Plant Pathology Bulletin 17: 125-135, 2008

Burkholderia gladioli 引起之鳳梨果腐病

許秀惠[1]　曾偉凡[1]　賴婉綺[1]　潘雅碧[1]　林俊義[1, 2]

[1] 行政院農委會農業試驗所 植物病理組

[2] 聯絡作者，電子郵件：cylin@wufeng.tari.gov.tw

接受日期：中華民國 97 年 3 月 25 日

摘　要

許秀惠、曾偉凡、賴婉綺、潘雅碧、林俊義. 2008. *Burkholderia gladioli* 引起之鳳梨果腐病 植病會刊 17：125-135.

將採集自南投縣及嘉義縣之無病徵鳳梨剖開後發現花室組織褐化及輕微軟腐的現象。經柯霍氏法則確認分離自鳳梨之病原爲細菌；生理生化測定顯示病原細菌爲革蘭氏陰性，桿狀，具單極生一至多根鞭毛之好氣菌，在 KB 培養基上不會產生螢光色素，在 NA 上爲白色菌落，培養後產生可溶性黃色色素，此結果顯示該病原細菌與 *Burkholderia gladioli* 的特性相近，經 Biolog 鑑定以及脂肪酸分析結果亦爲 *B. gladioli*。以對 *B. gladioli* 具專一性之 CMG-23-1/G-23-2 引子組對病原菌進行 PCR 鑑定，可產生 388 bp 大小的專一性 DNA 條帶，再以 f8-27/r1510 引子對增幅該病原菌之 16S rDNA 片段進行定序與鑑定，確認該病原菌爲 *B. gladioli*。由 *B. gladioli* 引起之鳳梨果腐病在鳳梨病害上爲首次記載。以 11 種殺菌劑測試在一般使用濃度下對該病菌生長之抑制效果，顯示供試 11 種藥劑包括歐索林酸、鋅錳乃浦、四環黴素、氫氧化銅、嘉賜黴素、嘉賜銅、鏈四環黴素、多保鏈黴素、鏈黴素、鹼性氯氧化銅及三元硫酸銅等藥劑均能抑制病原菌生長，且以歐索林酸抑制效果最佳。

關鍵詞：鳳梨、果腐病、聚合酶連鎖反應

緒　言

鳳梨 (*Ananas comosus* (L.) Merr.)，爲鳳梨科 (Bromeliaceae)、鳳梨屬 (*Ananas*)，多年生草本單子葉植物，俗稱波蘿、黃梨、王梨或王萊，英名爲 pineapple，原產於熱帶及亞熱帶美洲，適合栽培在終年溫暖、日照充足及雨量分布均勻的環境下，土壤則以砂質壤土爲佳[19]。依據民國 95 年農業統計資料[9] 顯示台灣鳳梨種植總面積爲 11,981 公頃，主要種植地區爲南投、嘉義、台南、高雄及屏東等地。鳳梨在台灣不只是豐富的鮮果來源，經加工後之鳳梨罐頭、果醬及飲料銷售國內外，亦可製作成脫水鳳梨、蜜餞、鳳梨酥等甜點，頗具經濟重要性[36]。主要品種可分爲三種，分別爲在來種、開英種及雜交種，在產業發展過程中在來種已被開英種所取代，目前少有栽培。農業試驗所自光復初期至今育成之雜交品種，目前共有台農 1~8、11、13、16~21 號[19]。

已知鳳梨病害種類頗多，眞菌病害主要以心腐病 (heart rot)[4]、黑腐病 (black rot)[2]、小果腐敗病 (fruitlet core rot；又稱黑目病，black spot)[26] 爲主，細菌病害有花樟病 (marbling；又稱小果褐腐病，fruiltlet brown rot)[15, 31, 32, 33] 及赤色病 (pink disease)[35]。另有病毒性萎凋病 (mealybug wilt)[28]，及線蟲感染[38] 等問題，生理性病害則有黑心病 (black heart)[39]。台灣鳳梨田間植株易發生病毒性萎凋病，另有心腐病危害鳳梨種苗或定植後的幼株，而果實採收時，則常有花樟病、赤色病、小果腐敗病及黑心病等問題發生[23]。台灣鳳梨之細菌性病害以花樟病爲主，在鳳梨果實引起淡褐色至褐色病徵，初期病徵帶有多汁且軟化之情形，至後期果實轉變爲乾燥且堅硬，所以又稱小果褐腐病，病原細菌爲 *Erwinia ananas* Serrano.[31]，民國 58~59 年代調查台灣花樟病發病率爲 14.84% ~ 60.65%[15]，尤以夏果發生率較高[32, 33]。在 1993 年 Mergaert[27] 等人經由生理生化、脂肪酸分析、核酸雜交及 DNA 之 G (鳥糞嘌呤) C (胞

嘧啶) 含量試驗，結果得知 *E. ananas* 依其特性較趨近於 *Pantoea* 屬，因此改稱爲 *P. ananas*，1997 年 Trüper [37] 等人依照國際細菌命名法規將 *P. ananas* 重新改名爲 *P. ananatis*，而台灣鳳梨花樟病經由孫氏 [32, 33] 之試驗結果證實與小果褐腐病的致病菌同爲 *P. ananatis*。除外，尚無其他病原細菌引起類似花樟病的報告。最近筆者於鳳梨栽培區植株上發現不同的病原細菌也可引起類似鳳梨花樟病之病徵，故本研究針對該病原菌進行各種特性分析以確定其分類地位，並了解殺菌劑對該病原菌生長之抑制效果，以提供防治參考。

材料與方法

菌株來源

將南投縣名間鄉及嘉義縣新港鄉栽培之鳳梨疑似病果攜回實驗室，外表先以清水洗滌數次，再以 75 % 酒精消毒、晾乾，以無菌刀將病果剖開，再以解剖刀切取組織呈褐化之處，並切碎置於無菌水中做成細菌懸浮液，將懸浮液劃線培養於營養培養基 (nutrient agar, NA) 平板上，置 30 ℃ 下培養一天後，挑取單一菌落再劃線於 NA 平板，重覆三次，移至 NA 斜面備用。或直接將褐化組織塊置於 NA 平板上 30 ℃ 下培養，待長出菌落後，挑選單一菌落移至新的 NA 平板，重覆三次後移至 NA 斜面備用。

病原性測定

將分離所得之細菌菌株分別於 NA 斜面上，於 3 ℃ 下培養一天後，懸浮於無菌蒸餾水中，以分光光譜儀 (spectrophotometer) 調整其吸收值 (A_{600}) 爲 0.3 (10^8 cfu/ml) 作爲接種源，以注射接種方法分別注射於萬國士煙草葉片內，置室溫下觀察結果。將在菸草上形成過敏性反應之菌株分別以 Bg 編號，選取 Bg3、Bg6、Bg7、Bg8、Bg9、Bg12、Bg14、Bg18 及 *P. ananatis* (鳳梨花樟病菌，購自食工所，菌株代號 13199)，分別培養於 NA 上，30 ℃ 下培養 24 hr，並做成細菌懸浮液做接種源用。將購買之健全果實 (台農16、17、20號)，整顆果實先以清水洗滌，繼以 95 % 酒精表面消毒，再以注射針 (23G) 將供試病菌懸浮液 (10^8 cfu/ml) 及無菌水 (接種對照) 各 100 μl 分別注入果肉不同部位內，注射孔以膠布封閉，將果實以塑膠袋保溼，置於室溫中一周後剖開觀察並紀錄病徵出現情形，再從接種之鳳梨組織中分離細菌，以完成柯霍氏法則 (Koch's postulates)。另外選 Bg3、Bg5、Bg8、*B. gladioli* pv. *gladioli* (唐菖蒲首腐病菌) 及 *B. cepacia* (洋蔥腐敗病菌，購自食工所，菌株代號 13208) 等菌株以上述方法製成接種源，分別以兩種方式接種至 2~3 葉大小之唐菖蒲葉片，一爲針刺法，另一爲剪葉法。針刺葉片做法爲消毒後之注射針 (23G) 刺傷葉片，同時用消毒後之棉花沾取供試菌液或無菌水 (接種對照) 均勻塗抹於傷口；剪葉法則以無菌剪刀平剪葉片前端後，將傷口浸入菌液或無菌水中，再分別將接種之植株以塑膠袋套袋保濕，放置 30 ℃ 定溫箱中，兩天後除去塑膠袋，觀察並記錄病徵出現情形。

病原菌形態及生理生化特性測定

將 30 ℃ 下 NA 斜面上培養一天之 Bg3 及 Bg14 菌株，加入少許無菌水及等量的 2% 鎢酸染色液 (PTA, pH 7.5，含 0.1% bovine serum)，置於 Hitach -7000的穿透式電子顯微鏡觀察細菌形態及鞭毛。選取 Bg3、Bg6、Bg7、Bg8、Bg9、Bg12、Bg14及 Bg18 等供試菌株分別在 NA 斜面上 30 ℃ 下培養一天，進行下列各項生理生化試驗：革蘭氏染色 (Gram stain)，葡萄糖之利用方式 (氧化/發酵試驗，O/F test)，YDC (yeast extract-dextrose-$CaCO_3$) 培養基上之菌落顏色，在 YDC 培養基於 30 ℃ 溫度時是否產生黏液，KB (King's B) 培養基上螢光色素之形成，KB 培養基上是否產生非螢光色素，結晶紫果膠 (crystal violet pectate, CVP) 培養基上果膠分解能力，在 PDA (potato dextrose agar) 培養基上是否產生色素，精氨酸二水解酶 (arginine dihydrolase) 測定，40 ℃ 下之生長能力，白明膠 (gelatin) 液化能力，澱粉 (starch) 分解能力，氧化酶 (oxidase test) 測定，硝酸鹽還原酶 (nitrate reduction) 測定，於 5 % NaCl 之生長能力及對 Adonitol、L-Arabinose、D-Arabitol、Gentiobiose、L-Fucose、Maltose、Xylitol、L-Rhamnose、L-Histidine、L-Ornithine、L-Phenylalanine、L-Threonine、Lactose 及 Sucrose 等碳源利用能力測定 [6, 17, 30]，以確認供試菌株之特性，並以花樟病菌之鑑別培養基 [20] 進行培養。

Biolog Identification System 鑑定細菌

將供試 Bg1、Bg3、Bg5、Bg8、Bg11、Bg14、Bg18 及 Bg21 等菌株，分別培養於 BUGM (biolog universal growth medium 36 g, Bacto agar 15 g) 培養基中約 16～24 hr，之後懸浮於 IF buffer (0.4% NaCl, 0.03% pluronic F-68, 0.01% gellan gum)中，調整濃度爲 63% T，分別加入 Biolog GN2 反應盤 (Biolog Inc. Hayward, CA) 中，每孔加入 150 μl 細菌懸浮液，置於 30 ℃ 下培養 4～24 hr，之後以光譜儀測讀，最後將資料輸入電腦與 Biolog GN2 資料庫 (Biolog 6.1 版) 中比對，以鑑

定其種屬(依廠商指示使用)。

脂肪酸組成分析及鑑定

取 Bg3、Bg5、Bg6、Bg7、Bg9、Bg12、Bg14 及 Bg18 分別培養於 TSA (BBL tryptic soy broth 15 g, agar 20 g) 培養基中，更新兩次後，取菌泥至試管中，依 Sasser[29] 所述之方法進行第一步驟皂化 (saponification) 反應：先加入 1 ml reagent 1 (NaOH 45 g, Methanol 150 ml, ddH_2O 150 ml)，震盪 5-10 sec，100℃ 水浴 5 min，再震盪 5-10 sec，100℃水浴 25 min；第二步驟爲甲基化 (methylation) 反應：加入 2 ml reagent 2 (6 N NaOH 325 ml, Methanol 275 ml)，震盪 5-10 sec，80℃水浴 10 min，冷卻試管 (置冷水中)；第三步驟爲萃取 (extraction)：加入 1.25 ml reagent 3 (Hexane 200 ml, Methyl-tert Butyl Ether 200 ml) 並上下混勻 10 min，靜置待分層，移除底層 (水層)；第四步驟爲鹼洗 (base wash)：加入 3 ml reagent 4 (NaOH 10.8 g, ddH_2O 900 ml)，上下混勻 5 min，靜置待分層，若分層不完全，可取飽和食鹽水滴入試管中，將有機層中之乳化與雜質滴至下層，分層完全後取上層之 2/3 有機層置 GC 小管。完成上述前處理後，以氣相層析質譜儀 GC-MS (HP 6890N, USA) 進行分析，並以 MIDI Sherlock® Microbial Identification System (MIS) 之資料庫比對分析結果。

專一性引子對聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 分析

選取 Bg1~26 及 Bg28 等 27 支菌株作爲供試菌株，及 *Burkholderia* 屬內的病原菌爲對照，包括 *B. cepacia* (洋蔥腐敗病菌)、*B. caryophylli* (康乃馨萎凋病菌)、*B. gladioli* pv. *gladioli* (唐菖蒲首腐病菌)、*B. glumae* (稻穀枯病菌) 和 *P. ananatis* (鳳梨花樟病菌) 等，依 Wang 等[40] 之方法略加修改後抽其 DNA，再各取 2 μl 作爲 DNA 模版。以 CMG-23-1/G-23-2 (此引子對是根據 23S rDNA 基因 spacer region 區間的核酸序列而設計，對 *B. gladioli* 菌株具專一性) 爲引子對[3]，進行 PCR 鑑定。引子濃度約 5.0 μM，分別加入 PCR 各反應物：5.0 mM dNTPs，1.0 units/μl Pro Taq DNA polymerase (Protech Technology, ROC) 以及 2.5 μl 10× 的反應緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 9.0, 15 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 1.0% Triton X-100)，總反應體積爲25 μl。PCR 增幅條件先以 95 ℃ 反應 5 min，之後進行 96 ℃ 30 sec，51 ℃ 30 sec，72 ℃ 45 sec，共 30 個循環，最後再進行 72 ℃ 7 min 1 個循環。引子對增幅後之產物分別以 1.5 % agarose (1×TAE buffer) 之電泳分析 (100 V)，並以 Gen-100 DNA ladder (GeneMark Technology, ROC) 爲大小標幟 (size marker)，最後以溴化乙錠 (ethidium bromide 0.5 μg/ml) 染色觀察，並照相記錄。

16S rDNA定序及鑑定

選取 Bg3 在 NA 培養基上之單一菌落，以 DNeasy plant mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) 抽取 genomic DNA 後，用細菌 16S rDNA universal primers f8-27/r1510[25] 進行 PCR 增幅，引子濃度約 10 μM，分別加入 PCR 各反應物：5.0 mM dNTPs，2.5 units/μl *RealTaq* DNA polymerase (Real Biotech Corporation, ROC)，以及 5.0 μl 10×的 PCR 反應緩衝液，總反應體積爲 50 μl。PCR 增幅條件先以 94 ℃ 反應 5 min，之後進行 94 ℃ 30 sec，55 ℃ 30 sec，72 ℃ 140 sec，共 40 個循環，最後再進行 72 ℃ 5 min 1 個循環。增幅後之產物則以 1.0~1.5% agarose 進行電泳分析，將所得之片段進行定序 (sequencing)，再將序列以 NCBI (National Center for Biotechnology Information，美國國家生物科技資料中心) 和 SDSC-Biology Workbench (加州大學之聖地牙哥分校高速電腦中心) 之 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 進行序列比對。

藥劑感受性測定

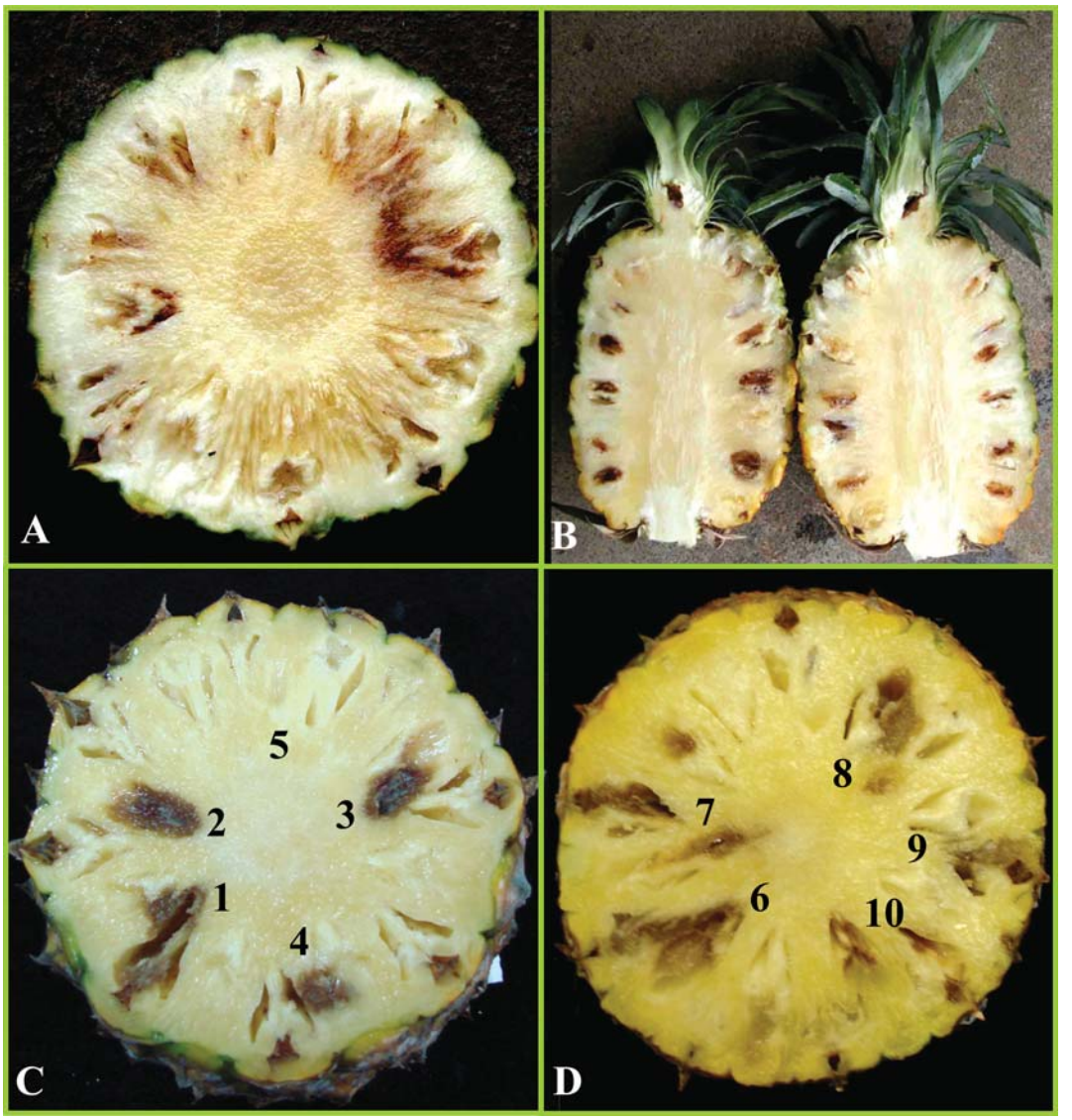
利用濾紙圓盤擴散法 (paper disc diffusion method)[1] 於 NA 培養基上測定分離自鳳梨之果腐病菌菌株對不同藥劑不同濃度之感受性。各菌株濃度爲 10^8 cfu/ml，分別取 0.1 ml 混於 0.8 % 水瓊脂 (water agar) 中，再覆於 NA 平板上；將各種藥劑稀釋成不同濃度後，分別取 0.14 ml 滴於每片濾紙 (直徑13 mm) 上，之後每皿放 3 個含藥之濾紙圓盤，並以浸無菌水之濾紙盤爲對照組，在室溫下培養 2 - 3 天後，測量抑制圈大小，若無抑制圈產生表示此藥劑在所測試的濃度對供試菌株之生長無抑制效果。取本研究室分離自鳳梨之菌株 Bg1、Bg3、Bg5~9、Bg11~12、Bg14、Bg15~16、Bg18~19、Bg21 及 Bg22 等 16 株菌株爲供試菌株，供試 11 種殺菌劑如下：四環黴素 (Tetracycline，商品名爲鉑美樹，臺灣氰氨公司，30.3 % SP)、鏈四環黴素 (Streptomycin Tetracycline，商品名爲枯萎寧，全台公司，10.0 % SP)、鏈黴素 (Streptomycin，商品名爲立農黴素，豈農公司，12.5 % SL)、多保鏈黴素 (Thiophanate methyl + Streptomycin，商品名爲安達菌，瑞穗公司，68.8% WP)、嘉賜黴素 (Kasugamycin，商品名爲加收米，大勝化工，2.0 % WP)；含銅劑類藥劑之鹼性氯氧化銅 (Copper oxychloride，商品名爲健果銅，益欣公司，85.0 % WP)、氫氧化銅 (Copper

hydroxide，商品名爲可產多，Kocide chemical corporation，77.0 % WP)、三元硫酸銅 (Tribasic copper sulfate，商品名爲銅高尚，日產化工公司，27.12 % SC)；含鋅錳類藥劑之鋅錳乃浦 (Mancozeb，商品名爲萬生- 200，杜邦公司，80.0 % WP)；混合類藥劑之嘉賜銅 (Kasugamycin + Copper oxychloride，商品名爲統統好，大勝化工，81.3 % WP)；其他類藥劑之歐索林酸 (Oxolinic acid，商品名爲金星，住友化學公司，20 % WP)，各藥劑的稀釋濃度如表三所示。

結 果

病徵

南投縣名間鄉及嘉義縣新港鄉栽培之鳳梨外觀完好，但剖開後發現花室組織呈褐色及輕微軟腐的現象 (圖一，A、B)。將分離所得之細菌 Bg 菌株分別注射接種至萬國士煙草葉片內，室溫下 24～48 hr 內皆形成壞疽病斑。Bg 菌株接種至台農 17 號金鑽鳳梨 (圖一，



圖一、鳳梨果腐病之病徵：A、B 爲田間罹病之鳳梨果實之病徵，C、D 爲接種之病徵。C，台農 17 號 (金鑽鳳梨)、D，台農 16 號 (甜蜜蜜鳳梨)。接種菌株分別爲 1. 鳳梨花樟病菌 *Pantoea ananatis* 、2. *Burkholderia gladioli* Bg 12、3. 唐菖蒲首腐病菌 *B. gladioli* pv. *gladioli* 、4. Bg 8、5. negative control、6. Bg 14、7. Bg 3、8. Bg 8 、9. Bg 18、10. Bg 12。

Fig. 1. Symptoms of bacterial fruit-rot of pineapple. A and B, Natural infected fruits, C and D, fruits (C: pineapple cultivar Tainon No. 17; D: pineapple cultivar Tainon No. 16) inoculated with different bacterial strains: 1, *Pantoea ananatis*; 2, *Burkholderia gladioli* Bg12; 3, *B. gladioli* pv. *gladioli*; 4, Bg 8; 5, negative control; 6, Bg 14; 7, Bg 3; 8, Bg 8; 9, Bg 18; 10, Bg 12.

C)、台農 16 號甜蜜蜜鳳梨 (圖一，D) 及台農 20 號牛奶鳳梨果實 (結果未顯示)，48 hr 後剖開果實，接種部位呈水浸狀，4 天後至一星期接種之果肉呈淡褐色至褐色，且較健部爲軟，汁液減少，具有典型鳳梨花樟病之病徵，而三種鳳梨品種病徵皆相同，再從病徵處分離所得細菌與原接種細菌相同，確認分離之病原菌可引起類似花樟病之病徵，供試鳳梨菌株 Bg3、Bg5、Bg8 及已知爲 *B. gladioli* pv. *gladioli* (唐菖蒲首腐病菌) 及*B. cepacia* (洋蔥腐敗病菌) 以針刺及剪葉傷口接種方法接種唐菖蒲，針刺接種 16 hr 後，*B. gladioli* pv. *gladioli* 與 Bg 菌株均可在傷口處造成水浸狀病斑，至第三天病斑中心轉爲白化，約一星期病斑外圍呈褐色，並帶有黃暈，約三星期後病斑顏色加深爲深褐色且傷口擴大，而剪葉法在接種後 16 hr 同樣出現水浸狀病斑，至第三天切口轉爲白化，約一星期後病斑周圍出現黃化，約三星期病斑顏色轉爲褐化；而 *B. cepacia* (洋蔥腐敗病病原菌) 之針刺傷口無白化現象，針刺接種後 16 hr 出現水浸狀病斑，至第二天病斑周圍具黃化，約一星期病斑外圍呈淺褐色，約二星期後病斑中心傷口擴大，外圍顏色加深爲深褐色，且剪葉病徵與針刺傷口的病徵相同。顯然供試菌株與唐菖蒲首腐病菌 *B. gladioli* pv. *gladioli* 在唐菖蒲葉片上所造成之病徵均相同，但洋蔥腐敗病菌 *B. cepacia* 形成之病徵稍有不同(結果未顯示)。

形態及生理生化特性

分離自鳳梨之 Bg 菌株爲革蘭氏陰性，桿狀菌，多數具 1~2 根單極生之鞭毛，少數具 4~5 根單極生鞭毛，爲好氣性菌，在 NA 上爲白色菌落，於 NA 上培養一天後可產生黃色色素，以氧化方式利用葡萄糖，在 YDC 培養基上不會產生色素，於 30 ℃ 培養時亦不會產生黏液，KB 上可產生黃色色素但不具螢光色素，不會產生菌果聚醣，於 PDA 上可產生黃色色素，不具氧化酶、精氨酸二水解酶及硝酸還原活性，在 40 ℃ 下可生長，不具澱粉水解能力，可液化白明膠，在煙草上可產生過敏性反應，可在 5% NaCl 生長，可利用 Adonitol、L-Arabinose、D-Arabitol、L-Fucose、L-Histidine、L-Phenylalanine及L-Threonine等碳源 (表一)。將 *P. ananatis* (鳳梨花樟病菌病原菌) 與供試 Bg 菌株分別培養於花樟病菌之鑑別培養基[20]，*P. ananatis* 形成圓形、粘滑及紫紅色的菌落，菌落中央稍爲突起，邊緣則有狹窄透明的暈環，而 Bg 菌株的菌落型態爲深藍色圓形且具皺摺，邊緣不具狹窄透明的暈環。綜合上述試驗之結果顯示，Bg 菌株與 *B. gladioli* 之生理生化特性相近。

Biolog Identification System 細菌鑑定

供試菌株 Bg1、Bg3、Bg5、Bg8、Bg11、Bg14、Bg18 及 Bg21，以 Biolog Microplate 6.1 測試，結果與 *B. gladioli* 相似值依序分別爲 0.74、0.60、0.93、0.69、0.85、0.76、0.66 及 0.55，而這些供試菌株符合 *B. gladioli* 之機率 (probability) 爲 97~100%。

脂肪酸組成分析及鑑定

以 GC-MS 進行分析後，得知 Bg 菌株的脂肪酸組成主要爲 $C_{16:0}$ (saturated)、$C_{17:0\ cyc}$ 和 $C_{19:0\ cyc}$ (cyclopropane)，以及含 hydroxy 之脂肪酸 3OH-10:0、3OH-16:0、2OH-16:0、2OH-16:1 以及 2OH-18:1，將所得資料輸入 MIDI Sherlock® (MIS) 電腦資料庫中比對，結果顯示 Bg3、Bg5、Bg6、Bg7、Bg9、Bg12、Bg14 及 Bg18 等供試菌株與 *B. gladioli* 之相似值分別爲 0.40、0.34、0.42、0.40、0.39、0.40、0.37 與 0.29，符合 *B. gladioli* 之機率爲 74.2~95 % (表二)。

專一性引子對聚合酶連鎖反應分析

以 *B. gladioli* 之專一性引子對 CMG-23-1/G-23-2[3] 進行 PCR，結果顯示供試之 27 株鳳梨菌株及唐菖蒲首腐病菌 *B. gladioli* pv. *gladioli* 相同，均產生 388 bp 大小的專一性之 DNA 條帶，而洋蔥腐敗病菌 *B. cepacia*、康乃馨萎凋病菌 *B. caryophylli*、稻穀枯病菌 *B. glumae* 以及鳳梨花樟病菌 *P. ananatis* 等供試菌株在 388 bp 處無條帶產生 (圖二)。

16S rDNA 定序及鑑定

以對細菌 16S rDNA 具專一性之引子對 f8-27/r1510[25] 進行 PCR 增幅，得到大小爲 1,502 bp 之 DNA 片段，將此片段進行 DNA 定序分析後，再將所得序列以 BLAST 程式搜尋 NCBI 和 SDSC-Biology Workbench database 之相似序列，結果顯示 Bg3 菌株與 *B. gladioli* 的菌株 2R34 及 PA17.2 (GenBank accession number 分別爲 EF178441.1 及 EF193645.1) 16S rDNA 部分序列間的相似度 (identity) 達 99 %。

藥劑之感受性

供試 16 株鳳梨菌株對 11 種殺菌劑在一般使用濃度下之感受性，測試結果顯示供試藥劑對該病菌之生長均有抑制效果 (表三)，其中又以歐索林酸之效果最佳，依其抑制效果之順序爲歐索林酸、鋅錳乃浦、四環黴素、氫氧化銅、嘉賜黴素、嘉賜銅、鏈四環黴素、多保鏈黴素、鏈黴素、鹼性氯氧化銅及三元硫酸銅。

討 論

近年來筆者於南投縣名間鄉以及嘉義縣新港鄉所種植之鳳梨發現外觀完好，但剖開後花室組織呈褐色且組織軟化。因鳳梨果肉形成褐色組織並圍繞果心呈放射狀排列，如樟樹樹幹橫斷面之花紋，猶如 *P. ananatis* 所造成的鳳梨花樟病害，因此將蒐集之病果分離之細菌，經柯霍氏法則確認爲病原菌後，進行各種生理生化特性分析，且以 TEM 觀察供試菌株之鞭毛，具單極生一至多根鞭毛，與 *Pantoea* 屬之周生鞭毛明顯不同，且由 Bg 菌株在 KB、PDA 以及 YDC 等培養基上之特性及其他特性均與 Schaad[30] 及 George[10] 等報告描述 *Burkholderia* 屬之生理生化特性相近 (表一)。另外，將已知的鳳梨花樟病菌 *P. ananatis* 與分離自鳳梨之 *Bg* 病菌分別培養於鳳梨花樟病菌之鑑別培養基[20]，供試鳳梨之 Bg 病菌的菌落型態爲深藍色圓形，具皺摺，且邊緣不具透明的暈環，肉眼即可明顯分辨兩者之菌落特性不相同。綜合生理生化及選擇性培養基之特性顯示該病原菌在分類上屬於 *Burkholderia* 屬，並非 *Pantoea* 屬。

供試 Bg 菌株進行脂肪酸分析鑑定結果與 *B. gladioli* 之相似度偏低 (0.29~0.42)，但爲同一種細菌之機率爲 74.2~95.0 %。在 Graves 等人[11] 之研究中指

表一、鳳梨果腐病菌之生理生化測試

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of bacterial strains isolated from pineapple

Character	Strains from pineapple[1]	*Burkholderia gladioli*[2]	*Pantoea ananatis*[2]
KOH test	G (−)[3]	G (−)[3]	G (−)[3]
O/F test	O[3]	O[3]	O/F[3]
Colonies yellow on YDC	−	−	+
Colonies mucoid on YDC at 30℃	−	−	−
Fluorescent pigment on KB	−	−	−
Diffusible non-fluorescent pigments on KB	+	+	−
Pectolytic Activity	−	−	−
Flagellar number	>1	>1	>1
Diffusible pigments	+	+	−
Arginine dihydrolase	−	−	+
Growth at 40℃	+	+	V[3]
Gelatin hydrolysis	+	+	+
Starch hydrolysis	−	−	−
Oxidase	−	V[3]	−
Nitrate reduction	−	−	−
Growth in 5 % NaCl	+	−	+
Tobacco HR	+	+	+
Growth on :			
Adonitol	+	+	−
L-Arabinose	+	+	+
D-Arabitol	V[3]	+	+
Gentiobiose	V-[3]	−	+
L-Fucose	+	+	+
Maltose	V-[3]	−	+
Xylitol	V-[3]	V[3]	V-[3]
L-Rhamnose	−	−	+
L-Histidine	+	+	+
L-Ornithine	−	+	−
L-Phenylalanine	+	+	V-[3]
L-Threonine	V[3]	+	−
Lactose	−	−	+
Sucrose	−	−	+

1 The tested strains isolated from pineapple were Bg 3, 6~9, 12, 14 and 18. 2 Data are combined by referring to Chun, *et al*., 2001 [6]. Cophlin, *et al*., 2001 [8]. George, *et al*., 2001 [10]. Grimont, *et al*., 2005 [12]. and Schaad, 2001 [30]. 3 G (-) , Gram negative; O , oxidative ；F, fermentation ；+, indicated positive reaction; −, indicated negative reaction; V, 21~79% positive; V-, 21~79% negative.

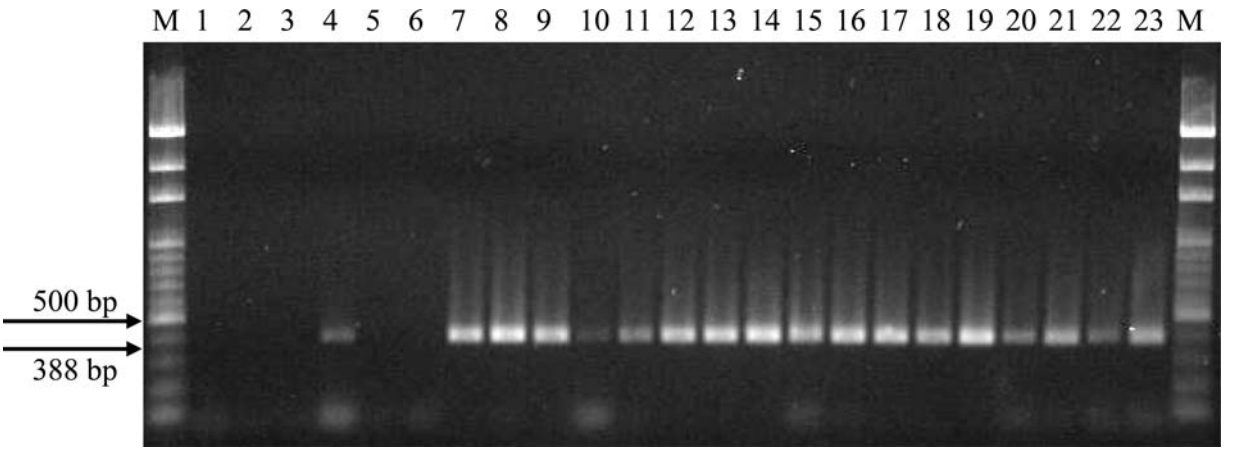
出，*B. gladioli* 之脂肪酸主成分爲 $C_{16:0}$ (saturated)，而其他組成爲 $C_{17:0}$ cyc、$C_{19:0}$ cyc (cyclopropane)，以及含 hydroxy之 6 種脂肪酸 3OH-14:0、3OH-16:0、2OH-16:0、2OH-16:1、2OH-18:1 以及 2OH-19:0_{cyc}，而供試 Bg菌株除了不含 3OH-14:0 和 2OH-19:0_{cyc} 以外，其餘脂肪酸種類均與 Graves 等人[11] 之研究結果相似。本研究之 Bg 菌株含有 3OH-10:0，在 Christenson 等人[5] 報告中亦指出大部分之 *B. gladioli* 皆具有 3OH-10:0，但 Graves 等人[11] 報導之 *B. gladioli* 則沒有偵測出 3OH-10:0。此外，Jiao 等人[16] 及 Lincoln 等人[24] 分別對 *B. gladioli* 之 3 種病原型進行脂肪酸分析，在 *B. gladioli* pv. *alliicola* 及 *B. gladioli* pv. *agaricicola* 中皆可測得 3OH-10:0，但在 *B. gladioli* pv. *gladioli* 中卻未偵測出此成分，由此可知同爲 *B. gladioli* 的菌株，其細胞脂肪酸

表二、鳳梨果腐病菌之脂肪酸分析

Table 2. The components of fatty acid of *Burkholderia gladioli* from pineapple

Fatty acids		Bg3	Bg5	Bg6	Bg7	Bg9	Bg12	Bg14	Bg18	Reference
Saturated										
	$C_{10:0}$	1.19	1.93	1.41	1.19	0.99	ND	1.44	ND	24
	$C_{14:0}$	4.00	3.79	3.81	3.60	3.85	3.95	3.97	4.01	5, 11, 16, 24
	$C_{16:0}$	21.59	20.06	16.59	16.17	16.30	15.50	15.21	15.48	5, 11, 16, 24
	$C_{17:0}$	1.03	2.31	2.57	2.75	1.11	2.82	2.68	2.39	5, 24
	$C_{18:0}$	1.09	0.94	2.27	3.97	2.52	1.31	1.27	2.52	5, 11, 16, 24
Cyclopropane										
	$C_{17:0}$	18.16	18.89	14.62	12.86	13.54	14.91	14.64	13.12	5, 11, 16, 24
	$C_{19:0}$	22.18	22.02	18.66	18.42	19.97	20.01	20.76	17.76	5, 11, 16, 23
Hydroxy										
2OH	$C_{16:0}$	1.48	1.67	1.91	1.95	1.65	2.12	2.15	1.63	5, 11, 16, 24
	$C_{16:1}$	0.63	0.75	1.17	1.26	0.84	1.32	1.12	1.25	5, 11, 16, 24
	$C_{18:1}$	1.88	1.93	3.01	ND	2.29	ND	ND	3.63	5, 6, 11, 16, 24
3OH	$C_{10:0}$	3.94	5.91	5.64	4.56	3.82	5.62	5.52	3.54	11,16
	$C_{16:0}$	5.09	4.52	4.56	4.53	4.74	5.20	5.14	4.63	5, 11, 16, 24
SIM index		0.40	0.34	0.42	0.40	0.39	0.40	0.37	0.29	
Percent named (*B. gladioli*)		95.0	93.5	83.9	79.3	89.2	78.9	82.1	74.2	

Percentages of total fatty acids. ND: not detected.



圖二、應用 PCR 技術以引子對 CMG-23-1/G-23-2 鑑定鳳梨細菌性果腐病菌。M, 100 bp DNA marker； 1, negative control； 2, *Burkholderia caryophylli* (康乃馨萎凋病菌)； 3, *B. cepacia* (洋蔥腐敗病菌)； 4, *B. gladioli* pv. *gladioli* (唐菖蒲首腐病菌)； 5, *B. glumae* (稻穀枯病菌)； 6, *Pantoea ananatis* (鳳梨花樟病菌)； 7~23, 鳳梨果腐病菌株 Bg 1~3、5~18。

Fig. 2. Identification of *B. gladioli* from pineapple by PCR with primer pair CMG-23-1/G-23-2. Lane M, 100 bp DNA marker; lane 1, negative control; lane 2, *Burkholderia caryophylli*; lane 3, *B. cepacia*; lane 4, *B. gladioli* pv. *gladioli*; lane 5, *B. glumae*; lane 6, *Pantoea ananatis*; lanes 7~23, Bg 1~3, 5~18.

有相同之主成分，但不同來源 (分離自植物或動物) 及不同病原型的 *B. gladioli* 菌株，其內含 hydroxy 之脂肪酸組成會有差異。

針對 *B. gladioli* 具專一性之引子 CMG-23-1/G-23-2 [3] 進行 PCR，可自供試 Bg 菌株及唐菖蒲首腐病菌 *B. gladioli* pv. *gladioli* 萃取而得的全菌 DNA 中增幅出大小爲 388 bp 之專一性 DNA 條帶 (圖二)。而洋蔥腐敗病菌 *B. cepacia*、康乃馨萎凋病菌 *B. caryophylli*、稻穀枯病菌 *B. glumae* 以及鳳梨花樟病菌 *P. ananatis* 則無任何 DNA 條帶產生 (圖二)，由 PCR 專一性引子對鑑定結果顯示供試鳳梨菌株爲 *B. gladioli*。此外，針對細菌16S rDNA 具專一性之引子 f8-27/r1510 [25] 進行 PCR 以及 DNA 定序，經由 BLAST 之比對結果得知與 *B. gladioli* 之序列相似度爲 99 %。綜合上述各項生理生化測定結果、選擇性培養基、Biolog 系統鑑定、脂肪酸組成分析、PCR 專一性引子及 16S rDNA 序列比對的結果均顯示分離自鳳梨果實之病原菌株爲 *B. gladioli*。

國內外研究均顯示造成鳳梨花樟病的病原菌爲 *P.*

表三、各種農藥在不同濃度下對鳳梨果腐病菌生長之抑制效果
Table 3. Growth inhibition of *Burkholderia gladioli* by various agrochemicals at different concentrations

Chemical	Concentration (ppm)	No. of strains inhibited/ No. of strains tested	Inhibition zone (cm in dia.)
Tetracycline	200	16/16	0.67-1.33
（30.3% SP）	400	16/16	0.83-1.53
	600	16/16	0.90-1.57
Streptomycin	100	16/16	0.43-0.90
（12.5% SL）	200	16/16	0.57-1.00
	400	16/16	0.80-1.17
Streptomycine	100	10/16	0.00-0.93
+ Tetracyclin	200	10/16	0.00-1.03
（10.0% SP）	400	10/16	0.00-1.27
Thiophanate methyl	500	16/16	0.50-0.87
+ Streptomycin	1000	16/16	0.67-1.10
(68.8% WP)	1500	16/16	0.90-1.20
Kasugamycin	100	2/16	0.00-0.97
（2.0% WP）	200	3/16	0.00-1.20
	400	10/16	0.00-1.33
Kasugamycin	500	16/16	0.20-0.97
+ Copper oxychloride	1000	16/16	0.40-1.13
（81.3% WP）	1500	16/16	0.47-1.27
Copper oxychloride	1000	16/16	0.23-1.07
（85.0% WP）	1500	16/16	0.40-1.10
	2000	16/16	0.47-1.17
Copper hydroxide	1000	16/16	0.47-1.13
（77.0% WP）	1500	16/16	0.60-1.27
	2000	16/16	0.80-1.37
Tribasic copper sulfate	1000	10/16	0.00-0.67
(27.12% SC)	1500	10/16	0.00-0.73
	2000	12/16	0.00-0.83
Mancozeb	1000	6/16	0.00-1.27
（80.0% WP）	1500	8/16	0.00-1.43
	2000	9/16	0.00-1.60
Oxolinic acid	1000	16/16	0.93-1.80
(20.0% WP)	1500	16/16	0.97-2.00
	2000	16/16	1.03-2.13

ananatis[15, 31, 32, 33]。而本研究證實 *B. gladioli* 同樣會造成與鳳梨花樟病相似之病徵。目前 *B. gladioli* 包括 *B. gladioli* pv. *alliicola*、*B. gladioli* pv. *agaricicola*、*B. gladioli* pv. *gladioli* 等病原菌，可引起洋蔥[21]、蘭花[18]、唐菖蒲[13]、櫻桃[22]、天堂鳥[7] 以及磨菇[24] 等作物的病害，多數造成細菌性葉斑病，於植物葉片上具水浸狀及壞疽病斑，在蘭科植物及洋蔥上則亦會引起軟腐。目前在台灣 *B. gladioli* 可造成植物細菌性病害之寄主有唐菖蒲[14]、蝴蝶蘭[34] 及山蘇[41]，但尚未有引起鳳梨病害之相關報導，因此本研究首次確認 *B. gladioli* 亦可造成鳳梨病害，因其引起之病徵呈現類似鳳梨花樟病之病徵，主要爲果實剖開後內部組織褐化及輕微軟腐，因此將此病害定名爲鳳梨果腐病，與由 *P. ananatis* 所引起之花樟病有所不同。

以 11 種殺菌劑在一般使用濃度下之感受性，測試之結果顯示在測試之濃度下對供試果腐病菌之生長均有抑制效果 (如表三)，其中又以歐索林酸之效果最佳，此結果可提供日後防治參考。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Adaskaveg, J. E. and Hine, R. B. 1985. Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. Plant Dis. 69: 993-996.
2. Barker, H. D. 1926. Fruitlet black rot disease of pineapple. Phytopathology 16: 359-363.
3. 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.
4. Chen, D. W. 1955. Studies on fruitlet heart rot of pineapple. Journal of Agriculture and Forestry 4: 114-132. (Taiwan, R.O.C., in Chinese)
5. Christenson, J. C., Welch, D. F., Mukwaya, G., Muszynski, 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.
6. Chun, W. and Jones, J. B. 2001. E. *Burkholderia*. Pages 142-144. in: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition. APS, St. Paul, Minnesota, USA. 373 pp.
7. Cirvilleri, G., Bonaccorsi, A., Vitale, A., Castello, I. and Polizzi, G. 2006. First report of leaf spot and blight of *Strelitzia reginae* caused by *Burkholderia gladioli* in Italy. Plant Dis. 90: 1553.
8. Cophlin, D. L. and Kado, C. I. 2001. B-3. *Pantoea*. Pages 76-77. in: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 373 pp.
9. Council of Agriculture, Executive Yuan. 2006. 5. Fruits (2) Pineapple, Ponkans. Page 76. in: Agricultural Statistics Yearbook. Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei, ROC. 320 pp. (Taiwan, R.O.C., in Chinese)
10. George, M. G., Julia, A. B., and Timothy, L. 2005. Family I. *Burkholderia fam. nov.* Pages 575-596. in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Part C. Springer. N Y, USA. 1388 pp.
11. Graves, M., Robin, T., Chipman, A. M., Wong, J., Khashe, S. and Janda, J. M. 1997. Four additional cases of *Burkholderia gladioli* infection with microbiological correlates and review. Clin. Infect. Dis. 25: 838-842.
12. Grimont, P. A. D. and Grimont, F. 2005. Genus XXIII. *Pantoea*. Pages 713-719. in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Part B. Springer, N Y, USA.1388 pp.
13. Hildebrand, D. C., Palleroni, N. J. and Doudoroff, M. 1973. Synonymy of *Pseudomonas gladioli* Severini 1913 and *Pseudomonas marginata* (McCulloch 1921) Stapp 1928. Int. J. Syst. Bacteriol. 23: 433-437.
14. 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. (Taiwan, R.O.C., in Chinese)
15. Huang, Z. and Du, C. C. 1960. Studies on *Erwinia ananas* fruitlet brown rot disease of pineapple. Plant Prot. Bull. 2: 125-126. (abstract) (Taiwan, R.O.C., in Chinese)
16. 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 *cocovenenans* and an emended dscription of *B. gladioli*. Microbiol. Immumol. 47: 915-925.
17. Jones, A. L. and Geider, K. 2001. B-1 *Erwinia amylovoraa* group. Page 46. in: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed. APS, St. Paul, Minnesota, USA. 373 pp.
18. 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.
19. Kuan, C. S., Cheng, Y. S. and Yang, H. J. 2007. Breeding, culture method and pests. Pages 64-75. in: Pineapple in Taiwan. Walkers Cultural. Taipei. ROC.

173 pp. (Taiwan, R.O.C., in Chinese)
20. Lai, S. C. and Hsu, S. T. 1974. Survival of *Erwinia ananas* in soil. Plant Prot. Bull. 16: 12-19. (Taiwan, R.O.C., in Chinese)
21. 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.
22. Li, T. S. C. and Sholberg, P. L. 1992. *Pseudomonas*-like early blight on sweet cherries. Can. Plant Dis. Surv. 72: 121-122.
23. Lin, C. C. and Cai, S. F. 2001. Review and present construe of pests of pineapple in Taiwan. Special Issue of Taiwan Agricultural Research Institute, COA, EY. 97: 41-57. (Taiwan, R.O.C., in Chinese)
24. Lincoln, S. P. and Fermor, T. R. 1991. Bacterial soft rot of *Agaricus bitorquis*. Plant Pathol. 40: 136-144.
25. Lipson, D. A. and Schmidt, S. K. 2004. Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the Colorado Rocky Mountains. Appl. Environ. Microbiol. 70: 2867-2879.
26. Marie, F., Malezieux, E., Marchal, J. and Perrier, X. 2000. On farm approach of pineapple fruitlet core rot disease in Martinique. Acta Hort. 529: 261-263.
27. Mergaert, J., Verdonck, L. and Kersters, K. 1993. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the genus *Pantoea* emend. as ananas (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 162-173.
28. Rohrbach, K. G., Beardsley, J. W., German, T. L., Reimer, N. J. and Sanford, W. G. 1988. Mealybug wilt, mealybugs, and ants on pineapple. Plant Dis. 72: 558-565.
29. Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. Pages 199-204. in: Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado. Budapest. 568 pp.
30. Schaad, N. W. 2001. Initial identification of common genera. Pages 7-10. in: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed. APS, St. Paul, Minnesota, USA. 373 pp.
31. Serrano, F. B. 1928. Bacterial fruitlet brown-rot of pineapple in the Philippine. Philipp. J. Sci. 36: 271-305.
32. Sun, S. K. 1960. Studies on fruitlet brown rot of pineapple. Plant Prot. Bull. 2: 16-17. (abstract) (Taiwan, R.O.C., in Chinese)
33. Sun, S. K. 1961. Studies on fruitlet brown rot of pineapple. Journal of the Agricultural Association of China 36: 66-81. (Taiwan, R.O.C., in Chinese)
34. 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. (Taiwan, R.O.C., in Chinese)
35. Syu, B. S. 1953. Inspection of pink disease of pineapple. Agriculture and Forestry Newsletter 5: 18. (Taiwan, R.O.C., in Chinese)
36. Tang, J. H. and Cheng, Y. S. 2007. Post-harvest treatment and transportation of pineapple. Pages 100-101. in: Pineapple in Taiwan. Walkers Cultural, Taipei, ROC. 173 pp. (Taiwan, R.O.C., in Chinese)
37. Trüper, H. G. and De' Clari, L. 1997. Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition". Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 908-909.
38. Tsai, D. Z. and Wu, X. Y. 2001. Nematode's disease of pineapple. Special Issue of Taiwan Agricultural Research Institute, COA, EY. 97: 37-39. (Taiwan, R.O.C., in Chinese)
39. Wang, G. M. 1951. Fruit blackheart of pineapple and its control in Changhua area in winter. Agriculture and Forestry Newsletter 2:11-13. (Taiwan, R.O.C., in Chinese)
40. Wang, H., Qi, M. and Cutler, A. J. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Res. 21: 4153-4154.
41. Yang, T. C. 2005. Study of incidences and control of major pests on bird nest fern, *Asplenium* spp. in Hualian area. Bull. Hualien DAIS. 23: 31-36. (Taiwan, R.O.C., in Chinese)

ABSTRACT

Hseu, S. H.,[1] Zeng, W. F.,[1] Lai, W. C.,[1] Pan, Y. P.[1] and Lin, C. Y.[1, 2] 2008. Fruit rot disease of pineapple caused by *Burkholderia gladioli*. Plant Pathol. Bull. 17: 125-135. ([1] Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung, Taiwan; [2] Corresponding author, E-mail: cylin@wufeng.tari.gov.tw)

A new record of pineapple disease in Taiwan was investigated. The disease did not cause apparent symptoms on pineapple plants or fruit surfaces, but it induced browning and mild soft-rot to the fruit flesh, similar to the pineapple marbling disease caused by *Pantoea ananatis*. Based on the symptom and pathological studies, physiological and biochemical analyses, Biolog GN2 and MIDI Sherlock Microbial Identification comparisons, the pathogen was identified as *Burkholderia gladioli*. PCR identification showed that the pathogen, same with *B. gladioli* isolated from various host plants, contained a DNA segment of 388 bp that is not found in *P. ananatis*. Results from 16S rDNA sequencing and comparison revealed that the degree of similarity to the ones of *B. gladioli* reached 99%. Besides, eleven commercial agrochemicals were tested and all found to inhibit the growth of this pathogen; among which, oxolinic acid was identified to be the most effective one.

Keywords: pineapple, fruit-rot disease, PCR, *Burkhoderia gladioli*