

# 蝴蝶蘭細菌性褐斑病菌 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* 專一性引子之開發

許秀惠<sup>1,3</sup> 宋嘉仁<sup>1</sup> 申屠萱<sup>2</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 22 日

## 摘要

許秀惠、宋嘉仁、申屠萱. 2011. 蝴蝶蘭細菌性褐斑病菌 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* 專一性引子之開發. 植病會刊 20: 52-64.

以 80 個隨機引子應用隨機增幅多型性核酸技術 (RAPD) 增幅並篩選出對蝴蝶蘭褐斑病菌 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (AAC) 共有之 567 bp 的專一性片段, 進一步將該片段接入 TOPO 選殖載體 pCR<sup>®</sup> II-TOPO 得到選殖株, 並分析其核酸序列, 再根據其序列設計出對 AAC 具專一性之引子組 Ac46f/Ac46r。應用此引子組進行聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR), 供試 144 株褐斑病菌皆能增幅出 463 bp 的片段, 但對供試之 8 屬 20 種共 119 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。以 Ac46f/Ac46r 引子組測試細菌性褐斑病菌 DNA, 其靈敏度可達 10~50 pg, 菌落偵測之靈敏度則為 5.8 ~ 7.5×10<sup>1</sup> cfu/ml 個活菌數。將 10<sup>6</sup> cfu/ml 的 AAC 菌液分別與其他細菌之菌液 10<sup>5</sup>~10<sup>8</sup> cfu/ml 等比率混合後再進行聚合酵素連鎖反應並不影響 AAC 之偵測結果。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褐斑病菌。將所設計之引子組應用於人工接種褐斑病菌之偵測以及田間蝴蝶蘭褐斑病樣品中褐斑病菌之偵測均具準確性, 顯示本研究所設計之引子組 Ac46f/Ac46r 可用於蝴蝶蘭細菌性褐斑病菌快速診斷鑑定及檢測。

關鍵詞: 蝴蝶蘭、細菌性褐斑病菌、引子、診斷、鑑定、偵測

註記: 本研究中開發之 AAC 專一性引子組 Ac46f/Ac46r 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

蝴蝶蘭的外形優美典雅, 廣受世人喜愛, 為重要的觀賞花卉, 在台灣已有多年的栽培歷史, 民國 90 年前外銷產值僅 36 萬台幣<sup>(1)</sup>, 但近年來政府致力擴展外銷, 民國 92 年後外銷產值顯著成長<sup>(1)</sup>, 包括盆苗、種苗及切花已

達 20 億台幣<sup>(14)</sup>, 加上台灣蝴蝶蘭的栽培及改良技術優良, 以及農民的積極投入, 使得蝴蝶蘭產業蓬勃發展, 但台灣屬高溫多濕環境又是以較密集方式栽培, 造成蝴蝶蘭細菌性病害也隨之增加。國內已知的蝴蝶蘭細菌性病害包括由 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (AAC) 所引起的褐斑病, 由 *Burkholderia gladioli* (BG) 所引起的葉斑病及消蕾的問題<sup>(11,22,25)</sup>, 以及由 *Pectobacterium chrysanthemi*

(PCH) 所引起的軟腐病等,其中細菌性褐斑病主要危害蘭科植物,包括嘉德利雅蘭、石斛蘭、拖鞋蘭、文心蘭、狐狸尾蘭、千代蘭及蝴蝶蘭等<sup>(9)</sup>,發生地區除了台灣<sup>(9)</sup>、中國<sup>(4)</sup>、菲律賓<sup>(5)</sup>等熱帶國家外,美國佛羅里達州<sup>(12)</sup>、加州<sup>(2)</sup>、義大利<sup>(17)</sup>、澳洲<sup>(20)</sup>及印度<sup>(3)</sup>等蝴蝶蘭生產的國家也有危害報告,顯示該病害是全世界蘭花栽培之重要病害。褐斑病菌主要是由傷口或自然開口侵入,病徵會因環境差異而有所差別<sup>(2,9,12,17)</sup>。台灣的蝴蝶蘭大多在溫室栽培,其適合蝴蝶蘭生長的溫度及濕度都很適合褐斑病菌繁殖,且潛伏在蝴蝶蘭種苗上之病原菌亦會常因出口貯運環境而出現病徵,導致蝴蝶蘭遭退貨而造成農民損失,因此建立一個快速且準確的檢測方法,讓農民能在蝴蝶蘭種苗及盆苗出口前施與正確且適當的防治處理,可確保出口品質優良。

近年來,分子生物技術發展極快速,設計偵測專一性引子的方法包括應用病原菌已知的特定基因序列來設計專一性片段<sup>(16,21)</sup>,或應用保留性高的 16S-23S rRNA 基因間的 ITS (internal transcribed spacer) 來針對特定病原菌搜尋專一性片段<sup>(18, 21, 24)</sup>,以及應用 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 技術自特定病原菌篩選出特有的專一性片段<sup>(7, 8, 22)</sup>。其中應用 RAPD 技術來篩選專一性片段需有大量樣本方可確保特有片段的專一性,筆者自民國 91-99 年間分別於台中、嘉義、屏東等地區收集蝴蝶蘭褐斑病菌,共計 144 菌株,應用 RAPD 技術篩選專一性片段來設計專一性引子,目前聚合酶連鎖反應技術的產物再現性及正確性都大幅提升,若能應用該技術建立褐斑病病原菌之檢測技術,對於蝴蝶蘭檢疫、防治及出口品質應有幫助。

## 材料與方法

### 菌株來源

民國 91-99 年間分別至台中、嘉義、屏東等地區之蘭園採集疑似罹患細菌性褐斑病之蝴蝶蘭植株,攜回實驗室進行組織分離,分離所得之菌株經柯霍氏法則及菸草過敏反應確認具病原性後,依 Jones 等<sup>(10)</sup>所述進行生理生化測定,得知這些菌株皆為桿狀具極生 1~2 根鞭毛,好氣菌,King's B 培養基上不會產生螢光色素,在 YDC 培養基上呈粘稠狀<sup>(27)</sup>,且具有氧化酶活性,確認這些菌株皆為 AAC,並分別以 Pha 編號,共得 144 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來自中興大學植物病理系(細菌研究室)的菌株,共計 8 屬 20 種 119 株(如表一),其中 AAC 13202、*Burkholderia cepacia* (Bce) 13208、*Pseudomonas cichorii* (Pc) 12682、*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Xcm) 13182 等標準菌株購自財團法人食品工業發展研究所。

### 細菌全 DNA 之抽取

純化分離來自蝴蝶蘭的 144 株 AAC 供試菌株,先以 5 ml 之 LB broth 在 30°C 下震盪培養 16 小時,再依 Sambrook 等<sup>(15)</sup>及 Hseu 等人<sup>(7, 8)</sup>所述進行細菌全 DNA 之抽取,抽取之 DNA 溶解後置 -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 等人<sup>(7, 8)</sup>所述進行,抽取之 DNA 置 -30°C 保存備用。

### RAPD 增幅反應及專一性引子之篩選

取 AAC 菌株 Pha 9172、Pha 9308、Pha 9513 及 Pha 9712 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 及 OPX 01~20 等 80 個隨機引子依 Hseu 等人<sup>(7, 8)</sup>所述進行 RAPD 反應,根據電泳結果初步對篩選出 AAC 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 AAC 菌株與其他細菌所增幅出之 DNA 片段之異同,藉以篩選出對 AAC 菌株產生專一性 DNA 片段之引子。

### 專一性 DNA 片段回收、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,放到 Ultrafree<sup>®</sup>-DA (MILLIPORE, USA) Kit 組所附之 Gel Nebulizer、Ultrafree-MC 及 Vial 組合中,依 Hseu 等人<sup>(7, 8)</sup>所述進行專一性 DNA 片段之回收及純化,並將回收好的 DNA 以 Dig high prime DNA Labeling and detection starter Kit II (Roche) 將該 DNA 片段依廠商建議之步驟製作成核酸探針,之後保存於 -30°C,以備後續進行核酸雜合反應。

表一、供 RAPD 及 PCR 試驗之 8 屬、20 種、119 株非標的細菌菌株。

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

Bacterial name	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>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> pv. <i>gladioli</i>	Bgg
<i>B. gladioli</i>	PA1-26、28、Bg1-24
<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>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>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>(19)</sup>之方法，將瓊脂凝膠上的 DNA 轉漬於尼龍濾膜上。首先以 AAC 菌株 Pha 9172、Pha 9308、Pha 9513 及 Pha 9712 等 4 株菌株及其他供試細菌 DNA 為模版，以 OPR-2 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 (Roche) 套組，依廠商建議之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 產品說明及 Hseu 等人<sup>(7, 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 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。

### 引子組專一性測定

**DNA 專一性測試：**分別抽取供試之 144 株來自蝴蝶蘭 AAC 菌株之 DNA，以及 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Aaa)、*A. avenae* subsp. *citrulli* (Aac)、*Agrobacterium tumefaciens* (At)、*Burkholderia andropogonis* (Ba)、*B. caryophylli* (Bc)、*B. cepacia* (Bce) 13208、*B. gladioli* (BG)、*B. gladioli* pv. *gladioli* (Bgg)、*B. glumae* (Bgl)、*Pantoea agglomerans* (Pag)、*Pa. ananatis* (Pan)、*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc)、*Pe. chrysanthemi* (PCH)、*Pseudomonas aeruginosa* (Pae)、*P. cichorii* (Pc)、*P. syringae* pv. *syringae* (Pss)、*P. fluorescens* (Pf)、*P. putida* (Ppu)、*P. syringae* pv. *glycinea* (Psg)、*P. syringae* pv. *lachrymans* (Psl)、*P. syringae* pv. *phaseolicola* (Psp)、*P. syringae* pv. *pisi* (Pspi)、*P. syringae* pv. *tabaci* (Psta)、*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) 13182、*X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo)、*X. oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) 等 8 屬 20 種共 119 株供試非標的菌株 (表一) 之 DNA，並依上述增幅條件進行 PCR，反應後進行電泳分析，以測試引子組 Ac46f/Ac46r 偵測 AAC 菌株 DNA 之專一性。

**非標的菌株 DNA 干擾專一性測試：**將供試 AAC Pha 9513 菌株之 DNA 與上述非標的菌株之 DNA 各自以等比例混合 (每管加入 2-3 株非標的菌株)，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 Ac46f/Ac46r 對供試 AAC 菌株之 DNA 是否仍具專一性。

**非標的菌株菌液干擾專一性測試：**將 AAC Pha 9513 菌株分別在 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 Aaa、Ba、Bce、Bg、PCH、Xad、Xca、Xcm、Xoo、Xoc 等 4 屬 10 株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 Pha 9513 菌液  $10^6$  cfu/ml 以等比例混合後，取菌液以 Hseu 等人<sup>(7)</sup>之簡易法萃取 DNA，並以 Ac46f/Ac46r 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 Ac46f/Ac46r 偵測 AAC 之專一性。

### 引子組靈敏度測定

**DNA 靈敏度測定：**分別將供試 AAC 菌株 Pha 9172、Pha 9308、Pha 9513 及 Pha 9712 之 DNA 分別取 100、10、1 ng 及 100、50、10、5、1、0.5 pg 等 DNA 量，加入 PCR 各反應物，使總反應體積為 20  $\mu$ l，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 Ac46f/Ac46r 偵測 AAC 菌株 DNA 之靈敏度。

**菌液靈敏度測定：**將 AAC 菌株 Pha 9172、Pha 9308、Pha 9513 及 Pha 9712 於 NA 上培養 24 hr 後，以無菌水懸浮並調整其 OD<sub>620nm</sub> 之讀值為 0.3 (約  $10^8$  cfu/ml)，以 10 倍系列稀釋，使濃度約為  $10^1 \sim 10^7$  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 Ac46f/Ac46r 為引子組進行 PCR 與電泳分析以測試引子組之靈敏度。

### 單一菌落快速檢測

修改 Wang<sup>(26)</sup>之簡易方法，用來檢測未知的單一菌落中若含有 AAC 是否可利用所設計的引子組快速偵測，

因此以滅菌過的牙籤各別沾取 AAC13202, AAC 菌株 Pha 9172、Pha 9205、Pha 9305、Pha 9308、Pha 9505、Pha 9513、Pha 9707 及 Pha 9711 等菌株, 經純化後的單一菌落, 放入含 50  $\mu$ l 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 Ac46f/Ac46r 進行 PCR 反應及電泳分析。

### 應用 PCR 偵測蝴蝶蘭葉片人工接種細菌性褐斑病菌之組織

將 AAC 菌株 Pha 9806 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 1-7 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, 以及距交界處 0.5 cm 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, 經稀釋 10 倍後, 再取 2  $\mu$ l 做為模板, 以引子組 Ac46f/Ac46r 進行 PCR 反應及電泳分析。

### 應用 PCR 偵測田間蝴蝶蘭疑似細菌性褐斑病組織

至台南市麻豆區蝴蝶蘭園攜回疑似罹患褐斑病之蝴蝶蘭植株, 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  $\mu$ l 做為模板, 以所設計之引子組 Ac46f/Ac46r 進行 PCR 反應及電泳分析。

## 結 果

### 以 RAPD 選殖專一性 AAC-R2-567 片段

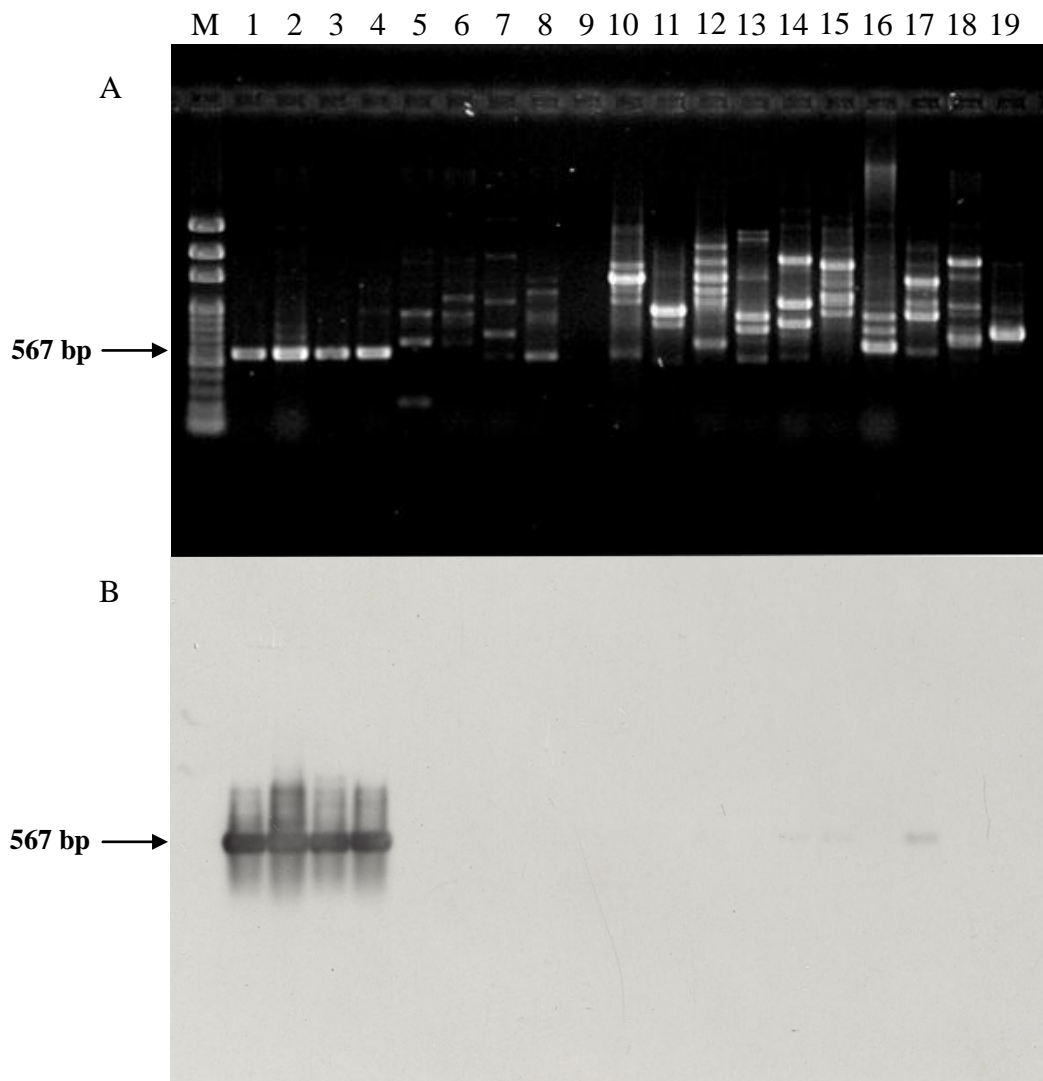
以 AAC 菌株 Pha 9172、Pha 9308、Pha 9513 及 Pha 9712 等 4 株菌株之全 DNA 為模板 DNA, 與 OP 系列共 80 組隨機引子進行 RAPD 分析, 由結果得知, 其中 OPR-02 隨機引子組本實驗室所分離之 144 株確認具病原性之蝴蝶蘭 AAC 菌株均可產生 567 bp 片段 (Data not shown); 再將 OPR-02 與其他非標的細菌之全 DNA (表一) 為模版進行 RAPD 反應, 並以該 567 bp 全 DNA 片段作為核酸探針以進行南方雜合法, 結果顯示此 567 bp 探針只與 AAC 菌株有強度雜合訊號 (圖一 A, B), 因此可初步確認此 567 bp 片段確為 AAC 的共同片段, 且與其他非標的菌株經 OPR-02-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

pR02-AAC-567 bp, 進行轉型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 567 bp DNA 片段皆具有 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; 但以 SDSC Biology Workbench (加州大學之聖地牙哥分校高速電腦中心) 之 (Basic Local Alignment Search Tool) 進行序列比對發現, 位於 204~222 bp 片段序列與 *Burkholderia glumae* BGR1 chromosome 1 之 complete sequence CP001503, 以及 *Acidovorax* sp. JS42 之 complete genome CP000539 之片段相同, 位於 293~315 bp 片段序列與 *Pseudomonas fluorescens* SBW25 complete genome AM181176 相同, 位於 358~378 bp 片段序列與 *Ps. putida* GB-1 complete genome CP000926 相同。因此, 避開與上述其它生物相似的片段, 利用 Vector NTI suite 8 (InforMax) 分別設計 Ac46f (正向引子) 及 Ac46r (反向引子), 之後進行適合的 PCR 條件測試。將此 4 條引子搭配組合並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、62°C 30 sec、72°C 1 min, 30 個循環; (c) 72°C 5 min, 1 個循環, 反應結果確認引子組 Ac46f/Ac46r, 對其他非標的菌株不會產生任何片段, 且對實驗室所保存之 144 株 AAC 菌株均可產生 463 bp 專一性片段 (Data not shown)。

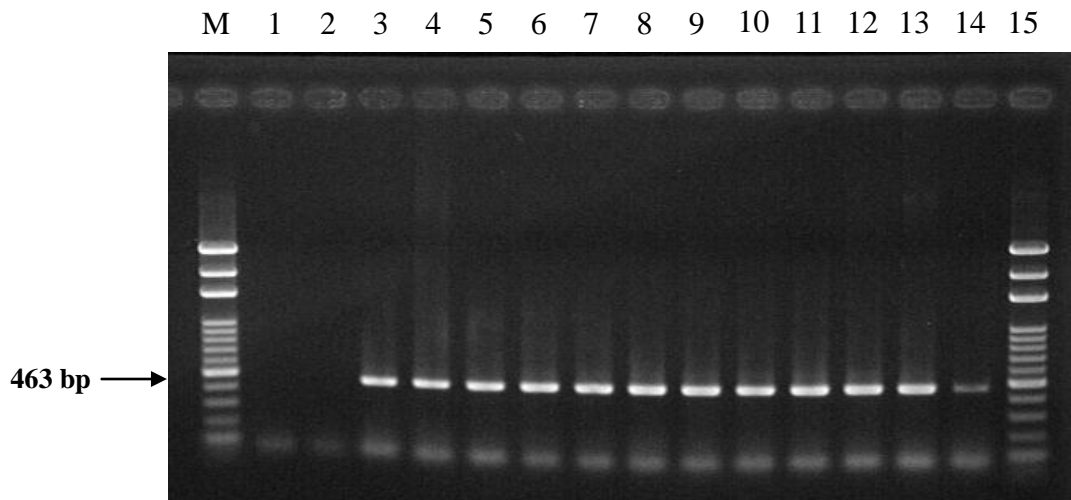
### Ac46f/Ac46r 引子組之專一性

測試 144 株來自蝴蝶蘭 AAC 菌株, 以 Ac46f/Ac46r 引子組進行 PCR, 結果顯示 144 株菌株均可增幅出 463 bp 之片段; 並將 Pha 9513 菌株之 DNA 分別加入等量的 Aaa、Aac、At、Ba、Bc、Bce、BG、Bgg、Bgl、Pag、Pcc、PCH、Pa、Pc、Pss、Pf、Ppu、Psg、Psl、Psp、Pspi、Pst、Psto、Rs、Xad、Xav、Xca、Xcm、Xoo、Xoc 等 8 屬、20 種, 共 119 株供試其他非標的菌株之 DNA 進行 PCR 反應, 並不影響 Ac46f/Ac46r 引子組對 AAC 菌株之專一性 (圖二)。且若將菌量濃度較低的 AAC 菌株混雜菌量濃度較高之非標的細菌 (Aaa、Ba、Bce、Bgl、PCH、Xad、Xca、Xcm、Xoo、Xoc 等 4 屬 10 菌株), 經簡易萃取 DNA 以 Ac46f/Ac46r 引子組進行 PCR 時, 只出現 AAC 之專一片段, 顯示非標的菌株數量多時並不影響標的菌株偵測之效率及準確性 (Data not shown), 確認所設計之引子組在樣品混雜其它非標的細菌時, 對於標的 AAC 菌株仍具專一性。



圖一、(A) 以隨機引子 OPR-02 應用 RAPD 方法分析蝴蝶蘭褐斑病菌及其他供試細菌菌株之電泳圖譜。(B) 利用選殖自蝴蝶蘭褐斑病菌 Pha 菌株的 R02-Pha-567 探針進行南方雜合反應之結果。1-4, 供試 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* 菌株依序為 Pha 72、9308、9513 及 9712; 5-19, 供試非標的菌株依序為 *A. avenae* subsp. *avenae*、*A. avenae* subsp. *citrulli*、*Agrobacterium tumefaciens*、*Burkholderia gladioli*、*B. glumae*、*Pantoea agglomerans*、*Pa. ananatis*、*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*、*Pe. chrysanthemi*、*Pseudomonas aeruginosa*、*P. cichorii*、*P. putida*、*P. syringae* pv. *syringae*、*Ralstonia solanacearum*、*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* 等。M 為 Bio 100 marker。

Fig 1. Agarose gel electrophoresis shows the RAPD patterns of *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* strains and the other non-target bacteria using the random primer OPR-02 (A) Southern hybridization of the RAPD products shown in (A) with R02Pha-567 probe cloned from *A. avenae* subsp. *cattleyae* (B) M: Bio100 marker. Lanes 1 - 4: *A. avenae* subsp. *cattleyae* Pha 72, 9308, 9513, and 9712; Lanes 5 - 19, *A. avenae* subsp. *avenae*, *A. avenae* subsp. *citrulli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia gladioli*, *B. glumae*, *Pantoea agglomerans*, *Pa. ananatis*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pe. chrysanthemi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. cichorii*, *P. putida*, *P. syringae* pv. *syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*.



圖二、以引子組 Ac46f/Ac46r 測定蝴蝶蘭細菌性褐斑病菌 Pha 9505 菌株 DNA 與其他非標的菌株 DNA 混合後之電泳圖譜。1: *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*; 2: 負控制組; 3-14, Pha 9505 依序分別 1:1 混合 *A. avenae* subsp. *avenae*、*A. avenae* subsp. *citrulli*、*Agrobacterium tumefaciens*、*Burkholderia andropogonis*、*B. cepacia*、*B. gladioli* pv. *gladioli*、*B. gladioli*、*B. glumae*、*Pantoea agglomerans*、*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*、*Pe. chrysanthemi*、*Pa. agglomerans*、*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*、*P. cichorii*、*P. fluorescens*、*P. putida*、*P. syringae* pv. *glycinea*、*P. syringae* pv. *lachrymans*、*P. syringae* pv. *phaseolicola*、*P. syringae* pv. *pisi*、*P. syringae* pv. *tomato*、*Ralstonia solanacerarum*、*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*、*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*、*X. campestris* pv. *armoraciae*、*X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*、*X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo)、*X. oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) 等非標的菌株。M: Bio 100 bp marker。

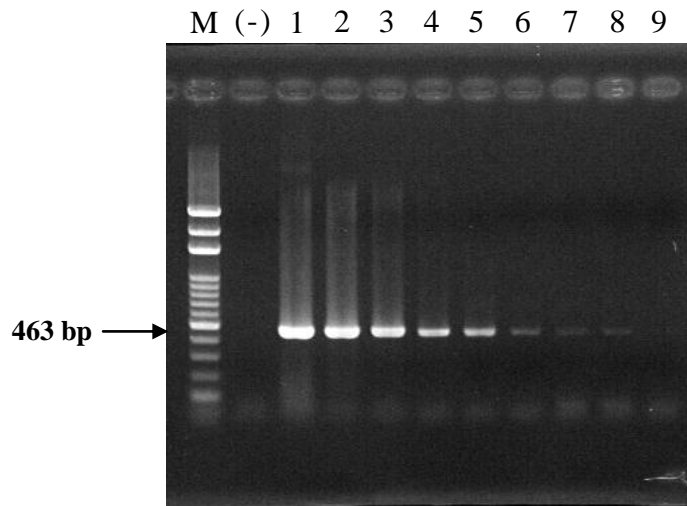
Fig. 2. The products of polymerase chain reaction (PCR) with primer pair Ac46f/Ac46r from the template DNA of *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* strains that were mixed with the other non-target bacterial DNA. M: Bio 100 bp marker; Lanes 1, *A. avenae* subsp. *avenae*; Lanes 2, negative control; Lanes 3-14, equal amount of Pha 9505 DNA mixed with the following DNA samples: *A. avenae* subsp. *avenae*, *A. avenae* subsp. *citrulli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia andropogonis*, *B. cepacia*, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *B. gladioli*, *B. glumae*, *Pantoea agglomerans*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pe. chrysanthemi*, *Pa. agglomerans*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. cichorii*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *lachrymans*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *pisi*, *P. syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacerarum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* pv. *armoraciae*, *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), *X. oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc).

### Ac46f/Ac46r 引子組之靈敏度

以 AAC 菌株 (Pha 9172、Pha 9308、Pha 9513 及 Pha 9712) 分別經培養後抽出的全 DNA 測試 Ac46f/Ac46r 引子組之靈敏度，最少可到 10 pg 的 DNA 即可有產物；再以前述菌株經培養後之細菌懸浮液測試該引子組之靈敏度，利用 0.5 N NaOH 溶液直接裂解供試細胞，使其溶出 DNA 的方式來偵測該引子組偵測供試菌液之敏感度，PCR 反應結果顯示，所設計之引子組最低可偵測到  $5.8 \sim 7.5 \times 10^1$  cfu/ml 細菌數 (圖三、圖四)。

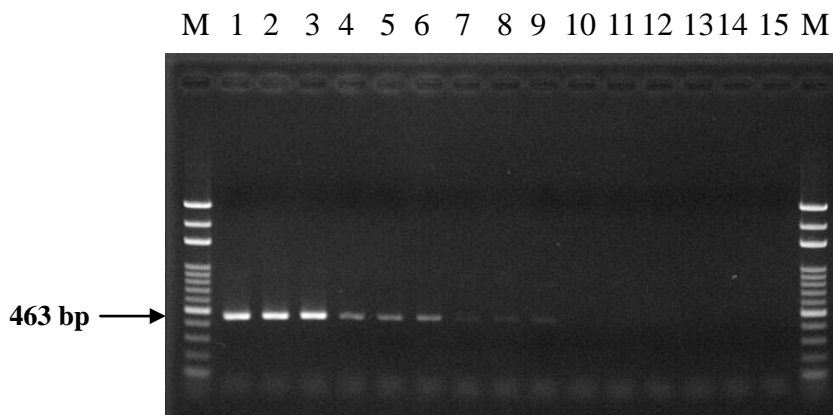
### 細菌性褐斑病菌菌落快速鑑定

各取 AAC 13202、Pha 9172、Pha 9205、Pha 9305、Pha 9308、Pha 9505、Pha 9513、Pha 9707、Pha 9711 單一菌落利用 0.5 N NaOH 溶液簡單萃取 DNA，再以引子組 Ac46f/Ac46r 進行 PCR 反應，結果顯示供試之 AAC 單一菌落在 463 bp 處形成條帶，因此可以將所設計之引子組用於 AAC 菌落快速鑑定 (圖五)。



圖三、應用引子組 Ac46f/Ac46r 之聚合酵素連鎖反應偵測蝴蝶蘭細菌性褐斑病菌 *Pha 9172* 菌株全 DNA 之靈敏度。M, Bio 100 bp marker; (-), negative control; 1-9 依序為 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 50 pg, 10 pg, 5 pg, 1.0 pg 及 0.5 pg。

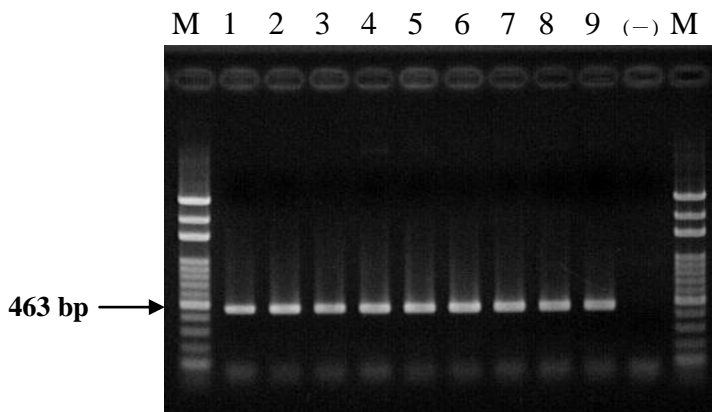
Fig 3. Detection sensitivity by polymerase chain reaction using primer pair Ac46f/Ac46r to detect the total DNA of *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* Pha 9172. M, Bio 100 bp marker. Lanes 1-9, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 50 pg, 10 pg, 5 pg, 1.0 pg and 0.5 pg of DNA, respectively; (-), negative control.



圖四、以引子組 Ac46f/Ac46r 進行聚合酵素連鎖反應偵測蝴蝶蘭褐斑病菌 *Pha 9308* 菌株細菌細胞數之靈敏度。1-3,  $5.83 \sim 7.5 \times 10^3$  cfu/ml; 4-6,  $5.83 \sim 7.5 \times 10^2$  cfu/ml; 7-9,  $5.83 \sim 7.5 \times 10^1$  cfu/ml; 10-12, 5.83 ~ 7.5 cfu/ml; 13-15,  $5.83 \sim 7.5 \times 10^{-1}$  cfu/ml; M, Bio 100 bp marker。

Fig. 4. Detection sensitivity by polymerase chain reaction with primer pair Ac46f/Ac46r for detecting the cell suspensions of *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* Pha 9308. M, Bio 100 bp marker; Lanes 1-3,  $5.83 \sim 7.5 \times 10^3$  cfu/ml; Lanes 4-6,  $5.83 \sim 7.5 \times 10^2$  cfu/ml; Lanes 7-9,  $5.83 \sim 7.5 \times 10^1$  cfu/ml; Lanes 10-12, 5.83 ~ 7.5 cfu/ml; Lanes 13-15,  $5.83 \sim 7.5 \times 10^{-1}$  cfu/ml.





圖五、以引子組 Ac46f/Ac46r 進行聚合酵素連鎖反應偵測蝴蝶蘭細菌性褐斑病菌株單一菌落之電泳圖譜。M 為 Bio 100 bp Marker；1，*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* 標準菌株 13202；2-9 依序為分離自蝴蝶蘭之細菌性褐斑病菌株：Pha 9172、9205、9305、9308、9505、9513、9707、9711 等單一菌落；(-)為負控制組。

Fig. 5. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* by PCR with primer pair Ac46f/Ac46r. Individual colonies on agar plates were extracted with 0.5 N NaOH and the crude extracts were used as templates for PCR. M: Bio 100 bp marker; Lanes 1, *A. avenae* subsp. *cattleyae* 13202; Lanes 2-9, colonies isolated from diseased *Phalaenopsis* tissue: Pha 9172, 9205, 9305, 9308, 9505, 9513, 9707, and 9711; (-), negative control.

**應用 PCR 偵測蝴蝶蘭葉片人工接種細菌性褐斑病菌之組織**

將蝴蝶蘭葉片接種 Pha 9806 菌株，並於接種後 1-6 日每日採樣，將採樣之組織液經簡易萃取法取得 DNA，以 Ac46f/Ac46r 引子組進行 PCR，結果發現接種後 1-6 日採集的樣品皆可偵測到 AAC，同樣的樣品經 NA 平板分離則在第 5 天的樣品就無法分離到 AAC (表二)。

**應用 PCR 偵測田間蝴蝶蘭疑似細菌性褐斑病組織**

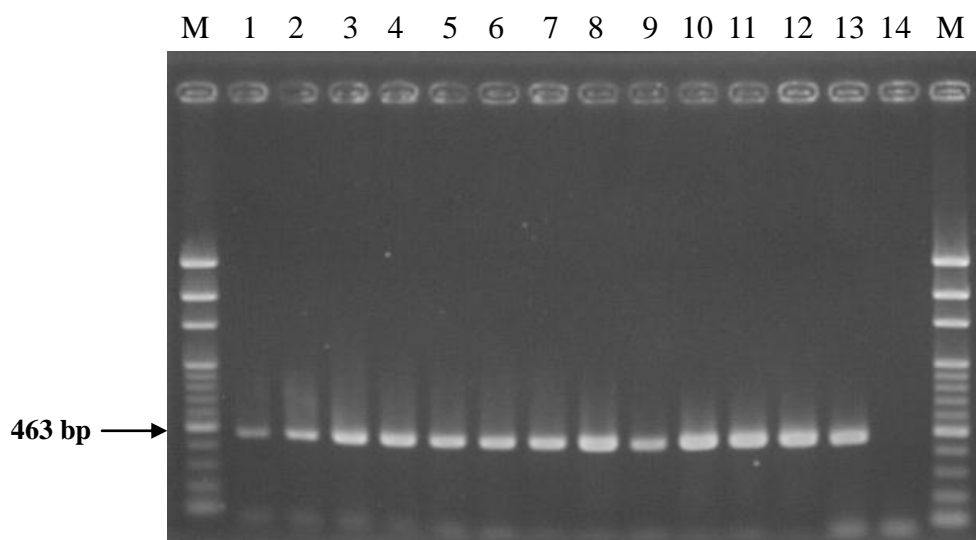
至台南市麻豆區之蝴蝶蘭園攜回整株植株置溫室，採集疑似罹患褐斑病之蝴蝶蘭葉片組織，將罹病部位之組織液經簡易萃取法取得 DNA，以 Ac46f/Ac46r 引子組進行 PCR，皆可偵測到病原菌 AAC，顯示此引子組能用來偵測蝴蝶蘭植株內之褐斑病菌 (圖六)。

表二、比較 PCR 及培養基方法對褐斑病菌 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* Pha 9806 經穿刺接種至蝴蝶蘭葉片之檢測效率

Table 2. Comparison of the detection efficiency of *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* Pha 9806 on stab-inoculated *Phalaenopsis* leaves by PCR and cultural methods.

Methods\ Sample location\ Days post inoculation	PCR detection with Ac46f/Ac46r		Bacterial growth on NA medium	
	Within lesion	0.5 cm away from the lesion	Within lesion	0.5 cm away from the lesion
1-day	+	+	+	+
2-day	+	+	+	+
3-day	+	+	+	+
4-day	+	+	+	+
5-day	+	+	-	-
6-day	+	-	-	-

+ indicated positive reaction, and - indicated negative reaction.



圖六、應用 PCR 技術以引子組 Ac46f/Ac46r 檢測田間罹患蝴蝶蘭細菌性褐斑病之樣品電泳圖譜。M 為 Bio 100 bp Marker；1-13 皆為罹病樣品之組織液；14 為負控制組。

Fig. 6. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*-infected tissues of *Phalaenopsis* orchids from fields by PCR with primer pair Ac46f/Ac46r. M: Bio 100 bp marker, Lanes 1-13, extracts of *Phalaenopsis* orchids infected with *A. avenae* subsp. *cattleyae*; Lanes 14, negative control.

## 討論

蝴蝶蘭褐斑病菌造成蝴蝶蘭葉片上的褐斑病徵使蝴蝶蘭失去商品觀賞價值，且病徵蔓延至生長點時會造成植株黃化死亡，縱使在蘭花出口前除去罹病葉片，病原菌仍有可能殘存於植株，在貯運期間的環境下易出現病徵造成品質不良而影響外銷市場。首先褐斑病的病徵有時會與其他病害的病徵相混淆，因此鑑定時需經組織分離後進行生理生化及接種試驗方能確認病原菌，所需耗費時間頗多，其二，若診斷鑑定錯誤將造成施藥不當，從防治面思考，若能早期且正確的診斷出危害之病因，將可早期且正確進行病害防治，因而減少損失。本研究室多年來共收集 144 株 AAC 菌株，應用 RAPD 技術，找到隨機引子 OPR2 可針對全部的 AAC 供試菌株均產生 567 bp 的片段，藉由 NCBI 及 SDSC-Biology Workbench 等資料庫比對結果，避開與其他菌株相似的片段，設計出針對 AAC 可產生 463 bp 專一性片段之引子組 Ac46f/Ac46r。

進一步以標的 144 株 AAC 菌株和非標的其他供試菌株進行 PCR 測試其專一性，所有供試 AAC 菌株皆可產生 463 bp 之專一性片段，而其它非標的菌株則無任何產物，確認所設計之引子組具高專一性。Su<sup>(21)</sup>亦針對 AAC 設計專一性的 AAC-ITS 引子組，是應用 AAC 的

16S-23S rRNA 基因間之 ITS 片段來尋找特有片段，其優點為 16S-23S rRNA 基因片段的保留性高，但因該片段與 AAC 同屬 *Acidovorax avenae* 的另兩個亞種 *A. avenae* subsp. *avenae* (Aaa)、*A. avenae* subsp. *citrulli* (Aac) 之 16S-23S -ITS 片段的相似性高達 97%<sup>(13, 21)</sup>，因此所設計的引子組對於同種之亞種如 Aaa 會產生相同的 PCR 產物<sup>(21)</sup>，相較於本研究設計出的 Ac46f/Ac46r 引子組，對供試之 Aaa 及 Aac 等菌株進行 PCR 時不會產生任何產物，其專一性更佳。本研究同時將非標的菌株包括其他植物病原細菌或腐生細菌（表一）之 DNA 及菌液混合標的 AAC 菌株的 DNA 或菌液時，結果只有產生 AAC 特有的 463 bp 專一性片段而不會有任何雜訊產生，Ac46f/Ac46r 引子組對 AAC 具高專一性，因此確認所設計 Ac46f/Ac46r 引子組可用來診斷鑑定 AAC。

根據關於檢測植物細菌性病原菌之引子組靈敏度測定報告得知，一般引子組要求 DNA 檢測靈敏度大致在 10~100 pg 之間，如 Sung<sup>(23)</sup>開發之 SL1/SR1 引子組對於引起瓜類果斑病 *A. avenae* subsp. *citrulli* 之偵測靈敏度為 100 pg；Hseu<sup>(8)</sup>開發之 Ec3F/Ec4R 引子組偵測 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) 及 *Pe. chrysanthemi* (PCH) 之偵測靈敏度為 10 pg，Su<sup>(21)</sup>開發之 AAC-ITS 引子組和 AAC\_rpoB\_IDd 引子組偵測 AAC 的 DNA 量分別需 10 pg 及 100 pg，而本研究所設

計之 Ac46f/Ac46r 引子組偵測 AAC 之 DNA 量亦只需 10 pg 即可產生專一性條帶，顯示所設計之引子組具有高靈敏度。另外，關於菌液靈敏度測試，Ha<sup>(6)</sup>等人所設計的引子組偵測 *A. avenae* subsp. *citrulli* 可達 10 cfu/ml 的靈敏度，Hseu<sup>(8)</sup>開發之 Ec3F/Ec4R 引子組偵測 Pcc 及 PCH 在  $1.1 \times 10^1$  cfu/ml 菌液細胞數就可測得，Song<sup>(18)</sup> 等人針對 *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；而本研究所設計之 Ac46f/Ac46r 引子組在  $5.8 \sim 7.5 \times 10^1$  cfu/ml 細胞數即可有反應產物。引子組若用於田間樣品之偵測時，其靈敏度相當重要，Ac46f/Ac46r 引子組與其他研究之引子組比較，顯示本研究所設計之引子組的靈敏度高，用來偵測 NA 上培養 24 小時的 AAC 單一菌落經簡易萃取法取得的 DNA，同樣可得到特有的 463 bp 專一性片段，顯示此引子組也可用於診斷鑑定培養基上未知的細菌菌落。

本研究為了確認 Ac46f/Ac46r 引子組是否可以直接應用於田間蝴蝶蘭細菌性褐斑病菌的早期且正確的偵測，將 AAC 菌株 (Pha 9806) 以穿刺法接種於蝴蝶蘭葉片上，並於接種後 1~6 日進行採樣偵測。在病徵未出現時，於距接種點外 0.5 cm 處採樣，以避免取到人工接種的菌泥，不論以 Ac46f/Ac46r 引子組或以畫線平板法檢測供試樣品其結果均可以檢測或分離到病原菌 AAC，顯示在應用 Ac46f/Ac46r 引子組，來檢測感染褐斑病菌初期尚未具明顯病徵時的蝴蝶蘭葉片，就可檢測到 AAC。在第 2~6 日間每日以同樣方法採樣，並將樣品經處理後以 Ac46f/Ac46r 引子組進行 PCR，也都可檢測到 AAC 產物，但是傳統的 NA 平板分離至第 5 日已無法分離到病原菌 AAC，此結果顯示所設計引子組進行 PCR 檢測 AAC 不論是人工接種或田間病徵檢測樣品，不僅快速且準確性高，而且靈敏度也優於傳統組織分離方法，且所花費時間更少，可達早期診斷鑑定的功效。另外，田間採樣樣品雖發病超過兩個星期，仍可應用 Ac46f/Ac46r 引子組進行 PCR 來檢測到病原菌 AAC，可在 4 小時內即可完成檢測步驟，改善培養基分離鑑定耗時的問題，即可達早期防治的目的。

應用本研究所設計之引子組，檢測台南市麻豆區之蝴蝶蘭疑似褐斑病病徵之樣品包含淡褐色水浸狀、褐化壞疽或褐化斑點等病徵，分別取其疑似病徵應用 Ac46f/Ac46r 引子組進行 PCR 快速檢測，於 4 次採樣共計 36 個疑似褐斑病徵之蝴蝶蘭樣品中除了 2 個樣品後期組織老化且已

乾枯因而未檢測到 AAC 外，其餘樣品以 Ac46f/Ac46r 引子組進行 PCR，均可檢測出褐斑病原細菌。

綜合本研究結果顯示，所開發之 Ac46f/Ac46r 引子組確實可應用在田間樣品 AAC 之檢測及鑑定，且可於感染初期即檢測到 AAC，檢測方法既快速又簡便，尤其是在處理大量樣品的時候，可解決生理生化測試所需費時耗力的問題，且可於病害發生早期即發現，即可在最短時間內採取適合的防治措施。因此，未來可應用本研究所開發的 Ac46f/Ac46r 引子組，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. Agricultural Trade Statistics of The Republic of China. 2008. 4-1. Cut flower. Page 80. in: Agricultural Trade Statistics of The Republic of China. Executive Yuan. Taipei, ROC. 334 pp.
2. Ark, P. A., and Thomas, H. E. 1946. Bacterial leaf spot and bud rot of orchids caused by *Phytophthora cactleyae*. *Phytopathology* 36: 695-698.
3. Borah, P. K., Modhusmita, K., Bhagabati, K. N., Pathak, J. J., and Bora, L. C. 2002. A new bacterial disease of orchid from India. *J. Agr. Sci. Soc. North-East India*. 15: 1-4.
4. Chung, S. C. 2006. *Phalaenopsis* and prevention of common diseases. *Journal of Anhui Agri. Sci.* 36: 1546-1547.
5. Divinagracia, G. G., Candole B. L., and Cadapan, E. T. 1984. Some studies on bacterial brown spot of orchids caused by *Pseudomonas cactleyae* (Pavarino) Saverlescu. *Philippine. Phytopathology* 20: 3-4.
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., Shentue, H., and Lin, C. Y. 2006. Development of specific PCR primers for identification of *Pseudomonas cichorii*. *Plant. Pathol. Bull.* 15:

- 275-285.
8. 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.
  9. Huang, T. C. 1990. Characteristics and control of *Pseudomonas cattleyae* causing brown spot of *Phalaenopsis* orchid in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 32: 327. (Abstract)
  10. Jones, J. B., Gitaitis, R. D., and Schaad, N. W. 2001. *Acidovorax* and *Xylophilus*. Pages 121-138. *in*: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3<sup>rd</sup> edition APS, St. Paul, Minnesota, USA. 373 pp.
  11. 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.
  12. Miller, J. W. 1990. Bacterial brown spot of orchid caused by *Pseudomonas cattleyae*. *Plant Pathol. Circular*, No.330.
  13. Postnikova, E., Vidaver, A., Agarkova, I., Sechler, A., and Schaad, N. 2006. Genetic relatedness among *Acidovorax avenae* subspecies *avenae*, *citrulli*, and *cattleyae*. *Phytopathology* 96: S94.
  14. Republic of China ministry of directorate general of customs. 2009. Export of goods, quantity, value tables: *Phalaenopsis*. Directorate General of Customs. (Taiwan, R.O.C.).
  15. 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.
  16. Sato, M., Watanabe, K., Yazawa, M., Takikawa, Y., and Nishiyama, K. 1997. Detection of new ethylene-producing bacteria *Pseudomonas syringae* pvs. *cannabina* and *sesame*, by PCR amplification of genes for the ethylene-forming enzyme. *Phytopathology* 87: 1192-1196.
  17. Scortchini, M., Ascenzo, D. D., and Rossi, M. P. 2005. New record of *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* on orchid in Italy. *J. Plant Pathol.* 87: 244.
  18. Song, W. Y., Kim, H. M., Hwang, C. Y., and Schaad, N. W. 2004. Detection of *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR. *J. Phytopathol.* 152: 667-676.
  19. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503.
  20. Stovold, G. E., Bradley, J., and Fahy, P. C. 2001. *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*Pseudomonas cattleyae*) causing leafspot and death of *Phalaenopsis* orchids in New South Wales. *Australasian Plant Pathol.* 30: 74-79.
  21. 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.)
  22. 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.
  23. Sung, P. F. 1999. The polymerase chain reaction technique for identification and detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Graduate Institute of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Master Thesis, 41 pp. (Taiwan, R. O. C.)
  24. Tsai, H. L., Huang, L. C., Ann, P. J., and Liou, R. F. 2006. Detection of orchid *Phytophthora* disease by nested PCR. *Bot. Studies.* 47: 379-387.
  25. Uchida, J. Y. 1994. Diseases of orchids in Hawaii. *Plant Dis.* 78: 220-224.
  26. Wang, H., Qi, M., and Cutler, A. J. 1993. A simple method of preparing plants samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21: 4153-4154.
  27. Willems, A., Goor, M., Thielemans, S., Gillis, M., Kersters, K., and Deley, J. 1992. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 42: 107-119.

## ABSTRACT

Hseu, S. H.<sup>1,3</sup>, Sung, C. J.<sup>1</sup>, and Shentu, H.<sup>2</sup> 2011. A specific primer pair for diagnosis and detection of bacterial brown spot pathogen: *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* on *Phalaenopsis* orchid. Plant Pathol. Bull. 20: 52-64. (<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)

*Phalaenopsis* cultivation is a very important floral industry in Taiwan since the early 1990s. Several bacterial diseases may occur on the orchids and cause serious economic loss during orchid cultivation. Among these diseases, the bacterial brown spot, caused by *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (AAC), is recognized as the most important bacterial disease in the *Phalaenopsis* cultivation in Taiwan. In this study, a highly specific primer pair was developed for diagnosis and detection of the pathogen. Totally eighty random primers were used to find specific DNA fragments of AAC, and a specific DNA fragment of 567 bp amplified by the primer OPR-02 was identified and cloned into the pCR<sup>®</sup> II-TOPO vector. The cloned DNA fragment was further sequenced and used for designing the specific primer pair Ac46f/Ac46r for AAC identification and detection. In order to elucidate the specificity of the primer pair, totally 119 isolates, collected from eight genera and twenty species of bacteria, were subjected for PCR, and the results showed that only AAC could produce a unique 463 bp fragment. Sensitivity of AAC using PCR was between 10 ~ 50 pg for purified DNA and 5.8-7.5 x 10<sup>1</sup> cfu/ml for bacterial cells. The results were not affected when AAC was mixed with other non-target bacteria. The time for PCR detection of AAC strains using primers Ac46f/Ac46r only took 3 to 4 hours. The primer pair was further used for detecting AAC on the leaves of infested *Phalaenopsis* orchids and was proved to be equally effective.

Keywords: *Phalaenopsis*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, PCR, primer, diagnosis, identification, detection.