

應用單一步驟巢式複合式聚合酶鏈鎖反應 同步鑑定刺足根蟎、羅賓根蟎及長毛根蟎

劉逸琪¹ 張淑貞*² 陳文華³ 許永斌¹

1. 桃園縣大園鄉 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局新竹分局
2. 台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業試驗所應用動物組
3. 高雄縣鳳山市 行政院農業委員會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所植物保護系

(接受日期：2006年6月8日)

摘 要

劉逸琪、張淑貞*、陳文華、許永斌 2006 應用單一步驟巢式複合式聚合酶鏈鎖反應同步鑑定刺足根蟎、羅賓根蟎及長毛根蟎 植保會刊 48 : 101 – 116

刺足根蟎 (*Rhizoglyphus echinopus* (Fumouze & Robin))、羅賓根蟎 (*R. robini* Claparede) 及長毛根蟎 (*R. setosus* Manson) 為世界性重要害蟎，本研究開發單一步驟巢式複合式聚合酶鏈鎖反應 (Single-step nested multiplex PCR) 技術以同步鑑定此三種根蟎。首先利用一般性引子，增幅放大並解序其核糖體 DNA 18S-28S 片段，根據根蟎種間 ITS1 片段 (the first internal transcribed spacer, ITS1) 核酸序列之差異，設計具種專一性引子，以增幅放大此三種根蟎之專一性 DNA 片段，其片段長度為 533、312、404bp，可清楚地於電泳圖上，直接區分此三種根蟎。同時放入據 18S 及 5.8S 轉錄區序列設計的一般性引子，可提升此單一步驟巢式複合式聚合酶鏈鎖反應方法的靈敏度至 pg 程度。增幅放大的專一性 DNA 片段，若再輔以限制酶 (*Taq* I / *Mfe* I / *Ssp* I / *Sty* I) 可更準確鑑定此三種根蟎。

(關鍵詞：刺足根蟎、羅賓根蟎、長毛根蟎、ITS1 片段、巢式複合式聚合酶鏈鎖反應)

緒 言

根蟎 (bulb mites) 為世界性重要害蟎，目前已紀錄之根蟎屬 (*Rhizoglyphus*) 種類

有 51 種⁽¹⁶⁾，其中又以刺足根蟎、羅賓根蟎及長毛根蟎危害經濟作物最為嚴重。寄主植物廣泛，包括百合科 (Liliaceae)、石蒜科 (Amaryllidaceae)、鳶尾科

* 通訊作者。E-mail: scchang@wufeng.tari.gov.tw

(Iridaceae)、茄科 (Solanaceae) 及十字花科 (Brassicaceae) 等花卉與蔬菜作物之球根、球莖、鱗莖、根莖及塊莖^(3, 16, 17)。根蟎以口器危害植株之根系和地下組織，受害植株常因根部受損、生長受阻、萎縮，最後衰敗死亡。其生活史短，繁殖力強，田間嚴重發生時，常造成大量缺株，亦會間接傳播植物病害⁽³⁰⁾，如唐菖蒲及百合萎凋病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Gladioli* (Massey) Snyder et Hansen)⁽¹⁹⁾、百合莖腐病 (*Rhizoctonia solani* Kuhn)⁽⁹⁾、百合軟腐病 (*Pythium ultimum* Trow)^(9, 10)及唐菖蒲細菌性萎凋病 (*Pseudomonas marginata* McCullough)⁽³⁴⁾等重要病害，當根蟎與病害複合感染，更加速植株的死亡，造成農作物品質與產量之重大損失。

根蟎由於個體微小且生活於土壤和植物組織中，危害初期密度低而不易察覺，每年自國外進口大量種球時，易遭忽略而導致新害蟎之入侵⁽¹⁾。其鑑定主要以成蟎外部形態為主，僅少數報導提及若蟎各齡期之外部形態描述^(3, 37, 38)，且不同根蟎間外部形態極為相似，常易造成鑑別混淆的狀況發生，尤其是刺足根蟎和羅賓根蟎兩種^(17, 37)。

近年來，由於分子生物學的迅速發展，對於 DNA 相關之化學結構、功能瞭解的愈加透徹，據此發展出的 DNA 操作技術，功能日益強大，可運用於害蟲分類、鑑定及親源關係研究上^(13, 35)，亦可同時協助解決蟎蟬面臨的相關問題^(8, 18, 23, 26, 28)。目前已廣泛應用於蟎蟬學如硬蟎 (Ixodida)、節蟎總科 (Eriophyoidea)、節蟎科 (Eriophyidae)、瓦蟎 (*Varroa* spp.)、甲蟎 (oribatids mites)、癢蟎科 (Psoroptidae)、捕植蟎科 (Phytoseiidae)、葉蟎總科 (Tetranychoidae) 及無氣門亞目 (astigmatids) 等之親緣分類鑑定上⁽¹⁵⁾。核糖體是細胞內的重要胞器，大部分動物細胞基因組中，有 100 至 500 套核糖體 DNA，

較易取得進行研究，且兼具序列高度保守之轉錄區 (coding region) 18S、5.8S、28S 片段，及序列變異性較大之非轉錄區 (non coding region) ITS1、ITS2 片段，使其近來常被應用於親緣關係接近之種或族群之研究，探討其變異分化、親緣關係及鑑定等課題^(4, 6, 14, 15, 21, 24)。如以核糖體 DNA ITS2 片段之限制酶圖譜 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析鑑定兩種葉蟎 *Tetranychus pueraricola* Ehara et Gotoh 及 *T. urticae* Koch⁽²¹⁾；以 rDNA ITS2 片段序列鑑定無氣門亞目 (astigmatids)⁽²⁹⁾；以核糖體 ITS1 片段序列結合複合式聚合酶鏈鎖反應 (Multiplex PCR) 鑑定節蟎類害蟎 (*cecidophyopsis mites*)⁽²⁴⁾。另可以粒線體 cytochrome oxidase subunit I (COI) 及 rDNA ITS2 片段的序列分析比對兩種葉蟎 *T. urticae* 及 *T. turkestanii* Ugarov & Nikolskiy 之差異性⁽²⁷⁾；以 12S rRNA 序列設計六種捕植蟎 (phytoseiids) 之具種專一性引子鑑定捕植蟎⁽²²⁾及以 16S 核糖體 DNA 之限制酶圖譜進行六種根蟎之 RFLP 分析⁽⁴⁾；以隨機擴增多形性去氧核糖核酸 (Random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分析長毛捕植蟎 (*Amblyseius longispinosus* Evans) 與溫氏捕植蟎 (*A. womersleyi* Schicha) 間之遺傳變異⁽⁵⁾等。

近年來國內積極發展精緻農業，推廣種植球根花卉，每年自國外輸入上億個種球，隨種球入侵之新害蟎實為一大隱憂，因此加強動植物檢疫制度為管制害蟎入侵之首要工作⁽²⁾。為提昇輸入農產品之重要害蟎檢測及鑑定效率，建立嚴密的檢防疫線，強化我國農產品的國際競爭力，本研究利用 DNA 遺傳特性，建立快速、簡便及高準確性之檢定技術，鑑別刺足根蟎、羅賓根蟎、長毛根蟎等輸入種球上常檢出的根蟎，應用不同根蟎種間核糖體 DNA ITS1 片段序列差異，設計專一性引子可增幅放

大不同長度之專一性 DNA 片段，再結合普遍性引子，進行單一步驟巢式複合式酶鏈鎖反應（Single-step nested multiplex PCR），以提高鑑定之靈敏度及效率。期許開發快速且準確之分子檢定技術，可有效應用於根蟻防檢疫工作中，達到有效管制根蟻之目標。

材料與方法

供試蟲體

因我國仍屬刺足根蟻非疫區，故刺足根蟻樣本，係來自荷蘭空運輸入之天鵝絨、百合、風信子、鬱金香，及自紐西蘭空運輸入之鬱金香等種球上攔截到的樣本，皆送農試所何琦琛博士協助鑑定。而檢出害蟻之貨物都於完成檢疫處理後輸入，國內亦持續監測重要害蟻族群發生情形，均無發現刺足根蟻之立足。羅賓根蟻、長毛根蟻、長肛毛根蟻 (*R. longispinosus* Ho and Chen) 及竹田根蟻 (*R. tsutienensis* Ho and Chen) 等四種樣本，係使用採集自台灣田間，飼養於農試所實驗室內的族群，經單隻飼養繁殖於人工飼料⁽³⁾，其部分子代，製成玻片標本，由外部形態鑑定確認種名，其餘子代，置於 70%酒精，保存於 -80°C 冷凍櫃，以待進一步的序列分析。

基因體 DNA 之製備

參考 Orrego 和 Agudelo-Silva⁽³¹⁾之 DNA 快速萃取流程，將單隻根蟻放入 1.5 ml 的微量離心管中，用熔黏的吸管尖頭磨碎後，加入 200 μ l 之 5% Chelex 100，置於 100°C 水浴鍋中 15 min，旋即劇烈震盪 2-3 min，再以 10,000 g 離心 15 min，上清液即為 DNA 模版來源。

複合式 PCR 靈敏度測試之模版 DNA，則以 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., USA) 萃取，將單隻根蟻置於 600 μ l lysis buffer 中，

用熔黏的吸管尖頭磨碎後，加入 17.5 μ l 之 20 mg/ml proteinase K，置於 65°C 乾浴鍋中 10 min，再加入 3 μ l RNaseA solution，繼續於 65°C 中反應 10 min。隨即改置於室溫 5 min 後，加入 200 μ l protein precipitation solution 後劇烈震盪，再改置於冰浴 5 min，續以 14,500 g 離心 4 min，取出上清液置於新微離心管中，加入 600 μ l isopropanol，置於室溫 10 min，再以 14,500 g 離心 10 min，倒掉上清液，並以 70%酒精清洗 DNA 沈澱兩次，真空抽乾後，回溶於 20 μ l 無菌水中，此即為 DNA 模版來源。

核糖體 DNA 18S-28S 及 ITS1 片段之增幅與定序

增幅 18S-28S rDNA 片段的引子對係依據 *Rhizoglyphus* sp. (GenBank accession number: AF287236)、*Sancassania ochoai* (GenBank: AY191833) 及 *Sancassania salasi* (GenBank: AY191834) 序列所設計，上、下游引子分別為 18SRh1: 5'-GATTACGTCCCTGCCCTTTG-3' 和 28SRh2: 5'-CTCCTTGGTCCGTGTTTCAA-3'，其中 18S Rh1 在 18S rDNA 片段末端，28SRh2 在 28S rDNA 片段中端。增幅 ITS1 片段序列的引子則為 ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' 和 RNA2: 5'-CACGAGCCGAGTGATCCACCGCTAAGAGT-3'⁽³⁹⁾。每一反應總體積為 20 μ l，內含 *Taq* Plus 0.75 U (*Taq* DNA polymerase + *Pfu* DNA polymerase)、1X reaction buffer、250 μ M dNTPs (GeneMark, Taiwan)、雙向引子 (各 20 pmoles) 及上述模板 DNA 10 μ l。PCR 增幅以 Perkin-Elmer 公司的 GeneAmp[®] PCR System 2400 迴溫循環器進行，於 95°C 3 min；隨即進行 95°C 1 min，55°C 1 min，72°C 1 min，共 30 個循環；最後以 72°C 3 min 使其反應完全。PCR 產物以 1.4%瓊脂凝膠 (agarose gel)，於 100 V 電壓條件

下進行 30 min 電泳，結束後以溴化乙錠 (ethidium bromide, 5 µg/ml) 染色，並於紫外燈箱上觀察結果及記錄。

將上述增幅放大的 DNA 產物，由瓊脂凝膠上切下，並以 Micro-Elute DNA Clean/Extraction kit (GeneMark, Taiwan) 純化。續採用 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, California, USA) 進行 PCR 產物基因選殖，將純化後的 DNA 接入 pCR[®] II-TOPO[®] 載體後，轉形至 TOP10 勝任細胞 (Invitrogen, California, USA) 中，利用含有 X-gal/IPTG 的 LB/ampicillin 培養基初步篩選三個成功的轉基因細菌選殖株，再以 LB/ampicillin 培養液於 37°C 恆溫箱中大量培養、萃取其重組 DNA 質體後，以 *EcoR* I 確認嵌入 DNA 片段，隨即將此菌液塗於 LB/ampicillin 培養基，送交源資國際生物科技股份有限公司進行核酸定序。此三個成功的轉基因細菌選殖株序列再以 Vector NTI[®] Suite 9.0 軟體 (Invitrogen, California, USA) 之 ContigExpress[™] 程式進行整理。每種不同來源葉蟻各 DNA 片段序列均做三隻個體重複。

ITS1 片段序列分析及專一性引子設計

不同種根蟻的 ITS1 片段序列，以 Vector NTI[®] Suite 9.0 軟體之 AlinX[®] 程式進行多序列比對分析，比對根蟻種間之核酸序列相似值 (pairwise similarity)。再依據進口球根作物上最常見之刺足根蟻、羅賓根蟻、長毛根蟻的 ITS1 片段核酸序列差異，設計具種專一性引子。引子合成係送交 Bio Basic Inc. (Canada) 代為合成。

專一性引子之巢式複合式 PCR 測試

以 QIAGEN[®] Multiplex PCR 試劑組 (QIAGEN, USA) 進行單管巢式複合式 PCR 反應分析。每一反應總體積為 20 µl，內含 10 µl 模板 DNA、1X QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (內含

HotStartTaq[®] DNA polymerase、buffer、dNTP Mix)，五個引子 ITS5/RNA2/Re8/Rr7/Rs7 (各 10 pmol)。PCR 增幅以 Perkin-Elmer 公司的 GeneAmp[®] PCR System 2400 迴溫循環器進行，於 95°C 15 min；隨即進行 95°C 0.5 min，55°C 1.5 min，72°C 1.5 min，共 25 個循環；最後以 72°C 10 min 使其反應完全。PCR 產物以 2.0% 瓊脂凝膠於 1X TBE 緩衝液中進行電泳，結束後以溴化乙錠染色，並於紫外燈箱上觀察結果及記錄。

專一性引子巢式複合式 PCR 之靈敏度測試

以 Wizard Genomic DNA Purification Kit 萃取單隻根蟻 DNA，最終溶於 20 µl 無菌水中，再以光譜儀 WPA Biowave Spectrophotometer S2100 (Biochrom Ltd, UK) 測其 DNA 濃度。以二倍系列稀釋單隻刺足根蟻、羅賓根蟻、長毛根蟻之 DNA 混和原液為模板 DNA，再以一般性引子及具種專一性引子 ITS5/RNA2/Re8/Rr7/Rs7 混合液，進行巢式複合式 PCR 之靈敏度測試。每一反應總體積為 20 µl，內含 1 µl 上述模板 DNA、1X QIAGEN Multiplex PCR Master Mix，五個引子 ITS5/RNA2/Re8/Rr7/Rs7 (各 10 pmol)。其 PCR 進行條件同上述巢式複合式 PCR 反應，PCR 後產物，再以電泳觀察其專一性條帶的表現情形，有專一性條帶表現的最小模板 DNA 量即為其靈敏度。

專一性 DNA 片段限制酶圖譜分析

根據根蟻在核糖體 DNA ITS1 區域，以具種專一性引子所增幅出之專一性片段序列，運用 DNASTAR 軟體 (DNASTAR, Inc., USA) 之 MapDraw 程式，搜尋適合的限制酶。以 PCR 增幅放大根蟻之專一性 DNA 片段，再由瓊脂凝膠上切下此片段，以 Micro-Elute DNA Clean/Extraction kit (GeneMark, Taiwan) 純化，純化後的 DNA

片段，分別以上述尋得之限制酶 *Taq* I、*Ssp* I、*Mfe* I、*Sty* I 進行剪切，隨即置於 1.4% 瓊脂凝膠電泳，結束後以溴化乙錠染色，並於紫外燈箱上觀察結果及記錄。

結 果

基因體 DNA 之製備

以 200 μ l 的 5% Chelex 100 萃取單隻根蟻 DNA 的方法，扣除 Chelex 體積，萃取後的 DNA 溶液有 158 μ l，濃度較以 Wizard Genomic DNA Purification Kit 萃取者為低，但仍足以進行 PCR，且萃取流程需時較短僅約 40 分鐘，所以定為本研究之主要萃取 DNA 方法。但因其 DNA 濃度太低，以 10 μ l 的石英管盛裝此 DNA 原液仍無法以現有之光譜儀偵測，故進行專一性引子巢式複合式 PCR 之靈敏度測試時，DNA 來源改以 Wizard Genomic DNA Purification Kit 萃取單隻根蟻 DNA，最終溶於 20 μ l 無菌水中，萃取流程約需 1 小時 10 分鐘。

核糖體 DNA 18S-28S 片段之分析

以 18SRh1/28SRh2 引子對，可增幅刺足根蟻、羅賓根蟻及長毛根蟻等三種根蟻的 18S-28S rDNA 序列，不同作物、地區之刺足根蟻序列略有差異，長度在 2543-2545 bp 間，其餘兩種根蟻長度各為 2535、2364 bp，並已登記於 NCBI 基因庫，自荷蘭輸入之風信子及紐西蘭輸入之鬱金香上的刺足根蟻序號分別為 DQ372566 及 DQ372567，實驗室飼養之羅賓根蟻及長毛根蟻序號分別為 DQ372568 及 DQ372569。比對節蟬 *Cecidophyopsis grossulariae*、*C. ribis* 及 *Phyllocoptes gracilis* 的 18S-28S 片段序列 AJ297572、AJ297574、AJ297573⁽¹⁸⁾，據此分出此三種根蟻之 ITS1 片段長度各為 516-519、509、413 bp，ITS2 片段長度各為 375-376、365、371 bp，根蟻之 ITS1

片段明顯較長，變異也較大，較適合用來設計具種特異性引子，所以後續針對不同根蟻的 ITS1 片段序列分析，並據此建立其鑑定方法。

核糖體 DNA ITS1 片段序列分析

利用一般性引子 ITS5/RNA2 增幅刺足根蟻、長肛毛根蟻、竹田根蟻、羅賓根蟻及長毛根蟻等五種根蟻之核糖體 ITS1 片段，結果可各明顯增幅出一 DNA 片段（圖一）此片段包含部分 18S 及 5.8S 片段，經定序後，不同作物、地區之刺足根蟻長度略有差異在 1011-1014 bp 間，其餘四種根蟻長度各為 976、841、916、1130 bp，AT 含量各為 70.4、63.2、52.1、53.9、67.4%。

不同根蟻 ITS1 片段間的核酸序列相似值，如表一所示，其中不同地區刺足根蟻的序列相似值高達 0.99~1.0，可見刺足根蟻在北半球荷蘭及南半球紐西蘭兩地之變化不大。而刺足根蟻、羅賓根蟻、長毛根蟻、長肛毛根蟻及竹田根蟻不同種間之核酸序列相似值在 0.48 至 0.63 間，核酸序列差異大，根據其序列比對圖（圖二），設計進口球根作物上最常見之刺足根蟻、羅賓根蟻、長毛根蟻的下游具種專一性引子 Re8、Rr7、Rs7（表二），預期可各與一般性上游引子 ITS5，增幅放大出 522、312 及 404 bp 等不同長度的 DNA 片段。

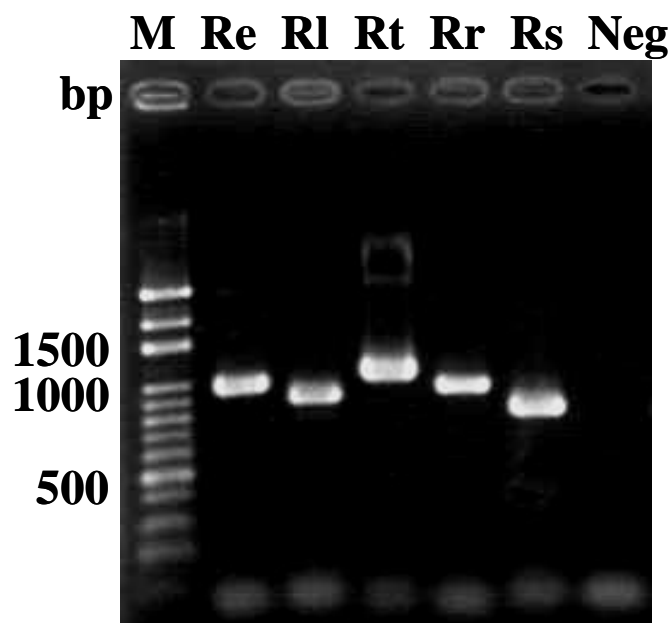
專一性引子之巢式複合式 PCR 測試

混和一般性引子 ITS5/RNA2 及刺足根蟻、羅賓根蟻、長毛根蟻下游具種專一性引子 Re8/Rr7/Rs7，加入不同來源之 DNA 模板，進行巢式複合式 PCR 反應，測試這些引子之專一性。結果均如預期，在相對應處均可產生專一性 PCR 產物（圖三），且無其他非專一性 DNA 條帶出現。至於一般性引子 ITS5/RNA2 放大之 ITS1 片段，則因進行複合式 PCR 時，DNA 片段小、與

表一、不同根蟎間核糖體 DNA ITS1 片段之核酸序列相似值
Table 1. Pairwise similarity of rDNA ITS1 region among bulb mites¹⁾

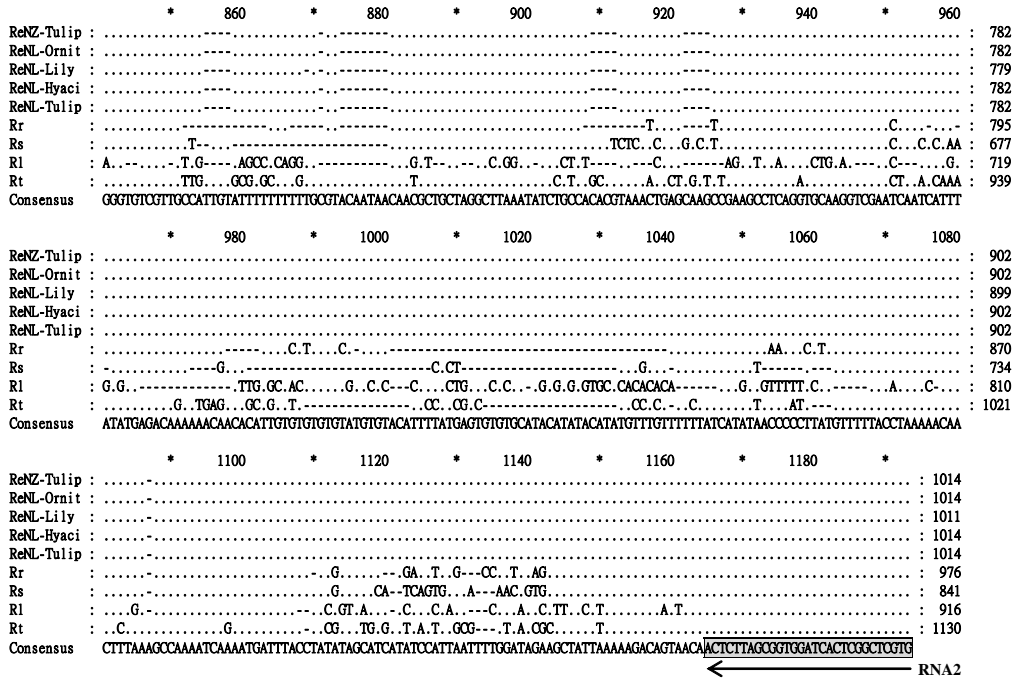
Species	<i>R. echinopus</i>					<i>Rl</i>	<i>Rr</i>	<i>Rs</i>	<i>Rt</i>
	NZ-T	NL-O	NL-L	NL-H	NL-T				
<i>Rhizoglyphus echinopus</i> NZ-T	-	1.00	0.99	1.00	1.00	0.57	0.63	0.58	0.58
<i>R. echinopus</i> NL-O		-	0.99	1.00	1.00	0.57	0.63	0.58	0.58
<i>R. echinopus</i> NL-L			-	1.00	0.99	0.57	0.63	0.58	0.58
<i>R. echinopus</i> NL-H				-	1.00	0.57	0.63	0.58	0.58
<i>R. echinopus</i> NL-T					-	0.57	0.63	0.58	0.58
<i>R. longispinosus</i> (<i>Rl</i>)						-	0.52	0.68	0.48
<i>R. robini</i> (<i>Rr</i>)							-	0.57	0.65
<i>R. setosus</i> (<i>Rs</i>)								-	0.50
<i>R. tsutiensis</i> (<i>Rt</i>)									-

¹⁾ NZ-T: New Zealand-Tulip; NL-O: Netherlands-Ornithogalum; NL-L: Netherlands-Lily; NL-H: Netherlands-Hyacinth; NL-T: Netherlands-Tulip.



圖一、以一般性引子 ITS5/RNA2 進行 PCR 放大刺足根蟎 (Re)、長肛毛根蟎 (Rl)、竹田根蟎 (Rt)、羅賓根蟎 (Rr) 及長毛根蟎 (Rs) 之核糖體 DNA ITS1 片段。Neg 為無 DNA 對照組。M 為核酸標準標誌。

Fig. 1. PCR-amplified ITS1 region of rDNA from *Rhizoglyphus echinopus* (Re), *R. longispinosus* (Rl), *R. tsutiensis* (Rt), *R. robini* (Rr) and *R. setosus* (Rs) using universal primers ITS5/RNA2. Neg, negative control (no DNA added). M, markers.



圖二、刺足根蟻 (Re)、羅賓根蟻 (Rr)、長毛根蟻 (Rs)、長肛毛根蟻 (Rl) 及竹田根蟻 (Rt) 之核糖體 DNA ITS1 片段序列。相同鹼基以 “.” 表示；間斷處以 “-” 表示，陰影區域為引子序列，下方之箭頭為引子方向。NZ-Tulip：紐西蘭鬱金香；NL-Orni：荷蘭天鵝絨；NL-Lily 荷蘭百合；NL-Hyac：荷蘭風信子；NL-Tulip：荷蘭鬱金香。

Fig. 2. ITS1 sequences of rDNA from *Rhizoglyphus echinopus* (Re), *R. robini* (Rr), *Rhizoglyphus setosus* (Rs), *R. longispinosus* (Rl) and *R. tsutiensis* (Rt). Dot, same nucleotide; dash, gap; shaded regions, sequence of primers; arrows, the direction of primers. NZ-Tulip: New Zealand-Tulip; NL-Orni: Netherlands-Ornithogalum; NL-Lily: Netherlands-Lily; NL-Hyac: Netherlands-Hyacinth; NL-Tulip: Netherlands-Tulip.

表二、三種根蟻之下游專一性引子及其與核糖體 DNA ITS1 片段一般性上游引子 ITS5 之增幅長度

Table 2. List of species-specific rDNA ITS1 reverse primers and the expected DNA fragment size amplified by PCR in combination with the universal forward primer ITS5

Species	Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	expected DNA fragment size (bp)	Tm (°C)
<i>Rhizoglyphus echinopus</i>	Re8	TCAACACACAATACTTGCCTGCGT	522	59.6
<i>R. robini</i>	Rr7	ACAGAGTCAAATTGGAGAATGTGT	312	54.6
<i>R. setosus</i>	Rs7	CAGTCACTGACAAGCGTAAAGTAC	404	55.6

引子序列專一性高的片段會優先被合成，所以在此圖不見 ITS1 片段，但當提高模版 DNA 量或增多 PCR 循環數目時，則可清楚於電泳圖上見到 ITS1 片段。若樣本混有上述兩種以上根蟻，亦可由電泳圖上看出(圖三)。由此結果可知，所設計之具種專一性引子，確實極具專一性，可實際應用於此三種根蟻之診斷及鑑定。

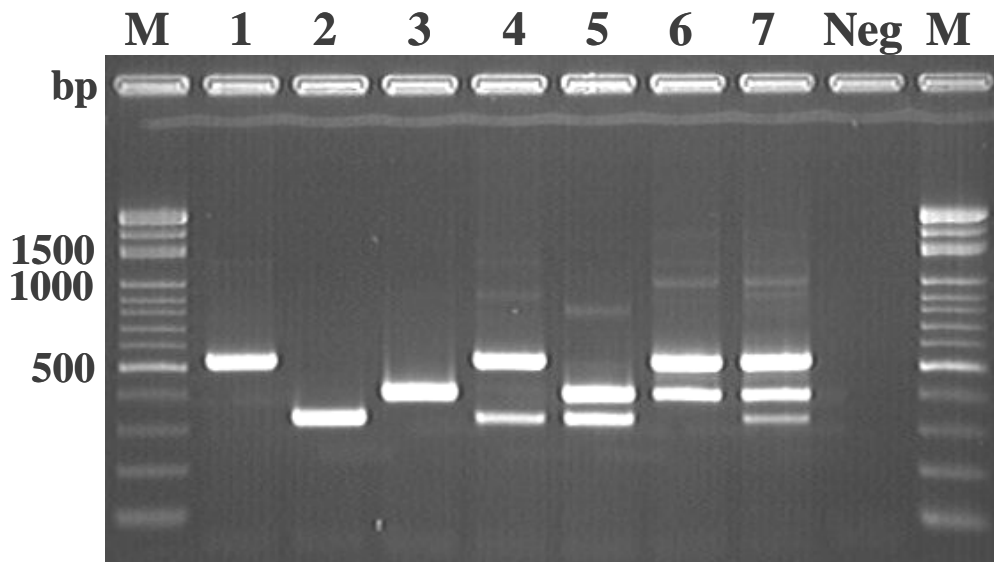
專一性引子巢式複合式 PCR 之靈敏度測試

單隻根蟻以 Wizard Genomic DNA Purification Kit 萃取後之 DNA 原液全部體積為 20 μ l，濃度約為 0.4-1.0 ng/ μ l，單隻根蟻萃取後的 DNA 共約 8-20 ng。取 1 μ l 萃

取後的 DNA 原液，作為 DNA 模版來源，以二倍序列稀釋 DNA 濃度，進行巢式複合式 PCR 之靈敏度測試。結果如圖四，刺足根蟻 DNA 原液稀釋至 2⁻⁹、羅賓根蟻 DNA 原液稀釋至 2⁻⁷、長毛根蟻 DNA 原液稀釋至 2⁻⁶，仍可測得專一性 DNA 條帶，故可知以巢式複合式 PCR 方式，分析根蟻之靈敏度可達 pg 程度。

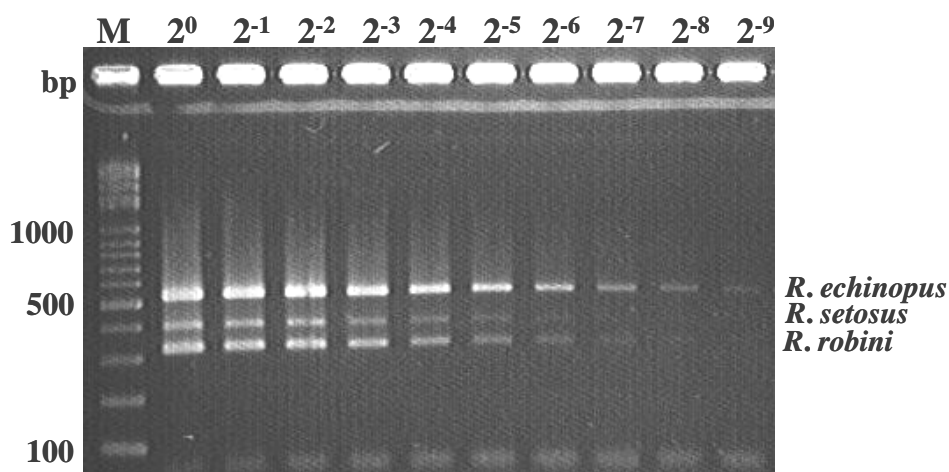
專一性 DNA 片段限制酶圖譜分析

刺足根蟻、羅賓根蟻及長毛根蟻，在核糖體 DNA ITS1 區域專一性片段之限制酶剪切結果，如圖五。限制酶 *Taq* I 可同時剪切此三種根蟻之專一性 DNA 片段，刺足



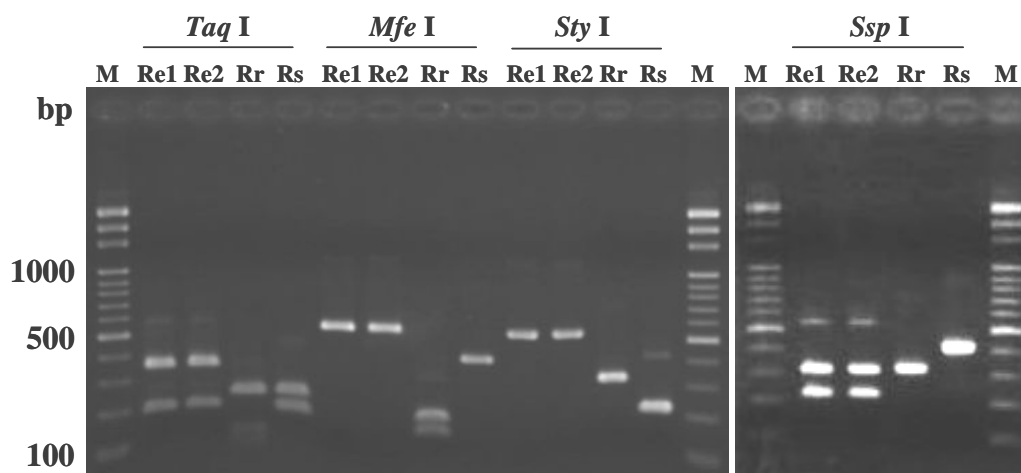
圖三、結合一般性引子 ITS5/RNA2 與下游具種專一性引子 Re8/Rr7/Rs7 進行巢式複合式 PCR，以同時檢測刺足根蟻、羅賓根蟻及長毛根蟻之電泳圖。DNA 模板如下：行 1 為刺足根蟻；行 2 為羅賓根蟻；行 3 為長毛根蟻；行 4 為刺足根蟻加羅賓根蟻；行 5 為羅賓根蟻加長毛根蟻；行 6 為刺足根蟻加長毛根蟻；行 7 為刺足根蟻加羅賓根蟻加長毛根蟻；Neg 為無 DNA 對照組；M 為核酸標準標誌。

Fig. 3. DNA bands amplified from DNAs of *Rhizoglyphus echinopus*, *R. robini* and *R. setosus* using mixtures of universal primers ITS5/RNA2 and species-specific reverse primers Re8/Rr7/Rs7 by nested multiplex PCR. 1 = *R. echinopus*; 2 = *R. robini*; 3 = *R. setosus*; 4 = *R. echinopus* plus *R. robini*; 5 = *robini* plus *R. setosus*; 6 = *R. echinopus* plus *R. setosus*; 7 = *R. echinopus* plus *R. robini* plus *R. setosus*. Neg, negative control (no DNA added). M, markers.



圖四、結合一般性引子 ITS5/RNA2 與下游具種專一性引子 Re8/Rr7/Rs7 進行巢式複合式 PCR 之靈敏度測試。DNA 模板如下：行 2 為刺足根蟎、長毛根蟎及羅賓根蟎 DNA 原液混合；行 3 至行 11 為三種根蟎 DNA 混合原液持續二倍序列稀釋，由 2^{-1} 至 2^{-9} ；M 為核酸標準標誌。

Fig. 4. Relative sensitivity of the nested multiplex PCR with mixtures of universal primers ITS5/RNA2 and species-specific primers Re8/Rr7/Rs7. Lane 2, the mix DNA stock of *Rhizoglyphus echinopus*, *R. robini* and *R. setosus*. Lane 3-11, two fold serial dilutions ranging from 2^{-1} to 2^{-9} from 1 μ l of DNA stock of three bulb mites; M, markers.



圖五、以限制酶剪切根蟎核糖體 DNA ITS1 區域之專一性片段。Re1 為刺足根蟎來自紐西蘭鬱金香；Re2 為刺足根蟎來自荷蘭風信子；Rr 為羅賓根蟎；Rs 為長毛根蟎；M 為核酸標準標誌。

Fig. 5. PCR-amplified species-specific ITS1 region of rDNA from bulb mites digested with restriction enzymes. Re1, *Rhizoglyphus echinopus* from tulip of New Zealand; Re2, *R. echinopus* from hyacinth of Netherlands; Rr, *R. robini*; Rs, *R. setosus*; M, markers.

根蟻可被剪切成 183 及 339 bp 兩個片段；羅賓根蟻可被剪切成 53、83 及 176 bp，但因 53 及 83 bp 長度太相近，且其長度太短，電泳圖上較模糊不清；長毛根蟻可被剪切成 175 及 229 bp 兩個片段，各種根蟻經剪切後的 DNA 片段長度各不相同，可以目視區分這三種根蟻。限制酶 *Mfe* I 僅可剪切羅賓根蟻之專一性 DNA 片段成 129 及 183 bp 兩個片段，無法剪切其餘兩種根蟻之專一性 DNA 片段。限制酶 *Sry* I 僅可剪切長毛根蟻之專一性 DNA 片段成 195 及 209 bp，但因二者長度太相近，電泳圖上只見一段 DNA，無法剪切其餘兩種根蟻之專一性 DNA 片段。限制酶 *Ssp* I 僅可剪切刺足根蟻之專一性 DNA 片段成 218 及 304 bp 兩個片段，無法剪切其餘兩種根蟻之專一性 DNA 片段。利用這四種限制酶進行 PCR-RFLP 分析，可更精確鑑定此三種根蟻。

討 論

本研究應用核糖體基因轉錄區之高度保守及非轉錄區序列變異性較大之特性，增幅刺足根蟻、羅賓根蟻及長毛根蟻之核糖體 DNA 18S-28S 片段。各類生物之 ITS1、ITS2 片段長短不一，本類根蟻定序後發現 ITS1 序列長度較長且變異性較大，據此選取 ITS1 片段序列設計專一性引子。設計專一性引子時，應特別留意其 T_m 值不要相差太多，以便於相同 PCR 條件下，得以進行複合式 PCR 反應，增幅之片段大小需相差 50 bp 以上，才可清楚地於電泳圖上，直接區分及鑑定此三種根蟻^(14, 36)。

現今 PCR 檢測技術，除利用基礎 PCR 反應增幅標的 DNA 並以電泳檢測外，亦衍生出許多新穎的 PCR 檢測法，如反轉錄 PCR 法 (reverse transcriptase PCR)、巢式 PCR 法 (nested PCR)、複合式 PCR 法 (multiplex PCR)、及定量 PCR 法 (real-time

PCR) 等，以加強檢測法之靈敏性及便捷性。目前已有多篇研究報告利用衍生之 PCR 檢測法以快速檢定許多重要疫病及害蟲^(6, 7, 11, 12, 20, 25, 32, 36)，本研究結合複合式 PCR 法及巢式 PCR 法，發展同步且具高靈敏性之刺足根蟻、羅賓根蟻及長毛根蟻檢測法，係因複合式 PCR 僅需花較少經費之基礎 PCR 儀器即可進行分析，較節省時間及 PCR 反應耗材，且可同時在同一次 PCR 反應內鑑定不同害蟻，應用於大量樣品檢定篩檢時較為經濟⁽³³⁾。惟開發複合式 PCR 分析法並不容易，最常碰到的問題為，需設計多條可在同一反應管進行反應的引子，這些引子可作用於各自的目標位置，且不會互相干擾對方，造成錯誤反應。再者所設計之引子，其增幅產物，需可輕易於電泳圖上，直接區分及鑑定特定目標物。為了克服這些問題，本研究於 ITS1 片段序列，多次篩選及分析測試，符合條件之專一性引子，最後終於成功篩選出三條專一性引子，可實際應用於複合式 PCR 反應，同步鑑定刺足根蟻、羅賓根蟻及長毛根蟻。根蟻體形極為微小，檢疫上常見之卵及幼蟻體型更小，惟恐萃取所得之 DNA 濃度太低，PCR 檢定法不足以正確檢定出害蟻種類，故加以採用巢式 PCR，同時加入一般性引子，以在相同 PCR 反應時間內，同時增加模版 DNA 的量，可提高檢測之靈敏度。巢式 PCR 反應分為單管巢式 PCR (one-tube nested PCR) 及雙管巢式 PCR (two-tube nested PCR)，本研究採取單管單一步驟巢式 PCR 分析法，進行害蟻檢定，可降低換管造成污染之風險，並兼具節省操作時間及耗材等優點。

為更確定根蟻種類，提供更強力的證據，可再將此專一性 DNA 片段以限制酶剪切，但會多需 2.5 小時操作時間。在做專一性 DNA 片段之限制酶剪切時，若反應內的 DNA 太多，或限制酶量、反應時間不足，則會在電泳圖上看到殘存的原始專一性

DNA 片段，如圖五，以 *Ssp* I 剪切 *Re1*、*Re2* 的電泳圖，但不影響最後結論。

總之，本研究發展之單一步驟巢式複合式 PCR 檢定法，提供快速、經濟且有效率之檢測方式，同步檢定刺足根蟎、羅賓根蟎及長毛根蟎，可實際應用於檢防疫之實務工作，以達到預防及合理管制根蟎之目標。

謝 辭

本研究承行政院農業委員會 89 科技-6.2-檢-41 及 93 農科-1.9.1-農-C1 計畫經費補助。自荷蘭及紐西蘭空運輸入種球上攔截到的根蟎樣本，皆承農業試驗所何琦琛博士協助鑑定，試驗期間承楊侑蓁及王思涵小姐協助養蟎及相關試驗執行，謹此一併致謝。

引用文獻

- 張世忠、柯俊成 編。2003。進口植物及其產品檢出之有害生物統計與圖鑑—害蟲篇。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局暨國立台灣大學。台北。400 頁。
- 陳文華、劉玉章、何琦琛。1999。根蟎在台灣之發生與分布。中華昆蟲特刊第十二號（第二屆蟎蜱學研討會）：105-119。
- 陳文華、劉玉章、何琦琛。2002。長毛根蟎 (*Rhizoglyphus setosus*) 的生活史、分布及其寄主植物。植保會刊 44：341-352。
- 葉文彬。1999。利用分生技術鑑定蟎類。中華昆蟲特刊第十二號（第二屆蟎蜱學研討會）：49-62。
- 葉文斌、何佳霖、許法祖、何琦琛。2000。利用逢機擴增多形性核酸分析長毛捕植蟎 (*Amblyseius longispinosus*) 及溫氏捕植蟎 (*A. womersleyi*) (蟎蜱亞綱：捕植蟎科) 的遺傳變異。中華昆蟲 20：335-346。
- 劉逸琪。2004。西方花薊馬之分子鑑定：rDNA 之單管巢式聚合酶鏈鎖反應。植保會刊 46：27-46。
- Aguero, M., Fernandez, J., Romero, L. J., Zamora, M. J., Sanchez, C., Belak, S., Arias, M., and Sanchez-Vizcaino, J. M. 2004. A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever in clinical samples. Vet. Res. 35: 551-563.
- Anderson, J. M., Ammerman, N. C., and Norris, D. E. 2004. Molecular differentiation of metastriate tick immatures. Vector-Borne Zoonotic Dis. 4: 334-342.
- Ascerno, M., Pflieger, F. L., and Wilking, H. F. 1981. Effect of root rot and *Rhizoglyphus robini* on greenhouse-forced easter lily development. Environ. Entomol. 10: 947-949.
- Ascerno, M., Pflieger, F. L., Morgan, F., and Wilking, H. F. 1983. Relationship of *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae) to root rot control in greenhouse-forced easter lily. Environ. Entomol. 12: 422-425.
- Bertolini, E., Olmos, A., Lopez, M. M., and Cambra, M. 2003. Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. Phytopathology 93: 286-292.

12. Caballero, O., Menezes, C., Costa, M., Fernandes, S., Anacleto, T., Oliveira, R., Viotti, E., Tavora, E., Vilaca, S., Sabbaga, E., Paula, F., Tavora, L., Villa, L., and Simpson, A. 1997. Highly sensitive single-step PCR protocol for diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 35: 3192-3197.
13. Caterino, M. S., Cho, S., and Sperling, F. A. H. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Ann. Rev. Entomol.* 45: 1-54.
14. Chang, S. H., Hu, N. T., Hsin, C. Y., and Sun, C. N. 2001. Characterization of differences between two *Trichogramma* wasps by molecular markers. *Biol. Control* 21: 75-78.
15. Cruickshank, R. H. 2002. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Syst. Appl. Acarol.* 7: 3-14.
16. Diaz, A., Okabe, K., Eckenrode, C. J., Villani, M. G., and Oconnor, B. M. 2000. Biology, ecology, and management of the bulb mites of the genus *Rhizoglyphus* (Acari: Acaridae). *Exp. Appl. Acarol.* 24: 85-113.
17. Fan, Q. H., and Zhang, Z. Q. 2003. *Rhizoglyphus echinopus* and *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae) from Australia and New Zealand: identification, host plants and geographical distribution. *Syst. Appl. Acarol. Special Pub.* 16: 1-16.
18. Fenton, B., Birch, A. N. E., Malloch, G., Lanham, P. G., and Brennan, R. M. 2000. Gall mite molecular phylogeny and its relationship to the evolution of plant host specificity. *Exp. Appl. Acarol.* 24: 831-861.
19. Forsberg, J. L. 1959. Relationship of the bulb mite *Rhizoglyphus echinopus* to bacterial scab of gladiolus. *Phytopathology* 49: 538.
20. Garipey, T. D., Kuhlmann, U., Haye, T., Gillott, C., and Erlandson, M. 2005. A single-step multiplex PCR assay for the detection of European *Peristenus* spp., parasitoids of *Lygus* spp. *Biocontrol Sci. Tech.* 15: 481-495.
21. Gotoh, T., Gutierrez, J., and Navajas, M. 1998. Molecular comparison of the sibling species *Tetranychus pueraricola* Ehara et Gotoh and *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Entomol. Sci.* 1: 55-57.
22. Jeyaprakash, A., and Hoy, M. A. 2002. Mitochondrial 12S rRNA sequences used to design a molecular ladder assay to identify six commercially available phytoseiids (Acari: Phytoseiidae). *Biol. Control* 25: 136-142.
23. Klimov, P. B., Lekveishvili, M., Dowling, A. P. G., and Oconnor, B. M. 2004. Multivariate analysis of morphological variation in two cryptic species of *Sancassania* (Acari: Acaridae) from Costa Rica. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97: 322-345.
24. Kumar, P. L., Fenton, B., and Jones, A. T. 1999. Identification of cecidophyopsis mites (Acari: Eriophyidae) based on variable simple sequence repeats of ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 sequences via multiplex PCR. *Insect Mol. Biol.* 8: 347-357.
25. Madani, M., Subbotin, S. A., and Moens, M. 2005. Quantitative detection of the potato cyst nematode, *Globodera pallida*,

- and the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*, using real-time PCR with SYBR green I dye. *Mol. Cellular Probes* 19: 91-86.
26. Maraun, M., Heethoff, M., Schneider, K., Scheu, S., Weigmann, G., Cianciolo, J., Thomas, R. H., and Norton, R. A. 2004. Molecular phylogeny of oribatid mites (Oribatida, Acari): evidence for multiple radiations of parthenogenetic lineages. *Exp. Appl. Acarol.* 33: 183-201.
 27. Navajas, M., Gutierrez, J., Bonato, O., Bolland, H. R., and Mapangou-Divassa, S. 1994. Intraspecific diversity of the cassava green mite *Mononychellus progresivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. *Exp. Appl. Acarol.* 18: 351-360.
 28. Navajas, M., and Fenton, B. 2000. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Exp. Appl. Acarol.* 24: 751-774.
 29. Noge, K., Mori, N., Tanaka, C., Nishida, R., Tsuda, M., and Kuwahara, Y. 2005. Identification of astigmatid mites using the second internal transcribed spacer (ITS2) region and its application for phylogenetic study. *Exp. Appl. Acarol.* 35: 29-46.
 30. Okabe, K., and Amano, H. 1991. Penetration and population growth of the robine bulb mite, *Rhizoglyphus robini* Claparede (Acari: Acaridae), on healthy and *Fusarium*-infected Rakkyo bulbs. *Appl. Entomol. Zool.* 26: 129-136.
 31. Orrego, C., and Agudelo-Silva, F. 1993. Genetic variation in the parasitoid wasp *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) revealed by DNA amplification of a section of the nuclear ribosomal repeat. *Florida Entomol.* 76: 519-524.
 32. Patsoula, E., Spanakos, G., Sofianatou, D., Parara, M., and Vakalis, N. C. 2003. A single-step, PCR-based method for the detection and differentiation of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 97: 15-21.
 33. Payungporn, S., Phakdeewirot, P., Chutinimitkul, S., Theamboonlers, A., Keawcharoen, J., Oraveerakul, K., Amonsin, A., and Poovorawan, Y. 2004. Single-step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. *Viral Immunol.* 17: 588-593.
 34. Poe, S. L., Noble, W. E., and Stall, E. E. 1979. Acquisition and retention of *Pseudomonas marginata* by *Anoetus feroniarum* and *Rhizoglyphus robini*. pp. 119-124. *In: J. G. Rodriguez [ed.], Recent advances in acarology.* Academic, London, UK. 631 pp.
 35. Roderick, G. K. 1996. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Ann. Rev. Entomol.* 41: 325-352.
 36. Scott, J. A., Brogdon, W. G., and Collins, F. H. 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles Gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49: 520-529.
 37. Tomonaga, T. 1963. Studies on the biology and the control method of the bulb mite, *Rhizoglyphus echinopus* Fumouze and Robin, attacking shallot

- (*Allium bakeri*). Rep. Fukui Agric. Exp. Stn. 1: 1-79. (in Japanese)
38. Hammen, L. van der. 1982. Morphology and postembryonic development of *Rhizoglyphus echinopus* (Fumouze & Robin) (Chelicerata, Actinotrichida). Zool. Meded. Leiden. 56: 237-258.
39. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. *In*: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Shinsky & T. J. White [eds.], PCR protocols, a guide to methods and applications. Academic, San Diego, USA. 482 pp.=

ABSTRACT

Liu, Y. C.¹, Chang, S. C.^{2*}, Chen, W. H.³, and Shu, W. B.¹ 2006. The application of single-step nested multiplex polymerase chain reaction for the identification of *Rhizoglyphus echinopus*, *R. robini* and *R. setosus* simultaneously. Plant Prot. Bull. 48: 101-116. (¹Hsinchu Branch, Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Dayuan, Taoyuan 33758, Taiwan (ROC); ²Applied Zoology Division, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung 41362, Taiwan (ROC); ³Fengshan Tropical Horticultural Experiment Station, Agricultural Research Institute, Fongshan, Kaohsiung 83052, Taiwan (ROC))

A specific single-step nested polymerase chain reaction (PCR) assay was developed to identify the three species of worldwide economically important bulb mites: *Rhizoglyphus echinopus*, *R. robini* and *R. setosus* simultaneously. General primers were used to amplify the 18S-28S region of ribosomal DNA by PCR. Sequences of the ITS1 region of the PCR products were used to construct species-specific primers which were then used to amplify the species specific DNA fragments. These fragments which can be visualized readily after electrophoresis were 522, 312 and 404 bp for *R. echinopus*, *R. robini* and *R. setosus*, respectively. The plus strand universal primers derived from the sequence in the 18S and 5.8S coding region increase the sensitivity of this single-step nested multiplex PCR assay to pg degree. Treatment of these species-specific DNA fragment with *Taq* I, *Mfe* I, *Sty* I and *Ssp* I further increase the accuracy in differencing these three species.

(Key words: *Rhizoglyphus echinophus*, *R. robini*, *R. setosus*, ITS1 region, nested multiplex PCR)

*Corresponding author. E-mail:scchang@wufeng.tari.gov.tw