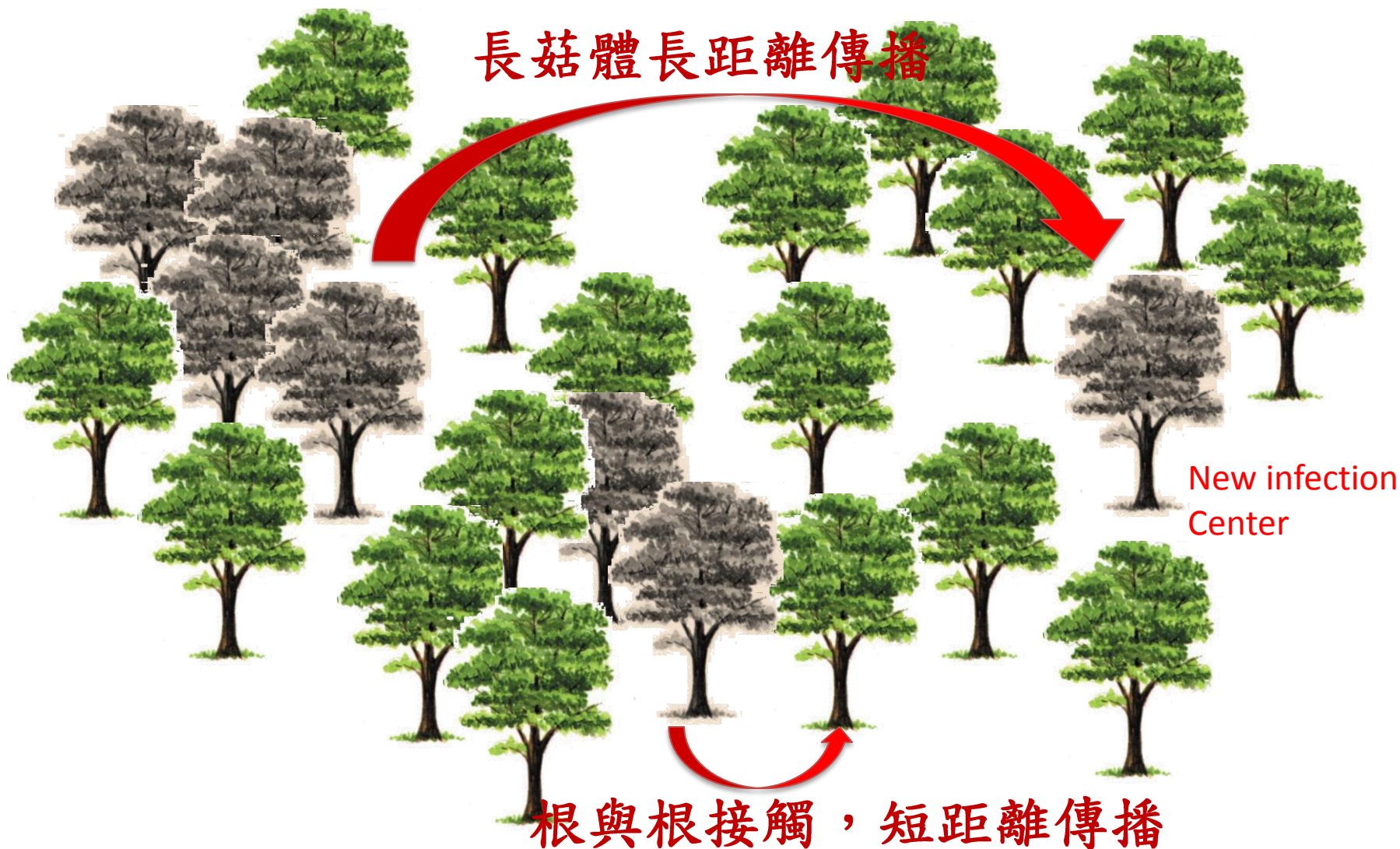


↑ 褐根病子實體，較少見

← 被為害的根部及莖基部之茶褐色或黑褐色的大片菌絲面包圍

# Transmission 傳播方式

長菇體長距離傳播



# 去除根部連結（掘溝阻斷）

- Root Graft Disruption



# 編號817受保護老樹 施用藥劑前後比較



**1050426**

**1050604**





**1050426**



**1050604**





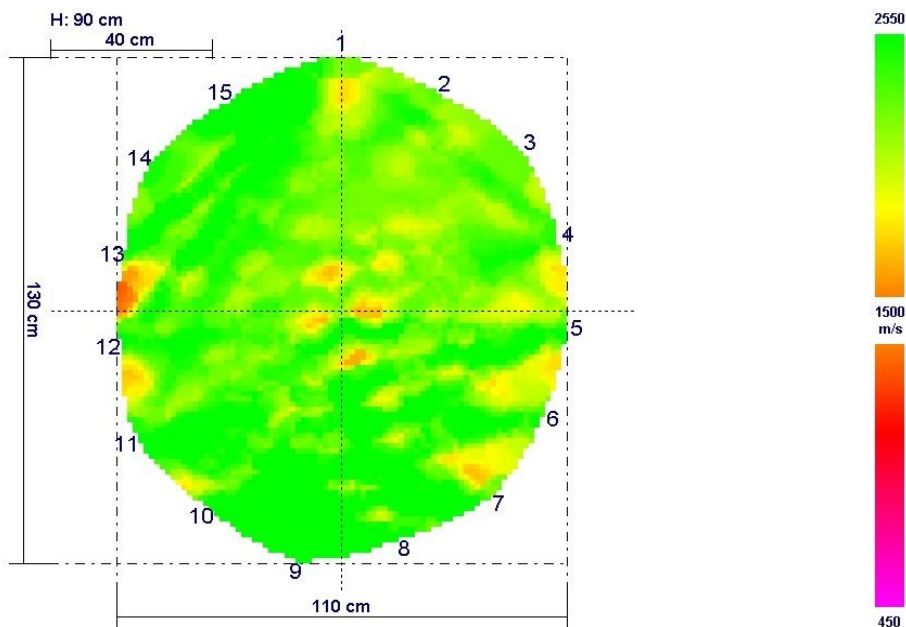
**1050426**



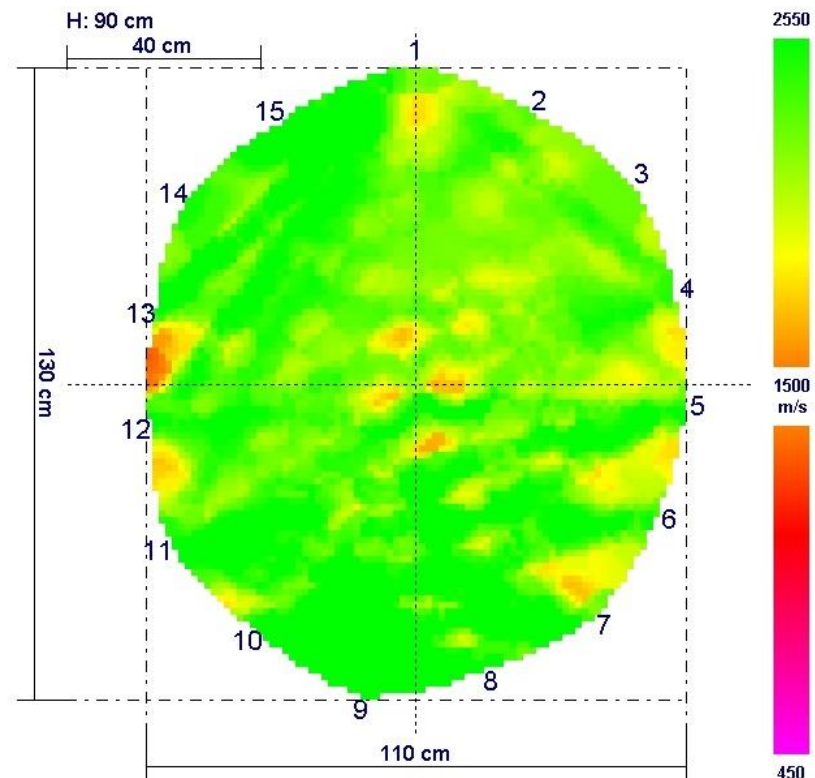
**1050604**



# 應力波檢測結果



# 應力波檢測對照

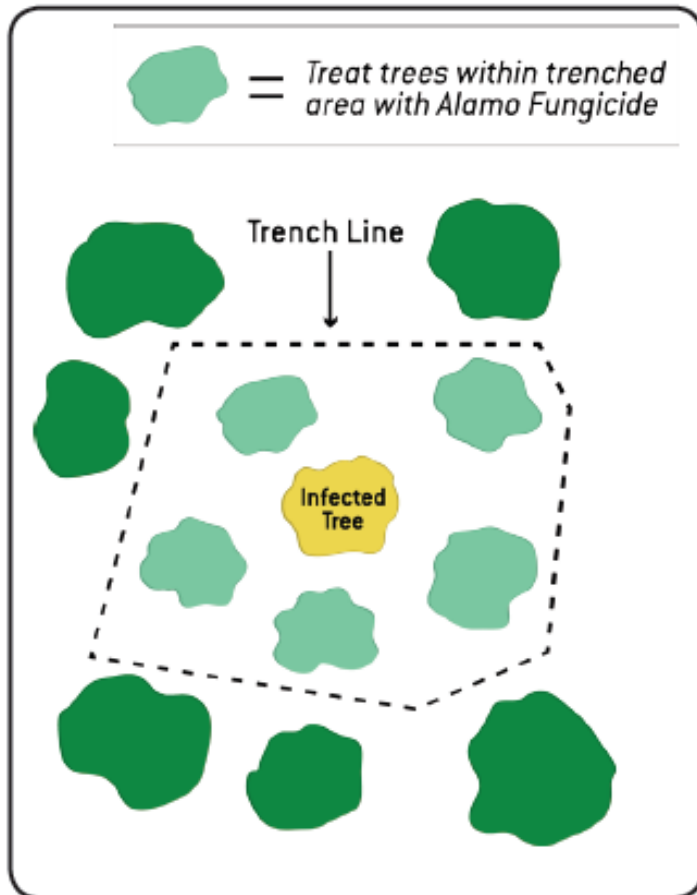


# 受保護老樹移除情形



# Treatment Protocol

- 掘溝線離最近的病樹至少100英尺(約30.5公尺) 4英尺(約121.9公分)深



## Trenching

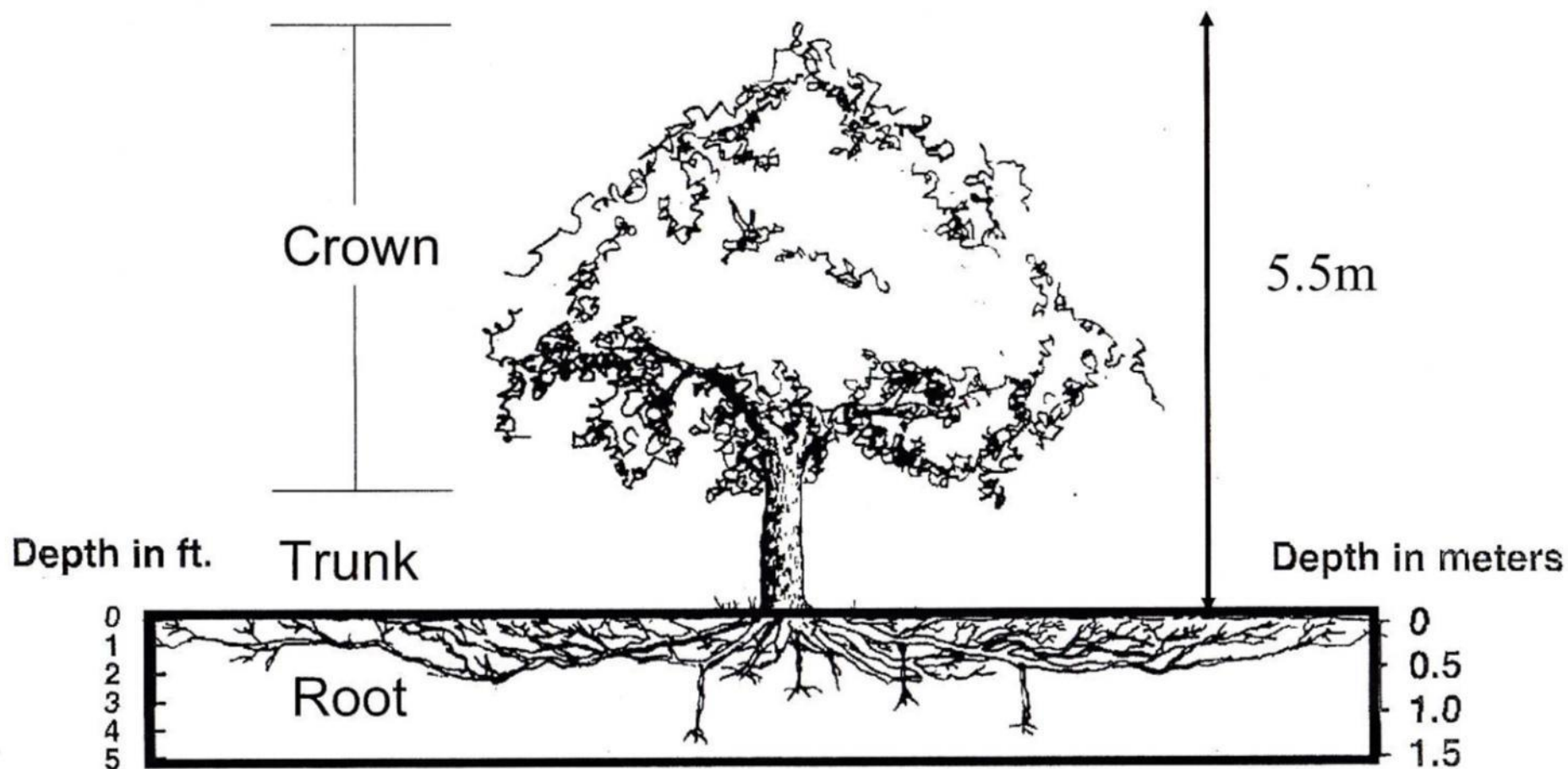
A diagram illustrating the trenching protocol. A central orange circle is labeled "Diseased". A dashed circular line, labeled "100'", surrounds the diseased tree. Inside the dashed circle, several dark green circles represent healthy trees. A legend at the top left shows an orange circle followed by "Diseased" and a dark green circle followed by "Healthy".

An illustration showing a series of trees with a dashed line labeled "Barriers" and "100' minimum" indicating the distance from the diseased tree to the trench line.

Trenches must be placed a **minimum of 100 feet** ahead of the disease, excavated to **at least 4 feet** (sometimes deeper), and sever **all root connections** to be effective.

TEXAS A&M  
FOREST SERVICE

# 樹冠層與根系的生長範圍



1. 樹根可長至樹冠滴水線之外, 到樹冠的半徑的兩到三倍。
2. 90% 以上的吸收根長在 0.5 米以下的土層。
3. 固定根和吸收根
4. 根冠比

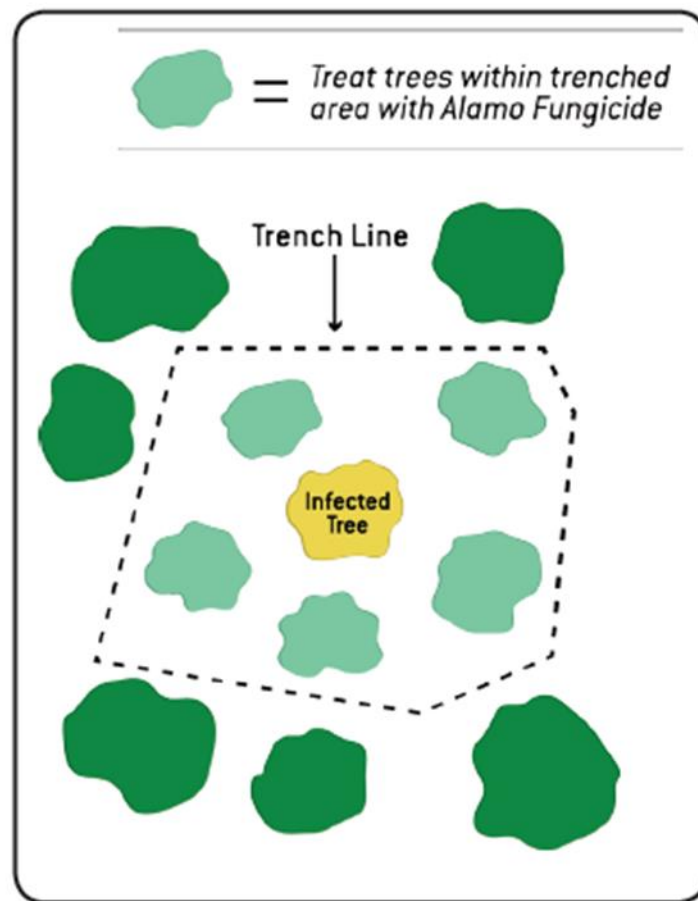
# 鑑定方法

## ■ 傳統鑑定

- 現地檢驗有無明顯**病徵/病兆**出現(**感染後期**)
- 分離培養病原菌再加以鑑定(鑑定時程長，菌量少，不易分離檢驗)

## ■ 快速檢測技術

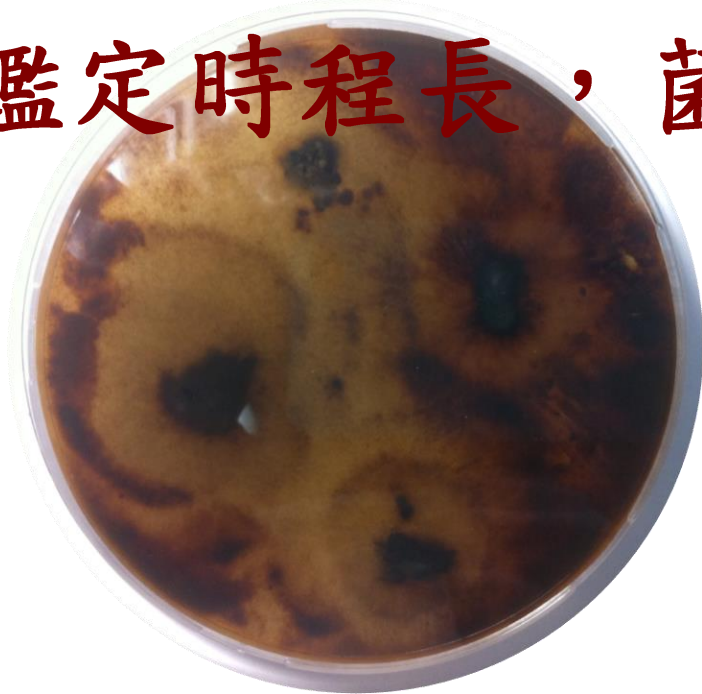
- 專一性佳
- 靈敏度高
- 鑑定快速
- 可早期鑑定



# Pathogen culture

病原菌分離培養(7-14天)

鑑定時程長，菌量少，不易分離



反面



正面



受感染組織進行分離培養情形

# 一、LAMP introduction 簡介

- DNA檢測
- 本研究團隊開發的樹木褐根病快速且靈敏的PCR與LAMP(Loop-mediated Isothermal Amplification)診斷技術，應用於林木褐根病診斷及疫情監控，並由專業人員從事褐根病快速診斷工作

- 由於在恆溫下反應，不需要昂貴的溫度控制熱循環機進行反應
- **LAMP檢測技術比傳統PCR分子診斷技術**
  - 反應時間更短，專一性及靈敏度更佳
- 不需繁瑣的檢測程序、昂貴的電泳及照膠設備，**適合園區自行檢測使用**

# LAMP technique 分子檢測技術

- 恆溫環式核酸增幅法(Loop-mediated Isothermal Amplification)
- 只需要水浴槽或加熱器等恆溫器即可進行反應，相當簡單實用
- 專一性及靈敏度高、反應時間短(40~60分鐘)
- 檢測反應所產生的白色沉澱產物用肉眼或濁度計即可觀察，相當簡便

# LAMP kit 技術移轉~商品化套組



# Price/per sample~

## 每一樣本須300-500元檢測費用



# LAMP detection SOP檢測流程

## 樣本採集

- ①先觀察樣樹狀況與四周環境



- ②根基部選4個點  
用鏟子採黃褐色菌絲面及  
周邊部位、黃褐色網紋的  
木材或疑似受害的部位

大小約2cm  
厚度約0.2cm  
數量約3至4塊



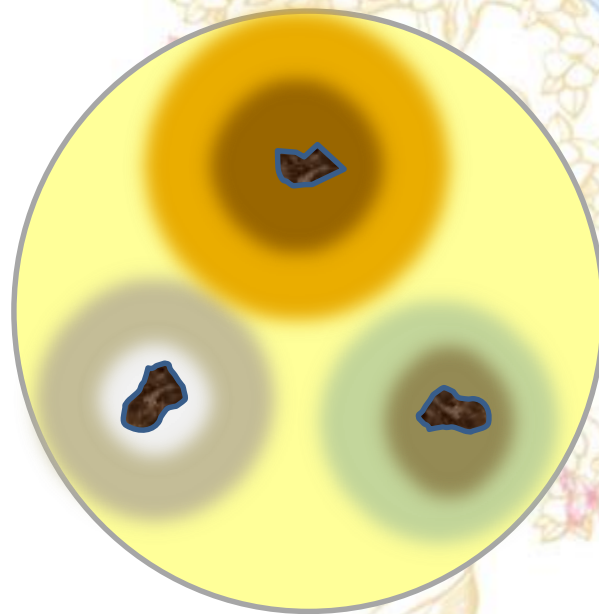
- ③樣本放入夾鏈袋中，於  
袋子標上該樣樹編號後  
封口  
回實驗室冰於4°C冰庫，  
接菌時再將樣本拿出

## 樣本病原菌分離與培養

- 採樣本約 $1\text{cm}^3$ 大小，樹皮內部朝MA+4培養基，  
放置3-4塊樣本在同一培養基上  
— 樣本之間要有空間讓病原生長，接菌時蓋子盡量  
不全開，以減少外部污染



- 將接菌完的培養皿從無菌操作台取出，在室溫下培養，培養褐根病病菌一般至少需要花4到5天的時間，長出菌絲後可採菌進行LAMP分子檢驗



## 培養基配置

| 成分名稱               | 加入量           | 備註      |
|--------------------|---------------|---------|
| Maltose-extract    | 10g           | 粉末      |
| Agar               | 10g           | 粉末      |
| Benlate            | 16ml          | 需配置成液體  |
| Dicloran           | 2ml           | 需配置成液體  |
| Ampicillin         | 0.04g         | 粉末，不可高溫 |
| Gallic acid        | 0.2g          | 粉末      |
| ddH <sub>2</sub> O | 總量加至<br>500ml |         |

# LAMP檢測套組操作流程

RM (2x Reaction Mix)

12.5  $\mu\text{L}$

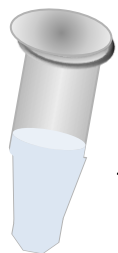
DW (Distilled Water)

9.5  $\mu\text{L}$

Primer 1.5  $\mu\text{L}$

Bst polymerase

1  $\mu\text{L}$



核酸 0.5  $\mu\text{L}$

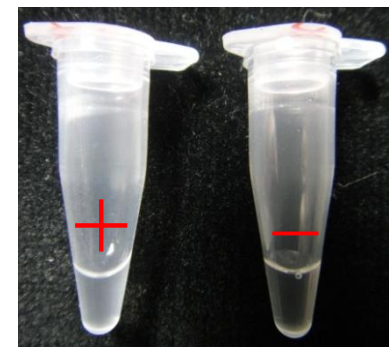


PCR tube

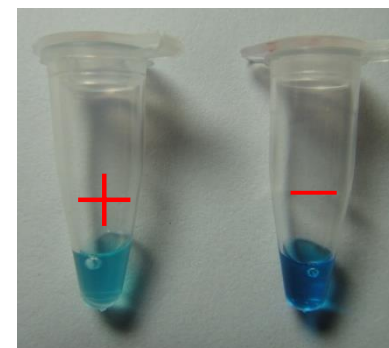


65°C 反應60分鐘

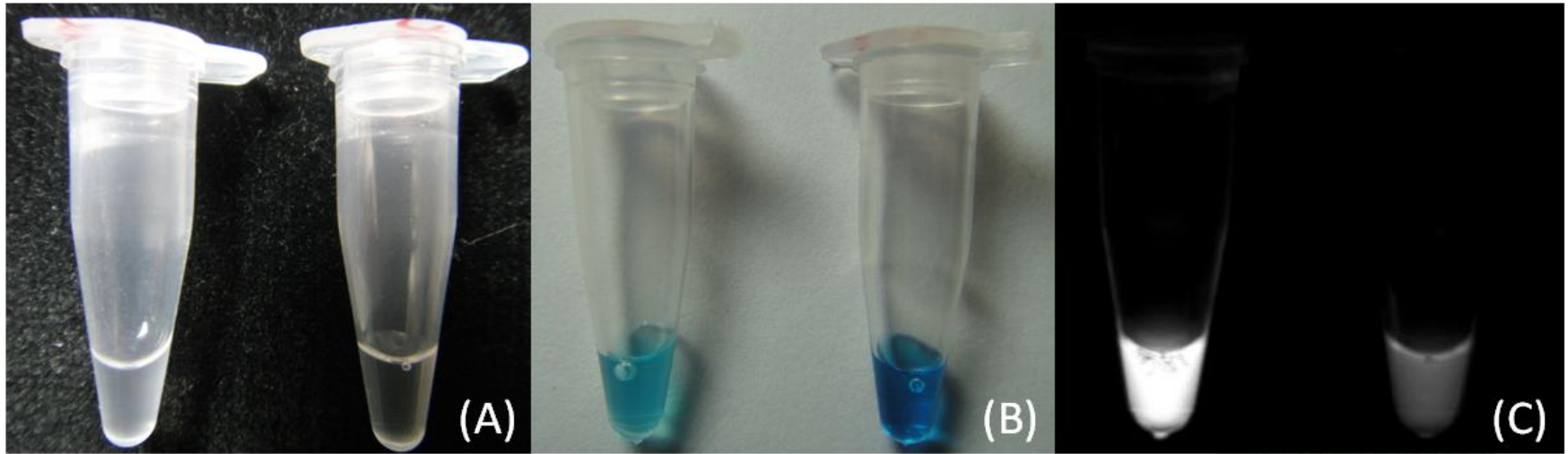
結果判讀-有白色混濁產物為陽性



結果判讀-可加入亞甲藍染劑幫助判讀



# LAMP results 結果判讀



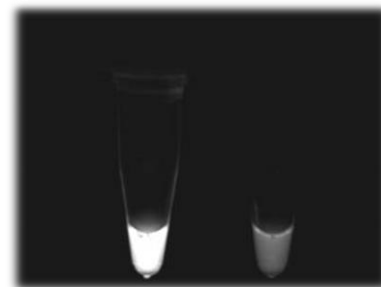
## ■ 肉眼判讀

(A) LAMP增幅反應後陽性樣本會產生的白色沉澱用肉眼或濁度計即可觀察，左側管為陽性右側為陰性

(B) 亦可加入亞甲基藍染劑

(C) 或是加入核酸染劑如EtBr於UV光激發下幫助觀察

# LAMP protocol 褐根病 檢測技術



採樣樣本

檢測套組

恆溫增幅

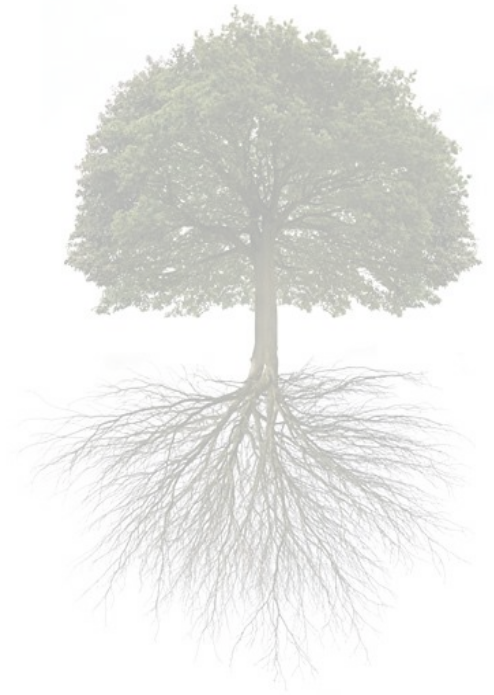
結果判讀

# LAMP reagents 檢測套組成份與體積 (已商品化)

| 成分名稱                 | 加入體積         |
|----------------------|--------------|
| 2xRM (2倍濃度混和溶液)      | 12.5 $\mu$ L |
| DW (無菌蒸餾水)           | 9.5 $\mu$ L  |
| Primer (引子組)         | 1.5 $\mu$ L  |
| Bst polymerase(反應酵素) | 1 $\mu$ L    |
| DNA(樣本核酸)            | 0.5 $\mu$ L  |
| 總體積                  | 25 $\mu$ L   |

# LAMP design 實驗設計

- 先以通用性引子對ITS1-F/ ITS-4 針對褐根病菌核酸進行PCR增幅並定序
- 針對*P. noxius* 之保守性序列設計專一性引子對
- 以Eiken原廠引子設計網站設計LAMP 3組引子對  
<http://primerexplorer.jp/index.html>



# LAMP reaction mix 反應溶液成份

| Reagent              |               | Amount  |
|----------------------|---------------|---------|
| RM (Reaction Mix)    |               | 12.5 uL |
| Primer               | FIP           | 40 pmol |
|                      | BIP           | 40 pmol |
|                      | F3            | 5 pmol  |
|                      | B3            | 5 pmol  |
|                      | LF (optional) | 10 pmol |
|                      | LB (optional) | 10 pmol |
| Bst polymersase      |               | 1.0 uL  |
| Sample DNA           |               | 1.0 uL  |
| DW (Distilled Water) |               | x uL    |
| Total                |               | 25 uL   |

# 三組LAMP primers screening引子組設

## 第一組 (Phenox 1)

|       |                                                                            |
|-------|----------------------------------------------------------------------------|
| 1-F3  | 5'- TTTGAGGCCCAAAGGTCAA -3'                                                |
| 1-B3  | 5'- GTGTCATGTTAATCTCAATACAACA -3'                                          |
| 1-FIP | 5'- ACA TTC ACC GTT TAC ACT TGC TAA TGT TAA GTG TTT GTC TCA TTA CAA GA -3' |
| 1-BIP | 5'- TAC ACC AAT TAC TCG AGC AAA AGC TTA ATA TTG GAC TTG GGG ACT G -3'      |
| 1-LB  | 5'- CAA GAG AAG CCG ACT TAC GC-3'                                          |

## 第二組 (Phenox 2)

|       |                                                                |
|-------|----------------------------------------------------------------|
| 2-LF  | 5'- TGC GCT CAT CCA TCT CAC A -3'                              |
| 2-LB  | 5'- TGA TCC TTC CGC AGG TTC A -3'                              |
| 2-F3  | 5'- CTC TCC CTC TCC CTC TCT -3                                 |
| 2-B3  | 5' TCT TGG TCA TTT AGA GGA AGT -3'                             |
| 2-FIP | 5'- CTG GAC TTG CAT GTG CTC AGT CTC TTC AGT AAG TGC ACA GG -3' |
| 2-BIP | 5'- GAC CCA CCA GCA TCA AGC TTC GTA ACA AGG TTT CCG TAG G -3'  |

## 第三組 (Phenox 3)

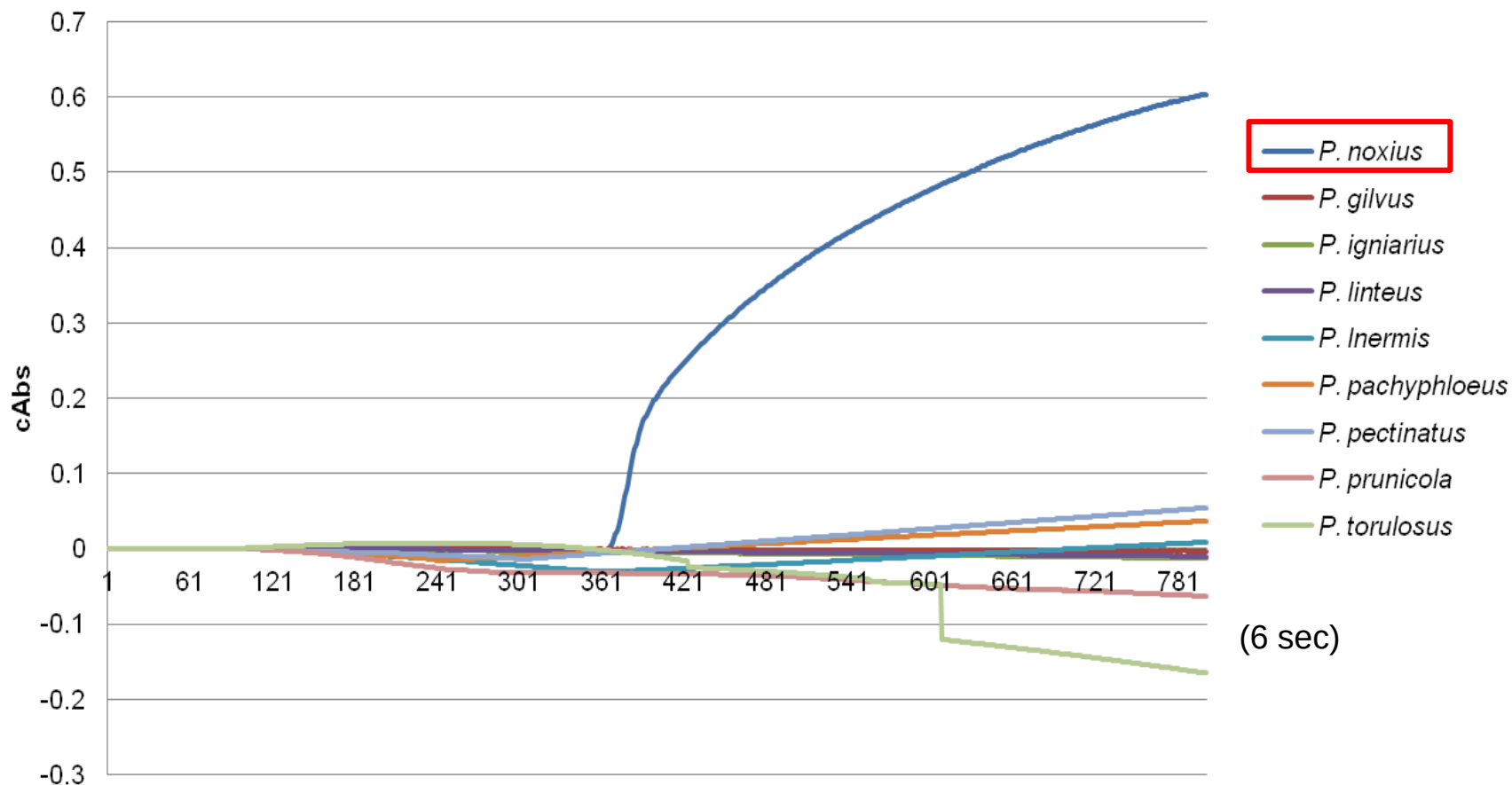
|       |                                                                       |
|-------|-----------------------------------------------------------------------|
| 3-FIP | 5'- TTG CAG AAT TCG GTG AAT CAT CGA CAT ACT CCT CGG AAT ACC AA -3     |
| 3-BIP | 5'- TTC ACA TTA CTT ATC GCA TTT CGC TCA ACT TTC AAC AAC GGA TCT C -3' |
| 3-F3  | 5'- TTA ACA TGA CAC TCA AAC AGG -3'                                   |
| 3-B3  | 5'- ATT AGC CTC ATT GTA GGT GA -3'                                    |

# ■LAMP reaction machine 即時濁度測定儀(LA-500)

-以較客觀的數據呈現實驗結果

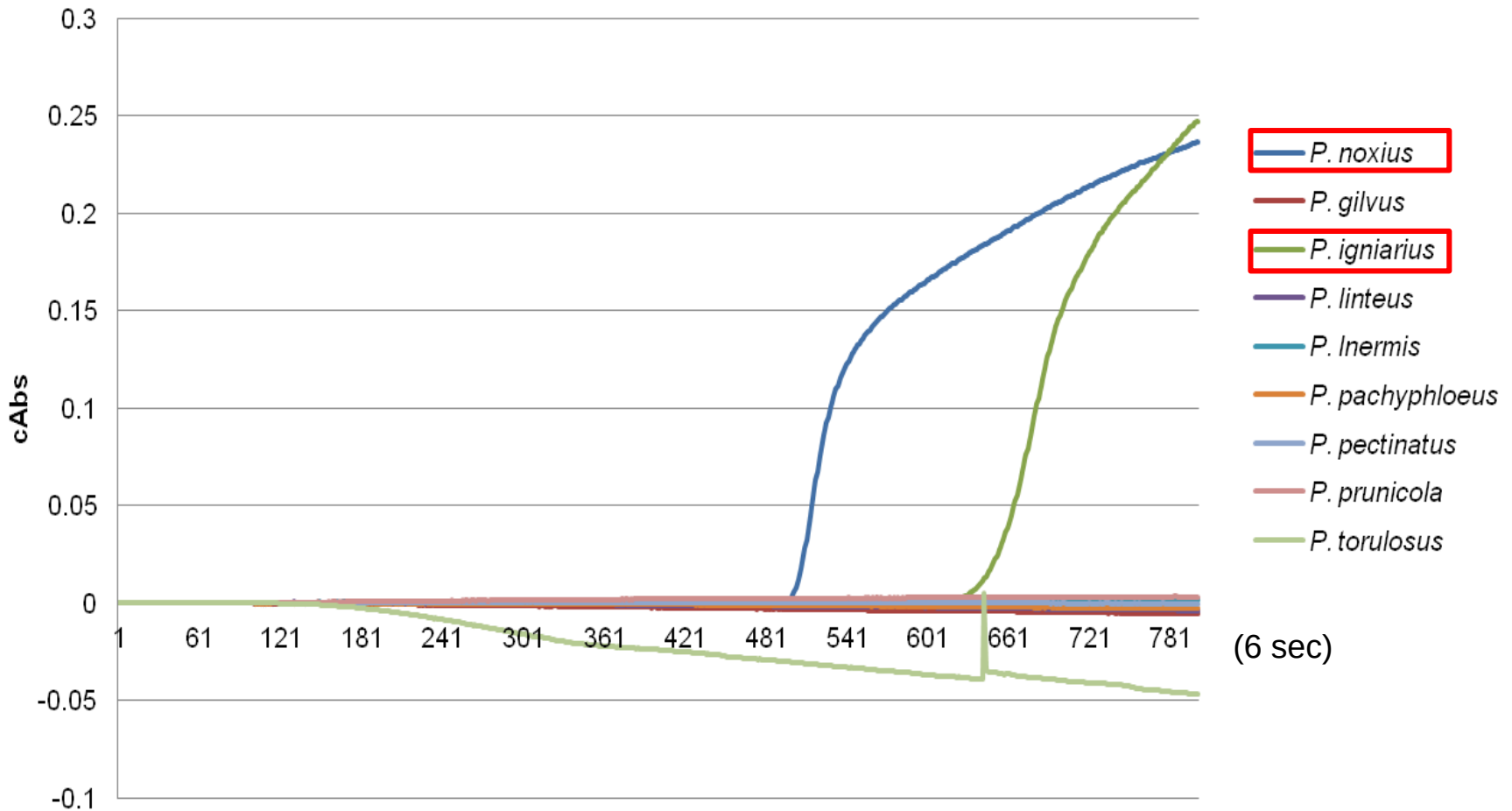


# LAMP specific test 專一性測試(第一組)



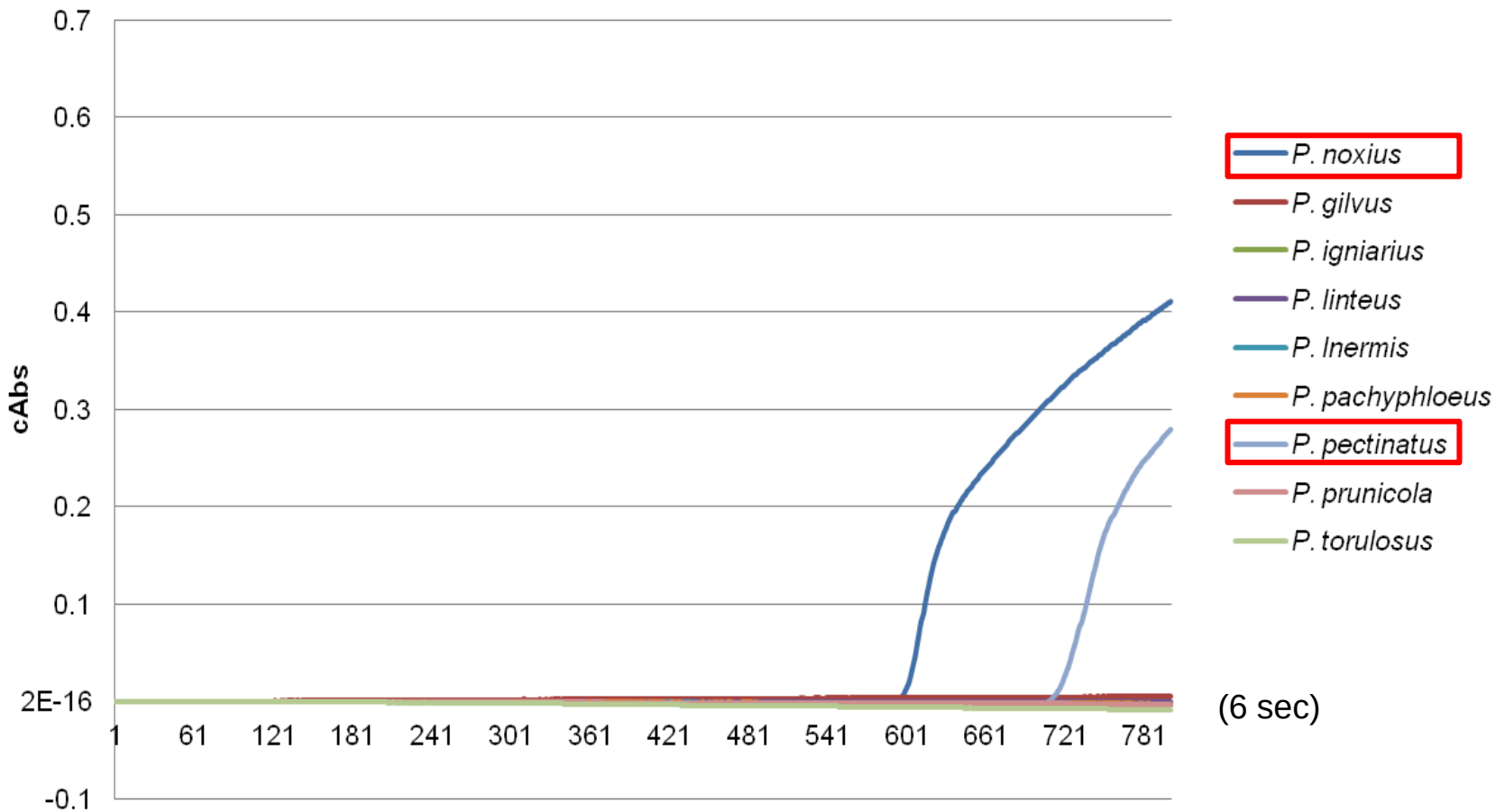
第一組引子對可針對褐根病菌核酸進行增幅反應，專一性佳

# LAMP specific test 專一性測試 (第二組)



第二組引子會對褐根病菌及*P. igniarius*核酸產生增幅反應

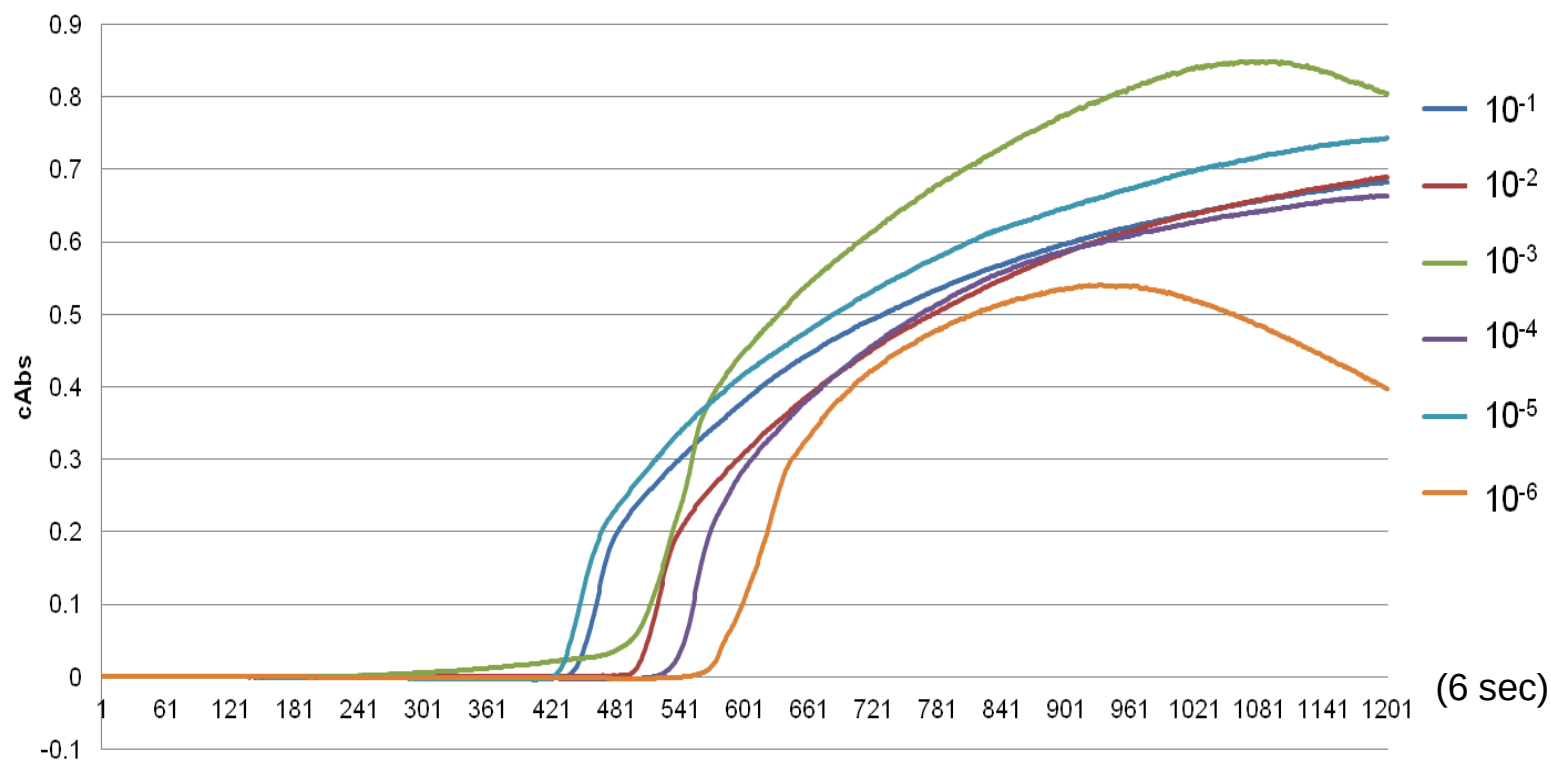
# LAMP specific test 專一性測試 (第三組)



(6 sec)

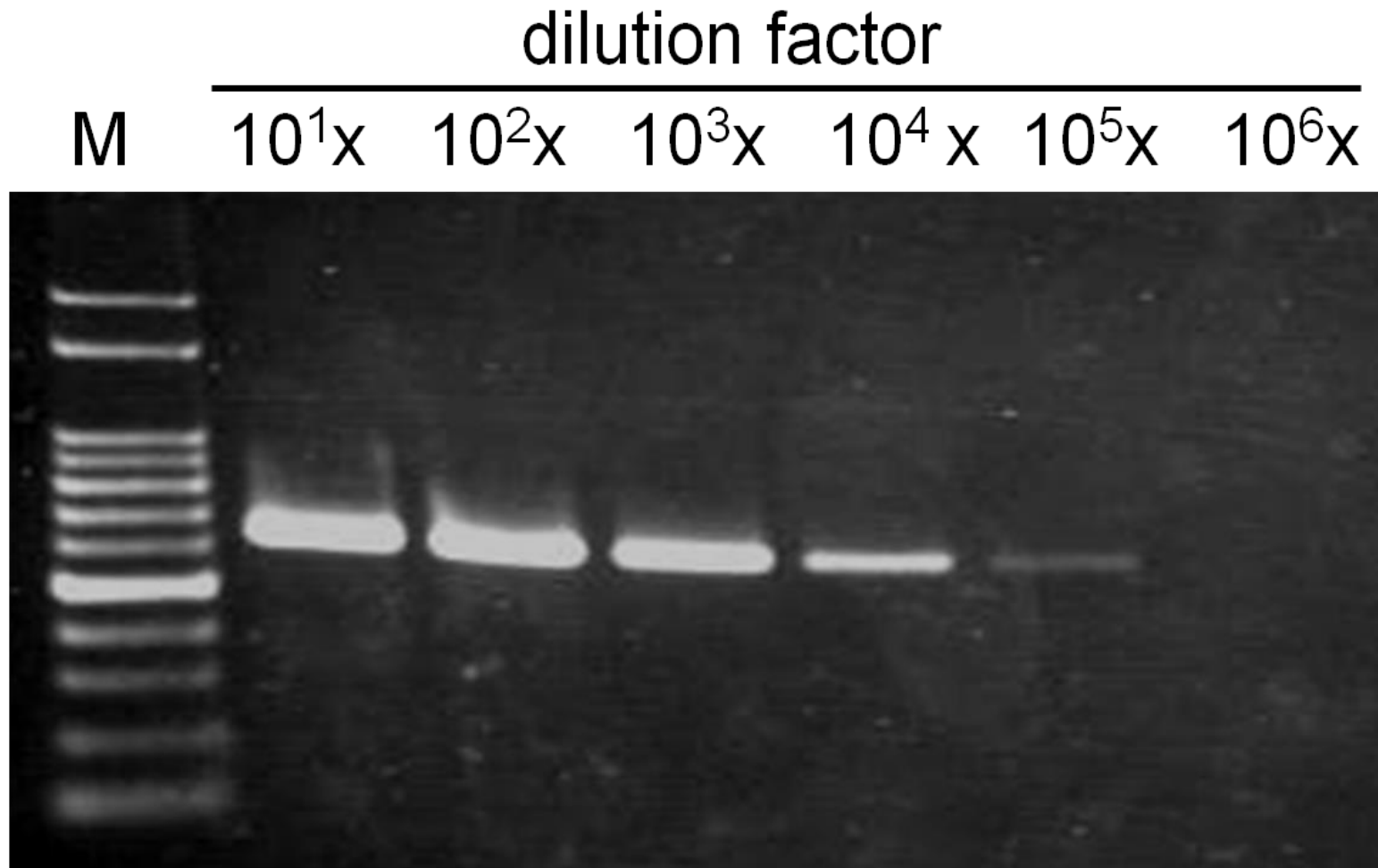
↑ 第三組引子會對褐根病菌及*P. pectinatus*核酸產生增幅反應

# LAMP sensitive test 靈敏度測試(第一組)



褐根病菌核酸稀釋 $10^6$ 倍後仍可被LAMP檢測技術偵測

# PCR sensitive test 靈敏度測試

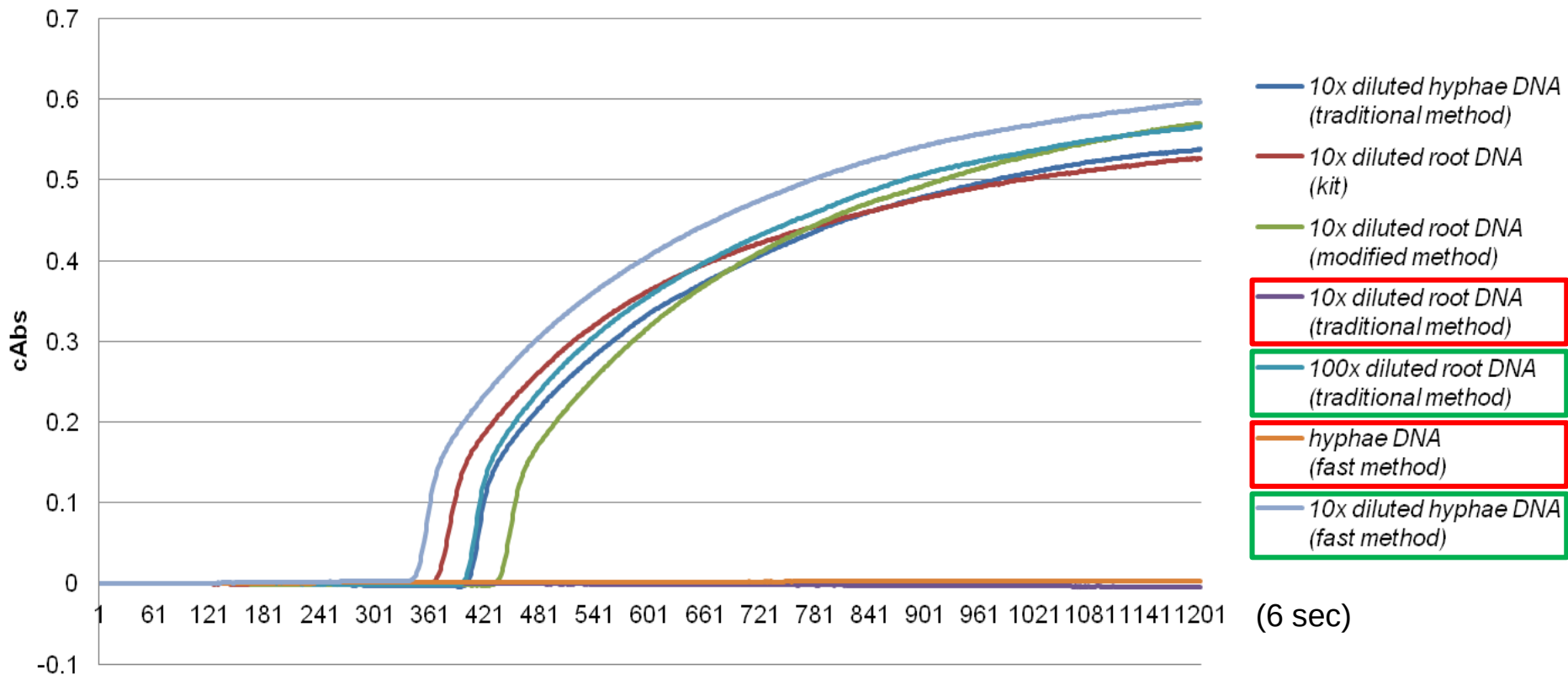


↑ PCR技術可偵測到稀釋 $10^5$ 倍之褐根病菌核酸

# LAMP test for DNA concentration

## 技術對不同核酸純度測試

DNA quality test

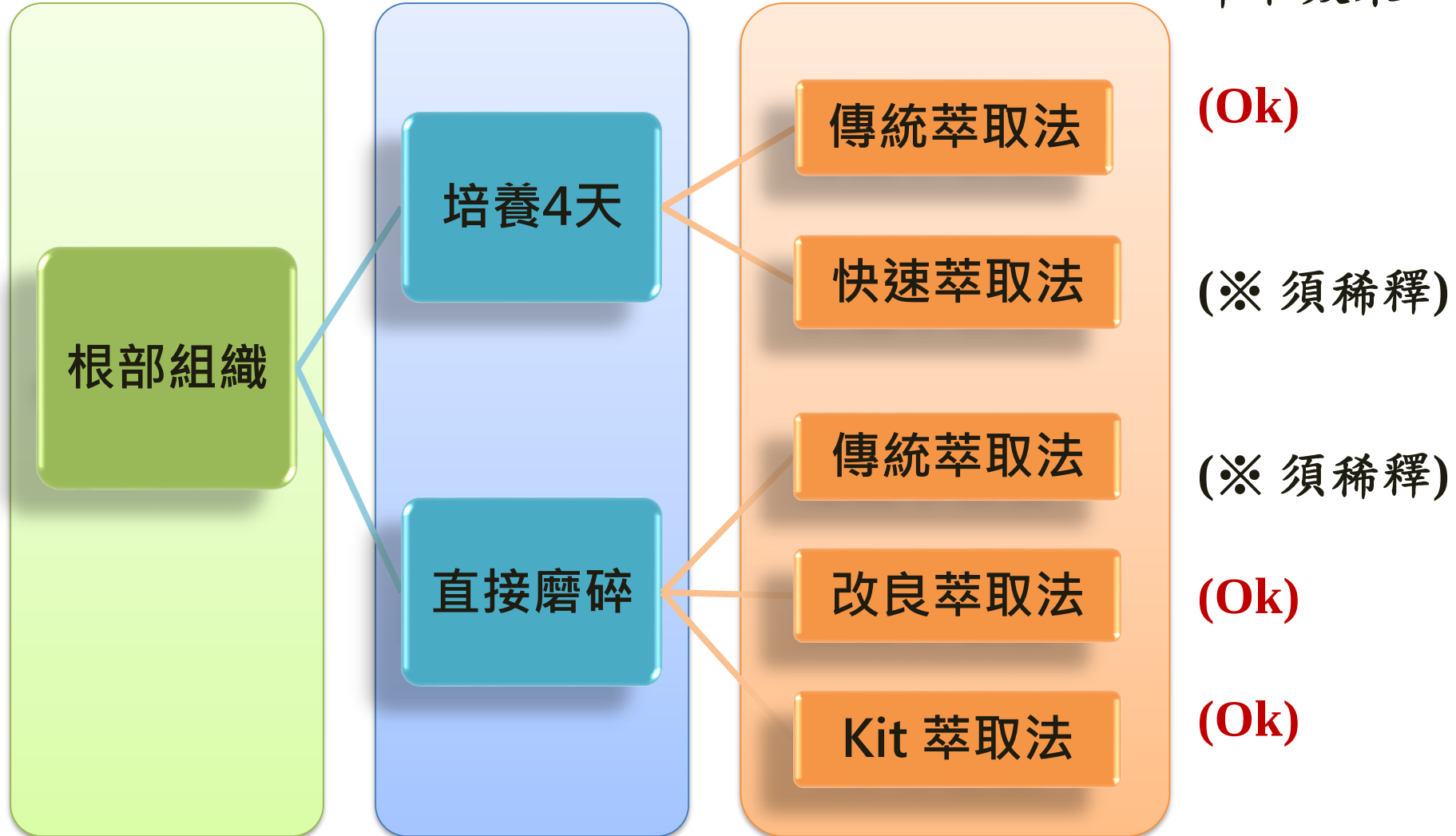


兩種含雜質較多之核酸無增幅反應(□)，須進一步稀釋降低雜質干擾以利LAMP反應偵測(□)

# LAMP for different purification

## 不同方法萃取待測核酸效果

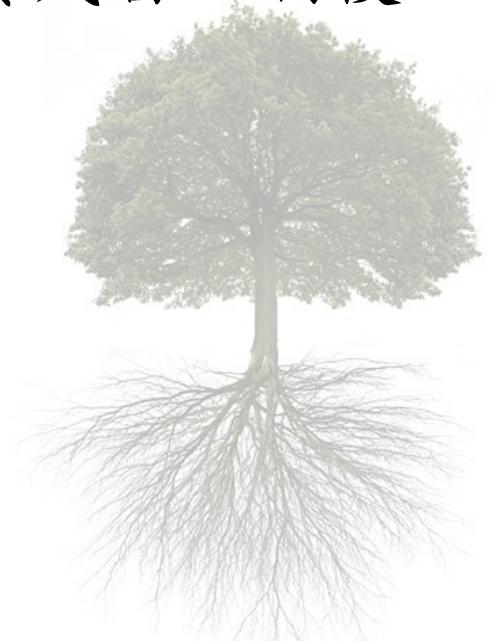
萃取效果



# Best sample purification

## 檢測建議

- 將待檢測樣本於培養基上分離培養4日以上，再萃取出生長出之菌絲核酸進行後續分子檢測鑑定，可確保組織上的病原菌具有生長活性
- 如必要直接萃取根部組織核酸時可使用改良萃取法/商品化套組進行萃取，可減少雜質殘留以利後續反應進行

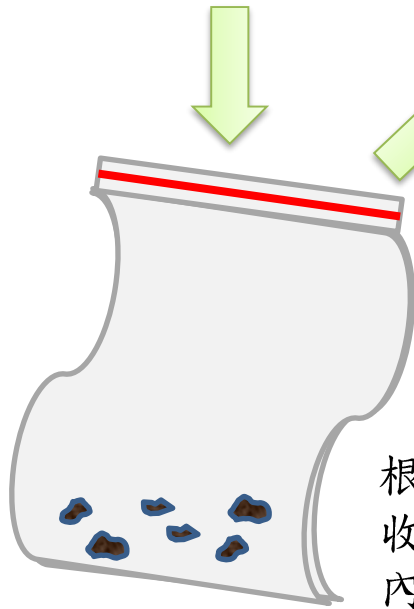


# Samples collection 樣本採集、培養及檢測

## 操作流程



於樹根部取3~4個位置  
採取根組織樣本

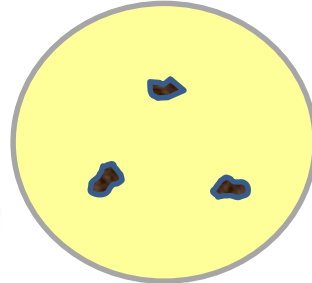


根組織樣本  
收集於夾鏈  
內帶回

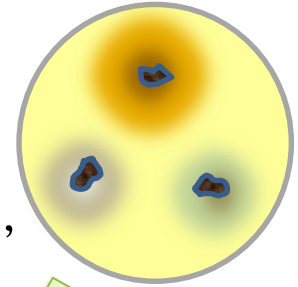
進行表  
面消毒



將樣本置於  
MA+4培養基上



培養4天以上，  
待菌絲生長



利用微量吸管  
刮取菌絲

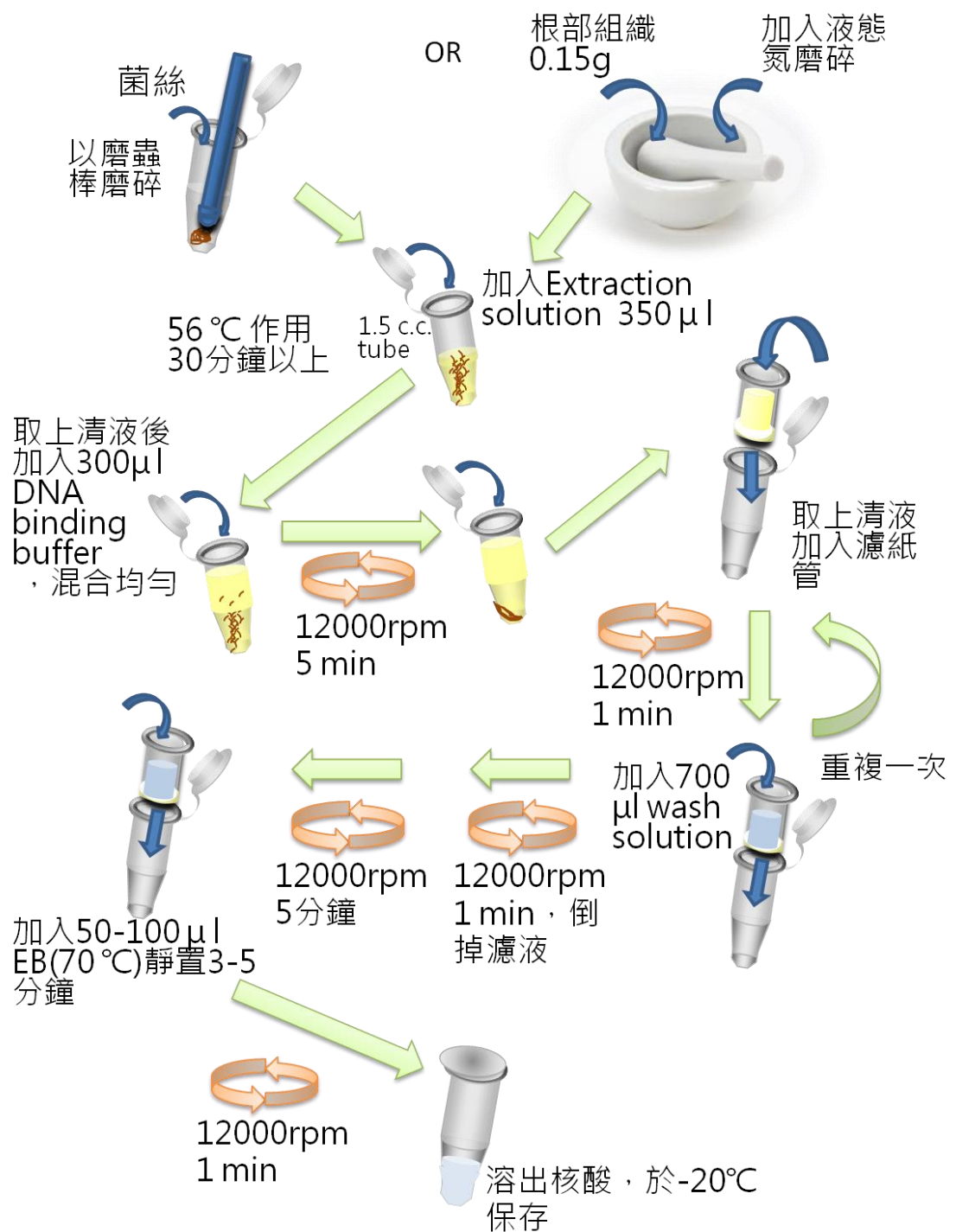


菌絲  
核酸  
萃取



褐根病專一性  
LAMP檢測

# 核酸萃取套組操作流程



# LAMP application

## 開發之LAMP技術特性

- 本研究開發的第一組LAMP引子對**具有高度專一性**
- 具有**高度靈敏度**，較PCR技術高出10倍以上
- **反應時間短**(約60分鐘)
- 檢測反應所產生的白色沉澱用**肉眼或濁度計**即可觀察，相當簡便
- 成本降低後是**具有應用潛力**的分子鑑定診斷技術



## 二、建立PCR分子檢測標準技術

- 開發對台灣褐根病具有專一性之分子診斷試劑。
- 提供非植病之林業專業人員從事褐根病快速診斷工作。
- 本研究主要是針對已建立PCR診斷技術，進一步對於不同檢測樣本來源，建立分子檢測標準技術。

# Pathogen DNA extraction

## 褐根病原核酸抽取

- 培養基分離之菌絲核酸抽取，依據（Hung et al.,1999）之核酸抽取方法修改後進行。
- 商業化核酸抽取套件萃取土壤之核酸：樹木根部土壤核酸利用兩種Mo-bio soil kit (Ultraclean & Powersoil)進行測試，檢測土壤重量為0.25g。

# Primers

## 褐根病菌專一性引子對之設計

- 依吳孟玲（2008）所設計之褐根病專一性引子對進行檢測分析，引子對序列如下：

primer G1-F：5'- GCCCTTTCCTCCGCTTATTG-3'

primer G1-R：5'- CTTGATGCTGGTGGGTCTCT -3'

所增幅之核酸片段為653bp，並針對上述引子對所包含之區間設計一反向引子以進行2nd PCR，序列如下：

primer G1-R2：5'- ATTGGACTTGGGGGACTGC -3'，

所增幅之核酸片段為228bp。

# Root & Soil samples

## 對褐根病之病根組織及土壤樣本， 建立分子檢測標準技術

以不同之核酸抽取方法，

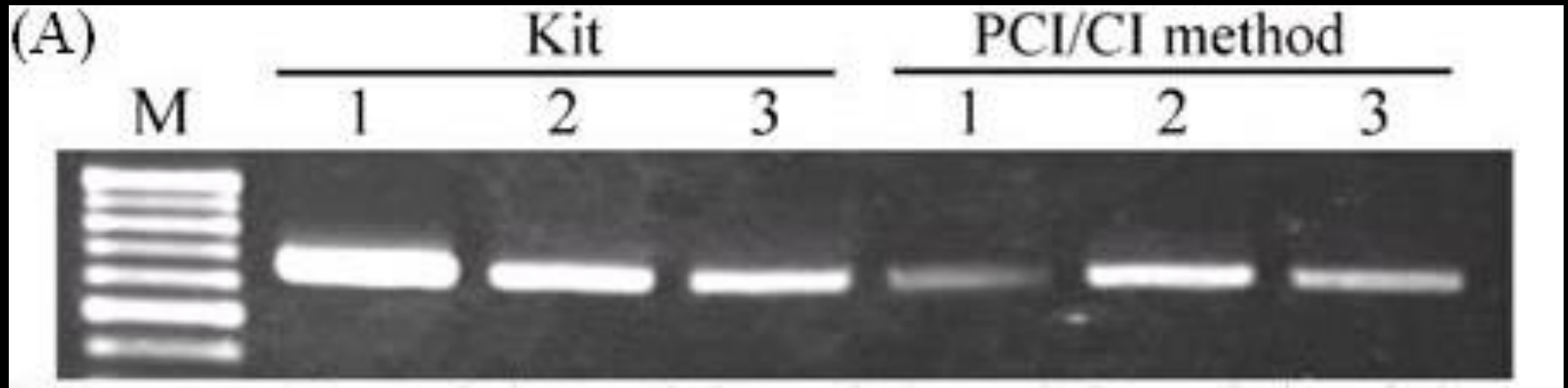
比較分析結果及建立標準技術：

- (1) 商品化核酸抽取套組抽取病原核酸。
- (2) 以傳統之有機萃取法萃取病原核酸。
- (3) 先以培養基分離病原再進行核酸抽取。

進行PCR分子技術檢測，

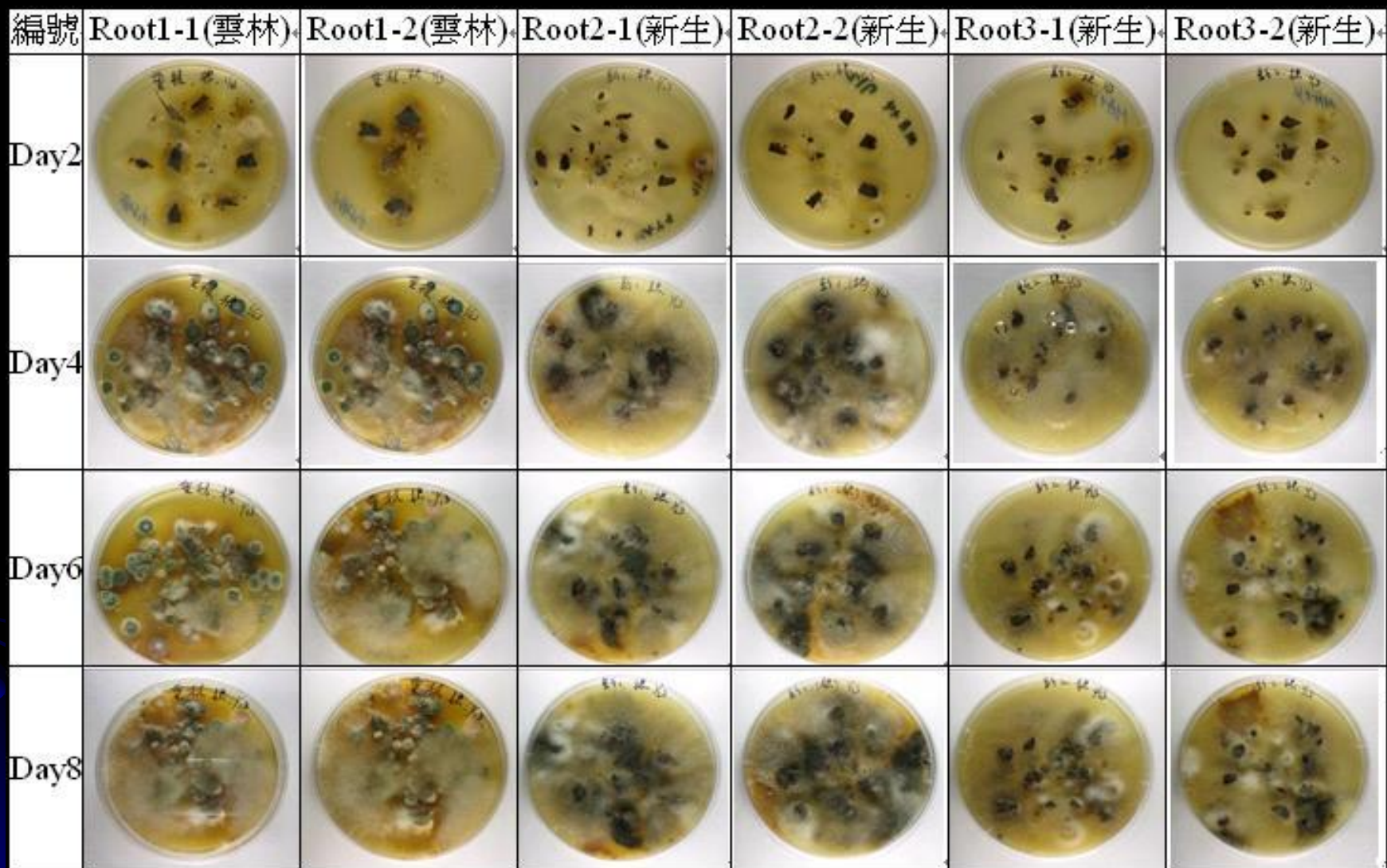
試圖尋得一套較佳的褐根病菌檢測法。

# Plant DNA extraction kit / Lab traditional extraction method

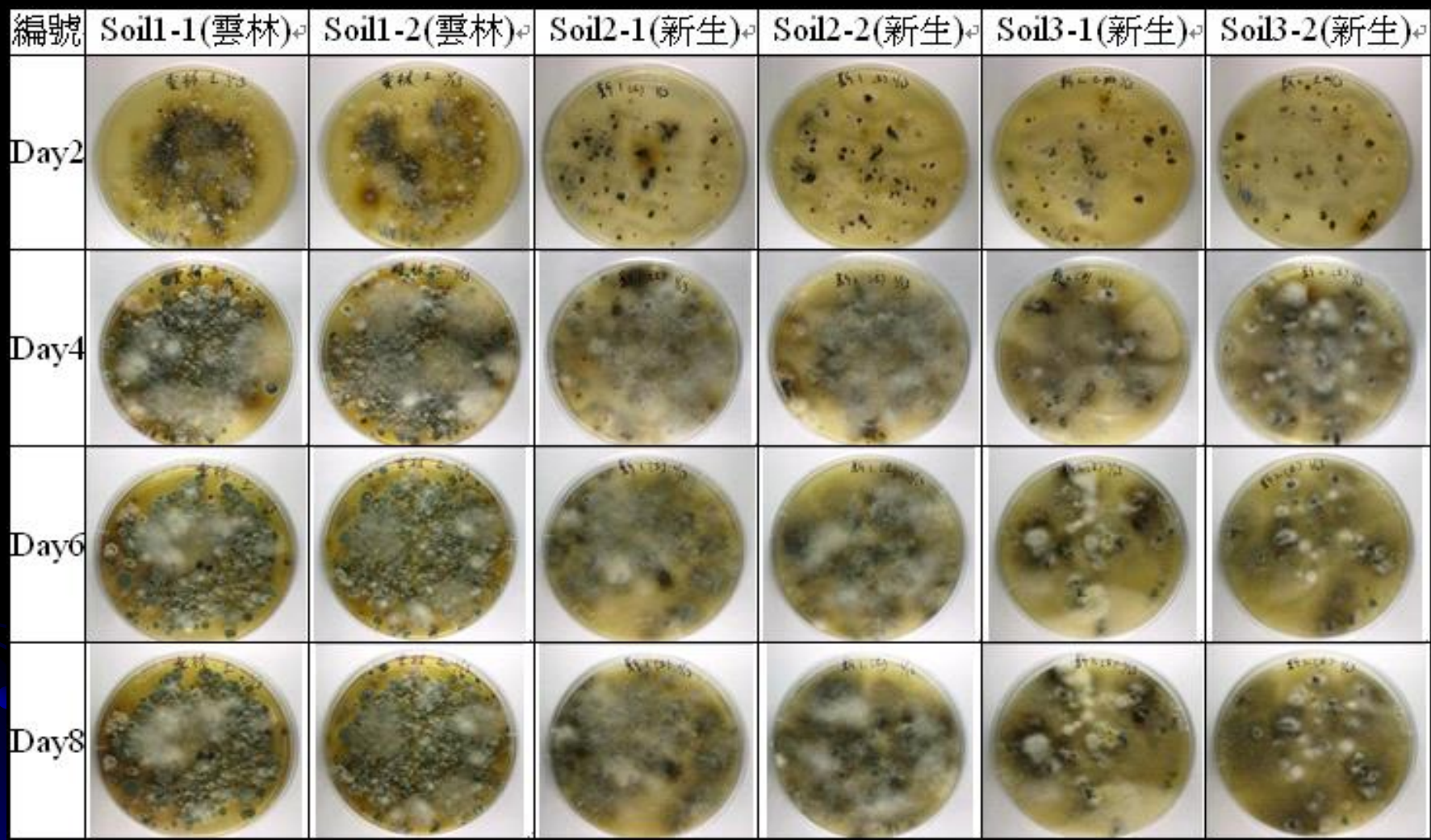


圖二a、

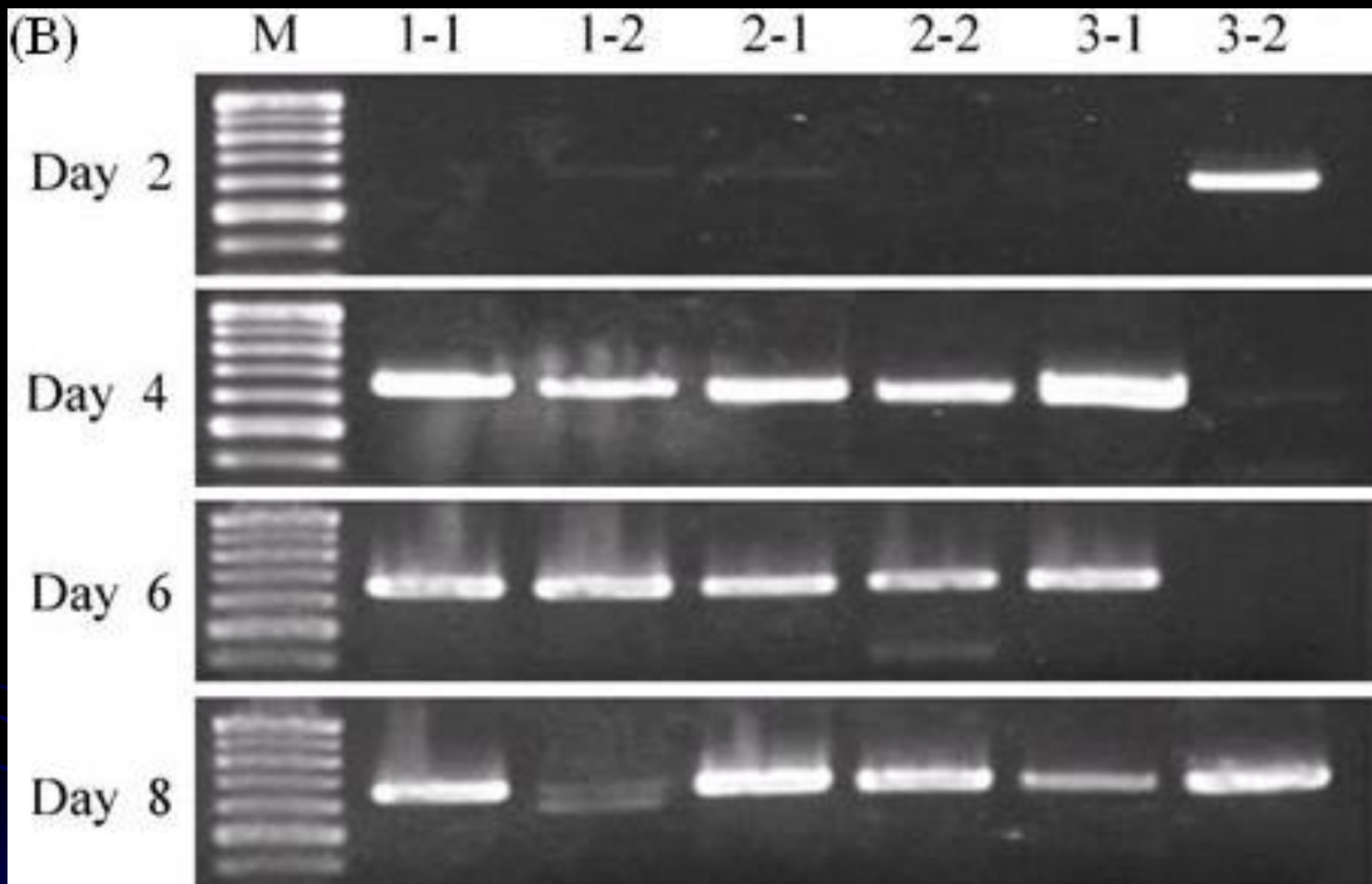
使用商業化植物組織核酸抽取套件及傳統  
CI/PCI抽取法抽取褐根病病根組織核酸進  
行PCR反應。



圖一a、以培養基分離褐根病病根 (Root samples) 2、4、6及8天，菌絲生長情形紀錄。



圖一b、以培養基分離褐根病土(Soil samples) 2、4、6及8天，菌絲生長情形紀錄。

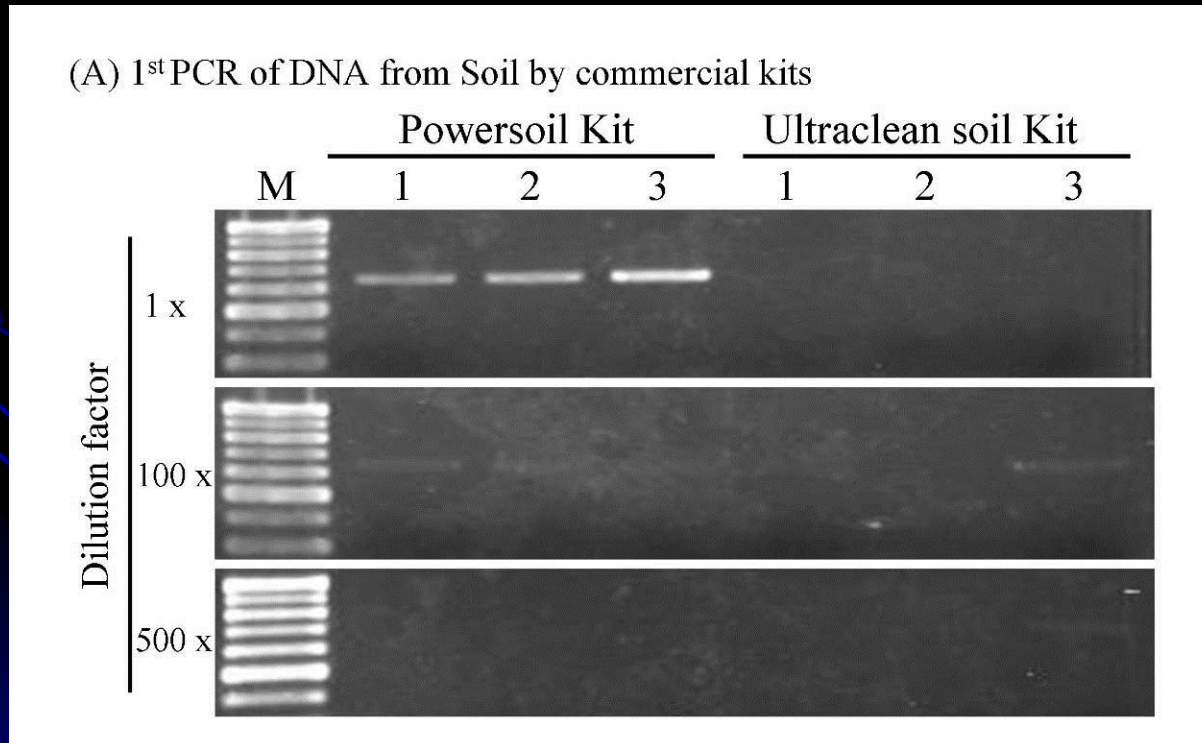


圖二b、

以選擇性培養基分離褐根病病根組織之菌絲核酸進行PCR反應，每個培養實驗皆做二重複。引子對為G1F/G1R，增幅片段大小為653bp。

# 病土(soil)核酸利用kit直接抽取之1<sup>st</sup> PCR結果

- 使用兩種商業化土壤核酸抽取套件（Mo bio Ultraclean kit & Powersoil kit）並利用G1F/G1R引子對進行PCR反應。效果以Powersoil kit較佳。



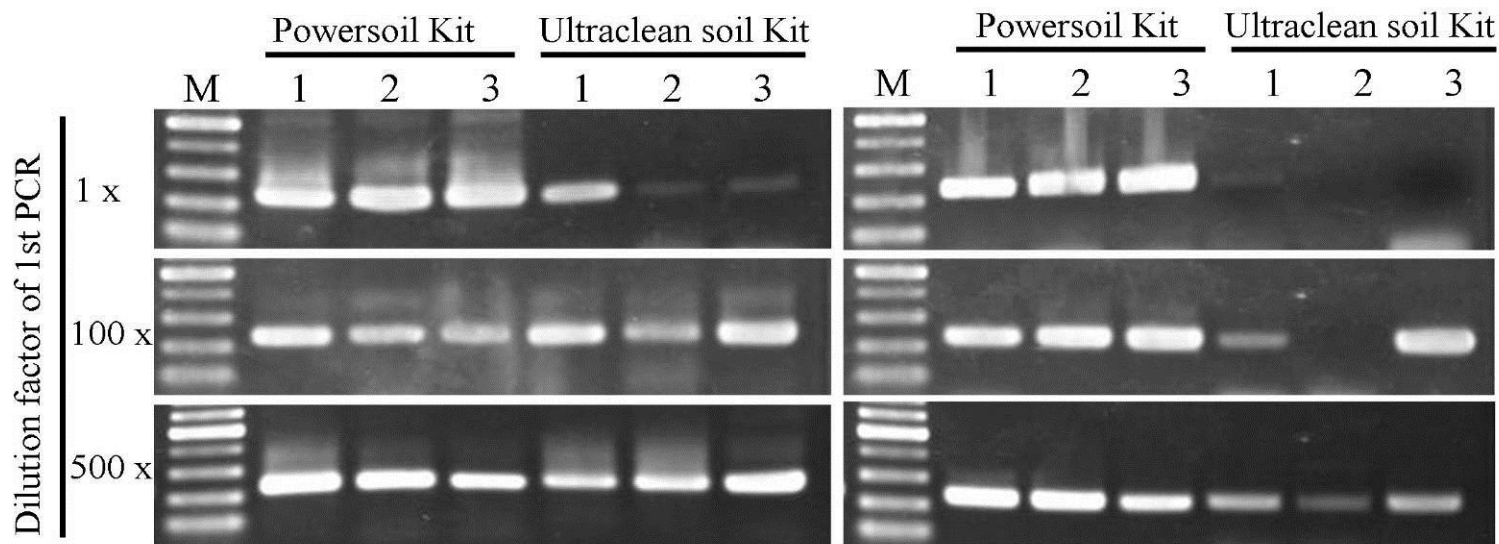
# 病土(soil)核酸利用kit直接抽取之2<sup>nd</sup> PCR結果

大都能明顯增幅出目標DNA片段228bp

## (B) 2<sup>nd</sup> PCR

a. 取第一次PCR 產物 1  $\mu$ l 進行2<sup>nd</sup> PCR

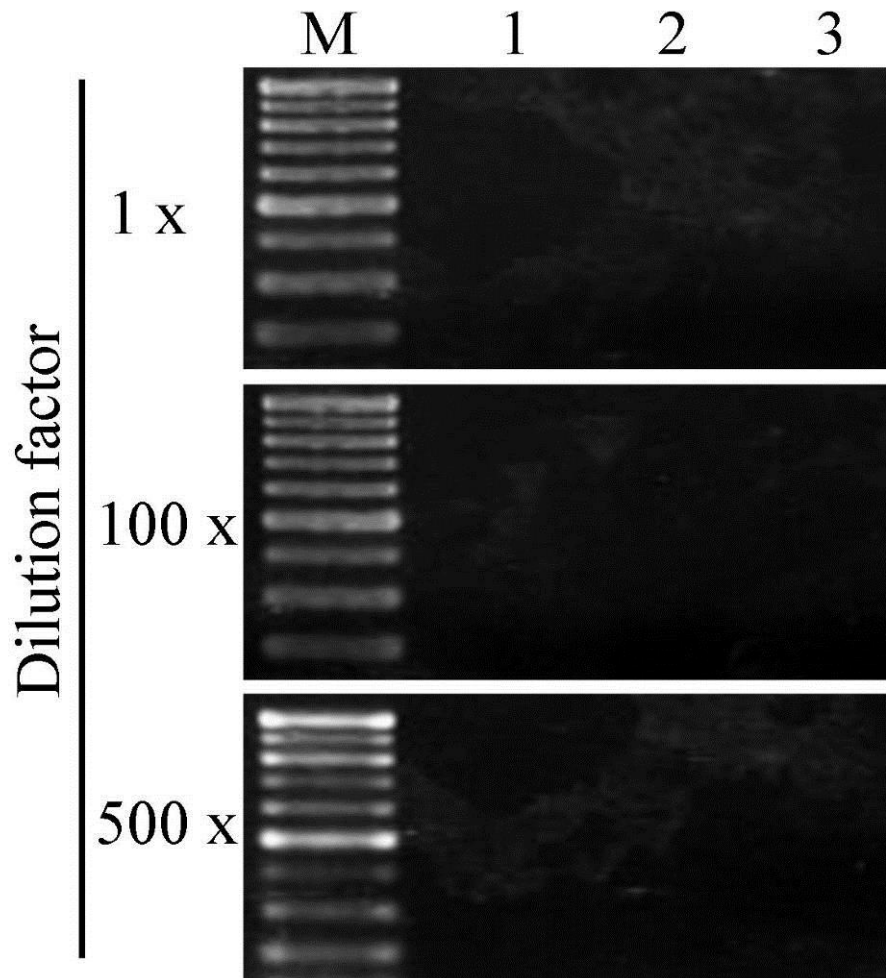
b. PCR 產物稀釋 400x 並取 1  $\mu$ l 進行2<sup>nd</sup> PCR



以1<sup>st</sup> PCR反應產物為模板進行2<sup>nd</sup> PCR反應。

# 病土(soil)核酸利用傳統抽取之1<sup>st</sup> PCR結果

(A) 1<sup>st</sup> PCR of DNA from Soil by PCI/CI method



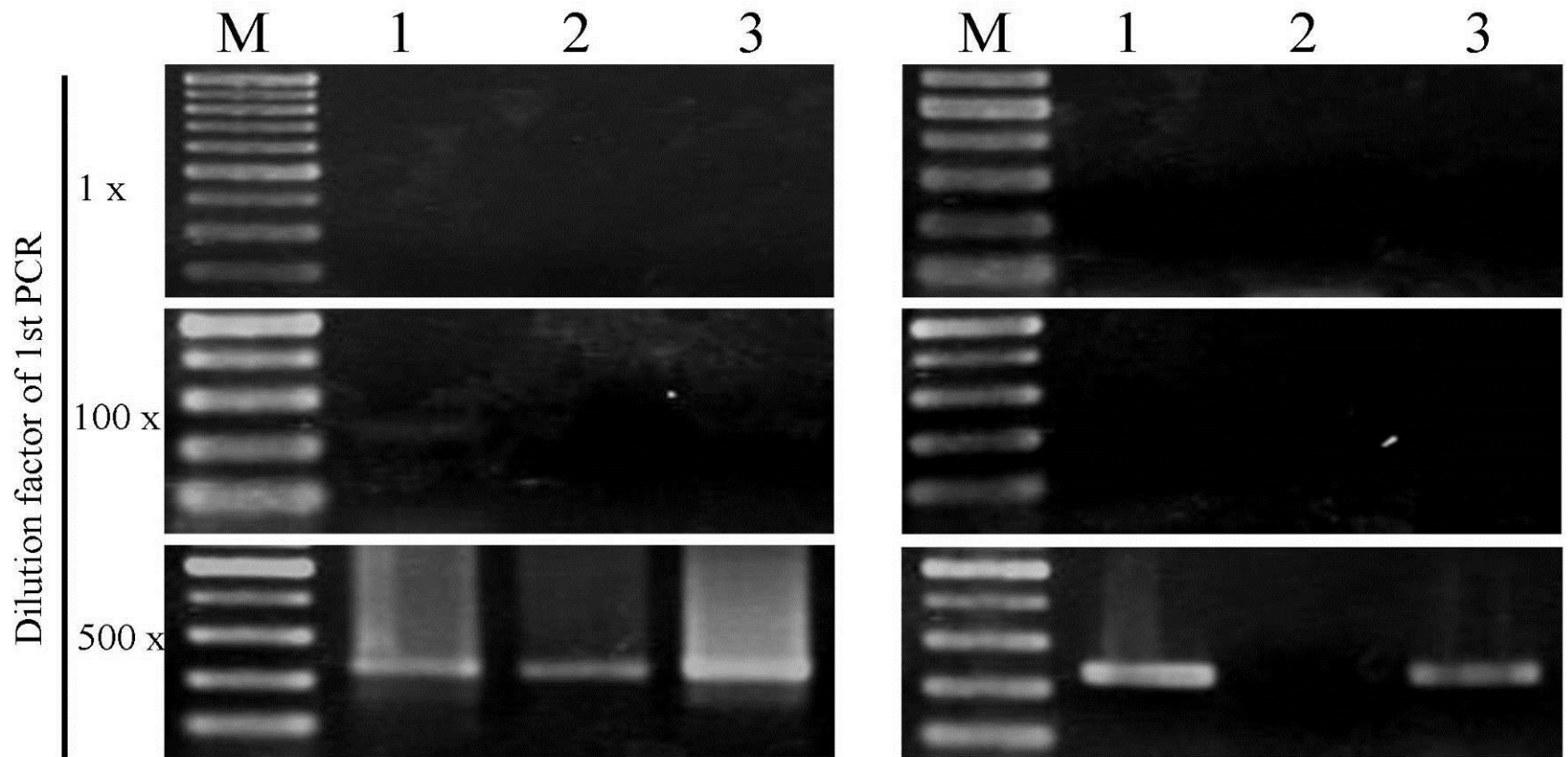
傳統核酸抽取法  
所抽取之核酸，  
皆無法PCR  
增幅目標DNA片  
段。

# 病土(soil)核酸利用傳統抽取之2<sup>nd</sup> PCR結果

## (B) 2<sup>nd</sup> PCR

a. 取第一次PCR 產物 1  $\mu$ l 進行2<sup>nd</sup> PCR

b. PCR 產物稀釋 400x 並取 1  $\mu$ l 進行2<sup>nd</sup> PCR

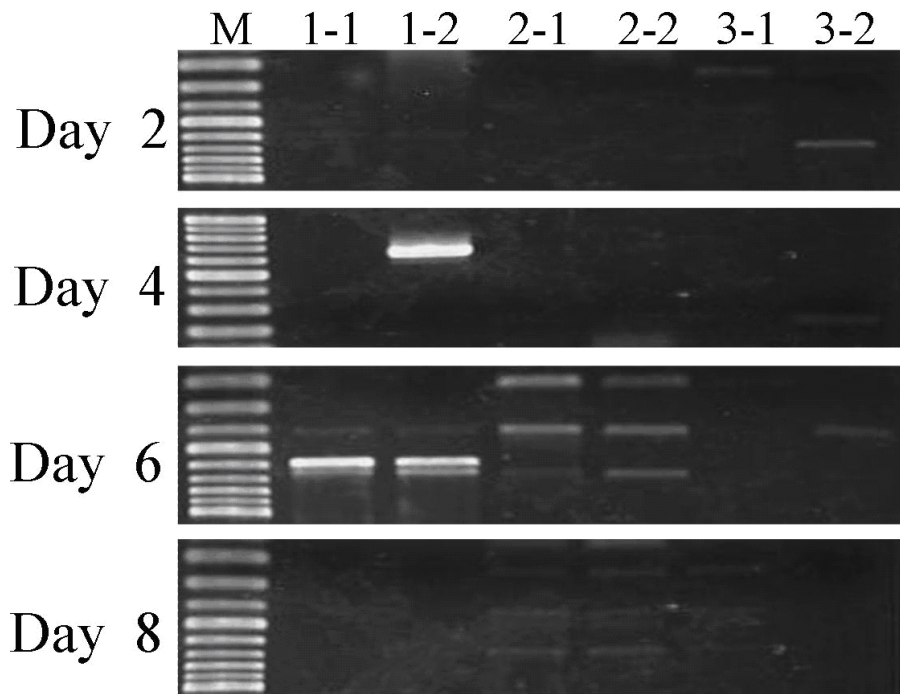


以1<sup>st</sup> PCR反應產物為模板進行2<sup>nd</sup> PCR反應

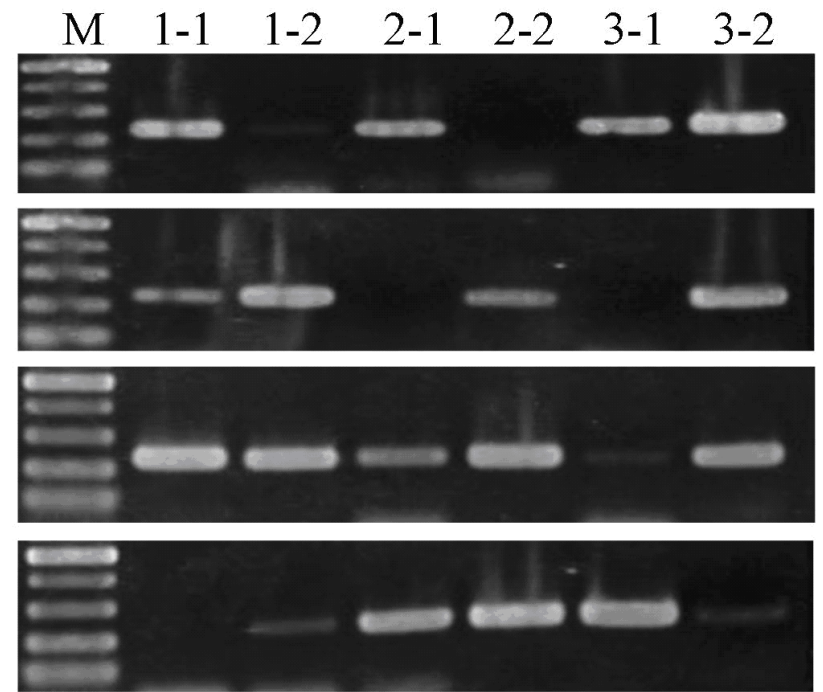
# 培養基褐根病菌PCR之結果

0.25g褐根病病土均勻灑佈於MA+4培養基，仍以培養四天以上樣本PCR檢測效果較佳。

(A) 抽取培養基分離之菌絲DNA 1  $\mu$ l 進行 PCR



(B) 第一次PCR 產物稀釋 400x 並取 1  $\mu$ l 進行2<sup>nd</sup> PCR



表一、病根(Root samples)樣本及檢測方法結果整理

|       | 樣本克數  | 處理方式                      | 1 <sup>st</sup> PCR之核酸稀釋倍數 | 2 <sup>nd</sup> PCR 之模板稀釋倍數 | 檢測反應效果 |
|-------|-------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------|
| 褐根病病根 | 0.15g | Nucleo Spin Plant DNA Kit | 1x                         | ...                         | +++    |
|       | 0.15g | CI/PCI method             | 500x                       | ...                         | +++    |
|       | 0.15g | MA+4培養基2天                 | 1x                         | ...                         | —      |
|       |       | MA+4培養基4天                 | 1x                         | ...                         | ++     |
|       |       | MA+4培養基6天                 | 1x                         | ...                         | ++     |
|       |       | MA+4培養基8天                 | 1x                         | ...                         | ++     |

# 表二、病土(Soil samples)樣本及檢測方法結果整理

| ☞                 | 樣本克數☞  | 處理方式☞           | 1 <sup>st</sup> PCR 之核<br>酸稀釋倍數☞ | 2 <sup>nd</sup> PCR 之模<br>板稀釋倍數☞ | 檢測反應效果☞ |
|-------------------|--------|-----------------|----------------------------------|----------------------------------|---------|
| 褐<br>根<br>病<br>土☞ | 0.25g☞ | Powersoil kit☞  | 1x☞                              | ...☞                             | +☞      |
|                   |        |                 | 1x☞                              | 1x☞                              | +++☞    |
|                   |        |                 | 1x☞                              | 400x☞                            | +++☞    |
|                   |        |                 | 100x☞                            | ...☞                             | -☞      |
|                   |        |                 | 100x☞                            | 1x☞                              | +++☞    |
|                   |        |                 | 100x☞                            | 400x☞                            | +++☞    |
|                   |        |                 | 500x☞                            | ...☞                             | -☞      |
|                   |        |                 | 500x☞                            | 1x☞                              | +++☞    |
|                   |        |                 | 500x☞                            | 400x☞                            | +++☞    |
|                   | 0.25g☞ | Ultraclean kit☞ | 1x☞                              | ...☞                             | -☞      |
|                   |        |                 | 1x☞                              | 1x☞                              | +☞      |
|                   |        |                 | 1x☞                              | 400x☞                            | -☞      |
|                   |        |                 | 100x☞                            | ...☞                             | -☞      |
|                   |        |                 | 100x☞                            | 1x☞                              | +++☞    |
|                   |        |                 | 100x☞                            | 400x☞                            | +☞      |
|                   |        |                 | 500x☞                            | ...☞                             | -☞      |
|                   |        |                 | 500x☞                            | 1x☞                              | +++☞    |
|                   |        |                 | 500x☞                            | 400x☞                            | ++☞     |

# 表三、病土(soil samples)樣本及檢測方法結果整理

| ↻                      | 樣本克數↻  | 處理方式↻          | 1 <sup>st</sup> PCR 之核<br>酸稀釋倍數↻ | 2 <sup>nd</sup> PCR 之模<br>板稀釋倍數↻ | 檢測反應效果↻ |
|------------------------|--------|----------------|----------------------------------|----------------------------------|---------|
| 褐<br>根<br>病<br>病<br>土↻ | 0.25g↻ | CI/PCI method↻ | 1x↻                              | ...↻                             | —↻      |
|                        |        |                | 1x↻                              | 1x↻                              | —↻      |
|                        |        |                | 1x↻                              | 400x↻                            | —↻      |
|                        |        |                | 100x↻                            | ...↻                             | —↻      |
|                        |        |                | 100x↻                            | 1x↻                              | —↻      |
|                        |        |                | 100x↻                            | 400x↻                            | —↻      |
|                        |        |                | 500x↻                            | ...↻                             | —↻      |
|                        |        |                | 500x↻                            | 1x↻                              | ++↻     |
|                        |        |                | 500x↻                            | 400x↻                            | +↻      |
|                        | 0.25g↻ | MA+4 培養基 2 天↻  | 1x↻                              | ...↻                             | —↻      |
|                        |        |                | 1x↻                              | 400x↻                            | +↻      |
|                        |        | MA+4 培養基 4 天↻  | 1x↻                              | ...↻                             | —↻      |
|                        |        |                | 1x↻                              | 400x↻                            | +↻      |
|                        |        | MA+4 培養基 6 天↻  | 1x↻                              | ...↻                             | —↻      |
|                        |        |                | 1x↻                              | 400x↻                            | ++↻     |
|                        |        | MA+4 培養基 8 天↻  | 1x↻                              | ...↻                             | —↻      |
|                        |        |                | 1x↻                              | 400x↻                            | ++↻     |

表

# 褐根病根(root samples)檢測

- 已建立之PCR檢測系統，直接應用於褐根病根部樣本檢測，相當穩定且有效。
- 我們勢必破壞樹木本身，對根部造成傷口。
- 病根樣本的研磨工作將十分耗時耗力。
- 無法確認是具有活性的褐根病菌
- 於是我們利用培養基分離法，結合PCR檢測方法以確立檢測出具有活性的褐根病菌，且菌絲的核酸抽取工作較容易進行。

# 褐根病病土(root samples)檢測

- 正如同預期的結果病土中之褐根病菌量微乎其微。
- 為此將第一次PCR反應產物作為模板，嘗試以另一組引子對進行第二次PCR反應，兩種商業化土壤核酸抽取套件，使用雙重PCR檢測方法大都能穩定呈現陽性反應。

- 結果證明不同之核酸抽取方法皆可獲得良好檢測效果，但商品化套組效果稍佳。
- 褐根病菌存在於病根組織較病土樣本為多，病根組織為較佳之檢測樣本。

- 但若必須進行土壤篩檢時，可利用雙重PCR提高檢測之靈敏度，亦可達到檢測之目的。
- 此實驗成果可作為未來應用於林木褐根病PCR診斷，病根/土壤採樣SOP建立之參考依據。

# Discussion效益評估及建議

- 本研究結合選擇性培養基及高靈敏度之PCR分子檢測技術，證明褐根病菌亦可在感染褐根病之樹木根部鄰近土壤中分離檢測發現，可不破壞樹木本身達到檢測之目的。
- 未來可針對珍貴樹種或保護老樹作例行性檢測以預防褐根病的發生，本研究成果可作為日後褐根病防疫檢測及健康土壤篩選之參考。

# 檢測土壤/殘根褐根病菌流程SOP



取少量土壤置  
於培養基上，  
培養2-4天



刮取菌絲將菌絲  
置入離心管內



利用磨蟲棒  
加以磨碎後



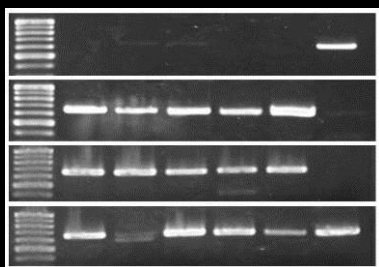
進行菌絲之核酸萃取 30 min



以專一性引子對進行  
PCR反應(90 min)



進行電泳分析(30 min)



結果分析

# 褐根病菌鑑定流程分析

ROOT  
sample

直接磨碎2.5g 病根  
組織抽取核酸

PCR

鑑定時程一天  
但樣本量多時費力

取2.5g 於MA+4培養  
基上，培養2-4天，  
抽取菌絲核酸

PCR

鑑定時程 2-4 天  
但較省力，且能證明  
病原為活菌

SOIL  
sample

直接磨碎2.5g 病土  
樣本抽取核酸

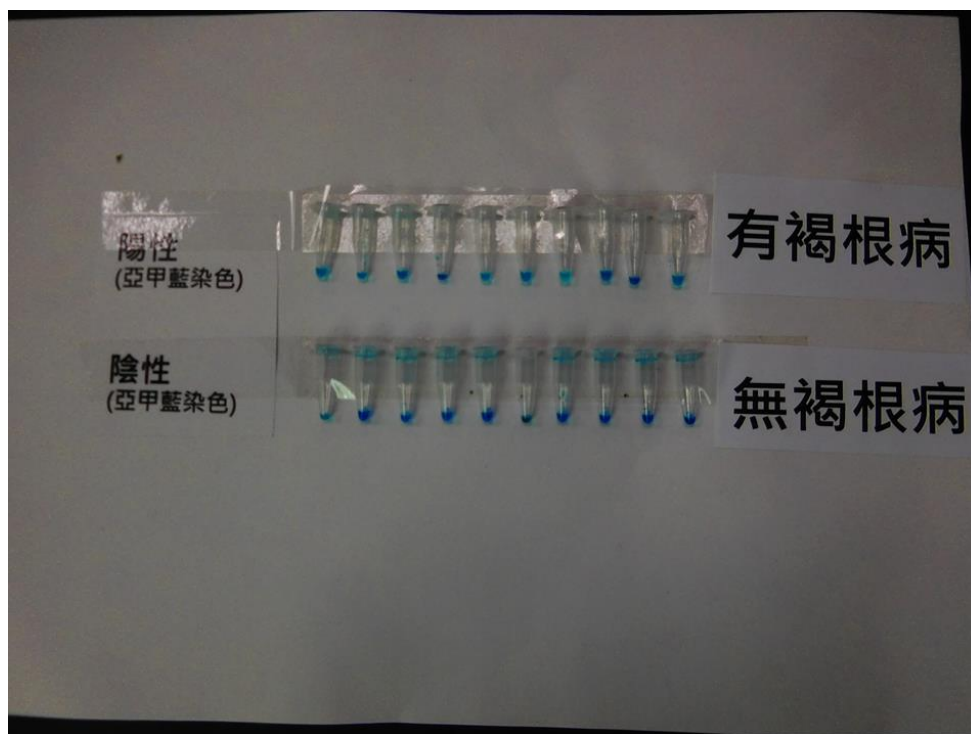
PCR

鑑定時程一天  
但需進行**雙重PCR**，不  
建議，若以不破壞樹體  
為前提可採用

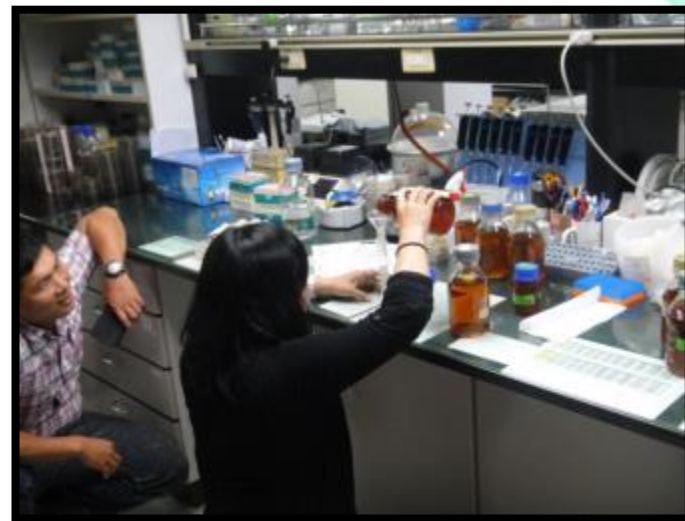
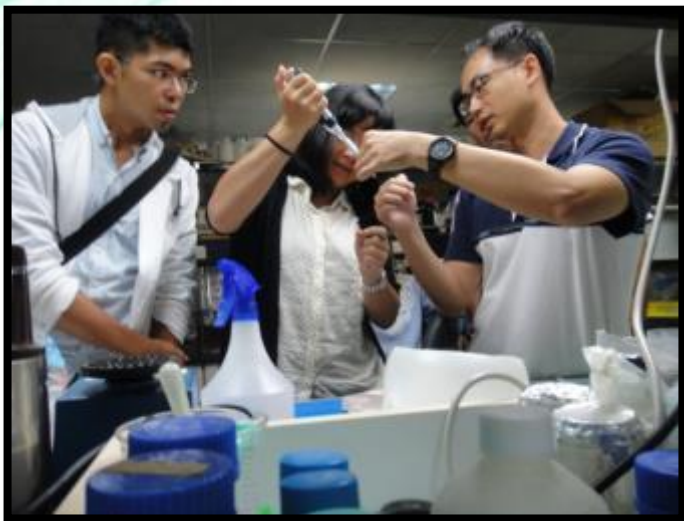
取2.5g 於MA+4培養  
基上，培養2-4天，  
抽取菌絲核酸

PCR

鑑定時程 2-4天  
且需進行**雙重PCR**，不  
建議，能證明病原為活  
菌若以不破壞樹體為前  
提可採用



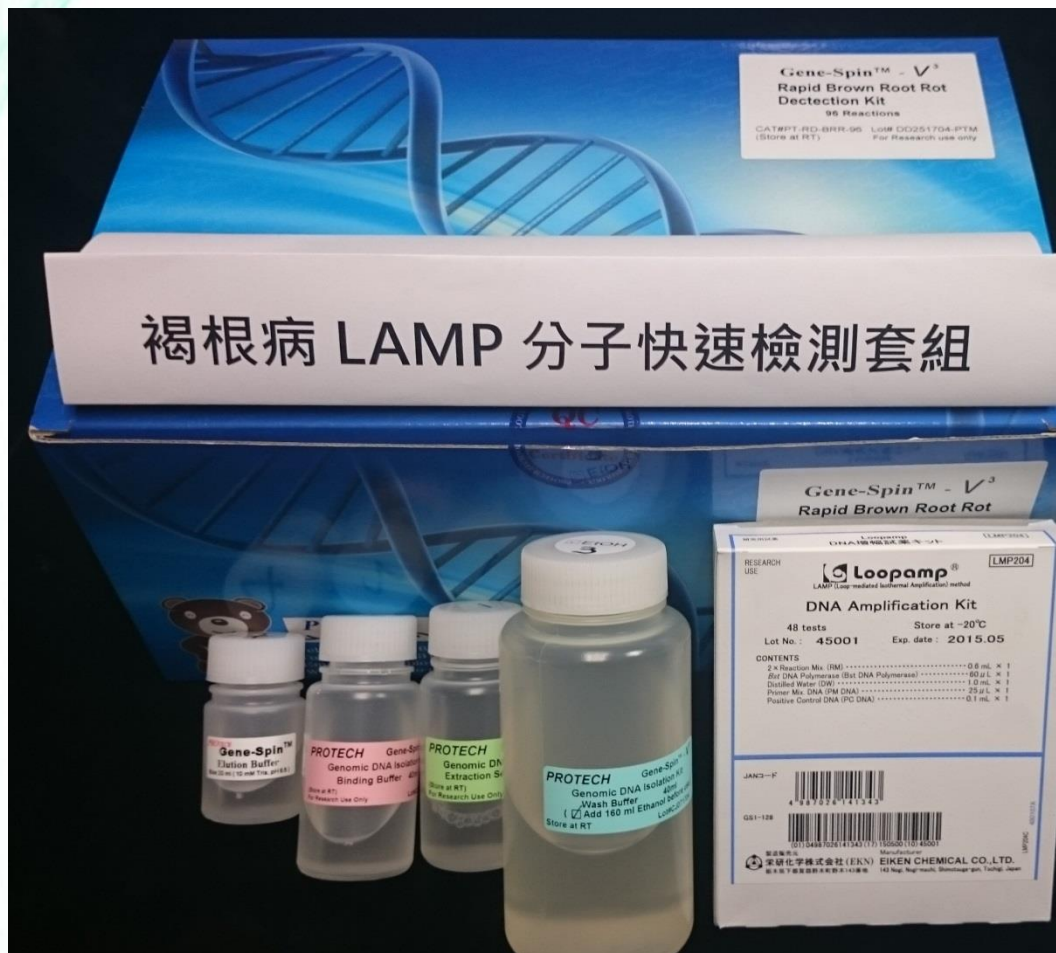
竹科檢測講習



## MA+4培養基製作與LAMP儀器介紹



# 套組內容物



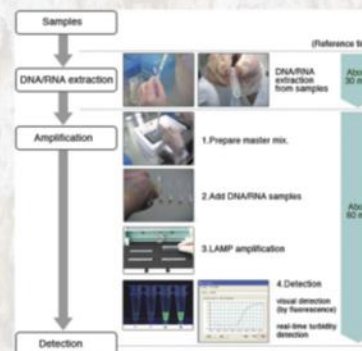
## 褐根病 LAMP 分子快速檢測套組

## 樹木褐根病快速檢測套組

波仕特生物科技股份有限公司  
榮獲 行政院農業委員會林業試驗所  
技術轉移授權

樹木褐根病 (Brown root rot) 是台灣最重要的木本植物真菌性根部病害，病原菌為害木腐孔菌 (Phellinus noxius) 或俗稱褐根病菌，它引起木本植物的根部及莖基部木材白腐朽及樹皮腐敗，導致莖基部環狀壞死，因而輸導功能遭受破壞，而引起植株萎凋死亡。

其褐根病的防治工作，應以預防為主，因此病原菌危害植物初期並沒有任何病徵，一旦出現病徵欲進行治療處理，為時已晚。波仕特生物科技股份有限公司受行政院農業委員會林業試驗所技術轉移授權製造生產樹木褐根病快速檢測套組，可藉由實驗檢測方式迅速得到可信任的檢測結果，達到快速的防治效果。



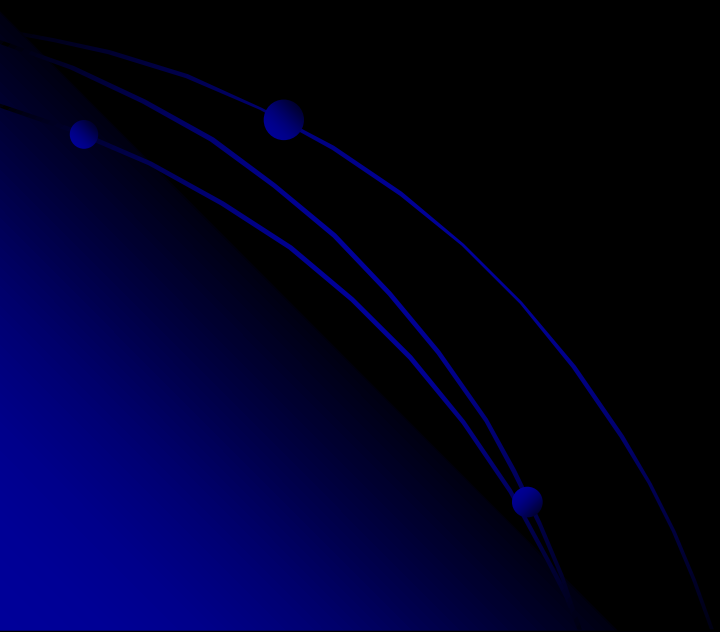
### 樹木褐根病快速檢測套組：

| Description                         | Package      |
|-------------------------------------|--------------|
| GenSpin Genomic DNA Kit             | 96/192 Tests |
| 0.2ml Thin Wall PCR Tubes, Flat Cap |              |
| Detection Primer Set                |              |
| DNA Amplification Kit               |              |

波仕特生物科技股份有限公司 台北 02-26557677 竹南 037-680138 台中 04-22624883  
Protech Technology Enterprise Co., LTD. 高雄 07-3425707 花蓮 03-8463953  
免付費電話：北區 0800-231-530 竹苗 0800-500-110 中部 0800-555-650 南部 0800-268-266

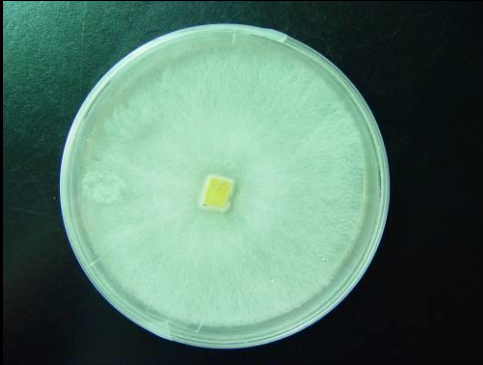


### 三、林木褐根病單元抗體製備



# 抗原製備

採取的抗原型式，主要以菌絲細胞壁，進行 balb/c小老鼠的注射免疫。



(1) 菌絲培養5-7天。(2) 取長滿5盤Plate，用刮勺將菌絲取下。



(3) 加入1cc PBS-buffer，  
用研鉢把菌絲磨碎。

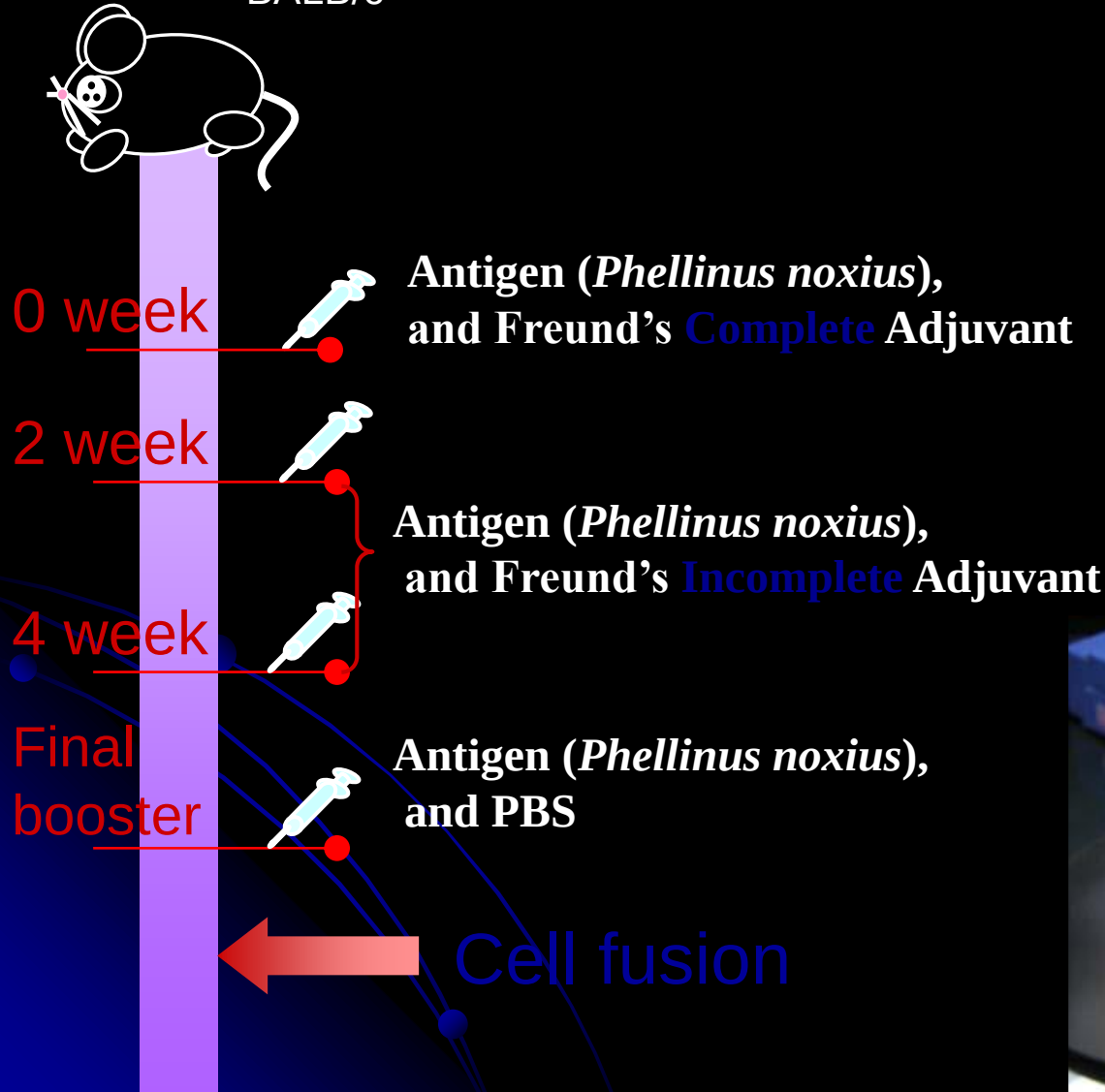


(4) 6,000rpm離心10分鐘，取其上清液，做為免疫一隻老鼠一次所需之抗原。

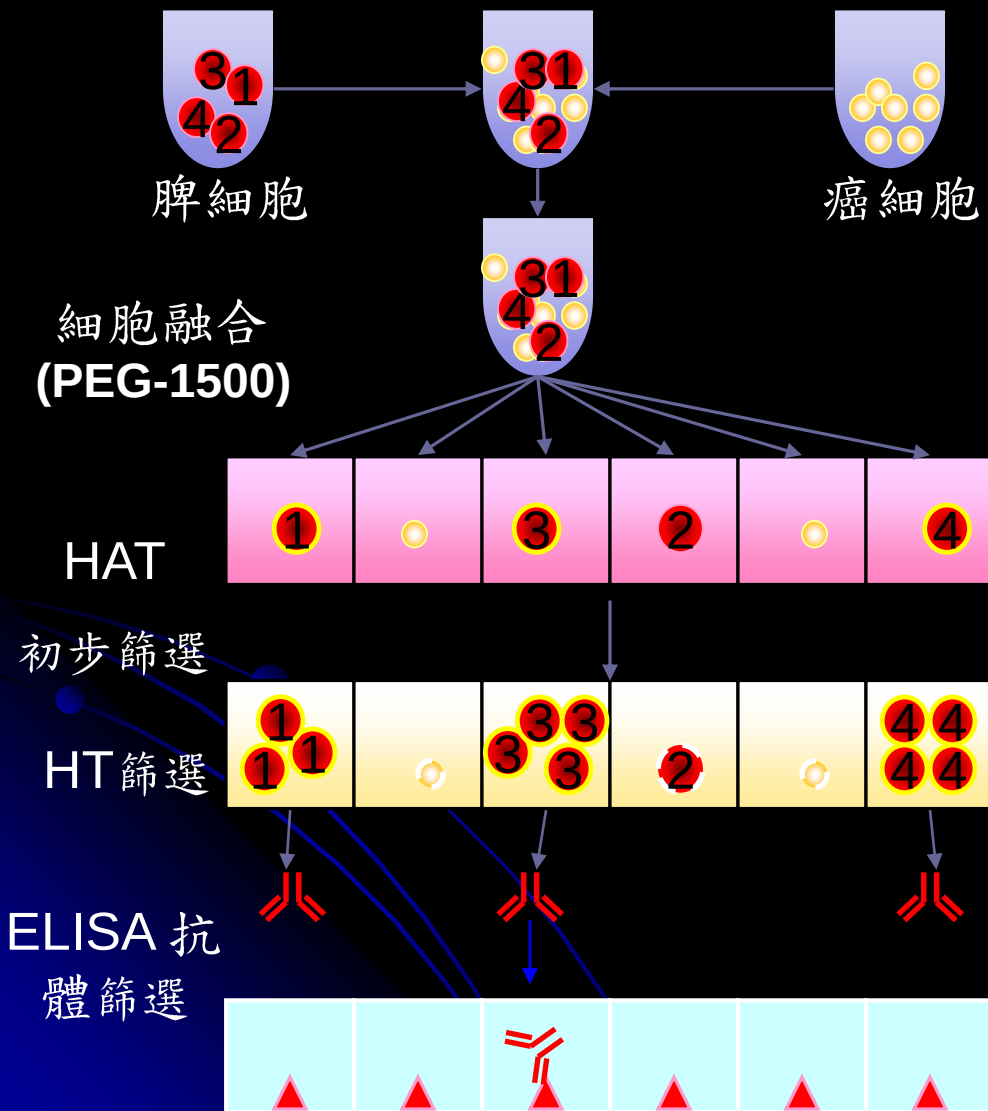
# 動物免疫

## 小白鼠免疫流程

BALB/c



# 單元抗體製備



# 單元抗體之篩選



ELISA

# 單元抗體生產及純化

抗體獲自小白鼠體內培養之融合瘤細胞，培養細胞養直接注射到小白鼠之腹腔，經兩週後抽取腹水。

抗體純化：Kit將抗腹水純化。

- **動物免疫及細胞融合技術：**

目前共完成6隻小白鼠細胞融合工作。

- **融合瘤細胞初步篩選：**初步共篩選出有1252細胞株對褐根病病原菌絲，43.47%呈正反應。

- **融合瘤細胞第二次篩選：**

**共篩選出152株**只對褐根病病原呈專一性反應的細胞株。

不同細胞株上清液  
之**ELISA**反應呈色



- 單元抗體生產及力價測試

單元抗體力價高且表現對褐根病病原菌絲呈專一性反應。

- 抗腹水生產及力價測試

抗腹水之力價測試可達到  $10^{-15}$  ,

並表現出對褐根病病原菌絲呈專一性反應。

不同濃度抗腹水系列  
稀釋之ELISA反應呈色



# 單元抗體應用

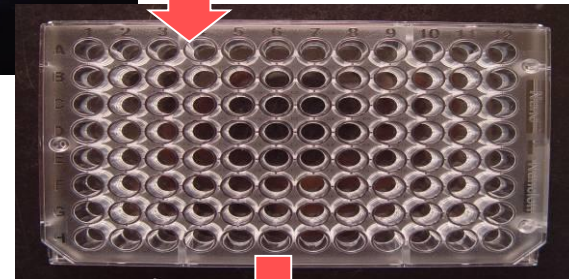
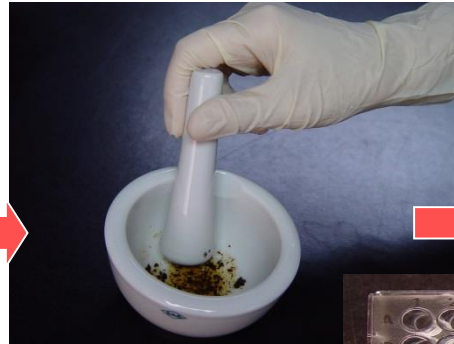
單元抗體應用於病根部組織，  
經由酵素免疫抗體法之力價測試

| 褐根病取樣植物 | ELISA value/37°C 1 hr<br>(Reciprocal of McAb dilution 50X) |
|---------|------------------------------------------------------------|
| 扁柏      | 1.038                                                      |
| 櫻花      | 1.045                                                      |
| 牛樟      | 1.174                                                      |
| 紅楠      | 1.171                                                      |
| 菌絲對照組   | 2.154                                                      |
| 健康樹根對照組 | 0.157                                                      |

---

\*Blank : 0.061

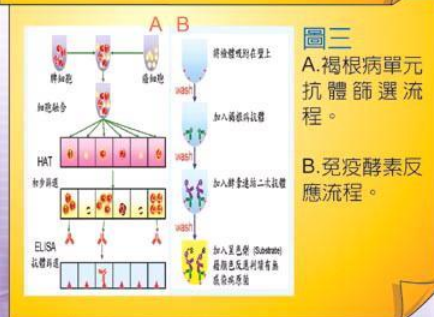
# 單元抗體免疫酵素反應應用在褐根病 快速診斷之流程。



# 林木褐根病單元抗體診斷試劑製備

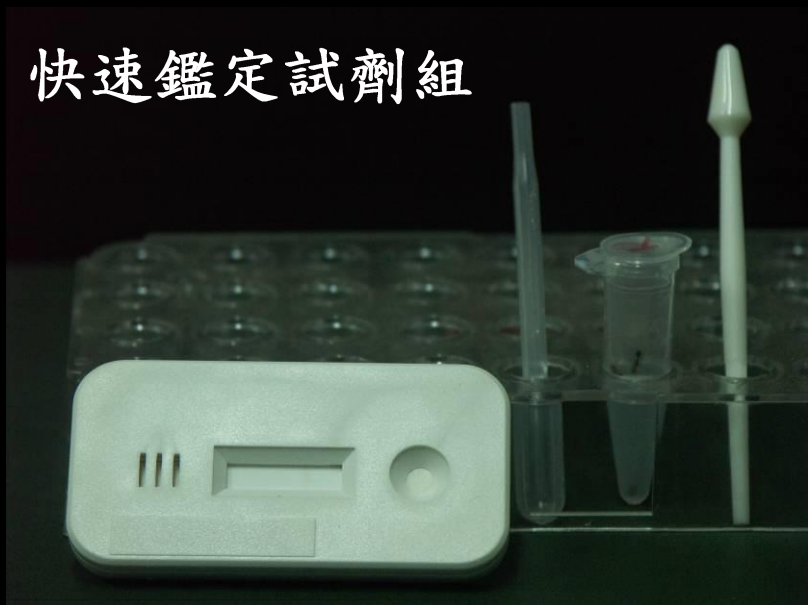
## Preparation of the diagnosis probe of the monoclonal antibodies against tree brown root diseases causing *Phellinus noxius*

樹木褐根病是台灣重要樹木病害，由*Phellinus noxius*所引起，每年許多珍貴樹種皆受其害而枯死。褐根病菌寄主範圍廣泛，在自然界鮮少形成子實體，因此不易在初期正確診斷，需仰賴植病專業人員，經病原菌分離培養來加以鑑定，每每造成林木疫情之延誤。林試所利用融合瘤（hybridoma）技術，開發對褐根病菌具專一性之單元抗體，應用於間接酵素免疫反應（indirect ELISA），提供一套褐根病快速診斷法。研究過程包括褐根病菌的抗原製備、Bal/c小鼠的免疫注射、細胞融合及融合瘤細胞篩選等。未來將進一步製成金標試劑（colloidal gold-labeling kit），提供更便利的褐根病快速診斷法。

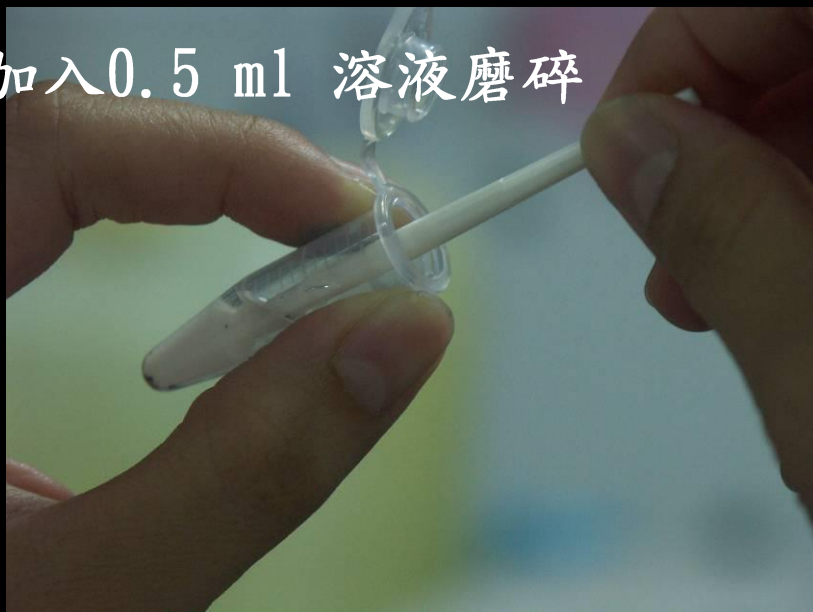


研究人員：吳孟玲 E-mail：mlw@tfri.gov.tw

快速鑑定試劑組



加入0.5 ml 溶液磨碎



未來開發快速鑑定試紙製備



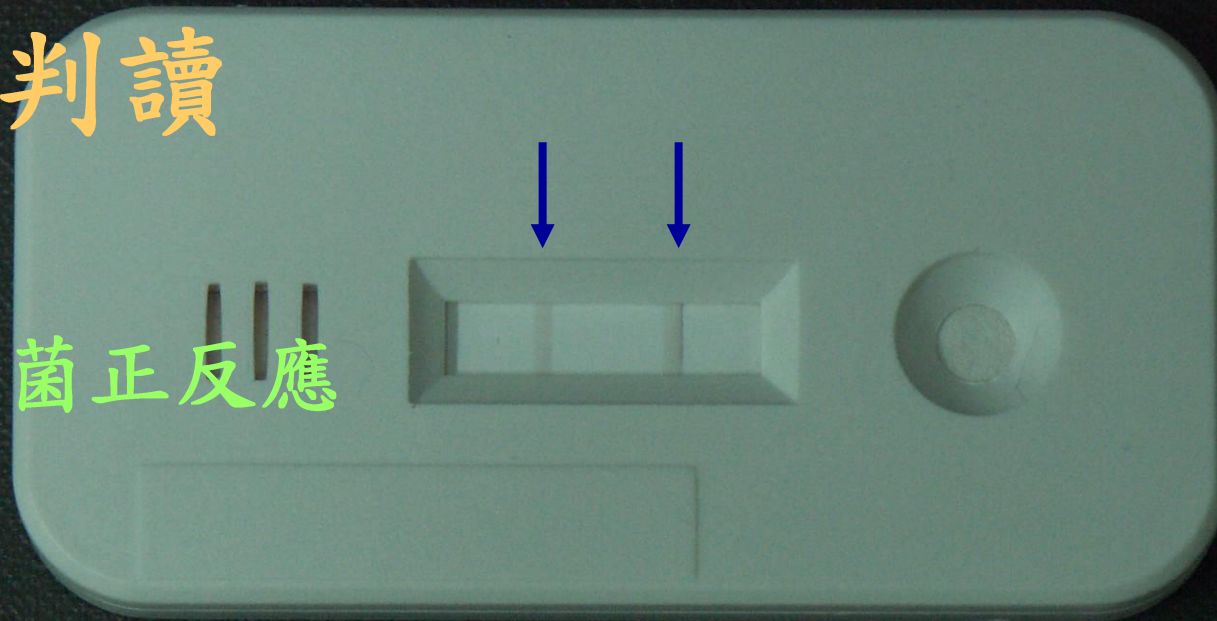
滴數滴溶液在試劑的凹孔內

吸取些許溶液

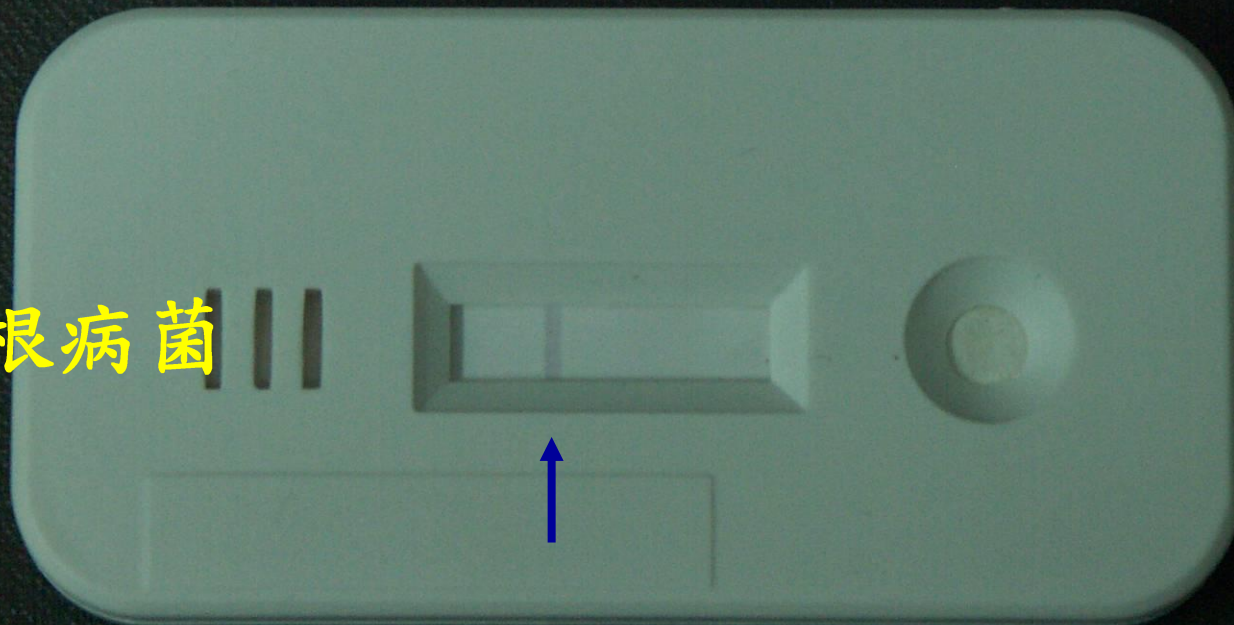


# 結果判讀

褐根病菌正反應



非褐根病菌





感謝聆聽  
敬請指教

