



防檢疫重要性薊馬（纓翅目：薊馬科）專一性引子之鑑定應用

葉文斌^{1*}、曾美容¹、吳昕縈¹、張念台²、蔡佺昇¹

¹ 國立中興大學昆蟲學系 40227 台中市南區興大路 145 號

² 國立屏東科技大學植物醫學系 91201 屏東縣內埔鄉學府路 1 號

* 通訊作者 email: wbyeh@nchu.edu.tw

收件日期：2018 年 3 月 24 日 接受日期：2018 年 6 月 14 日 線上刊登日期：2018 年 8 月 22 日

摘 要

薊馬分布廣泛，危害多種經濟作物，是各國植物防檢疫工作上的重要標的害蟲；但其個體細小，特徵細微或有種內變異，常造成分類鑑定上的困擾。藉由薊馬 DNA 分子研究，解決了許多分類種群的困擾，也證明一些薊馬物種具有不同的遺傳支系，無法以形態特徵區辨。本研究應用種間區別性較明確的核糖體第二區間 (Internal transcribed spacer 2, ITS2) DNA 片段，進行蔥薊馬 (*Thrips tabaci* Lindeman, 1889)、南黃薊馬 (*Thrips palmi* Karny, 1925)、梳缺花薊馬 (*Frankliniella schultzei* (Trybom, 1910)) 及玉米薊馬 (*Frankliniella williamsi* Hood, 1915) 等農作上常見薊馬的專一性引子分子鑑定；擴增的 ITS2 長度約為 500 bp，四種薊馬間 ITS2 平均變異範圍為 40.6~44.4%；比對世界各地族群的序列發現，蔥薊馬、南黃薊馬及梳缺花薊馬都有高達 18% 以上的種內變異存在。進一步針對四種薊馬設計多組 ITS2 的專一性引子對，共選用 15 屬 21 種薊馬測試，各薊馬的專一性片段均可複製成功；其它種薊馬的穩定性測試，則未複製出 DNA 條帶。然而，比對各種薊馬 ITS 序列後發現，雖然多數的專一性引子序列與世界各地族群的序列一致，最多差 2 個鹼基位，但有 2 條設計的專一性引子差異高達 6 個鹼基位；因此，若鑑定樣本來自遺傳變異大的族群，這些專一性引子的分子鑑定應用，可能造成偽陰性偵測結果。

關鍵詞：薊馬、分子鑑定、核糖體第二區間、專一性引子。

前 言

薊馬個體細小，分布廣泛，危害多種經濟作物及開花植物花器，致使植物嫩葉、芽、小果扭曲變形、營養不良或花果產生銹斑落色，直接造成農作的損傷 (Tommasini and Maini, 1995)。此外，也有近 20 種的薊馬會傳播影響農作甚鉅的萎凋病毒 (Tospovirus) (Mound, 2005; Inoue and Sakurai, 2007; Persley *et al.*, 2010)；學者估計薊馬引起的

農作損失每年可達 10 億美元 (Goldbach and Peters, 1994)，單蔥薊馬就可能超過 1 億美元的農損 (Gent *et al.*, 2006; Prins and Goldbach, 1998)。在農作產品全球化的貿易銷售下，薊馬有可能隨著農作產品的運送成為各國的入侵種；在植物檢疫措施的要求下，進口國須鑑定出輸入農作產品上的薊馬是否為檢疫有害生物，才有證據阻止或降低其入侵及散播的機會；對出口國而言，則要提出資料證明輸出農作產品上的薊馬並非該國檢疫有害

生物。因此，建立農作害蟲的基本資料，已是各國知己知彼的重要資料庫。事實上，薊馬是我國進口農作產品最常檢出之害蟲；自防檢局發佈的年報的檢疫結果可知 (<http://www.baphiq.gov.tw/view.php?catid=2962>)，大宗進口作物，像洋蔥、蘆筍、萵苣、豌豆及各類切花，均可檢測到重要危害薊馬，而許多攔截到的樣本多為若蟲期，無法明確鑑定為何種薊馬。

傳統上，薊馬的鑑定多依據透化製成玻片的成蟲特徵進行鑑定；屬與種分類位階的鑑定特徵，主為頭、胸、腹背及翅上的剛毛數量、大小及位置，但一些細微難辨的特徵及形態變異也常造成鑑定上的困擾，而若蟲階段的樣本則無法鑑定到種；因此，若在進口農作產品上發現薊馬若蟲，會減緩檢疫的速度，遂而影響農作產品品質。由於分子系統學的興起，已有許多與薊馬有關的分子研究發表，建立了科級親緣分析，也解決了不少分類種群的困擾，如 Buckman *et al.* (2013) 應用 5 個基因探討 7 科 99 種薊馬，提供紛爭已久的科級親緣關係的證據；這些分子研究更證明了危害嚴重薊馬，如西方花薊馬 (*Frankliniella occidentalis* (Pergande, 1895))、小黃薊馬 (*Scirtothrips dosalis* Hood, 1919)、南黃薊馬 (*Thrips palmi* Karny, 1925) 及蔥薊馬 (*Thrips tabaci* Lindeman, 1889) 等，其內各有截然不同的遺傳支系，具有複合種群 (species complex) 的特性，無法自形態特徵區辨，如小黃薊馬內含 9 個隱蔽種 (cryptic species) (Dickey *et al.*, 2015)，蔥薊馬有 3 個隱蔽種 (Brunner *et al.*, 2004; Asokan *et al.*, 2007; Toda and Murai, 2007)，西方花薊馬則有 2 個隱蔽種 (Brunner and Frey, 2010; Rugman-Jones *et al.*, 2010)。這些研究也提供資訊解析了這些為害薊馬種內為何有不同傳毒特性、生殖特性、棲所獨特性的爭議 (Mound, 2005)。

眾多分子標記中，通常選用粒線體細胞色素 I (cytochrome oxidase I, COI) 及核醣體區間 (internal transcribed spacer, ITS) 變異較快的基因進行研究，也進而發展出一些便於快速鑑定的方法；這些分子鑑定方法中，基於 PCR 技術而衍生出來的研究，如 real-time PCR (Walsh *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2010)，PCR-RFLP (Lin *et al.*, 2003; Rugman-Jones *et al.*, 2006; De Grazia *et al.*, 2016)，專一性引子 (Liu, 2004; Asokan *et al.*, 2007; Farris *et al.*, 2010; Kobayashi and Hasegawa, 2012)、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Przybylska *et al.*, 2015)

等，其中專一性引子結合 PCR 則是目前被認為最有效、簡單、方便、經濟的方法。此外，ITS 分子標記於種間有高比例的差異存在，易於設計出判定物種的專一性引子，也常用於種內族群間的分類鑑定 (Yeh *et al.*, 2014a, b, 2015)。

危害農作的薊馬以薊馬屬 (*Thrips*) 及花薊馬屬 (*Frankliniella*) 兩屬的物種較多 (Mound, 2005; Persley *et al.*, 2010)，已有學者針對這兩屬薊馬的部分物種建立核醣體第二區間 (ITS2) 分子資料，如花薊馬 (*Thrips hawaiiensis* (Morgan, 1913))、澳洲疫薊馬 (*Thrips imaginis* Bagnall, 1926)、西方花薊馬、臺灣花薊馬 (*Frankliniella intonsa* (Trybom, 1895)) 等的 ITS2 DNA 序列分析，並進行專一性引子的設計開發及應用 (Liu, 2004; Glover *et al.*, 2010; Yeh *et al.*, 2014a, b, 2015; De Grazia *et al.*, 2016)。本研究即應用種間區別性較明確的 ITS2 DNA 片段，進一步選用幾種臺灣農作上常見的重要危害薊馬進行研究；其中，南黃薊馬、蔥薊馬、梳缺花薊馬 (*Frankliniella schultzei* (Trybom, 1910)) 三種薊馬也是進口農作上常檢出之薊馬，而危害玉米及一些禾本科作物的玉米薊馬 (*Frankliniella williamsi* Hood, 1915)，則選作薊馬屬梳缺花薊馬專一性引子設計時的參考物種。針對這四種薊馬進行 ITS2 DNA 的定序分析，各開發多組 ITS 區段專一性引子的測試應用，共選用 15 屬 21 種薊馬做為材料，驗證引子的專一性及廣效性，提供此四種薊馬簡單、快速、便利的檢疫鑑定操作方法。

材料與方法

一、薊馬標本收集

樣本來源除自臺灣各地區外，亦收集進口農作上檢測到的薊馬，含美國、澳洲、泰國及印度。所採得標本，抽完 DNA 後將製作成玻片的存證標本，確認各物種之界定；其餘蟲體浸泡在 85%酒精內，標示採集日期及地點，置於-20°C 冷凍櫃中保存，儲存於國立中興大學；另蒐集 NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank 所登錄的蔥薊馬、南黃薊馬、梳缺花薊馬、玉米薊馬等四種薊馬相關 ITS2 序列據以分析比對，應用其它 20 種薊馬做為專一性引子的檢測樣品 (表一)。

基因庫下載的序列編號；蔥薊馬為 AB 063340、AB775443-52、AM932144、AM932152-54、AM932158、AM932160-1、AM932165-6、

表一 測試蔥薊馬、南黃薊馬、梳缺花薊馬及玉米薊馬引子的專一性及穩定性的薊馬物種

Table 1. Thrips species used to analyze the specificity and stability of specific primers of *Thrips tabaci*, *Thrips palmi*, *Frankliniella schultzei*, and *Frankliniella williamsi*

| L* | 中文名 | Scientific name | L | 中文名 | Scientific name |
|----|-------|------------------------------------|----|--------|---------------------------------------|
| 1 | 黑角貝薊馬 | <i>Bathrips melanicornis</i> | 13 | 赤帶薊馬 | <i>Selenothrips rubrocinctus</i> |
| 2 | 褐尾包薊馬 | <i>Bolacothrips graminis</i> | 14 | 台灣花薊馬 | <i>Frankliniella intonsa</i> |
| 3 | 蘭花薊馬 | <i>Dichromothrips corbetti</i> | 15 | 小黃薊馬 | <i>Scirtothrips dorsalis</i> |
| 4 | 尤加律薊馬 | <i>Taeniothrips euchariei</i> | 16 | 花薊馬 | <i>Thrips hawaiiensis</i> |
| 5 | 蔗腹齒薊馬 | <i>Fulmekiola serrata</i> | 17 | 栗帶薊馬 | <i>Anaphothrips sudanensis</i> |
| 6 | 玉米薊馬 | <i>Frankliniella williamsi</i> | 18 | 菊花薊馬 | <i>Microcephalothrips abdominalis</i> |
| 7 | 青蔥薊馬 | <i>Thrips alliorum</i> | 19 | 花薊馬 | <i>Thrips hawaiiensis</i> |
| 8 | 南黃薊馬 | <i>Thrips palmi</i> | 20 | 花薊馬** | <i>Thrips hawaiiensis</i> |
| 9 | 稻薊馬 | <i>Stenchaetothrips biformis</i> | 21 | 澳洲疫薊馬 | <i>Thrips imagines</i> |
| 10 | 腹鉤薊馬 | <i>Rhipiphorothrips cruentatus</i> | 22 | 西方花薊馬 | <i>Frankliniella occidentalis</i> |
| 11 | 豆花薊馬 | <i>Megalurothrips usitatus</i> | 23 | 網梳額突薊馬 | <i>Astrothrips aucubae</i> |
| 12 | 蔥薊馬 | <i>Thrips tabaci</i> | | | |

*The relative lane number (L) referring in electrophoresis in Fig. 5 to Fig. 8;

**Lane 20 in Fig. 8 is *Frankliniella schultzei*.

AM932189、JF429875-93、JF968492-505、KM877037-8、KP216395-407，南黃薊馬為 AB063341、AB775433-39、AB775441-2、AM932139-41、AM932145-50、AM932156-7、AM932159、AM932176-9、AM932181-3、AM932187-8、AM932192、FM956422-9、KF680274-5、KM877305-6、KU884556-8，梳缺花薊馬為 GQ343259、KR105630-3。GenBank 內未有玉米薊馬 ITS2 DNA 資料。

二、薊馬核糖體第二區間 (ITS2) DNA 序列的建立及分析

應用 QuickExtract DNA™ 萃取試劑 (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) 純化 DNA。參考 Tseng *et al.* (2010) 針對薊馬 ITS2 片段複製設計的引子對 P1-2 (5'GTGGATCCCTYGGCTTGTG3') 及 28Sj2 (5'GTTAGTTTCTTTTCCTC3')，運用聚合酵素連鎖反應 (PCR) 複製核糖體 ITS2 片段，此基因區段位於 5.8S rDNA 及 28S rDNA 之間。PCR 產物直接定序或用回收試劑純化 1% 洋菜膠上的 DNA；序列經由核酸自動定序儀 (Automatic sequencer) 獲得，分別用 ITS2 之上下游引子進行定序；並應用多管毛細管電泳儀器 HAD-GT₁₂ (eGene inc., Irvine, CA) 分析專一性引子 PCR 的複製結果。

應用 Bioedit 7.0 (Hall, 1999) 程式軟體將各分類單元 ITS2 序列的定序結果整併分析；另應用基因庫 EMBL 多序列排序軟體 MUSCLE，進行所有 ITS2 序列的複合運算排序 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>)，依其內訂參數值進行 progressive alignment，並應用 refine 指令增進排序的準確性。應用軟體 MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) 運算序列差異及親緣關係，各個分類單元間的序列百分比差異 (p-distance) 基於 Pairwise-Deletion 求得；親緣分析是基於均算聚集分析 (UPGMA analysis) 並執行 1000 次的拔靴值 (bootstrap replication) 運算而得。顛換取代 (Tv) 及轉換取代 (Ts) 相對於 Tajima-Nei 93 變異取代模式於軟體 DAMBE 運算而得 (Xia and Xie, 2001)。

三、核糖體第二區間 (ITS2) DNA 序列之專一性引子設計

應用 GenBank 上提供的 Primer-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 功能，進行蔥薊馬、南黃薊馬、梳缺花薊馬及玉米薊馬 ITS2 DNA 序列比對分析，進行多組上下游專一性引子之設計，各專一性引子對的 DNA 序列及產物複製大小見表二。

表二 檢測薊馬上下游專一性引子序列、代號及複製大小

Table 2. Sequences and abbreviated names of species-specific primers and approximate amplified fragment sizes for target thrips species

| Forward primers & sequences (5' to 3') | | Backward primers & sequences (5' to 3') | | Size (bp) |
|--|-------------------------------|---|-----------------------------|-----------|
| Ttab971U* | AGAAACGATTACCAGACTGCCCAAG | Ttab1D | AGTGATGCAGCACAAACACATTCCAC | 366 |
| Ttab971U | AGAAACGATTACCAGACTGCCCAAG | Ttab973D | TGCAGCACAAACACATTCCACTCAGG | 359 |
| Ttab972U | AGCGACAGCACACACCTCGTGTGTGTTG | Ttab973D | TGCAGCACAAACACATTCCACTCAGG | 338 |
| Ttab972U | AGCGACAGCACACACCTCGTGTGTGTTG | Ttab974D | CAGTGATGCAGCACAAACACATTCCAC | 344 |
| Tpal973U | ACGGGCGAGTCTCCAGT | Tpal971D | CCGCTGAGGGCAGGTGAATC | 321 |
| Tpal975U | ACTTGCTCTCACGGGCGAGT | Tpal971D | CCGCTGAGGGCAGGTGAATC | 333 |
| Tpal972U | TGGAATTGCTCTCACGGG | Tpal972D | GGGCAGGTGAATCGGAGCGA | 327 |
| Tpal973U | ACGGGCGAGTCTCCAGT | Tpal973D | CGGAGCGAGGAGGCATTTA | 307 |
| Fwil973U | TCAAAGAGAAAATGCATTCTGTCTGTCGG | Fwil971D | AAGGCGAGATGTTGCAATAATTTTC | 219 |
| Fwil973U | TCAAAGAGAAAATGCATTCTGTCTGTCGG | Fwil972D | ACGCGACGTCGAGTTTGGAAAAAAC | 145 |
| Fwil974U | ACCCGTCAAAGAGAAAATGCATTCTGTC | Fwil971D | AAGGCGAGATGTTGCAATAATTTTC | 224 |
| Fwil975U | AACCCCGACCCGTCAAAGAGAAAATG | Fwil971D | AAGGCGAGATGTTGCAATAATTTTC | 231 |
| Fsch981U | TTCCGGGGCAAGATGGGCCTCC | Fsch981D | ATATCCCACGTCCTGGCACACAAA | 300 |
| Fsch982U | GAGGGTCGGTAGACCATATCTTACG | Fsch982D | AAGCTGATGGGATGTGCCAGGAC | 360 |
| Fsch983U | AGATGGGCCTCCCCGATTAGTT | Fsch983D | ACACCGACGGGTGTTTCTGATGC | 244 |
| Fsch984U | GTTTTCCGGGGCAAGATG | Fsch984D | GACGAACTGATCAAACGGCGA | 162 |

*Ttab: *Thrips tabaci*; Tpal: *Thrips palmi*; Fwil: *Frankliniella williamsi*; Fsch: *Frankliniella schultzei*.

結果與討論

一、檢測薊馬之 ITS2 序列變異分析

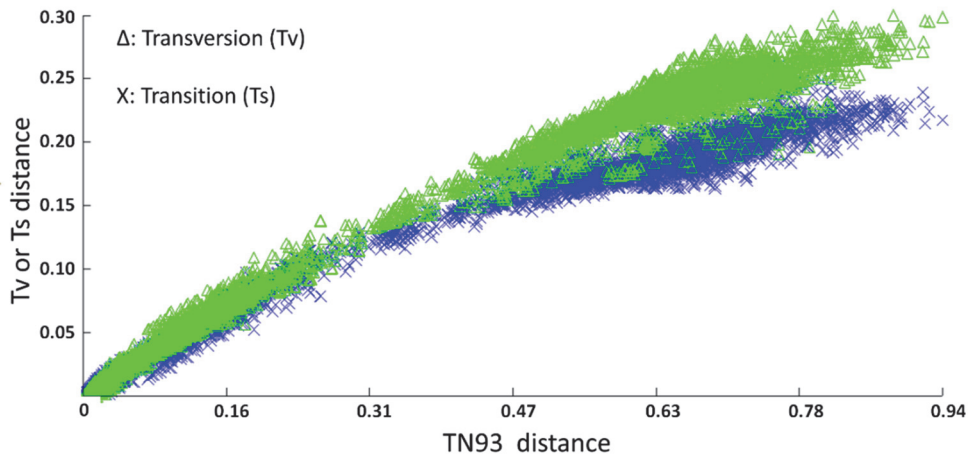
利用引子 P1-2 及 28Sj2 擴增出薊馬 ITS2 長度約為 500 bp 不等，分析的序列共有 154 條，其中蔥薊馬、南黃薊馬、梳缺花薊馬及玉米薊馬分別有 80、58、13 及 3 條；自 GenBank 下載 123 條，上述前 3 種薊馬分別為 70、48 及 5 條；玉米薊馬危害雖然嚴重，但目前尚未有人傳送此薊馬 ITS2 的序列到基因庫。本研究新增蔥薊馬、南黃薊馬及梳缺花薊馬上傳基因庫序號分別為 LC416206-36。

四種薊馬的 ITS2 序列變異分析顯示，ITS2 的變異的轉換取代 (Transition substitution, Ts) 或顛換取代 (Transversion, Tv) 尚未達飽和效應 (saturation effect)，即序列間的變異累積已近水平線的效應 (圖一)，顯示 ITS2 的序列變異於薊馬間仍會持續增加。本研究的薊馬物種間 ITS2 序列的平均變異範圍為 40.6~44.4%，且種間變異及屬間的平均變異都很相近；個體間最大差異是不同屬的蔥薊馬與梳缺花薊馬個體間的 52.2%，最小差異則是同

屬的梳缺花薊馬及玉米薊馬個體間 35.4%，此與 Liu (2004) 所提結果類似，花薊馬屬成員彼此關係很緊密。

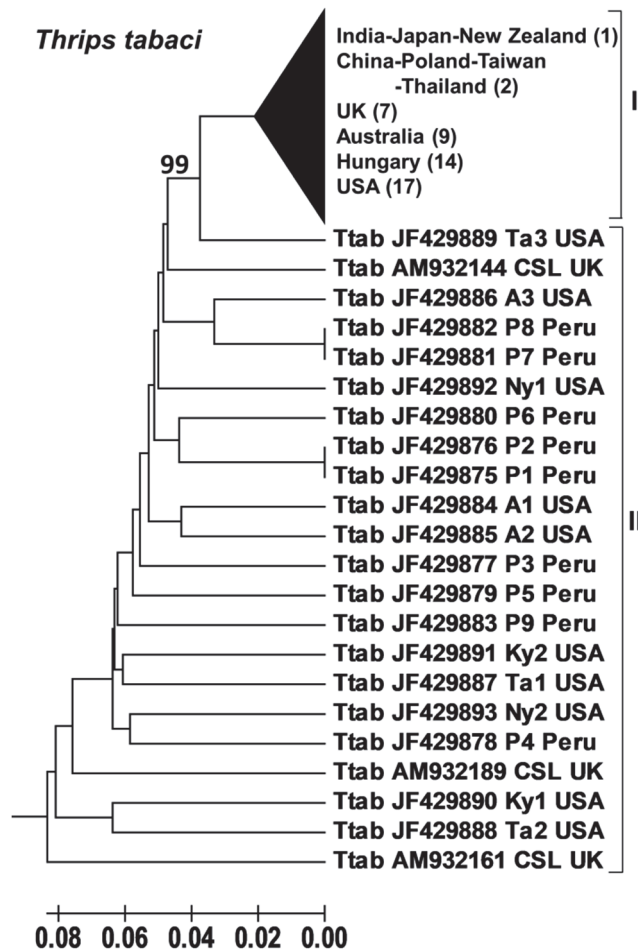
蔥薊馬序列樣本共有 80 條，含基因庫資料，有來自臺灣、日本、美國、中國、澳洲、英國、祕魯、匈牙利、波蘭、紐西蘭、泰國 (Przybylska *et al.*, 2015)；親緣分析顯示出有 2 大類群的差異特性 (圖二)，第一類群 (I) 組成來自全世界各地，彼此差異多小於 3% (差異資料未顯示)。第二類群 (II) 為美國、祕魯及英國的 22 條序列，彼此差異也大，最大差異達 29.7%，彼此差異多大於 10% 以上。兩類群類序列平均差則為 11.2%。

南黃薊馬樣本共有 58 條，含基因庫資料，來自印度、臺灣、日本、中國、澳洲、泰國及英國 (Toda and Komazaki, 2002; Glover *et al.*, 2010)。本研究所建立的臺灣個體自成一類 (T) 與世界各國的樣本 (W) 差異大 (圖三)，平均變異高達 18.8%；世界各國樣本彼此平均差異為 3.9%，其中有幾個樣本則有較獨特的變異累積，如英國 (AM932145、AM932159、AM932182、AM932188)、印度



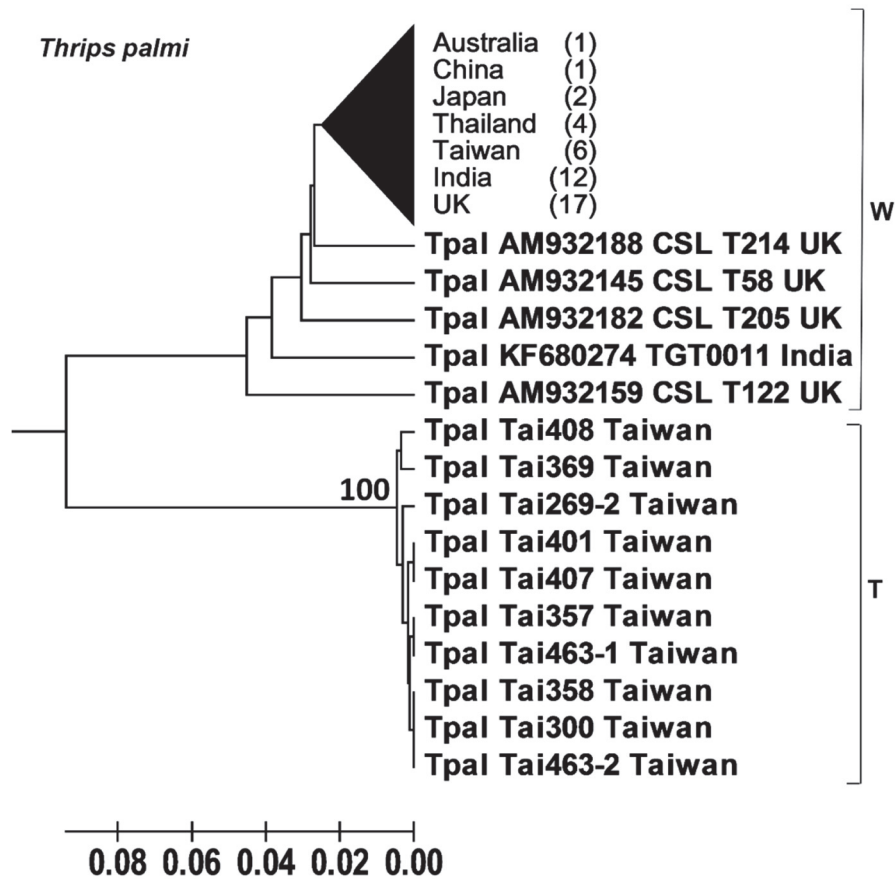
圖一 薊馬 ITS2 序列的顛換取代 (Tv) 及轉換取代 (Ts) 相對於 Tajima-Nei 93 距離模式的分布圖。

Fig. 1. Scatter plots for transversion (Tv) or transition (Ts) of ITS2 sequences versus total substitution of the Tajima-Nei 93 (TN93) substitution model for all pairwise thrips comparisons.



圖二 世界各地薊馬 ITS2 序列，以 p-distance 運算模式，再經 UPGMA 群聚方法所推導之親緣關係。世界各地薊馬之支系 (I) 變異小，以黑色三角形表示，括弧內為各國薊馬個體數量；變異大的類群 (II) 多來自秘魯、美國 (USA) 及英國 (UK)。分群的拔靴值列於樹支旁，比例尺為變異百分比大小。基因庫下載的序列標有基因庫代號、品系及國家。

Fig. 2. Phylogenetic tree inferred from ITS2 sequences of *Thrips tabaci* using the UPGMA clustering method with proportional distance. Sequences from various countries labeled next to the dark triangle form one lineage (I). The numerals in parentheses represent thrips individuals for each country. Divergent members (II) are mostly from Peru, the United States, and the United Kingdom. The bootstrap value of each divergent lineage is shown beneath the branch. The scale is proportional divergence. Sequences downloaded from GenBank are labeled with accession number, isolate name, and country.



圖三 世界各地南黃薊馬 ITS2 序列，以 p-distance 運算模式，再經 UPGMA 群聚方法所推導之親緣關係。臺灣有一群南黃薊馬遺傳變異獨特 (T)，世界各地成員另成一類 (W)；黑色三角形是變異更小的一類，括弧內為各國薊馬個體數量。分群的拔靴值列於樹支旁，比例尺為變異百分比大小。基因庫下載的序列標有基因庫代號、品系及國家。

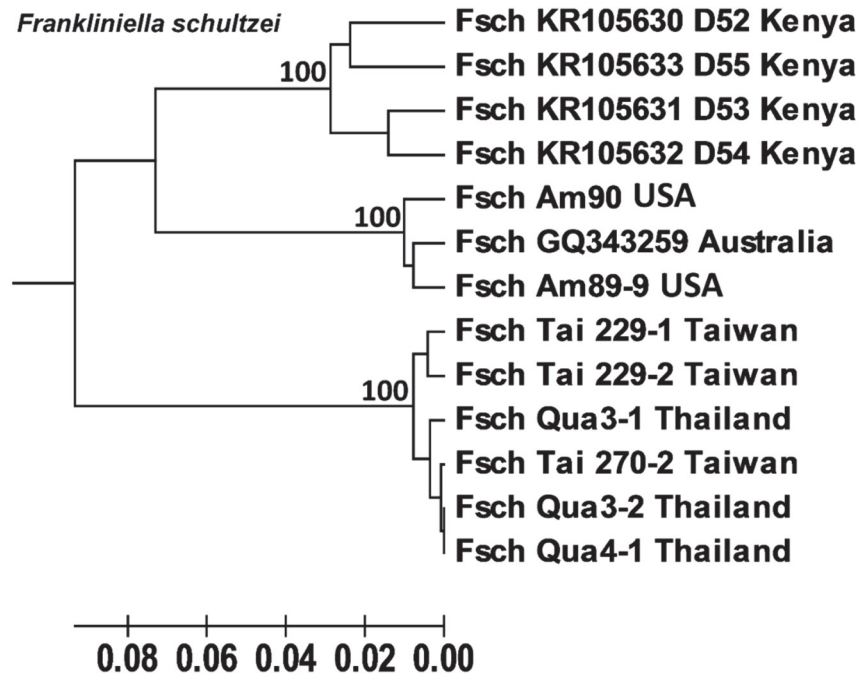
Fig. 3. Phylogenetic tree inferred from ITS2 sequences of *Thrips palmi* using the UPGMA clustering method with proportional distance. One divergent lineage (T) is particularly distributed in Taiwan, and sequences from other countries form the other lineage (W). Sequences in close affinity are labeled next to the dark triangle. The numerals in parentheses represent thrips individuals for each country. The bootstrap value of each divergent lineage is shown next to the branch. The scale is proportional divergence. Sequences downloaded from GenBank are labeled with accession number, isolate name, and country information.

(KF680274)，這幾個樣本與世界各國這一類其他樣本變異可達 11.2%。Glover *et al.* (2010) 曾指出，英國南黃薊馬的母系遺傳的粒線體 COI 有兩大群支系，彼此差異達 8.4%，但這些樣本兩性遺傳特性 ITS 的相對分析結果，卻未顯示如粒線體般的兩大群，顯示南黃薊馬英國各地族群彼此可能有基因交流。

梳缺花薊馬共有 13 個樣本，來自澳洲、美國、泰國、臺灣及肯亞 (Liu, 2004)，分為三大群 (圖四)，其中臺灣的樣本與泰國樣本近，非洲自成一類，美國-澳洲則另成一類，這 3 群彼此差異為 14.6~20.7% 之間。玉米薊馬目前在基因庫則尚未有序列可參考，臺灣的幾個樣本彼此沒有差異。

上述 ITS2 序列變異雖大，各薊馬物種仍自成一類源群，除玉米薊馬僅有臺灣樣本外，其他三種薊馬均顯示世界各地樣本都有非常明顯的分化現象，

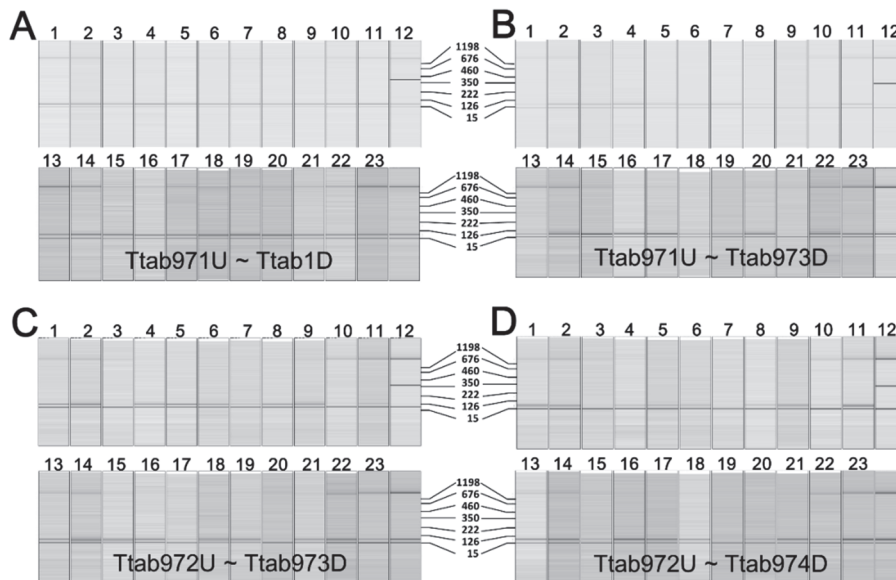
有些族群具有地理分布的獨特性，但也顯示有些分化支系彼此已有部分雜交的訊息。Glover *et al.* (2010) 提及英國的南黃薊馬有兩支系，其粒線體 COI 差異達 8.43%，但其核基因 ITS 序列卻未有分化現象。多篇研究也曾指出薊馬的粒線體 DNA 有三大群的分化 (Brunner *et al.*, 2004; Asokan *et al.*, 2007; Toda and Murai, 2007)，Bruner *et al.* (2004) 則明確指出感染菸草的薊馬與感染蔥及韭這兩群，粒線體 COI 差異高達 11%；但本研究分析顯示，匈牙利菸草上的薊馬核基因 ITS 序列與蔥、高麗菜等作物的樣本並未有特別的差異，亦顯示出有雜交的訊息；Li *et al.* (2015) 的研究也顯示，上述粒線體序列差異很大的薊馬間，在求偶及生殖行為的配對實驗並未有顯著差異。因此，這些世界各地具遺傳分化的薊馬、南黃薊馬及疏缺



圖四 世界各地梳缺花薊馬 ITS2 序列，以 p-distance 運算模式，再經 UPGMA 群聚方法所推導之親緣關係。共有 3 群變異大的支系，臺灣與泰國的遺傳變異相近，非洲自成一群。分群的拔靴值列於樹支旁，比例尺為變異百分比大小。基因庫下載的序列標有基因庫代號、品系及國家。

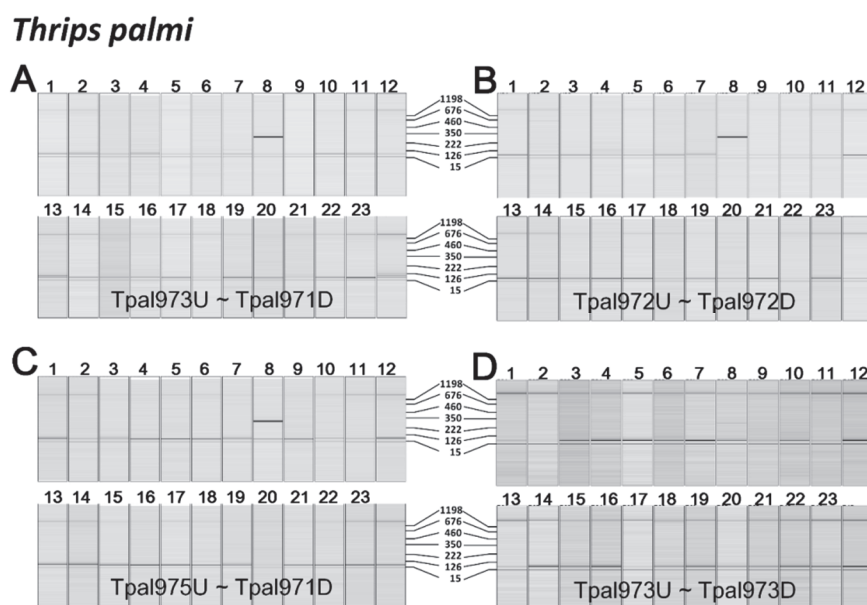
Fig. 4. Phylogenetic tree inferred from ITS2 sequences of *Frankliniella schultzei* using the UPGMA clustering method with proportional distance. Two of the three divergent lineages are distributed in Taiwan and Thailand or in Kenya. The bootstrap value of each divergent lineage is shown beneath the branch. The scale is proportional divergence. Sequences downloaded from GenBank are labeled with accession number, isolate name, and country information.

Thrips tabaci



圖五 蔥薊馬專一性引子對測試 21 種薊馬毛細管電泳結果，複製條帶僅見於目標蔥薊馬的泳道 12，未見於它種薊馬的泳道。所用專一性引子對均標示於圖上，檢測的薊馬及專一性引子資料分別列於表一及表二。DNA 大小 (bp) 標示於圖旁。

Fig. 5. Validation of ITS2 species-specific primer sets of *Thrips tabaci* for 21 thrips species. Amplified fragments are visible in lane 12 of the target onion thrips, with no cross-amplification. Specific primer sets are shown in each panel. The thrips examined in each lane are listed in Table 1, and species-specific primer information is presented in Table 2. DNA marker (bp) is shown.



圖六 南黃薊馬專一性引子對測試 21 種薊馬毛細管電泳結果，複製條帶僅見於目標南黃薊馬的泳道 8，未見於它種薊馬的泳道。所用專一性引子對均標示於圖上，檢測的薊馬及專一性引子資料分別列於表一及表二。DNA 大小 (bp) 標示於圖旁。

Fig. 6. Validation of ITS2 species-specific primer sets of *Thrips palmi* for 21 thrips species. Amplified fragments are visible in lane 8 of the target melon thrips, with no cross-amplification. Specific primer sets are shown in each panel. The thrips examined in each lane are listed in Table 1, and species-specific primer information is presented in Table 2. DNA marker (bp) is shown.

花薊馬族群，是否如上述學者所提的複合種群 (Species complex) 或是具有隱蔽種 (Cryptic species)，都需要更嚴謹的分析，除母系遺傳的粒線體基因外，也需分析雙性遺傳特性的核基因資料。

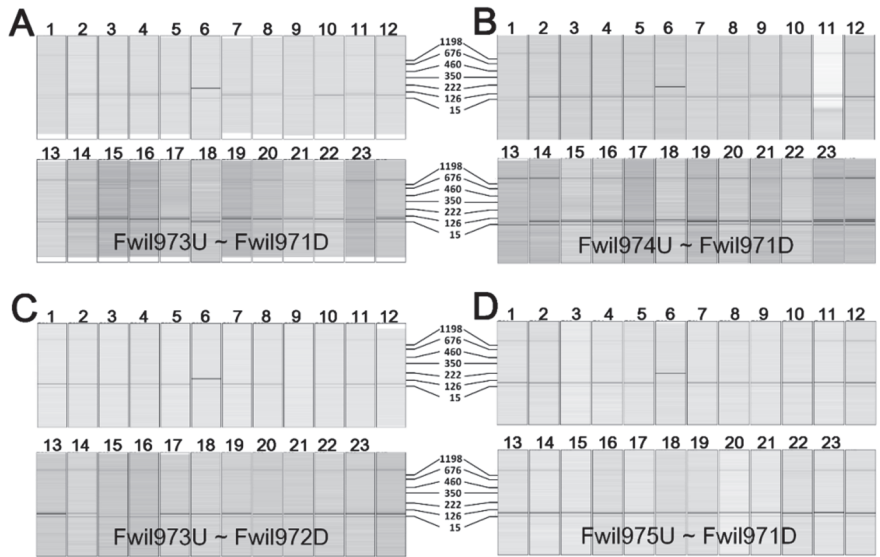
二、引子專一性及穩定性測試

本研究分別設計及測試蔥薊馬、玉米薊馬、南黃薊馬及梳缺花薊馬 4 種薊馬多組專一性引子對，針對不同物種進行專一性引子的穩定性測試，共檢測 15 屬 21 種薊馬 (表一)。毛細管電泳圖譜顯示蔥薊馬、玉米薊馬及南黃薊馬樣本的受測試結果 (圖五~圖七，表一)，專一性引子對在其他 20 種薊馬樣本的反應中均不會複製出產物，而對本身的樣本均可複製成功；蔥薊馬 4 組專一性引子對僅在蔥薊馬的泳道 12 出現複製的專一性條帶 (圖五)，而南黃薊馬及玉米薊馬的 4 組專一性引子也僅在其泳道 8 及泳道 6 分別出現南黃薊馬 (圖六) 及玉米薊馬 (圖七) 複製的專一性條帶；梳缺花薊馬的洋菜膠電泳圖也顯示出其專一及穩定的特性 (圖八)，僅在其泳道 20 出現其專一性引子條帶。

專一性引子或探針的鑑定研究雖然快速便利，在應用上都會遇上族群變異導致專一性檢測效果降低或偵測失效的問題。Yeh *et al.* (2014a) 指出，探

針與偵測目標序列，若有 1-2 個鹼基位差異發生在序列 5'端或 3'端，檢測效果影響不大，但 1 個鹼基位的差異若發生在探針中段，就可能影響偵測效果。Chen *et al.* (2014) 應用生物晶片偵測地中海果實蠅各地族群的結果也顯示，5'端或 3'端差 1 個鹼基位時，訊號仍明顯，但偵測的近緣種差到 3 個鹼基則幾乎無訊號。本研究設計的專一性引子序列，除玉米薊馬未有 ITS 序列發表外，其他 3 種薊馬的專一性引子序列經比對全世界的 ITS 序列樣本後顯示，多數專一性引子序列與世界各地族群幾乎一致，多差 1~2 個鹼基位，但 Ttab971U、Ttab972U 序列與美國及秘魯的族群差異達 6 個，而南黃薊馬的專一性引子序列對於僅分布於臺灣的第二支系個體則差異甚大，梳缺花薊馬的 Fsch984D 則於 3'端於非洲~美國~澳洲的族群有 4 個鹼基位的插入。因此，若薊馬物種內 ITS2 序列變異如南黃薊馬般，大於 18%，要設計全世界各地族群可共用的種專一性引子對，將不容易；本研究針對各種薊馬設計多組專一性引子對，可減少因族群變異導致專一性檢測效果降低或偵測失效的問題。

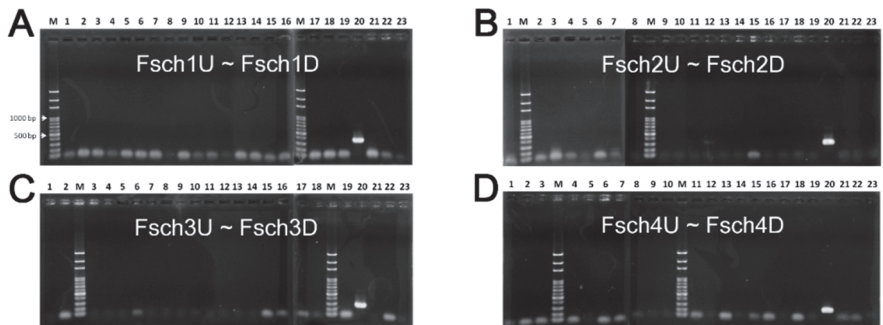
Frankliniella williamsi



圖七 玉米薊馬專一性引子對測試 21 種薊馬毛細管電泳結果，複製條帶僅見於目標玉米薊馬的泳道 6，未見於它種薊馬的泳道。所用專一性引子對均標示於圖上，檢測的薊馬及專一性引子資料分別列於表一及表二。DNA 大小 (bp) 標示於圖旁。

Fig. 7. Validation of ITS2 species-specific primer sets of *Frankliniella williamsi* for 21 thrips species. Amplified fragments are visible in lane 6 of the target corn thrips, with no cross-amplification. Specific primer sets are shown in each panel. The thrips examined in each lane are listed in Table 1, and species-specific primer information is presented in Table 2. DNA marker (bp) is shown.

Frankliniella schultzei



圖八 梳缺花薊馬專一性引子測試 21 種薊馬洋菜膠電泳結果，複製條帶僅見於目標梳缺花薊馬的泳道 20，未見於它種薊馬的泳道。所用專一性引子對均標示於圖上，檢測的薊馬及專一性引子資料分別列於表一及表二，DNA 標誌 (M) 為 100 bp。

Fig. 8. Validation of ITS2 species-specific primer sets of *Frankliniella schultzei* for 21 thrips species. Amplified fragments are visible in lane 20 of the target common blossom thrips, with no cross-amplification. Specific primer sets are shown in each panel. The thrips examined in each lane are listed in Table 1, and species-specific primer information is presented in Table 2. DNA ladder marker (M; 100 bp) is shown.

誌 謝

感謝行政院農委會動植物防疫檢疫局提供研究計畫 (98 農科-9.3.1-檢-B1 (10-1)、106 農科-9.5.6-檢-B2) 經費，並感謝蔡正隆博士及李蕙宜協助稿件修飾。

引用文獻

Asokan R, Kumar NKK, Kumar V, Ranganath HR. 2007. Molecular differences in the cytochrome oxidase I (mtCOI) gene and development of a species-specific marker for

- onion thrips, *Thrips tabaci* Lindeman, and melon thrips, *T. palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae), vectors of tospoviruses (Bunyaviridae). Bull Entomol Res 97: 461-470.
- Brunner PC, Chatzivassiliou EK, Katis NI, Frey JE.** 2004. Host-associated genetic differentiation in *Thrips tabaci* (Insecta: Thysanoptera), as determined from mtDNA sequence data. Heredity 93: 364-370.
- Brunner PC, Frey JE.** 2010. Habitat-specific population structure in native western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Insecta, Thysanoptera). J Evol Biol 23: 797-804.
- Buckman R, Mound LA, Whiting MF.** 2013. Phylogeny of thrips (Insecta: Thysanoptera) based on five molecular loci. Syst Entomol 38: 123-133. doi: 10.1111/j.1365-3113.2012.00650.x.
- Chen YH, Liu LY, Tsai WH, Haymer DS, Lu KH.** 2014. Using DNA chips for identification of tephritid pest species. Pest Manag Sci 70: 1254-1261.
- De Grazia A, Rita M, Moritz G.** 2016. Molecular diagnosis of native and quarantine pest thrips of southern European citrus orchards Bull Insectol 69: 1-6.
- Dickey AM, Kumar V, Hoddle MS, Funderburk JE, Morgan JK, Jara-Cavieres A, Shatters Jr RG, Osborne LS, McKenzie CL.** 2015. The *Scirtothrips dorsalis* species complex: endemism and invasion in a global pest. PLoS One 10: e0123747.
- Farris RE, Ruiz-Arce R, Ciomperlik M, Vasquez JD, DeLeón R.** 2010. Development of a ribosomal DNA ITS2 marker for the identification of the thrips, *Scirtothrips dorsalis*. J Insect Sci 10: 26.
- Gent DH, du Toit LJ, Fichtner SF, Mohan SK, Pappu HR, Schwartz HF.** 2006. Iris yellow spot virus: an emerging threat to onion bulb and seed production. Plant Dis 90: 1468-1480.
- Glover H, Collins DW, Walsh K, Boonham N.** 2010. Assessment of loci for DNA barcoding in the genus *Thrips* (Thysanoptera: Thripidae). Mol Ecol Res 10: 51-59.
- Goldbach R, Peters D.** 1994. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. Sem Virol 5: 113-120.
- Hall TA.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. pp 95-98, Nucleic Acids Symposium Series, Oxford University, UK.
- Huang KS, Lee E, Yeh Y, Shen GS, Mei E, Chang CM.** 2010. Taqman real-time quantitative PCR for identification of western flower thrip (*Frankliniella occidentalis*) for plant quarantine. Biol Lett 6: 555-557. doi:10.1098/rsbl.2009.1060.
- Inoue T, Sakurai T.** 2007. The phylogeny of *Thrips* (Thysanoptera: Thripidae) based on partial sequences of cytochrome oxidase I, 28S ribosomal DNA and elongation factor-1 α and the association with vector competence of tospoviruses. Appl Entomol Zool 42: 71-81.
- Kobayashi K, Hasegawa E.** 2012. Discrimination of reproductive forms of *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) by PCR with sequence specific primers. J Econ Entomol 105: 555-559.
- Li XW, Wang P, Fail J, Shelton AM.** 2015. Detection of gene flow from sexual to asexual lineages in *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). PLoS ONE 10: e0138353. doi:10.1371/journal.pone.0138353.
- Lin JS, Wang CL, Yeh WB.** 2003. Molecular identification of multiplex-PCR and PCR-RFLP for the quarantine pest, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). Formosan Entomol 23: 353-366.
- Liu YC.** 2004. Molecular identification of a plant quarantine pest (*Frankliniella occidentalis*) by one-tube nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. Plant Prot Bull 46: 27-46.

- Mound LA.** 2005. Thysanoptera: diversity and interactions. *Annu Rev Entomol* 50: 247-269.
- Persley D, Wilson C, Thomas J, Sharman M, Tree D.** 2010. IXth International Symposium on Thysanoptera and Tospoviruses; 2009 Aug 31 - Sept 4; *J Insect Sci* 10:166 available online: insectscience.org/10.166, <https://doi.org/10.1673/031.010.14126>.
- Prins M, Goldbach R.** 1998. The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. *Trends Microbiol* 6: 31-35.
- Przybylska A, Fiedler Ż, Kucharczyk H, Obrępańska-Stęplowska A.** 2015. Detection of the quarantine species *Thrips palmi* by loop-mediated isothermal amplification. *PLoS ONE* 10: e0122033. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122033>.
- Rugman-Jones PF, Hoddle MS, Mound LA, Stouthamer R.** 2006. Molecular identification key for pest species of *Scirtothrips* (Thysanoptera: Thripidae). *J Econ Entomol* 99: 1813-1819.
- Rugman-Jones PF, Hoddle MS, Stouthamer R.** 2010. Nuclear-mitochondrial barcoding exposes the global pest western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) as two sympatric cryptic species in its native California. *J Econ Entomol* 103: 877-886.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S.** 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197 PMID: 24132122.
- Toda S, Komazaki S.** 2002. Identification of thrips species (Thysanoptera: Thripidae) on Japanese fruit trees by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal ITS2 region. *Bull Entomol Res* 92: 359-364.
- Toda S, Murai T.** 2007. Phylogenetic analysis based on mitochondrial COI gene sequences in *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) in relation to reproductive forms and geographic distribution. *App Entomol Zool* 42: 309-316.
- Tommasini MG, Maini S.** 1995. *Frankliniella occidentalis* and other thrips harmful to vegetable and ornamental crops in Europe. *Wag Agric Uni Pap* 95: 1-42.
- Tseng LY, Chang NT, Tseng MJ, Yeh WB.** 2010. Genetic variation of *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) in the Pacific Rim. *Formosan Entomol* 30: 219-234.
- Walsh K, Boonham N, Barker I, Collins DW.** 2005. Development of a sequence-specific real-time PCR to the melon thrips *Thrips palmi* (Thysan., Thripidae). *J App Entomol* 129: 272-279.
- Xia X, Xie Z.** 2001. DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution, *J Hered* 92: 371-373.
- Yeh WB, Tseng MJ, Chang NT, Wu CSY, Tsai YS.** 2015. Agronomically important thrips: Development of species-specific primers in multiplex PCR and microarray assay using internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences for identification. *Bull Entomol Res* 105: 52-59. doi:10.1017/S000748531400073X.
- Yeh WB, Tseng MJ, Chang NT, Wu SY, Tsai YS.** 2014a. Development of species-specific primers for agronomical thrips and multiplex assay for quarantine identification of western flower thrips. *J Econ Entomol* 107: 1728-1735.
- Yeh WB, Wu CSY, Tseng MJ, Chang NT, Chen WP.** 2014b. Multiplex PCR for the molecular identification of economically important thrips. *Formosan Entomol* 34: 211-225.

Species-Specific Primers Identifying Major Thrips of Plant Protection and Quarantine Significance

Wen-Bin Yeh^{1*}, Mei-Jung Tseng¹, Cindy Sin-Ying Wu¹, Niann-Tai Chang², Yi-Sheng Tsai¹

¹ Department of Entomology, National Chung Hsing University, 145 Xingda Rd., South District, Taichung, 40227 Taiwan

² Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology, 1 Shuefu Rd., Neipu, Pingtung, 91201 Taiwan

* Corresponding email: wbyeh@nchu.edu.tw

Received: 24 March 2018

Accepted: 14 June 2018

Available online: 22 August 2018

ABSTRACT

Thrips (Thysanoptera: Thripidae) are major pests of agricultural crops worldwide. However, their minute size, highly diverse morphologies, and lack of easily recognizable characteristics often make their identification difficult. According to molecular analyses, which can provide reliable identification of species complex, numerous thrips species exhibit largely differ in their genetic composition; however, their morphological characters remain indistinguishable. In this study, sequences of the nuclear internal transcribed spacer 2 (ITS2) of agronomically damaged thrips—namely *Thrips tabaci*, *Thrips palmi*, *Frankliniella schultzei*, and *Frankliniella williamsi*—were analyzed to design species-specific primers for their molecular identification. The ITS2 fragments obtained using universal primers were approximately 500 bp in length, and the average sequence variation among the four species ranged from 40.6% to 44.4%. With sequences for *T. tabaci*, *T. palmi*, and *F. schultzei* from GenBank included in the analysis, more than 18% intraspecific sequence variation was found. ITS2 sequences were employed to design multiple sets of species-specific primers of the four thrips species. Examination of primer specificity and stability in 21 thrips species of 15 genera revealed the expected amplified products in the four target species, with no cross-amplifications. Sequence alignment of the specific primers with other conspecific GenBank sequences showed that these primers had conserved sequences with a mismatch of less than two nucleotides. However, more than six nucleotide mismatches to distinct lineages of conspecific target DNA were found in two specific primers. Therefore, amplification failure may occur if the target thrips have high intraspecific genetic variation.

Key words: thrips, molecular identification, internal transcribed spacer, specific primers