

基于形态与 RFLP 技术相结合的快速叶螨鉴定法^{*}

崔玉楠 孙荆涛 葛成 杨思霞 徐敏 赵婧妤 洪晓月^{**}

(南京农业大学昆虫学系 南京 210095)

摘要 叶螨属的叶螨具有个体微小、可用于鉴定的形态特征少、表型可塑性强及存在生物型分化现象的特点,给传统的形态学鉴定带来了极大的困难。在过去的十几年,叶螨科内个别种的鉴定和描述一直存在争议。本研究通过形态学和分子生物学相结合的鉴定手段,依据雄性叶螨阳具的形态特征和核糖体转录间隔区(ITS)限制性内切酶片段长度多态性技术(RFLP),对不同寄主、地理区域的叶螨种类进行了鉴定。结果表明,两项技术的结合能够准确鉴定出卢氏叶螨 *Tetranychus ludeni*, 豆叶螨 *Tetranychus phaseus*, 神泽氏叶螨 *Tetranychus kanzawai*, 二斑叶螨 *Tetranychus urticae*, 截形叶螨 *Tetranychus truncatus*, 皮氏叶螨 *Tetranychus piercei*, 为叶螨属的分类提供快速鉴定方法。

关键词 叶螨, 叶螨属, 形态鉴定, 分子鉴定, ITS

Quick identification of *Tetranychus* spider mites using morphological characters and RFLP technology

CUI Yu-Nan SUN Jing-Tao GE Cheng YANG Si-Xia XU Min

ZHAO Jing-Yu HONG Xiao-Yue^{**}

(Department of Entomology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract *Tetranychus* spider mites are so small that only a few morphological characteristics are useful for identification. Moreover, phenotypic plasticity and biological differentiation aggravate the situation when using traditional methods. Consequently, the identification of *Tetranychus* species has been controversial over the past few decades. We identified *Tetranychus* species from different hosts and geographic regions by combining morphological classification with RFLP-PCR technology-based molecular identification. We show that the combination of these two methods can accurately identify *T. ludeni*, *T. phaseus*, *T. kanzawai*, *T. urticae*, *T. truncatus*, and *T. piercei*. This combined method provides a rapid and accurate means of identifying *Tetranychus* species.

Key words spider mites, *Tetranychus*, morphological identification, molecular identification, ITS

叶螨是蜱螨亚纲(Acari)、真螨总目(Acariformes)、绒螨目(Trombidiformes)、前气门亚目(Prostigmata)、异气门总股(Elleutherengonides)、叶螨科(Tetranychidae)的植食性螨类。叶螨属(*Tetranychus*)是叶螨科中经济意义最大的一类叶螨。该属叶螨与农业生产的关系密切,暴发时常导致作物干枯落叶,生长停滞,严重影响产量和质量,在经济上造成一定的损失(Gotoh *et al.*, 2007)。由于叶螨体型微小,作物受害初期常无明显被害状,因而常被忽视。只有当虫口增多,对

作物造成严重危害时才易引起重视。

虽然叶螨属的叶螨经济意义重大,但是对于该属叶螨的快速准确鉴定存在较大的困难。目前对叶螨属物种的鉴定方法主要依据形态学的特征,这些特征主要包括雌成螨足 I 胫节刚毛数、背板表皮纹、螯肢、须肢、气门、爪间突、背板上的突起、夏型雌螨、卵初产的颜色及雄性外生殖器阳具等(Zhang and Robert, 2000),其中雄螨阳具形状是最有效的分类特征(王慧芳, 1981)。然而叶螨属的部分叶螨之间阳具形状十分相似(如二斑叶螨

^{*} 资助项目:公益性行业(农业)科研专项“作物叶螨综合防控技术研究与示范推广(201103020)”和国家自然科学基金项目(31172131)。

^{**}通讯作者, E-mail: xyhong@njau.edu.cn

收稿日期: 2012-12-06, 接受日期: 2012-12-25

与截形叶螨的阳具),只基于形态学鉴定很容易造成鉴定的错误;另外,形态特征鉴定方法容易受到生物性别和发育阶段的限制,且研究者须掌握一定的分类学经验,才能较好地利用形态之间的差异作为物种鉴定的重要特征。这些问题的存在严重困扰着叶螨学家对叶螨的快速准确鉴定。

由于生物的遗传信息不易受外在环境条件的影响,随着分子生物学技术的发展,这些信息逐渐被用于叶螨属叶螨的鉴定,如基于同工酶 phosphoglucumutase (PGM) zymogram (Gotoh *et al.* ,2007, 2011)、线粒体 mtDNA 条形码 (Ros and Breeuwer,2007; Li *et al.* ,2010)、核糖体序列 ITS-RFLP (Osakabe *et al.* ,2008) 的生化分子鉴定技术应运而生,为叶螨的准确鉴定提供了有效手段。其中,基于目标基因 DNA 序列变异的鉴定技术由于具有快速便捷特点而备受关注,此类研究用到的基因序列按照来源可分为两类,一类是母系遗传的线粒体基因,如 COI (Hinomoto *et al.* , 2001; Hinomoto and Takafuji,2001),另一类则是核基因,主要为核糖体 ITS 序列,包括 ITS1、ITS2、

5. 8S rDNA、28S rRNA (Hurtado *et al.* ,2008; 李国庆等,2010; Boubou *et al.* ,2011)。尽管基于 DNA 序列具有相对稳定和不受个体发育阶段的影响,但是不同的地理种群间由于长期的地理隔离和有限的基因流也会造成序列之间的变异,导致 PCR 扩增和序列测序的失败而无法鉴定叶螨种类,具有一定的不稳定性和局限性。

针对叶螨鉴定困难的现象,我们在传统鉴定方法的基础上结合分子技术,即通过结合叶螨雄螨阳具形态并结合 PCR-RFLP 的方法,对叶螨属 6 个物种进行鉴定,旨在探索准确又快速的鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

叶螨属样本分别采自 6 个不同的地区(表 1)。活成虫采集后立即保存在 70% 乙醇中, - 20℃ 保存。实验室内用隔水法在豇豆 (*Phaseolus vulgaris* Linn.) 叶片上饲养,饲养条件为 (25 ± 1)℃ ,相对湿度 60% 。

表 1 叶螨的样本来源
Table 1 Sampling data for spider mites

编号 Code	采集地点 Location	采集时间 Collection date	寄主植物 Host plant
1	山西省太原市	2011 年 7 月	茄子 <i>Solanum melongena</i> Linn.
2	山西省运城市	2011 年 7 月	豇豆 <i>Phaseolus vulgaris</i> Linn.
3	江西省九江市	2011 年 7 月	棉花 <i>Gossypium hirsutum</i> Linn.
4	黑龙江省哈尔滨市	2011 年 7 月	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Mansfeld
5	江苏省徐州市	2011 年 7 月	棉花 <i>G. hirsutum</i> Linn.
6	黑龙江省哈尔滨市	2011 年 7 月	棉花 <i>G. hirsutum</i> Linn.

1.2 形态学鉴定方法

将雄成螨制成玻片,玻片的制作方法参照洪晓月(2012)。玻片制好后于 ZEISS Imager A2 显微镜下观察叶螨阳具来鉴定物种。

1.3 叶螨 DNA 的提取和 ITS 基因的扩增和检测

从每个地理种群中随机挑取 8 头雌成螨,均用 Dneasy tissue Kit (Qiagen, USA) 试剂盒提取 DNA。

分子鉴定参照 Osakabe 等(2008)的方法并加以改进。扩增叶螨 ITS 基因片段所使用的上游引物为 rD02: 5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3'

(Hinomoto and Takafuji,2001);下游引物 HC2:5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3' (Navajas *et al.* , 1994)。总体积 30 μL 的扩增反应体系由以下成分组成:ddH₂O 13 μL,上游和下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, Fermentas DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) 15 μL,DNA 模板 2 μL。

PCR 反应条件:95℃ 预变性 4 min;95℃ 30 s, 49℃ 30 s,72℃ 70 s,共循环 35 次;循环后再以 72℃ 延伸 10 min。

扩增后,取 PCR 扩增产物 5 μL,在 2% (g/mL) 浓度的琼脂糖凝胶上进行 120 V 电压电泳检

测。电泳后,在 Gel Doc EQ 凝胶成像系统 (Bio-Rad,Hercules,CA)下观察并记录结果。

1.4 RFLP 鉴定方法

选择电泳检测条带亮的 PCR 产物作为酶切模板,分别使用 *Rsa* I、*Mbo* II、*Dde* I、*Hinf* I 4 种酶进行酶切反应。总体积为 15 μ L 的酶切反应体系由以下成分组成:ddH₂O 8.5 μ L,酶 0.5 μ L,各个酶所对应的 Buffer 1 μ L,DNA (PCR 产物) 5 μ L。酶切反应条件:在 37℃ 以下酶切反应过夜,然后在 65℃ 下 20 min 使内切酶失活。

取酶切产物 5 μ L,在 3% (g/mL) 浓度的琼脂糖凝胶上进行 90 V 电压电泳检测 (marker 选 100 bp)。电泳后,在 Gel Doc EQ 凝胶成像系统 (Bio-Rad,Hercules,CA)下观察并记录结果。试验所得图谱与 Osakabe 等 (2008) 酶切图谱比对,从而确定物种。

2 结果与分析

2.1 形态学鉴定结果

在显微镜下观察了这 6 个样本的雄叶螨阳具

特征。鉴定结果如下:

1 号样本叶螨雄虫阳具柄部末端弯向背部,形成小的端锤,后端圆钝。近侧突起短小,尖锐 (图 1:A),鉴定为卢氏叶螨 *T. ludeni*。

2 号样本叶螨雄虫阳具具有非常长的端锤,后突起向远侧延伸,前突起小但明显可见 (图 1:B),鉴定为豆叶螨 *T. phaselus*。

3 号样本叶螨雄虫阳具非常大,直径大约为 4 μ m,阳具背缘显半规状,近侧突起圆钝,远侧突起尖利 (图 1:C),鉴定为神泽氏叶螨 *T. kanzawai*。

4 号样本叶螨雄虫阳具端锤直径大约 2.5 ~ 2.6 μ m,近侧突起尖利或稍圆,远侧突起尖利,长度约等,端锤背缘形成一钝角 (图 1:D),鉴定为二斑叶螨 *T. urticae*。

5 号样本叶螨雄虫阳具端锤微小 (直径 1.5 μ m),端锤背缘平截状,末端 1/3 处有一轻微凹陷,近侧突起圆钝,远侧突起尖利 (图 1:E),鉴定为截形叶螨 *T. truncatus*。

6 号样本叶螨雄虫阳具端锤微小,几乎不明显,与柄部有一定的角度,端锤远侧突起短小而尖利 (图 1:F),鉴定为皮氏叶螨 *T. piercei*。

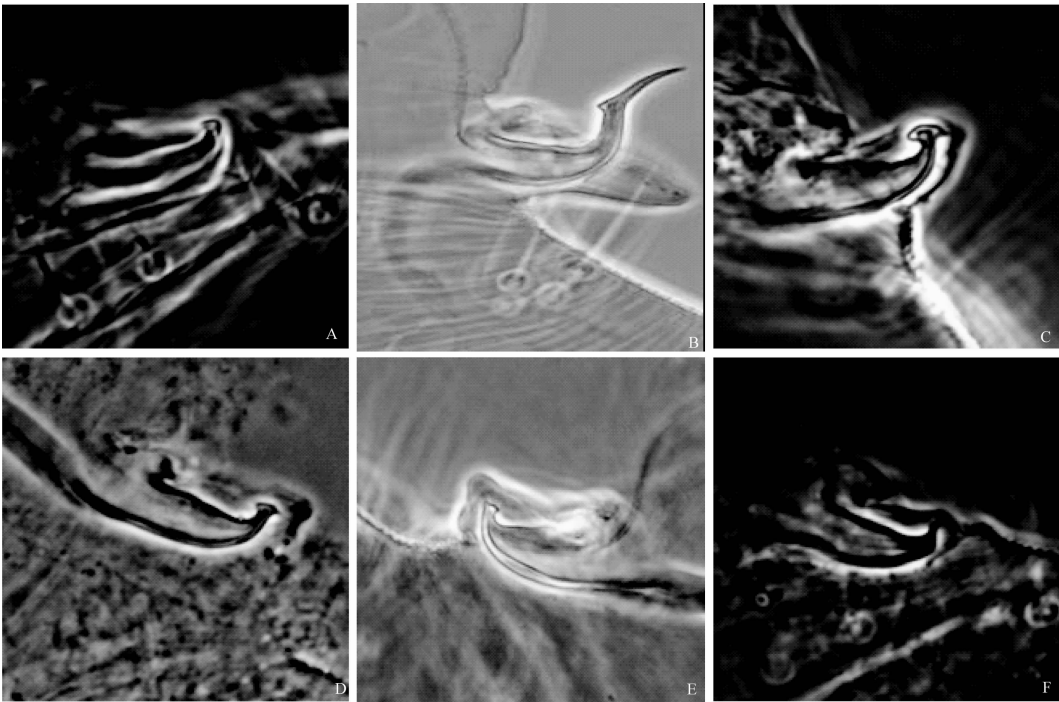


图 1 叶螨属雄虫阳具 (100 ×)

Fig.1 The aedeagus of male spider mites (100 ×)

注:A:卢氏叶螨 *T. ludeni*;B:豆叶螨 *T. phaselus*;C:神泽氏叶螨 *T. kanzawai*;
D:二斑叶螨 *T. urticae*;E:截形叶螨 *T. truncatus*;F:皮氏叶螨 *T. piercei*。

2.2 RFLP 技术鉴定结果

使用 *Mbo* II、*Dde* I、*Hinf* I、*Rsa* I 4 种限制性内切酶对 6 个地理种的 ITS 序列进行酶切,酶切电

泳结果如表 2、图 2。ITS 扩增产物经 *Mbo* II、*Dde* I、*Hinf* I、*Rsa* I 酶切后呈现 6 种不同的 RFLP 图谱,通过酶切图谱比对,从而确定物种。

表 2 叶螨属种类 ITS 序列酶切识别位点
Table 2 Recognition sites by restriction endonucleases on ITS sequences in *Tetranychus* species

限制性内切酶 Restriction endonuclease	酶切产物 (bp 左右) Endonuclease products	样本编号 Sample code					
		1	2	3	4	5	6
<i>Mbo</i> II	600		√			√	√
	420	√		√	√		
	370		√	√	√	√	√
	360	√					
	210	√		√	√		
	130		√	√	√	√	
	120	√					
<i>Dde</i> I	700		√				√
	420	√					
	410			√	√	√	
	380		√				
	250	√		√	√	√	√
	150	√		√	√	√	
	110	√		√	√	√	
<i>Hinf</i> I	610		√				
	580						√
	560			√	√	√	
	380	√					
	300		√				√
	210			√	√	√	
	190	√					
<i>Rsa</i> I	170		√	√	√	√	√
	150	√					
	500	√	√	√	√	√	√
	350		√	√	√	√	√
	340	√					
	310	√					
	190				√		
鉴定结果 Identification of <i>Tetranychus</i> species	180				√		
		卢氏叶螨 <i>T. ludeni</i>	豆叶螨 <i>T. phaselus</i>	神泽氏叶螨 <i>T. kanzawai</i>	二斑叶螨 <i>T. urticae</i>	截形叶螨 <i>T. truncatus</i>	皮氏叶螨 <i>T. piercei</i>

根据酶切图谱发现有非目的条带出现,包括豆叶螨 *Dde* I、*Hinf* I 酶切产生的 1 100 bp 左右的 DNA 片段(图 2:B.2;图 2:B.3),原因可能是因为 ITS-PCR 产物浓度不同,部分个体的 ITS 扩增产物

没有完全被切开,从而导致非目的条带出现。卢氏叶螨、神泽氏叶螨酶切产物中包括 650 bp 左右的 DNA 片段(图 2:A.1;图 2:C.1),可能是酶切位点发生了变异,从而产生了非预期条带,但主要识

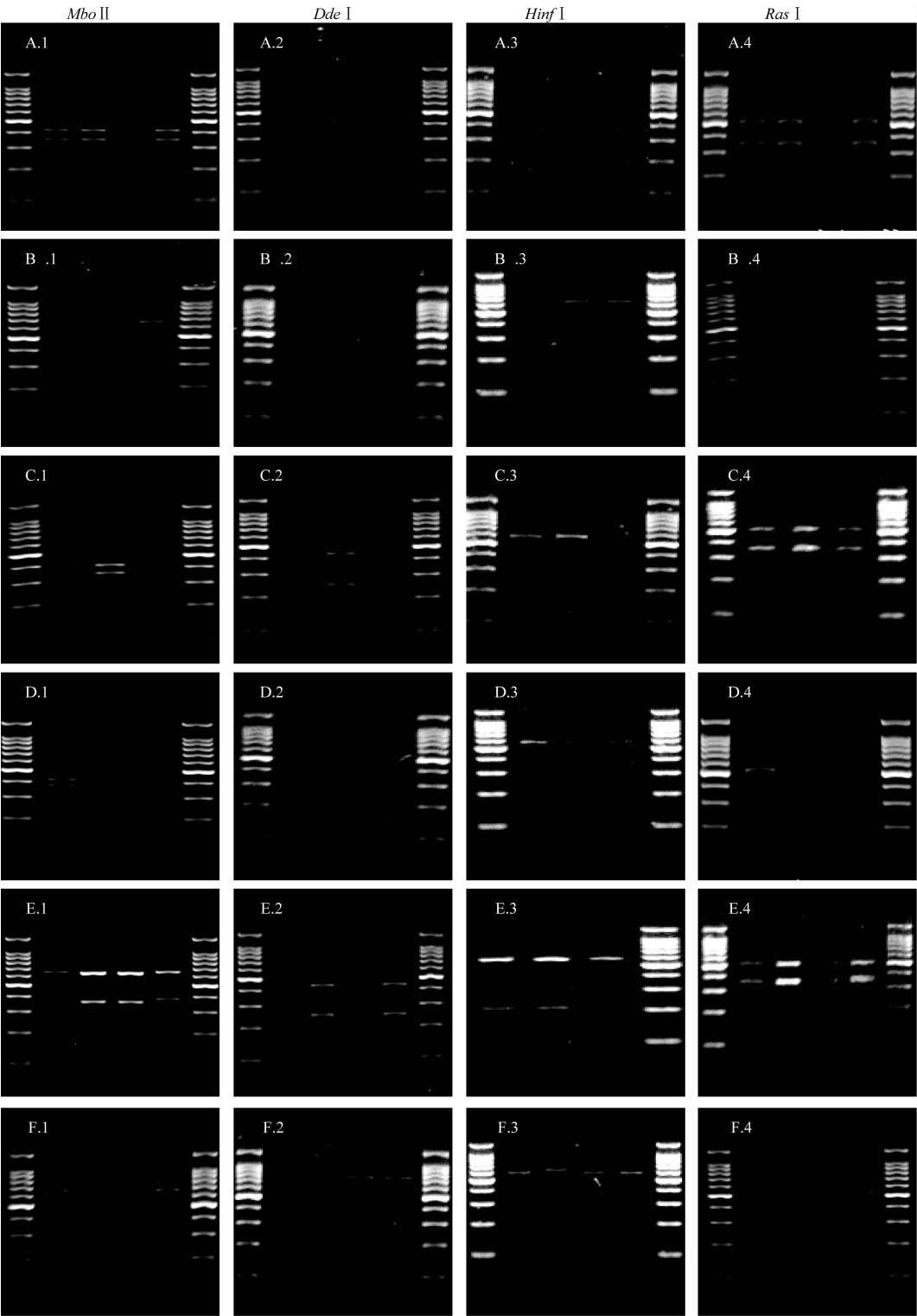


图 2 叶螨属种类 PCR-RFLP 条带电泳图

Fig. 2 Photographs of PCR-RFLP banding patterns in *Tetranychus* species

注:选用 100 bp 的 DNA 分子量标记。A. 1 ~ A. 4: 卢氏叶螨; B. 1 ~ B. 4: 豆叶螨; C. 1 ~ C. 4: 神泽氏叶螨; D. 1 ~ D. 4: 二斑叶螨; E. 1 ~ E. 4: 截形叶螨; F. 1 ~ F. 4: 皮氏叶螨。
100 bp DNA marker was used. A. 1 ~ A. 4: *T. ludeni*; B. 1 ~ B. 4: *T. phaselus*; C. 1 ~ C. 4: *T. kanzawai*; D. 1 ~ D. 4: *T. urticae*; E. 1 ~ E. 4: *T. truncatus*; F. 1 ~ F. 4: *T. piercei*.

别条带显示正常,不影响种的判断。

另外,酶切图谱比对后发现豆叶螨 *Dde* I 酶切产物中不包括 110 bp 左右的 DNA 片段(图 2:B. 2),皮氏叶螨 *Mbo* II 酶切产物中不包括 130 bp 左右的 DNA 片段(图 2:F. 1),说明不同地理种群的

同一物种 ITS 还是有所差异的。

两项技术的结合能够准确地对叶螨属中的卢氏叶螨、豆叶螨、神泽氏叶螨、二斑叶螨、截形叶螨、皮氏叶螨进行鉴定。我们对各地标本所属种类进行了汇总,鉴定结果如表 3。

表 3 供试叶螨属鉴定结果
Table 3 The identification of *Tetranychus* species

编号 Code	采集地点 Location	寄主植物 Host plant	物种 Species
1	山西省太原市	茄子 <i>S. melongena</i> Linn.	卢氏叶螨 <i>T. ludeni</i>
2	山西省运城市	菜豆 <i>P. vulgaris</i> Linn.	豆叶螨 <i>T. phaselus</i>
3	江西省九江市	棉花 <i>G. hirsutum</i> Linn.	神泽氏叶螨 <i>T. kanzawai</i>
4	黑龙江省哈尔滨市	西瓜 <i>C. lanatus</i> (Thunb.) Mansfeld	二斑叶螨 <i>T. urticae</i>
5	江苏省徐州市	棉花 <i>G. hirsutum</i> Linn.	截形叶螨 <i>T. truncatus</i>
6	黑龙江省哈尔滨市	棉花 <i>G. hirsutum</i> Linn.	皮氏叶螨 <i>T. piercei</i>

3 讨论

本文中不同地理种群叶螨的形态鉴定显示,豆叶螨和皮氏叶螨因为具有特殊的阳具特征(豆叶螨的阳具具有非常长的端锤,皮氏叶螨的阳具端锤微小,与柄部有一定的角度),容易从阳具形态上鉴定出,而其他种类的叶螨阳具形态特征差异不明显(Ehara,1999)。并且在研究中发现以下因素易对鉴定产生影响:(1)同一寄主植物上具有不同种类的叶螨,致使所选样本种类不一致(Foott,1963)。(2)形态鉴定主要是依靠雄成螨的阳具来区分各叶螨种类,但是在自然条件下螨类具有性比偏雌的特性(Breeuwer and Jacobs,1996),较难采集到雄性叶螨样本。(3)制玻片时盖玻片容易移动,致使螨体错位或滚动,难以保持螨体显现正侧面,影响阳具的鉴别。(4)光镜分辨率及图像景深等因素的限制,致使光镜下螨的端锤边缘模糊。

鉴于形态学鉴定方法的局限性,本试验结合了 PCR-RFLP 技术。在研究中发现,神泽氏叶螨与二斑叶螨的阳具的形态特征相近,但通过 ITS 酶切图谱比对,能够很好地鉴别出两个物种。所以,在研究中以形态学鉴定雄虫个体的同时,并以分子鉴定技术作为佐证,可使鉴定结果更为准确。

RFLP 技术通过 DNA 序列酶切产物的差异来鉴定物种。有研究发现(Ros and Breeuwer,2007)

在 GenBank 数据库中提交的叶螨属基因序列中有大于 50% 的序列没有记录在发表的文章中,并且其准确性有待进一步验证。鉴于数据库中相应叶螨种 DNA 序列不一定完全准确的现状,单纯依靠比对数据库中的 DNA 序列来鉴定叶螨种以及构建系统发育关系仍存在着不足,而 RFLP 技术避免了这种因素的影响。

另外,由于分子标记基因在不同物种间进化速率存在着差异性,因此同一分子标记在不同生物类群中的可应用性也可能不同。本研究当中所选用的序列为 ITS。叶螨属 ITS 序列具有物种内变异小(Navajas *et al.*,1994),物种间差异大(Navajas *et al.*,1997)的特性,为叶螨属物种的鉴定提供了可靠的分子标记。另外,用于扩增叶螨属 ITS 片段的 PCR 引物结合区域有着很好的保守性,从而保证了 PCR 扩增的特异性。试验结果也显示只有极少部分个体的 ITS 基因序列没有扩增出来。鉴于以上问题以及形态学鉴定方法的局限性,我们结合形态学鉴定和 PCR-RFLP 技术相对更为准确的鉴定了叶螨的种类。

本研究首次采用形态学和分子生物学相结合的方法成功鉴定了中国叶螨属内的 6 种叶螨,但是仍有诸多问题需要探索和研究。首先我们对叶螨种类的形态鉴定只集中在一些叶螨属种类,缺少叶螨总科其他属的研究和鉴定,其次所使用的内切酶种类较少,用酶切图谱区分叶螨物种具有

局限性。下一阶段的研究重点在于能够发现更加有效的分子标记基因片段或者通过更多的 ITS 序列分析和比对,找到新的具有种特异性酶切位点的内切酶。

参考文献 (References)

- Boubou A, Migeon A, Roderick GK, 2011. Recent emergence and worldwide spread of the red tomato spider mite, *Tetranychus evansi*; genetic variation and multiple cryptic invasions. *Biol. Invasions*, 13(1):81–92.
- Breeuwer J, Jacobs G, 1996. *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. *Exp. Appl. Acarol.*, 20(8):421–434.
- Ehara S, 1999. Revision of the spider mite family Tetranychidae of Japan (Acari, Prostigmata). *Species Diversity*, 4(1):63–141.
- Foott WH, 1963. Competition between two species of mites. II. Factors influence intensity. *Can. Entomol.*, 95(1):45–57.
- Gotoh T, Kitashima Y, Goka K, 2007. *Tetranychus* mite species identification using esterase and phosphoglucumutase zymograms. *Appl. Entomol. Zool.*, 42(4):579–585.
- Gotoh T, Mori K, 2011. Determination of seasonal changes of spider mite (Acari:Tetranychidae) densities and species composition on kudzu vine and soybean (Fabaceae) in Japan with the use of phosphoglucumutase zymograms. *Zoosymposia*, 6:72–81.
- Gotoh T, Noda H, Ito S, 2007. *Cardinium* symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. *Heredity*, 98:13–20.
- Hinomoto N, Osakabe M, Gotoh T, Takafuji A, 2001. Phylogenetic analysis of green and red forms of the two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari:Tetranychidae), in Japan, based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I sequences. *Appl. Entomol. Zool.*, 36(40):459–466.
- Hinomoto N, Takafuji A, 2001. Genetic diversity and phylogeny in the Kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai*, in Japan. *Exp. Appl. Acarol.*, 25(5):355–370.
- Hurtado MA, Ansaloni T, Cros-Arteil S, 2008. Sequence analysis of the ribosomal internal transcribed spacers region in spider mites (Prostigmata: Tetranychidae) occurring in citrus orchards in Eastern Spain: use for species discrimination. *Ann. Appl. Biol.*, 153(2):167–174.
- Li GQ, Xue XF, Zhang K, Hong XY, 2001. Identification and molecular phylogeny of agriculturally important spider mites (Acari:Tetranychidae) based on mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences with an emphasis on *Tetranychus*. *Zootaxa*, 2647:1–15.
- Navajas M, Gutierrez J, Bonato O, Bolland HR, Mapangou DS, 1994. Intraspecific diversity of cassava green mite *Mononychellus progresivus* (Acari:Tetranychidae) using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. *Exp. Appl. Acarol.*, 18(6):351–360.
- Navajas M, Gutierrez J, Gotoh T, 1997. Convergence of molecular and morphological data reveals phylogenetic information on *Tetranychus* species and allows the restoration of the genus *Amphitetanychus* (Acari:Tetranychidae). *Bull. Entomol. Res.*, 87(3):283–288.
- Osakabe MH, Kotsubo Y, Tajima R, Hinomoto N, 2008. Restriction fragment length polymorphism catalog for molecular identification of Japanese *Tetranychus* spider mites (Acari:Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.*, 101(4):1167–1175.
- Ros V, Breeuwer J, 2007. Spider mite (Acari:Tetranychidae) mitochondrial COI phylogeny reviewed: host plant relationships, phylogeography, reproductive parasites and barcoding. *Exp. Appl. Acarol.*, 42(4):239–262.
- Zhang ZQ, Robert JJ, 2000. Using adult female morphological characters for differentiating *Tetranychus urticae* complex (Acari:Tetranychidae) from greenhouse tomato crops in UK. *Syst. Appl. Acarol.*, 5:69–76.
- 洪晓月, 2012. 农业螨类学. 北京:中国农业出版社. 157–160.
- 李国庆, 于明志, 洪晓月, 2010. 基于核糖体 28S rRNA 对叶螨的鉴定及其系统发育分析. 南京农业大学学报, 33(5):49–54.
- 王慧芙, 1981. 中国经济昆虫志 叶螨总科. 北京:科学出版社. 106–126.