

台灣聖誕紅各品系中聖誕紅分枝誘導性植物菌質體之檢測與鑑定

陳武揚¹ 周浩平² 陳以錚² 林長平^{1,3}

¹ 台北市 國立台灣大學植物病理與微生物學系

² 台北市 行政院農委會動植物防疫檢疫局

³ 聯絡作者，電子信箱：cplin@ntu.edu.tw；傳真機：+886-2-23661980

接受日期：中華民國 96 年 2 月 26 日

摘要

陳武揚、周浩平、陳以錚、林長平. 2007. 台灣聖誕紅各品系中聖誕紅分枝誘導性植物菌質體之檢測與鑑定. 植病會刊 16 : 47-50.

聖誕紅 (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) 屬大戟科之花卉作物，為臺灣最大宗之盆花，亦是世界上銷售量第一之花卉作物。聖誕紅分枝誘導性植物菌質體 (poinsettia branch-inducing phytoplasma) 可誘導聖誕紅產生良好分枝性，其分類地位歸屬於 X-disease group (16SrIII) 之 16SrIII-H 亞群。本研究利用廣用型 PCR 引子對 f1/ r1 檢測隨機採樣之國外進口聖誕紅幼苗及國內園藝苗圃生產之聖誕紅種苗包括彼得之星、聖誕玫瑰、紅絲絨、雙色倍利、紅色倍利、白色倍利、天鵝絨、威望、光輝、檸檬雪、莫內、高檔等品系，發現其內均帶有植物菌質體。另利用 P1/ P7 引子對或 Pof/ Por 引子對由各檢體中增幅出 16S rDNA, 16S-23S rDNA spacer 及部分之 23S rDNA 序列並加以選殖、定序及比對，該等 DNA 序列與 GenBank 中登錄之聖誕紅分枝誘導性植物菌質體序列 (AF190223) 相同度均高達 99%，顯示各檢測之聖誕紅品系中均存在有聖誕紅分枝誘導性植物菌質體。

關鍵詞：植物菌質體 16SrIII-H 亞群、聖誕紅、聖誕紅分枝誘導性植物菌質體

聖誕紅 (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) 屬大戟科之花卉作物，聖誕紅分枝誘導性植物菌質體 (poinsettia branch-inducing phytoplasma) 可誘導聖誕紅產生良好分枝性⁽⁷⁾。植物菌質體為重要之植物病原菌，植物受感染後常表現之典型病徵包括：枝條增生、矮化、葉片畸形及變小、黃化及簇葉、髮根、花器綠化、不孕花、果實畸形及不發育等⁽⁴⁾。長久以來人們相信在聖誕紅中有某種生物媒介物 (biological agent) 可誘導聖誕紅產生分枝性狀⁽⁵⁾，Lee 等人於 1997 年利用植物菌質體專一性引子對進行 nested PCR，在 20 種分枝性佳的聖誕紅商業品系中均偵測到植物菌質體的存在⁽⁷⁾，此外，當以菟絲子為媒介時，可將植物菌質體由分枝性佳的聖誕紅傳到不易分枝的健康聖誕紅植株上，使其產生易分枝性，並以 ELISA 檢驗證實該病徵並非由聖誕紅嵌紋病毒 (poinsettia mosaic virus, PnMV) 所造成^(7,9)。聖誕紅

分枝誘導性植物菌質體在分類上歸屬於 X 病害植物菌質體分類群 (X-disease group, 16SrIII)⁽⁶⁾ 之 H 亞群 (subgroup 16SrIII-H)^(8,9)，其親緣性與 X-disease (subgroup 16SrIII-A) 及 spirea stunt (subgroup 16SrIII-E) 植物菌質體最接近⁽⁸⁾。16SrIII-H 亞群之植物菌質體截至目前為止除聖誕紅外尚未發現有其他天然植物寄主，亦尚未找到可傳播本植物菌質體之媒介昆蟲⁽⁹⁾。聖誕紅分枝誘導性植物菌質體感染聖誕紅所造成的病徵，如植株矮化及產生多量的分枝，卻恰巧成為園藝業者所需要之花卉性狀。聖誕紅為台灣最大宗之盆花，根據統計，2005 年台灣地區聖誕紅的總產量約 146 萬餘盆，其中銷售量最高的品系前五名分別為天鵝絨、倍利、彼得之星、紅絲絨及聖誕玫瑰⁽¹⁾。目前已知在美國及歐洲具有易分枝性的聖誕紅均與此植物菌質體具相關性，國內園藝業者採用之聖誕紅種苗大部分

由國外進口，其是否均攜帶此一植物菌質體，以及該植物菌質體與國內聖誕紅產業之關係在國內均未曾有任何研究加以評估。本研究即針對進口及國內業者生產之聖誕紅種苗進行檢測，以了解該植物菌質體在台灣之菌系分布情形，並提供相關資料予防疫單位參考。

本研究所檢測之十四種聖誕紅供試樣品之品系及進口國家如表一所示。實驗中採用 DNeasy plant mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) 進行聖誕紅葉脈全 DNA 之製備。首先以廣用型 f1/ r1 引子對進行聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)⁽⁹⁾ 以檢測聖誕紅中是否具有植物菌質體。於溫度循環控制器 (GeneAmp[®] PCR System 2700) (Applied Biosystems, CA) 中進行 PCR 循環，反應結束後取 10 μ l 以 1% 瓊脂凝膠進行水平電泳分析，結果發現由所有供試聖誕紅品系中均可增幅出預期大小約 650 bp 之植物菌質體序列片段 (圖一)，即不論是進口之聖誕紅種苗，或由本地農民利用進口種苗所自行繁殖的聖誕紅種苗，均含有植物菌質體。

針對上述之十四種聖誕紅品系選取其中八種品系 (美國進口種苗、義大利進口種苗、彼得之星、紅色倍利、天鵝絨、威望、光輝、高檔) 以能增幅出植物菌質體 16S rDNA, 16S-23S rDNA spacer 及部分 23S rDNA 序列之 P1/ P7 引子對進行 PCR 反應⁽¹⁰⁾，反應結束後取 10 μ l 以 1% 瓊脂凝膠進行水平電泳分析，增幅出之

DNA 片段大小約為 1.8 kb。隨後將該等 PCR 片段進行選殖，首先將 PCR 產物以 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN GmbH) 進行純化，其操作方法依廠商說明進行，接著使用 TOPO TA cloning kit (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) 將純化之 PCR 片段進行選殖，其操作方法亦依廠商說明進行，其後並篩選含有正確插入片段之選殖株，送交明欣生物科技公司 (Mission Biotech, Taipei, Taiwan) 進行定序。由於 P1/ P7 引子對使用於聖誕紅 DNA 之 PCR 反應時，可能因為某些聖誕紅品系中含有不明干擾因子而無法成功地將該等大小約 1.8 kb 之序列增幅出來，因此本研究室利用已解序獲得之部分 rDNA operon 序列，另行設計 Pof/ Por 引子對 (Pof: 5'- CCT TCG GGT TTT AGT GG - 3' ; Por: 5'- TTC ATC GGC TCT TGG TG -3') 以順利將聖誕紅分枝誘導性植物菌質體包含部分 16S rDNA, 16S-23S rDNA spacer 及部分 23S rDNA 之序列增幅出來，以利進行片段選殖及序列比對。PCR 反應進行時，於 0.2 ml PCR 反應管中各置入 50 ng 聖誕紅 DNA、10x PCR 緩衝液 2.5 μ l、dNTP (2.5 mM) 1 μ l、Pof 引子 (20 μ M) 1 μ l、Por 引子 (20 μ M) 1 μ l、Taq 聚合酶 (Promega Corporation, Madison, WI) (5U/ μ l) 0.25 μ l，以及 ddH₂O 使總反應體積為 25 μ l。以下列條件進行 PCR 循環：95 $^{\circ}$ C 5 分鐘；95 $^{\circ}$ C 30 秒、59 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 2 分鐘，進行 35 個循環；72 $^{\circ}$ C 7 分鐘；最後靜置於 4 $^{\circ}$ C 結束整個 PCR 循環。反應結束後取 10

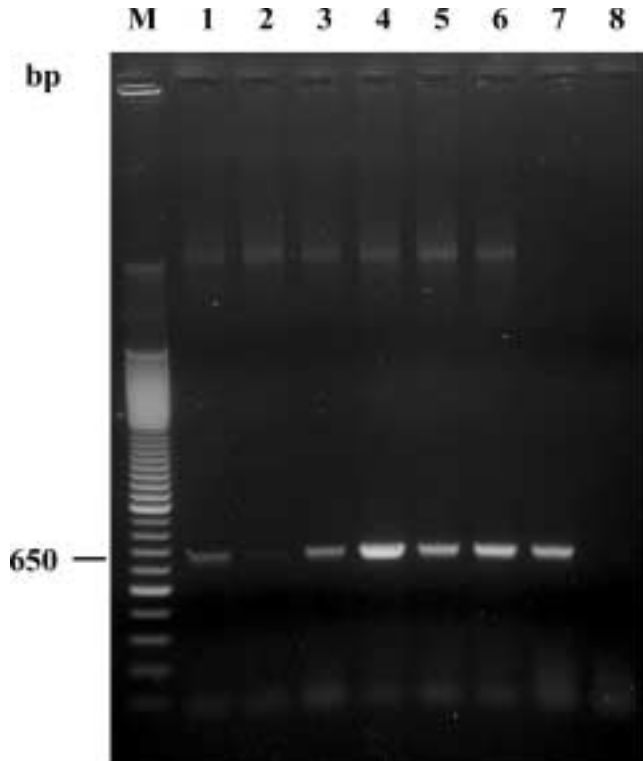
表一、供試聖誕紅品系及使用植物菌質體廣效性引子對 f1/ r1 進行聚合酶連鎖反應之檢測結果

Table 1. Result of polymerase chain reaction with DNA templates prepared from various poinsettia cultivars by using phytoplasma-universal primer f1/ r1

No.	Cultivar ¹	Imported area	Sample number	PCR result ²	Remark
1	Randomly selected from imported seedlings	U. S. A.	2	+	
2	Randomly selected from imported seedlings	Italy	3	+	
3	Peterstar 彼得之星	U. S. A.	25	+	Propagated by local farmer
4	Winter Rose 聖誕玫瑰	U. S. A.	7	+	Propagated by local farmer
5	Red Velveteen 紅絲絨	U. S. A.	7	+	Propagated by local farmer
6	Peptide Marble 雙色倍利	U. S. A.	7	+	Propagated by local farmer
7	Peptide Red 紅色倍利	U. S. A.	12	+	Propagated by local farmer
8	Peptide White 白色倍利	U. S. A.	7	+	Propagated by local farmer
9	Red Velvet 天鵝絨	U. S. A.	26	+	Propagated by local farmer
10	Prestige 威望	U. S. A.	7	+	Propagated by local farmer
11	Red Splendor 光輝	U. S. A.	12	+	Propagated by local farmer
12	Lemon Snow 檸檬雪	Germany	6	+	Propagated by local farmer
13	Monet 莫內	U. S. A.	4	+	Propagated by local farmer
14	Gaodang 高檔	unknown	5	+	Propagated by local farmer

¹ No. 1 and no. 2 samples were randomly selected from imported seedlings by Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine and the cultivar names are unknown.

² +: PCR product about 650 bp in size was amplified



圖一、以植物菌質體廣用型引子對f1/ r1針對彼得之星、聖誕玫瑰、紅絲絨、雙色倍利、紅色倍利、白色倍利等品系之聖誕紅進行聚合酶連鎖反應之結果。

Fig. 1. Polymerase chain reaction (PCR)-product amplified with primer pair f1/ r1 using DNA templates prepared from: lanes 1-6, poinsettia variety Peterstar, Winter Rose, Red Velvet, Pepride Marble, Pepride Red, Pepride White; lane 7, peanut witches' broom as positive control; lane 8, water control. M, 100 bp DNA ladder (Bayou Biolabs, LA) as molecular weight standards. Size (in bp) of PCR products is shown on the left.

μ l 以 1% 瓊脂凝膠進行水平電泳分析，增幅出之 DNA 片段大小約為 1.75 kb，並將 PCR 產物依前述之方法進行選殖及解序。將上述由八個品系所獲得之序列於 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 基因資料庫中以 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 進行比對，發現其均與 GenBank 中登錄之聖誕紅分枝誘導性植物菌質體序列 (AF190223) 之相同度 (identity) 高達 99%，故研判該等聖誕紅品系中之植物菌質體均為聖誕紅分枝誘導性植物菌質體。

本研究使用 Pof/ Por 引子對進行 PCR 可順利取得八種不同品系之聖誕紅部分 16S rDNA, 16S-23S rDNA spacer 及部分 23S rDNA 之序列，其相對於 NCBI 中登錄之 AF190223 序列之鹼基位置為 nt 67- nt 1809。比對各序列分別有 3-8 個鹼基與 AF190223 序列相異且分散

於序列之不同位置。其中有二處鹼基在本研究所得均相同，於 AF190223 相對位置則為不同之鹼基，一處為 nt 146 之 C (AF190223) 相對於 T (本研究所得序列)，及 nt 1516 之 T (AF190223) 相對於 C (本研究所得序列)。

國內園藝業者所栽種之聖誕紅種苗來源絕大部分為仰賴進口，業界亦普遍利用此一植物菌質體促進分枝的特性，以嫁接的方式取得分枝性較佳的聖誕紅園藝性狀⁽²⁾，由此可推論聖誕紅分枝誘導性植物菌質體長久以來已普遍存在於國內所生產販售之分枝性佳的聖誕紅品系中。聖誕紅分枝誘導性菌質體歸屬於 X 病害植物菌質體分類群 (X-disease group, 16SrIII)，該群植物菌質體中有許多亞群成員為重要之病原菌，但由於聖誕紅分枝誘導性植物菌質體係屬於 16SrIII-H 亞群，其目前尚未發現有聖誕紅以外之天然寄主以及任何媒介昆蟲，而且國內進口及種植此類分枝性佳的聖誕紅品系已有多年歷史，故應無針對進口聖誕紅種苗管制聖誕紅分枝誘導性植物菌質體之必要性，但對於 16SrIII phytoplasma group 中之其他成員，包括 X-disease phytoplasma 則應嚴防其進入台灣。

謝 辭

本研究承行政院農委會動植物防疫檢疫局「95 農科-13.4.1-檢-B5 (2)」經費補助，特致謝忱。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. 中華盆花協會. 2005. 2005 年聖誕紅產地巡迴報導. 台灣花卉園藝月刊 220:25-28.
2. 朱建鏞. 1998. 聖誕紅育種技術. p.5-11. 聖誕紅生產技術與消費. 傅仰仁、吳麗春編. 桃園區農業改良場出版.
3. 林翠淳、林長平. 1998. 植物菌質體廣效性 PCR 引子之評估. 植物病理會刊 7:33-42.
4. Agrios, G. N. 2005. Plant diseases caused by mollicutes: phytoplasmas and spiroplasmas. Pages 687-703 in: Plant pathology, 5th ed. G. N. Agrios ed. Academic Press, San Diego, CA.
5. Dole, J. M., Wilkins, H. F., and Desborough, S. L. 1993. Investigation on the nature of a graft-transmissible agent in poinsettia. Can. J. Bot. 71:1097-1101.
6. IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma Taxonomy Group. 2004. '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:1243-1255.

7. Lee, I.-M., Klopmeier, M., Bartoszyk, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Chou, T.-S., Thomson, K. L., and Eisenreich, R. 1997. Phytoplasma induced free-branching in commercial poinsettia cultivars. *Nature Biotechnology* 15:178-182.
8. Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., and Bartoszyk, I. M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:1153-1169.
9. Lee, I.-M. 2000. Phytoplasma casts a magic spell that turns the fair poinsettia into a christmas showpiece. *Plant Health Progress Online publication* DOI:10.1094/PHP-2000-0914-01-RV.
10. Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D., and Kirkpatrick, B. C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. Pages 369-380 in: *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*, vol. I. S. Razin and J. G. Tully eds. Academic Press, San Diego, CA.

ABSTRACT

Chen, W. Y.¹, Chou, H. P.², Chen, Y. J.², and Lin, C. P.^{1,3} 2007. The detection and identification of the poinsettia branch-inducing phytoplasma from various poinsettia cultivars in Taiwan. *Plant Pathol. Bull.* 16: 47-50. (¹ Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan 106, R. O. C.; ² Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Taipei, Taiwan 100, R. O. C.; ³ Corresponding author, E-mail: cplin@ntu.edu.tw; Fax: +886-2-23661980)

The poinsettia, *Euphorbia pulcherrima* Willd., is one of the best selling floricultural crops worldwide. The free-branching morphotype of poinsettia can be induced by poinsettia branch-inducing phytoplasma which is classified phylogenetically in subgroup 16SrIII-H of the X-disease group (16SrIII). The interactions between the phytoplasma and poinsettia result in dwarfing and moderate branching growth habit, which happens to be a desirable trait for poinsettia growers. This study examined the samples of imported and local poinsettia seedlings for the existence of phytoplasma by polymerase chain reaction (PCR)-based method using the primer pair fl/ r1. The PCR products of about 650 bp in size were amplified from all of the fourteen different poinsettia cultivars that were collected from various farms or imported from different countries, indicating that all of the samples tested were affected by phytoplasma. The 16S rDNA, 16S-23S rDNA spacer and partial 23S rDNA sequences of these phytoplasma isolates were amplified with PCR by using primers P1/ P7 or Pof/ Por, and then cloned, sequenced and aligned on NCBI by BLAST program. The 16S rDNA, 16S-23S rDNA spacer and partial 23S rDNA sequences amplified from eight randomly selected samples from the fourteen isolates share 99% identity with that of poinsettia branch-inducing phytoplasma (GenBank accession no. AF190223). The results showed that the poinsettia branch-inducing phytoplasma exists in all samples of poinsettia cultivars examined in this study.

Key words: phytoplasma subgroup 16SrIII-H, poinsettia, poinsettia branch-inducing phytoplasma