



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Molecular Identification of Multiplex-PCR and PCR-RFLP for the Quarantine Pest, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) 【Research report】

Multiplex-PCR及PCR-RFLP於檢疫害蟲西方花薊馬的鑑定【研究報告】

Jgun Sian Lin and Wen-Bin Yeh* Chin-Ling Wang
林峻賢、葉文斌* 王清玲

*通訊作者E-mail: wbyeh@kmu.edu.tw

Received: 2003/07/10 Accepted: 2003/12/20 Available online: 2003/12/01

Abstract

The polyphagous insect, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Fo), causes serious damage to economic plants in the world, whereas it is not found on the list of quarantine pests in Taiwan. However, the pest is occasionally found in imported agriculture products. In this study, molecular characters were used to identify the nymph stage of this quarantine pest; the onion thrips, *Thrips tabaci* Lindeman, found mostly in imported agriculture products was used as a reference sample. Molecular markers including both 28S rDNA and 16S rDNA sequences were analyzed. For 28S rDNA, 22 individuals of these two species were used, and intraspecific sequence variation were not found; interspecific variation was 12.3% in 689 bp. For 16S rDNA, 18 individuals of these two species were used, and intraspecific sequence variations were nearly zero, while interspecific variation was 17.5% between these two species. Specific primers designed from 28S rDNA and restriction enzyme from 16S rDNA were respectively applied for multiplex-PCR and PCR-RFLP to identify *F. occidentalis*. Results showed that application of the two molecular markers was useful in identifying this quarantine pest.

摘要

西方花薊馬 (*Frankliniella occidentalis* (Pergande))，簡稱Fo) 為世界性危害嚴重的農業害蟲，尚未在台灣田野發現，被列為檢疫害蟲；然而在進口的農作產品上，卻常檢測出此害蟲。因此本研究即針對其無法明確鑑定的若蟲階段，應用分子形質，以期達到鑑定的目標；除西方花薊馬之外，採用進口作物上最常檢測到的蔥薊馬 (*Thrips tabaci* Lindeman，簡稱Tt) 為比對物種。分析的分子形質包括28S rDNA及16S rDNA；其中28S rDNA主要的複製長度約689個鹼基，Fo及Tt分別有8及14隻個體，未發現種內變異，兩種間差異為12.3%；16S rDNA複製長度約300 bp，Fo及Tt分別有7及11隻個體，蔥薊馬種內最大變異為3個鹼基位，兩種間差異為17.5%。應用已知之序列採用專一性引子及酵素切位，進行multiplex-PCR及PCR-RFLP兩分析方法，分別針對單一及混合之害蟲樣品，進行鑑定之分析運用；結果顯示兩種方法均可如期達到鑑定的目的。

Key words: *Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*, multiplex-PCR, PCR-RFLP, 16S rDNA, 28S rDNA

關鍵詞: 西方花薊馬、蔥薊馬、multiplex-PCR、PCR-RFLP、16S rDNA、28S rDNA

Full Text: [PDF \(1.82 MB\)](#)

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

Multiplex-PCR 及 PCR-RFLP 於檢疫害蟲西方花薊馬的鑑定

林峻賢 葉文斌* 高雄醫學大學生物系
王清玲 行政院農業委員會農業試驗所應用動物系

摘要

西方花薊馬 (*Frankliniella occidentalis* (Pergande), 簡稱 Fo) 為世界性危害嚴重的農業害蟲，尚未在台灣的田野發現，被列為檢疫害蟲；然而在進口的農作產品上，卻常檢測出此害蟲。因此本研究即針對其無法明確鑑定的若蟲階段，應用分子形質，以期達到鑑定的目標；除西方花薊馬之外，採用進口作物上最常檢測到的蔥薊馬 (*Thrips tabaci* Lindeman, 簡稱 Tt) 為比對物種。分析的分子形質包括 28S rDNA 及 16S rDNA；其中 28S rDNA 主要的複製長度約 689 個鹼基，Fo 及 Tt 分別有 8 及 14 隻個體，未發現種內變異，兩種間差異為 12.3%；16S rDNA 複製長度約 300 bp，Fo 及 Tt 分別有 7 及 11 隻個體，蔥薊馬種內最大變異為 3 個鹼基位，兩種間差異為 17.5%。應用已知之序列採用專一性引子及酵素切位，進行 multiplex-PCR 及 PCR-RFLP 兩分析方法，分別針對單一及混合之害蟲樣品，進行鑑定之分析運用；結果顯示兩種方法均可如期達到鑑定的目的。

關鍵詞：西方花薊馬、蔥薊馬、multiplex-PCR、PCR-RFLP、16S rDNA、28S rDNA

前言

薊馬種類之個體細小，分佈廣泛，危害各種經濟作物，不僅造成農作經濟上的損失 (Robb and Parrella, 1991; Tommasini and Maini, 1995)，若在進口農作產品上發現薊馬幼蟲，也會減緩檢疫的速度。其中，纓翅目 (Thysanoptera) 薊馬科 (Thripidae) 之西方花薊馬危害較嚴重，為世界性分佈之害蟲，最早發現於美國加州 (Bryan and Smith,

1956)。此害蟲危害的作物種類甚為廣泛，一般經濟作物 (胡瓜、馬鈴薯、甜菜、豆類、草莓、苜蓿、花生)、花卉 (菊花、斑葉烏頭、百合薊草花及各類盆栽) 及木本的植物 (油桃、梨樹、蘋果、棉花等)，總計 62 科 244 種以上的作物均可受其危害 (Wang, 2002)。其危害地區從熱帶 (馬來西亞) 到寒帶 (加拿大) 均有，是一適應力極強的害蟲；近來雖有入侵台灣之傳聞，但尚無正式入侵之報導出現。

西方花薊馬體長約 2 mm，一般為淡黃

*論文聯繫人
e-mail: wbyeh@kmu.edu.tw

色，也有深黃色的個體；其觸角 8 節；前胸有 4 對長毛；前胸後緣的長毛之間有一對短毛；後胸前緣中間有一對毛；前翅有兩排整齊的毛列；腹背 V-VIII 節兩側有完整的齒形縫線，在第 VIII 節延伸到氣孔；腹部有分散的剛毛 (Mound and Kibby, 1998)。西方花薊馬一年十個世代以上，在夏天一個世代不到一星期，在冬季低溫時一世代約 2-5 個星期 (Parker *et al.*, 1995)；每次產卵量約 40 顆以上。其危害部位以葉芽、花苞及花瓣為主，也會在果實表面產生毀損的斑點及皺褶。另外，此薊馬是植物病毒 TSWV (tomato spotted wilt tospovirus, Bunyaviridae) 的主要媒介，而 TSWV 病毒可以危害 91 餘種經濟作物 (Mertelik and Mokra, 1998)。此外，此薊馬也會傳播桿菌 *Erwinia* (de Vries *et al.*, 2001)。雖然目前可以用改良的黃色或藍色黏蟲板捕捉，也可以用薰蒸 (SO₂, CO₂ 或 N₂)、低溫處理及天敵，如盲蝽春-Miridae、蟻類-*Tetranychus* spp. 及蟲生真菌等，防治此種薊馬，但其效果卻有限 (Castane *et al.*, 1996; Montserrat, 1998; Venzon *et al.*, 2000; Held *et al.*, 2001; Palevsky *et al.*, 2001; Pearsall and Myers, 2001; Yokoyama *et al.*, 2001)。

薊馬的鑑定分類通常以成蟲為依據，然而海關檢查到的薊馬，不少是屬於幼蟲期，常造成鑑定上的困擾。因此本研究擬從分子形質著手，分析西方花薊馬的分子特徵，藉以用於此薊馬的幼期鑑定。因遺傳物質於昆蟲各生活期的分子形質是相同的，而且分子形質對於物種之鑑定較不限於外部形態的特徵。另外，西方花薊馬與台灣花薊馬非常相似，其成蟲雖可從複眼後方的長剛毛區辨 (西方花薊馬複眼後長剛毛與小眼第三對剛毛約等長；而台灣花薊馬則僅為 0.3 倍左右)，但在若蟲階段則無法辨

識，因此薊馬的分子形質資料建立後，可提供檢疫相關人員，以分子形質快速鑑定薊馬的種類。

目前常應用於分類及鑑定的分子形質大致有下列諸項：逢機擴增多形性去氧核糖核酸 (random amplified polymorphic DNA, 簡稱 RAPD)；multiplex-PCR；衛星 DNA (satellite DNA)；限制酵素圖譜 (restriction fragment length polymorphism, 簡稱 RFLP)；DNA 序列等 (Avis, 1994)。本文應用建立之後的 28S rDNA 及 16S rDNA 序列，開發 multiplex-PCR 及 RFLP 等兩方法，應用於西方花薊馬的快速鑑定。

材料與方法

標本來源

採用的薊馬標本有西方花薊馬 (*Frankliniella occidentalis* Pergande)，簡稱 Fo) 及蔥薊馬 (*Thrips tabaci* Lindeman, 簡稱 Tt)；西方花薊馬由農試所王清玲博士及商檢局新竹分局提供。新鮮標本採得後均浸泡於 90% 酒精保存，西方花薊馬及蔥薊馬分別有 8 及 19 隻個體，相關資料列於表一。

薊馬 DNA 的萃取

應用 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)，萃取單隻薊馬 DNA。流程如下：取 0.5 M EDTA 溶液 (pH = 8.0) 120 μ l、核酸萃取液 (nuclei lysis solution) 500 μ l、蛋白酵素 K (proteinase K, 20mg/ml) 17.5 μ l 及欲研磨之薊馬置於 1.5 ml 微量離心管中研磨；用彈性膠膜 (Parafilm) 將 1.5 ml 微量離心管封起，放置於 55 μ l 恆溫箱反應 3 小時；取 RNase 溶液 3 μ l 加入 1.5 ml 微量離心管，上下翻轉 2~5 次，於 37 $^{\circ}$ C 反應

表一 西方花薊馬及蔥薊馬的樣本來源國家: WF 為 western flower thrips 的俗名縮寫; 羅馬數字 I、IV 及其後的數字均為採樣代號。

Table 1. Sample locality of *Frankliniella occidentalis* (Fo) and *Thrips tabaci* (Tt). WF means the common name of the west flower thrips; symbols I, IV, and the following numbers indicate the collection order.

Abbrev. of Fo	Sample locality	Abbrev. of Tt	Sample locality	Abbrev. of Tt	Sample locality
Fo-WF1	Japan	Tt	Taiwan	Tt-I-20-1-2	Vietnam
Fo-WF2	Japan	Tt-I-23-1-9	New Zealand	Tt-I-20-1-3	Vietnam
Fo-WF3	Japan	Tt-I-23-1-11	New Zealand	Tt-I-47-3-2	Vietnam
Fo-WF4	Japan	Tt-I-63-1-8	New Zealand	Tt-I-56-4-1	Vietnam
Fo-WF5	Malaysia	Tt-I-63-1-9	New Zealand	Tt-I-61-1-1	Vietnam
Fo-WF6	Malaysia	Tt-I-63-2-1	New Zealand	Tt-IV-183-2-17	USA
Fo-WF7	Malaysia	Tt-I-66-1-3	New Zealand	Tt-IV-183-2-18	USA
Fo-WF8	South Africa	Tt-I-50-1-1	Korea	Tt-IV-183-2-25	USA
		Tt-I-57-3-1	Korea	Tt-IV-191-2-1	USA
		Tt-I-81-2-1	Korea		

15~30 分鐘 (進行前先將樣品置於室溫 5 分鐘); 加蛋白質沉澱液 (protein precipitation solution) 200 μ l 至 1.5 ml 微量離心管中, 劇烈震盪 20 秒後, 置於冰上 5 分鐘; 於 4 $^{\circ}$ C 離心 13000 rpm 4 分鐘; 取上清液到含有異丙醇 600 μ l 的 1.5 ml 微量離心管中, 翻轉數次, 混合均勻, 離心 13000 rpm 1 分鐘; 倒掉上清液, 加入 70% 酒精 600 μ l, 翻轉幾次, 混合均勻, 離心 13000 rpm 1 分鐘; 倒掉上清液, 乾燥過後, 加去離子水 100 μ l 至 1.5 ml 微量離心管中。純化之薊馬 DNA 置於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱備用。

28S rDNA 及 16S rDNA 區段的複製

每一 0.2 ml 微量離心管依序加入去離子水 84.4 μ l、10X SuperTaq buffer 10 μ l、正反向引子各 2 μ l (10 μ M)、25 mM dNTP 0.8 μ l、酵素 SuperTaq (5 U/ μ l) 0.8 μ l 及 DNA 模板 2 μ l。共使用 5 組引子對分別進行 PCR 反應, 28S rDNA 之引子參考 Kjer *et al.* (1994) 發表的序列設計; 16S

rDNA 之引子參考 Yeh *et al.* (1997); 引子對 (正向引子; 反向引子) 分別如下: (28Sa; 28Sb)、(28Sc; 28Sd)、(28Se; 28Sf)、(28Sg; 28Sh) 及 (16S214; 16S22), 其序列詳列於表二。複製 28S rDNA 的反應流程為: 步驟一, 於 94 $^{\circ}$ C 預熱 2 分鐘; 步驟二, 於 94 $^{\circ}$ C 50 秒、50 $^{\circ}$ C 40 秒及 72 $^{\circ}$ C 50 秒, 共 30 個循環; 步驟三, 於 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘。複製 16S rDNA 流程設定為: 步驟一, 於 95 $^{\circ}$ C 預熱 2 分鐘; 步驟二, 於 95 $^{\circ}$ C 40 秒、52 $^{\circ}$ C 1 分鐘及 72 $^{\circ}$ C 50 秒, 共 30 個循環; 步驟三, 於 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘。

電泳分析

DNA 複製完成之後, 於 1% 洋菜膠進行電泳分析。複製產物取 5 μ l 跟 6X 染劑 1 μ l 混合均勻, 注入電泳槽孔; 用 1 kb DNA 梯度條帶為參考標幟。電壓設定為 100 伏特 (V) 進行電泳 30~40 分鐘。將洋菜膠取出, 用溴化乙錠 (ethidium bromide) 染色 20 分鐘; 於紫外光箱中觀察並照相, 確定複製產物的濃度

表二 使用之引子代號及其序列，上下游引子分別以 (+) 及 (-) 表示。

Table 2. Primer abbreviations and their sequences in this study. Upstream and downstream primers are indicated by plus (+) and minus (-) signs, respectively.

Abbrev. of primer		Nucleotide sequences
28Sa	(+)	5'-GACCCGTCCTTGAACCACGGAGTCT-3'
28Sb	(-)	5'-TTCGGCAGGTGAGTTGTTACA-3'
28Sc	(+)	5'-TGTAACAACCTCACCTGCCGAA-3'
28Sd	(-)	5'-AATCCTTATCCCGAAGTTACGGA-3'
28Se	(+)	5'-TCCGTAACCTTCGGGATAAGGATT-3'
28Sf	(-)	5'-TGTACCGCCCCAGTCAAACCT-3'
28Sg	(+)	5'-AGTTTGACTGGGGCGGTACA-3'
28Sh	(-)	5'-CTTAGAGGCGTTCAGGCATAA-3'
28Sd-Fo	(-)	5'-AGCAAGACTCCGACATCGAC-3'
28Sd-Tt	(-)	5'-GGAAGGCTGGACCATAC-3'
28Se-Fo1	(+)	5'-TCGGTTCTTGTGTCGGATG-3'
28Se-Tt1	(+)	5'-ACGTGGAGCCGGCGGGCT-3'
28Se-Fo2	(+)	5'-GGTTGGACGGGGCGCGC-3'
28Se-Tt3	(+)	5'-CTCCTTGTGTGATCCGTT-3'
28Sf-Fo	(-)	5'-CATCCGACACAAGAACCGA-3'
28Sf-Tt	(-)	5'-AGCCCGCCCGCTCCACGT-3'
16S214	(+)	5'-GGACGATAAGACCCT-3'
16S22	(-)	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCA-3'

及大小是否正確。將複製成功的 PCR 產物保存於 -20°C，再進行 PCR 產物之純化。

28S rDNA 及 16S rDNA 產物的純化

PCR 產物的純化步驟按照試劑組 (QIAGEN) 內的說明；取適量的回收產物進行電泳分析，評估所純化 PCR 產物的濃度。

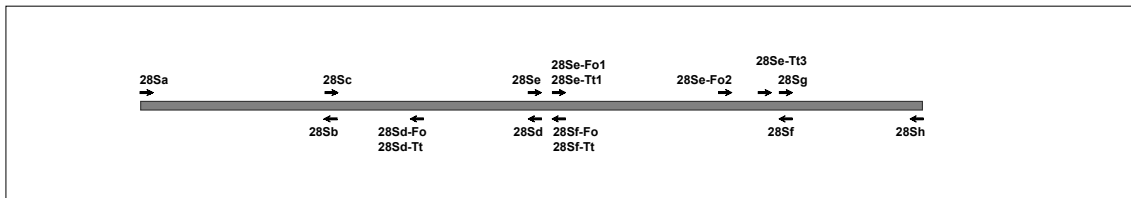
28S rDNA 及 16S rDNA 序列的定序

純化的 PCR 產物各取 8 µl (20 ng/µl)，分別跟 0.8 µM 的正反向引子 4 µl 混合均勻。選用 dye-terminator 的螢光試劑組 (ABI) 進行 PCR 雙向之定序反應，再經過自動定序分

析儀，得到 DNA 序列。16S rDNA 及 28S rDNA 序列已至登入基因庫，序號分別為 AY523638-AY523655 及 AY523384-AY523405。

序列的分析

以 GCG (<http://bioinfo.nhri.org.tw>)、Clustal (Thompson *et al.*, 1997) 及 MEGA2 (Kumar *et al.*, 2001) 等軟體進行 DNA 序列分析。反向引子 28Sb、28Sd、28Sf、28Sh 及 16S22 定序得到之反向負股 DNA 於 GCG 軟體逆位轉股後，再與正向之 DNA 相互校正，得到最正確之各樣品序列。全長之 28S rDNA 於軟體 ClustalW 排序比對。序列分別



圖一 複製 28S rDNA 之相關引子及其分佈位置。

Fig. 1. Designed primers and their distributions in the amplification of the 28S rDNA sequence.

整理好後，再用 MEGA2 軟體分析，計算樣品之間的差異大小，並設計 28S rDNA 之專一性引子及搜尋 16S rDNA 的酵素切位。

Multiplex-PCR 及 PCR-RFLP 於西方花薊馬的鑑定

運用已知的 28S rDNA 序列，分別設計西方花薊馬及蔥薊馬的專一性引子，進行 multiplex-PCR 的鑑定運用，專一性引子及引子之相對位置分別列於表二及圖一。單一或混合的 DNA 樣品於特殊配對的引子組合內，進行 PCR 的增幅，行電泳反應顯像。另外使用可以區辨西方花薊馬及蔥薊馬的酵素切割 16S rDNA 之 PCR 產物，行電泳反應顯像。

結果與討論

28S rDNA 及 16S rDNA 之變異分析

西方花薊馬 28S rDNA 全長為 2790 bp，而蔥薊馬 28S rDNA 全長為 2697 bp (圖二)。此外，針對 22 個樣品的 28Sab 區段 689 鹼基分析，發現其 G、A、T 及 C 的含量彼此相近，所佔百分比平均分別為 28.7%、26.6%、22% 及 22.7%。序列彼此間的比對差異可以看出，來自世界各國西方花薊馬的 8 個樣品及蔥薊馬 14 個樣品，均未發現種內變異；而兩種薊馬 689 個鹼基之間的差異比例則高達 12.3%。

西方花薊馬及蔥薊馬 16S rDNA 的複製

長度為 300 bp (圖三)。其 G、A、T 及 C 的含量彼此差異甚大，所佔百分比平均分別為 14.2%、45.8%、29% 及 11%，AT 比例高達 75%。西方花薊馬的 7 個樣品未偵測到種內的變異，而蔥薊馬的 11 個樣品則偵測到 3 個鹼基的差異，兩種薊馬之間的差異為 17.5%。

Multiplex-PCR 之分子形質於西方花薊馬之鑑定

Multiplex-PCR 應用兩條或兩條以上的引子，同時複製不同的產物用以偵測其內的產物來源。利用這一方法，針對西方花薊馬及蔥薊馬設計種專一性引子，來偵測樣本中是否含有所要檢疫的害蟲。每一組 multiplex-PCR 均加入正負兩類對照組加以比對；其中正對照組所添加的引子為共同的正向引子 28Sa 及共同的反向引子 28Sb (圖四中之符號 "+")，用以偵測 DNA 模板是否正常；負對照組則不添加任何 DNA 模板，用以偵測操作過程有無污染 (圖四中之符號 "-")。DNA 模板分別為蔥薊馬 (Tt)、西方花薊馬 (Fo) 及混合樣品 Tt 加 Fo。

應用西方花薊馬及蔥薊馬的引子 28Sc 為共同的正向引子，反向引子同時加入西方花薊馬的 28Sd-Fo 及蔥薊馬的 28Sf-Tt 等專一性引子。由結果可知，模板僅有蔥薊馬 (Tt) 時，只會複製出 28Sc 及 28Sf-Tt 這一區段約 830 bp；模板僅有西方花薊馬 (Fo) 時，只會複製出 28Sc 及 28Sd-Fo 這一區段約 330 bp；DNA

28S_a

```

Fo-WF1 GACCCGTCCT GAACCACGGA GTCTAACATG TGCGCGAGTC ATTGGGCTCT GCGAAACCTA AAGGCGAAAT GAAAGTGAAG GCCACGCACT TGTGCTGGTG
Fo-WF2 .....
Fo-WF3 .....
Fo-WF4 .....
Fo-WF5 .....
Fo-WF6 .....
Fo-WF7 .....
Fo-WF8 .....
Tt .....
Tt-I-20-1-2 ..... G... A..... CA.T..GCTC T..... AAGGT- GAG T.A..CT.-
Tt-I-20-1-3 ..... G... A..... CA.T..GCTC T..... AAGGT- GAG T.A..CT.-
Tt-I-23-1-9 ..... G... A..... CA.T..GCTC T..... AAGGT- GAG T.A..CT.-
Tt-I-47-3-2 ..... G... A..... CA.T..GCTC T..... AAGGT- GAG T.A..CT.-
Tt-I-56-4-1 ..... G... A..... CA.T..GCTC T..... AAGGT- GAG T.A..CT.-
Tt-I-57-3-1 ..... G... A..... CA.T..GCTC T..... AAGGT- GAG T.A..CT.-
Tt-I-63-1-8 ..... G... A..... CA.T..GCTC T..... AAGGT- GAG T.A..CT.-
Tt-I-63-2-1 ..... G... A..... CA.T..GCTC T..... AAGGT- GAG T.A..CT.-
Tt-I-66-1-3 ..... G... A..... CA.T..GCTC T..... AAGGT- GAG T.A..CT.-
Tt-I-81-2-1 ..... G... A..... CA.T..GCTC T..... AAGGT- GAG T.A..CT.-
Tt-IV-183-2-17 ..... G... A..... CA.T..GCTC T..... AAGGT- GAG T.A..CT.-
Tt-IV-183-2-25 ..... G... A..... CA.T..GCTC T..... AAGGT- GAG T.A..CT.-
Tt-IV-191-2-1 ..... G... A..... CA.T..GCTC T..... AAGGT- GAG T.A..CT.-

Fo-WF1 CTTAGGGGTG ATGGTCGTTC CT-ACACGGG CGGCCCGCAA CCCCAGGGCG TCTCGTTCCT TTTGAGAAGT GCGCACCCA GAGCGTACAC GTTGGGACCC
Fo-WF2 .....
Fo-WF3 .....
Fo-WF4 .....
Fo-WF5 .....
Fo-WF6 .....
Fo-WF7 .....
Fo-WF8 .....
Tt .....
Tt-I-20-1-2 ..... C..... G... A..CAT.C TT..... T G...A.C... ..G..A CA...TT ..C..T ..T...
Tt-I-20-1-3 ..... C..... G... A..CAT.C TT..... T G...A.C... ..G..A CA...TT ..C..T ..T...
Tt-I-23-1-9 ..... C..... G... A..CAT.C TT..... T G...A.C... ..G..A CA...TT ..C..T ..T...
Tt-I-47-3-2 ..... C..... G... A..CAT.C TT..... T G...A.C... ..G..A CA...TT ..C..T ..T...
Tt-I-56-4-1 ..... C..... G... A..CAT.C TT..... T G...A.C... ..G..A CA...TT ..C..T ..T...
Tt-I-57-3-1 ..... C..... G... A..CAT.C TT..... T G...A.C... ..G..A CA...TT ..C..T ..T...
Tt-I-63-1-8 ..... C..... G... A..CAT.C TT..... T G...A.C... ..G..A CA...TT ..C..T ..T...
Tt-I-63-2-1 ..... C..... G... A..CAT.C TT..... T G...A.C... ..G..A CA...TT ..C..T ..T...
Tt-I-66-1-3 ..... C..... G... A..CAT.C TT..... T G...A.C... ..G..A CA...TT ..C..T ..T...
Tt-I-81-2-1 ..... C..... G... A..CAT.C TT..... T G...A.C... ..G..A CA...TT ..C..T ..T...
Tt-IV-183-2-17 ..... C..... G... A..CAT.C TT..... T G...A.C... ..G..A CA...TT ..C..T ..T...
Tt-IV-183-2-25 ..... C..... G... A..CAT.C TT..... T G...A.C... ..G..A CA...TT ..C..T ..T...
Tt-IV-191-2-1 ..... C..... G... A..CAT.C TT..... T G...A.C... ..G..A CA...TT ..C..T ..T...

Fo-WF1 GAAAGATGGT GAACATGCC TGCGCAGGAC GAAGTCAGGG GAAACCCCTGA TGGAGGTCCG TAGCGATTCT GACGTGCAA TCGATCGTG GACCTGGGTA
Fo-WF2 .....
Fo-WF3 .....
Fo-WF4 .....
Fo-WF5 .....
Fo-WF6 .....
Fo-WF7 .....
Fo-WF8 .....
Tt .....
Tt-I-20-1-2 ..... ..... GT ..... A.C ..... A .....
Tt-I-20-1-3 ..... ..... GT ..... A.C ..... A .....
Tt-I-23-1-9 ..... ..... GT ..... A.C ..... A .....
Tt-I-47-3-2 ..... ..... GT ..... A.C ..... A .....
Tt-I-56-4-1 ..... ..... GT ..... A.C ..... A .....
Tt-I-57-3-1 ..... ..... GT ..... A.C ..... A .....
Tt-I-63-1-8 ..... ..... GT ..... A.C ..... A .....
Tt-I-63-2-1 ..... ..... GT ..... A.C ..... A .....
Tt-I-66-1-3 ..... ..... GT ..... A.C ..... A .....
Tt-I-81-2-1 ..... ..... GT ..... A.C ..... A .....
Tt-IV-183-2-17 ..... ..... GT ..... A.C ..... A .....
Tt-IV-183-2-25 ..... ..... GT ..... A.C ..... A .....
Tt-IV-191-2-1 ..... ..... GT ..... A.C ..... A .....

Fo-WF1 TAGGGGCGAA AGACTAATCG AACCATCTAG TAGCTGGTTC CCTCCGAAGT TTCCCTCAGG ATAGCTGGCG CTC-ATATAG AGTTTCATCC GGTAAAGCGA
Fo-WF2 .....
Fo-WF3 .....
Fo-WF4 .....
Fo-WF5 .....
Fo-WF6 .....
Fo-WF7 .....
Fo-WF8 .....
Tt .....
Tt-I-20-1-2 ..... ..... A ..... G--G.T TC .....
Tt-I-20-1-3 ..... ..... A ..... G--G.T TC .....
Tt-I-23-1-9 ..... ..... A ..... G--G.T TC .....
Tt-I-47-3-2 ..... ..... A ..... G--G.T TC .....
Tt-I-56-4-1 ..... ..... A ..... G--G.T TC .....
Tt-I-57-3-1 ..... ..... A ..... G--G.T TC .....
Tt-I-63-1-8 ..... ..... A ..... G--G.T TC .....
Tt-I-63-2-1 ..... ..... A ..... G--G.T TC .....
Tt-I-66-1-3 ..... ..... A ..... G--G.T TC .....
Tt-I-81-2-1 ..... ..... A ..... G--G.T TC .....
Tt-IV-183-2-17 ..... ..... A ..... G--G.T TC .....
Tt-IV-183-2-25 ..... ..... A ..... G--G.T TC .....
Tt-IV-191-2-1 ..... ..... A ..... G--G.T TC .....

```

圖二 薊馬之 28S rDNA 序列；Fo 及 Tt 分別為西方花薊馬及薊薊馬；“.”表示與第一行的序列相同；“-”表示間隔。僅兩個樣品定序出較長的序列。引子的設計位置及方向標幟於序列旁。

Fig. 2. Sequences of 28S rDNA from samples of *Frankliniella occidentalis* (Fo) and *Thrips tabaci* (Tt). Dots (.) indicate that the sequence is identical to the first line, while a dash (-) indicates a gap. Most of the 28S rDNA sequences were available from merely two samples. The sequence designed for primer and its direction are shown beneath the sequence.

Fo-WF1	ATGATTAGAG	GCCTGGGG	CGAAAGACC	TCAAACCTATT	CTCAAACCTTT	AAATGGGTGA	GAACCTGGG	TTGCTTAGGT	GAACCGCGA	GACTCAC-GA
Fo-WF2
Fo-WF3
Fo-WF4
Fo-WF5
Fo-WF6
Fo-WF7
Fo-WF8
Tt
Tt-I-20-1-2
Tt-I-20-1-3
Tt-I-23-1-9
Tt-I-47-3-2
Tt-I-56-4-1
Tt-I-57-3-1
Tt-I-63-1-8
Tt-I-63-2-1
Tt-I-66-1-3
Tt-I-81-2-1
Tt-IV-183-2-17
Tt-IV-183-2-25
Tt-IV-191-2-1
Fo-WF1	ATCAGAGTC	CAAGTGGCC	AATTTTGTA	AGCAGAAGTC	CGCGTGGG	ATGAACCAA	CGCGAGTTA	AAGCGCTAA	ATCGAGCTC	AT-TOGAAAC
Fo-WF2
Fo-WF3
Fo-WF4
Fo-WF5
Fo-WF6
Fo-WF7
Fo-WF8
Tt
Tt-I-20-1-2
Tt-I-20-1-3
Tt-I-23-1-9
Tt-I-47-3-2
Tt-I-56-4-1
Tt-I-57-3-1
Tt-I-63-1-8
Tt-I-63-2-1
Tt-I-66-1-3
Tt-I-81-2-1
Tt-IV-183-2-17
Tt-IV-183-2-25
Tt-IV-191-2-1
Fo-WF1	CATGAAAGCC	GTGTGGTCT	TAAGACAGCA	GGACGGTGC	CATGGAAGTC	GGATCCGCT	AAGGAGTGTG	TAACAACCTA	CCTCCGAA-	-----
Fo-WF2
Fo-WF3
Fo-WF4
Fo-WF5
Fo-WF6
Fo-WF7
Fo-WF8
Tt
Tt-I-20-1-2
Tt-I-20-1-3
Tt-I-23-1-9
Tt-I-47-3-2
Tt-I-56-4-1
Tt-I-57-3-1
Tt-I-63-1-8
Tt-I-63-2-1
Tt-I-66-1-3
Tt-I-81-2-1
Tt-IV-183-2-17
Tt-IV-183-2-25
Tt-IV-191-2-1
Fo-WF3	TGAAAATGG	TGGCGCTGA	GGTCTGTCT	TATACTGGC	CGTCAGGCA	AGAGAGGCTG	GACTTGTCCG	CCATGAAGCT	CTGACGAGTA	GGAGGGTCC
Tt
Fo-WF3	GTCCGTGTCC	GCAGAAAGGT	CTGGCGTGA	GCCTCCCTGG	AGCCGCGGAC	GGTCCAGATC	TTGGTGGTAG	TAGCAAATAC	TCCA--GAGA	GGCCCTGGAG
Tt
Fo-WF3	GACTGATGTG	GTAGAAGGGT	TTCCGTGTGA	CAGCCGTTC	ACACGAGTCA	GTCCATCCTA	AGCCCTAGGA	GAATCCGAA	GTCCGATGCC	GAGTCTTCT
Tt
Fo-WF3	ATGCTTTTGG	CCCTGTGCGA	AAAAACAACA	GAGGTCCAGA	CGCCGCTGG	GGAAAGGGA	ATCCGTTTCC	TATTCGGAA	CCGACATCC	GAACCGTTC
Tt
Fo-WF3	AATGGGCCC	TAAAGCTCG	TCAGGTAAC	CTAACATGCC	CCGAGAGCC	CGTCCGGAGC	TGCGGGGAGA	GTTATCTTTT	CTGTATAAGT	GGCCACACC
Tt
Fo-WF3	CCTGGAAGCC	TCTAGCAGGG	AGATAGGGGG	CAGC-GCGG	AAGAGCATGG	CACCTGCGGC	GATGTCCGCA	GGTCTCTCT	GGACCTTGAA	AATCCGGGTG
Tt
Fo-WF3	AGGGCCAGT	GGACATCCGA	TCTGGTGGT	ACCCATATCC	GCAGCAGTTC	TCCAAGTGA	ATAGCCCTCA	GTCCGATAGAA	TAATGTAGGT	AAAGGAAGTC
Tt
Fo-WF3	GGCAAAATGG	ATCCGTAAC	TCCGGATAAG	GATTG-CTCT	GAGGT-TCTA	GGTGAATCCG	GC-TTGTCCAG	AGAAGCGTTC	GGTTCCTGTG	TCCGATGCC
Tt

圖二 (續)。
Fig. 2. continued.



圖二 (續)。
Fig. 2. continued.

模板同時含有 Tt 及 Fo，則同時複製出 830 及 330 bp 兩區段 (圖四 A)。

使用 28Sc 為正向的共同引子，反向引子同時加入蔥薊馬的 28Sd-Tt 及西方花薊馬的 28Sf-Fo 等專一性引子。模板僅有蔥薊馬 (Tt) 時，只會複製出 28Sc 及 28Sd-Tt 這一區段約 330 bp；模板僅有西方花薊馬 (Fo) 時，只會複製出 28Sc 及 28Sf-Fo 這一區段約 830 bp；DNA 模板同時含有蔥薊馬 (Tt) 及西方花薊馬 (Fo) 時，則可同時複製出 330 及 830 bp 兩區段 (圖四 B)。

使用 28Sf 為反向的共同引子，正向引子同時加入蔥薊馬的 28Se-Tt1 及西方花薊馬的 28Se-Fo2 等專一性引子。模板僅有蔥薊馬 (Tt) 時，只會複製出 28Se-Tt1 及 28Sf 這一區段約 830 bp；模板僅有西方花薊馬 (Fo) 時，只會複製出 28Se-Fo2 及 28Sf 這一區段約 230 bp；DNA 模板同時含有蔥薊馬 (Tt) 及西方

花薊馬 (Fo) 時，則可同時複製出 230 及 830 bp 兩區段 (圖四 C)。

使用 28Sh 為反向的共同引子，正向引子同時加入蔥薊馬的 28Se-Tt3 及西方花薊馬的 28Se-Fo1 等專一性引子。模板僅有蔥薊馬 (Tt) 時，只會複製出 28Se-Tt3 及 28Sh 這一區段約 560 bp；模板僅有西方花薊馬 (Fo) 時，只會複製出 28Se-Fo1 及 28Sh 這一區段約 1330 bp；DNA 模板同時含有蔥薊馬 (Tt) 及西方花薊馬 (Fo) 時，則可同時複製出 560 及 1330 bp 兩區段 (圖四 D)。

使用 28Sh 為反向的共同引子，正向引子同時加入蔥薊馬的 28Se-Tt3 及西方花薊馬的 28Se-Fo2 等專一性引子。模板僅有蔥薊馬 (Tt) 時，只會複製出 28Se-Tt3 及 28Sh 這一區段約 560 bp；模板僅有西方花薊馬 (Fo) 時，只會複製出 28Se-Fo2 及 28Sh 這一區段約 730 bp；DNA 模板同時含有蔥薊馬 (Tt) 及西方

		16S214									
Fo-WF1	GGACGATAAG	ACCCATAGAG	ACTTAATTAT	AAATTTAAAA	ATTAAAAGGT	AAAAATTTTA	CTGGGGAAGT	AAAAAAATAA	AAATTTTITA	TTAAAATTAC	
Fo-WF2	
Fo-WF3	
Fo-WF4	
Fo-WF5	
Fo-WF7	
Fo-WF8	
Tt	A.T	TT.AAA	T-AA	.AAG	C..C	.T.A	..AA..
Tt-I-20-1-3	A.T	TT.AAA	T-AA	.AAG	C..C	.T.A	..AA..
Tt-I-23-1-11	A.T	TT.AAA	T-AA	.AAG	C..C	.T.A	..AA..
Tt-I-47-3-2	A.T	TT.AAA	T-AA	.AAG	C..C	.T.A	..AA..
Tt-I-50-1-1	A.T	TT.AAA	T-AA	.AAG	C..C	.T.A	..AA..
Tt-I-56-4-1	A.T	TT.AAA	T-AA	.AAG	C..C	.T.A	..AA..
Tt-I-61-1-1	A.T	TT.AAA	T-AA	.AAG	C..C	.T.A	..AA..
Tt-I-63-1-9	A.T	TT.AAA	T-AA	.AAG	C..C	.T.A	..AA..
Tt-I-66-1-3	A.T	TT.AAA	T-AA	.AAG	C..C	.T.A	..AA..
Tt-IV-183-2-17	A.T	TT.AAA	T-AA	.AAG	C..C	.T.A	..AA..
Tt-IV-183-2-18	A.T	TT.AAA	T-AA	.AAG	C..C	.T.A	..AA..
		16S22									
Fo-WF1	TATTAANAAG	ATAATAAACC	TTTTAAGAAA	AAA-----	AAGTTACCTT	AGGGATAACA	GAGCAAAAAT	TTTTTAGAGA	TCAAATCAAG	AAGATTAAT	
Fo-WF2	
Fo-WF3	
Fo-WF4	
Fo-WF5	
Fo-WF7	
Fo-WF8	
Tt	T	.TA.G.T	C.A.A.G	.AAAGAAT	TT	.T	.G	C	.G.A	.A.AAT.T
Tt-I-20-1-3	T	.TA.G.T	C.A.A.G	.AAAGAAT	TT	.T	.G	C	.G.A	.A.AAT.T
Tt-I-23-1-11	T	.TA.G.T	C.A.A.G	.AAAGAAT	TT	.T	.G	C	.G.A	.A.AAT.T
Tt-I-47-3-2	T	.TA.G.T	C.A.A.G	.AAAGAAT	TT	.T	.G	C	.G.A	.A.AAT.T
Tt-I-50-1-1	T	.TA.G.T	C.A.A.G	.AAAGAAT	TT	.T	.G	C	.G.A	.A.AAT.T
Tt-I-56-4-1	T	.TA.G.T	C.A.A.G	.AAAGAAT	TT	.T	.G	C	.G.A	.A.AAT.T
Tt-I-61-1-1	T	.TA.G.T	C.A.A.G	.AAAGAAT	TT	.T	.G	C	.G.A	.A.AAT.T
Tt-I-63-1-9	T	.TA.G.T	C.A.A.G	.AAAGAAT	TT	.T	.G	C	.G.A	.A.AAT.T
Tt-I-66-1-3	T	.TA.G.T	C.A.A.G	.AAAGAAT	TT	.T	.G	C	.G.A	.A.AAT.T
Tt-IV-183-2-17	T	.TA.G.T	C.A.A.G	.AAAGAAT	TT	.T	.G	C	.G.A	.A.AAT.T
Tt-IV-183-2-18	T	.TA.G.T	C.A.A.G	.AAAGAAT	TT	.T	.G	C	.G.A	.A.AAT.T
		16S22									
Fo-WF1	GCTACCTCGA	TGTTGAATTA	AGAAAACATC	TAATAGAAGA	AAATTAGATT	A-TAGGTCCTG	TTGACCTTT	AAATTCCTAC	ATGATCTGAG	TTCAGACCGG	
Fo-WF2	
Fo-WF3	
Fo-WF4	
Fo-WF5	
Fo-WF7	
Fo-WF8	
Tt	T	.ATA	.A	.T	T	C	.CA	
Tt-I-20-1-3	T	.ATA	.A	.T	T	C	.CA	
Tt-I-23-1-11	T	.ATA	.A	.T	T	C	.CA	
Tt-I-47-3-2	T	.ATA	.A	.T	T	C	.CA	
Tt-I-50-1-1	T	.ATA	.A	.T	T	C	.CA	
Tt-I-56-4-1	T	.ATA	.A	.T	T	C	.CA	
Tt-I-61-1-1	T	.ATA	.A	.T	T	C	.CA	
Tt-I-63-1-9	T	.ATA	.A	.T	T	C	.CA	
Tt-I-66-1-3	T	.ATA	.A	.T	T	C	.CA	
Tt-IV-183-2-17	T	.ATA	.A	.T	T	C	.CA	
Tt-IV-183-2-18	T	.ATA	.A	.T	T	C	.CA	

圖三 薊馬之 16S rDNA 序列；Fo 及 Tt 分別為西方花薊馬及蔥薊馬；"."表示與第一行的序列相同；"-"表示間隔。Ssp I (AATATT)是切割的辨識位置。

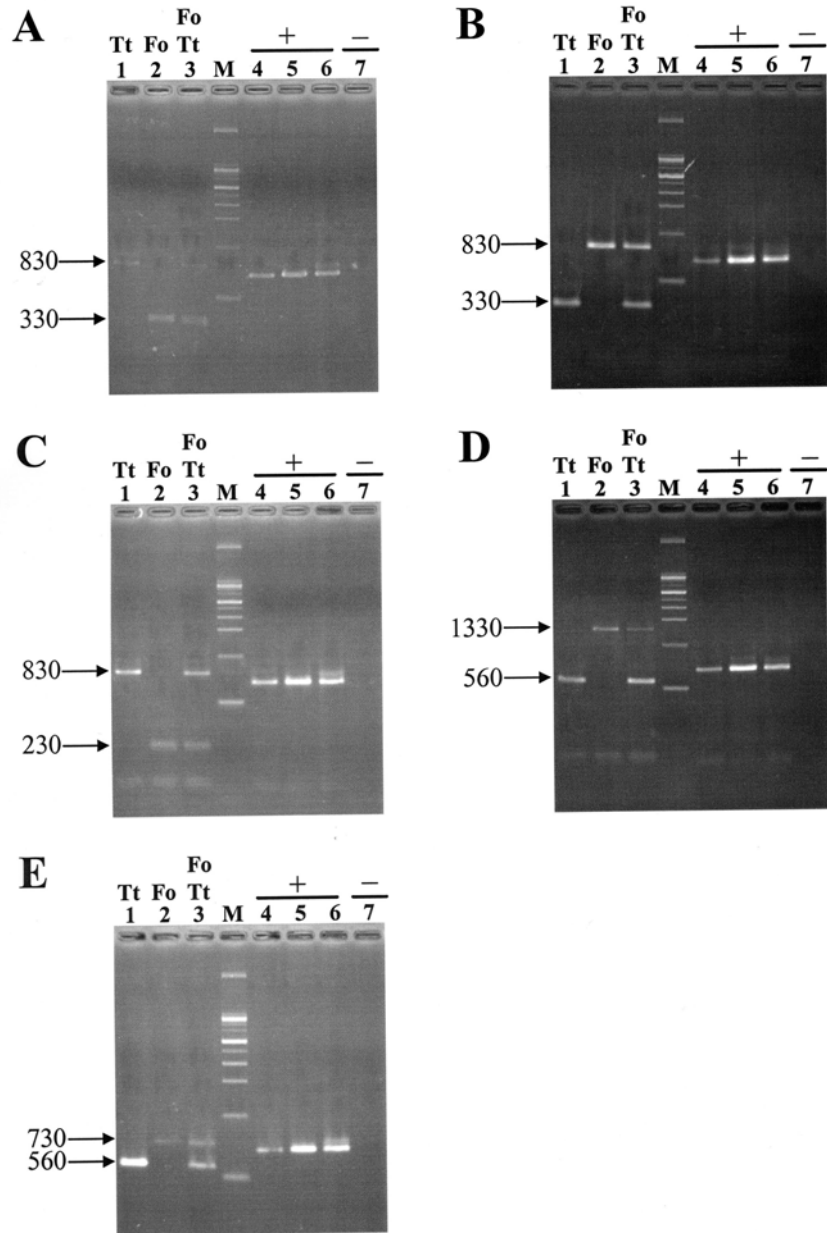
Fig. 3. Sequences of the partial 16S rDNA from samples of *Frankliniella occidentalis* (Fo) and *Thrips tabaci* (Tt). Dots (.) indicate that the sequence is identical to the first line, while a dash (-) indicates a gap. The restriction site of Ssp I (AATATT) is labeled in the gray box.

花薊馬 (Fo) 時，則可同時複製出 560 及 730 bp 兩區段 (圖四 E)。

PCR-RFLP 之分子形質於西方花薊馬之鑑定

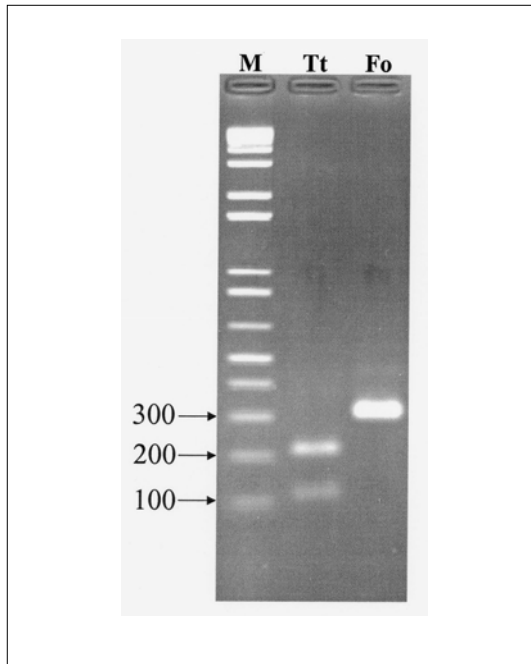
PCR 產物複製之後，續應用限制酵素可辨認特定 DNA 序列切割的特性，來區辨樣本中是否有我們所要檢疫的害蟲。分析已知序列

16S rDNA 的序列，搜尋可能的酵素切位，再選擇合適的酵素予以切割區辨標的害蟲。利用 GCG 軟體找出蔥薊馬及西方花薊馬在 16S214 及 16S22 這一區段的所有酵素切位，經過篩選，以 Ssp I (AATATT) 較為合適。蔥薊馬的 PCR 產物有 Ssp I 切位，因此被切割成兩個片段，分別為 200 及 100 bp；而西方



圖四 應用 multiplex-PCR 於西方花薊馬的鑑定。泳道 1 (4) 及 2 (5) 分別僅有薊薊馬 (Tt) 及西方花薊馬 (Fo) 的 DNA 模板，泳道 3 (6) 則同時含有兩種 DNA 模板，泳道 7 則未含有任何 DNA 模板。每一個反應均分別加入同樣的 3 條引子。符號 "+" 及 "-" 分別為正及負的對照組；M 為參考的 DNA 標幟。圖 A~E 為不同引子組合複製的結果。

Fig. 4. Application of multiplex-PCR to identify *Frankliniella occidentalis* (Fo). Lanes 1 (4) and 2 (5) contain a DNA template of *Thrips tabaci* and Fo in the PCR reaction, respectively. Lane 3 (6) contains two kinds of DNA templates of Tt and Fo. Lane 7 contains no DNA template as a negative control. Three primers were added in each reaction. The plus (+) and minus (-) signs indicate the positive and negative control, respectively, and M is a DNA marker. Panels A~E are the amplified result from different paired primers.



圖五 應用 RFLP 於西方花薊馬的鑑定。僅蔥薊馬 (Tt) 的 16S rDNA 可被 *Ssp I* 酵素切割。M 為參考的 DNA 標幟。

Fig. 5. Application of RFLP to identify *Frankliniella occidentalis* (Fo). The 16S rDNA sequence of *Thrips tabaci* (Tt) with the *Ssp I* restriction site was cut into two fragments.

花薊馬的 PCR 產物沒有 *Ssp I* 切位，所以不能被 *Ssp I* 切割，僅有一個條帶（圖五）。雖然選用的酵素是針對蔥薊馬切割，而不是西方花薊馬，其應用時會受到限制；然此一方法顯示，仍可應用於分子鑑定。

通常，應用昆蟲的分子特徵於鑑定須經幾個步驟：(1) DNA 的純化；(2) PCR 反應；(3) 電泳確認；(4) PCR 產物回收；(5a) PCR 產物切割分析或 (5b) 定序分析。最快的鑑定方法可在當天完成，慢者需到 2 天，但若是採用定序的方法，最快也需 3 個工作天 (Yeh, 2002)。因此，在快速鑑定的前提下，採用的反應步驟愈少愈能符合快速鑑定的要求。本研究結果顯示，在西方花薊馬及蔥薊馬的序列均

已知曉的情形之下，設計專一性引子或可以區辨的酵素切位進行 multiplex-PCR 或 PCR-RFLP 的鑑定應用，均可以達到預期的目的。然而，在快速鑑定的要求下，則以 multiplex-PCR 較能符合需求，因為此方法僅需用到前三項步驟，即 DNA 的純化-PCR 反應-電泳確認，於一天之內即可知曉樣品是否為檢疫害蟲；反觀 PCR-RFLP 則需應用到四到五項步驟，所花費的時間可能需要兩天。然而當檢疫的樣品序列太相近，無法應用 multiplex-PCR 時，也只能選用其它的鑑定方法。另外，在鑑定應用時，尚需考量其它的因素，以避免誤判；當有可疑樣品時，最好同時操作數個專一性引子對，或不同人重覆操作同樣的反應，以增其可靠性及鑑定速率。同時，28S rDNA 及 16S rDNA 的序列也可以分別開發 PCR-RFLP 及 multiplex-PCR 的分子形質，增加分子鑑定的選擇性及準確性。

誌謝

感謝農委會提供研究計畫 (90-農科-快速) 經費，及農委會動植物防疫檢疫局新竹分局提供部分之西方花薊馬標本。

參考文獻

- Avise, J. C.** 1994. Molecular tools. In: J. C. Avise, ed. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York. pp. 44-91.
- Bryan, D. E., and R. F. Smith.** 1956. The *Frankliniella occidentalis* (Pergande) complex in California (Thysanoptera: Thripidae). Univ. CA Publ. Entomol.

- 10: 359-410.
- Castane, C., O. Alomar, and J. Riudavets.** 1996. Management of western flower thrips on cucumber with *Dicyphus tamaninii* (Heteroptera: Miridae). *Biol. Control* 7: 114-120.
- de Vries, E. J., G. Jacobs, and J. A. Breeuwer.** 2001. Growth and transmission of gut bacteria in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *J. Invert. Pathol.* 77: 129-137.
- Held, D. W., D. A. Potter, R. S. Gates, and R. G. Anderson.** 2001. Modified atmosphere treatments as a potential disinfestation technique for arthropod pests in greenhouses. *J. Econ. Entomol.* 94: 430-438.
- Mertelik, J., and V. Mokra.** 1998. Tomato spotted wilt virus in ornamental plants, vegetables and weeds in the Czech Republic. *Acta Virol.* 42: 347-351.
- Kjer, K. M., G. D. Baldrige, and A. M. Fallon.** 1994. Mosquito large subunit ribosomal RNA: simultaneous alignment of primary and secondary structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1217: 147-155.
- Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen, and M. Nei.** 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245.
- Montserrat M. C.** 1998. Neozygites parvispora (Zygomycotina: entomophthorales) causing an epizootic in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) on cucumber in Spain. *J. Invertebr. Pathol.* 71: 165-168.
- Mound, L. A., and G. Kibby.** 1998. CIE Guides to Insects of Importance to Man. 2. Thysanoptera: An Identification Guide (2nd ed.). CAB International. Oxon, U. K.
- Palevsky, E., V. Soroker, P. Weintraub, F. Mansour, F. Abo-Moch, and U. Gerson.** 2001. How species-specific is the phoretic relationship between the broad mite, *Polyphagotarsonemus latus* (Acari: Tarsonemidae), and its insect hosts? *Exp. Appl. Acarol.* 25: 217-224.
- Parker, B. L., M. Skinner, and T. Lewis.** 1995. Thrips biology and management. Plenum Press, New York.
- Pearsall, I. A., and J. H. Myers.** 2001. Spatial and temporal patterns of dispersal of western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) in nectarine orchards in British Columbia. *J. Econ. Entomol.* 94: 831-843.
- Robb, K. L., and M. P. Parrella.** 1991. Western flower thrips, a serious pest of floricultural crops. pp. 343-357. *In*: B.L. Parker, M. Skinner, and T. Lewis, eds. Towards Understanding Thysanoptera. Gen. Tech. Rep. NE-147, USDA, Radnor, PA.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins.** 1997. The CLUSTAL_X windows

- interface. Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.
- Tommasini, M. G., and S. Maini.** 1995. *Frankliniella occidentalis* and other thrips harmful to vegetable and ornamental crops in Europe. *Wag. Agric. Papers* 95: 1-42.
- Venzon, M., A. Janssen, A. Pallini, and M. W. Sabelis.** 2000. Diet of a polyphagous arthropod predator affects refuge seeking of its thrips prey. *Anim. Behav.* 60: 369-375.
- Wang, C.-L.** 2002. Thrips of Taiwan: biology and taxonomy. *Spec. Publ. No. 99.* Taiwan Agric. Res. Inst., Taichung (in Chinese).
- Yeh, W.-B.** 2002. The identification of plant quarantine pest using PCR method. *In: The identification in important quarantine pest of plant,* Special Pub. No. 2. Bur. Ani. Plant Health Inspec. Quar. Cou. Agricul. and Chung-Hsiung University, press, Nov. Taichung, Taiwan. pp. 103-107.
- Yeh, W.-B., C.-T. Yang, and S.-C. Kang.** 1997. Identification of two sibling species, *Ephemer formosana* and *E. sauteri* (Ephemeroptera: Ephemeidae), based on mitochondrial DNA sequence analysis. *Chinese J. Entomol.* 17: 257-268.
- Yokoyama, V. Y., G. T. Miller, and C. H. Crisosto.** 2001. Pest response in packed table grapes to low temperature storage combined with slow-release sulfur dioxide pads in basic and large-scale tests. *J. Econ. Entomol.* 94: 984-988.

收件日期：2003年7月10日

接受日期：2003年12月20日

Molecular Identification of Multiplex-PCR and PCR-RFLP for the Quarantine Pest, *Frankliniella occidentalis* (Pergande)

Jgun Sian Lin Wen-Bin Yeh* Department of Biology, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung 807, Taiwan
Chin-Ling Wang Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung 413, Taiwan

ABSTRACT

The polyphagous insect, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Fo), causes serious damage to economic plants in the world, whereas it is not found on the list of quarantine pests in Taiwan. However, the pest is occasionally found in imported agriculture products. In this study, molecular characters were used to identify the nymph stage of this quarantine pest; the onion thrips, *Thrips tabaci* Lindeman, found mostly in imported agriculture products was used as a reference sample. Molecular markers including both 28S rDNA and 16S rDNA sequences were analyzed. For 28S rDNA, 22 individuals of these two species were used, and intraspecific sequence variation were not found; interspecific variation was 12.3% in 689 bp. For 16S rDNA, 18 individuals of these two species were used, and intraspecific sequence variations were nearly zero, while interspecific variation was 17.5% between these two species. Specific primers designed from 28S rDNA and restriction enzyme from 16S rDNA were respectively applied for multiplex-PCR and PCR-RFLP to identify *F. occidentalis*. Results showed that application of the two molecular markers was useful in identifying this quarantine pest.

Key words: *Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*, multiplex-PCR, PCR-RFLP, 16S rDNA, 28S rDNA