

# 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

邱一中 吳文哲 蕭旭峰 石正人\* 國立台灣大學 台北市大安區羅斯福路 4 段 1 號

## 摘 要

斑潛蠅屬 (*Liriomyza*) 昆蟲為國際檢疫上的重要害蟲，但其成蟲及幼體時期(卵、幼蟲和蛹)均不易鑑定，在檢疫鑑定上面臨極大的困難。本研究之目的在嘗試應用分子生物技術，分析基因組 DNA (genomic DNA) 並建立分子診斷標誌，以解決斑潛蠅種類鑑定所面臨的難題。以 DNA 作為分子標誌的試驗中，利用 100 個隨機引子 (random primer) 分別進行聚合酶連鎖反應 - DNA 隨機增幅多態型分析 (random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction, RAPD-PCR)，結果共篩選出 3 個隨機引子 UBC-70、UBC-71 和 UBC-96，所增幅出的核酸片段型態，可以清楚區別出供試的 6 種斑潛蠅，包括昭和草斑潛蠅 (*L. asterivora*)、蕃茄斑潛蠅 (*L. bryoniae*)、中華蔥斑潛蠅 (*L. chinensis*)、南美斑潛蠅 (*L. huidobrensis*)、蔬菜斑潛蠅 (*L. sativae*) 以及非洲菊斑潛蠅 (*L. trifolii*)。同種斑潛蠅的不同個體間、不同生活區，或取食不同寄主作物的小族群 (colony) 間，均增幅出極相似的 DNA 片段長度多態型，具有高穩定性。然而，不同種的斑潛蠅間其 RAPD-PCR 多態型，則具有明顯的差異，可供作 6 種斑潛蠅種類的鑑定依據。

關鍵詞：斑潛蠅、快速診斷鑑定技術、聚合酶連鎖反應、DNA 隨機增幅多態型。

## 前 言

台灣地處亞熱帶，終年適合昆蟲生長繁衍，蟲害問題一直威脅農民並困擾農政單位。在國際自由貿易與人員交流日益頻繁的今日，外來害蟲入侵的機會與日俱增。因此，如何作好害蟲檢疫工作，防止外來害蟲入侵，是當前重要的課題。Spencer (1989) 於“Plant Protection and Quarantine”專書

中，所列的 20 多種檢疫重要性潛蠅類害蟲中，斑潛蠅屬即佔了 10 種之多，足見斑潛蠅屬是潛蠅科中極具經濟重要性的一屬。斑潛蠅屬目前世界上約有三百多種，但真正為害農作物的害蟲種類，則約有 23 種 (Parrella, 1987; Spencer, 1973)，台灣目前已記錄的有 15 種，具經濟為害性者則有 7 種之多 (Shiao, 1991; Shiao and Wu, 1989; Shiao and Wu, 1995; Shiao and Wu, 1998;

\*論文聯繫人  
e-mail: shihcj@ccms.ntu.edu.tw

Shiao *et al.*, 1991)。

害蟲檢疫的首要工作是害蟲種類的鑑定，昆蟲分類一般以成蟲的外部形態作為鑑定依據，幼體時期的分類，常因形態不穩定或特徵不明顯而難以鑑定。因此，開發快速、簡易且準確的檢疫害蟲鑑定技術，廣泛適用於昆蟲不同的發育時期，且只需少數的樣品即可完成鑑定工作，是落實害蟲檢疫最基本的要求。隨著生化及分子生物技術的快速發展，提供許多新的技術和分析的分子標誌 (molecular markers)，用以協助進行分類鑑定的工作。這些分析標誌包括蛋白質和核酸分子等。透過這些新的技術和分析標誌，可以有效地探討形態特徵無法解決的部份問題，特別是外形相似的種類、幼期階段或不同地理分佈的族群等之鑑定。

本研究以重要的檢疫害蟲 - 斑潛蠅 (leafminer flies) 為材料，進行快速鑑定技術的研究。斑潛蠅在屬級的同質性極高，外部形態特徵極為近似，因此種級分類上不易進行，直接以外部形態進行鑑定非常困難。目前分類專家多採用穩定性較高的雄性生殖器官，作為分類的依據 (Nowakowski, 1962; Spencer, 1990)。但是，在雌蟲以及幼體階段的蟲體，目前均無法加以鑑定。此外，當兩種或兩種以上雜食性種類，同時並存於一個區域時，競爭、取代的現象不斷發生，而此時正確的判斷出種類，往往是防治成功與否的第一個關鍵 (Shiao and Wu, 1996; 1998)。1980 年代美國加州非洲菊斑潛蠅大猖獗時，分類上的混淆就是一個典型的例證，造成菊花業極嚴重的損失，幾乎全面崩潰 (Newman and Parrella, 1986; Parrella and Keil, 1983)。因此，在檢疫以及分類上，均面臨極需解決的同樣問題。

本研究則應用分子生物學的方法於斑潛

蠅之診斷鑑定上，期望能提供符合檢疫和分類要求的技術，輔助我國害蟲檢疫及鑑定的施行。試驗以 6 種斑潛蠅為材料，包括昭和草斑潛蠅、蕃茄斑潛蠅、中華蔥斑潛蠅、南美斑潛蠅、蔬菜斑潛蠅以及非洲菊斑潛蠅。利用 RAPD-PCR 的分析技術，進行這 6 種斑潛蠅種類的鑑定，並探討分子標誌作為斑潛蠅種類鑑定工具的準確性，及在害蟲檢疫上的應用價值。

## 材料與方法

### 一、斑潛蠅標本採集與保存

本研究以斑潛蠅為材料，利用基因組 DNA 進行種類的鑑別。供試蟲源採集自台灣本島北、中、南和東部田間，直接以吸蟲管採集成蟲及受害葉片。標本採集時，以小族群為單位，分為野外直接採集的蟲源，以及摘取受害植株，攜回實驗室純系飼養兩類。將活體及標本，分別依性別和不同生長階段加以區分，標本保存於 95% 酒精中備用，或直接冰存在 -80 的冰箱中或以液態氮冰存備用。並在各採集點的小族群中，選出部分雄成蟲，利用雄性生殖器官作為傳統形態上的種類鑑定。

實驗室純系飼養的方法，首先種植寄主植物於小型壓克力的養蟲箱中 (30 cm × 30 cm × 50 cm)，然後將採集自野外族群的單隻雌成蟲接入，使其產卵並延續世代，於飼養過程中收集幼蟲、蛹及成蟲等標本，並以雄成蟲進行傳統形態的種類鑑定，由此方式而獲得純系的蟲源。

供試的 6 種斑潛蠅採集記錄如下：

1. 昭和草斑潛蠅 (*L. asterivora*)：採自台大農場 (The farm of National Taiwan University)、宜蘭縣壯圍鄉 (Chuang-wei

- Shiang, Ilan County) 和三星鄉 (San-shing Shiang, Ilan County) ; 共 6 個小族群。
- 蕃茄斑潛蠅 (*L. bryoniae*) : 採自宜蘭縣壯圍鄉 (Chuang-wei Shiang, Ilan County) 和雲林縣西螺鎮 (C-lou Jen, Yunlin County) ; 共 7 個小族群。
  - 中華蔥斑潛蠅 (*L. chinensis*) : 採自宜蘭縣壯圍鄉 (Chuang-wei Shiang, Ilan County) 和三星鄉 (San-shing Shiang, Ilan County) 以及雲林縣西螺鎮 (C-lou Jen, Yunlin County) ; 共 15 個小族群。
  - 南美斑潛蠅 (*L. huidobrensis*) : 採自宜蘭縣壯圍鄉 (Chuang-wei Shiang, Ilan County) 和三星鄉 (San-shing Shiang, Ilan County)。共 14 個小族群。
  - 蔬菜斑潛蠅 (*L. sativae*) : 採自台大農場 (The farm of National Taiwan University)、台大植病新館 (National Taiwan University Department of Plant Pathology and Entomology)、宜蘭縣壯圍鄉 (Chuang-wei Shiang, Ilan County) 和三星鄉 (San-shing Shiang, Ilan County)、台中市作物田 (The cultivated land of Taichung)、彰化縣田尾鄉 (Tien-wei Shiang, Changhua County)、雲林縣西螺鎮 (C-lou Jen, Yunlin County) 和荊桐鄉 (Tzu-tung Shiang, Yunlin County)、以及台南縣新營市 (Hsin-yich City, Tainan County) ; 共 46 個小族群。
  - 非洲菊斑潛蠅 (*L. trifolii*) : 採自南投縣埔里鎮 (Pu-li Jen, Nantu County) 及彰化縣田尾鄉 (Tien-wei Shiang, Changhua County) 和花壇鄉 (Hun-tan Shiang, Changhua County) ; 共 25 個小族群。

## 二、核酸標誌的分析

### 1. 斑潛蠅基因組 DNA 的萃取 :

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) 以及 Omega Biotek 公司的 DNA 純化試劑組 (E.Z.N.A.<sup>®</sup> Tissue DNA Kit I, Cat. No. D3495-01) 進行斑潛蠅 DNA 萃取。將單隻斑潛蠅標本置於 1.5 ml 離心管中, 加入 200  $\mu$ l buffer LYS, 以研磨棒將蟲體組織充分研磨 (可先以液態氮處理標本後再研磨), 再將組織研磨液置於 65  $^{\circ}$ C 水浴中, 加熱處理 1 - 2 小時。依照 DNA 純化試劑組中所附說明書步驟, 萃取基因組 DNA。主要步驟略述如下: 在組織研磨液中加入 20  $\mu$ l Proteinase K (20 mg/ml), 震盪混合均勻後, 置於 56  $^{\circ}$ C 水浴中, 1 - 2 小時, 隨後增溫至 70  $^{\circ}$ C 加熱 20 分鐘, 使 Proteinase K 失去其功能。隨後加入 200  $\mu$ l buffer EX 於 70  $^{\circ}$ C, 10 分鐘後, 再加入 210  $\mu$ l isopropanol 並混合均勻。將樣品轉移到 spin column, 以 6,000 xg (或 10,000 rpm, KUBOTA 6800, RA-155R rotor) 離心 2 分鐘。以 wash buffer 500  $\mu$ l 清洗 spin column, 並以 6,000 xg 離心 2 分鐘, 重覆此步驟清洗兩次後, 用 100  $\mu$ l 已預熱 70  $^{\circ}$ C 的 elute buffer 或 ddH<sub>2</sub>O, 將 DNA 從 spin column 中洗提出來, 以 6,000 xg 離心 2 分鐘, 洗提液即含有斑潛蠅的 genomic DNA (約 2 - 4 ng/ $\mu$ l), 保存於 4  $^{\circ}$ C 備用或 -20  $^{\circ}$ C 中長久保存。

### 2. RAPD-PCR 分析 :

利用 10-mers RAPD primer set 100/1 kit (The University of British Columbia, UBC 合成), 對 6 種斑潛蠅進行 RAPD-PCR 分析。本試驗以 Perkin-Elmer 公司的 GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2400 溫度控制

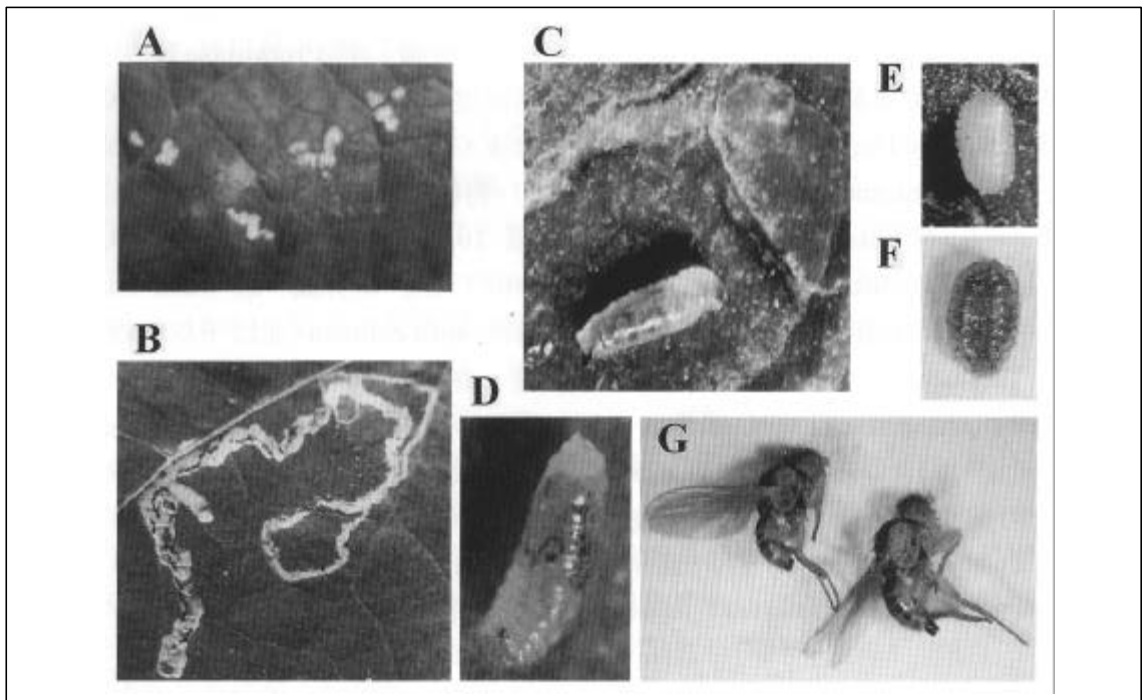
器，進行 PCR 的增幅。取 PCR 專用 0.2 ml 微量離心管，加入 4.0  $\mu$ l 的斑潛蠅 DNA 萃取液 (約 8 ~ 16 ng DNA)、0.6 unit 之 DNA polymerase (購自 TaKaRa 公司)、10X reaction buffer (內含 15 mM  $Mg^{2+}$ ) 2.5  $\mu$ l、2.5 mM dNTPs 混合液 2.5  $\mu$ l (終濃度 0.25 mM) 及 1.5  $\mu$ M random primer 3.5  $\mu$ l (終濃度 0.2  $\mu$ M)，最後加入去離子滅菌水，使總體積為 25  $\mu$ l。將溶液混合均勻後，進行 PCR 增幅反應。PCR 反應的條件為 96 /5 分鐘，然後 96 /30 秒，40 /30 秒，72 /1 分 30 秒，進行 40 個循環，最後經 72 /7 分鐘後，儲存於 4  $^{\circ}$ C 冰箱中備用。分析時，取 5  $\mu$ l 的 PCR 增幅產物，以 2.0% 的 agarose gel (內含 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide) 在

1X TAE buffer 中進行電泳，電泳結束後，取出膠片在 UV 光下檢視觀察並拍照記錄，比較其增幅的 DNA 片段圖譜，DNA 片段大小的測定，是採用台灣科光生物公司 (TOPBIO) 的 VGIS-1 數位影像系統 (Video Gel Image System) 及 AAB 公司 (Advanced American Biotechnology) 的影像分析軟體，依 Rf 值之原理推算出 DNA 片段長度。

## 結 果

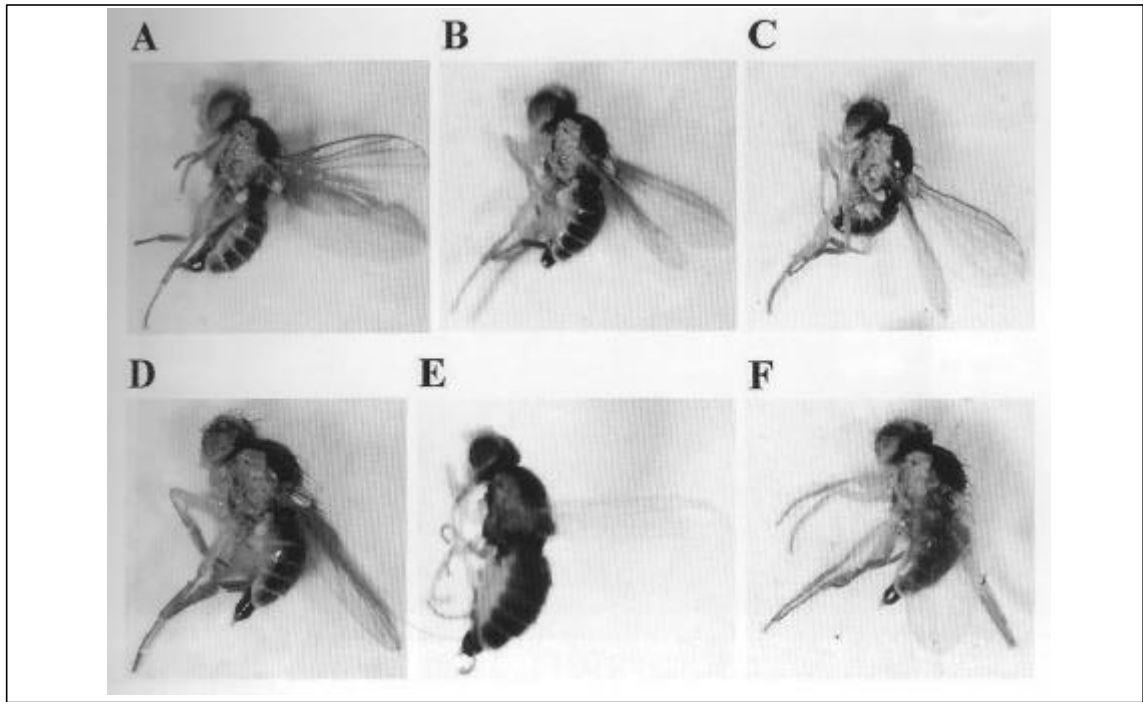
### 一、斑潛蠅標本採集與為害習性的觀察

通常斑潛蠅的雌蟲會利用其產卵管鞘，戳破植物葉片或莖表皮，再以口器舔食汁液；



圖一 蔬菜斑潛蠅 (*L. sativae*) 在菜豆上的為害情形及各生長時期的外部形態。

Fig. 1 The damage caused by *L. sativae* to yard long bean and external morphology of growing periods. A. Ovipositing traces of adults; B. The damage caused by larva; C. and D. Larva; E. Pupa; F. Emerging of pupa; G. Adult, male (left) and female (right).



圖二 外部形態極為近似的 6 種供試斑潛蠅雌成蟲。

Fig. 2 Six similar external morphology of female adults *Liriomyza* spp.

A. *L. trifolii* ; B. *L. sativae* ; C. *L. bryoniae* ; D. *L. asterivora* ; E. *L. chinensis* ; F. *L. huidobrensis*.

表一 RAPD-PCR 試驗中所使用的引子及其核酸序列。

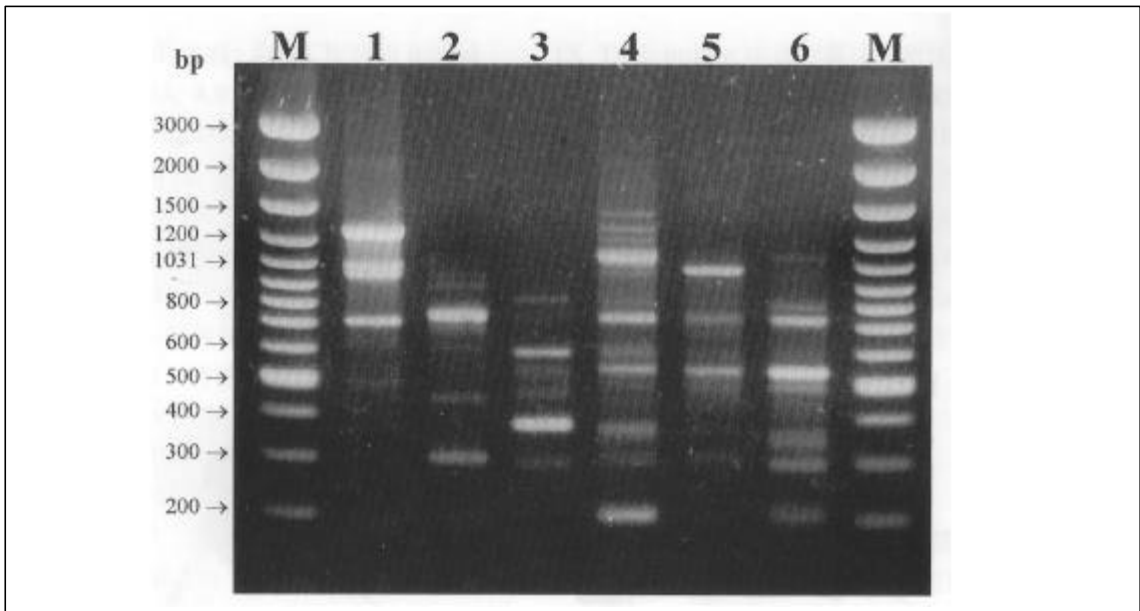
Table 1. Base-pair sequence of RAPD-PCR primers used.

Primer	Base-pair sequence (5'→3')
UBC-70	G G G C A C G C G A
UBC-71	G A G G G C G A G G
UBC-96	G G C G G C A T G G

而雄蟲因無堅硬的產卵管，因此多利用雌蟲的截痕或植物表面的傷口進行取食。另外雌蟲也利用產卵管穿破植物葉表皮，而將卵產於葉肉組織中。這些截痕是判斷作物是否遭受斑潛蠅為害的重要指標，可以作為標本採集或檢疫檢查時，一個重要的判斷依據。

雌蟲產於葉肉中的卵，通常是小而透明，不易以肉眼察覺。實際調查時，可利用乳酸酚-酸性洋紅染液染色後，再鏡檢觀察 (Lu,

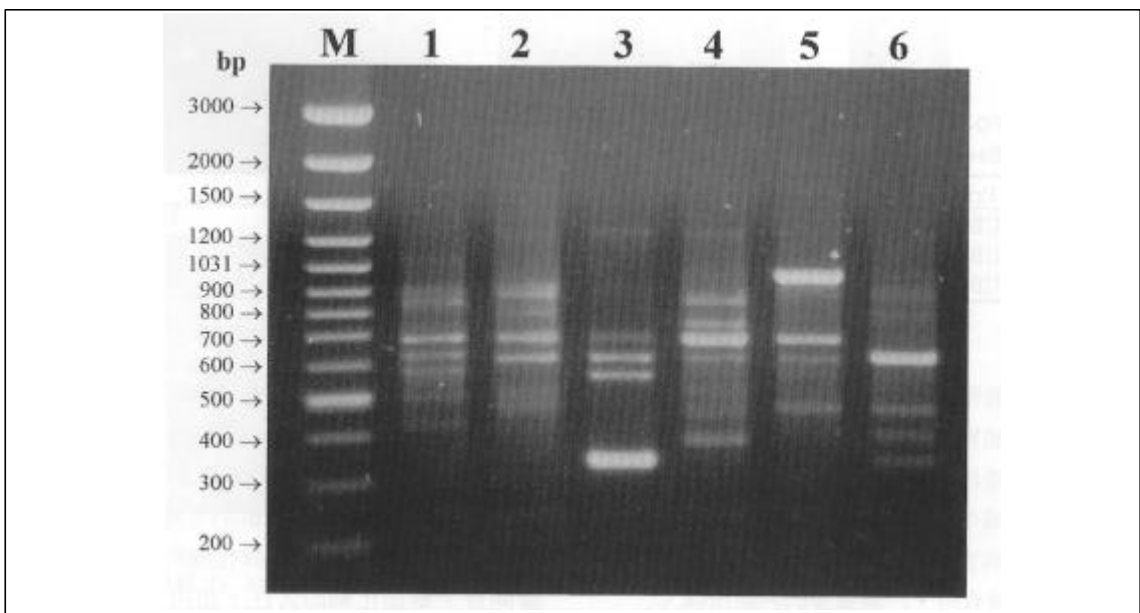
1987; Parrella and Robb, 1982)。幼蟲自卵孵化後即在植物的葉肉組織中潛食，形成蛇行的隧道狀食痕。幼蟲具有 3 齡，幼蟲取食痕可作為分類的參考，末齡的老熟幼蟲 (或稱為前蛹期) 會鑽出葉片尋找化蛹的位置，這種離開寄主植物化蛹的習性，也可以作為檢疫業務執行時，檢查貨物時的參考。以蔬菜斑潛蠅為例，圖示斑潛蠅取食菜豆時的為害狀及生活史，如圖一所示，為產卵造成的痕



圖三 6 種斑潛蠅使用 primer UBC-70 進行 RAPD-PCR 所得之 DNA 片段圖譜。

Fig. 3 Ethidium bromide-stained agarose gel (2.0%) electrophoresis of the products following RAPD-PCR amplification of six *Liriomyza* spp. genomic DNA by using primer UBC-70.

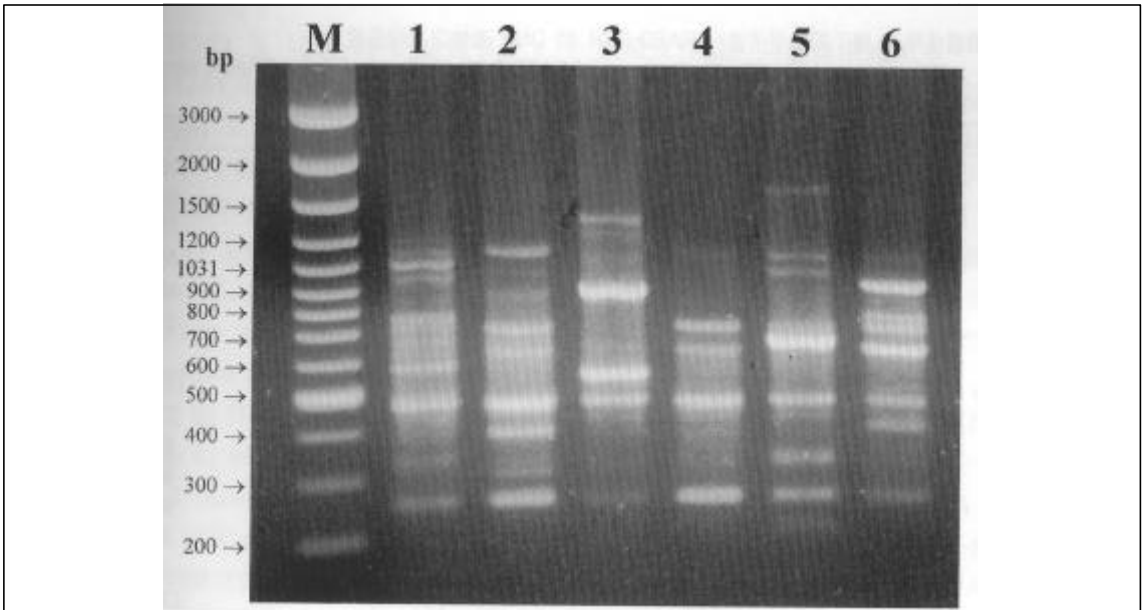
Lane 1: *L. trifolii*, ; Lane 2: *L. asterivora*, ; Lane 3: *L. chinensis*, ; Lane 4: *L. sativae*, ; Lane 5: *L. huidobrensis*, ; Lane 6: *L. bryonia*, ; M: 100 bp DNA ladder.



圖四 6 種斑潛蠅使用 primer UBC-71 進行 RAPD-PCR 所得之 DNA 片段圖譜。

Fig. 4 Ethidium bromide-stained agarose gel (2.0%) electrophoresis of the products following RAPD-PCR amplification of six *Liriomyza* spp. genomic DNA by using primer UBC-71.

Lane 1: *L. trifolii*, ; Lane 2: *L. asterivora*, ; Lane 3: *L. chinensis*, ; Lane 4: *L. sativae*, ; Lane 5: *L. huidobrensis*, ; Lane 6: *L. bryonia*, ; M: 100 bp DNA ladder.



圖五 6 種斑潛蠅使用 primer UBC-96 進行 RAPD-PCR 所得之 DNA 片段圖譜。

Fig. 5 Ethidium bromide-stained agarose gel (2.0%) electrophoresis of the products following RAPD-PCR amplification of six *Liriomyza* spp. genomic DNA by using primer UBC-96.

Lane 1: *L. trifolii*, ; Lane 2: *L. asterivora*, ; Lane 3: *L. chinensis*, ; Lane 4: *L. sativae*, ; Lane 5: *L. huidobrensis*, ; Lane 6: *L. bryonia*, ; M: 100 bp DNA ladder.

跡 (A)，幼蟲取食造成的為害 (B)，及各發育期的形態，(C)、(D) 為幼蟲，(E) 為剛形成之蛹，(F) 為將羽化的蛹，(G) 為雌 (右) 雄 (左) 成蟲，6 種斑潛蠅的情況類似，可供採集及調查取樣時的參考。

在北部 (台北)、中部 (台中和雲林)、南部 (台南) 和東部 (宜蘭) 進行斑潛蠅的標本採集。結果共採集到 6 種斑潛蠅的幼體時期和成蟲時期。由於各種斑潛蠅的外部形態極為近似 (如圖二所示)，且有混棲的情形，因此除了收集標本保存在 95% 酒精外，也採集活體攜回實驗室進行單雌品系的累代飼養，以收取純系的子代作為試驗蟲源。採集的標本共有 117 個小族群，其中，*L. asterivora* 有 6 個小族群、*L. bryoniae* 有 7 個小族群、*L. chinensis* 有 15 個小族群、*L. huidobrensis* 有 14 個小族群、*L. sativae*

有 46 個小族群及 *L. trifolii* 有 25 個小族群。

## 二、RAPD-PCR 分析

本研究以 100 組的逢機引子，來進行 RAPD-PCR 試驗，分別以 6 種斑潛蠅的基因組 DNA 作為模板 (template)，以 UBC-01 ~ UBC-100 作為引子，進行 RAPD-PCR 試驗，從中篩選可鑑定供試斑潛蠅種類的逢機引子。結果共篩選出 3 個符合上述要求的逢機引子，分別為 UBC-70、UBC-71 以及 UBC-96 (各引子核酸序列見表一)。3 種逢機引子利用 PCR 增幅的 DNA 產物，在供試的 6 種斑潛蠅種類中 (*L. asterivora*、*L. bryoniae*、*L. chinensis*、*L. huidobrensis*、*L. sativae* 及 *L. trifolii*)，具有明顯的差異，可作為種間的鑑別 (圖三 ~ 五及表二)。

表二 6 種斑潛蠅使用 3 種不同的引子進行 RAPD-PCR 的 DNA 產物之片段長度

Table 2. Size in base pairs of amplification patterns of RAPD-PCR products of three different primers of the six *Liriomyza* species

Species	UBC-70	UBC-71	UBC-96
<i>L. trifolii</i>	1272	846	1063
	1022	698	982
	961	638	793
	707	582	591
		514	491
		430	270
<i>L. asterivora</i>	754	950	1137
	448	698	736
	300	632	639
		514	491
		494	414
			270
<i>L. chinensis</i>	846	698	1396
	605	638	908
	468	582	550
	378	361	491
	300		270
<i>L. sativae</i>	1500	868	736
	1357	764	639
	1108	698	491
	746	638	270
	605	402	
	550		
	370		
	300		
	205		
<i>L. huidobrensis</i>	1014	1012	1660
	746	698	1094
	550	638	998
		490	729
			491
			345
		270	
<i>L. bryoniae</i>	812	638	908
	746	490	757
	550	417	700
	350	361	491
	300		405
	205		270



以 UBC-71 及 UBC-96 的逢機引子，進行 RAPD-PCR 所得的 DNA 產物型式，*L. trifolii*、*L. asterivora* 和 *L. sativae* 3 種斑潛蠅，其 PCR 增幅產物的 DNA 電泳條帶，可歸為同一類型，但是各種間仍有明顯的不同。以 UBC-71 逢機引子所增幅的 DNA 片段中，*L. trifolii* 較 *L. asterivora* 多 430 bp、582 bp 和 846 bp 等 3 條 DNA 片段，*L. asterivora* 較 *L. trifolii* 多 494 bp 和 950 bp 等 2 條 DNA 片段，而 *L. sativae* 則具有 764 bp 和 402 bp 的 DNA 片段，是 *L. trifolii* 和 *L. asterivora* 所沒有的（圖四）。在逢機引子 UBC-96 增幅的 DNA 片段中，*L. trifolii* 明顯具有 591 bp 的 DNA 片段，是 *L. asterivora* 和 *L. sativae* 所沒有，而 *L. asterivora* 具有 414 bp DNA 片段，是 *L. trifolii* 和 *L. sativae* 兩者所不具有（圖五）。利用上述之 DNA 片段長度的差異，可明顯的將 *L. trifolii*、*L. asterivora* 和 *L. sativae* 3 種斑潛蠅區分出來。

由所得之 RAPD 電泳圖譜的結果發現，6 種斑潛蠅的 DNA 片段多態型圖譜相似度，可約略的分為 2 個類群，*L. asterivora*、*L. sativae* 及 *L. trifolii* 3 種斑潛蠅一群，而 *L. bryoniae*、*L. chinensis* 及 *L. huidobrensis* 3 種斑潛蠅一群，這個結果與利用形態分類，解剖雄性生殖器特徵，進行親緣關係探討所得結果相吻合。就形態所作的類緣分析顯示 *L. trifolii*、*L. asterivora* 和 *L. sativae* 3 種斑潛蠅的親緣關係較接近，而另外 3 種斑潛蠅 *L. bryoniae*、*L. chinensis* 及 *L. huidobrensis* 則較相近，此結果與 RAPD-PCR 所得的分析結果相符。

供試的 6 種斑潛蠅種類中，分析採自不同地點，取食不同寄主作物，或不同生長時

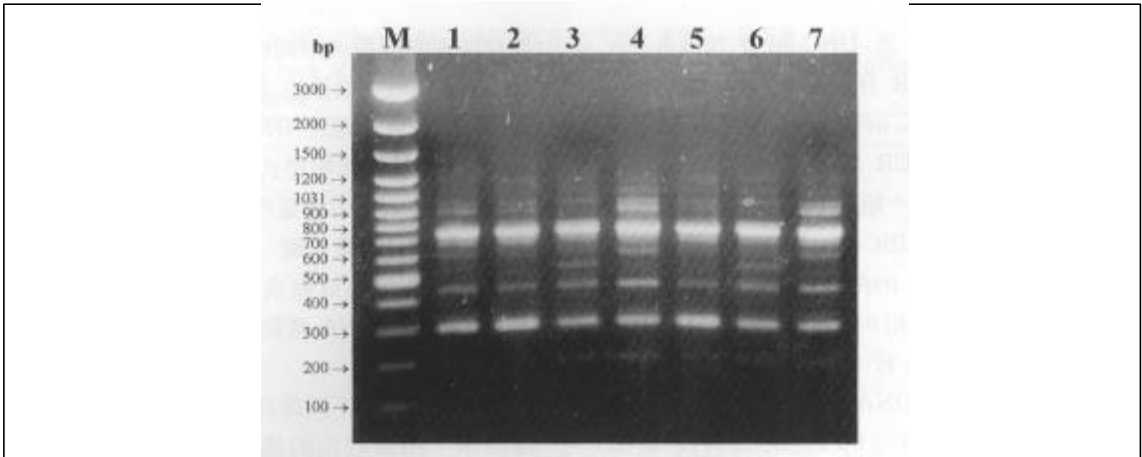
期及性別的同種斑潛蠅標本，進行種內的分析，以鑑別效果最佳的 UBC-70 逢機引子，來增幅供試斑潛蠅的 DNA，所得的 RAPD-PCR 之 DNA 產物型式，在供試的 6 種斑潛蠅中，其種內的穩定性極高，不同的生長時期及性別（幼蟲、蛹、雄成蟲和雌成蟲），以及不同採集地或取食不同寄主植物的標本，所增幅的 DNA 產物型式均極為相似（圖六 - 十一）。

此外，利用不同保存方式所保存的斑潛蠅標本，所萃取出之基因組 DNA，作為 RAPD-PCR 增幅的模板 DNA，進行分析試驗時，在同種斑潛蠅中，並不會影響或改變 RAPD-PCR 的最後結果，DNA 片段多態型圖譜是相同的。由此可知，RAPD-PCR 的鑑定技術，對標本品質的要求低，且同種斑潛蠅間穩定性高，而不同種斑潛蠅間差異度大，相當適合作為害蟲檢疫之快速鑑定。

## 討 論

目前斑潛蠅屬的分類主要是以成蟲特徵為依據 (Nowakowski, 1962; Sasakawa, 1961; Shiao, 1991; Spencer, 1986)，雖然也有學者對幼體時期（卵、幼蟲或蛹期）做過分類研究，但由於缺乏明顯的形態特徵差異，或是形態特徵不穩定，因此尚無明確的定論 (Frick, 1952; Sasakawa, 1961; Shiao, 1991)，故使斑潛蠅屬的鑑定更加困難。然而在檢疫業務檢查貨品時，發現的標本多為幼體時期，通常須飼養至成蟲方能從事鑑定。如此不僅耗時，標本數目少，且常常在飼養過程中即可能死亡。因此，開發快速、簡單而準確的鑑定技術是非常需要的。

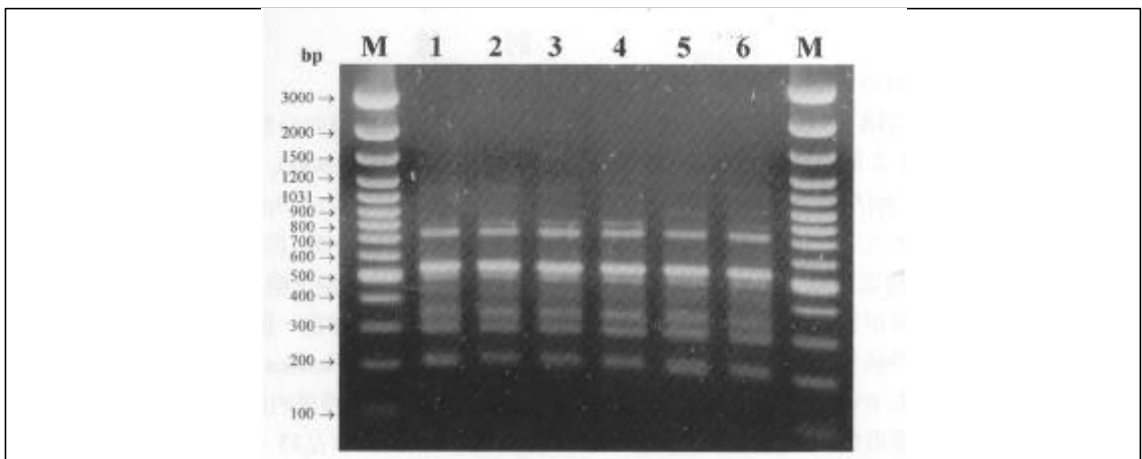
昆蟲種類繁多，常有多型性，或外部形態極為相近的近似種，或是處於鑑定困難的



圖六 *L. asterivora* 在不同生長時期、性別及不同採集地之 RAPD-PCR (primer UBC-70) 的 DNA 片段圖譜。

Fig. 6 Ethidium bromide-stained agarose gel (2.0%) electrophoresis of the products following RAPD-PCR amplification of *L. asterivora* genomic DNA from different growing periods, sexes, and collection sites by using primer UBC-70.

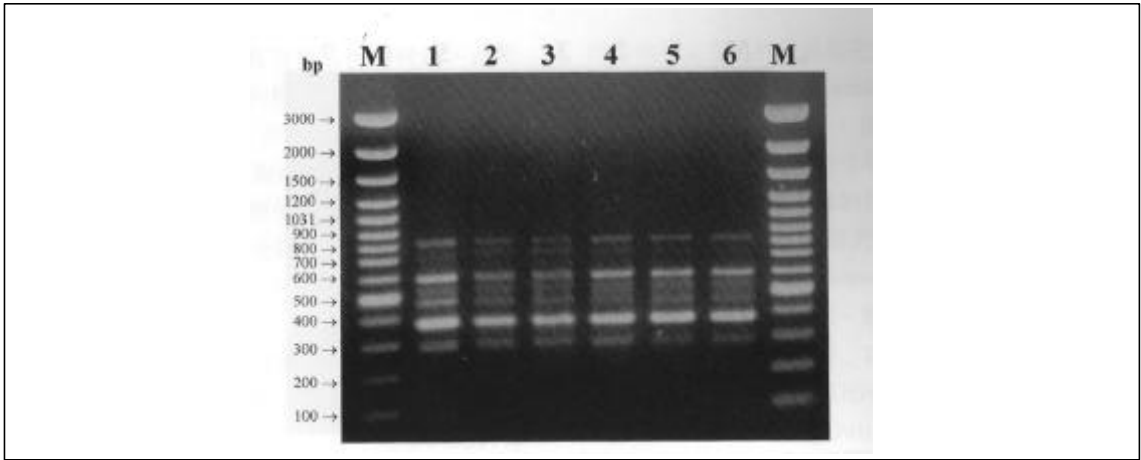
Lane 1 ~ 4: using larva, pupa, male, and female, collected from San-Shing Shiang Ilan County, host is Brazilian fireweed; Lane 5 and 6: using male and female, collected from the farm of National Taiwan University, host is Brazilian fireweed; Lane 7: using female, collected from Chuang-wei Shiang Ilan County, host is tomato; M: 100 bp DNA ladder.



圖七 *L. bryoniae* 在不同生長時期、性別及不同採集地之 RAPD-PCR (primer UBC-70) 的 DNA 片段圖譜。

Fig. 7 Ethidium bromide-stained agarose gel (2.0%) electrophoresis of the products following RAPD-PCR amplification of *L. bryoniae* genomic DNA from different growing periods, sexes, and collection sites by using primer UBC-70.

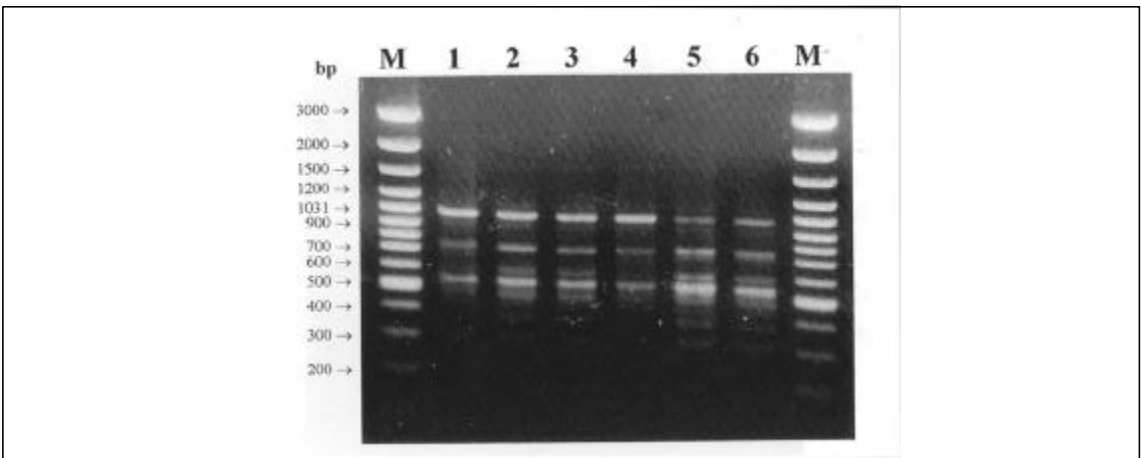
Lane 1 ~ 4: using larva, pupa, male, and female, collected from Chuang-wei Shiang Ilan County, host is oriental pickling melon; Lane 5: using female, collected from Chuang-wei Shiang Ilan County, host is wax gourd; Lane 6: using female, collected from San-shing Shiang Ilan County, host is Tomato; M: 100 bp DNA ladder.



圖八 *L. chinensis* 在不同生長時期、性別及不同採集地之 RAPD-PCR (primer UBC-70) 的 DNA 片段圖譜。

Fig. 8 Ethidium bromide-stained agarose gel (2.0%) electrophoresis of the products following RAPD-PCR amplification of *L. chinensis* genomic DNA from different growing periods, sexes, and collection sites by using primer UBC-70.

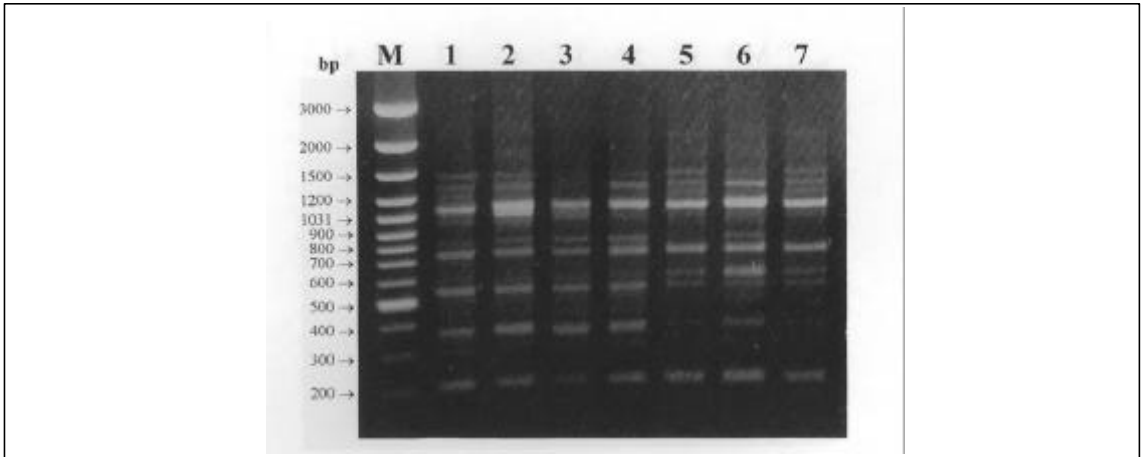
Lane 1 ~ 4: using larva, pupa, male, and female, collected from Chuang-wei Shiang Ilan County, host is spring onion; Lane 5: using female, collected from C-lou Jen Yunlin County, host is spring onion; Lane 6: using female, collected from Chuang-wei Shiang Ilan County, host is spring onion; M: 100 bp DNA ladder.



圖九 *L. huidobrensis* 在不同生長時期、性別及不同採集地之 RAPD-PCR (primer UBC-70) 的 DNA 片段圖譜。

Fig. 9 Ethidium bromide-stained agarose gel (2.0%) electrophoresis of the products following RAPD-PCR amplification of *L. huidobrensis* genomic DNA from different growing periods, sexes, and collection sites by using primer UBC-70.

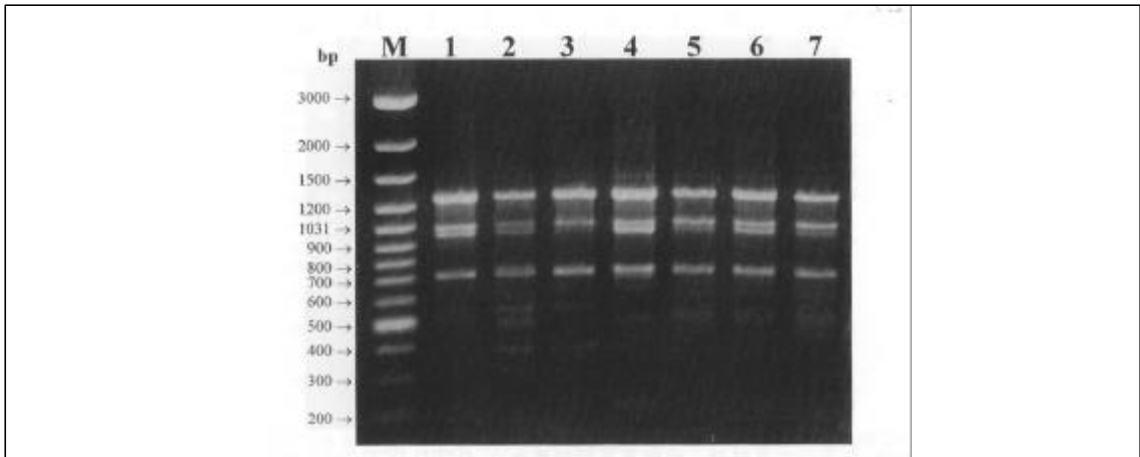
Lane 1 ~ 4: using larva, pupa, male, and female, collected from Chuang-wei Shiang Ilan County, host is white-flowered gourd; Lane 5: using female, collected from San-shing Shiang Ilan County, host is mustard; Lane 6: using female, collected from Chuang-wei Shiang Ilan County, host is mustard; M: 100 bp DNA ladder.



圖十 *L. sativae* 在不同生長時期、性別及不同採集地之 RAPD-PCR (primer UBC-70) 的 DNA 片段圖譜。

Fig. 10 Ethidium bromide-stained agarose gel (2.0%) electrophoresis of the products following RAPD-PCR amplification of *L. sativae* genomic DNA from different growing periods, sexes, and collection sites by using primer UBC-70.

Lane 1 ~ 4: using larva, pupa, male, and female, collected from Hsin-yich City Tainan County, host is green bean; Lane 5: using female, collected from Chuang-wei Shiang Ilan County, host is green bean; Lane 6: using female, collected from the farm of National Taiwan University, host is tomato; Lane 7: using female, collected from Tzu-tung Shiang Yunlin County, host is white-flowered gourd; M: 100 bp DNA ladder.



圖十一 *L. trifolii* 在不同生長時期、性別及不同採集地之 RAPD-PCR (primer UBC-70) 的 DNA 片段圖譜。

Fig. 11 Ethidium bromide-stained agarose gel (2.0%) electrophoresis of the products following RAPD-PCR amplification of *L. trifolii* genomic DNA from different growing periods, sexes, and collection sites by using primer UBC-70.

Lane 1 ~ 4: using larva, pupa, male, and female, collected from Tien-wei Shiang Changhua County, host is African daisy; Lane 5 ~ 7: using female, collected from Tien-wei Shiang Changhua County, host is African daisy; M: 100 bp DNA ladder.

幼體時期，或是只有發現部份的殘骸，或是生活史未完全了解的種類等，使種類鑑定困難甚至誤判產生。若以遺傳組成為基礎的 DNA 鑑定，則可克服這些困難。RAPD-PCR 的分析技術，操作簡便，對標本品質的要求度低，即使是部份殘骸也可進行分析，且所需的時間短，從抽取樣本的 genomic DNA、PCR 增幅到電泳分析，其過程只需約 7 - 8 小時，不僅適合檢疫鑑定的要求，也適合作為形態近似種類的鑑定分析，以作為形態學分類的輔助依據。此外，建立完整的比對資料系統，可做為田間害蟲族群數量調查或監測時，對具有混棲且形態近似的大量樣本處理時，提供快速且正確的種類鑑定，作為害蟲綜合管理措施的基本資料。

利用隨機引子 UBC-70、UBC-71 以及 UBC-96 等，對 6 種斑潛蠅進行 RAPD-PCR 分析，所得的 DNA 產物型式，在各種斑潛蠅之種內相當穩定，同種但不同個體間均有相同的 DNA 產物型式，而不同種個體間所得的 DNA 產物型式則有明顯的差異，因此可據以鑑定供試的 *L. asterivora*、*L. bryoniae*、*L. chinensis*、*L. huidobrensis*、*L. sativae* 及 *L. trifolii* 等不同的 6 種斑潛蠅。在檢疫鑑定上，要求快速、簡便且準確的鑑定工作，利用這 3 種隨機引子，進行 RAPD-PCR 分析，是極為適合的鑑定技術。

利用分子標示鑑別昆蟲種類的研究報告，近年來蓬勃發展，可見其受到的重視程度，然而分子標識的種類甚多 (Loxdale and Lushai, 1998)，取決何種分子標識才真正具有代表性，也有相當的爭論和困擾。在 DNA 分子標示中，若研究的昆蟲其 DNA 資料都未知的情況下，利用 RAPD-PCR 的技術是最簡便而快速，需要的 DNA 量少，可用於各種保存方式下的標本，且結果的判讀容易，

可作為特定害蟲的快速鑑定工具。

自 1990 年 Williams *et al.* 首先應用 RAPD-PCR 技術至今，在昆蟲學上已廣泛應用於分類學及系統發生學的研究，其中又以小型昆蟲及農業害蟲的應用較多，如蚊類的鑑定及族群遺傳的研究 (Apostol *et al.*, 1996; Ballinger-Crabtree *et al.*, 1992; Wilkerson *et al.*, 1995)、蚜蟲鑑定 (Black *et al.*, 1992; Cenis *et al.*, 1993)、粉蝨族群的分類 (De Barro and Driver, 1997; Gawel and Bartlett, 1993; Guirao *et al.*, 1997)、蝗蟲族群遺傳的探究 (Chapco *et al.*, 1992)、亞洲和北美吉普賽舞蛾的區分 (Garner and Slavicek, 1996; Reineke and Zebitz, 1999)、小麥莖蜂的地理分布及族群探討 (Lou *et al.*, 1998) 和地中海果實蠅族群的研究 (Haymer and McInnis, 1994) 等。運用的層面愈來愈廣。其中 De Barro and Driver (1997) 所篩選出的四種隨機引子 (F2、F12、H9 及 H16)，是目前鑑別銀葉粉蝨 (*Bamisia argentifolii*) 的重要依據。RAPD-PCR 的技術應用在雙翅目的研究中，雖然並未找到有關斑潛蠅相關的研究報告，不過因其在檢疫上的重要性，目前急需開發這類相關的技術，使檢疫害蟲種類鑑定能快速進行。本試驗研究成果提供可行的技術，用以區分 6 種斑潛蠅。然而在檢疫實務應用上，仍需再深入研究，建立更完整的比對資料系統，落實檢疫害蟲的快速鑑定。

## 誌 謝

本研究承行政院農業委員會 89 生技-2.2-檢-64 之經費補助，試驗期間承台灣大學顏妙朱小姐於標本採集的協助，謹致謝忱。

## 引用文獻

- Apostol, B. L., W. C. Black, P. Reiter, and B. R. Miller.** 1996. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity* 76: 325-334.
- Balling-Crabtree, M. E., W. C. Black, and B. R. Miller.** 1992. Use of genetic polymorphisms detected by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and population. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47: 893-901.
- Black, W. C., N. M. DuTeau, G. J. Puterka, J. R. Nechols, and J. M. Pettorini.** 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids. *Bull. Entomol. Res.* 82: 151-159.
- Cenis, J. L., P. Perez, and A. Fereres.** 1993. Identification of aphid (Homoptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 86: 545-550.
- Chapco, W., N. W. Ashton, R. K. B. Martel, and N. Antonishyn.** 1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers. *Genome* 35: 569-574.
- De Barro, P. J., and F. Driver.** 1997. Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyroflidae). *Aust. J. Entomol.* 36: 149-152.
- Frick, K. E.** 1952. A generic revision of the family Agromyzidae (Diptera) with a catalogue of New World species. *Univ. Calif. Publ. Entomol.* 8: 339-452.
- Garner, K. J., and J. M. Slavicek.** 1996. Identification and characterization of a RAPD-PCR marker for distinguishing Asian and North American gypsy moths. *Insect Mol. Biol.* 5: 81-91.
- Gawel, N. J., and A. C. Bartlett.** 1993. Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. *Insect Mol. Biol.* 2:33-38.
- Guirao, P., F. Beitia, and J. L. Cenis.** 1997. Biotype determination of Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Bull. Entomol. Res.* 87: 587-593.
- Haymer, D. S., and D. O. McInnis.** 1994. Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Genome* 37: 244-248.
- Lou, K. F., M. J. Weiss, P. L. Bruckner, W. L. Morrill, L. E. Talbert, and J. M. Martin.** 1998. RAPD variation within and among geographic populations of wheat stem sawfly (*Cephus cinctus* Norton). *American Genetic Association* 89: 329-335.

- Loxdale, H. D., and G. Lushai.** 1998. Molecular markers in entomology. Bull. Entomol. Res. 88: 577-600.
- Lu, F. M.** 1987. Different staining methods for eggs of diminutive insects. J. Agric. Res. China 36: 331-334. (in Chinese)
- Newman, J. P., and M. P. Parrella.** 1986. A license to kill. Greenhouse Management 5: 86-92.
- Nowakowski, J. T.** 1962. Introduction to a systematic revision of the family Agromyzidae (Diptera) with some remarks on host plant selection by these flies. Polska Akad. Nauk. Inst. Zool. Ann. Zool. 20 (8): 67-183.
- Parrella, M. P.** 1987. Biology of *Liriomyza*. Ann. Rev. Entomol. 32: 201-224.
- Parrella, M. P., and C. B. Keil.** 1983. Insect pest management: the lesson of *Liriomyza*. Bull. Entomol. Soc. Am. 30: 22-25.
- Parrella, M. P., and K. L. Robb.** 1982. Technique for staining eggs of *Liriomyza trifolii* within chrysanthemum, celery, and tomato leaves. J. Econ. Entomol. 75: 383-384.
- Reineke, A., and C. P. W. Zebitz.** 1999. Suitability of polymerase chain reaction-based approaches for identification of different gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) genotypes in central Europe. Ann. Entomol. Soc. Am. 92: 737-741.
- Sasakawa, M.** 1961. A study of the Japanese Agromyzidae (Diptera). Part 2. Pac. Insects 3: 307-472.
- Shiao, S. F.** 1991. Systematic Studies on *Liriomyza* Species in Taiwan (Diptera: Agromyzidae). Master's thesis. National Taiwan University. 129pp. (in Chinese)
- Shiao, S. F., and W. J. Wu.** 1989. Four new records of *Liriomyza* leaf-miners (Diptera: Agromyzidae) from Taiwan. J. Taiwan Mus. 42: 15-23.
- Shiao, S. F., and W. J. Wu.** 1995. A new *Liriomyza* species from Taiwan (Diptera: Agromyzidae). Pan-Pacific Entomol. 71: 161-168.
- Shiao, S. F., and W. J. Wu.** 1996. Diagnosis of quarantined plants (2) Diptera: Agromyzidae. Bureau of Standards, Metrology and Inspection, Ministry of Economic Affairs. pp. 579-677. (in Chinese)
- Shiao, S. F., and W. J. Wu.** 1998. Ecology and control of the vegetable leafminer (*Liriomyza sativae*) (Diptera: Agromyzidae). Scientific Agriculture 46: 312-318. (in Chinese)
- Shiao, S. F., F. J. Lin, and W. J. Wu.** 1991. Redescription of four *Liriomyza* species (Diptera: Agromyzidae) from Taiwan. Chinese J. Entomol. 11: 65-74.
- Spencer, K. A.** 1973. Agromyzidae (Diptera) of Economic Importance. Dr. W. Junk B. V., Publishers, The Hague. 418 pp.
- Spencer, K. A.** 1986. Agromyzidae (Diptera) from Thailand: new species, revisionary notes and new records. Proc. Ind. Acad. Sci. 95: 487-507.

**Spencer, K. A.** 1989. Leaf miner. Ch. 5. pp. 77-98. *in*: R. P. Kahn, ed. Plant Protection and Quarantine, Vol. 2, Selected Pests and Pathogens of Quarantine Significance. CRC Press, Inc. 265 pp.

**Spencer, K. A.** 1990. Host specialization in the world Agromyzidae (Diptera). Kluwwe Academic Publishers, The Netherlands. 444 pp.

**Wilkerson, R. C., T. J. Parsons, T. A. Klein, T. V. Gaffigan, E. Bergo, and J. Consolim.** 1995. Diagnosis by random

chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraquay, Argentina and Brazil. *J. Med. Entomol.* 32: 697-704.

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

收件日期：2000年8月13日

接受日期：2000年9月18日



# The Application of RAPD-PCR to Develop Rapid Diagnostic Technique for Identification of 6 Species of *Liriomyza* spp. (Dipter: Agromyzidae)

Yi-Chung Chiu, Wen-Jer Wu, Shih-Feng Shiao, and Cheng-Jen Shih\*

Department of Entomology, National Taiwan University Taipei, Taiwan 106, R.O.C.

## ABSTRACT

Leafminer flies (*Liriomyza* spp.) are important quarantined pests in international trade. However, the *Liriomyza* spp. are difficult to identify in immature stages (eggs, larvae, and pupae) as well as adult stage, so that many obstacles appeared in the international quarantine. This study attempts to develop the molecular technique of genomic DNA marker to identify 6 species of the genus *Liriomyza*. In the DNA analysis, we found DNA molecular marker to identify the *Liriomyza* species with similar morphological characters. In the random amplified polymorphic DNA (RAPD) test, we checked 100 random primers and only 3 primers (UBC-70, UBC71, and UBC-96) are available for distinguishing the 6 species of *Liriomyza* (*L. asterivora*, *L. bryoniae*, *L. chinensis*, *L. huidobrensis*, *L. sativae*, and *L. trifolii*), and there are no difference in the RAPD patterns among the different stages, sexes, strains of each species, but obvious differences between different species. According to this study, the RAPD patterns is worth to be suggested for the identification of these species.

Key words: *Liriomyza*, rapid diagnostic techniques, identification, polymerase chain reaction (PCR), random amplified polymorphic DNA (RAPD).



