



# Formosan Entomologist

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

## Identification of Three *Aulacaspis* Species (Homoptera: Diaspididae) by PCR-RFLP Analysis for Quarantine Application 【Research report】

### 利用PCR-RFLP技術鑑定三種白輪盾介殼蟲 (*Aulacaspis* spp.) (同翅目：盾蚧科) 及其在檢疫上之應用【研究報告】

Yi-Chung Chiu, Wen-Jer Wu and Cheng-Jen Shih  
邱一中、吳文哲、石正人\*

\*通訊作者E-mail: [shihcj@ccms.ntu.edu.tw](mailto:shihcj@ccms.ntu.edu.tw)

Received: 2001/09/21 Accepted: 2001/11/14 Available online: 2001/12/01

#### Abstract

Most scale insects are small and similar in appearance. It is difficult to identify these species especially in their immature stages, and this causes problems for quarantine officers. This study attempted to develop a molecular diagnostic technique using genomic DNA markers for identifying three species of the genus *Aulacaspis*, *A. murrayae*, *A. yabunikkei*, and *A. yasumatsui*. Amur 18S-3 and ITS6 primer sets were used to amplify ITS1 and its flanking regions of rDNA from genomic DNA as a template extracted from a single specimen. DNA extracted from these three species yielded a single fragment after PCR amplification. The DNA fragment sizes of the PCR products were about 450 bp (for *A. yabunikkei*) and 500 bp (for *A. murrayae* and *A. yasumatsui*). These PCR products were then cut with various restriction endonucleases in order to compare the results of the restriction fragment length polymorphism (RFLP). Our results also reveal that it is possible to discriminate these three *Aulacaspis* species based on the species-specific patterns acquired from digesting the PCR products with the endonucleases, *TaqI*, *MspI*, *CfoI*, and *HaeIII*.

#### 摘要

介殼蟲蟲體微小且外形相似，幼體時期特徵不明顯，在鑑定上不易確定，造成在檢疫工作上困難重重。本研究主要利用基因組核酸標誌 (genomic DNA markers) 建立分子診斷技術，以鑑別三種白輪盾介殼蟲 (*Aulacaspis* spp.) 之介殼蟲，分別為蘇鐵白輪盾蚧 (*A. yasumatsui* Takagi)、月橘白輪盾蚧 (*A. murrayae* Takahashi) 和樟白輪盾蚧 (*A. yabunikkei* Kuwana)。利用聚合酶連鎖反應 - 限制酶片段長度多態型 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 技術，探討核糖體形成基因 (ribosomal DNA, rDNA)，作為鑑別三種介殼蟲的可行性。我們使用單隻標本分別萃取 DNA 後，利用 PCR 引子對 (Amur18S-3 和 ITS6) 增幅 rDNA 之部分的 18S、ITS1 及部分的 5.8S 區域，蘇鐵白輪盾蚧和月橘白輪盾蚧均產生約 500 bp 的 DNA 片段；樟白輪盾蚧則產生約 450 bp 的 DNA 片段。利用多種核酸內切酶進行 DNA 片段切割，結果以 *TaqI*、*MspI*、*CfoI* 和 *HaeIII* 核酸內切酶，所得圖譜的種類特異性較高，可容易地區別三種白輪盾蚧。

**Key words:** *Aulacaspis*, rapid diagnostic techniques, polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP), internal transcribed spacer I (ITS1).

**關鍵詞:** 白輪盾蚧、快速鑑定、聚合酶連鎖反應(PCR)、限制性片段長度多態型(RELP)、轉錄區內空白段1(ITS1)

Full Text: [PDF \(1.62 MB\)](#)

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

# 利用 PCR-RFLP 技術鑑定三種白輪盾介殼蟲 (*Aulacaspis* spp.) (同翅目：盾蚧科) 及其在檢疫上之應用

邱一中 吳文哲 石正人\* 國立台灣大學昆蟲學系 台北市大安區羅斯福路四段一號

## 摘 要

介殼蟲蟲體微小且外形相似，幼體時期特徵不明顯，在鑑定上不易確定，造成在檢疫工作上困難重重。本研究主要利用基因組核酸標誌 (genomic DNA markers) 建立分子診斷技術，以鑑別三種白輪盾蚧屬 (*Aulacaspis* spp.) 之介殼蟲，分別為蘇鐵白輪盾蚧 (*A. yasumatsui* Takagi)、月橘白輪盾蚧 (*A. murrayae* Takahashi) 和樟白輪盾蚧 (*A. yabunikkei* Kuwana)。利用聚合酶連鎖反應 - 限制酶片段長度多態型 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 技術，探討核糖體形成基因 (ribosomal DNA, rDNA)，作為鑑別三種介殼蟲的可行性。我們使用單隻標本分別萃取 DNA 後，利用 PCR 引子對 (Amur18S-3 和 ITS6) 增幅 rDNA 之部分的 18S、ITS1 及部分的 5.8S 區域，蘇鐵白輪盾蚧和月橘白輪盾蚧均產生約 500 bp 的 DNA 片段；樟白輪盾蚧則產生約 450 bp 的 DNA 片段。利用多種核酸內切酶進行 DNA 片段切割，結果以 *TaqI*、*MspI*、*CfoI* 和 *HaeIII* 核酸內切酶，所得圖譜的種類特異性較高，可容易地區別三種白輪盾蚧。

關鍵詞：白輪盾蚧、快速鑑定、聚合酶連鎖反應 (PCR)、限制性片段長度多態型 (RELP)、轉錄區內空白段 1 (ITS1)。

## 前 言

白輪盾蚧屬 (*Aulacaspis* spp.) 昆蟲，由於身體細小，繁殖力強，且常隨苗木、種子、果實、塊莖和塊根等，侵入新地區而造成嚴重的蟲害問題，是農業上重要的經濟害蟲，且被列為國際重要的檢疫害蟲 (Burger and

Ulenberg, 1990; Wu, 1994)。根據最新調查資料顯示，目前在蘇鐵上嚴重危害的白輪盾蚧，疑似為新侵入台灣的種類，將來若擴散或轉移至其它寄主植物，將可能對農作物造成更嚴重損害。

白輪盾蚧屬的介殼蟲外形極為近似，即使是熟練的分類學者鑑定這些種類也很困難。目

\*論文聯繫人  
e-mail: shihcj@ccms.ntu.edu.tw

前，主要以雌成蟲的形態特徵為鑑定的依據，至於若蟲和雄成蟲則限於形態不穩定或特徵不明顯，鑑定極為不易，在檢疫上面臨極大的難題 (Wu, 1986, 1994)。為了解決鑑定的瓶頸，發展簡單、快速且準確的診斷鑑定技術，能夠在單一或少量的標本基礎下，使用較少變異的特徵來完成，對將來介殼蟲的檢疫工作相當重要。

近年來，由於分子生物學發展快速，利用生物技術建立害蟲快速鑑定方法，已有長足進步。在台灣，利用這類技術進行昆蟲鑑定也有很好的研究成果 (Chang, 1998; Chiu *et al.*, 2000a, 2000b; Chou, 2000; Lin, 2000; Chang, 2001; Deng, 2001; Liu, 2001)。在發展的鑑定技術中，主要以 RFLP 技術作為分析的依據 (Caterino *et al.*, 2000)。RFLP 在快速鑑定上的應用常配合 PCR 技術，增幅細胞核中的核糖體形成基因 (ribosomal DNA, rDNA) 或粒線體 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)，進而進行核酸內切酶切割，選用適當的核酸內切酶，可以用來區別屬、種的分類層級，或種以下的分類階元 (Loxdale and Lushai, 1998)。rDNA 或 mtDNA 在同種昆蟲中穩定性高，而不同種昆蟲間的變異性大，且在昆蟲體內複製單位多，並且已有多種通用的增幅引子 (universal primers) 可利用，可以很容易的增幅出大量需要之目標 DNA，適合拿來作為鑑定分析之用 (White *et al.*, 1990; Hillis *et al.*, 1996; Armstrong *et al.*, 1997)。本試驗即以 PCR-RFLP 方法，進行三種白輪盾蚧之快速鑑定技術開發，期能有助於將來介殼蟲防疫檢疫工作之推行。

## 材料與方法

### 一、介殼蟲之調查、採集及種類鑑定

定期至台灣各地依寄主植物、地理分布及季節變化等，記錄並採集三種白輪盾蚧作為試驗材料。部分介殼蟲作成玻片標本，依據外部形態特徵，進行種類鑑定，並建立標本資料庫，供分生技術鑑定時比對之用。其餘的標本則浸泡於 95% 酒精，或直接冰存於 -80 冰箱中，供萃取 DNA 時使用。

### 二、介殼蟲 DNA 萃取

取已初步鑑定種類之介殼蟲標本，抽取並純化蟲體 DNA。萃取 DNA 時，依種類及生長期不同，分別單隻萃取。本試驗利用 Viogene 公司的 DNA 純化試劑組 (Blood and Tissue Genomic DNA Miniprep System Kit, cat. no. GG1001)，依照試劑組中的說明書進行白輪盾蚧 genomic DNA 的萃取，主要步驟略述如下：將單隻白輪盾蚧置於 1.5 ml 離心管，加入 200  $\mu$ l buffer LYS，將蟲體充分研磨後，加入 10  $\mu$ l proteinase K (20 mg/ml) 於研磨液中，震盪混合均勻後，置於 56 水浴中加熱 2 小時，隨後增溫至 70 反應 20 分鐘，停止 proteinase K 的作用。加入 200  $\mu$ l buffer EX，再置於 70 ，10 分鐘，隨之加入 210  $\mu$ l isopropanol 並混合均勻。將反應液轉移到 spin column，以 6,000 xg 離心 2 分鐘。以 wash buffer 500  $\mu$ l 清洗 spin column，以 6,000 xg 離心 2 分鐘，重覆此步驟清洗兩次後，用 50  $\mu$ l 已預熱 70 的 ddH<sub>2</sub>O 將 DNA 從 spin column 中洗提出，以 6,000 xg 離心 2 分鐘，洗提液即含有白輪盾蚧的 genomic DNA (約 0.1-0.4 ng/ $\mu$ l)，保存於 4 備用或 -20 中長久保存。

### 三、利用 PCR 技術大量增幅目標 rDNA

利用通用 (universal primers) 及特定

引子 (specific primers), 增幅三種介殼蟲 rDNA 之 ITS1 和部分 18S 片段, 進行定序並比較 DNA 序列相似度。本試驗以 Perkin-Elmer 公司的 GeneAmp PCR System 2400 溫度控制器, 進行 PCR 的增幅。取 PCR 專用 0.2 ml 微量離心管, 加入 5.0  $\mu$ l 的白輪盾蚧 DNA 萃取液 (約 0.5-2.0 ng DNA)、0.6 units 之 DNA polymerase、1x reaction buffer (含 1.5 mM  $Mg^{2+}$ )、0.25 mM dNTPs 混合液、0.15  $\mu$ M 正向引子及 0.15  $\mu$ M 反向引子, 最後加入 ddH<sub>2</sub>O 使總體積為 25  $\mu$ l。溶液混合均勻後, 進行 PCR 增幅反應。PCR 反應條件為: 96 /3 min 預熱, 然後進行 40 個循環的 94 /1 min, 56 /1 min, 72 /1 min, 最後再進行 72 /5 min 的修補延伸。PCR 增幅時所使用的引子序列及增幅的相關位置見表一及圖一。

#### 四、rDNA 定序、比對及特定引子的設計

將 PCR 的增幅產物, 利用 PCR Clean Up-M Kit (購自 Viogene 公司, cat. no. PF1001) 進行 PCR 產物 DNA 純化, 以此純化的 DNA 供作定序使用。有關定序部分委託明欣生物科技公司進行, 將純化的 PCR

增幅產物利用 ABI Prism kits (購自 Perkin-Elmer 公司) 以 dideoxynucleotide chain termination 的方式, 利用 Perkin-Elmer 公司的 ABI PRISM model 377 核酸定序儀進行 DNA 定序。

利用連結國家衛生研究院 (National Health Research Institutes) 的 GCG 網站 (<http://gcg.nhri.org.tw>), 進行 DNA 序列的分析比對, 探討三種供試介殼蟲 rDNA 的 ITS1 及部分 18S 核酸序列的相似度, 並利用網站提供的引子設計功能, 進行三種介殼蟲特定引子的設計。

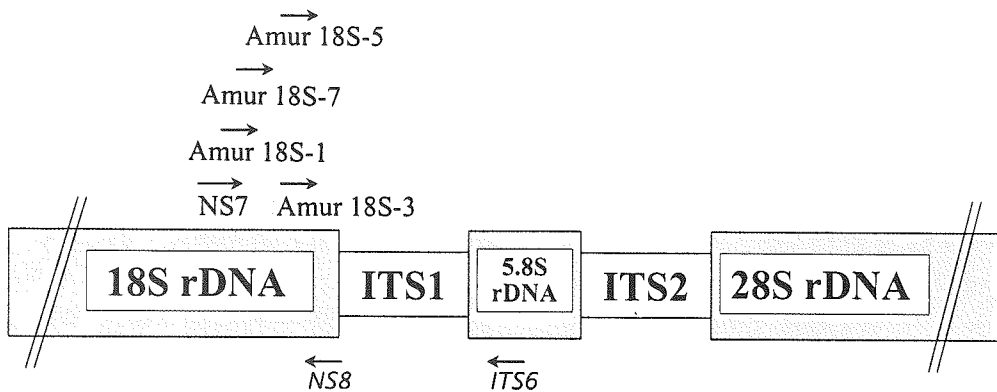
#### 五、RFLP 分析

利用特定引子, 增幅出的三種白輪盾介殼蟲 rDNA 之 ITS1 片段, 分別進行核酸內切酶切割的 RFLP 分析, 以尋找能夠明顯鑑別出不同種類白輪盾蚧的核酸內切酶。取增幅出的 rDNA 之 ITS1 片段 (約 1.0-1.5  $\mu$ g), 加入 1-2 units 的核酸內切酶、1x reaction buffer, 最後加入 ddH<sub>2</sub>O, 使總體積為 15  $\mu$ l, 依核酸內切酶所需的溫度下, 進行酶切反應 2 小時。酶切後的產物, 以 2.0 % agarose gel (內含 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide) 在 1x TAE buffer 中進行水平式

表一 增幅 rDNA 使用的 PCR 引子序列

Table 1. Sequences of PCR primers to amplify nuclear rDNA

Location	Primer name	Primer sequence (5' → 3')	Reference
18S of rDNA	NS7	GAGCCGAGTGATCCACCGCT	White <i>et al.</i> , 1990
	NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA	White <i>et al.</i> , 1990
	Amur18S-1	GGCTTTACCAGGAAACCCGCTGAAC	self-designed
	Amur18S-3	CGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTG	self-designed
	Amur18S-5	GCTCGCGTTGATTACGTCCC	self-designed
	Amur18S-7	TACCAGGAAACCCGCTGAAC	self-designed
5.8S of rDNA	ITS6	GAGCCGAGTGATCCACCGCT	Designed by Armstrong



圖一 在表一所列的 PCR 引子於 rDNA 上的相關區域。箭頭所指方向為各引子之 3' 端。  
 Fig. 1. Locations of PCR primers for the nuclear rDNA given in Table 1. Arrows represent the 3' end of each primer.

電泳，電泳結束後，在紫外光燈下觀察結果並拍照記錄，比較不同種白輪盾蚧間核酸片段的 RFLP 圖譜。DNA 片段大小的測定，採用台灣科光生物公司 (TOPBIO) 的 VGIS-1 數位影像系統 (Video Gel Image System) 及 AAB 公司 (Advanced American Biotechnology) 的影像分析軟體，依 Rf 值原理推算出 DNA 片段長度。

## 結 果

### 一、介殼蟲的採集與鑑定

本研究採集目前危害嚴重，疑似為新侵入種的蘇鐵白輪盾蚧 (*Aulacaspis yasumatsui* Takagi)，和二種與其外形極為近似，且為重要檢疫性害蟲的同屬近緣種介殼蟲--樟白輪盾蚧 (*A. yabunikkei* Kuwana) 和月橘白輪盾蚧 (*A. murrayae* Takahashi) 為試驗材料。其中蘇鐵白輪盾蚧和樟白輪盾蚧均有三個採集族群，月橘白輪盾蚧則有二個不同的採集族群 (表二)。標本採集後，浸泡於 95% 酒精中保存備用，亦可直接冰存在 -80°C 的冰箱

表二 試驗的白輪盾蚧採集資料表  
 Table 2. Collecting date of *Aulacaspis* species used in this study

Species	Collection no.	Locality in Taiwan (County)	Host plant
<i>A. murrayae</i>	1	Daan Chiu, Taipei	Orange jasmine
	2	Bei Chiu, Taichung	Orange jasmine
<i>A. yabunikkei</i>	1	Daan Chiu, Taipei	Camphor tree
	2	Dashi Jen, Taoyuan	Camphor tree
	3	Taitung City, Taitung	Camphor tree
<i>A. Yasumatsui</i>	1	Daan Chiu, Taipei	Cycads
	2	Dashi Jen, Taoyuan	Cycads
	3	Jungli City, Taoyuan	Cycads

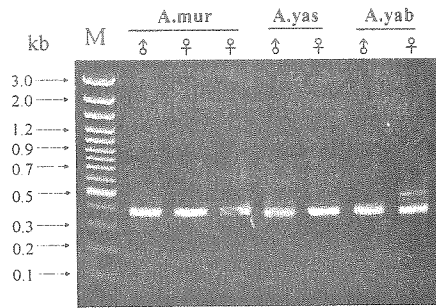
中，或以液態氮冰存備用，其中以活體或冰存之標本萃取 DNA 的效果較佳。各採集族群種類的鑑定，均利用雌成蟲之玻片標本，利用形態特徵及寄主植物進行初步的種類鑑定。

## 二、目標 rDNA 的增幅、解碼及序列比對

萃取三種白輪盾蚧標本的 DNA 後，利用聚合酶連鎖反應技術，擴增核糖體形成基因中編碼及非編碼的區段，以進行序列解碼及 RFLP 的分析。

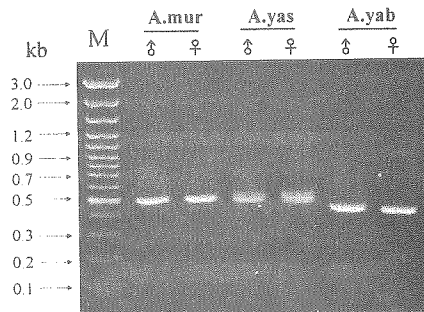
本試驗先根據 White *et al.* (1990) 所設計的通用引子，增幅 18S 保守區域並進行序列解碼，從解碼的 DNA 序列中，設計可供三種介殼蟲增幅的特定引子。結果利用 NS7 和 NS8 的引子對組合，增幅產物約 390 bp (圖二)，DNA 序列解碼後，利用國家衛生研究院的 GCG 網站進行 DNA 序列的比對，結果三種白輪盾蚧的這段 DNA 產物相似度高達 99% 以上，顯示白輪盾蚧此段 DNA 的高保守性，利用 390 bp 這段 DNA 的完全相同區域，設計出四個正向引子 (forward primer)，分別定名為 Amur18S-1、Amur18S-3、Amur18S-5 和 Amur18S-7。

以自行設計的特定正向引子，分別與反向的通用引子 ITS6 (design by K. F. Armstrong of Lincoln Univ., New Zealand) 進行 PCR 增幅 rDNA 之 ITS1 非編碼區段。各種不同引子組合測試後，以 Amur18S-3 與 ITS6 的增幅效果最好，增幅的產物中，月橘白輪盾蚧和蘇鐵白輪盾蚧約 500 bp，樟白輪盾蚧則為 450 bp (圖三)。其次，檢測採集自不同族群的同種白輪盾蚧的 DNA 樣品，結果經 PCR 所增幅的 DNA 片段長度均相同。增幅的 ITS1 區段經序列解碼比對後，發現同種但不同個體間的序列相似度都在 97.8% 之上，而不同種間的相似度則在



圖二 利用 NS7 和 NS8 引子組合增幅三種白輪盾蚧 18S/rDNA 的 PCR 產物圖譜。

Fig. 2. Amplification patterns of PCR products of 18S regions on rDNA using the primers, NS7 and NS8, for three *Aulacaspis* species. A.mur, *A. murrayae*; A.yab, *A. yabunikkei*; A.yas, *A. yasumatsui*; M, 100 bp DNA ladder maker (MBI Fermentas).



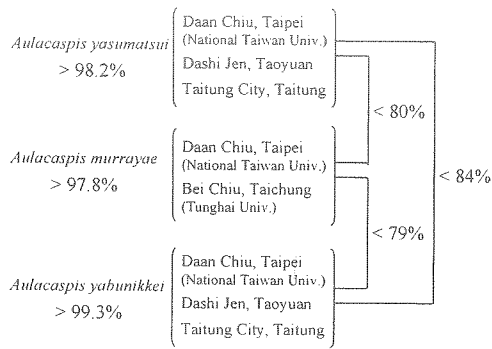
圖三 利用 Amur18S-3 和 ITS6 引子組合增幅三種輪盾蚧之 ITS1/rDNA 的 PCR 產物圖譜。

Fig. 3. Amplification patterns of PCR products of ITS1 regions on rDNA using the primers, Amur18S-3 and ITS6, for three *Aulacaspis* species. A.mur, *A. murrayae*; A.yab, *A. yabunikkei*; A.yas, *A. yasumatsui*; M, 100 bp DNA ladder maker (MBI Fermentas).

80% 左右 (圖四)，在初步增幅的結果中，已可以從三種白輪盾蚧中區分出樟白輪盾蚧。

## 三、PCR 增幅產物--ITS1 的 RFLP 分析

將 PCR 增幅的 ITS1 區段，進行核酸內



圖四 三種白輪盾蚧之 ITS1/rDNA 序列相似度比較。  
Fig. 4. Comparison of sequence similarities for ITS1/rDNA of three *Aulacaspis* species.

切酶切割的 RFLP 分析，以尋找能夠明顯鑑別白輪盾蚧的核酸內切酶。結果從十餘種核酸內切酶的酶切試驗中，篩選出 *TaqI*、*MspI*、*CfoI* 和 *HaeIII* 四種核酸內切酶，其酶切的核酸片段 RFLP 圖譜，可用來區別供試的蘇鐵白輪盾蚧、樟白輪盾蚧和月橘白輪盾蚧，其中又以 *TaqI* 的酶切圖譜鑑別能力最佳。並且同種白輪盾蚧但不同的採集族群或生長時期，其 RFLP 圖譜均相同（圖五和圖六），顯示其種內的穩定性。

## 討 論

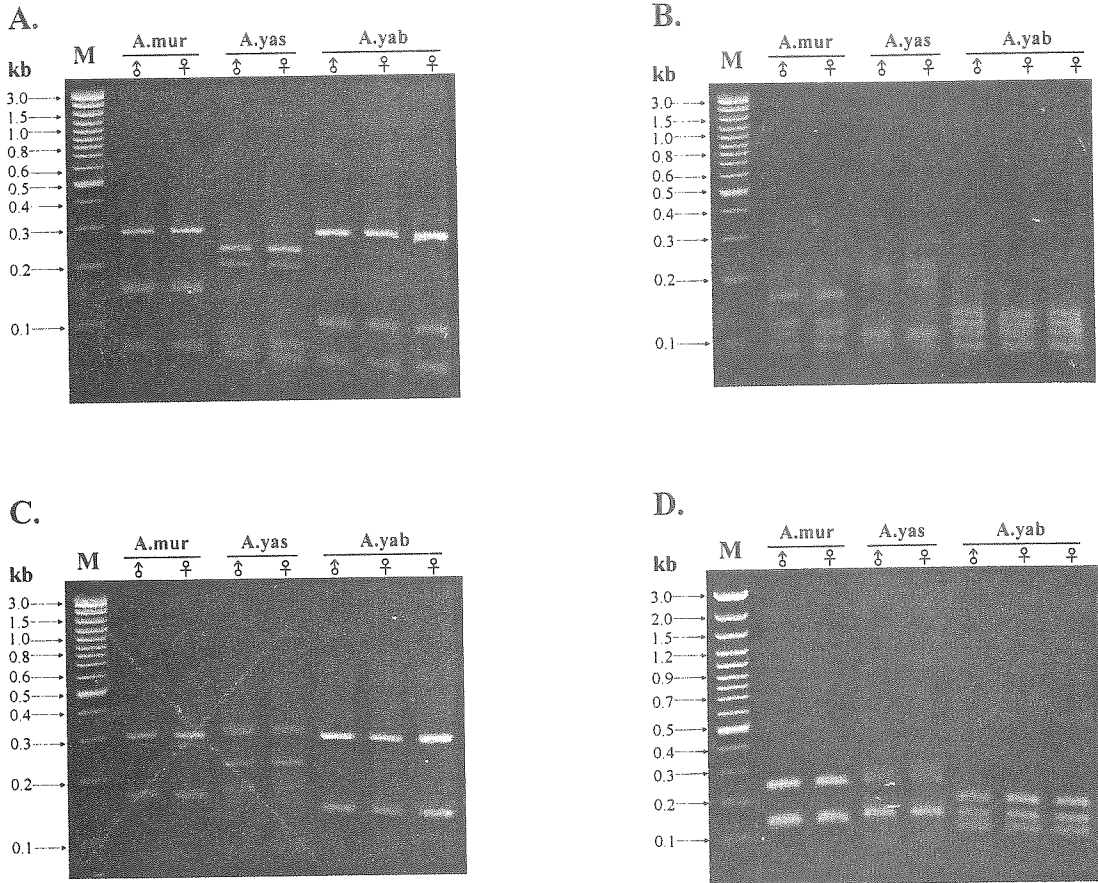
白輪盾蚧屬的介殼蟲，通常使用外部形態的特徵及寄主植物作為鑑定的依據，例如：前體部 (prosoma) 的形狀、頭瘤 (proosomal tubercle) 的有無、盤狀腺孔 (disc pore) 的數目、臀板 (pygidium) 的形狀和骨化程度、臀葉 (pygidial lobe) 的形狀和結構、泌蠟腺 (wax gland) 的形狀和數目、生殖孔 (gonopore) 的位置、肛門 (anus) 的位置和形狀、緣腺刺 (marginal gland spine) 的形狀和數目、圍陰腺 (perivulvar pore) 的數目等 (Wu, 1986)。但是這些形態特徵在白輪盾蚧屬的鑑定上仍有一些待克服之處，例如：1. 許多

鑑定的形態特徵有重疊的現象，對一個分類專家來說，進行鑑定工作也很困難；2. 白輪盾蚧屬的介殼蟲，其分類特徵大部分是利用雌成蟲，對於雄蟲或未成熟時期，均缺乏鑑定分類的特徵。由此可知，本屬介殼蟲不論在分類或是檢疫鑑定上，均遭遇到不同程度的難題。

利用分子技術進行快速鑑定，就檢疫害蟲鑑定而言，所選擇之 DNA 分子標誌應該具有下列特性：(1). 同種昆蟲穩定性高，而不同種昆蟲間具有明顯的差異性；(2). 有通用引子可以複製該段 DNA；(3). 該段 DNA 有很多個拷貝 (copies)，利用 PCR 技術可以很容易的增幅取得 (Armstrong *et al.*, 1997)。本研究所利用的 rDNA，同時具有上述三種特性，可作為鑑定昆蟲種類一個極佳的 DNA 分子標誌，值得進一步開發利用。

由本試驗的結果可知，rDNA 中非編碼區的轉錄區內空白段 (internal transcribed spacer I, ITS1)，利用 rDNA/PCR-RFLP 的技術分析得知，在同種的白輪盾蚧間，不同個體或不同族群間的穩定性極高，而不同種的白輪盾蚧間則有極大的差異，足以區別三種外形極為相近的白輪盾蚧類害蟲。並且，利用本試驗的分析技術，所得到的分類特徵相當明顯，檢疫人員只要接受簡單訓練的，即能從 DNA 的電泳膠片中得到答案，解決傳統形態鑑定需要專家進行的難題。此外，利用本項技術，可以在 10 小時內完成鑑定工作，克服形態鑑定必需費時費力飼養蟲源的工作，實在是一項快速、簡便且準確的害蟲檢疫鑑定技術，適合開發作為白輪盾蚧之檢疫快速鑑定的方法。

Armstrong *et al.* (1997) 利用 PCR-RFLP 的技術分析 rDNA，發現 ITS 區段，利用核酸內切酶進行切割形成的 DNA 片段多型性，可用來辨別果實蠅的種類。經比較分析各種方法，他們認為結合 rDNA/



圖五 四種核酸內切酶切割 ITS1/rDNA 區段的 PCR 產物 (引子組合為 Amur18S-3 and ITS6) 之種間 RFLP 圖譜分析 (A, *TaqI*; B, *MspI*; C, *CfoI*; D, *HaeIII*)。

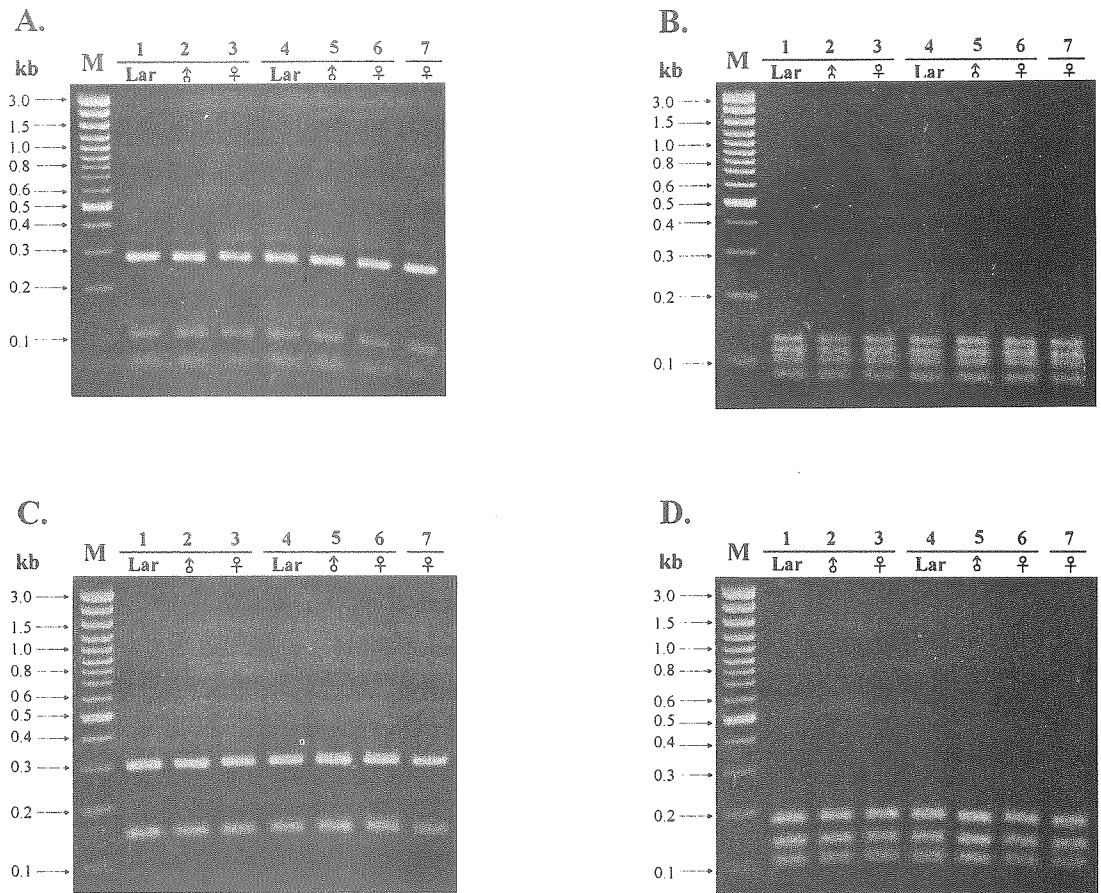
Fig. 5. Inter-species RFLP analysis of the ITS1/rDNA region PCR product (primers Amur18S-3 and ITS6) (endonucleases, A. *TaqI*; B. *MspI*; C. *CfoI*; D. *HaeIII*). A.mur, *A. murrayae*; A.yab, *A. yabunikkei*; A.yas, *A. yasumatsui*; M, GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus maker (MBI Fermentas).

PCR/RFLP 的新技術，不僅可鑑定成蟲，更適用於卵、幼蟲及蛹等幼體時期在害蟲的檢疫鑑定工作上，開發提供快速、準確且簡便的鑑定方法。

昆蟲中，常有多型性，或外部形態極為相近的近似種，或是只有發現部份的殘骸，或是生活史未完全了解的種類等，使種類鑑定困難甚至常有誤判發生。若以 DNA 進行鑑定，則可克服這些困難。rDNA/PCR-RFLP 的分

析技術，操作簡便，對標本品質的要求度較低，即使是部份殘骸也可進行分析，且所需的時間短，只需約 9~10 小時，適合檢疫鑑定的要求，也可作為形態近似種類的鑑定分析，以解決傳統分類學特徵不夠之問題。此外，如有完整的比對資料系統，也可做為田間害蟲調查或監測時，瞭解族群是否有混棲之現象，當有大量樣本等待處理時，此一方法可提供快速且正確的鑑定，對於害蟲綜合管理助益頗大。利





圖六 樟白輪盾蚧在不同生長時期、性別及不同採集地之 rDNA/PCR 產物 (引子組合為 Amur18S-3 and ITS6)，以種核酸內切酶切割之種內 RFLP 圖譜分析 (A, *TaqI*; B, *MspI*; C, *CfoI*; D, *HaeIII*)。

Fig. 6. Intra-species RFLP analysis of the rDNA/PCR product using the endonucleases, A, *TaqI*; B, *MspI*; C, *CfoI*; D, *HaeIII*. The rDNA/PCR products are from different growing periods, genders, and collection sites of *Aulacaspis yabunikkei*. Lanes 1~3, Collected from National Taiwan Univ; lanes 4~6, collected from Taitung City; lane 7, collected from Dashi Jen, Taoyuan; M, GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus marker (MBI Fermentas). Lar, larva; ♂, adult male; ♀, adult female.

用分子標誌鑑別昆蟲種類之研究報告，近年來蓬勃發展，受到相當的重視，然而分子標識之種類甚多，何種標誌才能具有代表性，在檢疫實務應用上，仍需再深入研究。

*Aulacaspis* 屬目前全世界已經記錄的超過 66 種，在台灣調查研究共紀錄有 20 種 (Wu, 1986)。因為利用分子生物技術的分類鑑定方法，其基礎是建構在形態學的分類系統

上，因此使用 rDNA 或 mtDNA 之分子鑑定技術分析的可靠性，必須藉由傳統分類學的驗證。Beuning *et al.* (1999) 即利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 的技術，鑑別四種粉蚧屬 (*Pseudococcus* spp.) 害蟲，對雄蟲及幼期也可鑑別。

本研究的另一個目的是利用 rDNA/PCR-RFLP 的鑑定技術，釐清目前中、北部

危害蘇鐵的白輪盾蚧是新侵入的蘇鐵白輪盾蚧，或是台灣近緣種轉移寄主危害，初步的分析結果顯示，似與台灣近緣種不同，但仍須進一步比對國外標本方能確知。

## 誌 謝

本研究承行政院農業委員會動植物防疫檢疫局委託計畫 90 農科-6.2.2-檢-B2(1) 之經費補助，試驗期間承台灣大學顏妙朱小姐在供試蟲源採集上的協助，以及論文完成後，蒙徐孟豪博士對摘要及圖說表說的修正，謹致謝忱。

## 引用文獻

- Armstrong, K. F., C. M. Cameron, and E. R. Frampton.** 1997. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) species identification: a rapid molecular diagnostic technique for quarantine application. *Bull. Entomol. Res.* 87: 111-118.
- Beuning, L. L., P. Murphy, E. Wu, T. A. Batchelor, and B.A.M. Morris.** 1999. Molecular-based approach to the differentiation of mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) species. *J. Econ. Entomol.* 92: 463-472.
- Burger, H. C., and S. A. Ulenberg.** 1990. Chapter 3.2 Quarantine problem and procedures. pp. 313-327. *In*: D. Rosen, ed. *Armored Scale Insect: Their Biology, Natural Enemies and Control*. Vol. B. Elsevier, Amsterdam. 688 pp.
- Caterino, M. S., S. Cho, and F.A.H. Sperling.** 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of babel. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 1-54.
- Chang, J. C.** 2001. Application of RAPD to rapid identification of lepidopteran pests-Using three common pests in Taiwan as a model. Master's thesis, Graduate Institute of Entomology, National Chung Hsing Univ. 82 pp (in Chinese).
- Chang, S. C.** 1998. The use of protein and DNA for the identification of *Trichogramma ostrinae* Pang & Chen and *T. chilonis* Ishii. Master's thesis, Graduate Institute of Entomology, National Chung Hsing Univ. 55 pp (in Chinese).
- Chiu, Y. C., W. J. Wu, S. F. Shiao, and C. J. Shih.** 2000a. The application of RAPD-PCR to develop rapid diagnostic technique for identification of 6 species of *Liriomyza* spp. (Diptera: Agromyzidae). *Chinese J. Entomol.* 20: 293-309 (in Chinese).
- Chiu, Y. C., W. J. Wu, S. F. Shiao, and C. J. Shih.** 2000b. The application of isoenzyme to develop rapid diagnostic techniques for identification of leafminer flies, *Liriomyza* spp. (Diptera: Agromyzidae). *Plant Prot. Bull.* 42: 235-247 (in Chinese).
- Chou, F. I.** 2000. Rapid identification of the silverleaf whitefly (*Bemisia argentifolii* Bellows & Perring) and its population parameters. Master's

thesis, Graduate Institute of Entomology, National Taiwan Univ. 134 pp (in Chinese).

- Deng, Y. M.** 2001. Use of DNA markers for the detection of geographical origins of the oriental fruit fly and grain weevils in Taiwan. Master's thesis, Graduate Institute of Entomology, National Taiwan Univ. 62 pp (in Chinese).
- Hillis, D. M., C. Moritz, and B. K. Mable.** 1996. Nucleic acid II: The polymerase chain reaction. pp. 205-247. *In*: S. R. Palumb, ed. Molecular Systematics, 2nd ed. Sinauer Associates, Publishers, Sunderland, MA.
- Lin, H. C.** 2000. Application of rDNA markers in identification of fruit flies and grain weevils. Master's thesis, Graduate Institute of Entomology, National Taiwan Univ. 59 pp (in Chinese).
- Liu, C. C.** 2001. Use of DNA markers for the discriminations of *Bemisia tabaci* biotypes and construction of phylogenetic relationship among four species of *Oxya* grasshoppers in Taiwan. Master's thesis, Graduate Institute of Entomology, National Taiwan Univ. 85 pp (in Chinese).
- Loxdale, H. D., and G. Lushai.** 1998. Molecular markers in entomology. *Bull. Entomol. Res.* 88: 577-600.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *In*: M. A. Innis, D. H. Gelgand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA.
- Wu, W. J.** 1986. Morphology and taxonomy of the genus *Aulacaspis* of Taiwan (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae). Doctoral dissertation, Graduate Institute of Plant Pathology and Entomology, National Taiwan Univ. 133 pp (in Chinese).
- Wu, W. J.** 1994. Scale insect. pp. 545-678. *In*: Y. H. Tzeng, and C. N. Chen, eds. Plant Quarantine--Diagnosis of Tiny Animals. Bureau of Standards, Methology and Inspection, Ministry of Economic Affairs Press. 888 pp (in Chinese).

收件日期：2001年9月21日

接受日期：2001年11月14日

# Identification of Three *Aulacaspis* Species (Homoptera: Diaspididae) by PCR-RFLP Analysis for Quarantine Application

Yi-Chung Chiu, Wen-Jer Wu, and Cheng-Jen Shih<sup>\*</sup> Department of Entomology, National Taiwan University, Taipei 106, Taiwan, R.O.C.

## ABSTRACT

Most scale insects are small and similar in appearance. It is difficult to identify these species especially in their immature stages, and this causes problems for quarantine officers. This study attempted to develop a molecular diagnostic technique using genomic DNA markers for identifying three species of the genus *Aulacaspis*, *A. murrayae*, *A. yabunikkei*, and *A. yasumatsui*. Amur 18S-3 and ITS6 primer sets were used to amplify ITS1 and its flanking regions of rDNA from genomic DNA as a template extracted from a single specimen. DNA extracted from these three species yielded a single fragment after PCR amplification. The DNA fragment sizes of the PCR products were about 450 bp (for *A. yabunikkei*) and 500 bp (for *A. murrayae* and *A. yasumatsui*). These PCR products were then cut with various restriction endonucleases in order to compare the results of the restriction fragment length polymorphism (RFLP). Our results also reveal that it is possible to discriminate these three *Aulacaspis* species based on the species-specific patterns acquired from digesting the PCR products with the endonucleases, *TaqI*, *MspI*, *CfoI*, and *HaeIII*.

**Key words:** *Aulacaspis*, rapid diagnostic techniques, polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP), internal transcribed spacer I (ITS1).