

# 蝴蝶蘭細菌性葉斑病菌 *Burkholderia gladioli* 專一性引子之開發

許秀惠<sup>1,3</sup> 申屠萱<sup>2</sup> 宋嘉仁<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 行政院農業委員會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所 植物保護系

<sup>2</sup> 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 新竹分局 植物檢疫課

<sup>3</sup> 聯絡作者，E-mail：shhseu@fthes-tari.gov.tw

接受日期：中華民國 101 年 2 月 20 日

## 摘要

許秀惠、申屠萱、宋嘉仁. 2011. 蝴蝶蘭細菌性葉斑病菌 *Burkholderia gladioli* 專一性引子之開發. 植病會刊 20: 39-51.

蝴蝶蘭細菌性葉斑病是由 *Burkholderia gladioli* (BG) 所引起的細菌性病害，本研究以 100 個隨機引子應用隨機增幅多型性核酸技術 (RAPD) 增幅，並篩選 BG 共有的 650 bp 之專一性片段，並根據其序列設計出對 BG 具專一性之引子組 BGRPF3/BGRPR3。應用此引子組進行聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 偵測 BG 菌株皆能增幅出 350 bp 的片段，但對供試之 8 屬 21 種共 97 株其他非標的之病原細菌及腐生細菌則不會產生任何片段。BGRPF3/BGRPR3 引子組偵測 BG 菌株的 DNA 靈敏度可達 10 pg，菌落偵測之靈敏度則為  $1.87 \times 10^1$  cfu/ml 個活菌數。將 BG 菌株與其他非標的細菌混合菌液經簡易萃取後進行 PCR，只產生 BG 特有的 350 bp 片段。應用單一菌落快速檢定法可於 3-4 小時內鑑定蝴蝶蘭細菌性葉斑病菌。用於偵測人工接種 BG 病菌之蝴蝶蘭葉片以及田間自然發病之蝴蝶蘭葉片均具準確性，顯示本研究所設計之引子組 BGRPF3/BGRPR3 可用於快速鑑定蝴蝶蘭細菌性葉斑病菌。

關鍵詞：蝴蝶蘭、細菌性葉斑病菌、引子、診斷、鑑定、偵測

註記：本研究中開發之 BG 專一性引子組 BGRPF3/BGRPR3 目前正在申請專利，基於審查過程資訊不公開原則，本篇論文僅呈現此專一性引子組的檢測效率，待專利核准後再以補遺 (supplement) 方式登錄此引子組的核酸序列。

## 緒言

由 *Burkholderia gladioli* (BG) 病原細菌所引起的蝴蝶蘭細菌性葉斑病可在蝴蝶蘭葉片及花蕾上造成葉斑及消蕾等病徵<sup>(27)</sup>，該病原菌也可引起其他蘭花植物的葉斑病<sup>(13)</sup>，BG 危害蝴蝶蘭初期會引起花瓣水浸狀病徵，蝴蝶蘭細菌性葉斑病常發生於高溫多濕的溫室中，在為害葉片初期除造成水浸狀病斑外，筆者觀察在病斑的外圍通常

會產生黑圈及黃暈，中期病徵為組織稍為軟化而使葉片下垂，但其表皮仍堅硬，至後期病斑蔓延至全葉黑化，業者皆稱之為“黑腐”，嚴重時導致全株死亡，蝴蝶蘭一旦發生此病害即會造成栽培業者的損失。

BG 最初分離於唐菖蒲葉斑病<sup>(19)</sup>，根據其來源可分為三種病原型 (pathovar)，包括引起唐菖蒲葉斑病之 *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*<sup>(19)</sup>、引起洋蔥軟腐病之 *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola*<sup>(14)</sup>、以及引起蘑菇軟腐病之 *Burkholderia gladioli* pv. *agaricola*<sup>(17)</sup>；目前自蝴蝶蘭

分離出之 BG 未確定病原型，只歸屬於 *Burkholderia gladioli*。在國外已發表的 BG 之寄主植物包括洋蔥<sup>(14)</sup>、石斛蘭<sup>(3)</sup>、小蒼蘭<sup>(13)</sup>、水稻<sup>(28)</sup>、櫻桃<sup>(15)</sup>等，在臺灣有關於 BG 之病害報告則有唐菖蒲<sup>(7)</sup>、蝴蝶蘭<sup>(26,27)</sup>、山蘇<sup>(31)</sup>、鳳梨<sup>(1)</sup>及杏鮑菇<sup>(16)</sup>等。BG 除了會引起植物細菌性病害之外，亦會危害人體，可感染肺部囊狀纖維化症 (cystic fibrosis, CF) 病人的呼吸道形成生物膜<sup>(2,23)</sup>及造成食物中毒<sup>(12)</sup>，由於可感染 CF 病人之病原菌尚有 *B. cepacia* complex，其菌群與 BG 遺傳性質相近且不易區分，因此學者研究 CF 同時亦曾針對 BG 開發專一性引子<sup>(1,30)</sup>以進行檢測。

在植物病害方面，已有針對分離自水稻及蝴蝶蘭由 BG 引起的植物病害菌株開發專一性的引子組<sup>(4, 18, 26)</sup>。文獻報告中提到，設計引子的方法包括以 BG 菌株之 16S 及 23S 之 rRNA 基因<sup>(1)</sup>取得 BG 之特異性片段，並以與 BG 遺傳組成相近之其它 *Burkholderia* 屬如 *Burkholderia cepacia* (Bce) 菌種以刪去法成功地找出對 BG 具專一性的片段，Su<sup>(26)</sup>針對蝴蝶蘭 BG 菌株以其 16S 及 23S 之 rRNA 基因保留序列之 ITS 區段設計研發引子組，以及 Maeda 等人<sup>(18)</sup>以 BG 之 *gyrB* 基因來開發專一性的引子組，二位的研究雖然以 16S 及 23S rRNA 基因設計所得引子之專一性較高，但文獻中卻未測試其相近種如 *B. cepacia* 是否產生類似的產物，也未測試其專一性是否可排除其它可引起植物葉斑病害之植物病原細菌，而在肺部囊狀纖維化症病人的呼吸道中，BG 與 Bce 常同時被分離出，筆者在進行蝴蝶蘭葉斑病之病原分離時也常同時分離到此兩種細菌，且均可在菸草皆上引起過敏性反應，顯示 Bce 也會引起蝴蝶蘭病害，並且與 BG 同時並存於相同環境中，因此本研究將研究目標以開發能快速且明確提高檢測 BG 專一性及靈敏性引子組為主要目的，期能建立快速準確檢測 BG 的方法，並應用於田間蝴蝶蘭病害鑑定，對於蝴蝶蘭檢疫、防治及出口品質確保將有很大幫助。

## 材料與方法

### 菌株來源

民國 96-99 年間分別至台中、嘉義、屏東等地區的蘭園採集疑似罹患細菌性葉斑病之蝴蝶蘭植株，攜回實驗室進行組織分離，分離所得之菌株依 Schaad 等人<sup>(22)</sup>所述進行生理生化測定及形態觀察，確認該群菌株為

*Burkholderia gladioli*，並分別以 BG 編號，共得 24 株菌株作為供試標的菌株。其他供試非標的菌株為本研究室及中興大學所保存的菌株，共計 8 屬 21 種 97 株，其中 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* AAC 13202、*B. cepacia* 13208、*Pseudomonas cichorii* 12682、*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Xcm) 13182、*Pantoea ananatis* 13199 及 *Pa. dispersa* 12159 等標準菌株購自食工所 (如表一)。

### 細菌全 DNA 之抽取

純化分離來自蝴蝶蘭的 24 株 BG 供試菌株，先以 5 ml 之 LB broth 在 30°C 下震盪培養 16 hr，再依 Sambrook<sup>(14)</sup>等及 Hseu 等<sup>(8)</sup>所述進行細菌全 DNA 之抽取，抽取之 DNA 溶解後放置 -30°C 保存備用。

### 小量質體 (plasmid) 的製備

抽取步驟係以 Plasmid miniprep purification kit (Genemark) 產品使用說明及 Hseu 等<sup>(8)</sup>所述進行，回收之 DNA 放置 -30°C 保存備用。

### RAPD 增幅反應及專一性引子之篩選

取蝴蝶蘭病原菌 BG4、BG9、BG12 及 BG23 等 4 株菌株之 DNA 為模版，應用 OPERON 10-MER KITS 之 OPO 01~20、OPP 01~20、OPR 01~20、OPS 01~20 及 OPT 01~20 等 100 個隨機引子依 Hseu 等人<sup>(8)</sup>所述進行 RAPD 反應，根據電泳結果初步篩選出對蝴蝶蘭 BG 菌株可增幅產生共同條帶且具再現性之隨機引子；同時取其他供試細菌之 DNA 為模版，以上述篩選出之隨機引子進行 RAPD，比較各隨機引子組蝴蝶蘭 BG 菌株與其他細菌所增幅出之 DNA 片段之異同，藉以篩選出對蝴蝶蘭 BG 菌株產生專一性 DNA 片段之引子。

### 專一性 DNA 片段之回收、純化及核酸探針之製備

將經 RAPD 得到之產物以 1X TAE buffer 配製之 1.2% agarose 電泳分析後，將欲回收的片段 DNA 切下，使用 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit 組 (Geneaid)，並依廠商建議之使用方法進行回收 DNA 片段，並使用 Dig High Prime DNA Labeling and Detection starter Kit II 組 (Roche) 將該 DNA 製作成核酸探針 (依廠商建議步驟)，之後保存於 -30°C，以備進行核酸雜合反應。

表一、供 RAPD 及 PCR 試驗之 8 屬 21 種 97 株非標的細菌菌株。

Table 1. Non-target bacterial isolates used in RAPD and PCR.

Bacterial strain	Strain number
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	CH12、Aa4、Aa5、Aa8、Aa9
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	Aac9801、Aac9802
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	Pha9811
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AA19
<i>Burkholderia andropogonis</i>	Pan1
<i>B. caryophylli</i>	Co8、Co10、Tw7、Tw9
<i>B. cepacia</i>	BCRC 13208
<i>B. gladioli</i>	PA1-26、28
<i>B. glumae</i>	<i>B. glumae</i> 01、 <i>B. glumae</i> 06
<i>Pantoea agglomerans</i>	Yx7
<i>Pa. ananatis</i>	PA13199
<i>Pa. dispersa</i>	BCRC 12189
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Zan55、72、75、130、Os5
<i>Pe. chrysanthemi</i>	Ech 83、9356、Os7、Sf18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pae
<i>P. cichorii</i>	BCRC 12682、sf75
<i>P. fluorescens</i>	Pf
<i>P. putida</i>	Pu
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	Psg
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	Psl
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Psph
<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	Pspi
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Pss
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Psta
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Psto
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Ia52、Ia85、Pss 05
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>	A072、A245
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Xv12、15、32、42、58
<i>X. campestris</i> pv. <i>armoraciae</i>	Hr8、17、24、31、45
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Xcc9901
<i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	Xcm13182、X58、M42、49、50
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (Xoo)	XM27、30、42、XF-111
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> (Xoc)	I-1C、F-9b、H-1、K-1b

### 南方雜合反應 (Southern hybridization)

依據 Southern 氏<sup>(25)</sup>之方法，將瓊脂凝膠上的 DNA 轉漬於尼龍濾膜上。首先以自蝴蝶蘭之 BG4、BG9、BG12 及 BG23 等 4 株菌株及其他供試細菌 DNA 為模版，以 OPT-7 引子進行 RAPD 反應，將其增幅產物經電泳後的

瓊脂凝膠，以毛細管方法將凝膠上的 DNA 轉印到尼龍膜上，應用 DIG High Prime DNA Labeling and Detection starter Kit II 組 (Roche) 套組依廠商建議步驟進行雜合反應及偵測反應，最後以 X-ray 底片進行曝光。

專一性 DNA 片段之選殖及核酸定序

本試驗專一性 DNA 片段之選殖係以 TOPO TA Cloning<sup>®</sup> kit (Invitrogen) 產品說明及 Hseu 等人<sup>(8)</sup>所述進行。挑到之選殖株以 *EcoRI* 剪切並進行電泳分析，以確認此白色菌落為含有選殖片段，並將上述挑到之選殖株委託明欣生物科技公司進行核酸定序後，藉由 NCBI (National Center for Biotechnology Information, 美國國家生物科技資料中心 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 進行線上基因庫 (GenBank) 的查詢與比對，並依此序列利用 Vector-NTI 8 (InforMax) 衍生設計出含 G+C 比例較高，不會造成髮夾環 (hairpin)，且引子雙型物 (primer dimer) 形成較少之正向引子 (forward primer) 及反向引子 (reverse primer)。

### 引子組之 PCR 反應條件設定

分別測試去氧核糖核苷三磷酸鹽 (dNTPs)、引子 (primer) 濃度、Taq polymerase (Pro-taq) 之適當反應量、不同 PCR 黏合溫度以及不同複製循環數等試驗條件，找出所設計引子組的最佳 PCR 反應條件。

### 引子組之專一性測定

**DNA 專一性測試：**分別抽取供試之 24 株來自蝴蝶蘭 BG 菌株之 DNA，以及 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Aaa)、*A. avenae* subsp. *citrulli* (Aac)、*A. avenae* subsp. *cattleyae* (AAC)、*Agrobacterium tumefaciens* (At)、*Burkholderia andropogonis* (Ba)、*B. caryophylli* (Bc)、*B. cepacia* (Bce)、*B. glumae* (Bgl)、*Pantoea agglomerans* (Pa)、*Pa. ananatis* (Pan)、*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc)、*Pe. chrysanthemi* (PCH)、*Pseudomonas aeruginosa* (Pa)、*P. syringae* pv. *syringae* (Pss)、*P. cichorii* (Pc)、*P. fluorescens* (Pf)、*P. putida* (Pp)、*P. syringae* pv. *glycinea* (Psg)、*P. syringae* pv. *lachrymans* (Psl)、*P. syringae* pv. *phaseolicola* (Psp)、*P. syringae* pv. *pisi* (Pspi)、*P. syringae* pv. *tabaci* (Pst)、*P. syringae* pv. *tomato* (Psto)、*Ralstonia solanacearum* (Rs)、*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (Xad)、*X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav)、*X. campestris* pv. *armoraciae* (Xca)、*X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Xcm)、*X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo)、*X. oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) 等菌株之 DNA，以 BGRPF3/BGRPR3 引子組進行 PCR，以測試該引子組之專一性。

**非標的菌株 DNA 干擾專一性測試：**將供試蝴蝶蘭

BG4、BG9、BG12 及 BG23 之 DNA 分別與上述非標的菌株之 DNA 各自以等比例混合，再分別取 10 ng 的量依上述增幅條件進行 PCR 反應，以了解供試樣品中若混雜其他不同的病原菌或雜菌，所設計之引子組 BGRPF3/BGRPR3 對 BG 菌株之 DNA 是否仍具專一性。

**非標的菌株細胞干擾專一性測試：**將 BG4、BG9、BG12 及 BG23 菌株分別培養在 NA 培養基上培養 24 hr 後以無菌水懸浮，並稀釋為  $10^6$  cfu/ml，而供試之其他 Aaa、Aac、Ba、Bce、*B. glumae*、Pa、Pan、Pd、Pc、RS、Xav、Xcm、Xcc 等 6 屬 13 種非標的菌株則分別培養於適當之培養基，之後以無菌水懸浮，並調整其濃度約為  $10^4 \sim 10^8$  cfu/ml，每個稀釋濃度先各別與供試之 BG 菌株之菌液  $10^6$  cfu/ml 以等比例混合後，取菌液以 Hseu 等人<sup>(8, 9)</sup>之簡易法萃取 DNA，並以 BGRPF3/BGRPR3 引子組進行 PCR 與電泳分析，以測試樣品中存在其他非標的細菌，是否會干擾引子組 BGRPF3/BGRPR3 偵測 BG 菌株之專一性。

### 引子組靈敏度測定

**DNA 靈敏度測定：**分別將供試蝴蝶蘭 BG4、BG9、BG12 及 BG23 之 DNA 分別取 100、50、10、1 ng/μl 及 100、50、10、1 pg/μl 等濃度，加入 PCR 各反應物，使總反應體積為 20 μl，依上述增幅條件進行 PCR，反應後進行電泳分析，以測試所設計之引子組 BGRPF3/BGRPR3 進行 PCR 反應及電泳分析，並比較其偵測蝴蝶蘭 BG 菌株 DNA 之靈敏度。

**菌液靈敏度測定：**將供試蝴蝶蘭 BG4、BG9、BG12 及 BG23 菌株於 NA 上培養 24 hr 後，以無菌水懸浮並調整其 OD<sub>620</sub> 之讀值為 0.3 (約  $10^8$  cfu/ml)，以 10 倍系列稀釋，使濃度約為  $10^3 \sim 10^7$  cfu/ml，並取適當之細菌懸浮液以 spiral plater (model D, Spiral systems, Inc. Bethesda, Maryland) 劃線於 NA 平板上，經 30°C 培養 24 hr 後，計算其細菌數，以確認供試細菌之菌量。取每個稀釋濃度之菌液依前述方法萃取 DNA，並以 BGRPF3/BGRPR3 為引子組進行 PCR 與電泳分析以測試引子組之靈敏度。

### BG 引子組靈敏度及專一性比較

根據已發表關於 BG 專一性引子之研究文獻<sup>(1, 18, 26)</sup>所提供之引子序列合成引子 (表二)，以分離自蝴蝶蘭菌

表二、本研究中使用之 BG 專一性引子組序列

Table 2. The sequences of BG-specific primer pairs that are used in this study

Primer	Sequence	Product size	Reference
CMG16-1 CMG16-2	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG CGAAGGATATTAGCCCTC	468 bp	Bauernfeind, <i>et al.</i> , 1998.
CMG23-1 CMG23-2	ATAgCTggTTCTCTCCgAA CCTACCATGCAYATAAAT	388 bp	Bauernfeind, <i>et al.</i> , 1998.
GyrB-IDR GyrB-IDF	CTGCGCCTGGTGGTGAAG CCGTCCCCGCTGCCGAATA	479 bp	Maeda, <i>et al.</i> , 2006
BG_Uni_ITS F BG_Uni_ITS R	GTGAATACGTTCCCGGGTCTT ATCTGCGGATCAAAGCTCGT	740 bp	Su, P. Y. 2009.

株 BG9 菌株之純 DNA 稀釋成不同濃度 (分別為 100、50、10、1 ng/μl 及 100、50、10、1 pg/μl 等), 以及 *Burkholderia cepacia* BCRC13208 之簡易萃取 DNA, 加入 PCR 各反應物, 使總反應體積為 20 μl, 分別依文獻所述之增幅條件進行 PCR, 反應後進行電泳分析, 以測試各引子組進行之專一性及靈敏度。

### 單一菌落快速檢測

修改 Wang<sup>(29)</sup>之簡易方法檢測單一菌落, 以滅菌過的牙籤沾取經純化後 BG4、BG12、BG14、BG18、BG23 等菌株之單一菌落, 放入含 50 μl 0.5 N NaOH 溶液之微量離心管中, 依前述方法萃得 DNA, 再以所設計之引子組 BGRPF3/BGRPR3 及文獻發表之引子組 CMG23-1/CMG23-2<sup>(1)</sup>進行 PCR 反應及電泳分析, 並比較其效果之差異。

### 應用 PCR 偵測蝴蝶蘭葉片人工接種細菌性葉斑病菌之組織

將蝴蝶蘭 BG9 等菌株在 NA 平板上培養 24 hr, 再以針刺法將菌泥接種於蝴蝶蘭葉片上, 置於室內觀察發病情形, 並於接種後 1-5 天期間每日採樣, 採樣部位包含發病組織與健康組織交界處之部位, 將採樣葉片組織切碎後以 1:10 加入無菌水並劇烈震盪, 取上清液依前述方法萃取 DNA, 取 10 μl 稀釋 10 倍後, 再取 2 μl 做為模板, 以引子組 BGRPF3/BGRPR3 進行 PCR 反應及電泳分析。

### 應用 PCR 偵測田間疑似細菌性葉斑病之蝴蝶蘭組織

於蝴蝶蘭園攜回疑似罹患葉斑病之蝴蝶蘭植株, 置放溫室內做為供試樣品, 每株均分別切取其葉片罹病組織, 將葉片組織切碎後以 1:10 加入無菌水並劇烈震盪, 取上清液依前述方法萃取 DNA, 稀釋 10 倍後, 再取 2 μl 做

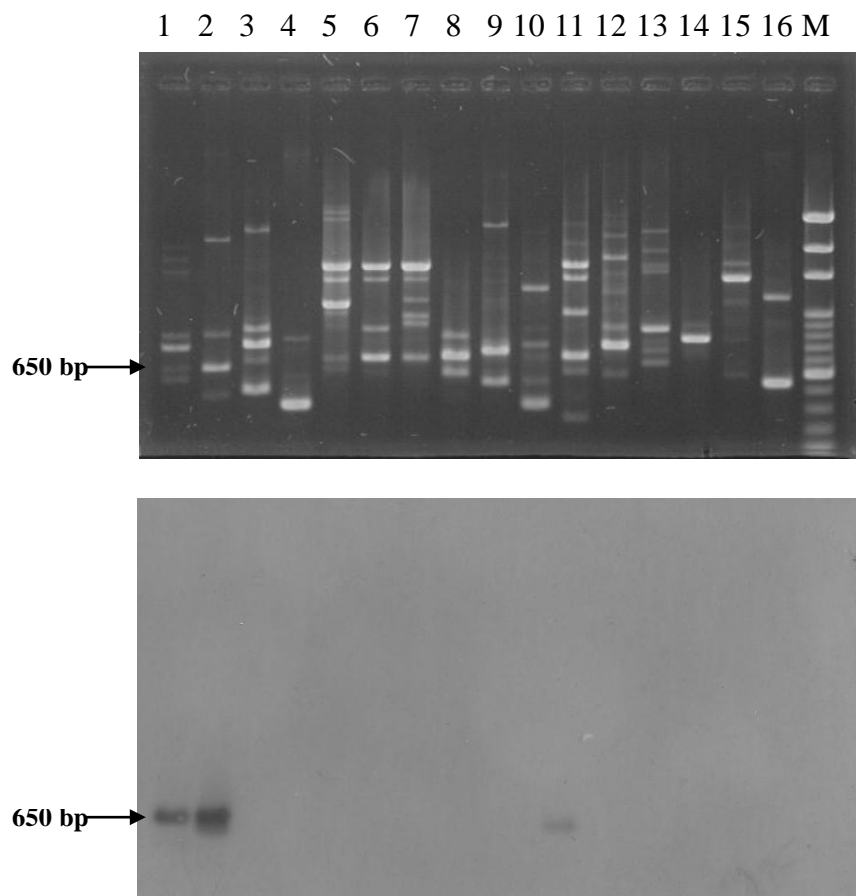
為模版, 以所設計之引子組 BGRPF3/BGRPR3 進行 PCR 反應及電泳分析。

## 結果

### 以 RAPD 選殖專一性 BG-T20-650 片段

以蝴蝶蘭葉斑病菌 BG4、BG9、BG12 及 BG23 等 4 株菌株之全 DNA 為模版 DNA, 與 OP 系列共 100 組隨機引子進行 RAPD 分析, 由結果得知, 其中 OPT-20 隨機引子組本實驗室所分離之 24 株確認具病原性之蝴蝶蘭 BG 菌株均可產生 650 bp 片段 (data not shown)。另將 OPT-20 與其他非標的細菌之全 DNA (表一) 為模版進行 RAPD 反應, 並以該 650 bp DNA 片段作為核酸探針以進行南方雜合法, 結果顯示此 650 bp 探針只與 BG 菌株及分離自鳳梨果腐之 BG 菌株有強度雜合訊號 (圖一 A、B), 因此可初步確認此 650 bp 片段確為 BG 菌株的共同片段, 且與其他非標的菌株經 OPT-20 RAPD 產生的片段都不同。

進一步將該片段選殖於 pCR<sup>®</sup> II-TOPO 載體, 定名為 pR13BG-650 bp, 進行轉形作用後得到帶有該片段之轉殖株, 經委託定序後, 將序列以 NCBI 比對結果顯示, 各選殖株嵌入之 650 bp DNA 片段之間皆具有 99% 以上之相同性 (identity), 且與其它已註冊其它生物 DNA 序列皆無相似序列。因此避開與其它生物相似的片段, 設計了 BGRPF3 及 BGRPR3 引子組, 之後進行適合的 PCR 條件測試。將此組引子與本實驗室收集之所有蝴蝶蘭及鳳梨等 BG 菌株與其他非標的菌株一起進行 PCR 反應, 其反應之增幅條件經試驗後設定為 (a) 95°C 1 min, 1 個循環; (b) 95°C 30 sec、60°C 30 sec、72°C 1 min, 30 個循環; (c) 72°C 5 min, 1 個循環, 電泳結果確認該引子組 BGRPF3/BGRPR3 對其他非標的菌株不會產生任何片段



圖一、(A) 以隨機引子 OPT-20 應用 RAPD 方法分析蝴蝶蘭葉斑病菌及其他供試細菌菌株之電泳圖譜。(B) 利用選殖自蝴蝶蘭葉斑病菌 BG 菌株的 T20BG-650 探針進行之南方雜合反應。1-2, 供試 *Burkholderia gladioli* BG 菌株 BG4、PA2；3-16, 供試非標的菌株 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*、*A. avenae* subsp. *citrulli*、*A. avenae* subsp. *cattleyae*、*Agrobacterium tumefaciens*、*Burkholderia andropogonis*、*B. glumae*、*B. cepacia*、*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*、*Pantoea ananatis*、*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*、*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*、*Ralstonia solanacerarum*、*Pa. dispersa* (BCRC 12189)、*X. campestris* pv. *campestris* (Xcc9901) 等其他非標的菌株。M 為 Bio 100 marker。

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis shows RAPD patterns of *Burkholderia gladioli* BG strains and other bacteria using OPT-20 random primer (A) and Southern hybridization of the RAPD products with T20BG-650 probe cloned from *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (B). Lanes 1 - 2, *B. gladioli* strain Bg4 and PA2; lanes 3 - 16, other non-targeted bacteria: *A. avenae* subsp. *avenae*, *A. avenae* subsp. *citrulli*, *A. avenae* subsp. *cattleyae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia andropogonis*, *B. glumae*, *B. cepacia*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pantoea ananatis*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, *Ralstonia solanacerarum*, *Pa. dispersa* (BCRC 12189), and *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc9901). M, Bio100 marker.

，且對實驗室所保存之 BG 菌株均可產生 350 bp 專一性片段 (data not shown)。

### BGRPF3/BGRPR3 引子組之專一性

以 BGRPF3/BGRPR3 引子組進行 PCR，測試 24 株來自蝴蝶蘭之 BG 菌株，結果顯示 24 株菌株均可增幅出 350 bp 之片段；並將 BG4、BG9、BG12 及 BG23

菌株的 DNA 分別加入等量的 Aaa、Aac、At、Ba、Bc、Bce、Pag、Pcc、Pch、Pa、Pc、Pss、Pf、Ppu、Psg、Psl、Psp、Pspi、Pst、Psto、Rs、Xad、Xav、Xca、Xcm、Xoo、Xoc、Xcc 等 8 屬 21 種，共 97 株供試非標的菌株 DNA 進行 PCR 反應，並不影響 BGRPF3/BGRPR3 引子組偵測蝴蝶蘭來源之 BG 菌株的專一性 (圖二)。若將菌量濃度較低 ( $10^6$  cfu/ml) 的 BG 菌株混雜菌量濃度較

高 ( $10^8$  cfu/ml) 之非標的細菌 (Aaa、Aac、Ba、Bce、*B. glumae*、Pa、Pan、Pd、Pc、RS、Xav、Xcm、Xcc 等 6 屬 13 菌株)，經簡易萃取 DNA 後再以 BGRPF3/BGRPR3 引子組進行 PCR 時，仍然只出現 BG 之專一性片段，確認所設計之引子組在樣品混雜其它非標的細菌時，對於 BG 菌株仍具專一性 (data not shown)。

### BGRPF3/BGRPR3 引子組之靈敏度

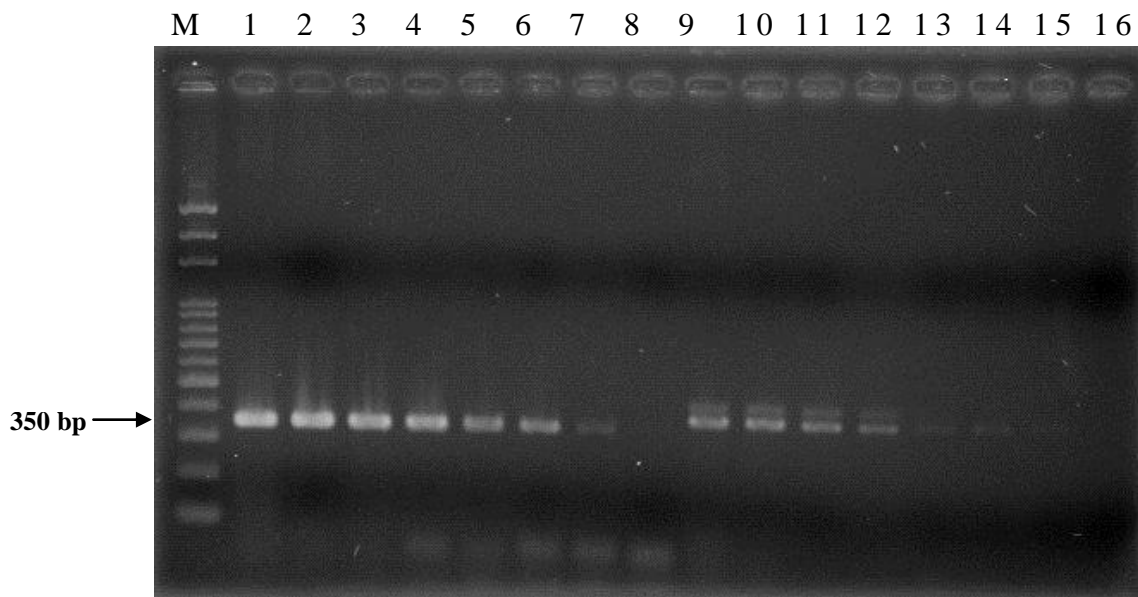
培養 BG4、BG9、BG12 及 BG23 菌株並抽取全 DNA 測試 BGRPF3/BGRPR3 引子組之靈敏度，最低可測到 10 pg 的 DNA；文獻引用之引子組 CMG23-1/CMG23-2<sup>(1)</sup> 進行 PCR，則在低於 1 ng DNA 就不會出現明顯的 388 bp 之標的產物，再以 BG4 菌株培養後之細菌懸浮液測試 BGRPF3/BGRPR3 該引子組之靈敏度，利用 0.5 N NaOH 溶液直接裂解供試細菌，使其溶出 DNA 的方式來偵測該引子組偵測供試菌液之靈敏度，PCR 反應結果顯示，所設計之引子組最低可偵測到  $1.87 \times 10^1$  cfu/ml 個細菌數。

### BG 引子組靈敏度及專一性

將供試蝴蝶蘭 BG9 菌株，以不同濃度的純化 DNA 測試文獻已發表之三組 BG 專一性引子組 GyRB-IDR/GyRB-IDF<sup>(18)</sup>、Uni-ITSF/Uni-ITSR<sup>(26)</sup>、CMG16-1/CMG16-2<sup>(1)</sup> 等以及本研究所設計之 BGRPF3/BGRPR3 引子組的靈敏度及專一性，比較結果顯示 GyRB-IDR/GyRB-IDF 及 Uni-ITSF/Uni-ITSR 之靈敏度皆可到 10 pg，但對 Bce 會產生多條產物 (data not shown)；CMG16-1/CMG16-2 引子組對 Bce 無產物，但其 DNA 靈敏度僅達 1 ng (data not shown)，而本研究所設計之 BGRPF3/BGRPR3 引子組不但靈敏度可達 10 pg (圖三)，且對 Bce 不會產生任何產物 (data not shown)，經比較結果顯示本研究所設計之 BGRPF3/BGRPR3 適合應用於 BG 病原菌之偵測。

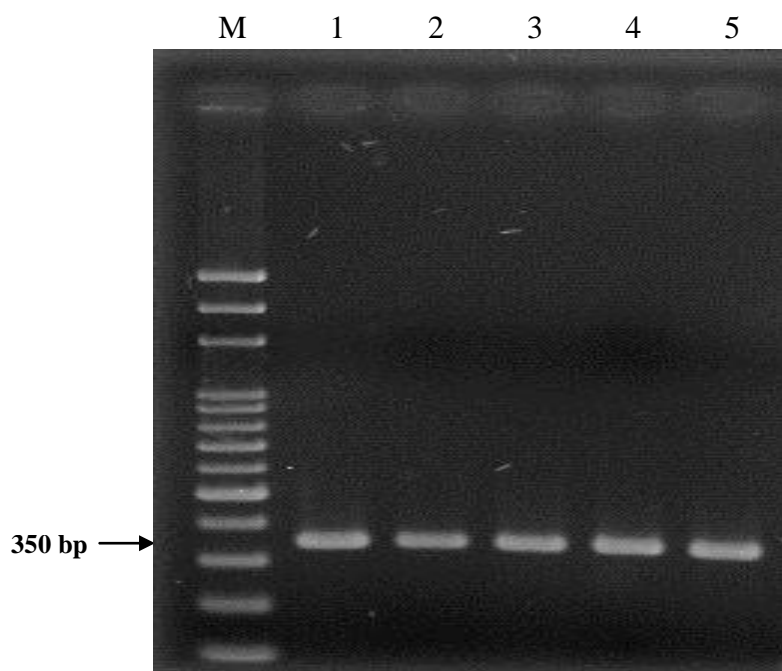
### 細菌性葉斑病菌菌落快速鑑定

各取 BG4、BG12、BG14、BG18、BG23 等菌株之單一菌落，利用 0.5 N NaOH 溶液簡單萃取 DNA，再以本研究所設計之引子組 BGRPF3/BGRPR3 進行 PCR 反



圖三、分別應用本研究開發之引子組 BGRPF3/BGRPR3 (350 bp) 及 CMG23-1/CMG23-2 (388 bp) [Bauernfeind *et al.*(1998)]，測試對 *Burkholderia gladioli* (BG) 菌株 DNA 之偵測效率。M 為 Bio 100 marker。1-8 分別為 *B. gladioli* BG4 之 DNA 100、50、10、1 ng 及 100、50、10、1 pg 等量以 BGRPF3/BGRPR3 進行 PCR 之結果，9-16 則為 BG4 之 DNA 100、50、10、1 ng 及 100、50、10、1 pg/ $\mu$ l 等濃度以 CMG23-1/CMG23-2 進行 PCR 結果。

Fig. 3. The detection limit of the primer pairs BGRPF3/BGRPR3 (350 bp) and the reported primers CMG23-1/CMG23-2 (388 bp) [Bauernfeind *et al.* (1998)] for *Burkholderia gladioli* strain BG4 DNA. M: Bio 100 marker; Lanes 1-8: respective DNA content is 100, 50, 10, 1 ng and 100, 50, 10, 1 pg with BGRPF3/BGRPR3 in PCR. Lanes 9-16: respective DNA content is 100, 50, 10, 1 ng and 100, 50, 10, 1 pg with CMG23-1/CMG23-2 in PCR.



圖四、以引子組 BGRPF3/BGRPR3 進行聚合酵素連鎖反應偵測 *Burkholderia gladioli* (BG) 菌株單一菌落之電泳圖譜。M 為 Bio 100 marker。1-5 為 BG4、BG12、BG14、BG18、BG23。

Fig. 4. Specific detection of *Burkholderia gladioli* (BG) strains by PCR with primer pair BGRPF3/BGRPR3. The DNA of individual colonies on agar plates was extracted with NaOH and used as templates for PCR. M: Bio 100 bp marker; Lanes 1-5, single colony of *B. gladioli* strains BG4, BG12, BG14, BG18, and BG23.

應，結果顯示供試之 BG 單一菌落，皆可在 350 bp 處形成條帶，因此該引子組確可應用於 BG 菌落之快速鑑定 (圖四)。

#### 應用 PCR 偵測蝴蝶蘭葉片人工接種細菌性葉斑病菌之組織

將經接種 BG9 菌株的蝴蝶蘭葉片，分別於接種後 1-5 日每日採樣，將採樣之組織液經簡易萃取法取得 DNA，再以 BGRPF3/BGRPR3 引子組進行 PCR，結果發現接種後 1-5 日採集的樣品皆可偵測到 BG，但第 5 日的樣品所產生之 BG 產物量較少 (data not shown)。另外 BG 接種之葉片，因環境條件之差異而有罹病程度之不同，自第 5 日起可分為未擴散 (環境乾燥) 及持續擴散 (環境潮溼) 兩種病徵 (如圖五)，未擴散之病徵於第 5 日已形成乾疽病斑，如上述在進行 PCR 時只形成微弱之標的產物，而持續擴散之病徵則於第 8 日仍可以 BGRPF3/BGRPR3 引子組進行 PCR 而得到清楚的 350 bp 產物。

#### 應用 PCR 偵測田間疑似細菌性葉斑病菌之蝴蝶蘭組織

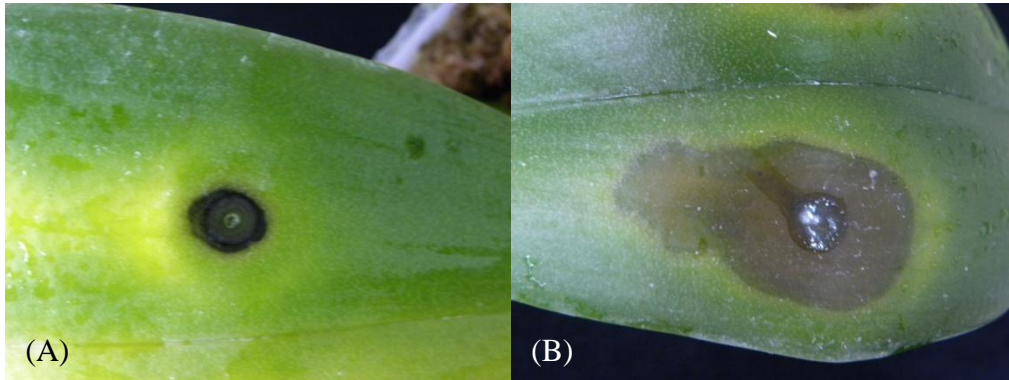
本研究在 99 年至嘉義大林蝴蝶蘭園採集疑似罹患葉

斑病之蝴蝶蘭，將罹病葉片部位之組織液經簡易萃取法取得 DNA，以 BGRPF3/BGRPR3 引子組進行 PCR，皆可得到清楚的 350 bp 產物，確認可以偵測到 BG 病原菌，顯示所設計之引子組能直接應用來偵測蝴蝶蘭植株內之細菌性葉斑病菌。

#### 討論

*Burkholderia gladioli* (BG) 除了是植物病原菌外，也是感染肺部囊狀纖維化症病人呼吸道之病原菌之一 (2, 12, 23)，國外已有多篇醫學方面文獻根據 BG 之 16S rRNA 基因保留序列設計專一性引子組來鑑定 (1, 18)，Su (26) 也是經由分離自蝴蝶蘭之 BG 病原菌之 ITR 序列設計專一性引子。經本研究室測試得知 Maeda (18) 等 Su (26) 所設計之 GyRB-IDR/GyRB-IDF、Uni-ITSF/Uni-ITSR 兩組引子因為對 *Bce* 會有產物，顯示其專一性不高的問題，推測因 Su (26) 僅針對 BG 菌株設計專一性引子，而未考慮到以 ITS 序列設計時，不容易與相近菌種區分。Bauernfeind (1) 等在開發 BG 的專一引子組時，即因考慮到可感染 CF 病人之病原菌，除了 BG 之外，還有 *B. cepacia* complex，因此在設計專一性引子組時就注意該引子組需可以將 BG 與 *B.*





圖五、將蝴蝶蘭葉片進行人工接種 *Burkholderia gladioli* BG9 菌株，觀察其罹病程度之差異，自第 5 日起可分為未擴散 (A) 及持續擴散 (B) 兩種病徵。

Fig. 5. The development of disease symptom on *Phalaenopsis* leaves that were artificially inoculated with *B. gladioli* strain BG9. At the 5<sup>th</sup> day post inoculation, the inoculation site developed to restricted (A) or expanded (B) symptom.

*cepacia* complex 明確區分。

筆者在進行蝴蝶蘭細菌性病害分離時，也發現在同一批罹病樣品中可同時分到 BG 與 Bce 兩種菌株的現象 (未發表)，顯示蝴蝶蘭可能為 BG 與 Bce 之共同寄主，因此 Maeda<sup>(18)</sup> 等及 Su<sup>(26)</sup> 所設計之 GyRB-IDR/GyRB-IDF、Uni-ITSF/Uni-ITSR 兩組引子組在應用於蝴蝶蘭的病害偵測方面，則會有專一性不高的疑慮，且會有蝴蝶蘭是感染 BG 還是感染 Bce 的困擾。

本研究應用 RAPD 技術，所設計出的 BGRPF3/BGRPR3 引子組，對供試之 Bce 菌株進行 PCR 時不會產生任何產物，且對 BG 只產生 350 bp 產物，證實 BGRPF3/BGRPR3 引子組在 BG 的專一性足夠。進一步將 BG 菌株與非標的菌株，包括其他植物病原細菌或土壤腐生菌 (表一) 之 DNA 及菌液混合時，只產生 BG 特有的 350 bp 專一性片段 (圖二)，而不會有任何其他非專一性片段產生，證明 BGRPF3/BGRPR3 引子組對標的菌 BG 具高專一性，且不受環境其他非標的病原菌或腐生細菌的影響。

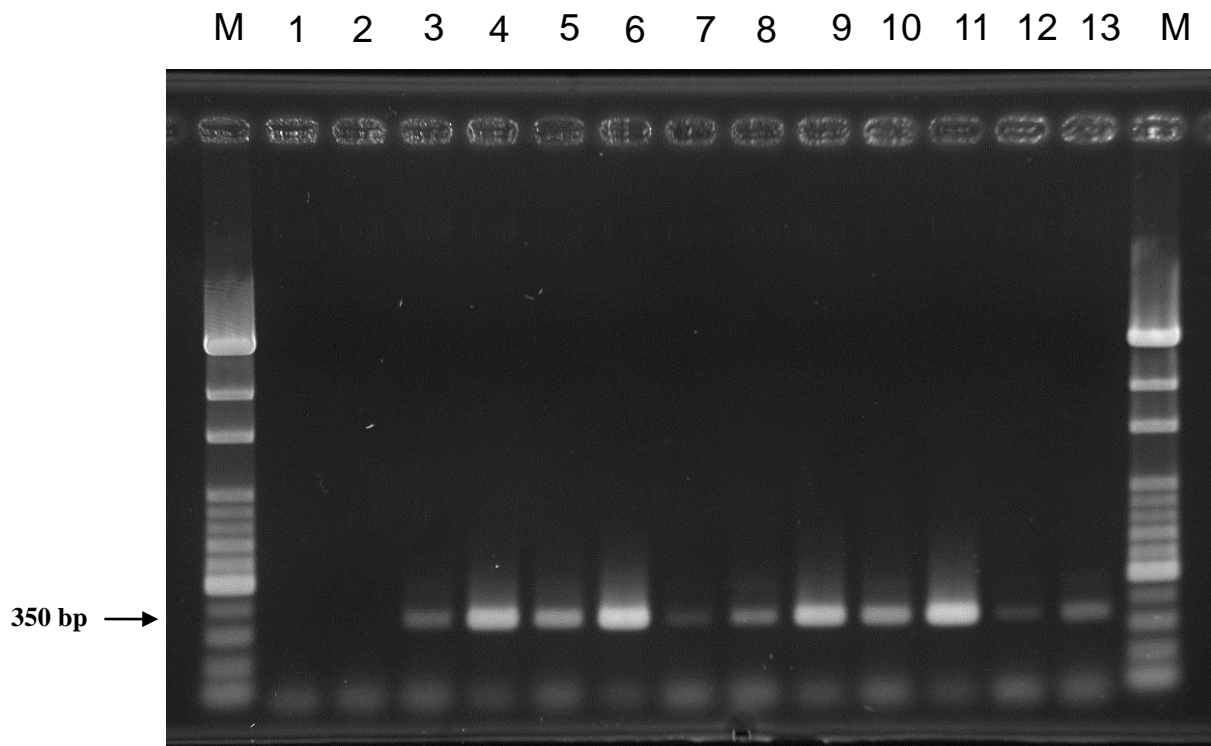
有關引子組靈敏度的報告，僅 Su<sup>(26)</sup> 提到其所開發之 Uni-ITSF/Uni-ITSR 引子組靈敏度可達 1 pg，經筆者進行 PCR 測試得知 GyRB-IDR/GyRB-IDF 及 Uni-ITSF/Uni-ITSR 之靈敏度皆可到 10 pg，與本研究開發之 BGRPF3/BGRPR3 引子組靈敏度相同，但 GyRB-IDR/GyRB-IDF 及 Uni-ITSF/Uni-ITSR 兩組引子組於 Bce 會有產物，專一性不高；而具專一性的 CMG16-1/CMG16-2 引子組的 PCR 靈敏度僅達 1 ng，由以上測試可知，本研究所設計之引子組

BGRPF3/BGRPR3，具有良好的靈敏度及專一性。關於菌液靈敏度測試方面，Ha 等人<sup>(6)</sup>所設計的引子組偵測 *A. avenae* subsp. *citrulli* 可達 10 cfu/ml 的靈敏度，Hseu 等人<sup>(9)</sup>開發之 Ec3F/Ec4R 引子組偵測 Pcc 及 Pch 則需  $1.1 \times 10^1$  cfu/ml 菌液細胞數就可測得；Song 等人<sup>(24)</sup>針對 *A. avenae* subsp. *avenae* 設計引子組進行 nested-PCR 可測得之靈敏度為 1-2 cfu/ml；而本研究所設計 BGRPF3/BGRPR3 引子組只需  $1.87 \times 10^1$  cfu/ml 細胞數即可有反應產物。當引子組用於田間樣品之偵測時，其靈敏度是相當重要的，本研究所設計 BGRPF3/BGRPR3 引子組與其他研究之引子組比較，具有良好之靈敏度，因此僅取在 NA 上培養 24 hr 的 BG 單一菌落，經簡易萃取法取得的 DNA，再以 BGRPF3/BGRPR3 引子組進行 PCR，即可得到專一的 350 bp 片段。

為了確認 BGRPF3/BGRPR3 引子組偵測的靈敏度與 BG 在蝴蝶蘭寄主發病病徵之關係，本研究以人工接種法將 BG9 菌株接種於蝴蝶蘭葉片，並於接種後 1-5 日各取距接種處 0.5 cm 處採樣，由結果得知 BG 接種 24 hr 內即產生褐化黃暈之壞疽，較 AAC 菌株快且明顯<sup>(11)</sup>；於接種後 1-5 日每日取下壞疽組織與健康組織交界處，經簡易萃取之 DNA 以 BGRPF3/BGRPR3 引子組進行 PCR，皆可得到 350 bp 專一產物，顯示 BGRPF3/BGRPR3 引子組偵測 BG 的效果頗佳。自接種後第 5 日開始，樣品病徵可分為未擴散及持續擴散兩種情形；將未擴散病徵及持續擴散之樣品，在接種後第 8 日時，採樣進行 PCR，兩者皆可產生專一性片段，同時將上述樣品應用 NA 培養基分離時，未擴散病徵之樣品已

無標的菌落產生 (因活菌量甚少難以培養), 擴散病徵之樣品則有很多雜菌產生 (因病徵發展至後期時, 會有其它腐生菌附著其上), 須依賴時間及經驗再挑選純化, 花費時間及人力甚多。因此由此接種結果顯示, 將本研究所設計 BGRPF3/BGRPR3 引子組進行 PCR 檢測 BG, 不僅

快速且準確性高, 而且敏感度也優於傳統組織分離方法, 且應用 PCR 快速檢測方法可在 3~4 hr 內即可完成檢測步驟, 既省時且省力。



圖二、以引子組 BGRPF3/BGRPR3 測定蝴蝶蘭細菌性葉斑病菌 BG12 菌株 DNA 與其他供試非標的菌株 DNA 混合後之電泳圖譜。1: 負控制組; 2: *Burkholderia cepacia*; 3-13, BG 12 依序分別 1:1 混合: 3 混勻 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*、*A. avenae* subsp. *citrulli*、*A. avenae* subsp. *cattleyae*; 4 混勻 *Agrobacterium tumefaciens*; 5 混勻 *Burkholderia andropogonis*、*B. caryophylli*、*B. cepacia*、*B. glumae*; 6 混勻 *Pantoea agglomerans*、*P. ananatis*; 7 混勻 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*、*P. chrysanthemi*; 8 混勻 *Pseudomonas aeruginosa*、*P. syringae* pv. *syringae*、*P. cichorii*; 9 混勻 *P. fluorescens*、*P. putida*、*P. syringae* pv. *glycinea*; 10 混勻 *P. syringae* pv. *lachrymans*、*P. syringae* pv. *phaseolicola*、*P. syringae* pv. *pisi*; 11 混勻 *P. syringae* pv. *tabaci*、*P. syringae* pv. *tomato*、*Ralstonia solanacearum*; 12 混勻 *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*、*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*、*X. campestris* pv. *armoraciae*; 13 混勻 *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*、*X. oryzae* pv. *oryzae* 等非標的菌株。M: Bio 100 marker。

Fig. 2. PCR amplification with the primer pair BGRPF3/BGRPR3 using mixed DNA containing *Burkholderia gladioli* BG12 DNA and the DNA extracted from non-targeted bacteria. Lane 1, negative control; Lane 2, *Burkholderia cepacia*; Lanes 3-13, the mixture of *Burkholderia gladioli* BG12 DNA with the DNA of non-targeted bacteria at 1:1 ratio (v/v) is used as DNA templates for PCR. The loading sequence of the non-targeted bacteria used in the experiment is listed as following: 3, the mixture of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *A. avenae* subsp. *citrulli* and *A. avenae* subsp. *cattleyae*; 4, *Agrobacterium tumefaciens*; 5, *B. andropogonis*, *B. caryophylli*, *B. cepacia*, and *B. glumae*; 6, *Pantoea agglomerans* and *Pa. ananatis*; 7, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pe. chrysanthemi*; 8, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. syringae* pv. *syringae* and *P. cichorii*; 9, *P. fluorescens*, *P. putida*, and *P. syringae* pv. *glycinea*; 10, *P. syringae* pv. *lachrymans*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, and *P. syringae* pv. *pisi*; 11, *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *tomato*, and *Ralstonia solanacearum*; 12, *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, and *X. campestris* pv. *armoraciae*; 13, *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* and *X. oryzae* pv. *oryzae*. M, Bio 100 bp marker.

在探討 BGRPF3/BGRPR3 引子組於田間之應用方面，筆者於民國 99 年自彰化大村、嘉義大林及民雄地區等蘭園，採集葉片呈褐化壞疽斑或全葉黃化之蝴蝶蘭樣品，取其病徵處經簡易萃取 DNA，應用 BGRPF3/BGRPR3 引子組進行 PCR，並於 3~4 小時內完成檢測，確定有 3 件樣品病徵為 BG 所引起。

綜合本研究結果顯示，所開發之 BGRPF3/BGRPR3 引子組確實可應用蝴蝶蘭細菌性病害之檢測，快速又簡便，尤其是在處理大量樣品的時候，可解決傳統分離及生理生化測試所需費時耗力的問題。目前國外已有多篇文獻以引起同一寄主之多種病原菌應用多套式 (Multiplex) PCR 來進行快速檢測的研究<sup>(4,18,2)</sup>，因此未來可望將 BGRPF3/BGRPR3 引子組配合應用本研究室所開發的 ECH<sup>(9)</sup>、AAC<sup>(11)</sup>之引子組，同時進行多套式 (Multiplex) PCR，配合蝴蝶蘭種苗及盆苗進行出口前之檢疫，以確保我國蝴蝶蘭之出口品質，使我國在蝴蝶蘭外銷國際市場上能穩定而持續的發展。

### 引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Bauernfeind, A., Schneider, I., Jungwirth, R., and Roller, C. 1998. Discrimination of *Burkholderia gladioli* from other *Burkholderia* species detectable in cystic fibrosis patients by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2748-2751.
2. Christenson, J. C., Welch, D. F., Mukwaya, G., Muszynsky, M. J., Weaver, R. E., and Brenner, D. J. 1989. Recovery of *Pseudomonas gladioli* from respiratory tract specimens of patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 27: 270-273.
3. Chuenchitt, S., Dhirabhava, W., Karnjanarat, S., Buangsuwon, D., and Uematsu, T. 1983. A new bacterial disease on orchids *Dendrobium* sp. caused by *Pseudomonas gladioli*. *Kasetsart. J.* 17: 26-36.
4. Diallo, S., Latour, X., Groboillot, A., Smadja, B., Copin, P., Orange, N., Feuilloley, G. J. F., and Chevalier, S. 2009. Simultaneous and selective detection of two major soft rot pathogens of potato: *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* subsp. *atrosepticum*) and *Dickeya* spp. (*Erwinia chrysanthemi*). *Eur. J. Plant. Pathol.* 125: 349-354.
5. Furuya, N., Ura, H., Iiyama, K., Matsumoto, M., Takeshita, M., and Takanami, Y. 2002. Specific oligonucleotide primers based on sequences of the 16S-23S rDNA spacer region for the detection of *Burkholderia gladioli* by PCR. *J. Gen. Plant Pathol.* 68: 220-224.
6. 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 seedlots using magnetic capture hybridization and real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 99: 666-678.
7. Hseu, S. H. 1994. The bacterial diseases of flower and ornamental foliage plants in Taiwan. The Plant Protection Society of the Republic of China Special Publication New 2: 63-75. (in Chinese with English abstract)
8. Hseu, S. H., Shentue, H., and Lin, C. Y. 2006. Development of specific PCR primers for identification of *Pseudomonas cichorii*. *Plant Pathol. Bull.* 15: 275-285.
9. Hseu, S. H., Shentue, H., Tzeng, K. C., and Lin, C. Y. 2007. Development of specific primers for differential identification pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Pathol. Bull.* 16: 19-29.
10. Hseu, S. H., Zeng, W. F., Lai, W. C., Pan, Y. P., and Lin, C. Y. 2008. Fruit rot disease of pineapple caused by *Burkholderia gladioli*. *Plant Pathol. Bull.* 17: 157-167.
11. Hseu, S. H., Sung, C. J., and Shentue, H. 2011. Development of specific PCR primers for *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*. *Plant Pathol. Bull.* 20: 64-76
12. Jiao, Z., Kawamura, Y., Mishima, N., Yang, R., Li, N., Liu, X., and Ezaki, T. 2003. Need to differentiate lethal toxin-producing strains of *Burkholderia gladioli*, which cause severe food poisoning: Description of *B. gladioli* pathovar *cocovenans* and an emended description of *B. gladioli*. *Microbiol. Immunol.* 47: 915-925.
13. Keith, L. M., Sewake, K. T., and Zee, F. T. 2005. Isolation and characterization of *Burkholderia gladioli* from orchids in Hawaii. *Plant Dis.* 89: 1273-1278.
14. Lee, C. J., Lee, J. T., Kwon, J. H., Kim, B. C., and Park, W. 2005. Occurrence of bacterial soft rot of onion plants caused by *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* in Korea.

- Australasian plant pathol. 34: 287-292.
15. Li, T. S. C., and Sholberg, P. L. 1992. *Pseudomonas* like early blight on sweet cherries. *Can. Plant Dis. Surv.* 72: 121-122.
  16. Lin, Y. T. 2010. Characterization of the causal agent of bacterial decay on king oyster mushroom, *Burkholderia gladioli*, and phenotypic and genotypic analyses of *B. gladioli* strains isolated from different sources. Graduate Institute of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Master Thesis 69 pp. (Taiwan, R. O. C.)
  17. Lincoln, S. P., and Fermor, T. R. 1991. Bacterial soft rot of *Agaricus bitorquis*. *Plant pathol.* 40: 136-144.
  18. Maeda, Y., Shinohara, H., Kiba, A., Ohnishi, K., Furuya, N., Kawamura, Y., Ezaki, T., Vandamme, P., Tsushima, S., and Hikichi, Y. 2006. Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* us *gyrB* and *rpoD* sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1031-1038.
  19. McCulloch, L. 1921. A bacterial disease of gladiolus. *Science* 54: 115-116.
  20. Özdemir, Z. 2009. Development of a multiplex assay for the simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* using pure cultures. *Journal of Plant Pathology* 91: 495-497.
  21. Sambrook, J., Mantis, T. I., and Fritsch, E. F. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Press, N. Y.
  22. Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 3<sup>rd</sup> ed., APS Press. Minnesota, 373 pp.
  23. Shin, J. H., Kim, S. H., Shin, M. G., Suh, S. P., Ryang, D. W., and Jeong, M. H. 1997. Bacteremia due to *Burkholderia gladioli*: case report. *Clin. Infect. Dis.* 25: 1264-1265.
  24. Song, W. Y., Kim, H. M., Hwang, C. Y., and Schaad, N. W. 2004. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR. *J. Phytopathol.* 152: 667-676.
  25. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503.
  26. Su, P. Y. 2009. Development of PCR detection of phytopathogenic bacteria in *Phalaenopsis* orchids. Graduate Institute of Medical Biotech, Chung Hwa University of Medical Technology Master Thesis 85 pp. (Taiwan, R. O. C.)
  27. Sung, I. H., Wu, Y. F., Chen, Y. H., Chen, S. C., Lin, M. Y., Chen, S. K., and Cheng, A. S. 2006. The symptom of collapse of *Phalaenopsis* flowers in an environmentally controlled greenhouse. *Plant Prot. Bull.* 48: 65-70.
  28. Ura, H., Furuya, N., Iiyama, K., Hidaka, M., Tsuchiya, K., and Matsuyama, N. 2006. *Burkholderia gladioli* associated with symptoms of bacterial grain rot and leaf-sheath browning of rice plants. *J. Gen. Plant Pathol.* 72: 98-103.
  29. Wang, H., Qi, M., and Cutler, A. J. 1993. A simple method of preparing plants samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21: 4153-4154.
  30. Whitby, P. W., Pope, L. C., Carter, K. B., Lipuma, J. J., and Terrence, L. S. 2000. Species-Specific PCR as a tool for the identification of *Burkholderia gladioli*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 282-285.
  31. Yang, T. C. 2005. Study of incidences and control of major pests on bird nest fern, *Asplenium spp.* In Hualien area. *Bull. Hualien DAIS.* 23: 31-36. (in Chinese with English abstract)

**ABSTRACT**

Hseu, S. H.,<sup>1,3</sup> Shentu, H.,<sup>2</sup> and Sung, C. J.<sup>1</sup> 2011. A specific primer pair for diagnosis and detection of bacterial leaf spot pathogen *Burkholderia gladioli* of *Phalaenopsis* orchid. Plant Pathol. Bull. 20: 39-51. (<sup>1</sup> Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Fengshan, Kaohsiung, Taiwan, R.O.C.; <sup>2</sup> Department of Plant Quarantine, Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Hsinchu, Taiwan, R.O.C.; <sup>3</sup> Corresponding author, E-mail: shhseu@fthes-tari.gov.tw)

Bacterial leaf spot disease, caused by *Burkholderia gladioli* (BG), is a new bacterial disease on the *Phalaenopsis* cultivation in Taiwan. In this study, a highly specific primer pair was developed for diagnosis and detection of the pathogen. Totally one hundred random primers were used to find specific DNA fragments of BG, and a specific DNA fragment of 650 bp amplified by the primer OPT-20 was identified and cloned into the pCR<sup>®</sup> II-TOPO vector. The specific DNA fragment of 650 bp was sequenced, and the specific primer pair BGRPF3/BGRPR3 was designed from the sequences for BG identification and detection. In order to elucidate the specificity of the primer pair, totally 97 non-BG bacterial isolates, representing eight genera and twenty-one species, were used for further testing. The results showed that only BG could produce a unique 350 bp fragment. Detection sensitivity of BG using PCR was between 10 pg for purified DNA and  $1.87 \times 10^1$  cfu/ml for cultured cells, and the sensitivity and specificity were not affected when BG cells were mixed with other non-target bacteria. The detection time for identifying BG cells by PCR with BGRPF3/BGRPR3 primers took only 3 ~ 4 hours. The primer pair was further used for detection BG on infested *Phalaenopsis* orchids and proved to be equally effective.

Keywords: *Phalaenopsis*, *Burkholderia gladioli*, primer, diagnosis, identification, detection