

植物检疫性有害生物蔗扁蛾的 PCR 快速鉴定

王星¹, 徐森锋², 廖力², 何明远³, 刘双清¹

(1.植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室,湖南长沙 410128;2.珠海出入境检验检疫局技术中心,广东珠海 519015;3.湖南省农业科学院植物保护研究所,湖南长沙 410125)

摘要:基于 PCR 分子检测技术,建立了进境植物检疫性有害生物蔗扁蛾(*Opogona sacchari*)快速、准确的鉴定方法。该方法对待检样品的基因组 DNA 经 PCR 扩增后进行凝胶电泳图分析,实现对待检样品的准确鉴定,检测时间缩短至 8 h 内,检测基因组 DNA 质量浓度限度为 1 ng/μL,最适检测限为 10 ng/μL 以上。

关键词:检疫性有害生物;蔗扁蛾;聚合酶链式反应

中图分类号:S851.34

文献标志码:A

文章编号:1007-1032(2013)02-0173-03

Rapid PCR-based identification of the plant quarantine pest *Opogona sacchari* (Bojer)

WANG Xing¹, XU Miao-feng², LIAO Li², HE Ming-yuan³, LIU Shuang-qing¹

(1.Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Changsha, 410128, China; 2.Quarantine of Plants, Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai, Guangdong 519015, China; 3.Plant Protection Institute, Academy of Hunan Agricultural Sciences, Changsha, 410125, China)

Abstract: Based on polymerase chain reaction (PCR), a rapid and accurate identification method was established for detection of the import plant quarantine pest *Opogona sacchari*. Genomic DNA of the samples was used as template in PCR amplification, and the PCR products were analyzed by gel electrophoresis. By PCR amplification, the detection time for *Opogona sacchari* was shortened to less than 8 hours. The test limit for genomic DNA concentration was 1 ng/μL, and the concentration above 10 ng/μL was the optimal.

Key words: quarantine pest; *Opogona sacchari*; polymerase chain reaction (PCR)

蔗扁蛾(*Opogona sacchari* (Bojer))属鳞翅目(Lepidoptera)、谷蛾科(Tineidae)、辉蛾亚科(Hieroxestinae)、扁蛾属(*Opogona* Zeller),原产于印度洋的马斯克林群岛,现主要分布于热带-亚热带地区^[1-2],食物广谱,食性复杂^[3],在中国主要危害甘蔗、香蕉、甘薯、玉米等重要经济作物和巴西木、发财树等观赏植物^[4],目前已成为严重威胁经济作物和花卉生产安全的外来入侵害虫。2007年,在修订的《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》中,该虫被列为进境植物检疫性有害生物^[5]。

近年来,口岸检疫多次截获蔗扁蛾的卵、幼虫、蛹等幼期虫态,而主要鉴定方法是先对其进行室内饲养,待成虫羽化后,借助蔗扁蛾成虫的外部形态特征^[3]进行鉴定,需10~15 d,鉴定周期过长,不利于口岸检验检疫的快速验放通关。

笔者尝试借助PCR分子检测技术^[6-7],通过对蔗扁蛾及其近缘种线粒体DNA的COI基因序列比分析,设计筛选出特异性引物^[8],建立一套准确、快速鉴定蔗扁蛾的检验检疫方法,以期对蔗扁蛾的快速鉴定提供参考。

收稿日期:2012-11-08

基金项目:国家自然科学基金项目(30800710);国家质量监督检验检疫总局项目(2009IK277)

作者简介:王星(1977—),女,四川绵阳人,博士,讲师,主要从事昆虫分类和害虫防治研究,wx1358@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 材料

蔗扁蛾的中国种群由扬州大学薛海洋先生提供,日本种群由日本大阪府立大学广渡俊哉博士提

供;蔗扁蛾近缘种样品为湖南农业大学昆虫病毒学与系统学研究室保藏。标本和DNA样品(-20℃)保存于湖南农业大学昆虫病毒学与系统学研究室和珠海出入境检验检疫局昆虫标本室。蔗扁蛾及其近缘种见表1。

表1 蔗扁蛾及其近缘种来源

Table 1 The origins of *Opogona sacchari* and its related species

编号	种类	来源
H001	蔗扁蛾(中国种群) <i>Opogona sacchari</i> (Bojer)	中国江苏省扬州市,海拔 200 m,2008-09-26,薛海洋采
486	蔗扁蛾(日本种群) <i>Opogona sacchari</i> (Bojer)	日本冲绳冲绳本岛,海拔 200 m,2007-07-13,广渡俊哉采
447	广东扁蛾 <i>Opogona</i> sp.1	中国广东省南岭,海拔 1 000 m,2005-06-11,黄国华采
448	王氏扁蛾 <i>Opogona</i> sp.3	中国广东省南岭,海拔 1 290 m,2005-06-12,黄国华采
449	南岭扁蛾 <i>Opogona</i> sp.4	中国广东省南岭,海拔 1 050 m,2005-06-13,黄国华采
472	三角扁蛾 <i>Opogona thidelpha</i> Meyrick, 1934	日本大阪府三草山,海拔 300 m,2007-07-18,广渡俊哉采
444	后斑拟扁蛾(云南种群) <i>Wegneria cerodelta</i> (Meyrick)	中国云南省铜壁关,海拔 1 300 m,2005-06-23,黄国华采
445	后斑拟扁蛾(广东种群) <i>Wegneria cerodelta</i> (Meyrick)	中国广东省广州,海拔 100 m,2005-06-16,黄国华采
446	灰拟扁蛾 <i>Wegneria</i> sp.	中国海南省尖峰岭,海拔 970 m,2006-10-20,黄国华采

1.2 方法

1.2.1 蔗扁蛾总 DNA 的提取

取不同种群的幼虫、蛹、成虫标本各 1 头,分别置于 1.5 mL 的离心管中,加入 TE 缓冲液浸泡过夜,利用基因组 DNA 离心柱型提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)提取 DNA,样品于-20℃保存。

1.2.2 引物设计

PCR 扩增引物选择蔗扁蛾线粒体 DNA 中 *COI* 基因(细胞色素氧化酶 基因)的部分序列,将蔗扁蛾与其近缘种的序列用 MEGA5.0^[6]进行排列比对,找出特异性位点,人工设计引物,并用 Primer Primer 5.0 检查引物二聚体、发夹结构以及错配情况。设计的引物输入 GeneBank,用 Blast 程序验证引物的特异性。筛选出特异性扩增蔗扁蛾的引物(COI-CF756: ATATATTTTAATTTTACCAGGATTCGGT; COI-CR1149: TACTACATAG TAAGTATCGTGGAGAGAT; PCR 扩增产物长度 394 bp),引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.3 PCR 反应体系和扩增条件

PCR 反应体系包括 10×PCR Buffer 2.5 μL, dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L) 2 μL,上下游引物

(10 pmol/L) 各 1 μL, *Taq* 酶(5 U/μL)0.13 μL, DNA 模板 2 μL,加双蒸水至总体积 25 μL。PCR 反应扩增条件为:94℃预变性 4 min;94℃变性 20 s,62℃退火 20 s,72℃延伸 30 s,共 30 个循环;最后 72℃延伸 5 min。PCR 产物 10 μL 在含 2%琼脂糖凝胶中电泳 45 min(90 V),再放入含溴化乙锭的溶液中染色 10 min,在凝胶成像系统中观察结果并记录。

1.2.4 灵敏度检测

用灭菌蒸馏水对提取的蔗扁蛾基因组 DNA 作 100、50、25、10、1、0.5 ng/μL 6 个梯度稀释。取稀释液 2 μL 作模板进行 PCR 扩增,确定 DNA 的最低检测限。

2 结果与分析

2.1 扩增产物的序列比较

利用基因组 DNA 提取试剂盒,从蔗扁蛾样品中提取到基因组 DNA,用微量分光光度计测定核酸浓度,结果显示,蔗扁蛾核酸质量浓度约为 150 ng/μL。

PCR 反应结束后,经 2%琼脂糖凝胶电泳(图 1),结果表明,以蔗扁蛾的 2 个种群的基因组 DNA 为模板,均能够扩增得到 1 条 400 bp 左右的特异性条带,但其他近缘种样本及阴性对照均未扩增特异性条带,表明该方法具有良好的特异性。

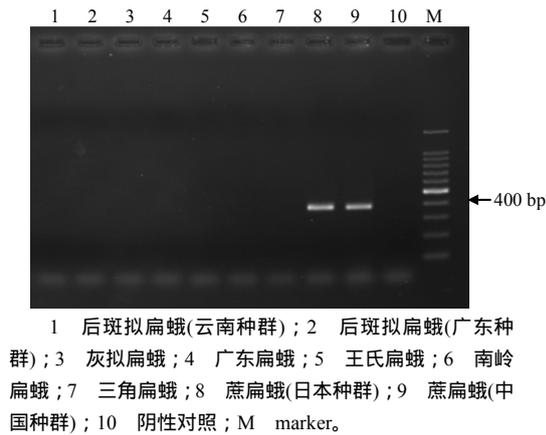


图 1 PCR 扩增产物凝胶电泳结果

Fig.1 Electrophoresis for PCR products

对蔗扁蛾成虫、幼虫和蛹的特异性 PCR 扩增产物进行测序表明, 它们的产物序列一致, 均为 394 bp 的 DNA 片段。将 PCR 产物与蔗扁蛾目的基因序列进行比较发现, 两者的序列完全相同。

2.2 检测的灵敏度

以 6 组不同浓度的蔗扁蛾基因组 DNA 为模板作 PCR 扩增, 模板质量浓度为 10 ~ 100 ng/μL 时, 均能够观察到明显的目的条带; 质量浓度小于 10 ng/μL 时, 随质量浓度的降低亮度逐渐减弱; 模板质量浓度为 1 ng/μL 时, 扩增的目的条带比较模糊; 模板质量浓度为 0.5 ng/μL 时, 未观察到目的条带(图 2)。说明该方法的最低检测限度为 1 ng/μL, 而最适检测限度为 10 ng/μL 以上。

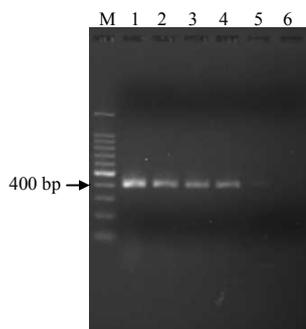


图 2 灵敏度检测凝胶电泳结果

Fig.2 Sensitivity of the PCR detection

3 结论与讨论

选用分类学上通用的线粒体 DNA 中 *COI* 基因

序列作为检测鉴定的基础, 选取其中特异性序列作为靶基因进行 PCR 扩增, 以区分鉴定蔗扁蛾与其他近缘种, 特别是形态学上难以区分的近缘种。通过特异性、灵敏度和与传统检测方法比较, 结果表明, 蔗扁蛾 PCR 快速鉴定方法具有较高的灵敏度和准确性, 而且可以进行高通量的样品检测, 弥补了传统形态学方法鉴定的不足, 提高了检疫效率。但由于本试验采用的蔗扁蛾及其近缘种大部分来自于中国和东南亚地区, 具有一定的局限性, 因此, 对于蔗扁蛾不同地理种群的基因型尚有待于继续研究。

中国扬州大学薛海洋先生和日本大阪府立大学广渡俊哉博士提供样品材料, 盛夏冰和李杰同学参与试验工作, 特此致谢。

参考文献:

- [1] 程桂芳, 杨集昆. 北京发现的检疫性新害虫——蔗扁蛾初报[J]. 植物检疫, 1997, 11(2): 95-100.
- [2] Davis D R, Pena J E. Biology and Morphology of the banana moth, *Opogona sacchari* (Bojer), and its introduction into Florida (Lepidoptera, Tineidae)[J]. Proceeding of the Entomological Society of Washington, 1990, 92(4): 593-618.
- [3] 殷玉生, 顾忠盈, 周明华. 入侵性害虫——蔗扁蛾的研究进展[J]. 检验检疫科学, 2006, 16(1): 76-78.
- [4] 蒋金炜, 徐永伟. 外来害虫蔗扁蛾的发生与防治[J]. 河南农业科学, 2004(3): 26-28.
- [5] 中国农业部, 中国国家质量监督检验检疫总局. 中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录[EB]. 中华人民共和国农业部公告第 862 号, 2007.
- [6] 廖力, 徐森锋, 张卫东, 等. 应用 DNA 条形码技术鉴别谷实夜蛾与棉铃虫[J]. 植物检疫, 2012, 26(6): 65-68.
- [7] 张西露, 刘峰, 戴雄泽, 等. 黄瓜性别控制基因 CsACS1G 的分子标记及其快速检测[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2010, 36(5): 512-515.
- [8] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, evolutionary distance, and Maximum Parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28: 2731-2739.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维