

梨葉緣焦枯病病菌 PCR 鑑定技術及親緣相關性分析

蘇秋竹¹ 副研究員

曾國欽² 徐世典² 教授

1. 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所農藥應用組

電子郵件：aba@tactri.gov.tw；傳真：04-2332-1478

2. 國立中興大學植物病理學系

摘要

梨葉緣焦枯病(Pear leaf scorch)為台灣特有之病害，亦為限制梨產業之重要病害，其病原菌為局限導管細菌(xylem-limited bacteria; *Xylella fastidiosa* Wells)具有波浪狀細胞壁且歸類為不易培養原核生物(fastidious prokaryote)，過去研究顯示梨葉緣焦枯病菌與其他寄主之 *X. fastidiosa* 菌株間為低血清相關性(serology relation)，同時 *X. fastidiosa* 專一性引子對 272-int-1/272-int-2 及 RST31/ RST33 對國內各地梨葉緣焦枯病病菌菌株進行 PCR 反應，則無任何條帶產生，為快速鑑別梨葉緣焦枯病菌菌株，利用 OPA11 隨機引子進行 RAPD 分析，成功篩選出梨葉緣焦枯病病菌獨有之核酸片段大小為 1412 bp，進一步進行轉殖及序列解序，並設計得到一組專一性引子對為 PLS-F/PLS-R(5'-TGGACGTTGTGGTATCGGTG-3'/5'-TTGAAGTTGACGTG TGGCTG-3')，此一組引子可對梨葉緣焦枯病病菌增幅出 416 bp 專一性基因產物，但其他寄主之 *X. fastidiosa* 菌株及其他對照一般病原細菌菌株之基因體核酸皆無法增幅出基因產物，其靈敏度最高可以到 10 pg 基因體核酸，並可直接進行田間罹病梨樹組織之檢測，此引子有潛力應用於田間中間寄主植物及蟲媒之病原菌偵測；本研究以 ERIC-PCR、RAPD-PCR 及 BOX-PCR 等技術分析國內各地之梨葉緣焦枯病病菌菌株及其他寄主之 *X. fastidiosa* 菌株之 DNA，其他寄主植物包括夾竹桃(oleander)、胡桃(pecan)、李(plum)、桃(peach)、桑(mulberry)、葡萄(grapevine)及無花果(sycamore)，由 DNA 指紋圖譜進行親緣相關性分析，結果皆可將試驗菌株區分為兩大群，分別為梨菌株群與其他寄主之 *X. fastidiosa* 菌株群，其中其他寄主之 *X. fastidiosa* 菌群可再細分為三次菌群：分別為(I)夾竹桃菌群，(II)核桃、桃、李及無花果菌群，(III)桑及葡萄菌群；進一步進行 16S rDNA 及 16-23S rDNA 區間序列之分析，分別選殖得到特定核酸片段大小介於 1537~1540bp 及 512~540bp，經分析梨葉緣焦枯病菌菌株 (PLSB) 間相似值 (similarity) 為 99.8~99.9%，PLSB 菌株與國外其他寄主之 *X. fastidiosa* 菌株相似為 98.3~98.6%，；另選殖得到特定 16-23S rDNA 區間序列片段大小為 510~540bp，而 PLSB 菌株間相似值為 100%，梨

葉緣焦枯病菌菌株與國外其他寄主之 *X. fastidiosa* 菌株為 87.6~88.4%；在梨葉緣焦枯病菌菌株之 16S rDNA 及 16-23S rDNA 區間序列基因圖譜 (gene map) 中發現獨有之序列，可作為鑑定 PLSB 菌株的依據。利用鄰聚法 (Neighbor Joining method) 進行親緣分析，可將菌株分為兩大群分別為梨菌株群及其它寄主之 *X. fastidiosa* 菌株群；由 DNA 指紋圖譜分析及特定核酸序列分析之結果，顯示梨葉緣焦枯病病菌菌株應為 *Xylella* 屬內獨立的菌株群，由此結果應可支持梨葉緣焦枯病菌菌株應為 *Xylella* 亞種以上分類地位，甚至可能為新種。

關鍵字：梨葉緣焦枯病、侷限導管細菌、親緣相關性、PCR 鑑定技術

PCR identified technique and Phylogenetic relationships Comparison of *Xylella fastidiosa* Between Strains of Pear Leaf Scorch and Strains of Other Host Origins

Chiou-Chu Su¹, Adjunct researcher

Kuo-Ching Tzeng², Shih-Tien Hsu², Professor

1. Department of Pesticide Application, Agricultural and Toxic Substances Research Institute

E-mail: auba@tactri.gov.tw; Fax: 04-2332-1478

2. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

ABSTRACT

Pear leaf scorch (PLS) disease was unique and limited the cultivation of pear in Taiwan. It was caused by strains of *Xylella fastidiosa*, xylem-limited bacteria, belonged to fastidious prokaryote that had a ripple cell wall structure. The early study showed PLS strains were low serology relation in comparison of strains of *X. fastidiosa* from other host. Then, for polymerase chain reaction (PCR) test, none DNA fragment was amplified from PLS strains with two specific sets of RST31/RST33 and 272-int/272-int-2 those to detect and identify of *X. fastidiosa*. For development of a rapid PCR technique to identify and detect PLS bacterium, a specific random amplified polymorphic DNA product (PLS-OPA11) was isolated from a PLS strain. The specific fragment of DNA was cloned, sequenced, and found to be 1412bp in length. A set of specific primer PLS-F/PLS-R (5'-TGGACGTTGTGGTATCGGTG-3' /5'-TTGAAGTTGACGTGTGGCTG-3') was obtained to utilize these sequence data for PLS strains. The primer set amplified a 416 bp DNA fragment from PLS strains, but not strains of *X. fastidiosa* from other host and strains of other general phyto-bacteria. The minimum amount of DNA from PLS bacterium that could be amplified by PCR was 10pg. The PLS bacterium could be directly detect by PCR technique with pear diseased tissue. A developed PCR primer technique would be a potential to exploit for detection of PLS bacterium within vector and alternative host plants in future. To determine the genetic relatedness between PLS bacterium and strains originally isolated from oleander, pecan, plum, peach, mulberry, grapes, and sycamore, we conducted DNA fingerprinting — enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR), random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR), and BOX-PCR assays and sequenced the 16S rDNA and 16-23S rDNA intergenic spaces region. Under dendrogram depict the genetic relationships using RAPD, ERIC-PCR and BOX-PCR assays, all strains were distinguished two major

groups — pear group and other host group, and strains of *X. fastidiosa* from other host could be grouped into three subgroups — (I) oleander group; (II) pecan, plum, peach, and sycamore group; (III) mulberry and grapevine group. Further study was designed to compare PLS bacterium with strains originally isolated from other hosts using sequence analyses of 16S rDNA and 16S-23S rDNA spacer region. When sequence analysis of 16S rDNA based on the fragment sizes of 1537-1540bp was compared, the similarity index among PLS strains was 99.8-99.9%; whereas the similarity index was 98.1-98.7% between PLS strains and strains from other hosts. When sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer region based on fragment size of 510-540bp, the similarity index among PLS strains was 100%; whereas the similarity index was 87.6-88.4% between pear leaf scorch strains and strains from other hosts. Based on the above similarity index study results, it seemed to suggest that specific gene sequence can be developed for specific identification of pear leaf scorch strains. Under neighbor-joining method showed phylogenetic relationships, all strains were distinguished two groups — pear group and other host group. According to the above DNA fingerprinting and intergenic spacer DNA sequence data, we postulated the PLS bacterium could be a new species or subspecies within the genera of *Xylella*, but further elucidate it that combined other characters.

Keyword: pear leaf scorch, *Xylella fastidiosa*, phylogenetic relationships, PCR identified technique

緒言

梨葉緣焦枯病(Pear leaf scorch)是 1980 年左右在台灣橫山梨產區發現的新病害，田間罹病梨樹於每年 7 月前後才會呈現典型葉緣焦枯之病徵，提早落葉，逐年形成枝枯並呈現樹勢衰弱之現象，嚴重罹病梨樹 3 至 5 年即死亡，農友根據其病徵俗稱酥葉病，但病因不明，爾後 1990 年經由 Leu 和 Su 兩人以電子顯微鏡觀察罹病梨樹組織始發現有桿狀細菌棲息於導管內，其細胞壁呈現波浪狀(ripple cell wall)，經由組織分離發現細菌只生長於特殊培養基中如 PD2 培養基，而且在培養基上生長較一般病原細菌緩慢，進一步以人工接種證明其病原性，由於此細菌棲息於梨樹維管束組織之導管內，其細胞型態及培養特性與國外一群不易培養之植物病原侷限導管細菌(xylem-limited bacteria)相同，始確定梨葉緣焦枯病由侷限導管細菌所引起(Leu and Su, 1993)。

侷限導管細菌文獻報導可為害許多重要經濟作物，例如葡萄(grapevine)(Davis et al., 1978)、苜蓿(alfalfa)(Goheen et al., 1973)、桃(peach)(Well et al., 1983)、李(plum)(Raju et al., 1982)、杏仁(almond)(Mircetich et al., 1976)、榆樹(elm)(Hearon et al., 1980)、無花果(sycamore)(Hearon et al., 1980)、桑椹(mullbery)(Koscka et al., 1986)、柑桔(citrus)(Chang et al., 1993)及咖啡樹(coffee)(de Lina et al., 1998)等，其中許多病害造成產業之嚴重損失，最典型例子如北美葡萄皮爾斯病(Pierce's disease, PD)及南美柑橘斑駁黃化病(citrus variegated cholorsis, CVC)，目前為北美葡萄與巴西柑橘產業主要限制因子(Hopkins and Purcell, 2002)。

有關侷限導管細菌之歷史沿革，首先於 1892 年時 N.B. Pierce 發現美國加州地區(California)引起葡萄(*Vitis vinifera* L.)之 PD 病害，由於此病在美國東南部發生相當嚴重，導致由歐洲引進之葡萄樹種大量死亡，造成農民重大損失(Hewitt et al., 1946)，爾後發現此病可經由嫁接及媒介昆蟲而傳播，故認為此病應是由病毒(virus)所引起(Hewitt et al., 1942)，且經由研究媒介昆蟲而發現位於葡萄園旁之苜蓿(alfalfa)具有高比例之苜蓿矮化病(alfalfa dwarf disease)，推斷此病可能與 PD 之發生有關(Hewitt and Houston, 1941)，而後經證實此二病害為同一病原菌所引起(Goheen et al., 1973)。1971 年 Hopkins 和 Mortensen 發現發生 PD 之葡萄病株經四環黴素(tetracycline)處理後可抑制此病之發展，確定病因為原核生物引起(Hopkins and Mollenhauer, 1971)。其後 Hopkins 和 Mollenhauer 藉由電子顯微鏡觀察病株導管組織時發現有病原菌之存在，由於其形態及細胞壁構造與 Rickettsiaceae 極為相似，故稱此病原菌為“Rickettsia-like bacteria(RLB)”由於此類病原菌存在於導管又稱侷限導管細菌(Hopkins and Mollenhauer, 1973)。然而此病原菌直到 1978 年 Davis 等人利用 JD-1 才可以人工培養，並完成柯霍氏法則，使得有關此菌之研究範疇更為廣

闊(Davis et al., 1978)。1987年 Wells 等人根據 DNA 的 G+C 比、血清學(serology)資料、脂肪酸(fatty acid)分析及 16Sr RNA 等分析結果，指出此病原菌並非 Rickettsiaceae，亦不屬於其它病原細菌，因而建議給予此類局限導管細菌一新的名字 *Xylella fastidiosa*，以建立一新屬(genus)及此一新屬中唯一的一種(species) (Wells et al., 1987)。

有關 *X. fastidiosa* 之鑑定與偵測，早期只能以特殊培養基培養、光學顯微鏡及電子顯微鏡切片觀察(Brlansky et al., 1982; Chagas et al., 1992; Davis et al., 1980; Well et al., 1983)，但耗時費力；爾後血清學技術發展日益成熟普及，加上血清學技術可以改善檢測效率及大規模樣品快速檢測，因此普遍應用於 *X. fastidiosa* 病原檢測、流行病學調查及蟲媒確認等工作(Brlansky et al., 1982; Chang et al., 1993; Nomé et al., 1980; Pooler et al., 1997; Sheraid et al., 1991; Yonce and Chang, 1987)，例如 1982 年 Brlansky 等人則利用免疫螢光技術(immunofluorescent) 技術觀察罹患皮爾斯病之葡萄導管組織內細菌；1987 年 Yonece 及 Chang 利用酵素連結免疫分析法(enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)進行桃樹矮化病(phony peach disease)田間蟲媒對於寄主及中間寄主植物之傳毒效率檢測；1991 年 Sherald 和 Lei 兩人以 Agdia 公司生產之 *X. fastidiosa* 之抗體測試組件進行榆樹葉枯病(elm leaf scorch)田間病害調查，在 18 株顯現葉緣焦枯病徵的榆樹中檢測到 17 株為正反應，然而血清技術也存在一些缺失，如植物體內含物常干擾 ELISA 檢測，不但會降低 ELISA 靈敏度且易造成誤判 (Duncan and Torrance et al., 1992)；晚近聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)(Mullis and Faloona et. al., 1987)亦常利用於 *X. fastidiosa* 病原菌之快速鑑定及偵測，例如 1994 年 Minsavage 等人以 *X. fastidiosa* 專一性引子 RST31/RST33 進行田間罹病組織之檢測，其靈敏度比 ELISA 檢測高 100 倍，而 1995 年 Pooler 和 Hartung 則利用 RAPD 產物發展 PCR 引子對(CVC-1/272-2-int)專一性鑑別 *X. fastidiosa* 之 CVC 菌群，1999 年 Bank 等人則以 RAPD 技術發展引子對(XF176f/XF686r)可專一性鑑別 *X. fastidiosa* PD 之菌群，1997 年 Pooler 等人應用免疫磁力分離法(immunomagnetic separation) 搭配 nested PCR，調查田間潛在性蟲媒(potential insect vector)種類及帶菌比例。

目前全世界 *X. fastidiosa* 所引起的病害，已被證實的寄主植物超過 145 種(Hopkins and Adlerz, 1988; Hopkins and Purcell, 2002)，這些來自不同寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株，依交叉接種試驗資料似乎可再細分為病原型(pathotype)，例如來自於葡萄、苜蓿及杏仁之菌株稱為 PD 菌群(Purcell and Hopkins, 1996)，來自柑橘及咖啡之菌株稱為 CVC 菌群(Li et al., 2001)，來自桃及李之菌株為同一菌群(Purcell and Hopkins, 1996)，而其他寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株目前仍缺乏交叉接種試驗之資料，主要受限於傳統之交叉接種試驗耗時費力，同時 *X. fastidiosa* 為國際檢疫病原菌其菌株不易取得，另一方面 *X. fastidiosa* 不易培養且生長速度緩慢，無法應用傳統之生理生化特性進行

種內菌系的鑑別；近年來由於分子生物學的進步，利用隨機增幅核酸多型性分析(random amplified polymorphic DNA, RAPD) (Williams et al., 1990)、ERIC-PCR (Sharpley and Robert 1990)、BOX-PCR (Martin et al 1992)、16S rDNA 序列分析 (Hillis and Dixon, 1991) 及 16S~23S 區間序列分析 (Gürtler and Stanisich, 1996; Jesús et al., 2001) 等分子鑑定技術，廣泛應用於細菌種間與菌系差異性之分析比較，例如 1995 年 Pooler 等人以 RAPD 技術分析 7 種不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株可將其細分為五群，分別為(I)柑橘菌群，(II)李-榆樹菌群，(III)葡萄-豬草菌群，(IV)杏仁菌群，(V)桑椹菌群；而 2001 年 Qin 等人則利用 ERIC-PCR、及 RAPD 技術對來自北美及南美共 57 株不同寄主 *X. fastidiosa* 進行分析，可將菌株區分四群分別為(I)桑椹菌群，(II)葡萄、豬草及杏仁菌群，(III)榆樹、橡樹及李菌群，(IV)咖啡及柑橘菌群，其中南美咖啡與柑橘菌群與來自北美另三群菌群間之相似度只有 0.45。而 2001 年 Kim 等人利用 BOX-PCR 指紋圖譜條帶明顯區分 *Bacillus anthracis* 與其近緣種 *B. cereus*、*B. thuringiensis* 及 *B. mycoides*；2002 年 Chen 等人則分析 20 株不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株之 16S rDNA 序列，可將菌株分為兩群，分別為(I)葡萄-桑椹菌群，(II)柑橘-咖啡菌群；而 2001 年 Metta 和 Rosato 分析 10 株不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株之 16~23S rDNA 區間序列間的相關性，可將菌株分為兩群，分別為(I)葡萄-夾竹桃菌群，(II)柑橘-咖啡-桃-橡樹及李菌群。

過去的研究顯示梨葉緣焦枯病病菌與國外不同寄主 *X. fastidiosa* 菌株具低血清相關性(Leu and Su, 1993; Leu et al., 1998)，也無法以國外開發的 *X. fastidiosa* 之專一性引子對進行檢測(蘇氏等人，2002)，本研究以 RAPD 技術選殖梨葉緣焦枯病病菌專一性核酸片段，進而建立本菌 PCR 快速鑑定及偵測技術之標準流程，未來可應用本菌於蟲媒、其他寄主或中間寄主等之相關研究，加速累積本菌生態及流行病學之資料；為了進一步確認梨葉緣焦枯病病菌與國外不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株彼此之間的差異性，本研究進行 ERIC-PCR、BOX-PCR 及 RAPD 等指紋圖譜及 16S rDNA 序列與 16S~23S rDNA 區間序列分析，了解梨葉緣焦枯病病菌與不同寄主 *X. fastidiosa* 菌株間之親緣相關性，作為本菌進一步系統性分類參考之基礎，有利本病防治策略之擬定，提供梨農參考，同時可作為國外 *X. fastidiosa* 病原侵入台灣之風險性評估參考。

材料與方法

供試菌株

本研究所使用之 30 株梨葉緣焦枯病病菌菌株，由台灣各地區田間採集的罹病梨樹分離而得，34 株國外不同寄主 *X. fastidiosa* 菌株 DNA 則由喬治亞大學張宗仁博士提供(表一)，而其他供試之一般細菌菌株則來自本實驗室及

國立中興大學植物病理學系細菌研究室所保存之菌種。

細菌全量 DNA 的抽取與濃度測定

細菌全量 DNA 的抽取係參照 Sambrook 氏的方式加以修改 (Sambrook, 1989), 其步驟如下: 挑取供試細菌培養於 PD2 培養基上, 置於 30°C 震盪培養約 72 小時。將培養液置於 50 ml 的離心管離心 (8000 rpm, 10 分鐘) 後, 去除上清液, 以 5 ml 的 Pett IV (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 M NaCl) 溶液懸浮沈澱之菌體, 離心 (8000 rpm, 10 分鐘), 此淋洗步驟重複一次, 再以 5 ml 的 STE [10 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA (pH8.0)] 使沉澱菌體懸浮, 離心 (8000 rpm, 10 分鐘), 最後溶於 1 ml 之 STE 緩衝液, 再移入 2 ml 的微量離心管中, 並慢慢滴入 100 μ l 的 10 % SDS (sodium dodecyl sulfate), 於 65°C 作用 1.5 小時, 加入 RNase (50 μ g/mL) 於 37°C 作用 1~2 小時後再加入 proteinase K (100 μ g/ml), 於 37°C 作用 3~4 小時後, 加入等體積之 phenol/chloroform/ isoamy alcohol (25:24:1, vol/vol/vol) 緩和混勻 15 分鐘以上至產生乳白色, 離心 (13000 rpm, 20 min, 4°C), 利用去頭之 tip 吸取上層液, 重複上述步驟 2~3 次, 所得之上層液加入 2 倍體積的 95 % 酒精以沈降 DNA, 離心 (13000 rpm, 20 min, 4°C), 倒去上層液並用 70 % 酒精洗滌沈降下來的 DNA, 經真空抽氣乾燥後, 加入 100 μ l 滅過菌之去離子水放於 4°C 下待 DNA 溶解, 以去離子水適當稀釋後, 以光譜儀 (spectrophotometer, pharmarcia biotech, England) 測定 OD_{260nm} 之讀值以計算 DNA 之濃度 並測定 OD_{260nm}/OD_{280nm} 比值以確定 DNA 之純度, 本研究中所製備使用之 DNA 其 OD_{260nm}/ OD_{280nm} 之比值, 皆介於 1.7~2.0 間。

梨葉緣焦枯病菌專一性引子對研發

本試驗利用隨機引子 OPA11 進行 RAPD 反應, RAPD 反應模式是參照 1998 年 Albibi 等人反應條件稍加修改, 篩選梨葉緣焦枯病病菌特有 DNA 片段作為探針, 對梨葉緣焦枯病病菌、國外不同寄主 *X. fastidiosa* 菌株、及其它植物病原細菌進行南方雜合法分析, 以確認此轉殖片段為梨葉緣焦枯病病菌特有之基因片段, 將梨葉緣焦枯病病菌獨有的條帶進行回收、轉殖及解序, 經由 OLIGO, version 4.0 (National Bioscience, Plymouth, MN) 衍生設計出含 G+C 比例較高且無穩定之 hairpin 及 duplex structure 較少之正向引子 (forward) 及反向引子 (reverse primer), 引子設計後進行黏合溫度、靈敏度測試及專一性測定。

田間梨葉緣焦枯病罹病樣品 PCR 檢測

由東勢橫山梨產區梨葉緣焦枯病罹病園, 標定 9 株罹患梨葉緣焦枯病之罹病株, 於 7 月中旬病徵顯現典型葉緣焦枯之病徵後, 採取葉片進行檢測; 採取葉柄以酒精表面消毒, 切為兩段, 一段葉柄加入 1ml 琥珀酸檸檬酸磷酸緩衝液 (succinate-citrate-phosphate buffer, SCP buffer: disodium succinate, 1g/L; trisodium citrate, 1g/L; K₂HPO₄, 1.5g/L; and KH₂PO₄, 1.0g/L, pH 7.0), 另一段葉柄則加入含有 0.02M 抗壞血酸鹽 (sodium ascorbate) 及 5% 聚乙烯吡咯酮 (polyvinylpyrrolidone) SCP 緩衝液 (簡稱 SCPAP 緩衝液), 分別研磨並去除

植物殘渣，取植物萃取液 100 μ l加入兩倍 0.5 N NaOH (含 0.5 % PVP (polyvinylpyrrolidone; Sigma, U.S.A.) 混合均勻，加入 300 μ l 1M Tris-HCl (pH 8.0) 中和，以消毒後之去離子水稀釋 10 倍作為PCR反應模板，PCR反應增幅條件為(a)94 $^{\circ}$ C 10 分鐘，1 個循環；(b) 94 $^{\circ}$ C 1 分、67 $^{\circ}$ C 45 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分，35 個循環；(C) 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘，1 個循環。並以電泳分析，比較這兩種萃取緩衝液對PCR檢測效率，標準方法確認後，針對田間標定的 9 株罹病株之葉柄組織樣品進行PCR檢測。

DNA 指紋譜圖分析

本試驗所採用的引子為 Operon technologies 公司(Alameda, CA)所製造的 OPERON 10-MER KIT 編號為 OPA 01-20 之 20 個隨機引子，RAPD 反應條件係參照 1998 年 Albibi 等人之方法稍加修改。BOX-PCR 分析引子對採用 1995 年 Koeuth 等人所設計的引子為 BOXAIR，反應條件則參照 Koeuth 等人的方法加以修改，ERIC-PCR 所採用的引子對為 ERIC1R/ERIC2(Versalovic et. al., 1991)，反應條件則參照 2001 年 Qin 等人的反應條件加以修改。

增幅後之產物則以水平式電泳進行分析，取 10 μ l PCR產物，與 1 μ l 的追蹤液，充分混合後，以微量吸管吸出，將其置入以 0.5 \times TAE buffer所製成之 1.5 % agarose之樣品槽中，並置入 2.5 μ l 核酸標幟 (Bio100 DNA Laddersize marker, GenMark Technology Co., Ltd. R.O.C)，以 150V 的電壓進行電泳分析，約 20 分鐘後取出膠體，經溴化乙錠 (ethidium bromide 0.5 mg / ml) 染色 10 分鐘後置於UV box上觀察，並利用拍立得照相機及Polaroid Type 667 底片照相記錄。將RAPD、ERIC-PCR 及BOX-PCR經由電泳分析後所呈現的指紋圖譜，紀錄各菌株之DNA指紋圖譜條帶，有條帶則定義為 1；無條帶則以定義為 0，資料輸入電腦，以NTSYSpc 2.0(Exeter software, NY., USA)軟體 Jaccard's 係數($S_J = N_{AB} / (N_{AB} + N_A + N_B)$)， N_{AB} 代表兩菌株共有的條帶數， N_A 、 N_B 分別代表兩菌株各自擁有之條帶，計算兩兩菌株之相似度(similarity, S_{SM})，再將所有結果排成三角矩陣，進一步依非加權配對算術平均法(UPGMA, Unweighted Pair Group Method Analysis)運算進行叢群分析(Clustering)，繪製出關係圖。

16S rDNA 序列與 16S-23S 區間序列分析

16S rDNA 序列分析所採用的引子對及PCR反應物條件參照 2000 年 Chen 等人之方法，16~23S rDNA 序列分析所採用的引子對及PCR反應物條件參照 2001 年 Metta 和 Rosato 兩人的反應條件。完成PCR增幅後產物則以水平式電泳進行分析並確認特定片段產物後進行轉殖與解序，方法如下：將PCR反應後所得的 16S rDNA 序列及 16-23S rDNA 區間序列片段，以 MontageTM PCR 離心過濾膜(MontageTM PCR centrifugal filter devices, Millipore, U.S.A.) 進行DNA之純化，並依廠商建議之使用說明進行，轉殖套件以 pOSI-T PCR Cloning kit (GeneMark, technology Co., Ltd. R.O.C) 來進行DNA片段之轉殖，並依廠商建議之使用說明進行，轉殖反應後所得菌株則經由質體DNA的抽取，以 plasmid miniprep purification kit (GeneMark, technology Co., Ltd. R.O.C) 來

進行。並依廠商建議之使用說明進行。經質體DNA抽取後確認將選殖株委託寄往明欣生物科技公司，進行選殖株重組質體DNA嵌入片段之核苷酸定序，經由自動定序儀所得序列先以bioedit軟體編輯，將梨葉緣焦枯病菌菌株、其他寄主之*X. fastidiosa*菌株及從GenBank上之柑橘與咖啡的*X. fastidiosa*菌株之16S rRNA 及 16-23S rRNA 基因序列以Clustal X 1.8 進行多序列比對 (multiple sequences alignment) (Jeannmougin et. al., 1998)並以 *X. axonopodis* pv. *citri*作為對照菌株，再以Phylip 3.6 (Felsenstein et al., 2004)之 DNADist程式計算序列相似值，以鄰聚法 (Neighbor Joining methods) 配合bootstrap方法重複取樣 1000 次驗證，進而推衍出梨葉緣焦枯病菌菌株與其他寄主來源*X. fastidiosa*菌株間之親緣樹型，再以TreeView 1.66 (Page, 1996)繪製親緣樹狀圖 (phylogentic tree)。

結果

梨葉緣焦枯病菌專一性引子對開發與田間罹病組織 PCR 檢測

梨葉緣焦枯病菌利用隨機引子OPA11 進行RAPD反應中可增幅出 1400 bp 左右明亮條帶，而國外不同寄主之*X. fastidiosa*及其他非標的細菌無相似產物產物出現(圖一A)，標定此片段為OPA11-1400，以OPA11-1400 為探針進行南方雜合反應分析，結果發現探針OPA11-1400 只與梨葉緣焦枯病菌可產生專一性雜合訊號，而國外*X. fastidiosa* 菌株與其他植物病原細菌菌株則皆無訊號產生(圖一B)；進一步經由純化、選殖、解序發現此片段大小為 1412 bp，將選殖株嵌入片段 OPA11-1400 利用 National Center for Biotechnology Information “ 網際網路，進行線上基因庫 (gene bank)的查詢與比對，發現選殖株嵌入DNA片段之核苷酸序列中 1-493bp與目前線上基因庫已註冊DNA序列之相似度皆低於 10%，根據此序列設計引子對 PLS-F (5'-TGGACGTTGTGGTATCGGTG-3') /PLS-R(5'-TTGAAGTTGACGTGGCTG -3')，經由測試所得PCR反應增幅條件為(a)94°C 10 分鐘，1 個循環；(b) 94°C 1 分、63°C 45 秒、72°C 1 分，35 個循環；(C) 72°C 10 分鐘，1 個循環；引子對PLS-F/PLS-R只對梨葉緣焦枯病菌增幅 416 bp的專一性條帶，對不同寄主*X. fastidiosa*及其他植物病原細菌菌株皆無增幅任何條帶(圖二)；引子對靈敏度測試達到 10pg DNA濃度及 1.36×10^2 cfu細菌菌量；比較SCP緩衝液與SCPAP緩衝液對田間罹病梨樹樣品檢測效率，結果只有SCPAP緩衝液處理樣品有檢測到專一性反應，SCP緩衝液皆為負反應；田間標定 9 株之罹病梨樹之葉柄組織樣品，直接進行PCR檢測皆能一致性得到正反應(圖三)。

DNA 指紋圖譜分析

以 20 個隨機引子對不同寄主 *X. fastidiosa* 菌株進行 RAPD 增幅反應，發現有五個增幅效果良好且具再現性之引子分別為 OPA2、OPA3、OPA4、OPA11

及 OPA18，進一步以此五個引子之 RAPD 指紋圖譜結果進行遺傳差異性分析。每個引子所增幅的條帶分別為 11~21 個，所產生的條帶共有 78 條，片段大小約為 200~3000 bp 之間，相同寄主的 *X. fastidiosa* 菌株由各引子所增幅之多型片段大致相同，只在次要條帶有些微差異，然而次要條帶再現性不高，而不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株間的條帶則有較大差異，其中梨葉緣焦枯病菌菌株與國外不同寄主 *X. fastidiosa* 菌株間無共通性條帶。以引子對 ERIC1/ERIC2 進行之 ERIC-PCR 增幅所得指紋圖譜共有 27 條條帶，片段大小約為 100~1000 bp 之間，相同寄主的 *X. fastidiosa* 菌株具有相同的條帶，而梨葉緣焦枯病菌與國外不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株間無共通性條帶。以引子 BOXAIR 進行之 BOX-PCR 增幅所得指紋圖譜共有 16 條條帶，片段大小約為 200~1500 bp 之間，相同寄主的 *X. fastidiosa* 菌株具有相同的條帶，而梨葉緣焦枯病菌與國外不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株間無共通性條帶。以 NTSYSpc 2.0 軟體分析 RAPD、ERIC-PCR 及 BOX-PCR 增幅所得之指紋圖譜條帶，並以非加權配對算術法繪出樹狀圖(圖四、圖五及圖六)，結果顯示三種指紋圖譜所繪製的樹狀圖可將不同寄主 *X. fastidiosa* 菌株區分為兩群：第一群為國內梨葉緣焦枯病菌菌群；第二群為國外不同寄主 *X. fastidiosa* 菌群，其中第二群可細分為三次菌群：分別為(I)夾竹桃菌群，(II)核桃、桃、李及無花果菌群，(III)桑及葡萄菌群。

16S rDNA 序列與 16S-23S rDNA 區間序列分析

由引子對 F/R 及 uni1320/uni332 對梨葉緣焦枯病菌、其他寄主之 *X. fastidiosa* 及 *X. axonopodis* pv. *citri* 菌株進行 PCR 增幅所得之基因片段分別約為 1.5 及 1.1 Kb 大小，經由轉殖、解序及比對後所得之 16S rDNA 基因及 16-23S rDNA 基因區間序列其片段大小分別為 1537~1540 bp 及 512~540 bp，進一步以 clustal X 軟體進行多序比對，結果發現梨葉緣焦枯病菌於 16S rDNA 基因序列中標號 51~65 與 16-23S rDNA 區間序列中標號 106~141、224~237、355~364 及 437~453 序列中各有其獨特之鹼基序列，其差異性可明顯區分梨葉緣焦枯病菌與其它寄主 *X. fastidiosa* 菌株；運用 Phylip 軟體中內之 DNADIST 程式所計算出菌株間 16S rDNA 序列及 16-23S rDNA 區間序列相似值，於 16S rDNA 序列中梨葉緣焦枯病菌菌株間的相似值介於 99.8 至 99.9% 而與其他九種不同寄主 *X. fastidiosa* 菌株之相似值介於 98.3 至 98.6%，而九種不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株間相似值為 99.3~99.7%，於 16-23S rDNA 區間序列中梨葉緣焦枯病菌菌株間的序列完全一致而與其他寄主 *X. fastidiosa* 菌株相似值為 87.6~87.4%，而其他寄主 *X. fastidiosa* 菌株間相似值為 97.2~100%。而以鄰聚法運算模式建構 16S rDNA 基因序列親緣樹狀圖如圖七，根據樹型關係遠近可將試驗菌株分為三大群，分別為梨葉緣焦枯病菌菌群、其他寄主 *X. fastidiosa* 菌群及 *X. axonopodis* pv. *citri* 菌株，這三群的 bootstrap 值都在 90% 以上。而其他寄主 *X. fastidiosa* 菌群中可再分為三菌株群：第一群為葡萄與桑椹菌株，第二群為咖啡菌株與柑橘菌株、第三群菌株包含胡桃、

李、桃及無花果菌株。16-23S rDNA 區間序列親緣樹狀圖如圖八，根據樹型關係遠近可將試驗菌株分為三大群，分別為梨葉緣焦枯病病菌菌群、其他寄主 *X. fastidiosa* 菌群及 *X. axonopodis* pv. *citri* 菌株，這三群 bootstrap 值都在 90 % 以上。而其他寄主 *X. fastidiosa* 菌群中可再細分為四群菌株：第一群為葡萄與桑椹菌株、第二群為咖啡菌株與柑橘菌株、第三群菌株包含胡桃、李、桃及無花果菌株，第四群則為夾竹桃菌株。

討論

梨葉緣焦枯病病原菌由於無法於一般性之培養基生長，因此無法以生理生化測試作為鑑定依據，只能以特殊培養基培養、光學顯微鏡及電子顯微鏡切片觀察鑑定(Leu and Sue, 1993)，且應用在大規模之中間寄主及蟲媒之流行病學調查上則不具效率，因此以應用 PCR 技術實為簡便可行的快速鑑定工具；本研究設計的專一性引子對 PLS-F/PLS-R 只對梨葉緣焦枯病病菌基因體核酸增幅出 416 bp 基因產物片段，但對國外不同寄主之 *X. fastidiosa* 之菌株及一般病原細菌之基因體核酸皆無法增幅出基因產物片段，表示此引子對梨葉緣焦枯病菌有高度專一性，可作為梨葉緣焦枯病病菌快速鑑定及偵測之基礎；然而進行田間樣品檢測時植物體內存在的干擾物質，常會影響 PCR 檢測效率，例如酚化合物(phenolic compounds)等物質可抑制 PCR 反應，文獻指出植物組織萃取緩衝液可添加抗壞血酸、PVPP 及檸檬酸等抑制植物體內之干擾物質，以提高 PCR 檢測效率(Benson et al., 1996; Kim et al., 1997; Minsavage et al., 1994; Rowhani et al., 1993; Singh et al., 1998; Wang et al., 2004)，例如 1994 年 Minsavage 等人以 SCPAP 緩衝液作為 PCR 前處理時植物組織萃取液，可提高對葡萄組織萃取液中之 *X. fastidiosa* PCR 檢測效率；在本研究所採用之兩種緩衝液，其中以 SCPAP 緩衝液明顯減緩田間罹病樣品組織褐化情況，才能有效進行田間樣品之 PCR 檢測，可能與 SCPAP 緩衝液中的成分含有抗壞血酸與 PVPP 有關，因為抗壞血酸可減緩植物組織酚化合物氧化的狀況(Benson et al., 1996; Minsavage et al., 1994; Rowhani et al., 1993)，而 PVPP 可吸附酚化合物(Warren et al., 2000)。因此梨樹田間罹病組織檢測時以 SCPAP 作為組織萃取緩衝液，可提升檢測效率以避免偽陰性結果發生。田間大量樣品檢測時，傳統 PCR 需電泳分析及電泳膠體染色，因而增加操作人員操作程序及時間，近年來因即時聚合酵素連鎖反應(real-time PCR)具有不需電泳及膠體染色，另具高靈敏度及可定量之優點，因此被應用於大規模檢疫檢測及流行病學之調查，例如 2002 年 Oliveira 等人應用即時聚合酵素連鎖反應技術調查 *X. fastidiosa* 於抗病與感病品種之柑橘體內病原菌分布及生存之情形。本研究研發的引子對可成功檢測田間採集的罹病梨樹組織，此引子對有潛力應用在梨葉緣焦枯病之罹病組織、蟲媒及中間寄主等方面之病原菌偵測，未來應可搭配即時 PCR 技術對此病原菌之生態學進行深入研究。

梨葉緣焦枯病為台灣地區獨有的風土病，由於病原菌之生物特性與局限導

管細菌相同，故病原菌仍被歸屬為 *X. fastidiosa*(Leu and Su, 1993)，然以梨葉緣焦枯病病菌及苜蓿矮化病菌的抗血清進行交叉測試，發現彼此間不具血清學相關性(Leu and Su, 1993)，1998 年 Leu 等人研發梨葉緣焦枯病病菌單一抗體並與國外不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株進行測試，結果顯示梨葉緣焦枯病病菌與國外不同寄主之 *X. fastidiosa* 為低血清相關性；另一方面以 *X. fastidiosa* 專一性引子對 RST31/RST33 及 272-1-int/272-2-int 對梨葉緣焦枯病病菌進行 PCR 檢測皆無法增幅出專一性片段，而國外不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株皆可增幅出專一性片段(蘇氏等人，2002)，綜合上述研究結果顯示梨葉緣焦枯病病菌與國外不同寄主之 *X. fastidiosa* 間有極大的差異性。本研究以 RAPD、ERIC-PCR 及 BOX-PCR 三種技術分析 64 株不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株，顯示梨葉緣焦枯病病菌與國外不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株間皆無共同性條帶，以數值分析則可將菌株分為兩大群，分別為梨葉緣焦枯病病菌菌群及國外不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株群，而國外不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株群可再細分為三個次菌群：分別為(I)夾竹桃菌群，(II)胡核、桃、李無花果群，(III)桑及葡萄群，顯示國外不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株彼此間具血緣相關性，此結果與國外文獻之研究結果類似(Albibi et al., 1998; Henderson et al., 2001; Hopkins and Adlerz, 1988; Hopkins, 1989; Poor and Hartung, 1995A; Purcell and Hopkins, 1996; Qin et al., 2001)，由指紋圖譜及親緣樹狀圖分析顯示梨葉緣焦枯病病菌與國外不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株群無相關性，此結果與血清學特性一致，因此梨葉緣焦枯病病菌應為 *X. fastidiosa* 中一獨特之菌群；本研究首次應用 BOX-PCR 技術分析不同寄主之 *X. fastidiosa*，其結果與文獻應用 RAPD 及 ERIC-PCR 分析結果相吻合，顯示 BOX-PCR 技術亦可作為不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株間分群鑑定之有效工具。雖然 1987 年 Wells 等人將不同寄主之局限導管細菌定義命名為 *X. fastidiosa* Well 一種，然而近年來文獻資料顯示經由交叉接種測試(Hopkins and Adlerz, 1988; Hopkins, 1989)、培養測試、DNA 指紋圖譜測試(Albibi et al., 1998; Henderson et al., 2001; Poor and Hartung, 1995A; Qin et al., 2001; Rosato et al., 1998) 及 16S rDNA 以及 16S~23S rDNA 區間序列分析(Chen et al., 2000A; Chen et al., 2000B; Chen et al., 2002; Henson et al., 2001; Metta et al., 2001; Qin et al., 2001; Rosato et al., 1998)等不同方式分析不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株，顯示來自不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株確有種內菌群或是亞種的存在((Purcell and Hopkins, 1996; Schaad et al., 2004); 2001 年 Mehta 和 Rosato 的研究中亦指出梨葉緣焦枯病病菌與其它不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株彼此間為低 DNA 同源性，而本研究之 16S rDNA 序列分析結果亦顯示梨葉緣焦枯病病菌與國外不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株分屬不同菌群；另 2004 年 Schaad 等人將來自不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株經由序列、血清學、DNA 同源性、抗生素感受性及培養特性等特性分析，將 *X. fastidiosa* 菌株定義區分為三群亞種：(1)*piercei* —來自葡萄、苜蓿、槭樹(maple)及杏仁(almond)菌株，(2) *multiplex* —來自桃(peach)、李(plum)、杏仁(almond)、榆樹(elm)及 pigeon 葡萄(*Vitis aestivalis*)菌株，(3) *pauca*

—來自柑橘(citrus)菌株，這三群亞種間 16~23S rDNA 區間序列相似值為 0.987~0.992，本研究顯示梨葉緣焦枯病病菌與國外不同寄主之 *X. fastidiosa* 菌株間之 16~23S rDNA 區間序列相似值介於 0.876~0.884，遠低於 *X. fastidiosa* 三群亞種間菌株相似值，因此推論梨葉緣焦枯病病菌應為亞種或甚至可提升至新種之層級。

引用文獻

- 蘇秋竹、楊文仁、徐世典、曾國欽。2002。梨葉緣焦枯病聚合酵素連鎖反應偵測技術之研究。植保會刊 44(4):368-369。
- Albibi, R., Chen, J., Lamikanra, O., Banks, D., Jarret, R. L., and Smith, B. J. 1998. RAPD fingerprinting *Xylella fastidiosa* Pierce's disease strains isolated from vineyard in North Florida. FEMS Microbiol. Letters 165:347-352.
- Banks D., Albibi R, Chen J., Lamikanra O., Jarret R. L., and Smith B. J. 1999. specific detection of *Xylella fastidiosa* Pierce's disease strains. Current. Microbial. 39:85-88.
- Benson, D. R., Stephens, D. W., Clawson, M. L., and Silvester, W. B. 1996. Amplification of 16S rDNA Genes from *Frankia* strains in root Nodules of *Ceanothus griseus*, *Coriaria arborea*, *Coriaria plumose*, *Discaria toumatou*, and *Purshia tridentate*. Appl. Environ. Microbiol. 62:2904-2909.
- Brlansky, R. H., Lee, R. F., Timmer, L. W., Purcifull, D. E., and Raju, B. C. 1982. Immunofluorescent detection of xylem-limited bacteria in situ. Phytopathology 71: 1444-1448.
- Chang, C. J., Garnier, M., Zreik, L, Rossetti, V., and Bove, J. M. 1993. Culture and serological detection of xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. Curr. Microbiol. 27:137-142.
- Chen, J., Bank, D., Jarret, R. L., Chang, C. J., and Smith, B. J. 2000A. Use of 16S rDNA sequences as signature characters to identify *Xylella fastidiosa*. Curr. Microbiol. 40:29-33.
- Chen. J., Chang. C. J., Jarret, R. L., and Gawel, L. 1992. Genetic variation among *Xylella fastidiosa* strains. Phtopathology. 82:973-977.
- Chen, J., Hartung, J. S., Chang, C. J., and Vidaver, A. K. 2002. An evolutionary perspective of Pierce's disease of grapevine, citrus variegated chlorosis, and mulberry leaf scorch diseases. Curr. Microbiol. 45:423-428.
- Chen, J., Jarret, R. L., Qin, X., Hartung, J. S., Banks, D., Chang, C. J., and Hopkins, D. L. 2000B. 16S rDNA sequence analysis of *Xylella fastidiosa*

- strains. *System. Appl. Microbiol.* 23: 349-354.
- Chagas, C. M., Rossetti, V., and Beretta, J. G. 1992. Electron microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. *J. Phytopathol.* 134:306-312.
- Davis, M. J., Purcell, A. H., Thomson, S. V. 1978. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. *Science* 199:75-77.
- Davis, M. J., Purcell, A. H., and Thomson, S. V. 1980. Isolation medium for the Pierce's disease bacterium. *Phytopathology.* 70:425-429.
- Duncan, J. M. and Torrance L. 1992. Techniques for the rapid detection of plant pathogens. Blackwell scientific publications, Inc. 3 Cambridge Center, Cambridge Massachusetts, 02142, U.S.A.
- de Lima, J. E. O., Miranda, V. S., Hartung, J. S., Bransky, R. H., Coutinho, A., Roberto, S. R., and Carlos, E. F. 1998. Coffee leaf scorch bacterium: Axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of citrus. *Plant Dis.* 82:94-97.
- Gómez Zavaglia, A., De Urraze P., and De Antoni, G. 1999. Characterization of Bifidobacterium strains using Box primers. *Anaerobe.* 6:169-177
- Goheen, A. C., Nyland, G., and Lowe, S. K. 1973. Association of a rickettsia-like organism with Pierce's of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. *Phytopathology* 63:341-345.
- Goncalves, E. R. and Rosato, Y. B. 2002. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 355-361.
- Gürtler, V. and Stanisich, V. A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16s-23s rDNA spacer region. *Microbiology.* 142: 3-16.
- Hillis, M. D. and Dixon, M. T. 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart. Rev. Bio.* 66: 411-453.
- Hauben, L., Vauterin, L., Swings, J., and Moore, E. R. B. 1997. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. 47:328-335.
- Hearon, S. S., Sherald, J. L., and Kostka, S. J. 1980. Association of xylem-limited bacteria with elm, sycamore and oak leaf scorch. *Can. J. Bot.* 58:1986-1996.
- Hendson, M., Purcell, A. H., Chen, D., Smart, C., Guilhabert, M., and Kirkpatrick, B. 2001. Genetic diversity of Pierces's disease strains and other pathotypes of *Xylella fastidiosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 895-903.
- Hewitt, W. B., Frazier, N. W., and Houston, B. R. 1942. Transmission of Pierce's disease of grapevin disease of grapevines with leaf hopper. (Abstr.)

Phytopathology 32:8.

- Hewitt, W. B., and Houston B. R. 1941. Association of Pierce's disease of grapevine and alfalfa dwarf in California. *Plant Dis. Rep.* 25:475-476.
- Hewitt, W. B., Houston, B. R., Frazier, N. W., and Freitag, J. H., 1946. Pierce's disease of grapevine. *Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.* 353:1-32.
- Hopkins, D. L. 1989. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27:271-290.
- Hopkins, D. L., and Adlerz, W. C. 1988. Natural hosts of *Xylella fastidiosa* in Florida. *Plant Dis.* 72:492-431.
- Hopkins, D. L., and Mollenhauer, J. A. 1971. Suppression of Pierce's disease symptoms by tetracycline antibiotics. *Plant Dis. Rep.* 55:610-612.
- Hopkins, D. L., and Mollenhauer, H. H. 1973. Rickettsia-like bacterium associated with Pierce's disease of grapes. *Science* 179:298-300.
- Hopkins, D. L. and Purcell, A. H. 2002. *Xylella fastidiosa* : Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Dis.* 86: 1056-1066.
- Jesús, G.-M., Ignacio, B., Jesús, J. R.-S., and Francisco, R.-V. 2001. RISSC: a novel database for ribosomal 16S-23S RNA genes spacer regions. *Nucleic Acids Res.* 29:178-180.
- Kamper, S. M., French, W. J., and Dekloet, S. R. 1985. Genetic relationships of some fastidious xylem-limited bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35:185-188.
- Kim W., Hong, Y., Yoo J., Lee W., Choi, C., and Chung, S.-in. 2001. Genetic relationship of *Bacillus anthracis* and closely related species BOX-PCR genomic fingerprinting. *FEMS Microbiol Letters.* 207:21-27.
- Kim, C. S., Lee, C. H., Shin, J. S., Chung, Y. S., and Hyung, N. I. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Re.* 1085-1086.
- Kostka, S. J., Tattar, T. A., Sherald, J. L., Hurtt, S. S. 1986. Mulberry leaf scorch, a new disease caused by a fastidious xylem-inhabiting bacterium. *Plant Dis.* 70:690-693.
- Koeth, T., Versalovic, J., Lupski, J. R. 1995. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* box elements in diverse bacteria. *Genome Res.* 5:408-418.
- Leu, L. S., and Su, C. C. 1990. Preliminary report on pear leaf scorch induced by xylem-limited bacteria in Taiwan. *Plant Prot. Bull.(Taiwan, R.O.C)*32:329.
- Leu, L. S. and Su, C. C. 1993. Isolation, cultivation, and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. *Plant Dis.* 77:642-646.

- Leu, H. H., Leu, L. S., and Lin, C. P. 1998. Development and application of monoclonal antibodies against the causal bacterium of pear leaf scorch, *Xylella fastidiosa*. J. Phytopathol. 146: 31-37.
- Li, W. B., Pria, W. D., Jr., Teixeira, D. C., Miranda, V. S., Ayres, A. J., Franco, C. F., Costa, M. G., He, C.-X., Costa, P. I., Hartung, J. S. 2001. Coffee leaf scorch caused by a strain of *Xylella fastidiosa* from citrus. Plant Dis. 85: 501-505.
- Nomé, S. F., Raju, B.C., Goheen, A. C., Nyland, G., and Docampo, D. 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay for Pierce's disease bacteria in plant tissues. Phytopathology 70:746-749.
- Mullis, K. B. and Falloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. Methods in Enzymology 155:335-350.
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Michell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R., Morrison, A. D., Boulnois, J. G., and Claverys, J. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. Nucleic Acids Res. 20: 3479-3483.
- Metta, A., and Rosato, Y. B. 2001. Phylogenetic relationships of *Xylella fastidiosa* strains from different hosts, based on 16S rDNA and 16-23S intergenic spacer sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 311-318.
- Minsavage, G. V., Thompson C. M., Hopkins, D. L., Leite, R. M. V. B. C., and Stall, R. E. 1994. Development of polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. Phytopathology 84:456-461.
- Mircetich, S. M., Lowe, S. K., Moller, W. J., Nyland, G. 1976. Etiology of almond leaf scorch and transmission of the causal agent. Phytopathology 84:456-461.
- Pooler, M. R., and Hartung, J. S. 1995A. Genetic relationships among strains of *Xylella fastidiosa* from RAPD-PCR Data. Curr. Microbiol. 31:134-137.
- Pooler, M. R., and Hartung, J. S. 1995B. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. Curr. Microbiol. 31:377-381
- Pooler, M. R., Myung, A. S., Bentz, J., Sherald J., and Hartung J. S. 1997. Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vector by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. Lett. Appl. Microbiol. 25:123-126.
- Purcell, A. H. and Hopkins, D. L. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 34:131-151.
- Oliveira, A. C., Vallim, M. A., Semighini, C. P., Araújo, W. L., Goldman, G. H.,

- and Machado, M. A. 2002. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 92:1048-1054.
- Qin, X., Miranda, V. S., Machado, M. A., Lemos, E. G. M., and Hartung, J. S. 2001. An evaluation of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from diseased citrus and coffee in São Paulo, Brazil. *Phytopathology* 91: 599-605.
- Raju, B. C., Wells, J. M., Nyland, G., Brlansky, R. H., and Lowe S. K. 1982. Plum leaf scald: isolation, culture, and pathogenicity of the causal agent. *Phytopathology* 72:1460-1466.
- Rosato, Y. B., Neto, J. B., Miranda, V. S., Carlos, E. F., and Manfio, C. P. 1998. Diversity of a *Xylella fastidiosa* population isolated from *Citrus sinensis* affected by citrus variegated chlorosis in Brazil. *System. Appl. Microbiol.* 21: 593-598.
- Rowhani, A., Chay, C., Golino, D. A., and Falk, B. W. 1993. Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. *Phytopathology* 83:749-753.
- Sharples, G. J. and Lloyd, R. G. 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research.* 18:6503-6508.
- Sanbrook, J., Maniatis, T. I., and Frisch, E. F. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Fatmi, M'B., and Chang, C. J. 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. *System. Appl. Microbiol.* 21: 290-300.
- Sheraid, J. L. and Lei, J. D. 1991. Evaluation of a rapid ELISA test kit for detection of *Xylella fastidiosa* in landscape. *Plant Dis.* 75: 200-203.
- Singh. R. P., Singh M., and King, R. R. 1998. Use of citric acid for neutralizing polymerase chain reaction inhibition by chlorogenic acid in potato extracts. *J. Virol. Methods.* 74:231-235.
- Stackebrandt, E. and G, Boebel. M. 1994. Taxonomic Note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA Sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- Su, C. C. and Leu, L. S. 1995. Distribution of pear leaf scorch and monthly isolation of its causal organism, *Xylella fastidiosa* from infected trees. *Plant Pathology Bulletin* 4:30-33.

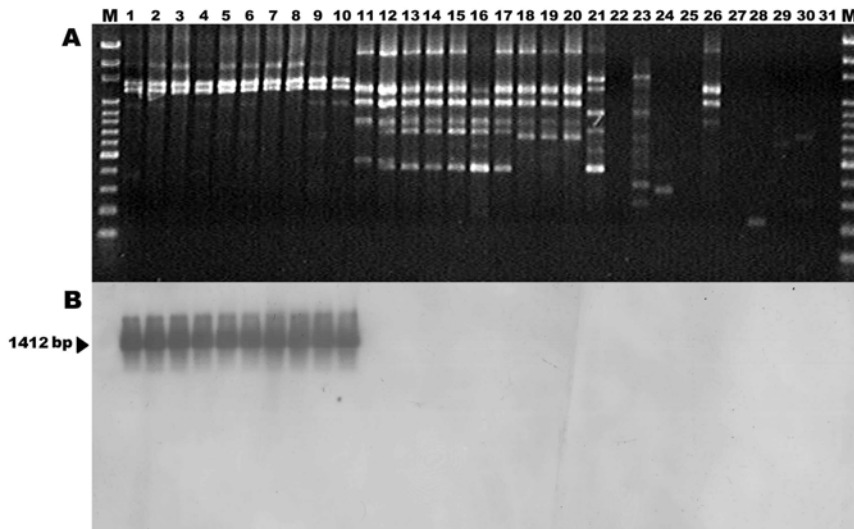
- Toth, I. K., Avrova, A. O., and Hyman, L. J. 2001. Rapid identification and differentiation of soft rot *Erwinias* by 16S-23S intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4070-4076.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., Vos DE, P., Kersters, K., and Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60:407-438.
- Versalovic, J., Koeuth, T., and Lupski, J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Res.* 19. 6853-6831.
- Wang, D., Wang, B., Li, B., Duan, C., and Zhang, J. 2004. Extraction of total RNA from *Chrysanthemum* containing high levels of phenolic and carbohydrates. *Col. Surf. B : Biointerfaces* 36:111-114.
- Warren, Charles R., Adams M. A., and Chen Zuliang. 2000. Is photosynthesis related to concentration of nitrogen and rubisco in leaves of Australian native plants? *Australian J. Plant Physiology* 27:407-416.
- Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H. Y., Weisburg, W. G., Mandelco-Paul, L., and Brenner, D. J. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp.nov.: Gram-negative xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:136-143.
- Wells, J. M., Raju, B. C., Nyland, G. 1983. Isolation, culture and pathogenicity of the bacterium causing phony disease of peach. *Phytopathology* 73:859-862.
- 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.
- Yonce, C. E., and Chang C. J. 1987. Detection of xylem-limited bacteria from sharpshooter leafhoppers and their feeding hosts in peach environs monitored by culture isolations and ELISA techniques. *Environ. Entomol.* 16: 68-71.

表一、本研究使用來自於梨及其他寄主侷限導管細菌菌株

Table 1. List of strains of xylem-limited bacteria from pear and other host used in this study

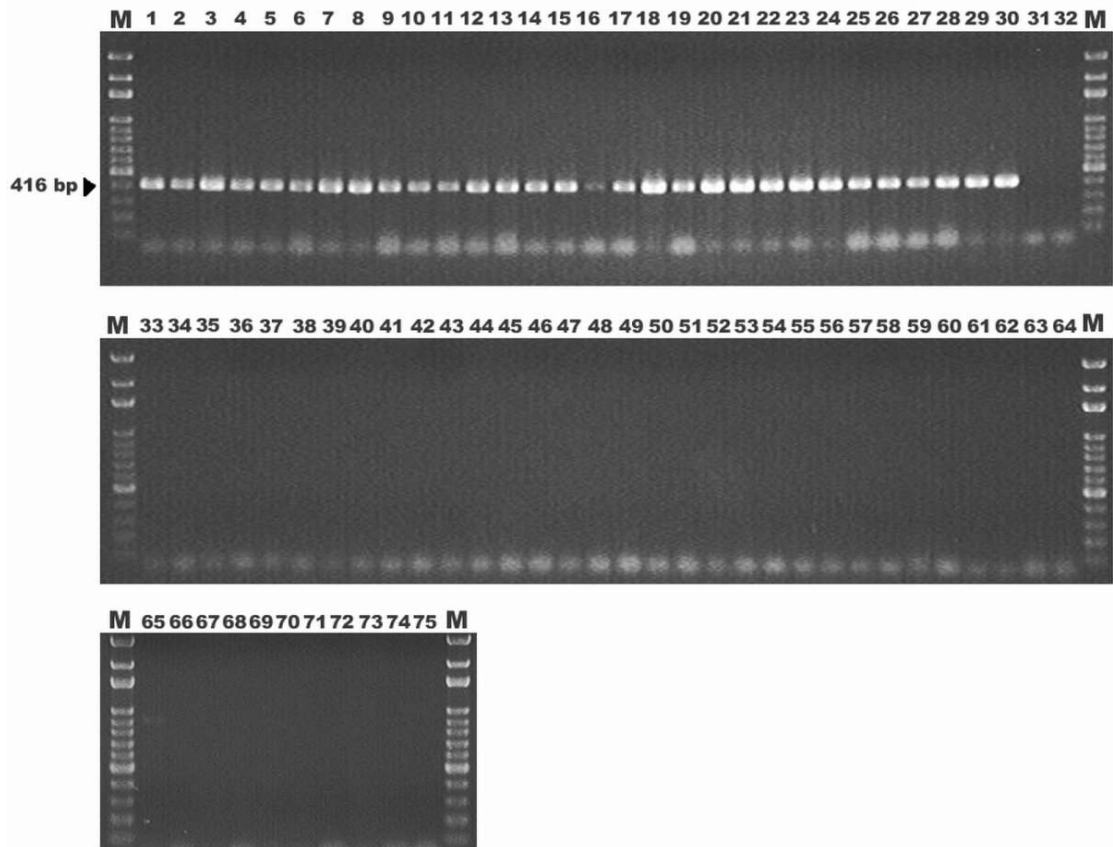
2	Number of strain	Strains	Source
<i>Xylella fastidiosa</i>			
Pear	30	002, 008, 013, 015, 022, 045, C. C. Su 052, 053, 061, 071, 072, 076,096, 097, 104, 114, 121, 123, 131, 139, 140, 150, 156, 184, 190, 194, 204, 207, 210, 222	
Oleander	4	GH#9, O1, #6 O-10	C. J. Chang ¹
Pecan	4	4BD7, 4BD3, 4BD2, 4B	C. J. Chang
Plum	2	2#4, 2#6	C. J. Chang
Peach	1	2#5	C. J. Chang
Grape	14	3SV 11A, FTC AG-1, Yugo B, Shirag w/PD, White eo A27, Cab San, Melody, R118 V3-4#10, ATCC35876, ATCC35879, ATCC35870, ATCC35869, ATCC35881, Chateau	C.J. Chang
Mullberry	4	Mul 1, Mul 7, GHS 505, C. J. Chang G9E	
Sycamore	5	SLS 55, SLS 61, SLS 27, C. J. Chang SLS DC5, SLS Mary	

1.Total DNA of strains of *Xylella fastidiosa* from different host were directly provided from C. J. Chang Lab.



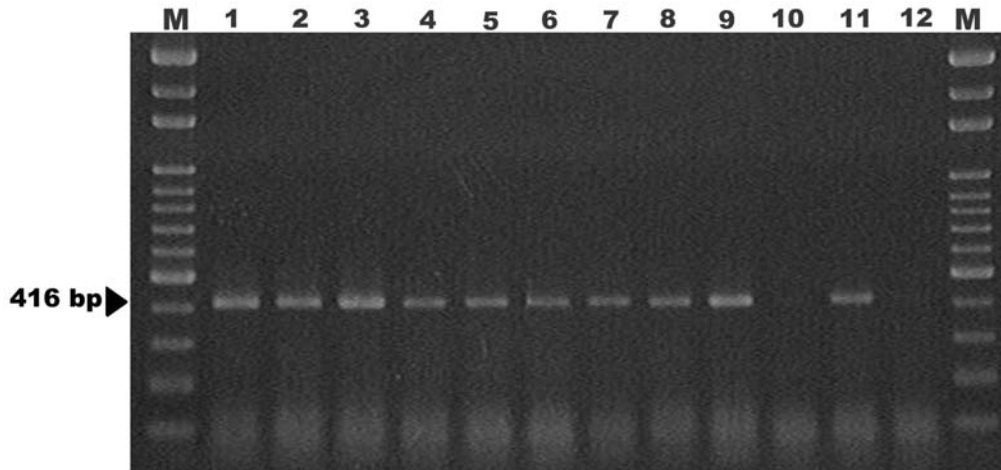
圖一、利用隨機引子 OPA-11 對梨葉緣焦枯病病菌、不同寄主 *Xylella fastidiosa* 菌株及其他細菌菌株之 RAPD 分析後所得到電泳圖譜(A)及利用選殖自梨葉緣焦枯病菌株 OPA11-1400 探針進行南方雜合反應(B)。

Fig. 1. RAPD pattern of strains of pear leaf scorch bacteria, *Xylella fastidiosa* from other host and other general bacteria using OPA-11 random primer (A) and southern hybridization of the RAPD production with OPA11-1400 probe cloned from pear leaf scorch bacteria strain 2(B). M: Gen-100 DNA Ladder (GeneMark, R.O.C); 1-10: pear leaf scorch bacterial strains; 11-20: strains of *X. fastidiosa* of different host; 21: *Erwinia chrysanthemi*; 22: *E. carotovora* subsp. *carotovora*; 23: *Burkholderia caryophyllies*; 24: *B. gladioli*; 25: *Pseudomonas syringae*; 26: *Ralstonia solanacearum*; 27: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*; 28: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; 29: *X. campestris* pv. *campestris*; 30: *X. campestris* pv. *vesicatoria*, 31: negative control(sterile distilled water).



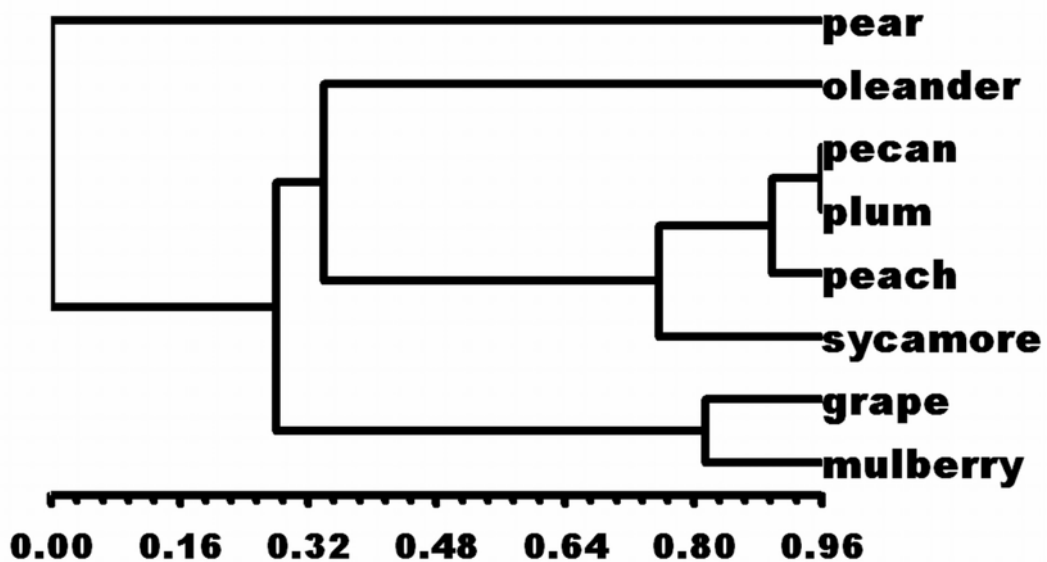
圖二、引子對 PLS-F/PLS-R 對梨葉緣焦枯病病菌、不同寄主 *Xylella fastidiosa* 菌株及其他細菌菌株全 DNA 之聚合酵素連鎖反應產物電泳圖譜。

Fig. 2. Polymerase chain reaction amplication products of total DNA from strains of pear leaf scorch bacteria, *Xylella fastidiosa* from other host, and other general bacteria with primer pair PLS-F/PLS-R. M: Gen-100 DNA Ladder (GeneMark, R.O.C); 1~30: pear leaf scorch bacteria strains; 31~64: strains of *X. fastidiosa* from different hosts; 65: *Erwinia chrysanthemi*; 66: *E. carotovora* subsp. *carotovora*; 67: *Burkholderia caryophyllies*; 68: *B. gladioli*; 69: *Pseudomonas syringae*; 70: *Ralstonia solanacearum*; 71: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*; 72: *X. campestris* pv. *campestris*; 73: *X. axonopodis* pv. *citri*; 74: *X. campestris* pv. *vesicatoria*.



圖三、利用引子對 PLS-F/PLS-R 進行聚合酵素連鎖反應偵測田間不同罹病梨樹組織內之梨葉緣焦枯病菌。

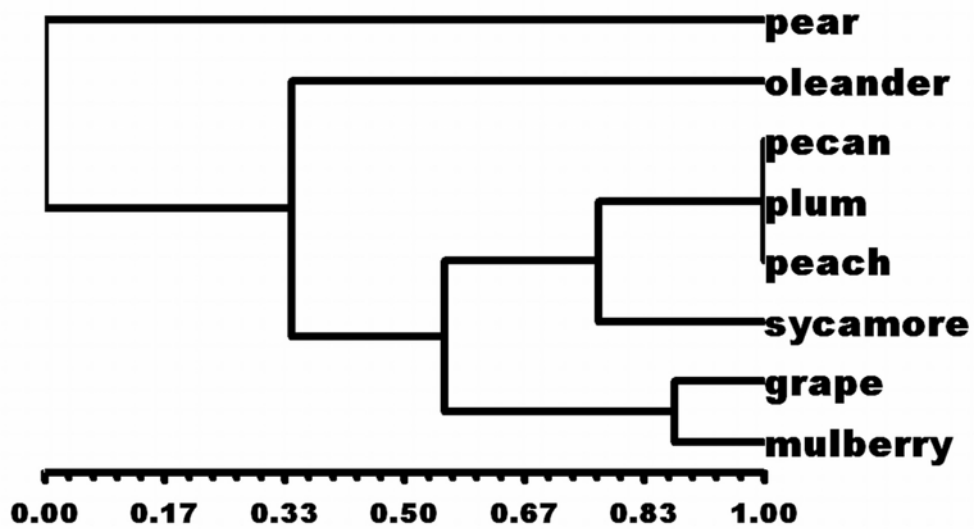
Fig. 3. Detection of pear leaf scorch bacteria of diseased tissues from different pear trees in fields by polymerase chain reaction using primer pair PLS-F/PLS-R. M: Gen-100 DNA Ladder (GeneMark, R.O.C); 1-9: samples from different pear diseased trees; 10: healthy tissue; 11: positive control; 12: negative control(sterile distilled water).



圖四、分析梨葉緣焦枯病菌與國外不同寄主 *Xylella fastidiosa* 菌株之 RAPD 條帶，經由 NTSYS-pc 電腦軟體中的 UPGMA 程式所繪製的相似值樹狀圖。

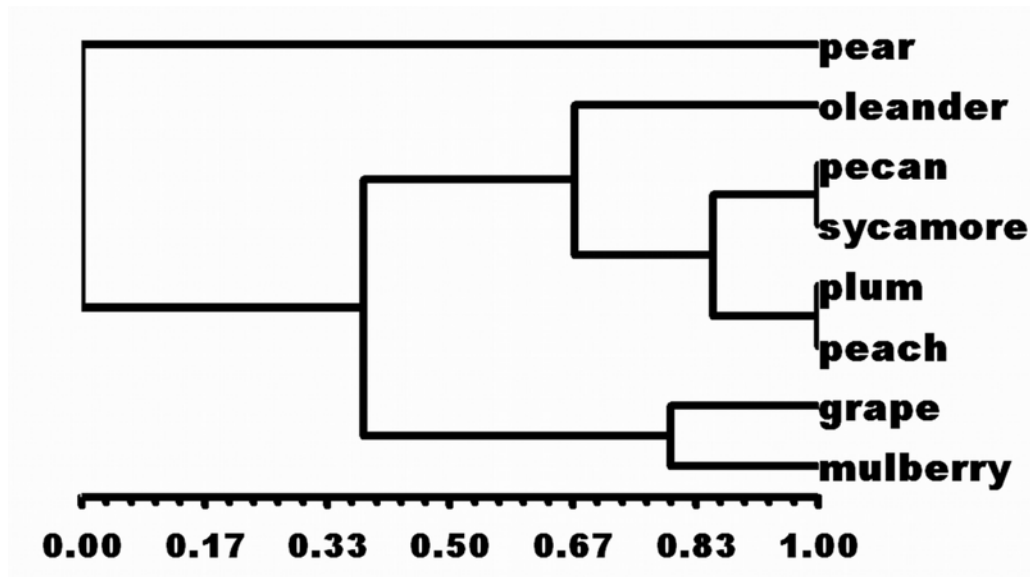
Fig. 4. Dendrogram depict the genetic relationships between pear leaf scorch bacteria and strains of *Xylella fastidiosa* from other host based on RAPD patterns. All analysis using Numerical Taxonomy and Multivariate analysis system

(NTSYS-pc). A similarity matrix was calculated on Jaccard's coefficient, and the tree was generated from the similarity matrix by unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA).



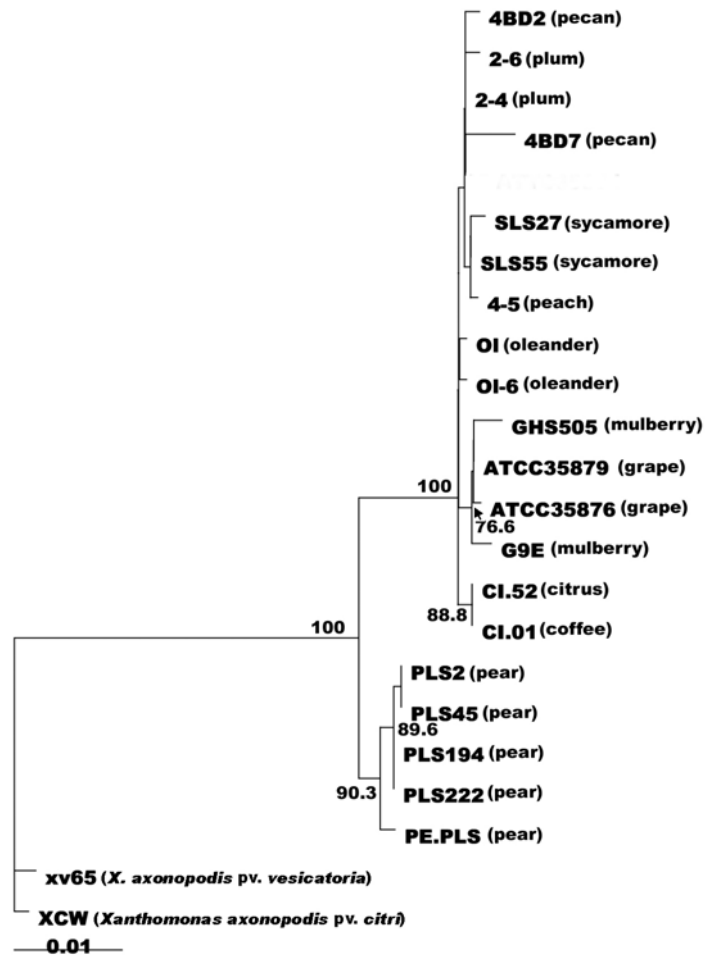
圖五、分析梨葉緣焦枯病菌與國外不同寄主 *Xylella fastidiosa* 菌株之 ERIC-PCR 條帶，經由 NTSYS-pc 電腦軟體中的 UPGMA 程式所繪製的相似值樹狀圖。

Fig. 5. Dendrogram depict the genetic relationships between pear leaf scorch bacteria and strains of *Xylella fastidiosa* from other host based on ERIC-PCR patterns. All analysis using Numerical Taxonomy and Multivariate analysis system (NTSYS-pc). A similarity matrix was calculated on Jaccard's coefficient, and the tree was generated from the similarity matrix by unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA).

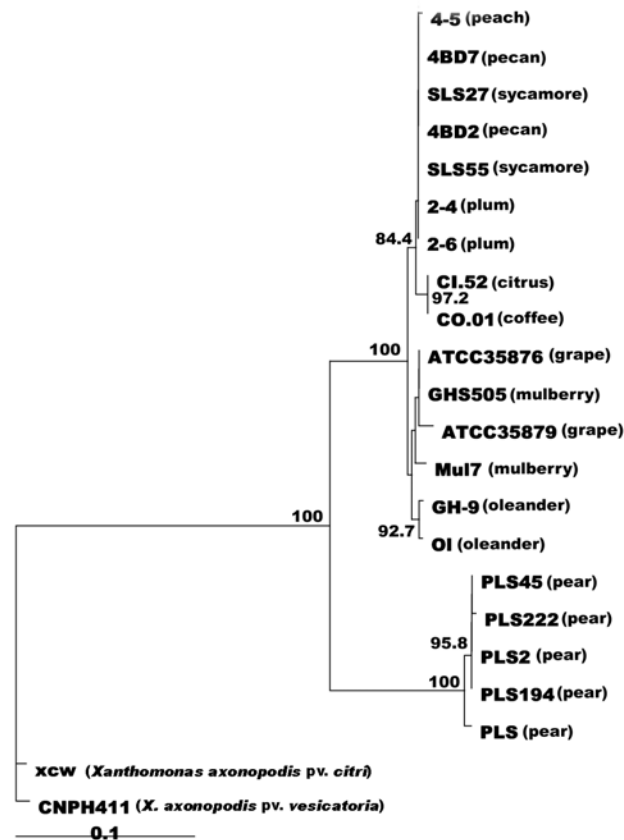


圖六、分析梨葉緣焦枯病菌與國外不同寄主 *Xylella fastidiosa* 菌株之 BOX-PCR 條帶，經由 NTSYS-pc 電腦軟體中的 UPGMA 程式所繪製的相似值樹狀圖。

Fig. 6. Dendrogram depict the genetic relationships between pear leaf scorch bacteria and strains of *Xylella fastidiosa* from other host based on BOX-PCR patterns. All analysis using Numerical Taxonomy and Multivariate analysis system (NTSYS-pc). A similarity matrix was calculated on Jaccard's coefficient, and the tree was generated from the similarity matrix by unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA).



圖七、分析梨葉緣焦枯病菌與不同寄主 *Xylella fastidiosa* 之 16S rDNA 序列，經由 Neighbor-joining (NJ) 方法分析親緣演化樹；枝條上的數字代表 bootstrap 值。
 Fig. 7. Neighbor-joining tree based on the 16S rDNA sequences show relationship between pear leaf scorch bacteria and strains of *Xylella fastidiosa* from other host. Numbers on branches indicate the percentage of the number of times that the node supported by 1000 replicates of bootstrap analysis (only values greater than 65% shown). Bar, represent 0.01 changes per nucleotide.



圖八、分析梨葉緣焦枯病菌與國外不同寄主 *Xylella fastidiosa* 之 16~23S rDNA 區間序列，經由 Neighbor-joining (NJ) 方法分析親緣演化樹；枝條上的數字代表 bootstrap 值。

Fig. 8. Neighbor-joining tree based on the 16~23S rDNA intergenic spacer sequences show relationship between pear leaf scorch bacteria and strains of *Xylella fastidiosa* from other host. Numbers on branches indicate the percentage of the number of times that the node supported by 1000 replicates of bootstrap analysis (only values greater than 65% shown). Bar represent, 0.1 changes per nucleotide.