

## 發展分子技術鑑定木瓜秀粉介殼蟲

陳明昭<sup>1\*</sup> 丁延年<sup>2</sup>

### 摘要

木瓜秀粉介殼蟲(半翅目:粉介殼蟲科)近年來已成為危害南臺灣木瓜的一種新害蟲。由於目前以形態鑑定粉介殼蟲的方法費時費力而且需要專業知識,因此區別木瓜秀粉介殼蟲與其它介殼蟲需要更簡單、可靠的方法。在本研究中,聚合酶鏈鎖反應-限制酶片段長度多型性(PCR-RFLP)被應用做為木瓜秀粉介殼蟲之分子診斷技術,進一步採集木瓜、釋迦、蓮霧、棗、芒果等五種果樹上不同粉介殼蟲,利用28S核糖體DNA的部分序列進行鑑定分析。結果顯示,利用限制酶*PstI*和*SacI*對PCR產物進行種專一性的切割,可區別木瓜秀粉介殼蟲(*Paracoccus marginatus* Williams and Granara de Willink)及鳳梨嫡粉介殼蟲(*Dysmicoccus brevipes* Cockerell),並以另一限制酶*BspHII*將柑桔粉介殼蟲(*Planococcus citri* Risso)與太平洋臀紋粉介殼蟲(*P. minor* Maskell)這兩種形態上很相似的近緣種進行分子鑑定。此外,本技術亦為臺灣第一個木瓜秀粉介殼蟲之分子鑑定技術。

關鍵語:木瓜秀粉介殼蟲、分子技術、鑑定、聚合酶鏈鎖反應-限制酶片段長度多型性

### 前言

粉介殼蟲(mealybugs)在分類上屬於半翅目(Hemiptera)、粉介殼蟲科(Pseudococcidae),是許多果樹、作物和觀賞植物的重要害蟲。由於其體型小故容易隱藏於植株內,加上其繁殖能力強,因此只要侵入的地區氣候適宜、寄主植物充足,介殼蟲族群將會快速增長,危害農作物並造成重大損失。如原本分布於中南美洲之木瓜秀粉介殼蟲(*Paracoccus marginatus*),該蟲於1998年首次於美國佛羅里達的朱槿上發現,在極短的時間內便已於當地危害25屬以上的植物,包括重要經濟作物如木瓜、朱槿、酪梨、柑橘、番茄、茄子、辣椒、甘藷、芒果等;於2002年此蟲亦嚴重危害關島地區之木瓜。此外,帛琉與夏威夷地區也相繼發生疫情。2011年木瓜秀粉介殼蟲已入侵臺灣<sup>(1,4)</sup>,且目前於木瓜上已造成嚴重之危害,但是否會擴及其他果樹仍需持續執行監測工作。

粉介殼蟲可危害臺灣地區多種果樹(番荔枝、蓮霧、棗、番石榴、鳳梨、香蕉、檬果、柑桔和木瓜等),但其形態上的相似度極高,不同種粉介殼蟲難以被清楚地分辨,進而限制其研究和蟲害管理<sup>(2,5)</sup>。介殼蟲大多是依據形態上

<sup>1</sup>高雄區農業改良場作物環境課助理研究員

<sup>2</sup>屏東科技大學植物醫學系

的特徵來鑑定，但缺點為鑑定過程繁瑣耗時，而且需配合傳統分類學門<sup>(2,5)</sup>。近年來分子生物學發展快速，已有許多學者將分子生物學技術應用於昆蟲學方面的研究，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不少研究發表<sup>(5,7,8,9,10,11)</sup>。如 Chiu 等人利用 PCR-RFLP 技術鑑定臺灣進口農產品中的 16 種介殼蟲<sup>(5)</sup>。Malausa 等人以 5 組分子指標將 11 種粉介殼蟲區分成四個分類群 (taxa)<sup>(7)</sup>。此外，亦有文獻指出太平洋臀紋粉介殼蟲 (*Planococcus minor*) 和柑桔粉介殼蟲 (*P. citri*) 極為相似<sup>(6)</sup>，但兩者是否有各自的寄主偏好仍無定論<sup>(6)</sup>，Rung 等人則已發展出可區分太平洋臀紋粉介殼蟲和柑桔粉介殼蟲之分子檢測方法<sup>(10,11)</sup>。

本研究擬以分子技術確認目前木瓜秀粉介殼蟲在臺灣南部果樹上的分布情形，並確認番荔枝上太平洋臀紋粉介殼蟲 (*Planococcus minor*) 和柑桔粉介殼蟲 (*P. citri*) 的分布。

## 材料與方法

果樹的種類包括番荔枝 (5 個樣區)、木瓜 (4 個樣區)、芒果 (1 個樣區)、蓮霧 (2 個樣區)、棗 (2 個樣區) 取樣地點如圖一。把果園採集之粉介殼蟲帶回實驗室進行單隻萃取 DNA，本試驗利用富聯生物科技股份有限公司的 DNA 純化試劑 (Blood & Tissue Genomic Extraction Miniprep system, Viogene®)，依照操作步驟進行 genomic DNA 的萃取，將介殼蟲放入 1.5 ml 離心管並以液態氮急速冷凍後，使用研磨棒將其磨碎，添加 50 µl PBS buffer，充分震盪後進行離心以去除管壁殘餘液體，每個樣本添加 20 µl proteinase K 和 130 µl 之 Buffer LTL，充分震盪後進行離心以去除管壁殘餘液體，以 56°C 之乾浴槽反應 1 小時，取出後進行充分震盪後離心以去除管壁殘餘液體，添加 200 µl 之 Buffer TLL，震盪 15 秒使其充分混勻，放入 56°C 之乾浴槽反應 15 分鐘，取出後進行充分震盪後離心以去除管壁殘餘液體，添加 200 µl 酒精 (Ethyl Alcohol 99.5 v/v%)，充分震盪 15 秒使其充分混勻後離心，將裂解液全部移至 Genomic DNA Spin Column & Collection Tube (2 ml)，以 11000 rpm 離心 1 分鐘後去除下層濾液，之後將 Genomic DNA Spin Column 移至全新的 Collection Tube (2 ml)，以全速離心 (15300 rpm) 離心 3 分鐘，將 Genomic DNA Spin Column 移至 1.5 ml 離心管後，加入 100 µl 已加熱至 70°C 之 Buffer CCEB 回融 DNA，靜置 1 分鐘後全速離心 1 分鐘，即完成 DNA 之萃取。接著參照 Malausa 等人<sup>(7)</sup> 所發表的 28S-D2-F (5'-AGAGAGAGTTCAAGAGTACGTG-3') 和 28S-D2-R (5'-TTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG-3') 引子對進行聚合酶連鎖反應

(Polymerase Chain Reaction, PCR)。PCR 反應條件為：98°C/30 秒預熱，然後以 98°C/10 秒變性 (denaturation)，60°C/1 分鐘黏合 (annealing)，72°C/15 秒延展 (extension) 進行 35 個循環，最後再進行 72°C/5 分鐘的修補延伸，其產物大小約 320bp。每個樣區提送 5 隻粉介殼蟲之 PCR 產物進行定序 (Sequencing)，並將獲得之核苷酸序列 (nucleotide sequences) 與 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 資料庫中之序列以 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 進行比對，結果顯示樣區中的粉介殼蟲包括木瓜秀粉介殼蟲 (*Paracoccus marginatus*)、鳳梨嫡粉介殼蟲 (*Dysmicoccus brevipes*)，另外有些樣品初步判斷可能是太平洋臀紋粉介殼蟲 (*Planococcus minor*) 或柑桔粉介殼蟲 (*P. citri*)，但無法判定是哪一種 (species)。

為建立 PCR-RFLP 的鑑定流程，本研究以核苷酸序列資料(NBE cutter: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) 從上述粉介殼蟲中找出可區分鳳梨嫡粉介殼蟲與木瓜秀粉介殼蟲之限制酶為 *PstI* (圖二 A) 和 *SacI* (圖二 B)，區分的方法是使用 28S-D2-F 和 28S-D2-R 引子對<sup>(7)</sup>增幅 28S rDNA 之 PCR 產物 (大小約為 320bp)，然後分別以限制酶 *PstI* 或限制酶 *SacI* 處理樣本的 PCR 產物，若有 *PstI* 的切位則判斷為鳳梨嫡粉介殼蟲 (圖二 A)，若有 *SacI* 的切位則判斷為木瓜秀粉介殼蟲 (圖二 B)。但由於太平洋臀紋粉介殼蟲或柑桔粉介殼蟲之 PCR 產物，並沒有上述兩種限制酶的切位(圖二 C)，因此進一步參照 Rung 等人(2009)<sup>(11)</sup> 所發表的另一組引子對 CJ-J-2183F 與 3014-R 進行 PCR (產物大小約為 840bp)。這組引子對 CJ-J-2183F (5'-CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3') 與 3014-R (5'-AATGTATGATTTAAATTAGGTG-3') 之 PCR 反應條件為：94°C/4 分鐘預熱，然後以 94°C/1 分鐘 (denaturation)，56°C/1 分鐘 (annealing)，72°C/1.5 分鐘 (extension) 進行 40 個循環，最後再進行 72°C/4 分鐘的修補延伸，其產物大小約 840bp；將 PCR 的產物分別以 *BspHI* 核酸內切酶進行切割，最後根據切型判斷該蟲是桔粉介殼蟲或是太平洋臀紋粉介殼蟲 (圖三)，若有切位為太平洋臀紋粉介殼蟲 (出現 430bp 的切割產物)，無切位則為柑桔粉介殼蟲。

## 結果與討論

木瓜的 4 個樣區中共取得 138 個樣本 (長治木瓜第 1 區共 26 個樣本、長治木瓜第 2 區共 40 個樣本、長治木瓜第 3 區共 36 個樣本、老埤木瓜共 36 個樣本)，分別以限制酶 *SacI* 和 *PstI* 切割 PCR 產物，在四個樣區中，所有樣本的結果皆顯示，*SacI* 有切位(片段小於 320bp)，而 *PstI* 無切位(片段約 320bp)，故判斷為木瓜秀粉介殼蟲，而且所占的比例皆為 100%。

台東市番荔枝的5個樣區中一共取得77個樣本(第一區共8個樣本、第二區共6個樣本、第三區共22個樣本、第四區共20個樣本、第5區共21個樣本),分別以限制酶 *SacI* 和 *PstI* 切割,結果皆顯示,在第1,2,4三個樣區中所有樣本均無 *SacI* 和 *PstI* 之切位,因此以 CJ-J-2183F 及 3014-R2-R 引子對進行 PCR 後,再將產物以限制酶 *BspHI* 切割,由於出現 430bp 的切割產物,故判斷其為太平洋臀紋粉介殼蟲,此結果顯示番荔枝第1,2,4區中太平洋臀紋粉介殼蟲的比例皆為 100%。另外,第3區的22個樣本中有1個樣本經鑑定為鳳梨嫡粉介殼蟲,其餘皆為太平洋臀紋粉介殼蟲,故此區中太平洋臀紋粉介殼蟲的比例為 95.45%;相較之下,台東番荔枝第5區共21個樣本的結果顯示, *PstI* 有切位(片段小於 320bp),但 *SacI* 無切位(片段約 320bp),故推斷其為鳳梨嫡粉介殼蟲,其比例為 100%。

枋山地區蓮霧2個樣區中共取得51個樣本(第1區共20個樣本、第2區共31個樣本),而枋山地區芒果1個樣區共50個樣本,以 28S-D2-F 和 28S-D2-R 引子對進行 PCR 之產物,分別以限制酶 *SacI* 和 *PstI* 切割,結果顯示兩者均無切位;接著以 CJ-J-2183F 及 3014-R2-R 引子對進行 PCR,再以限制酶 *BspHI* 切割,由於出現 430bp 的切割產物,故判斷其為太平洋臀紋粉介殼蟲。兩個蓮霧與一個芒果樣區的結果都顯示太平洋臀紋粉介殼蟲所占的比例為 100%。

高樹地區棗之兩個樣區中一共取得44個樣本(第1區共20個樣本、第2區共24個樣本),以 28S-D2-F 和 28S-D2-R 引子對進行 PCR 之產物,分別以限制酶 *SacI* 和 *PstI* 切割,結果顯示兩者均無切位;接著以 CJ-J-2183F 及 3014-R2-R 引子對進行 PCR,再以限制酶 *BspHI* 切割,由於沒有出現 430bp 的切割產物,故判斷其為柑桔粉介殼蟲。兩個棗子樣區結果都顯示柑桔粉介殼蟲所占的比例為 100%。

根據本次的研究結果推測木瓜秀粉介殼蟲雖然廣泛出現在這次的木瓜樣區中,但尚未擴散至其他果樹。另外,文獻指出太平洋臀紋粉介殼蟲和柑桔粉介殼蟲極為相像<sup>(6)</sup>,且兩者寄主範圍也很接近<sup>(6,10,11)</sup>,而在本次研究的五個番荔枝樣區中,經分子鑑定主要的粉介殼蟲種類確為太平洋臀紋粉介殼蟲,惟亦有鳳梨嫡粉介殼蟲分布於番荔枝上,顯示一種果樹上可能出現多種介殼蟲。相對地,同一種粉介殼蟲也可能出現在多種果樹上,如太平洋臀紋粉介殼蟲可危害番荔枝、蓮霧及芒果;鳳梨嫡粉介殼蟲 (*Dysmicoccus brevipes*) 在臺灣之寄主植物主要為鳳梨及香蕉,而在中國大陸地區記載之寄主植物尚有番荔枝<sup>(3)</sup>,本研究亦已確認鳳梨嫡粉介殼蟲會危害番荔枝。

### 參考文獻

1. 林明瑩、陳昇寬、黃秀雯、張淳淳. 2011. 新入侵害蟲～木瓜秀粉介殼蟲. 臺南區農業專訊 77: 10-12.
2. 翁振宇、陳淑佩、周樑鎰. 1999. 臺灣常見介殼蟲圖鑑, p5-7. 行政院農業委員會農業試驗所特刊第 89 號. 98 頁.
3. 湯祊德. 1992. 中國粉蚧科. 中國農業科技出版社. 北京. 767 頁.
4. Chen, S. P., J. Y. Wong, and W. J. Wu. 2011. Preliminary report on the occurrence of papaya mealybug, *Paracoccus marginatus* Williams and Granara de Willink, in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 60: 72-76.
5. Chiu, Y. C., W. J. Wu, C. Y. Wong, S. P. Chen, and C. J. Shih. 2004. Application of the PCR-RFLP technique for the rapid diagnosis of scale insects (Homoptera: Coccoidea) on imported agricultural products in Taiwan. Formosan Entomol. 24: 159-171.
6. Cox, J. M., and A. C. Freeston. 1985. Identification of mealybugs of genus *Planococcus* (Homoptera: Pseudococcidae) occurring on cacao throughout the world. J. Nat. Hist. 19: 719-728.
7. Malausa, T., A. Fenis, S. Warot, J. F. Germain, N. Ris, E. Prado, M. Botton, F. Vanlerberghe-Masutt, R. Sforza, C. Cruaud, A. Couloux, and P. Kreiter. 2010. DNA markers to disentangle complexes of cryptic taxa in mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). J. Appl. Entomol. 135: 142-155.
8. Park, D. S., Y. J. Leem, K. W. Hahn, S. J. Suh, K. J. Hong, and H. W. Oh. 2010. Molecular identification of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) found on Korean pears. J. Econ. Entomol. 103: 25-33.
9. Rugman-Jones, P. F., J. G. Morse, and R. Stouthamer. 2009. Rapid molecular identification of armored scale insects (Hemiptera: Diaspididae) on Mexican 'Hass' Avocado. J. Econ. Entomol. 102: 1948-1953.
10. Rung, A., D. R. Miller, and S. J. Scheffer. 2009. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method to distinguish three mealybug groups within the *Planococcus citri*-*P. minor* species complex (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae). J. Econ. Entomol. 102: 8-12.
11. Rung, A., S. J. Scheffer, G. Evans, and D. R. Miller. 2008. Molecular identification of two closely related species of mealybugs of the Genus *Planococcus* (Homoptera: Pseudococcidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 101: 525-532.

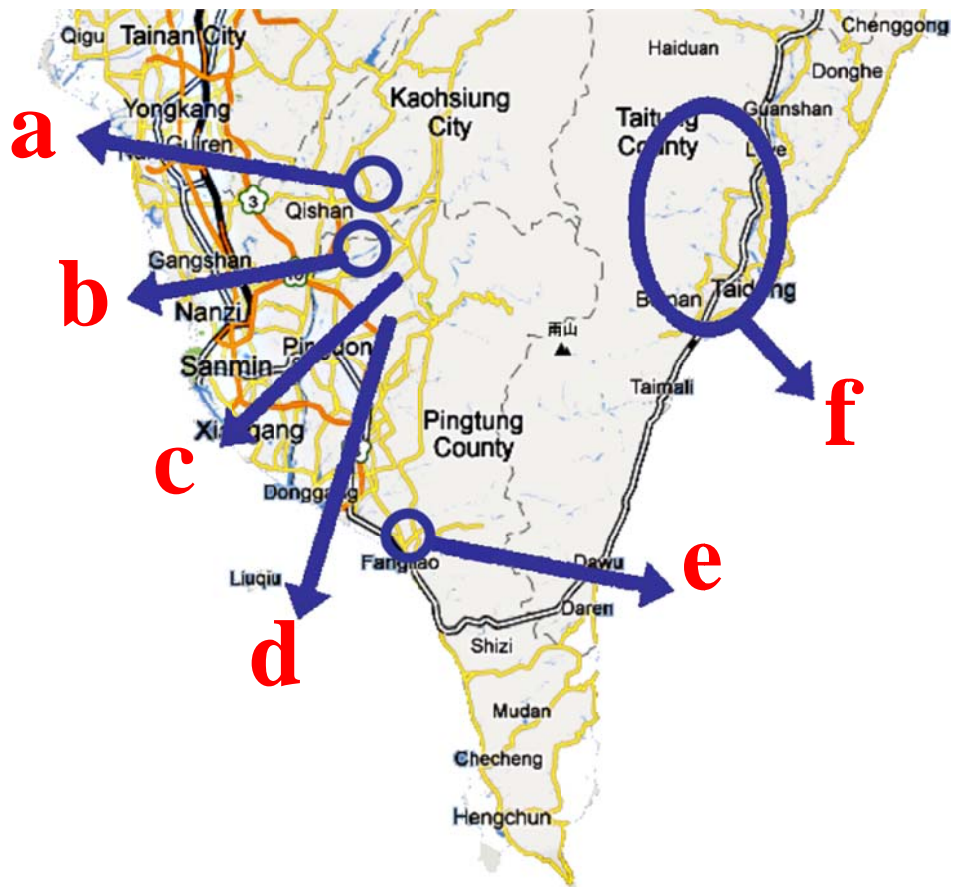


圖 1. 南臺灣粉介殼蟲取樣地點 (果樹) 。 a. 高樹鄉 (棗) ; b. 長治鄉 (木瓜) ; c. 老埤鄉 (木瓜) ; d. 長治鄉 (蓮霧) ; e. 枋山鄉 (芒果和蓮霧) ; f. 台東 (番荔枝) 。

Fig. 1. Collection site (fruit trees) of mealybugs in south Taiwan. a. Gaoshu Township (indian jujube); b. Changjih Township (papaya); c. Laobi Township (papaya) d. Changjih Township (wax apple); e. Fangshan Township (mango and wax apple); f. Taitung (custard apple).

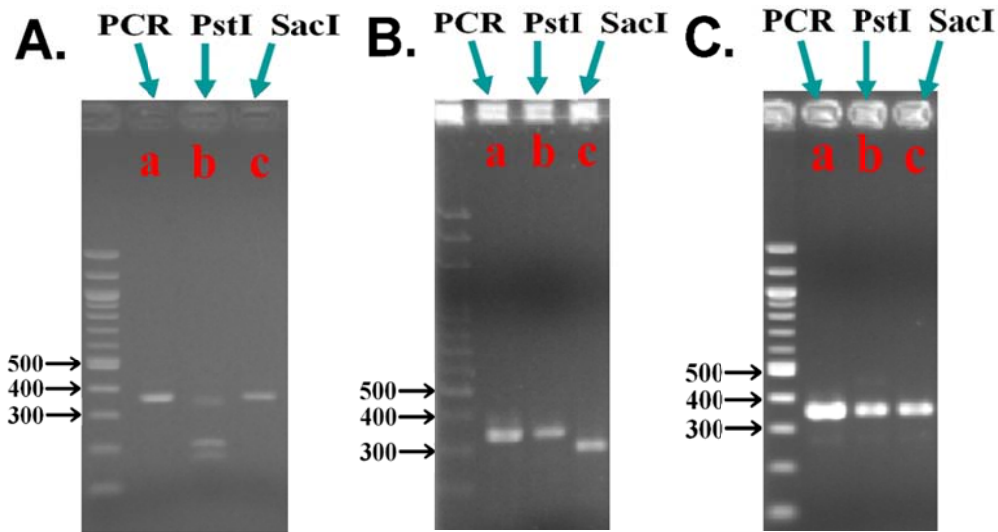


圖 2. (A) 鳳梨嫡粉介殼蟲、(B) 木瓜秀粉介殼蟲、(C) 太平洋臀紋粉介殼蟲的限制酶分析。  
a. 使用 28S-D2-F 和 28S-D2-R 引子對增幅 28S rDNA 之 PCR 產物 (大小約為 320bp) ; b. 限制酶 *PstI* 作用後的產物 ; c. 限制酶 *SacI* 作用後的產物 (柑桔粉介殼蟲的產物和太平洋臀紋粉介殼蟲的結果一樣)。

Fig. 2. RFLP analysis of (A) *Dysmicoccus brevipes*, (B) *Paracoccus marginatus*, (C) *Planococcus minor* (or *Planococcus citri*). a. amplification patterns of PCR product of the 28S rDNA using the primers, 28S-D2-F and 28S-D2-R (320bp). b,c. Product after restriction enzyme digests of PCR product by using *PstI* and *SacI*, respectively.

圖 3. 以聚合酶鏈鎖反應-限制酶片段長度多型性鑑別太平洋臀紋粉介殼蟲與柑桔粉介殼蟲。a. 使用 CJ-J-2183F 與 3014-R 引子對增幅太平洋臀紋粉介殼蟲 *COI* 之 PCR 產物 (大小約為 840bp); b. 將 a 以限制酶 *BspHII* 作用後的產物。c. 使用 CJ-J-2183F 與 3014-R 引子對增幅柑桔粉介殼蟲 *COI* 之 PCR 產物 (大小約為 840bp); d. 將 c 限制酶 *BspHII* 作用後的產物。

Fig. 3. PCR-RFLP was used to identify *Planococcus minor* and *P. citri*. a. amplification patterns of PCR product of the *COI* using the primers, CJ-J-2183F and 3014-R (840bp), for *P. minor*. b. Product after restriction enzyme digests of PCR product from *P. minor* by using *BspHII*. c. amplification patterns of PCR product of the *COI* using the primers, CJ-J-2183F and 3014-R (840bp), for *P. citri*. b. Product after restriction enzyme digests of PCR product from *P. citri* by using *BspHII*.

