

出國報告（出國類別：研習）

赴日本茨城大學農學部應用動物昆蟲
學研究室研習蟎蜱分類、鑑定與防治
技術

服務機關：行政院農業委員會臺東區農業改良場

姓名職稱：許育慈 助理研究員

派赴國家：日本

出國期間：99年9月19日至9月25日

報告日期：99年11月

壹、摘要

本次赴日本研習蠨蟬分類、鑑定與防治技術；研習過程中，於茨城大學農學部應用動物昆蟲學研究室針對葉蠨外部形態鑑定與酵素圖譜分子鑑定，同時學習葉蠨飼養技術及參觀試驗調查果園，並於農業生物資源研究所昆蟲-昆蟲、植物間相互作用研究室學習 DNA 分子鑑定技術、害蟲天敵飼養方法與被害植物與天敵間交互作用關係。不論是蠨蟬生態學或防治研究均須要以分類做為基礎，確認目標蠨類為何種，再進行更深入的研究，才有其實質上的意義。未來應改以形態鑑定為主，配合分子鑑定確認，才可以達到鑑定葉蠨的目的，配合其他生態特性與施用天敵吸引物質以天敵防治，供農業上葉蠨防治工作的參考。

貳、目次

摘要	1
目次	2
目的	3
簡要行程記要	4
研習概要	5
參觀研究室簡介	5
研習過程	5
心得與建議	9
誌謝	11
附錄	12

參、目的

本次赴日本茨城大學農學部應用動物昆蟲學研究室研習蚜蟬分類、鑑定與防治技術，研習過程針對葉蟬外部形態鑑定、酵素圖譜分子鑑定、DNA 分子鑑定等技術，同時學習葉蟬飼養技術及參觀試驗調查果園、害蟲天敵飼養方法與被害植物與天敵間交互作用關係。分類鑑定為一切研究的基礎，不論是蚜蟬生態學或防治研究均須要以分類做為基礎，確認目標蚜蟬為何種，再進行更深入的研究，才有其實質上的意義。未來應改以形態鑑定為主，配合分子鑑定確認，才可以達到鑑定葉蟬的目的，供農業上葉蟬防治工作的參考。

肆、簡要行程記要

日期	地點	行程摘要
9月19日	台灣桃園機場→ 日本成田空港	1. 去程。 2. 茨城大學農業部應用動物昆蟲學研究室
9月20日	茨城縣-茨城大學	1. 蟎類形態鑑定技巧 2. 蟎類飼養技術
9月21日	茨城縣-茨城大學	蟎類酵素圖譜 (zymogram) 鑑定技術
9月22日	茨城縣-筑波科學城 市	1. 蟎類 DNA 鑑定技術 2. 蟎類天敵飼養繁殖及相關研究
9月23日	茨城縣-茨城大學、梨 園	1. 蟎類標本製作技巧 2. 參訪梨園
9月24日	茨城縣-茨城大學、筑 波山	1. 蟎類標本鑑定 2. 筑波山
9月25日	日本成田空港→ 台灣桃園機場	1. 彙整研習資料及蒐集日本蟎類標本 2. 回程

伍、研習概要

一、參觀研究室簡介

(一) 茨城大學農業部應用動物昆蟲學研究室

茨城大學農業部校區位於茨城縣稻敷郡阿見町，應用動物昆蟲學研究室主持人後藤哲雄教授 (Dr. Tetsuo Gotoh)，主要研究包括：葉蟎科生活史研究、葉蟎寄主專一性與生殖隔離的遺傳變異、葉蟎系統分類學、葉蟎捕食性天敵的生態學研究、葉蟎抗藥性研究及節肢動物生殖寄生菌 (Wolbachia) 與蟎類生殖不親和性間的關係等項目。

(二) 農業生物資源研究所昆蟲-昆蟲、植物間相互作用研究室

農業生物資源研究所 (National Institute of Agrobiological Sciences, NIAS) 位於茨城縣筑波科學城市 (Tukuba Science City)，成立於 2001 年 4 月，研究項目包括基因與生物多樣性研究、動物科學、昆蟲學、植物科學等。過程中參觀的「昆蟲-昆蟲、植物間相互作用研究室」，主要研究蟎類 DNA 分子鑑定、害蟲天敵與被害植物交互作用等。

二、研習過程

蟎蜱在分類上屬於節肢動物門、蛛形綱、蟎蜱亞綱，其下又分為寄蟎目及真蟎目；農業上蟎類害蟲則多屬於真蟎目、輻蟎亞目 (Actinedida；Prostigmata 前氣門亞目) 或粉蟎亞目 (Acaridida；Astigmata 無氣門亞目)。雌成蟎約 250um~500um，體型小以肉眼不易觀察，更不易分辨其種類。農業上有害蟎類以葉蟎總科占大多數，但不同種之生態特性都不盡相同；為有效防止葉蟎對農作物造成損失，應確實辨識其種類，配合生態特性與發生時期，以達到防治效果。

(一) 蟎類形態鑑定

蟎類體型約 250um~500um，大小視種類而定；由於其體型小，肉眼不易觀察，因此需製成玻片標本後，利用光學顯微鏡觀察其形態特徵進行分類鑑定。葉蟎科 (Tetranychidae) 的分類鑑定常以雌成蟎背毛 (dorsal setae)、肛毛 (anal setae) 及肛側毛 (para-anal setae) 毛相 (chaetotaxy)、足跗節的爪及爪間體等外部形態特徵為分類至屬的依

據；分類至種則通常依據雄成蟎生殖器（陽莖）側面形態為主。

葉蟎形態分類鑑定依據檢索表（如附件 1），以光學顯微鏡針對雌成蟎外部形態特徵逐一比對檢索至屬（genus）；再以雄成蟎玻片標本，比對陽莖側面形態鑑定種。但部分近似種，如葉蟎屬（*Tetranychus*）中神澤氏葉蟎（*T. kanzawai*）及 *T. paraksnzawai* 二者間雄成蟎陽莖外形相似，此時則需測量其陽莖大小做為分類依據。

然而，利用形態鑑定葉蟎種類需配合其生態特性，包括葉蟎體色、對植株造成的為害狀，包括造成褐色、銹色或黃白色斑點等、於植株的棲息位置等相關資訊，綜合各項生態與形態資訊，都可為分類依據。

（二） 蟎類酵素圖譜（zymogram）鑑定技術

-北嶋康樹（Yasuki Kitashima）准教授

由於形態鑑定受限於必須將採集之葉蟎製成玻片標本，且需要採集到雄成蟎才能依據形態鑑定種類，但多數蟎類常可行孤雌生殖，田間不易採集雄成蟎，則無法鑑定其種類。此外，部分近似種神澤氏葉蟎（*T. kanzawai*）及 *T. parakanzawai*，以雄成蟎陽莖形態不易區別，易造成混淆增加鑑定之困難度；因此發展蟎類酵素圖譜（zymogram）鑑定技術，以提高種類鑑定之準確度。

phosphoglucosmutase（簡稱 PGM）電泳酵素分析(zymography method) 如下（如附件 2）：

預先完成電泳設置，置於 0~5°C 環境下備用；採自實驗室飼養之葉蟎雌成蟎 9 種（如表一），使用 96 孔盤，注入 10 μ l Triton-sucrose buffer 後，各取 1 隻雌成蟎（單一個體即可，過多易因個體差異無法鑑別）放入其中，於低溫下磨碎蟲體（因 PGM 高溫下易降解，固冰鎮保持低溫；圖 1）。取樣品 10 μ l 注入電泳膠（圖 2），設定 10mA/gel 定電流，0~5°C 環境下（圖 3），進行電泳分析 1.5 或 3 小時（視膠片大小而定）。

取出電泳膠片（於角落做記號為起始樣品），平放入裝有染劑的塑膠盒中，於黑暗環境下振盪染色 2 小時，後照相依據比對樣本葉蟎條帶判斷種類（圖 4）。

以蟎類 PGM 酵素圖譜做為鑑定工具，其優點在於可輕易將部分不易以外部形態鑑別的近似種，且不必製成玻片即可一次鑑定較多的樣品

數；但要使用此方法，必須有已知種做為比對樣品，若無則無法達到鑑定的目的。因此，蟎類鑑定仍以形態特徵為主要分類鑑定方法，再配合使用酵素圖譜技術確認結果，可以提高鑑定的準確率。

表一、9 種供試葉蟎屬葉蟎名錄

1	<i>Tetranychus urticae</i>	6	<i>T. parakanzawai</i>
2	<i>T. kanzawai</i>	7	<i>T. pueraricala</i>
3	<i>T. urticae</i>	8	<i>T. ezoensis</i>
4	<i>T. evansi</i>	9	<i>T. mismaiensis</i>
5	<i>T. ludeni</i> S.	10	<i>T. neocaredenicus</i>

(三) 蟎類 DNA 鑑定技術

為克服以外部形態鑑定葉蟎種類需先製成玻片標本、雄成蟎側面標本不易製作及雄成蟎不易採集之困難，另開發出以 DNA 分子技術鑑定葉蟎種類。

1. DNA 萃取：自田間採集 3 種葉蟎雌性個體，取單一雌成蟎置入離心管，加入 20 μ l PrepMan Ultra Reagent 後磨碎蟲體。將樣品以加熱器設定溫度 100°C，10 分鐘破壞組織內的酵素；其後，於室溫內靜置 2 分鐘回溫，spin10 秒、振盪、spin10 秒後，設定 16,000xg 離心 3 分鐘，取上清液存於 -20°C 備用。
2. PCR：加入 2 次蒸餾水、dNTP 混合液、Mbo II 或 Rsa I 兩種引子 (primer) 及 DNA 聚合酶 (Ex Taq HotStart)，設定條件 94°C 3 分鐘後，94°C 1 分鐘、50°C 1 分鐘及 72°C 2 分鐘循環 35 次，最後 72°C 10 分鐘後降溫至 4°C。
3. 電泳分析：使用 1% 洋菜膠，設定 100v、30 分鐘，結果如附件 3。

(四) 蟎類飼養技術

自田間或野外採集蟎類，攜回實驗室進行形態鑑定必須採集到雌成蟎及雄成蟎個體，才可以依據其特徵鑑定種類。但多數蟎類具有孤雌生殖的特性，不一定可以採集到雄成蟎，無法順利鑑定至「種」。因此，可將野外採集的葉蟎，飼育在實驗室，直至雄成蟎出現。在實驗室內飼養

蟎類也可以藉此保留各種葉蟎，做為使用酵素圖譜鑑定時所需的對照標誌。

使用直徑 9 公分塑膠培養皿，取直徑約 8 公分吸水飽和的海綿，放入培養皿並注入 RO 水備用（圖 6）。另取面紙剪出缺口，其缺口大小須小於做為葉蟎食物的葉片。將青皮豆（圖 5）或桑樹葉片，以葉背朝上平鋪於先前已完成之吸水海綿上（圖 7），再將面紙覆蓋於葉片上（圖 8），面紙吸水後即可避免葉蟎遷移至其他地方。

再以解剖針取 1 隻雌成蟎個體，移至葉片上飼育；其後每日確認是否有其他蟎類或天敵汙染，以確保葉蟎為單一種。此外，注意葉片品質及海綿四周水位，適時更換新鮮葉片（圖 9、10），避免因食物品質不佳造成葉蟎死亡或大量遷移。

上述葉蟎飼養方法，適用於飼養葉蟎種類多、空間有限、用於分類鑑定之研究；此法主要以葉片飼育，培養皿為飼育容器，並於培養皿注滿水防止葉蟎逃逸，節省空間（圖 11）；但較為耗時，必須每日確認培養皿水量及葉片品質，否則易失敗。利用此法不僅可以觀察各種葉蟎的生活史，同時以雜交方式確認是否為同種等，作為分類參考依據。

（五）蟎類天敵飼養繁殖及相關研究

筑波科學城市中農業生物資源研究所昆蟲-昆蟲、植物間相互作用研究室，除研習葉蟎 DNA 分子鑑定外，另一項研究為「昆蟲、植物間相互作用」；當植物遭受昆蟲或蟎類為害，雖然無法逃離或躲避，但可以藉由釋放出化學物質吸引天敵捕食或寄生害蟲，達到自我防禦的目的。

研究室中飼育多種 *Orius* 屬捕食性椿象、捕植蟎 (*Neoseiulus womerslyi*) 等葉蟎捕食性天敵（圖 12）；飼育時應注意其食物來源必須充足，且若實驗室中有飼育其他蟎類，可能成為此類捕食性天敵的獵物時，進出培養箱順序則先進入用於飼育葉蟎植物的生長箱，其次為葉蟎生長箱，最後才是捕食性天敵生長箱，避免因不甚汙染影響後續實驗。

藉由植物具有「求救」的防禦方式，分析大豆被二點葉蟎為害後釋放吸引 *Neoseiulus womerslyi* 捕植蟎前來的揮發物質組成，做為未來田間施用於吸引天敵前來捕食害蟎，以減少化學藥劑使用，達到有機防治害蟎的目的。

陸、心得與建議

一、研習心得

2. 分類研究強調「嚴謹」、「客觀」

研習過程中，後藤教授不斷強調「形態特徵」必須再三確認其位置與形態，再依據檢索表鑑定種類；分類鑑定必須以客觀、嚴謹的態度面對事情，絕不能馬虎了事，以避免因為一時疏忽誤判。

3. 分類鑑定為一切研究的基礎

不論是螞蟥生態學或防治研究均須要以分類做為基礎，確認目標螞蟥為何種，再進行更深入的研究才有其實質上的意義。但此學門所需之專業程度較高，尤其是種的鑑別；一般昆蟲分類鑑定方法以形態特徵，以解剖或光學顯微鏡輔助，依據檢索表比對昆蟲各項形態特徵後，才能確定其種。近年來分子鑑定技術發達，也常應用於昆蟲分類上，分類鑑定已不再侷限於外部形態。以分子技術鑑定又稱為分子分類，利用外部形態分類鑑定又稱為傳統分類；由於傳統分類所需的專業程度較高，再加上螞蟥體型小觀察不易，此學門的相關研究人員日益減少。在日本，螞蟥研究學者約 200 人以上，包括螞蟥的分類鑑定（形態鑑定及分子鑑定）、生態研究、防治等領域；反觀台灣，針對螞蟥學的研究多著重於田間防治，針對其他各領域研究學者，尤其是分類鑑定學者多已退休，退休後仍致力於此學門者更是寥寥無幾；藉由這次赴日本研習的機會，提升分類研究相關概念，並學習除形態鑑定外的分子鑑定技術，未來在此方面發展上增加更多學術上的資源。

分子鑑定與形態鑑定比較上，分子鑑定具有可以省略標本製作的時間、同時鑑定多個樣本，且不受於必須以雄成螞蟥鑑定種類的限制，因此多朝此方面研究發展；但僅使用分子技術不論利用 DNA 或酵素圖譜，目前仍無法順利將葉螞蟥順利鑑定種類，仍需要配合形態鑑定及生態資料。因此，以形態鑑定配合分子鑑定確認，才可以達到鑑定葉螞蟥的目的。

4. 研究精神與態度

此行包含去程與返程共 7 天，出發前正巧遇到凡那比颱風侵襲台灣，於出發前兩日台灣發布颱風警報後，後藤教授即以電子郵件通知，並確認筆者是否可以順利前往，由此可見其謹慎行事的態度。到達日本的第一天為星期

日，後藤教授親至成田機場接送筆者至茨城大學，到達其研究室時，實驗室中燈火通明，研究生並沒有因為周末假日而休假。於日本研習當週巧遇日本兩個國定假日，分別為9月20日老人節及9月23日秋分，其研究室的習慣便是「研究人員沒有假日」，此精神也確實是身為研究人員應該具備。

4. 空間利用

由於該研究室蒐集飼育全日本30種以上葉蟬屬（Tetranychus）葉蟬及包括Oligonychus屬、Panonychus屬、Eotetranychu屬等多種葉蟬，分子試驗儀器設備多樣，且該研究室研究生近20人，因此對空間需求非常大。因此，將葉蟬飼養空間，向天花板延伸、研究生分散在實驗室中各個角落，沒有任何浪費。

5. 日本人的待客之道

此行共7日，後藤教授交待研究生介紹日本風情，及每天陪同筆者吃晚餐，沒有一天例外；且安排參觀試驗調查田及當地景點，讓筆者不至於白去了一趟日本，從各方面都可見識到日本人重視禮貌及待客之道。

二、建議事項

1. 目前國內葉蟬分類研究學者僅剩少數，建議多培育相關研究人員，提供葉蟬種類與生態資訊，供田間防治參考。
2. 蟬類防治應該輪流使用不同作用機制藥劑，配合其生態特性發生時期施用；開發天敵吸引物質，以天敵做生物防治並配合田間管理，提高防治效果。
3. 各研究單位應善用團隊的力量及機關間相互合作的機會、明訂發展主軸，將業務單純化，才不致於浪費研究人員的能量。

柒、誌謝

感謝何琦琛老師引薦前往日本茨城大學應用動物研究室研習螭類鑑定與防治技術，感謝研習期間後藤教授、北嶋准教授、日本典秀博士及前田博士在研習期間對於各項技術與知識傾囊相授及後藤教授研究室的研究生提供各項生活上的協助，讓筆者一個人在異鄉仍感到溫暖；此外，謝謝場裡的長官提供難得的機會，特此感謝。

捌、附錄



圖 1. 低溫下磨碎蟲體



圖 2. 取樣品 $10\mu\text{l}$ 注入電泳膠

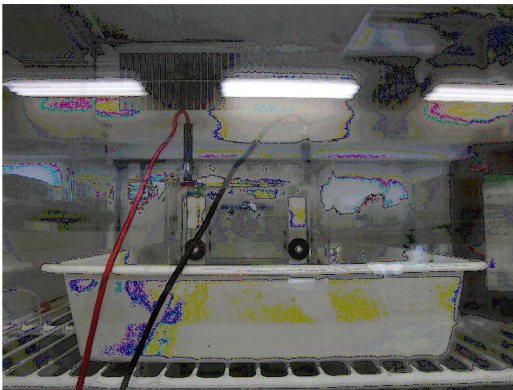


圖 3. $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ 環境下，進行電泳分析 1.5 或 3 小時

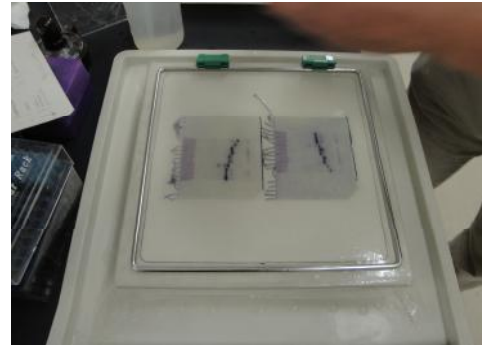


圖 4. 電泳分析結果



圖 5. 青皮豆培養環境



圖 6. 吸水飽和的海綿，放入培養皿並注入 RO 水備用



圖 7. 青皮豆以葉背朝上平鋪於先前已完成之吸水海綿上



圖 8. 再將面紙覆蓋於葉片上



圖 9. 葉片品質不佳時更換新鮮葉片



圖 10. 葉片品質不佳時更換新鮮葉片



圖 11. 葉蟎飼養空間



圖 12. 飼育 Orius 屬捕食性椿象



圖 13. Y 形管進行捕食性天敵氣味偏好試驗