

# 植物菌質體及梨衰弱病之診斷及鑑定

劉秀玲<sup>1</sup>、林長平<sup>1,2</sup>

1. 台北市 國立台灣大學植物病理學系
2. 聯絡作者：[電子郵件 cplin@ccms.ntu.edu.tw](mailto:cplin@ccms.ntu.edu.tw)；傳真 02-23661980

## 摘要

植物菌質體 (phytoplasma) 是一種重要之植物病原細菌，可造成花器葉化 (phyllody)、萎凋、矮化 (stunting)、黃化及簇葉 (witches' broom) 等病徵。全球超過兩百種的植物病害是由植物菌質體引起，其中包括多種重要果樹及經濟作物，在農業上造成嚴重的損失。由於迄今仍無法對此病原菌作純培養，故對其生理生化及生物特性的瞭解十分有限，因此也增加其在偵測上的困難。近年來聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 的研發成功，使得植物病害診斷及病原菌之偵測與鑑別更加快速靈敏。而在植物菌質體的研究上，PCR 技術則被普遍的應用於其偵測及類源鑑別之上。梨衰弱病 (pear decline) 為植物菌質體感染梨樹所造成之病害，在美、德、英、法、俄等國及澳洲皆有此一病害之報告。其引起梨樹萎凋、矮化、提早落葉，導致果實品質不良、產量減少，甚至死亡等重大損失，此病害常為梨樹生產之重要限制因子。由於梨衰弱病之病徵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，且植物菌質體在罹病梨樹內之濃度很低且分佈不均，造成組織切片觀察不易。由植物菌質體所引起之梨衰弱病在台灣尚無正式紀錄，從 1994 年六月起，台灣中部地區東勢、和平兩地陸續發生莫名之梨樹病害，本實驗室即針對此一病害進行植物菌質體之 PCR 偵測實驗，結果發現罹病植株內確實有受到植物菌質體感染，而藉由 16S rDNA 基因序列分析結果，顯示其與國外造成桃、梨及蘋果等果樹病害之植物菌質體具有高度相似性，並屬於同一亞群 (apple proliferation group)。

關鍵詞：梨衰弱病、植物菌質體

## 緒言

植物病原細菌病害之診斷與病原菌之鑑定，通常可由病害之病徵、病組織鏡檢、病原菌之培養及其生理生化特性分析、發病生態環境、病原性之確定等方法而達致，其間亦可輔以諸如噬菌體反應、血清反應、脂肪酸組成、蛋白質電泳圖譜及核酸圖譜分析等技術從事診斷鑑定工作。然而近年來，因巨分子分析工具及鑑定技術之研發成功，許多快速鑑定技術亦應運而生且被廣泛的應用於細菌及植物病原菌質體之鑑定及病害診斷之上，此等技術對無法或難以被培養之細菌的鑑定尤為重要。這些技術包括單元抗體、核酸探針之研製(DNA probe) (Rasmussen and Reeves, 1992) 及酵素聯結免疫吸附法(ELISA)，組織轉印法(tissue-printing)、核酸雜合法(hybridization)及聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)等技術之應用，其中許多研究報告乃由細菌基因庫(genomic library)中逢機選取以獲得具特異性的核酸片段當作探針來偵測該植物病原細菌(陳等, 1997; Chung *et al.*, 1994; Ko and Lin, 1994; Mizuno *et al.*, 1995)。此外，聚合酵素連鎖反應(PCR)也廣泛地被利用來鑑定和偵測植物病原細菌(Henson, 1993)，近來亦有研究報告以16S-23S ribosomal DNA區域中的spacer region及重覆序列片段如insertion sequence(IS)為目標(target)，設計具特異性之PCR引子(primer)，並在植物組織檢體中成功地偵測到植物病原細菌(Fegan *et al.*, 1998; Maes *et al.*, 1995; 1996; Miyoshi *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1997; 1998; 1999)。此等技術使得原本很難從事核酸探針選殖之病原細菌如維管束局限性(vascular-limited)之植物菌質體(phytoplasma)、似細菌體(bacteria-like organism)，或者如很難以生理生化特性區分之病原細菌各病理小種等，已能很有效率的完成具高敏感度及高專一性診斷技術之建立。近年來本研究室致力於利用分生技術，研發具專一性之植物病原細菌的偵測與鑑定用之核酸探針及PCR引子序列，並配合核酸雜配(DNA hybridization)和PCR等方法之應用，發展出快速、具高度靈敏性(sensitivity)和專一性(specificity)之病菌檢測系統(林與林, 1998; Chung *et al.*, 1994; Ko and Lin, 1994; Wu *et al.*, 1993)，期盼能將研究成果提供給檢、防疫單位及產業界以便防堵病菌入侵，預防病害發生，及協助產業界進行健康種苗篩選，進而提高作物生產品質，增加國際競爭力。

### 植物菌質體

植物菌質體(phytoplasma)，原名似菌質體(mycoplasmas-like organism, MLO)，是一種重要的植物病原細菌，可造成罹病植株出現枝條增生(proliferation)、侏儒化(dwarf)、花器葉化(phyllody)、花瓣(冠)變綠(virescence)、葉片變小(rosette, little leaf)、萎凋(wilt)、矮化(stunting)、黃化(yellowing)及簇葉(witches' broom)等病徵。目前全球已知有超過兩百種的植物病害是由植物菌質體所引起(Agrios, 1997)，其中包括桃、梨等重要

果樹及花生、甘藷及泡桐等重要經濟作物的病害，在農業上已造成十分可觀的損失。此病原菌最早是在 1967 年被發現，但由於迄今仍無法以人工方式對此病原菌作純培養，故對其生理生化及生物特性的瞭解仍屬有限(Lim *et al.*, 1992; Sinha, 1979; 1980)。植物菌質體病害屬系統性病害，可由昆蟲、種苗、嫁接等途徑傳播，而引起嚴重之損害。此類病害之防治對策，以採用不帶菌之健康種苗及防除媒介昆蟲為主，但此些預防措施需賴正確及快速之診斷偵測技術之配合。目前面對農產品開放進口政策，植物檢疫日益重要，針對迄今仍無法培養之植物菌質體之檢測，則端賴靈敏而快速之偵測方法方能有效達成檢疫目的。本研究室近年來已先後對本省之重要植物病原菌質體如水稻黃萎病、花生簇葉病及甘藷簇葉病等植物菌質體，除利用融合瘤技術(hybridoma techniques)研製單元抗體(monoclonal antibodies) (Shen and Lin, 1993) 外，亦利用基因選殖技術，將植物病原菌質體之基因體 DNA 中包括 rDNA 或 rDNA spacer (徐, 1996)，insertion sequences (IS) 及 repeated sequences 等高重複性片段予以選殖、定序及序列分析，而開發出專一性及廣用型植物菌質體核酸探針及 PCR 引子 (林與林, 1998; 魏, 2002; Ko and Lin, 1994; Wu *et al.*, 1993)，並建立檢測技術。此類核酸探針及 PCR 引子，能有效偵檢出疑病植株或組織中之植物菌質體，如此除可於防疫工作上提供綜合防治策略之資訊外，亦可對開放進口之花卉、水果、糧作等各農、園藝植物及產品之檢疫提供有效之偵檢工具。

### 以聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 偵測植物菌質體

由於聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 的研發成功 (Saiki *et al.*, 1988)，使得植物病害診斷及病原菌之偵測與鑑定更為快速與靈敏。聚合酵素連鎖反應是在試管 (in vitro) 之狀況下，對一特定標的 DNA (target DNA) 所進行之增幅反應，以期獲得大量之標的 DNA 片段以利分析。其主要反應步驟包括：(1) denaturation：將模版 DNA 以高溫處理 (約 94°C)，使其互補雙股分離。(2) primer annealing：降低反應溫度，使核苷酸引子能以氫鍵配對至模版 DNA 之相對位置上。(3) extension：將溫度提升至反應中 DNA polymerase 進行催化反應時所需之溫度，使反應物中之 dNTPs 能依模版 DNA 之序列逐序添加於核苷酸引子之 3'-OH 上，完成 DNA 片段之合成。此三步驟合稱為一個循環，一般 PCR 反應多重複數十個循環，藉以獲得大量 PCR 產物。PCR 反應具備多項優點，使得此技術成為現今普遍用以偵測、診斷植物病害之方法。其中包括：(1) 可用於不易培養病原菌之偵測。(2) 因 target DNA 可經由多次 PCR 反應之後增幅至百萬倍，故靈敏度極高。(3) PCR 反應時所使用之核苷酸引子可決定反應結果之專一性，因此 PCR 技術可依所偵測目的之不同，設計廣效性或專一性核苷酸引子。

近年來，在植物病理學的研究上，PCR 技術已廣泛地被應用於各種植物病原之偵測，在植物菌質體的研究，則因為其尚不能被培養的特性，故學者亦多採

用 PCR 技術來偵測、鑑別或進一步探討植物菌質體之分類特性 (Smart *et al.*, 1996)。Firrao *et al.* (1993) 利用植物菌質體之 16S rDNA 核苷酸序列，合成引子對，用以偵測鑑定造成 apple proliferation 與 clover phyllody 之植物菌質體。Jomantiene *et al.* (1998) 亦藉由分析 16S rDNA 發現稀有植物 *Fragaria multicipita* 其實是受到植物菌質體感染，造成外部型態改變之 *F. chiloensis*。Staniulis *et al.* (2000) 亦藉此偵測發現，苜蓿會同時感染一種以上的植物菌質體。

### 梨衰弱病 (pear decline)

梨衰弱病(pear decline)即為植物菌質體感染梨樹所造成之重要病害，自 1984 年 McLarty 首次報導在英屬哥倫比亞所發生之梨樹萎凋病以來，即在北美太平洋沿岸地區及德、英、法等歐洲各國陸續報告此一病害，澳洲和蘇俄之梨樹栽培區亦有嚴重的梨衰弱病發生 (Davies *et al.*, 1986; Kegler and Klinkowski, 1987; Seemüller, 1992)。梨樹中，目前已知有 French pear (*Pyrus communis*) (Giunchedi *et al.*, 1995)、Japanese pear (*P. pyrifolia*)、Chinese pear (*P. ussuriensis*) (Earle *et al.*, 1962) 等，均屬於極易感染之品種。一旦發病，即引起梨樹萎凋、矮化、提早落葉，導致果實品質不良、產量減少，甚至死亡等重大損失 (Blodgett *et al.*, 1962)，此病害因而成為種植梨樹之重要限制因子之一。梨衰弱病最初被認為是一種病毒性病害，直到 1970 年才由 Hibino 與 Schneider 在梨衰弱病植株中觀察到植物菌質體存在 (Hibino and Schneider, 1970)。此一病害可經由稼接 (grafting) 及媒介昆蟲 (insect vector) 梨木蝨 *Pylla pyricola* Foerster (Jensen *et al.*, 1964) 進行傳播。

關於植物菌質體在梨樹罹病株中之致病機制，至今尚不清楚，僅觀察到在病株中篩管細胞有 callose 的產生，使導管組織功能降低，篩管細胞逐漸壞死，而植物為了維持本身正常之生理功能，即不斷地分化形成新的韌皮部細胞，稱之為 replacement phloem。新生成的韌皮部細胞比正常細胞的體積小且更易壞死，在如此惡性循環的情況下，最終導致罹病株逐漸生長不良，進而萎凋死亡 (Seemüller and Schaper, 1984)。

梨衰弱病之病徵，可區分成三類型：quick decline、slow decline 及 leaf curl。quick decline 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 quick decline 前，會先表現 slow decline，紅葉 (reddening) 及捲葉 (leaf curl) 等病徵。quick decline 較易出現在夏秋兩季，或病株面臨乾熱的環境壓力時，也助於此類病徵之表現 (Westwood and Cameron, 1978)。除此之外，栽培梨樹之根砧對於病徵的類型也有影響，研究發現使用 *P. pyrifolia*、*P. ussuriensis* 及 *P. communis* 充當砧木，則罹病株更易表現出 quick decline 型病徵 (Blodgett *et al.*, 1962; Woodbridget *et al.*, 1957)。

由於梨衰弱病之病徵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。過去對於梨衰弱病之病因探討，大多

直接藉由病徵觀察、顯微鏡技術及傳播試驗等加以證實 (Hibino *et al.*, 1971)。後來 Seemüller (1984) 則利用 DAPI (4'-6-diamidino-2- pheyindole) 將病株組織切片染色，證實病組織內植物菌質體的存在。然而植物菌質體在罹病梨樹內之濃度很低且分佈不均，造成組織切片觀察不易，近來由於分子生物學的發達，許多學者們紛紛利用 PCR 技術來進行偵測梨衰弱病病株中植物菌質體的存在 (Davies *et al.*, 1995)，並進一步利用同一方法檢測可能傳播病原菌之媒介昆蟲 (Carraro *et al.*, 1998；Pollini *et al.*, 2001)。

### 台灣梨樹疑似梨衰弱症病因探討

台灣關於梨樹病害之記錄，包括有梨赤星病 (pear rust, *Gymnosporangium haraeum*)、黑星病 (pear scab, *Fusarium pirium*) 等已超過 24 種，但由植物菌質體所引起之梨衰弱病則尚無正式紀錄。從 1994 年六月起，台灣中部地區東勢、和平兩地陸續發生之莫名梨樹病害，其病徵表現與國外發表之梨衰弱症極為相似。本實驗室即針對此一病害，利用 PCR 技術，進行梨衰弱病病原菌質體之檢測，並希望進一步確定其病因。

本研究室於台中東勢、和平等橫山梨栽種地區，採集疑似梨衰弱病罹病株之枝條，進行植物全 DNA 之抽取。初步採用 Lee 等人 (1990) 依據翠菊黃萎病原菌質體 (aster yellows phytoplasma) 之 Michigan 菌株 (MIAY 86-7) 的 16S rRNA 基因序列設計而來的 R<sub>16</sub>F<sub>2</sub> (ACG ACT GCT AAG ACT GG) 與 R<sub>16</sub>R<sub>2</sub> (TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G)，及本實驗室所研發之植物菌質體專一性引子對，f<sub>1</sub> (AGT GGC GAA CGG GTG AGT AA) 與 r<sub>1</sub> (CGT CAG TAA AGA CCC AGC AA) 引子對，針對疑似梨衰弱病罹病株全 DNA 進行 PCR 反應，以偵測植物菌質體之存在。其中 R<sub>16</sub>F<sub>2</sub>/R<sub>16</sub>R<sub>2</sub> 預期增幅之專一性條帶大小約 1.2Kbp；f<sub>1</sub>/r<sub>1</sub> 增幅片段之大小約 600bp (圖一)。PCR 反應條件如下：

|              | Primer pairs   |                                |
|--------------|--|--------------------------------|
|              | R <sub>16</sub> F <sub>2</sub> +R <sub>16</sub> R <sub>2</sub> | f <sub>1</sub> +r <sub>1</sub> |
| Denaturation | 94°C, 1min   | 94°C, 5sec                     |
| Annealing    | 50°C, 2min   | 58°C, 10sec                    |
| Extension    | 72°C, 3min   | 72°C, 10sec                    |
| Cycle No.    | 35   | 40                             |
| Last cycle   | 72°C, 7min   | 72°C, 3min                     |

PCR 結果顯示，此二對引子對皆可從罹病梨樹植株全 DNA 中偵幅出預期大小之 PCR 產物，由此可得知罹病梨樹植株有受到植物菌質體感染。將該等 PCR 產物純化後進行選殖，對於所獲得之轉型株抽取質體 DNA，進一步對嵌入片段之核酸序列予以解序分析，經由序列比對後發現無論是 R<sub>16</sub>F<sub>2</sub>/R<sub>16</sub>R<sub>2</sub> 或 f<sub>1</sub>/r<sub>1</sub> 所偵幅出之 16S rDNA 序列，皆與國外發表之梨衰弱症 (pear decline)、apple proliferation 植物病原菌質體之 16S rDNA 序列具有高度相似性 (98%)。本年度 (民國九十一年) 從 1 月份至七月份，針對不同月份之梨樹罹病株進行採樣，實驗結果顯示

從4月份開始至7月份之罹病枝條內，PCR反應皆有出現正反應，其中4月份之偵測率為14%，5月時偵測率即大幅增加為71%，6、7月之偵測率各為22%、63%。本實驗並進一步利用國外發表可增幅出植物菌質體16S rDNA全長、16S-23S rDNA spacer及部分23S rDNA之P1/P7引子對（增幅片段之大小約1.8Kbp），現今以已成功增幅出該片段，並完成其選殖及定序工作，刻正對其分子生物資訊作進一步分析，此等資訊除可供台灣梨樹罹病株專一性引子對之設計外，並可進一步分析此一植物菌質體之屬性及其分類地位。

### 結論

植物病原菌質體受其無法人工純培養之限制，使得對其生理生化及生物特性的瞭解所知甚少，而其所引起之植物病害往往造成嚴重的經濟損失。此類病害最佳之防治對策，即為採用不帶菌之健康種苗及防除其媒介昆蟲，但此些預防措施需賴正確及快速之診斷偵測技術配合，方可有效實施。本研究室所研發之植物菌質體PCR引子對f1/r1，其PCR反應時間所需較短（約1小時），偵幅之DNA片段約600bp，其大小適合進行基因定序分析，是目前檢體檢測中之一極為有效之診斷、鑑定工具。而關於東勢、和平疑似梨衰弱病罹病株中，經實驗證實確有植物菌質體之感染，此一結果與年前之出步分析相符（林與林，1998），此次實驗中則進一步進行基因序列分析，其結果顯示此一植物菌質體與造成桃、梨與蘋果等果樹病害之植物菌質體同屬於apple proliferation group。後續實驗將深入探討植物菌質體是否即為導致台灣中部梨樹發生嚴重病害及快速死亡之主要原因，並配合其他實驗如1. 電子顯微鏡觀察：進行罹病株組織切片觀察，以期發現植物菌質體細胞。同時亦利用電子顯微鏡之檢測，觀察罹病株內是否包含有其他病原菌如病毒顆粒或其他細菌之菌體，以確定疑似梨衰弱病可能之發病原因。2. 嫁接實驗。3. 媒介昆蟲之確定：以PCR偵測、找尋田間可能的媒介昆蟲，並進行媒介昆蟲組織切片，利用電顯觀察昆蟲體內中可能含有植物菌質體之器官如中腸、唾腺等（Webb *et al.*, 1999），再加以配合咬食測試等實驗，進一步分析媒介昆蟲傳染之途徑及其對梨樹之危害性，並發展更積極有效的防治策略。

### 參考文獻

1. 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。
2. 徐仕美. 1996. 從16SrDNA限制片段長度多型性與16S-23S Spacer核苷酸序列分析台灣植物菌質體之親緣關係. 國立台灣大學植物病蟲害學研究所 碩士論文。
3. 陳隆鐘、王志宏、謝式土半鈺. 1997. 台灣水稻白葉枯病菌專一性核酸探針之選殖與分析. 植物保護學會會刊 39: 181-194。
4. 魏慧珍. 2002. 以逢機定序策略探討花生簇葉病病原菌質體之基因體DNA 國立台灣大學植物病理學研究所 碩士論文。

5. Agrios, G. N. 1997. Plant diseases caused by mollicutes: phytoplasmas and spiroplasmas. Pages 457-470 in: Plant pathology, 4th Ed. Academic Press, San Diego, CA.
6. Blodgett, E. C., Schneider, H., and Alicele, M. D. 1962. Behavior of pear decline disease on different stock-scion combinations. *Phytopathol.* 52: 679-684.
7. Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P., Gregoris, A., and Osler, R. 1998. Transmission of pear decline by using naturally infected *Cacopsylla Pyri* L. *Acta Hort.* 472: 665-668.
8. Chung, C. H., Lin, C. P., and Chen, C. T. 1994. Development and application of cloned DNA probes for *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal agent of sugarcane ratoon stunting. *J. Phytopathol.* 141: 293-301.
9. 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.
10. Davies, D. L., Clark, M. F., and Adams, A. N. 1986. A Mycoplasma-like organism associated with a decline-like disease in English pears. *Acta. Hort.* 193: 329.
11. Earle, C., Schneider, H., and Arichele, M. D. 1962. Behavior of pear decline disease on different stock-scion combinations. *Phytopathol.* 83: 602-607.
12. Fegan, M., Croft, B. J., Teakle, D. S., Hayward, A. C., and Smith, G. R. 1998. Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay. *Plant Pathol.* 47: 495-504.
13. Firrao, G., Gibbi, E., and Locci, R. 1993. Use of polymerase chain reaction to produce oligonucleotide probes for mycoplasma-like organisms. *Phytopathol.* 83: 602-607.
14. Giunchedi, L., Poggi Pollini, C., Bissani, R., Viccin, V., and Babini, A. R. 1995. Etiology of a pear decline diseases in Italy and susceptibility of pear variety and rootstock to phytoplasmas-associated pear decline. *Acta. Hort.* 386: 489-495.
15. Hibino, H., and Schneider, H. 1970. Mycoplasma-like bodies in sieve tubes of pear trees affected with pear decline. *Phytopathol.* 60: 499-501.
16. Hibino, H., Kaloostian, G. H., and Schneider, H. 1971. Mycoplasma-like bodies in the pear psylla vector of pear decline. *Virology* 43: 34-40.
17. Jensen, D. D., Griggs, W. H., Gonzales, C. O. and Schneider, H. 1964. Pear decline virus transmission by pear psylla. *Phytopathol.* 54: 1346-1351.
18. Jomantiene, R., Davis, R. E., Dally, E. L., and Maas, J. L. 1998. The

- distinctive morphology of '*Fragaria multicipita*' is due to pytoplasma. HortScience. 33(6): 1069-1072.
19. Kegler, H., and Klinkowski, M. 1987. Untersuchungen zum nachweis des virösen birnenverfalls (pear decline). Phytopathol. Z. 58: 293.
  20. Ko.H.C., and Lin,C.P. 1994. Development and application of cloned DNA probes for a mycoplasma-like organism associated with sweetpotato witches'broom. Phytopathol. 84: 468-473.
  21. Lee, I. -M., Davis, R. E., and DeWitt, N. D. 1990. Non-radioactive screening method for isolation of disease-specific probes to diagnose plant diseases caused by mycoplasma-like organism. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1471-1475.
  22. Lim, P. O., Sears, B. B., and Klomparens, K. L. 1992. Membrane properties of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism. J. Bacteriol. 174: 682-686.
  23. Maes, M., Garbeva, P., and Crepel, C. 1995. Direct PCR detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*, the causal agent of bacterial leaf spot and stem rot on pelargonium. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gen., 60/2a: 271-275.
  24. Maes, M., Garbeva, P., and Kamoen. 1996. Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. Phytopathology 86: 63-69.
  25. McLarty, H. R. 1948. Killing of pear trees. Ann. Rep. Anad. Plant Dis. Survey. 28: 77.
  26. Miyoshi, T., Sawada, H., Tachibana, Y., and Matsuda, I. 1998. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by PCR using primers from the spacer region between the 16S and 23S rRNA genes. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64: 249-254.
  27. Mizuno, A., Tsushima, S., Kadota, I., and Nishiyama, K. 1995. A cloned DNA probe for detection of *Pseudomonas gladioli*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 61: 22-26.
  28. Pan, Y.-B., Grisham, M. P., and Burner, D. M. 1997. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald disease. Plant Dis. 81: 189-194.
  29. Pan, Y.-B., Grisham, M. P., and Burner, D. M. 1998. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. Plant Dis. 82: 285-290.
  30. Pan, Y.-B., Grisham, M. P., and Burner, D. M., Legendre, B. L., and Wei, Q. 1999. Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald

- disease. *Plant Dis.* 83: 218-222.
31. Pollini, C. P., Bissani, R., Guerrini, S., and Giunchedi, L. 2001. Epidemiological studies on pear decline (PD) in Italy. *Acta Hort.* 550: 361-364.
  32. Rasmussen, O. F. and Reeves, J. C. 1992. DNA probes for the detection of plant pathogenic bacteria. *J. Biotechnol.* 25: 203-220.
  33. 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.
  34. 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.
  35. Seemüller, E., Schaper, U., and Zimbelmann, F. 1984. Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Z. PflKrankh. PflSchutz.* 91: 371-382.
  36. Shen, W.C., and Lin, C.P. 1993. Production of monoclonal antibodies against a mycoplasma-like organism associated with sweetpotato witches' broom. *Phytopathol.* 83: 671-675.
  37. Sinha, R. C. 1979. Lipid composition of mycoplasma-like organisms purified from clover phyllody and aster yellows-affected plants. *Phytopath. Z.* 96: 132-139.
  38. Sinha, R. C., and Madhosingh, C. 1980. Proteins of mycoplasma-like organisms purified from clover phyllody and aster yellows-affected plants. *Phytopath. Z.* 99: 294-300.
  39. Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens U, Lorenz, K. H., Seemüller, E., and Kirkpatrick, B. C. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2988-2993.
  40. Staniulis, J. B., Davis, R. E., Jomantiene, R., and Kalvelyte, A., Dally, E. L. 2000. Single and mixed phytoplasma infections in phyllody- and dwarf-disease clover plants in Lithuania. *Plant Dis.* 84(10): 1061-1066.
  41. Webb, D. R., Bonfiglioli, R. G., Osler, C. R., and Symons, R. H. 1999. Oligonucleotides as hybridization probes to localize phytoplasmas in host plants and vectors. *Phytopathol.* 89: 894-901.
  42. Westwood, M. N., and Cameron, H. R. 1978. Environment-induced remission of pear decline symptoms. *Plant Dis. Rep.* 62: 176-179
  43. Woodbridge, C. G., Blodgett, E. C., and Diener, T. O. 1957. Pear decline in

the Pacific Northwest. *Plant Dis. Rep.*41: 569-572

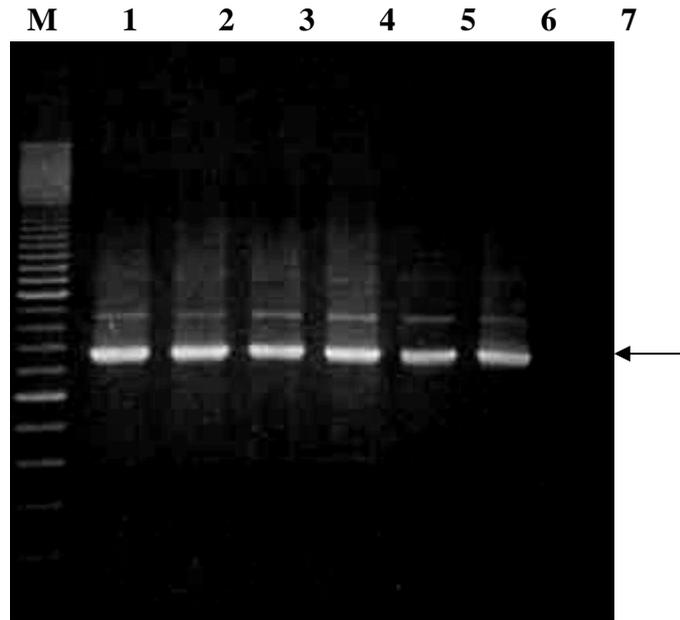
44. Wu, F. Y., Lin, C. P., and Chen, C. C. 1993. Development of cloned DNA probes for a mycoplasma-like organism associated with rice yellow dwarf. *Plant Pathol. Bull.* 2: 140-149.

## ABSTRACT

Liu, S. L.<sup>1</sup>, and Lin, C. P.<sup>1,2</sup> 2002. The detection and identification of phytoplasmas and pear decline. (<sup>1</sup>Department of plant pathology, Taipei, Taiwan; <sup>2</sup>Corresponding author, E-mail: [cplin@ccms.ntu.edu.tw](mailto:cplin@ccms.ntu.edu.tw); Fax: +886-2-23661980)

Phytoplasmas cause hundreds of plant diseases, several of which have worldwide agricultural significance. Symptoms associated with phytoplasmas disease include proliferation, dwarf, phyllody, stunting, yellowing and witches' broom. In spite of numerous attempts, phytoplasmas cannot be cultured *in vitro*. As a consequence, analyses of the genetic components of phytoplasmas at the molecular level are hindered dramatically. Polymerase chain reaction (PCR) has been a well-developed technique in the last decade, the applications of this technique for the detection and identification of pathogens has becomes more accurate and more convenient. In recent years, PCR technique has been widely used to detect and classify phytoplasmas. Pear decline (PD) is a serious disease of pear caused by phytoplasmas, and occurs mainly in Europe and North America. The typical symptoms of the disease are early leaf reddening, weak foliation, slight leaf rolling and death of pear, which results in great yield loss. The disease has become a limiting factor of fruit production in pear orchards. Due to the similar symptoms caused by PD phytoplasmas and by environmental stress such as, the correct diagnosis has been extremely challenging. The low and uneven distribution of phytoplasmas in plant tissues has also made the microscopic observation electron microscope difficult. In Taiwan, pear decline caused by phytoplasmas has not been reported. In 1994, an unknown pear disease was found in Dungshr and Heping. In our studies, PCR technique is employed to detect and identify the pathogen of this disease. Based on the analysis of its 16S rDNA gene sequence, this unknown disease was found to be caused by phytoplasma closely related to phytoplasmas of the apple proliferation group that causing diseases on peach, pear, and apple.

Key words: pear decline, phytoplasma



圖一、以引子對 f1/r1 增幅植物菌質體 DNA 之聚合酵素連鎖反應電泳圖。

Fig. 1. Amplified phytoplasma DNA from polymerase chain reaction (PCR) using primer pair f1/r1. Lane M, 100-bp ladder; land 1, DNA template from periwinkle infected with PNWB-phytoplasma; lands 2-6, DNA template from leaves of diseased pear; land 7, DNA template from healthy pear. The arrow indicates the 630bp PCR products.