

蘋果蠹蛾快速鑑定技術

路光暉、傅宇忠

國立中興大學昆蟲學系

簡 介

蘋果蠹蛾 (*Cydia pomonella* (L.)) 屬於鱗翅目 (Lepidoptera) 捲葉蛾科 (Tortricidae) 之昆蟲。此蛾最早源起於亞洲，隨亞洲移民移入歐洲，再自歐洲擴展，目前幾已分布至全球，為世界各地蘋果栽培區的主要害蟲之一；美國的蘋果蠹蛾則是約於 200 年前由歐洲移民遷徙而被引入。我國尚未發現蘋果蠹蛾的紀錄，由於蘋果為本省水果進口之大宗，為杜絕此蛾的入侵，故而將之列為重要的檢疫害蟲。

蘋果蠹蛾屬於小型蛾類。卵為扁平且幾近透明的橢圓形，直徑約為 1.0-1.2 mm，散產於幼果表面或其鄰近的葉與小枝條上；初孵化之幼蟲體長約為 2 mm，自表面蛀食進入果實內啃食，幼蟲有五個齡期，老熟幼蟲體色為白色中略帶粉紅色，體長約為 12.5-16 mm；老熟幼蟲自果實內移行至他處化蛹，多數在樹皮或落葉下等隱密場所結繭化蛹，溫帶地區者冬天則以幼蟲形式在蛹內越冬；成蟲體長約為 9 mm，平均翅寬為 19 mm，雌蟲較雌蟲略大，體色灰色上雜有棕色之細紋，前翅之尖端具明顯的古銅色區域。

蘋果蠹蛾主要危害的寄主作物為蘋果 (apple)、梨 (pear) 和核桃 (walnut) 等；除此之外，它亦會危害杏 (apricot)、桃 (peach)、李 (plum)、櫻桃 (cherry)、山楂 (hawthorn)、榲桲 (quince) 及沙果 (crab apple) 等作物。主要的危害為幼蟲侵入果實內蛀食所造成，另外，當初齡幼蟲尋得適當鑽入處前，亦會因隨處啃咬果皮而對表面造成小孔傷害，兩種危害均會減低果實的商品價值。

一般而言，進口蘋果可由表面蟲孔存在與否而判別是否受到危害，但若是確定其內的害蟲種類則需另費工夫，特別是如蘋果蠹蛾等害蟲，檢疫時發現者恐多為幼體，甚或是卵，其分類鑑定上更加困難。本文主要內容即在介紹利用 PCR 的方法，以蘋果蠹蛾 RAPD 分析結果為基礎，設計針對該種檢疫害蟲之專一性引子對；在經由下列操作標準，以此等專一性引子對，進行 PCR 反應，藉放大檢體 DNA 所得片段之有無與片段大小而能快速與準確地判讀檢體是否為蘋果蠹蛾。

蘋果蠹蛾鑑定操作方法

1. 設備與材料

1.1. 設備

- 1.1.1. 微量定量吸管 (micropipette; 刻度 10、20、200 及 1000 μ l 等)
- 1.1.2. 可見光/紫外光光譜儀 (例如 GeneSpect, Naka Instruments)
- 1.1.3. 聚合酶連鎖反應器 (例如 GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer)
- 1.1.4. 水平式電泳槽
- 1.1.5. 紫外線燈箱
- 1.1.6. 電泳照相系統

1.2. 試材與試劑

- 1.2.1. 200 及 1500 μ l 之微量離心管
- 1.2.2. 微量吸管尖 (micropipette tips)
- 1.2.3. 研磨緩衝液 (grinding buffer; 100 mM NaCl, 100 mM Tris HCl, 200 mM sucrose, 100 mM EDTA, 0.05% SDS)
- 1.2.4. 蘋果蠹蛾專一性引子組

1. Cp1F/Cp1R:

Cp1F: 5'-CGGGGAAATAATGGTTTTACGAAG-3'

Cp1R: 5'-TCCTAATGTAGGTGGGCGATATTA-3'

2. Cp2F/Cp2R:

Cp2F: 5'-CTGCATCGTGTGCTGAGGAGAAATG-3'

Cp2R: 5'-TGCCCGAGATGAGTCTGAACGAGATC-3'

3. Cp3F/Cp3R:

Cp3F: 5'-CCTACGTCAGGAAACAGAAAAGGA-3'

Cp3R: 5'-AGGTTTCGGAGATGGTTCGTG-3'

4. Cp4F/Cp4R:

Cp4F: 5'-ACCAGGTTGGCGAAGAAATGC-3'

Cp4R: 5'-GGTTGGGTTACGAGTTACGAGGTTT-3'

5. Cp5F/Cp5R:

Cp5F: 5'-ACTCTCCTCTAGTGTGTCACTAAGC-3'

Cp5R: 3'-GGAAGAGATCCCTCAAAGTGAT-3'

- 1.2.5. 示蹤染劑: 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol in H₂O

- 1.2.6. 5X TBE 電泳緩衝液: Tris 54 g, boric acid 27.5 g, 500 mM EDTA 20

ml 配製成 1000 ml

1.2.7. 溴化乙錠 (ethidium bromide) : 0.5 mg/ml

2. 步驟與方法

2.1. 昆蟲檢體之保存

2.1.1. 將整隻蟲體 (最好為新鮮的蟲體) 直接置入 100% 乙醇 (酒精), 密封, 置於 4°C 下即可。

2.2. 受檢蟲體基因體核酸之萃取

2.2.1. 將酒精浸泡之蟲體, 以紙巾吸乾多餘酒精後解剖之, 將其頭部及尾部去除, 剔除腹腔組織及器官, 僅留下體壁、其上之肌肉組織及脂肪體;

2.2.2. 將蟲體組織於液態氮中以研鉢磨成細粉, 之後將其置入微量離心管 (1500 µl);

2.2.3. 每 100 mg 組織加入 1.2 ml 的研磨緩衝液;

2.2.4. 將組織粉末與研磨緩衝液混合均勻;

2.2.5. 以離心機將樣本低速離心 5 至 10 秒;

2.2.6. 將樣本置於設定溫度於 65°C 之加熱器上 30 分鐘, 每隔 5 分鐘將樣本以震盪器混和均勻;

2.2.7. 當樣本仍微溫時加入樣本 1/7 倍體積之 8 M ammonium acetate;

2.2.8. 輕緩搖動混合均勻後置於冰上至少 30 分鐘;

2.2.9. 以 14,500 g 之速度離心 15 分鐘;

2.2.10. 將上清液移至新的微量離心管中;

2.2.11. 加入等體積之 100% 酒精;

2.2.12. 輕緩搖動混合均勻後置於 -80°C 冰箱中 5 至 10 分鐘;

2.2.13. 以 14,500 g 之速度離心 15 分鐘;

2.2.14. 小心地將上清液倒去, 並以 70 與 100% 酒精各清洗 DNA 沉澱一次;

2.2.15. 將酒精除去後, 以真空抽氣機將 DNA 沉澱乾燥之;

2.2.16. 最後以適量 TE buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) 回溶;

2.2.17. 純化所得之 DNA 保存於 -20°C; (此即為供試蟲體之基因體核酸, 以供試驗之模板 DNA 來源)

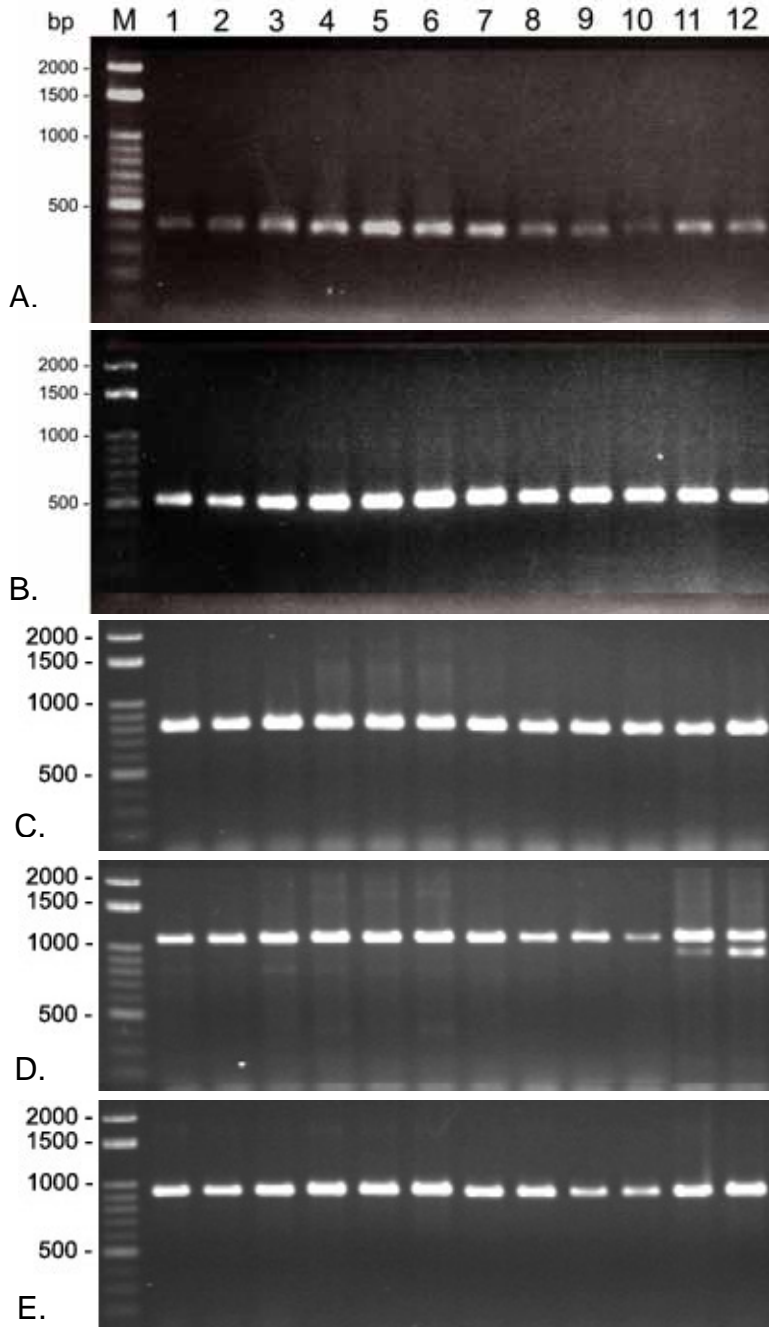
2.2.18. 取適量純化所得之基因體核酸以無菌水稀釋 200 倍, 置於光電比色計內, 測定其於波長 260 與 280 nm 之吸光值 (optical density; O.D.), 並以 OD₂₆₀ = 1 時雙股 DNA 含量為 50 µg/ml 為基準, 估計樣品 DNA 之濃度。

2.3. 操作步驟

- 2.3.1. 取 200 μl 之微量離心管，依序加入無菌水（使最後反應液之總體積為 25 μl ）、2.5 μl 之 10X taq PCR 緩衝液、正反向引子（均為 10 μM ）各 0.5 μl 、50 ng 模板 DNA、去氧核糖核苷三磷酸鹽（dNTPs, 2.5 mM each）2.5 μl 及 0.75 U Taq 聚合酵素；
- 2.3.2. 以微滴管尖將反應液混合均勻，稍加離心；
- 2.3.3. 將反應液置入聚合酶連鎖反應器中，進行聚合反應；
- 2.3.4. 反應條件：預熱（prewarm）94°C 5 分鐘；接著以 94°C 30 秒變性（denaturing）、55°C 30 秒黏合（annealing）、72°C 1 分鐘延伸（extension）為一個循環，進行 35 次聚合反應；最後以 72°C 處理 5 分鐘使其反應完全；
- 2.3.5. 反應完成之後，保存反應液於 4°C 或立即進行洋菜瓊脂電泳分析反應產物；
- 2.3.6. 取 5 μl 增幅後的反應液與 0.5 μl 之示蹤染劑充分混合後，注入 1X TBE 電泳緩衝液所製成 1%瓊脂凝膠之樣品槽中，於沉水式電泳槽內裝入適量之電泳緩衝液，以 60V 的電壓進行膠體電泳，約 4 小時後取出膠體；
- 2.3.7. 膠體以溴化乙錠染色後，於紫外光燈箱內觀察，照相紀錄並保存結果。

3. 結果判讀

- 3.1. 本診斷鑑定設計的五組引子對，僅會對蘋果蠹蛾檢體分別放大如下之 DNA 片段，但對其他昆蟲則不會放大。
 - 3.1.1. Cp1F/Cp1R：可放一大小約 400 bp 之 DNA 片段（圖 A）；
 - 3.1.2. Cp2F/Cp2R：可放一大小約 500 bp 之 DNA 片段（圖 B），但部分個體會在此片段下方出現約分別為 400 及 600 bp 之 DNA 片段；
 - 3.1.3. Cp3F/Cp3R：可放一大小約 850 bp 之 DNA 片段（圖 C）；
 - 3.1.4. Cp4F/Cp4R：可放一大小約 1100 bp 之 DNA 片段（圖 D），但部分個體會在此片段上下出現一大小約為 1000 bp 之 DNA 片段；
 - 3.1.5. Cp5F/Cp5R：可放一大小約 950 bp 之 DNA 片段（圖 E）。



圖說：蘋果蠹蛾樣本來源：1-2：紐西蘭、3-4：中國新疆、5-6：瑞士、7-8：美國華盛頓州、11-12：義大利。使用之專一性引子對：A. Cp1F/Cp1R；B. Cp2F/Cp2R；C. Cp3F/Cp3R；D. Cp4F/Cp4R；E. Cp5F/Cp5R。

4. 參考資料

- 4.1. Antolin, M. F., D. S. Guertin, and J. J. Peterson (1996) The origin of gregarious *Muscidifurax* (Hymenoptera: Pteromalidae) in north America: An analysis using molecular markers. *Biol. Cont.* 6: 76-82.
- 4.2. Brisse, S., J. -C. Dujardin, and M. Tibayrenc (2000) Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterized amplified region markers. *Mol. Biochem. Parasit.* 111: 95-105.
- 4.3. Guillot, E., and C. Mouton (1996) A PCR-DNA probe assay specific for *Bacteroides forsythus*. *Mol. Cell. Probes* 10: 413-421.
- 4.4. Paran, I., and R. W. Michelmore (1993) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 9: 85-93.
- 4.5. Taberner, A., J. Dopazo, and P. Castanera (1997) Genetic characterization of population of a de novo arisen sugar beet pest, *Aubeonuyms mariae-francisciae* (Coleoptera, Curculionidae), by RAPD analysis. *Mol. Evol.* 45: 24-31.
- 4.6. 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.