



# Formosan Entomologist

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

## Diagnostic Techniques for the Quarantine Pest, *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Hemiptera: Aphididae) 【Research report】

### 檢疫害蟲萵苣蚜 (*Nasonovia ribisnigri* (Mosley)) (Hemiptera: Aphididae) 鑑定技術之建立 【研究報告】

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

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

Received: 2005/12/05 Accepted: 2006/05/25 Available online: 2006/09/01

#### Abstract

*Nasonovia ribisnigri* is the most notorious pest of outdoor lettuce in Europe. Direct feeding damage and virus transmission can cause serious yield reductions. Although *N. ribisnigri* is not an indigenous aphid species in Taiwan, it has recently been frequently recorded in the customs inspection of imported lettuce. The partial mtDNA COI region of *N. ribisnigri* was amplified with primers COI-F01/COI-R02 and sequenced (accession no.: DQ153169). The morphological characters of *N. ribisnigri* were measured and described. These two diagnostic techniques were useful for identifying the quarantine pest, *N. ribisnigri*.

#### 摘要

萵苣蚜 (*Nasonovia ribisnigri* (Mosley)) 屬於半翅目 (Hemiptera)、常蚜科 (Aphididae) 之昆蟲，分布於歐洲、中亞南部及中東地區，不論其直接取食或媒介病毒，常造成萵苣類 (*Lactuca* spp.) 蔬菜的重大損失。雖然臺灣地區目前未有萵苣蚜發生的記錄，但近年由國外進口之萵苣類蔬菜大增，時常於海關進口檢驗標本之中，檢驗出萵苣蚜之記錄，而萵苣蚜為行政院農委會動植物防疫檢疫局公告之有條件輸入植物或植物產品的害蟲種類，因此本研究試在建立萵苣蚜之鑑定技術，從傳統形態與分生技術兩方面著手，提供更有效、準確的鑑定技術，除提供傳統形態鑑定方法之外，又以萵苣蚜之粒線體 DNA 細胞色素氧化酵素 (cytochrome oxidase I, COI) 基因為分子標記，以其序列供比對鑑定用；另再與桃蚜 (*Myzus persicae*) 和豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*) 一起，進行限制片段長度多態型 (RFLP) 分析。

**Key words:** Aphididae, *Nasonovia ribisnigri*, quarantine pest, molecular marker, diagnostic techniques

**關鍵詞:** 常蚜科、萵苣蚜、檢疫害蟲、分子標記、鑑定技術

Full Text: [PDF\(0.93 MB\)](#)

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

# 檢疫害蟲萵苣蚜 (*Nasonovia ribisnigri* (Mosley)) (Hemiptera: Aphididae) 鑑定技術之建立

葉信廷 柯俊成\* 許洞慶 國立臺灣大學昆蟲學系 臺北市大安區羅斯福路四段一號

## 摘要

萵苣蚜 (*Nasonovia ribisnigri* (Mosley)) 屬於半翅目 (Hemiptera)、常蚜科 (Aphididae) 之昆蟲，分布於歐洲、中亞南部及中東地區，不論其直接取食或媒介病毒，常造成萵苣類 (*Lactuca* spp.) 蔬菜的重大損失。雖然臺灣地區目前未有萵苣蚜發生的記錄，但近年由國外進口之萵苣類蔬菜大增，時常於海關進口檢驗標本之中，檢驗出萵苣蚜之記錄，而萵苣蚜為行政院農委會動植物防疫檢疫局公告之有條件輸入植物或植物產品的害蟲種類，因此本研究試在建立萵苣蚜之鑑定技術，從傳統形態與分生技術兩方面著手，提供更有效、準確的鑑定技術，除提供傳統形態鑑定方法之外，又以萵苣蚜之粒線體 DNA 細胞色素氧化酵素 (cytochrome oxidase I, COI) 基因為分子標記，以其序列供比對鑑定用；另再與桃蚜 (*Myzus persicae*) 和豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*) 一起，進行限制酶片段長度多態型 (RFLP) 分析。

**關鍵詞：**常蚜科、萵苣蚜、檢疫害蟲、分子標記、鑑定技術。

## 前言

因應國人飲食習慣之改變，萵苣 (lettuce) 為近年來從國外進口蔬果之大宗，根據國外文獻，蚜蟲類昆蟲是危害萵苣最嚴重之害蟲，重要常見的蚜蟲種類，有馬鈴薯網管蚜 (*Macrosiphum euphorbiae* (Thomas))、桃蚜 (*Myzus persicae* (Sulzer))、萵苣蚜 (*Nasonovia ribisnigri* (Mosley)) 及萵苣根綿蚜 (*Pemphigus bursarius* (L.)) (Parker *et al.*, 2002)，其中除萵苣根綿蚜危害萵苣的根部之

外，其餘 3 種皆在萵苣葉部取食危害，而萵苣蚜更喜於萵苣之心芽危害，時常造成重大損失。

萵苣蚜屬於半翅目 (Hemiptera)、常蚜科 (Aphididae) 之昆蟲。原本分布於歐洲、中亞南部及中東地區，後來被帶入北美、南美大陸。萵苣蚜進行異寄主的完全生活環 (Heteroecious holocycle)，其第一寄主 (冬季寄主) 為茶藨子類 (*Ribes* spp.) 植物，第二寄主 (夏寄主) 主要以菊科 (Compositae) 植物，如 *Cichorium*、*Crepis*、*Hieracium*、

\*論文聯繫人  
e-mail: kocc2501@ntu.edu.tw

*Lactuca* 和 *Lamproloma* 諸屬，其中以萵苣及菊苣為其取食之重要寄主，但有時也會以玄參科 (Scrophulariaceae) 或茄科 (Solanaceae) 的植物為寄主。在經濟上造成的危害為其聚集於萵苣屬 (*Lactuca* spp.) 或菊苣屬 (*Cichorium* spp.) 的心芽上取食，造成作物的葉捲曲、植株矮小等問題，當族群數量多時，其排放過多的蜜露，產生煤煙病，影響作物品質、妨礙作物生長。另外其可媒介持續性病毒，如醋栗脈綠嵌紋病 (gooseberry vein banding virus)，也可媒介非持續性病毒，如花菜之嵌紋病、瓜類嵌紋病 (Blackman and Eastop, 2000)。在防治工作上，由於其取食萵苣等作物的心芽，此部位被外部的葉片層層包裹，使得藥劑噴灑作用大為降低，而且在歐洲已有抗藥性族群產生的報告 (Rufingier *et al.*, 1997; Barber *et al.*, 1999)；而其他的防治方法，目前以培育抗蟲品系的作物，具有較佳的效果 (Parker *et al.*, 2002)。

萵苣蚜為行政院農委會動植物防疫檢疫局公告之有條件輸入植物或植物產品的害蟲種類，目前於臺灣地區未有發生之記錄，故國內並無相關文獻，可以做為檢疫人員鑑定萵苣蚜之依據，因此本研究在建立以萵苣蚜成蟲之外部形態描述，輔以分子生物學基因序列比對之鑑定技術。分生技術研究中，選取蚜蟲粒線體 DNA (mitochondrial DNA) 上之細胞色素氧化酵素 (cytochrome oxidase I, COI) 基因，進行序列定序；並加入桃蚜與豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*) 一起，進行限制酶片段長度多態型 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析，希望從傳統形態與分生技術兩方面著手，提供更有效、準確的鑑定技術。

## 材料與方法

### 一、供試昆蟲

萵苣蚜的取得，是以行政院農委會動植物防疫檢疫局基隆分局及新竹分局送國立臺灣大學昆蟲學系 (本系)，委託檢驗案件之標本為主 (見表一)；而做為限制酶片段長度多態型分析對照之桃蚜與豌豆蚜，則由本系張俊哲老師提供。

### 二、成蟲形態特徵診斷鑑定

#### 1. 藥劑配製

(1) 溶蠟藥品：carboxylene (10% phenol、90% xylene)；(2) 軟化藥品：5% KOH；(3) 透明藥品：EAF (Essig's Aphid Fluid) (75% lactic acid、14% acetic acid、7% phenol、4% distilled water)；(4) 組織固定及脫水藥品：95% ethanol；(5) 封膠藥品：Euparal (Gibson公司之商品，成份包括 eucalyptol、paraldehyde、camsal、sandarak 及 ethanol)。

#### 2. 蚜蟲玻片標本製作與拍照

自酒精浸泡標本中，選取若干無翅及有翅型成蟲，製作玻片標本。過程如下：(1) 將蟲體置於 95% 酒精中 2 小時，以固定蟲體組織，如蟲體有蠟質分泌物，則浸入 carboxylene 中脫蠟數分鐘。(2) 將蟲體置入 5% KOH 中約 10~20 分，以軟化蟲體 (體色淡者可省去此步驟，直接置入透明藥品中)。(3) 以 95% 酒精清洗 1~2 次。(4) 將清洗後的蟲體置入 EAF 中，加熱至 45~50°C，直到蟲體內部完全透明為止。(5) 挑出蟲體，以 95% 酒精迅速清洗 1~2 次。(6) 清洗後用 Euparal 進行封片即可觀察。封片後之玻片置於 40°C 之熱板或烘箱乾燥 1 個月以上。

封片後以光學顯微鏡 2~40X 觀察其外

表一 試驗中使用高苜蚜 (*Nasonovia ribisnigri*) 之資料

Table 1 Information of aphids (*Nasonovia ribisnigri*) used in the experiment

Quarantine no.	Host plant	Origin	Sampling date	Materials
60203047952	lettuce	US	Jul. 27, 2004	5 alate adults
60203048185	lettuce	US	Aug. 26, 2004	2 alate and 1 apterous adults
60203047759	lettuce	US	Jun. 23, 2004	1 apterous adult
60203087783	lettuce	US	Aug. 10, 2004	1 apterous adult
60203048187	lettuce	US	Aug. 26, 2004	2 apterous adults
VP6020448322	lettuce	US	Jul. 27, 2005	2 alate adults

部特徵，並以數位相機拍照記錄之，為使照片能有最佳之景深，另外以電腦軟體 Auto-Montage (Synoptics, Cambridge, UK) 將 10~20 張數位照片進行疊圖，以求得最佳景深之效果。

### 三、分子生物技術診斷鑑定

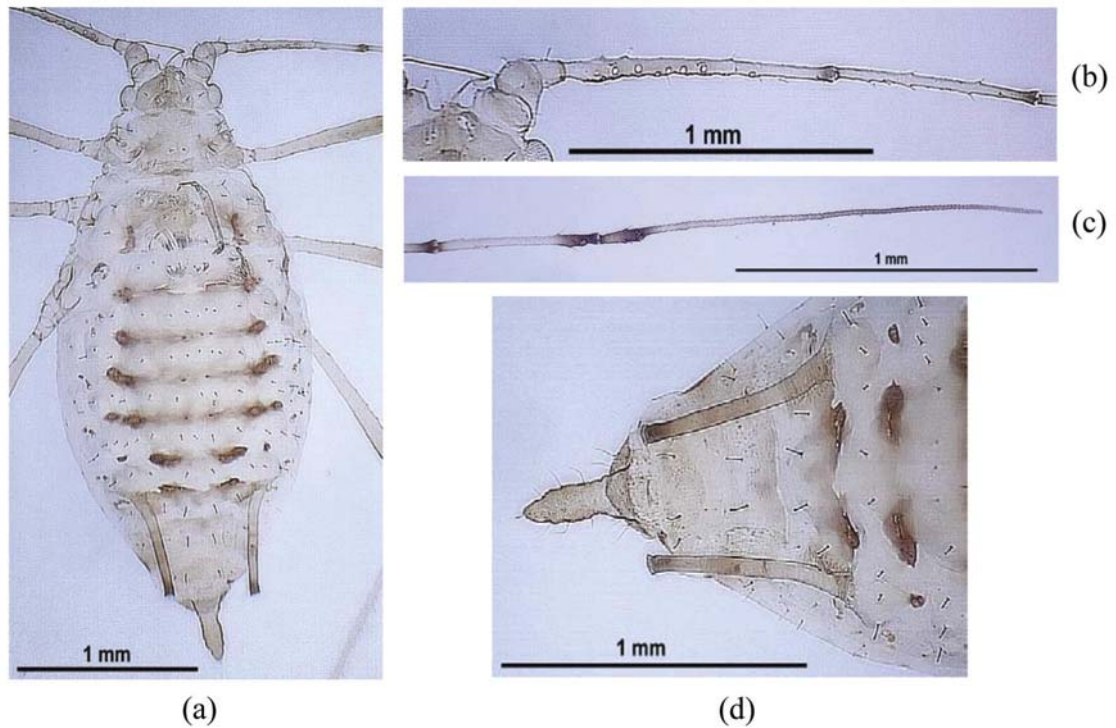
#### 1. 蚜蟲基因組 DNA 的萃取

使用 DNA 純化試劑組 (Blood and Tissue Genomic DNA Miniprep System kit, cat. no. GG1001, Viogene, Taiwan)，萃取蚜蟲基因組 (genomic) DNA。將單隻蚜蟲標本置於 1.5 ml 離心管中，加入少量液態氮冷凍後研磨蟲體，再加入 200  $\mu$ l LYS buffer 將蟲體充分研磨，加入 20  $\mu$ l proteinase K (20 mg/ml)，將之混勻後置於 60°C 水浴或氣浴中作用約 3 小時，之後增溫至 70°C 作用 20 分鐘，使 proteinase K 失去活性；加入 200  $\mu$ l EX buffer 混合均勻後，於 70°C 中作用 10 分鐘，之後再加入 210  $\mu$ l 的絕對酒精，混合均勻後將樣品轉移至 spin column 中，以 6000  $\times$ g 離心 2 分鐘，之後以 wash buffer 500  $\mu$ l 清洗 spin column，並以 6000  $\times$ g 離心 2 分鐘，重覆此步驟一次，最後將 spin column 移至新的 1.5 ml 離心管中，加入預熱 70°C 的 ddH<sub>2</sub>O 100  $\mu$ l，以 6000  $\times$ g 離心 2 分鐘，將 spin column 中的 DNA 沖提出來，其中即含有蚜蟲的基因組 DNA，保

存於 -20°C 中備用。

#### 2. 聚合酶連鎖反應 (PCR) 增幅目標 DNA 片段

參考 Yeh (2004)，利用正向引子 (forward primer) COI-F01 (5'-ATA ATG GAA CAG GAA CAG GAT GAA C-3') 和反向引子 (reverse primer) COI-R02 (5'-GTT AGG ATA ATC TGT GTA TCG TCG AG-3')，以前一步驟萃取的蚜蟲 DNA 為模板，進行 PCR 增幅粒線體 DNA 之 COI 區域。實驗過程及條件如下：取 PCR 專用 0.2 ml 微量離心管，加入 4.0  $\mu$ l 的蚜蟲基因組 DNA 萃取液、再加入 12.5  $\mu$ l 2X PCR Master Mix (MBI Fermentas, Taiwan) (內含：Taq DNA polymerase (recombinant) in reaction buffer: 0.05 units/ $\mu$ l; MgCl<sub>2</sub>: 4 mM; dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP): 0.4 mM of each)、2.5  $\mu$ l 1.5  $\mu$ M 正向引子及 2.5  $\mu$ l 1.5  $\mu$ M primer 反向引子，加水使總體積為 25  $\mu$ l，混合均勻放入聚合酶連鎖反應溫度控制器 (GeneAmp® PCR System 2700) 中，引子黏合條件為 54°C (2.5 分鐘)，進行聚合酶連鎖反應共 40 次循環；反應結束後，取 5  $\mu$ l PCR 產物，以 1.5% 的 agarose gel 進行電泳，再於紫外燈下檢視並拍照記錄，剩餘的 PCR 產物保存於 4°C 中備用。



圖一 萵苣蚜 (*Nasonovia ribisnigri*) 之無翅型成蟲。(a) 無翅型成蟲外觀；(b) 觸角 I~IV 節；(c) 觸角 V~VI 節；(d) 腹部。

Fig. 1. Morphological characters of a *Nasonovia ribisnigri* apterous adult (apterous virginoparae). (a) body; (b) antennae I-IV; (c) antennae V-VI; (d) abdomen.

### 3. DNA 定序及序列分析

將 PCR 產物委由源資國際生物科技股份有限公司 (臺北, 臺灣) 進行定序, 將定序所得之序列資料以 Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) 軟體進行核苷酸序列比對, 再以 GeneDoc (Nicholas and Nicholas, 1997) 軟體進行引子序列的刪除, 並連結國家衛生研究院 (National Health Research Institutes) 的 GCG 網站 (<http://bioinfo.nhri.org.tw/gcg/index.htm>), 進行序列分析及限制酶切位比對。

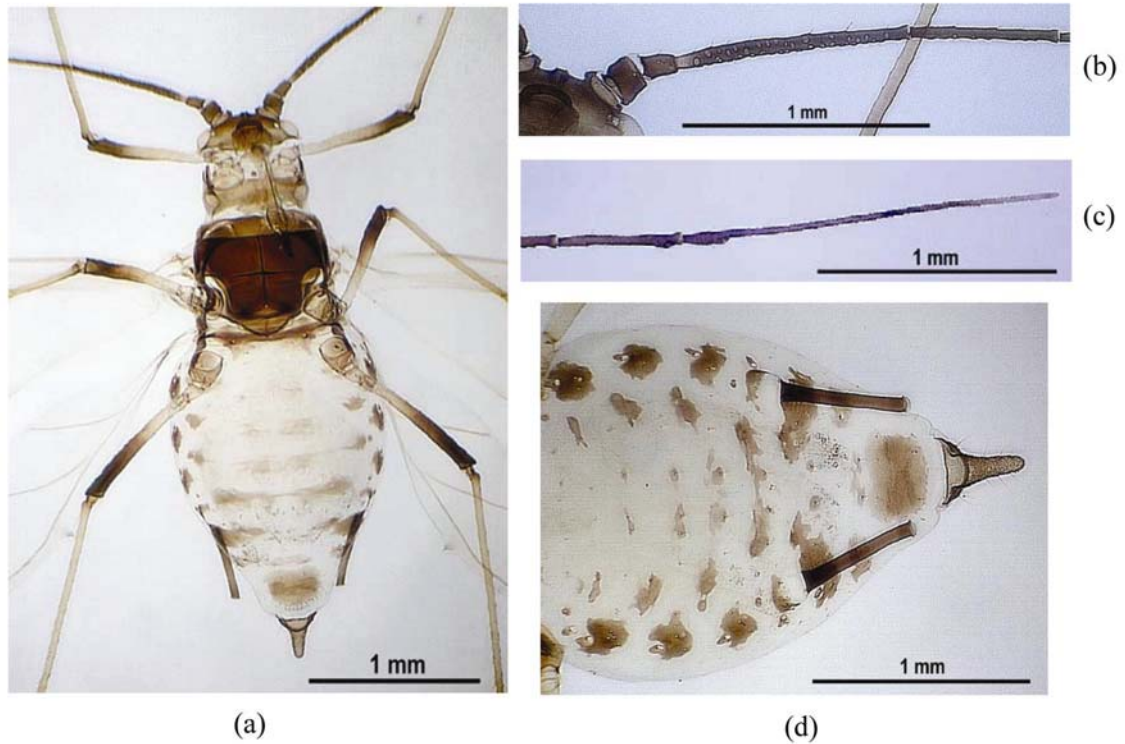
### 4. 限制酶片段長度多態型分析

取 10~15  $\mu$ l PCR 增幅產物, 加入 3~5 units 的限制酶, 最後加水使總體積為 20  $\mu$ l (含 1x buffer), 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。

## 結 果

### 一、成蟲形態特徵診斷鑑定

蚜蟲種類的鑑定, 是以成蟲的外部形態特徵為主, 但是同一種蚜蟲具有無翅和有翅型個



圖二 高苺蚜 (*Nasonovia ribisnigri*) 之有翅型成蟲。(a) 有翅型成蟲外觀；(b) 觸角 I~IV 節；(c) 觸角 V~VI 節；(d) 腹部。

Fig. 2. Morphological characters of a *Nasonovia ribisnigri* alate adult (alate virginoparae). (a) body; (b) antennae I-IV; (c) antennae V-VI; (d) abdomen.

體，而且外部形態變異程度有時相當大，於鑑定時最好能獲得此兩型的個體，以供比對特徵，才能獲得準確的鑑定結果。高苺蚜於活體時，體色多變化，由綠色、黃綠、桔色至粉紅色。本診斷方法是以製作蚜蟲玻片標本進行鑑定，於光學顯微鏡下可見其後足細長，氣孔大，觸角突起發達。無翅型成蟲觸角第 III 節基部顯著膨大，具次生感覺器 12~27 個，排列無序，觸角第 VI 節端部 (terminal process) 為基部 (base) 長之 6~9 倍；腹部第 2~6 節之腹節間具有成對之腹斑，在腹管前後之兩對腹斑位於體中央，其他腹斑則較靠體之兩側，腹管管狀，最末端具有少許刻紋，

但無網狀紋區 (圖一)。有翅型成蟲觸角約與身體等長，第 III 節具有次生感覺器 37~54 個，排列無序，第 IV 節有 7~9 個，分布於觸角節下方約排成一列；腹部第 2~6 腹節間，具有節間橫行之腹斑，以腹管後方之腹斑最為粗厚，腹管管狀，最末端亦具有少許刻紋，但無網狀紋區 (圖二)。

## 二、分子生物技術診斷鑑定

高苺蚜基因組 DNA 檢體，以引子對 COI-F01/COI-R02 增幅其粒線體 DNA 之 COI 基因片段，於電泳圖上可見長度約為 950 bp 的片段 (圖三 a)，將此增幅產物定



序，並刪除引子序列後可得 845 bp，此序列已被收錄於 GenBank (accession number: DQ153169)；另外做為 RFLP 對照的桃蚜與豌豆蚜，以相同引子對增幅結果，於電泳圖上並無差異，此 3 種蚜蟲粒線體 COI 基因片段序列之比較見表二。定序結果可知，3 種蚜蟲序列皆為 A+T 比例較高，而其種間的相似度 (similarity) 在 91.0~93.1% 之間。

將 3 種蚜蟲的粒線體 DNA COI 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 *AseI* 限制酶，在 3 種蚜蟲之間具有不同的切位，在高苜蓿蚜產生 330、230、170、120 和 100 bp 的片段，可明顯與桃蚜和豌豆蚜區分 (圖三 b)。另外以限制酶 *DraI* 和 *SstI* 同時進行酶切，在 3 種蚜蟲亦有不同的切位，根據限制酶片段多態型圖譜也可以清楚區分種類 (圖三 c)。

## 討 論

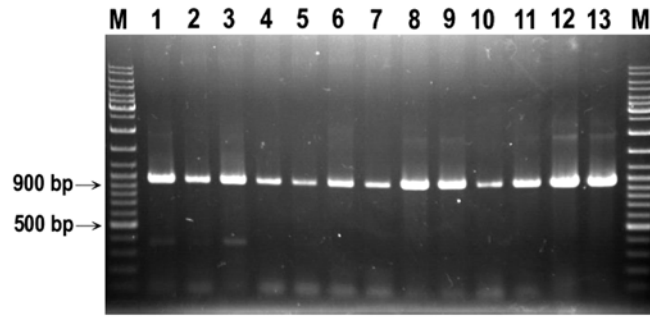
蚜蟲的形態鑑定是以成蟲的外部特徵為主，其幼期因齡期之不同，種類鑑定時的重要特徵，如觸角節數與比例、次生感覺器、尾片等構造，一直在變化中，難以有穩定的形態可供描述與確認，因此幼蚜的分類資料在文獻上無法取得，海關檢疫時檢查獲得的幼蚜，有時難以確定種名。另外，由於蚜蟲的體型微小，鑑定種類時，必須將其製作成玻片標本，但是在製片的過程當中，如不留意，容易造成標本的損害，尤其重要的鑑定特徵，如觸角、翅、腹管、尾片等，其受損的機率更高，如不能提供完整的玻片標本，形態鑑定的工作就難以進行。

由於蚜蟲的生活受氣候、寄主植物等外在環境的影響非常大，因此造成大多數的蚜蟲種

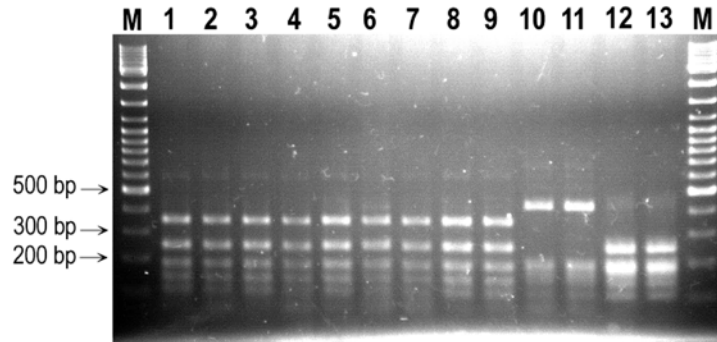
類有多態型 (polymorphism) 的情形出現 (Dixon, 1985)。如同一種蚜蟲，可能同時存在有翅型、無翅型個體，其外部形態特徵差異甚大，再加上取食不同寄主植物時，蚜蟲的體色及體型的差異也可能非常大 (Weisser *et al.*, 1999; Zitoudi *et al.*, 2001)，例如高苜蓿蚜於活體時，體色常為綠色或黃綠色，但是偶有紅色個體出現，而分布於腹部 2~6 節之腹斑，也常有個體間之變異產生，腹斑大者幾乎覆蓋整個腹部背方，而小者僅見於腹板兩側；另外季節性的有性及無性世代交替，以及不同地理區的分布，都是造成蚜蟲外部形態變異的因素 (Smith *et al.*, 1998; Kephalogianni *et al.*, 2002)。因此依據蚜蟲的外部形態鑑定種類時，能夠同時取得有翅型及無翅型的多隻個體進行鑑定是必要的。在傳統形態鑑定方面，因為有上述種種缺點或困難，故需長期累積經驗，才能無誤地鑑別種類，但是檢疫害蟲種類的鑑定工作具有時效性與正確性，因此建立高苜蓿蚜之分子資料，以彌補形態分類鑑定上之缺失，讓不具有蚜蟲相關背景知識之人員，同樣可以進行檢疫害蟲的鑑定工作是必要的。

目前分子生物技術日漸發展成熟，許多研究指出，只要選取適當的分子標示，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 (Chen and Shih, 2003)；分子資料也可以應用於體型微小、特徵不易觀察的昆蟲鑑定工作 (Brunner *et al.*, 2002)。經由分子的層次再配合適當的分析方法，對於體型小且具有多態型的蚜蟲，也同樣能夠提供鑑別種類的效果 (Figuroa *et al.*, 1999; Yeh *et al.*, 2005)。

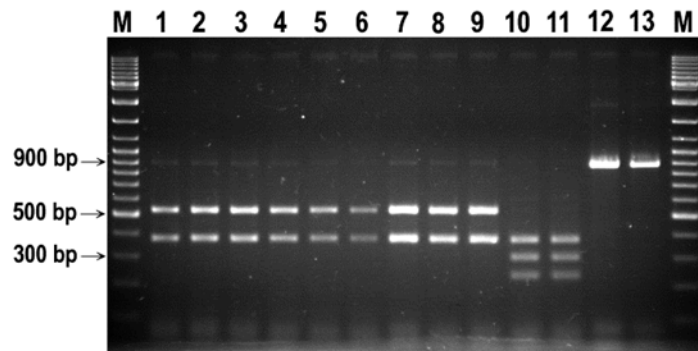
由於粒線體具有以下幾個特點：(1) 粒線體 DNA 基因組相對於核 DNA 顯得小許多，較不容易降解 (degraded)；(2) 通常一個細胞內具有  $10^2 \sim 10^5$  個粒線體存在，因此在



(a)



(b)



(c)

圖三 (a) 引子對 COI-F01/COI-R02 增幅結果，可得約 950 bp 的片段；(b) 以限制酶 *AseI* 進行酶切後之限制酶片段多態型圖譜；(c) 以限制酶 *DraI* 和 *SstI* 同時進行酶切後之限制酶片段多態型圖譜。M：100-bp DNA ladder (MBI Fermentas)；lanes 1~9：萵苣蚜 (*Nasonovia ribisnigri*)；lanes 10, 11：桃蚜 (*Myzus persicae*)；lanes 12, 13：豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*)。

Fig. 3. (a) Amplification of the mtDNA COI region (ca. 950 bp) with primers COI-F01 and COI-R02 for three aphid species. (b) RFLP analysis of the mtDNA COI with endonuclease *AseI*. (c) RFLP analysis of the mtDNA COI with endonucleases *DraI* and *SstI*. M, 100-bp DNA ladder (MBI Fermentas); lanes 1-9: *Nasonovia ribisnigri*; lanes 10, 11: *Myzus persicae*; lanes 12, 13: *Acyrtosiphon pisum*.



表二 萵苣蚜 (*Nasonovia ribisnigri*)、桃蚜 (*Myzus persicae*) 與豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*) 粒線體 DNA COI 基因序列片段之組成與比較

Table 2 Comparison of mtDNA COI sequences (845 bp) among *Nasonovia ribisnigri*, *Myzus persicae*, and *Acyrtosiphon pisum*

Aphids	Composition (%)				Similarity (%) with			Accession no.
	T	C	A	G	<i>N. ribisnigri</i>	<i>M. persicae</i>	<i>A. pisum</i>	
<i>N. ribisnigri</i>	42.4	12.7	33.4	11.6	-	92.7	93.1	DQ153169
<i>M. persicae</i>	42.4	12.7	33.1	11.8		-	91.0	DQ270002
<i>A. pisum</i>	42.0	13.5	33.0	11.5			-	

萃取及增幅的操作上較容易；(3) 其為母系遺傳，能減少重組產生的影響；(4) 特定區域內的突變速率大，使得物種種間、種內的差異明顯 (Simon *et al.*, 1994; Randi, 2000)；使得粒線體 DNA 對於物種的起源、類緣關係、遺傳結構與演化等相關研究，都可提供重要的分子資訊；而以蚜蟲粒線體 DNA 為分子標示之研究亦不少，Stern *et al.* (1997) 試以粒線體 DNA 之部份 COI 和 COII 基因序列的比對，做為蚜蟲分子鑑定的依據，其研究確定數種存疑的扁蚜亞科 (Hormaphidinae) 蚜蟲之分類地位，並且以其序列做為同種蚜蟲於生活環中不同型態個體之比對，據此，Stern *et al.* (1997) 認為，如蚜蟲這類具有複雜生活環及外部形態不易鑑定的昆蟲，可以藉由 DNA 的分子資料，做為種類鑑定時重要的參考。

本試驗以粒線體 DNA 之 COI 基因片段，選取不同時間，從美國輸入之萵苣，檢疫所得的萵苣蚜有翅型及無翅型成蟲共 14 隻 (資料見表一)，其試驗採樣期達一年，而定序結果顯示此 14 筆粒線體 COI 序列資料，並沒有任何位點的差異；雖然本試驗未選取萵苣蚜幼蚜進行試驗，但是由縊管蚜屬 (*Rhopalosiphum*) 蚜蟲的試驗，可知其幼期與成蟲的分子資料並無差異 (Yeh, 2004; Yeh *et al.*, 2005)，而且以單隻一齡幼蚜即可萃取 DNA 進行實驗，故相信粒線體 DNA 之

COI 基因片段，是一穩定的分子標記，可提供做為檢疫害蟲萵苣蚜分子鑑定之依據。

## 誌 謝

感謝行政院農業委員會動植物防疫檢疫局基隆分局及新竹分局提供萵苣蚜材料。臺大昆蟲系張慧羽教授提供實驗設備，以及張俊哲老師提供蚜蟲材料，特此感謝。本研究承蒙行政院農業委員會動植物防疫檢疫局委託計畫 93 農科-1.9.1-檢-B2(4) 及 94 農科-13.3.1-檢-B2(5) 之經費補助，謹致謝忱。

## 引用文獻

- Barber, M. D., G. D. Moores, G. M. Tatchell, W. E. Vice, and I. Denholm. 1999. Insecticide resistance in the currant-lettuce aphid, *Nasonovia ribisnigri* (Hemiptera: Aphididae). *Bull. Entomol. Res.* 89: 17-23.
- Blackman, R. L., and V. F. Eastop. 2000. *Aphids on the World's Crops: An Identification Guide* (2<sup>nd</sup> ed.). John Wiley & Sons, London, UK. 466 pp.
- Brunner, P. C., C. Fleming, and J. E. Frey. 2002. A molecular identification key for economically important thrips

- species (Thysanoptera: Thripidae) using direct sequencing and a PCR-RFLP-based approach. *Agric. For. Entomol.* 4: 127-136.
- 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)
- Dixon, A. F. G.** 1985. *Aphid Ecology*. Blackie & Son, New York. 157 pp.
- 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.
- Kephalogianni, T. E., J. A. Tsitsipis, J. T. Margaritopoulos, E. Zintzaras, R. Delon, I. Blanco-Martin, and W. Schwaer.** 2002. Variation in the life cycle and morphology of the tobacco host-race of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) in relation to its geographical distribution. *Bull. Entomol. Res.* 92: 301-307.
- Nicholas, K. B., and H. B. Jr. Nicholas.** 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>).
- Parker, W. E., R. H. Collier, P. R. Ellis, A. Mead, D. Chandler, J. A. Blood Smyth, and G. M. Tatchell.** 2002. Matching control options to a pest complex: the integrated pest management of aphids in sequentially-planted crops of outdoor lettuce. *Crop Prot.* 21: 235-248.
- Randi, E.** 2000. Mitochondrial DNA. pp. 136-167. *In: Baker, A. J. ed. Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Rufingier, C., L. Schoen, C. Martin, and N. Pasteur.** 1997. Resistance of *Nasonovia ribisnigri* (Homoptera: Aphididae) to five insecticides. *J. Econ. Entomol.* 90: 1445-1449.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook.** 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651-701.
- Smith, M. A. H., P. A. Mackay, and R. J. Lamb.** 1998. Seasonal morphometric variation in sexual and asexual, North American and Australian, populations of the aphids, *Acyrtosiphon pisum*. *Physiol. Entomol.* 24: 179-188.
- Stern, D. L., S. Aoki, and U. Kurosu.** 1997. Determining aphid taxonomic affinities and life cycle with molecular data: a case study of the tribe Cerataphidini (Homaphididae: Aphidoidea: Hemiptera). *Syst. Entomol.* 22: 81-96.
- 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.
- Weisser, W. W., C. Braendle, and N. Minoretti.** 1999. Predator-induced morphological shift in the pea aphid. Proc. R. Soc. Lond. B 266: 1175-1181.
- Yeh, H. T.** 2004. Studies on rapid identification and diversity of secondary symbionts of *Rhopalosiphum* (Aphididae). Graduate Institute of Entomology National Taiwan University, Master's thesis. 81 pp. (in Chinese)
- Yeh, H. T., C. C. Ko, T. C. Hsu, and C. J. Shih.** 2005. PCR-RFLP technique for molecular identification of *Rhopalosiphum* (Aphididae). Formosan Entomol. 25: 33-46. (in Chinese)
- Zitoudi, K., J. T. Margaritopoulos, Z. Mamuris, and J. A. Tsitsipis.** 2001. Genetic variation in *Myzus persicae* populations associated with host-plant and life cycle category. Entomol. Exp. Appl. 99: 303-311.

收件日期：2005年12月5日

接受日期：2006年5月25日

# Diagnostic Techniques for the Quarantine Pest, *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Hemiptera: Aphididae)

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

Department of Entomology, National Taiwan University, No. 1 Sec. 4 Roosevelt Rd., Taipei 106, Taiwan

## ABSTRACT

*Nasonovia ribisnigri* is the most notorious pest of outdoor lettuce in Europe. Direct feeding damage and virus transmission can cause serious yield reductions. Although *N. ribisnigri* is not an indigenous aphid species in Taiwan, it has recently been frequently recorded in the customs inspection of imported lettuce. The partial mtDNA COI region of *N. ribisnigri* was amplified with primers COI-F01/COI-R02 and sequenced (accession no.: DQ153169). The morphological characters of *N. ribisnigri* were measured and described. These two diagnostic techniques were useful for identifying the quarantine pest, *N. ribisnigri*.

**Key words:** Aphididae, *Nasonovia ribisnigri*, quarantine pest, molecular marker, diagnostic techniques