

鑑別 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 及 *Erwinia chrysanthemi* 細菌性軟腐病菌 專一性引子之開發

許秀惠¹ 申屠萱¹ 曾國欽² 林俊義^{1,3}

¹ 臺中縣 行政院農業委員會農業試驗所 植物病理組

² 臺中市 國立中興大學 植物病理系

³ 聯絡作者，電子郵件：cylin@wufeng.tari.gov.tw

接受日期：中華民國 96 年 2 月 27 日

摘要

許秀惠、申屠萱、曾國欽、林俊義. 2007. 鑑別 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 及 *Erwinia chrysanthemi* 細菌性軟腐病菌專一性引子之開發. 植病會刊 16 : 19-29

利用隨機增幅多型性核酸技術 (RAPD) 增幅彩色海芋細菌性軟腐病菌菌株 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) 之基因體 DNA，篩選出一 1,200 bp 具專一性之片段 Y20，該片段經選殖後進行轉型質體 pY20Ecc-1200 bp 核酸序列分析，再依據其序列與 NCBI 核酸資料庫比對得到該序列與 *E. chrysanthemi* (Ech) 之 *rhi N* 基因有 83 % 相似處，並根據相同序列處設計出專一性引子對 Ec3F / Ec4R，可用於區分 Ecc 及 Ech。應用此專一性引子對進行聚合酶連鎖反應，對於供試 225 株 Ecc 菌株均可增幅出 497 bp 之片段，供試 85 株 Ech 菌株均可增幅出 548 bp 之片段，但對供試之其他非標的菌株皆無法增幅出任何片段。以該引子對偵測彩色海芋細菌性軟腐病菌 Ecc 及蝴蝶蘭軟腐病菌 Ech 之 DNA 時，靈敏度同樣為 10~50 pg，且與 6 屬 7 種其他非標的菌株 DNA 混合時並不影響其偵測結果。以 Ec3F / Ec4R 偵測 Ecc 及 Ech 菌液之靈敏度時，最低分別可測到 1.2×10^1 及 1.1×10^1 個細菌數，且與其他 2 屬 3 種其他非標的細菌之菌液混合時並不會影響其偵測結果。以 Ec3F / Ec4R 建立對於 Ecc 及 Ech 之單一菌落快速檢定法，確實可偵測並區分 Ecc 及 Ech 菌株，且可應用於田間軟腐病株之偵測，因此，確認本試驗所設計之引子對 Ec3F / Ec4R 能快速鑑定及偵測軟腐病菌，並能區分 Ecc 及 Ech。

關鍵詞：彩色海芋、軟腐病菌、引子對

緒言

細菌性軟腐病是重要的植物病害之一，在台灣高溫多濕的氣候下，頗適合細菌性軟腐病發生，目前已有各種作物受軟腐病菌危害^(2, 3, 4, 5, 7, 8)，包括蔬菜、花卉及果樹等，尤其是彩色海芋，當軟腐病發病嚴重時可造成 50% 以上的損失⁽²⁾，軟腐病已成為彩色海芋栽培上的主要限制因子。由於軟腐病菌寄主廣泛，且可危害植物的生長期、儲藏期或運輸期，在世界各地造成極大的經濟損失⁽²⁰⁾，對於已正式加入 WTO 的台灣而言，未來面對大量農產品自由進口的情勢下，亟需開

發一個快速的診斷鑑定方法，以保護我國的農業，對於國內而言，如能早期確認病害種類，即能給予早期且明確的病害防治方法，可降低農民損失。

近年來分子生物技術發展快速，已廣泛被用於病原菌之鑑定與偵測，其中聚合酶連鎖反應技術 (polymerase chain reaction, PCR) 因具有高專一性及靈敏度，又可在很短的時間內得知結果，已成為診斷、鑑定及偵測病原菌的有利工具⁽¹⁷⁾。在台灣引起作物細菌性軟腐病的病原菌主要為 *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) 及 *E. chrysanthemi* (Ech)⁽¹³⁾，根據國內外文獻資料顯示，*Erwinia* 屬的專一性核酸引子包括可

偵測 *E. carotovora* subsp. *atroseptica* 及 Ech 之 ERWFOR 三條核酸引子⁽²³⁾、可偵測 *E. carotovora* subsp. *atroseptica* 之核酸引子對 ECA1f / ECA2r⁽⁴¹⁾，可單獨偵測 Ech 之 ADE1/ADE2⁽⁴⁸⁾ 以及 5A / 5B⁽¹⁾ 等，但尚未有可同時偵測且又能區分 Ecc 及 Ech 二種病原細菌的專一性引子對。因此本研究應用隨機增幅多型性核酸技術 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技術，自軟腐病菌全基因體中篩選出對 Ecc 具專一性之核酸片段，並設計出可同時偵測且區分 Ecc 及 Ech 的專一性引子對。

材料與方法

菌株來源

供試軟腐病原細菌 *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) 來自彩色海芋 (153 株菌株)、火鶴 (5 株菌株)、向日葵 (5 株菌株)、番茄 (14 株菌株)、白菜 (25 株菌株)、馬鈴薯 (20 株菌株) 及梨 (3 株菌株) 等寄主，共 225 株 Ecc，供試 *E. chrysanthemi* (Ech) 來自向日葵 (15 株菌株)、蝴蝶蘭 (70 株菌株) 等寄主，共 85 株 Ech；供試軟腐菌株來自農試所植病組細菌室所分離保存，而其他供試細菌菌株如表一。

細菌全 DNA 之製備

先將細菌接種於 5 ml 之 LB broth (Luria-Bertaini 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 緩衝溶液懸浮一次後以 12,000 rpm 離心 10 min，去除上清液，溶於 0.5 ml 之 STE 中，加入 50 μ l 的 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate)，於 65°C 作用 30 min，加入 25 μ l / ml 的

表一、供試菌株

Table 1. Bacterial strains used in this study

Bacterium	Strain
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AA19
<i>Burkholderia caryophylli</i>	Tw7, Tw9
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	Zan01~50
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Ech10~22, Sr53~56
<i>Pantoea agglomerans</i>	Yx5, Yx7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pae
<i>P. putida</i>	Pu
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Pss
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Ia29, 57
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>	A072

proteinase K (100 μ g / ml) 於室溫作用 30 min 後，再加入 27.5 μ l / ml 的 RNase A (50 μ g / ml)，於 37°C 作用 30 min 後，加入等體積之 phenol / chloroform (phenol:chloroform:isoamylalcohol = 25 : 24 : 1) 緩慢混勻至產生乳白色，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% 酒精緩慢混勻後，於 -20°C 放置 1 hr 以上或隔夜，再以滅過菌的牙籤挑取 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 μ l 無菌去離子水暫放於 4°C 下，待 DNA 溶解後測其 OD₂₆₀ / 280 值，貯放至 -30°C 備用⁽²¹⁾。

質體 DNA 之製備

細菌質體 DNA 的抽取步驟係以 Plasmid miniprep purification 套組進行 (Genemark Technology Co., Ltd)，其步驟如下：將經選殖之白色菌落培養於含有 Kanamycin (50 μ g / 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 μ l 的 solution I 溶解菌體，再加入 200 μ l solution II 並混勻，最後加入 200 μ l 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 μ l 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 μ l 去離子水，以 12,000 rpm 於 4°C 離心 30 sec 以回收 DNA。

RAPD 增幅反應及專一性引子之篩選

首先取彩色海芋軟腐病菌 Ecc (Zan01, Zan03, Zan13) 及蝴蝶蘭 Ech 菌株各 3 株 (Ech15, Ech20, Sr54) 之 DNA 為模版，應用 OPERON 10-MER KITS 之 OPX 01~20, OPY 01~20 及 OPZ 01~20 等共 60 個隨機引子進行 RAPD 反應，總體積 20 μ l 中，包含 100 ng 之 DNA、200 μ M 的 dNTPs、0.25 μ M 的引子、0.8 U 的 DNA 聚合酶與反應緩衝液，置於 GeneAmp PCR System 2400 迴溫循環器中，先以 94°C 反應 1 min，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 μ 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 (ethidium bromide) 染色後置於 UV box 上觀察及照相。根據電泳結果初步篩選出可同時自 Ecc 及 Ech 軟腐菌株增幅產生共同條帶，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，比較各引子對細菌性軟腐病菌與其他細菌所增幅出之 DNA 片段異同，以篩選出能對細菌性軟腐病菌產生專一性 DNA 片段之引子。

專一性 DNA 片段之回收、純化及核酸探針之製備

本試驗係將 Ecc 經 RAPD 得到之產物以電泳分析後，將欲回收的片段 DNA 切下，放到 Ultrafree®-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 回收後，以非放射性 Random Primer Fluorescein Labeling Kit with Antifluorescein-AP (NEN) 製作核酸探針。首先取 19 μ 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 μ l 之 Random primer and reaction buffer mix、5 μ l Fluorescein nucleotide mix、1 μ l Klenow fragment 及去離子水至總體積為 30 μ l，混合均勻後置於 37°C 下作用至少 1 hr。作用完成後加入 5 μ l 0.1 M EDTA (pH8.0) 以終止反應，即為製備好的核酸探針，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 方法⁽²⁴⁾，將瓊脂凝膠上的 DNA 轉漬於尼龍濾膜上。首先以 Ecc、Ech 及其他細菌 DNA 為模版以 OPY-20 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, pH7.5; 1.5 M NaCl) 處理 30 min；剪適當大小的尼龍濾膜以 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。轉漬完成後取出尼龍濾膜並以 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 μ 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 1 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 二次，再以含有 0.1% SDS 的 0.2X SSC 溶液於 65°C 下漂洗 15 min 二次，再以 buffer I (0.1 M Tris-HCl, pH7.5; 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® Life Science Products, Boston) 之

buffer II (1:5000) 漂洗 1 hr 後，再以 buffer I 漂洗四次，每次 5 min，最後以 buffer III (0.1 M Tris-HCl, pH9.5; 0.15 M NaCl) 漂洗二次，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

以 TOPO TA Cloning® (Invitrogen) 套組進行 DNA 片段之選殖。先取 4 μ l 回收 DNA 片段加入 1 μ l Salt solution 與 1 μ l 的 pCR® II-TOPO vector，於室溫 5 min 後置於冰上取 2~6 μ 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 μ 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 μ l 100 mM 之 IPTG、40 μ l 40 μ 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；並將上述挑到之選殖株委託品宇生物科技公司進行核酸定序後，藉由 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網際網路進行線上基因庫 (GenBank) 的查詢與比對，並依此序列利用 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)。

聚合酵素連鎖反應及引子對專一性與靈敏度之測定

聚合酵素連鎖反應中的反應混合液含 100 ng 的 DNA，0.1 μ M 的引子，200 μ M 的 dNTPs，0.4 U 的 Pro-Taq DNA polymerase 及 1X 的反應緩衝液等，加去離子水至總體積 20 μ l。最適當之 PCR 反應條件為 94°C / 5 min，94°C / 30 sec，60°C / 30 sec 及 72°C / 30 sec 進行 30 個循環後，再以 72°C 10 min 終止反應。反應完成後以 1X TAE 緩衝溶液製成之 2% agarose 進行電泳分析。

(1) Ec3F / Ec4R 引子對專一性之測試

DNA 專一性測試：分別抽取供試之 225 株 Ecc 及 85 株 Ech 菌株之 DNA，並依上述增幅條件進行 PCR 反應，以測試引子對 Ec3F / Ec4R 偵測 Ecc 及 Ech 兩種菌株 DNA 之專一性。

另外，將供 Ecc (Zan01) 及蝴蝶蘭 Ech (Ech15) 菌

株之 DNA 與 *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia caryophylli*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* 等 6 屬共 7 種其他非標的菌株之 DNA 各自以等比例混合，再分別取 10 ng 的量依上述增幅條件進行 PCR 反應，以了解供試樣品中若混雜其他不同的病原菌或雜菌，引子對 Ec3F / Ec4R 對 Ecc 及 Ech 兩種菌株之 DNA 是否仍具專一性。

將供試彩色海芋 Ecc 及蝴蝶蘭 Ech 菌株分別培養在 NA 培養基上培養 24 hr 後以無菌水懸浮，並稀釋為 10^6 cfu / ml，而供試之 *P. syringae* pv. *syringae*, *P. putida*, *A. tumefaciens* 等其他非標的菌株則分別培養於適當之培養基，之後以無菌水懸浮，並調整其濃度約為 $10^4 \sim 10^8$ cfu / ml，每個稀釋濃度先各別與供試之 Ecc 或 Ech 菌液 10^6 cfu / ml 以相等體積混合後，取 50 μ l 菌液，以 0.5 N NaOH 破解細胞方法將細胞打破後，再進行 PCR 反應，以測試樣品中存在不同數量之非標的細菌，是否干擾所設計引子對 Ec3F / Ec4R 偵測軟腐病菌之專一性。

(2) Ec3F / Ec4R 引子對靈敏度測試

DNA 靈敏度測試：分別將供試 Ecc 及 Ech 菌株之 DNA 稀釋成 100, 50, 10, 1 ng / μ l 及 100, 50, 10, 5, 1, 0.1 pg / μ l 等濃度，各取 1 μ l 並以引子對 Ec3F / Ec4R 進行 PCR 反應，以測試引子對 Ec3F / Ec4R 偵測 Ecc 及 Ech 供試菌株 DNA 之靈敏度。

細菌細胞數靈敏度測試：先確認供試細菌之菌量，將供試彩色海芋 Ecc 及蝴蝶蘭 Ech 菌株分別在 NA 培養基上培養 24 hr 後以無菌水懸浮，並調整其 OD₆₂₀ 之讀值為 0.3 (約 10^8 cfu / ml)，並以 10 倍系列稀釋，使其濃度約為 $10^1 \sim 10^7$ cfu / ml，取適當之稀釋細菌懸浮液以 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，以確認供試細菌之菌量。再將上述系列稀釋中每個稀釋濃度各取 50 μ l 於 200 μ l 微量離心管中，加入 50 μ l 之 0.5 N NaOH，混勻後再取 50 μ l 加入 50 μ l 的 1M Tris-HCl (pH 8.0) 以中和，取 2 μ l 並以 Ec3F / Ec4R 為引子對進行 PCR 與電泳分析以測試引子對之靈敏度。

細菌性軟腐病菌單一菌落快速檢測

參考 Wang⁽²⁷⁾ 之簡易方法並稍加修改，分別以滅菌牙籤沾取經純化後的 Ecc 或 Ech 單一菌落，放入含 50 μ l 0.5 N NaOH 溶液之微量離心管中，劇烈震盪後，取出 25 μ l 加入 25 μ l 1 M Tris buffer 混合均勻，取 1 μ l

以引子對 Ec3F / Ec4R 進行 PCR 反應及電泳分析。

應用 PCR 偵測彩色海芋及蝴蝶蘭組織內之細菌性軟腐病菌

至后里及潭子地區彩色海芋栽培田攜回 20 株罹患軟腐病之植株為供試樣品，每株均分別切取其球根、莖、葉等部位罹軟腐之組織，同時至蘭園攜回 20 株罹患軟腐病之蝴蝶蘭植株，分別切取葉片罹軟腐之組織，各取約 50 mg 的組織塊，置於已加入 100 μ l 0.5 N NaOH 之離心管中，於 5,000 rpm 下離心 3 min，取上清液 15 μ l 加入 135 μ l 之 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中混合均勻⁽²¹⁾，之後分別取 2 μ l 進行 PCR 反應，測試所設計之引子對 Ec3F / Ec4R 偵測植物組織內細菌性軟腐病菌之能力。

結 果

以 RAPD 選殖專一性 Ecc-1200 片段

首先取海芋軟腐病菌 Ecc 菌株 (Zan01, Zan03, Zan13) 及蝴蝶蘭 Ech 菌株各 3 株 (Ech15, Ech20, Sr54) 之全 DNA 為模版，以 OPX、Y、Z 01~20 共 60 組隨機引子進行 RAPD 分析，其中 OPY-20 只在所有 Ecc 軟腐菌株為模板能產生約 1,200 bp 共同片段 (圖一, A)。進一步以該 1,200 bp DNA 片段作為核酸探針以進行南方雜合法分析，結果顯示此 1,200 bp 探針只與 Ecc 有雜合訊號 (圖一, B)，因此可初步確認此 1,200 bp 片段應為軟腐病菌 Ecc 之共同 DNA 片段，該片段則選殖於 pCR® II-TOPO 載體，定名為 pY20Ecc-1,200 bp，此片段 DNA 經委託定序後，藉由 NCBI 網際網路進行基因庫的查詢與比對，發現此序列與 Ech 之 *rhiN* gene 相似性為 83% (圖二)，其保留序列落在兩個區域，分別是位於 339 至 427 bp 及 578 至 1,171 bp 處，且 Ech 在此兩段之間的序列比 Ecc 多了 49 bp，因此利用此相異處，以 Vector NTI 8 (InforMax) 於第一段設計 2 條正向引子 Ec3F, Ec4F，第二段設計 2 條反向引子 Ec3R, Ec4R (圖二)，此四條引子對組合與其他非標的菌株一起進行 PCR 反應，其反應之增幅條件經試驗後設定為 (a) 94°C 5 min，1 個循環；(b) 94°C 1 min、60°C 30 sec、72°C 30 sec，30 個循環；(c) 72°C 10 min，1 個循環，反應結果確認 Ec3F / Ec4R 對其他非標的菌株不會產生任何片段 (資料未示)，因此應用 Ec3F / Ec4R 引子對以同樣的 PCR 反應條件進一步探討該引子對偵測 Ecc 及 Ech 之專一性及靈敏度。

Ec3F / Ec4R 引子對之專一性

測試來自彩色海芋 153 株菌株、火鶴 5 株菌株、向日葵 5 株菌株、番茄 14 株菌株、白菜 25 株菌株、馬鈴薯 20 株菌株及梨 3 株菌株等總共 225 株 Ecc 菌株，結果顯示 Ec3F / Ec4R 引子對均可增幅出 497 bp 之片段，而向日葵 15 株菌株及蝴蝶蘭 70 株菌株等總共 85 株 Ech 菌株則可增幅出 548 bp 條帶，確認 Ec3F / Ec4R 引子對可以區分供試的 Ecc 及 Ech 菌株。

將供試彩色海芋 Ecc (Zan01) 及蝴蝶蘭 Ech (Ech15) 菌株之 DNA 混合後再分別加入等量的 *A. tumefaciens*, *B. caryophylli*, *P. agglomerans*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *R. solanacearum* 或 *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* 等其他 6 屬 7 種之非標的菌株之 DNA，進行 PCR 反應，並不影響 Ec3F / Ec4R 引子對偵測 Ecc 及 Ech 之結果 (圖三)。若偵測樣品中標的軟腐病菌菌量較低且混雜不同濃度之非標的細菌時，結果顯示當 Ecc 或 Ech 菌液 10^6 cfu / ml 與菌量大於 100 倍至小於 100 倍的 *P. syringae* pv. *syringae*, *P. putida*, *A. tumefaciens* 等其他 2 屬 3 種非標的菌株菌液 (10^4 ~ 10^8 cfu / ml) 混合，再進行 PCR 反應，同樣地，若偵測樣品中含 Ecc 菌株，則可在 497 bp 處形成條帶，若偵測樣品中含 Ech 菌株，則可在 548 bp 處形成條帶，不受其他 2 屬 3 種非標的菌株菌液存在之影響，均出現專一性的片段 (資料未示)，顯示所設計之引子對無論樣品中是否雜有非標的細菌，對於標的軟腐病菌株仍具專一性。

Ec3F / Ec4R 引子對之靈敏度

以引子對 Ec3F / Ec4R，針對 Zan01 菌株 (Ecc) 及 Ech15 菌株 (Ech) 的全 DNA 進行靈敏度測定，PCR 反應結果顯示無論對 Ecc 或 Ech 之 DNA，其最低之偵測量可達 10 pg~50 pg (圖四)。

利用 NaOH 溶液直接裂解軟腐病菌之細胞，使溶出 DNA 的方式進行 PCR，結果顯示當偵測供試之 Ecc 培養之菌液時，可偵測到 1.1×10^1 個細菌數，當偵測供試之 Ech 培養之菌液時，可偵測到 1.2×10^1 個細菌數 (圖五)。

細菌性軟腐病菌菌落快速鑑定

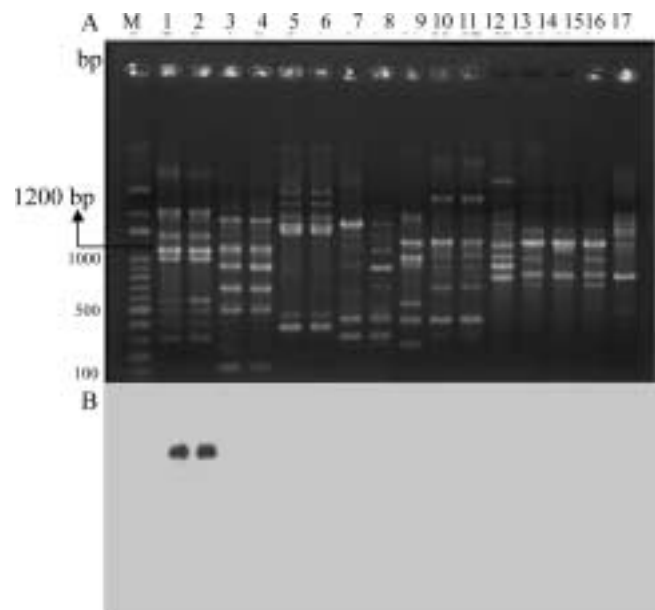
Ecc 或 Ech 的單一菌落利用 0.5 N NaOH 溶液分別萃取其 DNA，再以引子對 Ec3F / Ec4R 進行 PCR 反應，結果顯示供試之 Ecc 及 Ech 單一菌落分別在 497 bp 處及 548 bp 處形成條帶，因此可以將所設計之引子對用於菌落快速鑑定，並區分該菌落是為 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 或 *E. chrysanthemi* (圖六)。

應用 PCR 偵測植物組織內細菌性軟腐病菌

以所設計之引子對 Ec3F / Ec4R 偵測彩色海芋植株罹軟腐病之組織，結果發現不論所取之樣品是彩色海芋植株之球根、莖或葉組織，供試樣品經 PCR 反應後均可在 497 bp 處產生條帶，顯示此引子對能用來偵測彩色海芋植株內之 Ecc 軟腐病菌。而以所設計之引子對 Ec3F / Ec4R 偵測蝴蝶蘭葉片罹軟腐病組織，結果發現供試之蝴蝶蘭葉片組織樣品經 PCR 反應後可在 548 bp 處產生條帶，顯示此引子對能偵測到蝴蝶蘭葉片組織內之 Ech 軟腐病菌 (圖七)。

討 論

在台灣 *Erwinia* 屬引起之軟腐病發生非常普遍^(13, 26)，主要病原細菌包括 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) 及 *E. chrysanthemi* (Ech)，其中以 Ecc



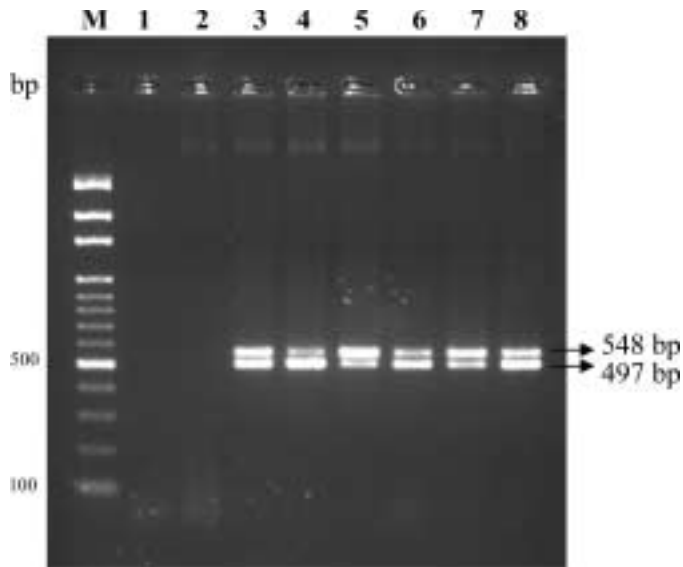
圖一、利用隨機引子 OPY-20 進行軟腐病菌及其他細菌菌株之 RAPD 分析後得到的電泳圖譜 (A)，及利用選殖自軟腐病菌 Ecc-Zan01 菌株的 Y20Ecc-1200 探針進行之南方雜合反應 (B)：M 為 Bio 100 marker，1-2 為 Ecc 菌株 Zan01 及 Zan03，3-4 為 Ech 菌株 Ech15 及 Ech20，5~17 為非標的菌株 (表一)。

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis analysis showing RAPD patterns of strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc), *E. chrysanthemi* (Ech) and other bacteria using OPY-20 random primer (A) and southern hybridization of the RAPD products probed with Y20Ecc-1200 fragment cloned from Ecc strain Zan01. (B). Lanes 1-2, Ecc strains Zan01, Zan03; Lanes 3-4, Ech strains Ech15, Ech20; Lanes 5~17, non-target bacterial strains (Table 1); M, Bio 100 marker.

AGCCGTGGAA	TACCTACACT	TACATCGCTG	ACGTGGACGA	40
AGTGATCACC	GCACAGCGTC	GCGAAGGGAT	CTTCGCCGGG	80
ATTATGACGC	TGACTCGCAA	AGCCTCTCAG	GCGGGGGCGG	120
TGATGTTGGT	GGGCGTGGTA	TTGCAGCTAT	CCGGCTTTGT	160
GTCCGGGCAG	AGTGTACAAG	CTCCGGGCGT	CAGCCACACG	200
ATTCTGATGA	TTTTGAGCGT	TGGCACCGTG	GGCGTGCTGG	240
CGCTGGGTTT	CCTGGTTTCT	CTGCGCTTTA	AACTCAATCT	280
GCAAACGCAC	AGCGTGCTGC	GGGAAGAAAC	GCTGAAAATG	320
CGCGAAGCCG	GACGCCCTGT	ACCGGAAAAG	ATTACGCCGC	360
AGGCACGGGC	<u>AACGGTCGAA</u>	<u>ATGCTGGC(T/C)G</u>	<u>GTATGCCGTA</u>	400
Ec3F →				
<u>TGAATCGCTG</u>	<u>TGGGG(G/C)AACA</u>	<u>ACAACATCGG</u>	CTACCTGAAC	440
Ec4F →				
CGCCATAAAG	GTGACAAGCC	GGTCACGCAT	GCCACGCAGT	480
CGTAACTGTA	TTGAACTGTT	AACTGATAAC	TCAATTGGAT	520
GAATGACTAT	GACCGTATTC	AGTGTA AAC	ATAGCCCGCT	560
TTTACGTCAG	CCGGAGCGCT	TCATCTCCCG	TGAGGGTCTG	600
AAGGCGCTGA	TTTGCCGTAT	GCGGCGCTGA	CTGGTGAATA	640
TTGAGGATAA	AACCGGTGAG	TTCTTGTTAC	GGCTGGACGA	680
TGGTCGGGTG	ATTGATACCA	AAGGCTGGGC	<u>GGGATGGGAA</u>	720
<u>TGGACGCACG</u>	<u>GCATCGGGCT</u>	GTACGGGATT	TACCAGTATT	760
Ec3R ←				
ATCAGCAGAC	GGGTGATGAG	CAGATGCGTG	CCATCATCGA	800
CGACTGGTTT	ACTGAGCGTC	TGGCTGAAGG	TACGCCGACG	840
AAGAATGTGA	<u>ACACCGTATG</u>	<u>TCCGTTCTG</u>	<u>ACGCTGGCTT</u>	880
Ec4R ←				
ATCGCTATGA	AGAGACGGGC	GACGCGCGCT	GGCGGCCGTA	920
TCTGGAGCGC	TGGGCGGAGT	GGGTGATGTA	TGAAATGCCG	960
CGCACGGATA	AGCAGGGTTT	GCAGCACATT	GTTTATAACA	1000
ATGAAAACCA	CCAGCAGCTG	TGGGATGACA	CGCTGATGAT	1040
GAGCGTGCTG	CCGCTGGCGA	AAATTGGCAA	GCTGTAAAC	1080
CGACCGGAGT	TTGTGGAAGA	AGCCATGTAT	CAGTTCTTGC	1120
TACACGTGCA	ATACCTGATG	GATCGTGAAA	GCGGCCTGTG	1160
GTTCCACGGC	T			1171

圖二、選殖株重組質體 pY20Ecc-1200bp 嵌入 DNA 片段之序列，粗體為 Ecc 與 Ech 相似的序列，畫線處為 Ec3F、Ec4F 兩條正向引子及 Ec3R、Ec4R 兩條反向引子。

Fig. 2. The sequence of the inserted DNA fragment in recombinant plasmid pY20Ecc-1200bp. The sequences of primers Ec3F, Ec4F, Ec3R and Ec4R are underlined, and the similar sequence between Ecc and Ech are bold-faced.

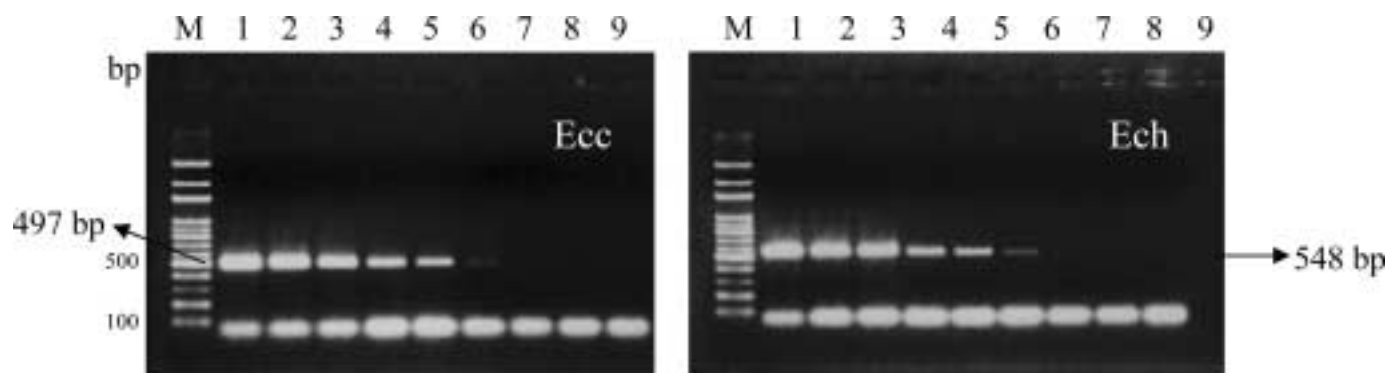


圖三、軟腐病菌 *E. carotovora* subsp. *carotovora* Zan01 及 *E. chrysanthemi* Ech15 與其他 6 屬 7 種非標的菌株的 DNA 混合後，以引子對 Ec3F / Ec4R 進行聚合酵素連鎖反應之電泳圖譜。M 為 100 bp marker；1 為負控制組；2 僅含 *Pseudomonas putida*；3-8, Ecc 及 Ech 依序分別混合 *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia caryophylli*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* 等非標的菌株。

Fig. 3. Polymerase chain reaction (PCR) products amplified from total DNA of strains *E. carotovora* subsp. *carotovora* and *E. chrysanthemi* mixed with other nontarget bacterial DNA with primer pair Ec3F/Ec4R. M, 100 bp marker; lane 1, negative control; lane 2, only *P. putida* DNA; lanes 3-8, Ecc and Ech mixed with *A. tumefaciens*, *B. caryophylli*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *R. solanacearum*, *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, respectively.

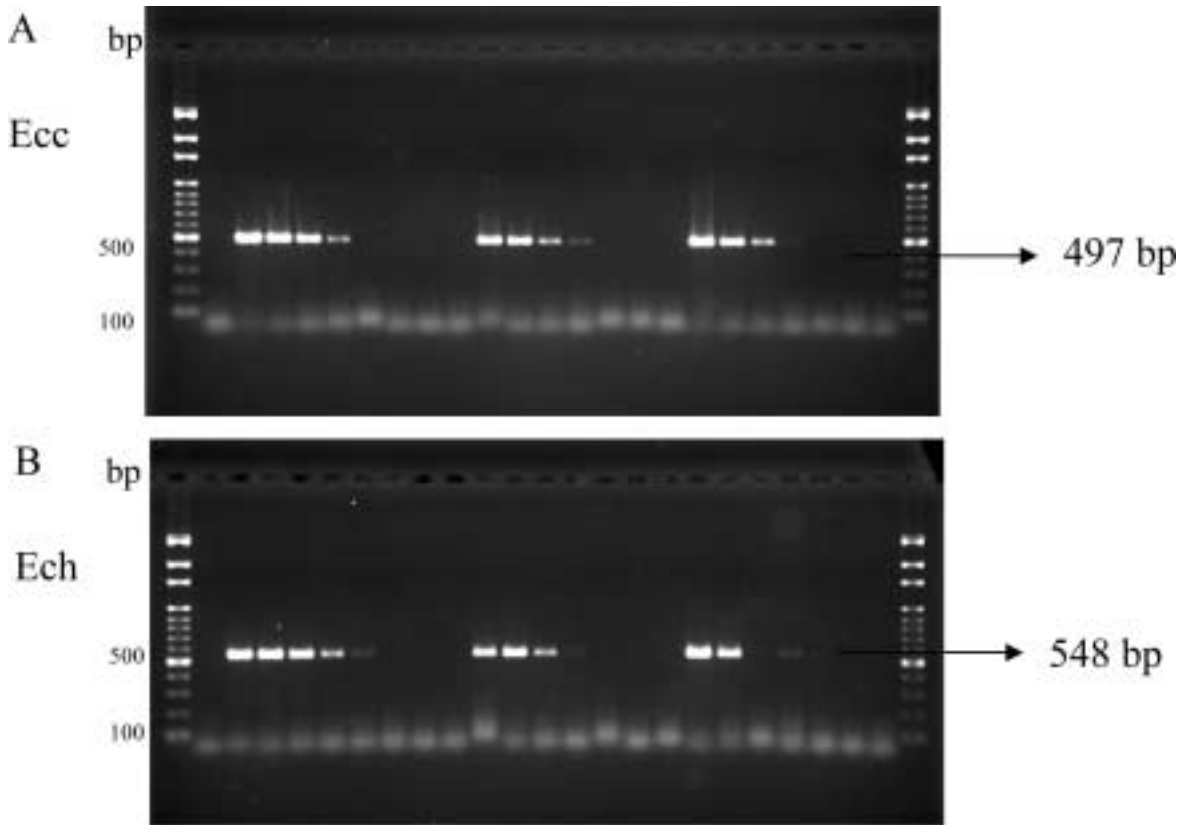
最為常見，該病原細菌之寄主範圍廣泛，包括蔬菜、花卉及果樹等作物^(2, 3, 4, 5, 7, 8)，而青蔥、玉米、牛蒡、蝴蝶蘭及狐狸尾蘭等作物之軟腐病則主要由 Ech 引起，至於馬鈴薯、芹菜、白蘿蔔、胡蘿蔔、芋頭、彩色海芋及向日葵等作物^(1, 3)之軟腐病則可由 Ecc 及 Ech 二種病原菌引起，雖然引起作物軟腐病之病原菌有所不同，但引起之軟腐病徵卻相同，所以無法單由植株之病徵直接鑑定軟腐病原菌的種類，必須將樣品攜回實驗室經組織分離手續，再藉由在 CVP 培養基上造成凹陷與否來作為鑑定 *Erwinia* 屬軟腐細菌之依據⁽²²⁾，但因為 Ecc 及 Ech 二種病原細菌皆會在 CVP 培養基上產生凹陷，所以仍然無法直接由培養基上所產生之凹陷來區分到底是 Ecc 或 Ech 病原細菌所造成，再加上二種病原細菌的生理生化之特性又頗為相近，若要區分 Ecc 及 Ech 二種病原細菌，必須進行更多的生理生化特性測定，因此造成鑑定工作不但耗時且費力。

一般鑑定及偵測 *Erwinia* 屬之植物病原細菌的方法除了傳統的生理生化測定及血清學方面的測定之外，建立分子生物技術來檢測病原菌的方法為近年來的趨勢⁽¹⁵⁾。在分子生物技術方面包括以 RFLP 等多型性分子試驗來區分 *Erwinia* 屬之不同種或同種間不同生理小種之分類^(9, 12, 25, 28)以鑑定病原菌，但此方法需很多的 DNA 量，且需花費數天的時間，在諸多分生技術中，因為 PCR 技術操作簡便，且所需的樣品量少，又可縮短偵測的時間，因此被廣為利用於病原菌之鑑定，其中直接應用於 *Erwinia* 屬之專一性核酸引子且已發表的報告，包括以 23S rRNA 基因所設計的引子對來檢測 *E. amylovora*⁽¹⁶⁾，自 *pel* 基因設計之引子對 Ec1 / Ec2 來檢測 *E. carotovora*⁽¹²⁾，同時應用多個引子對來分別偵測 *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) 及 Ech^(11, 23)，以及



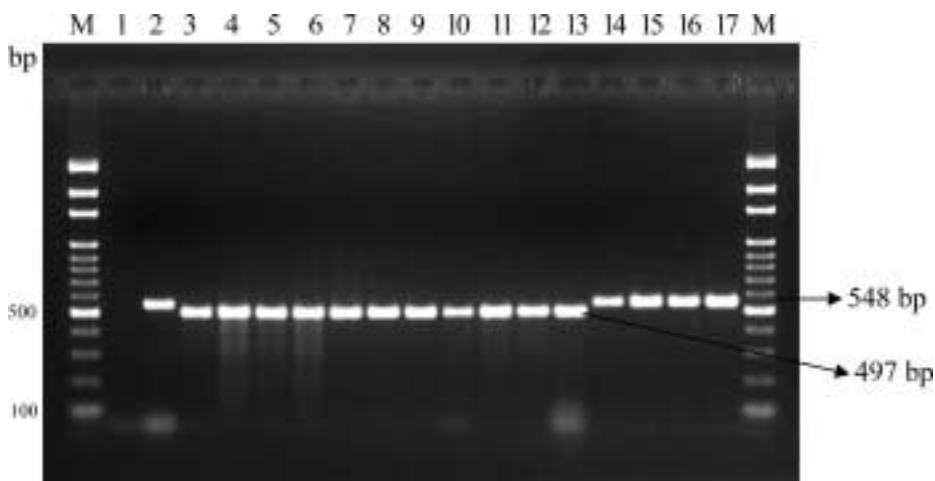
圖四、應用引子對 Ec3F/Ec4R 進行聚合酵素連鎖反應偵測海芋軟腐病菌 *E. carotovora* subsp. *carotovora* Zan01 及 *E. chrysanthemi* Ech15 菌株全 DNA 之靈敏度。圖A 為 Ecc (Zan01) 全DNA 分析之電泳圖譜；圖B 為 Ech (Ech15) 全DNA 分析之電泳圖譜，M 為 100 bp marker，1-9 分別為 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 50 pg, 10 pg, 1 pg 及 0.1 pg。

Fig. 4. Sensitivity of PCR using primer pair Ec3F/Ec4R to detect total DNA of *E. carotovora* subsp. *carotovora* Zan01 (A) and *Erwinia chrysanthemi* Ech15 (B). Lanes 1-9, 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 50 pg, 10 pg, 1 pg and 0.1 pg respectively. M, 100 bp marker.



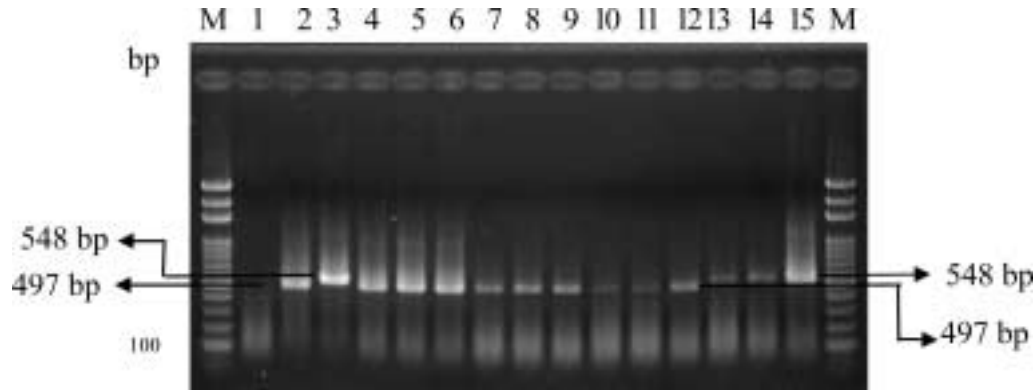
圖五、應用引子對 Ec3F / Ec4R 進行聚合酵素連鎖反應偵測彩色海芋軟腐病菌 Ecc 及蝴蝶蘭 Ech 軟腐病菌細胞數之靈敏度，2, 10, 17 為 $1.1\sim 1.2 \times 10^4$ cfu；3, 11, 18 為 $1.1\sim 1.2 \times 10^3$ cfu；4, 12, 19 為 $1.1\sim 1.2 \times 10^2$ cfu；5, 13, 20 為 $1.1\sim 1.2 \times 10^1$ cfu；6, 14, 21 為 $1.1\sim 1.2$ cfu；7, 15, 22 為 $1.1\sim 1.2 \times 10^{-1}$ cfu；8, 16, 23 為 $1.1\sim 1.2 \times 10^{-2}$ cfu；M 為 100 bp marker；1 為去離子水控制組。

Fig. 5. Sensitivity of PCR for detection of cultured *E. carotovora* subsp. *carotovora* (A) and *E. chrysanthemi* (B) with primer pair Ec3F / Ec4R. Lanes 2, 10 and 17, $1.1\sim 1.2 \times 10^4$ cfu; lanes 3, 11 and 18, $1.1\sim 1.2 \times 10^3$ cfu; lanes 4, 12 and 19, $1.1\sim 1.2 \times 10^2$ cfu; lanes 5, 13 and 20, $1.1\sim 1.2 \times 10^1$ cfu; lanes 6, 14 and 21, $1.1\sim 1.2$ cfu; lanes 7, 15 and 22, $1.1\sim 1.2 \times 10^{-1}$ cfu; lanes 8, 16 and 23, $1.1\sim 1.2 \times 10^{-2}$ cfu; . M, 100 bp marker; lane 1, negative control.



圖六、以引子對 Ec3F / Ec4R 進行聚合酵素連鎖反應鑑定不同的 Ecc 及 Ech 菌株單一菌落之電泳圖譜。M 為 100 bp Marker，1 為 ddH₂O 控制組，2 為 Sr50 菌株之 DNA，3-13 分別為來自彩色海芋 Ecc 菌株 Zan 1, 2, 3, 9, 10, 13, 31, 34, 36, 39, 50 等之單一菌落，14 - 17 則為來自蝴蝶蘭之 Ech 菌株 Ech 17, 18, 19, 20 等菌株之單一菌落。

Fig. 6. Identification of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi* by PCR with primer pair Ec3F / Ec4R. Individual colonies on agar plates were extracted with NaOH and used as templates for PCR. Lane 1, ddH₂O negative control; lane 2, Sr50 DNA; lanes 3-13, colonies from Ecc strains Zan1, 2, 3, 9, 10, 13, 31, 34, 36, 39, 50 respectively; lanes 14 - 17, colonies from Ech strains Ech 17, 18, 19 and 20 respectively. M, 100 bp marker.



圖七、以引子對 Ec3F / Ec4R 進行聚合酵素連鎖反應偵測彩色海芋及蝴蝶蘭軟腐組織中之軟腐病菌 Ecc 或 Ech 之電泳圖譜。M 為 100 bp Marker，1 為 ddH₂O 控制組，2 為彩色海芋軟腐菌株 Zano01 之 DNA，3 為蝴蝶蘭軟腐菌株 Ech15 之 DNA，4-6 罹軟腐病之彩色海芋種球，7-9 罹軟腐病之彩色海芋莖組織，10-12 罹軟腐病之彩色海芋葉組織，13-15 罹軟腐病之蝴蝶蘭葉組織。

Fig. 7. Detection of infected tissues of cala lily and phalaenopsis from fields by PCR with primer pair Ec3F / Ec4R. Lane 1, ddH₂O negative control; lane 2, Zano01 DNA; lane 3, Ech15 DNA; lanes 4-6, infected rhizome tissues of cala lily; lanes 7-9, infected stem tissues of cala lily; lanes 10-12, infected leaf tissues of cala lily, lanes 13-15, infected leaf tissues of phalaenopsis; M, 100 bp marker.

根據 16S rRNA 序列所設計之引子對，可同時檢測 Eca、Ecc 及 Ech⁽²⁵⁾ 等研究，皆希望能針對不同的 *Erwinia* 屬病原菌建立一套快速的檢測方法，但目前發表的引子對中，僅有可個別偵測 Ech 之專一性核酸引子對 ADE1 / ADE2⁽¹⁸⁾ 及 5A / 5B⁽¹⁾，可偵測出 *E. carotovora* 類細菌之引子對 Ec1 / Ec2⁽¹²⁾ 等，總之，從已發表的報告資料顯示，尚未有可以同時檢測並區分 Ecc 及 Ech 兩種病原細菌的引子對，若欲同時偵測並區分此二種病原細菌，就必須應用二種引子對進行 PCR 反應，比較浪費資材。從文獻資料顯示，有關二種性質相近的菌株間之鑑別，已知的有 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* 及 *Xanthomonas vesicatoria*，可用核酸引子同時偵測此兩種相近的病原菌⁽¹⁴⁾，而本研究以 RAPD 策略由彩色海芋細菌性軟腐病菌 Ecc 選殖到特有之 1,200 bp 專一性片段，此片段之核酸序列與 Ech *rhiN* 基因片段有 83% 相似性，並且其相似處落於二個區域，而在此 Ech 基因這二個區域之間比起 Ecc 多了 49 bp，因此利用此差異性，設計出具專一性的引子對 Ec3F / Ec4R，再應用此引子對 PCR，對 Ecc 菌株均可增幅出 497 bp 之片段，對 Ech 菌株均可增幅出 548 bp 之片段，而且只要進行一次 PCR 反應，即能達到區分 Ecc 及 Ech，因此使用此引子對可以改善國內外已發表鑑定軟腐病菌引子對之缺點。

對於 Ec3F / Ec4R 引子對靈敏度之測定，PCR 結果顯示所設計之引子對對於標的細菌最低可偵測到 10 pg~50 pg 的全 DNA 量，與其他相關研究比較，其偵測靈敏度較高⁽¹⁰⁾，而在測試供試標的細菌數量靈敏度試

驗中，Ecc 最低可測到之菌數量為 11 個，Ech 最低可測到之菌數量為 12 個，此結果與蔡⁽⁶⁾ 的結果比較，顯然我們所設計之引子對其偵測靈敏度較高，蔡⁽⁶⁾ 以 5A / 5B 及 Ec1 / Ec2 等引子對可測到之最低菌數量 Ecc 為 1.3×10^2 個菌數，而 Ech 為 5.2×10^1 個菌數，我們所設計之引子對之偵測靈敏度也比 Toth 等人⁽²⁵⁾ 的研究所得之靈敏度高，Toth 等人⁽²⁵⁾ 研究的結果最低可測到之菌數量為 $2.0 \times 10^3 \sim 3.4 \times 10^4$ ，顯然本研究設計之引子對 Ec3F / Ec4R 對 Ecc 及 Ech 之靈敏度較佳。

另外，應用所設計之引子對 Ec3F / Ec4R，並利用 PCR 技術，開發出單一菌落快速檢定法，從試驗結果顯示，此方法可於三~四小時內快速完成鑑定，並同時區分 Ecc 及 Ech，不但縮短鑑定所需的時間，且所需的樣品量少。另外，直接應用此引子對偵測田間軟腐病植株，不論是供試之彩色海芋樣品或蝴蝶蘭樣品均可直接偵測到植物體內之軟腐病菌，且可確認該樣品是 Ecc 病原菌或是 Ech 病原菌。綜合本研究的結果顯示，所開發之 Ec3F / Ec4R 專一性引子對在未來可推廣應用於田間植株、種球偵測、確認土壤是否帶菌⁽¹⁹⁾ 以及建立檢疫標準等。

引用文獻

1. 朱木貴。1995。 *Erwinia chrysanthemi* 之遺傳差異性、藍色素基因選殖及 PCR 偵測。國立中興大學植物病理學研究所博士論文。
2. 李一芸。1994。台灣彩色海芋細菌性軟腐病之研究。國立中興大學植物病理學研究所第二十四屆畢

- 業碩士論文。
3. 許秀惠、宋秉峰、吳峻璋、施淑晴、林俊義。2004。向日葵細菌性軸腐病之特性、品種抗性及藥劑篩選。植保會刊。46 : 367-378。
 4. 許秀惠、林俊義、宋子承。2003。 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 引起之蕃茄細菌性莖腐病。植保會刊。45 : 257-262。
 5. 許秀惠、林俊義、黃毓斌、方尙仁、安寶貞。2001。橫山梨果腐病之病因及病原菌藥劑感受性測定。植保會刊。43 : 105-115。
 6. 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。
 7. 劉興隆。1997。菊花扦插苗細菌性軟腐病之研究與應用PCR技術偵測 *Erwinia chrysanthemi*。國立中興大學植物病理系研究所第二十七屆畢業碩士論文。
 8. 鍾文鑫。1983。台灣青蔥細菌性軟腐病之研究。國立中興大學植物病理學研究所第二十三屆畢業碩士論文。
 9. 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.
 10. Berswell, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W. and Geider, K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 3522-3526.
 11. De Bore, S. H. and Ward, L. J. 1995. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. Phytopathol. 85 : 854-858.
 12. Darrasse, 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. Hsu, S. T. and Tzeng, K. C. 1981. Species of *Erwinia* associated with soft rot disease of plant in Taiwan. Pages 9-18 in Proc. Fifth Int. Conf. Plants Path. Bact. J. C. Lozano, ed. CIAT. Cali, Colombia.
 14. Kulfu, K. M. and Cuppels, D. A. 1997. Development of a diagnostic DNA probe for *Xanthomonas* causing bacterial spot of peppers and tomatoes. Appl. Environ. Microbiol. 63 : 4462-4470.
 15. Louws, F. J., Rademaker, J. L. W. and de Bruijn, F. J. 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto-bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. Annu. Rev. Phytopathol. 37 : 81-125.
 16. Maes, M., Garbeva, P. and Crepel, C. 1996. Identification and sensitive endophytic detection of fireblight pathogen *Erwinia amylovora* with 23S ribosomal DNA sequences and polymerase chain reaction. Plant Pathol. 45 : 1139-1149.
 17. Miller, S. A. and Martin, R. R. 1988. Molecular diagnosis of plant disease. Annu. Rev. Phytopathol. 26 : 409-432.
 18. Nassar, A., Darrasse, A., Lemattre, M., Kotoujansky, A. and Dervin, C., 1996. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR amplified fragments of *pel* genes. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 2228-2235.
 19. Perombelon, M. C. M. and Apple, J. D. 1984. Soil and seed tubers as source of inoculum of *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* for stem soft rot of potatoes. Phytopathology 74 : 429-432.
 20. Perombelon, M. C. M. and Kelman, A. 1980. Ecology of the soft rot *Erwinias*. Annu. Rev. Phytopathol. 18 : 361-387.
 21. Sambrook, J., Mantis, T. I. and Fritsch, E. F. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Press, N. Y.
 22. 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.
 23. Smid, E. J., Jansen, A. H. J. and Gorria, L. G. M. 1995. Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in potato tubers using polymerase chain reaction. Plant Pathol. 44 : 1058-1069.
 24. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98 : 503.
 25. 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.
 26. Tzeng, K. C. and Hsu, S. T. 1981. Identification and characterization of soft-rotting *Erwinia* in Taiwan. Plant Prot. Bull. 23 : 77-85.
 27. Wang, H., Qi, M. and Cutler, A. J. 1993. A simple method of preparing plants samples for PCR. Nucleic Acids Res. 21 : 4153-4154.
 28. 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

Hseu, S. H.,¹ Shentue, H.¹, Tzeng, K. C.² and Lin, C. Y.^{1,3} 2007. Development of specific primers for differential identification pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. Plant Pathol. Bull. 16 : 19-29 (¹ Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung, Taiwan; ² Department of Plant pathology, Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, ³ Corresponding author, E-mail: cylin@wufeng.tari.gov.tw)

A specific PCR (polymerase chain reaction) primer pair has been developed using RAPD (random amplified polymorphic DNA) to differentially detect *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) and *E. chrysanthemi* (Ech). A specific 1,200 bp DNA fragment was amplified and cloned from Ecc DNA using OPY20 primer, one of the sixty random primers used in RAPD. Nucleotide sequence of this 1,200 bp DNA showed 83% similarity to Ech *rhiN* gene, where conserved sequences were displayed in two regions. But in Ech *rhiN* sequence, there are additional 49 bp nucleotides inserted between these two conserved regions. Herein, a set of primers Ec3F / Ec4R was designed and applied to differentially detect Ecc and Ech by PCR. Using bacterial chromosomal DNA as templates, a distinct 497 bp fragment can be amplified from 225 Ecc strains, and a 548 bp fragment was amplified from 85 Ech strains. No fragment can be amplified from the other seven bacterial species in six genera. Sensitivity of PCR for detecting Ecc and Ech was between 10~50 pg for purified DNA and 1.1×10^1 cfu and 1.2×10^1 cfu for cultured cells, respectively. It took 3-4 hr to detect Ecc and Ech by colony PCR using Ec3F / Ec4R primer set and the target bacteria in infected tissues of cala lily and phalaenopsis. Results presented here suggest that the primer pair Ec3F / Ec4R applied in PCR can be very useful in rapid identification, detection, and differentiation of the soft rot pathogens Ecc and Ech.

Key words: Cala lily, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, primer.