

應用 DNA 指紋圖譜鑑別台灣梨葉緣焦枯病菌 與其他寄主來源之 *Xylella fastidiosa*

蘇秋竹^{1,4} 楊文仁^{1,2} 馮鈞育¹ 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、馮鈞育、徐世典、曾國欽。2008. 應用 DNA 指紋圖譜鑑別台灣梨葉緣焦枯病菌與其他寄主來源之 *Xylella fastidiosa*. 植病會刊 17: 261-269.

梨葉緣焦枯病 (pear leaf scorch) 為台灣特有之病害，普遍發生於橫山梨栽植產區，為梨產業之重要限制因子，其病原為 *Xylella fastidiosa*，但梨葉緣焦枯病菌與其他植物來源之 *X. fastidiosa* 菌株間在血清反應上有明顯差異。本研究利用 random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)、enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR) 及 BOX-PCR 等三種 DNA 指紋圖譜技術分析由國內 8 個產區收集之梨葉緣焦枯病菌 30 個菌株及國外 7 種其他寄主植物 *X. fastidiosa* 34 個菌株之 DNA，再利用 NTSYS-pc version 2.0 及 WinBoot 軟體分析，結果顯示梨葉緣焦枯病菌菌株與 7 種其他寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株間之相似值僅為 0.51，而另 7 種其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株間之相似值皆高於 0.70。由此三種指紋圖譜技術分析後加總所得之親緣樹狀圖可將 8 種寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株區分為 4 個菌群，分別為：(1) 梨菌群 (2) 夾竹桃及葡萄菌群 (3) 桑椹菌群 (4) 胡桃樹、李樹、桃樹及無花果菌群。利用此三種指紋圖譜技術可有效鑑別梨葉緣焦枯病菌，並顯示其為 *X. fastidiosa* 菌群中一獨立菌系。

關鍵詞：梨葉緣焦枯病菌、DNA 指紋圖譜分析

緒言

侷限導管細菌 (xylem-limited bacteria) *Xylella fastidiosa* 為絕對好氣性革蘭氏陰性菌，菌體呈直桿狀且具波浪狀細胞壁，需以特殊培養基培養，棲息在植物維管組織導管內⁽³⁶⁾，並可為害許多重要經濟作物，包括柑橘 (citrus)⁽²⁾、葡萄 (grape)⁽⁷⁾、咖啡 (coffee)⁽⁹⁾、苜蓿 (alfalfa)⁽¹⁰⁾、橡樹 (oak)⁽¹²⁾、榆樹 (elm)⁽¹²⁾、無花果 (sycamore)⁽¹²⁾、桑椹 (mulberry)⁽²⁰⁾、梨 (pear)⁽²³⁾、杏仁 (almond)⁽²⁶⁾、李樹 (plum)⁽²⁹⁾、桃樹 (peach)⁽³⁵⁾ 及夾竹桃 (oleander)⁽³⁵⁾ 等，亦可能造成許多都會景觀植物葉緣焦枯病及一些森林樹木衰弱現象⁽¹⁴⁾。

X. fastidiosa 寄主範圍廣，主要分佈於美洲地區，目前分類上 *Xylella* 屬僅此一種⁽³⁶⁾，傳統 *X. fastidiosa* 病原型的判斷主要靠交叉接種來確認，但僅少數寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株被區分為不同菌系^(14, 15)，主要受限於交叉接種費力耗時⁽¹⁶⁾，且 *X. fastidiosa* 被列為國際檢疫病原細菌，菌株取得不易，再加上 *X. fastidiosa* 生長需特殊培養基，無法以生理生化特性用於種內菌系的鑑別。近年來 PCR 延伸相關技術如隨機增幅核酸多型性分析 (random amplified polymorphic DNA, RAPD)⁽³⁷⁾，rep-PCR (repetitive sequence-based polymerase chain reaction) 包括 REP (repetitive

extragenic palindromic elements)、ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus)⁽³²⁾ 及 BOX⁽²⁴⁾ 等相繼應用於植物病原細菌種間及種內菌株鑑別^(1, 3, 11, 13, 18, 19, 24, 27, 28, 30)。

梨葉緣焦枯病自 1990 年在台灣被證實為 *X. fastidiosa* 所引起⁽²²⁾，迄今在全世界其他梨栽培地區未被報導發生，過去研究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^(21, 23)，也無法以 *X. fastidiosa* 之廣效性引子對進行 PCR 鑑定⁽³³⁾。為瞭解梨葉緣焦枯病菌與國外其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株間之遺傳差異性，本研究以 ERIC-PCR、BOX-PCR 及 RAPD 等基因體指紋圖譜技術分析國內不同地區梨葉緣焦枯病菌菌株及國外其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株，以期建立梨葉緣焦枯病菌之分子生物特性資料及比較其與國外其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株間之親緣相關性。

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、新竹縣新埔和三灣、苗栗縣卓蘭、台中縣東勢和后里、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；國外 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，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)，詳細菌株來源如表一所示。

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 的方式加以修改⁽³¹⁾，其步驟如下：挑取供試細菌培養於 PD2 或 LB 液體培養基中，置於 30°C 震盪培養約 72 小時。將培養液置於 50 ml 的離心管以 8,000 rpm 離心 10 分鐘後 (Sigma 3K18, SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Germany)，以 5 ml 的 pett IV [10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1M 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 於 37°C 作用 1~2 小時後再加入 proteinase K (最終濃度 100 μ g/ml)，於 37°C 作用 3~4 小時後，加入等體積之

表一、本研究所使用之細菌菌株

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 |

¹ Total DNAs of *Xylella fastidiosa* strains from different hosts were kindly provided by Dr. C. J. Chang, Department of Plant Pathology, University of Georgia, GA, USA.

phenol/chloroform (phenol:chloroform=1:1) 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)，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，離心 (13,000 rpm, 20 分鐘, 4°C)，或以滅過菌的 tip 挑取，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 溶解放置於 -30°C 備用。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，並將以上之 DNA 濃度調至 20 ng/ μ l，供後續實驗使用。

DNA 指紋圖譜分析

RAPD, ERIC-PCR 及 BOX-PCR 分析

RAPD 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；ERIC-PCR 所採用的引子對為 ERIC/ERIC2⁽³⁴⁾；BOX-PCR 則採用 Koeuth 等人所設計的 BOXAIR⁽⁴⁹⁾，其序列如表二所示。RAPD 反應條件樣式是參照 Albibi 等人⁽¹⁾ 之方法稍加修改如下：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 單位高溫聚合酶與 2 μ l 酵素反應緩衝液 (GeneMark, Taiwan)。以 Peltier thermal cycler PTC200 (MJ Research Inc., MA) 迴溫循環器進行 PCR 反應，增幅條件如下：(a)94°C，1 分鐘，1 個循環；(b)94°C，1 分鐘、40°C，1 分鐘、72°C，2 分鐘，40 個循環；(c)72°C，2 分鐘，1 個循環。ERIC-PCR 與 BOX-PCR 各反應物濃度同上述之 RAPD，反應條件則參照 Qin 等人之方法加以修改⁽²⁸⁾，增幅條件如下：(a)94°C，1 分鐘，1 個循環；(b)94°C，1 分鐘、40°C，1 分鐘、72°C，2 分鐘，40 個循環；(c)72°C，2 分鐘，1 個循環。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 1.5 μ l 的

表二、本研究所使用引子之序列

Table 2. Sequences of primers used in this study

| Primers | Sequence (5'-3') |
|---------|------------------------|
| OPA2 | TGCCGAGCTG |
| OPA3 | AGTCAGCCAC |
| OPA4 | AATCGGGCTG |
| OPA11 | CAATCGCCGT |
| OPA18 | AGGTGACCGT |
| ERIC1R | ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC |
| ERIC2 | AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG |
| BOXAIR | CTACGGCAAGGCGACGCTGACG |

追蹤液，充分混合後，以微量吸管吸出，將其置入以 0.5×TAE 所製成之 1.5% agarose 之樣品槽中，並置入 2.5 μ l 核酸標幟液 (Gen-100 DNA Ladder, GeneMark, Taiwan)，以 100V 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 分鐘後以 BioDoc-It 數位影像系統 (BioDoc-It Gel documentation system, UPV, USA) 照相記錄，選取其中可區分梨葉緣焦枯病菌與國外 *X. fastidiosa* 菌株的引子供進一步分析。

DNA 指紋圖譜數值分析

分別從梨、夾竹桃、胡桃樹、李樹、桃樹、桑椹、葡萄及無花果等 8 種寄主植物，各選取 1 個菌株為代表，記錄各菌株 RAPD、ERIC-PCR 及 BOX-PCR 之增幅 DNA 條帶所呈現的指紋圖譜 (haplotypes)，有條帶則定義為 1，無條帶則定義為 0。以 NTSYS-pc version 2.0 (Exeter Software, NY, USA) 軟體中之 Jaccard's 相似係數 [$SJ = N_{AB} / (N_{AB} + N_A + N_B)$ ，其中 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] 計算菌株之間的相似值 (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 with Arithmetic Averages) 運算進行階層式叢集分析 (dendrogram)，並繪製出關係圖。另使用 WinBoot 程式 (International Rice Research Institute, Manila, Philippines) 對樣本隨機取樣 2000 次，計算各群集 (groupings) 的信賴界限 (confidence limits)。

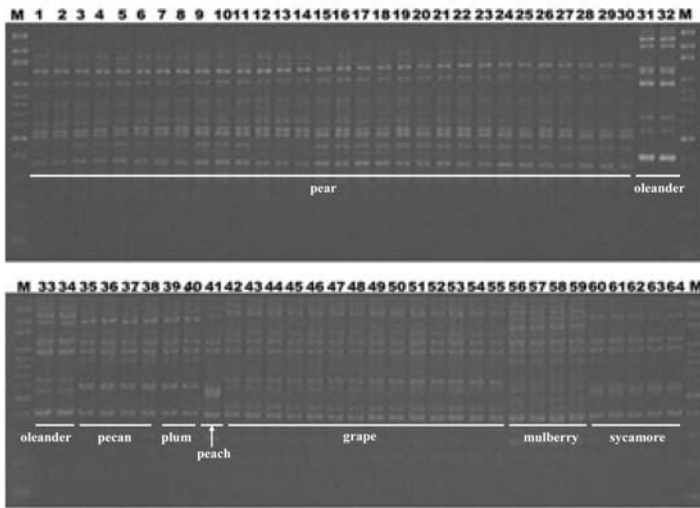
結 果

DNA 指紋圖譜分析

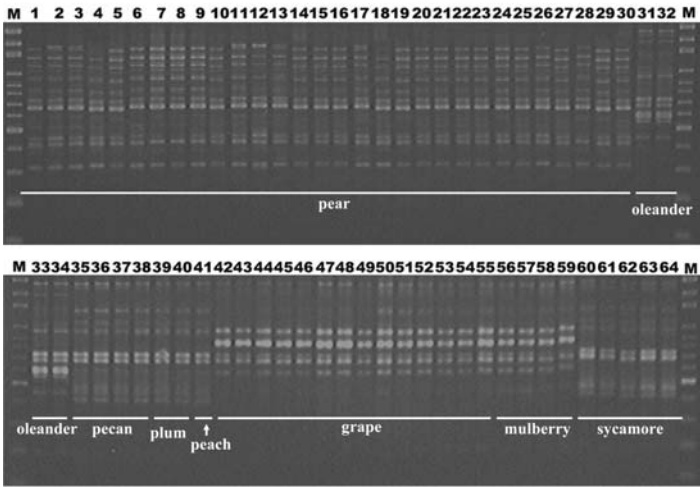
RAPD 分析

初步以 20 個隨機引子針對 8 種寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株，各取 1 個菌株 DNA 共 8 株進行 RAPD 增幅反應，發現有 5 個增幅效果良好且再現性佳之引子，分別是 OPA2、OPA3、OPA4、OPA11 及 OPA18，其序列見表二，進一步以此 5 個隨機引子對 8 種寄主植物共 64 個菌株之 DNA 進行 RAPD 增幅反應，增幅所得之 DNA 指紋圖譜進行遺傳差異性分析。每個引子所增幅的條帶介於 10~21 個之間，所產生的條帶共有 76 條，片段大小介於 200~3,000 bp 之間，同一寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株間由 5 個隨機引子所增幅之基因產物條帶相同，而不同寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株所

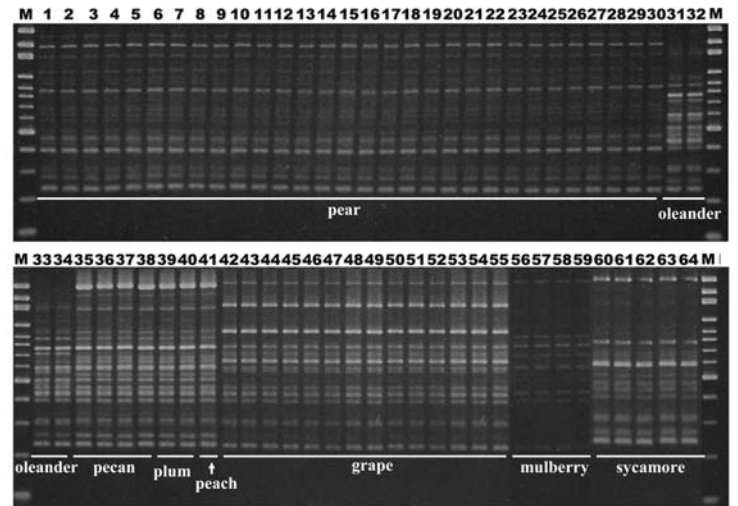
(A) OPA-2



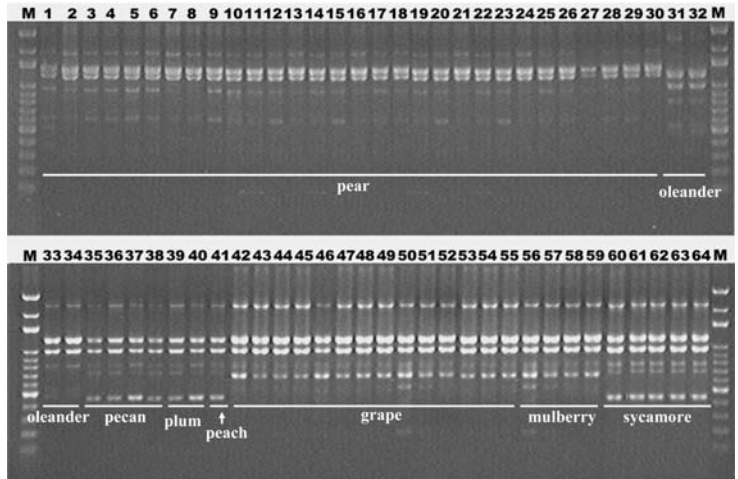
(B) OPA-3



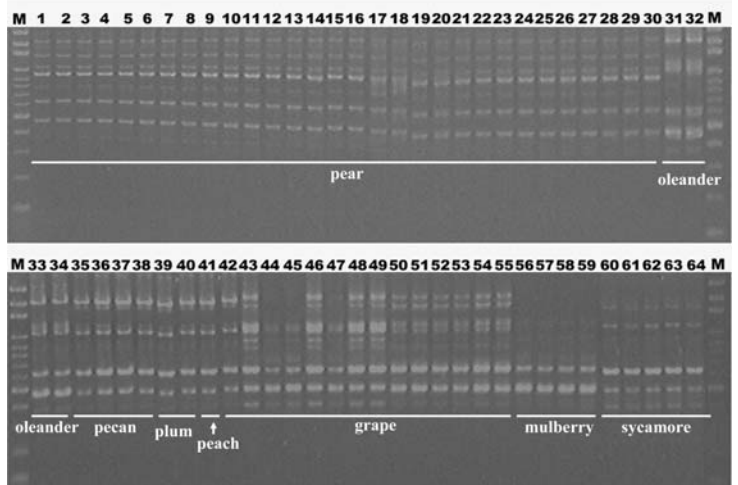
(C) OPA-4



(D) OPA-11



(E) OPA-18



圖一、分別利用5組隨機引子 OPA-2 (A)、OPA-3 (B)、OPA-4 (C)、OPA-11 (D) 及 OPA-18 (E) 對梨葉緣焦枯病菌與國外不同寄主 *Xylella fastidiosa* 菌株作 RAPD 分析後所得之 DNA 指紋圖譜。

Fig. 1. DNA fingerprintings of pear leaf scorch bacterium (PLSB) and strains of *Xylella fastidiosa* from other hosts were generated by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) using random primers OPA-2 (A), OPA-3 (B), OPA-4 (C), OPA-11 (D) and OPA-18 (E). M, Gen-100 DNA ladder. Lanes 1~30: PLSB strains 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: *X. fastidiosa* strains 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, ATCC35869, ATCC35870, ATCC35876, ATCC35879, ATCC35881, Chateau, Mul 1, Mul 7, GHS 505, G9E, SLS 55, SLS 61, SLS 27, SLS DC5, and SLS Mary, respectively.

增幅條帶則有差異，其中梨葉緣焦枯病菌菌株與 7 種其他寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株共通性條帶最少(圖一)。

ERIC-PCR分析

引子對 ERICIR/ERIC2 針對 8 種寄主植物之 *X. fastidiosa* 共 64 個菌株 DNA 進行之 ERIC-PCR 增幅所得指紋圖譜共有 17 條條帶，片段大小約為 100~2,000 bp 之間，同一寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株間由引子對 ERICIR/ERIC2 所增幅之基因產物條帶相同，而不同寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株所增幅條帶則有差異，其中梨葉緣焦枯病菌菌株與 7 種其他寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株共通性條帶最少(圖二)。

BOX-PCR分析

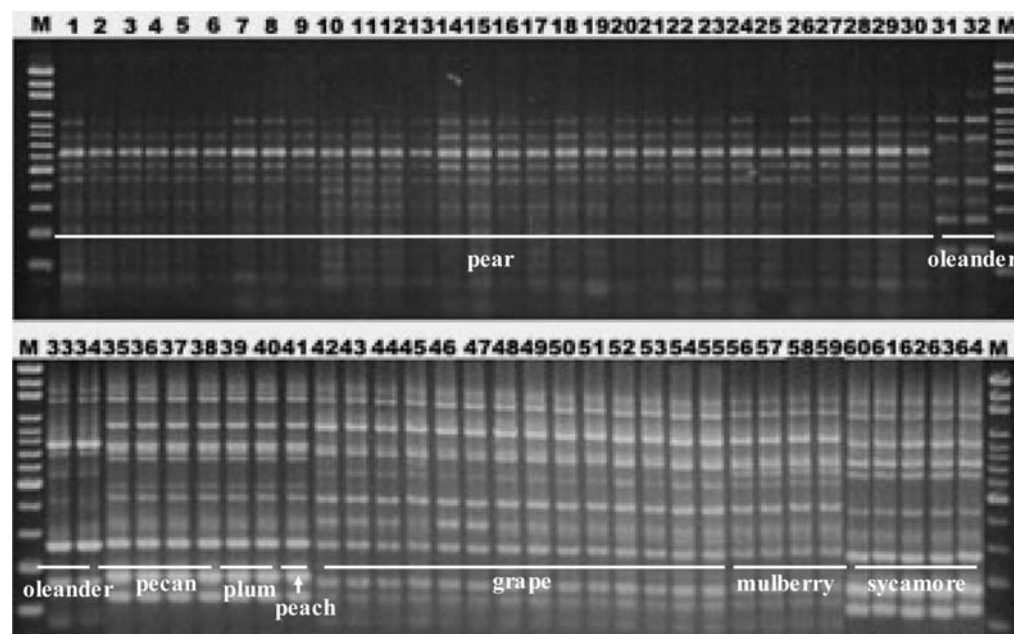
引子 BOXAIR 針對 8 種寄主植物之 *X. fastidiosa* 共 64 個菌株 DNA 進行之 BOX-PCR 增幅所得指紋圖譜共有 17 條條帶，片段大小約為 200~1,500 bp 之間，同一寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株間由引子 BOXAIR 所增幅之基因產物條帶相同，而不同寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株間所增幅條帶則有差異，其中梨葉緣焦枯病菌菌株與 7 種其他寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株共通性條帶最少(圖三)。

DNA指紋圖譜數值分析

以 RAPD、ERIC-PCR 及 BOX-PCR 三種技術針對 8 種寄主植物之 *X. fastidiosa* 共 64 個菌株 DNA 增幅所得之指紋圖譜條帶加總共有 110 個不同的 DNA 指紋樣式 (haplotypes)。利用 NTSYS-pc 軟體分析，結果顯示梨葉緣焦枯病菌菌株與 7 種其他寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株間相關性低 (相似值為 0.51)，而另 7 種其他寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株間之相似值皆高於 0.70；進一步將所有相似值以非加權配對算術法繪製親緣樹狀圖，由所繪製的樹狀圖顯示 8 種寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株可區分為 4 個菌群，分別為：(1)梨菌群 (2)夾竹桃及葡萄菌群 (3)桑椹菌群 (4)胡桃樹、李樹、桃樹及無花果菌群(圖四)。由 WinBoot 程式計算出各群集 (groups) 之 bootstrapping values 則直接標示於親緣樹狀圖中各群集之轉折點。

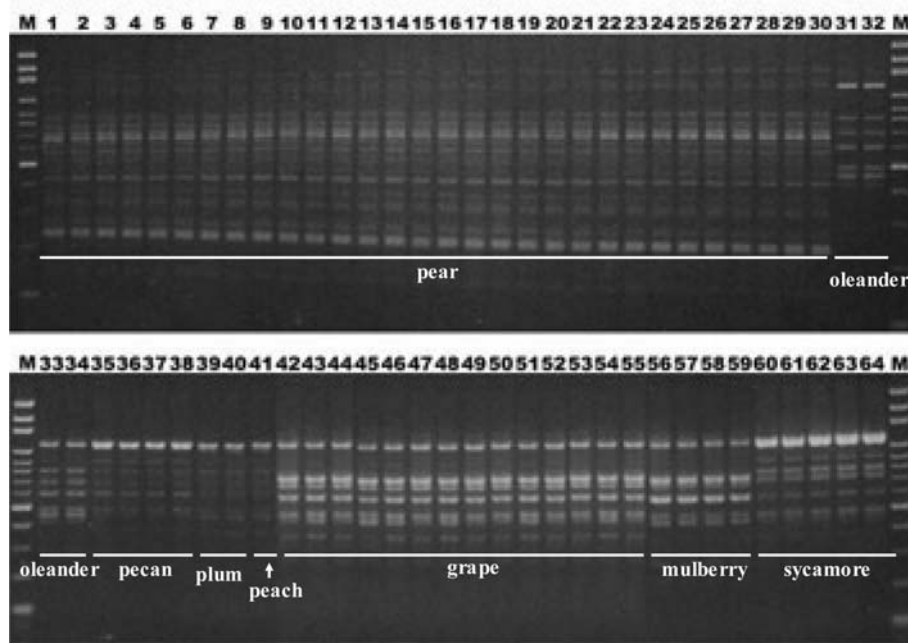
討 論

X. fastidiosa 為寄主範圍廣之植物病原細菌，主要分佈於美洲地區，近年來美洲地區的 *X. fastidiosa* 菌株以 RAPD、ERIC-PCR 及 16S rDNA 等分子技術分析，可將不同寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株區分為不同菌群^(1,3)。



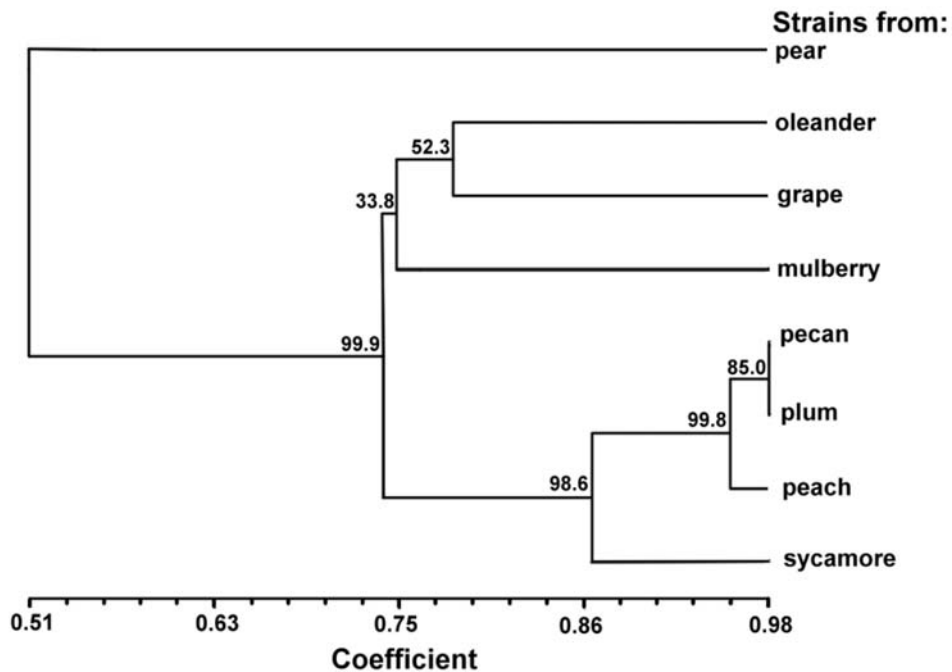
圖二、利用引子對 ERICIR/ERIC2 對梨葉緣焦枯病菌與國外不同寄主植物 *Xylella fastidiosa* 菌株作 ERIC-PCR 分析後所得之 DNA 指紋圖譜。

Fig. 2. DNA fingerprintings of pear leaf scorch bacterium (PLSB) and strains of *Xylella fastidiosa* from other hosts were generated by repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) using primer ERICIR/ERIC2. M, Gen-100 DNA ladder. Strains of *X. fastidiosa* in lanes 1-64 are the same as in Fig. 1.



圖三、利用引子對 BOXAIR 對梨葉緣焦枯病菌與國外不同寄主植物 *Xylella fastidiosa* 菌株 BOX-PCR 分析後所得之 DNA 指紋圖譜。

Fig. 3. DNA fingerprintings of pear leaf scorch bacterium (PLSB) and strains of *Xylella fastidiosa* from other hosts were generated by BOX polymerase chain reaction (BOX-PCR) using primer BOXAIR. M, Gen-100 DNA ladder. Strains of *X. fastidiosa* in lanes 1-64 are the same as in Fig. 1.



圖四、分析梨葉緣焦枯病菌與國外不同寄主植物 *Xylella fastidiosa* 菌株之 RAPD、ERIC-PCR 及 BOX-PCR DNA 指紋圖譜條帶，並經由 NTSYS-pc version 2.0 電腦軟體中的 UPGMA 程式繪製相似值樹狀圖。另由 WinBoot 程式計算出各群集之信賴界限，標示於親緣樹狀圖中各群集之轉折點。

Fig. 4. A dendrogram showing the genetic relationships between strains of pear leaf scorch bacterium and strains of *Xylella fastidiosa* from other hosts based on DNA fingerprintings generated by RAPD、ERIC-PCR and BOX-PCR. Data were analyzed by NTSYS-pc version 2.0 using unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) and confirmed by bootstrapping using WinBoot program.

4, 5, 6, 13, 17, 25, 27, 28, 30), 而不同菌群間似乎皆存有病原性、培養特性及分子特徵差異性。有些學者推測不同 *X. fastidiosa* 菌群的形成可能與寄主植物之特化性有關^(14, 15, 16)。

本研究以 RAPD、ERIC-PCR 及 BOX-PCR 技術對國內採集自 8 個橫山梨產區 30 個梨葉緣焦枯病菌菌株與其他 7 種寄主植物 34 個 *X. fastidiosa* 菌株間進行分析比較, 由 DNA 指紋圖譜及親緣樹狀圖分析結果發現國內梨葉緣焦枯病菌為獨立菌群, 與其他 7 種寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株親緣相關性低; 而 7 種其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株彼此間有親緣相關性 (coefficient > 0.70), 可區分為 3 個菌群, 分別為: (1) 夾竹桃及葡萄菌群 (2) 桑椹菌群 (3) 胡桃樹、李樹、桃樹及無花果菌群, 此結果與國外文獻報導相似, 例如 Pooler 等人以 RAPD 技術將 7 種寄主植物分離之 *X. fastidiosa* 菌株區分為 5 群⁽²⁷⁾, 分別為: (1) 柑橘菌群 (2) 李及榆樹菌群 (3) 葡萄及豬草 (ragweed) 菌群 (4) 杏仁菌群 (5) 桑椹菌群; Qin 等人⁽²⁸⁾ 利用 ERIC-PCR 及 RAPD 技術對來自北美地區及南美地區共 9 個不同寄主植物 57 個 *X. fastidiosa* 菌株進行比較分析, 可將試驗菌株區分為北美 7 種寄主植物菌群及南美柑橘及咖啡菌群, 其中北美菌群可細分為 3 個菌群, 分別為: (1) 桑椹菌群 (2) 葡萄、豬草及杏仁菌群 (3) 榆樹、橡樹及李樹菌群。另由 3 種 DNA 指紋圖譜技術分析結果顯示國內 8 個橫山梨產區之 30 個梨葉緣焦枯病菌菌株間無差異性, 彼此間具同源性, 此結果顯示國內不同地區之梨葉緣焦枯病菌菌株可能來自於同一起源, 但詳細的分子親緣關係仍有待深入探討。

過去研究發現梨葉緣焦枯病菌在血清學及分子特徵與國外其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株間有極大差異^(21, 23, 33), 本研究再利用 3 種 DNA 指紋圖譜技術鑑別梨葉緣焦枯病菌與其他寄主來源的 *X. fastidiosa* 不同, 這些差異性顯示台灣梨葉緣焦枯病菌是 *X. fastidiosa* 菌群中一獨立菌群, 至於梨葉緣焦枯病菌是否可能為 *Xylella* 屬的新種, 則需進一步利用 16S rDNA 序列分析、16S-23S rDNA 區間序列分析及 DNA 同源性 (DNA-DNA hybridization) 等分析後, 才能釐清其分類地位。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

- 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.
- Chang, C. J., Garnier, M., Zreik, L., Rossett, I. 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., Banks, D., Jarret, R. L., Chang, C. J., and Smith, B. J. 2000. 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. Phytopathology 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. 2000. 16S rDNA sequence analysis of *Xylella fastidiosa* strains. System. Appl. Microbiol. 23:349-354.
- 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 Lina, 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.
- Gómez Zavaglia, A., De Urraze, P., and De Antoni, G. 1999. Characterization of Bifidobacterium strains using Box primers. Anaerobe 6:169-177.
- 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 Pierce's disease strains and other pathotypes of *Xylella fastidiosa*. Appl. Environ. Microbiol. 67:895-903.
- Hopkins, D. L. 1989. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. Annu. 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.
16. 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.
 17. 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.
 18. Kim, W., Hong, Y., Yoo, J., Lee, W., Choi, C., and Chung, S. 2001. Genetic relationship of *Bacillus anthracis* and closely related species BOX-PCR genomic fingerprinting. *FEMS Microbiol. Letters.* 207:21-27.
 19. Koeuth, T., Versalovic, J., and Lupski, J. R. 1995. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res.* 5:408-418.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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)
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. Pooler, M. R., and Hartung, J. S. 1995. Genetic relationships among strains of *Xylella fastidiosa* from RAPD-PCR data. *Curr. Microbiol.* 31:134-137.
 28. Qin, X., Miranda, V. S., Machado, M. A., Lemos, E. G. M., and Hartung, L. 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.
 29. 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.
 30. 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.
 31. 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.
 32. Sharples, G. J., and Lloyd, R. G. 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 18:6503-6508.
 33. 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)
 34. Versalovic, J., Koeuth, T., and Lupski, J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19:6853-6831.
 35. 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.
 36. 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.* 37:136-143.
 37. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.

ABSTRACT

Su, C. C.^{1,4}, Yang, W. J.^{1,2}, Feng, C. Y.¹, Hsu, S. T.^{3,5}, and Tzeng, K. C.³ 2008. The application of DNA fingerprintings amplified by arbitrary primers in differentiating pear leaf scorch bacterium from other *Xylella fastidiosa* strains. Plant Pathol. Bull. 17: 261-269. (¹ Department of Pesticide Application, Agricultural and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan; ² Keelung Branch Office, Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Taiwan; ³ Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; ⁴ Corresponding author, Email: auba@tactri.gov.tw, Fax: +886-4-2332-1478, ⁵ Corresponding author, Email: Sthsu@mail.nchu.edu.tw, Fax:+886-4-2287-7585)

Pear leaf scorch (PLS) disease, the only *Xylella fastidiosa*-induced disease reported in Taiwan, is commonly found in areas where the pear variety Hengshan (*Pyrus pyrifolia*) is grown. PLS disease is an important limiting factor for pear cultivation in Taiwan. Early serological study shows differences between strains of PLS bacterium and strains of *X. fastidiosa* from other hosts. In this study, DNA fingerprintings generated by random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) 、enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR) and BOX-PCR were used to compare 30 strains of PLS bacteria with 34 strains of *X. fastidiosa* isolated from oleander, pecan, plum, peach, mulberry, grape, and sycamore. The DNA fingerprintings of all strains were analyzed by NTSYS-pc, and the Jaccard's similarity coefficient (Sj) of 0.51 was obtained between strains of PLS bacterium and other *X. fastidiosa* strains. The constructed dendrograms showed that all strains of PLS bacterium were clustered together and separate from other *X. fastidiosa* strains, and the latter were clustered into three groups: one consisted of mulberry strains, another consisted of grape and oleander strains, and the third comprised pecan, plum, peach and sycamore strains. Our results indicate that the DNA fingerprintings amplified by arbitrary primers are useful to differentiate pear leaf scorch bacteria from other *X. fastidiosa* strains.

Key words: pear leaf scorch bacterium, *Xylella fastidiosa*, DNA fingerprinting