分子技術在防檢疫害蟲鑑定之應用

張淑貞 [1,*]

[1] 行政院農業委員會農業試驗所應用動物組。台灣 台中市。

摘要

防檢疫害蟲的種類鑑定是後續相應措施的基本根據，在缺乏明顯形態特徵的未成熟期或僅餘蟲體殘骸時，以分子技術鑑定害蟲是唯一獲知害蟲種類的方法。隨著近代分子生物學的快速發展，應用保存生物所有遺傳訊息的 DNA 鑑定防檢疫害蟲種類，已越來越便利、可行。目前較常應用於防檢疫害蟲鑑定的分子技術有聚合酶鏈鎖反應、逢機增幅多態型-聚合酶連鎖反應、序列特徵化增幅區域、限制酶多型性分析、具種專一性之聚合酶鏈鎖反應、複合式聚合酶鏈鎖反應、恆溫環狀擴增法、生物晶片及 DNA 條碼等。這些方法各有優缺點，都可應用在防檢疫害蟲不同生活時期的種類鑑定。本文將就上述應用於鑑定害蟲種類之分子技術逐一介紹。隨著科學的快速進步，預期未來也將會有更新的分子技術應用在害蟲種類鑑定。

關鍵詞：分子技術、種類鑑定、聚合酶連鎖反應、DNA 條碼。

前言

DNA 儲存了生物所有的遺傳訊息，複製時會有一億分之一的錯誤機率，這些錯誤的 DNA 若不影響生物基本生命功能，就可被留存並遺傳給下一代。若這些錯誤的序列干擾到生物的功能，在物競天擇下，此個體極可能被淘汰。這些逐代累積在生物體內的 DNA 序列差異，即表現在種內個體間、族群間的差異。而這些差異在空間、時間、生態等多方面因素的加乘下，使不同族群間達到生殖隔離時，便形成了不同種。而生命初始細胞核內的遺傳物質 DNA 皆會經過一連串的複製、分裂、分配至個體的所有細胞，所以在此個體所有細胞內的 DNA 皆完全相同，當然在個體不同生長期之 DNA 也完全相同。同種內的所有個體共享一個基因池 (gene pool)，有其獨特的遺傳物質 DNA，明顯異

*論文聯繫人
E-mail: scchang@tari.gov.tw

於其他種生物。應用分子技術檢測上述這些變異序列，即可用來區分、鑑定不同分類群的昆蟲。

昆蟲具有幾丁質外骨骼的獨特生物性，所以在其一生發育過程中，隨者體內組織器官的生長，表皮也需相應脫落、更換成更大的表皮，也衍生了多次形態的改變，這對防檢疫害蟲的種類鑑定是一大挑戰。因為傳統害蟲鑑定是以成蟲期的外部形態如翅脈、觸角等或外生殖器 (genitalia) 為鑑定依據，對於未成熟期的卵、幼蟲及蛹則較難由外部形態分辨種類。再者昆蟲種類繁多，有些種類更存在有個體間多態型的現象，增添以形態鑑定昆蟲種類的困難度。而在田間害蟲防治前，知道害蟲種類，以期能採取相應有效的防治措施；或是農產品進口時，隨貨物進來的害蟲檢疫定位，以期採取相應檢疫處理，正確的害蟲種類鑑定都是防檢疫害蟲最迫切需要解決的問題。這樣的困境隨著近代科學的快速飛躍，分子生物學蓬勃發展，相應分析的材料、儀器日新月異，應用在防檢疫害蟲鑑定上的分子技術也與時俱進，提供更快速、準確的解決方案。在這些分子技術發展過程中，其中最具革命性進步，突破分析時 DNA 量不足的關鍵技術是聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)。

聚合酶連鎖反應

聚合酶連鎖反應是仿照細胞內 DNA 複製的步驟，包括雙股 DNA 的變性分離 (90-95℃)、引子 (約 20-30 個鹼基 (base)) 的黏合 (37-65℃) 及聚合酶進行的複製延伸 (72℃) 等三個步驟的循環、增幅。PCR 技術發展初期使用萃取自大腸桿菌 *Escherichia coli* 的聚合酶，最適反應溫度為 37℃，每次循環進行到雙股 DNA 的高溫變性分離時，聚合酶就會被高溫破壞，所以每次循環都需要重加一次聚合酶，使得整個操作流程非常繁瑣，且試管中逐次累積許多被破壞的酶，亦會增加反應的不穩定性。

1985 年 Karry Mullis 將這三個反應步驟結合在同一台機器內進行，大大提升 DNA 在細胞外複製的效率 (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.* 1985)，而他也因在 PCR 技術的成就，獲得 1993 年的諾貝爾化學獎。之後在溫泉中發現耐高溫菌 *Thermus aquaticus*，並將此耐高溫的聚合酶 *Taq* DNA polymerase 應用在 PCR 中，反覆經高溫 (90-95℃) 也不容易被破壞 (Saiki *et al.*1988)，使得 PCR 技術更加成熟可行，解決了生物遺傳物質研究中，DNA 量太少無法分析的瓶頸。因聚合酶連鎖反應可在體外大量複製 DNA，也衍生出許多相關的分子技術，帶動下一波生物遺傳研究的熱潮。

逢機增幅多態型-聚合酶連鎖反應 (random amplified polymorphic DNA-PCR, RAPD-PCR)

RAPD-PCR 是在未知 DNA 序列的情

況下，用一小段逢機合成的引子 (約 10 個鹼基、50-80% GC)，進行物種體 DNA (genomic DNA) 的 PCR。因引子長度短，且黏合溫度較低，引子會黏附上整個基因體的多個位置，PCR 增幅後的 DNA 產物片段大小多樣，經電泳、染色後呈現的電泳圖譜變化較多，可用來分析物種的種間差異，甚至是同種內不同族群間的差異，尤其是有地理隔離的不同族群間的差異。此技術在1990年首度由 Williams 等人應用在不同物種間，即人體、玉米、大豆及真菌間的 DNA 差異分析 (Williams *et al*. 1990)。在防檢疫害蟲鑑定的應用上，如鑑定區分外型極為相似的米象 (*Sitophilus oryzae* L.) 與玉米象 (*S. zeamais* Motschulsky) (Hidayat *et al*. 1996)；輔助煙草粉蝨 (*Bemisia tabaci* (Gennadius) 與銀葉粉蝨 (*B. argentifolii* Bellows & Perring) 間的差異釐清 (De Barro & Driver 1997; Guirao *et al*. 1997; 王等，2004; Qiu *et al*. 2009)；快速鑑定斑潛蠅屬 (*Liriomyza*) 中，形態相似的 6 種斑潛蠅 (邱等，2000)；鑑定網蝽科 Tingidae 中的 4 種網蝽 (*Corythucha arcuata* Say, *Corythucha ciliata* Say, *Stephanitis pyri* F., *Monosteira unicostata* Mulsant et Rey) (Besedina & Kil 2019)。在美洲廣泛分布的 *Oncideres* 屬的天牛幼蟲期很長，有些種類甚至可達一年，成蟲壽命則很短，加上缺乏幼蟲的型態鑑定特徵，以RAPD-PCR 可鑑定 *Oncideres saga* (Dalman)、*O. ocularis* (Thomson) 及 *O. ulcerosa* (Germar) 等3種天牛 (Cordeiro *et al*. 2019)。

此方法的優點是僅需要少量的 DNA，且在未知任何 DNA 序列前，即可以商品化的大量逢機引子進行 PCR，依據目的篩選具有種間或族群間差異代表的電泳圖譜。缺點則是為讓有較多的引子黏上模板 DNA，以得到最多樣的 PCR 產物增幅狀況，所以引子黏合溫度設定較低、循環數目較多，以至於 RAPD-PCR 所需時間是一般 PCR 的兩倍。而且因為引子長度較短、黏合溫度較低，所以引子對序列的專一性較低，產物不穩定、變異大，判讀不易，常要花費大量時間篩選合適的逢機引子，以期在不同個體、族群間產生穩定的電泳圖譜。而也因為此敏感特性，即使以相同的溫度、循環條件進行 PCR，但使用不同廠牌的聚合酶及 PCR 迴溫循環器，仍然很有可能獲得不同的電泳圖譜，或者只保有較明顯的產物，而新增或減少其他不同長度的產物，增加判讀的困擾。而也因此敏感特性，近年來，RAPD-PCR 多改用在分析種內族群間的差異。如伊朗南部和西南部甘蔗、玉米和水稻的重要害蟲蛀莖夜蛾 (*Sesamia nonagrioides* (Lefebvre))，即藉由 RAPD-PCR 分析其在不同地區與不同寄主作物上的族群差異 (Cheraghali *et al*. 2015)。另亦可用在寄生蜂條斑螟小繭蜂 (*Bracon hebetor* (Say)) 不同地理族群間的鑑定 (Kil *et al*. 2018)。

序列特徵化增幅區域 (sequence characterized amplified regions, SCARs)

因為 RAPD-PCR 不穩定的缺點，衍生出序列特徵化增幅區域 (SCARs) 法。此方法是篩選 RAPD-PCR 後的增幅產物，選取長度獨特、且穩定出現的片段，轉接到載體後，以商品細菌如 *E. coli* 大量增幅此片段序列，再進行定序確認序列。接續再以此片段序列設計序列較長之專一引子 (約 20-30 個鹼基)，並進行 PCR 確認此引子的專一性及增幅產物的穩定性。如蘋果上的重要檢疫害蟲蘋果蠹蛾 (*Cydia pomonella* (L.)) 在檢疫過程中，通常發現時多是在蘋果內取食的幼蟲期，可藉由 SCARs 方法輔助幼蟲的形態鑑定 (路等 2003)；光肩星天牛(*Anoplophora glabripennis* Motschulsky) 源自中國大陸與韓國，其幼蟲曾跟隨輸入的包裝木材侵入北美洲，由各生長期、殘骸與蟲糞萃取 DNA，藉由 SCARs 方法，可區分光肩星天牛與與其他 7 種相近種類的天牛 (Kethidi *et al.* 2003)；東方果實蠅 (*Bactrocera dorsalis* Hendel)、瓜實蠅 (*B. cucubitae* Coquillet) 及南瓜實蠅 (*B. tau* Walker) 是台灣的 3 種主要瓜果實蠅，成蟲形態足以辨別，但是卵與幼蟲則無法區分，應用 SCARs 方法可區分這 3 種瓜果實蠅 (路等 2002)。另亦可應用在隨國際穀物買賣交易而擴散的麥蛾 (*Sitotroga cerealella* (Olivier))、外米綴蛾 (*Corcyra cephalonica* (Stainton))、粉斑螟蛾 (*Cadra cautella* (Walker)) 及印度穀蛾 (*Plodia interpunctella* (Hübner)) 等積穀害蟲的鑑定上，先進行 RAPD-PCR，選取該種蛾的獨特 DNA 片段後，再以此序列設計專一引子，並經後續 PCR 確認其種類專一性 (Yao *et al.* 2012) (圖一)。

由此法設計之專一引子通常為 18-25 bp，較逢機引子的 10 bp 長，引子黏上模版 DNA 的序列數目較多，所以可提高 PCR 時的引子黏合溫度，藉此可提升 PCR 的專一性，減少非專一性片段的增幅，PCR 產物穩定度大為提升，也較容易判讀。而且設計專一引子的參考序列片段，是由逢機引子增幅體 DNA 而來，片段來源較多樣，生物各種間的差異可能較大，專一引子的設計較容易。但此專一引子之獲得，需先選殖 RAPD-PCR 後的產物至細菌，定序後再據此定序結果設計專一引子，相對也耗費更多發展時程、經費及人力。

限制酶多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析

RFLP 是先以 PCR 增幅特定基因片段，再以限制酶去剪切此增幅的基因片段後，所建立的電泳圖譜分析法。其原理是因每一種限制酶只固定在一段特定序列的 DNA 處 (通常是 4-6 個鹼基) 剪切，而因不同物種 DNA 序列不同，即會有不同的限制酶切位；或可用同一限制酶剪切，但剪切位置不同，切

下的 DNA 片段大小即不同。再經電泳、染色後會呈現一特有之電泳圖譜，比較其差異性，即可用來探討不同種昆蟲間的親緣關係，或鑑別其種類。如以粒線體 COI (cytochrome c oxidase subunit 1, COI) 基因之限制酶圖譜鑑別檢疫害蟲萵苣蚜 (*Nasonovia ribisnigri* (Mosley)) 及本地種桃蚜 (*Myzus persicae* (Sulzer))、豌豆蚜 (*Acyrthosiphon pisum* (Harris)) (葉等 2006)。Arneodo 等人 (2015) 以粒線體 COI 基因之限制酶圖譜鑑定入侵之棉鈴實夜蛾 (*Helicoverpa armigera* (Hübner)) 與阿根廷本土的2種蛾 (Arneodo *et al*. 2015)。以粒線體 COⅡ 基因之限制酶圖鑑別危害園藝作物之 16 種 *Otiorhynchus* 屬的象鼻蟲 (Hirsch *et al*. 2010)。以核糖體 DNA ITS1 (internal transcribed spacer 1, ITS1) 片段之限制酶圖譜鑑定檢疫根蠕刺足根蠕 (*Rhizoglyphus echinopus* (Fumouze & Robin)) 及台灣本地既有害蠕羅賓根蠕 (*R. robini* Claparède)、長毛根蠕 (*R. setosus* Manson) (圖二) (劉等，2006)；以核糖體 DNA ITS 片段之限制酶圖譜區辨常見之 *Tetranychus* 屬的葉蠕等 (Osakabe *et al*. 2002, 2008; Hurtado *et al*. 2008)。

RFLP 分析方法的優點是比 PCR 更確定物種種類。缺點是要先尋找可順利增幅出要分析片段的 PCR 引子，繼之根據序列，篩選具有辨別性的限制酶。而且實際應用時，在進行 PCR 後，還要將此 PCR 產物回收，再以限制酶剪切，最後再以電泳分析，耗費時間較長、步驟較繁瑣，但總括來說，耗費時間較定序所需時間短。

具種專一性之聚合酶鏈鎖反應 (species-specific PCR)

以 PCR 增幅、定序特定片段的 DNA 後，針對不同物種在此段 DNA 的序列差異處，設計具種專一性引子，可經 PCR 後就區分出不同的物種。如在檢疫害蟲鑑定方面，以粒線體 COI 基因序列，設計專一引子鑑別 6 種象鼻蟲，其中李象鼻蟲 (*Conotrachelus nenuphar* (Herbst))、白喙粗吻象鼻蟲 (*Graphognathus leucoloma* (Bohernan))、新幾內亞甘蔗象鼻蟲 (*Rhabdoscelus obscurus* (Boisduval)) 等 3 種為檢疫害蟲，甘薯蟻象 (*Cylas formicarius* (Fabricus))、粉綠象鼻蟲 (*Hypomeces squamosus* (Fabricius))、台灣三月始灰象鼻蟲 (*Sympiezomias cribricollis* Kono) 則為台灣本地種 (林等 2008)。亦可以核糖體 DNA ITS1 片段序列設計專一引子，鑑定重要檢疫害蠕刺足根蠕及台灣本地既有害蠕羅賓根蠕、長毛根蠕 (劉等 2006)。擬步行蟲科 (Tenebrionidae) *Palorus* 屬是穀物的貯藏性害蟲，藉由形態鑑定無法確認其殘骸或未成熟期的種類，應用粒線體 COI 基因序列設計專一引子，可有效鑑定 *Palorus subdepressus subdepressus* (Wollaston)，*P. ratzeburgi* (Wissman) 和 *P. cerylonoides*

(Pascoe) (Lu *et al.* 2018)。

此方法之優點是專一引子建立後，一次 PCR 就可以確定此 DNA 來源是否為預期的種類，較為快速、經濟。缺點是要先篩選適合的引子 PCR 增幅出特定的 DNA 片段，定序此片段後需再比對相近物種間序列之差異處，據此找出專一引子可穩定、專一的區辨不同種類。而且相近種類越多，專一引子的設計也會越困難。若設計專一引子時，沒有納入可能會同時出現的相近物種，則專一引子的專一性就會被質疑。另因一次 PCR 僅能鑑定一個種類，若此 DNA 來源預期是 3 個相近種之一，則需分別進行 3 個專一性 PCR，操作較繁雜。

恆溫環狀擴增法 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP)

一般 PCR 如上述需有 3 個溫度重複循環進行反應，所以需有特定的 PCR 儀器才可進行反應，因此限縮其應用場域。Notomi 等人在 2000 年提出LAMP方法，使用 *Bst* DNA Polymerase 在定溫 65℃ 打開雙股 DNA、並增幅標的 DNA，不須經 95℃ 才打開雙股 DNA。且使用特殊設計的 3 組引子: outer primers、inner primers 和 loop primers。前 2 組引子增幅後可產生具環型 (loop) 構造的長鏈狀產物，loop primers 則可以加速反應進行，1 小時內可將數個 DNA 增幅至 10^9 個 (Notomi *et al.* 2000)。增幅過程會產生大量的焦磷酸根 (pyrophosphate, PPi)，與鎂離子形成焦磷酸鎂 (magnesium pyrophosphate) 的白色沉澱物，藉此可以肉眼判斷反應是否有進行，或使用其他呈色劑如 EtBr、甲基藍、SYBR green 螢光劑等，在 UV 光下觀察判定。

葡萄根瘤蚜 (*Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch)) 危害葡萄的根部與葉片，形成蟲癭，造成葡萄根部腐爛，是重要檢疫害蟲。Agarwal 等人 (2020) 即根據粒線體 COI 基因序列，設計 6 條引子，以 LAMP 方法鑑定葡萄根瘤蚜。Nam 等人 (2020) 則根據粒線體 NADH5 基因序列設計 6 條引子，建立 LAMP 方法鑑定穀物與玉米害蟲羅氏秘夜蛾 (*Mythimna loreyi* (Duponchel))。另針對 4 種多食性夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner)、秋行軍蟲 (*S. frugiperda* (JE Smith))、斜紋夜盜蛾 (*S. litura* (Fabricius))及 *S. littoralis* (Boisd.)，根據其粒線體 COI 基因序列，設計 6 條引子，建立 LAMP 鑑定方法，整個過程約 70 分鐘 (Nam *et al.* 2021)。此 LAMP 方法的優點為可以定溫進行反應，儀器相對簡單，增幅迅速，可直接以肉眼辨識反應結果，所以可在田間使用。缺點則為引子設計複雜，酵素與試劑昂貴。

複合式聚合酶鏈鎖反應 (multiplex PCR)

為了改善專一性 PCR 一次反應只能鑑定一個種類的缺點，後續研究人員嘗試在一

次 PCR 中同時放入多組專一引子，同時偵測兩種以上的 DNA 來源種類。例如以 3 種根蟎之核糖體 DNA ITS1 片段序列，設計 3 組專一引子，可分別放大 3 種根蟎，將此 3 組引子混和後同時進行一次 PCR，即可同時鑑定這 3 種根蟎，節省 3 倍的時間及耗材 (圖三) (劉等 2006)。其他如在印度有 4 種薊馬可傳播 5 種 Tospovirus 病毒，正確的鑑定薊馬種類，有助於了解病毒發生狀況，擬定相應薊馬管理策略，是防治成效的關鍵。應用粒線體 COIII 和核糖體 ITS2 片段的 DNA 序列，設計相應種類的 4 組薊馬專一引子，可分辨南黃薊馬 (*Thrips palmi* Karny)、小黃薊馬 (*Scirtothrips dorsalis* Hood)、蔥薊馬 (*T. tabaci* Lindeman) 和梳缺花薊馬 (*Frankliniella schultzei* (Trybom)) (Jangra *et al*. 2020)。

此複合式聚合酶鏈鎖反應方法之優點是可以在一次 PCR 中，同時鑑定出 2 種以上的昆蟲，應用上較為快速、有效率且更為節省經費。缺點是尋找專一引子已如前述不容易，要將所有引子混和在同一 PCR 溶液中，不會互相干擾，仍能各自增幅出專一片段，且其片段大小又可於電泳圖上清楚區別差異，此兼具符合序列差異及預期長度的專一引子，尋找時的困難程度更大。受限於該段 DNA 的特性及長度，及相近種類數目的多寡，複合式聚合酶鏈鎖反應鑑定技術的建立，總括來說更不容易。

生物晶片 (biochip)

生物晶片依偵測對象不同，分成許多類別，其中較常用於昆蟲種類鑑定的為寡核苷酸晶片 (oligonucleotide chip)。其原理是藉由 DNA 兩互補股間黏合所需的序列專一性特性，藉此判別昆蟲種類。此原理與南方墨點雜合技術的基本原理相同。發展流程則是先將標的 DNA，如粒線體 COI 基因，以 PCR 增幅、定序後，根據不同種間的序列差異處設計單股 DNA 的探針 (probe)，再將此探針點佈、固定在晶片上，此與南方墨點雜合法將體 DNA 固定在晶片上剛好相反。生物晶片在使用時，先以螢光或其他呈色反應物標定過的引子，進行特定 DNA 片段的 PCR 增幅。一方面可增加偵測的敏感度，一方面也可藉此將標的 DNA 標上螢光或其他呈色反應物，使其在與探針黏合後，在後續的呈色反應中呈色；若 PCR 增幅的標的 DNA 與探針間序列不同，則無法與探針黏合，並在後續清洗步驟時清除，無法呈色，藉此呈色與否判斷昆蟲種類。如先以粒線體的 COI、ND4 (NADH dehydrogenase subunits 4) 及 ND5 為標的基因，先設計可增幅 11 種實蠅科 (Tephritidae) 害蟲的通用簡併引子，並在引子上標定生物素 (biotin)，經由 PCR 增幅上述 3 個基因片段後，再與特定序的探針逕行雜合反應，藉由晶片上出現的圓點樣態，可區分這 11 種實

蠅 (Chen *et al*. 2014)。另以核糖體 ITS1 為標的 DNA 片段，可以生物晶片區辨 15 種薊馬 (Yeh *et al*. 2015)。

用生物晶片鑑定昆蟲的優點是一片晶片可點佈上千個探針，且探針間彼此互不接觸，不會有互相干擾的狀況，理論上可同時篩檢上千種昆蟲，即可直接在一次 PCR、雜合、呈色後，判定種類，大大降低操作的時間 (路 2004)。在樣本種類、數量很多時，相對上述其他方法會更為快速。其缺點是在有限長度的 DNA 片段中，要尋找足夠差異的序列設計探針，並不容易，且此探針還要能穩定、專一的與特定種類的昆蟲 DNA 黏合，更需要經過多次的測試。且發展過程需會設計探針、將探針點佈在晶片上的設備及技術、雜合設備及呈色技術等，技術及設備門檻較高，所以生物晶片應用在昆蟲種類鑑定上的實例目前還不多見，但隨著生物晶片的基本技術、設備發展越趨成熟、簡便，前景可期。

DNA 條碼 (DNA barcode)

DNA 儲存了生物所有的遺傳訊息，不同種生物的 DNA 當然也存在著差異。應用 PCR 技術直接取得特定基因片段，再經定序取得序列，據此可以比對不同物種間的序列差異，直接區分害蟲種類。這些可代表該物種的 DNA 片段即可稱之為 DNA 條碼。常被用來當作昆蟲 DNA 條碼的基因有粒線體 DNA 的 COⅠ、COⅡ、Cytb (cytochrome b) 基因，核糖體 DNA 的 18S、28S。因為粒線體 COI 基因不含內含子 (intron)，且較少有基因重組及單倍遺傳的特性 (Saccone *et al*. 1999)，以及增幅此段基因的廣效性引子較易取得，能順利增幅大部分物種的 COI 基因，而取得序列分析 (Folmer *et al*. 1994 ; Zhang & Hewitt 1997)，且 COI 基因相較其他粒線體基因有較多的演化訊息，所以 Hebert 等人大力推動以粒線體 COI 基因序列為生物的 DNA 條碼，並建立資料庫，形成全球生物鑑定系統 (global bioidentification system, GBS)，並進一步以粒線體 COI 基因序列分析 200 種鱗翅目近源種昆蟲的差異，證明 COI 基因的適用性 (Hebert *et al*. 2003)。

Tahir 等人則對巴基斯坦的農田害蟲，同時進行形態鑑定與 DNA 條碼建立，完成 48 種害蟲的 COI 基因定序，各約 600 bp，與形態鑑定結果比對，確認 DNA 條碼可用來鑑定農業害蟲種類 (Tahir *et al*. 2018)。Scheffer 等人 (2006) 以粒線體 COI 基因序列，區辨南美斑潛蠅 (*L. huidobrensis* (Blanchard))、非洲菊斑潛蠅 (*L. trifolii* (Burgess)) 及蔬菜斑潛蠅 (*L. sativae* Blanchard) 等入侵菲律賓的斑潛蠅。Toda 等人 (2000) 以粒線體 COI 基因序列，區辨 4 種 *Pananychus* 屬的葉蟎。雙翅目黑翅蕈蚋科 (Sciaridae) 的 *Bradysia* 屬生活在潮濕環境，是菇類與溫室的重要害蟲，已用粒線體 COI 基因建立其中 25 種蕈蚋的 DNA 條碼，可應用於種類鑑定，尤其是缺乏明顯形

態特徵的幼蟲 (Shin *et al.* 2015)。

DNA 條碼因具有遺傳特性，本質上和物種的形態特徵相同，都可是該物種的分類特徵。傳統昆蟲分類會以多個形態特徵描述物種，DNA 條碼亦可視為該物種的特徵。以 DNA 條碼鑑定害蟲，亦可同時使用多段基因。如 Kohnen *et al.* (2009) 以粒線體 COI、COⅡ、Cyt b 基因序列，分析 *Rhagoletis alternata* (Fallen) 和 *Carpomya schineri* (Loew) 等 2 種果實蠅的差異。Gullan *et al.* (2010) 以粒線體 COI 基因、核糖體 DNA 28S 基因及延長因子 (elongation factor 1-α, EF-1α) 基因序列分辨粉介殼蟲 *Ferrisia* 屬中的 *Ferrisia virgata* Cockerell 及 *F. gilli*Gullan，並藉由序列資料，重新檢討其形態鑑定特徵的穩定性。

應用 DNA 條碼鑑定害蟲，可藉由直接比對 DNA 序列確認害蟲種類。優點是序列證據最直接、準確，一次可直接比對數百個鹼基，相較於PCR的引子或探針每次只能根基於數十個鹼基，DNA 條碼能提供更多的證據，另亦可在網路上的 DNA 資料庫如 NCBI 網站 (National Center for Biotechnology Information)，直接搜尋比對。缺點則是需要尋找合適的引子，以 PCR 增幅出預期的 DNA 片段，而且每一次的鑑定都要將此段 DNA 先進行 PCR 後，再回收 PCR 產物進行定序，較耗費人力、物力及時間。而且若該物種尚未有學者將序列公布至網路資料庫中，則無法確認其種類。目前公布至網路資料庫中的序列並未經過審核，其物種正確性也須審慎求證。隨著分生技術的進步，DNA 定序技術與儀器自動化的長足進展，為物種建立 DNA 條碼已越來越容易，需要的人力與經費也越來越低。再加上資訊科技的進步，DNA 序列分析、網站資料庫功能愈漸強大，以致 DNA 條碼在害蟲物種鑑定的應用也越來越普及。

結論

隨著近代科學的快速進步，應用分子技術鑑定防檢疫害蟲，已越來越普遍。目前常用來鑑定防檢疫害蟲種類的分子技術有 8 類，包括聚合酶鏈鎖反應、逢機增幅多態型-聚合酶連鎖反應、序列特徵化增幅區域、限制酶多型性分析、具種專一性之聚合酶鏈鎖反應、複合式聚合酶鏈鎖反應、恆溫環狀擴增法、生物晶片及 DNA 條碼等。這些技術各有優缺點，視鑑定目的，可各採取相應的分子技術進行害蟲種類的鑑定、分析。其中聚合酶鏈鎖反應是其他 7 類技術的基石，聚合酶鏈鎖反應增幅目標 DNA，解決分析所需 DNA 量不足的瓶頸後，後續衍生許多分子技術鑑定害蟲種類。而隨著科學的快速進步，分析儀器的長足進展，原來耗時、耗錢的 DNA 條碼，在全球科學人努力擴展生物 DNA 條碼資料庫下，可行性與重要性日漸提升，也將是未來防檢疫害蟲種類鑑定的重要依據。

參考文獻

王重雄、柯俊成、劉中琪、陳秋男。2004。利用 PCR 快速鑑定銀葉粉蝨 (*Bemisia argentifolii*) (半翅目：粉蝨科)。台灣昆蟲 24：229-246。

林季瑋、呂曉玲、黃廷宇、施鈞嘵、吳文哲、張俊哲。2008。檢防疫重要性象鼻蟲的分子鑑定。台灣昆蟲 28：43-55。

邱一中、吳文哲、蕭旭峰、石正人。2000。RAPD-PCR 在六種斑潛蠅 (*Liriomyza* spp.) (雙翅目：潛蠅科) 快速鑑定技術之應用。中華昆蟲 20：293-309。

葉信廷、柯俊成、許洞慶。2006。檢疫害蟲蒿苣蚜 (*Nasonovia ribisnigri* (Mosley)) (Hemiptera: Aphididae) 鑑定技術之建立。台灣昆蟲 26 : 283-293。

路光暉。2004。生物晶片在防疫檢疫害蟲鑑定上之應用。植物重要防疫檢疫害蟲診斷鑑定研習會 (四)。p.119-125。

路光暉、張君銘、陳家殷、陳昱如。2002。台灣三種主要瓜果實蠅類害蟲之專一性引子開發。植保會刊 44 : 255-265。

路光暉、張世忠、許昭元、楊正澤。2003。傳統與現代昆蟲鑑定技術的結合-以蘋果蠹蛾 (鱗翅目 : 捲葉蛾科) 為例。植保會刊 45：359-364。

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螨、羅賓根螨及長毛根螨。植保會刊 48：101-116.

Agarwal, A., J. P. Cunningham, I. Valenzuela and M. J. Blacket. 2020. A diagnostic LAMP assay for the destructive grapevine insect pest, phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*). Sci. Rep. 10: 1-10.

Arneodo, J. D., E. I. Balbi, F. M. Flores and A. Sciocco-Cap. 2015. Molecular identification of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae) in Argentina and development of a novel PCR-RFLP method for its rapid differentiation from *H. zea* and *H. gelotopoeon*. J. Econ. Entomol. 108: 2505-2510.

Besedina, E. and V. Kil. 2019. Molecular-genetic analysis of diff erent species of lace bugs (Heteroptera: Tingidae) by RAPD-markers. Hortic. Vitic. 6: 21-25. (In Russ.)

Chen, Y. H., L. Y. Liu, W. H. Tsai, D. S. Haymer and K. H. Lu. 2014. Using DNA chips for identification of tephritid pest species. Pest Manag. Sci. 70: 1254-1261.

Cheraghali, Z., M. Esfandiari, S. Mossadegh and H. R. Memari. 2015. Genetic diversity of populations of the stem borer Sesamia

nonagrioides (Lepidoptera: Noctuidae) in southern and southwestern Iran, using RAPD-PCR. North-West J. Zool. 11: 70-5.

Cordeiro, G., M. S. Cunha, C. R. Silva, I. R. Jorge, J. A. Dergam and P. S. Ferreira. 2019. Molecular identification of three species of *Oncideres* (Coleoptera: Cerambycidae) using RAPD markers. An. Acad. Bras. Cienc. 91: e20180209.

De Barro P, T. Sherratt, C. Brookes, O. David and N. Maclean. 1997. Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). Aust. J. Entomol. 36: 149-152.

Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3: 294-299.

Guirao, P., F. Beitia and J. Cenis. 1997. Biotype determination of Spanish populations of Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae). Bull. Entomol. Res. 87: 587-594.

Gullan, P. J., M. B. Kaydan and N. B. Hardy. 2010. Molecular phylogeny and species recognition in the mealybug genus *Ferrisia* Fullaway (Hemiptera: Pseudococcidae). Syst. Entomol. 35: 329-339.

Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball and J. R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 270: 313-321.

Hidayat, P., T. W. Phillips and R. H. Ffrench-Constant. 1996. Molecular and morphological characters discriminate *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and confirm reproductive isolation. Ann. Entomol. Soc. Am. 89: 645-652.

Hirsch, J., P. Sprick and A. Reineke. 2010. Molecular identification of larval stages of *Otiorhynchus* (Coleoptera: Curculionidae) Species based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. J. Econ. Entomol. 103: 898-907.

Hurtado, M. A., T. Ansaloni, S. Cros-Arteil, J. A. Jacas and M. Navajas. 2008. Sequence analysis of the ribosomal internal transcribed

spacers region in spider mites (Prostigmata: Tetranychidae) occurring in citrus orchards in Eastern Spain: use for species discrimination. Ann. Appl. Biol. 153: 167-174.

Jangra, S., A. Mittal, H. Dhall, R. K. Jain and A. Ghosh. 2020. A multiplex PCR assay for rapid identification of major tospovirus vectors reported in India. BMC Genom. 21: 1-8.

Kethidi, D. R., D. B. Roden, T. R. Ladd, P. J. Krell, A. Retnakaran and Q. Feng. 2003. Development of scar markers for the dna based detection of the Asian long horned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky). Arch. Insect Biochem. Physiol. 52: 193-204.

Kil, V. I., A. T. Balaban, E. N. Besedina, I. S. Agasieva and V. Y. Ismailov. 2018. Identification of habrobracon hebetor populations using RAPD markers. Russ. Agric. Sci. 44: 449-53.

Kohnen, A., V. Wissemann and R. Brandl. 2009. No genetic differentiation in the rose-infesting fruit flies *Rhagoletis alternata* and *Carpomya schineri* (Diptera: Tephritidae) across central Europe. Eur. J. Entomol. 106: 315-321.

Lu, Y., Y. Zhao, Z. Wang, S. Miao, F. Liu and R. N. Emery. 2018. DNA barcoding, species-specific PCR for the identification of three stored-product pest species of genus *Palorus* (Coleoptera: Tenebrionidae). J. Stored Prod. Res. 78: 32-38.

Mullis, K. B, and F. A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155: 335-350.

Nam, H. Y., M. Kwon, H. J. Kim and J. Kim. 2020. Development of a species diagnostic molecular tool for an invasive pest, *Mythimna loreyi*, using LAMP. Insects 11: 817.

Nam, H. Y., J. H. Kim, S. H. Lee, D. G. Heckel and J. Kim. 2021. Development of a lamp-based molecular species diagnosis method for four major agricultural pests in the genus *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae). Insects 12: 883.

Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic acids Res. 28: e63-

e63.

Osakabe, M., T. Hirose and M. Sato. 2002. Discrimination of four Japanese *Tetranychus* species (Acari: Tetranychidae) using PCR-RFLP of the inter-transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA. Appl. Entomol. Zool. 37: 399-407.

Osakabe, M., Y. Kotsubo, R. Tajima and N. Hinomoto. 2008. Restriction fragment length polymorphism catalog for molecular identification of Japanese *Tetranychus* spider mites (Acari: Tetranychidae). J. Econ. Entomol. 101: 1167-1175.

Qiu, B., Y. Chen, L. Liu, W. Peng, X. Li, M. Z. Ahmed, V. Mathur, Y. Du and S. Ren. 2009. Identification of three major Bemisia tabaci biotypes in China based on morphological and DNA polymorphisms. Prog. Nat. Sci.: Mater. Int. 19: 713-718.

Saccone, C., C. De Giorgi, C. Gissi, G. Pesole and A. Reyes. 1999. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. Gene 238: 195-209.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.

Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.

Scheffer, S. J., M. L. Lewis and R. C. Joshi. 2006. DNA Barcoding applied to invasive leafminers (Diptera: agromyzidae) in the philippines. Ann. Entomol. Soc. Am. 99: 204-210.

Shin, S., S. Jung, K. Heller, F. Menzel, T. Hong, J. Shin, S. Lee, H. Lee and S. Lee. 2015. DNA barcoding of Bradysia (Diptera: Sciaridae) for detection of the immature stages on agricultural crops. J. Appl. Entomol. 139: 638-645.

Tahir, H. M., A. Noor, S. Mehmood, S. M. Sherawat and M. A. Qazi. 2018. Evaluating the accuracy of morphological identification of insect pests of rice crops using DNA barcoding. Mitochondrial DNA Part B: Resour. 3: 1220-1224.

Toda, S., M. Osakabe and S. Komazaki.

2000. Interspecific diversity of mitochondrial COI sequences in Japanese *Panonychus* species (Acari: Tetranychidae). Exp. Appl. Acarol. 24: 821-829.

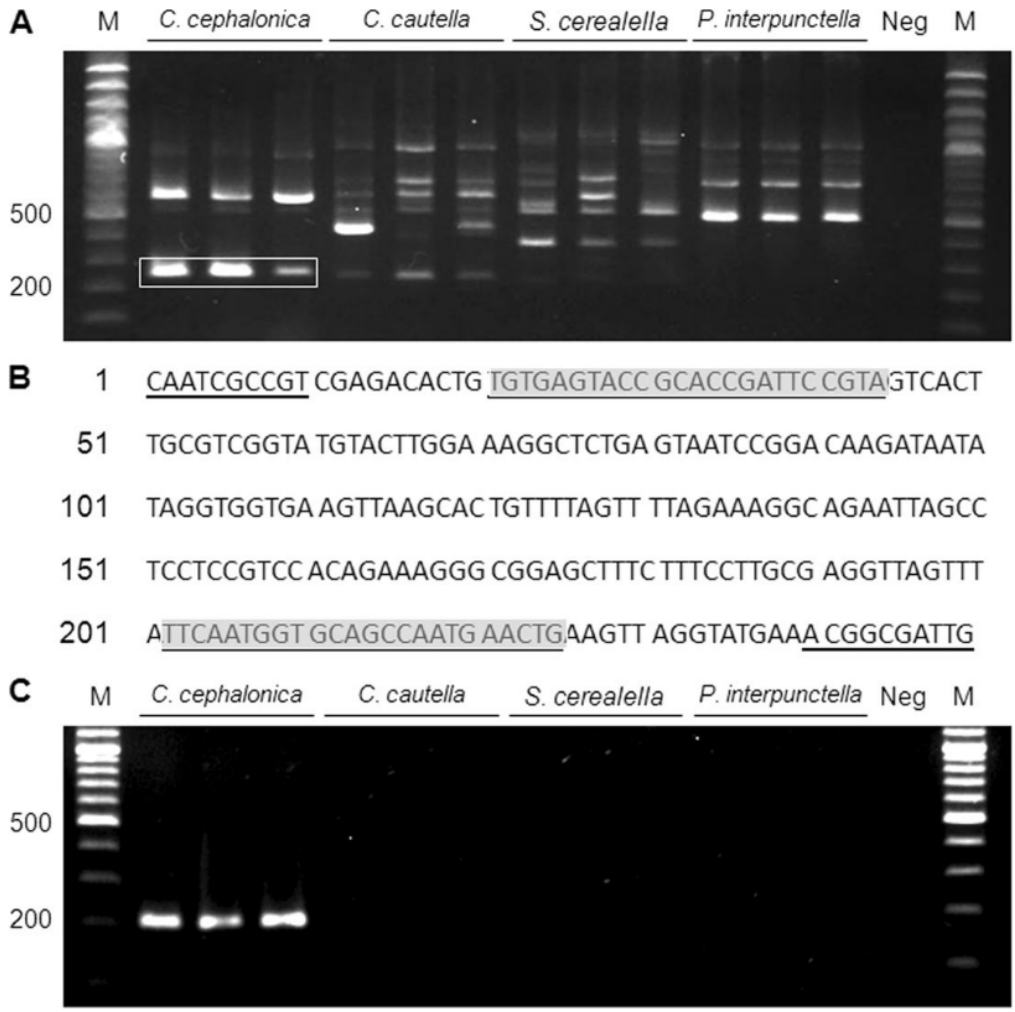
Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.

Yao, M. C., S. C. Chang, C. Y. Lee and K. H. Lu. 2012. A SCAR-based method for rapid identification of four major lepidopterous stored-product pests. J. Econ. Entomol. 105: 1100-1106.

Yeh, W., M. Tseng, N. Chang, S. Wu and Y. Tsai. 2014. Development of species-specific primers for agronomical thrips and multiplex assay for quarantine identification of western flower thrips. J. Econ. Entomol. 107: 1728-1735.

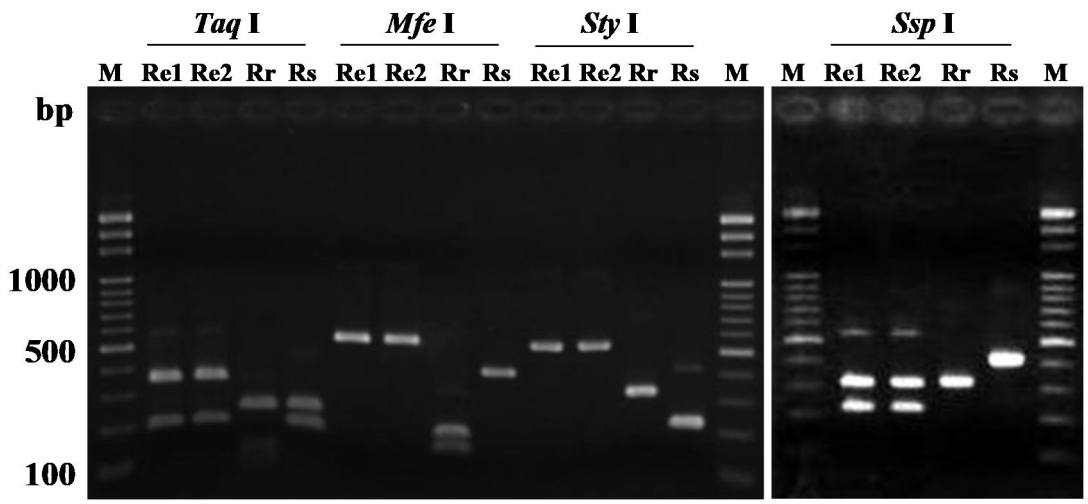
Yeh, W., M. Tseng, N. Chang, S. Wu and Y. Tsai. 2015. Agronomically important thrips: development of species-specific primers in multiplex PCR and microarray assay using internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences for identification. Bull. Entomol. Res. 105: 52-59.

Zhang, D. X. and G. Hewitt. 1997. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. Insect Mol. Biol. 6: 143-150.



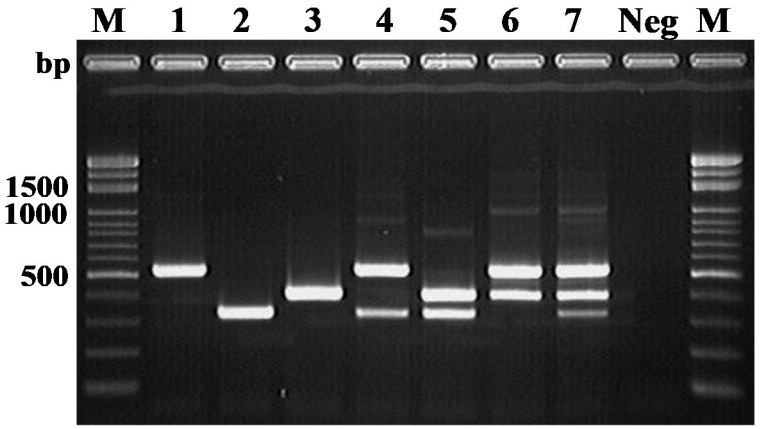
圖一、 外米綴蛾以序列特徵化增幅區域法開發具蟲種專一性引子的過程 (A) 隨機引子 S-31 增幅之 RAPD 電泳圖譜；(B) 經由 RAPD-PCR 選取得之蟲種特有 DNA 片段之序列；(C) SCAR 圖譜。M 為100 bp 大小之 DNA 標準標誌。圖：姚等 (2012)。

Fig. 1. Screening for a species-speciÞc SCAR primer for *C. cephalonica*. (A) RAPD-PCR proÞles of the four examined insect species ampliÞed with the S31 RAPD primer. The speciÞc amplicons are boxed. (B) Sequence of the speciÞc DNA fragment, with the sequence of the S-31 primer underlined, and the sequences of the SCAR-PCR primer pair marked with double underlines and shaded regions. (C) SCAR-PCR profiles generated using the *C. cephalonica* speciÞc primer pair. Neg, negative control; M, 100-bp DNA markers. From Yao *et al*. (2012).



圖二、以限制酶剪切根螨核糖體 DNA ITS1 區域之 PCR-RFLP 電泳圖譜。 Re1 為來自紐西蘭鬱金香的刺足根螨 (*Rhizoglyphus echinopus* (Fumouze & Robin))， Re2 為來自荷蘭風信子的刺足根螨， Rr 為羅賓根螨 (*R. robini* Claparede)， Rs 為長毛根螨 (*R. setosus* Manson)。M為核酸標準標誌。圖：劉等 (2006)。

Fig. 2. 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. From Liu *et al.* (2006).



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，以同時檢測刺足根螨、羅賓根螨及長毛根螨之電泳圖。DNA 模板如下：行 1 為刺足根螨，行 2 為羅賓根螨，行 3 為長毛根螨，行 4 為刺足根螨加羅賓根螨，行 5 為羅賓根螨加長毛根螨，行 6 為刺足根螨加長毛根螨，行 7 為刺足根螨加羅賓根螨加長毛根螨。Neg 為無 DNA 對照組。M 為核酸標準標誌。圖：劉等 (2006)。

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 = *R. 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. From Liu *et al.* (2006).

The application of molecular techniques on the species identification of pests

Shu-Chen Chang[1,*]

[1]Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

Abstract

Accurate species identification of pests is the first step in initiating species-specific treatment procedures. In the immature stage lacking obvious morphological characteristics or the wreckage of pests, the molecular technique is the only way to confirm the species of pests. With the vigorous development of molecular biology, it has become more and more convenient and feasible to use DNA to identify pest species. Here we review the molecular techniques used for the identification of pest species, including polymerase chain reaction (PCR), random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR), sequence characterized amplified regions (SCARs), restriction fragment length polymorphism (RFLP), species-specific PCR, multiplex PCR, loop-mediated isothermal amplification (LAMP), biochip and DNA barcode. With the rapid progress of science, it is expected that there will be newer molecular technique applications in the species identification of pests.

Key words: molecular technique, species identification, polymerase chain reaction, DNA barcode

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