



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

The Insect Vectors of Pierce' s Disease on Grapevines in Taiwan 【Research report】

臺灣葡萄皮爾斯病媒介昆蟲之初探【研究報告】

Ying-Shiou Lin*, and Yu-Lin Chang

林映秀^{1*}、張玉鈴

*通訊作者E-mail: yslin@tactri.gov.tw

Received: 2012/01/13 Accepted: 2012/05/12 Available online: 2012/06/01

Abstract

Pierce' s disease (*Xylella fastidiosa*) of grapevines has been occurring in central Taiwan since 2002. In this study, we surveyed the vector species that transmitted Pierce' s disease in this area and then conducted the transmission test to prove these vectors in Taiwan. We collected all hemipteran in and around vineyards. The number of *X. fastidiosa* from these collected hemiptera were determined by PCR with the common primers RST31/RST33 and specific primers XF2542-L/XF2542-R of *X. fastidiosa*. The results showed a positive reaction for *Kolla paulula*, *Xyphon* sp. (Cicadelloinae), *Tartessus ferrugineus* (Tartessinae), *Poophilus costalis* (Aphrophoridae) and *Tricentrus acuticornis* (Cetrotinae). To complete the Koch' s postulates, we reared *K. paulula* and *P. costalis* in vivo and then conducted the transmission tests by the above-mentioned consequential adults. *K. paulula* with a 72-hr acquisition access periods were transferred to ten healthy grapevine plants. Six grapevine plants showed similar symptoms of Pierce' s disease 1-2 months after transmission. These infected grapevine plants showed a positive reaction to the *X. fastidiosa* common primers. In addition, *P. costalis* with a 72-hr acquisition access periods were transferred to three healthy grapevine plants and one grapevine plant showed similar symptoms 1.5 months after transmission, and the infected grapevine plant also showed a positive reaction with the *X. fastidiosa* primers. In these transmission tests, we used a total of fifty adults of *K. paulula*, and 25 adults had a positive reaction with the *X. fastidiosa* primers, ie. *K. paulula* had a 50% acquisition rate. In addition, thirteen *P. costalis* adults were used, with 2 adults having a positive reaction. The acquisition rate of *P. costalis* was 15.4%. The results of both the transmission tests and acquisition rates showed that *K. paulula* and *P. costalis* were the vectors of Pierce' s disease of the grapevines in Taiwan.

摘要

從2002年起，臺灣中部葡萄栽培區陸續發生葡萄皮爾斯病 (Pierce' s disease)。為瞭解傳播本病害之媒介昆蟲種類，2008~2010年在台中縣外埔鄉、后里鄉、新社鄉及苗栗縣卓蘭鎮葡萄皮爾斯病罹病園園內及其周遭的地被進行半翅目昆蟲採樣調查，採得樣本利用 *Xylella fastidiosa* 之廣效性引子對 RST31/RST33 及專一性引子對 XF2542-L/XF2542-R 進行 PCR 檢測帶菌情形，結果顯示大葉蟬亞科的白邊大葉蟬 (*Kolla paulula*) 與 *Xyphon* sp.、錐胸葉蟬亞科的褐翅葉蟬 (*Tartessus ferrugineus*)、尖胸沫蟬科的嗜菊短頭脊沫蟬 (*Poophilus costalis*)，以及角蟬科 *Cetrotinae* 亞科的尖三刺角蟬 (*Tricentrus acuticornis*) 呈現正反應。以室內繼代的白邊大葉蟬及嗜菊短頭脊沫蟬成蟲分別進行傳播試驗，經獲菌處理的白邊大葉蟬接種之 10 株健康葡萄植株中，在接種 1~2 個月後，有 6 株逐漸產生葉緣黃化情形，其葉片經 PCR 檢測 *X. fastidiosa* 亦為正反應；而以沫蟬接種之 3 株健康葡萄植株，在 1.5 個月後有 1 株呈現與田間病株類似之病徵，植株葉片經 PCR 檢測 *X. fastidiosa* 亦為正反應；在昆蟲獲菌情形方面，前述完成傳播試驗的白邊大葉蟬供試成蟲共計 50 隻，25 隻呈現正反應，獲菌率為 50%；供試沫蟬成蟲共計 13 隻，2 隻呈現正反應，獲菌率為 15.4%。由上述昆蟲獲菌及傳播試驗結果顯示，白邊大葉蟬及嗜菊短頭脊沫蟬是可傳播葡萄皮爾斯病的媒介昆蟲。

Key words: Pierce' s disease, insect vectors, *Kolla paulula*, *Poophilus costalis*, transmission test

關鍵詞: 葡萄皮爾斯病、媒介昆蟲、白邊大葉蟬、嗜菊短頭脊沫蟬、傳播試驗。

Full Text: [PDF \(1.99 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

臺灣葡萄皮爾斯病媒介昆蟲之初探

林映秀^{1*}、張玉鈴

行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所農藥應用組 41358 台中市霧峰區光明路 11 號

摘 要

從 2002 年起，臺灣中部葡萄栽培區陸續發生葡萄皮爾斯病 (Pierce's disease)。為瞭解傳播本病害之媒介昆蟲種類，2008~2010 年在台中縣外埔鄉、后里鄉、新社鄉及苗栗縣卓蘭鎮葡萄皮爾斯病罹病園園內及其周遭的地被進行半翅目昆蟲採樣調查，採得樣本利用 *Xylella fastidiosa* 之廣效性引子對 RST31/RST33 及專一性引子對 XF2542-L/XF2542-R 進行 PCR 檢測帶菌情形，結果顯示大葉蟬亞科的白邊大葉蟬 (*Kolla paulula*) 與 *Xyphon* sp.、錐胸葉蟬亞科的褐翅葉蟬 (*Tartessus ferrugineus*)、尖胸沫蟬科的嗜菊短頭脊沫蟬 (*Poophilus costalis*)，以及角蟬科 Cetrantinae 亞科的尖三刺角蟬 (*Tricentrus acuticornis*) 呈現正反應。以室內繼代的白邊大葉蟬及嗜菊短頭脊沫蟬成蟲分別進行傳播試驗，經獲菌處理的白邊大葉蟬接種之 10 株健康葡萄植株中，在接種 1~2 個月後，有 6 株逐漸產生葉緣黃化情形，其葉片經 PCR 檢測 *X. fastidiosa* 亦為正反應；而以沫蟬接種之 3 株健康葡萄植株，在 1.5 個月後有 1 株呈現與田間病株類似之病徵，植株葉片經 PCR 檢測 *X. fastidiosa* 亦為正反應；在昆蟲獲菌情形方面，前述完成傳播試驗的白邊大葉蟬供試成蟲共計 50 隻，25 隻呈現正反應，獲菌率為 50%；供試沫蟬成蟲共計 13 隻，2 隻呈現正反應，獲菌率為 15.4%。由上述昆蟲獲菌及傳播試驗結果顯示，白邊大葉蟬及嗜菊短頭脊沫蟬是可傳播葡萄皮爾斯病的媒介昆蟲。

關鍵詞：葡萄皮爾斯病、媒介昆蟲、白邊大葉蟬、嗜菊短頭脊沫蟬、傳播試驗。

前 言

Xylella fastidiosa 屬侷限導管細菌

(Houston *et al.*, 1947)，可危害梨、葡萄、柑桔、苜蓿、咖啡、杏仁及李等多種經濟作物 (Hopkins and Purcell, 2002)，受害植株出現

*論文聯繫人

Corresponding emails: yslin@tactri.gov.tw

葉緣焦枯、提早落葉、植株矮化或果實縮小等病徵，並影響產量 (Hopkins, 1989)，如葡萄皮爾斯病 (Pierce's disease) (Hopkins and Mollenhauer, 1973; Davis *et al.*, 1978)、南美柑橘斑駁黃化病 (citrus variegated chlorosis) (Rossetti *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 1993) 及梨葉緣焦枯病 (pear leaf scorch disease) (Leu and Su, 1993; Hopkins and Purcell, 2002) 等即由 *X. fastidiosa* 不同菌系引起。其中，葡萄皮爾斯病於 1892 年在美國加州聖達安娜河谷 (Santa Ana River Valley) 首次被發現 (Goheen *et al.*, 1973)，現普遍發生於美洲冬季溫暖地區的葡萄栽培區；南美柑橘斑駁黃化病則於 1987 年首次在巴西米納斯吉拉斯州 (Minas Gerais) 被發現 (Rossetti *et al.*, 1990)，本病普遍發生於巴西東南沿海的柑橘栽培區；梨葉緣焦枯病於 1980 年代首次在臺灣中部被發現，至 1990 年才確定病因，目前仍為臺灣海拔 1,200 m 以下地區橫山梨栽植園普遍發生之病害 (Leu and Su, 1993)。

葡萄皮爾斯病的傳播途徑包括媒介昆蟲 (Frazier and Freitag, 1946; Severin, 1949)、根接 (root grafting) 及芽接 (budding) (Hewitt, 1939) 等，其中媒介昆蟲是重要的傳播途徑。Krell 等人曾探討機械與媒介昆蟲等具潛能機制於傳播此病害之重要性，證實以相同的修枝剪修剪罹病葡萄的青綠枝條 (green shoot) 時，有 5% 的機率會將病原菌傳播至後續修剪的葡萄植株，但田間實務上係於植株休眠期進行修剪，因此其傳播潛能仍有待釐清；至於媒介昆蟲方面，*Homalodisca liturata* 與 *Diceroprocta apache* 於 2 天獲菌處理後均可成功傳播此病害 (Krell *et al.*, 2007)。另同由 *X. fastidiosa* 引起的苜蓿矮化病 (alfalfa dwarf disease) 則經由媒介昆蟲

及嫁接傳播 (Hewitt *et al.*, 1946)。

因 *X. fastidiosa* 侷限分佈於罹病植株木質部之導管細胞 (Houston *et al.*, 1947)，故在其病害環 (disease cycle) 中，木質部取食者 (xylem-feeders) 因吸食植物汁液而獲菌，病原菌藉此昆蟲後續取食之過程進入健康植株，形成本病傳播途徑 (Frazier and Freitag, 1946; Hewitt *et al.*, 1946; Houston *et al.*, 1947)。此類病害之媒介昆蟲，以半持續性 (semi-persistent) 之非循環型 (noncirculative) 方式傳播病原菌，獲菌時間約需數小時，其傳菌能力於蛻皮後消失 (Purcell and Finlay, 1979)，而獲菌之雌性成蟲亦無法將病原菌經卵傳遞至子代 (Freitag, 1951; Varela *et al.*, 2001)。以葡萄皮爾斯病為例，目前確定可傳播本病害之媒介昆蟲包括葉蟬科、大葉蟬亞科 (Cicadellinae) 之褐透翅尖頭葉蟬 (*Homalodisca vitripennis*) (Adlerz and Hopkins, 1979; Purcell and Saunders, 1999)、藍綠尖頭葉蟬 (*Graphocephala atropunctata*) (Purcell, 1975)、綠尖頭葉蟬 (*Draeculacephala minerva*) (Frazier and Freitag, 1946; Hewitt *et al.*, 1946)、紅尖頭葉蟬 (*Xyphon fulgida*) (Frazier and Freitag, 1946; Hewitt *et al.*, 1946) 與沫蟬總科、尖胸沫蟬科 (Aphrophoridae) 之黃頭長沫蟬 (*Philaenus spumarius*) (Severin, 1950) 等。自從褐透翅尖頭葉蟬於 1989 年侵入加州南部後，因其寄主範圍極廣、繁殖力強，飛行能力亦遠優於前述三種葉蟬，使葡萄皮爾斯病由地區性一般病害躍升為美國加州等地葡萄的重要病害 (Varela *et al.*, 2001)。

2002 年起，臺灣中部之南投縣草屯鎮平林里、台中縣外埔鄉、后里鄉與新社鄉以及苗栗縣卓蘭鎮等地栽培區之葡萄植株陸續發

病，其病徵表現類似國外文獻所述皮爾斯病，經分離培養、超薄切片電顯觀察及人工接種方式測定病原性，確認為 *X. fastidiosa* 造成之皮爾斯病 (Su *et al.*, 2011; Su, 個人通訊)。為探討本地葡萄皮爾斯病媒介昆蟲種類，本研究調查葡萄園的葉蟬科、沫蟬總科以及角蟬科等半翅目昆蟲種類與其帶菌情形，依前述種類田間帶菌資訊建立室內族群，並以此蟲源進行傳播試驗，由供試葡萄植株發病及供試昆蟲帶菌的情形，確認本地葡萄皮爾斯病之媒介昆蟲種類。

材料與方法

(一) 本地可疑媒介昆蟲之採集與帶菌情形調查

2008~2010 年在台中縣外埔鄉、后里鄉、新社鄉及苗栗縣卓蘭鎮葡萄皮爾斯病罹病園內及其周遭的地被，以掃網方式進行昆蟲調查採集，採樣對象以半翅目昆蟲之木質部取食者為重點。採回的樣本經鏡檢外部形態鑑定至屬或亞科層級後，經 DNA 萃取，利用 *X. fastidiosa* 廣效性及專一性引子對進行 PCR，以檢測帶菌情形，其 DNA 萃取及 *X. fastidiosa* 偵測依後述之 (四) 及 (五) 方法進行，其中具 *X. fastidiosa* 正反應之昆蟲種類列為葡萄皮爾斯病之可疑媒介昆蟲。

(二) 供試昆蟲之飼育

以前述經檢測帶菌的可疑媒介昆蟲白邊大葉蟬及嗜菊短頭脊沫蟬為飼育對象，於定溫 25°C，相對濕度 60% 及光週期 12L:12D 條件下，提供菊科大花咸豐草 (*Bidens pilosa* L. var. *radiata* Sch.) 為食草以進行室內飼育，繼代飼育之成蟲供後續傳播試驗使用。

(三) 傳播試驗

供試昆蟲為室內繼代的白邊大葉蟬 50 隻及嗜菊短頭脊沫蟬 13 隻成蟲。利用直徑 7 cm，高 12 cm 的立體紗網袋套住罹病葡萄植株的帶葉枝條，將羽化 3 日內之供試昆蟲侷限於網袋中使其獲菌，72 小時後將前述供試蟲移至 1~2 年生葡萄健株，侷限於網袋中使其自然傳菌至死亡為止。每植株放入 5 隻供試蟲，其中嗜菊短頭脊沫蟬飼育蟲數不足時，減為每植株 4 隻。其中，白邊大葉蟬完成接種 10 株，嗜菊短頭脊沫蟬接種 3 株葡萄健株。完成獲菌或傳播試驗之供試昆蟲，利用 *X. fastidiosa* 廣效性及專一性引子對檢測獲菌情形，另接種後逐月以 *X. fastidiosa* 廣效性引子對檢測供試葡萄植株是否存在 *X. fastidiosa*，並以肉眼觀察及記錄病徵發生情形，本試驗持續檢測及觀察一年，由前述結果計算葡萄植株發病率。

(四) 昆蟲與植物全 DNA 之萃取

為萃取昆蟲全 DNA，將單隻昆蟲體置入 1.5 mL 離心管中，加入液態氮冷凍後研磨蟲體，再利用組織及細胞染色體 DNA 純化試劑組 (Tissue & Cell Genomic DNA Purification Kit, GeneMark Technology Co., Ltd., Taiwan)，依其操作流程進行 DNA 萃取。

植物全 DNA 之萃取係參照蘇等人的模式 (Su *et al.*, 2008) 稍加修改如下：切取葡萄葉片的葉柄及葉脈，加入 1 mL SCPAP 緩衝液 (Minsavage *et al.*, 1994)，經研磨之組織萃取液置入 1.5 mL 微量離心管內，離心 13,000 rpm 6 分鐘，去除上層液植物殘渣，加入 400 μ L 0.5 N NaOH (含 0.5% PVP (polyvinylpyrrolidone; Sigma, USA))，混合均勻後加入 400 μ L 1 M Tris-HCl (pH 7.5)，以 8,000 rpm 轉速離心 1 分鐘，取上清液 100 μ L，以

滅菌之去離子水稀釋 10 倍作為 PCR 反應模版。

(五) *Xylella fastidiosa* 之偵測及鑑定

取得昆蟲或植物 DNA 後，分別以 *X. fastidiosa* 廣效性引子對 RST31/RST33 (Minsavage *et al.*, 1994) 及 *X. fastidiosa* 葡萄皮爾斯病品系專一性引子對 XF2542-L/XF2542-R (Costa *et al.*, 2006; Hernandez-Martinez *et al.*, 2006) 進行聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)。引子對 RST31/RST33 增幅條件為 94°C 1 分鐘，1 個循環進行 DNA 變性 (denaturation) 反應，再以 95°C 30 秒、60°C 30 秒及 72°C 45 秒共 35 個循環進行粘合 (annealing) 及延伸 (extension) 增幅反應，最後以 75°C 5 分鐘、1 個循環結束 PCR 反應；另引子對 XF2542-L/XF2542-R 增幅條件參照 Costa 等人的模式 (Costa *et al.*, 2006)，修改粘合 (annealing) 及延伸 (extension) 增幅反應條件為 94°C 40 秒、56°C 40 秒、72°C 1 分鐘共 35 個循環。完成反應後，取 10 μ L PCR 增幅產物，以 1.5% agarose gel 在 0.5X TAE 緩衝液進行電泳分析 (150 V, 20 mins)，並置入 2.5 μ L 核酸標幟 (Gen 100 DNA Ladder size marker, GenMark Technology Co., Ltd., Taiwan)，完成後取出膠體，經溴化乙錠 (ethidium bromide, 0.5 mg/mL) 染色 10 分鐘後，置於紫外燈下照相記錄各樣本之 DNA 指紋圖譜。

完成傳播試驗之白邊大葉蟬及發病葡萄植株以專一性引子對 HL5/HL6 (Francis *et al.*, 2006) 進行 PCR 檢測帶菌情形，其增幅產物以 DNA 純化回收套組 (Gene-Spin 1-4-3 DNA Extraction Kit, Protech Technology Enterprise Co., Ltd., Taiwan) 進行回收純化後，與載體 pGEM[®]-T-EASY vector 進行核

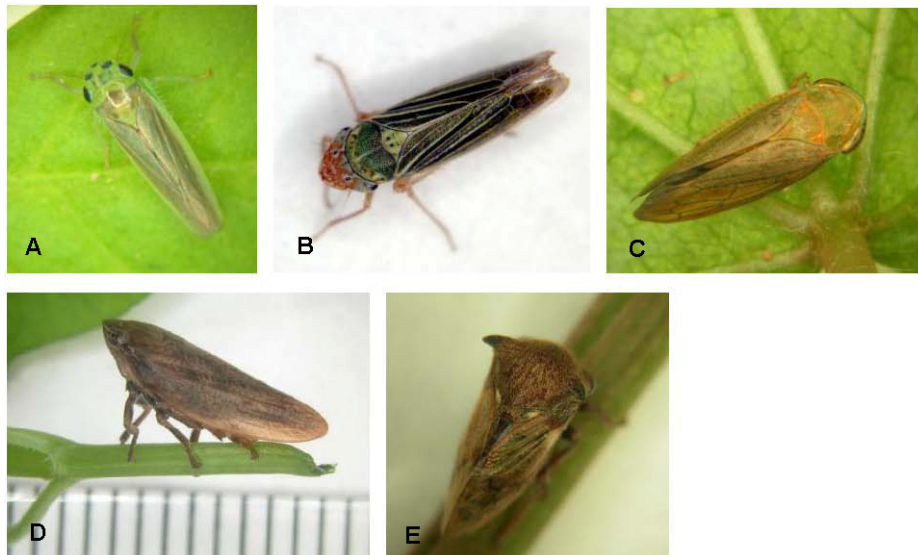
酸片段之選殖，經轉形反應後，將白色菌落作為準選殖株進行培養。抽取準選殖株之質體 DNA 再藉由限制酵素 EcoRI 反應獲得 DNA 片段，將上述得到之 DNA 片段送交基龍米克斯生物科技有限公司 (Genomics Biotechnology Co., Ltd.) 進行解序後，於 National Center for Biotechnology Information (NCBI, National Library of Medicine (NLM), U.S.A.) 網站，進行線上基因庫 (GenBank) 的查詢與比對，以確認所檢測之病原菌為 *X. fastidiosa*。

結 果

一、本地可疑媒介昆蟲之採集與帶菌情形調查

2008~2010 年在台中縣及苗栗縣共 9 個葡萄罹病園內及其周遭的地被採得葉蟬科 (Cicadellidae)、角蟬科 (Membracidae) 及沫蟬總科 (Cercopoidea) 昆蟲共 2,554 隻，其中，大葉蟬亞科的白邊大葉蟬 (圖一 A) 與 *Xyphon* sp. (圖一 B)，錐胸葉蟬亞科的褐翅葉蟬 (*Tartessus ferrugineus*) (圖一 C)，尖胸沫蟬科的嗜菊短頭脊沫蟬 (*Poophilus costalis*) (圖一 D)，以及角蟬科 Cetrotinae 亞科的尖三刺角蟬 (*Tricentrus acuticornis*) (圖一 E) 經 *X. fastidiosa* 廣效性引子對 RST31/33 及專一性引子對 XF2542-L/XF2542-R 檢測後，分別於 733 bp 與 412 bp 有一特定片段，呈現正反應，因此將此 5 種昆蟲列為國內可疑媒介昆蟲。在可疑蟲媒的田間帶菌比例方面，2008 年有 4 種可疑媒介昆蟲經檢測確認帶菌，以尖三刺角蟬之帶菌比例最高，達 20.6%；2009 年之帶菌種類減少，嗜菊短頭脊沫蟬於本年首次檢出 1% 帶菌情形；至 2010 年 5 種可疑媒介昆蟲均未測得帶菌情形 (表一)。

前述 5 種可疑媒介昆蟲中，白邊大葉蟬、



圖一 臺灣葡萄皮爾斯病可疑媒介昆蟲。A：白邊大葉蟬；B：Xyphon sp.；C：褐翅葉蟬；D：嗜菊短頭脊沫蟬；E：尖三刺角蟬。

Fig. 1. Suspicious insect vectors of Pierce's disease on grapevine. A: *Kolla paulula*; B: *Xyphon* sp.; C: *Tartessus ferrugineus*; D: *Poophilus costalis*; E: *Tricentrus acuticornis*.

表一 葡萄皮爾斯病罹病園內及周遭地被 5 種可疑媒介昆蟲之田間帶菌情形

Table 1. Infective rate of suspicious vectors collected in and around vineyards with Pierce's disease

Family	Subfamily	Suspicious vectors	Year/infective rate*		
			2008	2009	2010
Cicadellidae	Cicadellinae	<i>Kolla paulula</i>	9% (9/100)	0.6% (1/155)	0 (0/17)
Cicadellidae	Cicadellinae	<i>Xyphon</i> sp.	10.5% (4/38)	1.3% (6/446)	0 (0/25)
Cicadellidae	Tartessinae	<i>Tartessus ferrugineus</i>	1.3% (3/226)	0 (0/4)	0 (0/10)
Aphrophoridae		<i>Poophilus costalis</i>	0 (0/50)	1.0% (1/105)	0 (0/150)
Membracidae		<i>Tricentrus acuticornis</i>	20.6% (7/34)	0 (0/46)	0 (0/81)

*Infective rate, percentage of *Xylella fastidiosa*-detected insects over the total tested insects.

Xyphon sp. 以及嗜菊短頭脊沫蟬 3 種為木質部取食者，其採得數量佔全數木質部取食者的 87.1% (表二)，均採自地被植物，而非葡萄植株，其中白邊大葉蟬與嗜菊短頭脊沫蟬主要採自大花咸豐草，後者亦可採自紫花藿香薊、葎草、大波斯菊、田菁等植物上，*Xyphon* sp. 多採自具禾本科植物地被處；另尖三刺角蟬及

褐翅葉蟬等 2 種可疑媒介昆蟲非木質部取食者，前者主要採自大花咸豐草，後者則採自葡萄植株等。

二、傳播試驗

完成試驗的 50 隻白邊大葉蟬利用 *X. fastidiosa* 廣效性引子對 RST31/33 及專一性

表二 2008~2010 年葡萄皮爾斯病罹病園內及周遭地被採得木質部取食昆蟲數量

Table 2. Number and percentage of xylem-feeding insects collected in and around vineyards with Pierce's disease from 2008 to 2010

	Year/Percentage*			Total
	2008	2009	2010	
Xylem feeders	353	735	227	1315
<i>Xylella fastidiosa</i> detected species				
<i>Kolla paulula</i>	103 (29.2%)	171 (23.3%)	22 (9.7%)	296 (22.5%)
<i>Xyphon</i> sp.	47 (13.3%)	454 (61.8%)	23 (10.1%)	524 (39.8%)
<i>Poophilus costalis</i>	52 (14.7%)	106 (14.4%)	168 (74%)	326 (24.8%)
<i>X. fastidiosa</i> non-detected species				
<i>Cofana spectra</i>	151 (42.8%)	0	3 (1.3%)	154 (11.7%)
<i>Clovia</i> sp.	0	1 (0.1%)	11 (4.9%)	12 (0.9%)
Others	0	3 (0.4%)	0	3 (0.2%)

* Percentage, percentage of species of xylem-feeding insects collected in that year.

表三 白邊大葉蟬傳播 *Xylella fastidiosa* 之情形

Table 3. Infectivity of *Xylella fastidiosa* by *Kolla paulula* adults on grapevines

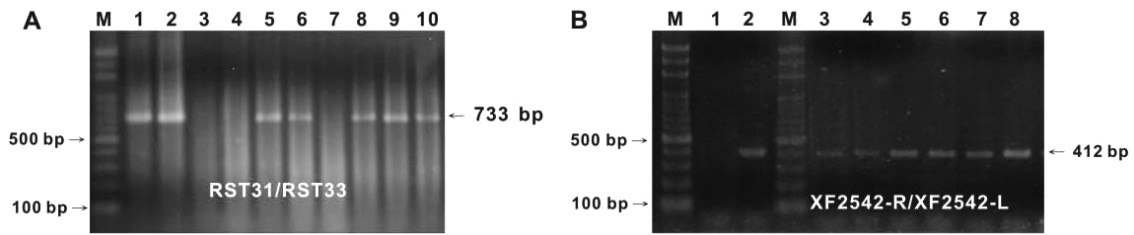
	Grape seedlings										Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
No. of <i>Kolla paulula</i> adult	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	50
No. of <i>Xylella fastidiosa</i> -detected <i>K. paulula</i>	4	5	2	1	1	3	2	2	3	2	25
Infection	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	6
Timing of the symptoms of Pierce's disease on grapevines	2	1.5	1	1.5	1	1	-	-	-	-	

引子對 XF2542-L/XF2542-R 進行 PCR 檢測獲菌情形，其中 25 隻皆可分別增幅出 733 bp 及 412 bp 的片段（圖二 A 行 5, 7~10 及 B 行 5~8），獲菌率為 50%（表三）；而供試的嗜菊短頭脊沫蟬成蟲共 13 隻，獲菌檢測結果共 2 隻呈現正反應（圖二 A 行 6 及 B 行 3~4），獲菌率為 15.4%（表四）。

由上述白邊大葉蟬完成 10 株葡萄健株之接種，其中 6 株於接種後 1~2 個月陸續出現葉緣黃化情形（圖三 A、B），傳播率為 60%，

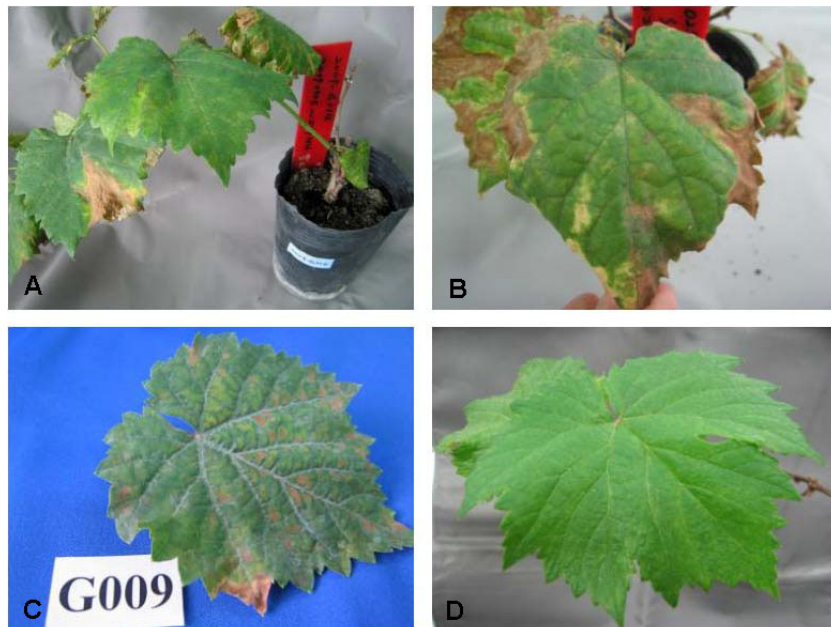
X. fastidiosa 檢測亦為正反應（圖四行 7~8 及 12~15），此結果顯示帶菌白邊大葉蟬可成功傳播此病害，病株於接種後 1 個月出現病徵（表三）。嗜菊短頭脊沫蟬接種之 3 株葡萄健株，其中 1 株於接種後 1.5 個月出現葉緣黃化情形（表四、圖三 C），經 PCR 檢測 *X. fastidiosa* 亦為正反應（圖四行 16）。

將供試白邊大葉蟬及發病葡萄植株所定序之 DNA 序列以引子對於 NCBI 基因庫（GenBank）進行查詢與比對，與 *X. fastidiosa*



圖二 利用 *Xylella fastidiosa* 廣效性引子對 RST 31/RST 33 及專一性引子對 XF2542-R/XF2542-L 進行聚合酵素連鎖反應偵測傳播試驗後的白邊大葉蟬 (*Kolla paulula*) 及嗜菊短頭脊沫蟬 (*Poophilus costalis*) 成蟲體內 *X. fastidiosa* 之帶菌情形。行 M, 100~3,000 bp DNA 標幟; (A) 行 1~2, *X. fastidiosa* 總體 DNA; 行 3~4, 空白對照; 行 5、7~10, *K. paulula* DNA; 行 6, *P. costalis* DNA。 (B) 行 1, 空白對照; 行 2, *X. fastidiosa* 總體 DNA; 行 3~4, *P. costalis* DNA; 行 5~8, *K. paulula* DNA。

Fig. 2. Detection of *Xylella fastidiosa* from *Kolla paulula* and *Poophilus costalis* with *X. fastidiosa* common primers RST31/RST33 and strain-specific primers XF2542-R/XF2542-L in polymerase chain reaction. M, 100-3,000 bp DNA Ladder (GeneMark, Taiwan); (A) Lanes 1-2, total DNA of *X. fastidiosa* as positive control; Lanes 3-4, blank control; Lanes 5, 7-10, DNA of *K. paulula*; Lanes 6, DNA of *P. costalis*. (B) Lanes 1, blank control; Lanes 2, total DNA of *X. fastidiosa* as positive control; Lanes 3-4, DNA of *P. costalis*; Lanes 5-8, DNA of *K. paulula*.



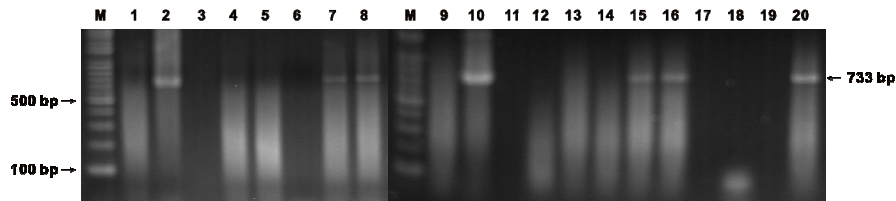
圖三 以媒介昆蟲進行 *Xylella fastidiosa* 傳播試驗之葡萄皮爾斯病病徵, 經白邊大葉蟬接種 2 個月後 (A) 與 4 個月後 (B) 的病葉, 以及經嗜菊短頭脊沫蟬接種 1.5 個月後的病葉 (C), D 為未接種的葡萄健康植株葉片。

Fig. 3. Symptoms of Pierce's disease on grapevine transmitted by vectors. Leaves infected with *Xylella fastidiosa* 2 (A) and 4 (B) months after transmission by *Kolla paulula*, and 1.5 months (C) after transmission by *Poophilus costalis*. D, a healthy grapevine leaf.

表四 嗜菊短頭脊沫蟬傳播 *Xylella fastidiosa* 之情形

Table 4. Infectivity of *Xylella fastidiosa* by *Poophilus costalis* adults on grapevines

	Grape seeding			Total
	1	2	3	
No. of <i>Poophilus costalis</i> adult	4	4	5	13
No. of <i>Xylella fastidiosa</i> -detected <i>P. costalis</i>	2	0	0	2
Infection	+	-	-	1
Timing of the symptoms of Pierce's disease on grapevines	1.5	-	-	



圖四 利用 *Xylella fastidiosa* 廣效性引子對 RST 31/RST 33 進行聚合酶連鎖反應偵測經白邊大葉蟬及嗜菊短頭脊沫蟬傳播試驗後的葡萄植株內之皮爾斯病病菌。行 M，100~3,000 bp DNA 標幟；行 1、3、9、11、17、19，空白對照；行 2、10，*X. fastidiosa* 總體 DNA；行 7~8、12~15，*Kolla paulula* 傳播試驗後之葡萄植株 DNA；行 16，*Poophilus costalis* 傳播試驗後之葡萄植株 DNA；行 4~6、18，*Xyphon* sp. 傳播試驗後之葡萄植株 DNA。

Fig. 4. Detection of *Xylella fastidiosa* from the grapevines, transmitted by *Kolla paulula* and *Poophilus costalis*, with *X. fastidiosa* common primers RST31/RST33 in polymerase chain reaction. M, 100-3,000 bp DNA Ladder (GeneMark, Taiwan); Lanes 1, 3, 9, 11, 17, 19, blank control; Lanes 2,10, total DNA of *X. fastidiosa* as positive control; Lanes 7-8,12-15, sample from different grapevines transmitted by leafhopper *K. paulula*; Lanes 16, sample from grapevines transmitted by spittlebugs *P. costalis*; Lanes 4-6,18, sample from different grapevines transmitted by leafhopper *Xyphon* sp.

subsp. *fastidiosa* GB514, complete genome 的 2383181~2383401 區域分別有 99% 及 100% 相似度，由上述昆蟲獲菌及傳播試驗結果顯示，白邊大葉蟬 (*K. paulula*) 及嗜菊短頭脊沫蟬 (*P. costalis*) 兩種昆蟲可傳播葡萄皮爾斯病。

討 論

國內罹病園及周遭地被採得之木質部取食昆蟲中 (表二)，並無文獻所述褐透翅尖頭葉

蟬 (*Homalodisca vitripennis*) 等五種國外葡萄皮爾斯病的媒介昆蟲，但國內的白邊大葉蟬、白翅褐脈葉蟬與 *Xyphon* sp.，和國外的褐透翅尖頭葉蟬、藍綠尖頭葉蟬、綠尖頭葉蟬與紅尖頭葉蟬同屬大葉蟬亞科；另國內的嗜菊短頭脊沫蟬與國外的黃頭長沫蟬均為尖胸沫蟬科種類。在媒介昆蟲棲所及寄主植物方面，國內之白邊大葉蟬等 3 種木質部取食者主要棲息葡萄園內或周遭之大花咸豐草、紫花藿香薊、葎草或禾本科地被植物，由採集棲所推測，本地白邊大葉蟬等 3 種木質部取食者對葡

萄的喜好程度不高；國外的媒介昆蟲褐透翅尖頭葉蟬的主要寄主植物為木本植物，並常棲息取食葡萄植株，藍綠尖頭葉蟬等媒介昆蟲的主要棲所則為葡萄園附近的植物，其中，藍綠尖頭葉蟬常棲息於苜蓿、黑莓、野葡萄、長春花、蕁麻、接骨木、百慕達草、水禾、多年生麥草、牛毛草等，紅尖頭葉蟬和黃頭長沫蟬則主要棲息禾本科及莎草科等草本植物 (Purcell, 1975; Varela *et al.*, 2001)，又藍綠尖頭葉蟬、綠尖頭葉蟬及紅尖頭葉蟬均為美國南方沿海地區葡萄園之主要媒介昆蟲，春季時，越冬成蟲自周圍雜草雜木林遷入果園取食，並將病害傳入園區，此時罹病株多分佈於距蟲源 120 ~ 150 公尺範圍內 (Purcell, 1974)；秋季時，植株內病原菌持續增殖，繼代的葉蟬成蟲亦廣泛分佈於園區，由園內病害分佈的變化，可見葡萄植株間 (vine-to-vein) 病害傳遞的情形不普遍，應是剪枝時除去罹病部位，或低溫導致病原菌繁衍速度減緩之故 (Varela *et al.*, 2001)。是否因棲息及取食偏好的差異，使國內皮爾斯病發生情形不似國外之嚴重程度，有待後續調查研究加以釐清。

在葡萄皮爾斯病傳播效率方面，國外之藍綠尖頭葉蟬於 12 小時的獲菌處理後，獲菌率可達 68% (Hill and Purcell, 1995)，國內之白邊大葉蟬與嗜菊短頭脊沫蟬獲菌率較低，於 72 小時獲菌處理之獲菌率則分別為 50% 及 15.4%。另國外大葉蟬亞科藍綠尖頭葉蟬造成之植株發病率可達 92% (Purcell, 1980)，紅尖頭葉蟬次之，植株發病率為 33% (Severin, 1949)，綠尖頭葉蟬、褐透翅尖頭葉蟬、Smoke tree sharpshooter (*H. liturata*) 和 Apache cicada (*Diceroprocta apache*) 之植株發病率則為 12~22% (Krell *et al.*, 2007) (Purcell and Finlay, 1979; Almeida and Purcell, 2003; Krell *et al.*, 2007)，由本研究結果指

出，白邊大葉蟬的傳播效率為 60% (表三)，僅次於藍綠尖頭葉蟬，並優於國外紅尖頭葉蟬等其他 3 種媒介昆蟲；另國外尖胸沫蟬科之黃頭長沫蟬 (*Philaenus spumarius*) 造成的植株發病率高達 96% (Purcell, 1980)，而國內嗜菊短頭脊沫蟬之傳播效率遠不及之 (表四)，是否因接種蟲數、獲菌時間、接種時間等造成之差異，則尚待證實。

由本研究結果顯示，白邊大葉蟬與嗜菊短頭脊沫蟬是可傳播葡萄皮爾斯病的媒介昆蟲，未來仍將持續探討其傳播特性、寄主植物種類、行為學與管理模式等，希釐清媒介昆蟲在此病害傳播上扮演的角色。又本研究結果顯示之帶菌種類中，除大葉蟬亞科與沫蟬總科等木質部取食種類 (Purcell, 1982)，尚包括非木質部取食者之褐翅葉蟬以及尖三刺角蟬，此 2 種昆蟲是否於尋找適宜吸食部位過程中，穿刺吸食木質部汁液後造成帶菌情形，將持續加以研究探討。

誌 謝

研究期間，承蒙本所蘇秋竹博士指導病原菌檢測技術、病株建立與提供病原菌菌株，農業試驗所石憲宗博士協助鑑定白邊大葉蟬，東海大學林仲平教授協助鑑定尖三刺角蟬，以及本實驗室張齡予、吳佩玲、簡惠琪、廖怡婷、林淑霞小姐協助調查及試驗，一併致謝。

引用文獻

- Adlerz WC, Hopkins DL. 1979. Natural infectivity of two sharpshooter vectors of Pierce's disease of grape in Florida. *J Econ Entomol* 72: 916-919.
- Almeida RPP, Purcell AH. 2003.

- Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). *J Econ Entomol* 96: 264-271.
- Chang CJ, Garnier M, Zreik L, Rossetti V, Bove JM.** 1993. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Curr Microbiol* 27: 137-142.
- Costa HS, Guzman A, Hernandez-Martinez R, Gispert C, Cooksey DA.** 2006. Detection and differentiation of *Xylella fastidiosa* strains acquired and retained by glassy-winged sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) using a mixture of stain-specific primer sets. *J Econ Entomol* 99: 1058-1064.
- Davis MJ, Purcell AH, Thomson SV.** 1978. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. *Science* 199: 75-77.
- Francis M, Lin H, Rosa JCL, Doddapaneni H, Civerolo EL.** 2006. Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. *Eur J Plant Pathol* 115: 203-213.
- Frazier NW, Freitag JH.** 1946. Ten additional leafhopper vectors of the virus causing Pierce's disease of grapes. *Phytopathol* 36: 634-637.
- Freitag JH.** 1951. Host range of Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. *Phytopathol* 41: 920-934.
- Goheen AC, Nyland G, Lowe SK.** 1973. Association of a rickettsialike organism with Pierce's disease of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. *Phytopathol* 63: 341-345.
- Hernandez-Martinez R, Costa HS, Dumenyo CK, Cooksey DA.** 2006. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* infecting grape, almonds, and oleander using a multiprimer PCR assay. *Plant Disease* 90: 1382-1388.
- Hewitt WB.** 1939. A transmissible disease of grapevines. *Phytopathol* 29: 10.
- Hewitt WB, Houston BR, Frazier NW, Freitag JH.** 1946. Leafhopper transmission of the virus causing Pierce's disease of grape and dwarf of alfalfa. *Phytopathol* 36: 117-128.
- Hill BL, Purcell AH.** 1995. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. *Phytopathol* 85: 209-212.
- Hopkins DL.** 1989. *Xylella fastidiosa*: a xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annu Rev Phytopathol* 27: 271-290.
- Hopkins DL, Mollenhauer HH.** 1973. Rickettsia-like bacterium associated with Pierce's disease of grapes. *Science* 179: 298-300.
- Hopkins DL, Purcell AH.** 2002. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent

- diseases. *Plant disease* 86 (10): 1056-1066.
- Houston BR, Esau K, Hewitt WB.** 1947. The mode of vector feeding and the tissues involved in the transmission of Pierce's disease virus in grape and alfalfa. *Phytopathol* 37: 247-253.
- Krell R, Boyd E, Nay J, Park Y, Perring T.** 2007. Mechanical and insect transmission of *Xylella fastidiosa* to *Vitis vinifera*. *Am J Enol Vitic* 58: 211-216.
- Leu LS, Su CC.** 1993. Isolation, cultivation, and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scald in Taiwan. *Plant Dis* 77: 642-646.
- Minsavage GV, Thompsom CM, Hopkins DL, Leite RMVBC, Stall RE.** 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathol* 84: 456-461.
- Purcell AH.** 1974. The spatial distribution of Pierce's disease in the Napa Valley. *Am J Enol Vitic* 25: 162-167.
- Purcell AH.** 1975. Role of the blue-green sharpshooter, *Hordnia circellata*, in the epidemiology of Pierce's disease of grapevines. *Environ Entomol* 4: 745-752.
- Purcell AH.** 1980. Almond leaf scorch: leafhopper and spittlebug vector. *J Econ Entomol* 73: 834-838.
- Purcell AH.** 1982. Insect vectors relationships with procaryotic plant pathogens. *Ann Rev Phytopathol* 20: 397-417.
- Purcell AH, Finlay AH.** 1979. Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. *Phytopathol* 69: 393-395.
- Purcell AH, Saunders SR.** 1999. Glassy-winged sharpshooters expected to increase plant disease. *California Agriculture* 53 (2): 26-27.
- Rossetti V, Garnier M, Bové JM, Beretta MJ, Teixeira ARR, Quaggio JA, DiNegri JD.** 1990. Presence de bacteries dan le xylem d'oranges atteint de chlorose variegee une nouvelle maladie des agrumes au Brazil. *C R Acad Sci III* 310: 345-349.
- Severin HHP.** 1949. Transmission of the virus of Pierce's disease of grapevines by leafhoppers. *Hilgardia* 19: 190-202.
- Severin HHP.** 1950. Spittle-insect vectors of Pierce's disease. II life history and virus transmission. *Hilgardia* 19 (11): 357-380.
- Su CC, Shih HT, Lin YS, Su WY, Kao CW.** 2011. Current status of Pierce's disease of grape and its vector in Taiwan. In: Shih HT, Chang CJ (eds). *Proceedings of the symposium on integrated management technology of insect vectors and insect-borne diseases*; Taiwan Agricultural Research Institute, Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine. pp 25-50. (in Chinese with English abstract)
- Su CC, Yang WJ, Hsu ST, Tzeng KC.** 2008.

Specific detection of *Xylella fastidiosa* strains causing pear leaf scorch by polymerase chain reaction. Plant Pathol Bull 17: 183-194.

收件日期：2012年1月13日

接受日期：2012年5月12日

Varela L, Smith R, Philips P. 2001. Pierce's disease. University of California Agricultural and Natural Resources Publication 21600, Oakland, CA.

The Insect Vectors of Pierce's Disease on Grapevines in Taiwan

Ying-Shiou Lin*, and Yu-Lin Chang

Division of Pesticides-application, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic substances Research Institute, Council of Agriculture, Wufong District, Taichung City 41358, Taiwan

ABSTRACT

Pierce's disease (*Xylella fastidiosa*) of grapevines has been occurring in central Taiwan since 2002. In this study, we surveyed the vector species that transmitted Pierce's disease in this area and then conducted the transmission test to prove these vectors in Taiwan. We collected all hemipteran in and around vineyards. The number of *X. fastidiosa* from these collected hemiptera were determined by PCR with the common primers RST31/RST33 and specific primers XF2542-L/XF2542-R of *X. fastidiosa*. The results showed a positive reaction for *Kolla paulula*, *Xyphon* sp. (Cicadelloinae), *Tartessus ferrugineus* (Tartessinae), *Poophilus costalis* (Aphrophoridae) and *Tricentrus acuticornis* (Cetrotinae). To complete the Koch's postulates, we reared *K. paulula* and *P. costalis* in vivo and then conducted the transmission tests by the above-mentioned consequential adults. *K. paulula* with a 72-hr acquisition access periods were transferred to ten healthy grapevine plants. Six grapevine plants showed similar symptoms of Pierce's disease 1-2 months after transmission. These infected grapevine plants showed a positive reaction to the *X. fastidiosa* common primers. In addition, *P. costalis* with a 72-hr acquisition access periods were transferred to three healthy grapevine plants and one grapevine plant showed similar symptoms 1.5 months after transmission, and the infected grapevine plant also showed a positive reaction with the *X. fastidiosa* primers. In these transmission tests, we used a total of fifty adults of *K. paulula*, and 25 adults had a positive reaction with the *X. fastidiosa* primers, ie. *K. paulula* had a 50% acquisition rate. In addition, thirteen *P. costalis* adults were used, with 2 adults having a positive reaction. The acquisition rate of *P. costalis* was 15.4%. The results of both the transmission tests and acquisition rates showed that *K. paulula* and *P. costalis* were the vectors of Pierce's disease of the grapevines in Taiwan.

Key words: Pierce's disease, insect vectors, *Kolla paulula*, *Poophilus costalis*, transmission test

* Corresponding emails: yslin@tactri.gov.tw