



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Molecular Identification of Important Spider Mites Using Multiplex PCR and PCR-RFLP 【Research report】

應用PCR-RFLP及Multiplex PCR於重要性葉蟎之鑑定【研究報告】

Kivem Hsu Tsen Hua, Niann-Tai Chang Wen-Bin Yeh*
許凱文 華真、張念台 葉文斌*

*通訊作者E-mail: wbyeh@nchu.edu.tw

Received: 2005/09/13 Accepted: 2005/11/22 Available online: 2005/12/01

Abstract

Species recognition of spider mites is difficult due to their small body sizes and unstable morphological characters in the immature stages. In this study, sequences of 28S rDNA and ITS2 of ~2900 and 600 bp in length, respectively, were used to identify the molecular variations of five species of spider mites in four genera: *Oligonychus coffeae* (Nietner), *Panonychus citri*, *Panonychus ulmi* (Koch), *Petrobia harti* (Ewing), and *Tetranychus kanzawai* Kishida. Specific primers and restricted digestion enzymes were designed from the 28S rDNA and ITS2 regions, and applied for multiplex PCR and PCR-RFLP to identify these spider mites. Results showed that the application of the two molecular markers was useful for identifying these economically important pests.

摘要

本研究針對蟎類體型細小且幼體時期特徵不明顯的特性，開發 DNA 為主的鑑定方法，建立數種重要葉蟎的 DNA 特徵；有咖啡小爪蟎 (*Oligonychus coffeae* (Nietner))、歐洲葉蟎 (*Panonychus ulmi* (Koch))、哈第岩蟎 (*Petrobia harti* (Ewing)) 及神澤葉蟎 (*Tetranychus kanzawai* Kishida) 的 28S rDNA 約 2900 個鹼基位；另外針對歐洲葉蟎及柑桔葉蟎 (*Panonychus citri* (McGregor)) 建立 ITS2 區段的 DNA 序列。應用建立之 DNA 序列開發 PCR-RFLP 及 multiplex-PCR 兩種方法，分別針對葉蟎各屬及歐洲葉蟎進行鑑定及分析。

Key words: spider mite, multiplex PCR, PCR-RFLP, ITS2, 28S rDNA

關鍵詞: 葉蟎、多引子 DNA 複製圖譜、限制酶切割圖譜、28S 核糖體 DNA、核糖體第二內轉錄區間

Full Text: [PDF \(1.32 MB\)](#)

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

應用 PCR-RFLP 及 Multiplex PCR 於重要性葉蟎之鑑定

許凱文 國立屏東科技大學植物保護學系；國立旗山高級農工職業學校 高雄縣旗山鎮旗甲路一段 195 號

華真 張念台 國立屏東科技大學植物保護學系 屏東縣內埔鄉學府路 1 號

葉文斌* 國立中興大學昆蟲學系 台中市南區國光路 250 號

摘 要

本研究針對蟎類體型細小且幼體時期特徵不明顯的特性，開發 DNA 為主的鑑定方法，建立數種重要葉蟎的 DNA 特徵；有咖啡小爪蟎 (*Oligonychus coffeae* (Neitner))、歐洲葉蟎 (*Panonychus ulmi* (Koch))、哈第岩蟎 (*Petrobia harti* (Ewing)) 及神澤葉蟎 (*Tetranychus kanzawai* Kishida) 的 28S rDNA 約 2900 個鹼基位；另外針對歐洲葉蟎及柑桔葉蟎 (*Panonychus citri* (McGregor)) 建立 ITS2 區段的 DNA 序列。應用建立之 DNA 序列開發 PCR-RFLP 及 multiplex-PCR 兩種方法，分別針對葉蟎各屬及歐洲葉蟎進行鑑定及分析。

關鍵詞：葉蟎、多引子 DNA 複製圖譜、限制酶切割圖譜、28S 核糖體 DNA、核糖體第二內轉錄區間。

前 言

葉蟎為蛛形綱 (Arachnida)、蟎蜱亞綱 (Acarina)、蟎形目 (Acariformes)、前氣門亞目 (Prostigmata)、葉蟎總科 (Tetranychoidae) (Krantz, 1978) 之成員。葉蟎科之種類大部份均棲息於葉背，用鉅角銼開葉背之表皮，再以口針刺入吸食葉片組織，使受害細胞乾枯、壞死。取食時多沿著葉背葉脈，被吸食處最初呈銹色斑點，繼而葉片黃萎、捲曲、畸形導致落葉。被害植物體因代謝作用受到影響，使果實細小、歪曲提早落果、品質變劣或不耐貯存，更能影響樹齡。

葉蟎之物種判定，多以外形態為主，應用成蟎作為鑑定的依據 (Wang, 1981)，而幼體時期 (卵、幼蟎或若蟎) 的特徵則常因形狀的不穩定或不明顯，較難明確應用於種的分類鑑定。此外，葉蟎的體形細小 (多小於 1 mm)，近緣種或姐妹種 (sibling species) 間的變異不大，在形態的分類判定上有時會受到限制。因此，有學者嘗試應用 DNA 特徵研究葉蟎的變異；其中 Navajas *et al.* (2001) 分析 *Tetranychus kanzawai* (Kishida) 和 *Tetranychus hydrangeae* (Pritchard et Baker) 的 ITS (internal transcribed spacer) 序列，發現在此序列上雖有變異但應為同物異

*論文聯繫人
e-mail: wbyeh@nchu.edu.tw

名。Osakaba and Sakagami (1994) 對全爪蟻屬 (*Panonychus*, *Pan.*) 三個物種的 rDNA 進行研究,說明 *Pan. ulmi* (Koch)、*Pan. mori* 和 *Pan. citri* (Mc Gregor) 三種蟻雖為同屬,但其 rDNA 的分子特徵已有明確的差異。由此可知 rDNA 中的 ITS1 及 ITS2 兩區段變異快,適合來推斷種間或近緣種的分類地位 (Osakaba and Sakagami, 1994; Navajas and Fenton, 2000)。此後,有更多研究應用 DNA 的資料探討葉蟻的親緣關係及分類鑑定等課題 (Navajas *et al.*, 1992, 1996, 1998; Navajas and Fenton, 2000; Robert, 2002)。因此在形態特徵外,透過對 DNA 的序列研究,不僅可解決部分外部形態的鑑定困難,更提供另一個分類鑑定的方法,揭示葉蟻種間及種內的遺傳差異及親緣關係。本文應用建立的 28S rDNA 及 ITS2 序列,開發 multiplex-PCR 及 PCR-RFLP 兩種方法,應用於經濟上嚴重危害之數種葉蟻之鑑定。

材料與方法

一、標本來源

供試標本分別從台灣田野採集,單隻飼養於透明的壓克力箱內的寄主植物上;如咖啡小爪蟻 (*Oligonychus coffeae* (Nietner)) 飼養於茶樹老葉上;哈第岩蟻 (*Petrobia harti* (Ewing)) 飼養於酢醬草上;神澤葉蟻 (*T. kanzawai*) 飼養於菜豆上。將飼養箱放入 25°C 的環控溫室內飼養;而歐洲葉蟻 (*Pan. ulmi*) 則飼養於 20°C 的植物生長箱內的蘋果樹上。葉蟻族群大量增加後,採取葉片,置於解剖顯微鏡下,以毛筆挑出葉蟻置入 1.5 ml 微量離心管中;每管雌成蟻約 50 隻,保存於 70% 的酒精中以備核酸標幟分析,其詳細資料記錄於表一。

二、葉蟻 DNA 的萃取

應用 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) 萃取葉蟻之 DNA,詳細流程參考 Lin *et al.* (2003)。

三、28S rDNA 及 ITS2 區段的複製

每一 0.2 ml 微量離心管依序加入去離子水 42.1 μ l、10X SuperTaq 緩衝液 5 μ l、正反向引子各 10 pmole、dNTP 200 μ M、SuperTaq 酵素 2 個單位及 DNA 模板 1 μ l (約 30 ng),總體積為 50 μ l。將溶液混合均勻後,進行 PCR 反應。共使用 5 組引子對分別進行反應,配對分別為 28Sa 對 28Sb、28Sc 對 28Sd、28Se 對 28Sf、28Sg 對 28Sh 及 ITS1M 對 ITS2M (表二)。複製 28S rDNA 反應流程為:步驟一,於 94°C 預熱 2 分鐘;步驟二,於 94°C 50 秒、52°C 60 秒及 72°C 50 秒,共 30 個循環;步驟三,於 72°C 10 分鐘。複製 ITS2 流程設定為:步驟一,於 95°C 預熱 2 分鐘;步驟二,於 95°C 40 秒、50°C 40 秒及 72°C 50 秒,共 30 個循環;步驟三,於 72°C 10 分鐘。

四、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 與 6X 染劑 1 μ l 混合均勻,注入電泳槽孔;用 100 bp DNA 梯度條帶為參考標幟。進行電泳反應後,將洋菜膠取出,用溴化乙錠 (ethidium bromide) 染色 20 分鐘;於紫外光箱觀察照相,確定複製產物的濃度及大小是否正確。將複製成功的 PCR 產物保存於 -20°C,再進行 PCR 產物之純化。

五、28S rDNA 及 ITS2 產物的純化

以反應試劑組 QIAquick PCR Purification

表一 供測五種葉蟎的學名、採集地點、採集時間及寄主植物

Table 1. Scientific name, collecting location, date, and host plant of five tetranychid mites

Taxon	Locality	Host	Date
<i>Oligonychus coffeae</i> (Nietner)	Yunlin	<i>Thea sinensis</i> L.	12 May 2002
<i>Panonychus ulmi</i> (Koch)	Taichung	<i>Malus pumila</i> Mill	1 July 2003
<i>Panonychus citri</i>	Pingtung	<i>Carica papaya</i> L.	14 Dec. 2002
<i>Petrobia harti</i> (Ewing)	Kaoshiung	<i>Oxalis corniculata</i> L.	6 June 2002
<i>Tetranychus kanzawai</i> Kishida	Pintung	<i>Glycine max</i> Merr	14 Feb. 2003

表二 本研究所用之引子序列

Table 2. Primers and their sequences used in this study

Locus	Primer	Primer sequences
28S rDNA region	28Sa	GAC CCG TCT TGA ACC ACG GAG TCT
	28Sb	TTC GGC AGG TGA GTT GTT ACA
	28Sc	TGT AAC AAC TCA CCT GCC GAA
	28Sd	AAT CCT TAT CCC GAA GTT ACG GA
	28Se	TCC GTA ACT TCG GGA TAA GGA TT
	28Sf	TGT ACC GCC CCA GTC AAA CT
	28Sg	AGT TTG ACT GGG GCG GTA CA
	28Sh	CTT AGA GGC GTT CAG GCA TAA
	28SU	TCT AGC GAA ACC ACA GCC AAG GGA AC
	28SD	GTT CCC TTG GCT GTG GTT TCG CTA GA
	28Stk	ACC CTG AGG TAA ACC CAA GTG AGA GAG AC
	28Sph	CGA GCC ACC CTT AAT GGA ACA ACC AC
	28Spu	AGT GGT ATT TCA TTG GCG CAA AGG GG
	28Soc	AGC ATC AAG ATT TCG GTC TTG GTG TTT CAG A
ITS2 region	ITS1M	ACG GGA GCT CGG TGC GAA TTG CAG GAC ACG CCG
	ITS2M	TAC GGG AGC TCG ACC TGA TCT GAG ATC AAA A
	ITS1-MU	GGA TGA CCG GAT GGT CTA TGC TTA GCA G
	ITSpu1	TAT GGT GAT GTG TGA TAC ACG CTA CTA AC
	ITSpu2	GTT ACA AGT TAT ACG CTA AGT TTT ACA ACC AAC
	ITSpc	TGG GAG ACG GGA TAC ATG CGC TAC TAA C

Kit (Qiagen, UK) 直接回收產物，其步驟參考試劑內的說明，並略作修改 (Lin *et al.*, 2003)。當產物有多條帶時，以反應試劑組 QIAquick Gel Extration Kit 回收，其步驟參考試劑內的說明。

六、28S rDNA 及 ITS2 的定序

純化之 PCR 產物各取 8 μ l (約 200 ng 之 DNA)，分別和 0.8 μ M 的上下游引子 4

μ l 充分混合，PCR 反應後經自動定序儀分析，而得到 DNA 序列。28S rDNA 及 ITS2 序列已登入基因庫 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)，序號分別為 AY750691、AY750696、AY750698、AY750699、A750707 及 AY750708。

七、序列的分析

以 GCG (<http://bioinfo.nhri.org.tw>) 及

MEGA2 (Kumar *et al.*, 2001) 等軟體進行 DNA 序列分析。下游引子 28Sb、28Sd、28Sf、28Sh 及 ITS2M 得到之反向負股序列於 GCG 軟體逆位轉股後，再與正向之 DNA 比對校正，得到最正確之樣品序列。序列分別整理好後，再用 MEGA2 軟體分析，計算樣品之間差異大小。另搜尋 ITS2 的酵素切位及設計 28S rDNA 及 ITS2 之專一性引子，應用於 PCR-RFLP 及 multiplex-PCR 之分析。

八、PCR-RFLP 於柑桔葉蟻 (*Pan. citri*) 及歐洲葉蟻 (*Pan. ulmi*) 的 ITS2 區段鑑定

PCR 產物回收後，分別以數種限制酶 (*Bbv* I、*Bciv* I、*Alw* I、*Ssp* I、*Rsa* I 和 *Psi* I) 進行柑桔葉蟻及歐洲葉蟻之 ITS2 DNA 片段之切割。反應溶液總體積為 10 μ l，其中 PCR 產物 3 μ l、限制酶 1 μ l (3 U)、10X 的緩衝液 1 μ l 及去離子水 3 μ l，將反應液置於 37°C 水浴 2 小時，取 10 μ l 反應液及 2 μ l 之染劑充分混合，以 2% 的瓊脂膠體於 0.5X 的 TBE 緩衝液中進行電泳 70 分鐘，置於溴化乙錠中染色 30 分鐘，於紫外光箱觀察照相並比較其限制酶切割圖譜。

九、Multiplex-PCR 於蟻類的鑑定

運用已知的 28S rDNA 及 ITS2 序列，分別設計葉蟻屬 (*Tetranychus*)、全爪蟻屬 (*Panonychus*)、小爪蟻屬 (*Oligonychus*)、岩蟻屬 (*Petrobia*) 及柑桔葉蟻及歐洲葉蟻的專一性引子 (表二)，進行 multiplex-PCR 的鑑定運用，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。PCR 反應條件，步驟一：95°C 預熱 15 分鐘；步驟二，於 94°C 30 秒、60°C 90 秒及 72°C 90 秒，共 35 個循環；步驟三，於 72°C 10 分鐘，

再行電泳反應顯像。

結 果

一、28S rDNA 及 ITS2 序列分析

28S rDNA 的複製長度約為 2900 bp，其中神澤葉蟻為 2839 bp、哈第岩蟻為 2904 bp、歐洲葉蟻為 2889 bp 及咖啡小爪蟻 2857 bp (圖一)；G、A、T 及 C 的含量比例平均分別為 26.3、27.3、25.3 及 21.1%。歐洲葉蟻及柑桔葉蟻 ITS2 區段的複製長度分別 654 及 668 bp (圖二)；G、A、T 及 C 的含量比例平均分別為 21.9、28.2、30.8 及 19.1%。

二、PCR-RFLP 於歐洲葉蟻及柑桔葉蟻之鑑定

應用 GCG 上之 "mapplot" 程式搜尋歐洲葉蟻及柑桔葉蟻之 ITS2 區段的限制酶切割位，再從中選取合適的限制酶，進行 PCR-RFLP 的分子鑑定。針對柑桔葉蟻選擇 *Bbv* I、*Psi* I 和 *Ssp* I 三種酵素，可以將柑桔葉蟻的 ITS2 切割成二個片段，而在歐洲葉蟻則沒有切割位置；另外針對歐洲葉蟻選擇 *Alw* I、*Bciv* I 和 *Rsa* I 三種酵素，其在柑桔葉蟻上也無相對的切割位。

利用引子 ITS1M 及 ITS2M 擴增出歐洲葉蟻長度約為 660 bp，柑桔葉蟻長度約為 670 bp，上述六種限制酶的切割結果顯示於圖三。*Alw* I 可以將歐洲葉蟻切成大小約 160 及 500 bp 兩個片段，但在歐洲葉蟻上有切割不完全的現象；*Bciv* I 可將歐洲葉蟻切成大小約 290 及 370 bp 大小，但仍有切割不完全的情形；*Rsa* I 可將歐洲葉蟻完全的切割成大小約 280 及 380 bp 的兩個片段。*Bbv* I 可以將柑桔葉蟻切割成 190 及 480 bp 兩個片段，但切割結果不佳；*Psi* I 可以將柑桔葉蟻

28Sa									
Tkan	GACCCGTCTT	GAACCACGGA	GTCTAACATG	TATGCAAGCT	GATCAGTCTT	GTTTAGGCTT	GAAAGCGGAA	TTGAAAGAAA	
PharC.....AAC.....CC.....	
OcofGATAAAAC.....G.....C	
PulmGT.AA.AA.....G.....T.C	
Tkan	TTGATATGAT	GTAT-----	-----	-----GCTTG	TAAGAGTATA	CCGCAATATC	AGCCCGTGAT	ATATCCACTT	
Phar	.C.G.....	.G.CACCAC	ATCCTAGCTG	TAACA.G..A	GGTTG..C.C.	G.....T.	.G..T...	
OcofG.....	.GTGATATGT	G-----	-----AAACA	...T.TCGAT	.G.....C...	.A...A..TA	T.....	
PulmG.....	.G.GGTATAG	A-----	-----CT.GT	CT.T.T.T.CC...	.A...A..T.	.A.....	
Tkan	TACCGAGATT	TTCGCGGAGC	ACTAGTATAT	ATGTTAGTAC	CCGAAAGATG	GTGAACTAAG	CCCGGACAAG	ATGAAGCCAG	
PharC.	TA.....	..G.....T.G.....	
Ocof	...T.T.....	...AT...T	...C.....	..C.....T	
PulmT.....	...AT...T	.T.....	..AC.....	
Tkan	AGGAAACTCT	GGTGGAGGTC	TGTAGCGATT	CTGACGTGCA	AATCGATCGT	CAGATCCGGG	TTTAGGGGCG	AAAGACTAAT	
Phar	A.....	
Ocof	
Pulm	
Tkan	CGAACCGTCT	AGTAGCTGGT	TTCTCCGAA	GTTTCCTCA	GGATAGCTGG	CACCAATGGA	AGTA--CCA	GTAGCATCCG	
PharA...	
OcofC...AACA..	
PulmGC...AACA..	
Tkan	GTAGAGCGAA	TGATTAGAGG	TCTTGGGGCC	GAAATGGCCT	CAACCTATTC	TCAAACCTCT	AATGGGTGCG	AAGTTCAACT	
Phar	
OcofG.....A.T..C.	
PulmG.....A.T..C..	
Tkan	TGTTAAA---	-----	---CTTTTA	AAGCTGAACA	TACT-----	-----TTG	TATGATGGTG	CCCAGTGGGC	
Phar	-----G..	C.....	
OcofAAG	CTC-----	---G.A...	GCT.AAATGA	TAA-----	
PulmAAG	CTCGATTAT	GGTAG.AAA.	C.C.AT...	.CA.AAAGCT	GAACAGC...	
Tkan	CATTTTTGGT	AAGCAGAACT	GGCGCTGTGG	GATGAACCAA	ACGTTAGGTT	AAGGTGCCCG	ATGCTGACGC	TAATGAGATC	
PharC.	
OcofA...	.T.....A	.A.A.....CA	
PulmA...	.T.....A	.A.A.....CA	
28Sb									
Tkan	CCATGAAAGG	TGTTGGTTGC	TAAAGACAGC	AGGACGGTGG	CCATGGAAGT	TGGAATCCGC	TAAGGAGTGT	GTAACAACCTC	
Phar	T...A...	.A.....	
OcofA.	
PulmA.	
28Sc									
Tkan	ACCTGCCGAA	GCAACTAGCC	CTGAAAATGG	ATGGCGCTCA	AGCGTTGAAC	CTATACCTAA	CCGTTAAGGC	AATCATATAT	
PharC.....G.TG..G.	
OcofT.T.G.G	C.A.CC.CCA	
PulmT..C..C.G	C.A.CACA..	
Tkan	AT--TA-TT	-TATCATGAT	ATAAGCTTTA	ACGAGTAGGA	AGAATGTAGT	GATAGCGTCG	AAGGTGTCTG	ACGTAAGTCA	
Phar	.AACCACC..	A.....C...C.C...	.T.....A.	
Ocof	.CATG.CCGC	AC.A.....	..T..C...A.C.....	
Pulm	.CATGA.GAG	AG.G.....	..T..C..GC.....	
Tkan	GCCTGGAGCT	TTCACTATTA	CAGATCTTGG	TGGTAGTAGC	AAATACTCAA	GTGAGACCCT	TGAGGACCAA	TGTGGAGAAG	
PharA...G..G	
OcofG.	A...T.....	
PulmG.	A.....	
Tkan	GGTTCATGT	GAACAGTAGT	TGAACATGGG	TCAGTCGGTC	CTAAGCGATG	GGGAGAAATC	CCTAACCAAA	GTCCCAGAT-	
PharT.T	
OcofT...A.GTAGAT	
PulmC.GTAGGT	

圖一 葉蟻之 28S rDNA 序列；Tkan、Phar、Ocof 及 Pulm 分別為神澤葉蟻、哈第岩蟻、咖啡小爪蟻和歐洲葉蟻；”-”表示與第一行的序列相同；“-”表示間隔；引子之相對位置標示於序列旁。

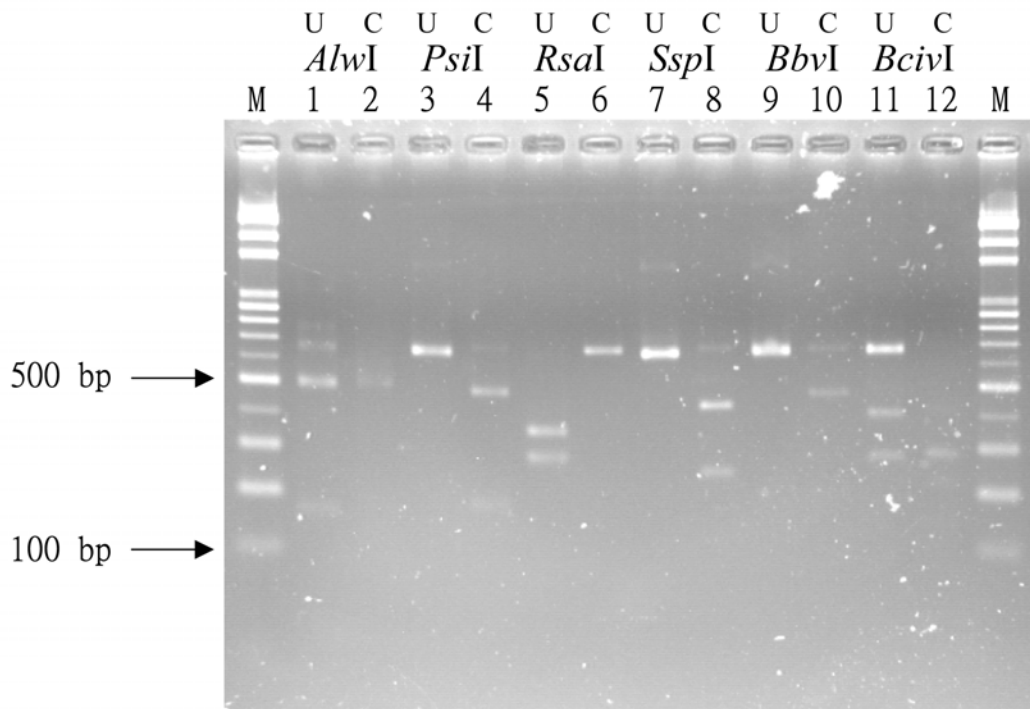
Fig. 1. Sequences of 28S rDNA from samples of *Tetranychus kanzawai* (Tkan), *Petrobia harti* (Phar), *Oligonychus coffeae* (Ocof), and *Panonychus ulmi* (Pulm). A dot (.) indicates that the sequence is identical to the first line, while a dash (-) indicates a gap. The location and direction of the primers are labeled beneath the sequences.

Tkan	----ACAAT	TATCAAGTTG	ACTGTGGTGT	TTCGCGAAAG	GGAATCGGGT	TAATATTCCC	GAACCTGGCG	TGGGAGATTG
Phar	CATTA...A	..ATCT.A..AGC	A.....A.
Ocof	TTTAACT..-	.C.ATT....	..AC.....A....A..G.T
Pulm	TT--A..T.-	CC.T.C....	T...C....	A.....A..G.T
Tkan	CTTCTTCGGA	-----	-----AGTA	AATGCGGTAA	CGCAAATAA	CATGGAGATG	TTTCCAAAAG	TCCTGGGAAG
Phar	-----	-----CC	G.....C.GG..
Ocof	AC...G.C.	TTGAAAGATG	TTCTTG....	T.....C..CC.G..
Pulm	GC...GTT.	TTTATAG--	--CAAG....	T.....CC.G..
Tkan	AGTTGTCTTT	TCCTTGTAAAG	GTACCAAGTC	CCTGGAATCG	GTTTAACCGG	AGATAGGGAT	TCCGGTCCCG	TAAAGCACCG
PharT.....T..A.A...
OcofC.	..GT....	..GT.....T..A.A...
PulmC.	..GT....	..G.....T..CA...
Tkan	CGGCTCTTGC	GGTGTCAGT	GCACITTTTG	AAACCCTTGA	AAATCTATGT	TAGAGATT-A	TAACITTTCC	GCCAGACCGT
PharG...--T	..T.T...T	CT.....
OcofC....	..G...C.C-	..A.....	..T...C..
PulmAC....	GC...C.C.	..A.....	..T.....
Tkan	ACCCATATCC	GCAGCAGTC	TCCAAGGTGA	ACAGCCTCTG	GTCACTAGAA	TAATGTAGAT	AAGGGAAGTC	GGCAAAGCGG
Phar
Ocof
PulmCG
	28Sd		28Se					
Tkan	ATCCGTAAC	TCGGGATAAG	GATTGGCTCT	GAAAACTGAG	CTGGTCGGGC	TGAAGTCAGA	AGCAAGTACT	GCAAAATACC
PharGG....
OcofA..C...TG....
PulmA..C...	A...TTG...T
Tkan	GAGACTGGTT	GA-----T	----GTTGG	GT--AACTAA	CTGATGCCGG	ACTTGTGTTT	TTGTGATCTT	GTG-GATTGC
PharAACAAGGC	----A..TC	.GTGCTT.GGA....	..C...C
Ocof	A.....AG	A.AGGGAGCC	T-----	-.CGGT.CC	TG..AT.T..	..C...CCT..CGA.
PulmA.	..AATTTCTA	TGTTAT..AT	AGCAT.G.T.	TG...T.T..C.T...GA.
	28Soc							
Tkan	TTCAGCTAGG	ATCCTTTGTG	CAGCCTTTT	GAAGGGTA-	-ACCTGGATG	AGAGTGT-CT	GTTGCAGGGG	GCAATCCTTT
PharC.....CA	TG.....C	GC...AT..	G....C-..C..T...
Ocof	.AT.....A.	..T.A----	-----	---A.AT.T	C.GTCT.GG.	..T...A..	..TT.....
Pulm	.AT.....ACC	..TTA.AGC.	T.GCAT.GTT	T..GCTATGT	TA.C.A.GA.	.G..T.A..	..T.....
Tkan	CGGCCAGCGA	AAAACAGTTG	AATCAGAACT	GGCACGGACC	CCGGGAATCC	GACTGTCTAA	TTAAAACAAA	GCATTGTGAT
PharT..
OcofC.....
PulmC.....
Tkan	AGCCGGTGAA	CGGTATTGAC	ACAATGTGAT	TTCTGCCCAG	TGCTCTGAAT	GTCAAAGTGA	AGAAATTCAA	CCAAGCGCGG
Phar	G....A..T	..G.....	G.....
Ocof
PulmA..
Tkan	GTAACCGCG	GGAGTAACTA	TGACTCTCTT	ATGGTAGCCA	AATGCCTCGT	CATCTAATTA	GTGACGCGCA	TGAATGGATT
PharA.....
OcofA.....
PulmA.....
			28SD		28SU			
Tkan	AACGAGATTC	CCAATGTCCC	TAACACTACT	CTAGCGAAAC	CACAGCCAAG	GGAACGGGCT	TGGCAAAATC	AGCGGGGAAA
Phar
OcofG....
Pulm
Tkan	GAAGACCCTG	TTGAGCTTGA	CTCTAGTCTG	ACTTTGTGAA	GAGACATGAG	AGGTGTAGCA	TAAGTGGGAG	CCGAGGGAT-
PharTT...-C
Ocof	TTTT.....-
PulmTTT.....-

圖一 (續)
Fig. 1. (continued)

	28Spu							
Tkan	CAATCTTGGC	TGTTACTTCG	GTGGCAGTTA	AGACCCCTTG	GCTACAGTGA	AATACCACTA	CTCTCATAGT	TTCTTTACTT
PharT	...G.C.T	..A....CA	..A..T
Ocof	..C....A	..CAGT...	..CT.T....	...G....A	A.A.TCA..GC..
PulmA	..AGAGT...	..CTTT....GT	..GC..A..C..
	28Stk							
Tkan	ACACGGTTAA	AGGGAAGTTG	GGATAGTGTG	TCTCTCACTT	GGGTTT--AC	CTCAGGGTTC	GGGAAGGCCT	CCTATCCTTA
PharA.....T.....A	..CC..CGGG	T..TA.....G.....
OcofG..	..A....A...	A.....TTC	..AC..TTG-	..TCA-.A.G	CA..G....ATC..
PulmA	..A....A...	T.....TTC	..AC..CGG-	..TCAT.AA	..A.G....AAC..
	28Sph							
Tkan	AATTCTAGAG	CAAAGTGTGG	GTACTTTCAT	CAATGCTCAA	GAC-CCTATG	ACTTGTCTTG	TTCTT--CGG	GACTTGATGA
Phar	TC....G...	..C.....CC...CT...	...-.....	T..G.GT..C	AG..CCGA.T	TTTCG...TT
Ocof	..G.....	..C..A....	T..C.A.C...	AT.....AG	..A....AT	TGCAC....	..GT.CTT...G..T
PulmA.....	T..C.AAC...	AC....CTTT	..A....A	GTA.C.....TCG..GAT
	28Sph							
Tkan	G-----	--ACTTAGA	CTTGGGTTTG	AAAGGTAACG	TGGGTGTACC	GTAAA-----	---GAAACT	TGTTTGTGGT
Phar	..GACTGGGAC	TCAC.A....	..A.....	GG.....	..T...T..	A.T..GGGTG	GCTC.C..GG	GT.ACC....
Ocof	..-----	--ATTAA...	..TA.....	GTT...G.C	AAT...C.T-	-----	-----	---CAGCAA
Pulm	C-----	--TTTAA...	..AAA.....	GTT.....C	A.T..AACTT	-----	-----	CTCAC..ACA
	28Sf		28Sg					
Tkan	GCATACTACA	ATCTGCATGA	TCCTCACCGT	GGACATTGTC	AGGCGGGGAG	TTTGACTGGG	GCGGTACATC	TGTCAAAAGG
Phar	T..ATTC...T
Ocof	TG..GTACAT	..A.CA....G...C
Pulm	AG.CCTACAC	..A.C....A	..CA....	-----	..GACAT..
Tkan	TAACGCAGGT	GTCCTAAGGC	CAGCTCAGTG	AGGACAGAAA	CCTCGCGTAG	AGCAAAAAGG	CAAAAGCTGG	CITGATCCAG
Phar
OcofC.....	..A.....
PulmC.....	..A.....
Tkan	ATTTTCAGTA	CGAATACGGA	CCGCGAAAGC	GGGCCTATC	GATCCTTTTG	ATT-ATTGAG	AGTTTCAATC	AAGAGGTGTC
PharA
Ocof	..C.....C	..GA.-...TC	G.....
Pulm	..C.....C	..GA.-...TC	G.....
Tkan	AGAAAAGTTA	CCACAGGGAT	AACTGGCTTG	TGGCGGCCAA	GCGTTCATAG	CGACGTCGCT	TTTTGATCCT	TCGATGTCGG
Phar
OcofA.....	..T.....
PulmA.....	..T.....
Tkan	CTCTTCCTAT	CATTGCGAAG	CAGAGTTCGC	CAAGCGTTGG	ATTGTTTACC	CACTAATAGG	GAACGTGAGC	TGGGTTTAGA
PharCA....
Ocof
Pulm
Tkan	CCGTCGTGAG	ACAGGTTAGT	TTTACCCTAC	TGATGACTTG	TCGTTGCAAA	AGAAATCCTG	CTCAGTACGA	GAGGAACCGC
PharA...
OcofA...
PulmT...
	28Sh							
Tkan	AGGTTCCGGAC	AAATGGTACA	TGTGCCTGCT	CGACCGAGCA	ATGGCACGAC	GCTATCGTCC	GAGGGATTAT	GCCTGAACGC
PharT
OcofT.....T.....A
PulmT.....T.....A
Tkan	CTCTAAG							
Phar							
Ocof							
Pulm							

圖一 (續)
Fig. 1. (continued)



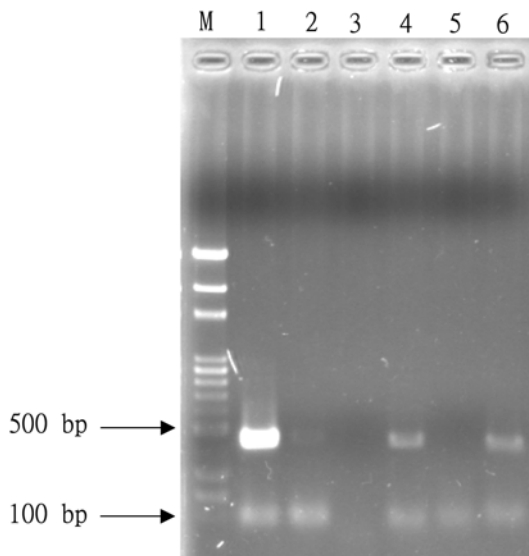
圖三 應用 RFLP 於歐洲葉蟎 (U) 和柑桔葉蟎 (C) 之 ITS2 片段鑑定，分別有 *AlwI*、*PstI*、*RsaI*、*SspI*、*BbvI* 及 *BcivI* 切割之結果。M 為 100 bp DNA 標幟；泳道 1、3、5、7、9、11 為歐洲葉蟎；泳道 2、4、6、8、10、12 為柑桔葉蟎。

Fig. 3. RFLP analysis of ITS2 fragments from *Panonychus ulmi* (U) and *Pan. citri* (C). M, 100 bp DNA ladder; lanes 1, 3, 5, 7, 9, and 11 show the digested results for *P. ulmi*; lanes 2, 4, 6, 8, 10, and 12 show results for *Pan. citri*.

Pulm、Ocof 及 Phar 等 DNA)。由結果可知，模板僅有神澤葉蟎時只會複製出 28SU 及 28Stk 這一區段約為 270 bp；模板僅有歐洲葉蟎時，只會複製出 28SU 及 28Spu 這一區段約為 200 bp；模板僅有咖啡小爪蟎時只會複製出 28SD 及 28Soc 這一區段約為 350 bp；模板僅有哈第岩蟎時，應該會複製出 28SU 及 28Sph 這一區段約為 440 bp，但這個區段並沒有複製出來；混合的 DNA 模板同時含有這四種葉蟎時，則複製出 270、200 及 350 bp 三個區段 (圖五)，哈第岩蟎專一片段也未複製出來。

討 論

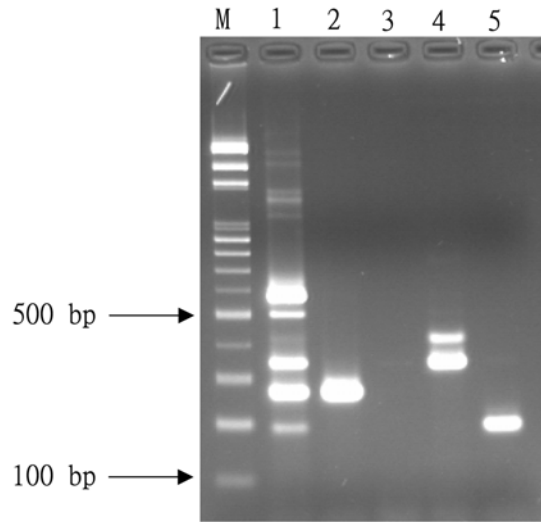
蟎類的發育過程中，不同的齡期具有不同的特徵變化，且在幼蟎、若蟎時期的分類，常因缺乏可供鑑定的分類特徵而難以鑑定。但是若以遺傳物質來進行分析比對，透過 DNA 序列的變異分析比較，則較不會有上述的困擾。通常 DNA 分子鑑定須經幾個步驟：(1) DNA 純化；(2) PCR 反應；(3) 電泳確認；(4) PCR 產物回收；(5) PCR 產物切割分析或定序分析 (Yeh, 2002)。採用的步驟愈多，所花費的間即愈長；因此，在快速鑑定的前提下，本研究採用反應步驟較少或各步驟時間短的方式，期望能夠達到快速鑑定的要求。



圖四 應用專一性引子於歐洲葉蟎和柑桔葉蟎之鑑定。泳道 1、3、5 為含柑桔葉蟎 DNA 模板的複製結果；泳道 2、4、6 為含歐洲葉蟎 DNA 模板的複製結果；M 為參考的 DNA 標幟。

Fig. 4. Application of a specific primer to identify *Pan. citri* and *Pan. ulmi*. Lanes 1, 3, and 5 contain a DNA template of *P. citri* in the reaction. Lanes 2, 4, and 6 contain a DNA template of *P. ulmi* in the reaction. M is the DNA marker.

由本實驗的結果可知，利用 PCR-RFLP 的技術雖可快速鑑定歐洲葉蟎及柑桔葉蟎，但已經過 GCG 軟體篩選的酵素也可能發生切割不完全的情形或是 DNA 量太少切割後的片段太小，電泳時無法達到預期的效果，因此最好開發多組的限制酶才可提高準確性。Multiplex-PCR 雖僅需 DNA 純化、PCR 反應、電泳確認等三個步驟，即可知曉樣品是否含有該葉蟎，但當複製的 DNA 大小太相近則無法適當的應用，且在選出專一性引子時其結果也可能不如預期，如哈第岩蟎之專一性引子並未複製出該有的片斷，所幸哈第岩蟎特有之 28S rDNA 及 ITS2 的序列仍可明確界定本種；因此為了解決這些問題，最好同時操作數個不同的 DNA 區段及數個專一性引子



圖五 Multiplex-PCR 於葉蟎間之鑑定。泳道 1 含有四種 DNA 模板，泳道 2、3、4 及 5 分別僅含有神澤葉蟎、哈第岩蟎、咖啡小爪蟎及歐洲葉蟎。每一個反應均加入共同的引子兩條 (28SU 及 28SD) 及專一性引子各一條，共計六條。M 為參考的 DNA 標幟。

Fig. 5. Application of multiplex-PCR to identify tetranychid mites. Lane 1 contains the DNA templates of four species. Lanes 2 ~ 5 contain a DNA template of *T. kanzawai*, *P. hartii*, *O. coffeae*, and *Pan. ulmi* in the PCR reaction, respectively. Six primers, including two universal primers and four specific primers, were added to each reaction. M is the DNA marker.

對，以增加其可靠性及準確性。另外，可針對某一種重要性害蟎建立其遺傳組成的資料庫如 PCR-RFLP、multiplex-PCR 或 DNA 序列等，視實際需求而選用。當有可疑樣品時無論是卵、幼蟎、若蟎或雌雄成蟎，分析 DNA 比較其資料庫，即可達到鑑定目的。

誌 謝

感謝農委會提供研究計畫(91 農科-7.2.2-檢-B7；92 農科-1.8.2-檢-BA；93 農科-1.9.1-檢-B2) 經費之支持；另感謝曾義雄博士的於

形態上的鑑定協助。

引用文獻

- Krantz, G. W.** 1978. A Manual of Acarology. 2nd ed. Oregon State University Book Stores, Corvallis, OR. 509 pp.
- Kumar, S., K. Tanura, I. B. Jakobsen, and M. Nei.** 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245.
- Lin, J. S., W. B. Yeh, and C. L. Wang.** 2003. Molecular identification of multiplex-PCR and PCR-RFLP for the quarantine pest, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Formosan Entomol.* 23: 345-358. (in Chinese)
- Navajas, M., and B. Fenton.** 2000. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Exp. Appl. Acarol.* 24: 751-774.
- Navajas, M., D. Cotton, S. Kreiter, and J. Gutierrez.** 1992. Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): preliminary data on ribosomal DNA sequences. *Exp. Appl. Acarol.* 15: 211-218.
- Navajas, M., J. Gutierrez, J. Lagnel, and P. Boursot.** 1996. Mitochondrial cytochrome oxidase I in tetranychid mites: a comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits. *Bull. Entomol. Res.* 86: 407-417.
- Navajas, M., J. Gutierrez, M. Williams, and T. Cotoh.** 2001. Synonymy between two spider mite species, *Tetranychus kanzawai* and *T. hydrangea*, shown by ribosomal ITS2 sequences and cross-breeding. *Bull. Entomol. Res.* 91: 117-123.
- Navajas, M., J. Lagnel, J. Gutierrez, and P. Boursot.** 1998. Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity* 80: 742-752.
- Osakabe, M., and Y. Sakagami.** 1994. RFLP analysis of ribosomal DNA in sibling species of spider mite genus *Panonychus* (Acari: Tetranychidae). *Insect Mol. Biol.* 3: 63-66.
- Robert, H.** 2002. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Syst. Appl. Acarol.* 7: 3-14.
- Wang, H. F.** 1981. Fauna of China Economic Insect. Vol. 23. Tetranychoida. Science Press, Beijing. 150 pp.
- 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. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, and Chung-Hsiung University Press, Taichung, Taiwan. pp. 103-107. (in Chinese)

收件日期：2005年9月13日

接受日期：2005年11月22日

Molecular Identification of Important Spider Mites Using Multiplex PCR and PCR-RFLP

Kivem Hsu Department of Plant Protection, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung 912, Taiwan
National Cishan Agricultural and Industrial Vocational Senior High School, Chishan, Kaoshiung 842, Taiwan, 195 Chigia
1st Rd., Chishan, Kaoshung, Taiwan

Tsen Hua, Niann-Tai Chang Department of Plant Protection, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung
912, Taiwan, 1 Hseuh-Fu Rd., Neipu, Pingtung, Taiwan

Wen-Bin Yeh* Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan, 250 Kuo Kuang Rd., Taichung,
Taiwan

ABSTRACT

Species recognition of spider mites is difficult due to their small body sizes and unstable morphological characters in the immature stages. In this study, sequences of 28S rDNA and ITS2 of ~2900 and 600 bp in length, respectively, were used to identify the molecular variations of five species of spider mites in four genera: *Oligonychus coffeae* (Nietner), *Panonychus citri*, *Panonychus ulmi* (Koch), *Petrobia harti* (Ewing), and *Tetranychus kanzawai* Kishida. Specific primers and restricted digestion enzymes were designed from the 28S rDNA and ITS2 regions, and applied for multiplex PCR and PCR-RFLP to identify these spider mites. Results showed that the application of the two molecular markers was useful for identifying these economically important pests.

Key words: spider mite, multiplex PCR, PCR-RFLP, ITS2, 28S rDNA