



# Formosan Entomologist

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

## PCR-RFLP Technique for Molecular Identification of Rhopalosiphum (Aphididae) 【Research report】

### 利用PCR-RFLP技術進行縊管蚜屬 (Rhopalosiphum) (常蚜科) 昆蟲之分子鑑定 【研究報告】

Hsin-Ting Yeh, Chiun-Cheng Ko\*, Tung-Ching Hsu, and Cheng-Jen Shih  
葉信廷、柯俊成\*、許洞慶、石正人

\*通訊作者E-mail: [kocc2501@ccms.ntu.edu.tw](mailto:kocc2501@ccms.ntu.edu.tw)

Received: 2004/04/03 Accepted: 2004/09/24 Available online: 2005/03/01

#### Abstract

Aphids are insects with polymorphism. Species identification mostly depends on the morphological features of the adult. However, it is difficult to distinguish species at immature stages. Molecular markers may be helpful in solving this problem. Therefore, in this study, the elongation factor 1 $\alpha$  (EF 1 $\alpha$ ) in the genome of aphids and the partial pLeuC gene of the endosymbionts (*Buchnera* sp.) in aphids were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers. Then, the restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the PCR products was obtained. These DNA fragments were different from each other in the four species of aphids, *Rhopalosiphum maidis*, *R. nymphaeae*, *R. padi* and *R. rufiabdominalis*. Moreover, the DNA pattern of PCR-RFLP was also stable in immature stages, as those found in both adults. These results indicate that the DNA markers of PCR-RFLP from both host insects and their endosymbionts may be useful in species identification.

#### 摘要

近年來分子標記已被用於區分個體微小、外部形態相似不易辨別之物種，其檢測快速、操作容易的優點，相信對微小昆蟲的鑑定，也能提供莫大的幫助。依照形態特徵對於鑑定蚜蟲標本品質的要求相當高，再加上蚜蟲具有多態型，個體間外部形態變異程度大，造成蚜蟲種類鑑定時的困難。本研究藉由 DNA 分子標記來鑑定目前分布在台灣的縊管蚜屬 (*Rhopalosiphum*) 之四個種類：玉米蚜 (*R. maidis*)、睡蓮蚜 (*R. nymphaeae*)、稻麥蚜 (*R. padi*) 及紅腹根蚜 (*R. rufiabdominalis*)。首先增幅蚜蟲核 DNA 之延伸因子 1 $\alpha$  (elongation factor 1 $\alpha$ , EF 1 $\alpha$ ) 以及蚜蟲體內的原生共生菌 (primary symbionts) *Buchnera* sp. 所攜帶之質體的基因片段 pLeuC，再配合限制酶片段長度多態型 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析，結果以限制酶 *Nla*III 和 *Eam*1104I 進行 EF 1 $\alpha$  增幅片段酶切，以及限制酶 *Dra*I 進行 pLeuC 增幅片段的酶切，在四種蚜蟲間可得不同的限制酶片段多態型圖譜，藉以鑑別種類。另外提供上述二個基因片段之核苷酸序列以為種類鑑定之用。最後再探討利用原生共生菌的 DNA 分子資料做為鑑別蚜蟲種類之可行性。

**Key words:** PCR-RFLP, endosymbiont, elongation factor 1 $\alpha$ , *Buchnera*

**關鍵詞:** 聚合酶連鎖反應-限制酶片段長度多態型、內共生菌、延伸因子 1 $\alpha$ 、原生共生菌

Full Text: [PDF \(2.39 MB\)](#)

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

# 利用 PCR-RFLP 技術進行縊管蚜屬 (*Rhopalosiphum*) (常蚜科) 昆蟲之分子鑑定

葉信廷 柯俊成\* 許洞慶 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

近年來分子標記已被用於區分個體微小、外部形態相似不易辨別之物種，其檢測快速、操作容易的優點，相信對微小昆蟲的鑑定，也能提供莫大的幫助。依照形態特徵對於鑑定蚜蟲標本品質的要求相當高，再加上蚜蟲具有多態型，個體間外部形態變異程度大，造成蚜蟲種類鑑定時的困難。本研究藉由 DNA 分子標記來鑑定目前分布在台灣的縊管蚜屬 (*Rhopalosiphum*) 之四個種類：玉米蚜 (*R. maidis*)、睡蓮蚜 (*R. nymphaeae*)、稻麥蚜 (*R. padi*) 及紅腹根蚜 (*R. rufiabdominalis*)。首先增幅蚜蟲核 DNA 之延伸因子 1 $\alpha$  (elongation factor 1 $\alpha$ , EF 1 $\alpha$ ) 以及蚜蟲體內的原生共生菌 (primary symbionts) *Buchnera* sp. 所攜帶之質體的基因片段 pLeuC，再配合限制酶片段長度多態型 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析，結果以限制酶 *Nla*III 和 *Eam*1104I 進行 EF 1 $\alpha$  增幅片段酶切，以及限制酶 *Dra*I 進行 pLeuC 增幅片段的酶切，在四種蚜蟲間可得不同的限制酶片段多態型圖譜，藉以鑑別種類。另外提供上述二個基因片段之核苷酸序列以資種類鑑定之用。最後再探討利用原生共生菌的 DNA 分子資料做為鑑別蚜蟲種類之可行性。

**關鍵詞：**聚合酶連鎖反應-限制酶片段長度多態型、共生菌、延伸因子 1 $\alpha$ 、原生共生菌。

## 前言

蚜蟲的形態鑑定依據是以成蟲的特徵為主，由於其幼齡期多項鑑定時的重要依據，如觸角節數、次生感覺器、尾片等構造，尚未生長完全，難以進行種類鑑定的工作；再加上蚜蟲的生活受氣候、寄主植物等環境的影響非常

大，也因此造成大多數種類的蚜蟲有多態型 (polymorphism) 的情形出現 (Tao, 1980; Dixon, 1985)。同一種蚜蟲，可能同時存在有翅型、無翅型個體，其外部形態特徵差異非常大，再加上取食不同寄主植物時，蚜蟲的體色及體型的差異也可能非常大。如要進行蚜蟲形態鑑定時，能夠同時取得有翅型及無翅型的多

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

隻個體來比對，才能準確地鑑別種類。

在分子生物技術日漸成熟的發展下，許多的研究指出，只要選取適當的分子標記，配合各種生物技術的方法，對於表型相似的近似物種，都可以根據分子的層次，有效地鑑別種類 (Chiu *et al.*, 2001; Chen and Shih, 2003)。相信經由分子的層次，對於具多態型的蚜蟲，也同樣能夠提供鑑別的效果 (Figueroa *et al.*, 1999)。本試驗選定分布在台灣地區的縊管蚜屬 (*Rhopalosiphum*) 四種蚜蟲：玉米蚜 (*R. maidis*)、睡蓮蚜 (*R. nymphaeae*)、稻麥蚜 (*R. padi*) 及紅腹根蚜 (*R. rufiabdominalis*)，以聚合酶連鎖反應增幅蚜蟲核 DNA 內的延伸因子 1 $\alpha$  (Elongation factor 1 alpha, EF 1 $\alpha$ ) 以及其體內的原生共生菌 (primary symbionts) *Buchnera* sp. 所攜帶之質體的 pLeuC 基因片段，再配合限制酶片段長度多態型 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析，比較四種蚜蟲的限制酶片段多態型圖譜，進行蚜蟲分子鑑定的研究，期望能以分子資料配合既有之形態資料，對蚜蟲的鑑定方法提供完整且易操作的方式。

延伸因子位於核 (nuclear) 內，為參與從訊息 RNA (mRNA) 轉譯成蛋白質的過程中，具有重要功能的蛋白質，其主要有兩個複合體 (complexes) EF 1 和 EF 2，每個複合體又由數個蛋白質組成，每一個小單位的蛋白質在轉譯的過程中，都具有特別的功能。其中延伸因子 1 $\alpha$  (EF 1 $\alpha$ ) 主要的功能在幫助 aminoacyl-tRNA 與核糖體 (ribosome) 的鍵結 (Hovemann *et al.*, 1988)。延伸因子的功能對於生物體而言相當重要，所以無論是動物或植物，不同分類群間的胺基酸序列歧異度都不高 (Palumbi, 1996)。

另一方面，常蚜科 (Aphididae) 昆蟲體

內普遍存在原生共生菌 *Buchnera*，其能提供蚜蟲多種必需胺基酸，缺乏原生共生菌的個體會生長速度遲緩及發育不良，導致無法產生後代 (Douglas, 1996)。因為原生共生菌對蚜蟲的生長與繁殖有重大的影響，所以於自然條件下蚜蟲體內必然有原生共生菌的存在，又有研究指出不同種類蚜蟲體內之原生共生菌 *Buchnera*，有隨著寄主蚜蟲而分化的趨勢 (Moran and Baumann, 1994; Brynne *et al.*, 1998; Baumann *et al.*, 1999; van Ham *et al.*, 1999; Martinez-Torres *et al.*, 2001)；於是本研究以原生共生菌 *Buchnera* 所攜帶之質體的 pLeuC 基因片段進行試驗，探討利用原生共生菌 DNA 分子資料做為鑑別蚜蟲種類之可行性。

## 材料與方法

### 一、蚜蟲標本採集與保存

蚜蟲的取得以目視法直接於田間採集，當尋得所需的種類時，採集整個族群（包含成蟲、若蟲）直接置入 95% 酒精之中，帶回實驗室置於  $-20^{\circ}\text{C}$  中保存；再自酒精浸泡標本中，選取若干成蟲製成玻片標本，待種類確定後，再進行後續實驗。

### 二、蚜蟲基因組 DNA 萃取

本研究使用 Viogene 公司的 DNA 純化試劑組 (Blood and Tissue Genomic DNA Miniprep System kit, Cat. No. GG1001) 萃取蚜蟲基因組 DNA，詳細過程參考 Chen and Shih (2003)。

### 三、利用聚合酶連鎖反應 (PCR) 增幅目標 DNA

取 PCR 專用 0.2 ml 微量離心管，加入

5.0  $\mu\text{l}$  的蚜蟲基因組 DNA 萃取液、0.6 unit 之 *Taq* DNA polymerase (Protech Technology Enterprise CO., Ltd.)、10x reaction buffer (內含 15 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ) 2.5  $\mu\text{l}$ 、2.5 mM dNTPs (Protech Technology Enterprise CO., Ltd.) 混合液 2.5  $\mu\text{l}$  (終濃度 0.25 mM)、1.5  $\mu\text{M}$  正向引子 (forward primer) 2.5  $\mu\text{l}$  (終濃度 0.15  $\mu\text{M}$ ) 及 1.5  $\mu\text{M}$  primer 反向引子 (reverse primer) 2.5  $\mu\text{l}$  (終濃度 0.15  $\mu\text{M}$ )，最後加入去離子無菌水，使總體積為 25  $\mu\text{l}$ ，將溶液混合均勻。將調配完成的混合液放入 GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2400 型聚合酶連鎖反應溫度控制器中，進行聚合酶連鎖反應。所欲增幅 DNA 之片段，依以下二種方式進行：

1. 核 DNA 之延伸因子 1 $\alpha$  (EF 1 $\alpha$ ) 區域：增幅 EF 1 $\alpha$  之引子對，正向引子為 EF3 (GAA CGT GAA CGT GGT ATC AC) 及反向引子 EF6 (TGA CCA GGG TGG TTC AAT AC)(von Dohlen *et al.*, 2002)。PCR 反應條件為 95 $^{\circ}\text{C}$ / 5 分鐘，然後進行 40 個循環之 95 $^{\circ}\text{C}$ / 1 分鐘、52 $^{\circ}\text{C}$ / 1.5 分鐘、72 $^{\circ}\text{C}$ / 1.5 分鐘，最後再經 72 $^{\circ}\text{C}$ / 15 分鐘完成反應，將 PCR 產物儲存於 4 $^{\circ}\text{C}$  中備用。

2. 原生共生菌 *Buchnera* 攜帶質體之 pLeuC 區域：參考 Bracho 等 (1995) 的研究，設計一組引子增幅原生共生菌 *Buchnera* 所攜帶與合成白胺酸 (leucine) 相關之質體 pLeuC 區域，正向引子為 pLeuC-F03 (CGG TCC TGA ACA AGG TAT GAC ATT AC) 及反向引子 pLeuC-R02 (AAT GTG TTC TAC CAC CCC TAC CTT G)。PCR 反應條件為 94 $^{\circ}\text{C}$ / 5 分鐘，然後進行 40 個循環之 94 $^{\circ}\text{C}$ / 1 分鐘、56 $^{\circ}\text{C}$ / 1 分鐘、72 $^{\circ}\text{C}$ / 1.5 分鐘，最後再經 72 $^{\circ}\text{C}$ / 15 分鐘完成反應，將 PCR 產物儲存於 4 $^{\circ}\text{C}$  中備用。

#### 四、限制剷長度片段多態型 (RFLP) 分析

取 10~15  $\mu\text{l}$  PCR 增幅產物，加入 3~5 unit 的限制酶和 1x buffer，最後加入去離子無菌水使總體積為 20  $\mu\text{l}$ ，在適當溫度水浴中，使限制酶作用 3~5 小時。酶切後的產物以 2.5% agarose gel 在 1x TAE 緩衝液進行電泳，於紫外燈下觀察並拍照，比較不同種類蚜蟲之限制酶切割片段圖譜。

#### 五、DNA 定序及序列分析

將 PCR 產物委由明欣生物科技公司進行定序，所得 DNA 序列以 GeneDoc (Nicholas and Nicholas, 1997) 以及 Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) 等軟體進行序列比對，並連結國家衛生研究院 (National Health Research Institutes) 的 GCG 網站，進行序列分析及限制酶切位比對。

## 結 果

### 一、蚜蟲標本採集

本研究於台灣本島進行全面採集，至 2004 年 3 月為止，除了紅腹根蚜僅於宜蘭縣雙連埤、台北縣三峽、新竹縣竹東等三地，採得有翅型及若蟲少數個體之外，其餘三種，皆採得各齡期蟲體；其中玉米蚜及稻麥蚜，寄主植物以玉米 (*Zea mays*) 為主，廣泛分佈於各地；睡蓮蚜以多種水生植物為寄主植物，分布較為侷限。後續實驗中所使用的蚜蟲標本之採集資料列於表一。

### 二、目標 DNA 的增幅

延伸因子 1 $\alpha$  (EF 1 $\alpha$ ) 經 PCR 增幅後，以 1.2% agarose gel 電泳分析，發現四種蚜蟲的 EF 1 $\alpha$  片段長度皆約 1050 bp (圖一 A)，並無太大差異。而原生共生菌 *Buchnera*

表一 本試驗使用蚜蟲標本之採集資料

Table 1. Collection information of *Rhopalosiphum* aphids used in this study

Species	Stage <sup>1)</sup>	Locality of collection	Host plant	Date
<i>R. maidis</i>	WA	Puli Township, Nantou County	<i>Zea mays</i>	Jan 18, 2003
	AA	Yonghe City, Taipei County	<i>Zea mays</i>	Apr 2, 2003
	1° N	Beinan Township, Taitung County	<i>Zea mays</i>	Oct 7, 2003
<i>R. nymphaeae</i>	WA	Sansing Township, Ilan County	<i>Caldesia gradis</i>	May 29, 2003
	AA	Da-an District, Taipei City	<i>Eichorhia crassipes</i>	Jan 17, 2003
	1° N	Fuli Township, Hualien County	<i>Nymphaea tetragona</i>	Jun 23, 2003
<i>R. padi</i>	WA	Yuanshan Township, Ilan County	<i>Zea mays</i>	May 29, 2003
	AA	Shihlin District, Taipei City	<i>Zea mays</i>	May 25, 2003
	1° N	Beinan Township, Taitung County	<i>Zea mays</i>	Feb 26, 2003
<i>R. rufiabdominalis</i>	WA	Sansia Township, Taipei County	<i>Prunus campanulata</i>	Jan 1, 2004
	AA	Yuanshan Township, Ilan County	<i>Zea mays</i>	May 29, 2003
	1° N	Jhudong Township, Hsinchu County	<i>Prunus campanulata</i>	Feb 11, 2004

<sup>1)</sup> WA, wingless adult; AA, alate adult; 1° N, first instar nymph.

攜帶質體之 pLueC 區域，經電泳分析後，片段長度約為 950 bp (圖二 A)，在四種蚜蟲之間也無太大差異。

### 三、PCR-RFLP 分析結果

1. 延伸因子 1α 分析：將四種蚜蟲的 EF 1α 片段的定序結果，連結至國家衛生研究院的 GCG 網站，進行限制酶切位的比對與分析，結果發現 *Nla*III 與 *Eam*1104I 一起進行限制酶切，可在四種蚜蟲之間，具有不同的限制酶切位，得以清楚鑑別四種蚜蟲 (圖一 B)；在玉米蚜會產生約 550、370、100 和 30 bp 的片段；在睡蓮蚜產生約 440、370、135 和 100 bp 片段；在稻麥蚜可產生約 440、210、160、100、110 和 20 bp 的片段；在紅腹根蚜可產生約 580、210、160 和 100 bp 的片段。再分別測試單種蚜蟲內的穩定度，分別選取無翅型、有翅型及幼齡期個體於不同採集地點 (表一) 進行測試，結果顯示穩定性極高 (圖三)。

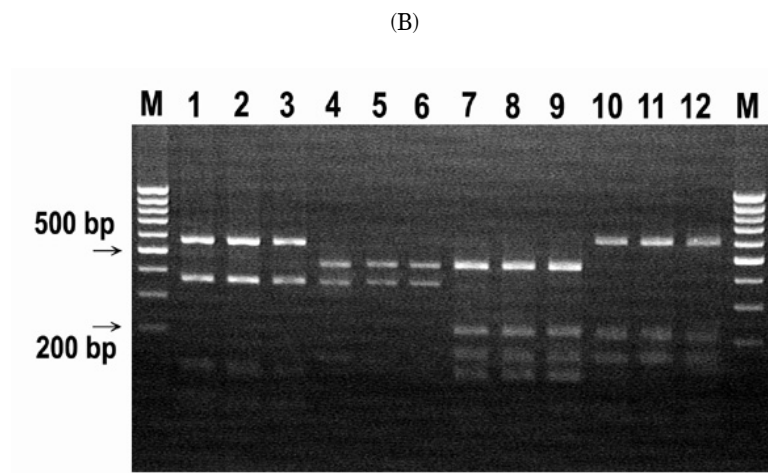
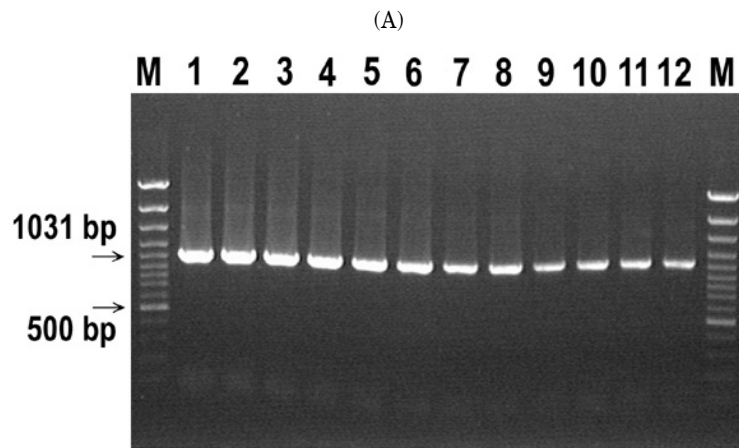
2. 原生共生菌 *Buchnera* 攜帶質體之 pLueC 區域：同樣將四種蚜蟲的 pLueC 片

段定序結果連結至 GCG 網站，進行限制酶切位比對，結果可得 *Dra*I 限制酶切割後，在四種蚜蟲之間具有不同的切位，根據限制酶片段多態型圖譜可以清楚區分種類 (圖二 B)。再進行種內穩定度測試，結果也顯示穩定度極高 (圖四)。

### 四、EF 1α 與 pLueC 的序列分析

本研究除了以 PCR-RFLP 建立縊管蚜屬之玉米蚜、睡蓮蚜、稻麥蚜和紅腹根蚜的限制酶片段多態型圖譜，另外將此四種蚜蟲的核 DNA 之 EF 1α 及原生共生菌 *Buchnera* 之 pLueC 基因片段定序結果，整理列出如圖五及圖六，提供核苷酸序列以為種類鑑定之用。

四種蚜蟲的核 DNA 之 EF 1α 基因片段經定序後分析，平均長度約為 928.8 bp，A + T% 為 57.9%，在所定序的區域間，有兩個插入子 (intron)，相關位置見圖五，第一個插入子長約 71 bp，第二個插入子長約 72 bp；結果顯示在四種蚜蟲間的序列組成歧異度並不大，種間序列相似度 (similarity) 最高為 98.6%，最低為 93.3%。原生共生菌 *Buchnera*



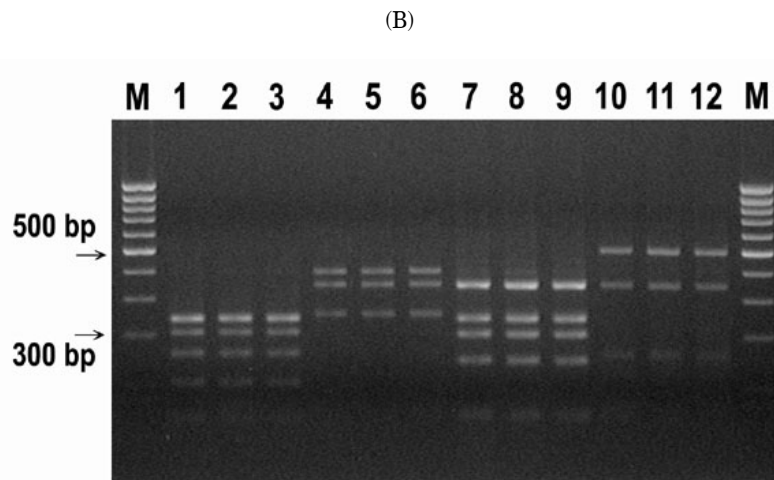
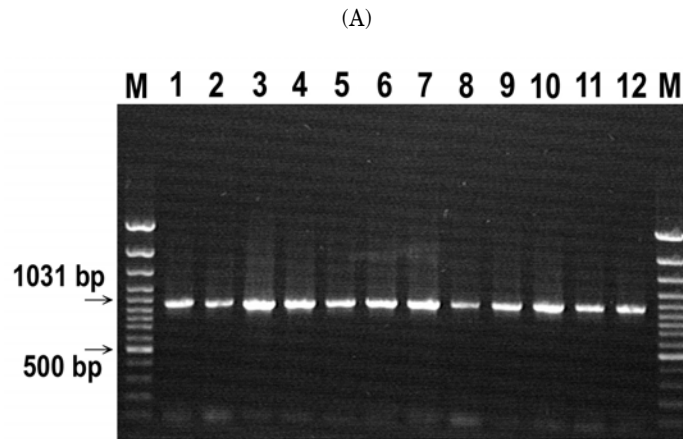
圖一 蚜蟲 EF 1 $\alpha$  區域 PCR-RFLP 分析之結果。(A) 以 EF3/EF6 引子組增幅四種蚜蟲 EF 1 $\alpha$  區域，可得約 1050 bp 之片段。(B) 以核酸內切酶 *Nla*III 與 *Eam*1104I 切割四種蚜蟲 EF 1 $\alpha$  片段之 RFLP 圖譜。

Fig. 1. (A) Amplification of the EF 1 $\alpha$  region with primers EF3 and EF6 for four *Rhopalosiphum* species. (B) RFLP analysis of the EF 1 $\alpha$  with endonuclease *Nla*III and *Eam*1104I. M, 100-bp DNA ladder (MBI Fermentas); lanes 1-3: *R. maidis* wingless adult, alate adult, first instar nymph; lanes 4-6: *R. nymphaeae* wingless adult, alate adult, first instar nymph; lanes 7-9: *R. padi* wingless adult, alate adult, first instar nymph; lanes 10-12: *R. rufiabdominalis* alate adult.

之 pLeuC 片段定序後分析，長度為 746~751 bp，A + T% 為 71%；結果顯示此基因片段在四種蚜蟲之間變異程度較 EF 1 $\alpha$  高 (圖六)，種間的相同度最高為 94.0%，最低為 84.6% (表二、表三)。

## 討 論

近年來應用核酸分子資料做為物種鑑別的方式逐漸受到重視，常用的分子標記有核糖體 DNA (ribosomal DNA, rDNA)、粒線體 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)、衛星



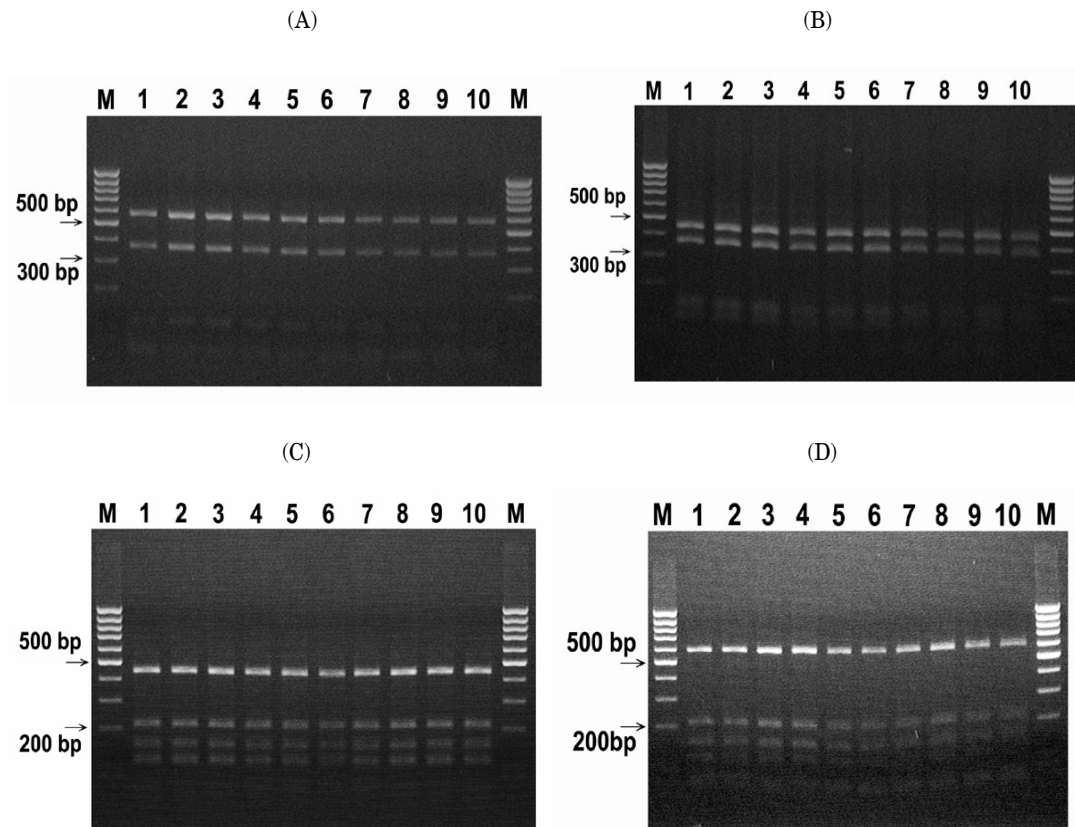
圖二 內共生菌 pLeuC 區域 PCR-RFLP 分析之結果。(A) 以 pLeuC-F03/ pLeuC-R02 引子組增幅四種蚜蟲內共生菌 pLeuC 區域，可得約 950 bp 之片段。(B)以核酸內切酶 *DraI* 切割四種蚜蟲內共生菌 pLeuC 片段之 RFLP 圖譜。

Fig. 2. (A) Amplification of the pLeuC region of *Buchnera* with primers pLeuC-F03 and pLeuC-R02 for four *Rhopalosiphum* species. (B) RFLP analysis of pLeuC with endonuclease *DraI*. M, 100-bp DNA ladder (MBI Fermentas); lanes 1-3: *R. maidis* wingless adult, alate adult, first instar nymph; lanes 4-6: *R. nymphaeae* wingless adult, alate adult, first instar nymph; lanes 7-9: *R. padi* wingless adult, alate adult, first instar nymph; lanes 10-12: *R. rufiabdominalis* alate adult.

DNA (satellite DNA) 等，再配合不同的分析技術，不僅可以用來鑑別外部形態相似的物種，也應用於同種不同族群的遺傳變異、演化、親緣關係探討等。

本試驗選取的兩個 DNA 片段，延伸因子 1 $\alpha$  為蚜蟲核 DNA 的基因片段，結果顯

示在四種蚜蟲間的序列組成歧異度並不大 (圖五)，所以需要二種限制酶搭配，才能得較好的判讀效果；另一個 DNA 片段為蚜蟲體內原生共生菌 *Buchnera* 的基因片段，*Buchnera* 為常蚜科昆蟲體內普遍存在的一種共生菌，對於蚜蟲的生長所需胺基酸之提供與繁殖



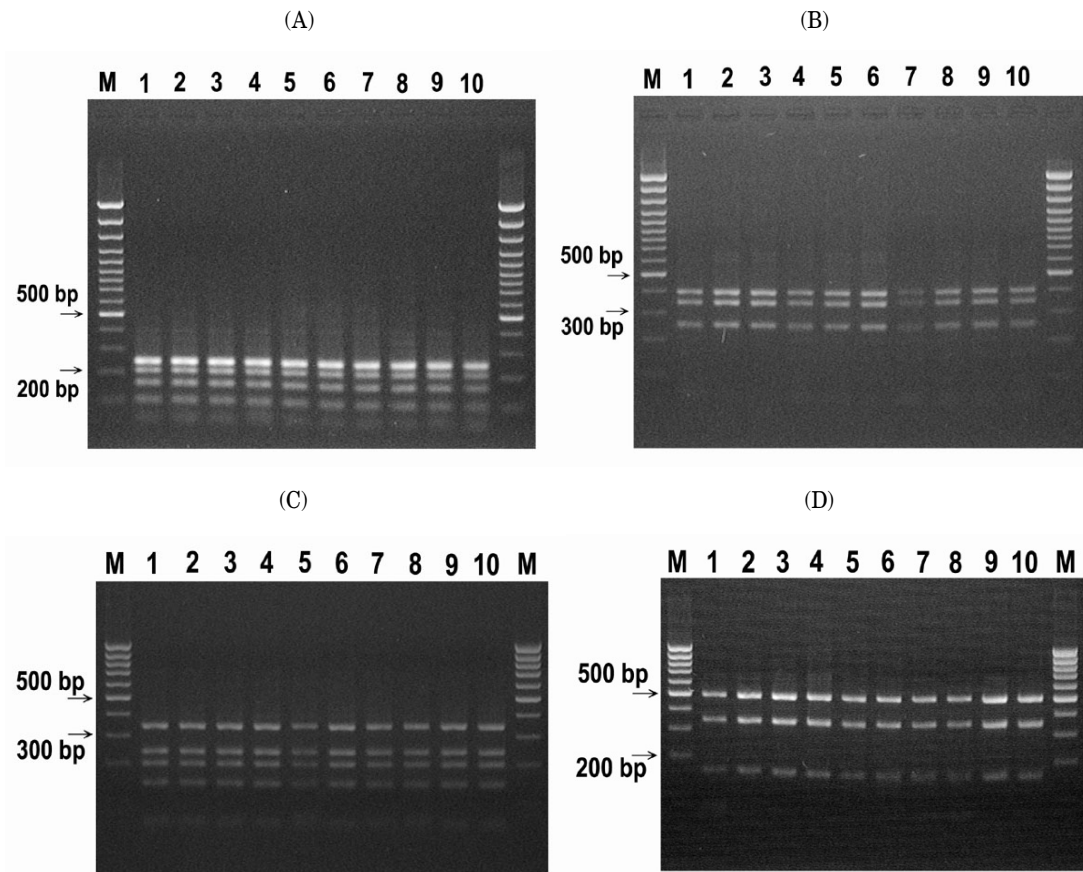
圖三 四種蚜蟲的無翅型、有翅型及幼齡期個體之 EF 1 $\alpha$  片段，以核酸內切酶 *Nla*III 與 *Eam*1104I 切割之 RFLP 圖譜。A: 玉米蚜 (*R. maidis*); B: 睡蓮蚜 (*R. nymphaeae*); C: 稻麥蚜 (*R. padi*); D: 紅腹根蚜 (*R. rufiabdominalis*)。Fig. 3. RFLP analysis of the EF 1 $\alpha$  with endonuclease *Nla*III and *Eam*1104I for four *Rhopalosiphum* species. Template DNA for PCR was obtained from a wingless adult, alate adult, and first instar nymph, respectively. M, 100-bp DNA ladder (MBI Fermentas). (A) *R. maidis*; (B) *R. nymphaeae*; (C) *R. padi*; (D) *R. rufiabdominalis*. A, B, C: lanes 1-3: wingless adult; lanes 4-6: alate adult; lanes 7-10: first instar nymph. D: lanes 1-6: alate adult; lanes 7-10: first instar nymph.

(Douglas *et al.*, 2001; Douglas, 2003), 都具有重要的功能。在自然的情況下，蚜蟲體內必定存在此原生共生菌，許多相關研究顯示：1. 母系傳遞 (maternal transmission) 是子代蚜蟲得到原生共生菌 *Buchnera* 的唯一機制。2. 即使是同種蚜蟲，不同個體之間，*Buchnera* 也不會有水平轉移 (horizontal transferring) 的現象。3. *Buchnera* 的染色體並沒有與不同蚜蟲體內的共生菌產生基因

重組 (genetic recombination) 的機會 (Moran and Baumann, 2000)。由此看來，可以將 *Buchnera* 視為是蚜蟲身體的一部份，以 *Buchnera* 的基因組 DNA 為分子標記來進行蚜蟲種類鑑定的工作。

*Buchnera* 菌體除一環狀染色體外，並帶有兩個質體，其中一個與合成白胺酸有關 (Shigenobu *et al.*, 2000)，其上有四個相關基因 *leuA*、*B*、*C* 和 *D* (Baumann *et al.*, 1999;





圖四 四種蚜蟲的無翅型、有翅型及幼齡期個體之內共生菌 pLeuC 片段，以核酸內切酶 *Dral* 切割之 RFLP 圖譜。A：玉米蚜 (*R. maidis*)；B：睡蓮蚜 (*R. nymphaeae*)；C：稻麥蚜 (*R. padi*)；D：紅腹根蚜 (*R. rufiabdominalis*)。Fig. 4. RFLP analysis of pLeuC of *Buchnera* with endonuclease *Dral* for four *Rhopalosiphum* species. Template DNA for PCR was obtained from a wingless adult, alate adult, and first instar nymph, respectively. M, 100-bp DNA ladder (MBI Fermentas). (A) *R. maidis*; (B) *R. nymphaeae*; (C) *R. padi*; (D) *R. rufiabdominalis*. A, B, C: lanes 1-3: wingless adult; lanes 4-6: alate adult; lanes 7-10: first instar nymph. D: lanes 1-6: alate adult; lanes 7-10: first instar nymph.

Soler *et al.*, 2000)。本試驗選取 *leuC* 的基因片段，研究發現此片段在四種蚜蟲之間變異程度大 (圖六)，但是種內的穩定性高，是一適合做為分子鑑定的分子標記。

不少昆蟲類群在演化過程中，都與原核生物產生共生的關係 (Bandi *et al.*, 1995; Spaulding and von Dohlen, 1998; Chen *et al.*, 1999; Sauer *et al.*, 2000)，其中大部份是

與營養物質的供需有關，在長期與昆蟲共存的情況之下，這些原核生物漸漸失去在自然環境中存活的能力，使其必須只能生存於該種昆蟲的體內，如蚜蟲與 *Buchnera* 即是最佳的例子 (Wernegreen, 2002)；但是另一方面，昆蟲也極度仰賴共生菌所提供的物質，一旦失去這些共生菌，對昆蟲本身的生存也有關鍵性的影響。如此一來兩者互利共生、共依共存，長

```

#001-080
Rma-EF1 GGATTGAA- CTGCCAAGTA CTATGTCACC ATCATTGAGC CACCTGGTCA CAGAGATTTC ATCAAGAACA TGATCACTGG
Rny-EF1 .A.....A .....A.....
Rru-EF1 .A.....- .....
Rpa-EF1 .....- .....C.....

#081-160
Rma-EF1 TACTTCCCAA GCTGATTGTG CTGTAATTAT CGTCGCTGCT GGTACTGGTG AATTGGAAGC TGGTATTTCT AAAAATGGAC
Rny-EF1 .....
Rru-EF1 ..A.....C.....
Rpa-EF1 ..A.....T.....

#161-240
Rma-EF1 AAACCCGTGA ACACGCTCTA TTGGCTTTCA CCTGGGTTGT GAAACAATTG ATCGTTGGTG TGAACAAGAT GGACTCAACT
Rny-EF1 .....A.....A.....
Rru-EF1 .....C.....A.....T.....
Rpa-EF1 .....C.....A.....

#241-320
Rma-EF1 GAACCACCAT ACAGCGAAGT AAGTTTTTTA ATTCTTAATT TATGGTGATT ACTTACAAC TACTAATTG TGAATTGTTA
Rny-EF1 .....A.....TAAC...T...CT...A.....
Rru-EF1 .....T.....C.....T.....
Rpa-EF1 .....T.....C.....T.....
Intron 1

#321-400
Rma-EF1 TTTGTAGGCC CGTTTCGAAG AAATCAAGAA AGAAGTCAGC AGTTACATCA AGAAGATTGG TTACAACCCA GCTGCTGTTG
Rny-EF1 .....T.....
Rru-EF1 .....
Rpa-EF1 .....
Intron 2

#401-480
Rma-EF1 CTTTCGTTCC CATTCTGGA TGAATGGAG ACAACATGTT GGAAGTTTCC GACAAAATGT CATGGTTCAA AGGATGGAAT
Rny-EF1 ...T...T..C.....G...G.....
Rru-EF1 ...C.....G...G.....
Rpa-EF1 ...C.....G.....

#481-560
Rma-EF1 GTTGAACGTA AAGAAGGAAA GGCTGATGTT AATGTCCTGA TTGAAGCTTT AGACGCTATC CTACCCCCCA GTCGCCAAC
Rny-EF1 .....T.....
Rru-EF1 .....
Rpa-EF1 .....

#561-640
Rma-EF1 TGACAAGGCT CTCCGCTCC CACTCCAGGT ATAAATTAT ATCAATATGT TTTAAACAAT CCTGTAATC- -TACAGTTTC
Rny-EF1 .....T.....C...G...T.....A.T...A...A.....
Rru-EF1 .....G...CG.....C...A.A.TCA- -.....G...
Rpa-EF1 .....T.....T.G...C.....CA A..A.TC..- -.....G...

#641-720
Rma-EF1 TAACCTCTGT TTATTTATAG GATGCTACA AAATGGAGG TATTGGAACA GTCCAGTAG GTCGTGTCGA AACTGGTTTA
Rny-EF1 ...T..AA.....T.....C.G.....
Rru-EF1 ...TAA...G.....T.....C.....
Rpa-EF1 ...TAA...G.....C.....

#721-800
Rma-EF1 TTA AACCTG STATGTTGT TGTCTTCGCA CCTGCAAACA TCACCCTGA AGTTAAGTCC GTAGAAATGC ACCACGAAGC
Rny-EF1 ..G...C.....T.....G.....
Rru-EF1 ..G...C.....G.....
Rpa-EF1 ..G...C.....G.....

#801-880
Rma-EF1 TTTGGTAGAA GCTGTTCCCG GAGACAATGT TGGTTTCAAC GTAAAGAACG TTTCAGTCAA GGAATTGAGA CGTGGTTTTG
Rny-EF1 .....A.....
Rru-EF1 .....T.....A.....C.....
Rpa-EF1 .....A.....C.....

#881-932
Rma-EF1 TTGCTGGAGA CACAAAGAAC AACCCACCCA AGGGTCTGCT TGATTCACA GC
Rny-EF1 .....C.....T...
Rru-EF1 .....C.....
Rpa-EF1 .....

```

圖五 四種蚜蟲 EF 1α 片段序列比較。Rma-EF 1: 玉米蚜 (*R. maidis*); Rny-EF 1: 睡蓮蚜 (*R. nymphaeae*); Rpa-EF 1: 稻麥蚜 (*R. padi*) ; Rru-EF 1: 紅腹根蚜 (*R. rufiabdominalis*) (點代表相同的核苷酸)。

Fig. 5. Sequence comparisons for EF 1α among four *Rhopalosiphum* species. Rma-EF 1, *R. maidis*; Rny-EF 1, *R. nymphaeae*; Rpa-EF 1, *R. padi*; Rru-EF 1, *R. rufiabdominalis* (dots represent identical nucleotides).

```

#001~080
Rma-pLeuC GGTGCATTG GAGCTTTGTC TTTTGGCATA GGTACTTC-T GAAGTTGAAC ATGTTCTTGT AACACAAACG TTAAACAAC
Rpa-pLeuC .....T.C.A. ....A.T .....- .....T .....
Rru-pLeuC .....T.....A. ....A.T .....A.- .....T ..G.....
Rny-pLeuC .G.T. .T.A.A. ....T.T .....A.- .....T.....T ..G.G.....

#081~160
Rma-pLeuC AGCGTTTAAA AAACATGAGA GTTAAAATA TAGGGAAAAT TAAAAAATT ATTACTGCTA AAGATATTAT TCTTTTGT
Rpa-pLeuC .A.....G.T...A. A.C.....AG.....T...G......G......A..
Rru-pLeuC .A.....G.....A. A.C.....AG..A......C.GT..C .....G.C......A..
Rny-pLeuC .A.....G... .T.....A......T.C...G.....T... ..C..G.....A.....A..

#161~240
Rma-pLeuC ATAGGTAAAT TAGGTACATC TGCTGTTCT GGATATGTAA TTGAATTTG TGGTAGTGTA ATTAATAAAA TGAACATGGA
Rpa-pLeuC .....A.....G.G......G......GA.....
Rru-pLeuC .....A.G.....A.G......G......GA......T.....
Rny-pLeuC .....C.T.A.T. G.GA..GG.. .G......G......A...G...T.....T.....

#241~320
Rma-pLeuC AGAGCGGATG ACAATTGTA ATATGGCAAT TGAATGGGT GCTAAATCTG CTTAATTGC ACCAGATGAA ACTACATATT
Rpa-pLeuC ..A.A... .G...C. ....G... ..A..C...A... ..T..
Rru-pLeuC ..A.A... ..C.....A.....A......T..
Rny-pLeuC ..AA.A... ..G.....T......AA.....

#321~400
Rma-pLeuC TATATTTAAA AAATAAATT TATGCACCAA AGGATAAATA TTGGGAAGAA GCTTTAAAAT ATTGGAGAAC ATTAACAACG
Rpa-pLeuC .....GG.G.G. .T...TC .A.G...T .....G......A... .T...A
Rru-pLeuC .G.....G GGG...G. .T...TC .A.G...T .....T... ..CA.....A.....GT...A
Rny-pLeuC .....G...G... .T...C. ..GA...T ...AT... ..AA...T. ....A...G...GT...A

#401~480
Rma-pLeuC GACGCAAATG CTTATTGTA TAAAGATTT ACTTTGATA TATCTGATCT TTCTCCTCAG GTTACTTGGG GAACGAGTCC
Rpa-pLeuC .T.A......T.....G......G......A......A A......G..T.....
Rru-pLeuC .T.A.....CT.C. C.....A......A.C.....A A......T..T.....
Rny-pLeuC .TAA.....AT......A...T.A......AA.A......A A......T..T.C.....

#481~560
Rma-pLeuC TGATCAGGTT TTATCAATTA ATGAAAAAAT ACCTGATTTT AATTTTTTTG AAGATTTTAC AAAAAAAAC TTAGCTCGTT
Rpa-pLeuC .....C.....T.....A .....C.GT ...G...T .....
Rru-pLeuC .....C......C.GT .....T .....
Rny-pLeuC .....A...G......C......C...C.G. ....T .....

#561~640
Rma-pLeuC CTGCATGTAA TTATATGGGT TTAAAACCAG GTGTATATTT AACGGATGTT AAAATTGATA AGGTATTTAT TGGTCTTGT
Rpa-pLeuC .....G.....AA......TC......A.CA.....
Rru-pLeuC .....A......T......A......C......T.....
Rny-pLeuC .....G.....A......A......A......A.....

#641~720
Rma-pLeuC ACTAATTCTC GTATAGAA-G ATTTAAGATC TGCAGCAA-A AATTTTAAAA AA-TAAAAA A--TTTCAA AA-TGTGAAA
Rpa-pLeuC .....- .....T.- .-A.G... ..- .....A.A.A...
Rru-pLeuC .....- .....T.- ..A.G... ..- .....A.A.A...
Rny-pLeuC .....C.....A......T.CCC. ...A.....-.....-C GAT..C-... ..A..T...

#721~758
Rma-pLeuC --GCAATTG- -TTGTACCCT GGTTCAGGTT TAGTAAAG
Rpa-pLeuC --.....- .....G..TG .A.CTG.-A C.....A
Rru-pLeuC G--.....- .....TG .A.CTG.-A CG.....A
Rny-pLeuC --.T...G T.G..T...G .T.C.G.-A .G.....A

```

圖六 四種蚜蟲 pLeuC 片段序列比較。Rma-pLeuC：玉米蚜 (*R. maidis*)；Rny-pLeuC：睡蓮蚜 (*R. nymphaeae*)；Rpa-pLeuC：稻麥蚜 (*R. padi*)；Rru-pLeuC：紅腹根蚜 (*R. rufiabdominalis*) (點代表相同的核苷酸)。

Fig. 6. Sequence comparisons for pLeuC among four *Rhopalosiphum* species. Rma-EF 1, *R. maidis*; Rny-EF 1, *R. nymphaeae*; Rpa-EF 1, *R. padi*; Rru-EF 1, *R. rufiabdominalis* (dots represent identical nucleotides).

表二 四種蚜蟲間的 EF 1 $\alpha$  和 pLeuC 序列相似度之比較

Table 2. Pairwise sequences similarity of EF 1 $\alpha$  (upper matrix) and pLeuC (lower matrix) among four *Rhopalosiphum* species

	<i>R. maidis</i>	<i>R. nymphaeae</i>	<i>R. padi</i>	<i>R. rufiabdominalis</i>
<i>R. maidis</i>	-	95.1	96.8	96.4
<i>R. nymphaeae</i>	84.6	-	94.7	93.3
<i>R. padi</i>	88.7	86.2	-	98.6
<i>R. rufiabdominalis</i>	87.0	85.0	94.0	-

表三 四種蚜蟲 EF 1 $\alpha$  及 pLeuC 片段核苷酸組成比例與長度

Table 3. Nucleotides composition of PCR-amplified EF 1 $\alpha$  and pLeuC of four species in *Rhopalosiphum* aphids

Species	Gene	Length (bp)	Nucleotides composition (%)			
			T (U)	C	A	G
<i>R. maidis</i>	EF 1 $\alpha$	929	29.0	20.2	29.1	21.7
<i>R. nymphaeae</i>	EF 1 $\alpha$	929	29.4	19.7	29.4	21.5
<i>R. padi</i>	EF 1 $\alpha$	928	28.4	20.6	29.0	22.0
<i>R. rufiabdominalis</i>	EF 1 $\alpha$	929	28.3	20.6	29.0	22.2
<i>R. maidis</i>	pLeuC	747	34.7	11.0	36.4	17.9
<i>R. nymphaeae</i>	pLeuC	751	34.8	11.2	36.1	18.0
<i>R. padi</i>	pLeuC	746	34.7	11.1	36.5	17.7
<i>R. rufiabdominalis</i>	pLeuC	748	34.2	11.8	36.6	17.4

期演化的結果，使得共生的原核生物，隨著昆蟲產生分化的現象，即使是近緣種的昆蟲，其體內共生菌基因序列還是有所不同，所以研究者在選擇分子標記進行實驗分析時，除了昆蟲本身的 DNA 外，其體內共生菌的基因組 DNA，也可以提供重要的資訊做為參考。

## 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 92農科-1.8.2-檢-B2-4 之經費補助，謹致謝忱。另外感謝洪裕堂學長於實驗過程中，提供許多寶貴建議與協助。

## 引用文獻

- Bandi, C., M. Sironi, G. Damiani, L. Magrassi, C. A. Nalepa, U. Laudani, and L. Sacchi.** 1995. The establishment of intracellular symbiosis in an ancestor of cockroaches and termites. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 259: 293-299.
- Baumann, L., P. Baumann, N. A. Moran, J. Sandström, and M. L. Thao.** 1999. Genetic characterization of plasmids containing genes encoding enzymes of leucine biosynthesis in endosymbionts (*Buchnera*) of aphids. *J. Mol.*

- Evol. 48: 77-85.
- Bracho, A. M., D. Martinez-Torres, A. Moya, and A. Latorre.** 1995. Discovery and molecular characterization of a plasmid localized in *Buchnera* sp. bacterial endosymbiont of the aphid *Rhopalosiphum padi*. J. Mol. Evol. 41: 67-73.
- Brynnel, E. U., C. G. Kurland, N. A. Moran, and G. E. Andersson.** 1998. Evolutionary rates for *tuf* genes in endosymbionts of aphids. Mol. Biol. Evol. 15: 574-582.
- Chen, C. H., and C. J. Shih.** 2003. Rapid identification of three species of blow flies (Diptera: Calliphoridae) by PCR-RFLP and DNA sequencing analysis. Formosan Entomol. 23: 59-70 (in Chinese).
- Chen, X. A., S. Li, and S. Aksoy.** 1999. Concordant evolution of a symbiont with its host insect species: molecular phylogeny of genus *Glossina* and its bacteriome-associated endosymbiont, *Wigglesworthia glossinidia*. J. Mol. Evol. 48: 49-58.
- Chiu, Y. C., W. J. Wu, and C. J. Shih.** 2001. Identification of three *Aulacaspis* species (Homoptera: Diaspididae) by PCR-RFLP analysis for quarantine application. Formosan Entomol. 21: 365-375 (in Chinese).
- Dixon, A. F. G.** 1985. Aphid Ecology. Blackie & Son Ltd, New York. 157 pp.
- Douglas, A. E.** 1996. Reproductive failure and the amino acid pools in pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) lacking symbiotic bacteria. J. Insect Physiol. 42: 247-255.
- Douglas, A. E.** 2003. *Buchnera* bacteria and other symbionts of aphids. pp. 23-38. In: Bourtzis, K., and T. A. Miller, eds. Insect Symbiosis. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Douglas, A. E., L. B. Minto, and T. L. Wilkinson.** 2001. Quantifying nutrient production by the microbial symbiosis in an aphid. J. Exp. Biol. 204: 349-358.
- Figuroa, C. C., J. C. Simon, J. F. Le Gallic, and H. M. Niemeyer.** 1999. Molecular markers to differentiate two morphologically-close species of the genus *Sitobion*. Entomol. Exp. Appl. 92: 217-225.
- Hovemann, B., S. Richter, U. Walldorf, and C. Cziepluch.** 1988. Two genes encode related cytoplasmic elongation factor 1  $\alpha$  (EF 1 $\alpha$ ) in *Drosophila melanogaster* with continuous and stage specific expression. Nucl. Acids Res. 16: 3175-3194.
- Martinez-Torres, D., C. Buades, A. Latorre, and A. Moya.** 2001. Molecular systematics of aphids and their primary endosymbionts. Mol. Phylogen. Evol. 20: 437-449.
- Moran, N. A., and P. Maumann.** 1994. Phylogenetics of cytoplasmically inherited micro-organisms of arthropods. Trends Ecol. Evol. 9: 15-20.

- Moran, N. A., and P. Baumann.** 2000. Bacterial endosymbionts in animals. *Curr. Opinions Microbiol.* 3: 270-275.
- Nicholas, K. B., and H. B. Nicholas Jr.** 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author (available at <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>).
- Palumbi, S. R.** 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. pp. 205-246. *in:* Hillis, D. M., C. Moritz, and B. K. Mable, eds. *Molecular Systematics*, 2<sup>nd</sup> ed, Sinauer Associates, Massachusetts.
- Sauer, C., E. Stackebrandt, J. Gadau, B. Hölldobler, and R. Gross.** 2000. Systematic relationships and cospeciation of bacterial endosymbionts and their carpenter ant host species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1877-1886.
- Shigenobu, S., H. Watanabe, M. Hattori, Y. Sakaki, and H. Ishikawa.** 2000. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature* 407: 81-86.
- Soler, T., A. Latorre, B. Sabater, and F. J. Silva.** 2000. Molecular characterization of the leucine plasmid from *Buchnera aphidicola*, primary endosymbiont of the aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Curr. Microbiol.* 40: 264-268.
- Spaulding, A. W., and C. D. von Dohlen.** 1998. Phylogenetic characterization and molecular evolution of bacterial endosymbionts in psyllids (Hemiptera: Sternorrhyncha). *Mol. Biol. Evol.* 15: 1506-1513.
- Tao, C. C.** 1980. Aphid-fauna of Taiwan Province, China. Taiwan Museum, Taipei, Taiwan. 327 pp (in Chinese).
- 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. *Nucl. Acids Res.* 24: 4876-4882.
- von Dohlen, C. D., U. Kurosu, and S. Aoki.** 2002. Phylogenetics and evolution of the Asian-eastern North American disjunct aphid tribe, Hormaphidini (Hemiptera: Aphididae). *Mol. Phylogen. Evol.* 23: 257-267.
- van Ham, R. C. H. J., D. Martinez-Torres, A. Moya, and A. Latorre.** 1999. Plasmid-encoded anthranilate synthase (*trpEG*) in *Buchnera aphidicola* from aphids of the family Pemphigidae. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 117-125.
- Wernegreen, J. J.** 2002. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nat. Rev. Genet.* 3: 850-861.

收件日期：2004年4月3日

接受日期：2004年9月24日

# PCR-RFLP Technique for Molecular Identification of *Rhopalosiphum* (Aphididae)

Hsin-Ting Yeh, Chiun-Cheng Ko\*, Tung-Ching Hsu, and Cheng-Jen Shih

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

## ABSTRACT

Aphids are insects with polymorphism. Species identification mostly depends on the morphological features of the adult. However, it is difficult to distinguish species at immature stages. Molecular markers may be helpful in solving this problem. Therefore, in this study, the elongation factor 1 $\alpha$  (EF 1 $\alpha$ ) in the genome of aphids and the partial pLeuC gene of the endosymbionts (*Buchnera* sp.) in aphids were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers. Then, the restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the PCR products was obtained. These DNA fragments were different from each other in the four species of aphids, *Rhopalosiphum maidis*, *R. nymphaeae*, *R. padi* and *R. rufiabdominalis*. Moreover, the DNA pattern of PCR-RFLP was also stable in immature stages, as those found in both adults. These results indicate that the DNA markers of PCR-RFLP from both host insects and their endosymbionts may be useful in species identification.

**Key words:** PCR-RFLP, endosymbiont, elongation factor 1 $\alpha$ , *Buchnera*