

实验方法与技术

Experimental Method & Technology

重大检疫性害虫玉米根萤叶甲的种特异性
SS-CO I快速检测技术研究张桂芬^{1,2*}, 王玉生¹, 郭建洋^{1,2}, 冼晓青^{1,2},
万方浩^{1,2}, 张金良³, 王福莲⁴, 张亚宁⁴(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;
2. 农业部外来入侵生物预防与控制研究中心, 北京 100193; 3. 北京市植物保护站, 北京 100029;
4. 长江大学农学院, 荆州 434100)

摘要 玉米根萤叶甲在欧洲和美国是一种严重为害玉米的入侵性害虫, 传播速度快, 侵入我国的可能性极高。本文针对其难以快速准确进行形态鉴别的问题, 以玉米根萤叶甲为研究对象, 以其他 9 种/生物型叶甲总科常见害虫为参照, 采用基于 CO I 基因的种特异性 PCR 方法 (species-specific CO I, SS-CO I), 研究其快速分子检测鉴定技术。通过提取 10 种/生物型叶甲 DNA 和通用型引物扩增测序, 获得其基因片段的碱基序列, 并比对分析设计 1 对玉米根萤叶甲特异性引物 (DvvZCE1/DvvZCF1), 其扩增片段为 462 bp。种特异性检验结果显示, 该对引物只对玉米根萤叶甲的 CO I 基因具有扩增能力, 对其他常见叶甲类害虫, 包括玉米双斑长跗萤叶甲、榆黄毛萤叶甲、黄曲条跳甲、油菜蚤跳甲、黄点直缘跳甲、莲草直胸跳甲、枸杞负泥虫以及褐足角胸叶甲的棕黄型和蓝绿型没有扩增能力, 该对引物不仅对成虫有很好的扩增效果, 对单粒卵、2 龄幼虫以及成虫残体 (包括触角、头部、胸部、腹部、前足、后足) 也具有同样的扩增效果, 其最低检出阈值为 102.73 pg/ μ L (相当于 1/122 880 头雌性成虫)。玉米根萤叶甲特异性 SS-CO I 检测技术在其口岸检疫, 以及有效阻截中具有重要意义。

关键词 玉米根萤叶甲; SS-CO I 标记; 种特异性引物; 快速鉴定; 分子检测

中图分类号: S 435.132 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018031

Rapid identification of the important quarantine pest
Diabrotica virgifera virgifera by SS-CO IZHANG Guifen^{1,2}, WANG Yusheng¹, GUO Jianyang^{1,2}, XIAN Xiaoqing^{1,2},
WAN Fanghao^{1,2}, ZHANG Jinliang³, WANG Fulian⁴, ZHANG Yaning⁴

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Center for Management of Invasive Alien Species, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China; 3. Beijing Plant Protection Station, Beijing 100029, China; 4. College of Agronomy, Yangtze University, Jingzhou 434100, China)

Abstract The western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, one of the most devastating and invasive pest insect of field maize in Europe and USA, has most likely invaded China due to its rapid propagation. Identification based on the external morphology of *D. virgifera virgifera* is blocked by small body size, high degree of similarity and pleomorphism. In this study, a molecular method based on species-specific cytochrome c oxidase subunit I (SS-CO I) PCR technique was developed for rapidly identifying the western corn rootworm by using nine other common leaf beetle species as reference. The mitochondrial DNA CO I (mtDNA CO I) gene from *D. virgifera virgifera* and nine other leaf beetle species common in China, including *Monolepta hieroglyphica*

收稿日期: 2018-01-18 修订日期: 2018-03-12

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1200600, 2016YFC1201200); 农业部“948”项目(2016-X48)

* 通信作者 E-mail: guifenzhang3@163.com

(Motschulsky), *Pyrhalta maculicollis* (Motschulsky), *Phyllotreta striolata* (Fabricius), *Psylliodes punctifrons* Baly, *Ophrida xanthospilota* Baly, *Agasicles hygrophila* Selman & Vogt, *Lema decempunctata* Gebler, and *Basilepta fulvipes* (Motschulsky) biotype brown-yellow and biotype blue-green, were amplified by using the universal primer pair LCO1490/HCO2198 and sequenced. Moreover, one pair of SS-CO I primers (DvvZCE1/DvvZCF1) amplifying a single band of 462 bp from *D. virgifera virgifera* was designed. The specificity test of the primer pair against the other nine leaf beetle species indicated that it was specific to *D. virgifera virgifera* and no cross reactions were observed. The method was tested with egg, 2nd-instar larva, male and female adults as well as adult debris (including antenna, head, thorax, abdomen, foreleg and posterior leg), showing that it was applicable. In addition, the 462 bp DNA fragment could be clearly detected even at the concentration of 102.73 pg/ μ L, equal to 1/122 880 of a whole female adult of *D. virgifera virgifera*. The SS-CO I marker developed here for rapid identification of *D. virgifera virgifera* could be used in port quarantine and interception in international transportation of agricultural products.

Key words *Diabrotica virgifera virgifera*; species-specific COI marker; species-specific primer; rapid identification; molecular detection

玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, 又名玉米切根叶甲, 属于鞘翅目, 叶甲总科, 叶甲科, 萤叶甲亚科, 根萤叶甲属; 原产于北美洲的南部和中美洲的北部, 是为害玉米的一种世界性毁灭性检疫害虫^[1-2], 2007 年农业部将根萤叶甲属列入《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》^[3]。玉米根萤叶甲的成虫和幼虫均可造成危害, 且幼虫较成虫为害更为严重; 寄主植物包括禾本科、菊科、豆科及葫芦科等, 而玉米受害最为严重^[4]。其中, 成虫主要以玉米植株的雌穗花丝, 雄穗花穗、花粉, 叶片以及玉米的幼嫩籽粒等为食, 亦可取食其他植物的花粉和叶片; 为害叶片时成虫主要取食叶片的上表皮, 形成玻璃窗样不规则的半透明条形斑; 授粉期为害雌穗花丝使花穗呈齐头剪断状, 影响玉米的授粉和受精, 导致结实不良^[5-6]。幼虫主要以玉米的须根和主根或其他寄主植物如小麦、大豆、南瓜、向日葵等的根为食^[4, 7-9]; 初孵幼虫取食须根, 大龄幼虫钻入根部组织内蛀食为害, 不仅影响水分和养分的输送, 形成瘪粒造成减产, 甚至使植株干枯死亡; 此外, 幼虫钻蛀所形成的伤口还可诱发病菌感染, 导致植株根部腐烂, 引发植株倒伏, 甚至死亡^[5-6, 10-11]。倘若防治不及时, 可造成玉米减产 10%~40%, 甚至高达 90% 的产量损失^[12-13]。如在欧洲, 据测算玉米根萤叶甲每年可造成大约 4.72 亿欧元的损失^[14]; 在美国, 则每年可造成大约 8 亿美元的玉米产量损失和 2 亿美元的防治费用, 并因此被冠以“十亿美元害虫”的名号^[5]。此外, 玉米根萤叶甲还可以传播玉米褪绿斑驳病毒 (MCMV), 使玉米病毒病流行^[15], 造成绝产绝收。

1955 年之前, 玉米根萤叶甲主要在美国的中西部地区发生与为害, 是该地区玉米的一种重要害虫^[5]。然而, 在此后的 50 年间却以每年 44~125 km 的速度迅速向东扩张, 1985—2005 年扩散至大西洋沿岸并在北美和中美地区广泛分布, 发生区域主要包括加拿大、美国、墨西哥、哥斯达黎加、危地马拉和尼加拉瓜等国家^[16]。1992 年, 玉米根萤叶甲首次在位于欧洲东南部的塞尔维亚 (前南斯拉夫) 首都贝尔格莱德国际机场附近的玉米田被发现^[17], 之后在欧洲迅速扩散蔓延^[18-19], 目前已在阿尔巴尼亚、奥地利、白俄罗斯、比利时、波黑 (波斯尼亚-黑塞哥维那)、保加利亚、克罗地亚、捷克共和国、法国、德国、希腊、匈牙利、意大利、黑山共和国、荷兰 (已根除)、波兰、罗马尼亚、俄罗斯联邦、塞尔维亚 (前南斯拉夫)、斯洛伐克、斯洛文尼亚、瑞士、乌克兰、英国等 24 个国家发生与为害, 使玉米产业遭受了严重打击^[9, 18-19]; 已经成为欧美乃至世界玉米产业的一种毁灭性害虫^[18-19]。尽管目前我国尚未有玉米根萤叶甲的发生, 然而由于我国每年从疫情发生国如美国、匈牙利等大量进口玉米 (海关信息网 <http://www.haiguan.info/>), 其侵入我国的可能性极大^[20]; 进一步的定性定量风险分析表明, 该种根萤叶甲属于高度危险性有害生物 (综合风险值为 2.08)^[21], 并且我国玉米的主要种植区域 (如东北平原和华北平原) 与其适生区域高度吻合^[22]。因此加强对玉米根萤叶甲的检疫检验和检测监测, 是保障我国玉米, 以及小麦、向日葵等产业健康发展的首要前提。

以往, 叶甲类害虫的识别与鉴定主要是依据成虫的外部形态特征。玉米根萤叶甲为小型甲虫类昆

虫,成虫体长约 4.4~6.8 mm,与其他近缘种叶甲的形态极为相似^[23],未经专业训练的普通植保植检人员很难对其进行准确识别;至于它的卵(长 0.65 mm、宽 0.45 mm,初产为白色,近孵化时为淡黄色)、幼虫(初孵半透明,几近无色或白色)和蛹^[1, 23],即使是经过专业培训亦难以将其与近缘种快速区分开来。故而,本研究拟以线粒体 DNA 细胞色素 C 氧化酶亚基 I(mitochondrial DNA cytochrome c oxidase sub-mit I, mtDNA CO I)基因为靶标,研究建立靶定玉

米根萤叶甲的种特异性(species-specific CO I, SS-CO I) PCR 检测技术体系,以期为玉米根萤叶甲快速检测鉴定,有效防范其侵入我国提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

玉米根萤叶甲分别来自匈牙利和美国,寄主植物均为玉米;本文涉及的其他叶甲总科昆虫共计 9 种,相关具体信息详见表 1。

表 1 玉米根萤叶甲及其近缘种的标本信息

Table 1 *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte and other leaf beetles used in the present study

物种 Species	寄主植物 Host plant	采集地点 Location	采集时间/ 年-月 Date
叶甲科 Chrysomelidae			
萤叶甲亚科 Galerucinae			
玉米根萤叶甲 <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> LeConte	玉米 Maize	匈牙利格德勒 Godollo, Hungary	2015-07
	玉米 Maize	美国密苏里 Missouri, USA	2013-10
双斑长跗萤叶甲 <i>Monolepta hieroglyphica</i> (Motschulsky)	高粱 Sorghum	甘肃兰州 Lanzhou, Gansu, China	2013-08
榆黄毛萤叶甲 <i>Pyrrhalta maculicollis</i> (Motschulsky)	榆树 Elm	北京海淀 Haidian, Beijing, China	2016-07
跳甲亚科 Alticinae			
黄曲条跳甲 <i>Phyllotreta striolata</i> (Fabricius)	小白菜 Seedling of Chinese cabbage	北京顺义 Shunyi, Beijing, China	2015-06
油菜蚤跳甲 <i>Psylliodes punctifrons</i> Baly	二月兰 Orychophragmus	北京顺义 Shunyi, Beijing, China	2015-06
黄点直缘跳甲 <i>Ophrida xanthospilota</i> Baly	黄栌 Common smoke tree	北京海淀 Haidian, Beijing, China	2016-07
莲草直胸跳甲 <i>Agasicles hygrophila</i> Selman & Vogt	空心莲子草 Alligator weed	湖南长沙 Changsha, Hunan, China	2016-07
负泥虫科 Crioceridae;负泥虫亚科 Criocerinae			
枸杞负泥虫 <i>Lema decempunctata</i> Gebler	枸杞 Chinese wolfberry	北京海淀 Haidian, Beijing, China	2015-09
肖叶甲科 Eumolpidae;肖叶甲亚科 Eumolpinae			
褐足角胸叶甲(棕黄型) <i>Basilepta fulvipes</i> (Motschulsky) biotype brown-yellow	玉米 Maize	北京顺义 Shunyi, Beijing, China	2015-07
褐足角胸叶甲(蓝绿型) <i>B. fulvipes</i> biotype blue-green	玉米 Maize	北京顺义 Shunyi, Beijing, China	2015-07

1.2 DNA 提取

以玉米根萤叶甲以及其他 9 种/生物型叶甲(包括双斑长跗萤叶甲、榆黄毛萤叶甲、黄曲条跳甲、油菜蚤跳甲、黄点直缘跳甲、莲草直胸跳甲,枸杞负泥虫、褐足角胸叶甲(棕黄型)和褐足角胸叶甲(蓝绿型))为对象,以盐渍法^[24]略加改进,提取单头叶甲总 DNA。将单头叶甲成虫的部分组织(其中,黄曲条跳甲和油菜蚤跳甲为单头整个虫体,其余种类均为腹部 1/4)置于 1.5 mL 的离心管中,加入液氮后以玻璃研磨棒充分研磨,然后以 150 μ L 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1% SDS, 20 mmol/L NaCl; pH 8.0)分 2 次清洗研磨棒,混匀,加入 5 μ L 蛋白酶 K(20 mg/mL),充分混匀后于 60℃水浴 1 h(中途混匀 1 次);然后沸水浴 8 min,加入 220 μ L 氯仿/异戊醇(V:V=24:1)抽提液,轻柔混匀数十次

后,冰上放置 30 min;4℃、14 000 r/min 离心 10 min,取上清液约 350 μ L 移入另一离心管,加入 800 μ L 预冷的无水乙醇,轻轻混匀,待出现少量絮状沉淀后于-20℃放置 30 min;4℃、14 000 r/min 离心 10 min,小心弃去上清液。加入 300 μ L 预冷的 75%乙醇洗涤,4℃、14 000 r/min 离心 10 min,小心弃去上清液;然后将离心管倒扣于洁净滤纸上,自然干燥 30 min后每管加入 30 μ L 超纯水,充分溶解,以超微量分光光度计(NanoPhotometerTM P330, Implen, Munich, Germany)测定提取的 DNA 浓度,-40℃保存备用。

1.3 叶甲类昆虫 CO I 基因序列的 PCR 扩增

以玉米根萤叶甲以及其他 9 种/生物型常见叶甲总科害虫的 DNA 为模板,以 mtDNA CO I 基因的通用型引物对 LCO1490/HCO2198(上游引物和下

游引物的碱基序列分别为 LCO1490: 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3' 和 HCO2198: 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') 进行 PCR 扩增, 扩增片段的长度约为 680 bp^[25]。PCR 反应体系为 25 μ L, 其中, 10 $\times$ Buffer(含 Mg^{2+}) 2.5 μ L, dNTPs(10 mmol/L) 0.5 μ L, 上游引物和下游引物(5 pmol/L) 各为 0.5 μ L, Taq DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L, 北京全式金生物技术有限公司产品) 0.3 μ L, 模板 DNA 2.0 μ L, 以 18.7 μ L 超纯水补齐。扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 51 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 扩增反应在基因扩增仪(ABI-9700)上运行。取 5 μ L PCR 产物在含有 GoldView 的 1.0%(W:V) 琼脂糖凝胶上以 90 V 电泳(Bio-Rad PowerPac Basic)分离 45 min 后, 以 GelDoc-Univer-sal HoodII 型凝胶成像系统(BIO-RAD Laboratories)检测电泳结果。经电泳检测验证合格的 PCR 产物, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。依据标本采集情况, 分别检测 3~8 头。

1.4 玉米根萤叶甲 SS-PCR 引物的设计

根据本研究中测序获得的玉米根萤叶甲和其他 9 种/生物型叶甲以及数据库中已公开的玉米根萤叶甲的碱基序列, 以软件 MEGA6、Oligo7 进行比对分析, 设计玉米根萤叶甲特异性 SS-COI 引物 1 对(DvvZCE1/DvvZCF1), 上游引物 DvvZCE1 的碱基序列为 5'-GTA CGA GCA GAA TTA GGA AGG-3', 下游引物 DvvZCF1 的碱基序列为 5'-AAT TAC GAC AGC TCA AAC AAA TAG G-3'(生工生物工程(上海)股份有限公司协助合成), 可扩增出 462 bp 的片段。

1.5 SS-COI 引物的种特异性和灵敏性检验

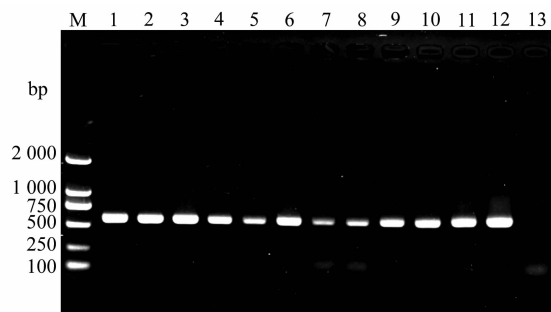
分别以田间常见 9 种/生物型叶甲的成虫 mtDNA 为模板, 以玉米根萤叶甲为阳性对照, 检验玉米根萤叶甲 SS-COI 引物 DvvZCE1/DvvZCF1 的种特异性。PCR 反应体系为 25 μ L, 其中 10 $\times$ Buffer 2.5 μ L(含 Mg^{2+}), dNTPs 0.5 μ L(0.2 mmol/L), 上游引物和下游引物各 0.5 μ L(5 pmol/L), Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.3 μ L, 模板 DNA 2 μ L, 超纯水 18.7 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。每种叶甲分别检测 8 头成虫。同时, 以卵(单粒)、2 龄幼虫(腹部 1/3)以及成虫残体[包括触角(1 对)、头部、

胸部(1/2)、腹部(1/4)、前足(1 对)、后足(1 对)] DNA 为模板, 进行灵敏性检验; 以梯度稀释的单头雌性成虫(腹部 1/4)DNA 为模板, 进行最低检测阈值测定, 每种虫态/成虫残体或浓度梯度分别检测 8 头。

2 结果与分析

2.1 叶甲类昆虫 COI 基因 5' 端序列扩增及 SS-COI 标记分析

以玉米根萤叶甲以及其他 9 种/生物型叶甲即双斑长跗萤叶甲、榆黄毛萤叶甲、黄曲条跳甲、油菜蚤跳甲、黄点直缘跳甲、莲草直胸跳甲、枸杞负泥虫、褐足角胸叶甲(棕黄型)和褐足角胸叶甲(蓝绿型)成虫的 mtDNA 为模板, 以通用型引物 LCO1490/HCO2198 进行 PCR 扩增。电泳检测结果显示, 10 种叶甲均能扩增出一条清晰的目的片段(图 1); 对经电泳检测合格的 PCR 产物进行双向测序, 结果表明, 该片段约 680 bp, 为线粒体 DNA COI 基因 5' 端的克隆片段。根据 10 种叶甲的测序结果设计玉米根萤叶甲特异性 SS-COI 引物 1 对(DvvZCE1/DvvZCF1), 其扩增片段的大小为 462 bp。



M: DNA 分子量标准; 1~3: 玉米根萤叶甲; 4: 双斑长跗萤叶甲; 5: 榆黄毛萤叶甲; 6: 黄曲条跳甲; 7: 油菜蚤跳甲; 8: 黄点直缘跳甲; 9: 莲草直胸跳甲; 10: 枸杞负泥虫; 11: 褐足角胸叶甲-棕黄型; 12: 褐足角胸叶甲-蓝绿型; 13: 阴性对照(超纯水)

M: DNA ladder; 1-3: *Diabrotica virgifera virgifera*; 4: *Monolepta hieroglyphica*; 5: *Pyrrhalta maculicollis*; 6: *Phyllotreta striolata*; 7: *Psylliodes punctifrons*; 8: *Ophrida xanthospilota*; 9: *Agasicles hygrophila*; 10: *Lema decempunctata*; 11: *Basilepta fulvipes* biotype brown-yellow; 12: *B. fulvipes* biotype blue-green; 13: Negative control (ultra-pure water)

图 1 mtDNA COI 基因通用型引物 LCO1490/HCO2198 对玉米根萤叶甲及其他 9 种/生物型常见叶甲的扩增结果电泳检测

Fig 1 Gel images of PCR amplicons of *Diabrotica virgifera virgifera* and other nine common leaf beetle species/biotypes using mtDNA COI gene universal primer pair LCO1490/HCO2198

2.2 玉米根萤叶甲 SS-COI 引物种特异性检验

以玉米根萤叶甲和其他 9 种/生物型常见叶甲的成虫 DNA 为模板, 以上述所设计的特异性 SS-COI 引

物对 DvvZCE1/DvvZCF1 进行 PCR 扩增,电泳检测结果显示,该引物只对玉米根萤叶甲具有扩增效果,对其他 9 种近缘种/生物型叶甲不具有扩增能力,表明该对引物为玉米根萤叶甲的特异性引物(图 2)。

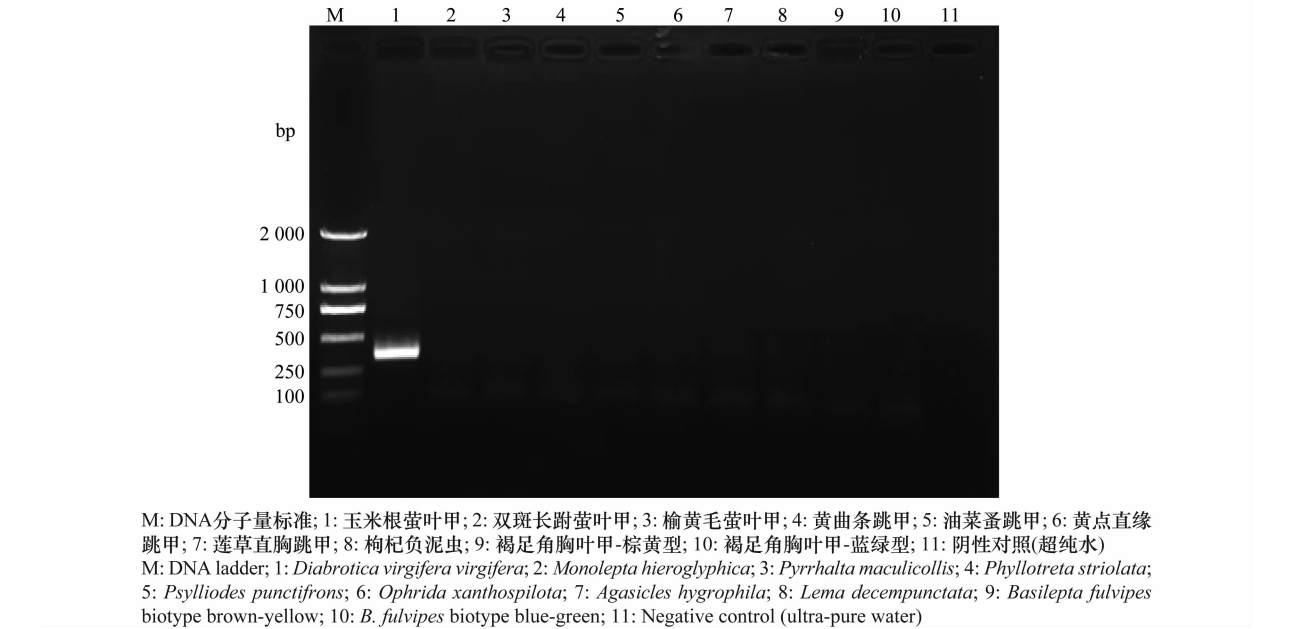


图 2 玉米根萤叶甲 SS-CO I 引物 DvvZCE1/DvvZCF1 种特异性检验

Fig. 2 Amplification pattern of mtDNA of *Diabrotica virgifera virgifera* using SS-CO I primer pair DvvZCE1/DvvZCF1

2.3 玉米根萤叶甲 SS-CO I 引物灵敏性检验

以玉米根萤叶甲的卵、2 龄幼虫、雄性成虫以及雌性成虫及其残体 DNA 为模板,以 SS-CO I 引物 DvvZCE1/DvvZCF1 进行 PCR 扩增,电泳检测结果显示,不同虫态、不同性别以及雌性成虫的不同残体均能稳定地扩增出 462 bp 的特异性靶标片段(图 3)。

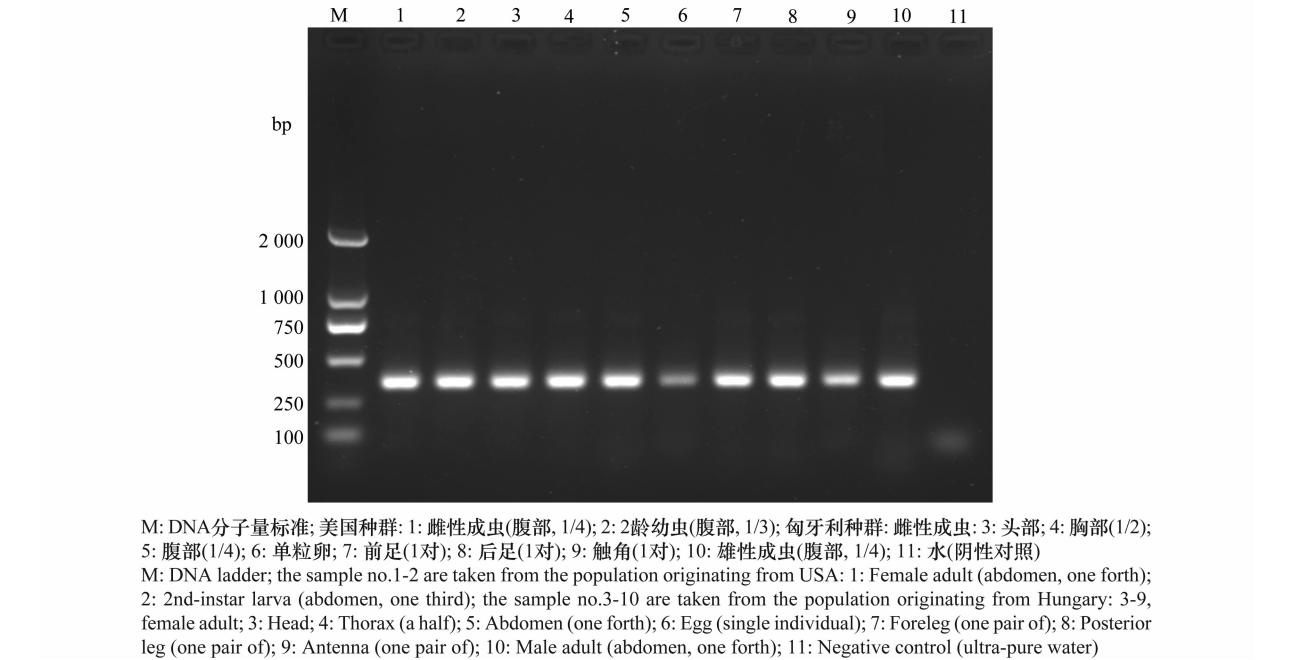


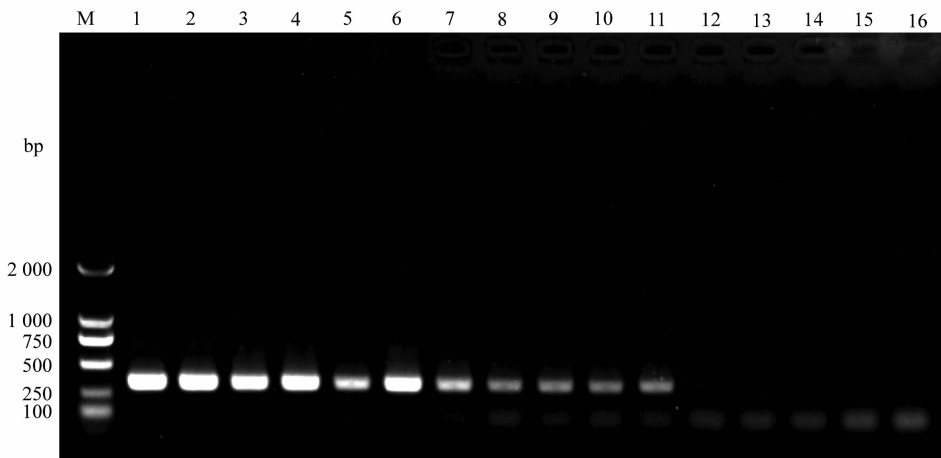
图 3 特异性引物 DvvZCE1/DvvZCF1 对玉米根萤叶甲卵、幼虫及成虫残体的 SS-CO I PCR 扩增结果电泳检测

Fig. 3 Amplification pattern of mtDNA of egg, larva and adult debris of *Diabrotica virgifera virgifera* using SS-CO I primer pair DvvZCE1/DvvZCF1

2.4 玉米根萤叶甲 SS-CO I 引物的检测阈值

将玉米根萤叶甲雌性成虫 DNA 模板以 2 倍递减梯度进行稀释,检测结果显示,当 DNA 浓度稀释

为 102.73 pg/ μ L(相当于 1/122 880 头雌性成虫)时,所有个体均可扩增出 462 bp 的靶标片段,而且条带清晰明亮(图 4)。



M: DNA 分子量标准; 1~15: 分别为 105.2×10^3 , 52.6×10^3 , 26.3×10^3 , 13.15×10^3 , 6.575×10^3 , 3.288×10^3 , 1.644×10^3 , 821.88, 410.94, 205.47, 102.73, 51.37, 25.68, 12.84 和 6.42 pg/ μ L, 相当于 1/120, 1/240, 1/480, 1/960, 1/1 920, 1/3 840, 1/7 680, 1/15 360, 1/30 720, 1/61 440, 1/122 880, 1/245 760, 1/491 520, 1/983 040, 1/1 966 080 头雌性成虫; 16: 水(阴性对照)
M: DNA ladder; 1~15: Dilution of 105.2×10^3 , 52.6×10^3 , 26.3×10^3 , 13.15×10^3 , 6.575×10^3 , 3.288×10^3 , 1.644×10^3 , 821.88, 410.94, 205.47, 102.73, 51.37, 25.68, 12.84 and 6.42 pg/ μ L, equal to 1/120, 1/240, 1/480, 1/960, 1/1 920, 1/3 840, 1/7 680, 1/15 360, 1/30 720, 1/61 440, 1/122 880, 1/245 760, 1/491 520, 1/983 040, 1/1 966 080 of a whole adult female, respectively; 16: Negative control (ultra-pure water)

图 4 特异性引物 DvZCE1/DvZCF1 对玉米根萤叶甲的检测阈值

Fig. 4 Threshold of SS-CO I primer pair DvZCE1/DvZCF1 in detection of mtDNA of *Diabrotica virgifera virgifera*

3 讨论

玉米根萤叶甲是玉米的毁灭性害虫,也是我国禁止进境的植物检疫性有害生物,极易随进口玉米(如青储玉米)(海关信息网 <http://www.haiguan.info/>)等的国际贸易活动侵入我国^[9]。玉米根萤叶甲主要以幼虫取食玉米须根、蛀食玉米主根,使植株倒伏乃至死亡^[5-6],同时还可传播玉米褪绿斑驳病毒,使病毒病大流行^[15],造成玉米绝产绝收,一旦传入将严重影响我国玉米产业以及小麦等其他禾本科粮食作物的健康发展,严重威胁我国粮食安全和生态安全。

玉米根萤叶甲可以藏匿在植物生长介质中的卵,钻蛀在根或根茎中的幼虫,以及隐藏在嫩芽、叶片、茎秆、花序中的成虫等,借助贸易活动进行远距离传播^[9]。目前,玉米根萤叶甲尚未入侵我国,但该种叶甲已在 20 多个国家包括我国的邻邦俄罗斯发生,并且进一步传播扩散趋势明显,其潜在适生区与我国玉米的主要种植区极度吻合^[22],因此研发快速准确的检测鉴定技术是防止玉米根萤叶甲入侵我国,保障我国粮食安全和生态安全的紧要前提,而以往基于外部形态特征的比较形态学

鉴定法不能满足快速通关和有效阻截的基本需求。本研究研发的玉米根萤叶甲特异性 SS-CO I 检测技术专一性强,只对玉米根萤叶甲具有扩增作用,对其他常见的近缘种叶甲没有扩增效果。而且,该检测技术的灵敏度高,不仅可以检测玉米根萤叶甲的单粒卵,还可检测成虫的残体,包括头部、胸部、腹部以及触角、前足、后足等;以成虫 DNA 为模板进行梯度稀释,其最低检测阈值为 102.73 pg/ μ L,相当于 1/122 880 头雌性成虫。将特异性引物 DvZCE1/DvZCF1 扩增片段的测序结果与 GenBank 进行比对,结果显示,该片段与玉米根萤叶甲的同源性为 99%~100%,而与其他种类昆虫的同源性为 87%~90%,包括同属近缘种十一星根萤叶甲 *Diabrotica undecimpunctata* (L.) (同源性 88%) 和巴氏根萤叶甲 *Diabrotica barberi* Smith & Lawrence (同源性 90%) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#743172760>)。显示该检测技术完全可以用于口岸进境植物检疫中玉米根萤叶甲的检测。

目前,基于分子生物学的叶甲类昆虫识别鉴定技术研究时有报道,如 RFLP(restriction fragment length polymorphism)技术^[26-27]、基于 mtDNA CO I 单基因^[28]和 mtDNA CO I /rDNA ITS2 联合基因^[29]

的条形码技术、实时荧光 PCR 技术^[30]等。然而,这些技术各具优缺点,比如 RFLP 技术操作较为繁琐且需要酶切,对 DNA 的需求量也比较大;DNA 条形码技术需要对 PCR 产物进行回收纯化、序列测定及比对分析;实时荧光 PCR 技术所需要的仪器设备较为昂贵、应用受限。种特异性 SS-CO I 技术由基于多拷贝的 mtDNA CO I 基因标记技术发展而来,具有特异性强、操作简便、检测灵敏度高,与实时荧光 PCR 技术的检测灵敏度相当^[30],以及谱带单一、结果直观、重复性能好等诸多优点,完全可以用于大规模快速检测分析^[31]。

参考文献

- [1] KRYSAN J L, SMITH R F. Systematics of the *Virgifer* species group of *Diabrotica* (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae)[J]. Entomography, 1987, 5: 375 - 484.
- [2] MEINKE L J, SAPPINGTON T W, ONSTAD D W, et al. Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) population dynamics [J]. Agricultural and Forest Entomology, 2009, 11: 29 - 46.
- [3] 中华人民共和国农业部和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(共 435 种),农业部公告第 862 号[EB/OL]. 2007-05-28. <http://www.moa.gov.cn/govpublic/ZZYQLS/201006/t201>.
- [4] CHIANG H C. Bionomics of the northern and western corn rootworms [J]. Annual Review of Entomology, 1973, 18: 47 - 72.
- [5] KRYSAN J L, MILLAR T A. Methods for the study of pest *Diabrotica* [M]. Springer-Verlag New York Inc, 1986: 260.
- [6] LEVINE E, OLOUMI-SADEGHI H. Management of *Diabrotica* rootworms in corn [J]. Annual Review of Entomology, 1991, 36: 229 - 255.
- [7] BRANSON T F, ORTMAN E E. Host range of larvae of western corn rootworm [J]. Journal of Economic Entomology, 1967, 60: 201 - 203.
- [8] BREITENBACH S, HEIMBACH U, GLOYNA K, et al. Possible host plants for larvae of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) [J]. BCPC Symposium Proceedings, 2005, 81: 217 - 218.
- [9] CABL. *Diabrotica virgifera virgifera* (western corn rootworm) [EB/OL]. (2017 - 06 - 22)[2018 - 01 - 18]. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/18637>.
- [10] GRAY M E, SAPPINGTON T W, MILLER N J, et al. Adaptation and invasiveness of western corn rootworm: Intensifying research on a worsening pest [J]. Annual Review of Entomology, 2009, 54: 303 - 321.
- [11] SPENCER J L, HIBBARD B E, MOESER J, et al. Behaviour and ecology of the western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) (Coleoptera: Chrysomelidae)[J]. Agricultural and Forest Entomology, 2009, 11: 9 - 27.
- [12] MCBRIDE D K. Corn rootworm control trials-1971 [J]. North Dakota Farm Research, 1972, 29: 9 - 13.
- [13] SPIKE B P, TOLLEFSON J J. Yield response of corn subjected to western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) infestation and lodging [J]. Journal of Entomology, 1991, 84(5): 1585 - 1590.
- [14] WESSELER J, FALL E H. Potential damage costs of *Diabrotica virgifera virgifera* infestation in Europe-the 'no control' scenario [J]. Journal of Applied Entomology, 2010, 134(5): 385 - 394.
- [15] JENSEN S G. Laboratory transmission of maize chlorotic mottle virus by three species of corn rootworms [J]. Plant Disease, 1985, 69(10): 864 - 868.
- [16] ONSTAD D W, CRWODER D W, ISARD S A, et al. Does landscape diversity slow the spread of rotation-resistant western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)? [J]. Environmental Entomology, 2003, 32(5): 992 - 1001.
- [17] BACA F. New member of the harmful entomofauna of Yugoslavia *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera, Chrysomelidae)[J]. Zastita Bilja, 1994, 45(2): 125 - 131.
- [18] GERGINOV L, TOMOV N. The western corn rootworm-*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae)-a new quarantine pest of maize [J]. Rasteniye' dni Nauki, 1995, 32(9/10): 159 - 160.
- [19] KISS J, EDWARDS C R, BERGER H K, et al. Monitoring of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) in Europe 1992 - 2003 [M]// VIDAL S, KUHLMANN U, EDWARDS C R. Western Corn Rootworm: Ecology and Management, 2005: 29 - 39.
- [20] BAUFELD P, ENZIAN S. Maize growing, maize high-risk areas and potential yield losses due to western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) damage in selected European countries [M]// VIDAL S, KUHLMANN U, EDWARDS C R. Western Corn Rootworm: Ecology and Management. Wallingford, UK: CAB International, 2005: 285 - 302.
- [21] 江幸福, 罗礼智. 玉米切根叶甲入侵我国的定性与定量风险分析[C]// 成卓敏. 植物保护与现代农业——中国植物保护学会 2007 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2007: 41 - 47.
- [22] 张俊华, 马菲, 曹逸雯, 等. 玉米根萤叶甲在中国的潜在适生区域与检疫措施研究[J]. 植物检疫, 2009, 23(6): 9 - 12.
- [23] KRYSAN J L, SMITH R F, BRANSON T F, et al. A new subspecies of *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae): description, distribution, and sexual compatibility [J]. Annals of the Entomological Society of America, 1980, 73(2): 123 - 130.
- [24] SUNNUCKS 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.

- [11] 陆凡, 陈志谊, 陈毓苓, 等. 稻曲病菌的生物学特性及其侵染循环中某些未确定要点的研究[J]. 江苏农业学报, 1996, 12(4): 35-40.
- [12] 左广胜, 冉西京, 杜生茂, 等. 稻曲病菌初侵染源研究[J]. 中国农学通报, 1996, 12(5): 17-18.
- [13] SCHAEFER C B, OOI S K T, BESTOR T H, et al. Epigenetic decisions in mammalian germ cells [J]. Science, 2007, 316: 398-399.
- [14] REIK W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development [J]. Nature, 2007, 447: 425-432.
- [15] TAMAME M, ANTEQUERA F, VILLANUEVA J R, et al. High-frequency conversion to a “fluffy” developmental phenotype in *Aspergillus* spp. by 5-azacytidine treatment: evidence for involvement of a single nuclear gene [J]. Molecular and Cellular Biology, 1983, 3(12): 2287-2297.
- [16] ANTEQUERA F, TAMAME M, VILLANUEVA J R, et al. DNA methylation in the fungi [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1984, 259(13): 8033-8036.
- [17] DHILLON B, CAVALETTO J R, WOOD K V, et al. Accidental amplification and inactivation of a methyltransferase gene eliminates cytosine methylation in *Mycosphaerella graminicola* [J]. Genetics, 2010, 186: 67-77.
- [18] LIU Siyang, LIN Jianqing, WU Honglong, et al. Bisulfite sequencing reveals that *Aspergillus flavus* holds a hollow in DNA methylation [J/OL]. PLoS ONE, 2012, 7(1): e30349.
- [19] ZEMACH A, MCDANIEL I E, SILVA P, et al. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation [J]. Science, 2010, 328: 916-919.
- [20] HONDA S, LEWIS Z A, HUARTE M, et al. The DMM complex prevents spreading of DNA methylation from transposons to nearby genes in *Neurospora crassa* [J]. Genes & Development, 2010, 24(5): 443-454.
- [21] LEWIS Z A, ADHVARYU K K, HONDA S, et al. DNA methylation and normal chromosome behavior in *Neurospora* depend on five components of a histone methyltransferase complex, DCDC [J/OL]. PLoS Genetics, 2010, 6(11): e1001196.
- [22] REYNA-LOPEZ G E, SIMPSON J, RUIZ-HERRERA J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphism [J]. Molecular Genetics and Genomics, 1997, 253: 703-710.
- [23] IKEDA K, VAN VU B, KADOTANI N, et al. Is the fungus *Magnaporthe* losing DNA methylation? [J]. Genetics, 2013, 195: 845-855.
- [24] JEON J, CHOI J, LEE G W, et al. Genome-wide profiling of DNA methylation provides insights into epigenetic regulation of fungal development in a plant pathogenic fungus, *Magnaporthe oryzae* [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 8567.
- [25] JAROSLAV F, ALES K. How to interpret methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) profiles? [J]. BMC Genetics, 2014, 15: 2. DOI: 10.1186/1471-2156-15-2.
- [26] NAKAYASHIKI H, IKEDA K, HASHIMOTO Y, et al. Methylation is not the main force repressing the retrotransposon MAGGY in *Magnaporthe grisea* [J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(6): 1278-1284.
- [27] SALMON A, AINOUCHE M L, WENDEL J F, et al. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae) [J]. Molecular Ecology, 2005, 14: 1163-1175.
- [28] 李卫国, 常天俊, 龚红梅. MSAP 技术及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 生物技术, 2008, 18(1): 83-87.
- [29] 黄韞宇, 张海军, 邢燕霞, 等. NaCl 胁迫对黄瓜种子萌发的影响及 DNA 甲基化的 MSAP 分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(8): 1646-1656.
- [30] MISHRA P K, BAUM M, CARBON J. DNA methylation regulates phenotype-dependent transcriptional activity in *Candida albicans* [J]. PNAS, 2011, 108(29): 11965-11970.
- [31] 褚会娟, 张今今, 王喆, 等. 丹参 MSAP 分子标记技术体系的优化及其应用[J]. 西北植物学报, 2011(5): 920-928.
- [32] SANTOS D, FEVERIRO P. Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 70(2): 155-161.
- [33] XIA Ran, WANG Junguo, LIU Chunyan, et al. ROR1/RPA2A, a putative replication protein A2, functions in epigenetic gene silencing and in regulation of meristem development in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2006, 18(1): 85-103.
- [34] 丛建民, 陈凤清, 沈海龙, 等. 水曲柳胚后熟时期 MSAP 分析[J]. 南京林业大学学报, 2015, 39(3): 39-44.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 115 页)

- [25] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994, 3(5): 294-299.
- [26] SZALANSKI A L, POWERS T O. Molecular diagnostics of three *Diabrotica* (Coleoptera: Chrysomelidae) pest species [J]. Journal of the Kansas Entomological Society, 1996, 69(3): 260-266.
- [27] CLARK T L, MEINKE L J, FOSTER J E. PCR-RFLP of the mitochondrial cytochrome oxidase (subunit I) gene provides diagnostic markers for selected *Diabrotica* species (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. Bulletin of Entomological Research, 2001, 91(6): 419-427.
- [28] 席欧彦, 李晓, 郑飞, 等. 杨树蚱叶甲 DNA 条形码研究[J]. 新疆农业科学, 2016, 53(2): 309-316.
- [29] CLARK T L, MEINKE L J, FOSTER J E. Molecular phylogeny of *Diabrotica* beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) inferred from analysis of combined mitochondrial and nuclear DNA sequences [J]. Insect Molecular Biology, 2001, 10(4): 303-314.
- [30] 雍容婧, 李志红, 陈宏, 等. 3 种根蚱叶甲实时荧光 PCR 检测技术研究[J]. 植物检疫, 2017, 31(5): 38-43.
- [31] 张桂芬, 刘万学, 郭建英, 等. 美洲斑潜蝇 SS-PCR 检测技术研究[J]. 生物安全学报, 2012, 21(1): 74-78.

(责任编辑: 田 喆)