

利用 real-time PCR 進行二種台灣梨衰弱病菌質體 之多重檢測及定量分析

李芷芸¹ 林長平^{1,2}

¹ 臺北市 國立臺灣大學植物病理與微生物學系

² 聯絡作者，E-mail：cplin@ntu.edu.tw；傳真：+886-2-23661980

接受日期：中華民國 101 年 2 月 8 日

摘要

李芷芸、林長平. 2011. 利用 real-time PCR 進行二種台灣梨衰弱病菌質體之多重檢測及定量. 植病會刊 20: 11-20.

本研究以同步聚合酶鏈鎖反應 (real-time PCR) 針對台灣梨衰弱病菌質體 (pear decline-Taiwan phytoplasma, PDTW phytoplasma) 及第二群台灣梨衰弱病菌質體 (PDTWII phytoplasma) 設計專一性引子對，進行台灣梨衰弱病之多重檢測及定量分析。台灣梨衰弱病最早在 1994 年六月台灣中部東勢、和平等梨樹栽種地發現，本實驗室研究之初先證實該病害之病原為分類地位屬於第十群 (group 16SrX) 之 PDTW phytoplasma，隨後證實其可藉由黔梨木蝨 (*Cacopsylla qianli*) 與中國梨木蝨 (*C. chinensis*) 傳播，並於 2005 年在中國梨木蝨蟲體內發現第二群 (group 16SrII) 之 PDTWII phytoplasma，至 2006 年則發現此兩群植物菌質體可複合感染 (coinfection) 梨樹，為檢測並追蹤此二群植物菌質體在罹病梨樹及媒介昆蟲體內消長的情形，在本研究中針對二者之 16S rDNA 序列設計出多重同步聚合酶連鎖反應 (multiplex real-time PCR) 引子對，配合以 real-time PCR 為基礎之定量分析，發現在先前以 PCR 檢測確認有第十群 PDTW phytoplasma 感染之梨樹病株檢體 DNA 中，亦可偵測到第二群之 PDTWII phytoplasma 之存在，確認其為複合感染，顯示田間罹病植株受兩群植物菌質體複合感染之情形相當普遍。經靈敏度測試則發現 real-time PCR 優於 PCR，而 multiplex real-time PCR 亦優於 multiplex PCR。此定量技術之建立將可應用於追蹤兩群台灣梨衰弱病菌質體於梨樹及媒介昆蟲體內之細胞數量及二者間族群消長情形之觀察。

關鍵詞：台灣梨衰弱病、同步聚合酶鏈鎖反應

緒言

植物菌質體 (phytoplasma) 為絕對寄生型病原 (obligate pathogen)，原名似菌質體 (mycoplasma-like organism, MLO)，最早於 1967 年發現，是一種重要的植物病原細菌，依植物菌質體之 16S rRNA 核酸序列資料進行分群，現今共區分為 28 群，以及接近 100 個亞群^(10, 13)，目前全球已知有超過一千種的植物病害與植物菌質體有關⁽¹⁾，其中包括桃、梨等重要果樹及花生、甘藷與泡桐等重要經濟作物的病害，在農業上造成十分可觀的損

失。台灣梨樹衰弱病 (pear decline-Taiwan, PDTW) 最早在 1994 年六月於台灣中部東勢、和平等梨樹栽種地被發現⁽⁴⁾。其病徵表現主要分為急速衰弱 (quick decline) 及慢性衰弱 (slow decline) 二型，急速衰弱型多發生於 10 年生以上之植株，造成罹病植株快速萎凋，全株葉片呈脫水狀，並在幾天至數週內死亡；慢性衰弱病之病徵通常於梨樹局部枝條的葉片開始出現病變，以紅葉與捲葉為主，到了春季時，其新生葉變小且稀疏，造成小果與提早落果之現象，反覆發生數年 (2-5 年) 後，使罹病植株逐漸凋萎並死亡。經研究發現台灣梨衰弱病可由黔梨木蝨 (*Cacopsylla qianli*) 與中國梨木蝨 (*C. chinensis*) 傳播^(4, 5, 6, 7)。在

2005 年 8 月時，本研究室在中國梨木蠹蟲體內同時偵測到第十群台灣梨衰弱病菌質體 (PDTW phytoplasma) 及第二群台灣梨衰弱病菌質體 (PDTWII phytoplasma)，並於 2006 年 9 月時發現第十群台灣梨衰弱病菌質體 (PDTW phytoplasma) 及第二群台灣梨衰弱病菌質體 (PDTWII phytoplasma) 可複合感染 (co-infection) 梨樹^(6, 7)，但此兩群植物菌質體於梨樹與媒介昆蟲體內之消長情形則仍屬未知。

同步聚合酵素連鎖反應 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) 可量化核酸，且靈敏度較高，因此近年來以同步聚合酵素連鎖反應為基礎，針對基因表現差異、病原數量定量等領域之相關研究發展迅速^(11, 12, 14)。

由於植物菌質體 16S rDNA 核酸在植物菌質體內之套組數已知為兩個套組^(8, 9)，本研究結合 real-time PCR 具高靈敏度與可定量之特性，研發多重同步聚合酵素連鎖反應 (multiplex real-time PCR)，應用於梨衰弱病複合感染之罹病梨樹，進行第十群台灣梨衰弱病菌質體 (PDTW phytoplasma) 與第二群台灣梨衰弱病菌質體 (PDTWII phytoplasma) 之檢測。配合以 real-time PCR 為基礎之絕對定量分析，定量兩群植物菌質體於罹病植株內之細胞數量，此定量技術之建立將有利於將來追蹤兩群台灣梨衰弱病菌質體於梨樹及媒介昆蟲體內之細胞數量與二者間消長情形之觀察。

表一、本研究所使用引子之核酸序列

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers used in this study

Primer	Sequence (5' to 3')	Length (mer)	Target sequence	Aim ^a	Source
16S-F1	AGA CAC GGC CCA AAC TCC TAC G	22	16S rDNA	A	This study
16S-R1	AGC CGC CTA CGC CTC TGG T	19	16S rDNA	A	This study
P1	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T	25	Phytoplasma	A	Deng and Hiruki, 1991
L1n	CAA GGC ATC CAC TGT	15	PDTW phytoplasma	A	Liu and Lin, 2007
16SrII-f1	AGG AAG AAA AGC AAA TGG CG	20	16SrII phytoplasma	R	This study
16SrII-r1	CAA GTT TAG CAG TTT CAA TAG CCG	24	16SrII phytoplasma	R	This study
PDtwX-mf2	TGA GTA ACA CGT AAG TAA CCT GCC TCT	27	PDTW phytoplasma	R	This study
PDtwX-mr2	TCT CAG CAT ACC CTT GCG G	19	PDTW phytoplasma	R	This study

^a A, primers for artificial template construction; R, specific primers for real-time PCR

材料與方法

植物樣本全 DNA 之純化

台灣梨衰弱病菌質體感染之罹病梨株樣本採集自東勢、和平梨衰弱病發病地區，並使用 Plant Genomic DNA Extraction Maxiprep System (Viogene-Biotech Corporation, Taipei, Taiwan) 經修改其操作步驟後，進行梨樹全 DNA 之純化。

本實驗以日日春 (*Catharanthus roseus*, periwinkle) 作為試驗植物以繁殖植物菌質體。第二群台灣梨衰弱病菌質體 (PDTWII phytoplasma) 之核酸主要由前人嫁接成功之日日春中純化^(6, 7)，植物全 DNA 抽取之方法主要乃參考 Ko 與 Lin 等人的方法⁽³⁾稍作修改後進行。

人工模板之建構

以 Primer Express[®] software v2.0 (Applied Biosystems, Foster, CA) 進行 PDTWII phytoplasma 16S rDNA 序列引子對 16S-F1/ 16S-R1 (for 16S rDNA) (表一) 之設計；針對 PDTW phytoplasma，則使用植物菌質體專一性引子 P1⁽²⁾ 及本實驗室先前所設計之 PDTW phytoplasma 專一性引子 L1n^(4, 5) (表一)。進行第十群或第二群台灣梨衰弱病菌質體 16S rDNA 序列之聚合酵素連鎖反應 (PCR) 時，在 0.2 ml 之微量 PCR 反應管中依序加入無菌水 (使反應總

體積為 25 μ l)、5 μ l 的 5x Colorless GoTaq[®] Flexi Buffer1 (Promega Corporation, Madison, WI)、1.5 μ l 之 MgCl₂ Solution (25 mM)、1 μ l dNTPs mixture (dATP, dTTP, dCTP, dGTP 各 2.5 mM)、引子對 P1/ L1n 或 16S-F1/ 16S-R1 (均為 20 μ M) 各 1 μ l (使反應濃度各為 0.8 μ M)、感染第十群或第二群台灣梨衰弱病菌質體之梨樹全 DNA 10 μ l, 再加入 1 單位 (unit) 之 GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega Corporation)。引子對 16S-F1/ 16S-R1 之 PCR 反應程式如表二所示。反應完成後, 於含 SYBR[®] safe DNA gel stain (Invitrogene Corporation, Eugene, Oregon) 之 1.2% 或 2.0% 瓊脂凝膠進行水平電泳分析, 完成後透過 QIAquick[®] PCR purification kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) 與 TOPO TA cloning[®] Kit (Invitrogene Corporation) 進行 PCR 產物之純化與選殖, 操作方法依照廠商說明書進行。確定選殖片段為第二群及第十群台灣梨衰弱病菌質體之 16S rDNA 序列後, 經 Mini Plus[™] Plasmid DNA Extraction System (Viogen-Biotek Corporation) 依照廠商說明書進行純化重組質體 DNA, 以作為 real-time PCR 進行時所需之人工 DNA 模板 (artificial DNA template), 分別將其命名為 pPAT-PDTW 及 pPAT-PDTWII。

同步聚合酵素連鎖反應專一性引子對之設計

Real-time PCR 所使用之專一性引子對, 係以 Primer Express[®] software v2.0 (Applied Biosystems) 進行設計, 共計有引子對 PDtwX-mf2/ PDtwX-mr2 (for PDTW

phytoplasma) 及 16SrII-f1/ 16SrII-r1 (for 16SrII phytoplasma) (表一)。

台灣梨衰弱病菌質體菌量之測定及標準曲線之建構

為進行 PDTW phytoplasma 與 PDTWII phytoplasma 於寄主植株內之菌量分析, 將前述所得之人工模板 pPAT-PDTW 與 pPAT-PDTWII DNA 進行十倍系列稀釋 (decimal dilution), 取十倍系列稀釋之人工模板 1 μ l, 引子對 PDtwX-mf2/ PDtwX-mr2 或 16SrII-f1/ 16SrII-r1 (5 μ M) (表一) 各 1 μ l, 與 Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 10 μ l 及無菌水 (使總反應體積為 20 μ l) 於 0.2 ml 的微量光學 PCR 反應管 (ABI Prism MircoAmp[™], Applied Biosystems) 中, 以 ABI 7000 Real-Time PCR machine 進行 real-time PCR 反應程式如表二。完成後即可藉由觀察 T_m 值辨別增幅出來的片段是否為預期片段及引子對之專一性, 並以反應器所記錄的增幅曲線進行反應臨界循環數值 (threshold cycle, Ct) 分析。

為建構 real-time PCR 之標準曲線, 以 pPAT-PDTW 及 pPAT-PDTWII 為人工 DNA 模板進行兩次以上 real-time PCR, 每次反應中同一 DNA 模板進行三重複以避免誤差。將人工 DNA 模板之濃度取對數 (log, 以原始濃度 1 ng/ μ l 為 log = 0) 與臨界循環數值 (threshold cycle, Ct) 以 Excel 計算軟體 (Microsoft Corporation, Albuquerque, New Mexico) 作圖, 建構對數濃度 (log concentration) 與 Ct 值之線性關係曲線即標準曲線及其

表二、各引子對進行聚合酵素連鎖反應及同步聚合酵素連鎖反應之反應程式

Table 2. PCR/ real-time PCR program for each primer set

Primer set	PCR/ real-time PCR program
16S-F1 / 16S-R1	(1) 94°C /5 min
	(2) 94°C /30 sec, 55°C /20 sec, 72°C /30 sec, 35 cycles
	(3) 72°C /7 min
P1 / L1n	(1) 94°C /5 min
	(2) 95°C /30 sec, 60°C /60 sec, 72°C /90 sec, 35 cycles
	(3) 72°C /10 min
16SrII-f1 / 16SrII-r1 or	(1) 50°C /2 min
	(2) 95°C /10 min
	(3) 95°C /15 sec, 60°C /60 sec, 40 cycles
PDtwX-mf2 / PDtwX-mr2	(4) Melting curve detection : 95°C /1 min, 60°C /1 min, heating to 95°C in 20 min

方程式。

台灣梨衰弱病菌質體於寄主內之菌量分析，以 3 μ l 受 PDTW phytoplasma 及/或 PDTWII phytoplasma 感染之梨樹或日日春植株之全 DNA 為模板，各反應試劑及總體積如前述，進行 real-time PCR (表二)。

將進行 real-time PCR 所得之第十群之 PDTW phytoplasma 與第二群之 PDTWII phytoplasma 16S rDNA 之 Ct 值，分別代入於前述標準曲線內，即可求得兩群植物菌質體 16S rDNA 原始濃度之對數值 (log concentration)，再將此數值取指數 (ln)，即為受第十群及/或第二群台灣梨衰弱病菌質體感染之梨樹或日日春植株內之 16S rDNA 原始量。由於 16S rDNA 在植物菌質體內已證實具 2 個套組⁽¹¹⁾，因此將此基因之原始含量除以 2 即為每 3 μ l 內台灣梨衰弱病菌質體之數量。由於依本研究中之實驗步驟，每 1.5 g 植物組織可純化製備出 1500 μ l 之全 DNA，因此將上述每 3 μ l 內植物菌質體之數量除以 3 後，再乘以 1000 (即每 3 μ l 內植物菌質體之數量乘以 333)，即可求得每公克植物組織內植物菌質體之含量。計算方式如下：

$$\text{Number of phytoplasma/ g plant tissue} = \frac{\text{16S rDNA copy number}}{2 \times 333}$$

Real-time PCR 與 PCR 偵測台灣梨衰弱病菌質體靈敏度之比較

由前述實驗中所求得之每公克罹病植株內 PDTW phytoplasma 及 PDTWII phytoplasma 之細胞數量，將內含 PDTW phytoplasma 或 PDTWII phytoplasma 菌量最高之罹病植株全 DNA，分別稀釋至 10⁶ cells/ g plant tissue，即 DNA template 中具 1 \times 10³ cells 後，十倍系列稀釋 (10⁰ 至 10⁶ 倍)，以引子對 PDtwX-mf2/ PDtwX-mr2 或 16S-F1/ 16S-R1 (均為 20 μ M) (表一) 進行 real-time PCR，反應如前述。

以上述引子對及罹病植株十倍系列稀釋 DNA 為模板，進行聚合酵素連鎖反應 (表二)，反應試劑及總體積如前述。

Multiplex real-time PCR 與 multiplex PCR 偵測台灣梨衰弱病菌質體靈敏度之比較

以上述經十倍系列稀釋之內含 PDTW phytoplasma 與 PDTWII phytoplasma 之 DNA 各 1 μ l，引子對

PDtwX-mf2/ PDtwX-mr2 (5 μ M) 及 16SrII-f1/ 16SrII-r1 (10 μ M) (表一) 各 1 μ l，與 Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 10 μ l 及無菌水 (使總反應體積為 20 μ l) 於 0.2 ml 的微量光學 PCR 反應管 (ABI Prism MircoAmp[™], Applied Biosystems) 中，進行 multiplex real-time PCR (表二)。

以上述引子對及罹病植株 DNA 模板進行 multiplex PCR，總體積及反應程式如前述。

結果

同步聚合酵素連鎖反應之專一性引子對之測定

以 PDTW phytoplasma 專一性引子對 PDtwX-mf2/ PDtwX-mr2 (產物長度 123 bp) 及 16SrII phytoplasma 專一性引子對 16SrII-f1/ 16SrII-r1 (產物長度 205 bp) 針對受第十群之 PDTW phytoplasma 與第二群之 PDTWII phytoplasma 感染之梨樹全 DNA 為模板進行 real-time PCR，由變性曲線 (dissociation curve) 分析引子對 PDtwX-mf2/ PDtwX-mr2 及 16SrII-f1/ 16SrII-r1 之專一性。以引子對 PDtwX-mf2/ PDtwX-mr2 所增幅出之產物解鏈溫度 (Tm) 約 76.6°C；而引子對 16SrII-f1/ 16SrII-r1 之產物解鏈溫度則為 81.2°C，而 70°C 所偵測到的高峰 (Tm peak) 為 primer dimer，並非非專一性產物。將所得產物解序後，確認 PDtwX-mf2/ PDtwX-mr2 所增幅出片段屬於第十群之 PDTW phytoplasma 之 16S rDNA 序列，而由 16SrII-f1/ 16SrII-r1 所增幅之片段則屬於第二群之 PDTWII phytoplasma 之 16S rDNA 序列。

台灣梨衰弱病菌質體 16S rDNA 序列 real-time PCR 標準曲線之建構

分析人工 DNA 模板 pAT-PDTWII 之序列，確認其為第二群之 PDTWII phytoplasma 之 16S rDNA 序列後，以 Mini Plus[™] Plasmid DNA Extraction System (Viogene-Biotek Corporation) 純化重組質體 DNA，獲得質體 DNA 之原始濃度約 75 ng/ μ l。將兩者之人工 DNA 模板稀釋至 10⁸ copies/ μ l 後當作起始濃度，以其十倍系列釋 (decimal dilution) 之 DNA (從 10⁰ 至 10⁶ 倍稀釋) 作為模板，以專一性引子對 PDtwX-mf2/ PDtwX-mr2 及 16SrII-f1/ 16SrII-r1 進行進行 real-time PCR，可獲得其增幅曲線與各稀釋濃度所對應之 Ct 值 (圖三)，並藉由變性

曲線 (dissociation curve) 及電泳分析 (electrophoresis) 觀察增幅片段之專一性。

以 Prism7000 SDS Software V1.1 (Applied Biosystems) 對上述 real-time PCR 之結果進行分析，依 PDtwX-mf2/ PDtwX-mr2 及 16SrII-f1/ 16SrII-r1 引子對之效率，獲得增幅曲線 (amplification curve) 之螢光臨界值 (threshold value)，其分別為 0.052189 及 0.063741。將其對應之 Ct 值與對數濃度 (log concentration) 作圖，即可獲得其標準曲線 (standard curve)。在本實驗中以 PDtwX-mf2/ PDtwX-mr2 及 16SrII-f1/ 16SrII-r1 分別進行兩次實驗，每次實驗均進行三重複以避免誤差，由兩次實驗內三重複之平均值，進行相關性 (correlation coefficient) 分析，獲得第十群之 PDTW phytoplasma 與第二群之 PDTWII phytoplasma 16S rDNA 序列於兩次實驗之相關性分別為 0.999469 及 0.999866，顯示建構標準曲線之兩次實驗間的人為誤差極小，可作為後續定量之標準曲線，如此以兩次實驗所求得 Ct 值之平均 (每次實驗進行三重複) 為 Y 軸，對數濃度 (log concentration) 為 X 軸做圖，便可獲得可用於定量台灣梨衰弱病菌質體之標準曲線圖。

第十群之 PDTW phytoplasma 之標準曲線圖之方程式為：

$$Ct = -2.9341 (\log_{10}(\text{PDTW phytoplasma concentration})) + 41.977$$

第二群之 PDTWII phytoplasma 之標準曲線圖之方程式為：

$$Ct = -3.1007 (\log_{10}(\text{PDTWII phytoplasma concentration})) + 35.195$$

第十群與第二群台灣梨衰弱病菌質體於寄主內之菌量分析

以受第十群之 PDTW phytoplasma 感染之梨樹與受 PDTW phytoplasma 與 PDTWII phytoplasma 複合感染 (co-infection) 之梨樹或日日春植株為 DNA 模板，進行 real-time PCR 定量分析，可求得兩群台灣梨衰弱病菌質體 16S rDNA 之 Ct 值。將所得之 Ct 值分別代入第十群之 PDTW phytoplasma 與第二群之 PDTWII phytoplasma 之標準曲線方程式 (第十群之 PDTW phytoplasma: $y = -2.9341x + 41.977$; 第二群之 PDTWII phytoplasma: $y = -3.1007x + 35.195$)，計算二者在 DNA template 中 16S rDNA 之原始量 (number)，植物菌質體 16S rDNA 核酸在植物菌質體內之套組數已知為兩個套組^(8,9)，因此將此數值除以 2 後，即為每 3 μ l 內植物菌質體之細胞數量，經公式 (Number of phytoplasma/ g plant tissue = 16S rDNA copy number/ 2 \times 333) 計算得每公克植物組織內，植物菌質體之細胞數量(表三)。結果顯示在以往以 PCR 檢測，僅可偵測到第十群之 PDTW phytoplasma 感染之梨樹植株內，利用本研究所建立之

表三、第十群台灣梨衰弱病菌質體 (PDTW phytoplasma) 與第二群台灣梨衰弱病菌質體 (PDTWII phytoplasma) 16S rRNA 基因之 real-time PCR Ct 值、16S rRNA 基因數量 (number) 與每公克植物組織內菌質體細胞數量

Table 3. The Ct value of real-time PCR, numbers of 16S rRNA gene of PDTW phytoplasma and PDTWII phytoplasma and the number of phytoplasma cells per gram of PDTW phytoplasma-infected and co-infected plants

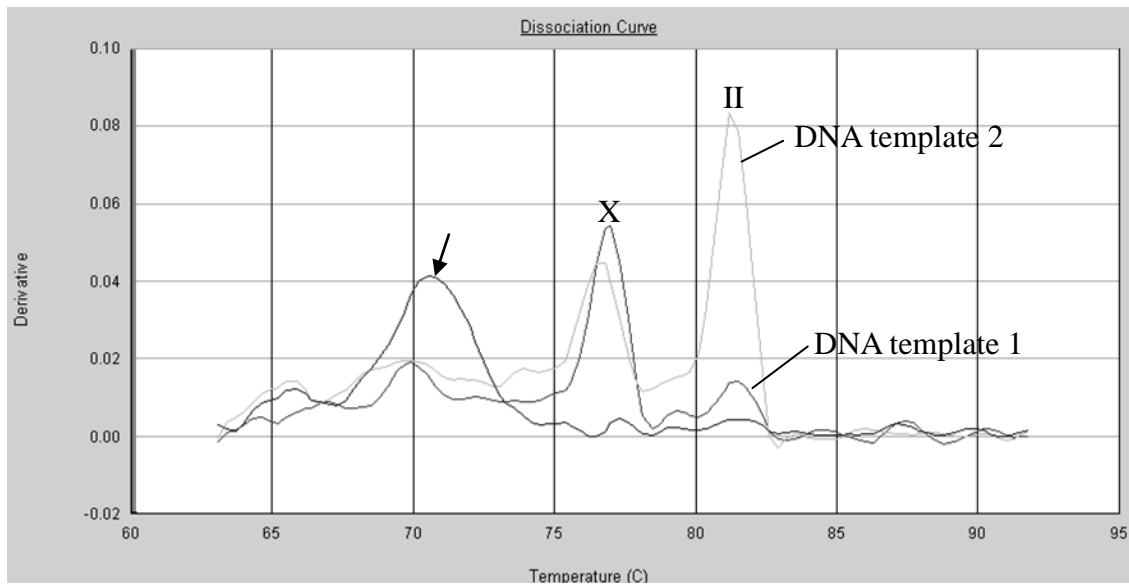
Source of DNA template	PCR detection of PDTW	Average Ct value for 16S rDNA ^a	Number of 16S rDNA ^b in DNA template	Number of PDTW phytoplasma/ g plant tissue ^c
PDTW phytoplasma-infected pear-1	Group X	23.10 \pm 0.01	1.2 \times 10 ⁴	2.0 \times 10 ⁶
	Group II	26.49 \pm 0.15	6.4 \times 10 ²	1.1 \times 10 ⁵
PDTW phytoplasma-infected pear-2	Group X	24.30 \pm 0.05	5.0 \times 10 ³	8.4 \times 10 ⁵
	Group II	29.94 \pm 0.43	5.0 \times 10 ¹	8.2 \times 10 ³
Co-infected ^d pear	Group X	33.28 \pm 0.21	4.1 \times 10 ⁰	6.8 \times 10 ²
	Group II	34.44 \pm 0.23	2.9 \times 10 ⁰	4.7 \times 10 ²
Co-infected periwinkle	Group X	30.80 \pm 0.44	4.7 \times 10 ¹	7.9 \times 10 ³
	Group II	23.09 \pm 0.38	8.0 \times 10 ³	1.3 \times 10 ⁶

^aAverage Ct value of real-time PCR using primer pair PDtwX-mf2/ PDtwX-mr2 with 3 repeats.

^bNumber of 16S rDNA of PDTW phytoplasma was calculated from the standard curve equation of PDTW phytoplasma.

^cNumber of phytoplasma/ g plant tissue = 16S rDNA copy number/ 2 \times 333

^dCo-infected by PDTW phytoplasma and PDTWII phytoplasma.



圖一、以 PDtwX-mf2/ PDtwX-mr2 及 16SrII-f1/ 16SrII-r1 引子對針對 PDTW phytoplasma 與 PDTWII phytoplasma 之混合 DNA 模板進行 multiplex real-time PCR 所得產物之解離曲線 (dissociation curve)。

Fig. 1. Dissociation curve of multiplex real-time PCR with PDTW phytoplasma and PDTWII phytoplasma DNA as template using PDtwX-mf2/ PDtwX-mr2 and 16SrII-f1/ 16SrII-r1 primer pairs. Melting temperature peaks (T_m peaks) of 16S rDNA of PDTW phytoplasma (X) and PDTWII phytoplasma (II) are 76.6°C and 81.2°C , respectively. Primer dimers showed a T_m peak of 70°C (arrow) in negative control (ddH₂O as template). DNA template 1 was prepared by mixing DNA prepared from pear tree infected with PDTW phytoplasma and DNA prepared from pear tree infected with PDTWII phytoplasma. DNA template 2 was prepared by mixing DNA prepared from pear tree infected with PDTW phytoplasma and periwinkle plant infected with PDTWII phytoplasma.

real-time PCR 定量技術，亦可偵測到第二群之 PDTWII phytoplasma 之存在 (表三)。

同步聚合酵素連鎖反應與多重同步聚合酵素連鎖反應之靈敏度分析

配合 real-time PCR 之定量技術比較 PCR 與 real-time PCR 對於菌量偵測之靈敏度測試，以內含 PDTW phytoplasma 或 PDTWII phytoplasma 細胞數量最高之罹病植株全 DNA 進行十倍系列稀釋後，進行靈敏度測試，發現當 PDTW phytoplasma 菌量達 10^5 cells/g plant tissue 以上，即 DNA template 中具 1×10^2 cells 以上時，可經由 PCR 產物之電泳分析觀察到 123 bp 之 PCR 產物預期片段，而以 real-time PCR 進行偵測時，其菌量僅需達 10^3 cells/g plant tissue 以上，即 DNA template 中具 1 cell 以上時，即可經由變性曲線觀察到屬於 PDTW phytoplasma (76.6°C) 之 T_m peak；以 PCR 針對 PDTWII phytoplasma 進行偵測，則僅可於菌量達 10^6 cells/g plant tissue，即 DNA template 中具 1×10^3 cells

時，方可增幅出 205 bp 之 PCR 產物預期片段，以 real-time PCR 進行偵測時，PDTWII phytoplasma 之菌量則僅需達 10^3 cells/g plant tissue 以上，即 DNA template 中具 1 cell 以上時，即可經由變性曲線觀察到 PDTWII phytoplasma (81.2°C) 之 T_m peak，顯示以 real-time PCR 為基礎所進行之定量與靈敏度優於 PCR (表四)。

而針對 multiplex real-time PCR 與 multiplex PCR 所進行之靈敏度測試 (圖一、圖二)，亦發現 multiplex PCR 針對 PDTW phytoplasma 在受測之各稀釋濃度則均無法經由 multiplex PCR 增幅出 123 bp 之預期片段 (圖二 B)，而以 multiplex real-time PCR 偵測 PDTW phytoplasma 則於 10^4 cells/g plant tissue，即 DNA template 中具 10 cells 以上時，便可出現 PDTW phytoplasma 之 T_m peak (76.6°C)；針對 PDTWII phytoplasma 之 multiplex PCR 偵測則發現，僅可於 PDTWII phytoplasma 菌量達 10^6 cells/g plant tissue，即 DNA template 中具 1×10^3 cells 時，方可增幅出屬於 PDTWII phytoplasma 之 205 bp 預期片段 (圖二 B)，然

而在 multiplex real-time PCR 測試中，則僅需 PDTWII phytoplasma 菌量達 10^3 cells/g plant tissue，即 DNA template 中具 1 cell 時，即可偵測到 PDTWII phytoplasma 之 Tm peak (81.2°C)，此結果亦顯示 multiplex real-time PCR 之靈敏度優於 multiplex PCR (表四)。

討 論

本研究利用第十群台灣梨衰弱病菌質體 (PDTW phytoplasma) 專一性引子對 PDtwX-mf2/ PDtwX-mr2 (PCR 產物長度 123 bp) 與第二群植物菌質體 (16SrII phytoplasma) 專一性引子對 16SrII-f1/ 16SrII-r1 (PCR 產物長度 205 bp)，進行 real-time PCR 之定量分析，結果發現在先前以 semi-nested PCR 確認為 PDTW 與 PDTWII phytoplasma 複合感染之梨樹^(6, 7)內，的確可偵測到兩群台灣梨衰弱病菌質體之存在；而在以往經 PCR

確認為 PDTW phytoplasma 感染之梨樹內，亦可偵測到 PDTWII phytoplasma 之存在，顯示田間罹病植株受此兩群植物菌質體複合感染之情形相當普遍。此外，於本研究中亦發現所檢測之罹病植株內，兩群台灣梨衰弱病菌質體細胞數量之差異，推測可能與環境變化、寄主及植物菌質體之生理狀態有關，至於不同時期兩群台灣梨衰弱病菌質體於罹病植株內族群之消長情形，則值得進一步探討。比較 real-time PCR 與 PCR 之靈敏度，發現當 DNA template 中僅具 1 phytoplasma cell 時，仍可藉由變性曲線 (dissociation curve) 觀察到分屬於 PDTW phytoplasma (76.6°C) 與 PDTWII phytoplasma (81.2°C) 之 Tm peak；相對地，若以 PCR 進行檢測，則 DNA template 中須具 10^2 phytoplasma cells 以上時，方可增幅出 123 bp (PDTW phytoplasma) 及 205 bp (PDTWII phytoplasma) 之 PCR 產物預期片段。顯示 real-time PCR 之靈敏度優於 PCR。經 multiplex real-time PCR 與 multiplex PCR 測試，亦得到類似之結果。其中值得注意的是，當以一般 PCR 進行

表四、PCR, real-time PCR, multiplex PCR 與 multiplex real-time PCR 之靈敏度比較

Table 5. Amplification results of the decimal dilution series of PDTW phytoplasma and PDTWII phytoplasma (cells/g plant tissue) used to compare the sensitivity of PCR, real-time PCR, multiplex PCR and multiplex real-time PCR

Number of phytoplasma cells/g plant tissue ^a	Number of phytoplasma cells in DNA template	PDTW phytoplasma ^b				PDTWII phytoplasma ^c			
		PCR	Real-time PCR	Multiplex PCR	Multiplex real-time PCR	PCR	Real-time PCR	Multiplex PCR	Multiplex real-time PCR
1	10^{-3}	— ^d	—	—	—	—	—	—	—
10	10^{-2}	—	—	—	—	—	—	—	—
10^2	10^{-1}	—	—	—	—	—	—	—	—
10^3	1	—	+ ^e	—	—	—	+	—	+
10^4	10	—	+	—	+	—	+	—	+
10^5	10^2	+	+	—	+	—	+	—	+
10^6	10^3	+	+	—	+	+	+	+	+

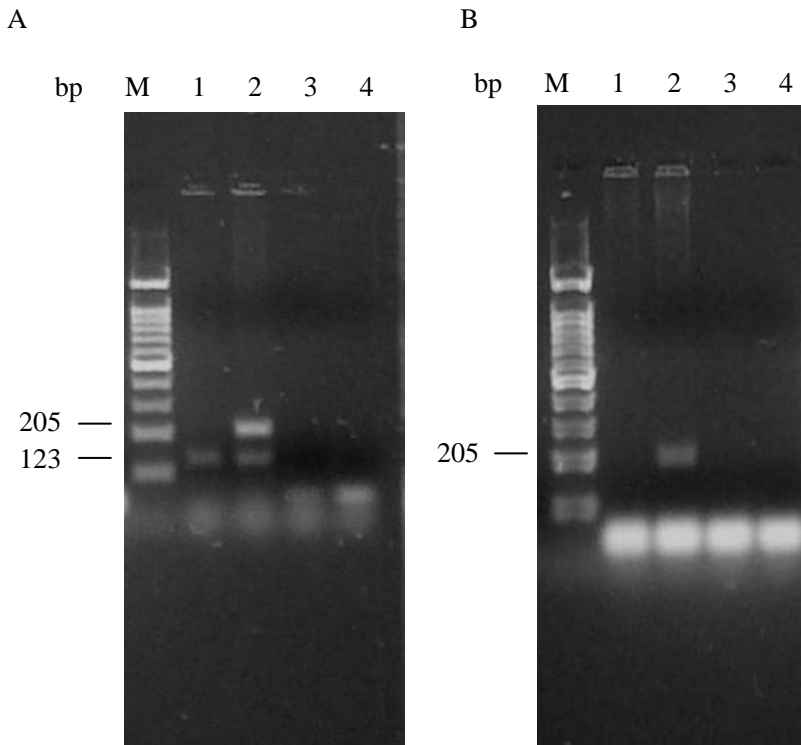
^aDecimal dilution series from 10^0 to 10^{-6} starting at 10^6 cells/g plant tissue of DNA prepared from PDTW phytoplasma-infected pear-1 used as template for PDTW phytoplasma and DNA prepared from co-infected periwinkle plant used as template for PDTWII phytoplasma.

^bPDtwX-mf2/ PDtwX-mr2 primers used for the detection of PDTW phytoplasma in PCR, real-time PCR, multiplex PCR and multiplex real-time PCR.

^c16SrII-f1/ 16SrII-r1 primers used for the detection of PDTWII phytoplasma in PCR, real-time PCR, multiplex PCR and multiplex real-time PCR.

^dNo amplification.

^ePositive amplification.



圖二、以 PDtwX-mf2/ PDtwX-mr2 (product length 123 bp) 及 16SrII-f1/ 16SrII-r1 (product length 205 bp) 引子針對 PDTW phytoplasma 與 PDTWII phytoplasma 之混合 DNA 模板對進行 multiplex real-time PCR (A)，及 multiplex PCR (B) 之產物電泳分析圖。

Fig. 2. Electrophoresis analyses of multiplex real-time PCR (A), and multiplex PCR (B) with mixed PDTW phytoplasma DNA and PDTWII phytoplasma DNA as template using PDtwX-mf2/ PDtwX-mr2 (product length 123 bp) and 16SrII-f1/ 16SrII-r1 (product length 205 bp) primer pairs. DNA template 1 was prepared by mixing DNA prepared from pear tree infected with PDTW phytoplasma and DNA prepared from pear tree infected with PDTWII phytoplasma (lane 1); DNA template 2 was prepared by mixing DNA prepared from pear tree infected with PDTW phytoplasma and DNA prepared from periwinkle plant infected with PDTWII phytoplasma (lane 2); healthy pear DNA (lane 3); ddH₂O as negative control (lane 4). M, 100 bp DNA ladder as molecular weight standards. Sizes (in bp) of PCR products are shown on the left.

PDTW phytoplasma 偵測時，可檢測之最低菌量為 10^5 cells/g plant tissue，優於 PDTWII phytoplasma 之 10^6 cells/g plant tissue，然而於 multiplex PCR 反應時，卻無法增幅出 PDTW phytoplasma 之 PCR 產物片段 (123 bp)，類似差異亦出現於 real-time PCR 及 multiplex real-time PCR 可檢測 PDTW phytoplasma 最低菌量之實驗中，推測可能由於引子對相互競爭所造成。

根據行政院農業委員會之資料，台灣梨樹栽種面積約 9 千公頃，年產值高達 37 億左右，為台灣高經濟價值之果樹，本研究室以 PCR 技術偵測屬於第十群之 PDTW phytoplasma 16S rDNA 序列，經長期田間監測及咬食實驗，證明黔梨木蝨 (*Cacopsylla qianli*) 與中國梨木蝨 (*C. chinensis*) 為傳播此病原之媒介昆蟲^(4, 5, 6, 7)。本實驗室並

於 2005 年 8 月時發現在中國梨木蝨蟲體內同時具有第十群之 PDTW phytoplasma 及第二群之 PDTWII phytoplasma^(6, 7)。於本研究中所建立之定量植物菌質體細胞數量之技術，可應用於追蹤田間不同時期罹病植株內，兩群台灣梨衰弱病菌質體族群間之消長情形，以及監測不同媒介昆蟲蟲體內，兩群台灣梨衰弱病菌質體之帶菌量差異，在此一病害發病生態之研究上可提供重要之研究工具。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Agrios, G. N. 2005. Plant diseases caused by mollicutes: phytoplasmas and spiroplasmas. Pages 687-703 in: Plant

- Pathology, 5th ed. G. N. Agrios ed. Academic Press, San Diego, CA.
2. Deng, S., and Hiruki, C. 1991. Amplification of 16S rRNA gene from culturable and nonculturable molecules. *J. Microbiol. Meth.* 14: 53-61.
 3. Ko, H. C., and Lin, C. P. 1994. Development and application of cloned DNA probe for a mycoplasma-like organism associated with sweet potato withes' broom. *Phytopathology* 84: 468-473.
 4. Liu, H. L., Chen, C. C., and Lin, C. P. 2007. Detection and identification of the phytoplasma associated with pear decline in Taiwan. *Eur. J. Plant Pathol.* 117: 281-291.
 5. Liu, H. L., and Lin, C. P. 2007. Development and application of PCR-based strategies for the detection of the phytoplasma causing pear decline in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 16: 1-10.
 6. Liu, H. L., Liu, S. L., Yang, M. M., and Lin, C. P. 2007. Studies on the insect vectors and ecology of pear decline in Taiwan. *Pant Pathol. Bull.* 49: 13-26.
 7. Liu, S. L., Liu, H. L., Chang, S. C., and Lin, C. P. 2011. Phytoplasmas of two different 16S rDNA groups are associated with pear decline in Taiwan. *Botanical Studies* 52: 313-320.
 8. Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B. C., and Seemüller, E. 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Gen. Microbiol.* 139: 519-527.
 9. Schneider, B., and Seemüller, E. 1994. Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3409-3412.
 10. Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D., and Kirkpatrick, B. C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. Pages 369-380 *in: Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*, vol. 1. S. Razin, and J. G. Tully eds. Academic Press, San Diego, CA.
 11. Torres, E., Bertolini, E., Cambra, M., Montón, C., and Martín, M. P. 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. *Mol. Cell Probes* 19: 334-340.
 12. Wei, F., Hamilton, T., Webster-Sesay, S., Nikolich, M. P., and Lindler, L. E. 2007. Multiplex real-time SYBR Green I PCR assay for detection of tetracycline efflux genes of Gram-negative bacteria. *Mol. Cell Probes* 21: 245-256.
 13. Wei, W., Davis, R. E., Lee, I.-M. and Zhao, Y. 2007. Computer simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1855-1867.
 14. Whelan, J. A., Russel, N. B., and Whelan, M. A. 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real time PCR. *J. Immunol. Methods* 278: 261-269.

ABSTRACT

Lee, C. Y., and Lin, C. P.^{1,2} 2011. Multiplex detection and quantification of two pear decline phytoplasmas in Taiwan by real-time PCR. *Plant Pathol. Bull.* 20:11-20. (¹ Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan 106, R.O.C.; ² Corresponding author, E-mail: cplin@ntu.edu.tw; Fax: +886-2-23661980)

Pear decline (PD) was first reported in 1994 in pear orchards near central Taiwan and was previously proved to be caused by pear decline-Taiwan (PDTW) phytoplasma (Liu *et al.*, 2007. *Eur. J. Plant Pathol.* 117:281-291). PDTW phytoplasma can be transmitted by two pear psyllas, *Cacopsylla qianli* and *C. chinensis*. Besides PDTW phytoplasma, PDTWII phytoplasma of 16SrII group was first identified in pear psyllas since 2005. In 2006, co-infection of PDTW phytoplasma and PDTWII phytoplasma in pear trees was later identified by PCR. To detect these two phytoplasmas in pear plants and insect vectors, specific primer pairs for multiplex real-time PCR and real-time PCR were designed and applied effectively in this study. The copy number of 16S rDNA of PDTW phytoplasma, which is relatively easier to be cloned from phytoplasma than other genes, was used as a reference sequence to quantify the number of phytoplasma cell in plant tissues. DNA samples previously prepared from PDTW phytoplasma-infected pears that had been confirmed by PCR were reexamined in this study using real-time PCR, and many of them were found to harbor the DNA of PDTWII phytoplasma as well. The results indicated that the co-infection of PDTW and PDTWII phytoplasmas in pear trees and insect vectors may be common in fields. The detection of PD phytoplasmas in pear trees and insect vectors based on the multiplex real-time PCR and real-time PCR showed higher sensitivity than those based on multiplex PCR and conventional PCR, respectively. The real-time PCR-based quantification of PDTW and PDTWII phytoplasmas described in this study can be applied with a great potential to monitor the population fluctuations of these two phytoplasmas in pear trees and insect vectors.

Keywords: pear decline, real-time PCR