



## 利用微衛星基因鑑別台灣家白蟻 *Coptotermes formosanus* Shiraki (蜚蠊 目：鼻白蟻科) 巢群

陳冠豫<sup>1</sup>、陳慕璇<sup>1</sup>、邱俊偉<sup>1,2</sup>、李後鋒<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> 國立中興大學昆蟲學系

<sup>2</sup> 清邁大學農學院昆蟲暨植物病理學系

<sup>3</sup> 國立中興大學前瞻理工科技研究中心

\* 通訊作者 email: houfeng@nchu.edu.tw

收件日期：2023年10月11日 接受日期：2024年1月18日 線上刊登日期：2024年3月1日

### 摘要

台灣家白蟻 (*Coptotermes formosanus* Shiraki) 是社會性昆蟲，單巢白蟻的危害面積可達一公頃，為了評估殺蟲藥劑是否將全巢白蟻滅除，傳統的方法是用染色標放法確認單一白蟻巢的活動範圍。然而執行染色標放法費力且費時，因此本研究目標是以五組微衛星標記 (microsatellite marker)，發展出一套能用於台灣族群的巢群 (colony) 身分鑑定流程：在多個地點採集白蟻，依循孟德爾遺傳法則重建親本基因型，根據各地點親本基因型來判斷各地點白蟻是否屬於同巢，再檢測巢群的遺傳組成是否符合單王單后的組合形式，來避免因為巢中含有多王或多后造成誤判。我們將鑑定流程應用於一防治案例：我們在中興大學校內的肖楠神木樹基表面上 16 個位置發現台灣家白蟻活動，其中的 6 個位置採集到超過 10 隻個體的白蟻樣本，從 6 個位置所重建的親代基因型相同，且 6 個位置合併後的資料通過單巢單王單后遺傳組成的檢定，可以得知這些樣本皆來自同一巢群。其他的 10 個位置雖然個體數不足 10 隻難以重建親代基因型，但所觀察到的基因型組合亦符合樣本皆來自同一巢群的判斷。我們僅在神木樹基上的其中一個位置施放餌劑，在 38 天後所有白蟻都被消滅，防治的結果支持所有白蟻同屬一巢，與微衛星鑑定法的結果相同。微衛星巢群鑑定法協助我們判斷樣本之間的巢群關係，有助於未來台灣家白蟻防治策略和餌劑的開發，並為台灣家白蟻的生態學提供有力的研究工具。

**關鍵詞：**台灣家白蟻、藥效檢測、白蟻防治、巢群生殖結構。

### 前言

台灣家白蟻 (*Coptotermes formosanus* Shiraki, 1909)，原生於台灣及中國東南方 (Kistner, 1985; Maruyama and Iwata, 2002; Li *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2020)，因其生態適應力與入侵能力成

為全球性的木材害蟲 (Gay, 1969; Scheffrahn and Su, 2005; Evans *et al.*, 2013)，常對居家裝潢、交通工具和古蹟等造成嚴重損害 (Rust and Su, 2012; Evans *et al.*, 2013)。具有真社會性 (Eusociality) 的家白蟻巢群 (colony) 有鮮明的階級組成，一個巢群通常由一隻蟻王及一隻蟻后負責

繁殖，產下的子代再區分為兵蟻工蟻若蟲及有翅繁殖型。家白蟻成熟的巢群可以生產超過 100 萬隻個體 (Su and Scheffrahn, 1988)，地下通道的直線距離可達一百公尺以上，整體隧道系統面積涵蓋區域超過一公頃 (King and Spink, 1969; Su and Scheffrahn, 1988)。在覓食區域內，白蟻巢群在地下有結構複雜的多個巢室和連接彼此的通道，食物資源和巢室分離，巢室通常建造在地下或木材內部，因而難以透過物理方式直接移除。

針對家白蟻屬 (*Coptotermes* Wasmann, 1896) 害蟲，市場上有許多不同的防治方法，根據藥劑作用的方式可將防治策略分為以下三種 (Su and Scheffrahn, 1998; Su, 2019; Chen, 2021; Oi, 2022)：(1) 噴灑或灌注各類藥劑以滅除目標區域白蟻個體、(2) 以忌避性物質或以物理手段形成防護層阻隔白蟻危害以及 (3) 以幾丁質合成抑制劑 (chitin synthase inhibitors, CSIs) 為有效成分的餌劑滅除整個白蟻巢群。只滅除巢群的部分個體或者採用阻隔性的方法，對於單一個受保護目標建築物而言或許是可以接受的，然而，若我們以社區或城市的角度來考慮，這些方法顯然不是良好的控制手段。當巢群有大量的個體沒有被滅除，剩餘的個體可能再次入侵受保護目標或者鄰近的區域 (Su and Scheffrahn, 1996)。不僅無法阻止白蟻進一步的擴散，並且需要定期支出維持藥劑及物理裝置有效性的成本。因此，Su and Scheffrahn (1998) 認為確保整個白蟻巢群被滅除才能滿足 IPM (Integrated Pest Management) 的防治方針；CSIs 餌劑的作用成分毒性不僅較低且僅須極低劑量便可以達到滅巢的效果 (Su, 1994; Chouvenc and Su, 2017)，同時確實降低白蟻損害的潛力，還能降低對於環境的負荷。

在 CSIs 餌劑的發展史中，研究人員發現掌握白蟻活動並鑑定巢群身分是證實餌劑的有效性的必要條件 (Su, 2019)。由於家白蟻的工蟻與兵蟻離開巢室在不同的食物資源上取食，而不同家白蟻巢群的領土之間沒有肉眼可見的界線，當我們的目標是滅除整個白蟻巢群時，我們必須要掌握位於不同地點活動的工蟻及兵蟻之間的巢群關係，才能區分藥劑的效果是忌避、滅除部分巢群又或者是滅除了整個巢群。現今，白蟻餌劑的有效性已受到學界與業界認可 (Su, 2019)，而餌劑防治的實務操作中仍然常需要監測白蟻活動並鑑定家白蟻的巢群身分。最主要的考量是由於在每次的野外實作中，我們都不可能像實驗室操作那樣精確的評估餌劑的有效性及防治

結果，而掌握目標區域及其周圍的白蟻巢群動態是評估成效最直接的依據 (Grace et al., 1996)。此外，家白蟻巢群再次入侵的潛力使得人們難以正確評估防治效果。前人研究表明，台灣家白蟻可以在防治結束僅 3 個月 (Mullins et al., 2011) 或 6 個月 (Su et al., 2016b) 後，就再次入侵原防治區域。即使藥劑確實發揮作用，當本應被完全滅除的白蟻再次在目標區域出現，若我們無法確知巢群的身分，則無法分辨防治失敗與再次入侵之間的不同。最後，了解目標區域內的白蟻巢群空間分布能夠協助人們制定防治策略，在防治目標涉及不同管理單位時讓各方有一致的討論依據。綜上所述，鑑定巢群應作為防治工作中的重要一環，以有效的方法鑑定和監測白蟻巢群，才能有個穩定的依據來評估防治成效，並制定出更合理的防治計畫。

前人研究以受到取食的木樁或餌站來代表家白蟻巢群在野外的活動範圍 (Su and Scheffrahn, 1986)，接著再利用染色標放法標記來自個別巢群的白蟻個體 (Su and Scheffrahn, 1988; Su et al., 1993)，藉此來掌握樣點的巢群身分以及族群的空間分布。這些研究餵食白蟻含有染劑的食物，藉由觀察受染色白蟻個體在巢群所佔領的不同樣點間移動，來掌握單一巢群的領域範圍，進而識別範圍內的不同白蟻巢群。染色標放法的缺點在於需要耗時費力地執行多輪的捕捉-染色-放回 (Su and Scheffrahn, 1988; Su et al., 1993)，並且白蟻的覓食活動隨著季節與氣候的改變而變動 (Waller and La Fage, 1987; Cornelius and Osbrink, 2011)，這些都增加了染色工作的難度。此外，在防治實作中需要比較防治前後樣區及周圍白蟻巢群身分的場合，尤其是當白蟻族群再次入侵防治區域時，染色標放法沒有辦法用於區別同一地點不同時間白蟻巢群身分的異同。

微衛星 DNA (microsatellite DNA)，指以兩個或多個核苷酸 (nucleotide) 為單位重複排列所形成的序列，也稱為短串聯重複 (short tandem repeat) 序列，為一種共顯性 (codominant) 的遺傳標記 (genetic marker)。微衛星的突變率高於中性突變率 (Schlötterer and Tautz, 1992; Jarne and Lagoda, 1996)，在族群內和族群間常具有長度多態性 (length polymorphic)。因此，該標記有助於探索個體之間或族群之間的遺傳關係 (Tautz, 1989)，適用於社會性動物的巢群鑑定 (Goodisman and Crozier, 2002; Husen et al., 2006; Kusaka and Matsuura, 2018; Braude et al., 2021)。微衛

星巢群鑑別法作為染色標放法的替代方案，能有效的鑑別巢群 (Husen *et al.*, 2006; Mullins *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2016b)；此鑑別法能如同收集人類指紋那樣為每個巢群建立「身份證明」，在防治前後可以留存每個巢群的身分資料，協助跨越時間的巢群身分比對 (Owens *et al.*, 2012)。此外，微衛星巢群鑑別法只需要保存良好的樣本（如酒精浸液標本、乾燥標本）便可以操作，能不受到白蟻的活動或者防治方法的影響，彈性較大能搭配各種情境使用。

過去在台灣地區的白蟻防治研究中，研究人員使用染色標放法來識別不同的白蟻巢群 (Chiu *et al.*, 2016; Lai, 2019)，而後續研究也確實遭遇白蟻巢群再次入侵所造成的困難，因為無法再次使用染色標放法來識別巢群 (Lin *et al.*, 2021)，這強調了台灣地區急需引入微衛星巢群鑑定法的迫切性。本研究旨在開發適用於台灣地區的家白蟻巢群檢測流程，測試曾用於台灣地區家白蟻族群研究的微衛星標記(microsatellite marker) (Chen, 2022)，並評估這些微衛星標記在巢群鑑定上的適用性。我們接著將所開發的巢群鑑定方法套用於實際的防治案例中。案例中防治的目標為一觀賞用肖楠神木樹基(圖一)，台灣家白蟻在樹基上 16 個不同的位置造成危害。我們採集來自樹基的家白蟻樣本，放大選定的微衛星基因，個別並釐清樣點間的巢群關係。而後，我們在巢群佔領的其中一個樣點施放含有 CSIs 的餌劑，並持續追蹤藥劑是否滅除了整個巢群。

## 材料與方法

### 白蟻樣本與防治過程描述

本實驗的防治對象為一直徑約 1.6 m 長約 6.2 m 的觀賞用肖楠 (*Calocedrus formosana*) 神木樹基(圖一)，樹木原生於南投縣仁愛鄉惠蓀林場，1999 年 921 地震後倒塌，樹基被運至中興大學校園內做裝飾用途，放置於  $12.3 \times 16.9\text{ m}^2$  的磁磚鋪面上，神木樹本身並無接觸土壤。在 2021 年 6 月，我們接獲通報發現白蟻對其造成嚴重危害，根據外表形態鑑定危害白蟻物種為台灣家白蟻，並決定進行相關防治措施。

家白蟻為社會性昆蟲，一個巢群內的個體間共享食物資源能在同一空間內自由交流互動 (Wilson, 1971)，並且具有排他性 (Wallis, 1964)。因此本研究定義同一批被發現的白蟻個體被定義為一筆樣本，例如來自同一條蟻道的白蟻個體、危害同一木材部位的白蟻個體、在同一腔室內被發現的白蟻個體

等，而單筆樣本的採集位置被稱為樣點。於 2021 年的 6 月 24 日和 6 月 25 日，我們從樹基的不同部位共採集了 16 群白蟻樣本，並為每個樣本分別編號為 GT1 至 GT16 (圖一)。GT1(編號), 1(個體數); GT2, 115; GT3, 5; GT4, 14; GT5, 14; GT6, 45; GT7, 5; GT8, 5; GT9, 5; GT10, 17; GT11, 7; GT12, 6; GT13, 5; GT14, 4; GT15, 2; GT16, 1。這 16 筆樣本經巢群鑑定後確認來自同一巢群 (見結果)。6 月 25 日，我們選擇於 GT10 樣點設置了一個地上型白蟻餌站 (圖一)，內含有效成分 0.5% 諾福隆 (Noviflumuron) 的地上型白蟻餌站 Recruit IV AG (Dow AgroSciences, Indiana, United States)。並在餌站中加入少量過濾水以潤濕餌劑。隨後，每週檢查所有樣點，觀察是否 16 個樣點的白蟻都會受到餌劑影響而消滅。在所有白蟻活動消失後，持續監測四週以確認白蟻不再出現。

### 微衛星基因序列分析

16 群白蟻樣本保存於 95% 酒精內，樣本內含 30 隻以上白蟻則取 30 隻個體進行微衛星基因序列分析，若樣本內白蟻個體數量少於 30 隻，僅留下數隻個體作為存證樣本，其餘全數進行微衛星基因序列分析。白蟻以 HotSHOT 方法萃取 DNA (Meeker *et al.*, 2007)，將工蟻或兵蟻的整隻蟲體置入 0.2 ml 反應管，管中加入 50 mM NaOH 100  $\mu\text{L}$ ，將蟲體磨碎。所得之混合液在 95°C 下加熱 20 分鐘，而後冷卻至 4°C，接著加入 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 10  $\mu\text{L}$ ，離心後取出上清液，將其保存於 -20°C 冰箱，供 PCR (Polymerase chain reaction) 使用。我們擴增曾用在台灣地區家白蟻族群的五個微衛星標記，*CopF6F*、*CopF10F*、*CopF10-4*、*Clac1* 與 *Cg33* (Chouvinc *et al.*, 2017; Chen, 2022)。單次 PCR 反應的體積為 10  $\mu\text{L}$ ，包含 1  $\mu\text{L}$  的 HotSHOT DNA，5  $\mu\text{L}$  的聚合酶預混組 (master mix, amaR OnePCR™)，並根據引子使用不同濃度的 forward primer、reverse primer 與 M13 (-19) 螢光引子。*CopF6F*、*CopF10F* 與 *CopF10-4* 使用 100 nM forward primer、200 nM reverse primer 與 40 nM 螢光引子；而 *Clac1* 與 *Cg33* 則含有 350 nM forward primer、200 nM reverse primer 與 24 nM 螢光引子。序列以 SensoQuest Labcycler 热迴圈儀 (SensoQuest Biomedizinische Elektronik GmbH, Gottingen, Germany) 擴增，迴圈行程為：DNA 雙股分離 (95°C, 5 min)，27 個迴圈 (95°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 72°C, 30 sec)，接著 8 個迴圈



圖一 受白蟻為害之觀賞用神木樹基，發現白蟻活動的樣點在圖中以數字來表示。數字 1 至 16 分別對應到文中列出的樣點 GT1 到 GT16。編號 1 至 9 為照片中位於樹基正面的樣點，而編號 10 至 16 的樣點則位於樹基的背面。本研究在 GT10 白蟻活動樣點旁邊安裝含餌藥之餌站。圖片比例可以邊長 20 cm 的磁磚做為參考。

Fig. 1. A huge Shen-mu ("holy giant tree" in Chinese, a kind of decoration made with a big fallen tree in Taiwanese culture) tree trunk infested by termites. The sample points where termite activity was found are indicated by numbers. The numbers 1 to 16 correspond to the sample points GT1 to GT16 listed in the main text. The sample points numbered 1 to 9 are located at the front of the tree, while 10 to 16 are located at the back of the tree. The bait station with bait was installed beside GT10. The 20-cm tiles can serve as a reference for the picture's scale.

(95°C, 30 sec; 50°C, 30 sec; 72°C, 30 sec)，最後延長 DNA 複製股 (72°C, 20 min)。PCR 產物送至國立陽明交通大學腫瘤惡化卓越研究中心進行片段分析 (fragment analysis)，再以 Geneious R11 軟體協助基因型判讀 (peak calling/allele calling)。

#### 基因型與巢群鑑定

本研究將有取得超過 10 隻個體的樣本用於親本基因型重建。一對蟻王蟻后在任一微衛星基因座 (locus) 上，一共有 7 種不同的等位基因 (allele) 組合。根據孟德爾遺傳法則，本文將這 7 種組合以旁氏表 (Punnett square) 的方式呈現所有可能衍生出的子代基因型組合 (圖二)。若一白蟻族群由一個單王單后的巢群所產生，則族群的基因型組合需要符合這 7 種組合形式的其中一種。在本研究中，若來自一樣點的所有基因型組合皆符合 7 種組合形式 (圖二) 的任一種，表示其由一個單王單后的巢群所

生，可根據圖二來重建出親代的基因型。舉例而言，若所得的基因型組合為 A/C、A/D、B/C 和 B/D (圖二，Type 1)，我們能重建出親代的基因型組合 A/B 和 C/D。本研究的巢群鑑定法奠基於親代基因型重建，而當不同樣點重建出完全相同的親代基因型，則這些樣點應來自相同巢群。

為了強化上述推論的可信度，當複數樣點因重建出完全相同的親代基因型而被視同一巢群，我們會接著將這些樣點視作一個整體，做一次基因型組合比例的測試。比例測試的邏輯如下，若一白蟻族群由一個單王單后的巢群所產生，則族群的基因型組合除了需要符合 7 種組合形式的任一種，亦須遵守該組合形式的基因型比例。舉例而言，當一個白蟻巢群有親代基因型組合為 A/B 和 C/D，子代基因型組合應為 A/C、A/D、B/C 和 B/D，且各組合出現的比例應為 1:1:1:1 (圖二，Type 1)。給定一基因型組合在各樣點的出現數量之加總為觀測值 (observed

The diagram illustrates the relationship between seven types of parental allele combinations (Type 1 to Type 7) and their corresponding offspring allele combinations and their ratios. The left side shows the parental allele combinations, and the right side shows the offspring allele combinations and their ratios.

		Parent 1 alleles			
Parent 2 alleles		offspring allele combinations			
Type 1	<b>C</b>	<b>D</b>	Ratio of each combination		
A	AC	AD	Allele combination	AC	AD
B	BC	BD	ratio	1	1
Type 2	<b>B</b>	<b>C</b>	Allele combination	AB	AC
A	AB	AC	ratio	1	1
A	AB	AC			
Type 3	<b>B</b>	<b>C</b>	Allele combination	AB	AC
A	AB	AC	ratio	1	1
B	BB	BC	BB	BC	
Type 4	<b>A</b>	<b>B</b>	Allele combination	AA	AB
A	AA	AB	ratio	1	2
B	AB	BB	BB		
Type 5	<b>B</b>	<b>B</b>	Allele combination	AB	
A	AB	AB	ratio	1	
A	AB	AB			
Type 6	<b>A</b>	<b>B</b>	Allele combination	AA	AB
A	AA	AB	ratio	1	1
A	AA	AB			
Type 7	<b>A</b>	<b>A</b>	Allele combination	AA	
A	AA	AA	ratio	1	
A	AA	AA			

圖二 單王單后巢群的基因型組合形式與各組合數量比例。我們列出在家白蟻巢群為單王單后前提下，所有可能的親代基因型組合（繁殖型）以及其子代基因型組合（工蟻、兵蟻），並提供子代基因型組合的數量比例。圖的左半列出總共七種親代基因型組合形式（Type1-Type7），右半則列出每個組合形式中，各個子代基因型組合的數量比例。

Fig. 2. Allelic combinations in colonies led by single-king and single-queen, along with the corresponding proportions of each combination. The left half of the figure lists seven allelic combination forms (Type1-Type7); the right half lists the proportion of each offspring allele combination.

value)，根據圖二中列出的各基因型組合的比例產生期望值 (expected value)，我們使用費雪精確檢定 (Fisher exact test,  $\alpha = 0.05$ ) 進行檢定，再以邦佛洛尼法 (Bonferroni correction) 進行多重比較的顯著性校正。

若樣點所得之基因型不符合圖二的七種組合形式之任一種，又或者基因型數量比例的檢定結果顯著偏離預期，則表示所監測之樣點巢群結構不為單王單后，又或者不由單一個巢群所產生，在這種狀況下，本研究無法判斷樣點間的關係。

## 結 果

我們分別在神木樹基本體上 16 個不同的危害位置，採集 16 群白蟻樣本（圖一，編號 GT1-GT16）。本實驗從這些樣本中取 132 隻個體進行微衛星基因的序列分析（表一、二）。五段所選用的微衛星序列皆成功放大（成功率 98.5%）。在取食神木樹基的白蟻族群中，*CopF6F* 標記上共發現 4 種長度的等位基因；*CopF10F* 標記上共發現 1 種長度的等位基因；*CopF10-4* 標記上共發現 4 種長度的等位基因；*Clac1* 標記上共發現 3 種長度的等位基因；*Cg33* 標記上共發現 1 種長度的等位基因。*CopF10F* 與 *Cg33* 這兩段標記因在本實驗中沒有多態性在分

表一 個體數量大於 10 之樣本基因型親代重建結果

Table 1. Results of parental reconstruction for samples with the number of individuals more than 10

locus	genotype	Sample Code						Punnett square	Observed value <sup>a</sup>	Expected value <sup>a</sup>	p-value <sup>b</sup>	Parent 1	Parent 2
		GT2	GT3	GT4	GT5	GT6	GT10						
<i>CopF6F</i>	191/195	9	1	4	1	4	3	Type 1	22	26	0.80	191/206	195/202
	191/202	5	2	2	3	10	4		26	26			
	206/195	6	3	2	3	7	3		24	26			
	206/202	8	6	3	5	8	2		32	26			
<i>CopF10-4</i>	158/176	9	2	4	4	9	4	Type 1	32	26	0.55	158/167	176/182
	158/182	5	4	3	1	3	2		18	26			
	167/176	8	1	1	5	11	1		27	26			
	167/182	6	5	3	2	6	5		27	26			
<i>Clac1</i>	199/199	10	3	3	2	14	1	Type 4	33	26	0.51	199/206	199/206
	199/206	12	3	6	7	11	6		45	52			
	206/206	6	6	2	3	4	5		26	26			
<i>CopF10F</i>	346/346	28	12	11	12	29	12	-	-	-	-	-	-
<i>Cg33</i>	214/214	28	12	11	12	29	12		-	-			

<sup>a</sup> 將各樣點同一個基因型組合的數量加總為觀測值 (Observed value)，根據基因型的組合形式 (Punnett square) 得到各基因型組合數量的期望值 (Expected value)。

<sup>b</sup> 以費雪精確檢定 (Fisher Exact Test,  $\alpha = 0.05$ ) 檢測觀測值是否偏離預期之比例。

<sup>a</sup> The quantity of the same allele combination of each sample is summed as the observed value, while the proportions of each allele combination listed in Punnett square serve as the expected value.

<sup>b</sup> Fisher's exact test ( $\alpha = 0.05$ ) is conducted to test if the observed value deviates from the expected proportion.

析中被排除。

在 16 群樣本中，GT2、GT3、GT4、GT5、GT6、GT10 這 6 個樣本有取得超過 10 隻個體的基因型資訊，其遺傳組成彼此相同且符合孟德爾遺傳法則，可用於重建親本基因型與單王單后巢群檢定（表一）。以 *CopF6F* 標記為例，六個樣本都觀察到 191/195、191/202、206/195、206/202 這四種基因型，可以 A/C、A/D、B/C、B/D 代表，與旁氏表第一型 (Type 1) A/B 親本與 C/D 親本所產生的子代基因型組合吻合（圖二）。將 6 個樣本所得之基因型觀察值加總，得到 22 (191/195)、26 (191/202)、24 (206/195)、32 (206/202)，將此數值比例與 1:1:1:1 比例所得之預測值 26 (191/195)、26 (191/202)、26 (206/195)、26 (206/202) 做費雪精確檢定 (Fisher Exact Test) 結果為  $p = 0.80$ ，不拒絕單一巢群單王單后的假設。

除了 *CopF10F* 與 *Cg33* 兩個沒有表現多態性的標記，六個樣本在剩下的 *CopF10-4* 與 *Clac1* 兩標記上也表現出彼此相同的親代基因型組合，而所觀察到的基因型組合比例亦不拒絕單一巢群單王單

后的假設（表一），表示 GT2、GT3、GT4、GT5、GT6、GT10 這 6 個樣點皆來自同一單王單后巢群。雖然 GT1、GT7、GT8、GT9、GT11、GT12、GT13、GT14、GT15、GT16 這幾個樣點的個體數量不足 10，無法讓我們推知其親本基因型，但其上檢測出的基因型皆包含於前面所述 GT2、GT3、GT4、GT5、GT6、GT10 這 6 個樣點所觀察到的基因型（表二）。根據以上的結果，我們認為神木樹基上僅存在一個由單王單后所領導的台灣白蟻巢群。

2021 年 6 月 25 日，我們將白蟻餌站裝設於白蟻活動量最大的樣點 GT10。於 7 月 2 日始觀測白蟻活動 (< 50 隻)，而後於 7 月 9 日 (< 50 隻)、7 月 16 日 (> 50 隻) 及 7 月 23 日 (> 100 隻) 皆發現餌站內有活動之白蟻個體，而其他樣點的白蟻活動消失。白蟻餌劑的取食量於 7 月 23 日達到約 95%，因此於該日補充新的白蟻餌劑。於 8 月 2 日，也就是施藥後的第 38 天後，餌站內僅觀察到工蟻和兵蟻的屍體，且其他樣點沒有任何活動的白蟻。其後的 8 月 6 日、8 月 13 日、8 月 27 日和 9 月 3 日，所有

表二 個體數量不足 10 之樣本基因型

Table 2. Genotypes of samples with less than 10 individuals

locus	genotype	GT1	GT7	GT8	GT9	GT11	GT12	GT13	GT14	GT15	GT16
CopF6F	191/195		2	1	2						
	191/202			1		3	1	2			1
	195/206			1	1		1		1	1	
	202/206	1	1				1	1	1		
CopF10-4	158/176		1	1	1				1		1
	158/182			1	2		2	1	1		
	167/176	1	1			3		1			
	167/182		1	1			1		1		1
Clac1	199/199	1	1		1		2	1	1	1	
	199/206		2	2	1	2	1	2			
	206/206			1	1	1			1		1
CopF10F	346/346	1	3	3	3	3	3	3	2	1	1
Cg33	214/214	1	3	3	3	3	3	3	2	1	1

樣點再無任何活動的白蟻。白蟻巢群被滅除的兩年後（2023 年 8 月），該神木樹基仍沒有出現新的白蟻活動，顯示台灣家白蟻巢群已被完全滅除，不再對神木樹基造成危害，也沒有其他白蟻巢群再次入侵。

## 討 論

本研究提供一套基於微衛星標記的檢測流程，過程中我們先取得各樣點的親代基因型組合，將帶有相同親代基因型組合的樣點合併，再對合併後的樣點基因型組合之出現頻率進行是否符合單王單后假設的檢定。本研究的防治案例中，神木樹基上共有 16 個不同的白蟻樣點，所有個體數量大於 10 的樣點在五個標記上的基因型都符合單巢單王單后假設下預期出現的組合，各樣點所重建的親代基因型相同並且通過巢群組成的檢定，我們可以得知這些樣點皆來自同一巢群。至於個體數量不足 10 的樣點，我們沒有發現與前述樣點不同的基因型。另一方面，我們僅在樹基上的其中一個樣點（GT10）上施放餌劑，而樹基上的所有樣點的白蟻活動都受到餌劑的影響而在一個多月後完全消失。這表示樣點間的個體共享了含有藥劑的食物資源，而共享資源正是一個白蟻巢群的行為表現。因此，防治的結果支持了遺傳鑑定的判斷，即神木樹基上的家白蟻族群是來自同一個巢群。

本研究測試了五個標記 (*CopF6F*、*CopF10F*、*CopF10-4*、*Clac1* 和 *Cg33*) 作為台灣地區台灣家白蟻巢群鑑定工具的潛力。此五標記是由 Chouvenec *et al.* (2017) 將前人所發表的家白蟻微衛星標記初步測試，篩選出能成功擴增台灣家白蟻與格斯家白蟻兩物種的序列。在台灣，這五個標記被證實能用於台灣家白蟻與格斯家白蟻的物種鑑定 (Chen, 2022)、兩物種雜交個體判別 (Chen, 2022) 與格斯特家白蟻巢群鑑定 (Lin *et al.*, 2021)，而本研究進一步支持五標記也能用於台灣家白蟻的巢群鑑定。根據 Chen (2022)，台灣家白蟻在 *CopF6F*、*CopF10-4*、*Clac1* 和 *CopF10F* 標記具有遺傳多態性；而格斯家白蟻則在 *CopF6F*、*CopF10-4*、*Clac1* 和 *Cg33* 標記具有遺傳多態性，雖然 *CopF10F* 和 *Cg33* 標記分別在格斯家白蟻及台灣家白蟻上不具多態性，但在兩物種上表現出物種特有的基因型。研究人員或執業人員在缺乏形態資訊分辨物種的場合（例如：樣本破損、樣本過少、缺乏兵蟻可供鑑定時），或者在兩物種共同存在的區域中執行巢群分析時，可以藉由這五個標記同時達到辨認白蟻物種與巢群鑑定的效果。

本研究羅列出所有可能的基因型組合以重建親本基因型，再據親本基因型的異同判別巢群。此方法雖然較直覺且操作起來相當簡便，但其中的運作邏輯追根究柢是仰賴操作人員判斷基因型「相同」或是

「相異」，來達到巢群鑑別的結果，巢群鑑別的效力可能會隨著所使用遺傳標記的數量或多態性程度的不同與改變。研究須確保有敘明前提假設並確認微衛星標記在當地是否表現出多態性。另一方面，在研究使用超過一定數量的標記時，需避免基因分型錯誤 (genotyping error)。操作人員須掌握樣區所在的族群等位基因頻率 (population level allele frequency)，才能避免基因分型錯誤。本研究在鑑定巢群身份時，除了比較樣點之間基因型的異同，其分析流程包含親本基因型重建以及繁殖組成 (是否為單王單后) 的統計檢定，是提供鑑定流程一個內在的檢核機制，讓前提假設錯誤或基因分型錯誤發生時有機會被偵測。

隨著白蟻防治策略逐漸走向區域控制 (areawide control) 與永續管理 (sustainable management) (Su *et al.*, 2016a)，即針對大範圍內的多個巢群進行撲滅，我們將更需要監測區域內所有巢群的位置並監測白蟻活動範圍的演替。本研究示範了基於微衛星的巢群鑑定方法可以有效判斷不同位置所採集的樣本是否屬於同一巢群，協助未來白蟻餌劑的發展與防治策略的擬定，也為家白蟻生物學提供一套有力的研究工具。

## 誌謝

感謝國立中興大學詹富智院長/校長與甘禮銘先生提供實驗場地與材料並協助研究進行。本計畫由國立陽明交通大學生技醫藥核心設施平台國家基因體學臨床及產業應用發展中心提供測序服務 (NSTC 112-2740-B-A49-001)，以及中華民國國家科學及技術委員會 (NSTC 112-2313-B-005-024, NSTC 111-2313-B-005-021) 提供專題研究計畫經費。

## 引用文獻

- Braude S, Hess J, Ingram C.** 2021. Inter-colony invasion between wild naked mole-rat colonies. *J Zool* 313: 37-42. doi: 10.1111/jzo.12834
- Chen G-Y.** 2022. Hybridization between Formosan subterranean termite and Asian subterranean termite in Taiwan [Master thesis]. Taichung, Taiwan: National Chung Hsing University. 100 pp.

- Chen K-H.** 2021. Developing evaluation methods for termiticide used in Taiwan [Master thesis]. Taichung, Taiwan: National Chung Hsing University. 44 pp.
- Chiu C-I, Yeh H-T, Tsai M-J, Li H-F.** 2016. Naturalization and control of *Coptotermes gestroi* (Blattodea: Rhinotermitidae) in a Taiwanese forest. *J Econ Entomol* 109: 1317-1325. doi: 10.1093/jee/tow050
- Chouvenç T, Su N-Y.** 2017. Subterranean termites feeding on CSI baits for a short duration still results in colony elimination. *J Econ Entomol* 110: 2534-2538. doi: 10.1093/jee/tox282
- Chouvenç T, Osorio S, Chakrabarti S, Helmick EE, Li H-F, Su N-Y.** 2017. Assessment of genetic markers for the determination of *Coptotermes formosanus* × *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae) F1 hybrids. *Fla Entomol* 100: 657-659. doi: 10.1653/024.100.0325
- Cornelius ML, Osbrink WL.** 2011. Effect of seasonal changes in soil temperature and moisture on wood consumption and foraging activity of Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *J Econ Entomol* 104: 1024-1030. doi: 10.1603/EC10332
- Evans TA, Forschler BT, Grace JK.** 2013. Biology of invasive termites: a worldwide review. *Annu Rev Entomol* 58: 455-474. doi: 10.1146/annurev-ento-120811-153554
- Gay FJ.** 1969. Species introduced by man, pp. 459-494. In: Krishna K, Weesner FM (eds.), *Biology of Termites*. Academic, New York.
- Goodisman MA, Crozier RH.** 2002. Population and colony genetic structure of the primitive termite *Mastotermes darwiniensis*. *Evolution* 56: 70-83. doi: 10.1111/j.0014-3820.2002.tb00850.x
- Grace J, Tome C, Shelton T, Oshiro R, Yates J.** 1996. Baiting studies and consideration with *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) in Hawaii. *Sociobiology* 28: 511-520.
- Husen TJ, Kamble ST, Stone JM.** 2006.

- Microsatellite genotyping to distinguish colonies and intraspecies genetic variation in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology* 48: 819-835.
- Jarne P, Lagoda PJ.** 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol* 11: 424-429. doi: 10.1016/0169-5347(96)10049-5
- King EG, Spink WT.** 1969. Foraging galleries of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*, in Louisiana. *Ann Entomol Soc Am* 62: 536-542. doi: 10.1093/aesa/62.3.536
- Kistner D.** 1985. A new genus and species of termophilous aleocharinae from mainland China associated with *Coptotermes formosanus* and its zoogeographic significance (Coleoptera: Staphylinidae). *Sociobiology* 10: 93-104.
- Kusaka A, Matsuura K.** 2018. Allee effect in termite colony formation: influence of alate density and flight timing on pairing success and survivorship. *Insectes Soc* 65: 17-24. doi: 10.1007/s00040-017-0580-9
- Lai Y-Y.** 2019. Termite infestation survey of protected old trees and baiting Formosan subterranean termite (Blattodea: Rhinotermitidae) in mango trees [Master thesis]. Taichung, Taiwan: National Chung Hsing University. 57 pp.
- Li H-F, Ye W-M, Su N-Y, Kanzaki N.** 2009. Phylogeography of *Coptotermes gestroi* and *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) in Taiwan. *Ann Entomol Soc Am* 102: 684-693. doi: 10.1603/008.102.0413
- Liang W-R, Maruyama M, Kanao T, Iwata R, Li H-F.** 2020. Discovery of termitophilous rove beetles associated with Formosan subterranean termite *Coptotermes formosanus* in Taiwan, with the first larval description for the tribe Termitohospitini (Coleoptera: Staphylinidae). *Acta Entomol Mus National Prag* 60: 77-87. doi: 10.37520/aemnp.2020.005
- Lin W-J, Chen G-Y, Chiu C-I, Liang W-R, Tsai M-J, Yeh H-T, Li H-F.** 2021. Damage and reinvasion of Asian subterranean termite on trees: a case study of Luchu pine in xiaping tropical botanical garden. *Jour Exp For Nat Taiwan Univ* 35: 49-60. doi: 10.6542/EFNTU.202103\_35(1).0005
- Maruyama M, Iwata R.** 2002. Two new termitophiles of the tribe Termitohospitini (Coleoptera: Staphylinidae: Aleocharinae) associated with *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Can Entomol* 134: 419-432. doi: 10.4039/Ent134419-4
- Meeker ND, Hutchinson SA, Ho L, Trede NS.** 2007. Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. *Biotechniques* 43: 610-614. doi: 10.2144/000112619
- Mullins AJ, Su N-Y, Owens C.** 2011. Invasion and colony expansion of *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) after areawide elimination. *J Econ Entomol* 104: 1687-1697. doi: 10.1603/ec11036
- Oi F.** 2022. A review of the evolution of termite control: A continuum of alternatives to termiticides in the United States with emphasis on efficacy testing requirements for product registration. *Insects* 13: 50. doi: 10.3390/insects13010050
- Owens CB, Su N-Y, Husseneder C, Riegel C, Brown KS.** 2012. Molecular genetic evidence of Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) colony survivorship after prolonged inundation. *J Econ Entomol* 105: 518-522. doi: 10.1603/EC11150
- Rust MK, Su NY.** 2012. Managing social insects of urban importance. *Annu Rev Entomol* 57: 355-375. doi: 10.1146/annurev-ento-120710-100634
- Scheffrahn RH, Su N-Y.** 2005. Distribution of the termite genus *Coptotermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) in Florida. *Fla Entomol* 88: 201-203. doi: 10.1653/0015-4040(2005)

- 088 [0201:DOTTGC]2.0.CO;2
- Schlötterer C, Tautz D.** 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Res 20: 211-215. doi: 10.1093/nar/20.2.211
- Su N-Y.** 1994. Field evaluation of a hexaflumuron bait for population suppression of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). J Econ Entomol 87: 389-397. doi: 10.1093/jee/87.2.389
- Su N-Y.** 2019. Development of baits for population management of subterranean termites. Annu Rev Entomol 64: 115-130. doi: 10.1146/annurev-ento-011118-112429
- Su N-Y, Scheffrahn RH.** 1986. A method to access, trap, and monitor field populations of the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). Sociobiology 12: 299-304.
- Su N-Y, Scheffrahn RH.** 1988. Foraging population and territory of the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) in an urban environment. Sociobiology 14: 353-360.
- Su N-Y, Scheffrahn RH.** 1996. Fate of subterranean termite colonies (Isoptera) after bait applications--an update and review. Sociobiology 27: 253-275.
- Su N-Y, Scheffrahn RH.** 1998. A review of subterranean termite control practices and prospects for integrated pest management programmes. Integr Pest Manag 3: 1-13. doi: 10.1023/A:1009684821954
- Su N-Y, Ban PM, Scheffrahn RH.** 1993. Foraging populations and territories of the eastern subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) in southeastern Florida Environ Entomol 22: 1113-1117. doi: 10.1093/ee/22.5.1113
- Su N-Y, Guidry E, Cottone C.** 2016a. Sustainable management of subterranean termite populations (Isoptera: Rhinotermitidae) in Armstrong Park, New Orleans, with durable baits. J Econ Entomol 109: 1326-1332. doi: 10.1093/jee/tow051
- Su N-Y, Guidry E, Mullins AJ, Cotonne C.** 2016b. Invasion dynamics of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) following the elimination of all detectable colonies in a large area. J Econ Entomol 109: 809-814. doi: 10.1093/jee/tow018
- Tautz D.** 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res 17: 6463-6471. doi: 10.1093/nar/17.16.6463
- Waller D, La Fage J.** 1987. Seasonal patterns in foraging groups of *Coptotermes formosanus* (Rhinotermitidae). Sociobiology 13: 173-181.
- Wallis D.** 1964. Aggression in social insects, pp. 15-22. In: Carthy J, Ebling F (eds.), The Natural History of Aggression, London, New York.
- Wilson EO.** 1971. The insect societies. Harvard University Press, Cambridge, USA. 562 pp.

# Utilizing Microsatellite Markers for Formosan Subterranean Termite *Coptotermes formosanus* Shiraki (Termitidae: Rhinotermitidae) Colony Identification

Guan-Yu Chen<sup>1</sup>, Mu-Xuan Chen<sup>1</sup>, Chun-I Chiu<sup>1,2</sup>, Hou-Feng Li<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan

<sup>2</sup> Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

<sup>3</sup> i-Center for Advanced Science and Technology (i CAST), National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan

\* Corresponding email: houfeng@nchu.edu.tw

Received: 11 October 2023      Accepted: 18 January 2024      Available online: 1 March 2024

## ABSTRACT

The Formosan subterranean termite (*Coptotermes formosanus* Shiraki) is a social insect, and the damage caused by a single termite colony can extend up to one hectare. For assessing whether insecticides effectively eliminate the entire termite colony, the traditional method involves using the mark-release-recapture (MRR) procedure to determine the activity range of a single termite colony. However, this MRR procedure is labor-intensive and time-consuming. Therefore, this study aimed to develop a nest identification process specific to Taiwanese populations using five microsatellite markers. This process involved collecting termites from multiple locations, reconstructing parental genotypes following Mendelian inheritance rules, and determining whether they belong to the same colony based on their parental genotypes. It also involved examining the reproductive structure of the colonies to avoid misidentification due to the presence of multiple kings or queens within a colony. We applied this identification process to a case of termite control, where we found termite activity on the surface of a tree trunk at the National Chung Hsing University in 16 different locations. Termite samples with more than 10 individuals were collected from 6 of these locations. Their reconstructed parental genotypes are the same, fitting the genetic composition of a single-pair-reproductive colony. Although the termites collected from the other 10 locations were fewer than 10 individuals, which is insufficient for reconstructing parental genotypes, the observed genotypes are not different from the other 6 samples, indicating that the 16 locations were infested by the same colony. Bait was only applied to one of the locations on the tree trunk, and after 38 days, all termites were eradicated. The control treatment results supported the conclusion that all termites belonged to a single colony, consistent with the microsatellite identification method. The microsatellite-based nest identification method assisted in determining the colony relationships among samples and will contribute to the development of future strategies for controlling Formosan subterranean termites and the development of baits. Additionally, it provides a powerful research tool for studying the ecology of Formosan subterranean termites.

**Key words:** *Coptotermes formosanus*, pesticide efficacy test, termite control, colony structure