台灣昆蟲 24: 159-171 (2004)
Formosan Entomol. 24: 159-171 (2004)

利用 PCR-RFLP 技術快速鑑定台灣進口農產品中常見的介殼蟲 (同翅目：介殼蟲總科)

邱一中　吳文哲　國立台灣大學昆蟲學系　台北市 106 大安區羅斯福路 4 段 1 號
翁振宇　陳淑佩　行政院農業委員會農業試驗所應用動物組　台中縣 413 霧峰鄉中正路 189 號
石正人*　國立台灣大學昆蟲學系　台北市 106 大安區羅斯福路 4 段 1 號

摘　要

依據海關人員截獲農產品上附有的介殼蟲，經鑑定共計有 30 種，本研究針對其中 16 種經常截獲的介殼蟲，建立以核糖體形成基因爲基礎的聚合酶連鎖反應-限制酶片段長度多態型技術 (ribosomal DNA/polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, rDNA/PCR-RFLP)，做爲介殼蟲分子快速診斷鑑定的操作標準流程，提供海關、機場的檢疫人員依操作標準進行常見介殼蟲的診斷鑑定。試驗篩選出 NS7 和 ITS6 引子對，可供增幅供試的 16 種介殼蟲之 rDNA/ITS1 特定區域。並進一步篩選出 *Msp*I、*Taq*I 和 *Hae*III 核酸內切酶的酶切圖譜具有較高的種類特異性，可作爲種類鑑定依據。此外，利用分類學慣用的檢索表概念，以 RFLP 酶切圖譜差異之分生特徵，建立試驗 16 種介殼蟲的分子檢索表，提供快速、簡單且準確的診斷鑑定方式。

關鍵詞：介殼蟲、快速鑑定、限制酶片段長度多態型 (RFLP)、分子檢索表

前　言

介殼蟲屬於同翅目 (Homoptera) 胸喙亞目 (Sternorrhyncha) 介殼蟲總科 (Coccoidea)。目前全世界已記錄的種類超過 7,000 多種，分布於台灣的介殼蟲種類，包括 12 科 317 種 (Wong *et al.*, 1999; Chang and Ko, 2003)。介殼蟲通常行固著生活，身體細小，不太移動，隱藏於植物根部、枝條、苗木或果實等部位，容易隨農產品自由貿易而擴散，若不實施嚴格檢疫措施，將很容易入侵新地區 (Williams and Watson, 1988)。

由於介殼蟲繁殖能力強，有些種類尚且能行孤雌生殖，只要侵入地區氣候適宜，寄主植物充足，族群很快猖獗，造成農作物嚴重損害。此外，介殼蟲外表包被一層蠟質或介殼，使用殺蟲劑不易防治，所以一旦成災，會一發不可收拾，是農業上重要的經濟害蟲。歐洲暨

*論文聯繫人
e-mail: shihcj@ntu.edu.tw

地中海地區植物保護組織 (EPPO) 及中國大陸等國家，將 15 種介殼蟲列爲危險且限制輸入的檢疫對象，其中台灣僅紀錄有 1 種，可見台灣是處在新介殼蟲入侵機率極高的地區 (Wong *et al*., 1999)。因此，介殼蟲的防檢疫更顯其重要。

依據海關人員截獲農產品上附有的介殼蟲類害蟲，經行政院農委會農業試驗所統計，共計鑑定出 30 種，分別爲：1. 埃及吹綿介殼蟲 (*Icerya aegyptiaca*)，2. 黃吹綿介殼蟲 (*Icerya seychellarum*)，3. 褐圓盾介殼蟲 (*Chrysomphalus aonidum*)，4. 橙褐圓盾介殼蟲 (*Chrysomphalus dictyospermi*)，5. 淡薄圓盾介殼蟲 (*Aspidiotus destructor*)，6. 纓圍盾介殼蟲 (*Thysanofiorina nephelii*)，7. 椰子擬輪盾介殼蟲 (*Pseudaulacaspis cockerelli*)，8. 菠契白輪盾介殼蟲 (*Aulacaspis spinosa*)，9. 扁堅介殼蟲 (*Coccus hesperidum*)，10. 長堅介殼蟲 (*Coccus longulus*)，11. 黃綠介殼蟲 (*Coccus viridis*)，12. 工背硬介殼蟲 (*Saissetia oleae*)，13. 咖啡硬介殼蟲 (*Saissetia coffeae*)，14. 黃綠綿介殼蟲 (*Pulvinaria psidii*)，15. 棒緣大綿介殼蟲 (*Megapulvinaria maxima*)，16. 刺玻蠟介殼蟲 (*Ceroplastodes chiton*)，17. 紅蠟介殼蟲 (*Ceroplastodes rubens*)，18. 桔球粉介殼蟲 (*Nipaecoccus filamentosus*)，19. 鳳梨嫡粉介殼蟲 (*Dysmicoccus brevipes*)，20. 擬嫡粉介殼蟲 (*Dysmicoccus neobrevipes*)，21. 絲粉介殼蟲 (*Ferrisia virgata*)，22. 甘蔗簇粉介殼蟲 (*Cataenococcus hispidus*)，23. 緣管粉介殼蟲 (*Lomatococcus ficiphilus*)，24. 桔臀紋粉介殼蟲 (*Planococcus citri*)，25. 臀紋粉介殼蟲 (*Planococcus kraunhiae*)，26. 咖啡臀紋粉介殼蟲 (*Planococcus lilacinus*)，27. 太平洋臀紋粉介殼蟲 (*Planococcus minor*)，28. 長尾粉介殼蟲 (*Pseudococcus longispinus*)，29. 康氏粉介殼蟲 (*Pseudococcus comstocki*) 和 30. 桑粉介殼蟲 (*Maconellicoccus hirsutus*) (Chang and Ko, 2003)。其中，有許多種類外形極爲近似，即使是熟練的分類學者鑑定這些種類也很困難。

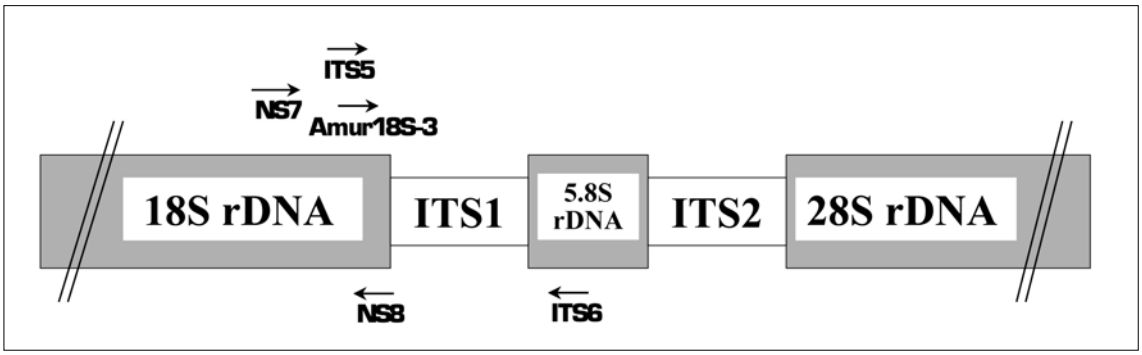
目前，針對介殼蟲的鑑定或分類，主要以雌成蟲的形態特徵爲依據，至於若蟲和雄成蟲則限於形態不穩定或特徵不明顯或不易採集，使鑑定和分類不易進行。爲了解決鑑定的瓶頸，發展簡單、快速且準確的診斷鑑定技術，能夠在單一或少量的標本基礎下，便可完成鑑定工作，對介殼蟲的檢疫工作相當重要。

近年來，分子生物學發展快速，已有眾多學者應用分子標記在昆蟲學方面的研究，且有相當豐碩的成果展現，其中在種類的快速鑑定、親緣關係的分析和族群動態上的探討等，已有長足進步，在台灣的研究則尚屬起步階段 (Chiu *et al*., 2000, 2001; Chen and Shih, 2003; Lu *et al*., 2003; Chen *et al*., 2004)。有關鑑定技術上的應用，主要仍以 RFLP 及 RAPD 等技術作爲分析的依據 (Caterino *et al*., 2000)。RFLP 技術在快速鑑定上的應用，多選用細胞核中的核糖體形成基因 (ribosomal DNA, rDNA) 或粒線體 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 爲標的，進行核酸內切酶的酶切試驗分析，用以區別屬、種的分類層級，或種以下的分類階元 (Loxdale and Lushai, 1998)。本試驗即以 rDNA/PCR-RFLP 方法，進行進口常截獲介殼蟲類之快速鑑定技術開發，期能有助於將來介殼蟲防疫檢疫工作之推行。

材料與方法

表一　增幅 rDNA 使用的 PCR 引子序列
Table 1.　Sequences of PCR primers for amplifying nuclear rDNA

Location	Primer name	Primer sequence (5'→3')	Reference
18S of rDNA	NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	White *et al*., 1990
	NS8	TCCGCAGGTTCACCTACGGA	White *et al*., 1990
	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White *et al*., 1990
	Amur18S-3	CGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTG	Chiu *et al*., 2001
5.8S of rDNA	ITS6	GAGCCGAGTGATCCACCGCT	Designed by Armstrong (unpublished data)



圖一　在表一所列的 PCR 引子於 rDNA 上的相關區域。箭頭所指方向為各引子之 3' 端。
Fig. 1.　Locations of PCR primers for the nuclear rDNA given in Table 1. Arrows represent the 3' end of each primer.

一、供試介殼蟲樣本採集及外部形態鑑定

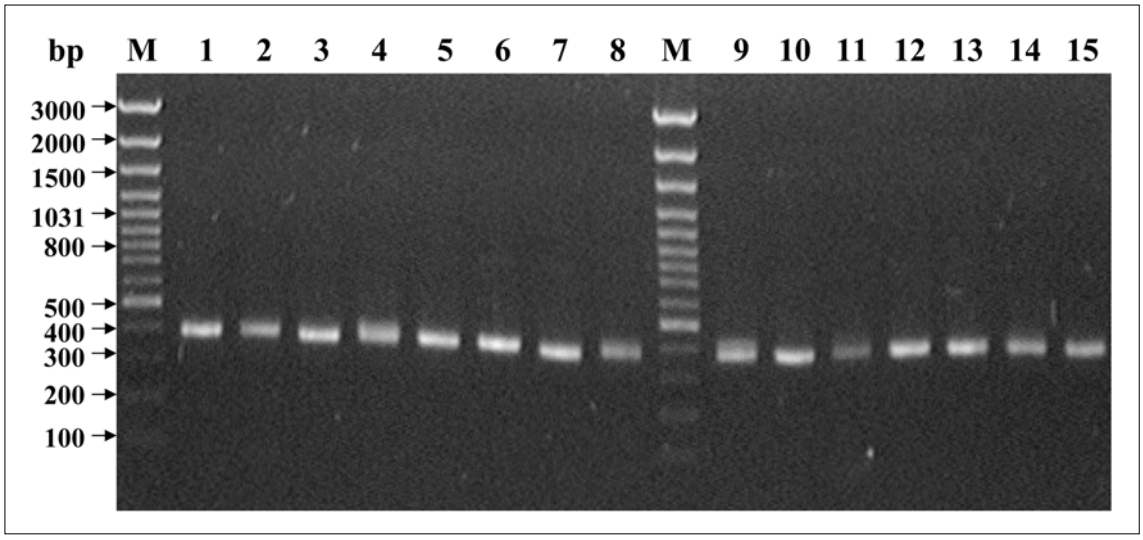
定期至台灣各地採集，並與農業試驗所及機場、海關檢疫站合作，收集供試的介殼蟲標本。部分介殼蟲作成玻片標本，依據外部形態特徵，進行種類鑑定，並建立標本資料庫，供分生技術鑑定時比對之用。其餘的標本則浸泡於 95% 酒精，或直接冰存於 -80℃ 冰箱中，供萃取 DNA 時使用。

二、介殼蟲 DNA 萃取及 PCR 增幅目標 rDNA

取已初步鑑定種類之介殼蟲標本，抽取並純化蟲體 DNA。萃取 DNA 時，依種類及生長期不同，分別單隻萃取。本試驗利用 Viogene 公司的 DNA 純化試劑組 (Blood and Tissue Genomic DNA Miniprep System kit, cat. no. GG1001)，依照萃取步驟進行 genomic DNA 的萃取，主要參照 Chiu *et al*. (2001) 所列步驟進行。

PCR 增幅時所使用的引子序列及增幅的相關位置見表一及圖一。利用通用引子 (universal primers) 及特定引子 (specific primers)，增幅供試介殼蟲 rDNA 之 ITS1 和部分 18S 片段，並進行 DNA 序列解碼及比對。本試驗以 Perkin-Elmer 公司的 GeneAmp PCR System 2400 溫度控制器，進行 PCR 的增幅。PCR 反應溶液的配製參照 Chiu *et al*. (2001)。PCR 反應條件為: 94℃/3 min 預熱，然後以 94℃/1 min (denaturation), 56℃/1 min (annealing), 72℃/1 min (extension) 進行 40 個循環，最後再進行 72℃/5 min 的修補延伸。

三、RFLP 分析



圖二　利用 NS7 和 NS8 引子組合增幅 15 種介殼蟲之 rDNA/18S 的 PCR 產物圖譜。
1. 褐圓盾介殼蟲; 2. 淡薄圓盾介殼蟲; 3. 纓圍盾介殼蟲; 4. 扁堅介殼蟲; 5. 工背硬介殼蟲; 6. 咖啡硬介殼蟲; 7. 埃及吹綿介殼蟲; 8. 長尾粉介殼蟲; 9. 桔球粉介殼蟲; 10. 臀紋粉介殼蟲; 11. 康氏粉介殼蟲; 12. 鳳梨嫡粉介殼蟲; 13. 太平洋臀紋粉介殼蟲; 14. 黃綠綿介殼蟲; 15. 椰子擬輪盾介殼蟲。

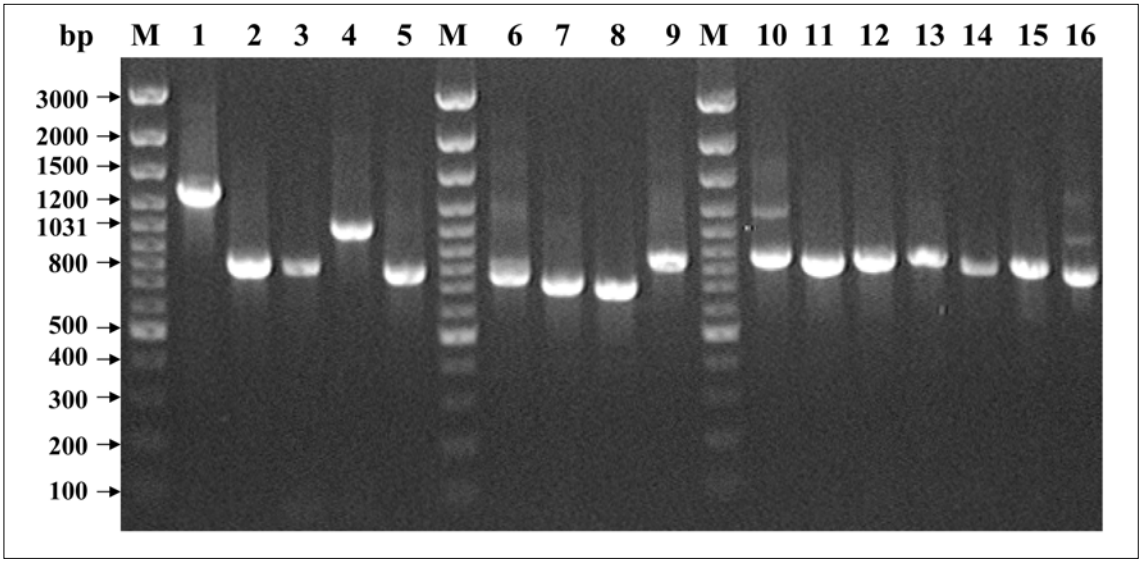
Fig. 2. Amplification patterns of PCR products of the 18S region of rDNA using the primers, NS7 and NS8, for 15 scale insect species.
1. *Chrysomphalus aonidum*; 2. *Aspidiotus destructor*; 3. *Thysanofiorina nephelii*; 4. *Coccus hesperidum*; 5. *Saissetia oleae*; 6. *Saissetia coffeae*; 7. *Icerya aegyptiaca*; 8. *Pseudococcus longispinus*; 9. *Nipaecoccus filamentosus*; 10. *Planococcus kraunhiae*; 11. *Pseudococcus comstocki*; 12. *Dysmicoccus brevipes*; 13. *Planococcus Minor*; 14. *Pulvinaria psidii*; and 15. *Pseudaulacaspis cockerelli*.
M, 100 bp DNA ladder marker (MBI Fermentas).

利用所篩選出的引子對，增幅供試 16 種介殼蟲 rDNA 之 ITS1 片段，然後分別進行核酸內切酶切割的 RFLP 分析，篩選能夠明顯鑑別出不同種類介殼蟲的核酸內切酶。取增幅出的 rDNA 之 ITS1 片段（約 1.0~1.5 μg），加入 1~2 units 的核酸內切酶、1x reaction buffer，最後加入 ddH_2O，使總體積爲 20 μl，依核酸內切酶所需的溫度下，進行酶切反應 2 小時。酶切後產物的電泳及 DNA 片段分析，參照 Chiu *et al*. (2001) 的方法及步驟進行，比較供試 16 種介殼蟲間核酸片段的 RFLP 圖譜。

結　果

一、介殼蟲的採集與鑑定

從海關進口截獲及田間採集的介殼蟲標本進行形態鑑定及玻片標本的製備。將獲得的樣本，挑出雌成蟲製成可供形態鑑定的玻片標本，共計 30 種，提供作爲傳統形態特徵鑑定時的依據，進行種類鑑定時並配合寄主植物進行。其中，16 種介殼蟲樣本充足，可供進行分子鑑定。包括：1. 埃及吹綿介殼蟲，2. 褐圓盾介殼蟲，3. 淡薄圓盾介殼蟲，4. 纓圍盾介殼蟲，5. 椰子擬輪盾介殼蟲，6. 扁堅介殼蟲，7. 工脊硬介殼蟲，8. 咖啡硬介殼蟲，9. 黃綠綿介殼蟲，10. 桔球粉介殼蟲，11. 鳳梨嫡粉介殼蟲，12. 絲粉介殼蟲，13. 甘蔗簇粉介殼蟲，14. 臀紋粉介殼蟲，15. 太平



圖三　利用 NS7 和 ITS6 引子組合增幅 16 種介殼蟲之 rDNA/部分 18S+ITS1 的 PCR 產物圖譜。
1. 埃及吹綿介殼蟲; 2. 褐圓盾介殼蟲; 3. 淡薄圓盾介殼蟲; 4. 纓圍盾介殼蟲; 5. 椰子擬輪盾介殼蟲; 6. 扁堅介殼蟲; 7. 工背硬介殼蟲; 8. 咖啡硬介殼蟲; 9. 黃綠綿介殼蟲; 10. 桔球粉介殼蟲; 11. 鳳梨嫡粉介殼蟲; 12. 絲粉介殼蟲; 13. 甘蔗簇粉介殼蟲; 14. 臀紋粉介殼蟲; 15. 太平洋臀紋粉介殼蟲; 16. 長尾粉介殼蟲。

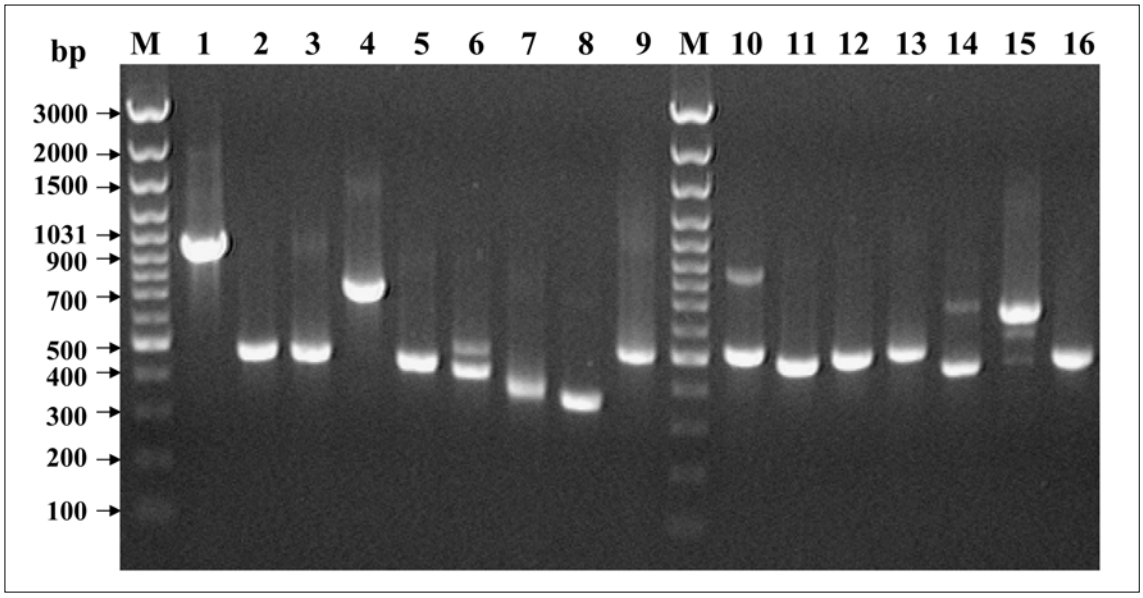
Fig. 3. Amplification patterns of PCR products of the ITS1 region and small portions of the 18S region of rDNA using the primers, NS7 and ITS6, for 16 scale insect species.
1. *Icerya aegyptiaca*; 2. *Chrysomphalus aonidum*; 3. *Aspidiotus destructor*; 4. *Thysanofiorina nephelii*; 5. *Pseudaulacaspis cockerelli*; 6. *Coccus hesperidum*; 7. *Saissetia oleae*; 8. *Saissetia coffeae*; 9. *Pulvinaria psidii*; 10. *Nipaecoccus filamentosus*; 11. *Dysmicoccus brevipes*; 12. *Ferrisia virgata*; 13. *Cataenococcus hispidus*; 14. *Planococcus kraunhiae*; 15. *Planococcus minor*; and 16. *Pseudococcus longispinus*.
M, 100 bp DNA ladder marker (MBI Fermentas).

洋臀紋粉介殼蟲，16. 長尾粉介殼蟲。另外也收集有康氏粉介殼蟲，但萃取後的 DNA 品質較差，僅進行部分的試驗。

二、目標 rDNA 的增幅、解碼及序列比對

萃取供試驗介殼蟲標本的 DNA 後，利用聚合酶連鎖反應技術，擴增核糖體形成基因中編碼及非編碼的區段，以進行序列解碼及 RFLP 的分析。本試驗根據 White *et al.* (1990) 所設計的通用引子，增幅 18S 保守區域並進行序列解碼比對，希望能從中設計供試驗介殼蟲利用的專一性引子。結果利用 NS7 和 NS8 的引子對組合，增幅產物約 390 bp (圖二)，DNA 序列解碼後進行比對，結果這段 DNA 產物在 15 種介殼蟲間（進行該試驗時尚未取得絲粉介殼蟲和甘蔗簇粉介殼蟲，但包括未進行後續試驗的康氏粉介殼蟲），分屬不同科的種類差異度較高，同屬或同科之間具有較高的保守性，顯示此段 DNA 可供進行科級的分析。但由於試驗介殼蟲的這段 DNA 序列差異度大，無法設計供使用的專一性引子，因此轉而篩選利用通用性引子。

利用通用引子進行初步篩選，以尋找合適的引子對。結果以 NS7 + ITS6 和 ITS5 + ITS6 兩組引子對，進行 PCR 增幅 rDNA 之 ITS1 非編碼區段，所得產物最佳 (圖三、四)。以 NS7 + ITS6 引子對增幅的產物大小，埃及吹綿介殼蟲約 1,200 bp，褐圓盾介殼蟲約 750 bp，淡薄圓盾介殼蟲約



圖四　利用 ITS5 和 ITS6 引子組合增幅 16 種介殼蟲之 rDNA/ITS1 的 PCR 產物圖譜。
1. 埃及吹綿介殼蟲; 2. 褐圓盾介殼蟲; 3. 淡薄圓盾介殼蟲; 4. 纓圍盾介殼蟲; 5. 椰子擬輪盾介殼蟲; 6. 扁堅介殼蟲; 7. 工背硬介殼蟲; 8. 咖啡硬介殼蟲; 9. 黃綠綿介殼蟲; 10. 桔球粉介殼蟲; 11. 鳳梨嫡粉介殼蟲; 12. 絲粉介殼蟲; 13. 甘蔗簇粉介殼蟲; 14. 長尾粉介殼蟲; 15. 臀紋粉介殼蟲; 16. 太平洋臀紋粉介殼蟲。

Fig. 4. Amplification patterns of PCR products of the ITS1 region of rDNA using the primers, ITS5 and ITS6, for 16 scale insect species.
1. *Icerya aegyptiaca*; 2. *Chrysomphalus aonidum*; 3. *Aspidiotus destructor*; 4. *Thysanofiorina nephelii*; 5. *Pseudaulacaspis cockerelli*; 6. *Coccus hesperidum*; 7. *Saissetia oleae*; 8. *Saissetia coffeae*; 9. *Pulvinaria psidii*; 10. *Nipaecoccus filamentosus*; 11. *Dysmicoccus brevipes*; 12. *Ferrisia virgata*; 13. *Cataenococcus hispidus*; 14. *Pseudococcus longispinus*; 15. *Planococcus kraunhiae*; and 16. *Planococcus minor*.
M, 100 bp DNA ladder marker (MBI Fermentas).

750 bp，纓圍盾介殼蟲約 1,000 bp，椰子擬輪盾介殼蟲約 750 bp，扁堅介殼蟲約 750 bp，工脊硬介殼蟲約 700 bp，咖啡硬介殼蟲約 700 bp，黃綠綿介殼蟲約 850 bp，桔球粉介殼蟲約 850 bp，鳳梨嫡粉介殼蟲約 800 bp，絲粉介殼蟲約 800 bp，甘蔗簇粉介殼蟲約 800 bp，臀紋粉介殼蟲約 800 bp，太平洋臀紋粉介殼蟲約 800 bp，長尾粉介殼蟲約 800 bp。在初步增幅的結果中，已可以粗略的將埃及吹綿介殼蟲和纓圍盾介殼蟲區別出來。

以 ITS5 + ITS6 引子對增幅的產物，其實是包含在以 NS7 + ITS6 引子對所增幅產物的一部份，該引子對增幅的各介殼蟲 DNA 產物大小較上述長度各約少 300 bp。由於以 ITS5 + ITS6 引子對增幅的產物較小，進行核酸內切酶的篩選及 RFLP 圖譜分析難度較高，因此僅選擇以 NS7 + ITS6 引子對所增幅的產物進行 RFLP 分析試驗。

三、PCR 增幅產物--ITS1 的 RFLP 分析

爲建立供試介殼蟲的 RFLP 酶切圖譜，以 NS7 + ITS6 引子對進行 PCR 增幅所得的 ITS1 區域及其側翼區，進行核酸內切酶切位的 RFLP 分析，以尋找能夠明顯鑑別 16

種介殼蟲的核酸內切酶。結果從十餘種核酸內切酶中，篩選出 *Taq*I、*Msp*I 和 *Hae*III 三種核酸內切酶，進行酶切的核酸片段 RFLP 分析，利用分類學檢索表的概念，可以用來區別供試的 16 種海關常截獲農產品上附有的介殼蟲類害蟲（圖五）。

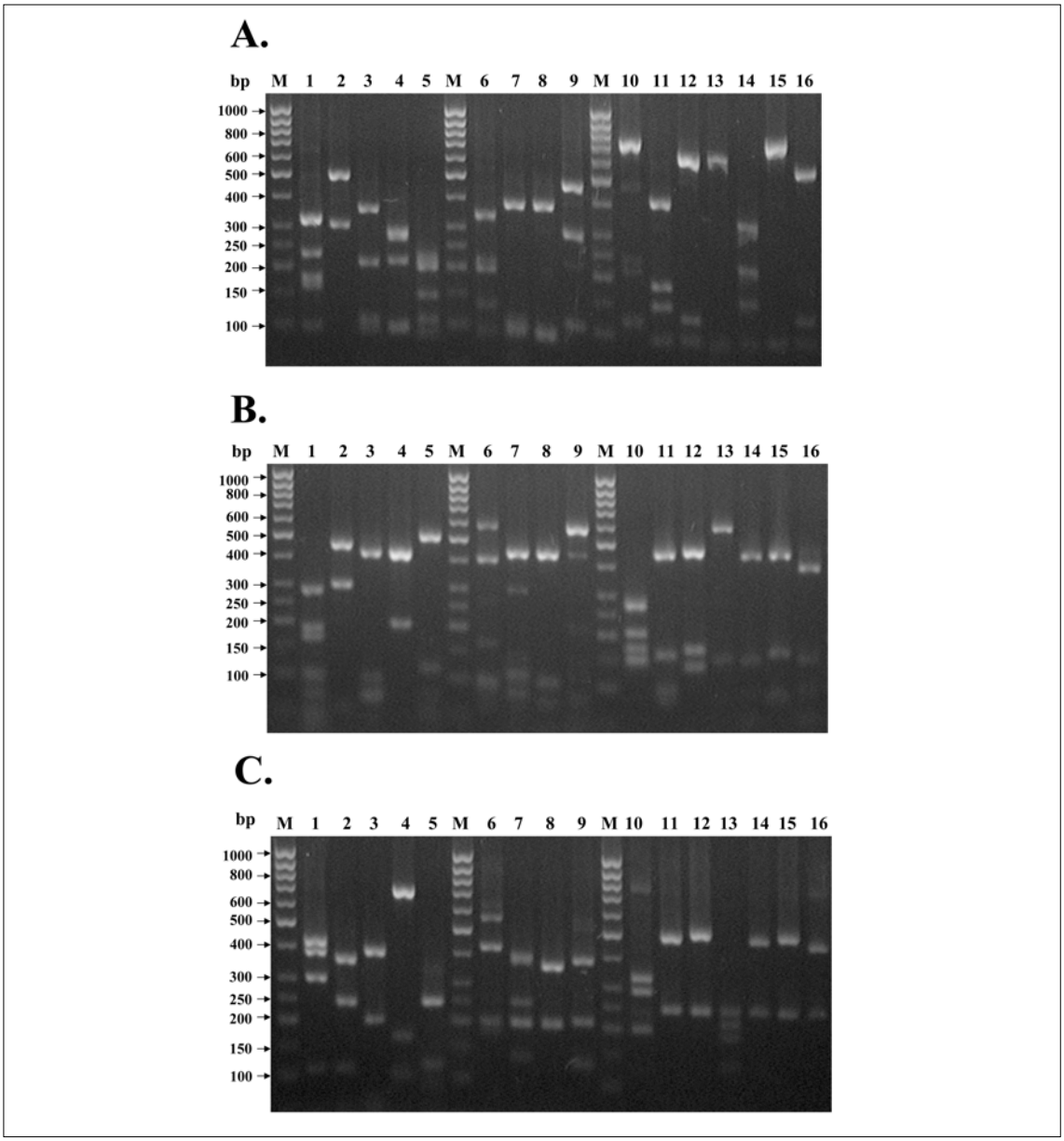
爲證明該技術在同種但不同個體間具有相同結果，消除因個體差異可能導致結果不同的可能性，因此針對同種介殼蟲，但不同生長期的個體進行核酸內切酶 RFLP 分析，以臀紋粉介殼蟲、太平洋臀紋粉介殼蟲和絲粉介殼蟲之卵、若蟲和雌成蟲爲例，在 *Msp*I 及 *Taq*I 的 RFLP 圖譜中，同種介殼蟲之各時期均具有相同的酶切條帶，而不同種間則條帶均具有差異鑑別性（圖六），證明該技術的可行性及可信度。

討　論

介殼蟲的鑑定，通常使用雌成蟲外部形態的特徵及寄主植物作爲鑑定的依據，例如白輪盾介殼蟲屬（*Aulacaspis*）依前體部（prosoma）的形狀、頭瘤（prosomal tubercle）的有無、盤狀腺孔（disc pore）的數目、臀板（pygidium）的形狀和骨化程度、臀葉（pygidial lobe）的形狀和結構、泌蠟腺（wax gland）的形狀和數目、生殖孔（gonopore）的位置、肛門（anus）的位置和形狀、緣腺刺（marginal gland spine）的形狀和數目、圍陰腺（perivulvar pore）的數目等特徵鑑別種級（Wu, 1994）。但是形態特徵在相似的介殼蟲種類的鑑定上仍有一些待克服之處，例如：1. 許多鑑定的形態特徵有重疊的現象，對一個分類專家來說，進行鑑定工作也很困難；2. 介殼蟲的鑑定，其分類特徵大部分是利用雌成蟲，對於雄蟲或未成熟時期，均缺乏鑑定分類的特徵。由此可知，介殼蟲不論在分類或是檢疫鑑定上，均遭遇到不同程度的難題。

在進口植物或其產品檢出之介殼蟲中，共計鑑別出 21 屬 30 種之介殼蟲，爲目前檢出各類微小動物中，鑑定至種最多的一類，在這 30 種中，以台灣地區尚未有發生記錄之甘蔗簇粉介殼蟲被檢出次數最多，達 122 次，其次爲纓圍盾介殼蟲，被檢出次數達 119 次，而後爲桑粉介殼蟲 54 次、橘臀紋粉介殼蟲 47 次、長尾粉介殼蟲 46 次等（Chang and Ko, 2003）。由於自由經濟的發展及國人飲食多元化的影響，國人逐漸喜好榴槤、山竹、紅毛丹等風味特殊的東南亞熱帶水果，加上產期因素所進口的荔枝、龍眼，使得近幾年來東南亞地區生產之熱帶水果輸入量大幅成長，由於熱帶地區氣候條件極爲適合介殼蟲之繁殖與生長，上述水果種類亦爲介殼蟲極爲喜愛之寄主植物，使得檢出介殼蟲種類之植物或其產品幾乎均由東南亞地區國家所進口，因此如何做好檢疫把關的工作，是當前重要的課題。

利用分子技術進行昆蟲快速診斷鑑定，不但可以作爲傳統形態鑑定結果的重複驗證，並可輔助解決具有多態型物種的鑑定，以及解決某些昆蟲在形態鑑定上必須以特定蟲期或性別的限制。此外，以 DNA 作爲分子標誌的鑑定技術，更提供檢疫上只取得部分殘肢樣本即可診斷鑑定的優點。以本研究所利用的 rDNA 標誌具有下列優點：1. 在同種昆蟲中穩定性高，而不同種昆蟲間的變異性大；2. 在昆蟲體內的複製單位（copy unit）多；3. 已有多種通用的增幅引子（universal primers）可利用，能容易地大量增幅出所需之目標 DNA 等優點，因此在作爲鑑定分析昆蟲種類的工具中，是一種極佳



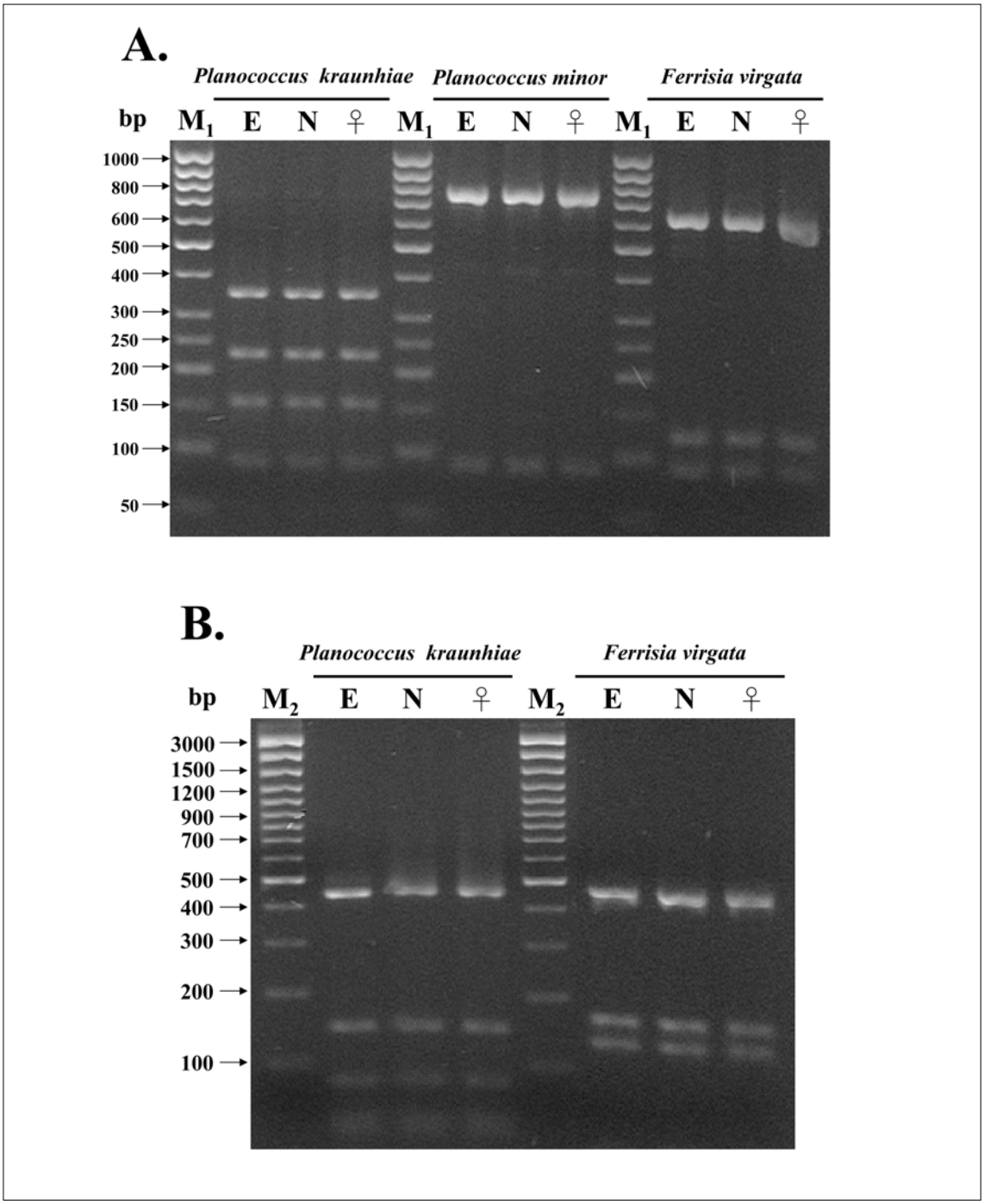
圖五　利用核酸內切酶 (A. *Msp*I; B. *Taq*I; C. *Hae*Ⅲ) 酶切 18S+ITS1/rDNA 區段的 PCR 產物 (引子組合為 NS7 and ITS6) 之種間 RFLP 圖譜分析。

1. 埃及吹綿介殼蟲; 2. 褐圓盾介殼蟲; 3. 淡薄圓盾介殼蟲; 4. 纓圍盾介殼蟲; 5. 椰子擬輪盾介殼蟲; 6. 扁堅介殼蟲; 7. 工背硬介殼蟲; 8. 咖啡硬介殼蟲; 9. 黃綠綿介殼蟲; 10. 桔球粉介殼蟲; 11. 鳳梨嫡粉介殼蟲; 12. 絲粉介殼蟲; 13. 甘蔗簇粉介殼蟲; 14. 長尾粉介殼蟲; 15. 臀紋粉介殼蟲; 16. 太平洋臀紋粉介殼蟲。

Fig. 5. Interspecific RFLP analysis of the ITS1 and 18S/rDNA region PCR products (primer sets, NS7 and ITS6) (endonucleases, A. *Msp*I; B. *Taq*I; and C. *Hae*Ⅲ).

1. *Icerya aegyptiaca*; 2. *Chrysomphalus aonidum*; 3. *Aspidiotus destructor*; 4. *Thysanofiorina nephelii*; 5. *Pseudaulacaspis cockerelli*; 6. *Coccus hesperidum*; 7. *Saissetia oleae*; 8. *Saissetia coffeae*; 9. *Pulvinaria psidii*; 10. *Nipaecoccus filamentosus*; 11. *Dysmicoccus brevipes*; 12. *Ferrisia virgata*; 13. *Cataenococcus hispidus*; 14. *Pseudococcus longispinus*; 15. *Planococcus kraunhiae*; and 16. *Planococcus minor*.

M, 50 bp DNA ladder marker (MBI Fermentas).



圖六　同種介殼蟲在不同生長時期之 rDNA/PCR 產物 (引子組合為 NS7 and ITS6)，以核酸內切酶 (A. *Msp*I; B. *Taq*I) 切割之種內 RFLP 圖譜分析。

Fig. 6. Intraspecific RFLP analysis of rDNA/PCR products using the endonucleases, A. *Msp*I; and B. *Taq*I. The rDNA/PCR products are from different growth periods of the same scale insect species.
E, egg; N, nymph; ♀, adult female.
M_1, 50 bp DNA ladder marker (MBI Fermentas); M_2, 100 bp DNA ladder marker (MBI Fermentas).

表二　16 種試驗介殼蟲的 DNA 標誌檢索表

Table 2.　DNA marker key for the 16 scale insect species used in this study

1. ITS1 PCR 產物 (引子爲 NS7+ITS6) 大於 900 bp ---------- 2
--. ITS1 PCR 產物 (引子爲 NS7+ITS6) 小於 900 bp ---------- 3
2. PCR 產物以 *Msp* I 酶切可得 410, 390, 300 和 110 bp 片段 ---------- 埃及吹綿介殼蟲 (*Icerya aegyptiaca*)
--. PCR 產物以 *Msp* I 酶切可得 700, 170 和 110 bp 片段 ---------- 纓圍盾介殼蟲 (*Thysanofiorina nephelii*)
3. PCR 產物以 *Hae* III 酶切可得 2 個片段者 ---------- 4
--. PCR 產物以 *Hae* III 酶切可得 2 個片段以上者 ---------- 11
4. PCR 產物以 *Hae* III 酶切可得 250 和 120 bp 片段 ---------- 椰子擬輪盾介殼蟲 (*Pseudaulacaspis cockerelli*)
--. PCR 產物以 *Hae* III 酶切的片段並非 250 和 120 bp 者 ---------- 5
5. PCR 產物以 *Hae* III 酶切可得 400 和 200 bp 片段 ---------- 6
--. PCR 產物以 *Hae* III 酶切可得 500 和 250 bp 片段 ---------- 7
6. PCR 產物以 *Msp* I 酶切可得 380, 220, 110 和 100 bp 片段 ---------- 淡薄圓盾介殼蟲 (*Aspidiotus destructor*)
--. PCR 產物以 *Msp* I 酶切可得 390 和 90 bp 片段 ---------- 咖啡硬介殼蟲 (*Saissetia coffeae*)
7. PCR 產物以 *Msp* I 酶切可得 4 個片段者 ---------- 8
--. PCR 產物以 *Msp* I 酶切可得 3 個片段以下者 ---------- 9
8. PCR 產物以 *Msp* I 酶切可得 400, 180, 140 和 90 bp 片段 ---------- 鳳梨嫡粉介殼蟲 (*Dysmicoccus brevipes*)
--. PCR 產物以 *Msp* I 酶切可得 350, 220, 150 和 90 bp 片段 ---------- 臀紋粉介殼蟲 (*Planococcus kraunhiae*)
9. PCR 產物以 *Msp* I 酶切可得 710 和 100 bp 兩片段者 ---------- 太平洋臀紋粉介殼蟲 (*Planococcus minor*)
--. PCR 產物以 *Msp* I 酶切可得 3 個片段者 ---------- 10
10. PCR 產物以 *Taq* I 酶切可得 500, 170 和 140 bp 片段 ---------- 絲粉介殼蟲 (*Ferrisia virgata*)
--. PCR 產物以 *Taq* I 酶切可得 420, 160, 100 和 50 bp 片段 ---------- 長尾粉介殼蟲 (*Pseudococcus longispinus*)
11. PCR 產物以 *Msp* I 酶切可得 3 個片段以上者 ---------- 12
--. PCR 產物以 *Msp* I 酶切可得 2 個片段者 ---------- 13
12. PCR 產物以 *Msp* I 酶切可得 350, 200, 130 和 80 bp 片段 ---------- 扁堅介殼蟲 (*Coccus hesperidum*)
--. PCR 產物以 *Msp* I 酶切可得 460, 300 和 120 bp 片段 ---------- 黃綠綿介殼蟲 (*Pulvinaria psidii*)
13. PCR 產物以 *Taq* I 酶切可得 2 個片段者 ---------- 14
--. PCR 產物以 *Taq* I 酶切可得 3 個片段以上者 ---------- 15
14. PCR 產物以 *Taq* I 酶切可得 450 和 300 bp 片段 ---------- 褐圓盾介殼蟲 (*Chrysomphalus aonidum*)
--. PCR 產物以 *Taq* I 酶切可得 610 和 160 bp 片段 ---------- 甘蔗簇粉介殼蟲 (*Cataenococcus hispidus*)
15. PCR 產物以 *Hae* III 酶切可得 380, 250 和 200 bp 片段 ---------- 工脊硬介殼蟲 (*Saissetia oleae*)
--. PCR 產物以 *Hae* III 酶切可得 330, 290 和 250 bp 片段 ---------- 桔球粉介殼蟲 (*Nipaecoccus filamentosus*)

的 DNA 分子標誌 (White *et al*., 1990; Palumbi, 1996; Armstrong *et al*., 1997)。由本試驗的結果可知，rDNA 中非編碼區的 ITS 1 轉錄區內空白段，利用 rDNA/PCR-RFLP 的技術分析得知，在同種的試驗介殼蟲間，但不同個體或不同生長期間，其 DNA 的切位穩定性極高，具有一致性，而不同種的試驗介殼蟲間則具有不同的切位，產生某種程度上的差異，足以區別 16 種海關常截獲農產品上附有的介殼蟲類害蟲。並且，利用本試驗的 rDNA/PCR-RFLP 技術，所得到的分類特徵相當明顯，直接可從 RFLP 圖譜中比對鑑定，任何接受簡單訓練的檢疫人員，即能從 DNA 的電泳膠片中得到答案，解決傳統形態鑑定需要專家進行的難題。

由於進口植物或其產品檢出有害生物種類統計，昆蟲綱爲檢出種類最大宗。針對昆蟲類的統計中，2002~2003 年間以纓翅目薊馬類被檢出最多，同翅目介殼蟲類居次，蚜蟲類第三 (Chang and Ko, 2003)。因此在檢出次數頻繁、種類多且形態特徵相似的介

殼蟲上，雖利用本試驗的鑑定技術，可從 RFLP 圖譜中比對診斷，但在眾多的圖譜中，會讓人不知從何進行比對，加上近源種的 DNA 片段差異較小，也造成直接比對圖譜的困難度。爲解決這個難題，本試驗仿效傳統分類二分法檢索的方式，將 16 種介殼蟲的分子鑑定結果製作成檢索表 (表二)，方便檢疫人員或使用者進行鑑定。爲檢測檢索表的準確性，我們進行 16 種介殼蟲共 28 個不同族群，84 個不同個體的圖譜檢索測試，都得到正確的答案。因此利用本項技術及檢索方式，可以在極短時間內完成鑑定工作，克服傳統形態鑑定需費時費力飼養疑似蟲源的工作，實在是一項快速、簡便且準確的害蟲檢疫鑑定方式，適合開發作爲介殼蟲之檢疫快速鑑定的方法。

誌　　謝

本研究由行政院農業委員會動植物防疫檢疫局委託計畫 92 農科-1.8.2-檢-BB 及 93 農科-1.9.1-檢-B2 之經費補助，使 DNA 標誌的診斷鑑定技術開發得以順利進行，謹致謝忱。

引用文獻

Armstrong, K. F., C. M. Cameron, and E. R. Frampton. 1997. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) species identification: a rapid molecular diagnostic technique for quarantine application. Bull. Entomol. Res. 87: 111-118.

Caterino, M. S., S. Cho, and F. A. H. Sperling. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of babel. Annu. Rev. Entomol. 45: 1-54.

Chang, S. C., and C. C. Ko. 2003. Guidebook to Detection of Pest from Imported Plants or Plant Products--Part of Insect. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quaratine, Council of Agriculture, Taipei, Taiwan. 258 pp. (in Chinese)

Chen, C. H., and C. J. Shih. 2003. Rapid identification of three species of blow flies (Diptera: Calliphoridae) by PCR-RFLP and DNA sequencing analysis. Formosan Entomol. 23: 59-70 (in Chinese).

Chen, W. Y., T. H. Hung, and S. F. Shiao. 2004. Molecular identification of forensically important blow fly species (Diptera: Calliphoridae) in Taiwan. J. Med. Entomol. 41: 47-57.

Chiu, Y. C., W. J. Wu, and C. J. Shih. 2001. Identification of three *Aulacaspis* species (Homoptera: Diaspididae) by PCR-RFLP analysis for quarantine application. Formosan Entomol. 21: 365-375 (in Chinese).

Chiu, Y. C., W. J. Wu, S. F. Shiao, and C. J. Shih. 2000. The application of RAPD-PCR to develop rapid diagnostic technique for identification of 6 species of *Liriomyza* spp. (Diptera: Agromyzidae). Chinese J. Entomol. 20: 293-309 (in Chinese).

Loxdale, H. D., and G. Lushai. 1998. Molecular markers in entomology. Bull. Entomol. Res. 88: 577-600.

Lu, K. H., S. C. Chang, J. Y. Hsu, and J. T. Yang. 2003. A combination of traditional and modern techniques for insect identification-using the codling moth, *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae), as an example. Plant Prot. Bull. 45: 359-364 (in Chinese).

Palumbi, S. R. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. pp. 205-247. *In*: D. M. Hillis, C. Moritz, and B. K. Mable eds. Molecular Systematics, 2'nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *In*: M. A. Innis, D. H. Gelgand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA.

Williams D. J., and G. W. Watson. 1988. The Scale Insects of the Tropical South Pacific Region. C.A.B. International, Wallingford, Oxon, UK. 290 pp.

Wong, C. Y., S. P. Chen, and L. Y. Chou. 1999. Guidebook to Scale Insects of Taiwan. Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan. 98 pp. (in Chinese).

Wu, W. J. 1994. Scale insect. pp. 545-678. *In*: Y. H. Tzeng, and C. N. Chen, eds. Plant Quarantine--Diagnosis of Tiny Animals. Bureau of Standards, Methology and Inspection, Ministry of Economic Affairs, Taipei, Taiwan (in Chinese).

收件日期：2004 年 3 月 20 日
接受日期：2004 年 6 月 20 日

Application of the PCR-RFLP Technique for the Rapid Diagnosis of Scale Insects (Homoptera: Coccoidea) on Imported Agricultural Products in Taiwan

Yi-Chung Chiu and Wen-Jer Department of Entomology, National Taiwan University, Taipei 106, Taiwan, R.O.C.
Cheng-Yu Wong and Shu-Pei Chen Department of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung 413, Taiwan, R.O.C.
Cheng-Jen Shih* Department of Entomology, National Taiwan University, Taipei 106, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

There are 30 scale insect species which have been intercepted from agricultural products coming into Taiwan by quarantine workers at customs. This study attempted to develop a molecular diagnostic technique (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) using genomic DNA markers (ribosomal DNA, rDNA) for identifying 16 scale insect species. NS7 and ITS6 primer sets were used to amplify ITS1 and its flanking regions of rDNA from genomic DNA as a template extracted from a single specimen. DNA extracted from these 16 scale insect species yielded a single fragment after PCR amplification. These PCR products were then cut with various restriction endonucleases in order to compare the results of restriction fragment length polymorphism. Our results also reveal that it is possible to discriminate these 16 scale insect species based on the species-specific patterns acquired from digesting the PCR products with the endonucleases, *Taq*I, *Msp*I, and *Hae*III. Futhermore, we also a set up a molecular key for these 16 scale insect species based on their RFLP digestion patterns.

Key words: scale insect, rapid identification, restriction fragment length polymorphism (RFLP), molecular key