

# 細菌性葉斑病菌 *Pseudomonas cichorii* 專一性引子之開發

許秀惠<sup>1</sup>、申屠萱<sup>1</sup>、林俊義<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 行政院農委會農業試驗所 植物病理組

<sup>2</sup> 通訊作者：cylin@wufeng.tari.gov.tw

接受日期：中華民國 95 年 12 月 02 日

## 摘要

許秀惠、申屠萱、林俊義。2006。細菌性葉斑病菌 *Pseudomonas cichorii* 專一性引子之開發。植病會刊 15：275-285

以60個隨機引子應用隨機增幅多型性核酸技術 (RAPD) 增幅並篩選出對細菌性葉斑病菌 *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp 特有之1,100 bp的專一性片段，進一步將該片段接入 Topo 載體 pCR®II-TOPO 得到選殖株，並分析其核酸序列，再根據其序列設計出對 *Pseudomonas cichorii* 具專一性之引子對 SfL1/SfR2。應用此引子對進行聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，其對供試向日葵細菌性葉斑病菌皆能增幅出 379 bp 的片段，但對供試之 6 屬 21 種其他非標的之病原菌及雜菌菌株則不會產生任何片段。當以引子對 SfL1 / SfR2 測試細菌性葉斑病菌 *P. cichorii* 之全 DNA 時，其靈敏度可偵測到 5~10 pg，而用於偵測其細菌數之靈敏度則可以測到5.5~9個活菌數。將向日葵細菌性葉斑病菌 (*P. cichorii*) 10<sup>6</sup> cfu/ml 菌液與其他細菌菌株之菌液 10<sup>5</sup>~10<sup>8</sup> cfu/ml 混合，再以引子對 SfL1/ SfR2 進行聚合酵素連鎖反應，結果顯示不影響其對 *P. cichorii* 之偵測效率。應用單一菌落快速檢定法可於 3 - 4 hr 內鑑定向向日葵細菌性葉斑病菌，該引子對可用於人工接種葉斑病菌之向日葵植株樣品之偵測，因此確認所設計之引子對 SfL1/SfR2 可用於快速鑑定及診斷細菌性葉斑病菌 *P. cichorii*。

關鍵詞：向日葵，細菌性葉斑病菌，PCR 引子

## 緒言

在國外，菊苣假單胞菌 *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp 是蔬菜作物及觀賞植物上常見的病原菌，其寄主範圍廣泛<sup>(10)</sup>，可危害萵苣 (lettuce)<sup>(13)</sup>、甘藍 (cabbage)<sup>(27)</sup>、芹菜 (celery)<sup>(15)</sup>、番茄 (tomato)<sup>(33)</sup> 等蔬菜作物，以及菊科 (chrysanthemum)<sup>(16)</sup>、天竺葵 (geranium)<sup>(16)</sup>、鵝掌蘂 (dwarf schefflera)<sup>(11)</sup>、向日葵 (sunflower)<sup>(22)</sup>、木蘭花 (magnolia)<sup>(19)</sup> 等花卉植物。該病原菌可在種子及罹病殘體上越冬，並藉由風雨、灌溉水等媒介傳播蔓延<sup>(5, 10)</sup>，在多雨的氣候下病害容易發生。在台灣由菊苣假單胞菌引起之病害除蘇等<sup>(5)</sup> 發表之芹菜細菌性葉斑病，以及許等<sup>(3)</sup> 發現向日葵細菌性葉斑病外，尙未有其他相關報告，但台灣的氣候極適

合細菌性葉斑病發生。在向日葵栽培田，一旦細菌性葉斑病發生，在莖、葉片、葉柄、萼片及花上均可見斑點，不但影響向日葵切花品質<sup>(3)</sup>，更造成農民損失，再加上 *P. cichorii* 是蔬菜作物及觀賞植物上常見的病原菌<sup>(10)</sup>，且此病原菌造成之植株病徵與其他病原菌引起之病徵不易區分<sup>(14)</sup>，常常造成農民用藥錯誤的困擾，不但延誤防治時機又增加農民成本，因此建立一個快速的檢測方法，於病害發生初期，即給予正確且適當的防治，當可及早防範病害發生及蔓延，進而減少農民經濟損失。

一般對於植物病原菌的偵測及診斷常依據病徵、生理生化特性及接種試驗等方法確定，不但耗時且費力。最近諸多分子生物技術如聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術<sup>(20)</sup>，RFLP (

restriction fragment length polymorphism) , AFLP (amplified fragment length polymorphism) 及 RAPD (random amplified polymorphic DNA)<sup>(17, 18, 32)</sup> 等, 已廣泛應用於植物病原菌之偵測。有關應用於 *Pseudomonas* 屬的植物病原細菌之偵測, 如應用 *Pseudomonas syringae* pv. *cannabina* 之 *efe* gene DNA 序列設計 ETH1、ETH2、ETH3 可同時偵測 *P. syringae* pv. *cannabina*、*P. syringae* pv. *glycinea* 及 *P. syringae* pv. *phaseolicola* 等假單胞菌<sup>(24)</sup>, 也有研究指出以 *P. syringae* pv. *atropurpurea* 之 *cfl* gene DNA 序列設計的 Primer 1 及 Primer 2 可針對 *P. syringae* pv. *glycinea*、*P. syringae* pv. *maculicola* 及 *P. syringae* pv. *tomato* 產生專一性片段<sup>(8)</sup>; 而 *P. syringae* pv. *atropurpurea*<sup>(30)</sup>、*P. syringae* pv. *pisi*<sup>(7)</sup> 及 *P. syringae* pv. *phaseolicola*<sup>(25)</sup> 則分別應用會產生植物毒素的基因序列來設計專一性引子。有關分生技術應用於在其他屬的植物病原細菌之偵測, 如利用 *pel* 基因設計引子對來檢測 *Erwinia carotovora* 種內之病原<sup>(12)</sup>, 也有利用 RFLP 方法來區分 *Erwinia* 屬之不同種或同種間不同生理小種之病原菌<sup>(6, 12, 29)</sup>, 但此方法需很多的 DNA 量且需花費數天的時間, 因此若發展專一性核酸探針, 再以快速簡便的 PCR 方法來鑑定病原菌, 將可節省許多人力及時間。Seal 等人<sup>(26)</sup> 即利用 RAPD 篩選 *Ralstonia solanacearum* 的專一性片段, 再設計專一性片段, 可加強 PCR 產物之穩定性。因此本研究應用 RAPD 技術並以向日葵細菌性葉斑病菌為標的, 設計出對 *Pseudomonas cichorii* 具專一性的核酸引子, 以建立檢測 *Pseudomonas cichorii* 之專一性的簡易 PCR 方法, 祈能快速且準確地檢測該病原細菌。

## 材料與方法

### 菌株來源

供試 35 株 *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp 菌株來自苗栗大湖及南投集集等地罹細菌性葉斑病之向日葵植株, 經分離所得之菌株代號為 Sf, 其他供試菌株皆為本研究室所保存(表一)。

### 細菌全DNA之抽取

先將細菌在 5 ml 之 LB broth 中於 30°C 震盪培養 16 hr 後, 以 12,000 rpm 離心 10 min, 以 1 ml 的 STE 溶液懸浮一次後以 12,000 rpm 離心 10 min, 去除上清液, 溶於 0.5 ml 之 STE 中, 加入 50 ml 的 10% SDS, 於 65°C 作用 30 min, 加入 proteinase K (100 µg/ml) 於

表一、供 RAPD 及 PCR 試驗之細菌菌株。

Table 1. Bacterial isolates used in experiments of RAPD and PCR.

Bacterium	Strain
<i>Burkholderia andropogonis</i>	Pan1
<i>B. caryophylli</i>	Tw7, Tw9
<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	Bg
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	Zan01~15
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Ech10~22
<i>Pantoea agglomerans</i>	Sr53~56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Yx5, Yx7
<i>P. cichorii</i>	Pae
<i>P. fluorescens</i>	Sf
<i>P. putida</i>	Pf
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	Pu
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	Psg
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Psl
<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	Psph
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Pspi
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Pss
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Psta
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Psto
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>	Ia57, 29
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Ao72
<i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	Xv15
	X58

室溫作用 30 min 後, 再加入 RNase A (50 µg/ml), 於 37°C 作用 30 min 後, 加入等體積之 phenol/chloroform (phenol : chloroform : isoamylalcohol = 25 : 24 : 1) 並混勻至乳白色, 以 12,000 rpm 於 4°C 離心 30 min, 吸取上層液, 加入 1/10 體積的 3 M NaOAc 及 2 倍體積的 95% 酒精, 緩慢混勻並於 -20°C 以下放置 1 hr 以上或隔夜, 再以滅菌牙籤挑取 DNA 至含有 70% 酒精的微量離心管內, 以 12,000 rpm 於 4°C 離心 30 min, 倒去上層液, 經 50°C 乾燥 15 min 後, 加入 100 µl 滅菌之去離子水暫放於 4°C 下, 待 DNA 溶解後放至 -30°C 備用<sup>(23)</sup>。

### 小量質體 (plasmid) 的製備

抽取步驟係以 Plasmid miniprep purification kit (Genemark), 依產品使用說明進行: 將經選殖之白色菌落培養於含有 Kanamycin (50 µg/ml) 之 5 ml LB 培養液中, 於 37°C 培養 16 hr 後, 取 2 ml 至微量離心管, 以 12,000 rpm 離心 5 min, 去上清液, 加入 200 µl 的 solution I 溶解菌體, 再加入 200 µl solution II 並混勻, 最後加入 200 µl 的 solution III 混合後, 以 12,000 rpm 於 4°C 離心 10 min, 吸取上清液至吸附 DNA 離心管內; 加入 700 µl washing solution, 以 12,000 rpm 於

4°C 離心 30 sec，去除下層液，再以 12,000 rpm 於 4°C 離心 3 min，將附 DNA 離心管置於新的 1.5 ml 微量離心管，60°C 下烘乾約 5~10 min 後，加入 50  $\mu$ l 去離子水，以 12,000 rpm 於 4°C 離心 30 sec 後回收 DNA。

### RAPD 增幅反應及專一性引子之篩選

取細菌性葉斑病菌 Sf01、Sf02、Sf07、Sf09 及 Sf31 等 5 個菌株之 DNA 為模版，應用 OPERON 10-MER KITS 之 OPX 01~20, OPY 01~20 及 OPZ 01~20 之 60 個隨機引子進行 RAPD 反應，總體積 20  $\mu$ l 中包含 100 ng DNA、200  $\mu$ M dNTPs、0.25  $\mu$ M 隨機引子、0.8 U 的 DNA 聚合酶與 1 $\times$  的反應緩衝液，置於 GeneAmp PCR System 2400 迴溫循環器中，先以 94°C 1 min 反應，而後於 94°C 1 min, 40°C 1 min, 72°C 2 min 進行 40 個循環，最後以 72°C 20 min 完成反應，再取 8  $\mu$ l 產物加入以 1X TAE 緩衝溶液製備之 1.5% agarose gel，以 100 V 進行電泳分析後取出膠體，經溴化乙錠染色後置於 UV box 上觀察及照相。根據電泳結果初步篩選出從向日葵斑點病菌菌株可增幅產生共同條帶且具再現性之隨機引子；並同時取其他細菌之 DNA 為模版，以上述篩選出之隨機引子進行 RAPD，比較各引子對向日葵斑點病菌與其他細菌所增幅出之 DNA 片段異同，以篩選出能對向日葵斑點病菌產生專一性 DNA 片段之引子。

### 專一性 DNA 片段之回收及純化及核酸探針之製備

片段回收係將經 RAPD 得到之產物以 1X TAE buffer 配製之 1.2% agarose 電泳分析後，將欲回收的片段 DNA 切下，放到 Ultrafree<sup>®</sup>-DA (MILLIPORE, USA) KIT 組所附之 Gel Nebulizer、Ultrafree-MC 及 Vial 組合中並蓋上蓋子，以 6,000 rpm 離心 10 min 將離心下來之 DNA 回收，放至 -30°C 備用。回收之 DNA 片段採用非放射性 Random Primer Fluorescein Labeling Kit with Antifluorescein-AP (NEN) 製作核酸探針 (probe)。先取 19  $\mu$ l 的模版 DNA 置於離心管內，於沸水中煮 5 min 後，靜置在冰上 5 min，再加入 5  $\mu$ l 之 Random primer and reaction buffer mix、5  $\mu$ l Fluorescein nucleotide mix、1  $\mu$ l Klenow fragment 及去離子水至總體積為 30  $\mu$ l，混合均勻後置於 37°C 下作用 1 hr。作用完成後加入 5  $\mu$ l 0.1 M EDTA (pH8.0) 以終止反應，保存於 -30°C，以備進行核酸雜合反應。

### 南方雜合反應 (Southern hybridization)

依據 Southern 氏<sup>(28)</sup> 之方法，將瓊脂凝膠上的 DNA 轉漬於尼龍濾膜上。首先以 Sf41、Sf80 及其他細菌

DNA 為模版以 OPY-20 引子進行 RAPD 之增幅產物經電泳後的瓊脂凝膠，於 0.25 N 的 HCl 處理 10 min，以清水漂洗後加入 denature buffer (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) 處理 30 min 後，以清水漂洗後再加入 neutralization buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5; 1.5 M NaCl) 處理 30 min；剪適當大小的尼龍濾膜一片，並以 10X SSC 先潤濕後，把瓊脂凝膠置於尼龍濾膜上，以 10X SSC 作為緩衝溶液，以毛細管方法進行轉漬 >16 hr。轉漬完成後小心取出尼龍濾膜，將吸附 DNA 之面朝上，置於乾淨的濾紙上，待晾乾後，置於 UVC-515 Ultraviolet Crosslinker (ULTRA-LUM, Inc. U.S.A.) 內以 254 nm 波長的紫外光進行聯結後，靜置晾乾。尼龍濾膜以 2X SSC 潤濕後置入雜合袋中，將 salmon sperm DNA 及核酸探針加入 200  $\mu$ l 之雜合溶液 (hybridization solution: 5X SSC, 0.5% SDS, 50% Formamide, 5X Denhardt's) 後，於沸水煮 3 min，置於冰上 5 min，再加入適量的 hybridization solution 中，於 65°C 進行雜合反應 16 hr 以上。其後將濾膜取出，以含有 0.1% SDS 的 2X SSC 溶液於室溫漂洗 5 min 2 次，再以含有 0.1% SDS 的 0.2X SSC 溶液於 65°C 下漂洗 15 min 2 次，再以 buffer I (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5; 0.15 M NaCl) 漂洗 5 min 一次，及 buffer II (0.5% blocking reagent in buffer II, 4°C) 漂洗 1 hr 後，加入含有 Anti-fluorescein-AP conjugate (NEN<sup>®</sup> Life Science Products, Boston, MA) 之 buffer II (1:5000) 漂洗 1 hr 後，再以 buffer I 漂洗 4 次，每次 5 min，最後以 buffer III (0.1 M Tris-HCl, pH 9.5; 0.15 M NaCl) 漂洗 2 次，每次 5 min。漂洗完後將濾膜取出放入反應袋，將 CDP-Star 12.5 mM (Tropix, U.S.A.) 加入 buffer III (1:200)，滴在濾膜上，於室溫下反應 5 min 後，以 X-ray 底片進行曝光，約 10 min 可得最適當訊號強度。

### 專一性 DNA 片段之選殖及核酸定序

本試驗係以 TOPO TA Cloning<sup>®</sup> kit 來進行 DNA 片段之選殖，依產品說明進行。取 4  $\mu$ l 回收 DNA 片段加入 1  $\mu$ l salt solution 與 1  $\mu$ l 的 pCR<sup>®</sup>II-TOPO vector，於室溫 5 min 後，置於冰上取 2~6  $\mu$ l 加入勝任細胞 (competent cell)，混勻並置於冰上 30 min 後，於 42°C 熱休克 30 sec，再置於冰上 2 min 後，加入 250  $\mu$ l 的 SOC 培養液以 200 rpm 震盪在 37°C 下培養 1 hr。將此培養菌液均勻塗抹於含有 40  $\mu$ l 100 mM 之 IPTG、40  $\mu$ l 40  $\mu$ g/ml 之 X-gal 及 Kanamycin (50 ppm) 的 LA 培養基，於 37°C 隔夜培養後，挑選白色之單一菌落，抽取質體 DNA，並以 EcoRI 剪切並進行電泳分析，以確認此白色菌落為含有選殖片段的選殖株；並將上述挑

到之選植株委託品宇生物科技公司進行核酸定序後，藉由 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 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 Vector-NTI 8 (InforMax) 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 primer) 及反向引子 (reverse primer)。

### 聚合酵素連鎖反應條件設定

分別測試去氧核糖核甘三磷酸鹽 (dNTP)，引子 (primer) 濃度，Taq polymerase (Dynazyme) 之適當反應量，不同 PCR 黏合溫度，及不同 PCR 循環數等試驗條件，找出最佳的 PCR 反應條件。

### 引子對專一性及靈敏度測定

DNA 專一性測試：將 Sf 菌株之 DNA 與 *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. syringae* pv. *syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovota* pv. *carotovota*, *E. chrysanthemi*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* 等 5 屬共 9 種其他非標的菌株各取 10 ng，以引子對 SfL1/SfR2，依上述增幅條件進行 PCR，反應後進行電泳分析，以測試引子對 SfL1/SfR2 偵測 *P. cichorii* 菌株 DNA 之專一性。

細胞專一性測試：將 Sf 菌株於 NA 上培養 24 hr 後，以無菌水懸浮調整其為約  $10^8$  cfu/ml，並以 10 倍系列稀釋，使濃度約為  $10^6$  cfu/ml，取 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*，*P. putida*，*Agrobacterium tumefaciens* 等其他非標的菌株則分別劃於適當之培養基，調整其濃度約為  $10^4 \sim 10^8$  cfu/ml，每個稀釋濃度先各別與 Sf 菌株之  $10^6$  cfu/ml 菌液以相等比例混合後，各取 50  $\mu$ l 於 200 ml 微量離心管中，加入 50  $\mu$ l 之 0.5 N NaOH，混勻後再取 50  $\mu$ l 加入 50  $\mu$ l 的 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 以中和，取 2  $\mu$ l 並以 SfL1/SfR2 為引子對進行 PCR 與電泳分析。

DNA 靈敏度測試：將 Sf02 及 Sf76 之 DNA 分別取 100, 10, 1 ng 及 100, 10, 1, 5, 1, 0.1, 0.5 pg 等以引子對 SfL1/SfR2 作為引子對，加入 PCR 各反應物，使總反應體積為 20  $\mu$ l，依上述增幅條件進行 PCR，反應後進行電泳分析，以測試引子對 SfL1/SfR2 偵測向日葵細菌性葉斑病菌 DNA 之靈敏度。

細胞靈敏度測試：將 Sf02 及 Sf058 菌株於 NA (nutrient agar) 上培養 24 hr 後，以無菌水懸浮並調整其 OD<sub>620</sub> 之讀值為 0.3 (約  $10^8$  cfu/ml)，以 10 倍系列稀釋，使濃度約為  $10^1 \sim 10^7$  cfu/ml，每個稀釋濃度各取 50  $\mu$ l

於 200  $\mu$ l 微量離心管中，加入 50  $\mu$ l 之 0.5 N NaOH，混勻後再取 50  $\mu$ l 加入 50  $\mu$ l 的 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 以中和，取 2  $\mu$ l 並以 SfL1/SfR2 為引子對進行 PCR 與電泳分析。並取適當之細菌懸浮液以 spiral plater (model D, Spiral systems, Inc. Bethesda, Maryland) 劃線於 NA 平板上，經 30°C 培養 24 hr 後，計算其細菌數。

### 細菌性葉斑病菌菌落之快速鑑定

利用 Wang<sup>(91)</sup> 之簡易方法加以修改，以滅菌過的牙籤沾取經純化後的單一菌落，放入含 50  $\mu$ l 0.5 N NaOH 溶液之微量離心管中，劇烈震盪後，取出 25  $\mu$ l 加入 25  $\mu$ l 1 M Tris-HCl (pH 8.0)，混合均勻，取 2  $\mu$ l 做為模板，再以引子對 SfL1/SfR2 進行 PCR 反應及電泳分析。

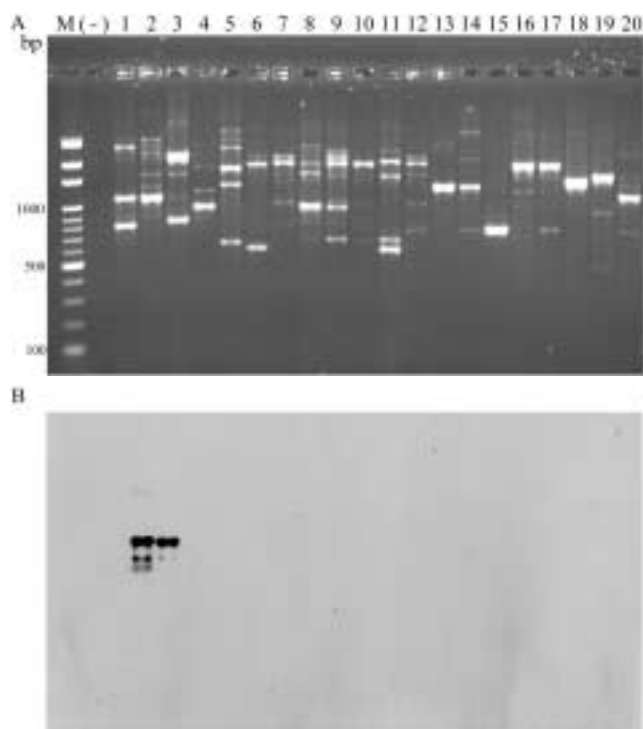
### 應用 PCR 技術偵測向日葵植株上之細菌性葉斑病菌

將向日葵葉斑病菌 (*Pseudomonas cichorii*) Sf06、Sf09、Sf26、Sf28、Sf30、Sf62 等菌株分別在 NA 平板上培養 24 hr，之後懸浮於無菌蒸餾水中，利用 Spectrophotometer 在 A<sub>620</sub> nm 下調整細菌懸浮液之 O.D 值為 0.3 (約為  $1 \times 10^8$  cfu/ml)，再噴灑接種至健康之向日葵植株上，置放 30°C 生長箱內，分別於接種後 24, 48, 72, 96 及 120 hr 切取葉片組織，以 1:10 的無菌水研磨葉片組織，之後再將研磨液稀釋為 1:30 及 1:50 等濃度，再將不同濃度之組織液分別取 50  $\mu$ l 再加入 500  $\mu$ l 之 PBS-Tween-20 (含 phosphate-buffer saline 與 0.5% Tween-20)，置離心管中以 10,000 rpm 離心 20 min，倒掉上清液，將下層之沈澱物回溶於 100  $\mu$ l 之 PBS-Tween-20 中<sup>(9)</sup>，各稀釋比例分別取 2  $\mu$ l，以所設計之 SfL1/SfR2 引子對進行 PCR 反應，測試所設計之引子對 SfL1/SfR2 是否能偵測到向日葵植株上之葉斑病菌。

## 結 果

### 細菌性葉斑病菌 RAPD 反應之引子篩選及南方雜合法

取向日葵細菌性葉斑病菌 Sf01、Sf02、Sf07、Sf09、Sf31 等 5 株菌株之全 DNA 為模版，以 OPX 01~20, OPY 01~20, OPZ 01~20 共 60 組隨機引子進行 RAPD 分析，初步篩選出向日葵細菌性斑點病菌能產生共同條帶且具再現性之隨機引子共 10 組，其中 OPX-



圖一、利用隨機引子 OPX-17 進行向日葵細菌性斑點病及其他細菌菌株之 RAPD 分析後得到的電泳圖譜 (A)，及利用選殖自向日葵細菌性斑點病 Sf 菌株的 X17-Sf1100 探針進行之南方雜合反應 (B)。Lane 1 及 lane 2 為 Sf 菌株，M 為 Bio 100 marker，(-) 為負控制組，Lane 3-20 為非標的菌株。

Fig 1. Agarose gel electrophoresis shows RAPD patterns of strains of *Pseudomonas cichorii* and other bacteria using OPX-17 random primer (A) and southern hybridization of the RAPD products with X17-Sf1100 probe cloned from *Pseudomonas cichorii* (B). Lanes 1 and 2, *Pseudomonas cichorii* Sf isolates; M, Bio100 marker; lanes 3 - 20, other bacteria; (-), negative control.

17 能在實驗室內所有向日葵細菌性斑點病菌菌株產生約 1,100 bp 共同片段 (圖一)。進一步以 OPX-17 與其他非標的細菌之全 DNA (表一) 為模版進行 RAPD 反應，並以該 1,100 bp DNA 片段作為核酸探針以進行南方雜合法，結果顯示只有供試向日葵 Sf 菌株可增幅出一條 1,100 bp 左右之條帶，而其他非標的細菌則無 1,100 bp 之共同條帶出現，且此 1,100 bp 探針只與有雜合訊號，因此可初步確認此 1,100 bp 片段應為向日葵細菌性葉斑病菌的共同 DNA 片段，因此以該片段來進行進一步的分析。

### 細菌性葉斑病菌專一性 DNA 片段之回收、選殖、核酸定序及專一性引子對之設計

將向日葵細菌性葉斑病菌 Sf 菌株經 RAPD 增幅出的 1,100 bp 之 DNA 片段回收，以載體 pCR<sup>®</sup>II-TOPO

vector 進行核酸片段之選殖，進行轉型作用後得到帶有該片段之轉殖株，經委託定序後，比對各選殖株嵌入 DNA 片段之核苷酸序列結果顯示，各選殖株嵌入 DNA 片段皆具有 99% 以上之相同性 (identity)。並藉由 NCBI 網際網路，進行線上基因庫的查詢與比對，發現嵌入 DNA 片段 1,100 bp 之序列中分別於 8~242 bp、272~304 bp、480~537 bp、765~1138 bp 等 4 段片段序列與 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 片段分別有 84~93% 相似性 (圖二)，為了避開與 *P. syringae* pv. *tomato* 相似的片段，選取 304~765 之間的片段 (與線上基因庫已註冊其它生物 DNA 序列皆低於 15%)，利用 Vector NTI suite 8 (InforMax) 分別設計 2 條正向引子 SfL1、SfL2 及 2 條反向引子 SfR1、SfR2，經與其他非標的菌株一起進行 PCR 反應，確認只有 SfL1/SfR2 對其他非標的菌株不會產生任何片段 (Data not shown)，且對 Sf 菌株可產生 379 bp 之專一性片段，因此接著進一步探討該引子對偵測向日葵細菌性葉斑病菌 *P. cichorii* 之靈敏度。

### 聚合酵素連鎖反應之適當反應條件之測定

以 SfL1/SfR2 引子對進行 PCR 反應最佳條件測試，結果顯示 PCR 檢測時，於 20  $\mu$ l 總反應體積分別包含 50 ng 的模版 DNA，1X Taq buffer，200  $\mu$ M 的 dNTP，0.25  $\mu$ M 的 Primer 及 0.4 Unit 的 Dynazyme 等原料，並設定 PCR 反應時間為進行 (a) 94 $^{\circ}$ C 5 min，1 個循環；(b) 94 $^{\circ}$ C 1 min、65 $^{\circ}$ C 30 sec、72 $^{\circ}$ C 30 sec，30 個循環；(c) 72 $^{\circ}$ C 10 min，1 個循環以終止反應，以此反應條件之產物最佳，完成後之反應液以 2% agarose 進行電泳分析。

### 引子對 SfL1/SfR2 之專一性測試

將 Sf02、Sf10、Sf28、Sf33、Sf41、Sf68、Sf74 及 Sf85 等菌株之 DNA 與其他 *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. syringae* pv. *syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovota* pv. *carotovota*, *E. chysanthemi*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* 等 5 屬 9 種之非標的菌株 DNA 混合，並不影響所設計引子對對 Sf 菌株 DNA 之偵測 (圖三)，顯示無論其他病原菌或雜菌存在，均不影響該引子對偵測 *P. cichorii* 之專一性。

以 Sf41 菌株培養後之細菌懸浮液測試該引子對之專一性，結果顯示取 Sf41 菌液 10<sup>6</sup> cfu/ml 與其他 2 屬 3 種非標的菌株之菌液 (10<sup>8</sup>~10<sup>4</sup> cfu/ml) 混合進行 PCR 反應時，Sf 菌株仍可明確地出現 379 bp 的片段，結果顯示此引子對偵測 *P. cichorii* 具專一性。

```

121 GCCTGCAACG CCAATCTTCA CGTCGGCCTG GGCAAATGAA GATACGCCCA ATGCAGTTGC
181 CACTGCGATT GCCAGAAAGC CTTTCTGTAA AACGTATGC GACATGAGTG GTGCTCCTGA
241 GGTTTTTTTA ATTAGCACTG CAACTACAAG AGTTGCGTAG AGCAAGGGGC GTGCCATCAC
301 TTTTCATTCG GCGAATCGGA ATGTCGTGTC AGCCGTCTCG GACTGACCG GTCCTTGAA
                                     Sfl1 →
361 AAGGGCCGTG CAACCGTCTG CAACGCAAGA GGTGCAACCA TGGAAAAACA TGGCGCAACC
421 CGAACAGACA GAAACGGCGA ACCACACACT CCCTGACGTG CAACCCGGCT GTAACCGGTC
481 ACGTCACCGA AGTGCACACC CCCAGTGCGC ATGCGCTACG AGACGCACCA TTTGAGGTTA
541 GTGGAAGCAC GGAAAAACGC TGGCGACGAT GCACAAAACC GGCCTGCAGG AACCGGCATG
                                     Sfl2 →
601 GGGCACACCG GCGTGTACC GGGAGGTGTC CGATACATAT CGCTGTCCCG GATTTCTGC
661 ACTCGATGCG GGAACCGTTC GATCATCCGG CAAGTAAAGG GTGACAATGG GAACCCAGCA
                                     ← Sfr1
721 GGCCGCGAGT GCTCAGAACA GGACATTCG GAGCCCAACG TTATCGGCTG CTCTGGAGAT
                                     ← Sfr2
781 CCGAATCAAT GAGCGGGAGC GCCTTCTCGA ATCGCATCGT GCAAAATCTG CTCGATACCG
841 ACTTCTACAA GCTCACCATG ATGCAGGCGG TACTGCATAA CTATCCCAAC ACCGATGTGG
901 AGTGGAATT CCGTTGCCGG AACGGCGAGG ACCTGCGGCC CTATCTGGCC GAGATCAGAC
961 ATCAGATCGA GTTGCTTTGC GAGCTGTTCG TGAGCAGCGA ACACCTGGCA TTCCTGGAAC
1021 GCATCACCTT TCTGAAACCG GACTTCTTCG GGTTCTGGG ACTGTTCCGC TTCAACACCC
1081 GCTATGTGAA AACCAGCATC GAAAACGACG AGTTGTGCAT TCGTCTGCAC GGTCCGTGTC
1141 A

```

圖二、選殖株重組質體 pX17-Sf1100 bp 嵌入 DNA 片段之序列，粗體劃線處為 Sfl1、Sfl2 兩條正向引子及 Sfr1、Sfr2 兩條反向引子。

Fig.2. The sequence of the inserted DNA fragment in recombinant plasmid pX17-Sf1100 bp. The sequence of the primers Sfl1, Sfl2, Sfr1 and Sfr2 designed are underlined, and the sequence of random primers OPX 17 are indicated red bold-faced.

### 引子對 Sfl1/Sfr2 之靈敏度測試

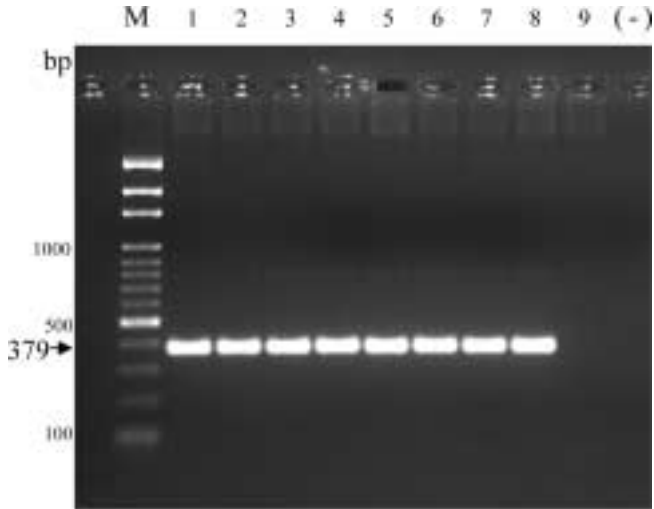
偵測引子對 Sfl1/Sfr2 對 Sf02 及 Sf76 供試菌株 DNA 之靈敏度，PCR 反應結果顯示，該引子對可偵測供試菌株 Sf76 DNA 含量至 5 pg ~ 10 pg (圖四)。

以 Sf02 及 Sf58 菌株培養後之細菌懸浮液測試該引子對之靈敏度，利用 NaOH 溶液直接裂解供試細胞，使其溶出 DNA 的方式來偵測該引子對偵測供試菌液之敏感度，PCR 反應結果顯示，該引子對最低可偵測到 5.5 ~ 9 個菌數之細菌性葉斑病菌的菌量 (圖五)。

### 細菌性葉斑病菌菌落快速鑑定

各取 Sf02、Sf07、Sf09、Sf27、Sf31、Sf35、Sf41、Sf58、Sf68、Sf70、Sf71、Sf75、Sf77、Sf80、Sf83 及 Sf85 等菌株之單一菌落，利用 0.5 N NaOH 溶液簡單萃取 DNA，再以引子對 Sfl1/Sfr2 進行 PCR 反應及電泳分析，依據 379 bp 電泳條帶結果顯示此引子對可用來鑑定 *P. cichorii*。

### 應用 PCR 技術偵測向日葵植株上之細菌性葉斑病菌



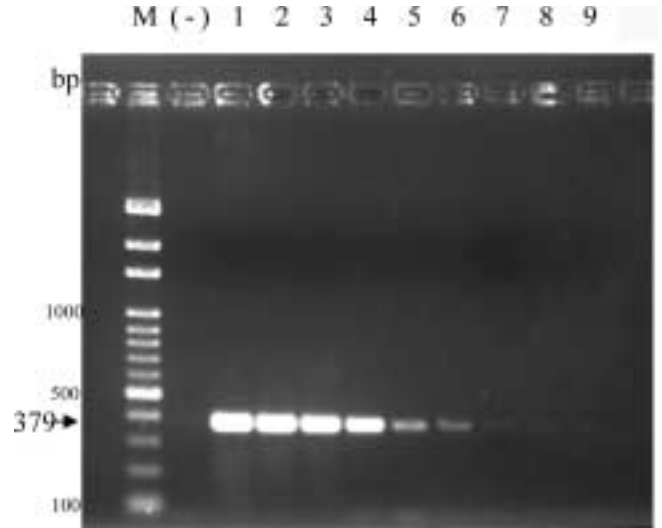
圖三、向日葵細菌性葉斑病 Sf41 菌株與其他非標的菌株 DNA 混合後，以引子對 SfL1/SfR2 進行聚合酵素連鎖反應之電泳圖譜。1-8 分別依序為 *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. syringae* pv. *syringae*, *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *E. chrysanthemi*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, *Agrobacterium trmefaciens*, *Ralstonia solanacerum* 等，9 僅 *Pseudomonas aeruginosa* DNA; M 為 100 bp marker, (-) 為負控制組。

Fig 3. Polymerase chain reaction amplification products of total DNA from strains of *Pseudomonas cichorii* Sf41 mixed with other bacterial with primer pair SfL1/SfR2. Lanes 1-8, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. syringae* pv. *syringae*, *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *E. chrysanthemi*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachine*, *Agrobacterium trmefaciens*, *Ralstonia solanacerum*, respectively; lane 9, only *Pseudomonas aeruginosa* DNA; M, 100 bp marker; (-), negative control.

將不同接種時間所取得之向日葵葉片組織，以無菌水分別稀釋成 1 : 10, 1 : 30 及 1 : 50 等三種濃度經 PBST 處理後，各取 2  $\mu$ l 以所設計之引子對 SfL1/SfR2 進行 PCR 反應，測試結果發現向日葵接種葉斑病菌 24 hr 及 48 hr 後取得之葉片樣品不論何種稀釋倍率均偵測不到葉斑病菌，但是在接種 72 hr 後三種不同組織稀釋比例 (1 : 10, 1 : 30 及 1 : 50) 皆能偵測到向日葵細菌性葉斑病菌，之後於接種後 96 hr 及 120 hr 取得之樣品也都能偵測到向日葵細菌性葉斑病菌(圖六)。

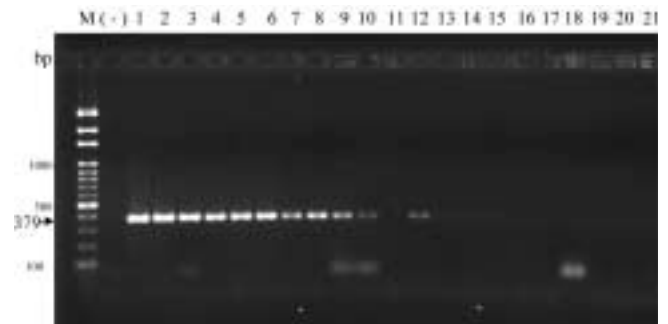
## 討 論

*Pseudomonas* spp. 植物病原菌的專一性核酸引子方法之建立多是由已知的基因片段找尋專一性核酸引子<sup>(7, 8, 25, 30)</sup>，而欲研究這些基因片段就必須花費很長的研究時間，對於目前相關文獻較少的 *P. cichorii* 來說，以



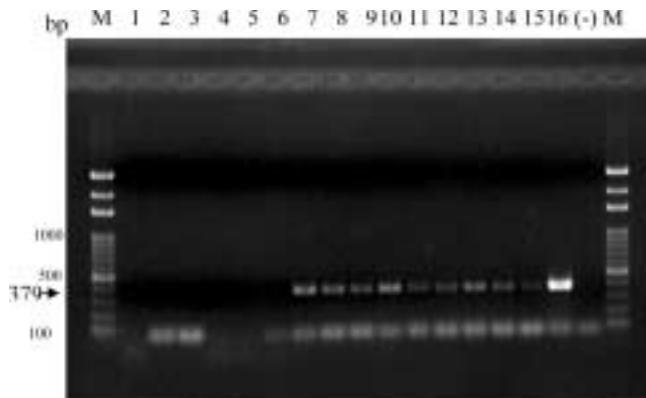
圖四、應用引子對 SfL1/SfR2 之聚合酵素連鎖反應偵測向日葵細菌性葉斑病 Sf76 菌株全 DNA 之靈敏度。M 為 100 bp marker, (-) 為負控制組，1-9 分別為 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 5 pg, 1 pg, 0.5 pg 及 0.1 pg 等。

Fig 4. Sensitivity of polymerase chain reaction using primer pair SfL1 / SfR2 to detect total DNA of *Pseudomonas cichorii* Sf76. Lanes 1-9, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 5 pg, 1 pg, 0.5 pg and 0.1 pg of DNA, respectively. M, Bio 100 DNA marker; (-), negative control.



圖五、以引子對 SfL1/SfR2 進行聚合酵素連鎖反應偵測向日葵細菌性葉斑病 Sf58 菌株細菌細胞數之靈敏度。1-3 為  $5.5\sim 9.0 \times 10^3$  cfu, 4-6 為  $5.5\sim 9.0 \times 10^2$  cfu, 7-9 為  $5.5\sim 9.0 \times 10^1$  cfu, 10-12 為  $5.5\sim 9.0$  cfu, 13-15 為  $5.5\sim 9.0 \times 10^1$  cfu, 16-18 為  $5.5\sim 9.0 \times 10^2$  cfu, 19-21 為  $5.5\sim 9.0 \times 10^3$  cfu, M 為 100 bp marker, (-) 為負控制組。

Fig 5. Sensitivity of PCR for detection of cells of *Pseudomonas cichorii* Sf58 with primer pair SfL1/SfR2. Lanes 1-3,  $5.5\sim 9.0 \times 10^3$  cfu; lanes 4-6,  $5.5\sim 9.0 \times 10^2$  cfu; lanes 7-9,  $5.5\sim 9.0 \times 10^1$  cfu; lanes 10-12,  $5.5\sim 9.0$  cfu; lanes 13-15,  $5.5\sim 9.0 \times 10^1$  cfu; lanes 16-18,  $5.5\sim 9.0 \times 10^2$  cfu; lanes 19-21,  $5.5\sim 9.0 \times 10^3$  cfu; M, 100 bp marker; (-), negative control.



圖六、以引子對 SfL1/SfR2 應用 PCR 偵測人工接種向日葵細菌性葉斑病菌之植株葉片中之葉斑病菌 *Pseudomonas cichorii*。M 為 100 bp marker，(-) 為負控制組，1-3 為人工接種葉斑病菌 24 hr 之樣品；4-6 為人工接種葉斑病菌 48 hr 之樣品；7-8 為人工接種葉斑病菌 72 hr 之樣品；9-12 為人工接種葉斑病菌 96 hr 之樣品；13-15 為人工接種葉斑病菌 120 hr 之樣品；1-15 則分別依序為接種葉片組織稀釋為 1:10, 1:30 及 1:50 之樣品，16 為葉斑病菌 *Pseudomonas cichorii* 菌液 DNA。

Fig 6. Detection of *Pseudomonas cichorii* in artificially infested leaf tissues of sunflower by polymerase chain reaction using primer pair SfL1/SfR2. Lanes 1-3, 24hr; lanes 4-6, 48 hr; lanes 7-9, 72 hr; lanes 10-12, 96 hr; lanes 13-15, 120 hr; lanes 1-15, symbol 1:10, 1:30 and 1:50 of sample, respectively. 16, *Pseudomonas cichorii*; M, Bio 100 DNA marker; (-), negative control.

RAPD 技術來尋找專一性引子是較快的方法。因此本研究以向日葵細菌性葉斑病之病原菌 *P. cichorii* 作為試驗材料，應用 RAPD 技術發展專一性引子來偵測 *P. cichorii*，但由於 RAPD 片段再現性及靈敏度皆較低，因此參考 Arnold et al.<sup>(7)</sup> 的方法進一步將此片段經轉型作用接入載體，以所得之質體 pX17-sf-1100 來進行核酸定序，所找到的 OPX-17 之 1.1 kb 片段在經過 NCBI 比對時，發現該序列於 8~242 bp、272~304 bp、480~537 bp、765~1,138 bp 等 4 段片段序列與 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (AE016853) 之部分序列分別有 84~93% 相似性(圖二)，而 813-956 bp 片段則與 *P. aeruginosa* PAO1 (AE004091) 部分序列則有 88% 之相似性。在挑選 *P. cichorii* 之專一性片段時，為了增加其專一性，因此避開與 *P. syringae* pv. *tomato* 及 *P. aeruginosa* PAO1 相似的片段，因此挑選 304~765 bp 之間的片段(與線上基因庫已註冊其它生物 DNA 序列皆低於 15%)，再利用 Vector NTI suite 8 (InforMax) 分別設計 2 條正向引子 SfL1、SfL2 及 2 條反向引子 SfR1、SfR2，可互相搭配組成四種組合，並經 PCR 測試顯示以 SfL1 配合 SfR2 之引子對組合在高溫黏合溫度下所得

到的反應產物最專一且清晰，同時以 SfL1/SfR2 引子對與來自向日葵細菌性葉斑病菌 *P. cichorii* 及購自食料所的芹菜葉斑病菌株 *P. cichorii* (No. 12682) 以及其他非標的菌株，包括 *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Ralstonia* 及 *Pseudomonas* spp. 等起進行 PCR 反應，確認只有來自向日葵的 *P. cichorii* 菌株與購自食料所的芹菜的 *P. cichorii* 方能產生 379 bp 之專一性片段。

Sato et al.<sup>(24)</sup> 曾提到以 *efe* gene 所設計的 ETH1、ETH2、ETH3 可同時偵測 *P. syringae* pv. *cannabina*, pv. *glycinea*, pv. *phaseolicola*, pv. *sesame* 等生理小種，但是卻無法區分它們；而 Bereswill et al.<sup>(8)</sup> 同樣以 *efl* gene 設計 Primer 1 及 Primer 2 兩條核酸引子，也只能同時偵測 *P. syringae* pv. *atropurpurea*, pv. *glycinea*, pv. *maculicola*, pv. *tomato* 等生理小種而無法區分，因此應用已知的功能性基因 DNA 序列來設計核酸引子時，其專一性的機會也會降低。而在本研究針對偵測 *P. cichorii* 之 SfL1/SfR2 在對於其他非標的菌株(尤其是與 *P. cichorii* 相似的 *P. syringae* 等生理小種)皆無產生任何 DNA 片段，更證明此經由 RAPD 技術尋找出此專一性引子對適用於 *P. cichorii* 之檢測，且其專一性極高。

對於 SfL1/SfR2 引子對之靈敏度方面，最低可偵測到 5 pg~10 pg 的全 DNA 量，與其他相關研究比較，Bereswill 等人<sup>(9)</sup> 偵測 *Erwinia amylovora* 之靈敏度只有 10 ng，宋<sup>(2)</sup> 所開發的 SL1/SR1 對於引起瓜類果斑病之 *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli* 之偵測靈敏度可至 100 pg 等，可得知 SfL1/SfR2 引子對有不錯的偵測靈敏度。而在菌數敏感度的試驗中，Sf02 及 Sf58 最低可測得菌數為 5.5 ~ 9 個，比其他植物病原細菌較佳；蔡<sup>(4)</sup> 以 5A/5B, Ec1/Ec2 等引子對偵測 *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*、*E. chrysanthemi* 所測得菌數 Ecc 最高為  $1.3 \times 10^2$  個菌數，Ech 最高為  $5.2 \times 10^1$  個菌數，宋<sup>(2)</sup> 以 SL1/SR1 偵測 *Acidovorax avenae* subsp. *citruilli* 之靈敏度  $1.2 \times 10^2$  個菌數，朱<sup>(1)</sup> 以 nL/nR 偵測 *Burkholderia caryophylli* 則為約 20 個菌數，Prosen et al.<sup>(21)</sup> 偵測 *P. syringae* pv. *phaseolicola* 之靈敏度為  $10^3$  cfu 等，可以看出 SfL1/SfR2 之引子對 *P. cichorii* 之菌液靈敏度是屬於較佳的。另外 Prosen et al.<sup>(21)</sup> 曾提到將 *P. syringae* pv. *phaseolicola* 以專一性探針雜合反應方法 (probe hybridization) 所測得之靈敏度為  $10^1$  cfu/ml，本研究開發的 SfL1/SfR2 引子對則不須經雜合反應即可達  $5.5 \times 10^1$  cfu 之靈敏度，且時間上也相對地縮短為四小時內即可得知分析結果。從試驗結果確定 SfL1/SfR2 引子對 *P. cichorii* 菌株具高靈敏度，且進一步將其他非標的菌株之 DNA 或菌液與 *P. cichorii* 混合進行 PCR 反應，皆



可產生 379 bp 的專一性片段，且不會有任何干擾訊號出現，顯示其他非標的細菌之存在並不會影響 *P. cichorii* 的偵測，因此得知所發展之引子對具有偵測 *P. cichorii* 的價值。

在進行 *P. cichorii* 靈敏度測試時，其萃取方法是採用 Wang et al.<sup>(31)</sup> 之方法將稀釋好的菌液以 0.5 N NaOH 來打破細胞讓 genomic DNA 流出細胞外，再以 Tris-HCl buffer 中和含 genomic DNA 之 0.5 N NaOH 之反應液，並以此反應液取少量直接進行 PCR 反應，即可得到明確的 DNA 專一性片段，宋<sup>(2)</sup> 及朱<sup>(1)</sup> 等人也是應用上述方法，進一步開發單一菌落快速檢定法，所得之結果顯示，若取 *P. cichorii* 單一菌落應用此方法以 SfL1/SfR2 進行檢測，可於四小時內快速鑑定 *P. cichorii*。採用此方法不僅不須花費太多時間及材料來大量養菌以抽取 DNA，且可以在短時間內即完成 *P. cichorii* 之鑑定或診斷。除單一菌落之測試外，本研究也應用 PCR 技術偵測向日葵植株上之細菌性葉斑病菌，測試結果發現接種向日葵葉斑病菌 24 hr 及 48 hr 後均偵測不到葉斑病菌，但是在接種 72 hr, 96 hr 及 120 hr 取得之樣品，已經可約略看出葉斑病菌所引起之初期病徵，當時所取得之樣品都能偵測到向日葵細菌性葉斑病菌，顯示所設計之引子對可應用於田間植株之偵測。

由研究結果顯示，所開發之 SfL1/SfR2 專一性引子對，確實具有檢測效果及實用性，未來除實際應用於田間植株病害之偵測、種子檢測等，也可應用於植物病原菌之檢疫，尤其在檢疫方面，當面臨大量樣品時，可解決因使用傳統之生理生化及病原性測定既費時又耗力的問題，另外，應用 SfL1/SfR2 引子對針對 *P. cichorii* 可能為害且具經濟重要性之寄主進行檢測，可以確認 *P. cichorii* 在台灣是否已廣泛發生。

## 參考文獻

1. 朱軒宇。1999。Burkholderia caryophylli 偵測技術之發展應用。國立中興大學植物病理系研究所第二十九屆畢業碩士論文。
2. 宋秉峰。1999。鑑定及偵測瓜類細菌性果斑病菌之聚合酵素連鎖反應技術。國立中興大學植物病理系研究所第二十九屆畢業碩士論文。
3. 許秀惠、施淑晴、丁佩分、林俊義。2004。向日葵細菌性葉斑病之特性及藥劑篩選。植病會刊。13：329-334。
4. 蔡佳玲。1998。應用聚合酶連鎖反應技術偵測台灣 Erwinia 軟腐細菌。國立中興大學植物病理系研究所第二十八屆畢業碩士論文。
5. 蘇秋竹、徐世典、曾國欽。1989。芹菜細菌性葉斑病。植保會刊。31：346-357。
6. Anna, O. A., Hyman, L. J., Toth, R. L. and Toth, I. K. 2002. Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria Erwinia carotovora and Erwinia chrysanthemi. Appl. Environ. Microbiol. 68：1499-1508.
7. Arnold, D. L., Atheypollard, A., Gibbon, M. J., Taylor, J. D. and Vivian, A. 1996. Specific oligonucleotide primers for the identification of Pseudomonas syringae pv pisi yield one of two possible DNA fragments by PCR amplification：evidence for phylogenetic divergence. Physiol. Mol. Plant Pathol. 49：233-245.
8. Bereswill, S., Pshl, A., Bellemann, P., Zeller, W. and Geider, K. 1992. Sensitive and species-specific detection of Erwinia amylovora by polymerase chain detection analysis. Appl. Environ. Microbiol. 58：3522-3526.
9. Bereswill, S., Bugert, P., Volksch, B., Ullrich, M., Bender, C. L., et al. 1994. Identification and relatedness of coronatine-producing pseudomonas syringae pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. Appl. Environ. Microbiol. 60:2924-2930.
10. Chase, A. R. 1988. Compendium of ornamental foliage plant diseases. APS PRESS 92pp.
11. Chase, A. R. and Jones, J. B. 1986. Effects of host nutrition, leaf age, and Preinoculation light levels on severity of leaf spot of dwarf schefflera caused by Pseudomonas cichorii. Plant Dis. 70：561-563.
12. Derrasse, A., Prious, S., Kotoujansky, A. and Bertheau, Y. 1994. PCR and restriction fragment length polymorphism of a pel gene as a tool to identify Erwinia carotovora in relation to potato disease. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1437-1443.
13. Grogan, R. G., Misaghi, I. J., Kimble, K. A., Greathead, A. S., Ririe, D. and Bardin, R. 1977. Varnish spot, destructive disease of lettuce in California caused by Pseudomonas cichorii. Phytopathology. 67：957-960.
14. Gulya, T. J., Woods, D. M., Bell, R. and Mancl, M. K. 1991. Disease of sunflower in california. Plant Dis. 75：572-574.
15. Jagger, I. C. 1914. Bacterial leaf spot disease of celery. Phytopathology. 4：395(Abstr.).
16. Jones, J. B., B. C. Raju., and A. W. Engelhard. 1984. Effects if temperature and leaf wetness on development of bacterial spot of geranium and chrysanthemum incited by Pseudomonas cichorii. Plant Dis. 68：248-251.
17. Louws, F. J., Rademaker, J. L. W. and de Bruijn, F. J. 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of

- phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 81-125.
18. Manulis, S., Valinsky, L., Lichter, A. and Gabriel, D. W. 1994. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* with DNA primers and probes identified by random amplified polymorphic DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 4094-4099.
  19. Mullen, J. M. and G. S. Cobb. 1984. Leaf spot of southern magnolia caused by *Pseudomonas cichorii*. *Plant Dis.* 68 : 1013-1015.
  20. Mullid, K. B. and Faloon, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology.* 155 : 335-350.
  21. Prosen, D., Hatziloukas, E., Schaad, N. W. and Panopoulos, N. J. 1993. Specific detection of *pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. *Phytopathology* 83 : 965-970.
  22. Robbs, C. F. and Almeida, A. M. R. 1982. Bacterial leaf blight of sunflower caused by *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp. First record in Brazil. *Rev. Plant Pathol.* 61 : 356.
  23. Sambrook, j., Mantis, T. I. and Fritsch, E. F. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Press, N. Y.
  24. Sato, M., Watanabe, K., Yazawa, M., Takikawa, Y. and Nishiyama, K. 1997. Detection of new ethylene-producing bacteria *Pseudomonas syringae* pvs. *cannabina* and *sesame*, by PCR amplification of genes for the ethylene-forming enzyme. *Phytopathology* 87 : 1192-1196.
  25. Schaad, N. W., Azad, H., Peet, R. C. and Panopoulos, N. J. 1989. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by a DNA hybridization probe. *Phytopathology* 79 : 903-907.
  26. Seal, S. E., Jackson, L. A. and Daniels, M. J. 1992. Isolation of a *Pseudomonas solanacearum* specific DNA probe by hybridization and construction of species-specific oligonucleotide primers for sensitive detection by the polymerase chain-reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 3759-3761.
  27. Smith, M. A. and Ramsey, G. B. 1956. Bacterial zonate spot of cabbage. *Phytopathology* 46 : 210-213.
  28. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 : 503-517.
  29. Toth, I. K., Hyman, L. J. and Wood, J. R. 1999. A one-step PCR-based method for the detection of economically important soft rot *Erwinia* species on micropropagated potato plants. *J. Appl. Microbiol.* 87 : 158-166.
  30. Tskahashi, Y., Omura, T., Hibino, H. and Sato, M. 1996. Detection and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *atropurpurea* by PCR amplification of specific fragments from an indigenous plasmid. *Plant Dis.* 80 : 783-788.
  31. Wang, H., Qi, M. and Cutler, A. J. 1993. A simple method of preparing plants samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21: 4153-4154.
  32. 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.
  33. Wilk, J. D. and Dye, D. W. 1974. *Pseudomonas cichorii* causing tomato and celery diseases in New Zealand. *N. Z. J. Agr. Res.* 17 : 123-130.

## ABSTRACT

Hseu, S. H.,<sup>1</sup> Shentue, H.<sup>1</sup> and Lin, C. Y.<sup>1,2</sup> 2006. Development of specific PCR primers for identification of *Pseudomonas cichorii*. Plant Pathol. Bull. 15: 275-285 (<sup>1</sup> Department of Plant Pathology, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.; <sup>2</sup>Corresponding author, E-mail: cylin@wufeng.tari.gov.tw)

A specific PCR (polymerase chain reaction) primer pair have been developed using RAPD ( random amplified polymorphic DNA ) to detect *Pseudomonas cichorii*. Totally sixty random primers were used to find specific DNA fragments of *P. cichorii*, and a specific DNA fragment of 1,100 bp amplified by the primer OPX17 was cloned into the pCR<sup>®</sup>II-TOPO vector and further sequenced to design a specific primer pair SfL1 / SfR2. The primer pair could amplify a distinct band of 379 bp that was specific to *P. cichorii*, and no DNA fragment amplified by the same primer pair from the other tested 21 bacterial species in 6 genera. Sensitivity of PCR for detection of *P. cichorii* with primer pair SfL1 / SfR2 was between 5 ~ 10 pg for purified DNA and 5.5 ~9 cfu for cultured cells. Non-target bacteria did not affect the efficiency of specific amplification of *P. cichorii* in PCR assay with primer pair SfL1 / SfR2. PCR technique using primer pair SfL1 / SfR2 identifies the culture of *P. cichorii* within 3 - 4 hours and detected the bacterium in artificially inoculated sunflower leaf tissue. Based on the data provided, we conclude that the primer pair SfL1 / SfR2 might be a useful tool for rapid identification and diagnosis of *P. cichorii*.