



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Use of the Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) to Distinguish Variations of *Aedes aegypti* based on Abdominal 【Research report】

運用隨機增幅多型性DNA聚合酶連鎖反應技術區別埃及斑蚊 (Diptera: Culicidae) 腹部背板白鱗分佈的差異 【研究報告】

Yu-Cheng Su and Err-Lieh Hsu Chau-Mei Ho*
蘇俞丞、徐爾烈 何兆美*

*通訊作者E-mail: vectorho@ym.edu.tw

Received: 2003/05/22 Accepted: 2003/07/29 Available online: 2003/09/01

Abstract

There is much variation in the distribution of white scaling on the abdominal tergites of *Aedes aegypti*. The C. K. Meek' s (CKM) classification system was used to identify and rank eight classes in the abdominal scale patterns, but only seven classes were found in Taiwan, including CKM1 which was generalized as the type form of *Aedes aegypti* and CKM2 to CKM7 which were concluded to be as the pale form. Pure CKM strains were selected by single-pair matings, and genomic DNA of these mosquitoes was extracted in order to detect the variations in RAPD patterns. The RAPD fragments profiles of seven strains with different scale pattern were analyzed and genetic similarities were estimated between each two strains using two different statistic methods. The UPGMA dendrogram method illustrated the relatedness of these strains, and both statistical methods assorted these strains into two major groups: the type form and the pale form. But the genetic distance between each pair of strains differed using these two methods. These results indicate that the RAPD-PCR technique is sufficiently sensitive for studies of mosquito molecular taxonomy, especially at intra-species level.

摘要

埃及斑蚊 (*Aedes aegypti* L.) 成蟲腹部背板鱗片的分佈具有明顯的多樣性，依照白色鱗片在腹部各節的背板從基部往後延伸的情形可分為三型：模式型、深色型及淺色型。以CKM分級系統共可分為8個級別，即CKM0至CKM7。屬於埃及斑蚊CKM0級的個體是深色型的埃及斑蚊，僅在非洲地區和印度洋島嶼之*Aedes aegypti* fomorsus看到。台灣地區的則屬於模式型的埃及斑蚊 (CKM1) 和淺色型 (CKM2-7) 共同混雜在一起的族群。本研究以相同CKM級別之親代在實驗室內進行交配，由產下的後代中挑選出與親代同一性狀的子代繼續交尾繁衍，直至篩選出所有的子代個體皆為親代的CKM級別之品系。再萃取此一純系後代的genomic DNA，以10個具有解析能力的引子(primer)進行隨機擴增多型的核酸-聚合酶連鎖反應 (RAPD- PCR)。根據兩兩比對各種CKM級別的埃及斑蚊品系的核酸擴增的出來的多型性的DNA片段之相似度，可以明顯地將CKM1-7級的埃及斑蚊品系區分成二群：一群為由淺色型埃及斑蚊個體所組成，另一群為模式型的埃及斑蚊。本實驗證明此二型的埃及斑蚊在自然界雖有部分重疊的生態席位 (niche)，但可利用成蟲腹節背板的白色鱗片之分布情形和RAPD-PCR的方法區分出來。

Key words: *Aedes aegypti*, abdominal tergal scale, CKM, random amplified DNA polymorphism, intra-specific variation

關鍵詞: 埃及斑蚊、腹部背板鱗片、CKM、隨機增幅DNA多型性、種內變異

Full Text: [PDF \(0.64 MB\)](#)

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

運用隨機增幅多型性 DNA 聚合酶連鎖反應技術區別埃及斑蚊 (Diptera: Culicidae) 腹部背板白鱗分佈的差異

蘇俞丞 徐爾烈 國立台灣大學昆蟲學系 臺北市大安區羅斯福路四段 113 巷 27 號
何兆美* 國立陽明大學寄生蟲學研究所 臺北市北投區立農街二段 155 號

摘 要

埃及斑蚊 (*Aedes aegypti* L.) 成蟲腹部背板鱗片的分佈具有明顯的多樣性，依照白色鱗片在腹部各節的背板從基部往後延伸的情形可分為三型：模式型、深色型及淺色型。以 CKM 分級系統共可分為 8 個級別，即 CKM0 至 CKM7。屬於埃及斑蚊 CKM0 級的個體是深色型的埃及斑蚊，僅在非洲地區和印度洋島嶼之 *Aedes aegypti fomorsus* 看到。台灣地區的則屬於模式型的埃及斑蚊 (CKM1) 和淺色型 (CKM2-7) 共同混雜在一起的族群。本研究以相同 CKM 級別之親代在實驗室內進行交配，由產下的後代中挑選出與親代同一性狀的子代繼續交尾繁衍，直至篩選出所有的子代個體皆為親代的 CKM 級別之品系。再萃取此一純系後代的 genomic DNA，以 10 個具有解析能力的引子 (primer) 進行隨機擴增多型的核酸-聚合酶連鎖反應 (RAPD-PCR)。根據兩兩比對各種 CKM 級別的埃及斑蚊品系的核酸擴增的出來的多型性的 DNA 片段之相似度，可以明顯地將 CKM1-7 級的埃及斑蚊品系區分成二群：一群為由淺色型埃及斑蚊個體所組成，另一群為模式型的埃及斑蚊。本實驗證明此二型的埃及斑蚊在自然界雖有部分重疊的生態席位 (niche)，但可利用成蟲腹節背板的白色鱗片之分布情形和 RAPD-PCR 的方法區分出來。

關鍵詞：埃及斑蚊、腹部背板鱗片、CKM、隨機增幅 DNA 多型性、種內變異

前 言

埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 為一種在外部型態、生理機能、生態習性、行為以及遺傳上具有許多種內差異的蚊種 (Machdo-Allison and Craig, 1972; McClelland, 1974; Trips

and Hausermann, 1975; Tabachnick *et al.*, 1979)，在外型上，成蟲腹部背板鱗片的分佈更顯現出高度的差異。成蟲腹部背板為深棕色，其上覆蓋著黑色及白色兩種的鱗片，白色鱗片通常分佈於每一腹節之基部和側面，有時白色鱗片的範圍會從腹節基部往後端延伸，其

*論文聯繫人
e-mail: vectorho@ym.edu.tw

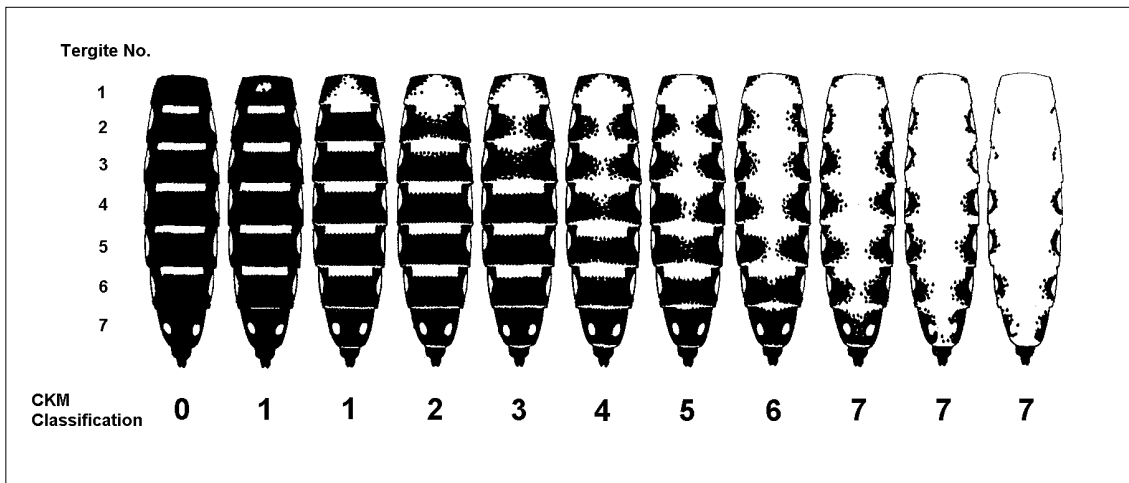
他部分則全由黑色鱗片所覆蓋，白色鱗片往後延伸的情形並不一定出現於每一腹節的背板。Mattingly (1957) 利用此種變異的特性將埃及斑蚊區分為三型 (forms)：1. 模式型的埃及斑蚊 (type form)，此型廣泛分佈於全球熱帶、亞熱帶地區，蟲體呈現深棕色，最主要的特徵在於其腹部各節除了基部有白色鱗片外，白色鱗片僅在第一腹節往後延伸；在許多文章中將此型的埃及斑蚊視為一個亞種，即 *Aedes aegypti aegypti*。2. 淡色型的埃及斑蚊 (pale form)，本型之埃及斑蚊發生地區與模式型相同，腹節背板白色鱗片往後延伸的情形可以連續發生於其他腹節上 (附註)。3. 深色型的埃及斑蚊 (dark form)，本型分佈於撒哈拉沙漠以南的非洲地區以及印度洋上的島嶼 (Failloux *et al.*, 2002)，為埃及斑蚊之另一亞種 (*Aedes aegypti fomorsus*)，蟲體較為深暗，除腹部各節的基部外，其他的部分完全無往後延伸的白色鱗片。

Mattingly (1957) 以「家棲性」(domesticity) 程度來解釋此三型的埃及斑蚊與人類生活的關係。他認為深色型的埃及斑蚊的棲息地有家棲的 (domestic)，半家棲 (peridomestic) 的及林棲的 (sylvatic) 三種。所謂林棲的是指孳生於有積水的樹洞、石穴內的個體，其雌蚊並不以人類為吸血對象，所以它們是生活於森林中且與人類的環境是分開的。半家棲的意思即在其生活史中一部分時期是生活於人類的生活環境中。模式型埃及斑蚊的家棲性則為家棲的 (domestic) 的或半家棲的，雌蚊通常以吸食人類血液為主。而淡色型的埃及斑蚊則屬於家棲的，這些個體在人類生活環境中孳生，包括各種的人造的積水容器，吸食人類血液、棲息於建築物之中等。這些生態特性的差異後來有許多文獻予以證實 (McClelland 1960, 1974; McIntosh *et al.*,

1972; Trips and Hausermann, 1975; Leahy *et al.*, 1978; VandeHey *et al.*, 1978; Tabachnick *et al.*, 1979; Mogi *et al.*, 1989; Jupp and McIntosh, 1990; Jupp *et al.*, 1991; Kemp and Jupp, 1991)。

Hartberg *et al.* (1986) 在觀察埃及斑蚊的成蟲時，創立「CKM」分級系統，CKM 是採用當時負責純系培養的昆蟲學者 C. K. Meeks 的姓名而得名。此一系統是按照成蟲腹部各節背板除了基部之白色鱗片以外，依照其他部分的白色鱗片從第一腹節往後延伸的節數而分成 CKM0 至 CKM7 等 8 級。所謂 CKM0 就是在第一腹節至第七腹節背板，除各節的基部之外，其他部分完全沒有白鱗出現；CKM1 即第一腹節上出現白鱗；CKM2 即第一和第二腹節背板連續出現白鱗；CKM3 即第一、第二和第三腹節背板連續出現白鱗；CKM4 即第一、第二、第三和第四腹節背板連續出現白鱗，以此類推至 CKM7。即 CKM7 是從第一腹節至第七腹節之背板均連續出現白鱗。(如圖一)

McClelland (1960) 認為埃及斑蚊身上鱗片所表現出來的性狀是由幾個對偶基因共同控制。VandeHey *et al.* (1978) 亦推測埃及斑蚊身上鱗片的多型性是由一個多基因系統及另外的調節因子所控制。Hartberg *et al.* (1986) 根據不同 CKM 級別的成蟲交配實驗及其後代個體各種性狀的比例加以分析，發表了埃及斑蚊成蟲的腹節背板的鱗片之多型性是受三組主要基因之控制的假說。他的結論也支持前人從埃及斑蚊成蟲的腹部背板白鱗的分佈可以區分不同的類群的分類方法及這些性狀可能由多基因來控制的想法。本研究利用 RAPD 技術對七個 CKM 級別的埃及斑蚊的純系品系，以 11 個任意組合序列之引子進行隨機多型性 DNA 的增幅，所得產物經瓊脂膠體



圖一 以 CKM 系統區分出埃及斑蚊雌成蟲腹部背板白鱗分佈的形式 (修改自 G. A. H. McClelland, 1960)。
 Fig. 1. Generalized stages in the graded series of female abdominal tergum of *Aedes aegypti* from CKM0 to CKM7.
 Edited according to G. A.H. McClelland (1960).

電泳將不同大小核酸帶(DNA fragments)分開，挑選出各類群中穩定重現的核酸帶，並以兩種相似性指數 (similarity index 和 percentage match) 計算出各品系間的遺傳差異，再以 UPGMA 的方法建構各類群之間的支序圖，藉此探討不同 CKM 級別的埃及斑蚊之間的類群關係。

材料與方法

一、獲得腹部背板白色鱗片各種 CKM 級別之蚊蟲

由於野外採集不易取得數目夠多且含各種 CKM 級別的個體，故將野外採取的埃及斑蚊幼蟲，攜回實驗室飼養待其羽化，再進行各級 CKM 純系後代的篩選。

(一) 埃及斑蚊成蟲 CKM 級別的判定方法

以吸蟲管將羽化後二十四小時內之成蟲自蚊籠中取出，吹入周圍有冰塊的試管內，由於低溫的影響成蟲會暫時昏迷，失去活動的能力。再將昏迷的成蟲放置於下面有冰塊之玻璃

板上，使蟲體繼續保持低溫；以軟鑷夾住成蟲的足，同時以細針把覆蓋在腹部背板上的翅向頭部的方向撥開，並移至解剖顯微鏡下觀察其腹部背板各節的白色鱗片判定其 CKM 級別。

(二) 篩選埃及斑蚊各種 CKM 級別的純系品系

由於沒有採集到 CKM0 級的個體，本實驗中除了 CKM0 級的品系之外共篩選了 CKM1 至 CKM7 七個級別。先選出具有相同 CKM 值之埃及斑蚊成蟲各三對分別放入蚊籠中交配，交尾後三日以小白鼠供雌蚊吸血，並放入產卵杯。每隻雌蚊個別所產下的蟲卵待一週的發育後分別放入 25°C 的水中孵化，供給飼料飼養至蛹期。將蛹移入蚊籠中待其羽化。羽化後之成蟲於二十四小時內進行 CKM 級別的檢定。每次均計算子代中各種 CKM 級別的個體比例，在三組中挑選出具有與親代相同性狀比例最高的一組的子代個體三對再行自交 (self-cross)，如此步驟連續數代直到所有子代的 CKM 級別均與親代相同為止。

二、對各級 CKM 的純系品系的成蟲進行隨機擴增多型性 DNA

(一) 蚊蟲 genomic DNA 的製備

蚊蟲 genomic DNA 的萃取方法是將 Jowett (1986), Ballinger-Crabtree *et al.* (1992), Hoy (1994) 等篇報告所用的方法稍加修改而成。萃取前先自每個 CKM 級別的純系品系中挑選二個世代的雄蚊及雌蚊各 5 隻準備進行 genomic DNA 的萃取。萃取的步驟如後：將每一隻成蟲置於 1.5 mL 的離心管中，並加入 300 μ L 的分解緩衝液研磨蟲體，分解緩衝液中含有下列成分與數量：1 M 之 Tris-HCl, pH 8, 30 μ L; 3 M 之 NaCl, 5 μ L; 0.5 M 之 EDTA, pH 8, 30 μ L; 10% 之 SDS, 30 μ L; 60% 之蔗糖溶液, 85 μ L; 無菌水, 120 μ L。於離心管中加入 20 μ g/ml 的 proteinase K 溶液 5 μ L，並在 50-55°C 的水浴放置 40 分鐘。加入 60 μ L 的醋酸鉀溶液 (potassium acetate, 8 M, pH 8)，混合均勻後放置在冰浴 30 分鐘，再以 14,000 rpm 離心 20 分鐘。取出上層溶液加入 1 mL 的酚溶液 (phenol)，並於 4°C 的環境下輕搖晃 10 分鐘，再加入 1 mL 的氯仿 (Choloroform-IAA=24:1) 混合後，以 10,000rpm 離心 5 分鐘使酚-氯仿溶液與上層 DNA 溶液分離，取出上層 DNA 溶液重覆一次酚-氯仿的步驟。以 40 μ L 的 8 M, pH 5.6 的醋酸鉀溶液及 1 mL 的無水酒精加入含 DNA 的溶液，放置於 -30°C 至少一小時。然後以 14,000 rpm 離心 10 分鐘，將 DNA 沉積於離心管的底部；繼而以 1 mL 的 70% 酒精沖洗離心管的內壁與沉積的 DNA，離心後倒去酒精，重覆此步驟二至三次。最後將離心管倒置讓殘留在管壁的酒精完全揮發，只留下沉積的 DNA，再以 5 μ L 的 Tris-EDTA 緩衝液 (Tris, pH 8, 10 mM, EDTA, pH 8, 1 mM) 中將 DNA 溶解，並保存於 4°C 的冰箱中。

(二) 引子 (primer) 的製備

共用 11 組由 10 個核苷酸任意排列而成的寡核苷序列其 G+C 的含量在 50-80% 之間當作引子 (由台灣，台北 Oligonucleotide Synthesis 公司合成製造) 對 7 個品系 (每一品系之實驗對象包含二個世代，每一世代雄蚊及雌蚊各五隻) 之 genomic DNA 進行隨機增幅，這 11 組引子的名稱與核苷酸序列如下：

- A2 (5'-TGCCGAGCTG-3')、
- B1 (5'-GTTTCGCTCC-3')、
- B3 (5'-CATCCCCCTG-3')、
- B13 (5'-TTCCCCCGCT-3')、
- C4 (5'-CCGCATCTAC-3')、
- C7 (5'-GTCCCGACGA-3')、
- C9 (5'-CTCACCGTCC-3')、
- C13 (5' -AAGCCTCGTC)、
- C15 (5'-GACGGATCAG-3')、
- C16 (5'-CACACTCCAG-3')、
- C19 (5'-GTTGCCAGCC-3')。

(三) 隨機擴增多型性 DNA-聚合酶連鎖反應 (random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction, RAPD-PCR)

擴增反應條件的設定主要參考 Ballinger-Crabtree *et al.* (1992) 的方法作部分修改而成，每一次的反應之總體積為 25 μ L，包含：15.77 μ L 的無菌水，2.5 μ L 之 2 mM dNTPs, 2.63 μ L 之 InviTaq DNA polymerase buffer (100 mM, pH 9 之 Tris-HCl, 500 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 0.1% gelatin, 1% Triton X-100), 1 μ L 之 15ng/ μ L primer solution, 0.1 μ L 之 InviTaq DNA polymerase (0.5 units), 3 μ L 之 16-17 ng/ μ L 蚊蟲 template solution (約 50 ng DNA)，混合後滴進二滴礦物油 (mineral oil) 使其完全覆蓋在反應物上。擴增反應是在 Omni gene

temperature cycler (Hybaid Limited, Middlesex, UK) 機器中進行。反應的溫度循環程序設定如下：94°C, 4 min., 1 cycle; 94°C, 1 min., 36°C, 1 min., 72°C, 2 min., 45 cycles; 72°C, 5 min., 1 cycle。

(四) 多型性 DNA 的分析

擴增後的產物用水平膠體電泳將不同大小的 DNA 片段分開。其方法是將擴增反應所得的產物全部放入鑄有凹槽的 1.5% 的瓊脂凝膠 (agarose gel) 上。用 1x Tris-borate-EDTA (TBE) 當緩衝溶液 (Tris borate, 90 mM, EDTA, 2 mM)，同時在其他的凹槽中放入 100-bp (base pair) DNA ladder 作為測量 DNA 片段的分子標記 (marker)；在 50-volt 電壓下讓電泳跑約 1 hr。電泳後讓凝膠在溴化銨 (Ethidium bromide) 水溶液 (2 mg/300 mL) 中染色 10 分鐘後取出，再以紫外光 (UV light) 下檢查及照相。所得的照片再用 AAB 程式 (Advanced software package, American Applied Biotechnology, Fullerton, CA, USA) 協助判讀每個片段的大小。

為比較不同 CKM 的品系間多型性 DNA 的差異，試驗中用於比較的 DNA 片段是選擇在每一個 CKM 品系的個體當中在同一世代雌，雄性之間及個體間同質性最高的片段；但是在不同 CKM 品系之個體之間又是異質性程度較大者。用於估算品系間兩兩相比 (pairwise) 相似度的方法有二種，一為相似指數 (similarity index, SI)，其計算方法如下： $SI = 2 N_{AB} / (N_A + N_B)$ ，其中 N_{AB} 為 DNA 片段在兩兩比對的二個個體 (A 與 B) 均出現之片段的數目， N_A 、 N_B 是只在其中一個個體 (A 或 B) 出現之 DNA 片段數目。另一種方法是相配百分率指數 (percentage match, PM)。使用此法的原因是由於有些 DNA 片段只在某幾對比較時出現，在其他的個體作比對

時並未出現；當整體比較時，必須全盤考量，其計算的方法是 $PM = (N_{A, B})/N$ ，公式中的分子即 $N_{A, B}$ 是兩兩比對的二個個體均出現的 DNA 片段之數目與此二個個體均未出現的 DNA 片段之數目的和，分母 N 是所有品系或個體經 11 組引子擴增出來之 DNA 片段的總數。二個品系之間的差異可由公式：(1 - 兩者的相似度) 計算出來。再將所有品系或個體的差異依大小排成矩陣便可得到距離矩陣 (distance matrices)。根據距離矩陣用不加權算術平均值 (unweighted pair-group method using arithmetic average, UPGMA) 畫出 CKM1 至 CKM 7 等七個品系的埃及斑蚊的支序圖 (clustering dendrogram)。

結 果

一、各種 CKM 等級的蚊蟲的純系篩選

自高雄市採集之幼蟲羽化後的成蟲的 CKM 級別經判定後發現有 CKM1 至 CKM7 的個體，但並未發現任何 CKM0 的個體；而且其幼蟲會有共同孳生於同一個容器中的情形發生。為得到各 CKM 等級純系的埃及斑蚊，經過 3-14 代的累代篩選即可得到各 CKM 等級的純系品系。篩選過程中每個子代中各種 CKM 等級的個體所佔的比例如表一所示。

在此實驗結果中可以發現在同一次交配所產生的子代中，雄蟲的平均 CKM 等級都較雌蟲為低，此結果與許多前人研究的結果相同。根據 Hartberg *et al.* (1986) 之遺傳假說，控制此性狀的多基因系統亦同時受調節因子的影響，加上白鱗無法明確的量化，因此各相近之 CKM 等級的基因組合所表現出來的性狀會有重疊的部分。在篩選的過程中可以發現 CKM2-CKM6 品系其子代各 CKM 級別的頻率變動很大，不但篩選到純系性狀後代所需要

表一 各 CKM 品系純系累代篩選子代比例的變化

Table 1. Percentage of selected CKM progeny of each single CKM strain crossing in each generation

Generation	Percentage of progeny of single-strain crossings (%)						
	CKM1xCKM1	CKM2xCKM2	CKM3xCKM3	CKM4xCKM4	CKM5xCKM5	CKM6xCKM6	CKM7xCKM7
F1	82	26.2	16.7	14.9	12.8	10.7	33.6
F2	100	32.6	18.8	18.9	15.2	15.4	37.9
F3	100	32	23.2	23.5	21.4	26	46
F4		41.3	24.4	25.6	26.9	32	100
F5		57.5	36.4	27.9	33.3	42.7	100
F6		88.2	56.9	46.4	36.9	43.4	
F7		100	100	71.5	39.6	55.3	
F8		100	100	100	42.7	74.5	
F9				100	48.5	100	
F10					94.2	100	
F11					96.4		
F12					100		
F13					100		

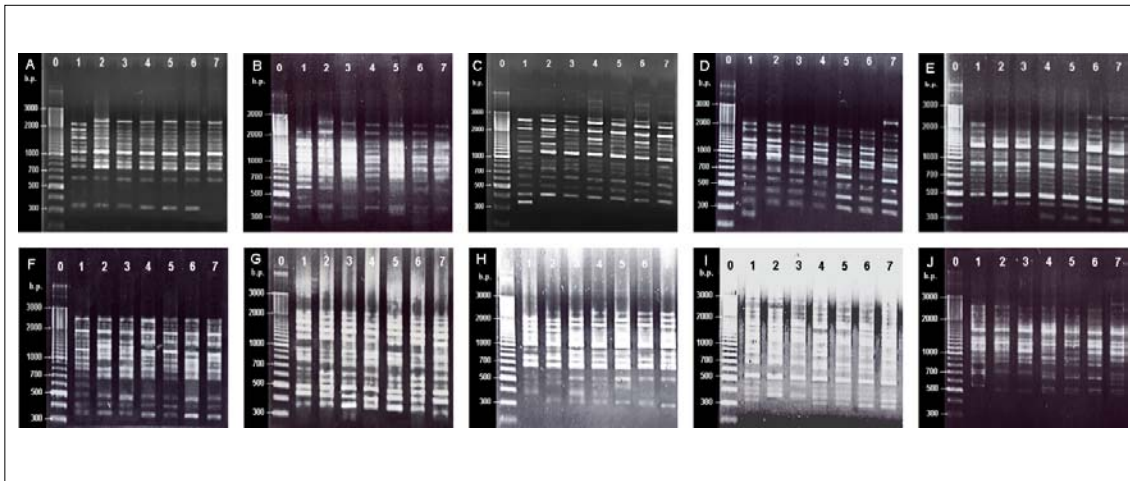
的時間比其他二者長，而且後代的死亡率很高。

二、各級 CKM 純系品系的成蟲之隨機擴增多型性 DNA

對於 140 隻分屬 7 個不同 CKM 等級的埃及斑蚊的純系品系之 DNA 分別以 11 個引子進行隨機擴增聚合酶連鎖反應，其中共有 1,540 次反應成功。實驗中發現以 B13 引子在各品系擴增出來的 12 條 DNA 所呈現出帶型完全相同；由於有差異的 DNA 帶型在區分各品系上具有較高的解析度，所以由 B13 引子複製出來的這些 DNA 片段在分析時完全不用。我們自其他的產物中挑選出各品系內在世代間、個體間及雌雄間均穩定出現的機率達 80% 以上的 DNA 片段用於支序分析上。分析中所包括的 DNA 片段來自 CKM1 有 147 個 DNA bands、CKM2 有 137 個、CKM3 有 137 個、CKM4 有 143 個、CKM5 有 141 個、CKM6 有 143 個、CKM7 有 146 個，如圖二所示。由 A2 等 10 個較具解析能力的引子的擴增之

下，CKM2-6 這五個品系在膠體電泳上所出現的 DNA 片段，不論在數量或位置上所出現的差異均較 CKM1 和 CKM7 為多，在支序分析 (cluster analyses) 時也足以區分此五個品系。根據擴增的反應產物，在 CKM1 品系出現的 DNA 片段的帶型與其他六個品系截然不同，因此支序分析顯示 CKM1 成爲一個獨立的族群。雖然由 CKM7 擴增出來 DNA 片段帶型的差異比 CKM1 少，但可以顯示 CKM7 與 CKM2-6 這一群不同。

作支序分析時，我們利用二種方法來計算各品系間的相似度，一爲 similarity index，另一爲 percentage match。前者只考慮品系間「共有 DNA bands」所造成的影響，而後者不僅考慮「共有 DNA bands」也考慮到「共無 DNA bands」所造成的影響。由兩兩比對計算出二個品系間的相似程度，便可換算成它們的差異度，然後便可得到距離矩陣（如表二、三）。最後再根據矩陣，採用 UPGMA 建構支序樹狀圖，所得的結果如圖三及圖四。



圖二 10 個具有解析能力引物所擴增出各品系的 RAPD 產物電泳帶型。

Fig. 2. Ethidium bromide-stained 1.5% agarose gel electrophoresis of products following RAPD-PCR of seven strains of *Aedes aegypti* (CKM1-CKM7) genomic DNA by using 10 primers (A: A2, B: B1, C: B3, D: C4, E: C7, F: C9, G: C13, H: C15, I: C16, J: C19). Lane 0: 100-b.p. DNA ladder; Lane 1: CKM1; Lane 2: CKM2; Lane 3: CKM3; Lane 4: CKM4; Lane 5: CKM5; Lane 6: CKM6; Lane 7: CKM7.

此二種方法所建構出的樹狀圖顯示，similarity index method (SI) 在各品系間所顯示的差異程度比 percentage match method (PM) 要小，其差異是由於後者將「共無的片段」也列入考慮。例如在 SI 的方法中 CKM2 和 CKM3 是完全沒有差異的，而 PM 的方法卻產生 0.0126 的差異，但事實上此二品系在 C15 和 C16 的擴增下各有一個 DNA band 的不同（如圖二），因此 PM 的方法在本研究中明顯的具有較高的解析力。通常在使用 RAPD-PCR 的技術時，如所用的引子數目不多，因此擴增出來的標記的數目也有限。如果利用這些標記探討差異程度不大之物種間的關係，必需要多方面的考量，才可能從有限的資料找出一個較為合理的解釋方向。本實驗所用的埃及斑蚊的七個品系的支序分析中，SI 及 PM 二種方法分析的結果相同：對於 CKM2-6 六個品系而言 CKM1 是屬於外群 (out-group)；CKM2 和 CKM3 形成一群，

CKM4-7 為一群，這種關係尚稱合理。若以 Hartberg *et al.* (1986) 之遺傳假說來看 CKM2 和 CKM3 為基因組合相似度很高的二個品系，而 CKM4 與 CKM5 亦是相似的品系但卻與 CKM2、CKM3 有明顯不同，CKM6 和 CKM7 在這一群中的關係則較遠。若從外型上來看，CKM2 和 CKM3 的個體間時常會有令人混淆的模糊地帶，此情況通常都會發生在第三腹節背板白鱗若有似無的從基部往後延伸，雖然此情況從鏡檢的過程中發現其發生的頻率不高，但也由此可見此二者從外型上推測，控制此性狀的基因機制應極為類似。CKM4、CKM5 和 CKM6 之間的情況與 CKM2、CKM3 類似，而至於 CKM7 則為此白鱗性狀較為極端的情形，不論從外型上、基因假說的推測上，都應與其他具有白鱗延伸的品系有所不同。累代篩選的實驗顯示，CKM7 在第 4 代便篩選到純系個體，CKM2-CKM6 則需 7 到 11 代才能篩選到純系個體，所以前

表二 以 SI 方法所計算出各品系之間的相對差異度

Table 2. Distance matrix based on the similarity index method

	CKM1	CKM2	CKM3	CKM4	CKM5	CKM6	CKM7
CKM1	0						
CKM2	0.0717	0					
CKM3	0.0717	0	0				
CKM4	0.0629	0.0429	0.0429	0			
CKM5	0.0704	0.0432	0.0504	0.007	0		
CKM6	0.0769	0.05	0.0571	0.028	0.0211	0	
CKM7	0.0865	0.0742	0.0831	0.0519	0.0453	0.0381	0

表三 以 %M 方法所計算出各品系之間的相對差異度

Table 3. Distance matrix based on the percentage match method

	CKM1	CKM2	CKM3	CKM4	CKM5	CKM6	CKM7
CKM1	0						
CKM2	0.1195	0					
CKM3	0.1258	0.0126	0				
CKM4	0.1132	0.0755	0.0755	0			
CKM5	0.1258	0.0755	0.0881	0.0126	0		
CKM6	0.1258	0.0881	0.1006	0.0503	0.0377	0	
CKM7	0.1572	0.1321	0.1447	0.0943	0.0818	0.0692	0

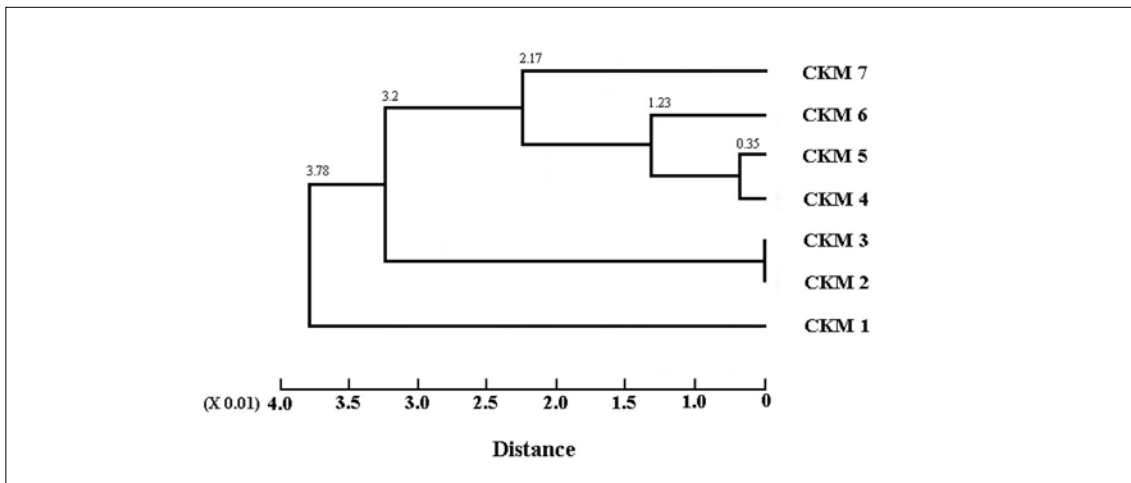
者在篩選到純系個體所需的代數比後者為少。從各品系篩選的過程中子代的數目來看（未列出），在篩選初期，鱗片為 CKM7 的個體通常比其他 CKM 等級的個體多。Hartberg *et al.* (1986), Sucharit and Surathin (1994) 也曾報告同樣的結果，因此白色鱗片較多的應是顯性性狀，CKM7 正為此顯性性狀的極度表現。

討 論

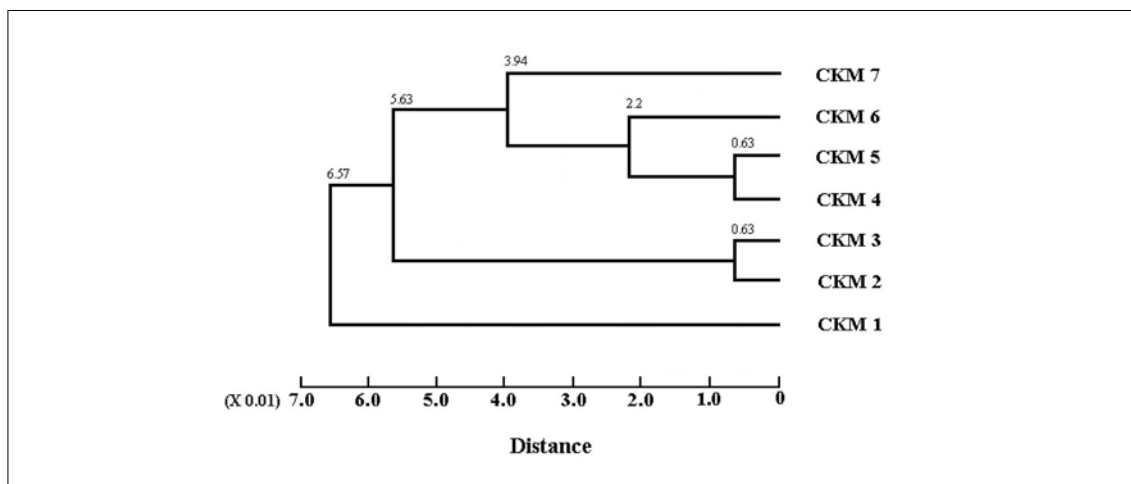
由於本實驗所用的埃及斑蚊的原始採集地是高雄市的三民區、苓雅區、及前鎮區，這三區全為人口稠密、房舍櫛比鱗次的都會型環境，這些蚊蟲的幼蟲原來也是孳生於人工容器的積水中。因此我們認為這二型（CKM1 及

CKM2-7) 的埃及斑蚊會混棲在這種環境中。Mattingly (1957) 認為深色型的埃及斑蚊 (CKM0) 主要孳生於森林樹洞、葉腋、椰子殼等天然積水處。研究期間我們曾經至台南縣東山、玉井、南化、左鎮，高雄縣旗山、美濃、六龜、茂林，屏東縣萬巒、三地門等地靠近山區的森林中採集進行埃及斑蚊的幼蟲，羽化的成蟲中並未找到 CKM0 的個體。截止目前的資料，只有生長在非洲之埃及斑蚊亞種 (*Aedes aegypti formosus*) 為深色型的埃及斑蚊，所以深色型的埃及斑蚊在台灣地區存在的可能性不大。

Hartberg *et al.* (1986) 之遺傳假說，埃及斑蚊的白色鱗片性狀是由多基因系統控制同時亦受調節因子的影響，加上白色鱗片數目無法明確的量化，因此各相近之 CKM 等級的



圖三 根據 SI 的差異距離所構建出的 UPGMA 樹狀圖。
 Fig. 3. Genetic distance dendrograms based on the similarity index using UPGMA.



圖四 根據 %M 的差異距離所構建出的 UPGMA 樹狀圖。
 Fig. 4. Genetic distance dendrograms based on the percentage match using UPGMA.

個體的基因所表現出來的性狀可能有重疊的部分。純系篩選的過程中我們曾發現 CKM2-CKM6 各品系自交所生的子代中，各級 CKM 的個體出現的頻率變異很大。不但篩選純系時需要自交的代數較多，生出的子代的死亡率也較高；這個結果與 Hartberg *et al.* (1986)所報告的情況不大相同。Hartberg *et*

al. (1986) 認為白色鱗片是由 3 組對偶基因所控制，如果每一次親代可能產生 8 種配子 (gametes)，其子代基因的組合共有 $8 \times 8 = 64$ 種。Hartberg *et al.* (1986) 將此 64 種基因組合依照白色鱗片表現的程度以 CKM1-8 等 8 個等級表示。根據這樣的組合可以有以下的預測：(1) CKM1xCKM1 不會產生 CKM4 以

上的後代。(2) CKM2xCKM2 不會產生 CKM5 以上的後代。(3) CKM3xCKM3 和 CKM4xCKM4 將產生所有 CKM 值的後代。(4) CKM5xCKM5 不產生 CKM4 以下之後代。(5) CKM6xCKM6 和 CKM7xCKM7 不會有 CKM5 以下的後代。但本實驗發現除了 CKM1xCKM1 這一組之外，其他各級別的純系交配所得之第一子代中都會出現其他 CKM 級別的個體（結果未列出）；這個結果有待數學模擬作進一步的分析。

雖然埃及斑蚊在成蟲期可利用腹部背板白鱗分布來區分其型別，如果碰到樣本是卵、幼蟲、蛹或是鱗片已部分掉落的成蟲則無法利用此一表型來區分。此時就必須將樣本的 DNA 萃取出來再藉 RAPD-PCR 的技術以適當的引子加以隨機擴增，參照本實驗所得之 RAPD 的帶型資料，即可鑑定出埃及斑蚊的型別。RAPD-PCR 擴增反應的另一項優點為只需少量的 DNA 作模板，因此即使是僅用成蟲的足所萃取的核酸即可進行擴增反應。整個過程所花費的時間僅需數小時，所以此法是一種快速方便的鑑定方法。

隨機擴增多型性 DNA 的實驗結果顯示 CKM1 為一外群，說明了模式型的埃及斑蚊與淺色型埃及斑蚊之間不只在表型上不同，此一技術也可以證明這二型的埃及斑蚊在 DNA 序列的排列上可能有差異。Ballinger-Crabtree *et al.* (1992) 以 RAPD-PCR 的方法找出 3 個可以區分深色型和典型的埃及斑蚊的引子，本實驗另外找出 7 個引子，藉它們擴增出來的 DNA 帶型也可以明顯地區別典型及淺色型的埃及斑蚊。埃及斑蚊為台灣南部地區傳染登革熱之主要病媒蚊，我們採集時發現此二型埃及斑蚊可以混合生長於相同的生態席位 (niche)。雖然至今尚無報告比較此二型的埃及斑蚊在傳播登革熱病毒能力方面有無差

異；如果此二型的埃及斑蚊傳播登革熱病毒的能力不同，則本實驗所得的結果將有助於的鑑識出傳病力較強的病媒蚊。

誌謝

本試驗承蒙國科會 NSC-86-2314-010-072 及 NSC-87-2314-010-072 之經費補助，文稿的撰寫承蒙國立台灣大學昆蟲系張慧羽教授、中央研究院動物研究所研究員馬堪津教授及寇融博士提供寶貴建議與指教，在此謹致謝忱。

引用文獻

- Ballinger-Crabtree, M. E., W. C. Black IV, and B. R. Miller.** 1992. Use of genetic polymorphisms detected by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47(6): 893–901.
- Failloux, A. B., M. Vazeille, and F. Rodhain.** 2002. Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *J. Mol. Evol.* 55: 653–663.
- Hartberg, W. K., C. K. Meek, and K. R. Williams.** 1986. A model for polygenic inheritance of abdominal tergal scale pattern in *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2(4): 490–502.
- Hoy, M. A.** 1994. Some basic tools: how to cut, paste, copy, measure, and visua-

- lize DNA. pp. 125–152. *In*: M. A. Hoy, ed. *Insect Molecular Genetics*. Academic Press, London.
- Jowett, T.** 1986. Preparation of nucleic acids. pp. 275–286. *In*: D. B. Roberts, ed. *Drosophila: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, UK.
- Jupp, P. G., A. Kemp, and C. Frangos.** 1991. The potential for dengue in South Africa: morphology and the taxonomic status of *Aedes aegypti* populations. *Mosq. Systemat.* 23(3): 182–190.
- Jupp, P. G., and B. M. McIntosh.** 1990. *Aedes furcifer* and other mosquitoes as vectors of chikungunya virus at Mica, northeastern Transvaal, South Africa. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 6: 415–420.
- Kemp, A., and P. G. Jupp.** 1991. Potential for dengue in South Africa: mosquito ecology with particular reference to *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 6: 415–420.
- Leahy, S. M. G., R. C. VandeHey, and K. S. Booth.** 1978. Differential response to oviposition site by feral and domestic populations of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.* 68: 455–463.
- Machdo-Allison, C. E., and G. B. Craig, Jr.** 1972. Geographic variation in resistance to desiccation in *Aedes aegypti* and *A. atropalpus* (Diptera, Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 65: 542–547.
- Mattingly, P. F.** 1957. Genetical aspects of the *Aedes aegypti* problem, I. Taxonomy and bionomics. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 51: 305–320.
- McClelland, G. A. H.** 1960. A preliminary study of the genetics of abdominal color variations in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 54: 305–320.
- McClelland, G. A. H.** 1974. A worldwide survey of variation in scale pattern of the abdominal tergum of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Trans. R. Entomol. Soc. Lond.* 126: 239–259.
- McIntosh, B. M., P. G. Jupp, and J. DeSousa.** 1972. Mosquitoes feeding at two horizontal levels in gallery forest in Natal, South Africa, with reference to possible vectors of chikungunya virus. *J. Entomol. S. Soc. Afr.* 35: 81–90.
- Mogi, M., W. Choochote, T. Okazawa, C. Khamboonruang, and P. Suwanpanti.** 1989. Scale pattern variations of *Aedes aegypti* in Chiang Mai, northern Thailand. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 5(4): 529–533.
- Sucharit, S., and K. Surathin.** 1994. The occurrence of *Aedes aegypti* Linnaeus variety or form *queenslandensis* Theobald in Thailand. *Mosq.-Borne Dis. Bull.* 11(4): 122–126.
- Tabachnick, W. J., L. E. Munstermann, and J. R. Powell.** 1979. Genetic distinctness of sympatric forms of

Aedes aegypti in East Africa.
Evolution 33: 287–295.

Trips, M., and W. Hausermann. 1975. Demonstration of differential domesticity of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae) in Africa by mark-release-recapture. Bull. Entomol. Res. 65: 199–208.

VandeHey, R. C., S. M. G. Leahy, and K. S. Booth. 1978. Analysis of colour variations in feral, peridomestic and domestic populations of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Bull. Entomol. Res. 68: 443–453.

附註：

「連續發生於其他腹節上」是指腹節背面的白色鱗片會從第一腹節延伸至第二腹節或其他的腹節。白色鱗片連續延伸範圍最大的是從第一腹節至第七腹節的背面都有白鱗覆蓋。

收件日期：2003年5月22日

接受日期：2003年7月29日

Use of the Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) to Distinguish Variations of *Aedes aegypti* based on Abdominal Tergal Scales

Yu-Cheng Su and Err-Lieh Hsu Department of Entomology, National Taiwan University, Taipei 106, Taiwan, R.O.C.

Chau-Mei Ho* Department of Parasitology, National Yang-Ming University, Taipei 112, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

There is much variation in the distribution of white scaling on the abdominal tergites of *Aedes aegypti*. The C. K. Meek's (CKM) classification system was used to identify and rank eight classes in the abdominal scale patterns, but only seven classes were found in Taiwan, including CKM1 which was generalized as the type form of *Aedes aegypti* and CKM2 to CKM7 which were concluded to be as the pale form. Pure CKM strains were selected by single-pair matings, and genomic DNA of these mosquitoes was extracted in order to detect the variations in RAPD patterns. The RAPD fragments profiles of seven strains with different scale pattern were analyzed and genetic similarities were estimated between each two strains using two different statistic methods. The UPGMA dendrogram method illustrated the relatedness of these strains, and both statistical methods assorted these strains into two major groups: the type form and the pale form. But the genetic distance between each pair of strains differed using these two methods. These results indicate that the RAPD-PCR technique is sufficiently sensitive for studies of mosquito molecular taxonomy, especially at intra-species level.

Key words: *Aedes aegypti*, abdominal tergal scale, CKM, random amplified DNA polymorphism, intra-specific variation