



# Formosan Entomologist

Journal Homepage: [entsocjournal.yabee.com.tw](http://entsocjournal.yabee.com.tw)

## Genetic Diversity of *Amblyseius longispinosus* and *A. womersleyi* (Acari: Phytoseiidae) Using RAPD Analysis 【Research report】

運用逢機擴增多形性核酸分析長毛捕植蟎 (*Amblyseius longispinosus*) 及溫氏捕植蟎 (*A. womersleyi*) (蟎蜱亞綱；捕植蟎科) 的遺傳變異【研究報告】

Wen-Bin Yeh\* Chai-Lien Ho Cho-Fat Hui Chyi-Chen Ho  
葉文斌\* 何佳霖 許祖法 何琦琛

\*通訊作者E-mail: [wbyeh@cc.kmu.edu.tw](mailto:wbyeh@cc.kmu.edu.tw)

Received: 2000/05/09 Accepted: 2000/07/14 Available online: 2000/12/01

### Abstract

Predatory mites of *Amblyseius longispinosus* and *A. womersleyi* are used to control spider mites. It has been considered that *A. womersleyi* is a synonym of *A. longispinosus* since their identification character (dorsal setae L8) with intermediate length has been found. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) was used to analysis the genetic diversity of these two morphologically similar mites. Genomic DNAs were extracted separately from egg, nymph, and adult either from *A. longispinosus* or *A. womersleyi*, respectively. The optimal reaction condition including the buffer and DNA template were determined. Sixty random primers were used to perform the amplification in a constant condition. The results of PCR amplification showed that the DNA template from egg, nymph, or adult of the same species gave a similar pattern. Whereas, the genetic similarity between *A. longispinosus* and *A. womersleyi* were very low either from rough (14.9%) or serious (8.3%) calculation. It implied that these was a great divergence between these 2 mites. Furthermore, the OPH-17 and OPH-18 primers were selected, very provided a clearly different pattern between *A. longispinosus* and *A. womersleyi*.

### 摘要

長毛捕植蟎 (*Amblyseius longispinosus*, AL) 及低溫捕植蟎 (*A. womersleyi*, AW) 被廣用於葉蟎之生物防治研究。由於學名曾被混用，且 AL 及 AW 的辨識徵是 L8 背毛，但有中間型，因此有學者認為 AL 與 A 同一物種。本報告運用 DNA 指紋-逢機擴增多形性核酸 (random amplified polymorphic DNA) 技術，探討長毛捕植蟎與溫氏捕植蟎遺傳物質的歧異度。包括長毛捕植蟎與溫氏捕植蟎的卵、若蟲及成蟲 6 種樣本。各項反應條件的測試結果顯示，模板 DNA 的純度、量及其保存液，對反應結果均會有影響。以 60 個逢機序列的引子分別進行 RAPD-PCR 反應，再從電泳圖譜分析兩種捕植蟎的遺傳歧異度的結果顯示，AL 或 AW 的卵、若蟲及成蟲複製的的電泳圖譜上的核酸條帶數，分別得到 8.3% 與 14.6% 之遺傳相似性，可見此兩種捕植蟎的遺傳物質已有很大的歧異。其中，引子 OPH-17 及 OPH-18 兩個引子所擴增的核酸條帶簡單，可以簡易用於鑑定 AL 與 AW。

**Key words:** predatory mite, RAPD, genetic diversity, Phytoseiidae.

**關鍵詞:** 捕植蟎、逢機擴增多形性核酸、遺傳變異

Full Text: [PDF \(0.24 MB\)](#)

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

# 運用逢機擴增多形性核酸分析長毛捕植蟎 (*Amblyseius longispinosus*) 及溫氏捕植蟎 (*A. womersleyi*) (蟎蜱亞綱；捕植蟎科) 的遺傳變異

葉文斌\* 高雄醫學大學生物系 高雄市 807 三民區十全一路 100 號  
何佳霖 中央研究院動物學研究所 台北市 115 南港區研究院路二段 128 號  
許祖法 中央研究院動物學研究所 台北市 115 南港區研究院路二段 128 號  
何琦琛 台灣農業試驗所應用動物系 台中縣 413 霧峰鄉中正路 189 號

## 摘 要

長毛捕植蟎 (*Amblyseius longispinosus*, AL) 及溫氏捕植蟎 (*A. womersleyi*, AW) 被廣用於葉蟎之生物防治研究。由於學名曾被混用，且 AL 及 AW 的辨識特徵是 L8 背毛，但有中間型，因此有學者認為 AL 與 AW 是同一物種。本報告運用 DNA 指紋—逢機擴增多形性核酸 (random amplified polymorphic DNA) 技術，探討長毛捕植蟎與溫氏捕植蟎遺傳物質的歧異度。包括長毛捕植蟎與溫氏捕植蟎的卵、若蟲及成蟲 6 種樣本。各項反應條件的測試結果顯示，模板 DNA 的純度、量及其保存液，對反應結果均會有影響。以 60 個逢機序列的引子分別進行 RAPD-PCR 反應，再從電泳圖譜分析兩種捕植蟎的遺傳歧異度的結果顯示，AL 或 AW 的卵、若蟲及成蟲複製的電泳圖譜彼此類似，表示實驗條件的選擇合適。為求客觀，以兩種不同標準計算電泳圖譜上的核酸條帶數，分別得到 8.3% 與 14.9% 之遺傳相似性，可見此兩種捕植蟎的遺傳物質已有很大的歧異。其中，引子 OPH-17 及 OPH-18 兩個引子所擴增的核酸條帶簡單，可以簡易用於鑑定 AL 與 AW。

關鍵詞：捕植蟎、逢機擴增多形性核酸、遺傳變異。

## 前 言

長毛捕植蟎 *Amblyseius longispinosus* (Evans) 及溫氏捕植蟎 *A. womersleyi*

(Schicha)，被廣用於葉蟎之生物防治，其外部形態特徵相似不易分辨，通常以 L8 背毛的短或長予以分辨 (Schicha, 1975)。然而，1982 年 Collyer 卻捉到具有中間型

\*論文聯繫人  
e-mail: wbyeh@cc.kmu.edu.tw

L8 背毛的個體，並推論 *A. longispinosus* 與 *A. womersleyi* 其實只是同種異名 (synonym)。在台灣，長 L8 背毛的個體 (*A. womersleyi*) 曾被釋放於草莓、茶樹及桑樹上以防治葉蟎 (Lo *et al.*, 1984; Chen, 1987; Shih, 1985)，不過此種個體當時卻被學者誤認為是 *A. longispinosus*，導致種名上的混淆，可見其外部形態不易鑑識。雖然，雜交試驗的結果顯示，此兩種捕植蟎有部份生殖隔離的現象，已具不同物種的生物特性 (Ho *et al.*, 1995)，然其遺傳物質的差異程度如何，則尚無學者探討過。

Williams 等人，以 PCR 為基礎，於 1990 年發表隨機擴增多形性核酸 (random amplified polymorphic DNA, 簡稱 RAPD) 分析技術。由於 RAPD 具有下列幾項優點 (1) 所需的模板 DNA (template) 量甚少，每次反應僅需幾 ng ( $1 \text{ ng} = 10^{-9} \text{ g}$ ) 至幾十個 ng 的 DNA 即可；(2) 不需放射性同位素之操作；(3) 操作簡單；(4) 可同時分析大量的樣品；(5) 不需事先取得相關的 DNA 序列資料即可分析。此後，便有很多學者將其運用在血緣相近種或種內族群間的親緣關係研究，被廣泛運用於各種動物及植物上，是一項非常有力的工具。一般的 PCR 方法，使用一對專一性引子 (primer)，其長度大都在 20 個鹼基 (base) 左右，針對基因組上某一特定 DNA 序列加以放大。而 RAPD-PCR 與一般 PCR 之不同處，在於它僅使用一條引子，長度約 10 個鹼基，以正向或反向黏合於 DNA 上任何與其序列吻合的相對位置，進行複製。由於引子長度較短，PCR 反應過程需注意黏合溫度不能太高，否則會導致無法黏合；而且 RAPD 對於反應的條件極為敏感，像模板 DNA 的濃度、引子的濃度、 $\text{Mg}^{+2}$  的濃度、

聚合酶 (polymerase) 的廠牌、PCR 機器的廠牌、反應時間及反應溫度等等，這些條件的改變，對於放大產物均有可能產生影響 (Schierwater and Ender, 1993)。因此在本文的實驗中，上述條件均控制在穩定條件下進行反應。

形態特徵顯示，長毛捕植蟎與溫氏捕植蟎在外觀上唯一的差異，僅有一根背毛長短的不同，然此種變異僅能用於成蟎的鑑定，對於若蟎則無法有效區辨，更不用說卵的辨別。本研究之目的，即希望能藉由 RAPD 的方法，分析此兩種捕植蟎遺傳物質的差異程度，提供另類證據來探討這兩種捕植蟎種化的程度，並提供 RAPD 方法中各反應物的適當條件。

## 材料與方法

### 標本來源

長毛捕植蟎及溫氏捕植蟎的卵、若蟎及成蟎等六種樣本，源自農業試驗所何琦琛博士，每一種樣本約一百隻左右，置於 100% 酒精，保存於  $-20^{\circ}\text{C}$  冷凍櫃中。

### DNA 備製

DNA 的製備過程均使用 1.5 ml 微量離心管，在冰上操作。先把標本離心下來，並小心倒去上層的酒精，在離心管內加入 500  $\mu\text{l}$  之萃取液，內含 SDS (1%)、DTT (10 mg/ml)、proteinase K (0.5 mg/ml)、Tris-Cl (10 mM, pH = 8) 及 EDTA (2 mM)，將標本吸入均質器 (homogenizer) 內，把標本完全磨碎，直到看不見殘骸為止；將萃取液吸回離心管，放入  $50^{\circ}\text{C}$  反應 8 個小時；以 12000  $\times\text{g}$  離心 20 分鐘，抽取上層之水溶液，置入另一新的離心管中；加入等體

積之酚 (phenol), 顛倒搖晃混合三分鐘後, 以 12000  $\times g$  離心 10 分鐘; 抽取上層之水溶液, 注入另一新的離心管中, 再依照以上步驟, 以等體積適當比例之酚-氯仿-異丙醇 (phenol: chloroform: isoamylalcohol = 25: 24: 1) 及氯仿-異丙醇 (chloroform: isoamylalcohol = 24: 1) 先後各處理兩次; 抽取上層液後, 加入 1/10 倍體積之 NaOAc (3 M, pH = 5.2) 及 2.5 倍體積之純酒精 (-20°C), 以手輕輕搖晃混合, 置入 -20°C 冰箱冰存過夜; 取出後, 在 4°C 下以 15000  $\times g$ , 離心 30 分鐘, 將水溶液倒除, 留下沈澱物於離心管中; 加入 70% 酒精, 以手指輕拍管壁, 讓沈澱物脫離管壁, 在 4°C 下以 15000  $\times g$ , 離心 10 分鐘; 將酒精倒除, 留下沈澱物於離心管中, 再以真空離心抽氣機 (speed vacuum) 乾燥殘餘的酒精, 所得到的即為捕植蟻 DNA。將 DNA 溶入 20  $\mu l$  之 TE (Tris-Cl, 10 mM, pH = 8.0; EDTA, 1 mM) 溶液中, 混合均勻, 冰存於 -20°C 備用。

#### DNA 定量

取 5  $\mu l$  之 DNA 溶液, 加入 495  $\mu l$  之 TE 溶液, 再用光譜儀 (HITACHI U-2000) 以 260 nm 波長測量其 OD 值 (optical density)。計算出 DNA 的總量後, 以無菌水或 TE 保存液將剩餘 15  $\mu l$  之 DNA 溶液稀釋成 1 ng/ $\mu l$ , 冰存於 -20°C 備用。

#### RAPD 聚合酶連鎖反應

聚合酶連鎖反應之條件, 以 PCR 製劑所提供的反應條件為主, 並參考其它報告 (Gawel and Bartlett, 1993; Wilkerson *et al.*, 1993), 經過多次的實際操作及測試,

逐次修改而成。反應所有的步驟都在 0.5 ml 的微量離心管及冰上操作完成。每管的反應溶液總體積為 25  $\mu l$ , 其中包括有 50 mM Tris-Cl (pH = 9.0)、50 mM KCl、7 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mg/ml BSA、16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 及 0.1 mM dNTPs (內含相同濃度的 dATP、dGTP、dTTP 及 dCTP); 並加入 15 pmole 增幅所需的一段引子、10 ng 的模板 DNA、0.75 U SuperTaq 聚合酶 (HT Biotechnology LTD) 及 11.15  $\mu l$  的無菌水; 最後以 20  $\mu l$  的礦物油覆蓋於溶液表面。將離心管置於溫度循環控制儀 (Perkin-Elmer 480 thermocycler), 進行下列反應: 94°C 變性 1 分鐘, 以 35°C 黏合 1 分鐘, 以 72°C 延伸 2 分鐘, 重覆此三步驟 44 個循環, 最後降至 4°C 保存。取出置於 -20°C 冰箱保存。

#### 洋菜膠片電泳

PCR 產物在 1.4% 的洋菜膠片, 以 100 伏特電壓, 進行約 1.5 小時的電泳。之後, 將洋菜膠片置於 0.5  $\mu g/ml$  之溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) 溶液中染色一小時。最後將洋菜膠片置於紫外燈下拍照, 並與  $\emptyset \times 174$ -RF DNA/*Hae* marker 比較, 以判斷 DNA 條帶的長度及量度。

#### 結 果

本研究使用的模板 DNA 分別萃取自長毛捕植蟻及溫氏捕植蟻之卵、若蟲及成蟲, 以 ALE、ALN、ALA、AWE、AWN 及 AWA 簡稱之。

一、模板 DNA 的純度、量及其保存液等各項反應條件的測試結果

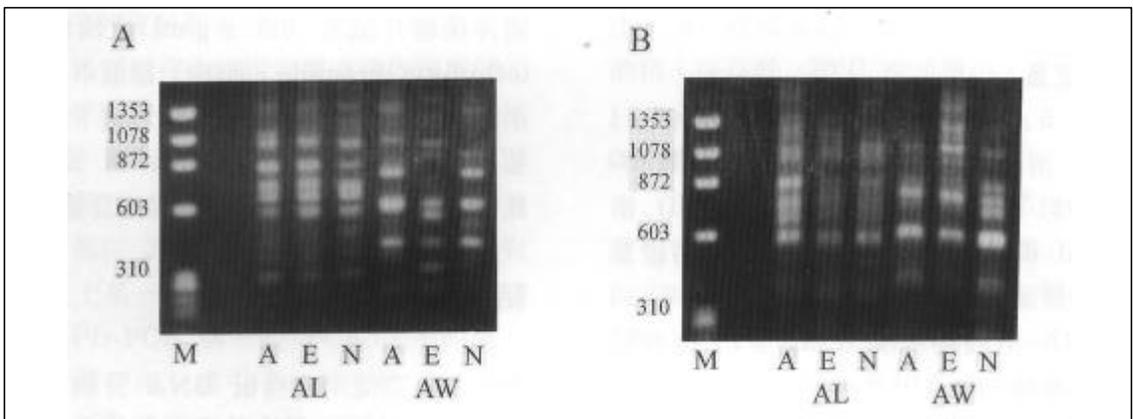
由於 RAPD 的敏感特性 (Maria *et al.*, 1994), 做了以下測試, 期讓 PCR 反應能得到最佳結果。

### 1. 模板 DNA 的純度對反應的影響

因為萃取時間不同, 其中 AWE 經光譜儀測試後, 顯示其純度稍低於其他五個樣品, 經 PCR 反應後的電泳圖, 也與理論上應相同的 AWN 及 AWA 的電泳圖有極大差異 (圖一 A), 於是以前酚-氯仿-異丙醇及氯仿-異丙醇分別再處理一次, 除去可能影響反應的雜質。處理過的 AWE 模板 DNA 在往後的反應中有顯著改進, 其擴增之 DNA 條帶與 AWN 及 AWA 相同 (圖一 B), 但是在高分子量處有幾個 DNA 條帶, 偶爾亮度會較 AWN 及 AWA 為高, 甚至出現 AWN 及 AWA 沒有的 DNA 條帶, 此一結果顯示出模板 DNA 的純度或抽取過程的誤差對反應結果的影響。

### 2. DNA 量及其保存於 TE 溶液或水對反應的影響

將 DNA 分別以水或 TE 溶液稀釋 (1 ng/ $\mu$ l), 各取 1、5 或 10  $\mu$ l 的模板 DNA 於反應中, 用 OPH-07 引子進行 PCR 反應。將反應的結果簡列於表一。電泳圖 (圖二) 的結果顯示, 以無菌水為溶劑的條件下, 無論是 1、5 或 10  $\mu$ l 的模板 DNA, 其擴增的 DNA 條帶均與對照組類似, 呈現出相當清楚的 DNA 條帶; 而低劑量 TE (1  $\mu$ l) 的擴增結果亦與對照組類似 (1  $\mu$ l 的反應結果未圖示), 但是中劑量 TE (5  $\mu$ l) 的反應結果則呈現出較為模糊的 DNA 條帶 (圖二 A), 至於高劑量 TE (10  $\mu$ l) 反應產生的 DNA 條帶則幾乎完全消失 (圖二 B)。從結果看來, 無菌水對反應沒有影響, 而 TE 溶液則隨著相對濃度的升高, 影響反應, 造成擴增 DNA 條帶的模糊。TE 溶液在低劑量中的相對濃度較低 (1/25 = 4%) 時, 對反應不會產生影響; 隨著相對濃度的增加, 在高劑量中, TE 的相對濃度提高 10 倍 (10/25 = 40%), 影響反應結果至巨。上



圖一 以引子 OPG-17 擴增之結果。(A) AWE 的 DNA 條帶相對位置與 AWA、AWN 有多處不同; (B) DNA 再萃取後, AWA、AWE 及 AWN 之間則彼此類似。對照組 ALA、ALE 及 ALN 的 DNA 圖譜一致; M 為參考 DNA ( $\emptyset$ X174-RF/Hae )。

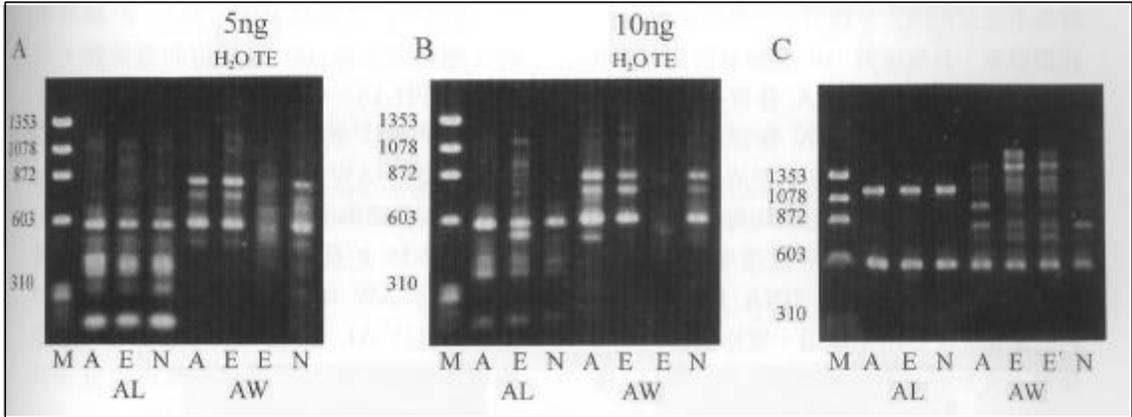
Fig. 1. Amplified results with OPG-17 primer. (A) Some nucleotide bands from AWE located at unrelative position to that of AWA and AWE; (B) After DNA re-extraction, amplified results were similar among AWA, AWE and AWN. Note the amplified results from ALA, ALE, and ALN showed a uniform pattern as positive control. Lane M is DNA marker ( $\emptyset$ X174-RF/Hae ).

表一 模板 DNA 的量及保存於 TE 溶液或水對反應的影響

Table 1. The effect of template DNA in TE buffer or H<sub>2</sub>O on amplification reaction

	H <sub>2</sub> O	TE	
1 <sup>a</sup>	nucleotide band clear	nucleotide band clear	
5	nucleotide band clear	nucleotide band ambiguous	Fig. 2A
10	nucleotide band clear	nucleotide band less	Fig. 2B

<sup>a</sup> 1、5 or 10 μl (1 ng/μl) of DNA template in each reaction



圖二 DNA 模板量及其保存於 TE 溶液或水對反應的影響 — 引子 OPH-07 的反應結果。(A) 及 (B)：實驗組 AWE 的模板量 (5ng 或 10ng) 及其保存液 (TE 或 H<sub>2</sub>O) 分別標示於圖上；對照組 ALA、ALE、ALN、AWA 及 AWN 的 DNA 模板溶於水中，均為 10 ng。(C)：DNA 模板量為 30ng，AWE' 為不同時間萃取的 DNA 模板。在高模板量 (30ng) 時，比起圖 A 及 B，多了一些較大條帶，有些較小的條帶則消失。

Fig. 2. Amplified results from primer OPH-07 that were influenced by template amount and its stored solution. (A) & (B): DNA template amount and its stored solution were shown on figure. DNA template of 10ng was used in control reactions of ALA, ALE, ALN, AWA, and AWN. (C) 30ng of DNA template was used shown a different amplified result. Template of AWE' was from alternative extraction. Some large size bands were more in high template condition, whereas a few small size bands were disappeared.

述結果顯示保存液內的鹽類濃度對 RAPD 的反應結果影響很大。因此將以無菌水稀釋 DNA，作為 RAPD 反應用的模板 DNA。

### 3. 模板 DNA 的量對反應的影響

使用 OPH-07、OPH-17 及 OPG-19 引子，作模板 DNA 量的測試，比較在相同的條件下，不同量的模板 DNA 是否會造成不同的結果。每個引子分別測試 10 ng 及 30 ng 兩種 DNA 量，進行 PCR 反應。OPH-07 的反應結果顯示，有些低分子量的條帶僅在低濃度 (10 ng) 時才出現

(圖二 A 及 B)，有些高分子量的條帶則只有在高濃度 (30 ng) 時才出現 (圖二 C)，亦有在兩者均出現者，但產量卻不相同。顯示模板 DNA 的量是影響反應的重要因素之一。OPH-17 及 OPG-19 兩個引子的反應得到類似的結果。由於 DNA 條帶在低模板 DNA 量 (10 ng) 時，比 30 ng 清楚，因此以下的反應均使用 10 ng 的 DNA 當模板。

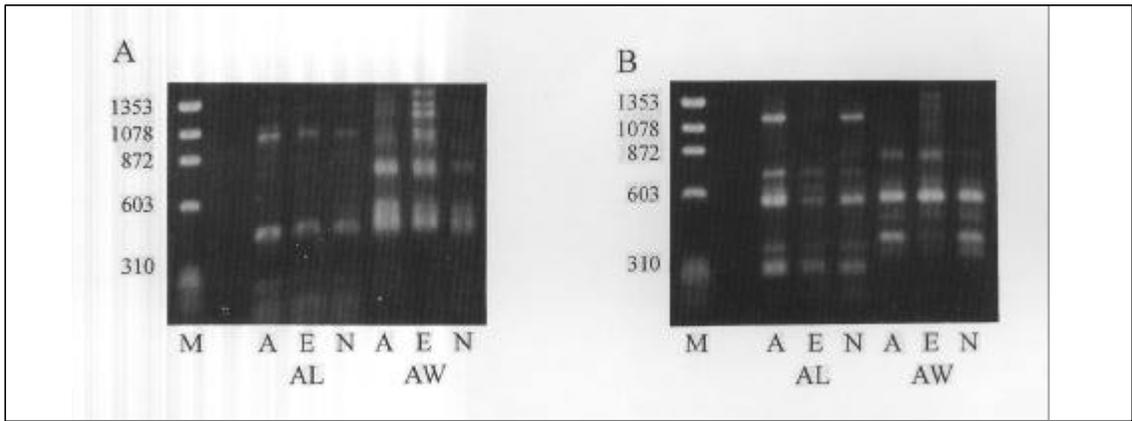
## 二、擴槽之 DNA 條帶的變異分析

本研究使用 OPERON 試劑 F、G 及 H 三組 10 mer 的引子 (表二), 分別對 ALA、ALN、ALE、AWA、AWN 及 AWE 六種樣本進行分析。PCR 產物經電泳解析後的結果, 顯示出 RAPD 的敏感特性: 電泳圖的 DNA 條帶大小非常複雜、DNA 條帶亮度變異大、各樣本之間的相似度高但有時並不完全相同。多數引子所擴增的產物片段都很多, 長度從數 10 個鹼基對到 1000 多個鹼基對; 有些 DNA 條帶亮度很高、獨立且清晰, 有些 DNA 條帶則因為長度相當接近, 亮度也差不多, 形成帶狀分佈, 極不易區分, 造成判斷上的困難。因此, 電泳圖如果出現模糊難辨或清晰度不足的 DNA 條帶, 就不列入 DNA 條帶相似與否的運算。反應結果顯示, 電泳圖的 DNA 條帶, 大致可分為三種類型: (1) DNA 條

帶複雜, 數目很多, 除了各自獨立外, AL 與 AW 具共有的 DNA 條帶 (即相對位置的 DNA 條帶在 AL 及 AW 均出現) (圖三); (2) DNA 條帶複雜, 數目很多, 均獨立於 AL 及 AW, 並無共有的 DNA 條帶 (圖四); (3) 電泳圖簡單, DNA 條帶很少, AL 與 AW 無共有的 DNA 條帶 (圖五)。在 60 個引子的反應結果中, 僅有 3 條引子的反應可產生第 (3) 種類型的電泳圖, 分別是 OPH-16、OPH-17 及 OPH-18; 於引子 OPH-17 的反應中, 780bp 左右的條帶僅出現於 AW 中, 而 920bp 及 280bp 左右的兩條帶則僅出現於 AL (圖五 A); 引子 OPH-18 的反應中, 380bp 左右的條帶僅出現於 AW 中, 而 280bp 左右的條帶則僅出現於 AL (圖五 B)。由於第三種類型的電泳圖圖形簡單, 具容易區辨的分子特

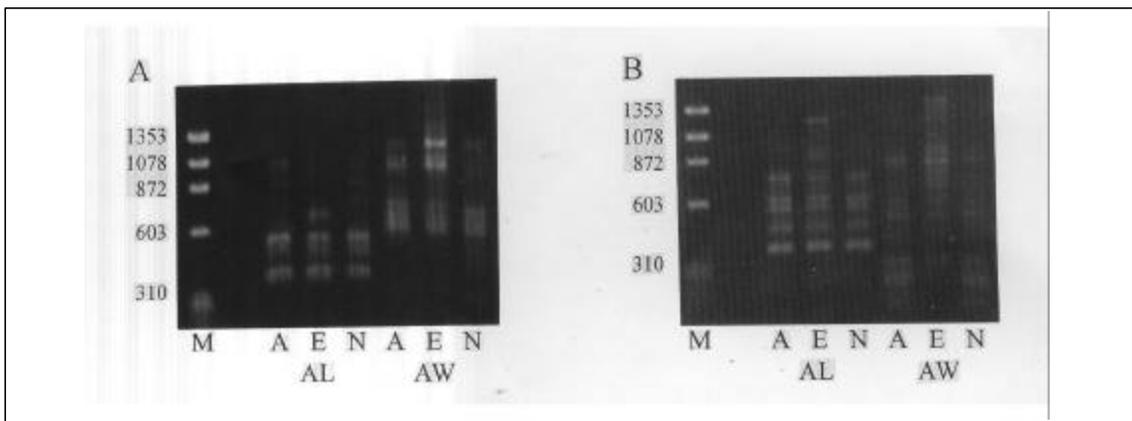
表二 實驗所用的 60 條 10 個鹼基的引子, 自 5' 撇端到 3' 撇端  
Table 2. Sixty primers from 5' end to 3' end with 10mer used in this study

OPERON-G kit		OPERON-H kit		OPERON-F kit	
OPG-01	CTACGGAGGA	OPH-01	GGTCGGAGAA	OPF-01	ACGGATCCTG
OPG-02	GGCACTGAGG	OPH-02	TCGGACGTGA	OPF-02	GAGGATCCCT
OPG-03	GAGCCCTCCA	OPH-03	AGACGTCCAC	OPF-03	CCTGATCACC
OPG-04	AGCGTGTCTG	OPH-04	GGAAGTCGCC	OPF-04	GGTGATCAGG
OPG-05	CTGAGACGGA	OPH-05	AGTCGTCCCC	OPF-05	CCGAATTCCC
OPG-06	GTGCCTAACC	OPH-06	ACGCATCGCA	OPF-06	GGGAATTCGG
OPG-07	GAACCTGCGG	OPH-07	CTGCATCGTG	OPF-07	CCGATATCCC
OPG-08	TCACGTCCAG	OPH-08	GAAACACCCC	OPF-08	GGGATATCGG
OPG-09	CTGACGTAC	OPH-09	TGTAGCTGGG	OPF-09	CCAAGCTTCC
OPG-10	AGGGCCGTCT	OPH-10	CCTACGTACG	OPF-10	GGAGCCTTGG
OPG-11	TGCCCGTCGT	OPH-11	CTTCCGCAGT	OPF-11	TTGGTACCCC
OPG-12	CAGCTCACGA	OPH-12	ACGCGCATGT	OPF-12	ACGGTACCAG
OPG-13	CTCTCCGCCA	OPH-13	GACGCCACAC	OPF-13	GGCTGCAGAA
OPG-14	GGATGAGACC	OPH-14	ACCAGGTTGG	OPF-14	TGCTGCAGGT
OPG-15	ACTGGGACTC	OPH-15	AATGGCGCAG	OPF-15	CCAGTACTCC
OPG-16	AGCGTCCTCC	OPH-16	TCTCAGCTGG	OPF-16	GGAGTACTGG
OPG-17	AGGACCGACA	OPH-17	CACTCTCCTC	OPF-17	AACCCGGGAA
OPG-18	GGCTCATGTG	OPH-18	GAATCGGCCA	OPF-18	TTCCCGGGTT
OPG-19	GTCAGGGCAA	OPH-19	CTGACCAGCC	OPF-19	CCTCTAGACC
OPG-20	TCTCCCTCAG	OPH-20	GGGAGACATC	OPF-20	GGTCTAGAGG



圖三 引子 OPG-01 (A) 及 OPG-19 (B) 的複製結果。複製的 DNA 條帶多，除了各自獨有的條帶外，尚有一些共有的條帶。

Fig. 3. Amplified results of primers OPG-01 (A) and OPG-19 (B). Both panels shown that there were many synapomorphic bands between AL and AW except the autapomorphic bands in AL or AW.



圖四 A 及 B 分別為引子 OPG-02 及 OPH-04 的複製結果。複製的 DNA 條帶多，AL 及 AW 間無共有的條帶。

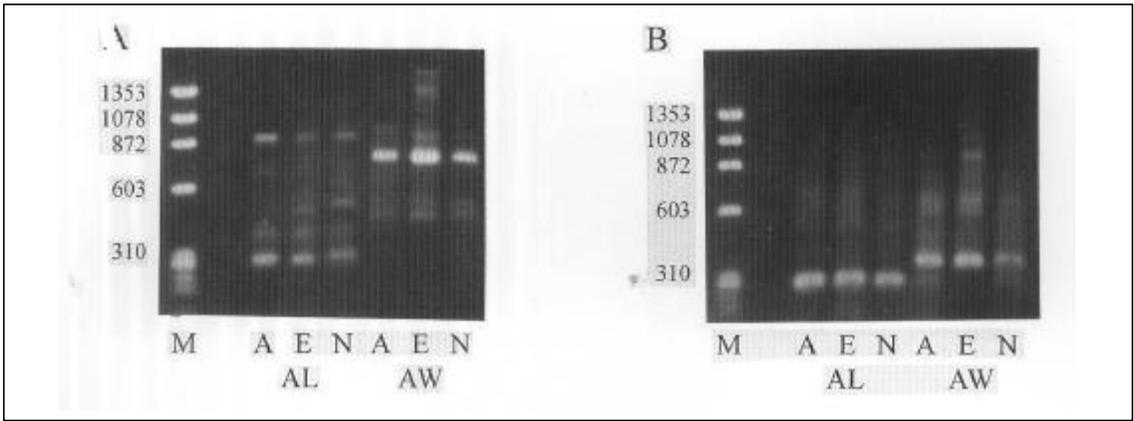
Fig. 4. Amplified results of primers OPG-02 (A) and OPH-04 (B). There was no synapomorphic band in the amplified result.

徵，因此這 3 條引子所擴增的 DNA 條帶，是區分 AL 與 AW 最合適的遺傳標幟。

## 討 論

模板 DNA 的純度、量及其保存液等各項反應條件的測試結果

RAPD 的實驗結果顯示 DNA 模板的純度或抽取過程的誤差對反應結果的影響(圖一)；因此，對於不同操作者或不同時間萃取的 DNA 模板必須先行測試，其間是否有一致性，再進行大量的比對實驗。結果亦顯示，保存液內的鹽類濃度對 RAPD 的反應結果影響很大(圖二 A 及 B)，因此所進行的各個反應過程中，模板 DNA 的保



圖五 A 及 B 分別為引子 OPH-17 及 OPH-18 簡單易辨的複製結果。

Fig. 5. Amplified results of primers OPH-17 (A) and OPH-18 (B). Both panels shown simple and distinguished pattern.

存液應當要一致，以降低對 RAPD 反應誤差的影響。

#### 長毛捕植蟎或溫氏捕植蟎內的遺傳變異

電泳圖顯示，無論是長毛捕植蟎或溫氏捕植蟎，擴增之 DNA 條帶除了亮度上的微量差異外，其成蟲、若蟲及卵所得到的電泳圖譜基本上完全相同。可見，樣本的來源無論是卵、若蟲或成蟲，均可予以測試比對。此種結果在應用時方便許多，因為捕植蟎的體形極為微小，分辨成蟲或若蟲須耗費相當的時間。今從結果得知道，將其混合分析，應不會影響長毛捕植蟎及溫氏捕植蟎之間的比較。此亦顯示出分子特徵的便利特性，無論是蟎、若蟲或卵均具變態的生物特性，以往運用形態特徵判定物種時，須比較相對時期的形態特徵，建立不同的分類體系。而分子特徵則無此困擾，因為無論是若蟲或卵的遺傳物質均與成蟲極為類似，可應用於物種的判定，不會因成蟲取得不易而難於比對。

#### 長毛捕植蟎及溫氏捕植蟎間的遺傳變異

為了得知長毛捕植蟎及溫氏捕植蟎的遺

傳物質差異大小，必須計算其在電泳圖上的 DNA 條帶數。由於 DNA 條帶複雜，以致於在計算上有許多 DNA 條帶難以取捨，為了不造成人為上主觀判斷的誤差，採用兩種不同的取捨標準。較嚴謹的標準；DNA 條帶在成蟎、若蟎及卵等三組均有出現且清晰，以及亮度雷同者，才列入計算。另較簡單的標準；DNA 條帶在成蟎、若蟎及卵等三組均有出現，只要 DNA 條帶能區分得開，雖亮度略有差別，亦列入計算（例：圖三 B 中 ALE 的條帶比 ALA 及 ALN 暗）。此外，模糊聯結的 DNA 條帶 (smeared bands) 均不列入計算（例：圖二 A 中之 ALA、ALE 及 ALN 之 400bp 的位置）。

遺傳相似性的計算方式，乃參考 Nei & Li 所提出的遺傳相似系數 (genetic similarity coefficient) (Nei and Li, 1979)，即  $2N_{xy} / (N_x + N_y)$ ， $N_{xy}$  為 AL 與 AW 共有的 DNA 條帶數， $N_x$  及  $N_y$  分別為 AL 與 AW 各自的總 DNA 條帶數。於 60 個引子的反應結果中，以嚴謹的計算方式，AL 組共擴增 95 個 DNA 條帶，

AW 組為 171 條，其中有 11 條在兩組的圖譜內均有出現，共 255 條 DNA 條帶，即 84 條僅出現於 AL 組，160 條僅出現於 AW 組，遺傳相似性為 8.3%。以簡單的計算方式，AL 組共擴增 210 個 DNA 條帶，AW 組 192 條，其中有 30 條在兩組均出現，共 372 條 DNA 條帶，即 180 條僅出現於 AL 組，162 條僅出現於 AW 組，遺傳相似性為 14.9%。

根據 RAPD-PCR 的方法分析兩不同種蚊子 *Anopheles gambiae* 與 *A. arabiensis* (Wilkerson *et al.*, 1993) 顯示，其遺傳相似性為 35.7%，遠高於本研究 8.3% 或 14.9% 的結果。同樣以 RAPD-PCR 的方法討論菸草粉蝨及草莓粉蝨所得到的結果，兩不同種之間的遺傳相似性為 16.5% (Gawel and Bartlett, 1993)，仍高於本研究的 8.3% 或 14.9%。這樣的結果顯示，AL 與 AW 在遺傳組成上有極大的差異，已遠超過近緣種間的歧異，並不如其在外觀上的相似。

## 誌 謝

感謝農業試驗所陳文華博士提供材料及相關資料提供。

## 引用文獻

- Chen, H. T.** 1987. Tea mite biological control in fields. Taiwan Tea Res. Bull. 7: 15-25 (in Chinese).
- Collyer, E.** 1982. The Phytoseiidae of New Zealand (Acarina). I. The genera *Typhodromus* and *Amblyseius* – keys and new species. N. Z. J. Zool. 9: 185-206.
- Gawel, N. J., and A. C. Bartlett.** 1993. Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. Insect Mol. Biol. 2: 33-38.
- Ho, C. C., Kang-Chen Lo, and Wen-Hua Chen.** 1995. Comparative biology, reproductive compatibility, and geographical distribution of *Amblyseius longispinosus* and *Amblyseius womersleyi* (Acari: Phytoseiidae). Envir. Entomol. 24: 601-607.
- Lo, K. C., H. K. Tseng, and C. C. Ho.** 1984. Biological control of spider mites on strawberry in Taiwan (I). J. Agric. Res. China 33: 406-417 (in Chinese).
- Maria, R. M., R. Bova, E. Pascale, and E. D'Ambrosio.** 1994. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. Nuclei Acids Res. 22: 1921-1922.
- Nei, M., and Li, W.-H.** 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5269-5273.
- Osakabe, M., and Y. Sakagami.** 1994. RFLP analysis of ribosomal DNA in sibling species of spider mite, genus *Panonychus* (Acari:Tetranychidae). Insect Mol. Biol. 3: 63-66.
- Schicha, E.** 1975. A new predacious species of *Amblyseius* Berlese from strawberry in Australia, and *A. longispinosus* (Evans) redescribed

(Acari: Phytoseiidae). J. Aust. Entomol. Soc. 14: 101- 106.

**Schierwater, B., and A. Ender.** 1993. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. Nuclei Acids Res. 21: 4647-4648.

**Shih, C. T.** 1985. Biological control of mulberry spider mite, *Tetranychus kanzawai* with augmentation of *Amblyseius womersleyi*. Taiwan Agric. Res. Inst. Spec.Pub. 19: 21-27.

**Wilkerson, R. C., T. J. Parsons, D. G. Albright, T. A. Klein, and M. J. Braun.**

1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*). Insect Mol. Biol. 1: 205-211.

**Williams, J. G. K., A. R. Kubelic, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S.V. Tingey.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nuclei Acids Res. 18: 6531-6535.

收件日期 : 2000 年 5 月 9 日

接受日期 : 2000 年 7 月 14 日

# Genetic Diversity of *Amblyseius longispinosus* and *A. womersleyi* (Acari: Phytoseiidae) Using RAPD Analysis

Wen-Bin Yeh\* Department of Biology, Kaohsiung Medical University, 100 Shih-Chuan 1<sup>st</sup> Rd. Kaoshiung, Taiwan 807, ROC.

Chai-Lien Ho Institute of Zoology, Academia Sinica, Taipei, Taiwan 115, ROC.

Cho-Fat Hui Institute of Zoology, Academia Sinica, Taipei, Taiwan 115, ROC.

Chyi-Chen Ho Department of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan 413, ROC.

## ABSTRACT

Predatory mites of *Amblyseius longispinosus* and *A. womersleyi* are used to control spider mites. It has been considered that *A. womersleyi* is a synonym of *A. longispinosus* since their identification character (dorsal setae L8) with intermediate length has been found. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) was used to analysis the genetic diversity of these two morphologically similar mites. Genomic DNAs were extracted separately from egg, nymph, and adult either from *A. longispinosus* or *A. womersleyi*, respectively. The optimal reaction condition including the buffer and DNA template were determined. Sixty random primers were used to perform the amplification in a constant condition. The results of PCR amplification showed that the DNA template from egg, nymph, or adult of the same species gave a similar pattern. Whereas, the genetic similarity between *A. longispinosus* and *A. womersleyi* were very low either from rough (14.9%) or serious (8.3%) calculation. It implied that there was a great divergence between these 2 mites. Furthermore, the OPH-17 and OPH-18 primers were selected, they provided a clearly different pattern between *A. longispinosus* and *A. womersleyi*.

Key words: predatory mite, RAPD, genetic diversity, Phytoseiidae.