

臺灣引起長豇豆花器葉化症植物菌質體之特性分析

張哲銘¹ 詹富智² 蘇秋竹^{1*}

摘要

張哲銘、詹富智、蘇秋竹。2018。臺灣引起長豇豆花器葉化症植物菌質體之特性分析。臺灣農藥科學 4: 53-67。

長豇豆 [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] 為一年生草本植物，原產於印度，在臺灣被稱為菜豆，營養價值高又可全年供應，為臺灣重要的豆科蔬菜。長豇豆喜溫暖、日照充足的氣候，耐熱耐旱耐濕，再生力亦強，主要產地為屏東、高雄、彰化、雲林、新北及嘉義等縣市。2015年7月於雲林縣水林鄉首次發現疑似植物菌質體感染的長豇豆病株，罹病株呈現花器葉化、葉片叢生、葉片黃化且明顯變小等系統性病徵，罹病植株幾無產量，該園之發生率為4%。切取罹病組織進行超薄切片觀察，可於篩管內發現植物菌質體存在，植物菌質體呈現大小不一致之形態。萃取罹病株之植物總量DNA後，以植物菌質體廣效性引子對F1/F7及R16F2n/R16R2進行巢式聚合酶連鎖反應，可增幅得到F2nR2序列片段，確認為植物菌質體所引起。以16S rDNA基因片段與基因庫登錄之不同植物菌質體16Sr分群之菌系進行比較，並以最大似然法繪製親緣關係樹狀圖，得知臺灣長豇豆花器葉化症與澳洲、中國及緬甸危害豇豆的植物菌質體菌系歸屬於為同一群。同時將16S rDNA序列於網站模擬17種限制酵素的酶切作用進行限制酵素片段長度多型性分析，結果亦顯示在臺灣與澳洲、中國及緬甸危害豇豆的植物菌質體皆歸屬於16Sr II-A群。

關鍵詞：長豇豆、植物菌質體、花器葉化症

接受日期：2018年6月22日

* 通訊作者。E-mail: auba@tactri.gov.tw

¹ 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

² 臺中市 國立中興大學植物病理學系

緒言

豇豆 [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] 為豆科長豇豆屬一年生草本植物，栽培種豇豆可再區分為 4 群；分別為短長豇豆 (biflora group)、黑眼豆 (unguiculata group)、長豇豆 (sesquipedalis group) 及 *textilis* group。臺灣主要栽培種為長豇豆 [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. spp. *sesquipedalis* (L.) Verdc.]，原產於印度，性喜溫暖、日照充足的氣候，耐熱、耐旱、耐濕，而耐寒性弱。其盛產期為 4~9 月，但南部地區冬天溫度仍適合長豇豆生長而可全年供應，為國人喜愛的豆科蔬菜。根據農情報告資源網統計，近 5 年臺灣長豇豆栽種面積約為 826~979 公頃，主要產地依序為屏東、高雄、彰化、雲林、新北及嘉義等縣市，其中屏東及高雄地區佔了全國栽種面積 55~60%。產量資料顯示，近 5 年長豇豆年產量則為 9,807~11,794 公噸，高屏地區亦佔了全國產量 55~60%。目前臺灣已確認的豇豆病害^(2,5,16) 包括白粉病 (powdery mildew)、白絹病 (southern blight)、角斑病 (angular leaf spot)、炭疽病 (anthracnose)、莖腐病 (stem rot)、煤黴病 (Sooty blotch; leaf spot)、萎凋病 (*Fusarium* wilt)、銹病 (rust)、濕腐病 (*Choanephora* wet rot)、疫病 (*Phytophthora* stem rot)、病毒病 (virus disease)...等。

2015 年本研究室首度於雲林縣水林

鄉發現疑似菌質體感染的長豇豆病株，該田區的罹病株呈現花器葉化、葉片叢生、葉片黃化且明顯變小等病徵，且全株病徵呈現系統性分布。根據文獻報導，最早在 2006 年澳洲就有長豇豆被植物菌質體為害的紀錄^(25, 30)，豇豆的起源中心—印度則在 2012 年首次報導⁽²⁰⁾，而其他的發生案例皆發生在亞洲，包括伊朗、緬甸⁽³⁷⁾ 及中國。

植物菌質體 (phytoplasma) 為一群棲息於植物篩管組織的無細胞壁、多形性、絕對寄生原核生物，其可感染的寄主植物超過 700 種以上⁽²⁴⁾，主要的病徵為造成寄主植物枝葉增生、花器葉片化、花器綠化、葉片變小、植株生長遲緩、萎凋、葉片黃化及簇葉等病徵⁽²³⁾。Doi 等人於 1967 年以穿透式電子顯微鏡觀察馬鈴薯簇葉病、桑樹萎縮病、泡桐簇葉病與翠菊黃萎病等罹病植物組織的超薄切片，才發現其存在，並暫稱之為類菌質 (mycoplasma-like organisms, MLO)⁽¹²⁾。直到 1994 年 Schneider 等人依其生物特性、物理特性及基因組成等特徵才正式命名為植物菌質體⁽²⁷⁾，並於 2004 年由 International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology (IRPCM) Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma Taxonomy Working Group 暫定其屬名為 'Candidatus Phytoplasma'⁽¹⁵⁾。由於植物菌質體難以純化培養，無法應用傳統細菌形態及生理生化特性進行分類鑑定。早期主要藉由病徵、嫁接、傳播試驗及電子顯微

鏡觀察等方式進行診斷；鑑定則依據病徵及寄主範圍、媒介昆蟲種類、血清學...等特性來進行分析。然而植物菌質體的寄主範圍甚廣，同一作物可能受多種植物菌質體複合感染，且不同植物菌質體所造成的病徵相似，因此上述的分類方式缺乏一致性⁽²⁸⁾。直到 1998 年 Lee 等人依據植物菌質體的 16S rRNA 基因序列及 F2nR2 序列片段之限制酵素片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 作為分群依據，截至 2016 年為止，植物菌質體菌系可被區分成 33 個主要菌群^(21,29,37)。

目前臺灣較重要的植物菌質體病害包括一條根簇葉病、梨衰弱病、木瓜莖頂病、葉枯萎病、花生簇葉病、絲瓜簇葉病、甘藷簇葉病、泡桐簇葉病、日日春葉片黃化病、水稻黃萎病、甘蔗白葉病、洛神捲葉及花器葉化症、長梗紫麻簇葉病等^(1,4,6,7,31,32)。本文為首次報導臺灣地區長豇豆花器葉化症之致病因子並探討其 16S rRNA 特性，再更進一步分析比較與其他國家長豇豆菌質體菌系間親緣相關性。

材料與方法

一、植物樣本來源及病害發生調查

2015 年 7 月於雲林縣水林鄉的田區發現長豇豆植株呈現花器葉化、葉片叢生、葉片黃化且明顯變小等病徵，且全株病徵呈現系統性分布，與植物菌質體所引

起之病徵相似，採集同一田區之罹病及正常植株，並將採集的樣本保存於 4°C 冰箱。同年於屏東縣長豇豆產區進行病害調查，調查區域涵蓋長治鄉、鹽埔鄉及內埔鄉等 3 鄉鎮共計 10 區栽植園。

二、穿透式電子顯微鏡觀察

切取罹病長豇豆花器葉化之葉柄組織，以陳與劉氏等人的方式加以修改進行樣品固定與脫水⁽³⁾：先以 2.5% 戊二醛 (glutaraldehyde) 及 1% 四氧化銻 (osmium tetroxide) 行雙重固定後，以丙酮系列脫水，並進行樹脂包埋，包埋後的樣品以超薄切片機進行切片，最後以飽和醋酸鈾 (uranyl acetate) 及 0.2% 檸檬酸鉛雙重染色後，置於銅網上以穿透式電子顯微鏡 (JEM-1010, JEOL, Japan) 觀察。

三、總量 DNA 萃取及巢氏聚合酶連鎖反應檢測

取罹病植株花器葉化及正常植株之葉柄組織以酒精消毒表面後，切取 100 mg 組織樣本放入研磨袋，並加入 1mL SCPAP 緩衝液 (0.1% disodium succinate, 0.1% trisodium citrate, 0.15% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.02 M sodium ascorbate, and 5% acid-washed insoluble polyvinylpyrrolidone, pH7.0) 進行研磨後，再利用組織與細胞基因體 DNA 純化試劑盒 (GeneMark, Taichung, Taiwan) 萃取植物總量 DNA，純

化所得 DNA 樣品存放於 -20°C 冰箱，待進行聚合酶連鎖反應。

以植物菌質體廣效性引子對 P1/P7 (5'-AAGAGTTTGATCTGGCTCAGGATT-3'/5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3') 對長豇豆罹病組織進行第一次聚合酶連鎖反應⁽²⁶⁾。聚合酶連鎖反應總體積為 20 μL ，其中包含 1 倍反應緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 0.01% gelatin, 1.5 mM MgCl_2 , 0.1% Triton X-100)、250 μM 的 dNTPs、0.5 μM 的引子、0.8 Units 的 ProTaq™ DNA Polymerase (Protech Technology Enterprise Co. Ltd., Taipei, Taiwan) 及 20 ng 基因體 DNA。聚合酶連鎖反應增幅條件先以 94°C 反應 30 sec，之後進行 94°C 2 min、 55°C 1 min、 72°C 90 sec，共 35 個循環，最後再進行 72°C 7 min。第一次聚合酶連鎖反應所得產物稀釋 10 倍後，再以 R16F2n / R16R2 (5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'/5'-TGACGGCGGTGTGTACAAACCCCg-3')⁽²¹⁾ 進行巢氏聚合酶連鎖反應 (nested polymerase chain reaction)，其方法及增幅條件與上述相同，以得到 F2nR2 序列片段。

增幅後之產物以 1% agarose (1 倍 TAE buffer) 之電泳分析 (100V)，並以 1 Kb DNA ladder H3 RTU (GeneDireX Inc. 5348 Vegas Dr. Las Vegas City, Nevada 89108, USA.) 作為核酸標誌物，最後以溴化鈣錠染色觀察，並照相記錄。

將聚合酶連鎖反應所得 16S rRNA 序列片段經純化後，將序列片段送至明欣生

物科技公司以自動定序儀 (Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) 進行定序。將定序所得之 16S rDNA 序列送至 NCBI (National Center for Biotechnology Information, 美國國家生物科技資料中心) 的 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 進行序列比對。

四、親緣關係探討

將得到的 16S rDNA 序列與登錄於 GenBank (基因庫) 之不同菌系序列進行比較，本實驗所參考的植物菌質體菌系包括：9 個來自國外感染豇豆的植物菌質體菌系及 17 個感染其他寄主且屬於不同 16S rRNA 分群之模式菌株 (表一)，另以 *Acholeplasma laidlawii* (GenBank accession number : FJ655561) 之 16S rDNA 序列作為外群。所有序列以 BioEdit 7.0.9.0 版 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) 軟體 ClustalW⁽¹⁴⁾，進行多序列比對並整理得到一致性序列後，再以 DNA 序列分析軟體 Molecular Evolution Genetic Analysis (MEGA) version 7.0⁽¹⁹⁾ 套用 Jukes cantorr 模式，計算序列間之遺傳距離，並以最大似然法 (Maximum Likelihood) 方法繪製親緣關係樹狀圖，以 1000 次重複取樣之 bootstrap replications 值以檢驗親緣關係樹狀圖各支點的可信度^(13,18)，比較各不同菌系之親緣性。

表一、本研究所引用不同植物菌質體菌系及其 16S rDNA 序列基因之來源

Table 1. Phytoplasma strains from different 16Sr groups and corresponding 16S rDNA sequence Genbank accession numbers

RFLP subgroup classification	Strain	Hosts	Genbank Accession No.	Reference
ND ²⁾	Cowpea bud proliferation phytoplasma, CwND	<i>Vigna unguiculata</i>	HM449952	20
I-A	Tomato big bud, BB	tomato	L33760	6
I-B	Oenothera phytoplasma 86-7	<i>Oenothera hookeri</i>	M30790	27
II-A	Vigna phyllody strain VU-6	<i>Vigna sesquipedalis</i>	KU170532	* ¹⁾
II-A	Vigna phyllody strain VU-1	<i>Vigna sesquipedalis</i>	KU170533	*
II-A	Vigna phyllody strain VU-4	<i>Vigna sesquipedalis</i>	KU170534	*
II-A	Vigna phyllody strain VU-3	<i>Vigna sesquipedalis</i>	KU170535	*
II-A	Long bean phyllody phytoplasma	<i>Vigna sesquipedalis</i>	AB690306	34
II-A	Sweet potato little leaf phytoplasma strain V4	<i>Vigna sesquipedalis</i>	JQ067649	30
II-A	Cowpea phyllody phytoplasma, CowP-YNym	<i>Vigna unguiculata</i>	KC953001	*
II-A	Peanut witches'-broom, PnWB	peanut	L33765	33
II-B	Witches'-broom of lime, WBDL	lime	U15442	6
II-D	<i>Vigna unguiculata</i> flat stem phytoplasma	<i>Vigna unguiculata</i>	KY439870	*
III-S	Western peach X-disease, WX	peach	L04682	38
V-A	' <i>Ca. Phytoplasma ulmi</i> '	elm	AY197655	35
V-B	' <i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i> ' strain JWB-G1	jujube	AB052876	35
VI	<i>Vigna unguiculata</i> virescence phytoplasma, Nazarlou 182	<i>Vigna unguiculata</i>	KC633092	*
VI	<i>Vigna unguiculata</i> virescence phytoplasma, Sabestar 182-Sa	<i>Vigna unguiculata</i>	KC633093	*
VI	<i>Vigna unguiculata</i> virescence phytoplasma, Tabriz-172	<i>Vigna unguiculata</i>	KC633094	*
VI-A	' <i>Ca. Phytoplasma trifolii</i> '	<i>Trifolium hybridum</i>	AY390261	35
VII-A	' <i>Ca. Phytoplasma fraxini</i> '	<i>Fraxinus</i> spp.	AF092209	35
VII-A	Ash yellows, AshY	ash	X68339	6
IX-D	Almond witches' -broom, strain A4	almond	AF515636	35
X-A	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '	apple	AJ542541	35
X-C	' <i>Ca. Phytoplasma pyri</i> '	<i>Pyrus communis</i>	AJ542543	35
X-D	' <i>Ca. Phytoplasma spartii</i> '	<i>Spartium junceum</i>	X92869	35
X-F	' <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> '	Peach	AJ542544	35
XI-A	' <i>Ca. Phytoplasma oryzae</i> '	rice	AB052873	35
XII-A	Stolbur, STOL	peper	X76427	29
XII-A	Stolbur phytoplasma, STOL#11	periwinkle	AF248959	11
XIV-A	' <i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i> ', CW01	<i>Vigna unguiculata</i>	LT558768	*

*¹⁾ This 16S rDNA gene was analyzed in this study.

²⁾ ND. The fragment of 16S rRNA was too short to be analyzed with iPhyClassifier.

五、植物菌質體之 16SrRNA 分群

將上述所得之 16SrDNA 序列輸入 iPhyClassifier 網站，網站會與資料庫中的模式菌株之進行 16SrDNA 序列比對，並計算其核酸序列相同度 (identities)。若其相同度高於 97.5%，則表示該菌株為模式菌株之相關菌株。iPhyClassifier 網站亦可電腦模擬 17 種限制酵素 (*AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MboI* (*Sau3AI*), *MseI*, *RsaI*, *SspI* and *TaqI*) 於其 F2nR2 區間序列進行酶切作用⁽²¹⁾，並比對分析所得到的片段。其分析公式 $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ ，是以 X 及 Y 兩種不同的植物菌質體經上述 17 種酵素酶切所得之總片段數 (N_x 及 N_y) 與兩种植物菌質體所共有的酶切片段數 (N_{xy}) 之比例，得到相似係數 (similarity coefficient, F)，來作為分群依據⁽³³⁾。相似係數大於或等於 0.98，可視為同一亞群；若相似係數小於 0.85，則歸屬於不同群。

結果

一、病害之發生、病徵與調查

2015 年 7 月於雲林縣水林鄉首次發現長豇豆罹病株呈現花器葉化、葉片叢生、葉片黃化且明顯變小等病徵 (圖一)，與植物菌質體所引起之病徵相似。

調查罹病園及其鄰近園區，未發現其他罹病園區，而該罹病園區之發生率為 4%，罹病株呈現零星點狀分布，罹病株之花器葉化病徵呈現系統性分布，罹病株幾無產量。同年於屏東縣長治鄉、鹽埔鄉及內埔鄉共調查 10 區長豇豆田區，亦未發現罹病園區。爾後 2016 年及 2017 年分別於嘉義縣太保市及南投縣竹山鎮亦發現長豇豆花器葉化之病徵，以 P1/P7 廣效性引子對進行聚合酶連鎖反應確認為植物菌質體感染。經實地調查發現太保之罹病園區之病害發生率為 4~5%，其罹病株皆分布於園區邊緣區域；竹山罹病園區之病害發生率高達 50%，而罹病株平均分布於整個園區。

二、穿透性電子顯微鏡觀察

長豇豆罹病樣本花器葉化組織之葉柄以穿透性電子顯微鏡觀察，可以發現其維管束組織篩管細胞中有植物菌質體存在 (圖二)，且呈現大小不一致之形態，而健康之長豇豆組織之篩管細胞並無植物菌質體存在。

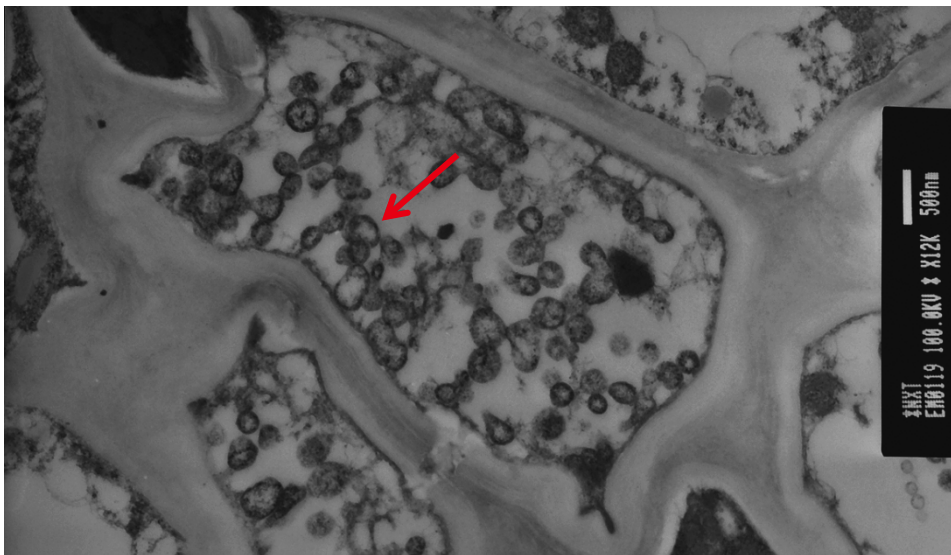
三、聚合酶連鎖反應檢測鑑定

利用植物菌質體廣效性引子對 P1/P7 進行第一次聚合酶連鎖反應，目標為增幅植物菌質體之 16S-23S rDNA 序列，片段大小約為 1.8 Kb。結果發現三個罹病樣本皆可增幅出符合預計大小的 DNA 片段，



圖一、菌質體感染長豇豆所引起花器葉化、葉片叢生及葉片黃化且明顯變小病徵。

Fig. 1. A *Vigna sesquipedalis* plant infected by phytosmia in Yunlin county. Systemic symptoms included leaf yellowing, witches'-broom, proliferation of small leaves, and phyllody.



圖二、長豇豆罹病株篩管內聚集多形態菌質體菌體 (箭頭) 之電顯圖。

Fig. 2. Micrograph of pleomorphic phytosmia cells (red arrow) found in the sieve tubes of vascular tissue from infected *Vigna sesquipedalis* plants.

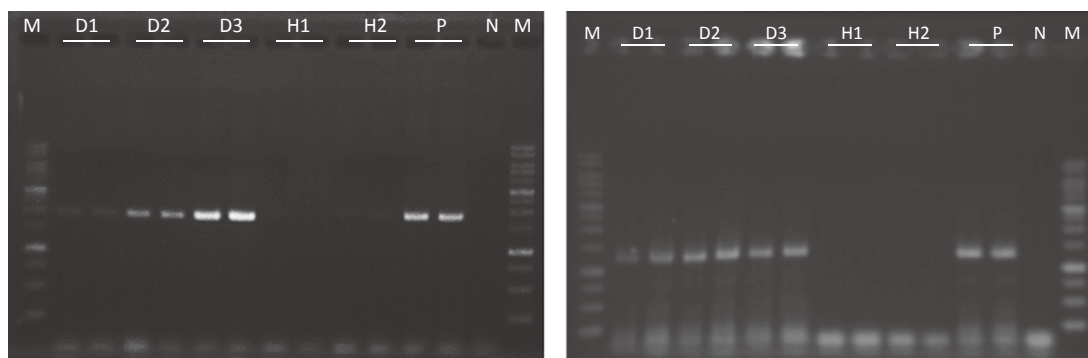
而健康植株之樣本則無法增幅出任何產物。第一次聚合酶連鎖反應所得之產物經 10 倍稀釋後，再以 R16F2n / R16R2 引子對進行巢式聚合酶連鎖反應，得到 F2nR2 序列片段 (圖三)。

四、16S rDNA 定序及親緣關係比對

聚合酶連鎖反應所得之 16S-23S rDNA 片段進行定序，將 4 個菌系之序列資料上傳至 NCBI (KU170532-KU170535)，並於 BLAST 網站進行序列比對，結果顯示其與造成青箱簇葉病

(*Celosia argentea* phyllody and witches'-broom, KX426374)、臺灣梨衰弱病 (pear decline-Taiwan, EF193157)、甜麻花器葉化症 (*Corchorus aestuans* phyllody, KX645865)、花椰菜簇葉病 (cauliflower phyllody, KC953000)、落花生簇葉病 (peanut witches'-broom, JX871467) 及木豆簇葉病 (pigeon pea witches'-broom, AB741637)...等植物菌質體菌系之序列相同度達 99.76%。

以臺灣及國外豇豆植物菌質體菌系及其他寄主植物菌質體菌系之 16S 序列片段進行多序列比對，整理得到一致性序列後，再以最大似然法繪製親緣關係樹狀

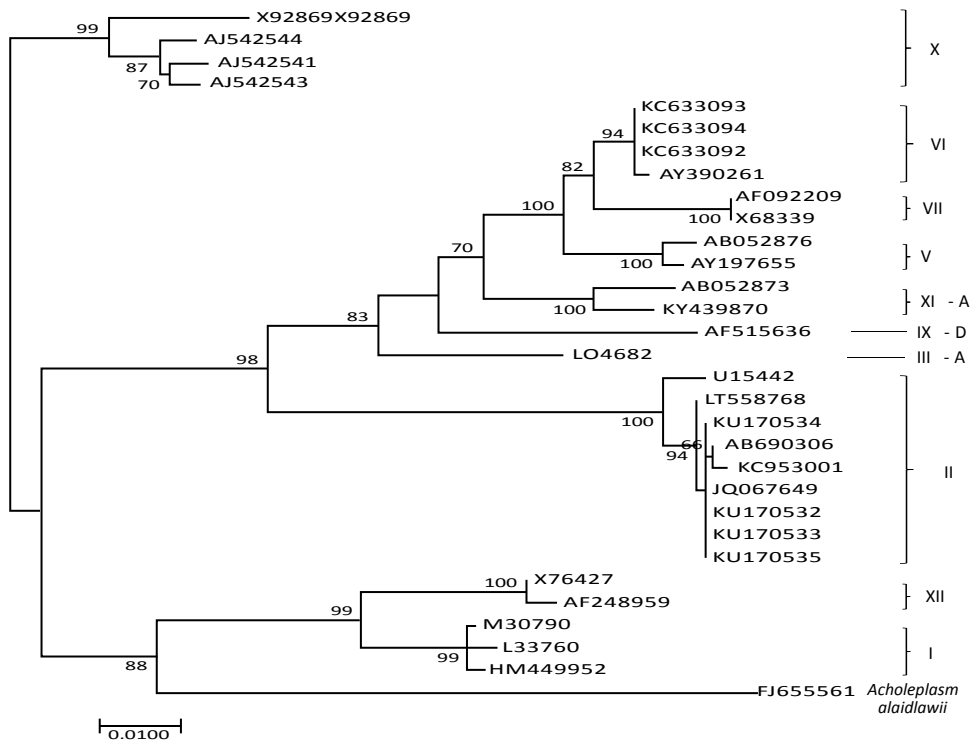


圖三、以廣效性引子對 P1/P7 (左圖) 及 R16F2n/R16R2 引子對 (右圖) 進行長豇豆花器葉化症組織之巢式聚合酶連鎖反應檢測。M 為 1Kb DNA ladder；D1-D3 為罹病植株之葉柄樣本；H1-H2 為健康植株之葉柄樣本；P 為一條根簇葉病之正對照組；N 為去離子水對照組。

Fig. 3. Results of nested polymerase chain reaction of the total DNAs extracted from symptomatic and healthy *Vigna sesquipedalis* tissue using primer pairs P1/7 (Left) and R16F2n/R16R2 (Right). M: 1Kb DNA ladder; lane D1-D3: diseased tissues of *V. sesquipedalis*; lane H1-H2: healthy tissues of *V. sesquipedalis*; P: diseased tissues of *Glycine tomentella*; N: ddH₂O.

圖。親緣關係樹狀圖顯示供試菌系共可以分成 10 群，臺灣 (KU170532, KU170533, KU170534, KU170535)、緬甸 (AB690306)、中國 (KC953001) 及澳洲 (JQ067649) 的豇豆植物菌質體菌系皆與感染萊姆的菌系歸屬於 16SrII；而來自伊朗 (KC633092, KC633093, KC633094) 的

豇豆植物菌質體則與感染車軸草 (*Trifolium hybridum*) 的菌系歸屬於 16SrVI；而豇豆的起源中心—印度共有三次植物菌質體菌感染的紀錄，三個菌系 (KY439870, LT558768, HM449952) 經分析各歸屬於 16SrI、16SrII 及 16SrXI-A 三個不同分群 (圖四)。



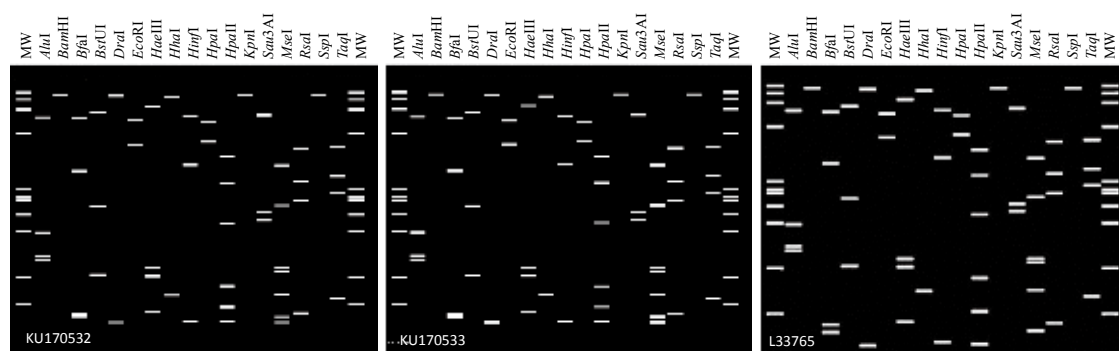
圖四、臺灣及國外長豇豆之植物菌質體與其他寄主植物菌質體菌系之 16S rDNA 序列，經由最大似然法分析親緣關係樹狀圖。枝條上的數字代表 bootstrap 值，且僅標示高於 65 的 bootstrap 值。

Fig. 4. A Maximum likelihood tree (based on 16s rDNA gene sequences) which illustrates the relationship between phytoplasma strains found on *Vigna sesquipedalis* in Taiwan and in other countries and other hosts. Probability values were determined using bootstrap analyses with 1000 re-samplings; probability values greater than 65% are shown above the internal branches.

進一步以 F2nR2 區間序列片段於 *iPhyClassifier* 網站進行限制酵素片段長度多型性分析，結果可得知來自臺灣、緬甸、中國、澳洲的豇豆植物菌質體菌系與感染萊姆的 16SrII-B 亞群菌系的相似係數為 0.88，可歸屬於 16SrII 菌群中的 16SrII-A 亞群（落花生簇葉病菌群）（圖五）；來自伊朗的豇豆植物菌質體菌系則與感染車軸草之菌系歸屬於 16SrVI 之菌群；來自印度的三個豇豆植物菌質體菌系則分屬於 16SrI、16SrII-D 及 16SrXIV-A 之分群。

討論

長豇豆為國人喜愛的豆科蔬菜，主要以嫩莢供膳食用，為夏季重要的蔬菜之一。2015 年於雲林縣水林鄉首次發現長豇豆花器葉化症，根據當地老農表示該狀況長年來偶有零散發生，俗稱「瘋穰」，且懷疑為病毒感染所造成。首先以電子顯微鏡觀察罹病組織，發現其維管束組織之篩管內有植物菌質體存在，再進一步以巢氏聚合酶連鎖反應證實該病症與植物菌質體有關。親緣關係樹狀圖及限制酵素片段長度多型性分析其分群，結果顯示臺灣長豇豆花器葉化症菌系與來自緬甸、中國、印度及澳洲之菌系皆歸屬於落花生簇葉病菌群（16SrII-A）。



圖五、利用 *iPhyClassifier* 網站針對臺灣長豇豆花器葉化症（左、中）及 16SrII-A 亞群：落花生簇葉病菌群（右）16SrRNA 之 F2nR2 區域模擬 17 種限制酵素片段長度多型性分析。

Fig. 5. Virtual RFLP patterns of the F2nR2 region of the 16SrRNA gene from phytoplasma strains KU170532 (left) and KU170533 (center) found on *Vigna sesquipedalis* and from the 16SrII-A subgroup phytoplasma strain L33765 (right) of peanut witches'-broom. Patterns were generated by 17 restriction enzymes (AluI, BamHI, BfaI, BstUI, DraI, EcoRI, HaeIII, HhaI, HinfI, HpaI, HpaII, KpnI, Sau3AI, MseI, RsaI, SspI, and TaqI) using the *iPhyClassifier* program.

植物菌質體寄生於植物韌皮部而造成系統性的病害，藉由媒介昆蟲吸食、種苗、嫁接等途徑傳播^(8,22,36)，因此首要的防治策略為採用健康種苗及防除媒介昆蟲。近年來，許多學者針對植物菌質體是否可藉由種子帶原進行研究，Cordova 等學者於 2003 年利用 *in situ* PCR 於椰子胚偵測到椰子致死黃化菌質體⁽¹⁰⁾，而 Khan 等學者提出植物菌質體可藉由苜蓿種子傳播，並可在幼苗上偵測到其存在⁽¹⁷⁾；Botti 及 Bertaccini 則表示植物菌質體可存在於萊姆及番茄種子中且可以正常發芽及發育⁽⁹⁾。

本篇為臺灣長豇豆被植物菌質體感染的首篇報導，迄今共於水林、太保及竹山各發現一個獨立罹病園區。水林及太保之罹病園區之病害發生率為 4~5%，其罹病株呈零星分布或分布於園區邊緣區域，推測本病可能藉由媒介昆蟲傳播？竹山罹病園區之病害發生率高達 50%，其罹病株平均分布於整個園區。同時於罹病園區及其鄰近田區以掃蟲網調查媒介昆蟲，亦跟園主索取當年播種的同批種子，再以聚合酶連鎖反應檢測所捕捉到 3 種類葉蟬及種子，兩者初步測試皆可增幅出特定片段(未發表之數據)，初步推測本病可能藉由種子及媒介昆蟲傳播？

回顧臺灣重要的植物菌質體病害，梨衰弱病、落花生簇葉病、甘藷簇葉病、一條根簇葉病、芝麻曲莖及花器葉化症⁽⁴⁾及紫錐菊簇葉病⁽³¹⁾之植物菌質體菌系皆為 16SrII-A，其中長豇豆花器葉化症與臺灣

的梨衰弱病植物菌質體菌系之序列相同度高達 99.76%，菌系之間的寄主專一性仍待探討。

謝辭

本研究感謝農業藥物毒物試驗所退休研究員楊秀珠博士提供罹病樣本，感謝李祈益先生協助穿透式電子顯微鏡觀察，使本篇得以順利完成，特致謝忱。

引用文獻

1. 洪挺軒、林長平。2011。臺灣農作物重要植物菌質體病害研究現況。農作物害蟲及其媒介病害整合防治技術研討會專刊，第 63-71 頁。石憲宗、張宗仁 編。行政院農業委員會農業試驗所、農委會動植物防疫檢疫局。臺中、臺北。
2. 徐世典、張東柱、張清安、蔡進來、蔡東纂 編。2002。臺灣植物病害名彙。4 版。中華民國植物病理學會。臺中。386 頁。
3. 陳脉紀、劉興業。1974。水稻黃萎病之電子顯微鏡研究。植物保護學會會刊 16: 42-55。
4. 曾意雯。2014。造成芝麻、洛神花及長梗紫麻病害的植物菌質體之診斷鑑定及特性分析。國立中興大學植物病理研究所碩士論文。臺中。62 頁。
5. 鄧汀欽、陳啟予、許秀惠、陳殿義。2015。本世紀臺灣新發生的植物病害紀

- 錄—「臺灣植物病害名彙」增補篇。臺灣新浮現之重要作物病害及其防治研討會專刊，第 145-199 頁。鄧汀欽、陳金枝、蔡佳欣、蔡志濃、謝廷芳 編。行政院農業委員會農業試驗所。臺中。
6. 蘇秋竹、楊文仁、高清文。2006。金門一條根簇葉病發生報導。植物保護學會會刊 48: 203-216。
 7. 蘇秋竹、楊文仁、高清文。2006。臺灣地區木瓜莖頂枝葉枯萎病發生報導。植物病理學會刊 15: 301。
 8. Agrios, G. N. 2005. Plant diseases caused by prokaryotes: bacteria and mollicutes. pp. 615-703. *In*: G. N. Agrios [ed.], Plant pathology, 5th ed, Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA. 952 pp.
 9. Bertaccini, A., and Duduk, B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathol. Mediterr.* 48: 355-378.
 10. Cordova, I., Jones, P., Harrison, N. A., and Oropexa, C. 2003. *In situ* PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Mol. Plant Pathol.* 4: 99-108.
 11. Davis, R. E., and Dally, E. L. 2001. Revised subgroup classification of group 16SrV phytoplasmas and placement of *Flavescence dorée*-associated phytoplasmas in two distinct subgroups. *Plant Dis.* 85: 790-797.
 12. Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., and Asuyama, H. 1967. Mycoplasma- or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches'-broom, aster yellows, or paulownia witches'-broom. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 33: 259-266.
 13. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
 14. Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
 15. 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.
 16. Kao, C. W., and Leu, L. S. 1982. *Phytophthora* stem rot of cowpea caused by *phytophthora vignae* Purss. *Plant Prot. Bull.* 24: 189-191.
 17. Khan, A. J., Botti, S., Paltrinieri, S., AlSubhi, A. M., and Bertaccini, A. 2002. Phytoplasmas in alfalfa seedlings: infected or contaminated seeds? pp. 6. *In*: Abstract, 14th Congress International Organization for Mycoplasmaology, July 7-12, 2002, Vienna.
 18. Kimura, M. 1980. A simple method for

- estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
19. Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. 2016. MEGA 7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.
 20. Kumar, S., Singh, V., and Lakhanpaul, S. 2012. A '*Candidatus* Phytoplasma asteris' isolate associated with bud proliferation disease of cowpea in India. *New Dis. Rep.* 25: 28.
 21. Lee, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis R. E., and Bartoszyk, I. M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1153-1169.
 22. Liu, H. L., Chen, C. C., and Lin, C. P. 2007. Detection and identification of the phytoplasma associated with pear decline in Taiwan. *Eur. J. Plant Pathol.* 117: 281-291.
 23. Musetti, R., Favali, M. A., and Pressacco, L. 2000. Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasma. *Cytobios* 102: 133-147.
 24. Oshima, K., Ishii, Y., Kakizawa, S., Sugawara, K., Neriya, Y., Himeno, M., Minato, N., Miura, C., Shiraishi, T., Yamaji, Y., and Namba, S. 2011. Dramatic transcriptional changes in an intracellular parasite enable host switching between plant and insect. *PLoS ONE* 6(8): e23242.
 25. Saqib, M., Bayliss, K. L., and Jones, M. G. K. 2006. Identification of sweet potato little leaf phytoplasma associated with *Vigna unguiculata* var. *sesquipedalis* and *Lycopersicon esculentum*. *Australasian Plant Pathology*, 35: 293-296.
 26. Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B. C., and Seemüller, E. 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J Gen. Microbiol.* 139: 519-527.
 27. Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D., and Kirkpatrick, B. C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas, pp. 369-380. *In: S. Razin and J. G. Tully [eds.], Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasmology, Volume 1, Academic Press, San Diego, CA, USA. 483pp.*
 28. Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., and Göschl, M. 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol.* 80: 3-26.
 29. Seemüller, E., Schneider, B., Mäurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K. H., Firrao, G., Avinent, L. Sears, B. B.,

- and Stackebrandt, E. 1994. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribo-somal DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 440-446.
30. Tran-Nguyen, L. T. T., Smith, S. H., and Liberato, J. R. 2012. Sweet potato little leaf strain V4 phytoplasma associated with snake bean in the Northern Territory, Australia. *Aust. Plant Dis. Notes* 7: 147-150.
31. Tseng, Y. W., Deng, W. L., Chang, C. J., Su, C. C., Chen, C. L., and Jan, F. J. 2012. First report of a 16SrII-A subgroup phytoplasma associated with purple coneflower (*Echinacea purpurea*) witches'-broom disease in Taiwan. *Plant Dis.* 96: 582.
32. Tseng, Y. W., Deng, W. L., Chang, C. J., Shih, H. T., Su, C. C., and Jan, F. J. 2016. The phytoplasma associated with purple woodnettle witches'-broom disease in Taiwan represents a new subgroup of the aster yellows phytoplasma group. *Ann. Appl. Biol.* 169: 298-310.
33. Wei, W., Lee, I. M., Davis, R. E., Suo, X., and Zhao, Y. 2008. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 2368-2377.
34. Win, N. K. K., and Jung, H. Y. 2012. Molecular analysis of 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia' associated with phytoplasma diseases in Myanmar. *J. Gen. Plant Pathol.* 78: 260-263.
35. Wei, W., Davis, R. E., Lee, I. M., and Zhao, Y. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1855-1867.
36. Weintraub, P. G., and Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 91-111.
37. Zhao, Y., and Davis, R. E. 2016. Criteria for phytoplasma 16Sr group/subgroup delineation and the need of a platform for proper registration of new groups and subgroups. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 2121-2123.
38. Zhao, Y., Wei, W., Lee, I. M., Shao, J., Suo, X., and Davis, R. E. 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, *iPhyClassifier*, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 2582-2593.

Identification and Characterization of Phyllody Phytoplasma Associated with *Vigna sesquipedalis* in Taiwan

Che-Ming Chang¹, Fuh-Jyh Jan², Chiou-Chu Su^{1*}

Abstract

Chang, C. M., Jan, F. J., and Su, C. C. 2018. Identification and characterization of phyllody phytoplasma associated with *Vigna sesquipedalis* in Taiwan. *Taiwan Pestic. Sci.* 4:53-67.

In July 2015, *Vigna sesquipedalis* (cowpea plants) with phytoplasma-like symptoms were found in Shuilin Township, Yunlin County in Taiwan. The systemic symptoms on these plants included phyllody, witches'-broom, the proliferation of small leaves, and leaf yellowing. Transmission electron microscopy, PCR detection, 16S rDNA sequence analysis, and virtual restriction fragment length polymorphism (RFLP) were used to identify the pathogen, which was determined to be phytoplasma. Micrographs revealed pleomorphic phytoplasma particles in the sieve tubes of symptom *V. sesquipedalis*. Nested PCR assays with P1/P7 and R16F2n/R16R2 universal phytoplasma primers further detected a 1.8 kb product and an 1.2 kb product. A phylogenetic tree using the maximum likelihood method and virtual RFLP analysis with an *iPhyClassifier* based on 16S rDNA both revealed that this cowpea phyllody phytoplasma belongs to 16SrII-A group.

Key words: *Vigna unguiculata*, phytoplasma, phyllody.

Accepted: June 22, 2018.

* Corresponding author, E-mail: auba@tactri.gov.tw

¹ Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung

² Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung