



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Molecular Identification of Weevils Significant for Customs Inspection and Quarantine Importance 【Research report】

檢防疫重要性象鼻蟲的分子鑑定【研究報告】

Gee-Way Lin, Shau-Lin Lu+, Ting-Yu Huang+, Chun-Liang Shih, Wen-Jer Wu*, Chun-che Chang*
林季璋、呂曉鈴+、黃廷宇+、施鈞曉、吳文哲*、張俊哲*

*通訊作者E-mail: wuwj@ntu.edu.tw; chunche@ntu.edu.tw

Received: 2008/02/09 Accepted: 2008/03/15 Available online: 2008/03/01

Abstract

Most weevils are polytrophic insects. The larvae of many weevils feed by boring into host plants which may be damaged or killed as a result. Weevil larvae and eggs regularly enter Taiwan through imported agricultural products and pose a serious threat to the local agricultural ecology. Identification of invasive weevils, particularly larvae and eggs with indistinct morphological features is only possible using molecular methods and species-specific DNA sequences. We extracted DNA from live or ethanol-immersed samples of adult weevils for use as templates for Polymerase Chain Reaction (PCR), and cloned target sequences of a region containing divergent sequences near the 3' -end of the COI (cytochrome oxidase subunit I) gene in the mitochondrial genome. Within this target region, we successfully designed species-specific primers for six weevil species belonging to different genera (foreign species: *Conotrachelus nenuphar* (plum curculio), *Graphognathus leucoloma* (whitefringed beetle), and *Rhabdoscelus obscurus* (New Guinea sugarcane weevil); local species: *Cylas formicarius* (sweet-potato weevil), *Hypomeces squamosus* (gold-dust weevil), and *Sympiezomias cribricollis* (gourd-waist weevil)). Using the same strategy, we also were able to discriminate two weevil species of the same genus, namely *R. obscurus* and the Asiatic palm weevil *R. lineaticollis*. Strategies and technologies developed in this study can be applied to molecular identification of other kinds of weevils of quarantine importance.

摘要

大多數的象鼻蟲為植食性昆蟲，寄主範圍廣泛，許多種類的幼蟲會蛀食寄主植物，往往造成嚴重的農作損害與植株死亡。由於象鼻蟲之幼蟲與卵已在我國進口農作物當中檢出，對本土農業生態形成潛在嚴重威脅。因此，建立一套有效之分子鑑定系統來檢測外觀形態不易區辨之檢防疫重要性象鼻蟲之幼蟲與卵實屬必要。本研究已成功開發出檢測象鼻蟲之分子鑑定技術平台，含活體與浸漬酒精蟲體之 DNA 萃取、基因片段增幅以及序列分析等技術。我們已由細胞色素氧化酵素 (cytochrome oxidase subunit I, COI) 基因序列在鞘翅目昆蟲中歧異度較高的區段設計可分辨六種不同屬象鼻蟲 (李象鼻蟲 (*Conotrachelus nenuphar*)、白緣粗吻象鼻蟲 (*Graphognathus leucoloma*)、新幾內亞甘蔗象鼻蟲 (*Rhabdoscelus obscurus*) 等三種為外來種；甘藷蟻象 (*Cylas formicarius*)、粉綠象鼻蟲 (*Hypomeces squamosus*)、台灣三月始灰象鼻蟲 (*Sympiezomias cribricollis*) 為

檢防疫重要性象鼻蟲的分子鑑定

林季瑋、呂曉鈴⁺、黃廷宇⁺、施鈞曉、吳文哲*、張俊哲*

國立台灣大學昆蟲學系暨研究所 台北市大安區 106 羅斯福路四段 113 巷 27 號昆蟲學館

摘要

大多數的象鼻蟲為植食性昆蟲，寄主範圍廣泛，許多種類的幼蟲會蛀食寄主植物，往往造成嚴重的農作損害與植株死亡。由於象鼻蟲之幼蟲與卵已在我國進口農作物當中檢出，對本土農業生態形成潛在嚴重威脅。因此，建立一套有效之分子鑑定系統來檢測外觀形態不易區辨之檢防疫重要性象鼻蟲之幼蟲與卵實屬必要。本研究已成功開發出檢測象鼻蟲之分子鑑定技術平台，含活體與浸漬酒精蟲體之 DNA 萃取、基因片段增幅以及序列分析等技術。我們已由細胞色素氧化酵素 (cytochrome oxidase subunit I, COI) 基因序列在鞘翅目昆蟲中歧異度較高的區段設計可分辨六種不同屬象鼻蟲 (李象鼻蟲 (*Conotrachelus nenuphar*)、白緣粗吻象鼻蟲 (*Graphognathus leucoloma*)、新幾內亞甘蔗象鼻蟲 (*Rhabdoscelus obscurus*) 等三種為外來種；甘藷蟻象 (*Cylas formicarius*)、粉綠象鼻蟲 (*Hypomeces squamosus*)、台灣三月始灰象鼻蟲 (*Sympiezomias cribricollis*) 為本土既存物種) 之專一性引子對。其中，新幾內亞甘蔗象鼻蟲之專一性引子可進一步區辨同屬之亞洲棕櫚象鼻蟲 (*R. lineaticollis*)。本研究開發的檢測技術與策略可作為鑑定其他檢防疫象鼻蟲之重要參考。

關鍵詞：COI 基因、分子鑑定、引子、專一性、象鼻蟲。

前言

我國自 2002 年加入世界貿易組織 (World Trade Organization; WTO) 以來，進口農產品的種類與數量激增。因此，隨農產品挾帶有害昆蟲入侵的風險也隨之提高。為了準確檢測入侵物種，特別是難用形態特徵鑑別

的幼蟲和卵，建立一套有效的分子鑑定技術實刻不容緩。截至目前，我國進口農產品常檢出之鞘翅目昆蟲以倉儲害蟲佔大部分，其中以黃斑出尾蟲 (*Carpophilus hemipterus*) 受檢出次數 (至少 30 次) 為最多 (Chang and Ko, 2006)。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 (以下稱防檢局) 針對進口之農產品可能挾帶

⁺這兩位作者對本論文具具有等量貢獻。

*論文聯繫人

e-mail: wuwj@ntu.edu.tw; chunche@ntu.edu.tw

表一 六種標的象鼻蟲基礎資料 (蟲種之排列依學名之英文字母順序)

Table 1. Basic information on the six target weevil species (in alphabetic order of species names)

Scientific name/English name/Chinese name	Host plants (common names)	Distribution	References
<i>Cylas formicarius</i> (Fabricius)/sweet potato weevil/甘藷蟻象	sweet potato, morning glory, water convolvulus	North America (USA), Taiwan, Japan and tropical areas	Sutherland, 1986
<i>Conotrachelus nenuphar</i> (Herbst)/plum weevil/李象鼻蟲	drupe, pear, apple	North America (USA, Canada)	Lathrop, 1949; Yonce <i>et al.</i> , 1995
<i>Graphognathus leucoloma</i> (Boheman)/white fringed weevil/白緣粗吻象鼻蟲	drupe, potato, bean, sweet corn	North America (USA), South America, South Africa and Australia	Ahmad, 1974; Gough and Brown, 1991; Waterhouse, 1993; Tan <i>et al.</i> , 1998
<i>Hypomeces squamosus</i> (Fabricius)/gold-dust weevil/粉綠象鼻蟲	citrus, potato, morning glory, sugar cane, drupe	Taiwan, Japan, Philippine, Malaysia, Thailand	Miwa, 1931; Lin, 2002
<i>Sympiezomias cribricollis</i> (Kono)/gourd-waist weevil/台灣三月始灰象鼻蟲 (細腰葫形象鼻蟲)	citrus, sugar cane, flower (jasmine, yulan etc.)	Taiwan	Chu, 1971; Lee <i>et al.</i> , 2006; Shih <i>et al.</i> , 2006
<i>Rhabdoscelus obscurus</i> (Boisduval)/New Guinea sugarcane weevil/新幾內亞甘蔗象鼻蟲	sugar cane, drupe	Australia, Hawaii, Japan, Indonesia, Malaysia	Lamb, 1974; Mohamed and Steven, 2001

對我國農作物具有嚴重潛在威脅之象鼻蟲，例如李象鼻蟲 (*Conotrachelus nenuphar*)、甘藷象鼻蟲 (*Euscepes postfasciatus*)、白緣粗吻象鼻蟲 (*Graphognathus leucoloma*)、椽果種子象鼻蟲 (*Sternochetus mangiferae*) 等四種象鼻蟲列為檢防疫重要害蟲 (Chang *et al.*, 2005)。

本研究之目的在建立一套以分子工具鑑定象鼻蟲之技術平台，作為鑑定各種象鼻蟲害蟲之重要參考。我們蒐集到六種象鼻蟲作為分子檢測之標的昆蟲 (target insects)，其中李象鼻蟲、白緣粗吻象鼻蟲以及新幾內亞甘蔗象鼻蟲 (*Rhabdoscelus obscurus*) 等三種為外來種；粉綠象鼻蟲 (*Hypomeces squamosus*)、台灣三月始灰象鼻蟲 (*Sympiezomias cribricollis*，又名細腰葫形象鼻蟲) 和甘藷蟻

象 (*Cylas formicarius*) 等為本土既存之種類。這六種象鼻蟲危害之寄主植物與害蟲分布地區詳如表一。

在實驗策略方面，我們以粒線體細胞色素氧化酵素 (cytochrome oxidase subunit I, COI) 基因作為標的序列 (target sequence)。根據 Howland and Hewitt (1995) 研究顯示，在鞘翅目昆蟲中靠近 COI 基因 3' 端長約 400 個核苷酸的序列在屬 (genus) 間有高達 12-18% 的歧異度 (divergence) (圖一)，因此在本研究中我們由六種象鼻蟲 DNA 選殖出這段 COI 基因片段，並進一步由當中找出各物種間歧異之核酸序列，做為設計專一性引子的依據。

材料與方法

一、蟲體來源與處理

來源：甘藷蟻象由邱卉（台灣大學昆蟲學系）提供；李象鼻蟲與白緣粗吻象鼻蟲由 Russ Mizell 教授（美國佛羅里達大學昆蟲與線蟲學系 (Department of Entomology and Nematology, University of Florida, U.S.A)）提供；粉綠象鼻蟲由洪挺軒副教授（台灣大學植物病理與微生物學系）提供；台灣三月始灰象鼻蟲由石憲宗博士（行政院農業委員會農業試驗所）提供；亞洲棕櫚象鼻蟲 (*R. lineaticollis*) 由柯俊成教授（台灣大學昆蟲學系）提供；新幾內亞甘蔗象鼻蟲由 Mohamed N. Sallam 教授（澳洲蔗糖試驗管理處 (Bureau of Sugar Experiment Station, Australia)）提供。

活體以液態氮急速冷凍後，立即研磨萃取 DNA 或保存在 -80°C 。來自於國外之蟲體由提供者將浸漬於 95% 酒精之蟲體包覆於酒精棉球，再密封於塑膠試管中郵遞。

二、象鼻蟲 DNA 的萃取

我們使用 Puregene DNA 純化試劑組 (Puregene DNA Isolation kit (Cell and Tissue Kit, Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA)) 萃取象鼻蟲 DNA。冷凍保存之蟲體，在加入細胞裂解液 (cell lysis solution) (600 μl /10 mg) 後立即研磨。酒精保存之樣本，須先在室溫浸漬於 TE 緩衝液 (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8.0) 中至少 8 小時。均質液中加入 20 μl Proteinase K (10 mg/ml) 於 55°C 水浴 4 小時，再加入 3 μl RNase A solution (4 mg/ml)，上下倒置 25 次充份混勻，放入 37°C 水浴 1 小時；冷卻至室溫後，加入 200 μl 蛋白酶沉澱液 (proteinase

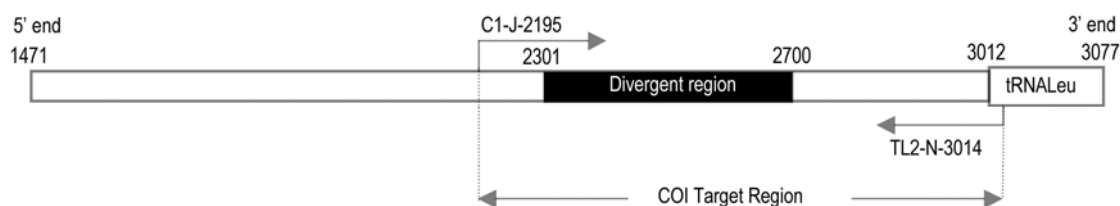
precipitation solution)，震盪 20 秒充份混合，以 10,000 $\times\text{g}$ 離心 5 分鐘，取出上清液。上清液以同體積的 100% 異丙醇 (isopropanol) 進行 DNA 沉澱。乾燥的 DNA 以 100 μl DNA hydration solution 於 65°C 回溶 1 小時之後於 1% 洋菜膠 (agarose gel；含 Ethidium Bromide (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)) 進行電泳檢測（詳細步驟參閱 Sambrook and Russell, 2001）。

三、選殖 COI 基因片段

我們以通用引子 (universal primers) C1-J-2195 (5'-TTGATTTTTTGGTCATCCA GAAGT-3') (Roehrdanz, 1993) 與 TL2-N-3014 (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATA TTA-3') (Simon *et al.*, 1994) 選殖 COI 基因靠近 3' 端的序列片段 (圖一) (Kocher *et al.*, 1989; Howland and Hewitt, 1995)。聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction; PCR) 選殖條件為 $95^{\circ}\text{C}/5$ 分鐘，接續 40 個循環的 $95^{\circ}\text{C}/30$ 秒， $55^{\circ}\text{C}/30$ 秒， $70^{\circ}\text{C}/40$ 秒，最後 $70^{\circ}\text{C}/7$ 分鐘完成反應；將 PCR 產物純化後黏合至 TA 載體 (T&A cloning vector (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan))，並進行定序。序列分析使用 Mac vector 8.0 (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA) 這個軟體。

四、引子專一性測試

每試管包含 1x PCR buffer、0.25 mM dNTPs、1U *Taq* DNA Polymerase (Bioman Ltd., Taipei, Taiwan)、1 μM 正向引子及 1 μM 反向引子，0.5 μl DNA、加入 ddH₂O 使總體積達 15 μl ，將反應液混合，並快速離心。聚合酶連鎖反應條件為 $95^{\circ}\text{C}/5$ 分鐘，接續 40 個循環的



圖一 象鼻蟲 COI 基因之標的區段與涵蓋歧異序列區段之位置示意圖。COI 基因總長 1542 bp (核酸序列由 1471 至 3012, 序列編號參照果蠅 *Drosophila yakuba* 粒線體基因體 (Clary and Wolstenholme, 1985))。黑色區塊為鞘翅目昆蟲 COI 序列歧異度較高之區段 (2301 至 2700) (Howland and Hewitt, 1995)。C1-J-2195 (箭號) 為正向通用引子, TL2-N-3014 (箭號) 為反向通用引子。TL2-N-3014 的 5' 端與 *tRNALeu* 這個基因的 5' 端序列有 3 bp 之重疊。

Fig. 1. Schematic locations of the COI target region and the locus containing divergent DNA sequences. In total there are 1542 bp in the COI gene (1471-3012; numbers of the nucleotide positions follow those of the mitochondrial genome sequences of *Drosophila yakuba* (Clary and Wolstenholme, 1985)). The region containing divergent sequences (2301-2700) is highlighted with a black box (Howland and Hewitt, 1995). C1-J-2195 is the universal forward primer; TL2-N-3014 is the universal reverse primer. There are 3 nucleotides overlapping between the 5' end of TL2-N-3014 and that of the *tRNALeu* gene.

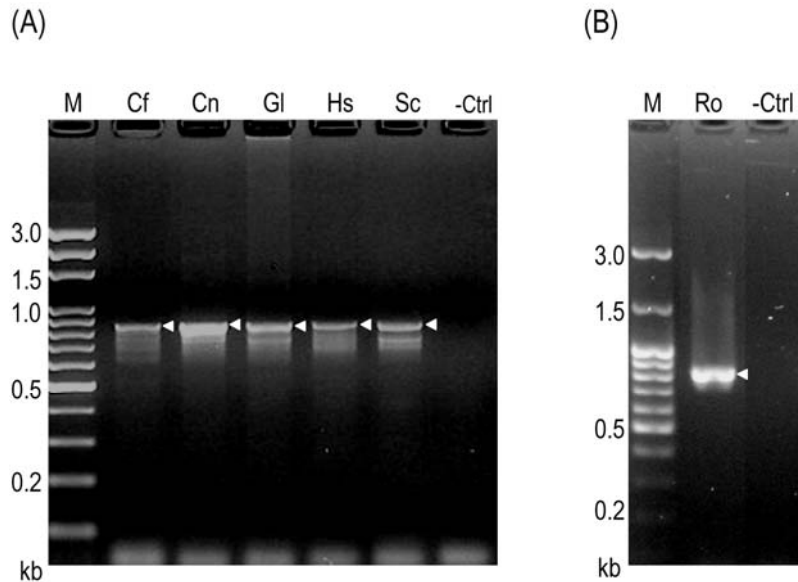
95°C/30 秒、每一對引子對同種之 DNA 模板共嘗試三種黏合溫度：55、60、65°C/30 秒，72°C/40 秒，最後 72°C/7 分鐘完成反應。之後，取 3 µl PCR 產物，於 2% 洋菜膠進行電泳檢測 (含 Ethidium Bromide (0.5 µg/ml))。

結 果

一、COI 專一性引子之設計

萃取自六種標的象鼻蟲的 DNA 模板皆可以被通用引子 (C1-J-2195 與 TL2-N-3014) 增幅出長度接近 860 個鹼基對 (base pairs; bp) 的色帶 (圖二)。因為在主要之增幅色帶下方有 DNA 拖曳與其他小於 860 bp 的 DNA 色帶出現 (圖二)，為避免非專一性增幅之干擾，我們將主要增幅出之 DNA 色帶自電泳膠片切出後，由切出之細膠塊中萃取 DNA，進行 COI 同源基因之次級選殖 (subcloning)。

選殖、純化與定序後之象鼻蟲基因序列於 NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 資料庫中以 BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide) 這個程式來檢視所選殖到的基因是否為 COI。在確定所選殖出的六種象鼻蟲為 COI 同源基因後將序列登錄於 NCBI，入冊編號 (accession number) 分別為：甘藷蟻象 (EU522676)、李象鼻蟲 (EU522677)、白緣粗吻象鼻蟲 (EU522678)、粉綠象鼻蟲 (EU522679)、台灣三月始灰象鼻蟲 (EU522680) 以及新幾內亞甘蔗象鼻蟲 (EU522681)。每次我們在獲得一種象鼻蟲 COI 序列後，隨即將基因庫當中與該 COI 序列最相似之五個其他物種之 COI 序列以 Mac vector 8.0 軟體分析，找出序列之間差異較高的兩個區段，並由當中具有差異性之序列設計正向和反向之專一性引子 (表二)。由於新幾內亞甘蔗象鼻蟲已有 1241 個 COI 核



圖二 利用 COI 基因通用引子 C1-J-2195 與 TL2-N-3014 對象鼻蟲 DNA 進行 PCR 反應之增幅的結果。黏合溫度為 55°C。主要增幅片段長度約為 860 bp (以箭頭標示)。(A) 甘藷蟻象 (Cf)、李象鼻蟲 (Cn)、白緣粗吻象鼻蟲 (Gl)、粉綠象鼻蟲 (Hs)、和台灣三月始灰象鼻蟲 (Sc)。(B) 新幾內亞甘蔗象鼻蟲 (Ro)。因蟲源取得時序遠異於其他象鼻蟲，因此增幅測試不在相近時段進行，PCR 結果以獨立之電泳膠片呈現。M: DNA 分子量標準; -Ctrl: 負控制組，PCR 反應中不加 DNA 模板。

Fig. 2. PCR amplification of the COI target region with universal primers C1-J-2195 and TL2-N-3014. PCR was performed at an annealing temperature of 55°C. The size of each major amplicon was about 860 bp (arrowhead). (A) *Cy. formicarius* (Cf), *Co. nenuphar* (Cn), *G. leucoloma* (Gl), *H. squamosus* (Hs) and *Sy. cribricollis* (Sc). (B) *R. obscurus* (Ro). Because the arrival order of the Ro samples was significantly different from those of other weevils, PCR amplification was not performed within as close a period as that of other weevil species. The electrophoresis result of PCR amplification using Ro templates is therefore shown on an independent agarose gel. M: DNA molecular weight marker; -Ctrl: negative control, PCR amplification without the DNA template.

核苷酸序列收錄於 NCBI 資料庫中 (AY131115)，而且部份核苷酸與我們選殖到的 COI 區段 5' 端重疊 (圖三)。爲了提高搜尋到高度歧異序列之機率，我們亦將非重疊區段納入設計引子之參考。

二、引子之專一性測試

我們將引子對於同種之 DNA 模板與萃取自他種的 DNA 模版在 55°C 黏合溫度反應條件下進行專一性測試。結果如同我們預期：引子僅對同種之 DNA 模

板產生明顯之增幅片段 (主要增幅之 DNA 片段大小：甘藷蟻象，509 bp (圖四 A)；李象鼻蟲，324 bp (圖四 B)；白緣粗吻象鼻蟲，477 bp (圖四 C)；粉綠象鼻蟲，278 bp (圖四 D)；新幾內亞甘蔗象鼻蟲，598 bp (圖四 E) 和 810 bp (圖四 F)；台灣三月始灰象鼻蟲，312 bp (圖四 G))。惟李象鼻蟲之引子對仍可微弱地增幅白緣粗吻象鼻蟲的 DNA 模板 (圖四 B)。

新幾內亞甘蔗象鼻蟲專一性引子之測試條件較其它五種象鼻蟲嚴格。此測試肇因

表二 六種象鼻蟲 COI 專一性引子序列

Table 2. Sequences of species-specific primers used in this study

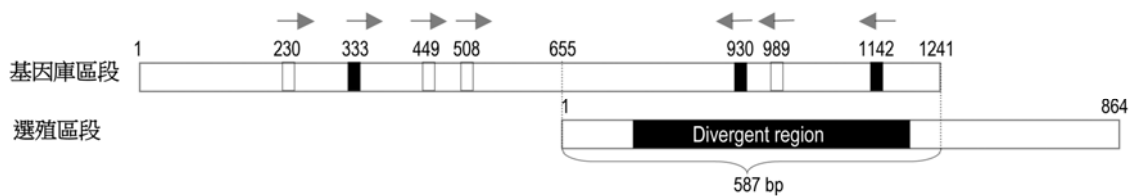
<i>Cylas formicarius</i> (Cf-COI)	
Cf-COI-F293	5'-CGAACTTTGAACCAACTACAC-3'
Cf-COI-R801	5'-TCAGCTGGTGGTATTGATCT-3'
<i>Conotrachelus nenuphar</i> (Cn-COI)	
Cn-COI-F448	5'-AGCTGTATTTGCAATCATCG-3'
Cn-COI-R771	5'-ATGGAAGTAGGTAAGTTCAGAGC-3'
<i>Graphognathus leucoloma</i> (Gl-COI)	
Gl-COI-F292	5'-GCTTCCTTTAATCCTAGATCAC-3'
Gl-COI-R768	5'-GGAAGGAAGTTATTCTTGATCTTG-3'
<i>Hypomeces squamosus</i> (Hs-COI)	
Hs-COI-F292	5'-CGTTCCTTTAATCCTAGCG-3'
Hs-COI-R569	5'-GCAAGTAAATTTACGCCG-3'
<i>Rhabdoscelus obscurus</i> (Ro-COI)	
Ro-COI-F230	5'-TTACTCCCACCTTCTCTAACCC-3'
Ro-COI-F333	5'-ATAATGGGGCCTCAGTAGACC-3'
Ro-COI-R449	5'-CGCGTTCAAAAGACT AAGTC-3'
Ro-COI-R930	5'-GACGGGTTAAAGGTAATACGAGC-3'
Ro-COI-R1142	5'-CGCGATTAAGAGTTAGCCCAGTA-3'
Ro-COI-R508mv	5'-TCTATCCCTCCCAGTATTGGCAG-3'
Ro-COI-R989mv	5'-TTACCCAGTTAAGCCACCTATTG-3'
<i>Sympiezomias cribricollis</i> (Sc-COI)	
Sc-COI-F213	5'-ATTTCAATTTAGACCAAGCTCCC-3'
Sc-COI-R524	5'-TCCTCTTAGCCCTAGAAAATGC-3'

於我們後來取得同屬之亞洲棕櫚象鼻蟲，所以我們想在新幾內亞甘蔗象鼻蟲的 COI 基因中找出既可區辨不同屬象鼻蟲，又可與同屬之近緣種象鼻蟲分辨之引子。因此，除了在通用引子增幅之區段內之 864 bp，也利用這個區段向 5' 端所延伸的 654 bp（來自 NCBI 資料庫的序列），在共計 1518 bp 的序列中，設計了四個含有差異性序列的正向引子與三個反向引子（圖三），對新幾內亞甘蔗象鼻蟲與亞洲棕櫚象鼻蟲進行測試。在 55、60、65°C 之黏合溫度下，七對引子對組合中，有四對引子可對新幾內亞象鼻蟲產生專一性增幅；然而，其中僅有兩對引子（F333 +

R930; F333 + R1142）具有顯著之增幅。相較以 F333 為正向引子的這兩對引子組合，以 F230 為正向引子搭配相同反向引子之組合則無法偵測得到增幅的 DNA 色帶；F449 在相同之反向引子搭配組合下，有微弱之專一性增幅（F449 + R930）與非專一性增幅（F449 + R1142）之結果；另一對獨立組合之引子對：F508mv + R989mv，僅出現微弱的專一性增幅（詳見圖五與其說明）。

討 論

在本研究當中，我們利用每一種標的



圖三 取自基因庫之新幾內亞甘蔗象鼻蟲 COI 區段與標的區段相對位置示意圖。由基因庫所獲得的 COI 基因含 1241 bp，利用通用引子選殖的標的區段長度為 864 bp。兩者重疊區段計有 587 bp。七個方框顯示引子位置，其上方的數字表示引子之起始序列編號；其中三個黑色方框表示測試後可與同屬之亞洲棕櫚象鼻蟲明顯區分之專一性引子所在位置 (Ro-COI-F333, Ro-COI-R930, and Ro-COI-R1142; 測試結果見圖五)。

Fig. 3. Schematic locations of the fragment containing COI sequences retrieved from the GenBank and the target region. The upper rectangle shows the COI sequences (1241 nucleotides) retrieved from the GenBank; the lower rectangle shows the COI fragment (864 nucleotides) cloned using universal primers C1-J-2195 and TL2-N-3014. There are 587 nucleotides overlapping between these two fragments. Locations of primers (4 forward and 3 reverse) are indicated with black margins in the upper rectangle. Primers that can discriminate *R. lineaticollis* from *R. obscurus* (Ro-COI-F333, Ro-COI-R930, Ro-COI-R1142) are highlighted with black boxes. The number on each primer indicates the first nucleotide of the primer.

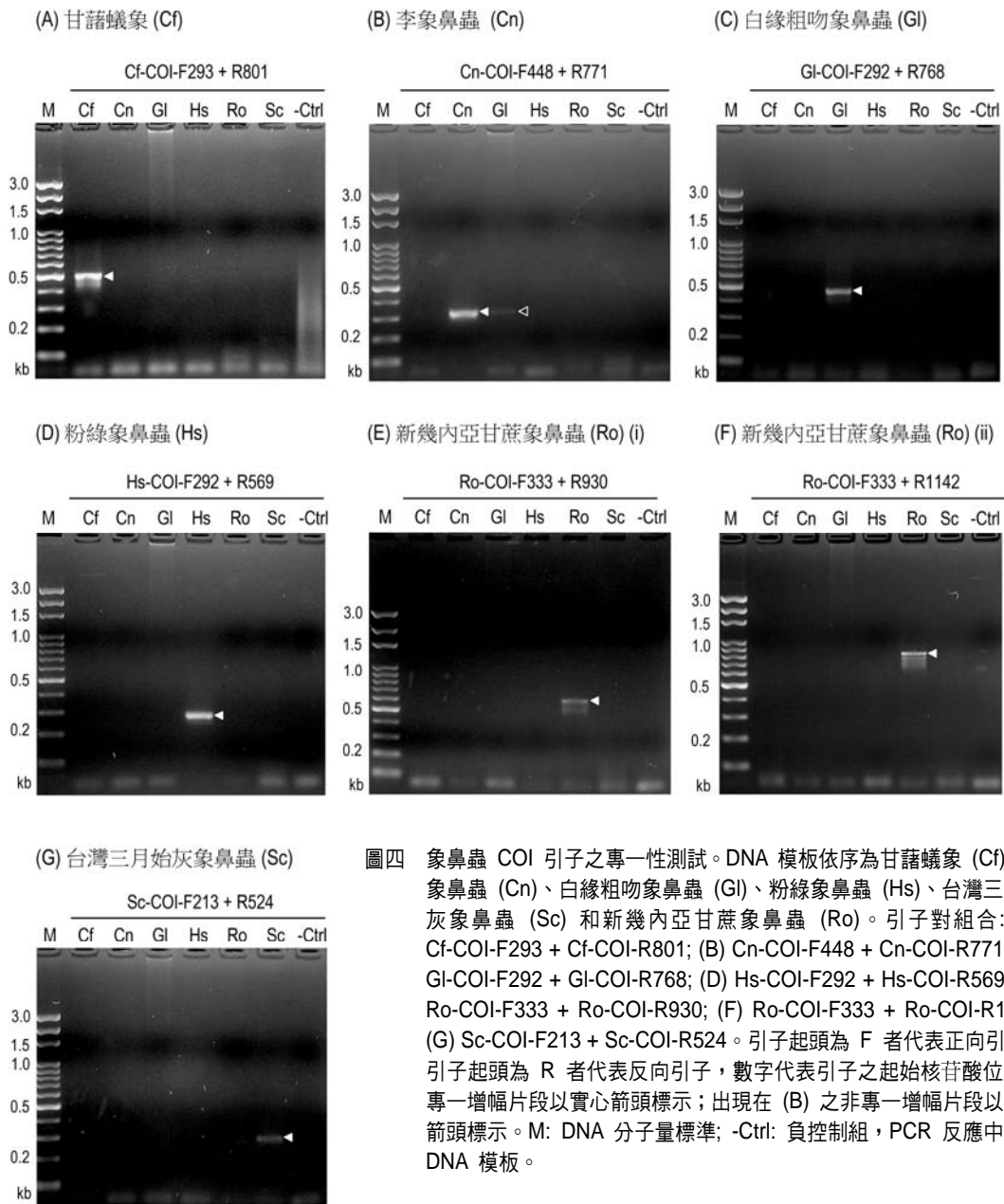
象鼻蟲特有之 COI 基因序列設計引子並且對引子之專一性進行測試。每一對受測引子皆對非同種之 DNA 模板無預期大小或明顯之 DNA 片段增幅。綜覽每一個專一增幅片段之長度大小，除了李象鼻蟲 (324 bp) 與台灣始灰象鼻蟲 (312 bp) 的增幅片段大小僅有 12 bp 之差，不容易在 1% 至 2% 的電泳膠片上明顯區辨，其他四種象鼻蟲可依增幅之 DNA 片段的長度對蟲種進行初步之判定 (圖四)。

在 55°C 的反應條件下，李象鼻蟲的引子對白緣粗吻象鼻蟲有微弱之非專一增幅，而且增幅片段具有相同之長度 (圖四 B)。因此，在將這對李象鼻蟲引子應用至檢疫工作時，我們建議吸取和受測組等量之 DNA 模板作為正控制組 (positive control)，依增幅色帶之明亮程度差異作為和其他受測物種做有效區辨之依據。我們曾嘗試以高於 60°C 以上的黏合溫度提高李象鼻蟲引子的專一性，然而增幅之穩定度卻因而下降 (只有部份李象鼻蟲的 DNA

模板被增幅，推測可能與 DNA 模板之品質有關)。若能在其他 COI 基因區段測試到另一組專一性引子，應有助於提升對李象鼻蟲鑑定之準確性。

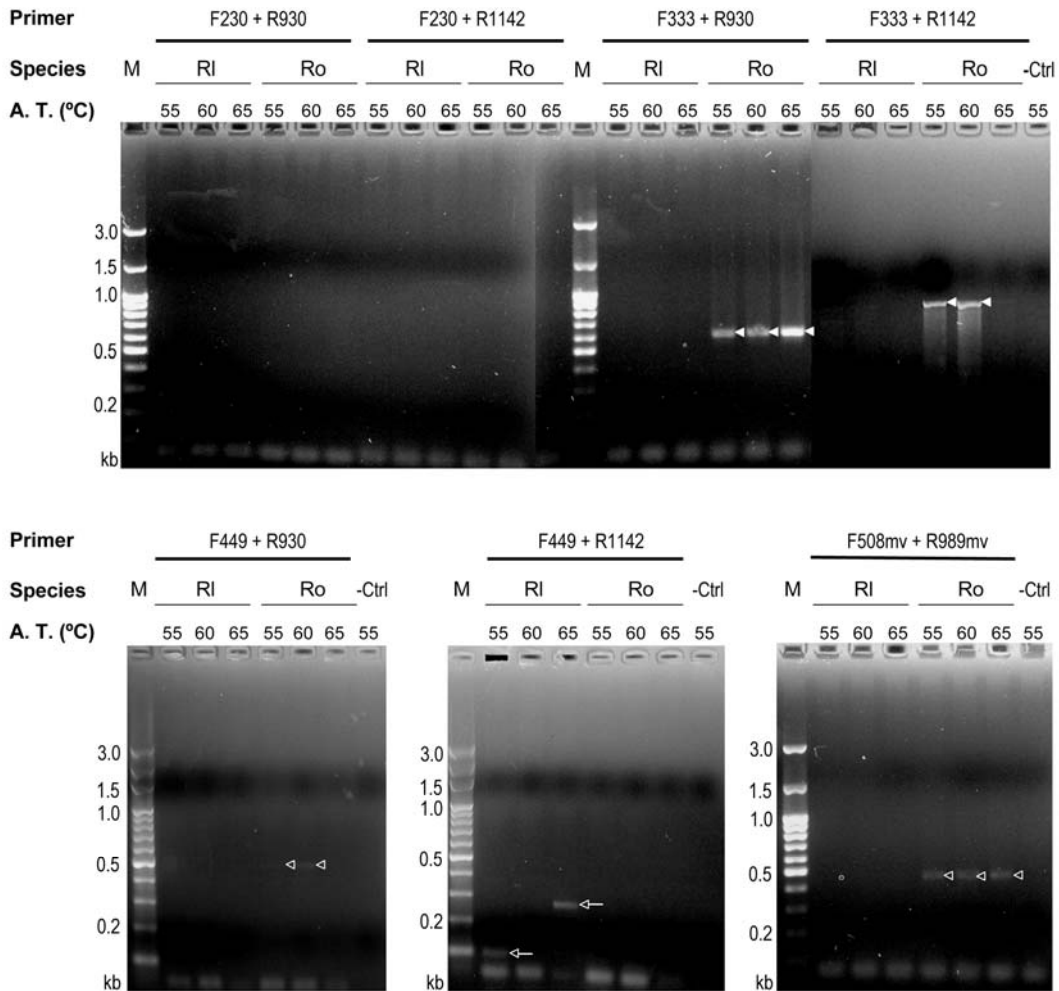
對新幾內亞甘蔗象鼻蟲和同屬的亞洲棕櫚象鼻蟲而言，我們在 55、60 與 65°C 之黏合溫度下，由七組引子對中，得到四組專一性之增幅；然而，僅有兩對引子具有較顯著之增幅結果 (圖五)。我們曾嘗試將黏合溫度降至 50°C，以改進微弱增幅組之強度，然而非專一性之增幅隨即出現。這顯示除了引子本身的序列，黏合溫度也是能否達到專一增幅之重要反應條件。進一步而言，本試驗所獲得具有專一增幅效果之引子是否也能在其他同屬 (*Rhabdoscelus*) 象鼻蟲間具有高度之區辨效果，須依賴引子對更多種同屬之象鼻蟲進行測試，才能得知引子專一性之適用範圍。

另外，由於在本研究中這六種象鼻蟲樣品之蒐集先後長達一年之久，為先進行專一性引子之設計與測試，我們不待獲取所有象鼻蟲 COI 序列後，再由標的區段內的差異性序列



圖四 象鼻蟲 COI 引子之專一性測試。DNA 模板依序為甘藷蟻象 (Cf)、李象鼻蟲 (Cn)、白緣粗吻象鼻蟲 (Gl)、粉綠象鼻蟲 (Hs)、台灣三月始灰象鼻蟲 (Sc) 和新幾內亞甘蔗象鼻蟲 (Ro)。引子對組合: (A) Cf-COI-F293 + Cf-COI-R801; (B) Cn-COI-F448 + Cn-COI-R771; (C) Gl-COI-F292 + Gl-COI-R768; (D) Hs-COI-F292 + Hs-COI-R569; (E) Ro-COI-F333 + Ro-COI-R930; (F) Ro-COI-F333 + Ro-COI-R1142; (G) Sc-COI-F213 + Sc-COI-R524。引子起頭為 F 者代表正向引子; 引子起頭為 R 者代表反向引子, 數字代表引子之起始核苷酸位置。專一增幅片段以實心箭頭標示; 出現在 (B) 之非專一增幅片段以空心箭頭標示。M: DNA 分子量標準; -Ctrl: 負控制組, PCR 反應中不加 DNA 模板。

Fig. 4. Specificity tests of the six primer pairs designed according to species-specific sequences. DNA templates used in each test are abbreviated as follows: *Cy. formicarius* (Cf), *Co. nenuphar* (Cn), *G. leucoloma* (Gl), *H. squamosus* (Hs), *Sy. cribricollis* (Sc), and *R. obscurus* (Ro). Primers: (A) Cf-COI-F293 + Cf-COI-R801; (B) Cn-COI-F448 + Cn-COI-R771; (C) Gl-COI-F292 + Gl-COI-R768; (D) Hs-COI-F292 + Hs-COI-R569; (E) Ro-COI-F333 + Ro-COI-R930; (F) Ro-COI-F333 + Ro-COI-R1142; (G) Sc-COI-F213 + Sc-COI-R524. F, forward primers, and R, reverse primers. The numbers after F or R indicate the positions of the first nucleotide of primers. Specific amplicons of expected size are indicated with arrowheads; non-specific amplifications in (B) are highlighted with a hollow arrowhead. M refers to the DNA molecular weight marker; -Ctrl: negative control, PCR amplification without the DNA template.



圖五 新幾內亞甘蔗象鼻蟲 COI 引子之專一性增幅測試。引子對之組合計有：F230 + R930；F230 + R1142；F333 + R930；F333 + R1142；F449 + R930；F449 + R1142；F508mv + R989mv 等七種。黏合溫度 (A.T.) 為 55、60、65°C。引子起頭為 F 者代表正向引子；引子起頭為 R 者代表反向引子，數字代表引子之起始核苷酸位置。DNA 模板萃取自亞洲棕櫚象鼻蟲 (RI) 與新幾內亞甘蔗象鼻蟲 (Ro)。F230 + R930 與 F230 + R1142 這兩對引子之增幅色帶無法偵測；F333 + R930 與 F333 + R1142 有較顯著之專一增幅 (以箭頭標示)；F449 + R930 與 F508mv + R989mv 這兩對引子有專一增幅色帶，但強度較微弱 (以空心箭頭標示)。F449 + R1142 在 RI 出現非專一增幅色帶 (以空心箭號標示)，但在 Ro 之增幅色帶無法偵測。M: DNA 分子量標準；-Ctrl: 負控制組，PCR 反應中不加入 DNA 模板。

Fig. 5. Specificity tests of the seven primer pairs designed according to species-specific sequences of *R. obscurus*. Primer combinations: F230 + R930; F230 + R1142; F333 + R930; F333 + R1142; F449 + R930; F449 + R1142; F508mv + R989mv. Annealing temperatures (A.T.): 55, 60, 65°C. F, forward primers, and R, reverse primers. The numbers after F or R indicate the positions of the first nucleotides. Resources of DNA templates: *R. lineaticollis* (RI) and *R. obscurus* (Ro). F333 + R930 and F333 + R1142: undetectable amplifications; F333 + R930 and F333 + R1142: significant amplifications (arrowheads); F449 + R930 and F508mv + R989mv: weak amplifications (hollow arrowheads). F449 + R1142: non-specific amplification is identified in RI (hollow arrows), but amplification is undetectable in Ro. M: DNA molecular weight marker; -Ctrl: negative control, PCR amplification without the DNA template.

設計引子。我們的實際作法是：避開基因庫內與標的區段當中具有相同序列之區域，再由較相近同源 COI 基因之間具有差異序列區段來作為引子設計之依據（實際作法詳見「結果」第一段）。由此測試而得之專一性引子的優點在於它不僅可區辨本研究中其他五種之象鼻蟲，對於本研究尚未涵蓋之其他象鼻蟲，也可能具有區辨之效果。然而，因為基因庫當中象鼻蟲 COI 之基因序列數目相當有限，這個策略也可能只找到不同科，而非不同屬之間的差異序列。因此，若僅要有效地區分這六種象鼻蟲，可將標的區段之序列重新作一比對，由差異序列逕行設計專一性引子。

如 Howland and Hewitt (1995) 文獻內容所敘，我們所選擇之標的區段為鞘翅目已知歧異度較高之區段（COI 的 3' 端序列）。而且 Hughes and Vogler (2004) 也是利用這個區段來建立櫟果象鼻蟲 (acorn weevils, genus *Curculio*) 之系統分類。可見本試驗所採用之標的區段應可適用至其他象鼻蟲之分子鑑定。以現有之證據來看，新幾內亞甘蔗象鼻蟲的四個正向引子 (F230, F333, F449, F508mv) 都位在較靠近 5' 端之非標定區段 (圖三)，當他們搭配位在標的區段內含有差異序列的反向引子卻分別出現強弱不同之專一性增幅，甚或不增幅之結果 (圖五)。我們僅能保守地推斷在靠近 5' 端的區域在象鼻蟲種間仍具有差異性序列之存在，但這個區段是否和 3' 端之標的區段在象鼻蟲種間具有相近之歧異度，可供作設計專一引子之參考，則有賴本試驗六種象鼻蟲 COI 基因 5' 端選殖與定序工作的完成，才能有更明確之答案。雖本研究僅對六種象鼻蟲進行 COI 基因選殖與引子之專一性測試，然而所建立的檢測方法與策略，應可運用至尚未分析的其他數種檢防疫重要性象鼻蟲之鑑定。

誌 謝

我們感謝彭武康教授、柯俊成教授、洪挺軒副教授、石憲宗博士、Mohamed N. Sallam 教授、Russ Mizell 教授以及邱卉同學提供象鼻蟲樣本。Charles E. Cook 博士對 COI 序列之分析與實驗策略建議，還有陳柔含、邱卉、張德斌等三位同學對文稿校正之付出也在此一併感謝。本研究由農委會動植物防疫檢疫局提供經費支持 (計畫編號 94 農科-13.3.1-檢-B2 與 95 農科-13.3.1-檢-B2)。

引用文獻

- Ahmad, R. 1974. Study on *Graphognathus leucoloma* (Boh.) (Coleoptera: Curculionidae) and its natural enemies in the central provinces of Argentina. Commonwealth Inst. Biol. Control. Tech. Bull. 17: 19-28.
- Chang, S. J., and C. C. Ko, eds. 2006. Statistics and Illustrations of Quarantined Pests Invading Taiwan via Imported Plants or Their Products. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei, Taiwan. 392 pp. (in Chinese)
- Chang, S. Y., S. B. Horng, and S. P. Chen, eds. 2005. The Illustrated Handbook of Quarantined Pests of Taiwan (I). Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei, Taiwan. 217 pp. (in Chinese)
- Chu, Y. I. 1971. *Sympiezomias cribricollis*

- Kono. Plant Prot. Bull. 13: 74. (in Chinese)
- Clary, D. O., and D. R. Wolstenholme.** 1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. Mol. Evol. 22: 252-271.
- Gough, H. R., and J. D. Brown.** 1991. Development of larvae of the white fringed weevil, *Graphognathus leucoma* (Coleoptera: Curculionidae), in northern Queensland. Bull. Entomol. Res. 81: 385-393.
- Howland, D. E., and G. M. Hewitt.** 1995. Phylogeny of the Coleoptera based on mitochondrial cytochrome oxidase I sequence data. Insect Mol. Biol. 4: 203-215.
- Hughes, J., and A. P. Vogler.** 2004. The phylogeny of acorn weevils (genus *Curculio*) from mitochondrial and nuclear DNA sequences: the problem of incomplete data. Mol. Phylogenet. Evol. 32: 601-615.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas, and S. A. Meyer.** 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6196-6200.
- Lamb, K. P.** 1974. Economic Entomology in the Tropics. Academic Press, London, UK. 195 pp.
- Lathrop, F. H.** 1949. Biology of the plum curculio in Maine. J. Econ. Entomol. 42: 12-18.
- Lee, F. T., T. C. Yang, J. F. Chen, and C. M. Chen.** 2006. Survey and control of *Sympiezomias cribricollis* Kono in Hualien area. Plant Prot. Bull. 48: 81-91. (in Chinese)
- Lin, K. S.** 2002. A list pests of fruit plant from Taiwan and Mainland China. Taiwan Agric. Res. Inst., Spec. Publ. No. 100. Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan. 847 pp. (in Chinese)
- Miwa, Y.** 1931. A systematic catalogue of Formosan Coleoptera. Rep. Dep. Agric. Formosa Govt. Res. Inst. Formosa. 359 pp.
- Mohamed, N. S., and W. G. Steven.** 2001. Distribution and sampling of adults of *Rhabdoscelus obscurus* (Boisduval) (Coleoptera: Curculionidae) and their damage in sugarcane. Aust. J. Entomol. 40: 281-285.
- Roehrdanz, R. L.** 1993. An improved primer for PCR amplification of mitochondrial DNA in a variety of insect species. Insect Mol. Biol. 2: 89-91.
- Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. Preparation and analysis of eukaryotic genomic DNA. pp. 6.1-6.64. *In*: Molecular Cloning- A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A.
- Shih, H. T., C. Y. Lee, S. C. Chang, and W. J. Wu.** 2006. Preliminary study on the identification, ecology, and control methods for *Sympiezomias cribricollis*

- Kono, 1930 (Coleoptera: Curculionidae). Formosan Entomol. 26: 203-215. (in Chinese)
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook.** 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondria gene sequence and a compilation of conserved PCR primers. Ann. Entomol. Soc. Am. 87: 651-701.
- Sutherland, J. A.** 1986. A review of the biology and control of the sweet potato weevil *Cylas formicarius* (Fab). Trop. Pest Manage. 32: 304-315.
- Tan, S. D., J. D. Wei, and R. X. Lan.** 1998. Analysis on the similarity of the structure of the litchi and longan pest communities. Guangxi Sci. Tech. Trop. Crops 69: 4-10. (in Chinese)
- Waterhouse, D. F.** 1993. The Major Arthropod Pests and Weeds of Agriculture in Southeast Asia. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), Canberra, Australia. 141 pp.
- Yonce, C. E., D. L. Horton, and W. R. Okie.** 1995. Spring migration, reproductive behavior, monitoring procedures, and host-preference of plum curculio (Coleoptera, Curculionidae) on *Prunus* species in Central Georgia. J. Entomol. Sci. 30: 82-92.

收件日期：2008年2月9日

接受日期：2008年3月15日

Molecular Identification of Weevils Significant for Customs Inspection and Quarantine Importance

Gee-Way Lin, Shau-Lin Lu⁺, Ting-Yu Huang⁺, Chun-Liang Shih, Wen-Jer Wu*,
Chun-che Chang*

Department and Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University, National Taiwan University, No. 27, Lane 113, Roosevelt Road, Sec. 4, Taipei 106, Taiwan

ABSTRACT

Most weevils are polytrophic insects. The larvae of many weevils feed by boring into host plants which may be damaged or killed as a result. Weevil larvae and eggs regularly enter Taiwan through imported agricultural products and pose a serious threat to the local agricultural ecology. Identification of invasive weevils, particularly larvae and eggs with indistinct morphological features is only possible using molecular methods and species-specific DNA sequences. We extracted DNA from live or ethanol-immersed samples of adult weevils for use as templates for Polymerase Chain Reaction (PCR), and cloned target sequences of a region containing divergent sequences near the 3'-end of the COI (cytochrome oxidase subunit I) gene in the mitochondrial genome. Within this target region, we successfully designed species-specific primers for six weevil species belonging to different genera (foreign species: *Conotrachelus nenuphar* (plum curculio), *Graphognathus leucoloma* (whitefringed beetle), and *Rhabdoscelus obscurus* (New Guinea sugarcane weevil); local species: *Cylas formicarius* (sweet-potato weevil), *Hypomeces squamosus* (gold-dust weevil), and *Sympiezomias cribricollis* (gourd-waist weevil)). Using the same strategy, we also were able to discriminate two weevil species of the same genus, namely *R. obscurus* and the Asiatic palm weevil *R. lineaticollis*. Strategies and technologies developed in this study can be applied to molecular identification of other kinds of weevils of quarantine importance.

Key words: COI gene, molecular identification, primer, specificity, weevil

⁺These two authors contributed equally to this paper.

*Correspondence addresses

e-mail: wuwj@ntu.edu.tw; chunche@ntu.edu.tw