

火鶴花細菌性葉斑病菌 *Acidovorax anthurii* 專一性引子開發

許秀惠^{1*}、蔡宜容¹、曾怡蓉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

* 聯絡作者, E-mail: shhseu@fthes-tari.gov.tw

摘 要

許秀惠、蔡宜容、曾怡蓉。2016。火鶴花細菌性葉斑病菌 *Acidovorax anthurii* 專一性引子開發。植物醫學58(1): 9-16。

利用隨機增幅多型性核酸技術 (random amplified polymorphic DNA, RAPD), 以 160 個隨機引子增幅火鶴花細菌性葉斑病菌 *Acidovorax anthurii* 的基因體 DNA, 篩選出 *A. anthurii* 特有的 1813 bp 專一性片段, 並進一步將此 DNA 片段純化, 選殖後進行轉形質體 pW2 Ant -1813 bp 的核酸序列分析, 再根據其序列設計對 *A. anthurii* 具有專一性的引子組 Ant 2F/Ant 2R。應用此引子組進行聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR), 供試的 11 株火鶴花細菌性葉斑病菌的菌株皆能增幅出 343 bp 的片段, 但對其他供試的 8 屬 21 種共 121 菌株的其他非標的病原細菌及腐生細菌, 均不會產生任何片段。以 Ant 2F/Ant 2R 引子組測試細菌性葉斑病菌的 DNA, 其靈敏度可達 10 ~ 50 pg, 菌落偵測的靈敏度為 4.5×10¹ cfu/ml 活菌數。將 10⁶ cfu/ml 的 *A. anthurii* 菌液分別與其他細菌的菌液 10⁵ ~ 10⁸ cfu/ml 等比率混合後, 再進行聚合酵素連鎖反應, 也不影響 *A. anthurii* 的偵測結果。應用單一菌落快速檢測法可於 3 - 4 小時內鑑定火鶴花細菌性葉斑病菌, 顯示本研究設計的引子組 Ant 2F/Ant 2R 可用於火鶴花細菌性葉斑病菌快速診斷鑑定及檢測。

關鍵詞：火鶴花，細菌性葉斑病，*Acidovorax anthurii*，引子，診斷，鑑定，偵測

緒 言

火鶴花 (*Anthurium andraeanum*) 是一種熱帶觀賞作物，在商業上有其重要性。火鶴花為天南星科 (Araceae) 花燭屬 (*Anthurium*) 原產於中、南美洲等熱帶地區，花朵明艷美麗，又富變化適合做切花和切葉⁽⁶⁾，外銷國家主要為日本。目前，台灣火鶴花種植面積為189公頃⁽⁴⁾，主要產地在中南部的南投、台中、台南、高雄和屏東等地區，嘉義和彰化則為零星栽培，其中以高雄產量最多。在2009~2012年間筆者⁽¹⁷⁾於高雄市和屏東縣的火鶴花苗圃發現一種新的病害-細菌性葉斑病 (bacterial leaf spot disease of anthurium)，已確認是由 *Acidovorax anthurii*⁽¹⁷⁾ 所引起，該病害最早的記載是 1989 年 Prior & Rott⁽³³⁾

在法屬西印度群島 Guadeloupe & Martinique 地區栽培的火鶴花上發現的細菌性病害，之後在 1992~2015 年間 Dilbar 等⁽⁵⁾，Saddler 等⁽³⁵⁾ 和 Holder 等⁽¹⁴⁾ 在 Trinidad 地區栽培的火鶴花上相繼發現相同的病害，該病害可造成系統性感染，導致火鶴花植株死亡，是具威脅性的病害^(8,35)。

Acidovorax 屬包含許多植物病原細菌的種 (species) 和亞種 (subspecies)，在世界各地已經廣泛造成單子葉和雙子葉植物的重要病害，也造成經濟損失^(1,9,10,22,24,37)，由文獻資料顯示，許多研究者已設計出針對 *Acidovorax* spp. 的專一性引子組，包括針對 *A. avenae* subsp. *avenae* 的專一性引子組如 Aaaf3/Aaar2 與 Aaaf5/Aaar2⁽³⁹⁾，針對 *A. avenae* subsp. *cattleyae* 的專一性引子組如 Ac46f/Ac46r⁽²¹⁾ 以及針對 *A. avenae* subsp. *citrulli* 的專一性引子組如 WFB1/WFB2⁽⁴⁵⁾、EQID5/SEQID4^{m(46)}、AACF3/AACR2⁽⁷⁾、BX-L1/BX-S-R2⁽²⁾ 與 SL1/SR1⁽⁴³⁾ 等。筆者測試上述可用來偵測 *Acidovorax* 屬的引子組，均無法偵測 *Acidovorax anthurii* 這個病原菌，確認目前無可供鑑定此病原菌的PCR技術。另外，這個病害是於台灣新發現的病害，病原菌是一新的“種”，因此需要發展一套檢測技術，而且為了有效防止此病害傳播，也需要研發快速診斷鑑定的技術以供應用，期能達到早期發現早期防治的效果。本研究應用 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 技術^(26,27,49)，針對火鶴花細菌性葉斑病菌全基因體中特有的核酸片段，設計出針對 *Acidovorax anthurii* 具專一性的引子組，以降低該病原菌危害台灣栽培火鶴花的風險。

材料與方法

菌株來源

利用於 2009~2012 年間在高雄市及屏東縣等多處火鶴花園分離，且經各項鑑定⁽²³⁾及柯霍氏法則確認病原性的 11 株火鶴花細菌性葉斑病菌 (*Acidovorax anthurii*)⁽¹⁷⁾ 均分別編號，作為供試標的菌株。其他供試非標的菌株為本研究及來自中興大學植物病理系(細菌研究室)的菌株，共計 8 屬 21 種 121 株 (如表一)，其中 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* 13202、*Burkholderia cepacia* 13208、*Pseudomonas cichorii* 12682、*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 13182 等標準菌株購自財團法人食品工業發展研究所。

10 J. Plant Med.

表一、供 RAPD 及 PCR 試驗之 8 屬、21 種、121 株非標的細菌菌株。

Table 1. Non-target bacterial strains 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>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	Aac68、BCRC 13202
<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、Bgl-24
<i>B. glumae</i>	B. glumae01、B. glumae06
<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>Ps.cichorii</i>	BCRC 12682、sf75
<i>Ps. fluorescens</i>	Pf
<i>Ps. putida</i>	Pu
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	Psg
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	Psl
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Psph
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	Pspi
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Pss
<i>Ps. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Psta
<i>Ps. 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> (<i>Xoo</i>)	XM27、30、42、XF-111
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> (<i>Xoc</i>)	I-1C、F-9b、H-1、K-1-b

細菌全 DNA 之抽取

純化分離來自火鶴花的 11 株 *Acidovorax anthurii* 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⁽³⁶⁾ 及 Hseu 等^(19,20) 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)，依產品說明使用：將經選殖之白色菌落培養於含有 kanamycin (50µg/ml) 之 5 ml LB 培養液中，於 37°C 培養 16 hr 後，取 2 ml 至微量離心管，以 12,000 rpm 離心 5 min，去上清液，加入 200 µl solution I 溶解菌體，再加入 200 µl solution II 並混勻，最後加入 200 µl solution III 混合後，以 12,000 rpm 於 4°C 離心 10 min，吸取上清液至吸附 DNA 離心管內；加入 700 µl washing solution，以 12,000 rpm 於 4°C 離心 30 sec，去除下層液，再以

12,000 rpm 於 4°C 離心 3 min，將附著 DNA 離心管置於新的 1.5 ml 微量離心管，於 60°C 下烘乾約 5~10 min 後，加入 50 µl 去離子水，以 12,000 rpm 於 4°C 離心 30 sec 後回收 DNA。

RAPD 增幅反應及專一性引子之篩選

選取 *Acidovorax anthurii* 02、03 及 10 等 3 株菌株的 DNA 為模版，應用 OPERON 10-MER KITS (Blossom Biotechnologies, Inc. ROC) 之 OPL 01~20、OPO 01~20、OPP 01~20、OPQ1~20、OPR 01~20、OPS01~20、OPT01~20 及 OPW 01~20 等 160 個隨機引子進行 RAPD 反應，總體積為 20 µl，包含 100 ng 之 DNA、200 µM 的 dNTPs、0.25 µM 的隨機引子、0.8 units/ µl DyNzyme Taq DNA polymerase 及 2 µl 10X PCR 反應緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100) 等。PCR 增幅條件先以 94°C 反應 5 min，之後進行 94°C 1 min，40°C 1 min，72°C 1 min，共 38 個循環，最後再進行 72°C 5 min 1 個循環。所用引子對增幅後之產物分別以 1.5% agarose (1xTAE buffer) 之電泳分析 (100V)，並以 Gen-100 DNA ladder (GeneMark Technology, ROC) 為大小標幟 (size marker)，最後以溴化乙錠 (ethidium bromide 0.5 µg/ml) 染色觀察，並照相記錄。根據電泳結果初步對篩選出 *A. anthurii* 菌株可增幅產生共同條帶，且具再現性的隨機引子；同時取其他供試細菌的 DNA 為模版，以上述篩選出的隨機引子進行 RAPD，比較各隨機引子組 *A. anthurii* 菌株與其他細菌所增幅的 DNA 片段之異同，藉以篩選出對 *A. anthurii* 菌株具專一性的引子對。

專一性 DNA 片段回收、純化及核酸探針之製備

將經 RAPD 測試所得到的產物，以 1xTAE buffer 配製之 1.2% agarose 電泳分析，再將欲回收的片段 DNA 切下，放到 Gel Elution Kit 組 (GeneMark Technology, ROC) 所附的 Spin Column、Collection Tube 組合中並蓋上蓋子，以 12,000 rpm 離心 1 min 將離心下來之 DNA 回收，並將回收好的 DNA 利用 Dig high prime DNA Labeling and detection starter Kit II (Roche Applied Science, USA) 試驗套組將該 DNA 片段製作成核酸探針，之後保存於 -30 °C，供後續核酸雜合反應。

南方雜合反應 (Southern hybridization)

依據 Southern 氏⁽⁴⁰⁾ 的方法，將 DNA 轉漬到尼龍濾膜。首先以 *Acidovorax anthurii* 02、03、10、11、12 及 13 等 6 株菌株及其他供試細菌的 DNA 為模版，利用 OPW-2 引子進行 RAPD 反應，將其增幅產物以毛細管方法將 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 片段選殖及核酸定序

本試驗專一性 DNA 片段的選殖係以 TOPO TA Cloning® kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) 產品說明進行。取 4 µl 回收 DNA 片段加入 1 µl Salt solution 與 1 µl 的 pCR® II-TOPO vector，於室溫下 5 min 後，置於冰上取 2~6 µl 加入勝任細胞 (competent cell)，混勻並置於冰上 30 min 後，於 42°C 熱休克 30 sec，再置於冰上 2 min 後，加入 250 µl 的 SOC 培養液以 200 rpm 震盪在 37°C 下培養 1 hr。將此培養菌液均勻塗抹於含有 40 µl 100 mM 之 IPTG、40 µl 40 µg/ml 之 X-gal 及 Kanamycin (50 ppm)

的LA培養基，於 37°C 隔夜培養後，挑選白色之單一菌落，抽取質體 DNA。選殖株以 *EcoRI* 剪切後進行電泳分析，以確認此白色菌落為含有選殖片段，之後定序選殖株的核酸，再藉由 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 Primer 3 web (v.4.0.0) 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) 形成較少的正向引子 (forward primer) 及反向引子 (reverse primer)。

引子組 PCR 反應條件設定

所設計的引子組為 Ant 2F/Ant 2R，分別測試去氧核糖核苷三磷酸鹽 (dNTPs)、引子 (primer) 濃度、Taq polymerase (Pro-taq) 的適當反應量、不同 PCR 黏合溫度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 11 株 *Acidovorax anthurii* 菌株的 DNA 及 *A. avenae* subsp. *avenae*、*A. avenae* subsp. *citrulli*、*A. avenae* subsp. *cattleyae*、*Agrobacterium tumefaciens*、*Burkholderia andropogonis*、*B. caryophylli*、*B. cepacia* 13208、*B. gladioli*、*B. gladioli* pv. *gladioli*、*B. glumae*、*Pantoea agglomerans*、*Pa. ananatis*、*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*、*Pe. chrysanthemi*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Ps. cichorii*、*Ps. syringae* pv. *syringae*、*Ps. fluorescens*、*Ps. putida*、*Ps. syringae* pv. *glycinea*、*Ps. syringae* pv. *lachrymans*、*Ps. syringae* pv. *phaseolicola*、*Ps. syringae* pv. *pisi*、*Ps. syringae* pv. *tabaci*、*Ps. syringae* pv. *lachrymans*、*Ps. syringae* pv. *phaseolicola*、*Ps. syringae* pv. *pisi*、*Ps. syringae* pv. *tabaci*、*Ps. syringae* pv. *tomato*、*Ralstonia solanacearum*、*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*、*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*、*X. campestris* pv. *armoraciae*、*X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* 13182、*X. oryzae* pv. *oryzae*、*X. oryzae* pv. *oryzicola* 等 8 屬 121 株供試非標的菌株 (表一) 的 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 Ant 2F/Ant 2R 偵測 *A. anthurii* 菌株 DNA 的專一性。

非標的菌株 DNA 干擾專一性測試：將供試 *A. anthurii* 02 菌株的 DNA 與上述非標的菌株的 DNA 各自以等比例混合 (每管加入 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，所設計引子組 Ant 2F/Ant 2R 對供試 *A. anthurii* 菌株的 DNA 是否仍具專一性。

非標的菌株菌液干擾專一性測試：將 *Acidovorax anthurii* 03 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 *A. avenae* subsp. *avenae*、*A. avenae* subsp. *citrulli*、*A. avenae* subsp. *cattleyae*、*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*、*Pe. chrysanthemi*、*Pseudomonas cichorii*、*Ralstonia solanacearum*、*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* 等 5 屬 8 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 $10^5 \sim 10^8$ cfu/ml，每個稀釋濃度先各別與供試之 *A. anthurii* 03 菌液 10^6 cfu/ml 以等比例混合後，各取 50 μ l 於 200 μ l 微量離心管中，加入 50 μ l 的 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 以中和，取 2 μ l 並以

Ant 2F/Ant 2R 為引子組進行 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 Ant 2F/Ant 2R 偵測 *A. anthurii* 的專一性。

引子組靈敏度測定

DNA 靈敏度測定：分別將供試 *Acidovorax anthurii* 菌株 02、12、及 1011 的 DNA 分別取 200、100、50、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 μ l，依上述增幅條件進行 PCR，反應後進行電泳分析，以測試所設計引子組 Ant 2F/Ant 2R 偵測 *A. anthurii* 菌株 DNA 的靈敏度。

菌液靈敏度測定：將 *A. anthurii* 菌株 12、13、及 1011 於 NA 上培養 24 hr 後，以無菌水懸浮並調整其 OD₆₂₀ 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，並取適當的細菌懸浮液以 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 Ant 2F/Ant 2R 為引子組進行 PCR 與電泳分析以測試引子組的靈敏度。

單一菌落快速檢測

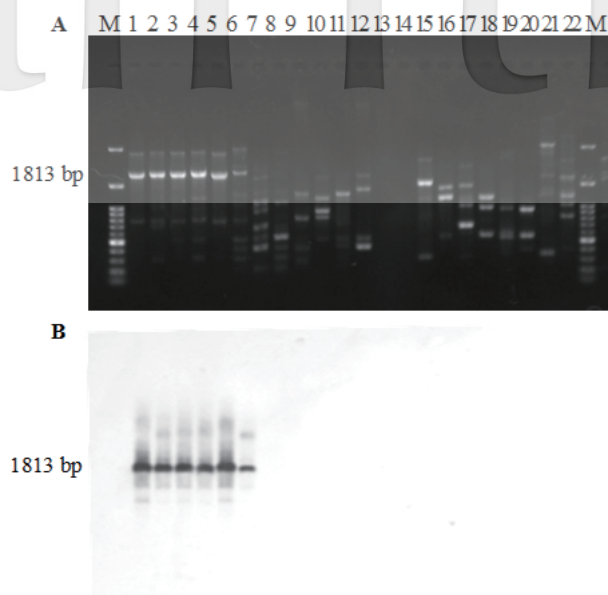
修改 Wang⁽⁴⁷⁾ 簡易方法或是菌液直接加熱法⁽²⁸⁾，用來檢測未知的單一菌落中若含有 *Acidovorax anthurii* 是否可利用所設計的引子組快速偵測，因此以滅菌過的牙籤各別沾取 *A. anthurii* 菌株 02、03、10、11、12、13、14、15、16、17 及 1011 等菌株，經純化後的單一菌落，放入含 50 μ l 0.5 N NaOH 溶液之微量離心管中，依前述方法萃得 DNA，再以所設計的引子組 Ant 2F/Ant 2R 進行 PCR 反應及電泳分析。

結果

以 RAPD 選殖專一性 *Acidovorax anthurii* W02-Ant-1813 片段

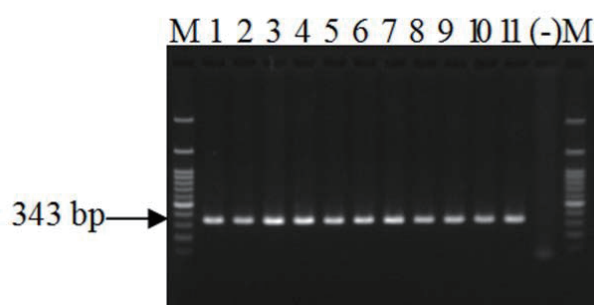
以 *Acidovorax anthurii* 菌株 02、03 及 10 等 3 株菌株的全 DNA 為模板，與 OP 系列共 160 組隨機引子進行 RAPD 分析，結果顯示，以 OPW-02 隨機引子組與本實驗室所分離之 11 株 *A. anthurii* 菌株均可產生 1813 bp 片段 (Data not shown)；再將 OPW-02 與其他非標的細菌的全 DNA (表一) 為模版進行 RAPD 反應，並以該 1813 bp 全 DNA 片段作為核酸探針以進行南方雜合法，結果顯示此 1813 bp 探針只與 *A. anthurii* 菌株有強度雜合訊號 (圖一A, B)，因此，初步確認此 1813 bp 片段確為 *A. anthurii* 的共同片段，且與其他非標的菌株經 OPW-02-RAPD 產生的片段都不同。

進一步將該片段選殖於 pCR®II-TOPO 載體，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 比對並避開與其它生物相似的片段，利用 Primer3web (v.4.0.0) 分別設計 Ant 2F (正向引子) 及 Ant 2R (反向引子)，之後進行適合的 PCR 條件測試。將此組引子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) 94°C 5 min, 1 個循環；(b) 94°C 30 sec、60°C 30 sec、72°C 30 sec, 35 個循環；(c) 72°C 7 min, 1 個循環，反應結果確認引子組 Ant 2F/Ant 2R，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 11 株 *A. anthurii* 菌株均可產生 343 bp 專一



圖一、(A) 以隨機引子 OPW-02 應用 RAPD 方法分析火鶴花細菌性葉斑病菌及其他供試細菌菌株之電泳圖譜。(B) 利用選殖自火鶴花細菌性葉斑病 *Acidovorax anthurii* 菌株的 W02-Ant-1813 探針進行南方雜合反應之結果。1-6供試 *Acidovorax anthurii* 菌株依序為 02、03、10、11、12 及 13；7-22 為供試非標的菌株。M: 100 bp marker。

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis shows the RAPD patterns of *Acidovorax anthurii* strains and the other non-target bacteria using the random primer OPW-02 (A) Southern hybridization of the RAPD products shown in (A) W02-Ant-1813 probe cloned from *Acidovorax anthurii* (B) M: 100 bp marker. Lanes 1-6: *Acidovorax anthurii* 02, 03, 10, 11, 12 and 13; Lanes 7-22, other bacterium. M: 100 marker.



圖二、以引子組 Ant 2F/Ant 2R 進行聚合酶連鎖反應偵測火鶴花細菌性葉斑病菌株DNA之電泳圖譜。M: 100 bp Marker；(-)為負控制組；1-11依序為分離自火鶴花細菌性葉斑病 *Acidovorax anthurii* 菌株：02、03、10、11、12、13、14、15、16、17、1011；(-)：負控制組。

Fig. 2. Detection of *Acidovorax anthurii* PCR with primer pair Ant 2F/ Ant 2R from the template DNA of *Acidovorax anthurii* strains. M: 100 bp marker; (-), negative control; Lanes 1-11, colonies isolated from diseased anthurium: *Acidovorax anthurii* 02, 03, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 and 1011.

性片段(圖二)，因此進一步探討此引子組用於偵測火鶴花細菌性葉斑病菌 *A. anthurii* 之專一性和靈敏度。

Ant 2F/Ant 2R 引子組之專一性

測試 11 株來自火鶴花 *Acidovorax anthurii* 菌株，以 Ant 2F/Ant 2R 引子組進行 PCR，結果顯示 11 株菌株均可增幅出 343 bp 之片段(圖二)；並將 *A. anthurii* 02 菌株的 DNA 分別加入等量的 *Acidovorax*：CH12、Aa4、Aa5、Aa8、Aa9、Aac9801、Aac9802、Aac68、BCRC 13202，*Agrobacterium*：AA19，*Burkholderia*：Pan1、Co8、Co10、Tw7、Tw9、BCRC 13208、Bgg、PA1-26、28、Bg1-24、01、06，*Pantoea*：Yx7、PA13199，*Pectobacterium*：Zan55、72、75、130、Os5、Ech83、9356、Os7、Sf18，*Pseudomonas*：Pae、BCRC 12682、sf75、Pf、Pu、Psg、Psl、PspH、Pspi、Pss、Psta、Psto，*Ralstonia*：Ia52、Ia85、Pss 05，*Xanthomonas*：A072、A245、Xv12、15、32、42、58、Hr8、17、24、31、45、Xcm13182、X58、M42、49、50、XM27、30、42、XF-111、I-1C、F-9b、H-1、K-1-b 等 8 屬 21 種，共 121 株供試非標的菌株的 DNA 進行 PCR 反應，並不影響 Ant 2F/Ant 2R 引子組對 *A. anthurii* 菌株的專一性(圖三)。且若將菌量濃度較低的 *A. anthurii* 菌株混雜菌量濃度較高的非標的細菌(*Acidovorax*、*Pectobacterium*、*Pseudomonas*、*Ralstonia*、*Xanthomonas*等 5 屬 8 菌株)，經簡易萃取 DNA 以 Ant 2F/Ant 2R 引子組進行 PCR 時，只出現 *A. anthurii* 的專一片段，顯示非標的菌株數量多時並不影響標的菌株偵測效率及準確性(data not shown)，確認所設計的引子對在樣品混雜其它非標的細菌時，對於標的 *A. anthurii* 菌株仍具專一性。

Ant 2F/Ant 2R 引子組之靈敏度

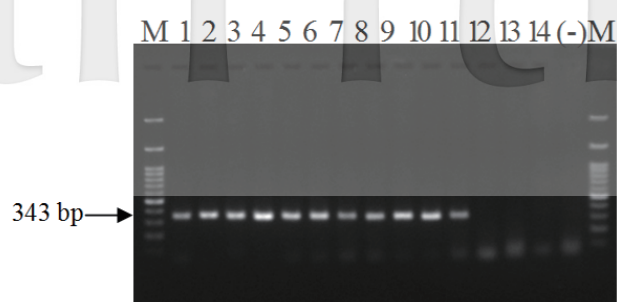
以 *Acidovorax anthurii* 菌株(03、12 及 1011)分別經培養後抽出的全DNA 測試 Ant 2F/Ant 2R 引子組的靈敏度，樣品低到 50~10 pg 的 DNA 也會有產物；再以前述菌株經培養後的細菌懸浮液測試該引子組的靈敏度，利用 0.5 N NaOH 溶液直接裂解供試細胞，使其溶出 DNA 的方式來偵測該引子組偵測供試菌液的敏感度，PCR 反應結果顯示，所設計的引子組最低可偵測到 4.5×10^1 cfu/ml 細菌數(圖四、圖五)。

細菌性葉斑病菌菌落快速鑑定

各取 *Acidovorax anthurii* 02、03、10、11、12、13、14、15、16、17 及 1011 單一菌落利用 0.5 N NaOH 溶液簡單萃取 DNA，再以引子組 Ant 2F/Ant 2R 進行 PCR 反應，結果顯示 2 種方法對於供試之 *A. anthurii* 單一菌落皆在 343 bp 處形成條帶，因此，可以將所設計的引子組用於菌落快速鑑定(圖六)。

討論

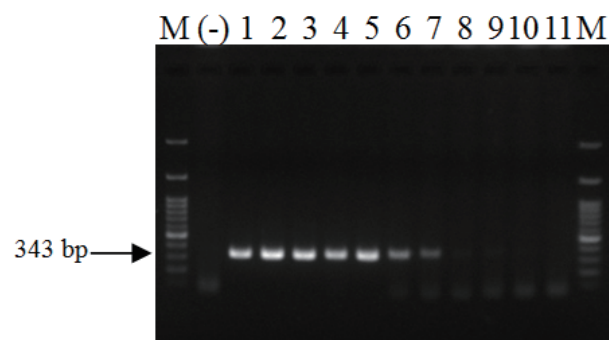
從國內外文獻資料顯示危害火鶴花的細菌病害中，由 *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* 引起的葉枯病(bacterial blight)，遍及全世界各火鶴花產區^(3,13,16,30)，也是危害台灣火鶴花最嚴重的病害，葉枯病於 1991 年在南投埔里火鶴花栽培場首先發現，在 1994 年該病害已經遍及全台灣火鶴花園，對火鶴花產業造成極大的損失⁽¹⁵⁾，另外，由 *Ralstonia solanacearum* 引起的青枯病^(31, 41)，及由 *Pectobacterium*



圖三、以引子組 Ant 2F/ Ant 2R 測定火鶴花細菌性葉斑病菌 *Acidovorax anthurii* 02 菌株 DNA 與其他非標的菌株 DNA 混合後之電泳圖譜。1-11, *Acidovorax anthurii* 02 依序分別 1:1 混合 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*、*A. avenae* subsp. *citrulli*、*A. avenae* subsp. *cattleyae*、*Agrobacterium tumefaciens*、*Burkholderia andropogonis*、*B. caryophylli*、*B. cepacia*、*B. gladioli* pv. *gladioli*、*B. gladioli*、*B. glumae*、*Pantoea agglomerans*、*Pa. ananatis*、*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*、*Pe. chrysanthemi*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Ps. cichorii*、*Ps. fluorescens*、*Ps. putida*、*Ps. syringae* pv. *glycinea*、*Ps. syringae* pv. *lachrymans*、*Ps. syringae* pv. *phaseolicola*、*Ps. syringae* pv. *pisi*、*Ps. syringae* pv. *syringae*、*Ps. syringae* pv. *tabaci*、*Ps. syringae* pv. *tomato*、*Ralstonia solanacearum*、*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*、*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*、*X. campestris* pv. *armoraciae*、*X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*、*X. oryzae* pv. *oryzae*、*X. oryzae* pv. *oryzicola* 等非標的菌株；12：*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*；13：*A. avenae* subsp. *citrulli*；14：*A. avenae* subsp. *cattleyae*；(-)：負控制組；。M: 100 bp marker。

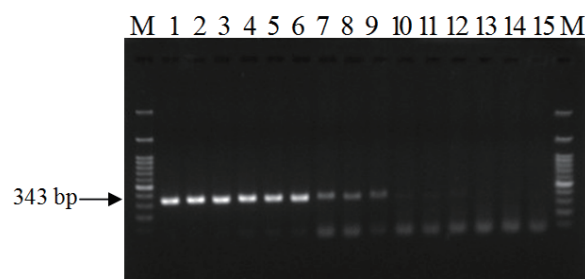
Fig. 3. The products of polymerase chain reaction (PCR) with primer pair Ant 2F/ Ant 2R from the template DNA of *Acidovorax anthurii* strains that were mixed with the other non-target bacterial DNA. M: 100 bp marker; Lanes 1-11, equal amount of *A. anthurii* 02 DNA mixed with the following DNA samples: *A. avenae* subsp. *avenae*, *A. avenae* subsp. *citrulli*, *A. avenae* subsp. *cattleyae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia andropogonis*, *B. caryophylli*, *B. cepacia*, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *B. gladioli*, *B. glumae*, *Pantoea agglomerans*, *Pa. ananatis*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pe. chrysanthemi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. cichorii*, *Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. syringae* pv. *glycinea*, *Ps. syringae* pv. *lachrymans*, *Ps. syringae* pv. *phaseolicola*, *Ps. syringae* pv. *pisi*, *Ps. syringae* pv. *syringae*, *Ps. syringae* pv. *tabaci*, *Ps. syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* pv. *armoraciae*, *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*. Lanes 12, *A. avenae* subsp. *avenae*; Lanes 13, *A. avenae* subsp. *citrulli*, Lanes 14, *A. avenae* subsp. *cattleyae*, Lanes 15, negative control.

carotovorum subsp. *carotovorum* 引起的軟腐病在台灣僅偶而發生，且都有PCR偵測技術可供應用^(20, 38)，目前在火鶴花病害的專一性引子開發相關研究及應用主要是針對葉枯病菌^(25,44)，關於由 *Acidovorax anthurii* 所引起的細菌性葉斑病，國內除筆者的病原菌鑑定報告⁽¹⁷⁾ 外，尚無其他報告，而全世界也尚未研發出可用來檢測此病害的分子生物技術的相關研究。



圖四、應用引子組 Ant 2F/ Ant 2R 之聚合酵素連鎖反應偵測火鶴花細菌性葉斑病菌 *Acidovorax anthurii* 12 菌株全 DNA 之靈敏度。M: 100 bp marker；(-)：negative control；1-11依序為 200ng，100ng，50ng，10ng，1ng，100pg，50pg，10 pg，5 pg，1.0 pg 及 0.5 pg。

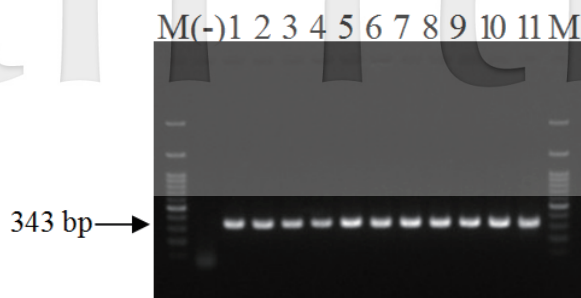
Fig. 4. Detection sensitivity by polymerase chain reaction using primer pair Ant 2F/ Ant 2R to detect the total DNA of *Acidovorax anthurii* 12. M: 100 bp marker. Lanes 1-11, 200ng, 100ng, 50ng, 10ng, 1ng, 100pg, 50pg, 10 pg, 5 pg, 1.0 pg and 0.5 pg of DNA, respectively; (-), negative control.



圖五、以引子組 Ant 2F/ Ant 2R 進行聚合酵素連鎖反應偵測火鶴花細菌性葉斑病菌 *Acidovorax anthurii* 03 菌株細菌細胞數之靈敏度。1-3， 4.5×10^4 cfu/ml；4-6， 4.5×10^3 cfu/ml；7-9， 4.5×10^2 cfu/ml；10-12， 4.5×10^1 cfu/ml；13-15，4.5 cfu/ml；M: 100 bp marker。

Fig. 5. Detection sensitivity by polymerase chain reaction with primer pair Ant 2F/ Ant 2R for detecting the cell suspensions of *Acidovorax anthurii* 03. M: 100 bp marker; Lanes 1-3, 4.5×10^4 cfu/ml; Lanes 4-6, 4.5×10^3 cfu/ml; Lanes 7-9, 4.5×10^2 cfu/ml; Lanes 10-12, 4.5×10^1 cfu/ml; Lanes 13-15, 4.5 cfu/ml.

應用分子生物技術來鑑定和偵測病原菌的方法頗多^(26,27,29,49)，除了傳統的 PCR (polymerase chain reaction) 技術外，為了增加檢測的靈敏度和專一性，各種相關技術持續開發，如用於偵測 *A. avenae* subsp. *citrulli* 所引起瓜類細菌性果斑病菌即開發多種 PCR 相關技術，譬如 Bio-PCR、IMS-PCR (Immunomagnetic separation and polymerase chain reaction) 與 real-time PCR 等^(7,29)。用於植物病原細菌的 PCR 偵測所使用的引子設計大部份是以 16S ribosome DNA (rDNA)、16S-23S rDNA 的內部轉錄間隔區 (internally transcribed spacer; ITS) 或是特異基因、蛋白質如 *A. citrulli* 的 BOX 片段、hrpG-hrpX 基因 spacer region^(2,32) 等。這些方法都必需知道標的 (target) 病原細菌相關



圖六、以引子組 Ant 2F/Ant 2R 進行聚合酶連鎖反應偵測火鶴花細菌性葉斑病菌株單一菌落之電泳圖譜。M: 100 bp Marker; 負為負控制組; 1-11 依序為分離自火鶴花細菌性葉斑病菌株: *Acidovorax anthurii* 02、03、10、11、12、13、14、15、16、17、1011。

Fig. 6. Detection of *Acidovorax anthurii* PCR with primer pair Ant 2F/ Ant 2R. Individual colonies on agar plates were extracted with boiled bacterial cultures and the crude extracts were used as templates for PCR. M: 100 bp marker; (-), negative control; Lanes 1-11, colonies isolated from diseased anthurium: 02, 03, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 and 1011.

基因的 DNA 序列，由於火鶴花細菌性葉斑病菌為新病害，目前已知序列只有登錄的 16S rDNA (GenBank accession number KC261873.1、AJ007013.1) 資料，無其他資料可供參考，而且 16S rDNA 相對於 ITS 是較保守 (conserved) 的區域，所以在進行 PCR 過程中極容易出現其它 *Acidovorax* 屬的訊號，因此，本研究採用 RAPD 技術(26,27,49)，在沒有該病原菌的基因體 DNA 序列下，找出對 *Acidovorax anthurii* 具專一性的片段序列來設計引子組。

應用 RAPD 技術，在測試 160 組隨機引子後找到 OPW2 對供試 11 株標的 *A. anthurii* 菌株均可產生 1813 bp 的片段，經由 SDSC-Biology WorkBench (加州大學之聖地亞哥分校高速電腦中心) 比對顯示在位於靠近 3 端序列約 1300 bp 後的序列與 *Burkholderia cenocepacia* J2315 chromosome 1 的 complete genome AM747720、*Pseudomonas aeruginosa* strain: 8380 的 complete genome AP014839 序列之間相似性為 80%~84%；另外以 NCBI 進行序列比對則是顯示位於 1110~1589 bp 之間的序列與 *Janthinobacterium agaricidamnorum* NBRC 102515 complete genome HG322949 相似性為 77%，位於 360~1630 bp 之間的序列與 *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 complete genome CP010415 相似性為 72%，位於 1355~1590 bp 之間的序列與 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* ATCC 19860 complete genome CP000512 序列相似性 79%。*Azotobacter chroococcum* hdr 和目標序列的相似性主要是在 5 端，*A. chroococcum* hdr 是一種土壤固氮菌⁽³⁴⁾，*Janthinobacterium agaricidamnorum* 主要危害洋菇造成軟腐病⁽¹¹⁾。由於經比對後的結果顯示和 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* 及其它會造成植物病害之細菌序列相似性較高的部分均是位於所選殖序列近 3 端的位置，因此本次試驗專一性引子組的設計避開與其他菌株相似的片段，以 5 端位置 1~1000 bp 序列為主，設計出針對 *A. anthurii* 可產生專一性 343 bp 的引子組 Ant 2F/Ant 2R。

進一步將 Ant 2F/Ant 2R 引子組，分別以 11 株 *A. anthurii* 標的菌株和非標的菌株 (表一) 進行 PCR，結果顯示此引子對

只會對於標的菌株產生 343 bp 的專一性條帶，而對於非標的菌株特別是 *A. avenae* subsp. *citrulli*、*A. avenae* subsp. *avenae* 和 *A. avenae* subsp. *cattleyae* 均未產生任何條帶。本研究中也將表一所列的非標的菌株的 DNA、菌液的 DNA 和 11 株 *A. anthurii* 標的菌株的 DNA、菌液的 DNA 混合進行 PCR，結果僅產生 *A. anthurii* 特有的 343 bp 專一性條帶，並沒有其它雜訊的產生，這個結果也確認所設計的 Ant 2F/Ant 2R 引子組對於 *A. anthurii* 具有高度專一性，可應用於火鶴花細菌性葉斑病的鑑定和偵測。

依據圖四結果 Ant 2F/Ant 2R 引子組 DNA 檢測靈敏度大致在 10~50pg 之間，之前的研究報告如 Su⁽⁴²⁾ 開發 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，Hseu^(18,20,21) 開發的 Ec3F/Ec4R 引子組偵測 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 及 *Pe. chrysanthemi* 的靈敏度為 10~50pg，開發的 BGRPF3/ BGRPR3 引子組偵測 *Burkholderia gladioli* (Bg) 的靈敏度為 10 pg，開發的 Ac46f/Ac46r 引子組偵測 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* 的靈敏度為 10~50pg，本研究所設計開發的引子組 Ant 2F/Ant 2R 能偵測到 *A. anthurii* 的 DNA 靈敏度與上述引子組的靈敏度相近，但相較於 Sung⁽⁴³⁾ 開發的 SL1/SR1 引子組對於引起瓜類果斑病 *A. avenae* subsp. *citrulli* 偵測靈敏度為 100 pg，顯示本研究開發的 Ant 2F/Ant 2R 引子組其偵測的靈敏度略高。

關於菌液靈敏度測試，Wang⁽⁴⁸⁾ 等人針對因 *A. avenae* subsp. *citrulli* 所引起之西瓜細菌性果斑病菌 (bacterial fruit blotch of watermelon, WFB) 以 BX-L1/BX-R5 引子組和 BX-L1/BX-S-R2 引子組進行 nested-PCR，可檢測菌液靈敏度為 4.7×10^1 cfu/mL，另外 Walcott⁽⁴⁵⁾ 等人以 WFB1/ WFB2 引子組加上 IMS-PCR 方法檢測 *A. avenae* subsp. *citrulli* 可測得菌液靈敏度 10 cfu/mL，Ha⁽¹²⁾ 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^(18,20,21) 開發的 Ec3F/Ec4R 引子組偵測 Pcc 及 PCH 在 1.1×10^1 cfu/ml 菌液細胞數，BGRPF3/ BGRPR3 引子組偵測 Bg 在 1.87×10^1 cfu/mL 菌液細胞數，Ac46f/Ac46r 引子組偵測 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* 在 $5.8 \sim 7.5 \times 10^1$ cfu/ml 菌液細胞數，Song⁽³⁹⁾ 等人針對 *A. avenae* subsp. *avenae* 設計引子組進行 nested-PCR 可測得的靈敏度為 1-2 cfu/ml；而本研究所設計 Ant 2F/Ant 2R 引子組在 4.5×10^1 cfu/ml 菌液細胞數即可有反應產物。為了能將 Ant 2F/Ant 2R 引子組應用於實際田間作物病害的偵測，同時將在 NA 培養基上培養 24 小時的 *A. anthurii* 單一菌落經 0.5 N NaOH 溶液簡易萃取法取得的 DNA 進行 PCR 測試，同樣可得到特有的 343 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。

雖然，*Acidovorax anthurii* 還未被植物防疫檢疫法列為有條件輸入的病害。但本研究中所發展的 Ant 2F/Ant 2R 引子組以 PCR 方式針對火鶴花細菌性葉斑病菌快速且準確的檢測植株是否感病，一旦懷疑輸入的火鶴花樣品或田間樣品是否帶有此新的病原菌，則可應用分子生物技術以所開發的 Ant 2F/Ant 2R 引子組進行檢測來確認，將可阻擋有問題的植株輸入，且可避免該病害擴大，造成農民經濟的嚴重損失。

引用文獻

1. Ark, P. A. and Thomas, H. E. 1946. Bacterial leaf spot and bud rot of orchids caused by *Phytophthora cattleyae*. *Phytopathology*

- 36: 695-698.
2. Bahar, O., Efrat, M., Hadar, E., Dutta, B., Walcott, R. R. and Burdman, S. 2008. New subspecies-specific polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Plant Pathol. 57: 754-763.
 3. Cooksey, D. A. 1985. *Xanthomonas* blight of *Anthurium andraeanum* in California. Plant Dis. 69: 727. (Abstr.)
 4. Council of Agriculture, Executive Yuan. 2015. Agricultural Statistics Yearbook. Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei, ROC. from http://agr.afa.gov.tw/afa/afa_frame.jsp.
 5. Dilbar, A. 1992. Studies on a new bacterial disease and other diseases of anthurium in Trinidad. Univ. West Indies, St. Augustine, Trinidad. MSc Diss.
 6. Elibox, W., and Umaharan, P. 2014. Genetic basis for productivity in *Anthurium andraeanum* Hort. Hortscience 49: 859 – 863.
 7. Feng, J. J., Li, J. Q., Walcott, R. R., Zhang, G. M., Luo, L. X., Kang, L., Zheng, Y. and Schaad, N. W. 2013. Advances in detection of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbits. Seed Sci. & Technol. 41: 1-15.
 8. Gardan, L., Dauga, C., Prior, P., Gillis, M. and Saddler, G. S. 2000. *Acidovorax anthurii* sp. nov., a new phytopathogenic bacterium which causes bacterial leaf-spot of anthurium. Int. J. Sys. and Evol. Microbiol. 50: 235-246.
 9. Giordano, P. R., Chaves, A. M., Mitkowski, N. A. and Vargas, J. M. J. 2012. Identification, characterization, and distribution of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* associated with creeping bentgrass etiolation and decline. Plant Dis. 96: 1036-1742.
 10. Goto, M. 1983. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* subsp. nov., the causal agent of bacterial leaf blight of konjac (*Amorphophallus konjac* Koch.) Int. J. Syst. Bacteriol. 33: 539-545.
 11. Graupner, K., Lackner, G. and Hertweck, C. 2015. Genome sequence of mushroom soft-rot pathogen *Janthinobacterium agaricidamnosum*. Genome Announc. 3: 1-2.
 12. 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.
 13. Hayward, A. C. 1972. A bacterial disease of anthurium in Hawaii. Plant Dis. 56: 904-908.
 14. Holder, A. W. B., Elibox, W. and Umaharan, P. 2015. Status of bacterial leaf spot disease of anthurium in Trinidad and characterization of native isolates of the causal organism, *Acidovorax anthurii*. Hortscience 50: 1023 – 1027.
 15. Hseu, S. H. 2003. Awareness and prevention of anthurium bacterial blight. 150-165. Taiwan Floriculture Development Association. Taipei., R. O. C. 218 pp.
 16. Hseu, S. H. and Lin, C. Y. 1998. Anthurium bacterial blight in Taiwan and the sensitivity of the pathogen to agrochemical. Plant Pathol. Bull. 40:409-417. (in Chinese)
 17. Hseu, S. H. Chen, M. T., and Sung, C. J. 2015. A new bacterial leaf spot disease of anthurium caused by *Acidovorax anthurii*. Plant Pathol. Bull. 24:13-23. (in Chinese)
 18. Hseu, S. H., Shentue, H. and Sung, C. J. 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. (in Chinese)
 19. 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. (in Chinese)
 20. 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. (in Chinese)
 21. Hseu, S. H., Sung, C. J. and Shentu H. 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. (in Chinese)
 22. Hu, F. P., Young, J. M., Triggs, C. M. and Wilkie, J. P. 1997. Pathogenic relationships of the subspecies of *Acidovorax avenae*. Australas. Plant Pathol. 26: 227-238.
 23. 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.
 24. Latin, R. and Hopkins, D. L. 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon. Plant Dis. 79: 761-765.
 25. Lin, B. S. and Lin, C. P. 2002. Development and application of PCR primer for *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, the causal agent of anthurium blight. Pathol. Bull. 11: 97-106.
 26. Louws, F. J., Rademaker, J. L.W. and Bruijn, d. F. 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytopathogenic bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. Annu. Rev. Phytopathol. 37: 81 – 125.
 27. Manulis, S., Valinsky, L., Lichter, A. and Gabriel, D.W. 1994. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* with DNA primers and probes identified by random amplified polymorphic DNA analysis. Appl. Environ. Microbiol. 60: 4094-4099.
 28. McCabe, K. M., Zhang, Y. H., Huang, B. L., Wagar, E. A. and McCabe, Edward R. B. 1999. Bacterial species identification after DNA amplification with a universal primer pair. Mol. Genet. and Metab. 66: 205 – 211.
 29. Mullid, K. B. and Faloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. Meth. Enzymol. 155: 335-350.
 30. Natural, M. P., Tabo, G. A. and Telebanco, M. J. G. 1990. Bacterial blight of *Anthurium andraeanum* Lind in the Philippines. Phil. Phytopathol. 26: 25-35.
 31. Norman, J. and Yuen, J. M. F. 1999. First report of *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* infecting pot Anthurium Production in Florida. Plant Dis. 83: 300.
 32. Oya, H., Nakagawa, H., Saito, N., Uematsu, H. and Ohara, T. 2008. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from seed using LAMP method. Jpn. J. Phytopathol. 74: 304-310.
 33. Prior, P. and Rott, P. 1989. Bacterial leaf spot of *Anthurium*

- caused by a *Pseudomonas* sp. in the French West Indies. J. Phytopathol. 124: 215-224.
34. Robson, R. L., Jones, R., Robson, R. M., Schwartz, A. and Richardson, T. H. *Azotobacter* Genomes: The Genome of *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 (ATCC 4412). PLoS ONE. 10: 1-35.
 35. Saddler, G. S., O'Grady, E. B. and Spence, J. A. 1995. Characterization of a pseudomonad-like bacterium pathogenic for *Anthurium* species. Bull. Oepp. 25: 211-217.
 36. Sambrook, J., Mantis, T. I., and Fritsch, E. F. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Press, N. Y.
 37. Schaad, N. W., Postnikova, E., Sechler, A., Claflin, L. E., Vidaver, A. K., Jones, J. B., Agarkova, I., Ignatov, A., Dickstein, E. and Ramundo, B. A. 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. Avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol. 31: 434-446.
 38. Smid, E. J., Jansen, A. H. J. and Gorria, L. G. M. 1995. Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in potato tubers using polymerase chain reaction. Plant Pathol. 44: 1058-1069.
 39. 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.
 40. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503.
 41. Su, C. C. and L, L. S. 1994. Bacterial wilt of anthurium caused by *Pseudomonas solanacearum*. Plant Pathol. Bull. 4: 34-38. (in Chinese)
 42. 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.)
 43. Sung, P. F. 1999. The polymerase chain reaction technique for identification and detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Master Thesis, 41 pp. (Taiwan, R. O. C.)
 44. Tsai, M. H. 2000. Isolation, Detection and management of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* causal organism of bacterial blight of *Anthurium*. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Master Thesis, 115 pp. (Taiwan, R. O. C.)
 45. Walcott, R. R. and Gitaitis, R. D. 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the Polymerase Chain Reaction. Plant Dis. 84: 470-474.
 46. Walcott, R.R., Gitaitis, R.D. and Castro, A. C. 2003. Role of blossoms in watermelon seed infestations by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Phytopathology. 93: 528-534.
 47. Wang, H., Qi. M. and Cutler, A. J. 1993. A simple method of preparing plants samples for PCR. Nucleic Acids Res. 21: 4153-4154.
 48. Wang, J., Bi, Y., Zhu, Y., Han, S. Y., Zhu, X., Sheng, W. J. and Li, M. 2014. Nested-PCR rapidly detecte *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from watermelon seeds. Sci. Agric. Sin. 47: 284-291. (in Chinese)
 49. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.

ABSTRACT

Hseu, S.-H., Tsai, Y.-J. and Tseng, Y.-J. 2016. A specific primer pair for diagnosis and detection of bacterial leaf spot pathogen: *Acidovorax anthurii* on anthurium. J. Plant Med. 58(1):9-16.

A specific PCR (polymerase chain reaction) primer pair has been developed to detect *Acidovorax anthurii* using RAPD (random amplified polymorphic DNA). A 1813 bp DNA fragment was amplified from genomic DNA of *A. anthurii* using OPW-2 primer, after screening one hundred and sixty random primers in RAPD. The amplified DNA was purified, cloned into a pCR II-TOPO vector, and sequenced. A primer pair Ant 2F/Ant 2R based on 1813-bp DNA sequence was designed and tested for specificity. The primer pair could amplify a DNA fragment of 343 bp that was specific to *Acidovorax anthurii*. No DNA fragment was amplified by the same primer pair from other 21 bacterial species in 8 genera, including non-target pathogens and saprophytes. The designed primer pair Ant 2F/Ant 2R was highly sensitive and could amplify the 343-bp fragment from *A. anthurii* DNA between 10-50 pg obtained from 4.5×10^1 cfu/ml bacterial cells. Non-target bacterial DNA did not affect the efficiency of specific amplification of *A. anthurii* in PCR assays with the primer pair Ant 2F/Ant 2R. Successful identification of *A. anthurii* could be achieved within 3-4 hrs using PCR with specific primer set. Based on the data provided, we conclude that the primer pair Ant 2F/Ant 2R will be a useful tool for rapid identification and diagnosis of *Acidovorax anthurii*.

Keywords: anthurium, *Acidovorax anthurii*, PCR, primer, diagnosis, identification, detection.