



利用新 PCR 引子檢測小綠葉蟬 (*Empoasca* spp.) 攜帶花生簇葉病菌質體

陳覽纘¹、蔡正隆^{1,2}、蔡孟旅³、陳昇寬³、陳美娥^{1*}

¹ 國立中興大學昆蟲學系

² 佛羅里達大學昆蟲及線蟲學系

³ 行政院農業委員會台南區農業改良場

* 通訊作者 email: meirchen@dragon.nchu.edu.tw

收件日期：2020 年 11 月 24 日 接受日期：2021 年 5 月 7 日 線上刊登日期：2021 年 6 月 9 日

摘要

植物菌質體 (*Candidatus Phytoplasma*) 為一植物病原細菌，可透過吸食韌皮部汁液之昆蟲傳播，感染多種植物造成不同之疾病。花生受菌質體感染引發簇葉病 (peanut witches' broom disease)，造成經濟損失。目前已知南斑葉蟬 (*Orosius orientalis*) 為傳播花生簇葉病的媒介昆蟲。然而，在花生田中亦可發現小綠葉蟬 (*Empoasca* spp.) 的蹤跡，小綠葉蟬與南斑葉蟬皆為吸食韌皮部汁液之昆蟲，因此本研究檢測小綠葉蟬是否也攜帶花生簇葉病菌質體，以探究其為花生簇葉病之媒介昆蟲的可能性。利用 PCR 檢測小綠葉蟬全蟲的 DNA，透過 P1/P7 及 f1/r1 通用性引子對增幅植物菌質體之 16S rRNA 基因，初步檢測小綠葉蟬是否攜帶花生簇葉病菌質體，結果顯示以 f1/r1 引子對檢測採集樣本中有 76% 的小綠葉蟬及 52% 的南斑葉蟬可增幅出產物。進一步設計專一性引子對 f3/r3，降低通用性引子對 f1/r1 增幅非目標產物之情形，結果於採集樣本中 41% 的小綠葉蟬及 53% 的南斑葉蟬可增幅出菌質體標的產物。本研究證實小綠葉蟬也可攜帶花生簇葉病菌質體，是否能藉以傳播則有待進一步檢測；此成果可作為花生簇葉病菌質體病害防治中防除媒介昆蟲之基礎資訊。同時，本研究研發之 f3/r3 引子對可應用於防治花生簇葉病菌質體媒介昆蟲之檢測工具。

關鍵詞：花生簇葉病、植物菌質體、小綠葉蟬、南斑葉蟬。

前 言

台灣落花生受花生簇葉病菌質體感染後會引發花生簇葉病 (peanut witches' broom disease)，受感染之花生會出現花器綠化、節間縮短、葉片變小、光合作用減少，簇葉等病徵，且花生簇葉病之病株將無法正常開花，使花生無法順利結果，致使產量減少，造成經濟損失 (Yang, 1985)。植物菌質體

(*Candidatus Phytoplasma*) 屬無壁菌門 (Tenericutes) 柔膜菌綱 (Mollicutes)，為一重要植物病原菌，全球逾一千多種植物病害由植物菌質體所造成 (Marcone, 2014)，包括重要果樹及經濟作物，造成農業嚴重的經濟損失，例如梨衰弱病 (pear decline disease)、甘蔗白葉病 (sugarcane white leaf disease)、水稻黃萎病 (rice yellow dwarf disease)、日日春葉片黃化病 (periwinkle leaf

yellowing disease)、絲瓜簇葉病 (loofah witches' broom disease) 等。

植物菌質體寄生於植物韌皮部的篩管細胞，可藉由媒介昆蟲傳播，包含葉蟬 (leafhopper)、木蝨 (psyllid)、飛蟲 (planthopper) 等刺吸式口器之半翅目昆蟲 (Weintraub and Beanland, 2006)。媒介昆蟲以口器刺吸受植物菌質體感染之病株韌皮部時，植物菌質體經由口器進入消化道，穿過腸壁進入血體腔，植物菌質體在昆蟲體內增殖並轉移至唾腺細胞中 (Namba, 2019)。當媒介昆蟲再以口器刺吸其他植物時，植物菌質體即可藉由唾液注射進植物韌皮部之篩管細胞，植物菌質體藉由韌皮部液體之雙向運輸傳播至植物葉片、莖部、根部，引起植物病害 (Namba, 2019)。為防止病害傳播，防除農田裡的媒介昆蟲是植物菌質體病害防治中的重要工作。目前已知南斑葉蟬 (*Orosius orientalis*) 為花生簇葉病菌質體之媒介昆蟲 (Yang and Wu, 1990)，然近年於台中及雲林的落花生田，發現小綠葉蟬 (*Empoasca* spp.) 的個體數量不亞於南斑葉蟬，且在未觀察到南斑葉蟬的落花生田亦發生簇葉病。因此除了南斑葉蟬之外，小綠葉蟬是否也攜帶花生簇葉病菌質體而傳播簇葉病？本研究即利用聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 偵測小綠葉蟬體內是否有植物菌質體 DNA，以釐清小綠葉蟬體內是否亦帶有植物菌質體，為花生簇葉病之防治提供基本研究資料。

目前具備多項檢測植物菌質體之技術，如：酵素連結免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay)、免疫吸附電子顯微技術 (immunosorbent electron microscopy) (Sinha and Benhamou, 1983)、direct fluorescence detection method (Namba *et al.*, 1981)、PCR (Namba *et al.*, 1993) 等。其中，PCR 技術運用引

子對增幅出植物菌質體 16S rRNA 之基因片段，以進行菌質體之檢測。而 PCR 除了可進行檢測，亦可取得植物菌質體之基因片段進一步進行鑑定及分類，因此學者常運用於植物菌質體研究。本研究利用 PCR 技術，藉引子對增幅小綠葉蟬全蟲 DNA 中之植物菌質體 16S rRNA 基因片段，以判斷小綠葉蟬是否攜帶植物菌質體。本研究使用 P1 (Deng and Hiruki, 1991) 與 P7 (Schneider *et al.*, 1995) 以及 f1/r1 (Lin and Lin, 1998)，兩對植物菌質體之通用引子對進行 PCR 檢測，並進一步開發適用於檢測花生簇葉病菌質體之引子對。

材料與方法

一、樣本採集與 DNA 萃取

於台中市東勢及雲林縣北港、虎尾、土庫之花生田掃網採集得到南斑葉蟬 93 隻、小綠葉蟬 29 隻，葉蟬 (Cicadellidae sp.) 2 隻及長蝽 (*Nysius graminicola*) 1 隻，將昆蟲樣本以 95% 酒精保存。接著，每隻樣本使用 100 μ l QuickExtractTM DNA Extraction Solution (epicentre[®], Madison, WI, USA) 依照實驗步驟萃取全蟲 DNA。

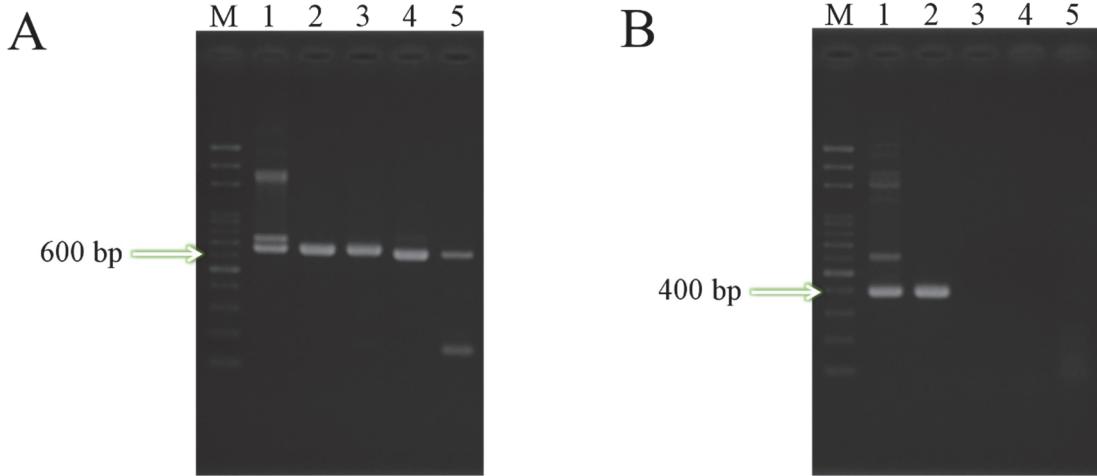
二、PCR 增幅及定序

以 P1/P7 及 f1/r1 兩對引子 (表一)，將所有昆蟲樣本之 DNA 進行初步檢測，並以染病植株的 DNA 作為對照組。以 P1/P7 引子對進行 first PCR，PCR program 設定為：94°C 5 分鐘，接著重複 35 個循環如下：94°C 30 秒、50°C 1 分鐘、72°C 2 分鐘，最後 72°C 10 分鐘。接著以 first PCR 之產物為模板，使用 f1/r1 引子對進行 nested PCR，PCR program 設定為：94°C 5 分鐘，接著重複 40 個循環如下：94°C 5 秒、58°C 10 秒、

表一 PCR 使用引子之序列

Table 1. Primer sequences used in this study

Primer name	Primer sequence	References
P1	5'- AAGAGTTGATCCTGGCTCAGGATT -3'	Deng and Hiruki, 1991
P7	5'- CGTCCTTCATCGGCTCTT -3'	Schneider <i>et al.</i> , 1995
f1	5'- AGTGGCGAACGGGTGAGTAA -3'	Lin and Lin, 1998
r1	5'- CGTCAGTAAAGACCCAGCAA -3'	Lin and Lin, 1998
f3	5'- TTAATAGGTATGCTTAGGAGGGC -3'	This study
r3	5'- CCATTACACCACTGACTTACTAGAC -3'	This study



圖一 利用 PCR 檢測植物菌質體。A、以 P1/P7 進行 first PCR，接著以 f1/r1 進行 nested PCR 所增幅出之產物 (658 bp)。B、以 P1/P7 進行 first PCR，接著以 f3/r3 進行 nested PCR 所增幅出之產物 (400 bp)。Lane M : 100 bp 核酸標記；lane 1：花生簇葉病 (PnWB disease) 病株；lane 2：編號 1250-3 之小綠葉蟬 (*Empoasca* sp.)；lane 3：編號 1250-4 之小綠葉蟬；lane 4：編號 1280-3 之小綠葉蟬；lane 5：編號 1235-1 之長蝽 (*N. graminicola*)。

Fig. 1. Detection of phytoplasmas using PCR. A. First PCR was performed with P1/P7 primers and then f1/r1 primers for nested PCR. The size of the PCR product was 658 bp. B. First PCR was performed with P1/P7 primers and then f3/r3 primers for nested PCR. The size of the PCR product was 400 bp. Lane M: molecular ladder 100 bp. Lane 1: plants with PnWB diseases. Lane 2: no. 1250-3 *Empoasca* sp. Lane 3: no. 1250-4 *Empoasca* sp. Lane 4: no. 1280-3 *Empoasca* sp. Lane 5: no. 1235-1 *N. graminicola*.

72°C 10 秒，最後 72°C 3 分鐘。

以電泳膠體分析 PCR 產物，預期產物大小為 658 bp。並將對照組及隨機選取的 2 個南斑葉蟬、3 個小綠葉蟬及長蝽之 nested PCR 產物進一步以 ABI3730 系統 (Applied Biosystems) 全自動 DNA 毛細管電泳取得序列 (源資國際生物科技股份有限公司，台北，台灣)。以美國全國生物技術資訊中心資料庫 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 之 BlastN 進行序列分析。

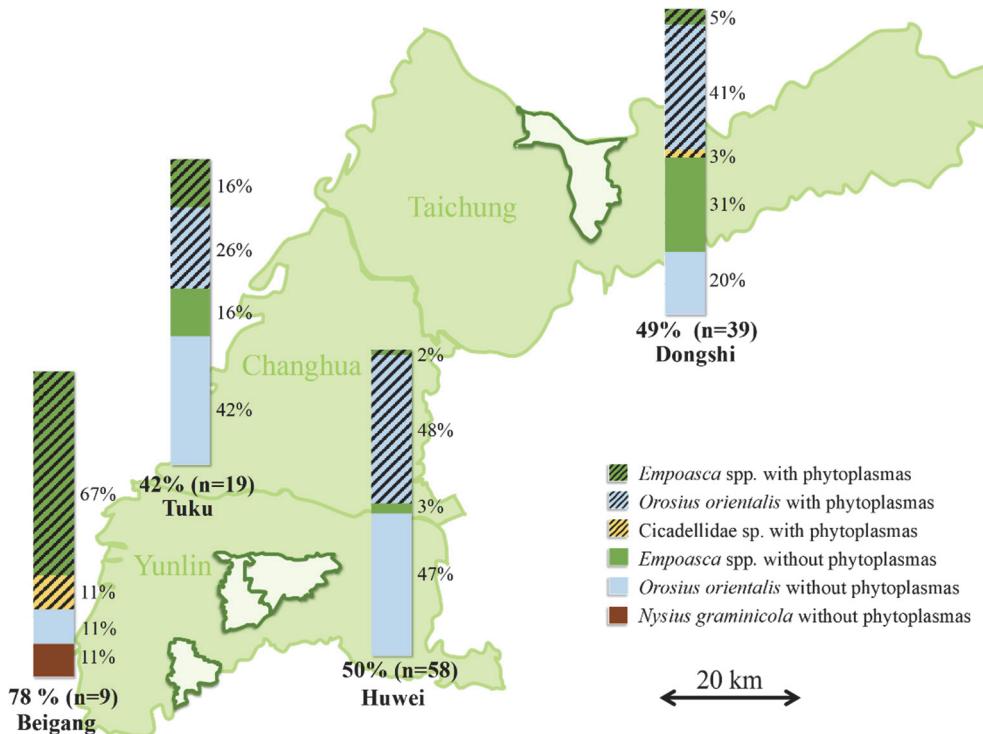
三、專一性引子對設計

上述序列經 Blast 分析後，花生簇葉病病株 PCR 產物的序列確為花生簇葉病菌質體 (相同度 99%)，而小綠葉蟬 PCR 產物的序列則出現厚壁菌門 (Firmicutes) 細菌之 16S rRNA 基因序列。比對病株及偽陽性 PCR 產物的序列，根據專一於病株中菌質體 16S rRNA 基因的區域設計 f3/r3 引子對，再將所有昆蟲樣本以 P1/P7 以及 f3/r3 進行檢測。First PCR 反應配製為：Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (Ampliqon, Odense, Denmark)，P1 及 P7 引子各 0.33 μM，10 μl 之昆蟲 DNA 作為模板，以去離子水補足至總體積為 30 μl。Nested PCR 反應之配製與 first PCR 相同，唯將引子改為 f3/r3，並以 1 μl 之 first PCR 產物作為模板，增幅之產物大小為 400 bp。First PCR 與

nested PCR program 設定同上述方法二中之 nested PCR program。

結 果

以 P1/P7 引子對進行 first PCR，再以 first PCR 產物為模板，以 f1/r1 進行 nested PCR，可增幅出約 600 bp 之產物 (圖一 A)。採集樣本中有 76% 的小綠葉蟬全蟲 DNA 可增幅出產物 (n=29)；52% 的南斑葉蟬全蟲 DNA 可增幅出產物 (n=93)，葉蟬 (Cicadellidae sp.) 之全蟲 DNA 沒有增幅出產物 (n=2) (本結果未示出)，而長蝽全蟲 DNA 則可增幅出產物 (n=1)。為確認 PCR 產物是否為花生簇葉病菌質體之基因，我們分別將花生簇葉病病株，及隨機選取 2 個南斑葉蟬、3 個小綠葉蟬、及長蝽之 nested PCR 產物進行定序。定序結果顯示花生簇葉病病株 (圖一 A lane 1) 的序列與基因庫中 (GenBank) 花生簇葉病菌質體 16S rRNA 基因 (accession number: JX871467.1) 吻合 (相同度 99%)。2 隻南斑葉蟬及編號 1250-3 的小綠葉蟬 (圖一 A, lane 2) nested PCR 產物的序列與花生簇葉病病株的序列相同。但編號 1250-4 小綠葉蟬 (圖一 A, lane 3) 的序列則與厚壁菌門 (Firmicutes) 的一種乳酸菌 (*Fructobacillus durionis*) 16S rRNA 基因 (accession number: MN809361.1) 具有 99% 的相



圖二 各採集地點攜帶植物菌質體之昆蟲百分比。綠色為小綠葉蟬 (*Empoasca* spp.)，藍色為南斑葉蟬 (*O. orientalis*)，黃色為葉蟬 (*Cicadellidae* sp.)，褐色為長椿 (*N. graminicola*)。柱狀圖中斜線部分代表帶植物菌質體之昆蟲。柱狀圖旁的數字代表各種昆蟲佔所有昆蟲之百分比 (%)。柱狀圖下的數字為所有昆蟲帶植物菌質體之比例 (%) 及採集樣本數 (n)。

Fig. 2. Percentage of insects with phytoplasmas in each collection site. Green represents *Empoasca* spp. Blue represents *O. orientalis*. Yellow represents *Cicadellidae* sp. Brown represents *N. graminicola*. The oblique lines in the histogram represent insects with phytoplasmas. The numbers beside each bar represent the percentage (%) of various insects among the sample in that site. The percentage under each histogram bar denotes the percentage of insects with phytoplasmas among the sample in that site and the number in parentheses denotes all insects collected in that site.

同度。編號 1280-3 小綠葉蟬 (圖一 A, lane 4) 的序列則與厚壁菌門毛螺菌科 (Lachnospiraceae) 16S rRNA 基因 (accession number: KX426599.1) 具有 99% 的相同度。而長椿 (圖一 A, lane 5) 的序列與厚壁菌門梭菌屬 (*Clostridium*) 16S rRNA 基因 (accession number: LC000899.1) 具有 95% 的相同度。上述序列分析結果顯示以 P1/P7 進行 first PCR, 再以 f1/r1 進行 nested PCR 可增幅出非植物菌質體之基因，亦即出現偽陽性之情況。

為減少增幅出非植物菌質體之基因，本研究根據 f1/r1 PCR 產物專一於病株菌質體 16S rRNA 的序列設計 f3/r3 引子對，再以 P1/P7 進行 first PCR, f3/r3 引子對進行 nested PCR，所增幅之產物為 400 bp (圖一 B)。以 f3/r3 引子對檢測偽陽性之昆蟲樣本全蟲 DNA，則不會增幅出其他細菌之 16S rRNA 基因 (圖一 B, lane 3、4、5)。所有採集樣本中，以 f3/r3 進行 nested PCR，可以增幅出產物之小綠葉

蟬的比例由 f1/r1 檢測之 76% 減少為 41%；而椿象全蟲 DNA 無法增幅出產物。此結果顯示 f3/r3 引子對可檢驗出 f1/r1 之偽陽性情況，亦即使用 f3/r3 引子對可減少偽陽性發生的機率。同時，隨機選取 2 個南斑葉蟬、1 個小綠葉蟬，及編號 1250-3 的小綠葉蟬之 PCR 產物進行定序，其序列與花生簇葉病病株 PCR 產物序列相同 (結果未示出)。

各採集地點昆蟲攜帶植物菌質體之百分比如圖二。在虎尾花生田採集到 58 隻樣本，包括 55 隻南斑葉蟬及 3 隻小綠葉蟬，其中 28 隻南斑葉蟬及 1 隻小綠葉蟬攜帶菌質體，分別占虎尾花生田全部樣本之 48% 及 2% (圖二)；而 3 隻小綠葉蟬中即有 1 隻攜帶菌質體，其陽性攜帶率為 33%。在東勢花生田採集到 39 隻樣本，包括 24 隻南斑葉蟬、14 隻小綠葉蟬及 1 隻葉蟬，其中 67% 的南斑葉蟬 (16 隻)、14% 的小綠葉蟬 (2 隻) 及 100% (1 隻) 的葉蟬攜帶菌質體，分別占東勢花生田全部樣本之 41%，5%

及 3% (圖二)。在樣本數較高的虎尾及東勢花生田裡，約 50% 的昆蟲攜帶植物菌質體，且多數為目前已知為媒介的南斑葉蟬。然而在土庫花生田採集到的 6 隻小綠葉蟬有 3 隻攜帶菌質體；13 隻南斑葉蟬中僅有 4 隻攜帶菌質體，分別占土庫花生田全部樣本之 16% 及 26% (圖二)。但以小綠葉蟬而言，其陽性攜帶率為 50%，較之南斑葉蟬的陽性攜帶率 31% 為高，惟土庫花生田裡僅採集到 19 隻昆蟲，樣本數太小。在北港花生田僅採集到 9 隻樣本，包括：1 隻長蝽不帶菌質體，1 隻葉蟬帶菌質體 (陽性攜帶率 100%)，1 隻南斑葉蟬不帶菌質體，及 6 隻小綠葉蟬皆攜帶菌質體 (陽性攜帶率 100%)。在北港花生田小綠葉蟬攜帶植物菌質體比例佔全部樣本之 67% (圖二)，但與土庫花生田樣本數太小的情況相同，小綠葉蟬攜帶植物菌質體比例的結果仍有待長期且大量的監測。

討 論

植物菌質體為引起植物上千種疾病之病原菌 (Marcone, 2014)。目前，植物菌質體無法於體外培養，其研究仍多著重於植物菌質體、媒介昆蟲及寄主植物這三者間之交互關係。植物菌質體侷限於韌皮部，主要傳播媒介為半翅目具刺吸式口器且吸食韌皮部之昆蟲。吸食植物韌皮部的昆蟲主要有下列六科：葉蟬科 (Cicadellidae)、菱飛蝨科 (Cixiidae)、稻蝨科 (Delphacidae)、長翅飛蝨科 (Derbidae)、青翅飛蝨科 (Flatidae) 及木蝨科 (Psyllidae) (Weintraub and Beanland, 2006)。目前已知種類數目最多的為葉蟬科，而本研究所採集及檢測體內攜帶植物菌質體之南斑葉蟬、小綠葉蟬及葉蟬皆屬於葉蟬科。長蝽不屬於上述六科，初次利用 f1/r1 引子對偵測到訊息時，即定序 PCR 產物，序列比對結果顯示非植物菌質體；再利用 f3/r3 引子對增幅後，即未出現訊號。另外，編號 1250-4 及 1280-3 的小綠葉蟬在利用 f1/r1 引子對增幅後所得到的偽陽性 PCR 產物屬於厚壁菌門細菌，其為常見的昆蟲腸道菌 (Yun et al., 2014)，故利用此對引子時要注意昆蟲消化道的細菌 DNA 被增幅的可能性。

根據 16S rRNA 基因，植物菌質體可被分為 35 群 (group) (Trivellone, 2018)，花生簇葉病菌質體的 16S rRNA 基因屬於 16SrII group。本研究所使用之 P1/P7 及 f1/r1 為植物菌質體通用引子對，可偵測植物菌質體 DNA 是否存在。為提高偵測植物菌質體專一性，可針對各群的 16S rRNA 基因序列

設計 group-specific 引子對，此引子對配合 nested-PCR 可提高靈敏度，且可同時檢測從寄主植物或媒介昆蟲來源之植物菌質體 (Lee et al., 1994; Lorenz et al., 1995)。本研究所設計之 f3/r3 可被使用為 f1/r1 PCR 反應之 nested PCR 引子對，亦能提高對花生簇葉病菌質體的專一性。此對引子尚未使用於其他植物菌質體檢測，未來可測試同為 16SrII group 的甘藷簇葉病及台灣梨衰弱病菌質體 (Hung and Lin, 2011)，或測試其他非 16SrII group 的植物菌質體，以進一步定位此引子對的應用性。

根據 PCR 結果，小綠葉蟬及葉蟬全蟲 DNA 中可增幅出花生簇葉病菌質體 16S rRNA 基因，可確定其攜帶花生簇葉病菌質體。葡萄金黃色菌質體 (flavescence dorée phytoplasma)，在病媒及非病媒昆蟲都可被檢出 (Lefol et al., 1993)；翠菊黃萎病菌質體 (aster yellows phytoplasma) 在病媒二叉葉蟬 (*Macrostelus fascifrons*) 及非病媒玉米黃翅葉蟬 (*Dalbulus maidis*) 亦皆可被檢出 (Vega et al., 1994)。故小綠葉蟬及葉蟬是否傳播花生簇葉病菌質體，為花生簇葉病之病媒，還需後續實驗才能證明。

誌 謝

本研究承蒙農委會動植物防疫檢疫局計畫 (108-救助調整-檢-03 (Z)) 經費補助，謹誌謝忱。

引用文獻

- Deng S, Hiruki C.** 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *J Microbiol Meth* 14: 53-61.
- Hung TH, Lin CP.** 2011. Current status on important crop diseases induced by phytoplasmas. In Shih HT, Chang CJ (eds). *Proceedings of the Symposium on Integrated Management Technology of Insect Vectors and Insect-Borne Diseases*; 2011 July; Taichung Taiwan. pp 63-71. (in Chinese with English abstract)
- Lee IM, Gundersen DE, Hammond RW, Davis RE.** 1994. Use of mycoplasmalike organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant.

- Phytopathology 84: 559-566.
- Lefol C, Caudwell A, Lherminier J, Larrue J.** 1993. Attachment of the Flavescence dorée pathogen (MLO) to leafhopper vectors and other insects. Ann Appl Biol 123: 611-622.
- Lin TC, Lin CP.** 1998. Evaluation of universal PCR primers for the detection of phytoplasmas. Plant Pathol B 7: 33-42. (in Chinese with English abstract)
- Lorenz KH, Schneider B, Ahrens U, Seemüller E.** 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. Phytopathology 85: 771-776.
- Marcone C.** 2014. Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas. Ann Appl Biol 165: 199-221.
- Namba S.** 2019. Molecular and biological properties of phytoplasmas. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 95: 401-418.
- Namba S, Yamashita S, Doi Y, Yora K.** 1981. Direct fluorescence detection method (DFD method) for diagnosing yellows-type virus diseases and mycoplasma diseases of plants. Ann Phytopathol Soc Jpn 47: 258-263 (in Japanese with English abstract).
- Namba S, Kato S, Iwanami S, Oyaizu H, Shiozawa H, Tsuchizaki T.** 1993. Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasmalike organisms using polymerase chain reaction. Phytopathology 83: 786-791
- Schneider B, Seemueller E, Smart CD, Kirkpatrick BC.** 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. pp 369-380. In: Razin S, Tully JG (eds). Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology Vol I. Academic Press, London.
- Sinha RC, Benhamou N.** 1983. Detection of mycoplasmalike organism antigens from aster yellows-diseased plants by two serological procedures. Phytopathology 73: 1199-1202.
- Trivellone V.** 2018. online. Hemiptera-Phytoplasma-Plant biological interaction database. Web site: <http://trivellone.speciesfile.org/>
- Vega FE, Davis RE, Dally EL, Barbosa P, Purcell AH, Lee IM.** 1994. Use of a biotinylated DNA probe for detection of the aster yellows mycoplasmalike organism in *Dalbulus maidis* and *Macrosteles fascifrons* (Homoptera: Cicadellidae). Fla Entomol 77: 330-334.
- Weintraub PG, Beanland L.** 2006. Insect vectors of phytoplasmas. Annu Rev Entomol 51: 91-111.
- Yang IL.** 1985. Host responses of peanut witches' broom disease. J Agric Res China 34: 464-468.
- Yang IL, Wu SY.** 1990. The latent period of peanut witches' broom agent in the vector *Orosius orientalis*. J Agric Res China 39: 204-207
- Yun JH, Roh SW, Whon TW, Jun MJ, Kim MS, Park DS, Yoon C, Nam YD, Kim NY, Choi JH, Kim JY, Shin NR, Kim SH, Lee WJ, Bae JW.** 2014. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. Appl Environ Microbiol 80: 5254-5264.

Peanut Witches' Broom Phytoplasma Detection in *Empoasca* spp. Using New PCR Primers

Lan-Pin Tan¹, Cheng-Lung Tsai^{1,2}, Meng-Lu Tsai³, Sheng-Kuan Chen³, and Mei-Er Chen^{1*}

¹ Department of Entomology, National Chung Hsing University

² Department of Entomology and Nematology, University of Florida

³ Tainan District Agricultural Research and Extension Station

* Corresponding email: meirchen@dragon.nchu.edu.tw

Received: 24 November 2020 Accepted: 7 May 2021 Available online: 9 June 2021

ABSTRACT

Phytoplasmas are plant pathogens transmitted by phloem-feeding insects and cause many diseases. Peanut witches' broom (PnWB) disease is induced by phytoplasmas and causes substantial economic loss for farmers. Until now, *Orosius orientalis* has been identified as the vector of PnWB diseases. However, *Empoasca* spp. are also found in peanut fields. Both *Orosius orientalis* and *Empoasca* spp. are phloem-feeding insects. Therefore, phytoplasma detection in *Empoasca* spp. was performed to determine the possibility of *Empoasca* spp. being a vector. The first step was to detect if the phytoplasma 16S rRNA gene was present in total *Empoasca* spp. DNA through a polymerase chain reaction (PCR) with P1/P7 and f1/r1 universal primers. Further, f3/r3 primers were designed to avoid the untargeted PCR products from universal f1/r1 primers. Phytoplasmas were detected in 76% of *Empoasca* spp. and 52% of *Orosius orientalis* samples when the f1/r1 primers were used, and in 41% of *Empoasca* spp. and 53% of *O. orientalis* samples when the f3/r3 primers were used. The results of this study can be used as fundamental information in developing preventative measures against the insects that transmit PnWB diseases. Additionally, the f3/r3 primers developed in this study can serve as a tool for the detection of PnWB phytoplasma in insects.

Key words: peanut witches' broom disease, phytoplasma, *Empoasca* sp., *Orosius orientalis*