苹果蠹蛾线粒体 DNA COI 基因克隆与序列分析*

冯宏祖[1,3] 王 兰[1] 郭文超[2] 曹 玉[1] 杨明禄[1] 刘慧敏[1] 许建军[2]**

(1. 塔里木大学植物科学学院 阿拉尔市 843300;2. 新疆农业科学院植物保护研究所 乌鲁木齐市 830091;
3. 塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室 阿拉尔市 843300)

摘 要 本研究采集新疆阿拉尔地区苹果蠹蛾 *Cydia pomonella*(L.)幼虫,对其线粒体 DNA 细胞色素氧化酶Ⅰ亚基(COⅠ)基因进行了扩增、克隆和测序,并对 COⅠ序列进行了分析。结果显示:苹果蠹蛾 DNA 扩增出的 COⅠ基因序列片段长度为 709 bp,序列中 A+T 含量极高,占 68.7%,而 G+C 的含量只有 31.3%。经基因序列比对,与其它几种食心虫的同源性为 85.4% ~88.1%,遗传距离为 0.130 ~0.162;采用 NJ 法构建了卷蛾科系统树,所得的聚类结果与传统的分类结果基本一致。本研究结果为苹果蠹蛾快速鉴定的 DNA 条形码技术研究提供重要基础。

关键词 苹果蠹蛾,COⅠ基因,克隆,序列分析

Cloning and sequencing analysis of the codling moth *Cydia pomonella* COⅠ gene

FENG Hong-Zu[1,3] WANG Lan[1] GUO Wen-Chao[2] CAO Yu[1]
YANG Ming-Lu[1] LIU Hui-Ming[1] XU Jian-Jun[2]**

(1. College of Plant Science, Tarim University, Alar 843300, China; 2. Institute of Plant Protection, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China; 3. Key Laboratory of Protection & Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, Alar 843300, China)

Abstract The mitochondrial COⅠ gene fragment of codling moth *Cydia pomonella* (L.) specimens from the Alar area of Xinjiang was amplified via PCR and the PCR products were purified, cloned and sequenced. 709 bp nucleotide sequences were obtained with a very high A+T content (68.7%) and relatively low G+C content (31.3%). Comparing the COⅠ sequence of the codling moth with that of several other moth species, the homologies of nucleotides ranged from 85.4% to 88.1% and the genetic distances ranged from 0.130 to 0.162. Reconstructing the molecular phylogenetic tree of the Tortricidae with the Neighbor-Joining (NJ) method produced a result in accord with the traditional morphological classification. The results of this study provide an important basis for the rapid identification of *C. pomonella* with DNA barcode technology.

Key words codling moth, *Cydia pomonella*, COⅠ gene, clone, sequence analysis

苹果蠹蛾 *Cydia pomonella*(L.)原产于欧洲,对苹果、桃、杏、樱桃、胡桃、油桃、石榴、山楂、李、枣、梨等多种水果都能造成极大危害(秦晓辉等,2006)。张学祖(1957)首次发现苹果蠹蛾在我国新疆局部发生,到目前为止该虫已传入我国甘肃、内蒙古、宁夏、黑龙江、辽宁省的多个县市(秦占毅等,2007;许永锋,2008;武宇鹏和陆俊姣,2011)。随着我国水果产品的大量进口、出口和在国内频繁调运,苹果蠹蛾从我国新疆等地以及邻国传入内地的可能性迅速加大。一旦传入,势将对我国的水果生产造成重大损失,也对我国的水果出口产生严重影响(张孝峰,2008)。因此,在农产品的贸易运输中对该虫的准确鉴定十分重要。但是,苹果蠹蛾幼虫的鉴定目前仍是一个难题,特别是对于非昆虫专业人员而言。随着分子生物学和信息技术的发展,分子鉴定已成为时代潮流,其已越

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(200903042)、973 计划课题(2009CB119204)。
** 通讯作者,E-mail: xjj@163.com
收稿日期:2011-12-06,接受日期:2011-12-23

来越广泛地应用于各个实践领域。其中，以线粒体 COⅠ基因序列为基础的 DNA 条形码技术在物种鉴定方面的优势已经在学术界备受关注（肖金花等，2004；宁淑萍等，2008；钱路和安榆林，2009）。鉴于线粒体 COⅠ基因在物种鉴别方面的独特优点，相对于传统形态鉴定，分子鉴定不受待测物种的生物型，性别和发育阶段的限制，方法简便，成本低廉，非专业人员也可以利用合适的分子标记进行物种鉴定，目前已在国境卫生检疫中昆虫等物种的鉴定方面得到应用（欧阳小艳，2007；谭玲等，2009）。为了揭示苹果蠹蛾 DNA 的分子特性，更好地利用 DNA 条形码信息，建立快速高效的苹果蠹蛾鉴定方法，本研究对苹果蠹蛾线粒体中的 DNA COⅠ基因片段进行了克隆，并对获得的序列进行了分析。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DNA 提取试剂盒（EasyPure Genomic DNA Kit）、DNA 凝胶回收试剂盒（EasyPure Quick Gel Extraction Kit）、*Taq* DNA 聚合酶（EasyTaqTM DNA Polymerase）、TA 载体（pEASYTM-T1 Cloning Vector）、DH5α 感受态细胞（Trans5α Chemically Competent Cell）等均购自北京全式金生物技术有限公司。PCR 扩增引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 虫源

选择新疆阿拉尔地区苹果蠹蛾危害较重的香梨园，在树干老翘皮下，采集老熟幼虫带回室内，放入 25℃的人工气候箱保存备用。

1.3 苹果蠹蛾总 DNA 提取

使用 DNA 提取试剂盒（EasyPure Genomic DNA Kit）提取苹果蠹蛾总 DNA。挑选活跃健康的苹果蠹蛾幼虫，用蒸馏水冲洗 3 次，放在灭菌的载玻片上，用灭菌的手术刀切取 20 ~ 50 mg 的组织，按照 DNA 提取试剂盒说明书步骤提取总 DNA。用核酸浓度分析仪测定提取的苹果蠹蛾总 DNA 浓度、纯度。

1.4 苹果蠹蛾 COⅠ基因片段 PCR 扩增

PCR 反应采用 25 μL 反应体系，其中含有 DNA 模板 2 μL、10 × buffer（Mg^{2+}）2.0 μL、10 μmol·L^{-1}引物各 1 μL、2 mmol·L^{-1} dNTPs 2.0 μL、*Taq* DNA 聚合酶（5U/mL）0.5 μL。PCR 反应条件为：95℃变性 3 min，94℃1 min，47℃ 1 min，72℃1 min 30 s，35 个循环后 72℃延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖电泳后置于紫外透射仪上观察照相。

1.5 COⅠ基因片段的克隆与序列分析

使用手术刀从凝胶中回收 PCR 产物，然后使用 DNA 凝胶回收试剂盒（EasyPure Quick Gel Extraction Kit）纯化。在连接酶的作用下将高纯度的 PCR 产物与载体连接，实现外源片段的克隆。连接反应（15 μL 体系）中含 DNA 10 μL、pUC18 载体 2.5 μL、5 × buffer 1.5 μL、T4 ligase（3 U/μL）1 μL，16℃放置过夜（用 PCR 仪）。将连接产物转化到感受态细胞中，涂布于含有异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷（IPTG）、Xgal、抗生素（氨苄青霉素，Amp）的 LA 平板，37℃培养 12 ~ 16 h，经蓝白筛选，挑取白色菌落接种于含 Amp 的 LB 培养基中 37℃摇床培养过夜，鉴定正确的克隆菌送上海生工生物工程有限公司测序部测序。基因片段核苷酸应用生物软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 苹果蠹蛾全基因组的提取

苹果蠹蛾全基因组提取后，经过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳，结果见图 1。试验提取的苹果蠹蛾基因组 DNA 经紫外分光光度计测定，OD260/OD280 值界于 1.8 ~ 2.0 之间，表明其纯度较高；从电泳结果看，DNA 条带清晰，无拖尾降解现象，可用于特定核酸序列的扩增试验。

2.2 苹果蠹蛾 COⅠ基因片段 PCR 扩增

苹果蠹蛾线粒体 COⅠ序列的扩增引物为无脊椎动物通用引物：LCOI490/HCO2198（上海生工生物工程技术有限公司合成）。扩增的产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳，结果见图 2。电泳结果表明，扩增的目的条带结果理想，具有很好的扩增特异性和扩增效率。

2.3 苹果蠹蛾 COⅠ基因片段序列分析

扩增到的目的片段回收克隆后所培养的菌液送上海生物工程有限公司测序。经过重复测序，测得目的片段有效序列大小为 709 bp。获得的序列与卷蛾科几种食心虫线粒体 COⅠ基因同源性比对结果见图 3 和图 4。从图 3 和图 4 中可以看出，

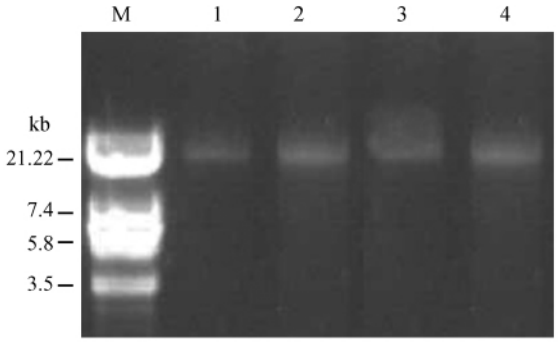


图 1　苹果蠹蛾基因组 DNA

Fig. 1　Genome DNA of *Cydia pomonella*

1 ~ 4:总 DNA; M:marker。

1 - 4:genome DNA; M:marker.

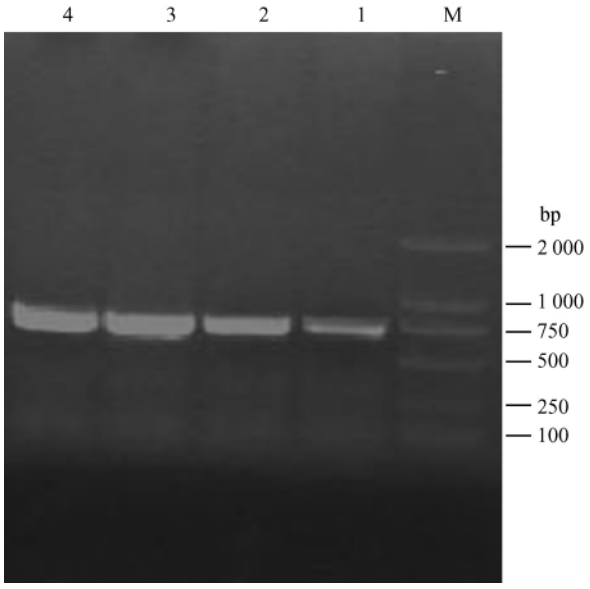


图 2　苹果蠹蛾 COⅠ基因片段 PCR 扩增

Fig. 2　PCR amplification of mitochondrial COⅠ gene fragment from *Cydia pomonella*

1 ~ 4:PCR 的产物; M:marker;下图同。

1 - 4:PCR products; M:marker. The same below.

所测序列与卷蛾科几种食心虫线粒体 COⅠ基因具有很高的同源性,同源性为 85.4% ~88.1%,遗传距离为 0.130 ~ 0.162,因此可以确定这序列为苹果蠹蛾线粒体 COⅠ基因。序列中各个碱基组成分别为 A 275 个、T 212 个、G 114 个和 C 108 个,A + T 含量极高,占 68.7%,而 G + C 的含量只有 31.3%。AT 含量高是节肢动物线粒体 DNA 碱基组成中普遍存在的现象。同时,也证实了 COⅠ扩增产物来自线粒体 DNA,而非核基因组 DNA 或假基因。苹果蠹蛾 COⅠ基因序列已经提交到 GenBank,登录号为 JF707773。

2.4　系统进化树的构建

为了比较本试验中所研究苹果蠹蛾和已报道的卷蛾科其他食心虫线粒体 DNA COⅠ基因的序列差异,从 GenBank 中查找并下载了卷蛾科 4 属 5 种食心虫的 COⅠ序列进行比对。采用 NJ 法构建了卷蛾科系统树,并对各分支均进行 1 000 次的重复检验。从系统进化树(图 5)可知,6 种卷蛾科食心虫聚在一起,分为 2 个大的支系。其中小食心虫属的李小食心虫 *Grapholita funebrana* 和梨小食心虫 *G. molesta* 聚为 1 支;然后与小卷蛾属的苹果蠹蛾和白小卷蛾属的苹果白卷蛾 *Spilonota ocellana* 聚成的 1 支共同组成 1 个支系;而蛀果蛾属的桃蛀果蛾 *Carposina sasakii* 和 *C. smaragdias* 单独聚为 1 个支系,所得的聚类结果与传统的分类结果基本一致。

3　讨论

细胞色素氧化酶亚基Ⅰ(COⅠ)基因是线粒体基因组中研究较多的基因,由于其进化速度快,故不仅适于种群水平差异的检测,也可用于种间分析。目前已经将 COⅠ基因作为 1 种 DNA 条形码(DNA barcode),成功的应用于害虫种类的鉴定(褚栋等,2005;潘程莹等,2006;欧阳小艳,2007;游中华等,2007)。本研究扩增了苹果蠹蛾 COⅠ基因 709 bp 片段,序列中 A + T 含量极高,占 68.7%,而 G + C 的含量只有 31.3%;经基因序列比对,与其它几种食心虫 COⅠ基因的同源性为 85.4% ~88.1%,遗传距离为 0.130 ~ 0.162;采用 NJ 法构建的卷蛾科系统树与传统的分类结果基本一致,表明该序列为苹果蠹蛾线粒体 COⅠ基因。

苹果蠹蛾的传统鉴定方法是通过形态学特征来识别,主要依赖于经验丰富的昆虫分类学专家。但对于残片、虫卵、形态学上难以区分的幼虫,形态学的鉴定就受到局限,同时鉴定所需时间长,不适合检验检疫部门快速检疫通关的要求。随着分子技术的发展,基于基因线粒体 DNA 细胞色素氧化酶Ⅰ亚基(COⅠ)基因的 DNA 条形码技术在昆虫分子鉴定中已得到广泛应用,目前国内外关于医学媒介蚊类和农业害虫实蝇的 DNA 条形码研

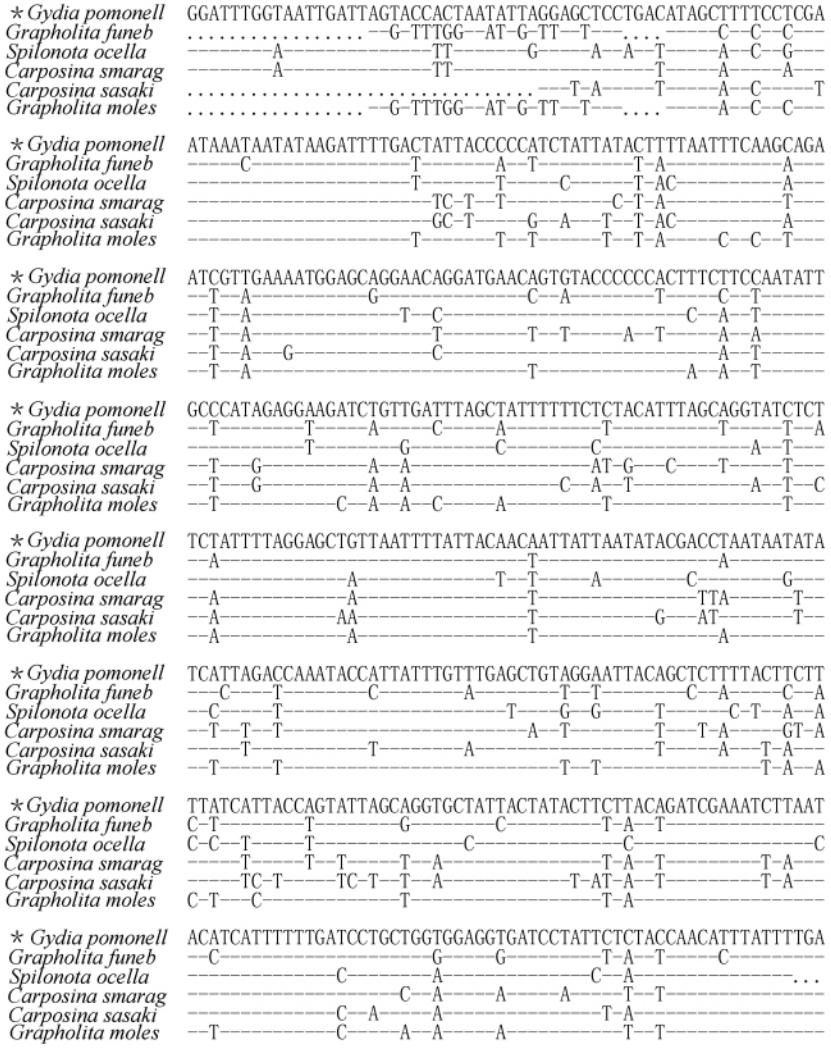


图 3　苹果蠹蛾和几种食心虫 COI 基因序列比对结果

Fig. 3　Comparison outcome of COI gene sequence of *Cydia pomonella* with several other moth

苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* JF707773，李小食心虫 *Grapholita funebrana* FJ217780，苹果白卷蛾 *Spilonota ocellana* FJ412964，*Carposina smaragdias* GU828805，桃蛀果蛾 *C. sasakii* EF684934，梨小食心虫 *G. molesta* FJ217765.

究项目已经展开，未来的发展趋势是将 DNA 条形码与 DNA 芯片技术相结合（Pfunder *et al.*，2004；Garaizar *et al.*，2006；Peplies *et al.*，2006），建立一套高通量、低成本、灵敏准确的快速检测技术。从本研究的初步结果看，用苹果蠹蛾线粒体 COI 基因进行食心虫种类鉴定，具有一定的可行性，有望成为未来进出口检疫检验中的有利工具。

参考文献（References）

Garaizar J, Rementeria A, Porwollik S, 2006. DNA microarray technology: a new tool for the epidemiological typing of bacterial pathogens. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.*, 47(2): 178—189.

Peplies J, Lachmund C, Glockner FO, Manz W, 2006. A DNA microarray platform based on direct detection of rRNA for characterization of freshwater sediment-related prokaryotic communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(7): 4829—4838.

Pfunder M, Holzgang O, Frey JE, 2004. Development of microarray-based diagnostics of voles and shrews for use in biodiversity monitoring studies, and evaluation of mitochondrial cytochrome oxidase I vs. cytochrome b as genetic markers. *Mol. Ecol.*, 13(5): 1277—1286.

褚栋，张友军，丛斌，徐宝云，吴青君，朱国仁，2005. 烟粉虱

同源性 Homology

遗传距离 Genetic distance	1	2	3	4	5	6
1		85.4%	88.1%	86.0%	85.6%	85.9%
2	0.162		83.6%	84.3%	83.7%	91.7%
3	0.130	0.186		84.7%	86.3%	85.3%
4	0.154	0.176	0.171		88.3%	85.3%
5	0.160	0.183	0.151	0.127		85.4%
6	0.157	0.088	0.163	0.163	0.162	

图 4　苹果蠹蛾 COⅠ序列与相近食心虫序列的核苷酸同源性、遗传距离比较

Fig. 4　The homologies of nucleotide and genetic distances of COⅠ gene fragment from *Cydia pomonella* and several other moth

1. 苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* JF7077B; 2. 李小食心虫 *Grapholita funebrana* FJ217780; 3. 苹果白卷蛾 *Spilonota ocellana* FJ412964; 4. *Carposina smaragdias* GU828805; 5. 桃蛀果蛾 *C. sasakii* EF684934; 6. 梨小食心虫 *G. molesta* FJ217765.

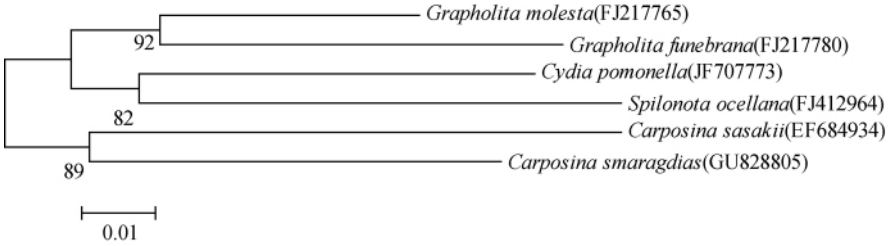


图 5　基于 COⅠ构建的 6 种食心虫的系统进化树(NJ 法)

Fig. 5　The molecular phylogenetic tree for six moth sequence with methods of Neighbor-Joining

不同地理种群的 mtDNA COl 基因序列分析及其系统发育. 中国农业科学,38(1):76—85.

宁淑萍,颜海飞,郝刚,葛学军,2008. 植物 DNA 条形码研究进展. 生物多样性,16(5):417—425.

欧阳小艳,2007. DNA 条形码与 DNA 芯片识别蚊媒准确性的比较. 中国国境卫生检疫杂志,30(6):349—352.

潘程莹,胡婧,张霞,黄原,2006. 斑腿蝗科 Catantopidae 七种蝗虫线粒体 COⅠ基因的 DNA 条形码研究. 昆虫分类学报,28(2):103—110.

钱路,安榆林,2009. 物种鉴定的新武器—基因条码. 植物检疫,23(3):42—46.

秦晓辉,马德成,张煜,李广华,王培,2006. 苹果蠹蛾在我国西北发生危害情况. 植物检疫,20(2):95—96.

秦占毅,刘生虎,岳彩霞,张家银,2007. 苹果蠹蛾在甘肃敦煌的生物学特性及综合防治技术. 植物检疫,21(3):170—171.

谭玲,何建伟,王志杰, 莫邦辉, 赵明, 曾晓茂,2009. DNA 条形码在国境卫生检疫中的应用. 中国国境卫生检疫杂志,32(5):425—431.

武宇鹏, 陆俊姣, 2011. 苹果蠹蛾在我国的发生与防控. 农业技术与装备, (2):48—50.

肖金花,肖晖,黄大卫,2004. 生物分类学的新动向—DNA 条形编码. 动物学报,50(5):852—855.

许永锋,2008. 苹果蠹蛾在张掖市发生与为害规律调查. 植物检疫,22(4):246—248.

游中华,路虹,张宪省,冯纪年,石宝才,宫亚军,黄大卫,2007. 入侵害虫西花蓟马及其他 8 种常见蓟马的分子鉴定. 昆虫学报,50(7):720—726.

张孝峰,2008. 苹果蠹蛾在中国的风险性分析. 中国植保导刊,28(4):38—40.

张学祖,1957. 苹果蠹蛾在我国的新发现. 昆虫学报,7(4):467—472.