

台灣梨衰弱病菌質體檢測技術之研發與應用

劉秀玲¹ 林長平^{1,2}

¹ 臺北市 國立台灣大學植物病理與微生物學系

² 聯絡作者：電子郵件 cplin@ntu.edu.tw，傳真：+886-2-2366-1980

接受日期：中華民國 96 年 1 月 12 日

摘要

劉秀玲、林長平. 2007. 台灣梨衰弱病菌質體檢測技術之研發與應用. 植病會刊 16 : 1-10.

從 1994 年六月起，台灣中部梨樹栽培區發生台灣梨衰弱病 (pear decline in Taiwan, PDTW)，其病徵表現與國外發表之梨衰弱病 (pear decline) 極為相似，皆會引起罹病植株出現紅葉、衰弱萎凋等病徵，嚴重時造成植株死亡。經由針對該病原之核糖體 RNA 基因序列 (rDNA) 進行研究，本研究已證實此病害係由屬於 apple proliferation group (group 16SrX) 之台灣梨衰弱病菌質體 (PDTW phytoplasma) 所引起。本研究利用南方雜配實驗，證實 PDTW phytoplasma 之核糖體 RNA 基因於基因體中應具二重複套組，適合做為檢測用之標的序列。研究中亦針對此 PDTW phytoplasma 之 rDNA 陸續開發出多項聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 之檢測技術，其中包括專一性放大式聚合酵素連鎖反應 (specific booster PCR)、多引子聚合酵素連鎖反應 (multiplex PCR)、巢式聚合酵素連鎖反應 (nested PCR) 與 PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism) 等，可供田間罹病梨株、媒介昆蟲及梨接穗之病原菌檢測。本研究並由 2002 年至 2004 年完成歷時 3 年之各月份罹病梨樹中 PDTW phytoplasma 之 PCR 偵測調查，以瞭解罹病梨樹中 PDTW phytoplasma 含量之季節性變化，結果顯示罹病梨樹中 PDTW phytoplasma 之檢出率於春季三至五月間開始上升，夏季六至九月份間為病原菌檢出率最高，而冬季落葉期之檢出率則降為零。

關鍵詞：台灣梨衰弱病菌質體、聚合酵素連鎖反應、核糖體 RNA 基因、季節性變化

緒言

從 1994 年六月起，台灣中部東勢、和平兩地梨樹栽培區陸續發生台灣梨衰弱病 (pear decline-Taiwan, PDTW)，其病徵表現與國外發表由植物菌質體造成之梨衰弱病 (pear decline) 極為相似，皆會引起罹病植株出現紅葉、衰弱萎凋等病徵，嚴重時造成植株死亡，但台灣梨衰弱病之紅葉病徵具兩側葉緣往向軸 (adaxial) 內捲約 30 度之現象，其與國外梨衰弱病發病初期葉片近葉柄部位先內捲，再逐漸由葉尖的方向往背軸 (abaxial) 往外翻捲至 70 度形成鉤狀的徵狀具顯著差異^(2, 30, 31)。目前已知造成歐洲與北美地區梨衰弱病之植物病原菌質體屬於 apple proliferation group^(25, 26, 31)，其所引起的病徵可區分成三類型：快速萎凋型 (quick decline)、緩慢衰弱型 (slow decline) 及捲葉型 (leaf curl)。快速

萎凋型即植株罹病後快速萎凋，葉片轉成暗紅、乾燥，罹病株在幾天至數週內死亡。然而有些病株在呈現快速萎凋型前，會先表現緩慢衰弱型，紅葉 (reddening) 及捲葉 (leaf curl) 等病徵。快速萎凋型較易出現在夏秋兩季，或病株面臨乾熱的環境壓力時，也有助於此類病徵之表現^(30, 31)。此一植物菌質體病害，可經由嫁接 (grafting) 及媒介昆蟲 (*Cacopsylla pyricola* 改名前稱為 *Pylla pyricola* Foerster)^(1, 5, 17) 進行傳播。關於台灣梨衰弱病之病因探討，則經由本研究室就台灣梨衰弱病病原之核糖體 RNA 基因序列 (rDNA) 進行研究，確定此一病害乃由屬於 apple proliferation group (group 16SrX) 之台灣梨衰弱病菌質體 (PDTW phytoplasma) 所引起⁽²⁴⁾。

近年來，隨著聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術的研發^(8, 27)，提供了研究者一個更快

速、靈敏的方法來偵測植物菌質體^(4, 6)。聚合酵素連鎖反應是在試管 (*in vitro*) 中，對一特定標的 DNA (target DNA) 所進行之 DNA 序列增幅反應，以期獲得大量之標的 DNA 片段以利分析。本研究即針對 PDTW phytoplasma 核糖體 rRNA (rDNA) 基因序列進行探討，實驗中除利用南方氏雜配實驗針對此病原菌之 rDNA 套組數進行研究外，並針對 PDTW phytoplasma 之 rDNA 開發出多種快速靈敏之聚合酵素連鎖反應檢測策略。配合上述檢測技術之研發，本研究於 2002 至 2004 年間進行各月份罹病梨株內 PDTW phytoplasma 之 PCR 偵測調查，以探討罹病梨株中病原菌之含量與季節性變化之相關性。

材料與方法

試驗植物材料來源與植物全 DNA (total DNA) 之純化

試驗植物研究材料取自於東勢、和平等地之梨樹果園，經台中區農業改良場陳慶忠博士協助，藉由目測觀察，針對出現異常紅葉及萎凋等台灣梨衰弱病病徵之罹病株進行標定採樣。梨樹全 DNA 之純化係採用富聯生技公司之 Plant Genomic DNA Extraction Maxiprep System (Viogene-Biotek Corporation, Taipei, Taiwan) 套組 (kit)，其方法稍做修改後進行：收集數十片葉片中肋之中段共 1.5 g 以液態氮研磨，加入 6 ml 經 65 °C 預熱之 PX1 buffer 與 RNase A (使其最終濃度為 100 µg/ml)，置於 65 °C 水浴 10 分鐘，再加入 2 ml 之 PX2 buffer，置於冰浴 5 分鐘，於室溫下以 6,000 rpm 離心 10 分鐘 (TJ-25 centrifuge, Beckman Coulter Inc.,

Palo Alto, CA) 以去除植物組織殘渣，取上清液加入等體積 CIAA 進行 2-3 次之萃取 (extraction) 後，先將含 DNA 之上層液移至新的離心管中待用，同時取上層液 0.5 倍體積之 PX3 buffer 以及上層液等體積之 95 % 酒精 (已在 -20 °C 中預冷) 先行混和後，再加入待用之上層液中，以進行 DNA 沉降作用。後續實驗即依套組建議方法進行。每年於落葉期若無法取得葉片組織時，則以新芽、花苞或枝條韌皮部組織進行全 DNA 之純化。

南方氏轉漬 (Southern blotting) 及雜配反應 (hybridization)

核酸探針 (DNA probe) 之標識 (label) 反應係採用 Roche Molecular Biochemicals 公司 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) 所開發之 PCR DIG probe synthesis kit 進行，製備核酸探針時利用依據 PDTW phytoplasma 16S rDNA 序列設計之引子對 f1/r1n (表一) 進行 PCR 反應，其 PCR 反應條件列於表二。進行南方氏雜配試驗時，取 5 µg 罹病梨樹之植物全 DNA，分別以 10 單位之 *Bam*HI, *Bg*III, *Cla*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Sma*I, *Xba*I, *Xho*I 限制酵素 (Roche Molecular Biochemicals) 進行酵解；另外，取 5 µg 健康梨樹全 DNA 以 10 單位之 *Eco*RI 限制酵素進行酵解以作為對照組。上述酵解產物以 0.8 % 瓊脂凝膠在 1x TAE 緩衝液中，以 1 V/cm 的電壓進行水平式電泳約 13 小時，並將 DNA 轉漬至 Nylon 濾膜 (HybondTM-N+, 0.45 µm, Nylon transfer membrane, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)，隨後即進行雜配及呈色反應^(3, 18)。

表一、本研究中台灣梨衰弱病菌質體偵測用 PCR 引子之核酸序列

Table 1. Sequences of oligonucleotide primer pairs applied in the PCR-based detection strategies of PDTW phytoplasma in this study

Primer	Sequence (5' to 3')	Position ^a	Length (mer)
f1	AGTGGCGAACGGGTGAGTAA	78-97	20
r1	CGTCAGTAAAGACCCAGCAA	716-735	20
r1n	CGTCAGTTAAGACCCAGCAA	716-735	20
P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	1-25	25
P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	1767-1784	18
fPD1	GACCCGCAAGGGTATGCTGA	192-211	20
rPDS1	CCAAGCCATTATTAATTTTAA	1574-1594	21
Apf1	GTGTTGGGTAAACCAGTGC	810-829	20
Apf2	GATGAGTACTAAGTGTGGG	798-817	20
L1n	CAAGGCATCCACTGT	1747-1761	15

^a The numbers of positions are the corresponding nucleotide numbers of the *rrn* (ribosomal RNA operon) sequence of the PDTW phytoplasma (GenBank accession number DQ011588).

表二、各引子對所使用之聚合酵素連鎖反應條件

Table 2. The PCR thermocycling parameters used in this study for different PCR primer pairs

PCR parameter	Primer pairs				
	f1/ r1, f1/ r1n	P1/ P7	fPD1/ rPDS1	Apf1/ rPDS1	Apf2/ L1n
Preheat ^a	94 °C, 5 min	95 °C, 5 min	95 °C, 5 min	95 °C, 5 min	95 °C, 5 min
Denaturation	94 °C, 5 sec	95 °C, 30 sec	95 °C, 30 sec	95 °C, 30 sec	95 °C, 30 sec
Annealing	58 °C, 10 sec	60 °C, 60 sec	55 °C, 45 sec	55 °C, 30 sec	62 °C, 30 sec
Extension	72 °C, 10 sec	72 °C, 90 sec	72 °C, 60 sec	72 °C, 45 sec	72 °C, 45 sec
Cycle No.	40	35	35	35	35
Last incubation	72 °C, 3 min	72 °C, 10min	72 °C, 4 min	72 °C, 4 min	72 °C, 4 min

^a PCR reaction tubes were preheated before the first cycle of PCR.

台灣梨衰弱病菌質體專一性聚合酵素連鎖反應 (specific PCR) 檢測技術之研發

台灣梨衰弱病專一性聚合酵素連鎖反應乃是在試管中，針對台灣梨衰弱病罹病梨樹之全 DNA 模版，在專一性引子對存在下所進行之增幅反應，以期獲得大量之 PDTW phytoplasma rDNA 片段以利分析。本研究依據本實驗室登錄之 PDTW phytoplasma 之 rDNA 序列 (GenBank accession number DQ11588)，設計 PDTW phytoplasma 專一性引子對 Apf1/ rPDS1 (表一)。聚合酵素連鎖反應中分別取健康梨樹植株全 DNA、罹病梨樹植株全 DNA 及分別感染花生簇葉病 (PnWB) 與甘藷簇葉病 (SPWB) 之日日春全 DNA 各 50 ng 做為模版 DNA，引子對 Apf1/ rPDS1 濃度均為 0.5 μ M，反應條件如表二所列。反應結束後取 10 μ l PCR 產物以 1% 瓊脂凝膠進行水平電泳，並以 EtBr 染色觀察聚合酵素連鎖反應的結果。若 PCR 產物不穩定或產量稀少時，則可取上述 PCR 產物稀釋 10-100 倍後，取其 1 μ l 作為模版 DNA，並依循上述反應步驟以放大式 PCR (booster PCR) 執行第二次 35 個循環，以增加 PCR 產物之產量。

台灣梨衰弱病菌質體多引子聚合酵素連鎖反應 (multiplex PCR) 檢測技術之研發

台灣梨衰弱病多引子聚合酵素連鎖反應乃針對台灣梨衰弱病罹病梨樹之全 DNA 模版，在多對不同序列之引子同時存在之狀況下所進行之 PCR 增幅反應，以期於單一反應試管及相同反應條件下，同時獲得二種以上位於 rDNA 不同區域 (region) 之 PDTW phytoplasma rRNA 基因序列之大量 PCR 產物^(15, 32)。在本操作流程中，在一反應管同時加入植物菌質體廣用型引子對 f1/ r1^(16, 23) (表一) 及 PDTW phytoplasma 專一性引子對 Apf1/ rPDS1 (表一)，以期提高偵測之精確度。聚合酵素連鎖反應中分別取健康梨樹植株全 DNA、罹病梨樹植株全 DNA 及感染花生簇葉病之日日

春植株全 DNA 各 50 ng 做為模版 DNA，f1/ r1 濃度均為 0.25 μ M，Apf1/ rPDS1 濃度均為 0.75 μ M，反應條件如下：95 °C 30 秒，57 °C 30 秒，72 °C 45 秒。反應結束後取 10 μ l PCR 產物以 1% 瓊脂凝膠進行水平電泳，並以 EtBr 染色觀察聚合酵素連鎖反應的結果。

台灣梨衰弱病菌質體巢式聚合酵素連鎖反應 (nested PCR) 檢測技術之研發

此實驗設計之主要依據為第一階段 PCR 反應引子對之增幅序列內必須包含第二階段 PCR 反應之引子對序列^(10, 12, 33)，故當第一階段之 PCR 增幅產物過於微弱而無法由肉眼辨識時，即可藉由第二階段 PCR 反應加以擴充，以達到可供辨識之 PCR 產量，提高偵測之靈敏度，並可藉由不同屬性引子對之組合達致實驗目的。本方法中第一階段使用之引子對為植物菌質體之廣用型引子對 P1/ P7^(8, 29)，第二階段使用之引子對為 PDTW phytoplasma 之專一性引子對 Apf1/ rPDS1，其序列包含於 P1/ P7 引子對所增幅之 PCR 片段序列中。第一階段聚合酵素連鎖反應中分別取健康梨樹植株全 DNA、罹病梨樹植株全 DNA 及感染花生簇葉病之日日春全 DNA 各 50 ng 做為模版 DNA，引子對 P1/ P7 濃度均為 0.5 μ M，以表二所列之反應程序進行第一階段 PCR 反應。第二階段反應採用之 DNA 模版則為第一階段之 PCR 產物稀釋 100-1000 倍後，取 1 μ l 稀釋液做為模版 DNA，引子對 Apf1/ rPDS1 濃度為 0.5 μ M，以表二所列之反應程序進行第二階段 PCR 反應。反應結束後取 10 μ l PCR 產物以 1% 瓊脂凝膠進行水平電泳，並以 EtBr 染色觀察聚合酵素連鎖反應的結果。

台灣梨衰弱病菌質體 PCR-RFLP 檢測分析 (PCR-restriction fragment length polymorphism)

將 PDTW phytoplasma 之 PCR 產物以限制酵素酶解，進行限制酵素酶解片段多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析，藉此可進一步佐證

PCR 反應所增幅出之產物確為欲偵測之 PDTW phytoplasma 目標 rRNA 基因序列，而無須再經由基因選殖及序列定序分析之步驟。聚合酵素連鎖反應中分別取健康梨樹植株全 DNA、罹病梨樹植株全 DNA 及感染花生簇葉病日日春全 DNA 各 50 ng 做為模版 DNA，PDTW phytoplasma 專一性引子對 fPD1/ rPDS1⁽²⁴⁾ 濃度均為 0.5 μ M，以表二所列之反應程序進行聚合酵素連鎖反應。PCR 反應完成後，取 PCR 產物以 1 單位限制酵素 *cfoI* (Roche Molecular Biochemicals) 進行酵解反應。反應結束後分別取 10 μ l PCR 酵解產物以 1% 瓊脂凝膠進行水平電泳，並以 EtBr 染色觀察聚合酵素連鎖反應酵解後的結果。

各月份罹病梨樹中台灣梨衰弱病菌質體之偵測調查

本實驗由台中區農業改良場陳慶忠博士協助進行各月份田間罹病植株採樣，全程自 2002 至 2004 年歷時三年完成。2002 年分別於大雪山林道 13K、15K 及和平崑崙段三處發病梨園進行台灣罹病梨樹植株之標定，2003 年六月再加入慶福里一處。每棵台灣梨衰弱病罹病植株標記三枝主幹，並隨機由三主幹上採集葉片，進行植物全 DNA 之抽取，以避免因病原菌於罹病梨株中分佈不均之情況影響到實驗結果。於 2002 年本研究初期乃利用植物菌質體廣用型引子對 f1/ r1^(22, 23) (表一)，針對出現衰弱病徵之罹病梨樹全 DNA 進行 PCR 反應。2003 年加入本研究所研發之 PDTW phytoplasma 專一性引子對 Apf1/ rPDS1；2004 年再加入 PDTW phytoplasma 專一性引子對 Apf2/ L1n⁽²⁴⁾ (表一)，以 PCR 或放大式 PCR (booster PCR) 偵測策略進行二重複試驗。PCR 反應方式如前述，各反應條件如表二所列，以完成罹病植株內 PDTW phytoplasma 之月份偵測實驗。

結 果

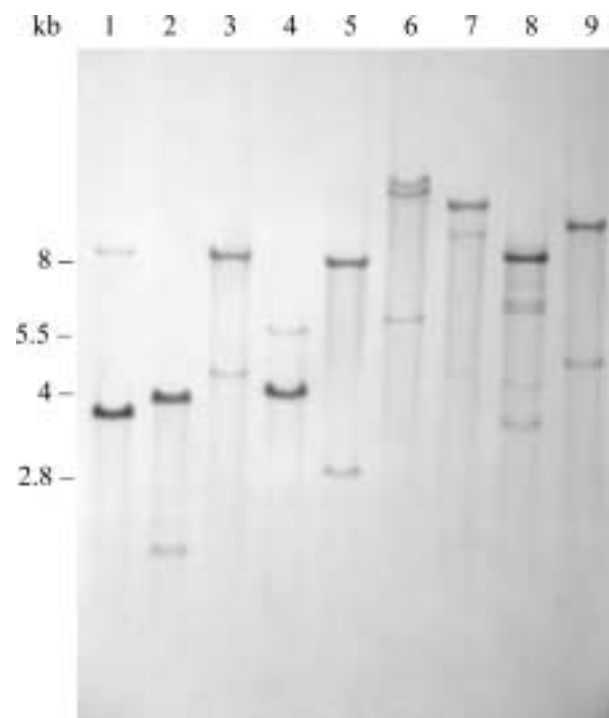
植物全DNA之純化

經利用本研究改良之梨樹全 DNA 純化方法，結果顯示每年 3 月至 11 月份，可由 1.5 g 的罹病梨樹葉片中肋組織中純化得到約 3 μ g 無色透明略帶黏稠狀之 DNA，其 OD 值介於 1.5 至 1.8 之間。而冬季 12 月至翌年 2 月梨樹處於落葉期或只萌芽少數新芽(花苞)，此一時期落葉植株多無法採集到實驗所需之葉片數量，或完全無葉片可供實驗，吾人即收集枝條之韌皮部進行全 DNA 之萃取，實驗結果顯示若以枝條韌皮部

進行全 DNA 之抽取極為困難，由 1.5 g 的枝條韌皮部組織萃取得之 DNA 含量皆少於 500 ng。而當以新芽或花苞進行全 DNA 之萃取時，所得 DNA 之含量極少(約 20-50ng) 且質量較差，其產物呈現黃褐黏稠狀，OD 值多低於 1.5。

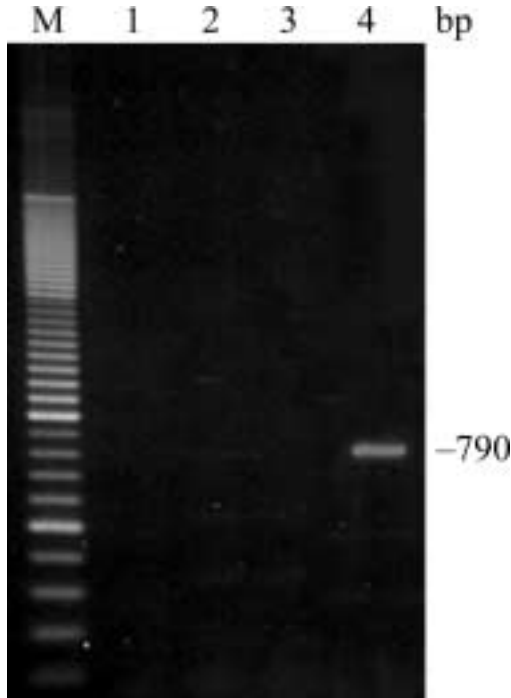
南方氏轉漬及雜配反應

以引子對 f1/ r1n 增幅出具 DIG 標識之 PDTW phytoplasma 16S rDNA 基因片段作為探針進行南方氏轉漬及雜配反應時，其結果顯示此探針可對罹病梨樹之植物全 DNA 產生雜配訊號，其中以限制酵素 *EcoRI* 酵解者，可在約 4 kb 及 5.5 kb 之 DNA 片段處產生雜配訊號；以限制酵素 *HindIII* 酵解者，可在約 2.8 kb 及 8 kb 之 DNA 片段處產生雜配訊號，而以其餘幾種限制酵素酵解者亦皆在 2 個 DNA 片段處產生雜配訊號(圖



圖一、對台灣梨衰弱病罹病株全 DNA 以不同限制酵素酵解後利用以 f1/ r1n 引子對所增幅之 16S rDNA 部分序列為核酸探針進行南方氏轉漬雜配分析。

Fig. 1. Southern blot analysis of total DNA (5 μ g per lane) prepared from PDTW-phytoplasma affected pear digested with restriction enzymes *Bam*HI (lane 1), *Bg*III (lane 2), *Cla*I (lane 3), *Eco*RI (lane 4), *Hind*III (lane 5), *Pst*I (lane 6), *Sma*I (lane 7), *Xba*I (lane 8), *Xho*I (lane 9). Restricted fragments were separated in a 0.8% agarose gel. Hybridizations were conducted at 68 $^{\circ}$ C using the PCR DIG-labeled partial 16S rRNA gene probe amplified with primers f1/ r1n. Sizes (in kb) of the hybridization signals are shown on the left.



圖二、利用台灣梨衰弱病菌質體專一性引子對 Apf1/ rPDS1 進行梨樹罹病株 PCR 試驗之 PCR 產物。
 Fig. 2. Polymerase chain reaction (PCR) product amplified by using PDTW phytoplasma-specific primers Apf1/ rPDS1 with the DNA templates extracted from PnWB-phytoplasma infected periwinkle (lane 1), SPWB-phytoplasma infected periwinkle (lane 2), healthy pear (lane 3) and PDTW-phytoplasma infected pear (lane 4). PCR products were separated in a 1% agarose gel. M, 100 bp DNA ladder (Bayou Biolabs, Harahan, LA) as molecular weight standards. Size (in bp) of PCR product is shown on the right.

一)；相對的，對健康梨樹之全 DNA 則沒有任何雜配訊號出現(結果未示出)。

台灣梨衰弱病菌質體專一性聚合酵素連鎖反應

利用 PDTW phytoplasma 專一性引子對 Apf1/ rPDS1，分別以健康梨株及罹病梨株及感染花生簇葉病日日春之全 DNA 作為模板 DNA，進行專一性聚合酵素連鎖反應，結果顯示只有罹病梨株會出現一長度約為 790 bp 之專一 DNA 片段(圖二)，而無法於健康梨株及感染他種植物菌質體之日日春全 DNA 中增幅任一 PCR 產物。本研究即以此專一性 PCR 偵測策略，或再配合放大式 PCR (booster PCR) 偵測策略，進行罹病梨株中 PDTW phytoplasma 之月份偵測調查實驗。

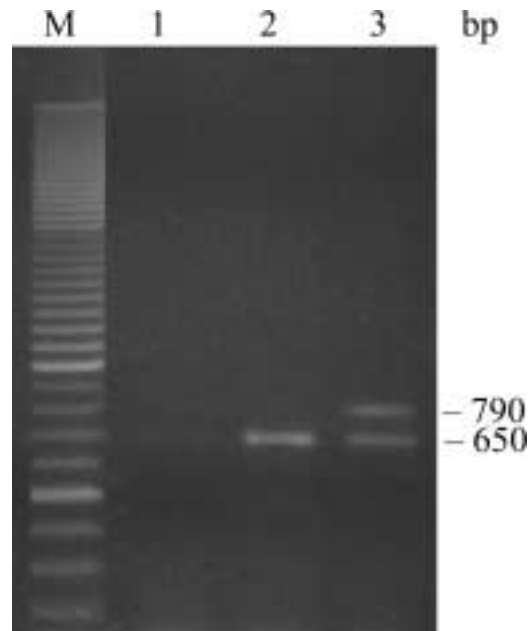
台灣梨衰弱病菌質體多引子聚合酵素連鎖反應

配合植物菌質體廣用型引子對 f1/ r1 及 PDTW

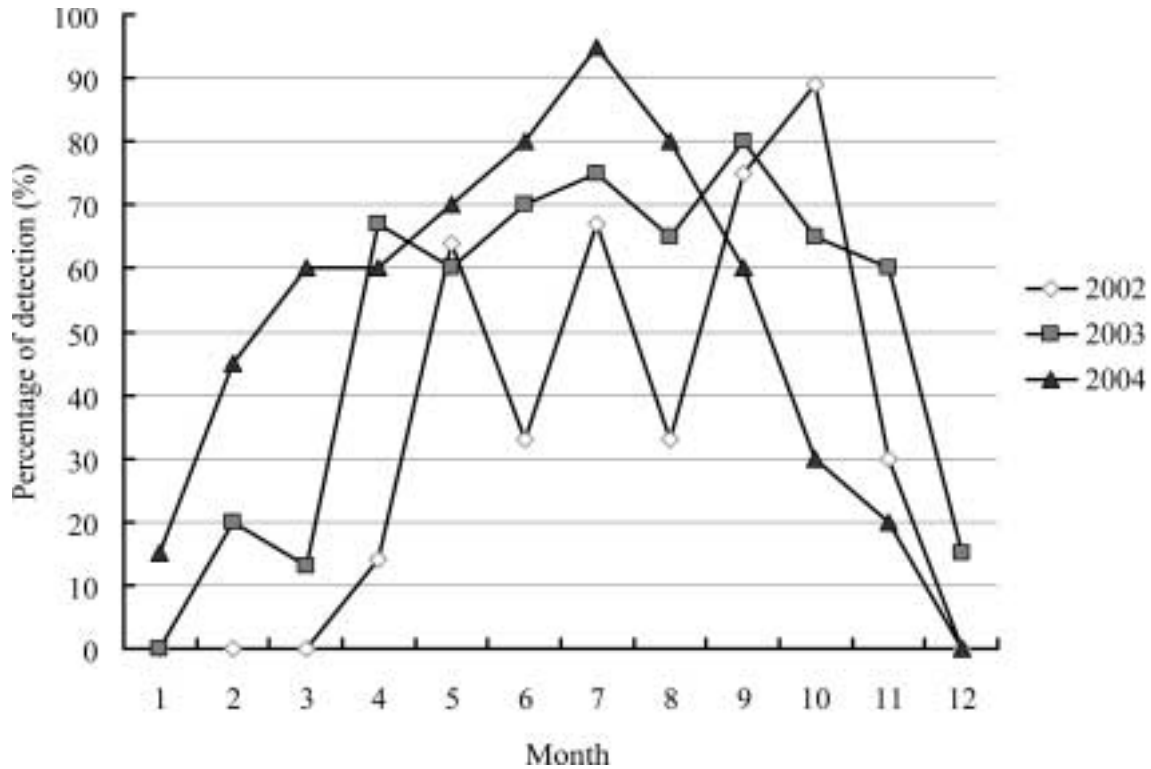
phytoplasma 專一性引子對 Apf1/ rPDS1，於單一反應試管及相同 PCR 反應條件下進行實驗，結果顯示只要感染植物菌質體之罹病植株，無論是受到 PDTW phytoplasma 感染之梨樹或是受到花生簇葉病感染之日日春植株，皆可以植物菌質體廣用型引子對 f1/ r1 增幅出大小約為 650 bp 之 PCR 產物(圖三)，但只有受到 PDTW phytoplasma 感染之罹病梨株才會出現由 PDTW phytoplasma 專一性引子對 Apf1/ rPDS1 所增幅出大小約 790 bp 之 PCR 片段產物，而由他種植物病原菌質體如花生簇葉病菌質體則無法增幅出此一 PCR 產物(圖三)。

台灣梨衰弱病菌質體巢式聚合酵素連鎖反應

以第一階段 PCR 反應引子對 P1/ P7 配合第二階段 PCR 反應之引子對 Apf1/ rPDS1 進行巢式聚合酵素連鎖反應，實驗結果顯示只要感染植物菌質體之罹病植株，無論是受到 PDTW phytoplasma 感染之梨樹亦或是受到花生簇葉病感染之日日春植株，皆可以植物菌質



圖三、台灣梨衰弱病菌質體 multiplex PCR 試驗之 PCR 產物。
 Fig. 3. Multiplex PCR product amplified by using phytoplasma universal primers f1/ r1 and PDTW phytoplasma-specific primers Apf1/ rPDS1 with the DNA templates prepared from healthy pear (lane 1), PnWB-phytoplasma infected periwinkle (lane 2) and PDTW-phytoplasma infected pear (lane 3). PCR products were separated in a 1% agarose gel. M, 100 bp DNA ladder (Bayou Biolabs, Harahan, LA) as molecular weight standards. Sizes (in bp) of PCR products are shown on the right.



圖四、台灣梨衰弱病罹病植株各月份病原菌質體之偵測率。
 Fig. 4. The monthly variation of the percentage of PCR-based detection of PDTW phytoplasma in diseased pear trees in three consecutive years.

體廣用型引子對 P1/ P7 增幅出約為 1,800 bp 之 PCR 產物。分別將第一階段 PCR 產物進行稀釋，再以 PDTW phytoplasma 專一性引子對 Apf1/ rPDS1 進行第二階段巢式 PCR，結果顯示只有受到 PDTW phytoplasma 感染之罹病梨株會出現大小約為 790 bp 之 PCR 專一性產物(結果未示出)。

台灣梨衰弱病菌質體PCR-RFLP分析

PDTW phytoplasma 之 PCR-RFLP 分析實驗結果顯示，以台灣梨衰弱病罹病梨株全 DNA 做為模板時，可利用 fPD1/ rPDS1 增幅出一大小約 1,400 bp 之 PCR 產物，此一 PCR 產物再經過限制酵素 *cfoI* 之酵解作用後，即會出現二條大小分別約 500 bp 與約 900 bp 之酵解片段，此一結果即可確定罹病株受到 PDTW phytoplasma 感染；而受到花生簇葉病感染之日日春或健康梨株，則無法藉由 PDTW phytoplasma 專一性引子對 fPD1/ rPDS1 增幅出任何 DNA 片段(結果未示出)。

各月份罹病梨樹中台灣梨衰弱病菌質體之偵測調查

本實驗於 2001 年底標定大雪山林道 13K、15K 及

和平崑崙段三處發病梨園共 10 棵罹病梨株，進行罹病植株內病原菌月份偵測實驗，然而於 2002 年實驗期間吾人所標定之發病梨株除因病勢嚴重導致死亡外，部份則因政府大力實施罹病株砍除之防疫措施而遭果農砍除，導致吾人於 2002 年採樣之罹病株數無法恆定。2003 年經由吾人與果農協調，由已轉作甜柿之果農協助增加其保留之罹病梨株以供研究所需，此外，再配合選取病徵較輕微之罹病植株進行採樣，將標定植株固定為 15 株，同年六月再加上慶福里之 5 株新標定之罹病株共 20 株，此一研究株數即一直維持至 2004 年罹病株病原菌月份偵測實驗結束。台灣梨衰弱病罹病植株各月份病原菌質體之偵測率結果，顯示除冬季落葉期無法於罹病梨樹剝皮部組織中偵測到 PDTW phytoplasma 外，其餘月份若可取得葉片組織則皆可從罹病植株中偵測到 PDTW phytoplasma 之存在。而綜合該三年之月份偵測結果顯示，罹病梨樹中 PDTW phytoplasma 之檢出率於春季三至五月間開始上升，夏季六至九月份間為病原菌檢出率最高之時期，十月、十一月份檢測率下降，而冬季十二月份至隔年之一月份偵測率極低或為零(圖四)。

討 論

本研究初期有關植物全 DNA (total DNA) 之純化方式係採用林氏 1996 年⁽¹⁾ 抽取梨樹全 DNA 的方法，結果發現抽取之梨樹全 DNA 顏色呈褐色具黏稠狀，顯示梨樹組織含有多量之多醣物質 (polysaccharide compounds)。然而，模板 DNA (template DNA) 之品質係聚合酵素連鎖反應成功與否之重要因子，因而在利用聚合酵素連鎖反應技術檢測植物病原菌質體之相關研究中，許多有關模板 DNA 抽取的方法也被廣泛探討，以適用於不同之偵測檢體與偵測目的。例如有人重覆多次萃取 (extraction) 之步驟，以期獲得良好品質之模板 DNA，減少在 DNA 製備中殘留可能干擾 PCR 反應之成份⁽¹³⁾；但也有人爲了在短時間內得知偵測結果，乃將抽取 DNA 之步驟予以簡化，以達目的^(9, 20)。根據上述論點，吾人在本研究中選擇以商品化之植物全 DNA 抽取套組修改其操作方法，藉由增加三次 CIAA 萃取步驟，以獲得高品質之全 DNA。經由上述改良之方法，只需一個工作天即可完成梨樹全 DNA 之抽取，以獲得品質優良之 PCR 模板 DNA。而本實驗室在 1994 年 6 月至 1995 年 11 月期間，利用植物菌質體廣用型 PCR 引子對 R₁₆F₂/R₁₆R₂ 與 f1/r1，共完成 151 株田間疑似衰弱病罹病梨樹檢體之植物菌質體檢測實驗，結果其檢出率分別爲 4/151 及 5/151，此期間所獲得之植物菌質體 PCR 檢出率與田間實際發病程度相較之下顯然偏低⁽²³⁾。吾人推測其原因可能爲當時由梨樹組織純化之全 DNA 其質與量皆欠佳，而造成 PCR 檢出率與田間實際發病情形有落差。

植物菌質體所引起之病害極不易由病徵加以辨識，而梨衰弱病之病徵又與梨樹面臨生長環境或氣候不佳時所表現之病徵類似，故常造成該病害在病因診斷上的困難。而針對台灣梨衰弱病最佳之防治對策，即爲採用不帶菌之健康種苗及防除其媒介昆蟲^(5, 14, 31)，但此些預防措施均端賴正確及快速之診斷偵測技術之配合方可奏效。在以南方氏雜配法進行 16S rRNA 基因序列於 PDTW phytoplasma 基因體 (genome) 上所存在之套組數分析中，當以 7 種限制酵素酵解罹病梨樹全 DNA 時，皆可獲得二雜配訊號，顯示在 PDTW phytoplasma 之基因體中，16S rRNA 基因應具有二套組 (two copies)，此結果與其他學者在報告中所提植物菌質體具有 2 個 *rrn* operons 之特性相符^(7, 19, 21, 22)。部分研究亦顯示植物菌質體 2 個 *rrn* operons 間之序列具有異質性 (sequence heterogeneity)^(19, 21, 22)。吾人由罹病植株所獲得約 10 餘組 PDTW phytoplasma 之 rDNA 序列，比對結果顯示其序列完全相同，故吾人推論 PDTW phytoplasma 之 *rrn* operons 序列應不具異質性，而屬於

同源性質 (homogeneity)⁽²⁴⁾。由此結果亦支持吾人採用具多重複性之 rRNA 基因，作爲 PDTW phytoplasma PCR 偵檢之標的 DNA，以提高 PCR 偵檢效率。曾有學者提出造成梨樹衰弱病害之病因，可能包含多種植物菌質體複合感染之情形，例如在澳洲發現的造成梨衰弱病之植物病原菌質體不屬於 apple proliferation group (group 16SrX)，而是與甘藷小葉病 (sweet potato little leaf, SPLI, group 16SrII) 菌質體較爲相似⁽²⁸⁾。而依據吾人分別於 2001 及 2002 年由不同罹病梨株所獲得之 PDTW phytoplasma rDNA 序列，顯示台灣梨衰弱病至 2002 年之發病情形係由單一種屬於 apple proliferation group 之植物菌質體造成。

本研究配合台灣梨衰弱病專一性引子對之設計，進行了一系列快速靈敏之病原菌質體 PCR 檢測策略之擬定，其中包括 specific PCR (booster PCR)、multiplex PCR、nested PCR 及 RFLP-PCR 等。經由實驗結果發現利用台灣梨衰弱病專一性 PCR 引子對 Apf1/rPDS1，配合 booster PCR 策略即可有效提高偵測靈敏度，且實驗中只需單一對核酸引子即可完成全程檢測實驗，如此方便應用於罹病植株之病原菌長期監測實驗，有利於健康梨接穗之檢測及進行田間可能媒介昆蟲之篩檢與監測；而 multiplex PCR 與 PCR-RFLP 之策略研發，則可省略 PCR 產物之 DNA 選殖定序實驗程序，即能有效的用於鑑定梨衰弱病菌質體係屬於 AP group 之 PDTW phytoplasma⁽²⁴⁾。Nested PCR 雖需要經由二引子對之配合方可有效提高偵測靈敏度，但當罹病植株中可能包含他種植物菌質體時，此一方法即可有效配合他種植物菌質體專一性引子對進行巢式 PCR 實驗設計，以達到有效檢測與鑑別之目的。

利用本研究所研發之 PDTW phytoplasma 專一性 booster PCR 技術，針對不同月份之梨樹罹病株進行 PCR 偵測實驗時，發現冬季病原菌之偵測率明顯降低，國外報告亦指出罹病梨樹中植物菌質體之含量於冬季會明顯下降⁽³¹⁾。而當冬季落葉期無法取葉片組織時其病原菌質體偵測率爲零，推測其可能原因爲落葉期韌皮部組織之全 DNA 萃取極爲不易，加上冬季時地上部之病原菌含量下降，故導致本研究無法於冬季落葉期於罹病梨樹枝條韌皮部組織中偵測到病原菌質體。其餘月份則皆可用 PCR 於罹病植株中偵測到 PDTW phytoplasma，而由月份偵測率顯示，由罹病植株中偵測出病原菌質體之機率係受到季節變動影響，其中以六至十月之夏、秋二季偵測率較高，此一病原菌質體之偵測結果亦與國外梨衰弱病之偵測結果一致^(11, 31)。此外，吾人亦觀察到在罹病植株內病原菌含量較高之六至十月夏秋二季，其病原菌月份偵測率仍具波

動性，其原因可能係罹病梨樹組織內植物菌質體之分佈極為不均，導致偵測上之誤差。梨衰弱病之相關研究文獻亦指出因植物菌質體於罹病植株中之濃度低且分佈不均，故於採集研究材料時需擴大枝條採樣之範圍，並盡量增加檢測樣品之重複數⁽³¹⁾。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

- Blodgett, E. C., Schneider, H., and Alicele, M. D. 1962. Behavior of pear decline disease on different stock-scion combinations. *Phytopathology* 52: 679-684.
- Chen, C. C., Leu, T. D., Lin, C. P., and Kuo, K. C. 2001. Comments on the disease that similar to pear decline in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 42: 1-5.
- Chen, M. F. and Lin, C. P. 1997. DNA probes and PCR primers for the detection of a phytoplasma associated with peanut witches' broom. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 137-145.
- Davies, D. L., Barbara, D. J., and Clark, M. F. 1995. The detection of MLOs associated with pear decline in pear trees and pear psyllids by polymerase chain reaction. *Acta Hort.* 386: 484-488.
- Davies, D. L., Guise, C. M., and Clark, M. F. 1992. Parry's disease of pears is similar to pear decline and is associated with mycoplasma-like organisms transmitted by *Cacopsylla pyricola*. *Plant Pathol.* 41: 195-203.
- Davis, R. E., Dally E. L., Guvdersen, D. E., Lee, I. M., and Habili, N. 1997. *Candidatus* phytoplasma australiense, a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 262-269.
- Davis, R. E., Jomantiene, R., Kalvelyte, A., and Dally, E. L. 2003. Differential amplification of sequence heterogeneous ribosomal RNA genes and classification of the '*Fragaria multicipita*' phytoplasma. *Microbiol. Res.* 158: 229-36.
- Deng, S., and Hiruki, C. 1991. Amplification of 16S rRNA gene from culturable and nonculturable molecules. *J. Microbiol. Methods* 14: 53-61.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19: 1349.
- Errea, P., Aguelo, V., and Hormaza, J. I. 2002. Seasonal variations in detection and transmission of pear decline phytoplasma. *J. Phytopathol.* 150: 439-443.
- Garcia-Chapa, M., Lavina, A., Sanchez, I., Medina, V., and Batlle, A. 2003. Occurrence, symptom expression and characterization of phytoplasma associated with pear decline disease in Catalonia (Spain). *J. Phytopathol.* 151: 584-590.
- Garcia-Chapa, M., Medinab, V., Viruelc, M. A., Laviña, A., and Batlle, A. 2003. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathol.* 52: 513-520.
- Gibb, K., and Padovan, A. 1994. A DNA extraction method that allows reliable PCR amplification of MLO DNA from "difficult" plant host species. *PCR Methods Appl.* 4: 56-58.
- Guise, C. M., and Davies, D. L. 1992. Absence of decline-like symptoms in English pear trees protected from early season populations of *Cacopsylla pyricola*. *Acta Hort.* 309: 261-264.
- Hendolin, P.H., Markkanen, A., Ylikoski, J., and Wahlfors, J. J. 1997. Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusions. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2854-2858.
- Hsyu, S. M. 1996. Phylogenetic Relationship of Phytoplasmas on the Basis of Restriction Fragment Length Polymorphisms of 16S rDNAs and Sequences of 16S-23S rDNA Spacers. National Taiwan University Graduate Institute of Plant Pathology and Entomology. Master Thesis. (in Chinese with English abstract)
- Jensen, D. D., Griggs, W. H., Gonzales, C. O. and Schneider, H. 1964. Pear decline virus transmission by pear psylla. *Phytopathology* 54: 1346-1351.
- 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.
- Lee, I. M., Davis, R. E., Sinclair, W. A., Dewitt, N. D., and Conti, M. 1993. Genetic relatedness of mycoplasma-like organisms detected in *Ulmus* spp. in the United States and Italy by means of DNA probes and polymerase chain reactions. *Phytopathology* 83: 829-833.
- Levy, L., Lee, I. M., and Hadidi, A. 1994. Simple and rapid preparation of infected plant tissue extracts for PCR amplification of virus, viroid, and MLO nucleic acids. *J. Virol. Methods* 49: 295-304.
- Liefting, L. W., Andersen, M. T., Beever, R. E., Gardner, R. C., and Forster, R. L. 1996. Sequence heterogeneity in the two 16S rRNA genes of Phormium yellow leaf phytoplasma. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3133-3139.
- Lin, T. C. 1996. Development of PCR Primers for the Detection of Phytoplasmas and the Organism Associated with Pear-Decline-Like Disease. Graduate

- Institute of Plant Pathology & Entomology National Taiwan University. Master Thesis. (in Chinese with English abstract)
23. Lin, T. C., and Lin, C. P. 1998. Evaluation of universal PCR primers for the detection of phytoplasmas. *Plant Pathol. Bull.* 7: 33-42.
 24. 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: in press.
 25. Lorenz, K. H., Schneider, B., Ahrens, U., and Seemüller, E. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85: 771-776.
 26. Martín, R., Carazo, G., Arribas, C., Colino, I., Santiago, R., and de Blas, C. 2001. Four Spanish isolates of pear decline phytoplasma are related to other European phytoplasmas of the apple proliferation group. *J. Phytopathol.* 149: 481-484.
 27. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
 28. Schneider, B., and Gibb, K. S. 1997. Detection of phytoplasmas in declining pears in southern Australia. *Plant Dis.* 81: 254-258.
 29. 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. L. S. Razin and J. G. Tully, eds. Academic Press. San Diego, Ca.
 30. Seemüller, E. 1990. Pear decline. Pages 68-69 in: *Compendium of Apple and Pear Disease*. APS Press. Minnesota, USA.
 31. Seemüller, E. 1992. Pear decline. Pages 308-334 in: *Plant Diseases of International Importance*, Vol. 3. J. Kumar, H. S. Chaube, U. S. Singh, and A. N. Mukhopadhyay, eds. Prentice Hall. Eaglewood Cliffs, NJ.
 32. Sen, K. 2005. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. *Can. J. Microbiol.* 51: 957-966.
 33. Torres, E., Martín, M. P., and Paltrinieri, S. 2004. Spreading of ESFY phytoplasmas in stone fruit in Catalonia (Spain). *J. Phytopathol.* 152: 432-437.

ABSTRACT

Liu, H. L.¹, and Lin, C. P.^{1,2} 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. (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: +886-2-2366-1980)

In 1994, pears exhibited a slow decline symptom were observed in orchards of central Taiwan. According to the molecular evidences of the ribosomal RNA gene (rDNA), the pear decline in Taiwan (PDTW) has been proven to be caused by PDTW phytoplasma closely related to the members of the apple proliferation group (16SrX) in our previous study. According to the rDNA sequence of PDTW phytoplasma, various polymerase chain reaction (PCR)-based strategies including specific booster PCR, multiplex PCR, nested PCR and PCR-RFLP were developed and applied in this study for the detection of the causative agent in pear trees. The study of the seasonal variation in the detection of PDTW phytoplasma was conducted in four pear orchards in Dungsht and Heping. Samples collected from 7-20 infected trees were detected by booster PCR monthly in three consecutive years from 2002 to 2004. Unless there is no leaf sample can be collected from the pear trees in the winter, PDTW phytoplasma in the pear trees can be detected readily. The maximum detection rates of PDTW phytoplasma were obtained in summer.

Key words: PDTW phytoplasma, polymerase chain reaction, ribosomal RNA gene, seasonal variation