



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Development of Rapid Identification of *Bemisia argentifolii* (Hemiptera: Aleyrodidae) by PCR 【Research report】

用 PCR 快速鑑定銀葉粉蝨 (*Bemisia argentifolii*) (半翅目：粉蝨科) 【研究報告】

Chung-Hsiung Wang, Chiun-Cheng Ko*, Chung-Chi Liu and Chiou-Nan Chen
王重雄、柯俊成*、劉中琪、陳秋男

*通訊作者E-mail: kocc2501@ccms.ntu.edu.tw

Received: 2004/04/23 Accepted: 2004/08/19 Available online: 2004/09/01

Abstract

Diagnosis between *Bemisia tabaci* biotypes A and B was first carried out in this investigation using RAPD-PCR analysis. The four primers, OPA01, F12, 91167, and 91074, from 27 random primers were selected for specific discrimination of biotypes A and B. The specific amplicon of biotype B was cloned and sequenced by RAPD-PCR using primer 91074. A primer set, Baf/Bar, was designed based on the nucleotide sequence of this amplicon. An amplicon (of about 500 bp) offered yields with Baf/Bar only with the genomic DNA template by PCR, while none was found with other genomic DNA biotypes. This result shows that the specific primer set can be used to discriminate biotype B from other biotypes of *B. tabaci*. This is initial work on a molecular diagnostic approach for *B. tabaci* in Taiwan. Using results from this investigation, we will study more populations of *B. tabaci* from Taiwan using additional molecular studies.

摘要

本研究利用隨機增幅核酸多形性 - 聚合酶連鎖反應(RAPD-PCR) 方法鑑定形態上不易鑑別之煙草粉蝨 (*Bemisia tabaci*) A 及 B 生物小種。自 27 個隨機引子中篩選出對於兩生物小種具有鑑別力之 4 種引子 (OPA03, 91167, 91074, F12)。並依據所獲得之 RAPD-PCR 圖譜，選殖出具有生物小種間之特異性片段，經定序分析後，再設計出專一性引子組 Baf/Bar。此引子組可在 B 生物小種之 DNA 中增幅出一段約 500bp 的片段，而在其他生物小種以及不同種類之粉蝨則不會產生任何產物，顯示此專一性引子組適用於煙草粉蝨 B 生物小種之鑑定。本研究為首先建立台灣地區煙草粉蝨之分子標示鑑定法，並著手煙草粉蝨之全面採集調查，進而提供後續研究之依據。

Key words: RAPD, specific primer set, diagnostic techniques, *Bemisia tabaci*, *B. argentifolii*

關鍵詞: 隨機增幅核酸多形性、專一性引子組、鑑定技術、煙草粉蝨、銀葉粉蝨

Full Text: [PDF\(1.3 MB\)](#)

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

利用 PCR 快速鑑定銀葉粉蝨 (*Bemisia argentifolii*) (半翅目：粉蝨科)

王重雄 柯俊成* 劉中琪 陳秋男 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

本研究利用隨機增幅核酸多形性－聚合酶連鎖反應(RAPD-PCR) 方法鑑定形態上不易鑑別之煙草粉蝨 (*Bemisia tabaci*) A 及 B 生物小種。自 27 個隨機引子中篩選出對於兩生物小種具有鑑別力之 4 種引子 (OPA03, 91167, 91074, F12)。並依據所獲得之 RAPD-PCR 圖譜，選殖出具有生物小種間之特异性片段，經定序分析後，再設計出專一性引子組 Baf/Bar，此引子組可在 B 生物小種之 DNA 中增幅出一段約 500bp 的片段，而在其他生物小種以及不同種類之粉蝨則不會產生任何產物，顯示此專一性引子組適用於煙草粉蝨 B 生物小種之鑑定。本研究為首先建立台灣地區煙草粉蝨之分子標示鑑定法，並著手煙草粉蝨之全面採集調查，進而提供後續研究之依據。

關鍵詞：隨機增幅核酸多形性、專一性引子組、鑑定技術、煙草粉蝨、銀葉粉蝨

前言

煙草粉蝨 (*Bemisia tabaci*) 目前已成為世界上亞熱帶、熱帶地區重要的農業害蟲。自命名以來，至今於世界各地已有 20 個以上的生物小種 (biotype)，顯示其為處於進化過程中的種群 (species complex)。煙草粉蝨除極地外，世界各地皆有分布，其寄主範圍廣泛，寄主植物多達 900 種 (Perring, 2001)。有關粉蝨屬與種的鑑定方面是以第四齡若蟲的蛹殼 (pupal case) 為依據，在其他齡期之鑑定相當困難。然蛹殼之形態又常因其寄主植物、

氣候、環境等因素而有所不同，更增加粉蝨類在鑑定上之困難度。其中煙草粉蝨分布遍及熱帶與溫帶，其生殖、發育及外部形態變化情形尤甚，因而產生許多生物小種，常造成辨識上的困擾 (Bethke *et al.*, 1991; De Barro, 1995)。

Brown *et al.* (1995b) 利用增幅核酸多形性－聚合酶連鎖反應 (RAPD-PCR) 分出 16 個生物小種，其中又以 B 生物小種最具經濟重要性，相關研究亦多 (Gerling, 1990; Perring *et al.*, 1991, 1992; Gill, 1992; De Barro, 1995; Rosell *et al.*, 1997)。Perring

*論文聯繫人
e-mail: kocc2501@ccms.ntu.edu.tw

et al. (1993) 因 B 生物小種會導致南瓜銀葉病 (squash silverleaf)，而以銀葉粉蝨 (silverleaf whitefly) 稱之。Bellows *et al.* (1994) 利用同功異構酶、交尾行爲、蛹殼前亞緣區剛毛之有無及胸氣孔褶之寬度等特徵將 B 生物小種自煙草粉蝨中獨立出，正式命名爲 *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring。然煙草粉蝨與銀葉粉蝨兩者間在外部形態無法鑑別，需輔以體型大小、生殖能力、寄主範圍、爲害程度、攝食率、傳播南瓜銀葉病之能力、抗藥性程度及生化等方法加以區別，所以在分類上之爭議一直存在 (Barinaga, 1993; Campbell *et al.*, 1993a, b, 1994; Coats *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995b; Rosell *et al.*, 1997)。De Barro and Hart (2000) 以澳洲當地生物小種 (Australian biotype) 與 B 生物小種進行交尾行爲研究，證實兩者於實驗室及野外均有雜交現象，且產生具有生殖能力之第一代，故 B 生物小種是否可獨立成爲一種，目前仍無定論。

煙草粉蝨自從 1985 年大發生以來，旋即擴散到世界各地，20 個生物小種中以 A、B、India/Pakistan、Spanish 及 Sudanese 等 5 個生物小種爲害最爲嚴重。其生物小種間之區別，早期多是利用蛋白質電泳來分析 (Costa and Brown, 1991; Liu *et al.*, 1992; Perring *et al.*, 1992; Byrne and Devonshire, 1993; Perring *et al.*, 1993; Coats *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995a; Byrne *et al.*, 1995a, b; Gunning *et al.*, 1995, 1997; Demichelis *et al.*, 2000)，隨著 PCR 技術之純熟發展，其後多以 RAPD-PCR 作爲分析之依據 (Gawel and Bartlett, 1993; De Barro and Driver, 1997; Guirao *et al.*, 1997; De Barro *et al.*, 1998; De Oliveira

et al., 2000)。

利用 RAPD-PCR 作爲探討生物小種間差異之相關研究甚多，在煙草粉蝨之應用亦有相關研究報告 (Gawel and Bartlett, 1993; Garner and Slavicek, 1996; Nagaraju and Singh, 1997)。De Barro and Driver (1997) 篩選出 4 種引子確定可成功區分出 B 及非 B 生物小種之煙草粉蝨，並提供此法供澳洲害蟲檢防疫之用。Guirao *et al.* (1997) 分別以蛋白質電泳及 RAPD-PCR 兩種方法分辨西班牙的煙草粉蝨 A、B 生物小種，分析兩生物小種之地理分布及解析 B 生物小種的侵入時間。De Oliveira *et al.* (2000) 篩選出 5 種引子，首先區分巴西境內之煙草粉蝨 B 及非 B 生物小種。至於國內，Chou (2000) 利用 De Barro and Driver (1997) 所使用之引子 F2、F12、H9、H16 建立台灣地區常見之銀葉粉蝨、溫室粉蝨及螺旋粉蝨之 RAPD-PCR 圖譜，並確定台灣地區之銀葉粉蝨是由美國所侵入，在其研究中亦檢視了許多不同採集地及作物上之銀葉粉蝨，並無煙草粉蝨 A 生物小種之發現，但在該論文中並未論及台灣地區煙草粉蝨 A 及 B 生物小種之鑑定圖譜。本研究則先以向國外索取之煙草粉蝨 A 及 B 生物小種進行 RAPD-PCR，獲得具鑑別力之 RAPD-PCR 方法及圖譜，爲首先建立台灣地區煙草粉蝨之分子標示鑑定法，並著手於煙草粉蝨之全面採集調查，進而提供後續研究之依據。煙草粉蝨在台灣地區廣泛分布，有記錄之寄主植物共有 36 科、148 種。截至目前爲止，分子標記之研究報告較少，僅有 De Barro *et al.* (1998, 2000)、Chou (2000) 以及 Liu (2001) 等分析少數的族群 (Ko *et al.*, 2002)。本研究針對外部形態無法鑑別之 A 及 B 生物小種，利用 RAPD-PCR 圖譜及專一性引子建立其快速鑑定之模式，以

表一 本實驗分析之台灣地區粉蝨種類

Table 1. Populations of whitefly species used in the study from Taiwan

編號	寄主植物	採集地	粉蝨種類	採集者及時間
TATV	萵苣 (菊科) <i>Lactuca sativa</i>	台北市山豬窟	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	柯俊成 26-IV-2001
TAAD	番石榴 (桃金娘科) <i>Psidium guajava</i>	高雄縣鳳山市	<i>Aleurodicus dispersus</i>	溫宏治 13-VIII-1999
TASP	風藤 (胡椒科) <i>Piper kadsura</i>	台北市景美	<i>Singhiella piperis</i>	柯俊成等 15-III-2001
TANB	秀貴甘蔗 (禾本科) <i>Saccharum officinarum</i>	南投縣南山溪	<i>Neomaskellia bergii</i>	柯俊成等 21-VII-2001
TAAF	黃金榕 (桑科) <i>Ficus microcarpa</i>	台北市公館	<i>Aleuroplatus fici</i>	柯俊成等 31-XII-2001
TAAP	山萵苣 (菊科) <i>Lactuca indica</i>	嘉義縣義竹鄉	<i>Aleyrodes prolella</i>	柯俊成 6-I-2002
TAAT	桂花 (木犀科) <i>Osmanthus fragrans</i>	台北市南港	<i>Aleurolobus taonabae</i>	柯俊成等 13-III-2002
TAAM	桂花 (木犀科) <i>Osmanthus fragrans</i>	嘉義縣義竹鄉	<i>Aleurotrachelus micheliae</i>	柯俊成 16-III-2002
TADK	茉莉 (木犀科) <i>Jasminum sambac</i>	嘉義縣義竹鄉	<i>Dialeurodes kirkaldyi</i>	柯俊成 16-III-2002
TASP	安石榴 (安石榴科) <i>Punica granatum</i>	台北市景美	<i>Siphoninus phillyreae</i>	柯俊成等 16-V-2002
TABP	水黃皮 (豆科) <i>Pongamia pinnata</i>	台北市信義區	<i>Bemisia pongamiae</i>	柯俊成 29-V-2002

為檢防疫工作之參考。

材料與方法

一、供試昆蟲之採集

於台灣地區採集粉蝨之第四齡若蟲，攜回實驗室飼養至成蟲。將第四齡若蟲以及成蟲製成永久玻片標本，經鑑定外部形態確定種類後，將羽化成蟲挑出浸泡於 95% 酒精，保存於 -70°C 冷凍櫃 (表一、表二)。並向國外專家交換或索取煙草粉蝨各生物小種之成蟲，浸泡於 95% 酒精中，保存於 -70°C 冷凍櫃 (表三)。

二、萃取基因組 DNA

依照 De Barro and Driver (1997) 之

方法，取一隻蟲體置於 1.5 ml 離心管中，加入 10 µl lysis buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8.4), 0.45% Tween 20, 0.2% gelatin, 0.45% NP40, 60 µg/ml proteinase K)，以研磨棒將蟲體磨碎，再加入 15 µl lysis buffer，以 65°C 水浴 30 分鐘，再以 100°C 煮沸 10 分鐘，加入 25 µl 之二次蒸餾水，進行分析或置於 -20°C 冷凍櫃中保存待用。

三、RAPD-PCR

利用逢機引子 91167、91074 (Haymer, 1995)、OPA 組、UBC431 及 F2、F12、H9、H16 (Chou, 2000)，對粉蝨類進行 RAPD-PCR。PCR 擴增是以 AG-9600 型聚合酶連鎖反應器 (Thermal Station, AcuGen Systems, USA) 進行。反應溶液總

表二 本實驗分析之台灣地區煙草粉蝨族群

Table 2. Populations of *Bemisia tabaci* used in the study from Taiwan

編號	寄主植物	採集地	粉蝨種類	採集者及時間
TABT01	甘藍 (十字花科) <i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i>	台南縣善化鎮	<i>Bemisia tabaci</i>	蔡文錫 15-XII-2000
TABT02	藿香薊 (菊科) <i>Ageratum conyzoides</i>	台南縣新化鎮	<i>B. tabaci</i>	蔡文錫 15-XII-2000
TABT03	甘藍 (十字花科) <i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i>	台南縣善化鎮	<i>B. tabaci</i>	蔡文錫 15-XII-2000
TABT04	番茄 (茄科) <i>Lycopersicon esculentum</i>	台南縣善化鎮	<i>B. tabaci</i>	蔡文錫 15-XII-2000
TABT05	番茄 (茄科) <i>Lycopersicon esculentum</i>	台南縣善化鎮	<i>B. tabaci</i>	蔡文錫 15-XII-2000
TABT06	聖誕紅 (大戟科) <i>Euphorbia pulcherrima</i>	台北市內湖	<i>B. tabaci</i>	柯俊成等 22-I-2002
TABT07	甘藍 (十字花科) <i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i>	台南縣新化鎮	<i>B. tabaci</i>	陳昇寬 25-IX-2001
TABT08	胡瓜 (葫蘆科) <i>Cucumis sativus</i>	彰化縣大村鄉	<i>B. tabaci</i>	白桂芳 26-IX-2001
TABT09	番茄 (茄科) <i>Lycopersicon esculentum</i>	花蓮縣吉安鄉	<i>B. tabaci</i>	楊大吉 7-II-2002
TABT10	甘藍 (十字花科) <i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i>	嘉義縣義竹鄉	<i>B. tabaci</i>	柯俊成 23-XII-2001
TABT11	蕪菁 (十字花科) <i>Brassica rapa</i>	嘉義縣義竹鄉	<i>B. tabaci</i>	柯俊成 6-I-2002
TABT12	番茄 (茄科) <i>Lycopersicon esculentum</i>	嘉義縣義竹鄉	<i>B. tabaci</i>	柯俊成 17-III-2002
TABT13	花椰菜 (十字花科) <i>Brassica oleraceae</i> var. <i>botrytis</i>	嘉義市內庄	<i>B. tabaci</i>	柯俊成 13-I-2002
TABT14	楊梅 (楊梅科) <i>Myrica rubra</i>	澎湖縣馬公市	<i>B. tabaci</i>	蔡金池 13-V-2002
TABT15	紫背草 (菊科) <i>Emilia sonchifolia</i>	台北市公館	<i>B. tabaci</i>	柯俊成等 25-VI-2002
TABT16	紫背草 (菊科) <i>Emilia sonchifolia</i>	嘉義縣竹崎鄉	<i>B. tabaci</i>	柯俊成 6-VII-2002
TABT17	葎草 (桑科) <i>Humulus scandens</i>	嘉義縣竹崎鄉	<i>B. tabaci</i>	柯俊成 6-VII-2002
TABT18	紫背草 (菊科) <i>Emilia sonchifolia</i>	嘉義市	<i>B. tabaci</i>	柯俊成 7-VII-2002
TABT19	紫背草 (菊科) <i>Emilia sonchifolia</i>	屏東縣潮州鎮	<i>B. tabaci</i>	柯俊成等 3-VIII-2002
TABT20	紫背草 (菊科) <i>Emilia sonchifolia</i>	屏東縣內埔鄉	<i>B. tabaci</i>	柯俊成等 3-VIII-2002
TABT21	紫背草 (菊科) <i>Emilia sonchifolia</i>	台南市	<i>B. tabaci</i>	謝佳宏 20-VII-2002
TABT22	紫背草 (菊科) <i>Emilia sonchifolia</i>	台北市松山區	<i>B. tabaci</i>	柯俊成 27-VII-2002
TABT23	紫背草 (菊科) <i>Emilia sonchifolia</i>	台南縣學甲鎮	<i>B. tabaci</i>	謝佳宏 4-VIII-2002

表三 本實驗分析之其他國家煙草粉蠹族群

Table 3. Populations of *Bemisia tabaci* used in the study from other countries

編號	採集地	粉蠹種類	採集者	生物小種
USBTA1	USA	<i>Bemisia tabaci</i>	J. K. Brown	A
USBTB1	USA	<i>B. tabaci</i>	J. K. Brown	B
AUBTAN	Australia	<i>B. tabaci</i>	P. J. De Barro	AN
AUBTNauro	Australia	<i>B. tabaci</i>	P. J. De Barro	Nauru
AUBTB	Australia	<i>B. tabaci</i>	P. J. De Barro	B
EGBTB	Egypt	<i>B. tabaci</i>	I. D. Beford	B
SPBTQ1	Spain	<i>B. tabaci</i>	I. D. Beford	Q
USBTA2	USA	<i>B. tabaci</i>	H. Y. Liu	A
USBTB2	USA	<i>B. tabaci</i>	H. Y. Liu	B
COBTA	Colombia	<i>B. tabaci</i>	L. A. Calvert	A
COBTB	Colombia	<i>B. tabaci</i>	L. A. Calvert	B
SPBTQ2	Spain	<i>B. tabaci</i>	J. L. Cenis	Q

體積 25 μ l，其中含有 2 μ l DNA 溶液 (100 μ g/ml)、1U DNA 聚合酶 (*Taq polymerase*; Promega, USA)、1 \times 反應緩衝液、0.1 mM dNTPs、1.5 mM MgCl₂ 及 0.2 μ M 之引子。其中 DNA 之定量是以核酸計算儀 Gene Quant II (Pharmacia Biotech, USA) 進行。反應條件為：【1】預熱 (prewarm) 94°C 2 分鐘；【2】變性 (denaturing) 94°C 1 分鐘；【3】黏合 (annealing) 37°C 1 分鐘；【4】延伸 (extension) 72°C 1 分鐘；【5】重複步驟【2】至【4】共 45 個循環；【6】最終延長 (final extension) 72°C 5 分鐘；【7】最後保存於 15°C。PCR 之產物以含溴化乙烷 (ethidium bromide, EtBr) 之 TAE 緩衝溶液用 1.6% 之瓊脂電泳膠片進行電泳分析。於 UV 光下觀察、拍照並比較其擴增片段圖譜。

四、DNA 純化

利用 E.Z.N.A[®] gel extraction kit (Omega, USA) 依其所附之步驟，純化電泳膠片中之 DNA，步驟如下：在紫外燈下以刀片切出含有 DNA 片段的薄膠，置於 1.5 ml 離心管中，加入膠體積 4~6 倍的 binding buffer，置於 55~65°C 水浴 7 分鐘或直到膠

完全溶解，將 HiBind[®] extraction column 套入 2 ml 收集管中，再將反應溶液加入 HiBind[®] extraction column，於室溫下以最高速離心 1 分鐘，丟棄濾液，加入 750 μ l 的 wash buffer 以最高速離心 1 分鐘，丟棄濾液，重複此步驟一次，將空 column 於室溫下以最高速離心 3 分鐘使其乾燥，將 HiBind[®] extraction column 套入 1.5 ml 離心管中，加入 30~50 μ l 已預熱至 70°C 之二次蒸餾水，於室溫下靜置 5 分鐘，於室溫下以 6000 $\times g$ 離心 1 分鐘，回收濾液可得純化之 DNA 溶液。置於 -20°C 冷凍櫃中保存待用。

五、勝任細胞 (competent cell) 之製備

取單一菌落的大腸桿菌 (JM109) 置於 5 ml 之 L.B. 培養液 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.5) 中，在 37°C 搖菌培養過夜，取 3 ml 之菌液移至 100 ml 之 L.B. 培養液中在 37°C 搖菌培養 3 小時。以下步驟需於無菌操作台與 4°C 下完成。以 1000 $\times g$ 離心 10 分鐘回收細菌，再以 50 ml 2X TSS (L.B. broth 內含 5% PEG6000, 5% DMSO, 50 mM MgSO₄, 50

mM MgCl₂) 震盪懸浮之，以 1000 ×g 於 4 °C 下離心 10 分鐘，倒去上清液得沈澱，加入 10 ml 的 1X TSS (內含 30% glycerol) 溶液混合均勻，將菌液分裝於微量離心管中，儲存於 -70°C 冷凍櫃。

六、接合反應

依反應組 pGEM[®]-T Easy Vector System 完成接合反應其步驟如下：定量已純化之 DNA，公式為 (ng of vector × kb size of insert / kb size of vector) × (insert/vector molar ratio) = ng of insert。總體積 10 μl 之反應溶液中含有 5 μl 2X rapid ligation buffer、1 μl pGEM[®]-T Easy Vector (50 ng)、1 μl T4 DNA Ligase (3 Weiss units/μl)、定量後得知所需之 DNA 體積 (需低於 3 μl)，若 DNA 體積不足時，以二次蒸餾水補足之。混合均勻，室溫下作用 1 小時或於 4°C 下反應過夜 (至少 16 小時)。

七、質體轉形

將 JM109 勝任細胞置於冰上回溶 (約 5 分鐘)，輕拍管壁使細胞混合均勻。取 2 μl 完成接合反應之反應液，置於 1.5 ml 之離心管中，加入 50 μl 勝任細胞，輕輕混合，置於冰上 20 分鐘，於 42°C 水浴槽中 heat-shock 45~50 秒後立即置於冰上 2 分鐘，加入 500 μl 室溫之 SOC medium，於 37°C 震盪培養 1.5 小時。分別取 100 及 200 μl 之菌液塗抹於 L.B./ampicillin plate (使用前加入 IPTG (200 mg/ml) 4 μl 及 X-Gal (20 mg/ml) 40 μl) 上，待培養機表面之菌液完全被吸收後，倒置培養皿，於 37°C 培養過夜，即可進行正反應株之篩選，培養皿若置於 4°C 則可長期保存菌株。

八、重組質體鑑定

將所篩選到的正反應株置於 1.5 ml 的 L.B. 培養液中，於 37°C 培養過夜後，以反應組 E.Z.N.A[®] plasmid miniprep kit I (Omega) 抽取質體，依其所附之步驟如下：將菌液加於微量離心管中，以低速離心 2 分鐘後，倒去上清，以微量吸管儘可能吸去殘留液體。加入 250 μl 的 solution I/Rnase A 劇烈震盪，將沈澱完全打散。加入 250 μl 的 solution II，蓋上管蓋後將管子上下反覆搖動，再加入 350 μl 的 solution III 輕輕的混和均勻，以最高速離心 10 分鐘，將 HiBind[™] DNA column 套入 2 ml 收集管，小心吸取上清液至 column 中，以最高速離心 1 分鐘，丟棄濾液，加入 750 μl 的 DNA wash buffer 以最高速離心 1 分鐘，丟棄濾液，重複此步驟一次，將空 column 於室溫下以最高速離心 1 分鐘 使其乾燥，將 HiBind[®] extraction column 套入 1.5 ml 離心管中，加入 50~100 μl 已預熱至 70°C 之二次蒸餾水，於室溫下靜置 5 分鐘，於室溫下以 6000 ×g 離心 1 分鐘，回收濾液可得純化之質體。將純化之質體以 *EcoRI* 於 37°C 進行反應 1 小時，以 1% 之瓊脂電泳膠片進行電泳分析，確定轉形之結果。

九、DNA 定序及序列分析

將確定轉形成功之菌株送至生技公司分析，獲得煙草粉蝨 B 生物小種特異區域之序列。DNA 序列以 GeneWorks Ver. 2.5 (Intelligenetics, USA)、GeneDoc (available at <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>) 以及 Clustal W (PC/GENE) 等軟體進行序列排列分析。

十、專一性 PCR

表四 實驗中所使用之引子及序列

Table 4. Primers and primer sequences used in the experiments

引子	序列 (5'-3')	Tm (°C)
UBC431	CTGCGGGTCA	25
OPA01	CAGGCCCTTC	23
OPA02	TGCCGAGCTG	25
OPA03	AGTCAGCCAC	9
OPA04	AATCGGGCTG	24
OPA05	AGGGGTCTTG	16
OPA06	GGTCCCTGAC	13
OPA07	GAAACGGGTG	18
OPA08	GTGACGTAGG	6
OPA09	GGGTAACGCC	24
OPA10	GTGAGCGCAG	19
OPA11	CAATCGCCGT	25
OPA12	TCGGCGATAG	21
OPA13	CAGCACCCAC	17
OPA14	TCTGTGCTGG	12
OPA15	TTCCGAACCC	23
OPA16	AGCCAGCGAA	25
OPA17	GACCGCTTGT	17
OPA18	AGGTGACCGT	15
OPA19	CAAACGTCGG	20
OPA20	GTTGCGATCC	18
91167	CGGCCCGGTA	35
91074	CGGCCCTGT	33
F2	GAGGATCCCT	13
F12	ACGGTACCAG	12
H9	TGTAGCTGGG	14
H16	TCTCAGCTGG	11
Baf	CGGAACCTGAGACTGGAA	53
Bar	CCCCTGTCAAATGGC	56

在 0.2 ml 之微量離心管中依序加入無菌水 (使最後之反應總體積為 20 μ l)、2 μ l 的 10x Taq reaction buffer、兩引子 Baf/Bar (均為 20 μ M) (表四) 各 0.5 μ l、模板 DNA 50 ng、再加入 1.25 單位的 Taq DNA polymerase。以 AG-9600 型聚合酶連鎖反應器進行 PCR 反應。PCR 之反應條件為：【1】預熱 (prewarm) 94°C 2 分鐘；【2】變性 (denaturing) 94°C 45 秒；【3】黏合 (annealing) 60°C 30 秒；【4】延伸 (extension) 72°C 1 分鐘；【5】重複步驟【2】至【4】共 40 個循環；【6】最終延長 (final extension) 72°C 5 分鐘；【7】保存於 15°C。PCR 產物

以含溴化乙烷之 TAE 緩衝溶液用 1% 之瓊脂電泳膠片進行電泳分析，於 UV 光下觀察、拍照並比較其擴增片段圖譜。

結 果

一、RAPD-PCR

共篩選 27 個 逢機引子 (表四)，其中 4 個引子對於煙草粉蝨 A、B 生物小種較具有鑑別力，分別為 OPA03、91167、91074 及 F12，其結果如圖一所示。以 OPA03 增幅之結果，在 B 生物小種可獲得的片段長度為 720、590、500、350 以及 300 bp；在 A 生

物小種可獲得的片段長度為 580、470、390、330、280 以及 220 bp。以 91167 增幅之結果，在 B 生物小種可獲得的片段長度為 750、500、460、320 以及 280 bp；在 A 生物小種可獲得的片段長度為 630、590、500、420、400、300 以及 280 bp。以 91074 增幅之結果，在 B 生物小種可獲得的片段長度為 800、720、600、550、450 以及 350 bp；在 A 生物小種可獲得的片段長度為 550、500 以及 420 bp。以 F12 增幅之結果，在 B 生物小種可獲得的片段長度為 870、600、500 以及 450 bp；在 A 生物小種可獲得的片段長度為 820、670、450 以及 250 bp。將 5 個採集自不同作物上之煙草粉蝨及澳洲地區之煙草粉蝨 B 生物小種，與本研究中初步確定之 A、B 兩生物小種以隨機引子 91074 進行 RAPD-PCR，5 種作物上之煙草粉蝨皆屬於 B 生物小種，且增幅澳洲地區之煙草粉蝨 B 生物小種所獲得之 RAPD-PCR 圖譜與台灣地區煙草粉蝨 B 生物小種之圖譜相同 (圖二)。

二、專一性 PCR

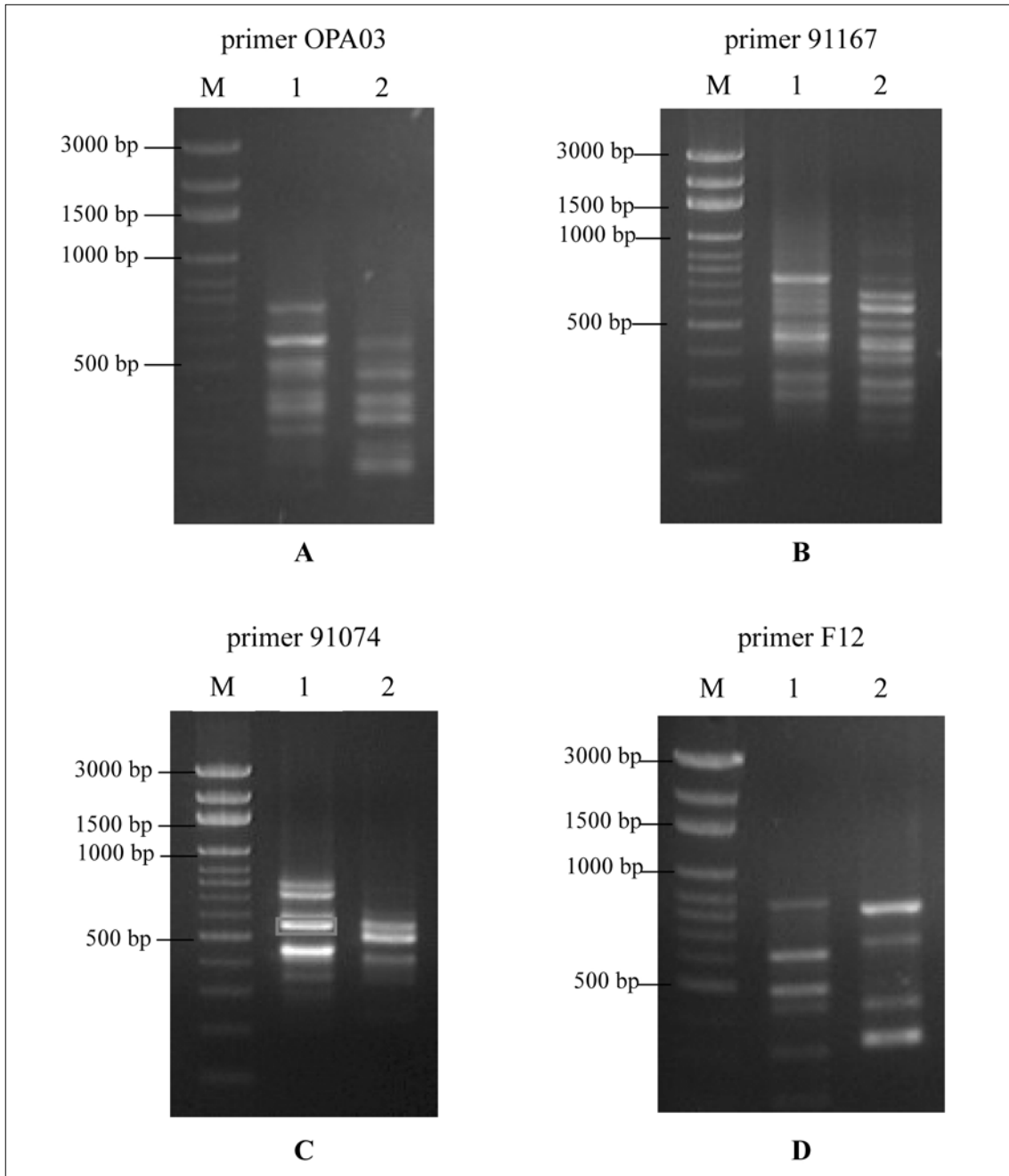
依據隨機引子 91074 擴增所獲得之圖譜，選取 B 生物小種約 550 bp 處具有生物小種間特異性之片段，經定序後設計專一性引子組 Baf/Bar，其中 Baf 之序列為 CGGAACCTGAGACTGGAA，Bar 之序列為 CCCCTGTCAAAATGGC，可在 B 生物小種擴增出大小約為 500 bp 之片段。分別就煙草粉蝨 A 生物小種、不同採集地之 B 生物小種、溫室粉蝨和螺旋粉蝨進行 PCR 增幅，所有的煙草粉蝨 B 生物小種皆可增幅出與預期片段大小相同，約 550 bp 之特異性片段，而在其他粉蝨皆無法擴增出任何 PCR 產物 (圖三及圖四)。再者，分別就國內採得之粉

蝨種類 (表一)，以及向國外專家交換煙草粉蝨標本 5 個生物小種 (A、B、AN、Nauru 及 Q) 計 12 筆 (表三)，評估專一性引子組 Baf/Bar 之適用性，發現該引子組具相當穩定之鑑別力，可供煙草粉蝨 B 生物小種快速鑑定之用 (圖五及圖六)。進一步利用專一性引子組完成台灣地區未知之 16 筆以及紫背草 9 筆煙草粉蝨族群之鑑定 (表二)，發現皆屬煙草粉蝨 B 生物小種 (圖七及圖八)。

討 論

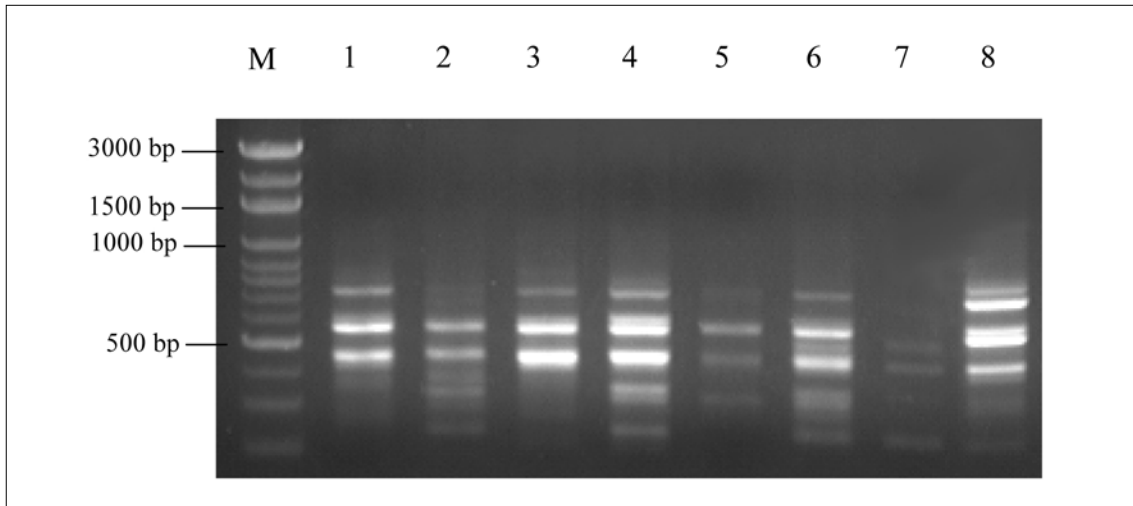
本研究除參考 De Barro and Driver (1997) 及 De Oliveira *et al.* (2000) 鑑定煙草粉蝨之隨機引子外，並利用對果實蠅類具鑑別力之隨機引子 91167 及 91074 (Haymer, 1995)，共 27 條引子，篩選對於台灣地區煙草粉蝨具鑑別力之引子。結果共有 4 種引子 (OPA03、91167、91074、F12) 被篩選出，其中又以 91074 所獲得之 RAPD-PCR 圖譜之增幅片段較少且明顯清晰，較適合用於生物小種之區分 (圖一)。

利用引子 91074 分析在田間所採集之煙草粉蝨，依據其 RAPD-PCR 圖譜確定 5 個不同作物上所採集到之煙草粉蝨皆屬於 B 生物小種 (圖二)，與 Chou (2000) 於田間採集分析所得皆為 B 生物小種之結果相符合，此一結果是否可反映田間為害主要作物之煙草粉蝨確為 B 生物小種，B 生物小種在生存競爭上是否較本地生物小種佔有優勢，則需要更多相關之採集分析才可確定。此外，本研究中亦對澳洲地區的煙草粉蝨 B 生物小種以引子 91074 進行 RAPD-PCR，其所獲得之圖譜與台灣地區的煙草粉蝨 B 生物小種圖譜相同 (圖二)。De Barro and Driver (1997) 針對以色列、荷蘭、澳洲、美國、科克群島、新喀里



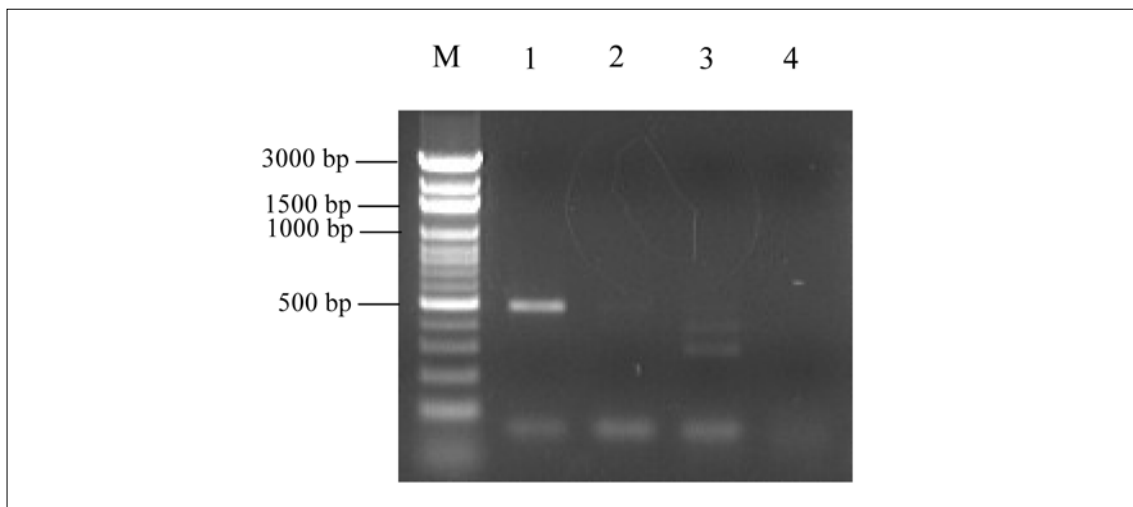
圖一 以逢機引子 (A) OAP03 (AGTCAGCCAC)、(B) 91167 (CGGCCCGGTA)、(C) 91074 (CGGCCCTGT)、(D) F12 (ACGGTACCAG) 對於煙草粉蝨進行 RAPD-PCR 之結果。M: Bio100 DNA LadderTM; lane 1: B 生物小種 (USBTB1); lane 2: A 生物小種 (USBTA1)

Fig. 1. Agarose gel with RAPD-PCR products from the *Bemisia tabaci* with primers (A) OPA03 (AGTCAGCCAC), (B) 91167 (CGGCCCGGTA), (C) 91074 (CGGCCCTGT), and (D) F12 (ACGGTACCAG). M, Bio100 DNA LadderTM; lane 1, biotype B (USBTB1); lane 2, biotype A (USBTA1).



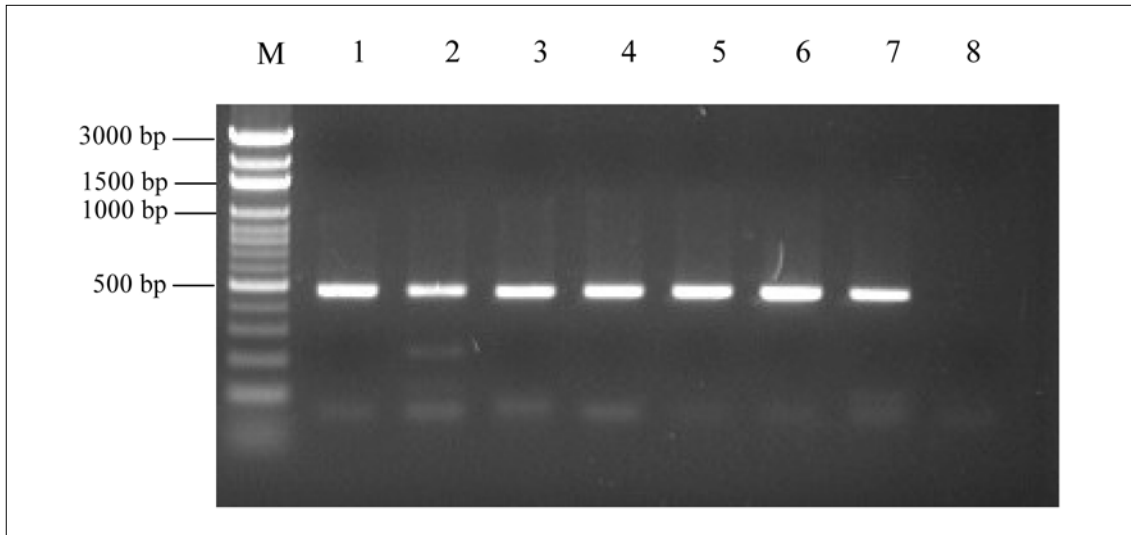
圖二 以逢機引子 91074 (CGGCCCTGT) 鑑別不同來源之煙草粉蝨。M: Bio100 DNA Ladder™；lane 1: 甘藍 (TABT01)；lane 2: 藿香薊 (TABT02)；lane 3: 甘藍 (TABT03)；lane 4: 番茄 (TABT04)；lane 5: 番茄 (TABT05)；lane 6: B 生物小種 (USBTB1)；lane 7: A 生物小種 (USBTA1)；lane 8: B 生物小種 (AUBTB)

Fig. 2. Agarose gel with RAPD-PCR products from the *Bemisia tabaci* species complex from various host plants with primer 91074 (CGGCCCTGT). M, Bio100 DNA Ladder™; lane 1: *Brassica oleraceae* var. *capitata* (TABT01); lane 2, *Ageratum conyzoides* (TABT02); lane 3, *Brassica oleraceae* var. *capitata* (TABT03); lane 4, *Lycopersicon esculentum* (TABT04); lane 5, *Lycopersicon esculentum* (TABT05); lane 6, biotype B (USBTB1); lane 7, biotype A (USBTA1); lane 8, biotype B (AUBTB).



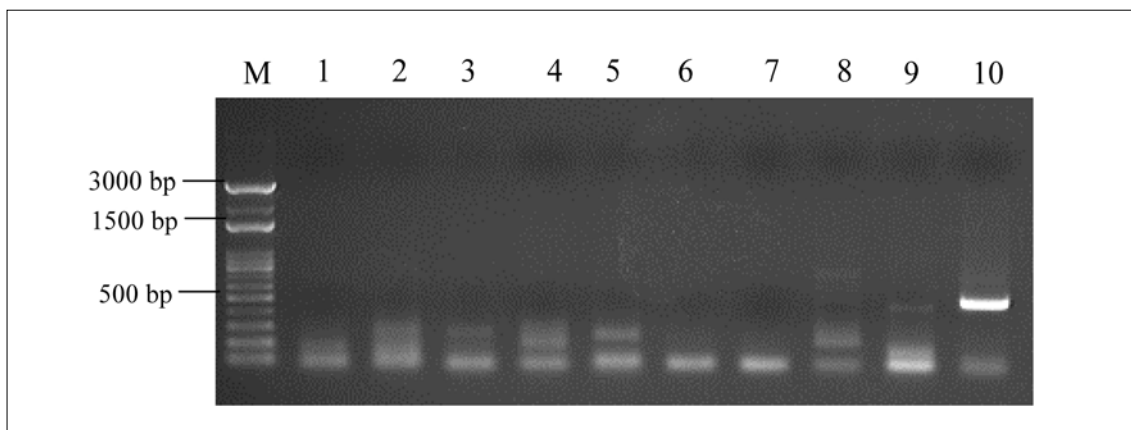
圖三 以專一性引子組 Baf/Bar 鑑別不同種類之粉蝨。M: Bio100 DNA Ladder™；lane 1: 煙草粉蝨 B 生物小種 (AUBTB)；lane 2: 煙草粉蝨 A 生物小種 (USBTA2)；lane 3: 溫室粉蝨 (TATV)；lane 4: 螺旋粉蝨 (TAAD)

Fig. 3. Identification of different whiteflies using the specific primer set Baf/Bar. M, Bio100 DNA Ladder™; lane 1, *Bemisia tabaci* biotype B (AUBTB); lane 2, *B. tabaci* biotype A (USBTA2); lane 3, *Trialeurodes vaporariorum* (TATV); lane 4, *Aleurodicus dispersus* (TAAD).



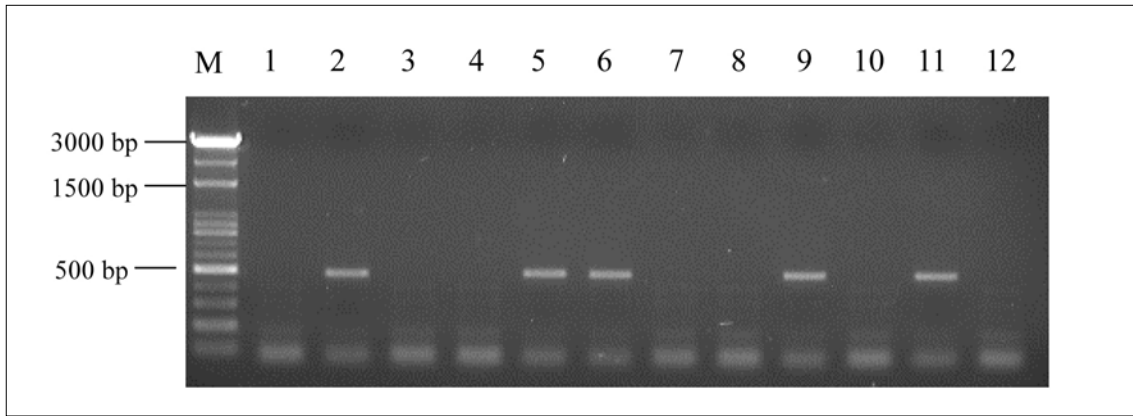
圖四 以專一性引子組 Baf/Bar 鑑別不同來源之煙草粉蝨。M: Bio100 DNA Ladder™; lane 1: 甘藍 (TABT01); lane 2: 藿香薊 (TABT02); lane 3: 甘藍 (TABT03); lane 4: 番茄 (TABT04); lane 5: 番茄 (TABT05); lane 6: B 生物小種 (USBTB2); lane 7: B 生物小種 (AUBTB); lane 8: A 生物小種 (USBTA2)

Fig. 4. Identification of *Bemisia tabaci* from various host plants using the specific primer set Baf/Bar. M, Bio100 DNA Ladder™; lane 1, *Brassica oleraceae* var. *capitata* (TABT01); lane 2, *Ageratum conyzoides* (TABT02); lane 3, *Brassica oleraceae* var. *capitata* (TABT03); lane 4, *Lycopersicon esculentum* (TABT04); lane 5, *Lycopersicon esculentum* (TABT05); lane 6, biotype B (USBTB2); lane 7, biotype B (AUBTB); lane 8, biotype A (USBTA2).



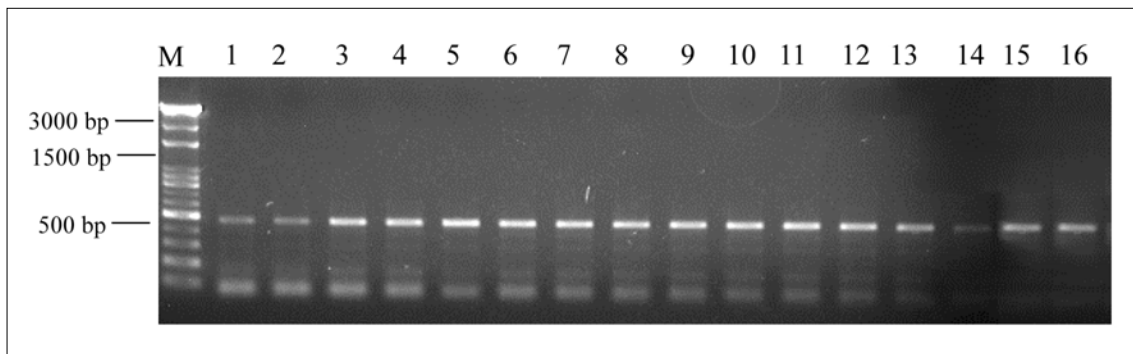
圖五 以專一性引子組 Baf/Bar 鑑別國內 9 種不同之粉蝨種類。M: Bio100 DNA Ladder™; lane 1: *Singhiella piperis*; lane 2: *Neomaskellia bergii*; lane 3: *Aleuroplatus fici*; lane 4: *Aleyrodes proletella*; lane 5: *Aleurolobus osmanthi*; lane 6: *Aleurotrachelus micheliae*; lane 7: *Dialeurodes kirkaldyi*; lane 8: *Siphoninus phillyrae*; lane 9: *Bemisia pongamiae*; lane 10: 煙草粉蝨 B 生物小種 (USBTB2)

Fig. 5. Identification of nine different whitefly species using the specific primer set Baf/Bar. M, Bio100 DNA Ladder™; lane 1, *Singhiella piperis*; lane 2, *Neomaskellia bergii*; lane 3, *Aleuroplatus fici*; lane 4, *Aleyrodes proletella*; lane 5, *Aleurolobus osmanthi*; lane 6, *Aleurotrachelus micheliae*; lane 7, *Dialeurodes kirkaldyi*; lane 8, *Siphoninus phillyrae*; lane 9, *Bemisia pongamiae*; lane 10, *Bemisia tabaci* biotype B (USBTB2).



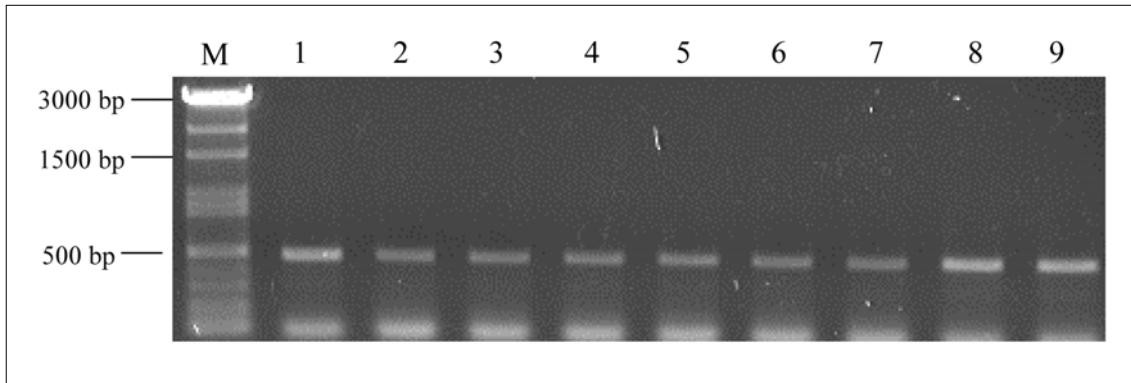
圖六 以專一性引子組 Baf/Bar 鑑別國外之不同煙草粉蝨生物小種。M: Bio100 DNA Ladder™; lane 1: A 生物小種 (USBTA1); lane 2: B 生物小種 (USBTB1); lane 3: AN 生物小種 (AUBTAN); lane 4: Nauru 生物小種 (AUBTNaura); lane 5: B 生物小種 (AUBTB); lane 6: B 生物小種 (EGBTB); lane 7: Q 生物小種 (SPBTQ1); lane 8: A 生物小種 (USBTA2); lane 9: B 生物小種 (USBTB2); lane 10: A 生物小種 (COBTA); lane 11: B 生物小種 (COBTB); lane 12: Q 生物小種 (SPBTQ2)

Fig. 6. Identification of *Bemisia tabaci* from various host plants using the specific primer set Baf/Bar. M, Bio100 DNA Ladder™; lane 1, biotype A (USBTA1); lane 2, biotype B (USBTB1); lane 3, biotype AN (AUBTAN); lane 4, biotype Nauru (AUBTNaura); lane 5, biotype B (AUBTB); lane 6, biotype B (EGBTB); lane 7, biotype Q (SPBTQ1); lane 8, biotype A (USBTA2); lane 9, biotype B (USBTB2); lane 10, biotype A (COBTA); lane 11, biotype B (COBTB); lane 12, biotype Q (SPBTQ2).



圖七 以專一性引子組 Baf/Bar 鑑別國內不同地區及寄主植物之煙草粉蝨生物小種。M: Bio100 DNA Ladder™; lane 1: 聖誕紅 (TABT06); lane 2: 甘藍 (TABT07); lane 3: 胡瓜 (TABT08); lane 4: 番茄 (TABT09); lane 5: 甘藍 (TABT10); lane 6: 蕪菁 (TABT11); lane 7: 番茄 (TABT12); lane 8: 花椰菜 (TABT13); lane 9: 楊梅 (TABT14); lane 10: 紫背草 (TABT15); lane 11: 紫背草 (TABT16); lane 12: 葎草 (TABT17); lane 13: 紫背草 (TABT18); lane 14: 紫背草 (TABT19); lane 15: 紫背草 (TABT20); lane 16: B 生物小種 (USBTB2)

Fig. 7. Identification of *Bemisia tabaci* from various host plants using the specific primer set Baf/Bar. M, Bio100 DNA Ladder™; lane 1, *Euphorbia pulcherrima* (TABT06); lane 2, *Brassica oleraceae* var. *capitata* (TABT07); lane 3, *Cucumis sativus* (TABT08); lane 4, *Lycopersicon esculentum* (TABT09); lane 5, *Brassica oleraceae* var. *capitata* (TABT10); lane 6, *Brassica rapa* (TABT11); lane 7, *Lycopersicon esculentum* (TABT12); lane 8, *Brassica oleraceae* var. *botrytis* (TABT13); lane 9, *Myrica rubra* (TABT14); lane 10, *Emilia sonchifolia* (TABT15); lane 11, *Emilia sonchifolia* (TABT16); lane 12, *Humulus scandens* (TABT17); lane 13, *Emilia sonchifolia* (TABT18); lane 14, *Emilia sonchifolia* (TABT19); lane 15, *Emilia sonchifolia* (TABT20); lane 16, biotype B (USBTB2).



圖八 以專一性引子組 Baf/Bar 鑑別不同地區紫背草上之煙草粉蝨生物小種。M: Bio100 DNA LadderTM; lane 1: TABT15; lane 2: TABT16; lane 3: TABT18; lane 4: TABT21; lane 5: TABT22; lane 6: TABT19; lane 7: TABT20; lane 8: TABT23; lane 9: B 生物小種 (USBTB2)

Fig. 8. Identification of *Bemisia tabaci* from *Emilia sonchifolia* using the specific primer set Baf/Bar. M, Bio100 DNA LadderTM; lane 1, TABT15; lane 2, TABT16; lane 3, TABT18; lane 4, TABT21; lane 5, TABT22; lane 6, TABT19; lane 7, TABT20; lane 8, TABT23; lane 9, biotype B (USBTB2).

多尼亞島 6 地之煙草粉蝨 B 生物小種進行 RAPD-PCR 分析獲得相同之圖譜，此一結果確定本研究中煙草粉蝨 B 生物小種之鑑定無誤。

Behura *et al.* (1999) 自瘿蚋科 (Diptera: Cecidomyiidae) 之亞洲水稻瘿蚋 (*Orseolia oryzae*) 的 RAPD-PCR 圖譜中篩選出在不同生物小種間具有專一性的片段，進行序列分析後，設計專一性的引子組進行 PCR 增幅，可依增幅出之電泳圖譜成功區分出亞洲水稻瘿蚋 5 個生物小種，首次將 SCARs (sequence characterized amplified regions) 之技術應用於昆蟲生物小種區分上。在本研究亦利用煙草粉蝨 A、B 生物小種以隨機引子所增幅出之 RAPD-PCR 圖譜，篩選出生物小種間具有特異性片段，經定序分析後所設計之專一性引子組 Baf/Bar，僅可在煙草粉蝨 B 生物小種增幅出一段約 500 bp 的片段，而在 A 生物小種則無該片段之出現。若用此引子組擴增國外專家所提供之煙草粉蝨各生物小種，亦對 B 生物小種具專一

性之鑑別力 (圖六)，且此一片段亦不出現於國內其他 9 種粉蝨種類中 (圖五)，由此確知引子組 Baf/Bar 對煙草粉蝨 B 生物小種具專一性之鑑別力。更進一步利用此專一性引子組分析國內所採得之 16 筆及紫背草 9 筆煙草粉蝨族群，發現皆屬於 B 生物小種，尚未發現其他生物小種之存在 (圖七及圖八)，推究其原因可能與採集資料之不足以及 B 生物小種已於台灣地區立足有關，但仍須進行更多研究分析佐證。

專一性引子組之建立不但可作為形態分類之再確定，亦可提供該種生物小種間較 RAPD-PCR 圖譜更為穩定明確之鑑定依據。然目前僅確定此專一性引子組可適用於本研究中所有的煙草粉蝨 B 生物小種，且此專一性引子只是針對 A、B 兩個生物小種之煙草粉蝨所設計，尚未測試當有其他生物小種存在時之適用與否，故仍有分析更多煙草粉蝨生物小種之必要。

誌 謝

感謝以下專家提供材料：溫宏治（行政院農委會農試所鳳山熱帶園藝分所）、陳昇寬（行政院農委會台南區農改場）、白桂芳（行政院農委會台中區農改場）、楊大吉（行政院農委會花蓮區農改場）、蔡金池（行政院農委會澎湖農改場）、蔡文錫（財團法人亞洲蔬菜研究發展中心）、J. K. Brown (University of Arizona, Tucson, AR, USA), P. J. De Barro (CSIRO Entomology, Indooroopilly, Australia), I. D. Bedford (John Innes Centre, Norwich, UK), H. Y. Liu (USDA-ARS, U. S. Agricultural Research Station, Salinas, CA, USA), L. A. Calvert (Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia), J. L. Cenis (CIDA, Murcia, Spain)。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(6) 及 91農科-7.2.2-檢-B2(5) 之經費補助，謹致謝忱。

引用文獻

- Barinaga, M.** 1993. Is devastating whitefly invader really a new species? *Science* 259: 30.
- Behura, S. K., S. C. Sahu, S. Rajamani, A. Devi, R. Mago, S. Nair, and M. Mohan.** 1999. Differentiation of Asian rice gall midge, *Orseolia oryzae* (Wood-Mason), biotypes by sequence characterized amplified regions (SCARs). *Insect Mol. Biol.* 8: 391-397.
- Bellows, T. S., T. M. Perring, R. J. Gill, and D. H. Headrick.** 1994. Description of a species of *Bemisia* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 195-206.
- Bethke, J. A., T. D. Paine, and D. H. Headrick.** 1991. Comparative biology, morphometrics, and development of two populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) on cotton and poinsettia. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 84: 407-411.
- Brown, J. K., S. A. Coats, I. D. Bedford, P. G. Markham, J. Bird, and D. R. Frohlich.** 1995a. Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). *Biochem. Genet.* 33: 205-214.
- Brown, J. K., D. R. Frohlich, and R. C. Rosell.** 1995b. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annu. Rev. Entomol.* 40: 511-534.
- Byrne, F. J., and A. L. Devonshire.** 1993. Insensitive acetylcholinesterase and esterase polymorphism in susceptible and resistant populations of the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Genn.). *Pesticide Biochem. Physiol.* 45: 34-42.
- Byrne, F. J., D. Bedford, A. L. Devonshire, and P. G. Markham.** 1995a. Esterase variation and squash induction in B-type *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Bull. Entomol. Res.* 85: 175-179.
- Byrne, F. J., M. Cahill, I. Denholm, and A.**

- L. Devonshire.** 1995b. Biochemical identification of interbreeding between B-type and non B-type strains of the tobacco whitefly *Bemisia tabaci*. *Biochem. Genet.* 33: 13-23.
- Campbell, B. C., J. E. Duffus, P. Baumann, A. C. Bartlett, and N. J. Gawel.** 1993a. Determining whitefly species. *Science* 261: 1333.
- Campbell, B. C., J. D. Steffen-Campbell, and J. H. Werren.** 1993b. Phylogeny of the *Nasonia* species complex (Hymenoptera: Pteromalidae) inferred from an internal transcribed spacer (ITS2) and 28S rDNA sequences. *Insect Mol. Biol.* 2: 225-237.
- Campbell, B. C., J. D. Steffen-Campbell, and R. J. Gill.** 1994. Evolutionary origin of whiteflies (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae) inferred from 18S rDNA sequences. *Insect Mol. Biol.* 3: 73-88.
- Chou, F. I.** 2000. Rapid identification of the silverleaf whitefly (*Bemisia argentifolii* Bellows & Perring) and its population parameters. Graduate Institute of Entomology NTU, Master's thesis. 134 pp (in Chinese).
- Coats, S. A., J. K. Brown, and D. L. Hendrix.** 1994. Biochemical characterization of biotype-specific esterases in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24: 723-728.
- Costa, H. S., and J. K. Brown.** 1991. Variation in biological characteristics and esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci*, and the association of one population with silverleaf symptom induction. *Entomol. Exp. Appl.* 61: 211-219.
- De Barro, P. J.** 1995. *Bemisia tabaci* biotype B: a review of its biology, distribution and control. CSIRO, Canberra. 58 pp.
- De Barro, P. J., and F. Driver.** 1997. Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Aust. J. Entomol.* 36: 149-152.
- De Barro, P. J., F. Driver, J. W. H. Trueman, and J. Curran.** 2000. Phylogenetic relationships of world populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) using ribosomal ITS1. *Mol. Phylogen. Evol.* 16: 29-36.
- De Barro, P. J., and P. J. Hart.** 2000. Mating interactions between two biotypes of the whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Australia. *Bull. Entomol. Res.* 90: 103-112.
- De Barro, P. J., W. Liebrechts, and M. Carver.** 1998. Distribution and identity of biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) in member countries of the Secretariat of the Pacific Community. *Aust. J. Entomol.* 37: 214-218.

- De Oliveira, M. R. V., M. S. Tigano, and S. Aljanabi.** 2000. Molecular characterization of whitefly (*Bemisia* spp.) in Brazil. *Pesq. Agropec. Bras.* 35: 1261-1268.
- Demichelis, S., D. Bosco, and A. Manino.** 2000. Distribution of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) biotypes in Italy. *Can. Entomol.* 132: 519-527.
- Garner, K. J., and J. M. Slavicek.** 1996. Identification and characterization of a RAPD-PCR marker for distinguishing Asian and North American gypsy moth. *Insect Mol. Biol.* 5: 81-91.
- Gawel, N. J., and A. C. Bartlett.** 1993. Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. *Insect Mol. Biol.* 2: 33-38.
- Gerling, D.** 1990. Whiteflies: Their Bionomics, Pest Status and Management. Andover, Hants, UK. 348 pp.
- Gill, R. J.** 1992. A review of the sweetpotato whitefly in southern California. *Pan-Pacif. Entomol.* 68: 144-152.
- Guirao, P., F. Beitia, and J. L. Cenis.** 1997. Biotype determination of Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Bull. Entomol. Res.* 87: 587-593.
- Gunning, R. V., F. J. Byrne, B. D. Conde, M. I. Connelly, K. Hergstrom, and A. L. Devonshire.** 1995. First report of B-biotype *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) in Australia. *J. Aust. Entomol. Soc.* 34: 116.
- Gunning R. V., F. J. Byrne, and A. L. Devonshire.** 1997. Electrophoretic analysis of non-B and B-biotype *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in Australia. *Aust. J. Entomol.* 36: 245-249.
- Haymer, D. S.** 1995. Genetic analysis of laboratory and wild strains of the melon fly (Diptera: Tephritidae) using random amplified polymorphic DNA-polymerase reaction. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 88: 705-710.
- Ko, C. C., C. N. Chen, and C. H. Wang.** 2002. A review of taxonomic studies on the *Bemisia tabaci* species complex. *Formosan Entomol.* 22: 307-341 (in Chinese).
- Liu, C. C.** 2001. Use of DNA markers for discriminations of *Bemisia tabaci* biotypes and construction of phylogenetic relationship among four species of *Oxya* grasshoppers in Taiwan. Graduate Institute of Entomology NTU, Master's thesis. 85 pp (in Chinese).
- Liu, H. Y., S. Cohen, and J. E. Duffus.** 1992. The use of isozyme pattern to distinguish sweetpotato whitefly biotypes. *Phytoparasitica* 20: 187-194.
- Nagaraju, J. G., and L. Singh.** 1997. Assessment of genetic diversity by DNA profiling and its significance in silkworm, *Bombyx mori*. *Electrophoresis* 18: 1633-1638.
- Perring, T. M.** 2001. The *Bemisia tabaci*

- species complex. *Crop Prot.* 20: 725-737.
- Perring, T. M., A. Cooper, D. J. Kazmer, C. Shields, and J. Shields.** 1991. New strain of sweetpotato whitefly invades California vegetables. *Calif. Agric.* 45: 10-12.
- Perring, T. M., A. Cooper, and D. Kazmer.** 1992. Identification of the poinsettia strain of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) on broccoli by electrophoresis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 85: 1278-1284.
- Perring, T. M., A. D. Cooper, R. J. Rodriguez, C. A. Farrar, and T. S. Bellows, Jr.** 1993. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science* 259: 74-77.
- Rosell, R. C., I. D. Bedford, D. R. Frohlich, R. J. Gill, J. K. Brown, and P. G. Markham.** 1997. Analysis of morphological variation in distinct population of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90: 575-589.
- 註：煙草粉蝨 (*Bemisia tabaci*) 泛指煙草粉蝨種群 (species complex)；銀葉粉蝨 (*Bemisia argentifolii*) 為煙草粉蝨 B 生物小種 (biotype)
- 收件日期：2004 年 04 月 23 日
接受日期：2004 年 08 月 19 日

Development of Rapid Identification of *Bemisia argentifolii* (Hemiptera: Aleyrodidae) by PCR

Chung-Hsiung Wang, Chiun-Cheng Ko*, Chung-Chi Liu and Chiou-Nan Chen

Department of Entomology, National Taiwan University, Taipei 106, Taiwan

ABSTRACT

Diagnosis between *Bemisia tabaci* biotypes A and B was first carried out in this investigation using RAPD-PCR analysis. The four primers, OPA01, F12, 91167, and 91074, from 27 random primers were selected for specific discrimination of biotypes A and B. The specific amplicon of biotype B was cloned and sequenced by RAPD-PCR using primer 91074. A primer set, Baf/Bar, was designed based on the nucleotide sequence of this amplicon. An amplicon (of about 500 bp) offered yields with Baf/Bar only with the genomic DNA template by PCR, while none was found with other genomic DNA biotypes. This result shows that the specific primer set can be used to discriminate biotype B from other biotypes of *B. tabaci*. This is initial work on a molecular diagnostic approach for *B. tabaci* in Taiwan. Using results from this investigation, we will study more populations of *B. tabaci* from Taiwan using additional molecular studies.

Key words: RAPD, specific primer set, diagnostic techniques, *Bemisia tabaci*, *B. argentifolii*