

同功異構 在斑潛蠅快速診斷 鑑定技術之應用

邱一中 吳文哲 蕭旭峰 石正人*

台北市 國立台灣大學昆蟲學系

(接受日期：中華民國 89 年 10 月 31 日)

摘 要

邱一中、吳文哲、蕭旭峰、石正人 2000 同功異構 在斑潛蠅快速診斷鑑定技術之應用 植保會刊 42：235—247

潛蠅類具經濟危害性的種類大約有 150 餘種，是重要的經濟害蟲，其中又以斑潛蠅屬 (*Liriomyza*) 最為重要，為國際檢疫上的重要害蟲。本屬成蟲及幼體時期（卵、幼蟲和蛹）均不易鑑定，在檢疫上面臨極大的困難。本研究之目的在嘗試應用蛋白質電泳技術，以同功異構 (isoenzyme) 作為診斷鑑定的標誌，以解決斑潛蠅種類鑑定所面臨的難題。本研究以 8 種 的同功異構 進行 7 種斑潛蠅的鑑定，結果以天冬氨酸轉胺 (aspartate aminotransferase)、蘋果酸脫氫 (malate dehydrogenase) 以及 B (peptidase B) 等 3 種 的同功異構 電泳圖譜，對斑潛蠅鑑別效果較佳。同種斑潛蠅內，不同生長時期和不同性別間，均有相同的同功異構 電泳圖譜，穩定性高；但在不同種斑潛蠅間，則有明顯的差異，可供作 7 種斑潛蠅種類鑑定的依據；酯 (esterase, non-specific) 的同功異構 圖譜，則僅可鑑別出部分斑潛蠅種類，可供作為種類鑑定的輔助；而 6-磷酸葡萄糖脫氫 (glucose-6-phosphate dehydrogenase)、核 磷酸化 (nucleoside phosphorylase)、甘露糖磷酸異構 (mannose phosphate isomerase) 和乳糖脫氫 (lactate dehydrogenase) 等 的同功異構 ，在試驗的活性染色方法下，均無法產生明顯可供分析的區帶以供辨識。

(關鍵詞：斑潛蠅、快速鑑定技術、蛋白質電泳、同功異構)

* 通訊作者：shihcj@ccms.ntu.edu.tw

緒 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⁽²²⁾整理的 20 多種檢疫重要性潛蠅類害蟲，其中斑潛蠅屬即佔了 10 種，是潛蠅科中極具經濟重要性的一屬。斑潛蠅分類上屬雙翅目 (Diptera)、潛蠅科 (Agromyzidae)、植潛蠅亞科 (Phytomyzinae) 之斑潛蠅屬 (*Liriomyza*)。斑潛蠅屬目前世界上約有三百多種，但真正危害農作物的害蟲種類，則約有 23 種^(16, 21)，台灣目前已記錄的有 15 種，具經濟危害性者有 7 種之多^(3, 5, 18, 19, 20)。

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。

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，因此種級分類上不易進行，大部份種類外部形態特徵極為近似，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^(15, 23)。但是，在雌蟲以及幼體階段的蟲體，目前均無法加以鑑定。當兩種或兩種以上的雜食性種類，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^(4, 5)。因此，在檢疫以及分類上，均面臨極需解決的同樣問題。Zenhdher 等人⁽²⁵⁾曾利用 4 種的同功異構

區別 3 種斑潛蠅，得到不錯的鑑定結果，本研究也應用分子生物學的方法於 7 種斑潛蠅之診斷鑑定上，期望提供檢疫和分類的要求，輔助我國害蟲檢疫的施行。以 7 種斑潛蠅為材料，利用 8 種的同功異構進行蛋白質電泳分析。並將所得的結果與利用斑潛蠅雄性生殖器進行的形態分群結果相比較，確保以蛋白質標誌作為斑潛蠅種類鑑定工具的準確性，以及在害蟲檢疫上的應用價值。

材料和方法

斑潛蠅標本採集與保存

本研究以斑潛蠅為材料，利用同功異構進行種類的鑑別。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，並摘取受害植株，攜回實驗室作純系飼養。標本採集以小族群 (colony) 為單位，分為活體裝瓶以及實驗室純系飼養的蟲源。其中，提供進行蛋白質分析的蟲體，冰存在 -80℃ 的冰箱中或以液態氮冰存備用。進行雄性生殖器官初步鑑定的蟲體，則浸泡於 95% 酒精中保存備用。

有關實驗室純系飼養斑潛蠅的方法，主要是種植寄主植物於小型壓克力的養蟲箱中 (30 cm×30 cm×50 cm)，進行斑潛蠅的純系飼養。將採集自野外族群的單隻雌成蟲，接入種有寄主植物的小型壓克力養蟲箱中，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 7 種斑潛蠅採集記錄如下：

1. 昭和草斑潛蠅 (*L. asterivora* Sasakawa)：採自台大農場 (The farm of National Taiwan University)、宜蘭縣壯圍鄉 (Juangwei, Ilan Co.) 和三星鄉 (Sanshing, Ilan Co.)；共 6 個小族群。
2. 白菜斑潛蠅 (*L. brassicae* Riley)：採自

- 彰化縣田尾鄉 (Tianwei, Changhua Co.) 以及台南縣官田鄉 (Guantian, Tainan Co.)；共 4 個小族群。
3. 蕃茄斑潛蠅 (*L. bryoniae* Kaltenbach)：採自宜蘭縣壯圍鄉 (Juangwei, Ilan Co.) 和雲林縣西螺鎮 (Shiluo, Yunlin Co.)；共 7 個小族群。
 4. 中華蔥斑潛蠅 (*L. chinensis* Kato)：採自宜蘭縣壯圍鄉 (Juangwei, Ilan Co.) 和三星鄉 (Sanshing, Ilan Co.) 以及雲林縣西螺鎮 (Shiluo, Yunlin Co.)；共 15 個小族群。
 5. 南美斑潛蠅 (*L. huidobrensis* Blanchard)：採自宜蘭縣壯圍鄉 (Juangwei, Ilan Co.) 和三星鄉 (Sanshing, Ilan Co.)。共 14 個小族群。
 6. 蔬菜斑潛蠅 (*L. sativae* Blanchard)：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 (Juangwei, Ilan Co.) 和三星鄉 (Sanshing, Ilan Co.)、台中市作物田 (The cultivated land of Taichung)、彰化縣田尾鄉 (Tianwei, Changhua Co.)、雲林縣西螺鎮 (Shiluo, Yunlin Co.) 和莿桐鄉 (Tsztung, Yunlin Co.)、以及台南縣新營市 (Shinying, Tainan Co.)；共 46 個小族群。
 7. 非洲菊斑潛蠅 (*L. trifolii* Burgess)：採自南投縣埔里鎮 (Puli, Nantou Co.) 及彰化縣田尾鄉 (Tianwei, Changhua Co.) 和花壇鄉 (Huatan, Changhua Co.)；共 25 個小族群。

蛋白質電泳分析

本試驗使用 2 種不同的電泳系統進行同功異構的分析。

一、瓊脂糖膠體電泳 (agarose gel electrophoresis)：

利用 Innovative Chemistry 公司的

AuthentiKit™ System 同功異構 電泳系統設備，包括全套的電泳設備和酵素試劑，進行 7 種 的同功異構 電泳及活性染色分析，分別為天冬氨酸轉胺 (aspartate aminotransferase, EC 2.6.1.1)、6-磷酸葡萄糖脫氫 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, EC 1.1.1.49)、乳糖脫氫 (lactate dehydrogenase, EC 1.1.1.27)、蘋果酸脫氫 (malate dehydrogenase, EC 1.1.1.37)、甘露糖磷酸異構 (mannose phosphate isomerase, EC 5.3.1.8)、核磷酸化 (nucleoside phosphorylase, EC 2.4.2.1) 以及 B (peptidase B, EC 3.4.11.4) 等 的同功異構。有關瓊脂糖膠體電泳所需之電泳設備及藥劑，均購自 Innovative Chemistry 公司，酵素的萃取、酵素活性的測量、電泳及染色等之詳細步驟，亦參照 Innovative Chemistry 公司所提供的使用手冊⁽¹³⁾，相關的步驟略述如下：

(一)、斑潛蠅蟲體酵素的萃取：

使用 AuthentiKit™ 的試劑系統組 (reagent system kit)，取新鮮或低溫冷凍的單隻標本，置於微量離心管中，加入 25 µl 的 cell extraction buffer，研磨後置於冰上 40 分鐘，使細胞破裂。然後在 4℃ 下，以 3,000 Xg (KUBOTA 6800, RA-155R rotor) 離心 10 分鐘，將細胞膜及未破裂的細胞和殘渣沈澱下來。吸取上層 20 µl 的澄清液並加入 20 µl 的 Enzyme Stabilizer™，以保持同功異構 的活性。若保存於 -20℃ 下，約可維持酵素活性至少 1 年。

(二)、測量 酵素活性：

若是酵素的活性太高，會造成電泳所得到的酵素區 (enzyme zone) 太廣；反之，活性太弱結果會太模糊，皆不利於隨後的分析工作。因此，在進行電泳之前，先測量酵素活性，將各樣品的酵素活性調整至適當的反應程度 (適當的反應活性見表一所示)。將欲檢測的 7 種酵素基質試劑 (enzyme substrate reagent, 100 mg/vial) 溶解於 2.5 ml

0.1 M SAB *plus* Buffer™，置於冰上。然後取 100 μ l 於 1.5 ml 離心管中，置於 37°C 水浴 2 ~ 3 分鐘後，再加入 10 μ l 的斑潛蠅研磨萃取液，在 37°C 水浴下與酵素基質試劑進行反應，10 分鐘後加入 1.0 ml Quench-A-Zyme™ reagent 終止反應。30 分鐘內以光譜儀 (spectrophotometer, Hitachi F4500) 在波長 565 nm 下，測量斑潛蠅研磨萃取液的酵素活性。

(三)、電泳及染色：

調整斑潛蠅研磨萃取液的酵素至表一所述的適當活性後，將此樣品 (1.5 μ l) 逐一加入瓊脂糖膠體電泳膠片 (agarose electrophoresis film) 之樣品槽中，以 0.05 M SAB *plus* buffer 作為緩衝液，使用 AuthentiKit™ System 同功異構電泳系統的設備，在 4°C，160 V 的電壓下進行電泳 40 分鐘。電泳結束後取出瓊脂糖膠體電泳膠片，將欲檢測的酵素基質試劑 (enzyme substrate, 100 mg/vial) 溶解於 0.5 ml ddH₂O 後，滴在膠片上並塗佈均勻，然後置於 37°C 定溫箱中反應並染色 30 分鐘。染色結果顯示清楚後，以去離子水將膠片上多餘的酵素基質試劑沖洗乾淨，最後再置於 37°C

乾燥室中烘乾，記錄並照相保存。

二、聚丙烯胺膠體電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)：

利用 Mini-PROTEAN® II Cell 的蛋白質電泳設備 (購自 Bio-Rad 公司)，進行聚丙烯胺膠體電泳，電泳結束後，進行酯 (esterase) 類之同功異構的活性染色。酯的同功異構萃取、電泳及染色之步驟略述如下⁽¹⁰⁾：

(一)、酯的萃取及電泳：

以上層膠 (stacking gel) 為 4%，下層膠 (resolving gel) 為 10% 的聚丙烯胺電泳膠片進行酯電泳。電泳進行的緩衝液 (reservoir buffer) 為 0.025 M Tris—0.2 M glycine, pH 8.3。取新鮮或低溫冷凍的單隻標本，置於微量離心管中，加入 15 μ l 的 ddH₂O 研磨後，離心 (10,000 Xg, KUBOTA 6800, RA-155R rotor) 5 分鐘。吸取上層 10 μ l 的澄清液，混合 2 μ l 的 bromphenol blue (BPB) 甘油染劑，將處理好的樣品，逐一加入聚丙烯胺電泳膠片的樣品槽 (well) 中，在 4°C 的條件下，進行電泳，定電壓為 100 V，待 BPB 甘油染劑指示線泳動至膠體底部後，切斷電流，進行膠片的酯活性染色。

表一、電泳分析時需要的最低與最高的樣品酵素活性程度。

Table 1. Maximum and minimum activity levels required for electrophoretic analysis, using 1 microliter of sample per well.⁽¹³⁾

Enzyme ¹⁾ substrate	Maximum A ₅₆₅	Activity : IU/L ²⁾	Minimum A ₅₆₅	Activity : IU/L
NP	0.5	500	0.1	100
G6PD	0.7	700	0.1	100
MD	0.9	900	0.1	100
MPI	0.6	600	0.1	100
Pep B	0.6	600	0.1	100
AST	0.6	600	0.1	100
LD	1.2	1200	0.1	100

¹⁾ NP: nucleoside phosphorylase ; G6PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase ; MD: malate dehydrogenase ; MPI: mannose phosphate isomerase ; Pep B: peptidase B ; AST: aspartate aminotransferase ; LD: lactate dehydrogenase.

Enzyme substrate reagent bought from the Innovative Chemistry.

²⁾ One International Unit (1 IU) is one micromole of product produced in one minute under the conditions of the reaction.

(二)、酯 的染色方法：

先在染色盒中將 0.18 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 25.0 ml、0.15 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5.0 ml、*n*-propanol 2.5 ml、dd H_2O 17.0 ml、0.054 M α -naphthyl acetate 1.0 ml 以及 0.054 M β -naphthyl acetate 0.8 ml 混合均勻後，放入欲染色之電泳膠片，膠片切勿折疊，以免染色不均勻。隨後加入 7.5 mM fast garnet GBC salt 5.0 ml。當膠片染色至結果顯示清楚後，即可倒去染液，準備進行固定及乾燥膠片。

將染色好的膠片放入 50 % 的酒精溶液中 5 ~ 10 分鐘，取出膠片在壓克力板上以濾紙為襯底，再覆蓋一層玻璃紙加以固定，待完全乾燥後，即可取下拍照記錄。

結果與討論

一、斑潛蠅的觀察與標本的採集

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 7 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，且有混棲的情形，因此除了收集保存在 95% 酒精外，也攜回實驗室進行累代的飼養，以收取純系的子代供作試驗蟲源。

採集的田間標本共有 117 個小族群，其中 *L. asterivora* 有 6 個小族群、*L. brassicae* 有 4 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、蛋白質電泳分析

本研究是進行斑潛蠅體內蛋白質中，同功異構 電泳圖譜（isoenzyme electrophoresis patterns）的分析，利用相關的活性染色方法，可使相同種類的同功異構 之泳動條帶呈色，藉以判斷此類酵素基因在不同斑潛蠅種類間的差異情形。本

試驗以 2 種不同的電泳系統進行 8 種 的同功異構 電泳型態的分析，其中共篩選出 4 種 的同功異構 ，具有鑑別供試斑潛蠅種類的能力，其結果如下：

(一)、酯 的同功異構 電泳圖譜分析：

本研究利用酯 的高度多態性，嘗試以電泳圖譜的形式作為種類鑑定依據。從酯 電泳的條帶和泳動距離結果顯示，斑潛蠅屬內多為單純的酯 型式，在試驗的 7 種斑潛蠅中，均為兩個基因座（locus）型式。由圖一可明顯的看出 7 種斑潛蠅的酯

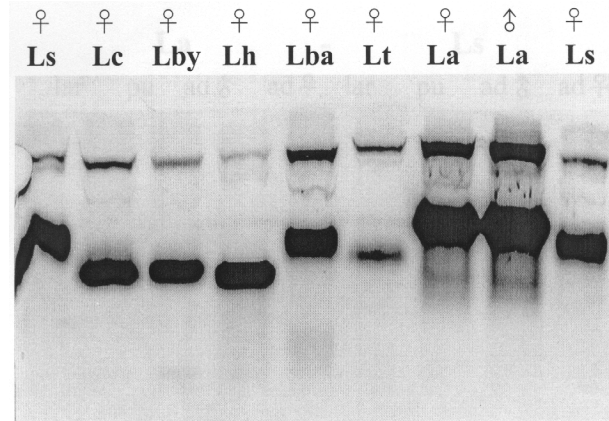
電泳圖譜中，均具有 2 種不同分子型式的酯 ，即具有 2 個酯 基因座，其中一個基因座所控制的酯 ，分子的大小及所帶的電性及電量，在 7 種斑潛蠅中較相近且穩定，而另一個基因座所控制的酯 ，其分子的結構在 7 種斑潛蠅中的差異情形較大。

在不同種斑潛蠅的標本，進行酯 的同功異構 電泳分析，結果顯示所有酯 具有相異的泳動條帶和泳動距離，可以粗略的區分出 *L. asterivora*、*L. brassicae*、*L. bryoniae*、*L. chinensis*、*L. huidobrensis*、*L. sativae* 及 *L. trifolii* 等 7 種不同的斑潛蠅（圖一），其中 *L. bryoniae*、*L. chinensis*、*L. huidobrensis* 和 *L. trifolii* 等 4 種斑潛蠅的酯 泳動速度較快，而 *L. asterivora*、*L. brassicae* 和 *L. sativae* 等 3 種斑潛蠅的酯 泳動速度較慢。

進一步檢測採自不同地點，或取食不同寄主作物之不同小族群間的同種斑潛蠅標本，結果發現都具有相似的酯 電泳型態。以 *L. sativae* 為例，在台大農場、宜蘭壯圍、台中作物田、雲林西螺、雲林荊桐和台南新營等地，以及在龍葵（*Solanum nigrum* L.）、蕃茄（*Lycopersicon esculentum* Mill.）、立刀豆（*Canavalia ensiformis* DC.）、菜豆（*Vigna sesquipedalis* Fruwirth）、綠豆（*Phaseolus radiatus* L.）、白菜（*Brassica campestris* L.）、瓠瓜（*Lagenaria siceraria* Standl.）和絲瓜（*Luffa cylindrical* Roem.）等寄主作物上採

集的雌成蟲，進行酯的同功異構電泳分析，結果顯示均具有相似的泳動條帶和泳動距離（圖二）。由此可知，利用酯的同功

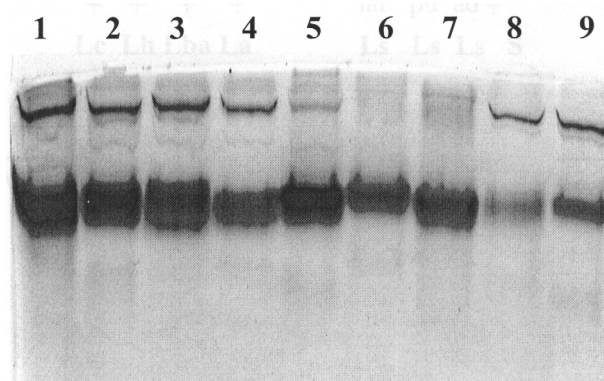
異構電泳分析，不會因為採集地點的不同，或取食寄主作物的不同而有所差異，亦即其穩定性高。



圖一、7 種斑潛蠅之酯的同功異構電泳圖譜。

Fig. 1. Esterase isoenzyme patterns of seven *Liriomyza* spp.

La: *L. asterivora*, Lba: *L. brassicae*, Lby: *L. bryoniae*, Lc: *L. chinensis*, Lh: *L. huidobrensis*, Ls: *L. sativae*, Lt: *L. trifolii*.



圖二、不同採集地及取食不同寄主植物之 *Liriomyza sativae* 雌成蟲酯的同功異構電泳圖譜。

Fig. 2. Esterase isoenzyme patterns of adult female *Liriomyza sativae* in different collecting site and different hosts.

Lanes 1 ~ 9: adult female collected from: 1. the farm of National Taiwan University (NTU), on yard long bean; 2. the farm of NTU, on sword bean; 3. Juangwei, Ilan Co., tomato; 4. Juangwei, Ilan Co., on mungbean; 5. the cultivated land of Taichung, on sponge gourd; 6. Shiluo, Yunlin Co., on Chinese cabbage; 7. Tsztung Yunlin Co., on white-flowered gourd; 8. Shinying, Tainan Co., on black nightshade; 9. Shinying, Tainan Co., on tomato.

同樣的以採自台南新營綠豆上的 *L. sativae* 和採自台大農場昭和草 (*Erechites valerianaefolia* DC.) 上的 *L. asterivora* 為例，在同種的族群中，不同生長時期，包括幼蟲期、蛹期、雄成蟲和雌成蟲，進行酯的同功異構電泳分析，結果顯示酯

的同功異構電泳圖譜，均具有相似的泳動條帶和泳動距離（圖三）。由此可知，利用酯的同功異構電泳分析，不會因為種內的各個時期而有不同的結果，亦即其種內的穩定性極高。

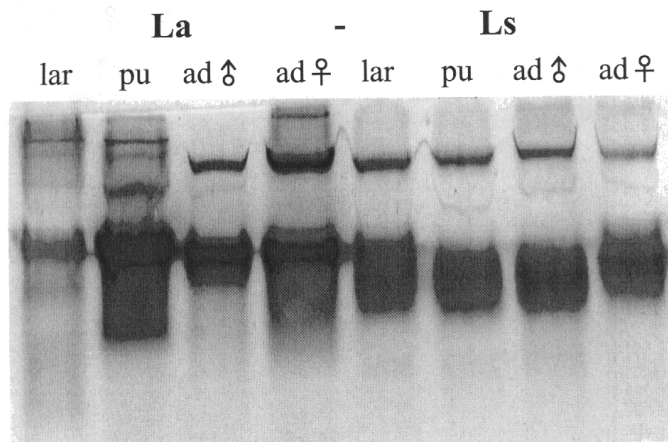
由以上的結果顯示，酯的同功異構電泳分析在斑潛蠅的種間具有差異性，而在種內的差異極小，穩定性高，適合用來作為斑潛蠅快速鑑定時的參考。

此外，由酯的同功異構電泳試驗結果，發現 7 種斑潛蠅的酯泳動速度可明顯的分為 2 群，*L. asterivora*、*L. brassicae*、*L. sativae* 及 *L. trifolii* 等 4 種斑潛蠅的酯泳動速度較慢，而 *L. bryoniae*、*L. chinensis* 及 *L. huidobrensis* 等 3 種斑潛蠅的酯泳動速度較快，這個結果與解剖雄性生殖器特徵所作的推論相吻合。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⁽³⁾，此結果與酯的同功異構電泳所得到之結果相符，彼此可初步的得到驗證。

(二)、AST、MD 和 PepB 的同功異構電泳分析：

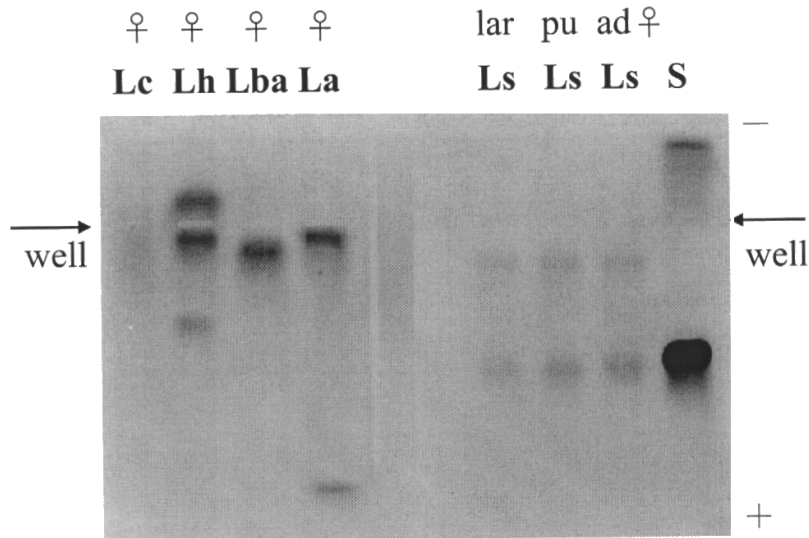
利用 Innovative 公司的 **Authenti Kit™** System 進行 7 種的同功異構之瓊脂糖膠體 (agarose gel) 電泳分析。其中，3 種的同功異構，對供試的 5 種斑潛蠅種類具有高的鑑別力，分別是天冬氨酸轉胺 (aspartate aminotransferase, AST)、蘋果酸脫氫 (malate dehydrogenase, MD) 以及 B (peptidase B, PepB)。電泳的試驗結果顯示，不同種斑潛蠅的電泳圖譜均具有相異的泳動條帶和泳動距離，可以明顯的區分出 *L. asterivora*、*L. brassicae*、*L. chinensis*、*L. huidobrensis* 以及 *L. sativae* 等不同的 5 種斑潛蠅，而同種斑潛蠅中不同的生長時期，則具有相同的泳動條帶和泳動距離（圖四、圖五、圖六）。



圖三、2 種斑潛蠅在不同生長時期之酯的同功異構電泳圖譜。

Fig. 3. Esterase isoenzyme patterns of two *Liriomyza* spp. of different stages.

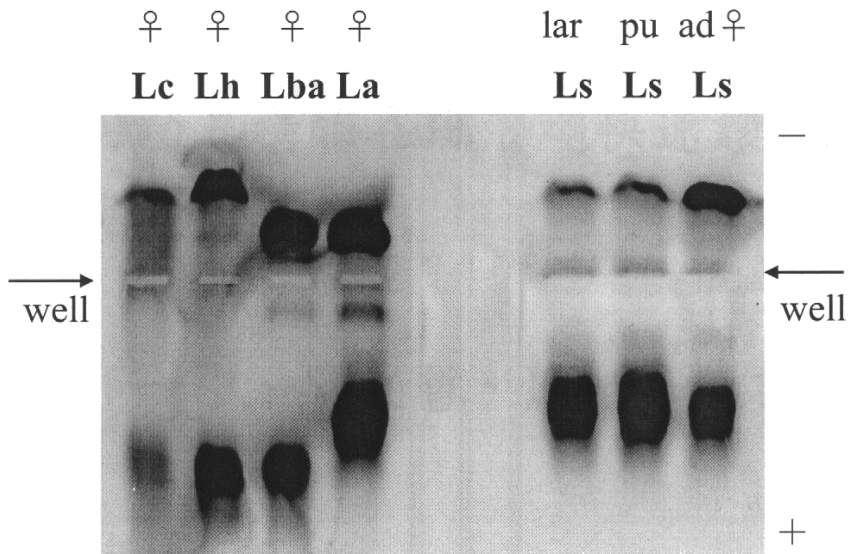
La: *L. asterivora*, Ls: *L. sativae*, lar: larva, pu: pupa, ad ♂: adult male, ad ♀: adult female.



圖四、5 種斑潛蠅之天冬氨酸轉胺 (aspartate aminotransferase) 的同功異構 電泳圖譜。

Fig. 4. Aspartate aminotransferase isoenzyme patterns of five *Liriomyza* spp.

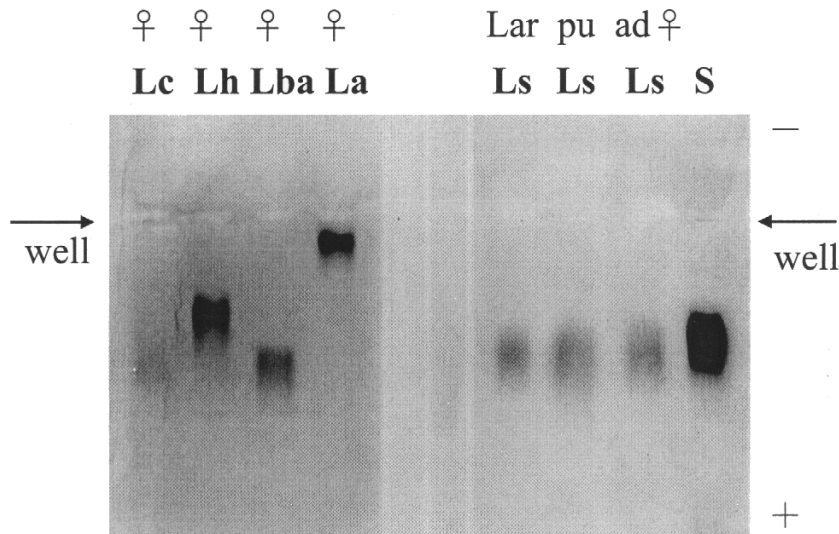
La: *L. asterivora*, Lba: *L. brassicae*, Lc: *L. chinensis*, Lh: *L. huidobrensis*, Ls: *L. sativae*, lar: larva, pu: pupa, ad ♀: adult female, S: standard (NCTC Clone 929 Cell line, Mouse C3H/An).



圖五、5 種斑潛蠅之蘋果酸脫氫 (malate dehydrogenase, MD) 的同功異構 電泳圖譜。

Fig. 5. Malate dehydrogenase isoenzyme patterns of five *Liriomyza* spp.

La: *L. asterivora*, Lba: *L. brassicae*, Lc: *L. chinensis*, Lh: *L. huidobrensis*, Ls: *L. sativae*, lar: larva, pu: pupa, ad ♀: adult female.



圖六、5 種斑潛蠅之 B (peptidase B, PepB) 的同功異構 電泳圖譜。

Fig. 6. Peptidase B isoenzyme patterns of five *Liriomyza* spp.

La: *L. asterivora*, Lba: *L. brassicae*, Lc: *L. chinensis*, Lh: *L. huidobrensis*, Ls: *L. sativae*, lar: larva, pu: pupa, ad♀: adult female, S: standard (NCTC Clone 929 Cell line, Mouse C3H/An).

在 AST 的同功異構 電泳圖譜中, *L. chinensis* 具有 1 條帶負電荷, 且泳動速度較慢的泳動條帶; *L. huidobrensis* 具有 1 條帶正電荷的泳動條帶, 以及 2 條帶負電荷的泳動條帶; *L. brassicae* 具有 1 條泳動速度較慢且帶負電荷的泳動條帶; *L. asterivora* 具有 2 條帶負電荷的泳動條帶, 其中 1 條泳動速度快; 而 *L. sativae* 同樣具有 2 條帶負電荷的泳動條帶, 但泳動速度較快的 1 條較 *L. asterivora* 慢。其次在 *L. sativae* 的不同生長時期, 其泳動的結果均相同。亦即在種間具有鑑別力, 而種內的穩定性高 (圖四)。

在 MD 的同功異構 電泳圖譜中, *L. chinensis* 和 *L. sativae* 具有 2 條泳動條帶, 其中 *L. sativae* 帶負電的泳動條帶泳動速度較慢; *L. sativae*、*L. brassicae* 和 *L. asterivora* 具有 3 條泳動條帶, 其中 *L. sativae* 具有 2 條帶正電荷的泳動條帶, 而 *L. brassicae* 和 *L. asterivora* 具有 2 條帶負

電荷的泳動條帶, 但 *L. asterivora* 泳動速度較快的條帶較 *L. brassicae* 慢。其次在 *L. sativae* 的不同生長時期, 其泳動的結果均相同。亦即在種間具有鑑別力, 而種內的穩定性高 (圖五)。

在 PepB 的同功異構 電泳圖譜中, *L. asterivora*、*L. brassicae*、*L. chinensis*、*L. huidobrensis* 以及 *L. sativae* 等不同的 5 種斑潛蠅, 均具有 1 條泳動條帶, 但彼此泳動的速度均不同。其泳動的速度由快到慢依次為, *L. brassicae*、*L. chinensis*、*L. sativae*、*L. huidobrensis* 和 *L. asterivora*。其次在 *L. sativae* 的不同生長時期, 其泳動的結果均相同。亦即在種間具有鑑別力, 而在種內的穩定性高 (圖六)。

由以上的結果顯示, AST、MD 和 PepB 等 3 種 的同功異構 電泳分析, 在試驗之 5 種斑潛蠅的種間, 具有高度的差異性, 而有極佳的鑑別能力, 並且在種內差異小, 而穩定性極高。此外, 利用

Innovative 公司的 **AuthentiKit™** System 進行同功異構 的電泳分析時，只需要 2 ~ 3 小時即可完成，因此非常適合用來作為斑潛蠅的快速鑑定依據。

(三)、G6PD、NP、MPI 和 LDH 的同功異構 電泳分析：

6- 磷酸葡萄糖脫氫 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD) 在斑潛蠅體內的含量，可能隨種類的不同，或不同的生長時期而有所差異，有些種類或生長時期的含量較少，在經活性染色之後，於電泳圖譜上並無明顯的泳動條帶，因此無法比較鑑定。此類同功異構 只能鑑別出 *L. brassicae* 和 *L. huidobrensis* 等 2 種斑潛蠅，實用性較差。

其他 3 種 的同功異構 ，核 磷酸化 (nucleoside phosphorylase, NP)、甘露糖 磷酸 異 構 (mannose phosphate isomerase, MPI) 和乳糖脫氫 (lactate dehydrogenase, LDH)，在斑潛蠅體的體內可能含量較少，或這 3 類酵素比較不穩定，容易在樣品處理過程中失去活性，因此在電泳結束後，進行活性染色分析時，仍無法產生明顯的區帶以供辨識，因此無法進行斑潛蠅的鑑別。

結 語

利用同功異構 來進行分類鑑定的研究歷史已很長，如應用在煙草粉蝨(*Bemisia tabaci*) Non-B 和 B-type 的鑑別^(6, 7, 9, 14, 24)、地中海果實蠅的鑑定⁽⁸⁾、赤眼卵蜂的分類^(11, 17)和根腐線蟲⁽¹²⁾的分類等，而在斑潛蠅分類上的應用，只有 1983 年 Zehnder 等人，利用 4 類 同 功 異 構 (Isocitrate dehydrogenase、Aldehyde oxidase、Aconitase、Glucose-6-phosphate dehydrogenase)，進行 3 種斑潛蠅 (*L. brassicae*、*L. sativae*、*L. trifolii*) 的鑑別。不過由於斑潛蠅在檢疫上的重要性，目前急需開發快速的鑑定技

術，使檢疫重要性的斑潛蠅種類鑑定能快速進行。本試驗研究成果提供可行的技術，用以區分台灣目前危害較嚴重的 7 種斑潛蠅。然而在檢疫實務應用上，仍須在深入研究，建立更完整的比對資料系統，落實檢疫害蟲的快速鑑定。

在利用同功異構 來鑑定斑潛蠅種類的試驗中，於測試的 8 種 的同功異構 中，發現有 4 種 的同功異構 可以用來區分所採集的 7 種斑潛蠅種類，這 4 種的同功異構 ，分別為酯 、天冬氨酸轉胺 、蘋果酸脫氫 以及 B。因此，只要比較這 7 種斑潛蠅種類，在這 4 種的同功異構 中，其電泳圖譜內泳動條帶的數目、條帶泳動的速度和距離，就可以達到鑑別的目的。如此不僅可以解決斑潛蠅在外部形態難以區分的難題，也可以彌補在田間調查或監測時，可能遇到多種斑潛蠅混棲危害作物，使得鑑定難以進行的困擾，提供正確的鑑定資訊及防治措施，以掌握及時的防治時機。

酵素是廣泛分布於生物體的蛋白質，在各器官或不同發育期中均可發現，分析時僅需少量單隻樣品的蛋白質萃取液即可，且在短時間內可同時檢測大量的樣品，因此利用同功異構 電泳型態分析在快速鑑定分子層次的研究中，具有低成本和高效率的優點⁽²⁾。但是分析時必須使用新鮮，或經冷凍處理保存的標本，且此法低估了大量的差異，並不是一種完美的遺傳變異檢測方法，因為不是所有的氨基酸取代都會引起電泳泳動速率的改變，同時具有相同泳動速率的電泳條帶，並不一定含有相同的蛋白質⁽²⁾。以 DNA 的層級來說，由於密碼子的簡約性，約有 30 % 的鹼基替換，不會發生氨基酸的取代改變，即使發生取代改變，也大約有 2/3 的改變不會影響蛋白質分子的靜電荷，所以蛋白質電泳分析檢測不出這些變化⁽²⁾。因此在鑑定分析時，雖然是不同的斑潛蠅，但卻具

有相同的同功異構 電泳圖譜，而造成無法鑑別的情形。

綜觀這些優缺點，利用同功異構 的電泳分析，雖可作為斑潛蠅的種類鑑定，但要直接應用於海關進行害蟲檢疫鑑定時，宜多配合其他方法，如 DNA 的分析⁽¹⁾，使其有更完整的結果。

謝 辭

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

1. 邱一中、吳文哲、蕭旭峰、石正人。2000。RAPD-PCR 在 6 種斑潛蠅（雙翅目：潛蠅科）快速鑑定技術之應用。中華昆蟲 20: 293-309。
2. 黃原。1998。分子系統學：原理、方法及應用。中華人民共和國農業部教育司主編。中國農業出版社出版。372 頁。
3. 蕭旭峰。1991。臺灣斑潛蠅屬昆蟲之系統分類研究（雙翅目：潛蠅科）。國立臺灣大學植物病蟲害學研究所碩士論文。129 頁。
4. 蕭旭峰、吳文哲。1996。植物檢疫診斷（二）雙翅目潛蠅科（Agromyzidae）。經濟部商品檢驗局新竹分局出版。579-677 頁。
5. 蕭旭峰、吳文哲。1998。蔬菜斑潛蠅（*Liriomyza sativae*）之生態和防治（雙翅目：潛蠅科）。科學農業 46: 312-318。
6. Byrne, F. J., and Devonshire, A. L. 1993. Insensitive acetylcholinesterase and esterase polymorphism in susceptible and resistant populations of the tobacco whitefly *Bemisia tabaci* (Genn.). Pestic. Biochem. Physiol. 45: 34.
7. Costa, H. S., and Brown, J. K. 1991. Variation in biological characteristics and esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci*, and the association of one population with silverleaf symptom induction. Ent. Exp. Appl. 61: 211-219.
8. Dadour, I. R., Yeates, D. K., and Postle, A. C. 1992. Two rapid diagnostic techniques for distinguishing Mediterranean fruit fly from *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 85: 208-211.
9. Gunning, R. V., Byrne, F. J., and Devonshire, A. L. 1997. Electrophoretic analysis of Non-B and B-biotype *Bemisia tabaci* (Gennaduis) (Hemiptera: Aleyrodidae) in Australia. Aust. J. Entomol. 36: 245-249.
10. Hillis, D. M., Moritz, C., and Mable, B. K. 1996. Molecular Systematics, second edition. Sinauer Associates Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts U.S.A. 655 pp.
11. Hung, A. C. F. 1982. Chromosome and isozyme studies in *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Entomol. Soc. Wash. 84: 791-796.
12. Ibrahim, S. K., Perry, R. N., and Webb, R. M. 1995. Use of isozyme and protein phenotypes to discriminate between six *Pratylenchus* species from Great Britain. Ann. Appl. Biol. 126: 317-327.
13. Innovative Chemistry. 1988. The Authentikit™ System Handbook for Cell Authentication and Identification, second edition. Marshfield U.S.A. 78 pp.
14. Liu, H. Y., Cohen, S., and Duffus, J. E. 1992. The use of isozyme patterns to

- distinguish sweetpotato whitefly (*Bemisia tabaci*) biotypes. *Phytoparasitica* 20: 187-194.
15. 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: 67-183.
16. Parrella, M. P. 1987. Biology of *Liriomyza*. *Ann. Rev. Entomol.* 32: 201-224.
17. Pintureau, B., and Babault, M. 1981. Caractérisation enzymatique de *Trichogramma evanescens* et de *T. maidis* (HYM: Trichogrammatidae); étude des hybrides. *Entomophaga* 26: 11-22.
18. Shiao, S. F., and Wu, W. J. 1989. Four new records of *Liriomyza* leaf-miners (Diptera: Agromyzidae) from Taiwan. *J. Taiwan Mus.* 42: 15-23.
19. Shiao, S. F., and Wu, W. J. 1995. A new *Liriomyza* species from Taiwan (Diptera: Agromyzidae). *Pan-Pacific Entomol.* 71: 161-168.
20. Shiao, S. F., Lin, F. J., and Wu, W. J. 1991. Redescription of four *Liriomyza* species (Diptera: Agromyzidae) from Taiwan. *Chinese J. Entomol.* 11: 65-74.
21. Spencer, K. A. 1973. Agromyzidae (Diptera) of Economic Importance. Dr. W. Junk B. V., Publishers, The Hague. 418 pp.
22. 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.
23. Spencer, K. A. 1990. Host specialization in the world Agromyzidae (Diptera). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. 444 pp.
24. Wool, D., Gerling, D., Bellotti, A. C., and Morales, F. J. 1993. Esterase electrophoretic variation in *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hom., Aleyrodidae) in Israel and Colombia. *J. Appl. Ent.* 115: 185-196.
25. Zehnder, G. W., Trumble, J. T., and White, W. R. 1983. Discrimination of *Liriomyza* species (Diptera: Agromyzidae) using electrophoresis and scanning microscopy. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 85: 564-574.

ABSTRACT

Chiu, Y. C., Wu, W. J., Shiao, S. F., and Shih, C. J.* 2000. The application of isoenzyme to develop rapid diagnostic techniques for identification of leafminer flies, *Liriomyza* spp. (Dipter: Agromyzidae). Plant Prot. Bull. 42: 235 - 247. (Department of Entomology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.)

One hundred and fifty reported species of leafminer flies cause economic damage in crops, and the most important species are polyphagous especially *Liriomyza* spp. that are important quarantined pests in international trade. The identification of *Liriomyza* spp. are difficult to identify in immature stages (eggs, larvae and pupae) and even adult, which lead to many obstacles in the international quarantine. This study attempts to develop the molecular techniques of isoenzyme electrophoresis to identify *Liriomyza* spp. and evaluate the application in quarantine. Seven *Liriomyza* species were used for this study. The patterns of isoenzymes including aspartate aminotransferase, malate dehydrogenase and peptidase B could be suggested for identification of these species, and there are no difference in the isoenzyme electrophoresis patterns among the different stages and sexes of each species, but obvious differences between different species. Moreover, the patterns of esterase also could distinguish some of the *Liriomyza* species. Due to the trace amount of glucose-6-phosphate dehydrogenase、lactate dehydrogenase, mannose phosphate isomerase and nucleoside phosphorylase inside the body of *Liriomyza*, they could not be stained after electrophoresis.

(Key word: *Liriomyza* spp., rapid diagnostic techniques, identification, protein electrophoresis, isoenzyme)

*Corresponding author. E-mail: shihcj@ccms.ntu.edu.tw