

入境旅客非法携带番石榴中实蝇幼虫的分子鉴定

李静¹, 王坤¹, 王建昌^{1*}, 张毅², 邓宏飞², 王金凤¹

(1. 河北出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 河北石家庄 050051; 2. 河北出入境检验检疫局石家庄机场办事处, 河北石家庄 050800)

摘要 [目的]探索 DNA 条形码技术在实蝇快速鉴定中的应用。[方法]利用 DNA 条形码技术和 BOLD 系统, 选取线粒体细胞色素氧化酶 I(COI)基因片段, 针对截获入境旅客非法携带的番石榴中实蝇幼虫进行序列测定、比对和分析, 并对培养后的成虫进行形态学分类从而验证分子分类的结果。[结果]检测的 11 头实蝇幼虫全部鉴定为橘小实蝇 [*Bactrocera dorsalis* (Hendel)]。[结论]为河北出入境检验检疫部门初步探索 DNA 条形码技术在实蝇快速鉴定中的应用及提升检疫工作的时效性奠定了技术基础。

关键词 实蝇; 幼虫; DNA 条形码; COI 基因; 分子鉴定

中图分类号 S433.89 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)32-11350-03

Molecular Identification of Fruit Fly Larvae from Intercept Entry Passenger Illegal Carrying Guava

LI Jing¹, WANG Shen¹, WANG Jian-chang^{1*} et al (1. Technology Center of Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shijiazhuang, Hebei 050051)

Abstract [Objective] The aim was to explore application of DNA barcoding technology in rapid identification of fruit fly. [Method] Based on the DNA barcoding and BOLD system, a series of studies, including sequencing, alignment and analysis, were conducted based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene using fruit fly larvae samples collected from intercept entry passengers illegal carrying guava. Adult morphological classification was carried out in order to verify the results of the molecular classification. [Result] All of the 11 larval specimens were *Bactrocera dorsalis* (Hendel). [Conclusion] The results lay the basis for exploring application of DNA barcoding technology in rapid identification of fruit fly and promoting the timeliness of quarantine for Hebei entry-exit inspection and quarantine departments.

Key words Fruit fly; Larvae; DNA barcoding; COI gene; Molecular identification

实蝇类昆虫隶属于双翅目(Diptera)实蝇科(Tephritid), 我国有 400 余种, 其中绝大多数种类为水果、蔬菜和花卉作物的害虫^[1]。据统计, 对农业有重要经济意义的实蝇种类超过 100 种, 还有 150 多种是次要或是潜在的害虫。进入 21 世纪以来, 随着国际贸易活动的日趋频繁和复杂化, 实蝇类害虫成为影响世界水果、蔬菜、花卉等进出口贸易的重要的检疫问题, 因此, 实蝇的准确识别与快速鉴定受到世界各国的高度重视。实蝇类害虫多为国内外检疫对象, 目前检疫鉴定工作主要以完整成虫的外部形态特征为依据^[2], 幼体(包括卵、幼虫、蛹)由于形态不稳定或特征不明显不能用于种类鉴定, 而残体更是无法用于种类识别。口岸截获的往往是幼虫、卵或蛹, 亦或有头、胸、足、翅等残体的发现, 对幼体一般是将其进行室内饲养, 待成虫羽化后再进行鉴定^[3], 而对残体则无法进行准确鉴定。传统形态学鉴定方法耗时长, 并且需要由专门从事实蝇分类的人员完成, 所以无论是在室内进行物种分类研究还是在口岸进行检疫鉴定都受到限制。

随着 DNA 检测和分析技术的快速发展, 目前各种分子生物学手段被广泛应用于实蝇种类的鉴定, 如 RFLP、AFLP 及 DNA 测序等^[4]。DNA 条形码技术(DNA Barcoding)是一种新技术。其原理是利用基因组 DNA 上一段标准的或者大家公认的基因片段作为分子靶标来进行种级水平的种类鉴定。用于条形码的 DNA 序列与整个基因组 DNA 相比要短很多, 而且非常容易获得。线粒体 COI 基因非常保守, 在物

种内不同个体之间只有 1%~2% 的差异, 而近缘种间的差异略大, 非常适合作为 DNA 条形码技术的分子标记^[5]。该技术可使非专业人员在很短时间内准确、经济地对目标物种进行鉴定^[6], 国际上加拿大科学家 Paul Hebert 于 2003 年第 1 个利用 DNA 条形码进行物种鉴定^[7], 通过对线粒体 COI 基因 5'端一段长度约为 650 bp 的标准基因片段进行测序和序列分析, 进而在 DNA 水平上成功地区分物种^[8]。针对出入境植物检疫领域的实际需求, 笔者应用 DNA 条形码技术对截获台湾番石榴果实中的实蝇幼虫进行了 COI 基因片段序列检测, 将所获序列与生命条形码数据库(Barcode of Life Data System v2.5; BOLD)中的实蝇标准序列进行相似性比对并构建系统发育树, 实现了实蝇幼虫的分子鉴定, 以期为河北出入境检验检疫部门初步探索 DNA 条形码技术在实蝇快速鉴定中的应用及提升检疫工作的时效性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 供试实蝇幼虫为河北出入境检验检疫局石家庄机场办事处截获台湾入境旅客携带的番石榴果实中剖检收集得到, 共计 11 头, 其中 6 头用于 DNA 条形码技术的鉴定, 样品浸泡于 100% 乙醇中低温保存, 剩余实蝇幼虫在昆虫培养箱中饲养至成虫。以地中海实蝇和非洲芒果实蝇作为外群, 并同时从 GenBank 中下载橘小实蝇和离腹寡毛实蝇属中其他实蝇的 COI 基因片段(表 1)进行比对分析。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取。实蝇幼虫的 DNA 提取采用 Genomic DNA Wizard 纯化试剂盒(Promega 公司)。参照试剂盒说明书进行基因组 DNA 的提取。

1.2.2 PCR 扩增及测序。

1.2.2.1 DNA 扩增。参考 Folmer 1994 年所使用的 PCR 扩

基金项目 河北出入境检验检疫局科研项目(HE2013K030)。

作者简介 李静(1964-), 女, 河北保定人, 农艺师, 硕士, 从事出入境植物检疫研究。* 通讯作者, 兽医师, 博士, 从事病原微生物分子生物学鉴定研究。

收稿日期 2014-09-25

增引物^[9],由上海生工生物工程技术有限公司合成,引物序列:LCO1490,5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3';HCO2198,5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'。反应扩增体系为25.0 μl,包含2×Taq PCR MasterMix 12.5 μl、20 μmol/L上、下游引物各1.0 μl、DNA模板1.0 μl、ddH₂O 9.5 μl。PCR反应程序:94℃预变性5 min;94℃30 s,55℃30 s,72℃1 min,35个循环;最后72℃延伸10 min。PCR产物保存于4℃,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,分析电泳结果。

表1 GenBank中下载的离腹寡毛实蝇和腊实蝇COI基因片段信息

物种	登录号	物种	登录号
橘小实蝇 (<i>Bactrocera dorsalis</i>)	JX266412	南瓜实蝇 (<i>Bactrocera tau</i>)	GQ154160
番石榴实蝇 (<i>Bactrocera correcta</i>)	DQ116265	地中海实蝇 (<i>Ceratitidis capitata</i>)	JQ668128
瓜实蝇 (<i>Bactrocera cucurbitae</i>)	DQ116242	非洲芒果实蝇 (<i>Ceratitidis cosyra</i>)	AY778421

1.2.2.2 PCR产物纯化、测序及基因序列分析。实蝇幼虫DNA的PCR扩增产物经纯化后,克隆到pGM-T Vector,酶切鉴定插入片段正确的阳性克隆,分别随机挑选3个进行测序(由上海生工生物工程技术有限公司完成),将获得的实蝇幼虫序列进行比较,然后在NCBI、BOLD等公认数据库进行相似性比对。利用Mega 5.0软件中的邻接法(Neighbor-joining, NJ)与数据库中现有的靶标实蝇种类的COI序列一同构建系统进化树,并以地中海实蝇和非洲芒果实蝇为外围种群,对各分支置信度(Bootstrap)进行1 000次以上的重复检验。最后,根据同源性分析数据和所构建的系统进化树确定鉴定结果。

1.2.3 成虫形态学鉴定。根据实蝇分类特征,在显微镜下完成实蝇成虫的形态学鉴定。实蝇属双翅目实蝇科。实蝇科主要鉴定特征:Sc脉完整,与R₁脉分离;该脉端段突然朝前弯曲成近90°;弯曲段变弱,终于前缘脉的断裂处;或弯曲段消失。臀室具一尖角状延伸^[10-11]。

2 结果与分析

2.1 PCR扩增结果 PCR产物经凝胶电泳检测,实蝇幼虫均能扩增出658 bp的清晰条带(图1),其中第1~6泳道为实蝇幼虫样品。

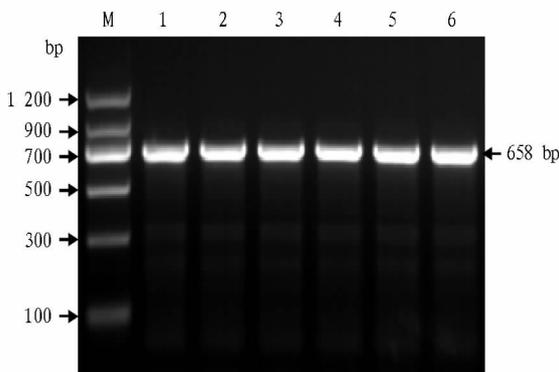


图1 实蝇幼虫各样品PCR产物电泳检测结果

2.2 实蝇幼虫序列相似性比对鉴定 测序结果经Chromas软件验证图谱为有效序列。6头幼虫样品扩增片段长度均为658 bp,碱基相似度为100%。将所获得的线粒体COI序列在GenBank中Blast结果显示,与序列号为JX266412的橘小实蝇同源性为99.09%。使用Boldsystems v3检索所获得的幼虫序列,所有样品COI序列与编号为GBMIN 21141-13橘小实蝇的标准序列相似性为99.68%。该研究获得的线粒体COI片段的序列信息提交至GenBank数据库中,登录号为KF696671。

2.3 NJ系统发育树的构建与分析 以地中海实蝇和非洲芒果实蝇为外群,将得到的6头实蝇幼虫COI序列利用Mega 5.0软件,采用邻接法(NJ法)构建系统发育树。结果显示(图2),聚集趋势显著,均和橘小实蝇聚为一支,能够明显与番石榴实蝇、瓜实蝇和南瓜实蝇区分开。表明同一物种个体能与其他物种的个体明显区分,结果也验证了分子鉴定的结论,DNA条形码技术可对实蝇类幼虫进行准确识别。

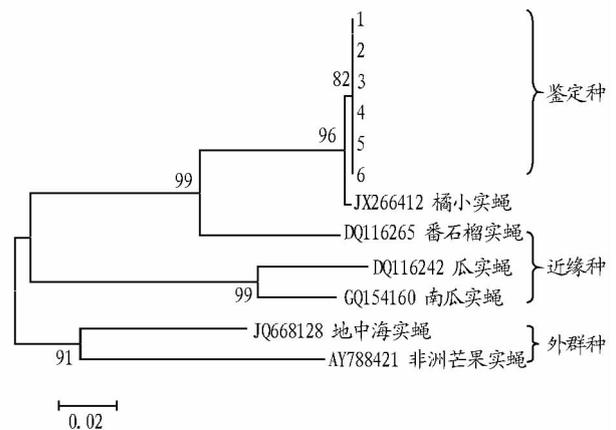


图2 NJ法构建的未知种及其相关种系统发育树

2.4 实蝇成虫形态学分类鉴定 对实蝇成虫进行形态学鉴定(图3),成虫以黑色到暗褐色为主,或黑色与黄色相间。头部黄色或黄褐色,中颜板具圆形黑色颜面斑1对。上侧额鬃1对,下侧额鬃2对;具内顶鬃、外顶鬃和颊鬃;触角显长于颜面长,末端圆钝。中胸背板黑褐色或黑色带红褐色区;缝后侧黄色条伸至翅内鬃之后;肩胛、背侧胛完全黄色;前翅上鬃、后翅上鬃、翅内鬃和小盾鬃各1对,背中鬃确如;肩板鬃和背侧鬃各2对。小盾片较扁平,黄色,基部具狭窄的暗色横条。中背片黑色或中部浅黄色到橙褐色,两侧具暗色斑(图3-A)。翅前缘带褐色,伸至翅尖,较狭窄,其宽度不超出R₂₊₃脉;臀条褐色,不达后缘;bm室长是宽的1.8~1.9倍,其宽是cup室宽的2.5倍;cup室后端延伸段长,其长超过A₁+CuA₂脉段长(图3-B)。各足节不具暗色斑。腹部背板分离,黄色到橙褐色;第2腹背板前缘有黑色狭短横条;第3~5节腹背板具黑褐色中纵条,该中纵条与第3腹背板褐色横带形成“T”形斑;第4腹背板的前侧缘常有黑色斑纹;第5腹背板具腺斑(图3-C)。成虫整体形态见图3-D。

以成虫的形态学分类特征为依据,进行验证,结果表明未知实蝇为橘小实蝇(*Bactrocera dorsalis*)。

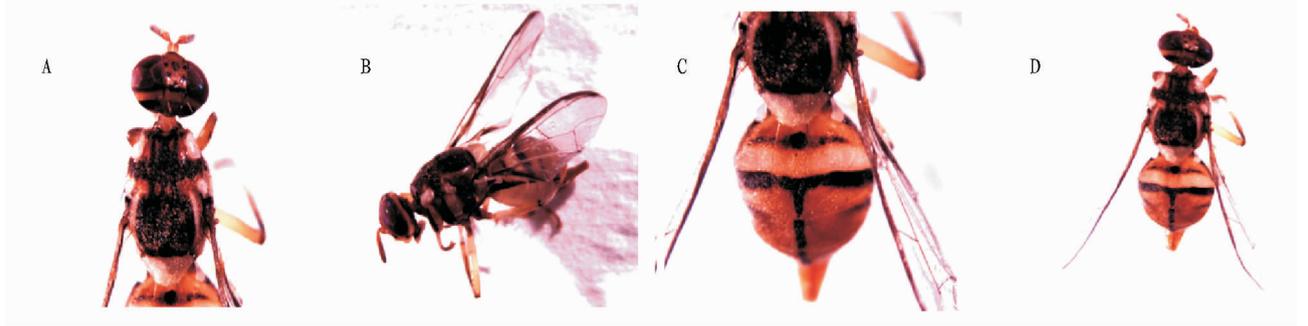


图3 成虫形态特征

3 讨论

实蝇属于全变态昆虫,生长发育过程包括卵、幼虫、蛹和成虫4种虫态。而实蝇类害虫的鉴定一般以成虫的形态特征为依据,而幼虫的鉴定一直是一个分类难题。实蝇类害虫的鉴定不仅需要依靠分类人员的经验积累,还要采取实验室内饲养,费时费力。如果不能对外来有害生物及时鉴定种类,将对生态环境造成潜在威胁。2003年Hebert提出了DNA条形码的概念,该技术的出现为解决幼虫的快速鉴定提供了技术理论支持和强有力的手段,如埃塞俄比亚学者利用COI分子标记技术对发生在甘蔗上的夜蛾属幼虫进行了鉴定^[12];刘慎思等研究表明DNA条形码技术可准确鉴定橘小实蝇幼体及成虫残体,证明该技术不限制于传统形态学鉴定^[13]。

该研究利用DNA条形码技术进行了橘小实蝇幼虫的分子鉴定,构建的NJ系统发育树表明截获的实蝇幼虫和GenBank中的橘小实蝇遗传距离非常近,与近似种的遗传距离相对很远,物种鉴定结果具有较高的可信度和准确性。同时还对羽化后成虫进行了形态学的鉴定复核,鉴定结果为橘小实蝇,与DNA条形码技术鉴定结果完全一致。在实验室条件下,橘小实蝇幼虫期一般为4~7d,蛹期8d左右,同时需要经验丰富的专业技术人员进行形态学鉴定。通过DNA条形码技术,从DNA提取、扩增、测序到序列比对仅用3d时间,不仅克服了幼虫或蛹期的限制,而且实现了橘小实蝇幼虫的非专家鉴定。近年来,基于DNA条形码技术建立的检测鉴定方法已广泛应用于实蝇幼虫的鉴定和区分^[14-16]。

一种昆虫成为某一地区的新害虫有多种原因,自然扩散、人员往来、经贸活动都是导致害虫侵入的重要途径^[17],另外全球气候、种植结构等变化也常导致新害虫的发生^[18-19]。河北省是一个开放性大省,拥有1个国际空港和4个大型海港,同国外贸易频繁。同时该省是一个农业大省,其鲜梨出口量占我国总出口量的45%,位于全国前列。目前尚未见河北省存在橘小实蝇的报道,该害虫一旦进入该省,将对该省农业特别是果蔬生产业造成不可估量的损失。加大进境旅客非法携带水果的查验力度,缩短截获实蝇的鉴

定周期,提高物种鉴定效率,并采取切实有效的防控措施,防止橘小实蝇入侵已成为河北口岸迫切的任务。

参考文献

- [1] 汪兴鉴. 重要果蔬类有害实蝇概论(双翅目:实蝇科)[J]. 植物检疫, 1995, 9(1): 20-30.
- [2] 梁广勤, 梁帆, 赵菊鹏, 等. 中国实蝇检疫研究概况[J]. 环境昆虫学报, 2008, 30(4): 361-369.
- [3] 崔俊霞, 徐瑛, 闻伟刚, 等. 橘小实蝇快速检疫鉴定方法[J]. 昆虫知识, 2006, 43(5): 731-733.
- [4] 朱振华, 叶辉, 张智英. 基于mtDNA Cytb的六种实蝇的分子鉴定(双翅目:实蝇科)[J]. 昆虫学报, 2007, 48(3): 386-390.
- [5] 岳巧云, 邱德义, 黄艺文, 等. DNA条形码技术在未知昆虫幼虫种类鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(3): 615-617.
- [6] 陈庆, 白洁, 刘力, 等. 北京地区7种常见嗜尸性蝇类的COI基因序列分析及DNA条形码的建立[J]. 昆虫学报, 2009, 52(2): 202-209.
- [7] HEBERT P D, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of Royal Society of London B, 2003, 270: 313-321.
- [8] FLOYD R, LIMA J, DEWAARD J, et al. Common goals: policy implications of DNA barcoding as a protocol for identification of arthropod pests[J]. Biological Invasions, 2010, 12: 2947-2954.
- [9] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrate[J]. Mol Mar Blot Biotechnol, 1994, 3: 294-299.
- [10] 吴佳教, 梁帆, 梁广勤. 实蝇类重要害虫鉴定图册[M]. 广州: 广东科技出版社, 2009: 75-76.
- [11] 胡学难, 赵菊鹏, 江兴培, 等. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准《橘小实蝇检疫鉴定方法》(SN/T 2031-2007)[S]. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 2007.
- [12] ASSEFA Y, MITCHELL A, CONLONG D E, et al. DNA identification of *Busseola* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in *Ethiopian sugarcane*[J]. African Entomology, 2007, 15: 375-379.
- [13] 刘慎思, 张桂芳, 武强, 等. 橘小实蝇幼体及成虫残体DNA条形码识别技术的建立与应用[J]. 昆虫学报, 2012, 55(3): 336-343.
- [14] LIU L J, LIU J Q, WANG Q L, et al. Identification of *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) from *Burundi*, based on morphological characteristics and DNA barcode[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(62): 13623-13630.
- [15] NOPPARAT B, 李志红, 吴佳教, 等. 基于DNA条形码技术的泰国番石榴中实蝇幼虫分子鉴定研究[J]. 植物检疫, 2011, 25(1): 49-52.
- [16] 姜帆, 刘佳琪, 李志红, 等. 基于DNA条形码的广西苦瓜中实蝇幼虫分子鉴定研究[J]. 植物保护, 2011, 37(4): 150-153.
- [17] MACK R N, SIMBERLOFF D, LONSDALE W M, et al. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences and control[J]. Ecological Applications, 2000, 10: 689-710.
- [18] 王培新, 杜薇薇, 李孟强. 气候变暖与林木害虫的适应性变化[J]. 西北林学院学报, 2011, 26(3): 124-128.
- [19] 王义平, 于振东, 吴鸿. 林木昆虫演变为重大害虫的主要环境因子[J]. 浙江林学院学报, 2007, 24(6): 752-757.