

黑尾大葉蟬(*Bothrogonia ferruginea* (F.)) (半翅目：葉蟬科) 傳播台灣葡萄皮爾斯病(Pierce's disease)效率之探討

張薰尹^[1] 黃姿碧^[2] 段淑人^{[1]*}

摘要 黑尾大葉蟬(*Bothrogonia ferruginea* (F.))屬半翅目、葉蟬科、大葉蟬亞科。為刺吸植株木質部汁液者。常棲息於田間菊科雜草叢。葡萄皮爾斯病(Pierce's disease)是由木質部難養菌(*Xylella fastidiosa* Wells et al.)阻塞植株導管而產生葉緣焦枯病徵。在台灣中部地區已發生十餘年。本研究擬證實此葉蟬是否具有媒介葡萄皮爾斯病病原菌 *X. fastidiosa* 之能力。故利用該菌專一性引子進行葉蟬獲菌率及致使植株感染率之探討。於台中市后里區及外埔區之皮爾斯病疫區的葡萄園內。採集到明顯葉緣焦枯病徵之黑后與金香葡萄罹病枝條。經 PD2 培養基及 PCR 鑑定確為感染 *X. fastidiosa*。將黑尾大葉蟬侷限於田間採集之金香罹病株上。經 24 小時之獲菌處理後。其獲菌率為 42~60%；在田間採得之罹病枝條中以 8~9 月者經葉蟬吸食之獲菌率高於 6~7 月者。但其間不具顯著性差異。而經由葉蟬刺吸接種可造成金香及黑后植株染病。傳菌率分別為 27.3 及 9.1%。接種植株需經過 4 個月之潛伏期。才逐漸表現葡萄皮爾斯病葉緣焦枯壞疽病徵。並可從接種植株內再分離出相同的病原菌及 PCR 陽性反應。唯在室內供水充足之條件下所呈現之植株病徵。不如田間酷熱環境下表現之嚴重焦枯程度。雖然黑尾大葉蟬可自罹病葡萄植株獲菌。並傳菌至健康葡萄植株上。引起金香及黑后二種釀酒葡萄植株感染皮爾斯病。但此葉蟬在田間之媒介效率。出現於葡萄果園之頻率。和棲群密度等生態資料仍需進一步研究。以證實其為臺灣葡萄皮爾斯病之媒介昆蟲。

關鍵詞：黑尾大葉蟬、葡萄皮爾斯病、木質部難養菌、獲菌率、傳播效率。

Transmission efficiency of Pierce's disease by *Bothrogonia ferruginea* (F.) (Hemiptera: Cicadellidae) in Taiwan

Hsun-Yin Chang^[1] Tzu-Pi Huang^[2] Shu-Jen Tuan^{[1]*}

ABSTRACT A xylem sap-sucking leafhopper, *Bothrogonia ferruginea* (F.) (Hemiptera, Cicadellidae, Cicadellinae), usually inhabits in composite weeds. Pierce's Disease (PD) of grapevines caused by a xylem-limited bacterium, *Xylella fastidiosa*, occurred in central Taiwan for over a decade. The grape vessels were blocked by propagative bacteria, causing the symptom of leaf scorch around margins. For investigating the transmission ability of *B. ferruginea* to both grapevine cultivars, Golden Muscat and Black Queen, the specific primers of *X. fastidiosa* were used for PCR amplification to detect the acquisition rate of this leafhopper and the infection rate of grapevines. PD-infected grapevines were collected from Waipu and Houli District, Taichung. The causal bacterium was pure-cultured on the PD2 medium and identified by PCR using *X. fastidiosa* specific primers. The acquisition rates of *X. fastidiosa* from infected grapevines by *B. ferruginea*, after 24 h acquisition access period ranged from 42 to 60%. The acquisition rates during June to July is higher than those during August to September, however they are not significantly different. The

[1] 國立中興大學昆蟲學系

Dept. of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung 40227, Taiwan.

[2] 國立中興大學植物病理學系

Dept. of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung 40227, Taiwan.

* Corresponding Author. E-mail: sjtuan@nchu.edu.tw

transmission efficiency of *X. fastidiosa* to grapevines by *B. ferruginea* was 27.3 and 9.1% on Golden Muscat and Black Queen, respectively. All the PD-infected receptor plants were confirmed by PCR and PD2 cultures. After passing a four-month latent period, the leaf-scorch symptom appeared on inoculated grapevine; however, it was not as severe as that on grapevines growing in harsh-dry fields during late summer and fall. Based on successful acquisition from infected plants and transmission of *X. fastidiosa* to healthy grapevines, it was suggested that *B. ferruginea* is capable of transmitting PD. Nevertheless, more information regarding occurrence, population density, and the natural transmission efficacy of this leafhopper in the field need to be investigated before suggesting it as a PD vector.

Key Words: *Bothrogonia ferruginea* (F.), Pierce's Disease, *Xylella fastidiosa*, acquisition rate, transmission efficiency.

一、前言

葡萄皮爾斯病(Pierce's disease)屬於國際檢疫病害，可造成葡萄釀酒產業之重大損失^[13]。此病害乃由 *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* 引起，此種細菌屬於木質部難養菌^[29]。菌體侷限於寄主植物木質部導管中，當菌落大量增生後會阻礙水分運輸，而產生葉緣焦枯、黃化及提早落葉等病徵^[12,15,18,21,22]。此病原主要造成葡萄莖部產生不正常之木質化、呈現不規則小區域的綠色條斑，轉色期果粒整串脫水呈現乾燥狀態，植株呈現矮化、短藤、小葉或新芽變形等^[28]。臺灣於 2002 年首度發現該病害，依據農業試驗所及農業藥物毒物試驗所研究人員之調查，在中部地區陸續發現櫻井(巨峰)(*Vitis vinifera* L. cv. Kyoho)、蜜紅(*V. vinifera* L. cv. Honey Red)、及金香(*V. vinifera* L. cv. Golden Muscat)等品種之罹病植株，其中又以台中縣后里及外埔之釀酒葡萄園區最為嚴重，經由人工接種法證實其病原性，同時由 16S rRNA 及 16S-23S ITS 序列比對，得知其與美國之葡萄皮爾斯病病原菌相近^[25]。

此病原菌需藉由媒介昆蟲將其傳播至健康植株進而感染，在美國加州，褐透翅尖頭葉蟬(*Homalodisca vitripennis* (Germer))及藍綠尖頭葉蟬(*Graphocephala atropunctata* (Signoret))係主要的媒介昆蟲^[7,10]。葉蟬以半持續性(semi-persistence)的方式傳播 *X. fastidiosa*，藉由口針刺吸罹病植株木質部汁液後，*X. fastidiosa* 會以菌體端部附著於蟲體前腸，並在食竇(cibarium)與前食竇(precibarium)上增殖、形成生物膜(biofilm)再長成菌落^[7,10]。前腸屬於外胚層，昆蟲因蛻皮而失去帶菌能力，而成蟲獲菌後不需經過潛伏期即可傳菌，且能永久保留菌體^[17]。葉蟬藉由刺吸植物時的取食行為，即可將病菌傳播至健康植株的導管內^[18]。經過長期的田間監測、調查可疑蟲媒種類，以及利用針對 *X. fastidiosa* 專一性引子之分子檢測其帶菌之結果，蘇等人將大葉蟬亞科

(Cicadellinae)中之木質部取食者，如白邊大葉蟬(*Kolla paulula* (Walker))、黑尾大葉蟬(*Bothrogonia ferruginea* (F.))、縱脈斑大葉蟬(*Anatkina horishana* (Matsunura))、及尖胸沫蟬科(Aphrophoridae)之嗜菊短頭脊沫蟬(*Poophilus costalis* (Walker))列為傳播台灣皮爾斯病之候選媒介昆蟲^[4]；其中白邊大葉蟬與嗜菊短頭脊沫蟬已被證實具有獲菌與傳病能力^[1]。而本研究擬針對黑尾大葉蟬成蟲之媒介效率進行探討，於實驗室進行其獲菌及傳菌試驗，並完成柯霍氏法則的傳病驗證程序，確認此種葉蟬是否可自田間採集之罹病葡萄植株條獲菌，並將病原傳播至健康植株，而引起金香及黑后兩品種罹患葡萄皮爾斯病。

二、材料與方法

(一) 供試昆蟲採集及飼養

自非葡萄皮爾斯病疫區之苗栗縣公館鄉柿子果園周邊(24°31'05.29"N, 120°51'02.82"E, altitude 120 m)及南投縣仁愛鄉惠蓀林場內(24°05'27.80"N, 121°02'05.60"E, altitude 700 m)之雜草叢生處採集黑尾大葉蟬若蟲與成蟲。採集地點之植物種類多以大花咸豐草(*Bidens pilosa* L. var. *radiata*)及紫花藿香薊(*Ageratum houstonianum* Mill)等菊科雜草為主。採集所得蟲源飼養於實驗室養蟲箱(47.5×47.5×47.5 cm, 100 mesh, MegaView Science Co., Ltd, Taiwan)。因黑尾大葉蟬在田間多種雜草上棲息活動、喜取食不同種類之植物^[4]，故提供大花咸豐草、南美蠟蟻菊(*Wedelia triloba* L.)、鴨跖草(*Commelina communis* L.)及日日春(*Catharanthus roseus* L.)等四種雜草做為葉蟬的混合食草。並依各食草的生長狀況及葉蟬吸食、排蜜露情形做必要之植株更新。逢機取用 2 日齡以上之成蟲，進行獲菌及傳病試驗，同時為了反映田間自然情況，試驗之成蟲不分雌雄。

(二) 供試葡萄植株之準備

本試驗使用之釀酒葡萄品種 - 金香(*Vitis vinifera* × *Vitis labruscana* cv. Golden Muscat)及黑后(*Vitis vinifera* × *Vitis labruscana* cv. Black Queen) · 均購自國立中興大學園藝試驗場葡萄中心 · 選取苗齡達三個月以上的扦插苗 · 移植入 5 吋塑膠盆 (直徑 14.7 cm, 高 12.6 cm) · 栽培介質為等量均勻混合之有機培養土、壤土及泥炭土 · 移盆後一個月即施用複合肥一次(Compound-Fer 43, N:P:K:Mg = 15:15:15:4, Taiwan Agricultural Biotechnology Co., Ltd, Taiwan) · 供試葡萄植株盆栽培養於實驗室中 28±2°C、70±10% RH、12h 光照 (自然光及植物生長燈 12L:12D) 的條件下 · 每 2~3 天澆一次水 · 約 2.5~3 個月時植株長至 30 至 55 cm · 且有 5~8 片完全展開葉時 · 則選用健康植株為傳菌試驗用材料 · 試驗期間不施用任何農藥 · 並避免植株缺水 · 以免影響蟲體或植株感病結果。

(三) 田間病株採集與病原菌鑑定培養

自台中市后里區葡萄皮爾斯病疫區(24° 18' 57.40"N, 120° 41' 53.30"E)的金香葡萄園內取得罹病株 · 截取一段葉緣焦枯病徵明顯之枝條帶回實驗室 · 切下約 2~3 cm 之葉柄 · 以 70% 的酒精進行表面消毒 · 再以 0.6% 的次氯酸鈉溶液浸泡消毒 10 min 後 · 以無菌水漂洗三次 · 每次 30 sec · 取約 0.2 g 消毒過之葉柄 · 加入 1 mL PD2 培養液^[14] · 以解剖刀將葉柄切碎 · 以移植環沾取汁液塗佈在 PD2 固態培養基上^[14] · 置於 28±1°C 全暗之恆溫箱中培養 2~3 週 · 待菌落長出後 · 選取單一菌落再次塗佈在培養基上 · 共進行三次純培養 · 以國立中興大學植物病理學系微生物遺傳研究室參考 Minsavage 等人^[20]修改設計之 *X. fastidiosa* 專一性引子對 · 在 RST31 之 5'端減少 GCGTAAAT 8 個核苷酸 (未發表) 之 RST31'(5'-TTTCGAAGTGATTTCGATTGC-3') 及 RST33(5'-CACCATTCGTATCCCGGTG-3') 進行聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 以鑑定菌種是否為 *X. fastidiosa* · PCR 反應如下: 94°C 1 min 後 · 進行 94°C 30 sec · 52°C 30 sec 及 68°C 1 min · 利用 MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 共進行 30 個循環 · 最後以 68°C 延長複製 5 min · 各樣品取 10 µl PCR 增幅終產物 · 及 2 µl (172 µg/mL) 核酸標幟 (Kplus DNA ladder RTU, GeneDireX Inc., Nevada, USA) · 以 1.2% agarose gel 在 0.5×TAE 緩衝液進行電泳分析 (100 V, 25

min) · 完成後膠體經溴化乙錠 (ethidium bromide, 0.5 mg/mL) 染色 5 min 後 · 置於紫外燈 (312 nm) 照射下 · 觀察記錄各樣本之 DNA 圖譜。

(四) 葉蟬與葡萄葉柄 DNA 之萃取及 PCR 偵測限度測定

將 *X. fastidiosa* 菌落以無菌水 10 倍序列稀釋後 · 各稀釋液取 10 µL 加入未經接種處理之葉蟬蟲體頭部及健康葡萄葉柄中 · 並依下列方法分別自植株及蟲體樣本中萃取總量 DNA 後進行 PCR 反應 · 以測定兩種檢體樣本中 *X. fastidiosa* 之檢出限度 · 將單隻黑尾大葉蟬表面消毒後 · 於解剖顯微鏡下切取頭部 · 且參考 Bexine *et al.*^[9] 及 Ramirez *et al.*^[23] 在檢體上儘量去除其複眼 · 以提高 PCR 檢出率 · 於 1.5 mL 微量離心管中加入液態氮冷凍後研磨蟲體頭部 · 利用 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Inc., CA, USA) · 依廠商建議方法進行 DNA 萃取 · 葡萄葉柄 DNA 之萃取方法則參照 Su *et al.*^[26] 修改如下: 將葉柄約 3 cm (0.2 g) 放入研磨袋並加入 1 mL SCPAP (disodium succinate, 1g/L; trisodium citrate, 1g/L; K₂HPO₄, 1.5g/L; and KH₂PO₄, 1.0g/L; 0.02M sodium ascorbate, and 5% acid-washed insoluble polyvinylpyrrolidone, pH 7.0) 緩衝液進行研磨^[20] · 再以離心機 (KM-15200, KUBOTA Co., Tokyo, Japan) 12,000 rpm 離心 5 min · 去除上層液後加入 400 µL 0.5 N NaOH (含 0.5% polyvinyl pyrrolidone) 均勻混合 · 再加入 400 µL 1 M Tris-HCl (pH 7.5) · 以 8,000 rpm 離心 1 min · 取上清液 500 µL 加入 1 mL Solution 4 (isopropanol, 84.48%; 0.2 M potassium acetate) 後置於 -80°C 下 30 min 以沈澱 DNA · 再以 12,000 rpm 離心 10 min · 去除上層液 · 加入 500 µL 70% 酒精 · 以 12,000 rpm 離心 2 min · 取沈澱物 · 風乾 6 h · 再加入 20 µL 無菌水 · 放置 -20°C 下保存待利用 *X. fastidiosa* 專一性引子對進行 PCR 檢測 (同上) · 為確認加入各樣品之 *X. fastidiosa* 菌量 · 同步取 10 µL 各稀釋液塗抹於 PD2 培養基 · 置於 28°C 生長箱內培養 · 於 14 天後觀察其菌落生長情形 · 再回推算各檢體加入之菌量。

(五) 蟲媒傳播試驗

自 102 年 6 月至 103 年 8 月間 · 陸續自后里及外埔區之葡萄疫病園區採集病株 · 取得之金香葡萄病枝 (長度 50~60 cm 且有 3~4 片明顯病徵葉 · 兩端以吸飽水之海棉套緊以保持鮮度) · 放入直徑 13.5 cm · 高 55.5 cm 的中空塑

膠圓筒裝置中（兩端罩上 100 網目尼龍紗網），加入 10 隻黑尾大葉蟬成蟲，進行 24 h 之獲菌試驗（圖 1 a）。而後逢機挑選獲菌處理完成之葉蟬，每 5 隻為一組移至健康葡萄植株，並利用上述之塑膠圓筒套住葡萄苗盆栽，筒上方再覆蓋 100 目之尼龍紗網，以侷限葉蟬於裝置中刺吸傳菌（圖 1 b），葉蟬在葡萄植株上自行傳菌至死亡為止。傳菌試驗之葉蟬至少要進行 24 h 之接種處理，若不足 24 h 即死亡者，該組數據不列入結果，且在過程中均確認葉蟬有刺吸植株並排出蜜露（圖 1 c）。黑尾大葉蟬完成接種金香及黑后品種各 22 株葡萄植株。試驗場所在中興大學昆蟲學系實驗室內 28±2°C，相對濕度 70±10% 及光照時間 12~14 h（室內窗邊自然光+植物生長燈 12L:12D）之條件下進行。接種期間每天觀察葉蟬吸食植株情形，若有死亡之葉蟬則立即單隻包裝冷凍保存於 -20°C，待葉蟬全數自然死亡後即結束傳播試驗。接種處理後持續觀察植株的發病情形，自第 10 週起陸續採樣，以有葉綠焦枯病徵為優先檢體樣本，若無病葉出現則逢機採取葉柄進行 PCR 檢測其受感染情形，同時進行表面消毒（程序如前述(三)），將受檢植株葉柄之汁液塗抹在 PD2 固體培養基上，置入 28°C 生長箱中培養，檢測植株感染 *X. fastidiosa* 菌之情形。接種試驗期間，同時以黑后和金香品種植株各三

盆，每個盆栽裝置（同上，圖 1 b）均放入已吸食健康植株 24h 之 5 隻葉蟬做為對照組。在檢測接種植株感染時，亦同步進行對照組之檢測。葉柄檢體必須同時有 PCR 陽性反應，且在 PD2 上能培養出 *X. fastidiosa* 菌落者，方判定為感染葡萄皮爾斯病之植株。

三、結果

(一) 病株分離及鑑定

自 2012 年 6 月至 2013 年 8 月間，由台中市后里區金香葡萄疫病園內採集具典型葡萄皮爾斯病病徵之罹病株，葉片病徵從枝條基部系統性延伸至頂端，葉緣處呈現如火燒般焦枯及黃化（圖 2 a, b）。金香及黑后兩種植株表現之病徵顏色亦有不同，黑后病葉在焦枯與黃量邊緣間尚有暗紅色沈澱，且焦枯病斑向中肋內陷幅度較大；而金香病葉之黃量部份較明顯。將表面消毒並切碎的罹病株葉柄之汁液塗佈在 PD2 固態培養基，置於 28°C 恆溫箱中培養約 2~3 週後，可見表面光滑的乳白色圓形菌落，若用燈光照射時，可見較飽滿的菌落在同一方向有亮點產生（圖 3）。利用 *X. fastidiosa* 專一性引子對 RST31'/RST33 進行 PCR 檢測，可自罹病之金香及黑



圖 1 蟲媒傳播試驗裝置圖：(a) 田間病株獲菌試驗之裝置；(b) 蟲媒接種健康植株試驗之裝置；(c) 黑尾大葉蟬刺吸葡萄葉。
 Fig. 1 The devices of transmission experiments: (a) A device of acquisition assay; (b) A device of insect inoculation assay; (c) An adult of *Bothrogonia ferruginea* fed on grape leaf.

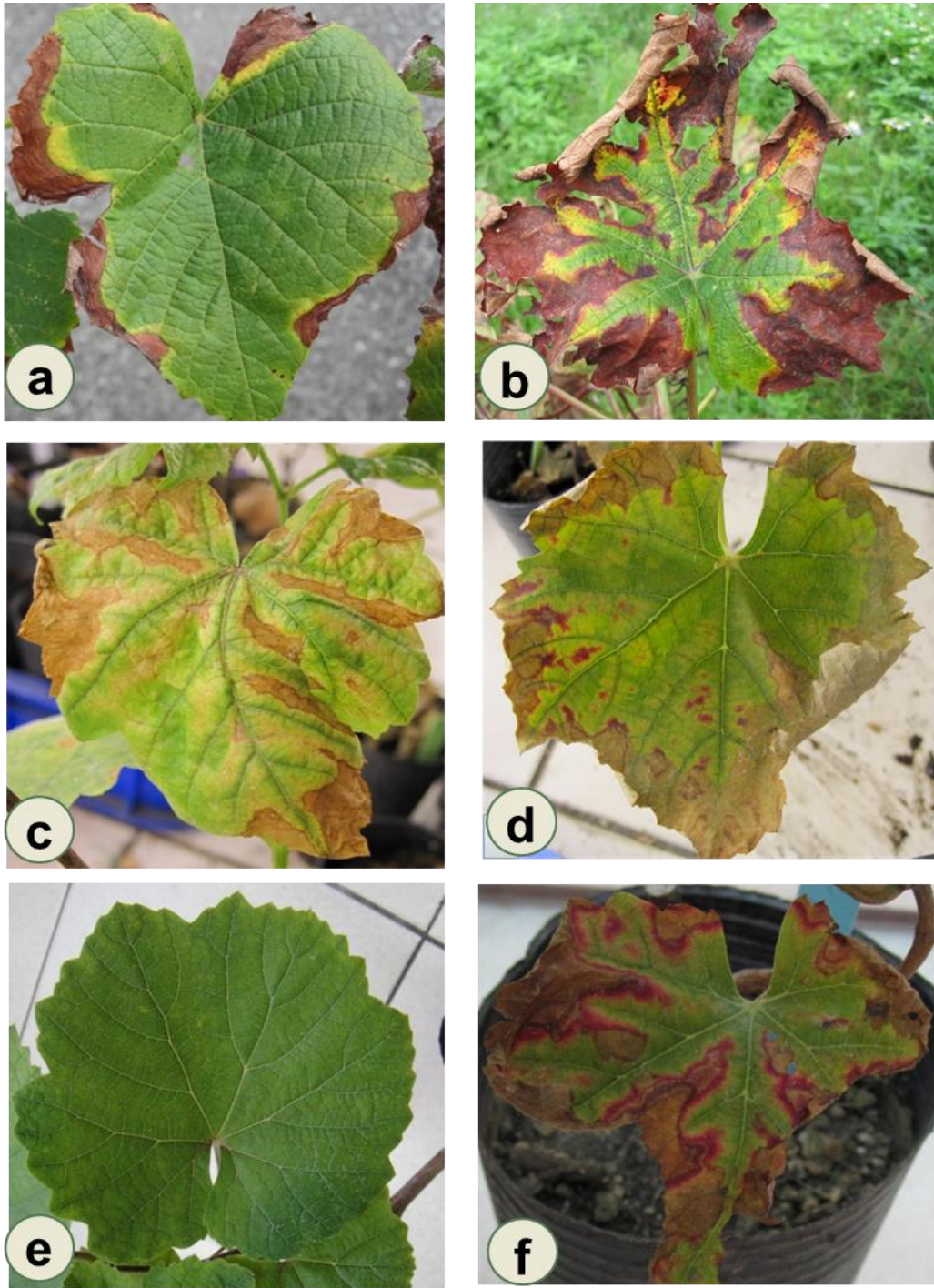


圖 2 葡萄受葡萄皮爾斯病感染後之病徵：(a) 田間罹病金香葡萄；(b) 田間罹病黑后葡萄；(c) 實驗室內經黑尾大葉蟬接種感染之金香葡萄植株輕病徵；(d) 實驗室內經黑尾大葉蟬接種感染之黑后葡萄植株輕病徵；(e) 對照組之健康黑后葡萄植株；(f) 實驗室內經黑尾大葉蟬接種感染之黑后葡萄植株嚴重病徵。

Fig.2 Symptoms of Pierce's disease in two grapevine cultivars: (a) Infected Golden Muscat grapevine collected from vineyards; (b) Infected Black Queen grapevine collected from vineyards; (c) Mild symptom of an infected Golden Muscat grapevine transmitted by *Bothrogonia ferruginea* adults in the lab.; (d) Mild symptom of an infected Black Queen grapevine transmitted by *B. ferruginea* adults in lab.; (e) A healthy Black Queen grapevine in control set; (f) Severe symptom of an infected Black Queen grapevine transmitted by *B. ferruginea* adults in the lab.

后葡萄葉柄檢體中增幅出 713 bp 核酸片段 (圖 4) · 證實分離出的菌落為 *X. fastidiosa*。

(二) 黑尾大葉蟬及葡萄植株中 *X. fastidiosa* 之檢測限度

添加 10 倍序列稀釋菌液於未帶菌之黑尾大葉蟬或健康葡萄植株葉柄 · 依前述材料方法之步驟萃取全 DNA 後 · 再以 *X. fastidiosa* 專一性引子對進行 PCR 增幅以測定檢出限度 · 同步將 10 倍序列稀釋後的菌液滴於 PD2 培養基 · 其中經序列稀釋 9 次之菌液仍有長出菌落 (10μL 菌液不可塗抹開 · 需直接滴在 PD2 上 · 否則不易長出菌落) · 因此推測原始配置最高濃度之菌液濃度為 10¹¹ cultivable cells/ml · 而加入至各樣本之菌量依序為 10⁹~10⁰ cultivable cells · 試驗結果顯示 · 葉蟬檢體內之 *X. fastidiosa* 以 PCR 進行檢測之偵測限度為 1×10¹ cultivable cells/head (圖 5 a · Lane 9) ; 而自植物檢體中 *X. fastidiosa* 之 PCR 偵測限度為 1×10⁶ cultivable cells/petiole (圖 5 b · Lane 4)。

(三) 黑尾大葉蟬獲菌率及傳菌率

本研究中完成獲菌試驗的黑尾大葉蟬數量超過 250 隻成蟲 · 唯少部份葉蟬在操作過程中不明原因死亡或失蹤 · 故能進行 PCR 檢測其頭部是否帶菌者共計 237 隻 · 其中 114 個檢體可利用 *X. fastidiosa* 專一性引子對 RST31'/RST33 進行 PCR 後呈陽性反應 · 增幅出 713 bp 的核酸片段 (圖 6) · 表示黑尾大葉蟬成蟲能經由刺吸取食罹病枝條 24 h 後 · 即可自葡萄病株獲得 *X. fastidiosa* 菌體 · 其成功獲菌率高達 42.0~60.0% · 在 2012 年 8~9 月 · 2013 年 6~7 月及 2013

年 8 月的三個時段中 · 分別以 59 · 82 及 96 隻葉蟬在罹病枝條上進行獲菌處理 · 而依序有 35 · 48 及 31 隻經由 PCR 檢測判定為帶菌蟲 · 獲菌率因田間採集的時間而有不同 · 但無顯著性差異 · 2012 年 8~9 月自田間採得之葡萄病枝經葉蟬吸食後可達最高之獲菌率 60.0±10.0% · 及最高之傳菌率 41.7% · 而 2013 年 6~7 月之病枝經葉蟬獲菌後再傳菌者 · 僅造成 6.7%之植株感染 · 唯因樣本數不多 · 未進行統計分析 (表 1) · 而 44 株接受葉蟬傳菌試驗的葡萄植株中 · 有 8 株經葉蟬接種成功 · 其中金香品種 22 株中有 6 株出現病徵 · 黑后品種 22 株中僅 2 株感染 *X. fastidiosa* · 其傳播率分別為 27.3 及 9.1% ; 在金香及黑后植株上傳菌之葉蟬均為 110 隻成蟲 · 分別有 40.9 及 45.5%經 PCR 檢測為陽性反應 (表 2) · 其中各組 (盆) 接種之葉蟬經 PCR 檢測帶菌之比例以



圖 3 分離自田間金香病株之 *Xylella fastidiosa* 生長在 PD2 培養基的菌落形態。

Fig.3 Colony morphology of *Xylella fastidiosa* isolated from a symptomatic Golden Muscat grapevine which was collected in the field on PD2 agar plate.

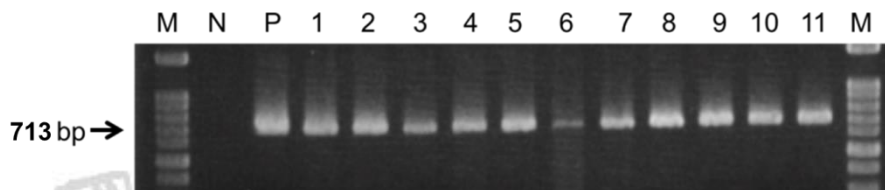


圖 4 以 *Xylella fastidiosa* 專一性引子對 RST31'/RST33 進行聚合酵素連鎖反應偵測分離自田間病株之 *X. fastidiosa* 菌落 · 1~7 行 · DNA 分離自金香葡萄葉柄之菌落 ; 8~11 行 · DNA 分離自黑后葡萄葉柄之菌落 ; P · *X. fastidiosa* PD 菌株之 DNA ; N · 空白對照-無菌蒸餾水 ; M · DNA 標誌。

Fig. 4 PCR amplification of DNA from *Xylella fastidiosa* isolated from symptomatic grapevines collected in the field with primers RST31'/RST33. Lanes 1-7, DNA extracted from various bacterial colonies isolated from diseased Golden Muscat grapevines; lanes 8-11, DNA extracted from colonies isolated from diseased Black Queen grapevines; P, DNA of *X. fastidiosa* PD strain as a positive control; N, A blank control-ddH₂O; M, DNA ladder.

n/5 表示 (n 為 PCR 陽性反應之蟲數、5 為每盆栽有 5 隻傳菌葉蟬/組) 在金香植株部份為以下五群：(1). 0/5 有 3 組、(2). 1/5 有 6 組、(3). 2/5 有 4 組、(4). 3/5 有 5 組、(5). 4/5 有 4 組、各群分別造成 1、0、2、2、1 株感染；而黑后植株上的葉蟬帶菌情形則可分為六群：(1). 0/5 有 4 組、(2). 1/5 有 3 組、(3). 2/5 有 6 組、(4). 3/5 有 3 組、(5). 4/5 有 4 組、及(6). 5/5 有 2 組、其中僅 0/5 及 5/5 兩群中各有 1 株葡萄植株感染、各組蟲體檢出帶菌比例之增加、並不會提高受接種植株之感染率 (表 2)。本研究中被判定為罹病植株者、其葉柄汁液均需在 PD2 培養基上長出 *X. fastidiosa* 菌落、並

在 PCR 檢測呈陽性反應。而罹病之金香植株葉片未表現典型皮爾斯病病徵、其葉緣焦枯的病徵並不明顯、僅輕微壞疽 (圖 2 c)、而罹病的黑后植株中、一株顯現輕度病徵 (圖 2 d)、另一株則呈現如田間病株之典型皮爾斯病病徵、不僅葉緣處有嚴重焦枯壞疽、且在病變及綠色葉部交際處有黃暈病徵、亦可見暗紅色條斑介於焦枯病徵及綠色葉部間 (圖 2 f)。對照組之所有金香與黑后植株在菌體培養及 PCR 檢測上均呈現陰性反應、且經過一年後再度追蹤檢測仍為陰性反應、無病徵表現 (圖 2 e)。此結果顯示黑尾大葉蟬確實能傳播 *X. fastidiosa* 至葡萄植株上造成皮爾斯病、唯病徵因植株品種

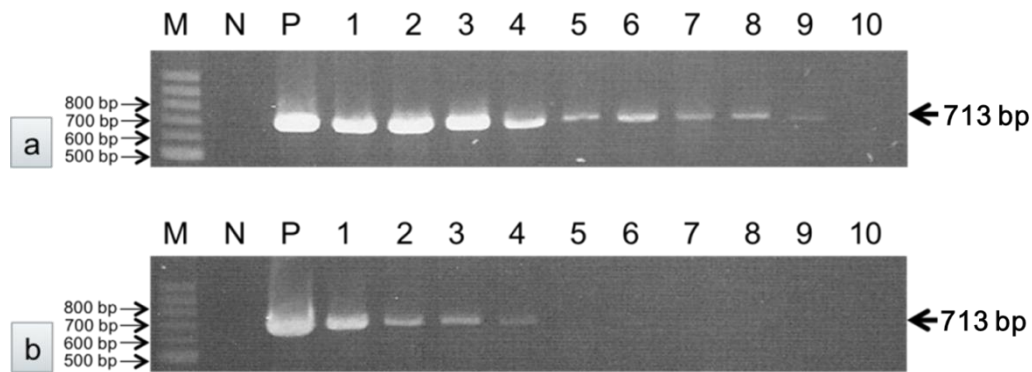


圖 5 以 *Xylella fastidiosa* 專一性引子對 RST31'/RST33 進行聚合酵素連鎖反應偵測黑尾大葉蟬體內及葡萄植株內之 *X. fastidiosa* 之偵測極限測試。(a) 1~9 行、加入 10^9 至 10^0 cultivable cells *X. fastidiosa* 菌液的黑尾大葉蟬蟲體經萃取後的蟲體 DNA；(b) 1~9 行、加入 10^9 至 10^0 cultivable cells *X. fastidiosa* 菌液的植株葉柄經萃取後的植物 DNA；P、*X. fastidiosa* PD 菌株的 DNA；N、空白對照-無菌蒸餾水；M、DNA 標誌。

Fig. 5 Limit of detection of *Xylella fastidiosa* in *Bothrogonia ferruginea* and grapevines by PCR with primers RST31'/RST33. (a) Lanes 1-9, DNA extracted from *B. ferruginea* added with 10-fold serial dilutions of *X. fastidiosa* (10^9 to 10^0 cultivable cells); (b) Lanes 1-9, DNA extracted from leaf petioles added 10-fold serial dilutions of *X. fastidiosa* (10^9 to 10^0 cultivable cells); P, DNA of *X. fastidiosa* PD strain as a positive control; N, blank control-dd H_2O ; M, DNA ladder.

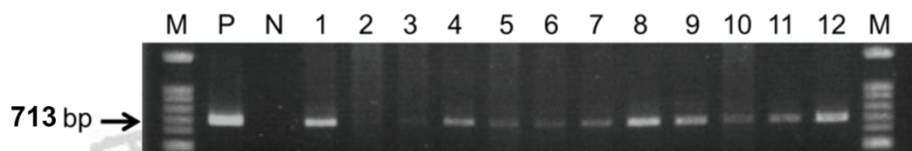


圖 6 以 *Xylella fastidiosa* 專一性引子對 RST31'/RST33 進行聚合酵素連鎖反應偵測傳播試驗之黑尾大葉蟬蟲體內的 *X. fastidiosa*。1~12 行、以田間金香病株獲菌之黑尾大葉蟬蟲體 DNA；P、*X. fastidiosa* PD 菌株的 DNA；N、空白對照-無菌蒸餾水；M、DNA 標誌。

Fig.6 DNA amplification of *Xylella fastidiosa* from *Bothrogonia ferruginea* heads by PCR with primers RST31'/RST33. Lanes 1-12, DNA extracted from *B. ferruginea* adults which acquired *X. fastidiosa* from diseased Golden Muscat grapevines; P, DNA of *X. fastidiosa* PD strain as a positive control; N, A blank control-dd H_2O ; M, DNA ladder.

或個體不同而異。

四、討論

經黑尾大葉蟬刺吸傳播至健康之金香與葡萄植株上，可造成與田間葡萄皮爾斯病株類似之葉緣焦枯、壞疽病徵，且可自受接種而感染之植株葉柄中培養出 *X. fastidiosa* 菌落，並經由專一引子進行 PCR 檢測得到陽性反應，唯其焦枯程度不如田間嚴重 (圖 2)。Gubler *et al.*^[16] 提出植株發病時間和病徵的嚴重性，會受植株生長環境的氣候而影響。當植株生長在溫度較高的環境，對水份的需求增加時，會加速植株發病^(11,27)。台灣夏末秋初期間，田間葡萄園區的栽培環境酷熱且日夜溫差變動大，使得植株對於水份的需求增加，因而罹病株病徵呈現明顯且嚴重；而本試驗全程在 26~30°C 的實驗室內，光照溫和、每 2~3 天即澆水以確保充份給水，避免因人為缺水導致植株乾枯，經接種後感染之植株，尚需經過 4 個月的潛伏期，才逐漸呈現病徵。相較於田間的罹病株病

徵，室內感病葡萄葉片病徵溫和，葉緣焦枯速度較慢、紅褐化之程度低與焦枯壞疽範圍較少 (圖 2)。

Lopes *et al.*^[19] 提出蟲媒傳播途徑包含三個階段：(1) 由罹病株獲得病原菌、(2) 保存菌體、(3) 接種病原菌至健康植株。Almeida *et al.*^[6] 認為延長蟲媒接種時間，可增加接種植株菌量及口針刺吸傳菌之次數，因而提高植株感病率。但在本研究中並未發現各組供試之黑尾大葉蟬的帶菌比例與植株的感染率間具有相關性 (表 2)。在白邊大葉蟬傳播皮爾斯病之研究中，亦有相似情形發生，葉蟬帶菌比例高的群組，接種植株後未必能成功傳病，然帶菌比例低者卻成功傳病，且於 1~1.5 個月即呈現病徵，反而較全組 100% 都帶菌者具更短的潛伏期^[1,2]。此種情況也在美國加州藍綠尖頭葉蟬及褐透翅尖頭葉蟬之傳病試驗中發生，蟲媒帶菌率與植株感染率未呈現相關性^[5,17]。本試驗中此種不相關的情形更為明顯，推測可能的原因為：(1) 蟲體與植株葉柄間之 PCR 檢測極限差異很大，如本試驗中即相距 100,000 倍 (圖 3)，故接種處理之

表 1 不同時期黑尾大葉蟬獲菌經 24 小時獲毒處理後，自田間金香病株產生之獲菌率及傳播至健康植株的傳播率

Table 1 Acquisition rates of *Xylella fastidiosa* by *Bothrogonia ferruginea* from infected Golden Muscat grapevine cultivar after a 24-h AAP during different periods, and transmission rates by a grouping-inoculation of 5 *B. ferruginea* adults per healthy grapevine

	Aug~Sep 2012	Jun~Jul 2013	Aug 2013
No. infected insects	35	48	31
No. uninfected insects	24	34	65
Acquisition rate ¹ (% Mean±SE)	60.00±10.00	57.00±10.00	42.00±14.00
Infection rate (%) ²	41.7	6.7	11.8

¹ AAP: acquisition access period for 24 h, and acquisition rate is PCR⁺ proportion of vectors in all *B. ferruginea* adults tested.

² Infection rate of plants is the numbers of infected plants divided by the total tested plants.

表 2 黑尾大葉蟬自罹病金香植株獲菌比例及傳播 *Xylella fastidiosa* 至金香及黑后葡萄造成之植株感染率

Table 2 Acquisition rate of *Xylella fastidiosa* by *Bothrogonia ferruginea* from Pierce's diseased Golden Muscat and the infection rate of two grape cultivars with *X. fastidiosa* transmitted by vectors

Grape cultivar	PCR ⁺ -proportion of vector in 5-leafhopper set ¹						Acquisition rate of vector (%) ²	Infection rate of plant (%) ³
	0	1	2	3	4	5		
Golden Muscat	1 (3)	0 (6)	2 (4)	2 (5)	1 (4)	-	40.9 (45/110)	27.3 (6/22)
Black Queen	1 (4)	0 (3)	0 (6)	0 (3)	0 (4)	1 (2)	45.5 (50/110)	9.1 (2/22)

¹ Number in parentheses is the quantity of receptor plants for given PCR⁺-proportion of vector in each set of 5- *B. ferruginea* adults.

² Number in parentheses is the proportion of positive acquisition *B. ferruginea* adults divided by the total tested vectors.

³ Number in parentheses is the proportion of positive infected grapevines transmitted by *B. ferruginea* divided by the total tested plants.

葉蟬死亡時，其頭部即使經 PCR 檢測為陽性反應，但植株亦無法被檢出受感染；(2) 蟲媒體內的 *X. fastidiosa* 菌量會隨著時間變化而有消長情形⁽⁸⁾，本研究中之葉蟬蟲體在死亡時 PCR 檢出陰性反應，但可能之前於刺吸時已造成受接種植株之感染，即媒介昆蟲死亡後被檢出帶菌與否，無法確實反映該蟲在接種植株時體內的帶菌量。由於取蟲體進行 PCR 反應時蟲體已死亡，以活蟲而言亦屬破壞性取樣方式，無法持續同步追蹤媒介昆蟲體內之病原量變化，對於刺吸植物汁液之蟲媒可利用蜜露帶菌量配合 16S rRNA-targeted fluorescent oligonucleotides 檢測技術來監測其體內 *X. fastidiosa* 菌量^[24]。故有關蟲媒帶菌率與傳菌率之相關性，未來可利用 Rogrigues 等人之技術進行更縝密之試驗，以釐清此議題。而 Minsavage 等人利用 SCAPA 處理植株葉柄檢體，可提高 PCR 陽性反應之檢出率^[20]，雖然本篇亦使用相同的緩衝液進行檢測，唯所得之偵測極限與其相差甚遠，推測原因有 1). 受檢測植株組織內的成份含量，因品種不同而有所差異，可能造成 *X. fastidiosa* 菌體 DNA 萃取效率及 PCR 反應之干擾；2). 不同於 Minsavage 等人用已事先萃取植物汁液再另加入 *X. fastidiosa* 菌液，本試驗操作步驟是先加入菌液，將葉柄與菌體共同研磨再經流程萃取總量 DNA，進行後續 PCR 檢測，因此本試驗之檢出極限值較高。

美國加州主要之葡萄皮爾斯病媒介昆蟲 - 藍綠尖頭葉蟬成蟲吸食葡萄病株 12 h 後的獲菌率為 68%，經由 7 天之接種期可造成 92% 之罹病率^[17]。本研究中黑尾大葉蟬吸食罹病金香葡萄植株 24 h 之獲菌率為 42~60% (表 1)、對金香及黑后植株之傳播效率分別為 27.3 及 9.1% (表 2)。雖黑尾大葉蟬的獲菌率及傳播率不如藍綠尖頭葉蟬^[17]及白邊大葉蟬^[1]，但因黑尾大葉蟬的成蟲壽命長 (32~54 天)，故其保留菌體之持久性增加，且該葉蟬的體型大 (體長 10.6~15.8 mm)、具有良好的飛行能力、取食率高 (>5mL/天) 及食性廣^[3]等特性，均可能有助於此蟲在田間散播及保存病原菌的能力，故不可忽視其在媒介葡萄皮爾斯病上的重要性。而本試驗並未針對黑尾大葉蟬不同齡期、接種蟲數與時間、以及病原在蟲媒體內菌量變化情形加以研究，此等因子均可影響傳病率，未來期能逐一釐清，以更深入了解黑尾大葉蟬的傳播特性與效能，並整合其田間族群動態及生物特性等資料，擬訂臺灣葡萄皮爾斯病之病媒昆蟲防治時機及可行方法。

五、結論

經由本試驗得知黑尾大葉蟬可自罹病葡萄植株上獲菌，並可將 *X. fastidiosa* 菌體傳播至健康植株，在受感染植株可分離出原先接種之病原，而完成柯霍氏法則 (Koch's postulates) 之驗證程序，故證實黑尾大葉蟬具有傳播葡萄皮爾斯病的能力。但因此葉蟬之傳病效率及在葡萄園區周邊之出現頻率，均不如白邊大葉蟬高，且其棲群密度、寄主植物多樣性、與地理分佈等生態資訊，尚需進一步蒐集，故其在田間媒介葡萄皮爾斯病的角色界定尚需藉由不同領域之專家學者繼續努力，才能證實其扮演媒介昆蟲之重要性。

誌謝

本研究期間承行政院農委會動植物防疫檢疫局計畫 (101 農科-10.2.1-檢-B4; 102 農科-10.2.1-檢-B5) 補助經費，農業藥物毒物試驗所蘇秋竹博士及其助理們在分子檢測技術、菌株分離培養及田間罹病株之採集工作上，給予完整資訊與協助，以及本實驗室同仁協助田間病株與試驗昆蟲之採集，於此一併誌謝。同時感謝二位審稿者的費心審查及正面建議。

參考文獻

- [1] 林映秀、張玉玲 (2012)。「臺灣葡萄皮爾斯病媒介昆蟲之初探」, 台灣昆蟲 32: 155-167。
- [2] 胡斐婷 (2014)。「白邊大葉蟬媒介葡萄皮爾斯病在不同品系葡萄之傳播效率比較」, 國立中興大學昆蟲學系研究所碩士論文 48 pp。
- [3] 張薰尹 (2014)。「黑尾大葉蟬生活史及媒介葡萄皮爾斯病之傳播效率探討」, 國立中興大學昆蟲學系研究所碩士論文 58 pp。
- [4] 蘇秋竹、石憲宗、林映秀、蘇文瀛、高清文 (2011)。「臺灣葡萄皮爾斯病及媒介昆蟲研究現況」, 農作物害蟲及其媒介病害整合防治技術研討會，農業試驗所特刊第 152 號，台中。
- [5] Almeida, R. P. P. and Purcell A. H. (2003). "Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera, Cicadellidae)." *J. Econ. Entomol.* 96: 265-71.
- [6] Almeida, R. P. P., Blua M. J., Lopes J. R. S. and Purcell A. H. (2005). "Vector transmission of *Xylella*

- fastidiosa*: applying fundamental knowledge to generate disease management strategies." *Ann. Entomol. Soc. Am*, 98: 775-786.
- [7] Alves, E., Leite B., Marucci R. C., Pascholati S. F., Lopes J. R. S. and Andersen P. C. (2008). "Retention sites for *Xylella fastidiosa* in four sharpshooter vectors (Hemiptera: Cicadellidae) analyzed by scanning electron microscopy." *Curr. Microbiol*, 56: 531-538.
- [8] Backus, E. A. and Morgan D. J. W. (2011). "Spatiotemporal colonization of *Xylella fastidiosa* in its vector supports the role of egestion in the inoculation mechanism of foregut borne plant pathogens." *Phytopathology*, 101: 912-922.
- [9] Bextine, B., Tuan S. J., Shaikh H., Blua M. and Miller T. A. (2004). "Evaluation of methods for extracting *Xylella fastidiosa* DNA from the glassy-winged sharpshooter." *J. Econ. Entomol*, 97: 757-763.
- [10] Brlansky, R. H., Timmer L. W., French W. J. and McCoy R. E. (1983). "Colonization of the sharpshooter vectors, *Oncometopia nigricans* and *Homalodisca coagulata*, by xylem-limited bacteria." *Phytopathology*, 73: 530-535.
- [11] Chatterjee, S., Almeida R. P. P. and Lindow S. (2008). "Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*." *Annu. Rev. Phytopathol.* 46: 243-271.
- [12] Da Silva, F. R., Vettore A. L., Kemper E. L., Leite A. and Arruda P. (2001). "Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity." *FEMS Microbiol. Lett*, 203: 165-171.
- [13] Davis, M. J., Purcell A. H. and Thomson S. V. (1978). "Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium." *Science*, 199: 75-77.
- [14] Davis, M. J., Purcell A. H. and Thompson S. V. (1980). "Isolation medium for Pierce's disease bacterium." *Phytopathology*, 70: 425-429.
- [15] Esau, K. (1948). "Anatomic effects of the viruses of Pierce's disease and phony peach." *Hilgardia*, 18: 423-482.
- [16] Gubler, W. D., Stapleton J. J., Leavitt G. M., Purcell A. H., Varela L. G. and Smith R. J. (1999). "UC IPM Pest Management Guidelines: Grape." UC ANR Publication 3448. URL: <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r302101211.html>
- [17] Hill, B. L. and Purcell A. H. (1995). "Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*." *Phytopathology*, 85: 209-212.
- [18] Hopkins, D. L. (1989). "*Xylella fastidiosa*-xylem-limited bacterial pathogen of plants." *Annu. Rev. Phytopathol*, 27: 271-290.
- [19] Lopes, J. R. S., Daugherty M. P. and Almeida R. P. P. (2009). "Context-dependent transmission of a generalist plant pathogen: host species and pathogen strain mediate insect vector competence." *Entomol. Exp. Appl*, 131: 216-224.
- [20] Minsavage, G. V., Thompson C. M., Hopkins D. L., Leite R. M. V. B. C. and Stall R. E. (1994). "Development of polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue." *Phytopathology*, 84: 456-461.
- [21] Mircetich, S. M., Lowe S. K., Moller W. J. and Nyland G. (1976). "Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent." *Phytopathology*, 66: 456-461.
- [22] Mollenhauer, H. H. and Hopkins D. L. (1976). "Xylem morphology of Pierce's disease-infected grapevines with different levels of tolerance. Physiol." *Plant Pathol*, 9: 95-100.
- [23] Ramirez, J. L., Perring T. M. and Miller T. A. (2008). "Fate of a genetically modified bacterium in foregut of glassy-winged sharpshooter (Hemiptera: Cicadellidae)." *J. Econ. Entomol*, 101: 1519-1525.
- [24] Rogrigues, J. L. M., Silva-Stenico M. E., de Souza A. N., Lopes J. R. S. and Tsai S. M. (2006). "*In situ* probing of *Xylella fastidiosa* in honeydew of a xylem sap-feeding insect using 16S rRNA-targeted fluorescent oligonucleotides." *Environ. Microbiol*, 8: 747-754.

- [25] Su, C. C., Chang J. C., Chang C. M., Shih H. T., Tzeng K. C., Jan F. J., Kao C. W. and Deng W. L. (2013). "Pierce's Disease of grapevines in Taiwan: isolation, cultivation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*." *J. Phytopathol*, 161: 389-396.
- [26] Su, C. C., Yang W. J., Hsu S. T. and Tzeng K. C. (2008). "Specific detection of *Xylella fastidiosa* strains causing pear leaf scorch by polymerase chain reaction." *Plant Pathol. Bull*, 17: 183-194.
- [27] Thorne, E. T., Stevenson J. F., Rost T. L., Labavitch J. M. and Matthews M. A. (2006). "Pierce's disease symptoms: comparison with symptoms of water deficit and the impact of water deficits." *Am. J. Enol. Viticult*. 57: 1-11.
- [28] Varela, L. G., Smith R. J., and Phillips P. A. (2001). "Pierce's disease." *University of California Agriculture and Natural Resources Publication 21600*. University of California.
- [29] Wells, J. M., Raju B. C., Hung H. Y., Weisburg W. G., Mandelco-Paul L. and Brenner D. J. (1987). "*Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. Int." *J. Syst. Bacteriol*. 37: 136-143.

2014 年 08 月 20 日 收稿

2014 年 09 月 08 日 修正

2014 年 10 月 08 日 接受

國立中興大學



National Chung Hsing University