

5 种仓储豆象的分子鉴定和检测

刘昌燕, 李莉, 焦春海, 万正煌*

(湖北省农业科学院粮食作物研究所, 粮食作物种质创新与遗传改良湖北省重点实验室, 武汉 430064)

摘要 本研究以在检疫中经常被截获的 5 种豆象为研究对象, 通过对 GenBank 中 5 种豆象 mtDNA CO I 序列的查询, 并进行序列比对, 共设计了 30 对引物, 通过筛选获得 5 对能分别鉴定 5 种豆象的特异引物, 并用 50、25、10、5、1、0.5、0.1、0.05 ng/ μ L 8 个不同浓度系列的豆象 DNA 模板来检测灵敏度, 结果表明, 豌豆象和四纹豆象特异引物对的灵敏度为 0.1 ng/ μ L, 蚕豆象、菜豆象和绿豆象特异引物对的灵敏度为 0.5 ng/ μ L。该方法可用于快速准确地鉴定 5 种豆象, 对于豆象类害虫的检测监测具有重要意义。

关键词 豆象科; mtDNA CO I 基因; 特异引物; 分子鉴定

中图分类号: S 379 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.04.022

Molecular identification and detection of five bean weevils

Liu Changyan, Li Li, Jiao Chunhai, Wan Zhenghuang

(Institute of Food Crops, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Hubei Key Laboratory of Food Crop Germplasm and Genetic Improvement, Wuhan 430064, China)

Abstract Molecular identification of five bean weevils that were frequently intercepted from customs was studied in this paper. Based on the mtDNA CO I gene sequences of *Callosobruchus chinensis*, *Bruchus rufimanus*, *B. pisorum*, *Acanthoscelides obtectus* and *C. maculatus* from GenBank, 30 pairs of primers were designed, and the five bean weevils can be specifically identified by PCR amplification with five pairs of specific primers. Moreover, the sensitivity of PCR was detected at 50, 25, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 and 0.05 ng/ μ L genomic DNA of *C. chinensis*, *B. rufimanus*, *B. pisorum*, *A. obtectus* and *C. maculatus*, respectively. The results showed that the sensitivity for *B. pisorum* and *C. maculatus* was 0.1 ng/ μ L, while 0.5 ng/ μ L for the other three. The method provides a rapid and reliable tool for identification of the five bean weevils, which could be applied in detecting and monitoring of bean weevil pests.

Key words Bruchidae; mtDNA CO I gene; specific primers; molecular identification

豆象是豆象科昆虫的总称, 分布于除南极之外的各大陆, 尤其以亚洲的热带区以及中美和南美地区数量最多^[1]。豆象科昆虫目前全世界记录约 1 400 种, 分属于 58 个属^[2]。该科昆虫大约有 84% 的种类取食豆科植物种子, 成为栽培豆科植物的一类重要害虫^[3]。1997 年浙江宁海曾发生蚕豆象大规模为害, 为害率高的达到 80% 以上, 经济损失严重^[4]。绿豆象严重为害绿豆、豇豆、鹰嘴豆、蚕豆和豌豆等多种豆类^[5-6], 主要在仓内蛀食储藏的豆粒, 造成的损失达 30% 以上^[7]。我国共记载有 18 种储藏物中豆象科昆虫, 其中绿豆象 *Callosobruchus chinensis*、蚕豆

象 *Bruchus rufimanus* 和豌豆象 *Bruchus pisorum* 为我国主要的储藏豆类害虫; 而菜豆象 *Acanthoscelides obtectus* 和四纹豆象 *Callosobruchus maculatus* 为我国规定禁止入境的检疫性害虫^[8]。

目前口岸检验检疫部门对豆象科昆虫的鉴定主要以成虫的外部形态特征作为鉴定依据, 但本研究涉及的 5 种豆象个体微小(约 2~5 mm), 且寄主范围、生活习性和种间外部形态极为相似, 给种类鉴定工作带来了极大的困难^[1,9]。同时, 豆象能够以卵、幼虫、蛹、成虫随寄主果实和运输工具等进行远距离人为传播, 且主要以卵、幼虫、蛹等非成虫形态为主, 需将其

收稿日期: 2016-09-30 修订日期: 2017-01-10

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-09); 科技部国际合作重点项目(2011DFB31620); 湖北省农业科技创新中心资助项目(2016-620-000-001-006)

* 通信作者 E-mail: zhwan168@163.com

饲养至成虫才能进行种类鉴定,整个检疫鉴定过程长达数周,不适应口岸快速检验检疫的要求,且容易混淆误检,无法适应实际工作的需要。我国在进口货物上截获的豆象不单单存在于豆类上,在玉米、小麦、棉花等货物中也存在,极大地增加了检疫的难度^[2]。因此,寻找一种正确快速的鉴定方法对口岸检验检疫具有十分重要的指导意义。

分子标记是实现分子鉴定的重要技术手段,目前已应用于昆虫近缘种、地理种群的鉴别。细胞色素 C 氧化酶含有 13 个亚基,其中细胞色素氧化酶亚基 I (CO I) 是细胞色素氧化酶的重要组成部分,编码该亚基的基因片段不同位置的进化速率有所不同,通过选取该基因的适宜基因片段进行测序和序列分析,进而在 DNA 水平上对物种进行正确地识别鉴定,已成为生物分类学研究的发展方向^[10-11]。相比于其他分子标记技术,由于其具有统一性和标准性而成为生物分类学研究中应用最为广泛的分子手段之一^[12-13]。目前,CO I 基因已用于鳞翅目、膜翅目、半翅目等物种鉴定,并对基于形态学的物种分类进行了验证或修正^[14-15]。

本研究以在检疫中经常被截获的 5 种豆象为研究对象,设计了以 CO I 为目标基因的特异性引物并对其特异性进行验证,旨在建立豆象类害虫快速分子鉴定技术,为有效截阻豆象类害虫的传入及进一步扩散,保障我国豆类安全生产提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

本研究所用的昆虫样品、来源和寄主见表 1。所有虫源样品均用体式显微镜进行鉴定,以确定种类。用于分子生物学试验的豆象标本用 100% 乙醇浸泡并保存于-20℃ 冰箱。

表 1 5 种豆象来源及寄主

Table 1 Sources and hosts of five bean weevils

昆虫样品 Sample	来源 Source	寄主 Host
绿豆象 <i>Callosobruchus chinensis</i>	北京门头沟	绿豆 <i>Vigna radiata</i>
豌豆象 <i>Bruchus pisorum</i>	湖北武汉	豌豆 <i>Pisum sativum</i>
蚕豆象 <i>Bruchus rufimanus</i>	湖北武汉	蚕豆 <i>Vicia faba</i>
四纹豆象 <i>Callosobruchus maculatus</i>	重庆永川	绿豆 <i>Vigna radiata</i>
菜豆象 <i>Acanthoscelides obtectus</i>	云南曲靖	菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i>

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、蛋白酶 K、DL1000 DNA Marker、Tris、EDTA、SDS 均购自 TaKaRa 公司。胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司,其他生化试剂均为国产分析纯。

1.3 基因组 DNA 的提取

豆象基因组 DNA 的提取参照 Sunnuck 等^[16]的盐析法并稍作改进。将单头豆象于 1.5 mL 离心管中研磨粉碎,加入 300 μL TENS (50 mmol/L Tris, pH 7.5, 400 mmol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 0.5% SDS) 和 100 μg/mL 蛋白酶 K, 于 37℃ 水浴 4 h, 加入 85 μL 5 mol/L NaCl 剧烈振荡 15 s; 14 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 加入等体积无水乙醇沉淀 DNA, 12 000 r/min 离心 5 min, 用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次, 沉淀充分干燥后, 加入 30 μL 蒸馏水溶解 DNA, -20℃ 保存备用。

1.4 特异引物对的设计

通过 GenBank 中登录的豌豆象 (EF570097)、四纹豆象 (AY625417)、蚕豆象 (AY997313)、菜豆象 (KF157281) 和绿豆象 (AY625416) 的 mtDNA CO I 序列, 用 DNAMAN 软件对目标种的 mtDNA CO I 序列进行比对分析, 根据分析结果, 针对目的基因序列人工设计特异引物, 并用 Primer 5 对引物进行评估, 检查引物 T_m 值、GC%、错配、二聚体和发夹结构等, 并用 GenBank 中的 BLAST 程序检查同源序列^[17]。本研究共设计了 30 对引物, 通过筛选获得能分别特异鉴定 5 种豆象的特异引物 5 对 (表 2), 引物筛选的原则是所有引物在所设计的 PCR 反应体系和反应条件下能特异地鉴定出某一种豆象。引物由武汉擎科生物技术有限公司合成。

1.5 PCR 扩增

分别以单头豆象的基因组 DNA 为模板, 用表 2 的特异性引物进行 PCR 扩增, 以水作阴性对照。PCR 反应体系 (25 μL): 10×buffer (含 Mg²⁺) 2.5 μL、2.5 mmol/L dNTPs 2.5 μL、10 μmol/L 引物 (上、下游引物) 各 1.0 μL、2.5 U/μL Taq 酶 0.2 μL、基因组 DNA 1 μL、ddH₂O 16.8 μL。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s、54℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保存。取 5 μL PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 溴化乙锭 (EB) 染色, 在凝胶成像系统中观察并成像分析。

表 2 引物序列及扩增产物

Table 2 Primer sequences and amplification products

引物	Primer	豆象种类	Species	序列 5'-3'	Sequence	目标片段长度/bp	Length
Bp1		豌豆象		AGTTGGGGGTTTAACTGGTGTA		166	
Bp2		<i>Bruchus pisorum</i>		TGTTAAACCTGTAAATAATGGG			
Cm1		四纹豆象		GGTCCCTACTGGAATTAAAGTA		276	
Cm2		<i>Callosobruchus maculatus</i>		AAAGTAACTCCGGTAAAAAGG			
Br1		蚕豆象		AGTGGGAGGATTGACTGGTGTT		167	
Br2		<i>Bruchus rufimanus</i>		AGTTAATCCTGTAAATAATGAA			
Ao1		菜豆象		CATGATAGCTATCGGATTA		432	
Ao2		<i>Acanthoscelides obtectus</i>		ACCTAAAAATATAGTAATAAAATTGGG			
Cc1		绿豆象		AGTACCAACCGGAATCAAAGTA		274	
Cc2		<i>Callosobruchus chinensis</i>		AGTGACACCAGTAAAAAAGAGGA			

1.6 PCR 产物回收测序

PCR 产物采用天根琼脂糖凝胶回收试剂盒进行切胶回收纯化,回收纯化后的 PCR 产物由武汉擎科生物科技有限公司进行测序。

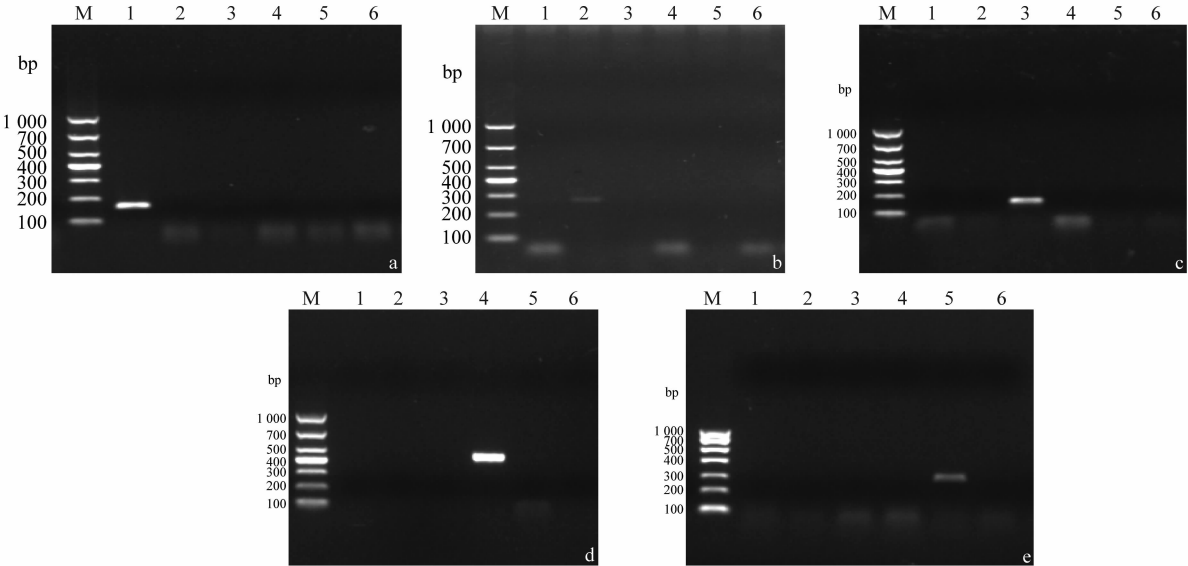
1.7 特异引物对的灵敏度检测

供试豆象的基因组 DNA 用蒸馏水进行系列稀释,得到基因组 DNA 浓度分别为:50、25、10、5、1、0.5、0.1、0.05 ng/ μ L。分别取每种稀释液 1 μ L 为模板(水为阴性对照),用上述 5 对特异性引物分别对 5 种豆象的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳上检测。

2 结果与分析

2.1 引物特异性验证

用设计的特异性引物对所有供试豆象的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,其中 Bp1/Bp2 仅在豌豆象基因组 DNA 扩增出 166 bp 特异性条带(图 1);Cm1/Cm2 仅在四纹豆象基因组 DNA 中扩增出 276 bp 特异性条带(图 2);Br1/Br2 仅在蚕豆象基因组 DNA 中扩增出 167 bp 特异性条带(图 3);Ao1/Ao2 仅在菜豆象中扩增出 432 bp 特异性条带(图 4);Cc1/Cc2 仅在绿豆象中扩增出 274 bp 特异性条带(图 5),其他豆象基因组 DNA 及水对照均无扩增片段。表明设计的引物在供试豆象范围内具有特异性。



a~e: 依次为豌豆象、四纹豆象、蚕豆象、菜豆象和绿豆象的特异性检测。M: DL1000 DNA Marker; 1: 豌豆象; 2: 四纹豆象; 3: 蚕豆象; 4: 菜豆象; 5: 绿豆象; 6: 阴性对照

a~e: Specific detection of *B. pisorum*, *C. maculatus*, *B. rufimanus*, *A. obtectus* and *C. chinensis*, respectively; M: DL1000 DNA Marker; 1: *B. pisorum*; 2: *C. maculatus*; 3: *B. rufimanus*; 4: *A. obtectus*; 5: *C. chinensis*; 6: Negative control

图 1 5 种豆象的特异性检测

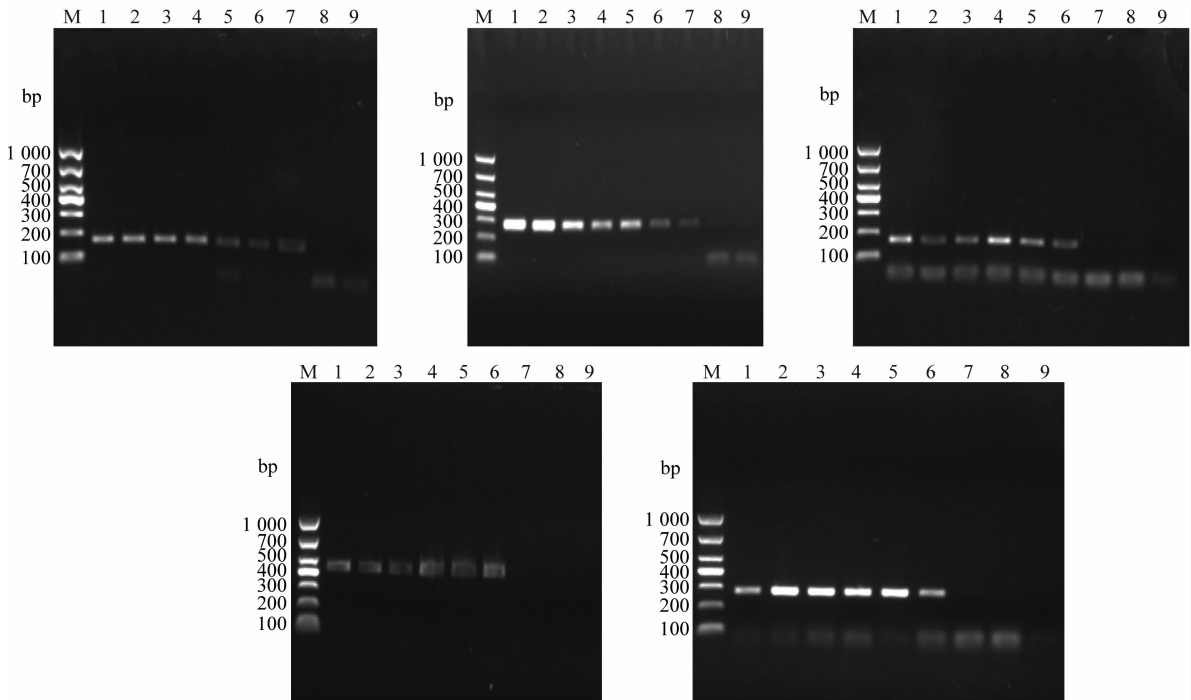
Fig. 1 Detection of five bean weevils with specific primers

2.2 PCR 产物测序验证

分别对扩增出的 PCR 产物进行测序和序列分析,对产物的特异性进行进一步确认。经测序表明,豌豆象特异引物对扩增的 PCR 产物与原序列有 5 个碱基的差异,四纹豆象特异引物对扩增的 PCR 产物序列与原序列有 4 个碱基的差异,蚕豆象特异引物对扩增的 PCR 产物与原序列有 9 个碱基的差异,菜豆象特异引物对扩增的 PCR 产物与原序列有 6 个碱基的差异,绿豆象特异引物对扩增的 PCR 产物与原序列没有碱基的差异,造成这些差异的原因可能是测序的差异或者不同地理种群间序列存在差异。

2.3 特异引物灵敏度检测

PCR 方法的检测灵敏度分别用 50、25、10、5、1、0.5、0.1、0.05 ng/ μ L 等 8 种不同浓度的豆象 DNA 为模板来确定。由图 2 可知,当模板浓度为 0.05 ng/ μ L 时,豌豆象和四纹豆象特异引物对均没有扩增出特异性条带,当模板浓度为 0.1 ng/ μ L 及以上时,均产生特异性条带,而水对照即 CK 无扩增片段(图 2)。由此可知,应用本试验的 PCR 鉴定方法可以检测到浓度为 0.1 ng/ μ L 的豌豆象和四纹豆象基因组 DNA,灵敏度非常高。从图 8~10 可以看出,蚕豆象、菜豆象和绿豆象特异引物对的灵敏度为 0.5 ng/ μ L。



a-e: 依次为豌豆象、四纹豆象、蚕豆象、菜豆象和绿豆象特异引物对的灵敏度检测。M: DL1000 DNA marker; 1: 50 ng/ μ L; 2: 25 ng/ μ L; 3: 10 ng/ μ L; 4: 5 ng/ μ L; 5: 1 ng/ μ L; 6: 0.5 ng/ μ L; 7: 0.1 ng/ μ L; 8: 0.05 ng/ μ L; 9: 阴性对照
a-e: Sensitivity detection of specific primers for *B. pisorum*, *C. maculatus*, *B. rufimanus*, *A. obtectus* and *C. chinensis*, respectively. M: DL1000 DNA Marker; 1: 50 ng/ μ L; 2: 25 ng/ μ L; 3: 10 ng/ μ L; 4: 5 ng/ μ L; 5: 1 ng/ μ L; 6: 0.5 ng/ μ L; 7: 0.1 ng/ μ L; 8: 0.05 ng/ μ L; 9: Negative control

图 2 特异引物的灵敏度检测

Fig. 2 Sensitivity detection of specific primers for five bean weevils

3 讨论

现代分子生物学技术尤其是分子标记技术为研究生物之间的进化关系开辟了新手段。PCR 的广泛应用以及基因测序的精确和简便使分子系统分析达到空前的水平。许多研究者利用 RFLP 或 RAPD 标记分析物种或地理种群的遗传多态性,并据此推导其亲缘关系。如顾耕等^[18]采用 RAPD 技术对生

活在辣椒、番茄和烟草上的棉铃虫进行了寄主种群遗传分化的研究。魏晓棠等^[19]利用 AFLP 技术对我国 4 个地理种群的棉褐带卷蛾进行遗传结构分析,为不同地理种群的棉褐带卷蛾的分类鉴定和遗传变异分析提供参考依据。但 RFLP 需要筛选大量的限制酶,而 RAPD 需要筛选大量随机引物。以核酸序列测定为基础,扩增单一的稳定条带,实现豆象的分子鉴定具有方便、稳定和可靠的优点。顾杰等^[20-21]结合 PCR

和酶切技术,从分子水平对鹰嘴豆象和四纹豆象进行了快速检测,鉴定灵敏度达 $10\text{ ng}/\mu\text{L}$,并检测了四纹豆象 4 个地理种群的 Cytb 和 CO I 基因序列,对不同地理种群间遗传结构多态性进行了研究。本研究通过序列搜索比对,并对设计的相关引物进行筛选鉴定,获得 5 对能特异鉴定 5 种豆象的特异性引物,灵敏度达 $0.5\text{ ng}/\mu\text{L}$ 以上,且该方法具有不受豆象发育阶段和环境条件的影响,对于非成虫态的样品及形态结构不完整的成虫样品,均能从基因序列上获得准确、可靠的鉴定信息等优点。该技术操作简便快捷,缩短了检测时间,提高了工作效率。因此,该技术可以用于豆象的检测鉴定工作,并在检疫性害虫的检疫检验与检测监测中具有重要应用价值。

参考文献

- [1] 张生芳,刘永平,武增强. 中国储藏物甲虫[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [2] 喻梅,谢令德,徐广文. 六种检疫性储粮豆象防治研究进展[J]. 粮食储藏, 2006(6): 9-12.
- [3] Johnson C D. Biosystematics of the Arizona, California, and Oregon species of the seed beetle genus *Acanthoscelides* Schilsky (Coleoptera: Bruchidae) [M]. University of California Publications in Entomology, 1970, 59: 1-116.
- [4] 叶秀亦,钱永谦,谢时秀,等. 宁海地区蚕豆象发生危害及其防治[J]. 植物保护, 1997, 23(5): 31-32.
- [5] 刘昌燕,李莉,陈宏伟,等. 绿豆象在不同豆类上的生长发育研究[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(22): 5610-5617.
- [6] 刘昌燕,万正煌,仲建锋,等. 绿豆象的辐照致死效应研究[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(9): 4607-4610.
- [7] 仲建锋,万正煌,李莉,等. 低温和高温对仓储绿豆象的防治效果[J]. 中国农业科学, 2013, 46(1): 54-59.
- [8] 刘昌燕,焦春海,仲建锋,等. 食用豆虫害研究进展[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(24): 5908-5912.
- [9] 陈新,魏春艳,任炳忠,等. 豆象属昆虫检疫重要性概述[J]. 植物检疫, 2013, 27(1): 63-67.
- [10] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [11] 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(9): 2947-2954.
- [12] Shufran K A, Puterka G J. DNA barcoding to identify all life stages of holocyclic cereal aphids (Hemiptera: Aphididae) on wheat and other Poaceae [J]. Annals of the Entomological Society of America, 2011, 104(1): 39-42.
- [13] Mehrdad H, Daniel H J, John M B, et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(4): 968-971.
- [14] 刘慎思,张桂芬,万方浩. 基于 mtDNA CO I 基因的离腹寡毛实蝇属常见种 DNA 条形码识别和系统发育分析[J]. 昆虫学报, 2014, 57(3): 343-355.
- [15] Acs Z, Challis R J, Bihari P, et al. Phylogeny and DNA barcoding of inquiline oak gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae) of the Western Palaearctic [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2010, 55(1): 210-225.
- [16] Sunnuck P, Hales D F. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae) [J]. Molecular Biology and Evolution, 1996, 13(3): 510-524.
- [17] Muraji M, Nakahara S. Discrimination among pest species of *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) based on PCR-RFLP of the mitochondrial DNA [J]. Applied Entomology and Zoology, 2002, 37(3): 437-446.
- [18] 顾耕,张迎春,王思芳. 棉铃虫不同寄主种群遗传分化的 RAPD 分析[J]. 华东昆虫学报, 2002, 11(2): 30-34.
- [19] 魏晓棠,张成标,张京宣,等. 基于 AFLP 方法对不同地理种群棉褐带卷蛾遗传分化的研究[J]. 应用昆虫学报, 2015, 50(3): 686-692.
- [20] 顾杰,王莉萍,毛雅琴,等. 鹰嘴豆象与四纹豆象的分子检测技术[J]. 植物保护学报, 2010, 37(3): 211-216.
- [21] 顾杰,毛雅琴,王莉萍,等. 四纹豆象不同地理种群的遗传分化[J]. 昆虫学报, 2009, 52(12): 1349-1355.

(责任编辑: 杨明丽)