

應用聚合酵素連鎖反應偵測梨葉緣焦枯病菌

蘇秋竹^{1,4} 楊文仁^{1,2} 徐世典^{3,4} 曾國欽³

¹ 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

² 現址：行政院農業委員會動植物防疫檢疫局基隆分局

³ 國立中興大學植物病理學系

⁴ 聯絡作者，電子郵件：auba@tactri.gov.tw；傳真：+886-4-2332-1478 (蘇)；

sthsu@mail.nchu.edu.tw；傳真：+886-4-2287-7585 (徐)

接受日期：中華民國 97 年 1 月 20 日

摘要

蘇秋竹、楊文仁、徐世典、曾國欽. 2008. 應用聚合酵素連鎖反應偵測梨葉緣焦枯病菌. 植病會刊 17: 183-194.

梨葉緣焦枯病 (Pear leaf scorch) 為台灣橫山梨 (*Pyrus pyrifolia*) 栽植區特有之病害，其病原菌為侷限導管細菌 (*Xylella fastidiosa* Wells)，但梨葉緣焦枯病菌與其他寄主植物來源之 *X. fastidiosa* 菌株間無血清相關性，且以 *X. fastidiosa* 廣效性引子對 272-int-1/272-int-2 及 RST31/RST33 對梨葉緣焦枯病菌菌株進行 PCR 反應時，亦無任何基因產物。為研發快速鑑定及偵測梨葉緣焦枯病菌之 PCR 技術，本研究利用隨機引子進行 RAPD 分析，成功獲得對梨葉緣焦枯病菌獨有之約 1,400 bp 大小核酸片段，進一步將此核酸片段轉殖及序列解序，確認此核酸片段大小為 1,412 bp (GenBank 註冊編碼為 DQ452418)，從所得核酸序列中設計得到一組專一性引子對 PLS-F/PLS-R(5'-TGGACGTTGTGGTATCGGTG-3'/5'-TTGAAGTTGACGTGTGG CTG-3')，此一引子對測試梨葉緣焦枯病菌 30 個菌株皆可增幅出 416 bp 大小之專一性基因產物，但測試來自於夾竹桃 (oleander)、胡桃樹 (pecan)、李樹 (plum)、桃樹 (peach)、葡萄 (grape)、桑椹 (mulberry) 及無花果 (sycamore) 等 7 種寄主植物之 *X. fastidiosa* 34 個菌株及一般植物病原細菌 10 個菌株之基因體核酸皆無法增幅出基因產物。此一引子對可直接進行梨葉緣焦枯病田間罹病梨樹組織之 PCR 檢測，具有潛力可應用於田間中間寄主植物及蟲媒內病原菌偵測。

關鍵詞：梨葉緣焦枯病菌、專一性引子對、聚合酵素連鎖反應、偵測

緒言

梨為薔薇科 (Rosaceae) 梨亞屬 (Pomoideae) 梨屬 (*Pyrus*) 植物，屬於落葉喬木，原產於亞洲、歐洲及非洲等地，種類極多，全世界栽培地區亦很廣泛，主要栽培品種有西洋梨 (*P. communis* L.; European pear) 和沙梨 (*P. pyrifolia* Nakai; Asian pear)，目前許多商業化栽培品種皆屬於此二種。台灣梨栽培品種為沙梨，依栽培之模式可分為二類：一為高需冷性，如新世紀、幸水、豐水、新興、秋水、福壽、雪梨等品種，需種植於高海拔山區，才能正常萌芽、開花、結果；另為低需冷性品種主要是橫山梨，在低海拔地區即能正常開花結果⁽¹⁸⁾，最近 30 年來栽植橫山梨之果農流行以人為

落葉方式進行產期調節，或以溫帶品種之梨穗寄接橫山梨徒長枝基部，生產高品質之『寄接梨』以提高橫山梨產業之經濟效益⁽¹⁷⁾。

梨葉緣焦枯病為台灣低海拔地區 (海拔 1200 公尺以下) 栽植園之重要病害，為侷限導管細菌 (xylem-limited bacteria) *Xylella fastidiosa* 所引起⁽¹⁶⁾，本病於 1990 年才被確認病因⁽¹⁵⁾，爾後在台灣各地橫山梨產區調查其發生率為 5-43 % 不等，而高海拔地區如梨山之溫帶梨品種無此病害發生之現象⁽³⁴⁾，目前僅知低海拔地區栽培之橫山梨、烏梨及蜜雪梨品種皆會被感染，於各地栽植區普遍發生，不但造成梨樹葉緣焦枯病之病徵且降低梨樹的樹勢及活力，間接會影響梨樹或寄

接梨果實之產量及品質。

X. fastidiosa 可為害許多重要經濟作物，例如柑桔 (citrus)、葡萄 (grapevine)、咖啡樹 (coffee)、苜蓿 (alfalfa)、榆樹 (elm)、無花果 (sycamore)、桑椹 (mulberry)、杏仁 (almond)、李 (plum) 及桃 (peach) 等^(6, 7, 9, 10, 11, 13, 20, 28, 37)，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 chlorosis, CVC)，目前為北美葡萄與巴西柑橘產業之主要限制因子⁽¹⁰⁾。

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^(5, 12)，但耗時費力。在 80 年代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，普遍應用於 *X. fastidiosa* 病原菌檢測、流行病學調查及蟲媒偵測^(4, 6, 22, 26, 32, 39)。近年分子生物學的鑑定技術如核酸探針 (DNA probe)⁽³¹⁾、聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)⁽²¹⁾ 及隨機增幅核酸多型性分析 (random amplified polymorphic DNA, RAPD)⁽³⁸⁾ 等具有快速、專一性及高靈敏度之特性，廣泛應用於植物病原細菌之鑑定及偵測，其中 PCR 技術普遍應用於 *X. fastidiosa* 之檢測^(19, 23, 25, 26)，甚至有些已開發專一性引子對可鑑別來自不同寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株菌群^(2, 24)。

過去的研究指出梨葉緣焦枯病菌與其他寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株無血清相關性^(14, 16)，也無法以 *X. fastidiosa* 之廣效性引子對進行 PCR 檢測⁽³⁵⁾，為了快速鑑定及偵測梨葉緣焦枯病菌，本研究利用 RAPD 技術選殖梨葉緣焦枯病菌專一性核酸片段，並開發梨葉緣焦枯病菌之專一性引子對，期建立梨葉緣焦枯病菌 PCR 快速鑑定及偵測技術，應用於蟲媒、其他寄主或中間寄主植物等方面研究，加速累積梨葉緣焦枯病生態學及流行病學之資料。

材料與方法

菌株來源

本研究所用梨葉緣焦枯病菌菌株共 30 個，分別自宜蘭縣三星、新竹縣新埔及三灣、苗栗縣卓蘭、台中縣東勢及后里、彰化縣埤頭及嘉義縣竹崎等 8 個橫山梨栽植區之罹病梨樹分離所得，所有菌株皆塗抹於 PD2⁽⁸⁾ 培養基上置於 28°C 定溫箱培養保存，並每隔 2-3 星期更新培養；7 種其他寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株 DNA 共 34 個則由美國喬治亞大學張宗仁教授提供，

這些寄主植物包括夾竹桃 (oleander)、胡桃樹 (pecan)、李樹 (plum)、桃樹 (peach)、葡萄 (grape)、桑椹 (mulberry) 及無花果 (sycamore)，而供試之一般植物病原細菌共 10 個菌株則來自國立中興大學植物病理學系細菌研究室所保存之菌種，以供比較試驗之用，詳細菌株來源如表一所示。

細菌全量DNA的抽取與濃度測定

將梨葉緣焦枯病菌畫線於 PD2 平板培養一星期後，挑取單一菌落於 PD2 液體培養基內，置於 28°C 定溫箱震盪培養約 3-5 天，而其他供試之一般植物病原細菌則挑取新鮮單一菌落於 nutrient broth (NB) 培養 1 天後供細菌全量DNA抽取製備用。細菌全量DNA抽取係參照 Sambrook 氏的方式加以修改⁽³⁰⁾，其步驟如下：將新鮮之細菌培養液置於 50 ml 的離心管離心 (8,000 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 (8,000 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 (8,000 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 (13,000 rpm, 20 分鐘, 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 (13,000 rpm, 20 分鐘, 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, Pharmacia 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。

以隨機增幅核酸多型性分析篩選梨葉緣焦枯病菌之專一性 DNA 片段

分別選取表一梨葉緣焦枯病菌 10 個菌株、7 種其他寄主植物之 *X. fastidiosa* 10 個菌株及一般植物病原菌 10 個菌株之 DNA 為模版，利用 RAPD 技術進行 PCR 電泳分析，隨機引子則採用 Operon Technologies 公司

(Alameda, CA) 所製造的 OPERON 10-MER KITS 編號為 OPA 01~20 之 20 個隨機引子，RAPD 反應條件參照 Albibi 等人⁽¹⁾ 的模式稍加修改如下：每一樣本參與反應的總體積為 20 μ l，包含 20 ng 之模版DNA、250 μ M 的去氧核糖核苷三磷酸鹽 (dNTPs) (GeneMark,

Taiwan) 、0.5 μ M 的引子、0.8 單位 GenTaq DNA Polymerase (GeneMark, Taiwan) 與 1 \times 的反應緩衝液。PCR 反應增幅條件如下：(a) 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘，1 個循環；(b) 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘、40 $^{\circ}$ C 1 分鐘、72 $^{\circ}$ C 2 分鐘，40 個循環；(c) 72 $^{\circ}$ C 5 分鐘，1 個循環，完成 PCR 增幅後產物

表一、本研究所使用菌株

Table 1. List of bacterial strains used in this study

Species/host	Number of strains	Strain	Source
<i>Xylella fastidiosa</i> pear	30	002, 008, 013, 015, 022, 045, 052, 053, 061, 071, 072, 076, 096, 097, 104, 114, 121, 123, 131, 139, 140, 150, 156, 184, 190, 194, 204, 207, 210, 222	This study
oleander	4	GH-9, O 1, O 6, O 10	C. J. Chang ¹
pecan	4	4BD7, 4BD3, 4BD2, 4B	C. J. Chang
plum	2	2-4, 2-5	C. J. Chang
peach	1	4-5	C. J. Chang
grape	14	3SV 11A, FTC AG-1, Yugo B, Shirag w/PD, White eo A27, Cab San, Melody, R118 V3-4, ATCC35869, ATCC35870, ATCC35876, ATCC35879, ATCC35881, Chateau	C.J. Chang
mulberry	4	Mul 1, Mul 7, GHS 505, G9E	C. J. Chang
sycamore	5	SLS 55, SLS 61, SLS 27, SLS DC5, SLS Mary	C. J. Chang
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> orchid	1	Ecc	K. C. Tzeng ²
<i>E. chrysanthemi</i> orchid	1	Ech	K. C. Tzeng
<i>Burkholderia caryophylli</i> baby's branch	1	Go8	K. C. Tzeng
<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> gladiolum	1	B2	K. C. Tzeng
<i>Pseudomonas syringae</i> carambola	1	Boac05	K. C. Tzeng
<i>Ralstonia solanacearum</i> sweet pepper	1	Ps-tm-9	K. C. Tzeng
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> watermelon	1	AAC143	K. C. Tzeng
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> citrus	1	XCW	K. C. Tzeng
<i>Xan. campestris</i> pv. <i>campestris</i> cabbage	1	XCC	K. C. Tzeng
<i>Xan. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> sweet pepper	1	XV65	K. C. Tzeng

¹ Total DNA of strains of *Xylella fastidiosa* from different host were directly provided from Dr. C. J. Chang's Lab., Department of Plant Pathology, University of Georgia.

² Dr. K. C. Tzeng, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan.

則以水平式電泳進行分析，取 10 μ l 增幅後的 DNA 產物，與 1 μ l 的追蹤液 (loading dye ; 0.25% bromophenol blue, 30 % glycerol in H₂O)，經充分混合後，以微量吸管吸出，將其置入 (loading) 以 0.5 \times TAE buffer 所製成之 1.5 % 瓊脂凝膠 (agarose gel) 之樣品槽中，並置入 4 μ l Gen-100 DNA Ladder (GeneMark, Taiwan) 為其大小標幟 (size marker)，以 150V 的電壓進行電泳分析，約 50 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。

核酸探針製備及南方雜合法分析 (Southern hybridization)

轉漬 (Transfer) 與連接 (UV-crosslinking)

將上述選取隨機引子 OPA11 經 RAPD 技術進行增幅所得產物，參照南方氏⁽³³⁾ 試驗方法，將瓊脂凝膠經由去嘍呤作用 (depurination)，變性作用 (denature) 以及中和作用 (neutralization) 等處理方式後以 TransVac vacuum transfer unit (Hofer Pharmacia, Inc. U.S.A.) 轉漬至尼龍濾膜 (Nytran membranes, MAGNA, Micron Separations Inc.) 上，轉漬完畢待晾乾後，置於 UVC-500 Ultraviolet Crosslinker (Hofer Pharmacia, Inc. U.S.A.) 內以 254 nm 波長的紫外光進行聯結反應。

探針標定 (probe labeling)

將 RAPD 增幅對梨葉緣焦枯病菌具專一性片段經由電泳分離後以 Gel Elution kit (GeneMark, Taiwan) 進行專一性片段之回收：加入等體積的 Binding solution，於 60°C 下作用 5 分鐘以溶解膠體，之後將溶化的膠體加入含有分子篩的離心管，並將此離心管放入收集管於室溫下混勻後，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒除下層液，加入 500 μ l 的 Binding solution 以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒除下層液，再加入 700 μ l 清洗溶液 (washing solution) 以 13,000 rpm 離心 1 分鐘沖洗兩次以上，去除下層液，以 60°C 處理 30 分鐘蒸發殘留液體，最後加入於 60°C 預熱的 30 μ l 滅菌之去離子水 (ddH₂O)，置於新的下層管，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，將下層液回收進行核酸探針之標誌；核酸探針之製備採用非放射性之 VersiTag™ Fluorescein Labeling System (NEN™ Life Science Production, U.S.A.) 進行標幟，依廠商建議之使用說明進行。以每 500 ng DNA 加 0.5 μ l (0.5 unit) VeriTag fluorescein linking reagent 為比例，再用標誌溶液 (labeling solution) 調整反應總體積為 20 μ l，將此混合液瞬間離心後，置於 85°C 下作用至少 30 分鐘。作用完成後加入 stop solution 以終止反應，並於 -30°C 下保存，以備進行核酸雜合反應。

雜合反應 (hybridization)

將前述經由聯結反應之尼龍濾膜置入適當大小的雜合試管 (hybridization tube) 中，加入 15 ml 的前雜合溶液 (prehybridization solution: 5 \times SSC, 5 \times Dehardts, 50% Formamide, salmon sperm DNA 50 μ g/ml) 於 42°C 進行前雜合 3 小時，反應完畢後倒除前雜合液，加入 15 ml 的雜合溶液 [前雜合溶液含變性之核酸探針 (25ng/ml)]，於 42°C 進行雜合反應作用 12 小時以上或隔夜。雜合反應後倒除雜合液，以含有 0.1 % SDS 的 2 \times SSC (30 mM sodium citrate, 300 mM NaCl, pH 7.0) 溶液 15 ml 於室溫下漂洗 5 分鐘兩次，再以含有 0.1 % SDS 的 0.2 \times SSC 溶液 15 ml 於 65°C 下漂洗兩次，每次 15 分鐘。然後再以 buffer I [0.1M Tris-HCl (pH 7.5), 0.15M NaCl] 漂洗 5 分鐘重複兩次，再加入 buffer II (0.5 % blocking reagent in buffer I, 4°C) 漂洗 5 分鐘重複兩次後，換加入含有 Anti-fluorescein-alkaline phosphatase (Applied Biosystem, U.S.A.) 之 buffer I (1:5000) 漂洗 1 小時後，再以 buffer II 漂洗四次，每次 5 分鐘，再以 buffer III [0.1M Tris-HCl (pH 9.5), 0.15 M NaCl] 漂洗兩次，每次 5 分鐘，漂洗完後將濾膜取出放入雜合反應袋 (hybridization plastic bag) 並保持濾膜濕潤；偵測反應則以 CDP-Star (Applied Biosystem, U.S.A.) 為反應受質，首先以 assay buffer (0.1M Diethanolamine, 1mM MgCl₂, pH 9.5) 漂洗兩次，再加入以 assay buffer 稀釋 50 倍反應受質 CDP-Star stock solution，在室溫下緩慢的搖動 5 分鐘，再倒除反應溶液，以 X-ray 底片 (BIOMAX™-ML, Kodak, U.S.A.) 進行曝光，約 5~10 分鐘可得最適當訊號強度。

梨葉緣焦枯病菌專一性 DNA 片段之回收、轉殖與解序

以梨葉緣焦枯病菌編號 002 菌株之 DNA 為模版，進行 RAPD 電泳分析後從膠體上將專一性 DNA 片段切下，以 Gel Elution kit (GeneMark, Taiwan) 來進行 DNA 之回收。回收之 DNA 片段則以 TOPO TA Cloning® kit (Invitrogen®, U.S.A.) 來進行 DNA 片段之選殖，並依廠商建議之使用說明進行。取 1 μ l 經純化之專一性 DNA 片段，加入 3 μ l 的滅過菌之去離子水、1 μ l 的 pCR®II-TOPO® vector 與 1 μ l 的鹽溶液 (Salt solution)，混合均勻，於室溫 5 分鐘後，即完成黏接反應 (ligation)，並置於冰上備用。取出組件內所附之勝任細胞 (competent cell) *E. coli* (TOP10F' cells)，再加入上述完成黏接反應之混合物 2~5 μ l，將其混勻，放在冰上 30 分鐘後，置於 42°C 之水浴中 30 秒，再置於冰上 2 分鐘後，加入 250 μ l 的 SOC (bacto-tryptone 20g/L, bacto-yeast extract

5 g/L, NaCl 0.5 g/L, MgCl₂ 0.95 g/L, KCl 0.186 g/L, glucose 3.6 g/L, pH 7.0) 培養液於 37°C 震盪培養 1 小時，將此培養菌液均勻塗抹於含有 40 μl 100 mM 之 IPTG (isopropyl-thio-β-D-galactoside), 40 μl 40 μg/ml 之 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosidase) 及 kanamycin (50 ppm) Luria-Bertani (LB, bacto-Tryptone 10g/L, bacto-yeast extract 5g/L, NaCl 5g/L, pH 7.0) 平板培養基(簡稱 LA), 於 37°C 隔夜培養後，挑選白色之單一菌落，此白色菌落可能為含有選殖片段的轉型株 (transformants)，而藍色的菌落則表示不含有選殖片段者。此準轉型株再經質體 DNA 抽取及嵌入片段大小分析後，以確認其是否為含有專一性 DNA 片段之選殖株。細菌質體 DNA 的抽取，以 plasmid miniprep purification kit (GeneMark, Taiwan) 來進行。並依廠商建議之使用說明進行其操作：將上述所獲得之準轉殖株接種於含有 kanamycin (50 ppm) 之 5 ml LB 培養液中，於 37°C 震盪培養 16 小時後，取 1.5 ml 至微量離心管，以 7,000 rpm 離心 5 分鐘以收集菌體，倒去上清液，加入 200 μl 的 solution I 懸浮沈澱的菌體，再加入 solution II 200 μl 使其澄清，再加入 200 μl 的 solution III 混合，以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，吸取上清液放入含有分子篩的離心管中，以 12,000 rpm 離心 1 分鐘，倒除下清液，加入 700 μl 的 washing solution 淋洗兩次，以 12,000 rpm 離心 1 分鐘，以 60°C 蒸發殘留酒精，最後加入於 60°C 預熱的 25 μl ddH₂O，置於新的收集管，以 12,000 rpm 離心 1 分鐘，將下層液回收備用。取前述抽取之選殖株重組質體 DNA 1 μl 加入 1 μl 的限制酵素反應緩衝液、0.3 μl (12 U/μl) 的 EcoRI 限制酵素 (Promega, U.S.A.)，再與 8.7 μl 的去離子水混合均勻，使總體積為 10 μl，於 37°C 水浴中反應 1 小時後，以 1.5 % 的瓊脂凝膠進行電泳分析是否含有欲選殖的專一性 DNA 片段。

選殖株重組質體 DNA 嵌入片段之核苷酸定序與其特性分析及專一性引子對之設計

將上述選殖後得到之選殖株培養於含有 kanamycin (50 ppm) 之 LA 平板培養基上，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。並藉由“National Center for Biotechnology Information (NCBI)”網際網路，進行線上基因庫 (GenBank) 的查詢與比對。並依此序列利用 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)，引子合成則委託明欣生物科技公司合成。

聚合酵素連鎖反應條件

聚合酵素連鎖反應之引子黏合溫度測試

選取 3 個梨葉緣焦枯病菌菌株 (002、008 及 013)、1 個 *X. fastidiosa* 葡萄菌株 (ATCC35876) 及 1 個一般病原細菌 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 之 DNA 為模版進行 PCR 引子黏合溫度測試，各反應物之濃度為：20 ng 的模版 DNA，設計後所得 1 組引子對 PLS-F/PLS-R 濃度約 0.5 μM，dNTPs 各 250 μM，0.8 單位的 GenTaq DNA Polymerase (GeneMark, Taiwan)，1×的反應緩衝液，加去離子水至總反應體積 20 μl。利用以下增幅測試條件進行不同黏合溫度的聚合酵素連鎖反應：(a) 94°C 1 分鐘，1 個循環；(b) 94°C 1 分鐘，61°C、63°C、65°C、67°C 或 69°C 45 秒，72°C 1 分鐘，30 個循環；(c) 72°C 5 分鐘，1 個循環。

靈敏度測試

將梨葉緣焦枯病菌編號 002 菌株之 DNA 分別稀釋成濃度為 100, 10, 1 ng/μl 及 100, 50, 25, 10, 1, 0 pg/μl，各取 1 μl 當模版，以 PLS-F/PLS-R 為引子對，加入 PCR 各反應物，使總反應體積為 20 μl，依上述增幅條件將黏合溫度設定為 67°C 進行 PCR，反應後進行電泳分析，以測試引子對 PLS-F/PLS-R 偵測梨葉緣焦枯病菌 DNA 之靈敏度。將梨葉緣焦枯病菌編號 002 菌株於 PD2 液體培養基培養 3-5 天後，以無菌水懸浮，並調整其 OD_{620nm} 之讀值為 0.29 (約 10⁸ cfu/ml)，並加以十倍系列稀釋，使濃度約為 10⁷~10¹ cfu/ml，每個稀釋濃度各取 1 μl 作為模版並以 PLS-F/PLS-R 為引子對，加入 PCR 各反應物，依上述增幅條件進行 PCR 測試與電泳分析，另每個稀釋濃度各取 0.1 ml 之細菌懸浮液以塗抹平板於 PD2 平板上，3 重複，經 30°C 培養一星期後計算其菌落數，以換算引子對 PLS-F/PLS-R 可測得最低細菌數。

聚合酵素連鎖反應專一性測定

兩組 *X. fastidiosa* 廣效性引子對 272-int-1/272-int-2⁽²⁴⁾ 與 RST31/RST33⁽¹⁹⁾ 及本研究開發之專一性引子對 PLS-F/PLS-R 分別進行 PCR 反應，測試表一列梨葉緣焦枯病菌 30 個菌株、7 種其他寄主植物之 *X. fastidiosa* 34 個菌株及一般植物病原細菌 10 個菌株；PCR 反應物濃度如上述。引子 272-int-1/272-int-2 增幅條件如下：(a) 94°C 1 分鐘，1 個循環；(b) 94°C 1 分鐘、67°C 1 分鐘、72°C 1 分鐘，30 個循環；(c) 72°C 10 分鐘，1 個循環。引子 RST31/RST33 的增幅條件如下：(a) 95°C 1 分鐘，1 個循環；(b) 95°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 45 秒，40 個循環；(c) 72°C 5 分鐘，1 個

循環。PLS-F/PLS-R 增幅條件如下：(a) 94°C 1 分鐘，1 個循環；(b) 94°C 1 分鐘，67°C 45 秒，72°C 1 分鐘，30 個循環；(c) 72°C 5 分鐘，1 個循環，完成 PCR 增幅後產物則以水平式電泳進行分析。

田間罹病樣品PCR技術檢測

比較不同樣品處理方式對田間罹病樣品組織 PCR 檢測效率

由東勢地區橫山梨栽植園標定罹患梨葉緣焦枯病之罹病株，於 7 月中旬植株顯現病徵後，採取 30 個具典型葉緣焦枯之葉片攜回實驗室立刻進行 PCR 檢測。切取葉片葉柄組織，經 1% 次氯酸鈉溶液振盪消毒 10 分鐘，切除兩端留約 2 公分長葉柄組織，平均縱切為兩份，分別以下列方式處理，方式一(簡稱 SCPAP 法)：將葉柄組織加入 1 ml SCPAP 緩衝液 (disodium succinate, 1 g/L; trisodium citrate, 1 g/L; K₂HPO₄, 1.5 g/L; KH₂PO₄, 1.0 g/L; sodium ascorbate, 3.52 g/L and acid-washed insoluble polyvinylpyrrolidone, 50 g/L, pH 7.0)⁽¹⁵⁾，研磨並過濾後組織萃取液置入 1.5 ml 微量離心管內，離心 8,000 rpm 10 分鐘，加入 1 ml 0.5 N NaOH 混合均勻，離心 8,000 rpm 10 分鐘，取 100 μl 上清液置入 1.5 ml 微量離心管中，加入 100 μl 1M Tris-HCl (pH 8.0) 中和，以滅菌後之去離子水稀釋 10 倍作為 PCR 反應模版；方式二(簡稱 NaOH 法)：將葉柄組織加入 1 ml 0.5 N NaOH [含 0.5 % PVP (polyvinylpyrrolidone ; Sigma, U.S.A.)] 研磨並過濾後取植物萃取液 100 μl 加入 100 μl 1M Tris-HCl (pH 8.0) 中和，以滅菌後之去離子水稀釋 10 倍作為 PCR 反應模版，PCR 反應則依據上述 PCR 條件進行，並以水平式電泳分析，比較這兩種方式對 PCR 之檢測效率。

比較組織分離與 PCR 檢測之效率

田間標定梨葉緣焦枯病之罹病梨樹，摘取罹病枝條顯現梨葉緣焦枯病病徵之葉片，帶回實驗室內置於 4°C 保存，以供病原菌組織分離與 PCR 檢測，每次逢機選取 25 個葉片，共進行四次測試，測試葉片僅切取葉柄組織，經 1% 次氯酸鈉溶液振盪消毒 10 分鐘，切除兩端留約 2 公分長葉柄組織，平均縱切為兩份分別進行病原菌分離及 PCR 檢測。病原菌組織分離是將葉柄組織切碎溶於 0.2 ml 之 PD2 培養液，劃線於 PD2 平板上，置於 28°C 之定溫箱培養觀察二星期是否有邊緣完整之乳白色具圓形突起之菌落。PCR 檢測是以前述 SCPAP 法處理葉柄組織，以 SCPAP buffer 研磨，去除植物殘渣，取萃取液 100 μl 加入兩倍 0.5 N NaOH [含 0.5 % PVP (polyvinylpyrrolidone ; Sigma, U.S.A.)] 混合

均勻，加入 300 μl 1M Tris-HCl (pH 8.0) 中和，以滅菌過之去離子水稀釋 10 倍作為 PCR 反應模版，PCR 反應條件則依據上述 PCR 反應條件，PCR 反應結束後以電泳分析並以拍立得相機記錄結果。

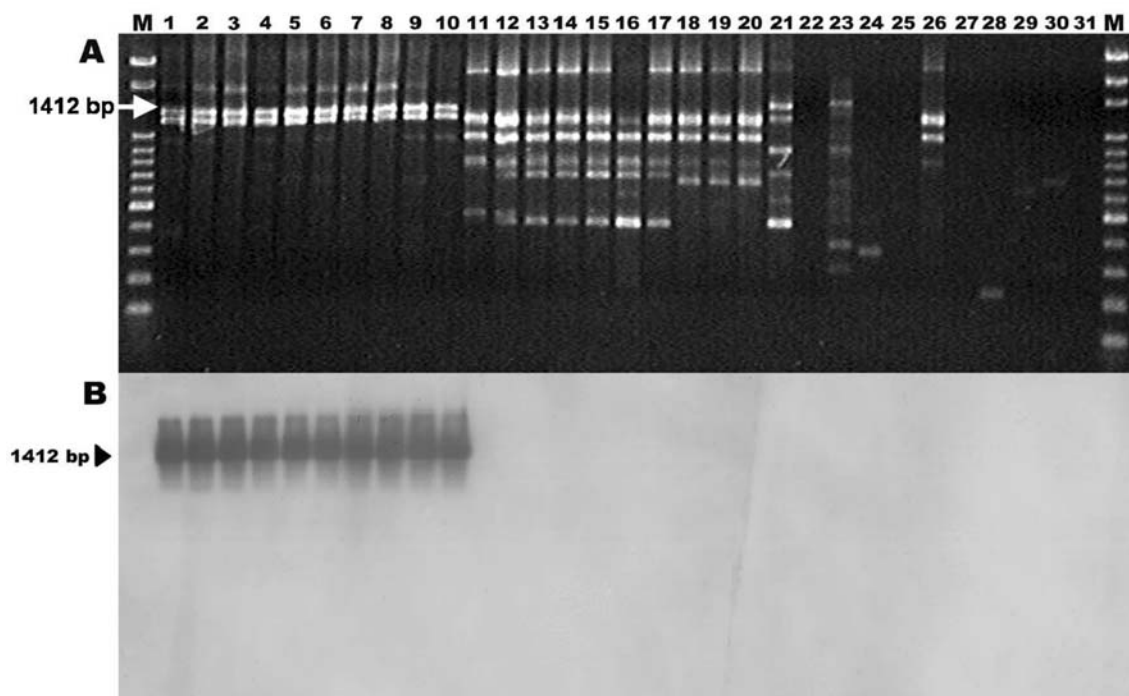
結 果

梨葉緣焦枯病菌專一性 DNA 片段之篩選

測試 20 組 OPA 隨機引子，其中 OPA2、OPA3、OPA4、OPA9、OPA11、OPA14 及 OPA18 等 7 組隨機引子對梨葉緣焦枯病菌皆能產生共同基因產物條帶且具再現性高；選取隨機引子 OPA11 經 RAPD 增幅出 DNA 產物條帶中，梨葉緣焦枯病菌 10 個菌株皆可增幅出一條約 1,400 bp 大小基因產物之明亮條帶，而國外來自 7 種其他不同寄主植物之 *X. fastidiosa* 10 個菌株及一般植物病原細菌 10 個菌株所增幅之條帶中則無 1,400 bp 大小之基因產物出現(圖一A)，將此片段製作為探針進行南方雜合法分析，結果顯示僅對梨葉緣焦枯病菌可產生專一性雜合訊號，其他寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株與一般植物病原細菌菌株則皆無訊號產生(圖一B)，故此 DNA 產物條帶為梨葉緣焦枯病菌之專一性 DNA 片段。

梨葉緣焦枯病菌專一性 DNA 片段之選殖及選殖株重組質體 DNA 嵌入片段之序列分析

將梨葉緣焦枯病菌編號 002 菌株為模版利用隨機引子 OPA11 所增幅出的 1,400 bp 左右之 DNA 產物回收，與載體 pCR[®]II-TOPO[®] vector 進行核酸片段之選殖，經轉形反應後，各逢機選取 10 個白色菌落作為準選殖株。抽取準選殖株之質體 DNA 再藉由限制酵素 *EcoRI* 反應與電泳分析後，各分別得到 7 個嵌入 DNA 片段之大小為 1,400 bp 之選殖株，逢機選取一個選殖株進行核苷酸序列分析。將上述得到之選殖株經委託定序後，藉由 NCBI 網際網路，進行線上基因庫 (GenBank) 的查詢與比對，並將此序列於線上基因庫註冊所得註冊編碼為 DQ452418。發現選殖株嵌入 DNA 片段之核苷酸序列中 494-1,412 bp 與目前線上基因庫已註冊 DNA 序列之相似度皆高於 85% 以上，而 1-493 bp 與目前線上基因庫已註冊 DNA 序列之相似度皆低於 10%，故以 OPA11 引子增幅出之 1,412 bp 片段(簡稱 OPA11-1400) 中 1~493 bp 為梨葉緣焦枯病菌共有之專一性 DNA 序列(圖二)，將所選殖到之專一性 DNA 片段序列利用 OLIGO, version 4.0 (National Bioscience, Plymouth, MN) 衍生設計出含 G+C 比例較高，無穩定



圖一、利用隨機引子 OPA11 對梨葉緣焦枯病菌、其他寄主植物之 *Xylella fastidiosa* 菌株及一般植物病原細菌菌株之 RAPD 分析後所得之電泳圖譜 (A)，利用選殖自梨葉緣焦枯病編號 002 菌株之 OPA11-1400 探針進行南方雜合反應。

Fig 1. RAPD pattern of strains of pear leaf scorch bacterium (PLSB), strains of *X. fastidiosa* from other host and other phytopathogenic bacteria using OPA11 random primer (A) and southern hybridization of the RAPD fragment with OPA11-1400 probe cloned from pear leaf scorch bacterium (PLSB) strain no. 002 (B). M, Gen-100 DNA Ladder (GeneMark, Taiwan); Lanes 1-10: PLSB no. 002, 008, 013, 018, 022, 045, 052, 053, 061, and 071, respectively; Lanes 11-20 *X. fastidiosa* strain no. GH-9, 4BD2, 4BD7, 2-5, 4-5, SLS 27, SLS 55, ATCC35876, ATCC35879, and Mul 7, respectively; Lanes 21-30: *Erwinia chrysanthemi*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *Burkholderia caryophylli*, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Xan. campestris* pv. *campestris*, and *Xan. axonopodis* pv. *vesicatoria*, respectively; Lane 31: ddH₂O as negative control.

```

1   GCACTGTTATTCTGAGCGCATCCGCGCAATGGACGTTGTGGTATCGGTGTAGATGACGG
                                     PLS-F
61  ATGTCATGTTCTTGATCGTCTCTAAGGTATTAAGAAACATGGAGCGGCATACACGCTCA
121 GTACGATTGGATCAGCGATCCCCGGGTCAAATGACAACACCTATGCATCAAACGCCGTCG
181 CAACCGATAAC CAGCGGCGCAAGATACATCGCTTCAAACACCATCTCTATACACCATATA
241 CGTGGGATGGACTATGACATCCGTGACAGATGTTTGCACCTGTTCTAGAAGAACGTTGC
301 ACGCCGTTTTACCTCACGGCGTGCATGACAACCAGGTTCCACAAGACTAGCCAGTACGGC
361 ACTCATTGGCCTCGTGATCTGACGAGATGTGTAGCTCTCGCTACCCAAGCGACTCTGGT
                                     PLS-R
421 CCATCCAGCCACCGTCACTTCAGAATCCGACCTCTTGCCCAAGGGGCGCTACAGCC
481 AAGCACACGTACTCAGCAACCGGGTTGCATACTGCGATTGCGAGCAAGATAGTCAGCA
    
```

圖二、選殖株重組質體 OPA11-1400 嵌入 DNA 片段之部分 540 bp (1-540) 核苷酸序列及引子對 PLS-F (31-50) / PLS-R (427-456) 之 20 bp 核苷酸序列

Fig 2. The 540 bp (1-540) partial nucleotide sequence selected from the inserted DNA fragment in recombinant plasmid OPA 11-1400 and the 20 bp nucleotide sequences of primer of PLS-F (31-50) / PLS-R (427-456).

之 harpin 及 duplex structure 較少，且各 20 mers 之正向引子及反向引子，軟體所建議引子對為 PLS-F (5' TGGACGTTGTGGTATCGGTG 3') / PLS-R (5' TTGAAGTTGACGTGTGGCTG 3')

聚合酵素連鎖反應條件

聚合酵素連鎖反應之引子黏合溫度

以梨葉緣焦枯病菌菌株、*X. fastidiosa* 葡萄菌株及一般植物病原細菌菌株之 DNA 為模版，在不同黏合溫度 (61°C、63°C、65°C、67°C 及 69°C) 下進行聚合酵素連鎖反應，結果可發現引子對 PLS-F/PLS-R 僅對梨葉緣焦枯病菌菌株分別在 61°C、63°C、65°C 及 67°C 下皆可增幅出 416 bp 之基因產物，其最高黏合溫度為 67°C (未出示的資料)，因此為進一步確保 PCR 高度之專一性，故聚合酵素連鎖反應增幅條件為：(a) 94°C 10 分鐘，1 個循環；(b) 94°C 1 分鐘、67°C 45 秒、72°C 1 分鐘，35 個循環；(c) 72°C 10 分鐘，1 個循環。

靈敏度測試

梨葉緣焦枯病菌編號 002 菌株之 DNA 系列稀釋成濃度為 100, 10, 1 ng 及 100, 50, 25, 10, 1 pg，經 PCR 反應後進行 1.5% 之瓊脂凝膠電泳分析，結果得知模版 DNA 濃度從 100, 10, 1 ng 至 100, 50, 25, 10 pg 都可增幅出 416 bp 的專一性 DNA 條帶 (未出示的資料)，而 1 與 0 pg 則看不出任何產物，而以梨葉緣焦枯病菌不同細菌懸浮液濃度進行 PCR 測試，結果顯示 PCR 檢測出正反應最低細菌數需 1.36×10^2 cfu/ml (未出示的資料)。

聚合酵素連鎖反應專一性測試

以 *X. fastidiosa* 廣效性引子對 272-int-1/272-int-2 及 RST31/RST33 分別進行 PCR 測試，結果顯示供試的國外 7 種其他寄主植物來源之 *X. fastidiosa* 34 個菌株 DNA，皆分別增幅出 500 bp 及 733 bp 大小基因產物片段，而來自國內 8 個橫山梨產區之梨葉緣焦枯病菌 30 個菌株及一般植物病原細菌 10 個菌株則無增幅出任何基因產物 (圖三、A 及 B)，而引子對 PLS-F/PLS-R 均可對梨葉緣焦枯病菌株增幅出一條 416 bp 大小基因產物片段，而 7 種其他寄主植物 *X. fastidiosa* 及一般植物病原細菌菌株則無增幅出任何基因產物 (圖三、C)，顯示此引子對 PLS-F/PLS-R 對梨葉緣焦枯病菌株具高度專一性。

PCR 技術應用於田間罹病樣品檢測

採自田間梨葉緣焦枯病新鮮罹病樣品以 SCPAP 法

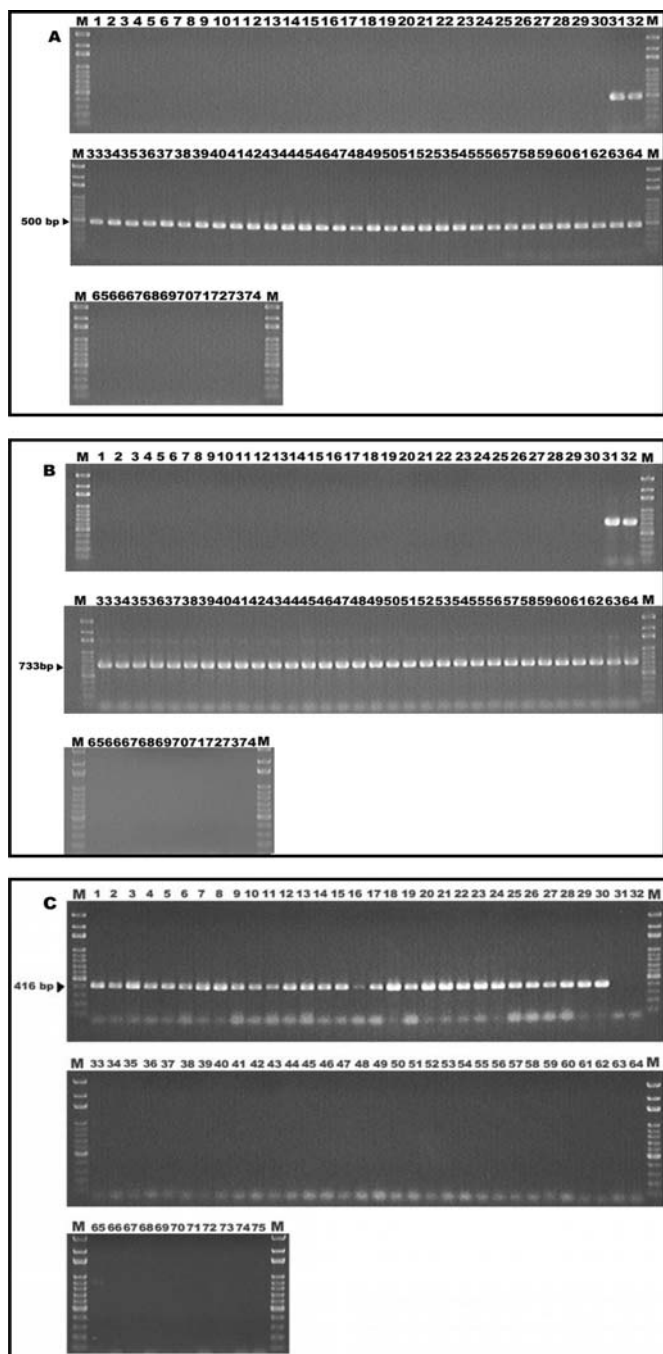
及 NaOH 法進行 PCR 檢測，結果顯示 SCPAP 法檢測 30 個罹病樣品皆為正反應，而 NaOH 法皆為負反應，以 SCPAP 法之葉柄組織研磨萃取液呈現無色或淡褐色，而 NaOH 法所得到葉柄組織研磨萃取液皆呈現深褐色；冷藏 3 天後田間罹病樣品比較病原菌組織分離與 PCR 檢測效率，綜合 4 次試驗結果顯示 PCR 檢測效率下降至 71%，仍優於病原菌組織分離率之 54% (表二)。

討 論

梨葉緣焦枯病於 1990 年始被確認是侷限導管細菌所引起，目前仍為台灣低海拔地區橫山梨栽植園普遍發生之病害^(15, 16, 34)，由於病原菌僅能於特殊培養基生長，且較一般植物病原細菌生長緩慢及接種試驗不易進行，有關梨葉緣焦枯病生態學及流行病學資料仍未臻於完整，因此，建立梨葉緣焦枯病菌快速鑑定及偵測之 PCR 技術顯得格外重要。

目前 *X. fastidiosa* 菌株可依交叉接種試驗資料可分為幾個菌群，例如來自於許多寄主植物之 PD 菌群、來自柑橘及咖啡菌株之 CVC 菌群及來自桃與李所分離的菌株群⁽²⁷⁾。不同菌群目前已有開發鑑別性引子對進行鑑定，例如 Pooler 和 Hartung⁽²⁴⁾ 利用 RAPD 產物發展 PCR 引子對 (CVC-1/272-2-int)，以區分 *X. fastidiosa* 中的 CVC 菌群和非 CVC 菌群的菌株；Banks 等人⁽²⁾ 也以 RAPD 技術發展引子對 (XF176f/XF686r) 可專一性鑑別 PD 菌群之菌株。

本研究利用國外已設計 *X. fastidiosa* 廣效性引子對 RST31/RST33⁽¹⁹⁾ 及 272-int-1/272-int-2⁽²⁴⁾ 測試來自國內 8 個橫山梨產區之 30 個梨葉緣焦枯病菌株皆無法增幅出預期之基因產物片段，而過去的研究亦指出梨葉緣焦枯病菌與其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株無血清相關性^(14, 16)，此等結果意謂著梨葉緣焦枯病菌菌株與其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株在基因層次之親緣性有明顯差異。利用隨機引子 OPA11 進行 RAPD 分析，選殖獲得梨葉緣焦枯病菌之 1,412 bp 大小 DNA 片段，核苷酸序列中 494-1,412 bp 與目前線上基因庫已註冊 DNA 序列之相似度皆高於 85% 以上，而 1-493 bp 與目前線上基因庫已註冊 DNA 序列之相似度皆低於 10%，因此，1~493 bp 為梨葉緣焦枯病菌共有之特異性核苷酸序列，從中設計獲得 1 組引子對 PLS-F/PLS-R，此引子對只對梨葉緣焦枯病菌株可增幅 416 bp 大小基因產物，其他 7 種寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株及一般植物病原細菌皆無基因產物，同時 PCR 黏合溫度測試更可高達 67°C，顯示本研究所研發之引子對 PLS-F/PLS-R 對梨葉緣焦枯病菌菌株具有高度專一性，有利於 PCR 技



術直接應用於梨葉緣焦枯病罹病組織、中間寄主植物或可疑蟲媒之檢測。

比較 NaOH 法與 SCPAP 法處理田間梨葉緣焦枯病罹病梨樹葉柄組織之樣品後直接進行 PCR 檢測，結果 SCPAP 緩衝液處理之樣品皆為正反應，而 NaOH 緩衝液皆處理者為負反應，且葉柄組織製備過程中研磨後之萃取液立刻轉為褐色，推測梨樹葉柄組織細胞內含有酚化合物 (phenolic compounds) 等物質干擾 PCR 檢測。Minsavage 等人⁽¹⁹⁾ 以 SCPAP 緩衝液作為 PCR 前處理植物組織萃取液，可提高對葡萄組織萃取液中之 *X. fastidiosa* PCR 檢測效率，本研究所採用 SCPAP 緩衝液

圖三、引子對 272-int-1/272-int-2 (A)、RST31/RST33 (B) 及 PLS-F/PLS-R (C) 對梨葉緣焦枯病菌、其他寄主植物 *Xylella fastidiosa* 菌株及一般植物病原細菌菌株全 DNA 之聚合酵素連鎖反應產物電泳圖譜。

Fig 3. PCR amplification products of total bacterial DNA with primer pairs 272-int-1/272-int-2 (A), RST31/RST33 (B), and PLS-F/PLS-R (C). M, Gen-100 DNA ladder (GeneMark, Taiwan); Lanes 1~30: pear leaf scorch bacterium (PLSB) strains no. 002, 008, 013, 015, 022, 045, 052, 053, 061, 071, 072, 076, 096, 097, 104, 114, 121, 123, 131, 139, 140, 150, 156, 184, 190, 194, 204, 207, 210, and 222, respectively; Lanes 31~64: strains of *Xylella fastidiosa* from other hosts, strains no. GH-9, O 1, O 6, O 10, 4BD7, 4BD3, 4BD2, 4B, 2-4, 2-5, 4-5, 3SV 11A, FTC AG-1, Yugo B, Shirag w/PD, White eoA27, Cab San, Melody, R118V3-4, ATCC 35869, ATCC 35870, ATCC 35876, ATCC 35879, ATCC 35881, Chateau, Mul 1, Mul 7, GHS 505, G9E, SLS 55, SLS 61, SLS 27, SLS DC5, and SLS Mary, respectively (see Table 1 for details); Lanes 65~74: phytopathogenic bacteria *Erwinia chrysanthemi*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *Burkholderia caryophylli*, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xan. axonopodis* pv. *citri*, and *Xan. axonopodis* pv. *vesicatoria*, respectively.

表二、比較 PCR 與組織分離技術偵測田間梨葉緣焦枯病罹病葉柄組織之效率

Table 2. Detection efficiency of pear leaf scorch bacteria from diseased petiole tissues collected from fields by polymerase chain reaction (PCR) and traditional tissue isolation

Experiment	PCR ¹	Tissue isolation ¹
	No. of positive/Sample size	No. of positive/Sample size
1	15/25	15/25
2	18/25	13/25
3	18/25	10/25
4	20/25	16/25
Total	71/100	54/100

¹ The petiole leaf tissues showing typical leaf scorch symptom were kept at 4°C for 3 days. Each petiole of 2 cm in length was longitudinally cut into two sections, one for PCR test with the specific primer of PLS-F/PLS-R and the other for tissue isolation test with PD2 medium.

亦可明顯減緩田間罹病樣品組織液褐化情況，可有效進行田間樣品之 PCR 檢測。SCPAP 緩衝液含有抗壞血酸與 PVPP，抗壞血酸可減緩植物組織中酚化合物之氧化^(3, 19, 29)，而 PVPP 可吸附酚化合物⁽³⁶⁾，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；但樣品冷藏 3 天後，田間罹病組織樣品之 PCR 檢測效率下降至 71% 但仍高於組織分離病原菌法的 54%，顯然如何保持罹病組織樣品新鮮度或樣品冷藏過程中可能有其他物質之變化而影響檢測結果，仍待深入探討。

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 Oliveira 等人⁽²³⁾ 應用即時聚合酵素連鎖反應技術研究 *X. fastidiosa* 菌株於抗病與感病品種之柑橘體內分布及生存。本研究研發的引子對 PLS-F/PLS-R 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綠焦枯病之罹病組織、蟲媒及中間寄主等方面之病原菌偵測，未來可進一步研發即時 PCR 技術以便對此病原菌之生態學進行深入研究。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

- Albibi, R., Chen, J., Lamikanra, O., Bank, R. L., Jarret R. L., and Smith, B. J. 1998. RAPD fingerprinting *Xylella fastidiosa* Pierce's disease strains isolated from a 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. Curr. Microbiol. 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.
- 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.
- Chang, C. J., Garnier, M., Zreik, L., Rossetti, V., and Bove, J. M. 1993. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. Curr. Microbiol. 27:137-142.
- Davis, M. J., Purcell, A. H., and 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.
- de Lima, J. E. O., Miranda, V. S., Hartung, J. S., Brlansky, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kostka, S. J., Tattar, T. A., Sherald, J. L., and Hurtt, S. S. 1986. Mulberry leaf scorch, a new disease caused by a fastidious xylem-inhabiting bacterium. Plant Dis. 70:690-693.
- 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.
- Leu, L. S., and Su, C. C. 1990. Preliminary report on pear leaf scorch induced by xylem-limited bacteria in Taiwan. Plant Prot. Bull. 32:329 (in Chinese with English abstract).
- 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.
- Liaw, W. J. 2005. The development of pear cultivation technique in Taiwan. Pages 47-54. in: Proceedings of a Symposium on Cultural Techniques and Management in Pear. 510pp. (in Chinese with English abstract)
- Lin, J. H., Liaw, W. J., Lin, H. S., and Chang, L. R. 1991. The review and outlook of pear cultivation in Taiwan. Pages 379-396. in: Proceeding of A Symposium on Fruit Production, Research and Development in Taiwan. 429pp. (in Chinese with English abstract)

19. 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.
20. Mircetich, S. M., Lowe, S. K., Moller, W. J., and Nyland, G. 1976. Etiology of almond leaf scorch and transmission of the causal agent. *Phytopathology* 84:456-461.
21. Mullis, K. B., and Falloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350.
22. 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.
23. 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.
24. Pooler, M. R., and Hartung, J. S. 1995. Genetic relationships among strains of *Xylella fastidiosa* from RAPD-PCR data. *Curr. Microbiol.* 31:134-137.
25. Pooler, M. R., and Hartung, J. S. 1995. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Curr. Microbiol.* 31:377-381.
26. 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. *Letters Appl. Microbiol.* 25:123-126.
27. Purcell, A. H., and Hopkins, D. L. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:131-151.
28. 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.
29. Rowhani, A., Chay, C., Golino, D. A., and Falk, B. W. 1993. Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fan leaf virus in grapevine tissue. *Phytopathology* 83:749-753.
30. Sambrook, 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.
31. Schaad, N. W., Cheng, S. S., Tamski, S., Hatziloukas, E., and Panopoulos, N. J. 1995. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by DNA hybridization probe. *Phytopathology* 79:903-907.
32. 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.
33. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
34. 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 Pathol. Bull.* 4:30-33.
35. Su, C. C., Yang, W. J., Hsu, S. T., and Tzeng, K. C. 2002. Development of polymerase chain reaction technique for detection xylem-limited bacterial pathogen of pear leaf scorch. *Plant Prot. Bull.* 44:368-369. (in Chinese with English abstract)
36. Warren, C. R., Adams, M. A., and Chen, Zuliang. 2000. Is photosynthesis related to concentration of nitrogen and rubisco in leaves of Australian native plants? *Austral. J. Plant Physiol.* 27:407-416.
37. Wells, J. M., Raju, B. C., and Nyland, G. 1983. Isolation, culture, and pathogenicity of the bacterium causing phony disease of peach. *Phytopathology* 73:859-862.
38. 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.
39. 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.

ABSTRACT

Su, C. C.^{1,4}, Yang, W. J.^{1,2}, Hsu, S. T.^{3,5}, and Tzeng, K. C.³ 2008. Specific detection of *Xylella fastidiosa* strains causing pear leaf scorch by polymerase chain reaction. Plant Pathol. Bull. 17: 183-194. (¹Department of Pesticide Application, Agricultural and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan; ²Keelung Branch Office, Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Taiwan; ³Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; ⁴Corresponding author, Email: auba@tactri.gov.tw, Fax: +886-4-2332-1478; ⁵Corresponding author, Email: Sthsu@mail.nchu.edu.tw, Fax: +886-4-2287-7585)

Pear leaf scorch (PLS) disease is unique in Taiwan and only found in areas where the Hengshen variety (*Pyrus pyrifolia*) is grown. It is caused by *Xylella fastidiosa*, a xylem-limited bacterium. However, PLS strains are not serologically related to strains of *X. fastidiosa* from other hosts. Likewise, no DNA fragment was amplified from PLS strains with two universal primer sets of RST31/RST33 and 272-int/272-int-2 used to detect strains of *X. fastidiosa* from other hosts. In this study, we developed a polymerase chain reaction (PCR) technique to specifically identify and detect PLS bacterium. The random amplified polymorphic DNA technique was employed and a fragment of 1,412 bp in size was specifically amplified with a random primer OPA11 for PLS strains (GenBank accession no. DQ452418). A set of specific primer PLS-F/PLS-R (5'-TGGACGTTGTGGTATCGGTG-3'/5'-TTGAAGTTGACGTGTGGCTG-3') designed from the 1,412-bp DNA amplified a 416 bp fragment from all 30 PLS strains tested but not from 34 strains of *X. fastidiosa* originally isolated from other hosts, including oleander, pecan, plum, peach, grape, mulberry and sycamore, nor from 10 strains of plant pathogenic bacteria other than *Xylwella*. The primer set can efficiently detect PLS bacterium in PLS-diseased leaf tissues collected from fields. We proposed the PCR technique developed in this study could be a useful tool for rapid detection of PLS bacterium in potential insect vectors and alternative hosts in the future.

Key words: *Xylella fastidiosa*, pear leaf scorch, specific primer set, polymerase chain reaction, detection