

吐鲁番枣实蝇快速检疫鉴定方法

阿地力·沙塔尔^{1,2}, 程晓甜², 张伟³

(1北京林业大学省部共建森林培育与保护教育部重点实验室 北京 100083;2新疆农业大学林学与园艺学院, 乌鲁木齐830052; 3新疆出入境检验检疫局技术中心 830083)

摘要: 本研究采用形态学观察与PCR 技术相结合的方法对新疆吐鲁番地区的鄯善县, 托克逊县及吐鲁番市的枣实蝇*Carpomya vesuviana* Costa幼虫和蛹进行快速鉴定。采用试剂盒的方法快速提取昆虫基因组DNA, 并根据通用引物, 采用PCR 技术从枣实蝇幼虫和蛹样本中均扩增得到666 bp的条带, 经测序比较发现, 三个地方的扩增产物目的基因序列完全相同, 随后, 此次剩余的幼虫、蛹经室内培养, 成虫羽化后经形态鉴定再次确认为枣实蝇。该方法解决了枣实蝇幼虫和蛹等未成熟虫态的快速检疫难题, 大大缩短了检测周期, 值得口岸检验检疫借鉴应用。

关键词: 枣实蝇; 吐鲁番; 快速; 检疫鉴定; PCR

Rapid quarantine and identification of *Carpomya vesuviana*

Costa from Turpan

Adili Shataer^{1,2}, Cheng Xiaotian², Zhang Wei³,

(1. Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. College of Forestry & Horticulture, Xinjiang Agriculture University, Urumqi 830052, China; 3. Xinjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Urumqi 830083)

Abstract: In this study, morphological observation combined with PCR method were used to rapid quarantine and identification of dubious larvae and pupae of *Carpomya vesuviana* -a Costa from Xinjiang's Shanshan, Toksun and Turpan. The kit rapid extraction of insect genomic DNA by PCR technique from *Carpomya vesuviana* Costa larvae and pupae samples were amplified bands of 666 bp by sequencing found three parts of the target sequence amplification products identical, followed by the remaining larvae, pupae by the indoor culture, adult emergence, once again by morphological identification is recognized as *Carpomya vesuviana* Costa. This method solved the difficult problem of rapid identification of immature larvae and pupae of *Carpomya vesuviana* Costa and should be useful for practical application in port of entry quarantine.

Key words: *Carpomya vesuviana* Costa; Turpan; rapid, quarantine and identification, PCR

枣实蝇 *Carpomya vesuviana* Costa 是一种入侵重大检疫性害虫,属双翅目 *Diptera* 实蝇科 *Tephritidae* 实蝇亚科 *Trypetinae* 实蝇族 *Trypetini* 实蝇属 *Carpomya* Costa, 主要分布在高加索、意大利、巴基斯坦、毛里求斯、阿富汗、印度、泰国、乌兹别克斯坦、塔吉克斯坦、土库曼斯坦、伊朗、波斯尼亚、亚美尼亚、塞浦路斯、俄罗斯、阿曼等国家^[1-3]。2007年首次在新疆吐鲁番地区的鄯善县, 托克逊县及吐鲁番市发现, 发生面积为 1029.42 hm², 导致果实产量及品质下降, 丧失其经济价值, 且造成的落果率高达 70-90%, 销毁有虫枣果 2233.8t, 对该地区的枣果业造成了毁灭性的危害, 严重影响农民种植红枣的积极性。目前, 口岸检验检疫部门对枣实蝇的鉴定主要以成虫的外部形态特征作为依据。但是, 口岸截获的往往是卵、幼虫或蛹等一些未成熟虫态, 传统方法是对其进行室内饲养, 待成虫羽化后再进行鉴定, 这需要 5~15 d 的检测周期, 不适应口岸快速检验检疫的要求。随着分子生物学技术的不断发展与完善, 越来越多的分子标记技术被应用到昆虫的分类与鉴定中。这也使得采用分子生物学技术手段对形态学难以分辨的昆虫种类进行分子分类与鉴定成为可能。其中, PCR 技术以生物基因组 DNA 为检测依据, 具有检测周期短和不受靶标的形态、性状等方面影响的优点, 非常适合枣实蝇等一些检疫性害虫未成熟虫态的快速检疫鉴定^[4]。为了能够准确及时对截获的实蝇幼虫进行鉴定, 我们尝试了应用分子生物学方法对吐鲁番枣实蝇幼虫进行 DNA 检测分析, 最终建立了一套快速、准确的枣实蝇分子鉴定方法, 供检验检疫部门参考应用。

1 材料与方法

1.1 标本来源

枣实蝇蛹标本分别采自 3 个地区: 吐鲁番地区的鄯善县, 托克逊县及吐鲁番市, 其采集地, 个体数量及采集时间见表 1

表 1 不同枣实蝇种群的标本采集地点、个体数量以及采集时间

标本采集地点	个体数量 (头)	采集时间
吐鲁番市	16	2010. 8
鄯善县	18	2010. 8
托克逊县	20	2010. 9

1.2 供试试剂

1.2.1 引物

参考文献^[5,6]引用 2 对引物, 送至宝生物工程(大连)有限公司合成, 其中 can-F 和 can-R 用于质量检测, UEA7 和 UEA10 用于目标片段扩增, 如表 2

表 2: PCR 引物(从 5' 到 3' 端)
Table 2: PCR primers (from 5 'to 3' end)

引物名称	引物序列
can-F	AAGAGCGACGGG CGATG
can-R	CTAGGATTAGATACCCTATT
UEA7	TACAGTTGGAATAGACGTTGATAC
UEA10	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA

1.2.2 酶及其他试剂

Takara 试剂盒, Taq 酶、PCR 反应体系试剂(dNTP、10 ×buffer 和 Mg^{2+})、琼脂糖、EB、2000bp Ladder Marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 主要仪器

定量梯度 PCR 仪 (Biometra)、高速冷冻离心机 (CF16R × II 型)、多功能电泳仪、数字图像分析仪 (Alpha1220V 型)、核酸蛋白检测仪、全自动高压灭菌仪、全温水浴锅、超低温冰箱

1.4 试验方法

1.4.1 形态鉴定

对枣幼虫和蛹进行形态学观察,解剖镜下观察幼虫的头部特征、气门形状、尾部特征,蛹的气门特征等,并进行拍照^[7],同时对多余的幼虫和蛹进行室内培养。

1.4.2 分子生物学方法

1.4.2.1 枣实蝇基因组 DNA 的提取

本研究采用宝生物工程(大连)有限公司研发的 Takara 试剂盒推荐的方法来提取基因组 DNA。

1.4.3 PCR 扩增

PCR 扩增引物和测序引物: 目标片段 PCR 扩增的引物为 Uea7/Uea10。

PCR 反应体系: PCR 扩增在定量梯度 PCR 仪上进行, 反应体系: 10 × Buffer 2.5 μl, Mg^{2+} 2 μl, dNTP 2.5 μl, 上下游引物各 0.2 μl, 1 U Taq 酶 (Takara) 0.2 μl, 模板 DNA 2.5 μl, 加水至总体积 25 μl。

PCR 扩增条件: 94 °C/5 min, 95 °C/40 sec, 48 °C/30 sec, 72 °C/1 min, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 7 min。取 PCR 产物 5 μl 在含溴化已锭的 1.5% 琼脂凝胶

上电泳 30 min (90V), 在数字图像分析仪上检测结果^[8]。

1.4.4 PCR 产物纯化

将50 μ l左右的DNA样品用含溴化已锭的1.5%琼脂凝胶上电泳30 min (90V) 电泳分离, 电泳缓冲体系为TBE。回收DNA(片段大约为700bp)。

用宝生物工程(大连)有限公司生产的Takara Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 code DV805A纯化目的条带。回收DNA溶于25 μ l Elution Buffer中。

1.4.5. 序列测定与数据分析

1.4.5.1 测序

把纯化后的 PCR 产物送至上海宝生物工程有限公司测序。

1.4.5.2 枣实蝇 mtDNACO1 基因序列比较分析

将测得的基因序列选用多序列对位排列程序 (Clustal X) 进行多序列对位排列, 并且进行人工校对^[9-10]。

2. 结果分析

2.1 形态特征

鉴别特征: 体长 3.6~4.2mm。头宽大于长。具 2 对上侧额鬃; 单眼鬃细小或缺; 具单眼后鬃、内顶鬃、外顶鬃和颊鬃。颜面斑不存在, 额和侧额无银色斑。复眼长略大于宽, 或长宽近等。喙短, 呈头状花序状。中胸背板浅黄色或褐色, 两侧各具 5 个黑斑, 基部后缘中央具黑斑。小盾片浅黄色, 基部两侧、端部两侧及基部中间各具 1 黑斑, 中基部中间的黑斑与中胸背板后缘的黑斑相连, 端部 2 黑斑相距较近。肩胛鬃、中侧鬃、前背侧鬃、后背侧鬃、前翅上鬃、后翅上鬃、翅内鬃、背中鬃、小盾前鬃各 1 对, 小盾鬃 2 对; 背中鬃着生于前翅上鬃连线上或其稍后处。

翅透明, 具 4 个黄色至黄褐色横带, 横带的部分边缘带有灰褐色; 基带和中带彼此隔离, 较短, 均不达翅后缘; 亚端带较长, 伸达翅后缘; 带的前端与前端带于 r_1 和 r_{2+3} 室内互连接成倒 V 形; 前端带伸至翅尖之后, 边缘的大部分一般由几个小透明斑带与翅前缘相隔。 R_{4+5} 脉背、腹面裸或仅于径脉结节上被小鬃; $r-m$ 横脉接近 dm 室的中点。 cup 室的后端角较短。

足完全黄色; 前股节具 1~3 根后背鬃和 1 列后腹鬃; 中胫端刺 (距) 1 根。腹部黄色

到橙黄色，各节腹背板分离；第3~5节腹背板不具暗色中纵条，第5腹背板不具腺斑。雄成虫第3腹背板无栉毛，第5腹节腹板后缘深凹；雄成虫侧尾叶超过第9背板长度的一半；后叶长。雌成虫产卵器基节短，约为第5腹背板的长的0.3~0.5倍；产卵管末端尖，针状，两侧其微细锯齿；具3个受精囊（吴佳教等，2009）^[11]。

2.2 分子鉴定

2.2.1 PCR 扩增结果

PCR 反应结束后,经1.5%琼脂糖凝胶电泳显示,枣实蝇模板DNA扩增结果中可以看出500-750 bp之间大约700 bp目标片段的位置有一条扩增带，亮度差异表示模板浓度的差异。DNA确切浓度和纯度通过核酸蛋白检测仪来测定。见图1

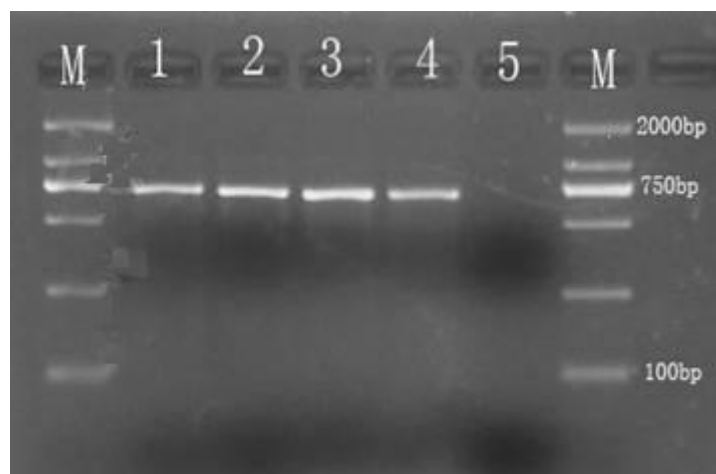


图1 Uea7/Uea10 引物 PCR 模板 DNA 质量电泳图

Fig.1. Agarose gel electrophoresis analysis (GEA) of the quantity of DNA template with primer set Uea7/Uea10.

M:DL2000 DNA Marker 1: 吐鲁番市枣实蝇幼虫 *Carpomya vesuviana* Costa; 2: 吐鲁番市枣实蝇蛹 *Carpomya vesuviana* Costa 3: 鄯善县枣实蝇蛹 *Carpomya vesuviana* Costa; 4: 托克逊县枣实蝇蛹 *Carpomya vesuviana* Costa; 5: 阴性对照;

2.2.2 COI 基因组成

本研究分别对已测定的4条序列的COI基因蛋白编码区662bp（第1位-662位点）进行排列，3个不同地方的枣实蝇COI基因序列碱基组成如表3所示，mtDNACOI基因的碱基T、C、A、G的含量均为38.6%，14.6%，32.6%，14.3% A+T含量为71.2%。

2.2.3 序列比较

将PCR产物基因序列进行比较发现，四者的序列完全相同，由表可知枣实蝇DNA片段长度为666bp,并将吐鲁番市枣实蝇序列已经录入GenBank数据库，序

列号为 HQ687210。

[1]CTGAAAAGCTACTTTACTTCGC--ACTATAATTATT-GCTGTACCTACAGGAATTAAGATTTTCAGTTGATTAGCTAC	[78]
[2].....	[78]
[3].....	[78]
[4].....	[78]
[1]ATTACATGGAACTCAACTAAATTATCCCCAGCAATATTATGAGCTTTAGGATTTGTATTTTATTACAGTAGGAGG	[156]
[2].....	[156]
[3].....	[156]
[4].....	[156]
[1]ATTAACAGGAGTAGTATTAGCAAATTCATCAGTTGATATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCTCATTTCA	[234]
[2].....	[234]
[3].....	[234]
[4].....	[234]
[1]TTATGTAATCAATAGGAGCTGTATTTGCTATTATAGCTGGATTTGTGCATTGATACCCTTTATTACAGGATTAGT	[312]
[2].....	[312]
[3].....	[312]
[4].....	[312]
[1]TTTAAATCCAAAATGGTTAAAAAGTCAATTTATTATTATTTATTGGTGTAATTTAACATTCTTCCACAACATT	[390]
[2].....	[390]
[3].....	[390]
[4].....	[390]
[1]TTTAGGGTTAGCTGGTATACCTCGACGTTATTCAGATTATCCAGATGCTTATACAACATGAAATGTAGTATCAACTAT	[468]
[2].....	[468]
[3].....	[468]
[4].....	[468]
[1]TGGTCTCTATTTCATTATTAGGAATTTATTCTTCTTATTATTATCTGAGAAAGTTTAAATTCACAACGACAAGT	[546]
[2].....	[546]
[3].....	[546]
[4].....	[546]
[1]AATTTACCCAATACAATTAATTTCTCAATTGAGTGATTACAAAATACACCACCAGCAGAACATAGTTATTCTGAATT	[624]
[2].....	[624]
[3].....	[624]
[4].....	[624]
[1]ACCTATTTAAGAAATTTCTAATATGGCAGATAGGGGAATTTGAAA	[666]
[2].....	[666]
[3].....	[666]
[4].....	[666]

‘.’代表相同的碱基

- 1: 吐鲁番市枣实蝇幼虫 *Carpomya vesuviana* Costa; 2: 吐鲁番市枣实蝇蛹 *Carpomya vesuviana* Costa
3: 鄯善县枣实蝇蛹 *Carpomya vesuviana* Costa; 4: 托克逊县枣实蝇蛹 *Carpomya vesuviana* Costa;

图2 PCR产物目的基因的序列比较

3. 讨论

新疆作为我国西北的门户, 是中亚乃至欧洲有害物种传入我国的重要通道。然而, 入侵新疆的有害物种传入途径较多, 一是由我国内地各省传入, 二是新疆 17 个对外开放口岸。据不完全统计, 自 20 世纪 50 年代以来, 新疆的农林外来入侵生物总计 79 种, 其中入侵害虫有 50 种。农林外来入侵生物的传入给新疆农林产业带来严重的经济损失。尤其是新入侵的重大检疫性害虫——枣实蝇在吐鲁番地区的暴发成灾便是明证。在口岸检疫截获未成熟虫态(幼虫或蛹)的几率较大, 一般情况下室内饲养至成虫大约需 5~15 d 左右的时间, 检测周期较长, 不能满足贸易性果蔬现场检疫快速通关的需求, 因此利用分子生物学技术快速检疫鉴定害虫种类已成为趋势。定性 PCR 检测可解决这一长期困扰口岸检验检疫人员的难题, 它不受虫态的限制, 不管是哪一种虫态(卵、幼虫、蛹或成虫), 只要获得基因组 DNA, 均能进行检测, 弥补了传统形态学方法鉴定的不足, 大大缩短了检测周期, 提高了通关速率。

我们对实蝇类幼虫、蛹进行形态鉴定的同时进行了PCR检测, 6h内可完成检疫鉴定。随后, 此次剩余的幼虫、蛹经室内培养, 成虫羽化后经形态鉴定再次确认为枣实, 从而, 验证了分子检测方法的准确性和可靠性。

然而, 近几年越来越多的分子生物学快速检疫鉴定技术已运用到实蝇类昆虫检疫鉴定中, 比如:SYBR Green实时荧光PCR, TaqMan、Taq-Man-MGB及分子信标(molecular beacon)探针实时荧光PCR等, 关于枣实蝇实时荧光PCR快速检疫鉴定技术有待继续研究。

参考文献:

- [1] 张润志,汪兴鉴,阿地力·沙塔尔.检疫性害虫枣实蝇的鉴定与入侵威胁 [J].昆虫知识,2007,44(6):928-930.
- [2] 岳朝阳,田呈明,张新平,等.枣实蝇入侵我国的风险分析[J].防护林科技,2009,(6).
- [3] 中华人民共和国农业部公告第 862 号 [EB/OL].(2007-05-29)[2009-05-15].
http://www.agr.gov.cn/blgg/t20070604_827310.htm.
- [4]施伟,叶辉.桔小实蝇分子生物学研究中样品采集及保存处理的改进方法.昆虫知识,2005,42(4):460~462.
- [5] Jammonglik W, Baimai V & Kittayapong P. Molecular evolution of tephritid fruit flies in the genus *Bactrocera* based on the cytochrome oxidase I gene. *Genetica*, 2003, 119(1):19-25.
- [6] 余坚道.检疫性实蝇分子生物学快速鉴定技术的研究 [D].上海:中国科学院上海生命科学研究院,2005.
- [7]崔俊霞,徐瑛,等.橘小实蝇快速检疫鉴定方法[J].昆虫知识,2006,43(5):731~733.
- [8] 吴佳教,胡学难,赵菊鹏,等.9种检疫性实蝇PCR-RFLP快速鉴定研究[J].植物检疫,2005,19(1):2-6.
- [9] Nardi EC, Arapell A, Dallai Retal. The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations. *Insect Mol. Bio*, 2003, 12(6):605-611.
- [10] 褚栋,张友军,丛斌等.烟粉虱不同地理种群的 mtDNACO1 基因序列分析及其系统发育 [J].中国农业科学,2005,38(1):76-85.

[11]吴佳教, 梁帆, 梁广勤, 等主编. 实蝇类重要害虫鉴定手册[J]. 广州:广东科技出版社, 2009. 7~119.