

應用複合式 PCR 同時偵測並區分三種蝴蝶蘭 細菌性病害

許秀惠^{1,3} 申屠萱² 宋嘉仁¹

¹ 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。

² 臺中市政府農業局，農會輔導休閒農業科。

³ 通訊作者：shhseu@fthes-tari.gov.tw

接受日期：中華民國 101 年 4 月 16 日

摘要

許秀惠、申屠萱、宋嘉仁. 2012. 應用複合式 PCR 同時偵測並區分三種蝴蝶蘭細菌病害。植病會刊 21：91-100.

臺灣為蝴蝶蘭重要種苗輸出國，因此提供健康的種苗是最重要的課題。危害蝴蝶蘭的病害中細菌性病害目前有 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (AAC) 引起之褐斑病、*Burkholderia gladioli* (BG) 引起之葉斑病及 *Pectobacterium chrysanthemi* (PCH) 引起之軟腐病等三種，其中褐斑及葉斑兩者初期病徵不易區分，與真菌性病害的病徵也不易區分。本研究為達快速且明確區分不同病原引起的病害，因而研發複合式 (multiplex) PCR，並應用於標的物之檢測，不但可快速且同時偵測到 AAC、BG 及 PCH 三種病原細菌，且不論樣品中標的物僅存在單一菌或存在兩種菌或存在三種菌，均可針對標的物分別產生 463 bp (AAC)、350 bp (BG) 及 548 bp (PCH) 的產物，除可確認外又能區分三種病原細菌，並與供試 6 屬 11 種非標的菌無任何產物產生，靈敏性測試結果顯示可偵測到細菌數之最低量約為 $1.8\sim 1.9 \times 10^1$ cfu/ml，可偵測到細菌全 DNA 之最低量約為 50~100 pg，顯示其專一性及靈敏性均高。人工接種或田間罹病之蝴蝶蘭組織經由簡易萃取法後即可進行複合式聚合酵素連鎖反應，並得到專一且可明確區分之片段。由試驗結果確知所使用的複合式多引子組確可應用於蝴蝶蘭三種細菌性病害 (褐斑病、葉斑病及軟腐病) 之快速且準確之診斷，鑑定及偵測。

關鍵詞：蝴蝶蘭，褐斑病菌，葉斑病菌，軟腐病菌，複合式聚合酵素連鎖反應，診斷，鑑定，偵測。

前言

蝴蝶蘭近年來為臺灣出口的大宗花卉之一，佔了出口花卉的五成以上，為重要且具本土指標性的花卉，由於國內大型企業相繼投資蝴蝶蘭產業，在生產管理方面已建立蝴蝶蘭企業化經營的模式，目前臺灣已為全世界重要的蝴蝶蘭種苗供應國。根據統計，臺灣的蝴蝶蘭自 2003 至 2011 年，其外銷總值由 8 億元成長至約 29 億元⁽¹⁷⁾，其中蝴蝶蘭種苗及盆苗約 28 億元，佔了蝴蝶蘭出口的大

部分。由於臺灣培育蝴蝶蘭分生苗的技術成熟，在溫室栽培設備及管理完善，加上成功開發海運至歐美的貯運技術⁽⁶⁾，使運輸之腐損率自 30% 降低至 3% 以下，大大降低運輸期的損失，因而提高蝴蝶蘭產業之產值。

由於蝴蝶蘭的培育採組織培養分生苗來繁殖，因此常是在移至溫室栽培時發生病蟲害的問題較多，生產廠商因溫室設備資本高，為充分利用設施使蝴蝶蘭栽培過於密

集，一旦有病原菌存在，遇到適宜的環境，容易引發真菌性及細菌性病害，並快速傳播而造成產量損失，若在出口前未去除已感染病原菌之植株，則易在運輸過程中造成其它健株也被感染，因而造成出口貨品的品質不佳，有損我國名譽，因此，蝴蝶蘭的病害檢測及管理在蝴蝶蘭產業是重要的一環。造成蝴蝶蘭病害的病原菌包括病毒、真菌、細菌等，其中細菌性病害則包括由 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (AAC) 引起之褐斑病^(11, 15)、*Burkholderia gladioli* (BG) 引起之葉斑病⁽¹³⁾ 及 *Pectobacterium chrysanthemi* (PCH)^(1, 19)引起之軟腐病(病原菌原名為 *Erwinia chrysanthemi*，2009 年分類地位改為 *Dickeya chrysanthemi*)^(9, 19)。此三種植物病原細菌在感染蝴蝶蘭之初期病徵大多會出現水浸狀斑，其中軟腐病菌因分解寄主細胞之果膠質造成組織崩解且擴展快速而容易辨識，但褐斑病菌及葉斑病菌之病徵相近且與真菌引起的病徵不易區分，當蝴蝶蘭植株出現初期病徵時，除了儘快移除罹病株外，也需趁早確認病因，區分病原菌種類，瞭解引起病害之原因，方能決定正確的防治方向，因此，發展並建立快速診斷鑑定及偵測的技術是病害防治的重要課題。

材料與方法

菌株來源

2002 至 2011 年間陸續至台中、嘉義、屏東等地區之蝴蝶蘭園採集疑似細菌病徵之植株，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性反應確認具病原性後，再進行簡單生理生化測定^(7, 8, 12, 20) 及 Hseu 等^(3, 4, 5)開發可偵測 AAC、BG、PCH 之專一性引子組鑑定，得知這些菌株分別為褐斑病菌 (AAC 共 144 株)，軟腐病菌 (PCH 共 136 株) 以及葉斑病菌 (BG 共 31 株) 等三種病原細菌分別作為本研究的供試標的菌株。其他供試非標的菌株為本研究室及中興大學細菌研究室所保存的菌株，共計 6 屬 11 種共計 32 株，其中 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (AAC) 13202，*Burkholderia cepacia* (Bce) 13208，*Pseudomonas cichorii* (Pc) 12682，*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Xcm) 13182 等標準菌株則購自食工所 (如表一)。

表一、供 PCR 試驗之 6 屬 13 種 343 株細菌菌株。

Table 1. Bacterial isolates used in the experiment of *Phalaenopsis* multiplex PCR.

Bacterium	Isolates
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	Pha (AAC---共 144 株)
<i>Burkholderia gladioli</i>	Bg (BG---共 31 株)
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	Ech (PCH---共 136 株)
Non-target bacterium	
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	CH12、Aa4、Aa5、Aa8、Aa9
<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	Aac9801、Aac9802
<i>Burkholderia andropogonis</i>	Pan1
<i>B. cepacia</i>	BCRC 13208
<i>B. glumae</i>	<i>B. glumae</i> 01、 <i>B. glumae</i> 06
<i>Pantoea agglomerans</i>	Yx7
<i>P. ananatis</i>	PA13199
<i>P. dispersa</i>	Pd12159
<i>Pseudomonas cichorii</i>	BCRC 12682、sf75
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Ia52、Ia85、Pss 05
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Xv12、15、32、42、58
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Xcc1、20、30
<i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	BCRC 13182、X58、M42、49、50

細菌全 DNA 之抽取

純化分離來自蝴蝶蘭的 AAC、BG、PCH 等共計 311 株供試標的菌株，分別先以 5 ml 之 LB broth 在 30°C 下震盪培養 16 小時，再依 Sambrook⁽¹⁸⁾等及 Hseu 等^(2, 3, 4, 5)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。蝴蝶蘭複合式聚合酵素連鎖反應 (multiplex PCR) 增幅條件之設定根據 Hseu 等^(3, 4, 5)開發可偵測 AAC、BG、PCH 之專一性引子組，分別為 Ac46f / Ac46r (5'-GTA CCC GCA GCA TTG AAG TT 及 5'-ACC AAC AGG TTT GGG ATT TG)、BgRPF3 / BgRPR3 (5'-CAG TCA AGC GCC AAG GCC TTG C 及 5'-CCG GAG CAG AAA CAG GAT TCG G) 及 Ec3F / Ec4R (5'-AAA TGC TGG CYG GTA TGC CGT A 及 5'-CAG CGT CAG GAA CGG ACA TAC)，供試三組引子組先分別測試去氧核糖核苷三磷酸鹽 (dNTPs)、引子 (primers) 濃度、*Taq* DNA 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，再根據其可互相配合之反應條件測試以獲得蝴蝶蘭複合式聚合酵素連鎖反應中引子組的最佳反應條件。

蝴蝶蘭複合式 PCR 專一性測定

DNA 專一性測試：

除抽取供試之 6 株分別來自蝴蝶蘭之 AAC (Pha9811、Pha9818)、BG (Bg4、Bg12) 及 PCH (Ech9813、Ech9833) 等供試菌株之 DNA 外，另抽取 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Aaa)、*A. avenae* subsp. *citrulli* (Aac)、*Burkholderia andropogonis* (Ba)、*B. cepacia* (Bce)、*B. glumae* (Bgl)、*Pantoea agglomerans* (Pa)、*P. ananatis* (Pan)、*P. dispersa* (Pd)、*Pseudomonas cichorii* (Pc)、*Ralstonia solanacearum* (Rs)、*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav)、*X. campestris* pv. *campestris* (Xcc)、*X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Xcm) 等 6 屬 11 種共計 32 株非標的菌株 (表一) 之 DNA，以蝴蝶蘭複合式引子組進行 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：

將分離自蝴蝶蘭之 AAC (Pha9811)、BG (Bg4)、PCH (Pch9854) 等供試菌株之 DNA，與非標的菌株之 DNA

以等比例混合，再分別取總 DNA 為 10 ng 的量，依上述增幅條件進行 PCR 反應，以瞭解供試樣品之粗萃 DNA 中若雜帶其他不同的病原菌或腐生菌，此蝴蝶蘭複合式引子組是否只對自蝴蝶蘭分離 AAC、BG、PCH 等供試菌株產生專一性。

非標的菌株干擾專一性測試：

將 AAC (Pha9811)、BG (Bg4)、PCH (Pch9854) 等標的供試菌株分別培養在 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、Bgl、Pa、Pan、Pd、Pc、Rs、Xav、Xcm、Xcc 等 6 屬 11 種非標的菌株則分別培養於適當之培養基，皆以無菌水懸浮，並調整其濃度約為 $10^6 \sim 10^8$ cfu/ml，每個稀釋濃度先各別與供試之 AAC、BG、PCH 菌株之菌液 10^8 cfu/ml 以等比例混合後，取菌液以 Wang 等人⁽²³⁾之簡易法萃取 DNA，並以蝴蝶蘭複合式引子組進行 PCR 與電泳分析，以測試樣品中存在其他非標的細菌，是否會干擾蝴蝶蘭複合式引子組偵測 AAC、BG、PCH 等病原菌株之專一性。

蝴蝶蘭複合式 PCR 靈敏度測定

DNA 靈敏度測定：

分別將供試蝴蝶蘭 AAC (Pha9811)、BG (Bg4)、PCH (Pch9854) 之 DNA 分別取 100、10、1 ng 及 100、50、10、5、1、0.5 pg 等濃度，加入 PCR 各反應物，使總反應體積為 20 μ l，依上述增幅條件進行 PCR，反應後進行電泳分析，測試以蝴蝶蘭複合式引子組進行 PCR 反應及電泳分析時所需最低的 DNA 量。

細菌懸浮液靈敏度測定：

將 AAC (Pha9811)、BG (Bg4)、PCH (Pch9854) 純化菌株之菌落於 NA 上培養 24 hr 後，以無菌水懸浮並調整其 OD_{620nm} 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，取每個稀釋濃度之菌液依前述方法萃取 DNA，並以蝴蝶蘭複合式 (multiplex) 引子組進行 PCR 與電泳分析，以測試可測得標的菌之最低菌量；並取適當之細菌懸浮液以 spiral plater (model D, Spiral systems, Inc. Bethesde, 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。

應用蝴蝶蘭複合式 PCR 偵測人工接種蝴蝶蘭之罹病組織

將分離自蝴蝶蘭 Pha9811 (AAC)、Bg4 (BG)、Pch9854 (PCH) 等純化菌株在 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，接種試驗包含：接種 Pha9811 (AAC)；接種 Bg4 (BG)；接種 Pch9854 (PCH)；於同一葉片接種 Pha9811 (AAC) 及 Bg4 (BG)；於同一葉片接種 Pha9811 (AAC) 及 Pch9854 (PCH)；於同一葉片接種 Pch9854 (PCH) 及 Bg4 (BG)；於同一葉片接種 Pha9811 (AAC)、Bg4 (BG) 及 Pch9854 (PCH)；每種接種試驗均進行三重覆，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部位，將所採葉片組織切碎後以 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，以蝴蝶蘭複合式引子組進行 PCR 反應及電泳分析。

應用蝴蝶蘭複合式 PCR 偵測田間蝴蝶蘭罹病組織

於嘉義民雄、大林及台南等地區之蘭園攜回疑似罹患細菌性病害之蝴蝶蘭植株，每株均分別切取其罹病葉片組織，並切碎後以 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 做為模板，以蝴蝶蘭複合式引子組進行 PCR 反應及電泳分析，以判別其是否為本研究所進行之 AAC、BG、PCH 等病原菌引起的細菌病害。

結 果

蝴蝶蘭複合式 PCR 之增幅條件

根據 Hseu 等^(3,4,5)開發可偵測 AAC、BG、PCH 之專一性引子組分別為 Ac46f / Ac46r、BgRPF3 / BgRPR3、Ec3F / Ec4R，進行複合式 PCR 之條件測試，當總體積為 25 µl 時，最適合的原料比例包括其 *Taq* polymerase 所附之反應緩衝液為 2.5 µl，200 µM dNTP，0.4 µM 的 Ac46f / Ac46r 引子組，0.8 µM 的 Bg RPF3 / BgRPR3 引子組，

0.4 µM 的 Ec3F / Ec4R 引子組，4 µl 標的 DNA 及 0.8 U *Taq* polymerase，並設定進行 PCR 步驟為起始溫度 94 °C 進行 2 分鐘，循環複製為 94 °C 30 秒，60 °C 30 秒，72 °C 30 秒，共進行 30 次循環數，最後以 72 °C 進行 10 分鐘以黏合，所得之 PCR 產物並以 2% 瓊脂膠進行電泳分析以檢視結果，以上經試驗建立標準的 PCR 檢測條件。

蝴蝶蘭複合式 PCR 專一性及靈敏度

以 Pha9811 (AAC)、Bg4 (BG)、Pch9854 (PCH) 菌株經培養後溶出之細菌懸浮液以 NaOH 溶液直接裂解使其溶出 DNA，並進行蝴蝶蘭複合式 PCR，結果顯示 AAC 可偵測到之最低量分別為 1.89×10^1 cfu/ml 細菌數、BG 為 1.87×10^1 cfu/ml 細菌數、PCH 為 1.79×10^1 cfu/ml 細菌數；細菌全 DNA 之靈敏度則最少皆可到 50~100 pg。進行非標的菌株細胞干擾專一性測試時，將供試之 AAC 菌株 (Pha9811)、BG 菌株 (Bg4)、PCH 菌株 (Pch9854) 等菌株稀釋為 10^8 cfu/ml 無菌水懸浮液，並與其他非標的菌株 Aaa、Aac、Ba、Bce、Bgl、Pa、Pan、Pd、Pc、Xav、Xcm、Xcc 等 6 屬 11 種共計 32 株非標的菌株稀釋為 10^8 cfu/ml 無菌水懸浮液混合後，經 NaOH 簡易法萃出 DNA 並進行蝴蝶蘭複合式 (multiplex) PCR，只有 AAC、BG、PCH 等三種標的產物出現，無其它雜訊，顯示非標的菌株存在時並不影響標的菌株偵測之效率及準確性。另外將 AAC、BG、PCH 菌株各取單一菌落利用 0.5 N NaOH 溶液簡單萃取 DNA，再進行複合式 PCR，結果顯示無論單菌、兩種菌混合或三種菌混合皆可產生 463 bp、350 bp 及 548 bp 分別為 AAC、BG、PCH 之 PCR 產物，且可明確區分 (圖二)。

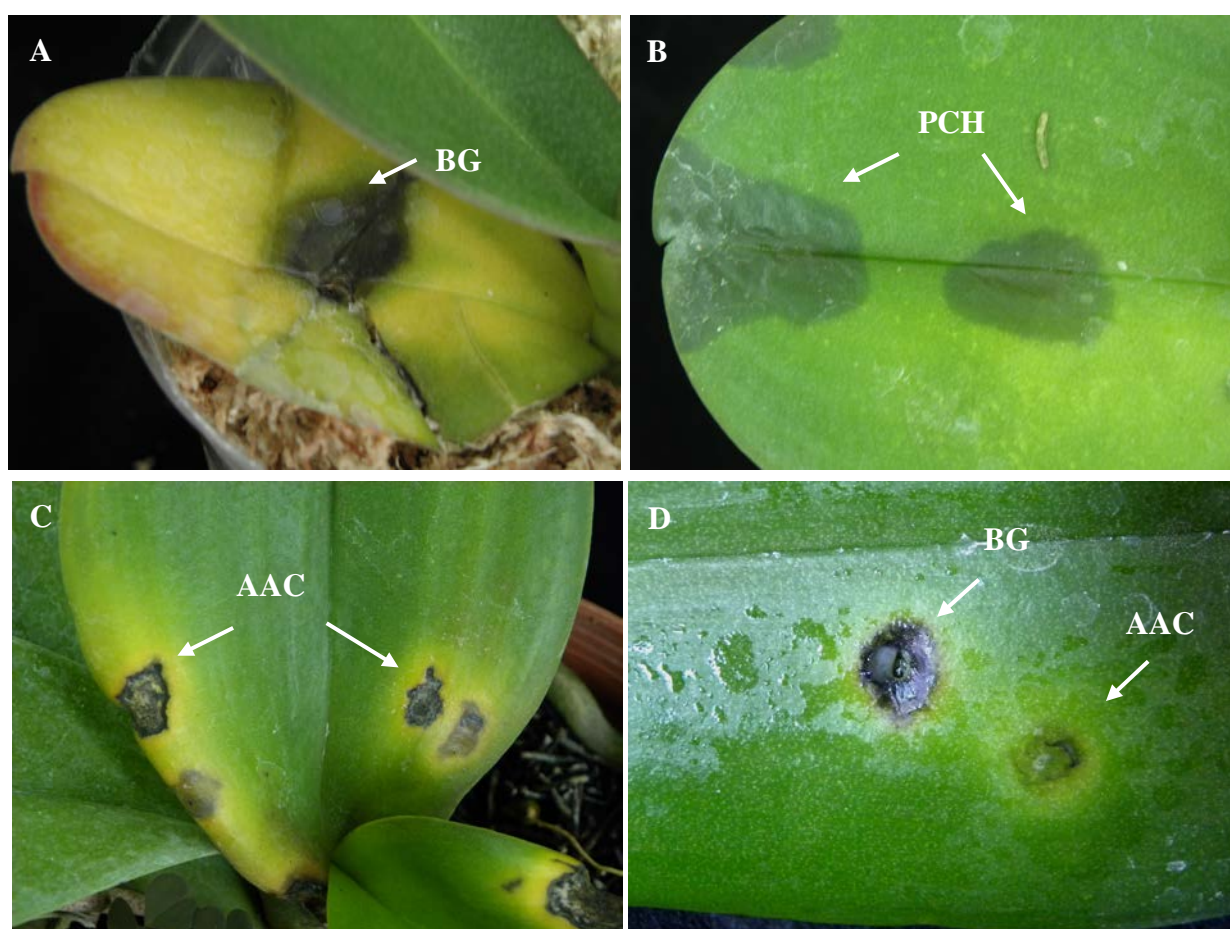
應用蝴蝶蘭複合式 PCR 偵測人工接種蝴蝶蘭之罹病組織以針刺法進行人工接種於蝴蝶蘭植株葉片，接種 Pha9811 (AAC) (圖一、C)；接種 Bg4 (BG) (圖一、A)；接種 Pch9854 (PCH) (圖一、B)；於同一葉片接種 Pha9811 (AAC) 及 Bg4 (BG) (圖一、D)；但於同一葉片接種 Pha9811 (AAC) 及 Pch9854 (PCH)；於同一葉片接種 Pch9854 (PCH) 及 Bg4 (BG)；於同一葉片接種 Pha9811 (AAC)、Bg4 (BG) 及 Pch9854 (PCH) 等接種處理因為含 PCH 之處理於第三天時全葉軟爛，因此未提供圖片，也無法採樣，所以所有試驗均僅採第二天的樣品進行蝴蝶蘭

複合式 PCR 偵測，其結果顯示第 1-2 日採集的樣品除了 AAC 接種部位無 PCR 產物之外，無論是出現單一病徵或複合式病徵皆可偵測到標的菌（圖三）。

應用蝴蝶蘭複合式 PCR 偵測田間蝴蝶蘭罹病組織

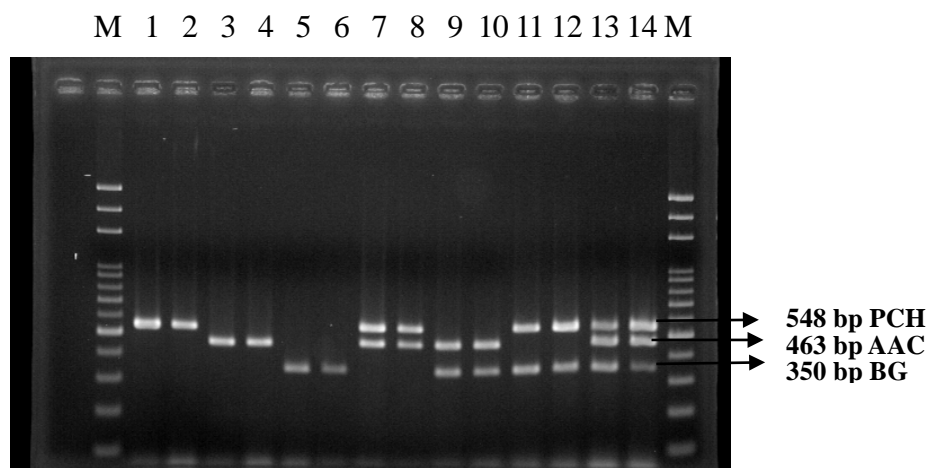
本研究室於 2010 年至嘉義大林、民雄育品蘭園及彰

化台大蘭園攜回疑似罹患葉斑病、軟腐病及褐斑病之蝴蝶蘭植株，以前述方法將其組織分離並進行蝴蝶蘭複合式 PCR 之快速檢測，於 4 小時內測得有 AAC、BG 及 PCH 之標的產物，並同時進行平板分離並經生理生化確認其分別為 AAC、BG 及 PCH 之菌株，確認蝴蝶蘭複合式 PCR 之快速檢測法應用在蝴蝶蘭種苗檢測有快速且專一的效果（圖四）。



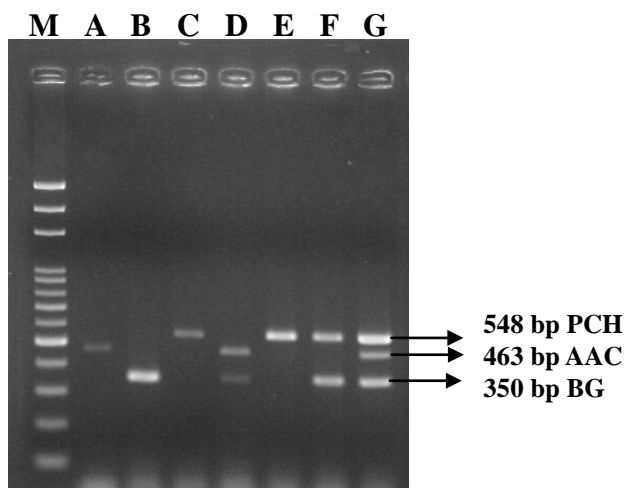
圖一、蝴蝶蘭葉片分別接種 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (AAC)、*Burkholderia gladioli* (BG) 及 *Pectobacterium chrysanthemi* (PCH) 所引起的病徵。A：接種 BG 引起葉斑黃化病徵；B：接種 PCH 引起的軟腐病徵；C：接種 AAC 引起具黃暈的褐斑病徵；D：同一蝴蝶蘭葉片上分別接種 AAC 及 BG 引起壞疽病徵難以分辨。

Fig. 1. Symptoms caused by *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (AAC), *Burkholderia gladioli* (BG), and *Pectobacterium chrysanthemi* (PCH) on *Phalaenopsis* leaves. A, symptoms caused by BG; B, symptoms caused by PCH; C, symptoms caused by AAC; D, symptoms caused by AAC and BG were not distinguishable on the same *phalaenopsis* leaf.



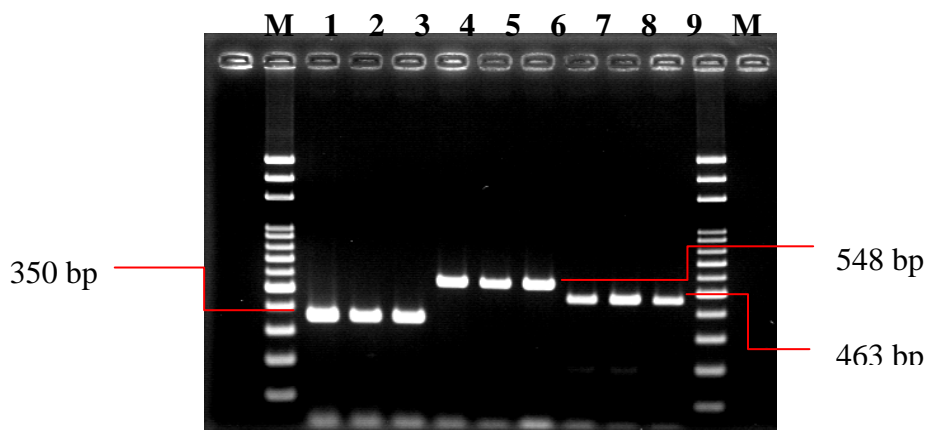
圖二、以複合式 PCR 偵測蝴蝶蘭三種病原細菌 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (AAC)、*Burkholderia gladioli* (BG)、及 *Pectobacterium chrysanthemi* (PCH) 單一菌落之電泳圖譜。M: Bio 100 Marker, 1-2 為 PCH 單一菌落; 3-4 為 AAC 單一菌落; 5-6 為 BG 單一菌落; 7-8 為 PCH 和 AAC 單一菌落混合液; 9-10 為 AAC 和 BG 單一菌落混合液; 11-12 為 PCH 和 BG 單一菌落混合液; 13-14 為 AAC、BG 及 PCH 單一菌落混合液。

Fig. 2. Detection of a single colony suspension of three pathogenic bacterial diseases of *Phalaenopsis* by multiplex PCR. M, Bio 100 bp Marker; 1-2, suspension of PCH single colony; 3-4, suspension of AAC single colony; 5-6, suspension of BG single colony; 7-8, suspension of PCH and AAC single-colony mixture; 9-10, suspension of AAC and BG single-colony mixture; 11-12, suspension of PCH and BG single-colony mixture; 13-14, suspension of AAC, BG and PCH single-colony mixture.



圖三、蝴蝶蘭人工接種三種細菌病害之病原細菌 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (AAC)、*Burkholderia gladioli* (BG)、及 *Pectobacterium chrysanthemi* (PCH) 二天後取樣進行複合式 PCR 之電泳圖譜。M: Bio 100 Marker; A: 接種 AAC; B 組: 接種 BG; C 組: 接種 PCH; D 組: 接種 AAC 及 BG; E 組: 接種 PCH; F 組: 接種 PCH 及 BG; G 組: 接種 AAC、BG 及 PCH。

Fig. 3. Samples of *Phalaenopsis* leaves were inoculated with three pathogenic bacteria *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (AAC), *Burkholderia gladioli* (BG), and *Pectobacterium chrysanthemi* (PCH), sampled at two days post inoculation, and detected by multiplex PCR. M: Bio 100 bp Marker; A, artificial inoculation with AAC; B, artificial inoculation with BG; C, artificial inoculation with PCH; D, artificial inoculation with AAC and BG; E, artificial inoculation with PCH; F, artificial inoculation with PCH and BG; G, artificial inoculation with AAC, BG and PCH.



圖四、以複合式 PCR 偵測田間蝴蝶蘭葉片感染 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (AAC)、*Burkholderia gladioli* (BG)、或 *Pectobacterium chrysanthemi* (PCH) 之電泳圖譜。M：Bio 100 Marker、1-3：為呈葉斑病徵之蝴蝶蘭葉片、4-6：為呈軟腐病徵之蝴蝶蘭葉片、7-9：為呈褐斑病徵之蝴蝶蘭葉片。

Fig. 4. Detection of *Phalaenopsis* leaves infected by *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (AAC), *Burkholderia gladioli* (BG), or *Pectobacterium chrysanthemi* (PCH) in fields by multiplex PCR. M: Bio 100 bp Marker; 1-3, *Phalaenopsis* leaves infected by BG with leaf spot symptoms; 4-6, *Phalaenopsis* leaves infected by PCH with soft rot symptoms; 7-9, *Phalaenopsis* leaves infected by ACC with brown spot symptoms.

討 論

針對蝴蝶蘭細菌性病害診斷鑑定或偵測方法有早期的生理生化^(7, 8, 12, 20)、酵素連結免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)⁽²¹⁾、核酸雜合⁽²¹⁾，到現在廣泛使用的 PCR、Real-time PCR⁽¹⁰⁾、複合式 (multiplex) PCR 等方法^(9, 14, 16, 22)。採用快速的 PCR、Real-time PCR、multiplex PCR 等檢測法先初步篩出病原菌，再進行較費時的生理生化及接種實驗，已成了現今偵測植物病害之趨勢。其中複合式 PCR 主要是應用二組或二組以上之引子組，可同時鑑定二種或二種以上目標微生物，其因目的不同而有不同的應用方式，包括可應用複合式引子組針對同一基因進行 PCR 以產生不同片段作多重確認⁽²²⁾，或是應用複合式引子組不同基因或標的生物產生其相對應片段以做確認^(9, 14, 16)。Diallo⁽⁹⁾等人以 Y45 / Y46 及 Ech1 / 1' 兩組引子組進行複合式 PCR，同時鑑定造成馬鈴薯種薯軟腐之 *Pectobacterium atroseptica* 及 *P. chrysanthemi*；Ozdemir 則應用 CMM-5 / CMM-6、Primer1 / Primer2 及 RST2 / RST3 等三組引子組針對感染蕃茄種子造成植株病害之 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (造成潰瘍病)、

Pseudomonas syringae pv. *tomato* (造成葉斑病) 及 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (造成斑點病) 進行複合式 PCR，建立檢測蕃茄種子之技術⁽¹⁶⁾；Maeda⁽¹⁴⁾ 等也應用 glu-FW / glu-RV、pla-FW / pla-RV 及 gla-FW / gla-RV 等三組引子以複合式 PCR 技術，同時鑑定 *Burkholderia glumae*、*B. plantarii* 及 *B. gladioli* 等三種引起水稻病害的病原菌，以建立檢測稻種子帶菌的技術⁽¹⁴⁾；可見將複合式 PCR 應用於快速鑑別同一寄主之不同病原菌，已為廣泛應用之技術。本研究室近幾年針對蝴蝶蘭上已知的軟腐病、褐斑病、葉斑病等三種細菌性病害之病原菌開發出專一性的引子^(3, 4, 5)，並進一步研究探討應用複合式 PCR 同時檢測蝴蝶蘭上常見的三種細菌性病害的效率及田間偵測之可行性及實用性。

本研究於 2002 - 2011 年間分別至臺灣主要蝴蝶蘭產區 (台中、嘉義、屏東等地區) 之蘭園採集疑似細菌性病害樣品，經過鑑定後確認的細菌菌株分別為 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (AAC)、*Burkholderia gladioli* (BG) 及 *Pectobacterium chrysanthemi* (PCH) 等 311 支菌株作為供試標的菌株，同時以其他供試非標的菌株為對照，共計 6 屬 11 種 32 株細菌 (表一)，除了將 Hseu 等^(3, 4, 5) 開發可偵測 AAC、BG、PCH 病原細菌的專一性引子組，進

行複合式 PCR 反應條件測試外，並進而建立蝴蝶蘭三種主要細菌性病害之標準檢測流程，同時測試此複合式 PCR 檢測之專一性及靈敏度，結果顯示 Pha9811 (AAC)、Bg4 (BG) 及 Pch9854 (PCH) 可偵測到之最低菌量分別為 $1.79 \sim 1.89 \times 10^1$ cfu/ml 細菌數，較前述 Özdemir⁽¹⁶⁾ 應用於蕃茄病害之複合式 PCR 靈敏度達 3 cfu/ml 為稍低，但較前述 Diallo⁽⁹⁾ 等以 Y45 / Y46 及 Ech1 / 1' 兩組引子組進行複合式 PCR 之靈敏度僅 4×10^4 cfu/ml 高；另外，在細菌全 DNA 之靈敏度測試，本研究開發之蝴蝶蘭複合式 PCR 最低可檢測到細菌全 DNA 50 pg，較 Diallo⁽⁹⁾ 等研究的靈敏度僅達 10 ng 為優，顯示本研究開發之蝴蝶蘭複合式 PCR 其靈敏度較佳；其他相關研究如 Özdemir⁽¹⁶⁾、Maeda 等⁽¹⁴⁾ 及 Su⁽²²⁾ 只提到其開發之複合式 PCR 可明確同時分離不同大小之特定片段，但卻未分析其靈敏度，故無從比較。

進行非標的菌株干擾以測定複合式 PCR 之專一性，將供試之 Pha9811 (AAC)、Bg4 (BG) 及 Pch9854 (PCH) 菌株與其他 6 屬 11 種共計 32 株非標的菌株經 NaOH 簡萃法並進行蝴蝶蘭複合式 PCR，顯示只有對供試標的菌株有條帶產物出現且無其它雜訊，顯示其專一性佳。挑選單一菌落以 NaOH 簡萃法進行蝴蝶蘭複合式 PCR，結果顯示無論單一種標的菌或兩種混合或三種混合標的菌，均可針對標的菌分別產生 463 bp (AAC)、350 bp (BG) 及 548 bp (PCH) 之 PCR 產物，且可明確區分，上述三項試驗皆顯示此蝴蝶蘭複合式 PCR 檢測技術之靈敏性、專一性及偵測簡便性較佳。

Su⁽²²⁾ 曾提到，試以健康葉片研磨汁另混合 AAC、BG、PCH 菌液來模擬田間發病時應用其開發之蝴蝶蘭複合式 PCR 檢測法之效能，運用離心萃取法使其葉片成分或附生於葉片上之腐生菌不會干擾其複合式 PCR 反應。本研究為了測試實際應用田間樣品偵測之可行性，分別以針刺接種法將 Pha9811 (AAC)、Bg4 (BG) 及 Pch9854 (PCH) 供試菌株之菌泥接種於蝴蝶蘭植株葉片，因為接種含有 PCH 菌泥的處理葉片於第三日即腐爛，因此只顯示第 1-2 天的結果，其中採集的樣品除了 E 組之 AAC 接種部位未出現病徵而無 PCR 產物之外，無論是接種單一細菌出現之病徵或複合式接種所出現的病徵皆可偵測到標的菌 (圖三)，顯示其蝴蝶蘭複合式 PCR 應用於蝴蝶蘭植株罹病樣品檢測效果甚佳，且無葉片成分

或環境菌干擾之顧慮。另外，從接種第一日仍未出現病徵時的樣品，亦可以檢測到該目標病原，因此所設計的引子應可用於偵測帶菌但尚未出現病徵的樣品，並確認標的病原細菌是否潛在或附著於植體表面。進一步採集田間疑似罹患細菌性病害之蝴蝶蘭植株，以前述方法將其組織分離並進行蝴蝶蘭複合式 PCR 之快速檢測，於 3 小時內測得有 AAC、BG、PCH 之標的產物，並同時進行平板分離並經生理生化確認其分別為 AAC、BG、PCH 之菌株，確認蝴蝶蘭複合式 PCR 之快速檢測法應用在蝴蝶蘭種苗檢測有快速且專一的效果 (圖四)。

現今關於植物病原菌的分子檢測技術進步神速，從定量及靈敏度而言，以 Real-Time PCR⁽¹⁰⁾ 效果較佳，但其設備昂貴且成本高，而複合式 PCR 成本與一般 PCR 相同，不需較複雜的 DNA 抽取法即可進行，且本研究用一份試劑組即可快速且同時偵測兩種以上的病原細菌為其特點，國外在蕃茄⁽¹⁶⁾、稻米⁽¹⁴⁾ 及馬鈴薯⁽⁹⁾ 研究也有以複合式 PCR 同時偵測 2~3 種病原菌的例子且效果佳。本研究開發之蝴蝶蘭複合式 PCR 快速檢測法，未來除了可廣泛應用於蝴蝶蘭細菌病害快速檢測之外，其引子合成片段亦可作為發展生物晶片之基礎，建立蝴蝶蘭種苗包括病毒、真菌及細菌多重病原菌之檢測技術，以達理想的蝴蝶蘭病害之監測管理及檢疫管制，使我國蘭花外銷市場在國際上更具競爭力。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

- Huang, T. C., Lee, H. L., Chou, Y. H., and Lu, Y. M. 1998. Control of soft rot on *Phalaenopsis* spp. and drug resistance in the pathogenic bacterium. *Plant Pathol. Bull.* 7: 216 (Abstract)]
- 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.
- Hseu, S. H., Shentue, H., Tzeng, K. C. and Lin, C. Y. 2007. Development of specific primers for differential identification pathogen *Erwinia carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Pathol. Bull.* 16: 19-29.

4. Hseu, S. H., Shentu, H. and Sung, C. J. 2011. A specific primer pair for diagnose and detection of bacterial leaf spot pathogen: *Burkholderia gladioli* on *Phalaenopsis* orchid. Plant Pathol. Bull. 20: 39-51.
5. Hseu, S. H., Sung, C. J. and Shentu H. 2011. A specific primer pair for diagnose and detection of bacterial brown spot pathogen: *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* on *Phalaenopsis* orchid. Plant Pathol. Bull. 20: 52-64.
6. Ou, S. K. and Huang, C. C. 2010. Miracle of Taiwan *Phalaenopsis* orchid Sea transport storage and transportation technology in Europe and America. Food & Fertilizer Technology Center agnews. Online, <http://www.tari.gov.tw/taric/modules/news/article.php?storyid=>
7. Chun, W. and J. B. Jones. 2001. Burkholderia. Pages 139-150. ; in: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition APS, St. Paul, Minnesota, USA. 373 pp
8. De Boer, S. H. and A. Kelman. 2001. Erwinia soft rot group. Pages 56-72. ; in: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition APS, St. Paul, Minnesota, USA. 373 pp
9. 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.
10. 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* on Cucurbit seedlots using magnetic capture hybridization and real-time polymerase chain reaction. Phytopathology. 99 : 666-678.
11. Huang, T. C. 1990. Characteristics and control of *Pseudomonas cattleyae* causing brown spot of *Phalaenopsis* orchid in Taiwan. Plant Prot. Bull. 32:327 (Abstr.).
12. 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. 3rd edition APS, St. Paul, Minnesota, USA. 373 pp.
13. Keith, L. M., Sewake, K. T., and Zee, F. T. 2005. Isolation and characterization of *Burkholderia gladioli* from orchids in Hawaii.
14. Maeda, Y., Shinohara, H., Kiba, A., Ohnishi, K., Furuya, N., Kawamura, Y., Ezski, T., Vandamme, P., Tsushima, S. and Hikichi Y. 2006. Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* using *gyrB* and *rpoD* sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56 : 1031-1038.
15. Miller, J. W. 1990. Bacterial brown spot of orchid caused by *Pseudomonas cattleyae*. Plant Pathol. Circular, No.330.
16. 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 (2), 495-497.
17. Republic of china ministry of directorate general of customs. 2009. Export of goods, quantity, value tables: *Phalaenopsis*. Directorate General of Customs (in R.O.C.) <http://web.customs.gov.tw>.
18. Sambrook, J., Mantis, T. I. and Fritsch, E. F. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Press, N. Y.
19. Samson, R., Legendre, J. B., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., Achouak, W. and Gardan, L. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiacal* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbackiae* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov. Int. J.

- Syst. Evol. Microbiol. 55 : 1415-1427.
20. Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria 3rd ed., APS Press. Minnesota, 373 pp.
21. Singh, U., Trevors, C. M. and Boer, S. H. 2000. Fimbrial-specific monoclonal antibody-based ELISA for European potato strains of *Erwinia chrysanthemi* and comparison to PCR. Plant Dis. 84 : 443-448.
22. 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.)
23. Wang, H., Qi. M. and Cutler, A. J. 1993. A simple method of preparing plants samples for PCR. Nucleic Acids Res. 21: 4153-4154.

Abstract

Hseu, S. H.^{1,3}, Shentu, H.² and Sung, C. J.¹ 2012. Multiplex PCR-based rapid detection of bacterial diseases on *Phalaenopsis* orchid. Plant Pathol. Bull. 21: 91-100. (1. Department of Plant Protection, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Fengshan, Kaohsiung, Taiwan, R.O.C., 2. Farmers' Association Support and Agri-Tourism Division, Taichung City Government Agriculture Bureau, Taichung, Taiwan, R.O.C., 3: Corresponding author, E-mail: shhseu@fthes-tari.gov.tw)

Exportation of *Phalaenopsis* seedlings is an important industry in Taiwan; therefore, seedling health is one of the most concerned issues. Of the diseases in *Phalaenopsis*, brown spot caused by *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (AAC), leaf spot caused by *Burkholderia gladioli* (BG), and soft rot caused by *Pectobacterium chrysanthemi* (PCH) are important bacterial diseases. Among them, symptoms of brown spot and leaf spot are not easy to distinguish and might be misdiagnosed with some other fungal diseases at the initial stage of infection. For the purpose of rapid and differentiate these different diseases, this study was conducted to develop a multiplex polymerase chain reaction technique (multiplex PCR) to detect, distinguish, and identify AAC, BG and PCH with high sensitivity and specificity. Diseased tissues of *Phalaenopsis* obtained from artificial inoculation or natural infection could be subjected to the multiplex PCR after a simple DNA extraction procedure. After the multiplex PCR, DNA fragment could be specifically amplified from the samples of AAC, BG, and PCH with the length of 463 bp, 350 bp, and 548 bp, respectively. On the contrary, no DNA fragment was obtained from the multiplex PCR using a total of 32 non-target bacterial strains which belong to 6 genera 11 species. Sensitivity of PCR for detecting AAC, BG, and PCH was between 50 and 100 pg for purified DNA and $1.8 - 1.9 \times 10^1$ cfu/ml for cultured cells, respectively. It took 3-4 hr to detect target bacterium from colony or infected tissues of phalaenopsis. These results revealed the multiplex PCR technique could be applied for the detection, diagnosis, and identification of the three bacterial diseases in *Phalaenopsis* seedlings rapidly and accurately.

Keywords: *Phalaenopsis*, brown spot, soft rot, leaf spot, multiplex PCR, diagnosis, identification, detection.